

·学科进展·

共刺激分子及其在肿瘤学上的应用

陈列平 王皓

(第二军医大学国际合作肿瘤研究所免疫学研究室,上海 200433)

[摘要] 简要介绍了在不同实验体系中利用共刺激作用原理来增强 T 淋巴细胞抗肿瘤免疫反应的研究进展,并进一步讨论了如何将其应用于肿瘤的免疫治疗。

[关键词] 共刺激分子,肿瘤,免疫治疗,基因治疗

引言

尽管各种实验证据表明,肿瘤细胞确实表达特异性抗原,但肿瘤患者的免疫系统却无法有效地清除肿瘤细胞。肿瘤免疫原性低下的可能原因之一在于缺乏共刺激分子的表达。单有肿瘤抗原特别是弱的肿瘤抗原尚不能有效地刺激机体产生免疫反应,必须同时有第二(辅助)信号存在^[1]。第一信号的产生依赖于 T 细胞受体与结合在 MHC 分子上的抗原肽相互作用;第二信号靠表达于专职性抗原提呈细胞(antigen-presenting cell, APC,如树突状细胞、巨噬细胞、活化的 B 细胞等)上的共刺激分子所产生。

肿瘤细胞可通过缺乏共刺激的方式逃避机体免疫。

1 共刺激分子

在过去不到 10 年间,人们发现了数十种有共刺激作用的细胞表面分子(表 1),并对其中一些分子在诱发机体抗肿瘤中的作用进行了广泛深入的研究。这些分子包括:B7 和 CD28、4-1BB(CD137)和 4-1BB Ligand、CD40 和 CD40 Ligand(CD154)及 OX40 和 OX40 Ligand 等。本文简要介绍了我们在不同实验体系中利用共刺激作用来增强 T 淋巴细胞抗肿瘤免疫的研究进展,并讨论其在肿瘤免疫治疗中的作用。

表 1 共刺激受体及其配基

分类	共刺激分子	对应配体分子	
免疫球蛋白超家族	B7-1(CD80), B7-2(CD86)	CD28/CTLA-4	
	B7h	ICOS	
	B7-H1	?	
	ICAM-1(CD54), ICAM-2(CD102), ICAM-3(CD50)	LFA-1(CD11a/CD18)	
	CD48(murine)	CD2(LFA-2)	
	LFA-3(CD58)	2B4	
	CD59	CD2(LFA-2)	
	SLAM	SLAM	
	肿瘤坏死因子及受体超家族	CD40L(CD154, gp-39)	CD40
		CD27L(CD70)	CD27
CD30L(CD153)		CD30	
4-1BBL		4-1BB(CD137, ILA)	
OX40L		OX40(CD134)	
LIGHT		HVEM(TR2, ATAR)	
		LTβR	
TRANCE(RANKL, OPGL)		RANK(TRANCE-R) OPG(TR1, OCIF)	
GPI-anchored 蛋白	HAS(CD24)	HAS(CD24)	
TM4 家族	CD63/CD81/CD82	CD9	
Hyaladherin 家族	Hyaluronan/MIP-1β	CD44	
整合素家族	VCAM-1(ICAM-10)	VLA-4(CD49d/CD29)	

本文于 2000 年 3 月 20 日收到。

1.1 B7 家族

10年前,Thompson 等人证实抗 CD28 单抗能够共刺激激活 T 细胞增殖,后来发现 CD28 有两个细胞表面配体,即 B7-1(CD80)和 B7-2(CD86)。B7-1 和 B7-2 均属免疫球蛋白超家族。B7-1 和 CD28 的相互作用对于 CD8⁺ CTL 的体内诱导非常重要^[2]。在体内或体外实验系统中,均发现 CD8⁺ T 细胞的激活可能需要 CD4⁺ T 细胞的辅助^[3]。B7-2 也能共刺激激活抗原特异性 CD8⁺ CTL。这些结果表明,肿瘤细胞表达 B7-1 和/或 B7-2 对诱发机体产生肿瘤特异性效应细胞起关键的辅助作用。

在小鼠黑色素瘤细胞模型中,转染 B7-1 的瘤细胞可诱发抗肿瘤免疫,并保护机体不受野生肿瘤细胞的攻击。进一步实验证实,此种方法可以应用于其他许多肿瘤的免疫治疗。用 B7-2 基因转染的肿瘤细胞免疫小鼠,亦可大幅度提高肺转移模型实验鼠的生存率,并能使已形成的肿瘤减小。单用抗 CD80 或抗 CD86 的 mAb 仅能部分抑制抗 P815 肿瘤细胞的 CTL 的产生,而二者联合才能完全抑制 CTL 活性,因此一个优化的肿瘤免疫激活方案可能既需 CD80 也需 CD86。绝大多数小鼠体内实验结果表明,CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞均在清除原发肿瘤的过程中发挥作用。

利用共刺激原理对肿瘤进行免疫治疗显示了良好的前景。Guo 等人^[4]证实用大鼠肝癌细胞与激活的 B 细胞融合能够大大增加肿瘤细胞的免疫原性。这个方法充分利用了活化 B 细胞高表达的多种共

刺激分子,包括 B7-1、ICAM-1 等,有效地治疗了大鼠的野生型肝癌模型。另外,应用体外抗 CD28 和抗肿瘤抗原的双特异单抗预处理的肿瘤细胞可激活 CTL,清除已建立的小鼠肝癌模型^[5]。人肝癌细胞系表达的 CD80、CD86 水平极低。应用含有人 CD80 基因的质粒转染肝癌细胞大大增加了细胞表面 CD80 的表达水平,提高了转染细胞激活 CTL 抗亲本瘤细胞的能力。因此,增加 B7-CD28 的共刺激信号,可能将对人肝细胞癌的免疫及基因治疗发挥积极作用。

B7 家族目前被认为是最主要的共刺激分子,其家族成员在不断扩大(表 2)。近来,我们又克隆了一个新的 B7 家族分子,命名为 B7-H1,并研究了其性质和功能^[6]。B7-H1 与 B7-1、B7-2 的细胞外功能区仅有 20% 的氨基酸同源性,但它们的二级结构却极为相似。在结构上除了有保守的半胱氨酸,B7-H1 还具有 B7-1(第 87 号氨基酸)和 B7-2(第 82 号氨基酸)免疫球蛋白 V 样功能区所具有的酪氨酸(第 81 号氨基酸)。免疫球蛋白 C-样功能区基序 SQDXXXELY(B7-1 中第 190-198 号氨基酸;B7-2 中第 189-197 号氨基酸)为 B7-1 和 B7-2 结合其受体 CTLA4 和 CD28 所必需。但是,B7-H1 无此基序。实验结果提示 B7-H1 不是 CTLA4 的相应受体。另有实验表明 ICOS-Ig(inducible costimulatory molecule, ICOS)不能与表达 B7-H1 的 293 细胞结合,提示 B7-H1 亦非 ICOS 分子的配体。最终结果尚有待于 ICOS 配体或 B7-H1 受体的基因克隆和功能分析。

表 2 B7 分子家族成员的性质与功能

B7 蛋白	细胞分布	T 细胞表面的配体	已知的功能
B7-1	专职抗原提呈细胞(APC),经微生物、细胞因子、CD40:CD40L 相互作用而刺激的纤维母细胞	CD28, CTLA4	对 T 细胞具有中等强度的刺激作用,但经小鼠基因敲除试验证明为可缺少基因
B7-2	专职 APC,组成性表达或经微生物、细胞因子、CD40:CD40L 的相互作用诱导而迅速表达	CD28, CTLA4	增强 T 细胞对抗原的反应,在 T 细胞的增殖、分化和 T、B 细胞相互作用中必不可少
B7(h)(小鼠)	APCs,组成性或可诱导表达;也可表达于 TNF 诱导的纤维母细胞或其他细胞	ICOS	在 T 细胞对抗原的反应中促进 T 细胞增殖
B7-H1(人)	组成性表达于单核细胞,在激活的单核细胞和少数激活的 T、B 细胞中表达上调	?	增强 T 细胞对抗原的反应;增加细胞因子尤其是 IL-10 的分泌

我们的研究表明,B7-H1 具有共刺激作用,它可在较低浓度抗 CD3 单抗和同种混合淋巴细胞反应中刺激 T 细胞增殖。转染了 B7-1 或 B7-2 的细胞可共刺激 T 细胞产生大量 IFN- γ 和 IL-2,而且转染了 B7-2 的细胞可增强 IL-4、IL-10 的表达。我们的研究表明,尽管 B7-H1-Ig 可刺激产生 IL-10,但亦可共刺激产生少量的 IL-2。这种细胞因子刺激分泌模式似

乎与转染 B7-1、B7-2 或使用抗 ICOS 的单抗不同,三者均可大量产生 IL-10、IL-4。因此,B7-H1 的共刺激作用对于诱导表达 IL-10 具有相对选择性,这与经典的 Th1、Th2 类细胞因子分泌方式不同。IL-2 的分泌量尽管较少,但对于 B7-H1 介导的共刺激作用却是必需的,因为,应用阻断 IL-2 的特异性单抗可阻断 B7-H1 介导的共刺激作用下产生的 T 细胞增殖

和 IL-10 的产生。IL-2 对于防止和逆转 T 细胞无反应性都是必需的。

系统性红斑狼疮患者的淋巴细胞可出现自发性死亡,这与 IL-10 及 Fas Ligand 的表达上调有关。应用抗 Fas Ligand 或抗 IL-10 的特异性单抗可增加细胞的存活。我们在肺、胎盘等正常器官中发现大量的 B7-H1 mRNA,这些器官多不受炎性或免疫反应所影响。而 B7-H1 可增强 IL-10 的产生和促进 T 细胞的凋亡。总体说来,我们的研究结果提示,B7-H1 可能参与细胞免疫的器官特异性负向调控。

Swallow 等人在寻找 TNF 处理后小鼠细胞的 NF- κ B 转录因子激活的基因时,也发现了一个新的 B7 分子同源物,命名为 B7h^[7]。后来的研究证明,它是 ICOS 的配基。ICOS 表达于激活的 T 细胞,这与 CD28 不同,后者为静息(naive) T 细胞的激活和分化所必需。ICOS 的共刺激信号诱导细胞表达 IL-10,使 B7-1 和 B7-2 的表达下调,阻断 B7 介导的 CD28 的共刺激激活。因此,B7-1 和 B7-2 在免疫反应的触发和增强中发挥重要作用,而 B7h 的作用可能为减弱免疫反应,避免出现过强的免疫反应和产生自身免疫。所以,我们猜想,B7 家族的不同成员在免疫反应的触发、增强及减弱调节中发挥不同的作用。具体情况需利用特异性拮抗剂或基因剔除小鼠进行体内实验进一步研究。

1.2 4-1BB 及其配体

4-1BB(CD137)是一种 I 型膜糖蛋白,属于肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)超家族。应用特异的抗体在活化的 CD8⁺、CD4⁺ T 细胞、活化的胸腺细胞、上皮内的淋巴细胞、活化的 NK 细胞及嗜酸性细胞均可检测到 4-1BB 的表达。4-1BB 的配体表达于巨噬细胞、单核细胞、DC、B 细胞、某些小鼠的 B 淋巴瘤细胞及活化的 T 细胞等。

多个体外及体内实验均证实,4-1BB 与其配体的结合可以有效地共刺激 T 细胞,使其增殖,增加它们的溶细胞能力。给荷瘤小鼠体内注射抗 4-1BB 单抗,能诱导有治疗作用的抗肿瘤免疫反应^[8]。在此研究中 4-1BB 单抗不但能清除像 P815 这样的具有免疫原性的肿瘤,而且能够清除像 AG104A 肉瘤这种低免疫原性的肿瘤。我们最近的研究表明,抗 4-1BB 单抗在其他肿瘤,如淋巴瘤、乳腺癌和肾癌等小鼠模型的治疗也很有效。有趣的是,NK 细胞也参与发挥抗 4-1BB 单抗的抗肿瘤效应:若使用抗 - 去唾液酸 GM1 或抗 NK1.1 的单克隆抗体消除 NK 细胞,则能够完全阻断其抗肿瘤效果^[9]。我们的实验结果

表明,4-1BB 共刺激途径是一个很有希望的抗肿瘤免疫反应靶点。但是如何确定应用抗 4-1BB 单抗或 4-1BBL 基因治疗的优化条件,尚待进一步研究。

2 肿瘤免疫的共刺激方法

尽管体外及动物体内的免疫学研究明确地提示共刺激分子有望用于人类肿瘤的免疫治疗,但在此方法应用于临床前有许多问题尚待解决,包括如何有效地提供共刺激信号、如何最佳地激活抗肿瘤效应 T 细胞等。目前共刺激分子用于肿瘤治疗的方法大体可分为 3 类:基因转移、生物学方法和小模拟分子。

2.1 基因转移

已有实验证实,共刺激分子要发挥最大的效应必须和抗原一起象在同一细胞中一样以“物理接触”的方式呈递。这可能因为 T 细胞的激活需要 T 细胞与 APC 接触区域的不同受体对的主动聚集,而这一过程能够为 B7-CD28 所增强。目前已有多种策略转基因至肿瘤细胞。在如上所述的绝大多数肿瘤模型中,目的基因均通过体外基因转染方案转至肿瘤细胞。尽管这些体外基因转移方法在实验研究中非常有效,但因为难以快速地从原发性肿瘤建立细胞系,其临床应用受到限制。体内基因转移效率低下,表达水平不高及难以到达体内的肿瘤等因素亦大大限制了其临床应用。

2.2 生物学方法

如前所述,另外一种提供共刺激信号激活肿瘤 CTL 的方法是应用相关受体的配体或单抗。该方法在某些小鼠肿瘤模型中证明有效。如抗 4-1BB 单抗可诱导机体清除已形成的大体肿瘤。抗 CTLA-4 单抗也证明有体内治疗作用,其机理可能是阻断了 CTLA-4 介导的 T 细胞抑制信号。但注射抗 CD28 单抗(体外可对 T 细胞发挥很强的共刺激作用)却未显示有效的治疗作用,原因尚不清楚。这些看似矛盾的结果提示,单抗在影响产生局部免疫反应的组织中分布方式可能不同;此外,单抗在体内还可能产生除共刺激 T 细胞以外的其他功能。

2.3 小模拟分子

小的稀夫碱形成分子(Schiff-base-forming molecule)可以和辅助分子上的胺结合,模拟 T 细胞激活所需要的共刺激信号^[10]。应用一个这类药物 tucarecol 与抗 CD3 单抗共同刺激人 PBMC,IL-2 的分泌和分裂原激活的蛋白激酶(MAPK)的表达明显增加。另外,tucarecol 可增加 Th1 类细胞因子(IL-2,

INF- γ)的产生,抑制 Th2 类分子的生成。由于 Th1 类细胞因子很可能在细胞免疫的活化及肿瘤细胞的排斥等方面发挥作用,Tucarecol 的这种特性非常值得重视。

3 问题与展望

对 T 细胞共刺激现象的研究加深了人们对淋巴细胞活化和调节的理解;阐明各种共刺激途径的作用,可以为干预免疫反应,特别是增强抗肿瘤免疫提供帮助。目前发现了多种共刺激分子,它们各自的受体是什么?它们的共刺激信号是促进抑或减弱免疫反应?何种分子的共刺激作用更强?它们的相互作用调节关系如何?这些问题尚需进一步研究。利用共刺激分子人工修饰肿瘤细胞,从而刺激机体的抗肿瘤免疫反应,是肿瘤免疫治疗重要的策略之一,为肿瘤治疗提供了新的希望。

参 考 文 献

- [1] Chen L. Immunological ignorance of silent antigens as an explanation of tumor evasion. *Immunol. Today*, 1998, **19**(1):27—30.
- [2] Chen L, Ashe S, Brady W A et al. Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell*, 1992, **71**(7):1 093—1 102.
- [3] Chen L, McGowan P, Ashe S et al. Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity. *J. Exp. Med.*, 1994, **179**(2):523—532.
- [4] Guo Y, Wu M, Chen H et al. Effective tumor vaccine generated by fusion of hepatoma cells with activated B cells. *Science*, 1994, **263**(5146):518—520.
- [5] Guo Y J, Che X Y, Shen F et al. Effective tumor vaccines generated by in vitro modification of tumor cells with cytokines and bispecific monoclonal antibodies. *Nat. Med.*, 1997, **3**(4):451—455.
- [6] Haidong Dong, Gefeng Zhu, Koji Tamada et al. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat. Med.*, 1999, **5**(12):1 365—1 369.
- [7] Abul K Abbas, Sharpe A H. T-cell stimulation: an abundance of B7s. *Nat. Med.*, 1999, **5**(12):1 345—1 346.
- [8] Melero I, Shuford W W, Newby S A et al. Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat. Med.*, 1997, **3**(6):682—685.
- [9] Melero I, Johnston J V, Shufford W W et al. NK1.1 cells express 4-1BB(CDw137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by anti-4-1-BB monoclonal antibodies. *Cell Immunol.*, 1998, **190**(2):167—172.
- [10] Rhodes J, Chen H, Hall S R et al. Therapeutic potentiation of the immune system by costimulatory Schiff-base-forming drugs. *Nature*, 1995, **377**:71—75.

LYMPHOCYTE CO-STIMULATION AND ITS APPLICATION IN CANCER ONCOLOGY

Chen Lieping Wang Hao

(*International Joint Cancer Institute, Second Military Medical University, Shanghai 200433*)

Abstract In the course of T cell activation by tumor cells, signal induced by interaction between T cell receptor and MHC-antigen peptide complex is essential but not enough. At least one additional signal, signal-2 or accessory signal, is needed, which is induced by the ligation of co-stimulatory molecules expressed on APC (antigen-presenting cell) and their counterreceptors on T cells. Tumor cell may escape the immune surveillance by lacking of co-stimulatory molecules, resulting in low immunogenicity. By now, quite a few co-stimulatory molecules have been found and some of them have been extensively investigated. Here we will give a brief review on the present progress of the co-stimulatory molecules and their application in cancer medicine.

Key words co-stimulatory molecules, cancer, immunotherapy, gene therapy