

能的总和的改变,那么自由能的改变可以认为是相加的。由于抗体亲和力的叠加是不能完全预言的,因此,CDR 顺序适应的方法更受人们青睐。目前认为最高亲和力抗体的获得来源于对重链 CDR3 及轻链 CDR3 区域的改造。该方法之所以能优越于 PCR 错配或突变株诱导的突变是因为其对于母本抗体的修饰仅限于超变区,而该区域的改变所引起的免疫抗体更少(相对于包含保守序列结构区域的改变而言)。

五、结束语

产生及选择重组抗体库的方法仍将不断地改善和发展。其主要动力是完全人源化单抗的潜在医学价值。迄今已有不少抗体被选择用于蛋白识别、免疫及基础应用学科的研究。预计不久将制备一个大库容、稳定的噬菌体抗体库,使其得到更为广泛地应用。抗体库可以用于寻找新药的作用目标、细胞受体及它们的配体。与此同时,筛选及洗脱方法的改善,对于技术的成熟同样具有重要意义。可以预见,噬菌体表面显示技术必将成为抗体产生的主要技术。

摘 要

从显示在丝状噬菌体表面的重组抗体库中选择抗体的方法已成为获得试剂、诊断及治疗的重要手段。本文介绍该技术的原理、发展及运用,但着重描述如何利用细胞筛选、改进洗脱条件、增加库容及进一步筛选以获得高亲和力抗体的方法。

参 考 文 献

- [1] Huse WD, Sastry L, Iverson SA, et al., 1989, *Science*, **246**:1275-1281.
[2] Smith GP. 1985, *Science*, **228**:1315-1317.

- [3] Christoph Rader, 1997, Carlos F Barbas III. *Curr Opin Biotechnol*, **8**:503-508.
[4] 董志伟、王琰, 1997. 5, 抗体工程, 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社.
[5] Yang WP, Green K, Pinz-Sweeney S, et al., 1995, *J Mol Biol.*, **254**:392-403.
[6] Andrew D Griffiths, Alexander R Duncan. 1998, Feb. *Curr Opin Biotechnol.* **9**(1): 102-8 Samuelsson A, Yari F, Hinkula J, et al., *Eur J Immunol.*
[7] Andersen PS, Stryhn A, Hause n B E, et al., 1996, *Natl Acad Sci USA.*, **93**:1820-1824.
[8] Figini Mariangela et al., 1998, *Cancer Research*, **58**:991-996.
[9] *Immunol Methods* 203(1997)11-24.
[10] Siegel DL, 1995, *Ann NY Acad Sci.* **764**:547-558.
[11] Parren PWHI, Fiscaro P, Labrijn AF, et al., 1996, *J Virol.*, **70**:9046-9050.
[12] Van Ewijk W, de Kruij J, Germeraad WT, et al., 1997, *Proc Natl Acad Sci USA.*, **94**:3903-3908.
[13] Hoogenboom HR, de Bruine AP, Hufton SE, et al., 1998, *Immunotechnology, Jun*, **4**(1):1-20.
[14] Osbourn JK, Derbyshire E, Vaughan T, et al., 1998, *Immunotechnology Jan*, **3**(4):293-302.
[15] Hawkins RE, Russell SJ, Winter G. *J Mol Biol.*, 1992, **266**:889-896.
[16] Schier R, Marks JD, 1996, *Hum Antibodies Hybridomas.*, **7**:97-105.
[17] Robert de Bruin, Kees Spelt, Joseph Mol, et al., 1999, *Nat Biotechnol*, **17**:397-399.
[18] De Lalla c, Tamborini E, Longhi R, et al., 1996, *Eur J Immunol*, **26**:629-639.
[19] Doorbar J, Foo C, Columon IV, Medcalf L, et al., 1997, *Virology*, **238**:40-52.
[20] Akerstrom B, Nilson BH, Hoogenboom HR, et al., 1994, *J Immunol Methods*, **177**:151-163.
[21] Hoogenboom HR. 1997, *Trends Biotechnol*, **15**:62-70.
[22] Barbas CF III, Burton DR, 1996, *Trends Biotechnol*, **14**:230-234.
[23] Schier R, Mc Call A, Adams GP, et al., 1996, *J Mol Biol.*, **263**:551-567.
[24] Schier R, Bye J, Apell G, et al., 1996, *J Mol Biol.*, **255**:28-43.
[25] Low NM, Holliger P, Winter G. 1996, *J Mol Biol.*, **260**:359-368.

Th1/Th2 细胞分化的分子机制

巩 芷 娟*

(上海市免疫学研究所 上海 200025)

CD4⁺ T 细胞的亚群及其功能已早有报道, Th1/Th2 细胞在调节机体免疫功能中起着重要作用。这些 CD4⁺ T 细胞亚群的出现实际上是分化、成熟的 T 细胞在外周特异性免疫应答过程中形成不同效应细胞群体,在功能上发生极化的过程^[1]。

Th 细胞的这种分化受多种因素影响,包括细胞因

上海市免疫学研究所周光炎研究员对本文进行了校阅,谨此致谢。

* 现工作单位:上海儿童医院遗传所,邮编 200040。

子、抗原的种类及浓度、APC类型及环境因素等的综合作用。

一、Th细胞亚群的异质性

早在1986年, Mosmann等研究发现, 鼠CD4⁺T细胞根据产生的细胞因子不同, 可被分为Th1/Th2两种不同的细胞亚群。Th1细胞产生IL-2、IFN- γ 和TNF- β , Th2细胞产生IL-4、IL-5、IL-6、IL-10及IL-13^[2]。Th1/Th2细胞亚群的分化是不同抗原及环境因素等综合作用的结果。首先, 在许多实验诱导以及自然发生的免疫应答中, 可有不同种类的细胞因子产生而发挥不同的作用, 这些效应功能有的以Th1细胞为主, 有的则以Th2细胞为主。这些情况在某些病毒或真菌感染及一些自身免疫性疾病中均存在。其次, 在淋巴细胞激活的早期, 细胞因子的产生以混合的Th0形式存在(产生各种复合细胞因子的T细胞被称为Th0细胞); 而在有抗原持续存在且不易清除的慢性疾病中, Th1/Th2细胞亚群的分化更为明显。因此, Th细胞的分化很大程度上与免疫应答类型有关, 是分化、成熟的T细胞在免疫应答的活化过程中, 因环境和基因的共同作用而形成不同效应类型细胞群体的过程。

二、Th1/Th2细胞的功能

不同Th细胞亚群产生的细胞因子不同, 因而发挥不同的效应功能^[3]。Th1细胞活化Tc、NK细胞和巨噬细胞, 主要促进细胞免疫或迟发型超敏反应, Th2细胞主要参与体液免疫。Th1细胞为主的免疫应答常与炎症及组织损伤有关, 因为两种主要的Th1型细胞因子TNF- α 及IFN- γ 可激活T细胞、炎症细胞和内皮细胞以增强细胞介导的免疫应答引起的组织损伤。迟发型超敏反应(DTH)在抗微生物感染免疫中发挥重要作用。

Th2细胞主要参与体液免疫。其中IL-4能诱导B细胞产生IgE类抗体, 在IgE依赖的巨噬细胞介导的免疫反应中起重要作用。IL-5是一种嗜酸性粒细胞激活因子, IL-4及IL-5参与变态反应及抗寄生虫感染。Th2细胞产生的细胞因子有抗炎作用。IL-4及IL-13可拮抗IFN- γ 的巨噬细胞激活作用; IL-10可抑制巨噬细胞反应。因此, Th2细胞的激活可抑制急性及慢性炎症, 包括DTH。这提示Th2细胞因子的生理作用不仅仅是效应分子, 而更重要的是免疫调节分子。有研究显示T细胞在体外被激活时, Th1参与的反应常发生在早期, Th2细

胞随着免疫应答的发展而增多^[4]。

三、Th细胞的分化

有研究表明, Th1/Th2细胞来源于共同的前体T细胞, 这些前体T细胞是成熟的未致敏CD4⁺T细胞(naive cell)。这些细胞在受抗原刺激时主要产生IL-2, 且其分化受到多种因素的影响, 其中最主要的因素是细胞因子本身。IL-12可促进其向Th1细胞分化, IL-4可促使其向Th2细胞分化。

1. Th细胞分化的信号传导途径

细胞因子促进Th细胞的分化通过JAK-STAT信号途径^[5]。STAT(signal transducers and activators of transcription)是在几年前被确认的DNA结合蛋白超家族。STAT之所以引起普遍关注是因为其独特的活化方式以及介导抗病毒反应和细胞分化的多样性生物学效应。首先确定的STAT家族成员是STAT1、STAT2, 它们是IFN调控基因表达信号转导中的DNA结合蛋白。STAT家族成员均具有几个保守的结构域, 如SH2(Src homology 2 domain)。SH2有三个重要功能: 它是活化的受体复合物募集STAT的关键; 与JAK(Janus protein-tyrosine kinases)酪氨酸激酶结合^[6], JAK使STAT磷酸化; 使STAT分子形成二聚体结合DNA。STAT的DNA结合部位于一高度保守的结构域中间。细胞因子受体超家族成员通过和细胞因子的结合, 导致一种或几种STAT被激活, 分别传递具不同生物功能的信号。同一家族具有保守的胞外配体结合基序(motif), 这提示其具有共同的起源。细胞因子受体超家族还具有结合一种或几种JAK家族成员的特点。研究显示, 配体结合导致受体链和JAK的聚合, 随之发生磷酸根转移作用及JAK激酶的激活。JAK激酶使受体分子胞内部分的酪氨酸残基发生磷酸化, 以及募集到活化受体复合物的一系列细胞底物发生磷酸化。因此, JAK激酶在启动对细胞因子反应的多种信号途径中有重要作用。分析JAK缺陷的细胞系证明JAK是引起STAT1和STAT2磷酸化对IFN应答所必需, 而过度表达的JAK激活STAT的DNA结合活性。

在对细胞因子的应答中, STAT的活化具有特异性。例如, 淋巴细胞中, IL-2激活STAT5、IL-12激活STAT4、IL-4激活STAT6, 这种特异性不是由JAK控制, 而是由各自活化的受体复合物募集特异的STAT的能力决定。这出现在STAT蛋白的SH2结构域与受体酪氨酸磷酸化的特异位点相互

作用的整个过程中,也就是 STAT 的 SH2 结构域首先募集 STAT 到特异位点酪氨酸磷酸化的受体复合物,使 STAT 能够接近和结合活化的 JAK 激酶而被磷酸化。

2. 细胞因子对 Th 细胞分化的影响

很多因素(如某些细菌感染、内毒素、病毒等)可激活巨噬细胞及并指状树突细胞,促使 IL-12 的产生,并诱导 Th1 细胞为主的免疫应答^[7]。IFN- γ 可通过促进 IL-12 的分泌及维持 IL-12 受体的表达而促进 Th1 细胞的分化。IL-12 是一种重要的细胞因子,是由 p35、p40 两个亚单位共价结合形成的二聚体,它通过结合特异的 IL-12 受体(IL-12R)发挥生物学效应。两个不同的 IL-12R 亚单位均为细胞因子受体超家族成员,分别命名为 IL-12R β_1 和 IL-12R β_2 。未致敏 T 细胞并不表达 IL-12R,触发 T 细胞抗原受体可引起 IL-12R 两条链的表达,如 IL-12 或 IFN- α 存在, T 细胞则分化为 IL-12 应答的 Th1 细胞,持续表达 IL-12 受体的两条链。相反,当未致敏 T 细胞受到 IL-4 刺激时选择性丢失 IL-12R β_2 链,成为 Th2 细胞。IL-12R β_2 亚单位的表达仅限于 Th1 细胞亚群,是至今为止第一个确定的 Th1 细胞亚群特异的非细胞因子基因。调控 IL-12 信号途径是 Th 细胞分化的关键^[8]。用 IL-12 刺激人 T 细胞可诱导 JAK 家族的 JAK2 与 TYK2 的酪氨酸发生磷酸化,说明 TYK2、JAK2 的激活是 IL-12 与其受体作用后信号传递的早期事件。随后发生酪氨酸磷酸化与活化的是 STAT4 和 STAT3。STAT3 还参与其他细胞因子的信号传递,而 STAT4 则不参与其他的信号途径的传递。STAT4 具有限制性分布特点,主要表达在生血的组织包括胸腺和脾。IL-12 诱导 STAT4 的酪氨酸磷酸化,使其形成分子间的二聚体,转位到核内通过结合特异的 DNA 序列来直接激活细胞因子应答的靶基因^[9]。

STAT4 基因缺陷小鼠中,所有的 IL-12 功能受阻,包括诱导分泌 IFN- γ 、有丝分裂、加强 NK 细胞功能及 Th1 细胞分化^[10]。另外,STAT4 缺陷的淋巴细胞具有向 Th2 细胞分化的自然趋势,说明 STAT4 不仅介导淋巴细胞对 IL-12 的应答,而且调控着 Th1/Th2 细胞分化^[11]。

IL-4 是一种多效性细胞因子,在免疫系统中起重要作用。IL-4 通过 STAT6 的酪氨酸磷酸化及称作 4PS 的 170kD 蛋白的磷酸化来激活两个不同的信号途径^[12]。这两种不同的酪氨酸磷酸化蛋白,STAT6 和 IRS 相关的 4PS 在 IL-4 介导的信号传递

途径中起关键性作用。磷酸化的 4PS 与 PI-3K (p85)的调控亚单位及其它含有 SH2 结构域分子相互作用。血生成细胞系 32D 缺乏 4PS 则不能对 IL-4 发生增生反应,证实 4PS 是 IL-4 诱导的有丝分裂所必需的。而 STAT6 参加的 JAK-STAT 信号途径则对特异性基因表达及有丝分裂皆有作用。

IL-4 的受体复合物是由两个不同的多肽,139kD 的配体结合亚单位(IL-4R)和分子量稍小的多肽(IL-2R γ)组成。IL-2R γ 也用做 IL-2、IL-7 和 IL-13 的信号传递。用 IL-4 刺激细胞能够引起 IL-4R 亚单位胞内结构域的迅速酪氨酸磷酸化。事实上,IL-4R 的酪氨酸(Y472)磷酸化与胞浆蛋白 IRS-1(insulin receptor substrate-1)或称做 4PS 蛋白的信号传递有关。STAT6 的原始氨基酸序列 SH3、SH2 结构域能促使其与 IL-4 受体胞内结构域的直接作用,STAT6 通过它的 SH3、SH2 结构域与酪氨酸磷酸化的 IL-4R 结合,使其接近受体结合的 JAK,导致 STAT6 酪氨酸(Y641)磷酸化^[13],然后发生关键性的反应,包括 STAT6 聚合成二聚体及伴随的其从受体释放出来。

IL-4 诱导的 STAT6 的激活,对于许多功能包括有丝分裂、T 细胞的分化、免疫球蛋白的同型转换有重要作用。STAT6 基因敲除的小鼠表现为 Th2 细胞分化、细胞表面标记的表达及免疫球蛋白转为 IgE 型的缺陷,说明通过 STAT6 激活的信号是 IL-4 诱导的生物学效应的主要信号途径^[14]。

3. Th 细胞分化的其他影响因素

除细胞因子外,其他很多因素亦可影响免疫应答中 Th1/Th2 细胞平衡。首先是抗原的剂量或浓度。一般而言,低抗原浓度和低剂量感染易于诱导 Th1 反应,而高剂量诱导 Th2 应答。其机理尚不清楚。可能是由于低剂量时,主要的抗原提呈细胞(APC)是树突细胞或巨噬细胞,这两种细胞产生 IL-12 使 T 细胞向 Th1 分化。相反,当抗原浓度高时,可被不分泌 IL-12 的 APC 递呈,导致 Th2 分化。另一影响 T 细胞分化的因素是由 APC 提供的共刺激。共刺激因子是两个结构相关蛋白,B7-1 和 B7-2,两者都通过与 T 细胞的特异受体 CD28 作用激活 T 细胞。Th1/Th2 细胞的分化依赖共刺激,高水平的共刺激信号增强 Th2 应答。可能是由增加初始 T 细胞的激活的数量,增加 IL-4 产生导致 IL-4 依赖的 Th2 途径分化,也有报道说 CD28 共刺激通过增加 IL-4 受体的敏感性加速 Th2 细胞分化^[15]。研究显示 B7-1 和 B7-2 分别调控 Th1 和 Th2 细胞的分

化, B7-1 主要作为 Th1 细胞分化的共刺激因子, B7-2 则诱导 Th2 细胞的产生。然而, 没有证据表明这两个共刺激因子向 T 细胞传递不同的化学信号, 而是由于 B7-2 在未激活的 APC 中占主导地位, 当 APC 暴露于炎症刺激时则 B7-1 增加。并且, 不同的 T 细胞亚型分别在不同的激活和分化时期依赖共刺激信号, Th2 细胞的分化随着初期 APC 提供的共刺激信号而增加, 相反, 已分化的 Th2 细胞对抗原的应答无需 B7-2 共刺激因子, 而 Th1 细胞则持续需要 B7-1 信号的活化。因此, 决定 T 细胞分化的是共刺激信号的时间和水平而不是简单的其存在与否。T 细胞上 CD30 及其配体 CD30L 的相互作用在 Th 细胞向 Th2 极化过程中亦起一定作用, 在未致敏 T 细胞中加入抗 CD30 抗体拮抗剂能促使 TTS(破伤风毒素特异的) T 细胞克隆向 Th2 极化。反之, 在 T 细胞克隆前用抗 CD30 分子可阻断 CD30-CD30L 之间的相互作用, 促进 T 细胞向 Th1 的极化, CD30-CD30L 相互作用的机制尚不明确。其他因素如遗传因素^[16], 佐剂的作用, 抗原提呈细胞的种类也可影响 Th 细胞的分化。

四、Th1 / Th2 细胞与疾病的关系

Th1/Th2 细胞的平衡与否常常决定着感染、过敏性疾病及自身免疫病的结局。多数寄生虫感染中, Th2 占优势的免疫应答可加重疾病, 而 Th1 应答具有治疗作用。Th1 应答也是机体抵御真菌感染的主要反应方式。过敏性疾病的发生与抗原特异性 Th2 占优势的免疫应答密切相关, 由 Th2 分泌的细胞因子促进 IgE 的产生和嗜酸性粒细胞的炎症反应。系统性红斑狼疮(SLE)是 Th2 优势应答的自身免疫病^[17]。总的来说, 感染性疾病、过敏性疾病及自身免疫病中, 同一抗原特异性的两群 Th 细胞之间的平衡能决定机体对疾病表现出的不同反应, 即耐受和易感, 因而成功的疗法需要调节抗原特异性的 Th1/Th2 之间的平衡, 下调病理性 Th 优势应答, 促进向保护性 Th 优势应答类型的转变。

五、结束语

以上就 T 细胞的功能、分化机制及其影响因素、以及与疾病的关系作了一个概述, Th1/Th2 细胞在体内相互调节、相互平衡。Th1 细胞分泌的细胞因子可抑制 Th2 细胞的分化, 而 Th2 细胞分泌的细胞因子亦可抑制 Th1 细胞的分化^[18]。Th1/Th2 细胞的平衡及相应的极化状态常常决定着感染及自

身免疫的结局。随着对 T 细胞分化机制及影响因素的深入了解, 通过调节 Th1/Th2 细胞的平衡失调可用于治疗感染及自身免疫病。不断丰富与深化调节 Th 细胞亚群的方法, 将为多种免疫性疾病的治疗提供新思路。

摘要

Th1/Th2 细胞亚群的分化是不同的细胞因子、抗原及环境等综合因素作用的结果。在细胞因子参与的 Th 细胞分化中, JAK/STAT 信号途径是细胞因子受体转导细胞内信号的一种主要机制。本文主要就 Th1/Th2 细胞的功能、分化的分子机制及其影响因素作一综述。

参考文献

- [1] Romagnani, S., 1997, *Immunol Today*, **18**:263-266.
- [2] Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W. et al., 1996, *J Immunol.*, **136**:2348-2357.
- [3] Abbas, A. K., Kenneth, M., Sher, A., 1996, *Nature*, **381**:387-389.
- [4] Croft, M., Swain, S. L., 1995, *J. Immunol.*, **154**:4269-4281.
- [5] Ihle, J. N., 1996, *Cell*, **84**:331-334.
- [6] Ihle, J. N., 1995, *Semin Immunol.*, **7**:247-251.
- [7] Okamura, H., Kasniwamura, S. K., Tsusui, H., et al., 1998, *Curr Opinion Immunol.*, **10**:259-264.
- [8] Rogge, L., Sinigaglia, F., 1998, *The Immunologist*, **6**:142-145.
- [9] Cho, S. S., Bacon, C. M., Sudarshan, C., et al., 1996, *J. Immunol.*, **157**:4781-4786.
- [10] Thierfelder, W. E., Deursen, J. M., Yamamoto, K., et al., 1996, *Nature*, **382**:171-174.
- [11] Kaplan, M. H., Sun, Y. L., Hoey, T., et al., 1996, *Nature*, **382**:174-177.
- [12] Takeda, K. T., Tanaka, W., Shi, M., et al., 1996, *Nature*, **380**:627-630.
- [13] Kamogawa, Y., Lee, H. J., 1998, *J. Immunol.*, **161**:1074-1077.
- [14] Shimoda, K. J., Van Deursen, M. Y., Sangster, S. R., et al., 1996, *Nature*, **380**:630-633.
- [15] Kubo, M., Yamashita, M., Abe, R., 1999, *J. Immunol.*, **163**:2432-2442.
- [16] Guler, M., 1996, *Science*, **271**:984-987.
- [17] Segal, R., Bermas, B. L., Dayan, M., et al., 1997, *J. Immunol.*, **158**:3009-3016.
- [18] Levings, M. K., Schrader, J. W., 1999, *J. Immunol.*, **162**:5224-5229.