



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20180480

数字出版日期: 2019-10-16; 数字出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1355.N.20191016.1503.006.html>

## PD-L1 表达抑制剂的筛选及其抗肿瘤活性

景磊, 赵苗苗, 姜博, 李玉银, 刁爱坡  
(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 为了筛选 PD-L1 启动子活性抑制剂, 研究其抑制肿瘤细胞中 PD-L1 蛋白表达对机体抗肿瘤免疫活性的调节作用. 利用荧光素报告基因检测系统对小分子化合物库中的 311 种化合物进行筛选, 发现硫酸长春新碱(vincristine sulfate, VCR)以浓度依赖性抑制 PD-L1 基因启动子活性. RT-PCR、免疫印迹实验(Western blot)等生物学评价实验显示: VCR 抑制 MDA-MB-231 乳腺癌细胞中 PD-L1 表达以及 B16 细胞 PD-L1 蛋白表达和成瘤; VCR 增强 Jurkat 细胞对 MDA-MB-231 细胞的杀伤活性, 并促进 C57BL/6 小鼠细胞因子 IL-2 和  $\gamma$ -IFN 的分泌, 增强抗肿瘤活性. 研究结果表明, VCR 通过抑制 PD-L1 启动子活性下调肿瘤细胞中 PD-L1 蛋白表达, 从而解除 PD-1/PD-L1 信号通路介导的免疫抑制, 增强机体对肿瘤细胞的免疫应答和杀伤作用.

**关键词:** PD-L1; 免疫检验点; 硫酸长春新碱; 小鼠成瘤; 细胞因子

中图分类号: Q291

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2020)01-0026-07

## Screening of PD-L1 Expression Inhibitor and its Anti-tumor Activity

JING Lei, ZHAO Miaomiao, JIANG Bo, LI Yuyin, DIAO Aipo

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** The aim of this study is to screen a compound inhibiting the expression of PD-L1 protein in tumor cells and study its anti-tumor immune activity. 311 compounds of a small molecule library were screened using a fluorescein reporter gene assay system and then it was found that VCR could inhibit the activity of PD-L1 promoter in a concentration-dependent manner. RT-PCR, Western blot and other biological evaluation showed that VCR could inhibit the expression of PD-L1 in MDA-MB-231 cells, the expression of PD-L1 protein and tumorigenesis of B16 cells. VCR treatment enhanced the killing activity of Jurkat cells to MDA-MB-231 cells, and promoted the secretion of IL-2 and  $\gamma$ -IFN, which in turn could enhance the anti-tumor activity in C57BL/6 mice. These results indicate that VCR down-regulates the expression of PD-L1 in tumor cells by inhibiting the activity of PD-L1 promoter, which leads to abolishing of immunosuppression mediated by PD-1/PD-L1 signaling pathway and thus enhancing the immune response and killing activity of the agent to tumor cells.

**Key words:** PD-L1; immune checkpoint; vincristine sulfate; xenograft tumor mode; cytokine

肿瘤细胞可以利用免疫检验点 (immune checkpoint) 调节 T 淋巴细胞的功能<sup>[1]</sup>, 从而逃逸免疫系统对肿瘤细胞的识别与杀伤作用. 机体免疫细胞的激活与抑制是通过共刺激信号进行调节, 其中程序性死亡蛋白 1 (PD-1) 与其配体蛋白 PD-L1 作为一个主要的免疫检验点, 是一个负调节性信号途径. 当 PD-1/PD-L1 信号激活后, 抑制 T 淋巴细胞的活化和细胞

因子的分泌, 使机体免疫应答受到抑制<sup>[2-3]</sup>. 因此, 阻断 PD-1/PD-L1 信号的传递是激活机体抗肿瘤免疫应答的有效途径<sup>[4]</sup>.

目前, 靶向 PD-1/PD-L1 免疫检验点的抗体类阻断剂已经在超过 1 000 例临床试验中被评估并取得了一定的疗效<sup>[5]</sup>, 但是, 大约 1/3 的患者在治疗过程中会出现乏力、头昏、全身肌肉酸痛等现象, 部分患

收稿日期: 2018-12-08; 修回日期: 2019-03-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31471335)

作者简介: 景磊 (1988—), 男, 河南开封人, 博士研究生; 通信作者: 刁爱坡, 教授, diaoaiipo@tust.edu.cn

者甚至会出现严重的免疫相关不良反应<sup>[6-8]</sup>。与抗体类阻断剂相比,小分子多肽类药物则没有抗体的局限性,如减弱Fc-免疫效应功能,同时可以避免与免疫相关的不良反应<sup>[9]</sup>。目前已有许多非抗体类PD-1/PD-L1信号通路抑制剂被报道,如PD-1蛋白表面肽段的突变体和D-型短肽等<sup>[10-11]</sup>,但是需要进一步的临床评估。小分子化合物具有高稳定性、易穿透性、低成本性和方便口服的特性,具有广阔的发展空间,由于PD-1/PD-L1相互作用结构区域具有高度疏水的特性,致使靶向于该位点的小分子化合物阻断剂的发展远远滞后于抗体阻断剂的发展。目前只有百时美施贵宝公司设计开发的一类小分子化合物可以直接作用于PD-1/PD-L1结合位点,如BMS-1、BMS-202等<sup>[12-13]</sup>。总之,这些阻断剂主要通过竞争性阻断PD-1/PD-L1蛋白间的结合,进而解除PD-1/PD-L1介导的免疫抑制信号。

PD-L1蛋白是由290个氨基酸组成的可被糖基化修饰的I型跨膜蛋白,在多种恶性实体瘤中高表达,如非小细胞肺癌、三阴性乳腺癌、头颈癌、黑色素瘤等<sup>[14]</sup>,其蛋白表达水平因肿瘤类型不同而不同。肿瘤细胞逃逸免疫细胞与PD-L1蛋白表达紧密相连<sup>[15-16]</sup>。尽管PD-L1在肿瘤免疫中具有重要作用,但是对如何调控PD-L1蛋白表达,进而促进抗肿瘤免疫活性研究较少,因此,寻找抑制肿瘤细胞PD-L1蛋白表达的小分子化合物具有重要研究意义。本文拟利用荧光素报告基因系统筛选抑制PD-L1启动子活性的化合物,通过RT-PCR、Western blot、细胞共培养体系、ELISA、小鼠成瘤等方法研究其调控PD-L1蛋白表达和抗肿瘤免疫活性的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种、细胞、质粒与实验动物

大肠杆菌(*E. coli*) Top10 购自Invitrogen公司;子宫颈癌细胞HeLa、乳腺癌细胞MDA-MB-231、小鼠黑色素瘤细胞B16 购自北京协和医学院细胞资源中心;PD-L1启动子荧光素报告基因质粒pGL4-hPD-L1本实验室构建<sup>[17]</sup>,pCMV- $\beta$ -Gal购自Thermo Scientific公司。C57BL/6小鼠(许可证11400500028097)购自中国食品药品检定研究院。

#### 1.1.2 主要试剂

DNA marker、PageRuler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder、Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000, Thermo Scientific公

司;细胞完全培养基DMEM、RPMI 1640、胰酶、GIBCO公司;青霉素、链霉素、L-Glutamine、荧光素、ONPG溶液,碧云天生物技术有限公司;胎牛血清,杭州四季青生物工程材料有限公司;小分子化合物库(L1300 Selleck FDA Approved Drug Library), Selleck公司;hPD-L1抗体(EPR19759)、mPD-L1(EPR20529), Abcam公司; $\beta$ -actin、Goat anti-rabbit IgG-HRP、Goat anti-mouse IgG-HRP,天津三箭生物技术有限公司;硫酸长春新碱(HY-N0488),MCE公司;Mouse IL-2 ELISA kit、mouse  $\gamma$ -IFN ELISA kit,科诺迪生物技术有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 PD-L1表达抑制剂筛选

待HeLa细胞于3cm培养皿中生长至70%~80%时,共转染5 $\mu$ g pGL4-hPD-L1和1 $\mu$ g pCMV- $\beta$ -Gal质粒,8h后换成新鲜培养基继续培养12h,然后以15000个/孔的细胞密度铺96孔板,24h后用3% FBS的DMEM培养基稀释小分子化合物(终浓度1 $\mu$ mol/L)和等量DMSO(作为对照)处理HeLa细胞24h。弃培养基,每孔加入100 $\mu$ L细胞裂解液,冰上裂解30min,每10min振荡一次。吸取40 $\mu$ L裂解样品于96孔白板中,加入荧光素酶底物溶液105 $\mu$ L,测定荧光素酶活性值;同时吸取40 $\mu$ L裂解样品于96孔板,加入48 $\mu$ L Buffer Z(使用前每10mL buffer Z缓冲液36 $\mu$ L  $\beta$ -巯基乙醇),再迅速加入16 $\mu$ L 6mg/mL的ONPG溶液,待有一个孔的溶液变黄时,测定420nm波长下的吸光度( $\beta$ -半乳糖苷酶活性值)。

$$\text{荧光素酶活性校正值} = \frac{\text{荧光素酶活性值}}{\beta\text{-半乳糖苷酶活性值}} \quad (1)$$

### 1.2.2 RT-PCR

分别用DMSO和10nmol/L硫酸长春新碱(vincristine sulfate, VCR)预处理MDA-MB-231细胞24h, Trizol试剂提取Total RNA,并进行逆转录及PCR反应,依照说明书的方法进行操作,其中RT反应条件:50 $^{\circ}$ C cDNA合成30min,85 $^{\circ}$ C孵育5min。PCR反应条件:94 $^{\circ}$ C预变性5min;变性30s,55 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸1min,29个循环;72 $^{\circ}$ C延伸5min。PD-L1和 $\beta$ -actin引物序列分别为:PD-L1上游5'-GACCTATATGTGGTAGAGTATGG-3',下游5'-GGCATTGACTTTTCACAG-3'; $\beta$ -actin上游5'-GGCATTGACTTTTCACAG-3',下游5'-GGCATTGACTTTTCACAG-3'。用2 $\mu$ g/mL PHA诱导Jurkat细胞

48 h 后,按照上述方法提取 Total RNA 并 RT-PCR, PD-1 引物序列为: PD-1 上游 5'-CCAGGATGGT TCTTAGACTCC-3', 下游 5'-GGCTGGCCTGGGTGA GGGGCTG-3'.

### 1.2.3 MTT 法检测细胞活力

96 孔板每孔接种 8 000 个细胞,待细胞贴壁后,分别加入不同浓度梯度的 VCR,每个浓度梯度设置 3 个复孔. VCR 分别处理 24、48、72 h 后,每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 20  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 细胞培养箱继续培养 4 h,弃孔板内液体,每孔加入 200  $\mu$ L DMSO,水平振荡器上振荡 10 min,酶标仪测定 490 nm 处吸光度.

### 1.2.4 MTT 法检测 Jurkat 细胞对肿瘤细胞杀伤活性

DMSO 和 10 nmol/L VCR 分别处理 MDA-MB-231 细胞 48 h,再分别接种于 96 孔板,5 000 个/孔,设置 4 个重复.待细胞贴壁后按照 E:T(Jurkat:MDA-MB-231)比为 4:1 和 8:1 的比例加入活化的 Jurkat 细胞<sup>[18]</sup>(2  $\mu$ g/mL PHA 预处理 Jurkat 细胞 48 h)共培养 24 h.每孔加入 20  $\mu$ L MTT 溶液(5 mg/mL),37  $^{\circ}$ C 细胞培养箱继续培养 4 h,不吸出培养基直接每孔加入甲瓚裂解液<sup>[19-20]</sup>100  $\mu$ L,置于 37  $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 8 h,水平振荡器上振荡 10 min,酶标仪测定 570 nm 处吸光度(A).肿瘤杀伤率按照式(2)计算.

$$\text{肿瘤杀伤率} = \left( 1 - \frac{A_{\text{实验}} - A_{\text{单独效应细胞}}}{A_{\text{单独靶细胞}}} \right) \times 100\% \quad (2)$$

### 1.2.5 ELISA 法检测小鼠血清细胞因子含量

用肝素抗凝管收集 C57BL/6 小鼠血液,1 000 r/min 离心 10 min,取上清液.按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作,检测小鼠血清中 IL-2 和  $\gamma$ -IFN 的含量.

### 1.2.6 小鼠成瘤实验

21 只 6~8 周龄的雌性 C57BL/6 小鼠购自中国食品药品检定研究院,取培养至对数生长期的小鼠黑色素瘤细胞 B16 用生理盐水配制成为  $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$  的细胞悬浮液,每只小鼠右前肢腋下接种 100  $\mu$ L 细胞悬浮液.当观察到肿瘤出现后随机分为 3 组,每组 7 只,开始给药.给药浓度分别为 0.5 mg/kg 和 1.5 mg/kg,对照组给予等量生理盐水,每隔 1 d 腹腔注射给药一次,同时用游标卡尺测量肿瘤的长径(mm)和短径(mm),按照式(3)计算肿瘤体积.在第 13 天处死小鼠,眼球取血,用于检测小鼠血液细胞因子分泌情况.同时剥离肿瘤,冻存于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱

中,用于后续免疫印迹实验.

$$\text{肿瘤体积} = \text{长径} \times \text{短径} \times \text{短径} \times 0.5 \quad (3)$$

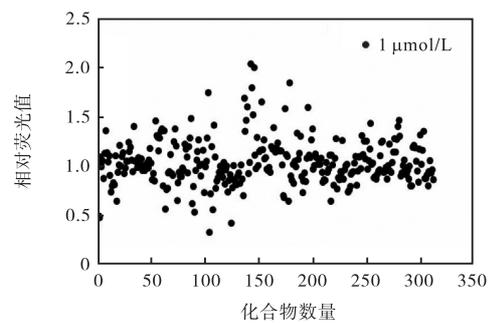
## 1.3 统计学分析

应用 SPSS 软件进行数据的整理分析,采用 *t* 检验进行组间比较,检验结果  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义,\*、\*\*和\*\*\*分别表示与对照组比较  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$  和  $P < 0.001$ .

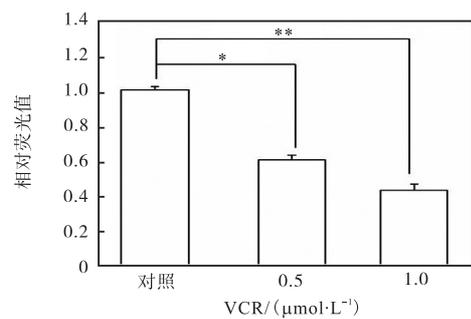
## 2 结果与分析

### 2.1 PD-L1 表达抑制剂筛选

利用实验室保存的 PD-L1 启动子荧光素报告基因质粒 pGL4-hPD-L1 和  $\beta$ -半乳糖苷酶报告基因质粒 pCMV- $\beta$ -Gal 共转染 HeLa 细胞,设置药物筛选浓度为 1  $\mu$ mol/L,筛选抑制 PD-L1 启动子活性的小分子化合物,结果如图 1 所示.



(a) 筛选 311 个小分子化合物抑制 PD-L1 表达结果



(b) 不同浓度 VCR 对 PD-L1 启动子活性的影响

图 1 抑制 PD-L1 启动子活性小分子化合物的筛选

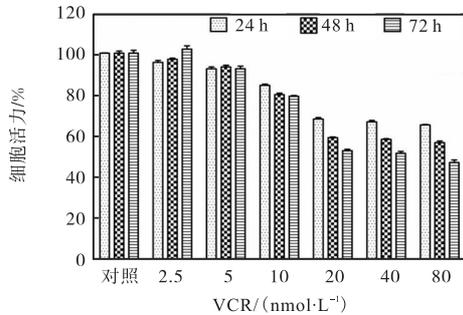
Fig. 1 Screening of 311 small molecule compounds down-regulating the activity of PD-L1 promoter

筛选了化合物库中 311 种小分子化合物(图 1(a)),其中硫酸长春新碱(VCR)具有浓度梯度依赖性抑制 PD-L1 启动子活性效果(图 1(b)),在 VCR 浓度 1  $\mu$ mol/L 时抑制率约为 60%.

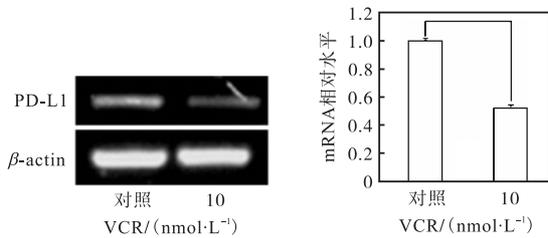
### 2.2 VCR 抑制 MDA-MB-231 细胞 PD-L1 蛋白表达

乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 能够高表达 PD-L1

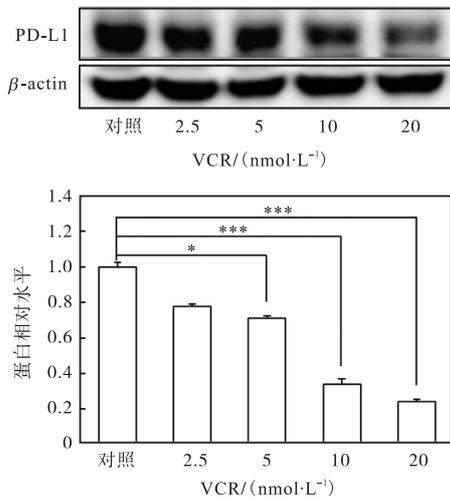
蛋白<sup>[21]</sup>. 首先通过 MTT 法检测 VCR 对 MDA-MB-231 细胞活力的影响,结果如图 2(a)所示. 当药物处理浓度小于 10 nmol/L 时,VCR 对 MDA-MB-231 细胞活力影响较小.



(a) MTT 检测结果



(b) RT-PCR 检测结果



(c) Western blot 检测结果

图 2 VCR 抑制 MDA-MB-231 细胞中 PD-L1 表达

Fig. 2 VCR suppressing PD-L1 expression in MDA-MB-231 cells

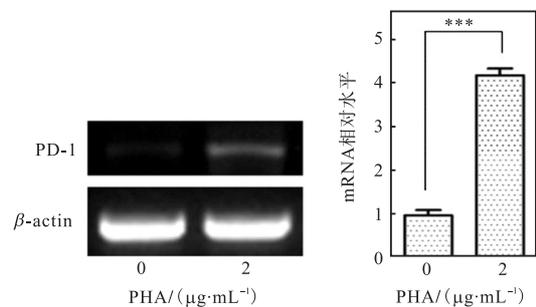
用 10 nmol/L VCR 处理 MDA-MB-231 细胞 24 h 后提取全 RNA, RT-PCR 检测 PD-L1 mRNA 水平变化,结果如图 2(b)所示,VCR 下调 MDA-MB-231 细胞 PD-L1 mRNA 表达水平. 不同浓度的 VCR 处理 MDA-MB-231 细胞 48 h 后收集细胞,制备蛋白样品,免疫印迹实验(Western blot)检测 PD-L1 蛋白水

平变化. 结果(图 2(c))显示,随着 VCR 药物浓度增加,PD-L1 蛋白水平呈浓度依赖性减少. 以上结果表明,VCR 通过下调 MDA-MB-231 细胞 PD-L1 基因的转录活性,进而抑制细胞 PD-L1 蛋白表达.

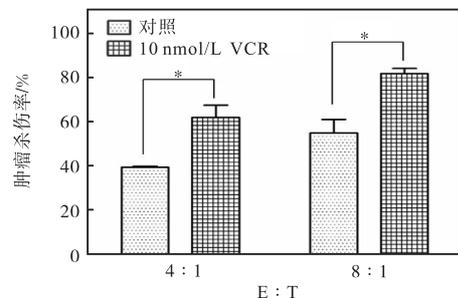
### 2.3 VCR 增强 JurkatT 细胞对 MDA-MB-231 细胞的杀伤能力

植物血凝素 (phytohemagglutination, PHA) 能够诱导人 T 淋巴细胞株 Jurkat 细胞表达 PD-1<sup>[22]</sup>. 用 2 μg/mL PHA 诱导 Jurkat 细胞 48 h 后, RT-PCR 方法检测 Jurkat 细胞 PD-1 表达变化,结果如图 3(a)所示. 与无 PHA 诱导相比, 2 μg/mL PHA 处理促进 Jurkat 细胞 PD-1 mRNA 水平明显升高.

通过 Jurkat 细胞和 MDA-MB-231 细胞共培养, MTT 法检测 VCR 处理 MDA-MB-231 后 Jurkat 细胞对其杀伤能力的影响,结果如图 3(b)所示. 在 E : T 比为 4 : 1 和 8 : 1 时,与 DMSO 对照组相比,用 10 nmol/L VCR 处理组均能够增加 Jurkat 细胞对 MDA-MB-231 细胞的杀伤率. 研究结果显示,当用 VCR 抑制 MDA-MB-231 细胞 PD-L1 蛋白表达后,阻断了由 PD-1/PD-L1 信号介导的免疫抑制,从而增强 Jurkat 细胞对 MDA-MB-231 细胞杀伤作用.



(a) RT-PCR 检测结果



(b) Jurkat 细胞对 MDA-MB-231 细胞的杀伤活性比较

图 3 VCR 增强 Jurkat 细胞对 MDA-MB-231 细胞的杀伤作用

Fig. 3 VCR enhancing the killing activity of Jurkat cells to MDA-MB-231 cells

### 2.4 VCR抑制 B16细胞 PD-L1蛋白表达

由以上结果可知, VCR 通过抑制 *PD-L1* 启动子活性下调 MDA-MB-231 细胞 PD-L1 蛋白表达, 然而 VCR 在体内是否通过抑制 PD-L1 表达而增强机体的抗肿瘤活性有待深入了解. 由于 MDA-MB-231 细胞在免疫系统正常的小鼠体内无法成瘤, 而 B16 细胞 C57BL/6 小鼠成瘤模型在 PD-1/PD-L1 抑制剂检测方面有着广泛的应用<sup>[23-24]</sup>, 因此选择小鼠 B16 细胞研究 VCR 对其在小鼠体内成瘤情况以及调控机体的抗肿瘤活性. 首先, 用不同浓度的 VCR 处理 B16 细胞 48 h 后, 收集蛋白样, Western blot 检测 PD-L1 蛋白表达情况, 结果如图 4 所示. VCR 化合物浓度大于 40 nmol/L 时, VCR 处理 B16 细胞中 PD-L1 蛋白水平明显降低. 以上结果表明, VCR 能够下调 B16 细胞 PD-L1 蛋白表达水平.

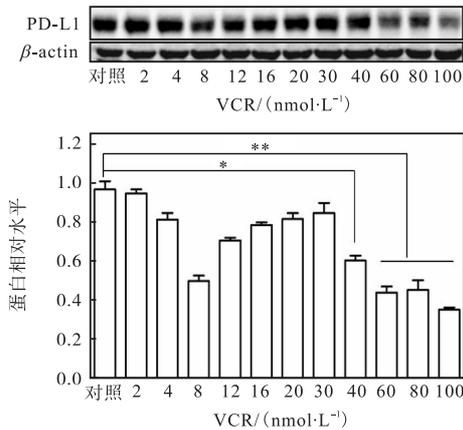
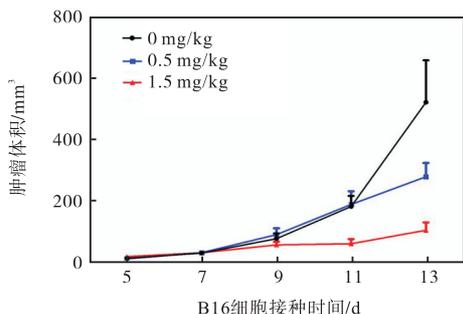


图 4 VCR抑制 B16细胞 PD-L1蛋白表达

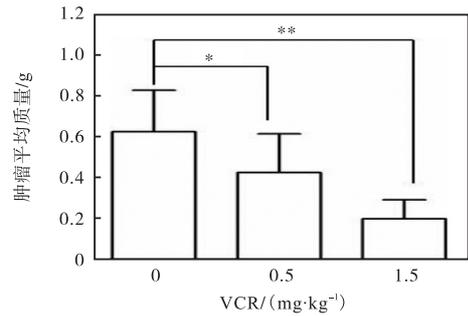
Fig. 4 VCR inhibiting the expression of PD-L1 in B16 cells

### 2.5 VCR抑制 B16在 C57BL/6小鼠体内成瘤

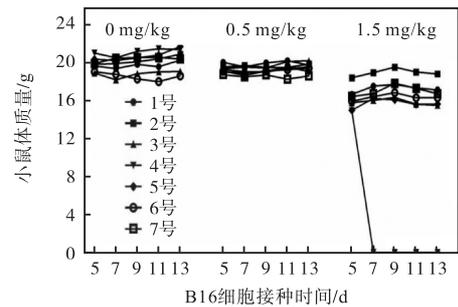
将 B16 细胞接种到 C57BL/6 小鼠皮下成瘤, 在接种第 5 天分别用 0、0.5、1.5 mg/kg VCR 腹腔给药, 每隔 1 d 给药一次, 共给药 4 次; 同时测量肿瘤大小, 第 13 天处死小鼠前最后一次测量肿瘤大小, 结果如图 5 所示.



(a) 肿瘤体积随时间变化趋势



(b) 接种第 13 天时的肿瘤平均质量



(c) C57BL/6 小鼠体质量变化

图 5 VCR抑制 B16细胞在 C57BL/6小鼠体内成瘤

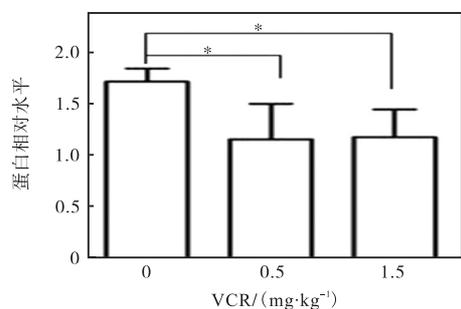
Fig. 5 VCR suppressing tumorigenesis of B16 cells in C57BL/6 mice

与对照组相比, 随着肿瘤生长时间的延长, 0.5 mg/kg 和 1.5 mg/kg VCR 给药组的肿瘤生长受到显著抑制, 其中 1.5 mg/kg 组肿瘤生长抑制更加明显. 第 13 天时 0.5 mg/kg 和 1.5 mg/kg VCR 给药组的肿瘤体积和质量也明显小于对照组. 对照组和 0.5 mg/kg 组小鼠体重无差异, 1.5 mg/kg 组体质量有略微下降, 其中一只死亡. 以上结果表明, VCR 能够抑制 B16 细胞在 C57BL/6 小鼠体内成瘤, 高剂量 VCR 会对小鼠产生毒副作用.

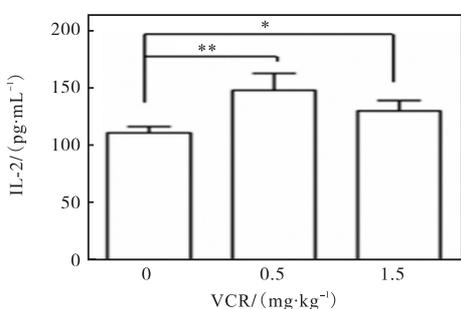
### 2.6 VCR调控 C57BL/6小鼠抗肿瘤免疫活性

每组选取上述 5 个黑色素瘤肿瘤组织通过研磨裂解制备样品, Western blot 检测肿瘤组织中 PD-L1 蛋白水平, 结果如图 6(a) 所示, 与对照组相比, 0.5 mg/kg 和 1.5 mg/kg VCR 给药组肿瘤组织中 PD-L1 蛋白水平呈整体下降趋势. 参与抗肿瘤免疫应答的 T 细胞有很多种, 其中细胞毒性 T 细胞(Tc)和辅助性 T 细胞(Th)在增强抗肿瘤免疫应答过程中发挥着主要作用, 而 Th 细胞可以产生 IL-2、 $\gamma$ -IFN 等细胞因子增强机体免疫活性<sup>[25-26]</sup>. 通过 ELISA 方法检测 C57BL/6 小鼠血清中细胞因子 IL-2 和  $\gamma$ -IFN 含量变化, 结果(图 6(b) 和 6(c))显示, 与对照相比, 0.5 mg/kg 和 1.5 mg/kg 组均能够上调血清中细胞因子 IL-2 和  $\gamma$ -IFN 水平. 以上结果表明, VCR 通过抑

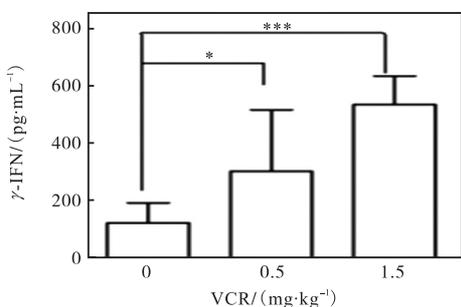
制 B16 细胞中 PD-L1 蛋白表达阻断 PD-1/PD-L1 信号,增加 T 细胞分泌 IL-2 和  $\gamma$ -IFN,从而增加机体免疫系统对肿瘤细胞的杀伤作用。



(a) Western blot 检测肿瘤组织中 PD-L1 蛋白表达



(b) ELISA 方法检测小鼠血清中 IL-2 含量变化



(c) ELISA 方法检测小鼠血清中  $\gamma$ -IFN 含量变化

图 6 VCR 调控 C57BL/6 小鼠抗肿瘤免疫活性

Fig. 6 VCR regulating anti-tumor immunity activity of C57BL/6 mice

### 3 讨论

VCR 是从长春花中提取的一种生物碱,其作用于细胞微管蛋白,抑制微管聚合,从而干扰肿瘤细胞分裂<sup>[27]</sup>。临床上常作为抗肿瘤药物,主要应用于治疗急性淋巴细胞白血病(ALL)、神经母细胞瘤<sup>[28]</sup>等,但由于其对神经系统和注射局部正常组织刺激性大,限制其临床应用<sup>[29]</sup>。目前临床上通常采用联合用药的方法降低 VCR 的剂量,从而降低 VCR 的毒副作用<sup>[30]</sup>,如无毒剂量的维拉帕米与低浓度 VCR 联合使

用可使其抑制胃癌细胞增殖作用增强 2.7~7.5 倍<sup>[31]</sup>,VCR 和甲基泼尼松龙联合对 ALL 效果比单用 VCR 效果显著<sup>[32]</sup>。本文研究显示:10 nmol/L 的 VCR 在体外下调乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 PD-L1 mRNA 水平和蛋白水平;VCR 在体内抑制 B16 细胞成瘤和 PD-L1 蛋白表达,并且上调 C57BL/6 小鼠血清中细胞因子 IL-2 和  $\gamma$ -IFN 的含量。这些研究结果表明,VCR 可以通过抑制肿瘤组织细胞中 PD-L1 蛋白表达调控 PD-1/PD-L1 信号,并解除对肿瘤浸润性 T 细胞的抑制状态,从而增强 T 细胞对肿瘤细胞的免疫杀伤作用。

目前,免疫疗法联合用药越来越受到人们的关注,已有多种联合用药方案应用于临床并取得了令人意外的疗效<sup>[33]</sup>,如 keytruda/pemetrexed/carboplatin 三药联合已经成为转移性非鳞状 NSCLC 的一线治疗药物<sup>[34]</sup>。三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)发病率约占乳腺癌的 15%,是乳腺癌的一种独立临床病理类型,具有预后差、侵袭能力强等特点<sup>[35]</sup>。由于其具有独特的生物学特征,现有的内分泌治疗和分子靶向治疗等治疗方式不能满足 TNBC 患者治疗的临床需求<sup>[36]</sup>。研究发现黑色素瘤相关抗原 3(melanoma associated antigen 3, MAGEA3)在多达 40% 的 TNBC 患者中特异性表达,可以作为肿瘤疫苗靶点用于 TNBC 患者的临床治疗<sup>[37]</sup>。本文发现 VCR 在纳摩尔水平就可以抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 PD-L1 蛋白表达,同时也发现高剂量 VCR 给药会对小鼠有毒副作用。因此,适合剂量 VCR 与 MAGEA3 肿瘤疫苗联合使用,有望改善单药治疗在临床应用上的局限性,使患者获得更大的治疗效果。

### 参考文献:

- [1] Topalian S L, Drake C G, Pardoll D M. Immune checkpoint blockade: A common denominator approach to cancer therapy[J]. *Cancer Cell*, 2015, 27(4): 450-461.
- [2] Dong H D, Chen L P. B7-H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity[J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2003, 81(5): 281-287.
- [3] Topalian S L, Drake C G, Pardoll D M. Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2012, 24(2): 207-212.
- [4] Pardoll D M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2012, 12(4): 252-264.

- [ 5 ] Liang C, Xu L, Song G, et al. Emerging nanomedicine approaches fighting tumor metastasis: Animal models, metastasis-targeted drug delivery, phototherapy, and immunotherapy[J]. *Chemical Society Reviews*, 2016, 45(22): 6250–6269.
- [ 6 ] Naidoo J, Page D B, Li B T, et al. Toxicities of the anti-PD-1 and anti-PD-L1 immune checkpoint antibodies[J]. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 2016, 27(7): 1362.
- [ 7 ] Postow M A. Managing immune checkpoint blocking antibody side effects[J]. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 2015, 35: 76–83.
- [ 8 ] Rizvi N A, Mazières J, Planchard D, et al. Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small cell lung cancer (CheckMate 063): A phase II, single-arm trial[J]. *Oncology*, 2015, 16(3): 257–265.
- [ 9 ] Vlieghe P, Lisowski V, Martinez J, et al. Synthetic therapeutic peptides: Science and market[J]. *Drug Discovery Today*, 2010, 15(1/2): 40–56.
- [ 10 ] Chang H N, Liu B Y, Qi Y K, et al. Blocking of the PD-1/PD-L1 interaction by a D-peptide antagonist for cancer immunotherapy[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, 54(40): 11760–11764.
- [ 11 ] Maute R L, Gordon S R, Mayer A T, et al. Engineering high-affinity PD-1 variants for optimized immunotherapy and immuno-PET imaging[J]. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(47): E6506–E6514.
- [ 12 ] Skalniak L, Zak K M, Guzik K, et al. Small-molecule inhibitors of PD-1/PD-L1 immune checkpoint alleviate the PD-L1-induced exhaustion of T-cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(42): 72167–72181.
- [ 13 ] Chupak Louis S, Ding Min, Martin Scott W, et al. Compounds useful as immunomodulators: US9850225[P]. 2015–04–08.
- [ 14 ] Sun C, Mezzadra R, Schumacher T N. Regulation and function of the PD-L1 checkpoint[J]. *Immunity*, 2018, 48(3): 434–452.
- [ 15 ] Zou W, Wolchok J D, Chen L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations[J]. *Science Translational Medicine*, 2016, 8(328): 328rv4.
- [ 16 ] Dong H, Strome S E, Salomao D R, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion[J]. *Nature Medicine*, 2002, 8(8): 793–800.
- [ 17 ] Jiang B, Shi Z, Wang A, et al. Construction of the PD-L1 promoter-luciferase reporter expressing vector for small molecule inhibitors screening[C]//International Conference on Applied Biotechnology. Lecture Notes in Electrical Engineering. Singapore: Springer, 2016: 705–712.
- [ 18 ] Yang W, Chen P W, Li H, et al. PD-L1: PD-1 Interaction contributes to the functional suppression of T-Cell responses to human uveal melanoma cells in vitro[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2008, 49(6): 2518–2525.
- [ 19 ] 陈珊珊. PD-1 在肿瘤患者 PBMC 中的表达情况及其对 T 淋巴细胞体外杀伤活性的影响[D]. 福州: 福建医科大学, 2015.
- [ 20 ] 安飞云, 廖春华, 边寰峰. 改良 MTT 法检测 HePG-2 细胞增殖的研究[J]. *毒理学杂志*, 2006, 20(3): 186–188.
- [ 21 ] Lim S O, Li C W, Xia W, et al. Deubiquitination and stabilization of PD-L1 by CSN5[J]. *Cancer Cell*, 2016, 30(6): 925–939.
- [ 22 ] 宋莉, 葛彦, 曹莎莎, 等. 人 PD-L1 基因转染细胞株的构建及其对活化的 Jurkat 细胞增殖和凋亡的影响[J]. *江苏大学学报: 医学版*, 2015, 25(2): 123–127.
- [ 23 ] Spranger S, Koblish H K, Horton B, et al. Mechanism of tumor rejection with doublets of CTLA-4, PD-1/PD-L1, or IDO blockade involves restored IL-2 production and proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells directly within the tumor microenvironment[J]. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2014, 2(1): 1–14.
- [ 24 ] Hao L, Amy W, Jennifer M, et al. T cell mediated immunity after combination therapy with intraslesional PV-10 and blockade of the PD-1/PD-L1 pathway in a murine melanoma model[J]. *PLoS One*, 2018, 13(4): 1–15.
- [ 25 ] Knutson K L, Disis M L. Tumor antigen specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy[J]. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 2005, 54(8): 721–728.
- [ 26 ] Schroder K, Hertzog P J, Ravasi T, et al. Interferon-gamma: An overview of signals, mechanisms and functions[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2004, 75(2): 163–189.
- [ 27 ] 尚海, 潘莉, 杨澍, 等. 微管蛋白抑制剂的研究进展[J]. (下转第 50 页)

- crosslinked cyclodextrin/hydroxypropylmethylcellulose hydrogel films for hydrophobic drug delivery[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 93: 75–86.
- [12] Ghorpade V S, Yadav A V, Dias R J. Citric acid crosslinked  $\beta$ -cyclodextrin/carboxymethylcellulose hydrogel films for controlled delivery of poorly soluble drugs[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 164: 339–348.
- [13] 严安, 刘泽华, 双金玲. CMC/阳离子  $\beta$ -环糊精自组装材料的制备研究[J]. 造纸化学品, 2009, 21(5): 7–12.
- [14] 李明时, 张帆.  $\beta$ -环糊精的分光光度测定[J]. 分析化学, 1998, 26(7): 912.
- [15] 马霞, 李路遥, 张缅甸, 等. pH 敏感  $\gamma$ -聚谷氨酸/聚乙烯醇水凝胶的溶胀动力学[J]. 农业工程学报, 2016, 32(S1): 333–338.
- [16] 叶青, 孙晓峰, 景占鑫, 等. pH 敏感型半纤维素水凝胶的制备及释药性能研究[J]. 现代化工, 2012(5): 62–66.
- [17] Kono H, Onishi K, Nakamura T. Characterization and bisphenol A adsorption capacity of  $\beta$ -cyclodextrin-carboxymethylcellulose-based hydrogels[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 98(1): 784–792.
- [18] 回瑞华, 候冬岩. 近代有机仪器分析[M]. 长春: 吉林大学出版社, 1995.
- [19] 邓丰林. 羧甲基纤维素水凝胶纤维的制备及性能研究[D]. 武汉: 武汉纺织大学, 2016.
- [20] Junthip J, Tabary N, Leclercq L, et al. Cationic  $\beta$ -cyclodextrin polymer applied to a dual cyclodextrin polyelectrolyte multilayer system[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 126: 156–167.
- [21] 邵雪, 梁天宇, 丁克毅, 等. pH 敏感型聚乙烯醇/壳聚糖互穿网络水凝胶的溶胀及载药释药性能研究[J]. 西南民族大学学报: 自然科学版, 2015, 41(5): 582–587.
- [22] Rodriguez-Tenreiro C, Alvarez-Lorenzo C, Rodriguez-Perez A, et al. New cyclodextrin hydrogels cross-linked with diglycidylethers with a high drug loading and controlled release ability[J]. Pharmaceutical Research, 2006, 23(1): 121–130.
- [23] Davidson III G W R, Peppas N A. Solute and penetrant diffusion in swellable polymers: V. Relaxation-controlled transport in P(HEMA-co-MMA) copolymers[J]. Journal of Controlled Release, 1986, 3(1/2/3/4): 243–258.
- [24] Costa P, Lobo J M S. Modeling and comparison of dissolution profiles[J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001, 13(2): 123–133.
- [25] 张晓彤, 梁俊虎, 任创, 等. 功能化 SBA-15 在药物阿司匹林缓释的动力学模型[J]. 石油化工高等学校学报, 2012, 25(2): 1–4.

责任编辑: 周建军

(上接第 32 页)

- 药学报, 2010(9): 1078–1088.
- [28] Gidding C E, Kellie S J, Kamps W A, et al. Vincristine revisited[J]. Critical Reviews in Oncology/hematology, 1999, 29(3): 267–287.
- [29] Douer D. Efficacy and safety of vincristine sulfate liposome injection in the treatment of adult acute lymphocytic leukemia[J]. Oncologist, 2016, 21(7): 840–847.
- [30] Chaklader M, Das P, Pereira J A, et al. Telomerase reverse transcriptase (TERT) expression and role of vincristine sulfate in mouse model of malignancy related peritoneal ascites: An experimental metastatic condition[J]. Experimental Oncology, 2011, 33(2): 83–89.
- [31] 李定国, 王秀玲, 葛成华, 等. 抗癌药物与钙拮抗剂合用对体外人胃癌细胞的影响[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 1998(1): 63–66.
- [32] 施红, 严文伟, 韩俊岭, 等. 长春新碱联合甲基泼尼龙体外净化淋巴细胞白血病细胞的实验研究[J]. 中华血液学杂志, 1994(10): 526–529.
- [33] Page D B, Postow M A, Callahan M K, et al. Immune modulation in cancer with antibodies[J]. Annual Review of Medicine, 2014, 65: 185–202.
- [34] Langer C J, Gadgeel S M, Borghaei H, et al. Carboplatin and pemetrexed with or without pembrolizumab for advanced, non-squamous non-small-cell lung cancer: A randomised, phase 2 cohort of the open-label KEYNOTE-021 study[J]. Lancet Oncology, 2016, 17(11): 1497–1508.
- [35] Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, et al. Triple negative breast cancer current status and future directions[J]. Annals of Oncology, 2009, 20(12): 1913–1927.
- [36] 尉承泽, 江泽飞. 乳腺癌治疗基本原则和临床选择[J]. 中国实用外科杂志, 2009, 29(9): 774–776.
- [37] Ayyoub M, Scarlata C M, Ahmed Hamaï, et al. Expression of MAGE-A3/6 in primary breast cancer is associated with hormone receptor negative status, high histologic grade, and poor survival[J]. Journal of Immunotherapy, 2014, 37(2): 73–76.

责任编辑: 郎婧