

OLP 患者外周血 T 细胞 B7-H1 及 PD-1 的表达情况及与疾病状态的关系研究

任莉¹ 韩杰¹ 徐明明² 王隽^{1*}

(1. 北京华信医院(清华大学第一附属医院)口腔科 北京 100016;

2. 北京大学口腔医院特诊科 北京 100101)

[摘要] 目的:通过检测口腔扁平苔藓(oral lichen planus, OLP)患者外周血 T 细胞 B7-H1 及 PD-1 的表达情况及与疾病状态的关系,以此来探讨 B7-H1/PD-1 信号通道在 OLP 患者 T 细胞免疫中的作用。方法:选择 22 例 OLP 患者,12 例健康成人作为对照。应用 REU 计分系统及视觉模拟评分法(VAS)对 OLP 患者的疾病状态进行计分。密度梯度离心法分离 OLP 组和对照组外周血中的单个核细胞,流式细胞术检测单个核细胞中 T 细胞表面 B7-H1 及 PD-1 的表达水平。贴壁法去除单核细胞后,将 OLP 患者的淋巴细胞与健康成人淋巴细胞混合培养,加入抗 B7-H1 单克隆抗体阻断 B7-H1/PD-1 信号通道,培养 5 d 后应用 XTT 方法检测细胞增殖情况。结果:CD₃⁺B7-H1⁺、CD₃⁺PD-1⁺ 的表达百分率在 OLP 和正常对照组之间存在有明显差异($P < 0.05$)。CD₃⁺B7-H1⁺ 在 OLP 组的表达水平与疾病状态计分正相关($P = 0.002$),而 CD₃⁺PD-1⁺ 的表达水平与疾病的临床状态计分无关($P = 0.537$)。在混合淋巴细胞培养中,使用抗 B7-H1 单克隆抗体阻断 B7-H1/PD-1 信号通道后,淋巴细胞增殖情况与对照组无明显差异($P > 0.05$)。结论:OLP 患者外周血 T 细胞中的 CD₃⁺B7-H1⁺、CD₃⁺PD-1⁺ 很可能参与了 OLP 的发病;CD₃⁺B7-H1⁺ 对 OLP 的疾病进展可能产生一定作用。

[关键词] 口腔扁平苔藓 B7-H1/PD-1 信号通道 T 细胞 混合淋巴细胞培养

[中图分类号] R781.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-7651(2017)12-1319-04

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2017.12.020

Expression of B7-H1 and PD-1 on Peripheral Blood T Cells in OLP Patients and Its Correlation with Disease. REN Li¹, HAN Jie¹, XU Ming-ming², WANG Jun¹. 1. Department of Stomatology, Beijing Huaxin Hospital, Beijing 100016, China; 2. Department of Specialty, Peking University Hospital of Stomatology, Beijing 100081, China.

[Abstract] **Objective:** To compare the expression of B7-H1 and PD-1 on peripheral blood T cells in oral lichen planus (OLP) patients and controls, and to explore its relationship with the disease. **Methods:** Twenty-two patients of OLP and twelve healthy adults were chosen. The scores of OLP disease activity were assessed according to the REU scoring system and the visual analogue scale (VAS) as described in the previous studies. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient centrifugation. The expression of B7-H1 and PD-1 on T cells in PBMCs were tested by two-color flow cytometry. After monocyte cells were removed by adhesion, the lymphocyte cells of OLP patients and controls were mixed for culture using anti-B7-H1 mAbs to block the B7-H1/PD-1 pathway, then the proliferation of lymphocyte cells were detected through XTT method after 5 days. **Results:** Significant differences were found among OLP patients and controls in the expression of B7-H1 and PD-1 on T cells ($P < 0.05$). The expression of B7-H1 on T cells in OLP positively associated with the disease activity score ($P = 0.002$). However, there had no relationship between the expression of PD-1 on T cells and the disease activity score in OLP ($P = 0.537$). After blocking the B7-H1/PD-1 pathway with anti-B7-H1 mAbs, the proliferation of T cells was not significant different between the control group and the OLP group after mixed lymphocyte cell cultures ($P > 0.05$). **Conclusion:** The results indicated that B7-H1 and PD-1 might play important

roles in the pathogenesis of OLP. B7-H1 in T cells might relate with the progression of OLP disease.

[Key words] Oral lichen planus B7-H1/PD-1 pathway T cells Mixed lymphocyte culture

作者简介 任莉(1982~),女,甘肃人,学士,主治医师,主要从事口腔科临床治疗工作。

* 通讯作者 王隽,电话:1777788884

尽管目前口腔扁平苔藓(oral lichen planus, OLP)的病因尚未明确,但已有许多研究表明,OLP是一种T细胞介导的自身免疫性疾病^[1]。目前为止,国内外关于B7-H1/PD-1信号通道在口腔扁平苔藓方面的研究还很少,且已有研究均没有显示B7-H1/PD-1信号通道与OLP临床特征之间是否存在联系。因此本研究通过检测OLP患者外周血中B7-H1及PD-1表达水平的变化,探讨其与OLP临床特征间的关系,并观察在阻断B7-H1/PD-1信号通道后T细胞增殖能力是否发生改变,进而推测其在OLP发病中的作用,从而提供一种新的更有效治疗OLP的思路及方法。

1 材料与方法

1.1 材料 主要试剂:人淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限责任公司);磷酸盐缓冲液(实验室自配);胎牛血清(HyClone公司,美国);改良型RPMI-1640培养基(HyClone公司,美国);异硫氰酸基荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的抗人CD3单抗(FITC anti-humanCD3);藻红蛋白(Phycoerythrin, PE)标记的抗人CD3单抗(PE anti-humanCD3),藻红蛋白(Phycoerythrin, PE)标记的抗人B7-H1单抗(PE anti-humanB7-H1),藻红蛋白(Phycoerythrin, PE)标记的抗人PD-1单抗(PE anti-humanPD-1),纯化抗人B7-H1单抗(purified anti-human B7-H1)。(Biolegend公司,美国);XTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(凯基生物,中国南京)。研究对象:OLP患者22例,均来自于本院口腔科门诊,男8例,女14例,年龄32~61岁,平均年龄(47.18±7.37)岁,病程1~36个月。所有病例经临床及病理检查证实,均符合WHO关于OLP诊断标准。患者均无全身系统性疾病,近3个月内未接受任何局部或全身免疫治疗。12例健康成人为对照组,男5例,女7例,年龄25~62岁,平均年龄(45.25±11.76)岁。经T检验和方差分析性别无差异($P > 0.05$),年龄具有统计学差异($P = 0.001$)。该实验均在患者和健康志愿者知情同意的情况下进行。

1.2 方法

1.2.1 根据疾病状态进行计分,采集标本 分别应用REU计分系统(表1)及VAS(visual analogue scale)评分法对OLP患者临床表现进行评估,再测算疾病临床状态。采用VAS评分法对记录疼痛程度,操作方法:用一条长10 cm直线,两端分别标上0和10,0表示无痛,10表示想象中的最剧烈疼痛。

操作者用棉签在OLP病损充血溃疡区轻轻摩擦,向患者介绍VAS含义及与疼痛的关系,让患者根据自己所感受的疼痛程度,在直线上某一点作标记,以表示疼痛的强度,记录从起点至记号处的长度,即VAS疼痛指数。无菌条件下采集OLP组及正常对照组外周静脉血5 ml,肝素抗凝,待用。

表1 REU计分系统

Table 1 REU scoring system

临床表现	计分
斑纹或过度角化(R)	0=无白色条纹; 1=有白色条纹或者角化丘疹
充血发红(E)	0=无病损;1=病损<100 mm ² ; 2=病损在100 mm ² 和300 mm ² 之间;3=病损>300 mm ²
溃疡糜烂(U)	0=无病损;1=病损<100 mm ² ;2=病损在100 mm ² 和300 mm ² 之间;3=病损>300 mm ²
总分	$\Sigma R + \Sigma(E \times 1.5) + \Sigma(U \times 2.0)$

1.2.2 B7-H1和PD-1表达的检测 取5只离心管,做标记后加样:A管:加入20 μ L FITC-anti-human-CD₃+20 μ L PE-anti-human-B7-H1+100 μ L细胞悬液;B管:加入20 μ L FITC-anti-human-CD₃+20 μ L PE-anti-human-PD-1+100 μ L细胞悬液;C管:加入20 μ L FITC-anti-human-CD₃+100 μ L细胞悬液;D管:加入20 μ L PE-anti-human-CD₃+100 μ L细胞悬液;E管:加入100 μ L细胞悬液,以上各管混匀后,室温避光孵育20 min。各管加入PBS 2 mL,洗涤,离心1000 r/min,5 min,弃上清。加入0.5 mL 1%多聚甲醛固定混匀后上流式细胞仪检测。

1.2.3 混合淋巴细胞培养 剩余细胞用含10%胎牛血清(FBS)的RPMI-1640细胞培养液培养1.5 h,去除贴壁细胞,调整细胞浓度,OLP组调整为 1×10^5 /mL,正常对照组为 2×10^5 /mL。96孔板中混合淋巴细胞培养1组:100 μ L OLP组细胞悬液+1 μ L抗B7-H1单抗,培养30 min后,加入100 μ L正常对照组细胞悬液;二组:100 μ L OLP组细胞悬液+100 μ L正常对照组细胞悬液;3组:200 μ L正常对照组细胞悬液(浓度 1.5×10^5 /mL);4组:200 μ L RPMI-1640完全培养液;每组各设3个复孔。将96孔板放入培养箱内培养5 d(按分组加入刺激因子),培养结束前4 h加入XTT工作液,培养结束后上酶标仪检测各孔A₄₅₀值。

1.3 统计学处理 所有数据均采用SPSS13.0统计软件进行统计学分析。结果以均数±标准差表示,各组数据经方差齐性检验(Levene检验),分析

各组数据方差齐性后,数据采用样本均数 *t* 检验或 ANOVAS-N-K 检验;相关性分析采用 Pearson 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常对照组及 OLP 组 $CD_3^+ B7-H1+$ 、 $CD_3^+ PD-1+$ 的表达百分率 如表 2 所示,OLP 患者和正常对照组外周血单个核细胞 $CD_3^+ B7-H1+$ 及 $CD_3^+ PD-1+$ 的表达存在有显著差异 ($P < 0.05$)。提取 PBMC,加入 FITC-anti-CD3 及 PE-anti-human-B7-H1 或 PE-anti-human-PD-1,上机进行流式分析。结果显示 $CD_3^+ B7-H1+$ 、 $CD_3^+ PD-1+$ 的表达百分率在 OLP 和正常对照组之间存在有明显差异 ($P < 0.05$)。

表 2 $CD_3^+ B7-H1+$ 、 $CD_3^+ PD-1+$ 表达结果

Table 2 Expression of $CD_3^+ B7-H1+$ and $CD_3^+ PD-1+$ $\bar{x} \pm s$

项目	OLP	Control
$CD_3^+ B7-H1+/\%$	22.20 ± 16.43	12.08 ± 9.49
$CD_3^+ PD-1+/\%$	18.66 ± 12.91	10.12 ± 4.48

注: $P < 0.05$

2.2 OLP 组 $CD_3^+ B7-H1+$ 、 $CD_3^+ PD-1+$ 表达水平与疾病状态计分的关系 如图 1 所示, CD_3^+

$B7-H1+$ 在 OLP 组的表达水平与疾病状态计分呈明显正相关 (相关系数 $r = 0.615, P = 0.002$), 而 $CD_3^+ PD-1+$ 的表达水平与疾病的临床状态计分无关 (相关系数 $r = 0.139, P = 0.537$)。 $CD_3^+ B7-H1+$ 表达水平与疾病计分成正相关 (相关系数 $r = 0.615, P = 0.002$), 而 $CD_3^+ PD-1+$ 表达水平与疾病状态计分无关 (相关系数 $r = 0.139, P = 0.537$)。

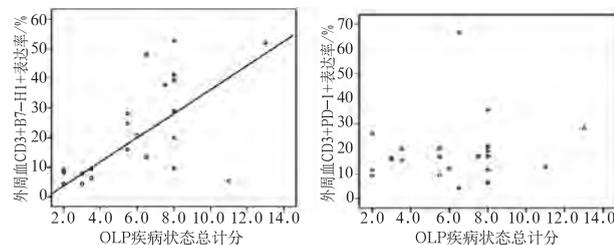


图 1 OLP 组 $CD_3^+ B7-H1+$ 、 $CD_3^+ PD-1+$ 表达水平与疾病状态计分的关系散点图

Fig. 1 Scatter diagram of the relationship between $CD_3^+ B7-H1+$ and $CD_3^+ PD-1+$ expression levels and disease status score

2.3 抗-B7-H1 单克隆抗体对混合淋巴细胞培养(MLC)T 细胞增殖的影响 各组间无显著差异 ($P > 0.05$)。因此,使用抗 B7-H1 单克隆抗体阻断 B7-H1/PD-1 信号通道后,淋巴细胞增殖情况与对照组无明显差异,见表 3。

表 3 抗-B7-H1 单克隆抗体对混合淋巴细胞培养(MLC)T 细胞增殖的影响

Table 3 Effect of anti-B7-H1 monoclonal antibody on proliferation of mixed lymphocyte cultures (MLC) T cells $\bar{x} \pm s$

项目	1 组	2 组	3 组	4 组
A_{450} 值	0.454 ± 0.065	0.456 ± 0.076	0.457 ± 0.099	0.433 ± 0.083
增值抑制率/%	28.53 ± 2.26	29.32 ± 1.69	27.32 ± 2.58	27.62 ± 2.24

3 讨论

在对肿瘤动物模型的研究中发现,阻断 B7-H1 也可以对患癌动物的长期生存率产生影响,这说明阻断 B7-H1 可能能够改善记忆免疫反应的发展过程^[2]。当 B7-H1/PD-1 通道被阻断时,实验小鼠体内的肿瘤加速消失,对黑色素瘤细胞株及结肠癌细胞株的研究显示,阻断 B7-H1 还可以抑止肿瘤的转移^[3]。在慢性淋巴球性脑膜脉酪膜炎病毒(LCMV)感染的小鼠体内发现了失去功能的病毒特异性 T 细胞,有学者^[4]通过进行全基因微点阵的对比分析发现,这些失去功能的 LCMV 特异性 CD_8^+ T 细胞最显著上调了 PD-1 基因,同时他们注意到,B7-H1 在感染小鼠脾细胞上大量表达。

有学者认为,OLP 的发病机理可能是有活化的朗格汉斯细胞和角质形成细胞参与的 T 细胞介导

的免疫过程。Pornpan^[5] 等通过多色荧光染色技术研究发现,PD-1 在 OLP 病损组织局部浸润 T 细胞及巨噬细胞中大量表达,B7-H1 则表达在接近 T 细胞浸润区的上皮和上皮内的淋巴细胞以及角质形成细胞上。有学者通过多色荧光染色技术研究发现,PD-1 和 B7-H1 在 OLP 上皮浸润区的 T 细胞和巨噬细胞以及上皮内淋巴细胞上高表达,此外,B7-H1 在邻近上皮 T 细胞浸润的角质形成细胞上也大量表达。

目前检测到大多数的人恶性肿瘤细胞表面高表达 B7-H1,但是在小鼠和人类肿瘤细胞系中却检测到 B7-H1 低表达甚至很少表达,这可能是因为在体外细胞系培养时缺乏机体内的完全的肿瘤微环境,免疫调节的失衡会影响肿瘤微环境中肿瘤特异性 T 细胞的免疫功能^[6]。Fumihiko^[7] 等通过免疫

组化的实验方法发现,口腔鳞状细胞癌细胞 B7-1/H1 染色呈显著阳性,在肿瘤细胞的质膜及细胞质中发现有 B7-1/H1 的表达。因此,阻断肿瘤细胞的 B7-1/H1/PD-1 途径有望成为一种治疗肿瘤的新型有效方法。本实验从 B7-1/H1/PD-1 信号通道的角度对 OLP 的发病机制进行了探讨。本文运用流式细胞术的方法检测了 22 例 OLP 患者和 12 例健康对照者外周血单个核细胞(PBMC)中 T 细胞 B7-1/H1、PD-1 的表达状况,结果显示,CD₃⁺ B7-1/H1⁺、CD₃⁺ PD-1⁺ 的表达百分率在 OLP 和正常对照组之间存在有明显差异($P < 0.05$)。这说明 T 细胞中的 B7-1/H1、PD-1 很可能参与了 OLP 疾病的发生。这与之前外国学者所做相关研究结果一致。为进一步探明 T 细胞表面 B7-1/H1、PD-1 的表达是否与 OLP 患者的临床病情状态相关,CD₃⁺ B7-1/H1⁺ 在 OLP 组的表达水平与疾病状态计分正相关($P = 0.002$),而 CD₃⁺ PD-1⁺ 的表达水平与疾病的临床状态计分无关($P = 0.537$)。这表明与 PD-1 相比,OLP 患者外周血 T 细胞 B7-1/H1 的表达水平与病情关系更为密切。

在慢性炎症过程中,效应 T 细胞分泌细胞因子(如 IFN- γ 、IL-4、TNF- α 等)增多,如炎症来源未被及时消除,则一些细胞因子会诱导上调 T 细胞及靶细胞表面 B7-1/H1、PD-1 的表达水平,因此,B7-1/H1/PD-1 信号通道可能会发挥其抑制作用,延迟 T 细胞应答,产生慢性炎症性免疫反应,造成病情反复^[8]。有学者^[9]在对 OLP 患者病损组织渗出液的研究中发现,TNF- α 、IL-1- α 、IL-6、IL-8 分泌水平显著增高。因此,OLP 患者细胞因子的变化可能与 B7-1/H1/PD-1 信号通道的功能发挥有密切联系。而 PD-1 除了 B7-1/H1 外还有另一个配体 B7-DC(PD-L2),通过本实验,可以推测得知,B7-DC/PD-1 信号通道与 B7-1/H1/PD-1 信号通道在 OLP 的发病机制中可能表达及作用不尽相同,因此,与 PD-1 相比,OLP 患者 T 细胞 B7-1/H1 的表达水平与病情关系更为密切。

有研究认为,B7-1/H1 通过一个未知受体(B7-1/H1R)共刺激 naïve 或 primed T 细胞及静止的记忆性 CD₄⁺ T 细胞增殖并促进细胞因子(如 IL-10)的产生,而对已活化的 T 细胞,B7-1/H1 则通过 B7-1/H1/PD-1 信号通道发挥抑制 T 细胞作用。本文可以推测,OLP 患者与健康成人的外周血淋巴细胞表面的 B7-1/H1 分子很可能通过不同的受体通道,

发挥不同的细胞调节作用。而其具体作用过程及机制则需进一步实验来证明。OLP 虽然是一种发生于口腔黏膜局部的疾病,但是许多研究表明,OLP 患者全身的免疫状态存在异常^[10]。

综上所述,本文研究从分子水平上检测了共刺激分子 B7-1/H1、PD-1 在 OLP 患者外周血的表达状况,并进一步探讨了 B7-1/H1、PD-1 在 OLP 患者的表达情况与其疾病严重程度的关系,初步研究了 B7-1/H1 分子在 OLP 中对淋巴细胞增殖情况的作用,对揭示 OLP 的免疫机制具有一定的理论意义。一些体外实验及动物模型的研究表明,阻断 B7-1/H1/PD-1 信号通道可对多种疾病达到治疗效果,因此对 B7-1/H1/PD-1 信号通道的深入研究可能成为有效治疗 OLP 提供一种新的思路。

参考文献

- [1] 刘红梅,王翎,张光波,等.共刺激分子 B7-1/H1 对小鼠髓源性抑制细胞免疫抑制功能的调节作用[J].中华老年医学杂志,2014,33(2):197-200
- [2] 张小玲,王国恩,张军,等.PD-L1 及 CD86 在脓毒症小鼠外周血单核细胞中的表达趋势[J].中国急救医学,2015,(10):950-953.
- [3] 翁志宏,叶翩,张淑玲,等.阻断程序性死亡蛋白-1 及其配体信号通路增强慢性乙型肝炎病毒感染小鼠的抗病毒免疫[J].中华肝脏病杂志,2010,18(4):263-266
- [4] 诸葛欣,孙宁,王丽莉,等.程序性死亡受体 1 缺乏对动脉粥样硬化性免疫反应的影响[J].中华医学杂志,2014,94(30):2377-2381
- [5] Youngnak-Piboonratanakit P, Tsushima F, Otsuki N, et al. The expression of B7-1/H1 on keratinocytes in chronic inflammatory mucocutaneous disease and its regulatory role[J]. Immunol Lett,2004,94(3):215-222
- [6] 李晓英.Treg 细胞与肿瘤免疫的关系[J].重庆医学,2016,45(25):3567-3570
- [7] Tsushima F, Tanaka K, Otsuki N, et al. Predominant expression of B7-1/H1 and its immunoregulatory roles in oral squamous cell carcinoma [J]. Oral Oncol,2006,42(3):268-74
- [8] 张弘,张英.口腔扁平苔藓组织中 STATs 家族表达与外周血 PD-1、PD-L1 表达及免疫功能的相关性[J].海南医学院学报,2016,22(24):3101-3104
- [9] 刘洋,金建秋,袁振芳,等.2 型糖尿病伴口腔扁平苔藓患者唾液白细胞介素-6 和肿瘤坏死因子- α 水平[J].北京大学学报(医学版),2011,43(4):596-599
- [10] 吴伟,宣璐,李幼华,等.口腔扁平苔藓免疫功能变化观察及其意义[J].现代实用医学,2009,21(11):1242,1244

[收稿日期:2017-06-28]

(本文编辑 汪喻忠)