

述评 ·

在免疫老化中 T 细胞结构与功能的变化

何 维 (中国医学科学院基础医学研究所中国协和医科大学基础医学院免疫室,北京 100005)

中国图书分类号 R392.12 R592 文献标识码 A

文章编号 1000-484X(2001)02-0057-04



何 维,男,45 岁。留德医学博士,教授,博士生导师,中国协和医科大学基础医学院副院长,中国医学科学院基础医学研究所副所长。中国免疫学会基础免疫分会委员,北京免疫学会理事,《国外医学免疫学分册》、《中华微生物学和免疫学杂志》、《中国免疫学杂志》编委。94 年回国工作后共主持和参与国家重点基础研究发展项目(973)课题、95 攻关课

题、国家自然科学基金、863 生物高科技计划、卫生部基金、国家博士点基金、教委基金和中美、中日和中德合作研究项目及医科院各种课题 22 项。科研集中在 T 细胞在肿瘤免疫和自身免疫中的作用,IL-15 的抗肿瘤作用,超氧化与免疫在衰老中的关系,胸腺退化的基因调控和老年性痴呆免疫学诊断与治疗等。目前共发表论文 43 篇(国外 12 篇),论文在国外为他人引用 49 次,出版专著 2 部,获省部级科研二等奖一项

21 世纪人口的老龄化对人类社会是一个重大的挑战。我国目前已经步入老年型社会。随着社会性人口的衰老,与人口衰老相关疾病的发生急剧增加,特别是阿尔采默痴呆(AD)、帕金森病(PD)、骨质疏松和 II 型糖尿病为代表的老年性疾病引起的智能衰退、行动障碍、骨折和肾功能衰竭等严重地影响老人的生活质量,为社会和家庭带来沉重负担。老年性疾病并非简单地由机体老化所致,也非疾病在老年期的明显表现,但是以老化为其发病基础的。同时,遗传因素和体内外环境因素在老年性疾病的发生与发展方面起一定作用。然而,目前大多数老年性疾病研究尚处于资料的积累阶段,迫切需要有科学创意假说的提出,从多个角度全方位地对老化和老年性疾病的发生机制进行研究,进而为临床提供有效的手段用于老年性疾病的防治。

衰老或老化(senescence)是机体代谢过程中的一个必然阶段,主要表现为机体对环境刺激的适应能力减弱以至丧失。老化的机制颇为复杂,有关老化

的理论假说也颇多,如氧化损伤学说、遗传控制学说、体细胞突变学说、衰老符合途径假说等。美国病理学家 Wolford 在 60 年代首先提出老化的免疫学假说,认为免疫系统从根本上参加了正常脊椎动物的老化过程,是老化过程的主要调节系统之一。老化免疫学旨在研究免疫老化(Immunosenescence)的发生与发展机制,研究正常脊椎动物免疫系统功能与结构的增龄性变化规律,为高等生物生命活动研究提供全程性(尤其生命处于衰退阶段时)免疫系统方面的信息,并且探讨免疫老化对机体抗感染和抗肿瘤机能及其自身免疫病易感性等方面的影响,为解决衰老所致的免疫相关性疾病的诊断、预防和治疗提供策略与方法。

T 淋巴细胞功能降低与数量减少是增龄性免疫系统的主要改变,其中胸腺增龄性萎缩(退化)表现尤为明显。T 细胞与免疫老化的关系是老化免疫学机制研究的核心内容,其中至少有以下 6 项研究为研究者们所关注:其一,T 细胞来源于骨髓的前体 T 细胞,因此老化对 T 细胞的影响的第一个证据应在老龄动物或老年人造血发生的研究之中来寻求,老化时干细胞缺陷受到重视;其二,胸腺是 T 淋巴细胞发育与成熟的场所,对于成年个体来说,胸腺似乎为 T 细胞发育成熟的特殊目的而存在。然而,胸腺随增龄而发生退化,即便是年轻成熟的个体,其胸腺功能和 T 细胞产生也随着胸腺退化而表现低下,因此胸腺退化机制的澄清对老化免疫的深刻理解至关重要;其三,静止成熟的 T 淋巴细胞在外周是长寿命的,其人类 T 细胞一般认为可存活几十年。在此期间,它们也将受到老化过程的影响;其四,T 淋巴细胞介导的免疫应答表现为特异性 T 细胞克隆的迅速扩增性增殖。此外,记忆性反应也是少数 T 细胞克隆增殖的结果。这些增殖性淋巴细胞与老化的关系受到研究者的重视;其五,老化时 T 细胞与抗原呈递细胞的关系有待于澄清;其六,老化时 T 细胞活化时信号传导异常目前引起关注。

本文仅就近年来老化免疫研究中有关 T 细胞研

究一些重要进展作相关述评。

1 胸腺萎缩机制的研究

长期以来,人们观察到:增龄性胸腺萎缩(退化)是最主要的衰老性免疫系统的变化,其结果导致胸腺内 T 淋巴细胞发育障碍。晚近研究取得了以下重要进展:其一,TCR 基因重排影响胸腺萎缩。胸腺内 TCRV 基因重排随增龄发生改变。胸腺细胞重组酶活化基因——RAG1 和 RAG2 的表达随增龄明显降低。与幼龄动物相比,老龄动物未成熟胸腺细胞不表达 RAG1 和 RAG2,但是来自幼龄和老龄动物骨髓体外衍生细胞则表达 RAG1 和 RAG2,并且 TCRV 重排无差异,这提示老龄小鼠骨髓仍然保持产生 T 细胞前体并使其发生 TCR 重排的潜能,但 TCR 重排在胸腺内发生了异常^[1]。增龄性胸腺萎缩在表达重排转基因(Tg) TCR 小鼠体内并不发生,表明增龄相关性 TCR 重排缺陷是胸腺退化的主要原因。进一步研究发现,重排的 TCR 基因单独表达并不能预防胸腺萎缩的发生,提示尚有其它的一些因素参与胸腺萎缩的调控过程^[1]。其二,胸腺微环境对胸腺萎缩有影响。晚近发现,LIF, OSM, IL-6, M-CSF 和 SCF mRNA 表达与降低的胸腺发育生成相关。IL-7 是在胸腺细胞早期发育的关键性细胞因子,然而,IL-7mRNA 并非随老化而表现表达下降。小鼠体内实验表明,腹腔注射 LIF, OSM, IL-6 或 SCF 3 d 以上可诱导胸腺萎缩,并且伴随皮质 CD4⁺ 和 CD8⁺ 胸腺细胞的丧失,这表明某些胸腺内细胞因子可能参与胸腺萎缩的调控^[2]。其三,老化对不同 T 淋巴细胞亚群的产出有不同的影响。Mu 等最近利用同种异体骨髓移植的嵌和小鼠模型,观察了老化对 CD8⁺ T 细胞分化影响,同时在照射去除外周 T 细胞池后,观察该模型小鼠成熟 T 细胞再生能力。该研究结果显示,尽管老龄受者小鼠 T 细胞绝对数有所下降,但其供者 CD4⁺ 与 CD8⁺ T 细胞比例与幼龄鼠无区别,提示老化对经胸腺发育成熟的 CD4⁺ 与 CD8⁺ T 细胞的比例无影响。然而,幼龄嵌和型小鼠体内受者 CD8⁺ T 细胞百分率明显高于其老龄鼠,提示在幼龄鼠淋巴细胞再生时,受者 CD8⁺ T 细胞存在明显扩增。此种 CD8⁺ T 细胞低水平表达 CD44 (CD8⁺ CD44^{low}),提示为纯真细胞。相比之下,其老龄小鼠 CD8⁺ T 细胞则表达记忆性表型,并且产生明显高于幼龄鼠的 IFN- γ 和 IL-4,这一结果提示老化时的胸腺微环境对 CD8⁺ T 细胞的再生能力有影响^[3]。其四,研究发现,BALB/c 品系的年青、成年和衰老小

鼠胸腺细胞体外趋化性受到 3 种神经肽 CCK-8s, GRP 和 NPY 的抑制。GRP 和 NPY 可刺激年青和成年小鼠淋巴细胞发生趋化作用,而 CCK-8s 的趋化抑制作用在老龄小鼠表现的更突出,这提示神经肽的趋化刺激作用在衰老时可能消失了或转变为抑制效应^[4]。其五,晚近有证据显示,胸腺增龄性改变是量性变化,而非质的变化。一个研究小组开发了一项检测胸腺的外周血内迁移物的新技术,在经受抗病毒疗法治疗的 AIDS 病人体内已经检测到纯真 T 细胞的数量增加^[5]。另一个小组也报道了利用定量检测人类外周血中最新胸腺迁移物(RTEs)的频率和多样性。研究者还检测了细胞的 TCR 重排删除周期(TCR rearrangement deletion circles, DCs)和附着的 TCR V(D)J 重排的副产品。结果表明,CD4⁺ CD45RA⁺ CD62L⁺ 纯真 T 细胞亚群频率较高存在于 22~76 岁的成人外周血中。在 CD4⁺ CD45RO⁻ CD62L⁺ 和 CD4⁺ CD45RO⁺ CD62L⁺ 两类 T 细胞中均可检测到 TCRDCs。RTEs 有多于一个 V 的重排,提示成人 T 细胞受体库至少是寡克隆的,这一结果表明,老年个体胸腺也有新生 T 细胞的产出^[6]。其六,我们小组用差异显示 PCR 技术对 Balb/c 小鼠 1 月和 10 月的胸腺组织 mRNA 表达进行了分析,发现其表达存在增龄相关性差异。然后选取差异表达的 cDNA 片段作为分子杂交的探针从小鼠胸腺 cDNA 文库克隆到若干新的基因片段。我们的结果初步验证了胸腺萎缩过程中存在着某些基因的表达异常,为胸腺萎缩机制的研究提供了重要的资料。从胸腺中寻找与衰老相关的未知或已知基因并探讨它们与 T 淋巴细胞分化发育及衰老的关系,将有助于更深入地了解免疫系统与衰老之间的密切关系。其七,我们还发现氧化损伤与胸腺萎缩有一定关系。我们采用 DNA 氧化损伤主要产物之一——8-羟基脱氧鸟嘌呤核苷(8-OHdG)作为标志物,检测小鼠胸腺细胞发生氧化损伤的情况,发现小鼠胸腺内 8-OHdG⁺ 细胞密度随增龄而增多,并主要位于髓质区。这表明氧化损伤可能参与了胸腺萎缩的过程。综上所述,晚近研究表明,TCR 基因重排异常、胸腺微环境中细胞因子、神经肽和氧化损伤等因素与胸腺萎缩的发生与发展关系密切。老年个体胸腺仍然保持产生新生 T 细胞的功能。

2 免疫老化时 T 淋巴细胞量与质的变化

胸腺退化与萎缩被认为是外周淋巴器官中 T 细胞数量减少的主要原因。同时,T 细胞功能也随增

龄而恶化,表现为纯真 T 细胞比例降低,而记忆 T 细胞亚群或对抗原刺激无应答性的 T 细胞的比例增多, Th 细胞和 CTL 的前体细胞频率明显降低。T 细胞受体库伴随老化变得越来越有限。上述情况造成 T 淋巴细胞整体水平信号与反应性随增龄而降低。体内实验可见迟发性超敏反应、移植物抗宿主反应和对同基因和异基因肿瘤细胞和寄生虫刺激的反应性随老化而明显降低。同时体外实验显示,随增龄人类和啮齿动物淋巴细胞对植物血凝素 (PHA) 和刀豆蛋白 A (ConA) 的增殖反应以及 CTL 活性下降。

CD8⁺ T 细胞百分率在肠道相关淋巴组织 (GALT) 则未见降低^[7]。CD8⁺ 纯真 T 细胞 (CD8⁺ CD45RA⁺ CD95⁻) 在老年人外周血中比例减少^[8], 其绝对数量也降低, 而 CD8⁺ CD45RO⁺ CD95⁺ 记忆表型 T 细胞绝对数量则增高^[8]。在 18~105 岁各个年龄段, 人外周血纯真 CD8⁺ CD95⁻ T 细胞数量明显低于 CD4⁺ CD95⁻ T 细胞, 而最老的个体外周血中前者几乎不存在^[9]。与纯真 CD4⁺ T 细胞相比, 纯真 CD8⁺ T 细胞数量随增龄下降更明显。在人 CD4⁺ T 细胞表面, 74 岁以前 CD95 表达呈现随增龄而增强趋势, 其后则随增龄表达下降^[10]。因此, CD95 也可能作为免疫老化的标志来预测成功老年。

CD28 已经基本被公认为免疫老化的重要标志, CD28 分子在人类 CD8⁺ T 细胞和 CD4⁺ T 细胞表面随增龄而表达降低的证据依然可见于晚近的一些报道中^[5,11,12]。不过, 这些研究开始更加深入, 如发现 CD8^{high} CD28⁺ CD57⁺ 表型 T 细胞呈现增龄累进性下降^[5]; 观察到老年个体体内 CD4⁺ CD28⁻ T 细胞高频率的存在^[12]; 与 40 岁个体相比, 70~90 岁和百岁老人的 T 细胞表达 CD28 有明显下降, CD8⁺ T 细胞的 CD28 表达下调尤为明显, CD28 表达增龄性下降与 T 细胞对有丝分裂原反应性下降相伴随。有研究发现, CD4⁺ CD28⁻ T 细胞是长寿命, 在体内经过克隆扩增后, 在体外表现出对自身抗原的反应性。尽管有 CD28 表达缺陷, 但仍能发生功能活化, 并且产生高水平的 IFN- γ 和 IL-2。但是, 由于其 CD28 表达缺陷与 CD40L 丧失相关联, 故对 B 细胞分化和免疫球蛋白分泌无促进作用^[13]。据报道增龄相关性人类 CD28 表达缺陷与基因特异性核因子结合活性丧失有关^[12]。人 T 细胞在体外抗原刺激下长期培养, 细胞进入不可逆的细胞周期, 端粒变短, 端粒酶丧失和 CD28 表达完全缺陷, 这种情况被称之为复制性老化。在体内, 慢性感染或衰老均可导致 CD8⁺ T 细胞的 CD28 表达缺陷, 而这一情形较少见于 CD4⁺ T 细胞。

上述变化与 CD28 启动子内 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 位点与核蛋白结合活性有关。和 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 结合复合物可见于淋巴组织内 CD28⁺ T 细胞和某些转化的 B 细胞内。这些复合物一般可表达, 但在复制老化状态时, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 位点表达下调, 无 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 位点表达。T 细胞活化可导致 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 结合活性的平行下降。CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 位点结合活性有差异, 这也许与老化的 CD8⁺ T 细胞更易于 CD28 下调表达有关。体内扩增的 CD8⁺ CD28⁻ 和 CD4⁺ CD28⁻ T 细胞缺乏 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 复合物, 与长期活化的 T 细胞相似。上述研究表明, CD28 随增龄主要在 CD8⁺ T 细胞表现表达缺陷, 其原因与 CD28 基因启动子内 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 位点与核蛋白结合活性有关。

细胞因子在免疫老化中表现也非常明显, 人 IL-2 及其受体表达水平随衰老而明显下降。老年人外周血 CD4⁺ T 细胞产生 IFN- γ 的水平高于年青组, 但 IL-4 水平则降低, 提示老年个体有 Th1 极化现象^[14]。细胞内细胞因子检测结果表明, TNF- α 和 IL-6 在老年人表达增高^[15], 提示炎症细胞因子随增龄而表达增强。在老年人血清中, IL-12 和 IL-12p40 水平有明显增高, 但是 IL-12p70 则无增高表现。IL-12p70 具有 IL-12 的生物活性, 而 IL-12p40 可拮抗 IL-12 活性并抑制 CTL 分化^[16]。

在衰老过程中, T 细胞活化过程中信号传导亦存在着一定程度的障碍, 如 Ca^{2+} 动员能力降低和早期活化信号的抑制, CD3 刺激的人类和小鼠 T 细胞 MAP 激酶途径的 MEK/ERK 的活化随增龄下降。ConA 刺激的小鼠 T 细胞的 PKC 从细胞浆到细胞膜的转移随增龄也降低。老龄小鼠 T 细胞活化早期阶段 Raf-1/MEK/ERK 激酶和 JNK 蛋白激酶活化的降低。PKC 从细胞浆向 T 细胞与 APC 相互作用位点的转移随增龄减弱也许反映了 T 细胞活化的下游级联反应的缺陷^[17]。大鼠 T 细胞钙/调钙蛋白依赖性 calcineurin 磷酸酶和 CaMK-IV 激酶活化随增龄发生降低^[18]。老化也导致细胞周期调节异常。老龄小鼠 CD4⁺ T 细胞对 CD3 和 CD28 刺激的反应能力明显下降, 该反应与细胞周期蛋白 (Cyclin) 依赖性激酶 CDK2, CDK4 和 CDK6 的诱导相关。CDK2 活性诱导在老龄小鼠中随增龄下降。老龄小鼠 CD4⁺ T 细胞 CDK 抑制子 p27 在细胞活化后有所下调。改变的 CDK 活化可能介导多克隆刺激所致的 T 细胞增殖反应的增龄性下降^[19]。c-Jun N-端激酶 (JNK) 的活化既可产生于 TCD 和 CD28 联合刺激, 又可诱导为应激相关性刺激包括紫外线, H₂O₂ 等等。就 T 细胞而言, JNK 的 TCR/CD28 刺激可导致 c-Jun、ATF-2 和

Elk-1 新基因的表达。由于 JNK 活化减弱,在 CD3/CD4/CD28 交联刺激下,小鼠 CD4⁺ T 细胞 c-Jun 磷酸化随增龄下降。进一步研究显示,增龄对 JNK 活化减弱影响有 2 种情形:其一,记忆细胞的累积;其二,纯真 T 细胞发生增龄性 JNK 活性下降^[20]。

我们还建立了臭氧吸入的 Balb/C 小鼠氧化应激模型,并进行了较系统的免疫系统的研究。结果表明氧化应激状态明显促进了胸腺萎缩的进程,抑制 T 细胞增殖及其 IL-2 的诱导性表达,促进脾细胞 IFN- 的诱导性合成和血清中 IL-6 水平增加,导致小鼠外周 CD4⁺ 和 CD28⁺ 细胞比例明显下降和 OVA 抗原特异性 T 细胞频率降低。综上所述,氧化应激可造成机体特异性 T 细胞免疫应答水平下降,提示氧化应激可能是免疫老化重要的原因之一。

在未来的研究中,阐明增龄性胸腺萎缩的机制不仅有助于理解复杂的老化免疫机制,而且还会给免疫应答机制的研究带来新的线索。胸腺萎缩的基因调控机制将是该领域研究的重点。同时还应该重视老化时胸腺外 T 细胞分化的研究。胸腺外 T 细胞的正常发育可能为“成功老年”人提供了纯真 T 细胞的来源。此外,以 T 淋巴细胞为中心的老化免疫研究应取得突破性进展,其中应重点澄清在老化 CD28 分子下调的确切机制,选择性对其上调也许会恢复衰老时的免疫应答。

3 参考文献

- Lacorazza H D, Guevara Patino J A, Weksler M E *et al.* Failure of rearranged TCR transgenes to prevent age-associated thymic involution[J]. *J Immunol*, 1999;163:4262
- Sempowski G D, Hale L P, Sundry J S *et al.* Leukemia inhibitory factor, oncostatin M, IL-6, and stem cell factor mRNA expression in human thymus increases with age and is associated with thymic atrophy[J]. *J Immunol*, 1999;164:2180
- Mu X Y, Thoman M L. Aging affects the regeneration of the CD8⁺ T cell compartment in bone marrow transplanted mice [J]. *Mech Ageing Dev*, 2000; 3:112
- Medina S, Del Rio M, Manuel Victor V *et al.* Changes with ageing in the modulation of murine lymphocyte chemotaxis by CCK-8S, GRP and NPY [J]. *Mech Ageing Dev*, 1998;102(2-3):249
- Merino J, Martinez Gonzalez M A, Rubio M *et al.* Progressive decrease of CD8high⁺ CD28⁺ CD57⁻ cells with aging [J]. *Clin Exp Immunol*, 1998;112:48
- Poulin J F, Viswanathan M N, Harris J M *et al.* Direct evidence for thymic function in adult humans[J]. *J Exp Med*, 1999;190:479
- Banerjee M, Sanderson J D, Spencer J *et al.* Immunohistochemical analysis of aging human B and T cell populations reveals an age-related decline of CD8 T cells in spleen but not gut-associated lymphoid tissue (GALT) [J]. *Mech Ageing Dev*, 2000;115:85
- Aspinall R, Carroll J, Jiang S. Age-related changes in the absolute number of CD95 positive cells in T cell subsets in the blood[J]. *Exp Gerontol*, 1998;33:581
- Fagnoni F F, Vescovini R, Passeri G *et al.* Shortage of circulating naive CD8⁽⁺⁾ T cells provides new insights on immunodeficiency in aging[J]. *Blood*, 2000;95:2860
- Botestio M, Pawelec G, Di Lorenzo G *et al.* Age-related changes in the expression of CD95 (APO1/FAS) on blood lymphocytes[J]. *Exp Gerontol*, 1999;34:659
- Boucher N, Dufour-Duchesne T, Vicaut E *et al.* CD28 expression in T cell aging and human longevity[J]. *Exp Gerontol*, 1998;33:267
- Vallejo A N, Nestel A R, Schirmer M *et al.* Aging-related deficiency of CD28 expression in CD4⁺ T cells is associated with the loss of gene-specific nuclear factor binding activity[J]. *J Biol Chem*, 1998;273:8119
- Weyand C M, Brandes J C, Schmidt D *et al.* Functional properties of CD4⁺ CD28⁻ T cells in the aging immune system[J]. *Mech Ageing Dev*, 1998;102:131
- Sakata Kaneko S, Wakatsuki Y. Altered Th1/Th2 commitment in human CD4⁺ T cells with aging[J]. *Clin Exp Immunol*, 2000;120:267
- O Mahony L, Holland J, Jackson J *et al.* Quantitative intracellular cytokine measurement: age-related changes in proinflammatory cytokine production[J]. *Clin Exp Immunol*, 1998;113:213
- Rea I M, McNerlan S E, Alexander H D. Total serum IL-12 and IL-12p40, but not IL-12p70, are increased in the serum of older subjects; relationship to CD3⁽⁺⁾ and NK subsets[J]. *Cytokine*, 2000;12:156
- Miller R A. Effect of aging on T lymphocyte activation[J]. *Vaccine*, 2000;18:1654
- Pahlavani M A, Vargas D M. Age-related decline in activation of calcium/calmodulin-dependent phosphatase calcineurin and kinase CaMK-IV in rat T cells[J]. *Mech Ageing Dev*, 1999;112:59
- Tamir A, Miller R A. Aging impairs induction of cyclin-dependent kinases and down regulation of p27 in mouse CD4⁽⁺⁾ cells[J]. *Cell Immunol*, 1999;198:11
- Kirk C J, Miller R A. Age-sensitive and -insensitive pathways leading to JNK activation in mouse CD4⁽⁺⁾ T-cells[J]. *Cell Immunol*, 1999;197:83

[收稿 2000-12-15]
[编辑 许四平]