

阻断巨噬细胞介导的 PD1/PD-L1 通路对小鼠结核复发的抑制作用

孙萌萌, 秦 川, 唐 军, 占玲俊*

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 卫计委人类疾病比较医学重点实验室, 新发再发传染病动物模型研究北京市重点实验室, 北京市人类重大疾病实验动物模型, 中国医学科学院结核病中心, 北京 100021)

【摘要】 目的 利用功能性 PD-L1 (programmed cell death ligand-1, PD-L1) 单抗阻断巨噬细胞介导的 PD1/PD-L1 通路, 研究其对小鼠结核治疗后复发的免疫干预作用和机制。**方法** 10^6 CFU H37Rv 经尾静脉感染 C57BL/6 雌性小鼠获得结核的急性感染, 两周之后分别给予异烟肼 (10 mg/kg) 和异烟肼联合 PD-L1 单抗 (每只 50 μ g) 连续治疗四周, 获得潜伏感染, 在潜伏期用 TNF- α 抗体 (每只 50 μ g) 诱导四周使其复发。通过对各时间点的肺、脾和肝组织病理及荷菌量的定量分析, 探讨 PD-L1 单抗对小鼠活动性结核及结核复发的干预作用。利用体外实验, 进一步阐明敲低 PD-L1 对结核菌感染的巨噬细胞凋亡的影响。**结果** 小鼠感染后, 前两周肺、脾和肝荷菌量较高 (3 ~ 4 Lg CFU/mL)、肉芽肿病变较重, 表现为活动性结核, 异烟肼和异烟肼联合 PD-L1 单抗分别治疗四周之后, 肺、脾和肝荷菌量均较模型对照组显著性地降低, 肉芽肿样病变也显著减轻, 但是两个治疗组之间没有显著性的差异。而在复发期, 相比较于异烟肼治疗组, 异烟肼联合 PD-L1 单抗治疗组能够显著降低复发期组织荷菌量, 减轻病理病变。体外实验证实: 用 PD-L1 抗体或 siRNA 敲低巨噬细胞上 PD-L1, 结果发现二者都能促进结核感染的巨噬细胞凋亡。**结论** 功能性的 PD-L1 抗体可以抑制结核复发, 敲低巨噬细胞上 PD-L1 或阻断 PD1/PD-L1 通路能促进巨噬细胞凋亡, 提示阻断 PD-L1 能够有效的协助异烟肼治疗结核病, 并且显著地抑制结核的复发。

【关键词】 PD-L1 抗体干预; 小鼠结核模型; 结核复发; 巨噬细胞凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 04-0050-09

doi: 10. 3969/j. issn. 1671 - 7856. 2018. 04. 009

Blockage of macrophage-mediated PD1/PD-L1 pathways inhibits tuberculosis relapse in mice

SUN Mengmeng, QIN Chuan, TANG Jun, ZHAN Lingjun*

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Key Laboratory of Human Disease Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Beijing Key Laboratory for Animal Models of Emerging and Reemerging Infections; Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Diseases; Tuberculosis (TB) Center, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China)

【基金项目】 中央级公益性事业单位院基本业务费 (2016ZX310183-2); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2016-I2M-1-031)。

【作者简介】 孙萌萌 (1992—), 女, 硕士研究生, 专业: 病理学与病理生理学。E-mail: 13011825389@163.com

【通信作者】 占玲俊, 副教授, 硕士生导师。E-mail: zhanlj@cnilas.org

【Abstract】 Objective To study the immune intervention effect and mechanism of blockage of macrophage-mediated PD1/PD-L1 pathways with functional PD-L1 (programmed cell death ligand-1, PD-L1) monoclonal antibody upon tuberculosis (TB) relapse in mice. **Methods** Female C57BL/6 mice were infected by tail vein injection of 10^6 CFU *M. tuberculosis* H37Rv to obtain active TB infection. Two weeks postinfection, the mice in different groups were administered isoniazid (10 mg/kg) (group ISO) and isoniazid combined with PD-L1 monoclonal antibody (50 μ g/each) (group ISO + PD-L1) respectively, continued for four weeks to obtain latent infection. The subsequent relapse was monitored. Among the treatment groups, the TB relapse was induced by TNF- α antibody (50 μ g/each) for four weeks from the beginning of latent stage. At each scheduled time point, bacterial loads and pathological changes in the lung, spleen and liver were quantitatively analyzed, thereby, the *in vivo* intervention effect of PD-L1 monoclonal antibody on tuberculosis recurrence in mice was revealed. The *in vitro* experiment was further explored whether knock-down the expression of PD-L1 on the infected macrophages could accelerate the macrophage apoptosis. **Results** The bacterial burden reached 3–4 Lg (CFU/mL), and granuloma lesions were extensive in the lung, spleen and liver in the all infected groups, which appeared as active TB stage at 2nd week postinfection. After treated, the bacterial burden of the lung, spleen and liver was decreased, and the pathological lesions alleviated in the group ISO and group ISO + PD-L1, compared with the model control group, showing significant differences, but there was no significant difference between the two treatment groups. However, compared with the group ISO, the group ISO + PD-L1 had a significantly lower bacterial load and milder pathological lesions during the relapse period. Furthermore, knock-down the expression of PD-L1 on macrophages with anti-PD-L1 or PD-L1-siRNA promoted apoptosis in macrophages. **Conclusions** Blockade of the PD1/PD-L1 pathway by PD-L1 functional antibody can inhibit TB relapse in mice, and knock-down the expression of PD-L1 on macrophages or PD1/PD-L1 pathway with functional antibody can promote apoptosis in macrophages, which together indicate that PD-L1 blockage can effectively promote isoniazid treatment of TB and remarkably inhibit the recurrence of TB in mice.

【Key words】 blockade with PD-L1 functional antibody; mice model of tuberculosis; tuberculosis relapse; macrophage apoptosis

结核病是危害人类健康的重要传染病,根据 WHO (World Health Organization, WHO) 报告^[1], 2015 年全球新发结核病 (tuberculosis, TB) 数量约为 1040 万例,有 140 万人死于结核病。我国每年复发肺结核病患者占新发肺结核患者的 15%~20%,而复治肺结核中发展成耐药结核的比例约为 35%~55%^[2]。临床上结核治疗后复发和耐药的情况时有发生,导致结核迁延不愈^[3]是耐药结核产生的主要原因,因而控制结核病的疫情首要任务就是要积极预防结核病的复发。

PD1/PD-L1 通路在某些病毒和细菌感染中^[4-7]发挥作用,PD-1: PD-L1/PD-L2 通路在肿瘤和某些感染性疾病中发挥免疫抑制作用,而在结核病中的免疫作用尚不明确。已有报道^[8-10],菌株 BCG (Bacillus Calmette-Guérin) 和菌株 H37Rv (结核分枝杆菌标准株 H37RV) 感染 PD-1 敲除小鼠的相关体内实验显示出 PD-1/PD-L1 通路相悖的结果。

本研究拟用 PD-L1 单抗或与异烟肼共同作用探究其对于 TNF- α 抗体诱导的结核复发的抑制作用。通过分析小鼠结核病急性感染期和复发期的荷菌量及病理病变,明确 PD-L1 抗体的作用。通过 siRNA 体外敲低结核菌感染的巨噬细胞上 PD-L1 或

用 PD-L1 抗体阻断 PD1/PD-L1 通路,用流式方法检测巨噬细胞凋亡的情况,初步探究巨噬细胞上 PD1/PD-L1 通路在结核发病和复发中的作用及机制,以期能为结核病复发的临床干预提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

菌株和细胞结核分枝杆菌标准株 H37Rv (菌号为 93009) 由中国药品生物制品检定所提供,在中性罗氏培养管中培养,37℃、5% CO₂,培养 4 周后收菌,无菌过滤制成单细胞悬液,分装储存于 -80℃ 低温冰箱。过滤之后的菌液用细菌超声分散计数仪分散均匀,浓度调为 1.0×10^7 CFU/mL。

RAW264.7 细胞系购自赛百慷公司。培养于含 10% 胎牛血清、100 μ mol/mL 青霉素和 100 μ mol/mL 链霉素的 DMEM 培养液中,置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养,调节细胞的传代浓度,每 2 d 传代一次。

1.2 实验动物

SPF 级 C57BL/6 雌性小鼠 28 只,4~6 周龄,体重 12~14 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK(京)2016-0011], [SYXK(京)2011-

0022]。实验动物的使用得到了中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用和管理委员会的批准(批准号:ZLJ16001),实验在中国医学科学院医学实验动物研究所生物安全 3 级实验室(国卫 ABSL3-059)进行。动物在感染 1 周前进入生物安全 3 级实验室适应。

1.3 主要试剂与仪器

分枝杆菌中性罗氏培养管(珠海贝索生物技术有限公司,中国);Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(BD 公司,美国);Annexin V-PE/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒(BD 公司,美国);LEAF™ Purified Anti-Mouse CD274(B7-H1)(Biolegend,美国);LEAF™ Purified Anti-Mouse TNF- α (Biolegend)、Isoniazid(Sigma,美国);CD274(B7-H1)PE(eBioscience,美国);流式细胞仪(BD 公司,美国);NanoZoomer S60 明场荧光切片扫描仪(日本);细菌超声分散计数仪(广东体必康生物科技有限公司,中国);siRNA(广州锐博,AGAcGuAAGcAGuGuuGAA GATATTGCTGTCTTTATA)。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组

实验分为 A 组:感染对照组、B 组:异烟肼治疗组、C 组:异烟肼 PD-L1 抗体协同治疗组、D 组:TNF- α 诱导复发组、E 组:异烟肼协同 PD-L1 抗体自然复发组、F 组:异烟肼自然复发组。

1.4.2 动物感染和取材

以 1.0×10^7 CFU/mL 的 H37Rv 100 μ L/只尾静脉感染 C57BL/6 小鼠,两周之后分别给予异烟肼(10 mg/kg),异烟肼联合 PD-L1 单抗(每只每周 50 μ g)连续治疗四周,之后 TNF- α 抗体(每只每周 50 μ g)诱导四周。每个时间点各组分别取 4 只小鼠脱颈椎处死,解剖取脾脏、肺脏、肝脏组织进行荷菌量的检测和病理分析。

1.4.3 组织荷菌量检测

取左侧肺组织、脾头 1/3 及肝腹背部的小叶,组织研磨匀浆。匀浆液用生理盐水按照 1:10 的比例进行梯度稀释,分别取 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 三个稀释度的组织稀释液 50 μ L,接种于分枝杆菌中性罗氏培养管,每个梯度各接种 2 管,37℃、5% CO₂,培养 3~4 周进行菌落计数。

1.4.4 组织病理分析

余下的脾、肺、肝组织置于 4% 中性甲醛固定液中固定 72 h,脾脏和肝脏组织分别按长轴最大横切面

进行修块,肺组织完整分离小肺叶。组织块经梯度酒精脱水后石蜡包埋,切片厚度为 5 μ m,HE 染色之后,将 HE 片用 NanoZoomer S60 明场荧光切片扫描仪(日本)进行明场半自动扫片,用 VDP. View 2 软件对病变组织进行定量分析。分析单位面积(mm²)的肺组织中肉芽肿面积,单位面积(mm²)脾脏内白髓内肉芽肿的面积,单位面积(mm²)肝脏内肉芽肿个数。

1.4.5 PD-L1 表达的检测方法

用 6 孔板每孔加 2 mL 的 5×10^5 cells 的巨噬细胞悬液,按照 MOI = 1 加 1×10^6 CFU 的 H37Rv,5% CO₂,37℃ 孵育感染 24 h,设置正常对照组和感染组。培养结束后,弃培养液,加入 PBS,1000 r/min 离心 5 min 洗涤细胞 3 遍。收集细胞于 1.5 mL 离心管中,加 200 μ L PBS 重悬,加 PE-PD-L1(eBioscience)流式抗体每孔 2 μ L,室温避光孵育 15 min,标记细胞。上机前 100 μ L 4% 多聚甲醛固定 15 min,用流式细胞仪检测细胞 PD-L1 的表达情况。

1.4.6 PD-L1 对巨噬细胞凋亡的影响

感染当天,取对数生长期的 RAW264.7 细胞 1×10^6 个接种到六孔板,于 5% CO₂、37℃、饱和湿度条件下培养,共 3 个组:对照组 control、实验组 H37RV、PD-L1 + H37Rv,每个处理组设 3 个复孔。第二天加入 PD-L1-siRNA 或 PD-L1 抗体,孵育 1 h 之后加入 H37Rv 感染巨噬细胞,培养 4 h 后消化细胞并收集细胞,加入 PBS 1000 r/min 离心 5 min 洗涤后,将细胞重悬于 400 μ L $1 \times$ binding buffer(BD Pharmingen PE annexin V apoptosis detection kit I, LOT:7026588)中。PD-L1-siRNA 组加入 5 μ L FITC Annexin V 和 5 μ L propidium iodide staining solution(PI)染色;PD-L1 单抗组加入 5 μ L PE annexin V 和 5 μ L 7-AAD 染色。室温避光孵育 15 min,加 400 μ L $1 \times$ binding buffer 到每个管中。每管加 4% 多聚甲醛 200 μ L 固定 15 min,用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.5 统计学方法

采用统计软件 Graphpad Prism 7 进行统计分析。所有数据均采用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。结果采用单因素方差分析(One-way ANOVA), t 检验和 Tukey 检验分析组间差异是否显著, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 小鼠组织荷菌量分析

小鼠在感染 2 周后分别给予异烟肼和异烟肼联

合 PD-L1 进行治疗 4 周后(图 1)相比较 A 组,B, C 组肺、脾、肝脏荷菌量明显减少($P < 0.001$),C 组较之 B 组荷菌量虽有下降,但是差异无显著性。B 和 C 组的小鼠用 TNF- α 抗体诱导四周后(图 1),相比较 F 组,D 组肺、脾、肝荷菌量明显增加($P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.001$);E 组的肝脏和脾脏的荷菌量减少,但是差异无显著性。与 D 组相比,E 组肝脏和脾脏荷菌量显著性减少($P < 0.001$)。

2.2 感染小鼠组织病理变化

感染 2 周治疗 4 周之后(图 3),A 组肝脏病变主要为出现大量散在的小肉芽肿,肉芽肿主要由巨噬细胞、淋巴细胞及少数中性粒细胞构成。脾脏白髓区及红髓区可见主要由巨噬细胞组成的肉芽肿。肺脏可见肉芽肿样病变。病理定量分析(图 2),相比较于 A 组 B、C 组的脾脏病变明显减轻($P < 0.01$),肝脾病变显著减轻($P < 0.01$, $P < 0.001$) (图 2),但是 A 组和 B 组的肝脾病理差异无显著性。TNF- α 抗体诱导四周之后(图 2),D、E 组肝脏、脾脏和肺脏内均可见的肉芽肿,但是 E 组的脾脏肉芽肿要比 D 组的病变面积小。进行病理病变定量

分析(图 2),相比较 D 组,E 组的肺脾的病变程度显著性减轻($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$),肝脏的肉芽肿密度也显著降低($P < 0.01$),相对于 F 组,E 组的肺脏和肝脏的病变程度降低,但是二者差异没有显著性。

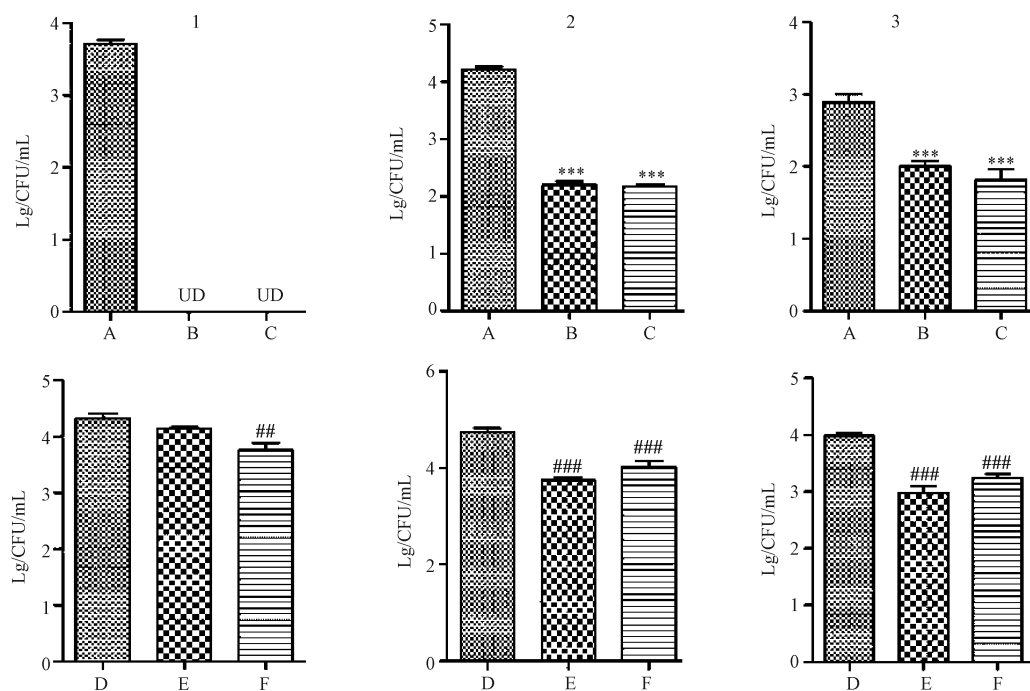
2.3 结核菌感染巨噬细胞后 PD-L1 的表达

流式细胞仪检测发现(见图 4):H37Rv 感染巨噬细胞 24 h 后,红色峰(感染组)相比较蓝色峰(对照组)右移,表明 PD-L1 表达升高。

2.4 PD-L1 敲低或阻断后对结核菌感染的巨噬细胞凋亡的影响

利用流式细胞仪检测结核菌感染的巨噬细胞的凋亡,用 PD-L1 单抗干预后,巨噬细胞对照凋亡率为见(图 5A)左图(14.4%),H37Rv 感染后巨噬细胞凋亡率见中图(12.2%),加入 PD-L1 单抗后,巨噬细胞凋亡的细胞比例见右图(13.9%)。对 3 个复孔流式结果进行统计,结果见图 5 A-1, H37Rv 感染巨噬细胞之后细胞凋亡率降低($P < 0.05$),加 PD-L1 单抗后细胞凋亡率较感染组显著性上升($P < 0.05$)。

用 siRNA 敲低巨噬细胞上 PD-L1 后检测细胞凋亡(图 5B),左图为巨噬细胞对照(14.4%),中图

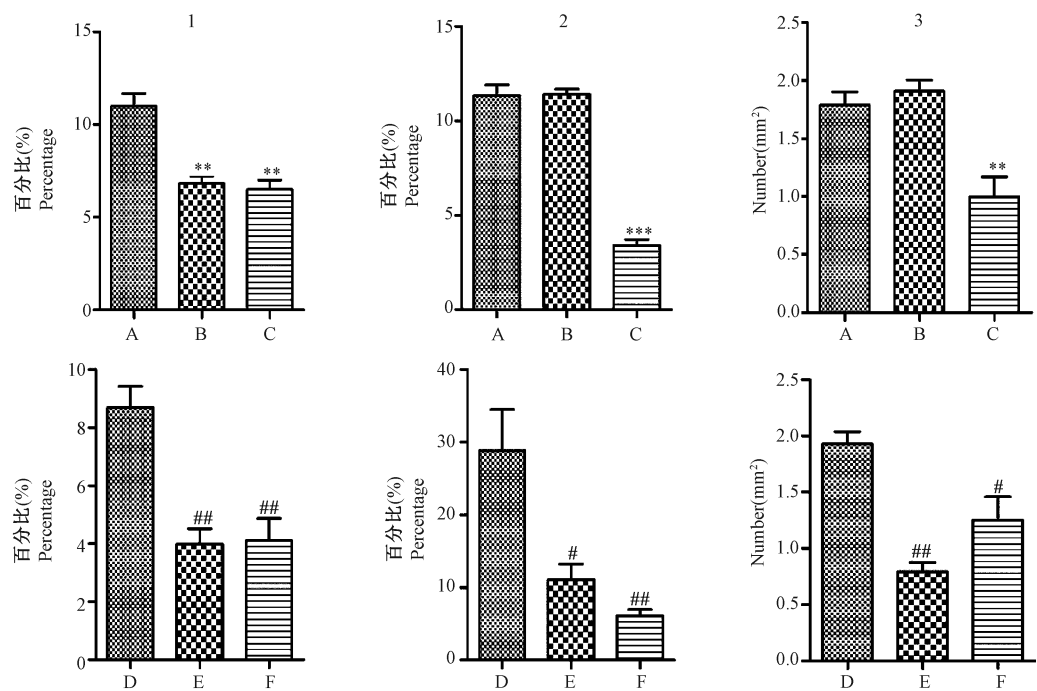


注:1:肺脏荷菌量;2:脾脏荷菌量;3:肝脏荷菌量;A:感染对照组;B:异烟肼治疗组;C:异烟肼 PD-L1 抗体协同治疗组;D:TNF- α 诱导复发组;E:异烟肼协同 PD-L1 抗体自然复发组;F:异烟肼自然复发组;与 A 组比较,*** $P < 0.001$;与 D 组比较,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$ 。

图 1 小鼠结核模型中肺脾肝不同时期的菌荷菌量($n = 4$)

Note. 1: Bacterial load in lung. 2: Bacterial load in spleen. 3: Bacterial load in liver. A: infection group. B: isoniazid treatment group. C: isoniazid combined with PD-L1 monoclonal antibody group. D: TNF- α induced-relapse group. E: natural relapse in isoniazid combined PD-L1 monoclonal antibody group. F: natural relapse in isoniazid group. Compared with the group A, *** $P < 0.001$. Compared with the group D, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

Fig. 1 Bacterial load of the lung, spleen and liver in the *M. tuberculosis*-infected mice in different periods



注:1:肺脏荷菌量;2:脾脏荷菌量;3:肝脏荷菌量;A:感染对照组;B:异烟肼治疗组;C:异烟肼 PD-L1 抗体协同治疗组;D: TNF- α 诱导复发组;E: 异烟肼协同 PD-L1 抗体自然复发组;F: 异烟肼自然复发组;与 A 组比较, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$; 与 D 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 2 小鼠结核模型中肺脾肝不同时期的组织病变定量($n=4$)

Note. 1: Bacterial load in lung. 2: Bacterial load in spleen. 3: Bacterial load in liver. A: Infection group. B: Isoniazid treatment group. C: Isoniazid combined with PD-L1 monoclonal antibody group. D: TNF- α induced-relapse group. E: Natural relapse in isoniazid combined with PD-L1 monoclonal antibody group. F: Natural relapse in isoniazid group. Compared with the group A, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$. Compared with the group D, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Fig. 2 Quantitative analysis of the pathological changes in the lung, spleen and liver tissues of the *M. tuberculosis*-infected mice in different periods

为 H37Rv 感染巨噬细胞后凋亡情况(7.97%),右图 为 H37Rv 感染后加入 PD-L1-siRNA 后,凋亡的细胞 比例(14.0%)。对 3 个复孔流式结果进行统计(图 5B-1),H37Rv 感染巨噬细胞之后细胞凋亡率显著 性降低($P < 0.001$),加 PD-L1-siRNA 组细胞凋亡 率较感染组显著性上升($P < 0.001$)。

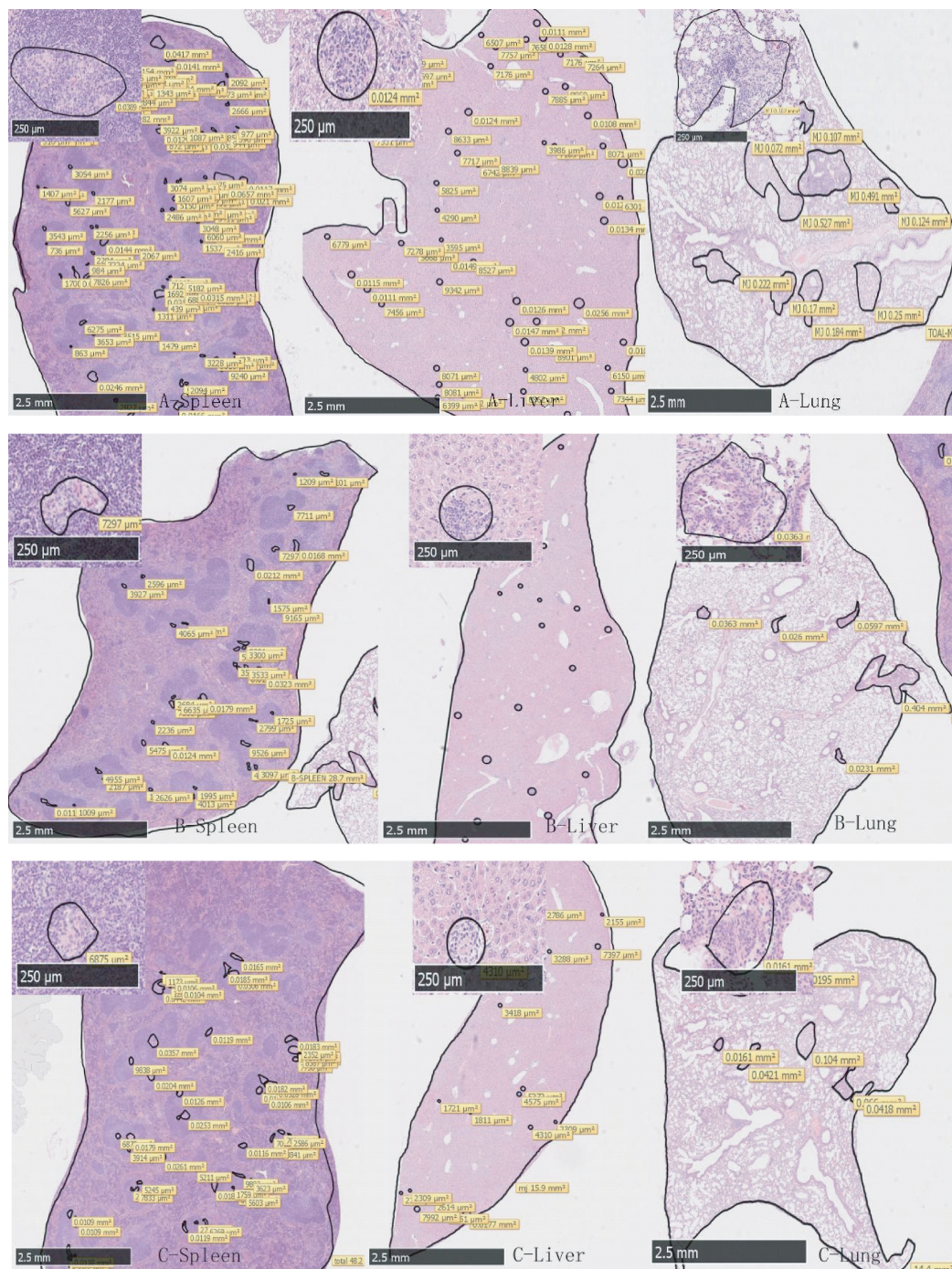
3 讨论

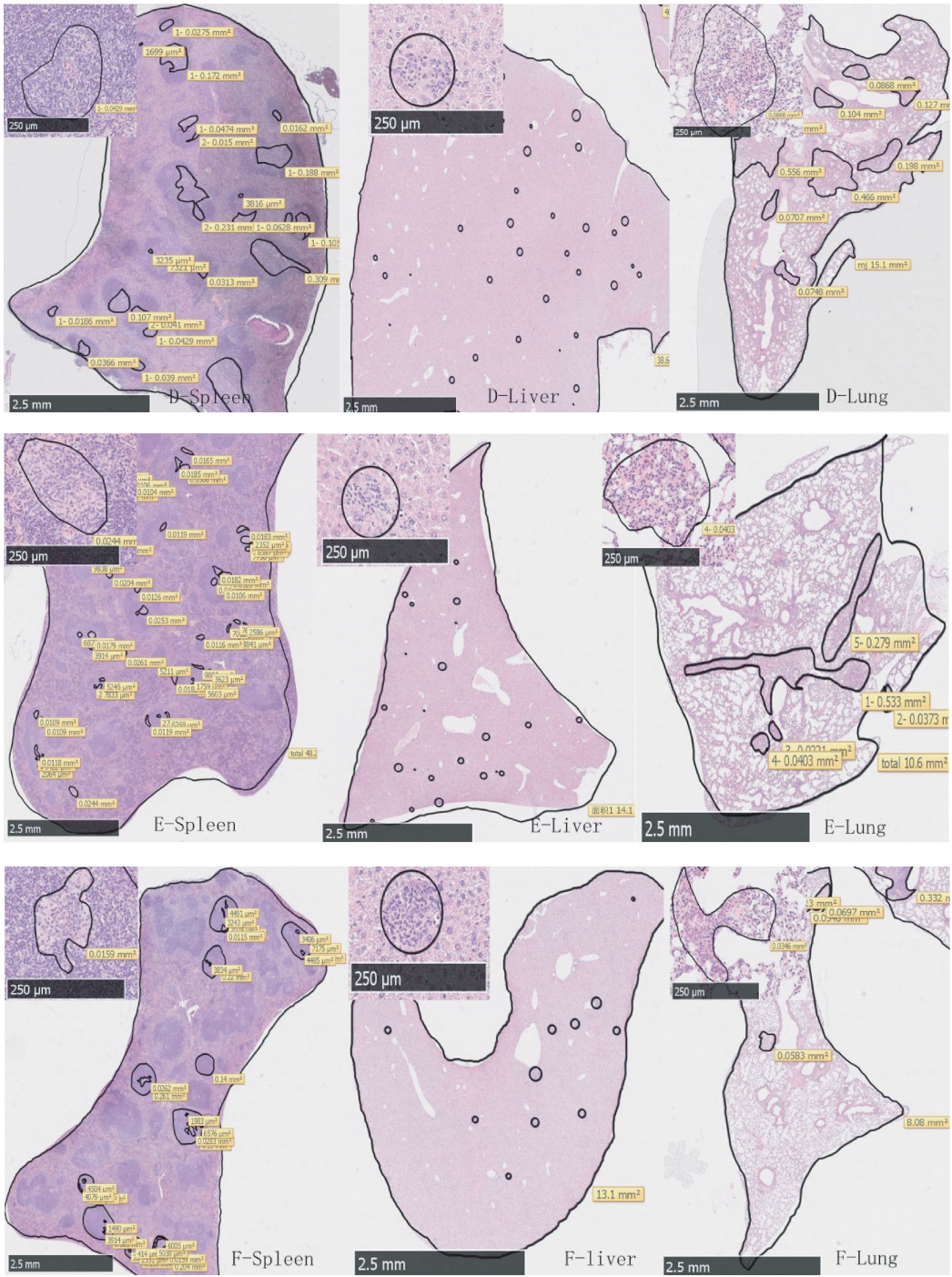
本研究发现,结核急性感染经过异烟肼单独治 疗及 PD-L1 单抗协同异烟肼治疗后,均可以明显降 低荷菌量和减轻病变,虽然两者组间无显著性差 异,但是经 TNF- α 抗体诱导复发之后,可以看到 PD-L1 单抗联合异烟肼治疗组相比较单用异烟肼治 疗组,可以显著降低复发期的荷菌量和病变。这表明 PD-1:PD-L1 通路在体内可能发挥免疫抑制作用, PD-L1 单抗阻断 PD-1:PD-L1 通路后,可能逆转该通 路的免疫抑制作用,从而遏制复发期荷菌量上升而

表现出免疫保护作用。用 H37Rv 体外感染巨噬细 胞,24 h 后发现 PD-L1 的表达上升,利用 PD-L1 抗 体阻断或 si-RNA 敲低结核菌感染的巨噬细胞上 PD-L1,可以促进巨噬细胞的凋亡,在抑制小鼠结核 的复发中发挥作用。

上述结果与已发表的用 BCG 感染 PD-1 敲除小 鼠的结论是一致的,但是与 H37Rv 感染的 PD-1 敲 除小鼠的结论是相悖。但依然不能否认结核感染 的宿主体内 PD1/PD-L1 通路发挥免疫抑制作用。 究其原因,是因为:其一:用 BCG 和 H37Rv 分别感 染小鼠后,PD-1 通路所发挥的免疫作用不同,这种 差异的产生可能与 PD-L1、PD-L2 的差异表达有关。 小鼠感染 BCG 后,PD-L1 高表达,而 PD-L2 无明显 表达变化。PD-1:PD-L1 通路使 Th1 型细胞免疫功 能受到损伤,可以恢复 Th1 型细胞免疫的功能,从而 在体内表现出免疫保护作用,即 PD-1 敲除后的小鼠 脾脏荷菌量比野生型小鼠低。H37Rv 感染小鼠后,

而 PD-1/PD-L1 通路的体外结果与本研究组 PD-L1 抗体干预的结果一致,虽然已报道的 PD-1 敲除小鼠结果与之相左,依然提示小鼠体内 PD-1/PD-L1 通路可能发挥免疫抑制作用,其原因是因为 PD-1 敲除小鼠可能由于敲除导致的自身免疫过强使结核加重,然而,其精确作用和机制需要深入研究。



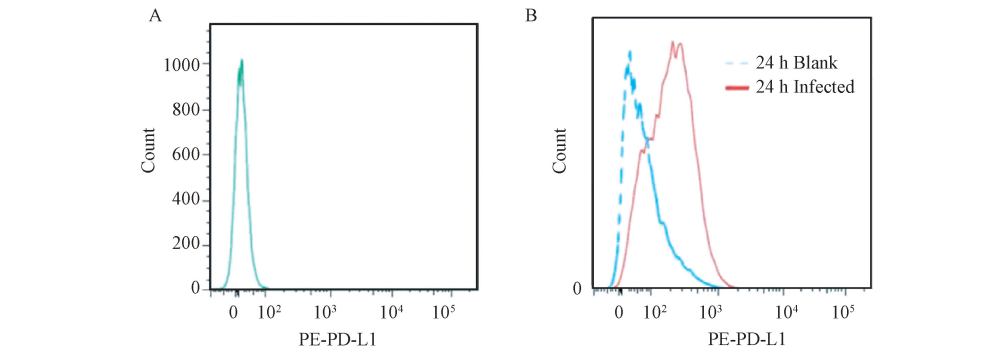


注:从左到右分别为脾、肝、肺的组织病变图;HE 染色;大图是 $\times 12.5$ 倍,左上角小图为 $\times 100$ 倍;脾、肝和肺组织中标记处为病变。

图 3 小鼠结核模型中肺脾肝不同时期的组织病理改变($n=4$)

Note. Figures from left to right stand for pathological changes in the spleen, liver and lung tissues, respectively, HE staining. Magnification was $\times 12.5$ of the larger picture, $\times 100$ of the upper left insets. The markers on the spleen, liver and lung tissue pictures are the disease lesions.

Fig. 3 Pathological changes in the lung, spleen and liver tissues in the *M. tuberculosis*-infected mice in different periods

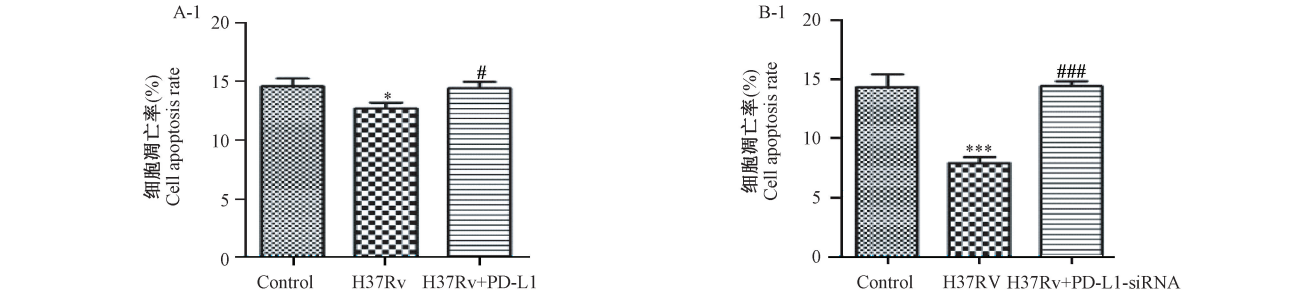
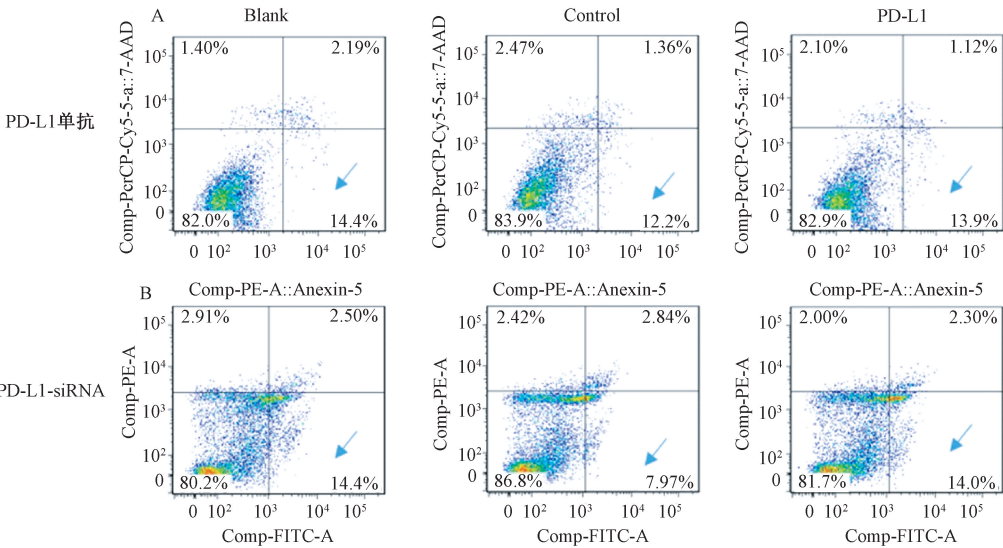


注:A 为巨噬细胞阴性对照;B 为 H37Rv 感染巨噬细胞 24 h 的结果;红色峰表示感染细胞 PD-L1 的表达;蓝色峰表示未感染细胞 PD-L1 的表达。

图 4 感染 H37Rv 的巨噬细胞 PD-L1 的表达

Note. A stands for negative control macrophages. B stands for the result of macrophages H37Rv-infected for 24 hours. Red curve represents the expression of PD-L1 of infected macrophages. Blue curve represents the expression of PD-L1 of uninfected macrophages.

Fig. 4 PD-L1 expression of the macrophages infected by H37Rv



注:与 Control 组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$;与 H37Rv 组相比较, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ 。

图 5 PD-L1 对感染的巨噬细胞的凋亡影响 ($n = 3$)

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Compared with the H37Rv group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$.

Fig. 5 Effect of PD-L1 on apoptosis in the infected macrophages

巨噬细胞作为机体天然免疫系统中重要的效应细胞,其细胞凋亡作为一种有利于宿主清除结核菌的方式,及通过防止结核菌逸散造成二次感染^[12],在机体与结核杆菌的抗争中起着非常重要的作用。体外实验发现,敲低 PD-L1 或用抗体阻断均可以逆转结核感染中 PD1:PD-L1 通路对巨噬细胞凋亡的可能抑制作用,有效促进结核菌的清除并防止结核菌逸散造成的二次感染,即抑制结核病的复发。该作用需要在细胞上 PD-L1 特异性敲除的小鼠中深入论证。

综上所述,阻断 PD1:PD-L1 通路可以抑制结核病的复发,该抑制作用与促进巨噬细胞凋亡有关。

参考文献:

- [1] WHO. Global Tuberculosis Report 2016 [EB/OL]. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250441/1/9789241565394-eng.pdf?ua=1>
- [2] 王胜圣,周杰,张彦峰,等. 中医药治疗复治肺结核的研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2012, (07): 1433-1435.
- [3] 周夏裕,田文广. 耐药结核病的现状与治疗策略[J]. 西部医学, 2017, 29(01): 141-144.
- [4] Moreno-Cubero E, Subira D, Sanz-de-Villalobos E, et al. According to hepatitis C virus (HCV) infection stage, interleukin-7 Plus 4-1BB triggering alone or combined with PD-1 blockade increases TRAF1 (low) HCV-specific CD8⁺ cell reactivity [J]. J Virol, 2018, 92(2): e01443-17.

- [5] 林城,陈雄,刘静南,等. PD-1/PD-L1 信号通路在非小细胞肺癌免疫逃逸及其治疗中的研究进展[J]. 中国肺癌杂志 2014, 17(10): 734-740
- [6] See JX, Chandramathi S, Abdulla MA, et al. Persistent infection due to a small-colony variant of *Burkholderia pseudomallei* leads to PD-1 upregulation on circulating immune cells and mononuclear infiltration in viscera of experimental BALB/c mice [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2017, 11(8): e0005702.
- [7] 肖健,刘显,郁晓磊,等. HIV-1 感染过程中 CD8⁺ T 细胞 PD-1 水平增高与其活化状态正相关[J]. 细胞与分子免疫学杂志 2016, 32(10): 1372-1377.
- [8] Zhou Y, Hu Z, Cao S, et al. Concomitant *Mycobacterium tuberculosis* infection promotes lung tumor growth through enhancing Treg development [J]. Oncol Rep, 2017, 38(2): 685-692.
- [9] Shen L, Gao Y, Liu Y, et al. PD-1/PD-L pathway inhibits M. tb-specific CD4⁺ T-cell functions and phagocytosis of macrophages in active tuberculosis [J]. Sci Rep, 2016, 6: 38362.
- [10] Tousif S, Singh Y, Prasad DV, et al. T cells from programmed death-1 deficient mice respond poorly to *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. PLoS One, 2011, 6(5): e19864.
- [11] 占玲俊,唐军,秦川. PD-1: PD-L1/PD-L2 通路在结核感染中的免疫作用[J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(07): 74-76.
- [12] 张嘉美,马臣杰,赵宁,等. Necrostatin-1 对 BCG 感染后小鼠巨噬细胞 RAW264.7 凋亡的调控[J]. 农业生物技术学报, 2016, (10): 1552-1559.

[收稿日期]2017-11-12

专家问答

问:大小鼠常见采血方法

答:采血是动物实验常见的操作,我们可以在不同的情况下选择恰当的方法,现总结如下:

(1)剪尾采血:所需血量较少时采用,适用于涂片、试纸检测血糖等。鼠尾消毒后,浸在 45℃~60℃ 左右的温水中 10~30 s,使尾部血管充盈,用刀片或剪刀割去尾尖小鼠 1~2 mm,大鼠 3~5 mm,自尾根向尾尖捋尾巴,让血液流出。每只实验动物一般可采血 10 次以上。小鼠每次可取血 0.1 mL;大鼠 0.3~0.5 mL。如果长期反复取血,由近鼠尾末端向近心端操作。

(2)眼眶静脉丛采血:采血量较多,且动物不致死,适用于实验中血液指标的检验。取血时拇指及食指压迫颈部两侧,使眶后静脉丛充血。手持硬质玻璃滴管(毛细管内径 0.5~1.0 mm),与鼠面成 45 度的夹角,由眼内角刺入,刺入后再深入小鼠约 2~3 mm,大鼠约 4~5 mm,穿刺适当血液能自然流出。多次建议左右两眼轮换取血。小鼠每次可采血 0.2~0.3 mL;大鼠每次可采血 0.5~1.0 mL。

(3)摘眼球取血:此采血方法动物可致死,多用于小鼠。小鼠倒置,尽量将小鼠眼周皮肤往颈后压,使眼球突出,用眼科弯镊迅速夹去眼球,血液从眼眶中流入 EP 管。注意不要反复用镊子刺眼眶,容易溶血。每次采血量 0.6~0.1 mL。

(4)腹主动脉采血:采血量大,动物致死,多用于大鼠。动物麻醉,仰卧固定,从腹正中线皮肤切开腹腔,使腹主动脉清楚暴露。用注射器抽取血液,速度要慢,防止溶血。小鼠每次可采血 1.0~1.5 mL;大鼠每次可采血 8 mL 以上。

(感谢上海中医药大学中医肾病研究所 刘伟伟 的解答)