

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2003 )03-0229-03

## RANKL 的免疫调节作用研究进展

裘建明 综述; 曹雪涛 审阅 ( 浙江大学免疫学研究所, 杭州 310031 )

[ 摘 要 ] RANKL 是新近发现的免疫分子,它在体内介导一系列生物学效应。近来,关于它的免疫调节作用日益受到重视,如调节 T-DC 以相互作用等。本文拟对此作一综述。

[ 关键词 ] RANKL; 免疫调节; T 细胞; 树突状细胞; 信号传导

[ 中图分类号 ] R392 [ 文献标识码 ] A

RANKL( NF-kappa B 配体的受体激活因子, receptor activator of NF-kappa B ligand ) 是一个由人类 13q14 基因序列编码的肿瘤坏死因子( TNF )超家族的新成员,属于二类膜蛋白,分子量约 35 kD。它的受体 RANK 编码序列定位于 18q22.1,与 CD40 有较高的同源性。RANKL 主要表达于淋巴结、胸腺、T 细胞、树突状细胞等组织和细胞,同时存在膜型和分泌型 2 种形式。RANK mRNA 能在人体各种组织中广泛检测到,但目前为止 RANK 只发现在成熟的树突状细胞和破骨细胞得到表达,推测其表达受到一种转录后的调节<sup>[1]</sup>。自 1997 年《自然》杂志首次报道以 Anderson 为首的科研小组发现 RANKL 以来<sup>[2]</sup>,关于它的生物学效应陆续被发现。其中 RANKL 的免疫学效应尤其引人注目,本文就此作一系统阐述。

### 1 RANKL 和 T 细胞

RANKL 最先是在一项 T 细胞杂交瘤定位一套凋亡调控基因的研究中被克隆和发现的。它在 T 细胞表面普遍得到丰富的表达,TCR 激活对其 mRNA 存在一个明显的上调作用。Wang 等<sup>[3]</sup>用抗 CD3 单抗诱导了 RANKL 在 A1.1 细胞的表达,并进一步证明这种表达不依赖于 c-myc,而 TGF-β 能促进它的表达。这些与 FasL 的诱导表达显著不同。重组的可溶性胞外段 RANKL 可活化抗原递呈细胞的 JNK 和 NF-κB,并且 RANKL 受体 RANK 在 DCs 的表达一定要在淋巴因子的存在才能促成,从而说明 RANKL 产生于 T 细胞并有特异性调节 T 细胞的作用<sup>[4]</sup>。

基于 RANKL 和 CD154 有高度同源性的事实,Bachmann 等<sup>[5]</sup>用 LCMV 感染小鼠模型研究了 RANKL-RANK 和 CD154-CD40 两条途径在 T 细胞与 APC 相互作用中的差异。结果表明 RANKL-RANK 信号途径在对抗 LCMV 的免疫并不是必需的,但在 CD40 缺陷的小鼠,注射可溶性 RANK-IgFc 段融合蛋白几乎完全阻断了 CD4<sup>+</sup> T 细胞对 LCMV 的免疫反应,说明 RANKL-RANK 信号途径与 CD40-CD154 信号途径不是一种毫无意义的重复,前者为后者提供了一条可选择的储备途径<sup>[5,6]</sup>。

RANKL 在维持 Th1 与 Th2 平衡方面可能也发挥了一定

作用。将 RANKL 和成熟的树突状细胞共培养显著增加 IL-12 的表达水平,而 IL-12 是公认的 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 Th1 分化的促进因子<sup>[5]</sup>。Th1 型克隆细胞比 Th2 表达更多的 RANKL; 处女型 T 细胞在有 IL-4 存在时,活化后表达的 RANKL 明显受抑制。这些现象表明 RANKL 参与了免疫反应中 Th 细胞两型之间平衡的调节<sup>[7]</sup>。

关于 TCR 激活介导 RANKL 高表达的具体机制,Wang 等<sup>[4]</sup>研究后发现 RANKL 与 TNF 一样是一个即刻早基因,在 TCR 激活后 1 h 开始表达,2.5 h 达到高峰。FK506 和环孢霉素 A (两者都是神经钙蛋白的抑制剂)都能有效地抑制由 TCR 介导的 RANKL 的表达。它能进一步兴奋转录因子 NFAT。由此推测 RANKL 的表达是以 TCR 激活为促发因素,然后通过依赖神经钙蛋白的传导途径,依次激活 NFAT 等转录因子,最终使 RANKL 基因表达增加的过程<sup>[8]</sup>。另外,T 细胞表面存在少量 RANK,且有实验表明用重组的可溶性 RANKL 胞外段可激活 T 细胞的 JNK,估计 RANKL 存在一个自分泌途径,其具体的生物学意义尚在研究当中。此外,需要说明的是 FasL,CD40L 和 TNF 在淋巴细胞的诱导产生都与 NFAT 蛋白有关,从而说明它是 TNF 家族一个普遍的调控因子。

### 2 RANKL 和 DC

RANKL 主要表达于 T 细胞,而 RANK 则几乎只存在于成熟的树突状细胞( DC )。DC 是 RANKL 最主要的靶细胞。体外实验表明 RANKL 能显著促进 DC 存活率和各种细胞因子的分泌包括,IL-1,IL-6,IL-12,IL-15 等。将经过可溶性 RANKL 预处理的成熟 DC 和抗原注入皮下后发现抗原递呈性 DC 在引流淋巴结的数目和滞留时间以及原发性、记忆性 T 细胞免疫都显著高于对照组。其中 RANKL 促进成熟 DC 的存活很可能是通过上调 bcl-X 的表达进而阻断 caspase 的致凋亡作用而促成的<sup>[1,8]</sup>。可以认为 RANKL 对 DC 的这种作用是对 DC 激活 TCR 的正反馈应答,DC 的活化又会进一步促进 T 细胞功能的发挥。如 RANKL 促使 DC 分泌 IL-12 和 IL-15,两者分别增进 Th1 和记忆 CD8 效应细胞的免疫活性。在这个正向反馈过程中,将初始信号放大,从而调动更

多的免疫细胞对入侵的抗原进行攻击。

另外有研究表明 RANKL 与黏膜 DC 的免疫耐受相关。Williamson 等<sup>[10]</sup>用口服 OVA 和可溶性 RANKL 的方法成功地在两个不同的小鼠模型上诱导出免疫耐受,显示出黏膜 DC 与其它组织 DC 在 RANKL-RANK 作用上的差异。

RANKL 和 CD40L 在活化成熟 DC 方面有惊人的相似,这与上面提及的 RANKL-RANK 为 CD40<sup>+</sup>CD154 信号传导途径提供了互补途径是相吻合的。实验也证明 CD40L 基因敲除的小鼠对 DC 的活化明显不如对照组。但两者还是有区别的,以下既是它们的不同之处也是各自的特点<sup>[11]</sup>:

I. RANKL 在 CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞都有表达,尤以前者为著,而 CD40L 只在活化的 CD4<sup>+</sup>T 细胞上表达。提示 RANKL 可能存在通过 CD8<sup>+</sup>T 细胞独立激活 DC 的通路。

II. CD28 共刺激通路增加 TCR 促 CD4<sup>+</sup>T 细胞表达 RANKL 的效应,但不增加 CD40L 的表达。

III. RANKL 在 TCR 激活后 4~8 h 可测到它的表达,持续 2 d;而 CD40L 的表达在 TCR 激活后即表达,并在 16~24 h 内迅速地消退。所以在活化 DC 方面,RANKL 的作用更多的体现在 TCR 激活后的延迟相,作用更持久。

IV. CD40L 除了表达在成熟 DC 上,还表达在未成熟 DC。它对未成熟 DC 的成熟有一定作用,而 RANKL 似乎没有这方面的作用。

V. CD40L 对 B 细胞功能也有重要意义,RANKL 则无。

近来以 DC 为基础的生物治疗方兴未艾,如能将 RANKL 对它的正向调节作用应用其中,势必显著提高这种疗法的效果。比如预先将 DC 以 TNF 处理再输入肿瘤患者体内,通过增加引流淋巴结的 APC 活性和滞留时间,提高 T 细胞对肿瘤的攻击性<sup>[5]</sup>。

### 3 RANKL 和淋巴系统的发生

近来有证据表明 RANKL 参与了 T、B 淋巴细胞的发生与淋巴结的形成。Green 等<sup>[1]</sup>以基因敲除的 RANKL<sup>-/-</sup>小鼠为模型研究后发现与正常小鼠相比,RANKL<sup>-/-</sup>小鼠的淋巴小室存在明显缺陷,胸腺组织也明显小于后者。RANKL 的缺失可阻断 B220<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>向 B220<sup>+</sup>CD43<sup>-</sup>的转化。此外,尽管 RANKL 对 T 细胞/DC 相互作用起着促进作用,但它对 DC 的发生似乎并没有多大影响。有实验表明 RANKL<sup>-/-</sup>小鼠和对照组小鼠脾脏中的 CD11<sup>+</sup>DC 无显著性差异,并且没有证据表明 RANKL 对 DC 表面共刺激分子、黏附分子及 CD40 的表达有任何实质性的影响。

### 4 RANKL 和疾病

免疫反应对机体在一定环境的生存是必需的,但在某些情况下他的异常活化常常造成正常组织的损伤。在很多自身免疫性疾病、多发性骨髓瘤<sup>[12]</sup>、成人 T 细胞性白血病、骨转移性肿瘤<sup>[13]</sup>等疾病的全身性反应中,普遍存在骨质的丢失。现认为这一现象与 RANKL 上密不可分的<sup>[14]</sup>。除了成熟 DC 外,另一个 RANKL 分布比较集中的地方就是破骨细

胞。异常活化的 T 细胞合成大量 RANKL,RANKL 通过 RANKL/RANK 信号途径增加破骨细胞的活性,从而打破了成骨细胞与破骨细胞之间的平衡,导致骨质的破坏和丢失。Kong 等<sup>[15]</sup>通过实验证实 RANKL 在体内及体外都具有致骨质疏松作用。新近用基因转导方法证明了 RANK 下游的 TNF 受体相关因子 6 (TRAF-6) 是溶骨过程中的一个很重要的因子,它不但影响破骨细胞的分化和细胞骨架的构建,还直接调控破骨细胞功能的发挥。同时,INF- $\gamma$ <sup>[16]</sup>和 socs<sup>[17]</sup>对 RANKL 起调控作用。

### 5 RANKL/RANK 信号传导途径的分子机制

同其它 TNF 一样,TANKL 由胞内、胞外和跨膜段组成。其核心结构在胞外,由数条  $\beta$  型折叠构成。它负责与 RANK 富含半胱氨酸的区域结合,引发下游的一系列反应<sup>[18]</sup>。虽然 RANKL 是一种膜蛋白,它可在一定位置断开脱落形成可溶性 RANKL。在人类,这个断开的区域位于第 140 位异亮氨酸或 145 位的丙氨酸。RANKL 的类似 TNF- $\alpha$  转化酶 (TA-CE) 的金属蛋白酶有关<sup>[6]</sup>。RANK 是由 616 个氨基酸组成的 I 型膜蛋白,其胞内段不含经典的信号传导亚单位,可能需募集适配蛋白后才能将信号继续传导。这些蛋白属于 TRAF 家族,具有一个锌指环的效应域和一个羧基端的 RANK 结合域<sup>[19]</sup>。

根据目前已有的实验结果并结合其构型,RANKL/RANK 信号传导途径的具体机制如下<sup>[6,20]</sup>:

首先是 RANKL 和 RANK 的结合,然后受体募集 TRAFs,后者通过特化的效应域激活 NF- $\kappa$ B 或分裂原激活的蛋白激酶 (MAPK),其中 MAPK 又包含了 JNK 和 ERK 两条途径。NF- $\kappa$ B 能促进炎症前 (pre-inflammatory) 免疫反应和细胞因子的分泌,并介诱导细胞的生存、分化、及活化。JNK 能进一步激活 c-Jun 和活化蛋白 1 (AP-1),影响 T 细胞核内因子的活性<sup>[19]</sup>。ERK 是 c-Fos 表达与否的调控因子,后者是破骨细胞分化中一个重要的转录因子<sup>[20]</sup>。

此外,RANKL/RANK 信号传导途径在不同的淋巴组织和细胞中介导的生物学效应各不相同,其特异性的获得可能与靶细胞内具体的信号分子的种类以及结合到 RANK 胞内段的 TRAFs 的数量和种类有关。

总之,RANKL 作为肿瘤坏死因子超家族的新成员,由淋巴细胞产生又调控着机体的免疫功能,特别是对淋巴组织的发生、T 细胞/DCs 的相互作用以及症状性骨丢失具有重要意义。但关于 RANKL/RANK 的很多方面尚不清楚,如为什么免疫系统和骨骼系统在漫长的进化过程中共享着一个调控分子(一个可能的解释是在免疫反应过程中,血液中适当升高的钙浓度对免疫系统功能的正常发挥是必需的。)弄清这些疑点以及探索如何将 RANKL 的免疫调控作用应用于临床将是今后努力的方向。

### [参考文献]

[1] Green EA, Flavell RA. TRANCE-RANK, a new signal pathway

- involved in lymphocyte development and T cell activation[ J ]. *J Exp Med*, 1999, 189(7): 10170-10182.
- [ 2 ] Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, *et al*. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function[ J ]. *Nature*, 1997, 390(6656): 175-179.
- [ 3 ] Wang R, Zhang L, Zhang X, *et al*. Regulation of activation induced receptor activator of NF-kappaB ligand( rankl) expression in T cells[ J ]. *Eur J Immunol*, 2002, 32(4): 1090-1098.
- [ 4 ] Wang BR, Rho J, Arron J, *et al*. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun n-terminal kinase in T cells[ J ]. *J Biol Chem*, 2000, 272(40): 25190-25194.
- [ 5 ] Josien R, Li HL, Ingulli E, *et al*. TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells *in vivo*[ J ]. *J Exp Med.*, 2000, 191(3):495-501.
- [ 6 ] [ 6 ] Bachmann MF, Kopf M. Balancing protective immunity and immunopathology[ J ]. *Curr Opin Immunol*, 2002, 14(4): 413-419.
- [ 7 ] Wang BR, Josien R, Choi Y, *et al*. TRANCE is a TNF family member that regulates dendritic cell and osteoclast function[ J ]. *J Leukoc Biol*, 1999, 65(6): 715-724.
- [ 8 ] Lum L, Wang BR, Josien R, *et al*. Evidence for a role of a tumor necrosis factor- $\alpha$  ( TNF- $\alpha$  )-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival[ J ]. *J Biol Chem*, 1999, 274(19): 13613-13618.
- [ 9 ] Wang Z, Karras JG, Howard RG, *et al*. Induction of bcl-x by CD40 engagement rescues slg-induced apoptosis in murine B cells [ J ]. *J Immunol*, 1995, 155(8): 3722-3725.
- [ 10 ] Williamson E, Bilshorough JM, Viney JL, *et al*. Regulation of mucosal dendritic cell function by receptor activator of NF-kappa B ( RANK )/RANK ligand interactions: Impact on tolerance induction[ J ]. *J Immunol*, 2002, 169(7): 3606-12.
- [ 11 ] Josien R, Wang BR, Li HL, *et al*. TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induce cytokine production in dendritic cells[ J ]. *J Immunol*, 1999, 162(5): 2562-2568.
- [ 12 ] Nicola, Colla S, Sala R, *et al*. Human myeloma cells stimulate the receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand( RANKL ) in T lymphocytes: A potential role in multiple myeloma bone disease[ J ]. *Blood*, 2002, 100(13): 4615-4621.
- [ 13 ] Huang L, Cheng YY, Chow LT, *et al*. Tumor cells produce receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand ( RANKL ) in skeletal metastases[ J ]. *J Clin Pathol*, 2002, 55(11): 876-879.
- [ 14 ] Udagawa N, Horwood NJ, Elliott J, *et al*. Interleukin-18 is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon- $\gamma$  to inhibit osteoclast formation[ J ]. *J Exp Med*, 1997, 185(6): 1005-1012.
- [ 15 ] Kong YY, Feige U, Sarosi I, *et al*. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand[ J ]. *Nature*, 1999, 402(6759): 304-308.
- [ 16 ] Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, *et al*. T cell mediated regulation of osteoclastogenesis by signaling cross-talk between RANKL and IFN- $\gamma$ [ J ]. *Nature*, 2000, 408: 600-605.
- [ 17 ] Hayashi T, Kaneda T, Toyama Y, *et al*. Regulation of receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand-induced osteoclastogenesis by endogenous interferon-beta suppressor of cytokine signaling( socs ): The possible counteracting role of socs in INF-beta inhibited osteoclast formation [ J ]. *J Biol Chem*, 2002, 277(31): 27880-27886.
- [ 18 ] Goillot E, Raingeaud J, Ranger A, *et al*. Mitogen-activated protein kinase-mediated Fas apoptotic signaling pathway[ J ]. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, 94(7): 3302-3307.
- [ 19 ] Darnay BG, Aggarwal BB. Early events in TNF signaling: A story of associations and dissociations[ J ]. *J Leukoc Biol*, 61(5): 559-566.
- [ 20 ] Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: Regulation and function[ J ]. *Annu Rev Immunol*, 1997, 15: 707-747.
- [ 收稿日期 ] 2003 - 04 - 02 [ 修回日期 ] 2003 - 05 - 08

## 《肿瘤防治研究》征订、征稿启事

《肿瘤防治研究》杂志创刊于1973年,中华人民共和国卫生部主管,湖北省卫生厅、中国抗癌协会、湖北省肿瘤医院主办,郭沫若同志题写刊名。中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国科学引文数据库来源期刊,并被《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》、《中文科技期刊数据库》全文收录。创刊30年来,在学术上具有较高的权威性和指导性,在全国肿瘤学界享有较高的知名度,社会影响大,深受广大医务工作者所钟爱。本刊主要栏目有:基础研究、临床研究、影响诊断、论著摘要、技术交流、流行病学、综述、新技术、临床药典、短篇个案等,读者对象为从事肿瘤专业的工作人员及广大相关专业中、高级医务人员。2004年《肿瘤防治研究》杂志为了扩大停息量,加快用稿周期,将由双月刊改为月刊,国际标准A4开本,哑光铜版纸印刷,64页码,每月25日出版。欢迎订阅,欢迎投稿。

刊号:ISSN1000-8578/CN42-1241/R; 邮发代号:38-70; 国外发行代号:BM6482; 定价:6.00元/册。本刊编辑部亦可随时为读者代办邮购(免邮寄费)。通讯地址:湖北省武汉市武昌卓刀泉南路16号《肿瘤防治研究》编辑部(邮政编码:430079)。电话:027-87393126; 传真:027-87396522; E-mail: zlfzjy@hotmail.com