

- tion[J]. *J Cell Physiol*, 2003, 196(3): 2-8.
- [8] Muzylak M, Price JS, Horton MA, et al. Hypoxia induces giant osteoclast formation and extensive bone resorption in the cat[J]. *Calcif Tissue Int*, 2006, 79(5): 301-309.
- [9] Fukuoka H, Aoyama M, Miyazama K, et al. Hypoxic stress enhances osteoclast differentiation via increasing IGF-2 production by non-osteoclastic cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 328(4): 885-894
- [10] Nagae M, Hiraga T, Yoneda T. Acidic microenvironment created by osteoclasts causes bone pain associated with tumor colonization[J]. *J Bone Miner Metab*, 2007, 25(2): 99-104.
- [11] Siriwardena BS, Kudo Y, Ogawa I, et al. VEGF-C is associated with lymphatic status and invasion in oral cancer[J]. *J Clin Pathol*, 2008, 61(1): 103-108.
- [12] Yang QL, Kevin P, McHugh SP, et al. VEGF enhancement of osteoclast survival and bone resorption involves VEGF receptor-2 signaling and  $\beta 3$ -integrin[J]. *Matrix Biology*, 2008, 27(7): 589-599.
- [13] Knowles HJ, Athanasou NA. Hypoxia-inducible factor is expressed in giant cell tumour of bone and mediates paracrine effects of hypoxia on monocyte-osteoclast differentiation via induction of VEGF[J]. *J Pathol*, 2008, 215(1): 56-66.
- [14] Kohno S, Kaku M, Kawata T, et al. Neutralizing effects of an antivascular endothelial growth factor antibody on tooth movement[J]. *Angle Orthod*, 2005, 75(5): 797-804
- [15] Lovibond AC, Haque SJ, Chambers TJ, et al. TGF-beta2 induced SOCS3 expression augments TNF-alpha-induced osteoclast formation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 309(4): 762-767.
- [16] Karst M, Gorny G, Galvin RJ, et al. Roles of stromal cell RANKL, OPG, and M-CSF expression in biphasic TGF-beta regulation of osteoclast differentiation[J]. *J Cell Physiol*, 2004, 200(1): 99-106.
- [17] Nakamura H, Hiraga T, Ninomiya T, et al. Involvement of cell and cell matrix interactions in bone destruction induced by metastatic MDA2MB2231 human breast cancer cells in nude mice[J]. *J Bone Miner Metab*, 2008, 26(6): 642-647.
- [18] 王庆德, 杨述华, 杨操, 等. 低氧对人骨髓间充质干细胞 HIF-1 $\alpha$ , SDF-1, VEGF mRNA 表达的影响[J]. *山东医药*, 2008, 48(3): 21-22.
- [19] Liu YL, Yu JM, Song XR, et al. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 and metastasis by hypoxia inducible factor in non small cell lung cancer cell lines[J]. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5(10): 1320-1326.
- [20] Wright L M, Maloney W, Yu X, et al. Stromal cell derived factor-1 binding to its chemokine receptor CXCR4 on precursor cells promotes the chemotactic recruitment[J]. *Bone*, 2005, 36(5): 840-853.
- [21] Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, et al. Interactive effect of Interleukin-6 and prostaglandin E2 on osteoclastogenesis via the OPG/RANKL/RANK system[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1068: 225-233.
- [22] 赵吉清, 林海, 赛燕, 等. 缺氧对 PC12 细胞 IL-6 及 GP130 基因表达影响[J]. *中国公共卫生*, 2009, 25(3): 289-291.
- [23] Maxwell PJ, Gallagher R, Seaton A, et al. HIF-1 and NF-kappaB mediated upregulation of CXCR1 and CXCR2 expression promotes cell survival in hypoxic prostate cancer cells[J]. *Oncogene*, 2007, 26(52): 7333-7345.
- [24] Kang Y, Siegel PM, Shu W, et al. A muhigenic program mediating breast cancer metastasis to bone[J]. *Cancer Cell*, 2003, 3(6): 537-549.
- [25] 徐智, 吴国明, 李昆霖, 等. PKC/MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路在低氧诱导大鼠单核细胞表达 IL-1 $\beta$  中的作用[J]. *中国急救医学*, 2008, 28(9): 1002-1049.

(收稿日期: 2011-04-16 修回日期: 2011-05-15)

· 综 述 ·

## PD-L1 在脑胶质瘤中表达的研究进展

周红建 综述, 王雄伟, 汪 雷, 王旭光 审校

(三峡大学第一临床医学院神经外科, 湖北宜昌 443002)

关键词: 神经胶质瘤; PD-L1; PD-1

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.26.045

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)26-2690-03

近年来, 有关共刺激分子在免疫调节中的作用已经越来越受到广大研究者重视。已知协同刺激分子分为 3 个家族: B7 家族、TNF 家族和细胞因子家族。B7 家族作为惟一能从抗原提呈细胞 (antigen presenting cell, APC) 单向传送信号至 T 细胞的共刺激分子, 其正向的共刺激分子是以 CD28 为代表, 而负向的共刺激分子已成为目前研究的热点, 其中共刺激分子

PD-L1 (又称 B7-H1 或者 CD274) 及其受体 PD-1 (programmed death 1) 的信号途径被认为与移植排斥反应、疾病免疫调节<sup>[1]</sup>、慢性病毒感染<sup>[2]</sup>、肿瘤免疫逃逸<sup>[3]</sup> 等密切相关。共刺激信号不仅可以协助激活 T 细胞, 而且可以通过负性共刺激信号下调免疫反应, 从而精确地调节应答的程度和持续时间。因此, 以 PD-1/PD-L1 为代表的负性共刺激途径, 在研究肿瘤细胞免疫

逃逸和临床肿瘤免疫治疗中均具有重要的意义。本文就 PD-L1 的分子生物学特点、功能和在脑胶质瘤中表达的研究进展作一综述。

## 1 PD-L1 分子生物学特点

**1.1 PD-L1 的分子结构** 1999 年 Dong 等<sup>[4]</sup>采用 cDNA 表达序列标签 (expressed sequence tag, EST) 首次从人基因组中克隆出人 PD-L1 分子。PD-L1 mRNA 主要为 4.2 kb, 此外还有 1.8、3.7 和 7.2 kb 等转录形式。它属于 B7 超家族成员, 定位于人染色体 9p24, 间隔 42 kb, 开放阅读框表明, PD-L1 基因编码 290 个氨基酸, 胞外区各有 1 个 IgV 和 IgC 样区, 具有疏水的跨膜区及 30 氨基酸细胞质尾。其胞内区具有蛋白激酶 C 磷酸化位点, 胞内区与 PD-1、PD-2 同源性分别为 6% 和 16%, 表明其可能具有传输信号的功能。最近, 有研究显示, PD-1 上与 PD-L1 的结合位点, 细胞黏附实验结果也证明了两者的相互作用后可抑制 T 细胞反应, 产生牢固、双向的作用。此方法不仅展示了体外 PD-1/PD-L1 相互作用产生的抑制性信号, 而且对于调节免疫反应及治疗应用也非常必要<sup>[5]</sup>。

**1.2 PD-L1 受体** PD-1 作为 CD28 超家族成员之一, 被证实是 PD-L1 和 PD-L2 的受体, 与细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4, CTLA-4) 具有 23% 的氨基酸同源性<sup>[6]</sup>。但 PD-1 比 CTLA-4 具有更广泛的免疫调节作用, 其主要表达于活化的 T 细胞、B 细胞、髓系细胞和胸腺细胞。且 CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞、NK T 细胞、B 细胞和单核细胞在激活以后, 均诱导性地表达 PD-1 分子<sup>[7-8]</sup>。PD-1 相对分子质量为  $50 \times 10^3 \sim 55 \times 10^3$  的 I 型跨膜糖蛋白, 是诱导活化 T 细胞进入凋亡的表面标志, 通过与 B7 家族新成员 PD-L1 和 PD-L2 的 IgV 样结构域相互结合, 将所产生的信号传至其胞质区尾部的免疫受体酪氨酸抑制基序 (ITIM), 在免疫应答中发挥重要的负性调控作用。它由胞外区、疏水性跨膜区、胞质区组成。其中胞外由一个 IgV 样结构域组成, 胞质区含两个酪氨酸残基, 形成 ITIM 和免疫受体酪氨酸转换基序 (ITSM), 在 PD-1 激活后都可发生磷酸化<sup>[9]</sup>。人 PD-1 基因位于 2q37, 在正常状态下 T、B 细胞不表达, 但在活化状态下诱导高表达。PD-1 和 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 结合可导致 SHP-2 的迅速磷酸化而抑制 TCR 信号, 进而传递负性信号, 在外周免疫耐受的建立中有重要作用。

**1.3 PD-L1 的表达特性** PD-L1 主要表达于 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上调<sup>[10]</sup>。此外, PD-L1 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 B 细胞、胎盘的合体滋养层细胞等。研究表明, PD-L1 广泛表达在大多数肿瘤细胞系上, 如淋巴瘤、绒毛膜癌、黑色素瘤、食管癌、成神经细胞瘤等都检测到了 PD-L1 的 mRNA 水平和蛋白水平的表达, 并且其表达能增加 T 细胞的凋亡, 促进活化 T 细胞的清除, 而阻断此通路能提高肿瘤特异性 T 细胞的反应<sup>[11]</sup>。这提示肿瘤细胞可能广泛表达该分子并且 PD-L1 的表达水平可能和患者的临床病理特征及预后紧密相关。Geng 等<sup>[12]</sup>研究发现, PD-L1 在胰腺癌中的表达和肿瘤分化程度、肿瘤分期密切相关, 并且肿瘤组织中 PD-L1 在蛋白和 mRNA 两个表达水平均成显著相关。此外, 有研究发现, 它共表达有 290 个氨基酸, 与人 PD-L1 有 69% 同源性。mRNA 分析表明, PD-L1 在鼠心脏、脾脏、骨骼肌、胎盘及肺组织中呈高表达, 中度表达于胸腺、肝脏及甲状

腺, 而胰腺及睾丸中则无 PD-L1 表达。在免疫调节方面, 有大量的研究发现, PD-L1 或 PD-L2 与 PD-1 结合后对 T 细胞发生的作用, 整体上发挥了免疫抑制的作用, 可抑制免疫反应的产生, 对 T 细胞的增殖、细胞因子的分泌及杀伤能力都有抑制作用, 阻断该通路后可以恢复 T 细胞的大部分功能<sup>[13]</sup>。张良甫等<sup>[14]</sup>研究发现, 利用 PD-L1 基因修饰的供体 DC, 可以明显延长大鼠移植胰岛的存活时间, 而受体 DC 则无此作用, 但两种 DC 联合应用可以使移植胰岛获得更长的存活时间。在生理和非炎症条件下, PD-L1 在体内主要表达在抗原提呈细胞上, 如单核细胞和树突状细胞。然而, 在炎症条件下发现, PD-L1 表达不再局限于表达在抗原提呈细胞上, 也可表达在非淋巴组织的其他类型细胞上, 如内皮和肌肉细胞。提示 PD-L1 和它的受体相互作用有可能参与炎症和非炎症性中枢神经系统病变。

## 2 PD-L1 在脑胶质瘤中的表达

目前国内外的研究结果显示, PD-L1 蛋白在多种肿瘤组织中呈阳性表达, 与包括胶质瘤在内的肿瘤的发生发展及预后密切相关。最近有研究发现, 在黑色素瘤细胞、肺癌细胞、卵巢、结肠以及在一些非中枢神经系统肿瘤细胞系中均有 PD-L1 基因的表达<sup>[15]</sup>。随着人们对肿瘤分子发生机制研究的不断深入, 越来越多的学者把癌症的发生发展归因于一系列的肿瘤细胞的免疫逃避策略<sup>[16]</sup>。人类胶质母细胞瘤是一种典型的具有免疫抑制功能的肿瘤。它具有抗肿瘤免疫反应的机制, 如释放转化生长因子、IL-10 等, 来逃避机体免疫系统的监控和杀伤。而对于脑胶质瘤的免疫治疗策略, 要么尝试取消免疫抑制机制, 要么提高抗肿瘤免疫反应<sup>[17]</sup>。

有研究证实, PD-L1 在脑胶质瘤中有高表达, 而在正常的脑组织和肿瘤旁组织中均无其表达, 从而有可能与患者的临床病理特征及预后的密切相关。已有关文献报道, 一些基因的改变和物质的表达和胶质瘤增殖活性、病理级别及患者预后密切相关, 如 Ki-67、兔转化生长因子  $\beta_2$  (TGF- $\beta_2$ )、增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、表皮生长因子受体 (EGFR)、p16 蛋白、survivin 蛋白等。Parsa 等<sup>[18]</sup>研究证实, 抑癌基因 PTEN 的丧失导致了脑胶质瘤的免疫抵抗, PD-L1 基因表达增加则在此中间通路中发挥了作用。多数研究认为, PD-L1 蛋白表达水平能较好地反映脑胶质瘤恶性程度及患者预后, 可作为评价脑胶质瘤生物学行为, 预测患者术后生存时间长短的有效指标。Wintterle 等<sup>[19]</sup>通过 RT-PCR 技术对 12 种脑胶质瘤细胞株检测发现, 所有胶质瘤细胞系均有 PD-L1 mRNA 的表达, 但表达水平较低。随后应用免疫组织化学研究发现, 9 例 IV 级胶质母细胞瘤标本和 1 例 III 级混合神经胶质瘤中均有 PD-L1 蛋白的表达。

## 3 PD-L1 在脑胶质瘤中的作用机制

有研究认为, 在脑胶质瘤的作用机制方面, PD-L1 主要通过抑制抗肿瘤免疫反应的 T 细胞和 DC 细胞的功能启动。此外, PD-L1 基因可能保护胶质瘤细胞逃避免疫抗原特异性细胞毒性 T 细胞在效应水平的直接攻击也起着相当的作用。在肿瘤细胞表面的 PD-L1 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, 抗原提呈细胞表面的 PD-L1 与初始 T 淋巴细胞相互作用诱导 T 淋巴细胞的无能化。因此, PD-L1 是参与肿瘤免疫逃逸的重要分子, 阻断 PD-1/PD-L1, 既能直接抑制肿瘤生长, 又能抑制肿瘤的免疫逃避,

提高初始 T 细胞的激活能力和 CTL 的杀伤活性,从而提高其他抗原的免疫反应。Pilon-Thomas 等<sup>[20]</sup>研究发现,在体外中和抗体与 PD-L1 结合有效地增加 IFN- $\gamma$  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 PD-L1 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 CD8<sup>+</sup> T 细胞增多。Okudaira 等<sup>[21]</sup>使用 C57BL/6 小鼠胰腺肿瘤模型,分 3 次给予 PD-1/PD-L1 抗体(每次间隔 1 周)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/PD-L1 表达量减少。RT-PCR 显示,IFN- $\gamma$  抗肿瘤细胞因子表达量增多,IL-10 和 FoxP3 等机体抑制性免疫细胞因子表达量减少。因此,PD-L1 与脑胶质瘤的研究不仅为肿瘤发生提供了新的病因学理论,也为今后肿瘤的诊断、基因治疗提供了新的研究课题和思路。

#### 4 展 望

综上所述,PD-L1 作为 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。鉴于 PD-L1 基因在脑胶质瘤细胞上表达的特异性,可以大胆地尝试将抗肿瘤的化疗药物与 PD-1/PD-L1 抗体和蛋白连接并联合用于脑胶质瘤的治疗、有理由相信肿瘤分子免疫治疗将会是除传统外科手术、放射治疗、化学药物治疗等之外另一有效的治疗手段。

#### 参考文献:

[1] 邵永,王槐志,董家鸿. PD-L1 分子与疾病免疫调节[J]. 免疫学杂志,2008,24(5):591-594.

[2] 陈定强,郑伯建. PD-1 及其配体在慢性病毒感染中的作用[J]. 微生物与免疫,2007,2(2):118-119.

[3] 陈陆俊,孙静,张学光. PD-1/PD-L1 信号途径在肿瘤免疫逃逸机制中的作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2008,15(30):289-291.

[4] Dong HD, Zhu GF, Tamada K, et al. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion[J]. Nat Med, 1999, 5(12): 1365-1369.

[5] Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, et al. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses[J]. Immunity, 2007, 27(1): 111-122.

[6] Zhang X, Schwartz JC, Guo X, et al. Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1 [J]. Immunity, 2004, 20(3): 337-347.

[7] Okazaki T, Honjo T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance [J]. Trends Immunol, 2006, 27(4): 195-201.

[8] Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited [J]. Annu Rev Immunol, 2005, 23: 515-548.

[9] Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, et al. CTLA-4

and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(21): 9543-9553.

[10] Liang SC, Iatchman YE, Buhmann JE, et al. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses[J]. Eur J Immunol, 2007, 33(10): 706-716.

[11] Blank C, Kuball J, Voelkl S, et al. Blockade of PD-L1(B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro[J]. Int J Cancer, 2006, 119(2): 317-327.

[12] Geng L, Huang D, Liu J, et al. B7-H1 up-regulated expression in human pancreatic carcinoma tissue associates with tumor progression [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2008, 134(9): 1021-1027.

[13] Blackburn SD, Shin H, Freeman GJ, et al. Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by alpha PD-L1 blockade [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(39): 15016-15021.

[14] 张良甫,黄赤兵,冯嘉瑜,等. 程序性死亡因子配体 1 修饰供者 DC 对大鼠异体胰岛移植存活的影响[J]. 重庆医学, 2006, 35(15): 1361-1363.

[15] Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, et al. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T-cell activation and cytokine production [J]. J Immunol, 2003, 171(3): 1257-1266.

[16] Theresa L. Whiteside. Immune responses to malignancies [J]. Allergy Clin Immunol, 2010, 125(2): 272-283.

[17] Walker PR, Calzascia TD, Ietriche PY. All in the head: obstacles for immune rejection of brain tumours[J]. Immunology, 2002, 107(1): 28-38.

[18] Parsa AT, Waldron JS, Panner A, et al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma [J]. Nat Med, 2007, 13(1): 84-88.

[19] Wintterle S, Schreiner B, Mitsdoerffer M, et al. Expression of the B7-Related Molecule B7-H1 by Glioma Cells: A Potential Mechanism of Immune Paralysis [J]. Cancer Research, 2003, 63(21): 7462-7467.

[20] Pilon-Thomas S, Mackay A, Vohra N, et al. Blockade of programmed death ligand enhances the therapeutic efficacy of combination immunotherapy against melanoma [J]. J Immunol, 2010, 184(7): 3442-3449.

[21] 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 [J]. Int J Oncol, 2009, 35(4): 741-749.