



PD-1:PD-L1/PD-L2 通路在结核感染中的免疫作用

占玲俊,唐 军,秦 川

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,卫生部人类疾病比较医学重点实验室,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室,北京 100021)

【摘要】 PD-1:PD-L1/PD-L2 通路在肿瘤和某些感染性疾病中发挥免疫抑制作用,而在结核病中的免疫作用尚不明确。结核菌感染后,免疫细胞上 PD-1:PD-L1/PD-L2 通路高表达,体外实验显示:用该通路的抗体阻断后保护性 T 细胞增强,而体内免疫作用不明确。PD-1 与配体 PD-L1 结合后可能发挥免疫抑制作用,其中 PD-L1 表达受 Th1 细胞因子调控;PD-1 与配体 PD-L2 结合后可能发挥免疫保护作用,其中 PD-L2 表达受 Th2 型细胞因子调控。利用 Cas9-CRISPR 基因敲除方法分别敲除特定免疫细胞上 PD-1、PD-L1 和 PD-L2,可研究 PD-1、PD-L1 和 PD-L2 在结核感染中免疫作用及机制,为结核病的防控提供理论依据。

【关键词】 PD-1:PD-L1/PD-L2 通路 结核感染 免疫作用

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】**1671-7856(2015) 07-0074-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.007.016

The immune role of PD-1:PD-L1/PD-L2 pathway in Mycobacterium tuberculosis infection

ZHAN Ling-jun, TANG Jun, QIN Chuan

(Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Key Laboratory of Human Diseases Animal Model, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Pan Jia Yuan Nan Li No. 5, Chao Yang District, Beijing 100021, China)

【Abstract】 PD-1:PD-L1/PD-L2 pathway played negative immune role in most tumor and several infectious diseases, but the immune role in tuberculosis (TB) was not explicated. Since the high expression of PD-1:PD-L1/PD-L2 pathway was correlated with MTB infection both in vitro and in vivo, the in vitro negative immune role was indicated by inhibited T cell protective immune function, while the in vivo immune role was not clear. The binding of PD-1 and PD-L1 played an immunosuppression role, the expression of PD-L1 was regulated by Th1-type cytokines. The binding of PD-1 and PD-L2 played protective immune role, and the expression was regulated by Th1-type cytokines. The immune role and mechanism of PD-1, PD-L1 and PD-L2 would be investigated by Cas9-CRISPR technique, which would provide theoretical basis for the tuberculosis prevention and control.

【Key words】 PD-1:PD-L1/PD-L2 pathway; Mycobacterium tuberculosis infection; Immune role

结核病是免疫相关的感染性疾病, T 细胞、APC (巨噬细胞、DC) 等是重要的免疫细胞^[1-3]。结核

菌进入机体后, 首先被巨噬细胞吞噬, 当巨噬细胞的杀伤力强于结核菌的毒力时, 结核菌被清除, 反

【基金项目】“十二五-艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”国家科技重大专项子课题(2012ZX10004501)。

【作者简介】占玲俊, 博士, 副研究员, 研究方向: 结核病与结核动物模型研究。

【通讯作者】秦川, 教授, 博士生导师。E-mail: chuanqin@vip.sina.com。

之,结核菌裂解巨噬细胞产生病变,继而感染其他巨噬细胞,导致感染播散^[2]。此外,结核菌还经 APC 进行抗原加工并提呈给 T 细胞,刺激免疫应答的产生,通过 $\text{IFN-}\gamma^+$ CD4^+ T 细胞和 $\text{IFN-}\gamma^+$ CD8^+ T 细胞^[1-2]发挥免疫保护作用,通过分泌 IL-17 细胞因子的 Treg 细胞^[3]发挥免疫抑制作用,感染的结果取决于保护性免疫和抑制性免疫抗衡的结果。

1 程序性死亡配体-1(PD-1)通路与免疫

PD-1 通路包括 PD-1 及两个配体 PD-L1 和 PD-L2。PD-1 主要表达于 CD4^+ T 细胞,PD-L1 表达于 T 细胞和 APC(单核/巨噬细胞,DC 和 B 细胞)表面,PD-L2 表达于炎性巨噬细胞、DC、B1 细胞表面。在病原或某些抗原蛋白诱导下,PD-L1、PD-L2 均可表达于 T 细胞,PD-L1 的表达受 Th1 细胞调控,PD-L2 的表达受 Th2 细胞调控^[4]。

在肿瘤、自身免疫病和某些持续性感染病(包括病毒如 HIV、HCV 等、细菌、寄生虫和真菌感染)中,PD-1;PD-L1/PD-L2 通路向 T 细胞传递抑制性第二信号,导致 T 细胞“无能”或“耗竭”,从而发病^[5]。虽然 PD-1;PD-L1/PD-L2 通路整体发挥免疫抑制作用,但其中 PD-L1 和 PD-L2 可能发挥相反的免疫作用。PD-L1 能分别与 PD-1 和 B7-1 作用,发挥免疫抑制作用;PD-L2 能分别与 PD-1 和 B7-2 作用,发挥免疫保护作用^[6-7]。

2 PD-1;PD-L1/PD-L2 通路与结核感染

在活动性结核病人中,T 细胞、单核/巨噬细胞及 B 细胞上 PD-1、PD-L1 和 PD-L2 的表达均明显上升,以 PD-L1 表达升高为主要特点。其中 T 细胞上以 PD-1 升高为主;单核巨噬细胞和 B 细胞以 PD-L1 为主,PD-1 和 PD-L2 的表达也升高,表达水平接近。

体外实验证明:用 PD-1、PD-L1 和 PD-L2 的单抗分别阻断结核病人外周血 T 细胞上 PD-1、单核细胞上 PD-L1/PD-L2、或联合阻断 PD-1 和 PD-L1/PD-L2,均能挽救保护性的 $\text{IFN-}\gamma^+$ CD3^+ T 细胞,并且保护性 $\text{IFN-}\gamma$ 分泌增加,提示 PD-1;PD-L1/PD-L2 通路抑制抗结核的保护性免疫^[8-9]。

BCG 感染小鼠后,PD-1 敲除的 C57 小鼠脾组织荷菌量比 C57 野生小鼠明显低,PD-1;PD-L1 作用使 Th1 型细胞免疫受损,提示:敲除 PD-1 对结核感染产生保护性免疫。而 H37Rv 感染 PD-1 敲除的 C57 小鼠后,肺组织病变比 C57 野生鼠重,肺、脾组织荷菌量也比野生小鼠高^[10],提示:PD-1 帮助清除小鼠体内的 H37Rv 结核菌,但不能确定 PD-1 是否有免疫抑制作用^[11]。

深入分析可知:BCG 和 H37Rv 感染后 PD-1 通路免疫作用不同,可能与 PD-L1、PD-L2 的表达差异

有关。BCG 感染后,PD-L1 高表达,而 PD-L2 表达无明显变化。PD-1;PD-L1 使 Th1 型细胞免疫受损,PD-1 敲除后可以拯救 Th1 型细胞免疫,表现出免疫保护作用,即脾组织荷菌量比野生小鼠低^[10]。H37Rv 感染后,PD-L1 和 PD-L2 均高表达,PD-1;PD-L1 可能发挥免疫抑制作用,而 PD-1;PD-L2 可能发挥免疫保护作用^[11]。

3 结核感染中 PD-1;PD-L1/PD-L2 的免疫作用机制

用抗体阻断结核病人外周血淋巴细胞上 PD-1;PD-L1/PD-L2 通路后,特异性脱颗粒的 CD8^+ T 细胞和 $\text{IFN-}\gamma^+$ CD3^+ T 细胞升高,提示结核急性感染中 PD-1;PD-L1/PD-L2 通路能抑制效应 CD8^+ T 细胞功能^[12]和 $\text{IFN-}\gamma^+$ CD3^+ T 细胞功能。其中 PD-1、PD-L1 和 PD-L2 的作用机制各有特点。

(1)结核中 PD-L1、PD-L2 的免疫作用机制:用 PD-L1 抗体治疗败血症引起的肝损伤,可逆转因 T 细胞耗竭而致的肝损伤^[13]。在哮喘、气道变态反应性疾病中研究发现:PD-L1 与 PD-1 和 B7-1 结合后,可抑制 T 细胞增殖。用抗体阻断 PD-L1 后, $\text{IFN-}\gamma$ 表达上调;单独阻断 PD-L1 与 B7-1 结合,对 $\text{IFN-}\gamma$ 分泌无明显影响,提示 PD-1;PD-L1 能抑制 NKT 细胞产生 $\text{IFN-}\gamma$ 。PD-L2 主要通过影响 CD4^+ T 细胞的增殖及细胞因子或共刺激分子的分泌来发挥免疫作用,PD-L2 的作用可以不依赖 PD-1^[6,14]。Treg 或 NKT 细胞也可参与 PD-L2 的免疫作用。结核中 PD-L1 和 PD-L2 的免疫作用机制可能与上述疾病中类似。

(2)PD-L1 可能的作用机制:与潜伏感染相比,活动性结核病人中高表达 PD-L1 的嗜中性粒细胞显著增加^[15],而嗜中性粒细胞在小鼠结核中有病理损伤作用,提示 PD-L1 可能介导嗜中性粒细胞聚集所致的免疫病理损伤^[16]。H37Rv 感染人单核细胞后,PD-L1、PD-L2 表达都明显增高,PD-L1 水平高于 PD-L2;用单抗阻断 PD-L1 后, $\text{IFN-}\gamma^+$ T 细胞增殖明显、凋亡减少,提示 PD-L1 可抑制保护性 T 细胞增殖、促进其凋亡。

(3)PD-L1 和 PD-1 的免疫抑制作用机制不完全相同:在肿瘤和多种慢性感染中,PD-1;PD-L1 作用均被证实能抑制 T 细胞的保护性免疫^[5,13,17],其免疫抑制作用在结核的体外实验中也得到证实^[8,18-20]。PD-1 表达于活化的 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、DC 细胞和单核细胞表面,也表达于“耗竭”的 T 细胞表面。PD-1 通过与 PD-L1、PD-L2 结合,抑制 T 细胞的 TCR 信号,下调免疫激活因子和存活相关的蛋白表达,促进免疫抑制因子 IL-10 的表达。而表达于 APC 上的 PD-L1 是 MAPK/细胞因子/STAT-3 依赖模式:在 STAT-3 调控下,TLR-APC 高表达 IL-

6 和 IL-10,抑制 STAT-3 的活化,从而阻断 PD-L1 的表达^[21]。因此,阻断 PD-1 和 PD-L1 后免疫反应存在差异。

(4)结核感染中 PD-L1、PD-L2 的表达和调控:结核病人中 Th1 (CD4⁺ T 细胞)和 Th2 (CD8⁺ T 细胞)细胞均发挥免疫作用。Th1 和 Th2 细胞在 BCG 与 H37Rv 感染的小鼠中表达有差异:BCG 感染中期,发挥免疫保护作用的主要是 Th1 细胞,Th2 细胞的免疫保护作用很微弱;而 H37Rv 感染小鼠后,Th1 细胞和 Th2 细胞均发挥作用。PD-L1 和 PD-L2 的表达分别由 Th1 和 Th2 细胞来调控,在 LPS、Th1 型细胞因子 IFN- γ 刺激下,巨噬细胞上 PD-L1 的表达调控依赖 STAT1,而 Th2 型细胞因子 IL-4 刺激炎性巨噬细胞上 PD-L2 表达,其表达调控依赖 STAT6^[7]。BCG 感染 DC 细胞后,PD-L2 高表达,其表达依赖于 IL-10,通过 TLR2-p38 MAPK 信号通路来调控^[22]。

4 结语

PD-1;PD-L1/PD-L2 通路于结核感染有很大的相关性,而具体的免疫作用和机制还未深入进行,可以在细胞和动物水平用特异性基因敲除技术研究 PD-L1 和 PD-L2 的免疫作用及相关的机制。明确该通路的作用和机制的同时,也为结核的干预提供指导。

参考文献:

- [1] Tubo NJ, Jenkins MK. CD4 + T Cells: Guardians of the Phagosome. *Clinical Microbiology Reviews* 2014, 27 (2) :200 - 213.
- [2] Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annual review of immunology* 2001, 19(1) :93 - 129.
- [3] Urdahl KB, Shafiani S, Ernst JD. Initiation and regulation of T-cell responses in tuberculosis. *Mucosal Immunology* 2011, 4 (3) :288 - 293.
- [4] Hamid O, Carvajal RD. Anti-programmed death - 1 and anti-programmed death-ligand 1 antibodies in cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2013, 13(6) :847 - 861.
- [5] Sakthivel P, Gereke M, Bruder D. Therapeutic Intervention in Cancer and Chronic Viral Infections: Antibody Mediated Manipulation of PD - 1/PD-L1 Interaction. *Reviews on Recent Clinical Trials* 7, 2012, 7(1) :10 - 23.
- [6] Akbari O, Stock P, Singh AK, *et al.* PD-L1 and PD-L2 modulate airway inflammation and iNKT-cell-dependent airway hyperactivity in opposing directions. *Mucosal Immunology* 2009, 3(1) :81 - 91.
- [7] Loke P, Allison JP. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003, 100(9) :5336 - 5341.
- [8] Javier O. Jurado IBA, Virginia Pasquinelli, *et al.* Programmed Death (PD) - 1;PD-Ligand 1/PD-Ligand 2 Pathway Inhibits T Cell Effector Functions during Human Tuberculosis. *The Journal of Immunology* 2008, 181(1) :116 - 125.
- [9] Singh A, Mohan A, Dey AB, *et al.* Inhibiting the Programmed Death 1 Pathway Rescues Mycobacterium tuberculosis-Specific Interferon-Producing T Cells From Apoptosis in Patients With Pulmonary Tuberculosis. *Journal of Infectious Diseases* 2013, 208(4) :603 - 615.
- [10] Sakai S, Kawamura I, Okazaki T, *et al.* PD - 1 - PD-L1 pathway impairs Th1 immune response in the late stage of infection with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin. *International Immunology* 2010, 22(12) :915 - 925.
- [11] Khader S, Tousif S, Singh Y, *et al.* T Cells from Programmed Death - 1 Deficient Mice Respond Poorly to Mycobacterium tuberculosis Infection. *PLoS ONE* 2011, 6(5) :e19864.
- [12] Jurado JO, Alvarez IB, Pasquinelli V, *et al.* Programmed death (PD) - 1; PD-ligand 1/PD-ligand 2 pathway inhibits T cell effector functions during human tuberculosis. *J Immunol* 2008, 181(1) :116 - 125.
- [13] Zhu W, Bao R, Fan X, *et al.* PD-L1 Blockade Attenuated Sepsis-Induced Liver Injury in a Mouse Cecal Ligation and Puncture Model. *Mediators of Inflammation* 2013, 2013:1 - 7.
- [14] Singh AK, Stock P, Akbari O. Role of PD-L1 and PD-L2 in allergic diseases and asthma. *Allergy* 2011, 66(2) :155 - 162.
- [15] McNab FW, Berry MP, Graham CM, *et al.* Programmed death ligand 1 is over-expressed by neutrophils in the blood of patients with active tuberculosis. *European Journal of Immunology* 2011, 41(7) :1941 - 1947.
- [16] Marzo E, Vilaplana C, Tapia G, *et al.* Damaging role of neutrophilic infiltration in a mouse model of progressive tuberculosis. *Tuberculosis* 2014, 94(1) :55 - 64.
- [17] Ryoyo Ikebuchi SK, Tomohiro Okagawa, Kazumasa Yokoyama, *et al.* Blockade of bovine PD - 1 increases T cell function and inhibits bovine leukemia virus expression in B cells in vitro. *Veterinary Research* 2013, 44(59) :1 - 15.
- [18] Bhatt K, Kim A, Kim A, *et al.* Equivalent functions for B7.1 and B7.2 costimulation in mediating host resistance to Mycobacterium tuberculosis. *Cellular Immunology* 2013, 285(1 - 2) :69 - 75.
- [19] Mendoza-Coronel E, Camacho-Sandoval R, Bonifaz LC, *et al.* PD-L2 induction on dendritic cells exposed to Mycobacterium avium downregulates BCG-specific T cell response. *Tuberculosis* 2011, 91(1) :36 - 46.
- [20] Ivana B. Alvarez VP, Javier O. Jurado, Eduardo Abbate, *et al.* Role Played by the Programmed Death-1 - Programmed Death Ligand Pathway during Innate Immunity against Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases* 2010, 202(4) :524 - 532.
- [21] Sabine J. Wölfle JS, Holger Bartz, Aline Sa`hr, *et al.* PD-L1 expression on tolerogenic APCs is controlled by STAT-3. *Eur J Immunol*, 2011, 41(2) :413 - 424.
- [22] Elizabeth Mendoza-Coronela RC-S, Laura C. Bonifazb, Yolanda López-Vidal. PD-L2 induction on dendritic cells exposed to Mycobacterium avium downregulates BCG-specific T cell response. *Tuberculosis* 2011, 91(1) :36 - 46.

[修回日期]2015-06-24