

自然杀伤 T 细胞的研究进展

张艳 魏海涛 陈元鼎

(中国医学科学院,北京协和医学院医学生物学研究所,昆明 650118)

摘要: 自然杀伤 T 细胞(NKT)是一类具有 NK 受体和 T 细胞受体且显示 NK 细胞和 T 细胞两方面性质的淋巴细胞。因其表型和功能与 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞等免疫细胞有所不同,近年来颇受关注。NKT 细胞具有高度保守的 TCR 表型(TCRV α 24/V β 11-人),同时共表达 NK 细胞特有标志 CD161。NKT 细胞识别由 CD1d 分子提呈的特异糖脂分子,并能够分泌大量细胞因子,参与机体的先天性免疫和获得性免疫反应。研究发现,NKT 细胞在抗感染、抗肿瘤,以及抑制自身免疫性疾病(如:肥胖型糖尿病、再生障碍性贫血等)的发生中发挥着重要作用。本文将对有关 NKT 细胞特征和功能的研究现状,以及存在的问题作一综述。

关键词: NKT 细胞 细胞学特征 发育 功能

Advances in Studies on Natural Killer T Cells

Zhang Yan Wei Haitao Chen Yuanding

(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Kunming 650118)

Abstracts: (NKT) express NK receptor and TCR, thus presenting the character of these two lymphocytes. In recent years, NKT are concerned for its difference in T, B and NK cells. NKT express highly conservative TCR (TCRV α 24/V β 11 in human) as well as CD161 which on the surface of NK cells. NKT recognize glycolipid antigens presented by non-polymorphic major histocompatibility complex (MHC) class I-like protein CD1d, and secrete a lot of cytokines which involve in innate immune and acquired immune response. Studies showed that NKT play an important role in anti-infective, antitumor and inhibiting autoimmune diseases (such as NOD, aplastic anemia). In this article the present status of NKT properties study are reviewed and? problems met in studies discussed.

Key words: NKT cells Cellular properties Development Functions

NKT 细胞于 1987 年由 Fowlker 等首先在小鼠中发现,到 20 世纪 90 年代后期才在人类中发现,由于其表型和功能与传统 T 细胞、B 细胞、NK 细胞的不同,立即受到研究者的高度重视。NKT 细胞表达保守的限制性的 TCR 谱,其 $\alpha\beta$ TCR 结构单一。NKT 细胞作为一种重要的免疫细胞,在免疫反应和免疫调节方面发挥重要作用。因此受到了广大学者的青睐。涉及 NKT 细胞各方面的实验研究大量涌现,NKT 细胞的特征和功能逐步被人们所了解,但目前仍有很多方面尚需进一步证实。

1 NKT 的细胞学特性

NKT 细胞是 CD4+CD8-或者 CD4-CD8+T 细胞的一个亚类,与传统的 T 细胞不同,它不识别由经典的 MHC-I 或 II 类分子递呈的肽类抗原,而是识别由非经典的 MHC-I 类分子 CD1d 呈递的糖脂类分子抗原^[1,2],之后具有迅速分泌大量细胞因子,参与机体先天性免疫和获得性免疫的能力。CD1d 在肝细胞以及造血起源的组织细胞如树突状细胞、B 细胞、T 细胞、巨噬细胞中都有表达。第一个被鉴定对 NKT 细胞有结合及刺激作用的配体是从海洋海绵中提取的 α -半乳糖神经酰胺(α -galactosylceramide,简称 α -Galcer)。 α -Galcer 是一种

收稿日期:2009-05-04

作者简介:张艳(1982-),女,硕士,研究方向:分子病毒学;E-mail:zhyan_3@163.com

通讯作者:陈元鼎,E-mail:chenyud@imbcams.com.cn

由亲水性的碳水化合物部分与疏水性的酰基鞘胺醇部分通过 α 连接形成的糖脂,由于相对分子质量仅在 800000 左右,极微量的 α -Galcer 就能介导 NKT 细胞与 CD1d 分子间的结合和刺激作用,使 NKT 细胞大量扩增及功能活化,迅速分泌大量细胞因子,发挥免疫调节以及抗感染,抗肿瘤的作用。据报道,日本学者通过改进 α -Galcer,研制出试剂 KRN7000,是目前激活 NKT 细胞的最有效 α -Galcer 配体^[3]。目前很多研究工作者正致力于 α -Galcer 及其微小结构的差异对 NKT 细胞分化和功能的影响的研究。

2 NKT 细胞的分布

NKT 细胞的分布具有组织特异性,所占比例各不相同,有研究报道小鼠肝脏的 NKT 细胞在占成熟 T 细胞的 30%-50%,骨髓为 20%-30%,在胸腺占 HAS-T 的 10%-20%,脾为 31%,淋巴结为 0.3%,外周血为 4%,肺为 7%^[4]。也有报道小鼠 NKT 细胞占肝脏淋巴细胞的 10%-40%,在胸腺,骨髓,脾,淋巴结,血中不足 1%。人类中的 NKT 细胞的组织分布也已有研究,研究发现在人类肝脏中 NKT 细胞所占比例明显低于小鼠^[5],在人其它组织分布情况尚需进一步证实。

3 NKT 细胞的发育

NKT 细胞产生于围产期的胸腺,由 CD4+CD8+ 双阳性细胞偏离于主流的 T 细胞分化途径而分化产生^[6]。NKT 细胞在胸腺经历了复制周期,因此这部分数目非常少的经历随机 TCR 重排形成恒定的 TCR- α 链的细胞,在出生 3 周后增殖至有意义的水平。其阳性选择是由表达 CD1d 的骨髓衍生的细胞而不是胸腺皮质上皮细胞介导,这是 NKT 细胞的特殊性。在骨髓衍生的表达 CD1d 的细胞中,胸腺细胞已基本被认定为阳性选择至关重要的细胞。在成熟晚期阶段,NKT 细胞表达几种分子,包括 IL27R、CD24、DX5、NK1.1 和 Ly49 家族 NKR。NK1.1 表达的诱导可以发生在胸腺,但大部分从胸腺移出的细胞 NK1.1 为阴性。表明 NKT 细胞的最终成熟阶段也可发生在外周血。

4 NKT 细胞的分型及表面标志

4.1 NKT 细胞的分型

目前所指的 NKT 细胞均为 CD1d 限制性,根据

TCR (小鼠 V α 14-J α 18, 人类 V α 24-J α 18) 的表达与否,而将 NKT 细胞分为 V α 14-J α 18+(I 型)NKT 细胞和 V α 14-J α 18-(II 型)NKT 细胞,通常所说的 NKT 细胞即为 I 型 NKT 细胞^[1]。

根据 NK1.1 的表达与否将 NKT 细胞分为如下 2 型:

(1)NK1.1+ NKT 细胞根据 CD4、CD8 的表达与否,小鼠的此类 NKT 细胞分为 CD4+ 和 (CD4-CD8-) DN 2 个亚群。人类的 NKT 细胞分为 CD4+、CD8+ 和 (CD4-CD8-) DN 3 个亚群。

(2)NK1.1- NKT 细胞此类细胞大多表达 CD4。目前研究认为在胸腺 NK1.1- NKT 细胞是 NK1.1+ NKT 细胞的前体,有可能在外周血继续成熟^[7]。然而在体外实验中观察到 NK1.1+ NKT 细胞在 α -GalCer 刺激后出现 NK1.1 的表达下调,而表现为 NK1.1-,所以 NK1.1- NKT 细胞又可能为体内接受刺激后的细胞。基于上述研究,目前认为 NK1.1 的表达与否同下列因素有关:遗传背景、NKT 细胞是否成熟、是否被刺激及其组织定位。

4.2 NKT 细胞表面表达的 NK 细胞标志

NKT 细胞表面能表达 NK 细胞的多种标志,但重要的有两类:

(1)活化性受体:在人类为 NKR-P1A,小鼠为 NKR-P1C,它们对寡糖有高亲和力,能与靶细胞上糖类配体结合,激活 NKT 的杀伤功能,并分泌细胞因子。

(2)抑制性受体:1997 年 Davodeau 等用单克隆抗体确证了人类 V α 24+/V β 11+ NKT 细胞上有 4 种杀伤细胞抑制性受体(KIR)及 CD94/NKG2。小鼠 NKT 细胞表达的抑制性受体为 Ly49A、Ly49C,但不表达活化性受体 Ly49D。

4.3 NKT 细胞表面表达的 T 细胞标志

(1)TCR:大多数 NKT 细胞的 TCR 为 $\alpha\beta$ TCR,少数为 $\gamma\delta$ TCR。

(2)CD4 及 CD8:大多数 NKT 细胞为 CD4-CD8- 双阴性 NKT(DNNKT),其次为 CD4+ NKT 细胞,少数为 CD8+ NKT 细胞。

5 NKT 细胞的功能

5.1 NKT 细胞在自身免疫性疾病中的作用

器官特异性自身免疫性疾病是由 Th1 优势应

答介导的。对人类 Th1 介导的自身免疫病及其动物模型的研究发现,NKT 细胞数量的减少以及分泌 IL-4 能力降低是此类自身免疫病的特征。

研究发现 NKT 细胞发挥该功能的特征是它们在体外激活后能分泌大量的免疫调节因子 IL-4, IFN- γ 和 TNF^[8]。NKT 细胞在不同微环境中产生不同的细胞因子,进而引发不同的免疫反应。1990 年 Romagnani 等^[9]研究证实,人类存在 Th1 和 Th2 细胞两种亚型。Th1 细胞分泌 IFN- γ 及 IL-2,其中以分泌 IFN- γ 为主要特征,主要介导细胞免疫;活化细胞毒性 T 细胞。而 Th2 细胞主要分泌 IL-4, IL-5, IL-10,其中以 IL-4 的分泌最具代表性,主要介导体液免疫,活化 B 淋巴细胞。Th1 和 Th2 细胞通过分泌的细胞因子进行发育,分化的相互调节。当环境中以 IL-12 为优势时,NKT 优势分泌 IFN- γ ,进而引起 Th1 的分化和保护性免疫应答反应;而当环境中以 IL-7 为优势时,NKT 优势分泌 IL-4, IL-10, IL-13 等,进而引起 Th2 的分化和抑制性免疫反应。因此,在不同的情况下,NKT 细胞可能通过释放不同的细胞因子来调节 Th1/Th2 分化,从而产生不同的免疫应答,是一种重要的免疫调节细胞。

再生障碍性贫血(再障)发病机制的研究一直是血液病的一项重点内容。应用免疫抑制治疗能使大部分再障患者得以缓解,这些疾病发生造血干细胞质和量的异常很可能是免疫机制异常介导的^[10]。许多研究证实,再障患者骨髓组织 T 淋巴细胞数量显著增多,T 细胞亚群分布及表型表达异常,CD4+/CD8+ 细胞比例倒置,Th1/Th2 细胞比值升高等,而造成负调控因子 IFN- γ , TNF- α 及 IL-2 浓度升高^[11]。由此推测再障可能是由于异常的免疫调节导致 Th1 细胞增多,IFN- γ , IL-2 增加导致 CD8+T 淋巴细胞增殖,TNF 增加促使 Fas 和 FasL 介导的髓系造血细胞凋亡,最后导致骨髓造血功能衰竭而引起的。那么,作为调节 Th1/Th2 的重要免疫调节细胞,NKT 细胞在再障病理过程中的地位和作用很值得进一步探讨研究。2002 年,美国 NIH 研究发现,再障患者骨髓中 NKT 细胞 Va24 基因的 PCR 定量检出水平较正常的明显减少^[12]。对于再障患者,NKT 细胞是否有细胞因子分泌功能的障碍,有待进一步的研究证实。据此推测,通过对 NKT 细胞数量及功

能的调整,阻断 Th1 过度激活,恢复 Th1/Th2 平衡状态,是否可成为再障临床治疗的新方向。Kaer 等^[13]在动物实验中发现,体内注射 α -Galcer 后,可快速扩增 NKT 细胞及分泌细胞因子,进而活化一系列免疫细胞,促进免疫应答偏倚于 Th2 型反应,抑制 Th1 型反应。Crough 等^[14]进一步研究发现,G-CSF 体内作用于 NKT 细胞后可使得 NKT 细胞经 α -Galcer 激活后,免疫应答同样偏倚于 Th2,具 IL-4 分泌表型的 NKT 细胞优先扩增。由此考虑到, α -Galcer 可能会成为在临床治疗中的一个新的免疫调节药物。

有关肥胖型糖尿病(NOD)NKT 细胞的研究表明,NOD 小鼠的 T 细胞介导的自身免疫性糖尿病的发生与 NKT 细胞的确密切相关^[15]。I 型糖尿病(T1D)是一种自身免疫性疾病,由淋巴细胞破坏胰岛产生 β 细胞所引起的,研究发现输注 NKT 细胞能抑制 I 型糖尿病的发生。Va14+ T 细胞受体转基因表达可增加小鼠 NKT 细胞的表达水平,同时可防止 NOD 小鼠糖尿病的发生。在人类,也发现同卵双胞胎之间,糖尿病患者个体与非糖尿病个体相比,NKT 细胞数量在前者明显降低,由这些糖尿病患者体内分离得到的 Va24+ NKT 细胞在产生 IL-4 方面也存在缺陷^[16]。

在其它自身免疫性疾病中也存在 NKT 细胞缺失。国内有研究显示,系统性红斑狼疮(SLE)患者 TCRV α 24+V β 11+ NKT 细胞数量较正常对照少,而且 NKT 细胞体外活化前胞质内 IFN- γ 水平与正常对照无差异,而活化后则低于正常对照,然而 IL-4 则在活化前后都明显高于正常人^[17]。由此推测,SLE 发病与 NKT 细胞改变而促进免疫应答向 Th2 型诱导的体液免疫倾斜有关。Linsen 等^[18]对风湿性关节炎(RA)的研究显示,RA 患者外周血 TCRV α 24+V β 11+ NKT 细胞数目减少,IL-4 分泌也明显减少,免疫应答偏倚于 Th1 型。有关 NKT 细胞在自身免疫性疾病中的功能状态,尚需更多的资料予以证实。

还有研究表明,在一些自身免疫病的发病过程中伴有大量的炎症细胞浸润,尤其在早期炎症中,浸润细胞中有较大成分的 NK 和 NKT 细胞。在此则有一个值得深思的问题,由于罹患自身免疫病变的

器官和组织的实质细胞通常并不表达 MHC 抗原,那么,大量 NK/NKT 细胞的浸润是否对炎症反应起到抑制作用呢?但是过量的浸润又会造成组织损伤,带来新的破坏。这些问题的解决仍需要对研究 NKT 细胞的免疫调节的技术和方法不断改进。

5.2 抗感染作用

NKT 细胞参与了一系列不同病原体的免疫应答反应。有研究发现 NKT 细胞可以识别分枝杆菌并产生相应的免疫应答效应。因为分枝杆菌可以呈递 CD1d 糖脂类抗原,激活 NKT 细胞,分泌 IFN- γ 的 DN NKT 细胞还可以通过释放抗微生物的肽段(溶菌素)直接发生抗分枝杆菌的作用^{[19][20]}。

有研究发现在给 HBV 转基因小鼠中注射 α -脑苷脂,发现 α -脑苷脂对 HBV 复制的抑制作用是通过活化肝脏中的 NKT 细胞,然后活化 NK 细胞,释放多种抗病毒因子。由此可见 NKT 细胞的快速反应性是机体对 HBV 感染自然防御的第一关。

Emoto 等^[20]报道,产单核细胞李斯特菌感染的小鼠肝内,分泌 IL-4 的 CD4-NKT 细胞数量减少,而分泌 IFN- γ 的 DN NKT 细胞数目增加。但 Flesch 等^[21]检测发现,产单核细胞李斯特菌感染后,脾 CD4+ NKT 细胞分泌 IL-4 水平增加。这一免疫应答有助于招募分泌 IFN- γ 的 DN NKT 细胞至感染部位,且转移至脾脏的具 IL-4 分泌功能的 CD4+ NKT 细胞有助于抗体的产生。

由于 NKT 细胞亚群表达 CD4 同时高表达细胞因子受体 CCR5,所以 NKT 细胞是 HIV-1 感染的靶点,在 AIDS 患者体内选择性较少。NKT 细胞具有细胞因子分泌的潜能,可以进一步增强 B 细胞产生抗体,可以考虑通过增强中和抗体对 HIV 抗原产生免疫反应。以 α -Galcer 及其衍生物激活 NKT 细胞潜能增强疫苗活性,可作为 HIV 疫苗研制策略之一。

5.3 抗肿瘤作用

Kawano 等^[22]首次报道了在肿瘤中存在循环的 NKT 细胞数目的缺失。体内外许多实验都支持 NKT 细胞可直接作为抗肿瘤效应细胞而发挥作用。与传统的 T 细胞一样,NKT 细胞的激活依赖于 TCR 识别特异性的配体。NKT 细胞的激活后,在肿瘤免疫中发挥作用有三种途径:一是活化的 NKT 细胞

增强 ADCC 作用和增强细胞表面肿瘤相关抗原的特异性抗体;二是 NKT 细胞通过释放细胞因子抑制血管瘤的形成;三是活化的 NKT 释放的细胞因子进一步激活 NK 和 CTL,活化的 NK 细胞和 CTL 进而穿过内皮细胞直接杀伤肿瘤。

从肿瘤患者或健康人外周血中分离所得的 Va24+NKT 细胞,由 α -Galcer 激活后,在体内外均显示了可释放穿孔蛋白,穿孔蛋白可在细胞膜上打孔,细胞外液循孔道进入细胞内,致使细胞肿胀裂解,杀死肿瘤细胞。该方式即为穿孔素介导的杀伤肿瘤的方式,但该活性并不依赖于靶细胞上 MHC-I 类分子的表达与否,说明 Va24+ NKT 细胞与传统的 NK 细胞效应机制不同。

Metelitsa 等^[23]的研究表明,NKT 细胞在受到 α -Galcer 及 IL-12 激活后,通过穿孔素介导方式杀伤肿瘤细胞,而且不依赖肿瘤细胞是否表达 CD1d。同时也有人认为不排除 NKT 细胞的抗肿瘤功能主要是通过激活其它免疫效应细胞包括 NK 细胞来实现的可能。 α -Galcer 通过激活 NKT 细胞分泌 IFN- γ ,IFN- γ 可增加 NK 细胞的先天性肿瘤细胞毒活性以及 CD8+ T 细胞的获得性抗肿瘤反应来抑制肿瘤转移,也可能通过 NKT 细胞激活 B 淋巴细胞而产生抗肿瘤效应。

Molling 等^[24]报道,健康人群中的外周血 TCRV α 24+V β 11+ NKT 细胞数目随年龄增高而减少,这与机体随年龄的增加免疫力下降相一致。Molling 等进一步研究检测了一组不同肿瘤外周血 NKT 细胞,发现肿瘤患者外周 NKT 细胞较正常对照减少 50%,并且其减少与肿瘤负荷及肿瘤类型无相关性。同样日本学者 Yoneda 等^[25]报道,70 例恶性血液系统疾病,包括恶性淋巴瘤,急/慢性髓系白血病,骨髓增生异常综合症,外周血中 NKT 细胞数目较正常对照显著降低。这些结果显示,肿瘤患者外周血中 NKT 细胞数目的减少,可能是反映肿瘤发生发展的一个危险因子指标。

有实验已经证明 Va14+ NKT 是 IL-12 体内抗肿瘤免疫反应所必需的效应细胞亚群。由 IL-12 治疗诱导出的 Va14-Ja28 NKT 细胞可以介导排斥,转输经 IL-12 活化的 Va14+ NKT 细胞可以有效阻止小鼠 B16 黑色素瘤肝脏转移灶的形成。

在肿瘤细胞表面并不能检测到 α -Galcer, 而 DC 细胞激活 NKT 细胞时需要 α -Galcer 作为配体, 因此, α -Galcer 可能成为一种理想的抗肿瘤药物。而 CD1d 分子又不具有个体多态性, 故 α -Galcer 可应用于所有患者。Ishikawa 等[26]研究证明, 在转移性肺肿瘤小鼠模型中, 静脉应用 α -Galcer/DC 可诱导肺中 Val4+ NKT 细胞明显扩增及活化, 发挥抗肿瘤作用。目前, Ishikawa 研究小组已将 α -Galcer/CD 应用于人类非小细胞肺癌治疗的 I 期临床试验。结果显示较好。

同时也有研究表明, NKT 细胞通过释放 IL-4 和 IL-13, 经 IL-4R-STAT6 途径, 下调机体对肿瘤的免疫监视功能[27]。

6 小结

由于在抗感染、抗肿瘤及在自身免疫疾病中所起的重要调节作用, 近年人们十分重视对 NKT 细胞的研究。NKT 细胞在免疫反应和免疫调节中发挥的作用不断被人们所了解, NKT 细胞在临床上的应用也越来越广, NKT 作为治疗手段发挥的功能越来越大。同时对 NKT 细胞的病变引起的免疫疾病, 通过相应配体和细胞因子作为治疗手段也在不断进步。但是, 对 NKT 细胞的认识依然目前仍很有限, 许多问题如 NKT 细胞的来源, 不同来源 NKT 细胞的功能差异, NKT 细胞的天然配体, NKT 细胞对 NK、T 细胞发育分化及免疫应答调节的具体方式等也有待解决。随着这些问题的解决, 人们对 NKT 细胞在正常和病理状态下的功能将会有更多、更新的认识, NKT 细胞在将来的免疫治疗中也将发挥更大作用。

参考文献

- Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, et al. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(3):231-237.
- Mattner J, Debord KL, Ismail N, et al. *Nature*, 2005, 434(7032):525-529.
- Shimosaka A. *Int J Hematol*, 2002, 76 :277-279.
- Matsuura A, Kinebuchi M, Chen HZ, et al. *Immunol*, 2000, 164 (6):3140-3148.
- Kenna T, Golden-Mason L, Porcelli SA, et al. *Immunol*, 2003, 171 (4):1775-1779.
- Kronenberg M, Engel I. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19 (2):186-193.
- Kronenberg M, Gapin L. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(8):557-568.
- Tsuda H, Sakai M, Michimata T, et al. *Am J Reprod Immunol*, 2001, 45(5):295-302.
- Romagnani S. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2000, 85(1):9-18.
- 何广胜, 邵宗鸿, 刘鸿, 等. *中华免疫学杂志*, 2001, 22:176-181.
- 和虹, 邵宗鸿, 何广胜, 等. *中华血液学杂志*, 2002, 23:574-577.
- Zeng W, Maciejewski JP, Chen G, et al. *Br J Haematol*, 2002, 119(3):803-809.
- Van Kaer L. *Immunol Res*, 2004, 30(2):139-153.
- Crough T, Nieda M, Nicot AJ. *Immunol*, 2004, 173 (8):4960-4966.
- Yang Y, Bao M, Yoon JW. *Diabetes*, 2001, 50(12):2691-2699.
- Kent SC, Chen Y, Clemmings SM, et al. *Immunol*, 2005, 175(7):4458-4464.
- 马莉, 楚兰, 杨洁, 等. *中华检验医学杂志*, 2005, 28:181-183.
- Linsen L, Thewissen M, Baeten K, et al. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(3):493-502.
- Brigl M, Bry L, Kent SC, Gumperz JE, Brenner MB. *Nat Immunol*, 2003, 4(12):1230-7.
- Emoto Y, Emoto M, Kaufmann SH. *Infect Immun*, 1997, 65(12):5003-9.
- Flesch IE, Wandersee A, Kaufmann SH. *Immunol*, 1997, 159(1):7-10.
- Kawano T, Nakayama T, Kamada N, et al. *Cancer Res*, 1999, 59 (20):5102-5.
- Metelitsa LS, Naidenko OV, Kant A, et al. *Immunol*, 2001, 167 (6):3114-22.
- Molling JW, Kolgen W, van der Vliet HJ, et al. *Int J Cancer*, 2005, 116(1):87-93.
- Yoneda K, Morii T, Nieda M, et al. *Leuk Res*, 2005, 29 (2):147-152.
- Ishikawa A, Motohashi S, Ishikawa E, et al. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(5):1910-7.
- Kinjo YD, Wu G, Kim GW, et al. *Nature*, 2005, 434 (7032):520-5.