

文章编号: 1004-7220(2024)05-0796-10

T 细胞力学免疫学研究进展

吴松芳, 娄继忠

(中国科学院生物物理研究所, 表观遗传调控与干预重点实验室, 北京 100101)

摘要: T 细胞是获得性免疫的核心之一, T 细胞受体(T cell receptor, TCR)对抗原的特异性识别是启动抗肿瘤、抗病毒免疫应答的关键过程。近年来的研究表明力在 T 细胞免疫反应中起着重要的调控作用, 为力学免疫学这一新兴领域奠定了基础。本文重点讨论力协助 TCR 区分特异性抗原和自身非特异性抗原的机制, 以及力在启动 TCR 跨细胞膜信号传导及触发 T 细胞激活过程中发挥的关键作用。总结了力学免疫学研究中新的生物物理单分子工具和先进的成像技术, 这些工具的能够在分子和细胞尺度上深入揭示力作用的重要性。本文基于国内外专家团队的研究成果, 并结合本团队研究工作, 对力在 T 细胞功能中的作用进行总结探讨, 为深入理解力学免疫学领域的前沿热点和探索新的研究方向提供系统框架。

关键词: T 细胞受体; 逆锁键; 力学传导; 单分子力谱; 肿瘤免疫治疗; 力学免疫学

中图分类号: R 318.01 **文献标志码:** A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2024.05.002

Advances in T Cell Mechanoimmunology

WU Songfang, LOU Jizhong

(Key Laboratory of Epigenetic Regulation and Intervention, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: T cells play an essential role in adaptive immunity, and the specific recognition of antigens by T cell receptors (TCRs) is the key in initiating anti-tumor and antiviral immune responses. Recent studies have demonstrated that force plays an important regulatory role in T cell immune responses, laying the foundation for the emerging field of mechanoimmunology. In this review, the mechanisms by which force assists TCRs in distinguishing between specific antigens and non-specific antigens, as well as the critical role force plays in initiating TCR transmembrane signaling and triggering T cell activation are mainly discussed. The novel biophysical single-molecule tools and advanced imaging techniques that can deeply reveal the importance of mechanical forces at the molecular and/or cellular level are summarized. Based on the research results of domestic and foreign expert teams, combined with the research work of our team, this review summarizes and discusses the role of force in T cell function, so as to provide a system framework for deeply understanding the cutting-edge hotspots in the field of mechanoimmunology and exploring new research directions.

Key words: T cell receptor; catch bond; mechanotransduction; single-molecule force spectroscopy; cancer immunotherapy; mechanoimmunology

收稿日期: 2024-10-05; 修回日期: 2024-10-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(T2394513, 32090044)

通信作者: 娄继忠, 研究员, E-mail: jlou@ibp.ac.cn

几十年来,“力”被认为是细胞适应微环境的重要物理参数。无论是外部施加,还是内部产生的力,细胞都能利用力来调节其各种作用,如黏附、迁移到分化和免疫功能等。例如,在感知来自细胞外基质(extracellular matrix, ECM)或邻近细胞的力输入时,天然的力感受器,即整合素、钙黏素、T 细胞受体和 Notch 等,受力后产生构象的改变并触发力学转导来调节细胞的反应^[1]。尤其,T 淋巴细胞在识别抗原提呈细胞(antigen-presenting cells, APCs)表面的同源抗原时,可利用这种力敏感性来解读信号,这是适应性免疫应答的关键过程。T 细胞受体(T cell receptor, TCR)是在 T 淋巴细胞上表达的跨膜多亚基复合体,为多种 T 淋巴细胞类型执行一系列抗原识别任务,并将识别转化为生化信号,主要用于调节宿主适应性免疫防御过程中的淋巴细胞生存、生长、分化和效应功能等。T 细胞在迁移、抗原识别、活化和功能过程中都受到并产生力,同时进行其免疫监视和效应活性。研究表明,T 细胞的信号激活触发需要剪切力或拉力施加于 TCR^[2-3]。实验表明,细胞毒性 T 淋巴细胞也会通过施加力来优化其对靶细胞的杀伤功能^[4]。本文从以下几个方面综述目前国内外在 T 细胞激活与信号传导中的力学免疫学的研究进展。

1 T 细胞受到自发或外源机械力的调控

T 细胞与 APCs 的互相作用主要是通过 TCR 识别 APCs 的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)上的抗原肽(peptide MHC, pMHC)。一旦 TCR 与同源的 pMHC 结合,可以看到 T 细胞对 APCs 施加周期性的推力和拉力。这些机械力主要是由激活后的 T 细胞骨架蛋白 F-actin 的快速重组自发产生的,并参与形成一个特殊的被称为“免疫突触”(immune synapse, IS)的细胞-细胞界面,IS 中也包含其他受体-配体对;通过这些相互作用,APC 传递一系列高度协调的信号,驱动 T 细胞活化、增殖和分化^[5]。具体来说,IS 的信号传导在含有表面受体和下游信号分子的动态微簇中发生。这些微簇形成于 IS 的外围,在一个富含分支肌动蛋白丝的区域,类似于迁移细胞前缘的片状伪足,联合肌动球蛋白网络的向心式流动,共同向 IS 的中心移动^[6]。T 细胞将其伪足插

入 APC 细胞中大约 $1 \mu\text{m}$ ^[7]。当 T 细胞与 pMHC 在平面脂质双分子层上相互作用时,观察到伪足中肌动蛋白细胞骨架的振荡运动,细胞骨架以约为 $0.04 \mu\text{m/s}$ 速度延长,周期约 2min ^[8]。高速光片成像显示,T 细胞与 pMHC 接触后,会在约 1min 内频繁地推动 F-actin 至 IS 的前外边缘和外周围^[9]。在此运动过程中,TCR:pMHC 之间的键会感受到机械力并受力的影响。而且,维持 TCR 信号传导需要持续的肌动蛋白流动,如果流动被阻止,细胞内的钙离子水平就会下降,早期的信号转导中间产物就会被迅速去磷酸化^[10]。随后的研究指出了力诱导的受体激活^[11],以及力驱动的信号微簇的形成和集中^[6,10,12-13]。因此,早期的 T 细胞触发信号驱动了 IS 处 F-actin 的强大聚合移动产生机械力,进而增强完全的 T 细胞活化的信号转导。

与简单的推力或拉力不同,由抗 CD3 和 CD28 抗体激活的 T 细胞中感受到的牵引力首先是会产生向外的推力,然后是向内收缩的拉力^[5,14-15]。重要的是,抗 CD3 抗体和 CD3-TCR 复合物之间产生了牵引力,而共刺激分子 CD28 通过激活 PI3K 信号增强了牵引力的强度^[16]。在另一项研究中,Husson 等^[17]用抗 CD3 和 CD18 的抗体激活 T 细胞,以测量活化 T 细胞的细胞骨架动力学。结果发现,T 细胞在与抗 CD3-TCR 结合后的 140s 内首先对激活珠施加 24pN 推力,然后从 180s 开始逐渐向内施加 16pN 拉力。肌动蛋白聚合诱导的拉力加载速率随载抗原微球的刚度的增大而呈线性增加,表明 IS 具有力学传感特性。

T 细胞在发育和正常免疫监视过程中经历了无数的外源性机械力,包括血液流动带来的剪切力和与周围其他细胞摩擦产生的挤压等^[18]。当 T 细胞和 APCs 相互作用时相对移动,TCR 也会受到剪切力的影响^[19]。同时,T 细胞需要基于肌球蛋白的收缩性来感知细胞外基质的硬度,同时调整其收缩力以匹配基质的性质^[20-22],对较硬的基质表面施加更强的力,对较软的基质表面施加更弱的力^[23-25]。最新的研究也表明,虽然细胞毒性 T 淋巴细胞可以有效地杀伤僵硬分化的肿瘤细胞,但不能杀伤软肿瘤再生细胞。肿瘤再生细胞的柔软性阻碍了细胞毒性 T 淋巴细胞释放穿孔素导致的膜孔形成^[26]。

2 力学敏感的蛋白 TCR 可以将力信号转化为生化信号

TCR 作为 T 细胞的信号识别和传导的主要复合物,同时也是一个力学敏感的蛋白体。研究发现 TCR 是一个各向异性的力学感受器,开创性的激光捕获实验最初表明了 TCR 对力是敏感的^[2,27]。使用热力可以改变膜的形状,诱导短暂、独立的受体-配体的接触^[28],这种结合可以导致膜附着和进一步的 TCR 信号触发。而且,使用激活型的 CD3 或 TCR 单克隆抗体表明了力刺激对于 T 细胞激活的重要性,当这些抗体在与底物(如磁珠、培养皿、Fc 受体或其他)等结合时更能有效激活 T 细胞^[29-31],T 细胞在相对坚硬的表面上表现出更强的信号传导反应和细胞因子分泌,这与抗原受体通过与配体对抗拉扯来获得最佳信号传导能力的观点一致^[32]。而且,在对 pMHC 单体的识别中,一项研究也证实了固定的 pMHC 比游离的 pMHC 更容易激起 T 细胞的激活信号^[33]。使用基于 DNA 的张力传感器的实验显示,当 T 细胞面对玻璃固定的刺激型 pMHCs 时,大于 12 pN 力会作用于与配体结合的 TCR 上^[34]。据报道,T 细胞与平面玻璃支撑的脂质双分子层(supported lipid bilayer, SLB)上固定在金颗粒上的 pMHCs 相互作用时的力高达 4.7 pN^[35]。

随着单分子力学工具研究的发展,生物膜力学探针(biomembrane force probe, BFP)和光镊(optical tweezer, OT)可以对单一的受体施加恒定的皮牛尺度的力。研究发现,与选择素和整合素等力学敏感的蛋白类似,TCR 可以形成配体诱导的逆锁键(catch bond)^[3,36]。综上所述,TCR 被证实是一个力学敏感的蛋白,可以将 T 细胞感受到的各种来源的力转化为细胞内部的生化信号,用于 T 细胞的激活和其他效应功能,该过程也被称为力学传导(mechanotransduction)。力学传导使这些机械力不仅能够调节配体与 TCR 相互作用的解离动力学^[37],也诱导 TCR 和 pMHC 之间的构象变化^[38],激活下游 TCR 信号传导,并放大 T 细胞毒性功能。

3 机械力调控 TCR-pMHC 键的解离常数增强抗原识别能力

研究表明,刺激型的 pMHC 与对应的 TCR 相互

作用时,形成逆锁键,即随着力的增加二者的键寿命(bond lifetime)得到延长,且在外部施加的力约为 10 pN 时键寿命达到最大。即在张力的作用下,pMHC 与 TCR 键的形成与更强且更持久的 TCR 诱导的 Ca^{2+} 流呈线性相关,表明更强的 T 细胞活化需要逆锁键的形成。相比之下,活性较低的 pMHC 配体与 TCR 在力的作用下解离速度更快,这表明了二者间是存在滑移键(slip bond)的行为^[3](见图 1)。TCR 触发必须非常敏感,因为在给定的 APC 表面通常只有少数同源 pMHC 分子。事实上,TCR 触发和 T 细胞活化可以发生在对单一的 pMHC 复合体的反应^[39]。其次,TCR 必须有效区分罕见的刺激型和丰富的非刺激型 pMHC 分子。其中,T 细胞如何区分真正的外来抗原和自身来源的肽是一个非常重要的问题,特别是在自身抗原 pMHC 复合物对 TCR 的亲合力与真正的抗原 pMHC 复合物相比差异小于 1 个数量级的情况下。TCR 与 pMHC 在外加机械力刺激下存在逆锁键的分子机制的发现,解决了 TCR 如何进行准确的抗原区分识别,以及机械力可将 TCR 的抗原识别的辨别能力提高 15 倍^[3,36,40]。最后,尽管 pMHC 和 TCR 的结合具有近乎无限的多样性,但 TCR 触发必须发生。这种多样性与触发机制的结合,构成了免疫系统在面对复杂抗原环境时的高效应答能力。

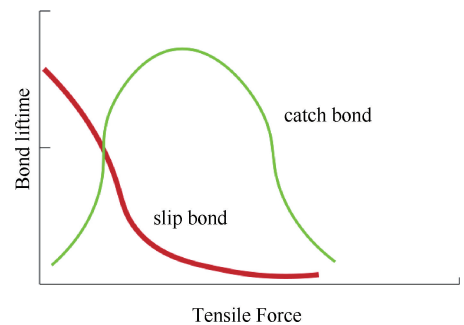


图 1 机械力调控 TCR-pMHC 键的解离常数

Fig. 1 Dissociation constant of the TCR-pMHC bond regulated by mechanical forces

最新的研究中报告了基于工程 DNA 双链构建的从头逆锁键的设计和实现。基于逆锁键的最小热力学模型,研究人员设计了具有逆锁键的 DNA 双链。这些双链包含一个在没有力的情况下稳定的隐秘域,但在张力下迅速变得不稳定,暴露出额外的碱基对,从而在外力的作用下加强键合;这些逆

锁键再现了力增强的滚动黏附,即白细胞中生物性逆锁键的标志特征^[41]。

4 机械力调控 TCR-pMHC 及 CD3 亚基的构象变化

机械力通过调控 TCR-pMHC 解离常数进而延长键合时间其具体的分子机制并未明确揭示。随后的研究发现,机械力会诱导 pMHC 的构象发生变化,以增强原有的与 TCR 的互作,并激活 TCR-pMHC 结合界面的新的相互作用,以抵抗键的解离,最终引起 TCR-pMHC 的逆锁键和 T 细胞活化^[38]。在拉力作用下,MHC 发生构象变化,促进 $\beta 2 M$ 与 MHC $\alpha 1\alpha 2$ 结构域的解离,进而导致 $\alpha 1\alpha 2$ 向 TCR 旋转,从而促进更紧密的 TCR:pMHC 结合界面。在刚度更强的 TCR 中并没有观察到大的构象变化,但力能够诱导 TCR 恒定域和可变域的显著变形,以稳定界面上的接触方式。同时,与这种构象改变相关的机械力的加入会驱动 TCR 跨膜结构域的结构重排。例如,机械力能够引起 TCR 的 α -跨膜结构域的构象变化,进而导致 CD3- $\zeta\zeta$ 的膜解离,释放出膜保护的免疫受体酪氨酸激活基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motifs, ITAMs)^[42]。这也和之前的研究一致,即在非磷酸化状态下,CD3 复合体的细胞质尾部与质膜的内叶相结合,从而有效屏蔽其 ITAMs 的磷酸化^[43-44]。TCR 与配体的结合能诱导 CD3 链构象的改变暴露这些 ITAMs,允许它们

被 src 家族的激酶磷酸化^[45-46]。磷酸化的 ITAMs 又可以与 syk 家族激酶 ZAP70 结合,从而向下游传播信号。综上所述可以总结出以下的机制流程,即机械力可以通过调控 TCR-pMHC 的构象以及 CD3 的构象变化,进而引起下游的 TCR 信号的触发和传导,进一步证实了 TCR 作为力学敏感蛋白可以进行的力学传导,将力学的信号传导为胞内的生物化学信号,实现力学-生物学的信号耦合。

5 单分子力谱学方法在 T 细胞力学研究中的应用

对单个分子施加力和测量力,对于理解细胞如何解释和传播力学信号以影响细胞功能至关重要。例如,施加和测量细胞受力的常用方法之一是原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)^[47-48][见图 2(a)]。在这种方法中,将感兴趣的细胞或分子连接到柔性悬臂上,然后使其与涂有靶细胞或同源配体的玻璃表面接触,随后撤回悬臂梁,通过监测悬臂梁的挠度来测量黏附力。AFM 技术已被用于测定 T 细胞-APC 之间的黏附结合强度,也被用于分析整合素的逆锁键行为^[49-50]。AFM 的悬臂尖端可以从顶部压入样品,产生能够反映样品物理特性(如 ECM 材料的刚度等)的正挠度。而且,AFM 可以与荧光显微镜耦合,实现多重荧光读出,如钙流动、受体的位置变化,或细胞骨架重排,可以实现强大的实时成像^[51-52]。牵引力显微镜(traction force

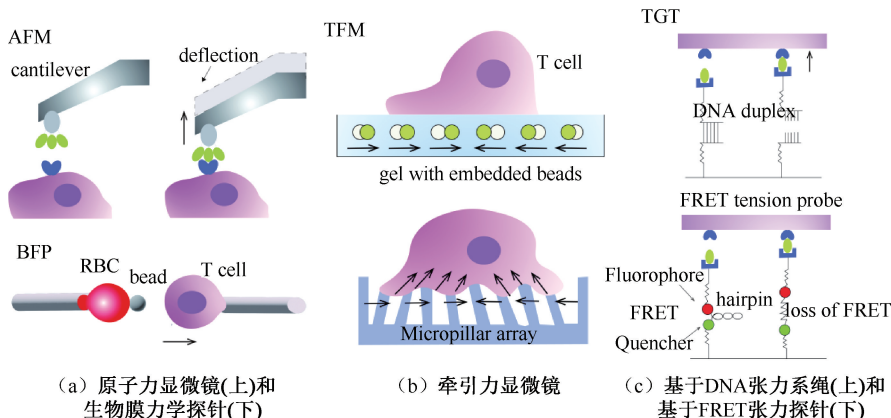


图 2 不同的单分子力谱学工具和手段用于力学免疫学研究

Fig. 2 Different single molecular force spectroscopy tools and means used for mechanical immunology research

(a) Atomic force microscope (AFM, top) and biomembrane force probe (BFP, bottom), (b) Traction force microscope (TFM), (c) DNA-based tension gauge tether (TGT, top) and FRET tension probe (bottom)

microscope, TFM)可以在细胞和亚细胞水平上绘制和量化细胞对其底物产生的力[见图 2(b)]。材料的弹性模量与它所承受的单位面积的力(应力, σ)和单位长度产生的形变率(应变, ε)有关:

$$\begin{aligned}\sigma &= F/A \\ \varepsilon &= \Delta l/l \\ E &= \sigma/\varepsilon\end{aligned}\quad (1)$$

因此,如果已知物体的弹性模量,并可以测量它的应变,就可以计算施加在物体上的力。在 TFM 中,可以通过跟踪凝胶中示踪粒子的运动来确定因力产生的形变量^[53],这种力与基底形变之间的关系符合弹性力学基本假设。将细胞嵌入在弹性模量已知且含有少量荧光示踪粒子的弹性水凝胶基质(2D 或 3D)中,细胞产生的牵引力通过结构分子和信号分子组成的黏着斑传递给细胞外基质,在肌动蛋白细胞骨架和细胞外基质之间形成物理联系。细胞形变时,会牵引基质产生形变,即由肌动球蛋白细胞骨架产生的细胞收缩力的结果,可以通过荧光珠的位移来检测,并通过弹性力学来量化,从而得到亚细胞水平的牵引力的矢量图^[54-55]。另外,TFM 也可以通过可变形的微柱阵列来实现,例如由聚二甲基硅氧烷(PDMS)制成的弹性模量已知的微柱,可以通过微柱的挠度来计算施加的力^[56]。基于 DNA 的张力系绳(tension gauge tether, TGT)方法是利用 DNA 双链将细胞受体与配体连接到表面, DNA 双链的长度和序列具有特定的断裂力。使用不同力的 TGT,可以确定细胞附着或细胞激活所需的力的大小^[57][见图 2(c)]。在对 TGT 的进一步的改造设计中引入荧光共振能量转移(Förster resonance energy transfer, FRET),DNA 双链被一个荧光团和一个淬灭剂包围,在断裂之前荧光强度很低,通过荧光的增加可以实时地监测到 DNA 双链脱离的时间点,这项技术也称为 FRET tension probe[见图 2(c)]。在多重 TGT 结构中,可对不同的力阈值敏感的 TGT 标记不同的荧光染料,用于同时绘制细胞中不同的张力水平^[58]。近期有研究团队开发使用基于 DNA 的力诱导位点特异性酶裂解(force-induced site-specific enzymatic cleavage, FUSE)探针,通过控制力触发的核酸内切酶水解反应的速率来调节张力的持续时间,这一新的工具为研究累积力的持续时间如何促进 T 细胞活化提供了新的研究

方法^[59]。Wang 等^[60]提出了一种制作微流控芯片的方法,该方法集成了 TGT,以测量在受限细胞迁移过程中整合素介导的力的时空变化。利用这一开发的装置,该团队测量了不同微通道中运动细胞整合素-配体张力信号的空间分配、大小和时间特征,发现当细胞在密闭空间迁移时,施加的力更小,整合素-配体的相互作用时间越来越短。该技术为理解细胞在空间限制环境中的迁移机制提供了新的方法和见解。

生物膜力学探针(biomembrane force probe, BFP)是基于成像的方法利用红细胞(red blood cell, RBC)作为敏感的力传感器,将涂有刺激性配体(例如 pMHC)的微球连接到 RBC 上,然后通过微管末端的吸力将其固定。将微球与附在另一微管上的淋巴细胞接触,淋巴细胞对珠粒的推拉导致 RBC 的挤压和拉伸[见图 2(a)]。经过特殊处理的 RBC 可以视为弹性系数已知且恒定的弹簧,其弹性系数可以从微管吸附压力(Δp)、微球与 RBC 的接触半径(r_c)、RBC 的半径(R_0)和微管的半径(R_p)计算得出:

$$k \cong \pi \frac{R_p \Delta p}{(1 - R_p/R_0) \cdot \ln[4R_0^2/(R_p r_c)]} \quad (2)$$

根据胡克定律 $F = kX$,通过 RBC 的弹性系数和形变量可以计算出所受力的大小。由于 RBC 的硬度取决于吸附压力,因此研究人员只需通过调节吸附压力就可以测量 0.01 ~ 1 000 pN 力^[3,38,61-62]。其他的力学检测工具还包括光镊、磁镊等^[63],也都被广泛应用于 T 细胞的力学检测中。

6 机械力调控 T 细胞用于肿瘤免疫治疗

近年来,利用工程化的肿瘤杀伤性 T 细胞精准靶向肿瘤细胞,是治疗癌症的新兴手段,如 CAR-T 已经成功被用于治疗 B 系淋巴细胞白血病。利用机械力对自身 T 细胞或工程化 T 细胞进行直接调控,是调控 T 细胞激活的重要手段。和 TCR 一样,PIEZO1 是一个力学敏感的离子通道,其表达在细胞间高度保守^[64]。有研究发现,PIEZO1 可以通过诱导钙内流进而参与 T 细胞的活化^[65]。有研究者开发了一种力学遗传学的工具系统,通过激发 PIEZO1 力学传感器,利用超声刺激能够远程且精确地操纵 CAR-T 细胞的活化,证明了力学转导在控

制 CAR-T 细胞毒性活性中的应用^[66]。钙离子作为第二信使,将触发许多钙依赖酶的活动,如一种通用的脱氨酸蛋白酶钙蛋白酶与许多肌动蛋白结合蛋白的相互作用^[67]。钙蛋白酶介导 Talin 的分解,调节 T 细胞中肌动球蛋白细胞骨架和微管的运动动力学^[68]。在最新的研究中发现,当阻断 PIEZO1 的激活时,T 细胞介导的肿瘤细胞的死亡在体外和体内均显著增加,即提示 PIEZO1 可以作为肿瘤免疫治疗的靶点。该研究显示 PIEZO1 可负调控细胞毒性 T 淋巴细胞对肿瘤细胞的牵引力,此过程涉及 GRHL3 转录因子的作用。在 PIEZO1 的作用下,GRHL3 上调了 RNF114 的表达,进而通过影响 F-actin 网络而降低了 T 细胞对肿瘤细胞的牵引力^[69]。最新的一项研究中揭示了转录因子 Osr2 整合来自 ECM 的生物力学信号并促进肿瘤反应性 CD8⁺ T 细胞的终末耗竭。Osr2 通过偶联 TCR 信号和 PIEZO1/ Ca²⁺/CREB 轴介导的生物力学应力,选择性地诱导肿瘤特异性 CD8⁺ T 细胞亚群表达;Osr2 可作为生物力学的检查点加剧 CD8⁺ T 细胞耗竭,同时也可以作为增强癌症免疫治疗的靶点^[70]。有研究利用磁场驱动包裹了 pMHC 和 CD28 抗体的顺磁性纳米颗粒的聚集,使 TCR 簇的大小增加了 1 倍,在体外和体内过继转移后 T 细胞扩增增加。磁场增强纳米颗粒活化的 T 细胞对 B16 黑素瘤的生长具有抑制作用,表明磁场增强纳米颗粒刺激可产生大量活化的抗原特异性 T 细胞,在过继免疫治疗方面具有临床应用价值^[71]。

工程化 T 细胞受体(TCR-T)的过继细胞疗法是一种很有前景的靶向癌症抗原的方法,然而,对肿瘤有反应的 TCR 通常对其 pMHC 反应较弱。亲和性成熟的 TCR 可增强 TCR-T 细胞治疗的疗效,但也可与脱靶抗原发生交叉反应,导致器官免疫病理反应。近期,Zhao 等^[72]开发了一种替代策略用来分离 TCR 的突变体,这些突变体表现出高的激活信号,并通过逆锁键与低亲和力的 pMHC 结合。同时,他们提出了一种称为 BATTLES (biomechanically assisted T cell triggering for large-scale exogenous-pMHC screening) 的技术,该技术利用机械力并行启动肽和细胞引起的 T 细胞的信号触发。BATTLES 将候选的 pMHCs 展示在光谱编码的磁珠上,这些磁珠由能够对 T 细胞施加剪切力的热响应性聚合物

组成,有助于探索 T 细胞响应的机械力和序列依赖性情形;BATTLES 可用于探索 T 细胞力学生物学机制以及基于 T 细胞的免疫治疗^[73]。T 细胞免疫治疗在实体瘤的治疗中受到了极大的挑战。除了癌症的免疫抑制表型外,T 细胞难以浸润到硬化的肿瘤细胞外基质中,以及由于组织压力增加导致的药物渗透性差都是实体瘤治疗所面临的问题^[74-75]。通过抑制胶原交联分子,如赖氨酰氧化酶 (lysyl oxidase, LOX) 来调节细胞外基质力学,是一种利用细胞力学敏感性和细胞外基质力学的简单的免疫治疗手段。通过比较 5 种不同的具有异质性 ECM 组织的小鼠肿瘤模型,Nicolas-Boluda 等^[76]证明了肿瘤硬度与肿瘤生长和 ECM 交联呈正相关,而与 T 细胞迁移呈负相关。总体而言,T 细胞力学免疫疗法有望成为一个快速发展的领域,具有显著的临床可转化性。

7 总结与展望

总体而言,免疫受体信号是由一个复杂的调节网络控制的,该网络涉及化学和物理信号之间的交叉对话和反馈回路。本文已经介绍了分子尺度的机械力在影响免疫应答方面的关键作用,可能也适用于大多数的受体-配体相互作用。由于力学免疫学领域仍处于起步阶段,仍然需要进一步的研究来阐明免疫受体感知和调节力学刺激的确切机制。在过去十多年中,开创性的生物物理学方法有助于我们理解免疫应答过程中发挥作用的力学生物学。为了更好地理解 T 细胞的力学生物学,测量和监测作用于 T 细胞或 T 细胞施加的力的时空变化至关重要。迄今为止,尚缺乏能够在细胞水平对机械力进行活体监测的技术。Vorselen 等^[77]开发了一种基于微粒的牵引力显微镜平台,并将其应用于 T 细胞力的测量。这种以微粒子为基础的平台,可以用针注射到组织中,显示出作为一种记录单个 T 细胞在体内受力分布的方法的前景。尽管如此,直接在体内测量 T 细胞和靶细胞之间的作用力仍然是一个重大的挑战。为此,DNA 力探针在皮牛顿范围内提供了良好的灵敏度和定量读数,具有测量或可视化活体内细胞间力的特殊前景^[78]。

来源于 ECM 或邻近细胞的各种生物物理因素,如硬度、微/纳米形貌、配体密度,以及外力(如

流体剪切、固体应力)等都会影响 T 细胞的功能,包括 T 细胞的抗原识别、增殖、分化和细胞毒性^[70]。在传统组织培养板的体外培养过程中,原代 T 细胞通常会失去其表型,导致其治疗能力的降低。因此,工程化生物材料基底(如硅棒、聚合物纤维、水凝胶等)^[79-81]已被开发用于体外扩增和训练 T 细胞,从而在过继性 T 细胞转移之前激活 TCR 信号。通过生物材料的力学特性的调节,来扩大工程化 T 细胞的产量、增强其靶向特异性,可能是 T 细胞力学中的一个非常重要的研究领域^[81-82]。

在过去的十来年中,利用生物力学因素调控 T 细胞反应成为了免疫治疗的一个新方向。然而,力学免疫工程仍然是一个新兴领域,只有屈指可数的临床前模型的体内研究。虽然这些概念验证研究显示巨大的希望,但力学免疫工程方法的未来发展和转化依然面临挑战。

致谢:感谢中国科学院生物物理研究所邱玥婷、关欣和强海燕同学对本文的建议和帮助。

利益冲突声明:无。

作者贡献声明:吴松芳负责文献搜集整理、论文撰写与修改;姜继忠负责论文设计并修改论文。

参考文献:

- [1] YANG S, WANG M, TIAN D, *et al.* DNA-functionalized artificial mechanoreceptor for de novo force-responsive signaling [J]. *Nat Chem Biol*, 2024, 20(8): 1066-1077.
- [2] LI YC, CHEN BM, WU PC, *et al.* Cutting edge: Mechanical forces acting on T cells immobilized via the TCR complex can trigger TCR signaling [J]. *J Immunol*, 2010, 184(11): 5959-5963.
- [3] LIU B, CHEN W, EVAVOLD BD, *et al.* Accumulation of dynamic catch bonds between TCR and agonist peptide-MHC triggers T cell signaling [J]. *Cell*, 2014, 157(2): 357-368.
- [4] BASU R, WHITLOCK BM, HUSSON J, *et al.* Cytotoxic T cells use mechanical force to potentiate target cell killing [J]. *Cell*, 2016, 165(1): 100-110.
- [5] BASU R, HUSE M. Mechanical communication at the immunological synapse [J]. *Trends Cell Biol*, 2017, 27(4): 241-254.
- [6] VARMA R, CAMPI G, YOKOSUKA T, *et al.* T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster [J]. *Immunity*, 2006, 25(1): 117-127.
- [7] UEDA H, MORPHEW MK, MCINTOSH JR, *et al.* CD4+ T-cell synapses involve multiple distinct stages [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(41): 17099-17104.
- [8] SIMS TN, SOOS TJ, XENIAS HS, *et al.* Opposing effects of PKC θ and WASp on symmetry breaking and relocation of the immunological synapse [J]. *Cell*, 2007, 129(4): 773-785.
- [9] RITTER AT, ASANO Y, STINCHCOMBE JC, *et al.* Actin depletion initiates events leading to granule secretion at the immunological synapse [J]. *Immunity*, 2015, 42(5): 864-876.
- [10] BABICH A, LI S, O'CONNOR RS, *et al.* F-actin polymerization and retrograde flow drive sustained PLC γ 1 signaling during T cell activation [J]. *J Cell Biol*, 2012, 197(6): 775-787.
- [11] CHEN W, ZHU C. Mechanical regulation of T-cell functions [J]. *Immunol Rev*, 2013, 256(1): 160-176.
- [12] YI J, WU XS, CRITES T, *et al.* Actin retrograde flow and actomyosin II arc contraction drive receptor cluster dynamics at the immunological synapse in Jurkat T cells [J]. *Mol Biol Cell*, 2012, 23(5): 834-852.
- [13] ILANI T, VASILIVER-SHAMIS G, VARDHANA S, *et al.* T cell antigen receptor signaling and immunological synapse stability require myosin IIA [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(5): 531-539.
- [14] MA X, DAGLIYAN O, HAHN KM, *et al.* Profiling cellular morphodynamics by spatiotemporal spectrum decomposition [J]. *PLoS Comput Biol*, 2018, 14(8): e1006321.
- [15] HU KH, BUTTE MJ. T cell activation requires force generation [J]. *J Cell Biol*, 2016, 213(5): 535-542.
- [16] HUI E, CHEUNG J, ZHU J, *et al.* T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition [J]. *Science*, 2017, 355(6332): 1428-1433.
- [17] HUSSON J, CHEMIN K, BOHINEUST A, *et al.* Force generation upon T cell receptor engagement [J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19680.
- [18] ADU-BERCHIE K, OBOSEH FO, MOONEY DJ. T cell development and function [J]. *Rejuvenation Res*, 2023, 26(4): 126-138.
- [19] BEEMILLER P, KRUMMEL MF. Mediation of T-cell activation by actin meshworks [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2(9): a002444.
- [20] ENGLER AJ, SEN S, SWEENEY HL, *et al.* Matrix elasticity directs stem cell lineage specification [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 677-689.
- [21] TRICHET L, LE DIGABEL J, HAWKINS RJ, *et al.*

- Evidence of a large-scale mechanosensing mechanism for cellular adaptation to substrate stiffness [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(18): 6933-6938.
- [22] ASSOIAN RK, KLEIN EA. Growth control by intracellular tension and extracellular stiffness [J]. *Trends Cell Biol*, 2008, 18(7): 347-352.
- [23] ELOSEGUI-ARTOLA A, ORIA R, CHEN Y, *et al.* Mechanical regulation of a molecular clutch defines force transmission and transduction in response to matrix rigidity [J]. *Nat Cell Biol*, 2016, 18(5): 540-548.
- [24] SAEZ A, BUGUIN A, SILBERZAN P, *et al.* Is the mechanical activity of epithelial cells controlled by deformations or forces? [J]. *Biophys J*, 2005, 89(6): L52-54.
- [25] CALIFANO JP, REINHART-KING CA. Substrate stiffness and cell area predict cellular traction stresses in single cells and cells in contact [J]. *Cell Mol Bioeng*, 2010, 3(1): 68-75.
- [26] LIU Y, ZHANG T, ZHANG H, *et al.* Cell softness prevents cytolytic T-cell killing of tumor-repopulating cells [J]. *Cancer Res*, 2021, 81(2): 476-488.
- [27] KIM ST, TAKEUCHI K, SUN ZY, *et al.* The alphabeta T cell receptor is an anisotropic mechanosensor [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(45): 31028-31037.
- [28] LEE SJ, HORI Y, CHAKRABORTY AK. Low T cell receptor expression and thermal fluctuations contribute to formation of dynamic multifocal synapses in thymocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(8): 4383-4388.
- [29] ANDRIS F, DENANGLAIRE S, DE MATTIA F, *et al.* Naive T cells are resistant to anergy induction by anti-CD3 antibodies [J]. *J Immunol*, 2004, 173(5): 3201-3208.
- [30] BOROVSKY Z, MISHAN-EISENBERG G, YANIV E, *et al.* Serial triggering of T cell receptors results in incremental accumulation of signaling intermediates [J]. *J Biol Chem*. 2002, 277(24): 21529-21536.
- [31] LI Y, KURLANDER RJ. Comparison of anti-CD3 and anti-CD28-coated beads with soluble anti-CD3 for expanding human T cells: Differing impact on CD8 T cell phenotype and responsiveness to restimulation [J]. *J Transl Med*, 2010(8): 104.
- [32] JUDOKUSUMO E, TABDANOV E, KUMARI S, *et al.* Mechanosensing in T lymphocyte activation [J]. *Biophys J*, 2012, 102(2): L5-7.
- [33] GE Q, STONE JD, THOMPSON MT, *et al.* Soluble peptide-MHC monomers cause activation of CD8+ T cells through transfer of the peptide to T cell MHC molecules [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(21): 13729-13734.
- [34] LIU Y, BLANCHFIELD L, MA VP, *et al.* DNA-based nanoparticle tension sensors reveal that T-cell receptors transmit defined pN forces to their antigens for enhanced fidelity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(20): 5610-5615.
- [35] MA VP, LIU Y, BLANCHFIELD L, *et al.* Ratiometric tension probes for mapping receptor forces and clustering at intermembrane junctions [J]. *Nano Lett*, 2016, 16(7): 4552-4559.
- [36] DAS DK, FENG Y, MALLIS RJ, *et al.* Force-dependent transition in the T-cell receptor β -subunit allosterically regulates peptide discrimination and pMHC bond lifetime [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(5): 1517-1522.
- [37] LIU B, CHEN W, NATARAJAN K, *et al.* The cellular environment regulates in situ kinetics of T-cell receptor interaction with peptide major histocompatibility complex [J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(7): 2099-2110.
- [38] WU P, ZHANG T, LIU B, *et al.* Mechano-regulation of peptide-MHC class I conformations determines TCR antigen recognition [J]. *Mol Cell*, 2019, 73(5): 1015-1027. e7.
- [39] HUANG J, BRAMESHUBER M, ZENG X, *et al.* A single peptide-major histocompatibility complex ligand triggers digital cytokine secretion in CD4 (+) T cells [J]. *Immunity*, 2013, 39(5): 846-857.
- [40] CHOI HK, CONG P, GE C, *et al.* Catch bond models may explain how force amplifies TCR signaling and antigen discrimination [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 2616.
- [41] VAN GALEN M, BOK A, PESHKOVSKY T, *et al.* De novo DNA-based catch bonds [J/OL]. *Nat Chem*, 2024, doi: 10.1038/s41557-024-01571-4.
- [42] BRAZIN KN, MALLIS RJ, BOESZOERMENYI A, *et al.* The T cell antigen receptor α transmembrane domain coordinates triggering through regulation of bilayer immersion and CD3 subunit associations [J]. *Immunity*, 2018, 49(5): 829-41. e6.
- [43] AIVAZIAN D, STERN LJ. Phosphorylation of T cell receptor zeta is regulated by a lipid dependent folding transition [J]. *Nat Struct Biol*, 2000, 7(11): 1023-1026.
- [44] XU C, GAGNON E, CALL ME, *et al.* Regulation of T cell receptor activation by dynamic membrane binding of the CD3epsilon cytoplasmic tyrosine-based motif [J]. *Cell*, 2008, 135(4): 702-713.
- [45] LEE MS, GLASSMAN CR, DESHPANDE NR, *et al.* A mechanical switch couples T cell receptor triggering to the cytoplasmic juxtamembrane regions of CD3 ζ [J].

- Immunity, 2015, 43(2): 227-239.
- [46] SWAMY M, BECK-GARCIA K, BECK-GARCIA E, *et al.* A cholesterol-based allostery model of T cell receptor phosphorylation [J]. *Immunity*, 2016, 44(5): 1091-1101.
- [47] POLACHECK WJ, CHEN CS. Measuring cell-generated forces: A guide to the available tools [J]. *Nat Methods*, 2016, 13(5): 415-423.
- [48] LI J, LIU Y, YUAN Y, *et al.* Applications of atomic force microscopy in immunology [J]. *Front Med*, 2021, 15(1): 43-52.
- [49] KONG F, GARCÍA AJ, MOULD AP, *et al.* Demonstration of catch bonds between an integrin and its ligand [J]. *J Cell Biol*, 2009, 185(7): 1275-1284.
- [50] LIM TS, GOH JK, MORTELLARO A, *et al.* CD80 and CD86 differentially regulate mechanical interactions of T-cells with antigen-presenting dendritic cells and B-cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45185.
- [51] WAN Z, SHAHEEN S, CHAU A, *et al.* Imaging: Gear up for mechano-immunology [J]. *Cell Immunol*, 2020(350): 103926.
- [52] HU J, CHEN S, HU W, *et al.* Mechanical point loading induces cortex stiffening and actin reorganization [J]. *Biophys J*, 2019, 117(8): 1405-1418.
- [53] STYLE RW, BOLTYANSKIY R, GERMAN GK, *et al.* Traction force microscopy in physics and biology [J]. *Soft Matter*, 2014, 10(23): 4047-4055.
- [54] WANG JH, LI B. Application of cell traction force microscopy for cell biology research [J]. *Methods Mol Biol*, 2009(586): 301-313.
- [55] LEGANT WR, MILLER JS, BLAKELY BL, *et al.* Measurement of mechanical tractions exerted by cells in three-dimensional matrices [J]. *Nat Methods*, 2010, 7(12): 969-971.
- [56] TAN JL, TIEN J, PIRONE DM, *et al.* Cells lying on a bed of microneedles: An approach to isolate mechanical force [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(4): 1484-1489.
- [57] WANG X, HA T. Defining single molecular forces required to activate integrin and notch signaling [J]. *Science*, 2013, 340(6135): 991-994.
- [58] WANG Y, WANG X. Integrins outside focal adhesions transmit tensions during stable cell adhesion [J]. *Sci Rep*, 2016(6): 36959.
- [59] ROGERS J, MA R, FOOTE A, *et al.* Force-induced site-specific enzymatic cleavage probes reveal that serial mechanical engagement boosts T cell activation [J]. *J Am Chem Soc*, 2024, 146(11): 7233-7242.
- [60] WANG L, CHEN W, LI H, *et al.* Exploring integrin-mediated force transmission during confined cell migration by DNA-based tension probes [J]. *Anal Chem*, 2022, 94(11): 4570-4575.
- [61] EVANS E, RITCHIE K, MERKEL R. Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces [J]. *Biophys J*, 1995, 68(6): 2580-2587.
- [62] SIBENER LV, FERNANDES RA, KOLAWOLE EM, *et al.* Isolation of a structural mechanism for uncoupling T cell receptor signaling from peptide-MHC binding [J]. *Cell*, 2018, 174(3): 672-87. e27.
- [63] NEUMAN KC, NAGY A. Single-molecule force spectroscopy: Optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy [J]. *Nat Methods*, 2008, 5(6): 491-505.
- [64] BOTELLO-SMITH WM, JIANG W, ZHANG H, *et al.* A mechanism for the activation of the mechanosensitive Piezo1 channel by the small molecule Yoda1 [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4503.
- [65] LIU CSC, RAYCHAUDHURI D, PAUL B, *et al.* Cutting edge: Piezo1 mechanosensors optimize human T cell activation [J]. *J Immunol*, 2018, 200(4): 1255-1260.
- [66] PAN Y, YOON S, SUN J, *et al.* Mechanogenetics for the remote and noninvasive control of cancer immunotherapy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(5): 992-997.
- [67] HANNA RA, CAMPBELL RL, DAVIES PL. Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin [J]. *Nature*, 2008, 456(7220): 409-412.
- [68] FRANCO SJ, RODGERS MA, PERRIN BJ, *et al.* Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics [J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(10): 977-983.
- [69] PANG R, SUN W, YANG Y, *et al.* PIEZO1 mechanically regulates the antitumour cytotoxicity of T lymphocytes [J]. *Nat Biomed Eng*, 2024, 8(9): 1162-1167.
- [70] ZHANG J, LI J, HOU Y, *et al.* Osr2 functions as a biomechanical checkpoint to aggravate CD8(+) T cell exhaustion in tumor [J]. *Cell*, 2024, 187(13): 3409-3426. e24.
- [71] PERICA K, TU A, RICHTER A, *et al.* Magnetic field-induced T cell receptor clustering by nanoparticles enhances T cell activation and stimulates antitumor activity [J]. *ACS Nano*, 2014, 8(3): 2252-2260.
- [72] ZHAO X, KOLAWOLE EM, CHAN W, *et al.* Tuning T cell receptor sensitivity through catch bond engineering [J]. *Science*, 2022, 376(6589): eabl5282.
- [73] FENG Y, ZHAO X, WHITE AK, *et al.* A bead-based method for high-throughput mapping of the sequence- and

- force-dependence of T cell activation [J]. *Nat Methods*, 2022, 19(10): 1295-1305.
- [74] WINKLER J, ABISOYE-OGUNNIYAN A, METCALF KJ, *et al.* Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5120.
- [75] CARUANA I, SAVOLDO B, HOYOS V, *et al.* Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redirceted T lymphocytes [J]. *Nat Med*, 2015, 21(5): 524-529.
- [76] NICOLAS-BOLUDA A, VAQUERO J, VIMEUX L, *et al.* Tumor stiffening reversion through collagen crosslinking inhibition improves T cell migration and anti-PD-1 treatment [J]. *Elife*, 2021(10): e58688.
- [77] VORSELEN D, WANG Y, DE JESUS MM, *et al.* Microparticle traction force microscopy reveals subcellular force exertion patterns in immune cell-target interactions [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 20.
- [78] ZHAO B, LI N, XIE T, *et al.* Quantifying tensile forces at cell-cell junctions with a DNA-based fluorescent probe [J]. *Chem Sci*, 2020, 11(32): 8558-8566.
- [79] KIM HS, HO TC, WILLNER MJ, *et al.* Dendritic cell-mimicking scaffolds for *ex vivo* T cell expansion [J]. *Bioact Mater*, 2023(21): 241-252.
- [80] CHEUNG AS, ZHANG DKY, KOSHY ST, *et al.* Scaffolds that mimic antigen-presenting cells enable *ex vivo* expansion of primary T cells [J]. *Nat Biotechnol.*, 2018, 36(2): 160-169.
- [81] WU C, ZHANG H, GUO Y, *et al.* Porous hydrogels for immunomodulatory applications [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(10): 5152.
- [82] ZHANG DKY, ADU-BERCHIE K, IYER S, *et al.* Enhancing CAR-T cell functionality in a patient-specific manner [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 506.