

TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁻ CD8⁻ 细胞 在胚胎胸腺器官培养中的发育特征*

肖士云** 李燕** 钱晓萍 王月丹 陈慰峰***

北京大学医学部免疫学系, 北京 100083

摘要 为研究 TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁻ CD8⁻ 双阴性(DN)胸腺细胞在胚胎胸腺中的发育特征, 采用胚胎胸腺器官培养(FTOC)体系、免疫荧光标记与流式细胞仪检测技术, 对 FTOC 体系中不同发育阶段(第9天和第18天)的 TCR $\alpha\beta$ ⁺ DN 细胞的增殖、分化及凋亡特性进行了分析. 结果表明, 抗 CD3 单抗能够显著促进 FTOC 第18天的 TCR $\alpha\beta$ ⁺ DN 细胞的增殖, 对 FTOC 第9天的 TCR $\alpha\beta$ ⁺ DN 细胞作用相对较弱. IL-7 能够促进 FTOC 第9天的 TCR $\alpha\beta$ ⁺ DN 细胞向 TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁺/CD8⁺ SP 细胞分化; 对 FTOC 第18天的 TCR $\alpha\beta$ ⁺ DN 细胞促分化作用明显减弱. 胸腺基质细胞系 MTEC5 细胞可调节 IL-7 的促分化作用. 同时, 实验发现在 FTOC 体系中的 TCR $\alpha\beta$ ⁺ DN 细胞是一群不易凋亡的细胞, 从而对该特殊亚群胸腺细胞的发育分化特性获得了新的认识.

关键词 FTOC TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁻ CD8⁻ 胸腺细胞

TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁻ CD8⁻ (TCR $\alpha\beta$ ⁺ DN) 细胞是一群不同于 CD4⁺/CD8⁺ SP 细胞的 TCR $\alpha\beta$ ⁺ 细胞亚群, 是胸腺细胞发育的一个独特谱系. 在正常胸腺 DN 细胞中占有一定比例, 且与种属有关. 在胚胎和成年胸腺、骨髓、外周淋巴组织及胃肠上皮中均有分布^[1,2]. 目前研究已经明确 TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁻ CD8⁻ 细胞的特点是优势表达 V β 8.2 TCR、能够产生高水平的 IL-4, 以及小鼠 IL-17 mRNA 在活化的 TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁻ CD8⁻ T 细胞的特异表达^[3,4]. 近年来越来越多的研究表明该亚群细胞在免疫调节尤其免疫耐受的维持中发挥重要作用, 是一种抗原特异性的调节性 T 细胞, 能够抑制具有相同 TCR 特异性的 CD8⁺ T 细胞的功能. 因此对 TCR $\alpha\beta$ ⁺ DN 细胞及其免疫抑制机理的研究将对解释外周自身耐受机制以及如何获得移植耐受具有重要的意义^[5]. 但是目前有关 TCR $\alpha\beta$ ⁺ DN 细胞的来源、发育、特点及其免疫调节机理仍远未阐明. 在胚胎胸腺器官培养(FTOC)体系中, 我们发现 TCR $\alpha\beta$ ⁺ DN 细胞呈优势生长, 为研究 TCR $\alpha\beta$ ⁺ DN 细胞在胚胎胸腺中的发育特征提供了有利条件. 我们对 FTOC 体系中

TCR $\alpha\beta$ ⁺ DN 细胞的表型、增殖、分化及凋亡几方面特性进行分析, 以期对该特殊亚群胸腺细胞的发育及功能特征进行深入了解.

1 材料与方法

1.1 实验动物和细胞系

定期怀孕 13~15 d 的 Balb/c 孕鼠, 4~6 周龄成年鼠来源于中国科学院遗传研究所. 小鼠胸腺基质细胞系 MTEC5 为本室建立的胸腺髓质型上皮细胞来源的细胞系^[6].

1.2 细胞因子与抗体

rhIL-7, FITC/PE 标记的抗 CD4 (GK1.5), PerCP 标记的抗 CD8 (536.7), APC 标记的抗 TCR β (H57-597), 均购自 PharMingen. 抗 CD4 (GK1.5) 和仓鼠抗小鼠 CD3 (145-2C11) 抗体为本室制备.

1.3 胚胎胸腺器官培养(FTOC)

取定期怀孕 13~15 d 的 Balb/c 孕鼠, 剖腹取出

2002-11-27 收稿; 2003-01-24 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

** 同等贡献作者

*** 联系人, E-mail: wfch@public.bta.net.cn

胚胎小鼠, 置于 RPMI1640-10% 新生牛血清(NCS) 培养基中. 体视显微镜下解剖胚胎小鼠, 取出胸腺小叶, 置于上述培养基中备用. 将凝胶海绵置(Uppjohn Co. Kalama Zoo, MI, USA) 6 孔细胞培养板中, 加入 RPMI1640-10% FCS 培养基使凝胶海绵充分浸润, 将经煮沸处理的 0.8 μ m 微孔滤膜置于凝胶海绵上, 并将胚胎胸腺小叶放置滤膜边缘, 约每孔 20~30 小叶, 于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 保持湿度的孵箱中培养, 每隔 2~3 d 更换一次培养基.

1.4 流式细胞仪分析(FACS)细胞表型

取 FTOC 培养不同时间的胸腺小叶, 置于 400 目尼龙网研磨, 用平衡盐缓冲液(BSS-2% NCS) 洗涤细胞两次, 调整细胞至适当浓度进行染色. 采用直接抗体染色法, 每 1×10^6 细胞中加入 1 μ g 不同荧光标记的抗体, 4 $^{\circ}$ C 40 min 后, BSS-2% NCS 洗去游离抗体, 加入 FACS 保存液, 用 Cellquest 软件在双激光管流式细胞仪上(FACS Calibur, BD 公司) 进行分析.

1.5 TCR⁺ CD4⁻ CD8⁻ 细胞分选

收获 FTOC 第 9 天和第 18 天胚胎胸腺小叶制备细胞悬液, 加于预先包被抗 CD4(GK1.5) 单抗腹水(终浓度 1:100) 的 Maxisorp 聚苯乙烯培养皿(Nunc 公司) 中, 37 $^{\circ}$ C 2 h, 用 BSS-2% NCS 液轻轻冲洗, 收获游离细胞以富集 CD4⁻ CD8⁻、CD4⁻ CD8⁺ 细胞, 进行 CD4-PE, CD8-Cy5, TCR-APC 3 色染色, 无菌条件下用 FACS Vantage 分选 TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁻ CD8⁻ 细胞.

1.6 ³H-TdR 掺入法测定细胞增殖

分选出 FTOC 第 9 天和第 18 天的 TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁻ CD8⁻ 细胞(2×10^5 /孔) 加入预先包被不同浓度抗 CD3 单抗(终浓度 1:50, 1:100, 1:200) 的 96 孔板中. 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养 48 h, 于收获细胞前 8 h 加入 ³H-TdR, 收获细胞, β 液闪仪(Wallac) 测定 cpm 值.

1.7 细胞共育与表型分析

取生长良好的胸腺基质细胞 MTEC5, 按 1×10^4 /孔接种 96 孔板, 待细胞长至 80% 满时, 加入 2×10^5 /孔的 TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁻ CD8⁻ 细胞和/或 rhIL-7(终浓度 50 U/mL), 48 h 后收获细胞计数, 并作 CD4-PE, CD8-Percp, CD3-Cy5 3 色染色分析表型变化.

1.8 细胞凋亡检测

收获 FTOC 不同时间胚胎胸腺细胞, 进行

CD4-PE, CD8-percp, TCR β -APC3 色标记, 并用 FITC-Annexin V 检测试剂盒(PharMingen) 经 FACS 分析检测细胞凋亡.

2 结果

2.1 TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁻ CD8⁻ 细胞在 FTOC 中的动态产生过程

13~14 d 胚胎小鼠来源的胸腺细胞表型均为 TCR⁻ CD4⁻ CD8⁻, 随着在 FTOC 体系中培养时间的延长, CD4⁻ CD8⁻ 细胞数量逐渐减少, CD4⁺ CD8⁺ 及 CD4⁺/CD8⁺ SP 细胞逐渐增多, 至 FTOC 培养的第 7 天, CD4⁻ CD8⁻ 细胞比例降至占培养胸腺小叶细胞总数的 8.2%. 此后, CD4⁻ CD8⁻ 细胞又逐渐增多, 在第 18 天时占胸腺小叶细胞总数的 21%. 在第 30 天时, 这个比例可高达 40%. 同时, 对 CD4⁻ CD8⁻ 细胞的 TCR 表达进行分析发现, 在 FTOC 培养第 4 天, TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁻ CD8⁻ 细胞占 CD4⁻ CD8⁻ 细胞的 10%, 第 18 天时为 50%, 至培养第 30 天时高达 68%. 这表明从 FTOC 第 7 天开始, DN 细胞中具有分化潜能的 TCR⁻ CD4⁻ CD8⁻ 胸腺细胞逐渐减少, TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁻ CD8⁻ 细胞逐渐成为主体, 但在 FTOC 的整个过程中均可以检测到 TCR⁻ CD4⁻ CD8⁻ 细胞的存在(图 1).

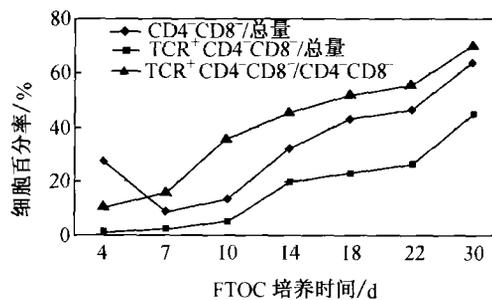


图 1 TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁻ CD8⁻ 细胞在 FTOC 中的动态产生过程

2.2 抗 CD3 单抗对 TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁻ CD8⁻ 细胞的促增殖作用

应用流式细胞仪分选 FTOC 第 9 天和第 18 天的 TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁻ CD8⁻ 细胞, 并用 ³H-TdR 掺入法检测其增殖能力. 结果发现, 固相抗 CD3 单抗可促进 FTOC 第 18 天的 TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁻ CD8⁻ 细胞增殖, 增殖程度与刺激所用的抗 CD3 单抗剂量呈正相关, 但其增殖能力低于外周 T 细胞. 而抗 CD3 单抗对来源于 FTOC 第 9 天 TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁻ CD8⁻ 细胞的促增殖

能力相对较弱(表1).

表1 抗CD3单抗促进TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ 细胞的增殖

刺激剂	$^3\text{H-TdR}$ 掺入量/(计数 $\cdot\text{min}^{-1}$)		
	TCR $\alpha\beta^+$ DN 细胞 (第9天)	TCR $\alpha\beta^+$ DN 细胞 (第18天)	外周 T 细胞
抗-CD3 单抗 (1:50)	8057 \pm 402	42576 \pm 2346	52543 \pm 2553
抗-CD3 单抗 (1:100)	8465 \pm 367	31470 \pm 2224	41356 \pm 3281
抗-CD3 单抗 (1:200)	7652 \pm 234	17520 \pm 2023	22637 \pm 2130
培养基对照	625 \pm 157	642 \pm 236	528 \pm 187

2.3 IL-7 促进 TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ 细胞向 TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^+$ /CD8 $^+$ SP 细胞分化

在 FTOC 第 18 天, TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ 细胞数量增加, 同时 TCR $\alpha\beta^+$ CD4/CD8 单阳性(SP)细胞也增加. 分离出两个发育阶段即第 9 天与第 18 天的 TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ 细胞, 观察 TCR $\alpha\beta^+$ DN 细胞在 IL-7 或和胸腺基质细胞系 MTEC5 细胞共育诱导下的表型变化. 结果表明, 来源于 FTOC 第 9 天的 TCR $\alpha\beta^+$ DN 细胞与 IL-7 共育 2d 后可向 TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^+$ SP 及/CD8 $^+$ SP 细胞分化, 其阳性率分别达 22% 和 13%, 且 CD3 表达均高达 98%, 但未见双阳性(DP)细胞出现. 当有 MTEC5 细胞存在时, 可促进其分化作用, 其中 CD4 $^+$ SP 细胞达 36%, CD8 $^+$ SP 为 30%, 分别增加了 0.7 倍和 1.4 倍. 单独应用 IL-7 也能促进 FTOC 第 18 天来源的 TCR $\alpha\beta^+$ DN 细胞向 CD4 $^+$ /CD8 $^+$ 细胞分化, 但其作用明显减弱, CD4 和 CD8 的阳性率分别为 15% 和 5.3%. MTEC5 存在时对 CD4 $^+$ SP 与 CD8 $^+$ SP 细胞的生成比例无明显改变. 在无 IL-7 的对照组培养中细胞大量死亡, 因此未能收获到足量细胞进行分析(图 2).

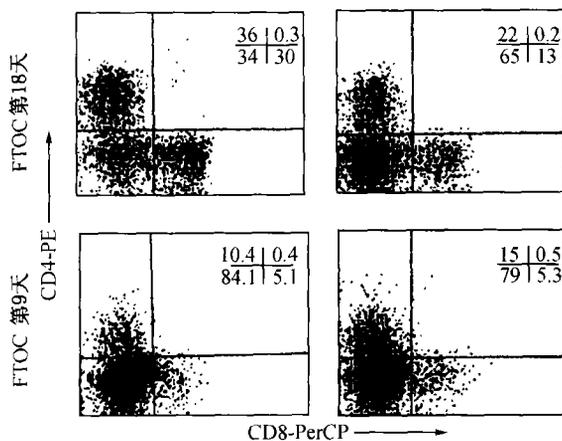


图2 IL-7 促进 TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ 细胞向 TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^+$ /CD8 $^+$ SP 细胞分化

2.4 TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ 细胞在 FTOC 中的凋亡动态变化

在 FTOC 培养后期, TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ 细胞在 DN 细胞及细胞总数中的比例持续增加, 这种现象是由于在 FTOC 培养后期的微环境更适合该亚群细胞发育增殖抑或该亚群细胞不易凋亡而造成? 为此我们对其可能原因进行了初步分析, 对各阶段各细胞亚群凋亡特性的检测结果表明, 在 FTOC 培养的前 7 天, 尽管 CD4 $^-$ CD8 $^-$ 细胞亚群凋亡率最高, 但 TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ 细胞与其他各亚群(CD4 $^+$ /8 $^+$ SP, DP 细胞)相比, 凋亡率最低, 且这种趋势保持在 FTOC 的全程发育阶段. TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ 细胞亚群的凋亡率偏低, 可能不足以使其在培养后期的比例显著增加, 但至少提示 TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ 细胞不易凋亡是其后期比例增高的重要原因之一(图 3).

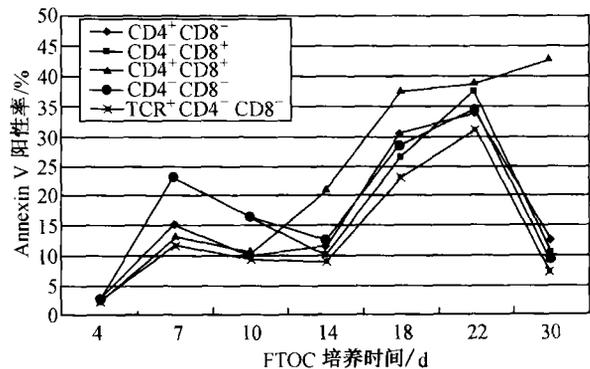


图3 TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ 细胞在 FTOC 中的凋亡动态变化

3 讨论

我们的实验研究发现, 在 FTOC 培养开始就能够检测到 TCR $\alpha\beta^+$ DN 细胞的产生, 且随着培养时间的延长, 该亚群细胞在胸腺小叶细胞总数及 DN 细胞中的比例均逐渐增加(见图 3). 这表明在 FTOC 培养过程中 TCR $\alpha\beta^+$ DN 细胞渐趋优势生长, 在培养后期越趋成为主体, 这为我们研究该亚群细胞的特性提供了有利条件.

尽管对 TCR $\alpha\beta^+$ DN 细胞这一特殊亚群细胞的发现由来已久, 但是对其分化潜能的文献报道研究甚少. 早期曾有报道, TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ 细胞主要是一群非增殖的细胞亚群, 几乎不具有前体细胞活性, 不同于 TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ 细胞, 它不是主要胸腺细胞亚群或典型外周 T 细胞的前体, 因而是有别于胸腺细胞发育主流方向的独特谱系^[7,8]. 尽管

有人曾经报道, HSA⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺DN 细胞在 IL-7 作用下, 可以分化发育为 HSA⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺DN 细胞, 提示其来源可能与 HSA⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺DN 细胞有关, 但未能证实 IL-7 是否能够促进 TCR $\alpha\beta$ ⁺DN 继续分化^[9]. 我们的研究结果表明, IL-7 能够促进 FTOC 第 9 天或第 18 天来源的 TCR $\alpha\beta$ ⁺DN 细胞直接向 TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺/CD8⁺SP 细胞分化, 且未发现 DP 细胞出现. 另外, IL-7 对早期 FTOC 第 9 天的 TCR $\alpha\beta$ ⁺DN 细胞的作用较强, 胸腺髓质型基质细胞系 MTEC5 细胞的存在能显著促进 IL-7 的作用. IL-7 对后期第 18 天 TCR $\alpha\beta$ ⁺DN 细胞的作用明显减弱, MTEC5 细胞的存在对其促分化作用亦无明显改变. 因此, FTOC 第 9 天与第 18 天来源的 TCR $\alpha\beta$ ⁺DN 细胞均是具有向 TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺/CD8⁺SP 细胞分化潜能的细胞, 但其分化潜能随着在 FTOC 中的培养时间延长而减弱. 这一方面可能是因为培养后期具有分化潜力的细胞逐渐减少; 另一方面可能与胸腺的成熟与衰老、基质细胞退行性改变引起的微环境的改变有关^[10]. 因而也影响到 TCR $\alpha\beta$ ⁺DN 细胞的发育分化. 但是由 TCR $\alpha\beta$ ⁺DN 细胞分化而来的 TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺/CD8⁺SP 细胞的功能与由通常 TCR $\alpha\beta$ ⁻DN 细胞来源的有何不同将是值得深入研究的问题. 另一方面, 对 TCR $\alpha\beta$ ⁺DN 细胞增殖能力的研究发现, FTOC 第 18 天的 TCR $\alpha\beta$ ⁺DN 细胞对抗 CD3 单抗刺激具有显著增殖反应, 而第 9 天的 TCR $\alpha\beta$ ⁺DN 细胞增殖反应相比之下显著减弱, 其增殖能力相差数倍, 表明晚期的 TCR $\alpha\beta$ ⁺DN 细胞相比早期细胞功能更为成熟. 因此, TCR $\alpha\beta$ ⁺DN 细胞在胸腺内的发育是阶段性的, 经历了分化潜能逐渐降低而由功能不成熟走向成熟的过程.

Ralph 等报道 TCR $\alpha\beta$ ⁺DN 细胞是一群富集了针对自身抗原的 TCRV β 表达的且易于凋亡的细胞群体^[11,12]. 但在 FTOC 体系中该亚群细胞呈优势生长, 在 DN 细胞及细胞总数中的比例持续增加, 这种现象是由于 FTOC 体系培养后期的微环境更适合该亚群细胞发育增殖还是因为该亚群细胞不易凋亡而造成? 我们通过对 TCR $\alpha\beta$ ⁺DN 细胞与其他主要亚群细胞在不同阶段的凋亡特性分析发现, TCR $\alpha\beta$ ⁺DN 细胞的凋亡率在 FTOC 胚胎胸腺生长发育的各个阶段, 相比其他亚群始终保持最低. 这与 Ralph 等的报道不同. 可见在 FTOC 体系中的 TCR $\alpha\beta$ ⁺DN 细胞并不易凋亡. 加之 FTOC 培养与胸腺在体内的正常发育过程不同, 后期阶段既无造血

来源的干细胞的补充, 也无成熟的 SP 细胞的迁出. 此外长期的器官培养后大量细胞增生, 有限的胚胎胸腺小叶不足以支持大量的细胞存活, 细胞开始凋亡而减少也是其重要原因. 细胞总数在培养 18d 后开始减少, 最早减少的主要是 DP 细胞, 之后是 CD8⁺SP 与 CD4⁺SP 细胞, 培养后期主要的亚群是 TCR $\alpha\beta$ ⁺DN 细胞与 CD4⁺SP 细胞(数据未显示). 因此, 加上 TCR $\alpha\beta$ ⁺DN 细胞不易凋亡的特性, 造成了 FTOC 后期该亚群细胞比其他细胞亚群要多.

TCR $\alpha\beta$ ⁺DN 细胞作为特殊的调节性 T 细胞亚群的研究正在不断深入, 对 TCR $\alpha\beta$ ⁺DN 细胞及其免疫抑制机理的研究将对解释外周自身耐受机制以及如何获得移植耐受将具有重要的意义.

参 考 文 献

- 1 Bank I, et al. A functional T3 molecule associated with a novel heterodimer on the surface of immature human thymocytes. *Nature*, 1986, 322 (6075): 1792
- 2 Lew A, et al. Characterization of T cell receptor gamma chain expression in a subset of murine thymocytes. *Science*, 1986, 234 (4782): 1401
- 3 Kennedy J, et al. Mouse IL-17: A cytokine preferentially expressed by alpha beta TCR⁺CD4⁻CD8⁻T cells. *J Interferon Cytokine Res*, 1996, 16(8): 611
- 4 Bean A G, et al. CD38 expression on mouse T cells: CD38 defines functionally distinct subsets of alpha beta, TCR⁺CD4⁻CD8⁻ thymocytes. *Int Immunol*, 1995, 7(2): 213
- 5 Zhang Z X, et al. CD3⁺CD4⁻CD8⁻ alphabeta-TCR⁺T cell as immune regulatory cell. *J Mol Med*, 2001, 79(8): 419
- 6 舒石庄, 等. 八株小鼠胸腺基质细胞系的建立和鉴定. *北京医科大学学报*, 1993, 25: 237
- 7 Scollay R, et al. Developmental status and reconstitution potential of subpopulations of murine thymocytes. *Immunol Rev*, 1988, 104: 81
- 8 Wu L, et al. CD4⁻CD8⁻ thymocytes that express the T cell receptor may have previously expressed CD8. *Int Immunol*, 1990, 2 (1): 51
- 9 Takashi S, et al. Origin, differentiation, and repertoire selection of CD3⁺CD4⁻CD8⁻ thymocytes bearing either $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ T cell receptors. *J Immunol*, 1993, 150(2): 447
- 10 Takeoka Y, et al. The murine thymic microenvironment: Changes with age. *Int Arch Allergy Immunol*, 1996, 111(1): 5
- 11 Ralph C B, et al. The origin of CD4⁻CD8⁻ TCR $\alpha\beta$ ⁺ thymocytes: A model based on T-cell receptor avidity. *Immunology Today*, 1995, 16(9): 4289
- 12 Rawleigh C H, et al. Functional responsiveness *in vitro* and *in vivo* of alpha/beta T cell receptors expressed by the B2A2 (J11d)- subset of CD4⁻CD8⁻ thymocytes. *J Immunol*, 1989, 143 (1): 25