

胸腺上皮细胞的发育分化及其分子调控

孙丽娜, 赵勇* (中国科学院动物研究所生物膜与膜生物工程国家重点实验室移植生物学研究组, 北京 100101)

[摘要] T细胞在胸腺中发育成熟依赖特殊的微环境,而胸腺上皮细胞(TECs)是微环境中最重要的成分之一。TECs主要分为皮质上皮细胞(cTECs)和髓质上皮细胞(mTECs),分别介导胸腺细胞的阳性选择和阴性选择过程。cTECs和mTECs来源于共同的胸腺上皮干细胞(TEPCs),经过一系列发育过程,最终分化为功能及表型成熟的TECs。TECs发育分化过程除受到自身内在基因如转录因子Foxn1和Aire的调控以外,还需要与间质细胞、胸腺细胞相互作用,接受外源信号如TNFR家族成员RANK、CD40和LT β R信号的调节,这些信号尤其对mTECs的发育至关重要。而成纤维细胞生长因子(FGFs)和Wnt通路则对TECs的扩增和功能维持非常重要。本文综述了TECs发育分化过程以及参与调控该过程的信号分子通路。

[关键词] 胸腺上皮细胞; Foxn1; Aire; TNFR; NF- κ B; FGFs; Wnt

[中图分类号] R392.12 **[文献标志码]** A

作为中枢免疫器官,胸腺是T细胞发育和成熟的必需场所。构成胸腺微环境最主要的细胞成分是胸腺上皮细胞(thymic epithelial cells, TECs)和胸腺细胞,由TECs组成三维网状结构,其中充满着大量发育不同阶段的胸腺细胞。另外胸腺还包括巨噬细胞、树突状细胞(dendritic cells, DCs)、成纤维细胞等其他类型细胞。TECs根据在胸腺的位置不同可分为两群:皮质上皮细胞(cortical thymic epithelial cells, cTECs)分布在胸腺外围皮质部分,髓质上皮细胞(medullary thymic epithelial cells, mTECs)分布在胸腺中心髓质部分。胸腺细胞在胸腺中游走的同时,通过与TECs相互作用而发育成熟及完成选择过程。cTECs主要介导胸腺细胞的阳性选择,而mTECs在阴性选择中起重要作用。这些选择过程将保证最终发育成熟的T细胞既具有识别自身MHC分子限制性抗原又对自身抗原耐受的特性^[1]。可见TECs是胸腺微环境中最重要的组成部分。对TECs发育分化过程及调控机制的研究有助于我们更加全面了解胸腺微环境和T细胞的发育分化。对于TECs的研究已数十年,尽管取得一些进展,然而TECs的发育分化过程及参与调控机制仍未完全明晰,本文将综述近年相关研究成果,以便更好地理解TECs发育分化过程及调控机制,进而对未来研究方向有所启发。

1 胸腺上皮细胞的发育分化过程

胸腺器官的发生是一个高度复杂和受到严格调控的动态发育过程^[2],大约胚胎期第9天(E9),在第三咽囊内胚层形成胸腺器官原基。胸腺原基包含着向上皮细胞发育的前体细胞,该前体细胞能发育分化为cTECs和mTECs^[3]。进一步的研究证实mTECs和cTECs存在各自的前体细胞^[4]。mTECs,

尤其是Aire⁺mTECs的前体细胞是一群高表达紧密连接相关蛋白claudin3和claudin4的mTECs(Cld3, 4^{hi} UEA-1⁺)^[4]。cTECs的前体细胞在E15d出现,认为是EpCAM⁺CD205⁺CD40⁻表型的细胞群体^[5]。

mTECs和cTECs的发育分化过程并不是十分清楚。目前公认的是,在胚胎期胸腺器官发生时mTECs和cTECs由具有双重分化能力的共同前体发育而来,在出生后的胸腺中仍存在TECs前体细胞库,使mTECs和cTECs不断得到更新,并且该前体细胞库的大小决定最终成熟TECs的数量。TECs均不表达造血细胞来源的标志CD45,表达上皮标志EpCAM和MHC II类分子。mTECs和cTECs表达不同的角蛋白分子,mTECs主要表达角蛋白5(K5),cTECs主要表达角蛋白8(K8)。而K5⁺K8⁺双阳性细胞主要分布在皮髓质交界处,它们或者是cTECs的一群,或者是不成熟的mTECs和/或cTECs前体细胞。在表达膜表面分子方面,mTECs表达UEA-1,不表达Ly51(UEA⁺Ly51⁻);而cTECs则表达Ly51,不表达UEA-1(UEA⁻Ly51⁺),从而通过免疫荧光或者流式细胞术的方法可以区分这两群TECs。

mTECs的发育过程研究相对较多也较明晰(图1)。大体来说,mTECs发育经历3个阶段:不成熟mTECs表达UEA-1,低表达MHC II类分子和共刺激分子CD80/86;随后mTECs上调MHC II类分子和CD80/86的表达,发育成中度成熟mTECs,但这阶段mTECs仍不表达Aire,所以功能上还是不成熟的。成熟的mTECs是UEA-1⁺MHC II^{hi}CD80/86^{hi}Aire⁺,受Aire的调控,该阶段的mTECs表达自身组织限制性抗原(tissue restricted antigens, TRAs),参与胸腺细胞的阴性选择^[6]。

对于mTECs发育终末阶段的认识也是逐渐深入。最早人

收稿日期: 2012-09-29; 接受日期: 2012-11-05

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973)资助(2010CB945301); 国家自然科学基金(C81130055); 中科院知识创新工程重要方向项目(YSC-X2-YW-R-238)

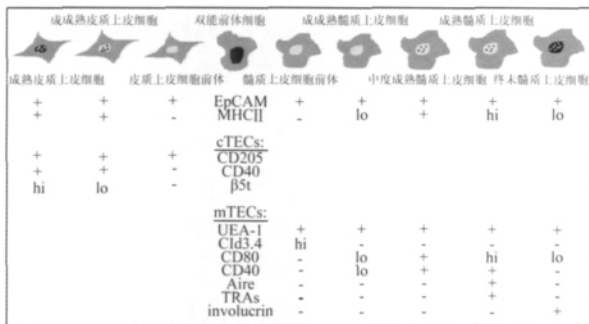
作者简介: 孙丽娜(1985-),女,湖南常德人,博士

Tel: 15810072134; E-mail: sunln@ioz.ac.cn

* Corresponding author, 赵勇, E-mail: zhaoy@ioz.ac.cn

们认为具有 MHC II^{hi}CD80^{hi}Aire⁺ 表型的 mTEC 是终末分化阶段,它们失去了自我更新能力,最终通过凋亡被清除。然而越来越多的证据显示,mTECs 最终发育到超过 Aire⁺ 的阶段。2009 年,Nishikawa 等^[7]通过细胞命运追踪方法,直接证明了表达 Aire 并不是 mTECs 发育分化的最终阶段,mTECs 由 Aire⁺CD80^{hi}MHC II^{hi} 继续发育到 Aire⁻CD80^{int}MHC II^{lo} 阶段。利用 Aire 启动子驱动表达 LacZ 的报告系统发现 mTECs 2~3 周的生命周期中,Aire 在单个 mTEC 中只表达一次,而且表达时间非常有限,最多 1~2 d,随后 Aire 表达快速下调,伴随着 MHC II、CD80 和大部分 Aire 依赖和不依赖的 TRAs 表达也下调。在终末阶段,mTECs 失去细胞核成为哈氏小体一部分,而且特异表达桥粒核心糖蛋白(DGs)1 和 3^[8]。所以 Aire、CD80 和 MHC II 的表达在 mTECs 发育中有一个由低到高,再由高转低的过程。这一结果不仅进一步阐明了 mTECs 发育分化的过程,而且更加有力的支持了 TECs 渐进式分化理论。末端分化的 mTECs 以表达 involucrin 作为标志,在发育时间轴上,involucrin⁺ mTECs 的出现晚于 Aire⁺ mTECs^[9]。

对 cTECs 的发育分化研究相对要少。目前认为 cTECs 的发育过程是:具有双分化功能的 TEPCs 首先发育成 cTECs 谱系前体细胞 cTEPCs(EpCAM⁺CD205⁺CD40⁻MHC II⁻),随着 CD40 和 MHC II 的表达上调标志着 cTECs 逐渐发育成熟,成熟的 cTECs 表达一系列蛋白酶对介导胸腺细胞的阳性选择发挥作用。比如包含蛋白酶 β5t 的胸腺蛋白酶体(thymoproteasome)对产生 MHC I 限制性的 CD8⁺T 细胞有重要作用^[10]。而 cathepsin-L 和 TSSP 则参与 CD4⁺T 细胞产生^[11]。cTECs 具有再生能力,在胸腺损伤造成 cTECs 大量减少后能自我更新重建胸腺皮质区域和恢复 T 细胞发育^[12]。图 1 总结了 TECs 发育分化阶段以及相应的分子标志。



+: 表达; -: 不表达; hi: 高表达; lo: 低表达。

图 1 TECs 发育分化过程及分子标志^[6]

2 胸腺上皮细胞的发育分化调控

TECs 的发育成熟受到多层次信号调控。首先 TECs 受到自身内部信号的调控,转录因子 Foxn1 和 Aire 决定了 TECs 和 mTECs 发育分化和功能成熟。通过细胞间相互接触由其他细胞提供的外源信号也参与了 TECs 的发育分化,比如 TNFR 家族成员 RANK,CD40 和 LTβR,尤其是对 mTECs 发育至关重要。而成纤维细胞生长因子(FGF)和 Wnt 调节 TECs 扩增和功能维持。还有另外一些分子对 TECs 的发育没有系统性的作用,但是缺失这些分子也导致 TECs 发育缺陷,证明它们也参与了 TECs 的发育分化过程。以下将简述 TECs 发育分化过程中起作用的内源和外源信号。

2.1 Foxn1 转录因子 Foxn1 无疑对胸腺(胸腺上皮细胞)的发育起到至关重要的作用。Foxn1 在 小鼠胚胎期 11.25 d (E11.25) 胸腺原基形成后、TECs 分化之前开始表达,调控从胚胎期到出生后的 TECs(包括 mTECs 和 cTECs)各个阶段的发育分化和功能。

对一系列 Foxn1 基因改造小鼠胸腺的研究结果阐述了 Foxn1 对出生后胸腺微环境的维持具有重要作用。Foxn1^{nu} 等位基因缺失小鼠(Foxn1^{nu/nu},即裸鼠)胸腺萎缩,没有 T 细胞生成,导致严重的免疫缺陷。虽然裸鼠胸腺发育的最早期阶段并不受影响,仍然有 TEPCs 存在,但是胸腺发育会阻滞在胸腺原基形成后(小鼠中约 E12),并且造血前体细胞不会定位到胸腺原基。另一个转基因小鼠模型是 Foxn1^{Δ/Δ},这种鼠表达的 Foxn1 蛋白缺失 N 端第 3 个外显子。与裸鼠相比,Foxn1^{Δ/Δ} 小鼠表型是胸腺特异的(其皮肤和毛发正常),胸腺发育缺陷的表型也要缓和一些,Foxn1^{Δ/Δ} 胸腺组织高度空泡化,缺少皮质髓质区域及成熟的 mTECs 和 cTECs,已有造血前体细胞迁入到胸腺,但胸腺细胞的发育是不正常的^[13]。Foxn1^{lacZ} 小鼠模型是将 LacZ 基因插入到 Foxn1 基因 3 端非编码区,导致 Foxn1 转录受影响。在出生时,Foxn1 表达水平正常,从出生后 1 周开始 Foxn1 的表达会逐渐下降,当下降超过 50% 时,胸腺出现萎缩,TECs 和 T 细胞减少,呈现 Foxn1 剂量依赖效应。成熟 mTECs(MHC II^{hi}UEA-1^{hi})因为表达更高水平的 Foxn1 而更加敏感^[14]。Foxn1 表达缺陷使 TEC 发育受阻,伴随着 T 细胞产生减少,从而造成个体免疫力低下,更易遭受细菌或病毒感染,出现类似衰老的症状^[15]。在 Foxn1^{lacZ} 小鼠中,由于 LacZ 基因的插入是随机的,所以 Foxn1 表达降低具有不可控性,加上 LacZ 基因可能影响小鼠其他发育过程,所以条件性敲除 Foxn1 小鼠(Foxn1^{fx}(fx))更能精确的描述了 Foxn1 在胸腺发育中的作用^[16]。出生后全身敲除 Foxn1 在 5 d 内就能引起严重的胸腺萎缩,mTECs(尤其是 MHC II^{hi}UEA-1^{hi} 成熟 mTECs)比 cTECs 减少更明显。mTECs 减少是由于活化的 p53 诱导的凋亡引起的。值得注意的是在 K5(K5 主要表达在 mTECs)启动子驱动下敲除 Foxn1 也能导致相同的胸腺萎缩,但在 K8(K8 主要表达在 cTECs)启动子就没有这种表型。这也证明了出生后胸腺 Foxn1 对 mTECs 的维持更为重要。将 Foxn1^{fx}(fx) 小鼠与普遍表达 Cre 酶的小鼠杂交得到 fx/fx-uCreERT 小鼠,它的特点是随着年龄增加 Foxn1 自发的降低表达水平,胸腺髓质出现空泡,Aire 的表达降低,影响了阴性选择^[17]。一种可逆转的低表达 Foxn1 基因的转基因鼠 Foxn1^R,通过与 WT 鼠或者 Foxn1^{-/-} 小鼠杂交,可得到一系列包括 Foxn1 各种基因组合的小鼠,相应的表达不同水平的 Foxn1 蛋白。通过分析这些小鼠的胸腺发育情况,揭示出 Foxn1 调控了 cTECs 及 mTECs 的多个发育分化过程,并且呈现出 Foxn1 剂量依赖效应,但是 Foxn1 似乎并不参与 TEPCs 的形成和 mTECs 的亚系分化的命运选择过程^[18]。

简单说来,Foxn1 在 TECs 发育中的作用是:(1) Foxn1 不参与从 TEPCs 生成和向 mTECs 或者 cTECs 的分化命运决定^[18]。这一点并不意外,早期研究就发现 Foxn1 基因缺失小

鼠胸腺中存在 TEPCs,提示了 Foxn1 可能参与调节 TECs 的生长和分化,而不是决定 TECs 前体的出现。(2) 接下来胚胎胸腺中 TEPCs 进入分化阶段产生 mTECs 和 cTECs 两个亚系是需要 Foxn1 调控的。(3) Foxn1 对出生后 mTECs 和 cTECs 两个细胞亚群各自发育分化也是必须的。(4) Foxn1 还参与 TECs 的增殖以及终末分化^[14]。

胸腺中 Foxn1 的表达和维持受 Wnt 和骨形态发生蛋白 (BMP) 信号通路调控。Wnt 蛋白是一大类分泌型糖蛋白,参与了细胞的命运决定、增殖、迁移、极化和凋亡等多个方面。在胸腺中主要是 Wnt4 和 Wnt5b,由 TECs 和胸腺细胞通过自分泌和旁分泌的形式正向调节 Foxn1 的表达。BMP 是 TGF- β 超家族成员,作为形态发生素对多种器官发育有重要作用。BMP4 调节 Foxn1 表达作用主要是在胚胎期胸腺发生时,在 E10.5 d BMP4 第三咽囊内胚层检测到表达,这些区域在 E11.5 d 后将检测到 Foxn1,提示 BMP4 定位的区域将发育为表达 Foxn1 的胸腺区域。在胚胎胸腺器官培养 (fetal thymus organ culture, FTOC) 中加入 BMP4 能提高 TECs 的 Foxn1 表达水平^[19]。

作为转录因子, Foxn1 调控许多在胸腺(胸腺上皮细胞)发育中发挥作用的基因^[20]。Pax1 于 E9.5 d 表达在第三咽囊,对胸腺发生、胸腺上皮细胞发育分化/增殖起重要作用,其在胸腺原基中的表达是 Foxn1 依赖的^[18]。Foxn1 还调节与胸腺细胞发育相关的基因:当 Foxn1 缺失时,检测不到上皮细胞表达调节造血前体细胞定位到胸腺的基因 CCL25 和 CX-CL12^[21],及促进前体细胞生长的细胞因子干细胞生长因子 (stem cell factor, Scf)。控制造血前体细胞向 T 细胞定向分化的因子 Dll4 (Notch 的配体) 在 Foxn1 缺失胸腺也是特异性缺失^[21]。另外 Foxn1 还直接或者间接调节 cathepsin L、CD40、MHC II 等对 TECs 发育分化起重要作用的基因^[18]。

2.2 Aire 人们在自身免疫多内分泌病-念珠菌病-外胚层营养不良 (autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy, APECED), 一个以多腺体发生自身免疫病变为特征的疾病中发现了 Aire,对建立中枢免疫耐受发挥重要作用。Aire 不仅是成熟 mTECs 的标志,同时 Aire 也参与 mTECs 的发育分化调控。Aire 缺失小鼠的胸腺髓质部分破坏, mTECs 数量下降^[22]。采用细胞命运追踪方法——追踪表达过 Aire 的细胞的整个生命轨迹,让我们能区分出表达过和从未表达 Aire 的 mTECs。在这种小鼠模型中,当 Aire 缺失时, involu-
crin⁺ mTECs, 即终末分化的 mTECs 是减少的, mTECs 发育阻滞在终末分化前阶段,与此相应的胸腺中代表终末分化的哈氏小体类结构也是减少的。这些结果都提示我们, Aire 参与调控 mTEC 的发育分化过程^[23]。

Aire 最重要的功能是作为转录因子调节 TRAs 在 mTECs 上表达,并且在一定程度的增加 mTECs 给胸腺细胞提呈抗原的能力,参与 T 细胞阴性选择,从而建立中枢免疫耐受。Aire 调节 TRAs 表达的方式是多方面的,目前主要有三种模型,第一种模型是 Aire 作为经典转录因子,能够结合到靶基因启动子上,启动基因的表达;第二种模型是 Aire 能结合到染色质

上,使基因组 DNA 松散,从而非特异性的增加 TRAs 的转录;第三种模型涉及表观遗传修饰, Aire 能识别表观遗传位点,比如非甲基化组蛋白 3,通过去甲基化作用, Aire 或者自身,或者招募其他转录激活子增加基因转录。Danso-Abbeam 等^[24] 详尽描述了这三种模型。除了这三种方式, Giraud 等^[25] 通过基因芯片分析野生型和 Aire 缺失 mTECs 的表达谱,发现 Aire 还能通过释放 RNA 聚合酶 II 参与转录中的延伸 (elongation) 过程而增加靶基因的转录。最近的研究指出 Aire 能调控 microRNAs 在 mTECs 中的表达,对维持正常胸腺微环境发挥重要作用。在 TECs 中特异敲除对形成 miRNA 起重要作用的 Dicer 酶导致胸腺细胞生成减少和阴性选择破坏,从而产生自身免疫病^[26]。

2.3 肿瘤坏死因子受体 肿瘤坏死因子受体 (tumor necrosis factor receptor, TNFR) 超家族和它们相应的配体在 mTECs 的发育分化中扮演重要角色。mTECs 表达多种 TNFR^[27], 其中 3 种受体 [NF- κ B 激活受体 (RANK)、CD40 和淋巴毒素 β 受体 (LT β R)] 介导的信号通路在 mTECs 发育中起到关键的作用^[28]。

RANKL-RANK 决定了 mTECs 的形成及发育成熟。在小鼠胚胎期,由 CD4⁺ CD3⁻ 的淋巴组织诱导 (LTi) 细胞提供 RANKL 信号促进 CD80⁻ Aire⁻ mTECs 发育成 CD80⁺ Aire⁺ mTECs。小鼠出生后胸腺缺失 RANK 或 RANKL 也会降低 UEA-1⁺, CD80^{hi}, MHC II^{hi} 成熟 mTECs。出生后 RANKL 主要由成熟单阳性胸腺细胞提供^[27, 29]。相反,若是缺失 RANKL 的阻断性受体 OPG,胸腺会增大,成熟 mTECs 增多^[27]。将 RANKL 缺失小鼠的胸腺移植或者脾细胞过继转移到免疫缺陷鼠会引起炎症细胞浸润和自身抗体产生^[29]。总之, RANKL-RANK 信号异常导致成熟 mTECs 发育受阻, T 细胞自身免疫耐受状态出现缺陷。

形成完整有功能的胸腺髓质微环境还需要 CD40L-CD40 信号通路的参与。CD40 或 CD40L 缺失小鼠也表现出成熟 mTECs 减少, TRAs 表达异常,虽然其表型没有 RANK 信号缺失那么严重。而 RANKL 和 CD40 同时敲除的小鼠, mTECs 的缺陷比单独缺失更加明显,说明 RANK 和 CD40 协同发挥作用。出生后 CD40L 也是由经过阳性选择的成熟单阳性细胞 (CD4⁺ 和 CD8⁺) 提供。

淋巴毒素信号对包括淋巴结、Peyer 结 (Peyer's patches)、脾脏等多种淋巴器官发生都是必需的。在胸腺中,淋巴毒素受体 (LT β R) 主要表达在基质细胞而不是 T、B 淋巴细胞上,它有两个配体,分别是 LT α 1 β 2 和 LIGHT。LT α 1 β 2 又包括 LT α 和 LT β 亚基。成熟的单阳性胸腺细胞仍然是 LT β R 配体的主要来源。淋巴毒素信号在 mTECs 发育中的作用是肯定的。小鼠缺失 LT β R、它的配体 (LT α 和 LT β) 或者下游信号分子 NF- κ B 诱导激酶 (Nik) 都导致髓质发育缺陷,表现在胸腺髓质结构破坏, mTECs 细胞数显著降低, T 细胞成熟延缓,并伴随自身免疫病发生^[30]。然而 LT β R 信号调节自身免疫病并不是直接调控 Aire 和 TRAs 在 mTECs 中的表达以及调节性 T 细胞 (Treg) 的数量和功能。可见淋巴毒素信号通路和 Aire 对

mTECs 的调控并不是关联的^[30]。不过相对于 LT β R, 它的配体 LT α 、LT β 、LIGHT 缺失对胸腺髓质的影响都比较缓和, 基于 LT β R 缺失胸腺受损程度大于其配体缺失, 可以推断除了 LT α 1 β 2 和 LIGHT, 似乎还有其他配体通过 LT β R 对 mTECs 发育发挥作用。淋巴毒素信号通路中分子缺失对胸腺髓质的影响总结于表 1。

表 1 参与胸腺髓质上皮细胞发育的淋巴毒素信号

基因型	特征	髓质结构	mTECs 发育
LT β R ^{-/-}	淋巴毒素信号缺失	结构破坏 髓质减小	mTEC 明显减少
LT α ^{-/-}	淋巴毒素信号缺陷	无明显改变 髓质少量减少	mTEC 无明显减少
LT β ^{-/-}	淋巴毒素信号缺陷	mTEC 均一性降低	mTEC 无明显减少
LIGHT ^{-/-}	淋巴毒素信号缺陷	无明显改变	mTEC 无明显减少
LT β ^{-/-} LIGHT ^{-/-}	淋巴毒素信号缺陷	mTEC 均一性降低	mTEC 无明显减少

淋巴毒素信号通路还参与 mTECs 在胚胎期的发育和 Aire 之后的终末分化阶段 (involucrin⁺)。以往的研究表明在胚胎期 mTECs 依赖 RANK 信号, 而 LT β R 信号能上调胸腺基质表达 RANK, 从而促进 mTECs 的分化。而且 LT β R 和 RANK 信号通路存在协同作用, 因为两种受体双敲除的小鼠 mTECs 减少程度比其中任何单敲除的表型更显著^[31]。在 mTECs 终末分化过程中, Aire 的表达和末端分化是受到不同机制调控的。Aire⁺ mTECs 依赖于 RANK 信号通路, 成熟的胸腺细胞对其不是必须的。然而 Aire⁺ mTECs 继续发育到 involucrin⁺ mTECs 阶段则需要与成熟的胸腺细胞相互作用, 通过 LT α -LT β R 信号的激活^[9]。

目前看来, 似乎 RANK 信号在 mTECs 发育中起主导作用。在胚胎期 mTECs 发育初期, RANKL-RANK 信号决定了 mTECs 的形成。在这个阶段 LT β R 可以促进 RANK 的表达。出生后 mTECs 的发育及扩增由 RANK、CD40 和 LT β R 共同发挥作用。在 mTECs 发育到终末阶段则由 LT β R 参与调控。总之, 三种 TNFR 协同调控完整髓质微环境的形成。

2.4 NF- κ B RANK、CD40 和 LT β R 的下游信号通路一般是经典或/和非经典的 NF- κ B 信号通路, 所以 NF- κ B 对形成功能性的胸腺髓质有重要意义。NF- κ B 家族包括 5 名成员: p65 (RelA)、RelB、c-Rel、p50/p105 (NF- κ B1) 和 p52/p100 (NF- κ B2), 在静息状态下的细胞中形成同源或异源二聚体与 I κ B 家族蛋白 (I κ B α 、I κ B β 、I κ B γ 、I κ B ϵ 和 BCL-3) 结合, 阻止 NF- κ B 的入核, 当受体配体结合后, I κ B 激酶 (IKK, 包括 IKK α 、IKK β 、IKK γ) 活化, 磷酸化 I κ B, 使其泛素化被降解, 从而释放出 NF- κ B 入核发挥转录因子作用。

经典和非经典 NF- κ B 信号通路均可控制 mTECs 的发育。一般认为 RANK 和 CD40 连结的是经典 NF- κ B 通路, 它们与各自的配体结合后, 通过 TNF 受体相关因子 6 (TRAF6) 活化下游 IKK 复合物, 释放 NF- κ B 因子, 经典通路中主要是 p50/RelA 异源二聚体。而 LT β R 与配体结合后激活的是非经典的 NF- κ B 通路, 通过 TRAF2/5 激活 NF- κ B 诱导激酶 (NIK), 进而活化 IKK, 释放 p52/RelB。因此, 与 NF- κ B 经典通路相关的基因, 主要是 TRAF6 基因缺失小鼠表现出髓质结构破坏, 缺失 UEA-1⁺ mTECs, mTECs 发育阻滞在不成熟阶段^[32]。与

NF- κ B 非经典通路相关的基因, 包括 NIK、IKK α 和 RelB 缺失小鼠髓质结构也是不正常的, UEA-1⁺ 或/和 Aire⁺ mTECs 减少或者缺失^[32]。

2.5 成纤维细胞生长因子 胸腺上皮细胞发育分化后必须经历细胞增殖, 扩大细胞数量才能形成完整有功能的微环境, 支持胸腺细胞发育。成纤维细胞生长因子 (FGF) 在胸腺发育中既有促进增殖又有促进分化的作用。在胸腺器官发生阶段, FGF8 表达异常时, 胸腺发育不全, FGF8 并不是直接作用于 TECs, 而是通过影响神经脊细胞 (NCC) 的存活和分化而发挥作用。FGF7 和 FGF10 主要作为营养因子调节 TECs 的生长而不是分化过程。小鼠缺失 FGF7 和 FGF10 的受体 FGFR2 IIIb, 胸腺生长停滞在 E12.5 天刚刚出现 TECs 时。然而 FGF 信号也不是越多胸腺生长越好, 在胸腺甲状旁腺共同起源于小鼠第三咽囊内胚层时, FGF 信号受到一定的抑制有利于 Gcm2, Bmp4 和 Foxn1 基因的表达和胸腺与甲状旁腺的分离^[33]。

FGF7 (又名角蛋白生长因子, KGF) 能促进胸腺整体功能活动。在胸腺中, 成熟的 CD4⁺ 和 CD8⁺ 单阳性胸腺细胞及成纤维细胞是 KGF 的主要来源。KGF 能同时作用于 TECs 和胸腺细胞, 促进其增殖和功能活动。外源加入的 KGF 能诱导成熟及不成熟 TECs 瞬时扩增, 并且促进不成熟 TECs 的分化, 进而促进 T 细胞的发育分化。KGF 还能通过保护胸腺免受照射或者 GVHD 的损害从而增加骨髓移植后免疫系统的重建^[34]。因此, 在老龄个体中, KGF 能减缓胸腺衰老过程, 保护胸腺皮髓质结构, 促进 T 细胞产生^[35]。

2.6 Wnt 在胸腺中, 几乎所有 TECs 都表达 Wnt 的受体, 所以可以推想 Wnt 信号可能对 TECs 发挥功能。前面已经提到, Wnt 首先调节 TECs 的 Foxn1 表达, 从而对 TECs 的发育分化起到重要作用。最近也有很多关于 Wnt, 尤其是 Wnt4 (可诱导经典) 和非经典 Wnt 信号通路, 对胸腺微环境的维持发挥重要作用的报道。Wnt4 既能增加 TECs 及其前体的增殖, 又能促进胸腺细胞及其前体的扩增进而调控胸腺发生过程和控制胸腺大小^[36]。Wnt4 能保护胸腺 (TECs) 抵抗地塞米松诱导的胸腺损伤。在 TECs 中表达 Wnt4 的抑制因子 DKK1 导致胸腺萎缩, TEPCs 减少, TECs 增殖能力降低, 类似于衰老引起的胸腺表型^[37]。因此, Wnt4 被认为是胸腺 (胸腺上皮细胞) 衰老的标志之一。随着年龄增大, Wnt4 和下游调节的 Foxn1 表达是降低的。

2.7 其他调节分子 胸腺 (TECs) 的发育分化是非常复杂的过程, 有着精细的调控网络。除了以上提到的, 还有很多其他信号通路对 mTECs 的发育分化也发挥重要功能。

Sin 是一个信号接头蛋白, 通过调节蛋白-蛋白相互作用发挥功能。Sin 表达在 mTECs 而不在 cTECs 上, Sin 基因缺失小鼠胸腺髓质结构是破坏的, 成熟 mTECs 减少, 有自身免疫病倾向, 并且 Sin 缺失抑制 KGF 对 mTECs 的扩增作用。Sin 作为接头蛋白, 通过调节 KGF/FGFR2 IIIb 下游 Erk1/2 活化诱导 TECs 增殖, 同时促进 RANKL 介导的非经典 NF- κ B 活化, 调节 mTECs 的存活和分化^[16, 38]。

其他参与胸腺微环境形成及维持的分子还有: Notch, 由胸腺细胞提供信号, 对胸腺发生时 TECs 的发育起重要作用^[39]。Spatial(T β) 是 TECs 内源性表达, 通过抑制 TECs 增殖调节胸腺大小^[40]。p63 是 p53 的同源基因, p63 缺失胸腺大小和细胞组成发生异常。p63 表达在 TEPCs 上, TEPCs 需要 p63 保持其增殖潜力, 主要通过抑制 TEPCs 凋亡促进存活而实现^[41]。解聚素(disintegrin) 又称为金属蛋白酶(metalloproteinase) 在胸腺发育中也发挥作用。Adam10 基因在上皮细胞敲除(K14-cre) 导致胸腺萎缩^[42], TECs 缺失 Adam17(Foxn1-cre) 虽然不影响 TECs 的分化过程和 T 细胞的发育, 但是 Aire 表达水平明显下降^[43]。而 Adam8 缺失小鼠胸腺皮/髓质比例下降, mTECs 增多, 成熟的单阳性胸腺细胞在胸腺内聚集^[44]。维生素 A 代谢产物维甲酸(retinoic acid, RA) 调节 TECs 动态平衡得到广泛关注。RA 信号是胸腺器官发生的先决条件之一, RA 表达异常导致胸腺发育不全。胸腺中 RA 主要由间质细胞分泌, 能加速 TECs 退出细胞周期, 限制 TECs 数量, 尤其影响 cTECs 群体^[45]。表皮生长因子样蛋白 8(epidermal growth factor-like protein 8, EGFL8) 在 T 细胞的发育中发挥调节作用。用 RNAi 的方法降低 EGFL8 在 TECs 中表达, 能增加 TECs 表达细胞间黏附分子 1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1), 从而增加 TECs 与胸腺细胞的黏附, 促进胸腺细胞向单阳性成熟阶段发育。同时, 低表达 EGFL8 的 TECs 表达更高的与胸腺发生相关的因子比如 IL-7, GM-CSF 等^[46]。

3 结语

TECs 是胸腺基质细胞的最主要成分, 对 T 细胞发育分化、选择、成熟具有至关重要的作用。因此了解调控 TECs 发育分化的信号机制对研究胸腺形成、发育、自身免疫病、衰老等基础生物学问题具有重要意义。TECs 的发育成熟受到多层次信号调控。TECs 受到自身内部信号的调控, 转录因子 Foxn1 是调节 TECs 谱系发育中的强有力的分子, 在胚胎和出生后的胸腺发育中都起到重要作用。Aire 既作为成熟 mTECs 的标志, 又是调节 mTECs 发育分化的调控因子, 对 mTECs 的成熟和功能至关重要。TECs 与其他胸腺基质细胞相互作用, 包括与间质细胞及与淋巴细胞相互作用对 TECs 的发育成熟、细胞扩增和功能维持都十分重要。成熟的胸腺细胞主要提供 TNFR 信号, 如 RANK、CD40 及淋巴毒素信号, 而间质细胞主要产生 FGFs 和维甲酸。总体来说, TECs 的发育分化受到多层次严格调控。尽管我们对 TECs 谱系发生和一些分子机制有初步认识, 目前仍需要更多的实验证据来细致描绘 TECs 的发育分化过程及其细胞分子调控网络。

参考文献:

- [1] Anderson G, Takahama Y. Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection [J]. Trends Immunol, 2012, 33(6): 256-263.
- [2] 李兰兰, 张连军, 赵勇. 哺乳动物胸腺器官发育及调控[J]. 实

验动物科学, 2010, 27(3): 50-54.

- [3] Zhang L, Sun L, Zhao Y. Thymic epithelial progenitor cells and thymus regeneration: an update [J]. Cell Res, 2007, 17(1): 50-55.
- [4] Hamazaki Y, Fujita H, Kobayashi T, et al. Medullary thymic epithelial cells expressing Aire represent a unique lineage derived from cells expressing claudin [J]. Nat Immunol, 2007, 8(3): 304-311.
- [5] Shakib S, Desanti GE, Jenkinson WE, et al. Checkpoints in the development of thymic cortical epithelial cells [J]. J Immunol, 2009, 182(1): 130-137.
- [6] Alexandropoulos K, Danzl NM. Thymic epithelial cells: antigen presenting cells that regulate T cell repertoire and tolerance development [J]. Immunol Res, 2012, 54(1-3): 177-190.
- [7] Nishikawa Y, Hirota F, Yano M, et al. Biphasic Aire expression in early embryos and in medullary thymic epithelial cells before end-stage terminal differentiation [J]. J Exp Med, 2009, 207(5): 963-971.
- [8] Wang X, Laan M, Bichele R, et al. Post-Aire maturation of thymic medullary epithelial cells involves selective expression of keratinocyte-specific autoantigens [J/OA]. Front Immunol, 2012, 3(March): 19.
- [9] White AJ, Nakamura K, Jenkinson WE, et al. Lymphotoxin signals from positively selected thymocytes regulate the terminal differentiation of medullary thymic epithelial cells [J]. J Immunol, 2010, 185(8): 4769-4776.
- [10] Takahama Y, Takada K, Murata S, et al. beta5t-containing thymoproteasome: specific expression in thymic cortical epithelial cells and role in positive selection of CD8⁺ T cells [J]. Curr Opin Immunol, 2012, 24(1): 92-98.
- [11] Viret C, Leung-Theung-Long S, Serre L, et al. Thymus-specific serine protease controls autoreactive CD4 T cell development and autoimmune diabetes in mice [J]. J Clin Invest, 2011, 121(5): 1810-1821.
- [12] Rode I, Boehm T. Regenerative capacity of adult cortical thymic epithelial cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(9): 3463-3468.
- [13] Su DM, Navarre S, Oh WJ, et al. A domain of Foxn1 required for crosstalk-dependent thymic epithelial cell differentiation [J]. Nat Immunol, 2003, 4(11): 1128-1135.
- [14] Chen L, Xiao S, Manley NR. Foxn1 is required to maintain the postnatal thymic microenvironment in a dosage-sensitive manner [J]. Blood, 2009, 113(3): 567-574.
- [15] Guo J, Feng Y, Barnes P, et al. Deletion of FoxN1 in the thymic medullary epithelium reduces peripheral T cell responses to infection and mimics changes of aging [J/OA]. PLoS One, 2012, 7(4): e34681.
- [16] Cheng L, Guo J, Sun L, et al. Postnatal tissue-specific disruption of transcription factor Foxn1 triggers acute thymic atrophy [J]. J Biol Chem, 2010, 285(8): 5836-5847.
- [17] Xia J, Wang H, Guo J, et al. Age-related disruption of steady-state thymic medulla provokes autoimmune phenotype via perturbing negative selection [J]. Aging Dis, 2012, 3(3): 248-259.
- [18] Nowell CS, Bredenkamp N, Tetelin S, et al. Foxn1 regulates lineage progression in cortical and medullary thymic epithelial cells but is dis-

- pensable for medullary sublineage divergence [J/OA]. *PLoS Genet*, 2011, 7(11): e1002348.
- [19] Tsai PT, Lee RA, Wu H. BMP4 acts upstream of FGF in modulating thymic stroma and regulating thymopoiesis [J]. *Blood*, 2003, 102(12): 3947–3953.
- [20] 李红然,张连军,赵勇. Foxn1 在胸腺上皮细胞发育分化中的关键调控作用 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(11): 1161–1163.
- [21] Calderon L, Boehm T. Synergistic, context-dependent, and hierarchical functions of epithelial components in thymic microenvironments [J]. *Cell*, 2012, 149(1): 159–172.
- [22] Gillard GO, Dooley J, Erickson M, et al. Aire-dependent alterations in medullary thymic epithelium indicate a role for Aire in thymic epithelial differentiation [J]. *J Immunol*, 2007, 178(5): 3007–3015.
- [23] Yano M, Kuroda N, Han H, et al. Aire controls the differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance [J]. *J Exp Med*, 2008, 205(12): 2827–2838.
- [24] Danso-Abeam D, Humblet-Baron S, Dooley J, et al. Models of aire-dependent gene regulation for thymic negative selection [J/OA]. *Front Immunol*, 2011, 2: 14.
- [25] Giraud M, Yoshida H, Abramson J, et al. Aire unleashes stalled RNA polymerase to induce ectopic gene expression in thymic epithelial cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(2): 535–540.
- [26] Zuklys S, Mayer CE, Zhanybekova S, et al. MicroRNAs control the maintenance of thymic epithelia and their competence for T lineage commitment and thymocyte selection [J]. *J Immunol*, 2012, 189(8): 3894–3904.
- [27] ikosaka Y, Nitta T, Ohigashi I, et al. The cytokine RANKL produced by positively selected thymocytes fosters medullary thymic epithelial cells that express autoimmune regulator [J]. *Immunity*, 2008, 29(3): 438–450.
- [28] Akiyama T, Shinzawa M, Akiyama N. TNF receptor family signaling in the development and functions of medullary thymic epithelial cells [J/OA]. *Front Immunol*, 2012, 3: 278.
- [29] Akiyama T, Shimo Y, Yanai H, et al. The tumor necrosis factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance [J]. *Immunity*, 2008, 29(3): 423–437.
- [30] Venanzi ES, Gray DH, Benoist C, et al. Lymphotoxin pathway and Aire influences on thymic medullary epithelial cells are unconnected [J]. *J Immunol*, 2007, 179(9): 5693–5700.
- [31] Mouri Y, Yano M, Shinzawa M, et al. Lymphotoxin signal promotes thymic organogenesis by eliciting RANK expression in the embryonic thymic stroma [J]. *J Immunol*, 2011, 186(9): 5047–5057.
- [32] Irla M, Hollander G, Reith W. Control of central self-tolerance induction by autoreactive CD4⁺ thymocytes [J]. *Trends Immunol*, 2009, 31(2): 71–79.
- [33] Gardiner JR, Jackson AL, Gordon J, et al. Localised inhibition of FGF signalling in the third pharyngeal pouch is required for normal thymus and parathyroid organogenesis [J]. *Development*, 2012, 139(18): 3456–3466.
- [34] Alpdogan O, Hubbard VM, Smith OM, et al. Keratinocyte growth factor (KGF) is required for postnatal thymic regeneration [J]. *Blood*, 2006, 107(6): 2453–2460.
- [35] Berent-Maoz B, Montecino-Rodriguez E, Signer RA, et al. Fibroblast growth factor-7 partially reverses murine thymocyte progenitor aging by repression of Ink4a [J]. *Blood*, 2012, 119(24): 5715–5721.
- [36] Heinonen KM, Vanegas JR, Brochu S, et al. Wnt4 regulates thymic cellularity through the expansion of thymic epithelial cells and early thymic progenitors [J]. *Blood*, 2011, 118(19): 5163–5173.
- [37] sada M, Jardine L, Misir R, et al. DKK1 mediated inhibition of Wnt signaling in postnatal mice leads to loss of TEC progenitors and thymic degeneration [J/OA]. *PLoS One*, 2010, 5(2): e9062.
- [38] Danzl NM, Donlin LT, Alexandropoulos K. Regulation of medullary thymic epithelial cell differentiation and function by the signaling protein Sin [J]. *J Exp Med*, 2010, 207(5): 999–1013.
- [39] Masuda K, Germeraad WT, Satoh R, et al. Notch activation in thymic epithelial cells induces development of thymic microenvironments [J]. *Mol Immunol*, 2009, 46(8–9): 1756–1767.
- [40] Flomerfelt F A, El Kassab N, Gurunathan C, et al. Tbeta modulates thymic stromal cell proliferation and thymus function [J]. *J Exp Med*, 2010, 207(11): 2521–2532.
- [41] Senoo M, Pinto F, Crum CP, et al. p63 is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia [J]. *Cell*, 2007, 129(3): 523–536.
- [42] Weber S, Niessen MT, Prox J, et al. The disintegrin/metalloproteinase Adam10 is essential for epidermal integrity and Notch-mediated signaling [J]. *Development*, 2011, 138(3): 495–505.
- [43] Gravano DM, McLelland BT, Horiuchi K, et al. ADAM17 deletion in thymic epithelial cells alters aire expression without affecting T cell developmental progression [J/OA]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13528.
- [44] Gossens K, Naus S, Hollander GA, et al. Deficiency of the metalloproteinase-disintegrin ADAM8 is associated with thymic hypercellularity [J/OA]. *PLoS One*, 2010, 5(9): e12766.
- [45] Sitnik KM, Kotarsky K, White AJ, et al. Mesenchymal cells regulate retinoic acid receptor-dependent cortical thymic epithelial cell homeostasis [J]. *J Immunol*, 2012, 188(10): 4801–4809.
- [46] Choi HJ, Yoon TD, Muhammad I, et al. Regulatory role of mouse epidermal growth factor-like protein 8 in thymic epithelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 425(2): 250–255.