

文章编号 :1004-0374(2010)06-0506-09

记忆性 T 细胞的形成、维持和功能

刘 昀, 吴长有 *

(中山大学中山医学院免疫学教研室, 广州 510080)

摘要: 免疫记忆是指机体在对某一抗原产生特异性识别及应答的同时, 记住该抗原, 当再次遭遇同一抗原时, 能发生快速和强烈的免疫应答。树突状细胞吞噬病原微生物后, 通过主要组织相容性复合体分子提呈抗原短肽段, 与 T 细胞相互作用。在 T 细胞抗原受体信号和共刺激信号的协同作用下, 抗原特异性 T 细胞增殖, 收缩, 小部分细胞作为记忆细胞长期存活。免疫记忆 T 细胞在表型特征和功能上都存在多样性。深入研究机体记忆性 T 细胞的特征, 不仅能指导新型疫苗的设计, 而且可望帮助治疗疾病。

关键词: T 细胞; 记忆性; 细胞因子

中图分类号: R392.12 **文献标识码:** A

Generation, maintenance and function of memory T cells

LIU Yun, WU Chang-you*

(Department of Immunology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: Immunological memory is the ability to make a second and more effective immune response to an antigen that encountered previously. Antigen is processed to short peptides and presented by DCs on MHC molecules to initiate the responses of T cells. A TCR signal with co-stimuli leads to clonal expansion of antigen-specific T cells and follows a phase of contraction, in which most short-lived antigen-specific effector T cells die. Some of these cells survive and form long-lived memory cells. Memory cells are heterogeneous in phenotype and function. Understanding the properties of memory T cells will help in the design of vaccines and the immunotherapy for diseases.

Key words: T cells; memory; cytokine

免疫记忆是机体免疫应答的主要特征之一, 即机体在对某一抗原产生特异性识别及应答的同时, 记住该抗原, 当再次遭遇同一抗原时, 能发生快速和强烈的免疫应答。因此, 免疫记忆在体内可以防止同一疾病的再次发生或减轻疾病的严重程度。有关免疫记忆现象的记载可以追溯到两千多年前的古希腊, Thucydides 在描述瘟疫时这样写到: 同一个人一般不会受到同一疾病的两次攻击。但直至 19 世纪末, 人们才真正地认识到传染病是由病原微生物引起的, 而机体的免疫系统可以抵抗病原微生物的入侵并形成免疫记忆。众所周知, 在未经抗原刺激时机体中抗原特异性细胞数量很少, 但经抗原刺激后, 初始细胞活化、克隆扩增、分化而成为效应

细胞; 当抗原被清除后, 大多数效应细胞死亡, 只有少数细胞分化为记忆细胞。与初始细胞相比, 记忆细胞无论在数量上还是在功能方面均发生了质和量的变化, 如数量的增加、反应速度的加快和反应功能的增强等等。

免疫记忆的维持机制可以分为两大类, 即抗原依赖性与非抗原依赖性。周期性反复接触同一种病原微生物是维持高水平免疫应答的一种有效方式, 这种接触或感染通常无症状或只产生轻微的临床症

收稿日期: 2010-04-07

基金项目: 国家重点基础研究发展计划("973"计划)
(2007CB512404)

* 通讯作者: E-mail: changyou_wu@yahoo.com

状, 属于抗原依赖性的免疫记忆维持机制。而在实际中, 更重要的是需要了解在没有抗原持续存在或微生物持续感染的情况下, 非抗原依赖性的免疫记忆能够维持多久。研究表明在没有再次接触同一病原微生物的情况下, 人体对黄热病病毒的保护性免疫记忆可以维持 75 年, 对麻疹病毒和脊髓灰质炎病毒的免疫记忆可分别维持 65 年和 40 年。在过去的十几年中, 利用小鼠的感染模型和非感染性模型也证明在缺乏抗原持续刺激的情况下, 体内确实存在着记忆性 B 细胞和记忆性 T 细胞, 是非抗原依赖性的免疫记忆维持机制的佐证。免疫记忆是疫苗学的基础, 探讨影响记忆细胞生成和维持的机制, 对于疫苗的研究与开发和疫苗效果的评价具有十分重要的意义。这方面的研究已成为近年来免疫学研究的热点之一, 并已取得了很大进展。现拟就免疫记忆 T 细胞的研究进展做一综述。

1 免疫应答的起始

机体尚未接触抗原时, 初始 T 细胞(naive T cells)富集在次级淋巴器官(如脾脏, 淋巴结等), 通过血液循环和淋巴循环执行免疫监视功能。当机体遭遇抗原后, 非成熟的树突状细胞(dendritic cell, DC)在感染部位吞噬抗原后, 迁移至淋巴结, 通过主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC) 或 MHC 类分子提呈抗原短肽段, 与 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞相互作用。通过 T 细胞抗原受体(TCR)的第一信号和共刺激分子第二信号的协同刺激激活细胞^[1,2]。许多病原微生物都含有 LPS、CpG、dsRNA 等病原相关分子模式, 它们通过固有免疫细胞表达的模式识别受体, 如 TLRs 等激活 DC 细胞, 表达共刺激分子, 如 CD40、CD80 和 CD86, 这些分子分别与 T 细胞表达的 CD154、CD28 和 CD152 相互作用, 提供 T 细胞活化的第二信号^[3,4]。同时, DC 和其他固有免疫细胞也产生细胞因子和趋化因子(第三信号), 共同作用于 T 细胞。这些信号的共同作用决定了 T 细胞的分化和功能。

2 T 细胞的增殖

T 细胞与 APC 接触后, 在 T/APC 接触部位形成免疫突触, 突触的形成使与肽/MHC 复合物结合的 TCR 迅速簇集, 胞内信号, 如 LCK、LAK、PCK 等被激活, 诱导细胞的增殖和细胞因子的合成, 使细胞分化为细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic lympho-

cyte, CTL)和 T 辅助细胞^[5-7]。

CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的增殖能力不同。体外刺激 24 h 的 CD8⁺ T 细胞转输至无抗原宿主, 至少可以分裂 7 次, 并获得效应和记忆细胞功能。而短期抗原刺激只可诱导 CD4⁺ T 细胞有限次数的分裂, 持续的抗原刺激对 CD4⁺ T 细胞的增殖和分化很重要。而且 CD4⁺ T 细胞较之 CD8⁺ T 细胞频率更低, 形态更小。在细胞扩增阶段, 大约有 50% 的 CD8⁺ T 细胞是针对病毒的单一抗原表位, 而只有 10% 左右的 CD4⁺ T 细胞对某一病毒发生反应。

3 T 细胞的收缩期和记忆细胞的形成

当抗原进入机体 1~2 周后, T 细胞的增殖到达高峰, T 细胞开始进入收缩期。绝大多数抗原特异性效应 T 细胞凋亡, 只有大约 5%~10% 细胞作为记忆细胞长期存活^[8,9]。那么, 是什么因素决定着细胞成为效应或记忆细胞; 在记忆 T 细胞形成过程中, 哪些因素起重要作用; 哪些因素决定细胞的存活或凋亡; 记忆 T 细胞是如何维持的。我们将围绕这几个关键问题进行阐述。

3.1 决定细胞分化为效应或记忆细胞的因素

目前有几种分化假说可以帮助我们了解效应和记忆 T 细胞的形成:

第一种假说, 就是最简单的一种模型: 效应 T 细胞和记忆 T 细胞是从不同亚群的初始 T 细胞分化而来。但是, 与此理论相悖的是: 当过继转输同一初始 CD8⁺ T 细胞后, 可以形成效应和不同亚群的记忆 T 细胞。由于利用的是转基因 T 细胞, 所以此结论是否在所有情况下都成立还未可知。

第二种假说: “一个细胞, 多种命运”。这个理论是由 Reiner 研究组提出来的。他们发现激活的 CD8⁺ T 细胞第一次分裂是不对称分裂, 分别具有分化为效应和记忆 T 细胞潜能^[10]。最近有文献报道, 利用 OT-1-TCR 点突变的转基因小鼠模型, 发现 TCR 的 β TMD 的点突变使记忆 CD8⁺ T 细胞的分化和功能大大降低, 而效应 CD8⁺ T 细胞的分化和功能不受到影响。进一步研究发现, 突变的 T 细胞不能使 TCR 聚集, 在免疫突触部位不能传导 NF- κ B 信号。这说明效应和记忆 CD8⁺ T 细胞的分化在免疫应答的起始——免疫突触的形成时就已经决定了, 效应和记忆 T 细胞的分化需要二套不同的信号传导通路^[11]。Wu 等^[12]实验结果证明, 在经过抗原免疫后, 生成的 IFN- γ ⁺ TCR Tg 效应 CD4⁺ T 细胞过继转输至宿主后, 不能长期存活; 而 IFN- γ -TCR Tg

可成为长期记忆细胞,并在再次刺激时,产生 IFN- γ 。这表明,有一部分激活的初始 T 细胞可以不经过效应细胞阶段,而直接成为记忆细胞。

第三种假说:所用细胞都经过了早期的效应阶段,终末分化的细胞发挥效应后凋亡。在免疫应答的后期,由于抗原逐渐被效应细胞清除,携带抗原进入淋巴结的 DC 减少,与 T 细胞的作用不足以使其到达表达未分化,死亡信号不完全或可逆,使其得以存活而成为记忆细胞。而在此过程中,“效应样”分子(如 CD4⁺ T 细胞的 IFN- γ 和 CD8⁺ T 细胞的 GranzymeB)相关基因的表达起着重要的作用。

最近有两篇报道证明,IFN- γ ⁺ 效应 CD4⁺ T 细胞具有与 IFN- γ -效应 CD4⁺ T 细胞一样的分化为记忆细胞能力,甚至能更好地分化为记忆细胞^[13,14]。激活的初始 T 细胞可能在分化为产生细胞因子的效应细胞后,小部分细胞转化为记忆细胞。

以上第二、三两种假说可能都参与了记忆细胞的形成,在免疫应答起始和发挥效应阶段,都有记忆细胞的形成。

第四种假说:所有的 CD8⁺ T 细胞都将到达终末分化阶段,其中少数细胞在收缩期再分化为具有长期存活和增殖能力的记忆细胞。支持这一模型的实验证据有:从效应细胞到记忆细胞的分化过程中,细胞的增殖能力逐渐提高,IL-2、Bcl-2 和 CD62L 表达增加。

3.2 影响记忆 T 细胞形成的因素

3.2.1 抗原

抗原和疫苗初次进入机体诱导特异性 T 细胞扩增的程度,决定着抗原特异性 CTL 的频率和数量^[15,16]。在 LCMV 感染小鼠模型中,在免疫反应的高峰期有 5%~10% 的细胞将转变为记忆细胞。在流感病毒的小鼠模型中,特异性记忆 CTL 细胞的数量也直接与在初次感染时诱导 CD8⁺ T 细胞的数量有关。抗原特异性 CTL 的频率似乎与最初接触抗原的量和微生物性抗原的持续存在相关。通常活病毒或减毒活疫苗比非复制性载体、DNA 疫苗或蛋白质亚单位疫苗诱导更多数量 CTL。此外,具有复制性的疫苗与非复制性的疫苗相比诱导的 CTL 具有本质的不同。

3.2.2 非 r-链细胞因子的作用

前面已经提到,初始 T 细胞的激活不仅需要肽-MHC 复合物(第一信号),还需要共刺激信号(第二信号)。佐剂通过 PRRs,除了诱导第二信号外,同时还刺激细胞因子的表达,如 I 型 IFNs,IL-12 和

IFN- γ 。这些细胞因子通过促进 DCs 的成熟,从而增强 CTL 作用。这些细胞因子还可以直接作用于 T 细胞,对 T 记忆细胞的生成起着非常重要的作用(第三信号)。

IL-12、IFN- γ 和 I 型 IFNs 可以增强效应 CD8⁺ T 细胞扩增能力和细胞毒性作用。IL-12 可以诱导 Bcl-3 的表达,从而增强效应 CD8⁺ T 细胞的扩增^[17,18]。除了增强效应细胞的作用外,这些细胞因子还限制记忆细胞的形成。IL-12^{-/-} 缺失小鼠感染 *Listeria* 后,记忆 CD8⁺ T 细胞频率增加。而且,IL-12 还剂量依赖地诱导激活 CD8⁺ T 细胞 T-bet 表达^[19,20];而高表达 T-bet 被认为与 KLRG1^{high} IL-7^{low} 短期效应细胞的形成有关。IFN- γ 的作用仍需要研究,有文献报道 IFN- γ 可以下调 IL-7R 的表达,但也有报道,IFN- γ R 在记忆 CD8⁺ T 细胞的形成中是必须的^[21,22]。

除了以上因子外,最近发现 IL-10 对 CD8⁺ T 细胞应答也有影响。在 IL-10 缺失小鼠,即使在感染后 24 h 应用抗生素,CD8⁺ 记忆 T 细胞数量下降^[23]。相反地,IL-10 的负调控作用也有报道,在将 IL-10R 缺失的抗原特异性 CD8⁺ T 细胞转输后,在 *Listeria* 模型中发现高频率的记忆细胞^[24]。

3.2.3 r-链细胞因子的作用

研究最多的影响记忆 T 细胞形成的细胞因子是 IL-7 和 IL-15。IL-7 对初始和记忆细胞的存活至关重要。IL-7R 高表达于静息 T 细胞,当 T 细胞被激活后,IL-7R α 迅速下调,并重新表达于小部分效应细胞上。在 CD8⁺ T 细胞已经证明,IL-7R 的表达对检测记忆细胞前体很有作用,但 IL-7 在效应细胞向记忆细胞分化的阶段并不是必须的。与 CD8⁺ T 细胞不同,IL-7 对 CD4⁺ T 记忆细胞的形成起了至关重要的作用。在 IL-7 宿主和 IL-7R 表达突变的宿主,不能形成 CD4⁺ T 记忆细胞^[25,26]。Sun 等^[27]报道,在反应的高峰增强 IL-7 信号,可以促进 TCR 转基因效应 CD4⁺ T 细胞的增殖以及 Bcl-2 的表达上调,从而阻止其收缩;但当所有效应细胞都表达 GM-CSF/IL-7R 嵌合体受体而增强 IL-7R 信号时,在 LCMV 感染中并没有增强记忆细胞的形成,说明只有 IL-7 信号对于记忆细胞的形成并不足够。

最近,IL-2 对 CD8⁺ 记忆 T 细胞形成影响也有研究。在 T 细胞收缩期注入 IL-2、IL-7 或 IL-15 都可以使 CD8⁺ T 细胞收缩的程度下降^[28-30]。在收缩期内注入 IL-2 或 IL-15 后,主要是积聚 KLRG1^{hi} CD127^{lo} 短期存活效应和记忆细胞,而 IL-7 主要是

积聚 KLRG1^{lo} CD127^{hi} 长期存活记忆细胞。

3.2.4 细胞内信号的影响

T-bet、Id2、Blimp-1 等转录因子对记忆 T 细胞的形成也有影响。

T-bet 是 Th1 细胞分化的转录因子, 现在发现 T-bet 和 eomesodermin (eomes) 有广泛的作用。T-bet 可以增强效应 CD8⁺ T 细胞的作用, 并抑制 CD127 的表达, 影响记忆 CD8⁺ T 细胞的形成。前文已经提到, IL-12 诱导 T-bet 表达, 而下调 eomes 的表达。高表达 T-bet 被认为与 KLRG1^{hi}IL-7R^{lo} 短期效应细胞的形成有关, 低表达 T-bet 与 KLRG1^{lo}IL-7R^{hi} 记忆细胞前体细胞形成有关。

Id2 是在淋巴细胞发育和维持中起着重要的作用的转录因子。感染后, Id2 缺失的 CD8⁺ T 细胞快速应答, 但是效应细胞数量下降, 经过收缩期后, 记忆细胞的数量下降了 80%~90%。Id2 缺失的 CD8⁺ T 细胞增殖能力没有改变, 而是诱导了效应细胞的凋亡, 从而使记忆细胞减少^[31]但其机制仍不清楚。

Blimp-1 在成熟效应细胞的生成中起重要作用。Blimp-1 与 Id2 相似, 高表达在效应细胞, 低表达在初始细胞和记忆细胞, Blimp-1 缺失可以增强抗原特异性效应细胞和记忆细胞的存活。提示 Blimp-1 可能负调控 T 细胞记忆的生成。Blimp-1 调控 B 细胞和 T 细胞 Bcl-6 的表达, Bcl-6 缺失小鼠在牛痘病毒感染时, CD8⁺ 记忆 T 细胞频率和数目下降, 进一步研究表明, Bcl-6 主要是对中央型记忆细胞的生成, 以及其在再次抗原入侵时的反应有影响。

3.2.5 T 细胞代谢状态的影响

T 细胞的代谢在长期存活记忆细胞的形成中起着很大的作用。T 细胞要从效应细胞的合成代谢向记忆细胞的分解代谢转化。如果此转化被阻止, 记忆 CD8⁺ T 细胞则不能形成^[32,33]。在此过程中, mTOR 是一个关键的分子。mTOR 的抑制剂雷帕霉素, 有利于效应细胞分化为记忆 CD8⁺ T 细胞^[32,33]。机体也存在平衡, 如果封闭 mTOR, 则初始 T 细胞将无法激活和增殖。而为什么少数的细胞会发生者两种代谢的转化, 而其它细胞不发生, 仍然是一个需要探讨的问题。

3.3 影响细胞存活或凋亡的因素

3.3.1 Bim 和 Fas

绝大部分效应细胞在免疫应答的后期凋亡, 而一部分细胞存活, 许多诱导凋亡分子和抗凋亡分子在这一过程中起重要作用。抗凋亡分子 Bcl-2, 在活化 T 细胞中表达下调, 从而在收缩期发挥作用^[34]。

在对研究 Bcl-2 的作用中发现, 在 Bim^{+/+} Bcl-2^{-/-} 小鼠, 初始 T 细胞严重受损, 而 LCMV- 特异性记忆 CD4⁺ T 细胞的数量微有下降, 但这些 CD4⁺ T 细胞表现出淋巴球减少症诱导的增殖, 在转输至正常小鼠后, 迅速消失。这表明 Bcl-2 在维持 CD4⁺ T 记忆细胞的存活中具有很重要的作用。同时, 诱导凋亡分子 Bim(Bcl-2-interacting mediator of death) 在收缩期也发挥着作用。Bim 可能是限制了分化为记忆细胞的细胞数量, 从而维持 T 细胞内环境的稳定。在 Bim^{-/-} 小鼠, 大部分效应细胞存活向着记忆细胞分化, 但是 Bim^{-/-} 记忆 CD4⁺ T 细胞并没有延长寿命, 表明除了 Bim 外, 机体仍存在着其他的自稳机制。

虽然早期认为 Fas/Fas-L 在感染后 CD8⁺ T 细胞收缩期的作用很小, 但最近的研究表明, 在急性 LCMV 和慢性 MHV 感染中, Fas 和 Bim 在收缩期共同起作用^[35-38]。

3.3.2 FOXO3a 和 Noxa

由于转录因子 FOXO3a 的关闭和 STAT5a 的激活抑制了 Bim 和 Fas 的转录, 从而影响着 CD4⁺ T 记忆细胞的存活。当沉默了 HIV 患者 FOXO3a 的激活后, CD4⁺ T 记忆细胞的存活得以增强。

另一个凋亡分子 Noxa 也被认为与 T 记忆细胞的生成相关。Bim1 调控 Noxa 的表达, 缺失 Bim1 的 CD4⁺ T 细胞可以增殖并分化为效应细胞, 但继续分化为记忆细胞的能力严重受损。Bim1^{-/-} 效应细胞的死亡可能是由于 Noxa 表达的增高所致。从而推断 Bim1 促进 CD4⁺ T 记忆细胞的生成是通过抑制了 Noxa 基因的表达。

3.4 维持记忆 T 细胞的因素

3.4.1 记忆 CD8⁺ T 细胞的维持

3.4.1.1 细胞因子和抗原 以往认为记忆细胞的维持需要与体内一定量的抗原接触, 但现在已经清楚, 在急性感染的病原或抗原被清除后, 记忆 CD8⁺ T 细胞的维持都是不依赖 MHC 分子的, 而是依靠 IL-7 和 IL-15 共同维持^[39-42]。

IL-7R 突变小鼠的初始 CD8⁺ T 细胞可以分化为抗原特异性 CD8⁺ 记忆 T 细胞, 但由于缺少 IL-7 的信号, 这群细胞逐渐消失。封闭成熟 CD8⁺ T 细胞的 IL-7R 的信号或使小鼠 IL-7R 突变后, 不能激活 STAT5 和诱导 Bcl-2 的表达。而过表达 Bcl-2, 可以逆转细胞的死亡, 表明 IL-7 主要是通过激活 STAT5, 上调 Bcl-2 的表达来发挥作用。IL-15 敲除小鼠也可以产生抗原特异性 CD8⁺ 记忆 T 细胞, 但这群细胞不能增殖, 最后逐渐消失。这表明, 抗

原特异性 CD8⁺ 记忆 T 细胞的稳定需要依靠 IL-7 和 IL-15 共同维持, IL-7 主要维持细胞存活, IL-15 维持其增殖。由于抗原特异性 CD8⁺ 记忆 T 细胞的数量是维持不变的, 那么, 就需要它的增殖和死亡达到平衡。了解细胞因子在这个过程中调节机制对疫苗的应用很重要。

相反, 在慢性感染中, CD8⁺ 记忆 T 细胞的表现和功能都有部分的改变。Barber 等^[43]报道, 持续感染小鼠的 CD8⁺ 记忆 T 细胞表达 PD1(programmed cell death 1), 使其功能耗竭。封闭 PD1 后, CD8⁺ 记忆 T 细胞清除 LCMV 感染功能增强。另外, 有报道认为在慢性感染中产生的 IL-10 也抑制了 CD8⁺ 记忆 T 细胞的抗病毒功能^[44,45]。重要的是, 从持续感染的小鼠分离出的 CD8⁺ 记忆 T 细胞转输至无抗原小鼠体内后, CD8⁺ 记忆 T 细胞不能存活。这表明, 慢性感染的 CD8⁺ 记忆 T 细胞的维持需要抗原的持续刺激, 而 IL-7 和 IL-15 对慢性感染中 CD8⁺ 记忆 T 细胞的维持没有作用^[46,47]。慢性感染模型中生成的 CD8⁺ 记忆 T 细胞比急性感染后产生的 CD8⁺ 记忆 T 细胞增殖更快, 但只是有限次数的分裂, 推断在这种情况下, 最终抗原特异性 CD8⁺ 记忆 T 细胞将被清除; 但是相反的是, 抗原特异性 CD8⁺ T 细胞并没有被完全清除, 近来有报道认为是新产生的 CD8⁺ T 细胞的激活将维持记忆细胞的长期存在。

总之, 急性感染和慢性感染产生的 CD8⁺ 记忆 T 细胞维持因素和功能特征都存在很大差别。而在慢性感染中, 记忆 CD8⁺ T 细胞功能的耗竭是对病原还是宿主有利, 仍然需要探讨。

3.4.1.2 CD4⁺ T 细胞对记忆 CD8⁺ T 细胞的辅助 早期用非感染物质免疫动物后发现, 抗原特异性 CD4⁺ T 细胞通过 CD40/CD40L 与 DC 相互作用, 使 DC 作用于 CD8⁺ T 细胞, 诱导有效的 CTL 反应^[48-50]。在慢性病毒如 LCMV、HIV 感染中, CD4⁺ T 细胞减少或缺失, CTL 反应也受到损害。而在病毒或细菌急性感染时, 病原相关分子模式如 LPS、CpG DNA、dsDNA、ssRNA、鞭毛蛋白等通过模式识别受体激活 DC 或其他细胞, 诱导 CTL 反应, 无需 CD4⁺ T 细胞的辅助。最近研究表明, 在某些感染模型中, 如 LCMV, VSV 或 Listeria, CD4⁺ T 细胞缺失虽然对初次反应 CD8⁺ T 细胞的扩增没有影响, 但记忆细胞却没有功能, 在第二次刺激时不能发生再次应答^[51-53]。Castellino 等^[54]证明 CD4⁺ T 细胞和 DC 相互作用后, 可以产生趋化因子, 趋化 CD8⁺ T 细胞

到达存在向记忆细胞分化信号的位置, 从而分化为 CD8⁺ T 记忆细胞。

在 CD4⁺ T 细胞缺失时, 初次刺激后, CD8⁺ T 细胞高表达死亡受体 TRAIL, 再次刺激时, CD8⁺ T 细胞发生活化诱导的凋亡^[55]。在 LCMV 感染模型中, 无 CD4⁺ T 细胞存在时, TRAIL 表达缺失可以使 CD8⁺ 记忆 T 细胞在感染后 60 d 中与正常对照组仍无差别, 但最终也将完全失去其功能。这提示 CD4⁺ T 细胞(至少在一些环境下)在 CD8⁺ T 细胞反应的起始就辅助其发挥作用, 并维持其记忆细胞功能。Intlekofer 等^[56]研究表明, 绝大多数无辅助的 CD8⁺ T 细胞高表达 T-bet。当敲除 T-bet, 在无 CD4⁺ T 细胞情况下, CD8⁺ T 细胞生成中央型记忆细胞(CD62L^{hi}CCR7^{hi})的能力可以恢复。T-bet 与 TRAIL 表达之间的关系需要进一步的研究。

以上和其他许多研究都已证实 CD4⁺ T 细胞对维持 CD8⁺ T 记忆细胞的数量以及功能非常重要。在 CD4⁺ T 细胞缺失的环境中, CD8⁺ T 记忆细胞在再次刺激时, IFN- γ 和 IL-2 产生降低, 低表达 IL-7R α 、CD62L 和 CD122。IL-2 可能是辅助 CD8⁺ T 记忆细胞发挥功能的一个重要因子。IL-2R 高亲和力和链(CD25)表达缺失小鼠的 CD8⁺ T 细胞的扩增、收缩、和记忆细胞的生成都是正常的, 但是再次反应却是异常的^[57]。推测 IL-2 可能在 CD8⁺ T 细胞从效应细胞向记忆细胞的生成这一过程中起重要作用。

现在研究认为, CD4⁺ T 细胞在 CD8⁺ T 记忆细胞的维持起着重要作用, 但是其中的信号通路和机制仍不明了。这一领域的研究进展对制备更好的疫苗以及制定更好的免疫策略都是非常关键的。

3.4.2 CD4⁺ T 记忆细胞的维持

3.4.2.1 细胞因子 维持 CD4⁺ T 记忆细胞稳定的条件 非常复杂。最近关于抗原特异性 TCR 转基因和多克隆记忆 CD4⁺ T 细胞的研究表明, 与 CD8⁺ T 记忆细胞相似, CD4⁺ T 记忆细胞的维持是不依赖 MHC 分子的, 而是依靠 IL-7 和 IL-15 共同维持^[58,59], 但 IL-7 在维持 CD4⁺ T 记忆细胞存活的作用上远远要比 IL-15 重要。两者对细胞的增殖则具有同等重要的作用。由于 IL-15 的受体(CD122)在 CD4⁺ T 记忆细胞的表达要远低于 CD8⁺ T 记忆细胞和 NK 细胞, 所以 IL-15 对 CD4⁺ T 记忆细胞的作用要小于 CD8⁺ T 记忆细胞和 NK 细胞。

3.4.2.2 TCR 与 MHC II 分子的相互作用 大部分的记忆性 CD4⁺ T 细胞都是由抗原特异性细胞组成, 但有

一小部分记忆表型 CD4⁺T 细胞增殖非常迅速, 而此增殖是依赖于 TCR 与 MHC II 分子的相互作用, 而不需要 IL-7 和 IL-15。这表明, TCR-MHC 信号对 CD4⁺T 记忆细胞的维持也有作用。抗原特异性记忆 CD4⁺T 细胞的增殖都比较缓慢, 这群分裂迅速的细胞的功能以及其分裂机制仍然不清楚。

4 免疫记忆细胞的多样性

传统上根据 CD45 亚型的表达与否, 将人的 T 细胞分为初始 T 细胞(CD45RA⁺)和记忆 T 细胞(CD45RA⁻); 但是, 一些 CD8 T_{EM} 也表达 CD45RA (T_{EMRA}), 并含有大量的穿孔素。某些研究结果还表明活化早期的 CD8⁺T 细胞表达 CD27, 而分化晚期的、穿孔素阳性的 CTL 不表达 CD27, 提示 CD27 表达的丢失可能是效应和记忆 CD8⁺T 细胞的一种标志^[60]。

根据归巢特点和效应功能将记忆 T 细胞至少分为中央型记忆细胞(central memory cells, T_{CM})和效应型记忆细胞(effector memory cells, T_{EM})^[61,62]。T_{CM} 表达 CD45RO、CCR7 和 CD62L, 可以通过高内皮静脉进入淋巴器官。当再次接触抗原刺激时, T_{CM} 主要表达 IL-2, 并能迅速分裂, 补充周围器官中的效应 T 细胞。T_{EM} 表达 CD45RO, 不表达 CCR7 和 CD62L, 而表达其它趋化因子受体和黏附分子, 使其游走至感染组织。与 T_{CM} 相比, T_{EM} 在 TCR 刺激后, 增殖较慢, 但迅速释放细胞因子, CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞都在短时间内产生 IFN- γ 、IL-4 和 IL-5。CD8 T_{EM} 还释放穿孔素, 发挥杀伤功能。但最近有文献报道, 在反复免疫后, T_{EM} 扩增较 T_{CM} 还要明显。

关于 T_{CM} 和 T_{EM} 亚群是怎样形成的, 两者的形成是互相依赖关系还是来源于不同亚系, 目前仍然不清楚。有三种分化模型被提出: (1) 体外的研究表明, T_{CM} 能够失去 CCR7 发挥效应功能, 提示 T_{CM} 直接转变为 T_{EM}; (2) 两者来源于不同细胞系; (3) T_{EM} 转变为 T_{CM}。在低频率前提细胞的情况下, T_{EM} 不能转变为 T_{CM}, 而在高频率的 TCR 转基因细胞中, T_{EM} 可以转变为 T_{CM}。

根据趋化因子受体和其他标志的不同, T_{CM} 和 T_{EM} 还可以分为不同亚群。一群 T_{CM} 表达 CXCR5, 存在于扁桃体中, 被定义为滤泡辅助 T 细胞。它们在活化后产生 IL-2 和少量 IL-10, 通过表达 CD40L 和 ICOS, 辅助 B 细胞。T_{EM} 则根据它所表达的 T_{H1} 或 T_{H2} 细胞因子和趋化因子受体将其分为不同亚

群。CXCR3 和 CCR4 分别表达在 T_{H1} 和 T_{H2} 细胞上, 同时也表达于不同的 T_{EM} 亚群, 代表前效应细胞(前 T_{H1} 或前 T_{H2} 细胞)。

记忆 T 细胞除了归巢淋巴结能力不同之外, 还具有组织特异性。从肠系膜淋巴结而来的 T 细胞更倾向于向肠道迁移; 从外周淋巴结而来的 T 细胞, 更倾向于向外周器官迁移。这是由于不同部位淋巴结的 DC 在与 T 细胞相互作用时, 上调了 T 细胞的归巢受体所致。同时, 表达 CLA 和 CCR4 的 T 细胞被认为是归巢皮肤的 T 细胞; 表达 CCR9 的 T 细胞被认为是归巢肠道的 T 细胞。一些归巢皮肤和肠道的 T 细胞也表达 CCR7, 说明他们可以归巢至淋巴器官和非淋巴器官。

5 初始细胞与效应和记忆细胞的差异

初始细胞与效应和记忆细胞在许多方面都存在差异: (1) 反应的速度: 实验证明, 当用抗原再次刺激时, 中央型记忆细胞比初始细胞进入细胞周期、合成细胞因子、分化为 CTL 以及迁移至非淋巴组织等器官的滞后时间都要短, 而且更不依赖于共刺激信号。相反, 效应型记忆细胞存在于非淋巴组织中, 处于活化状态, 在体内持续合成细胞因子和发挥 CTL 功能。当再次遭遇病原时, 迅速发生保护性免疫应答。(2) 细胞的数量: 虽然在初次免疫结束后, T 细胞大量死亡, 但是由于细胞的扩增, 存活的抗原特异性记忆细胞所占数量和比例都要高于初始 T 细胞中的抗原特异性细胞(大约 1000 倍)。(3) 反应的强度: 存活的抗原特异性记忆细胞的频率高于初始细胞中抗原特异性细胞的频率是再次反应的强度大大高于初次反应的最主要原因。(4) 组织的分布: 初始 T 细胞主要集聚在次级淋巴器官, 如脾、淋巴结等, 并通过血循环和淋巴循环在淋巴器官之间游走。激活的效应 T 细胞可以分布在各个非淋巴器官, 包括肝脏、肠道、肾脏和唾液腺, 还可游走至骨髓和胸腺髓质。在淋巴器官和非淋巴器官的效应 T 细胞在 2~3 周内死亡, 一些细胞存活成为记忆细胞。(5) 基因的变化: 当初始 T 细胞分化为记忆细胞后, 它的基因表达会发生了变化。例如, 初始 CD8⁺T 细胞不编码 IFN- γ , 穿孔素和颗粒酶 B, 但是在效应和记忆 CD8⁺T 细胞中持续表达。当接触抗原后, 则迅速地释放这些因子。由于记忆细胞具有高水平的信使 RNA 转录, 记忆 CD8⁺T 细胞比初始 CD8⁺T 细胞产生这些蛋白更快。

6 免疫记忆与疫苗设计

疫苗的发现与应用是人类在医学领域里最伟大的发明。众所周知,天花在地球上被消灭,是由于长期和广泛地使用牛痘疫苗的结果,这是人类历史上第一个使用疫苗消灭的传染病。疫苗的应用,虽然在很大程度上降低了传染病的死亡率,并控制了传染病的发生和传播,但传染病至今仍然是世界上导致死亡的主要原因。目前所应用的疫苗,大多数是诱导机体产生记忆性B淋巴细胞,持久产生抗体,以保护机体免受病原微生物的感染。相反,对某些细胞内感染的传染性疾,如艾滋病、结核病、乙型肝炎和疟疾等,虽然抗体在防止感染中起着一定的作用,但是T淋巴细胞所介导的细胞免疫反应起着更为重要的作用。

调控CD4⁺和CD8⁺效应和记忆T细胞的分化和维持因素,与疫苗的设计密切相关^[63,64]。如在设计需要Th1细胞应答来抵御疾病的疫苗时,首先,要考虑这种疫苗必须可以直接诱导初始CD4⁺T细胞分化为Th1细胞;其次,它能长期维持Th1细胞在体内的应答。结核分枝杆菌和利什曼原虫感染机体后,产生的Th1和CD8⁺T细胞具有相当持久的维持记忆应答和强有力的效应功能,因此,针对这些病原体的疫苗应该能够同时诱导产生Th1和CD8⁺T两种细胞。由于T细胞的应答在高峰之后减弱,此时90%以上的效应T细胞死亡,所以限制免疫应答减弱期细胞的死亡,可能会增强记忆性免疫应答。

近年来,在对小鼠实验和人体免疫的研究中发现,疫苗的保护效果和患者的预后及转归与多功能性T细胞的数量和质量密切相关^[65]。以往仅仅检测某种或少数几种效应T细胞的功能,远远不能代表机体的特异性免疫状态。在单个细胞水平上,同时产生两种或以上效应功能,包括细胞因子、趋化因子及杀伤功能的细胞被称为多功能性T细胞。多功能性T细胞与疾病的保护效果密切相关。为此,多功能性T细胞的检测,能更准确、完整地反映机体特异性细胞免疫应答,尤其对于疫苗的设计和评价具有十分重要的意义。因此,深入研究机体记忆性T细胞的特征,并据此开发的新型疫苗,不仅能诱导机体产生特异性体液免疫反应,而且也诱导机体产生特异性持久的细胞免疫反应,既可预防疾病,又可望用于治疗疾病,这将是疫苗研究与开发的目标和方向。

[参 考 文 献]

- [1] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998, 392(6673): 245-52
- [2] Heath WR, Carbone FR. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*, 2001, 19: 47-64
- [3] Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol*, 2005, 560: 11-8
- [4] Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol*, 2006, 7(2): 131-7
- [5] Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, et al. Three dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*, 1998, 395 (6697): 82-6
- [6] Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*, 1999, 285(5425): 221-7
- [7] Lanzavecchia A, Sallusto F. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science*, 2000, 290(5489): 92-7
- [8] Lanzavecchia A, Sallusto F. Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2: 982-7
- [9] Masopust D, Kaech SM, Wherry EJ, et al. The role of programming in memory T-cell development. *Curr Opin Immunol*, 2004, 16(2): 217-25
- [10] Chang JT, Palanivel VR, Kinjyo I, et al. Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science*, 2007, 315(5819): 1687-91
- [11] Teixeira E, Daniels MA, Hamilton SE, et al. Different T cell receptor signals determine CD8⁺ memory versus effector development. *Science*, 2009, 323(5913): 502-5
- [12] Wu CY, Kirman JR, Rotte MJ, et al. Distinct lineages of T (H)1 cells have differential capacities for memory cell generation *in vivo*. *Nat Immunol*, 2002, 3(9): 852-8
- [13] Lohning M, Hegazy AN, Pinschewer DD, et al. Long-lived virus-reactive memory T cells generated from purified cytokine-secreting T helper type 1 and type 2 effectors. *J Exp Med*, 2008, 205(1): 53-61
- [14] Harrington LE, Janowski KM, Oliver JR, et al. Memory CD4 T cells emerge from effector T-cell progenitors. *Nature* 2008, 452(7185): 356-60
- [15] Hou S, Hyland L, Ryan KW, et al. Virus-specific CD8⁺ T-cell memory determined by clonal burst size. *Nature*, 1994, 369(6482): 652-4
- [16] Blattman JN, Antia R, Sourdive DJ, et al. Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J Exp Med*, 2002, 195(5): 657-64
- [17] Schmidt CS, Mescher MF. Adjuvant effect of IL-12: conversion of peptide antigen administration from tolerizing to immunizing for CD8⁺ T cells *in vivo*. *J Immunol*, 1999, 163 (5): 2561-7
- [18] Valenzuela JO, Hammerbeck CD, Mescher MF. Cutting edge: Bcl-3 up-regulation by signal 3 cytokine (IL-12) prolongs survival of antigen-activated CD8 T cells. *J Immunol*, 2005, 174(2): 600-4
- [19] Joshi NS, Cui W, Chandele A, et al. Inflammation

- directmemory precursor and short-lived effector CD8⁺ T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity*, 2007, 27(2): 281-95
- [20] Takemoto N, Intlekofer AM, Northrup JT, et al. Cutting Edge: IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8⁺ T cell differentiation. *J Immunol*, 2006, 177(11): 7515-9
- [21] Whitmire JK, Eam B, Benning N, et al. Direct interferon-gamma signaling dramatically enhances CD4⁺ and CD8⁺ T cell memory. *J Immunol*, 2007, 179(2): 1190-7
- [22] Whitmire JK, Tan JT, Whitton JL. Interferon-gamma acts directly on CD8⁺ T cells to increase their abundance during virus infection. *J Exp Med*, 2005, 201(7): 1053-9
- [23] Foulds KE, Rotte MJ, Seder RA. IL-10 is required for optimal CD8 T cell memory following *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol*, 2006, 177(4): 2565-74
- [24] Biswas PS, Pedicord V, Ploss A, et al. Pathogen-specific CD8 T cell responses are directly inhibited by IL-10. *J Immunol*, 2007, 179(7): 4520-8
- [25] Kondrack RM, Harbertson J, Tan JT, et al. Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *J Exp Med*, 2003, 198(12): 1797-806
- [26] Osborne LC, Dhanji S, Snow JW, et al. Impaired CD8 T cell memory and CD4 T cell primary responses in IL-7R α mutant mice. *J Exp Med*, 2007, 204(3): 619-31
- [27] Sun JC, Lehar SM, Bevan MJ. Augmented IL-7 signaling during viral infection drives greater expansion of effector T cells but does not enhance memory. *J Immunol*, 2006, 177(7): 4458-63
- [28] Yajima T, Yoshihara K, Nakazato K, et al. IL-15 regulates CD8⁺T cell contraction during primary infection. *J Immunol*, 2006, 176(1): 507-15
- [29] Melchionda F, Fry TJ, Milliron MJ, et al. Adjuvant IL-7 or IL-15 overcomes immunodominance and improves survival of the CD8⁺ memory cell pool. *J Clin Invest*, 2005, 115(5): 1177-87
- [30] Nanjappa SG, Walent JH, Morre M, et al. Effects of IL-7 on memory CD8 T cell homeostasis are influenced by the timing of therapy in mice. *J Clin Invest*, 2008, 118(3): 1027-39
- [31] Cannarile MA, Lind NA, Rivera R, et al. Transcriptional regulator Id2 mediates CD8⁺ T cell immunity. *Nat Immunol*, 2006, 7(12): 1317-25
- [32] Araki K, Turner AP, Shaffer VO, et al. mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature*, 2009, 460: 41-2
- [33] Pearce EL, Walsh MC, Cejas PJ, et al. Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature*, 2009, 460, 103-7
- [34] Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, et al. Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity*, 2002, 16(6): 759-67
- [35] Weant AE, Michalek RD, Khan IU, et al. Apoptosis regulators Bim and Fas function concurrently to control autoimmunity and CD8⁺ T cell contraction. *Immunity*, 2008, 28(2): 218-30
- [36] Green DR. Fas bim boom! *Immunity*, 2008, 28(2): 141-3
- [37] Hughes PD, Belz GT, Fortner KA, et al. Apoptosis regulators Fas and Bim cooperate in shutdown of chronic immune responses and prevention of autoimmunity. *Immunity*, 2008, 28(2): 197-205
- [38] Hutcheson J, Scatizzi JC, Siddiqui AM, et al. Combined deficiency of proapoptotic regulators Bim and Fas results in the early onset of systemic autoimmunity. *Immunity*, 2008, 28(2): 206-17
- [39] Becker TC, Wherry EJ, Boone D, et al. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med*, 2002, 195(12): 1541-8
- [40] Goldrath AW, Sivakumar PV, Glaccum M, et al. Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8⁺ T cells. *J Exp Med*, 2002, 195(12): 1515-22
- [41] Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, et al. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells *in vivo*. *Nat Immunol*, 2000, 1(5): 426-32
- [42] Tan JT, Ernst B, Kieper WC, et al. Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8⁺ cells but are not required for memory phenotype CD4⁺ cells. *J Exp Med*, 2002, 195(12): 1523-32
- [43] Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*, 2006, 439(7077): 682-7
- [44] Brooks DG, Trifilo MJ, Edelmann KH, et al. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence *in vivo*. *Nat Med*, 2006, 12(11): 1301-9
- [45] Ejrnaes M, Filippi CM, Martinic MM, et al. Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. *J Exp Med*, 2006, 203(11), 2461-72
- [46] Shin H, Blackburn SD, Blattman JN, et al. Viral antigen and extensive division maintain virus-specific CD8 T cells during chronic infection. *J Exp Med*, 2007, 204(4): 941-9
- [47] Lang KS, Recher M, Navarini AA, et al. Inverse correlation between IL-7 receptor expression and CD8 T cell exhaustion during persistent antigen stimulation. *Eur J Immunol*, 2005, 35(3): 738-45
- [48] Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, et al. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature*, 1998, 393(6684): 478-80
- [49] Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature*, 1998, 393(6684): 474-8
- [50] Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, et al. T^H cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*, 1998, 393(6684): 480-3
- [51] Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, et al. CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature*, 2003, 421(6925): 852-6
- [52] Shedlock DJ, Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science*, 2003, 300(5617): 337-9
- [53] Sun JC, Bevan MJ. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science*, 2003, 300(5617): 339-42
- [54] Castellino F, Huang AY, Altan-Bonnet G, et al. Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8⁺ T cells to sites of

- CD4⁺ T cell-dendritic cell interaction. *Nature*, 2006, 440 (7086): 890-5
- [55] Janssen EM, Droin NM, Lemmens EE, et al. CD4⁺ T-cell help controls CD8⁺ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature*, 2005, 434(7029): 88-93
- [56] Intlekofer AM, Takemoto N, Kao C, et al. Requirement for T-bet in the aberrant differentiation of unhelped memory CD8⁺ T cells. *J Exp Med*, 2007, 204(9): 2015-21
- [57] Williams MA, Tyznik AJ, Bevan MJ. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8⁺ memory T cells. *Nature*, 2006, 441(7095): 890-3
- [58] Purton JF, Tan JT, Rubinstein MP, et al. Antiviral CD4⁺ memory T cells are IL-15 dependent. *J Exp Med*, 2007, 204 (4): 951-61
- [59] Lenz DC, Kurz SK, Lemmens E-et al. IL-7 regulates basal homeostatic proliferation of antiviral CD4⁺T cell memory. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(25): 9357-62.
- [60] 吴长有. 初始和记忆 T 细胞的研究进展. *现代免疫学*, 2005, 25(5): 353-6
- [61] Lanzavecchia A, Sallusto F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol*, 2005, 17(3): 326-32
- [62] Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A, et al. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*, 2004, 22: 745-63
- [63] 吴长有. 免疫记忆与疫苗研究开发. *中国免疫学杂志*, 2005, 21(1): 4-7
- [64] 李丽, 吴长有. Th1 细胞的分化、多样性、记忆细胞的形成及对疫苗研究的意义. *中国免疫学杂志*, 2006, 22(7): 680-1
- [65] 李丽, 吴长有. 多功能 T 细胞的检测及其意义. *中国免疫学杂志*, 2009, 25(2): 99-102