

• 研究论文 •

绿原酸通过 IFN- γ 信号通路抑制食管癌细胞中 PD-L1 的表达

詹 芸, 李 瑞, 李晓琳, 韩燕星, 蒋建东*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

摘要: 本研究应用体内、外模型探讨了绿原酸 (chlorogenic acid, CGA) 对食管癌中程序性死亡受体配体 1 (programmed cell death ligand 1, PD-L1) 的表达调控作用, 以及干扰素 γ (interferon γ , IFN- γ) 在这一调控过程中发挥的作用。遵从中国医学科学院药物研究所动物实验中心标准操作规程 (SOP) 建立小鼠食管癌模型, 通过基因芯片检测发现小鼠食管癌组织中 PD-L1 的差异表达, 并应用 qRT-PCR、Western blot 和免疫组化 (immunohistochemistry, IHC) 染色在小鼠食管癌组织中进行验证, 然后在体外培养的食管癌细胞中进行进一步的验证和机制探讨。结果发现, CGA 能够显著抑制小鼠食管癌组织中 PD-L1 的表达, 但在体外培养的 KYSE180 及 KYSE510 食管癌细胞中, PD-L1 的表达并不受 CGA 的调控。用 IFN- γ 对 KYSE180 和 KYSE510 细胞进行预处理, PD-L1 的表达明显升高, 再加入 CGA 处理, PD-L1 的表达下调, 并且随着 CGA 浓度的增加或者处理时间的延长, PD-L1 表达受抑制的效果越明显。同时, 通过对 PD-L1 上游的干扰素调节因子 1 (interferon regulatory factor 1, IRF1) 的检测表明, 在经 IFN- γ 预处理的 KYSE180 及 KYSE510 细胞中, IRF1 的表达受到 CGA 的抑制, 其变化趋势与 PD-L1 一致。上述结果表明, CGA 可以通过 IFN- γ 信号通路下调食管癌中 PD-L1 的表达, 为食管癌治疗的新方法提供了分子理论基础。

关键词: 绿原酸; 干扰素 γ ; 食管癌; 程序性死亡受体配体 1; 干扰素调节因子 1

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)06-1599-07

Chlorogenic acid down-regulates the expression of PD-L1 in esophageal squamous cell carcinoma via IFN- γ signaling pathway

ZHAN Yun, LI Rui, LI Xiao-lin, HAN Yan-xing, JIANG Jian-dong*

(State Key Laboratory of Bioactive Substances and Function of Natural Medicine, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: In this study, the regulatory effects of chlorogenic acid (CGA) on the expression of programmed cell death ligand 1 (PD-L1) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), as well as the role of interferon γ (IFN- γ), has been discussed using both *in vitro* and *in vivo* animal models. ESCC murine model was established according to the standard operating procedures (SOP) of Animal Experiment Center of Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences. The expression of PD-L1 in esophageal tissues of murine models was analyzed using the microarray assay. Then, the results were verified by qRT-PCR, Western blot and immunohistochemistry (IHC) staining, the molecular mechanism was explored in KYSE180 and KYSE510 ESCC cells *in vitro*. The results showed that CGA could suppress the expression of PD-L1 in tumor tissues in murine models significantly, rather than the expression in KYSE180 and KYSE510 ESCC cells *in vitro*. However, after the pretreatment of IFN- γ , the expression of PD-L1 was significantly increased, then it was down-regulated by CGA in both dose- and time-dependent manner. Meanwhile, the expression of interferon regulatory factor 1 (IRF1), an upstream regulatory factor of PD-L1, was suppressed by CGA in both KYSE180 and KYSE510 pretreated with IFN- γ , which was

收稿日期: 2021-01-20; 修回日期: 2021-02-09.

基金项目: 国家科技重大专项“重大新药创制”项目 (2018ZX09711001-003-001); 协和青年基金资助项目 (3332015165).

*通讯作者 Tel: 86-10-63017906, E-mail: jiang.jdong@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0111

consistent with the expression of PD-L1. These results indicate that CGA down-regulates the expression of PD-L1 in ESCC via IFN- γ -IRF1 signaling pathway, providing the molecular theoretical basis for exploration of new treatment of ESCC.

Key words: chlorogenic acid; interferon- γ ; esophageal squamous cell carcinoma; programmed cell death ligand 1; interferon regulatory factor 1

食管癌是常见的消化道恶性肿瘤之一,分为鳞癌和腺癌。我国是食管鳞癌(以下简称食管癌)的高发地区,其发病率和死亡率居我国恶性肿瘤发病率和死亡率的第三位和第四位^[1]。由于食管解剖位置的隐蔽性,现有治疗手段局限,预后不佳^[2],开发寻找新的治疗药物和治疗方案是当务之急。程序性死亡受体-配体1(programmed cell death ligand 1, PD-L1)是程序性死亡受体1(programmed cell death 1, PD-1)的天然配体之一,通过PD-1/PD-L1通路激活,发挥负向调控T细胞活性的作用。在肿瘤中,肿瘤细胞通过表达PD-L1抑制T、B细胞的活化,实现免疫逃逸,是目前肿瘤治疗中的热门靶点^[3]。肿瘤细胞中的PD-L1可被肿瘤微环境中T细胞来源的细胞因子诱导表达,其中干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)是最有效的^[4]。绿原酸(chlorogenic acid, CGA)是从金银花和杜仲等中提取的小分子活性化合物,具有良好的抗肿瘤活性^[5]。作为一种天然植物药物,CGA对肿瘤细胞的抑制作用存在多种不同的分子机制。研究表明,CGA不仅能够作用于肿瘤细胞本身,还能够通过调节相关免疫细胞发挥抗肿瘤作用^[6]。本课题组前期已经证实CGA能够抑制食管癌细胞在体内、外的增殖和侵袭转移^[7]。为了进一步探索CGA抑制食管癌的分子机制,本课题组对小鼠食管癌组织进行了表达谱芯片检测,寻找CGA调控的潜在靶点。本研究选取差异表达基因之一的PD-L1,应用体内及体外食管癌模型,探讨了CGA对PD-L1的调控作用。

材料与方法

试剂 重组人源IFN- γ (PEPROTECH公司, 300-02)溶于无菌双蒸水中,配制成 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 储液储存,后用0.1% BSA稀释成 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的工作浓度;RPMI-1640培养基、0.25%胰酶、青链霉素和胎牛血清(fetal bovine serum)购自美国Gibco公司;RNA提取试剂盒(Rnease Mini Kit)购自美国QIAGEN公司;cDNA第一链合成试剂盒(High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, 4368813)及SYBR Green实时定量PCR试剂盒(PowerUp SYBR Green Master Mix, A25742)均购自美国Applied Biosystems公司;抗体干扰素调节因子1(interferon

regulatory factor 1, IRF1)(CST-8478)、 β -actin(CST-4970)购自美国Cell Signaling Technology公司;抗体PD-L1(ab205921)购自美国Abcam公司。

细胞培养及处理 KYSE180及KYSE510细胞来自东京大学Dr. Y. Shimada的馈赠,并已采用短串联重复序列(short-tandem repeats, STR)分析进行了细胞鉴定。采用含10%胎牛血清及1%青链霉素的RPMI-1640培养基进行细胞培养。分组:①不同浓度CGA($0, 25, 50, 100$ 和 $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)分别处理KYSE180及KYSE510细胞48 h后,检测PD-L1的表达情况;②IFN- γ ($10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)预处理细胞12 h,然后再用不同浓度CGA($0, 25, 50, 100$ 和 $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理细胞48 h后,检测PD-L1及IRF1的表达情况;③IFN- γ ($10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)预处理细胞12 h,然后再用CGA($50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理不同时间($0\sim 5$ 天),检测PD-L1的表达情况。

RNA提取及qRT-PCR检测 小鼠食管组织剪碎后,加入适量Trizol,用研磨仪研磨使组织全部溶于Trizol,然后用RNA提取试剂盒提取总RNA。取 $1\text{ }\mu\text{g}$ 总RNA进行逆转录合成cDNA,按照试剂盒说明书进行real-time PCR检测PD-L1的表达,以管家基因GAPDH的表达作为内参,并用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法来进行定量分析。GAPDH及PD-L1的引物序列如下:GAPDH:正向5'-CTCCCACTCTTCCACCTTCG-3',反向5'-TAGGGCC TCTCTTGCTCAGT-3';PD-L1:正向5'-GACGCCTCA CTTGCTCATTA-3',反向5'-CAGAGCTAATGGGCTC CTTC-3'。

Western blot法检测 提取组织或细胞内总蛋白,用BCA法测定蛋白浓度,取 $30\text{ }\mu\text{g}$ 总蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳,转膜,5%脱脂牛奶封闭非特异性抗原,分别加入一抗(均为 $1:1\ 000$ 稀释)于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜, TBST洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗($1:5\ 000$)室温孵育2 h, TBST洗膜后用电化学发光法(electro-chemi-luminescence, ECL)显色成像,得到蛋白免疫印记条带,以 β -actin蛋白条带作为参照。

动物实验及取材 本实验用动物均购自北京维通利华有限公司,动物实验均在中国医学科学院药物研究所动物实验中心完成,许可证号SYKX(京)2019-0023。动物实验遵循北京实验动物管理委员会的规定,并严

格按照中国医学科学院药物研究所动物实验中心标准操作规程 (SOP) 进行。本研究中共涉及两个不同的动物模型, 模型 1 为 4-硝基喹啉-*N*-氧化物 (4-nitroquinoline-*N*-oxide, 4-NQO) 诱导 C57 小鼠自发食管癌模型, 给予 6 周龄雄性 C57 小鼠 4-NQO ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 水溶液持续喂水 16 周, 从第 22 周开始给予 CGA ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) 或者同等体积生理盐水 (normal saline, NS) 腹腔注射, 6 周后处死小鼠取出食管组织进行检测; 模型 2 则是将 KYSE510 细胞制备成单细胞悬液, 注射至 NOD/SCID 小鼠皮下, 接种 10 天后, 开始给予 CGA ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) 或者同等体积 NS 腹腔注射, 连续给药 6 周, 每隔 3 天测量 1 次小鼠体重及肿瘤长、短径。实验结束后处死小鼠, 分离肿瘤组织进行检测。详细的动物实验模型建立方法参考本课题组之前的文章^[7]。

免疫组化 (immunohistochemistry, IHC) 将小鼠食管组织及皮下肿瘤组织经 4% 多聚甲醛固定后, 送武汉谷歌生物科技有限公司按照病理实验检测 SOP 程序进行修剪、脱水、包埋、切片、染色及封片, 对组织样品进行 PD-L1 (1:100) IHC 染色, 并将染色结果用 PANNORAMIC 全景切片扫描仪扫描保存, 用 Aperio ImageScope 软件 (美国 Aperio 公司) 对 IHC 结果进行定量分析。

统计学分析 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Graph-Pad Prism 6.0 软件绘制统计图, 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析, 两组间比较用独立样本 *t* 检验, 多组间比较

采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

结果

1 CGA 可下调经 4-NQO 诱导的小鼠食管癌组织中 PD-L1 的表达

本课题组前期已证实 CGA 能够减缓 4-NQO 诱导小鼠发生食管癌的速度, 并延长食管癌小鼠的生存期^[7]。对该模型中的小鼠食管组织进行表达谱芯片检测, 发现与正常小鼠相比, 经 4-NQO 诱导的食管癌小鼠食管组织中, PD-L1 的表达明显升高, 给予 CGA ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) 治疗后, PD-L1 的表达则有所下降 (图 1A), 提示 PD-L1 可能是 CGA 的潜在靶点之一。分别提取该模型中剩余小鼠食管组织的 RNA 和蛋白进行 qRT-PCR 和 Western blot 检测。结果显示, 在 RNA 水平, 正常小鼠食管组织中 PD-L1 的表达偏低, 给予 4-NQO 诱导的食管癌小鼠食管组织中 PD-L1 的表达显著增加, 接受 CGA 治疗的食管癌小鼠食管组织中 PD-L1 的表达出现明显回落 (图 1B)。在蛋白水平, Western blot 结果同样表明, 与对照组相比, 接受 CGA 治疗的食管癌小鼠食管组织中 PD-L1 的表达显著降低 (图 1C)。IHC 染色同样证实了该结果 (图 1D、E), 表明 CGA 能够从 mRNA 及蛋白水平降低 4-NQO 诱导的食管癌小鼠食管组织中 PD-L1 的表达。

2 CGA 对体外培养的细胞中 PD-L1 的表达没有影响

在 KYSE180 及 KYSE510 食管癌细胞的培养基中加入不同浓度的 CGA ($0 \sim 200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 48 h,

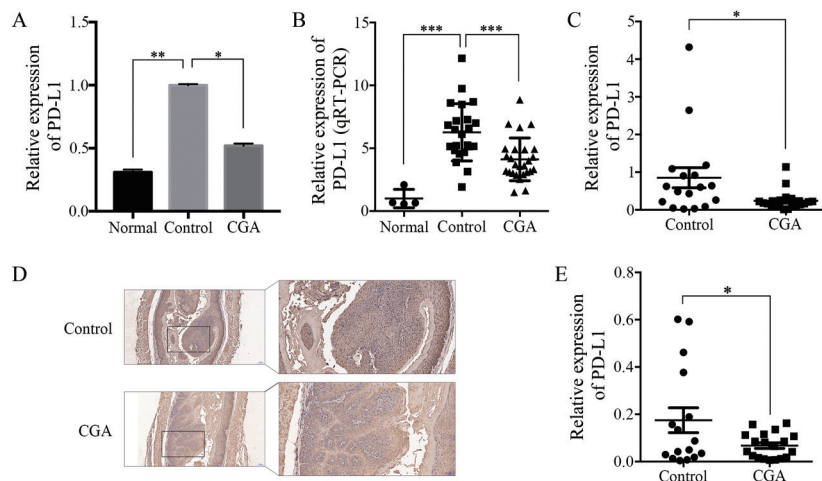


Figure 1 Down-regulation of programmed cell death ligand 1 (PD-L1) expression in 4-nitroquinoline-*N*-oxide (4-NQO) induced esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) murine model. A: Microarray analysis of the expression of PD-L1 in esophageal tissues of 4-NQO induced ESCC murine model; B: Expression of PD-L1 at mRNA level detected by qRT-PCR; C: Quantitative analysis of Western blot for detection of PD-L1 expression at protein level; D and E: Representative photos of acquired at 20 \times (left, scale bar = 100 μm) and 50 \times (right, scale bar = 50 μm), respectively (D) and quantitative analysis (E) of PD-L1 in esophagi by immunohistochemistry (IHC) staining. Normal: Healthy mice with no treatment; Control: 4-NQO induced ESCC mice, receiving normal saline (NS) daily by intraperitoneal injection; CGA: 4-NQO induced ESCC mice, receiving $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ CGA by intraperitoneal injection. $n = 20$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

收取细胞蛋白进行PD-L1的检测。与小鼠食管组织PD-L1的表达变化不同,即使使用较高浓度的CGA ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理, KYSE180及KYSE510细胞中PD-L1的表达未发生显著改变(图2)。本课题组在前期工作中已经证实中等浓度的CGA ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 能够有效抑制KYSE180及KYSE510细胞的增殖及侵袭转移,并且随着CGA浓度的增加,抑制效果越显著^[7],说明PD-L1表达量不改变并非因为CGA对KYSE180及KYSE510细胞无抑制作用。

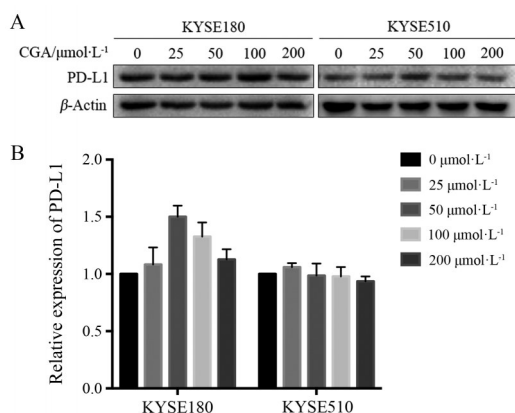


Figure 2 Detection of PD-L1 expression in KYSE180 and KYSE510 cells treated with different dose of CGA ($0\sim 200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) using Western blot assay. A: Expression of PD-L1 was confirmed by Western blot; B: The density scanning of Western blot

3 CGA 下调小鼠皮下肿瘤组织中 PD-L1 的表达

将KYSE510细胞注射至NOD/SCID小鼠皮下形成皮下移植瘤,然后给予CGA ($50 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) 治疗,观察皮下肿瘤的生长情况,发现CGA能抑制KYSE510细胞形成的皮下肿瘤的生长^[7]。将皮下肿瘤剥离出来进行IHC染色,发现对照组小鼠肿瘤组织中PD-L1的表达较高,CGA治疗组小鼠肿瘤组织中PD-L1的表达明显降低(图3),该结果与4-NQO诱导的食管癌小鼠食管组织中PD-L1的表达变化趋势相同,说明CGA能够下调食管癌体内动物模型组织中PD-L1的表达。

4 CGA 能够调节 IFN- γ 处理后的食管癌细胞中 PD-L1 的表达

研究表明,肿瘤细胞中PD-L1的表达受到其所处的肿瘤微环境中的各种免疫细胞及细胞因子的诱导和维持,其中以IFN- γ 的作用最为显著^[4]。与小鼠体内IFN- γ 的浓度相比,体外细胞培养基中IFN- γ 的浓度可以忽略不计,这可能是CGA下调KYSE510形成的皮下肿瘤中PD-L1的表达,却对体外培养的KYSE510细胞中的PD-L1无作用的原因。用IFN- γ ($10 \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 预处理KYSE180和KYSE510细胞12 h,然后加入CGA处

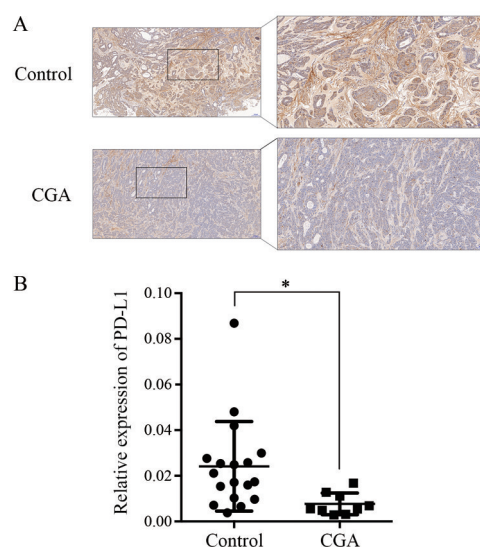


Figure 3 The expression of PD-L1 in transplanted tumor tissues by IHC staining. A: Representative photos of IHC staining acquired at $20\times$ (left, scale bar = $100 \mu\text{m}$) and $50\times$ (right, scale bar = $50 \mu\text{m}$), respectively; B: Quantitative analysis. KYSE510 cells was injected into NOD/SCID mice subcutaneously, after tumor formation, the mice received NS (control) or $50 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ CGA (CGA) by intraperitoneal injection for 6 weeks, then tumor tissues were extracted for the detection of PD-L1 expression. $n = 20, \bar{x} \pm s. *P < 0.05$

理,48 h后收取细胞蛋白进行Western blot检测。结果表明,KYSE180和KYSE510细胞中PD-L1的表达受IFN- γ 的诱导显著升高,在此基础上加入CGA ($0\sim 200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),细胞中PD-L1的表达水平降低,并且随着CGA浓度的增加,PD-L1受到的抑制作用越明显(图4A、B)。此外,用较低浓度的CGA ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理经过IFN- γ ($10 \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 预处理的KYSE180和KYSE510细胞,分别于处理后不同的时间点收取细胞蛋白进行检测,发现经过IFN- γ 预处理,KYSE180及KYSE510细胞中PD-L1的表达明显升高,加入CGA之后,随着CGA处理时间的延长,KYSE180及KYSE510细胞中PD-L1的表达逐渐减少(图4C、D),而在未经IFN- γ 预处理的KYSE180及KYSE510细胞中PD-L1的表达不受CGA的影响(图2),说明IFN- γ 是CGA对食管癌细胞中PD-L1发挥调控作用的一个关键因子。

5 CGA 通过抑制 IFN- γ 信号通路下调 PD-L1 的表达

研究表明,IFN- γ 通过上调IRF1的表达,从而诱导PD-L1在肿瘤细胞中的表达升高^[8]。用IFN- γ 预处理KYSE180和KYSE510细胞,然后加入不同浓度的CGA ($0\sim 200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理48 h,收取细胞蛋白检测IRF1的表达。结果表明,KYSE180及KYSE510细胞中IRF1的表达受IFN- γ 的诱导明显上调,PD-L1也随之升高,

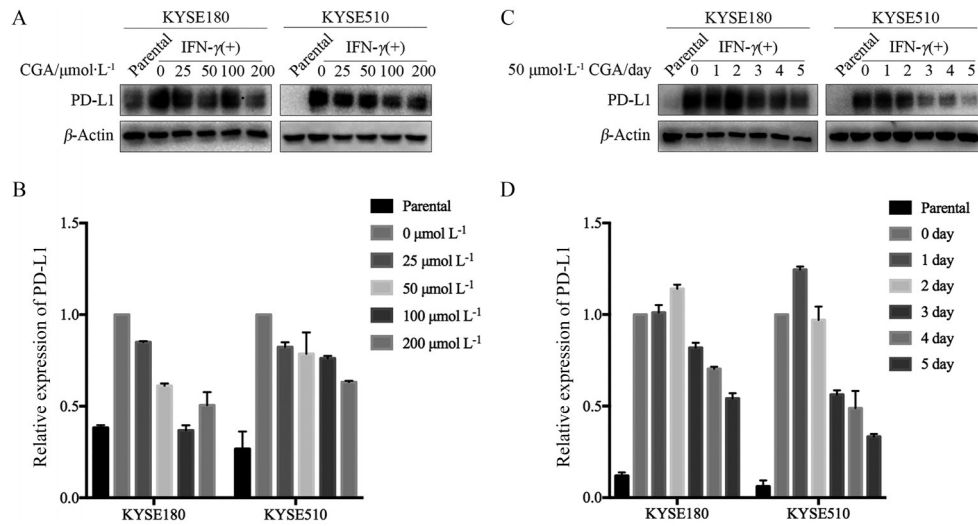


Figure 4 Protein expression levels of PD-L1 analyzed by Western blot. KYSE180 and KYSE510 cells were pretreated with IFN- γ (10 ng·mL⁻¹) for 12 h, then accepted with different concentrations of CGA (0~200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 48 h, or with 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CGA for different treating time. A, B: Western blot analysis of PD-L1 expression in KYSE180 and KYSE510 cells with different concentration of CGA (A) as well as the density scanning (B); C, D: Detection of PD-L1 expression in KYSE180 and KYSE510 cells treated with CGA for different days (C) and quantitative analysis (D)

加入不同浓度的 CGA (0~200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), IRF1 的表达受到抑制, 并且随着处理浓度的增加, CGA 对 IRF1 抑制作用越明显, PD-L1 的表达变化趋势与 IRF1 完全一致 (图 5), 说明 IFN- γ 通过上调 IRF1 的表达诱导食管癌细胞表达 PD-L1, CGA 则可以抑制这一通路, 进而抑制 PD-L1 的表达。

讨论

食管癌是我国常见的消化道肿瘤之一, 具有高发病率及高死亡率特征^[1]。尽管目前治疗手段呈现多样化, 但是, 对食管癌的疗效, 尤其是晚期食管癌疗效较差。因此, 人们一直在探索寻找食管癌治疗的新药物和新方法。CGA 作为一种潜在的抗癌药物, 已经被国家食品药品监督管理局 (China Food and Drug Administration, CFDA) 批准用于脑胶质瘤患者的 I 期 (NCT02728349, 2016 年 4 月) 和 II 期 (NCT03758017, 2018 年 11 月) 临床试验。尽管大量研究报道了 CGA 具有抗肿瘤的作用, 但是其分子作用机制呈现多样化^[9]。本课题组前期已经证实 CGA 能够抑制食管癌细胞在体内、外的生长和转移^[7]。在此基础上, 本课题组对 4-NQO 诱导的食管癌小鼠食管组织进行了差异基因的检测, 从中探索 CGA 抑制食管癌的不同作用靶点和分子机制。

PD-L1 是诱导肿瘤细胞发生免疫逃逸的关键分子之一。一方面, 肿瘤细胞中的癌基因可以调节 PD-L1 的持续表达, 诱使肿瘤细胞发生初始免疫抵抗, 另一方

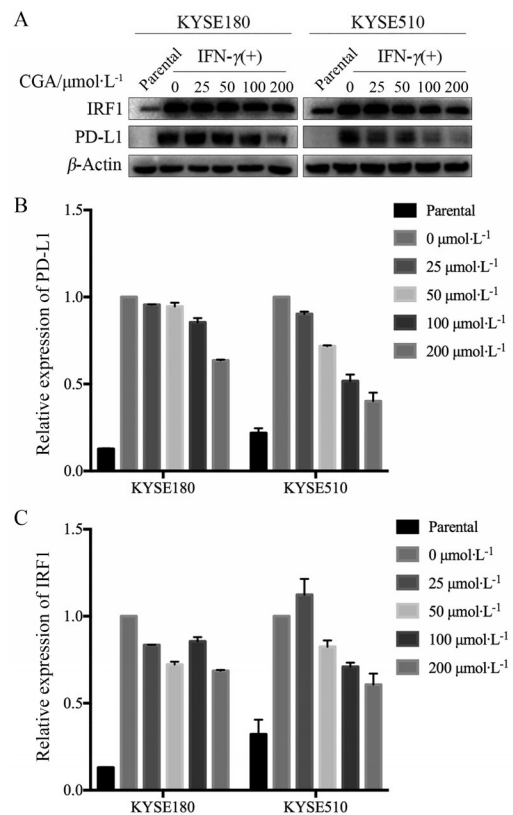


Figure 5 Effects of different concentration of CGA (0~200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on protein expression levels of both interferon regulatory factor 1 (IRF1) and PD-L1 in KYSE180 and KYSE510 cells pretreated with IFN- γ (10 ng·mL⁻¹) for 12 h. A: Western blot analysis of both the expression of IRF1 and PD-L1; B, C: Quantitative analysis of Western blot of the expression PD-L1 (B) and IRF1 (C)

面肿瘤微环境中的细胞及多种炎症因子能够进一步刺激肿瘤细胞表达 PD-L1, 诱导肿瘤细胞发生适应性免疫抵抗^[10]。针对临床肿瘤组织标本的多项研究报道, PD-L1 基因的拷贝数在多种不同类型的肿瘤中呈现显著扩增, 而且其表达受到多条癌基因相关信号通路的激活调控^[11]。另外, PD-L1 的表达高低也与临床肿瘤患者的预后呈负相关^[12]。本课题组在前期已经证实, CGA 能够有效延长食管癌小鼠的生存期^[7], 在本研究中, 通过对同一模型小鼠食管组织中 PD-L1 表达的检测, 发现与正常小鼠相比, 食管癌小鼠食管组织中 PD-L1 的表达明显升高, 在接受一段时间 CGA 治疗后, PD-L1 的表达水平显著下降, 提示 PD-L1 在食管癌小鼠组织中的表达与小鼠的生存期相关, 这一结果与 PD-L1 在其他肿瘤中的变化趋势一致, 提示 PD-L1 可能是 CGA 抑制食管癌的分子靶点之一。

IFN- γ 是一种主要由 CD4⁺/CD8⁺ 淋巴细胞和自然杀伤细胞分泌的 II 型干扰素。早期研究表明, IFN- γ 可以激活初始免疫应答发挥抗肿瘤活性, 通过抑制增殖及转移、促进细胞凋亡和抗血管生成等作用方式用于临床肿瘤治疗^[13-16]。然而, 随着研究的深入, 越来越多的研究报道显示 IFN- γ 能够增加肿瘤微环境中调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Tregs) 和髓源性抑制细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSC) 等免疫抑制细胞的数量, 从而促进肿瘤发展^[17,18], 说明 IFN- γ 在肿瘤发生发展过程中发挥了双面作用。近期的报道显示, IFN- γ 能够上调多种肿瘤细胞中 PD-L1 的表达, 通过与活化的 CD8⁺ T 细胞表面表达的 PD-1 受体结合诱导 T 细胞凋亡, 促使肿瘤细胞发生免疫逃逸^[10,19]。在本研究中, KYSE180 和 KYSE510 细胞经 IFN- γ 诱导后, 细胞内 PD-L1 的表达水平显著增加, 提示 IFN- γ 对 PD-L1 的诱导表达同样适用于食管癌。而 CGA 则以 IFN- γ 依赖的方式下调食管癌细胞中 PD-L1 的表达, 这也是 CGA 能够抑制 KYSE510 细胞形成的皮下肿瘤组织中 PD-L1 的表达, 但对体外培养的 KYSE510 细胞中 PD-L1 的表达无明显抑制作用的原因。

研究表明, IFN- γ 可以通过多种方式上调 PD-L1 的表达。在 PD-L1 的启动子区域存在多个 IFN- γ 的结合元件, 可以直接调节 PD-L1 的转录^[20], 同时 IFN- γ 可以通过 JAK/STAT 和 PI3K/AKT 等多条信号通路激活下游转录因子——IRF, 间接上调 PD-L1 的表达^[8,21,22]。本研究选择 IRF 家族成员之一 IRF1 作为研究对象, 探讨 CGA 及 IFN- γ 对食管癌中 PD-L1 的表达调控作用。与文献报道的结果类似, IFN- γ 能够诱导 KYSE180 和 KYSE510 细胞上调 IRF1 的表达, 这一作用受到了 CGA 的抑制, 随着 CGA 浓度的增加, 抑制效果越明

显。IRF1 在食管癌细胞中的变化趋势与 PD-L1 一致, 说明 CGA 能够通过下调 IRF1 抑制 IFN- γ 诱导的 PD-L1 表达, 但具体的调控机制还有待进一步的探索。

以抗 PD-1/抗 PD-L1 单抗为主的 PD-1/PD-L1 免疫检查点抑制剂治疗是目前热门的肿瘤治疗手段之一, 在临床肿瘤治疗中展现出不错的疗效, 应用前景广泛, 然而, PD-1/PD-L1 抑制剂治疗有效的患者在接受一段时间的治疗后, 大部分还是会不可避免地发生耐药。有研究表明, 在所有高表达 PD-L1 的肿瘤患者中, 60% 的患者表现出了治疗耐药性, 提示需要更有效的单一药物以及与放、化疗等多种治疗方法联合发挥作用, 从而不断提高肿瘤的治疗效果^[23]。在临床食管癌的治疗中, PD-1/PD-L1 抑制剂参与一线、二线治疗、新辅助放化疗、根治性放化疗等均有多项研究在开展, 其与化疗、放疗、抗血管生成治疗的联合治疗也受到了广泛关注^[24]。本研究证实, CGA 能以 IFN- γ 依赖的方式下调食管癌中 PD-L1 的表达, 为探索食管癌治疗中 PD-1/PD-L1 抑制剂的使用, 以及与其他药物的联用提供了分子理论基础。

作者贡献: 詹芸负责实验设计、实验的操作及论文初稿撰写; 李瑞负责细胞学实验; 李晓琳负责动物体内实验; 韩燕星负责课题设计及指导; 蒋建东负责课题指导和把关及终稿审查。

利益冲突: 所有作者均不存在利益冲突。

References

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66: 115-132.
- [2] Taylor PR, Abnet CC, Dawsey SM. Squamous dysplasia--the precursor lesion for esophageal squamous cell carcinoma [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2013, 22: 540-552.
- [3] Zou W, Wolchok JD, Chen L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: mechanisms, response biomarkers, and combinations [J]. Sci Transl Med, 2016, 8: 328rv324.
- [4] Wei Y, Zhao Q, Gao Z, et al. The local immune landscape determines tumor PD-L1 heterogeneity and sensitivity to therapy [J]. J Clin Invest, 2019, 129: 3347-3360.
- [5] Huang S, Wang LL, Xue NN, et al. Chlorogenic acid effectively treats cancers through induction of cancer cell differentiation [J]. Theranostics, 2019, 9: 6745-6763.
- [6] Xue N, Zhou Q, Ji M, et al. Chlorogenic acid inhibits glioblastoma growth through repolarizing macrophage from M2 to M1 phenotype [J]. Sci Rep, 2017, 7: 39011.
- [7] Zhan Y, Li R, Feng C, et al. Chlorogenic acid inhibits esophageal squamous cell carcinoma growth *in vitro* and *in vivo* by downregulating the expression of BMI1 and SOX2 [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 121: 109602.

- [8] Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH, et al. Interferon receptor signaling pathways regulating PD-L1 and PD-L2 expression [J]. *Cell Rep*, 2017, 19: 1189-1201.
- [9] Wang QH, Du TT, Zhang ZH, et al. Advances in research on the pharmacological effects and mechanism of action of chlorogenic acid [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 2273-2280.
- [10] Zhang X, Zeng Y, Qu Q, et al. PD-L1 induced by IFN-gamma from tumor-associated macrophages *via* the JAK/STAT3 and PI3K/AKT signaling pathways promoted progression of lung cancer [J]. *Int J Clin Oncol*, 2017, 22: 1026-1033.
- [11] Zerdas I, Matikas A, Bergh J, et al. Genetic, transcriptional and post-translational regulation of the programmed death protein ligand 1 in cancer: biology and clinical correlations [J]. *Oncogene*, 2018, 37: 4639-4661.
- [12] Gu L, Chen M, Guo D, et al. PD-L1 and gastric cancer prognosis: a systematic review and meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2017, 12: e0182692.
- [13] Aune TM, Pogue SL. Inhibition of tumor cell growth by interferon-gamma is mediated by two distinct mechanisms dependent upon oxygen tension: induction of tryptophan degradation and depletion of intracellular nicotinamide adenine dinucleotide [J]. *J Clin Invest*, 1989, 84: 863-875.
- [14] Addison CL, Arenberg DA, Morris SB, et al. The CXC chemokine, monokine induced by interferon-gamma, inhibits non-small cell lung carcinoma tumor growth and metastasis [J]. *Hum Gene Ther*, 2000, 11: 247-261.
- [15] Fukui T, Matsui K, Kato H, et al. Significance of apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha and/or interferon-gamma against human gastric cancer cell lines and the role of the p53 gene [J]. *Surg Today*, 2003, 33: 847-853.
- [16] Ribatti D, Nico B, Pezzolo A, et al. Angiogenesis in a human neuroblastoma xenograft model: mechanisms and inhibition by tumour-derived interferon-gamma [J]. *Br J Cancer*, 2006, 94: 1845-1852.
- [17] Katz JB, Muller AJ, Prendergast GC. Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape [J]. *Immunol Rev*, 2008, 222: 206-221.
- [18] Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer [J]. *J Immunol*, 2009, 182: 4499-4506.
- [19] Mandai M, Hamanishi J, Abiko K, et al. Dual faces of IFN-gamma in cancer progression: a role of PD-L1 induction in the determination of pro- and antitumor immunity [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22: 2329-2334.
- [20] Barach YS, Lee JS, Zang X. T cell coinhibition in prostate cancer: new immune evasion pathways and emerging therapeutics [J]. *Trends Mol Med*, 2011, 17: 47-55.
- [21] Schalper KA. PD-L1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes: revisiting the antitumor immune response potential in breast cancer [J]. *Oncoimmunology*, 2014, 3: e29288.
- [22] McInnes RR. 2014 Victor A. McKusick Leadership Award introduction: David Valle [J]. *Am J Hum Genet*, 2015, 96: 372-373.
- [23] Wu J, Lv JY, Lan Y, et al. Advances in tumor immunotherapy [J]. *Chin J Cell Mol Immunol (细胞与分子免疫学杂志)*, 2019, 35: 659-664.
- [24] Wu PY. Advances in immunotherapy for esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Chin J Cancer Biother (中国肿瘤生物治疗杂志)*, 2020, 27: 1043-1049.