

NK 细胞和 CD8+T 细胞对靶细胞杀伤机制的异同

自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK) 是先天免疫中的一类十分重要的淋巴细胞, 通过其细胞毒活性可以杀伤靶细胞。CD8+T 细胞细胞表面表达 CD8 分子, 可以特异的杀伤靶细胞, 又称为细胞毒性 T 细胞或杀伤性 T 细胞。NK 细胞和 CD8+T 细胞都具有杀伤靶细胞的作用, 但它们对靶细胞的杀伤既有相同之处, 又有不同之处。本文对 NK 细胞和 CD8+T 细胞杀伤靶细胞机制的异同进行了概述。

1. NK 细胞和 CD8+T 细胞杀伤靶细胞机制的相同之处

NK 细胞和 CD8+T 细胞都可以通过以下途径杀伤相应的靶细胞: 穿孔素、颗粒酶、Fas/FasL、TNF- α 、INF- γ 和 LT 途径。

1.1 穿孔素途径

穿孔素 (perforin) 也称为成孔蛋白 (performing pertein, PFP), NK 细胞和 CD8+T 细胞上都有表达。1988 年, Podack 等[1]报道了人穿孔素的结构和表达, 人穿孔素基因定位于 10 号染色体 10q22, 基因全长 6218bp, 其 cDNA 长为 1668bp。人穿孔素蛋白由 534 个氨基酸残基组成, 其分子量约为 66~75KD。

穿孔素贮存于 CD8+T 细胞和 NK 细胞胞浆颗粒中, 是 CD8+T 细胞和 NK 细胞杀伤靶细胞的主要毒性蛋白。细胞激活后发生脱颗粒 (含有穿孔素、颗粒酶等), 释放穿孔素。在 Ca^{2+} 的存在下, 穿孔素单体可迅速附着于靶细胞膜, 嵌入细胞膜的双层磷脂中, 多个单体聚合形成打孔聚合物, 在靶细胞膜上形成不同孔径 (50~160nm) 的跨膜孔道, 从而导致靶细胞膜去极化。Na⁺、H₂O 经过通道进入胞内, 一些电解质和大分子物质流出胞外, 改变细胞膜渗透压, 最终引起靶细胞渗透性死亡。此过程与补体介导的溶细胞过程类似, 溶解细胞过程比较迅速。细胞本身可能释放 A 型硫酸软骨素蛋白聚糖、硫酸软骨素 A 限制因子, 因此可避免穿孔素对自身细胞的攻击。对靶细胞进行攻击后, 细胞与裂解的靶细胞分离, 又可继续攻击其它靶细胞[2]。

穿孔素还可以通过颗粒酶促进靶细胞凋亡而杀伤靶细胞[3]。穿孔素形成的传膜孔道有利于颗粒酶进入靶细胞。此外, 穿孔素还引起颗粒酶在靶细胞胞浆和胞核的重新分布, 使颗粒酶聚集在其裂解部位, 有利于裂解靶细胞。

1.2 颗粒酶途径

颗粒酶即颗粒相关丝氨酸酯酶, 属于糜蛋白酶超家族, 在 N 端具有保守序列[4]。目前人们已经认识到的颗粒酶有 10 多种, 而研究较多的主要是颗粒酶 B。颗粒酶 B 分子量约为 35KD, 编码人类颗粒酶 B 的基因位于人类 14q11.2 上, 含有 5 个外显子[5]。

颗粒酶与穿孔素一起贮存于 NK 细胞和 CD8+T 细胞的胞浆颗粒中, 细胞激活胞吐过程中, 颗粒酶和穿孔素一起释放入细胞间隙。颗粒酶可借助于穿孔素在靶细胞上形成的跨膜通道进入细胞中, 直接作用于靶细胞核, 通过激活半胱天冬氨酸蛋白酶 (caspase) 级联反应而诱发靶细胞凋亡[6]。颗粒酶 B 能活化大多数 procaspase, 是诱发凋亡能力最强的酶。四肽序列异亮-谷-苏-天冬氨酸是颗 B 最适识别单位, 也是 caspase-8 和 caspase-10 的识别位点。同时颗粒酶 B 还可以裂解多聚 ADP 核糖聚合酶、DNA 依赖性蛋白酶和核有丝分裂器等核底物, 直接引起细胞凋亡。Sutton 等[7]认为, Bcl-2 可阻断由颗粒酶 B 和穿孔素引起的细胞凋亡。

颗粒酶和穿孔素还可以通过细胞内非 caspase 依赖性途径诱发细胞凋亡, 这种作用不被病毒产物 CrmA 所抑制, 而颗粒酶 caspase 依赖性细胞毒作用可以被病毒产物 CrmA 所抑制[3]。

Shi 等[8]发现尽管颗粒酶 B 也能自主进入靶细胞, 不需要穿孔素的辅助, 但穿孔素对凋亡

过程的起始和颗粒酶 B 进入核内有关键作用。纯化的颗粒酶 B 以及其它颗粒酶单独存在不能引起靶细胞凋亡。

1.3 Fas/FasL 途径

Fas 分子也称为 APO-1 或 CD95, 属于 I 型跨膜糖蛋白, 含有 335 个氨基酸残基, 分子量约为 45000—50000[9]。Fas 分子膜外部分的氨基酸序列与肿瘤坏死因子受体和神经生长因子受体同源, 可以与 Fas 配体或抗 Fas 抗体结合并将刺激信号传入膜内部分; 膜内部分与 TNF-R1 的膜内部分同源。

FasL 是 II 型跨膜糖蛋白, 呈球状三聚体结构, 与 TNF 超分子家族具有同源性[10]。FasL 全长 278 个氨基酸残基, 经过糖基化的 FasL 分子量为 36—43KD。细胞受到抗原刺激或在 IL-2 存在的条件下, 其表面可以迅速地诱导出 FasL。

当 FasL 与 Fas 结合时, Fas 可以向细胞传递"死亡信号", 数小时内细胞凋亡[11-13]。Fas 的凋亡信号主要是通过与其胞浆区相关的死亡结构域蛋白 (FADD) 介导的。Fas 与 FasL 结合后, 受体发生多聚化, 胞浆区的死亡结构域蛋白 (DD) 也发生多聚化, 使得位于胞浆内的 FADD 可以通过其 C 端的 DD 与受体胞浆的 DD 结合。FADD 一方面通过 C 端的 DD 结合 Fas, 另一方面通过 N 端的死亡反应结构域 (DEM) 与 caspase-8 N 端的 DEM 结合, 通过 caspase-8 诱导效应性 caspase 蛋白酶的激活, 降解自身的 DEM 并最终导致细胞凋亡的发生。

Fas/FasL 途径与穿孔素-颗粒酶途径是相互独立的。去处穿孔素基因小鼠的 CTL, 或无穿孔素表达的 CTL 细胞素均可通过 Fas 途径杀伤靶细胞[14]; 而 FasL 基因突变小鼠 CTL 无活性 FasL 表达, 但仍可通过穿孔素-颗粒酶途径杀伤[15]。同时 Fas/ FasL 途径与穿孔素-颗粒酶途径杀伤靶细胞作用有一定的区别[16], 前者主要删除活化 T 细胞和 NK 细胞, 作用较迅速 (<4 小时), 无 Ca²⁺依赖性, 具半胱天冬氨酸依赖性。后者主要清除病毒感染细胞、恶性转化细胞及异体细胞, 作用反应迅速 (分一秒), 具有 Ca²⁺依赖性及部分 (核效应) 半胱天冬氨酸酶依赖性。

1.4 TNF- α 途径

人 TNF- α 前体由 233 个氨基酸残基组成, 含 76 个氨基酸残基的信号肽, 切除信号肽后成熟型 TNF- α 为 157 氨基酸残基, 非糖基化, 第 69 位和 101 位两个半胱氨酸形成分子内二硫键。小鼠 TNF- α 前体为 235 氨基酸残基, 信号肽 79 氨基酸残基, 成熟的小鼠 TNF- α 分子量为 17kDa, 由 156 个氨基酸残基组成, 第 69 位和 100 位两个半胱氨酸形成分子内二硫键, 有一个糖基化点, 但糖基化不影响其生物学功能。人的 TNF- α 基因长约 2.76kb, 小鼠为 2.78kb, 结构非常相似, 均由 4 个外显子和 3 个内含子组成, 与 MHC 基因群密切连锁, 分别定位于第 6 对和第 17 对染色体上[17]。

NK 细胞和 CD8+T 细胞都可以分泌细胞因子 TNF- α , TNF 通过①改变靶细胞溶酶体的稳定性, 导致多种水解酶外漏; ②影响细胞膜磷脂代谢; ③改变靶细胞糖代谢使组织中 pH 降低; ④以及活化靶细胞核酸内切酶, 降解基因组 DNA 从而引起程序性细胞死亡等机理杀伤靶细胞[18]。TNF 引起细胞死亡过程要明显慢于穿孔素溶解细胞的作用过程。

1.5 INF- γ 途径

人 INF- γ 成熟分子由 143 个氨基酸组成, 糖蛋白, 以同源双体形式存在, 分子量为 40kDa; 小鼠成熟 INF- γ 分子由 133 个氨基酸残基组成, INF- γ 生物学作用有严格的种属特异性。人和小鼠 INF- γ 基因分别定位于 12 号和 10 号染色体, 在 DNA 水平上 INF- γ 基因与 INF- α / β 基因无同源性。人和小鼠 INF- γ 在 DNA 水平上有 65%左右同源性, 在氨基酸水平的同源性只有 40%左右[3]。

NK 细胞和 CD8+T 细胞可以通过 INF- γ 来间接杀伤靶细胞。INF- γ 活化巨噬细胞, 使其杀伤寄生虫和胞内寄生菌的能力显著增强。

1.6 LT 途径

NK 细胞和 CD8+T 细胞都可以分泌淋巴毒素 (lymphotoxin, LT), LT 与靶细胞表面的相应受体结合后向细胞内移, 继而被溶酶体摄取, 导致溶酶体稳定性下降, 各种溶酶体酶外逸, 直接引起细胞溶解。LT 也可与靶细胞表面的 TNF R1 结合, 通过受体胞浆区的 DD 传递靶细胞凋亡信号[3]。

2. NK 细胞和 CD8+T 细胞杀伤靶细胞机制的相异之处

杀伤过程的不同之处

杀伤靶细胞过程中, NK 细胞和 CD8+T 细胞对靶细胞的识别方式、颗粒产生方式及杀伤特性是不同的。

CD8+T 细胞识别靶细胞是受 MHC- I 类分子限制的, 由 TCR 将特异的识别。而 NK 细胞虽然也可以通过表达的 KIR, CD94/NKG2 等受体识别靶细胞上的 MHC- I 类分子, 但其也可通过 NKR-P1 家族识别靶细胞上的某些碳水化合物, 或其他粘附分子识别靶细胞, 因此 NK 细胞是非 MHC- I 类分子限制的[19]。MHC- I 类分子丢失的病毒感染细胞对 CD8+T 细胞不敏感而对 NK 细胞变得更敏感。

NK 细胞和 CD8+T 细胞产生穿孔素/颗粒酶颗粒的方式是不同的[19]。NK 细胞本身存在这种颗粒, 而静止的 CD8+T 细胞中不存在这种颗粒。CD8+T 细胞只有与靶细胞上特异的 MHC- I 和抗原的复合物识别后, 或受到 IL-2 等刺激的情况下, 才会在胞浆内产生这种颗粒。

NK 细胞的杀伤功能属于先天免疫, 特异性差, 其对靶细胞的杀伤作用出现的早, 在体外 1 小时、体内 4 小时及见杀伤效果。而 CD8+T 细胞对靶细胞的杀伤属于细胞免疫, 从前提细胞诱导成成熟的效应 T 细胞需要一个应答过程, 一般需要一周以上, 但其识别和杀伤具有特异性, 而且免疫力维持时间较长。

2.2 NK 细胞杀伤靶细胞的机制—ADCC 途径

NK 细胞表达的 Fc γ RIIIa (CD16) 主要结合人的 IgG1 和 IgG3 的 Fc 端 (C γ 2、C γ 3 功能区), 在针对靶细胞特异性 IgG 抗体的介导下, 可杀伤相应的靶细胞, 这一杀伤过程称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (antibody dependent cell mediated cytotoxicity, ADCC) [3]。IL-2 和 IFN- γ 明显增强 NK 细胞介导的 ADCC 作用。NK 细胞发挥 ADCC 后, 其本身表达 Fas 并可通过 Fas/FasL 机制发生活化诱导的细胞死亡。

2.3 CD8+T 细胞杀伤靶细胞的机制

2.3.1 Leulalexin 途径

Leulalexin 又称 TNF 相关蛋白, CD8+T 细胞的胞浆颗粒(分泌型)和细胞膜表面(膜结合型)均表达 leulalexin[20]。存在于胞浆颗粒的分泌型 leulalexin 进入靶细胞的过程及发挥作用的过程都依赖于穿孔素, 可介导靶细胞凋亡。膜表面的结合型 leulalexin 可通过细胞—细胞直接接触杀伤靶细胞, 其机制可能类似于 FasL。

2.3.2 丝氨酸酯酶途径

活化的 CD8+T 细胞可释放多种丝氨酸酯酶, 如 CTLA-1、CTLA-3 等, 它们的作用可能类似与参加补体激活的酯酶样成分, 通过激活穿孔素而促进杀伤靶细胞[3]。

综上所述, NK 细胞和 CD8+T 细胞对靶细胞的杀伤既有相同点也有不同点。相同点主要集中在两者都可以通过穿孔素、颗粒酶、Fas/FasL、TNF- α 、INF- γ 和 LT 途径杀伤靶细胞; 杀伤不同点包括两者对靶细胞的识别方式、颗粒产生方式及杀伤特性不同, NK 细胞可以通过 ADCC 杀死靶细胞, CD8+T 细胞可以通过 leulalexin 和丝氨酸酯酶途径杀伤细胞。

参考文献

- [1] Podack ER, Lowrey DM, Lichtenheld M, et al. Structure, function and expression of murine and human perforin 1 (P1). *Immunol Rev*, 1988, 103: 203-11.
- [2] 刘培军. 穿孔素研究紧张. *国外医学免疫学分册*, 2002, 25(2): 69-72.
- [3] 金伯泉. *细胞和分子免疫学(第二版)*. 北京: 科学出版社, 2001.

- [4] Podack ER, Konigsberg PJ. Cytolytic T cell granules. Isolation, structural, biochemical, and functional characterization. *J Exp Med*. 1984,160(3):695-710
- [5] Haddad P, Clement MV, Bernard O, et al. Structural organization of the hCTLA-1 gene encoding human granzyme B. *Gene*. 1990,87(2):265-71.
- [6] Galvin JP, Spaeny-Dekking LH, Wang B, et al. Apoptosis induced by granzyme B-glycosaminoglycan complexes: implications for granule-mediated apoptosis in vivo. *J Immunol*. 1999,162(9):5345-50.
- [7] Sutton VR, Vaux DL, Trapani JA. Bcl-2 prevents apoptosis induced by perforin and granzyme B, but not that mediated by whole cytotoxic lymphocytes. *J Immunol*. 1997,158(12):5783-90.
- [8] Shi L, Mai S, Israels S, et al. Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear localization. *J Exp Med*. 1997;185(5):855-66.
- [9] 郭梁, 吴荣聪, 王钊. 与 CD95 相关的细胞凋亡和免疫调节. *生命的化学*, 2002, 22(2):106-10.
- [10] Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science*, 1995, 267:1449-56.
- [11] Suda T, Nagata S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J Exp Med*. 1994, 179(3):873-9.
- [12] Berke G.. Unlocking the secrets of CTL and NK cells. *Immunol Today*. 1995, 16(7):343-6
- [13] 彭黎明, 王曾礼. 细胞凋亡的基础与临床(第一版). 北京: 人民卫生出版社, 2000
- [14] Walsh CM, Glass AA, Chiu V, et al. The role of the Fas lytic pathway in a perforin-less CTL hybridoma. *J Immunol*, 1994, 153(6):2506-14.
- [15] Suda T, Takahashi T, Golstein P, et al. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*, 1993, 75(6):1169-78.
- [16] Edwards KM, Davis JE, Browne KA, et al. Anti-viral strategies of cytotoxic T lymphocytes are manifested through a variety of granule-bound pathways of apoptosis induction. *Immunol Cell Biol*, 1999, 77(1):76-89.
- [17] 王良斌, 侯水薇, 吴文鹃. 肿瘤坏死因子(TNF)的分子结构和生物学活性. *新疆师范大学学报*, 1994, 12(2):74-9.
- [18] Golstein P, Ojcius DM, Young JD. Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev* 1991, 121:29-65.
- [19] 陆云彪, 葛锡锐. 杀伤性 T 淋巴细胞介导的细胞溶解机理. *上海免疫学杂志*, 1997, 17(5):318-20.
- [20] 潘景轩, 马润泉, 李树浓. 细胞毒性 T 细胞对靶细胞的杀伤机制研究进展. *免疫学杂志*, 1997, 13(1):58-62

.