



猪自然杀伤T细胞研究进展

杨冠¹, 印遇龙^{2*}, 任文凯^{3*}

1. 香港城市大学传染病与公共卫生系, 香港 999077;

2. 中国科学院亚热带农业生态研究所, 亚热带农业生态过程重点实验室, 动物营养生理与代谢过程湖南省重点实验室, 长沙 410125;

3. 华南农业大学动物科学学院, 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 国家生猪种业工程技术研究中心, 广东省动物营养与调控重点实验室, 岭南现代农业科学与技术广东省实验室, 广州 510642

* 联系人, E-mail: yinyulong@isa.ac.cn; renwenkai19@scau.edu.cn

2021-09-16 收稿, 2021-10-08 修回, 2021-10-09 接受, 2021-10-09 网络版发表

香港城市大学新研究计划(9610541)和国家自然科学基金(31922079, 31872365)资助

摘要 限制性自然杀伤T(invariant natural killer T, iNKT)细胞是一类同时表达NK与T细胞受体且具有NK细胞和T细胞两方面性质的独特淋巴细胞。与传统T细胞不同, iNKT细胞表达高度保守的T细胞受体(小鼠: TRAV11-TRAJ18、TRBV13、TRBV29或TRBV1; 人: TRAV10-TRAJ18、TRBV25-1), 这种限制性的受体表达决定了这类细胞的抗原特异性。iNKT细胞识别由CD1d分子提呈的糖脂类抗原, 迅速分泌大量细胞因子参与机体的先天性免疫和获得性免疫反应, 因此在免疫系统中具有不可忽视的作用。近年来研究发现, 与人和小鼠相似, 猪同样具有iNKT细胞。然而受限于多种因素, 对于猪iNKT细胞的研究进展相对缓慢, 对其表征与功能了解也十分有限。我们对猪iNKT细胞以及其在猪流感免疫中的作用开展了部分基础工作。本文对有关猪iNKT细胞特征和功能的研究现状, 以及存在的问题进行综述。

关键词 猪, iNKT细胞, 流感, 免疫

“自然杀伤T(natural killer T, NKT)细胞”这个词最早由日本科学家于1995年提出^[1]。这是一群细胞表面既表达传统T细胞表面受体(包括CD3和T cell receptor (TCR))又表达NK细胞受体(包括CD161, 在小鼠上又被称为NK1.1)的淋巴细胞亚群。根据细胞表达TCR的特性, NKT细胞可以分为恒定性NKT(invariant NKT, iNKT)细胞与多样性NKT(diverse NKT, dNKT)细胞。这两类细胞的TCR都可以识别由胸腺细胞表面的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)I类样分子CD1d所提呈的糖脂类抗原。iNKT细胞表达恒定的TCR受体(α 链: 小鼠, TRAV11-TRAJ18; 人, TRAV10-TRAJ18; β 链: 小鼠, TRBV13、TRBV29或TRBV1; 人, TRBV25-1), 而dNKT细胞则表达不同的

非TRAV10⁺ TCR亚基。iNKT细胞的恒定TCR可以识别海绵提取物中的原型抗原 α -半乳糖苷神经酰胺(α -Gal-Cer), 从而被 α -GalCer/CD1d四聚体或多聚体识别。尽管dNKT细胞发现至今已近20年^[2], 由于一直缺乏一种特定的细胞标记物, 这类细胞的研究速度相比于iNKT细胞非常缓慢。功能上, 根据其所表达的调控因子与所产生的细胞因子的不同, 参照T细胞亚型的分类, iNKT细胞可以被大致分为iNKT1、iNKT2、iNKT17型。目前越来越多的研究也逐渐发现其他细胞亚群, 例如iNKT10与iNKTfh等。根据iNKT细胞发育的过程与分子表面标记物的表达水平, iNKT细胞可以分为四大类: Stage 0, CD24⁺CD44⁻NK1.1⁻; Stage 1, CD24⁻CD44⁻NK1.1⁻; Stage 2, CD24⁻CD44⁺NK1.1⁻; Stage 3, CD24⁻

引用格式: 杨冠, 印遇龙, 任文凯. 猪自然杀伤T细胞研究进展. 科学通报, 2022, 67: 47–53

Yang G, Yin Y L, Ren W K. Porcine natural killer T cells (in Chinese). Chin Sci Bull, 2022, 67: 47–53, doi: [10.1360/TB-2021-0976](https://doi.org/10.1360/TB-2021-0976)

CD44⁺NK1.1⁺^[3,4]. 我们对iNKT细胞根据发育过程与功能两种分类方法的内在联系性还不是完全清楚, 发育上Stage 1型细胞主要包含一些祖细胞, 以及一部分与iNKT2型细胞相关的可以产生IL-4的细胞; Stage 2细胞则包含了所有iNKT1、iNKT2、iNKT17型细胞; Stage 3细胞则大部分是iNKT1型细胞^[5]. 目前绝大多数对NKT细胞的研究关注于iNKT细胞, 故本文主要介绍iNKT细胞. 本文简要介绍iNKT细胞的激活途径、iNKT细胞的辅助性T细胞功能, 以及CD1d分子与哺乳动物iNKT细胞系统, 最后重点介绍猪iNKT细胞表型与功能的研究现状.

1 iNKT细胞的激活途径

iNKT细胞至少可以被两种途径所激活: (1) 通过CD1d分子提呈的糖脂类抗原与iNKT细胞恒定性TCR的结合; (2) 通过模式识别受体激活的抗原提呈细胞产生的促炎症因子配合微弱的TCR信号. 第一种模式激活的iNKT细胞可以产生Th1和Th2型细胞因子, 而第二种途径激活的iNKT细胞只产生Th1型细胞因子. 细胞因子介导的iNKT细胞激活在病毒或细菌感染时极其重要^[6]. iNKT细胞可以识别由CD1d分子提呈的包括内源性脂质抗原. 天然内源性自身脂质抗原包括自磷脂(例如糖基磷脂酰肌醇、磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、磷脂酰乙醇胺等)和糖鞘脂抗原(例如异球三十六烷基神经酰胺和神经节苷脂GD3)^[7]. 外源性抗原包含微生物糖脂或 α -GalCer的合成类似物. 其中对具有潜在医用效应的 α -GalCer类似物的研究最为广泛. 近些年, 通过修饰鞘氨醇碱、N-酰基、糖苷键或碳水化合物基团等途径研发了越来越多的 α -GalCer类似物^[7-10]. 这些化合物可以指导iNKT细胞产生Th1或Th2型免疫反应. 这些不同的免疫反应在不同疾病治疗中有极大的应用潜力, 例如在癌症或者病毒感染时, 我们更希望iNKT细胞产生促炎性细胞因子, 而在治疗自发性免疫疾病时, 我们更希望激活iNKT细胞的抗炎性免疫反应^[11].

2 iNKT细胞的辅助性T细胞功能

iNKT细胞所介导的免疫反应与传统CD4辅助T细胞介导的免疫反应有很多相似之处^[12]. iNKT细胞被CD1d分子所提呈的抗原激活后, 可以短时间内产生大量细胞因子, 例如IFN- γ 、IL-4、IL-17等, 从而参与机体先天性免疫和适应性免疫. 也正是因为这一快速连

接先天性免疫和适应性免疫反应的特性, iNKT细胞还被称作是免疫系统中的“瑞士军刀”^[13]. iNKT细胞又被归属于类天然T淋巴细胞(innate-like T cells). 类天然T淋巴细胞表面受体可以识别由非MHC分子所提呈的非多肽抗原, $\gamma\delta$ T细胞与黏膜相关恒定T细胞(MAIT cell)也属于类天然T淋巴细胞这一大家族. iNKT细胞介导的辅助T细胞功能与传统CD4辅助T细胞功能相比有很多优势. 主要体现在相对于抗原特异CD4辅助T细胞, iNKT细胞具有极大的数量. 人的iNKT细胞大约占总T细胞的0.01%~0.1%. 对于猪也有相似的比例, 多的时候可以达到总T细胞的1%, 而对于单种抗原特异CD4辅助性T细胞比例却不足总T细胞的0.005%^[14]. 另外, 常规辅助性T细胞应答还受限于远交群体个体之间高度的MHC多态性, 而糖脂配体可以特异并且大规模激活iNKT细胞, 尤其在接种疫苗时可以产生持久并且如“瑞士军刀”般多样的保护人和动物免受感染的免疫反应.

3 CD1d分子与哺乳动物iNKT细胞系统

CD1d分子对于iNKT细胞发育至关重要. CD1分子属于非多样性MHC I类家族的可以提呈脂类化合物的一类糖蛋白. CD1d是CD1分子家族中的一类. 尽管目前为止所研究的哺乳动物几乎都包含CD1分子, 并不是所有哺乳动物都表达CD1d基因. 目前发现, 人、黑猩猩、非洲绿猴和恒河猴^[15]、小鼠^[16]、大鼠^[17]、棉尾兔^[18]、羊^[19]、牛^[20]、猪^[21]和马^[22]都表达CD1d基因. 然而, 并不是所有的这些物种都存在着有功能的CD1d分子. 例如, 在牛中发现的CD1d基因实际上是含有突变起始密码子和不可切除的内含子的假基因^[20]. 又如, 虽然马表达CD1d基因^[22], 并且存在与人iNKT细胞非常相似的TCR α 链, 说明马中应该也存在iNKT细胞. 然而不管用人源或者鼠源CD1d四聚体都不能检测出马iNKT细胞, 说明马iNKT-CD1d系统与其他表达iNKT细胞的哺乳动物的iNKT-CD1d系统存在巨大差异^[23]. 目前发现, 哺乳动物包括人、小鼠、大鼠、棉鼠、猪等存在具有功能的iNKT细胞. 本文主要介绍猪iNKT细胞的研究进展, 以及如何合理利用猪iNKT细胞来控制猪流感.

4 猪iNKT细胞表型与功能研究现状

相比于人和小鼠的iNKT细胞, 目前人们对于猪iNKT细胞的了解非常有限. 本节总结猪iNKT细胞的研究进展, 同时也将猪iNKT细胞的表型与人和小鼠iNKT细胞进行比较研究, 主要从猪iNKT细胞分布、猪iNKT

细胞表型、猪iNKT细胞功能和猪iNKT细胞与猪流感四方面进行总结。

4.1 猪iNKT细胞分布

现有证据表明,猪iNKT细胞在发育或功能上都与小鼠和人iNKT细胞非常相似。例如,研究发现,猪iNKT细胞发育受到CD1d分子的限制,因为CD1d分子敲除的猪不能产生iNKT细胞^[24]。与人相似,猪也表达一套完整的CD1分子,包含CD1a、CD1b、CD1c(假基因)、CD1d和CD1e^[21],其中的一些分子例如CD1a和CD1b可以提呈脂质抗原^[25]。然而小鼠却只表达两个CD1d基因,而不表达其他CD1分子^[26]。猪CD1d分子与小鼠、人CD1d分子具有高度的同源性^[22,27],所以装载有 α -GalCer类似物PBS57的鼠源或者人源CD1d四聚体可以识别猪iNKT细胞^[24,27-34]。我们利用流式细胞术分析猪外周血中iNKT细胞的比例,发现人源与鼠源CD1d四聚体所识别的猪iNKT细胞比例相似^[29]。利用鼠源CD1d四聚体,我们对猪包括肺脏、脾脏、肝脏、支气管肺泡灌洗液、淋巴结与外周血等部位iNKT细胞比例进行分析,发现猪iNKT细胞存在于身体的不同部位。在这些组织中,iNKT细胞通常占总淋巴细胞的0.01%~1%,其中脾脏与肝脏的iNKT细胞所占总淋巴细胞的比例最高^[28,29]。猪与猪之间iNKT细胞比例存在很大的差异。猪iNKT细胞比例与小鼠和人iNKT细胞比例也存在一定差异。小鼠iNKT细胞可以占胸腺、外周血和脾脏T细胞的1%,以及骨髓T细胞的15%和肝脏T细胞的

30%^[35-39]。人外周血中iNKT细胞所占比例为0.01%~0.1%,同时人iNKT细胞不会在肝脏中富集^[40]。总体而言,相比于小鼠iNKT细胞,猪iNKT细胞比例和分布与人iNKT细胞更加相似(表1)。

4.2 猪iNKT细胞表型

与小鼠和人iNKT细胞相似,猪iNKT细胞也表达很多转录因子,其中包括PLZF和T-bet。与传统T细胞相比,猪iNKT细胞表达较高的PLZF^[30,41]。根据这些转录因子的表达来分类,猪iNKT细胞可以分为iNKT1(T-bet⁺/PLZF⁺)、iNKT2(T-bet⁻/PLZF^{hi})和非iNKT1-2型(T-bet⁻/PLZF^{lo})^[41]。其中,iNKT1型与iNKT2型所占比例最高,分别约为49.8%和41.7%^[41]。这其中iNKT2型细胞表达最高水平的PLZF。与人和小鼠iNKT细胞类似,猪iNKT细胞也有记忆细胞与激活细胞的表型,表现在高表达的MHC II、CD5、CD25、CD27、CD44和iCOS,但是低表达CD45RA^[29,30,41]。猪iNKT细胞不表达CD11b和Nkp46^[29]。与小鼠iNKT细胞不表达CD8但是部分表达CD4相反,猪iNKT细胞大部分都表达CD8,而只有非常小的一部分表达CD4。我们的研究还发现,猪CD8^{hi}iNKT细胞比CD8^{lo}iNKT细胞具有更强的激活能力,表现在PMA/ionomycin激活的CD8^{hi}iNKT细胞比CD8^{lo}iNKT细胞产生更多的IFN- γ ^[29]。这一发现之后也被Schäfer等人^[41]证明,CD4⁻CD8⁻iNKT细胞不表达或者表达很低水平的CD25和MHCII。通过高通量测序的方法,我们最近发现,猪iNKT细胞主要使用与人iNKT细

表1 人、小鼠和猪iNKT细胞表型的比较

Table 1 Characteristics of human, mouse, and pig iNKT cells

	人iNKT	小鼠iNKT	猪iNKT
CD1d分子限制性	是	是	是
TCR免疫组库	TRAV10-TRAJ18、TRBV25-1	TRAV11-TRAJ18、TRBV13、TRBV29或TRBV1	pTRAV10-TRAJ18*01、pTRBV25-1
糖脂抗原反应表型	7DW8-5> α -GalCer>OCH、C-glycoside 激活态/记忆态	7DW8-5>C-glycoside> α -GalCer>OCH 激活态/记忆态	7DW8-5> α -GalCer>OCH>C-glycoside 激活态/记忆态
辅助受体表达	CD4 ⁻ >CD4 ⁺ 、CD8 ⁺ /、CD56 ⁺ 、CD161 ⁺	CD4 ⁺ >CD4 ⁻ 、NK1.1 ⁺ /、CD44 ⁺	CD4 ⁻ >CD4 ⁺ 、CD8 ⁺ 、CD44 ⁺
PLZF表达	是	是	是
外周血中比例(%总T细胞)	0.01%~1%	0.01%~3%	0.01%~1%
组织分布	大网膜>骨髓>肝脏、外周血	肝脏>骨髓>脾脏>淋巴结	脾脏,淋巴结>肝脏、外周血
产生细胞因子	TNF、IFN- γ 、IL-4、IL-10、IL-13	TNF、IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10、IL-13、IL-17、IL-21、IL-22和GM-CSF	IFN- γ 、PMA/ionomycin激活不能诱导产生IL-17。产生其他细胞因子能力未知
疫苗佐剂效应	是	是	是

胞TRAV10-TRAJ18和小鼠iNKT细胞TRAV11-TRAJ18重排相似的V α 和J α 区段。分子模型的预测证明了猪和人之间相对保守的 α -链抗原结合域: CDR1 α 。这表明, 猪iNKT细胞介导的免疫反应与人iNKT细胞介导的免疫反应相似, 进一步说明猪作为生物学模型物种的适用性^[27]。

4.3 猪iNKT细胞功能

研究iNKT细胞功能一个很重要的方面是检验 α -GalCer或 α -GalCer类似物是否同样可以激活猪iNKT细胞。体外实验发现, α -GalCer可以激活和扩增猪iNKT细胞。细胞数量的增加主要由细胞增殖引起^[41]。在激活时添加细胞因子IL-2和IL-15或IL-33可以促进 α -GalCer诱导的猪iNKT细胞增殖^[30]。我们还发现, α -GalCer刺激可以显著提高部分猪CD172 α^+ CD14 $^+$ 单核细胞MHC II的表达水平(2~5倍), 并且发现MHC II表达水平的提高与猪iNKT细胞比例没有直接关系, 表明其他一些因素包括iNKT细胞产生的细胞因子参与调控抗原提呈细胞的活化^[29]。研究还表明, 在猪体内使用 α -GalCer激活的iNKT细胞可以提供非同源性的B细胞帮助, 说明猪体内存在iNKTfh细胞亚型^[42]。首次在猪体内使用iNKT细胞激动剂的一项研究是从气管内接种 α -GalCer, 使肺部iNKT细胞活化从而导致急性气道高反应性^[34]。这导致猪呼吸困难、气道黏液分泌增强、体温升高。临床症状与肺部iNKT细胞被激活的程度有关而与其绝对频率无关。该研究表明, 猪可能是研究iNKT细胞介导的急性气道高反应性的有用模型。

5 猪iNKT细胞与猪流感

研究发现, 通过单独注射模型抗原鸡蛋溶菌酶(HEL)或者与3种鞘糖脂中的一种组合(α -GalCer、C-糖苷或OCH)来检验猪iNKT细胞激动剂的佐剂潜力。 α -GalCer具有极高的刺激能力诱导iNKT细胞产生Th1和Th2细胞因子, C-糖苷和OCH分别促进Th1和Th2的免疫反应^[43~46]。两次免疫后, 所有3种激活剂, 特别是OCH, 与单独用HEL免疫相比, 产生更高水平的HEL特异抗体。这可能是因为OCH有利于Th2细胞因子促进抗体产生。与OCH和C-糖苷相比, 使用 α -GalCer作为佐剂接种会产生更多的HEL特异T细胞, 可能是因为 α -GalCer引起相对更强和更混合的细胞因子反应来成熟和活化抗原提呈细胞。我们给新断奶仔猪单独或与 α -GalCer组合接种紫外线杀死的全流感病毒(H1N1 A/Cali-

fornia/04/2009), 并在接种两周后对其进行活病毒感染。研究证明, α -GalCer是增强猪流感疫苗效应的有效佐剂^[32]。 α -GalCer的添加强烈抑制了上下呼吸道的病毒复制, 减少病毒排出。这与iNKT细胞的全身性增加以及高水平抗血凝素抗体产生有关。尽管接受 α -GalCer的猪中iNKT细胞比例存在巨大差异, iNKT细胞比例和抗体反应或疾病保护之间没有很大关联。相反, 病毒特异T细胞反应与iNKT细胞比例相关。而病毒特异T细胞反应对于产生免疫持久记忆, 以及针对病毒感染的交叉保护至关重要, 但这些结果还有待进一步验证。为了模仿商业猪流感疫苗的应用, 我们采用了颈部肌肉注射。但是, Dwivedi等人^[31]证明, 通过鼻内途径给予 α -GalCer同样可以增强猪流感疫苗的效应。 α -GalCer与紫外线灭活的流感病毒(H1N1 Sw/OH/24366/07)共同免疫, 然后使用活病毒感染后发现, α -GalCer增强病毒特异IgA分泌, 提高NK细胞毒性和Th1细胞因子(IFN- γ 和IL-12)的分泌, 减少免疫抑制细胞因子(IL-10和TGF- β)的产生, 并显著降低病毒载量。最近的一项研究表明, 当遭遇非洲猪瘟病毒或猪流感感染之后, 猪iNKT细胞数量会显著增加^[41]。总之, 这些有限的研究表明, α -GalCer以及其类似物在猪体内能够引起与在小鼠体内相似的佐剂效应, 即当与灭活的全病毒流感疫苗同时应用时可以提高保护性免疫力。我们的研究还发现, 给已感染流感的猪施用 α -GalCer可以加速病毒的清除。鼻内但不是肌肉注射给予仔猪 α -GalCer可以改善流感疾病症状, 并导致体重增加, 并恢复至未感染猪的水平^[33]。 α -GalCer还抑制气道中的病毒复制, 减少病毒脱落和肺病理症状^[33]。有趣的是, α -GalCer诱导的流感保护程度与单个动物表达的iNKT细胞水平无关, 并且预防性地激活猪iNKT细胞对猪流感并没有保护作用^[47]。对于除 α -GalCer以外的其他一些iNKT细胞激活剂在作为猪流感疫苗佐剂上的作用还相对缺乏。其他iNKT细胞激活剂同 α -GalCer佐剂效应的比较研究也是未来的研究方向。

6 总结与展望

20多年来, 对小鼠和人iNKT细胞的研究非常翔实地奠定与扩充了iNKT细胞表型、功能以及临床应用的知识宝库。iNKT细胞的发现同包括肿瘤、细菌病毒感染、1型糖尿病和多发性硬化等自发性免疫疾病等各种免疫与代谢相关的疾病息息相关。大量的研究工作涉及科学地利用iNKT细胞来治疗这些疾病并取得

积极的效果。然而关于猪iNKT细胞的信息相对较少。一个最主要的原因当属对于猪特异性研究工具的缺乏,因此研究人员通常只能借助小鼠与人的试剂,并寄希望于这些试剂可以与猪产生交叉反应。这样的研究存在很多不利之处。另一个原因是,相比于研究小鼠iNKT细胞,猪iNKT细胞的研究具有更大的不易操作性,需要更多人力与资金的投入。现阶段人们发现,猪可以作为极佳的生物模型,对于猪免疫学的研究也开始加大规模与投入。在iNKT细胞与猪疾病的研究上目前主要涉及将猪iNKT细胞激活剂作为流感疫苗佐剂的应用上。但是将之产业化还存在重大的壁垒与不完善之处,包括经济成本过高、缺乏对于交叉感染的实验基础,以及潜在的体内残留。当然从另一方面,iNKT

细胞激活剂作为疫苗佐剂有其独特的优势。传统的疫苗佐剂不会产生最佳的体液免疫和细胞免疫,部分原因是CD4辅助性T细胞对激活CD8T细胞的能力不足。然而iNKT细胞可以使用糖脂抗原进行特异性和全局激活,以提供通用形式激活T细胞并有助于促进肽特异性CD8T细胞反应和抗体反应。研究猪iNKT细胞治疗有许多潜在的益处,包括开发更好的猪流感疫苗,这可能会减少人类流感大流行的发生。因为猪与人具有重要生理上的相似之处,使用 α -GalCer类似物还可以研究更多改善人类疫苗的可行性。总之,猪流感模型提供了一种更好地了解激活iNKT细胞用于流感疫苗佐剂的方法。这种知识可以在人和猪中被使用,以限制当前周期性的猪与人之间传播的流感病毒。

参考文献

- 1 Makino Y, Kanno R, Ito T, et al. Predominant expression of invariant $V_{\alpha}14^{+}$ TCR α chain in NK1.1 $^{+}$ T cell populations. *Int Immunol*, 1995, 7: 1157–1161
- 2 Exley M A, Tahir S M A, Cheng O, et al. Cutting edge: A major fraction of human bone marrow lymphocytes are Th2-like CD1d-reactive T cells that can suppress mixed lymphocyte responses. *J Immunol*, 2001, 167: 5531–5534
- 3 Benlagha K, Kyin T, Beavis A, et al. A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science*, 2002, 296: 553–555
- 4 Benlagha K, Wei D G, Veiga J, et al. Characterization of the early stages of thymic NKT cell development. *J Exp Med*, 2005, 202: 485–492
- 5 Yang G, Driver J P, Van Kaer L. The role of autophagy in iNKT cell development. *Front Immunol*, 2018, 9: 2653
- 6 Brigl M, Tatituri R V V, Watts G F M, et al. Innate and cytokine-driven signals, rather than microbial antigens, dominate in natural killer T cell activation during microbial infection. *J Exp Med*, 2011, 208: 1163–1177
- 7 Venkataswamy M M, Porcelli S A. Lipid and glycolipid antigens of CD1d-restricted natural killer T cells. *Semin Immunol*, 2010, 22: 68–78
- 8 Bendelac A, Savage P B, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25: 297–336
- 9 Li X, Fujio M, Imamura M, et al. Design of a potent CD1d-binding NKT cell ligand as a vaccine adjuvant. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 13010–13015
- 10 Brennan P J, Tatituri R V V, Heiss C, et al. Activation of iNKT cells by a distinct constituent of the endogenous glucosylceramide fraction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 13433–13438
- 11 Van Kaer L, Parekh V V, Wu L. Invariant NK T cells: Potential for immunotherapeutic targeting with glycolipid antigens. *Immunotherapy*, 2011, 3: 59–75
- 12 Yang G, Richt J A, Driver J P. Harnessing invariant NKT cells to improve influenza vaccines: A pig perspective. *Int J Mol Sci*, 2017, 19: 68
- 13 Matsuda J L, Mallevaey T, Scott-Browne J, et al. CD1d-restricted iNKT cells, the ‘Swiss-Army knife’ of the immune system. *Curr Opin Immunol*, 2008, 20: 358–368
- 14 Long H M, Chagoury O L, Leese A M, et al. MHC II tetramers visualize human CD4 $^{+}$ T cell responses to Epstein-Barr virus infection and demonstrate atypical kinetics of the nuclear antigen EBNA1 response. *J Exp Med*, 2013, 210: 933–949
- 15 Saito N, Takahashi M, Akahata W, et al. Analysis of evolutionary conservation in CD1d molecules among primates. *Tissue Antigens*, 2005, 66: 674–682
- 16 Bradbury A, Belt K T, Neri T M, et al. Mouse CD1 is distinct from and co-exists with TL in the same thymus. *EMBO J*, 1988, 7: 3081–3086
- 17 Ichimiya S, Kikuchi K, Matsuura A. Structural analysis of the rat homologue of CD1. Evidence for evolutionary conservation of the CD1d class and widespread transcription by rat cells. *J Immunol*, 1994, 153: 1112–1123
- 18 Calabi F, Belt K T, Yu C Y, et al. The rabbit CD1 and the evolutionary conservation of the CD1 gene family. *Immunogenetics*, 1989, 30: 370–377
- 19 Rhind S M, Hopkins J, Dutia B M. Amino-terminal sequencing of sheep CD1 antigens and identification of a sheep CD1d gene. *Immunogenetics*, 1999, 49: 225–230
- 20 Van Rhijn I, Koets A P, Im J S, et al. The bovine CD1 family contains group 1 CD1 proteins, but no functional CD1d. *J Immunol*, 2006, 176: 4888–4893

- 21 Eguchi-Ogawa T, Morozumi T, Tanaka M, et al. Analysis of the genomic structure of the porcine *CD1* gene cluster. *Genomics*, 2007, 89: 248–261
- 22 van Beeck F A L, Reinink P, Hermesen R, et al. Functional CD1d and/or NKT cell invariant chain transcript in horse, pig, African elephant and guinea pig, but not in ruminants. *Mol Immunol*, 2009, 46: 1424–1431
- 23 Dossa R G, Alperin D C, Garzon D, et al. In contrast to other species, α -galactosylceramide (α -GalCer) is not an immunostimulatory NKT cell agonist in horses. *Dev Comp Immunol*, 2015, 49: 49–58
- 24 Yang G, Artiaga B L, Hackmann T J, et al. Targeted disruption of CD1d prevents NKT cell development in pigs. *Mamm Genome*, 2015, 26: 264–270
- 25 Van Kaer L, Wu L, Joyce S. Mechanisms and consequences of antigen presentation by CD1. *Trends Immunol*, 2016, 37: 738–754
- 26 Kasmar A, Van Rhijn I, Moody D B. The evolved functions of CD1 during infection. *Curr Opin Immunol*, 2009, 21: 397–403
- 27 Yang G, Artiaga B L, Lomelino C L, et al. Next generation sequencing of the pig $\alpha\beta$ TCR repertoire identifies the porcine invariant NKT cell receptor. *J Immunol*, 2019, 202: 1981–1991
- 28 Artiaga B L, Whitener R L, Staples C R, et al. Adjuvant effects of therapeutic glycolipids administered to a cohort of NKT cell-diverse pigs. *Vet Immunol Immunopathol*, 2014, 162: 1–13
- 29 Yang G, Artiaga B L, Lewis S T, et al. Characterizing porcine invariant natural killer T cells: A comparative study with Nk cells and T cells. *Dev Comp Immunol*, 2017, 76: 343–351
- 30 Thierry A, Robin A, Giraud S, et al. Identification of invariant natural killer T cells in porcine peripheral blood. *Vet Immunol Immunopathol*, 2012, 149: 272–279
- 31 Dwivedi V, Manickam C, Dhakal S, et al. Adjuvant effects of invariant NKT cell ligand potentiates the innate and adaptive immunity to an inactivated H1N1 swine influenza virus vaccine in pigs. *Vet Microbiol*, 2016, 186: 157–163
- 32 Artiaga B L, Yang G, Hackmann T J, et al. α -Galactosylceramide protects swine against influenza infection when administered as a vaccine adjuvant. *Sci Rep*, 2016, 6: 23593
- 33 Artiaga B L, Yang G, Hutchinson T E, et al. Rapid control of pandemic H1N1 influenza by targeting NKT-cells. *Sci Rep*, 2016, 6: 37999
- 34 Renukaradhya G J, Manickam C, Khatri M, et al. Functional invariant NKT cells in pig lungs regulate the airway hyperreactivity: A potential animal model. *J Clin Immunol*, 2011, 31: 228–239
- 35 Matsuda J L, Naidenko O V, Gapin L, et al. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med*, 2000, 192: 741–754
- 36 Chen Y G, Tsaih S W, Serreze D V. Genetic control of murine invariant natural killer T-cell development dynamically differs dependent on the examined tissue type. *Genes Immun*, 2012, 13: 164–174
- 37 Benlagha K, Weiss A, Beavis A, et al. *In vivo* identification of glycolipid antigen-specific T cells using fluorescent CD1d tetramers. *J Exp Med*, 2000, 191: 1895–1904
- 38 Wilson M T, Johansson C, Olivares-Villagómez D, et al. The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 10913–10918
- 39 Swain M G. Natural killer T cells within the liver: Conductors of the hepatic immune orchestra. *Dig Dis*, 2010, 28: 7–13
- 40 Berzins S P, Smyth M J, Baxter A G. Presumed guilty: Natural killer T cell defects and human disease. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11: 131–142
- 41 Schäfer A, Hühner J, Schwaiger T, et al. Porcine invariant natural killer T cells: Functional profiling and dynamics in steady state and viral infections. *Front Immunol*, 2019, 10: 1380
- 42 Renu S, Dhakal S, Kim E, et al. Intranasal delivery of influenza antigen by nanoparticles, but not NKT-cell adjuvant differentially induces the expression of B-cell activation factors in mice and swine. *Cell Immunol*, 2018, 329: 27–30
- 43 Oki S, Chiba A, Yamamura T, et al. The clinical implication and molecular mechanism of preferential IL-4 production by modified glycolipid-stimulated NKT cells. *J Clin Invest*, 2004, 113: 1631–1640
- 44 Miyamoto K, Miyake S, Yamamura T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature*, 2001, 413: 531–534
- 45 Schmieg J, Yang G, Franck R W, et al. Superior protection against malaria and melanoma metastases by a C-glycoside analogue of the natural killer T cell ligand α -galactosylceramide. *J Exp Med*, 2003, 198: 1631–1641
- 46 Sullivan B A, Nagarajan N A, Wingender G, et al. Mechanisms for glycolipid antigen-driven cytokine polarization by V α 14 iNKT cells. *J Immunol*, 2010, 184: 141–153
- 47 Gu W, Madrid D M D, Yang G, et al. Unaltered influenza disease outcomes in swine prophylactically treated with α -galactosylceramide. *Dev Comp Immunol*, 2021, 114: 103843

Summary for “猪自然杀伤T细胞研究进展”

Porcine natural killer T cells

Guan Yang¹, Yulong Yin^{2*} & Wenkai Ren^{3*}

¹ Department of Infectious Diseases and Public Health, City University of Hong Kong, Hong Kong 999077, China;

² Hunan Provincial Key Laboratory of Animal Nutritional Physiology and Metabolic Process, Key Laboratory of Agro-ecological Processes in Subtropical Region, Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha 410125, China;

³ Guangdong Laboratory of Lingnan Modern Agriculture, Guangdong Provincial Key Laboratory of Animal Nutrition Control, National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry, State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, College of Animal Science, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China

* Corresponding authors, E-mail: yinyulong@isa.ac.cn; renwenkai19@scau.edu.cn

Invariant natural killer T (iNKT) cells are a subset of so-called innate-like T cells that share phenotypic characteristics of both NK and conventional T cells. Unlike conventional T cells, iNKT cells express a semi-invariant T cell receptor (TCR) (TRAV10-TRAJ18/TRBV25-1 in humans and TRAV11-TRAJ18/TRBV13, TRBV29, or TRBV1 in mice) that dictates their antigen specificity. iNKT cells recognize glycolipid antigens such as α -galactosylceramide (α -GalCer) presented by the non-polymorphic major histocompatibility complex (MHC) class I-like molecule, CD1d. Once activated, they interact with and influence multiple cell types in both innate and adaptive immune systems. Immune responses induced by activated iNKT cells resemble conventional CD4⁺ T helper cells in many aspects. Therefore, these cells have been studied extensively particularly for their therapeutic potential to treat various infectious and inflammatory diseases, autoimmune diseases, and cancer. However, the majority of this research has employed mouse studies that have been difficult to translate into humans due in part to differences in iNKT cells between mice and humans.

Although iNKT cells have been well characterized in mice and humans, very little is known about these cells in pigs. Like human and mouse iNKT cells, porcine iNKT cells possess a memory/activation phenotype, indicated by high MHC II-SLA-DR and CD5, and low CD45RA expression. Our previous studies have characterized the phenotype, function, and TCR repertoire diversity of iNKT cells in healthy pigs. Our results show that pig and human iNKT cells are fundamentally similar for their frequency, distribution, and TCR repertoire diversity, which suggests that iNKT cells between these species play a similar role in immunity and disease. We further evaluated the adjuvant effects of iNKT cells on swine influenza vaccines and showed that α -GalCer-elicited immune responses improved influenza vaccine efficacy. Our findings also indicate that pigs offer a valuable preclinical model for understanding how iNKT cells contribute to influenza infections in humans.

Swine hold several advantages over mice as a preclinical model for iNKT cell therapy because of the many similarities between human and pig iNKT cells. In this review, we first briefly summarize the activation modes and immunoregulatory functions of iNKT cells. Then we compare the phenotype and tissue distribution of porcine iNKT cells, focusing on their similarities and differences to their counterparts in mice and humans. Lastly, we review the adjuvant effects of iNKT cell agonists and discuss some challenges that must be overcome before iNKT cell agonists can be contemplated for veterinary use in livestock.

pig, iNKT cells, influenza, immunity

doi: [10.1360/TB-2021-0976](https://doi.org/10.1360/TB-2021-0976)