

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2020.07.0780

· 论 著 ·

微RNA-200家族对程序性死亡配体1的调控及其在非小细胞肺癌中的临床意义

孙伟¹, 白宗科², 姜梨华³, 邵晓轶^{1*}

1. 南通大学医学院免疫学系, 南通 226000

2. 中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 211198

3. 海军军医大学(第二军医大学)东方肝胆外科医院仪器设备科, 上海 201805

[摘要] **目的** 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)免疫检查点分子程序性死亡配体1(PD-L1)的表达及其与miRNA-200家族之间的调控关系,阐明PD-L1在NSCLC中的临床意义及调控机制。**方法** 选取138例NSCLC患者癌组织及配对的癌旁组织标本,采用免疫组织化学染色检测PD-L1表达,qRT-PCR检测miRNA-200家族(miRNA-200a、miRNA-200b、miRNA-200c、miRNA-429、miRNA-141)的表达水平。培养肺癌A549细胞,通过转染miRNA-200家族5个miRNA模拟物使其过表达,采用蛋白质印迹法检测miRNA-200家族过表达对PD-L1表达的影响,CCK-8实验检测miRNA-200家族过表达对A549细胞增殖活性的影响,荧光素酶报告基因实验验证miRNA-200家族对PD-L1的调控作用。**结果** 138例NSCLC患者癌组织PD-L1总阳性率为58.7%(81/138),高于癌旁组织(3.6%,5/138),差异有统计学意义($P<0.05$);PD-L1表达水平与患者性别、年龄、肿瘤大小、组织学类型无关,而与淋巴结转移、脉管侵犯、临床TNM分期有关(P 均 <0.05)。NSCLC癌组织中miRNA-200家族表达水平均低于癌旁组织(P 均 <0.01),且PD-L1表达阳性的患者具有更低水平的miRNA-200家族表达水平(P 均 <0.01)。A549细胞过表达miRNA-200家族能下调PD-L1的表达(P 均 <0.01),且抑制癌细胞增殖活性(P 均 <0.01)。荧光素酶报告基因实验证实miRNA-200家族直接负调控PD-L1的表达(P 均 <0.01)。**结论** PD-L1高表达预示NSCLC患者预后不良。PD-L1是miRNA-200家族的靶基因,miRNA-200家族表达水平低可能是NSCLC患者高表达PD-L1的重要原因。

[关键词] 非小细胞肺癌;微RNA-200家族;程序性死亡配体1;分子调控机制;免疫治疗

[中图分类号] R 734.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2020)07-0780-07

Regulation of programmed death ligand 1 by microRNA-200 family and its clinical significance in non-small cell lung cancer

SUN Wei¹, BAI Zong-ke², JIANG Li-hua³, SHAO Xiao-yi^{1*}

1. Department of Immunology, School of Medicine, Nantong University, Nantong 226000, Jiangsu, China

2. School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, Jiangsu, China

3. Department of Medical Equipment, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 201805, China

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of the immune checkpoint molecule programmed death ligand 1 (PD-L1) in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its regulatory relationship with the microRNA-200 (miRNA-200) family, and to elucidate the clinical significance and regulatory mechanism of PD-L1 in NSCLC. **Methods** NSCLC cancer tissues and matched paracancerous tissues (138 cases) were selected for this study. The PD-L1 expression was detected by immunohistochemistry and the expression levels of miRNA-200 family (miRNA-200a, miRNA-200b, miRNA-200c, miRNA-429, and miRNA-141) were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Lung cancer A549 cells were cultured and transfected with five miRNA mimics of miRNA-200 family. The effect of miRNA-200 family mimics on PD-L1 expression and proliferation activity of A549 cells were detected by Western blotting and cell counting kit-8 (CCK-8) assay, respectively. Luciferase reporter gene assay was used to elucidate the regulation of

[收稿日期] 2020-05-12 **[接受日期]** 2020-06-22

[基金项目] 国家自然科学基金(81771767,81801580). Supported by National Natural Science Foundation of China (81771767, 81801580).

[作者简介] 孙伟,硕士生. E-mail: 13331998355@189.cn

*通信作者(Corresponding author). Tel: 0513-85051735, E-mail: xy_shao@163.com

PD-L1 by miRNA-200 family. **Results** Total positive rate of PD-L1 in 138 NSCLC tissues was 58.7% (81/138), which was significantly higher than that in paracancerous tissues (3.6%, 5/138) ($P < 0.05$). The expression level of PD-L1 was not related to the patients' gender, age, tumor size or histological types, but was closely related to lymph node metastasis, vascular invasion and clinical TNM stage (all $P < 0.05$). The miRNA-200 family was expressed at a low level in NSCLC tissues than that in paracancerous tissues (all $P < 0.01$), and patients with positive PD-L1 expression had significantly lower levels of miRNA-200 family expression (all $P < 0.01$). Overexpression of miRNA-200 family in A549 cells significantly down-regulated PD-L1 and inhibited proliferation activity of cancer cells (all $P < 0.01$). Luciferase reporter gene assay confirmed that the miRNA-200 family directly and negatively regulated the expression of PD-L1 (all $P < 0.01$). **Conclusion** High expression of PD-L1 in NSCLC indicates poor prognosis. PD-L1 is the target gene of miRNA-200 family, and the low expression of miRNA-200 family may be an important reason for the high expression of PD-L1 in NSCLC.

[Key words] non-small cell lung cancer; microRNA-200 family; programmed death ligand 1; molecular regulatory mechanism; immunotherapy

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2020, 41(7): 780-786]

肺癌是全球范围内发生率与死亡率最高的恶性肿瘤之一, 美国最新统计报告显示, 预计2020年全美新发癌症患者达1 806 590例, 死亡606 520例, 其中新发支气管癌及肺癌228 820例, 死亡135 720例^[1]。支气管癌及肺癌中80%以上是非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC), 由于发病隐匿, 多数NSCLC患者确诊时已处于晚期, 失去手术机会, 预后较差^[2]。免疫抑制信号的激活是癌细胞免疫逃避的重要机制, 近几年针对免疫检查点分子细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4)、程序性死亡蛋白1(programmed death 1, PD-1)、程序性死亡配体1(programmed death ligand 1, PD-L1)设计的抗肿瘤免疫治疗发展迅猛, CTLA-4、PD-1、PD-L1抑制剂在临床前和临床试验中获得良好疗效^[3]。虽然这些免疫抑制剂显著延长了部分肺癌患者的生存期, 但总体反应率仍然很低^[4]。为了提高肺癌免疫治疗疗效, 有必要深入研究肺癌免疫检查点分子表达和功能的调控机制, 挖掘其中调控信号通路的生物标志物, 并通过这些生物标志物筛选可能的免疫治疗获益病例, 这正是当前急需解决的问题。本研究拟探讨NSCLC癌组织中PD-L1的表达及调控机制, 阐明PD-L1与miRNA-200家族的关系, 为临床设计更优越的以PD-L1抗体为主导的协同治疗方案提供依据。

1 材料和方法

1.1 病例标本 收集南通大学附属医院2018年1月至2019年12月138例NSCLC患者资料和

标本, 所有患者术前均未接受任何方式针对肿瘤的治疗。138例患者中, 男97例, 女41例; 年龄37~86岁, 中位年龄68岁。所有患者均经病理组织学检查确诊, 其诊断、分型及分期依据美国癌症联合委员会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)标准^[5]。手术标本取癌组织和相应的癌旁组织, 癌组织避开中心坏死区取材, 癌旁组织在距癌组织边缘2 cm以外的区域取材。一部分标本经甲醛固定、石蜡包埋后切片, 用于免疫组织化学染色; 一部分新鲜标本于-80℃保存, 用于qRT-PCR检测。本研究通过南通大学附属医院生物医学研究伦理委员会审批。

1.2 临床标本PD-L1免疫组织化学检测 免疫组织化学染色过程参照SP试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司)说明进行。鼠抗人PD-L1单克隆抗体购自福州迈新生物技术开发有限公司, 工作浓度为1:100。每张切片在200倍镜下计数5个视野的阳性细胞数, 并计算阳性率。

1.3 临床标本miRNA-200家族qRT-PCR检测 将新鲜NSCLC标本经TRIzol试剂盒(美国Invitrogen公司)裂解提取总RNA, 采用qRT-PCR试剂盒(大连宝生物公司)检测miRNA-200家族5个成员(miRNA-200a、miRNA-200b、miRNA-200c、miRNA-429、miRNA-141)的含量。内参选用U6基因。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.4 肺癌细胞系A549过表达miRNA-200家族实验 人肺癌A549细胞系由中国科学院上海生物细胞研究所提供, 用含10% FBS的DMEM培养液(美国Gibco公司)于37℃、5% CO₂培养箱中

培养。设计 miRNA-200 家族模拟物 (mimics), 并设置阴性对照 (miRNA-NC), 均由广州锐博生物技术有限公司化学合成。将 A549 细胞按每孔 1×10^6 个细胞的密度接种于 6 孔板中, 培养过夜后细胞贴壁, 换无血清培养液并加入 miRNA-200 家族模拟物 (终浓度 $20 \mu\text{g/mL}$), 继续培养 48 h。收集细胞, 采用 TRIzol 试剂盒提取总 RNA, 采用 qRT-PCR 检测 miRNA-200 家族的表达水平。

1.5 肺癌细胞系 A549 表达 PD-L1 的蛋白质印迹检测 A549 细胞转染 miRNA-200 家族模拟物后培养 48 h, 收集细胞, 采用 TRIzol 试剂盒抽提总蛋白, 用蛋白质印迹法检测 PD-L1 的表达。以 GAPDH 作为内参照。PD-L1 抗体 (货号 ab213524, 工作浓度 1 : 1 000) 和 GAPDH 抗体 (货号 ab181602, 工作浓度 1 : 2 000) 均为英国 Abcam 公司产品。

1.6 miRNA-200 家族对 A549 细胞增殖活性的影响 将 A549 细胞按每孔 5×10^3 的密度接种于 96 孔板中, 培养过夜后细胞贴壁, 换无血清培养液并加入 miRNA-200 家族模拟物 (终浓度为 $20 \mu\text{g/mL}$), 继续培养 24、48、72 h; 弃培养液, 每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 0.1 mol/L PBS, 再按 CCK-8 试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司) 说明书加入 CCK-8 试剂, 置孵箱内孵育过夜。用酶标仪 (Bio-Rad 公司) 进行检测, 读取 570 nm 波长处光密度值, 校正波长为 655 nm 。计算细胞存活率: 细胞存活率 (%) = [(实验孔光密度值 - 空白孔光密度值) / (对照孔光密度值 - 空白孔光密度值)] $\times 100\%$ 。

1.7 PD-L1 与 miRNA-200 家族调控的荧光素酶报告基因验证 合成 PD-L1 基因的 3'-非翻译区 (untranslated region, UTR) 序列的 2 个片段 F1 和 F2, F1 (5'-AGAGTCTCAGTGTTG-3')

含有 miRNA-200a 和 miRNA-141 的结合位点, F2 (5'-AACGGGACAGTATTT-3') 含有 miRNA-200b、miRNA-200c 和 miRNA-429 的结合位点。将 F1 和 F2 分别插入荧光素酶报告基因载体 (pGL3-Control, 美国 Promega 公司) 中, 构建 pGL3-F1 和 pGL3-F2 质粒。将 A549 细胞按每孔 5×10^3 个细胞的密度接种于 96 孔板, 培养 24 h 后换无血清培养液, 加入 miRNA-200 家族模拟物和阴性对照 miRNA-NC (终浓度 $20 \mu\text{g/mL}$), 24 h 后每孔加入 pGL3-F1 和 pGL3-F2 各 200 ng 进行转染, 并加入 pRL-TK 质粒 (美国 Promega 公司) 20 ng 进行共转染, 再培养 48 h 后, 回收并裂解细胞, 测定荧光素酶活性。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本 *t* 检验; 计数资料以例数和百分数表示, 组间比较采用 χ^2 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 NSCLC 癌组织 PD-L1 表达与临床病理学特征的关系 免疫组织化学染色结果显示, PD-L1 阳性反应多见于细胞核和细胞质 (图 1), NSCLC 癌组织 PD-L1 阳性率为 58.7% (81/138), 而癌旁组织阳性率仅为 3.6% (5/138), 癌组织 PD-L1 阳性率高于癌旁组织 ($P < 0.05$)。分析 PD-L1 与 NSCLC 临床病理特征的关系, 结果显示, PD-L1 表达水平与 NSCLC 患者的性别、年龄、肿瘤大小、组织学类型无关, 而与淋巴结转移、脉管侵犯、临床 TNM 分期密切相关, 有淋巴结转移、有微血管和淋巴管侵犯、临床分期较晚的患者 PD-L1 阳性率较高 (P 均 < 0.05 , 表 1)。

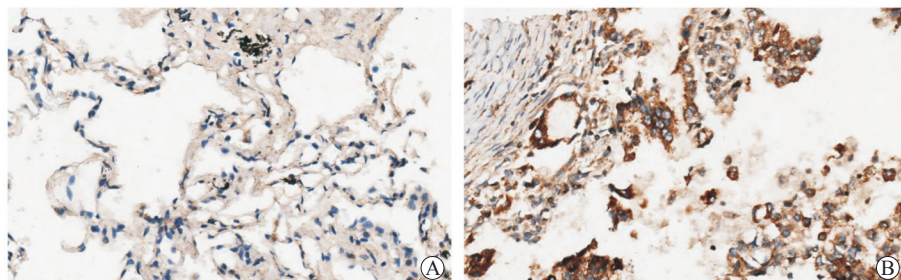


图 1 NSCLC 患者癌组织及癌旁组织 PD-L1 免疫组织化学染色

Fig 1 PD-L1 immunohistochemistry staining of cancer tissues and paracancerous tissues in NSCLC patients

A: Paracancerous tissue; B: Poorly differentiated lung adenocarcinoma tissue. NSCLC: Non-small cell lung cancer; PD-L1: Programmed death ligand 1. Original magnification: $\times 200$

表 1 NSCLC 患者癌组织 PD-L1 表达与临床病理特征的关系

Tab 1 Association between PD-L1 expression in cancer tissues and clinicopathological features of NSCLC patients

Clinicopathological feature	N	PD-L1 expression		χ^2 value	P value
		Positive	Negative		
Gender				0.162 4	0.687 0
Male	97	58 (59.8)	39 (40.2)		
Female	41	23 (56.1)	18 (43.9)		
Age (year)				0.437 6	0.508 3
$\geq 68^a$	70	43 (61.4)	27 (38.6)		
$< 68^a$	68	38 (55.9)	30 (44.1)		
Lymph node metastasis				6.086 0	0.013 6
Positive	80	54 (67.5)	26 (32.5)		
Negative	58	27 (46.6)	31 (53.4)		
Histological type				0.442 3	0.801 6
Squamous cell carcinoma	57	33 (57.9)	24 (42.1)		
Adenocarcinoma	66	38 (57.6)	28 (42.4)		
Large cell carcinoma	15	10 (66.7)	5 (33.3)		
Maximal diameter of tumor (cm)				2.985 6	0.084 0
≥ 5.0	75	49 (65.3)	26 (34.7)		
< 5.0	63	32 (50.8)	31 (49.2)		
Vascular invasion				9.149 3	0.002 5
Positive	52	39 (75.0)	13 (25.0)		
Negative	86	42 (40.8)	44 (59.2)		
TNM stage				5.413 8 ^b	0.020 0 ^b
I (T1-2N0M0)	19	8 (42.1)	11 (57.9)		
II (T1-2N1M0)	33	16 (48.5)	17 (51.5)		
III A (T3N0M0; T1-3N2M0)	49	35 (71.4)	14 (28.6)		
III B (T1-4N3M0; T4N1M0)	29	17 (58.6)	12 (41.4)		
IV (T1-4N1-3M1)	8	5 (62.5)	3 (37.5)		

^a: Median age; ^b: Comparison between TNM stage I - II and III - IV. NSCLC: Non-small cell lung cancer; PD-L1: Programmed death ligand 1

2.2 NSCLC 癌组织 miRNA-200 家族表达水平及其与 PD-L1 的关系 qRT-PCR 检测结果显示, 患者癌组织中 miRNA-200a、miRNA-200b、miRNA-200c、miRNA-429、miRNA-141 表达水平均低于癌旁组织 (P 均 <0.01 , 图 2A), 以 miRNA-

200a、miRNA-429 和 miRNA-141 为最显著。进一步分析这些 miRNA 表达水平与癌组织 PD-L1 表达的关系, 发现 PD-L1 表达阳性的患者具有更低水平的 miRNA-200 家族表达 (P 均 <0.01 , 图 2B)。

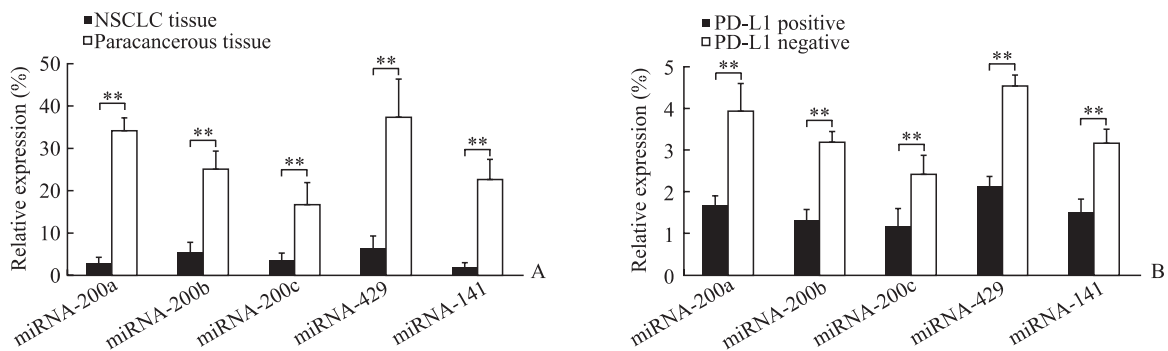


图 2 qRT-PCR 检测 NSCLC 患者癌组织 miRNA-200 家族的表达及其与 PD-L1 的关系

Fig 2 qRT-PCR analysis of miRNA-200 family expression and its relationship with PD-L1 in cancer tissues of NSCLC patients
 A: Expression levels of miRNA-200 family in NSCLC tissues and paracancerous tissues ($n=138$); B: Expression of miRNA-200 family in NSCLC tissues with PD-L1 positive ($n=81$) and negative ($n=57$) expression. qRT-PCR: Quantitative real-time polymerase chain reaction; NSCLC: Non-small cell lung cancer; miRNA: microRNA; PD-L1: Programmed death ligand 1. $**P<0.01$. $\bar{x} \pm s$

2.3 肺癌细胞过表达 miRNA-200 家族能下调 PD-L1 表达 qRT-PCR 检测结果显示, A549 细胞转染 miRNA-200 家族模拟物后, miRNA-200a、miRNA-200b、miRNA-200c、miRNA-429、miRNA-141 表达水平均较阴性对照组升高 (P 均 < 0.01 , 图 3A)。蛋白质印迹检测结果显示, 这些 miRNA 模拟物均能下调 PD-L1 表达 (P 均 < 0.01 , 图 3B)。

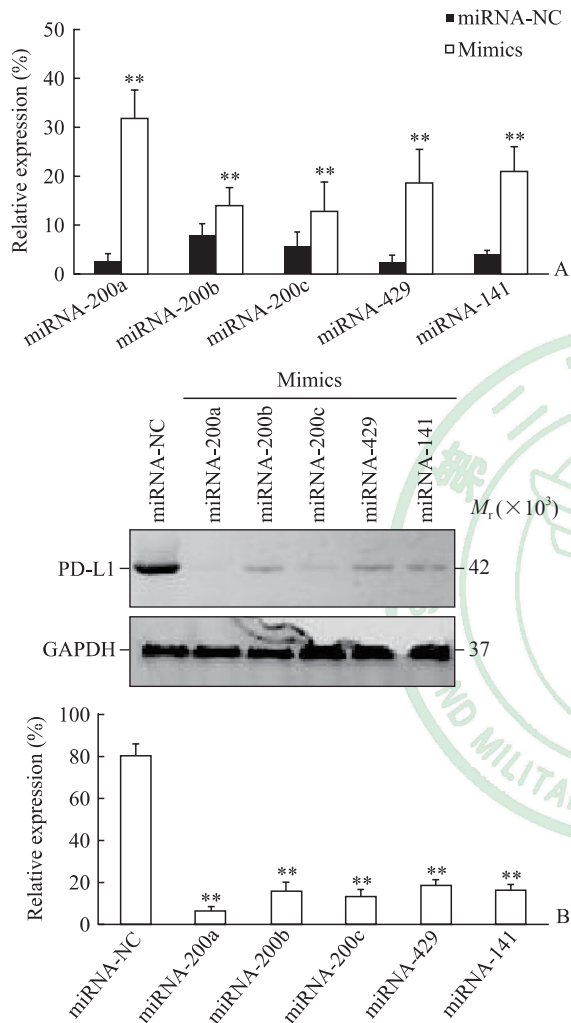


图 3 肺癌细胞 A549 过表达 miRNA-200 家族对 PD-L1 表达的影响

Fig 3 Impact of miRNA-200 family overexpression on PD-L1 expression in lung cancer A549 cells

A: qRT-PCR analysis demonstrated that miRNA-200 family was highly expressed following transfection with miRNA-200 family mimics in A549 cells; B: Western blotting analysis showed that the expression of PD-L1 decreased following transfection with miRNA-200 family mimics in A549 cells. miRNA: microRNA; NC: Negative control; PD-L1: Programmed death ligand 1; qRT-PCR: Quantitative real-time polymerase chain reaction; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. ** $P < 0.01$ vs miRNA-NC group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.4 肺癌细胞 A549 过表达 miRNA-200 家族能抑制细胞的增殖活性 CCK-8 实验结果显示, A549 细胞转染阴性对照 miRNA 后 24、48、72 h, 细胞存活率基本保持平稳, 说明转染过程本身不会对细胞存活率造成明显影响。A549 细胞转染 miRNA-200 家族模拟物后, 癌细胞存活率随时间延长而逐渐下降, 72 h 时与阴性对照组相比差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01), 其中 miRNA-429、miRNA-141 和 miRNA-200a 的作用最显著 (图 4)。

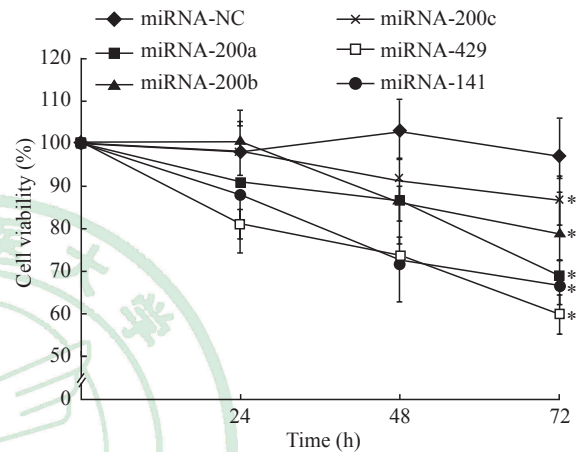


图 4 CCK-8 实验检测肺癌细胞 A549 过表达 miRNA-200 家族对细胞增殖活性的抑制作用

Fig 4 CCK-8 assay indicated that miRNA-200 family overexpression inhibited the proliferation of lung cancer A549 cells

CCK-8: Cell counting kit-8; miRNA: microRNA; NC: Negative control. ** $P < 0.01$ vs miRNA-NC group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.5 PD-L1 是 miRNA-200 家族的靶基因 荧光素酶报告基因实验证实, miRNA-200a 和 miRNA-141 模拟物能使 pGL3-F1 的荧光素酶活性下降, 与阴性对照组相比差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01), 但对 pGL3-F2 的荧光素酶活性无影响; miRNA-200b、miRNA-200c 和 miRNA-429 模拟物能使 pGL3-F2 的荧光素酶活性下降, 与阴性对照组相比差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01), 但对 pGL3-F1 的荧光素酶活性无影响 (图 5)。

上述结果提示, PD-L1 是 miRNA-200 家族的靶基因, miRNA-200 家族能下调 PD-L1 的表达, 但 5 个 miRNA-200 家族成员的作用位点不同, miRNA-200a 和 miRNA-141 共同作用于一个序列区, miRNA-200b、miRNA-200c 和 miRNA-429 共同作用于一个序列区。

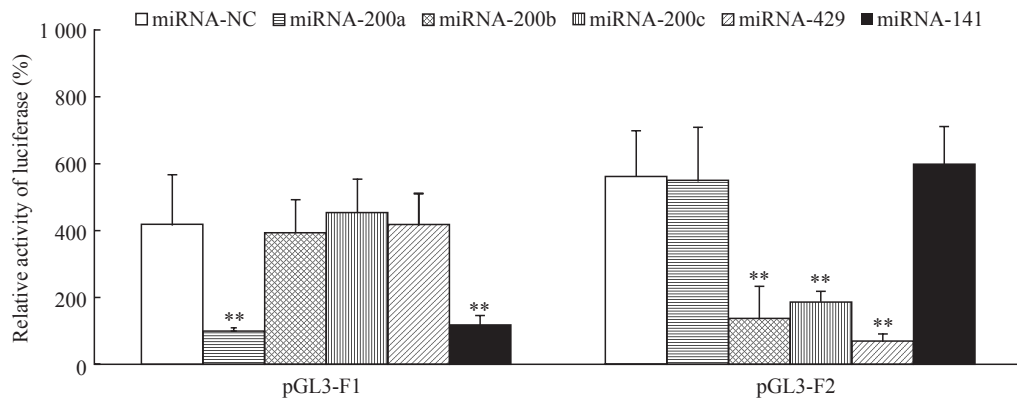


图5 荧光素酶报告基因实验证实 PD-L1 是 miRNA-200 家族靶基因

Fig 5 Luciferase assay confirmed that PD-L1 was the target gene of miRNA-200 family

PD-L1: Programmed death ligand 1; miRNA: microRNA; NC: Negative control. pGL3-F1: The luciferase reporter vector contains miRNA-200a and miRNA-141 binding sites; pGL3-F2: The luciferase reporter vector contains miRNA-200b, miRNA-200c and miRNA-429 binding sites. ** $P < 0.01$ vs miRNA-NC group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

PD-L1 是一种相对分子质量为 40 000 的 I 型跨膜蛋白,由 CD274 基因编码,因此又称为 CD274 或 B7 同源物 1 (B7 homolog 1, B7-H1)。PD-L1 的主要功能是与其受体 PD-1 结合传递免疫抑制信号,减少淋巴结中抗原特异性 CD8⁺ T 淋巴细胞的增殖^[6]。PD-L1 在多种肿瘤中均有表达,特别是 NSCLC、胃癌、胶质细胞瘤、黑色素瘤、肾癌、前列腺癌、肝癌等^[7-8]。在肿瘤细胞表面表达的 PD-L1 与 T 淋巴细胞表达的 PD-1 相互作用,能够保证肿瘤细胞的免疫逃避功能,促使肿瘤细胞生长。抑制 PD-L1/PD-1 通路能够提高 CD8⁺ T 细胞功能,并抑制调节性 T 淋巴细胞功能,从而达到抗肿瘤的目的^[9]。根据这个原理,已开发出 PD-L1 或 PD-1 抗体类药物,用来阻断 PD-L1 与 PD-1 的相互作用,并因此增强宿主抗肿瘤免疫应答、抑制肿瘤生长。目前,已有多种抗 PD-L1 和抗 PD-1 的抗体被批准用于临床试验或临床前研究中,并表现出令人期待的效果^[10-11]。

关于 NSCLC 中 PD-L1 的表达已有较多文献报道,但各结果间差异较大。Miyazawa 等^[12]研究表明,PD-L1 在肺鳞癌 (44%) 和大细胞癌 (67%) 中阳性率高于腺癌 (21%); 在腺癌的各亚型中,PD-L1 阳性率在腺泡型腺癌为 57%,实体型腺癌为 55%,明显高于乳头型腺癌和腺泡型腺癌。该研究还发现,PD-L1 阳性表达与男性 ($P = 0.001$)、吸烟者 ($P = 0.027$)、病理分期晚 ($P = 0.018$)、

静脉浸润阳性 ($P = 0.001$)、淋巴管浸润阳性 ($P = 0.011$) 等相关,但与年龄、临床分期、胸膜浸润、表皮生长因子受体突变不相关。本研究通过免疫组织化学染色对 138 例 NSCLC 的癌组织及癌旁组织 PD-L1 进行检测,发现癌组织中 PD-L1 总阳性率为 58.7% (81/138),大细胞癌阳性率 (66.7%, 10/15) 略高于鳞癌 (57.9%, 33/57) 和腺癌 (57.6%, 38/66)。PD-L1 的表达水平与患者性别、年龄、肿瘤大小、组织学类型不相关,而与淋巴结转移、脉管侵犯、临床 TNM 分期密切相关,有淋巴结转移、有微血管和淋巴管侵犯、临床分期较晚的患者 PD-L1 阳性率明显升高。本研究结果提示,PD-L1 可能与 NSCLC 的恶性进展密切相关。

PD-L1 阳性表达的调控机制非常复杂,还有很多影响因素没有确定。研究发现,PD-L1 受很多癌基因和抑癌基因调控,如 PD-L1 的表达会被抑癌基因 *PTEN* 抑制,在神经胶质瘤中敲除 *PTEN* 则能够通过激活 PI3K/AKT 下游 mTOR-S6K1 信号通路增加 PD-L1 的转录表达^[13]。此外,PD-L1 在肺癌细胞中与 miRNA 的关系也极为密切,一些 miRNA 如 miRNA-34、miRNA-200、miRNA-197 等能显著影响 PD-L1 抗体的疗效^[14]。研究 PD-L1 和 miRNA 之间的关系将有助于阐明 PD-L1 表达的调控机制和研发有效的靶向治疗策略。

为深入研究 NSCLC 中 PD-L1 表达差异的影响因素及其机制,本研究检测了 138 例 NSCLC 中 miRNA-200 家族 5 个 miRNA (miRNA-200a、miRNA-200b、miRNA-200c、miRNA-429、

miRNA-141) 的表达,发现 NSCLC 中 miRNA-200 家族水平均低于癌旁组织,并且这些 miRNA 均与 PD-L1 存在反向平行关系,即 PD-L1 表达阳性的患者具有更低水平的 miRNA-200 家族表达,提示 miRNA-200 家族与 PD-L1 表达相关。本研究在高表达 PD-L1 的肺癌细胞 A549 中过表达 miRNA-200 家族,发现随 miRNA-200 家族水平升高 PD-L1 表达水平下调,提示 miRNA-200 家族能负调控 NSCLC 细胞的 PD-L1 表达,而且这种负调控抑制了癌细胞的增殖活性。荧光素酶报告基因检测结果确认 PD-L1 是 miRNA-200 家族全部 5 个 miRNA 的靶基因,但其作用位点有所不同。本研究结果阐明 PD-L1 受 miRNA-200 家族的直接调控,为设计 NSCLC 靶向治疗策略提供了参考依据。

志谢 南通大学附属医院为本研究提供病例资料和标本,特此感谢!

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020[J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70: 7-30.
- [2] ANDRATSCHKE N, KRAFT J, NIEDER C, TAY R, CALIFANO R, SOFFIETTI R, et al. Optimal management of brain metastases in oncogenic-driven non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. *Lung Cancer*, 2019, 129: 63-71.
- [3] REMON J, PASSIGLIA F, AHN M J, BARLESIF, FORDE P M, GARON E B, et al. Immune checkpoint inhibitors in thoracic malignancies: review of the existing evidence by an IASLC expert panel and recommendations[J]. *J Thorac Oncol*, 2020, 15: 914-947.
- [4] LINGLING Z, JIEWEI L, LI W, DANLI Y, JIE Z, WEN L, et al. Molecular regulatory network of PD-1/PD-L1 in non-small cell lung cancer[J/OL]. *Pathol Res Pract*, 2020, 216: 152852. doi: 10.1016/j.prp.2020.152852.
- [5] KIM I G, HU X G, WANG H J, KIM B W, HONG S Y, SHEN X Y. The 7th/8th American Joint Committee on Cancer and the modified Union for International Cancer Control staging system for hepatocellular carcinoma[J]. *Yonsei Med J*, 2019, 60: 140-147.
- [6] DISKIN B, ADAM S, CASSINI M F, SANCHEZ G, LIRIA M, AYKUT B, et al. PD-L1 engagement on T cells promotes self-tolerance and suppression of neighboring macrophages and effector T cells in cancer[J]. *Nat Immunol*, 2020, 21: 442-454.
- [7] PATEL S P, KURZROCK R. PD-L1 expression as a predictive biomarker in cancer immunotherapy[J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14: 847-856.
- [8] JIANG Y, CHEN M, NIE H, YUAN Y. PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2019, 15: 1111-1122.
- [9] ZHANG J, DANG F, REN J, WEI W. Biochemical aspects of PD-L1 regulation in cancer immunotherapy[J]. *Trends Biochem Sci*, 2018, 43: 1014-1032.
- [10] ITO A, KONDO S, TADA K, KITANO S. Clinical development of immune checkpoint inhibitors[J/OL]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 605478. doi: 10.1155/2015/605478.
- [11] ZIELINSKI C C. A phase I study of MEDI4736, NNT-PD-L1 antibody in patients with advanced solid tumors[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2014, 3: 406-407.
- [12] MIYAZAWA T, MARUSHIMA H, SAJI H, KOJIMA K, HOSHIKAWA M, TAKAGI M, et al. PD-L1 expression in non-small-cell lung cancer including various adenocarcinoma subtypes[J]. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 2019, 25: 1-9.
- [13] ZHAO L, LI C, LIU F, ZHAO Y, LIU J, HUA Y, et al. A blockade of PD-L1 produced antitumor and antimetastatic effects in an orthotopic mouse pancreatic cancer model via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10: 2115-2126.
- [14] GREYDA A, KRAWCZYK P. New dancing couple: PD-L1 and microRNA[J]. *Scand J Immunol*, 2017, 86: 130-134.

[本文编辑] 孙岩