

顺铂诱导脑胶质瘤 U87 细胞的 PD-L1 表达及耐药机制的研究

周红建, 李军, 夏建国(杭州市萧山区中医院神经外科, 杭州 311201)

摘要: 目的 研究 PD-L1 的表达对 U87 细胞的顺铂(cisplatin, CDDP)耐药性的影响。方法 建立 U87 对 CDDP 耐药细胞株(U87/CDDP), 用不同浓度的 CDDP 处理 24 h 后, CCK-8 检测 U87/CDDP 细胞活力以验证耐药性。成功建立 U87/CDDP 细胞株后转染 PD-L1 shRNA, 用 CCK-8、BrdU 染色、流式细胞仪检测 U87/CDDP 细胞的增殖和凋亡。并分别用 qRT-PCR 检测 PD-L1、Bax、caspase-3、Survivin mRNA 的表达, Western blotting 检测 PD-L1、Bax、caspase-3、cleaved-caspase-3 和 P53 蛋白的表达。结果 CCK-8 结果表明, U87/CDDP 细胞成功建立。用相同浓度的 CDDP 处理 24 h 后, 转染 PD-L1 shRNA 的 U87/CDDP 细胞的细胞增殖率比未转染的 U87/CDDP 细胞低, 细胞凋亡率高。同时, 与对照组细胞相比, 在转染 PD-L1 shRNA 并给予 CDDP 处理的 U87/CDDP 细胞中, Bax、caspase-3 mRNA 和 Bax、cleaved-caspase-3 和 P53 蛋白的表达显著增加, PD-L1、Survivin mRNA 和 PD-L1 蛋白的表达显著降低。结论 通过抑制 U87 细胞中 PD-L1 的表达可以逆转脑胶质瘤 U87 细胞对 CDDP 的耐药性。

关键词: 脑胶质瘤; U87 细胞; 顺铂; PD-L1; 耐药性

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2022)09-1155-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.09.004

引用本文: 周红建, 李军, 夏建国. 顺铂诱导脑胶质瘤 U87 细胞的 PD-L1 表达及耐药机制的研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(9): 1155-1161.

Study on Expression of PD-L1 and Resistance Mechanism on Glioma U87 Cells Induced by Cisplatin

ZHOU Hongjian, LI Jun, XIA Jianguo(Department of Neurosurgery, Hangzhou Xiaoshan District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 311201, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of PD-L1 expression on the cisplatin(CDDP) resistance of U87 cells. **METHODS** U87 CDDP drug-resistant cell line(U87/CDDP) was established and the cell viability was estimated by CCK-8 to verify drug resistance after treated with different concentration of CDDP for 24 h. Then the U87/CDDP cells were transferred PD-L1 shRNA, and CCK-8, BrdU staining, flow cytometry was performed to detected the proliferation and apoptosis. Meanwhile, the mRNA expression of PD-L1, Bax, caspase-3, Survivin was detected by qRT-PCR, while the protein expression of PD-L1, Bax, caspase-3, cleaved-caspase-3, P53 was detected by Western blotting. **RESULTS** The result of CCK-8 showed that U87/CDDP was established successfully. After treated with same concentration of CDDP 24 h, the proliferation of PD-L1 shRNA-U87/CDDP cells was decreased and the apoptosis was increased compared with non transfected U87/CDDP cells. Meanwhile, compared to the control group, the mRNA expression of Bax, caspase-3 and the protein expression of Bax, cleaved-caspase-3 and P53 was significantly increased, while the mRNA expression of PD-L1, Survivin and the protein expression of PD-L1 was significantly decreased in PD-L1 shRNA transfected and CDDP treated U87/CDDP cells. **CONCLUSION** The tolerance of CDDP on U87 cells can reverse by down-regulating the expression of PD-L1.

KEYWORDS: glioma; U87 cells; cisplatin; PD-L1; tolerance

脑胶质瘤是最常见的恶性疾病, 约占所有颅内肿瘤的 40%~50%, 其生存期短, 死亡率高^[1], 目前以手术治疗为主, 辅以化疗、放疗等手段^[2]。但由于血脑屏障的限制、部分肿瘤对化疗药物的耐药性及肿瘤本身异质性问题, 使得肿瘤患者对化疗药物的敏感性有很大差异^[3-4]。大多数学者认为, 胶质瘤术后复发的主要原因之一是肿瘤细胞对化疗药物产生耐药, 但是目前关于胶质瘤细

胞对化疗药物的耐药机制仍不明确。

顺铂(cisplatin, CDDP)是临床上常用的化疗药物之一, 抗肿瘤作用强。然而, 目前临床上发现许多肿瘤对 CDDP 产生了耐药性和不良反应, 这可能是临床上患者对用药存在个体差异而导致的, 但其中可能的耐药机制尚不明确^[5-6]。有研究表明, CDDP 在抗肿瘤治疗时, 在一定的浓度条件下能够影响肿瘤细胞表面 PD-L1 基因的表达。因而 PD-L1

基金项目: 萧山区重大科技攻关项目(2017309)

作者简介: 周红建, 男, 硕士, 主治医师 E-mail: kxz8309@163.com

基因的改变可能是脑胶质瘤细胞对 CDDP 耐药的重要机制之一^[7]。Wang等^[8]发现 miR-34a 通过靶向 PD-L1 可以减弱胶质瘤细胞进展和化学耐药性。因此,本研究以脑胶质瘤细胞株 U87 作为研究对象,制备 U87 对 CDDP 耐药细胞株,通过转染 PD-L1 shRNA 观察用药前后对 U87 细胞增殖、凋亡以及 PD-L1 基因表达的影响,探讨肿瘤对化疗药物可能的耐药机制,为临床上合理选择化疗药物提供理论依据。

1 仪器与试剂

CMaxPlus 型酶标仪(SpectiaMAX 公司); AE2000 型光学显微镜(Motic 公司); VE 180C 型电泳槽、VE186 型转膜仪购自上海天能; 610020-9Q 型化学发光仪(勤翔公司); C6 型流式细胞仪(BD 公司)。

细胞凋亡试剂盒(BD 公司,批号: 1133534); DMEM 高糖培养基(批号: AE29431639)、RPMI1640 培养基(批号: AE29163439)、Trypsin 0.25%(1×)溶液(批号: J190002)均购自 Hyclone 公司; 胎牛血清(浙江天杭生物科技公司,批号: 19110501); MTT 试剂盒(BBI Life Sciences 公司,批号: 20210112); CCK-8 试剂盒(MCE 公司,批号: 20210127); BCA 蛋白定量试剂盒(索莱宝,批号: 120219200721); RIPA 裂解液(碧云天,批号: 10352); Bax 抗体(批号: 65e6022)、cleaved-caspase-3(批号: 15z0096)、p53 抗体(批号: 23y9837)、caspase-3 抗体(批号: 36z7763)、PD-L1 抗体(批号: 42a3751)、GAPDH 抗体(批号: 77p6700)均购自 Affinity; BrdU 溶液(上海碧云天生物技术有限公司,批号: 092820210513); TritonX-100(Sangon Biotech,批号: E111BA0012); LipofectamineTM 2000(Invitrogen,批号: 1799015); Hoechst 33342(上海碧云天生物技术有限公司,批号: 101819200522); RIPA 裂解液(康为世纪,批号: 10352); PVDF 膜(GE Healthcare Life,批号: A298125036); 逆转录试剂盒(康为世纪,批号: 36320)。

2 方法

2.1 脑胶质瘤 U87 细胞的培养

U87-MG 胶质母细胞瘤细胞系(购自赛百慷),将其接种于含 10%热灭活胎牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素 G、100 μg·mL⁻¹链霉素、1% L-谷氨酰胺、1% 非必需氨基酸和 1 mmol·mL⁻¹丙酮酸钠的 DMEM 培养基中,在 37 °C 含 5% CO₂ 的湿润培养

箱中培养。

2.2 MTT 检测细胞存活率

取对数生长期的脑胶质瘤 U87 细胞悬液接种于 96 孔板内,将培养板放在培养箱内预培养 24 h; 分别用不同浓度的 CDDP(0.312 5, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 μg·mL⁻¹)处理 24 h 后,每孔加入 10 μL MTT 溶液,在培养箱内分别孵育 0, 12, 24, 48 h。用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度,并计算细胞存活率。

2.3 CDDP 耐药性的细胞制备

采用药物连续诱导法筛选耐药细胞。取对数生长期的 U87 细胞接种于含 CDDP 的 DMEM 培养液中,CDDP 浓度依次为 0.312 5, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 μg·mL⁻¹,逐步诱导,作用 72 h 后换新培养液,每 2~3 d 传代 1 次,历时 6~8 周^[9]。最终存活的 U87 细胞对 CDDP 表现出抗药性,称为 U87/CDDP 细胞。在不含药物的培养基中培养的细胞作为亲代敏感对照。

2.4 CCK-8 检测耐药 U87 细胞和敏感 U87 细胞的增殖

取对数生长期的 U87 细胞和 U87/CDDP 细胞悬液接种于六孔板内,将培养板放在培养箱内预培养 24 h; 分别用不同浓度的 CDDP(0.312 5, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 μg·mL⁻¹)处理 24 h,消化清洗后,离心重悬,加至 96 孔板中培养 24 h,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,在培养箱内孵育。用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度,计算细胞存活率。

2.5 质粒转染及分组

将 U87/CDDP 细胞(2×10^5)接种到 6 孔板中孵育过夜,然后用 LipofectamineTM 2000 试剂将 PD-L1 shRNA(2.5 μg)转染到 U87/CDDP 细胞中^[9]。将 U87/CDDP 细胞分为以下 6 组:对照组(U87/CDDP 不做任何处理)、U87/CDDP 0.625, 1.25 μg·mL⁻¹组(U87/CDDP 分别与 0.625, 1.25 μg·mL⁻¹ CDDP 反应 48 h)、PD-L1 shRNA 质粒转染组(转染了 PD-L1 shRNA 质粒的 U87/CDDP 细胞)、PD-L1 shRNA+CDDP 0.625, 1.25 μg·mL⁻¹组(用 0.625, 1.25 μg·mL⁻¹ CDDP 处理转染了 PD-L1 shRNA 质粒的 U87/CDDP 细胞)。

2.6 CCK-8 检测细胞活力

取对数生长期的 U87/CDDP 细胞和转染了 PD-L1 shRNA 质粒的 U87/CDDP 细胞悬液接种于 6 孔板内,将培养板放在培养箱内预培养 24 h; 按

照“2.5”项下方法分组处理 24 h 后,采用“2.4”项下相同操作检测各组细胞活力。

2.7 BrdU 染色检测细胞增殖

取 U87/CDDP 细胞接种于 12 孔板中,按照“2.5”项下方法分组,每孔加 500 μL $2\times\text{BrdU}$ 溶液 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h, PBS 洗涤后用 0.3% TritonX-100 通透 10 min,随后每孔加入 0.5 mL Click 反应液混匀。吸除洗涤后再加入 1 mL Hoechst 33342 溶液孵育,倒置荧光显微镜下镜检。

2.8 流式细胞仪检测细胞凋亡

取对数生长期的 U87/CDDP 细胞和转染了 PD-L1 shRNA 质粒的 U87/CDDP 细胞于 6 孔板(1.2×10^6 个细胞, 2 mL)。按“2.5”项下方法分组处理 24 h 后收集细胞,预冷 PBS 洗涤 2 次,调整细胞浓度为 $1\times 10^6\cdot\text{mL}^{-1}$ 。加入 500 μL 结合缓冲液,离心弃上清,再加入 100 μL 结合缓冲液混匀后,分别加入 5 μL Annexin V-FITC 与 10 μL PI,充分混匀;室温避光反应 15 min。最后加入结合缓冲液 400 μL , 1 h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.9 qRT-PCR 检测 mRNA 表达

采用 qRT-PCR 检测上述各分组中 PD-L1、Bax、caspase-3、Survivin mRNA 表达情况。提取各组细胞总 RNA,逆转录为 cDNA,特异性扩增 PD-L1、Bax、caspase-3、Survivin, GAPDH 为内参。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 min 变性; 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 60 s; 40 次循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法计算 PD-L1、Bax、caspase-3、Survivin mRNA 表达量。各引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequence

基因	正向引物	反向引物
PD-L1	5'-TCAATGCCCATACA ACAAA-3'	5'-TGCTGTCCAGATGA CTTCG-3'
Bax	5'-AGGGTGGCTGGGAA GGC-3'	5'-TGAGCGAGGCGGTG AGG-3'
caspase-3	5'-CAAACCTTTTCAGA GGGGATCG-3'	5'-GCATACTGTTTCAGC ATGGCAC-3'
Survivin	5'-TTGGCAGGTGCCTG TTGAAT-3'	5'-AGCCAGTCCCCAC AGCAT-3'
GAPDH	5'-TGACTTCAACAGCG ACACCCA-3'	5'-CACCTGTTGCTGTA GCCAAA-3'

2.10 Western blotting 检测蛋白表达

用 RIPA 裂解液(含 PMSF 和蛋白酶抑制剂)提取上述各组细胞中的蛋白质。用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度后,用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白并转移到 PVDF 膜, TBST 洗膜后,用 5% 脱脂奶粉封闭 1.5~2 h。然后将膜放入含一抗稀

释液[Bax 抗体(1:500)、PD-L1 抗体(1:2000)、cleaved-caspase-3(Asp175), p17 抗体(1:2000)、p53 抗体(1:2000)、caspase-3 抗体(1:2000)和 GAPDH 抗体(1:30000)]的孵育盒中于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。随后加入二抗在室温下反应 1~2 h。化学发光仪显影后用 Image J 检测条带强度。

2.11 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析,计量资料多组间用 One-way-ANOVA 单因素方差分析,组间比较采用 SNK 分析。方差不齐者采用 Kruskal-Wallis H 检验。符合正态分布的数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 CDDP 对脑胶质瘤 U87 细胞的细胞活力的影响

与对照组相比, U87 细胞经 CDDP 处理 24, 48 h 后, 0.312 5, 0.625 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 CDDP 对 U87 细胞的细胞活力和增殖抑制率无明显改变; 1.25, 2.5, 5, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 CDDP 导致 U87 细胞活力出现显著性下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 增殖抑制率显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见图 1。

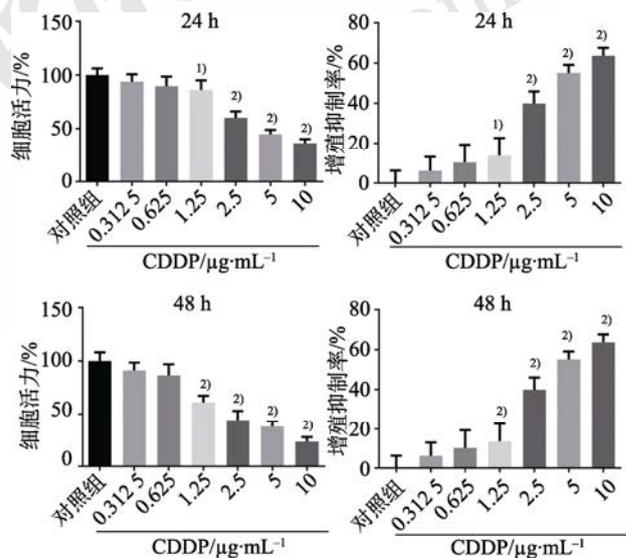


图 1 不同浓度顺铂对 U87 细胞活力和增殖抑制率的影响与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 1 Effects of different concentrations of cisplatin on the vitality and proliferation inhibition rate of U87 cells Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

3.2 不同浓度 CDDP 及 PD-L1 shRNA 对 U87 细胞和 U87/CDDP 细胞增殖的影响

在 U87 细胞中,与对照组相比, CDDP 浓度为 0.312 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, U87 细胞的细胞活力无明显改变, CDDP 浓度为 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

时, U87 细胞的细胞活力显著下降($P<0.01$)。对于 U87/CDDP 细胞, 与对照组相比, 当 CDDP 浓度为 0.312 5, 0.625, 1.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, U87/CDDP 细胞的细胞活力无明显改变; 当 CDDP 浓度为 2.5, 5, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时 U87/CDDP 细胞的细胞活力显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与对照组相比, U87/CDDP 细胞经 0.625, 1.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 CDDP 处理后, 细胞活力无明显改变; 而 PD-L1 shRNA 与 PD-L1 shRNA+CDDP 0.625, 1.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组 U87/CDDP 细胞的细胞活力显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与 PD-L1 shRNA 组相比, PD-L1 shRNA+CDDP 1.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组 U87/CDDP 细胞的细胞活力显著降低($P<0.05$)。结果见图 2。

3.3 PD-L1 shRNA 对 U87/CDDP 细胞增殖的影响
与对照组比较, CDDP 1.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组、PD-L1 shRNA 组、PD-L1 shRNA+CDDP 0.625, 1.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组细胞增殖率均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与 PD-L1 shRNA 组相比, PD-L1 shRNA+CDDP 0.625, 1.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组 U87/CDDP 细胞的细胞增殖率显著降低($P<0.01$)。结果见图 3。

3.4 PD-L1 shRNA 对 U87/CDDP 细胞凋亡的影响
与对照组比较, CDDP 0.625, 1.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组、PD-L1 shRNA 组、PD-L1 shRNA+CDDP 0.625, 1.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组细胞凋亡率均显著升高($P<0.01$), 且转染 PD-L1 shRNA 并给予 CDDP 干预的 U87/CDDP 细胞的凋亡率更高。结果见图 4。

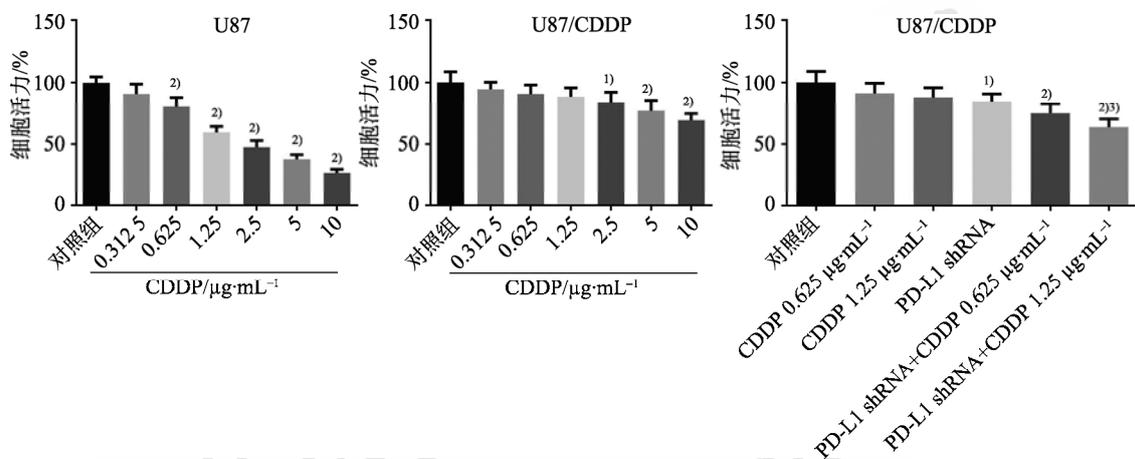


图 2 不同浓度顺铂及 PD-L1 shRNA 对 U87 细胞和 U87/CDDP 细胞增殖的影响
与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与 PD-L1 shRNA 组相比, ³⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 2 Effects of different concentrations of cisplatin and PD-L1 shRNA on the proliferation of U87 cells and U87/CDDP cells Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with PD-L1 shRNA group, ³⁾ $P<0.05$.

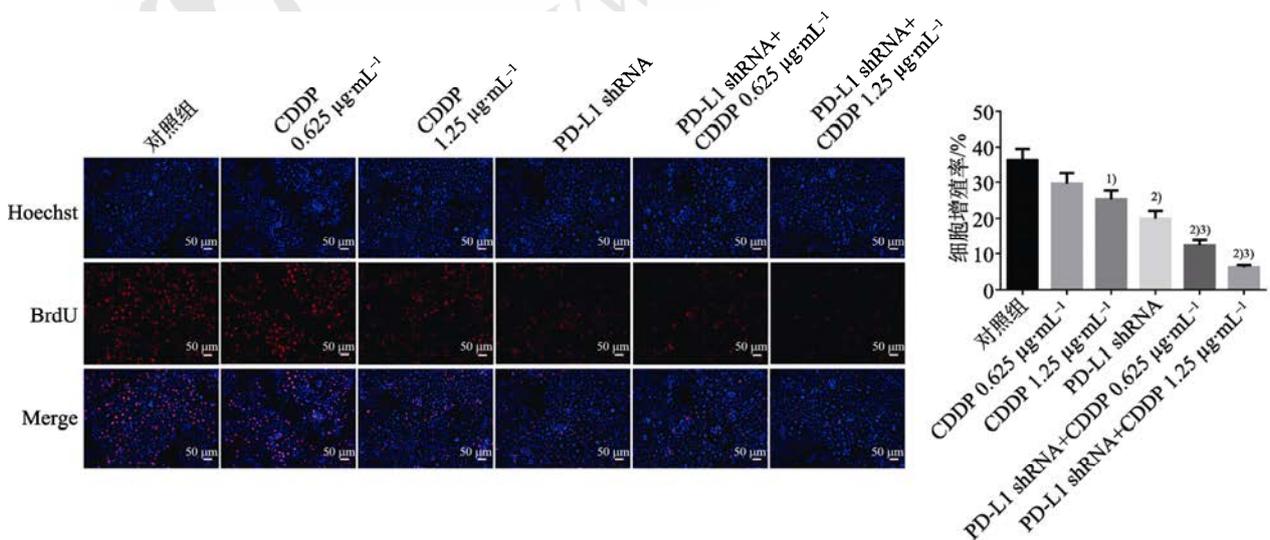


图 3 转染 PD-L1 shRNA 后顺铂对 U87/CDDP 细胞增殖的影响
与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与 PD-L1 shRNA 组相比, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effects of cisplatin on the proliferation of U87/CDDP cells after transfection of PD-L1 shRNA Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with PD-L1 shRNA group, ³⁾ $P<0.01$.

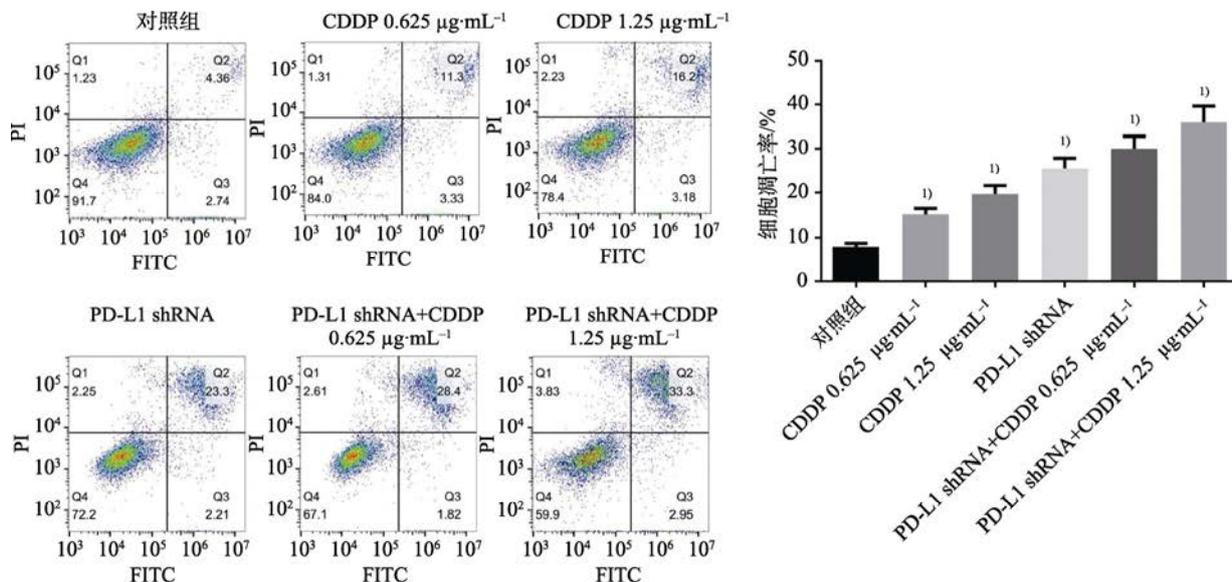


图4 顺铂对转染 PD-L1 shRNA 后 U87/CDDP 细胞凋亡的影响
与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 4 Effects of cisplatin on the apoptosis of U87/CDDP cells after transfection of PD-L1 shRNA
Compare with control group, ¹⁾ $P<0.01$.

3.5 各组细胞 PD-L1、Bax、caspase-3、Survivin mRNA 表达

与对照组相比, PD-L1、Bax、caspase-3、Survivin mRNA 的表达在 CDDP 0.625, 1.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组中无显著性变化。与对照组相比, PD-L1 shRNA+CDDP 0.625, 1.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组细胞中 Bax、caspase-3 mRNA 的表达均显著上升($P<0.01$), PD-L1、Survivin mRNA 表达均显著下降($P<0.01$)。与 PD-L1 shRNA 组相比, PD-L1 shRNA+CDDP 0.625, 1.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组细胞中 Bax、caspase-3 mRNA 的表达均显著上升($P<0.05$ 或 $P<0.01$), PD-L1、Survivin mRNA 表达均显著下

降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见图 5。

3.6 各组细胞 PD-L1、Bax、P53、caspase-3 和 cleaved-caspase-3 蛋白的表达

与对照组相比, PD-L1 shRNA+CDDP 0.625, 1.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组 U87/CDDP 细胞中的 Bax、cleaved-caspase-3 和 P53 蛋白的表达水平均显著升高($P<0.05$), PD-L1 shRNA+CDDP 1.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组 U87 细胞中的 PD-L1 蛋白的表达水平显著降低($P<0.01$)。与 PD-L1 shRNA 组相比, PD-L1 shRNA+1.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CDDP 组 U87 细胞中的 PD-L1 蛋白的表达水平显著降低($P<0.01$)。结果见图 6。

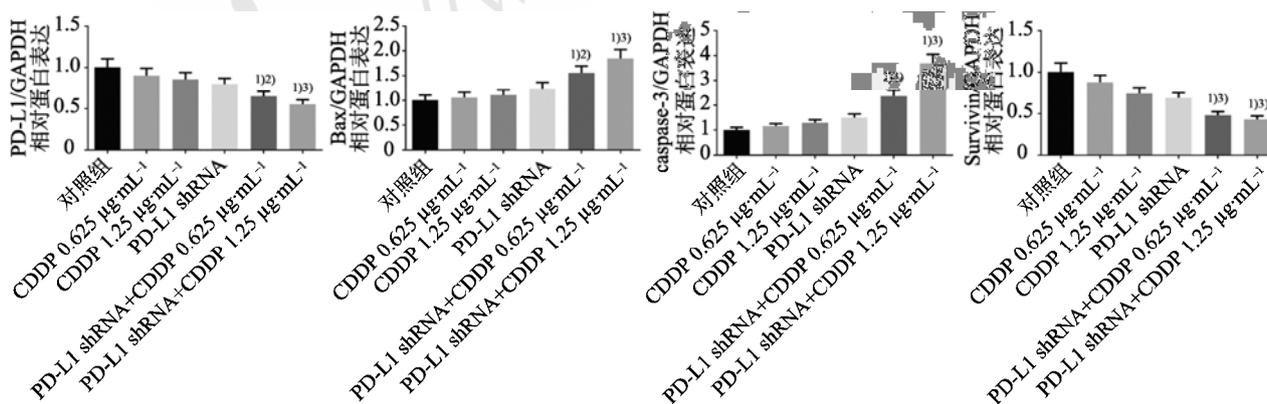


图5 顺铂对 U87/CDDP 细胞转染 PD-L1 shRNA 后各组细胞中 PD-L1、Bax、caspase-3、Survivin mRNA 表达的影响
与对照组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与 PD-L1 shRNA 组相比, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 5 Effect of cisplatin on the expression of PD-L1, Bax, caspase-3, Survivin mRNA in cells of each group after PD-L1 shRNA was transfected by U87/CDDP cells
Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with PD-L1 shRNA group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

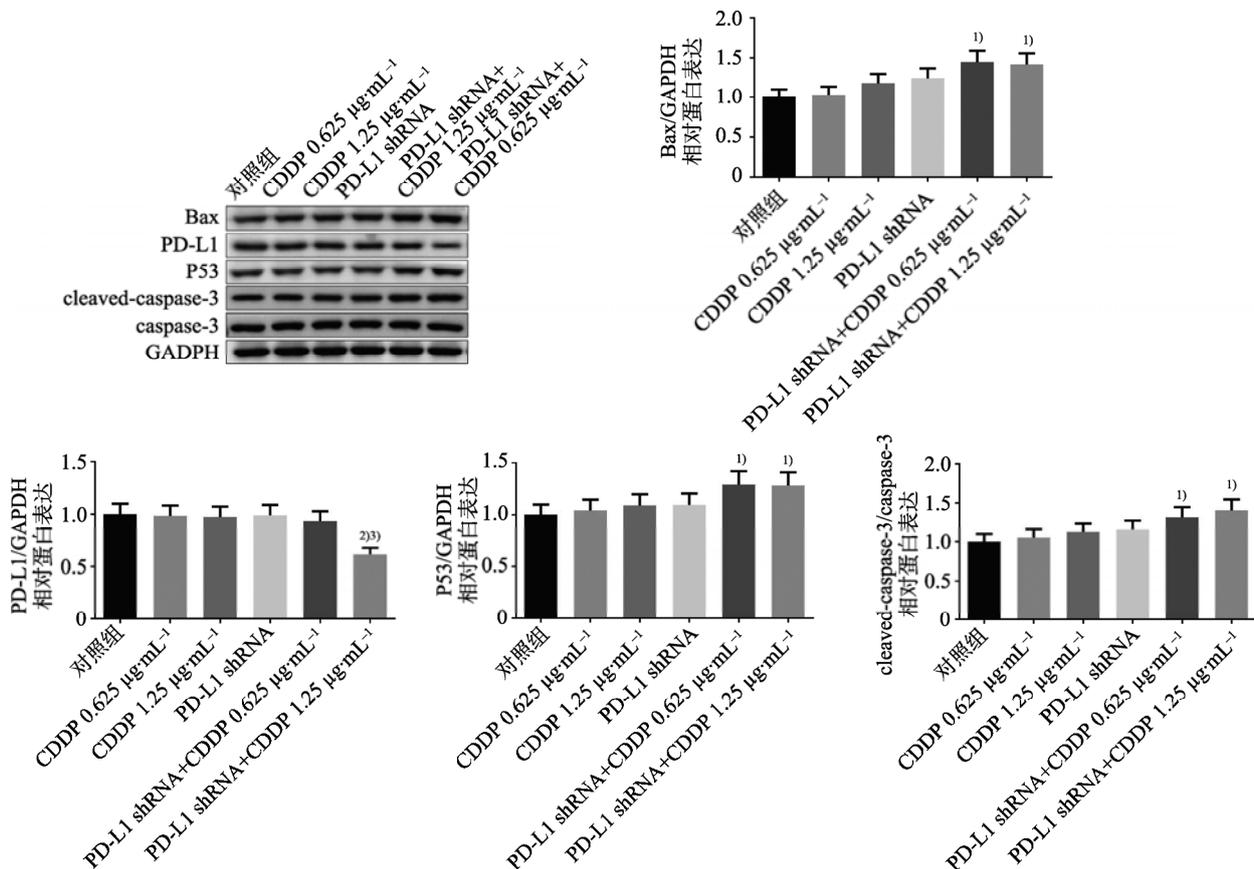


图6 顺铂对U87/CDDP细胞转染PD-L1 shRNA后各组细胞中Bax、PD-L1、P53、cleaved-caspase-3蛋白表达的影响与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与PD-L1 shRNA组相比, ³⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 6 Effect of cisplatin on protein expression of Bax, PD-L1, P53, cleaved-caspase-3 in various cells after PD-L1 shRNA was transfected by U87/CDDP cells

Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; compared with PD-L1 shRNA group, ³⁾ $P < 0.01$.

4 讨论

神经胶质瘤是成人中最常见的原发性恶性脑肿瘤,具有异质性和易感性,危及患者的生命^[10]。CDDP是治疗脑胶质瘤常用的化疗药物,能有效抑制脑胶质瘤的发展,而肿瘤细胞对CDDP的耐药性是临床治疗的一大难题^[11-12]。众所周知,神经胶质瘤可通过下调抗原呈递,上调抗炎蛋白和促进免疫抑制效应细胞的扩增来抑制免疫反应,从而发生免疫逃逸^[13-14]。有研究表明,PD-L1参与肿瘤耐药的胶质瘤细胞系。通过细胞增殖和凋亡结果表明,U87/CDDP细胞的增殖增加,凋亡降低,而转染PD-L1 shRNA的U87/CDDP细胞的增殖降低,凋亡增加,说明PD-L1低表达的胶质瘤细胞系对CDDP的敏感性增加,PD-L1的表达与U87细胞对CDDP的敏感性呈负相关。

此外,PD-L1的表达与胶质瘤的病理分级有关^[18]。同时,血管生成、细胞增殖和侵袭等与神经胶质瘤的恶性进展有关的蛋白质也可能调节

瘤的免疫治疗,被认为是多种肿瘤免疫治疗的主要预后生物标志物^[15]。而内源性PD-L1会促进神经胶质瘤的发展^[16-17]。在本研究中,通过建立U87CDDP耐药细胞株并转染PD-L1 shRNA来研究PD-L1对脑胶质瘤耐药性的作用,以期找到一种可以逆转肿瘤耐药性的途径。

笔者假设抑制PD-L1的表达可能是逆转肿瘤细胞耐药性的机制之一。因此在本研究中通过转染建立了一个稳定表达PD-L1 shRNA的具有CDDP PD-L1的表达^[19]。炎症因子基因、抗凋亡基因等与肿瘤的耐药机制有关^[20-21]。肿瘤细胞的凋亡涉及多种凋亡蛋白质,当细胞的肿瘤基因被激活时,将激活促凋亡蛋白,使细胞发生程序性死亡^[22]。该途径被多种凋亡及抗凋亡蛋白因子调控。在本研究中,qRT-PCR和Western blotting结果表明,用CDDP处理U87/CDDP细胞株,PD-L1、Bax、caspase-3、cleaved-caspase-3和P53的表达无显著变化,而转染PD-L1 shRNA的U87/CDDP细胞株

经过 CDDP 处理后, Bax、cleaved-caspase-3 和 P53 的表达水平均显著升高, PD-L1 和 Survivin 的表达水平显著降低。因此, PD-L1 可通过调节凋亡相关的细胞因子的表达来逆转 U87 细胞的耐药性。

因此, 通过本研究发现, PD-L1 在耐药性 U87 细胞中高表达, 且是逆转 U87 的耐药性的重要靶点, 其机制可能与凋亡基因的表达有关。

REFERENCES

- [1] WANG K Y, HUANG R Y, TONG X Z, et al. Molecular and clinical characterization of TMEM71 expression at the transcriptional level in glioma[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2019, 25(9): 965-975.
- [2] ZHANG N, YU Z D, HAMEED N U F, et al. Long-term functional and oncologic outcomes of glioma surgery with and without intraoperative neurophysiologic monitoring: A retrospective cohort study in a single center[J]. *World Neurosurg*, 2018(119): e94-e105.
- [3] PANG X C, GAO D D, CHAI Z Q, et al. Research progress of effective constituents in traditional Chinese medicine against glioma and the application of new dosage forms[J]. *Chin Gen Pract*(中国全科医学), 2019, 22(36): 4499-4503.
- [4] 汪超甲, 王辉. 脑胶质瘤化疗现状及耐药机制的研究进展[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2017, 22(11): 791-794.
- [5] 邵丹, 陈霞君, 高智峰, 等. 迎随补泻穴位注射法防治顺铂所致恶心呕吐的临床疗效观察[J]. *浙江临床医学*, 2019, 21(4): 502-503.
- [6] DING J, ZHANG L, CHEN S W, et al. LncRNA CCAT2 enhanced resistance of glioma cells against chemo drugs by disturbing the normal function of miR-424[J]. *Onco Targets Ther*, 2020(13): 1431-1445.
- [7] HAN D Y, ZHANG N, ZHAO S, et al. AKIP1 promotes glioblastoma viability, mobility and chemoradiation resistance via regulating CXCL1 and CXCL8 mediated NF- κ B and AKT pathways[J]. *Am J Cancer Res*, 2021, 11(4): 1185-1205.
- [8] WANG Y, WANG L. miR-34a attenuates glioma cells progression and chemoresistance via targeting PD-L1[J]. *Biotechnol Lett*, 2017, 39(10): 1485-1492.
- [9] YAN F, PANG J X, PENG Y, et al. Elevated cellular PD1/PD-L1 expression confers acquired resistance to cisplatin in small cell lung cancer cells[J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0162925. Doi: 10.1371/journal.pone.0162925.
- [10] WANG Z, ZHANG C, LIU X, et al. Molecular and clinical characterization of PD-L1 expression at transcriptional level via 976 samples of brain glioma[J]. *Oncoimmunology*, 2016, 5(11): e1196310.
- [11] QIN N. Study on the effect and mechanism of NDRG2 via regulating MGMT to enhance the chemosensitivity of temozolomide in glioblastoma[D]. Xi'an: The Fourth Military Medical University, 2017.
- [12] TABATABAEI P, ASKLUND T, BERGSTRÖM P, et al. Intratumoral retrograde microdialysis treatment of high-grade glioma with cisplatin[J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 2020, 162(12): 3043-3053.
- [13] XUE S, HU M, LI P F, et al. Relationship between expression of PD-L1 and tumor angiogenesis, proliferation, and invasion in glioma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(30): 49702-49712.
- [14] HUANG X S, ZENG H, ZHOU B L, et al. Identification of characteristic genes in glioblastoma by integrated bioinformatics and weighted gene correlation network analysis[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2020, 37(19): 2311-2316.
- [15] MOTZER R J, TANNIR N M, MCDERMOTT D F, et al. Nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib in advanced renal-cell carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(14): 1277-1290.
- [16] WANG Y T, WANG H B, YAO H, et al. Regulation of PD-L1: Emerging routes for targeting tumor immune evasion[J]. *Front Pharmacol*, 2018(9): 536.
- [17] YANG Z, WANG X J, ZHANG Q, et al. Expressions of CMTM6 and PD-L1 protein in glioma tissues and their correlation with clinicopathological characteristics of patients[J]. *Chin J Cancer Biother*(中国肿瘤生物治疗杂志), 2019, 26(7): 782-787.
- [18] MA C Y, LI Y, ZHANG X F, et al. Levels of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 proteins in patients with glioma[J]. *J Int Med Res*, 2014, 42(1): 198-204.
- [19] BARAL A, YE H X, JIANG P C, et al. B7-H3 and B7-H1 expression in cerebral spinal fluid and tumor tissue correlates with the malignancy grade of glioma patients[J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(3): 1195-1201.
- [20] CHEN Y, CHEN H J, YANG Y Y, et al. Effect of Siwei Xiaoliu decoction combined with temozolomide on expression of miR-21 and miR-221 in glioma[J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med*(现代中西医结合杂志), 2019, 28(33): 3658-3662, 3671.
- [21] YANG M. PD-L1 expression in glioma and its effect on proliferation, apoptosis and cytokine production of peripheral blood mononuclear cells[D]. Suzhou, China: Soochow University, 2019.
- [22] CAMPBELL K J, TAIT S W G. Targeting Bcl-2 regulated apoptosis in cancer[J]. *Open Biol*, 2018, 8(5): 180002.

收稿日期: 2021-06-01

(本文责编: 蔡珊珊)