

Th9细胞的特性、分化调控机制及其与肿瘤免疫

朱启泰^{1,2}, 赵鑫³, 张积^{4*}, 王雪峰^{1*}

(¹苏州大学苏州医学院, 基础医学与生物科学学院, 苏州 215123; ²苏州大学附属传染病医院中心实验室, 苏州 215007; ³苏州大学附属第一医院普外科, 苏州 215006; ⁴苏州大学附属第二医院眼科, 苏州 215004)

摘要: Th9细胞是近期发现的新型辅助性CD4⁺ T细胞亚群, 以大量分泌白细胞介素-9(interleukin 9, IL-9)等细胞因子为主要特征, 可由初始CD4⁺ T细胞经转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)联合IL-4诱导获得。Th9细胞的分化调控机制较为复杂, 目前尚不清楚其关键的特征性转录因子, 但已知多种转录因子参与了对Th9细胞分化的调控。在小鼠黑色素瘤过继转移治疗模型中, Th9细胞显示出极显著的抗肿瘤生长作用。本文概述了Th9细胞的生物学特性、分化调控机制、与肿瘤免疫应答的关系及其在肿瘤过继免疫治疗中的作用, 试图为探索诱导性能优良的Th9细胞并将之应用于肿瘤过继性免疫治疗, 提供有价值的理论基础和研究线索。

关键词: Th9细胞; 白细胞介素-9; 转录因子; 肿瘤免疫; 肿瘤过继免疫治疗

Characteristics, differentiation regulation mechanism of Th9 cells and their relationship with tumor immunity

ZHU Qitai^{1,2}, ZHAO Xin³, ZHANG Ji^{4*}, WANG Xuefeng^{1*}

(¹School of Basic Medicine and Biological Sciences, Suzhou Medical College, Soochow University, Suzhou 215123, China; ²Department of Central Laboratory, the Affiliated Infectious Diseases Hospital of Soochow University, Suzhou 215007, China; ³Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China; ⁴Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou 215004, China)

Abstract: Th9 is a novel type of helper CD4⁺ T cell subsets explored recently. Th9 subset is mainly characterized by the secretion of interleukin-9 (IL-9) and can be differentiated from naïve CD4⁺ T cells in the presence of transforming growth factors-β (TGF-β) and IL-4. The regulation of Th9 cell differentiation is complex. At present, its key characteristic transcription factor is not clear, but many transcription factors are known to be involved in the regulation of Th9 cell differentiation. In the adoptive immunotherapy treating mouse melanoma, Th9 cells showed a very significant antitumor effect. This paper aims to summarize the characteristics, differentiation regulation mechanism, relationship with tumor immune response of Th9 subset and its adoptive immunotherapeutic effect on treating tumors, trying to provide valuable theoretical basis and clues for differentiating superior Th9 cells and applying them to tumor adoptive immunotherapy.

Key Words: Th9 cells; interleukin-9; transcription factors; tumor immunity; tumor adoptive immunotherapy

收稿日期: 2022-02-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31970833, 91642103, 31570889, 8207112768); 江苏省六大人才高峰高层次人才项目(2017-SWYY-065); 江苏高校优势学科建设工程资助项目; 放射医学与辐射防护国家重点实验室开放课题(GZK1201912); 苏州市医学重点学科建设项目(SZFCXK202118)

第一作者: E-mail: 18305207956@163.com

*通信作者: 王雪峰, E-mail: wangxuefeng@suda.edu.cn; 张积, E-mail: jizhang0068@sina.com

随着肿瘤的不断发展,特别是到了中晚期阶段,手术切除、放化疗等常规手段难以产生有效的治疗效果。此外,对于葡萄膜恶性黑色素瘤等类型的肿瘤,采用眼球摘除术等方法进行治疗,不仅给患者带来极大损伤,而且难以确保免除肿瘤转移的可能性。近年来,免疫疗法的发展为肿瘤的治疗提供了新策略,免疫检查点阻断治疗、细胞因子疗法、T细胞过继转移治疗等方法,逐步取得了突破性的成果。T细胞过继转移治疗是最有发展前景的免疫治疗手段之一,主要包括两种类型,一是使用离体刺激活化并扩增的具有肿瘤抗原特异性的肿瘤浸润性淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocytes, TILs),二是使用经过基因修饰的表达同源嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)的T细胞,或者T细胞受体(T cell receptor, TCR)经过抗原改造能够特异性识别肿瘤抗原的T细胞^[1]。目前, CAR-T细胞在血液系统相关恶性肿瘤中,尤其在B细胞型恶性白血病中,已取得了非常有效的治疗效果^[2,3]。此外, TILs过继转移进实体瘤,如黑色素瘤、宫颈鳞状细胞癌、胆管癌,均具备引起肿瘤消退的能力^[4,5]。

研究发现,在应用于肿瘤过继治疗的不同辅助性T细胞(helper T cells, Th)亚群类型中, Th1细胞表现出较好的肿瘤抑制功能,但是其在体内的持久性较差; Th17则能在体内存活较长的时间,但是其肿瘤抑制能力又会随时间有所减弱^[6-8]。因此,找到更合适的细胞亚群应用于肿瘤过继免疫治疗是目前亟需解决的关键问题。作为近期发现的新型辅助性CD4⁺ T细胞亚群之一, Th9细胞在黑色素瘤模型中取得了显著的抗肿瘤效果,在过继转移到体内之后显示出了优于其他细胞类型的抗肿瘤能力^[7,9-11],是目前肿瘤过继治疗研究重点关注的细胞亚群。因此,多项研究围绕Th9细胞的生物学特性、分化程序及其在肿瘤发生过程中的角色而展开,致力于探索诱导性能优良的Th9细胞,从而为肿瘤免疫治疗提供更多的可能性,是目前肿瘤免疫治疗领域的研究热点。

1 Th9细胞及其生物学特性

CD4⁺ T细胞接受抗原刺激后,在不同细胞因子条件下,能够分化为多种细胞亚群,包括Th1、

Th2、Th9、Th17、Th22、调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)、滤泡辅助性T细胞(follicular helper T cells, Tfh)等。其中, Th9细胞是近年来新发现的Th细胞亚群,被定义为一群能够大量分泌特征性细胞因子IL-9、IL-10和IL-21的独特的辅助性T细胞亚群。

Schmitt等^[12]研究发现了一群在TGF- β 、IL-4以及IL-2的诱导条件下能够大量分泌IL-9的CD4⁺细胞群体,并将其定义为一个新的细胞亚群。Veldhoen等^[13]观察到, Th2细胞能够在单独的转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)刺激条件下转化为能够分泌IL-9的细胞群体,并将其命名为Th9细胞。此外, Dardalhon等^[14]发现,初始CD4⁺ T细胞在TGF- β 和IL-4的诱导条件下,也能够分化为一群大量分泌IL-9的细胞亚群,同样称之为Th9细胞。随后的研究表明,在Th2细胞分化的早期阶段,不仅能够分泌IL-4,还能够分泌IL-9,但是在加入TGF- β 的诱导条件后,这群细胞最终将会分化为Th9细胞^[15]。研究表明, IL-4作为Th2细胞的分化条件,能够抑制叉头状转录因子3(forkhead transcription factor protein 3, Foxp3)的表达,而TGF- β 则作为Th2细胞分化过程的抑制剂,二者联合可诱导初始CD4⁺ T细胞向Th9细胞方向分化。因此, TGF- β 和IL-4作为Th9细胞的特征性诱导条件也证明Th9细胞是一个独特的细胞亚群。此外,多种细胞因子能够促进Th9细胞的分化和IL-9的分泌,包括IL-1^[16]、IL-2^[17]、IL-6^[18]、IL-10^[14]、IL-21^[17]、IL-25^[19]、IL-33^[20]、IFN- α / β ^[21]、GM-CSF^[22]、胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP)^[23]等;而IFN- γ 和IL-27^[24]、IL-23^[25]、视黄酸(retinoic acid, RA)^[26]则会抑制Th9细胞的分化。除了TGF- β 和IL-4外,有研究显示, IL-4联合IL-1 β 也能够有效诱导Th9细胞的分化^[27],体现了诱导Th9细胞的多种可能性。尽管介导Th9细胞分化的关键性特征转录因子没有完全研究清楚,但是已经有多种转录因子被证明参与了对Th9细胞分化的调控,包括信号传导及转录激活蛋白6(signal transducer and activator of transcription 6, STAT6)、GATA结合蛋白3(GATA binding protein 3, GATA3)、PU.1、干扰素调节因子4(interferon regulatory factor 4, IRF4)等^[28]。

2 白细胞介素-9(IL-9)

基于IL-9增强肥大细胞生长活性的特点,其最初被定义为肥大细胞生长因子,称之为p40。人源IL-9基因位于5号染色体的长臂上,IL-9蛋白含有144个氨基酸残基并且具有一个包含18个氨基酸残基的信号肽^[29]。IL-9最初被认为是Th2型细胞因子,后续的研究发现,IL-9是一个多效性细胞因子,主要由Th9、Th2和肥大细胞分泌^[30],也可以由其它细胞亚群分泌,包括Th17、Tregs、自然杀伤T细胞(natural killer T cell, NKT)细胞、CD8⁺ T细胞和树突状细胞(dendritic cells, DCs)^[31]。

IL-9受体(IL-9 receptor, IL-9R)包括两个亚基:IL-9R α 以及另一条 γ 链,其中IL-9R α 只能特异性识别IL-9,而 γ 链则是属于IL-2、IL-4、IL-7、IL-15和IL-21等细胞因子受体组成部分中的一条共有的 γ 链。IL-9在与IL-9R α 特异性结合之后,必须继续与 γ 链结合,才能进一步介导IL-9信号。只有当IL-9与完整的IL-9R结合之后,才会激活IL-9信号的下游靶标,包括磷酸化并激活JAK激酶(Janus kinase, JAK)以及STAT1、STAT3、STAT5等转录因子^[32-34]。此外,IL-9/IL-9R信号能够激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)途径^[35]和磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K)-AKT途径^[36]。

IL-9是一种多效性细胞因子,对造血祖细胞、免疫细胞、气道平滑肌细胞、上皮细胞具有多重作用,且参与多种免疫相关疾病的过程,如过敏性炎症、寄生虫感染、自身免疫性疾病和移植排斥反应等^[31,37,38]。此外,一些研究揭示,IL-9在肿瘤发展中也发挥了作用,如其在肺癌^[39]、白血病^[40]、乳腺癌^[41,42]、结肠癌^[43]以及淋巴瘤^[44,45]中,显示出促进肿瘤细胞生长、迁移的作用;但是在黑色素瘤的发展过程中,IL-9可显著抑制黑色素瘤细胞生长并诱导其发生凋亡^[46-48]。

3 Th9细胞分化的调控机制

3.1 Th9细胞分化与转录因子PU.1

已有研究证明,PU.1是Th9细胞分化的关键转录因子^[49,50]。小鼠在条件性敲除PU.1之后,Th9细胞的分化和IL-9的表达受到严重的影响,而上调

PU.1的表达则会促进Th9细胞的分化,使其大量分泌IL-9^[49]。此外,在Th2细胞中增强PU.1的表达能够显著降低IL-4的分泌,并促进Th2细胞向Th9细胞分化^[51]。在Foxp3⁺ Tregs中过表达PU.1并不能诱导IL-9的分泌,提示除了TGF- β 信号外,还需要IL-4信号才能使Treg细胞分泌IL-9。研究表明,TGF- β 信号对Th9细胞的促进分化作用依赖Smad通路的活化以及PU.1的表达^[52]。此外,PU.1的表达还受维生素D的活性代谢物骨化三醇的调节^[53]。PU.1可以直接结合到IL-9基因的启动子上,募集组蛋白乙酰转移酶PCAF以及赖氨酸乙酰转移酶Gcn5,通过修饰染色质来促进Th9细胞的分化;PU.1还可与转录因子IRF4协同调控Th9细胞的分化。

3.2 Th9细胞分化与转录因子IRF4、IRF1和B-ATF

IRF4作为一种转录因子,能够被TCR信号诱导表达,并且能够参与到Th2细胞和Th17细胞的分化过程中^[54]。后续研究发现,IRF4基因缺陷的CD4⁺ T细胞不能分化为Th9细胞^[55],表明IRF4也是促进Th9细胞分化的重要转录因子。IRF4调节Th9细胞分化的机制比较复杂。一方面IRF4与碱性亮氨酸拉链转录因子(basic leucine zipper transcription factor, BATF)、STAT6协同作用来促进Th9细胞的分化;另一方面,IRF4与转录因子PU.1结合形成异源二聚体,同时与TGF- β 信号下游的分子Smad2和Smad3协同作用,以此来促进Th9细胞的分化。此外,Th9细胞在受到细胞因子IL-1 β 的刺激后,能够表达原本属于Th1细胞分化相关的转录因子IRF1,IRF1能够直接结合到IL-9的启动子上^[56],对IL-9的分泌极其重要,能够显著增强Th9细胞的转录程序。

有研究发现,TNF超家族的成员TL1A是Th9细胞分化的强诱导剂,经TL1A诱导的Th9细胞在mRNA和蛋白质水平均显著上调表达转录因子BATF和BATF3,并进一步结合到IL-9启动子区域,增强IL-9的分泌,提示转录因子BATF和BATF3在Th9细胞的分化过程中起重要的调节作用^[57,58]。此外,TL1A诱导的Th9细胞能够上调IRF4的表达,同样提示BATF、BATF3和IRF4之间可能存在协同作用来调节Th9细胞的分化^[57,58]。

3.3 Th9细胞分化与转录因子STAT6和GATA3

有研究发现, 在*STAT6*和*GATA3*基因缺陷小鼠中, IL-9表达水平明显下降^[59,60], 提示STAT6和GATA3在Th9细胞分化过程中具有关键作用。由于参与了IL-4/IL-4R信号转导, STAT6在Th9细胞分化过程中被磷酸化, 且进一步诱导GATA3的表达。STAT6和GATA3对于Th9细胞的分化均具有不可或缺的作用, 但STAT6和GATA3并不只在Th9细胞分化过程中特异性表达, 它们在Th2细胞分化的过程中也发挥重要作用。

GATA3的表达水平在Th9细胞分化过程中不断增加, 但是在Th9细胞分化成熟之后随即消失^[13,14]。对其机制的研究表明, GATA3并不直接参与Th9细胞分化的调节, 而是通过下调Foxp3的表达水平来间接调节Th9细胞的分化^[59], 并且这一过程同时受转录因子PU.1的调控^[61]。也就是说, GATA3在Th9细胞分化的早期阶段抑制其向Tregs细胞方向分化, 而Th9分化进入后期阶段后, 则主要由转录因子PU.1进行调控。

3.4 Th9细胞分化与转录因子Foxo1

转录因子前叉蛋白1(forkhead protein 1, Foxo1)被报道参与了促进Th9细胞的分化以及IL-9的分泌。Foxo1调控相关基因转录的功能依赖于其磷酸化作用^[62]。有研究表明, Foxo1在Th9细胞分化过程中的磷酸化水平要显著高于Th0和Th2细胞^[63]。这表明相较于Th0和Th2细胞, Foxo1在Th9细胞分化过程中发挥了更重要的作用。Foxo1通过与多种转录因子相互作用来实现调控Th9细胞分化的目的。一方面, Foxo1能够直接结合到Th9细胞的IL-9启动子区域, 促进IL-9的分泌^[63,64]; 另一方面, Foxo1的缺失可能导致PU.1的表达下降, 提示Foxo1可能通过调节PU.1来调控Th9细胞的分化。此外, Foxo1还可以与IRF4结合并促进其活化, 从而促进Th9细胞的分化^[55]。

3.5 Th9细胞与转录因子Hif-1 α

有研究发现, TGF- β 活化激酶1(TGF- β -activated kinase 1, TAK1)作为TGF- β -Smad通路的重要调节要素, 在调控Th9细胞分化的过程中起重要作用^[65]。TAK1能够抑制Th9细胞分化过程中去乙酰化酶SIRT1的表达^[66], 而SIRT1的缺乏能够促进Th9细胞的分化, 反之, SIRT1的过表达则会抑

制Th9细胞的分化。SIRT1缺陷能够诱导增强哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)-低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , Hif-1 α)依赖的糖酵解代谢途径, 由此满足Th9细胞分化所需的代谢条件。Hif-1 α 能在Th9细胞分化过程中直接结合到IL-9启动子区域, 介导Th9细胞的分化。因此, TAK1-SIRT1-mTOR-Hif-1 α 调控的糖酵解途径对于Th9细胞的分化极为重要。此外, 细胞外ATP通过诱导一氧化氮的产生, 增强嘌呤受体信号转导, 强化mTOR-Hif-1 α 代谢途径, 以ATP-NO-mTOR-Hif-1 α 信号轴的方式促进IL-9的表达与Th9细胞的分化^[67]。

3.6 Th9细胞分化与转录因子STAT5

STAT5是IL-2信号下游重要的转录因子。IL-2缺陷型的CD4⁺ T细胞在不加入外源性IL-2的情况下无法分化为Th9细胞, 表明除了TGF- β 和IL-4外, IL-2对于Th9细胞的分化也是必不可少的。IL-2与由IL-2R α (CD25)、IL-2R β (CD122)和共有 γ 链(CD132)构成的高亲和力的受体结合, 进一步激活并介导STAT5磷酸化^[68]。STAT5能够结合到IL-9启动子区域的DNA结合基序上, 调控IL-9的表达; 而STAT5缺陷的CD4⁺ T细胞无法分化为Th9细胞^[69]。有研究表明, IL-2/STAT5信号在调控Th9和Th17细胞分化过程的平衡中起重要作用, 通过STAT3非依赖性的方式抑制Th17细胞的分化, 从而促进细胞向Th9细胞方向分化^[70]。

3.7 Th9细胞与转录因子NF- κ B

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)受体家族的共刺激分子OX40能够在TGF- β 和IL-4存在的情况下, 通过激活NF- κ B信号来促进Th9细胞的分化^[71]。OX40能够激活泛素连接酶肿瘤坏死因子受体相关因子6(TNF receptor associated factor 6, TRAF6), 进而激活NF- κ B途径, 促进NF- κ B p52与RelB形成异源二聚体, 直接结合到IL-9的启动子上来促进Th9细胞的分化。NF- κ B p52缺陷的T细胞无法分化为Th9细胞。此外, NF- κ B还可以与活化T细胞核因子(nuclear factor of activated T cells 1, NFAT)家族成员协同作用来增强IL-9的转录, 包括NFAT1(NFATc2)^[72]和NFAT2(NFATc1)^[73]均能够显著促进Th9细胞的分化。除了OX40信号外, 有研究报道Fas信号可以通过Ca²⁺依赖的方式

激活蛋白激酶C- β (protein kinase C- β , PKC- β), 进一步激活NF- κ B信号, 从而促进Th9细胞的分化^[74]。

3.8 Th9细胞分化与转录因子Bcl6

B细胞淋巴瘤因子6(B cell lymphoma 6, Bcl6)是滤泡辅助性T细胞分化的关键转录因子, 并且能够抑制Th2细胞的分化。有研究发现, Bcl6也参与了Th9细胞的分化调控过程, 其表达量在已经分化成熟的Th9细胞中急速下调, 并且高水平的Bcl6不利于Th9细胞的分化。反之, 条件性敲降Th9细胞中的Bcl6会增加其IL-9的分泌。Bcl6对Th9细胞分化的抑制依赖IL-2/JAK3/STAT5通路, Bcl6结合到IL-9启动子上后, 能够抑制STAT5信号介导的对IL-9的转录激活作用^[75]。由此, Bcl6在Th9细胞的分化过程中扮演了一个关键的负调控角色。

3.9 Th9细胞分化与转录因子Blimp1

B淋巴细胞诱导成熟蛋白1(B lymphocyte-induced maturation protein 1, Blimp1)是T细胞终末分化过程中的一个关键的转录抑制因子。以前的研究发现, Blimp1能够抑制Th1细胞的分化^[76], 并且参与了Tfh细胞^[77]和CD8⁺ T细分化的调控^[78]。最近的研究发现, Blimp1能够抑制Th9细胞的分化以及IL-9的分泌; 而Th9细胞相关细胞因子对Blimp1的表达具有抑制作用。

综上所述, 参与Th9细胞分化的转录调控网络十分复杂, 多种转录因子参与其中, 包括PU.1、NF- κ B、STAT家族、IRF1、IRF4、Foxo1等参与Th9细胞分化的正向调控, 而Bcl6、Blimp1等转录因子参与其分化的负性调控。

4 Th9细胞与肿瘤免疫的关系

IL-9及Th9细胞对肿瘤进展的影响, 到底是促进还是抑制肿瘤的生长, 仍然具有争议。Th9细胞与肿瘤免疫应答的关系可能与肿瘤类型有关, 在不同类型的肿瘤中其发挥的作用也不相同。

4.1 Th9细胞和IL-9的促肿瘤作用

研究表明, IL-9能够促进肺癌细胞系A549和SK-MES-1的增殖^[39]。Th9细胞产生的IL-9通过促进转录因子STAT3编码序列上727位丝氨酸的磷酸化, 使其活化并激活下游JAK/STAT通路, 最终促进肿瘤细胞的增殖并使其逃脱细胞凋亡作用的调

控。乳腺癌细胞系无法在IL-9特异性敲除的小鼠中生长, 表明IL-9可能是乳腺癌细胞生长与增殖所必需的。另外, IL-9的表达与慢性淋巴瘤的发病机制以及结肠癌细胞系CT26的生长有紧密的联系^[43]。该研究发现, 与野生型小鼠相比, CT26细胞在IL-9基因敲除小鼠中的生长明显延缓。

4.2 Th9细胞和IL-9的抗肿瘤作用

目前关于Th9细胞抗肿瘤作用的研究主要集中在黑色素瘤中。研究发现, 将体外诱导形成的Th9细胞过继转移到接种B16黑色素瘤细胞的小鼠体内, 能显著延缓肿瘤的生长; 使用重组IL-9蛋白来处理上述荷瘤小鼠也能达到延缓肿瘤生长的效果^[11,39,79]。外源性的IL-9能够抑制B16F10黑色素瘤细胞和小鼠肺癌细胞LLC1的生长, 但使用抗体中和IL-9, 其所介导的抑制肿瘤生长的作用则会消失^[9]; IL-9的受体IL-9R缺陷会显著促进黑色素瘤的生长^[80,81]。研究发现, 过继转移至荷瘤小鼠体内的Th9细胞在体内可获得Th1细胞的表型, 能分泌相当量的IFN- γ ^[82,83], 这可能是Th9细胞抗肿瘤功能的机制之一。此外, Th9细胞可通过分泌IL-9来刺激上皮细胞产生趋化因子CCR6的配体CCL20, 由其招募抗原提呈细胞进入肿瘤, 进而激活细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTLs), 对肿瘤细胞进行杀伤。Th9细胞还可以通过分泌相关细胞因子来间接抑制肿瘤的生长, 如Th9细胞可以通过分泌IL-21来激活固有免疫细胞, 包括NK细胞和肥大细胞等, 或者促进Th17细胞的分化, 以此来间接地达到抑制肿瘤生长的效果^[84]。因此, Th9细胞能够通过多种途径抑制黑色素瘤的生长。

5 Th9细胞与肿瘤过继免疫治疗

T细胞过继治疗作为近些年兴起的新型治疗手段, 是肿瘤免疫治疗中最有前景的治疗手段之一, 已经在一些癌症类型中取得了显著的治疗效果。过继治疗的效果主要取决于过继转移进体内的T细胞对肿瘤细胞的抑制活性及其在体内能够长期存活的持久能力^[85]。CD8⁺ T细胞过继转移到体内之后, 常表现出缺乏持久性的特点^[86], 而CD4⁺ T细胞分化所形成的多种Th亚群, 则有可能在体内具有相对较强的存活能力。CD4⁺ T细胞在不同条件下分化成不同的亚群, 其中细胞毒性Th1细胞在

过继转移到体内后仍然显示出容易耗竭的表型, 并且在持久性方面表现较差^[87]。后续的研究发现, Th17细胞在体外具有相较于Th1细胞较低的肿瘤抑制能力, 但是其过继转移到体内之后, 持久性明显增强^[6], 能够在体内存活更长的时间, 因而能够介导更好的过继治疗效果。Th9细胞是以大量分泌细胞因子IL-9为特征的新型辅助性T细胞亚群, 研究发现其兼具了高度的肿瘤抑制活性以及在体内长期存活的能力, 并具有良好的增殖特性。因此, Th9细胞是T细胞过继治疗的一个更优的选择^[7]。已有研究发现, Th9细胞在黑色素瘤小鼠模型中展现出了很强的控制肿瘤生长的能力^[9], 其效果优于Th1细胞和Th17细胞, 其抗肿瘤功效依赖IL-9的表达, 并且Th9细胞表现出由Pu.1-Traf6-NF- κ B信号激活介导的优良增殖特性^[7], 这也是其在体内能够长期存在并发挥较好抗肿瘤功能的原因之一。癌细胞表面抗原的丢失变异会导致接受过继治疗的患者出现耐药性, 从而导致治疗效果不佳。有研究发现, 与Th1/Tc1、Th17细胞相比, Th9细胞显示出强大的抑制抗原丢失变异的肿瘤细胞生长的能力^[88,89]。一方面, Th9细胞具有较强的直接杀伤肿瘤细胞作用; 另一方面, Th9细胞促进肿瘤内细胞外ATP的累积, 从而增强IFN- α/β 的分泌以及单核细胞的瘤内浸润^[88,89]。这些结果进一步证明了Th9细胞在肿瘤过继治疗中的优越性。

6 小结

Th9细胞是一类新型的CD4⁺辅助性T细胞亚群, 以分泌IL-9为主要特征。TGF- β 和IL-4是Th9细胞经典的诱导条件, 此外多种细胞因子能够促进Th9细胞的分化, 包括IL-1、IL-2、IL-6、IL-10、IL-21、IL-25和IL-33等。调控Th9细胞分化的转录程序比较复杂, 目前还没有发现其特征性转录因子, 但PU.1、NF- κ B、STAT5、STAT6、Foxo1、IRF4、BATF等转录因子已被证明参与了Th9细胞分化的转录调控。Th9细胞在肿瘤中的作用可能与肿瘤类型有关, 在黑色素瘤模型中显现出对肿瘤强大的抑制作用, 并且在T细胞过继治疗中, Th9细胞显示出了优于其他Th亚群的能力, 是非常有前景的一种可用于过继治疗的细胞类型, 从理论

基础到应用价值上均具有重要的研究意义。

参考文献

- [1] Ti D, Bai M, Li X, et al. Adaptive T cell immunotherapy in cancer. *Sci China Life Sci*, 2021, 64(3): 363-371
- [2] Titov A, Zmievskaya E, Ganeeva I, et al. Adoptive immunotherapy beyond CAR T-cells. *Cancers*, 2021, 13(4): 743
- [3] Wang Z, Wu Z, Liu Y, et al. New development in CAR-T cell therapy. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 53
- [4] Kumar A, Watkins R, Vilgelm AE. Cell therapy with TILs: training and taming T cells to fight cancer. *Front Immunol*, 2021, 12: 690499
- [5] Chruziel E, Urban-Wójciuk Z, Arcimowicz, et al. Adoptive cell therapy—harnessing antigen-specific T cells to target solid tumours. *Cancers*, 2020, 12(3): 683
- [6] Muranski P, Borman ZA, Kerkar SP, et al. Th17 cells are long lived and retain a stem cell-like molecular signature. *Immunity*, 2011, 35(6): 972-985
- [7] Lu Y, Wang Q, Xue G, et al. Th9 cells represent a unique subset of CD4⁺ T cells endowed with the ability to eradicate advanced tumors. *Cancer Cell*, 2018, 33(6): 1048-1060
- [8] Fiering SN, Ho GW. Speed kills: advancement in Th17 cell adoptive cell therapy for solid tumors. *Cancer Res*, 2020, 80(18): 3795-3796
- [9] Purwar R, Schlapbach C, Xiao S, et al. Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. *Nat Med*, 2012, 18(8): 1248-1253
- [10] Benoit-Lizon I, Apetoh L. Harnessing TH9 cells in cancer immunotherapy. *Semin Immunol*, 2021, 52: 101477
- [11] Lu Y, Hong S, Li H, et al. Th9 cells promote antitumor immune responses *in vivo*. *J Clin Invest*, 2012, 122(11): 4160-4171
- [12] Schmitt E, Germann T, Goedert S, et al. IL-9 production of naive CD4⁺ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF- β and IL-4, and is inhibited by IFN- γ . *J Immunol*, 1994, 153(9): 3989-3996
- [13] Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, et al. Transforming growth factor- β 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol*, 2008, 9(12): 1341-1346
- [14] Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, et al. IL-4 inhibits TGF- β -induced Foxp3⁺ T cells and, together with TGF- β , generates IL-9⁺ IL-10⁺ Foxp3 effector T cells. *Nat Immunol*, 2008, 9(12): 1347-1355
- [15] Takami M, Love RB, Iwashima M. TGF- β converts apoptotic stimuli into the signal for Th9 differentiation. *J*

- [Immunol](#), 2012, 188(9): 4369-4375
- [16] Anuradha R, George PJ, Hanna LE, et al. IL-4-, TGF- β -, and IL-1-dependent expansion of parasite antigen-specific Th9 cells is associated with clinical pathology in human lymphatic filariasis. [J Immunol](#), 2013, 191(5): 2466-2473
- [17] Liao W, Spolski R, Li P, et al. Opposing actions of IL-2 and IL-21 on Th9 differentiation correlate with their differential regulation of BCL6 expression. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2014, 111(9): 3508-3513
- [18] Schütze N, Trojandt S, Kuhn S, et al. Allergen-induced IL-6 regulates IL-9/IL-17A balance in CD4⁺ T cells in allergic airway inflammation. [J Immunol](#), 2016, 197(7): 2653-2664
- [19] Angkasekwinai P, Sodthawon W, Jeerawattanawart S, et al. ILC2s activated by IL-25 promote antigen-specific Th2 and Th9 functions that contribute to the control of *Trichinella spiralis* infection. [PLoS One](#), 2017, 12(9): e0184684
- [20] Verma M, Liu S, Michalec L, et al. Experimental asthma persists in IL-33 receptor knockout mice because of the emergence of thymic stromal lymphopoietin-driven IL-9⁺ and IL-13⁺ type 2 innate lymphoid cell subpopulations. [J Allergy Clin Immunol](#), 2018, 142(3): 793-803.e8
- [21] Pritchard AL, Carroll ML, Burel JG, et al. Innate IFNs and plasmacytoid dendritic cells constrain Th2 cytokine responses to rhinovirus: a regulatory mechanism with relevance to asthma. [J Immunol](#), 2012, 188(12): 5898-5905
- [22] Kim IK, Koh CH, Jeon I, et al. GM-CSF promotes antitumor immunity by inducing Th9 cell responses. [Cancer Immunol Res](#), 2019, 7(3): 498-509
- [23] Siracusa MC, Saenz SA, Hill DA, et al. TSLP promotes interleukin-3-independent basophil haematopoiesis and type 2 inflammation. [Nature](#), 2011, 477(7363): 229-233
- [24] Murugaiyan G, Beynon V, Pires Da Cunha A, et al. IFN- γ limits Th9-mediated autoimmune inflammation through dendritic cell modulation of IL-27. [J Immunol](#), 2012, 189(11): 5277-5283
- [25] Beriou G, Bradshaw EM, Lozano E, et al. TGF- β induces IL-9 production from human Th17 cells. [J Immunol](#), 2010, 185(1): 46-54
- [26] Schwartz DM, Farley TK, Richoz N, et al. Retinoic acid receptor alpha represses a Th9 transcriptional and epigenomic program to reduce allergic pathology. [Immunity](#), 2019, 50(1): 106-120
- [27] Xue G, Jin G, Fang J, et al. IL-4 together with IL-1 β induces antitumor Th9 cell differentiation in the absence of TGF- β signaling. [Nat Commun](#), 2019, 10(1): 1376
- [28] Végran F, Apetoh L, Ghiringhelli F. Th9 cells: a novel CD4 T-cell subset in the immune war against cancer. [Cancer Res](#), 2015, 75(3): 475-479
- [29] Lee JE, Zhu Z, Bai Q, et al. The role of interleukin-9 in cancer. [Pathol Oncol Res](#), 2020, 26(4): 2017-2022
- [30] Goswami R, Kaplan MH. A brief history of IL-9. [J Immunol](#), 2011, 186(6): 3283-3288
- [31] Rojas-Zuleta WG, Vásquez G. Th9 lymphocytes: a recent history from IL-9 to its potential role in rheumatic diseases. [Autoimmun Rev](#), 2016, 15(7): 649-655
- [32] Knoops L, Renaud JC. IL-9 and its receptor: from signal transduction to tumorigenesis. [Growth Factors](#), 2004, 22(4): 207-215
- [33] Fawaz LM, Sharif-Askari E, Hajoui O, et al. Expression of IL-9 receptor α chain on human germinal center B cells modulates IgE secretion. [J Allergy Clin Immunol](#), 2007, 120(5): 1208-1215
- [34] Nalleweg N, Chiriac MT, Podstawa E, et al. IL-9 and its receptor are predominantly involved in the pathogenesis of UC. [Gut](#), 2015, 64(5): 743-755
- [35] Hong CH, Chang KL, Wang HJ, et al. IL-9 induces IL-8 production via STIM1 activation and ERK phosphorylation in epidermal keratinocytes: a plausible mechanism of IL-9R in atopic dermatitis. [J Dermatological Sci](#), 2015, 78(3): 206-214
- [36] Martelli AM, Tabellini G, Ricci F, et al. PI3K/AKT/mTORC1 and MEK/ERK signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia: new options for targeted therapy. [Adv Biol Regulation](#), 2012, 52(1): 214-227
- [37] Li Y, Yu Q, Zhang Z, et al. TH9 cell differentiation, transcriptional control and function in inflammation, autoimmune diseases and cancer. [Oncotarget](#), 2016, 7(43): 71001-71012
- [38] Gorczynski R, Yu K, Chen Z. Anti-CD200R2, anti-IL-9, anti-IL-35, or anti-TGF- β abolishes increased graft survival and treg induction induced in cromolyn-treated CD200R1KO.CD200tg mice. [Transplantation](#), 2014, 97(1): 39-46
- [39] Ye ZJ, Zhou Q, Yin W, et al. Differentiation and immune regulation of IL-9-producing CD4⁺ T cells in malignant pleural effusion. [Am J Respir Crit Care Med](#), 2012, 186(11): 1168-1179
- [40] Lavorgna A, Matsuoka M, Harhaj EW. A critical role for IL-17RB signaling in HTLV-1 tax-induced NF- κ B activation and T-cell transformation. [PLoS Pathog](#), 2014, 10(10): e1004418
- [41] Hsieh TH, Hsu CY, Tsai CF, et al. A novel cell-penetrating peptide suppresses breast tumorigenesis by inhibiting β -catenin/LEF-1 signaling. [Sci Rep](#), 2016, 6(1): 19156
- [42] Eller K, Wolf D, Huber JM, et al. IL-9 production by regulatory T cells recruits mast cells that are essential for

- regulatory T cell-induced immune suppression. *J Immunol*, 2011, 186(1): 83-91
- [43] Hoelzinger DB, Dominguez AL, Cohen PA, et al. Inhibition of adaptive immunity by IL9 can be disrupted to achieve rapid T-cell sensitization and rejection of progressive tumor challenges. *Cancer Res*, 2014, 74(23): 6845-6855
- [44] Qiu L, Lai R, Lin Q, et al. Autocrine release of interleukin-9 promotes Jak3-dependent survival of ALK⁺ anaplastic large-cell lymphoma cells. *Blood*, 2006, 108(7): 2407-2415
- [45] Koo GC, Tan SY, Tang T, et al. Janus kinase 3-activating mutations identified in natural killer/T-cell lymphoma. *Cancer Discov*, 2012, 2(7): 591-597
- [46] Fang Y, Chen X, Bai Q, et al. IL-9 inhibits HTB-72 melanoma cell growth through upregulation of p21 and TRAIL. *J Surg Oncol*, 2015, 111(8): 969-974
- [47] Lu Y, Wang Q, Yi Q. Anticancer Tc9 cells: long-lived tumor-killing T cells for adoptive therapy. *Oncoimmunology*, 2014, 3(5): e28542
- [48] Lu Y, Hong B, Li H, et al. Tumor-specific IL-9-producing CD8⁺ Tc9 cells are superior effector than type-I cytotoxic Tc1 cells for adoptive immunotherapy of cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(6): 2265-2270
- [49] Chang HC, Sehra S, Goswami R, et al. The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat Immunol*, 2010, 11(6): 527-534
- [50] Gerlach K, Hwang YY, Nikolaev A, et al. TH9 cells that express the transcription factor PU.1 drive T cell-mediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells. *Nat Immunol*, 2014, 15(7): 676-686
- [51] Chang HC, Zhang S, Thieu VT, et al. PU.1 expression delineates heterogeneity in primary Th2 cells. *Immunity*, 2005, 22(6): 693-703
- [52] Elyaman W, Bassil R, Bradshaw EM, et al. Notch receptors and smad3 signaling cooperate in the induction of interleukin-9-producing T cells. *Immunity*, 2012, 36(4): 623-634
- [53] Vyas SP, Hansda AK, Kaplan MH, et al. Calcitriol regulates the differentiation of IL-9-secreting Th9 cells by modulating the transcription factor PU.1. *J Immunol*, 2020, 204(5): 1201-1213
- [54] Ahyi ANN, Chang HC, Dent AL, et al. IFN regulatory factor 4 regulates the expression of a subset of Th2 cytokines. *J Immunol*, 2009, 183(3): 1598-1606
- [55] Staudt V, Bothur E, Klein M, et al. Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity*, 2010, 33(2): 192-202
- [56] Végran F, Berger H, Boidot R, et al. The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of TH9 cells. *Nat Immunol*, 2014, 15(8): 758-766
- [57] Tsuda M, Hamade H, Thomas LS, et al. A role for BATF3 in TH9 differentiation and T-cell-driven mucosal pathologies. *Mucosal Immunol*, 2019, 12(3): 644-655
- [58] Sundrud MS, Hogan SP. What's old is new again: Batf transcription factors and Th9 cells. *Mucosal Immunol*, 2019, 12(3): 583-585
- [59] Goswami R, Jabeen R, Yagi R, et al. STAT6-dependent regulation of Th9 development. *J Immunol*, 2012, 188(3): 968-975
- [60] Perumal NB, Kaplan MH. Regulating IL9 transcription in T helper cells. *Trends Immunol*, 2011, 32(4): 146-150
- [61] Hadjur S, Bruno L, Hertweck A, et al. IL4 blockade of inducible regulatory T cell differentiation: the role of Th2 cells, Gata3 and PU.1. *Immunol Lett*, 2009, 122(1): 37-43
- [62] Calnan DR, Brunet A. The foxO code. *Oncogene*, 2008, 27(16): 2276-2288
- [63] Malik S, Sadhu S, Elesela S, et al. Transcription factor Foxo1 is essential for IL-9 induction in T helper cells. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 815
- [64] Buttrick TS, Wang W, Yung C, et al. Foxo1 promotes Th9 cell differentiation and airway allergy. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 818
- [65] Nakatsukasa H, Zhang D, Maruyama T, et al. The DNA-binding inhibitor Id3 regulates IL-9 production in CD4⁺ T cells. *Nat Immunol*, 2015, 16(10): 1077-1084
- [66] Wang Y, Bi Y, Chen X, et al. Histone deacetylase SIRT1 negatively regulates the differentiation of interleukin-9-producing CD4⁺ T cells. *Immunity*, 2016, 44(6): 1337-1349
- [67] Roy S, Awasthi A. ATP triggers human Th9 cell differentiation via nitric oxide-mediated mTOR-HIF1 α pathway. *Front Immunol*, 2019, 10: 1120
- [68] Olson MR, Verdan FF, Hufford MM, et al. STAT3 impairs STAT5 activation in the development of IL-9-secreting T cells. *J Immunol*, 2016, 196(8): 3297-3304
- [69] Yang XO, Zhang H, Kim BS, et al. The signaling suppressor CIS controls proallergic T cell development and allergic airway inflammation. *Nat Immunol*, 2013, 14(7): 732-740
- [70] Canaria DA, Yan B, Clare MG, et al. STAT5 represses a STAT3-independent Th17-like program during Th9 cell differentiation. *J Immunol*, 2021, 207(5): 1265-1274
- [71] Xiao X, Balasubramanian S, Liu W, et al. OX40 signaling favors the induction of TH9 cells and airway inflammation. *Nat Immunol*, 2012, 13(10): 981-990
- [72] Jash A, Sahoo A, Kim GC, et al. Nuclear factor of activated T cells 1 (NFAT1)-induced permissive chromatin

- modification facilitates nuclear factor- κ B (NF- κ B)-mediated interleukin-9 (IL-9) transactivation. *J Biol Chem*, 2012, 287(19): 15445-15457
- [73] Qiu X, Shi Q, Huang Y, et al. miR-143/145 inhibits Th9 cell differentiation by targeting NFATc1. *Mol Immunol*, 2021, 132: 184-191
- [74] Shen Y, Song Z, Lu X, et al. Fas signaling-mediated TH9 cell differentiation favors bowel inflammation and anti-tumor functions. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2924
- [75] Bassil R, Orent W, Olah M, et al. BCL6 controls Th9 cell development by repressing *Il9* transcription. *J Immunol*, 2014, 193(1): 198-207
- [76] Cimmino L, Martins GA, Liao J, et al. Blimp-1 attenuates Th1 differentiation by repression of *ifng*, *tbx21*, and *bcl6* gene expression. *J Immunol*, 2008, 181(4): 2338-2347
- [77] Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, et al. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science*, 2009, 325(5943): 1006-1010
- [78] Kallies A, Xin A, Belz GT, et al. Blimp-1 transcription factor is required for the differentiation of effector CD8⁺ T cells and memory responses. *Immunity*, 2009, 31(2): 283-295
- [79] You FP, Zhang J, Cui T, et al. Th9 cells promote antitumor immunity via IL-9 and IL-21 and demonstrate atypical cytokine expression in breast cancer. *Int Immunopharmacol*, 2017, 52: 163-167
- [80] Shang Y, Kakinuma S, Nishimura M, et al. Interleukin-9 receptor gene is transcriptionally regulated by nucleolin in T-Cell lymphoma cells. *Mol Carcinog*, 2012, 51(8): 619-627
- [81] Li HJ, Sun QM, Liu LZ, et al. High expression of IL-9R promotes the progression of human hepatocellular carcinoma and indicates a poor clinical outcome. *Oncol Rep*, 2015, 34(2): 795-802
- [82] Wu B, Huang C, Kato-Maeda M, et al. IL-9 is associated with an impaired Th1 immune response in patients with tuberculosis. *Clin Immunol*, 2008, 126(2): 202-210
- [83] Liu J, Harberts E, Tammaro A, et al. IL-9 regulates allergen-specific Th1 responses in allergic contact dermatitis. *J Investig Dermatol*, 2014, 134(7): 1903-1911
- [84] Humblin E, Thibaudin M, Chalmin F, et al. IRF8-dependent molecular complexes control the Th9 transcriptional program. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 2085
- [85] Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(4): 269-281
- [86] Klebanoff CA, Gattinoni L, Palmer DC, et al. Determinants of successful CD8⁺ T-cell adoptive immunotherapy for large established tumors in mice. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(16): 5343-5352
- [87] Hunder NN, Wallen H, Cao J, et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4⁺ T cells against NY-ESO-1. *N Engl J Med*, 2008, 358(25): 2698-2703
- [88] Xue G, Zheng N, Fang J, et al. Adoptive cell therapy with tumor-specific Th9 cells induces viral mimicry to eliminate antigen-loss-variant tumor cells. *Cancer Cell*, 2021, 39(12): 1610-1622.e9
- [89] Sek K, Chan CW, Beavis PA, et al. Adoptive transfer of tumor-specific Th9 cells eradicates heterogeneous antigen-expressing tumor cells. *Cancer Cell*, 2021, 39(12): 1564-1566