

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.03.021

Cbl-b 在 T 细胞免疫耐受和肿瘤免疫治疗中的作用

Role of Cbl-b in T cell immune tolerance and tumor immune therapy

曲晶磊 综述; 曲秀娟, 刘云鹏 审阅(中国医科大学附属第一医院 肿瘤内科, 辽宁 沈阳 110001)

[摘要] Cbl-b(casitas B-cell lineage lymphoma-b)为一种高度保守的RING家族E3泛素连接酶,是调节T细胞信号的关键因子,对维持外周T细胞免疫耐受至关重要。Cbl-b表达受转录因子、共刺激分子CD28、CTLA4及自身泛素化的调控。Cbl-b通过泛素化激活的受体、受体相关酪氨酸激酶和下游信号分子而参与淋巴细胞信号的负性调控,进而精密调节抗原受体信号和免疫反应。另外,Cbl-b在调控T细胞TGF- β 信号转导通路中起着重要作用。Cbl-b的缺失能增强抗肿瘤免疫反应,打破自身免疫耐受。因此,深入研究Cbl-b在T细胞免疫耐受和肿瘤免疫治疗中的作用可为肿瘤免疫治疗提供新的靶点。

[关键词] Cbl-b; 肿瘤; T细胞; 免疫耐受

[中图分类号] R730.51; R392.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)03-0343-04

泛素系统是所有真核生物体内一种重要的具有高度选择性的蛋白质降解体系。泛素系统发挥功能首先是从底物蛋白的泛素化(ubiquitylation)开始,涉及E1泛素活化酶、E2泛素结合酶和E3泛素连接酶的一系列反应,最终通过E3泛素连接酶特异性地识别底物蛋白,促使活化的泛素分子连接到靶蛋白上,通过蛋白酶体进行降解^[1]。E3泛素连接酶由HECT(homology to E6-associated protein carboxyl terminus)、RING(really interesting new gene)和U-box蛋白三大家族组成,分别识别不同的降解信号。Cbl-b(casitas B-cell lineage lymphoma-b)即是一种高度保守的RING家族E3泛素连接酶,相对分子质量约为120 000,在哺乳动物的正常组织和肿瘤细胞上均有表达^[2]。近年来的研究显示,Cbl-b在外周T细胞免疫耐受及抗肿瘤免疫反应中发挥重要作用,本文就该领域的研究进展作一简要综述。

1 T 细胞信号和免疫耐受

抗原特异性T细胞的活化需要两种信号,一种是TCR(T-cell receptor)/CD3与抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APCs)表面特异的MHC-抗原肽复合物结合产生的特异性抗原刺激信号;另一种是APC提供的非特异性的共刺激信号。如果只有TCR/CD3复合物存在,没有共刺激信号参与,或者有共刺激分子的参与,但配体与TCR的亲合力低下,则不能有效地激活T细胞,而导致T细胞处于无能(anergy)状态^[3,4]。

1.1 TCR 与共刺激信号

TCR与特异性抗原受体结合后,募集Src家族蛋白酪氨酸激酶Lck和Fyn,并磷酸化下游信号分

子Zap70(ζ -associated protein of 70 000),活化的Zap70磷酸化多个底物,如LAT(linker for activation of T-cells)和SLP-76(SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 000)^[5]。LAT的磷酸化位点作为信号分子聚集的平台可以和关键的信号分子如PI3K(phosphoinositide 3-kinase)、PLC- γ (phospholipase C- γ)、Grb-2(growth factor receptor-bound protein 2)、Gads(Grb2-related adaptor downstream of Shc)等结合(图1)。PI3K能磷酸化脂膜的磷脂,其产物作为胞内含PH结构域的信号蛋白如Vav1、Akt、PLC- γ 1(phospholipase C γ -1)等的停泊位点并激活这些蛋白^[6]。PLC- γ 可调控钙离子内流、磷脂代谢、蛋白激酶C激活和细胞骨架的重组。

CD28是T细胞共刺激信号中的关键分子。CD28与其配体B7的结合能通过维持Lck和PI3K的活化增强TCR近膜区信号,促进T细胞生长因子白介素-2(interleukin -2, IL-2)的基因转录和mRNA的稳定性。另外,T细胞中Vav1的磷酸化和Vav1调控的免疫突触的形成有赖于CD28共刺激信号的存在^[7]。

1.2 免疫耐受与克隆性无能

免疫耐受(immune tolerance)是机体免疫系统接触某种抗原后形成的特异性无应答状态,此时机

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30770993, No. 31000607)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 30770993, No. 31000607)

[作者简介] 曲晶磊(1978-),女,辽宁省营口市人,博士,讲师,主要从事肿瘤免疫学研究。E-mail: qujinglei@hotmail.com

[通信作者] 刘云鹏(LIU Yun-peng, corresponding author), E-mail: cmuliuyunpeng@yahoo.cn

体对其他抗原仍可作出正常的免疫应答。克隆性无能(clone anergy)是免疫耐受形成的重要机制,是指 T 细胞遭遇抗原时处于功能失活状态,然而在这种低反应状态下 T 细胞仍能长时间保持细胞活力^[8]。T 细胞无能状态的维持有赖于抗原的持续存在,在某些情况下外源性给予 IL-2 能逆转这种无能状态。

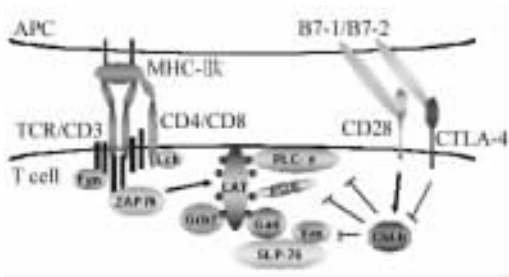


图1 TCR/CD3 近膜区信号复合体

许多分子参与了克隆性无能的调节和 T 细胞免疫耐受的诱导。近年来的研究^[9-10]表明, E3 泛素连接酶 Cbl-b 调控 T 细胞抗原受体活化的阈值,并参与共刺激分子的负性调控。另外, Cbl-b 作为 T 细胞无能的内在调节子在维持免疫耐受、免疫激活和自身免疫的平衡中发挥重要作用。

2 Cbl-b 的结构与功能

Cbl-b 是由 1 个保守的 N 末端酪氨酸激酶结合 (tyrosine kinase binding, TKB) 结构域、连接子、RING finger 结构域和 C 末端的脯氨酸富集区 (proline-rich domain)、泛素相关结合域 (ubiquitin-associated domain, UBA) 与亮氨酸拉链 (leucine zipper, LZ) 组成^[11] (图 2)。TKB 结构域又由 3 部分组成, 分别是四螺旋束 (a four-helix bundle, 4H)、EF hand 和可变的 Src 同源区 2 结构域 (Src homology 2 domain, SH2 结构域)。TKB 最主要的功能是通过与底物蛋白质的特异性磷酸化酪氨酸残基结合, 从而决定 Cbl 底物蛋白的特异性。然而, 由于一些底物如 Src 家族激酶能够通过 Cbl 蛋白的 C 末端结合, 所以底物的特异性并不完全由 TKB 结构域决定。RING finger 结构域具有内源性的 E3 泛素连接酶活性, 其作为一个停靠位点将底物蛋白和 E2 聚集在一起, 然后介导泛素由 E2 转移至底物蛋白上。LZ 介导多种蛋白质的二聚化, UBA 负责与泛素残基结合。

3 Cbl-b 表达的调控

当 T 细胞未完全激活而处于耐受状态时, Cbl-b

表达上调, 其中部分由 NFAT (nuclear factor of activated T-cells) 介导^[12]。在实验模型中, 弱的 TCR 刺激能诱导钙离子内流和 NFAT 活化, 而不伴有 AP1 (activator protein 1) 或 NF-κB (nuclear factor-κB) 的激活。在这种情况下, NFAT 启动抑制性基因转录程序, 细胞周期停滞。在耐受原的刺激下, 锌指结构转录因子 Egr-2 (early growth response 2) 和 Egr-3 被激活, 并能调控无反应性刺激诱导的 Cbl-b 的表达^[13]。近年来的研究^[14]表明, 激活的 T 细胞中双叉头转录因子 Foxp3 (forkhead box P3) 的表达与 Egr 和 Cbl-b 有关, 表明在效应 T 细胞中 Foxp3 通过 Egr 调控 Cbl-b 的表达使 T 细胞处于无能状态。

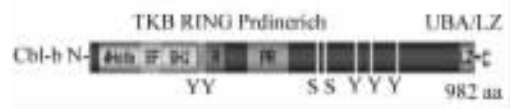


图2 Cbl-b 蛋白的结构

除了转录因子的调控, Cbl-b 的表达受共刺激分子 CD28 和抑制性的细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4) 的精密调节^[15]。一方面, 初始 T 细胞的激活需要 CD28 的参与; 另一方面, 初始 T 细胞激活后瞬间上调了 CTLA-4 的表达, CTLA-4 通过与 CD28 配体结合, 阻断共刺激信号而发挥其抑制作用。CD28 与其配体 B7 结合能诱导 Cbl-b 的泛素化和降解, 而 CTLA-4 和 B7 结合则使 Cbl-b 的表达上调, 进而抑制 T 细胞的增殖^[15,16]。CD28 和 CTLA-4 通过调控 Cbl-b 的表达而确保抗原受体驱动的 T 细胞的激活。另外, Cbl-b 自身也能被泛素化并经蛋白酶体进行降解。研究^[17-18]表明, HECT 家族 E3 泛素连接酶 ITCH 和 NEDD4 能结合并泛素化 Cbl-b。需要注意的是, 在 TCR 和 CD28 共刺激时, Cbl-b 能发生自身泛素化介导的降解^[16], 这可能是 CD28 共刺激抵抗 Cbl-b 抑制效应的一种机制。

4 Cbl-b 在 T 细胞信号中的作用

Cbl-b 是调节 T 细胞信号的关键因子, 对维持外周 T 细胞耐受至关重要。体外研究^[19]显示, Cbl-b^{-/-} T 细胞的 IL-2 生成增加, 细胞增殖不依赖于 CD28 的刺激。近年研究^[9,11]表明, Cbl-b 通过泛素化激活的受体、受体相关酪氨酸激酶和下游信号分子而参与淋巴细胞信号的负性调控, 进而精密调节抗原受体信号和免疫反应。

在 T 细胞中, Cbl-b 能泛素化多种底物蛋白, 调控 TCR 信号。例如, Cbl-b 能通过 C 末端脯氨酸富集区与 PI3K 的 p85 亚单位结合, 而负性调控 PI3K 信号^[20]。在 Jurkat 细胞中, Cbl-b 泛素化 p85 亚单位, 影响了亚细胞成分的定位, 并干扰 p85 亚单位与 CD28 和 TCR ζ 脂膜区的结合。在初始 T 细胞中, Cbl-b 通过 C 末端脯氨酸富集区与 TCR 下游分子 Vav-1 相互作用并抑制其功能。这种相互作用表现为负调控 TCR 成簇和抑制脂筏的聚集^[21]。野生型 T 细胞 Vav1 的激活需要 TCR 和 CD28 双通路刺激; 而在 Cbl-b^{-/-} T 细胞中, TCR 与抗原受体结合的单信号刺激即能激活 Vav1, 进而导致免疫突触的形成。另外, 在无能 T 细胞中, Cbl-b 的缺失导致 PLC- γ 泛素化异常和钙离子信号异常^[22], 表明 PLC- γ 是 Cbl-b 的关键靶分子。

5 Cbl-b 在调节性 T 细胞和 TGF- β 信号通路中的作用

CD4⁺CD25⁺ 调节性 T (regulatory T, Treg) 细胞是 T 细胞的重要亚群, 能分泌转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β), 对效应性 T 细胞具有抑制作用。在信号转导时, TGF- β 与其受体结合并激活受体, 活化的受体通过磷酸化细胞内 Smad 蛋白而将 TGF- β 信号从细胞膜传到细胞核, 发挥其免疫抑制作用。Wohlfert 等^[23]报道, Cbl-b 缺失的 CD4⁺CD25⁻ 效应 T 细胞能抵抗 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞和 TGF- β 的抗增殖作用。在小鼠模型中, Cbl-b 的缺失能抑制 TGF- β 诱导的 Foxp3⁺ 功能性 Treg 细胞的生成。体内研究进一步证实了 Cbl-b^{-/-} 鼠能产生抗 EL-4 肿瘤(该肿瘤具有分泌大量 TGF- β 而抑制正常 T 细胞抗肿瘤反应的特性)的免疫反应。且在 Cbl-b^{-/-} 效应 T 细胞中, TGF- β 介导的 Smad2 磷酸化受到抑制。总的说来, Cbl-b 在调控 T 细胞 TGF- β 信号转导通路中起着重要作用, Cbl-b 的缺失导致体内外多功能 TGF- β 相关信号通路异常^[24-25]。

6 Cbl-b 缺失可增强抗肿瘤免疫反应

目前肿瘤的免疫治疗不尽人意, 主要原因之一就是细胞毒 T 细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 产生有效的抗肿瘤免疫反应需要共刺激信号, 而许多肿瘤不表达共刺激信号的配体; 另外肿瘤部位富含 TGF- β , CTL 产生反应需要抵抗 TGF- β 的作用, 因此体内 T 细胞常处于无能状态。而 Cbl-b 的缺失能从多个方面干扰 T 细胞的免疫耐受: 首先, 在缺乏共

刺激信号的情况下, 单信号抗原刺激即能使 Cbl-b^{-/-} T 细胞增殖并产生大量的 IL-2^[19]; 其次, Cbl-b 控制 T 细胞活化的阈值, Cbl-b 的缺失能使 T 细胞对低亲和力的配体产生反应^[9]; 再次, Cbl-b 控制 Vav1 的激活和 Vav1 调控的免疫突触的形成^[21]。另外, Cbl-b^{-/-} T 细胞对 Treg 细胞介导的免疫抑制不敏感^[24]。

近年的研究^[26,27]表明, Cbl-b^{-/-} CD8⁺ T 的激活可不依赖于 CD28 共刺激分子, 并且能抵抗 TGF- β 的抑制作用。体内研究进一步证实, Cbl-b^{-/-} 鼠能有效排斥移植性肿瘤, 并能降低自发性肿瘤的发生率。将纯化的 Cbl-b^{-/-} CD8⁺ T 细胞过继转移给 E. G7 荷瘤小鼠, 能导致已接种的肿瘤消退。Loeser 等^[19]报道, Cbl-b^{-/-} 鼠能抵抗 UVB-诱导的自发性皮肤肿瘤的发生, 并且 Cbl-b^{-/-} 鼠能携带长期(1 年之久)的抗癌记忆。因此, Cbl-b 的缺失很可能成为激发抗肿瘤免疫反应的有效策略。另外, 研究^[19]表明, 在体内 Cbl-b^{-/-} CD8⁺ T 细胞能在正常诱导免疫耐受的情况下逃脱 T 细胞无能的命运。总的说来, Cbl-b^{-/-} CD8⁺ T 细胞能抵抗肿瘤细胞诱导的免疫耐受, 对接种的肿瘤细胞产生强有力的免疫监视作用。

7 结语

T 细胞激活和耐受的平衡对维持机体正常的免疫功能是至关重要的。Cbl-b 是调节 T 细胞激活和耐受的关键分子, 增强 Cbl-b 的表达能诱导免疫耐受, 防止自身免疫病的发生; 抑制 Cbl-b 的表达或功能改善肿瘤患者 T 细胞无能状态, 打破自身免疫耐受。过继转移 Cbl-b^{-/-} CD8⁺ T 细胞为肿瘤免疫治疗提供了新的方法。但是目前对 Cbl-b 的研究距临床应用还有很大距离, 在用于肿瘤防治之前, 应对 Cbl-b 缺失引发的近期和长期的生理功能改变进行更深入的研究。

[参考文献]

- [1] Gómez-Martín D, Díaz-Zamudio M, Alcocer-Varela J. Ubiquitination system and autoimmunity: the bridge towards the modulation of the immune response [J]. *Autoimmun Rev*, 2008, 7(4): 284-290.
- [2] Paolino M, Penninger JM. Cbl-b in T-cell activation [J]. *Semin Immunopathol*, 2010, 32(2): 137-148.
- [3] Mirshahidi S, Huang CT, Sadegh-Nasseri S. Anergy in peripheral memory CD4(+) T cells induced by low avidity engagement of T cell receptor [J]. *J Exp Med*, 2001, 194(6): 719-731.
- [4] Cemerski S, Das J, Giurisato E, et al. The balance between T cell receptor signaling and degradation at the center of the immuno-

logical synapse is determined by antigen quality [J]. *Immunity*, 2008, 29(3): 414-422.

[5] Billadeau DD. T cell activation at the immunological synapse: Vesicles emerge for LATer signaling [J]. *Sci Signal*, 2010, 3 (121): pe16.

[6] Seminario MC, Wange RL. Lipid phosphatases in the regulation of T cell activation: living up to their PTEN-tial [J]. *Immunol Rev*, 2003, 192(1): 80-97.

[7] Haubert D, Weckbecker G. Vav1 couples the T cell receptor to cAMP response element activation via a PKC-dependent pathway [J]. *Cell Signal*, 2010, 22(6): 944-954.

[8] Wells AD. New insights into the molecular basis of T cell anergy: anergy factors, avoidance sensors, and epigenetic imprinting [J]. *J Immunol*, 2009, 182(12): 7331-7341.

[9] Loeser S, Penninger JM. Regulation of peripheral T cell tolerance by the E3 ubiquitin ligase Cbl-b [J]. *Semin Immunol*, 2007, 19 (3): 206-214.

[10] Venuprasad K. Cbl-b and itch: key regulators of peripheral T-cell tolerance [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(8): 3009-3012.

[11] Thien CB, Langdon WY. c-Cbl and Cbl-b ubiquitin ligases: Substrate diversity and the negative regulation of signalling responses [J]. *Biochem J*, 2005, 391(Pt 2): 153-166.

[12] Soto-Nieves N, Puga I, Abe BT, et al. Transcriptional complexes formed by NFAT dimers regulate the induction of T cell tolerance [J]. *J Exp Med*, 2009, 206(4): 867-876.

[13] Safford M, Collins S, Lutz MA, et al. Egr-2 and Egr-3 are negative regulators of T cell activation [J]. *Nat Immunol*, 2005, 6 (5): 472-480.

[14] Chang X, Chen L, Wen J, et al. Foxp3 controls autoreactive T cell activation through transcriptional regulation of early growth response genes and E3 ubiquitin ligase genes, independently of thymic selection [J]. *Clin Immunol*, 2006, 121(3): 274-285.

[15] Li D, Gál I, Vermes C, et al. Cutting edge: Cbl-b: One of the key molecules tuning CD28- and CTLA-4-mediated T cell costimulation [J]. *J Immunol*, 2004, 173(12): 7135-7139.

[16] Zhang J, Bárdos T, Li D, et al. Cutting edge: Regulation of T cell activation threshold by CD28 costimulation through targeting Cbl-b for ubiquitination [J]. *J Immunol*, 2002, 169(5): 2236-2240.

[17] Magnifico A, Eittenberg S, Yang C, et al. WW domain HECT E3s target Cbl RING finger E3s for proteasomal degradation [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(44): 43169-43177.

[18] Yang B, Gay DL, MacLeod MK, et al. Nedd4 augments the adaptive immune response by promoting ubiquitin-mediated degradation of Cbl-b in activated T cells [J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(12): 1356-1363.

[19] Loeser S, Loser K, Bijker MS, et al. Spontaneous tumor rejection by cbl-b-deficient CD8⁺ T cells [J]. *J Exp Med*, 2007, 204(4): 879-891.

[20] Alcázar I, Cortés I, Zaballos A, et al. p85beta phosphoinositide 3-kinase regulates CD28 coreceptor function [J]. *Blood*, 2009, 113 (14): 3198-3208.

[21] Krawczyk C, Bachmaier K, Sasaki T, et al. Cbl-b is a negative regulator of receptor clustering and raft aggregation in T cells [J]. *Immunity*, 2000, 13(4): 463-473.

[22] Heissmeyer V, Macián F, Im SH, et al. Calcineurin imposes T cell unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins [J]. *Nat Immunol*, 2004, 5(3): 255-265.

[23] Wohlfert EA, Gorelik L, Mittler R, et al. Cutting edge: Deficiency in the E3 ubiquitin ligase Cbl-b results in a multifunctional defect in T cell TGF-beta sensitivity *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Immunol*, 2006, 176: 1316-1320.

[24] Adams CO, Housley WJ, Bhowmick S, et al. Cbl-b(-/-) T cells demonstrate *in vivo* resistance to regulatory T cells but a context-dependent resistance to TGF-beta [J]. *J Immunol*, 2010, 185(4): 2051-2058.

[25] Harada Y, Harada Y, Elly C, et al. Transcription factors Foxo3a and Foxo1 couple the E3 ligase Cbl-b to the induction of Foxp3 expression in induced regulatory T cells [J]. *J Exp Med*, 2010, 207 (7): 1381-1391.

[26] Chiang JY, Jang IK, Hodes R, et al. Ablation of Cbl-b provides protection against transplanted and spontaneous tumors [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(4): 1029-1036.

[27] Stromnes IM, Blattman JN, Tan X, et al. Abrogating Cbl-b in effector CD8(+) T cells improves the efficacy of adoptive therapy of leukemia in mice [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(10): 3722-3734.

[收稿日期] 2011-01-14 [修回日期] 2011-03-05

[本文编辑] 韩丹

本期广告目次

沈阳三生制药有限责任公司 封二

上海医元生物基因发展有限公司 封三

碧迪医疗器械有限公司 封四