

## 四、结 语

微管的聚合和解聚是细胞分裂中的一个重要环节,其动态平衡状态时常发生变化。微管动力学不稳定性通常是用微管正端(末端)聚合、解聚的速率以及从增长到缩短(灾变)、从缩短到增长(拯救)的转换频率四个参数来衡量的。对于活细胞来说,影响其微管动力学的因素不仅包括诸多的物理、化学、生物方面因素,此外还有物种的差异,以及包括细胞培养温度、荧光蛋白标记物、图像和软件配置的选择等因素,这些均可能对微管动力学研究有较大的影响,因此在研究过程中应兼顾多方面。目前随着微管相关蛋白的不断发现,这些相关蛋白的结构和功能在许多方面亟待进一步研究,特别是 MAPs 磷酸化、乙酰化后对微管动力学的影响,以及与某些疾病如恶性肿瘤、老年性痴呆综合征、短暂性大脑缺血等之间的相关性,均是当前研究者须关心的问题。1998年本课题组克隆的一个新基因 JWA (AF070523),初步研究结果显示其表达蛋白可能也是一种新的微管相关蛋白,参与细胞分化、氧化应激及细胞内氨基酸平衡调节等,目前还正在不断地进行深入研究。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Gundersen GG. 2002, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **3**(4):296-304.
- [ 2 ] Tseng HC et al., 1999, *Proc-Natl-Acad-Sci.*, **96**(17): 9503-9508.
- [ 3 ] Caplow M et al., 1998, *Biochemistry.*, **37**(37):12994-13002.
- [ 4 ] Shackelford DA et al., 1998, *Mol Chem Neuropathol.*, **34**(2-3):103-120.
- [ 5 ] Mailliot C et al., 2000, *J Cereb Blood Flow Metab.*, **20**(3):543-549.
- [ 6 ] Davis PK et al., 1999, *J Biol Chem.*, **274**(50):35686-35692.
- [ 7 ] Murakami K et al., 2000, *Proc Natl Acad Sci.*, **97**(7): 3579-3584.
- [ 8 ] Ebneith A et al., 1999, *Cell Motil Cytoskeleton.*, **44**(3): 209-224.
- [ 9 ] Vecino E et al., 1998, *Neurosci Lett.*, **245**(2):93-96.
- [ 10 ] Charbaut E et al., 2001, *J Biol Chem.*, **276**(19):16146-16154.
- [ 11 ] Troxell CL et al., 2001, *Mol Biol Cell.*, **12**(11):3476-3488.
- [ 12 ] Kline Smith SL et al., 2002, *Mol Biol Cell.*, **13**(8):2718-2731.
- [ 13 ] Arshad D et al., 1997, *Annu Rev Cell Dev Biol.*, **13**:83-117.

## NKT 细 胞 亚 群\*

张 勇 王福庆

(上海第二医科大学 上海市免疫学研究所 上海 200025)

经典的 NKT 细胞是一类表面既具有 T 细胞又具有 NK 细胞标志的 T 细胞亚群。与普通 T 细胞相比,1. NKT 细胞不受经典 MHC I 类分子限制,而受非经典 MHC I 类分子、CD1d 分子限制,不识别蛋白质抗原,而是识别脂类抗原;2. NKT 细胞的 TCR 库非常局限,一个物种的 NKT 细胞只有一种 TCR $\alpha$  链和 3-4 种 TCR $\beta$  链;3. 受刺激后, NKT 细胞能迅速产生大量的细胞因子,如 IFN- $\gamma$  和/或 IL-4<sup>[1,2]</sup>。关于 NKT 细胞的功能、调控以及与免疫系统其他细胞的关系尚不十分明确。随着对 NKT 细胞研究的深入,不同实验常得到不相一致、甚至是完全相反的结果,这可能与 NKT 细胞具有不同的亚群有关。

## 一、NKT 细胞的分类

NKT 细胞是一群高度异质性的细胞,可根据不

同的表型和功能特征加以分类:

## 1. 根据 NK1.1 的表达分类

1987年, Fowlkes 等在 C57BL/6 小鼠胸腺中发现一群 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> 的 T 细胞,其表面表达 NK 细胞标志 NK1.1<sup>[3]</sup>,因此将这种 NK1.1<sup>+</sup> T 细胞称为 NKT 细胞。但 NK1.1 只表达在 C57BL/6、NZB 和 CE 等小鼠品系中,而 Balb/c、NOD 以及 DBA 等其他许多小鼠品系均不表达该分子<sup>[4]</sup>。同时利用 CD1d- $\alpha$ -GalCer 四聚体技术(见下)发现,即使在 NK1.1 小鼠品系中也有不表达 NK1.1、但能识别 CD1d 分子递呈的脂类抗原的 NKT 细胞亚群。因此, NKT 细胞可分为 NK1.1<sup>+</sup> 和 NK1.1<sup>-</sup> 两种。

\* 国家自然科学基金资助项目(批准号:30070709)。

E-mail: zhangy@shsmu.edu.cn

## 2. 根据 CD1d 依赖性分类

1995年,发现 NKT 细胞识别由非经典 MHC I 类分子 CD1d 递呈的脂类抗原<sup>[5]</sup>。但直到现在仍未发现 CD1d 分子天然配体。一种人工合成的糖脂  $\alpha$ -半乳糖神经鞘胺醇 ( $\alpha$ -galactosylceramide,  $\alpha$ -GalCer) 被证明能与人和小鼠 APC 的 CD1 分子结合,在体内、外有效地激活 NKT 细胞<sup>[6]</sup>。在此基础上, Benlagha 等首次利用荧光标记的 CD1d- $\alpha$ -GalCer 四聚体成功地鉴定 NKT 细胞<sup>[7]</sup>。四聚体技术最初用于检测特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞。其原理是:将装载有特定抗原肽的重组 MHC I 类分子(MHC:肽单体)重链 C 端生物素化,则四个这样的单体分子能同时与一个荧光素标记的亲合素分子结合,形成荧光素标记的四聚体。由于特定的 TCR 分子能与相应 MHC:肽复合物结合,所以利用荧光素标记的四聚体就能检测抗原肽特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞。与此类似,四个生物素化的 CD1d: $\alpha$ -GalCer 单体与荧光标记的亲合素装配成的四聚体可以特异地检测 NKT 细胞。这种方法被认为是目前分离和鉴定 NKT 细胞最有效的方法。但是,正像下文将要提到的,某些 NKT 细胞是不受 CD1d 限制的。

## 3. 根据 TCR 基因取用分类

经典 NKT 细胞一个显著的特点是 TCR 基因取用呈极度偏移的格局,在小鼠为  $V_{\alpha}14J_{\alpha}281-V_{\beta}8/7$ (称为  $V_{\alpha}14^{+}$  NKT 细胞),在人类则是  $V_{\alpha}24J_{\alpha}Q-V_{\beta}11$ <sup>[2]</sup>。但有报道称,在  $J_{\alpha}281$  缺陷小鼠外周,发现有些 CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> 和 CD8<sup>+</sup> NKT 细胞,其 TCR 基因取用是随机的<sup>[8]</sup>。表明存在另一种  $V_{\alpha}14^{-}$  NKT 细胞。

4. 另外, NKT 细胞还可根据 TCR 的不同分为  $\alpha\beta^{+}$  NKT 和  $\gamma\delta^{+}$  NKT 细胞。

## 二、CD4<sup>+</sup>、DN 和 CD8<sup>+</sup> NKT 细胞

经典成熟 T 细胞根据表面共受体的不同可分为 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 两种亚群。与此类似, NKT 细胞主要可分为 CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> (DN) 和 CD8<sup>+</sup> 三种 NKT 细胞亚群。这三类 NKT 细胞的性质、分布、特点和功能等均存在一定的差异。

### 1. 组织分布

NKT 细胞最初是在胸腺中发现的。现在,几乎在所有经典 T 细胞存在的部位均可检测到 NKT 细胞,包括肝脏、骨髓、脾、外周血、淋巴结、子宫、肠和肺部等。其中需要特别指出的是,在正常子宫中无 NKT 细胞,但妊娠早期子宫中即出现一定数量的

NKT 细胞,其中绝大多数为 DN NKT<sup>[9]</sup>。我们实验室在对自发性流产模型小鼠的研究中也得到一致的结果。在不同的器官和组织成熟 T 细胞中, NKT 细胞所占的比例差异很大,以肝脏最多(30% - 50%),而淋巴结最少(约 0.3%)。除胸腺无 CD8<sup>+</sup> NKT 细胞外,其余器官都存在所有三种不同的 NKT 细胞亚群,但各亚群的比例差异很大(见表 1)<sup>[10,11]</sup>。

表 1 不同组织中 NKT 细胞亚群

| 组织    | CD4 <sup>+</sup> | DN  | CD8 <sup>+</sup> |
|-------|------------------|-----|------------------|
| 胸腺    | +++              | ++  | -                |
| 脾     | +++              | ++  | +                |
| 肝脏    | +++              | ++  | +                |
| 骨髓    | ++               | +++ | +                |
| 淋巴结   | ++               | +++ | ++               |
| 外周血   | ++               | ++  | +                |
| 肺     | ++               | ++  | +++              |
| 子宫    | +                | +++ | +                |
| 大肠和小肠 | +                | ++  | +++              |
| 腹膜渗出液 | ++               | +++ | ++               |

注: +++: >50%, ++: >10%, <50%, +: <10%。

### 2. 表面分子

NKT 细胞既具有 T 细胞标志,又具有 NK 细胞标志,故其表面分子的种类非常丰富。除了上面已经介绍的 TCR 和 NK1.1 外,还表达下列分子。

(1) Ly49: 小鼠 NKT 细胞主要表达 Ly49A、C/I 和 G。但不同亚群的 NKT 细胞, Ly49 的表达存在明显差异。在肝脏和脾, Ly49 只表达在 DN 和 CD8<sup>+</sup> NKT 细胞表面,而 CD4<sup>+</sup> NKT 不表达;胸腺和骨髓 CD4<sup>+</sup> NKT 虽表达 Ly49,但 Ly49<sup>+</sup> 的比率明显低于 CD8<sup>+</sup> 和 DN NKT 细胞<sup>[12]</sup>。

(2) CD69 和 CD44: CD69 和 CD44 是免疫细胞活化标志,在细胞活化后高表达。在 CD4<sup>+</sup> 和 DN NKT 细胞表面均表达高浓度的 CD69 和 CD44,提示这可能是一群在组织局部已受脂类抗原活化的细胞,因此再次受到刺激后能立即释放大量的细胞因子;而 CD8<sup>+</sup> NKT 更类似于未致敏细胞,表面 CD69 和 CD44 的表达很低,但高表达 CD62L。

(3) 趋化性细胞因子受体: NKT 细胞表面表达多种趋化性细胞因子受体,但不同亚群的 NKT 细胞表达的趋化性细胞因子受体的种类是不同的:如 CCR4 主要表达在 CD4<sup>+</sup> NKT 细胞表面,而 CCR1、CCR6 和 CXCR6 则主要表达在 DN 和 CD8<sup>+</sup> NKT 细胞表面<sup>[13]</sup>。这可能是造成不同亚群 NKT 细胞在

不同组织中分布不同的主要原因。例如,在胸腺中可检测到高水平的CCR4配体TARC和MDC,而在肺及肠道,它们的水平很低。这与CD4<sup>+</sup>NKT细胞在胸腺中比例很高,而在肺部及肠道只占极少部分是一致的,因为不同组织和不同生理状态下各种趋化性细胞因子的表达有所不同。

(4) 其他表面分子,如Fas、CD28、CD1d等在三种亚群中均高表达。

### 3. CD1d 约束性

一直以来,NKT细胞都被认为是只能识别由CD1d分子递呈的脂类抗原。但Eberl等发现在CD1d基因敲除小鼠脾脏和骨髓仍存在一定数量的NK1.1<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>NKT细胞,这些细胞表型为CD8<sup>+</sup>或DN,而且TCR基因的取用也是随机的<sup>[8]</sup>。

### 4. 发育过程

在裸鼠和出生后即摘除胸腺的小鼠中均发现CD4<sup>+</sup>和DN NKT细胞数量急剧减少,提示这两类NKT细胞的发育是胸腺依赖性的。但是在这些小鼠的肝脏,CD8<sup>+</sup>NKT细胞数量并无明显变化。那么这群细胞是怎样产生的呢?有报道认为CD8<sup>+</sup>NKT细胞是由经典MHC I类分子选择产生<sup>[10]</sup>。越来越多的学者认为CD8<sup>+</sup>NKT细胞的发育是胸腺非依赖性<sup>[14]</sup>,更确切地说,CD8<sup>+</sup>NKT细胞是在胸腺外组织,如肝脏中产生。最直接的证据就是在胎肝和成年肝脏中均检测到TCR基因重排所必需的重组激活基因(RAG-1和RAG-2)的表达<sup>[15]</sup>。

TCRV $\alpha$ 14J $\alpha$ 281对不同亚群NKT细胞的发育的影响也不同,在TCRV $\alpha$ 14J $\alpha$ 281缺陷小鼠中,NKT细胞总数明显下降,但进一步分析亚群时发现,CD4<sup>+</sup>NKT细胞明显下降,CD8<sup>+</sup>NKT细胞数量未见明显改变<sup>[10]</sup>。

从谱系发育过程来看,DN NKT细胞可能是由CD4<sup>+</sup>NKT细胞转变而来,因为有实验表明,CD4<sup>+</sup>NKT细胞在体外经抗CD3单抗刺激4天后,其表面CD4分子表达降低,而且仍保持CD8<sup>-</sup><sup>[16]</sup>。而CD8<sup>+</sup>NKT细胞与CD4<sup>+</sup>和DN NKT在发育上似无直接关系。但现已发现在许多器官和组织中,当CD4<sup>+</sup>NKT细胞受到损伤时,CD8<sup>+</sup>NKT细胞会代偿性扩增<sup>[8]</sup>。

### 5. 分泌细胞因子

激活后能迅速分泌大量的细胞因子并藉此发挥各种效应功能是NKT细胞最重要的特征之一。很多报道表明,CD4<sup>+</sup>和DN NKT细胞在激活后能平衡地分泌大量的IL-4和IFN- $\gamma$ <sup>[1,2]</sup>,但不同组织中

的NKT细胞分泌细胞因子能力的差异很大。脾脏NKT细胞分泌细胞因子的量远远低于胸腺中的NKT细胞<sup>[10]</sup>。而且,不管是在胸腺还是脾脏,DN NKT细胞分泌IL-4的能力较CD4<sup>+</sup>NKT细胞为低;而CD8<sup>+</sup>NKT细胞分泌细胞因子的能力则存在明显差异。最近所有关于CD8<sup>+</sup>NKT细胞的研究均显示,CD8<sup>+</sup>NKT激活后只能分泌IFN- $\gamma$ ,而不能分泌IL-4<sup>[10,17]</sup>,提示CD8<sup>+</sup>NKT在功能上与前两类细胞存在明显差异。这可能也是早期不同实验室结论不相一致的重要原因之一。

需要特别指出的是, $\alpha$ -GalCer能特异地激活NKT细胞。在小鼠实验中发现,这种激活作用一个显著的特点是,初次注射 $\alpha$ -GalCer能使小鼠NKT细胞迅速活化,平衡地分泌大量的IL-4和IFN- $\gamma$ 。而多次注射 $\alpha$ -GalCer后,NKT细胞极化为只分泌IL-4的细胞,同时伴有血清IgE升高<sup>[18]</sup>。虽然该实验未能确定这些NKT细胞的亚群,但很可能这是CD4<sup>+</sup>或DN NKT。 $\alpha$ -GalCer已成功地用于预防和治疗小鼠糖尿病的发生和发展<sup>[19,20]</sup>。但是也存在例外,Cui等报道,反复注射 $\alpha$ -GalCer会抑制Th2类细胞的分化<sup>[21]</sup>。与此相一致的是,有报道 $\alpha$ -GalCer能刺激脾脏细胞表达CD40L,继而激活分泌CD40<sup>+</sup>APC分泌IL-12<sup>[22]</sup>。

### 6. NKT细胞与临床免疫

NKT细胞与临床免疫的关系日益受到重视。迄今已发现NKT细胞与自身免疫病<sup>[23]</sup>、抗肿瘤<sup>[24]</sup>、抗感染<sup>[25]</sup>以及免疫耐受(移植排斥)关系密切,不同亚群的NKT细胞在其中可能发挥着不同的作用。

(1) 自身免疫病:大量的研究证明,包括糖尿病、多发性硬化(MS)、结肠炎和SLE在内的大多数Th1型自身免疫病的发生与发展与NKT细胞密切相关,其中以糖尿病的研究最为详细。几个不同的实验室均发现在糖尿病NOD小鼠中,NKT细胞数量明显下降,分泌IL-4的能力显著降低,但仍保留分泌IFN- $\gamma$ 的能力。如果给这些小鼠转移正常NKT细胞,则可明显降低疾病的发生或缓解病情<sup>[26,27]</sup>。在这种过继性免疫治疗中,CD4<sup>+</sup>和DN NKT细胞在其中发挥了重要作用,这与其受 $\alpha$ -GalCer反复刺激后,主要产生IL-4,从而能预防和治疗糖尿病的发生是一致的。

(2) 抗肿瘤:现已证明NKT细胞在肿瘤免疫中也发挥重要作用。IL-12或 $\alpha$ -GalCer活化的NKT细胞可通过释放高浓度的穿孔素、IFN- $\gamma$ 或激活

NK细胞和CTL等细胞的杀肿瘤活性杀死肿瘤细胞<sup>[24]</sup>。其中发挥重要作用的效应细胞主要是CD8<sup>+</sup>及部分DN NKT细胞。而CD4<sup>+</sup>NKT细胞被认为产生穿孔素的能力较弱。还有报道甚至认为在小鼠中CD1d限制性的CD4<sup>+</sup>NKT细胞可以通过分泌IL-13抑制效应性CTL介导的清除肿瘤的作用<sup>[28]</sup>。

(3) 控制感染:NKT细胞主要识别由CD1d分子递呈的脂类抗原。而各种病原生物(包括细菌、寄生虫等)表面富含脂类物质,因此NKT细胞必然在抗感染免疫中发挥重要作用。现已证实,NKT细胞与多种病原生物感染密切相关。但各种NKT细胞亚群在其中的作用不完全相同。在单核细胞增多性李斯特菌<sup>[29]</sup>和疟原虫<sup>[30]</sup>感染小鼠外周均发现分泌IL-4的CD4<sup>+</sup>NKT细胞下降,而分泌IFN- $\gamma$ 的DN NKT细胞增加。针对这些病原生物的免疫应答既包括将DN NKT招募到感染局部,也包括CD4<sup>+</sup>NKT细胞聚集在脾脏以辅助特异性抗体的产生。CD8<sup>+</sup>NKT细胞与抗病毒感染有关,在感染A型流感病毒的小鼠肺部常可检测到大量的CD8<sup>+</sup>NKT细胞,其作用可能是在病毒感染期间调节CD8<sup>+</sup>T细胞的效应功能<sup>[31]</sup>。Baron等也发现在感染乙型肝炎病毒的转基因小鼠模型中,一种CD1d限制性、但对 $\alpha$ -GalCer无反应的非经典NKT细胞激活后可介导急性乙型肝炎的发生<sup>[32]</sup>。

## 结 语

综上所述,NKT细胞是一群对免疫调节、抗肿瘤和抗感染具有重要作用的T细胞亚群。近年来发现不同品系的小鼠或同一品系的小鼠的NKT可具有不同的表型和功能,给NKT细胞的分离、鉴定及其功能的研究带来困难。CD1d- $\alpha$ -GalCer四聚体技术是分离和鉴定NKT细胞最好的方法之一,它能涵盖大部分具有NKT功能的细胞,但仍然不能包括CD1d非限制性NKT细胞。不同亚群的NKT细胞须根据其表型采用不同的方法分离鉴定。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Bendelac, A. et al. , 1997, *Ann. Rev. Immunol* , **15**: 535 - 562.
- [ 2 ] Godfrey, D. I. et al. , 2000, *Immunol Today* , **21** (11): 573 - 583.
- [ 3 ] Fowlkes, B. J. et al. , 1987, *Nature* , **329**: 251 - 254.
- [ 4 ] Serizawa, I. et al. , 2000, *Exp. Anim* , **49**: 171 - 180.
- [ 5 ] Bendelac, A. et al. , 1995, *Science* , **268**: 863 - 865.
- [ 6 ] Kawano, T. et al. , 1997, *Science* , **278**: 1626 - 1629.
- [ 7 ] Benlagha, K. et al. , 2000, *J. Exp. Med* , **191**: 1895 - 1903.
- [ 8 ] Eberl, G. et al. , 1999, *J. Immunol* , **162**: 6410 - 6419.
- [ 9 ] Dang, Y. et al. , 2000, *Immunology* , **101**: 484 - 491.
- [ 10 ] Hammond, KJL. et al. , 1999, *Eur J Immunol* , **29**: 3768 - 3781.
- [ 11 ] Bannai, M. et al. , 2001, *Eur J Immunol* , **31** (11): 3361 - 3369.
- [ 12 ] Markus, S. et al. , 2000, *Eur J Immunol* , **30**: 2488 - 2496.
- [ 13 ] Kim, CH. et al. , 2002, *Blood* , **100**(1): 11 - 16.
- [ 14 ] Kronenberg M. et al. , 2002, *Nat Rev Immunol* , **2** (8): 557 - 568.
- [ 15 ] Taniguchi, H. et al. , 1996, *Nature Med* , **2**: 198 - 203.
- [ 16 ] Chen, HJ. et al. , 1997, *J. Immunol* , **158**: 5112 - 5119.
- [ 17 ] Emoto, M. et al. , 2000, *Eur J Immunol* , **30**(8): 2300 - 2311.
- [ 18 ] Singh, N. et al. , 1999, *J. Immunol* , **163**: 2373 - 2377.
- [ 19 ] Hong, S. et al. , 2001, *Nat Med* , **7**(9): 1052 - 1056.
- [ 20 ] Sharif, S. et al. , 2001, *Nat Med* , **7**(9): 1057 - 1062.
- [ 21 ] Cui, J. et al. , 1999, *J. Exp. Med* , **190**: 783 - 792.
- [ 22 ] Tomura, M. et al. , 1999, *J. Immunol* , **163**: 93 - 101.
- [ 23 ] Hammond, KJ. et al. , 2002, *Tissue Antigens* , **59** (5): 353 - 363.
- [ 24 ] Smyth, MJ. et al. , 2002, *Curr Opin Immunol* , **14** (2): 165 - 171.
- [ 25 ] Gumperz, JE. et al. , 2001, *Curr Opin Immunol* , **13**: 471 - 478.
- [ 26 ] Baxter, AG. et al. , 1997, *Diabetes* , **46**: 572 - 582.
- [ 27 ] Hammond, KJL. et al. , 1998, *J. Exp. Med* , **1047** - 1056.
- [ 28 ] Terabe, M. et al. , 2000, *Nat Immunol* , **1**: 515 - 520.
- [ 29 ] Flesch, LEA. et al. , 1997, *J. Immunol* , **159**: 7 - 10.
- [ 30 ] Pied, S. et al. , 2000, *J. Immunol* , **164**: 1463 - 1469.
- [ 31 ] Kambayashi, T. et al. , 2000, *J. Immunol* , **165**: 4964 - 4969.
- [ 32 ] Baron, JL. et al. , 2002, *Immunity* , **16**: 583 - 594.