

## 4-1BB/4-1BBL在肿瘤免疫治疗中的作用

吕坤 综述, 吴俊英 审校

[关键词] 肿瘤/治疗; 免疫疗法; 4-1BB; 4-1BBL; 综述

[中国图书资料分类法分类号] R 730.51 [文献标识码] A

大量的实验研究表明, T细胞的活化需要两个信号的参与: 一个是 TCR接受抗原递呈细胞 (antigen-presenting cells, APC) 传导的 MHC 抗原肽信号, 另一个是细胞膜表面黏附分子提供的协同刺激信号 (或称第二信号)。缺乏第二信号, 不仅不能使 T细胞充分活化, 反而会诱导 T细胞无能或引发其程序性死亡<sup>[1]</sup>。CD28是目前研究较多的 T细胞协同刺激分子, 然而在 CD28<sup>-/-</sup>小鼠中, T细胞能以一种 CD28 非依赖的途径活化, 说明有其它的协同刺激分子参与 T细胞活化, 近年以 4-1BB最受关注<sup>[2-5]</sup>。CD28/B7 协同刺激信号主要在 T细胞活化前期起作用, 促进其增殖并维持其短期的存活; 而 4-1BB/4-1BBL 结合产生的协同刺激信号主要作用于应答晚期, 能协同 CD28 进一步活化 T细胞, 尤其对于维持 CD8<sup>+</sup> T细胞的生存和效应功能是必不可少的<sup>[3]</sup>。CD28 信号缺乏时, 4-1BB 协同刺激信号可刺激休止期 T细胞增殖, 并分泌高水平的 IL-2。4-1BB 信号途径还能促进 CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T细胞 (cytotoxic T lymphocytes, CTL) 活化、增殖并增强其细胞毒作用, 同时还能保护 CD8<sup>+</sup> T细胞免于活化诱导的细胞死亡 (activation induced cell death, AICD)<sup>[6]</sup>。根据 4-1BB/4-1BBL 协同刺激信号在 T细胞活化和效应中所起的作用, 近年已利用 4-1BB mAb 4-1BBL 基因转染以及与其它分子协同, 用于肿瘤的免疫治疗。

### 1 4-1BB mAb 的抗肿瘤作用

1.1 4-1BB 和 4-1BB mAb 4-1BB 是 I 型跨膜糖蛋白, 属于肿瘤坏死因子受体 (tumor necrosis factor receptor, TNFR) 超家族成员, 由信号肽、胞外区、疏水区及胞内区构成, 以单体或二聚体形式表达于活化的 T细胞表面<sup>[4]</sup>。4-1BB 在静止的 T淋巴细胞上不表达, 但在 PHA 或 PMA 刺激下, 几小时即可检测到 4-1BB mRNA 的表达, 40~60 h 达到高峰, 96 h 开始下降<sup>[9]</sup>。4-1BB 还表达于一些非淋巴细胞, 如树突细胞、单核细胞及中性粒细胞等, 提示 4-1BB 可能在免疫调节中起重要作用。T细胞无能是机体免疫耐受形成机制之一, 在肿瘤免疫逃逸方面起关键作用, 其发生机制还不明确。Wilcox 等<sup>[7]</sup>发现用 4-1BB mAb 可以阻止由可溶性抗原诱导的 CD8<sup>+</sup> CTL 无能, 而且当遇到同种抗原刺激时, 4-1BB mAb 可以逆转已发生的 CTL 无能。这可能是因为刺激性 4-1BB mAb 模拟 4-1BBL 与 4-1BB 结合产生的协同刺激途径传递了一种解除 T细胞无能的调节信号, 提示调节 4-1BB 信号可以作为打破 T细胞耐受的新方法。

1.2 4-1BB mAb 的抗肿瘤效应依赖活化的 CD8<sup>+</sup> T细胞和 CD40 分子 许多研究表明, 用 4-1BB mAb 治疗荷瘤小鼠可促使体内产生有效的抗肿瘤免疫, 而将体内用于治疗的 CD4<sup>+</sup> T细胞、CD8<sup>+</sup> T细胞及 NK 细胞阻断后, 再用 4-1BB mAb 作用表明, 这种抗肿瘤免疫主要是 CD8<sup>+</sup> T细胞起效应, 而不是 CD4<sup>+</sup> T细胞或 NK 细胞。IFN 和 CD40 都是反应需要的, Milne 等<sup>[8]</sup>发现在 IFN<sup>-/-</sup>小鼠中, 不能产生有效的抗肿瘤应答, 甚至经 4-1BB mAb 治疗后, 抗肿瘤应答仍不明显, 而且在 CD40L<sup>-/-</sup>、CD40<sup>-/-</sup> 及野生型小鼠中, 经 4-1BB mAb 治疗产生肿瘤排斥的效率分别为 37%、6%、67%, 这说明 4-1BB mAb 的作用是依赖 IFN 和 CD40 途径的。

1.3 4-1BB mAb 单链 Fv 片段基因转染肿瘤疫苗的作用 Y 等<sup>[9]</sup>用逆转录病毒载体连接 4-1BB mAb 单链 Fv 片段基因, 转染 K1735 黑色素瘤细胞, 使其大量表达抗 4-1BB 单链 Fv 片段。将这种细胞注入已建立黑色素瘤的小鼠, 可以使瘤体退化, 甚至清除已建立的肿瘤, 在其它低免疫原性肿瘤中也有相似的结果。推测肿瘤抗原与 4-1BB mAb Fv 片段同时表达能有效地连接 NK 单核细胞、DC 也能激活 CD4<sup>+</sup> T细胞和 CD8<sup>+</sup> T细胞, 从而诱导 T细胞向 Th1 极化, 产生抗肿瘤效应。

1.4 4-1BB mAb 在 CD28 途径中的极化反应 Meleio 等<sup>[10]</sup>首先发现 4-1BB mAb 可以诱导机体 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T细胞产生对低免疫原性肿瘤 (如皮下肿瘤) 的应答。在 4-1BB mAb、CD3 mAb 及 CD28 mAb 协同刺激下, 鼠肿瘤引流淋巴结 (Tumor draining lymph node, TDLN) 细胞可使 T细胞应答产生 Th1 型细胞因子, 同时减少 Th2 型细胞因子水平。在 CD28 协同刺激途径中 4-1BB mAb 诱导的抗肿瘤应答依赖于 IFN 产物, 并随着 IFN 产物的消失而消失。而 Kim 等<sup>[11]</sup>报道低免疫原性皮下肿瘤用 4-1BB mAb 难以治疗。Wilcox 等<sup>[12]</sup>将这一现象归咎于免疫耐受, 可以通过肿瘤相关抗原肽免疫与 4-1BB mAb 联合使用克服。Strome 等<sup>[13]</sup>发现, 过继性免疫治疗中, 用 4-1BB mAb 活化的 T细胞比单独用 CD3 mAb 或 CD3 mAb/CD28 mAb 活化的 T细胞在体内抗肿瘤活性更强, 然而这一机制仍未阐明。

### 2 4-1BBL 的抗肿瘤作用

2.1 4-1BBL 的协同刺激作用 4-1BBL 是肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 家族成员, II 型膜蛋白, 在静止的 B 细胞表达很低, 但在活化的 B 细胞和单核细胞中表达上调, 并可表达在其它 APC、骨髓细胞和肿瘤细胞上<sup>[14]</sup>。APC 及肿瘤细胞上 4-1BBL 表达不良, 不利于 T 淋巴细胞的活化及抗肿瘤效应的发挥。Yan 等<sup>[15]</sup>用人 K562 和鼠 Yac-1 细胞系构造了人工 APC (artificial antigen-presenting cell, aAPC), 并使其有效地表达 4-1BBL 和 CD32 (FcγII, 可与抗 CD3 抗 CD28 连接)。他们发现, aAPC 上 4-1BBL 介导的协同刺激优

[收稿日期] 2005-06-09

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究计划项目 (2004kz80)

[作者单位] 蚌埠医学院 免疫学教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 吕坤 (1979-), 男, 硕士研究生。

先于 CD28mAb 并伴随有 CD8<sup>+</sup>DX5<sup>+</sup>细胞的产生。DX5 是一类具有记忆效应表型的淋巴细胞活化标志物, 4-1BBL 诱导强大的 CD8<sup>+</sup>CTL 应答可能与 DX5 细胞群的存在有关。这些结果显示, 4-1BBL 可能在肿瘤免疫治疗中发挥重要作用。

2.2 4-1BBL 基因转染肿瘤细胞诱导的抗肿瘤免疫 在小鼠模型中转染表达 4-1BBL 的肿瘤细胞能显著的增强 CD8<sup>+</sup>T 细胞介导的抗肿瘤效应。C3H 鼠上生长的鳞状细胞癌 NRS4 高水平组成型表达协同刺激分子 CD80、Mog<sup>8</sup>等<sup>[16]</sup>发现 4-1BBL 基因转染 NRS4 能在同系的鼠中有效的引发抗肿瘤效应, 这些鼠获得了抗野生型肿瘤的特殊免疫性。这说明 4-1BBL 基因转染肿瘤细胞对于诱导抗肿瘤免疫应答是行之有效的, 这种转染或转导修饰肿瘤细胞的策略在抗肿瘤免疫治疗及疫苗制备中具有广阔的应用前景。

2.3 可溶性 4-1BBL (soluble 4-1BB ligand s4-1BBL) 与恶性血液病 s4-1BBL 是 4-1BBL 的可溶性形式, 被发现存在于恶性肿瘤患者的血清中, 如骨髓增生异常综合征 (MDS)、急性淋巴细胞白血病 (ALL)、急性髓细胞白血病 (AML) 等, 并推测它们可能参与了疾病的发展过程。Salih 等<sup>[17]</sup>发现血清中 s4-1BBL 可作为疾病进程和预后有价值的指征, 并且有可能为评价 MDS 疗效提供依据。Salih 等<sup>[14]</sup>还发现恶性肿瘤患者血清中释放的 s4-1BBL 是有活性的, 可与 4-1BB 结合活化 T 细胞, 而 s4-1BBL 的释放可通过基质金属蛋白酶 (MMP) 调节。值得一提的是, s4-1BBL 的释放很可能与肿瘤逃逸有关, s4-1BBL 通过限制宿主淋巴细胞接受协同刺激, 减少肿瘤细胞凋亡信号发挥这一作用, 当然这需要进一步研究。

2.4 4-1BBL 治疗 Ewing 骨肉瘤 Ewing 骨肉瘤患者体内循环 T 细胞表达 MHC 分子, 且抗肿瘤效应 T 细胞属于记忆性 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞, 而且是 CD28<sup>-</sup>/4-1BB<sup>+</sup>T 细胞。自身 Ewing 骨肉瘤细胞表达 4-1BBL 后者提供的协同刺激, 可诱导 T 细胞活化与增殖, 这是通过 CD3 mAb 和 4-1BBL mAb 刺激外周血 (PBL) 实现的, 而不是 CD3 mAb 和 CD28 mAb 刺激 PBL 产生。前者可以扩增那些控制原始肿瘤细胞生长的 T 细胞, 而且能控制肿瘤的转移, 而后者则无此作用。这个结果对于那些流行的肿瘤免疫耐受伴随肿瘤生长的模型提出质疑, 更确切地说, Zhang 等<sup>[18]</sup>在实验中观察到肿瘤进行性生长与肿瘤自身 4-1BBL 诱导抗肿瘤免疫同时存在。这进一步证实了 4-1BBL 介导的协同刺激在扩增肿瘤特异性效应 CTL 并用于过继性免疫治疗中潜在的作用。

### 3 4-1BB/4-1BBL 与其它分子的联合使用

3.1 4-1BBL 与 B7 协同作用 A20 是一种 B 淋巴瘤细胞, B7 分子可赋予其完全免疫原性, 但 4-1BBL 与 B7 协同作用比单纯转染 B7 在抗肿瘤免疫方面更加有效。表达高水平 4-1BBL 与 B7 的 A20 能介导完全持久的免疫原性, 阻止肿瘤生长, 在体内抵抗肿瘤的再次侵袭<sup>[19]</sup>。这说明几种共刺激分子联用可以产生更好的肿瘤治疗效应。

3.2 4-1BB 与 IL-12 协同作用 许多研究表明, 4-1BB mAb 治疗一些低免疫原性肿瘤疗效甚微。有学者<sup>[20]</sup>将 4-1BB 与 IL-12 联合使用, 观察了在皮下肿瘤和肺癌中的作用, 结果这种方法大大减缓皮下肿瘤生长, 50% 荷瘤小鼠因为肿瘤细胞的完全抑制而存活, 同时还可提高 CTL 对黑色素瘤 B<sub>16</sub>-F<sub>10</sub> 的杀

伤活性。体内 NK 或 CD8<sup>+</sup>T 细胞的消耗可消除这一作用, 说明这一过程可能需要 NK 或 CD8<sup>+</sup>T 细胞的共同参与<sup>[21]</sup>。

3.3 4-1BB 与特异性抗原联合作用可打破免疫忽视 肿瘤的免疫忽视是免疫治疗中的主要难题, 特别是一些低免疫原性肿瘤。Wilcox 等<sup>[12]</sup>发现肿瘤抗原特异性 CTL 的免疫忽视 (不是缺失或无能) 可阻止 4-1BB mAb 提供的协同刺激, 而用肿瘤抗原免疫可以打破免疫忽视, 使肿瘤退化, 当然这一作用需要 4-1BB mAb 协同刺激。

综上所述, 利用 4-1BB mAb 4-1BBL 基因转染及与其它分子联用等激活 4-1BB 信号途径, 应用于肿瘤免疫治疗已显示出良好的前景, 但其治疗的分子机制以及进一步优化治疗条件还有待进一步探讨。

### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] 周光炎主编. 免疫学原理 [ M ]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2000: 149.
- [ 2 ] Bukczynski J, Wen T, Watts TH. Costimulation of human CD28<sup>+</sup>T cells by 4-1BBL [ J ]. Eur J Immunol 2003; 33(2): 446-454.
- [ 3 ] Benran EM, Lau P, Watts TH, et al. Temporal segregation of 4-1BB versus CD28-mediated costimulation [ J ]. J Immunol 2002; 168(5): 3777-3785.
- [ 4 ] Kwon BS, Huardo JC, Lee ZH, et al. Immune responses in 4-1BB (CD137)-deficient mice [ J ]. J Immunol 2002; 168(11): 5483-5490.
- [ 5 ] DeBenedetto MA, Wen T, Bachmann MF, et al. Analysis of 4-1BB ligand (4-1BBL)-deficient mice and of mice lacking both 4-1BBL and CD28 reveals a role for 4-1BBL in skin allograft rejection and in the cytotoxic T cell response to influenza virus [ J ]. J Immunol 1999; 163(9): 4833-4841.
- [ 6 ] Mittler RS, Foell J, McCausland M, et al. Anti-CD137 antibodies in the treatment of autoimmune diseases and cancer [ J ]. Immunol Rev 2004; 29(1-3): 197-208.
- [ 7 ] Wilcox RA, Tamada K, Flies DB, et al. Ligation of CD137 receptor prevents and reverses established anergy of CD8<sup>+</sup> cytolytic T lymphocytes in vivo [ J ]. Blood 2004; 103(1): 177-184.
- [ 8 ] Miller RE, Jones J, Whimore J, et al. 4-1BB-specific monoclonal antibody promotes the generation of tumor specific immune responses by direct activation of CD8<sup>+</sup>T cells in a CD40-dependent manner [ J ]. J Immunol 2002; 169(4): 1792-1800.
- [ 9 ] Ye Z, Hellstom J, Hayden-Ledbetter M, et al. Gene therapy for cancer using single chain Fv fragments specific for 4-1BB [ J ]. Nat Med 2002; 8(4): 343-348.
- [ 10 ] Meleio J, Shuford WW, Newby SA, et al. Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors [ J ]. Nat Med 1997; 3(6): 682-685.
- [ 11 ] Kim JA, Avebook BJ, Chambers KJ, et al. Divergent effects of 4-1BB antibodies on antitumor immunity and on tumor reactive T-cell generation [ J ]. Cancer Res 2001; 61(5): 2031-2037.
- [ 12 ] Wilcox RA, Flies DB, Zhu GF, et al. Provision of antigen and CD137 signaling breaks immunological ignorance promoting regression of poorly immunogenic tumors [ J ]. J Clin Invest 2002; 109(5): 651-659.
- [ 13 ] Strone SE, Martin B, Flies D, et al. Enhanced therapeutic potential of adoptive immunotherapy by in vitro CD28/4-1BB costimulation of tumor reactive T cells against a poorly

- immunogenic major histocompatibility complex class I negative A9P melanoma J. *J Immunotherapy* 2000 23(4): 430-437
- [ 14] Salih HR, Schmeizer HM, Burke C, et al. Soluble CD137 (4-1BBL) ligand is released following leukocyte activation and is found in sera of patients with hematological malignancies J. *J Immunol* 2001 167(7): 4 059-4 066
- [ 15] Yan X, Johnson BD, Orentas RJ, et al. Murine CD8 lymphocyte expansion in vitro by artificial antigen-presenting cells expressing CD137L. 4-1 BBL is superior to CD28 and CD137L (41-BBL) expressed on neuroblastoma expands CD8 tumour reactive effector cell in vivo J. *Immunotherapy* 2004 112(1): 105-116
- [ 16] Mogi S, Sakurai J, Kohsaka T, et al. Tumour rejection by gene transfer of 4-1BB ligand into a CD80(+) murine squamous cell carcinoma and the requirements of costimulation molecules on tumour and host cells J. *Immunology* 2000 101(4): 541-547
- [ 17] Salih HR, Nuessler V, Denlinger C, et al. Serum levels of CD137 ligand and CD178 are prognostic factors for progression of myelodysplastic syndrome J. *Leuk Lymphoma* 2004 45(2): 301-308
- [ 18] Zhang H, Merchant MS, Chua KS, et al. Tumour expression of 4-1BB ligand sustains tumoricidal T cells J. *Cancer Biol Ther* 2003 2(5): 579-586
- [ 19] Guinn B, Debenedette MA, Watts TH, et al. 4-1 BBL cooperates with B7-1 and B7-2 in converting a B cell lymphoma cell line into a long-lasting antitumor vaccine J. *J Immunol* 1999 162(8): 5 003-5 010
- [ 20] Chen SH, Phan-Nguyen KB, Martinez Q, et al. Rejection of disseminated metastases of colon carcinoma by synergism of IL-12 gene therapy and 4-1BB costimulation J. *Mol Ther* 2000 2(1): 39-46
- [ 21] Xu D, Gu P, Pan PY, et al. NK and CD8<sup>+</sup> T cell mediated eradication of poorly immunogenic B<sub>6</sub>-F10 melanoma by the combined action of IL-12 gene therapy and 4-1BB costimulation J. *Int J Cancer* 2004 109(4): 499-506

[文章编号] 1000-2200(2007)03-0369-02

·综述·

## 脂肪组织来源的基质细胞与血管新生

吴 维, 余继海 综述, 胡何节 审校

[关键词] 脂肪组织; 基质细胞; 血管新生; 综述

[中国图书资料分类法分类号] R 329 [文献标识码] A

脂肪组织来源的基质细胞(adipose tissue derived stromal cells, ADSC)在一定条件下可以诱导分化为脂肪细胞等中胚层细胞,甚至可以分化成外胚层的神经元细胞。近年来的研究表明,ADSC还可以诱导分化成血管内皮细胞,促进血管新生。本文就这方面的进展进行综述。

### 1 脂肪组织中存在成体干细胞

脂肪组织中脂肪细胞可分为在胞质内积聚脂滴的成熟脂肪细胞和未在胞质内积聚脂滴但有这种潜能的前体脂肪细胞两种类型。前体脂肪细胞具有分裂和增殖的能力,在一定的条件下可以转化为成熟的脂肪细胞,具有成体干细胞的特性。Pozmaski<sup>[1]</sup>、Van等<sup>[2-4]</sup>学者的研究形成了完整的前体脂肪细胞的理论。将切下的脂肪组织用胶原酶处理,再将组织悬液离心,其中的沉淀物基质血管成分(stromal vascular fraction, SVF)即为前体脂肪细胞,该细胞具有增殖和向成熟脂肪细胞分化的潜能。通过脂肪整容术在人体脂肪组织中获取的成纤维样细胞称为PLA(processed liposiphate)细胞,免疫荧光和流式细胞术分析表明,PLA细胞来源于基质或中胚层,伴有少量的周细胞、内皮细胞和平滑肌细胞,PLA细胞在体外培养条件下可以分化为脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞等,具有成体干细胞多向分化的特性<sup>[5]</sup>。目前文献上所提到的脂肪组织中存在ADSC主要包括上述两类细胞。

### 2 ADSC的多胚层分化潜能

ADSC类属于多能干细胞,诸多研究证明,它不仅在脂肪

组织中能分化为成熟的脂肪细胞,而且具有可塑性和转分化能力,即在特异性细胞因子的作用下具有向外胚层和中胚层其它细胞分化的能力。

2001年,Zuk等<sup>[6]</sup>首先报道,从患者臀部和大腿皮下抽取少量脂肪,获取PLA细胞,结果发现240只左右的脂肪组织能够产生 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 个干细胞,进一步表明这些干细胞具有发育为健康软骨、骨和肌肉的能力,从而认为脂肪组织中存在干细胞这一发现可能成为干细胞的重要来源。

Erickson等<sup>[7]</sup>对经人皮下脂肪抽吸术获取的ADSC在体外培养条件下可以大量合成软骨基质成分胶原II、VI和硫酸软骨素;裸鼠皮下细胞移植后第4周和第8周,经免疫组织化学分析提示软骨基质成分显著增加。Planat-Benard等<sup>[8]</sup>在体外培养的ADSC中加入5氮杂胞苷(5-azacytidine),可见到少量跳动的细胞,早期培养阶段尚可见到细胞同步跳动现象,加入肾上腺素激动药物能刺激细胞跳动节律。这些研究表明,ADSC可以分化为中胚层的组织细胞。

新近又有实验证实,ADSC可以分化为外胚层的神经样细胞。Ashjian等<sup>[9]</sup>将人未分化PLA细胞体外培养2周,发现其中20%~50%分化为神经元样细胞,随着培养时间的延长,这些细胞可以表达神经元特异性的烯醇化酶、神经生长因子受体trk-A和波形蛋白。

### 3 ADSC与血管新生

既然ADSC具有跨胚层分化潜能,在一定条件下可以分化为中胚层甚至外胚层组织细胞,那么ADSC是否也具有分化为血管内皮细胞的能力呢?近年研究表明,ADSC可以分

[收稿日期] 2005-11-10

[作者单位] 安徽医科大学附属省立医院 血管外科, 安徽 合肥 230001

[作者简介] 吴 维 (1974-)男, 硕士研究生。