

· 专题二：双清论坛“面向未来的中国医学—免疫视角下的中西医融合之道” ·

单分子尺度下的免疫调控和干预策略^{*}

王爽^{1, 2, 3**}

1. 中国科学院物理研究所, 北京 100190
2. 中国科学院大学物理学院, 北京 100049
3. 松山湖材料实验室, 东莞 523808

[摘要] 癌症免疫疗法通过提高患者自身免疫力来识别和杀伤肿瘤目标, 涉及到免疫 T 细胞和其他细胞之间(肿瘤或抗原呈递细胞)的直接相互作用。受周围微观环境热涨落的影响, 精准探测这种力学信号是免疫疗法面临的重要挑战。单分子技术具备高时空分辨的优势, 能够克服环境热涨落的影响, 通过实时测量单个生物大分子的时空位置、结构转变、能量交换和信息流动等定量参数来刻画生物大分子的动力学行为。将单分子技术应用到免疫疗法相关的研究中, 精准测量免疫疗法涉及的受体—配体的力学相互作用和自身动态结构, 将为免疫疗法的发展提供单分子尺度的思考和见解, 实现物理学和免疫学的交叉融合发展。

[关键词] 免疫疗法; 单分子物理生物学; 单分子磁镊; 单分子荧光成像技术; 受体—配体力学相互作用

1 恶性肿瘤和免疫疗法

恶性肿瘤的复发和转移是造成人类死亡的重要因素之一, 2020 年度全球恶性肿瘤新发病例高达 1 929 万例, 死亡病例 996 万例。其中, 中国年度新发病例 457 万例, 占全球新发病例的 23.7%; 死亡病例 300 万例, 占全球死亡病例的 30.2%^[1]

近些年, 面向恶性肿瘤复发和转移的免疫疗法发展迅速, 其通过增强患者自身免疫系统的肿瘤识别和杀伤能力来实现恶性肿瘤治疗^[2, 3]。目前, 免疫检查点抑制剂、过继性 T 细胞疗法等肿瘤免疫疗法已投入临床使用, 并在多种恶性肿瘤治疗中取得显著治疗效果。

人体免疫系统通过释放 B 细胞和 T 细胞, 来抵抗外界的病毒和细菌入侵以及清除人体自身的肿瘤细胞, 是维持人体生命健康的重要免疫屏障。就免疫系统清除肿瘤细胞而言, 其大致过程是, 抗原呈递细胞吞噬并分解肿瘤细胞抗原, 将所分解的片段



王爽 中国科学院物理研究所副研究员, 主要研究方向为转录机器及调控相关的单分子动力学, 相关研究成果发表在 *Nature Communications*、*Proceedings of the National Academy of Sciences* 和 *Nucleic Acids Research* 等期刊, 目前主持国家自然科学基金项目 2 项, 中国科学院青年创新促进会员项目 1 项。

呈递给 T 细胞表面的受体(T Cell Receptor, TCR), 触发淋巴因子分泌, 进而实现 T 细胞的激活与扩增; 激活的 T 细胞通过血液和淋巴循环进入肿瘤组织中, 识别并杀伤肿瘤细胞^[4]。然而, 恶性肿瘤大多表现了极强的免疫抑制性, 使得 T 细胞无法正常识别和杀伤肿瘤细胞, 造成肿瘤免疫逃逸。

为了让肿瘤患者体内的 T 细胞具备识别和杀伤肿瘤细胞的能力, 科学家们开发了一种称为嵌合受体 T 细胞疗法(Chimeric Antigen Receptor T-cell Therapy, CAR T), 其基本思路是从患者血液中提

收稿日期: 2022-04-28; 修回日期: 2022-06-10

* 本文根据第 303 期“双清论坛”讨论的内容整理

** 通信作者, Email: shuangwang@iphy.ac.cn

本文受到国家自然科学基金项目(12004420, 32071228)的资助。

取 T 细胞,在 T 细胞膜表面嵌入靶向特定肿瘤相关抗原的抗原受体结合区域和 T 细胞激活共刺激因子结构域等,随后将改造的 T 细胞进行体外培养,待其数量符合治疗需求(大约为几十亿 CAR T 细胞/人)且质量合格后,再将 CAR T 输入到患者体内来特异性识别并杀死肿瘤细胞^[4]。然而,源自患者自身的 CAR T 疗法并不适用于所有肿瘤患者,原因在于相当一部分肿瘤患者血液中的 T 细胞数量非常少,无法通过现有技术获得足够量的 CAR T 细胞。因此,探索 T 细胞激活的物理机理,大幅度提升 T 细胞激活效率这一重要科学问题亟待解决。此外,CAR T 疗法是通过 T 细胞与肿瘤细胞之间的相互作用来实现对肿瘤细胞的杀伤功能,T 细胞与肿瘤细胞之间的相互作用强弱也会影响最终疗效。

现阶段细胞免疫研究认为抗原呈递细胞与 T 细胞的配体存在特异性识别,从而激活 T 细胞,或者识别靶细胞;而 T 细胞与目标肿瘤细胞表面的配体相互作用,决定了 T 细胞对目标肿瘤细胞的靶向识别和杀伤。近期研究表明(图 1),T 细胞激活以及靶向识别等过程中存在 TCR 受体和配体 (Peptide-Major Histocompatibility Complex, pMHC) 之间的力学相互作用,这种作用力的减弱或完全丧失将削弱 T 细胞和抗原结合能力,进而影响 T 细胞的激活效率及对靶向细胞的特异作用,并且这种力学作用会引发 T 细胞形变,而 T 细胞形变情况可能受 TCR 受体-pMHC 配体对空间分布的调控^[5]。因此,在激活和靶向杀伤过程中,T 细胞通过与其他相关细胞之间的直接物理接触以及接触所产生的相互作用力,来实现自身的免疫功能,这既涉及到生物大分子之间的力学相互作用和空间特异性分布等物理学问题,又和 T 细胞的生理功能密切相关,是需要借助物理学和生物学共同来探索的基础课题。

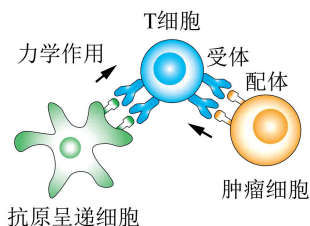


图 1 T 细胞、抗原呈递细胞和肿瘤细胞间的力学作用示意图

2 免疫疗法面临的挑战

在 T 细胞激活和杀伤靶向细胞等过程中,众多受体—配体之间通过力学相互作用和特异性结合来活化 T 细胞,如何精准地测量 T 细胞和靶细胞间的受体—配体力学相互作用以及相关构象变化,追溯其决定因素,总结归纳不同受体—配体对间的力学作用的相似性和差异性,是免疫疗法面临的重要挑战。能否通过力学干预来调节 T 细胞的激活和杀伤靶向细胞等过程、T 细胞的免疫功能是否存在统一的力学调控规律,这是免疫学领域尚未解答的重要科学问题。无论离体还是在体免疫疗法研究,受体—配体间的力学信号以及相关的构象信息都受到周围热涨落的影响,无法运用传统方法表征,须借助新的物理学测量方法来深入解析 T 细胞激活机理。

3 单分子技术

物理生物学基于物理方法的精密测量和生物对象的离体构建,是生物学研究的新范式,也是物理学研究领域的自然拓展,不局限于运用蛋白表达水平、浓度、亲和性、聚集状态和信号路径等特征参量来描述生命过程,更注重借助生物对象的时空位置、结构转变、能量交换和信息流动等定量参数刻画生命过程的动力学。尽管生命十分复杂,仍然是由单个分子组装而成,仍然有它最基本的单元即细胞。单分子物理生物学围绕定量理解生命过程动力学这一重要目标,发展造物致知的研究理念,以单分子为核心,将体外构建的单纯对象与活细胞上构建的复杂体系相结合,利用光、热、磁、电、力等技术,定量解析生命体系的微观动力学,量化各种核心参数,力图揭示生命过程的运行机理并为理解生物学领域的相关规律提供定量实验依据。

3.1 单分子操纵技术

单分子技术是探索单分子尺度物理生物学规律的关键技术,是基于物理学原理所发展的一类方法,以单个生物大分子为研究对象,借助新的显微测量手段进行力学操控或空间位置示踪,精准测量生物大分子的时空位置、结构转变、能量交换和信息流动等参数,揭示单个生物大分子的动力学信息。根据是否施加外力,单分子技术可分为单分子操纵和单分子荧光成像两类技术。

单分子操纵技术包括光镊、磁镊、原子力显微和玻璃微针等操纵技术。其中,光镊通过激光照射并在微球表面产生光压,从而借助操纵微球来操纵连接于微球表面的生物大分子,通过测量生物大分子的末端距离来精密测量生物大分子的动态结构,具备纳米级的测量精度和毫秒级的时间精度^[6],但也存在低数据采集效率的限制。单分子磁镊技术把感兴趣的生物大分子一端连接玻璃表面,另一端连接磁性微球表面,通过施加磁场来拉伸或旋转磁性微球,进而实现对生物大分子的操控^[7, 8](图 2A)。通过实时测量磁性微球相对于玻璃表面的距离变化,进而实时反映生物大分子的末端距离变化,即生物大分子微观结构变化,既可以实现恒力下对生物大分子结构的实时观测,也可以实时调节外力,测量生物大分子结构在外力下的响应。相比于光镊技术,单分子磁镊同样具备高的时间和空间分辨率,能够实现 1 毫秒的快速曝光,并且能够实现单个碱基尺度(~ 0.34 纳米)的空间精度,以及长时间尺度的数据采集,实现对生物大分子快速动态过程的精密测量。单分子磁镊尤其具备高通量数据采集能力,能够实时对近百个 DNA 分子的结构变化进行精密测量。单分子磁镊技术所面向的科学问题是,生物大分子的动态结构,并探寻导致这种结构变化的原因,即生物大分子之间的相互作用。以基因转录过程为例, RNA 聚合酶与 DNA 相互作用,导致 DNA 结构变化。利用单分子磁镊技术高时空分辨地测量磁性微球位置变化,进而精准地展现 RNA 聚合酶与 DNA 相互作用和自身动态行为,这是单分子操纵技术精密探测生物大分子之间力学相互作用和自身形态变化的体现,为理解其相互作用机理和结构演化规律提供定量实验依据^[9, 10]。

3.2 单分子荧光成像技术

单分子荧光成像技术借助荧光分子、荧光量子

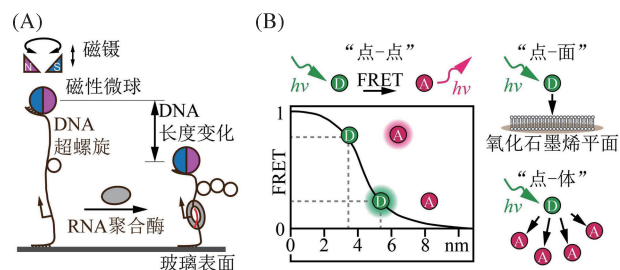


图 2 单分子技术示意图(A. 单分子磁镊操作技术, B. 单分子荧光技术)

点或荧光纳米金刚石颗粒等探针来修饰所关注的生物大分子,利用先进的显微成像平台来观测荧光分子的时间和空间分布,进而探索所标记生物大分子的时空动态演化机制。具备高通量、高时空分辨率的优势,能够实现对大量荧光信号的纳米甚至亚纳米尺度空间信息的平行测量。

单分子荧光技术包括单分子荧光共振能量转移、多通道荧光共定位和蛋白介导荧光增强等技术。其中,单分子荧光共振能量转移技术的物理学本质是偶极-偶极相互作用导致的偶极子间的能量传递(图 2B)。当偶极子为荧光分子时,若其中一个荧光分子(供体荧光分子)的发射光谱和另一个荧光分子(受体荧光分子)的吸收光谱重叠,那么当二者靠近到 2~8 纳米时,就会发生能量转移现象,即供体荧光分子的发射能量被受体荧光分子吸收进而发荧光,称为荧光共振能量转移^[11]。这种能量转移的效率与两个荧光分子之间距离的 6 次方成反比,是一种非常灵敏的探测两个分子距离的方法。荧光共振能量转移不但能发生在一对荧光分子之间,还可发生在多个荧光分子之间,即能量从一个供体荧光分子传递给若干受体荧光分子,即多色荧光共振能量转移技术,能够实时观测生物大分子局部运动行为^[12, 13]。

此外,某些金属和介质膜材料具备淬灭荧光的特性,单个荧光分子靠近这种材料表面时,将发生荧光能量被介质吸收或转变成等离子激发形式在介质表面传递。以氧化石墨烯涂层构建准二维平面,当荧光分子靠近氧化石墨烯平面时,将发生能量从荧光分子向氧化石墨烯平面转移的现象,其能量传递效率与二者距离的 4 次方成反比,即可借助这种现象来精密测量生物大分子相对于二维平面的垂直距离。在氧化石墨烯平面上修饰磷脂双分子层,其厚度是 4 纳米,当荧光标记的生物大分子落到磷脂双分子层表面并与磷脂双分子层发生动态相互作用时,其荧光光强将被氧化石墨烯吸收而发生能量转移,从而荧光分子的光强将非常灵敏地反映生物大分子在磷脂双分子层上面的法向位置,达到 5 埃的空间分辨率^[14]。这是一种高空间分辨地研究离体生物膜表面生物大分子动力学的方法。

进一步拓展上述荧光成像技术,将人工的生物膜构建成脂质体,可以模拟没有任何细胞器的空的细胞,在脂质体内部填充了大量受体荧光分子,当供

体荧光分子在脂质体表面与膜发生相互作用或产生构象变化时,供体荧光分子的光强将会转移到脂质体内部的受体荧光分子,从而发生显著的光强变化,可以用来研究膜外供体分子相对于脂质体表面法向位置变化和动力学,达到 6 埃的空间分辨率^[15]。在活细胞周围填充大量受体荧光分子,可以将上述方法推广到活细胞尺度,可以精密地测量生物大分子在活细胞表面的运动行为和构象变化,达到 1 纳米的空间分辨率^[16]。

综上,单分子荧光成像技术能够非常灵敏地探测荧光探针标记的生物大分子的空间分布,并且根据偶极—偶极相互作用,可以精密测量生物大分子之间、生物大分子与细胞膜之间甚至生物大分子在活细胞表面的微观距离和生物大分子结构变化,是探索细胞膜表面甚至活细胞膜表面生物大分子空间分布和动态演化等信息的有效方法。值得一提的是,单分子荧光成像技术的时间分辨率往往受限于相机的采样频率,以上单分子荧光成像技术均采用高灵敏电耦合相机 (Electron-multiplying CCD, EMCCD),达到 100 Hz 的采样率。随着相机技术的发展,科研级 CMOS 相机 (sCMOS) 提供了 1 000 Hz 采样频率,实现了对转运 RNA 与核糖体之间的快速结合/解离动态行为的精密测量^[17]。相信随着科学技术的发展,人们将能够探索更加精细的生命行为,深入理解生命的奥秘。

3.3 单分子操纵和荧光成像联用技术

单分子操纵和单分子荧光成像技术分别关注物理生物学不同侧面的信息:单分子操纵技术侧重研究对象的力学响应行为,而单分子荧光成像技术更加关注研究对象的微观时空分布及演变行为,两类信息互为补充、共同印证研究对象的动力学行为。单分子操纵和荧光成像联用技术通过把两种单分子技术耦合联用,同步探测研究对象的力学响应行为和微观时空分布的动态演变等的协同关联,提供更加全面的单分子尺度的物理生物学信息^[18]。

4 单分子技术和免疫疗法

如前所述,精准测量 T 细胞和其他细胞间的受体—配体力学相互作用以及相关构象变化是免疫疗法面临的重要挑战,而这些细胞间的受体—配体力学相互作用和相关构象变化等信息也是单分子物理生物学重点关注的研究对象,可以借助单分子技术

来深度解析单个受体—配体的时空位置、结构转变、能量交换和信息流动等物理学参数,从单分子动力学角度来刻画细胞间的受体—配体力学相互作用和相关构象变化等的物理机理。因此,借鉴单分子物理生物学所蕴含的精密测量和研究对象的离体构建等思想,来探索免疫疗法相关的 T 细胞与其他细胞表面之间的直接力学相互作用,并推动免疫学研究的发展存在可行性。

最近研究表明,人们运用光镊操纵发现了 TCR 受体与其配体结合以及外力调节的方向性,这些研究结果暗示 TCR 受体能够响应力学信号的方向性,并将其转变为生物学信号^[19]。另外,利用玻璃微针技术分别操控红细胞和 T 细胞,来测量两个细胞之间的 TCR 受体和 MHC 配体之间的力学相互作用,发现该力学作用通过改变 MHC 配体的构象来稳定 TCR 受体和 MHC 配体之间的特异性结合,暗示了力学信号对 T 细胞免疫响应的潜在调控^[20]。另一项研究工作,应用单分子磁镊方法精确测量了 SARSII 相关蛋白与细胞表面配体之间的相互作用力^[21]。这两项研究证明了,单分子技术能够应用于直接观测 T 细胞与其他细胞表面之间各种配体的相互作用和空间分布,并研究对 T 细胞活性的影响。

研究设想:运用单分子荧光成像技术和单分子磁镊操纵技术联用策略,借助其高通量数据采集的优势,利用化学键合方法实现对 T 细胞表面若干种类配体的特异性荧光修饰,并连接磁性微球探针,T 细胞周围填充受体荧光分子,通过多色荧光信号的空间定位来探测不同种类配体在 T 细胞表面的三维空间分布,通过精密测量磁性微球的力学信号来

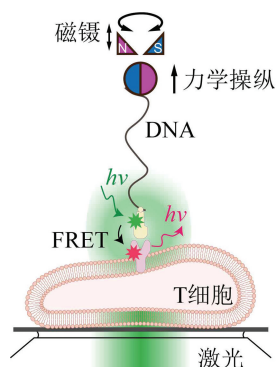


图 3 单分子荧光成像和磁镊操纵技术联用策略探索 T 细胞膜表面配体—受体相互作用及空间分布的示意图

探测不同种类配体之间的相互作用力的大小,总结归纳受体—配体之间的力学信号和三维空间分布的关联性,揭示该力学信号对 T 细胞激活和杀伤靶细胞能力的潜在调节规律,为 T 细胞免疫疗法的发展提供新思路(图 3)。

探索 T 细胞和其他细胞间的受体—配体力学相互作用以及相关构象变化等方面的规律将有望通过力学干预的方式,来改变 T 细胞和其他细胞间的受体—配体的相互作用力的强弱,从而调节 T 细胞的自身激活情况和杀伤靶向细胞的能力,从物理学的角度对现有的 CAR T 疗法的一些关键难题提出新的解决方案,推动免疫疗法研究的发展。

参 考 文 献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 2021, 71(3): 209—249.
- [2] Fridman WH, Zitvogel L, Sautès - Fridman C, et al. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2017, 14 (12): 717—734.
- [3] Weigel B, den Boer AT, Wagena E, et al. Cytotoxic T cells are able to efficiently eliminate cancer cells by additive cytotoxicity. *Nature Communications*, 2021, 12: 5217.
- [4] Jackson HJ, Rafiq S, Brentjens RJ. Driving CAR T-cells forward. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2016, 13(6): 370—383.
- [5] Liu Y, Blanchfield L, Ma VPY, et al. DNA-based nanoparticle tension sensors reveal that T-cell receptors transmit defined pN forces to their antigens for enhanced fidelity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(20): 5610—5615.
- [6] Neuman KC, Block SM. Optical trapping. *Review of Scientific Instruments*, 2004, 75(9): 2787—2809.
- [7] Gosse C, Croquette V. Magnetic tweezers; micromanipulation and force measurement at the molecular level. *Biophysical Journal*, 2002, 82(6):3314—3329.
- [8] Revyakin A, Ebright RH, Strick TR. Promoter unwinding and promoter clearance by RNA polymerase: detection by single-molecule DNA nanomanipulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(14): 4776—4780.
- [9] Lerner E, Chung S, Allen BL, et al. Backtracked and paused transcription initiation intermediate of Escherichia coli RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(43): 6562—6571.
- [10] Wang S, Han Z, Libri D, et al. Single-molecule characterization of extrinsic transcription termination by Sen1 helicase. *Nature Communications*, 2019, 10: 1545.
- [11] Ha T, Enderle T, Ogletree DF, et al. Probing the interaction between two single molecules; fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93 (13): 6264—6268.
- [12] Hohng S, Joo C, Ha T. Single-molecule three-color FRET. *Biophysical Journal*, 2004, 87(2): 1328—1337.
- [13] Lee J, Lee S, Ragunathan K, et al. Single-molecule four-color FRET. *Angewandte Chemie*, 2010, 122(51): 10118—10121.
- [14] Li Y, Qian ZY, Ma L, et al. Single-molecule visualization of dynamic transitions of pore-forming peptides among multiple transmembrane positions. *Nature Communications*, 2016, 7: 12906.
- [15] Ma DF, Xu CH, Hou WQ, et al. Detecting single-molecule dynamics on lipid membranes with quenchers-in-a-liposome FRET. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58 (17): 5577—5581.
- [16] Hou WQ, Ma DF, He XL, et al. Subnanometer-precision measurements of transmembrane motions of biomolecules in plasma membranes using quenchers in extracellular environment. *Nano Letters*, 2021, 21(1): 485—491.
- [17] Juette MF, Terry DS, Wasserman MR, et al. Single-molecule imaging of non-equilibrium molecular ensembles on the millisecond timescale. *Nature Methods*, 2016, 13(4): 341—344.
- [18] Comstock MJ, Whitley KD, Jia HF, et al. Direct observation of structure-function relationship in a nucleic acid-processing enzyme. *Science*, 2015, 348 (6232): 352—354.
- [19] Kim ST, Takeuchi K, Sun ZY J, et al. The $\alpha\beta$ T cell receptor is an anisotropic mechanosensor. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(45): 31028—31037.
- [20] Wu P, Zhang TT, Liu BY, et al. Mechano-regulation of peptide-MHC class I conformations determines TCR antigen recognition. *Molecular Cell*, 2019, 73(5): 1015—1027. e7.
- [21] Hu W, Zhang Y, Fei PY, et al. Mechanical activation of spike fosters SARS-CoV-2 viral infection. *Cell Research*, 2021, 31(10): 1047—1060.

Single-Molecule View of the Strategy for Immunological Regulation

Shuang Wang^{1, 2, 3*}

1. *Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190*

2. *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049*

3. *Songshan Lake Materials Laboratory, Dongguan 523808*

Abstract Immunotherapy for cancer targets and kills tumors via enhancing the immunity of individual patients, where the treatment effects can be significantly regulated by the interactions between T cells and targeted cells such as tumors or antigen-presenting cells. Due to the ubiquitous thermal fluctuations of the microenvironments around cells, precise measurements of the mechanistic information remain challenging. Single-molecule techniques possessing high temporal-spatial resolutions can overcome these thermal fluctuations and aim to describe the dynamics of biological molecules via monitoring their temporal-spatial distributions, structural transition, energy exchange and information transmission. Application of single-molecule techniques in studying receptor-ligand interactions and related structural transitions involved in immunotherapy may provide ideas and comments from a single-molecule view and shed light on the cross-development of physics and immunology.

Keywords immunotherapy; single-molecule physical biology; single-molecule magnetic trap; single-molecule fluorescence imaging; receptor-ligand force interaction

(责任编辑 魏鹏飞 姜钧译)

* Corresponding Author, Email: shuangwang@iphy.ac.cn