

· 综述 ·

PD-1/PD-L1 在慢性乙型肝炎相关原发性肝癌中免疫调节作用的研究进展

杜林林 何玲玲 赵亚林 张珂 江宇泳 杨志云

原发性肝癌是全球癌症所致死亡的第三大原因,其发病率在世界范围内逐年递增^[1]。目前,已知癌症的发生发展被归因为多种免疫逃避,包括细胞表面MHC-I分子的下调,免疫抑制因子的分泌(如转化生长因子- β)以及T细胞共刺激的缺乏^[2],从而导致宿主免疫抑制。在肿瘤免疫应答中,肿瘤抗原特异性T淋巴细胞的诱导凋亡是肿瘤免疫逃避的主要机制。已知T细胞的活化需要抗原提供的第一信号和协同刺激分子提供的第二信号。PD-1/PD-L1作为免疫球蛋白超家族协同刺激分子的重要成员,近年来被证实与T淋巴细胞免疫功能缺陷相关,是导致肿瘤免疫逃避的重要机制。本文就PD-1/PD-L1在慢性乙型肝炎相关性肝癌中免疫调节作用的研究进展做一综述。

一、PD-1/PD-L1的生物学特性

1. PD-1的结构及表达: PD-1(programmed death-1)于1992被发现,因与细胞凋亡有关而被命名,也称为CD279,其编码由288个氨基酸残基组成的50~55 kD的免疫球蛋白超家族I型跨膜糖蛋白,由胞外区、跨膜区和胞内区组成^[3],其结构与CTLA4、CD28和ICOS有21%~33%的同源性^[4]。胞外区由免疫球蛋白IgV结构域组成,在其与配体结合中发挥重要作用;胞内区包含两个酪氨酸残基,N-末端参与构成免疫受体酪氨酸抑制基序(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs, ITIM),C-末端参与构成免疫受体酪氨酸转换基序(immunoreceptor tyrosine-based switch motif, ITSM),其中ITIM在免疫应答中发挥负性调节作用。

PD-1广泛表达于T细胞、B细胞、自然杀伤细胞(natural killer cells, NK)和肿瘤浸润细胞^[5]。

2. PD-Ls的结构及表达: 已知的PD-1配体包括PD-L1(B7-H1, CD274)和PD-L2(B7-DC, CD273),均属免疫调节分子B7家族成员,均为I型跨膜糖蛋白,两者结构相似,均由IgV样区、IgC样区、跨膜区和胞浆区组成^[5]。

PD-L1广泛表达于活化的CD4⁺T和CD8⁺T细胞、树突状细胞(dendritic cells, DC)、巨噬细胞、B细胞、调节性T细胞、上皮细胞、血管内皮细胞,还可表达于胎盘屏障及许多肿瘤细胞^[5]。已报道B7-H1具有共刺激性和共抑制性,其中共抑制性与其与受体PD-1(CD279)的结合有关,与共刺激性相关的受体尚未明确^[6]。

PD-L2的分布相对局限,可表达于T淋巴细胞、树突状细胞(DC)、枯否细胞、星状细胞、髓样细胞以及肝窦内皮细胞等^[7]。

二、PD-1/PD-L1在慢性乙型肝炎中的免疫调节作用

1. PD-1/PD-L1表达水平与肝脏炎症血清学指标的相关性: 慢性乙型肝炎因被感染肝细胞的免疫反应而导致肝脏炎症和病毒持续存在。外周血T细胞PD-1上调与慢性乙型肝炎患者免疫功能低下或缺陷有关。为研究在慢性乙型肝炎患者中,PD-1/PD-L1对肝脏损伤和慢性感染状态的影响,Xie等^[8]对32例慢性乙型肝炎肝组织活检患者和4例健康对照者进行研究,结果发现,PD-1/PD-L1显著上调与肝脏炎症及ALT水平相关。此外,PD-L1在慢性乙型肝炎活动期患者的肝脏抗原提呈细胞(包括Kupffer细胞和肝窦内皮细胞)的表达适当上调而非过度表达,而在静止期则表达下调而表现为病毒抑制。此研究表明,在慢性乙型肝炎中,PD-1和PD-L1在肝脏细胞的相互作用对维持HBV免疫应答起到重要的平衡作用。

有研究发现慢性乙型肝炎患者T淋巴细胞以及髓样树突状细胞的PD-1/PD-L1表达水平较健康对照组显著升高,而且PD-1/PD-L1表达水平与ALT水平、HBV载量均呈显著正相关关系^[9]。这在PD-1/PD-L1信号通路及免疫耐受的相关研究也得到了证实^[10]。叶翩^[11]对89例HBV感染者研究表明慢性乙型肝炎患者外周血CD8⁺T淋巴细胞表面PD-1表达水平较健康对照组显著升高,且其表达水平与HBV载量以及HBV特异性CTLs数量呈正相关关系,但与ALT水平缺乏相关性。另有一项相关性分析表明^[12],慢性乙型肝炎患者单核细胞中PD-L1表达水平高于健康对照组,且与血清ALT水平呈明显正相关,而与HBV载量间无显著相关性,而T、B淋巴细胞表面PD-L1表达水平在慢性乙型肝炎与健康对照组间差异无统计学

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.06.032

基金项目: 首都医科大学教学能力提升项目(No. 0900-1141360521); 北京卫生系统高层次人才项目(No. 2013-3-026); 北京中医药“125”人才培养项目

作者单位: 首都医科大学附属北京地坛医院中西医结合中心(杜林林、何玲玲、赵亚林、江宇泳、杨志云); 外科(张珂)

通讯作者: 杨志云, Email: yangzhiyun66@163.com

意义。

此外,有文献报道慢性乙型肝炎患者 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞上 PD-1 表达水平在 HBV DNA 阳性者和低于检测值下限者间差异无统计学意义,且轻度慢性乙型肝炎患者 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞上 PD-1 表达水平显著高于慢性乙型肝炎重度患者,且差异具有统计学意义^[13]。

2. PD-1/PD-L1 表达水平与肝脏组织学指标的相关性:为阐明 PD-1/PD-L1 表达水平与肝组织病变程度的关系,谢冬英等^[14]对 22 例肝组织活检表现为不同程度炎症及纤维化患者的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)表面 PD-1 表达水平进行比较,结果发现,PD-L1 表达水平在 G1 和 S0 患者较高,而在炎症和纤维化程度较明显的患者表达水平则较低。进一步提示 PD-1/PD-L1 表达水平与肝脏炎症和纤维化程度相关,其高水平表达可减轻肝脏免疫损伤。另有研究证实慢性乙型肝炎患者肝组织中 PD-L1 呈阳性表达,且其表达水平与肝脏炎症及纤维化程度呈正相关关系^[15],提示机体为保持免疫耐受状态而高表达 PD-L1,并促进肝脏向纤维化进展。

PD-1/PD-L1 表达水平与慢性乙型肝炎患者肝脏炎症及纤维化程度的具体机制有待进一步研究。

三、PD-1/PD-L1 在慢性乙型肝炎相关性肝细胞癌中的免疫调节作用

文献报道肝癌细胞中 PD-L1 表达水平显著高于癌旁组织和正常组织,原发性肝癌恶性程度越高,PD-L1 表达水平越高,且伴有侵袭转移的肝癌与无侵袭转移的肝癌相比,PD-L1 表达水平更高^[16]。此外,原发性肝癌组织中 PD-L1 阳性的 T 淋巴细胞浸润也明显增强,研究提示在肝癌组织中,PD-L1 可与其受体 PD-1 结合,参与肝脏 T 细胞介导的免疫耐受,并抑制肝脏组织中细胞毒性 T 细胞的功能,从而诱导肝癌细胞的免疫逃避,进而发生侵袭性转移。

有研究对临床确诊为 HBV 感染所致的 58 例原发性肝癌患者,采用流式细胞技术分析发现,除肝癌患者 PD-L1 表达水平显著高于肝硬化组和健康对照组外,PD-L1 在病情较重的巴塞罗那分期 III 期患者外周血 CD8⁺ T 淋巴细胞的表达水平显著高于 I 和 II 期患者^[17],提示 PD-L1 表达水平与肝癌病程进展有关,且可预示病情严重程度。研究还提示同一患者 CD8⁺ T 细胞 PD-L1 表达水平在肿瘤区域、非肿瘤区域和外周血依次降低,预示 PD-L1 不仅在外周血发挥其功能,在肿瘤病灶中可同样发挥作用。

此外,另有研究对 HepG2 和 HepG2.2.15 肝脏肿瘤系细胞对 T 淋巴细胞 PD-1 表达影响提示,肝脏肿瘤细胞本身可诱导 PD-1 在 T 淋巴细胞上的表达,但并未发现转染 HBV DNA 的 HepG2.2.15 细胞和未转染 HBV DNA 的 HepG2 细胞对其诱导表达程度的差

异^[18],这提示 PD-1 在 T 淋巴细胞的诱导表达可能与 HBV DNA 感染并无显著相关性。该研究还通过在实验组加入抗 PD-L1 以阻断 PD-1/PD-L1 的相互作用,结果发现,T 淋巴细胞对 HepG2.2.15 细胞的杀伤能力及其分泌细胞因子的能力显著提升,从而证实 PD-1/PD-L1 通路在 HBV 相关性肝癌中发挥负性免疫调节作用。

有研究利用实时荧光定量 PCR 技术比较慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞 PD-1 基因拷贝数,采用 Logistic 回归进行相关性分析,结果发现,PD-1 基因拷贝数在 HBV 相关肝癌组的分布显著低于 HBV 携带者组和对照组^[19],提示不同慢性乙型肝炎转归者的 PD-1 基因拷贝数存在差异。

肿瘤细胞表面 PD-L1 和 PD-L2 的异常表达可抑制抗肿瘤免疫,从而导致肿瘤免疫逃避。Gao 等^[20]研究了肝细胞癌上 PD-Ls 表达对根治性手术的预后,结果提示高表达 PD-L1 的患者预后更差,高表达 PD-L2 的患者存活率虽更低,但其复发率差异无统计学意义。通过多因素分析证实肿瘤细胞表达的 PD-L1 可作为预测术后复发的独立因素。PD-Ls 表达和颗粒酶淋巴细胞浸润间并无显著相关性,但与 Fox P3⁺ 淋巴细胞浸润呈显著正相关关系。此外,肿瘤浸润的细胞毒性和调节性 T 细胞也是存活率和复发的独立预测因素。此研究首次发现 PD-Ls 可作为肝细胞癌患者术后复发的预测因素,为通过 PD-1/PD-Ls 途径治疗恶性肿瘤提供合理依据。

四、结论

在肿瘤免疫应答中,肿瘤抗原特异性 T 淋巴细胞的诱导凋亡是肿瘤免疫逃避的主要机制。但在慢性乙型肝炎相关性肝癌发生发展过程中,PD-1/PD-L1 对 T 淋巴细胞活化和增殖的抑制起重要作用。对这一信号通路进行阻断可为肿瘤的免疫治疗提供重要价值。

参考文献

- 1 Caja AJ. Current management strategies for hepatocellular carcinoma[J]. Minerva Gastroenterol Dietol, 2013, 59(2): 143-159.
- 2 Dong H, Strome SE, Salano DR, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion[J]. Nat Med, 2002, 8(8): 793-800.
- 3 王见之, 刘朝奇. PD-1/PD-L1 与 Treg 细胞相关性的研究新进展[J]. 生命科学, 2010, 22(6): 583-585.
- 4 Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-L1 ligands: from discovery to clinical application[J]. Int Immunol, 2007, 19(7): 813-824.
- 5 Afreen S, Dermime S. The immunoinhibitory B7-H1 molecule as a potential target in cancer: killing many birds with one stone[J]. Hematol Oncol Stem Cell Ther, 2004, 7(1): 1-17.
- 6 周莹, 娄景胜, 蔡在龙. PD-1 及其配体在感染性疾病中的研究进展[J]. 临床军医杂志, 2010, 38(6): 1071-1074.
- 7 原琳, 李智伟. PD-1/PD-L 通路对乙型肝炎病毒感染结局的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(10): 1051-1056.
- 8 Xie Z, Chen Y, Zhao S, et al. Intrahepatic PD-1/PD-L1 up-regulation closely correlates with inflammation and virus replication in patients with chronic HBV infection[J]. Immunol Invest, 2009, 38(7): 624-638.

- 9 陈良恩. B7-H1/PD-1抑制途径对慢性乙型肝炎患者T细胞免疫功能影响的研究[D]. 军事医学科学院. 2007.
- 10 沈立萍. 慢性乙肝患病状况调查与PD-1/PD-L1信号通路作为乙肝免疫治疗靶位的研究[D]. 中国疾病预防控制中心. 2009.
- 11 叶翮. PD-1/PD-L1通路在HBV感染中作用的研究[D]. 华中科技大学同济医学院. 2009.
- 12 谢璋怡. PD-1/PD-L1信号参与慢性乙型肝炎病毒特异性CTL功能衰竭的研究[D]. 第三军医大学. 2008.
- 13 车财妍, 翁鹏剑, 洪玲珍, 等. 慢性乙型肝炎患者外周血T淋巴细胞PD-1表达的研究[J]. 中国现代医生. 2010,48(29):19-21.
- 14 谢冬英, 陈凤娟, 林炳亮, 等. PD-1和PD-L1表达与慢性HBV感染者肝脏病变程度的相关性[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版. 2010,4(3):287-293.
- 15 徐成润. 慢性乙型肝炎组织中PD-L1的表达与临床相关性的研究[D]. 第二军医大学. 2010.
- 16 申民强, 孙趁意, 刘占举, 等. B7-H1及其受体PD-1分子在原发性肝癌组织中的表达及临床意义[J]. 世界华人消化杂志. 2008,16(27):3110-3113.
- 17 曾珍, 石峰, 张敏娜, 等. 肝细胞癌患者CD8⁺T淋巴细胞上PD-1高表达的意义研究[J]. 传染病信息. 2009,22(2):83-85.
- 18 彭建平, 孙克伟, 伍玉南, 等. 慢性乙型肝炎患者树突状细胞诱导的HBV特异性细胞毒性T细胞PD-1的表达[J]. 临床肝胆病杂志. 2012,28(12):926-929.
- 19 吴令杰. 不同慢性HBV感染转归患者PD-1基因拷贝数的变异[J]. 广东医学. 2011,32(2):198-200.
- 20 Gao Q, Wang XY, Qiu SJ, et al. Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma[J]. Clin Cancer Res. 2009,15(3):971-979.

(收稿日期: 2014-12-12)

(本文编辑: 孙荣华)

杜林林, 何玲玲, 赵亚林, 等. PD-1/PD-L1在慢性乙型肝炎相关原发性肝癌中免疫调节作用的研究进展[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版. 2014, 8(6): 860-862.

自然杀伤细胞在慢性乙型肝炎中双重作用的研究进展

明芳 章幼奕 秦刚 赵云

人类肝脏自然杀伤细胞(nature killer cell, NK)自然富集, 肝内优势突出了其在控制嗜肝病毒感染的的重要性。乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染中NK细胞为研究者提供了有利的机会来考虑这些免疫效应细胞在肝脏独特环境的重要功能。NK细胞在乙型肝炎中的作用仍在研究中。近年来数据表明, NK细胞是能够发挥抗病毒和免疫调节功能, 也通过死亡受体途径导致肝损伤。下面将NK细胞的抗病毒和致病作用作进一步概述。

一、NK细胞在肝脏微环境中的概况

了解HBV感染中NK细胞的作用, 首先要知道肝脏的微环境, 其特殊功能是以微环境的耐受性而著名的。这种“免疫特权”状态为病原体形成慢性感染提供了一个有利的环境。肝脏的耐受性是由多方面因素造成的, 局部免疫环境, 细胞因子和营养环境, 还有影响肝脏的靶细胞和其他特殊的专细胞类型。

NK细胞生物功能是调节多样的细胞表面受体、细胞因子平衡信号。肝窦内皮细胞和枯否细胞与NK细胞的配体的相关性是一个刚刚开始进行研究的领域。比如: 在慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)NK细胞Tim-3基因的表达升高, 可以下调其功能^[1]。而其配体galectin-9, 由Kupffer细胞强表达, Kupffer细胞能够产生免疫抑制细胞因子IL-10和TGF- β 可能使NK细胞耐受, 进而影响NK细胞^[2], 仍需进一步探讨。通过肝血窦或迁移到实质, NK细胞可以直接与被感染的肝细胞接触。肝脏NK细胞从

肝细胞收到的信号可进一步形成, 用少量的MHC I类分子上调细胞NK细胞的抑制性配体^[3]。

肝和外周血NK细胞的比例有最显著的区别。在健康的肝脏, NK细胞百分比通常是外周的3倍, 大约占肝内单核细胞的1/3。肝脏NK细胞表现出表型及功能特征, 也是不同于外周NK细胞的。特别是, 肝内NK细胞大多数有CD56^{bright}表型, 这被认为是一个早期的分化阶段, 而不同于CD56^{dim}表型主要在外周^[4-5]。

CD56^{bright}NK细胞以分泌细胞因子如IFN- γ 为主要功能, CD56^{dim}NK细胞以杀伤功能为主。NK细胞间杀伤功能的差异可能与NK细胞胞内信号转导有关。即使部分肝内CD56^{dim}CD16⁺NK细胞的表达低水平的杀伤细胞免疫球蛋白样受体(killer cell immunoglobulin-like receptor, KIR), 这仍可能会限制其能力^[4]。NK细胞是在胎肝生成, 少量的NK细胞是在成人肝内生成的, 这与其不成熟的表型相符合。有一个有趣的研究说明了成人肝NK细胞的来源, 即在肝移植术后不久, 供肝的NK细胞迅速被移植患者的NK细胞和前体细胞代替^[6]。这些数据表明, 来源于骨髓的NK细胞前体细胞来自循环的招募, NK细胞一旦迁徙至肝即被“签名”肝脏NK细胞。肝NK细胞在HBV感染炎症浸润时富集^[7-8]。趋化信号的调节和人肝NK细胞及前体细胞仍待进一步的研究。特别最近是有关在小鼠模型的发现, NK细胞的趋化因子受体CXCR6对病毒和半抗原有“记忆”的功能^[9]。

二、NK细胞在慢性乙型肝炎中的抗病毒作用

已有较多的证据支持NK细胞的抗病毒作用^[10-11]。最近研究发现在控制人类的持续性病毒感染(如人免

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.06.033

基金项目: 卫生厅青年项目(No. Q201208)

作者单位: 226006 南通市, 江苏南通市第三人民医院感染科

通讯作者: 章幼奕, Email: youyizhang@hotmail.com