

[文章编号] 1000- 4718(2006)05- 0873- 05

# 人外周血淋巴细胞及单核细胞表达 PD- L1 和 PD- L2 的动力学研究\*

迟晓云<sup>1</sup>, 何贤辉<sup>1△</sup>, 查庆兵<sup>1</sup>, 徐丽慧<sup>1,2</sup>, 曾耀英<sup>1</sup>, 王 通<sup>1</sup>(暨南大学 <sup>1</sup>组织移植与免疫教育部重点实验室, <sup>2</sup>生物工程研究所, 广东 广州 510632)

**[摘要]** 目的: 探讨 PD- L1 和 PD- L2 在正常人外周血静息和活化的 B 细胞 T 细胞及单核细胞表面的表达规律。方法: 利用荧光抗体染色和流式细胞术分析静息状态及经多克隆刺激剂脂多糖 (LPS) 和美洲商陆丝裂原 (PWM) 刺激 6、24、48 和 72 h 后表达 PD- L1 和 PD- L2 的 B 细胞和 T 细胞百分率, 同时分析静息状态及经 IFN-  $\gamma$  和 LPS 共同刺激 24、48、72 和 96 h 后表达 PD- L2 的单核细胞百分率。结果: 静息 B 细胞和 T 细胞表面不表达 PD- L1, LPS 和 PWM 刺激 6 h 后表达 PD- L1 的 B 细胞百分率均显著高于静息 B 细胞, 24 h 达到最高, 分别为 (46.26  $\pm$  10.71) % 和 (43.67  $\pm$  6.14) %, 之后随时间延长而降低; 表达 PD- L1 的 T 细胞百分率在 LPS 刺激下无显著变化, 但 PWM 刺激 6 h 后百分率明显高于静息条件, 24 h 达到最高, 为 (25.42  $\pm$  9.23) %, 之后下降。静息 B 细胞和 T 细胞不表达 PD- L2, 活化后 PD- L2 表达也无明显上调。另外, 静息状态单核细胞表面不表达 PD- L2, 体外活化 24 h 后表达 PD- L2 的单核细胞百分率显著上调, 48 h 达到最高为 (28.70  $\pm$  14.22) %, 之后随时间而降低。结论: 活化的淋巴细胞表达 PD- L1, 但不表达 PD- L2, 后者在活化的单核细胞表面表达, 并且后者达到高峰的时间迟于前者。

**[关键词]** B7- H1; B7- DC; 脂多糖类; 商陆有丝分裂原类; 流式细胞术; 淋巴细胞; 单核细胞

**[中图分类号]** R392.12

**[文献标识码]** A

## Kinetic expressions of PD- L1 and PD- L2 on the surface of human lymphocytes and monocytes

CHI Xiao- yun<sup>1</sup>, HE Xian- hui<sup>1</sup>, ZHA Qing- bing<sup>1</sup>, XU Li- hui<sup>1,2</sup>, ZENG Yao- ying<sup>1</sup>, WANG Tong<sup>1</sup>(<sup>1</sup>Key Laboratory of Ministry of Education for Tissue Transplantation and Immunology, <sup>2</sup>Institute of Bioengineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To investigate the expression kinetics of PD- L1 and PD- L2 on the surface of the resting and activated B/T cells as well as monocytes from healthy human peripheral blood. **METHODS:** Fluorescent antibody staining together with flow cytometry were used to detect the percentages of the resting as well as the activated B cells and T cells that expressed PD- L1 and PD- L2. Meanwhile the percentages of the resting and activated monocytes that expressed PD- L2 were determined. **RESULTS:** Both resting B cells and T cells did not express PD- L1 on their surface, however PD- L1 expression was significantly up-regulated on the surface of the activated B cells after 6 h stimulation with LPS or pokeweed mitogen (PWM), and the percentages of B cells that expressed PD- L1 reached a plateau at 24 h, which were (46.26  $\pm$  10.71) % with LPS and (43.67  $\pm$  6.14) % with PWM stimulation, respectively. No markedly change of PD- L1 expression on the surface of the activated T cells after stimulation with LPS was observed, but upregulation of PD- L1 expression was observed when stimulation with PWM. The percentages of T cells that expressed PD- L1 reached a plateau at 24 h, which was (25.42  $\pm$  9.23) %. PD- L2 expression was not found on the resting as well as the activated B cells and T cells. In addition, the resting monocytes did not express PD- L2. Combination of INF-  $\gamma$  plus LPS markedly induced the PD- L2 expression, and the percentages of monocytes that expressed PD- L2 reached a peak at 48 h, which was (28.70  $\pm$  14.22) %. **CONCLUSION:** The activated lymphocytes only express PD- L1, reaching a plateau at 24 h. PD- L2 is expressed on the surface of the activated monocytes, reaching a peak at 48 h.

**[收稿日期]** 2005- 07- 11

**[修回日期]** 2005- 09- 26

\* **[基金项目]** 国家自然科学基金重点项目 (No. 30230350); 国家自然科学基金面上项目 (No. 30371651); 国家重点基础研究发展规划项目 (No. G200057006)

△ 通讯作者 Tel: 020- 85220679; E- mail: thehx@jnu.edu.cn

[KEY WORDS] B7- H1; B7- DC; Lipopolysaccharides; Pokeweed mitogens; Flow cytometry; Lymphocytes; Monocytes

B7- CD28 途径为经典的共刺激途径,在 T 细胞活化和克隆扩增过程发挥重要作用,因此受到广泛而深入的研究<sup>[1]</sup>。近年来相继发现 B7 超家族成员 PD- L1(ligand 1 of programmed death- 1)和 PD- L2(ligand 2 of programmed death- 1)<sup>[2- 4]</sup>,为共刺激途径开辟了新思路。大量研究表明,PD- L1(又称 B7- H1)和 PD- L2(又称 B7- DC)与其共同受体 PD- 1 结合可传递共抑制信号,但在某些条件下 PD- L1 和 PD- L2 又可发挥共刺激效应,目前的研究提示可能是与不同于 PD- 1 的受体结合而介导共刺激信号<sup>[5]</sup>。总之,PD- L1 和 PD- L2 对 T 细胞增殖及细胞因子分泌具有重要的双重调控作用,因此有可能通过调控该共刺激通路而治疗自身免疫病和肿瘤<sup>[3,6,7]</sup>。PD- L1 表达相当广泛,包括 B 细胞、T 细胞及多种外周非淋巴样组织,而 PD- L2 表达主要局限于树突状细胞和巨噬细胞<sup>[3,4,8]</sup>。虽然对 PD- L1 和 PD- L2 表达分布已作了较多研究,但在人外周血淋巴细胞和单核细胞的表达则缺少系统分析和比较。本实验主要观察正常人外周血静息和活化的 B 细胞、T 细胞及单核细胞表面 PD- L1 和 PD- L2 的表达规律,为进一步分析其免疫调节功能奠定基础。

## 材 料 和 方 法

### 1 血 样

正常人肝素抗凝静脉血采自 20- 30 岁健康志愿者。

### 2 主要试剂和仪器

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和美洲商陆丝裂原(pokeweed mitogen, PWM)购自 Sigma 公司;  $\gamma$ - 干扰素(IFN-  $\gamma$ )购自上海克隆生物高技术有限公司;淋巴细胞分离液购自上海恒信化学试剂有限公司; RPMI- 1640 胎牛血清购自 Gibco 公司; anti- hCD3- PE- Cy5 anti- hCD19- FITC anti- hCD14- FITC anti- hPD- L1- PE 和 anti- hPD- L2- PE 单克隆抗体购自 eBioscience 公司; FACSCalibur 流式细胞仪为美国 Becton Dickinson 公司产品。

### 3 人外周血体外活化

将外周血按 1: 2 的比例以 RPMI- 1640 完全培养液(含 10% FBS、50  $\mu$ mol/L  $\beta$ - 巯基乙醇、100  $\times$  10<sup>3</sup> U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素)稀释,按每孔 1 mL 加于 24 孔培养板中,分别设置对照组、LPS (10 mg/L) 和 PWM (10 mg/L) 刺激组,所有细胞均在 37  $^{\circ}$ C、体

积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养,分别于 6、24、48 和 72 h 收集细胞,然后进行免疫荧光染色及流式细胞仪分析。

### 4 单核细胞的分离及体外活化

以淋巴细胞分离液制备外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC),重悬于 RPMI- 1640 完全培养液中,使细胞浓度为 3  $\times$  10<sup>9</sup>- 4  $\times$  10<sup>9</sup> cells/L,按每孔 1 mL 加于 24 孔培养板中,置于 37  $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养,2 h 后轻轻晃动培养板吸掉悬浮细胞,再用 PBS (phosphate- buffered saline, pH 7.4) 洗孔 2 次,然后实验孔加入 1 mL 含 IFN-  $\gamma$  (1 500  $\times$  10<sup>3</sup> U/L) 和 LPS (100  $\mu$ g/L) 的 RPMI- 1640 完全培养液,对照孔加入 1 mL RPMI- 1640 完全培养液,置于 37  $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养,于 24、48、72 和 96 h 分别收集细胞,进行免疫荧光染色及流式细胞仪分析。

### 5 淋巴细胞的 3 色荧光染色

取 150  $\mu$ L 样品,离心浓缩至 50  $\mu$ L,加入 3 种不同荧光素标记的抗体各 20  $\mu$ L (anti- hCD3- PE- Cy5 anti- hCD19- FITC、anti- hPD- L1- PE 或 anti- hPD- L2- PE),4  $^{\circ}$ C 温育 20 min,然后以红细胞裂解液破坏红细胞,离心获取有核细胞,经 PBS 洗涤 2 次后,加入 0.4 mL 质量分数 4% 多聚甲醛(配于 PBS)于 4  $^{\circ}$ C 固定 20 min,即可上机分析。

### 6 新鲜血单核细胞的双色荧光染色

取 30  $\mu$ L 新鲜血,加入 2 种不同荧光素标记的抗体各 20  $\mu$ L (anti- hCD14- FITC 和 anti- hPD- L2- PE),混匀后于 4  $^{\circ}$ C 温育 20 min。然后按上述方法破坏红细胞、洗涤、固定后进行流式细胞仪分析。

### 7 培养后单核细胞获取及双色荧光染色

轻轻吹打收集培养的单核细胞,经 PBS 离心洗涤 2 次后,重悬于 50  $\mu$ L PBS 中,加入 2 种不同荧光素标记的抗体各 5  $\mu$ L (anti- hCD14- FITC 和 anti- hPD- L2- PE),混匀后于 4  $^{\circ}$ C 温育 20 min。用 2 mL PBS 洗涤 2 次,加入 0.4 mL 质量分数 4% 多聚甲醛于 4  $^{\circ}$ C 固定 20 min 后进行流式细胞仪分析。

### 8 流式细胞仪分析

所有样品以 FACSCalibur 流式细胞仪进行分析,数据以 CELLQuest 软件获取,激发光为 488 nm 激光。前向散射(FSC)和侧向散射(SSC)以线性信号收集,所有荧光强度以对数(0- 10<sup>4</sup>)度量收集。FITC 为荧光 1(FL1),PE 为荧光 2(FL2),PE- Cy5 为荧光 3

(FL3)。重叠荧光通过电子补偿消除并以同型抗体做阴性对照。每个样品收集 10 000 个细胞的参数, 获得的数据用 CELLQuest 软件分析。

9 统计学处理

所有数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 以 SPSS 10.0 软件中的单因素方差分析 (One-way ANOVA) 方法进行分析, 并以 Dunnett 检验进行多组间比较。

结 果

1 B 细胞表面 PD- L1 和 PD- L2 的表达

静息 B 细胞表面不表达 PD- L1 和 PD- L2, LPS 和 PWM 刺激 6 h 后表达 PD- L1 的 B 细胞的百分率均显著高于静息状态, 24 h 达到最高, 分别为 (46. 26 ± 10. 71) % 和 (43. 67 ± 6. 14) % (图 1), 之后百分率随时间延长而降低, 各个时点的表达百分率与对照组比较均具有显著差异 ( $P < 0. 05, P < 0. 01$ ) (表 1)。LPS 和 PWM 刺激下各个时点表达 PD- L2 的 B 细胞的百分率与对照组比较均无显著差异 (数据未给出)。

2 T 细胞表面 PD- L1 和 PD- L2 的表达

与 B 细胞相同, 静息 T 细胞表面也不表达 PD- L1 和 PD- L2。表达 PD- L1 的 T 细胞的百分率在 LPS 刺激后无显著变化, 但 PWM 刺激 6 h 后百分率明显高于静息细胞, 24 h 达到最高, 为 (25. 4 ± 9. 23) % (图 2), 之后下降, 并且在 PWM 刺激下各个时点表达 PD- L1 的 T 细胞的百分率与对照组比较均具有显著差异 ( $P < 0. 01$ ) (表 2)。LPS 和 PWM 刺激下各个时点表达 PD- L2 的 T 细胞的百分率与对照组均无显著差异 (数据未给出)。

3 单核细胞表面 PD- L2 的表达

静息状态的单核细胞在培养过程中不表达 PD- L2, 经多克隆刺激剂 IFN-  $\gamma$  和 LPS 共同刺激 24 h 后表达 PD- L2 的单核细胞的百分率显著上调, 48 h 达到最高, 为 (28. 70 ± 14. 22) % (图 3), 之后随时间延长而降低, 在 IFN-  $\gamma$  和 LPS 共同刺激下各个时点表达 PD- L2 的单核细胞的百分率与对照组比较均具有显著差异 ( $P < 0. 01$ ) (表 3)。

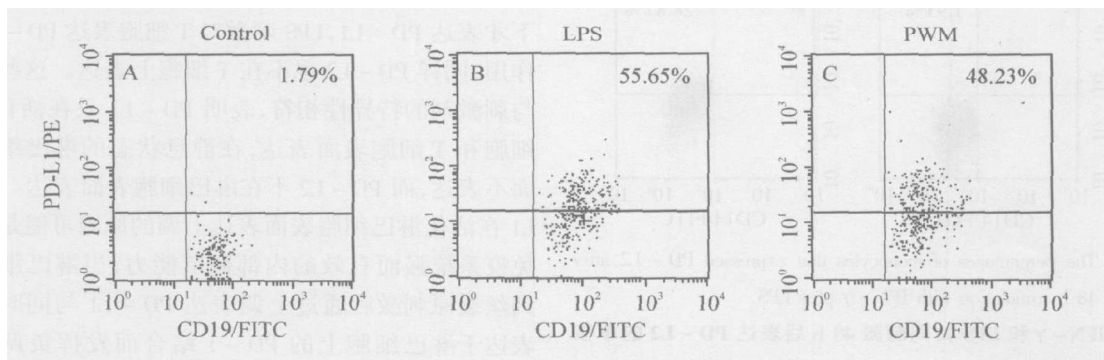


Fig 1 The percentages of B cells that expressed PD- L1 24 h after stimulation with LPS or PWM.

图 1 LPS 和 PWM 刺激 24 h 后表达 PD- L1 的 B 细胞的百分率

表 1 LPS 和 PWM 刺激前后表达 PD- L1 的 B 细胞的百分率

Tab 1 The percentages of B cells that expressed PD- L1 before and after stimulation with LPS or PWM (% .  $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Group	0 h	6 h	24 h	48 h	72 h
Control	1. 82 ± 0. 99	2. 26 ± 1. 82	4. 61 ± 1. 14	5. 35 ± 2. 58	4. 01 ± 2. 59
LPS (10 mg/L)		13. 42 ± 5. 37**	46. 26 ± 10. 71**	35. 40 ± 9. 88**	27. 44 ± 10. 34**
PWM (10 mg/L)		9. 15 ± 3. 69*	43. 67 ± 6. 14**	42. 36 ± 10. 35**	35. 65 ± 15. 41**

\*  $P < 0. 05, ** P < 0. 01$  vs control.

表 2 LPS 和 PWM 刺激前后表达 PD- L1 的 T 细胞的百分率

Tab 2 The percentages of T cells that expressed PD- L1 before and after stimulation with LPS or PWM (% .  $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Group	0 h	6 h	24 h	48 h	72 h
Control	0. 13 ± 0. 11	0. 43 ± 0. 35	0. 96 ± 0. 62	0. 65 ± 0. 44	0. 71 ± 0. 49
LPS (10 mg/L)		4. 19 ± 5. 19	9. 05 ± 7. 75	6. 15 ± 4. 94	4. 81 ± 4. 83
PWM (10 mg/L)		4. 39 ± 4. 81	25. 42 ± 9. 23*	21. 83 ± 4. 95*	19. 99 ± 9. 11*

\*  $P < 0. 01$  vs control.

表3 IFN- $\gamma$  和 LPS 共同刺激前后表达 PD- L2 的单核细胞的百分率

Tab 3 The percentages of monocytes that expressed PD- L2 before and after stimulation with IFN- $\gamma$  plus LPS (%.  $\bar{x} \pm s$ , n= 5)

Group	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Control	0.40 $\pm$ 0.35	3.03 $\pm$ 2.74	2.65 $\pm$ 0.72	2.20 $\pm$ 0.64	2.40 $\pm$ 1.14
IFN- $\gamma$ + LPS		11.38 $\pm$ 3.80*	28.70 $\pm$ 14.22*	26.78 $\pm$ 12.18*	20.69 $\pm$ 13.62*

\*  $P < 0.01$  vs control.

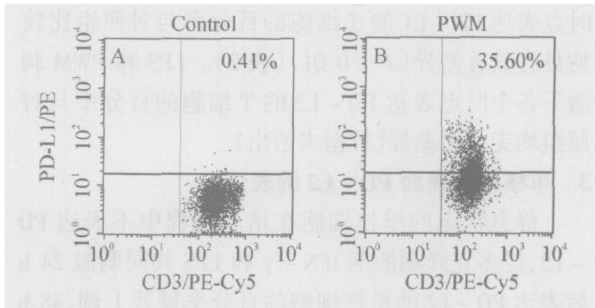


Fig 2 The percentages of T cells that expressed PD- L1 after 24 h stimulation with PWM.

图2 PWM 刺激 24 h 后表达 PD- L1 的 T 细胞的百分率

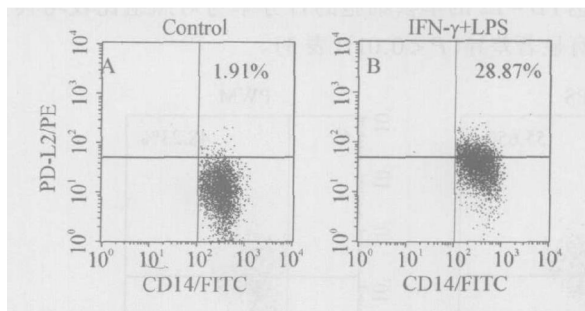


Fig 3 The percentages of monocytes that expressed PD- L2 after 48 h stimulation with IFN- $\gamma$  plus LPS.

图3 IFN- $\gamma$  和 LPS 共同刺激 48 h 后表达 PD- L2 的单核细胞的百分率

## 讨 论

PD- L1 是 B7 家族的第 4 个成员,由 Dong 等<sup>[2]</sup>首先从胎盘 cDNA 文库中克隆并证实。PD- L2 是 B7 家族的第 5 个新成员,是 Tseng 等<sup>[3,4]</sup>在研究 PD- L1 的功能时发现的。PD- 1(programmed death- 1)是 PD- L1 和 PD- L2 的共同受体<sup>[2]</sup>,PD- L1 和 PD- L2 与其共同受体 PD- 1 结合后发挥负性调控作用。例如,PD- 1 信号能够抑制 TCR 介导的 T 细胞增殖和下调 IFN- $\gamma$  JL- 10 JL- 4 和 IL- 2 等细胞因子的分泌<sup>[6,7]</sup>,并能阻断 B 细胞进一步增殖及向浆细胞或记忆细胞分化等<sup>[9]</sup>。因此,正如 B7- CD28 途径一样,PD- L1/PD- L2- PD- 1 途径在外周耐受和自身免疫病的诱导中同样起着重要的作用<sup>[3,6,7,9,10]</sup>。而最近的研究表明,PD- L1 和 PD- L2 也能够刺激 T 细胞增殖和细胞因子分泌<sup>[2,11]</sup>,因此推论 PD- L1 和

PD- L2 还存在假定的非 PD- 1 第二受体。上述研究结果提示,PD- L1/PD- L2 可能通过与不同的受体相互作用,发挥正向和负向双重调控作用<sup>[10]</sup>。

淋巴细胞表面具有识别丝裂原的受体,在特异性丝裂原刺激下可使相应 B 细胞和 T 细胞发生活化和增殖。LPS 是 B 细胞特异性丝裂原,能与 B 细胞表面的 CD14 结合,通过 LPS- CD14- TLR 转导通路激活 B 细胞,而 T 细胞表面不表达 CD14,因此 LPS 不能激活 T 细胞。PWM 是依赖 T 细胞的 B 细胞激活剂,对 T 细胞和 B 细胞都具有活化作用。本实验结果显示,LPS 和 PWM 刺激的 B 细胞均可表达 PD- L1,但不表达 PD- L2。而 T 细胞只有在 PWM 刺激下才表达 PD- L1,LPS 刺激对 T 细胞表达 PD- L1 无作用,同样 PD- L2 也不在 T 细胞上表达。这些结果与刺激剂的特异性相符,表明 PD- L1 只在活化的 B 细胞和 T 细胞表面表达,在静息状态的淋巴细胞表面不表达,而 PD- L2 不在淋巴细胞表面表达。PD- L1 在活化淋巴细胞表面表达上调的原因可能是由于免疫系统强而有效的内部调节能力,当淋巴细胞受到丝裂原刺激后通过上调表达 PD- L1 与同时上调表达于淋巴细胞上的 PD- 1 结合而发挥负调控作用,以达到内环境稳定(homeostasis)。PD- L1 在活化淋巴细胞表面的表达规律与淋巴细胞表面活化标志 CD69 的表达规律相一致,都是在 24 h 达到最高,之后随时间延长而降低。可见活化的淋巴细胞通过上调表达 PD- L1 与同时上调表达于淋巴细胞上的 PD- 1 结合发挥负性调控作用以达到内环境稳定这一观点是合理的。必须特别注意的是,只有 PD- L1 在活化淋巴细胞上表达,而 PD- L2 并不表达,这种表达分布的差异提示了两者在功能上存在明显不同之处。

除了分析淋巴细胞表面 PD- L1 和 PD- L2 的表达规律,我们还测定了 PD- L2 在单核细胞表面的表达情况。IFN- $\gamma$  和 LPS 联用能够有效地刺激单核细胞的活化和增殖。活化的单核细胞上调表达 PD- L2,但其上调的时间与淋巴细胞相比要迟,在 48 h 才达到高峰,并持续到 72 h 才开始下降。两者在时间上的差异可能正是反映在功能上的不同。有较多的

研究表明表达于树突状细胞或其它抗原提呈细胞上的 PD- L2 为 T 细胞提供共刺激作用, 但发挥共刺激作用的受体仍有待阐明。

本研究结果表明, 活化的淋巴细胞表达 PD- L1, 但不表达 PD- L2, 后者在活化的单核细胞表面表达, 并且后者达到高峰的时间要迟于前者, 这 2 种 B7 家族的新成员在细胞分布及表达时间上的差异, 提示 PD- L1 和 PD- L2 在调节淋巴细胞的活化和增殖过程中具有不同的功能, 通过对该通路进行调控的策略, 在自身免疫性疾病和肿瘤治疗中都具有潜在的应用价值。

#### [参 考 文 献]

- [1] Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses[J]. *Ann Rev Immunol*, 2002, 20: 29- 53.
- [2] 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.
- [3] Tseng SY, Otsuji M, Gorsaki K, et al. B7- DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cell[J]. *J Exp Med*, 2001, 193(7): 839- 845.
- [4] Mueller DL. T cells: A proliferation of costimulatory molecules [J]. *Curr Biol*, 2000, 10(6): 227- 230.
- [5] Subudhi SK, Alegre ML, Fu YX. The balance of immune responses: costimulation verse coinhibition [J]. *J Mol Med*, 2005, 83(3): 193- 202.
- [6] 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.
- [7] Latchman Y, Wood CR, 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- 267.
- [8] Ishida M, Iwai Y, Tanaka Y, et al. Differential expression of PD- L1 and PD- L2, ligands for an inhibitory receptor PD- 1, in the cells of lymphohematopoietic tissues[J]. *Immunol Lett*, 2002, 84(1): 57- 62.
- [9] 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.
- [10] Selenko- Gebauer N, Majdic O, Szekeres A, et al. B7- H1 (programmed death- 1 ligand) on dendritic cells is involved in the induction and maintenance of T cell anergy[J]. *J Immunol*, 2003, 170(7): 3637- 3644.
- [11] Tamura H, Dong H, Zhu G, et al. B7- H1 costimulation preferentially enhances CD28- independent T- helper cell function[J]. *Blood*, 2001, 97(6): 1809- 1816.