

IFN- γ 激活 ERK/Jak2-STAT 信号通路诱导乳腺癌细胞过表达 PD-L1 和上皮-间质转化

严玉荣, 赵晨辰, 杨睿, 周婷, 许娜

武汉科技大学 生命科学与健康学院, 湖北 武汉 430065

严玉荣, 赵晨辰, 杨睿, 等. IFN- γ 激活 ERK/Jak2-STAT 信号通路诱导乳腺癌细胞过表达 PD-L1 和上皮-间质转化. 生物工程学报, 2018, 34(12): 2007–2015.

Yan YR, Zhao CC, Yang R, et al. IFN- γ induces overexpression of PD-L1 and epithelial-mesenchymal transformation of breast cancer cells through activating ERK/Jak2-STAT signaling pathways. Chin J Biotech, 2018, 34(12): 2007–2015.

摘 要: 旨在探讨 IFN- γ 诱导乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 表面程序性死亡配体 (PD-L1) 的表达、对上皮间质转化的影响及其分子机制。用不同浓度 IFN- γ 作用 MDA-MB-231 细胞后, 利用蛋白质免疫印迹检测 PD-L1、细胞迁移相关蛋白 (E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白、波形蛋白)、ERK、p-ERK、Jak2 及 p-Jak2 的表达水平; 通过细胞划痕实验和 Transwell 实验检测细胞迁移能力; 利用免疫荧光实验进一步检测细胞迁移相关蛋白的表达量。结果表明, IFN- γ 可上调 PD-L1 的表达, 使细胞划痕融合率显著增高, 细胞迁移速率显著加快; 波形蛋白和 N-钙黏蛋白的表达量升高, E-钙黏蛋白表达量下降; ERK、p-ERK、Jak2 及 p-Jak2 表达水平显著增加。加 U0126 后 PD-L1、ERK 及 p-ERK 表达水平下降, 而加入 AG490 后, PD-L1、Jak2、p-Jak2 表达水平下降。结果表明 IFN- γ 能上调乳腺癌细胞 PD-L1 表达水平, 促进肿瘤细胞迁移, 促使细胞从上皮向间质转化, 而这一过程可能与 ERK 及 Jak2-STAT 信号通路相关。

关键词: IFN- γ , 乳腺癌, PD-L1, 上皮-间质转化, ERK, Jak2

IFN- γ induces overexpression of PD-L1 and epithelial-mesenchymal transformation of breast cancer cells through activating ERK/Jak2-STAT signaling pathways

Yurong Yan, Chenchen Zhao, Rui Yang, Ting Zhou, and Na Xu

School of Life Sciences and Health, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, Hubei, China

Abstract: To investigate the effect of IFN- γ on the expression of programmed death ligand 1 (PD-L1), epithelial-mesenchymal transition (EMT) and the potential mechanism in breast cancer cell line MDA-MB-231, the cells were treated with different concentrations of IFN- γ . The expressions of proteins, including PD-L1, cell-migration-related proteins

Received: February 25, 2018; **Accepted:** July 9, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31700824).

Corresponding author: Na Xu. E-mail: naxu@wust.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31700824) 资助。

(E-cadherin, N-cadherin and vimentin), ERK, p-ERK, Jak2, and p-Jak2 were detected by Western blotting analysis and immunofluorescent staining assay. Cell migration was studied through cell wound healing assay and transwell assay. IFN- γ could up-regulate the expressions of PD-L1 in MDA-MB-231 cells. The cell migration rate was significantly increased after adding IFN- γ . The expression levels of vimentin and N-cadherin were increased whereas the expression of E-cadherin was decreased after adding IFN- γ . The expression levels of ERK, p-ERK, Jak2 and p-Jak2 were significantly increased and this phenomenon was inhibited when adding ERK inhibitor U0126 or Jak2 inhibitor AG490. These results demonstrate that IFN- γ could up-regulate the expression of PD-L1, promote cell migration and transmission, and facilitate epithelial-mesenchymal transformation of breast cancer cells and this process may be related with ERK and Jak2-STAT signaling pathways.

Keywords: IFN- γ , breast cancer, PD-L1, epithelial-mesenchymal transition, ERK, Jak2

乳腺癌是全世界女性中最常见的恶性肿瘤之一, 全球每年约有 120 万人被确诊为乳腺癌, 高达 50 万人死于乳腺癌^[1]。其中乳腺癌细胞的转移以及肿瘤复发是导致患者死亡的一个主要原因, 所以探讨乳腺癌转移的相关机制对于治疗乳腺癌具有十分重要的意义。

干扰素- γ (Interferon- γ , IFN- γ) 是一种多效应的细胞因子, 能够参与体内获得性免疫和固有免疫应答, 在多种肿瘤中发挥抗肿瘤作用^[2-5]。但同时也有研究发现, 在某些情况下 IFN- γ 对肿瘤的发生发展具有促进作用^[6-7]。

程序性死亡配体-1 (Programmed cell death ligand 1, PD-L1) 是由 290 个氨基酸亚基组成的跨膜分子, 属于 B7 家族的成员。主要表达于成熟的免疫细胞和膜细胞表面, 且在多种肿瘤细胞表面高表达^[8-9], 而 PD-L1 的高表达被证明与肿瘤转移有关^[10-11]。

上皮-间质转化 (Epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是癌症转移早期的关键步骤之一。在 EMT 的生理病理过程中, 上皮细胞与周围间充质细胞发生相互作用, 并获得一定的间质表型, 包括形态学、极性、表面标记和相关转录因子的变化^[12-14]。一旦癌细胞获得间充质表型, 它们就能够迁移到基质和器官, 最终导致肿瘤转移和复发^[15-16]。

已有研究表明基底样乳腺癌细胞系的 MDA-MB-231 在 IFN- γ 的诱导下 PD-L1 的表达上

调^[17], Sun 等在最新的研究中发现, IFN- γ 可以通过转化生长因子 β_1 (Transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) 激活的相关途径导致奶牛乳腺上皮细胞的恶性转化^[18], 而 IFN- γ 诱导的乳腺癌细胞高表达的 PD-L1 与乳腺癌细胞上皮间质转化的机制尚不明确。因此本研究旨在检测 IFN- γ 诱导的乳腺癌细胞表面 PD-L1 的表达和乳腺癌细胞上皮间质转化所涉及到的相关信号通路之间的关系, 为乳腺癌的治疗提供方向。

1 材料与方法

1.1 主要材料

MDA-MB-231 细胞株购于上海细胞库。DMEM 培养基 (Hyclone, 美国); 胎牛血清 (Ginimi, 美国); IFN- γ (Recombinant Human Interferon- γ , Gibco 公司); 胰蛋白酶 (Biosharp, 中国); RIPA 裂解液、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、蛋白 Marker (Thermo scientific, 中国); PMSF (Amresco, 美国); Western 及 IP 细胞裂解液 (碧云天, 中国); BCA 试剂盒 (碧云天, 中国); Jak2、p-Jak2、ERK、p-ERK、PD-L1 单克隆抗体、N-钙黏蛋白 (N-cadherin) 单克隆抗体、波形蛋白 (Vimentin) 和 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 单克隆抗体 (Cell Signaling Technology, 美国); CY3 标记的波形蛋白二抗和 FITC 标记的 E-钙黏蛋白二抗 (BOSTER, 美国); PVDF 膜 (Bio-Rad, 美国); AG490 (Selleck, 美国); U0126 (Sigma, 美国);

transwell 小室 (Corning, 美国)。倒置荧光显微镜 (Olympus, 日本); 多功能酶标仪 (Molecular Devices, 美国); 电泳仪、凝胶成像系统 (Bio-Rad, 美国); 细胞培养箱 (ASTEC, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组与处理

将 MDA-MB-231 细胞接种至 6 孔板, 待细胞长至 70%–80% 时, 弃去原有培养基, 加入新培养基, 用 IFN- γ 处理培养基使 IFN- γ 在培养基的浓度分别为 0 (NC 组)、1、10、50 ng/mL, 培养 48 h。

1.2.2 PD-L1 过表达

按照实验 1.2.1 分组处理细胞, 收集各组细胞, 用 RIPA 裂解细胞后, 提取总蛋白。通过 BCA 试剂盒测定各组蛋白浓度, 加入 1:1 000 稀释的一抗 PD-L1 单克隆抗体, 4 °C 过夜, TBST 缓冲液洗膜 (5 min \times 3 次), 加 1:2 000 稀释的兔二抗, 室温摇床孵育 2 h, TBST 缓冲液洗膜 (5 min \times 3 次), 扫膜成像, 检测各组细胞中 PD-L1 的表达量。

1.2.3 细胞划痕实验

将 MDA-MB-231 细胞接种至 6 孔板, 待细胞长至 70%–80% 时, 用 20 μ L 的枪头划一条直线, PBS 清洗细胞, 加入 2 mL 含 10% 胎牛血清的培养基, 用 IFN- γ 处理使 IFN- γ 在培养基中的浓度分别为 0、1、10、50 ng/mL, 在显微镜下分别拍摄加入 IFN- γ 后培养 0、24、48 h 细胞划痕宽度。该实验重复 3 次。

1.2.4 Transwell 实验

将长至 70%–80% 的 MDA-MB-231 细胞消化下来, 制成单细胞悬液, 按每孔 5×10^5 个细胞重悬于 200 μ L 含 1% 胎牛血清培养基中, 并分别加入 IFN- γ (使 IFN- γ 在培养基的浓度分别为 0、1、10、50 ng/mL), 将此培养基加入到上室, 下室加含 10% 胎牛血清的培养基 600 μ L, 培养 24 h。取出小室, 用棉签将上室内细胞擦去, 用 4% 多聚

甲醛固定 10 min, 0.1% 结晶紫染色 15 min, PBS 洗 3 次, 显微镜拍照。染色细胞用 10% 醋酸溶解, 酶标仪测 570 nm 处吸光度。

1.2.5 蛋白免疫印迹法

按照实验 1.2.1 分组处理细胞, 根据实验 1.2.2 的方法检测 N-钙粘蛋白、波形蛋白和 E-钙粘蛋白的表达量。

1.2.6 免疫荧光实验

按照实验 1.2.1 分组处理细胞后, 弃原培养基, PBS 洗一遍, 4% 多聚甲醛固定 10 min; PBS 洗一遍, 0.1% Triton 通透 10 min, PBS 洗一遍。5% BSA 封闭 10 min; PBS 洗一遍, 加 1:200 稀释的一抗波形蛋白和 E-钙黏蛋白单克隆抗体, 室温孵育 1.5 h, PBS 洗一遍, 加 1:200 稀释的 CY3 标记的波形蛋白二抗和 FITC 标记的 E-钙黏蛋白二抗孵育 20 min, 弃掉二抗, PBS 洗一遍, 加 DAPI 染色 10 min, 荧光显微镜拍照。

1.2.7 信号通路

按照实验 1.2.1 分组处理细胞 48 h 后, 根据实验 1.2.2 的方法检测 ERK、p-ERK、Jak2 及 p-Jak2 表达量。将单细胞悬液接种至 6 孔板分为 NC 组、IFN- γ 组 (10 ng/mL)、U0126 组 (20 μ mol/L, 1 h)、AG490 组 (100 μ mol/L, 24 h) 培养 48 h, 然后收集蛋白, 根据实验 1.2.2 的方法检测各组细胞中 ERK、p-ERK、Jak2、p-Jak2 及 PD-L1 表达量。

1.2.8 统计学分析

蛋白质印记成像和细胞划痕宽度均用 ImageJ 软件分析, 所有图像均采用 Origin8.0 软件分析, 统计数据以平均值 \pm 方差的形式表示。采用 *t* 检验方法进行组间比较, $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 IFN- γ 诱导 MDA-MB-231 细胞过表达 PD-L1

与未加 IFN- γ 的对照组比较, 用不同浓度的 IFN- γ 处理细胞后, 随着 IFN- γ 浓度的增加, PD-L1

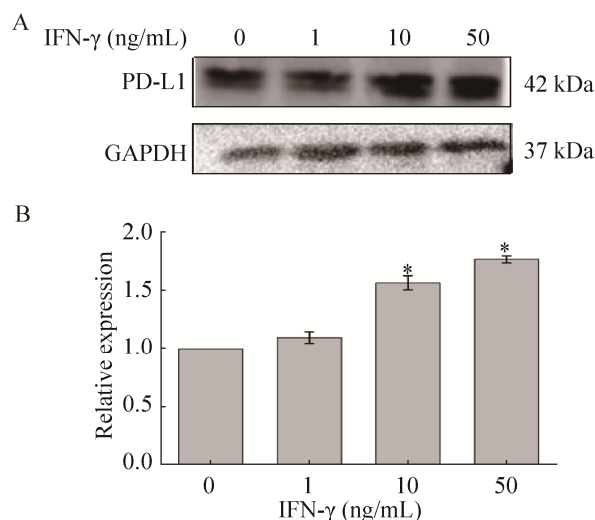


图1 IFN- γ 诱导 PD-L1 在 MDA-MB-231 细胞系中的表达

Fig. 1 IFN- γ induced PD-L1 expression in MDA-MB-231 cell line. (A) Western blotting images of PD-L1 expression. (B) The relative expression levels of PD-L1 compared to GAPDH. * $P < 0.05$.

的蛋白表达量逐渐上升 ($P < 0.05$), 这表明 IFN- γ 能诱导 MDA-MB-231 细胞过表达 PD-L1 (图 1)。

2.2 IFN- γ 促进 MDA-MB-231 细胞迁移

通过细胞划痕实验检测 PD-L1 过表达对 MDA-MB-231 细胞迁移的影响 (图 2)。在 IFN- γ 刺激 48 h 后, 与对照组 NC 相比, PD-L1 过表达组 (IFN- γ 处理组) 的细胞迁移能力显著增强, 50 ng/mL IFN- γ 处理组细胞划痕宽度仅剩余约 20%, 而对照组 NC 的宽度剩余约 70%。

Transwell 迁移实验结果 (图 3) 显示 IFN- γ 显著增强 MDA-MB-231 细胞穿过小室的能力, 而且该效应呈浓度依赖性。与 NC 组相比, 1、10、50 ng/mL IFN- γ 处理后, MDA-MB-231 细胞迁移的能力分别增加约 2 倍 ($P < 0.05$)、3 倍 ($P < 0.01$)、6 倍 ($P < 0.01$)。

细胞划痕实验和 Transwell 实验均表明 IFN- γ 诱导 MDA-MB-231 细胞过表达的 PD-L1 能够显著提高细胞的迁移能力。

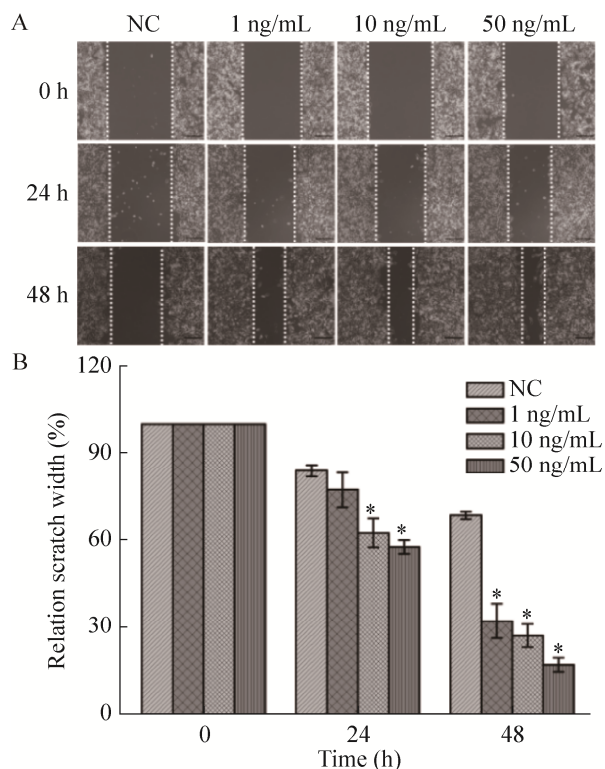


图2 细胞划痕实验结果表明 IFN- γ 促进细胞迁移

Fig. 2 Cell wound healing assay indicated that IFN- γ promotes cell migration. (A) Wound healing images of MDA-MB-231 cells after IFN- γ treatment. Scale bar=200 μ m. (B) Statistical analysis of wound healing degree. * $P < 0.05$.

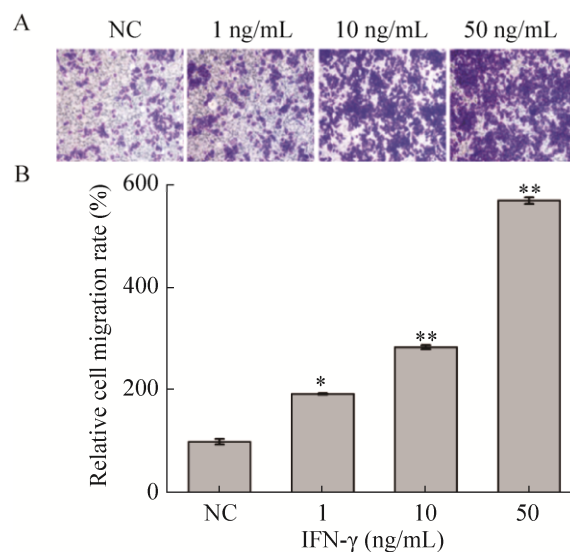


图3 Transwell 实验结果表明 IFN- γ 促进细胞迁移

Fig. 3 Transwell assay indicated that IFN- γ promotes cell migration. (A) Images of cell migration after IFN- γ treatment. (scale bar=200 μ m). (B) Statistical analysis of wound healing degree. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

2.3 IFN- γ 促进 MDA-MB-231 细胞的上皮-间质转化

蛋白免疫印迹实验结果 (图 4) 显示, 与 NC 组相比, 用 50 ng/mL 的 IFN- γ 处理组中, E-钙粘蛋白表达量下调最多, 约降低了 60% ($P<0.05$), 波形蛋白表达量上调约 1.6 倍 ($P<0.05$); 10 ng/mL 的 IFN- γ 处理细胞后的 N-钙粘蛋白表达量上调最多, 约 1.7 倍 ($P<0.05$)。这表明 IFN- γ 诱导乳腺癌细胞由上皮样向间质样转化。

免疫荧光实验结果 (图 5) 显示, 与 NC 组相比, 用不同浓度的 IFN- γ 处理细胞后, E-钙粘蛋白的荧光强度随药物作用浓度以及作用时间的增加而降低; 而波形蛋白随药物作用浓度以及作用时间的增加而升高。进一步表明 IFN- γ 诱导乳腺癌细胞由上皮样向间质样转化。

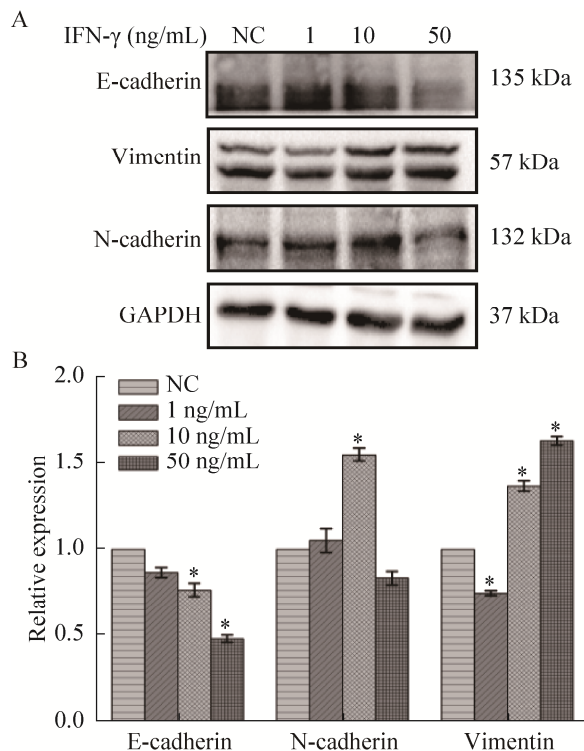


图 4 IFN- γ 处理后, 细胞迁移相关蛋白的表达图

Fig. 4 Expressions of cell-migration-related proteins after IFN- γ treatment. (A) Western blotting analysis of E-cadherin, N-cadherin and vimentin expression. (B) Quantitative analysis of proteins. * $P<0.05$.

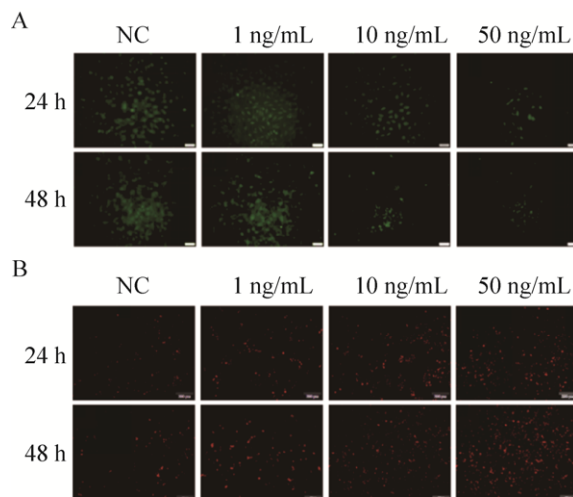


图 5 IFN- γ 处理后细胞迁移相关蛋白的免疫荧光染色图

Fig. 5 Immunofluorescent images of cell-migration-related proteins after IFN- γ treatment. (A) Fluorescent images of E-cadherin. (B) Fluorescent images of vimentin. Scale bar: 200 μ m.

2.4 IFN- γ 诱导 PD-L1 表达和细胞迁移的分子机制

蛋白质印记实验表明在乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中, ERK、Jak2、p-ERK 及 p-Jak2 表达量随着 IFN- γ 作用浓度的升高而上调 (图 6A)。与对照组相比, IFN- γ 浓度为 50 ng/mL 时, ERK 的表达量上调约 1.8 倍 ($P<0.05$), p-ERK 的表达量上调约 2.5 倍 ($P<0.01$), Jak2 及 p-Jak2 蛋白表达量均上调约 2 倍 ($P<0.01$)。根据实验结果选取 IFN- γ 浓度为 10 ng/mL 进行信号通路相关抑制剂实验。加入抑制剂 U0126 (ERK 抑制剂) 和 AG490 (Jak2 抑制剂) 后能显著抑制这 4 种蛋白及 PD-L1 的表达 (图 6C), 表明 IFN- γ 诱导的乳腺癌细胞 PD-L1 的上调可能是通过激活 ERK 及 Jak2 信号通路来调节, 并且 ERK 抑制剂同时抑制了 Jak2 及其磷酸化的表达, 而 Jak2 抑制剂也同时降低了 ERK 及其磷酸化的表达, 说明 IFN- γ 诱导的乳腺癌细胞 PD-L1 的上调可能是通过 ERK/Jak2-STAT 信号通路共同调节。

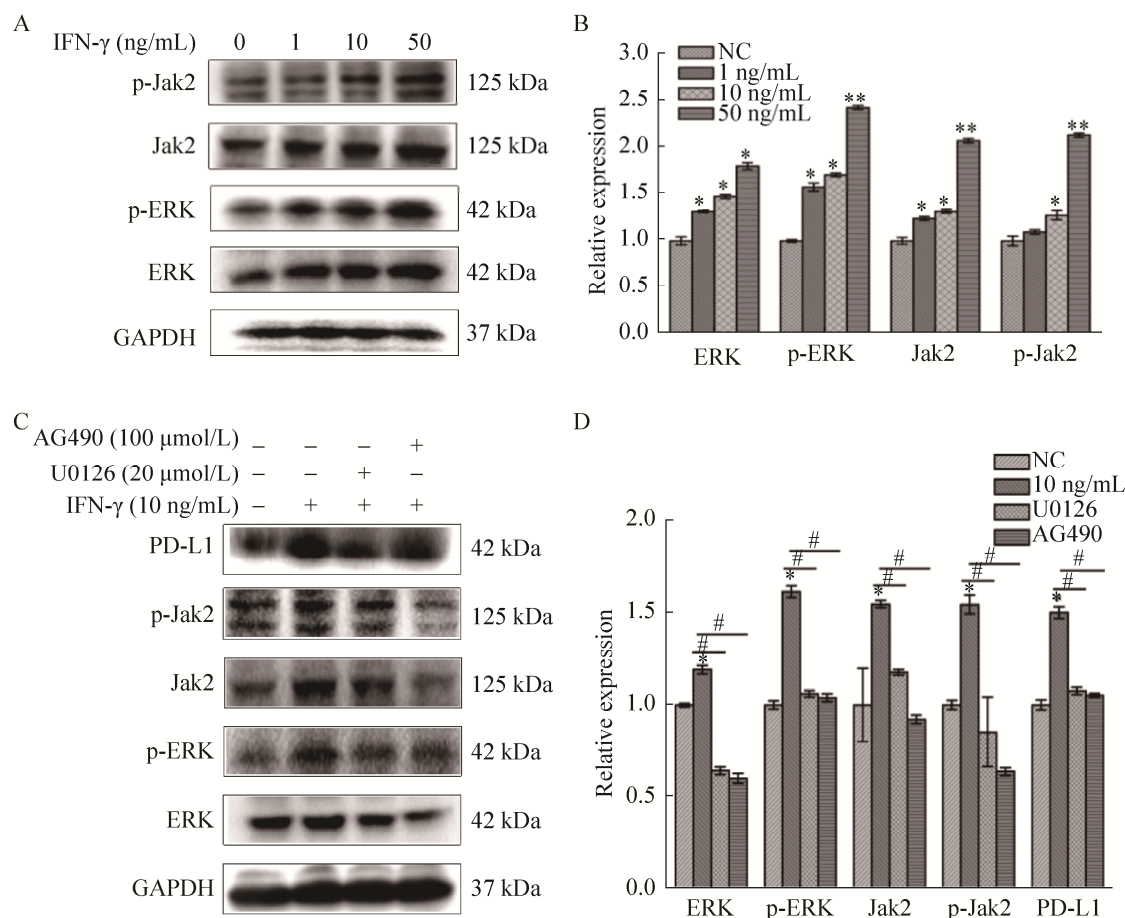


图6 IFN- γ 通过 ERK/Jak2-STAT 途径诱导 MDA-MB-231 细胞中的 PD-L1 表达

Fig. 6 IFN- γ induced PD-L1 expression in MDA-MB-231 cell line via ERK/Jak2-STAT pathway. (A) Western blotting analysis of ERK, p-ERK, Jak2, and p-Jak2 protein expressions. (B) Quantitative analysis of (A). (C) Western blotting images after adding inhibitors AG490 or U0126. (D) Quantitative analysis of (C) (*and ** means $P < 0.05$ and $P < 0.01$ relative to NC, respectively. # means $P < 0.05$ relative to NC 10 ng/mL IFN-8 treatment group).

3 讨论

乳腺癌是一种严重威胁女性生命健康的恶性肿瘤之一，其发病率居于女性恶性肿瘤之首^[19]，乳腺癌的浸润和转移是影响患者生存的主要原因。抑制乳腺癌细胞的增殖与转移并诱导乳腺癌细胞的凋亡是当前乳腺癌研究的热点之一^[20]。MDA-MB-231 细胞是三阴性高转移的人乳腺癌细胞系，该类乳腺癌更易复发和转移^[21]。PD-L1 抑制剂是肿瘤免疫治疗的关键药物之一，通过 PD-1/PD-L1 途径抑制 T 细胞的活化致使肿瘤免

疫耐受，因此阻断这一信号通路成为目前研究的热点。

干扰素是一类具有多种生物学活性的蛋白质，可分为 3 大类：I 型、II 型和 III 型干扰素。IFN- γ 是 II 型干扰素家族中的成员，具有广泛的免疫调节作用。并且 IFN- γ 在肿瘤中的免疫作用是通过激活免疫细胞如树突状细胞、自然杀伤细胞以及细胞毒性 T 淋巴细胞等细胞直接杀伤肿瘤细胞，或者通过增强抗原提呈作用以及调节细胞代谢等间接地抑制肿瘤的进展^[22]。但同时也有诸多报道 IFN- γ 对肿瘤的发生发展具有促进作用^[6-7]，

在本研究中通过使用不同浓度 IFN- γ 刺激乳腺癌细胞,观察到乳腺癌细胞的迁移速度明显加快。

PD-L1 (B7-H1),也称为 CD274,由 CD274 基因编码,属于 B7 家族的成员。它通过与在 T 细胞上表达的受体 PD-1 相互作用负性调节 T 细胞的活化和一系列功能。因此,它在抑制 T 细胞介导的抗肿瘤免疫应答中起着重要的作用^[23]。研究发现 IFN- γ 能诱导大多数肿瘤细胞表面过表达 PD-L1,包括胰腺癌、胃癌、肺癌、子宫颈癌等^[9-11,24]。而在我们的研究中也发现乳腺癌细胞系在 IFN- γ 的刺激下高表达 PD-L1,与先前研究相符。

已有很多研究表明,上皮-间质转化在乳腺癌转移过程中起着关键作用^[25-26]。EMT 的特征是上皮分化标志物 E-钙粘蛋白的缺失和间充质标志物如波形蛋白和 N-钙黏蛋白的上调^[27]。在 EMT 过程中,肿瘤细胞失去细胞极性,细胞之间的连接变松,EMT 的这个过程是癌细胞转移的关键步骤。在本研究中也同样发现 IFN- γ 能够刺激乳腺癌细胞发生 EMT。

丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路是真核细胞介导细胞外信号到细胞内反应的重要信号传导系统。包括 4 条信号通路,其中细胞外信号调节激酶 (Extracellular regulated protein kinases, ERK) 途径在信号传递过程中起重要作用,在很多肿瘤中,ERK 信号通路通常是被过度激活的^[28]。研究证实,ERK 信号通路在调节乳腺癌细胞的增殖、存活及侵袭力中发挥重要作用^[29]。在本研究中用 IFN- γ 刺激乳腺癌细胞也检测到 ERK 及其磷酸化的高表达,而加入抑制剂 U0126 后,高表达的水平被明显抑制,PD-L1 的表达也受到抑制,结果表明 IFN- γ 促进乳腺癌的发展可能与 ERK 信号通路有关。

Janus 激酶-信号转导和转录激活子 (Janus

kinase-signal transducer and activator of transcription, Jak-STAT) 信号通路是由多种细胞因子共用调控的信号传导通路,在调节人体免疫力方面发挥着十分重要的作用^[30]。IFN- γ 是此信号通路的重要激活剂,其与受体结合后,调控 PD-L1 及各类基因的表达^[31-33]。在本研究中也证实了 IFN- γ 诱导的乳腺癌细胞高表达 Jak2,而加入 Jak2 抑制剂 AG490 处理乳腺癌细胞后,观察到 PD-L1、Jak2 及其磷酸化水平显著降低。并且有研究表明 Jak 2-STAT 与 ERK 信号通路存在级联效应^[34],因此本研究用 U0126 处理细胞后,观察 Jak2 及其磷酸化水平,同时也观察 AG490 对 ERK 信号通路蛋白的影响。结果显示,ERK 被抑制后,Jak2 及其磷酸化水平也降低,反过来抑制 Jak2 后,ERK 及其磷酸化水平同时降低,这些表明 IFN- γ 对乳腺癌的促进作用可能是由 ERK/Jak2- STAT 信号通路共同调节。

本实验证明用不同浓度 IFN- γ 刺激乳腺癌细胞可上调 PD-L1 的表达,使细胞由上皮向间质样转化,从而降低肿瘤细胞的自身免疫原性,促使肿瘤细胞逃避机体的免疫系统的攻击,而先前有诸多的研究表明 IFN- γ 能够抑制乳腺癌细胞的增殖^[22,28],本研究表明 IFN- γ 并非都是抑制肿瘤增殖,也可能在一定程度上促进了肿瘤的免疫逃逸,因此在临床上使用 IFN- γ 治疗肿瘤时应谨慎对待。近年来放疗、化疗以及生物治疗在临床中的广泛应用,使得乳腺癌的治疗效果明显提高,但三阴乳腺癌及已发生转移的乳腺癌,仍然是治疗的难点,PD-L1 的检测可以指导临床化疗药物的选择,为乳腺癌的肿瘤免疫治疗提供了新思路。

4 结论

本研究通过用不同浓度 IFN- γ 刺激乳腺癌细胞可上调 PD-L1 的表达,IFN- γ 也能促使细胞由上皮向间质样转化,而高表达的 PD-L1 能显著提

高细胞的迁移能力,这一过程可能与 ERK/Jak2-STAT 信号通路相关,揭示了 IFN- γ 对乳腺癌细胞的促进作用,有助于进一步了解乳腺癌发生和发展的机制。

REFERENCES

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 CA: A Cancer J, 65(2): 87–108.
- [2] Zhang L, Cui H, Zhang RY, et al. Hepatocellular carcinoma cell lines exhibit sensitivity differences in response to IFN- γ treatment *in vitro*. Chin Hepatol, 2013, 18(8): 517–521 (in Chinese).
张玲, 崔宏, 张瑞阳, 等. 不同肝癌细胞系对 IFN- γ 治疗的敏感性. 肝脏, 2013, 18(8): 517–521.
- [3] Li SP, Wang Z, He JD, et al. Function of interferon- γ induced HepG2 cell apoptosis via inhibiting autophagy. Chin J Clin Pharmacol, 2017, 33(4): 343–346 (in Chinese).
李世朋, 王振, 何金丹, 等. 干扰素 γ 抑制自噬诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡的作用. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(4): 343–346.
- [4] Zhou L, Yu JP, Li H, et al. Clinical observation of CH-296 and IFN- γ in cytokine-induced killer cells in patients with advanced malignant solid tumors. Chin J Clin Oncol, 2013, 40(3): 161–163 (in Chinese).
周莉, 于津浦, 李慧, 等. CH-296 和 IFN- γ 共同培养的 CIK 细胞治疗晚期恶性实体瘤临床观察. 中国肿瘤临床, 2013, 40(3): 161–163.
- [5] Han J, Sun BC, Ma YM, et al. Effects and mechanism of interferon-gamma on vasculogenic mimicry of melanoma cells. Tianjin Med, 2015, 43(5): 453–456 (in Chinese).
韩健, 孙保存, 马跃美, 等. 干扰素- γ 对黑色素瘤细胞血管生成拟态的影响及机制. 天津医药, 2015, 43(5): 453–456.
- [6] Chen SF, Hou JY, Wu SY, et al. Interferon- γ up-regulates programmed death ligand 1 in human gastric cancer cells. China Pathophysiol, 2013, 29(11): 1952–1956 (in Chinese).
陈淑芬, 侯婧瑛, 吴淑云, 等. IFN- γ 上调人胃癌细胞株 PD-L1 表达. 中国病理生理杂志, 2013, 29(11): 1952–1956.
- [7] He YF, Wang XH, Zhang GM, et al. Sustained low-level expression of interferon- γ promotes tumor development: potential insights in tumor prevention and tumor immunotherapy. Cancer Immunol Immunother, 2005, 54(9): 891–897.
- [8] Sun XH. The expression and correlation analysis of FOXP3, PD-1 and PD-L1 in the tissue of cervical cancer [D]. Zhengzhou University, 2016 (in Chinese).
孙晓慧. FOXP3、PD-1 及 PD-L1 在宫颈癌组织中的表达及其相关性分析[D]. 郑州大学, 2016.
- [9] Zhang FB, Qiao JX, Wang YN, et al. Expression and clinical significance of PD-1/PD-L1 in gastric cancer tissues. Chin J Cancer Biother, 2018(2): 170–176 (in Chinese).
张凤宾, 乔静雪, 王英南, 等. PD-1/PD-L1 在胃癌组织中的表达及其临床意义. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018(2): 170–176.
- [10] Slater NA, Googe PB. PD-L1 expression in cutaneous squamous cell carcinoma correlates with risk of metastasis. J Cutaneous Pathol, 2016, 43(8): 663–670.
- [11] Li H, Fan LJ, Li JP, et al. PD-L1 affected STAT3 inhibited proliferation of vascular endothelial cells. Biotechnology, 2017, 27(3): 289–294, 258 (in Chinese).
李慧, 范丽娟, 李佳蓬, 等. PD-L1 通过 STAT3 抑制血管内皮细胞增殖迁移. 生物技术, 2017, 27(3): 289–294, 258.
- [12] Acloque H, Adams MS, Fishwick K, et al. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1438–1449.
- [13] Yan S, Jiang H, Fang S, et al. MicroRNA-340 inhibits esophageal cancer cell growth and invasion by targeting phosphoserine aminotransferase. Cell Physiol Biochem, 2015, 37(1): 375–386.
- [14] Niu HY, Gong L, Tian XF, et al. Low expression of miR-491 promotes esophageal cancer cell invasion by targeting TPX2. Cell Physiol Biochem, 2015, 36(6): 2263–2273.
- [15] Ye X, Weinberg RA, et al. Epithelial-mesenchymal plasticity: a central regulator of cancer progression. Trends Cell Biol, 2015, 25(11): 675–686.
- [16] Liu PF, Gao Y, Huan J, et al. Upregulation of PAX2 promotes the metastasis of esophageal cancer through interleukin-5. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(2): 740–754.

- [17] Soliman H, Khalil F, Antonia S. PD-L1 expression is increased in a subset of basal type breast cancer cells. *PLoS ONE*, 2014, 9(2): e88557.
- [18] Sun JRN, Li HM, Su Y, et al. Effects of Interferon- γ (IFN- γ) on the transdifferentiation of mammary epithelial cells in dairy cows. *J Anhui Agric Sci*, 2017, 45(4): 99–101 (in Chinese).
孙俊若男, 李海明, 苏韵, 等. IFN- γ 对奶牛乳腺上皮细胞转分化的影响. *安徽农业科学*, 2017, 45(4): 99–101.
- [19] Kohler BA, Sherman RL, Nadia H, et al. Annual report to the Nation on the status of cancer, 1975–2011, featuring incidence of breast cancer subtypes by race/ethnicity, poverty, and state. *Breast Diseases A Year Book Quarterly*, 2016, 27(1): 36–38.
- [20] Li YY, Fu S, Wang XP, et al. Down-regulation of C9orf86 in human breast cancer cells inhibits cell proliferation, invasion and tumor growth and correlates with survival of breast cancer patients. *PLoS ONE*, 2013, 8(8): e71764.
- [21] Bauer KR, Brown M, Cress RD, et al. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer*, 2010, 109(9): 1721–1728.
- [22] Tate DJ Jr, Patterson JR, Velasco-Gonzalez C, et al. Interferon-gamma-induced nitric oxide inhibits the proliferation of murine renal cell carcinoma cells. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(8): 1109–1120.
- [23] Ceeraz S, Nowak EC, Noelle RJ. B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends Immunol*, 2013, 34(11): 556–563.
- [24] Archana A, Terence F, Lu D, et al. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) characterization of circulating tumor cells (CTCs) in muscle invasive and metastatic bladder cancer patients. *Bmc Cancer*, 2016, 16(1): 744.
- [25] Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 2009, 139(5): 871–890.
- [26] Da Cunha IW, Souza MJL, Da Costa WH, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenotype at invasion front of squamous cell carcinoma of the penis influences oncological outcomes. *Urologic Oncol: Semin Orig Invest*, 2016, 34(10): 433.e19–433.e26.
- [27] Gheldof A, Berx G. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. *Progr Mol Biol Trans Sci*, 2013, 116: 317–336.
- [28] Zhang X, Ma L, Qi J, et al. MAPK/ERK signaling pathway-induced hyper-O-GlcNAcylation enhances cancer malignancy. *Mol Cell Biochem*, 2015, 410(1/2): 101–110.
- [29] Zhang F, Li N. Role of ERK/MAPK pathway in treatment of breast tumors. *Chin J Cancer Biother*, 2007, 14(5): 497–500 (in Chinese).
张丰, 李楠. ERK/MAPK 信号传导途径在乳腺肿瘤治疗中的意义. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 14(5): 497–500.
- [30] van Allen EM, Golay HG, Liu Y, et al. Long-term benefit of PD-L1 blockade in lung cancer associated with JAK3 activation. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3(8): 855–863.
- [31] Concha-Benavente F, Srivastava RM, Trivedi S, et al. Identification of the cell-intrinsic and -extrinsic pathways downstream of EGFR and IFN γ that induce PD-L1 expression in head and neck cancer. *Cancer Res*, 2016, 76(5): 1031–1043.
- [32] Clarke DL, Clifford RL, Jindarat S, et al. TNF α and IFN γ synergistically enhance transcriptional activation of *CXCL10* in human airway smooth muscle cells via STAT-1, NF- κ B, and the transcriptional coactivator CREB-binding protein. *J Biol Chem*, 2010, 285(38): 29101–29110.
- [33] Wildner G, Kaufmann U. What causes relapses of autoimmune diseases? The etiological role of autoreactive T cells. *Autoimmun Rev*, 2013, 12(11): 1070–1075.
- [34] Chen HF, Zhang YM, Deng HY. Effect of Janus kinase inhibition on extracellular signal-regulated protein kinase during invasion and metastasis of human breast cancer cell MDA-MB-231. *Academ J Second Milit Med Univ*, 2008, 29(8): 900–903 (in Chinese).
陈红芳, 张亚梅, 邓华瑜. 乳腺癌细胞 MDA-MB-231 侵袭转移中 JAK 抑制对 ERK 的作用及意义. *第二军医大学学报*, 2008, 29(8): 900–903.

(本文责编 郝丽芳)