

[文章编号] 1007-385X(2004)03-0220-03

## PD-L1 信号在肿瘤免疫应答中的作用

陈成, 古涛综述; 张学光, 强亦忠 审阅 (苏州大学生物技术研究所, 苏州 215007)

[摘要] PD-L1 分子是近年新克隆的 B7 家族成员, 其受体为 PD-1, 并可能存在另一受体。目前发现, PD-L1 分子在肿瘤细胞上表达能影响肿瘤免疫原性, 诱导肿瘤特异性 CTL 凋亡。肿瘤微环境能通过增强树突状细胞 PD-L1 信号以抑制其功能, 干预 PD-L1 信号为肿瘤免疫治疗开辟了一条新途径。

[关键词] PD-L1; 肿瘤免疫; T 淋巴细胞

[中图分类号] R329.11 [文献标识码] A

机体肿瘤免疫应答的产生是宿主免疫功能状态和肿瘤免疫原性综合作用的结果, 肿瘤细胞异常表达和(或)缺如的某些免疫分子广泛参与肿瘤的发生发展、血管的生成、肿瘤侵袭转移以及免疫攻击或逃逸。PD-L1<sup>[1]</sup>(曾用名 B7-H1) 为近年克隆的 B7 家族新成员, 因其独特的生物学功能以及在多种肿瘤细胞上广泛的表达而被发现在肿瘤免疫应答过程中发挥重要作用, 对其作用机制的进一步探讨有助于寻找新的肿瘤免疫治疗策略。

### 1 PD-L1 及其受体的分子结构和信号转导

#### 1.1 PD-L1

人和鼠的 PD-L1 基因都定位在染色体 9q24.2, 编码 290 个氨基酸残基的 I 型跨膜蛋白, 后者含有 1 个 IgV 样区、IgC 样区、疏水性跨膜区和一 30 氨基酸残基大小的胞浆尾端。其胞外段氨基酸序列与 B7-1 和 B7-2 胞外段的同源性分别为 20% 和 15%, 并含有 4 个高度保守的半胱氨酸, 后者参与 Ig 样结构中二硫键的形成。胞内段含有一潜在的 PKC 磷酸化位点, 可能提供了信号转导分子结构基础。

#### 1.2 PD-L1 受体

最初在凋亡的 T 细胞杂交瘤中利用削减杂交的方法克隆出 PD-L1 受体 PD-1<sup>[2]</sup>, 并认为和细胞凋亡相关而被命名为程序性死亡-1(programmed death-1)。人 PD-1 基因定位于 2q37, 编码一分子量为 55 kD 的免疫球蛋白超家族 I 型跨膜糖蛋白, 胞外段和 CTLA-4 在氨基酸水平上有 24% 的同源性, 并含有 1 个 IgV 样结构域, 4 个 N 连接糖基化位点, 此结构可能在与配体的结合中起重要作用。PD-1 分子最显著的特点在于胞浆区尾部含有 2 个酪氨酸残基, N 端酪氨酸残基参与构成一个 ITIM, C 端酪氨酸残基则参与构成 1 个 ITSM, 它们与下游的信号转导分子相互作用可能发挥不同的调节作用<sup>[3]</sup>。

大量的实验结果显示 PD-L1 可能存在第 2 个受体。例如, 利用功能定位和分子模型突变技术使 PD-L1 分子丧失对 PD-1 的结合能力, PD-L1 仍然能介导 T 细胞的增殖<sup>[4]</sup>。PD-L1-Ig 融合蛋白不仅能促进 PD-1<sup>-/-</sup> T 细胞的增殖和细胞因子

的分泌, 并且对正常 T 细胞的激发作用也不能完全为 PD-1-Ig 融合蛋白阻断。在肿瘤免疫应答过程中, PD-L1 分子也可不依赖 PD-1 发挥调节作用。

#### 1.3 PD-1/PD-Ls 信号转导途径

研究发现, B 细胞表面 PD-1 和 BCR 共同发生配基化后, 可通过 PD-1 胞浆区 C 端 ITSM 中酪氨酸残基招募 SH2 酪氨酸磷酸酶-2 (Src homology 2-domain containing tyrosine phosphatase 2, SHP-2), 使下游信号分子脱磷酸化而失活, 包括 Syk、磷脂酶-3、磷脂酰肌醇-3 激酶和胞外区信号调节激酶等<sup>[5-6]</sup>。此外, Jurkat 细胞系 PD-1 和 TCR 配基化也可引起 SHP-2 的磷酸化, 并向 PD-1 胞浆区募集。PD-1 还可通过抑制丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 酪氨酸残基磷酸化来抑制 B 淋巴瘤细胞系增殖<sup>[7-8]</sup>。应用改良酵母双杂交技术发现, PD-1 胞浆区 N 端 ITIM 中酪氨酸残基磷酸化后可与 SH2 酪氨酸磷酸酶-1 (SHP-1) 中 SH2 结构域结合, 这表明 PD-1 也可通过招募 SHP-1 而发挥调控作用<sup>[9]</sup>。Frann 等<sup>[9]</sup>研究发现, 在  $\gamma$  链细胞因子家族中, 仅 IL-2 能逆转 PD-1 介导的抑制效应并伴有 Stat5 的磷酸化, 这提示 Stat5 可能参与了调控 PD-1/PD-Ls 信号的转导。

同时也有学者提出 T 细胞表面 PD-L1 可能存在逆向信号转导。抗 PD-L1 单抗可介导静息 CD4<sup>+</sup> T 细胞的活化和增殖, 而促进活化 CD4<sup>+</sup> T 细胞的凋亡, 并且该凋亡机制可能和 caspase-3, caspase-10 以及 TRAIL 的上调性表达以及 IL-10 分泌的增加相关<sup>[10]</sup>。然而 PD-L1 胞浆区并不含有明显的分子结构以介导上述多种效应, 因此推测可能存在某些接头分子参与逆向信号转导, 但其胞内段含有的 PKC 磷酸化位点可能是其逆行信号传导的结构基础。

### 2 PD-L1 与肿瘤特异性免疫应答

#### 2.1 PD-L1 在肿瘤细胞上的表达

Dong 等<sup>[11]</sup>从卵巢癌组织 EST (expressed sequence tag) 中克隆出 PD-L1, 这提示肿瘤细胞可能广泛表达该分子。免疫组织化学发现, 肺癌组织中肿瘤细胞胞膜和胞浆都表达 PD-L1, 卵巢癌组织中 PD-L1 则主要表达于肿瘤细胞表面, 而淋

巴结转移黑色素瘤组织中 PD-L1<sup>+</sup> 肿瘤细胞围绕淋巴细胞分布。Tomohide 等<sup>[12]</sup>研究发现,造血系统和非造血系统肿瘤细胞都表达 PD-L1,包括 T 细胞淋巴瘤、B 细胞淋巴瘤、黑色素瘤、成纤维细胞瘤以及胃癌等,并且蛋白水平的表达和 mRNA 水平的转录具有严格的相关性。Julia 等<sup>[13]</sup>在胸腺组织肿瘤、乳腺癌、肝癌、肺癌、胃癌、结肠腺癌、膀胱癌和舌鳞癌等多种肿瘤组织也检测到 PD-L1 的存在,同时发现乳腺癌组织正常和恶变细胞都表达该分子,但肿瘤细胞的表达强度明显高于正常细胞。Scott 等<sup>[14]</sup>通过免疫组化结果显示大部分新鲜分离的头颈部鳞状细胞癌胞浆和胞内均表达 PD-L1,而鳞状细胞癌细胞系 SCC-012, SCC-WMM 以及 SCC-15 细胞表面并不表达 PD-L1,但可被 IFN- $\gamma$  诱导表达。此外,中枢神经系统肿瘤如胶质瘤细胞也表达 PD-L1<sup>[15]</sup>。

尽管已证实多种肿瘤细胞的胞膜和胞浆都有 PD-L1 的表达,但肿瘤细胞表面 PD-L1 调节性表达的机制尚不明确。Mazanel 等<sup>[16]</sup>研究发现,人 PD-L1 的启动子中含有数个 IFN- $\gamma$  反应元件,推测 IFN- $\gamma$  可通过干扰 PD-L1 转录后抑制而上调其在肿瘤细胞表面的表达。此外,实验还发现新鲜分离的肿瘤组织 PD-L1 的表达高于相应肿瘤细胞系,这提示肿瘤微环境中还存在其他一些细胞因子参与 PD-L1 的调节性表达。

## 2.2 肿瘤细胞表达 PD-L1 对其免疫原性的影响

PD-L1 基因修饰能显著减弱肥大细胞瘤细胞系 P815 细胞的免疫原性,相应荷瘤小鼠的肿瘤呈进行性生长,病理分析发现在肿瘤早期便出现腹腔广泛播散和血运转移,即使提供有效的 CD28 信号仍不能增强荷瘤小鼠的肿瘤免疫应答。小鼠骨髓瘤细胞系 J558L 细胞固有表达 PD-L1,荷瘤小鼠的肿瘤呈进行性发展,但如将荷瘤小鼠 PD-1 基因敲除,肿瘤生长即受到了明显的抑制<sup>[17]</sup>。然而,将弱免疫原性的小鼠鳞状细胞癌细胞系 SCCV 细胞转导 PD-L1 基因对其在荷瘤小鼠体内的生长无明显影响<sup>[14]</sup>。Blank 等<sup>[18]</sup>的研究发现,抗原表位修饰不能增强小鼠黑色素瘤 B16 细胞的免疫原性,并可能和 B16 细胞固有表达 PD-L1 有关。这初步表明,PD-L1 在肿瘤细胞上表达减弱了其免疫原性,某些肿瘤细胞表现为弱免疫原性可能与其固有表达 PD-L1 有关。

## 2.3 肿瘤细胞表达 PD-L1 诱导肿瘤抗原特异性 CTL 凋亡

既往研究证实,肿瘤细胞上调和(或)下调表达某些膜分子可逃避机体免疫攻击,例如低表达 MHC I 类分子和 B7-1/2,高分泌抑制性细胞因子 IL-10, TGF- $\beta$  等。最近的研究发现,肿瘤细胞表达的 PD-L1 能通过诱导特异性 CTL 的凋亡而使肿瘤细胞发生免疫逃逸。

人黑色素瘤细胞系 624mel 细胞转导 PD-L1 后能通过 PD-1 介导活化的肿瘤抗原特异性 CD8<sup>+</sup> CTL 克隆 M15 的凋亡;人乳腺癌细胞系 HBL-100 细胞固有表达 PD-L1,可不依赖 PD-1 介导活化的肿瘤抗原特异性 CD8<sup>+</sup> CTL 克隆 M99 凋亡。体内实验也发现,与 mock-P815 荷瘤小鼠相比,PD-L1-P815 荷瘤小鼠体内发生了明显的特异性 TCR-T 细胞凋亡。这表明肿瘤细胞表面表达的 PD-L1 在肿瘤细胞诱导特异性 CTL 凋亡的过程中发挥重要作用。此外,肿瘤细胞表达 PD-

L1 还使其对 CTL 的细胞毒作用敏感性下降,推测可能是由于肿瘤细胞表达的 PD-L1 介导了 CTL 凋亡而使其不能有效杀伤肿瘤细胞所致。

进一步的研究显示,PD-L1 信号能上调经抗 CD3 单抗活化的 T 细胞表面 Fas 和 FasL 的表达,促进 IL-10 的分泌,最终导致活化诱导细胞凋亡(activation-induced cell death, AICD)。在体外抗原特异性 CTL 克隆 M15 杀伤 PD-L1-624mel 过程中,阻断 Fas-FasL 信号不但能部分抑制肿瘤细胞表达的 PD-L1 对活化 CTL 凋亡作用,而且可抑制肿瘤细胞的生长,但阻断 IL-10 信号却不能抑制肿瘤细胞的增殖。这提示肿瘤细胞表面 PD-L1 可通过 Fas-FasL 信号直接触发特异性 CTL 发生凋亡,而 IL-10 可能仅间接地或在其他一些因素的调控下发挥作用<sup>[11]</sup>。

此外,Winterle 等<sup>[15]</sup>研究发现,脑胶质瘤细胞表面 PD-L1 能显著抑制 T 细胞的活化,减少 IL-2, IFN- $\gamma$  的分泌,这可能参与了中枢神经系统肿瘤逃避机体免疫攻击的过程。

## 2.4 肿瘤微环境对树突状细胞表达 PD-L1 的调节

树突状细胞(dendritic cells, DC)在肿瘤免疫应答过程中起着至关重要的调节作用。肿瘤瘤体内虽浸润一定数量的 DC,但其受到肿瘤细胞释放的 IL-10, TGF- $\beta$ , VEGF 等细胞因子的阻抑作用而影响了它的分化、发育和功能的介导。新近研究发现,DC 在一些细胞因子和肿瘤微环境的作用下可呈现 PD-L1 的上调性表达,并直接影响其激发 T 细胞产生抗肿瘤免疫应答。

Curjel 等<sup>[19]</sup>发现,肿瘤回流淋巴结部位 DC 以及肿瘤腹水中 CD14<sup>+</sup> 细胞来源 DC 表面 PD-L1 的表达显著高于外周血单核源性 DC;进一步的研究显示,肿瘤组织中巨噬细胞分泌的 IL-10 以及肿瘤细胞产生的 VEGF 可上调未成熟 DC 表面 PD-L1 的表达。但 IL-10 和 VEGF 对经 LPS 刺激成熟的 DC 表面 PD-L1 的表达无明显影响。此外,IL-10、VEGF、巨噬细胞以及肿瘤细胞对 DC 表达 PD-L1 的上调作用均弱于肿瘤局部微环境的作用,这提示体内肿瘤微环境还存在其它细胞因子参与 DC 表面 PD-L1 的调节性表达。

同时研究显示,肿瘤组织巨噬细胞、IL-10 和 VEGF 上调外周血单核源性 DC 表面 PD-L1 的表达可抑制其对特异性 T 细胞的激发作用。在肿瘤组织 DC 和 T 细胞相互作用过程中,PD-L1 信号可下调 DC 胞内 IL-12p70 及上调 IL-10 的表达,并促进 T 细胞分泌 IL-10,抑制分泌 IFN- $\gamma$  和 IL-2。但上述生物学过程并不依赖于已知的受体 PD-1 分子。据此推测肿瘤微环境可通过上调 DC 表面 PD-L1 的表达,在激发 T 细胞过程中调节 DC 胞内细胞因子的表达,进而抑制特异性 T 细胞增殖和细胞毒作用。这可能也是肿瘤细胞逃避机体免疫攻击的策略之一<sup>[19]</sup>。

## 3 干预 PD-L1 信号的肿瘤免疫治疗策略

目前的肿瘤免疫治疗效果尚不尽人意,例如仅对肿瘤生长的初期或个别免疫原性较强的肿瘤呈现较好的效果,但难以最终使肿瘤完全消退。研究发现,肿瘤细胞表达的 PD-L1

以及肿瘤微环境中树突状细胞表达的 PD-L1 均能抑制特异性 T 细胞的活化,下调 T 细胞介导的肿瘤免疫应答。干预 PD-L1 信号可望成为肿瘤免疫治疗的新策略。

Yoshiko 等<sup>[17]</sup>研究发现,抗 PD-L1 单抗能明显抑制 PD-L1-P815 荷瘤小鼠局部肿瘤的生长,并出现良好的完全缓解率。Scott 等<sup>[14]</sup>在建立 PD-L1-SCCV 的荷瘤小鼠模型的基础上,采用活化的特异性 CTL 联合抗 PD-L1 单抗进行免疫治疗,结果发现联合治疗较单纯 CTL 治疗更能提高荷瘤小鼠远期存活率。Curiel 等<sup>[19]</sup>利用肿瘤部位 DC 联合抗 PD-L1 单抗激发 CTL 针对荷瘤小鼠进行免疫治疗,发现经此治疗的小鼠肿瘤部位大量浸润 CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T 细胞,而单纯利用肿瘤部位 DC 激发的 CTL 疗法却不能促进该 T 细胞亚群在肿瘤部位浸润。利用敲基因技术发现,2C-TCR PD-1<sup>-/-</sup> T 细胞较 CTLA<sup>-/-</sup> T 和野生型 T 更有效促进肿瘤消退,推测肿瘤细胞表面 PD-L1 可能在 T 细胞免疫应答的效应相发挥主导作用<sup>[18]</sup>。因此,利用特异性抗 PD-L1 单抗进行免疫治疗,不仅可改善 PD-L1<sup>+</sup> 肿瘤细胞所致的肿瘤微环境,还能增强树突状细胞介导的肿瘤特异性免疫应答,从而介导和维持有效的 T 细胞抗肿瘤免疫应答。

#### 4 结语

PD-L1 作为一个表达在机体正常细胞和肿瘤细胞上的共刺激分子,对机体的肿瘤免疫应答起到了重要的调节作用,它直接影响了树突状细胞分化、发育和成熟及其对特异性 CTL 的激发,并可通过介导 CTL 的凋亡而使肿瘤细胞逃避免疫攻击。在此理论上利用抗 PD-L1 单抗进行肿瘤免疫治疗已取得了一定的效果,但有待设计出更为合理有效的免疫治疗方案。目前,尚需明确该分子可能存在的另一受体,阐明其如何参与机体免疫调节网络,以及由此如何参与多种免疫性疾病和肿瘤的发生发展,以期为自身免疫性疾病和恶性肿瘤的免疫治疗提供新的途径。

#### [参考文献]

[1] 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.

[2] Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, *et al.* Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death [J]. *Embo J*. 1992, 11(11): 3887-3895.

[3] Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation [J]. *J Exp Med*, 2000, 192(7): 1027-1034.

[4] Wang S, Bajorath J, Flies DB, *et al.* Molecular modeling and functional mapping of B7-H1 and B7-DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction [J]. *J Exp Med*, 2003, 197(9): 1083-1091.

[5] Okazaki T, Maeda A, Nishimura H, *et al.* PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homolo-

gy 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(24): 13866-13871.

[6] Nishimura H, Honjo T. PD-1: An inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance [J]. *Trends Immunol*, 2001, 22(5): 265-268.

[7] Latchman Y, Wood C. R., Chernova T, *et al.* PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation [J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(3): 261-268.

[8] Sathish JG, Johnson KG, Fuller KJ, *et al.* Constitutive association of SHP-1 with leukocyte-associated Ig-like receptor-1 in human T cells [J]. *J Immunol*, 2001, 166(3): 1763-1770.

[9] Bennett F, Luxenberg D, Ling V, *et al.* Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses [J]. *J Immunol*, 2003, 170(2): 711-718.

[10] Dong HD, Strome SE, Matteson EL, *et al.* Costimulating aberrant T cell response by B7-H1 autoantibodies in rheumatoid arthritis [J]. *J Clin Invest*, 2003, 113(11): 363-370.

[11] Dong HD, Strome SE, Salomao 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.

[12] Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, *et al.* Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC [J]. *J Immunol*, 2002, 169(7): 5538-5545.

[13] Julia AB, David MD, Feng-Rong Ma, *et al.* Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production [J]. *J Immunol*, 2003, 170(3): 1257-1266.

[14] Strome SE, Dong HD, Tamura H, *et al.* B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(19): 6501-6505.

[15] 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 Res*, 2003, 63(21): 7462-7467.

[16] Mazanet MM, Hughes CC. B7-H1 is expressed by human endothelial cells and suppresses T cell cytokine synthesis [J]. *J Immunol*, 2002, 169(7): 3581-3588.

[17] Yoshiko I, Masayoshi I, Yoshimasa T, *et al.* Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 99(19): 12293-12297.

[18] Blank C, Brown I, Peterson AC, *et al.* PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8<sup>+</sup> cells [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(3): 1140-1145.

[19] Curiel TJ, Wei S, Dong H, *et al.* Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity [J]. *Nat Med*, 2003, 9(5): 562-567.