

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2018.02.0152

· 论 著 ·

程序性死亡配体 1 在索拉非尼耐药肝癌细胞中的表达和功能

孙非凡¹, 李东², 李华², 王涛², 刘煜², 张涛^{2*}

1. 陆军军医大学(第三军医大学)研究生院, 重庆 400038

2. 成都军区总医院肿瘤诊治中心, 成都 610083

[摘要] **目的** 探讨程序性死亡配体 1 (PD-L1) 在索拉非尼耐药人肝癌细胞中的表达及其功能。**方法** 采用浓度递增法构建索拉非尼耐药人肝癌细胞株 (Hep3B-SR 和 HepG2-SR), 用 CCK-8 法检测半数抑制浓度 (IC₅₀) 并计算耐药指数, 蛋白质印迹法和 qPCR 检测 P-糖蛋白 (P-gp)、多药耐药相关蛋白 1 (MRP1) 和 PD-L1 的表达。转染 siRNA 沉默耐药细胞 PD-L1 的表达并检测沉默效率。沉默 PD-L1 表达后, CCK-8 法检测 IC₅₀、计算耐药指数, 并检测耐药基因的表达, 用细胞增殖实验检测细胞增殖情况, 划痕实验检测细胞迁移情况, 平板克隆形成实验检测细胞克隆形成情况, 流式细胞术检测细胞凋亡情况。**结果** Hep3B-SR 和 HepG2-SR 的耐药指数分别为 5.4 和 5.2。耐药细胞中 P-gp、MRP1 和 PD-L1 表达较亲本细胞上调 (P 均 <0.01)。沉默 PD-L1 表达后, Hep3B-SR 和 HepG2-SR 的耐药指数分别下降为 1.8 和 1.5, P-gp 和 MRP1 的表达下调 (P 均 <0.01); 沉默 PD-L1 表达可抑制耐药细胞的增殖、迁移、克隆形成并促进其凋亡 (P 均 <0.01), 合用索拉非尼时作用更为显著。**结论** PD-L1 在索拉非尼耐药人肝癌细胞中高表达; 抑制 PD-L1 表达可部分逆转索拉非尼耐药人肝癌细胞的耐药性, 提高索拉非尼的抗癌效果; 抑制 PD-L1 表达可有效抑制索拉非尼耐药人肝癌细胞的生长, 合用索拉非尼其抗癌效果更强。

[关键词] 肝细胞癌; 程序性死亡配体 1; 索拉非尼; 耐药性; 基因沉默**[中图分类号]** R 735.7; R 909.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2018)02-0152-07

Expression and role of programmed cell death ligand-1 in sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma cells

SUN Fei-fan¹, LI Dong², LI Hua², WANG Tao², LIU Yu², ZHANG Tao^{2*}

1. Graduate School, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing 400038, China

2. Cancer Center, Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610083, Sichuan, China

[Abstract] **Objective** To explore the expression and role of programmed cell death ligand-1 (PD-L1) in sorafenib-resistant human hepatocellular carcinoma cells. **Methods** Sorafenib-resistant human hepatocellular carcinoma cell lines (Hep3B-SR, HepG2-SR) were established by the procedure of stepwise increase in sorafenib concentrations. CCK-8 assay was used to detect half inhibition concentration (IC₅₀). The expressions of P-glycoprotein (P-gp), multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) and PD-L1 were examined by Western blotting and qPCR. The expression of PD-L1 was silenced by transfecting siRNA into the drug-resistant cells, and the silencing efficiency was tested. After silencing the expression of PD-L1 in the drug-resistant cells, CCK-8 assay was used to detect IC₅₀, the drug-resistance index was calculated, and the expressions of P-gp and MRP1 were examined. Then cell proliferation assay, wound healing assay, colony formation assay and flow cytometry were applied to examine cell proliferation, migration, clone formation and apoptosis, respectively. **Results** The drug-resistance indexes of Hep3B-SR and HepG2-SR were 5.4 and 5.2, respectively. The expressions of P-gp, MRP1 and PD-L1 in the drug-resistant cells were significantly up-regulated in comparison with the parental cells (all $P < 0.01$). After inhibiting the expression of PD-L1, the drug-resistance indexes of Hep3B-SR and HepG2-SR decreased to 1.8 and 1.5, respectively, and the expressions of P-gp and MRP1 were down-regulated (all $P < 0.01$). Silencing the PD-L1 expression could significantly inhibit the proliferation, migration and colony formation of drug-resistant cells, and could significantly promote the apoptosis (all $P < 0.01$); and

[收稿日期] 2017-11-16 **[接受日期]** 2017-12-25**[基金项目]** 国家自然科学基金(81101634), 四川省科技厅科技支撑计划项目(2015FZ0073), 四川省科技厅重点研发项目(2017SZ0066), 四川省卫计委科研课题(16PJ026). Supported by National Natural Science Foundation of China (81101634), Scientific and Technological Supporting Project of Science & Technology Department of Sichuan Province (2015FZ0073), Key Research and Development Project of Science & Technology Department of Sichuan Province (2017SZ0066), and Scientific Research Project of Health and Family Planning Commission of Sichuan Province (16PJ026).**[作者简介]** 孙非凡, 硕士生. E-mail: 826147901@qq.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 028-86570406, E-mail: zhangtao269@126.com

these effects were strengthened by combining sorafenib. **Conclusion** PD-L1 is highly expressed in sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma cells. Inhibition of PD-L1 expression can partially reverse the drug-resistance of the cells and significantly enhance the anticancer effect of sorafenib. Inhibiting the expression of PD-L1 can effectively repress the growth of sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma cells, which is more if combining with sorafenib.

[Key words] liver cell carcinoma; programmed cell death ligand-1; sorafenib; drug resistance; gene silencing

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(2): 152-158]

肝癌是世界排名第 2 位的癌症相关致死原因, 在发展中国家尤为突出。近些年肝癌发病率在发达国家中越来越高, 主要原因是丙型肝炎病毒感染、酗酒、肥胖和代谢综合征相关的非酒精性脂肪肝等^[1]。因此, 防治肝癌的研究显得刻不容缓。

目前肝癌的治疗手段主要包括手术、肝移植、肝动脉栓塞化学治疗和全身系统性治疗等^[2]。小分子多激酶抑制剂索拉非尼是第 1 个也是唯一适用于不适合手术的晚期肝癌患者的全身系统治疗药物^[3]。索拉非尼可以抑制肿瘤细胞的增殖和肿瘤血管生成^[4-5]。在 2 项晚期肝癌患者的随机 III 期临床试验中, 索拉非尼改善疾病进展和延长的总生存期分别为 2.8 个月和 2.3 个月。这表明索拉非尼延长肝癌患者生存时间的作用十分有限, 目前认为其主要原因是继发性耐药^[6]。研究表明, 肝癌细胞中索拉非尼耐药与 PI3K/Akt 信号通路、自噬、上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)、肿瘤微环境和表观遗传调控等有关^[7]。然而, 肝癌细胞索拉非尼耐药机制仍需要进一步的研究。

程序性死亡配体 1 (programmed cell death ligand-1, PD-L1) 是 B7 分子家族中一个重要的成员, 可以与 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、树突状细胞和自然杀伤 T 淋巴细胞上表达的程序性死亡 1 (programmed death-1, PD-1) 结合后抑制肿瘤免疫^[8]。多项研究显示, PD-L1 在耐药肿瘤细胞中高表达, 如恩杂鲁胺耐药的前列腺癌^[9]、顺铂耐药的小细胞肺癌^[10]和厄洛替尼耐药的肺腺癌^[11], 这表明 PD-L1 参与多种肿瘤细胞的耐药机制。

本研究旨在探讨 PD-L1 在索拉非尼耐药肝癌细胞中的表达及其功能。首先成功建立索拉非尼耐药的人肝癌细胞株, 并采用 qPCR 和蛋白质印迹法检测耐药基因和 PD-L1 的表达。转染 siRNA 沉默索拉非尼耐药肝癌细胞中 PD-L1 的表达, 研究其在细胞增殖、迁移、克隆形成和凋亡中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂 人肝癌细胞系 Hep3B、HepG2 (中国科学院细胞库); 索拉非尼 (sorafenib, 美国 Selleck 公司); DMEM 培养液、0.25% 胰酶 (含 EDTA)、青霉素-链霉素混合液 (penicillin-streptomycin liquid, 双抗; 美国 HyClone 公司); TRIzol、PrimeScript[®] RT Reagent Kit with gDNA Eraser (日本 TaKaRa 公司); 探针 (universal Probe Library Set)、Master mix (瑞士 Roche 公司); P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 基因多药耐药 1 (multidrug resistance 1, *MDR1*) 引物、多药耐药相关蛋白 1 (multidrug resistance-associated protein 1, *MRP1*) 引物、*PD-L1* 引物、*GAPDH* 引物 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司]; Lipofectamine[™] 2000 (美国 Invitrogen 公司); *PD-L1* siRNA、Control siRNA (上海吉玛制药技术有限公司); 蛋白 marker、BCA 蛋白定量液 (美国 Thermo 公司); 牛血清白蛋白 (albumin from bovine serum, BSA; 美国 MP 公司); 兔抗人 PD-L1 一抗、兔抗人 P-gp 一抗、兔抗人 *MRP1* 一抗、羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗 (英国 Abcam 公司); 鼠抗人 *GAPDH* 一抗 (武汉三鹰生物技术有限公司); Annexin V-APC, PI 凋亡检测试剂盒 (美国 Biolegend 公司); ECM550 试剂盒、PDVF 膜、ECL 发光液 (美国 Millipore 公司); CCK-8 溶液 (日本 Dojindo 公司)。

1.2 细胞培养 Hep3B、HepG2 细胞于含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、青霉素和链霉素各 100 U/L 的 DMEM 培养液中培养, 在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中孵育, 待细胞融合度达 80%~90% 消化传代。取对数生长期细胞进行实验。

1.3 CCK-8 法检测索拉非尼的半数抑制浓度 (half inhibition concentration, IC₅₀) 取对数生长期细胞以 4 000/孔的密度接种于 96 孔板。实验组设

不同浓度的索拉非尼(1.25、2.5、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$),每个浓度设3个复孔,另设不加索拉非尼的对照组和不含细胞的空白组。药物作用24 h后,每孔加入10 μL 的CCK-8试剂,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中孵育4 h,使用酶标仪检测450 nm波长处光密度(D)值,计算 IC_{50} 。

1.4 建立索拉非尼耐药细胞株 采用药物持续接触浓度递增法诱导索拉非尼耐药细胞株。选取对数生长期细胞,以Hep3B、HepG2细胞各自的 IC_{50} 药物浓度为起始诱导浓度,并以0.25 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度递增,历时6个月,获得索拉非尼耐药的Hep3B-SR、HepG2-SR细胞。

1.5 计算耐药指数 按照1.3项下的方法,计算耐药细胞Hep3B-SR和HepG2-SR的 IC_{50} 值。耐药指数=耐药细胞 IC_{50} /亲本细胞 IC_{50} 。

1.6 qPCR检测耐药基因(*MDR1*、*MRP1*)和*PD-L1*的表达 取对数生长期的细胞,用PBS洗3次并吸干残留液体,加入1 mL TRIzol提取总RNA并定量,去DNA反应后反转录成cDNA,用荧光定量PCR仪-CFX96进行qPCR。10 μL 反应体系: Master mix 5 μL 、引物0.3 μL 、探针0.15 μL 、cDNA模板2.5 μL 、灭菌蒸馏水2.05 μL 。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,1个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,45个循环;40 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,1个循环。*PD-L1*上游引物5'-TGG ATC CAG TCA CCT CTG AAT-3',下游引物5'-TGC TTG TCC AGA TGA CTT CG-3'。*MDR1*上游引物5'-GGA GGA AGA CAT GAC CAG GTA-3',下游引物5'-CAC CAA TTC CAC TGT AAT AAT AGG C-3'。*MRP1*上游引物5'-CTG GTG CCC TGA GAC AGA C-3',下游引物5'-ACC AGG AAA CCA CTT GCA TT-3'。内参基因*GAPDH*上游引物5'-TCC ACT GGC GTC TTC ACC-3',下游引物5'-GGC AGA GAT GAT GAC CCT TTT-3'。

1.7 蛋白质印迹法检测P-gp、MRP1和PD-L1的表达 取对数生长期细胞,用PBS洗3次并吸干残留液体,加入适量的蛋白裂解液提取蛋白,使用BCA蛋白定量试剂盒对蛋白样品进行定量,蛋白样品与5 \times 上样缓冲液混合后,97 $^{\circ}\text{C}$ 加热5 min使蛋白变性。每条泳道蛋白上样20 μL ,90 V恒压电泳20 min,110 V恒压电泳70 min,200 mA恒流转膜60 min。BSA常温封闭3 h,加P-gp、MRP1、

PD-L1和GAPDH一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜,TBST清洗后加二抗室温摇床孵育2 h,清洗曝光、拍照。

1.8 转染siRNA沉默PD-L1表达 取对数生长期耐药细胞进行siRNA转染。PD-L1 siRNA序列为5'-GCC GAA GUC AUC UGG ACA ATT UUG UCC AGA UGA CUU CGG CTT-3'。Control siRNA序列为5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3'和5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3'。根据说明书方法,将PD-L1 siRNA和Control siRNA转染进细胞,48 h后提取样品,通过qPCR和蛋白质印迹法检测沉默效率。

1.9 细胞增殖实验 将耐药细胞分为PD-L1 siRNA组和Control siRNA组,接种于96孔板,设3个复孔,分别培养24、48、72、96 h。在培养结束前4 h每孔加入CCK-8试剂10 μL ,用酶标仪测定450 nm处 D 值。得到的 D 值与初始值比较,增加或降低反映细胞生长或死亡。

1.10 细胞迁移、克隆形成与凋亡实验 实验设置5组:DMSO组、索拉非尼组、Control siRNA组、PD-L1 siRNA组、索拉非尼+PD-L1 siRNA组。划痕实验采用对数生长期耐药细胞接种于6孔板,使用200 μL 枪头进行划痕,用PBS洗2次,在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养24 h,分别于0、24 h拍摄照片;对比0、24 h时的划痕宽度以反映细胞的迁移能力。平板克隆形成实验采用对数生长期耐药细胞接种于6孔板,每孔200个细胞,在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养14 d,经过4%多聚甲醛固定和0.1%结晶紫溶液染色,计算克隆形成率。克隆形成率(%)=克隆数/接种数 \times 100%。流式细胞术检测细胞凋亡,采用对数生长期耐药细胞接种于6孔板进行实验,细胞密度为 1×10^5 /孔,24 h后按照说明书方法进行操作,使用C6式流式检测系统进行检测。

1.11 统计学处理 本研究所有 IC_{50} 和图表均采用Graphpad Prism 5.0软件进行计算和制作。所有实验均重复3次,实验数据表示为 $\bar{x}\pm s$,使用SPSS 14.0软件进行统计学分析,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 t 检验。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 索拉非尼耐药人肝癌细胞耐药性检测 Hep3B

细胞的 IC₅₀ 为 (2.88±0.07) μmol/L, 低于 Hep3B-SR 细胞的 (15.51±0.26) μmol/L ($t=46.79$, $P<0.01$); HepG2 细胞的 IC₅₀ 为 (2.98±0.05) μmol/L, 低于 HepG2-SR 细胞的 (15.58±0.13) μmol/L ($t=89.32$, $P<0.01$)。Hep3B-SR 和 HepG2-SR 细胞的耐药指数分别为 5.4 和 5.2。如图 1 所示, 蛋白质印迹结果显示 Hep3B-SR 和 HepG2-SR 细胞中 P-gp 和 MRP1 表达均高于其亲本细胞。qPCR 结果检测结果示 Hep3B-SR 和 HepG2-SR 细胞中 *MDR1* 表达均高于其亲本细胞 (6.53±0.38 vs 1.00±0.08, 11.95±0.69 vs 1.00±0.02, $t=14.21$ 、 15.91 , P 均<0.01), *MRP1* 表达也均高于其亲本细胞 (8.77±0.40 vs 1.00±0.07, 6.99±0.66 vs 1.00±0.16, $t=19.24$ 、 8.80 , P 均<0.01)。以上结果表明成功建立索拉非尼耐药人肝癌细胞株。

2.2 索拉非尼耐药人肝癌细胞中 PD-L1 的表达上调 为明确 PD-L1 在亲本细胞和耐药细胞中的表达差异, Hep3B、Hep3B-SR、HepG2 和 HepG2-SR 4 种细胞分别被设置为 2 组, 即对照组

(DMSO) 和实验组 (给予索拉非尼 10 μmol/L)。如图 2 所示, 蛋白质印迹结果显示耐药细胞实验组 PD-L1 表达与对照组比较无明显差异, 耐药细胞实验组和对照组 PD-L1 的表达均高于其亲本细胞, 亲本细胞实验组 PD-L1 表达较对照组上调。qPCR 从 mRNA 水平验证蛋白质印迹结果, 以上差异均有统计学意义 (P 均<0.01)。以上结果表明 PD-L1 在索拉非尼耐药人肝癌细胞中高表达。

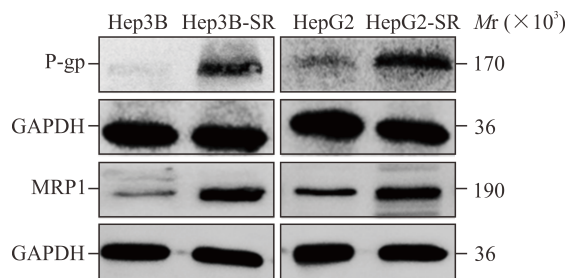


图 1 蛋白质印迹法检测索拉非尼耐药人肝癌细胞耐药性

Fig 1 Drug resistance of sorafenib-resistant human hepatocellular carcinoma cells by Western blotting

P-gp: P-glycoprotein; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; MRP1: Multidrug resistance-associated protein 1

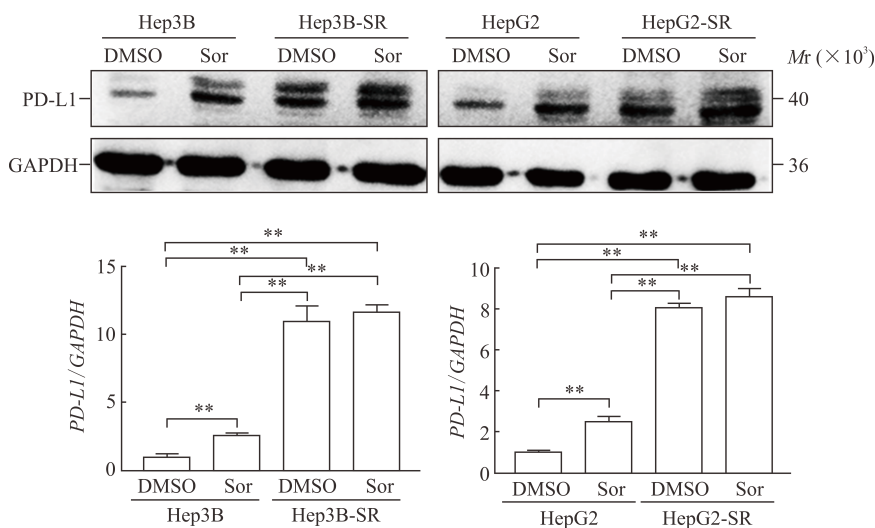


图 2 索拉非尼耐药人肝癌细胞 PD-L1 表达上调

Fig 2 Upregulated expression of PD-L1 in sorafenib-resistant human hepatocellular carcinoma cells

Expression of PD-L1 examined by Western blotting and qPCR. DMSO: Dimethyl sulphoxide; Sor: Sorafenib (10 μmol/L); PD-L1: Programmed cell death ligand-1; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. ** $P<0.01$. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

2.3 沉默 PD-L1 表达后部分逆转索拉非尼耐药人肝癌细胞的耐药性 为进一步验证 PD-L1 与人肝癌细胞索拉非尼耐药的相关性, 转染 PD-L1 siRNA 沉默 PD-L1 表达, 以转染 Control siRNA 作为对照。PD-L1 siRNA 组 Hep3B-SR 和 HepG2-

SR 细胞中 *PD-L1* mRNA 表达均较 Control siRNA 组下调 (1.00±0.09 vs 4.01±0.12, 1.00±0.10 vs 3.58±0.25, $t=20.24$ 、 9.63 , P 均<0.01), 2 种耐药细胞沉默效率分别为 80% 和 78%。蛋白表达也证明耐药细胞中 PD-L1 被成功沉默 (图 3A)。

如图 3B、3C 所示, 耐药细胞 PD-L1 siRNA 组 IC₅₀ 较 Control siRNA 组低 ($P < 0.01$)。Control siRNA 组 Hep3B-SR 和 HepG2-SR 细胞的耐药指数分别为 5.4 和 5.3。PD-L1 siRNA 组 Hep3B-SR 和 HepG2-SR 细胞的耐药指数分别下降为 1.8 和 1.5, 说明沉默 PD-L1 表达后耐药细胞的耐药性下降。

如图 3A 所示, 在 Hep3B-SR 和 HepG2-SR 细胞中, PD-L1 siRNA 组 P-gp 的表达均较

Control siRNA 组下调 (1.00 ± 0.05 vs 7.36 ± 0.51 , 1.00 ± 0.06 vs 3.54 ± 0.09 , $t = 12.48$ 、 23.34 , P 均 < 0.01) , MRP1 表达也均较 Control siRNA 组下调 (1.00 ± 0.07 vs 2.24 ± 0.19 , 1.00 ± 0.07 vs 4.42 ± 0.64 , $t = 6.06$ 、 5.29 , P 均 < 0.01) 。蛋白质印迹法和 qPCR 结果表明沉默 PD-L1 后 P-gp 和 MRP1 的表达均下调。以上结果证明沉默 PD-L1 部分逆转索拉非尼耐药人肝癌细胞的耐药性。

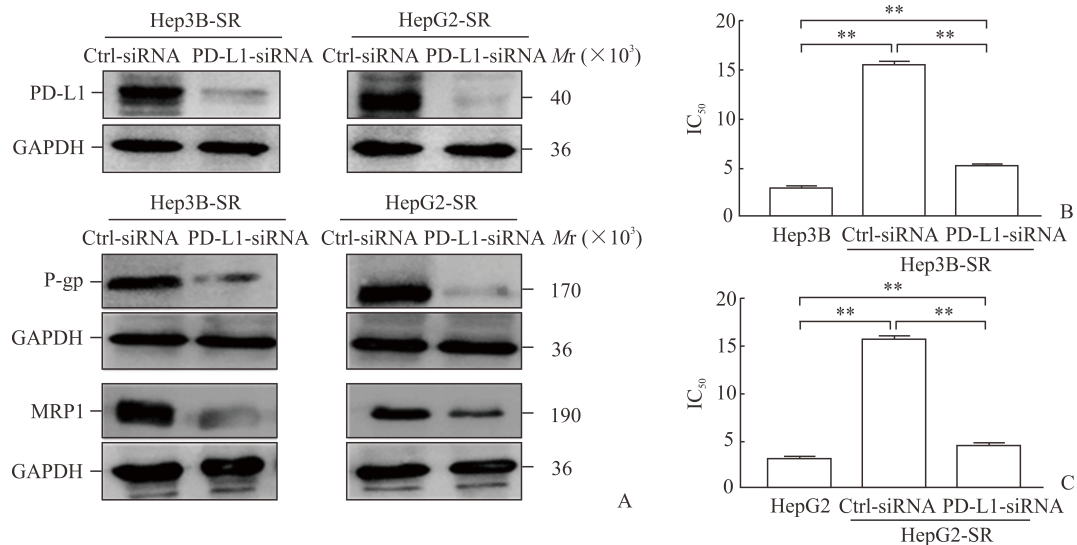


图 3 沉默 PD-L1 表达后部分逆转索拉非尼耐药肝癌细胞的耐药性

Fig 3 Silencing PD-L1 expression can partly reverse the drug resistance of hepatocellular carcinoma cells

A: Western blotting; B, C: CCK-8 assay. Ctrl: Control; PD-L1: Programmed cell death ligand-1; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; P-gp: P-glycoprotein; MRP1: Multidrug resistance-associated protein 1; IC₅₀: Half inhibition concentration. ** $P < 0.01$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.4 沉默 PD-L1 表达可抑制索拉非尼耐药人肝癌细胞的增殖、迁移和克隆形成并促进其凋亡 如图 4A、4B 所示, CCK-8 法检测发现 PD-L1 siRNA 组 Hep3B-SR 和 HepG2-SR 细胞的增殖能力在 24、48、72、96 h 时均低于 Control siRNA 组 (P 均 < 0.01), 表明沉默 PD-L1 表达后细胞增殖能力下降。

如图 4C、4D 所示, 划痕实验结果示 Hep3B-SR 和 HepG2-SR 细胞迁移宽度/划痕宽度为 Control siRNA 组 $>$ PD-L1 siRNA 组 $>$ 索拉非尼 + PD-L1 siRNA 组 ($F = 299.2$ 、 78.8 , P 均 < 0.01), 表明抑制 PD-L1 表达后耐药细胞迁移能力下降。

如图 4E、4F 所示, Hep3B-SR 和 HepG2-SR 细胞的克隆形成率为 Control siRNA 组 $>$ PD-L1 siRNA 组 $>$ 索拉非尼 + PD-L1 siRNA 组 ($F = 155.8$ 、 283.2 , P 均 < 0.01), 表明沉默 PD-L1 表达后耐药

细胞克隆形成率下降。

如图 4G、4H 所示, Hep3B-SR 和 HepG2-SR 细胞的凋亡比例为 Control siRNA 组 $<$ PD-L1 siRNA 组 $<$ 索拉非尼 + PD-L1 siRNA 组 ($F = 202.8$ 、 164.2 , P 均 < 0.01), 表明沉默 PD-L1 表达后耐药细胞凋亡增加。

3 讨论

肝癌目前在全球范围内仍然是导致人类死亡的主要疾病之一^[12]。多激酶抑制剂索拉非尼是唯一适用于晚期肝癌患者的全身化学治疗药物, 然而大部分患者在用药几个月后便出现耐药现象。研究表明肝癌中发生索拉非尼耐药是一个包含多种机制的复杂过程, 介导肿瘤免疫逃逸的 PD-L1 参与多种肿瘤细胞的耐药过程^[2]。

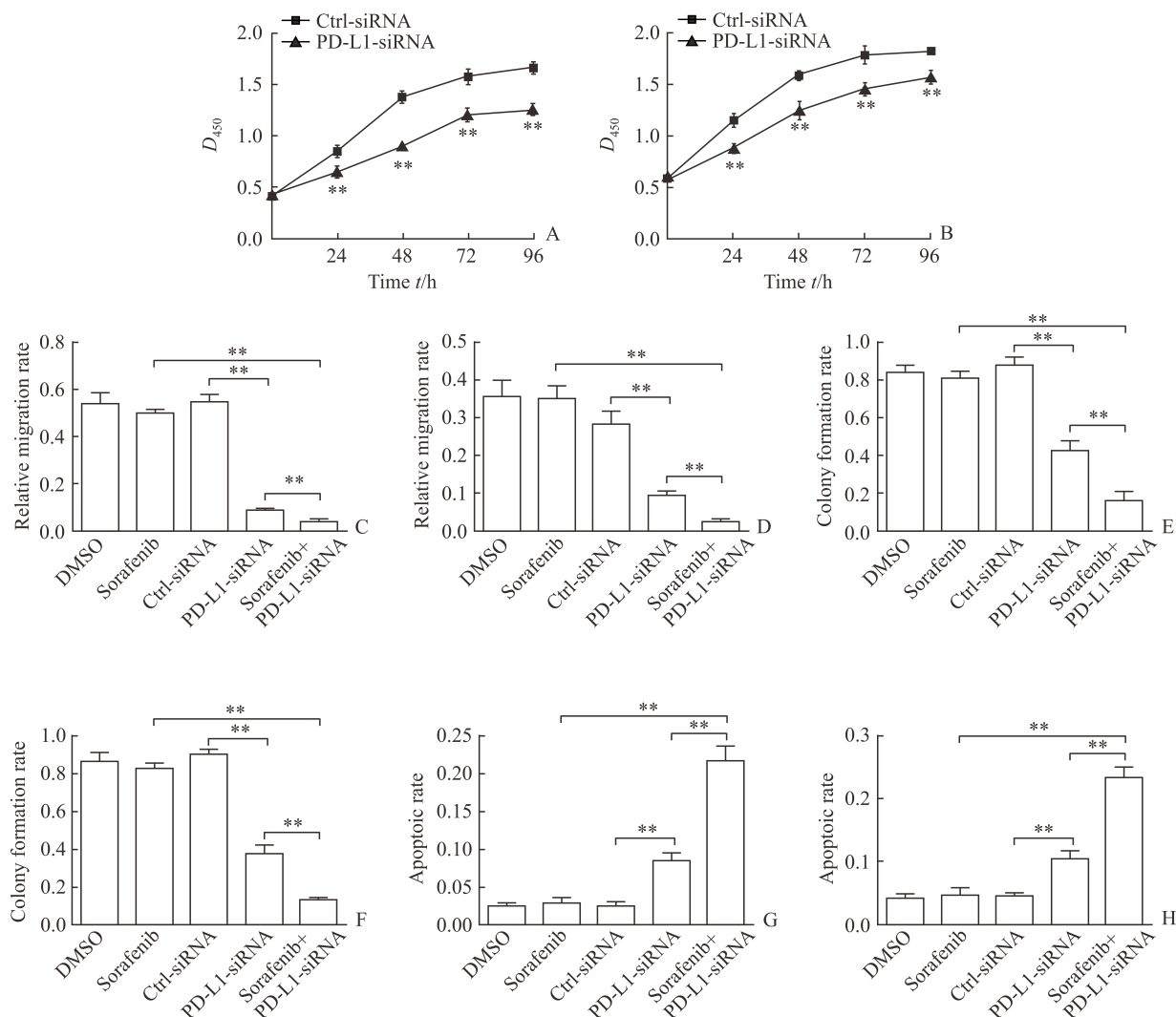


图 4 沉默 PD-L1 表达可抑制索拉非尼耐药人肝癌细胞的增殖、迁移和克隆形成并促进其凋亡

Fig 4 Silencing PD-L1 expression can repress the proliferation, migration and cloning formation of sorafenib-resistant human hepatocellular carcinoma cell and promote its apoptosis

A, B: Cell proliferation by CCK-8 assay; C, D: Cell migration by wound healing assay; E, F: Cell cloning formation by colony formation assay; G, H: Cell apoptosis by flow cytometry. A, C, E, G: Hep3B-SR; B, D, F, H: HepG2-SR. Ctrl: Control; PD-L1: Programmed cell death ligand-1; DMSO: Dimethyl sulphoxide. ** $P < 0.01$. $n = 3, \bar{x} \pm s$

本课题组前期进行了浓度梯度实验（药物浓度分别为 2.5、5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ ），结果显示当索拉非尼浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时肝癌细胞中 PD-L1 的表达上调且肝癌细胞的生长状态良好，因此结果 2.2 中实验组和功能实验中索拉非尼组剂量均为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。多药耐药已经被证明与 ATP 结合盒（ATP-binding cassette, ABC）超家族的转运蛋白过表达有关，包括 P-gp/ABCB1、MRP1/ABCC1 等^[13]，因此选取耐药基因 *MDR1* 和 *MRP1* 作为耐药性检测的重要指标。

本研究首先建立索拉非尼耐药人肝癌细胞 Hep3B-SR 和 HepG2-SR，利用 qPCR 和蛋白质

印迹法证实耐药细胞 PD-L1 的表达较亲本细胞上调，表明 PD-L1 在索拉非尼耐药肝癌细胞中高表达。沉默耐药细胞中 PD-L1 表达后，PD-L1 siRNA 组的 IC_{50} 较 Control siRNA 组下降，但仍高于其亲本细胞，并且耐药细胞 PD-L1 siRNA 组中 P-gp 和 MRP1 的表达较 Control siRNA 组下调，表明沉默 PD-L1 的表达可部分逆转肝癌细胞的索拉非尼耐药性。

通过功能实验发现，沉默 PD-L1 的表达可以有效抑制索拉非尼耐药人肝癌细胞的增殖、迁移、克隆形成和促进凋亡，尤其是合用索拉非尼时作用更为显著，表明 PD-L1 与索拉非尼耐药人肝癌细

胞的生物功能学特性有关。

Liu 等^[14]研究发现, PD-L1 在索拉非尼耐药人肝癌细胞中表达上调。本实验也观察到 PD-L1 在索拉非尼耐药人肝癌细胞中高表达, 并进一步证明沉默 PD-L1 表达后可逆转索拉非尼耐药人肝癌细胞的耐药性, 并且可抑制其增殖、迁移、克隆形成并促进其凋亡。前文已述, PI3K/Akt 通路参与肝癌细胞的索拉非尼耐药, 索拉非尼耐药人肝癌细胞中 Akt 表达上调。此外, 还有研究发现索拉非尼耐药人肝癌细胞中 IL-6 和 STAT3 表达上调^[7], 而 PD-L1 在多种耐药难治性肿瘤中的异常表达均与 PI3K/Akt 通路、STAT3 通路和 IL-6 有关^[15-16]。因此, 本课题组后期将进一步探讨索拉非尼耐药人肝癌细胞中 PD-L1 表达异常与 PI3K/Akt 通路、STAT3 通路和 IL-6 的关系。

综上所述, PD-L1 在索拉非尼耐药人肝癌细胞中表达上调, 沉默 PD-L1 表达后可有效抑制耐药细胞的增殖、迁移、克隆形成和促进其凋亡, 合用索拉非尼后其抗癌效果更显著。本实验证明了 PD-L1 是有效改善肝癌细胞索拉非尼耐药的一个新靶点, 沉默 PD-L1 表达可有效抑制索拉非尼耐药肝癌细胞的生长, 为进一步研究 PD-L1 参与肝癌细胞索拉非尼耐药的机制奠定了基础。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2016[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66: 7-30.
- [2] SUN X, NIU X, CHEN R, HE W, CHEN D, KANG R, et al. Metallothionein-1G facilitates sorafenib resistance through inhibition of ferroptosis[J]. *Hepatology*, 2016, 64: 488-500.
- [3] SIEGEL A B, OLSEN S K, MAGUN A, BROWN R S Jr. Sorafenib: where do we go from here?[J]. *Hepatology*, 2010, 52: 360-369.
- [4] WILHELM S M, CARTER C, TANG L, WILKIE D, McNABOLA A, RONG H, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis[J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 7099-7109.
- [5] TANAKA S, ARII S. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma[J]. *Semin Oncol*, 2012, 39: 486-492.
- [6] LLOVET J M, RICCI S, MAZZAFERRO V, HILGARD P, GANE E, BLANC J F, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359: 378-390.
- [7] NIU L, LIU L, YANG S, REN J, LAI P B S, CHEN G G. New insights into sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: responsible mechanisms and promising strategies[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1868: 564-570.
- [8] GOODMAN A, PATEL S P, KURZROCK R. PD-1-PD-L1 immune-checkpoint blockade in B-cell lymphomas[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14: 203-220.
- [9] BISHOP J L, SIO A, ANGELES A, ROBERTS M E, AZAD A A, CHI K N, et al. PD-L1 is highly expressed in enzalutamide resistant prostate cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6: 234-242.
- [10] YAN F, PANG J, PENG Y, MOLINA J R, YANG P, LIU S. Elevated cellular PD1/PD-L1 expression confers acquired resistance to cisplatin in small cell lung cancer cells[J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11: e0162925. doi: 10.1371/journal.pone.0162925.
- [11] DEMUTH C, ANDERSEN M N, JAKOBSEN K R, MADSEN A T, SORENSEN B S. Increased PD-L1 expression in erlotinib-resistant NSCLC cells with MET gene amplification is reversed upon MET-TKI treatment[J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 68221-68229.
- [12] FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, ESER S, MATHERS C, REBELO M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136: E359-E386.
- [13] RIGALLI J P, CIRIACI N, ARIAS A, CEBALLOS M P, VILLANUEVA S S, LUQUITA M G, et al. Regulation of multidrug resistance proteins by genistein in a hepatocarcinoma cell line: impact on sorafenib cytotoxicity[J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10: e0119502. doi: 10.1371/journal.pone.0119502.
- [14] LIU J, LIU Y, MENG L, LIU K, JI B. Targeting the PD-L1/DNMT1 axis in acquired resistance to sorafenib in human hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38: 899-907.
- [15] XU L, CHEN X, SHEN M, YANG D R, FANG L, WENG G, et al. Inhibition of IL-6-JAK/Stat3 signaling in castration-resistant prostate cancer cells enhances the NK cell mediated cytotoxicity via alteration of PD-L1/NKG2D ligand levels[J/OL]. *Mol Oncol*, 2017 Sep 2. doi: 10.1002/1878-0261.12135.
- [16] JIANG Z, YANG Y, YANG Y, ZHANG Y, YUE Z, PAN Z, et al. Ginsenoside Rg3 attenuates cisplatin resistance in lung cancer by downregulating PD-L1 and resuming immune[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 96: 378-383.

[本文编辑] 尹 茶