

[文章编号] 1007-385X(2006)05-0321-04

天然免疫识别与外周免疫耐受

Innate recognition and peripheral immune tolerance

田志刚, 孙 洵 (中国科技大学免疫学研究所, 合肥 230027; 山东大学免疫药理与免疫治疗研究所, 济南 250012)



[作者简介] 田志刚, 博士, 山东莱州人。中国科技大学生命科学院教授、副院长、免疫学研究所所长; 兼任山东大学“生物技术(医药)创新学术团队”首席科学家、免疫药理与免疫治疗研究所所长。1983年获山西医科大学学士学位、1985年获山东省医科院硕士学位、1989年白求恩医科大学获博士学位。1989-2001年曾任山东省医科院基础医学所研究员、所长, 山东肿瘤生物治疗研究中心主任; 1994年至今先后多次在美国国立卫生研究院进行天然免疫学研究; 2002-2003年在日本金泽大学国立癌症研究所任访问教授。2001年获得国家杰出青年科学基金和中科院“百人计划”资助, 近5年共主持(完成)国家“973”、“863”、基金委重点项目、知识创新工程项目等多个科研项目, 在 *PNAS*, *Hepatology*, *Cancer Res*, *J Immunology* 等刊物发表第一/通讯作者论文 40 余篇。E-mail: ustetgz@yahoo.com.cn

免疫应答强度的调节是决定机体可否有效控制致病因素(病毒、细菌、肿瘤等)而又不引起机体自身性损伤(如器官排异、自身免疫病等)的关键, 其中负性调节(或外周免疫耐受)是免疫调节的核心。近年的研究证明, 负调节性免疫细胞的各群体综合性地控制这一关键过程, 其中调节性 T 细胞(T-reg)的研究占据目前研究的主流, 并同时与辅助性 T 细胞的各亚群(Th1、Th2、Th3)的研究形成相互关联又互有区别的两大领域。这些研究对抗感染免疫、抗癌免疫、自身免疫病和器官移植提出了许多新的观点, 并进而有可能诞生新的针对这些重大疾病的诊断与治疗技术。近3年来固有(天然)免疫细胞如 NK、DC、 $\gamma\delta$ T、NKT 的某些亚群及其 Toll 样受体家族形成的天然免疫调节网络对免疫应答的调节作用引起学术界极大关注, 但固有(天然)免疫细胞的负性调节作用及其意义仍处于待开发状态, 尤其是随着 NK 细胞表型(尤其是 NK 细胞识别受体)和功能的深入研究, NK 细胞的免疫负调节作用愈来愈引起人们的重视, 有着重要的研究价值。

1 天然免疫的“泛特异性”识别受体及其生物学意义

天然免疫系统是生物体固有存在的对高危致病因子即时反应的“泛特异性”抵御外来侵袭的第一道防线。由于近年来天然免疫系统识别机制的逐渐揭秘, 人们得以开始认识天然免疫系统紧急应对高危致病因子的细胞与分子基础。在天然免疫系统识别机制中, 广泛存在于各种天然免疫效应细胞表面的两套受体系统尤为引人注目: (1) TOLL 样受体

(TLR)是一类生物进化中广泛保存的高度保守的 I 型跨膜受体, 已发现有 11 种(人类)或 13 种(小鼠), 其中大多数已寻找出对应的配基。这些配基主要为存在于细菌和病毒的“病原相关模式分子(pathogen-associated molecular patterns, PAMP)”, 每一个 TLR 识别的 PAMP 可以存在于某一大类的细菌或病毒中, 从而实现“泛特异性”识别。TLR 作为启动免疫应答或免疫耐受的关键分子以及连接固有免疫和适应性免疫的桥梁, 已引起极大关注^[1-5]。目前总体认为, TLR 是机体对外界环境的核心反应体系。(2)自然杀伤受体(NKR)从功能上分为抑制性受体和活化性受体, 从结构上分为 Lectin 样受体和 Ig 超家族样受体。尽管这些受体起初发现于自然杀伤(NK)细胞, 但现在证实广泛存在于各种天然免疫效应细胞。NKR 主要识别脊椎动物自身组织相容性复合体(MHC)或类似物。当致病因子侵袭时这些 MHC 分子或类似物发生结构或数目的变化, 进而启动具备这些 NK 受体的细胞对病原因子发起攻击, 实现另一类“泛特异性”免疫应答。NKR 识别模式的“missing self”学说认为, NK 细胞识别的细胞如丢失了 MHC 分子将引起 NK 细胞活化; “stress-inducible self”学说认为, NK 细胞识别的细胞如再现了正常情况不该出现的配基将引起 NK 细胞活化; “None self”学说认为, NK 细胞可直接识别病原生物某些模拟分子引起 NK 细胞活化或抑制。目前总体认为, NKR 是机体对内环境的核心反应体系, 当外界环境出现变化时, TLR 可引起内环境变化并进而触发 NKR。因此, NKR 亦同样作为启动免疫应答或

免疫耐受的关键分子以及连接固有免疫和适应性免疫的桥梁而引起极大关注^[6-12]。

2 天然免疫识别受体与重大疾病防治

随着 TLR 和 NKR 两类受体分子的发现,天然免疫系统在重大疾病防治中的意义将会重新认识,预测其热点领域应包括以下几个方面:(1)TLR 和 NKR 关系的研究。尽管 TLR 和 NKR 的生物学特性逐渐露出端倪,但贯穿几乎所有天然免疫细胞的这两套受体之间的关系尚无人研究。有关这两套受体在天然免疫细胞的分布特性,两类受体的共表达特性,两类受体的信号转导通路的分工与交叉,两类受体对相应细胞的终末生物学功能比较等均属空白领域。(2)TLR 和 NKR 在连接天然免疫和获得性免疫中的意义。已知天然免疫系统是获得性免疫应答的前提,获得性免疫反应则是在天然免疫应答基础上的进一步升华。尽管已有少数的证据提示存在某些连接这两套系统的细胞与分子,但确切的证据尚远远不足,其关键原因是天然免疫的识别机制尚不明。在 TLR 和 NKR 发现之后,一定会掀起以 TLR 和 NKR 为核心的研究,籍此将两套系统连接起来。(3)TLR 和 NKR 在重大疾病防治中的意义。已知机体对重大新型传染病(外环境急剧变化的例子)的突发和暴发传播主要依赖于天然免疫系统的有效控制,危重传染病的突发致死又往往起因于天然免疫应答过度反应,特异性免疫应答或记忆免疫反应(包括疫苗的功能)的形成则必须以适度的天然免疫应答为基础。目前 SARS、HBV、HIV 及结核等重大传染病严重威胁人类的健康,阐明 TLR 和 NKR 在这些重大传染性疾病中的作用并针对性寻求防治措施显得尤为重要。同样,已知肿瘤和自身免疫病(内环境持续变化的例子)主要依赖于病变处微环境的长期免疫失衡状态,该区域的特异性免疫应答或记忆免疫反应的形成也必须以适度的天然免疫应答为基础,天然免疫受体及其配基的失衡是一个主要原因。肿瘤、自身免疫病、移植排异等重大疾病长期威胁人类的健康,阐明 TLR 和 NKR 在这些疾病中的作用尤为重要。

3 调节性 NK 细胞与重大疾病的发生、发展

NK 细胞是机体三大类淋巴样细胞之一,过去人们较多研究和观察其杀瘤溶解功能。近年来人们发现 NK 细胞通过分泌细胞因子或细胞直接接触对机体的天然免疫和后天获得免疫进行调控是远远重

要于其杀伤特性的基本功能。由于这些假说的资料不多,历史较短,许多观点有待于验证。(1)我们注意到 NK 细胞在体内存在负相调节现象,曾于 1997 年以中文综述形式首先在提出“NK_{h1}/NK_{h2}”的假说^[13-14],以后国际同行和我们都开展了大量研究工作^[15-17]。我们在小鼠肿瘤模型、小鼠肝脏再生模型和临床哮喘病人中发现了 NK2 细胞或负调节 NK 细胞在重大疾病中意义^[18-20],同时也在人类结核病中首次观察到 NK 细胞对 $\gamma\delta$ T 细胞的调节作用需要细胞间的直接接触^[21],似乎类同于 Treg 细胞。(2)我们还初步观察到可通过 NK 细胞的 TLR 来调节 NKR 的表达并进而启动 NK 细胞的负相调节功能。应用小鼠肝炎模型,观察到足够剂量 TLR-3 的配基 (poly I:C) 可以有效活化小鼠肝脏的 NK 细胞,从而诱发由 NK 细胞介导的小鼠暴发性肝炎,这是继国际上第 3 个由固有免疫细胞介导的小鼠肝炎模型^[22]。有趣的是,发现低剂量 Poly I:C (此剂量不诱发肝脏损伤)对小鼠肝脏 NK 细胞的预活化,可以有效防止 Con A 诱发的、NKT 细胞介导的暴发性肝损伤^[23]。同时观察到低剂量 Poly I:C 可以通过 TLR-3 直接活化小鼠 Kupffer 细胞并引起该细胞的 TLR-4 表达的下调,使 Kupffer 细胞出现对 LPS 的耐受而预防由 LPS/甘露糖联合诱发的暴发性肝炎^[24],低剂量 Poly I:C 还可上调 NK 细胞的 NKG2D 杀伤肝脏星状细胞以预防肝纤维化^[25],或诱生 IL-15 并导致 NKT 细胞无法介导肝损伤^[26]。同时,发现 HBV 转基因鼠中肝脏再生受限和损伤后恢复迟缓与固有免疫状态失衡有关^[27-28],而且 NKG2D 多肽拮抗剂可缓解 T 细胞介导的肝损伤^[29]。这些现象提示 TLR/NKR 的天然免疫识别与固有免疫耐受有关。

在上述工作的基础上,我们认为(如图 1 所示):(1)NK 细胞可通过 TLR 直接感应环境变化(突发或慢性刺激)并由此出现 NKR 的变化,籍此对后续固有免疫或适应免疫进行正或负调节,从而参与或调控疾病过程;(2)其他免疫细胞可通过 TLR 直接感应环境变化(突发或慢性刺激)并由此出现 NKR 配基(如 Rea-1, H-60, Mult-1-6 等)的变化,NK 细胞可通过已有 NKR 对后续固有免疫或适应免疫进行正或负调节;(3)上述两机制同时进行。如果应用已有小鼠疾病模型,将可能进一步揭示 NKG2 受体家族和 TLR 受体家族的各受体之间相互作用及其固有免疫耐受机制,有利于解释:① TLRs 在诱发或活化负调节性 NK 细胞中的意义;②NK 细

胞负性调节固有或适应性免疫细胞时 NKG2 受体群的作用特点;③TLRs 和 NKG2 受体群之间相互调节及其分子机制;④NK 细胞 TLRs/NKG2 受体的调控及其免疫治疗学意义。因此,以 NK 细胞为载体将 TLRs/NKG2 连接起来,可以较好地反映机体内外环境变化或刺激时固有免疫对适应性免疫的负调节作用,为可能的“固有免疫耐受”机制提供理论依据,这是免疫耐受研究的急需解决的薄弱环节。

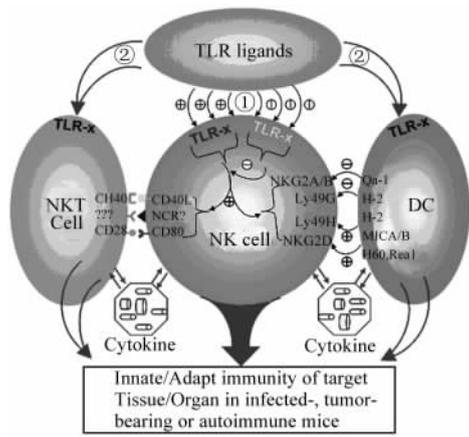


图1 NK 细胞固有免疫耐受机制的研究假设

[关键词] 天然免疫识别; NK 细胞; 免疫耐受

[中图分类号] R73 [文献标识码] C

[参考文献]

[1] Munz C, Steinman RM, Fujii S. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: Coordinated stimulation of innate and adaptive immunity[J]. J Exp Med, 2005, 202(2): 203-207.

[2] Liew FY, Xu D, Brint EK, *et al.* Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(6): 446-458.

[3] Prinz M, Garbe F, Schmidt H, *et al.* Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis[J]. J Clin Invest, 2006, 116(2): 456-464.

[4] Braham S, Inoko H, Shiina T, *et al.* MIC and other NKG2D ligands: From none to too many[J]. Curr Opin Immunol, 2005, 17(5): 505-509.

[5] Eriksson U, Ricci R, Hunziker L, *et al.* Dendritic cell-induced autoimmune heart failure requires cooperation between adaptive and innate immunity[J]. Nat Med, 2003, 9(12): 1484-1490.

[6] Bottino C, Castriconi R, Moretta L, *et al.* Cellular ligands of activating NK receptors[J]. Trends Immunol, 2005, 26(4): 221-226.

[7] Lodoen MB, Lanier LL. Viral modulation of NK cell immunity [J]. Nat Rev Microbiol, 2005, 3(1): 59-69.

[8] Zhang C, Zhang J, Wei H, *et al.* Imbalance of NKG2D and its

inhibitory counterparts: How does tumor escape from innate immunity[J]? Int Immunopharmacol, 2005, 5(7-8): 1099-1111.

[9] Oppenheim DE, Roberts SJ, Clarke SL, *et al.* Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity *in vivo* and reduces tumor immunosurveillance [J]. Nat Immunol, 2005, 6(9): 928-937.

[10] Ogasawara K, Hamerman JA, Ehrlich LR, *et al.* NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice[J]. Immunity, 2004, 20(6): 757-767.

[11] Groh V, Bruhl A, El-Gabalawy H, *et al.* Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(16): 9452-9457.

[12] Ogasawara K, Hamerman JA, Hsin H, *et al.* Impairment of NK cell function by NKG2D modulation in NOD mice[J]. Immunity, 2003, 18(1): 41-51.

[13] 田志刚, 孙 纳. NK 细胞的免疫学调节功能[J]. 国外医学: 肿瘤学分册, 1997, 24(3): 136-138.

[14] 田志刚, 孙 纳. NK 细胞的免疫学调节功能——“NKh1/NKh2 假说”的提出[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2000, 16(5): 371

[15] Peritt D, Robertson S, Gri G, *et al.* Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets[J]. J Immunol, 1998, 161(11): 5821-5824.

[16] Loza MJ, Perussia B. Final steps of natural killer cell maturation: A model for type 1 - type 2 differentiation[J]? Nat Immunol, 2001, 2(10): 917-924.

[17] 梁淑娟, 徐 彤, 魏海明, 等. NK 细胞功能亚群: “NKh1 和 NKh2”的初步验证[J]. 中国医学科学院学报, 2001, 23(2): 132-136.

[18] Wei H, Zheng X, Lou DM, *et al.* Tumor-induced suppression of interferon-production and enhancement of interleukin-10 production by natural killer (NK) cells: Paralleled to CD4⁺ T cells[J]. Mol Immunol, 2005, 42(9): 1023-1031.

[19] Sun R, Gao B. Negative regulation of liver regeneration by innate immunity (NK cells/IFN-gamma)[J]. Gastroenterology, 2004, 127(5): 1525-1539.

[20] Wei H, Zhang J, Xiao W, *et al.* Involvement of human natural killer cells in asthma pathogenesis: Natural killer 2 cells in type 2 cytokine predominance[J]. J Allergy Clin Immunol, 2005, 115(4): 841-847.

[21] Zhang R, Zheng X, Li B, *et al.* Human NK cells positively regulate gamma delta T cells in response to *Mycobacterium tuberculosis* [J]. J Immunol, 2006, 176: 2610-2616.

[22] Dong Z, Wei H, Sun R, *et al.* Involvement of natural killer cells in Poly I:C-induced liver injury[J]. J Hepatol, 2004, 41: 966-973.

[23] Wang J, Sun R, Wei H, *et al.* Poly I:C prevents T cell-mediated hepatitis via an NK-dependent mechanism[J]. J Hepatol, 2006, 44(3): 446-454.

[24] Jiang W, Sun R, Wei H, Tian Z. Toll-like receptor 3 ligand attenuates LPS-induced liver injury by down-regulation of toll-like re-

ceptor 4 expression on macrophages[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(47): 17077-17082.

- [25] Radaeva S, Sun S, Jaruga B, *et al.* Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D- and TRAIL-dependent manners[J]. Gastroenterology, 2006, 130(2): 435-452.
- [26] Li B, Sun R, Wei H, *et al.* Interleukin-15 prevents concanavalin A-induced liver injury in mice via NKT cell-dependent mechanism [J]. Hepatology, 2006, 43(6): 1211-1219.
- [27] Chen Y, Wei H, Gao B, *et al.* Activation and function of hepatic NK cells in hepatitis B infection: An underinvestigated innate im-

mune response[J]. J Viral Hepat, 2005, 12(1): 38-45.

- [28] Chen Y, Wei H, Sun R, *et al.* Impaired function of hepatic natural killer cells from murine chronic HBsAg carriers[J]. Int Immunopharmacol, 2005, 5(13-14): 1839-1652.
- [29] Zhang B, Wei H, Zheng X, *et al.* The inhibitory effects of synthetic short peptides, mimicking MICA and targeting at NKG2D receptors, on function of NK cells[J]. Peptides, 2005, 26(3): 405-412.

[收稿日期] 2006-09-09

[修回日期] 2006-09-18

[本文编辑] 韩 丹

[文章编号] 1007-385X(2006)05-0324-01

· 研究简报 ·

人 *HIF-1 α* 基因沉默肺癌细胞株的筛选及鉴定

Selection and identification of *HIF-1 α* gene silenced lung cancer lines

宋现让^{1,2}, 迟伟玲², 柳永蕾¹, 魏 玲¹, 王兴武¹, 宋 宝¹(1. 山东省肿瘤医院基础研究中心, 济南 250117; 2. 山东省千佛山医院, 济南 250014)

乏氧条件下, 肿瘤细胞基因不稳定, 突变的基因型影响信号传导途径, 细胞凋亡受抑制, 恶性程度升高, 转移能力增加, 对放疗的敏感性降低。在乏氧应答中起关键作用的是由 α 和 β 亚基组成乏氧诱导因子-1(HIF-1)。HIF-1 α 作为肿瘤治疗靶基因正引起大家关注。建立 HIF-1 α 基因沉默的细胞系模型, 可为研究 HIF-1 α 在肺癌乏氧应答中的作用和通过阻断 HIF-1 α 基因表达为治疗肺癌提供工具。

本研究采用 Invitrogen 公司的 BLOCK-iT Lentiviral RNAi Expression System, 构建用于慢病毒包装的 shRNA 表达质粒 pLenti6-HIF1 α , 通过 4 种质粒共转染 HEK293FT 细胞的方法产生复制缺陷型的慢病毒。定量 RT-PCR 方法直接测定上清中病毒 RNA 分子拷贝数。转导 SPCA1 和 A549 后经 Blasticidin 筛选的克隆计数法计算功能滴度。然后用 1 MOI 的病毒转导 SPCA1 和 A549 细胞, 经 Blasticidin 10 μ g/ml 筛选 HIF-1 α 基因沉默的细胞系。定量 RT-PCR 方法测定常氧和 0.5% O₂ 条件下筛选细胞和其父代细胞 HIF-1 α 表达水平来证实。实验结果显示, 目的片段正确地插入 pRNTR/U6 产生 pENTR/U6-HIF1 α 质粒。每 10 cm 培养板可生产病毒的 RNA 拷贝数为 (4. 2 \pm 0. 4) \times 10¹⁰ copies。转导 SPCA1 和 A549 细胞的功能滴度分别为 3. 5 \times 10⁶ TU/ml 和 2. 5 \times 10⁶ TU/ml。筛选 SPCA1 和 A549 细胞与其父代细胞相比, 常氧条件下在形态、增殖能力方面无明显区别。筛选 SPCA1 和 A549 细胞在常、乏氧条件下 HIF-1 α mRNA 水平只有对照细胞的 8. 4%、9. 3% 和 11. 1%、7. 4%, mRNA 水平约下降 90%。

HIF 是肿瘤细胞适应乏氧环境的调控核心, HIF-1 α 又是乏氧时 HIF 家族中升高最显著的因子, 抑制 HIF-1 α 的活性

成为干扰肿瘤乏氧应答的一个主要途径。文献报道采用热休克蛋白 Hsp90 特异抑制剂苯醌及其衍生物、YC-1、组氨酸脱乙酰酶抑制剂 FK228、PI3K 抑制剂 LY294002 和 FRAP 抑制剂 rapamycin 等药物抑制 HIF-1 α 转录活性并降解 HIF-1 α 蛋白, 减少肿瘤血管的生成, 具有显著的抗肿瘤作用。RNAi 是抑制基因表达的有力工具。目前, 利用 RNAi 在白血病、艾滋病、乙型肝炎的治疗研究已取得一定进展, 成功地下调了相关基因的表达。采用 RNAi 技术下调 HIF-1 α 基因在肿瘤细胞的表达, 进而阻断乏氧时 HIF-1 α 的应答性升高, 联合其他手段可以有效地消灭乏氧的肿瘤细胞。为验证此假设, 本实验构建 HIF-1 α RNAi 慢病毒载体系统, 建立稳定的 HIF-1 α 基因沉默细胞株, 并证实该系统可以稳定地介导肺癌细胞的 RNAi 作用, 下调 HIF-1 α 基因的表达水平 90% 左右。本研究正更深入地研究该细胞株乏氧条件下的增殖、凋亡、细胞因子分泌、对射线和药物的敏感性等生物学行为, 分析 HIF-1 α 作为治疗靶的可行性。

[关键词] 肺癌, RNA 干扰, 慢病毒, 乏氧诱导因子

[中图分类号] R73. 36

[文献标识码] D

[收稿日期] 2006-06-15

[修回日期] 2006-09-28

[本文编辑] 王 莹

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30570547)

[作者简介] 宋现让(1965-), 男, 山东临朐人, 博士, 研究员, 主要从事肿瘤基因治疗研究

[通讯作者] 宋现让, E-mail: sxr@vip. 163. com