

[文章编号] 1007-385X(2007)01-0194-03

Flt3 配体在生物治疗中应用的研究进展

Roles of Flt3 ligand in biotherapy of disease

周俊超^{1,2}综述; 卢 钊¹, 何秋明¹审阅(1. 四川大学 华西医院 肿瘤中心及生物治疗国家重点实验室, 成都 610041; 2. 四川大学 华西临床医学院, 成都 610041)

[摘要] Flt3 配体(Flt3 ligand, FL)是一种与造血调控有关的早期造血生长因子。FL 与造血干细胞表面的 Fm 样酪氨酸激酶受体 3 结合, 激活造血前体细胞, 促进其增殖; 与其他细胞因子联合应用, 可显著提高造血效应。研究还证实, FL 作为一种免疫佐剂, 单独或者联合其他细胞因子能在体内外扩增树突状细胞(dendritic cells, DCs), 促进其发育、成熟。树突状细胞是免疫系统中一类重要的专职抗原提呈细胞, 能够摄取外来抗原, 与自身的 MHC 形成复合物, 提呈给 T 细胞, 显著刺激抗原特异性 T 细胞反应, 在肿瘤免疫治疗中发挥重要作用。和 T 细胞不同, NK 细胞不需要抗原提呈细胞的作用, 通过分泌干扰素等细胞因子能够直接杀伤肿瘤细胞; FL 联合其他细胞因子能够诱导 NK 前体细胞(pro-NK cell)的扩增和增殖, 进而增强机体的抗肿瘤能力。目前 FL 已经被应用于造血系统疾病、乳腺肿瘤、前列腺肿瘤、肝脏肿瘤、神经系统肿瘤等疾病的基础或临床研究。此外, 在抗感染、抗宿主移植以及自身免疫反应疾病等方面 FL 也有较好的作用。随着研究的不断深入, FL 显示出了优越的生物学效应, 展示了其在生物治疗领域中的广阔前景。

[关键词] Flt3 配体; 树突状细胞; 肿瘤; 生物治疗

[中图分类号] R730.59 **[文献标志码]** A

Flt3 配体(Flt3 ligand, FL)是一种与造血调控有关、刺激早期造血的生长因子。早期的研究^[1]发现 FL 能促进树突状细胞的扩增和成熟, 激活机体的天然免疫反应。近年来, FL 在生物治疗领域的发展迅速, 相关的实验及临床研究渐趋广泛, 现仅就近几年 FL 的生物治疗应用进展作一综述。

1 Flt3 配体的发现与基因定位

1993 年 Lyman 等^[1]先后从鼠和人的细胞中克隆出 Flt3 配基, 它有可溶型和膜结合型两种。可溶型 FL 与造血祖细胞表面 Fm 样酪氨酸激酶受体 3 特异性结合, 能够刺激小鼠和人的骨髓造血祖细胞的增殖和分化。人 FL 基因序列编码的 FL 蛋白含有 235 个氨基酸, 与鼠 FL 蛋白有 72% 的同源性, 胞外区高于胞内区^[2]。进一步的研究发现, 人 FL 基因定位于染色体 19q13.3-13.4, 相对分子质量约为 5 900, 含有 8 个外显子, 分别编码不同的氨基酸序列^[3]。

2 Flt3 配体的造血作用

FL 作为一种重要的细胞因子早期主要应用于造血领域。研究^[4]表明, FL 能够促进造血干细胞扩增, 从而显著地刺激造血, 出现暂时性骨髓增生、脾大、淋巴结及肝增大, 如果终止 FL 的治疗, 骨髓造血终止, 相应的机体反应也消失。同时, 造血细胞的迁移通过 SDF-1 α (CXCL12)/CXCR4 轴接受 FL 及其受体共同调控^[5]。

新的研究^[6]发现, 在体外重组人 FL(recombinant human Flt3 ligand, rhFL)联合 SCF、GM-SCF 以及 IL-3 能够显著诱导造血效应, 且 FL 联合 TNF- α 、GM-SCF 及 IL-4 能够使 DCs 数量增加约 2.5 倍, 但对其表型和功能影响不大。FL 还可以与内皮细胞表面的 Flt3 受体结合, 刺激微血管内皮细胞分泌 G-CSF、GM-CSF、IL-6、IL-8 以及自身 FL 的分泌, 上述因子进而又可以促进造血。

此外, Coates 等^[7]发现单独应用 FL 可以扩增两类 DCs 亚型的数量, 且新分离的 CD11c⁺ pre-DCs 能够刺激幼稚 T 细胞的增殖。联合 GM-CSF 和 CD40L 过夜培养后, 两类亚型细胞表面的共刺激分子上调; 经 IL-3 和 CD40L 培养 72 h 后, CD123⁺ + pre-DCs 呈现单核细胞样形态, 发育为成熟的 DCs。

FL 对造血性疾病也有一定的效果。在用短尾猴构建的造血障碍模型中, 用 FL、SCF、MGDF 及 IL-3 治疗, 发现治疗初期, 中性粒细胞、血小板、红细胞(包括血红蛋白)显著改善, 外周血 CD34⁺ 细胞数量增加, 而且恢复迅速, 骨髓活检发现 CD34⁺ 数量及克隆活性增加, 但长期治疗和对照组并无显著差异, 淋巴细胞在治疗期间也无明显差异^[8]。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 3030045, No. 30470672)

[作者简介] 周俊超(1980-), 男, 河南周口人, 硕士生, 主要从事肿瘤生物治疗方面的研究

[通讯作者] 卢 钊, E-mail: radyoulu@hotmail.com

3 Flt3 配体在肿瘤生物治疗中的应用

由于肿瘤表面抗原免疫原性较弱, T 细胞不能直接识别表面抗原而杀灭肿瘤细胞, 需要借助抗原提呈细胞的作用介导抗肿瘤免疫。DCs 在机体抗肿瘤中发挥着重要作用。大量实验研究表明, FL 给予荷瘤动物后, 肿瘤细胞生长缓慢甚至消退, 与其他细胞因子联用, 其抗肿瘤效果更加明显。FL 主要通过诱导 DCs 分化和成熟而发挥生物学效应。FL 介导 DCs 扩增和成熟, 能够把肿瘤抗原有效地提呈给效应性 T 细胞, 发挥免疫监视作用, 从而杀伤肿瘤细胞。

3.1 Flt3 配体抗肿瘤效应机制

FL 的抗肿瘤效应主要通过 DCs 发挥作用。FL 联合某些细胞因子激活 DCs, 促进其成熟, 进而诱导 CD8⁺ T 和 NK 细胞等介导的抗肿瘤免疫, 其效应均依赖于 DCs 表面共刺激分子及表面 MHC-I 复合物的表达, 在早期肿瘤术后预防转移, 促进某些肿瘤的消退有很大价值^[9-11]。

尽管体外培养可以得到大量的 DCs, 但在体内 DCs 数量较少, 如何增加 DCs 的数量及促进 DCs 成熟是关键的一环。FL 则是很好的生物佐剂, 联合其他细胞因子可以在体内大量扩增 DCs, 诱导 DCs 成熟。

Manfra 等^[12]用四环素类抗生素诱导的 FL 转基因小鼠系, 经过强力霉素 (doxycycline, DOX) 治疗 1 周后, DCs 在外周血的数量增加可达 40%, 在连续治疗的情况下, DCs 的数量能够持续至少 9 个月, 在长期用 DOX 治疗的小鼠, 成熟及不成熟 DCs 数量在多种组织里均显著增加。FL 扩增 DCs 的作用与前体细胞表面受体有关, 研究^[13]发现淋巴和骨髓前体细胞表面表达 Flt3, FL 可以使上述细胞及其子代细胞扩增, 而无 Flt3 表达的上述细胞不能被扩增或者效果不明显。还有实验^[14]证实, 包括 FL 在内的多种 DNA 疫苗能够改善 DCs 摄取和处理抗原的活性、扩增以及成熟, 在这些生长因子的作用下, DCs 表面 MHC 复合物和共刺激分子表达增加、形状变化、与 T 细胞的结合也增加, 同时分泌趋化因子、细胞因子、黏附因子等, 吸引 T 细胞及其他免疫细胞参与机体的免疫反应。

另外, Swanson 等^[15]认为成熟 DCs 刺激 T 细胞的能力较强。经 FL 治疗或者过夜培养获得的成熟 DCs 细胞刺激 T 细胞能力显著增加。FL 对不同来源 DCs 的效应也不尽相同, 在构建的小鼠模型中, 用 FL 治疗后检测小鼠肺泡间隔, 发现 FL 扩增的骨髓源性 DCs 的能力优于淋巴组织源性 DCs^[16]。

NK 细胞是体内另外一类效应性免疫细胞, 源于成人骨髓和脐血 CD34⁺ 祖细胞。和 T 细胞不同, NK 细胞不需要抗原提呈细胞的作用, 通过分泌干扰素等细胞

因子能够直接杀伤肿瘤细胞, 在抗肿瘤反应中发挥着重要作用。FL 联合其他细胞因子能够诱导 NK 前体细胞 (pro-NK cell) 的扩增和增殖, 如单独或联合 IL-2 能够扩增 NK 细胞的数量, 增强其杀伤活性以及活化的黏附型 NK 细胞的发育。Kalberer 等^[17]用 FL + IL-15、FL + IL-15 + SCF、FL + IL-15 + IL-12 以及 FL + IL-15 + SCF + MGDF + IL-2 治疗脐血移植的 NOD 小鼠, 能够刺激 NK 细胞的发育和成熟。Chklovskaja 等^[18]也发现干细胞移植患者外周血及骨髓 CD34⁺ 经 FL、IL-15 及 SCF 联合培养后 NK 细胞迅速恢复, 但与 FL 及 IL-15 水平无关。众多的研究已经表明, FL 对 NK 细胞的扩增效应在抗肿瘤效应中具有举足轻重的意义。

3.2 Flt3 配体的体内抗肿瘤效应

Chen 等^[19]用 FL 治疗自体细胞移植后的肿瘤患者, 发现 FL 能够显著增加 CD11c⁺ DCs、类浆 DC 细胞 (plasmacytoid DCs, PDCs) 及 CD14⁺ 单核细胞数量, 刺激 T 细胞、NK 细胞增殖, 为肿瘤免疫治疗提供很好的策略。对脑胶质瘤的研究^[20]发现, 利用腺病毒载体构建的人可溶性 FL (human soluble fms-like tyrosine kinase 3 ligand, hsFlt3L) 治疗多形性脑胶质瘤的路易鼠, 能够显著抑制肿瘤的生长, 延长该鼠的生存期, 且存活期达 6 个月的小鼠脑部肿瘤消失。Ali 等^[21]用 FL 联合 HSV1-TK 腺病毒介导的基因治疗荷瘤路易鼠也能够显著延长其生存期, 而且发现在治疗前如果抑制巨噬细胞和 CD4⁺ 细胞活性, 此作用消失, 但抑制 CD8⁺ 和 NK 细胞活性不影响 AdTK + AdFL 的治疗效应。

Wang 等^[22]用鼠胞外段 FL 基因构建的质粒治疗肝癌小鼠, 观察到 mFL 蛋白的高表达及局部肿瘤组织 DCs、NK 细胞和淋巴细胞的积聚。瘤内注射 Ad-mFL 蛋白能够显著抑制肿瘤生长, 产生持久的抗肿瘤效应, 同时抑制 CD3⁺ T、CD4⁺ T 细胞或者 NK 细胞的作用, 抗肿瘤效应部分丧失, 如果给裸鼠过继性输注经 Ad-mFL 蛋白治疗的鼠脾细胞, 该作用又可以重新恢复。

在骨扫描阴性且激素耐受的前列腺癌的治疗中, Higano 等^[23]利用重组 FL 治疗 31 例患者, 1 个周期后检测发现 DCs 增加近 29 倍; 而且在 27 人中, 22 人检测到抗 FL 抗体, PSA 的增长显著减缓, 仅出现腹泻等较小的不良反应, 因此认为 FL 是安全有效的, 为临床进一步应用打下了基础。Freedman 等^[24]选取 15 例卵巢癌、胃肠癌以及间皮瘤患者, 对 FL 腹腔内或者皮下给药的效果进行对比, 发现两种给药途径临床不良反应较小, 在治疗过程中均能显著增加白细胞、单核细胞、Lin⁻ DR⁺ DCs 数量, 间歇期血小板增加, 且成熟的单核源性 DCs 分泌 IL-10、IL-12 增加, 延长患者的病情稳定期, 表明两种给药途径均能产生相似的生物学效应。

此外, FL 联合放疗可以明显改善荷瘤小鼠的生存

期,产生持久的保护性免疫,其效应与放疗后机体肿瘤细胞裂解产物导致免疫原性增强有关^[25]。

4 Flt3 配体在其他方面的应用

FL 除了表现出良好的抗肿瘤效应外,联合 IFN- α / β 能够有效地预防新生小鼠 1 型单纯疱疹病毒(herpes simplex virus type 1, HSV-1)感染, Vollstedt 等^[26] 使用 FL 基因敲除小鼠模型验证了 FL 的该效应。作者发现抗病毒效应与两者诱导产生的类浆 DC 细胞(plasmacytoid DC, pDC)有关。

目前也有 FL 应用于烧伤的研究。通常烧伤患者机体体液丧失过多,多种效应性免疫细胞如巨噬细胞、树突状细胞、NK 细胞、T 细胞等功能破坏,以及细胞因子 IFN- γ 、IL-12 等丧失,导致患者机体免疫力低下,特别易于感染。利用 FL 的造血效应产生新的免疫细胞来改善机体的状况将是一个很好的方法。Toliver-Kinsky 等^[27] 在研究小鼠烧伤模型发现,FL 能够非常有效地恢复小鼠机体的免疫细胞以及相关细胞因子,改善机体的免疫力。

FL 一方面能够增加 DCs 的免疫原性,提高机体的天然免疫;另一方面还能够刺激 DCs 产生特异性 T 细胞免疫耐受。在正常的机体内环境中,DCs 将抗原提呈给 T 细胞后,仅诱导短暂的 T 细胞激活,随后 T 细胞数量下降并逐渐衰竭失活。Miller 等^[28] 在 AdmFL 诱导的 DCs 经 OVA 刺激后治疗荷瘤小鼠,观察到肿瘤持续增长,仅有少量 CTL 产生,由此推测 AdmFL 诱导 DCs 在某些条件下将会产生 T 细胞免疫耐受。DCs 诱导的 T 细胞耐受有利于器官移植物的成活,预防机体对移植物的排斥。Yunusov 等^[29] 在对狗的研究中也证实了这一点。关于其机制,现在仍不完全清楚。

Chilton 等^[30] 在研究嵌合态与自身免疫反应时,发现 FL 治疗的 NOD 1 型糖尿病鼠,显著地降低了胰岛素炎,延缓了糖尿病的进展,这些均与成熟 DCs 增加有关,而且观察到在胰淋巴结有 CD4⁺ 和 CD25⁺ 细胞的出现,为糖尿病的治疗开拓了新的视野。

此外,有实验表明^[31],FL 在治疗过敏性气道炎症中的作用显著。它可以完全改善气道高反应性,显著增加 IFN- α 、IL-10 及 IgG2a 的水平,同时 IL-4、IgE 水平及嗜酸性粒细胞数量下降,FL 的这种作用将给呼吸道过敏性疾病提供新的治疗思路。

5 结 语

总之,FL 的发现和应用于疾病的免疫治疗提供了新的思路,注入了新的活力。目前在各个领域的研究不断表明,FL 作为一种免疫佐剂具有巨大的潜在应用价值。但如何有效使用 FL 达到相应的免疫应答效果

及治疗目的,仍需要进行深入研究。随着 FL 在生物治疗领域应用的不断探索,FL 疫苗应用于临床将具有广阔的发展前景。

[参 考 文 献]

- [1] Lyman SD, James L, Vanden Bos T, *et al.* Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: A proliferative factor for primitive hematopoietic cells[J]. *Cell*, 1993, 75(6): 1157-1167.
- [2] Hannum C, Culppepper J, Campbell D, *et al.* Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs[J]. *Nature*, 1994, 368(6472): 643-648.
- [3] Lyman SD, Stocking K, Davison B, *et al.* Structural analysis of human and murine flt3 ligand genomic loci[J]. *Oncogene*, 1995, 11(6): 1165-1172.
- [4] Brasel K, McKenna HJ, Morrissey PJ, *et al.* Hematologic effects of flt3 ligand *in vivo* in mice[J]. *Blood*, 1996, 88(6): 2004-2012.
- [5] Fukuda S, Broxmeyer HE, Pelus LM. Flt3 ligand and the Flt3 receptor regulate hematopoietic cell migration by modulating the SDF-1alpha (CXCL12)/CXCR4 axis[J]. *Blood*, 2005, 105(8): 3117-3126.
- [6] Xu Z, Xu Y, Zhu J, *et al.* Recombinant human Flt3 ligand exerts both direct and indirect effects on hematopoiesis[J]. *Chin Med J (Engl)*. 2002, 115(2): 202-205.
- [7] Coates PT, Barratt-Boyes SM, Zhang L, *et al.* Dendritic cell subsets in blood and lymphoid tissue of rhesus monkeys and their mobilization with Flt3 ligand[J]. *Blood*, 2003, 102(7): 2513-2521.
- [8] Drouet M, Mourcin F, Grenier N, *et al.* Single administration of stem cell factor, FLT-3 ligand, megakaryocyte growth and development factor, and interleukin-3 in combination soon after irradiation prevents nonhuman primates from myelosuppression: long-term follow-up of hematopoiesis[J]. *Blood*, 2004, 103(3): 878-885.
- [9] Davis ID, Chen Q, Morris L, *et al.* Blood dendritic cells generated with Flt3 ligand and CD40 ligand prime CD8⁺ T cells efficiently in cancer patients[J]. *J Immunother*, 2006, 29(5): 499-511.
- [10] van den Broeke LT, Daschbach E, Thomas EK, *et al.* Dendritic cell-induced activation of adaptive and innate antitumor immunity [J]. *J Immunol*, 2003, 171(11): 5842-5852.
- [11] Shibagaki N, Udey MC. Dendritic cells transduced with protein antigens induce cytotoxic lymphocytes and elicit antitumor immunity [J]. *J Immunol*, 2002, 168(5): 2393-2401.
- [12] Manfra DJ, Chen SC, Jensen KK, *et al.* Conditional expression of murine Flt3 ligand leads to expansion of multiple dendritic cell subsets in peripheral blood and tissues of transgenic mice[J]. *J Immunol*, 2003, 170(6): 2843-2852.
- [13] Karsunky H, Merad M, Cozzio A, *et al.* Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3⁺ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3⁺ dendritic cells *in vivo*[J]. *J Exp Med*, 2003, 198(2): 305-313.
- [14] Kutzler MA, Weiner DB. Developing DNA vaccines that call to