

## 热点评析

## 肿瘤免疫耐受——树突状细胞的免疫耐受

郭礼和

第七期“热点评析”栏目谈了肿瘤细胞本身的免疫学特性<sup>[1]</sup>,说明肿瘤细胞具有“免疫逃逸功能”,不受患者体内免疫系统的监督。这仅说明肿瘤免疫耐受的一个方面,更为重要的是患者自身免疫系统在肿瘤及其周围基质细胞的影响和调教下产生了对肿瘤的退让、和平共处、甚至助纣为虐的作用。例如,髓样细胞(包括骨髓间充质细胞)不仅为肿瘤创造了免疫耐受环境,而且也为肿瘤干细胞转移营造了低氧、免疫隔离的“安乐窝”(小龕, niche):单核细胞/巨噬细胞大量存在于肿瘤的原发灶和转移灶内,为制造肿瘤免疫耐受状态,促进肿瘤增殖、侵袭、外渗、转移和血管形成起到了重要作用<sup>[2]</sup>。同样,树突状细胞(dendritic cells, DC)和淋巴细胞也为肿瘤的生长、转移和免疫耐受等起到了重要促进作用。本文将对DC的免疫耐受及其在肿瘤“免疫逃避”机制中的作用重点给予阐述。

DC在免疫系统中是主要的专业抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC),直接和/或间接引起T细胞和B细胞的免疫应答。近年来研究发现,DC不仅是最强的抗原递呈细胞,而且也具有调节免疫反应、诱导免疫耐受的作用,而且越来越多的证据显示外周DC具有先天的遗传耐受特性(inherent tolerogenicity)。DC如何诱导外周免疫耐受的机制研究,已经越来越多地受到人们的重视,因为这对自身免疫性疾病、移植排斥、过敏性疾病以及更为人们重视的肿瘤治疗具有重要、甚至决定性的意义。

## 1 DC的分类和作用

DC可分为多种不同功能的亚群,虽然各亚群的起源和分化过程尚未完全清楚,但普遍认为每个亚群有自己独立的分化过程。人体内的DC主要分为两类:髓系DC(myeloid DC, mDC)和淋巴系DC(lymphoid DC, pDC)。mDC主要来源于骨髓CD34<sup>+</sup>细胞,也可用IL-4、GM-CSF和TNF- $\alpha$ 促使血液中的单核细胞转化而来,然后经CD40L或内毒素(LPS)刺激而

成熟。pDC来源于血液和扁桃体中的一种浆细胞样细胞,在IL-3的作用下转变成未成熟DC,经CD40L作用成熟为pDC。按功能的不同可将DC分为DC1和DC2。DC1可分泌大量IL-12、TNF- $\alpha$ 和少量IL-6,诱导Th(辅助性T细胞,初始CD4<sup>+</sup>T细胞)向Th1分化(具有促使初始CD8<sup>+</sup>T细胞形成CTL效应细胞的功能);而DC2可分泌大量IL-6和少量IL-12,诱导Th(初始CD4<sup>+</sup>T细胞)向Th2分化(具有促使B淋巴细胞激活分泌抗体的功能)。

DC在接受外源抗原刺激之前处于未成熟阶段,这时的DC具有很强的抗原摄取和加工能力,然后转化为成熟的DC。只有成熟的DC才能诱导初始的CD4<sup>+</sup>T细胞分化为Th1或Th2。DC的成熟涉及以下几个过程:首先,DC前体细胞通过血液进入非淋巴组织发育成未成熟的DC;然后,接受抗原、病原体模式分子(例如LPS等)和细胞因子等的刺激;之后再分化为成熟的DC,并分布于二级淋巴组织。

未成熟的DC(imDC)起着重要的免疫监视作用,这是通过抗原摄取、加工、处理和递呈,以及其表面存在Toll样受体的感应来实现。成熟DC的膜上高表达以下几种分子:MHC-I和II类分子, B7-1/B7-2共刺激分子(协同刺激分子CD80和CD86),黏附分子CD40、CD44和CD54,整合素 $\beta$ 1、 $\beta$ 2及特征性标记CD83等。这类分子对初始淋巴细胞有着强大的免疫刺激能力,能激活淋巴细胞。

DC在调节免疫反应中起着双重作用:一方面,DC在固有免疫反应和适应性免疫反应中起着触发和调节的关键作用;另一方面,DC也能够诱导T细胞无能(耐受)或/和促使调节型T细胞生成(抑制淋巴细胞的激活),产生免疫耐受,尤其在肿瘤患者体内更是如此。

## 2 DC诱导免疫耐受的机制

### 2.1 DC的成熟程度及状态与免疫耐受的关系

DC的成熟程度及状态决定其诱导的免疫应答

成为何种类型和反应激烈程度。成熟的DC诱导的免疫应答主要为激活反应(正向反应)。正常情况下体内大多数DC处于非成熟状态,其表面表达低水平的MHC分子,几乎不表达CD40、CD80、CD86、ICAM1等激活T细胞所必需的辅助分子。未成熟的DC具有很强的抗原摄取、加工能力,但由于缺乏多种共刺激分子不能使T细胞活化,若刺激初始T细胞反而会导致T细胞无能或低反应,造成免疫耐受状态。同时,未成熟的DC主要分泌IL-10,抑制免疫应答反应。另外,由于未成熟的DC表面缺乏第二信号刺激分子表达,可导致抗原特异性的T细胞发生无能或凋亡,从而诱导抗原特异性的免疫耐受。

## 2.2 DC成熟程度与调节型T细胞形成相关

2009年3月, *Journal of Immunology* 杂志发表了英国皇家医学研究院炎症研究中心Dumitriu等<sup>[3]</sup>的研究论文,该研究证实,肿瘤细胞能够诱使DC分泌TGF- $\beta$ ,并下调成熟DC表面CD86、HLA-DR的表达,变为不成熟的DC。此种不成熟的DC可诱导初始CD4<sup>+</sup>T细胞分化为具有免疫抑制作用的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>调节型T细胞(Treg),使机体对肿瘤细胞产生免疫耐受。若将未成熟的DC体外与人肺癌细胞(LCCs)共温育后,DC细胞TGF- $\beta$ 表达明显上调;在细胞培养上清中,能够检测到大量TGF- $\beta$ 蛋白。流式细胞仪检测显示,肿瘤细胞能够下调成熟DC表面CD86、HLA-DR的表达。将LCCs与成熟DC相互作用,LCCs不仅能够下调成熟DC的CD86表达,还能够抑制DC分泌IL-12。而且,LCCs能够使成熟的DC转化为分泌TGF- $\beta$ 的DC。这些分泌TGF- $\beta$ 的DC与CD4<sup>+</sup>T细胞相互作用后,CD4<sup>+</sup>T细胞的激活、增殖、分化受到抑制,也就不能分化成Th1,对肿瘤细胞最主要的杀伤效应细胞CTL形成受到抑制。由此可见,肿瘤可以逆转成熟DC变为不成熟的DC,而不成熟的DC可以诱导初始CD4<sup>+</sup>T细胞成为CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>调节型T细胞,进而抑制Th1和CTL形成。这就是肿瘤组织通过诱导DC不成熟,从而产生免疫耐受,逃避患者体内免疫系统的监督的主要机制。

在体外用单核细胞来源的不成熟DC刺激初始CD4<sup>+</sup>T细胞,也可导致调节型T细胞(Treg细胞)产生。这种Treg细胞能抑制Th1细胞的分化和增殖,间接阻断具有杀伤肿瘤细胞能力的CTL细胞形成。这种抑制作用是通过细胞接触的方式形成的,也就是这种抑制具有抗原特异性。

DC与Treg的相互作用是一个双向的过程。体外实验发现:在DC周围聚集能力方面,Treg比初始CD4<sup>+</sup>T细胞有着更强的能力。这种聚集的Treg可以通过特异下调DC共刺激分子CD80、CD86的表达来抑制DC成熟,从而强化免疫负向调节作用。在肿瘤患者体内通常是针对肿瘤细胞的抗原产生免疫耐受。所以,肿瘤患者体内的T细胞杀伤活性的降低是由于特异性的Treg细胞数量上升造成的,提示DC在肿瘤免疫调节方面发挥了重要作用。

DC诱导产生效应性T细胞(Th1或Th2)还是调节性T细胞(Treg)很大程度上取决于静息的、不成熟的DC与活化的、成熟的DC之间的比例。不成熟的DC可以通过诱导Treg的形成来介导免疫耐受,但是Treg细胞在外周的功能维持却依赖于成熟的抗原递呈细胞(APC),尤其是DC对抗原的递呈。此外,Treg细胞的动态平衡依赖于CD154和CD28参与的信号途径。在缺乏炎性刺激的情况下,CD154和CD28的配体CD40和CD80/CD86只在成熟的DC上表达,不在其他抗原递呈细胞(例如:巨噬细胞、B细胞或者上皮细胞)上表达。因此,成熟DC在调控外周T细胞耐受中也起了一定作用。有报道提出,成熟DC在一定的条件下也可以诱导调节性CD4<sup>+</sup>T细胞的产生。关于调节性T细胞在肿瘤免疫耐受方面的问题,有待后续专题文章作进一步讨论。

## 2.3 自身抗原的免疫耐受

人体如何防止对自身抗原的免疫反应?1975年,著名免疫学家Burnet提出了克隆选择学说,并以克隆清除学说解释自身免疫耐受现象。胚胎发育期,T细胞在胸腺内发育所遇到的都是自身抗原,机体通过克隆选择保存那些不识别自身抗原的T细胞,同时清除那些识别自身抗原的T细胞,故而产生自身抗原的免疫耐受。但是这种清除并不彻底,极少数能识别自身抗原的残余T细胞可通过自身凋亡细胞释放大量抗原来引发免疫耐受。

DC通过细胞的巨胞饮作用(macropinocytosis)或和甘露糖受体介导的内吞作用,将自身凋亡细胞释放的大分子摄入到DC内,经过抗原加工与MHC-II结合形成抗原复合物。同时,表达的趋化因子受体CCR7会升高,促使DC向淋巴结迁移。然后,DC从外周迁移到二级淋巴组织,在那里发育成熟,也就是把MHC抗原复合物递呈到细胞表面,上调细胞表面的共刺激分子(如CD80和CD86)和其它黏附分子

(如CD40、核因子B受体激活子(RANK)、CD54和CD58)。这一成熟过程可使DC转变为强大的专职抗原递呈细胞,从而激活能识别自身抗原的残余CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞。激活的淋巴细胞寿命较短,过几天后就会被机体清除掉。由于自身抗原量大,残余的T淋巴细胞数量较少,很容易被耗竭,故而机体最终获得自身抗原的彻底免疫耐受。利用大量原来耗竭识别自身抗原的特异性淋巴细胞,这在自身免疫病的临床治疗上已有应用(例如类风湿关节炎)。在肿瘤患者体内,由于肿瘤长得太大,造成肿瘤组织内部得不到足够营养供应而坏死,或者因治疗(化疗或放疗)引发肿瘤组织细胞大量死亡,由此释放大量的肿瘤抗原,导致识别肿瘤抗原的特异性淋巴细胞被耗竭;或者,因不成熟的DC吞噬了大量的肿瘤抗原,引发了识别肿瘤抗原的特异性淋巴细胞的无能或死亡。上述因素都可能引发肿瘤免疫耐受。至今对这些问题研究甚少,值得科学家和临床医生慎重考虑。

### 3 细胞核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)调节DC的耐受性

从DC诱导免疫耐受的机制出发,抑制DC成熟或诱导成熟的DC逆转都可产生免疫耐受的调节型DC。一些抗炎剂(如皮质醇类、水杨酸类)、免疫抑制剂、细胞因子(如TGF- $\beta$ 和IL-10)和维生素D3衍生物都有抑制DC成熟的作用。已有研究证明阿司匹林能够抑制DC的CD80和CD86表达,故而它能抑制DC成熟,引发T细胞耐受,减少血管粥样斑块周围的T淋巴细胞聚集。阿司匹林能在体外促进未成熟的骨髓来源的CD11c<sup>+</sup>DC数量增加,注射到鼠的皮下,这些细胞并不诱导细胞介导的接触性超敏反应。这是因为这些DC的NF- $\kappa$ B并未被活化,证明NF- $\kappa$ B的活化对DC的成熟起着非常重要的作用。肿瘤和癌旁组织大量分泌IL-6、IL-10、TGF- $\beta$ 、HGF、NO等细胞因子,这些因子都可抑制NF- $\kappa$ B的活化,故而肿瘤患者体内存在大量不成熟的DC也就不足为怪了。

### 4 Toll样受体(TLRs)与DC的免疫耐受

Toll样受体不仅在肿瘤细胞中广泛表达,在DC中也广泛存在并起着重要的调节作用。激活肿瘤细胞TLRs不仅可促进肿瘤细胞增殖和抵抗凋亡,而且可通过调节金属蛋白酶和整合素增强肿瘤细胞的侵袭和转移。此外,激活肿瘤细胞的TLRs可诱导促炎

性因子和免疫抑制分子合成,从而引导DC产生免疫耐受,增强肿瘤细胞免疫逃逸。

肿瘤细胞可以阻断TLRs介导的DCs成熟,这是肿瘤逃避机体免疫监视的另一机制。病原体引发DC成熟是通过TLRs信号通路,故而阻断TLRs信号通路就能够阻断DC的成熟。Idoyaga等<sup>[4]</sup>发现,HPV-16 E6/E7和c-H-ras基因共感染的小鼠肺上皮肿瘤细胞能干扰poly(I:C)和LPS触发的小鼠DC成熟。阻断DC的TLR3和TLR4信号通路就能抑制MHCII、CD40、CD86及细胞因子(IL-12、TNF- $\alpha$ 和IL-6)在DC内的表达。更重要的是,即使用TLRs配体刺激,肿瘤细胞仍然能够诱导体内DC的第二信号刺激抑制性分子(B7-DC、B7-H1)的表达,从而阻断T细胞的第二信号刺激,造成T细胞耐受。此外,他们还发现DC与肿瘤细胞共同温育一定时间后,DC对TLRs的配体刺激不发生应答。

Dummer等<sup>[5]</sup>发现TLR7配体——米喹莫特可募集肿瘤区域的pDC,增加I型IFN的分泌,形成炎症环境致使肿瘤退化。而且可通过瘤内注射CpG基序来激活DC的TLR9信号通路,逆转DC的免疫耐受,这可能成为治疗基底细胞癌和黑色素瘤转移灶的一种新策略。

### 5 启动DC上的TLRs信号通路,可调节Treg和效应T细胞之间的平衡

TLRs信号通路在DC启动固有免疫和适应性免疫方面有着至关重要的作用,但并不清楚TLRs对CD4<sup>+</sup>Treg的功能调节是否有作用? Treg不仅能抑制初始T细胞或效应T细胞的增殖和抗原特异性效应T细胞的IL-2分泌,而且也抑制DC的成熟,并诱导DC的吲哚胺2,3-双加氧酶(IDO,一种免疫抑制剂)的表达。刺激DC上的CD40和TLRs可以将不成熟的DC从Treg抑制状态释放出来。同样,在体外或体内用CpG或IL-10受体的抗体来刺激DC,可以逆转DC免疫耐受状态。虽然,用CpG或LPS来刺激DC上的TLRs信号通路可以解除Treg介导的免疫耐受状态,但用TLRs的配体刺激DC也可以明显提高初始T细胞和效应T细胞的增殖,并排除Treg对这些细胞的抑制。TLRs信号通路能促进DC成熟,但也能够促进Treg的增殖。然而,用LPS来刺激人的DC并不足以激活初始的CD4<sup>+</sup>T细胞增殖,说明TLR-4(LPS的受体)单独并不能逆转DC的免疫耐受状态。目前已知

逆转DC的免疫耐受状态, 可以通过激活TLR-7/8和TLR-9信号通路来实现。同时, 解除Treg的免疫抑制, 也是靠TLR-7/8和TLR-9的配体来实现。

## 6 细胞因子信号传导抑制蛋白1(suppressor of cytokine signaling 1, SOCS1)抑制DC的成熟

DC的成熟需要病原体的抗原摄取和TLRs的信号激活双重因素刺激。但在非成熟的DC内存在细胞因子信号传导抑制蛋白1(SOCS1), 它可以阻止抗原的摄取和抑制TLRs信号通路。由于肿瘤病人体内的DC大多是不成熟的, 故而利用肿瘤疫苗很难取得治疗效果, 因为疫苗中的抗原不能被DC递呈。为了克服这一困难, Shen等<sup>[6]</sup>设计了一种siRNA来干扰SOCS1, 从而促进DC抗原递呈和解除TLRs信号通路的抑制, 促使DC成熟, 提高肿瘤疫苗的治疗效果。

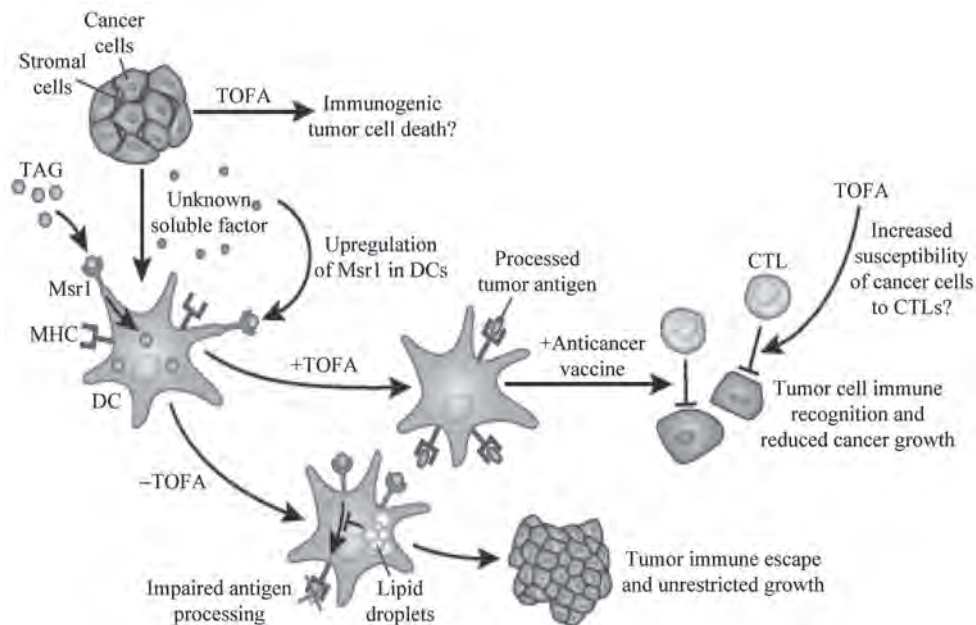
## 7 肿瘤组织的DC脂代谢与免疫耐受

Herber等<sup>[7]</sup>发现肿瘤组织(包括癌旁组织)分泌某种未知的可溶性因子, 能够促进肿瘤周围和远处的DC对Msr1的表达, 从而增强DC对胞外的甘油三酯摄取和提高甘油三酯前体的合成, 于是在DC胞内大量积累脂肪滴。这种脂肪滴可以阻止DC对抗

原的加工和递呈, 从而造成DC不能分化成熟, 对肿瘤产生免疫耐受。若对DC加入一种乙酰辅酶A羧化酶的抑制剂(TOFA), 阻止DC的甘油三酯生物合成, DC胞内就不会有很多甘油三酯积累, 从而恢复对肿瘤抗原的加工和递呈, DC就可分化成熟, 对初始的CD4<sup>+</sup>T细胞分化成Th1起到促进作用, 进而辅助CD8<sup>+</sup>T细胞形成具有杀伤肿瘤作用的CTL细胞(图1)<sup>[8]</sup>。

## 8 卵巢癌发展进程与DC表型的变化

侵袭性卵巢癌起初作为恶性细胞受到人体免疫系统的严格监控, 直到它们突然性地、无法预知地转化成转移性的肿瘤。美国宾夕法尼亚大学威斯达研究所(Wistar Institute) Scarlett等<sup>[9]</sup>发现, 卵巢癌并非通过摆脱免疫系统的控制, 而是借助免疫系统中的DC支持了肿瘤的逃逸。研究表明, 通过靶向患者自身的树突状细胞有可能修复人体的免疫系统。该研究代表了科学家们首次在小鼠卵巢癌模型中成功模拟了人类卵巢癌的肿瘤炎症微环境。精密的模型为研究人员提供了探测、预防和治疗肿瘤的良好工具。模型演示出在局部的卵巢肿瘤逐步转变为侵袭性转移肿瘤的过程中, 树突状细胞发生了表型改变。这一表型改变使得肿瘤能够在极短时间



树突状细胞的脂代谢受肿瘤及其基质细胞调控而转变为免疫耐受, 若抑制甘油三酯生物合成则可消除免疫耐受状态, 促进能杀伤肿瘤细胞的CTL细胞形成。TAG: 甘油三酯; Msr1: 转运TAG到DC胞内的清道夫受体; TOFA: 一种乙酰辅酶A羧化酶的抑制剂, 抑制甘油三酯生物合成。

图1 通过靶向改变DC的脂肪代谢来改善免疫系统抗癌反应的新策略<sup>[8]</sup>

内进展为绝症。有趣的是,肿瘤自身仍然具有免疫原性,能够激发宿主的免疫反应。只不过是树突状细胞竭力抑制了其它能抗肿瘤的免疫细胞,主要是T细胞抗肿瘤的作用。

这项研究发现对Schreiber提出的“癌症免疫编辑假说(cancer immunoediting hypothesis)”提出了挑战。肿瘤免疫编辑假说认为,免疫系统不但具有排除肿瘤细胞的能力,而且还具有促进肿瘤生长的作用。癌细胞在机体内发生、发展是一个免疫系统与癌细胞相互作用的动态过程。在这个过程中,免疫系统在清除一些肿瘤细胞的同时,也对另一些肿瘤细胞的生物学特性(如肿瘤的抗原性)进行重塑(re-shape),也即所谓的“免疫编辑”。被免疫编辑过的肿瘤细胞恶性程度越来越高,对免疫攻击的抵抗力越来越强,直至最终摧毁机体的免疫系统,造成肿瘤细胞的恶性生长并扩散。

但是Scarlett等<sup>[9]</sup>的文章中,研究人员发现在疾病早期除去树突状细胞会加速肿瘤扩增,然而在晚期除去树突状细胞则会延迟肿瘤进展,说明肿瘤晚期仍然受到宿主的免疫系统监督。该文通讯作者Conejo-Garcia表示,他们的研究结果表明癌症的进展是由于免疫系统自身,特别是树突状细胞表型改变所致,而非肿瘤的免疫原性丧失。目前,Conejo-Garcia和他的同事正在开发一套对“叛变”的DC进行重编程的策略,也就是如何利用合成的RNA分子来扭转树突状细胞,以便恢复它们抗肿瘤的能力。

### 参考文献 (References)

- 1 郭礼和. 肿瘤免疫耐受——肿瘤细胞的免疫学特性. 中国细胞生物学学报(Guo Lihe. Chinese Journal of Cell Biology) 2012; 34(7): 732-4.
- 2 赖东梅, 郭礼和. 炎症单核细胞促进乳腺癌转移的分子机制. 中国细胞生物学学报(Lai Dongmei, Guo Lihe. Chinese Journal of Cell Biology) 2011; 33(9): 948-9.
- 3 Dumitriu IE, Dunbar DR, Howie SE, Sethi T, Gregory CD. Human dendritic cells produce TGF-beta 1 under the influence of lung carcinoma cells and prime the differentiation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. J Immunol 2009; 182(5): 2795-807.
- 4 Idoyaga J, Moreno J, Bonifaz L. Tumor cells prevent mouse dendritic cell maturation induced by TLR ligands. Cancer Immunol Immunother 2007; 56(8): 1237-50.
- 5 Dummer R, Urosevic M, Kempf W, Hoek K, Hafner J, Burg G. Imiquimod in basal cell carcinoma: How does it work? Br J Dermatol 2003; 149 Suppl 66: 57-8.
- 6 Shen L, Evel-Kabler K, Strube R, Chen SY. Silencing of SOCS1 enhances antigen presentation by dendritic cells and antigen-specific anti-tumor immunity. Nat Biotechnol 2004; 22(12): 1546-53.
- 7 Herber DL, Cao W, Nefedova Y, Novitskiy SV, Nagaraj S, Tyurin VA, *et al.* Lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer. Nat Med 2010; 16(8): 880-6.
- 8 Zitvogel L, Kroemer G. Targeting dendritic cell metabolism in cancer. Nat Med 2010; 16(8): 858-9.
- 9 Scarlett UK, Rutkowski MR, Rauwerdink AM, Fields J, Escovar-Fadul X, Baird J, *et al.* Ovarian cancer progression is controlled by phenotypic changes in dendritic cells. J Exp Med 2012; 209(3): 495-506.