

领域前沿 · 中国



祁海, 清华大学教授, 清华-北大生命联合中心研究员, 教育部“长江学者”(2015年)、国家自然科学基金委杰出青年基金获得者(2014年)、科技部973项目首席科学家和“万人计划”中青年科技创新领军人才(2014年), 曾获谈家桢生命科学奖创新奖(2015年)、华生物学家协会青年奖(2016年)、吴阶平-保罗杨森医学药学奖(2016年), 2017年入选为美国霍华德休斯医学研究所国际学者(HHMI International Research Scholar)。祁海教授主要研究抗体免疫应答的调节机制, 应用包括双光子活体实时显微成像技术在内的动态免疫学方法, 探究淋巴细胞互作、迁徙以及微环境对其功能发育的影响, 在B细胞生物学、滤泡辅助T细胞(follicular T-helper cells, T_{FH})生物学和生发中心生物学领域取得了一系列原创成果, 以第一或通讯作者发表SCI论文20篇, 包括2篇《Science》、4篇《Nature》。

Ephrin-B1调控生发中心T细胞的运动 区域与辅助功能

吕佩纹 史长明 祁海*

(清华大学免疫学研究所, 动态免疫生物学实验室, 清华大学医学院, 基础医学系, 北京 100084)

摘要 滤泡辅助T细胞(follicular T-helper cells, T_{FH})对生发中心反应起着至关重要的调控作用。但是, T_{FH} 细胞如何被招募入生发中心以及它们在生发中心内的功能是否受局部微环境影响, 仍是悬而未决的问题。在这一研究中, 我们发现, 生发中心B细胞高表达Ephrin-B1(EFNB1)分子; Ephrin-B1以接触依赖的方式通过 T_{FH} 细胞上表达的EphB6受体排斥 T_{FH} 细胞, 抑制抗原特异的 T_{FH} -B细胞黏附互作, 限制 T_{FH} 细胞在生发中心的停留时间。另外, Ephrin-B1还通过EphB4受体促使正在生发中心里的 T_{FH} 细胞产生白介素-21。于是, 在没有了Ephrin-B1的生发中心里, 尽管有过量的 T_{FH} 细胞也无法产生足够的浆细胞; 而当Ephrin-B1缺陷型和野生型共存于生发中心, 前者会因获得更多 T_{FH} 黏附依赖的帮助信号而贡献更多骨髓浆细胞。这些结果首次揭示了一个排斥性生发中心导向系统, 既参与控制 T_{FH} 细胞的组织区域特性也调控其辅助功能。

关键词 滤泡辅助T细胞; 生发中心; Ephrin; 白介素-21

Ephrin-B1-Mediated Regulation of Germinal Center T-Cell Territoriality and Function

Lü Peiwen, Shi Changming, Qi Hai*

(Laboratory of Dynamic Immunobiology, Institute for Immunology, Tsinghua University,
Department of Basic Medical Sciences, School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract Follicular T-helper (T_{FH}) cells play a crucial role in orchestrating the germinal center (GC) response. It is not clear whether and how their recruitment and helper functions are regulated locally. We have found

*通讯作者。Tel: 010-62796757, E-mail: qihai@mail.tsinghua.edu.cn

*Corresponding author. Tel: +86-10-62796757, E-mail: qihai@mail.tsinghua.edu.cn

网络出版时间: 2017-06-02 11:10:54

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170602.1110.002.html>

GC-expressed Ephrin-B1 (EFNB1) serves as a contact-dependent, repulsive guidance cue that signals through T_{FH} -expressed EphB6 receptor to inhibit T-B adhesion and GC retention of T_{FH} cells. EFNB1 also signals through EphB4 and EphB6 to promote interleukin-21 (IL-21) production. As a result, EFNB1-null GCs are defective in producing plasma cells despite harboring excessive T_{FH} cells, whereas in a competitive GC reaction EFNB1-deficient B cells produce more bone-marrow plasma cells as a result of gaining more contact-dependent T cell help. These results reveal a new layer of self-organizing regulatory mechanisms for the GC reaction locally.

Keywords follicular T-helper cells; germinal center; Ephrin; interleukin-21

高亲和力、同种型转换过的抗体是机体长效抵抗微生物的重要机制之一。选择高亲和力抗体的成熟过程发生在次级淋巴器官滤泡区内称为生发中心(germinal center, GC)的组织结构中。GC主要含有呈递抗原的滤泡树突状细胞(follicular dendritic cells, FDC)、高速增殖和进行高频突变的B细胞以及调控B细胞反应的滤泡性辅助T细胞(follicular helper T cells, T_{FH})。相比于其他T细胞亚群, T_{FH} 细胞有其特异高表达的基因谱[比如CXCR5(C-X-C chemokine receptor type 5)、ICOS(inducible costimulator)、PD-1(programmed death-1)以及Bcl-6(B cell leukemia/lymphoma 6)], 可以通过提供CD40L等辅助信号, 促进生发中心反应^[1-3]。在生发中心形成之前, T_{FH} 细胞要通过上调G蛋白偶连趋化因子受体CXCR5响应滤泡区FDC细胞分泌的趋化因子CXCL13^[4-6], 通过ICOS与非抗原特异B细胞上的ICOSL(inducible costimulatory ligand)作用增强运动能力, 才能脱离T细胞区并迁移进入B细胞为主的滤泡区^[7]。生发中心在滤泡中心区形成之后, T_{FH} 细胞表面G蛋白偶联受体进一步发生变化, 下调GPR183(G-protein coupled receptor 183)与上调S1PR2(sphingosine-1-phosphate receptor 2)导致 T_{FH} 细胞向滤泡中心区定位, 促使它们进入生发中心^[8-9]。另一方面, T_{FH} 细胞表达SLAM相关蛋白[signaling lymphocytic activation molecule (SLAM)-associated protein, SAP]; SAP促进 T_{FH} 细胞与抗原特异B细胞的黏附互动, 而没有SAP的 T_{FH} 细胞无法从滤泡区进入生发中心^[10], 以至于SAP缺陷时生发中心应答会出现严重缺失^[11]。这些研究结果显示, T_{FH} 细胞的组织定位对生发中心反应至关重要, 暗示着除趋化因子介导的淋巴细胞迁移调控外, 细胞间接触黏附也可能控制 T_{FH} 细胞招募到生发中心的效率。

Ephrin及其受体Eph(erythropoietin-producing human hepatocellular receptor)是目前已知参与神经

轴突导向调控的重要分子机制。与这些配体和受体都是细胞膜表面表达蛋白的事实相一致, 细胞间接触黏附是Ephrin-Eph产生信号并指引细胞迁移方向的必要条件^[12-14]。我们的研究发现, 与神经轴突导向调控相仿, 生发中心表达的Ephrin家族Ephrin-B1分子调控了 T_{FH} 细胞在生发中心反应中的定位与功能。

1 生发中心B细胞上调Ephrin-B1

通过RT-PCR的实验手段, 我们发现, *Ephrin-B1*基因在免疫后的淋巴组织中出现上调。进一步分析各种淋巴细胞亚群以及不同免疫进程的B细胞亚群, 我们发现, 在生发中心B细胞表面会特异性上调Ephrin-B1表达量。在淋巴组织切片上, Ephrin-B1染色可以精确标记生发中心的区域与边界。接下来, 我们使用条件敲除小鼠, 在小鼠B细胞上特异性敲除*Ephrin-B1*后研究了抗原诱导的免疫反应进程。流式细胞术的结果发现, 在缺失Ephrin-B1的情况下, 生发中心B细胞与 T_{FH} 细胞的生成比例并无明显变化。然而, 组化切片分析却显示, 在Ephrin-B1缺失的生发中心里会出现较多的 T_{FH} 细胞。

2 Ephrin-B1-EphB6信号调节 T_{FH} 细胞定位

为了更清楚地研究Ephrin-B1对 T_{FH} 细胞招募至生发中心的影响, 我们采用表达荧光蛋白标记的抗原特异MD4 B细胞[Egg-white lysozyme (HEL)-specific BCR transgenic小鼠B细胞]和OT-II T细胞[Ovalbumin (OVA)-specific TCR transgenic小鼠T细胞]共转系统进行实验。在过继转移T、B细胞后, 以HEL-OVA化学偶联抗原免疫, 取免疫后第7天的淋巴结固定切片及染色, 根据T细胞所带荧光蛋白精确定量计算 T_{FH} 细胞在淋巴组织中的分布密度, 我们发现, 在缺失Ephrin-B1的生发中心有更多的 T_{FH} 细胞堆积, 暗示Ephrin-B1对 T_{FH} 细胞起了排斥作用。

我们进一步以双光子显微成像技术实时观察 T_{FH} 细胞在生发中心附近及内部的运动轨迹以及 T_{FH} 细胞与生发中心、B细胞间动态相互作用。分析结果显示, Ephrin-B1缺失的生发中心B细胞会与 T_{FH} 细胞产生更大面积的缠绕(entanglement)现象, 并使 T_{FH} 细胞从滤泡区进入生发中心后滞留于此, 从而为持Ephrin-B1主要起了排斥作用。接下来, 我们尝试使用shRNA技术敲低 T_{FH} 细胞上表达的Ephrin-B1受体EphB4或EphB6, 试图鉴定向 T_{FH} 细胞传递排斥信号的受体^[15]。结果显示, 在T细胞敲低EphB6的情况下, T_{FH} 细胞会更容易堆积在正常的生发中心里。这些结果表明, 生发中心B细胞上的Ephrin-B1通过EphB6负向调节 T_{FH} 细胞在生发中心的定位。

3 Ephrin-B1缺失影响浆细胞生成

T_{FH} 细胞作为辅助体液免疫应答发生的重要细胞亚群, 除了帮助生发中心B细胞产生与维持外, 还调控B细胞亲和力成熟及分化形成浆细胞的过程^[3,16]。过于密集的 T_{FH} 细胞, 往往导致强烈的免疫应答甚至自身免疫疾病的发生。我们以经典的蛋白抗原NP-KLH(4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl-keyhole limpet hemocyanin)免疫方式诱导小鼠产生免疫应答, 在不同时间点进行检测, 结果表明, 在B细胞缺失Ephrin-B1的小鼠中, 虽然生发中心B细胞的生成不受影响, 但浆细胞生成比例却出现下滑。这与 T_{FH} 细胞堆积可能导致反应过度的预期似乎相反。由于Ephrin-B1可以通过其胞内结构域中的PDZ(PSD95-Dlg1-Zo1)区域招募相关蛋白产生逆向信号(reverse signaling), 一种解释是Ephrin-B1的逆向信号对生成浆细胞很重要。为检验这一可能, 我们使用50%野生对50%缺陷型骨髓嵌合体小鼠进行研究。在这种小鼠出现的生发中心中, 两种B细胞会共用一种野生型 T_{FH} 细胞以及其他反应微环境。有趣的是, 这时Ephrin-B1缺失的B细胞反而更容易形成浆细胞。这个结果不支持逆信号决定浆细胞生成的假说; 同时, 单个 T_{FH} -GC细胞间在缺乏Ephrin-B1时缠绕现象加剧, 使B细胞能够获得更多接触依赖传递的辅助信号(比如CD40L), 因而可以解释这些细胞在形成浆细胞上更具优势^[17]。由此也可产生一个推论, 生发中心B细胞完全缺失Ephrin-B1时, 可能某种外源促浆细胞生成的因素被抑制了。换言之, Ephrin-B1可能促进某种促浆细胞的因子产生。

4 Ephrin-B1-EphB4信号调节 T_{FH} 细胞功能

IL-21(interleukin-21)在体液免疫反应中能够促进B细胞上调转录因子Prdm1(PR domain zinc finger protein 1, 又称为Blimp-1)、是促进B细胞向浆细胞分化的重要细胞因子, 它主要由 T_{FH} 细胞分泌^[18-20]。因此, 我们检验了Ephrin-B1是否通过Eph受体前向信号(forward signaling)促进 T_{FH} 细胞分泌IL-21。首先, 我们用Ephrin-B1 Fc对体外活化的CD4 T细胞进行刺激, 发现这种刺激的确特异性上调T细胞的IL-21表达。进一步比较B细胞特异Ephrin-B1缺陷型与野生型小鼠中 T_{FH} 细胞上IL-21的表达, 我们发现, 在Ephrin-B1缺陷的生发中心中, T_{FH} 细胞无法正常产生IL-21, 说明来自B细胞的Ephrin-B1信号的确是促进 T_{FH} 细胞局部产生IL-21的关键之一。接下来, 我们采取shRNA技术敲低或逆转录病毒过表达EphB4或EphB6, 并检测这些受体对 T_{FH} 细胞IL-21生成的影响。从流式细胞术与荧光定量PCR的分析结果发现, EphB4是 T_{FH} 细胞响应Ephrin-B1并产生IL-21的主要受体蛋白。

总结前述研究内容, 我们发现, Ephrin-B1在免疫系统中可以作为生发中心B细胞表面特异的标志性分子; 经由 T_{FH} 细胞上的EphB6受体传递信号, 它抑制T-B细胞间的黏附接触, 促使 T_{FH} 细胞离开生发中心, 从而控制 T_{FH} 不在生发中心过度聚集。与此同时, 由于所有生发中心B细胞都表达Ephrin-B1, T_{FH} 细胞只要在生发中心的区域里就会通过EphB4收到促进它们产生IL-21的信号。这样, 同一个Ephrin-B1分子完成了两个功能, 排斥控制 T_{FH} 细胞的定位与聚集, 但促进 T_{FH} 细胞在组织局部的辅助功能。这些结果第一次证明了调控淋巴细胞间互作的排斥性机制, 揭示了一个局域微环境通过膜表面配受体信号调控T细胞运动与功能的全新规定。理解这一规律可能会对将来抗体疫苗设计策略有所启发。

参考文献 (References)

- 1 Vinuesa CG, Linterman MA, Yu D, MacLennan IC. Follicular helper T cells. *Annu Rev Immunol* 2016; 34: 335-68.
- 2 Qi H. T follicular helper cells in space-time. *Nat Rev Immunol* 2016; 16(10): 612-25.
- 3 Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* 2011; 29: 621-63.
- 4 Haynes NM, Allen CD, Lesley R, Ansel KM, Killeen N, Cyster JG. Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal

- center-associated subpopulation. *J Immunol* 2007; 179(8): 5099-108.
- 5 Campbell DJ, Kim CH, Butcher EC. Separable effector T cell populations specialized for B cell help or tissue inflammation. *Nat Immunol* 2001; 2(9): 876-81.
- 6 Forster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* 1996; 87(6): 1037-47.
- 7 Xu H, Li X, Liu D, Li J, Zhang X, Chen X, *et al.* Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility. *Nature* 2013; 496(7446): 523-7.
- 8 Suan D, Nguyen A, Moran I, Bourne K, Hermes JR, Arshi M, *et al.* T follicular helper cells have distinct modes of migration and molecular signatures in naive and memory immune responses. *Immunity* 2015; 42(4): 704-18.
- 9 Moriyama S, Takahashi N, Green JA, Hori S, Kubo M, Cyster JG, *et al.* Sphingosine-1-phosphate receptor 2 is critical for follicular helper T cell retention in germinal centers. *J Exp Med* 2014; 211(7): 1297-305.
- 10 Qi H, Cannons JL, Klauschen F, Schwartzberg PL, Germain RN. SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature* 2008; 455(7214): 764-9.
- 11 Crotty S, Kersh EN, Cannons J, Schwartzberg PL, Ahmed R. SAP is required for generating long-term humoral immunity. *Nature* 2003; 421(6920): 282-7.
- 12 Pasquale EB. Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6(6): 462-75.
- 13 Poliakov A, Cotrina M, Wilkinson DG. Diverse roles of eph receptors and ephrins in the regulation of cell migration and tissue assembly. *Dev Cell* 2004; 7(4): 465-80.
- 14 Flanagan JG, Vanderhaeghen P. The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci* 1998; 21: 309-45.
- 15 Noberini R, Rubio de la Torre E, Pasquale EB. Profiling Eph receptor expression in cells and tissues: A targeted mass spectrometry approach. *Cell Adh Migr* 2012; 6(2): 102-12.
- 16 Crotty S. The 1-1-1 fallacy. *Immunol Rev* 2012; 247(1): 133-42.
- 17 Liu D, Xu H, Shih C, Wan Z, Ma X, Ma W, *et al.* T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction. *Nature* 2015; 517(7533): 214-8.
- 18 Kwon H, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Kim HP, Oh J, Tunyaplin C, *et al.* Analysis of interleukin-21-induced Prdm1 gene regulation reveals functional cooperation of STAT3 and IRF4 transcription factors. *Immunity* 2009; 31(6): 941-52.
- 19 Zotos D, Coquet JM, Zhang Y, Light A, D'Costa K, Kallies A, *et al.* IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J Exp Med* 2010; 207(2): 365-78.
- 20 Kuchen S, Robbins R, Sims GP, Sheng C, Phillips TM, Lipsky PE, *et al.* Essential role of IL-21 in B cell activation, expansion, and plasma cell generation during CD4⁺ T cell-B cell collaboration. *J Immunol* 2007; 179(2): 5886-96.