

B7 家族负性共刺激分子在肺区域免疫构建过程中的表达变化*

谢雨芹¹, 石芳¹, 曹邦荣², 万华靖^{1,3}, 刘瀚旻^{1,4△}

1. 四川大学华西第二医院 血管重构与发育缺陷实验室 出生缺陷与相关妇女儿童疾病教育部重点实验室(成都 610041);
2. 四川省肿瘤医院研究所, 四川省癌症防治中心, 电子科技大学医学院, 肿瘤基础研究部(成都 610041);
3. 成都新基因格生物技术有限公司(成都 610041); 4. 四川大学华西第二医院 儿童呼吸科(成都 610041)

【摘要】目的 了解 B7 家族负性共刺激分子在肺发育过程中表达的时空特异性, 探索 B7 家族负性共刺激分子在肺区域免疫构建中的作用。**方法** 利用已获得的恒河猴不同发育时期肺组织 RNA 测序(RNA-seq)数据, 采用每千碱基长度在每百万读值中的匹配数(RPKM)分析法, 分析 B7 家族负性共刺激分子(B7-1、B7-2、B7-H1、B7-DC)基因的相对表达变化。收集小鼠肺发育过程中不同时间点(小管期、囊状期、肺泡期)的肺组织标本, 利用免疫组化的方法, 检测 B7 家族负性共刺激分子在小鼠肺发育过程中的时空特异性表达及定位。**结果** 恒河猴 RNA 测序数据显示, B7 家族负性共刺激分子的 mRNA 在围产期(囊状期、肺泡期)表达上升, 其中 B7-2、B7-H1 基因的表达在肺泡期较前 2 期上升($P<0.05$)。小鼠肺组织的免疫组化结果显示, B7 家族负性共刺激分子蛋白表达水平在围产期也呈现上升趋势, 其中 B7-2、B7-H1、B7-DC 表达在围产期较小管期上升($P<0.05$), 且主要表达于气道上皮细胞中。进一步分析蛋白在不同分级气道中的表达, 发现 B7-2 蛋白在主气道上皮细胞中的表达量高于终末气道上皮细胞($P<0.05$)。**结论** B7 家族负性共刺激分子在肺发育过程中主要表达于气道上皮细胞中, 且在围产期表达水平有显著增加, 提示 B7 家族负性共刺激分子可能参与肺区域免疫调控。

【关键词】 B7 家族负性共刺激分子 肺区域免疫 围产期

Expression of B7 Family Co-inhibitory Molecules in the Establishment of Pulmonary Regional Immunity XIE Yu-qin¹, SHI Fang¹, CAO Bang-rong², WANG Hua-jing^{1,3}, LIU Han-min^{1,4△}. 1. The Vascular Remodeling and Developmental Defects Research Unit, Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children, Ministry of Education, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Basic Research, Sichuan Cancer Hospital & Institute, Sichuan Cancer Center, School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610041, China; 3. Chengdu Newgenegle Biotech Co. Ltd., Chengdu 610041, China; 4. Department of Pediatric Respiratory, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: liuhm@scu.edu.cn

【Abstract】Objective To identify the temporal-spatial expression of B7 family co-inhibitory molecules during lung development, and to explore the roles of B7 family co-inhibitory molecules in the developmental process of pulmonary regional immunity. **Methods** The expression of B7 family co-inhibitory molecules (B7-1, B7-2, B7-H1, B7-DC) in different developmental stages of Rhesus monkey lungs were normalized and calculated by the reads per kilo-base of transcript per million mapped reads (RPKM) method. Immunohistochemical staining was performed to identify the localization and the protein of B7 family co-inhibitory molecules in different developmental phase (canalicular stage, cystic stage, alveolar stage) in mouse. **Results** The expression of B7 family co-inhibitory molecules in rhesus monkey were increased during the prenatal period (cystic stage, alveolar stage), the expressions of B7-2 and B7-H1 mRNA were significantly increased in alveolar stage ($P<0.05$). The results of immunohistochemistry indicated that B7 family co-inhibitory molecules were mainly expressed in airway epithelial cells, and their protein levels were increased during the prenatal period. The expressions of B7-2, B7-H1 and B7-DC were significantly increased from canalicular stage ($P<0.05$). The protein of B7-2 was higher in airway than that in bronchus ($P<0.05$). **Conclusion** B7 family co-inhibitory molecules are mainly expressed in airway epithelial cells, and the expressions are increased during the prenatal period, which suggests that B7 family co-inhibitory molecules

* 国家自然科学基金青年科学基金(No. 81601326)和国家自然科学基金优秀青年科学基金(No. 81322001)资助

△ 通信作者, E-mail: liuhm@scu.edu.cn

are involved possibly in the development of pulmonary regional immunity.

[Key words] B7 family co-inhibitory molecules Pulmonary regional immunity The prenatal period

肺是一个对外开放的器官,其不仅是气体交换的场所,还具有重要的免疫防御功能。一方面,肺随时监控有害物质的入侵,并且做出快速有效的应答^[1]。另一方面,还要严格限制肺区域的免疫应答,在免疫防御的同时避免过度免疫反应对机体的损伤,影响气体交换^[2]。健全的肺区域免疫功能在肺发育过程中逐渐形成和完善。已有研究显示:出生前后,即围产期(包括肺发育的囊状期及肺泡期)是肺区域免疫功能构建的关键时期^[3-5]。目前有关肺区域免疫构建的文献鲜有,目前尚不清楚哪些关键分子与信号途径在肺区域免疫构建的过程中发挥重要作用。

B7 家族负性共刺激分子是近年来发现的非常重要的免疫负性调控蛋白^[6],在免疫调节过程中发挥重要作用。研究发现,B7 家族负性共刺激分子在多种来源的肿瘤组织中高表达,参与肿瘤免疫耐受的调控^[7]。由于肺与外环境直接相连,时刻接触诸多外来物的刺激,故肺区域免疫的特点常常表现为免疫耐受^[8]。目前在 B7 家族负性共刺激分子中研究最清楚的为 B7-1、B7-2、B7-H1、B7-DC。现有研究表明,这些 B7 家族负性共刺激分子通过与 T 淋巴细胞上的特异性受体结合,在 T 淋巴细胞的激活过程中发挥重要的调控作用^[9]。进一步研究还发现,B7 家族负性共刺激分子可通过抑制 PI3K/AKT 信号^[10],促进幼稚 T 细胞分化形成 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞,从而在免疫耐受的调控过程中发挥关键作用。但是目前 B7 家族负性共刺激分子在肺发育过程中的表达怎样?是否与肺区域的免疫耐受应答模式密切相关?目前并不清楚。因此,本研究利用已获得的恒河猴 RNA 测序数据,分析 B7 家族负性共刺激分子在恒河猴肺发育过程中的表达,并采用免疫组化染色观察 B7 家族负性共刺激分子在小鼠肺发育过程中的时空特异性表达及定位,为 B7 家族负性共刺激蛋白在肺区域免疫构建过程中的功能研究提供重要的前期研究数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物及主要试剂

C57BL/6J 小鼠 30 只,由四川省人民医院实验动物研究中心提供,动物合格证号:scxk(川)2013-

15。B7-1 抗体、B7-2 抗体(华安生物);B7-H1 抗体(Abcam);B7-DC 抗体(Thermo);山羊血清工作液、辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液、山羊抗兔二抗试剂(中杉金桥)、DAB 试剂盒(中杉金桥)。

1.2 实验方法

1.2.1 恒河猴不同发育时期肺组织 B7 家族负性共刺激分子 mRNA 的表达分析 对实验室已有的恒河猴不同发育时期的肺组织 RNA 测序数据^[4]进行每千碱基长度在每百万读值中的匹配数(RPKM)分析,了解 B7 家族负性共刺激分子的基因在肺发育不同时期的表达情况。

1.2.2 小鼠不同胚胎发育期和出生后肺组织样本的收集 将 C57BL/6J 雌鼠(20 只)与雄鼠(10 只)以 2 : 1 合笼(交配),以放入时为 0 h(常为下午 3 时以后),隔 16 h 检查雌鼠阴道是否出现阴栓。将雌鼠出现阴栓的当天作为小鼠胚胎发育第 0.5 天,分别在小管期(胚胎 16.5 d)、囊状期(出生后 1 d)、肺泡期(出生后 7 d)收取小鼠肺组织。获得 5 只小管期小鼠胚胎、10 只囊状期小鼠、7 只肺泡期小鼠。

1.2.3 小鼠肺组织标本处理 将收取后的肺组织用 PBS 溶液清洗 3 次,放入体积分数为 4% 多聚甲醛溶液(PBS 溶液配制),4 ℃ 固定 24 h。固定后使用 PBS 溶液清洗肺组织,将处理后的肺组织在自动脱水机(ASP200S)中进行脱水、浸蜡操作。使用石蜡对肺组织进行包埋、切片(5 μm),干燥后保存于 4 ℃ 冰箱中。

1.2.4 小鼠肺组织免疫组化染色 为了进一步验证 B7 家族负性共刺激蛋白在肺发育过程中表达的时空特异性,本研究将收集的小鼠肺发育过程中不同时间点的肺组织样本,用免疫组化的方法检测 B7-1、B7-2、B7-H1、B7-DC 蛋白在肺组织中的表达及定位。肺组织切片在二甲苯及梯度酒精中脱蜡水化后,使用微波修复法进行抗原修复。组织切片在柠檬酸钠缓冲液(pH6.0)中达到 100 ℃ 后保持 95~99 ℃ 15 min。自然冷却至 25 ℃ 左右,3%过氧化氢溶液孵育 10 min,PBS 溶液清洗,山羊血清工作液封闭 30 min,分别加入 1 : 400 滴度的 B7-1 抗体、1 : 400 滴度的 B7-2 抗体、1 : 200 滴度的 B7-H1 抗体、1 : 50 滴度的 B7-DC 抗体,4 ℃ 孵育 16 h。PBS 溶液清洗,山羊抗兔二抗试剂 25 ℃ 孵育 30 min,PBS 溶液清洗,辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作

液 25 ℃ 孵育 30 min, PBS 溶液清洗, DAB 溶液染色 4 min, 苏木素溶液复染 1 min, 盐酸酒精溶液分色 15 s, 双蒸水中返蓝 5 min, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。显微镜下对染色后的切片进行观察并拍照(×400)。设置阳性和阴性对照, B7-1、B7-2 抗体采用以小鼠脾脏组织切片作为阳性对照, B7-H1 抗体采用以小鼠淋巴细胞作为阳性对照, B7-DC 抗体采用以小鼠脑组织切片作为阳性对照; 阴性对照采用以 PBS 替代一抗来进行反应。

以细胞膜、细胞浆、细胞核出现棕黄色颗粒为免疫组化染色阳性反应。每个发育阶段胚胎或小鼠各取 3 只, 每只肺组织重复 3 次, 每张染色切片各取 5 个 400 倍视野, 使用 Image Pro Plus 计算各发育时期的阳性染色的平均光密度值。

以气道周围存在结缔组织作为判断气道为主气道的标准, 以气道与肺泡细胞相连呈现半封闭型为判断气道为末端气道的标准。对每个分子在主气道

及末端气道的染色强弱进行分析, 选择同一时期胚胎或小鼠, 每个分级气道各取 5 个 400 倍视野, 使用 image pro plus 计算不同气道中阳性染色的平均光密度值。

1.3 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 围产期恒河猴肺组织 B7 家族负性共刺激分子 mRNA 的表达

结果(图 1)显示, 在恒河猴肺的发育过程中, B7-1、B7-2、B7-H1、B7-DC 基因表达随发育进程动态变化。在肺发育的小管期, B7 家族负性共刺激分子基因表达均较低; 而在围产期(囊状期及肺泡期)基因表达水平增加, 特别是 B7-2、B7H1 基因在肺泡期的表达水平较前两个时期增加($P < 0.05$)。

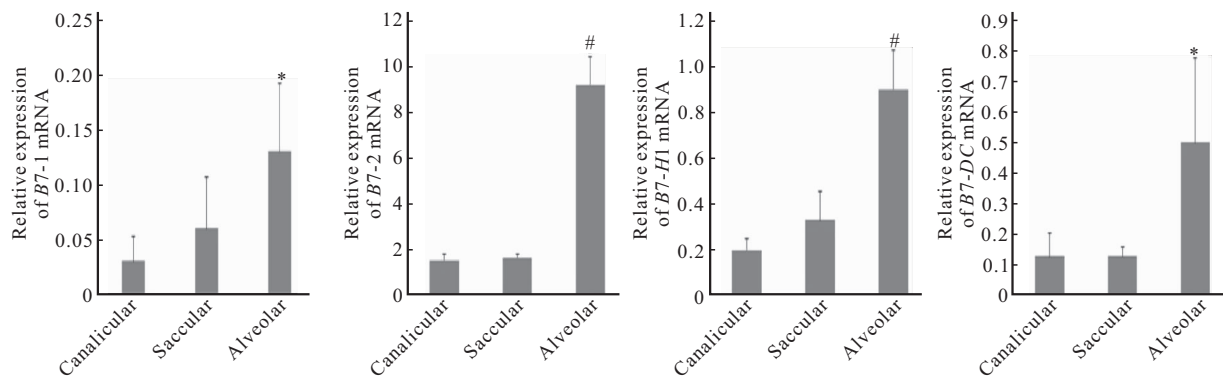


图 1 B7 家族负性共刺激分子 mRNA 在恒河猴肺组织不同发育阶段的表达($n=3$)

Fig 1 The mRNA levels of B7 family co-inhibitory molecules during lung development in rhesus monkeys ($n=3$)

* $P < 0.05$, vs. canalicular stage; # $P < 0.05$, vs. canalicular and saccular stages

2.2 B7 家族负性共刺激分子蛋白在小鼠肺组织的表达及在肺气道的分布

结果(图 2)显示, B7-1、B7-2、B7-H1、B7-DC 蛋白在小鼠肺发育过程中表达的变化趋势与恒河猴 RNA 测序数据分析结果大体一致。B7-2、B7-H1、B7-DC 蛋白在围产期的表达水平平均高于小管期的表达水平($P < 0.05$, 附表)。同时 B7-1、B7-2、B7-H1、B7-DC 蛋白的阳性染色信号均主要在肺气道上皮细胞中出现, 在外周组织中有少量的分布。

2.3 在不同分级气道中 B7-2 分子蛋白的表达

免疫组化染色结果显示, B7-2 蛋白的阳性信号在主气道中的染色强于末端气道(图 3)。以囊状期样本为例, 在主气道中, B7-2 蛋白的阳性染色强(0.164 ± 0.013), 而在与肺泡相连的末端气道中染

色较浅(0.098 ± 0.005)($P < 0.05$)。而 B7-1、B7-H1、B7-DC 蛋白无此现象(在主气道和末端气道阳性染色强弱无差异)。

3 讨论

近年来, 随着区域免疫学的发展, 人们逐渐认识到肺独特的生理现象与其免疫学特性密不可分, 肺脏各种疾病的发生发展也与肺区域免疫功能异常密切相关。因此, 深入认识肺区域的免疫学特性, 弄清其中起作用的关键分子与信号途径, 将有助于我们更好地从免疫学角度认识疾病发生机制, 为肺部疾病防治提供潜在的分子靶标。本研究发现, B7 家族负性共刺激分子在肺发育过程中主要表达于气道上皮细胞中, 且在围产期这一肺区域免疫功能构建的

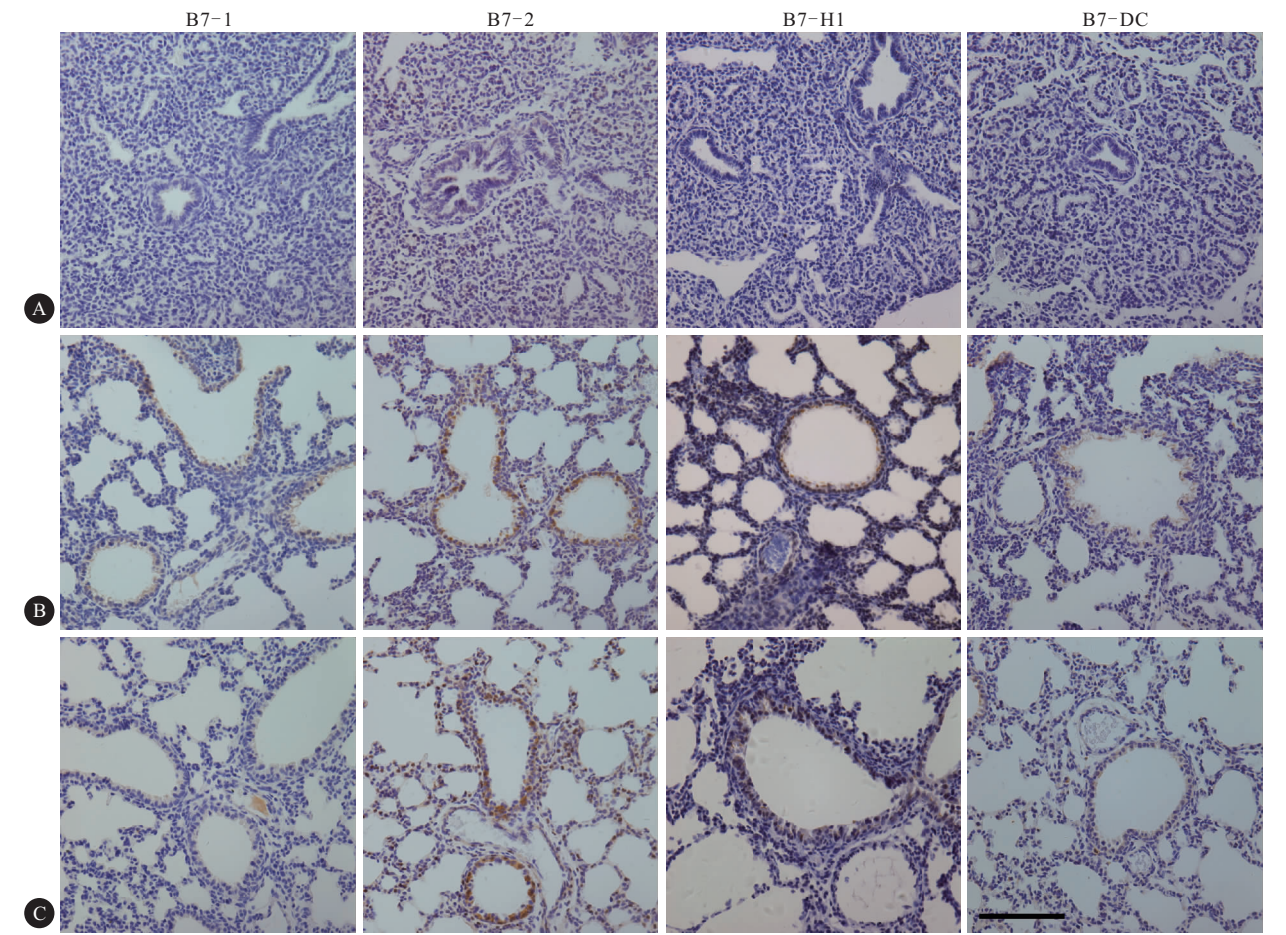


图 2 B7 家族负性共刺激分子在小鼠肺组织不同发育时期的表达及定位。SP ×400

Fig 2 The temporal-spatial expression of B7 family co-inhibitory molecules during lung development in mice. SP ×400

A: Canalicular stage; B: Saccular stage; C: Alveolar stage

附表 B7 家族负性共刺激分子在小鼠肺组织不同发育时期的平均光密度($\bar{x}\pm s$)

Table The mean density of B7 family co-inhibitory molecules during lung development in mice ($\bar{x}\pm s$)					
Stage	n	B7-1	B7-2	B7-H1	B7-DC
Canalicular	3	0.056±0.024	0.081±0.022	0.064±0.012	0.064±0.011
Saccular	3	0.098±0.016	0.159±0.018 *	0.116±0.013 *	0.121±0.026 *
Aveolar	3	0.071±0.013	0.168±0.046 *	0.108±0.016 *	0.103±0.021 *

* $P<0.05$, vs. canalicular stage

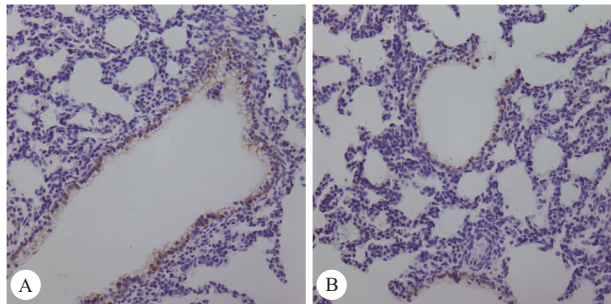


图 3 B7-2 在不同分级气道的表达。SP ×400

Fig 3 The protein level of B7-2 in different airways. SP ×400

A: Large conducting airways; B: Bronchioles

关键时期表达显著升高,提示 B7 家族负性共刺激

分子可能与肺区域免疫功能构建密切相关。

围产期是肺区域免疫构建的关键时期。在这期间,胎儿经历了从相对无菌的宫内到较为复杂的宫外环境的转变^[11]。为了应对出生后外环境中的各种刺激,肺区域免疫功能需要在出生前开始准备,并且在出生后发挥作用。已有报道,在小鼠肺发育过程中,很多与机体免疫防御及免疫调控相关的信号通路在小鼠胚胎肺发育的囊状期及肺泡期(胚胎 18.5 d 以后)被显著激活,如 STAT1、AP1 及 EGFR 信号途径等^[3]。本研究我们发现 B7 家族负性共刺激分子(B7-1、B7-2、B7-H1、B7-DC)的 mRNA 及蛋白表达水平随肺发育进程升高,在围产期升高尤为显著,提示这些分子也可能在这一时期

发挥重要作用。

B7 家族负性共刺激分子是机体重要的免疫调控蛋白,其通过与特异性受体结合,传递免疫抑制信号,从而调节免疫反应。研究显示,B7-1、B7-2 与 CTLA-4 结合后抑制了 Akt 信号通路的激活^[12],增加 T 细胞活化阈值^[13]。而 B7-H1、B7-DC 与 PD-1 结合后抑制了 PI3K/Akt 信号通路及 Ras /MEK / ERK 信号通路的激活,同时下调 Bcl-XL 的产生来传递 T 细胞抑制信号^[14]。目前,关于 B7 家族负性共刺激分子的研究多集中于肿瘤学领域,对于其是否参与围产期肺区域的免疫调控,目前并不清楚。KANEKO 等^[15]报道,给成年小鼠注射博来霉素后的第 1 小时到第 7 天,B7-1、B7-2 在肺组织中的 mRNA 表达量显著增加,提示 B7-1、B7-2 分子可能参与肺区域免疫防御功能的调节。另外,促炎因子可以增加 B7-H1、B7-DC 的表达^[10],以形成对 T 细胞反应的负调节,来保护组织免于免疫过度的损伤。本研究,我们进一步发现 B7 家族负性共刺激分子在围产期的表达量增加,提示 B7 家族负性共刺激分子与肺区域免疫的构建密切相关,可能参与出生后的肺区域免疫防御,这与之前的研究结论相匹配。此外,本研究发现 B7 家族负性共刺激分子主要表达于气道上皮细胞中,这与已有的研究发现一致^[15-16]。虽然在 KANEKO 等^[15]的研究中正常小鼠肺组织未检测到 B7-1、B7-2 的表达,这可能是因为当时的检测技术不能检测到低表达量的 B7-1、B7-2。

气道上皮是机体抵御外环境最前沿的防御屏障,其不仅可以通过纤毛运动清除外来物,还可通过分泌多种抗菌、抗炎物质(乳铁蛋白、几丁质酶、 β -防御素)发挥功能^[17]。同时,气道上皮细胞还具有抗原呈递细胞的特点,可以表达多种免疫模式识别受体来识别病原体,例如 Toll 样受体(TLR),通过受体与配体的结合,激活下游信号的传递,从而影响天然免疫相关基因的诱导表达以及特异免疫的激活^[1]。B7 家族负性共刺激分子在气道上皮细胞的表达提示其可能通过气道上皮细胞向下传递信号,抑制过度免疫反应。本研究创新性地在肺发育过程中研究 B7 家族负性共刺激分子的表达及定位,能够进一步探索肺区域免疫的构建,认识新生儿呼吸疾病。且利用现有的抗 B7 家族负性共刺激分子的药物,我们可以深入研究 B7 家族负性共刺激分子在肺区域免疫的作用。这为新生儿肺部疾病,特别是早产儿的肺部疾病研究以及治疗提供了新的研究思路 and 方向。

综上所述,本研究发现 B7 家族负性共刺激分子在肺区域与免疫构建密切相关。后续我们将进一

步深入研究这些分子在建立及维持肺区域高阈值的免疫应答模式中的作用及机制,为肺部疾病的防御与治疗提供潜在的新靶标。

参 考 文 献

- [1] HARTL D, TIROUVANZIAM R, LAVAL J, *et al.* Innate immunity of the lung: from basic mechanisms to translational medicine. *J Innate Immun*, 2018 [2018-08-16]. <https://doi.org/10.1159/000487057>.
- [2] NEWTON AH, CARDANI A, BRACIALE TJ. The host immune response in respiratory virus infection: balancing virus clearance and immunopathology. *Semin Immunopathol*, 2016, 38(4): 471-482.
- [3] XU Y, WANG Y, BESNARD V, *et al.* Transcriptional programs controlling perinatal lung maturation. *PLoS One*, 2012, 7(8): e37046 [2018-08-16]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037046>.
- [4] YU X, FENG L, HAN Z, *et al.* Crosstalk of dynamic functional modules in lung development of rhesus macaques. *Mol Biosyst*, 2016, 12(4): 1342-1349.
- [5] GOLLWITZER ES, SAGLANI S, TROMPETTE A, *et al.* Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1. *Nat Med*, 2014, 20(6): 642-647.
- [6] CEERAZ S, NOWAK EC, NOELLE RJ. B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends Immunol*, 2013, 34(11): 556-563.
- [7] LEUNG J, SUH WK. The CD28-B7 family in anti-tumor immunity: emerging concepts in cancer immunotherapy. *Immune Network*, 2014, 14(6): 265-276.
- [8] RACKLEY CR, STRIPP BR. Building and maintaining the epithelium of the lung. *J Clin Invest*, 2012, 122(8): 2724-2730.
- [9] BOUR-JORDAN H, ESENSTEN JH, MARTINEZ-LLODELLA M, *et al.* Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/B7 family. *Immunol Rev*, 2011, 241(1): 180-205.
- [10] SCHILDBERG FA, KLEIN SR, FREEMAN GJ, *et al.* Coinhibitory pathways in the B7-CD28 ligand-receptor family. *Immunity*, 2016, 44(5): 955-972.
- [11] GOLLWITZER ES, MARS LAND BJ. Impact of early-life exposures on immune maturation and susceptibility to disease. *Trends Immunol*, 2015, 36(11): 684-696.
- [12] PARRY RV, CHEMNITZ JM, FRAUWIRTH KA, *et al.* CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(21): 9543-9553.
- [13] TL W, DJ L, CY B, *et al.* CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*, 1994, 1(5): 405-413.
- [14] PATSOUKIS N, BROWN J, PETKOVA V, *et al.* Selective effects of PD-1 on Akt and Ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit T cell proliferation. *Sci Signal*, 2012, 5(230): ra46 [2018-08-16]. <http://stke.sciencemag.org/content/5/230/ra46>. doi: 10.1126/scisignal.2002796.
- [15] KANEKO Y, KUWANO K, HAGIMOTO N, *et al.* Expression of B7-1, B7-2, and interleukin 12 in bleomycin-induced pneumopathy in mice. *Int Arch Allergy Immunol*, 1998, 116(4): 306-312.
- [16] TSUDA M, MATSUMOTO K, INOUE H, *et al.* Expression of B7-H1 and B7-DC on the airway epithelium is enhanced by double-stranded RNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 330(1): 263-270.
- [17] ESPINOSA V, RIVERA A. First line of defense: innate cell-mediated control of pulmonary aspergillosis. *Front Microbiol*, 2016, 7: 272 [2018-08-16]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00272>.

(2018-07-14 收稿, 2018-10-27 修回)

编辑 沈进