

文章编号 :1004-0374(2011)01-0086-04

干扰程序性死亡分子 1 及其配体信号通路的免疫治疗

汪龚泽, 刘朝奇*

(三峡大学分子生物学研究所, 宜昌 443002)

摘要: 程序性死亡分子 1(programmed death-1, PD1)及其配体(programmed death ligand, PDL)属于 B7 家族的共刺激分子, 介导免疫反应的负性调节信号, 在肿瘤发生、病毒感染以及自身免疫病中都发挥了特异性的调节作用。利用 PD1/PDL1 信号途径调节机体的免疫应答从而达到免疫治疗的目的, 该文就此展开综述。

关键词: PD1; PDL1; 免疫调节; 免疫治疗

中图分类号: R392.11 **文献标识码:** A

A therapeutic strategy of targeting PD1/PDL signal pathway

WANG Gong-Ze, LIU Chao-Qi*

(Institute of Molecular Biology, Three Gorges University, Yichang 443002, China)

Abstract: PD1(programmed death-1, PD1)and PDL1(programmed death ligand-1, PDL1) are members of co-stimulating molecules of B7 superfamily. PDL1 binds to PD-1, which mainly expresses on the activated T cells, mediates the negative modulating signals. Interfering the PD1/PDL signal pathway regulates the immunological responses, which could be used as a therapeutic strategy for cancer, viral infection and auto-immune diseases. In this paper, we reviewed the current progress of the associated research.

Key words: PD1; PDL1; immuno-regulation; immunotherapy

1 PD1/PDL1 的免疫调节作用

抗原特异性 T 细胞的活化需要两个不同的信号, 第一信号来自抗原肽-MHC 分子组成的复合物与 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)的相互作用; 第二信号由抗原递呈细胞(antigen-presenting cells, APC)表面表达的协同刺激分子传递给 T 细胞。协同刺激信号可促进 T 细胞增殖、分化和细胞因子的产生, 以及为防止 T 细胞发生凋亡提供生存信号。此外, 协同刺激信号也具有负性调节作用, 对诱导和维持 T 细胞的无能(anergy)也至为关键。其中, 新近发现的程序性死亡分子 1(programmed death-1, PD1)及其配体(programmed death ligand, PDL)就属于 B7 家族的协同刺激分子。CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、NKT 细胞、B 细胞和单核细胞在激活后都诱导性地表达 PD1(CD279)分子^[1]。这与同属的 CD28 和 CTLA 分子有明显的不同, 它们仅特异性地表达在

T 细胞上。PD1 与其他的 CD28 家族成员发挥功能的方式相似, 传递的信号对 TCR 受体通路进行调控而不单独发挥作用。PD-1 的胞内区包含了两个酪氨酸信号结构域, 它们在 PD1 激活后都可发生磷酸化^[2]。其中 ITBS(immunoreceptor tyrosine-based switch motif)结构域的第二个酪氨酸磷酸化后, 招募酪氨酸磷酸化酶 SHP2 和 SHP1 到 PD1 的胞内区。这些磷酸酶对膜区附近的 TCR 受体相关信号分子 ZAP70、PKC θ 和 CD3 ζ 去磷酸化, 从而抑制 TCR/CD28 信号传导。PD1 信号通路还抑制 CD28 介导的 PI3K 的激活, 从而减少 Akt 磷酸化和葡萄糖代谢反

收稿日期: 2010-06-17; 修回日期: 2010-07-05

基金项目: 湖北省自然科学基金项目(2008CDB118)

* 通讯作者: E-mail: zqliu@ctgu.edu.cn; Tel: 0717-6397179

应。PDL有两种分子模式:PDL1和PDL2。PDL1组成性表达于T细胞、B细胞、巨噬细胞和树突状细胞(dendritic cell, DC)上,在活化后的细胞上表达量增加。除此之外,PDL1还表达于大量非淋巴细胞的组织细胞上,如心脏内皮细胞、胰腺的 β 细胞、胎盘的合体滋养层细胞等等。相反,PDL2的表达相对较局限,主要表达在抗原递呈细胞上,如活化的巨噬细胞、DC,所以在调节免疫方面主要是PD1/PDL1发挥作用。应用B7-H1抗体研究其信号转导, Kim等^[3]发现EBV-转化的B细胞能高表达PDL1,应用anti-B7-H1 Ab(clone 130002)可以诱导活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生,线粒体破坏,凋亡蛋白的释放及细胞凋亡。B7-H1的刺激可以诱导fasL的表达,促进JNK和c-jun的磷酸化,以及p-ERK1/2和p-Akt的下调。研究结果提示,B7-H1信号通路的活化介导的EBV-转化的B细胞凋亡可能包括ROS的产生和JNK的活化,使fasL表达上调。不过Chen研究小组报道,在肿瘤细胞表面高表达的B7-H1可接受PD-1的信号迅速诱导细胞产生抗CTL的杀伤作用。此保护活性不需要PD-1的胞内信号区。缺失B7-H1的信号区会增加CTL的杀伤活性。应用Fas mAb或者STP(streptomyces staurospores)诱导肿瘤细胞凋亡,如果预处理PD-1Ig就可以明显降低B7-H1/P815细胞的死亡。这些结果提示PD-1/PDL1信号通路中,PDL1可以作为受体接受PD-1的刺激,迅速产生保护效应使PDL1表达细胞免受杀伤^[4]。另外,在免疫调节中,PD-1/PDL1相互作用调节CD4⁺和CD8⁺T细胞的耐受。PDL1促进iTregs的发育和功能,PDL1通过增强iTregs上Foxp3的表达来诱导Treg细胞的分化和维持其功能。TGF- β 作为Tregs繁殖中必需的细胞因子,它与PDL1协同作用调节Foxp3⁺iTregs的发育。单独应用PDL1beads也可以诱导CD4⁺T细胞成为iTreg,说明PDL1在iTreg发育中的重要作用。Tregs通过下调机体针对外来抗原或自身抗原的免疫应答水平来维持自身耐受,使它具有免疫无能性和免疫抑制性两大功能。免疫无能性表现为高浓度IL-2的单独刺激,固相包被或可溶性抗原CD3刺激单抗以及抗CD3单抗和抗CD28单抗的联合作用呈无应答状态,也不分泌IL-2。免疫抑制性表现为能够抑制CD4⁺和CD8⁺反应性T细胞的活化和增殖,其抑制性是非特异性的,阻断该通路后可以恢复T细胞的大部分功能。

基于PD1/PDL1在机体免疫调节中的作用,

PD1与其配体PDL1介导的信号途径正成为通过免疫干预进行临床疾病治疗的手段之一。许多研究者针对PD1、PDL1分子设计特异性阻断其信号途径的药物,调节机体的免疫应答,期望达到免疫治疗作用。

2 利用PD1/PDL1信号通路的免疫治疗作用

2.1 干预PD1/PDL1信号通路的抗病毒作用

阻断PD1/PDL1通路发挥抗病毒作用主要在慢性感染, LCMV感染时PD1在抗病毒特异性T细胞上持续高表达,阻断PD1/PDL1的作用能恢复CD8⁺T细胞的大部分功能,促进病毒清除;而在急性感染阶段PD1是一过性的表达,随后很快降到基础水平^[5]。在SIV感染猕猴实验中,研究人员通过将鼠的重链可变区和人的IgG1相连,轻链的可变区与人类的k相连构建人源化抗体,通过抗体阻断PD1/PDL1的作用可以显著地促进T淋巴细胞的分裂,增加特异性杀伤性CD8⁺细胞数目,分泌大量的穿孔素、颗粒酶,产生大量表达多重细胞因子IFN- γ 、TNF- α 和IL-2特异地杀伤病毒宿主细胞;且可以增加针对病毒的特异性抗体的浆细胞,减少高表达PD1的记忆性B淋巴细胞,激活特异性的体液免疫,减少病毒的载量^[6]。在研究HIV病毒慢性感染时,Zhang等^[7]通过检测PD1分子在63例HIV感染患者病毒特异性CD8⁺T细胞上的表达,发现并首次报道长期无进展者体内功能完整的病毒特异性CD8⁺T细胞上PD1分子的表达明显低于典型进展者。PD-1分子在典型进展者病毒特异性CD8⁺T细胞上的上调表达与CD4⁺T细胞计数的减少、病毒载量的升高密切相关。更重要的是,PD1分子的上调表达与穿孔素释放减少和IFN- γ 产生减少相关,同时在典型进展者体内PD1分子的上调表达与HIV特异性效应性记忆性CD8⁺T增殖能力减弱相关。在体外应用抗体阻断PD1分子与其配体PDL1的结合,能够有效恢复HIV特异性CD8⁺T的效应功能和增殖能力。研究发现在HCV(丙型肝炎病毒)感染中发现HCV特异性杀伤T细胞高表达PD1分子,且功能缺失。研究人员通过对14位不同时期的HCV感染患者采用抗PDL1抗体治疗后数据显示:HCV-RNA表达水平显著下降,HCV特异性杀伤T细胞迅速增殖,IFN- γ 分泌增加,抗体治疗对细胞没有明显毒性,是未来治疗丙型肝炎病毒感染的有效手段之一^[8]。在Jeong的实验中也发现在HCV感染的肝间质细胞包括窦上皮细胞、库普弗细胞上都有PDL1的组成

性表达, 而且对活化的 T 细胞的增殖和分裂有抑制作用; 即使在使用抗 CD3 抗体时, T 细胞的活化也被抑制, 使用抗 PDL1 抗体时这种 T 细胞被抑制的现象才能解除。与此同时, 研究人员还发现在使用抗 PDL1 抗体后, IFN- γ 的表达量显著的增加, HCV 特异性 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞以及 TH1 细胞因子 IL-2 都明显上升。而 TH2 细胞因子 IL-4 和 IL-10 并未上升^[9]。总而言之, 慢性病毒感染中 PD1 高表达介导了 CD8⁺T 细胞的功能耗竭, 使病毒逃脱细胞性杀伤的免疫攻击。通过抗体阻断 PD1/PDL1 信号通路能够有效地抗病毒感染, 这也将是抗病毒治疗的新靶点之一。

2.2 干预PD-1/PDL1信号途径的抗肿瘤作用

PDL1 蛋白分子在正常组织中几乎不表达, 但普遍存在于人肺癌、卵巢癌、结肠癌、肾癌和黑色素瘤等多种肿瘤细胞表面。肿瘤细胞表面的 PDL1 能诱导肿瘤特异性 CTL 凋亡, 从而抑制机体对肿瘤的免疫反应; 而在淋巴器官内, 抗原呈递细胞表面的 PDL1 与初始 T 淋巴细胞相互作用诱导 T 淋巴细胞的无能。因此, PDL1 是参与肿瘤免疫逃逸的重要分子, 阻断 PD-1/PDL1 能抑制肿瘤的免疫逃逸, 提高初始 T 细胞的激活能力和 CTL 的杀伤活性, 从而提高其抗原的免疫反应。Pilon-Thomas 等^[10]研究发现在体外中和抗体与 PDL1 结合有效地促进 IFN- γ 的产生, 抗原特异性的杀伤性 T 细胞活性增强; 而在体内实验中将 PDL1 抗体与黑色素瘤以全身用药的形式注入小鼠体内发现特异性抗黑色素瘤的杀伤性的 CD8⁺T 细胞增多。Okudaira 等^[11]使用 C57BL/6 小鼠胰腺肿瘤模型, 分三次给药 PD-1/PDL1 抗体(每次间隔一周)来检测小鼠体内免疫调节功能在抗肿瘤中的作用。实验结果表明, 使用抗体治疗后, 肿瘤组织的生长得到抑制, 肿瘤组织中的 PD-1/PDL1 表达量减少。实时定量 PCR 显示 IFN- γ 抗肿瘤细胞因子表达量增多, IL-10 和 FoxP3 等抑制机体的免疫细胞因子表达量减少。

2.3 加强PD1/PDL1信号治疗自身免疫病作用

PD1/PDL1 信号途径在阻止自身免疫性疾病发生发展中起着重要作用。作为一个关键的共抑制分子, PD1 及其配体的异常表达与自身免疫病的发生存在明显的相关性。近年来对各种自身免疫病动物模型的研究显示 PD1 途径不仅在 T 细胞初次活化增殖中起重要作用, 而且还影响了 T 细胞再次遭遇抗原的反应, 如缺乏或阻断 PD1/PDL1 途径加速了 1 型糖尿病的进展, Liang 等^[12]测定了患有糖尿病的

NOD 小鼠在 3、9 周龄时的 PD1 及其配体的表达水平, 发现 3 周龄小鼠虽然胰岛已有单核细胞浸润, 但并没有 PD1 或其配体表达。而 9 周龄小鼠 PD1、PDL1 出现表达, 尤其是胰岛细胞表面的 PD1 表达急剧上调。利用转基因技术, 使 NOD 小鼠胰腺 β 细胞高表达 PDL1 后, 胰岛的炎症程度降低, 且糖尿病发作的时间推迟、频率下降^[13]。在活化耐受的 NOD 小鼠中, PD1/PDL1 途径可能在耐受的诱导及维持中发挥重要作用。但利用基因敲除技术获得的 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞缺陷型小鼠摄入抗 PDL1 的单抗后没有发生糖尿病。在系统性红斑狼疮 BXSB 小鼠模型实验中, 使用重组腺病毒载体 Ad-PDL1 感染 AD-293 细胞后, 其培养上清液加入到混合淋巴细胞反应培养基, T 细胞的增殖明显受到抑制。而在 BXSB 小鼠尾静脉注射重组腺病毒载体 Ad-PDL1 4 周后, 小鼠的狼疮样肾炎明显改善^[14], 表明了 PD1/PDL1 途径在抑制 SLE 进展中的保护作用。系统性红斑狼疮 BXSB 小鼠产生自身抗体、自发性发生高球蛋白血症、致死性肾小球肾炎等一系列自身免疫性综合征, 与人类系统性红斑狼疮相似, 由此我们可以相信使用人源化外源性的 PDL1 蛋白治疗将会有效地治疗人类系统性红斑狼疮这种自身免疫病。

3 结语

通过调节 T 细胞活化过程中的第二信号强度, PD1/PDL1 途径抑制了机体免疫应答反应, 从而在调控自身免疫耐受及自身免疫性疾病中发挥了重要的保护作用, 但同时一些病原微生物及肿瘤细胞利用该途径, 向淋巴细胞传递抑制信号, 引起了 T 细胞功能受损、细胞因子分泌受限, 进而导致了机体持续性慢性感染及肿瘤逃逸。作为重要的共抑制分子, PD1 及其配体显示了重要的临床应用前景, 尤其是研究发现 PD1/PDL1 途径直接调控了组织损伤处的病原性 T 细胞, 而对天然 Treg 没有明显的影响^[15]。因此, PD1/PDL1 途径可以成为调节机体免疫应答的理想靶点。人源化抗体的发现为我们运用 PD1/PDL1 抗体的免疫治疗提供了基础。人为地将抗病毒药物、抗肿瘤的化疗药物与我们的 PD1/PDL1 抗体和蛋白拼接的联合治疗也将是我们抗肿瘤、抗病毒的有效手段。

机体的免疫治疗一般为被动免疫治疗, 是根据免疫细胞表面的分子标记物靶向携带药物的一种治疗手法。但是, 新近研究发现 PD1/PDL1 信号通路

对 T、B 淋巴细胞的活化、发挥免疫调节作用起着重要作用。因此, 我们可以相信 PD1/PDL1 信号通路的免疫治疗将会得到越来越广泛的应用。

[参 考 文 献]

- [1] Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*, 2005, 23: 515-48
- [2] Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(21): 9543-53
- [3] Kim YS, Park GB, Lee HK, et al. Cross-linking of B7-H1 on EBV-transformed B cells induces apoptosis through reactive oxygen species production, JNK signaling activation, and fasL expression. *J Immunol*, 2008, 181: 6158-69
- [4] Azuma TS, Yao S, Zhu GF, et al. B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood*, 2008, 111(7): 3635-43
- [5] Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, et al. Restoring function in exhausted CD8⁺T cells during chronic viral infection. *Nature*, 2006, 439(7077): 682-7
- [6] Velu V, Titanji K, Zhu B, et al. Enhancing SIV-specific immunity *in vivo* by PD-1 blockade. *Nature*, 2009, 458(07662): 206-11
- [7] Zhang JY, Zhang Z, Wang XC, et al. PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8⁺T-cell exhaustion in atypical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood*, 2007, 109(11): 4671-8
- [8] Urbani S, Amadei B, Tola D, et al. Restoration of HCV-specific T cell functions by PD-1/PD-L1 blockade in HCV infection: effect of viremia levels and antiviral treatment. *J Hepatol*, 2008, 48(4): 548-58
- [9] Jeong HY, Lee YJ, Seo SK, et al. Blocking of monocyte-associated B7-H1 (CD274) enhances HCV-specific T cell immunity in chronic hepatitis C infection. *J Leukocyte Biol*, 2008, 83: 755-64
- [10] Pilon-Thomas S, Mackay A, Vohra N, et al. Blockade of programmed death ligand enhances the therapeutic efficacy of combination immunotherapy against melanoma. *J Immunol*, 2010, 184(7): 3442-9
- [11] Okudaira K, Hokari R, Tsuzuki Y, et al. Blockade of B7-H1 or B7-DC induces an anti-tumor effect in a mouse pancreatic cancer model. *Int J Oncol*, 2009, 35(4): 741-9
- [12] Liang SC, Latchman YE, Buhlmann JE, et al. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur J Immunol*, 2003, 33(11): 2706-16
- [13] Wang CJ, Chou FC, Chu CH, et al. Protective role of programmed death 1 ligand 1 in nonobese diabetic mice: the paradox in transgenic models. *Diabetes*, 2008, 57(7): 1861-9
- [14] Ding H, Wu X, Wu J, et al. Delivering PD-1 inhibitory signal concomitant with blocking ICOS co-stimulation suppresses lupus-like syndrome in autoimmune BXSB mice. *Clin Immunol*, 2006, 118(2-3): 258-67
- [15] Fife BT, Guleria I, Gubbels Bupp M, et al. Insulin-induced remission in new-onset NOD mice is maintained by the PD-1-PD-L1 pathway. *J Exp Med*, 2006, 203(12): 2737-47