

· 综 述 ·

PD-1/PD-L1 负性协同刺激通路在乙型病毒性肝炎慢性化中的地位及进展

徐成润 综述, 伍伟平 审校

〔摘要〕 乙型肝炎是影响我国人群健康的主要疾病之一,乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的慢性感染可导致疾病的进展。现有研究提示细胞程序性死亡因子-1/细胞程序性死亡因子配体(PD-1/PD-L1)通路可减弱 T 细胞的免疫功能,从而导致疾病的慢性化及重症化。目前有关 PD-1/PD-L1 通路在慢性乙型肝炎疾病进展中的作用未有系统的阐述。本文就 PD-1/PD-L1 通路与免疫调节在慢性乙型肝炎中的作用进行综述,为临床疾病预后的判断提供参考。

〔关键词〕 PD-1/PD-L1, 通路; 肝炎, 乙型, 慢性

〔中图分类号〕 R512.62 〔文献标志码〕 A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2015.05.021

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是不直接引起细胞破坏的嗜肝 DNA 病毒,HBV 持续感染造成乙型肝炎的慢性化,其临床转归是由病毒和宿主两方面的因素决定,其中机体免疫功能异常是造成 HBV 慢性持续感染的原因之一。在急性自限性乙型肝炎患者体内存在多克隆、特异性的细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)和 I 型辅助性 T(Th1)细胞反应^[1],而慢性 HBV 感染者体内病毒特异性 CTL 和 Th 细胞存在数量和功能上的缺陷。导致机体在防御病毒感染与维持自身耐受之间失去平衡的疾病慢性化、免疫耐受、肿瘤发生的确切机制尚有许多不明之处,但病毒抗原的持续存在导致体内特异性效应 T 细胞功能缺损是一个重要原因,而 T 细胞的状态与细胞程序性死亡因子-1/细胞程序性死亡因子配体(PD-1/PD-L1)刺激信号密切相关^[2]。

1 PD-1 及其配体 PD-L1

1.1 结构和表达 PD-1(programmed cell death 1),也称 CD279,属于 B7 免疫球蛋白超家族成员,相对分子量为 55 000,结构上与 CTLA-4 有 23% 的同一性,胞外区由一个 IgV 样域组成,胞质区含有两个酪氨酸信号基序,其一为免疫受体酪氨酸抑制模体(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif, ITIM),另一为免疫受体酪氨酸交换模体(immunoreceptor tyrosine-based switch motif, ITSM)。ITSM 募集磷酸酶 SHP-1 和 SHP-2,使 TCR 或 BCR 传递的效应

信号发生去磷酸化,同时 PD-1 信号降低 CD28 介导的信号,抑制 Akt 激酶磷酸化、糖代谢及 Bcl-XL 的表达。PD-1 表达较为广泛,可在活化的 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞和骨髓细胞上表达;少量表达于 NK-T 细胞表面^[3]。因此和 CTLA-4 相比,其表达范围更广,预示着其作用也更为广泛。

PD-1 已被证明有两个配体,分别为 PD-L1(又称 B7-H1)和 PD-L2(又称 B7-DC)。1999 年发现并证实的 PD-L1 属 B7 超家族成员,人 PD-L1 基因定位于人 9p24.2,可编码 290 个氨基酸的 I 型跨膜蛋白,其胞外段为 IgV 和 IgC 样结构域。PD-L1 的 mRNA 主要为 4.2 kb,此外还有 1.8 kb、3.7 kb 和 7.2 kb 这 3 种转录形式,但其编码产物相同,且功能相似。PD-L1 基因与 B7-1、B7-2 基因的二级结构和三级结构十分相似,因而表现出相似的生物学功能。PD-L1 表达于 DC、B 细胞、T 细胞及髓系细胞,当这些细胞激活时 PD-L1 表达上调^[4]。此外,与 B7-1、B7-2 不同,PD-L1 也表达于非造血细胞如血管内皮细胞,因此在非淋巴器官中也有表达,可表达于心脏、肺、胰腺、肝脏、肌肉和免疫豁免部位,如眼和胎盘^[5-6]。由于 PD-L1 能在非淋巴组织中表达,因而推测 PD-1/PD-L1 信号途径不仅在淋巴器官,而且在非淋巴器官都能调节免疫应答,预示 PD-1/PD-L1 信号可能在这些外周器官中通过调节自身反应性 T 细胞、B 细胞来调节免疫应答。PD-L2 和 PD-L1 有 40% 的序列相同。与 PD-L1 不同,PD-L2 仅表达于已诱导激活的巨噬细胞和 DC,初步研究显示 PD-L2 与 PD-1 的亲合力大于 PD-L1 的 3~6 倍,并有不同的结合、解离动力学^[7]。因此,PD-L1 可能是外周组织、器官中主要的调节配体,而 PD-L2 则是在淋巴

作者单位: 363000 福建漳州,厦门大学附属东南医院感染科

通讯作者: 伍伟平, E-mail: superwuweiping@163.com

器官的免疫调节中起主导作用。

1.2 生物学特性 组织上表达的 PD-L1 对保护外周组织不受自身免疫的攻击至关重要。实质细胞表达 PD-L1, 通过 PD-1/PD-L1 通路维持耐受状态, 如阻断该通路, 则可使自身免疫性疾病加重或肿瘤发生^[2,8]。研究表明, PD-1/PD-L1 信号途径能有效抑制 T 细胞增殖和细胞因子的产生, 且其结合力远大于 PD-1 与 CD28 的结合力^[9]。对自身免疫性糖尿病 NOD 小鼠模型, PD-1^{-/-} NOD 小鼠^[10] 和 PD-L1^{-/-} NOD 小鼠^[11] 都表现为糖尿病快速进展。无论是胰腺 β 细胞还是血管内皮上表达的 PD-L1 对于 NOD 小鼠自身免疫性糖尿病的发生都有保护作用。还有研究表明, 用抗 PD-L1 mAb 阻断 PD-1/PD-L1 通路可以抑制调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Treg) 的功能^[12]。将异源 C57BL/6 脾细胞过继输入 NOD/SCID 小鼠发生移植物抗宿主病 (GvHD) 是致命的, 而 Treg 细胞对于 GvHD 的抑制作用在给予抗 PD-L1 mAb 后终止, 说明阻断 PD-1/PD-L1 通路可以终止 Treg 介导的免疫调节功能。亦有报道在慢性炎症中, PD-L1 可通过 STAT-5 的磷酸化负性调控 Treg^[13]。

在抗微生物感染免疫中, PD-1/PD-L1 通路也起到关键作用。可能绝大部分微生物通过利用 PD-1/PD-L1 通路降低被清除的免疫, 引起慢性、持续性感染^[2]。在慢性病毒感染时, 病毒特异性 CD8⁺ T 细胞的功能通常都会减弱^[14], 这与急性感染或疫苗接种后产生强力的效应和记忆性 CD8⁺ T 细胞不同。在慢性感染模型中, 如灵长类 SIV 感染、小鼠 LCMV 感染或 HBV、HCV、HIV 等病毒感染, 通常可以观察到去功能化的病毒特异性 CD8⁺ T 细胞持续存在, 其代表一系列免疫缺陷^[15]。随病毒载量的升高, 病毒特异性 T 细胞的功能受损更加严重, 早期的去功能化主要表现在增殖和产生 IL-2 的能力的丧失, 晚期则表现为产生效应性细胞因子和溶细胞的功能的丧失。研究表明慢性 HIV 感染、LCMV 感染及 HCV 感染时外周血 CD8⁺ T 细胞上 PD-1 高度表达^[16-18], 病毒感染基础上的肿瘤亦可促进 Jurkat 细胞的 PD-1 高表达^[19]。慢性感染时 PD-1 上调, PD-1/PD-L1 通路在这一感染过程中对调节 T 细胞缺损有重要作用。使用抗 PD-1 或抗 PD-L1 阻断抗体, 病毒特异性 CD8⁺ T 细胞应明显增强, 表现为特异性 CD8⁺ T 细胞数量显著增加, 分泌的细胞因子增多及细胞毒功能增强^[19], 功能恢复的病毒特异性 CD8⁺ T 细胞使病毒载量明显下降, 但不会促进特异性 CD8⁺ T 细胞的溶解活性^[19]。有研究表明阻断 PD-1/PD-L1 通

路可使 T 细胞增生、CD8⁺ T 细胞的功能改善, 抗 PD-L1 还可以恢复 CD4⁺ T 细胞对 HIV 抗原的增生应答^[20-21], 抗 PD-L1 可促进 HCV 特异性 CD8⁺ T 细胞的增生。这些研究表明 PD-1/PD-L1 通路可以在慢性 HIV 和 HCV 感染中阻止抗病毒 T 细胞应答, 阻断这一通路可能恢复失能的 T 细胞, 成为抗病毒治疗的新策略。

2 肝脏免疫

肝脏是重要的免疫调节器官, 而肝脏调节免疫的结果往往导致免疫耐受, 目前认为肝脏库弗细胞、DC、肝窦内皮细胞 (liver sinusoidal endothelial cell, LSEC) 等非实质细胞是肝脏发挥免疫功能的细胞基础。Iwai 等^[22] 研究证实 PD-L1 是 LSEC 诱导免疫耐受的分子基础之一, PD-L1 在小鼠库弗细胞、LSEC 均可表达。构建活化 PD-1 小鼠 T 淋巴细胞与肝脏非实质细胞共同培养, 结果其 T 淋巴细胞增殖活性较 WT 小鼠明显增强, 向 WT 小鼠 T 淋巴细胞培养液中加入抗 PD-L1, T 淋巴细胞增殖反应也增强。静脉注射重组表达 lac-Z 的腺病毒引起的肝炎中 PD-1 小鼠 T 淋巴细胞增殖明显, 而脾脏中 T 淋巴细胞增殖活性与 WT 小鼠 T 淋巴细胞无差异, 肝脏病理上 PD-1 小鼠表现为严重但短暂的肝炎, 同时伴大量肝细胞凋亡, WT 小鼠肝脏病理改变较轻, 但清除病毒的时间却明显延长。肝脏是活化 T 淋巴细胞特异性聚集部位, 并在此诱导凋亡, 因此 T 淋巴细胞的肝内清除也是肝脏诱导免疫耐受的原因之一, 而 PD-L1 是决定 T 淋巴细胞在肝内聚集和清除的效应分子。Dong 等^[23] 发现 PD-L1 缺陷小鼠 (KO) 的 T 淋巴细胞在淋巴器官发育正常, 在肝内淋巴细胞数量则明显增多, 其中 CD4⁺ T 淋巴细胞轻度增加, CD8⁺ T 淋巴细胞增多显著。在刀豆蛋白 A 诱发的自身免疫性肝炎中, PD-L1 缺陷的小鼠肝炎症状较 WT 小鼠明显为重, 且死亡率高, 同时自然杀伤 T 淋巴细胞减少, 肝内 CD8⁺ T 淋巴细胞明显增加, 激活诱导的 CD8⁺ T 淋巴细胞凋亡明显减少。由此可以看出 PD-L1 参与了肝脏的免疫调节功能, 是肝脏维持 T 淋巴细胞稳态, 以及诱导耐受、抗病毒反应的分子基础之一。

3 PD-1/PD-L1 通路与慢性乙型肝炎

抗病毒治疗是慢性乙型肝炎治疗的一个重要手段, 有效的 T 细胞免疫应答是清除病毒的关键, HBV 慢性感染过程中, 机体效应、记忆性 T 细胞的功能缺损及病毒免疫逃避机制导致感染的持续性^[24], 其

抗病毒疗效明显低于急性感染者。T 细胞的有效激活需要双信号,其中由 APC 表面分子与 T 细胞表面相应受体结合所提供的第二刺激信号是非抗原特异性的,且是 T 细胞抗原特异性激活所必需的,决定受抗原刺激的 T 细胞是活化为效应细胞,还是去功能化或凋亡。其正向刺激信号分子以 CD28 为代表,负向协同共刺激分子 PD-1/PD-L1 通路最新认为与慢性病毒感染关系最为密切。研究表明,慢性 HBV 感染时,外周血 T 细胞中的 PD-1 表达水平明显升高,且与 HBVDNA 拷贝数呈正相关,CD8⁺ T 淋巴细胞的含量与 HBVDNA 拷贝数呈负相关,CD8⁺ T 淋巴细胞的增殖功能与 PD-1 表达水平呈负相关^[25],PD-L1 在 PBMCs 中的表达水平也较正常对照者显著升高,阻断 PD-1/PD-L1 通路后,HBV 特异性 CD8⁺ T 细胞的功能得到改善^[26]。将 HBV 特异性 CTL 移植入 HBV 转基因小鼠后,这些细胞迅速被诱导分泌 IFN- γ ,但其分泌功能很快就被抑制,并伴随 PD-1 表达上调,利用 mAb 阻断 PD-L1 后,肝内特异性 CTL 数量增加,分泌 IFN- γ 的时间延长^[27]。而对 HBV 急性感染的研究表明,感染清除的患者体内病毒特异性的 CD8⁺ 记忆性 T 淋巴细胞 PD-1 和 CD38 的表达下调,开始表达 CD127,同时血清转氨酶浓度降低,病毒被机体清除。因此认为 PD-1 是调节抗 HBV 特异性 T 细胞免疫的关键分子。上述研究均从不同的角度反映 PD-1/PD-L1 通路与乙肝病毒感染后的细胞免疫功能密切相关,并导致病毒在体内持续存在。

4 结 语

在有效的抗病毒免疫应答和自身免疫耐受所需的刺激和抑制信号之间,PD-1/PD-L1 信号通路至关重要,已在体外细胞培养中强有力地证实,封闭 PD-1/PD-L1 通路能有效恢复抗原特异性 CTL 功能,清除感染病毒。当然,由于肝脏组织中的 PD-1 及其配体的表达情况尚未检测,故目前尚无证据证明肝内相关细胞的 PD-1、PD-L1 表达情况及其所代表的临床意义,目前只能通过分析 HBV 感染后抗原特异性 T 淋巴细胞的抑制分子 PD-1 表达水平及其对 T 细胞功能的免疫调节作用了解 HBV 感染慢性化的机制并预测病情的转归。研究如何通过阻断 PD-1/PD-L1 抑制性信号途径来实现增强抗病毒特异性 T 细胞的功能,对于治疗慢性 HBV 感染和打破免疫耐受都有重要的意义。尽管该信号通路还有许多尚不明确的环节有待解决,随着不断深入研究,其与抗病毒免疫的关系逐步阐明,该信号很有可能成

为慢性乙型肝炎抗病毒治疗的主要靶位。

【参考文献】

- [1] Zhang JY, Zhang Z, Jin B, et al. Cutting edge: programmed death-1 up-regulation is involved in the attrition of cytomegalovirus-specific CD8⁺ T cells in acute self-limited hepatitis B virus infection[J]. J Immunol, 2008, 181(6): 3741-3744.
- [2] Muenst S, Soysal SD, Tzankov A, et al. The PD-1/PD-L1 pathway: biological background and clinical relevance of an emerging treatment target in immunotherapy [J]. Expert Opin Ther Targets, 2015, 19(2): 201-211.
- [3] Dai S, Jia R, Zhang X, et al. The PD-1/PD-Ls pathway and autoimmune diseases[J]. Cell Immunol, 2014, 290(1): 72-79.
- [4] Boussiotis VA, Chatterjee P, Li L. Biochemical signaling of PD-1 on T cells and its functional implications[J]. Cancer J, 2014, 20(4): 265-271.
- [5] El Annan J, Goyal S, Zhang Q, et al. Regulation of T-cell chemotaxis by programmed death-ligand 1 (PD-L1) in dry eye-associated corneal inflammation [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(7): 3418-3423.
- [6] Liu Y, Zhao M, Xu X, et al. Adoptive transfer of Treg cells counters adverse effects of Toxoplasma gondii infection on pregnancy[J]. J Infect Dis, 2014, 210(9): 1435-1443.
- [7] Ghiotto M, Gauthier L, Serriani N, et al. PD-L1 and PD-L2 differ in their molecular mechanisms of interaction with PD-1 [J]. Int Immunol, 2010, 22(8): 651-660.
- [8] Tang X, Li Q, Zhu Y, et al. The advantages of PD1 activating chimeric receptor (PD1-ACR) engineered lymphocytes for PDL1(+) cancer therapy[J]. Am J Transl Res, 2015, 7(3): 460-473.
- [9] Butte MJ, Pena-Cruz V, Kim MJ, et al. Interaction of human PD-L1 and B7-1 [J]. Mol Immunol, 2008, 45(13): 3567-3572.
- [10] Won TJ, Jung YJ, Kwon SJ, et al. Forced expression of programmed death-1 gene on T cell decreased the incidence of type 1 diabetes [J]. Arch Pharm Res, 2010, 33(11): 1825-1833.
- [11] Mfarrej B, Keir M, Dada S, et al. Anti-CD3 mAb treatment cures PDL1^{-/-}. NOD mice of diabetes but precipitates fatal myocarditis [J]. Clin Immunol, 2011, 140(1): 47-53.
- [12] Park HJ, Park JS, Jeong YH, et al. PD-1 upregulated on regulatory T cells during chronic virus infection enhances the suppression of CD8⁺ T cell Immune response via the interaction with PD-L1 expressed on CD8⁺ T cells [J]. J Immunol, 2015, 194(12): 5801-5811.
- [13] Franceschini D, Paroli M, Francavilla V, et al. PD-L1 negatively regulates CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Tregs by limiting STAT-5 phosphorylation in patients chronically infected with HCV [J]. J Clin Invest, 2009, 119(3): 551-564.
- [14] Klennerman P, Hill A. T cells and viral persistence: lessons from diverse infections[J]. Nat Immunol, 2005, 6(9): 873-879.
- [15] Onlamoon N, Rogers K, Mayne AE, et al. Soluble PD-1 rescues the proliferative response of simian immunodeficiency virus-specific CD4 and CD8 T cells during chronic infection [J]. Immunology, 2008, 124(2): 277-293.

- ism[J]. J Comput Assist Tomogr, 2006, 30(2):262-266.
- [27] Attina D, Valentino M, Galie N, et al. Application of a new pulmonary artery obstruction score in the prognostic evaluation of acute pulmonary embolism: comparison with clinical and haemodynamic parameters[J]. Radiol Med, 2011, 116(2):230-245.
- [28] Rodrigues AC, Guimaraes L, Guimaraes JF, et al. Relationship of clot burden and echocardiographic severity of right ventricular dysfunction after acute pulmonary embolism[J]. Int J Cardiovasc Imaging, 2015, 31(3):509-515.
- [29] Apfalter P, Henzler T, Meyer M, et al. Correlation of CT angiographic pulmonary artery obstruction scores with right ventricular dysfunction and clinical outcome in patients with acute pulmonary embolism[J]. Eur J Radiol, 2012, 81(10):2867-2871.
- [30] Aribas A, Keskin S, Akilli H, et al. The use of axial diameters and CT obstruction scores for determining echocardiographic right ventricular dysfunction in patients with acute pulmonary embolism[J]. Jpn J Radiol, 2014, 32(8):451-460.
- [31] Kumamaru KK, Hunsaker AR, Wake N, et al. The variability in prognostic values of right ventricular-to-left ventricular diameter ratios derived from different measurement methods on computed tomography pulmonary angiography: a patient outcome study[J]. J Thorac Imaging, 2012, 27(5):331-336.
- [32] Lu MT, Demehri S, Cai T, et al. Axial and reformat four-chamber right ventricle-to-left ventricle diameter ratios on pulmonary ct angiography as predictors of death after acute pulmonary embolism[J]. AJR Am J Roentgenol, 2012, 198(6):1353-1360.
- [33] Lu MT, Cai T, Ersoy H, et al. Interval increase in right-left ventricular diameter ratios at ct as a predictor of 30-day mortality after acute pulmonary embolism: initial experience[J]. Radiology, 2008, 246(1):281-287.
- [34] Kang DK, Thilo C, Schoepf UJ, et al. CT signs of right ventricular dysfunction: prognostic role in acute pulmonary embolism[J]. JACC Cardiovasc Imaging, 2011, 4(8):841-849.
- [35] Trujillo-Santos J, den Exter PL, Gomez V, et al. Computed tomography-assessed right ventricular dysfunction and risk stratification of patients with acute non-massive pulmonary embolism: systematic review and meta-analysis[J]. J Thromb Haemost, 2013, 11(10):1823-1832.
- [36] 刘畅, 曹小织. 自发性肺血栓栓塞症的早期诊断及分析[J]. 东南国防医药, 2014, 16(6):605-607.
(收稿日期:2015-06-03; 修回日期:2015-08-01)
(本文编辑:齐 名; 英文编辑:王建东)

(上接第 516 页)

- [16] Planes R, BenMohamed L, Leghmari K, et al. HIV-1 Tat protein induces PD-L1 (B7-H1) expression on dendritic cells through tumor necrosis factor alpha- and toll-like receptor 4-mediated mechanisms[J]. J Virol, 2014, 88(12):6672-6689.
- [17] Penalzoa-MacMaster P, Kamphorst AO, Wieland A, et al. Interplay between regulatory T cells and PD-1 in modulating T cell exhaustion and viral control during chronic LCMV infection[J]. J Exp Med, 2014, 211(9):1905-1918.
- [18] Su SS, He H, Kong LB, et al. Regulatory phenotype, PD-1 and TLR3 expression in T cells and monocytes from HCV patients undergoing antiviral therapy: a randomized clinical trial[J]. PLoS One, 2014, 9(4):e93620.
- [19] Shi F, Shi M, Zeng Z, et al. PD-1 and PD-L1 upregulation promotes CD8(+) T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients[J]. Int J Cancer, 2011, 128(4):887-896.
- [20] Palmer BE, Neff CP, Lecureux J, et al. In vivo blockade of the PD-1 receptor suppresses HIV-1 viral loads and improves CD4⁺ T cell levels in humanized mice[J]. J Immunol, 2013, 190(1):211-219.
- [21] Dai B, Xiao L, Bryson PD, et al. PD-1/PD-L1 blockade can enhance HIV-1 Gag-specific T cell immunity elicited by dendritic cell-directed lentiviral vaccines[J]. Mol Ther, 2012, 20(9):1800-1809.
- [22] Iwai Y, Terawaki S, Ikegawa M, et al. PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver[J]. J Exp Med, 2003, 198(1):39-50.
- [23] Dong H, Zhu G, Tamada K, et al. B7-H1 determines accumulation and deletion of intrahepatic CD8(+) T lymphocytes[J]. Immunity, 2004, 20(3):327-336.
- [24] Cai G, Nie X, Li L, et al. B and T lymphocyte attenuator is highly expressed on intrahepatic T cells during chronic HBV infection and regulates their function[J]. J Gastroenterol, 2013, 48(12):1362-1372.
- [25] Xu P, Chen YJ, Chen H, et al. The expression of programmed death-1 in circulating CD4⁺ and CD8⁺ T cells during hepatitis B virus infection progression and its correlation with clinical baseline characteristics[J]. Gut Liver, 2014, 8(2):186-195.
- [26] Boni C, Fiscaro P, Valdatta C, et al. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection[J]. J Virol, 2007, 81(8):4215-4225.
- [27] Hou FQ, Wu XJ, Wang Y, et al. Rapid downregulation of programmed death-1 and interferon-gamma-inducible protein-10 expression is associated with favourable outcome during antiviral treatment of chronic hepatitis B[J]. J Viral Hepat, 2013, 20(Suppl 1):18-26.
(收稿日期:2015-04-14; 修回日期:2015-06-22)
(本文编辑:齐 名; 英文编辑:王建东)