



· 论 著 ·

# PI3K/AKT通路通过Nrf2途径调控PD-L1在非小细胞肺癌中的表达

王 静, 陈 洁, 胡 春, 黄 诚

福建医科大学附属厦门弘爱医院肿瘤科, 福建 厦门, 361009

**[摘要]** 背景与目的: 程序性死亡[蛋白]配体-1 (programmed death ligand-1, PD-L1) 在肿瘤细胞中的表达对肿瘤逃避机体免疫监视具有重要的意义, 其表达通常受MAPK、PI3K-AKT或STAT3等多条通路的影响, 但这些通路具体经哪个关键环节尚不明确。拟通过PI3K/AKT信号通路对肺癌细胞A549、H460中PD-L1表达的调控具体机制进行探究。方法: 使用shRNA技术选择性地沉默A549、H460细胞中的*HEB*、*HTF4*、*Nrf2*及*FOXO3a*等基因, 构建缺陷细胞株; 将目的基因*PD-L1*的3'UTR区域构建至pGL3-basic载体中, 通过luciferase双报告基因体系检测*PD-L1*转录激活情况, 并使用实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 技术验证细胞内*PD-L1*基因转录的情况; 通过蛋白质印迹法 (Western blot) 检测细胞内PD-L1的总表达情况; 免疫细胞与肿瘤细胞共培养, 检测*Nrf2*基因敲除前后, 人外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) 对A549、H460细胞株的杀伤效果。结果: 经10 μg/mL的insulin刺激后, A549、H460细胞株中蛋白激酶B (AKT) 基因磷酸化水平显著增强, 伴随着*PD-L1*基因的转录水平和表达水平显著增强 ( $P < 0.001$ ), 在*HEB*、*HTF4*及*FOXO3a*基因敲除的细胞株中, 情况相似, 而在*Nrf2*基因敲除的细胞株A549 (A549<sup>*Nrf2*-</sup>) 和H460 (H460<sup>*Nrf2*-</sup>) 细胞株中, *PD-L1*的转录和表达水平则与阴性对照组一样未见明显变化 ( $P > 0.05$ ); 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 诱导剂isoproterenol能提高A549、H460细胞株中*PD-L1*基因的转录和表达水平, 而ROS在被NAC解除后, *PD-L1*的转录和表达水平显著下调, 进一步证明*Nrf2*对*PD-L1*基因的转录调控作用; wortmannin能逆转insulin刺激引起的AKT磷酸化水平增加, 促进*PD-L1*基因的转录水平和表达水平下降, 表明*PD-L1*的调控与AKT激活程度相关; 在insulin和wortmannin的分别干预下, A549、H460细胞株中的*Nrf2*磷酸化水平能随着AKT磷酸化水平改变而改变, 二者相关系数 $r$ 分别为0.86和0.93, 为强正相关; *Nrf2*敲除后, A549、H460细胞株与PBMC共培养后凋亡数量显著增加。结论: *PI3K/AKT*通路对肺癌细胞A549、H460中PD-L1表达具有关键调控作用, 该调控是通过磷酸化激活*Nrf2*而实现的。

**[关键词]** 免疫监视; PD-L1; 肺癌

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2020.06.003

中图分类号: R734.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2020)06-0419-09

**PI3K/AKT regulates the expression of PD-L1 via Nrf2 pathway in non-small cell lung cancer** WANG Jing, CHEN Jie, HU Chun, HUANG Cheng (Department of Oncology, Xiamen Humanity Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Xiamen 361009, Fujian Province, China)

Correspondence to: HUANG Cheng E-mail: cheng671@sina.com

**[Abstract]** **Background and purpose:** Programmed death ligand-1 (PD-L1) plays an important role in sheltering tumor cell from surveillance of immune system. While the potential modulation is regarded as being performed at MAPK, PI3K-AKT and STAT3 pathway in most cases, the key control point has never been explicitly reported. This study aimed to probe on this mechanism of lung carcinoma via PI3K/AKT pathway based on the A549 and H460 cell lines. **Methods:** By using shRNA technology, we created several selectively 'silent' mutations of A 549 and H460 cell lines, involving A549<sup>*HEB*-</sup>, A549<sup>*HTF4*-</sup>, A549<sup>*Nrf2*-</sup>, A549<sup>*FOXO3a*-</sup>, H460<sup>*HEB*-</sup>, H460<sup>*HTF4*-</sup>, H460<sup>*Nrf2*-</sup> and H460<sup>*FOXO3a*-</sup>. 3'UTR region of *PD-L1* was constructed into pGL3-basic vector in order to create a dual luciferase reporter gene system which was able to be used for monitoring the transcriptional activation of *PD-L1*. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR) was used to detect the transcriptional level of *PD-L1*, and the Western blot assay was used for monitoring the total expression of *PD-L1*; peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) co-culturing with A549 and H460 cell

lines were utilized to check the function of *Nrf2* in tumor immune resistance. **Results:** Phosphorylation level of *AKT* and expression level of *PD-L1* in A549 and H460 cell lines were simultaneously enhanced after treatment with 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  insulin ( $P < 0.001$ ), and the same phenomenon was observed in their mutations with defect in *HEB*, *HTF4* and *FOXO3a* respectively, however, the plot reversal occurred in A549<sup>*Nrf2*-</sup> and H460<sup>*Nrf2*-</sup> cell lines ( $P > 0.001$ ). Isoproterenol could boost both transcriptional activation and expression level in A549 and H460 cell lines, and this auto-action was able to be relieved by NAC. Results above further certified the transcriptional regulation of *Nrf2* on *PD-L1* gene. Wortmannin could change over the function of insulin to raise the expression of *PD-L1*, by prohibiting the increasing *AKT* phosphorylation level. Furthermore, the relationship between the phosphorylation level of *Nrf2* and *AKT* was also analyzed by using Wortmannin and insulin, and the results confirmed that the two parties correlated to each other positively, for the correlation coefficient  $r$  was 0.86 and 0.93 in A549 and H460 cell lines respectively. At last, A549<sup>*Nrf2*-</sup> and h460<sup>*Nrf2*-</sup> cell lines became more sensitive to the attack of PBMCs than that of their wild type owing to *Nrf2*-deficiency, for increased apoptosis was observed in co-culture experiment. **Conclusion:** *PI3K/AKT* pathway plays a vital role in regulating *PD-L1* expression in A549 and H460 cell lines, and this action is potentially realized via phosphorylating *Nrf2*.

**[Key words]** Immune surveillance; *PD-L1*; Lung carcinoma

程序性死亡 [ 蛋白 ] 配体-1 ( programmed death ligand-1, *PD-L1* ) 是一种相对分子质量为  $4 \times 10^4$  的跨膜蛋白, 由 *CD274* 基因编码<sup>[1]</sup>。早期被发现在机体某些特殊时期增量表达, 如妊娠、自身免疫性疾病及各种病毒感染等<sup>[2-3]</sup>。近年研究发现, *PD-L1* 在多种肿瘤细胞中均呈高表达, 参与对机体的免疫抑制<sup>[4-5]</sup>。*PD-L1* 可以与免疫T细胞表面的程序性死亡 [ 蛋白 ] -1 ( programmed death-1, *PD-1* ) 结合, 致使T细胞失去免疫识别活性, 无法杀伤肿瘤细胞<sup>[6-7]</sup>。肿瘤的发生、发展一方面与其自身恶性程度有关, 另一方面也决定于其对免疫系统的破坏能力<sup>[8-9]</sup>。因此, *PD-L1* 的表达水平直接影响患者的预后, 通过人工干预降低其在肿瘤细胞中的表达, 也成为促进免疫系统恢复、遏制肿瘤的潜在手段之一<sup>[3, 10-11]</sup>。*AKT* 又名蛋白激酶B ( protein kinase B, *PKB* ), 其活性受磷脂肌醇-3-激酶 ( phosphoinositide 3-kinase, *PI3K* ) 调控, 同时又调控着细胞多条信号通路, 在细胞存活和凋亡中起重要作用。多项研究发现, *AKT* 在许多肿瘤细胞中处于较为活跃的状态, 其异常活性常引起多条信号通路的异常激活, 并赋予肿瘤细胞异于正常细胞的能力, 包括无限增殖、侵袭、抗逆性及抗免疫等<sup>[12-13]</sup>。

前期实验中, 我们发现非小细胞肺癌A549细胞在经*PI3K*抑制剂wortmannin处理后, 细胞中*PD-L1*的表达与*AKT*去磷酸化出现同步下调, 根据*AKT*在细胞通路中的作用关系网, 我们推测这种下调可能是通过抑制某些转录因子的活

性而实现的。基于以上假设, 我们通过短发夹RNA ( short hairpin RNA, *shRNA* ) 技术同时构建了一些A549细胞和H460细胞的转录因子缺陷株, 这些转录因子均被报道受*AKT*调控, 如HeLa细胞系E-box结合蛋白 ( HeLa E-box binding protein, *HEB* )、螺旋环螺旋转录因子4 ( helix-loop-helix transcription factor 4, *HTF4* )、NF-E2相关因子2 ( nuclear factor erythroid 2-related factor 2, *Nrf2* ) 及叉头盒蛋白O3 ( forkhead box O3, *FOXO3a* ) 等, 以明确*AKT*通过转录因子调控*PD-L1*在肿瘤细胞内表达的机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂与仪器

实验所用人非小细胞肺癌A549及H460细胞及pGL3-basic载体均由本实验室保存。细胞培养在含10%灭活胎牛血清的RPMI-1640 ( 购自美国Gibco公司 ) 培养基中, 细胞共培养所有培养基Lonza X-VIVO™ 15购自美国Lonza公司; 人外周血单个核细胞 ( peripheral blood mononuclear cells, *PBMC* ) 购自美国ZenBio公司; 用于基因沉默的*shRNA* ( *HEB*、*HTF4*、*Nrf2*及*FOXO3a* ) 均购自美国Santa Cruz Biotechnology公司。用于抑制*PI3K*活性的抑制剂wortmannin购自美国MedChemExpress公司。所用一抗为鼠抗, 分别为抗*Nrf2*、抗p*Nrf2*、抗*PD-L1*、抗*AKT*、抗p*AKT* ( Ser473 ) 购自美国Cell Signaling公司; 二抗为兔抗鼠抗体, 购自美国DAKO公司。用于

流式细胞术分析的FITC标记PD-L1由本实验室自行偶联；蛋白质印迹法（Western blot）所用试剂购自美国Bio-Rad Laboratories公司。采用实时荧光定量聚合酶链反应（real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR），使用的Quant One Step RTFQ-PCR kit检测试剂盒及反转录试剂盒均购自天根生化科技（北京）有限公司；ROS探针检测试剂盒购自美国AAT Bioquest公司，用于检测PD-L1转录水平的RTFQ-PCR引物购自美国Thermofish公司；Dual-Luciferase Reporter Assay System购自美国Promega公司；FuGENE [sup]® [ /sup ] 6转染试剂盒购自美国Promega公司；SYBR green染料购自生工生物工程（上海）股份有限公司；Dynabeads®人CD3/CD28 T细胞激动剂购自美国Life Technology公司。

报告基因及细胞ROS反应检测采用美国PE公司生产的EnVision多功能酶标仪，RTFQ-PCR检测仪器为美国ABI公司的Stepone plus型RTFQ-PCR仪，Western blot定量分析软件为Image J 2.0。

### 1.2 转录因子敲除细胞株构建

A549细胞和H460细胞分别以 $3 \times 10^6$ 个/mL接种于含10%灭活胎牛血清的RPMI-1640培养基中，培养24 h后更换为不含血清的RPMI-1640培养基继续培养2~3 h。取3  $\mu$ L浓度为0.1  $\mu$ g/ $\mu$ L的FuGENE [sup]® [ /sup ] 6加入到的97  $\mu$ L无血清培养基轻轻混匀，于室温下静置5 min，加入2  $\mu$ L浓度为1  $\mu$ g/ $\mu$ L的shRNA-plamid（用于HEB、HTF4、Nrf2及FOXO3a等转录因子敲除）到试管中，用移液器混匀，室温放置20 min。用100  $\mu$ L枪吸出转染液，均匀的滴入含10%灭活胎牛血清RPMI-1640的培养皿中，于CO<sub>2</sub>培养箱中培养6~8 h，待后续实验检测。

### 1.3 PD-L1基因的luciferin双报告基因体系构建

据美国国家生物技术信息中心（NCBI, National Center for Biotechnology Information）基因数据库查验设计引物。顺义链为5'-TCACCGAAGGTCAGAAAGTCCAACGC-3'，反义链为5'-GGAGCCTCGGGGAAGCTGCGCAGAACTG-3'。通过PCR扩增方法获得PD-L1

基因启动子，并与pGL3-basic载体进行连接后转化入大肠杆菌中扩增，挑选菌落PCR为阳性克隆送测序。构建成功后，表达载体与海肾荧光素酶基因以1 000 : 1的比例共转染A549细胞和H460细胞，同时以pGL3-basic空载体作为对照。转染48 h后，使用Promega的Dual-luciferase报告基因检测试剂盒验证PD-L1启动子活性。

### 1.4 PD-L1的转录水平检测

根据mRNA提取试剂盒说明，提取A549细胞总RNA，并使用反转录试剂盒获得cDNA文库。据NCBI基因数据库查验，设计PCR引物。顺义链为5'-TGTACCACGTCT CCCA-CATAACAG-3'，反义链为5'-ACCCCACGATG AGGAACAAA-3'。以 $\beta$ -actin为内参，顺义链为5'-TGCTGACAGGATGCAGAAGGA-3'；5'-CGCTCAGGAGGAGCAATGAT-3'。对RTFQ-PCR实验数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析。

### 1.5 Western blot检测

分别收集实验组和对照组细胞，加入事先预冷至4  $^{\circ}$ C的洗板裂解液 [（裂解液：50 mmol/L Tris, pH为7.4；150 mmol/L NaCl溶液；1% Triton X-100；1.0%脱氧胆酸钠，0.1%十二烷基硫酸钠（sodium dodecyl sulfate, SDS），以及10 mmol/L的PMSF，10 mmol/L氟化钠]，10 mmol/L EDTA，0.1%的亮抑蛋白酶肽）5~10 min后收集于1.5 mL离心管中，冰浴超声裂解细胞。将裂解液于4  $^{\circ}$ C、11 000 $\times$ g离心10 min，取上清液测定蛋白质浓度，调整各组蛋白浓度一致后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）。将电泳后的SDS-PAGE胶经过100 V电转1 h至聚偏二氟乙烯（polyvinylidene fluoride, PVDF）膜，将膜置于5% BSA室温封闭1 h，一抗（体积比1 : 8 000 稀释）室温温育2 h，TBST洗涤3次，每次10 min。二抗（体积比1 : 10 000稀释）室温温育1 h，用TBST洗涤。最后PVDF膜用增强型化学发光剂（ECL）溶液浸润，显影观察。

### 1.6 PBMC细胞与肿瘤细胞共培养

将A549细胞与H460细胞及其对应的人工构建基因缺陷株以每孔 $6 \times 10^3$ 个肿瘤细胞的量接

种, 并培养于10%灭活胎牛血清的RPMI-1640培养基中, 培养于CO<sub>2</sub>体积分数为5%、37 °C的条件下。待细胞增殖16~18 h后, 去掉细胞上清液, 加入适量的Lonza X-VIVO™ 15无血清细胞培养基继续培养48 h后加入适量的PBMC细胞共培养2 h。按说明书要求加入适量的免疫因子刺激剂CD3和CD28单抗刺激剂, 通过流式细胞术检测免疫细胞对A549细胞、H460细胞及其基因缺陷株的杀伤效应。

流式细胞术检测方法: 待检测细胞经胰酶消化后, 在2 000×g的离心力下离心分离3 min, 使用预冷的PBS重悬细胞。加入FITC标记Annexin-V及PI, 轻轻混匀, 与4 °C冰箱中避光温育60 min。温育完成后, 在2 000×g的离心力下离心分离3 min弃去上清液, 加入一定量PBS洗涤并继续离心, 重复洗涤3遍后上机检测。

### 1.7 统计学处理

数据处理运用SPSS 20.0软件, 采用t检验方法, 实验结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示。方差齐性者采用方差分析法进行分析, 方差不齐者进行秩变换后具备方差齐性, 然后进行方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。组间数据相关性分析采用Pearson相关系数, 并

在显著性水平为0.05区间内进行双尾检验。

## 2 结 果

### 2.1 Insulin调节A549及H460细胞内PD-L1的表达水平

首先检测insulin的刺激对A549及H460亲本细胞内PD-L1的影响。结果显示, 细胞经10 μg/mL的insulin刺激后, 两株细胞内AKT的磷酸化水平出现显著增加, 伴随着PD-L1基因的转录(图1A、B)和表达水平(图1C、D)较阴性对照组而言, 也出现显著的增强。接着, 我们继续检测了在敲除特定转录因子的缺陷株中, insulin是否仍然能保持着对PD-L1表达的刺激效应。结果如图1A、图1B显示, 相同剂量的insulin, 对A549<sup>HEB-</sup>、H460<sup>HEB-</sup>、A549<sup>HTF4-</sup>、H460<sup>HTF4-</sup>、A549<sup>FOXO3a-</sup>及H460<sup>FOXO3a-</sup>细胞中PD-L1的转录水平影响显著( $P<0.001$ ), 但在A549<sup>Nrf2-</sup>、H460<sup>Nrf2-</sup>两株细胞株中PD-L1在刺激前后转录水平无明显变化( $P>0.05$ )。另外, Nrf2敲除后与亲本株比较, 的A549<sup>Nrf2-</sup>、H460<sup>Nrf2-</sup>细胞株中PD-L1的表达水平的变化和转录水平变化完全一致( $P>0.05$ , 图1C、D)。

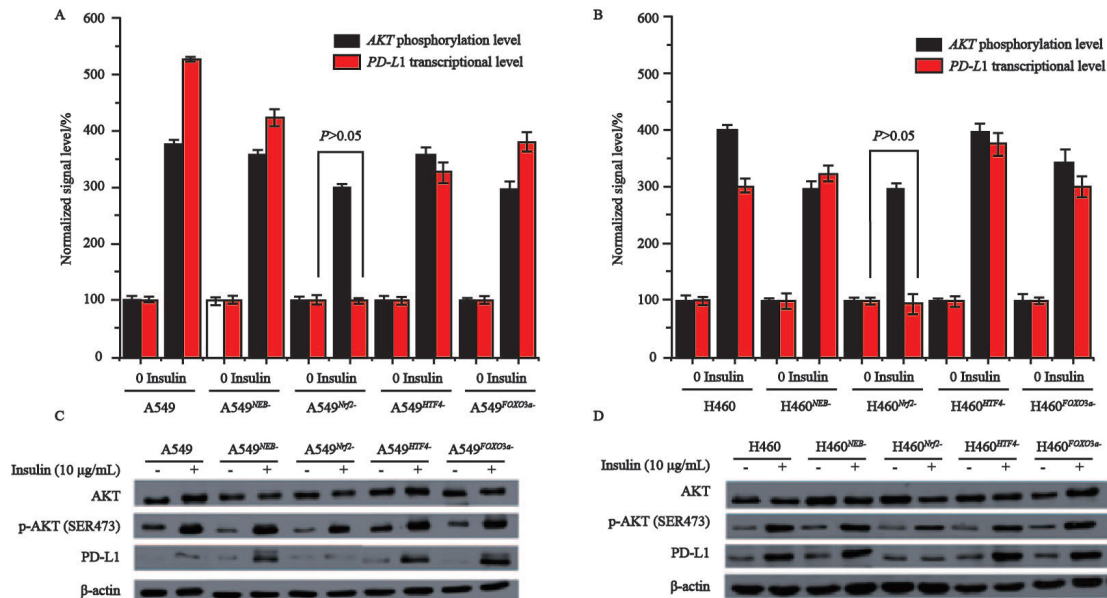


图1 Insulin对A549、H460细胞亲本株和转录因子缺陷株中PD-L1的转录和表达的调节作用

Fig. 1 Insulin regulated the transcription and expression of PD-L1 in A549 and H460 cell lines and their transcription factor-deficient strain

A: Digital alignment result of AKT phosphorylation and PD-L1 transcription in A549 cell line and its transcription factor-deficient strain; B: Digital alignment result of AKT phosphorylation and PD-L1 transcription in H460 cell line and its transcription factor-deficient strain; C: Digital alignment result of AKT phosphorylation and PD-L1 expression in A549 cell line and its transcription factor-deficient strain; D: Digital alignment result of AKT phosphorylation and PD-L1 expression in H460 cell line and its transcription factor-deficient strain

## 2.2 ROS反应经*Nrf2*调节*PD-L1*的转录与表达

我们发现, *AKT*的激活可以显著地提高*PD-L1*在A549细胞和H460细胞内*PD-L1*蛋白的转录和表达水平, 且这种促进作用与转录因子*Nrf2*有着重要的联系。为进一步验证*Nrf2*在*PD-L1*表达中的作用, 我们使用ROS诱导法

来破坏细胞中Keap与*Nrf2*的结合, 促进*Nrf2*入细胞核发挥作用。结果显示, 两株细胞株对isoproterenol的刺激, 均表明出了*PD-L1*增量表达的效应, 且呈浓度依赖性(图2)。

Isoproterenol提高*PD-L1*表达的作用, 可以被ROS清除剂NAC解除(图3)。

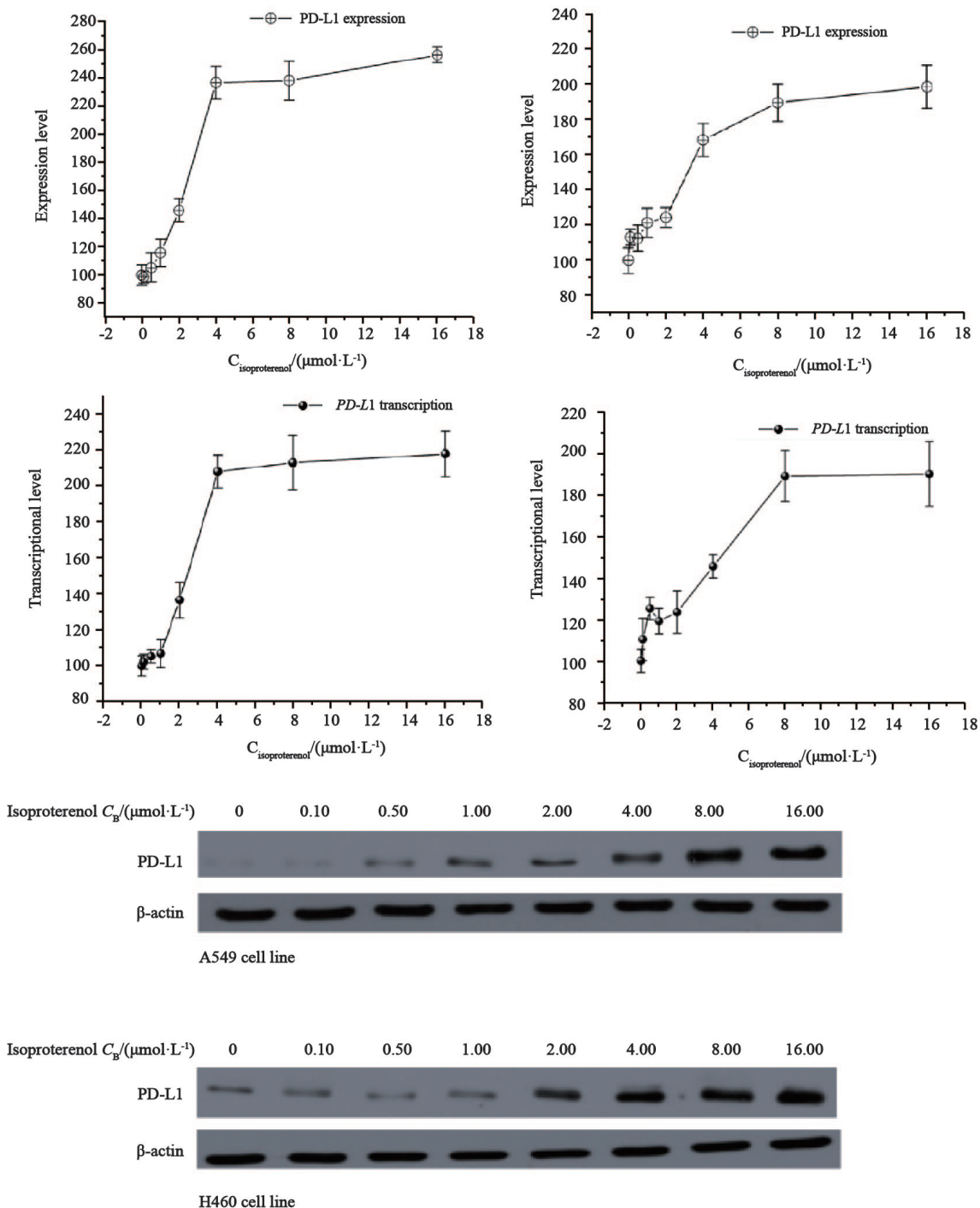


图2 Isoproterenol通过ROS途径上调A549细胞及H460细胞内*PD-L1*的转录和表达水平

Fig. 2 Isoproterenol up-regulates the transcription and expression of *PD-L1* via ROS pathway in A549 and H460 cell lines

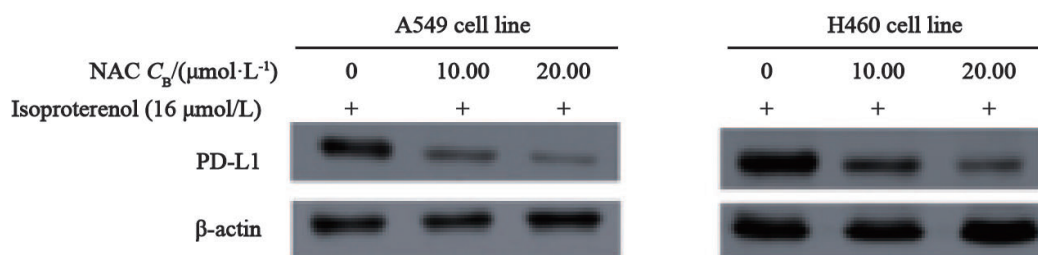


图3 NAC阻断isoproterenol在A549细胞及H460细胞内引起的PD-L1表达上调

Fig. 3 Up-regulation of PD-L1 transcription and expression in A549 and H460 cell lines could be blocked by NAC

### 2.3 PI3K/AKT抑制下调PD-L1表达水平

Insulin作为已知的PI3K/AKT通路激动剂,能引起AKT在细胞内的过度活化<sup>[14-15]</sup>。之前我们发现insulin的这种促进活化AKT作用,可以显著地提高PD-L1在A549和H460两株细胞系中的表达。为进一步验证这种促表达作用是否与AKT的过度磷酸化有关,我们接着使用PI3K的抑制剂wortmannin来调节AKT的磷酸化水平,并使用荧光素酶双报告基因体系评估PD-L1的转录水平是否与AKT磷酸化水平改变有同步效应。实验结果表明, wortmannin能逆转insulin刺激引起的AKT磷酸化水平增加,磷酸化的AKT随着抑制剂浓度的增加呈现梯度降低。与此同时, A549细胞株(图4A)和H460细胞株(图4B)内PD-L1的转录水平也逐渐降低( $P < 0.01$ ),经关联性分析, AKT的磷酸化程度和PD-L1在细胞内的表达量呈正相关关系,相关系数 $r$ 分别为0.95和0.93,该数据表明AKT的激活程度能直接影响PD-L1蛋白在细胞内的表达水平。

### 2.4 PI3K/AKT通路干预对Nrf2磷酸化水平的影响

Nrf2作为转录因子,其促进靶蛋白的转录通常是从其入核并结合靶基因的启动子开始的<sup>[16-17]</sup>。前述研究中我们证明,ROS反应可以提升PD-L1的表达量,同时AKT的过磷酸化也能增加PD-L1的表达,因此,我们推测AKT是通过磷酸化Nrf2促进其发挥功能。为验证以上假设,我们通过Western blot继续检测Nrf2在细胞内的磷酸化水平,并与AKT的磷酸化水平进行相关性分析。结果显示, A549、H460细胞株中的Nrf2磷酸化水平,在insulin和wortmannin的干预

下,出现了先升后降的趋势。首先随着insulin浓度的增加, Nrf2磷酸化水平出现了明显的增加,随后在保持10 μg/mL的insulin体系下,加入0.01~1.00 μmol/L的wortmannin, Nrf2的磷酸化水平则依剂量浓度开始出现下降。同时,我们还同步监测了AKT磷酸化水平的变化,并进行了两者的相关性分析。结果显示,在A549和H460细胞株中,两者的磷酸化水平变化趋势相关系数分别为0.86和0.93,为强正相关(图5)。

### 2.5 Nrf2缺陷促进PBMC杀伤A549及H460细胞

为进一步观察Nrf2转录因子在肿瘤抵抗免疫系统中的作用,我们将构建好的Nrf2缺陷细胞株A549<sup>Nrf2-</sup>、H460<sup>Nrf2-</sup>细胞株与PBMC进行共培养,以其亲本细胞A549和H460细胞为阴性对照,检测共培养后PBMC细胞对两种野生型亲本细胞株和缺陷型细胞株的杀伤作用。结果显示,在加入免疫刺激因子CD3和CD28单抗刺激剂后, A549和H460细胞与PBMC细胞培养后,肿瘤细胞凋亡数量有所增加, A549细胞系的凋亡比例从原来的6.3%±0.8%提升为8.9%±0.6% ( $P < 0.05$ ,图6A), H460细胞系的凋亡比例从原来的9.5%±0.7%提升为13.5%±1.2% ( $P < 0.05$ ,图6B);而另一组缺陷株中, A549<sup>Nrf2-</sup>、H460<sup>Nrf2-</sup>细胞株对CD3和CD28的刺激就表明得非常显著, A549细胞系的凋亡比例从原来的10.5%±1.1%提升为32.5%±1.5% ( $P < 0.001$ ), H460细胞系的凋亡比例从原来的15.3%±0.7%提升为41.2%±1.2% ( $P < 0.001$ )。该结果表明, Nrf2在肿瘤细胞抵抗免疫杀伤中有着重要的作用。

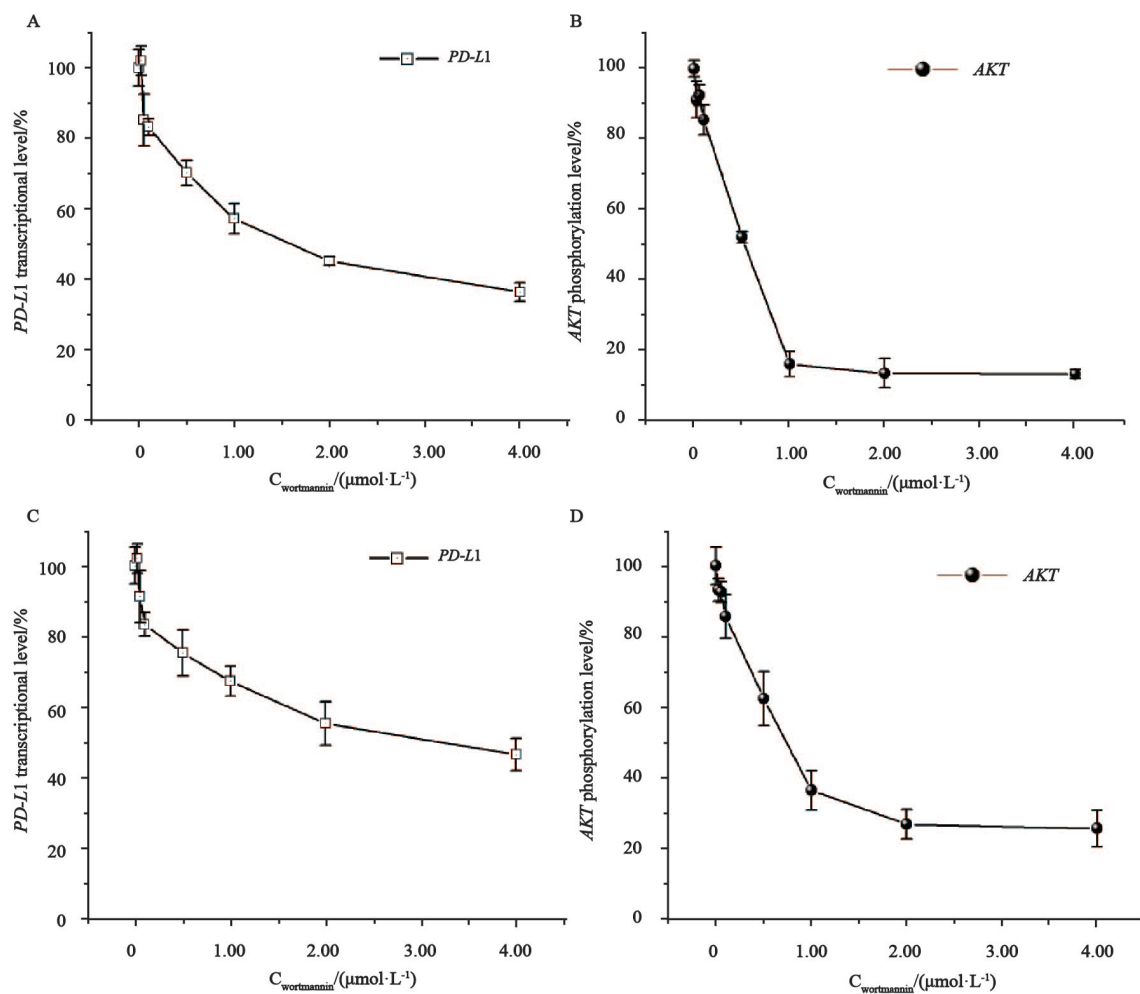


图4 Wortmannin能通过抑制AKT的磷酸化水平而降低A549细胞及H460细胞内PD-L1的转录水平

Fig.4 Wortmannin down-regulates the transcription of PD-L1 via inhibiting phosphorylation level of AKT in A549 and H460 cell lines

A, B: Experiment results of A549 cells; C, D: Experiment results of H460 cells

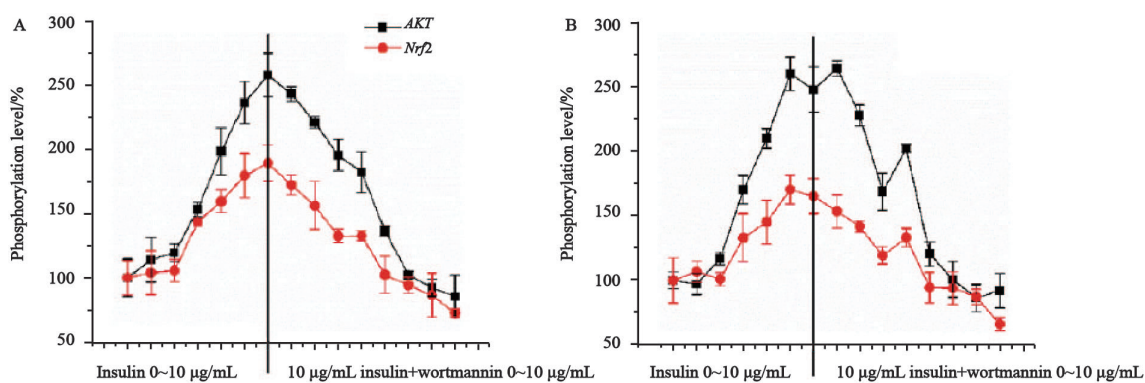


图5 Insulin与Wortmannin对A549细胞及H460细胞内Nrf2磷酸化水平的正负调控

Fig. 5 Positive and negative feedback regulation phenomenon which caused by insulin and wortmannin in A549 and H460 cell lines

A: Experiment results of A549 cells; B: Experiment results of H460 cells

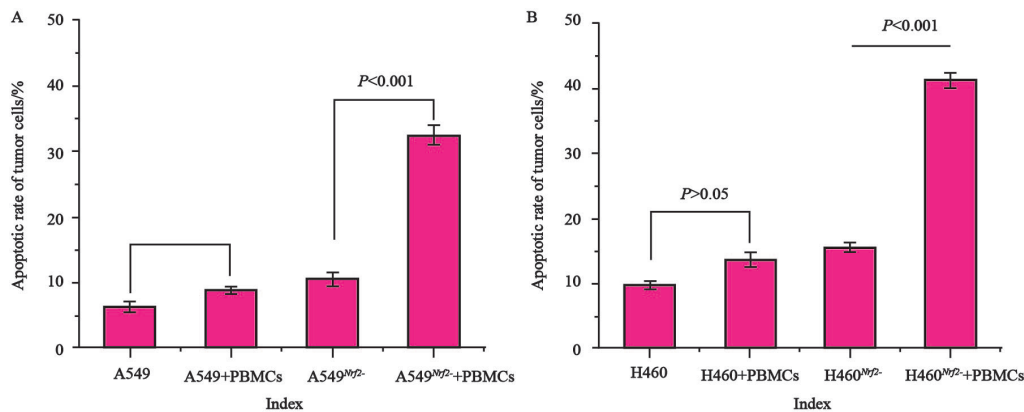


图 6 转录因子 *Nrf2* 具有协助 A549 细胞及 H460 细胞系逃逸免疫细胞 PBMC 杀伤的作用

Fig. 6 Transcription factor *Nrf2* was able to assist the tumor cells A549 and H460 in escape from by immune cell PBMC

A: Experiment results of A549 cells; B: Experiment results of H460 cells

### 3 讨 论

PD-L1/PD-1通路是免疫系统的一个关键检查节点,它调控着免疫系统对自身组织的识别,同时也成为被肿瘤细胞所利用的逃逸通路之一<sup>[18]</sup>。PD-L1/PD-1免疫检查点阻断为癌症的免疫治疗开启了新的革命式的发现,大量临床报道完全肯定了阻断该通路在肿瘤临床治疗的可行性<sup>[19-20]</sup>。PD-L1高表达是大多数实体瘤的重要特征<sup>[21]</sup>,本文实验研究中也证实A549细胞和H460细胞中存在广泛的PD-L1表达现象。现今治疗方案主要是通过抗原抗体反应法,选择性地阻断PD-L1与PD1的接触,重启免疫系统,本研究拟从源头上阻断PD-L1的表达,减少肿瘤对免疫系统的抑制,以期临床的靶向治疗与免疫治疗联用提供新的思路和理论基础。

本研究中发现,PD-L1的表达与一种同样活跃于各种实体瘤的蛋白AKT的活化程度有着重要的联系。PD-L1能受AKT的激活剂insulin影响,即insulin可以在促使AKT磷酸化的同时显著地提高PD-L1在肿瘤细胞的表达;而另一方面,这种促进作用可以为PI3K基因的抑制剂wortmannin所逆转。众所周知,PI3K基因是激活关键且为核心的环节之一,它的抑制能直接导致细胞内AKT的失活,进而促使凋亡。实验中我们发现,PD-L1基因的转录水平,也严格的受wortmannin调控,其下降水平与AKT去磷酸化同步发生,二者相关性分析提示,AKT的

磷酸化水平与PD-L1的转录水平有重要的联系。这种转录水平的调控又是如何实现的?进一步研究发现,一种名为*Nrf2*的转录因子,在此通路中发挥着重要的作用。我们分别研究了*Nrf2*缺陷株对AKT调控的敏感性以及ROS反应触发*Nrf2*活性,发现*Nrf2*的确是PD-L1正常表达的关键蛋白。与此同时我们还发现,AKT对*Nrf2*的调控与*Nrf2*的磷酸化有着紧密的联系,即AKT的激活与抑制,能同步影响*Nrf2*的磷酸化程度,这可能也是*Nrf2*启动PD-L1转录的关键因素之一。实验的最后,我们还检测了免疫细胞对*Nrf2*缺陷株的杀伤作用,并与其亲本株的反应作了比对。结果如同预期那样,敲除*Nrf2*的A549细胞系和H460细胞系对免疫细胞的敏感性显著性提高,在免疫因子刺激后,出现了大量的凋亡。

本研究发现AKT通路可能是通过*Nrf2*转录因子调控PD-L1蛋白在肿瘤细胞的表达,但还有部分情况仍未探明——AKT是否直接作用于*Nrf2*导致其磷酸化,这也是我们下一步研究要深入探究的课题。基于抑制PI3K/AKT通路以辅助PD-1/PD-L1免疫治疗,在非小细胞肺癌中也许具有良好的应用前景。

#### [参 考 文 献]

- [1] KRIEGSMANN M, ROESSLER S, KRIEGSMANN K, et al. Programmed cell death ligand 1 (PD-L1, CD274) in cholangiocarcinoma—correlation with clinicopathological data and comparison of antibodies [J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 72.
- [2] CONSTANTINIDOU A, ALIFIERIS C, TRAFALIS D T.

- Targeting programmed cell death -1 (PD-1) and ligand (PD-L1): a new era in cancer active immunotherapy [ J ] . Pharmacol Ther, 2019, 194: 84-106.
- [ 3 ] DERMANI F K, SAMADI P, RAHMANI G, et al. PD-1/PD-L1 immune checkpoint: potential target for cancer therapy [ J ] . J Cell Physiol, 2019, 234(2): 1313-1325.
- [ 4 ] GRAUERS WIKTORIN H, NILSSON M S, KIFFIN R, et al. Histamine targets myeloid-derived suppressor cells and improves the anti-tumor efficacy of PD-1/PD-L1 checkpoint blockade [ J ] . Cancer Immunol Immunother, 2019, 68(2): 163-174.
- [ 5 ] HSU K H, HUANG Y H, TSENG J S, et al. High PD-L1 expression correlates with primary resistance to EGFR-TKIs in treatment naive advanced *EGFR*-mutant lung adenocarcinoma patients [ J ] . Lung Cancer, 2019, 127: 37-43.
- [ 6 ] NA T H, VAN DER STARRE-GAAL J, VONK J M, et al. Essential preanalytics in PD-L1 immunocytochemistry [ J ] . Histopathology, 2019, 74(2): 362-364.
- [ 7 ] YAGHOUBI N, SOLTANI A, GHAZVINI K, et al. PD-1/PD-L1 blockade as a novel treatment for colorectal cancer [ J ] . Biomed Pharmacother, 2019, 110: 312-318.
- [ 8 ] CHEN S, ZHANG N, SHAO J, et al. Multi-omics perspective on the tumor microenvironment based on PD-L1 and CD8 T-cell infiltration in urothelial cancer [ J ] . J Cancer, 2019, 10(3): 697-707.
- [ 9 ] BITTON K, MICHOT J M, BARREAU E, et al. Prevalence and clinical patterns of ocular complications associated with anti-PD-1/PD-L1 anticancer immunotherapy [ J ] . Am J Ophthalmol, 2019, 202: 109-117.
- [ 10 ] GAUCI M L, LANOY E, CHAMPIAT S, et al. Long-term survival in patients responding to anti-PD-1/PD-L1 therapy and disease outcome upon treatment discontinuation [ J ] . Clin Cancer Res, 2019, 25(3): 946-956.
- [ 11 ] HIRSCH L, ZITVOGEL L, EGGERMONT A, et al. PD-L1: a cancer entity with a shared sensitivity to the PD-1/PD-L1 pathway blockade [ J ] . Br J Cancer, 2019, 120(1): 3-5.
- [ 12 ] GAO Y, YANG J, CAI Y, et al. IFN- $\gamma$ -mediated inhibition of lung cancer correlates with PD-L1 expression and is regulated by PI3K-AKT signaling [ J ] . Int J Cancer, 2018, 143(4): 931-943.
- [ 13 ] PARK S, CHO S, KIM M, et al. Dermatofibrosarcoma protuberans: a retrospective study of clinicopathologic features and related AKT/mTOR, STAT3, ERK, cyclin D1, and PD-L1 expression [ J ] . J Am Acad Dermatol, 2018, 79(5): 843-852.
- [ 14 ] FUENTES M, SANTANDER N, CORTÉS V. Insulin increases cholesterol uptake, lipid droplet content, and apolipoprotein B secretion in CaCo-2 cells by upregulating SR-BI via a PI3K, AKT, and mTOR-dependent pathway [ J ] . J Cell Biochem, 2018, 120(2): 1550-1559.
- [ 15 ] REN L, ZHOU X, HUANG X, et al. The IRS/PI3K/AKT signaling pathway mediates olanzapine-induced hepatic insulin resistance in male rats [ J ] . Life Sci, 2019, 217: 229-236.
- [ 16 ] ALI T, KIM T, REHMAN S U, et al. Natural dietary supplementation of anthocyanins via PI3K/AKT/Nrf2/HO-1 pathways mitigate oxidative stress, neurodegeneration, and memory impairment in a mouse model of Alzheimer's disease [ J ] . Mol Neurobiol, 2018, 55(7): 6076-6093.
- [ 17 ] BAIYUN R, LI S, LIU B, et al. Luteolin-mediated PI3K/AKT/Nrf2 signaling pathway ameliorates inorganic mercury-induced cardiac injury [ J ] . Ecotoxicol Environ Saf, 2018, 161: 655-661.
- [ 18 ] VANNITAMBY A, HENDRY S, MAKADIA T, et al. A novel approach to detect programmed death ligand 1 (PD-L1) status and multiple tumor mutations using a single non-small cell lung cancer (NSCLC) bronchoscopy specimen [ J ] . J Mol Diagn, 2019, 21(2): 1-10.
- [ 19 ] MCCORD R, BOLEN C R, KOEPPEN H, et al. PD-L1 and tumor-associated macrophages in de novo DLBCL [ J ] . Blood Adv, 2019, 3(4): 531-540.
- [ 20 ] PERMATA T B M, HAGIWARA Y, SATO H, et al. Base excision repair regulates PD-L1 expression in cancer cells [ J ] . Oncogene, 2019, 38: 4452-4466.
- [ 21 ] ANGELL H K, LEE J, KIM K M, et al. PD-L1 and immune infiltrates are differentially expressed in distinct subgroups of gastric cancer [ J ] . Oncoimmunology, 2019, 8(2): e1544442.

(收稿日期: 2019-09-15 修回日期: 2019-12-23)