

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2003 )04-0295-03

## 4-1BB/4-1BBL 在树突状细胞上的表达及其生物学意义

李 敏 综述; 张学光, 顾宗江 审阅 ( 苏州大学生物技术研究所, 苏州 215007 )

[ 摘 要 ] 4-1BB/4-1BBL 配体( 4-1BBL )属于肿瘤坏死因子受体/肿瘤坏死因子超家族成员,是机体特异性免疫应答中一对重要的共刺激分子,4-1BB/4-1BBL 相互作用产生的共刺激信号在维持 T 细胞的增殖、活化及功能介导中发挥了重要作用。最新研究发现,4-1BB/4-1BBL 共表达于树突状细胞( dendritic cells , DC ),通过激发 4-1BB/4-1BBL 为 DC 活化提供了新的思路,进而增强 DC 激发 T 细胞的能力。因此,调节 4-1BB/4-1BBL 信号在以 DC 为主导的肿瘤免疫中具有广阔的应用前景。

[ 关键词 ] 树突状细胞; 4-1BB/4-1BBL; 免疫应答

[ 中图分类号 ] R392.12 [ 文献标识码 ] A

树突状细胞( dendritic cells , DCs )由 Steinman 于 1973 年首先在小鼠脾脏中发现,是已知的体内功能最强的专职性抗原递呈细胞( antigen presenting cell , APC ),也是目前发现的唯一能激活初始型 T 细胞的 APC。DC 表面除表达 MHC I、II 类分子外还高表达多种共刺激分子,可通过与 T 细胞表面相应受体/配体结合,为 T 细胞及 DC 自身的活化提供了重要的共刺激信号,从而在体内外参与针对肿瘤的初次和再次免疫应答。

4-1BB/4-1BBL 是肿瘤坏死因子受体/肿瘤坏死因子( TNFR/TNF )超家族成员,是机体特异性免疫应答中一对重要的共刺激分子。4-1BB 配体化产生的共刺激信号对维持 T 细胞活化状态和功能介导具有重要意义,在肿瘤免疫、移植免疫等过程中有着重要的作用。

### 1 4-1BB/4-1BBL 分子及其生物学特性

#### 1.1 4-1BB/4-1BBL 基因和分子的特性

小鼠 4-1BB 由 Kwon 等<sup>[1]</sup>于 1988 年首先在小鼠的活化 T 细胞上发现,是分子量为 30 kD 的糖蛋白,以单体或 55 kD 二聚体形式表达于 T 细胞表面。其基因位于小鼠 14 号染色体上。人的 4-1BB( CD137 )又名淋巴细胞激活诱导的受体( receptor induced by lymphocyte activation, ILA ),其 cDNA 是以小鼠的 4-1BB DNA 片段为探针通过杂交分离的方法在人外周血激活的 T 淋巴细胞 cDNA 文库中获得。人 4-1BB 分子与小鼠 4-1BB 分子在氨基酸( amino acid , AA )水平上具有 60% 的同源性,其基因定位于人 1p36,为 TNFR 超家族的 I 型跨膜蛋白,由胞外区、跨膜区和胞浆内区组成。4-1BB 蛋白分子有膜结合型和可溶性两种表达形式,分别由 2.8 kb 和 1.4 kb mRNA 编码。Goodwin 等<sup>[2]</sup>于 1993 年克隆了小鼠 4-1BBL 基因,该基因位于小鼠 17 号染色体上,共编码 309 个 AA,分子量为 34 kD。随后, Alderson 等<sup>[3]</sup>于 1994 年克隆并鉴定了人的 4-1BBL cDNA,其基因定位于人染色体 19p13.3。4-1BBL 由 255 个 AA 组成,分子量约 27 kD,是 II 型跨膜糖蛋白,也有膜结合型和可溶性两种形式,后者是由 185 个氨基

酸组成的胞外段,两种形式均具生物学活性。人与鼠的 4-1BBL 在蛋白质水平有 36% 的同源性。

4-1BB 和 4-1BBL 的表达有各自的特点,4-1BB 呈诱导性表达,而 4-1BBL 往往呈持续性表达。既往研究认为,4-1BB 可诱导性表达在活化的 CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞、NK 细胞及 NK1.1<sup>+</sup> 细胞上<sup>[4]</sup>。此外,CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞表面也可组成性表达 4-1BB 分子<sup>[5]</sup>。最近发现,4-1BB 的表达并不局限于淋巴细胞亚群,其它多种细胞如骨髓细胞,包括单核细胞、中性粒细胞及 DC 均可持续表达 4-1BB<sup>[4,6-8]</sup>;另外,嗜酸性粒细胞在对活化的 T 细胞释放的可溶性因子的应答过程中也表达 4-1BB<sup>[9]</sup>。4-1BBL 则主要表达在活化的抗原递呈细胞诸如 DC、B 细胞<sup>[4]</sup>、巨噬细胞以及某些肿瘤细胞表面<sup>[7]</sup>。

#### 1.2 4-1BB/4-1BBL 的主要生物学功能

4-1BB/4-1BBL 在体内均以同源三聚体形式发挥其生物学功能。4-1BB/4-1BBL 所介导的共刺激信号可以诱导 T 细胞活化、增殖、分泌细胞因子,不但可使 CD8<sup>+</sup> T 细胞产生 IL-12 和 IFN- $\gamma$ , 还能使 CD4<sup>+</sup> T 细胞合成并分泌 IL-2 及 IL-4。此外,4-1BB/4-1BBL 相互作用还可增强 T 细胞的抗凋亡作用,维持其长时间生存。体内研究则表明,4-1BB 在 CD8<sup>+</sup> CTL 分化中的作用更为显著,并可能通过增加 IL-2 的分泌及 Bcl-xL 的表达而促进 CD8<sup>+</sup> T 细胞克隆增殖及存活<sup>[9]</sup>。其主要功能如下:(1)参与 T 细胞介导的抗肿瘤免疫。应用抗 4-1BB 单克隆抗体或将 4-1BBL 基因转入肿瘤细胞,能有效诱导细胞介导的抗肿瘤免疫应答。Melero 等<sup>[11]</sup>给荷瘤小鼠注射激发型 4-1BB 单抗能促进肿瘤消退及抑制超抗原刺激的 T 细胞死亡。(2)参与 T 细胞介导的移植排斥及抗病毒免疫<sup>[12]</sup>。大量实验证明,4-1BB 分子参与调节 T 细胞介导的移植排斥免疫应答,并能加速移植排斥宿主机( graft-vs-host disease , GVHD )的发生。如激发型 4-1BB 单抗能增加小鼠 GVHD 模型中 CTL 的数量,并加速转基因心脏移植后的排斥反应。这一点在皮肤移植动物模型中也得到了证实。另有研究表明,4-1BB/4-1BBL 相互作用在抗病毒 CTL 应答中也

具有重要作用。Tan 等<sup>[13]</sup>用 4-1BBL 敲基因小鼠观察到其产生 LCMV(lymphocytic choriomeningitis virus)特异性 CTL 的效率较野生型小鼠为低。(3)参与 NK 细胞介导的抗肿瘤免疫。最新研究发现,4-1BB 分子在 NK 细胞的激活中也有重要作用,能增强 NK 细胞对肿瘤的杀伤活性。通过对小鼠结肠癌和乳腺癌肝转移模型的研究发现,IL-12 可以增强 NK 细胞介导的抗肿瘤作用而减少肝转移灶,但激发的 CTL 不具有长期的抗癌效应,若将 4-1BB 单抗联合 IL-12 治疗或将 IL-12 和 4-1BBL 基因一同转入肿瘤细胞,结果发现不但可使 IL-12 的用量减少 18 倍,且此类动物的带瘤生存时间明显延长,皮下转移灶消失,较二者单用效果更佳并具有显著性差异<sup>[14]</sup>。

### 1.3 4-1BB/4-1BBL 的信号转导通路

TNF 与其受体结合既可以启动致凋亡的信号,也可以激活非凋亡或抗凋亡途径。目前研究认为,TNFR 相关因子 2 (TNF receptor-associated factor 2, TRAF2) 主要与抗凋亡的信号转导有关。4-1BB 与 4-1BBL 结合后发生聚集,并通过 TRAF2-NIK(NF-induced kinase)通路活化 NF- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B),从而抑制了活化诱导的细胞死亡(activation induced cell death, AICD)<sup>[15]</sup>的发生,并促进 T 细胞生长因子的分泌。也有研究表明,4-1BB 过度表达可活化蛋白激酶 P38 和 JNK(c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase),故其信号转导也可能与 P38-MAPK(mitogen-activated protein kinase)和 JNK-SAPK(stress-activated protein kinases)通路有关。而 NF- $\kappa$ B 和 P38 均被证实具有凋亡保护功能,JNK 途径激活时虽诱导凋亡,但当 TRAF2 同时激活 JNK 和 NF- $\kappa$ B 时,可产生对靶细胞的保护作用。TRAF2 缺陷型小鼠,则对 4-1BB 的激发不产生反应,也不能介导 IL-2 的产生。最近发现一种名为 LRR-1(Leucine-rich repeat protein)的蛋白可与 4-1BB 胞浆功能区结合,转导的信号能抑制 NF- $\kappa$ B 的活性,也可下调 JNK 的活性,在 4-1BB 介导的信号转导中起负调控作用<sup>[16]</sup>。

## 2 4-1BB/4-1BBL 在树突状细胞的表达

目前已证实,成熟 DC 可表达 4-1BBL。Debenedette 等<sup>[17]</sup>利用生物素标记的 4-1BB-AP 融合蛋白在小鼠脾脏 DC 上检测到 4-1BBL 的表达;Futagawa 等<sup>[8]</sup>经实验进一步证实小鼠脾脏 DC 上低表达 4-1BBL,且经 CD40 单克隆抗体或 LPS(lipopolysaccharide)刺激 24 h 后其表达上调。

最新研究则发现,DC 上也可表达 4-1BB 分子。Wilcox 等<sup>[7]</sup>研究发现,经 GM-CSF 联合 IL-4 体外培养的小鼠骨髓来源未成熟 DC,以及经 LPS 刺激 48 h 后的成熟 DC 上均可检测到 4-1BB 的表达,并且 LPS 的刺激能上调髓源性 DC 4-1BB 的表达。利用针对 4-1BB 不同表位的两种抗体进行夹心 ELISA 法检测,发现经 LPS 刺激后骨髓来源的 DC 释放可溶性 4-1BB 的水平也较未刺激组为高。而后用新鲜分离的小鼠脾脏 DC 进行实验,也观察到了类似结果。所不同的是,经 LPS 刺激后脾脏 DC 上 4-1BB 的表达无明显变化。此外,Futagawa 等人<sup>[8]</sup>经研究同样证实了小鼠脾脏 DC 持续性高表达 4-1BB,在 CD40 单克隆抗体刺激后其表达可轻度下调,同

时 CD40 配基化可诱导 DC 上调表达 4-1BBL。因此推测,DC 上 4-1BB 表达的下调可能是其与 DC 自身表达的 4-1BBL 相互作用的结果。Susanne 等<sup>[18]</sup>经实验证实,小鼠淋巴滤泡生发中心的滤泡样树突状细胞(follicular dendritic cell, FDC)及 FDC 来源细胞株均高表达 4-1BB。

## 3 4-1BB/4-1BBL 在树突状细胞上表达的生物学意义

### 3.1 4-1BB/4-1BBL 信号对 DC 活化的激发作用

Wilcox 和 Futagawa 等<sup>[7-8]</sup>用经辐照的转 4-1BBL 基因的小鼠肥大细胞瘤细胞 P815(4-1BB/P815)与小鼠骨髓及脾脏来源的 DC 共育,可检测到 DC 培养上清中 IL-6、IL-12 分泌增加并上调表达 CD80、CD86。此外,用表达 4-1BBL 的肿瘤细胞与脾脏来源的 DC 共育可诱导 DC 分泌 IL-12。

最早发现 LPS 可通过活化 NF- $\kappa$ B 诱导 DC 成熟,并通过活化 ERK 促进其存活。而后有研究表明,CD40 介导 DC 活化的信号起始于浆膜中一个类似脂筏的结构,而其信号的传递则依赖于的一组新近发现的连接 CD40 胞浆结构域(domain)与下游信号转导分子的接头蛋白(adapters)的介导,如:TRAFs 家族。TRAF2/3 及 src 家族蛋白激酶(如 Lyn)和 CD40 分子一起被募集到脂筏中,TRAF2/3 启动 P38MAPK 的活化,Lyn 诱导 ERK 活化。而应用阻断型抗 4-1BBL 单克隆抗体却能部分抑制 CD40 单抗刺激的 DC 分泌 IL-12。故 DC 上表达的 4-1BB 的配基化可能通过 DC-DC 相互作用或经外源信号激发诱导自身活化,从而促进细胞因子的分泌及共刺激分子的表达。4-1BB 作为诱导 DC 活化的分子与 CD40 及 RANK(receptor activator of NF- $\kappa$ B)有所不同的是,后两者需通过表达于活化 T 细胞上的相应配体激发,而 4-1BB 则可接受来自与其毗邻 APC(包括 DC 自身)上配体的刺激信号而无须 T 细胞介导。进一步研究表明,用激发型抗 4-1BB 单克隆抗体免疫小鼠,可增强其脾脏 DC 刺激 T 细胞活化、增殖的能力,且用激发型抗 4-1BB 单抗处理的 T、B 细胞缺陷型敲基因小鼠,其脾脏 DC 刺激 T 细胞增殖的能力也有所提高,故证实了这一作用是通过直接激发 DC 表面 4-1BB 而完成的。

### 3.2 DC 共表达 4-1BB/4-1BBL 对 T 细胞的影响及其在抗肿瘤免疫中的作用

众多研究表明,DC 表面 4-1BBL 与 T 细胞表面 4-1BB 相互作用,在 DC 向 T 细胞递呈抗原的过程中发挥了重要作用,能有效刺激 T 细胞活化,分泌细胞因子及调节其克隆增殖和存活。有研究认为,CD28/B7 共刺激信号主要在 T 细胞活化的前期起作用,可促进 T 细胞的增殖并维持其短期的存活。当 T 细胞表面的 CD28 分子受到过度的抗原刺激而表达下调时,T 细胞对活化信号的反应下降,易于发生 AICD。在存在 TCR 信号条件下,表达于 DC 上的 4-1BBL 与表达在 T 细胞表面的 4-1BB 相互作用可提供协同 CD28 的共刺激信号而维持 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞较长时间的存活,抑制 AICD 的发生,延长其免疫应答效应。

机体的抗肿瘤免疫应答主要是由 CD8<sup>+</sup> CTL 介导的,而 DC 在 CTL 的活化过程中发挥了至关重要的作用。DC 需要

活化至最佳状态才能有效刺激 CTL,而静止状态的 DC 仅表达低水平的 MHC 分子和共刺激分子,其刺激 CTL 的能力很弱。研究表明,CTL 的活化必需的共刺激分子和 IL-12,须通过 Th 细胞或感染性刺激物在 DC 中诱导产生。如前所述,DC 上表达的 4-1BB 通过与自身 4-1BBL 的配基化产生活化信号,促进 DC 活化成熟,诱导 IL-6、IL-12 分泌及上调 CD80、CD86 表达。Ferlazzo 等<sup>[19]</sup>研究表明,当 4-1BB 与 4-1BBL 的相互作用被阻断后,CD34<sup>+</sup>造血祖细胞或单核来源的 DC 诱导抗原特异性 CTL 的能力也减低。Melero 等人<sup>[11]</sup>给小鼠注射抗 4-1BB 激发型单克隆抗体后可通过显著增强肿瘤特异性 CD8<sup>+</sup> CTL 的活性促使荷瘤小鼠的肿瘤消退。将抗 4-1BB 抗体与 IL-12 或抗原肽疫苗<sup>[20]</sup>联合应用则可进一步增强抗肿瘤免疫治疗效果。故应用 4-1BBL 转基因细胞或激发型抗 4-1BB 单克隆抗体除可直接激发已致敏的肿瘤特异性 T 细胞及 NK 细胞表面 4-1BB 分子外,还能通过激发 DC 表面 4-1BB 分子,提高其激活 T 细胞应答的能力,从而在抗肿瘤免疫中发挥作用,且通过诱导 DC 活化所发挥的作用可能更为重要。

既往研究已证实,CD40L 转基因细胞及激发型抗 CD40 单克隆抗体通过诱导 DC 活化促进其分泌 IL-12 及上调表达 CD80、CD86 在抗肿瘤免疫中发挥了重要作用。因此,4-1BBL 转基因细胞和激发型抗 4-1BB 单克隆抗体可能以类似的方式在抗肿瘤免疫应答中发挥作用。另有研究表明,CD40L 转基因细胞或激发型抗 CD40 单克隆抗体体内应用会引起肺炎、淋巴细胞增生等并发症<sup>[21]</sup>。而由于 4-1BB 的主要表达于活化的 T 细胞及 DC 上,其表达谱较局限,推测其体内应用旁路效应及副作用较少,故其较 CD40 更适用于免疫治疗。

此外,近来研究表明 FDC 上表达的 4-1BB 与生发中心 B 细胞表面 4-1BBL 结合能促进 B 细胞增殖、增加 IgM 类抗体合成,并诱导 CD95 的表达,由此参与 B 细胞亲和成熟及克隆选择,从而在机体体液免疫应答中发挥重要作用<sup>[18]</sup>。

综上所述,表达于树突状细胞上的 4-1BB/4-1BBL 相互作用所提供的信号为 DC 的活化提供了一条新途径,并能进一步增强树突状细胞激活 T 细胞的能力,在以 CD8<sup>+</sup> CTL 为主介导的抗肿瘤免疫中具有广阔的应用前景。

#### [ 参考文献 ]

[ 1 ] Kwon BS, Weissman SM. CDNA sequences of two inducible T cell genes[ J ]. *Pro Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86( 6 ): 1963-1967.

[ 2 ] Goodwin RG, Din WS, Davis-Smith T, *et al*. Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1bb: A member of an emerging family of cytokine with homology to tumor necrosis factor[ J ]. *Eur J Immunol*, 1993, 23( 10 ): 2631-2641.

[ 3 ] Alderson MR, Smith CA, Tough TW, *et al*. Molecular and biological characterization of human 4-1BB and its ligand[ J ]. *Eur J Immunol*, 1994, 24( 9 ): 2219-2227.

[ 4 ] Kwon B, Moon CH, Kang S, *et al*. 4-1BB: Still in the midst of darkness[ J ]. *Mol Cells*, 2000, 10( 2 ): 119-126.

[ 5 ] McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, *et al*. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells: Gene expression analysis reveals a func-

tional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor[ J ]. *Immunology*, 2002, 16( 2 ): 311-323.

- [ 6 ] Heinisch IV, Daigle I, Knopfli B, *et al*. CD137 activation abrogates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-mediated antiapoptosis in neutrophils[ J ]. *Eur J Immunol*, 2000, 30( 12 ): 3441-3446.
- [ 7 ] Wilcox RA, Chapoval AI, Gorski KS, *et al*. Cutting edge: Expression of functional CD137 receptor by dendritic cells[ J ]. *J Immunol*, 2002, 168( 9 ): 4262-4267.
- [ 8 ] Futagawa T, Akiba H, Kodama T, *et al*. Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells[ J ]. *Int Immunol*, 2002, 14( 3 ): 275-286.
- [ 9 ] Heinisch IV, Bizer C, Volgger W, *et al*. Functional CD137 receptors are expressed by eosinophils from patients with IgE-mediated allergic responses but not by eosinophils from patients with non-IgE-mediated eosinophilic disorders[ J ]. *J Allergy Clin Immunol*, 2001, 108( 1 ): 21-28.
- [ 10 ] Maus MV, Thomas AK, Leonard DG, *et al*. *ex vivo* expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB[ J ]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20( 2 ): 143-148.
- [ 11 ] Melero I, W Shuford, SA Newby, *et al*. Monoclonal Abs against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors[ J ]. *Nat Med*, 1997, 3( 6 ): 682-689.
- [ 12 ] DeBenedette 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.
- [ 13 ] Tan JT, Whitmitre JK, Ahmed R, *et al*. 4-1BB ligand, a member of the TNF family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses[ J ]. *J Immunol*, 1999, 163: 4859-4868.
- [ 14 ] Martinet O, Ermekova V, Qiao JQ, *et al*. Immunomodulatory gene therapy with interleukin-12 and 4-1BB ligand: Long-term remission of liver metastasis in mouse model[ J ]. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92( 11 ): 931-936.
- [ 15 ] Jose C, Hurtado, Yong J, *et al*. Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death[ J ]. *J Immunol*, 1997, 158( 6 ): 2600-2609.
- [ 16 ] Kim HH, Kwack K, Lee ZH, *et al*. Activation of c-jun N-terminal kinase by 4-1BB ( CD137 ), a T cell co-stimulatory molecule[ J ]. *Mol Cells*, 2000, 30( 3 ): 247-52.
- [ 17 ] Mark A, DeBenedette AS, Tak WM, *et al*. Costimulation of CD28<sup>-</sup> T lymphocytes by 4-1BB ligand[ J ]. *J Immunol*, 1997, 158( 2 ): 551-559.
- [ 18 ] Susanne P, Karin B, Margarethe W, *et al*. CD137 is expressed by follicular dendritic cells and costimulates B lymphocyte activation in germinal centers[ J ]. *J Leukoc Biol*, 2002, 72: 35-42.
- [ 19 ] Ferlazzo G, Wesa A, Wer WZ, *et al*. Dendritic cells generated either from CD34<sup>+</sup> progenitor cells or from monocytes differ in their ability to activate antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells[ J ]. *J Immunol*, 1999, 163( 7 ): 3597-3604.
- [ 20 ] Chen SH, Pham-Nguyen KB, Martinet O, *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 ): 39-49.
- [ 21 ] French RR, Chan HT, Tutt AL, *et al*. CD40 antibody evokes a cytotoxic T cell responses that eradicate lymphoma and bypasses T cell help[ J ]. *Nat Med*, 1999, 5( 5 ): 548-551.