

PD-L1介导淋巴细胞YAP磷酸化在病毒性急性肺损伤中的作用

汪子意¹, 莫健兰², 陈凤鸣¹, 罗碧君², 冯继峰²

(1. 广西中医药大学, 南宁 530299; 2. 广西壮族自治区妇幼保健院麻醉科, 南宁 530002)

摘要 **目的:**探讨程序性死亡受体配体1(PD-L1)介导淋巴细胞yes相关蛋白(YAP)磷酸化在病毒性急性肺损伤中的作用。**方法:**将SPF级C57BL/6J小鼠随机分为对照组、根据小鼠气管内滴注聚肌苷-聚胞苷酸(即Poly I: C)的时间分为4 h、8 h、1 d、3 d、7 d组,在这五组中选取炎症损伤最严重的组作为Poly I: C组;利用PD-1/PD-L1抑制剂BMS-1 10mg/kg腹腔注射预处理后气管内滴注Poly I: C,作为Poly I: C+BMS-1组。野生型小鼠Poly I: C组和PD-L1敲基因小鼠Poly I: C组处理同Poly I: C组;野生型小鼠对照组和PD-L1敲基因小鼠对照组腹腔注射麻醉后气管内给予等量生理盐水。相应时间点将小鼠安乐死收集标本。采用苏木精-伊红(HE)染色法评估小鼠肺组织损伤程度;通过检测支气管肺泡灌洗液(BALF)中总蛋白浓度、总细胞数以及酶联免疫吸附法(ELISA)检测BALF中肿瘤坏死因子(TNF)- α 水平评估炎症情况;蛋白免疫印迹(western blotting, WB)检测程序性死亡受体1(PD-1)、PD-L1、YAP、p-YAP蛋白表达。**结果:**与对照组比较,8 h、1 d、3 d、7 d组肺组织病理学损伤评分及BALF总蛋白浓度显著升高,8 h、1 d、3 d组BALF中总细胞数明显增多,4 h、8 h、1 d、3 d组BALF中TNF- α 水平显著上调,差异均有统计学意义($P<0.05$);其中1 d组小鼠肺组织病理学损伤评分、BALF中总蛋白浓度、BALF总细胞数以及BALF中TNF- α 水平均高于4 h、8 h、3 d、7 d组。与对照组比较,1 d、3 d、7 d组小鼠肺组织中PD-1和PD-L1蛋白水平明显升高($P<0.05$)。Poly I: C组小鼠肺组织病理损伤评分和BALF中TNF- α 水平明显高于对照组,与Poly I: C组相比,Poly I: C+BMS-1组小鼠肺组织病理损伤评分和BALF中TNF- α 水平显著降低($P<0.05$)。与对照组相比,Poly I: C组和Poly I: C+BMS-1组小鼠淋巴细胞中YAP蛋白表达明显下调,p-YAP蛋白表达显著上调($P<0.05$);与Poly I: C组相比,Poly I: C+BMS-1组小鼠淋巴细胞中YAP蛋白表达上升,p-YAP蛋白表达下降($P<0.05$)。与对照组相比,Poly I: C组小鼠淋巴细胞中YAP蛋白表达明显下调而p-YAP蛋白表达显著上调,PD-L1基因敲除后Poly I: C组小鼠淋巴细胞中YAP蛋白表达有所上升而p-YAP蛋白表达明显下降,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**病毒性急性肺损伤小鼠肺组织中高表达PD-L1蛋白,PD-L1可能通过激活淋巴细胞的YAP磷酸化加重病毒性急性肺损伤。

关键词 程序性死亡配体;yes相关蛋白;急性肺损伤;淋巴细胞

中图分类号:R563.8 文献标志码:A 文章编号:1005-930X(2024)02-0247-08

DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.02.012

The role of PD-L1 mediating lymphocyte YAP phosphorylation in viral acute lung injury

WANG Ziyi¹, MO Jianlan², CHEN Fengming¹, LUO Bijun², FENG Jifeng². (1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530299, China; 2. Department of Anesthesiology, the Obstetrics & Gynecology Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530002, China)

Abstract **Objective:** To investigate the role of programmed death receptor ligand 1 (PD-L1) in mediating the phosphorylation of lymphocyte yes-associated protein (YAP) in viral acute lung injury. **Methods:** SPF-grade C57BL/6J mice were randomly divided into control groups, and divided into groups of 4 h, 8 h, 1 d, 3 d, and 7 d according to the time of intratracheal drip of polyinosinic-polycytidylic acid (Poly I: C). The group with the most severe inflammatory injury among these five groups was selected as the Poly I: C group; PD-1/PD-L1 inhibitor BMS-1 10mg/kg intraperitoneal injection pretreated with intratracheal drip of Poly I: C, as Poly I: C+BMS-1 group. The Poly I: C group of wild-type mice and the Poly I: C group of PD-L1 knockout mice were treated as

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 82060024);广西医学高层次骨干人才“139”计划(No. G202002015);

广西麻醉学临床医学研究中心建设(No. 桂科AD22035214)

[通信作者] 冯继峰, E-mail: 604282082@qq.com

[收稿日期] 2024-01-03

the Poly I: C group; the control group of wild-type mice and the control group of PD-L1 knockout mice were anesthetized by intraperitoneal injection and given an equal amount of saline intratracheally. Mice were euthanized at the corresponding time points and specimens were collected. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to assess the degree of lung tissue injury in mice; inflammation was assessed by measuring the total protein concentration, total cell number in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and tumor necrosis factor (TNF)- α levels in BALF using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blotting was used to detect the expression of PD-1, PD-L1, YAP, and p-YAP proteins. **Results:** Compared with the control group, the lung histopathological injury score and total protein concentration in BALF were significantly increased in the 8 h, 1 d, 3 d, and 7 d groups, the total cell number in BALF was significantly increased in the 8 h, 1 d, and 3 d groups, the TNF- α level in BALF was significantly up-regulated in the 4 h, 8 h, 1 d, and 3 d groups, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$); among them, the lung histopathological injury score, total protein concentration in BALF, total cell number in BALF and TNF- α level in BALF in the 1d group were higher than those in the 4 h, 8 h, 3 d and 7 d groups. Compared with the control group, the levels of PD-1 and PD-L1 proteins in the lung tissues of mice in the 1 d, 3 d, and 7 d groups were significantly increased ($P < 0.05$). The scores of pathological injury in the lung tissues of mice in the Poly I: C group and the levels of TNF- α in BALF were significantly higher than those in the control group. Compared with the Poly I: C group, the lung histopathological injury score and the levels of TNF- α in BALF were significantly lower than those in the Poly I: C+BMS-1 group ($P < 0.05$). Compared with the control group, YAP protein expression was significantly down-regulated and p-YAP protein expression was significantly up-regulated in the lymphocytes of mice in the Poly I: C and Poly I: C+BMS-1 groups ($P < 0.05$). Compared with the Poly I: C group, YAP protein expression in the lymphocytes of mice in the Poly I: C+BMS-1 group was increased and p-YAP protein expression was decreased ($P < 0.05$). Compared with the control group, YAP protein expression was significantly down-regulated, and p-YAP protein expression was significantly up-regulated in the lymphocytes of mice in the Poly I: C group; YAP protein expression in the lymphocytes of mice in the Poly I: C group was increased, while p-YAP protein expression was significantly decreased after the knockdown of the PD-L1 gene, and the differences were all statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** PD-L1 protein is highly expressed in the lung tissues of mice with viral acute lung injury, and PD-L1 may aggravate viral acute lung injury by activating YAP phosphorylation in lymphocytes.

Keywords programmed death ligand; yes-associated protein; acute lung injury; lymphocyte

病毒性肺部感染是一个引起国际广泛关注的卫生事件,肺炎和由此引起的急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是高致病性呼吸道病毒所致死亡的主要因素,也与重症监护患者的高死亡率相关^[1]。病毒性肺损伤是由病毒直接和特异性免疫反应间接共同导致的肺部损伤,病毒感染早期免疫系统释放大量细胞因子和趋化因子,例如干扰素(interferon, IFN)以及肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 等,促进免疫细胞浸润到组织以及维持其激活、增殖、分化与存活^[2-3];反之,炎症反应失控、免疫稳态失衡则会促使细胞因子和趋化因子大量分泌,从而导致组织损伤和ARDS^[6]。由于其涉及的机制复杂且不确定,目前常

规的抗病毒治疗效果欠佳,因此针对宿主免疫相关的新疗法越来越受到学者们的关注。

程序性死亡受体配体1(programmed cell death receptor ligand-1, PD-L1)通过与程序性死亡受体1(programmed cell death receptor-1, PD-1)结合在免疫抑制中发挥了重要作用^[7],也是维持免疫反应和炎症损伤平衡的关键^[8]。研究表明下调PD-L1蛋白表达可改善内毒素诱导的脓毒症急性肺损伤^[9];另外还发现,上调的PD-L1延缓人类中性粒细胞凋亡,加重脓毒症小鼠的肺损伤^[10]。Yes相关蛋白(yes-associated protein, YAP)能够通过铁蛋白自噬减缓脓毒症引起的急性肺损伤^[11],YAP缺失将导致内毒素诱导的细菌性肺部损伤修复障碍,并导致持

续的炎症反应^[12]。Chao 等^[13]发现 PD-L1 表达与肺癌细胞中的 YAP 呈正相关关系,但是 PD-L1 是否通过调控 YAP 在病毒性肺损伤发生发展中发挥作用尚不明确。本研究旨在探讨 PD-L1 在病毒性肺损伤中的作用,并探究其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选择健康清洁级 8~12 周龄野生型 C57BL/6 小鼠,体重(20±2)g,由广西医科大学实验动物中心(国家级动物中心)提供,PD-L1 基因敲除小鼠由赛业(苏州)生物科技有限公司构建,所有动物实验均获得广西医科大学实验动物伦理委员会的批准,动物合格证号:SCXK 桂 2020-0003,伦理审查号:桂妇保院医伦快审(2022-2)53 号。

1.2 主要试剂与仪器 聚肌苷一聚胞苷酸(Poly I: C) HMW(InvivoGen);BMS-1(MCE);PD-L1 抗体(Abcam);PD-1 抗体(CST);YAP 抗体(Proteintech);p-YAP 抗体(CST); β -actin 抗体(CST);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司);TNF- α 酶联免疫吸附试验(ELISA)Kit 试剂盒(联科生物技术有限公司);小鼠脾脏淋巴细胞分离液试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);活性染色剂 FVS780(BD)。双筒光学显微镜(Olympus);微量核酸蛋白检测仪(Thermo Fisher);双色红外激光成像系统(Odyssey Clx);高性能多功能酶标仪(SpectraMax iD5);流式细胞仪(贝克曼 Cyto FLEX)。

1.3 病毒性急性肺损伤模型小鼠的建立 通过腹腔注射 60 mg/kg 戊巴比妥麻醉小鼠,仰卧位并固定于保温毯上,使用胸部透光法直视下行气管插管,待小鼠气管检查镜暴露气管后,将 20 号无菌静脉注射针套经口插入气管腔内。在小鼠气管内注射用无菌 PBS 稀释的 Poly I: C(10 mg/kg),并根据 Poly I: C 给药时间分为 4 h、8 h、1 d、3 d、7 d 组;小鼠自然苏醒后于相应时间点将小鼠安乐死,收集标本。检测这 5 组小鼠肺部病理损伤程度,并选取其中最严重的组,采用该给药时间统一为后续实验的 Poly I: C 组小鼠进行 Poly I: C 气管内注射,对照组气管内注射等体积 PBS。Poly I: C+BMS-1 组为腹腔注射 10 mg/kg BMS-1(PD-1/PD-L1 抑制剂)预处理 24 h 后再给予 Poly I: C 气管内滴注(10 mg/kg)。

1.4 野生型小鼠和 PD-L1 敲除基因小鼠处理 共

4 组小鼠,分别为:野生型小鼠对照组(WT 对照组)、PD-L1 敲基因小鼠对照组(PD-L1^{-/-}对照组)、野生型小鼠 Poly I: C 组(Poly I: C^{WT} 组)和 PD-L1 敲基因小鼠 Poly I: C 组(Poly I: C^{PD-L1^{-/-}}组)。Poly I: C^{WT} 组和 Poly I: C^{PD-L1^{-/-}}组腹腔注射麻醉后,在小鼠气管内注射用无菌 PBS 稀释的 Poly I: C(10 mg/kg);WT 对照组和 PD-L1^{-/-}对照组腹腔注射麻醉后气管内给予等量生理盐水。1 d 后,将小鼠安乐死,收集标本。

1.5 BALF 收集和处理 通过注射过量麻醉剂量处死小鼠,正中切开小鼠胸骨,打开胸腔以暴露小鼠肺野,用 1 mL 无菌注射器抽取 1 mL 预冷的 PBS 经气管导管注入肺进行灌洗,如此反复 3 次以收取小鼠 BALF。BALF 收集后 1 200 r/min 离心 5 min, PBS 重悬细胞沉淀,吸取 10 μ L 样品加至细胞计数仪检测 BALF 中细胞数。

1.6 分离脾脏淋巴细胞 采用小鼠脾脏淋巴细胞分离液试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)分离纯化小鼠脾脏淋巴细胞,操作步骤按照试剂盒提供的说明书进行。

1.7 苏木精—伊红(HE)染色观察肺组织病理学损伤程度 取小鼠右肺下叶,将肺组织浸泡于 4% 多聚甲醛溶液中固定,石蜡包埋,行 0.5 μ m 切片后贴片于载玻片上,进行 HE 染色,在光镜下观察肺损伤程度,并根据文献[14-15]的方法进行肺损伤病理学评分:观察肺泡腔中性粒细胞、肺间质中性粒细胞、透明膜形成、肺泡腔内纤维蛋白沉积物和肺泡壁增厚 5 项指标并进行评分,5 项累计总分即为肺损伤评分。

1.8 BALF 蛋白浓度测定 采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司)测定离心后的 BALF 上清中蛋白浓度。

1.9 BALF 中 TNF- α 水平测定 将 BALF 从 -80 $^{\circ}$ C 冰箱取出,离心(300 g, 10 min)去除沉淀后即刻检测 TNF- α 水平,按照 Mouse TNF- α ELISA Kit 试剂盒(酶联免疫吸附法)说明书进行检测。

1.10 蛋白质免疫印迹(western blotting, WB)检测蛋白表达 提取组织或细胞蛋白,BCA 法测蛋白浓度;10%聚丙烯酰胺凝胶电泳后,冰上将蛋白转至 PVDF 膜上;TBST 洗膜 3 次,每次 5 min;5%脱脂奶粉常温封闭 1 h;将 PVDF 膜置于 PD-L1(1:1 000, Abcam)、PD-1(1:1 000, CST)、 β -actin(1:1 000, CST)、YAP(1:2 000, Proteintech)、P-YAP(1:1 000,

CST)抗体稀释液中4℃孵育过夜;洗膜,二抗稀释液(1:15 000,Abcam)中室温避光孵育1 h;双色红外激光成像系统(Odyssey Clx)扫描成像。

1.11 流式细胞术检测小鼠淋巴细胞活性 如前所述制备小鼠脾脏淋巴细胞单细胞悬液,用细胞计数仪计数,将体积调整为100 μL, 1×10^7 个/mL,加入0.1 μL Fixable Viability Stain 780 (FVS780)避光孵育后使用流式细胞仪分析,区分死活细胞。

1.12 统计学方法 采用IBM SPSS 20.0软件(Armonk, NY, USA)进行数据整理和统计分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组变量比较采用单因素方差分析,方差齐者采用LSD检验,方差不齐采用Dunnett T3检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

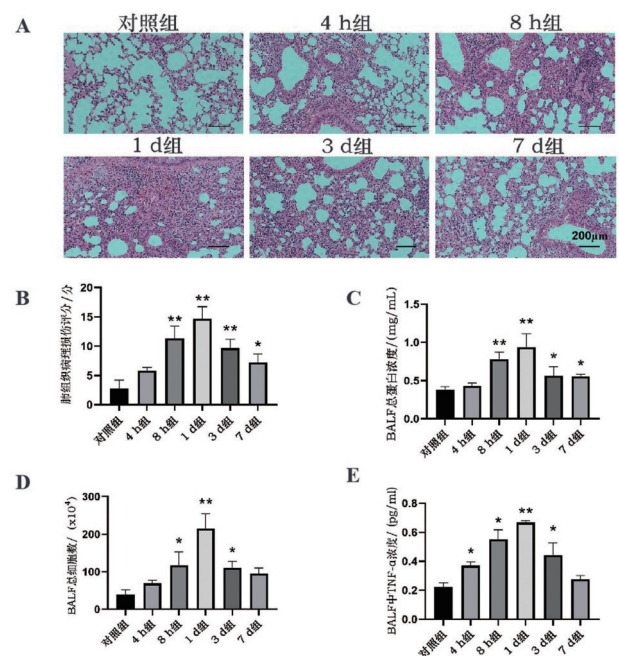
2.1 不同时期病毒性急性肺损伤小鼠肺组织损伤和炎症反应情况

小鼠肺组织HE染色结果显示(图1A),对照组和4 h组小鼠肺组织未见明显病理学改变:肺间质无充血水肿,肺泡腔无炎性渗出;8 h、1 d、3 d、7 d组肺组织结构破坏,肺泡壁增厚,肺间质充血水肿,有炎性细胞浸润,可见透明膜形成,肺泡腔内出现少量纤维蛋白沉积物。与对照组相比,4 h组小鼠肺组织病理损伤评分差异无统计学意义($P > 0.05$);8 h、1 d、3 d、7 d组小鼠肺组织病理损伤评分明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),其中1 d组小鼠肺组织病理损伤评分最高,肺组织损伤最严重(图1B)。

与对照组比较,8 h、1 d、3 d、7 d组BALF中总蛋白浓度显著增高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)(图1C);与对照组比较,8 h、1 d、3 d组BALF中总细胞数明显增多,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图1D);与对照组比较,4 h、8 h、1 d、3 d组BALF中TNF-α水平显著上调,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图1E);其中1 d组小鼠BALF总蛋白浓度、BALF总细胞数以及BALF中TNF-α水平均高于4 h、8 h、3 d、7 d组,1 d组肺组织炎症反应最严重。

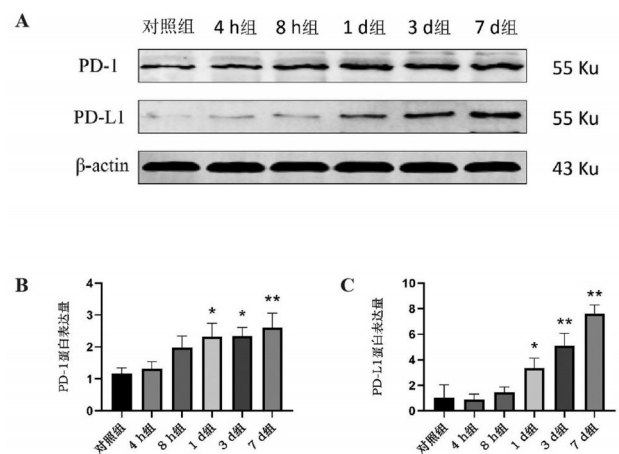
2.2 不同时期病毒性急性肺损伤小鼠肺组织中PD-1、PD-L1蛋白表达情况

小鼠肺组织WB结果显示,与对照组比较,1 d、3 d、7 d组小鼠肺组织中PD-1和PD-L1蛋白水平均有所升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图2。



A: 小鼠肺组织HE染色($\times 100$);B: 小鼠肺组织病理损伤评分;C: BALF总蛋白浓度;D: BALF总细胞数;E: BALF中TNF-α浓度。与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图1 不同时期病毒性急性肺损伤小鼠肺组织损伤和炎症反应情况



A: PD-1、PD-L1蛋白条带图;B: 各组PD-1蛋白表达比较;C: 各组PD-L1蛋白表达比较;与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图2 小鼠肺组织中PD-1、PD-L1蛋白的表达情况

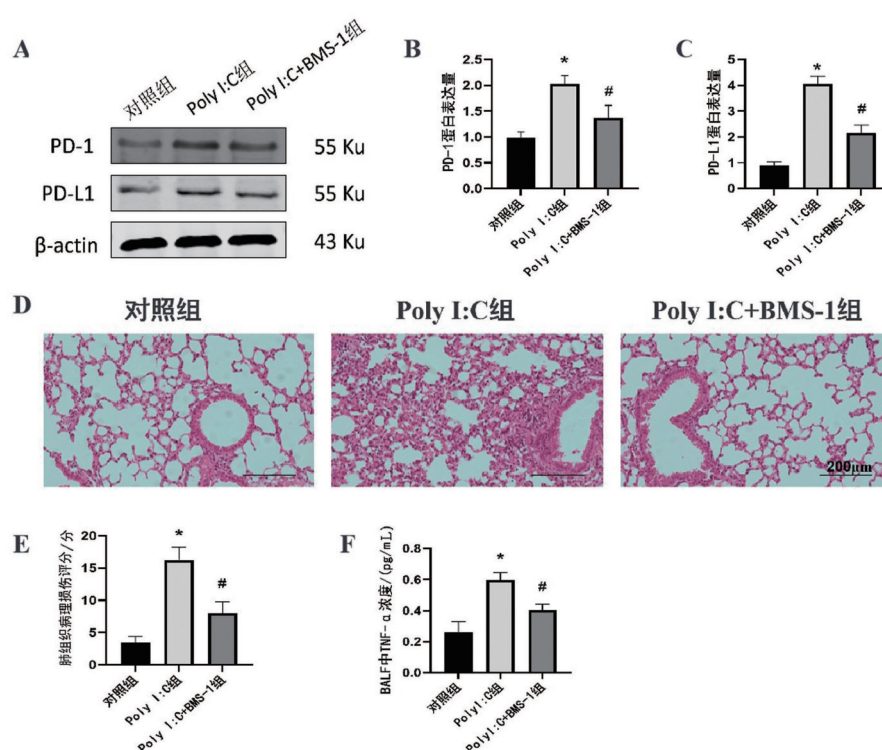
2.3 PD-L1蛋白对小鼠肺组织损伤和炎症反应的影响

选取上述小鼠肺炎损伤最明显的时间点1 d作为观察点,即Poly I: C组,利用抑制剂BMS-1干预观察PD-L1在病毒性急性肺损伤小鼠肺损伤和炎症反应中的作用。WB结果显示,与对照组相比,

Poly I: C 组小鼠肺组织中 PD-1 和 PD-L1 蛋白水平均显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 BMS-1 预处理组 (Poly I: C+BMS-1 组) 与对照组比较, PD-1 和 PD-L1 蛋白水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 Poly I: C 组比较, BMS-1 预处理组 (Poly I: C+BMS-1 组) PD-1 和 PD-L1 蛋白水平均显著降低 ($P < 0.05$), 见图 3A~图 3C。

小鼠肺组织 HE 染色结果显示 (图 3D), 与对照组相比, Poly I: C 组肺组织结构破坏, 肺泡壁明显增厚, 肺泡腔大量炎性细胞浸润; 与 Poly I: C 组相比, Poly I: C+BMS-1 组肺组织结构破坏明显减轻, 肺

间质充血水肿减轻, 炎性浸润减少。Poly I: C 组小鼠肺组织病理损伤评分明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 Poly I: C 组相比, Poly I: C+BMS-1 组小鼠肺组织病理损伤评分显著降低 ($P < 0.05$) (图 3E)。与对照组相比, Poly I: C 组 BALF 中 TNF- α 水平明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 Poly I: C 组相比, Poly I: C+BMS-1 组 BALF 中 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.05$) (图 3F)。BMS-1 预处理可改善 Poly I: C 导致的小鼠肺组织损伤及炎症反应。



A~C: 小鼠肺组织中 PD-1、PD-L1 蛋白的表达及统计分析; D: 小鼠肺组织 HE 染色 ($\times 200$); E: 小鼠肺组织病理损伤评分; F: BALF 中 TNF- α 浓度。与对照组比较, $*P < 0.05$; 与 Poly I: C 组比较, $#P < 0.05$ 。

图 3 PD-L1 蛋白对小鼠肺组织损伤和炎症反应的影响

2.4 BMS-1 对病毒性急性肺损伤小鼠体内淋巴细胞 YAP 磷酸化的影响

制备小鼠脾脏淋巴细胞单细胞悬液后, 流式细胞术检测存活率, 结果显示该细胞存活率 $> 90\%$, 表示细胞存活状态良好, 可用于后续相关实验 (图 4A)。

WB 结果显示 (图 4B~图 4D), 与对照组相比, Poly I: C 组和 Poly I: C+BMS-1 组小鼠淋巴细胞中 YAP 蛋白表达明显下调, p-YAP 蛋白表达显著上调, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 Poly I: C 组相比, Poly I: C+BMS-1 组小鼠淋巴细胞中 YAP 蛋白表达上升, p-YAP 蛋白表达下降, 差异均有统计学意义

($P < 0.05$)。

2.5 PD-L1 基因敲除对病毒性急性肺损伤小鼠体内淋巴细胞 YAP 磷酸化的影响

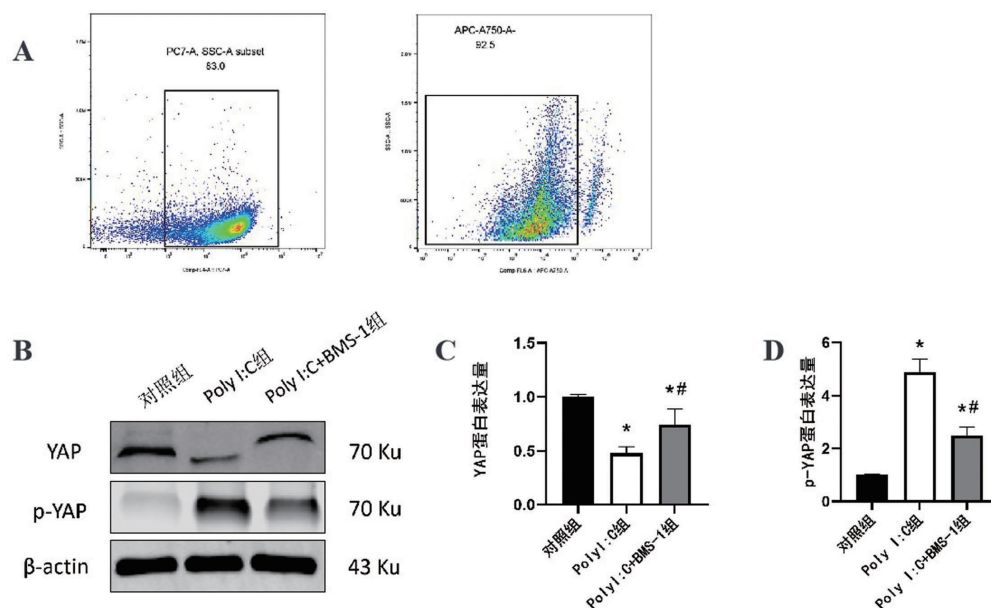
为了在基因层面进一步探究 PD-L1 对病毒性急性肺损伤小鼠体内淋巴细胞 YAP 磷酸化的影响, 采用野生型小鼠和 PD-L1 敲基因小鼠进行实验。

与 WT 对照组相比, Poly I: C^{WT} 组小鼠淋巴细胞中 PD-L1 蛋白表达显著上调 ($P < 0.05$); PD-L1^{-/-} 对照组和 Poly I: C^{PD-L1^{-/-}} 组的 PD-L1 均未表达。在两种类型的小鼠中, Poly I: C 处理后的小鼠淋巴细胞中 PD-1 蛋白表达均明显上调, 差异均有统计学意义

($P < 0.05$), 但 Poly I:C^{WT} 组与 Poly I:C^{PD-L1^{-/-}} 组之间 PD-1 蛋白表达无显著差异。

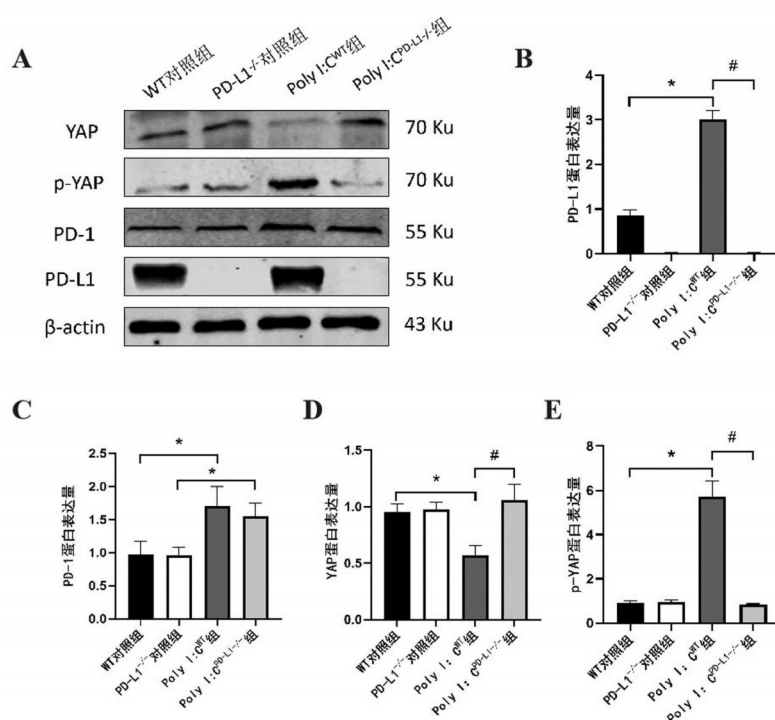
WB 结果显示(图 5), 与 WT 对照组相比, Poly I:C^{WT} 组小鼠淋巴细胞中 YAP 蛋白表达明显下调; 与 PD-L1^{-/-} 对照组小鼠相比, Poly I:C^{PD-L1^{-/-}} 组小鼠淋巴细

胞中 YAP 蛋白表达有所上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 WT 对照组相比, Poly I:C 组小鼠淋巴细胞中 p-YAP 蛋白表达显著上调, Poly I:C^{PD-L1^{-/-}} 组小鼠淋巴细胞中 p-YAP 蛋白表达明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



A: 流式细胞术检测小鼠淋巴细胞活性; B~D: 小鼠淋巴细胞中 YAP、p-YAP 蛋白的表达及统计分析。与对照组比较, $P < 0.05$; 与 Poly I:C 组比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

图 4 小鼠淋巴细胞中 YAP、p-YAP 蛋白的表达情况



组间比较, $^*P < 0.05$, $^{\#}P < 0.05$ 。

图 5 各组小鼠淋巴细胞中 PD-1、PD-L1、YAP、p-YAP 蛋白的表达情况

3 讨 论

本研究应用人工合成的双链 RNA Poly I:C 模拟病毒感染制备病毒性肺损伤小鼠模型, Poly I:C 通过与病毒感染相同的 TLR3 信号转导途径, 促使靶细胞分泌细胞因子和趋化因子, 被报道用来模拟 RNA 病毒感染及病毒致病机制的相关研究^[16]。实验结果显示, Poly I:C 组小鼠肺组织病理损伤评分、BALF 总蛋白浓度、BALF 总细胞数以及 BALF 中 TNF- α 水平增高, 差异有统计学意义, 提示 Poly I:C 诱导小鼠发生急性肺组织炎症损伤, 证明实验小鼠模型建立成功, 其中 1d 组小鼠肺组织炎症损伤最严重。

实验发现病毒性肺损伤小鼠炎症损伤时肺组织中 PD-1 和 PD-L1 蛋白表达上调, 于是本课题组猜测 PD-1/PD-L1 与病毒性急性肺损伤相关。在小鼠的大脑和脊髓中, 狂犬病毒感染导致 PD-L1 表达显著上调, PD-L1 表达在受感染的神经元中特异性表达^[17]。PD-L1 在新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 患者的许多类型的免疫细胞上表达异常, PD-L1 基因的失调与 COVID-19 病例与对照组之间的显著表型差异相关, 主要表现在单核细胞、中性粒细胞和 T 细胞中^[18]。乳酸上调肾脏中 PD-L1 的表达, 诱导淋巴细胞凋亡来诱导免疫抑制, 从而加重脓毒性急性肾损伤^[19]。相比之下, 关于病毒性肺损伤期间 PD-L1 的研究数据很少。PD-L1 的表达受促炎信号调控^[20], PD-L1 自炎症启动后便开始合成分泌, 在我们的实验模型中, 3 d 和 7 d 小鼠肺组织炎症反应趋于缓解, 但仍有大量炎症因子, 炎症并未完全消退, 在炎症因子作用下刺激下 PD-1、PD-L1 蛋白反将继续升高, 肺组织炎症反应减缓是促炎和炎症修复共同导致的结果, 因此表现为虽然肺组织炎症反应有所缓解, 但 PD-1、PD-L1 蛋白表达仍然增多。BMS-1 是一种小分子药物, 可诱导 PD-L1 二聚体化, 从而阻断其与 PD-1 的相互作用^[21]。在本实验中, 使用 PD-1/PD-L1 抑制剂 BMS-1 后, PD-1 和 PD-L1 蛋白表达减少, 同时, BMS-1 阻断 PD-1/PD-L1 通路后肺组织形态学损伤好转, 病理损伤评分以及 BALF 中 TNF- α 水平显著降低, 差异有统计学意义, 说明 BMS-1 预处理可改善小鼠肺组织损伤和炎症反应, 提示 PD-1/PD-L1 参与了小鼠病毒性急性肺损伤的发生发展。

河马信号通路 (hippo signaling pathway, Hippo)

因其对细胞增殖、组织再生、器官大小控制和癌症的关键调控而闻名, 大多数研究集中在 Hippo 通路在调节肿瘤代谢和微环境控制肿瘤生长和转移中的作用^[22]。YAP 作为 Hippo 信号通路的关键分子, 在肺的发育^[23]、限制组织器官大小、抑制肿瘤^[24]方面起着重要作用。研究表明, YAP 磷酸化激活在脓毒症肺损伤细胞凋亡中起核心作用, 抑制 YAP 磷酸化可能是脓毒症肺损伤的一种潜在治疗策略^[25]。我们前期检测小鼠肺组织 PD-L1 的细胞来源, 发现 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞中 PD-L1 表达百分比和倍数显著升高, 因此本实验进一步探讨 PD-L1 对病毒性急性肺损伤小鼠体内淋巴细胞 YAP 磷酸化的影响。我们发现病毒性急性肺损伤小鼠淋巴细胞 YAP 蛋白表达减少, 而 p-YAP 蛋白表达增多, 使用抑制剂干预和 PD-L1 基因敲除后 YAP 蛋白表达回升, p-YAP 蛋白表达下降。这些结果进一步表明, PD-L1 促进了病毒性肺损伤小鼠淋巴细胞的 YAP 磷酸化。

综上所述, PD-L1 蛋白在病毒性急性肺损伤的小鼠肺组织高表达, 并且可能通过激活淋巴细胞的 YAP 磷酸化加重病毒性急性肺损伤。本研究进一步探讨了病毒性肺损伤的发病机制, 为以 PD-1/PD-L1 信号通路为靶点探索在病毒性肺损伤中的治疗策略提供了研究方向和理论依据。然而, 本研究还存在一些不足, 针对 YAP 参与调控病毒性肺损伤发生发展的作用机制及其与 PD-L1 的交互作用尚不明确, 后期将进一步开展相关实验进行验证以完善其相关调控分子机制。

参考文献:

- [1] WU Z Y, MCGOOGAN J M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese center for disease control and prevention[J]. JAMA, 2020, 323(13): 1239-1242.
- [2] RUUSKANEN O, LAHTI E, JENNINGS L C, et al. Viral pneumonia[J]. Lancet, 2011, 377(9773): 1264-1275.
- [3] HIRSCH H H, MARTINO R, WARD K N, et al. Fourth European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL-4): guidelines for diagnosis and treatment of human respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, metapneumovirus, rhinovirus, and coronavirus[J]. Clinical infectious diseases: an official publication of the infectious diseases society of America, 2013, 56(2): 258-266.
- [4] DELANO M J, WARD P A. The immune system's role in

- sepsis progression, resolution, and long-term outcome[J]. Immunological reviews, 2016, 274(1): 330-353.
- [5] HOTCHKISS R S, MONNERET G, PAYEN D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy[J]. Nature reviews immunology, 2013, 13(12): 862-874.
- [6] LUYT C É, COMBES A, TROUILLET J L, et al. Virus-induced acute respiratory distress syndrome: epidemiology, management and outcome[J]. Presse medicale, 2011, 40(12 Pt 2): e561-e568.
- [7] BERGAMASCHI L, MESCIA F, TURNER L, et al. Longitudinal analysis reveals that delayed bystander CD8⁺ T cell activation and early immune pathology distinguish severe COVID-19 from mild disease[J]. Immunity, 2021, 54(6): 1257-1275.e8.
- [8] CALDRER S, MAZZI C, BERNARDI M, et al. Regulatory T cells as predictors of clinical course in hospitalised COVID-19 patients[J]. Frontiers in immunology, 2021, 12: 789735.
- [9] WANG Z Y, GUO Z, WANG X S, et al. Inhibition of EZH2 ameliorates sepsis acute lung injury (SALI) and non-small-cell lung cancer(NSCLC) proliferation through the PD-L1 pathway[J]. Cells, 2022, 11(24): 3958.
- [10] ARPAIA N, GREEN J A, MOLTEDO B, et al. A distinct function of regulatory T cells in tissue protection[J]. Cell, 2015, 162(5): 1078-1089.
- [11] ZHANG J, ZHENG Y P, WANG Y, et al. YAP1 alleviates sepsis-induced acute lung injury via inhibiting ferritinophagy-mediated ferroptosis[J]. Frontiers in immunology, 2022, 13: 884362.
- [12] DIGIOVANNI G T, HAN W, SHERRILL T P, et al. Epithelial Yap/Taz are required for functional alveolar regeneration following acute lung injury[J]. JCI insight, 2023, 8(19): e173374.
- [13] CHAO Y C, LEE K Y, WU S M, et al. Melatonin down-regulates PD-L1 expression and modulates tumor immunity in KRAS-mutant non-small cell lung cancer[J]. International journal of molecular sciences, 2021, 22(11): 5649.
- [14] MATUTE-BELLO G, DOWNEY G, MOORE B B, et al. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals[J]. American journal of respiratory cell and molecular biology, 2011, 44(5): 725-738.
- [15] KULKARNI H S, LEE J S, BASTARACHE J A, et al. Update on the features and measurements of experimental acute lung injury in animals: an official American thoracic society workshop report[J]. American journal of respiratory cell and molecular biology, 2022, 66(2): e1-e14.
- [16] VEIGA-PARGA T, SEHRAWAT S, ROUSE B T. Role of regulatory T cells during virus infection[J]. Immunological reviews, 2013, 255(1): 182-196.
- [17] LAFON M, MÉGRET F, MEUTH S G, et al. Detrimental contribution of the immuno-inhibitor B7-H1 to rabies virus encephalitis[J]. Journal of immunology, 2008, 180(11): 7506-7515.
- [18] SABBATINO F, CONTI V, FRANCI G, et al. PD-L1 dysregulation in COVID-19 patients[J]. Frontiers in immunology, 2021, 12: 695242.
- [19] XU J J, MA X H, YU K L, et al. Lactate up-regulates the expression of PD-L1 in kidney and causes immunosuppression in septic acute renal injury[J]. Wei mian yu gan ran za zhi, 2021, 54(3): 404-410.
- [20] SUN C, MEZZADRA R, SCHUMACHER T N. Regulation and function of the PD-L1 checkpoint[J]. Immunity, 2018, 48(3): 434-452.
- [21] GUZIK K, ZAK K M, GRUDNIK P, et al. Small-molecule inhibitors of the programmed cell death-1/programmed death-ligand 1 (PD-1/PD-L1) interaction via transiently induced protein states and dimerization of PD-L1[J]. Journal of medicinal chemistry, 2017, 60(13): 5857-5867.
- [22] MESSINA B, SARDO F L, SCALERA S, et al. Hippo pathway dysregulation in gastric cancer: from Helicobacter pylori infection to tumor promotion and progression[J]. Cell death & disease, 2023, 14(1): 21.
- [23] WARBURTON D. YAP and TAZ in lung development: the timing is important[J]. American journal of respiratory cell and molecular biology, 2020, 62(2): 141-142.
- [24] ZHAO B, LI L, LEI Q Y, et al. The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version[J]. Genes & development, 2010, 24(9): 862-874.
- [25] YI L, HUANG X Q, GUO F, et al. Lipopolysaccharide induces human pulmonary micro-vascular endothelial apoptosis via the YAP signaling pathway[J]. Frontiers in cellular and infection microbiology, 2016, 6: 133.

本文引用格式:

汪子意, 莫健兰, 陈凤鸣, 等. PD-L1介导淋巴细胞 YAP 磷酸化在病毒性急性肺损伤中的作用[J]. 广西医科大学学报, 2024, 41(2): 247-254. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r. 2024.02.012

WANG Z Y, MO J L, CHEN F M, et al. The role of PD-L1 mediating lymphocyte YAP phosphorylation in viral acute lung injury[J]. Journal of Guangxi medical university, 2024, 41(2): 247-254. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r. 2024.02.012