Opin Immunology, 1999, 11(1): 100—108.

[16] Prigozy T I, Sieling P A, Clemens D, *et al*. The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules[J]. Immunity, 1997, 6(2): 187—197.

[17] Madden D R. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes[J]. Annu Rev Immunol, 1995, 13: 545—622.

[18] Corr M, Slanetz A E, Boyd L F, *et al*. TCR-MHC class I peptide interactions: affinity, kinetics and specificity[J]. Science, 1994, 265(5 174): 946—949.

[19] Margulies D H, Plaksin D, Khilko S N. Studying interactions involving the T cell antigen receptor by surface plasmon resonance[J]. Curr Opin Immunol, 1996, 8: 262—270.

[20] Valitutti S, Muller S, Cella M, *et al*. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes[J]. Nature, 1995, 375(6 527): 148—151.

[21] Cai Z, Brunmark A B, Luxembourg A T, *et al*. Probing the activation requirements for naive CD8$^+$ T cell with Drosophila cell transfectants an antigen pricessing cells[J]. Immunol Rev, 1998, 165(1): 249—265.

[22] Grakoui A, Bromley S K, Sumen C, *et al*. The immunological synapse: A molecular mechine contralling T cell activation[J]. Science, 1999, 285(5 425): 221—227.

（编辑 汪勤俭）

文章编号：1000-5404(2000)10-0997-07

综述

蛋白糖基化与细胞毒性T淋巴细胞应答

Relationship between protein glycosylation and response of cytotoxic T lymphocyte

周吉军，吴玉章 （第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所，重庆 400038）

糖基化是已知的蛋白最重要的翻译后修饰。已知的蛋白糖基化有多种类型，其中最常见的是发生在天冬酰胺(Asparagine, Asn)的N-糖基化(N-linked glycosylation)和发生在丝氨酸(Serine, Ser)和苏氨酸(Threonine, Thr)的O-糖基化(O-linked glycosylation)。糖蛋白中糖基的结构大小不一，少者仅一个单糖，稍复杂的寡糖链可由12～15个单糖残基衍生物组成，甚至可多达20～30个单糖残基。糖链的结构类型与其在肽链上共价连接的氨基酸种类有关。蛋白(肽)糖基化后不仅亲水性增加，对蛋白酶耐受能力(酶稳定性)增强，而且二、三级结构也发生改变。糖基可改变蛋白的回形环(Loop cycle)、β-转角(Beta-turn)、α-螺旋(Alpha-helix)等空间构象。糖基化对蛋白生物学活性影响逐渐受到重视，特异性糖结构参与细胞-细胞及细胞-底物交互作用，从而影响淋巴细胞移动、免疫细胞激活、胚胎发生及肿瘤转移等过程。糖的种类和数目的变化(形成寡糖或多糖)、糖的异构性以及糖苷键所处位置不同，决定了糖蛋白上糖的多样性，也导致了糖蛋白的结构多样性和生物学活性的变化。

近年来，越来越多研究表明糖参与或影响免疫反应[1]。糖基化结构在改变蛋白或肽的三维结构的同时，还可通过改变蛋白表面表位或与MHC分子的结合位点影响细胞免疫。有研究表明T细胞所识别表位部分靠小的糖基结构确定[2]。糖基化可生成新的T细胞表位，或相反，废除识别[3]；糖基化可阻断肽与MHC-Ⅰ类分子结合，也可通过糖直接与MHC分子交互作用，恢复结合[3]；有的糖基可帮助Th细胞对抗原肽识别的精确化学定位[4]；MHC-Ⅰ类分子上的一些糖基化结构可能干扰T细胞识别，并限制CD8$^+$ T细胞应答[3]。病毒有可能通过上述机理逃避细胞免疫。糖基化结构也可通过改变肽抗体识别表位影响体液免疫[5]。一些寡糖结构本身就是半抗原(Hapten)，许多糖(单、双及多糖)本身就是半抗原，即单独不具抗原性，而连接在载体蛋白(或肽)骨架上，则具抗原性，可以诱导糖特异性的单克隆抗体(mAb)和细胞毒性T淋巴细胞(CTL)[6]。

机体免疫系统对胞内感染病毒和肿瘤细胞的清除，主要依赖细胞免疫，特别是特异性的CTL。但许多慢性病毒感染者(如慢性HIV、HBV感染者)和肿瘤病人不能清除病毒或肿瘤细胞，即病毒和肿瘤细胞出现免疫逃避。病毒表面蛋白均为GPs，由宿主细胞合成，在内质网经翻译后修饰糖基化，因此不易与宿主GPs特别是糖结构区别，如HIV、HBV、流感病毒以及部分原生寄生生物等，它们所具有的免疫逃避特性，很可能与其表面蛋白糖基化有关。异常糖基化是肿瘤细胞重要表型之一，肿瘤细胞也可能利用其异常糖基化结构逃避机体免疫监视和免疫识别。而一些特定的糖结构利用其半抗原性质，可引起针对自身组织的免疫反应，导致免疫损伤或自身免疫疾病，包括胶原相关的类风湿性关节炎、多发性硬化症、糖尿病、IgA肾病。

作者简介：周吉军(1967—)，男，重庆市人，博士，讲师，主要从事表位糖基化与HBV特异性CTV应答方面的研究，发表论文6篇，现在第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所，重庆 400038。电话：(023)68754479

收稿日期：2000-08-04；修回日期：2000-09-19

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

CTL通常识别与MHC-I类分子结合的短抗原肽(8~12个氨基酸残基),对抗原被加工成短肽的机制,抗原肽与MHC分子以及与TCR间的交互作用的本质,已有一定了解。已发现糖蛋白抗原中的糖能辅助与MHC分子结合表位肽被T细胞识别[7]。T细胞表位模型实验显示糖能通过多种途径调节T细胞应答。例如,在已确定的糖肽特异性CTL应答中,许多糖肽特异性CTL应答是针对含单糖残基肽,这似乎表明糖和肽二者与TCR结合位点发生连接,γ/δTCR识别抗原可受配体N-糖基化调节[8]。天然糖蛋白也可诱导糖肽特异性T细胞应答。糖所具有影响T细胞识别抗原的能力对免疫应答研究,特别是对CTL表位图谱研究起了深远影响。

1 表位糖基化对 CTL 识别影响

1.1 对抗原 CTL 表位结构及性质影响

病毒或肿瘤蛋白(肽)抗原分子上的抗原表位有两种类型:一种是连续性抗原表位(Continuous epitope),其氨基酸序列在一级结构上是连续的;另一种是不连续性抗原表位(Discontinuous epitope),由一级结构上不连续的氨基酸残基经过肽链的空间折叠而聚集在一起形成。糖基化不仅引起糖基化位点附近分子及其构象改变,还可导致蛋白(肽)二、三级结构如回形环、β反折、α螺旋等发生变化,从而导致相应抗原表位分子或空间结构改变。有研究表明T细胞识别表位部分靠小的糖基结构确定[2]。

Huang等在研究α-半乳糖基化对HIV-1 ⅢB V3肽上的小鼠MHC Ⅰ Db分子限制CTL识别表位(RIQRGPGRAFVTIGK,P18 ⅢB)三维结构影响时,通过核磁共振(NMR),圆二色(Circular dichroism, CD),分子模建等方法,发现T12糖基化轻微拉紧了免疫优势区顶部(G5-R8)的反向折叠(Reverse turn),糖也存在与肽骨架相关形态,并能影响局部肽结构。故认为简单糖基化就能影响V3肽的结构平衡。

研究糖基化对人类T淋巴细胞病毒Ⅰ(HTLV-Ⅰ)肽表位结构的影响发现,其gp46 Asn244 GlcNAc化的233~253肽,二级结构预测显示在肽的242~246残基存在β-反折,糖肽模型研究提示稳定的β-反折,可由仅一个单糖残基引起[9]。

抗原表位糖基化引起结构改变后,所产生影响表现为两方面:一方面可形成新免疫决定簇,诱导糖或糖肽特异性免疫反应。不同的糖基化表位免疫原性因糖结构差异而不同。糖或糖肽特异性T细胞可识别糖精确的化学结构。Deck等[10]在检测糖肽特异性CD4+T细胞的特异性研究中,把双糖半乳二糖(Galabiose, Galα1-4Gal)连接到鸡卵溶菌酶(HEL)52~61肽(公认I-ak分子结合肽)的中部(Ser-56),免疫CBA/J小鼠,从其脾窝淋巴结T细胞获得T细胞杂交瘤,并筛选识别连接在肽Ser-56残基上半乳二糖的杂交瘤。结果发现该杂交瘤为半乳二糖特异性,而非纤维二糖(Cellobiose, Glcβ1-4Glc)特异性;半乳二糖连接于HEL52-61残基53肽和连接于HEL34-45肽均不能激活该T细胞杂交瘤;半乳二糖羟基乙酰化(Acetylation)后,丧失与T细胞反应性。此外,他们在溶菌酶来源的52-61肽(可与I-Ak分子结合)第5个氨基酸残基连接上半乳二糖后,观察二种T细胞杂交瘤对其免疫识别。通过分别改变糖分子和肽序列,发现半乳二糖中靠外侧半乳糖残基与暴露的肽侧链一起被T细胞直接识别[11]。

另一方面可通过糖基化改变分子或空间结构而封闭或破坏该表位,这受所连接糖种类、数量、连接位置决定。

已发现多种病毒的糖基化结构影响宿主对其免疫反应。早在80年代研究流感病毒(H_2N_2和H_2N_1)时,就发现用糖基化抑制物衣霉素(Tunicamycin, TM),处理流感病毒感染的靶细胞后,可增强其对特异性和交叉反应性CTL的敏感性,且在细胞表面表达的血凝素(Haemagglutinin, HA)总量没有减少情况下,所表达HA与抗-HA IgG mAb结合力降低。Wood等发现流感病毒A核心蛋白(NP)上的2个MHC限制性CTL表位因糖基化不能被加工、提呈,而其N-糖基化被抑制后,经抗原加工、提呈该表位可暴露。近年来,糖基化在抗病毒免疫反应中的作用有了进一步发展,其中最具代表性的是对HIV的研究,发现其表面糖蛋白的糖结构成为病毒抵御机体免疫的屏障。

HIV-1表面糖蛋白,gp120和gp41组装成三聚体复合物,gp120中,糖结构约占50%质量,重组HIV-1 gp120诱导小鼠gp120-特异性CTL研究发现,酶切割掉gp120上N-连接聚糖(N-linked glycans)后,诱导特异性CTL作用增强[12]。

在研究中部和末端糖基化对合成狂犬病毒核心蛋白Th细胞表位31D(氨基酸残基404~418)和VF13N(29~41)肽生物学活性和肽形态影响中发现,在肽链中部的Asn残基连接麦芽糖或GlcNAc后,其T细胞刺激活性显著降低,主要是因为糖基化降低了肽同MHC分子的结合力,并发现肽特征性α螺旋减少(三氟乙醇水溶液中)。相反,把麦芽糖或N-乙酰氨基葡萄糖偶连Asn接在31D和VF13N的N-末端,不影响激活T细胞,而且31D肽N-末端糖基化,可降低对人血浆降解的敏感性,肽的α螺旋形态也不受影响。

1.2 对 CTL 表位加工、呈递影响

已发现糖基化可增强蛋白耐受蛋白酶水解能力,即提高了酶稳定性,而APC对抗原的加工就主要靠酶水解作用,因此糖基化可影响到抗原表位加工。

有报道病人血中分离到的糖基化的可溶性MUC1肿瘤抗原,不能被树突状细胞加工,也不能体外诱导MHC-Ⅱ类限制Th细胞应答,通过研究在MHC-I类分子作用下,树突状细胞呈递不同程度糖基化或非糖基化MUC1能力,发现不同程度糖基化的MUC1及未糖基化的MUC1合成肽均能诱导MUC1特异性,I类MHC限制的CTL应答,且抗原加工效率与活化CTL强度与抗原糖基化程度呈负相关[13]。

有些外源性糖肽可与细胞膜上跨膜"空"MHC-I类分子结合,以内吞小泡方式,在抗原呈递相关转运系统(Transporter associated with antigen presentation, TAP)辅助下,经内在化(Internalization)和再循环(Recycling)后,呈递到细胞表面[14]。有证据表明在被人MHC-I类分子体内呈递肽中,有一定数量的糖肽,大约占总肽量的0.1%,而且像O-β-GlcNAc糖基化的合成肽能被TAP有效转运[14]。

在HCV表面糖蛋白E1在从感染细胞内质网转运至胞质

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

过程中是否经 MHC-I 类加工研究中, 用可与 MHC I 类分子(Patr-B * 1601)结合, 含已知 CTL 表位(233-GNASRCWVA-241)的合成肽, 体外诱导 CTL 发现, 需极高浓度(> 100 Nm)达到溶靶细胞; 而使用氨基酸残基 234(Asn)被天冬氨酸(Asp)替代的合成肽, 浓度可降低 1 000 倍。氨基酸残基 Asp 被认为是肽氨基末端与 Patr-B * 1601 结合的锚残基(Anchor residue), 而 Asn234 是 N-糖基化信号序列(Asn-Xaa-Ser/Thr)的一部分, 在胞质内 N-糖苷酶作用下, Asn234 被 Asp 替代可通过去糖基化/去酰胺化自然发生。这一氨基酸替代及糖基化改变影响了肽呈递给 CTL。

由于 CTL 在肿瘤特异性细胞免疫应答研究中, 起关键作用, 因此诱导肿瘤特异性 CTL, 如何呈递肿瘤抗原肽给 MHC-Ⅰ类途径成为一中心课题。GU-XG 等报告了一类新的疏水多糖小颗粒, 能呈递含一 CTL 表位的部分 HER2 肽给 MHC-Ⅰ途径。疏水多糖有 2 种, 一种是胆固醇基连接性甘露聚糖(Cholesteryl group-bearing mannan, CHM), 另一种为胆固醇基连接性支链淀粉(Cholesteryl group-bearing pullulan, CHP); 它们分别与含原癌基因 erbB-2/neu/HER2(HER2)表达产物氨基末端 147 个氨基酸肽形成复合物颗粒(CHM-HER2 和 CHP-HER2), CHM-HER2 和 CHP-HER2 均能诱导 $CD3^+/CD8^+$ CTL 与 HER2 转染的纤维肉瘤细胞, 相反, 单独肿瘤蛋白无此作用, 这些 CTL 具 Kd 限制性, 并特异识别 HER2 的 63~71 位置, 此外 CHM-HER2 复合物可增强抗-HER2 IgG 抗体产生, 而单独 HER2 蛋白仅能诱导少量抗-HER2。经 CHM-HER2 或 CHP-HER2 免疫的小鼠成功排斥了 HER2 转染的肿瘤, 且在肿瘤植入 3 d 内用 CHM-HER2 免疫也能完全排斥肿瘤。表明这类疏水多糖可辅助可溶性蛋白诱导细胞免疫和体液免疫, 这种新佐剂可能成为肿瘤预防和治疗的潜在研究手段。

TCR 识别与 MHC 分子结合的短肽, 与表位对应的合成肽能在体外有效刺激 T 细胞杂交瘤的激增, 也能在体内诱导 T 细胞。但由于其较短半衰期和低免疫原性, 体内诱导 T 细胞, 特别是 CTL 免疫反应较弱。应用酶促方法把病毒肽装配到免疫球蛋白的糖上[15], 这样并未改变二者的生物学功能。该复合物体外激活 T 细胞杂交瘤能力是单独肽的 20 倍, 并能体内诱导肽特异性 T 细胞前体和 $CD4^+$、$CD8^+$T 细胞表达肽特异性 T 细胞受体的转基因小鼠淋巴细胞激增。结果显示, 用酶促方法将肽连接到免疫球蛋白的糖部分(半乳糖残基作为肽受体), 可作为感染性疾病保护性表位的一种安全、有效的呈递系统。该方法还可进一步发展为免疫治疗手段, 如呈递拮抗肽给自身免疫 T 细胞或白细胞介素等免疫调节剂。

1.3　对表位与 MHC 分子结合的影响

糖基化对表位于 MHC 分子结合影响, 主要表现在以下两方面: 其一, 糖基提供一新 MHC 结合锚结构, 生成一新 MHC 结合位点, 这因为糖基可作为 MHC 分子结合所需的氢键的供体和受体。其二, 锚残基糖基化修饰, 导致结构改变或形成空间障碍, 抗原肽不能进入 MHC 分子的结合沟, 导致已存在免疫应答在 MHC 分子结合水平被阻断。

CTL 通常识别与 MHC-I 类分子结合的, 经加工的 8~10 个氨基酸残基的短肽, 而通过研究 GlcNAc O-糖基化的合成糖肽发现糖肽也能与 MHC I 类分子有效结合, 并诱导糖肽特异性 CTL 应答[16], 表明含 O-连接 GlcNAc 的合成肽, 能被 TAP 有效转运至内质网, 加工与 I 类 MHC 分子结合呈递给人免疫系统, 实验发现人 MHC-I 类分子体内所呈递肽中, 糖肽占 0.1%。已发现一些糖肽可与 APC 上"空"MHC-I 类分子结合, 目前认为"空"MHC-I 类分子具抗原呈递和免疫调控功能, 活化的 T 细胞存在高比例"空"MHC-I 类分子。

糖基化在改变蛋白或肽的三维结构的同时, 还可通过改变蛋白(肽)的 MHC 分子结合位点影响细胞免疫[1]。有关 Tn 抗原的 T 细胞识别研究中, 选用鼠血红素(Hb)来源的 10 肽(67~76), VITAFNEGLK, 该肽能与 Ek 较好结合, 且对 CBA/J 小鼠是非免疫原。10 肽的每个氨基酸分别被含 α-D-GalNAc 的 Ser 或 Thr 替代后, 分别研究其与 Ek 的结合能力和对 CBA/J 小鼠的免疫原性。对所有这些不同位置发生 Tn 替代的糖肽, 进行晶体结构确定, 发现当 Tn 替代位于氨基酸侧链向下进入 MHC 分子结合位点时, 则完全丧失与 Ek 的结合能力, 这种情况发生在 68 和 76(该二氨基酸残基是主要的锚残基)替代以及 71 和 73(具次要锚残基功能)替代。除 70 和 74 外, 当 Tn 替代位置不在与 MHC 分子结合位点时, 则保留与 Ek 的结合能力。研究还发现当 Tn 替代发生在 72 时, 该具 MHC 分子结合能力的 10 肽具免疫原性, 已知该位点是 T 细胞受体与 Hb(67~76)连接残基。

笔者最近用分子模建技术研究糖基化对 CTL 表位与 MHC-Ⅰ类分子结合影响, 发现 HBV-PreS2 CTL 表位 44~53(SILSKT-GDPV)的 Ser44 O-α-GalNAc 糖基化对该表位的 HLA-A2 结合形态影响较小, 该糖肽与 HLA-A2 分子结合的稳定性高于未糖基化肽, 糖基提供的氢键增强了该 CTL 表位与 HLA-A2 结合沟结合的亲和力及稳定性, 这一改变有可能影响 HLA-A2/抗原表位复合物的表达水平, 引起该表位等级性改变。

1.4　对表位的 TCR 识别影响

蛋白糖基化可通过两方面影响 TCR 识别, 首先, 糖基提供可被 TCR 容纳的新结构而生成一新表位。其次, 表位完全修饰, 不能被被 TCR 容纳, 导致已存在的对未修饰肽免疫应答在 T 细胞识别水平被阻断。

通过 T 细胞对肿瘤相关糖结构的应答研究, 发现含单糖结构(Tn)糖肽诱导的 T 细胞, 与其它糖肽无明显交叉反应, 表明 T 细胞识别的高度糖特异性。而含复合糖糖肽诱导的 T 细胞与含单糖糖肽存在复杂的交叉反应谱。同时还发现一些糖肽无免疫原性, 提示可能因 T 细胞池缺乏识别某些特定糖结构的 TCR。该研究选取易与 MHC-Ⅱ类 E(k)分子结合, 小鼠血红蛋白来源的 10 肽 Hb(67~76), 其本身对于 CBA/J 小鼠乃非免疫原。在其主要的 TCR 结合位点 72, 通过 Thr、Ser 或 Asn 与不同聚糖连接, 进行 O-或 N-糖基化。糖部分包括肿瘤相关粘蛋白糖抗原(Tn)、粘蛋白相关聚糖及非粘蛋白相关聚糖。72 位点为 Hb(67~76)非 MHC 结合位点, 所有 16 种糖基化肽均能与 E(k)分子有效结合, 但发现与单糖相比, 所连糖越复杂, 结合越弱。12 种 O-糖基化肽中, 有 6 种可诱导 T 细胞激增; 4 种 N-糖基化肽无此能力。免疫原性最强的 4 种糖肽均为 O-糖基化, 其中 3 种为带 Tn 或 T 抗原。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

CTL通常识别靶蛋白通过受MHC-Ⅰ类分子限制的短肽，但已发现MHC-I类分子结合性糖肽可诱导糖特异性，非MHC限制的CTL。这表明CTL可通过非肽依赖性的T细胞受体(Peptide-independent TCR)识别靶蛋白和非蛋白结构。把单或双糖与Kb或Db结合性肽偶联后直接免疫小鼠，诱导糖特异性，非MHC限制的CTL应答。4种肽和3种糖用于分析研究，分别连在载体肽的末端或中间位置。其中来源于口腔疱疹病毒核心蛋白的Kb结合肽段(RGYVYQGL)，在其4或6位半胱氨酸上连接半乳糖(Gal alpha 1-4Gal，Gal2)后，免疫小鼠。结果与单纯核心肽比较，糖肽诱导的CTL具有优先杀死靶细胞的能力。还发现多克隆CTL可杀死表达含Gal2表位糖脂的靶细胞。对CTL表达的TCR研究表明，糖肽特异性，Kb限制的CTL与非限制性，糖-特异性CTL分别属于不同T细胞亚群。

糖特异性CTL依赖其TCR识别非肽性抗原和修饰的肽抗原。在用H-2Kb限制性糖肽RGY8-6H-Gal2(含二糖)免疫后，诱导出一群CTL，其中表达α/β TCR的CTL为糖肽特异性，而表达γ/δTCR的CTL则呈双糖特异性，甚至糖脂(Glycolipid)特异性。Kb/RGY8-6H-Gal2晶体结构显示肽和H-2 Kb结构不受肽糖基化的影响，但位于公认TCR结合位点的中央区则受所连接糖的支配，Kb/RGY8-6H-Gal2这一结构特征与α/β和γ/δTCR所分别优先选择的配体特征一致，这可解释糖特异性T细胞反应的产生。

T细胞表达的γ/δTCR可识别多种配体，除糖类、脂类分子外，Sciammas等在研究具单纯疱疹病毒一1糖蛋白I(gI)反应性小鼠T细胞TgI4.4的TCR时发现，与α/β TCR介导的MHC限制的抗原识别不同，TgI4.4的γ/δTCR直接识别纯化的gI，同抗原-抗体识别相似，不需要抗原加工或呈递。表明该类TCR通过结构依赖方式直接识别肽骨架。此外，与典型α/β TCR识别肽/MHC复合物具较强亲和力相比，γ/δTCR对肽/MHC复合物识别亲和力较弱，而主要受其配体N-糖基化调控[17]。

笔者最近用分子模建技术研究糖基化对CTL表位与MHC-Ⅰ类分子结合影响，发现HBV-PreS2 CTL表位44～53(SILSKT-GDPV)的Ser44 O-α-GalNAc糖基化不仅可与HLA-A2稳定结合，而且糖基部分基团可从MHC结合沟中向外伸出，可为与TCR交互作用提供了新的侧链基团，反过来，也不难理解如果糖基过大或过长，则不能被MHC结合沟容纳，或形成空间障碍，阻止抗原-MHC-Ⅰ复合物被TCR识别。

2 蛋白糖基化对CTL活化影响

CTL活化主要依赖于其TCR与APC表面，位于MHC-I类分子结合槽的抗原表位的交互作用，这是CTL活化的第一信号，要求TCR与抗原肽-MHC-I复合物必须有足够的结合时间和结合数量，因此要求TCR与抗原-MHC-I复合物间必须有足够的结合亲和力，另外因TCR具多态性，故主要对APC表面抗原肽-MHC-I复合物有数量要求。但CTL活化过程中面临4大障碍：(1)CTL的TCR与APC表面抗原肽-MHC-I复合物分子的体积比较小，周围存在大量的大体积糖蛋白分子如CD45、CD43等，它们可形成空间障碍，阻止TCR与抗原肽-MHC-I复合物分子的交互作用。(2)由于TCR与抗原肽-MHC-I复合物分子较小，它们之间发生交互作用的基团数量有限，也比较小，故认为通常TCR与抗原肽-MHC-I复合物分子的结合亲和力较小，不利于形成稳定结合。(3)APC表面MHC-I分子数量有限，其中部分是“空”MHC-I分子，再加上一些抗原与MHC-I分子结合不稳定及部分抗原肽-MHC-I复合物不能与TCR交互作用等因素，能与TCR稳定结合的抗原肽—MHC-I复合物数量较少。(4)CTL是在移动过程中对APC表面抗原肽-MHC-I复合物进行识别，这不利于TCR对抗原肽-MHC-I复合物进行精确识别，形成稳定结合。

糖基化不仅通过对CTL表位影响，改变表位与MHC-I分子的结合特性及与TCR交互作用的能力，影响到第(2)、(3)障碍，而且还可以影响到(1)、(4)障碍。

2.1 对免疫学突触形成影响

已发现克服第(1)大障碍主要是通过CTL含TCR部位，和相应APC含抗原-MHC-I复合物部位分别向外凸出，形成免疫学突触(Immunological synapses)，拉近TCR与抗原肽-MHC-I复合物的距离，克服体积小的不足[18]。在该免疫学突触形成过程中，有多种细胞表面糖蛋白受体-配体或粘附分子的参与，如LFA-1-ICAM-1、CD2-CD48和CD28-CD80等，它们通过交互作用不仅对免疫学突触起重要支撑作用，而且还可能转导活化信号。这些过程中，蛋白的糖基起着重要作用如参与细胞连接和信号传导等，如CD2和CD48膜近侧的寡糖作为脚手架调整CD2和CD48结合面方向，增加亲和力，辅助免疫学突触间及整个CTL与APC间形成稳定结合。

2.2 对细胞因子影响

穿孔素(Perforin)是活化CTL和NK细胞合成的一种分泌蛋白，它是CTL和NK细胞溶细胞作用的关键成分，它能插入靶细胞的质膜，形成一个孔，从而引起细胞裂解。用NK细胞株YT，研究穿孔素的合成，加工和细胞内转运。穿孔素首先被合成为70×10^3的无活性前体，然后其C-末端被蛋白水解酶切割，成为60×10^3的活性结构。表位图谱显示切割发生在C2区边缘，该区可通过钙离子依赖方式(Calcium-dependent manner)与磷脂膜结合。推测穿孔素被切割掉含一较大聚糖(Bulky glycan)的蛋白片段后，其C2区才能与磷脂膜相互作用，从而开始穿孔过程，提示穿孔素功能或活性受其自身糖基结构调控。

天然的含糖基化的IFN-β-1a和非糖基化的IFN-β-1b活性差别较大，IFN-β-1a抗病毒活性是IFN-β-1b的10倍，IFN-β-1a去糖基化后则通过二硫键形成不溶的IFN沉淀，对热变性(Thermal denaturation)敏感性增加。X-射线晶体学数据显示IFN-β-1a上聚糖与肽骨架形成氢键，从而形成不带电荷的表面罩。故认为IFN-β-1a较好的生物活性，是因为糖结构所起的稳定作用。

2.3 对粘附分子影响

粘附分子(Adhesion molecule)是一类介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质间粘附作用的膜表面糖蛋白，在免疫应答以及肿瘤的侵袭和转移中具有重要作用，其中在CTL对靶细胞粘附作用起重要作用。糖基结构是其粘附作用的重要分子基础。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.4　对第二信号影响

抗原呈递细胞(APC)上的 CD80(B7-1)和 CD86(B7-2)通过与 T 细胞上的 CD28 交互作用提供共刺激信号(Co-stimulatory signal), 活化 CTL。人类 $CD4^+$ T 细胞克隆表达的 CD86 不能为其它 $CD4^+$ T 细胞提供共刺激信号。人类 T 细胞 CD86 的翻译后修饰与 CD86 基因转染的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或 EB 病毒转染 B 细胞表达的 CD86 明显不同, 表达在 T 细胞膜表面的 CD86 呈低糖基化结构。因此表达在不同类型细胞的 CD86, 其共刺激功能和配体亲和力可能受细胞特异性的翻译后修饰, 特别是糖基化调控。

CD43 是高度 O-糖基化的白细胞归巢(Leukocyte homing)相关蛋白, mAb 1B11 可识别小鼠 CD43 的活化-相关糖结构(Activation-associated glycoform), 外周 $CD8^+$ T 细胞 CD45RB 上也有 1B11 表位, CD43 和 CD45RB 与 1B11 的结合受不同 O-糖基化影响。

2.5　对 Th1/Th2 平衡的影响

有研究发现糖相关蛋白, 甘露聚糖融合蛋白(Mannan-fusion protein, MFP)可通过影响 Th1/Th2 平衡, 调节体液/细胞免疫。利用乳腺癌细胞高度表达的 MUC1, VNTR 肽是抗-MUC1 的结合靶位, 其中氨基酸残基 APDTR 及相邻氨基酸, 是诱导小鼠抗体产生的高效免疫原。为研究其是否为 CTL 表位, 通过对小鼠进行下列研究发现: (1)MUC1+3T3 或 P815+3T3 注入同源小鼠, 产生 CTL 和 DTH 应答及弱的抗体应答, 此类免疫可完全抵御大剂量该肿瘤细胞再注入。(2)用肽(VNTR×2), 融合蛋白(VNTR×5)未能产生 CTL 应答和迟发型超敏反应(DTH)应答, 可引起较好抗体应答, 但仅起弱肿瘤保护(仅 10^6 细胞, 不能达 5×10^6 细胞)(可能为 Th2 型应答)。(3)用甘露聚糖-融合蛋白(Mannan-fusion protein, MFP)则可诱导 CTL 应答和 DTH, 产生极佳保护作用(抵御 50×10^6 细胞), 而抗体应答弱(可能为 Th1 型应答, 与肿瘤细胞排斥类似)。(4)MFP 延迟处理小鼠可很快排斥肿瘤。研究表明, 单纯肽使免疫反应主要为体液免疫, 而 MFP 则使免疫反应转向细胞免疫, 这免疫反应有可能进行选择性操控。

3　粘蛋白和 Tn 糖抗原对 CTL 应答影响

3.1　粘蛋白

异常糖基化是恶性细胞表型中最恒定特征之一。经常可观察到肿瘤细胞出现糖结构表达改变, 主要是 O-和 N-连接糖蛋白的变化, 肿瘤相关糖与肿瘤表型及临床预后有一定关系。糖结构可通过多种方式与不同糖粘附分子、凝集素发生交互作用。

粘蛋白(Mucins)是一类由正常上皮细胞和恶性化上皮细胞表达的糖蛋白, 其中糖部分占到分子质量的 50% ~ 90%, 正常表达粘蛋白与肿瘤相关粘蛋白的结构差异主要表现在糖基化差异, 肿瘤相关粘蛋白上寡糖链长度短于正常粘蛋白, 呈低糖基化(Underglycosylated)。已发现肿瘤相关粘蛋白在肿瘤发生、发展中起重要生物学作用, 包括: (1)其糖基化胞外区形成空间障碍; (2)能改变细胞骨架网; (3)可通过信号传导下调其它分子(如 catenins、cadherins 或 integrins 等粘附分子)的活性。MUC1 粘蛋白所含重要的肿瘤相关肽抗原通常被粘蛋白型聚糖包裹, 用 O-聚糖生物合成抑制物 benzyl-α-GalNAc 处理 JRST 胃癌细胞株后, 发现其与抗粘蛋白单克隆抗体反应性和对 MUC1 特异性 CTL 敏感性均升高。

粘蛋白被认为既可以是抗粘附分子, 也可以是粘附分子, 这有可能由其表面糖基决定。其蛋白骨架及糖基的延伸形态使其具有抗粘附性质, 降低细胞-细胞间结合, 及细胞-细胞外基质间粘附。肿瘤细胞有可能利用其大量表达的 MUC1 的抗粘附能力, 离开处原发位置的邻近细胞和细胞外基质, 向远处转移。在肿瘤细胞经血行转移过程中, MUC1 能通过抗粘附作用抵御特异性免疫细胞(如 CTL)和非特异性免疫细胞(如 NK 细胞)的攻击, 从而实现转移。然而某些特定来源的癌细胞, 如一些来自胰腺及结肠的癌细胞具较强粘附能力, 这是因为其表达的糖结构可能是内皮细胞上选择素(Selectin)样分子的配体, 这种粘附能力有助于癌细胞远处定植。MUC1 就是细胞间粘附分子 1(ICAM-1)的配体, ICAM-1 是一种参与细胞-细胞间交互作用的重要粘附分子, 在 CTL 与 APC 间免疫学突触形成过程中通过与 LFA-1 交互作用起重要支撑作用。

肿瘤细胞的 MUC1 能脱落到血液中而被检测, 研究发现可溶性 MUC1 可抑制移行细胞与内皮细胞间的粘附性交互作用, 这有可能导致肿瘤发生部位招募免疫细胞能力下降, 使肿瘤逃避免疫监视。

已发现 MUC1 表达水平与肿瘤细胞分化类型和预后相关, 高血浆 MUC1 水平的腺癌病人存在大量表达早期活化标志(CD69)的 T 细胞, 且认为这些 T 细胞处于无应答或无能状态, 如肿瘤浸润性淋巴细胞(TILs)通常不具识别特异性抗原能力, 它们虽然表达 CD69, 但却表达极低水平的白介素-2 受体(IL-2R, CD25), 提示这些 TILs 被"冻结"在早期活化状态, 而不能表达正常活化状态的 IL-2 和 IL-2R 水平。这些都支持肿瘤相关 MUC1 的免疫抑制作用。

MUC1 在正常生理条件下, 也具有调节 CTL 应答的能力。妊娠妇女的子宫内膜和血液中存在糖结构不同的 MUC1, 与肿瘤相关 MUC1 类似, 妊娠期妇女可产生抗-MUC1 T 细胞应答, 这可能因妊娠期分泌低糖基化 MUC1 刺激免疫系统所致, 有认为这种天然免疫可防止乳腺癌发生。女性子宫内膜 MUC1 含量随月经周期变化, 孕酮可上调 MUC1 转录, 所以增殖期表达水平最高, 进一步发现这种高表达与子宫内 CTL 活性受抑制相关, 这时子宫内 CTL 活性下调有助于半异原性胚胎着床, 而不致于发生排斥。

此外, 最近研究发现活化的人 T 淋巴细胞可表达 MUC1[18], 分析认为除利用其粘附或抗粘附特性影响淋巴细胞游动外, 活化 T 细胞表达的 MUC1 可能作为一种负反馈信号使免疫细胞由抗原激活状态向静息状态回归, 具体调节机理目前还不清楚, 但肯定有 MUC1 上糖基的参与。

3.2　Tn

Tn 糖抗原(GalNAc-α1-O-Ser/Thr)广泛表达在多种肿瘤细胞和病毒(HIV, HBV)表面糖蛋白上, 而在各种正常细胞上通常不

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表达，因为含加工 Tn 的半乳糖苷转移酶(Galactosyltransferase)。Tn 抗原能调节基因转染能力，有可能在细胞恶性变中起作用。Tn 抗原这种协助传递基因能力，可将其作为潜在免疫治疗性靶位，特别是用于靶向性 DNA 疫苗设计。Tn 不仅能诱导单克隆抗体，还有研究表明蛋白骨架上的 Tn 抗原可诱导细胞免疫并提供保护免役。

Haurum 等用 MHC-Ⅰ类分子结合性糖肽，诱导出糖-特异性 CTL 应答。研究发现仙台病毒(Sendai virus)核心蛋白野生型(WT)肽(FAPGNYPAL)以 P5-Asn 作为锚与 H-2 Db 分子结合。含一 P5-Ser 替代的 K2 肽不能与 Db 结合，当该 Ser 被 GlcNAc 糖基化后，这种新 O-连接糖基化可恢复肽与 Db 的结合能力。GalNAc 的 N-乙酰基可提供 Db 通常容纳 P5-Asn 时所需氢键。P5-Asn 残基本身糖基化后，与 K2 类似，丧失结合能力，这很可能因为空间障碍。K2-O-GlcNAc 可轻易诱导 Db-限制性 CTL，该 CTL 与 K2 或 WT 无交叉反应。所有 K2-O-GlcNAc 诱导的 Db—限制性 CTL 与其他糖肽，如 K3-O-GlcNAc，即 GlcNAc 糖基化发生在相邻 P4-Ser 替代位置，存在强烈交叉反应。且该 CTL 克隆均存在高度保守的 TCR。可能解释是 K2-O-GlcNAc 的糖，不仅可介导与 Db 结合，而且还可通过某种方式与 TCR 发生交互作用，就象对 K3-O-GlcNAc。表明糖基化可阻断肽与 MHC-Ⅰ类分子结合，也可通过糖直接与 MHC 分子交互作用，恢复结合。

有研究把含 Tn 抗原的多抗原糖肽(Multiple antigen glycopeptide，MAG)作为一种合成的含糖疫苗进行研究。即利用固相肽合成方法，把含糖苷的肿瘤相关 Tn 抗原偶联到含 Th 细胞表位的多赖氨酸(Polylysine)骨架上，观察其对几种肿瘤的特异性免疫应答的激活作用。结果发现与其他传统蛋白偶联佐剂不同，MAG 上的糖基可以帮助 Th 细胞对抗原肽识别的精确化学定位，并可增强本身低免疫原性的含多赖氨酸骨架肽的免疫原性(诱导出 Tn 特异性单克隆抗体)。利用合成多抗原性 O-连接糖肽(MAG)，含 Tn 抗原和一 $CD4^+$ T 细胞表位(MAG：Tn-PV)，已成功诱导了可识别人肿瘤细胞株的抗 Tn IgG 抗体，利用该完全合成性免疫原进行治疗性免疫实验，结果显示可提高肿瘤暴露小鼠的存活率。这一可精确确定和具通用性的 MAG 系统不仅为诱导糖-特异性抗肿瘤免疫反应提供了有效策略，而且如果针对细菌寡糖，还可能用于预防感染性疾病。

4 小结

糖基化可从多方面影响细胞免疫，包括对病毒或肿瘤表面蛋白(肽)抗原表位，抗原呈递细胞(APC)对免疫原的摄取、加工，MHC 分子结合、TCR 识别、粘附分子、细胞因子及 Th1/Th2 平衡等产生影响，而且这种影响往往表现在正、反二方面。糖基化等翻译后修饰能在 MHC 结合和 TCR 识别水平调节 CTL 应答，引起随后发生的免疫应答出现数种潜在后果：(1)通过提供可被 TCR 容纳的新结构而生成一新表位。(2)表位完全修饰，导致已存在的对未修饰肽免疫应答在 TCR 识别水平被阻断。(3)锚残基修饰，导致已存在免疫应答在 MHC 分子结合水平被阻断。(4)提供一新 MHC 锚结构，生成一新 MHC 结合位点。(5)对 MHC 结合和 TCR 识别无影响，不改变肽免疫原性。

蛋白的糖基化等翻译后修饰状态反映了其表达细胞的胞内环境，如病毒感染、细胞恶性化或其它环境因素(包括年龄、应激、激素)均可影响胞内代谢，导致翻译后修饰改变。糖基化是蛋白最重要的翻译后修饰。大多数细胞表面蛋白是糖基化的，已证实许多细胞表面蛋白是经胞内途径(Endocytic pathway)加工后，又转运到细胞表面的。因此，T 细胞对病毒感染或肿瘤细胞表面蛋白识别必须包括对糖基的识别。T 细胞对自然加工表位的识别部分由糖基决定。且侧链一个单糖替代就能直接与 MHC 分子和 TCR 发生交互作用，这要求糖位于某一精确位点。

糖基化修饰可在不改变其基因水平情况下，生成新表位(Neo-epitope)。糖蛋白(糖肽)作为来自细菌、病毒或肿瘤细胞等外原性抗原的重要结构，所引起的免疫反应应该包括糖或糖肽特异性 T 细胞应答，认识这一点对免疫治疗的发展具重要意义。

关键词：糖基化；表位；CTL；MHC；TCR
中图法分类号：R329.24 文献标识码：A

参考文献：

[1] Corthay A, Backlund J, Broddefalk J, *et al*. Epitope glycosylation plays a critical role for T cell recognition of type Ⅱ collagen in collagen-induced arthritis[J]. Eur J Immunol, 1998, 28(8): 2 580—2 590.

[2] Jensen T, Galli Stampino L, Mouritsen S, *et al*. T cell recognition of Tn-glycosylated peptide antigens[J]. Eur J Immunol, 1996, 26(6): 1 342—1 349.

[3] Haurum J S, Tan L, Arsequell G, *et al*. Peptide anchor residue glycosylation: effect on class I major histocompatibility complex binding and cytotoxic T lymphocyte recognition[J]. Eur J Immunol, 1995, 25(12): 3 270—3 276.

[4] Bay S, Lo Man R, Osinaga E, *et al*. Preparation of a multiple antigen glycopeptide (MAG) carrying the Tn antigen. A possible approach to a synthetic carbohydrate vaccine[J]. J Pept Res, 1997, 49(6): 620—625.

[5] Reitter J N, Means R E, Desrosiers R C. A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS[J]. Nat Med, 1998, 4(6): 679—684.

[6] Abdel Motal U M, Berg L, Rosen A, *et al*. Immunization with glycosylated Kb binding peptides generates carbohydrate specific, unrestricted cytotoxic T cells[J]. Eur J Immunol, 1996, 26(3): 544—551.

[7] Carbone F R, Gleeson P A. Carbohydrates and antigen recognition by T cells[J]. Glycobiology, 1997, 7(6): 725—730.

[8] Speir J A, Abdel Motal U M, Jondal M, *et al*. Crystal structure of an MHC class I presented glycopeptide that generates carbohydrate specific CTL[J]. Immunity, 1999, 10(1): 51—61.

[9] Conrad S F, Byeon I J, Digeorge A M, *et al*. Immunogenicity and conformational properties of an N-linked glycosylated peptide

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

epitope of human T lymphotropic virus type 1 (HTLV I)[J]. Biomed Pept Proteins Nucleic Acids, 1995, 1(2): 83—92.

[10] Deck B, Elofsson M, Kihlberg J, *et al*. Specificity of glycopeptide specific T cells[J]. J Immunol, 1995, 155(3): 1 074—1 078.

[11] Deck M B, Sjolin P, Unanue E R, *et al*. MHC restricted, glycopeptide specific T cells show specificity for both carbohydrate and peptide residues[J]. J Immunol, 1999, 162(8): 4 740—4 744.

[12] Doe B, Steimer K S, Walker C M. Induction of HIV 1 envelope (gp120) specific cytotoxic T lymphocyte responses in mice by recombinant CHO cell derived gp120 is enhanced by enzymatic removal of N linked glycans[J]. Eur J Immunol, 1994, 24(10): 2 369—2 376.

[13] Hiltbold E M, Alter M D, Ciborowski P, *et al*. Presentation of MUC1 tumor antigen by class I MHC and CTL function correlate with the glycosylation state of the protein taken up by dendritic cells[J]. Cell Immunol, 1999, 194(2): 143—149.

[14] Haurum J S, Hoier I B, Arsequell G, *et al*. Presentation of cytosolic glycosylated peptides by human class I major histocompatibility complex molecules *in vivo*[J]. J Exp Med, 1999, 190(1): 145—150.

[15] Brumeanu T D, Casares S, Harris P E, *et al*. Immunopotency of a viral peptide asssembled on the carbohydrate moieties of self immunoglobulins[J]. Nat Biotechnol, 1996, 14(6): 722—725.

[16] Haurum J S, Hoier I B, Arsequell G, *et al*. Presentation of cytosolic glycosylated peptides by human class I major histocompatibility complex molecules *in vivo*[J]. J Exp Med, 1999, 190(1): 145—150.

[17] Hampl J, Schild H, Litzenberger C, *et al*. The specificity of a weak gamma delta TCR interaction can be modulated by the glycosylation of the ligand[J]. J Immunol, 1999, 163(1): 288—294.

[18] Malissen B. Dancing the immunological two-step[J]. Science, 1999, 285: 207—208.

(编辑 汪勤俭)

文章编号: 1000-5404(2000)10-1003-05

综述

CTL 活性检测与监测

Methods for detecting and monitoring the activity of cytotoxic T lymphocyte

石统东, 吴玉章 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所, 重庆 400038)

在肿瘤及病毒性疾病的研究、治疗中, 体液免疫并不能彻底消除肿瘤细胞及细胞内感染病毒, 只有细胞介导的免疫反应, 特别是细胞毒性 T 淋巴细胞(Cytotoxic T lymphocyte, CTL)介导的细胞免疫反应才能发挥最根本的作用。发展上述疾病的特异性疗法和诱发针对病毒感染细胞与肿瘤细胞表面特异性抗原的细胞免疫应答, 特别是 CTL 介导的细胞毒作用, 是克服目前病毒性疾病的常规治疗方法不能消除宿主细胞内病毒感染, 以至使感染迁延、慢性化甚至向肿瘤恶性分化发展, 以及肿瘤治疗缺乏特异性、损伤大、毒副作用大、疗效不够满意等问题的关键。而检测和监测病毒性疾病和肿瘤的抗原特异性 CTL 的活性及其介导的免疫应答的发展与转归, 是评价特异性免疫疗法的基础。

目前我们已能直接定量某些特异性 $CD8^+$ T 细胞应答, 同时, 某些特异性 $CD4^+$ T 细胞应答的成熟的直接定量方法亦已面世。可以预计: 在不久的将来我们对细胞介导的免疫反应的认识将会加深, 有些理念可能要有所改变。目前国内外测定 CTL 活性的方法, 大致可分为两类: 一类是应用同位素的方法, 一类是单个细胞水平的方法。各方法的原理、材料要求、具体操作、灵敏度、适用范围等也不尽相同。

1 应用同位素的 CTL 活性测定方法

1.1 ^{51}Cr 释放法

自 Brunnner 等介绍以 ^{51}Cr 标记靶细胞的同位素释放法测定 CTL 的细胞毒活性以来, ^{51}Cr 释放法已成为测定 CTL 杀伤活性的常规方法。因其易操作、重复性好, 国外多采用此方法。^{51}Cr 能透入细胞质, 为细胞质内标记, 在细胞破损之后即被释放出来。所需标记时间较短, 一般 1 ~ 2 h。研究发现一个效应 CTL 细胞(Effector CTL, eCTL)可在 4 h 内连续杀伤 5 个靶细胞, 所以效应细胞和靶细胞的共孵育时间亦较短, 一般只需 4 h。

典型操作如下: 选择一种对 CTL 介导的细胞毒作用高度敏感的靶细胞, 以 10^4/孔的数量转移至 U 型或 V 型底的微孔细胞培养板中, 每组做 3 个复孔。效应 CTL 细胞以至少 1∶5、最多

基金项目: 国家高技术计划生物技术领域青年科学基金资助项目
作者简介: 石统东(1970—), 男, 山东省蒙阴县人, 博士研究生, 主要从事蛋白质及多肽的分子设计与功能方面的研究, 发表论文 7 篇。电话: (023)68752236
收稿日期: 2000-08-04; 修回日期: 2000-09-29

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net