

胸部肿瘤专题

· 基础研究 ·

# PD-L1 与缺氧诱导的肺癌细胞自噬及增殖相关性的研究

刘辉, 杨小琼<sup>△</sup>, 朱烟林, 何芋香, 刘杰, 谭渝

646000 四川 泸州, 西南医科大学附属医院 呼吸与危重症医学科

[摘要] 目的: 研究缺氧微环境对 H1299 肺癌细胞自噬水平及增殖的影响, 探究程序性死亡受体相关配体(program death ligand 1, PD-L1)在自噬相关通路中的作用。方法: 构建肺癌缺氧微环境模型, 设置对照组、缺氧组及缺氧 + 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)组。缺氧 + 3-MA 组给予 3-MA 干预, 分别于药物刺激 12 h、24 h 和 48 h 时, 通过 CCK-8 测定细胞增殖活性; 通过 Western blot 检测缺氧诱导因子 1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor 1-alpha, HIF-1 $\alpha$ )、微管相关蛋白 1 轻链 3 II (microtubule-associated protein 1 light chain 3-II, LC3-II) 表达; 通过荧光定量 PCR 检测 AKT、LC3-II、PD-L1 mRNA 基因表达水平。结果: 随着缺氧时间的延长, HIF-1 $\alpha$ 、LC3-II、AKT、PD-L1 表达逐渐升高, 细胞增殖活性逐渐增强; 加入自噬抑制剂后, LC3-II、AKT、PD-L1 基因表达水平均有所下降, 同时细胞增殖活性明显下降, 各组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论: 缺氧可能通过激活 PI3K/AKT 自噬通路途径, 上调 PD-L1、LC3-II 表达, 促进肺癌细胞增殖。

[关键词] 程序性死亡受体相关配体; 肺癌; 缺氧; 肿瘤微环境; 自噬; 细胞增殖

[中图分类号] R734.2 [文献标志码] A doi:10.3969/j.issn.1674-0904.2020.09.003

引文格式: Liu H, Yang XQ, Zhu YL, et al. Relation of PD-L1 to autophagy and proliferation of hypoxia-induced lung cancer cells[J]. J Cancer Control Treat, 2020, 33(9): 739-745. [刘辉, 杨小琼, 朱烟林, 等. PD-L1 与缺氧诱导的肺癌细胞自噬及增殖相关性的研究[J]. 肿瘤预防与治疗, 2020, 33(9): 739-745.]

## Relation of PD-L1 to Autophagy and Proliferation of Hypoxia-Induced Lung Cancer Cells

Liu Hui, Yang Xiaoqiong, Zhu Yanlin, He Yuxiang, Liu Jie, Tan Yu

Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China

Corresponding author: Yang Xiaoqiong, E-mail: 18308330539@163.com

[Abstract] **Objective:** To study the effects of hypoxic microenvironment on autophagy level and proliferation of H1299 lung cancer cells, and explore the role of program death ligand 1 (PD-L1) in autophagy-related pathways. **Methods:** We constructed the anoxic microenvironment for lung cancer, and set up the normoxia group (control group), the hypoxia group and the hypoxia + 3-Methyladenine (3-MA) group. Hypoxia + 3MA group was treated with 3MA to determine the cell proliferation activity by CCK-8 at 12 h, 24h and 48 h, respectively. The expression levels of hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1 $\alpha$ ) and microtubule-associated protein 1 light chain 3-II (LC3-II) were detected by Western blot, and the expression levels of AKT, LC3-II and PD-L1 mRNA were detected by qPCR. **Results:** As hypoxia aggravated, the expression of HIF-1 $\alpha$ , LC3-II and PD-L1 gradually increased, and the proliferative activity of cells also increased gradually. After adding the autophagy inhibitor, the expression levels of AKT, LC3-II and PD-L1 mRNA decreased, and the proliferative activity of cells decreased significantly, and the differences were significant among groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Hypoxia may promote the proliferation of lung cancer cells by activating PI3K/AKT autophagy pathway and up-regulating PD-L1 and LC3-II.

[Key words] PD-L1; Lung neoplasms; Hypoxia; Tumor microenvironment; Autophagy; Cell proliferation

[收稿日期] 2020-04-07 [修回日期] 2020-08-05

[通讯作者] <sup>△</sup>杨小琼, E-mail: 18308330539@163.com

近年来,以程序性死亡受体相关配体(programmed death 1/programmed death-1 ligand 1, PD1/PD-L1)抑制剂为代表的免疫疗法在恶性肿瘤治疗方面取得突破性进展,提高了晚期非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者的客观缓解率<sup>[1]</sup>。既往研究多集中在单一免疫检测点通路,然而免疫相关不良反应的出现,肿瘤微环境本身的复杂性限制了 PD1/PD-L1 通路在免疫治疗中的研究进展<sup>[2]</sup>。有研究表明<sup>[3-5]</sup>,在缺氧等应激状态下,肿瘤细胞内的溶酶体可对受损的细胞器及相关分子进行吞噬降解、再利用,即自噬,以此免受肿瘤微环境的负向影响,从而促进自身的存活。然而,肿瘤微环境尤其是缺氧微环境中,免疫检测点 PD1/PD-L1 在肿瘤细胞自噬相关通路中的影响机制尚未明确。本研究通过缺氧诱导 H1299 肺癌细胞自噬,同时给予一种特异性的磷脂酰肌醇三激酶(phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K)自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)进行干预,观察缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1-alpha, HIF-1 $\alpha$ )、自噬通路相关的微管相关蛋白 1 轻链 3-II (microtubule-associated protein 1 light chain 3-II, LC3-II)、AKT 和免疫检查点 PD-L1 的基因表达水平,以及细胞增殖情况,探讨 PD-L1 在肿瘤细胞自噬相关通路中的作用,为研究肺癌细胞药物耐受、逃避免疫系统攻击的机制,提供新的思路和方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂及器材

人肺腺癌细胞株 H1299 购自西南医科大学医学基础研究中心;缺氧培养箱(三通气培养箱, Thermo 公司);CCK-8 检测试剂盒购于碧云天生物技术有限公司;EntiLink™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 购于 ELK Biotechnology 公司、一抗为单克隆兔抗人的 HIF-1 $\alpha$  购于 abcam 公司、兔抗人的 LC3-II 购于 CST 公司,二抗 HRP-Goat anti Rabbit 购于 ASPEN 公司。

### 1.2 实验分组及缺氧培养

实验设对照组(Normoxia)、缺氧组(Hypoxia)及缺氧+3-MA组(Hypoxia+3-MA)。细胞用 10% 胎牛血清的完全培养基,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、21% O<sub>2</sub> 常规培养箱中传代培养,根据后续实验的不同,分别接种于 96 孔板及 60 mm 培养皿中,换用无血清培养基培养 12 h 使细胞周期同步化。更换新鲜培养基

后,对照组继续于常规培养箱培养,缺氧+3-MA 组加入药物 3-MA 预处理 5 min(通过查阅文献和前期预实验,选择最佳药物作用浓度 5 mM),然后缺氧组及缺氧+3-MA 组细胞同时置于 37 $^{\circ}$ C, 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub> 缺氧培养箱中培养 12 h、24 h 和 48 h。

### 1.3 CCK-8 测 H1299 细胞增殖活性

取对数生长期的 H1299 细胞,0.25% 胰酶消化吹打,以  $10 \times 10^4$  个/mL 的细胞密度接种于 96 孔板中,每孔 100  $\mu$ L,设对照组、缺氧组及缺氧+3-MA 组,每组 3 个复孔。缺氧+3-MA 组加入药物 3-MA (5 mM) 预处理 5 min。不同组在不同培养箱中培养,分别于 12 h、24 h 和 48 h 行 CCK-8 检测。每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 试剂,孵育 2 h,于 450 nm 处测定吸光值,以时间(h)为横坐标,OD<sub>450</sub> 为纵坐标绘制增殖存活曲线。

### 1.4 Western blot 检测 HIF-1 $\alpha$ 及 LC3-II 蛋白表达

取接种于 60 mm 培养皿中的 H1299 细胞,缺氧+3-MA 组先加入 3-MA (5 mM) 预处理 5 min,分别于 12 h、24 h 和 48 h 收集各组细胞。冰上预冷,磷酸盐缓冲溶液洗涤 3 次,加入蛋白提取试剂。BCA 法测定蛋白浓度。12% SDS-PAGE,蛋白上样量为 30  $\mu$ g,恒压电泳。湿转法电转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,单克隆兔抗人 HIF-1 $\alpha$  (1:500)、LC3-II (1:1 000) 及  $\beta$ -actin (1:10 000) 孵膜,4 $^{\circ}$ C 过夜后,洗膜 3 次,加入辣根酶标记羊抗兔 IgG 二抗稀释液 (1:10 000),ECL 混合液在室温下反应 1 min 后,进行曝光。最后应用 Image J 软件进行图像分析。

### 1.5 荧光定量 PCR 检测 PD-L1、LC3-II、AKT mRNA 基因表达

收取各组在 12 h、24 h 和 48 h 的 H1299 肺癌细胞,加入 TRI pure 裂解液,充分裂解。将提取的 mRNA 通过 EntiLink™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒获得 cDNA。PD-L1、LC3-II、AKT 相关引物序列信息见表 1,实时荧光定量 PCR,PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 3 min 预变性;95 $^{\circ}$ C, 10 s $\rightarrow$ 58 $^{\circ}$ C, 30 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C, 30 s,扩增 40 个循环。以  $\beta$ -actin 为内参,数据采用  $\Delta\Delta$ CT 法定量分析扩增曲线及溶解曲线。

### 1.6 统计学分析

应用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,数据用均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间采取单因素方差分析及 *q* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

表 1 PD-L1、LC3-II、AKT 基因相关引物信息

Table 1. Primer Information Related to PD-L1, LC3-II and AKT Genes

Name of primer	Positive/anti-chain	Base sequence	T <sub>m</sub> (°C)	CG%	Product length (bp)
H-ACTIN	Sense	GTCCACCGCAAATGCTTCTA	58.7	50	190
	Antisense	TGCTGTCACCTTCACCGTTC	58.9	55	
H-PD-L1	Sense	GTAGCACTGACATTCATCTTCC	59.2	47.8	127
	Antisense	CAATGCTGGATTACGTCTCCTC	59	50	
H-LC3-II	Sense	TCCGACTTATTCCGAGAGCAGC	59.8	52.4	167
	Antisense	AGCATTGAGCTGTAAGCGCC	60.6	55	
H-AKT	Sense	GTGGAGGACCAGATGATGC	60.4	47.8	285
	Antisense	TGCCCCTGCTATGTGTAAG	60.7	47.6	

## 2 结果

### 2.1 建立肺癌缺氧模型

本实验通过缺氧培养环境模拟缺氧微环境,以 Western blot 检测 HIF-1 $\alpha$  的表达来验证模型。如图 1 所示,在常氧培养中,HIF-1 $\alpha$  的蛋白表达较低,缺

氧培养中,HIF-1 $\alpha$  的蛋白表达明显增高,缺氧组 12 h、24 h 和 48 h 蛋白表达水平分别为  $0.316 \pm 0.021$ 、 $0.434 \pm 0.029$  及  $0.566 \pm 0.039$ ,和对照组在不同时间相比,差异有统计学意义 ( $P = 0.001$ 、 $P = 0.002$ 、 $P = 0.007$ )。

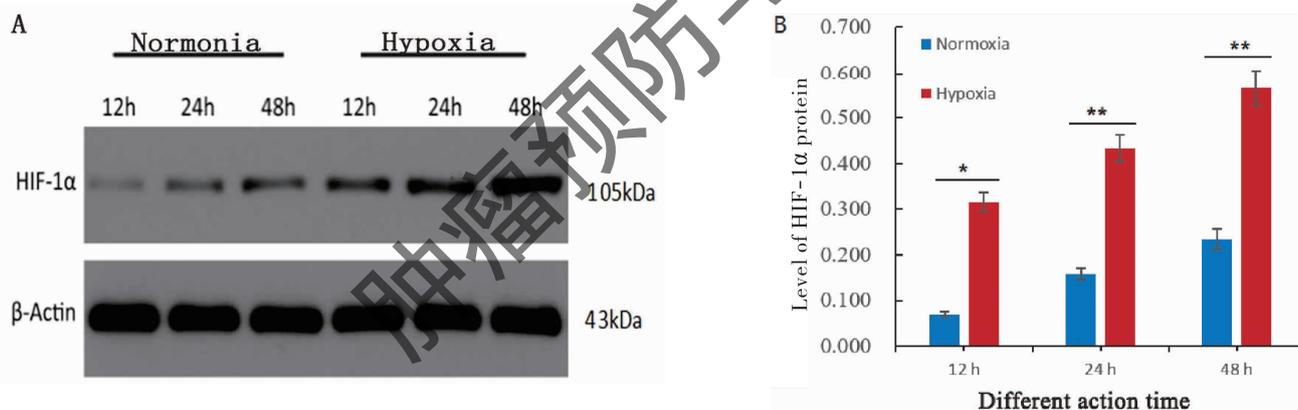


图 1 缺氧诱导因子 HIF-1 $\alpha$  在常氧及缺氧环境中不同时间点的表达水平

Figure 1. Expression of HIF-1 $\alpha$  in Normoxic and Hypoxic Environments at Different Time Points (\*  $P = 0.001$ , \*\*  $P < 0.05$ )

A; Protein expression at different time points in hypoxia and normoxia groups by Western blot; B: Protein expression levels at different time points between the hypoxia group and the normoxia group.

HIF-1 $\alpha$ : Hypoxia-inducible factor 1-alpha.

### 2.2 CCK-8 检测 H1299 肺癌细胞增殖活性

如图 2 所示,CCK-8 检测对照组、缺氧组、缺氧 + 3-MA 组在分别培养 12 h 时,OD<sub>450</sub> 值为:  $0.536 \pm 0.013$ 、 $0.473 \pm 0.014$  和  $0.356 \pm 0.009$ ; 24 h 的 OD<sub>450</sub> 值分别为:  $0.623 \pm 0.004$ 、 $0.782 \pm 0.007$  和  $0.506 \pm 0.006$ ; 48 h 的 OD<sub>450</sub> 值分别为:  $0.686 \pm 0.005$ 、 $0.982 \pm 0.010$  和  $0.577 \pm 0.004$ 。在 12 h 时,缺氧组表达量较对照组降低,两者的差异有统计学意义 ( $P = 0.001$ ),缺氧 + 3-MA 组表达量较缺氧组

降低,两者的差异有统计学意义 ( $P = 0.005$ ); 在 24 h 时,缺氧组表达量较对照组明显增高,差异有统计学意义 ( $P = 0.020$ ),缺氧 + 3-MA 组较缺氧组明显降低,两者差异有统计学意义 ( $P = 0.001$ ); 在 48 h 时,缺氧组表达量亦较对照组明显增高,差异有统计学意义 ( $P = 0.010$ ),缺氧 + 3-MA 组亦较缺氧组明显降低,两者差异有统计学意义 ( $P = 0.003$ )。

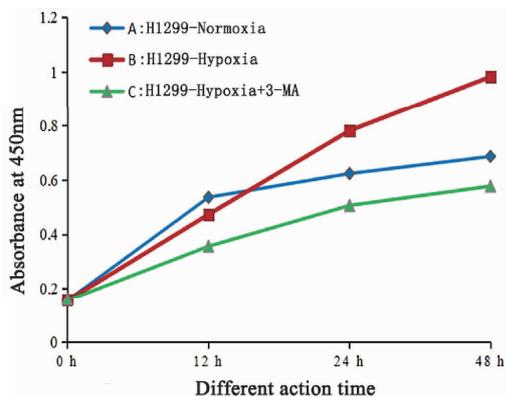


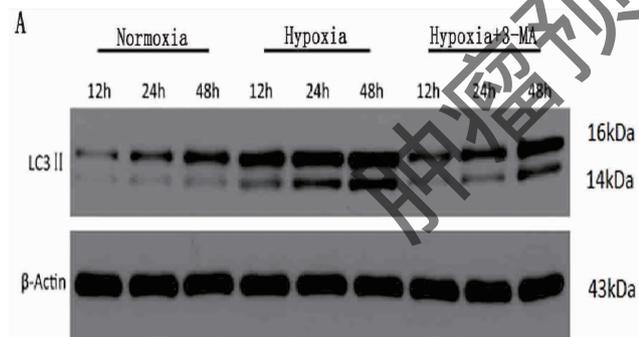
图2 缺氧和自噬抑制剂 3-MA 在不同时间对 H1299 肺癌细胞增殖活性的影响

Figure 2. Effects of Hypoxia and Autophagy Inhibitor 3-MA on the Proliferation of H1299 Lung Cancer Cells at Different Time

3-MA: 3-Methyladenine.

### 2.3 Western Blot 检测自噬相关通路蛋白 LC3-II 表达水平

如图 3 所示,随着常氧培养及缺氧时间的延长(12~48 h),LC3-II 表达量逐渐升高,并呈时间依赖性。和对照组相比,缺氧组在 3 个作用时间点的 LC3-II 表达量明显增加,差异有统计学意义( $P =$



0.046、 $P = 0.001$ 、 $P = 0.023$ )。和缺氧组相比,缺氧+3-MA 组在 3 个时间点的 LC3-II 表达量明显降低,差异亦有统计学意义( $P = 0.016$ 、 $P = 0.001$ 、 $P = 0.045$ )。

### 2.4 不同时间点检测 H1299 细胞中 PD-L1 基因 mRNA 表达水平

通过荧光定量 PCR 检测对照组、缺氧组、缺氧+3-MA 组的 PD-L1 基因表达水平,12 h 分别为:  $1.04 \pm 0.04$ 、 $1.87 \pm 0.19$ 、 $1.48 \pm 0.06$ ;24 h 分别为:  $1.21 \pm 0.07$ 、 $2.77 \pm 0.11$ 、 $2.33 \pm 0.18$ ;48 h 分别为:  $1.72 \pm 0.12$ 、 $3.64 \pm 0.29$ 、 $3.00 \pm 0.04$ 。如图 4 所示,在 12 h 时,缺氧组的 PD-L1 基因 mRNA 表达量较对照组高,两者差异有统计学意义( $P = 0.004$ ),缺氧+3-MA 组和缺氧组相比有所降低,但差异无统计学意义( $P = 0.067$ );24 h 时,PD-L1 表达量缺氧组较对照组明显增高,两者差异有统计学意义( $P = 0.001$ ),缺氧+3-MA 组较缺氧组明显降低,差异亦有统计学意义( $P = 0.012$ );在 48 h 时,缺氧组的 PD-L1 mRNA 表达水平较对照组明显增高,两者差异有统计学意义( $P = 0.032$ ),缺氧+3-MA 组较缺氧组有所降低,差异亦有统计学意义( $P = 0.011$ )。

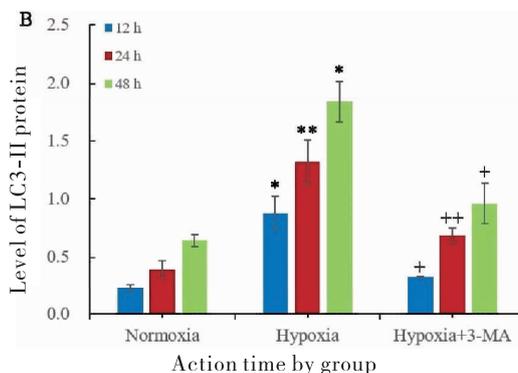


图3 缺氧和 3-MA 在不同时间对 H1299 肺癌细胞自噬相关通路蛋白 LC3-II 表达水平的影响

Figure 3. Effects of Hypoxia and 3-MA on the Expression of Autophagy-Related Protein LC3-II in H1299 Lung Cancer Cells at Different Times

A: Protein expression levels by group at different time points detected by Westernblot; B: Protein expression levels by group at different time points.

Compared to the normoxia group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P = 0.001$ ; compared to the hypoxia group, + $P < 0.05$ , ++ $P = 0.001$ .

LC3-II: Microtubule-associated protein 1 light chain 3-II.

### 2.5 同一时间点各组间 PD-L1、LC3-II、AKT 基因 mRNA 表达水平的比较

我们通过荧光定量 PCR 检测不同时间点(12~48 h)PD-L1、LC3-II、AKT 基因 mRNA 表达水平,发现 48 h 三者的表达水平均最高,故选此时三者基因

表达量进行组间差异性比较。对照组分别为:  $1.00 \pm 0.09$ 、 $0.90 \pm 0.10$  和  $1.12 \pm 0.12$ ;缺氧组分别为:  $2.78 \pm 0.16$ 、 $2.14 \pm 0.17$  和  $2.03 \pm 0.04$ ;缺氧+3-MA 组分别为:  $2.05 \pm 0.14$ 、 $1.68 \pm 0.08$  和  $1.98 \pm 0.07$ 。如表 2 所示,Hypoxia 组的 PD-L1 基因 mRNA

表达水平较 Normoxia 组增高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), Hypoxia + 3-MA 组较 Hypoxia 组显著降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ ); Hypoxia 组的 LC3-II 基因表达水平较 Normoxia 组明显增高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), Hypoxia + 3-MA 组较 Hypoxia

组显著降低, 差异亦有统计学意义 ( $P < 0.001$ ); Hypoxia 组的 AKT 基因 mRNA 表达量较 Normoxia 组显著增高, 差异亦有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), Hypoxia + 3-MA 组较 Hypoxia 组有所降低, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 2 PD-L1、LC3-II 和 AKT 基因水平的比较

Table 2. Expression Levels of PD-L1, LC3-II and AKT Genes

Variable	N	PD-L1	LC3-II	AKT
Normoxia	3	1.00 ± 0.09	0.90 ± 0.10	1.12 ± 0.12
Hypoxia	3	2.78 ± 0.16 <sup>a</sup>	2.14 ± 0.17 <sup>a</sup>	2.03 ± 0.04 <sup>a</sup>
Hypoxia + 3-MA	3	2.05 ± 0.14 <sup>b</sup>	1.68 ± 0.08 <sup>b</sup>	1.98 ± 0.07
F		90.18	54.94	74.18
P		<0.05	<0.05	<0.05

Comparison between the hypoxia group and the normoxia group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; comparison between the hypoxia + 3-MA group and the hypoxia group, <sup>b</sup> $P < 0.001$ .

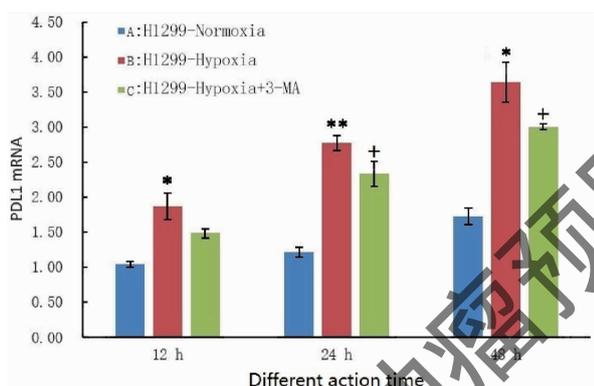


图 4 缺氧和自噬抑制剂 3-MA 在不同时间对 H1299 肺癌细胞 PD-L1 mRNA 基因表达水平的影响

Figure 4. Effects of Hypoxia and Autophagy Inhibitor 3-MA on the Expression of PD-L1 mRNA in H1299 Lung Cancer Cells at Different Time

Compared to the normoxia group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P = 0.001$ ; compared to the hypoxia group, † $P < 0.05$ .

PD-L1: Program death-1 ligand 1.

### 3 讨论

免疫治疗在 NSCLC 中是继靶向治疗后又一突破性治疗手段, 极大提高了广泛期 NSCLC 治疗成功率。近来发现的 PD-L1 因其在肿瘤组织上广泛表达且参与肿瘤的发展, 已成为免疫学和肿瘤学的研究热点<sup>[6]</sup>。目前, 驱动基因阴性的晚期 NSCLC 患者, 推荐 PD1/PD-L1 抑制剂联合化疗药物作为一线治疗选择方案, 并写入美国国立综合癌症网络指

南<sup>[7]</sup>。既往研究表明, PD-L1 与表达于 T 细胞表面的抑制性受体 PD1 结合, 对免疫 T 细胞的激活具有负向调控作用<sup>[8-10]</sup>。PD1/PD-L1 抑制剂通过封闭免疫检查点 PD1/PD-L1, 从而特异性激活免疫系统, 发挥肿瘤免疫杀伤作用。然而, 随着单一或联合 PD1/PD-L1 抑制剂在越来越多的肺癌患者中得到应用, 其免疫相关不良反应和影响治疗的因素也越来越受到人们的关注<sup>[11]</sup>。

HIF-1 $\alpha$  被认为是低氧条件下产生的主要标记分子, 在常氧环境, HIF-1 $\alpha$  常被蛋白酶降解而不稳定<sup>[12-13]</sup>, 我们通过模拟缺氧微环境, Western blot 检测 HIF-1 $\alpha$  表达水平进行模型评估, 从而构建稳定的肿瘤缺氧微环境模型, 保证后续实验的准确性和延续性。本研究通过缺氧诱导肺癌细胞自噬, 检测相关通路蛋白及基因水平的表达, 发现缺氧可促进肿瘤细胞自噬相关通路蛋白的表达及细胞增殖活性的增加, 且这个过程可被 PI3K 抑制剂 3-MA 所抑制, PD-L1 与肺癌细胞自噬及细胞增殖水平的变化有明显的相关性。随着对肿瘤细胞自噬研究的深入, 缺氧微环境中, 免疫检测点 PD-L1 与肺癌细胞自噬逐渐被认识。

既往研究发现, 肿瘤细胞与肿瘤微环境可以相互影响, 肿瘤细胞可以重塑肿瘤微环境, 微环境反之能进一步影响肿瘤细胞的行为和状态。其中缺氧是肿瘤微环境最明显的特征之一, 缺氧微环境能够诱导肿瘤细胞中与自噬、增殖、分化、侵袭转移及免疫耐受等相关癌基因的表达, 来维持癌细胞生长和转

移、免疫逃逸等恶性表型<sup>[14]</sup>。其中自噬是普遍存在于大部分真核细胞中的一种保守的分解代谢过程,对于肿瘤细胞而言,自噬的形成过程极其复杂,包括:自噬体的形成、降解、再利用的过程,自噬体的形成为其核心<sup>[15-16]</sup>,多种自噬相关基因参与其中。微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 是最重要的自噬相关通路蛋白之一,LC3 前体形成后,在胞浆中加工成可溶性形式微管相关蛋白 1 轻链 3-I (microtubule-associated protein 1 light chain 3-I, LC3-I),随后被修饰成膜结合形式的 LC3-II 蛋白,并定位于自噬前体和自噬体膜上,使之成为自噬体的标志分子。溶酶体和自噬体融合成自噬溶酶体后,自噬体内的 LC3-II 可被溶酶体中的水解酶降解,LC3-II 含量的多少与自噬体数量成正相关。与此同时,微管相关蛋白在自噬相关泛素化途径,如 ATG12-ATG5-ATG16L 的修饰过程中起重要作用,通过检测 LC3-II 蛋白表达情况,可初步反映自噬水平<sup>[17-18]</sup>。

PI3K 是细胞内一种重要的信号转导分子,激活后可使蛋白激酶 AKT 获得催化活性,进而激活或抑制下游的靶向蛋白,如 NF- $\kappa$ B、mTOR、Bcl-2 家族、E2F、Caspase-9、p53 和 S6 蛋白激酶等,进而发挥一系列生物学活性<sup>[19]</sup>。3-MA 为一种特异性的 PI3K 抑制剂,研究发现,自噬的激活过程需依赖 PI3K<sup>[20]</sup>,该抑制剂可通过阻碍 Beclin-1-Ptdlns3KC3 相关复合物的形成,而抑制可溶性形式 LC3-I 向膜结合形式 LC3-II 转化。其广泛参与了自噬小体的形成与发展,在抑制自噬相关通路中起到及其重要的作用,被普遍用于自噬相关通路研究。上述实验发现,缺氧组 AKT、LC3-II、PD-L1 在基因表达水平较对照组明显升高,加入自噬抑制剂(3-MA)后,三者的表达水平均降低。可见,缺氧可同时上调自噬相关通路蛋白 AKT、LC3-II 及 PD-L1 表达,而这个过程可被特异性的 PI3K 抑制剂 3-MA 所抑制,PD-L1 随着 AKT、LC3-II 基因水平的变化而变化,表明 PD-L1 可能参与了肺癌细胞自噬相关通路的表达,推测可能与 PI3K/AKT 通路有关。上述研究表明,LC3-II 及 PD-L1 与 H1299 肺癌细胞增殖活性密切相关。在实验 12 h 时,可见缺氧组 H1299 肺癌细胞增殖活性较常氧组低,随着缺氧培养时间的延长(12~48 h),肺癌细胞的增殖活性逐渐增强。通过上述实验结果推测,缺氧早期自噬水平较低,肺癌细胞抵御外界环境的能力较差,甚至早期自噬可能抑制肺癌细胞增殖,可能为 12 h 细胞增殖降低的原因

之一,但随着肿瘤微环境的逐渐恶化,肿瘤细胞逐渐调整策略,可能通过激活 PI3K/AKT 自噬相关通路,上调 PD-L1 及 LC3-II 蛋白的表达,增强肺癌细胞自噬水平,从而逃避恶劣的肿瘤微环境的影响,最终使得自身得以生存。目前发现 PD-L1 可能参与了 PI3K/AKT 自噬相关通路表达,但免疫检查点、缺氧微环境与肿瘤细胞自噬水平之间仍有许多问题亟待解决,PD1/PD-L1 本身的免疫负调控通路和肿瘤细胞自噬相关通路是否存在其它交叉反应,以及缺氧微环境会不会影响免疫检查点和自噬的其它通路,都需要进一步探究。该实验是通过缺氧的培养环境模拟肿瘤细胞的缺氧微环境,和体内实际的缺氧微环境有一定区别,接下来我们的工作,是研究 PD1/PD-L1 抑制剂在动物体内缺氧微环境中对自噬水平的影响机制,通过缺氧微环境、自噬与免疫检查点相关研究,探索一种联合治疗的策略,进一步提高人体肿瘤免疫治疗的效果。

**作者声明:**本文全部作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任;并承诺论文中涉及的原始图片、数据资料等已按照有关规定保存,可接受核查。

**学术不端:**本文在初审、返修及出版前均通过中国知网(CNKI)科技期刊学术不端文献检测系统的学术不端检测。

**同行评议:**经同行专家双盲外审,达到刊发要求。

**利益冲突:**所有作者均声明不存在利益冲突。

**文章版权:**本文出版前已与全体作者签署了论文授权书等协议。

#### [参考文献]

- [1] Li S, Zhang S, Liu J, *et al.* The effect of PD-L1/PD-1 immunotherapy in the treatment of squamous non-small-cell lung cancer: A meta-analysis of randomized controlled clinical trials[J]. *J Thorac Dis*, 2019, 11(11): 4453-4463.
- [2] Jiang XJ, Wang J, Deng XY, *et al.* Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 10.
- [3] Mazure NM, Pouyssegur J. Hypoxia-induced autophagy: Cell death or cell survival? [J]. *Cur Opin Cell Biol*, 2010, 22(2): 177-180.
- [4] 李洋,张清富,王洋,等. 缺氧对肺癌细胞 CCR7 表达及其侵袭力的影响[J]. *中国肺癌杂志*, 2008, 11(5): 704-706.
- [5] Qureshi-Baig K, Kuhn D, Viry E, *et al.* Hypoxia-induced autophagy drives colorectal cancer initiation and progression by activating the PRKC/PKC-EZR (ezrin) pathway[J]. *Autophagy*, 2020, 16

- (8) : 1436-1452.
- [6] Yu H, Boyle TA, Zhou C, *et al.* PD-L1 expression in lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2016, 11(7) : 964-975.
- [7] Ettinger DS, Wood DE, Aggarwal C, *et al.* NCCN guidelines insights: Non-small cell lung cancer, Version 1. 2020 [J]. *J Nat Compr Canc Netw*, 2019, 17(12) : 1464-1472.
- [8] He JB, Hu Y, Hu MM, *et al.* Development of PD-1/PD-L1 pathway in tumor immune microenvironment and treatment for non-small cell lung cancer [J]. *Sci Rep*, 2015, 5 : 13110.
- [9] Shimizu K, Okita R, Saisho S, *et al.* Comparative study of the PD-L1 expression and CD8 + tumor-infiltrating lymphocyte between surgically resected and matched re-biopsy specimens in recurrent non-small cell lung cancer [J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2019, 15 : 605-612.
- [10] 陈正庭, 曹轲, 李文辉, 等. 放疗联合免疫检查点抑制剂在晚期非小细胞肺癌中的研究进展 [J]. *肿瘤预防与治疗*, 2019, 32(1) : 86-92.
- [11] Wang L, Ma Q, Yao R, *et al.* Current status and development of anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy for lung cancer [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 79 : 106088.
- [12] Burke B, Tang N, Corke KP, *et al.* Expression of HIF - 1 $\alpha$  by human macrophages: Implications for the use of macrophages in hypoxia - regulated cancer gene therapy [J]. *J Pathol*, 2002, 196(2) : 204-212.
- [13] Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1 $\alpha$  [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(4) : 621-627.
- [14] Noman MZ, Hasmim M, Lequeux A, *et al.* Improving cancer immunotherapy by targeting the hypoxic tumor microenvironment: New opportunities and challenges [J]. *Cells*, 2019, 8(9) : E1083.
- [15] Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) [J]. *Autophagy*, 2016, 12(1) : 1-222.
- [16] Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(12) : 961-967.
- [17] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 445 : 77-88.
- [18] Lee S, Schmitt CA. The dynamic nature of senescence in cancer [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(1) : 94-101.
- [19] Wee KB, Aguda BD. Akt versus p53 in a network of oncogenes and tumor suppressor genes regulating cell survival and death [J]. *Biophys J*, 2006, 91(3) : 857-865.
- [20] Blommaart EF, Krause U, Schellens JP, *et al.* The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes [J]. *Eur J Biochem*, 1997, 243(1-2) : 240-246.



肿瘤预防与治疗

· 读者 · 作者 · 编者 ·

### 关于假冒《肿瘤预防与治疗》编辑的声明

近期发现有人或机构通过电子邮件或微信假冒《肿瘤预防与治疗》的责任编辑, 散布虚假信息。对此, 本刊特此声明:

- 1) 本刊仅通过①在线采编系统; ②官方邮箱 zlyfyzl@163.com 接收稿件并通知版面费缴纳等事宜。
- 2) 本刊不会向作者收取除版面费之外的任何费用。
- 3) 一切疑问均以《肿瘤预防与治疗》编辑部官方电话 028 - 85420233 解释为准。

请广大作者注意甄别, 谨防假冒。

《肿瘤预防与治疗》

网站: www.zlyfyzl.cn

邮箱: zlyfyzl@163.com

电话: 028 - 85420233