

卡介苗诱导的训练免疫

杨淑凤, 孙文长

(大连医科大学 微生物学教研室, 辽宁 大连 116044)

[摘要] 训练免疫是指具有记忆性的固有免疫。本文简述了卡介苗诱导的训练免疫的作用及机制, 即不仅可以抵抗结核分枝杆菌, 也能帮助清除其他病原体, 并且在非肌层浸润膀胱癌的治疗中发挥作用。卡介苗诱导的训练免疫通过病原体相关分子模式与模式识别受体结合启动, 并引起物质代谢改变和表观遗传变化, 最终引起肿瘤坏死因子及白介素等细胞因子表达上调, 增强对病原体或肿瘤细胞的清除作用。

[关键词] 卡介苗; 训练免疫; 物质代谢; 表观遗传学; 细胞因子

[中图分类号] R378.91 **[文献标志码]** A **文章编号:** 1671-7295(2022)03-0193-05

Trained immunity induced by BCG

YANG Shufeng, SUN Wenchang

(Department of Microbiology, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

[Abstract] Trained immunity is defined as the memory of innate immunity. The trained immunity induced by bacillus Calmette-Guérin (BCG) can protect against the secondary infection not only with *Mycobacterium tuberculosis*, but also with the other pathogens. BCG vaccination can also induce trained immunity on non-muscle-invasive bladder cancer. BCG-induced trained immunity is triggered by binding of pathogen-associated molecular patterns and pattern recognition receptors. This process can lead to metabolic changes and epigenetic reprogramming, which results in the increased expression of cytokines, such as tumor necrosis factor and interleukin et al. The enhancement of cytokine expression can help to eradicate the pathogens and tumor cells.

[Keywords] BCG; trained immunity; metabolic; epigenetics; cytokine

人体的免疫系统分为固有免疫和适应性免疫, 在过去的很长时间固有免疫被认为不具有记忆性, 可非特异性识别并清除各种外源性病原体; 而适应性免疫可特异性针对某种病原体或其抗原, 并具有记忆性。然而, 越来越多的研究显示, 固有免疫也具有记忆性^[1]。以无脊椎动物中的桡足动物为例, 该生物不具有适应性免疫, 外来病原体感染所产生的免疫反应理应没有记忆性, 但事实并非如此。感染过绦虫的桡足动物, 再次感染绦虫时, 其免疫系统比首次感染者能更有效地杀灭绦虫^[2], 说明该动物体内仅有的固有免疫具有记忆性, 记忆性固有免疫也称为训练免疫。训练免疫也存在于人和其他脊椎动物, 并在抗感染、抗肿瘤及自身免疫病形成等多个方面发挥作用。

卡介苗 (bacillus Calmette-Guérin, BCG) 是牛结核分枝杆菌的减毒株, 主要用于结核病的预防。

BCG 接种除了能激活细胞免疫外, 还可以诱导训练免疫, 该免疫反应不仅可以对抗结核分枝杆菌的感染, 还可以帮助机体清除其他病原体^[3], 另外 BCG 滴注还用于非肌层浸润性膀胱癌的治疗^[4], 所以 BCG 诱导的训练免疫表现为特异性和非特异性。本文就训练免疫的定义、BCG 诱导训练免疫的作用及机制等方面展开综述, 让读者对目前该领域的现状及进展有所了解。

1 训练免疫的定义

训练免疫是指固有免疫细胞在首次接触抗原后产生某种记忆性, 下次接触该抗原或其他抗原时引起更强的免疫反应^[1]。参与训练免疫的细胞种类很多, 如单核巨噬细胞、自然杀伤细胞及二者的前体细胞, 某些基质细胞及上皮细胞等。β-葡聚糖、脂多糖及 BCG 等是训练免疫的主要激活剂。目前, 训练免

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81801981)

第一作者简介: 杨淑凤 (1978-), 女, 副教授。E-mail: shufengyang@dmu.edu.cn

通信作者: 孙文长, 副教授。研究方向: 医学微生物学与免疫学。E-mail: 2981264350@qq.com

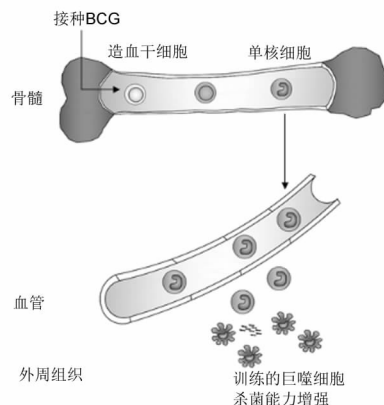
疫的研究多集中在单核巨噬细胞,该细胞受到激活剂的刺激,诱导产生训练免疫,当再次遇到某些病原体或刺激物时,会分泌更多的肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 、白介素(interleukin, IL)-1 β 和IL-6等细胞因子,从而对病原体产生更强的抵抗力或参与炎症性疾病的形成。

2 BCG 诱导的训练免疫的作用

BCG 是世界卫生组织推荐用于预防结核病的唯一现用疫苗,新生儿接种 BCG 可有效预防播散性结核及结核性脑膜炎,但其产生的保护力不持久,并且对成人肺结核保护力较差^[5],所以 BCG 抗结核免疫机制的研究一直是结核病研究的热点。Kaufmann 等^[6]研究发现,将 BCG 静脉接种小鼠,BCG 可通过血液进入骨髓并接触造血干细胞,经 BCG 致敏的造血干细胞主要向髓系增殖分化,并成熟为单核细胞,经外周血进入组织最终成为巨噬细胞。该巨噬细胞在未分化阶段已经接触 BCG,在外周再次遇到结核分枝杆菌时,与未接触过 BCG 的巨噬细胞相比,显示出对结核分枝杆菌更强更持久的杀伤力,这说明巨噬细胞具有记忆性,即训练免疫。另一项研究是在志愿者接种 BCG 前、接种后 2 周、3 周及 1 年分离外周血单核细胞,用脂多糖刺激该细胞,发现 BCG 接种后的单核细胞与接种前相比,能产生更多 TNF- α 、IL-1 β 、IL-17 等细胞因子,表现出记忆性的特点^[7]。

自然杀伤(natural killer, NK)细胞是固有免疫对抗结核病的重要成分。Suliman 等^[8]发现,出生时接种 BCG 可致敏 NK 细胞,成人后再次接种, NK 细胞表面的抗体 Fc 受体(CD16)表达增加,其 IFN- γ 分泌水平持续上升,并可持续 1 年之久,显示出具有记忆性的固有免疫反应。单核细胞、巨噬细胞和 NK 细胞抗结核训练免疫见图 1^[1]。

BCG 诱导的训练免疫可帮助抵抗某些病原体的感染。小鼠静脉接种 BCG 后,其巨噬细胞杀灭白假丝酵母菌的能力明显增强,小鼠肾、脾等脏器的菌量也较对照组减少^[9]。BCG 诱导的训练免疫也可增强对利什曼原虫的抵抗作用,减轻病损和原虫载量^[10]。BCG 还可以帮助小鼠抵抗甲型流感病毒的感染^[11],降低小鼠和兔子因感染单纯疱疹病毒而引起的死亡率^[12]。在人类,BCG 接种可降低新生儿的死亡率,尤其是低体重儿的死亡率。统计学显示,除去抗结核分枝杆菌的作用,还与其对其他病原体产生的非特异性保护有关,主要是针对呼吸道病原体和新生儿败血症产生的保护^[1,13]。BCG 诱导的训练免疫还可抵抗黄热病病毒^[14]和呼吸道合胞病毒的感染^[15],可降低血液中黄热病病毒载量,即减轻病毒血症^[14]。最近的研究还显示 BCG 可有效



接触过 BCG 的造血干细胞,分化成单核细胞、巨噬细胞及 NK 细胞,在外周组织,遇到入侵的结核分枝杆菌,“训练”过的巨噬细胞和 NK 细胞具有增强的杀菌能力。

图 1 单核细胞、巨噬细胞和 NK 细胞抗结核训练免疫^[1]

Fig. 1 The trained immunity against tuberculosis is mediated by monocytes, macrophages and NK cells^[1]

降低老年人呼吸道病毒感染的发生率,而不增加机体系统炎症反应,并且没有严重的副反应^[16]。最近的单细胞转录组学支持 BCG 诱导的训练免疫可以降低系统炎症^[17]。

膀胱内灌注 BCG 是治疗非肌层浸润膀胱癌的方法之一,尽管这种治疗方法已经使用近 50 年,但其作用机制还不完全清楚,最近研究显示可能与训练免疫有关^[4]。将 BCG 灌注 6 周的膀胱癌患者的单核细胞分离至体外,再用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激,与未经 BCG 治疗组对比,单核细胞显示出增强的细胞因子反应,主要为 TNF- α 和 IL-1 β 产生增多^[4,18]。将 BCG 治疗前后膀胱癌患者的单核细胞分离到体外,再用 LPS 刺激,细胞培养上清中 TNF- α 、IL-1 α 蛋白水平均显著高于未治疗组及对照组,但 IL-6 水平不升高,显示出训练免疫的特征^[19]。由于约有 1/3 患者对 BCG 的治疗效果不佳,因此多项研究正致力于重组 BCG 对非肌层浸润膀胱癌的治疗作用^[20]。

新生儿接种 BCG 后,将血液中单核细胞分离,用 LPS 刺激,细胞因子 TNF- α 及趋化因子 CCL-5 的水平均低于未接种组。而成人则高于对照组,显示 BCG 诱导的训练免疫可能具有年龄特异性^[21]。另外,在小鼠试验中,孕前 BCG 接种可使得胎鼠宫内生长受限,这可能是因为 BCG 在妊娠早期影响了母胎界面免疫细胞的种类和数量,如巨噬细胞和 NK 细胞减少而 T 细胞增多^[22]。

3 BCG 与免疫耐受及自身免疫病

免疫耐受是和训练免疫相反的免疫过程,主要表现为机体免疫系统对抗原的无反应性。临床上多种病理过程与免疫耐受有关,如脓毒症(sepsis)。

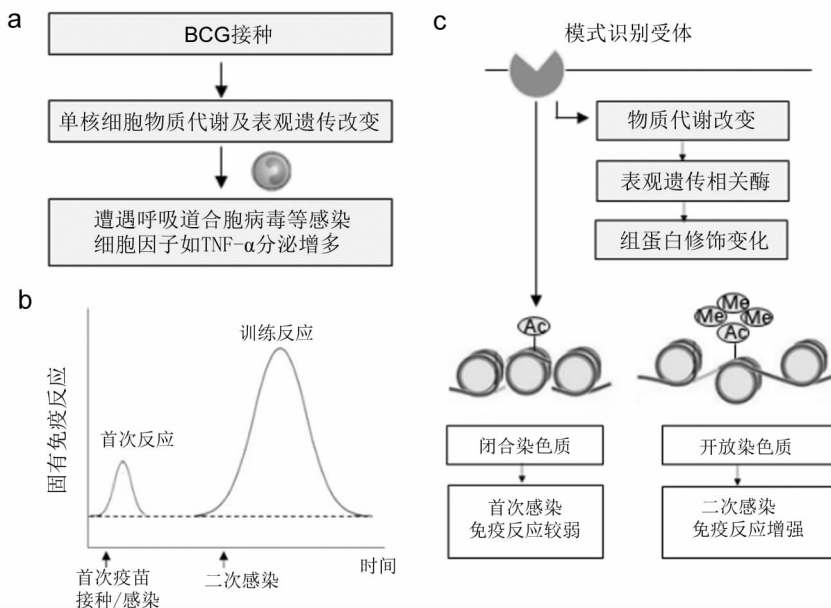
脓毒症患者的病理过程首先是免疫过度激活,即过度的炎症反应,随后发展为广泛免疫抑制,即免疫耐受,而免疫耐受容易导致二次感染,是脓毒症高死亡率的重要原因^[23]。研究中常用 LPS 诱导免疫耐受。即内毒素耐受。研究显示,训练免疫的激活剂——葡聚糖可以逆转内毒素耐受^[24]。我们在工作中发现 BCG 全细菌裂解液可以提高内毒素耐受巨噬细胞 RAW264.7 表达炎症因子的水平,提示 BCG 也可能逆转免疫耐受,这给临床治疗免疫耐受疾病提供了新的思路。

BCG 诱导的训练免疫使 TNF- α 等细胞因子分泌增加,接种 BCG 似乎应该加重自身免疫病的病情,但研究显示并非如此。BCG 接种可使 1 型糖尿病小鼠糖化血红蛋白及血糖水平降低,一方面是因为 BCG 接种使得糖酵解增加,促进了糖的摄取利用;另一方面,BCG 接种提高 CD4⁺ 调节性 T 细胞特征基因 Foxp3, TNFRSF18, IL2RA, IKZF2, IKZF4 和 CTLA4 去甲基化,引起上述 6 个基因 mRNA 水平增加,导致免疫耐受^[25]。另外,BCG 能延缓多发性硬化症早期病情进展^[26]。在用 BCG 治疗膀胱癌的研究中发现 BCG 可降低阿尔茨海默病及帕金森病的患病风险。不仅如此,在小鼠试验中显示 BCG 可通过诱导调节性 T 细胞抗炎,来缓解帕金森病的病情^[27]。综上,BCG 似乎在免疫过度

激活和免疫耐受之间起到平衡的作用。

4 BCG 诱导的训练免疫的分子机制

训练免疫的作用机制还不完全清楚,目前的研究主要集中在单核/巨噬细胞参与的训练免疫。该免疫反应的启动环节可能是通过病原体相关分子模式(pathogen associated molecular pattern, PAMP)与模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)的结合实现的,然后通过信号转导途径,引起物质代谢改变及表观遗传的变化,后者主要是组蛋白修饰的改变(图 2)^[3]。 β -葡聚糖通过与单核细胞表面的凝集素受体(C-type lectin receptor, CLR)结合,引起训练免疫^[28]。BCG 细胞壁组分胞壁酰二肽(muramyl dipeptide, MDP)可与单核细胞胞浆中核苷酸结合寡聚化结构域受体(nucleotide-binding oligomerization domain, NOD)2 结合,经过丝/苏氨酸蛋白激酶(AKT)-雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)途径,使染色质由致密变得疏松,组蛋白修饰改变,主要是位于 TNF- α 和 IL-6 基因上游启动子区组蛋白 H3K4 三甲基化增多,而组蛋白 H3K9 三甲基化减少^[7]。当病原体或其他刺激物再次遭遇单核/巨噬细胞,物质代谢中糖酵解增加,组蛋白的甲基化改变与 BCG 接种时一致,最终导致炎症因子分泌增加。



a~c. BCG 接种后可引起单核细胞表观遗传的改变,主要为组蛋白 H3K4 三甲基化增加,当再次感染呼吸道合胞病毒、流感病毒等其他病原体时,单核细胞组蛋白甲基化增加,引起细胞因子分泌增多,抵抗多种病原体感染致病。

图 2 BCG 诱导的训练免疫有助于抵抗其他病原体^[3]

Fig. 2 BCG-induced trained immunity helps to fight other pathogens^[3]

β -葡聚糖诱导的训练免疫不仅使糖酵解增多,还引起脂质和胆固醇合成增多,甚至氨基酸代谢也

发生改变,主要表现为谷氨酰胺分解代谢旺盛^[29-30]。BCG 接种后,单核巨噬细胞再次遭遇病原体或刺激

物,也会引起糖酵解增加和谷氨酰胺分解增加^[7],但是脂质代谢的改变尚无报道。物质代谢引起表观遗传的改变,尤其是三羧酸循环中间产物可以调控组蛋白修饰酶的活性,如氨基酸代谢生成的琥珀酸可进入三羧酸循环,可进一步变成延胡索酸,延胡索酸的累积可引起组蛋白赖氨酸脱甲基酶(lysine demethylase, KDM)5的抑制,从而引起细胞因子合成增多,即训练免疫发生^[30]。而 α -酮戊二酸则可以激活H3K27脱甲基酶活性,从而抑制训练免疫^[31]。最近还有研究显示人体接种BCG后细胞因子的水平与肠道中的罗氏菌(*Roseburia*)数量呈负相关,提示肠道菌群对BCG诱导的训练免疫有调节作用,菌群可能通过调控氨基酸代谢尤其是苯丙氨酸的代谢,进而影响训练免疫^[32]。另一项研究还显示IL-32有助于BCG诱导的训练免疫对利什曼原虫的抵抗作用,可能与IL-32和NOD的协同作用有关,也可能与IL-32诱导的维生素D激活有关,因为维生素D可引起表观遗传变化^[10]。

5 结 语

训练免疫打破以往我们对于固有免疫没有记忆性的认知,使我们了解到固有免疫的新特点。BCG诱导的训练免疫不仅可以特异性预防结核病,还可以非特异性预防多种病原体,尤其是病毒的感染,并用于非肌层浸润性膀胱癌等肿瘤的治疗,所以认识BCG诱导的训练免疫的作用及其机制,不仅可有助于基于BCG的抗结核疫苗的研发,推动结核病的预防,也为预防和治疗其他感染及肿瘤提供了新的思路。

参 考 文 献:

[1] Netea MG, Dominguez-Andrés J, Barreiro LB, et al. Defining trained immunity and its role in health and disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20(6): 375-388. DOI:10.1038/s41577-020-0285-6.

[2] Kurtz J, Franz K. Innate defence: evidence for memory in invertebrate immunity [J]. *Nature*, 2003, 425(6953): 37-38. DOI:10.1038/425037a.

[3] O'Neill LAJ, Netea MG. BCG-induced trained immunity: can it offer protection against COVID-19? [J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20(6): 335-337. DOI:10.1038/s41577-020-0337-y.

[4] van Puffelen JH, Keating ST, Oosterwijk E, et al. Trained immunity as a molecular mechanism for BCG immunotherapy in bladder cancer[J]. *Nat Rev Urol*, 2020, 17(9): 513-525. DOI: 10.1038/s41585-020-

0346-4.

[5] Kaufmann SH, Hussey G, Lambert PH. New vaccines for tuberculosis[J]. *Lancet*, 2010, 375(9731): 2110-2119. DOI:10.1016/S0140-6736(10)60393-5.

[6] Kaufmann E, Sanz J, Dunn JL, et al. BCG educates hematopoietic stem cells to generate protective innate immunity against tuberculosis[J]. *Cell*, 2018, 172(1-2): 176-190. e19. DOI:10.1016/j.cell.2017.12.031.

[7] Arts RJW, Carvalho A, la Rocca C, et al. Immunometabolic pathways in BCG-induced trained immunity [J]. *Cell Rep*, 2016, 17(10): 2562-2571. DOI:10.1016/j.celrep.2016.11.011.

[8] Suliman S, Geldenhuys H, Johnson JL, et al. Bacillus calmette-guérin (BCG) revaccination of adults with latent *Mycobacterium tuberculosis* infection induces long-lived BCG-reactive NK cell responses[J]. *J Immunol*, 2016, 197(4): 1100-1110. DOI: 10.4049/jimmunol.1501996.

[9] van't Wout JW, Poell R, van Furth R. The role of BCG/PPD-activated macrophages in resistance against systemic candidiasis in mice [J]. *Scand J Immunol*, 1992, 36(5): 713-719. DOI: 10.1111/j.1365-3083.1992.tb03132.x.

[10] Silva MVT, dos Santos JC, Figueiredo AMB, et al. The role of IL-32 in Bacillus Calmette-Guérin (BCG)-induced trained immunity in infections caused by different *Leishmania* spp [J]. *Microb Pathog*, 2021, 158: 105088. DOI:10.1016/j.micpath.2021.105088.

[11] Spencer JC, Ganguly R, Waldman RH. Nonspecific protection of mice against influenza virus infection by local or systemic immunization with Bacille Calmette-Guérin [J]. *J Infect Dis*, 1977, 136(2): 171-175. DOI:10.1093/infdis/136.2.171.

[12] Pittet LF, Curtis N. Does Bacillus Calmette-Guérin vaccine prevent Herpes simplex virus recurrences? A systematic review[J]. *Rev Med Virol*, 2021, 31(1): 1-9. DOI:10.1002/rmv.2151.

[13] Biering-Sørensen S, Aaby P, Lund N, et al. Early BCG-Denmark and neonatal mortality among infants weighing <2500 g: a randomized controlled trial[J]. *Clin Infect Dis*, 2017, 65(7): 1183-1190. DOI:10.1093/cid/cix525.

[14] Arts RJW, Moorlag SJCFM, Novakovic B, et al. BCG vaccination protects against experimental viral infection in humans through the induction of cytokines associated with trained immunity [J]. *Cell Host Microbe*, 2018, 23(1): 89-100. e5. DOI:10.1016/j.chom.2017.12.010.

[15] Stensballe LG, Nante E, Jensen IP, et al. Acute lower

- respiratory tract infections and respiratory syncytial virus in infants in Guinea-Bissau; a beneficial effect of BCG vaccination for girls community based case-control study[J]. *Vaccine*, 2005, 23(10): 1251-1257. DOI: 10.1016/j.vaccine.2004.09.006.
- [16] Giamarellos-Bourboulis EJ, Tsilika M, Moorlag S, et al. Activate; randomized clinical trial of BCG vaccination against infection in the elderly[J]. *Cell*, 2020, 183(2): 315-323. e9. DOI:10.1016/j.cell.2020.08.051.
- [17] Kong LJ, Moorlag SJCFM, Lefkovich A, et al. Single-cell transcriptomic profiles reveal changes associated with BCG-induced trained immunity and protective effects in circulating monocytes[J]. *Cell Rep*, 2021, 37(7): 110028. DOI:10.1016/j.celrep.2021.110028.
- [18] Babjuk M, Burger M, Comp erat EM, et al. European association of urology guidelines on non-muscle-invasive bladder cancer (TaT1 and carcinoma in situ) - 2019 update[J]. *Eur Urol*, 2019, 76(5): 639-657. DOI:10.1016/j.eururo.2019.08.016.
- [19] Conti P, Reale M, Nicolai M, et al. Bacillus Calmette-Gu erin potentiates monocyte responses to lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and interleukin-1, but not interleukin-6 in bladder cancer patients[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 1994, 38(6): 365-371. DOI:10.1007/BF01517205.
- [20] Singh AK, Srikrishna G, Bivalacqua TJ, et al. Recombinant BCGs for tuberculosis and bladder cancer[J]. *Vaccine*, 2021, 39(50): 7321-7331. DOI:10.1016/j.vaccine.2021.09.040.
- [21] Angelidou A, Diray-Arce J, Conti MG, et al. Human newborn monocytes demonstrate distinct BCG-induced primary and trained innate cytokine production and metabolic activation in vitro [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 674334. DOI: 10.3389/fimmu.2021.674334.
- [22] Dang YP, Souchet C, Moresi F, et al. BCG-trained innate immunity leads to fetal growth restriction by altering immune cell profile in the mouse developing placenta[J]. *J Leukoc Biol*, 2022, 111(5): 1009-1020. DOI:10.1002/JLB.4A0720-458RR.
- [23] Wiens MO, Kissoon N, Holsti L. Challenges in pediatric post-Sepsis care in resource limited settings; a narrative review[J]. *Transl Pediatr*, 2021, 10(10): 2666-2677. DOI:10.21037/tp-20-390.
- [24] Novakovic B, Habibi E, Wang SY, et al. B-glucan reverses the epigenetic state of LPS-induced immunological tolerance[J]. *Cell*, 2016, 167(5): 1354-1368. e14. DOI:10.1016/j.cell.2016.09.034.
- [25] K uhntreiber WM, Tran L, Kim T, et al. Long-term reduction in hyperglycemia in advanced type 1 diabetes; the value of induced aerobic glycolysis with BCG vaccinations [J]. *NPJ Vaccines*, 2018, 3: 23. DOI:10.1038/s41541-018-0062-8.
- [26] Ristori G, Faustman D, Matarese G, et al. Bridging the gap between vaccination with Bacille Calmette-Gu erin (BCG) and immunological tolerance; the cases of type 1 diabetes and multiple sclerosis[J]. *Curr Opin Immunol*, 2018, 55: 89-96. DOI:10.1016/j.coi.2018.09.016.
- [27] La an G, Dang H, Middleton B, et al. Bacillus Calmette-Gu erin vaccine-mediated neuroprotection is associated with regulatory T-cell induction in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease [J]. *J Neurosci Res*, 2013, 91(10): 1292-1302. DOI:10.1002/jnr.23253.
- [28] Cheng SC, Quintin J, Cramer RA, et al. mTOR- and HIF-1 -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity[J]. *Science*, 2014, 345(6204): 1250684. DOI:10.1126/science.1250684.
- [29] Mitroulis I, Ruppova K, Wang BM, et al. Modulation of myelopoiesis progenitors is an integral component of trained immunity[J]. *Cell*, 2018, 172(1-2): 147-161. e12. DOI:10.1016/j.cell.2017.11.034.
- [30] Arts RJ, Novakovic B, Ter Horst R, et al. Glutaminolysis and fumarate accumulation integrate immunometabolic and epigenetic programs in trained immunity [J]. *Cell Metab*, 2016, 24(6): 807-819. DOI:10.1016/j.cmet.2016.10.008.
- [31] Liu PS, Wang HP, Li XY, et al. A-ketoglutarate orchestrates macrophage activation through metabolic and epigenetic reprogramming[J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(9): 985-994. DOI:10.1038/ni.3796.
- [32] Stra ar M, Mourits VP, Koeken VACM, et al. The influence of the gut microbiome on BCG-induced trained immunity [J]. *Genome Biol*, 2021, 22(1): 275. DOI:10.1186/s13059-021-02482-0.

(收稿日期:2021-12-24;修回日期:2022-05-20)