

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2002 )04-0229-04

## 共刺激分子及其在特异性免疫应答中的调节

张学光, 古 涛( 苏州大学医学生物技术研究所免疫学教研室, 江苏 苏州 215007 )

\* 特异性免疫应答主要包括抗原递呈、免疫细胞相互作用、免疫效应 3 个阶段, 是一个由多种免疫细胞和分子( 膜分子和可溶性因子) 参与并受到严格调控及制约的复杂生理过程, 它涉及抗原递呈细胞( antigen presenting cells, APC ) 对抗原的特异性识别及记忆、APC 与 T 细胞等免疫细胞间相互作用及多种免疫分子构成有序的调控网络, 免疫效应分子和细胞发挥免疫效应。TCR 识别 APC 表达的 MHC-抗原复合物后, 获得第一信号即抗原特异性信号, 然而 T 细胞的活化必需获得它与 APC 表达的膜分子相互作用后产生的第二信号( 即共刺激信号)。若仅有第一信号, T 细胞将进入无反应状态或免疫耐受状态, 甚至进入程序性死亡。“共刺激信号( costimulatory signals ) 及共刺激分子( costimulatory molecules )” 是 1970 年由 Brestcher 和 Cohn 在 T 细胞激活双信号学说的基础上首先提出并证实的, 新的共刺激分子成员不断地被发现、克隆, 共刺激分子研究的日益深入, 极大地丰富了免疫学基础理论的研究。

### 1 共刺激分子的概述

T 细胞膜分子 CD28 是最早被证实也是迄今公认的最基本的共刺激分子, 其天然配基为 APC 表达的 B7 分子( CD80 和 CD86 )。一系列新的共刺激分子相继被发现, 根据其结构可分为 2 类: ( 1 ) TNF-TNFR 超家族, 包括 CD27-CD27L, CD30-CD30L, CD40-CD40L, OX40-OX40L, 4-1BB-41BBL, RANK-RANKL, Fas-FasL 等; ( 2 ) 免疫球蛋白超家族( immunoglobulin superfamily, IGSF ), 如 LAF1-ICAM-1/ICAM-2/ICAM-3, CD28-B7-1/B7-2, CTLA4-B7-1/B7-2, PD-1-PDL1/PDL2, ICOS-GL50 等。

共刺激分子及信号传递具有如下特点: ( 1 ) 这些分子均是以受体与配体相互作用的形式介导信号, 信号的传递往往是双向性的( 即受体和配体表达细胞均可同时接受到相应的信号和产生生物学效应), 受体和配体通常表达在不同的靶细胞上; ( 2 ) 其中一个呈持续性表达, 另一个为诱导性表达; ( 3 ) 在不同免疫应答阶段, 这些分子可能是以一定

的程序和各自独特而又相关的方式参与的, 在不同的免疫应答阶段, 这些分子既相互调节又相互协同; ( 4 ) 共刺激分子, 不论受体/配体, 均存在膜型和可溶性 2 种形式, 表达于细胞膜上和分泌于体液中, 均参与了共刺激信号的介导和调节; ( 5 ) 负性共刺激分子的参与使得共刺激信号在免疫应答中的作用更为复杂化。共刺激分子不单纯激发或增强正性免疫应答, 还介导下调或中止免疫应答, 如 CTLA-4-B7, CD95-CD95L 和 PD-1-PDL1/PDL2。

### 2 TNF/TNFR 超家族成员及其生物学特性

#### 2.1 CD40-CD40L 分子

人 CD40 基因定位于 20q11-20q13-2, cDNA 长度为 1.5 kb, CD40 分子是 I 型跨膜糖蛋白, 277 个 AA, 分子量为 48 kD, 有 2 个保守的糖基化位点( Asn153, Asn180 ), 氨基末端 193 个 AA 构成胞外段, 22 个 AA 组成跨膜段, 62 个 AA 组成胞浆段。小鼠 CD40 分子, 由 305 个 AA 组成, 人和鼠 CD40 的 AA 同源性为 62%, 胞内段同源性为 78%, 羧基末端的 32 个 AA 完全保守; 胞外段含有特殊的 22 个半胱 AA 残基, 形成 4 个蛋白结构域。人 CD40L 基因于 1992 年克隆, 基因定位于 Xq26. 3-Xq27. 1 区段, 长度约 12 ~ 13 kb; CD40L 是一个 II 型跨膜糖蛋白, 261 个 AA, 分子量约 39 kD, 目前发现有 31 kD 和 18 kD 2 种可溶性的 CD40L 分子的存在; 小鼠 CD40L 分子由 260 个 AA 组成, 其中 22 个 AA 构成胞内段, 24 个 AA 组成跨膜段, 214 个 AA 构成胞外段( 含 4 个半胱 AA )。X 线晶体衍射显示人 CD40L 胞外段 Gly116-Leu261 构成 TNF 样结构域, 三维结构与 TNF- $\alpha$  和 LT $\alpha$  胞外段结构类似。

CD40-CD40L 分子在特异性免疫应答中居于重要地位, 其主要功能包括: ( 1 ) CD40 分子的激活在

\* [ 基金项目 ] 国家重点基础研究发展规划( 973 计划 ) ( 2001CB51003 ) 资助

[ 作者简介 ] 张学光( 1951- ), 男, 江苏省无锡市, 教授、博士生导师, 主要从事免疫学研究。E-mail: smbvuegz@public1.sz.js.cn

B细胞的自然发育、分化、增殖、成熟的多个环节发挥重要作用,并在细胞因子(如IL-4,IL-10等)协同作用下,参与Ig的分泌及类型转换,阻止生发中心的B细胞经B细胞抗原受体介导而进入凋亡,是重要的B细胞抗凋亡分子,另外,CD40配基化不仅可以促进抗原特异性B细胞增殖,而且可以通过上调B细胞表面Fas抗原的表达,增加B细胞对Fas诱导的敏感性,传递促进凋亡的信号,从而有助于B细胞的克隆丢失。可见,CD40-CD40L在调控B细胞生长中具有双重作用,在B细胞分化发育的不同阶段,伴随细胞调节蛋白的种类和数量的差异,可以导致截然不同的效应。(2)促进T细胞的激发、定向分化。CD40配基化可以促进APC细胞产生IL-8,TNF- $\alpha$ ,MIP-1 $\alpha$ 和IL-12,IFN- $\gamma$ 等多种细胞因子,致使活化的CD4<sup>+</sup>T细胞向Th1亚型定向分化。CD40L基因缺失小鼠研究提示CD8<sup>+</sup>T细胞的极化可能不依赖于CD40L介导的信号,但由于记忆性CD8<sup>+</sup>CTL的形成必须CD4<sup>+</sup>T细胞的辅助,所以该小鼠中记忆性CD8<sup>+</sup>CTL反应缺陷。但也有研究显示:CD40分子激发后的DC可以不需CD4<sup>+</sup>Th细胞的辅助,直接活化CD8<sup>+</sup>CTL,但确切的机制尚未阐明。(3)参与APC的分化及功能的调节。CD40的配基化可导致单核细胞和DC生存能力增强;分泌IL-1,IL-6,IL-8,IL-10,IL-12,TNF- $\alpha$ ,MIP-1 $\alpha$ 和MMP等;增强单核细胞的杀瘤活性;NO的合成等。CD40的配基化可上调APC细胞共刺激分子的表达,是DC发育成熟的关键信号之一,CD40-CD40L的相互作用以及信号流动可能是双向的,CD4<sup>+</sup>T细胞与APC表面CD40L-CD40的相互作用对T细胞和APC细胞的功能均产生重要影响。

## 2.2 OX40-OX40L分子

鼠和人OX40分别于1989年和1994年克隆。人OX40(CD134)为I型跨膜糖蛋白,属TNFR家族,48~50kD,cDNA长1.4kb,与其它TNFR家族成员CD30,4-1BB,TNRF-II和DR3成簇排列于1P36。OX40广泛表达于ConA和PHA激活的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞,炎症部位的CD4<sup>+</sup>T细胞、成人T细胞白血病(ATL)细胞和人HTLV-1病毒感染的建株T细胞HuT102和MT-2,DC和上皮细胞上也有表达。人OX40L(CD134L)基因于1991年克隆,长约1kb,与FasL联合,位于1q25。OX40L蛋白含183个AA,分子量约34~40kD,属TNF家族,II型跨膜糖蛋白。人和大鼠的cDNA和AA序列的同源性分别为68%和46%。人OX40L主要表达于成熟DC、活化的B细胞、血管内皮细胞、脐带静脉

血管内皮细胞、巨噬细胞以及某些组织器官包括心、骨骼肌、睾丸和肺。

T细胞的CD40L与APC的CD40相互作用上调APC的OX40L表达,进而调节OX40-OX40L的相互作用。其主要功能包括:(1)OX40-OX40L信号促进DC的在成熟分化,CD40配基化上调未成熟DC OX40L的表达,OX40L组成性表达在成熟DC,促进IL-12合成增多,上调CD83,OX40L也许可作为DC成熟的标志。(2)OX40-OX40L信号扩大T细胞功能,促进Th极化:OX40-OX40L可调控T细胞致敏,增强T细胞与DC的相互活化和分化。在B7-CD28协同作用下,OX40-OX40L多方面作用于记忆性和效应性T细胞。Flynn实验均证实T细胞活化2d后表达OX40,与IgG类别转换和IL-4,INF- $\gamma$ 表达一致,提示OX40-OX40L在协调T,B细胞间反应中发挥重要作用。(3)OX40-OX40L信号促进生发中心形成。在淋巴结的T细胞区,CD28和OX40激发导致CD4<sup>+</sup>T细胞在识别DC递呈的抗原后迅速扩增,同时上调表达CXCR5和IL-4,促使T细胞区的活化CD4<sup>+</sup>T细胞移行到B滤泡中促进生发中心(germinal center,GC)的形成。APC特别是DC上OX40L可促进CD4<sup>+</sup>T细胞在B淋巴滤泡的聚集,CD28和OX40的协同效应是选择高亲和力CD4<sup>+</sup>T细胞并促进它们移行到B滤泡的动力。高亲和力的CD4<sup>+</sup>T细胞可活化更多样化的B细胞GC前体库。而OX40基因缺陷小鼠中GC形成下降。(4)OX40-OX40L信号促进细胞黏附。OX40-OX40L不仅介导了细胞间的物理黏附,而且还可以通过活化许多黏附分子,促进细胞黏附。OX40配基化主要活化 $\alpha 4\beta 1$ 整合素,推测还与CXCR5有关,但具体机制仍在探讨中。

## 2.3 4-1BB/4-1BBL分子

小鼠4-1BB基因于1988年克隆,人的4-1BB(CD137)又名淋巴细胞激活诱导的受体(receptor induced by lymphocyte activation,ILA),基因定位于1p36,属于TNFR家族,与小鼠cDNA有60%的同源性,为I型跨膜蛋白。4-1BB蛋白分子有膜结合型和可溶性2种形式,分别由2.8kb和1.4kb mRNA编码。小鼠和人4-1BBL基因分别于1993年和1994年克隆。人4-1BBL基因定位于19p13,4-1BBL由255个AA组成,约为27kD,是II型跨膜糖蛋白,有膜结合型和可溶性2种形式,后者是由185个AA组成的胞外段,2种形式均具生物学活性。人与鼠的4-1BBL在蛋白质水平有36%的同源性。

4-1BB/4-1BBL在体内均以同源三聚体形式存

在并发挥生物学功能。其主要功能如下:(1)参与 T 细胞介导的抗肿瘤免疫应答。当 T 细胞表面的 CD28 分子受过度刺激而表达下调, T 细胞对活化信号的反应下降, 易于发生 AICD, 而 4-1BBL 信号能协同 CD28 作用, 抑制 AICD 的发生。4-1BBL 也可不依赖于 CD28 而发挥对 T 细胞的活化作用, CD28 缺陷型小鼠初次免疫应答时 T 细胞反应受到损害, 而 4-1BBL 缺陷型小鼠 T 细胞反应的初期没有影响, 而在 T 细胞初次反应的后期及 2 次免疫应答时数量及功能有明显地下降, 尤其是 CD8<sup>+</sup> T 细胞。提示 4-1BBL 信号主要在初次免疫应答的后期, 维持 T 细胞的生存及免疫记忆应答中起重要作用。(2)参与 NK 细胞介导的抗肿瘤免疫应答: 活化的 NK 细胞表达一系列 TNF 家族配体, 包括 TNF, LT- $\alpha$ , LT- $\beta$ , FasL, CD27L, CD30L, OX40L, 4-1BBL 和 TRAIL。不成熟的 NK 细胞大多数 TNF 家族配体表达量很低, 单个 TNF 家族成员分子不足以引起同型聚集和该配体相应受体的三聚化, 但是由相应不同配体引起不同受体的多聚化和交联仍然是可能的, 由于 TNF 家族受体具有共同的信号传导通路, 所以可以通过 TNF 家族配体诱导表面表达相应受体的肿瘤靶细胞凋亡, 产生强大的凋亡信号从而杀伤肿瘤细胞。(3)4-1BBL 参与 APC 介导的肿瘤免疫应答。4-1BBL 信号能诱导 DC 与巨噬细胞的扩增, 促进细胞因子的分泌并增强其功能; 另外, 4-1BBL 信号是单核细胞生存所必需的。

### 3 免疫球蛋白超家族成员及其生物学特性

#### 3.1 B7-CD28/CTLA-4 分子

B7-1( CD80 )分子于 1982 年克隆, 1987 年发现它的第一个配体, 即 CD28 分子。1993 年 B7 家族的第二个成员 B7-2( CD86 )克隆。B7-1 和 B7-2 同属于 IGSF 成员, 有 2 个 Ig 样胞外区, 跨膜区和胞内区; 二者 AA 序列 25% 相同, 而胞内区的同源性仅为 6%, 提示 B7-1 和 B7-2 具有不同的生物学功能。在 APC 激活的不同时间, 有不同的 B7 分子与 T 细胞相互作用而产生共刺激信号。B7-2 的表达早于 B7-1, 故认为在 T 细胞激活的早期, 主要由 B7-2 提供 T 细胞活化所需的共刺激信号; 而 B7-1 则在后续的 T 细胞克隆性增殖中起作用。

CD28 基因 mRNA 全长为 663 bp, 编码 220 个 AA 的长开放读码框架, 具有典型的整合素膜蛋白结构, 成熟的 CD28 是由 202 个 AA 组成, 通过链间二硫键连接成同源二聚体, 为 I 型跨膜糖蛋白; CTLA-4 与 CD28 在基因结构、表达和序列的同源性方

面均很相似, 人 CD28 和 CTLA-4 基因定位于 1q33, 二者有相似的外显子和内含子结构, AA 的同源性为 31%, 定点突变分析表明, 其 CDR3 区含有一个高度保守的“MYPPPY”结构, 此是配体分子( B7-1/B7-2 )识别的关键序列。这种特殊的线形排列序列, 只存在于不同种属的 CD28 和 CTLA-4 中, 另外 CDR1 和 CDR2 中的非保守性氨基酸, 决定了 CTLA-4 与 B7 结合的亲和力比 CD28 与 B7 的结合力高 20 ~ 50 倍。

B7-CD28 信号对初次免疫应答的诱导是必需的, 修饰、补充 TCR 信号, 将多种信号整合后启动并调控免疫应答。其主要功能包括:(1)CD28 信号主要诱导 CTLA-4 的表达; OX40 的表达, 促使 Th2 细胞极化, 并介导 Th2 细胞迁移至 B 细胞滤泡, 促使生发中心的形成, 增强机体的体液免疫应答; 促进 4-1BB 的表达, 4-1BB 和 CD28 信号的协同作用可影响 Th 细胞的极化方向, CD28 协同 4-1BB 可促使 Th 细胞产生 IFN- $\gamma$ , 从而极化为 Th1 型细胞, 通过相互调节和制约, 共同调控免疫的平衡和稳定。(2)CD28 信号介导 T 细胞分泌淋巴因子, 其中 IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  等与 T<sub>DTH</sub>, CTL 的增殖、分化和成熟有关, 从而促进细胞免疫应答; 而 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 和 IL-13 等, 对 B 细胞的增殖、成熟和抗体的生成有促进作用, 可增强体液免疫应答。同时 IFN- $\gamma$  和 IL-10 又可分别抑制 Th2 型和 Th1 型的应答, 正是由于这种既有增强效应又有抑制作用之间的相互调节和抑制, 才能保证特异、适度的免疫应答。

#### 3.2 PD-1-PD-L1/PD-L2 分子

PD-1 是通过削减杂交技术从小鼠处于凋亡状态的杂交瘤及造血祖细胞系克隆, 被认为与细胞凋亡相关而命名为程序性死亡-1( programmed death-1 ), 分子量为 55 kD, 最显著的特征是胞浆区的尾部含有 2 个酪氨酸残基, 其中 N 末端的酪氨酸残基与其它 AA 残基共同组成了一个免疫受体酪氨酸抑制基序( immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs, ITIM ), 在免疫反应的负调控方面发挥重要作用。PD-1 分子在小鼠的 T, B 细胞抗原受体激发后诱导性表达, 在部分的 CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>胸腺细胞持续性表达, 当向双阳性分化过程中 PD-1 分子表达先升高而后降低, 而 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>细胞中几乎无 PD-1 的表达。这表明 PD-1 可能通过参与胸腺 T 细胞的发育而影响成熟的 T 细胞库。

PD-L1( B7-H1 )和 PD-L2( B7-DC )是 PD-1 的 2 个配体, 均定位于人染色体 9p24.2, 间隔 42 kb, 同属 B7 家族。与 PD-L2 相比, PD-L1 的胞浆区在人

鼠之间更为保守。PD-L1 和 PD-L2 的 mRNA 在外周血单核细胞和 B 细胞激活后迅速上调表达,不成熟及成熟的 DC 均有表达,而且 LPS 和 IFN- $\gamma$  激发后 DC 可显著地上调 PD-L1 mRNA 的表达。PD-L1 在激活的 T、B 及单核细胞均有表达。另外,PD-L mRNA 在许多恶性肿瘤细胞系上表达,其蛋白水平上的表达已在部分的乳腺癌细胞系得到证实。PD-L 与 PD-1 相互作用可抑制效应性 T 细胞的功能,因此 PD-L 在肿瘤细胞上的表达与肿瘤的免疫逃避机制相关性,还有待于进一步研究。

最初的研究表明,低剂量的激发型抗 CD3 单抗与 PD-L1Ig 联合应用可刺激体外 T 细胞的增殖,刺激其产生 IL-10,并且是 IL-2 依赖的。但最新研究表明,PD-L1 与 PD-1 相互作用可抑制 T 细胞的增殖,同时抑制 IL-2, IFN- $\gamma$  和 IL-10。PD-L1 与 PD-1 对 T 细胞功能的影响依赖于 TCR 与 CD28 信号的强度,在亚适量 TCR 信号情况下,PD-L1 对 T 细胞增殖的抑制作用明显;而在最适量的 TCR 信号时,仅在缺乏 CD28 刺激的情况下,才对 T 细胞增殖发挥抑制作用。与 PD-L1 相似,PD-L2 与 PD-1 相互作用也可抑制 TCR 所介导的 T 细胞增殖和细胞因子 IL-4, IL-10 和 IFN- $\gamma$  的产生。在较低的抗原浓度下,PD-L2 与 PD-1 作用可抑制 TCR 及 B7-2 所介导的预激活的 CD4<sup>+</sup> T 细胞的增殖,并减少 Th1 和 Th2 型细胞因子的产生,而随着抗原浓度的升高,对增殖的抑制下降,但仍能抑制细胞因子的产生。进一步的研究证明,低浓度抗原可刺激最高水平的 PD-1 表达,而随着抗原浓度的升高,其表达下降。由此表明 PD-L-PD-1 的相互作用对弱的抗原刺激反应更敏感,而这类抗原主要产生于自身免疫性疾病和肿瘤的发生过程中。但另有研究认为,在亚适量的 TCR 信号下,PD-L2( B7-DC )可有力地刺激体外 T 细胞的增殖及细胞因子(主要是 IFN- $\gamma$ )的产生。PD-L 对 T 细胞的刺激或抑制效应的机制仍有待于深入研究。

### 3.3 ICOS-GL50 分子

ICOS 与 CD28/CTLA4 高度同源和结构相似,在活化的 T 细胞上表达,命名为诱导性协同刺激分子( inducible costimulator, ICOS ),人 ICOS 基因也定位于 1q33。人和鼠的 ICOS 基因分别编码 199 和 200AA,人鼠的 ICOS 蛋白具有 71.7% 的同源性。ICOS 与 CD28/CTLA4 具有 30% ~ 40% 的序列相似性,然而 ICOS 缺乏保守的 MYPPPY 结构域,后者是 CD28/CTLA4 与 B7 分子结合所必需的。人和鼠

ICOS 的配体 GL50 是一种单链糖蛋白,分别由 309 和 322 个 AA 组成,但是缺乏 SQDXXXELY 结构域,后者是 B7 与 CD28/CTLA4 结合所必需的。

与 CD28 不同,ICOS 只表达在活化的 T 细胞上,CD4<sup>+</sup> T 细胞发生极化后,Th2 细胞表达量显著高于 Th1 细胞。其主要生物学功能如下:(1) ICOS-GL50 对细胞因子的影响。ICOS 通过诱导细胞因子的产生发挥调节 T 细胞的效应功能。CD4<sup>+</sup> T 细胞经 Anti-CD3 和 B7h-Ig 联合作用后,IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  水平显著上调,但对 IL-2 的产生没有影响。ICOS 基因敲除小鼠 IL-4, IL-5, IL-13 水平显著降低,ICOS<sup>-/-</sup> T 细胞产生 IL-4, IL-10 水平亦显著降低。(2) ICOS-GL50 对 Th1/Th2 反应的调节作用。应用 ICOS 融合蛋白能阻断体内的 Th2 反应;而应用 CD40 抗体能恢复 ICOS<sup>-/-</sup> 鼠正常的 Ig 类型转换,这提示 CD40-CD40L 在 T 细胞依赖性的 B 细胞反应中发挥重要作用,ICOS/GL50 可能通过上调 CD40L 产生对体液免疫的调节效应。ICOS/GL50 也参与 Th1 反应的调节,利用 ICOS 融合蛋白阻断 ICOS 信号转导能显著下调 IFN- $\gamma$  的产生;更有意义的是,ICOS 调控的 Th1 反应是 CD28 非依赖性的。在移植免疫排斥中,利用 CTLA-4-Ig 融合蛋白和 CD40L 抗体虽然能阻断急性排斥反应,但慢性排斥反应依旧发生,如果使用 ICOS 蛋白或特异性抗 ICOS 抗体能显著抑制移植物中 T 细胞的活化和细胞因子的产生,由此表明 ICOS 介导的 Th1 反应在移植物慢性排斥反应中起着不可忽视的作用。

共刺激分子可能在免疫应答的不同阶段介导免疫应答的启动、激发、扩大和增强作用以及效应介导,而且通过负性共刺激分子可精确地调节应答的程度和持续的时间。但如此多的共刺激分子在免疫应答中的共刺激作用是相互交叉叠加,还是在不同阶段各自发挥作用? 它必将涉及到这些共刺激分子和信号的整体作用,它们之间如何相互作用、调节或制约以达到整体效应? 还需建立新方法或新技术,系统、动态地分析,才能系统而全面地理解共刺激分子在机体特异性免疫应答中的确切作用及其机制,寻找正确、适度地调控与共刺激分子相关疾病的如自身免疫性疾病、移植排斥和肿瘤等治疗的新途径。

[关键词] 共刺激分子; 共刺激信号; 特异性免疫应答  
[中图分类号] R392.12 [文献标识码] C

[收稿日期] 2002-11-01