

• 综 述 •

NKT 细胞亚群研究进展及其在移植免疫中的作用

师煜博 综述, 黄建敏 审校

(广西医科大学第一附属医院, 广西南宁 530021)

关键词: NKT 细胞; CD1d; 移植免疫**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.06.022**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2016)06-0771-03

自然杀伤 T 细胞(NKT 细胞)是一类共表达 NK 细胞受体及恒定 T 细胞受体(TCR)的特殊细胞亚群^[1],既不同于 T、B 淋巴细胞,亦区别于自然杀伤(NK)细胞,该 TCR 与高度偏向的 Vs 链(主要为 V β 8.2)相关,由 V α 14 和 J α 281 基因节段所编码^[2]。TCRV α 24 片段通常和 V β 11 片段相结合,NKT 细胞活化后能迅速分泌大量白细胞介素 4(IL-4)等细胞因子促进 Th2 型应答,NKT 细胞可识别 CD1d 提呈的糖脂类抗原,且具 CD1d 识别限制的特殊性质^[3]。因此,NKT 细胞作为先天免疫性淋巴细胞,在移植免疫和机体免疫调节研究中发挥重要作用。本文对 NKT 细胞亚群在移植免疫研究做一综述。

1 NKT 细胞亚群分类

NKT 细胞为特殊的一类 T 淋巴细胞,属非均一高度保守的 T 细胞亚群,为 CD4⁺或 CD4⁻CD8⁻双阴性(DN)表型及部分 CD4⁻CD8⁺表型,表达 NK 细胞表面标记分子如:NK1.1/NKR-P1A(人类为 CD161)、白细胞介素 2 受体(IL-2R) β 链(CD122)、不完全恒定的 TCR、Ly-49 受体家族、CD3、CD5、CD161、Thy1,以及记忆/活化表型分子标记如:CD44^{high}、D69^{high}及 Ly6C^{high}。TCR 中分别编码鼠类非可变的重组 α -V α 14-J α 281 片段与人类同源性的为 V α 24 片段,及一定数目的 β -V β 8.2(小鼠主要为 V β 8,人类为 V β 11)^[4]。多数 NKT 细胞具有高度偏移性及保守 TCR 所有组成成分^[5],这群细胞常被称之为恒定 NKT 细胞(iNKT 细胞)^[6]。iNKT 细胞可通过调节达到维持有效的宿主防御,同时预防不可控的外界因素刺激与潜在的自身免疫性疾病^[7]。研究表明,iNKT 可有效激活一些免疫细胞,如树突状细胞(DC 细胞)、NK 细胞与 T 细胞。予以高亲和力的 CD1d 的配体 α -乳糖酰基鞘氨醇(α -GalCer),可致 iNKT 短暂的激活作用,之后,则出现长期无反应性却限制其治疗效应。虽然无法直接证实 iNKT 如传统的调节 T 细胞[CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T 细胞或分泌白细胞介素 10(IL-10)的 Tr1 细胞],可在体外实验中直接抑制 T 细胞,但在诱导的前房相关免疫偏离(ACAID)与在眼内注射抗原所致的外周耐受免疫模型中,仅 iNKT 可递呈抗原并引起免疫应答。实际上,CD1d 或 V α 14 NKT 细胞缺陷无法形成系统性耐受^[8],而 Kathrin 等^[9]的实验证明,当以 α -GalCer 载入可溶性 CD1d 重组体分子 α -GalCer/sCD1d 中,并反复予以 α -GalCer/sCD1d,成熟小鼠可通过分泌干扰素 γ (IFN- γ)激活 DC 细胞,同时亦可持久性激活 iNKT 和 NK 细胞,其激活作用是一致的。

2 NKT 细胞发育和分化

Lehuen 等^[10]的研究表明,NKT 细胞在胸腺内外发育。胸腺内,其发育过程与 T 细胞极为相似,在 CD4⁺CD8⁺双阳性(DP)选择阶段中,NKT 细胞从 T 细胞系分化发育的主流过程中分化出来^[10],富集 V α 14 和 V β 8TCR。CD11b⁻DC 参与

NKT 细胞在胸腺和胸腺外器官中的 DP 表型形成过程。NKT 细胞源自胸腺细胞的组成部分,随机产生活性 CD1d 的 TCR,经典 TCR 由 V α 14-J α 18 与 V β 8.2、V β 7 或 V β 2 所组成。当上述细胞与其他胸腺细胞(该细胞型在胸腺内细胞选择中起重要作用)所表达的 CD1d 分子接触后,将分化为 NKT 细胞系^[11]。在选择 NKT 细胞时,可明确与其他 T 细胞类型相区别,因其表达 NK 细胞的受体,为活化/记忆表型,及具有与 TCR 信号接触后迅速释放高水平细胞因子的能力^[2]。NKT 细胞个体差异较大,当机体中其数量较少则导致多种免疫缺陷疾病。据 NKT 细胞发育是否依赖 CD1d,将其分为 CD1d 依赖性和 CD1d 非依赖性 NKT 细胞。大多数 CD4⁺NKT 细胞和 CD4⁻CD8⁻NKT 细胞发育均依赖 CD1d,而 CD8⁺NKT 细胞属 CD1d 非依赖性的。

3 NKT 细胞生物学活性特点及其活化

NKT 细胞识别抗原的显著特征为 CD1d 限制性。NKT 细胞的抗原识别与常规的 T 细胞和 NK 细胞不同,传统的 CD8⁺T 细胞识别由经典的 I 类主要组织相容性复合物(MHC-I)提呈的肽类抗原,NK 细胞主要识别自身细胞表面缺少或改变的 MHC-I 抗原的细胞,NKT 细胞识别与 MHC-I 类似的由 CD1d 分子提呈的特异糖脂类抗原^[12]。研究发现 CD1d 基因缺陷可抑制小鼠 V α 14 NKT 细胞的发育,在阳性选择中,CD1d 分子在表达 V α 14 的不成熟 NKT 细胞生长发育起重要作用。V α 14y/ β 8.2 转基因受体表达地重组活化基因-1 缺陷小鼠(该基因缺陷小鼠体内虽其他淋巴细胞数量有不同程度缺失),可使 V α 14 NKT 发育。各研究表明,V α 14y/ β 8.2 并非常规 T 细胞的受体而是 NKT 细胞抗原受体。在啮齿类动物体内,可由非经典的 MHC-I 类分子 CD1d 分子递呈糖脂类抗原如: α -GalCer 及糖基磷脂酰肌醇-锚蛋白。现已明确一些内源性和外源性糖脂可激活 NKT 细胞^[13]。 α -GalCer 是一种人工合成的糖脂抗原,NKT 细胞可识别细胞类脂质或纯化磷脂且与 α -GalCer 相区别。初期研究仅发现 NKT 细胞识别由 CD1d 分子提呈的 α -GalCer。该分子中半乳糖和鞘氨醇上的羟基为 NKT 细胞 TCR 特异性识别部位,可激活 NKT 细胞,但 α -GalCer 并不激活其他淋巴细胞。研究发现 NKT 不仅在自身免疫性疾病起调控作用,且通过大量生产 IL-4 与 IFN- 等细胞因子,在 Th1 或 Th2 类型转变中扮演重要角色^[14]。 α -carba-GalCer 可促进其产生 Th1 型的细胞因子^[15]。NKT 细胞既产生 Th1 细胞分泌的细胞因子 IL-2 和 IFN- γ ,Th2 细胞分泌的 IL-4 和 IL-10,同时产生 CD8⁺T 细胞分泌的如穿孔素、颗粒酶等细胞因子以诱导细胞凋亡^[16]。V α 14 NKT 细胞另一作用是参与白细胞介素 12(IL-12)介导的肿瘤杀伤效应^[17]。NKT 细胞在多种免疫反应过程中起调节作用,NKT 细胞的主要免疫

激活功能依赖 α -GalCer 的刺激,仅少数研究报道 α -GalCer 的刺激为免疫抑制效应。NKT 细胞易利用同源糖脂类抗原进行免疫调节,如海洋源性的海绵鞘糖脂 α -GalCer。该特性可用于癌症防治、感染或自身免疫性疾病的干预^[4]。

4 NKT 细胞在移植中的作用

4.1 NKT 细胞与 ACAID 及免疫耐受关系 Koh-Hei 等^[18]研究显示,CD1d 介导的 NKT 细胞免疫调节是诱导 ACAID 系统性耐受的必需条件。角膜移植是最早、最成功的实体组织移植。角膜为免疫特惠组织可避免免疫排斥反应所造成的破坏,故角膜移植有较高存活率。虽角膜植入免疫特惠区,但该区分非是被动免疫而是一动态环境,并非所有人类或动物的原位角膜移植植物植入后均可形成免疫特惠区^[19]。免疫排斥仍为临床中的难题,约 10% 患者因角膜移植植物失功导致失明。ACAID 的特征:同种异体组织植入眼前房后,表现为特异性同基因系统的迟发型超敏反应(DTH)的抑制和免疫球蛋白结合补体的能力丧失。ACAID 形成外周耐受的机理为:骨髓来源的抗原呈递细胞俘获前房中的抗原后,将信号通过血液传递到脾,诱导脾中产生抗原特异性的 Tr 细胞,抑制 DTH 发生,维持前房免疫特惠区的活化。长期角膜移植术后,受体下调针对供体异体基因的 DTH,提示产生 ACAID 表现为 DTH 丧失。相反,若受体行角膜移植手术后,发展至 DTH 则将排斥角膜移植植物。因前房之前壁行原位角膜移植后,移植植物上皮细胞表达组织相容性抗原时,免疫特惠区诱导发生 ACAID,提示当发生 ACAID 时,可诱导受者脾源性的抗原特异性 Tr 细胞,延长远期的移植植物存活。CD1d 限制性 CD4⁺ V α 14⁺ 和 DN NKT 细胞可诱导 Tr 细胞形成^[20]。目前报道 NKT 细胞在 ACAID 的抗原特异性 Tr 细胞发育中处于中心地位。V α 14-J α 281 片段主要表达于鼠类的 NKT 细胞亚群表面,非其他常规的 T 细胞。Koh-Hei 等^[18]研究还发现,缺乏 NKT 细胞的小鼠前房接种抗原后,不能诱导 ACAID 和 Tr 细胞产生,若重新输入 NKT 细胞,则表现为 ACAID 恢复,且发生 ACAID 的小鼠脾中 NKT 细胞明显增多。但缺乏 NK 细胞的小鼠前房接种抗原后表现出正常的 ACAID,表明 NKT 细胞而非 NK 细胞在 ACAID 的形成中发挥重要作用。研究表明,CD1d 基因敲除小鼠的体内可检测到 NKT 选择性缺失的现象,表明在诱导免疫耐受时,NKT 细胞需与 CD1d 分子相互作用。无论在体内或体外实验中,经封闭 CD1d 抗体处理后,均可导致抗原特异性调节 NKT 细胞发育受阻。

4.2 NKT 细胞在同种异体移植中的作用 移植器官系统中,NKT 细胞发挥较为重要的作用。Oh 等^[21]在 NKT 细胞缺乏的 B6CD1d^{-/-}小鼠模型中,行同种异体皮肤移植,H-Y 不匹配的皮肤移植植物较早被排斥,移植植物的存活时间明显短于野生型 B6 小鼠,但过继输注同系基因型小鼠的肝或脾 NKT 细胞后,移植植物存活时间近似野生型 B6 小鼠。该模型中,CD1d 依赖性的 NKT 细胞的直接作用为增多 CD1d 表达,以达到所需的对抗免疫排斥的调节能力;移植前后予以野生型 B6 小鼠 α -GalCer 处理,实验组中移植植物存活时间较对照组(未予以 α -GalCer 处理)有所延长,但 α -GalCer 对 B6CD1d^{-/-}小鼠受体的移植植物存活时间近似无效应。故 NKT 细胞因抗原性强度差别而产生不同的调节能力。以过继输注或 NKT 细胞过表达的处理可改善非肥胖糖尿病小鼠的糖尿病症状。此外,Werner 等^[22]的相关研究表明,加以抗 CD4 单克隆抗体处理后,可达到诱导异基因胰岛细胞移植的特异性的抗原耐受;而行异种胰岛移植后,以 NKT 细胞及 CD4 封闭抗体干预,可促

进异种胰岛移植物的植入和维持耐受状态;在 BN-LEW 的大鼠原位肝移植中,供者来源的 NKT 细胞可能通过分泌 IL-10 和肿瘤坏死因子 β (TGF- β),诱导 Th2 型免疫反应,从而介导移植肝耐受。心脏移植术后的小鼠体内,NKT 细胞可产生高水平的 IL-10,以过继输注实验亦证明该方法可维持耐受状态。抗 IL-10 单抗可缩短野生型 B6 小鼠受体移植物的存活时间,表明免疫耐受的形成与 NKT 细胞及其产生的 IL-10 促进 Th2 细胞分化,抑制 Th1 细胞增殖及应答相关。NKT、DC 和 CD4⁺ T 细胞之间免疫调节的相互作用具有 IL-10 依赖性,甚至在缺乏人工合成糖脂等外界人为刺激时,对于维持耐受状态都是不可或缺。NKT 细胞在移植免疫中通过分泌 Th2 型细胞因子以及对 DC 细胞的细胞毒作用,抑制移植植物抗宿主反应的发生,以及降低免疫排斥反应^[23]。然而,NKT 细胞的免疫抑制功能目前尚未明确。以小鼠心脏移植模型研究 V α 14 NKT 细胞在异基因免疫排斥中的作用,发现 V α 14 NKT 细胞在诱导心脏移植耐受中起重要作用,即阻断淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1/ICAM-1)或 CD28/B7 等一些 T 细胞共刺激通路间的相互作用^[24]。该研究可解释 V α 14 NKT 细胞诱导免疫耐受的特定机制。Shinichiro 等^[25]通过重复使用 α -GalCer 刺激后的外周血单核细胞治疗非小细胞肺癌患者,取得了一定的临床效果。

5 小结

综上所述,NKT 细胞作为一类新发现的免疫细胞,在机体免疫反应中起重要作用。临床研究发现 NKT 细胞参与了对部分疾病的调节作用,尤其是参与器官移植的抗排斥反应调节,通过 CD1d 介导的 NKT 细胞诱导抗原特异性免疫耐,若明确其机制之后予以特异靶向性药物治疗,将可延长移植器官存活时间。这为基础研究及临床治疗提供了广阔的前景。

参考文献

- [1] Berzins SP, Smyth MJ, Baxter AG. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease[J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(1): 131-142.
- [2] Ken-ichiro Seino, Katashi Fukao. Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 27(5): 2577-2581.
- [3] Singh S, Nehete PN. Enhancement of Mucosal Immunogenicity of viral vectored vaccines by the NKT cell agonist alpha-galactosylceramide as adjuvant[J]. Vaccines (Basel), 2014, 2(4): 686-706.
- [4] Wu L, van Kaer L. Natural killer T cells in health and disease[J]. Front Biosci (Schol Ed), 2011, 1(3): 236-251.
- [5] Oh K, Kim S, Park SH, et al. Direct regulatory role of NKT cells in allogeneic graft survival is dependent on the quantitative strength of antigenicity[J]. J Immunol, 2005, 15(4): 2030-2036.
- [6] Di Pietro C, Falcone M. The role of invariant NKT cells in organ-specific autoimmunity[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2014, 19: 1240-1250.
- [7] Anna N, Paola P, Lucie B, et al. Functional education of invariant NKT cells by dendritic cell tuning of SHP-1[J]. J Immunol, 2013, 190(7): 3299-3308.
- [8] Gutowska-Owsiak D, Birchall MA. Proliferatory defect of invariant population and accumulation of non-invariant CD1d-restricted natural killer T cells in the joints of RA patients[J]. Mod Rheumatol, 2014, 24(3): 434-442.
- [9] Kathrin S, Romero JF, Lucia B, et al. Sustained activation and tumor targeting of NKT cells using a CD1d-anti-HER2-scFv fu-

- sion protein induce antitumor effects in mice[J]. J Clin Invest, 2008, 118(3):994-1005.
- [10] Lehuen A, Diana J. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes[J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10(7):501-513.
- [11] Tetsuzo T, Licun W, Masaki A, et al. Antitumor impact of interferon- γ producing CD1d-restricted NKT cells in murine malignant mesothelioma[J]. J Immunother, 2013, 36(8):391-399.
- [12] Hongo D, Tang X, Baker J, et al. Requirement for interactions of natural killer T cells and myeloid-derived suppressor cells for transplantation tolerance[J]. Am J Transplant, 2014, 14(11):2467-2477.
- [13] Venkataswamy MM, Porcelli SA. Lipid and glycolipid antigens of CD1d-restricted natural killer T cells[J]. Semin Immunol, 2010, 22(2):68-78.
- [14] Kumar SA, Poonam G, Das SN, et al. Natural killer T cell anergy, co-stimulatory molecules and immunotherapeutic interventions[J]. Hum Immunol, 2014, 75(3):250-260.
- [15] Tashiro T, Sekine-Kondo E. Induction of Th1-biased cytokine production by α -carba-GalCer, a neoglycolipid ligand for NKT cells[J]. Int Immunol, 2010, 22(4):319-328.
- [16] Mattarollo SR, Rahimpour A. Invariant NKT cells in hyperplastic skin induce a local immune suppressive environment by IFN- γ production[J]. J Immunol, 2010, 184(3):1242-1250.
- [17] Vivier E, Ugolini S. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer[J]. Nat Rev Immunol, 2012, 12(4):239-252.
- [18] Koh-Hei S, Masaru T, Joan SS, et al. Long-term survival of corneal allografts is dependent on intact CD1d-reactive NKT cells[J]. J Immunol, 2002, 168(4):2028-2034.
- [19] Stein-Streilein J. A privileged view of NKT cells and peripheral tolerance through the eye[J]. Ocul Immunol Inflamm, 2005, 13(2):111-117.
- [20] Niederkorn JY. Role of NKT cells in anterior chamber-associated immune deviation[J]. Expert Rev Clin Immunol, 2009, 5(2):137-144.
- [21] Oh K, Kim S, Park S-H, et al. Direct regulatory role of NKT cells in allogeneic graft survival is dependent on the quantitative strength of antigenicity[J]. J Immunol, 2005, 17(4):2030-2036.
- [22] Werner JM, Lang C. Distribution of intrahepatic T, NK and CD3(+)CD56(+)NKT cells alters after liver transplantation: Shift from innate to adaptive immunity[J]. Transpl Immunol, 2011, 25(1):27-33.
- [23] Zhou MH, Wang CM, Gong CP, et al. Detection of NK and NKT cells in peripheral blood of patients with cGVHD and its significance[J]. J Exper Hem, 2012, 20(5):1167-1170.
- [24] Godfrey DI, Mc-Conville MJ. Chewing the fat on natural killer T cell development[J]. J Exp Med, 2006, 203(10):2229-2232.
- [25] Shinichiro M, Kaoru N, Naoki K, et al. A phase I-II study of α -galactosylceramide-pulsed IL-2/GM-CSF-cultured peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer[J]. J Immunol, 2009, 182(4):2492-2501.

(收稿日期:2015-11-26)

• 综 述 •

降钙素原的检测在临床医学中的应用价值

张东梅¹, 李晓菲²综述, 刘贵明^{2△}审核

(1. 昆明医科大学药学院, 云南昆明 650500; 2. 昆明市第三人民医院, 云南昆明 650041)

关键词: 降钙素原; 感染; 临床应用

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.06.023

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)06-0773-03

感染性疾病是临床中的常见病症,而感染性疾病诊断的多数指标存在客观性、敏感性不高、耗时长等特点,不仅延误患者的治疗,且存在盲目使用抗感染药物带来的医疗资源浪费和细菌耐药性的发生,寻找灵敏、快速、高效的诊断指标对于感染性疾病的诊断具有重大的意义。1993年,Assicot等^[1]首次提出降钙素原可以作为判断细菌感染的标志物之后,降钙素原检测在临床感染性疾病诊治中的重要性不断体现出来,本文就降钙素原的检测在临床医学中的应用价值做一综述。

1 降钙素原的结构及生物来源

降钙素原是定位于11号染色体上由Calc-1基因编码^[2], 116个氨基酸组成,相对分子质量为 13×10^3 的糖蛋白,不具有激素活性,为降钙素的前体物质,在体内、外均稳定存在,血浆半衰期为25~30 h。在正常生理状况下,降钙素原由甲状腺C细胞、肺和肠的某些神经内分泌细胞分泌^[3],量极少(<0.05 ng/mL),几乎检测不到,但当感染发生时,不仅甲状腺C细胞,而且机体组织(肝、肾、肠、脂肪、肌肉等)的单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、内分泌细胞等都能合成和分泌降钙素原。细菌

脂多糖、白介素-1 β 、白介素-6、白介素-17、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等对降钙素原的生成有正向刺激作用,短期内可诱导产生大量的降钙素原。因此,机体出现炎症反应之后的3~4 h,血清降钙素原水平明显升高,6~24 h达到峰值^[4],其水平与感染的严重程度呈正相关。

2 降钙素原检测的临床应用价值

2.1 脓毒症 脓毒症是由感染引发的全身炎症反应综合征,其感染源包括细菌、真菌、病毒及寄生虫等,是临床危急重症患者的常见严重并发症,病死率较高,如果并发脓毒性休克,其病死率可达80%。研究证明降钙素原是诊断细菌性脓毒症的较好指标,不仅对脓毒症的预后有重要的指导意义,而且能够更好地反映脓毒症患者病情的严重程度^[5-7]。脓毒症及并发的多器官功能衰竭(MODS)是危重患者的又一重要死亡因素。Zurek等^[8]研究了62例多器官功能综合征合并脓毒症患儿血清降钙素原水平的变化,利用受试者工作特征(ROC)曲线分析结果显示降钙素原值为4.05 ng/mL可以更好地区分儿科logistic器官功能障碍(PELOD)评分小于12分和PELOD ≥ 12