

小鼠胸腺髓质单阳性细胞的阴性选择*

田甜 张君 钱晓萍 高凌 陈慰峰**

北京大学医学部免疫学系, 北京 100083

摘要 阴性选择的目的是为了清除自身反应性 T 细胞, 诱导自身耐受的产生. 一般认为, 阴性选择发生在 DP 细胞阶段, 位于胸腺的皮髓质交界处. 通过小鼠腹腔注射抗 TCR $\alpha\beta$ 抗体, 建立胸腺阴性选择模型. 胸腺细胞表型分析表明, 阴性选择不仅包括胸腺皮质的 DP 细胞, 还包括髓质区 CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4SP 细胞和 CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺CD8SP 细胞. 髓质区 SP 细胞发生阴性选择的状况呈现“倒三角”的形状, 越是早期阶段的亚群细胞对凋亡诱导的抵抗性越低, 而随着细胞的逐渐成熟, 对凋亡诱导的抵抗性越来越高, 晚期的功能成熟细胞则不会发生阴性选择. 这一结果对传统的胸腺阴性选择学说是一个补充. 髓质区 SP 细胞阴性选择的目的是为了进一步清除自身反应性 T 细胞, 形成精确的 T 细胞受体库, 诱导自身耐受的产生.

关键词 阴性选择 胸腺细胞 表型分析

小鼠胸腺细胞在由 CD4⁺CD8⁺ 双阳性(DP)向成熟的髓质型 CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD8⁻ 单阳性(CD4SP)和 CD4⁻CD8⁺ 单阳性(CD8SP)分化的过程中经历了阳性选择和阴性选择. 阴性选择是通过凋亡的方式清除对自身肽高亲和力的 T 细胞, 保障自身耐受的形成^[1]. 阴性选择的信号是通过 T 细胞受体(TCR)与抗原提呈细胞(APC)表面的肽-MHC 复合物的相互作用来传递的. 胸腺细胞的阴性选择不仅需要 TCR 的交联, 还需要 APC 细胞提供辅助刺激信号. 一般认为, 阴性选择发生在皮质区 DP 细胞阶段, 然而, 胸腺髓质区富含 APC 细胞, 循环的自身抗原也可通过血流进入胸腺髓质, 因此, 胸腺髓质是进行阴性选择的理想场所^[2].

胸腺髓质 T 细胞包括 CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4SP 细胞和 CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺CD8SP 细胞. 根据我室的前期工作, 这些细胞的表型和功能存在不均一性. 根据表面标志的不同, 髓质型的 SP 细胞发育可分为 4 个亚群阶段. 其中, 6C10⁺HSA^{high} 细胞处于髓质发育早期, 功能不成熟; 而 Qa-2⁺ 细胞处于发育晚期, 功能非常成熟^[3]. 本实验经小鼠腹腔注射抗 TCR $\alpha\beta$ 抗体(a-TCRmAb), 建立了胸腺阴性选择模

型. 胸腺细胞表型分析表明, 阴性选择不仅包括胸腺皮质的 DP 细胞, 还发生在髓质区 CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺SP 细胞阶段. 发生阴性选择的髓质 T 细胞主要是表型和功能不成熟的 6C10⁺HSA^{high} 细胞. 这说明髓质区 SP 细胞在迁入髓质一段时间内还可进行阴性选择, 其目的可能是进一步清除自身反应细胞, 精确调控 T 细胞库.

1 材料和方法

实验动物 BALB/c 小鼠, 6~8 周, 雌性, 购自中国科学院遗传研究所.

BALB/c 小鼠腹腔注射 a-TCR $\alpha\beta$ mAb(700 μ g/只), 48 h 后, 取小鼠胸腺细胞进行表型分析, 以腹腔注射 PBS 的小鼠作为正常对照.

直接抗体染色法为 1×10^6 细胞加入 1 μ g 不同荧光标记的抗体, 4 $^{\circ}$ C, 40 min 温育后, 用 2% 新生小牛血清-等渗 HEPES 平衡盐溶液(2% NCS-BSS)洗去游离抗体. 间接染色法为先加入 100 μ L 细胞培养上清或 1 μ g 生物素标记的抗体, 4 $^{\circ}$ C, 40 min, 2% NCS-BSS 洗去游离抗体, 加入终浓度 1:100 的荧光标记的羊抗大鼠 Ig 或者亲和素, 2% NCS-BSS 洗去

2001-06-06 收稿, 2001-07-09 收修改稿

* 国家自然科学基金(批准号: 39730410)和国家重点基础研究发展规划资助项目
联系人, E-mail: wfchen@public.bta.net.cn

游离抗体。染色后的细胞加入 FACS 保存液, 用 cellquest 软件在装配双激光管的流式细胞仪 (FACS Calibur, BD 公司) 上进行分析。多重染色时, 用同种型荧光染色的对照调节流式细胞仪的电压, 用每种荧光抗体的单染对照调节各种荧光之间的补偿。所有荧光抗体来源于 Pharmingen 公司。

2 结果和讨论

小鼠胸腺细胞根据细胞表面 CD4 和 CD8 分子的表达分为 CD4⁻ CD8⁻ DN, CD4⁺ CD8⁺ DP, CD4SP, CD8SP 等 4 个亚群。将新鲜分离的小鼠胸腺细胞进行荧光标记的抗 CD4 mAb, CD8 mAb,

TCR $\alpha\beta$ mAb 和 CD3 mAb 四重染色, 流式细胞仪分析, 圈定不同细胞亚群, 并分析亚群细胞 TCR $\alpha\beta$ 和 CD3 的表达。结果(图 1)显示, 约 50% DN 细胞呈 CD3⁻ TCR $\alpha\beta$ ⁻, 50% 细胞 CD3⁺ (其中 TCR $\alpha\beta$ ⁺ 占 80%, TCR $\alpha\beta$ ⁻ 占 20%); DP 细胞 CD3 和 TCR $\alpha\beta$ 的含量由低中度向高度表达过渡; 95% 以上的 CD4SP 细胞呈现 CD3⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺, 为成熟的髓质型单阳性细胞; CD8SP 细胞可明显分为 CD3⁻ TCR $\alpha\beta$ ⁻ (50%) 和 CD3⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺ (50%) 两个亚群, CD3⁻ TCR $\alpha\beta$ ⁻ CD8SP 细胞位于胸腺皮质, 是 DN 细胞向 DP 细胞发育的过渡状态, CD3⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD8SP 细胞为成熟的髓质型单阳性细胞^[4]。

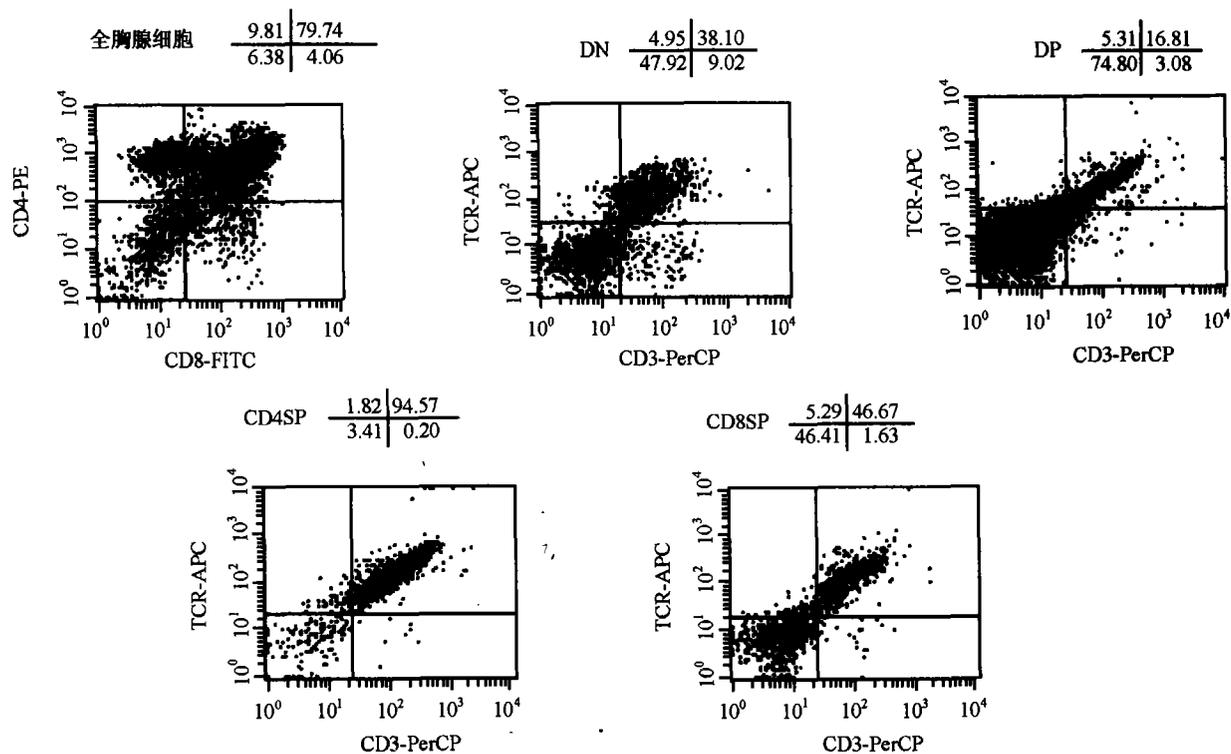


图 1 小鼠胸腺细胞各亚群 CD3 和 TCR $\alpha\beta$ 的表达

小鼠腹腔注射 α -TCR 抗体, 48 h 后, 小鼠胸腺明显萎缩, 细胞数目仅占正常对照的 3%。分析各亚群细胞的表型, 结果显示, 绝大部分 DP 细胞被清除, 存留细胞中 CD4SP 占 60%, CD8SP 占 15%, DN 细胞占 21%, DP 细胞占 4%。分析各亚群细胞 CD3 和 TCR $\alpha\beta$ 的表达, 发现 SP 细胞均高表达细胞 CD3 和 TCR $\alpha\beta$, 不成熟的 CD3⁻ TCR $\alpha\beta$ ⁻ CD8SP 细胞被清除; DN 细胞中大部分 CD3⁻ TCR $\alpha\beta$ ⁻ 细胞消失, 80% 以上 DN 细胞 CD3⁺

TCR $\alpha\beta$ ⁺。存留的 DP 细胞大部分表达 CD3 和 TCR $\alpha\beta$ 。分析结果见图 2。

CD3⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4SP 细胞位于胸腺髓质, 为成熟的单阳性细胞。这些细胞在胸腺髓质仍需要进一步发育才能成为表型和功能成熟的细胞迁出胸腺^[5]。小鼠经体内 α -TCR 抗体处理后, 不成熟表面标志 6Cl0⁺ 的细胞比例由正常对照的 23% 下降到 11%, HSA^{high} 的细胞比例由正常对照的 41% 下降到 25%, 而成熟标志 Qa-2⁺ 的细胞比例由正常对照的 12% 上升到 32%。

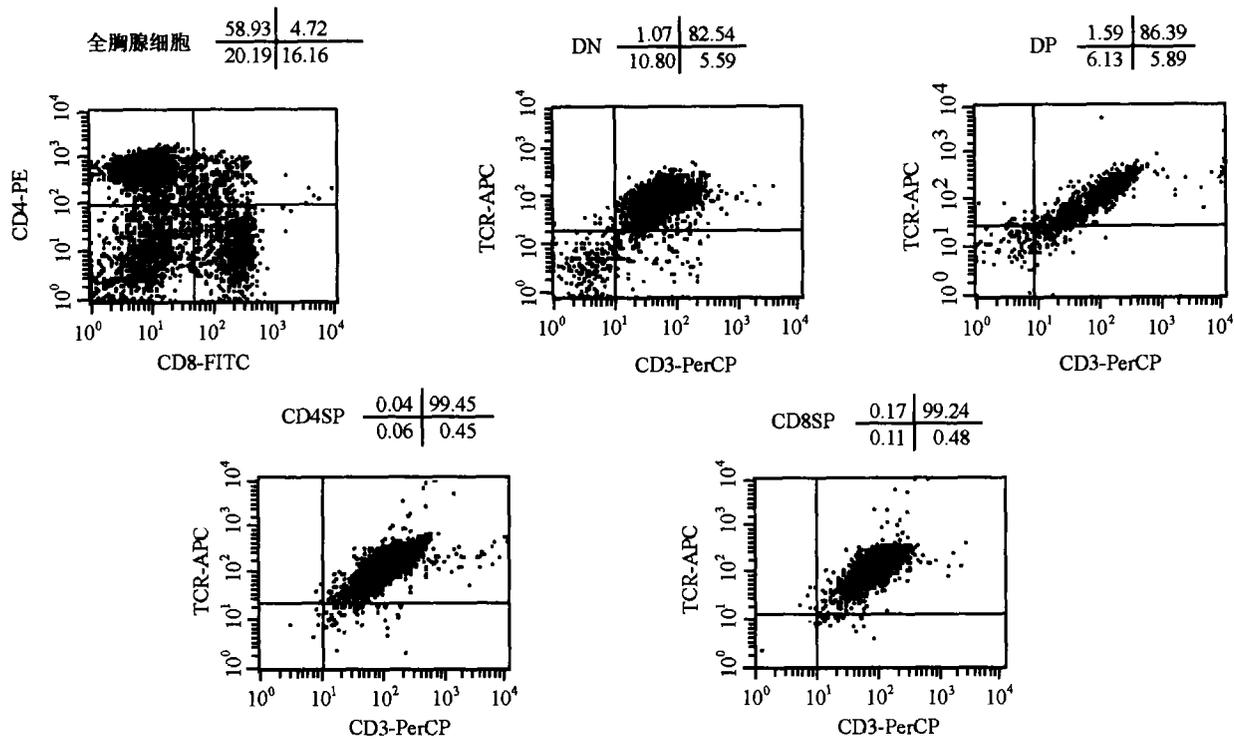


图 2 小鼠经体内 α -TCR 抗体处理后, 各亚群细胞 CD3 和 TCR $\alpha\beta$ 的表达

小鼠经体内 α -TCR 抗体处理后, 不成熟的 CD3⁻TCR $\alpha\beta$ ⁻CD8SP 细胞被清除, 存活的 CD8SP 细胞均是高表达细胞 CD3 和 TCR $\alpha\beta$, 为髓质型成熟的 SP 细胞. 其中, 6C10⁺ 的细胞比例由正常对照的 34% 下降到 10%, HSA^{high} 的细胞比例由正常对照的 39% 下降到 20%, 而成熟标志 Qa-2⁺ 的细胞比例由正常对照的 21% 上升到 41%.

胸腺是 T 细胞发育的主要场所. 胸腺前体细胞由骨髓迁入胸腺, 经历多次克隆选择最终产生成熟的功能性 T 细胞. 按照细胞表面标志的变化, $\alpha\beta$ T 细胞的发育过程可分为以下步骤: CD4⁻CD8⁻ → CD4⁺CD8⁺ → CD4⁺CD8⁻ 或 CD4⁻CD8⁺. 只有当细胞表面表达功能性 pT α 和 TCR β , 即 pre-TCR 复合物后, CD4⁻CD8⁻ 细胞才能发育成为 CD4⁺CD8⁺ 细胞, 这一过程称为 β 选择. 经历 β 选择后的细胞随后进行 TCR α 基因的重排. 一旦 CD4⁺CD8⁺ 胸腺细胞表达克隆特异的 TCR $\alpha\beta$, 这些细胞就与胸腺基质细胞呈递的肽-MHC 复合物相互作用, 经历阳性, 阴性选择, 上调 TCR 分子表达, 下调 CD4 或者 CD8 分子, 由胸腺皮质迁入髓质, 发育成为功能成熟, 自身耐受性和 MHC 限制性的多功能 CD4⁺CD8⁻ 或 CD4⁻CD8⁺ 单阳性 T 细胞亚群.

胸腺髓质区的 SP 细胞为异质性细胞群体, 细胞

在髓质区停留约 2 周, 在此期间, 这些细胞经历了表型乃至功能的进一步成熟, 然后迁出胸腺. 这些细胞是否还会经历阴性选择, 这是近年来的研究热点. 阴性选择的目的是为了清除自身反应性 T 细胞, 诱导自身耐受的产生. 一般认为, 阴性选择发生在 DP 细胞阶段, 位于胸腺的皮髓质交界处, 位于胸腺髓质的 SP 细胞较为成熟, 不会发生阴性选择, 但是越来越多的证据对此提出质疑. 1999 年, Baldwin 等^[6]发现, T 细胞的阴性选择贯穿胸腺细胞的整个发育过程. 较为成熟的髓质型 HSA^{low}CD69^{low}CD4SP 细胞比不成熟的 HSA^{high}CD69^{int} 细胞更易被清除. 我室的工作表明, 97% 的胸腺髓质 SP 细胞呈 Fas⁺, 表达 FasL 的树突状细胞可诱导 SP 细胞发生凋亡^[7].

阴性选择不仅需要胸腺细胞的 TCR 识别 APC 呈递的肽-MHC 复合物, 还需要 APC 表面辅助刺激分子提供第二信号. 小鼠腹腔注射 α -TCR 或者 α -CD3 抗体, 可诱导胸腺细胞阴性选择. 在这一模型中, 辅助刺激信号可由胸腺 APC 细胞提供, 48 h 后, 通过分析细胞表型, 可观察各亚群细胞的阴性选择情况. 我们采用多重染色的方法进行细胞表型分析, CD4 和 CD8 分子染色将细胞分为 DN, DP, CD4SP, CD8SP 等 4 个亚群, 再结合其他表面标志

的染色,可以系统分析各个亚群细胞的凋亡情况.这种方法直观、准确,可同时分析4个亚群的表型.

小鼠经体内 α -TCR 抗体处理后,95%以上胸腺细胞被清除,绝大部分 DP 细胞消失,这与自然状态下胸腺细胞的阴性选择相似.存活细胞以髓质型 $CD3^+ TCR\alpha\beta^+$ SP 细胞和 $CD3^+ TCR\alpha\beta^+$ DN 细胞为主. $CD3^- TCR\alpha\beta^-$ DN 细胞处于胸腺细胞发育的早期阶段,先发育至 DP 最后分化成为 $CD3^+ TCR\alpha\beta^+$ SP(包括 CD4SP 和 CD8SP)的细胞系.而 $CD3^+ TCR\alpha\beta^+$ DN 细胞不同于处于胸腺细胞发育的早期阶段的 $CD3^- TCR\alpha\beta^-$ DN 细胞,是一个独特的细胞亚群,位于胸腺髓质,细胞体积较小,大部分细胞可的松耐受,表型较为成熟,与髓质型 SP 细胞相当^[8].

结合我室前期的研究工作,髓质型的 CD4SP 和 CD8SP 细胞依照不成熟表面标志 6C10, HSA 和成熟标志 Qa-2 的表达,可分为4个亚群.SP 细胞在髓质中的发育顺序为: $6C10^+ HSA^{high} \rightarrow 6C10^- HSA^{high} \rightarrow 6C10^- HSA^{int-low} \rightarrow Qa-2^+$

$6C10^+ HSA^{high}$ 细胞为髓质发育早期的功能不成熟细胞,而 $Qa-2^+$ 细胞为晚期的功能成熟细胞.在髓质型 CD4SP 细胞中, $6C10^+ HSA^{high}$ 占 23%, $6C10^- HSA^{high}$ 占 18%, $6C10^- HSA^{int-low}$ 占 47%, $Qa-2^+$ 占 12%.小鼠腹腔注射 α -TCR 抗体 48 h 后,CD4SP 细胞中 $6C10^+$ 细胞比例降低至 11%,说明第一群的 $6C10^+ HSA^{high}$ 细胞中,52% 细胞被阴性选择清除.若仅有 $6C10^+ HSA^{high}$ 细胞发生凋亡,CD4SP 细胞中 $Qa-2^+$ 细胞比例应增高至 15%,而在此模型中, $Qa-2^+$ 细胞比例高达 32%,说明在 CD4SP 细胞发育的中间阶段,即 $6C10^- HSA^{high}$ 和 $6C10^- HSA^{int-low}$ 亚群细胞中,仍有细胞发生阴性选择,据推算,这两个亚群细胞中,有 23% 细胞发生凋亡.

髓质型 CD8SP 细胞与此类似,只是亚群细胞所占比例不同,其中, $6C10^+ HSA^{high}$ 占 34%, $6C10^-$

HSA^{high} 占 6%, $6C10^- HSA^{int-low}$ 占 39%, $Qa-2^+$ 占 21%.小鼠腹腔注射 α -TCR 抗体 48 h 后,第一群的 $6C10^+ HSA^{high}$ 细胞中,70% 细胞凋亡,在中间阶段,即 $6C10^- HSA^{high}$ 和 $6C10^- HSA^{int-low}$ 亚群细胞,有 20% 细胞发生凋亡.

综上所述,本试验通过小鼠腹腔注射抗 $TCR\alpha\beta$ 抗体,建立了胸腺阴性选择模型.结果表明,胸腺阴性选择不局限于皮质区的 DP 细胞,还包括髓质区的 SP 细胞,髓质区 SP 细胞发生阴性选择的状况呈现“倒三角”的形状,越是早期阶段的亚群细胞对凋亡诱导的抵抗力越低,而随着细胞的逐渐成熟,对凋亡诱导的抵抗力越来越高,晚期的功能成熟细胞则不会发生阴性选择.这一结果对传统的胸腺阴性选择学说是一个补充.胸腺髓质细胞阴性选择的目的是在髓质 SP 细胞中还存在自身反应性 T 细胞,阴性选择可进一步清除自身反应性 T 细胞,形成精确的 TCR 库,诱导自身耐受的产生.

参 考 文 献

- 1 Fisher A, et al. Natural and engineered disorders of lymphocyte development. *Science*, 1998, 20: 237
- 2 Kishighmkoto H, et al. Negative selection in the thymus includes semimature T cells. *J Exp Med*, 1997, 185(2): 263
- 3 Tian T, et al. Heterogeneity within medullary type $TCR\alpha\beta^+ CD3^+ CD4^- CD8^+$ thymocytes in normal mouse thymus. *Int Immunol*, 2001, 13(3): 313
- 4 田 甜, 等. 小鼠 $CD3^- TCR\alpha\beta^+ CD4^- CD8^+$ 胸腺细胞的研究. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2001, 21(3): 244
- 5 Ge Q, et al. Effect of murine thymic epithelial cell line (MTEC1) on the functional expression of $CD4^+ CD8^-$ thymocyte subgroups. *Int Immunol*, 2000, 12(8): 1127
- 6 Baldwin K K, et al. Negative selection of T cells occurs throughout thymic development. *J Immunol*, 1999, 63: 689
- 7 董海东, 等. 细胞膜分子在表达 Fas 配体的小鼠胸腺树突状细胞诱导凋亡中的应用. *中国科学, C 辑*, 1998, 28(2): 160
- 8 Bean A G D, et al. CD38 expression on mouse T cells: CD38 defines functional distinct subsets of $\alpha\beta TCR^+ CD4^- CD8^-$ thymocytes. *Int Immunol*, 1995, 7(2): 213