

PD-L1对TGF- β 1诱导的非小细胞肺癌上皮-间充质转化的调控作用

王芳 胡思琪 杨俊俊* 徐兴祥*

(扬州大学附属苏北人民医院呼吸与危重症医学科, 扬州 225001)

摘要 非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)因其早期远处转移和不良预后而备受关注。研究表明,转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)能诱导肺癌细胞上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)进而增强肿瘤细胞的侵袭和转移能力。同时,程序性死亡配体-1(programmed death ligand-1, PD-L1)在NSCLC细胞的EMT过程中发挥着关键作用。然而,PD-L1和TGF- β 1之间的作用机制尚未完全明确。该研究旨在探讨PD-L1与TGF- β 1之间的调控关系及其在NSCLC进展中的作用。通过Western blot和qRT-PCR检测了A549、H1299、H2170和H1975细胞中PD-L1的表达水平并结合生物信息学分析,进一步探讨了PD-L1、TGF- β 1与EMT标志物波形蛋白(vimentin, Vim)和上皮钙黏蛋白(E-Cadherin)之间的相关性。为了研究PD-L1在TGF- β 1诱导的EMT过程中的作用,通过siRNA敲低和质粒过表达PD-L1,结合创伤愈合实验、细胞侵袭实验和EdU实验,评估了PD-L1对TGF- β 1诱导的NSCLC细胞EMT相关蛋白以及细胞侵袭、迁移和增殖能力的影响。实验结果显示,经TGF- β 1诱导后Vim蛋白的表达水平上升,E-Cadherin表达水平下降,同时PD-L1的表达水平也上升。生物信息学分析显示TGF- β 1基因与PD-L1和Vim呈正相关,与E-Cadherin呈负相关。抑制PD-L1表达后,TGF- β 1分泌水平减少和Vim蛋白表达水平下降,而E-Cadherin的表达水平升高,并且能抑制TGF- β 1诱导的EMT。相反,过表达PD-L1后TGF- β 1分泌水平上升,E-Cadherin蛋白表达水平下降、Vim表达水平上升,从而促进TGF- β 1诱导的EMT。上述结果表明,TGF- β 1能诱导NSCLC细胞EMT并促进PD-L1的表达,而PD-L1能诱导TGF- β 1的分泌与表达,同时PD-L1也可促进TGF- β 1诱导的EMT,并增强细胞迁移和侵袭能力。

关键词 PD-L1; 非小细胞肺癌细胞; 上皮-间质转化; TGF- β 1

PD-L1 Influences Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by TGF- β 1 in Non-Small Cell Lung Cancer Cells

WANG Fang, HU Siqu, YANG Junjun*, XU Xingxiang*

(Department of Respiration and Critical Care Medicine, Northern Jiangsu People's Hospital Affiliated to Yangzhou University, Yangzhou 225001, China)

Abstract NSCLC (non-small cell lung cancer) has gained significant attention due to its early distant metastasis and poor prognosis. Studies have shown that TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1) can induce EMT (epithelial-mesenchymal transition) in lung cancer cells, thereby enhancing the invasiveness and metastatic po-

收稿日期: 2025-02-26 接受日期: 2025-04-30

国家自然科学基金(批准号: 81800049)和苏北医院科研基金(批准号: SBLC22002)资助的课题

*通信作者。Tel: 18051060044, E-mail: xiaojun_87624@126.com; Tel: 18051062315, E-mail: xuxx63@sina.com

Received: February 26, 2025 Accepted: April 30, 2025

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81800049) and the Research Fund of North Jiangsu People's Hospital (Grant No.SBLC22002)

*Corresponding authors. Tel: +86-18051060044, E-mail: xiaojun_87624@126.com; Tel: +86-18051062315, E-mail: xuxx63@sina.com

tential of tumor cells. Meanwhile, PD-L1 (programmed death ligand-1) plays a critical role in the EMT process in NSCLC cells. However, the mechanism of interaction between PD-L1 and TGF- β 1 remains unclear. This study aims to explore the regulatory relationship between PD-L1 and TGF- β 1 and their role in NSCLC progression. The expression levels of PD-L1 in A549, H1299, H2170, and H1975 cells were examined by Western blot and qRT-PCR, combined with bioinformatics analysis to further investigate the correlation among PD-L1, TGF- β 1, and EMT markers, including Vim (vimentin) and E-Cadherin. To explore the role of PD-L1 in TGF- β 1-induced EMT (epithelial-mesenchymal transition), PD-L1 was knocked down using siRNA and overexpressed via plasmid transfection. Subsequently, wound healing assays, cell invasion assays, and EdU assays were performed to evaluate the impact of PD-L1 on TGF- β 1-induced changes in EMT-related proteins, as well as the migratory, invasive, and proliferative capacities of NSCLC cells. The results showed that TGF- β 1 induction led to an increase in Vim protein expression, a decrease in E-Cadherin expression, and an upregulation of PD-L1 expression. Bioinformatics analysis revealed that *TGF- β 1* gene expression was positively correlated with PD-L1 and Vim and negatively correlated with E-Cadherin. After inhibiting PD-L1 expression, TGF- β 1 secretion decreased, Vim expression decreased, and E-Cadherin expression increased, which weakened TGF- β 1-induced EMT. In contrast, overexpression of PD-L1 led to increased TGF- β 1 secretion, a decrease in E-Cadherin protein expression, an increase in Vim expression, and promotion of TGF- β 1-induced EMT. These findings suggest that TGF- β 1 can induce EMT in NSCLC cells and promote PD-L1 expression, while PD-L1 can induce TGF- β 1 secretion and expression. Furthermore, PD-L1 can promote TGF- β 1-induced EMT, enhancing cell migration and invasion capabilities.

Keywords PD-L1; non-small cell lung cancer cells; epithelial-mesenchymal transition; TGF- β 1

肺癌是全球最常见的胸部恶性肿瘤, 导致了最高的发病率和死亡率。在其亚型中, 非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是最为常见的, 具有较高的发病率和死亡率^[1]。尽管手术切除是治疗NSCLC的有效方法, 但癌症的复发和远处转移仍然是其治疗中的主要挑战。上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是一个生物学过程, 在该过程中, 上皮细胞失去其上皮特性并获得间质表型, 细胞间黏附力下降, 迁移运动特性增强。这个过程涉及多种癌症, 包括肺癌等的侵袭和转移^[2]。EMT在免疫抑制、组织纤维化、癌症发生、转移和耐药性等方面也发挥着重要作用^[3]。

作为一种免疫检查点抑制剂, 程序性死亡配体-1(programmed death ligand-1, PD-L1)已成为多种癌症治疗的靶点。它通过重新激活被抑制的T淋巴细胞, 使其能够识别并攻击肿瘤细胞, 从而增强抗肿瘤免疫反应。研究发现, EMT过程在肿瘤细胞中被激活, 会促使肿瘤细胞上调PD-L1的表达, 而PD-L1表达量的增加有助于肿瘤逃避免疫系统的监视和攻击, 从而加速癌症的发展和转移^[4-5]。转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)是一种多功能细胞因子, 包含TGF- β 1、TGF- β 2和TGF- β 3三个亚

型, 分别由不同的基因编码, 并广泛表达于各种组织中。异常的TGF- β 激活可以通过刺激EMT、血管生成, 以及癌症相关成纤维细胞激活和肿瘤微环境内的免疫抑制来促进疾病进展^[6-8]。TGF- β 1作为TGF- β 家族成员之一, 在肿瘤微环境中的表达水平升高与临床预后差有关, 并且能通过诱导相关转录因子的表达, 如ZEB1/2和snail等, 促进EMT, 从而促进肿瘤的侵袭和转移^[9]。目前在多种肿瘤细胞中发现, TGF- β 1不仅能促进细胞EMT还能导致细胞内PD-L1的表达量增加, 抑制T细胞活性, 促进肿瘤免疫逃逸^[9-10]。然而, 具体参与这一过程的分子机制尚不清楚。

在本研究中, 我们通过TGF- β 1处理肺癌细胞构建EMT模型, Western blot和qRT-PCR观察TGF- β 1处理后EMT相关分子和PD-L1表达水平的改变, 过表达和敲低PD-L1表达后, 再次检测TGF- β 1对EMT以及细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。探讨PD-L1与TGF- β 1诱导EMT的关系, 为进一步阐明PD-L1在肺癌发生发展中的分子机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂

NSCLC细胞系H1299、H1975、A549和H2170

以及培养基(RPMI 1640、F12K)和胎牛血清均购自武汉普诺赛生命科技有限公司。实验所需的青霉素/链霉素双抗溶液、细胞裂解液、蛋白酶抑制剂以及TGF- β 1均购自MCE公司。RNA提取、反转录及荧光半定量PCR相关试剂(包括FreeZol Reagent RNA提取试剂盒、cDNA反转录试剂盒和荧光染料PCR试剂盒)均购自南京诺唯赞生物科技有限公司。EdU试剂盒购自武汉亚科因生物有限公司。ELISA试剂盒、HRP标记的山羊抗小鼠抗体及山羊抗兔抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。PCR实验所用引物[PD-L1、波形蛋白(vimentin, Vim)、E-Cadherin、GAPDH]由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。24孔板爬片购自Biosharp生物有限公司。0.45 μ m PVDF膜购自美国Millipore公司。基因调控实验所需的PD-L1小干扰RNA和PD-L1过表达质粒均购自苏州吉玛生物有限公司。蛋白免疫印迹(Western blot, WB)检测所用的PD-L1、Vim、E-Cadherin和GAPDH兔抗鼠多克隆抗体则购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.2 细胞培养和实验分组

H1975、H2170和H1299细胞在含10%胎牛血清及1%青霉素/链霉素双抗的RPMI 1640培养基中培养,而A549细胞则使用F12K培养基。所有细胞均置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的培养箱中。第一部分, TGF- β 1处理实验, 将A549和H1975细胞分为两组。实验组: 用10 ng/mL TGF- β 1处理48 h。对照组: 未进行TGF- β 1处理。处理结束后, 检测EMT相关标志物及PD-L1的表达情况。第二部分, PD-L1调控效率检测: A549细胞转染PD-L1过表达质粒, 分为两组, 即空白质粒组(Vector)和PD-L1过表达质粒组; H1975细胞转染PD-L1 siRNA, 分为五组, 即NC-siRNA、PD-L1 siRNA-1组、PD-L1 siRNA-2组、PD-L1 siRNA-3组、PD-L1 siRNA-4组。第三部分, PD-L1与TGF- β 1两种因素影响。(1) siRNA实验组, NC-siRNA、NC-siRNA+TGF- β 1、PD-L1 siRNA、PD-L1 siRNA+TGF- β 1; (2) 质粒实验组, Empty Vector、Empty Vector+TGF- β 1、PD-L1 Vector、PD-L1 Vector+TGF- β 1。

1.3 方法

1.3.1 形态学观察 将A549和H1975细胞以 1×10^5 /孔的密度接种于24孔板中, 置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中过夜, 以确保细胞充分贴壁。向细胞培养孔中加入10

ng/mL TGF- β 1(对照组0 ng/mL TGF- β 1), 处理48 h后, 在倒置显微镜下观察细胞的形态变化。

1.3.2 生物信息学分析 我们使用GEPIA数据库分析了PD-L1基因与TGF- β 1在肺腺癌(lung adenocarcinoma, LUAD)、肺鳞癌(lung squamous cell carcinoma, LUSC)以及正常肺组织中的关系。

1.3.3 RNA-Seq测序 RNA高通量测序服务由上海云序生物科技有限公司提供。根据供应商说明, 使用GenSeq[®] rRNA Removal Kit(GenSeq, Inc.)试剂盒去除样品中的核糖体RNA(rRNA)。去除rRNA后的样品, 通过GenSeq[®] Low Input RNA Library Prep Kit(GenSeq, Inc.)试剂盒, 按照厂商提供的说明书流程构建测序文库。通过BioAnalyzer 2100 system(Agilent Technologies, 美国)对构建好的测序文库进行质控和定量, 然后采用Illumina NovaSeq 6000仪器进行150 bp双端测序。在上海云序生物科技有限公司进行mRNA-Seq高通量测序和随后的生物信息学分析。经过Illumina NovaSeq 6000测序仪测序, 获得原始数据。首先使用Q30值进行原始数据质控。使用cutadapt^[11]软件(v1.9.3)去接头, 弃低质量短DNA/RNA片段序列, 获得高质量测序短读序列。使用hisat2^[12]软件将高质量测序短读序列比对到参考基因组, 然后, 使用HTSeq^[13]软件(v0.9.1)获得原始count数, 使用edgeR^[14]进行标准化并计算两组样品间的倍数变化和P-value, 筛选差异表达基因。利用差异表达mRNA进行GO(Gene Ontology)功能分析和KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)通路分析。

1.3.4 细胞转染 细胞准备: 将细胞以 4×10^5 /孔的密度接种于6孔板中, 置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养过夜, 直到细胞达到60%~80%汇合度。转染复合物制备如下。质粒转染: 在无菌EP管中加入200 μ L Opti-MEM; 加入2 μ g质粒, 轻轻混匀; 加入4 μ L HighGene转染试剂, 轻轻吹吸混匀, 室温静置15 min, 形成DNA-转染试剂复合物。siRNA转染: 在无菌EP管中加入200 μ L Opti-MEM或无血清培养基; 加入适量100 pmol siRNA, 轻轻混匀; 加入5 μ L HighGene转染试剂, 轻轻吹吸混匀, 室温静置15 min, 形成siRNA-转染试剂复合物。转染: 将复合物逐滴均匀加入细胞培养孔中, 轻轻晃动培养板, 使混合均匀。将培养板置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中继续培养。换液与培养: 转染6 h后, 更换为完全培养基继续培养

表1 qRT-PCR引物序列
Table 1 qRT PCR primer sequence

基因 Genes	上游引物(5'→3') Forward primer (5'→3')	下游引物(5'→3') Reverse primer (5'→3')
<i>PD-L1</i>	TGG CAT TTG CTG AAC GCA TTT	TGC AGC CAG GTC TAA TTG TTT T
<i>Vimentin</i>	AGT CCA CTG AGT ACC GGA GAC	CAT TTC ACG CAT CTG GCG TTC
<i>E-Cadherin</i>	CGA GAG CTA CAC GTT CAC GG	GGG TGT CGA GGG AAA AAT AGG
<i>GAPDH</i>	CTC ACC GGA TGC ACC AAT GTT	CGC GTT GCT CAC AAT GTT CAT

48 h, 进行后续检测。PD-L1过表达质粒和小干扰RNA(siRNA)。PD-L1 siRNA的序列如下。siRNA1: 5'-CAU UUG CUG AAC GCA UUU ATT-3', siRNA2: 5'-UGC ACU AAU UGU CUA UUG GTT-3', siRNA3: 5'-AUC CAG UCA CCU CUG AAC ATT-3', siRNA4: 5'-CAC AUC CUC CAA AUG AAA GTT-3'。

1.3.5 qRT-PCR检测基因的表达 培养细胞中的总RNA提取使用FreeZol Reagent试剂盒, 通过分光光度计(Nano Drop 2000)测定RNA浓度和纯度, 提取的RNA使用诺唯赞反转录试剂盒进行反转录, 实验步骤严格遵循试剂盒说明书。反应体系依据诺唯赞荧光定量PCR试剂盒说明书配制, 并在StepOnePlus实时PCR系统中运行。反应条件: 95 °C预变性30 s; 扩增阶段为95 °C变性10 s, 60 °C延伸30 s, 共40个循环; 熔解曲线为95 °C变性15 s, 60 °C复性60 s, 95 °C监测荧光值15 s进行PCR反应。以*GAPDH*用作内部参照, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法测定mRNA表达水平, 使用的所有引物序列见表1。

1.3.6 Western blot检测相关蛋白水平 使用PBS清洗细胞后, 加入蛋白裂解液提取总蛋白, 采用BCA法测定蛋白浓度, 将提取的蛋白裂解液与上样缓冲液按照4:1比例混合后煮沸10 min变性。取50 μ g总蛋白加入到SDS-PAGE胶中, 120 V跑胶90 min电泳分离蛋白。采用湿转法400 mA电转1 h将蛋白转移至PVDF膜。室温下用5%脱脂奶粉封闭1 h, 将膜与一抗(1:2 000)在4 °C孵育过夜。次日取出膜, 将膜放置于摇床孵育盒中, 加入TBST洗膜15 min, 3次后, 在室温下孵育对应种属的HRP二抗(1:10 000) 1 h, 取出膜, 再次用TBST洗膜15 min, 3次后, 将膜取出放置于有ECL发光液的盒子中15 s, 取出放于暗室通过ChemiDoc化学发光系统检测靶蛋白。ImageJ软件对蛋白条带的灰度值进行分析。

1.3.7 EdU检测 EdU法检测和定量细胞增殖。将处理过的细胞(每孔 2×10^4 个)接种于96孔板中, 用

EdU标记, 并使用细胞增殖EdU成像试剂盒染色。用赫斯特染料染色细胞核, 标记出孔内的所有细胞。使用荧光显微镜收集图像。

1.3.8 ELISA实验 按照制造商的说明书, 使用ELISA试剂盒检测细胞上清液中TGF- β 1的水平。

1.3.9 伤口愈合实验 将生长状态良好的A549和H1975细胞接种于6孔板, 培养至汇合度>90%, 37 °C细胞培养箱中培养24 h至细胞贴壁。使用200 μ L无菌黄色吸头在孔中央划痕, 确保每个孔划痕宽度一致。弃去培养基, 每孔加入1 mL PBS清洗, 去除悬浮细胞。按照1.2第三部分分组处理细胞, 37 °C细胞培养箱中继续培养48 h。在显微镜下观察划痕愈合情况, 采集图像。使用ImageJ软件测量划痕愈合面积, 计算愈合面积百分。

1.3.10 Transwell实验 取 2×10^5 个细胞种植于24孔板中, 下腔含有600 μ L完整培养基。48 h后, 用棉签取出顶层房间的细胞。将迁移或侵袭的细胞在室温下用4%多聚甲醛固定30 min, 结晶紫染色, 在显微镜下计数。

1.4 统计学分析

所有数据均使用SPSS 23.0软件进行统计分析。实验结果以均数 \pm 标准差表示, 每个独立实验至少重复3次。组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), *P*值小于0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 在NSCLC细胞中的PD-L1表达及A549细胞的RNA测序分析

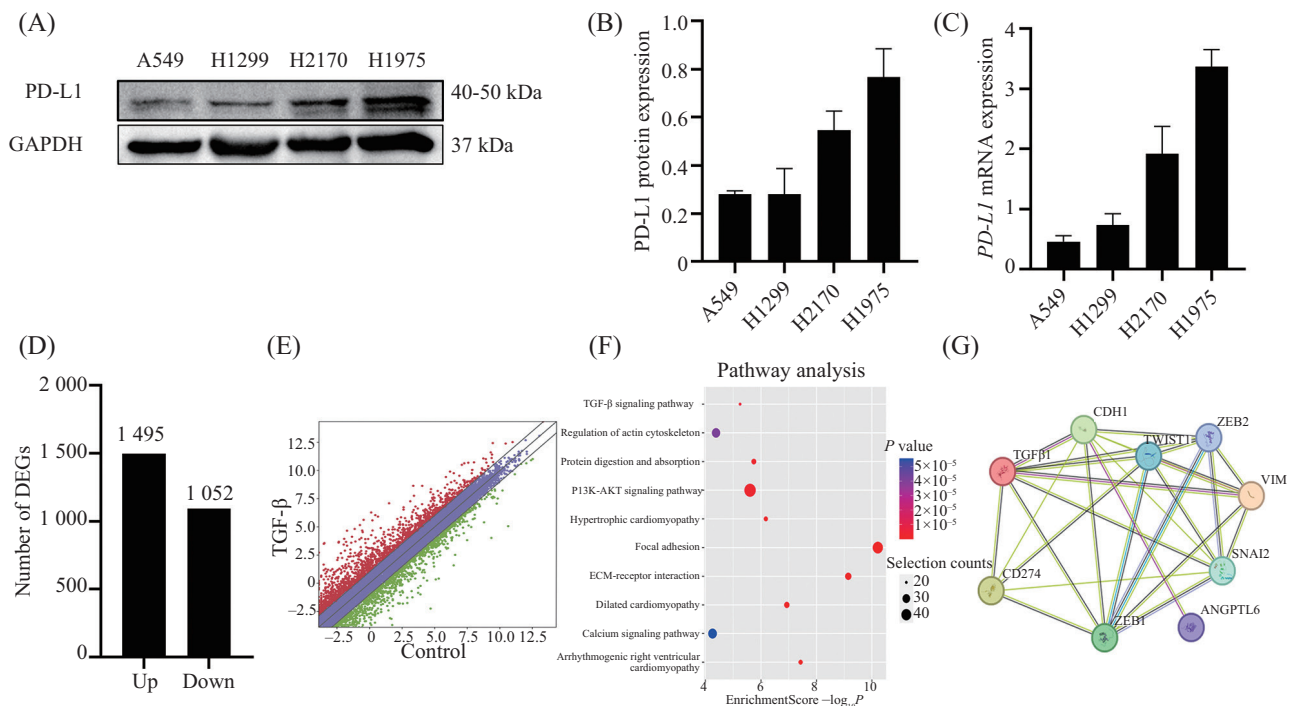
我们分析了非小细胞肺癌细胞系(A549、H1975、H1299、H2170)中PD-L1的mRNA和蛋白表达水平, Western blot和qRT-PCR结果显示NSCLC细胞系中H1975细胞PD-L1的表达水平较高, 而A549细胞PD-L1表达水平较低(图1A~图1C)。因此后续, 选用A549细胞转染PD-L1过表达质粒, H1975细胞转染PD-L1小干

扰RNA沉默*PD-L1*表达。随后,我们对A549细胞在有或无TGF- β 1刺激后的基因表达变化进行了RNA测序分析。RNA测序结果显示,共有1 495个基因被上调,1 052个基因被下调(图1D)。A549细胞的mRNA表达在有或无TGF- β 1刺激的情况下通过MiSeq测量。使用CummeRbund绘制了基因表达的散点图。散点图展示了在TGF- β 1刺激前后基因表达水平的变化,帮助我们可视化不同基因的表达差异,并且可以直观地看到刺激对细胞基因表达的影响(图1E)。对有无TGF- β 1刺激的表达差异基因进行KEGG基因富集分析,结果显示差异表达基因在PI3K-AKT信号通路、TGF-BETA信号通路等通路上富集(图1F)。使用STRING程序分析TGF- β 1、PD-L1(也称为CD274)与EMT相关蛋白之间相互作用关系(图1G),发现PD-L1(CD274)可能通过TGF- β 1调节EMT相关蛋白的表

达,说明PD-L1能调控TGF- β 1诱导的EMT。

2.2 TGF- β 1处理A549和H1975细胞对EMT标志物和PD-L1的表达的影响

A549和H1975细胞呈典型的上皮细胞形态,细胞单层排列,呈多角形,经10 ng/mL TGF- β 1处理48 h后,转变成为典型的梭形、拉长的形态,这是EMT的典型特征(图A)。我们通过GEPIA数据库,收集了来自TCGA和GTEx的979例肺癌组织和685例正常肺组织,分析了TGF- β 1基因与*Vim*、*E-Cadherin*以及*PD-L1*基因表达的相关性。结果显示,TGF- β 1与*Vim*和*PD-L1*基因的表达呈显著的正相关,具有统计学差异(相关系数 $R>1$, $P<0.05$),而TGF- β 1与*E-Cadherin*(也称为CDH1)的表达呈显著负相关,具有统计学差异($R=-0.27$, $P<0.05$)(图2B)。Western blot和qRT-PCR结果显示,与无TGF- β 1处理进行对



A: A549、H1299、H2170、H1975细胞中PD-L1蛋白表达水平; B: 肺癌细胞中PD-L1蛋白灰度值分析; C: A549、H1299、H2170、H1975细胞中*PD-L1* mRNA表达水平; D: 条形图展示了control组与TGF- β 1组之间的差异表达基因数量,其中上调的DEGs与下调的DEGs分别显示在图中; E: RNA-Seq基因表达分析的散点图,展示了有无TGF- β 1刺激基因表达水平的变化; F: 对有无TGF- β 1刺激的差异表达基因的KEGG通路分析; G: 使用STRING程序分析TGF- β 1、PD-L1(CD274)与EMT相关蛋白之间相互作用关系。

A: protein expression levels in non-small cell lung cancer A549, H1299, H2170, H1995 cells; B: protein grayscale value analysis; C: *PD-L1* mRNA levels in non-small cell lung cancer A549, H1299, H2170, H1995 cells; D: this bar graph shows the number of DEGs (differentially expressed genes) between the control group and the TGF- β 1 group, with upregulated and downregulated DEGs displayed separately in the graph; E: scatter plot of RNA-Seq gene expression analysis, showing changes in gene expression levels with or without TGF- β 1 stimulation; F: KEGG pathway analysis of differentially expressed genes with or without TGF- β 1 stimulation; G: the interaction between TGF- β 1, PD-L1 (CD274) and EMT-related proteins was analyzed using STRING program.

图1 NSCLC细胞中的PD-L1的表达及A549细胞有无TGF- β 1刺激的RNA测序分析

Fig.1 PD-L1 expression in NSCLC cells and RNA sequencing analysis of A549 cells with or without TGF- β 1 stimulation

比, 10 ng/mL TGF-β1处理后, 细胞中E-Cadherin表达水平下降, 而Vim和PD-L1的表达水平上升(图2C和图2D)。

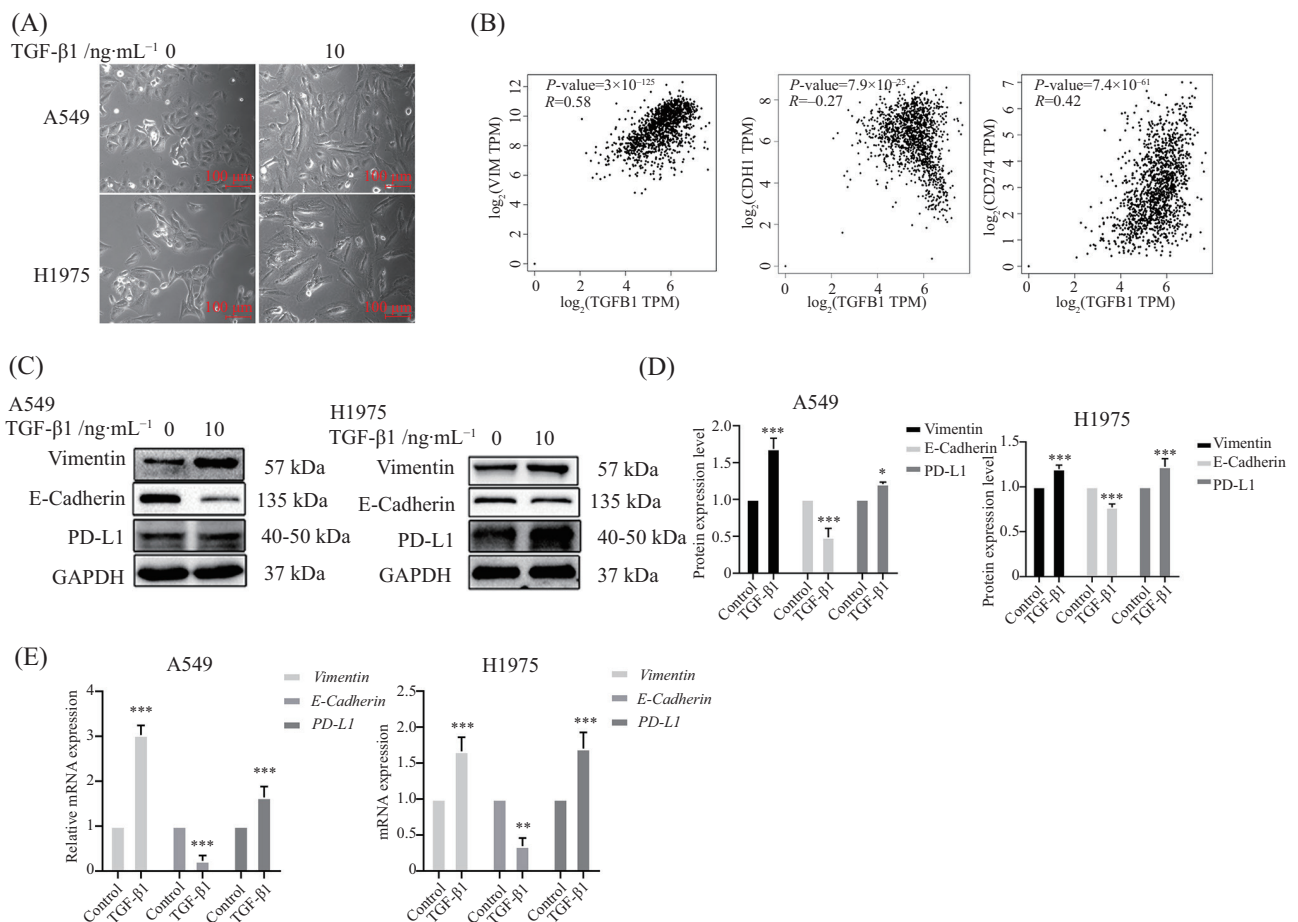
2.3 PD-L1过表达质粒转染A549细胞和PD-L1 siRNA转染H1975细胞转染效率验证

用PD-L1过表达质粒对A549细胞进行PD-L1表达能力的增强, 并通过Western blot和qRT-PCR验证其过表达效率。与转染空载体的细胞相比, 转染PD-L1过表达质粒的细胞中PD-L1的蛋白和RNA水平显著增加(图3A~图3C), 差异具有统计学意义($P < 0.001$)。用PD-L1 siRNA对H1975细胞进行PD-L1表达的沉默。通过qRT-PCR和Western blot

验证转染siRNA的抑制效率, 四种针对PD-L1的siRNA与阴性对照组(siRNA-NC)比较, 其中siPD-L1-1的PD-L1表达抑制效率最高(图3D~图3F)。因此, 我们选择siPD-L1-1进行后续实验。

2.4 过表达或沉默PD-L1对A549和H1975细胞中TGF-β1分泌以及对TGF-β1诱导的EMT相关蛋白的影响

生物信息学分析显示在肺癌组织和正常肺组织中PD-L1基因与Vim呈正相关, 而与E-Cadherin基因表达呈负相关(图4A)。这些发现表明PD-L1与EMT标志物之间存在关联。前面部分已证实TGF-β1能诱导H1975和A549细胞EMT, 因此, 我们

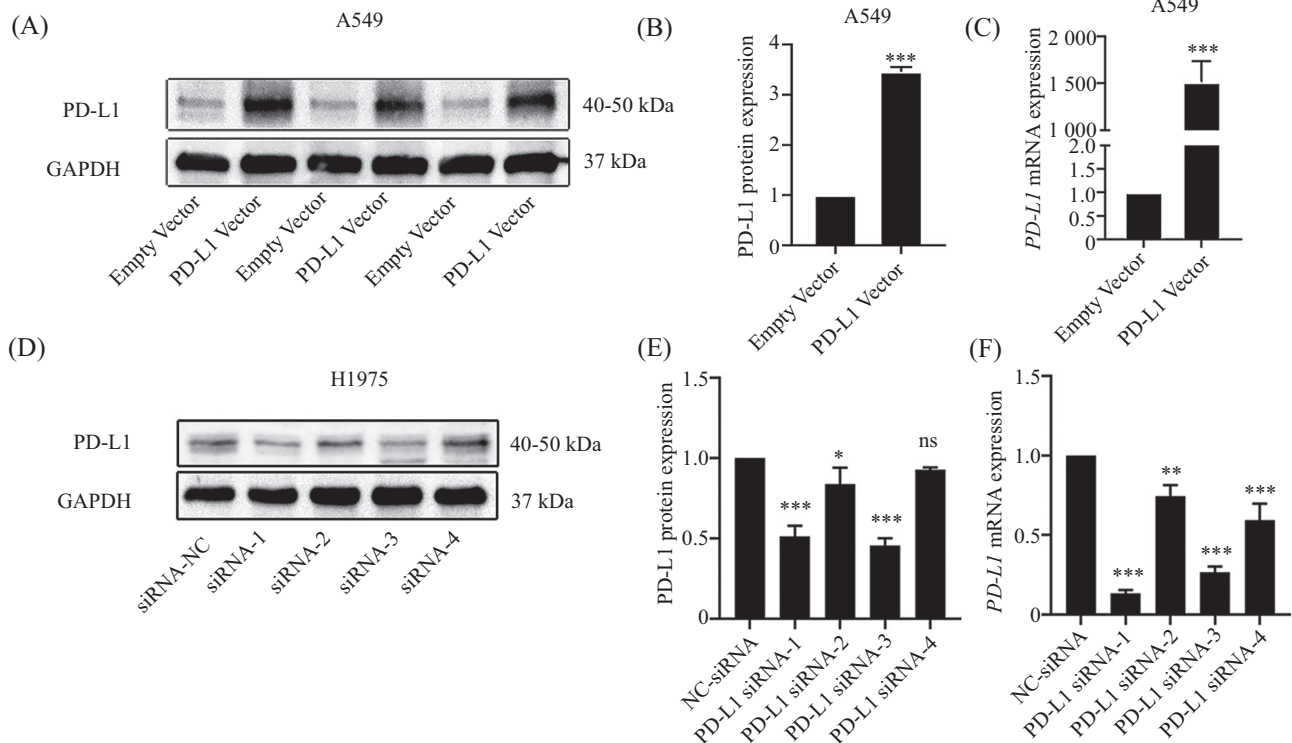


A: 10 ng/mL TGF-β1对A549和H1975细胞形态的影响; B: 生物信息学分析显示TGF-β1与PD-L1和EMT标志基因(E-Cadherin和Vim)表达之间的相关性; C: Western blot检测A549和H1975细胞中PD-L1和EMT相关蛋白(E-Cadherin和Vim)的变化情况; D: 蛋白灰度值分析; E: qRT-PCR检测A549和H1975细胞中PD-L1和EMT相关基因(E-Cadherin和Vim)的变化情况; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组比较。

A: the effects of 10 ng/mL TGF-β1 on the morphology of A549 and H1975 cells; B: bioinformatic analysis identified a correlation between TGF-β1 and PD-L1 expression, as well as other EMT-related genes (E-Cadherin and Vim) expression; C: Western blot demonstrated changes in PD-L1 and EMT-related proteins (E-Cadherin and Vim) in A549 and H1975 cells treated with 10 ng/mL TGF-β1 for 48 h; D: gray-value of protein level; E: qRT-PCR analyses demonstrated changes in PD-L1 and EMT-related genes (E-Cadherin and Vim) in A549 and H1975 cells treated with 10 ng/mL TGF-β1 for 48 h; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with control group.

图2 TGF-β1处理对A549和H1975细胞EMT标志物和PD-L1表达的影响

Fig.2 Effects of TGF-β1 treatment on expression of EMT markers and PD-L1 in A549 and H1975 cells



A: Western blot检测A549细胞转染PD-L1过表达质粒和空载质粒后PD-L1蛋白的表达情况; B: 蛋白灰度值分析转染质粒后PD-L1蛋白表达变化; $***P<0.001$, 与Empty Vector组比较; C: qRT-PCR检测A549细胞转染PD-L1过表达质粒和空载质粒后PD-L1 mRNA的表达情况; $***P<0.001$, 与Empty Vector组比较; D: Western blot检测H1975细胞转染siRNA后PD-L1蛋白的表达情况; E: 蛋白灰度值分析H1975转染siRNA后PD-L1蛋白表达变化; F: qRT-PCR检测H1975细胞转染PD-L1 siRNA后PD-L1 mRNA的表达情况; ns: 无显著差异; $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, 与NC-siRNA组比较。

A: Western blot analysis of PD-L1 protein expression in A549 cells transfected with PD-L1 overexpression plasmid and empty plasmid; B: protein grayscale analysis of PD-L1 protein expression changes after plasmid transfection; $***P<0.001$ compared with Empty Vector group; C: qRT-PCR analysis of PD-L1 mRNA expression in A549 cells transfected with PD-L1 overexpression plasmid and empty plasmid; $***P<0.001$ compared with Empty Vector group; D: Western blot analysis of PD-L1 protein expression in H1975 cells transfected with siRNA; E: protein grayscale analysis of PD-L1 protein expression changes in H1975 cells transfected with siRNA; F: qRT-PCR analysis of PD-L1 mRNA expression in H1975 cells transfected with PD-L1 siRNA; ns: no significant difference; $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ compared with NC-siRNA group.

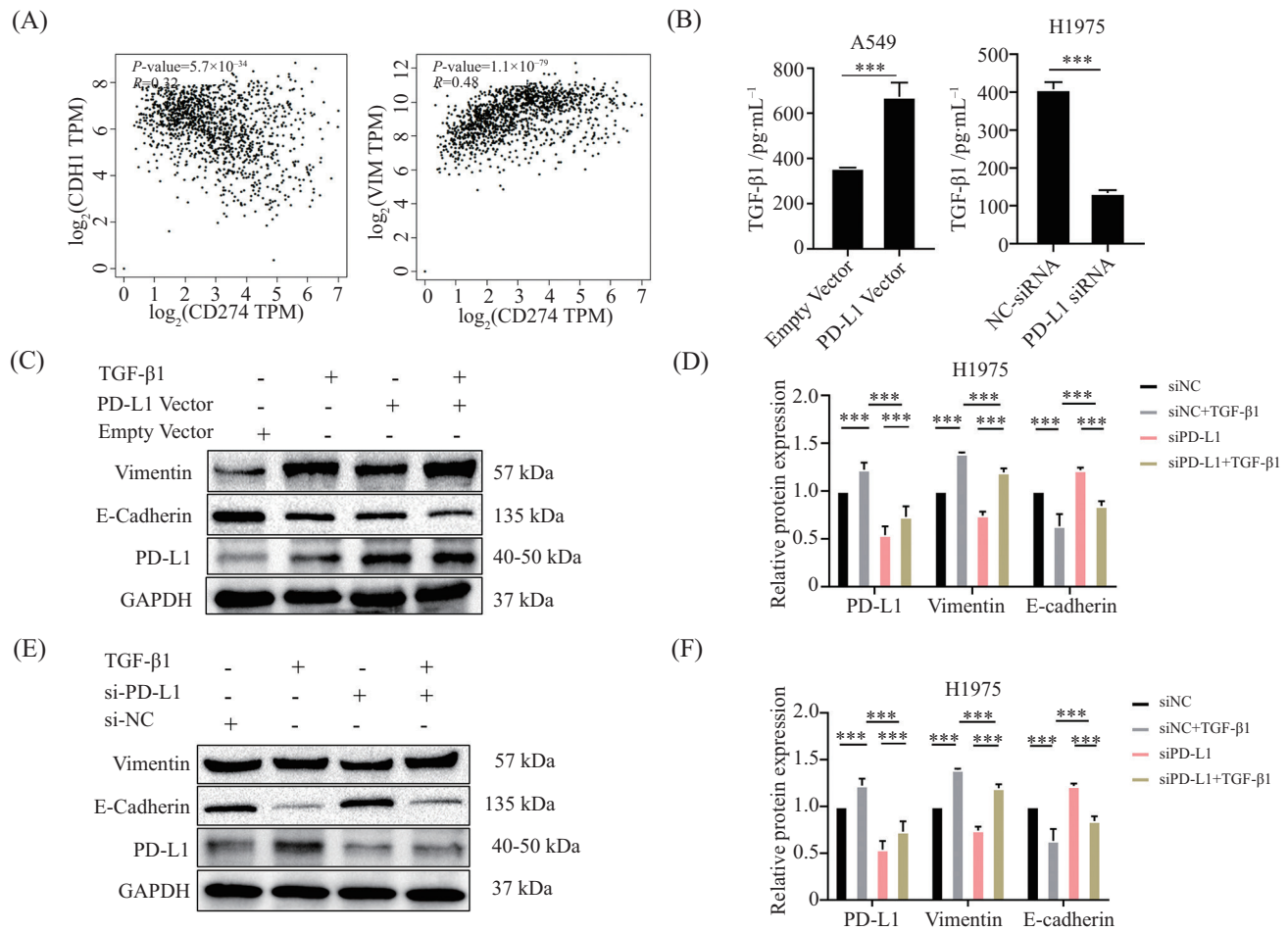
图3 PD-L1过表达质粒转染A549细胞和PD-L1 siRNA转染H1975细胞转染效率验证

Fig.3 Validation of transfection efficiency of PD-L1 overexpression plasmid in A549 cells and PD-L1 siRNA in H1975 cells

进一步研究了PD-L1在此过程中的作用。我们在A549细胞中转染了PD-L1过表达质粒,并在H1975细胞中转染了siRNA敲低PD-L1表达。ELISA结果显示,在PD-L1过表达的A549细胞中,TGF- β 1的分泌增加,而在PD-L1敲低的H1975细胞中,TGF- β 1的分泌减少(图4B)。这表明PD-L1能诱导细胞分泌TGF- β 1。在A549细胞中,我们转染了PD-L1过表达质粒,并在H1975细胞中使用siRNA沉默PD-L1,随后用TGF- β 1处理(图4C~图4F)。WB结果显示:A549细胞中PD-L1的增加促进了TGF- β 1诱导的EMT,并使Vim蛋白表达量显著增加,E-Cadherin蛋白表达量减少($P<0.001$)。相反,使用siRNA沉默H1975细胞中的PD-L1能减弱TGF- β 1诱导的肺癌细胞EMT。

2.5 过表达或沉默PD-L1对TGF- β 1处理后A549和H1975细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响

我们通过沉默或过表达PD-L1来研究其对经TGF- β 1处理后的A549和H1975细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。EdU染色实验结果显示A549细胞中PD-L1过表达组与空白质粒组对比,细胞增殖能力显著增强。与阴性对照组对比,PD-L1沉默后H1975增殖能力受到显著抑制。然而与对照组相比,有无TGF- β 1诱导对A549和H1975细胞的增殖能力没有显著改变(图5A)。Transwell和划痕实验表明,与对照组比较,TGF- β 1诱导后,细胞的迁移和侵袭能力增强。A549细胞过表达PD-L1后迁移和侵袭能力增强,而PD-L1沉默后,H1975细胞的迁移能



A: 生物信息学分析揭示了PD-L1与EMT相关基因(*E-Cadherin*和*Vim*)表达之间的相关性; B: A549细胞转染PD-L1过表达质粒和H1975细胞转染PD-L1 siRNA, 转染48 h后, ELISA检测细胞上清液中的TGF- β 1的表达情况; C、E: PD-L1过表达质粒转染A549细胞和PD-L1 siRNA转染沉默H1975细胞PD-L1表达后, 随后用或不用10 ng/mL TGF- β 1处理48 h。Western blot检测EMT标志物(*E-Cadherin*和*Vim*)及PD-L1的表达情况; D、F: 蛋白灰度值分析PD-L1、*Vim*和*E-Cadherin*的表达情况。*** $P < 0.001$ 。

A: bioinformatics analysis revealed a correlation between PD-L1 and EMT-related gene (*E-Cadherin* and *Vim*). B: A549 cells were transfected with PD-L1 overexpression plasmids, and H1975 cells were transfected with PD-L1 siRNA. After 48 h, the expression of TGF- β 1 in the cell supernatant was measured by ELISA. C,E: after transfection of A549 cells with PD-L1 overexpression plasmids and silencing of PD-L1 in H1975 cells using PD-L1 siRNA, cells were treated with or without 10 ng/mL TGF- β 1 for 48 h. Western blot as performed to detect the expression of EMT markers (*E-Cadherin* and *Vim*) and PD-L1. D,F: densitometric analysis of protein expression levels of PD-L1, *Vim*, and *E-Cadherin*. *** $P < 0.001$.

图4 过表达或沉默PD-L1对A549和H1975细胞中TGF- β 1分泌以及对TGF- β 1诱导的EMT相关蛋白的影响

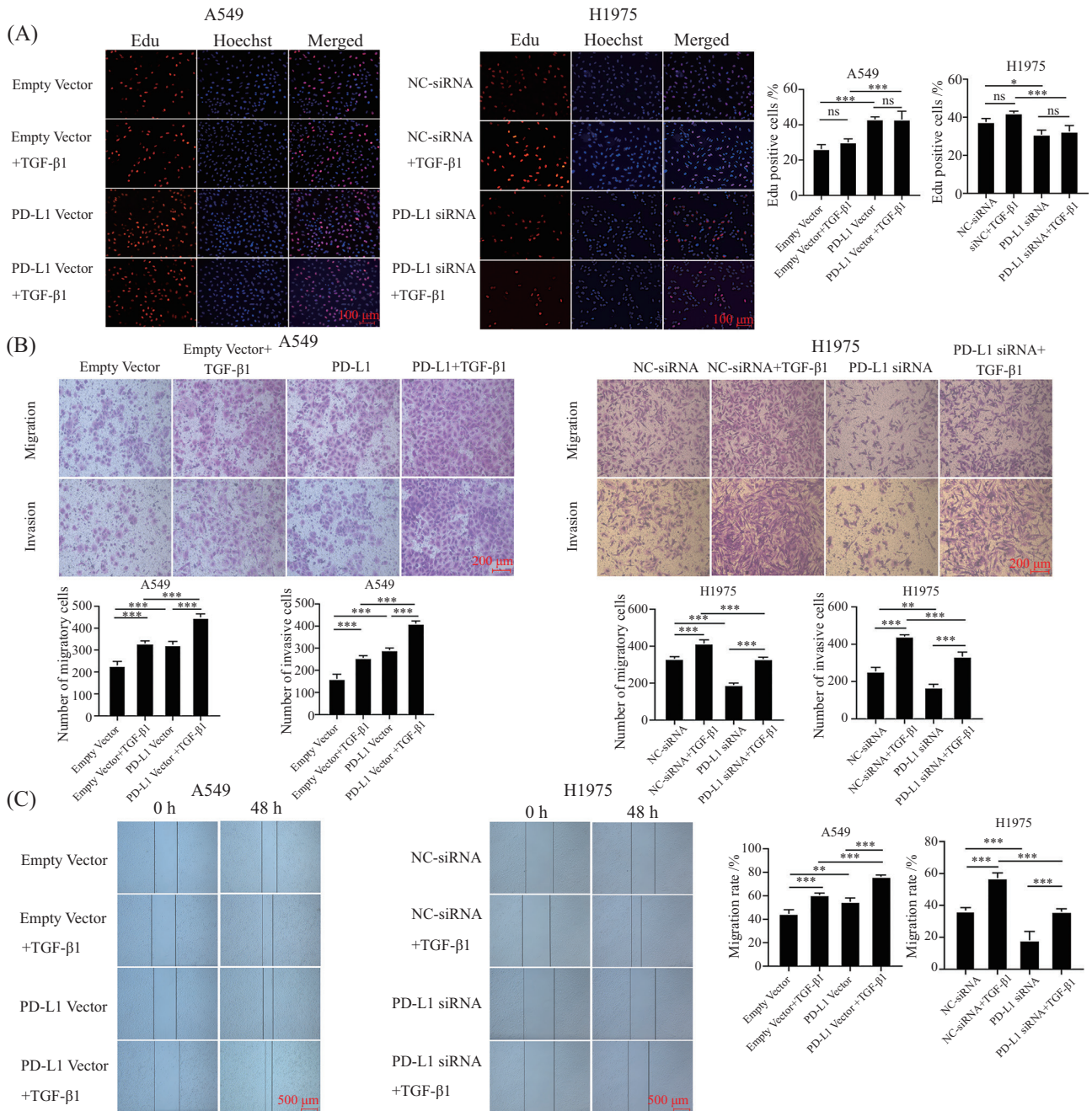
Fig.4 Effects of PD-L1 overexpression or knockdown on TGF- β 1 secretion and TGF- β 1-induced EMT-related proteins in A549 and H1975 cells

力降低。A549中PD-L1 Vector+TGF- β 1组与Empty Vector+TGF- β 1组对比, 细胞的迁移能力增加。H1975中si-PD-L1+TGF- β 1组与siNC+TGF- β 1组对比, 细胞的迁移能力减低(图5B和图5C)。结果表明, 过表达PD-L1能促进TGF- β 1处理后肺癌细胞的迁移和侵袭能力的增加, 而沉默PD-L1能抑制TGF- β 1处理后肺癌细胞的迁移和侵袭能力的增加。

3 讨论

肺癌是全球癌症相关死亡的主要原因。NSCLC

约占所有肺癌的85%。值得注意的是, 复发和转移被认为是肺癌患者死亡的主要原因。尽管治疗和预后方面有所进展, 但五年生存率仍低于20%, 这主要是由于晚期诊断和药物耐药性^[15]。免疫检查点抑制剂的出现显著提高了晚期NSCLC患者的生存率, 特别是PD-1/PD-L1抑制剂, 它们重塑了这些患者的治疗策略^[16]。PD-L1的表达常被用来预测NSCLC免疫治疗的效果^[17]。然而, 研究表明, 大约50%的高PD-L1表达患者未能从一线治疗中受益^[18]。目前尚不清楚为什么部分的患者对检查点抑制剂疗法无应答。有



PD-L1过表达质粒转染A549细胞和PD-L1 siRNA转染沉默H1975细胞PD-L1表达后,再用或不用10 ng/mL TGF- β 1处理48 h。A: 通过EdU检测试剂盒检测细胞增殖能力; B: 使用Transwell进行细胞迁移和侵袭实验; C: 伤口愈合实验; ns: 无显著差异; * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001。

After transfection of A549 cells with a PD-L1 overexpression plasmid and H1975 cells with PD-L1 siRNA to silence PD-L1 expression, cells were treated with or without 10 ng/mL TGF- β 1 for 48 h. A: cell proliferation was assessed using an EdU assay kit; B: cell migration and invasion were evaluated using Transwell assays; C: wound healing assays were performed to assess cell migration ability; ns: no significant difference; * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001.

图5 PD-L1对TGF- β 1处理的A549和H1975细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响

Fig.5 Effects of PD-L1 on the proliferation, migration, and invasion of TGF- β 1-treated A549 and H1975 cells

研究认为PD-L1表达水平与细胞介导的抗肿瘤免疫治疗无应答相关^[19]。因此,理解PD-L1表达的调控及其在肿瘤中的功能对于改善免疫治疗反应至关重要。

PD-L1在肿瘤中的表达受到多层次调控,包括

转录、翻译及肿瘤微环境的影响。在转录水平上,MYC和NF- κ B等转录因子可通过与PD-L1启动子区域结合,促进其基因的转录^[20]。在翻译水平上,eIF4F为代表的真核起始因子复合物能够调控PD-L1 mRNA的翻译效率,影响其在肿瘤细胞表面的表达

水平。此外,肿瘤微环境中的多种细胞因子也能显著影响PD-L1的表达。例如,活化的免疫细胞分泌的 γ -干扰素可通过激活JAK/STAT信号通路上调PD-L1的表达,帮助肿瘤细胞逃避免疫系统的识别和清除^[21]。TGF- β 1作为一种重要的免疫抑制因子,也被证实能够通过Smad依赖性及非Smad途径诱导PD-L1的表达上调^[22-24]。这一调控不仅增强了肿瘤的免疫逃逸能力,同时还促进了EMT的进程,从而提升了肿瘤细胞的侵袭性与转移潜能。由于TGF- β 1在诱导EMT和细胞增殖、侵袭和转移中扮演着重要的角色,因此我们主要探讨了PD-L1对TGF- β 1诱导的EMT和细胞增殖、侵袭和转移的影响,沉默PD-L1能明显抑制TGF- β 1诱导的EMT和细胞迁移和侵袭,过表达PD-L1能明显促进TGF- β 1诱导的EMT和细胞迁移和侵袭。结合以上研究结果,说明PD-L1可通过调控TGF- β 1的分泌来调控肿瘤的EMT和细胞迁移和侵袭,但其具体的调控机制还需进一步探讨与研究,这也是我们后续的研究方向。

TGF- β 1与PD-L1的关系及其在癌症治疗中的重要性:TGF- β 和PD-L1之间的关系在癌症治疗中至关重要,特别是在免疫治疗和靶向治疗的联合使用中。TGF- β 1通过诱导EMT增强肿瘤细胞的迁移和侵袭能力,同时通过调节PD-L1表达促进免疫逃逸。PD-L1通过与T细胞表面的PD-1受体结合抑制T细胞功能,使肿瘤细胞逃避免疫监视^[25-26]。这一机制在多种癌症中普遍存在。例如,在肝细胞癌中,研究表明,双重抑制PD-L1和TGF- β 1可以恢复肝癌细胞对索拉非尼的敏感性,改善治疗效果^[27]。类似地,在实体肿瘤中,将抗PD-L1抗体与TGF- β 抑制剂联合使用已显示出良好的前景^[28]。通过同时靶向这两条信号通路,可以阻断肿瘤免疫逃逸、抑制转移、降低药物耐药性,并延长患者生存期。这些发现表明,TGF- β 1可能作为NSCLC的潜在预后因素,并且靶向TGF- β 1信号通路与PD-L1联合治疗可能具有益处。我们的研究表明,PD-L1通过TGF- β 1诱导的EMT促进NSCLC的进展,这与之前的观察一致。

研究局限性与前景:我们研究的一个主要局限性是未深入探讨其中涉及的分子机制。我们认识到,进一步的研究需要探讨细胞内PD-L1与TGF- β 1之间具体调控的分子通路。然而本研究主要通过TGF- β 1构建了EMT模型,证明了PD-L1能通过TGF- β 1诱导的EMT,促进肿瘤的进展和转移,这些对癌症进展的

见解凸出了靶向PD-L1和TGF- β 1作为NSCLC治疗策略的潜力。未来的研究需要探索靶向TGF- β 1信号通路和PD-L1的治疗策略及其临床意义。

参考文献 (References)

- [1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-63.
- [2] PASTUSHENKO I, BLANPAIN C. EMT transition states during tumor progression and metastasis [J]. *Trends Cell Biol*, 2019, 29(3): 212-26.
- [3] BAKIR B, CHIARELLA A M, PITARRESI J R, et al. EMT, MET, plasticity, and tumor metastasis [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(10): 764-76.
- [4] JEONG H, KOH J, KIM S, et al. Epithelial-mesenchymal transition induced by tumor cell-intrinsic PD-L1 signaling predicts a poor response to immune checkpoint inhibitors in PD-L1-high lung cancer [J]. *Br J Cancer*, 2024, 131(1): 23-36.
- [5] CHEN L, XIONG Y, LI J, et al. PD-L1 expression promotes epithelial to mesenchymal transition in human esophageal cancer [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(6): 2267-80.
- [6] ZAVADIL J, BÖTTINGER E P. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions [J]. *Oncogene*, 2005, 24(37): 5764-74.
- [7] MARUYAMA T, CHEN W, SHIBATA H. TGF- β and cancer immunotherapy [J]. *Biol Pharm Bull*, 2022, 45(2): 155-61.
- [8] WANG X, EICHHORN P J A, THIERY J P. TGF- β , EMT, and resistance to anti-cancer treatment [J]. *Semin Cancer Biol*, 2023, 97: 1-11.
- [9] KIM S, KOH J, KIM M Y, et al. PD-L1 expression is associated with epithelial-to-mesenchymal transition in adenocarcinoma of the lung [J]. *Hum Pathol*, 2016, 58: 7-14.
- [10] PARK B V, FREEMAN Z T, GHASEMZADEH A, et al. TGF β 1-mediated SMAD3 enhances PD-1 expression on antigen-specific T cells in cancer [J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(12): 1366-81.
- [11] MARTIN M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads [J]. 2011, 17(1): 3.
- [12] KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG S L. Hisat: a fast spliced aligner with low memory requirements [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(4): 357-60.
- [13] ANDERS S, PYL P T, HUBER W. Htseq: a python framework to work with high-throughput sequencing data [J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(2): 166-9.
- [14] ROBINSON M D, MCCARTHY D J, SMYTH G K. Edger: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 139-40.
- [15] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [16] ANTONIA S J, VILLEGAS A, DANIEL D, et al. Durvalumab after chemoradiotherapy in stage III non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(20): 1919-29.
- [17] GANG X, YAN J, LI X, et al. Immune checkpoint inhibitors rechallenge in non-small cell lung cancer: current evidence and

- future directions [J]. *Cancer Lett*, 2024, 604: 217241.
- [18] GARON E B, RIZVI N A, HUI R, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(21): 2018-28.
- [19] O'DONNELL J S, LONG G V, SCOLYER R A, et al. Resistance to PD1/PDL1 checkpoint inhibition [J]. *Cancer Treat Rev*, 2017, 52: 71-81.
- [20] XU D, LI J, LI R Y, et al. PD-L1 expression is regulated by nf- κ b during EMT signaling in gastric carcinoma [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 10099-105.
- [21] JIANG Y, ZHAN H. Communication between EMT and PD-L1 signaling: new insights into tumor immune evasion [J]. *Cancer Lett*, 2020, 468: 72-81.
- [22] CHEN M J, WANG Y C, WANG L, et al. PD-L1 expressed from tumor cells promotes tumor growth and invasion in lung cancer via modulating TGF- β 1/SMAD4 expression [J]. *Thorac Cancer*, 2022, 13(9): 1322-32.
- [23] CHEN J, FENG W, SUN M, et al. TGF- β 1-induced SOX18 elevation promotes hepatocellular carcinoma progression and metastasis through transcriptionally upregulating PD-L1 and CXCL12 [J]. *Gastroenterology*, 2024, 167(2): 264-80.
- [24] LI Z, WANG F, DANG J, et al. Bidirectional regulation between tumor cell-intrinsic PD-L1 and TGF- β 1 in epithelial-to-mesenchymal transition in melanoma [J]. *Transl Cancer Res*, 2022, 11(10): 3698-710.
- [25] YI M, LI T, NIU M, et al. TGF- β : a novel predictor and target for anti-PD-1/PD-L1 therapy [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1061394.
- [26] LAN Y, YEUNG T L, HUANG H, et al. Colocalized targeting of TGF- β and PD-L1 by bintrafusp alfa elicits distinct antitumor responses [J]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(7): e004122.
- [27] SHRESTHA R, PRITHVIRAJ P, BRIDLE K R, et al. Combined Inhibition of TGF- β 1-induced EMT and PD-L1 silencing re-sensitizes hepatocellular carcinoma to sorafenib treatment [J]. *J Clin Med*, 2021, 10(9): 1889.
- [28] STRAUSS J, HEERY C R, SCHLOM J, et al. Phase I trial of M7824 (MSB0011359C), a bifunctional fusion protein targeting PD-L1 and TGF β , in advanced solid tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(6): 1287-95.