DOI:10.16016/j.2097-0927.202210100

PD-L1 在溃疡性结肠炎患者及小鼠结肠炎模型结肠黏膜的表达及其作用初探

宋娅岚,吴天宇,陈 聪,武振宇,汤旭东,陈 磊 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院消化内科

摘 要: 探讨细胞程序性死亡配体-1(programmed cell death-ligand 1,PD-L1)在溃疡性结肠炎(ulcerative colitis,UC)发病机制中的作用。**方法** 收集2022年1-9月于陆军军医大学第一附属医院消化内科肠镜室就诊的18~64岁的UC患者结肠组织标本29例,同期收集非UC患者结肠组织标本22例,采用免疫组化和RT-qPCR检测 *PD-L1* 和炎症因子 *IL-1β*、*IL-6*、*IL-17a*、*IL-22*、*TGF-β1* 的表达。选取8~10周龄C57BL/6雄性小鼠24只(23~26 g),分为空白对照组($n=4$)、PD-L1-Fc组($n=4$)、葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium salt,DSS)组($n=8$)、DSS+PD-L1-Fc组($n=8$),DSS组及DSS+PD-L1-Fc组连续7天予以2.5%DSS溶液自由饮水,第8天更换为正常饮水,其余组正常饮水,第3天予以PD-L1-Fc组及DSS+PD-L1-Fc组小鼠腹腔注射PD-L1-Fc蛋白(1 mg/mL)40μg/只,造模后8~10天检测各组小鼠结肠黏膜中PD-L1的表达情况,并观察各组小鼠的体质量、粪便性状、活体结肠黏膜形态变化、组织病理学改变及炎症因子改变情况。**结果** 与对照组相比,UC患者结肠黏膜中PD-L1表达显著升高(43.03±4.044,$P<0.001$),促炎因子 *IL-1β*、*IL-6* 及抗炎因子 *IL-22*、*TGF-β1* 的表达均升高($P<0.05$);在DSS小鼠模型中同样存在这一现象。腹腔注射PD-L1-Fc蛋白后,DSS小鼠的体质量、粪便评分、结肠黏膜大体形态及显微镜下炎症程度明显改善($P<0.05$),*IL-6*、*IL-17a* 下调($P<0.05$),*IL-22*、*Foxp3* 上调($P<0.05$)。**结论** *PD-L1* 在UC患者及小鼠DSS结肠炎模型中升高,可能是机体的一种适应性保护作用。

[**关键词**] 溃疡性结肠炎;*PD-L1*;炎症因子;Treg/Th17细胞
[**中图法分类号**] R361.2; R392.32; R574.62 [**文献标志码**] A

Expression and role of PD-L1 in colonic mucosa of ulcerative colitis patients and DSS-induced colitis mouse model

SONG Yalan, WU Tianyu, CHEN Cong, WU Zhenyu, TANG Xudong, CHEN Lei Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the role of programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) in pathogenesis of ulcerative colitis (UC). **Methods** A total of 29 colon tissue samples from UC patients aged 18~64 years who underwent the colonoscopy in our department from January 2022 to September 2022 were collected, and another 22 colon tissue samples from non-UC patients were also collected during the same period. The expression of *PD-L1* and inflammatory factors *IL-1β*, *IL-6*, *IL-17a*, *IL-22* and *TGF-β1* were detected by immunohistochemistry and RT-qPCR. Twenty-four male C57BL/6 mice (8~10 weeks old, 23~26 g) were randomly divided into blank control group ($n=4$), PD-L1-Fc group ($n=4$), dextran sulfate sodium salt (DSS) group ($n=8$), and DSS+PD-L1-Fc group ($n=8$). The mice from the DSS group and DSS+PD-L1-Fc group were given 2.5%DSS solution for 7 consecutive days, and were changed to normal drinking water on the 8th day. The animals of the other groups were given normal drinking water. On the 3rd day, the mice in the PD-L1-Fc group and DSS+PD-L1-Fc group were injected intraperitoneally with PD-L1-Fc protein (1 mg/mL, 40 μg/animal). In 8~10 d after modeling, the expression of *PD-L1* in colonic mucosa was detected, and the

[**基金项目**] 国家自然基金面上项目(81470850)
[**通信作者**] 陈 磊,E-mail:chenlei1977603@126.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

body weight, fecal traits, morphological changes, histopathological changes and inflammatory factors were observed in different groups. **Results** The expression of *PD-L1* was significantly increased in the colonic mucosa of UC patients (43.03±4.044, $P<0.001$) than of normal colon tissue samples, and the expression of pro-inflammatory factors *IL-1β* and *IL-6* and anti-inflammatory factors *IL-22* and *TGF-β1* were increased ($P<0.05$), which also existed in DSS mouse models. Intraperitoneal injection of PD-L1-Fc protein improved body weight, fecal score, gross morphology of colonic mucosa and microscopic inflammation ($P<0.05$), down-regulated *IL-6* and *IL-17a* ($P<0.05$) and up-regulated *IL-22* and *Foxp3* ($P<0.05$) in the DSS+PD-L1-Fc mice when compared with the DSS group. **Conclusion** The upregulation of *PD-L1* in UC patients and DSS-induced colitis mouse models may play an adaptive protective role.

[**Key words**] ulcerative colitis; programmed cell death-ligand 1; inflammatory factors; Treg/Th17 cells

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81470850). Corresponding author: CHEN Lei, E-mail: chenlei1977603@126.com

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一组病因尚不明确的肠道慢性非特异性炎症性疾病,主要包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)。在过去的十年里,全球(特别是亚洲和非洲)IBD 患者数量正在增加,因此 IBD 已经成为一个世界性的公共卫生问题[1]。IBD 的损害和症状是不同的,CD 可以扩散到整个胃肠道,患者可能会出现腹痛、腹泻、体质量减轻和发热;而溃疡性结肠炎一般只影响结直肠,一般症状为结直肠出血、频繁排便、里急后重和下腹痛[2]。UC 与使用 *PD-L1* 抑制剂后所出现的免疫介导性肠炎(immune-mediated colitis, IMC)在临床和内镜下表现以及组织病理学表型上均具有极高的相似性,若不结合用药史常难以区分[3]。程序性死亡受体-1(programmed cell death protein 1,*PD-1*)是一种表达在多种免疫细胞的免疫球蛋白基因超家族成员,*PD-L1* 作为其配体,与 PD-1 结合后抑制活化的 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 效应 T 细胞的增殖,在黏膜对共生菌和食物抗原的耐受中起着重要作用[4-5]。目前的研究证明,UC 的发病与肠黏膜的免疫平衡被打破存在着重要联系,其中调节性 T 细胞与辅助 T17 细胞(Treg/Th17 细胞)的失衡起着至关重要的作用[6],而肠黏膜的免疫平衡与 *PD-1*/*PD-L1* 通路密切相关[7-8],这提示我们 PD-L1 可能在 UC 的发病机制中也扮演着重要的角色。

但 *PD-L1* 在 UC 患者肠黏膜的表达情况仍存在争议,有研究[9-10]表明 *PD-L1* 在 UC 患者肠黏膜中上调明显,也有研究者认为 *PD-L1* 在 UC 患者与正常人之间表达并无差异[11]。因此本研究首先检测 *PD-L1* 在 UC 患者结肠黏膜中的表达水平,并建造了 DSS 肠炎的小鼠模型,对小鼠进行腹腔内注射 PD-L1-Fc 蛋白后观察相应指标的变化,初步探究 *PD-L1* 在实验性结肠炎动物模型的表达情况及其可能作用,为探讨 UC 的发病机制及其潜在的治疗方法提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 UC 标本来源

收集 2022 年 1-9 月于陆军军医大学第一附属医院消化内科肠镜室就诊的 18~64 岁的 UC 患者结肠组织标本 29 例,同期收集非 UC 患者结肠组织标本 22 例(取自病变最明显处),病例诊断符合 2018 年《炎症性肠病诊断与治疗的共识意见》,疾病活动性的评估采用改良梅奥(Mayo)评分(评分方式见表 1)。20 例 UC 患者及 12 例非 UC 患者标本制成病理切片,15 例 UC 和 10 例非 UC 患者标本提取 mRNA,其中 3 例 UC 患者及 1 例非 UC 患者组织标本同时制作了病理切片也提取了 mRNA,研究方案经陆军军医大学第一附属医院伦理委员会审核批准[批件号:(A)KY202261],研究对象对标本采集均知情同意。

1.2 实验动物及分组

8~10 周龄 C57BL/6 雄性小鼠 24 只,SPF 级,体质量 23~26 g,购自成都药康生物科技有限公司,动物生产许可证号:SCXK(川)2020-034。动物饲养于陆军

表 1 改良梅奥评分(Mayo 评分)

评分项目	0 分	1 分	2 分	3 分
排便次数	正常	比正常增加 1~2 次/d	比正常增加 3~4 次/d	比正常增加 5 次/d 或以上
便血	未见出血	不到一半时间出现便中混血	大部分时间便中混血	一直存在出血
内镜发现	正常或无活动性病变	轻度病变(红斑、血管纹理减少、轻度易脆)	中度病变(明显红斑、血管纹理缺乏、易脆、糜烂)	重度病变(自发性出血,溃疡形成)
医师总体评价	正常	轻度病情	中度病情	重度病情

军医大学复合伤研究所动物房,使用许可证号:SYXK(渝)2017-0002,恒温恒湿,自由饮水摄食,适应性饲养1周后开始实验。将24只小鼠分为:①空白对照组(n=4),自由摄食水。②PD-L1-Fc组(n=4),自由摄食水后第3天腹腔注射PD-L1-Fc蛋白(1 mg/mL)40 μg/只。③DSS组(n=8),2.5%DSS溶液自由饮用7 d换正常饮用水。④DSS+PD-L1-Fc组(n=8),2.5% DSS溶液自由饮用7 d换正常饮水,第3天腹腔注射PD-L1-Fc蛋白(1 mg/mL)40 μg/只。

1.3 小鼠结肠镜检查实验

取材当天上午禁食6 h后使用高分辨率的小鼠视频内窥镜系统(Karl STORZ,Tuttlingen,德国)对实验小鼠进行结肠镜检查。用1.5%~2.0%的异氟醚麻醉小鼠,然后用空气充气以显示近端结肠3 cm。根据以下参数对结肠炎的严重程度进行盲法评分(分):结肠半透明0~3,肠壁上附着纤维蛋白0~3,黏膜颗粒状0~3,血管形态0~3;粪便特征:正常至腹泻0~3,管腔内有血液0~3,最高得分为18[12]。

1.4 动物标本采集及处理

每日观察记录小鼠体质量、大便性状、血便情况,进行疾病活动指数(disease activity index,DAI)评分,评分标准为:体质量下降率(0~1%:0分,>1%~5%:1分,6%~10%:2分,11%~18%:3分,>18%:4分)、粪便黏稠度(正常0分,软1分,黏液便2分,稀便3分,稀水样便4分)及粪便潜血(阴性0分,浅蓝1分,蓝色2分,深蓝3分,肉眼血便4分)。PD-L1-Fc组于腹腔注射PD-L1-Fc蛋白后36 h取材,其余组在给予DSS后8~10 d取材,取材前脱颈椎处死;分离结肠组织,测量结肠长度。剪取部分结肠组织(肠道两端)迅速放入液氮中冷冻,-80 ℃冰箱保存备用,其余部分固定于含Zinc的EP管内。

1.5 主要试剂

RT-qPCR试剂:RNAiso Plus,PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser,TB Green Premix Ex *Taq* Ⅱ(TaKaRa),引物详见表2。免疫组化试剂:鼠抗人PD-L1单克隆抗体(66248-1-Ig武汉三鹰生物技术有限公司);山羊抗鼠二抗、山羊抗兔二抗/DAB显色试剂盒(购于北京中杉金桥生物技术有限公司);Western blot试剂:PD-L1单克隆抗体(66248-1-Ig)、GAPDH-HRP单克隆抗体(HRP-60004)购于武汉三鹰生物技术有限公司,兔抗人TNF-α多克隆抗体(BS6000)购于巴傲得生物科技有限公司,电泳凝胶试剂盒、电泳液购自上海雅酶生物医药公司;DSS购于MP Biomedical公司。

1.6 方法

1.6.1 免疫组化 检测患者及DSS小鼠肠黏膜*PD-L1*表达:肠组织标本制成3 μm连续切片。切片常规脱蜡、水化、抗原修复、阻断、封闭后加入*PD-L1*鼠抗人单克隆抗体(工作浓度1∶1 000)4 ℃孵育过夜,孵育二抗后DAB显色。结果判定:在非肿瘤细胞中,光学显微镜下见细胞质/细胞膜染色为阳性细胞[13]。在双盲条件下,由2名医师在80倍视野下随机选取5个清晰无折叠的视野,计数阳性细胞数。

1.6.2 RT-qPCR 检测患者肠黏膜*PD-L1*及促炎因子*IL-1β*、*IL-6*、*IL-17a*,抗炎因子*IL-22*、*TGF-β1*的mRNA水平,检测小鼠肠组织促炎因子*IL-1β*、*IL-6*、*IL-17a*,抗炎因子*IL-22*及*Foxp3*的mRNA水平,将收集到的结肠组织提取总RNA,RT-PCR检测*PD-L1*及相关细胞因子的表达情况。mRNA的相对水平以对应标本的*GAPDH*作为内参,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$计算。

1.6.3 Western blot检测 将速冻的肠道组织充分研磨后提取肠道总蛋白,蛋白样品在SDS-PAGE凝胶进行电泳分离,随后转印至PVDF膜,用5%脱脂奶粉于室温摇床封闭1 h,加入配置好的一抗*PD-L1*(1∶5 000),TNF-α(1∶1 000)于4 ℃摇床孵育过夜,洗净后加入配置好的二抗于4 ℃摇床孵育2 h,使用VILBER显色仪显色成像并测量灰度值。

1.7 统计学分析

采用GraphPad Prism 8.0统计软件进行数据分析;计量资料以$\bar{x}\pm s$表示;多组间比较采用单因素方差分析

表2 RT-qPCR引物序列表

基因	上游引物	下游引物
Human *PD-L1*	5′-CTGCACTTTTAGGAGATTAGATC-3′	5′-CTACACCAAGGCATAATAAGATG-3′
Human *TGFβ1*	5′-AGCTGTACCAGAAATACAGCA-3′	5′-ATAACCACTCTGGCGAGTC-3′
Human *IL-6*	5′-GGAGACTTGCCTGGTGAAA-3′	5′-CTGGCTTGTTCCTCACTACTC-3′
Human *IL-1β*	5′-CCTGTGGCCTTGGGCCTCAA-3′	5′-GGTGCTGATGTACCAGTTGGG-3′
Human *IL17a*	5′-GAGGACAAGAACTTCCCCCG-3′	5′-ACGTTCCCATCAGCGTTGAT-3′
Human *GAPDH*	5′-GTGAAGGTCGGAGTCAACG-3′	5′-TGAGGTCAATGAAGGGGTC-3′
Mouse *IL-1β*	5′-CCTCGTGCTGTCGGACCCATA-3′	5′-CAGGCTTGTGCTCTGCTTGTGA-3′
Mouse *IL-6*	5′-TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC-3′	5′-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3′
Mouse *IL-22*	5′-ATGAGTTTTTCCCTTATGGGGAC-3′	5′-GCTGGAAGTTGGACACCTCAA-3′
Mouse *Foxp3*	5′-TGAACTCCTCCCTGCTCCTCCT-3′	5′-CCTAATGCCTCCCAGAGCCCAT-3′
Mouse *IL-17a*	5′-CACCTCACACGAGGCACAAGTG-3′	5′-TCAGCAGCAGCAACAGCATCAG-3′
Mouse *GAPDH*	5′-CAGTGGCAAAGTGGAGATTGTTG-3′	5′-TCGCTCCTGGAAGATGGTGAT-3′

(One-way ANOVA),两两比较采用 t 检验,组间关联采用 Pearson 相关性分析;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者的一般情况及病情评分

共 29 名 UC 患者及 22 例非 UC 患者(对照组)的病例资料被纳入研究,病例组性别构成和年龄与相应对照组间差异无统计学意义($P>0.05$,表 3)。

表 3 患者一般情况

变量	对照组($n=22$)	UC($n=29$)
年龄		
<18~40 岁	11(50)	14(48)
>40 岁	11(50)	15(52)
性别		
男性	14(63.6)	17(58.6)
女性	8(36.4)	12(41.4)
病情分度		
轻度活动	0	6(15)
中度活动	0	16(65)
重度活动	0	7(20)
缓解期	0	0

2.2 免疫组化明确 *PD-L1* 在 UC 患者结肠黏膜表达情况

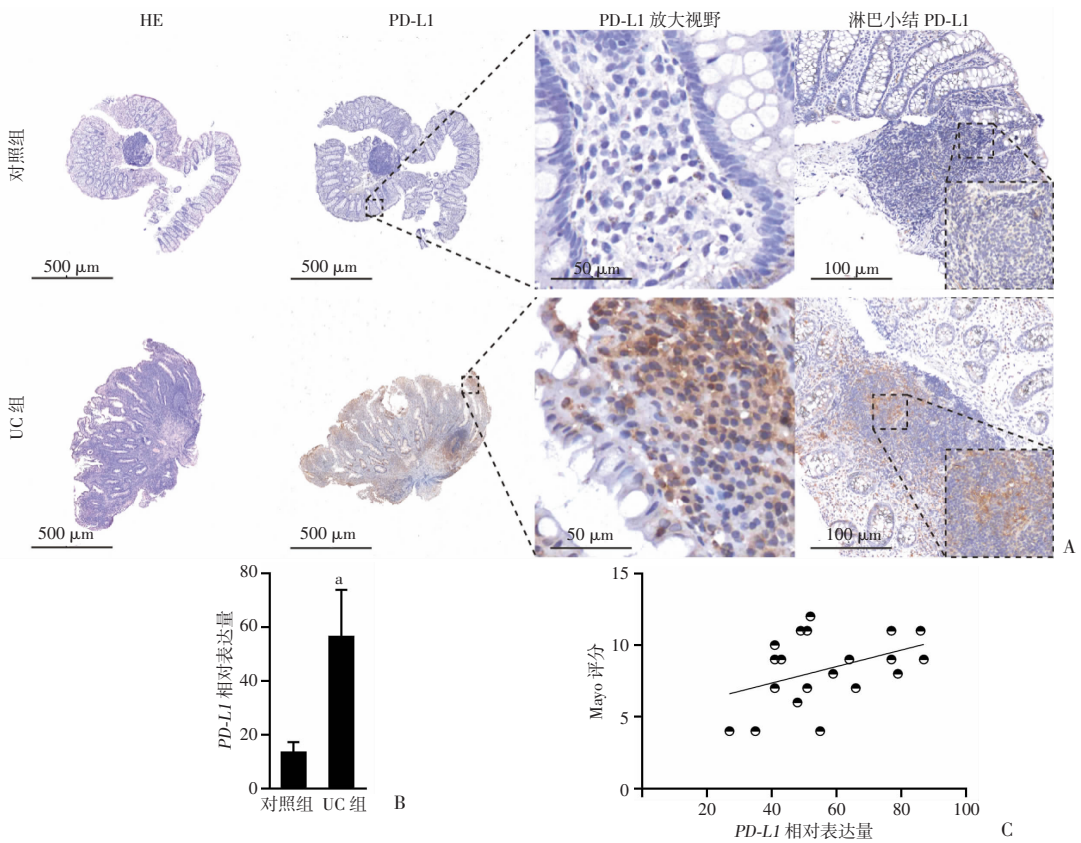
HE 染色示 UC 患者结肠黏膜内大量淋巴、浆细胞浸润,可见腺体分支、隐窝缩短等慢性损伤性改变,免疫组化结果显示,UC 患者结肠黏膜可见大量胞膜或胞质呈棕黄色和黄色的 *PD-L1* 阳性细胞,较对照组着色细胞数明显增多($P<0.000\ 1$),着色部位多位于固有层,且以淋巴小结处表达升高最为显著(图 1)。UC 组患者 Mayo 评分与 *PD-L1* 的表达量存在正相关趋势。

2.3 UC 患者肠黏膜 mRNA 水平 *PD-L1* 及炎症因子 *IL-6*、*IL-1β*、*IL-17a*、*IL-22*、*TGF-β1* 表达情况

RT-qPCR 结果表明,相较对照组而言,UC 结肠黏膜 *PD-L1* 仍有不同程度的升高($P<0.05$,图 2A),促炎因子 *IL-6*、*IL-1β*、*IL-17a* 升高($P<0.05$),而抗炎因子 *IL-22*、*TGF-β1* 同样升高($P<0.05$,图 2B~2F),其中仅 *TGF-β1* 与 *PD-L1* 的表达呈正相关($P<0.05$,图 2G)。

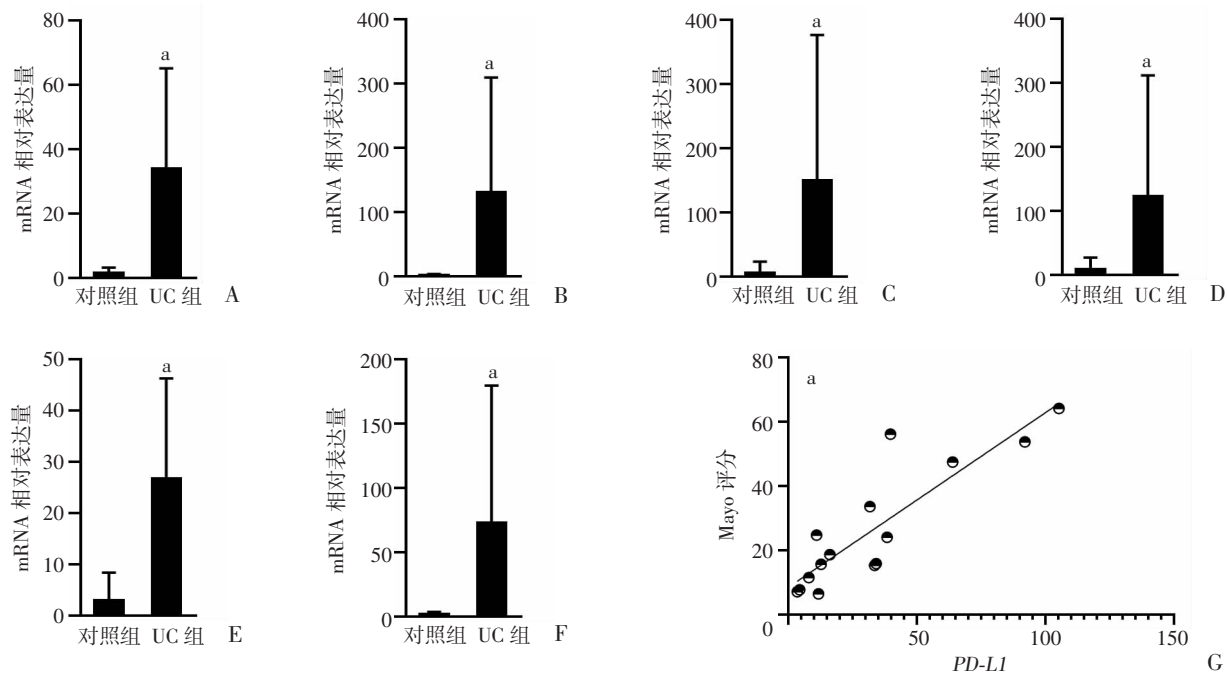
2.4 DSS 诱导的小鼠结肠炎模型中 *PD-L1* 表达情况

Western blot 示 DSS 组小鼠结肠黏膜中 *PD-L1* 表达较空白对照组明显升高($P<0.05$,图 3A、B),免疫组化也有相同现象($P<0.05$),且以组织损伤严重部位着色最显著(图 3C)。



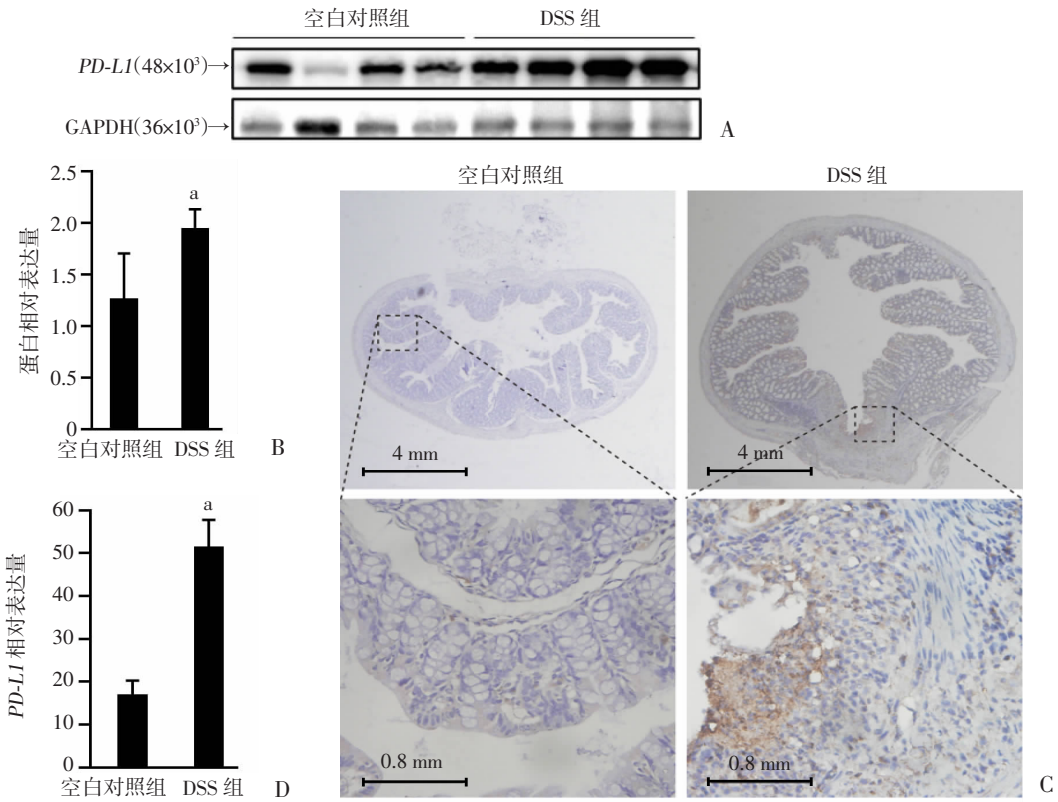
A:免疫组化染色检测 *PD-L1* 表达量;B:*PD-L1* 相对表达量 a:$P<0.000\ 1$,与对照组比较;C:Pearson 相关性分析统计 UC 患者 Mayo 评分与 *PD-L1* 表达量的关系

图 1 *PD-L1* 在 UC 组与对照组患者结肠黏膜表达情况比较 (对照组 $n=12$,UC 组 $n=20$,$\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.05$,与对照组比较　A:*PD-L1* mRNA;B:*IL-6* mRNA;C:*IL-1β* mRNA;D:*IL-17a* mRNA;E:*IL-22* mRNA;F:*TGF-β1* mRNA;G:Pearson 相关性分析统计 *TGF-β1* 与 *PD-L1* 表达量的关系($r=0.87$,$P<0.001$)

图 2　UC 组及对照组结肠黏膜 *PD-L1*、*IL-6*、*IL-1β*、*IL-17a*、*IL-22*、*TGF-β1* mRNA 表达水平比较　(对照组 $n=11$,UC 组 $n=15$,$\bar{x}\pm s$)

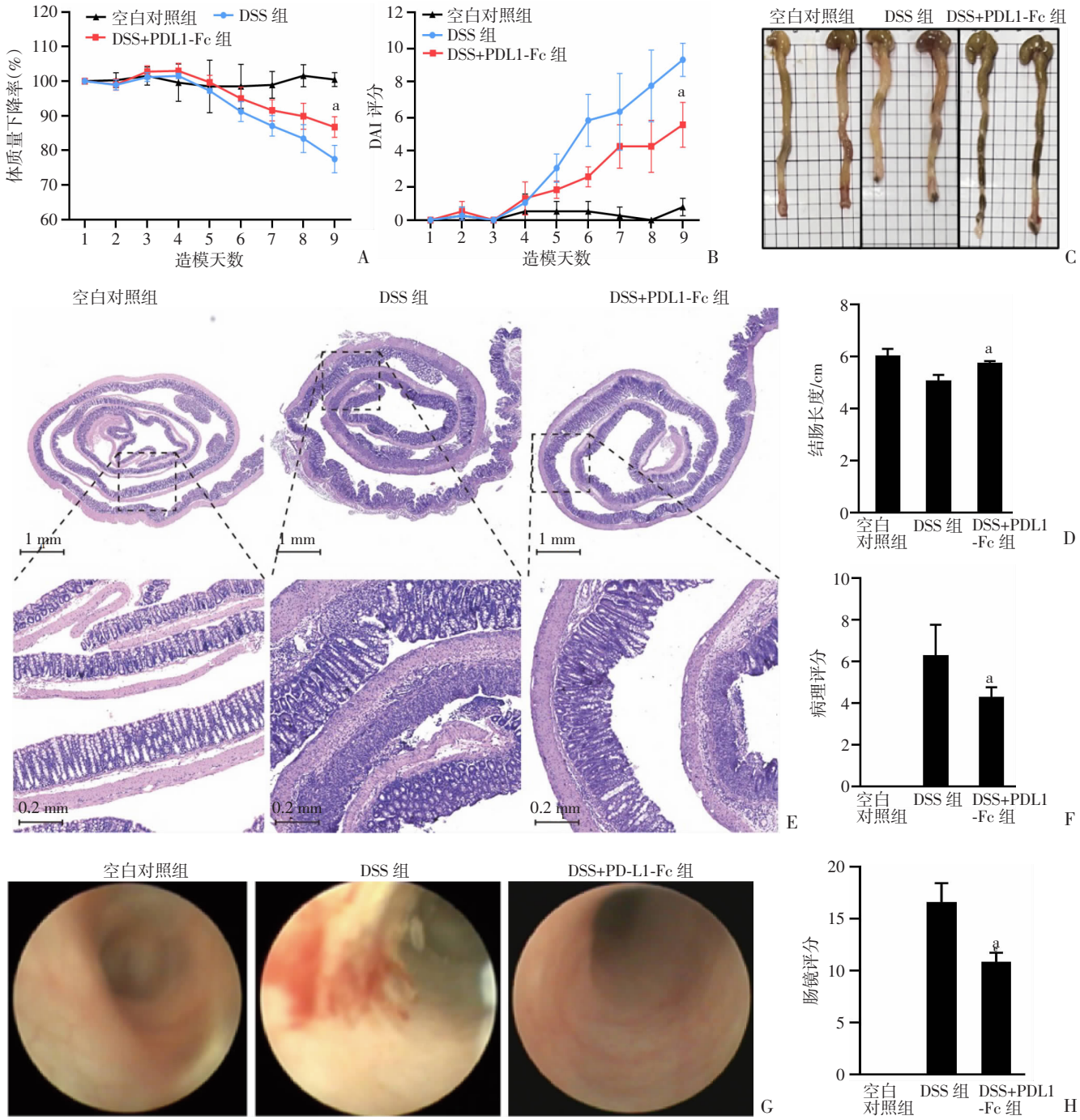


a:$P<0.05$,与空白对照组比较　A:Western blot 检测 *PD-L1* 表达量;B:PD-L1 蛋白相对表达水平;C:免疫组化检测 *PD-L1* 表达情况;D:*PD-L1* 表达定量分析

图 3　空白对照组与 DSS 组小鼠结肠 PD-L1 表达水平比较　($n=4$,$\bar{x}\pm s$)

2.5 PD-L1-Fc 蛋白对小鼠的全身状况及肠道表型影响

腹腔注射 PD-L1-Fc 蛋白后，DSS+PD-L1-Fc 组小鼠的体质量下降率(图 4A，$P<0.05$)、DAI 评分(图 4B，$P<0.05$)及结肠长度(图 4D，$P<0.05$)较 DSS 组均显著改善。肠镜显示 DSS+PD-L1-Fc 组小鼠肠黏膜相对 DSS 组更加光滑，纤维蛋白覆着及溃疡更少见，肠镜评分更低(图 4G、H，$P<0.05$)。HE 染色可以观察到 DSS 组小鼠的结肠黏膜明显受损，隐窝结构破坏，深大溃疡形成，黏膜下层有大量炎性细胞浸润，而 DSS+PD-L1-Fc 组小鼠受损程度较 DSS 组小鼠明显减轻，病理评分更低(图 4E、F，$P<0.05$)。



a：$P<0.05$，与 DSS 组比较　A：体质量变化率；B：DAI 评分；C、D：结肠长度比较及统计；E、F：结肠 HE 染色及病理评分；G、H：肠镜观察结果及内镜评分

图 4　PDL1-Fc 蛋白对各组小鼠的全身状况及肠道表型影响　($n=4$，$\bar{x}\pm s$)

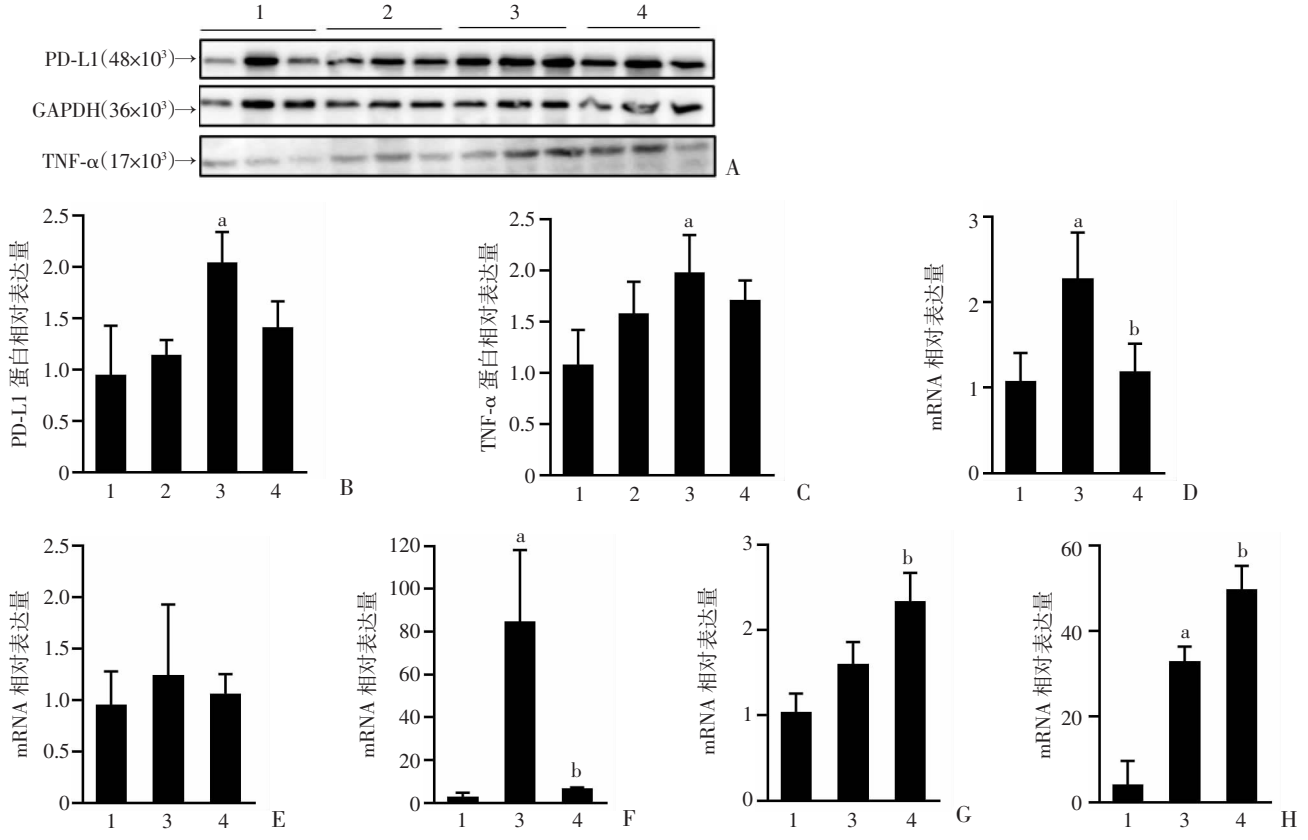
2.6 PD-L1-Fc 蛋白对小鼠结肠炎症因子的影响

Western blot 显示 DSS 组小鼠结肠 *TNF-α*、*PD-L1* 的表达量较空白对照组上调($P<0.05$),治疗后 DSS+PD-L1-Fc 组小鼠 *PD-L1* 及 *TNF-α* 的表达量较 DSS 组有下降趋势(图 5A~C)。RT-qPCR 结果表明腹腔注射 PD-L1-Fc 蛋白后下调 *IL-17α*、*IL-6* 的 mRNA 水平($P<0.05$),*IL-1β* 也呈下降趋势,同时上调了 *Foxp3*、*IL-22* 的 mRNA 水平($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 *PD-L1* 及炎症因子在 UC 患者结肠黏膜中表达升高

本实验证明了无论是 mRNA 还是蛋白水平,UC 患者肠上皮 *PD-L1* 的表达均明显高于对照组。近年来部分结肠癌患者也被报道了 *PD-L1* 的高表达[14],UC 在病程发展中也可能会出现癌变,那么 *PD-L1* 在 UC 患者肠上皮的上调会不会与癌变存在相关性?1 篇纳入 31 287 例 UC 的 Meta 分析显示,亚洲地区 UC 合并结直肠癌的患病率约 0.85%,随着病程延长,10 年的累计风险约 0.02%,20 年的累计风险约 4.81%[15],另一项来自澳洲的研究也显示了相似的发病率,同时他们还发现接受过肠切除术的 UC 患者患结肠癌的概率会明显升高[16]。而我们收集的 UC 患者最长病程不超过 10 年,且均未接受过肠切除术,肠道活检部位都未发现明显肿瘤细胞。遗憾的是本实验 UC 患者的 Mayo 评分与 *PD-L1* 的表达量不存在显著相关性,提示我们 *PD-L1* 的表达量或许无法作为一种病情提示指标。本实验中,*TGF-β1* 作为一种可促进 Treg 细胞分化的因子,也是 Treg 细胞分泌的抗炎因子,可激活细胞内转导途径并促进肠道稳态,在我们的实验结果中显著升高,并且与 *PD-L1* 呈正相关。有研究表明其在活动性 UC 患者肠黏膜及血清的表达上调[17],且 *TGF-β1* 可上调 *PD-L1/PD-L2* 信号治疗 DSS 结肠炎[18]。因此我们推测在 UC 患者肠黏膜中 *PD-L1* 和 *TGF-β1* 诱导 Treg 细胞的产生,起到自身的适应性保护作用,但其上调不足以对抗原有的免疫及炎症破坏,其具体机制还需要进一步的实验证明。



1:空白对照组;2:PD-L1-Fc 组;3:DSS 组;4:DSS+PD-L1-Fc 组; a: $P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与 DSS 组比较

A:Western blot 检测 *PD-L1* 及 *TNF-α* 的变化;B:PD-L1;C:TNF-α;D:*IL-6* mRNA;E:*IL-1β* mRNA;F:*IL-17α* mRNA;G:*Fxop3* mRNA;H:*IL-22* mRNA

图 5 PD-L1-Fc 蛋白对小鼠结肠炎症因子的影响 ($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

3.2 PD-L1 在 DSS 肠炎小鼠结肠表达升高且对 DSS 肠炎有治疗作用

DSS 肠炎模型类似于人类 UC,是一种常用的动物结肠炎模型[19]。我们在 DSS 肠炎小鼠结肠中验证了 *PD-L1* 同样高表达,但关于 *PD-L1* 及其受体 *PD-1* 在小鼠结肠炎模型中的作用的报道仍有争议。有研究者指出,抑制 *PD-1* 对 TNBS 诱导的结肠炎具有保护作用[20];CURIEL 等[21]证明阻断 *PD-L1* 可加重结肠炎模型小鼠的肠道炎症,而 SONG 等[22]进一步证明 PD-L1 可治疗两种不同造模方式的实验性结肠炎。本实验我们采取了腹腔注射 PD-L1-Fc 的方式治疗 DSS 结肠炎,治疗后小鼠结肠挛缩减轻,病理评分及肠道内镜评分均降低。在单独给予 PD-L1-Fc 蛋白后小鼠结肠 *PD-L1* 的表达上调,提示成功高表达肠组织 *PD-L1*,但在给予 PD-L1-Fc 蛋白治疗 DSS 肠炎后小鼠结肠中 *PD-L1* 的表达反而下降,我们推测这是一种负反馈机制引起的 PD-L1 蛋白下调。

3.3 PD-L1-Fc 可能通过调节 Treg/Th17 细胞平衡影响炎症因子变化减轻炎症

目前认为控制 UC 肠道局部炎症反应的关键点之一就是诱导肠道黏膜免疫耐受,调节 Treg/Th17 细胞的平衡[23-24]。*Foxp3* 与 *IL-17a* 分别是 Treg 细胞与 Th17 细胞的标志性因子,使用 PD-L1-Fc 治疗后,小鼠结肠 *Foxp3* 表达升高,而 *IL-17a* 表达下降。这提示我们 *PD-L1* 可能通过下调 Th17 细胞,上调 Treg 细胞从而维持免疫稳态平衡进一步治疗 DSS 肠炎。FRANCISCO 等[25]证明 *PD-L1* 可促进原始 $CD4^+$ T 细胞向 Treg 细胞分化,结肠 Treg 细胞表达 *Foxp3* 是预防结肠炎的组织学征象所必需的[26-28],*Foxp3* 可通过抑制 *RORγt* 抑制 *IL-17a* mRNA 转录,从而抑制 Th17 细胞的分化及功能[29]。目前的研究认为 Th17 细胞在 IBD 的发生发展过程中主要起到促炎作用,其机制可能为 *IL-17* 促进炎症因子的释放,增强黏膜免疫反应,与其他炎症因子产生协同作用进而增强炎症反应等有关[30]。其中 *IL-6* 已被证实可与 *TGF-β1* 等促进 Th17 细胞分化[31-33],即使没有 *IL-6*,*IL-1β* 也可与 *IL-23* 协同诱导致病性 Th17 细胞分化[34]。而 *TNF-α* 则可以通过激活 *Caspase-3* 凋亡途径增加肠上皮细胞凋亡和损伤来引起黏膜炎症[35]。我们观察到了 *IL-6*、*TNFα*、*IL-1β* 的下调,虽然部分下调缺乏统计学意义,但这种下降趋势提示了我们 *PD-L1* 可以通过抑制促炎因子进一步控制炎症。另外值得一提的是我们观察到了 DSS 组小鼠肠道 *IL-22* 的上调,*IL-22* 已被证实在 *IBD* 患者血液和肠道中高表达[36],可诱导抗菌肽产生而促进抗菌免疫,并通过增加上皮细胞增殖和存活在组织修复中发挥重要作用[37],已有研究表明 Th17 细胞可诱导先天性淋巴细胞产生 *IL-22* 而调节肠上皮细胞的脂质代谢稳态[38],我们或许可以推测 DSS 肠炎模型中,*PD-L1* 可上调 Th17 细胞由以上通路诱导 IL-22 产生从而保护结肠上皮细胞,近来钟超团队[39]发现 *PD-1* 缺乏的小鼠淋巴组织诱导细胞所产生的 *IL-22* 也随之减少最终加重小鼠结肠炎,这也进一步证明了我们的观点。

综上所述,我们从 mRNA 和蛋白水平证明了 *PD-L1* 在 UC 患者肠黏膜组织的上调,并且验证了 PD-L1-Fc 蛋白对 DSS 结肠炎模型的治疗作用,提示 *PD-L1* 的高表达或可调节 Treg/Th17 细胞的稳态平衡并影响炎症因子的变化而减轻 DSS 诱导的结肠炎,但作为免疫检查点,全身高表达 *PD-L1* 可能造成肿瘤细胞的免疫逃逸,因此靶向结肠定点释放 *PD-L1* 应当是未来治疗 UC 的潜在新方向。

参考文献:

[1] NG S C, SHI H Y, HAMIDI N, *et al*. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies[J]. Lancet, 2017, 390(10114): 2769-2778. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)32448-0.

[2] SUN M, HE C, CONG Y, *et al*. Regulatory immune cells in regulation of intestinal inflammatory response to microbiota[J]. Mucosal Immunol, 2015, 8(5): 969-978. DOI: 10.1038/mi.2015.49.

[3] SIAKAVELLAS S I, BAMIAS G. Checkpoint inhibitor colitis: a new model of inflammatory bowel disease?[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2018, 34(6): 377-383. DOI: 10.1097/MOG.0000000000000482.

[4] FREEMAN G J, LONG A J, 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. DOI: 10.1084/jem.192.7.1027.

[5] PINCHUK I V. PD-1 ligand expression by human colonic myofibroblasts/fibroblasts regulates CD4+ T-cell activity[J]. Gastroenterology, 2008, 135(4): 1228-1237.e2. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.07.016.

[6] WU W, SUN M M, ZHANG H P, *et al*. Prolactin mediates psychological stress-induced dysfunction of regulatory T cells to facilitate intestinal inflammation[J]. Gut, 2014, 63(12): 1883-1892. DOI: 10.1136/gutjnl-2013-306083.

[7] KEIR M E, BUTTE M J, FREEMAN G J, *et al*. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity[J]. Annu Rev Immunol, 2008, 26: 677-704. DOI: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.

[8] CHULKINA M, BESWICK E J, PINCHUK I V. Role of PD-L1 in gut mucosa tolerance and chronic inflammation[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(23): 9165. DOI: 10.3390/ijms21239165.

[9] CASSOL C A, OWEN D, KENDRA K, *et al*. Programmed cell death-1 (PD-1) and programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in PD-1 inhibitor-associated colitis and its mimics[J]. Histopathology, 2020, 77(2): 240-249. DOI: 10.1111/his.14115.

[10] NGUYEN J, FINKELMAN B S, ESCOBAR D, *et al*. Overexpression of programmed death ligand 1 in refractory inflammatory bowel disease[J]. Hum Pathol, 2022, 126: 19-27. DOI: 10.1016/j.humpath.2022.04.011.

[11] NAKAZAWA A, DOTAN I, BRIMNES J, *et al*. The expression and function of costimulatory molecules B7H and B7-H1 on colonic epithelial cells[J]. Gastroenterology, 2004,126(5): 1347-1357. DOI: 10.1053/j.gastro.2004.02.004.

[12] LIU Y J, TANG B, WANG F C, *et al*. Parthenolide ameliorates colon inflammation through regulating Treg/Th17 balance in a gut microbiota-dependent manner.[J]. Theranostics. 2020; 10(12): 5225-5241. DOI: 10.7150/thno.43716.

[13] AKHTAR M, RASHID S, AL-BOZOM I A. PD-L1 immunostaining: what pathologists need to know[J]. Diagn Pathol, 2021, 16(1): 94. DOI: 10.1186/s13000-021-01151-x.

[14] YANG Z Y, WU G C, ZHANG X, *et al*. Current progress and future perspectives of neoadjuvant anti-PD-1/PD-L1 therapy for colorectal cancer[J]. Front Immunol, 2022, 13: 1001444. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1001444.

[15] BOPANNA S, ANANTHAKRISHNAN A N, KEDIA S, *et al*. Risk of colorectal cancer in Asian patients with ulcerative colitis: a systematic review and meta-analysis[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2017, 2(4): 269-276. DOI: 10.1016/S2468-1253(17)30004-3.

[16] SELINGER C P, ANDREWS J M, TITMAN A, *et al*. Long-term follow-up reveals low incidence of colorectal cancer, but frequent need for resection, among Australian patients with inflammatory bowel disease[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2014, 12(4): 644-650. DOI: 10.1016/j.cgh.2013.05.017.

[17] SCHULER C, FOTI F, PERREN L, *et al*. Deletion of Smad7 ameliorates intestinal inflammation and contributes to fibrosis[J]. Inflamm Bowel Dis, 2022, izac221: ibd. DOI: 10.1093/ibd/izac221.

[18] GARO L P, AJAY A K, FUJIWARA M, *et al*. Smad7 controls immunoregulatory PDL2/1-PD1 signaling in intestinal inflammation and autoimmunity[J]. Cell Rep, 2019, 28(13): 3353-3366.e5. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.07.065.

[19] EICHELE D D, KHARBANDA K K. Dextran sodium sulfate colitis murine model: an indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(33): 6016-6029. DOI: 10.3748/wjg.v23.i33.6016.

[20] XU H M, ZHOU Y L, XU J, *et al*. Inhibition of PD-1 protects against TNBS-induced colitis via alteration of enteric microbiota[J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 4192451. DOI: 10.1155/2021/4192451.

[21] CURIEL T J, WEI S, DONG H D, *et al*. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity[J]. Nat Med, 2003, 9(5): 562-567. DOI: 10.1038/nm863.

[22] SONG M Y, HONG C P, PARK S J, *et al*. Protective effects of Fc-fused PD-L1 on two different animal models of colitis[J]. Gut, 2015, 64(2): 260-271. DOI: 10.1136/gutjnl-2014-307311.

[23] CHASSAING B, KUMAR M, BAKER M T, *et al*. Mammalian gut immunity[J]. Biomed J, 2014, 37(5): 246-258. DOI: 10.4103/2319-4170.130922.

[24] YAMADA A, ARAKAKI R, SAITO M, *et al*. Role of regulatory T cell in the pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(7): 2195-2205. DOI: 10.3748/wjg.v22.i7.2195.

[25] FRANCISCO L M, SALINAS V H, BROWN K E, *et al*. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells[J]. J Exp Med, 2009, 206(13): 3015-3029. DOI: 10.1084/jem.20090847.

[26] VAN DER VEEKEN J, CAMPBELL C, PRITYKIN Y, *et al*. Genetic tracing reveals transcription factor Foxp3-dependent and Foxp3-independent functionality of peripherally induced Treg cells[J]. Immunity, 2022, 55(7): 1173-1184.e7. DOI: 10.1016/j.immuni.2022.05.010.

[27] HARRISON O J, SRINIVASAN N, POTT J, *et al*. Epithelial-derived IL-18 regulates Th17 cell differentiation and Foxp3$^+$ Treg cell function in the intestine[J]. Mucosal Immunol, 2015, 8(6): 1226-1236. DOI: 10.1038/mi.2015.13.

[28] JIANG Z Q, WU C. Reciprocal interactions between regulatory T cells and intestinal epithelial cells[J]. Front Immu-

nol, 2022, 13: 951339. DOI: 10.3389/fimmu.2022.951339.

[29] KONKEL J E, ZHANG D F, ZANVIT P, *et al*. Transforming growth factor-β signaling in regulatory T cells controls T helper-17 cells and tissue-specific immune responses[J]. Immunity, 2017, 46(4): 660-674. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.03.015.

[30] CAO H, DIAO J, LIU H, *et al*. The pathogenicity and synergistic action of Th1 and Th17 cells in inflammatory bowel diseases[J]. Inflamm Bowel Dis, 2022: 2022Sep27; izac199. DOI: 10.1093/ibd/izac199.

[31] ALIYU M, ZOHORA F T, ANKA A U, *et al*. Interleukin-6 cytokine: an overview of the immune regulation, immune dysregulation, and therapeutic approach[J]. Int Immunopharmacol, 2022, 111: 109130. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.109130.

[32] YASUDA K, TAKEUCHI Y, HIROTA K. The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases[J]. Semin Immunopathol, 2019, 41(3): 283-297. DOI: 10.1007/s00281-019-00733-8.

[33] LEE J Y, HALL J A, KROEHLING L, *et al*. Serum amyloid A proteins induce pathogenic Th17 cells and promote inflammatory disease[J]. Cell, 2020, 180(1): 79-91.e16. DOI: 10.1016/j.cell.2019.11.026.

[34] WU B, ZHANG S, GUO Z L, *et al*. The TGF-β superfamily cytokine activin-A is induced during autoimmune neuroinflammation and drives pathogenic Th17 cell differentiation [J]. Immunity, 2021, 54(2): 308-323.e6. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.12.010.

[35] ALFEN J S, LARGHI P, FACCIOTTI F, *et al*. Intestinal IFN-γ-producing type 1 regulatory T cells coexpress CCR5 and programmed cell death protein 1 and downregulate IL-10 in the inflamed guts of patients with inflammatory bowel disease[J]. J Allergy Clin Immunol, 2018, 142(5): 1537-1547.e8. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.12.984.

[36] BRAND S, BEIGEL F, OLSZAK T, *et al*. IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006, 290(4): G827-G838. DOI: 10.1152/ajpgi.00513.2005.

[37] HUBER S, GAGLIANI N, ZENEWICZ L A, *et al*. IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine[J]. Nature, 2012, 491(7423): 259-263. DOI: 10.1038/nature11535.

[38] MAO K R, BAPTISTA A P, TAMOUTOUNOUR S, *et al*. Innate and adaptive lymphocytes sequentially shape the gut microbiota and lipid metabolism[J]. Nature, 2018, 554(7691): 255-259. DOI: 10.1038/nature25437.

[39] WU D, HU L N, HAN M W, *et al*. PD-1 signaling facilitates activation of lymphoid tissue inducer cells by restraining fatty acid oxidation[J]. Nat Metab, 2022, 4(7): 867-882. DOI: 10.1038/s42255-022-00595-9.

(收稿:2022-10-13;修回:2022-12-06)

(编辑 栾 嘉)