

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.06.018

补体依赖细胞毒作用通路与利妥昔单抗耐药

Complement-dependent cytotoxicity pathway and rituximab resistance

金璿¹, 宋玉琴², 朱军^{2*} (1. 北京大学第一医院 肿瘤化疗科, 北京 100009; 2. 北京大学肿瘤医院 暨 北京市肿瘤防治研究所 淋巴瘤内科 恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室, 北京 100142)

[摘要] 利妥昔单抗是针对 B 细胞表面标志 CD20 抗原的单克隆抗体, 利妥昔单抗联合化疗显著改善了 B 细胞淋巴瘤患者的预后。但是仍有部分患者对利妥昔单抗治疗无效或在治疗有效后短期内复发, 说明利妥昔单抗联合化疗不足以彻底清除淋巴瘤细胞, 提示存在着一定的耐药性肿瘤细胞。补体依赖细胞毒作用(complement-dependent cytotoxicity, CDC) 是利妥昔单抗对淋巴瘤细胞的主要杀伤机制之一, CDC 作用通路中的任何一个环节异常都有可能影响利妥昔单抗的疗效。CD20 抗原是利妥昔单抗发挥作用的基础, CD20 抗原的表达强度、其编码基因的多态性以及其在细胞膜上的承载结构——脂质筏均可能影响 CDC 作用; 此外, 补体的基因多态性(如 *C1q*、*CD11b*)、血清补体水平及补体调节蛋白的水平均可能影响着 CDC 作用通路中的不同环节, 从而影响利妥昔单抗作用的发挥。随着利妥昔单抗的广泛应用, 对其耐药机制的研究日益深入。本文将对目前关于利妥昔单抗 CDC 作用通路中可能影响其疗效的主要因素进行综述。

[关键词] 利妥昔单抗; 非霍奇金淋巴瘤; 耐药机制; 补体依赖细胞毒作用; 补体

[中图分类号] R967; R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)06-0662-06

利妥昔单抗(rituximab)是一种针对 CD20 抗原的人鼠嵌合型单克隆抗体, 能够结合大多数 B 细胞非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL) 细胞表面的 CD20 抗原, 直接杀灭肿瘤细胞, 并对化疗有增敏作用。利妥昔单抗的应用使 CD20 阳性的 B 细胞 NHL(B-NHL) 患者的治疗有效率及生存期得到了显著改善, 但是仍有近 30% 的侵袭性 B-NHL 患者对治疗无效, 并且部分对利妥昔单抗治疗有效的患者在一定时间后出现复发, 提示部分 B-NHL 患者对利妥昔单抗存在耐药性。

基础研究^[1-2]显示, 利妥昔单抗主要通过以下生物学机制发挥抗肿瘤作用: 抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(antibody-dependent cell mediated cytotoxicity, ADCC)、补体依赖细胞毒作用(complement-dependent cytotoxicity, CDC) 以及直接诱导凋亡/抗肿瘤细胞增殖作用。这些作用通路中的任何一个环节异常都有可能影响利妥昔单抗的疗效。本文将重点阐述 CDC 作用通路中可能影响利妥昔单抗疗效的主要因素。

1 CDC 作用机制

补体是机体免疫防御系统的重要组成部分, 是抗体发挥免疫效应的主要机制之一, 并对免疫系统自身的功能具有调节作用。补体缺陷、功能障碍或过度活化与多种疾病的发生发展过程密切相关。

CDC 是指补体参与的细胞毒作用, 特异性抗体首先与细胞膜表面相应的抗原相结合, 抗体的 Fc 片段与 C1q 结合, 活化补体的各种激活途径, 形成 C3 转化酶及 C5 转化酶, 并最终形成膜攻击复合物, 插入细胞膜的膜攻击复合物通过破坏细胞膜局部磷脂双层而形成“渗漏斑”, 或形成穿膜的亲水性通道, 破坏局部磷脂双层, 最终导致靶细胞崩解。

目前已有多项证据^[3-5]证实, CDC 在利妥昔单抗治疗 B-NHL 中发挥重要作用。应用眼镜蛇毒因子中和补体可明显减弱利妥昔单抗在重症联合免疫缺陷、无胸腺裸鼠体内的抗肿瘤活性^[3]。在 C1q 缺陷的同源小鼠模型中, 利妥昔单抗的抗肿瘤作用完全消失^[4]。而去除巨噬细胞、NK 细胞和/或中性粒细胞等与 CDC 无关的细胞后, 利妥昔单抗的抗肿瘤活性并不受影响^[4-5]。

利妥昔单抗与靶点 CD20 抗原结合是发挥 CDC 作用的前提, C1q 是利妥昔单抗发挥 CDC 作用的启动因子, 在 CDC 活化通路中还有多种补体成分参与

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30973484)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 30973484)

[作者简介] 金璿(1979 -), 女, 北京市人, 硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤个体化治疗及转化型的研究。E-mail: jinxuan@medmail.com.cn

[通信作者] 朱军(ZHU Jun, correspondence author), E-mail: zj@bj-cancer.org

此过程,如补体调节蛋白。CD20、C1q 以及此生物学过程中的每一环节都有可能成为导致利妥昔单抗耐药的原因。

2 CDC 作用通路中的耐药机制

2.1 CD20 抗原

2.1.1 CD20 抗原的表达强度 细胞表面 CD20 抗原的表达密度在不同 B 细胞肿瘤中程度不同^[6-8],最初研究^[9]数据认为利妥昔单抗的疗效与之相关,然而随后的数项体外研究结果^[6,10-11]认为,CD20 抗原的表达水平仅与 CDC 介导的利妥昔单抗的抗肿瘤作用有关。Bellosillo 等^[10]发现,利妥昔单抗诱导的 CDC 效应与每个 B 细胞上的 CD20 抗原分子数相关。Manches 等^[6]的体外研究显示,所有实验细胞系对 ADCC、抗体介导的肿瘤细胞吞噬作用以及利妥昔单抗诱导的凋亡反应相同,但是肿瘤细胞表面 CD20 抗原及补体调节蛋白的表达程度影响 CDC 效应的强弱。van Meerten 等^[11]应用具有不同 CD20 抗原表达水平的同源转基因细胞系研究再一次证实,CD20 抗原的表达水平与利妥昔单抗经由 CDC 介导的杀伤作用有关,而与由 ADCC 介导的杀伤作用无显著相关性。通常,慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)的 CD20 抗原表达弱于其他类型 B 细胞淋巴瘤^[7-8],为弱阳性,而滤泡性淋巴瘤(follicular lymphoma, FL)为较强阳性。临床研究^[9]发现,标准剂量利妥昔单抗(375 mg/m²)单药治疗 CLL 的有效率低于 FL。Horvat 等^[8]采用流式细胞术检测发现,CD20 高表达者接受利妥昔单抗治疗后具有更长的总生存时间(overall survival, OS),似乎提示利妥昔单抗的疗效与 CD20 抗原表达强度相关。但是,在 CD20 抗原表达强度与 FL 相似甚至更高的弥漫大 B 细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)和套细胞淋巴瘤(mantle cell lymphoma, MCL)中,利妥昔单抗的有效率却低于 FL,这说明单纯 CD20 抗原表达强度并不能预测利妥昔单抗的疗效。而且,如果仅仅 CD20 抗原的表达强度就决定了利妥昔单抗的有效性,那么,理论上在其治疗后很可能会出现 CD20 阴性的 B-NHL 复发。然而,事实上至今仅有少数个案和小样本研究报道了 CD20 阳性 B-NHL 经利妥昔单抗治疗后出现 CD20 阴性表型 B-NHL 的发生^[12-14]。有体外实验^[15-16]表明,长期暴露于利妥昔单抗的细胞系,其 CD20 抗原的表达下调,并且这种下调可能源于 mRNA 水平下降和转录后修饰导致的 CD20 蛋白降解;还有学者^[14]发现,这种下调可

能与某些后天调控机制相关。Johnson 等^[17]的研究显示,接受 R-CHOP 方案治疗的 DLBCL 患者在疾病复发时应用流式细胞检测发现了 CD20 表达的下调,而免疫组化方法并未发现这一下降,同时这些患者再次应用 R-CHOP 方案治疗的生存期更差。从中不难看出,CD20 表达的检测方法对于研究结果具有重要影响,但迄今仍没有明确证据表明 CD20 抗原表达程度下调是导致利妥昔单抗耐药的原因。

2.1.2 CD20 基因突变或多态性 理论上推测,CD20 抗原基因的多态性或某些突变可能会影响 CD20 抗原的结构以及抗体与靶抗原的亲合性,导致利妥昔单抗与 CD20 抗原分子的结合出现异常,从而导致耐药发生。一项体外研究^[18]显示,若 CD20 抗原的 ANPS 或 YCYSI 蛋白序列发生突变,则会明显减弱利妥昔单抗与 CD20 抗原胞外区结合的能力。编码 CD20 抗原决定簇及第 3、4 穿膜结构域的基因位于 MS4A1 基因的外显子 5。Johnson 等^[19]收集了 264 例 DLBCL 患者的标本,检测 MS4A1 基因的外显子 5,发现无论是初诊还是复发后的标本,外显子 5 的基因突变均罕见,并且不是 R-CHOP 方案耐药的原因。Sar 等^[20]研究了 11 例 R-CHOP 方案治疗后 24 个月内疾病复发进展的 DLBCL 患者,并未发现 CD20 抗原基因多态性与 R-CHOP 方案的临床疗效间存在相关性。

但是一项日本的研究^[21]从 68 例接受利妥昔单抗治疗的 B-NHL 患者的淋巴结或骨髓中分离 CD19 阳性新鲜细胞,发现其中 12 例患者在 CD20 抗原第 3 个穿膜区域和胞质的 C 端结构域存在点突变,并且 C 端胞质结构域突变的患者其 CD20 抗原表达减弱,而穿膜区域突变者其 CD20 抗原表达增强。研究者指出,CD20 抗原的点突变可能导致利妥昔单抗耐药^[22]。该研究小组随后发表的另一项研究^[23]进一步证实,CD20 抗原 C 末端的缺失突变导致 CD20 抗原表达降低,并且可能与利妥昔单抗耐药或治疗后复发相关。然而,迄今尚无其他研究数据能够明确证实 CD20 抗原基因突变或多态性能够导致利妥昔单抗疗效下降。

2.1.3 脂质筏 CD20 抗原主要分布于细胞膜脂质筏的微绒毛上,CD20 抗原移行至脂质筏对于其与利妥昔单抗等 I 型抗 CD20 抗体的结合十分重要,并且抗体与靶抗原结合后,会在脂质筏上迅速重新分布,进一步触发多种信号转导过程^[24]。膜磷脂或胆固醇的含量可能会影响 I 型抗 CD20 抗体的疗效,其中神经节苷脂 GM1 在脂质筏的形成与稳定性上发挥了重要作用。GM1 已经成为脂质筏的标志。

Meyer 等^[25]研究发现, GM1 在 B-NHL 细胞表面的表达与其对利妥昔单抗的敏感性相关。这种差异不仅在不同类型 B-NHL 中观察到, 即使是同一类型 B-NHL 患者, 其表达水平也存在差异。另一项研究^[26]也发现, 在 B-NHL 细胞系中应用他汀类药物, 能够通过改变 CD20 抗原的构象, 减弱利妥昔单抗的 CDC 效应, 引发了脂质筏与利妥昔单抗疗效相关性的研究热潮。Ringshausen 等^[27]在体内及体外研究均发现, 在应用利妥昔单抗治疗的同时应用抗真菌药物伊曲康唑可减弱利妥昔单抗的抗肿瘤作用, 进一步分子水平的研究显示, 伊曲康唑不但抑制了 CD20 抗原向脂质筏移行, 还破坏了利妥昔单抗介导细胞死亡的关键步骤——钙离子内流; 而不具有上述两种作用的抗真菌药物卡泊芬净, 对利妥昔单抗的抗肿瘤作用没有影响。这一研究不但进一步阐明利妥昔单抗的作用机制, 还提示人们在应用单克隆抗体治疗时需谨慎调整合并用药。

2.2 补体基因多态性

2.2.1 *C1q* 基因多态性

C1 由 3 个亚单位组成, 分别是 *C1q*、*C1r* 和 *C1s*。*C1q* 是各种靶点(微生物、免疫复合物、凋亡和坏死细胞等)与 *C1* 结合的识别亚单位, 启动补体的经典激活途径。*C1q* 是由 6 个亚单位组成的六聚体, 每个亚单位由 A、B、C 三条不同的多肽链组成。编码 *C1qA* 的基因位于染色体 1p36.3 - p34.1, 共包含 3 个外显子, 其中较受关注的是 *C1qA* [276A/G]。2008 年, Racila 等^[28]首次报道 *C1qA* 基因多态性与利妥昔单抗治疗 FL 的疗效相关。该研究发现, 具有 A 等位基因的患者, 其完全缓解率(complete response, CR)及至疾病进展时间(time to progression, TTP)优于具有 G 等位基因的患者。在 Divi 等^[29]的报道中, 研究对象同样为惰性淋巴瘤(包括 FL 和边缘带淋巴瘤)患者, 但是却发现 *C1qA* [276A/G] 基因多态性与利妥昔单抗单药治疗的 CR 并无相关性。在 Colm 等^[30]的研究中, 受试对象为 115 例初治 DLBCL 患者, 结果发现 *C1qA* [276A/G] 基因多态性与患者一线 R-CHOP 方案治疗的无事件生存时间(progression free survival, PFS)及 OS 无相关性, 与迟发中性粒细胞减少的发生率亦无相关性。在欧美亚急性皮肤系统性红斑狼疮患者中开展的一项研究^[31]显示, 在患者及正常对照人群中, 携带有 *C1qA* [276A/A] 纯合子基因者, 其 *C1q* 蛋白水平显著降低, 而 Rafiq 等^[32]的研究显示, *C1qB* 基因多态性与 *C1q*、*C3* 及 *C4* 蛋白水平相关, 而并未发现 *C1qA* 基因多态性与系统性红斑狼疮患者的 *C1q* 蛋白水平具有相关性。在 B-NHL 患者中,

尚没有 *C1qB* 基因多态性的相关研究报道, 是否存在 *C1qA*、*C1qB* 基因多态性, 以及由其导致的 *C1q* 蛋白水平差异, 这种差异是否影响利妥昔单抗的抗肿瘤活性尚未可知。

2.2.2 *CD11b* 基因多态性

目前认为, 除了膜攻击复合物导致细胞裂解外, 活化的补体还可通过其他途径发挥作用。*CD11b* 在利妥昔单抗介导的 CR3-ADCC 效应中具有重要作用。有研究^[33]提出, *CD11b* 基因的多态性可能与利妥昔单抗治疗后 FL 患者的无进展生存期(progression free survival, PFS)有关, 但是相关数据尚未正式发表。另外, 除了疗效, 补体活化可能与利妥昔单抗治疗的某些不良反应相关。van der Kolk 等^[34]研究发现, 静脉滴注利妥昔单抗后患者体内的补体被迅速活化, 进而导致细胞因子释放, 这种补体活化水平不仅与治疗前患者体内循环 B 细胞的数量有关, 还与患者出现不良反应的严重性有关。

2.3 补体水平

血清补体水平对利妥昔单抗疗效的影响尚不明确。CLL 患者的细胞及体液免疫功能均受损, 常合并低补体血症, 易出现严重感染或合并自身免疫性疾病。因此, 目前关于补体水平与利妥昔单抗疗效的研究主要集中于 CLL 患者。Kennedy 等^[35]发现, 静脉滴注利妥昔单抗后, CLL 患者体内的补体水平快速下降, 并因此推测补充补体有可能增强利妥昔单抗的 CDC 作用。新鲜冰冻血浆(fresh frozen plasma, FFP)富含补体蛋白, Klepfish 等^[36]首次报道了利妥昔单抗联合 FFP 输注治疗复发难治的 CLL 患者并取得良好疗效。随后几个小样本研究^[37-38]显示, FFP 联合利妥昔单抗治疗复发难治的 CLL 患者取得良好疗效。这些研究均表明, 补体系统在利妥昔单抗治疗 CLL 的抗癌作用中确实发挥了一定作用, 并且通过提高补体蛋白水平可增强利妥昔单抗的疗效。但目前仅限于 CLL 患者的小样本研究, 在其他 B-NHL 患者中是否也存在类似状况尚不得而知。

2.4 补体调节蛋白

补体的细胞溶解作用不仅取决于其活化程度, 也受膜补体调节蛋白(membrane complement regulatory proteins, mCRP)表达水平的影响, 特别是受到补体抑制因子(如膜辅助因子蛋白 CD46、衰减加速因子 CD55 和膜溶解反应抑制因子 CD59)的调节。mCRP 在大部分肿瘤细胞上均有表达, 其表达程度可能与肿瘤细胞分化阶段、肿瘤微环境或间质细胞等因素有关。日本学者研究^[39]显示, 对利妥昔单抗

耐药的 B 细胞 NHL 细胞系 Raji 和 Ramos 与利妥昔单抗及正常人血清共同培养后,出现补体调节因子 CD55 和 CD59 的上调,同时伴随 CD20 的下调。Weng 等^[40]在 29 名接受利妥昔单抗治疗的滤泡性淋巴瘤患者中检测 CD46、CD55 和 CD59 的表达,发现其表达强度均与治疗疗效无相关性。而另一项样本量相当的研究^[41]发现,在获得 CR 的患者中具有 CD46 与 CD59 高表达,在具有大包块患者中 CD55 和 CD59 表达更高。关于补体抑制因子的表达能否预测利妥昔单抗抗肿瘤效应的研究结果尚未达成一致,并且多为小样本研究,值得进一步探索。

如果 mCRP 在利妥昔单抗作用通路中发挥作用,那么它可能成为改善利妥昔单抗耐药的作用位点。有研究^[42]显示,在 B-NHL 细胞系中,补体抑制因子 CD55 和 CD59 的表达与利妥昔单抗诱导的补体溶解细胞作用抵抗相关,并且应用单克隆抗体中和 CD59 后可逆转这种对补体溶解细胞作用的抵抗。福达拉滨是一种核苷类似物,主要用于惰性淋巴瘤的治疗。有报道^[43]认为该药能够下调 CD55 的表达,是利妥昔单抗联合福达拉滨获得良好疗效的原因之一。体外^[44]及体内^[45]研究显示,针对 CD55 和 CD59 的改良抗体能够显著增加利妥昔单抗的抗肿瘤活性。另外,也有研究^[46]应用 siRNA 转染技术抑制 CD55 表达后,减弱了 B 细胞淋巴瘤细胞系对利妥昔单抗的补体介导细胞溶解作用的抵抗。但是,这些方法尚未应用于临床。新近关于 CD59 抑制剂 rILYd4 的研究成为热点,几项体外研究^[47-49]证实,应用 CD59 抑制剂能够增强利妥昔单抗耐药淋巴瘤和 CLL 细胞系中利妥昔单抗介导的 CDC 效应,从而增加利妥昔单抗的抗肿瘤效应。或许,rILYd4 将成为肿瘤免疫治疗的新成员。

另外,Manches^[6]等的体外研究发现,不同的 B-NHL 细胞对利妥昔单抗诱导的 CDC 反应不同,CD20 抗原表达率与补体抑制物(complement inhibitor, CI)表达率的比值能够预测 CDC 的敏感性,其中 FL 细胞最敏感,而 MCL 细胞敏感性最差。这些数据可部分解释 FL 与 MCL 对利妥昔单抗敏感性的差异,尽管这两种类型淋巴瘤的 CD20 抗原均呈高表达,但是 MCL 的 CI 值明显高于 FL。但是这些体外研究数据尚不能预测利妥昔单抗的临床疗效。

3 结 语

尽管利妥昔单抗的广泛应用显著改善了 B-NHL 患者的预后,但仍有部分患者不能从中获益。迄今,利妥昔单抗的确切耐药机制仍未阐明,对其耐

药机制的研究不但能够帮助人们寻找到预测疗效和指导治疗策略的分子标志物,进一步提高靶向药物的疗效;而且可据此开发新的、更具特异性的靶向药物。同时,临床也能够早期甄别出有效人群,使得部分患者避免不必要的治疗,实现真正意义的个体化治疗。CDC 是利妥昔单抗发挥抗肿瘤作用的重要机制之一,因而其中可能存在该药物的重要耐药机制,是 B-NHL 研究的热点问题之一,但是大量的基础研究结果还需要与临床数据相结合,才能更明确的阐明利妥昔单抗的耐药机制。

[参 考 文 献]

- [1] Reff ME, Carner K, Chambers KS, et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20 [J]. *Blood*, 1994, 83(2): 435-445.
- [2] Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2000, 48(12): 673-683.
- [3] Cragg MS, Glennie MJ. Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents [J]. *Blood*, 2004, 103(7): 2738-2743.
- [4] Di Gaetano N, Cittera E, Nota R, et al. Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo [J]. *J Immunol*, 2003, 171(3): 1581-1587.
- [5] Golay J, Cittera E, Di Gaetano N, et al. The role of complement in the therapeutic activity of rituximab in a murine B lymphoma model homing in lymph nodes [J]. *Haematologica*, 2006, 91(2): 176-183.
- [6] Manches O, Lui G, Chaperot L, et al. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas [J]. *Blood*, 2003, 101(3): 949-954.
- [7] Prevodnik VK, Lavrenčak J, Horvat M, et al. The predictive significance of CD20 expression in B-cell lymphomas [J]. *Diagn Pathol*, 2011, 6: 33.
- [8] Horvat M, Kloboves Prevodnik V, Lavrenčak J, et al. Predictive significance of the cut-off value of CD20 expression in patients with B-cell lymphoma [J]. *Oncol Rep*, 2010, 24(4): 1101-1107.
- [9] McLaughlin P, Grillo-López AJ, Link BK, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: Half of patients respond to a four-dose treatment program [J]. *J Clin Oncol*, 1998, 16(8): 2825-2833.
- [10] Bellosillo B, Villamor N, López-Guillermo A, et al. Complement-mediated cell death induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders is mediated *in vitro* by a caspase-independent mechanism involving the generation of reactive oxygen species [J]. *Blood*, 2001, 98(9): 2771-2777.
- [11] van Meerten T, van Rijn RS, Hol S, et al. Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(13): 4027-4035.

- [12] Kennedy GA, Tey SK, Cobcroft R, et al. Incidence and nature of CD20- negative relapses following rituximab therapy in aggressive B cell non-Hodgkin's lymphoma: A retrospective review [J]. *Br J Haematol*, 2002, 119(2): 412-416.
- [13] Ferreri AJ, Dognini GP, Verona C, et al. Re-occurrence of the CD20 molecule expression subsequent to CD20- negative relapse in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Haematologica*, 2007, 92(1): e1-2.
- [14] Hiraga J, Tomita A, Sugimoto T, et al. Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab containing combination chemotherapies: Its prevalence and clinical significance [J]. *Blood*, 2009, 113(20): 4885-4893.
- [15] Rawal YB, Nuovo GJ, Frambach GE, et al. The absence of CD20 messenger RNA in recurrent cutaneous B-cell lymphoma following rituximab therapy [J]. *J Cutan Pathol*, 2005, 32(9): 616-621.
- [16] Czuczman MS, Olejniczak S, Gowda A, et al. Acquisition of rituximab resistance in lymphoma cell lines is associated with both global CD20 gene and protein down-regulation regulated at the pre-transcriptional and posttranscriptional levels [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(5): 1561-1570.
- [17] Johnson NA, Boyle M, Bashashati A, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: Reduced CD20 expression is associated with an inferior survival [J]. *Blood*, 2009, 113(16): 3773-3780.
- [18] Binder M, Otto F, Mertelsmann R, et al. The epitope recognized by rituximab [J]. *Blood*, 2006, 108(6): 1975-1978.
- [19] Johnson NA, Leach S, Woolcock B, et al. CD20 mutations involving the rituximab epitope are rare in diffuse large B-cell lymphomas and are not a significant cause of R-CHOP failure [J]. *Haematologica*, 2009, 94(3): 423-427.
- [20] Sar A, Perizzolo M, Stewart D, et al. Mutation or polymorphism of the CD20 gene is not associated with the response to R-CHOP in diffuse large B cell lymphoma patients [J]. *Leuk Res*, 2009, 33(6): 792-797.
- [21] Terui Y, Mishima Y, Yokoyama M, et al. Point mutation of C-terminal region of CD20 molecule predicts rituximab- induced complement- dependent cytotoxicity and clinical response to rituximab in non- Hodgkin's lymphoma [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(18s): 7563.
- [22] Terui Y, Hatake K. Resistance to rituximab and CD20 mutation [J]. *Nihon Rinsho*, 2007, 65(Suppl 1): 416-423.
- [23] Terui Y, Mishima Y, Sugimura N, et al. Identification of CD20 C-terminal deletion mutations associated with loss of CD20 expression in non-Hodgkin's lymphoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(7): 2523-2530.
- [24] Deans JP, Li H, Polyak MJ. CD20-mediated apoptosis: Signaling through lipid rafts [J]. *Immunology*, 2002, 107(2): 176-182.
- [25] Meyer zum Büschenfelde C, Feuerstacke Y, Götze KS, et al. GMI expression of non- Hodgkin's lymphoma determines susceptibility to rituximab treatment [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(13): 5414-5422.
- [26] Winiarska M, Bil J, Wilczek E, et al. Statins impair antitumor effects of rituximab by inducing conformational changes of CD20 [J]. *PLoS Med*, 2008, 5(3): e64.
- [27] Ringshausen I, Feuerstacke Y, Krainz P, et al. Antifungal therapy with itraconazole impairs the anti-lymphoma effects of rituximab by inhibiting recruitment of CD20 to cell surface lipid rafts [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(11): 4292-4296.
- [28] Racila E, Link BK, Weng WK, et al. A polymorphism in the complement component C1qA correlates with prolonged response following rituximab therapy of follicular lymphoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(20): 6697-6703.
- [29] Cornec D, Tempescul A, Querellou S, et al. Identification of patients with indolent B cell lymphoma sensitive to rituximab monotherapy [J]. *Ann Hematol*, 2012, 91(5): 715-721.
- [30] Keane C, Nourse JP, Crooks P, et al. Homozygous FCGR3A-158V alleles predispose to late onset neutropenia after CHOP- R for diffuse large B- cell lymphoma [J]. *Intern med J*, 2012, 42(10): 1113-1119.
- [31] Racila DM, Sontheimer CJ, Sheffield A, et al. Homozygous single nucleotide polymorphism of the complement C1QA gene is associated with decreased levels of C1q in patients with subacute cutaneous lupus erythematosus [J]. *Lupus*, 2003, 12(2): 124-132.
- [32] Ratiq S, Frayling TM, Vyse TJ, et al. Assessing association of common variation in the C1Q gene cluster with systemic lupus erythematosus [J]. *Clin Exp Immunol*, 2010, 161(2): 284-289.
- [33] Cartron G, Trappe RU, Solal-Céligny P, et al. Interindividual variability of response to rituximab: from biological origins to individualized therapies [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(1): 19-30.
- [34] van der Kolk LE, Grillo- López AJ, Baars JW, et al. Complement activation plays a key role in the side- effects of rituximab treatment [J]. *Br J Haematol*, 2001, 115(4): 807- 811.
- [35] Kennedy AD, Beum PV, Solga MD, et al. Rituximab infusion promotes rapid complement depletion and acute CD20 loss in chronic lymphocytic leukemia [J]. *J Immunol*, 2004, 172(5): 3280-3288.
- [36] Klepfish A, Schattner A, Ghoti H, et al. Addition of fresh frozen plasma as a source of complement to rituximab in advanced chronic lymphocytic leukaemia [J]. *Lancet Oncol*, 2007, 8(4): 361-362.
- [37] Klepfish A, Gilles L, Loannis K, et al. Enhancing the action of rituximab in chronic lymphocytic leukemia by adding fresh frozen plasma: Complement/rituximab interactions & clinical results in refractory CLL [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1173: 865-873.
- [38] Xu W, Miao KR, Zhu DX, et al. Enhancing the action of rituximab by adding fresh frozen plasma for the treatment of fludarabine refractory chronic lymphocytic leukemia [J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(9): 2192-2201.
- [39] Takei K, Yamazaki T, Sawada U, et al. Analysis of changes in CD20, CD55, and CD59 expression on established rituximab- resistant B- lymphoma cell lines [J]. *Leuk Res*, 2006, 30(5): 625-631.
- [40] Weng WK, Levy R. Expression of complement inhibitors CD46, CD55, and CD59 on tumor cells does not predict clinical outcome after rituximab treatment in follicular non-Hodgkin lymphoma [J]. *Blood*, 2001, 98(5): 1352-1357.
- [41] Dzięcień J, Wróbel T, Mazur G, et al. Expression of comple-

- ment regulatory proteins: CD46, CD55, and CD59 and response to rituximab in patients with CD20⁺ non-Hodgkin lymphoma [J]. *Med Oncol*, 2010, 27(3): 743-746.
- [42] Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T, et al. Biologic response of B lymphoma cells to anti- CD20 monoclonal antibody rituximab *in vitro*: CD55 and CD59 regulate complement- mediated cell lysis [J]. *Blood*, 2000, 95(12): 3900-3908.
- [43] Di Gaetano N, Xiao Y, Erba E, et al. Synergism between fludarabine and rituximab revealed in a follicular lymphoma cell line resistant to the cytotoxic activity of either drug alone [J]. *Br J Haematol*, 2001, 114(4): 800-809.
- [44] Ziller F, Macor P, Bulla R, et al. Controlling complement resistance in cancer by using human monoclonal antibodies that neutralize complement- regulatory proteins CD55 and CD59 [J]. *Eur J Immunol*, 2005, 35(7): 2175-2183.
- [45] Macor P, Tripodo C, Zorzet S, et al. *In vivo* targeting of human neutralizing antibodies against CD55 and CD59 to lymphoma cells increases the antitumor activity of rituximab [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(21): 10556-10563.
- [46] Terui Y, Sakurai T, Mishima Y, et al. Blockade of bulky lymphoma- associated CD55 expression by RNA interference overcomes resistance to complement- dependent cytotoxicity with rituximab [J]. *Cancer Sci*, 2006, 97(1): 72-79.
- [47] You T, Hu W, Ge X, et al. Application of a novel inhibitor of human CD59 for the enhancement of complement- dependent cytotoxicity on cancer cells [J]. *Cell Mol Immunol*, 2011, 8(2): 157-163.
- [48] Hu W, Ge X, You T, et al. Human CD59 inhibitor sensitizes rituximab- resistant lymphoma cells to complement- mediated cytotoxicity [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(6): 2298-2307.
- [49] Ge X, Wu L, Hu W, et al. rILYd4, a human CD59 inhibitor, enhances complement- dependent cytotoxicity of ofatumumab against rituximab- resistant B- cell lymphoma cells and chronic lymphocytic leukemia [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(21): 6702-6711.
- [收稿日期] 2012-06-27 [修回日期] 2012-10-12
[本文编辑] 王莹

· 科技动态 ·

I 型干扰素诱导沙门菌感染的巨噬细胞发生坏死性凋亡

固有免疫是控制病原体感染的关键, I 型干扰素(IFN- α 和 IFN- β)在抗病毒感染中发挥关键作用,但其在抗细菌感染中的作用却因不同的实验模型而异, I 型干扰素能控制 b 族链球菌、肺炎链球菌和大肠杆菌的感染,但却促进李斯特菌的感染。

沙门菌是一种能诱导宿主快速死亡的病原体,其已经进化出一种能逃避宿主固有免疫反应的机制。论文作者将沙门菌通过尾静脉注射到小鼠体内,发现 I 型干扰素受体缺陷小鼠的生存期较野生型小鼠长,这主要是由于缺陷小鼠体内有更多的 F4/80⁺ CD11b⁺ 双阳性巨噬细胞,而缺陷型或野生型巨噬细胞本身对沙门菌的清除能力并没有差别。随后作者发现,沙门菌感染可诱导 I 型干扰素信号活化,促进野生型巨噬细胞发生坏死性凋亡,而非经典的细胞凋亡。I 型干扰素受体缺陷型小鼠巨噬细胞可分泌较多的 IL-1 β ,但用 IL-1 β 抗体阻断 IL-1 β 信号通路,并不能抑制野生型巨噬细胞的坏死性凋亡,提示 I 型干扰素信号活化诱导的巨噬细胞坏死性凋亡与 IL-1 β 无关。此外, I 型干扰素受体缺陷型小鼠巨噬细胞在炎症复合体激活方面与野生型小鼠的巨噬细胞也基本一致。进一步研究发现, IFN- β 抗体可显著抑制野生型巨噬细胞的坏死性凋亡,且这种效应主要依赖于 RIP1 激酶的活化。沙门菌感染巨噬细胞后,可诱导 RIP1 磷酸化,促进 RIP3 的表达,导致野生型巨噬细胞坏死性凋亡。IFN- β 与其受体结合后,能激活 RIP1,促进 RIP1 激酶与 I 型干扰素受体的结合,诱导巨噬细胞发生坏死性凋亡。作者进一步用 RIP3 缺陷小鼠研究巨噬细胞坏死性凋亡在沙门菌感染中的作用,发现 RIP3 缺陷的巨噬细胞具有抗坏死性凋亡的作用。RIP3 缺陷小鼠的生存期和细胞因子分泌量与野生型小鼠无差异,但 RIP3 缺陷小鼠具有更多的 F4/80⁺ CD11b⁺ 双阳性巨噬细胞。将 RIP3 缺陷的巨噬细胞过继回输到野生型小鼠后,能显著提高野生型小鼠抗沙门菌感染的能力。

综上所述,沙门菌感染巨噬细胞后能诱导 I 型干扰素的产生, I 型干扰素与其受体结合后能招募和活化 RIP1 和 RIP3 激酶,诱导巨噬细胞发生坏死性凋亡,使沙门菌逃避固有免疫的监视,有助于沙门菌自身的扩增繁殖。

[郑青亮 摘译, 侯晋 校阅. Robinson N, McComb S, Mulligan R, et al. *Nat Immunol*, 2012, 13(10): 954-962.]