

肿瘤细胞中PD-L1表达调控机制的研究进展

姜茹斌 张凯瑞 葛源*

(中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003)

摘要 程序性死亡受体-1(programmed death receptor-1, PD-1)锚定在抗原特异性细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTLs)的细胞膜上, 其特异性配体程序性死亡-配体1(programmed death-ligand 1, PD-L1)是一种分子量约为40 kDa的I型跨膜蛋白, 在正常组织中广泛表达。在正常生理条件下, PD-1和PD-L1之间的胞外结合通过抑制CTLs活性从而阻止自身免疫疾病的发生。然而, PD-L1在黑色素瘤、肺癌、肾细胞癌等恶性肿瘤中的异常上调表达通过促进PD-1/PD-L1介导的CTLs失活导致癌细胞逃避免疫监控。近年来, 相关研究分别从基因扩增、染色质修饰、转录与转录后修饰、翻译与翻译后修饰等角度阐述了PD-L1表达调控的分子机制。同时, 针对PD-1/PD-L1轴的免疫检查点阻断治疗在多种恶性肿瘤的临床治疗中展现出了较好的疗效。该文系统总结了近年来癌细胞中的PD-L1表达调控机制研究领域的重要成果, 并在此基础上展望了针对PD-1/PD-L1轴的肿瘤免疫治疗的应用前景。

关键词 程序性死亡-配体1; 程序性死亡受体-1; 基因表达调控; 免疫检查点阻断治疗

Research Progress on Regulation Mechanism of PD-L1 Expression in Cancer Cells

JINAG Rubin, ZHANG Kairui, GE Yuan*

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract Cell surface receptor PD-1 (programmed death receptor-1) anchors on the cell membrane of antigen-specific CTLs (cytotoxic T lymphocytes). PD-1 binds to its ligand PD-L1 (programmed death-ligand 1), which is a type I transmembrane protein. PD-L1 is widely expressed in normal tissues with a molecular weight of about 40 kDa. Extracellular binding between PD-1 and PD-L1 inhibits the activity of CTLs and prevents autoimmunity under normal physiological conditions. However, the aberrantly upregulated expression of PD-L1 in malignant tumors such as melanoma, lung cancer, and renal cell carcinoma facilitates PD-1/PD-L1-mediated CTLs deactivation and leads to the immune evasion of cancer cells. In recent years, molecular mechanisms that modulating PD-L1 expression from the views of gene amplification, chromatin modification, transcription and post-transcriptional modification, translation and post-translational modification have been unraveled. Meanwhile, immune checkpoint blockade targeting PD-1/PD-L1 axis has exhibited promise in the clinical treatment of a variety of malignancies. In this review, the academic achievements in the regulatory pathways of PD-L1 in cancer cells are summarized, and the perspectives of tumor immunotherapy targeting the PD-1/PD-L1 axis are prospected.

Keywords PD-L1; PD-1; regulation of gene expression; immune checkpoint blockade therapy

收稿日期: 2021-04-14 接受日期: 2021-08-26

国家自然科学基金(批准号: 31201043)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13589267861, E-mail: geyuan@ouc.edu.cn

Received: April 14, 2021 Accepted: August 26, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31201043)

*Corresponding author. Tel: +86-13589267861, E-mail: geyuan@ouc.edu.cn

程序性死亡-配体1(programmed death-ligand 1, PD-L1; 又称B7-H1)也被称为表面抗原分化簇274(cluster of differentiation 274, CD274)是典型的免疫球蛋白超家族成员之一,是一种I型跨膜蛋白,由胞外区、疏水的跨膜序列和胞内区组成,PD-L1的胞外结构域包括Ig可变(Ig variable, IgV)远区和Ig恒定(Ig constant, IgC)近区两部分免疫球蛋白结构。IgV序列呈现一个标准的Ig样结构域,且具有互补决定样区(complementary determining-like region, CDR),使得PD-L1以1:1的化学计量比与PD-1结合^[1]。PD-L1通过疏水的跨膜序列锚定在细胞膜上,PD-L1的胞内结构是一个与其他B7家族成员分子序列相似性较低的短序列。该胞内区域包含RMLDVEKC、DTSSK和QFEET 3个基序。这3个基序结构在哺乳动物PD-L1分子中相对保守,信号的传递很可能是由RMLDVEKC和DTSSK基序介导的,比如小鼠细胞中PD-L1蛋白的胞内区域包含两个赖氨酸残基,可通过调节PD-L1蛋白上赖氨酸残基的泛素化过程来调节PD-L1的稳定性和信号转导^[1]。而PD-1同样属于I型跨膜蛋白,主要表达于CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、巨噬细胞、树突状细胞等细胞表面。胞外区由一个IgV区域组成,胞内区的N-端形成一个免疫受体酪氨酸抑制基序(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM),C-端则形成一个免疫受体酪氨酸转化基序(immunoreceptor tyrosine-based switch motif, ITSM)。

T细胞是获得性免疫的主要效应细胞。正常情形下免疫系统会对聚集在淋巴结或脾脏中的外来抗原产生反应,一些髓系细胞如树突状细胞(dendritic cell, DC)等,可作为抗原呈递细胞(antigen-presenting cell, APC)来捕获抗原并将其加工成抗原肽,这些抗原肽需要与主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)结合,并暴露在细胞表面与T细胞受体(T cell receptor, TCR)结合并被识别,诱发T细胞免疫应答从而促进具有抗原特异性的T细胞增殖。除了TCR-肽-MHC结合外,T细胞还需要“共刺激(co-stimulation)”作用才能达到激活状态。其中许多“共刺激”作用是通过APC上表达的B7家族蛋白与T细胞上的受体结合而发挥作用的,较为典型的有CD80(又称B7-1)和CD86(又称B7-2),它们与T细胞上的CD28结合,并在免疫突触的抗原识别过程中为T细胞提供“共刺激”信号以激活T细胞。这些信

号能够将T细胞从PD-1与PD-L1结合而产生的凋亡信号中解救出来,并刺激TCR传递增殖信号^[1]。而表达于T细胞表面的PD-1与PD-L1的结合,会引起白介素-10(interleukin-10, IL-10)的分泌,而非正常B7家族蛋白所引起的白介素-2(interleukin-2, IL-2)的分泌^[2],证明PD-1/PD-L1可以通过IL-10传导抑制性的信号,减少淋巴结T细胞的增生并诱发细胞凋亡信号的产生,在正常机制下能够防止过度的免疫应答引发过敏反应,但在肿瘤细胞中与肿瘤细胞的免疫逃逸机制有关。许多体内肿瘤和癌细胞株通过表达PD-L1反向诱导效应T细胞凋亡,导致在人类肿瘤性疾病中T细胞的免疫应答反应受到强烈抑制,其外泌体与肿瘤细胞的扩散高度相关。因此,PD-L1被普遍认为是癌症进展和预后不良的重要免疫检查点。

PD-L1的表达调控机制是多方面的,本文从DNA诱导、转录、翻译和翻译后修饰以及细胞微环境等方面的调控机制展开综述,并对小分子药物介入PD-L1表达调控进行讨论。

1 PD-L1在DNA水平的表达调控机制

*PD-L1*基因位于染色体9p24.1上。*PD-L1*基因启动子区域组蛋白的乙酰化会诱发PD-L1的表达。研究显示,组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)抑制剂处理导致*PD-L1*基因第一外显子上游约455个碱基对的组蛋白乙酰化水平上调并造成染色质松弛,显著增强了*PD-L1*基因的表达^[3]。此外,甲基化的DNA可以招募HDAC,从而抑制*PD-L1*基因转录进而下调PD-L1的表达,所以部分DNA甲基转移酶抑制剂也显示出增强PD-L1表达的潜力,如阿扎替丁和地西他滨与HDAC抑制剂一样能够增强PD-L1在人类黑色素瘤细胞系和小鼠黑色素瘤模型中的表达^[3]。还有研究表明,HDAC6可以通过将信号转导与转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)募集到*PD-L1*启动子上并激活STAT3信号来增强PD-L1的表达,在HDAC6缺乏或被抑制的情况下,蛋白磷酸酶2A(protein phosphatase 2A, PP2A)与STAT3的相互作用增强,进而促进了PP2A介导的STAT3的去磷酸化使STAT3的磷酸化水平降低^[4]。当白介素-6(interleukin-6, IL-6)刺激人黑色素瘤细胞后,*HDAC6*基因敲除的细胞中的PD-L1表达量增幅明显降低,因此,STAT3信号通路可能是影响PD-L1表达的重要因素^[4]。另外,溴结构域和额外

末端结构域(bromodomain and extra-terminal domain, BET)家族蛋白是一种组蛋白乙酰化阅读器,通过直接与组蛋白尾部的乙酰化赖氨酸结合,能够促进*PD-L1*基因转录。其中溴结构域蛋白4(bromodomain-containing protein 4, BRD4)是BET家族的成员之一,*CD274*是BRD4的靶点之一,BRD4能够直接介导*CD274*的转录。BRD4通过与*PD-L1*基因启动子区域和远端增强子中的乙酰化组蛋白H3K27Ac结合,能够有效促进PD-L1的表达。由于BRD4基因位于染色体19p13.1上,且这个位点在卵巢癌中经常发生扩增,因此在卵巢癌模型中抑制BRD4蛋白可以明显抑制PD-L1的表达,增强细胞毒性T细胞的活性;同时,在小鼠模型中,BET抑制剂JQ1(别名三苯甲烷三异氰酸酯)治疗显著降低了肿瘤细胞、肿瘤相关树突状细胞和巨噬细胞上PD-L1的表达水平,并且有实验证明BRD4阻断了干扰素- γ 诱导的PD-L1表达上调途径,以上研究都表明了BRD4是PD-L1表达的关键调节因子,BRD4的表达可能决定了PD-L1对肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)信号的反应程度^[5]。

基因突变是影响蛋白质表达和作用的重要因素,例如某些突变可能会导致蛋白质折叠障碍,从而破坏PD-1与PD-L1的相互作用而抑制免疫逃逸过程;也可能提高两种蛋白的亲合力,从而增强或减弱作用效果。分子结构领域的研究显示,PD-L1的N-端具有类似于Ig样的V型折叠结构域,该结构域负责其与PD-1的结合^[6]。PD-L1与PD-1通过Ig样V型结构域中较大的疏水表面进行相互作用。在复合物中,PD-1和PD-L1的长轴几乎彼此垂直,这促进了PD-1和PD-L1“前端”的结合^[6]。同时,PD-L1(主要是其Tyr123)及其邻近残基将PD-1表面的侧链推向蛋白质的两侧和核心,导致PD-1的PD-L1相互作用表面产生裂隙,这种诱导拟合提供了额外的相互作用面,提高了PD-1和PD-L1相互作用的概率^[6]。若蛋白质结构发生改变则会对蛋白质间的亲合力产生重要影响,已报道两种PD-1突变体结构,其中,高亲合力PD-1突变体在BC、CC'和FG链之间显示了不同的环排列,显著增强了PD-1和PD-L1结合的相互作用力,特别是M70E、Y68H和K78T突变可以形成额外的氢键和盐桥,从而稳定PD-1与PD-L1的相互作用,并且与PD-L1单克隆抗体相比,PD-1突变体对大肿瘤具有更好的穿透性,可作为免疫系统的潜在调节剂^[7]。另一种PD-1突变体只有一个氨基酸

(A132L)被取代,为PD-1突变体与PD-L1的结合提供了额外的范德华力,与野生型PD-1相比,PD-1突变体与PD-L1的亲合力提高了45倍^[8]。此外,对PD-L1的晶体结构研究表明,其存在小分子抑制剂作用位点,如BMS(Bristol Myers Squibb)公司开发的小分子PD-1/PD-L1抑制剂能够通过PD-L1的二聚化作用结合到PD-1与PD-L1相互作用的表面,在形成对称排列的蛋白二聚体时小分子物质能够结合到两个蛋白质分子之间,证明了在免疫检查点PD-1/PD-L1施加小分子药物的可能性。如小分子抑制剂BMS-202和BMS-8能够与PD-L1结合并通过抑制PD-L1二聚化来抑制PD-1/PD-L1的相互作用^[6,9]。*PD-L1*基因的SNP位点rs4143815存在常见的鸟嘌呤到胞嘧啶的体细胞突变,这种突变可通过破坏miR-570介导的转录后和翻译调控,导致PD-L1在胃癌中过度表达并增强癌细胞存活和侵袭的能力^[10]。除此之外,其他相关功能基因的突变也会对PD-L1的表达产生影响,如JAK1/2功能缺失突变导致细胞缺乏PD-L1反应性表达和对干扰素- γ 应答的遗传机制,造成对PD-L1阻断治疗产生原发耐药性^[11]等。

许多原癌基因通过拷贝数的改变上调蛋白表达量。研究显示,*PD-L1*的基因拷贝数增加导致PD-L1蛋白局部高水平表达,在小细胞肺癌患者中有1.9%的患者由于*CD274*的局部扩增而大量表达PD-L1^[12]。*CD274*的扩增是由基因组重排引起的,最终可导致*CD274*转录本大量增加和PD-L1的高水平表达^[12]。在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的研究中也报道了9p24.1染色体拷贝数扩增导致PD-L1高表达的现象^[13]。Janus激酶2扩增被证明与9p24.1染色体拷贝数扩增和PD-L1表达上调相关,JAK2抑制剂TG-101348和STAT3抑制剂BP-1-102可显著降低PD-L1蛋白的表达水平,而STAT3抑制剂氟达拉滨对PD-L1蛋白的表达无明显影响^[14]。这表明JAK2和*PD-L1*基因之间可能存在反式激活。同样,原癌基因MYC在正常情况下编码一种激活或抑制其目标基因表达的转录因子,但在一定条件下能够通过扩增或易位而发生致癌激活。有研究显示,MYC的过度表达是许多人类癌症的特征,过表达的MYC将直接导致各种类型细胞的恶性转化。除了驱动肿瘤的发生和发展,MYC也对肿瘤的维持起作用,在几种MYC驱动的恶性肿瘤小鼠模型中,肿瘤细胞的生存依赖持续的MYC过度表达,限制MYC表达或阻断其

功能可导致肿瘤细胞生长停滞、凋亡或分化^[15]。但 *MYC* 基因在 *PD-L1* 转录中的作用存在两种截然相反的结论。在急性 T 淋巴细胞白血病 (T-ALL) 细胞系或肝癌 (HCC) 细胞系的 Tet-off *MYC* 转基因小鼠模型中, *MYC* 可通过与 *PD-L1* 基因的启动子结合而增加 *PD-L1* 的表达量。在人类 T-ALL 细胞系、HCC 细胞系 HepG2、黑色素瘤细胞系 SKMEL28、NSCLC 细胞系 H1299, 甚至在人类 T-ALL 原代样本中也可得出类似的结论^[16]。相反, *MYC* 不影响小鼠 E μ -*MYC* 淋巴瘤细胞和乳腺癌细胞 AT3 中 *PD-L1* 的表达。此外, 在 Tet-off 小鼠肝癌模型中, 无论是否暴露于干扰素- γ , *MYC* 都能抑制 *PD-L1* 的表达^[16]。研究人员对于 *MYC* 的具体调控作用尚无准确定论, 其复杂的调控机制仍是今后研究的重点。由此可见, 基因扩增是驱动 *PD-L1* 在肿瘤中表达的因素之一, 但并不是绝对因素。

遗传机制中结构变异 (structural variations, SVs) 包括易位、倒置、串联复制和缺失, 在癌症基因中可以被广泛观察到, 是影响蛋白表达量改变的一个重要原因, *PD-L1* 转录本的 3'-非翻译区 (3'-untranslated region, 3'-UTR) 对 mRNA 的稳定性起负调控作用。SVs 通常破坏 *PD-L1* 基因的 3' 端区域导致 *PD-L1* 的异常表达促使免疫逃逸。这些转录可以通过截断 3'-UTR 来稳定 mRNA, 潜在的机制可能是位于 3'-UTR 区域的一些参与 mRNA 衰退的顺式作用元件被损伤, 包括富含 AU 的元件和潜在的 miRNA (microRNA) 结合位点。研究显示, *PD-L1* 3'-UTR 截断与 *PD-L1* 表达升高显著且独立相关; 并且, 将 *PD-L1* mRNA 的 3'-UTR 截短对 *PD-L1* 表达上调的影响远大于干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 对 *PD-L1* 的诱导作用, 当 *PD-L1* mRNA 的 3'-UTR 截断与 IFN- γ 协同作用时 *PD-L1* mRNA 的 3'-UTR 被破坏的细胞可以更有效地上调 *PD-L1* 的表达^[17], 证明了 3'-UTR 在 *PD-L1* 表达中的重要作用。与 *PD-L1* 表达水平相似的 SV(-) 样本相比, SV(+) 样本的效应 T 细胞杀伤活性显著降低, 表明 SV(+) 样本的抗肿瘤免疫反应显著减弱。同时, 与野生型 *PD-L1* mRNA 相比, 3'-UTR 截短后 *PD-L1* 不仅表达量显著增加, 并且 mRNA 清除也被显著延迟, 这表明 *PD-L1* 3'-UTR 在 mRNA 稳定性中也发挥重要作用^[17]。病毒感染引发的癌症也可以通过整合基因造成 *PD-L1* 的异常转录, 例如在宫颈鳞癌中人乳头瘤病毒 (human papilloma virus, HPV) 整合到 *CD274* 位点, 将

转录从截短的 *PD-L1* 延伸到 HPV *E2* 和 *E5* 基因, 导致被病毒中断的 *CD274* 等位基因显著扩增^[17]。EB 病毒转化的淋巴母细胞系也高表达 *PD-L1* 蛋白, 这是由潜伏膜蛋白 1 (latent membrane protein 1, LMP1) 介导、JAK/STAT 依赖的启动子和激活蛋白 1 (activator protein-1, AP-1) 相关的增强子激活造成的^[18]。有报道称, EB 病毒的潜伏膜蛋白 1 可以通过 LMP1/AP-1/核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 途径增加 *PD-L1* 的表达并与 IFN- γ 存在协同作用^[19]。在病毒介导的癌症中, 病毒整合被认为不仅诱导感染细胞在感染的早期阶段逃避抗病毒免疫, 而且还诱导感染细胞通过过表达 *PD-L1* 逃避后来的免疫监视^[17]。另外, NF- κ B 抑制剂能够有效减弱 *PD-L1* 的诱导效果表明 NF- κ B 是 LMP1 诱导 *PD-L1* 表达量上升所必需的信号途径^[9], 因此 NF- κ B 也是癌症治疗中可以阻断的重要位点。

2 *PD-L1* 在转录和转录后的表达调控机制

PD-L1 能够在多条信号通路激活后启动转录, 如已有报道的缺氧诱导因子- α (hypoxia inducible factor- α , HIF- α)、原癌基因 *MYC*、STATs、NF- κ B 和 AP-1 等转录因子都能够与 *PD-L1* 相关基因结合, 激活转录并翻译 *PD-L1* 蛋白。这些转录因子受 IFN- γ /Janus 激酶 (Janus kinases, JAKs)/信号转导与转录激活因子 1 (signal transducers and activators of transcription 1, STAT1)/干扰素调节因子 (interferon regulatory factor, IRF) 等多种信号通路以及富含乳酸的微环境调控^[9]。

目前已鉴定出许多参与 *PD-L1* 表达调控的转录因子。首先, *PD-L1* 基因增强子区域通过与转录因子 AP-1 组分结合来增强 *PD-L1* 启动子在经典里德-斯泰伯格氏细胞 (CHL Reed-Sternberg cells) 中的活性^[18]。其次, 研究表明 *IRF1* 基因表达的转录因子在干扰素- γ 诱导的癌细胞中对 *PD-L1* 的表达调控是必需的, *IRF1* 与其启动子进行结合利于干扰素诱导效果的维持, 可以增强干扰素诱导的 *PD-L1* 表达^[20]。*PD-L1* 在癌细胞中的表达也依赖于转录因子 NF- κ B。其中, 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 就是通过 NF- κ B 信号通路在乳腺癌、前列腺癌和结肠癌中诱导 *PD-L1* 表达的^[16,21-22]。*PD-L1* 基因启动子区域和 *PD-L1* 基因下游 140 Kb 的增强子区域都有 NF- κ B 结合位点。STAT3 是另一个重要的转录

因子, 通过与*PD-L1*启动子结合而上调PD-L1的表达, 有研究发现, 可以通过沉默*STAT3*来消除癌基因嵌合核仁磷酸蛋白(nucleophosmin, NPM)/间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK)的突变造成的PD-L1蛋白表达上调^[23], 证明了*STAT3*在免疫逃逸中的作用潜力。

研究表明, *IFN- γ* /*JAKs*/*STATs*/*IRF1*轴是PD-L1表达的主要调节方式, II型干扰素*IFN- γ* 是PD-L1的主要诱导因子, *IFN- γ* 通过*JAK*/*STAT1*/*IRF1*途径在多种类型的癌症, 如黑色素瘤、非小细胞肺癌、肝癌、头颈鳞癌、胃癌、骨髓瘤和胶质瘤等^[16,20,24-28]中发挥作用。*IFN- γ* 与受体结合会导致*JAK1*和*JAK2*的磷酸化, 在大多数细胞中, 受体磷酸化之后会引发*STAT1*的受体附着和磷酸化并形成二聚体, 在部分细胞中也存在*STAT3*的受体附着和磷酸化后形成二聚体的现象。随后, 激活的二聚体聚集在细胞核中, 这些二聚体作为转录因子与受*IFN- γ* 诱导且存在 *γ* 干扰素激活位点(gamma interferon activation site, GAS)的基因结合, 例如*IRF1*基因, 结合并被激活的相关基因显著增强了PD-L1的表达。有些干扰素的负调节因子, 如细胞因子信号蛋白家族的抑制子(suppressor of cytokine signaling, SOCS)可以通过与*JAK2*结合来传递信号并参与细胞因子的负反馈调节, 从而降低*STAT1*和*STAT3*的活性影响*IFN- γ* 的诱导作用^[20]。

表皮生长因子(epidermal augmentum factor, EGF)是一种由53个氨基酸残基组成的耐热单链低分子多肽, 能够通过磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, PKB/AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)和*JAK2*/*STAT1*途径在头颈鳞癌中或NSCLC中诱导PD-L1的表达^[16,26,29-30], 表皮生长因子受体(epidermal augmentum factor receptor, *EGFR*)基因的激活突变和棘皮微管相关蛋白样蛋白4(echinoderm microtubule-associated protein-like 4, *EML4*)基因的突变也被证明与PD-L1的表达有关^[31]。其中, *EGFR*基因的激活突变是NSCLC的致癌驱动因素之一, 并且间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK)和*EML4*基因的染色体重排也会导致NSCLC的发生。研究表明, *EML4-ALK*和突变体*EGFR*通过激活*PI3K/AKT*和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase kinase, MEK)/细

胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinase, ERK)信号通路上调PD-L1表达^[16], 这项结果是*PI3K/AKT*和*MEK/ERK*信号通路可作为调节免疫抑制靶点的重要证据。还有研究表明, *EGFR*抑制剂ES-072可诱导糖原合酶激酶3 α (glycogen synthase kinase 3 alpha, GSK3 α)激活下游的信号级联反应, GSK3 α 在Ser279和Ser283处磷酸化PD-L1, 促进了E3泛素连接酶ARIH1的招募, 导致了PD-L1蛋白的降解, 同时GSK3 α 的异构体GSK3 β 通过对PD-L1胞外区的两个磷酸化位点T180和S184的磷酸化促进了PD-L1的降解, 因此GSK3 α 和GSK3 β 同样有助于抗肿瘤免疫逃逸^[32]。

除细胞因子外, 17 α -雌二醇也可以通过*PI3K/AKT*信号通路诱导子宫内膜和乳腺癌细胞中的PD-L1蛋白水平^[16,33]。研究显示, *PI3K*抑制剂Buparlisib在头颈鳞癌细胞系中下调PD-L1蛋白表达, 并且人10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, *PTEN*)的表达产物是*PI3K/AKT*信号转导通路的重要肿瘤抑制因子和抑制剂, 也起到抑制乳腺癌细胞中PD-L1表达的作用^[9], *PTEN*功能的丧失是PD-L1在胶质瘤和肺癌中的表达量增加的重要原因^[16], 以上研究成果意味着阻断*PI3K/AKT/mTOR*途径对于对免疫检查点治疗表现出不良反应的患者来说可能是一个很好的额外疗法^[30], 具有潜在应用价值。

白介素家族是一种在白细胞或免疫细胞间相互作用的淋巴因子, 在PD-L1的表达调控中显示出巨大的研究潜力, 其中白介素-17(interleukin-17, IL-17)能够通过*NF- κ B*和细胞外调节蛋白激酶1/2(extracellular regulated protein kinases 1/2, ERK1/2)信号通路在前列腺癌和结肠癌中增加PD-L1的表达量^[16]; 白介素-27(interleukin-27, IL-27)则通过激活*STAT3*诱导卵巢癌PD-L1的表达^[16]; 白介素-4(interleukin-4, IL-4)则刺激肾癌细胞PD-L1的表达^[16,34]。以上结论证明, 不同种类白介素针对不同细胞的PD-L1表达分别有刺激作用, 是针对不同细胞免疫治疗的潜在位点, 但针对特定细胞的白介素免疫疗法是否能应用于其他细胞仍需研究验证。

除上述诱导因素外仍有其他多种物质在特定细胞中对PD-L1的表达具有显著调节作用, 如Toll样受体3(Toll-like receptor 3, TLR3)可以诱导

神经细胞瘤PD-L1的表达上调^[35]; ARE结合蛋白TTP(tristetraprolin)则可通过*PD-L1* mRNA富含AU元件的3'-UTR负向调节PD-L1的表达, RAS信号也可以通过其下游的MEK信号导致TTP磷酸化, 并通过丝裂原活化蛋白激酶2(mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2, MK2)抑制TTP增加癌细胞内源性PD-L1的表达^[36]; 泛素C-端水解酶L1(ubiquitin C-terminal hydrolase L1, UCHL1)是在NSCLC中异常表达的细胞信号转导调节剂, UCHL1通过促进AKT/P65信号通路的激活也能够促进NSCLC细胞系中PD-L1的表达, 暗示UCHL1的抑制可能通过NSCLC细胞中PD-L1表达的下调来抑制NSCLC的免疫逃逸^[37]。内源性转录调控因子核仁磷酸蛋白1(nucleophosmin 1, NPM1)在三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)细胞中特异性地与*PD-L1*启动子结合增强其活性, 并增加PD-L1的mRNA和蛋白表达^[38]。针对特定细胞中特定物质调节PD-L1的研究繁多且不成体系, 仍需要更多的深入研究才能具有开发应用前景。

3 PD-L1的翻译及翻译后修饰调控机制

miRNAs是一类高度保守的非编码小RNA, 在转录后水平调节基因表达, 可以潜在地调控细胞活动的方方面面, 包括分化和发育、新陈代谢、增殖、细胞凋亡、病毒感染和肿瘤发生等。研究显示, miR-513调节PD-L1的翻译, 并调节IFN- γ 诱导的人胆管细胞PD-L1的表达, 静息状态的人胆管细胞表达*PD-L1* mRNA, 但不表达PD-L1蛋白, 而IFN- γ 能够诱导胆管细胞PD-L1蛋白表达并改变其miRNA表达谱, 在具有IFN- γ 下调功能的miRNAs中, miR-513与*PD-L1*的3'-UTR具有互补性, 靶向miR-513可导致*PD-L1* mRNA的翻译被抑制, 但不会导致*PD-L1* mRNA的降解^[39-40]。*PD-L1* mRNA的3'-UTR中同样存在miR-34a的互补序列, 研究显示miR-34a参与抑制IFN- γ 和As₂O₃诱导的人白血病细胞PD-L1的表达并引发T细胞的凋亡, 且证实了miR-34a在HL-60细胞中对PD-L1的表达存在明显抑制作用^[41], 以上证据证明miR-34a同样可以靶向抑制PD-L1的表达。同时, miR-34a受到P53的调控, 已知P53通过调节炎症细胞因子、Toll样受体和干扰素信号转导以及T细胞和NK细胞的激活而参与免疫反应, 有新研究表明, P53能够通过miR-34直接与*PD-L1*的3'-UTR

结合并通过调节PD-L1的表达来特异性地调节肿瘤免疫反应, 且可以直接调控PD-L1表达的miR-200也被证明受到P53的调控^[42]。miR-200是针对PD-L1的一种上皮-间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)抑制因子, 而ZEB1(zinc-finger E-box-binding homeobox 1)是EMT的激活剂, 能够削弱miR-200的抑制作用, 研究显示, miR-200/ZEB1是一个EMT调节轴, PD-L1是miR-200/ZEB1轴的下游靶点, 因此通过调节miR-200/ZEB1轴就能够调控肿瘤细胞中PD-L1的表达^[43]。有报道称, 在化疗耐药的NSCLC中存在一个miR-197/CDC28蛋白激酶调节亚基1B(CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B, CKS1B)/STAT3介导的PD-L1网络, 该网络不依赖于免疫抑制信号, 且miR-197的表达水平与PD-L1的表达呈负相关, 随着miR-197的下调体内NSCLC细胞的耐药性和转移性增强。机制研究表明, miR-197介导的CKS1B/STAT3轴在多种基因(*Bcl-2*、*c-MYC*和*cyclin D1*)调控的肿瘤进展中发挥作用, PD-L1可能是该轴的生物标志物, 提示miR-197可以通过CKS1B和STAT3来调节NSCLC的耐药性和肿瘤进展, 证明了miR-197/CKS1B/STAT3介导的信号驱动肿瘤PD-L1的表达^[44]。同样, 在肺腺癌(lung adenocarcinoma, LUAD)的研究中发现miR-326抑制了LUAD免疫检查点分子*PD-L1*和*B7-H3*的基因表达, 改变了CD8⁺T细胞的浸润程度, 并降低了肿瘤细胞的迁移能力^[45]。miR-424(322)^[46]、miR-570^[10]、miR-138-5p^[47]、miR-17-5P^[48]、miR-25-93-106b^[49]等也有相关报道, 但都是针对不同癌症类型的独立结论, 它们对这些miRNA是否有协同作用尚无定论。

除了通过miRNA调节PD-L1的翻译外, mTOR激活也调控癌细胞中PD-L1蛋白的合成。在胶质瘤、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌和胰腺癌的研究中发现, PD-L1的表达对mTOR呈现依赖性。研究显示, AKT/mTOR通路的激活在体外和体内都严格调控PD-L1的表达, mTOR的激活增加了PD-L1蛋白的表达水平, 但并不影响*PD-L1*的mRNA水平, 因此这一途径对PD-L1的调节被认为是在翻译水平上发生的^[50]。胶质瘤细胞中PTEN缺失导致PI3K/AKT/mTOR/S6K1通路激活, 造成PD-L1蛋白水平升高, 前已述及PTEN产物是PI3K/AKT信号转导通路的重要肿瘤抑制因子和抑制剂, 能够抑制乳腺癌细胞中PD-L1的表达。此外, 研究表明PD-L1

的组成性表达还受到癌基因 *EGFR*、*KRAS* 和 *ALK* 突变的影响^[50]。

除了对PD-L1翻译的调控之外, PD-L1蛋白的糖基化、磷酸化、泛素化、去泛素化等翻译后修饰, 以及PD-L1的结合蛋白和蛋白质亚细胞转运过程也能够影响肿瘤细胞中PD-L1蛋白的稳定表达^[16]。

N-糖基化是决定蛋白质结构和功能的重要蛋白质修饰。通过改变蛋白质构象, 糖基化可以调节蛋白质的活性和蛋白质间的相互作用, PD-L1作为一种膜蛋白, 在翻译后被广泛糖基化修饰。PD-L1胞外区的 *N*-糖基化发生在内质网(endoplasmic reticulum, ER)的管腔内, 这种修饰促进了PD-L1与脂膜的相互作用。在Western blot分析中, 糖基化的PD-L1在45 kDa处被检测到, 而非糖基化形式的PD-L1在33 kDa处被检测到。通过生物信息学预测、质谱和诱变发现, PD-L1仅在N35、N192、N200和N219处发生 *N*-糖基化^[51]。含有N192、N200和N219残基的PD-L1分子形成了一个可以与糖原合成酶激酶3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β)结合的区域, 这些位点通过 *N*-糖基化掩盖必要的残基, 破坏了PD-L1和GSK3 β 之间的相互作用, 阻碍了由GSK3 β 导致的PD-L1的磷酸化和随之而来的 β -转导重复相容蛋白(β -transductin repeat containing protein, β -TrCP)介导的泛素化(图1)^[51]。糖基化的PD-L1不能与GSK3 β 相互作用, 继而影响了PD-L1的磷酸化过程, 所以PD-L1蛋白的磷酸化过程会受到糖基化程度的影响。同时, 糖基化也间接阻止了PD-L1蛋白的泛素化和降解。事实上, 癌细胞中的大多数PD-L1是糖基化的, 不能被蛋白酶体降解^[16]。

磷酸化涉及细胞信号的广泛调控机制, 并可能影响蛋白质的构象、活性和相互作用^[9]。GSK3 β 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 最初被认为是糖原代谢的调节因子, 在糖基化方面, GSK3 β 被认为是一种多功能开关, 可以介导多种底物包括eIF2B、cyclin D1、c-Jun、c-MYC、NFAT、Mcl-1等^[52]的直接磷酸化。它可以通过PD-L1上保守的GSK3 β 磷酸化基序促进PD-L1的磷酸化, 并且这种磷酸化启动了PD-L1与E3连接酶的相互作用, 会介导PD-L1泛素化过程^[9]。

泛素化是一种通过控制蛋白酶体降解来控制蛋白质新陈代谢的方式, 蛋白质在通过蛋白酶体或溶酶体这两种途径降解之前, 通常被标记上特定的多泛素链^[16]。在蛋白酶体降解蛋白质途径中, E1活化酶、

E2结合酶和具有靶蛋白识别特异性的E3连接酶介导泛素化过程。其中, 已有报道的针对PD-L1蛋白的E3连接酶主要有三种。一种是Cullin 3^{SPOP}, 其可以使PD-L1蛋白泛素化并导致其随后的降解, 但cyclin D-CDK4激酶(一种细胞周期激酶)可以介导SPOP的磷酸化, 促进APC/C^{Cdh1}对SPOP的降解从而阻断PD-L1的泛素化过程, 证明了cyclin D-CDK4激酶可以间接控制PD-L1蛋白的稳定性^[53]。同时, SPOP功能缺失突变也可影响泛素化介导的PD-L1降解, 导致小鼠肿瘤和原发人类前列腺癌标本中PD-L1水平增加和肿瘤浸润淋巴细胞数量减少。第二种E3连接酶是 β -TrCP, 它可以介导基底样乳腺癌细胞中被GSK3 β 磷酸化的PD-L1蛋白的泛素化^[16]。但这个过程受其糖基化的影响, 如上所述, 糖基化的PD-L1蛋白不能与GSK3 β 相互作用而发生磷酸化, 因此, 糖基化间接阻止了PD-L1蛋白的泛素化和降解。第三种E3连接酶是STUB1, 这种连接酶的缺失提升了CMTM6缺陷型细胞中PD-L1的蛋白水平, 有研究表明STUB1可通过修饰PD-L1蛋白在细胞内侧结构域中的赖氨酸直接或间接造成PD-L1的稳定性降低^[54]。

PD-L1的泛素化修饰会加速PD-L1的降解从而达到抑制效果, 而去泛素化则是泛素化的反向过程, 通常会保持目标蛋白的稳定性。有研究显示, COP9信号体5(constitutive photomorphogenic signalosome 5, CSN5)对PD-L1的去泛素化起到了关键作用, 保护了PD-L1免受蛋白酶体降解, 使用CSN5的抑制剂姜黄素可以明显降低CSN5的活性, 并减弱PD-L1蛋白稳定性^[21]。CSN5的表达还受TNF- α 的调控, TNF- α 是巨噬细胞分泌的炎性细胞因子之一, 在维持癌细胞免疫逃逸中发挥了重要作用, 研究显示, TNF- α 可以通过激活P65/CSN5增强PD-L1蛋白的稳定性, 表明CSN5对于TNF- α 介导的PD-L1信号通路是不可或缺的, 进一步强调了CSN5在抑制PD-L1泛素化和脱泛素化中的作用(图1)^[21]。

棕榈酰化和乙酰化修饰能够增强PD-L1蛋白的稳定性。棕榈酰化是蛋白质翻译后修饰之一, 由棕榈酸酯通过硫酯键(也称为S-棕榈酰化)与绝大多数半胱氨酸残基共价连接。研究发现PD-L1上的棕榈酰化在PD-L1的稳定性中发挥了重要作用, 从而保护肿瘤细胞免受T细胞的免疫监视, 通过定点突变或抑制PD-L1棕榈酰化转移酶ZDHHC9的表达来破坏PD-L1的棕榈酰化, 可使乳腺癌细胞对T细胞杀

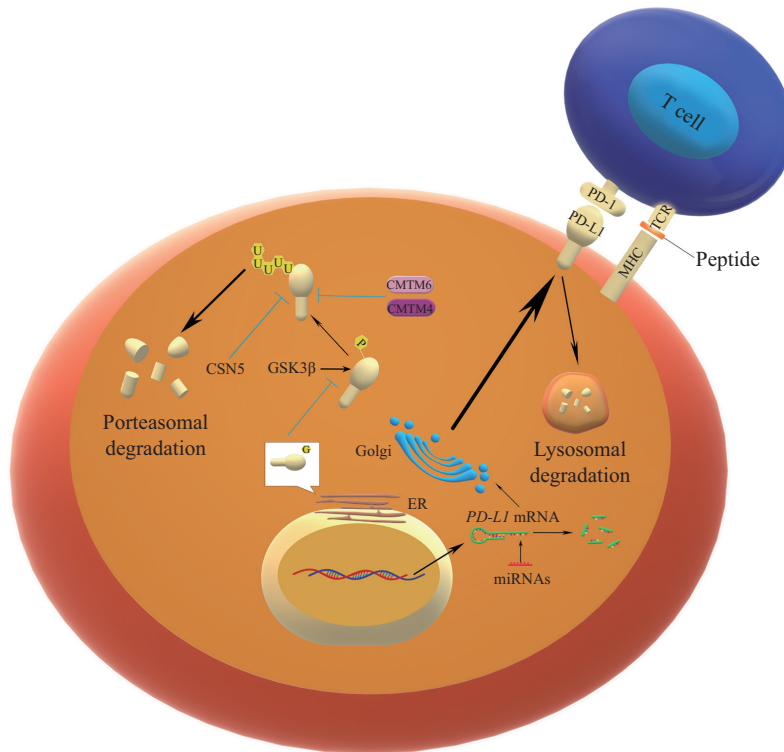


图1 PD-L1的翻译后修饰及降解

Fig.1 Post-translational modification and degradation of PD-L1

伤敏感,从而抑制肿瘤生长^[55]。乙酰化同样具有稳定和提升PD-L1表达的作用,有研究显示,*PD-L1*的启动子中有一个转录因子ETS2的结合位点,在乳腺癌细胞中的乙型肝炎X相互作用蛋白(hepatitis B X-interacting protein, HBXIP)能够上调和共激活转录因子ETS2来诱导*PD-L1*的转录。并且通过与乙酰基转移酶p300结合诱导PD-L1在赖氨酸270位(K270)的乙酰化,从而使PD-L1蛋白在乳腺癌细胞中稳定和积聚。证明PD-L1乙酰化是稳定PD-L1蛋白的重要方式,也是一个潜在的靶向治疗研究方向^[56]。

PD-L1的结合蛋白也会影响PD-L1蛋白的稳定性,CKLF样的Marvel跨膜区包含蛋白6[chemokine-like factor (CKLF)-like MARVEL transmembrane domain containing family member, CMTM6]是一种III型跨膜蛋白,存在于细胞表面,STUB1 E3泛素连接酶的缺失部分逆转了CMTM6基因敲除细胞的PD-L1蛋白水平,证明CMTM6通过与PD-L1蛋白结合抑制PD-L1的泛素化,使PD-L1不能成为溶酶体途径介导的降解靶点,从而保护PD-L1蛋白免受降解,通过延长PD-L1蛋白的半衰期来增强肿瘤细胞抑制T细胞的能力(图1)^[54,57]。有研究显示,CMTM6的耗尽减少

了干扰素- γ 诱导的PD-L1的表达量,但不会降低细胞表面MHC I类水平而影响抗原呈递,且不会损害PD-L1从内质网输出和由高尔基体向外运输,证明CMTM6不是PD-L1蛋白从内质网运输到细胞表面所必需的,但是PD-L1蛋白在质膜上稳定表达所必需的^[57]。此外,有研究显示CMTM6的近亲家族成员CMTM4同样具有与CMTM6相似的功能^[54]。另一种影响PD-L1稳定性的结合蛋白是Sigma1,它是一种由配体调节的整膜伴侣蛋白或支架蛋白,有助于细胞蛋白质和脂质的动态平衡^[58]。有实验证明,在表达Sigma1的TNBC细胞和雄激素非依赖性前列腺癌细胞中,PD-L1蛋白水平被Sigma1的RNAi敲除和Sigma1的小分子抑制剂所抑制。其机制是Sigma1调节剂可以通过调节药理反应蛋白复合物来调节PD-L1的转运和稳定性,还可以协同ER蛋白动态平衡机制的组成部分来调节PD-L1通过分泌途径向质膜的运输^[58]。Sigma1抑制剂可将分泌途径中的PD-L1蛋白隔离到自噬小体中并通过选择性自噬诱导PD-L1的降解^[58]。Sigma1的药理调节则可以影响通过免疫反应诱导的细胞因子,通过这些细胞因子介导细胞外反馈环或直接通过结合特定蛋白质来调节PD-L1的

产生和活性, 其机制是对肿瘤免疫微环境的调节, 提示选择性小分子Sigma1配体具有肿瘤免疫微环境调节的潜力^[58]。

代谢重编程被认为是肿瘤和免疫发展的标志。有证据表明, 代谢物可以通过直接相互作用或作为底物调节蛋白质的翻译后修饰来调节蛋白质的信号传递。因此, 除了生物能量和生物合成的供应外, 重新连接的代谢途径也在信号传递中发挥作用, 从而影响PD-L1的表达。例如干扰素- γ 可以通过AKT-mTORC1途径诱导肿瘤特异性叶酸循环酶亚甲基四氢叶酸脱氢酶2(methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2, MTHFD2)的表达, 同时, MTHFD2驱动叶酸循环以维持足够的尿苷相关代谢物, 包括UDP-GlcNAc, 从而促进包括c-MYC在内的全局蛋白O-N-乙酰葡萄糖胺糖基化修饰(O-GlcNAcylation), 从而增强c-MYC的稳定性和提高PD-L1的转录水平。在胰腺癌患者中, O-GlcNAcylation水平一直与MTHFD2和PD-L1呈正相关, 揭示了MTHFD2在细胞信号和癌症生物学中的非代谢作用^[59]。

亚细胞转运过程也能够通过影响PD-L1蛋白在细胞表面的含量间接影响肿瘤细胞的免疫逃逸。PD-L1蛋白在细胞内表达合成并被修饰, 最终在细胞膜表面发挥作用或被分泌到细胞外, 但也可能从细胞膜表面移位到细胞质中, 有研究显示, 经过伯喹(一种细胞内循环抑制剂)孵育后的细胞表面PD-L1蛋白迅速消失, 而在细胞的内循环小体中追踪到PD-L1蛋白和CMTM6, 表明大量细胞膜上的PD-L1蛋白不断地进行代谢和内化, 而经过同样处理的CMTM6基因敲除细胞中PD-L1不能有效循环, 前已述及, PD-L1的调节因子CMTM6能够通过抑制PD-L1蛋白的泛素化而稳定PD-L1蛋白, CMTM6的缺失可能导致内吞后PD-L1蛋白在溶酶体中被降解^[57]。PD-L1蛋白的内化和释放维持了位于细胞膜上的PD-L1蛋白的数量, 通过阻断内化循环途径来抑制PD-L1蛋白的表达量也是重要的研究思路。除了向细胞膜转运外, PD-L1还可以通过内吞作用和核质转运途径从质膜转移到细胞核中, PD-L1 C-端的Lys263在p300和HDAC2介导的乙酰化和去乙酰化作用控制下调节促炎反应和免疫反应相关基因的表达, 表明PD-L1的转录调控可能会促进局部肿瘤微环境中免疫炎症的发生, 使肿瘤对免疫检查点阻断治疗更加敏感。核PD-L1还

能够触发其他免疫检查点分子的表达, 这些分子不是PD-1/PD-L1阻断的靶点, 可能导致获得性免疫治疗耐药性。因此, 用HDAC2抑制剂阻断PD-L1的核转位可能会降低这些免疫检查点基因的转录, 导致CD8⁺T细胞浸润增加, TNF- α 水平降低, 进而增强针对PD-1的治疗性抗体所触发的抗肿瘤免疫反应, 为肿瘤免疫治疗提供了一种新的思路^[60]。

4 微环境分子调控机制

研究表明, 肿瘤微环境是在肿瘤发生过程中肿瘤细胞通过自身分泌物和外界细胞分泌物所产生的包围在肿瘤细胞周围的动态物质环境和细胞因子, 不仅含有营养物质, 还含有大量免疫细胞。为了满足细胞生物能量和生物合成的需求, 肿瘤细胞必须适应不断变化的微环境, 肿瘤细胞和免疫细胞都会重新编程代谢途径, 实现动态的对抗。在TEM中的许多特异性细胞因子和肿瘤来源的外泌体都可以诱导PD-L1的表达并引发免疫逃逸过程。

PD-L1主要作用于富含乳酸的肿瘤微环境, 同时, T细胞自噬是在缺乏色氨酸、精氨酸和葡萄糖的微环境中被诱导的。在这种细胞生长快速而周围营养缺乏的情况下, 葡萄糖无氧代谢增加, 造成乳酸积累, 从而为PD-1/PD-L1相互作用和肿瘤细胞的抗药性创造了最佳环境^[61]。缺氧诱导因子1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)是微环境中另一个主要的癌症驱动因子, 低氧环境会诱导HIF-1 α 的激活和乳酸的积累, HIF-1 α 与PD-L1启动子(一种缺氧反应元件)结合可刺激PD-L1的转录, 有助于肿瘤细胞从免疫系统中逃逸^[9]。例如, 有研究发现Zeste同源物增强子2(enhancer of zeste homolog 2, EZH2)能够通过HIF-1 α 调节NSCLC细胞中免疫抑制分子PD-L1的表达, 且EZH2的增强子是具有组蛋白甲基转移酶活性的表观遗传调节分子, 能够促进免疫抑制微环境的形成^[62]。研究显示, 在NSCLC中EZH2和PD-L1的表达水平之间存在很强的正相关关系, 提示EZH2可通过上调HIF-1 α 来调节PD-L1^[62]。

肿瘤细胞外泌体中的非编码RNA也能够促进PD-L1的表达并引发免疫逃逸, 在慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)中, 单核细胞和巨噬细胞有促肿瘤表型倾向, 包括支持肿瘤的细胞因子的释放和免疫抑制分子如PD-L1的表达。此外, CLL衍生的外泌体被证明可以诱导癌症相关

成纤维细胞的产生。研究显示,在CLL来源的外泌体中非编码Y RNA hY4能够驱动单核细胞中Toll样受体7(Toll-like receptor 7, TLR7)信号通路并诱发PD-L1的表达,研究人员在多种肿瘤来源的外泌体中也检测出了Y RNA,并且观察到了肿瘤相关的慢性炎症和PD-L1表达上调^[63]。以上研究发现证明了肿瘤微环境中的外泌体在促进肿瘤进展中发挥了一定作用,是肿瘤微环境的重要调节因素和抑制位点。

对微环境的调控是一项复杂而系统的研究,微环境的变化影响了T细胞浸润和T细胞活化等过程,对免疫抑制微环境的研究有助于了解肿瘤进展和减弱治疗抗性^[64]。

5 小分子药物治疗及展望

在正常生理条件下,PD-L1的mRNA受到严格的转录后调控,与之形成鲜明对比的是在各种人类肿瘤细胞表面均有大量PD-L1蛋白表达,因为肿瘤微环境中的癌细胞和其他细胞在遇到T细胞后可以通过干扰素- γ 上调PD-L1的表达。肿瘤细胞和肿瘤微环境中的其他细胞也可表达高水平的PD-L1,这些过表达的PD-L1均可与PD-1相互作用而抑制免疫功能。PD-L1对免疫抑制的影响机制十分复杂,表达PD-L1的细胞可以通过多种机制抑制肿瘤免疫,如PD-L1⁺肿瘤细胞和抗原呈递细胞可诱导T细胞凋亡、功能衰竭并刺激人外周血T细胞产生IL-10以介导免疫抑制;它们还可以介导树突状细胞抑制和诱导调节T细胞的分化;PD-L1还可以在癌细胞上形成“分子屏障”,保护肿瘤细胞免受细胞毒性T淋巴细胞的溶解,有效防止免疫效应器细胞杀死癌细胞。PD-L1途径介导的肿瘤免疫逃逸是一种“适应性抵抗”。肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)对肿瘤抗原的识别能启动这种“适应性抵抗”。经T细胞受体特异性识别后,TIL释放干扰素- γ ,并可能诱导这些细胞表达PD-L1。PD-L1在大多数正常组织中并不存在,而干扰素- γ 可以诱导几乎任何有核细胞中PD-L1的表达^[65]。干扰素- γ 可以通过增加TIL的分化以及刺激抗原的处理和呈递来增强TIL的功能,而细胞表面的PD-L1结合其受体从而使T细胞瘫痪。因此,虽然PD-L1表达上调的生理功能是阻止炎症扩散和减轻组织损伤,但在肿瘤微环境中诱导的PD-L1则可抑制肿瘤免疫的负反馈调节。

近些年来,PD-L1靶向单克隆抗体(monoclonal

antibody, MAb)是针对免疫抑制的主要应对方式,如pembrolizumab和nivolumab是已获得批准上市的MAb药物,且在几种肿瘤细胞的治疗中显示出明显效果。然而,治疗性抗体也表现出一些缺点,如有限的组织和肿瘤渗透,相对较大的单抗难以很好地穿透复杂的肿瘤微环境,从而限制MAb的治疗效果^[66],同时非常长的半衰期,缺乏口服生物利用度,免疫原性,以及生产困难和价格昂贵都限制了MAb的应用规模和前景。此外,目前针对PD-1/PD-L1轴的单克隆抗体只在一小部分病例和肿瘤类型中起作用^[67]。因此,开发更小尺寸的小分子药物和提高肿瘤PD-L1靶向的特异性是至关重要的^[68],小分子药物由于具有更好的肿瘤穿透性和口服利用度对疗效可能会有显著提升作用^[6]。在分子结构学领域,通过对共晶结构的研究发现小分子药物结合的可能性,如BMS化合物能够结合于PD-L1和PD-1的相互作用表面,PD-L1与PD-1的这种相互作用产生了对称排列的蛋白质二聚体,即在两个蛋白质分子之间存在一个小分子结合位点。分析蛋白质分子和结合的抑制剂之间的相互作用,可以表征疏水蛋白质-抑制剂接触的网络,以及稳定同源二聚体的大量氢键和静电效应,证明了PD-1/PD-L1免疫检查点的小分子药物抑制可行性^[6]。最新研究表明,一种化合物ARB-272572(化合物A)可以与PD-L1结合形成顺式相互作用的同源二聚体,并通过在两个PD-L1分子之间形成的疏水区来稳定PD-L1同源二聚体诱导细胞表面PD-L1的快速内化,其内化造成了细胞表面PD-L1的快速丢失,从而阻止PD-L1与表达PD-1的细胞的进一步相互作用,但这种内化是可逆的^[69],意味着不会对治疗之外的正常细胞造成不可逆损伤,对生物学检查点和临床治疗具有指导意义。

目前,大多数的小分子抑制剂的研究都直接针对PD-1和PD-L1蛋白的结合位点,而对于PD-L1上游调控通路的小分子抑制剂的研究十分有限。PD-L1上游通路的调控作用是根据不同癌细胞类型而不同的,并且肿瘤微环境的差异也会影响其调控效果,因此针对上游通路的小分子抑制剂虽可能难以显现广泛的适用性,但也可能成为癌症治疗过程中的辅助治疗手段。

参考文献 (References)

- [1] ESCORS D, GATO-CANAS M, ZUAZO M, et al. The intracellular signalosome of PD-L1 in cancer cells [J]. Signal Transduct

- Target Ther, 2018, 3: 26.
- [2] DONG H, ZHU G, TAMADA K, et al. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion [J]. *Nat Med*, 1999, 5(12): 1365-9.
- [3] WOODS D M, SODRE A L, VILLAGRA A, et al. HDAC inhibition upregulates PD-1 ligands in melanoma and augments immunotherapy with PD-1 blockade [J]. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3(12): 1375-85.
- [4] LIENLAF M, PEREZ-VILLARROEL P, KNOX T, et al. Essential role of HDAC6 in the regulation of PD-L1 in melanoma [J]. *Mol Oncol*, 2016, 10(5): 735-50.
- [5] ZHU H, BENGSCH F, SVORONOS N, et al. BET bromodomain inhibition promotes anti-tumor immunity by suppressing PD-L1 expression [J]. *Cell Rep*, 2016, 16(11): 2829-37.
- [6] ZAK K M, GRUDNIK P, MAGIERA K, et al. Structural biology of the immune checkpoint receptor PD-1 and its ligands PD-L1/PD-L2 [J]. *Structure*, 2017, 25(8): 1163-74.
- [7] PASCOLUTTI R, SUN X, KAO J, et al. Structure and dynamics of PD-L1 and an ultra-high-affinity PD-1 receptor mutant [J]. *Structure*, 2016, 24(10): 1719-28.
- [8] LAZAR-MOLNAR E, SCANDIUZZI L, BASU I, et al. Structure-guided development of a high-affinity human Programmed Cell Death-1: implications for tumor immunotherapy [J]. *EBio-Medicine*, 2017, 17: 30-44.
- [9] WANG Y, WANG H, YAO H, et al. Regulation of PD-L1: emerging routes for targeting tumor immune evasion [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 536.
- [10] WANG W, LI F, MAO Y, et al. A miR-570 binding site polymorphism in the B7-H1 gene is associated with the risk of gastric adenocarcinoma [J]. *Hum Genet*, 2013, 132(6): 641-8.
- [11] SHIN D S, ZARETSKY J M, ESCUIN-ORDINAS H, et al. Primary resistance to PD-1 blockade mediated by JAK1/2 mutations [J]. *Cancer Discov*, 2017, 7(2): 188-201.
- [12] GEORGE J, SAITO M, TSUTA K, et al. Genomic amplification of CD274 (PD-L1) in small-cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(5): 1220-6.
- [13] CLAVE S, PIJUAN L, CASADEVALL D, et al. CD274 (PDL1) and JAK2 genomic amplifications in pulmonary squamous-cell and adenocarcinoma patients [J]. *Histopathology*, 2018, 72(2): 259-69.
- [14] IKEDA S, OKAMOTO T, OKANO S, et al. PD-L1 is upregulated by simultaneous amplification of the PD-L1 and JAK2 genes in non-small cell lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2016, 11(1): 62-71.
- [15] KRESS T R, SABO A, AMATI B. MYC: connecting selective transcriptional control to global RNA production [J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(10): 593-607.
- [16] SHI Y. Regulatory mechanisms of PD-L1 expression in cancer cells [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2018, 67(10): 1481-9.
- [17] KATAOKA K, SHIRAIISHI Y, TAKEDA Y, et al. Aberrant PD-L1 expression through 3'-UTR disruption in multiple cancers [J]. *Nature*, 2016, 534(7607): 402-6.
- [18] GREEN M R, RODIG S, JUSZCZYNSKI P, et al. Constitutive AP-1 activity and EBV infection induce PD-L1 in Hodgkin lymphomas and posttransplant lymphoproliferative disorders: implications for targeted therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(6): 1611-8.
- [19] FANG W, ZHANG J, HONG S, et al. EBV-driven LMP1 and IFN-gamma up-regulate PD-L1 in nasopharyngeal carcinoma: implications for oncotargeted therapy [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(23): 12189-202.
- [20] GARCIA-DIAZ A, SHIN D S, MORENO B H, et al. Interferon receptor signaling pathways regulating PD-L1 and PD-L2 expression [J]. *Cell Rep*, 2017, 19(6): 1189-201.
- [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): 925-39.
- [22] WANG X, YANG L, HUANG F, et al. Inflammatory cytokines IL-17 and TNF-alpha up-regulate PD-L1 expression in human prostate and colon cancer cells [J]. *Immunol Lett*, 2017, 184: 7-14.
- [23] MARZEC M, ZHANG Q, GORADIA A, et al. Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(52): 20852-7.
- [24] LEE S J, JANG B C, LEE S W, et al. Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN-gamma-induced upregulation of B7-H1 (CD274) [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(3): 755-62.
- [25] LI N, WANG J, ZHANG N, et al. Cross-talk between TNF-alpha and IFN-gamma signaling in induction of B7-H1 expression in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2018, 67(2): 271-83.
- [26] CONCHA-BENAVENTE F, SRIVASTAVA R M, TRIVEDI S, et al. Identification of the cell-intrinsic and -extrinsic pathways downstream of EGFR and IFN-gamma that induce PD-L1 expression in head and neck cancer [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(5): 1031-43.
- [27] MOON J W, KONG S K, KIM B S, et al. IFN-gamma induces PD-L1 overexpression by JAK2/STAT1/IRF-1 signaling in EBV-positive gastric carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 17810.
- [28] LIU J, HAMROUNI A, WOLOWIEC D, et al. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN-gamma and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway [J]. *Blood*, 2007, 110(1): 296-304.
- [29] OKITA R, MAEDA A, SHIMIZU K, et al. PD-L1 overexpression is partially regulated by EGFR/HER2 signaling and associated with poor prognosis in patients with non-small-cell lung cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2017, 66(7): 865-76.
- [30] FIEDLER M, SCHULZ D, PIENDL G, et al. Buparlisib modulates PD-L1 expression in head and neck squamous cell carcinoma cell lines [J]. *Exp Cell Res*, 2020, 396(1): 112259.
- [31] SUMIMOTO H, TAKANO A, TERAMOTO K, et al. RAS-mitogen-activated protein kinase signal is required for enhanced PD-L1 expression in human lung cancers [J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0166626.
- [32] WU Y, ZHANG C, LIU X, et al. ARIH1 signaling promotes anti-tumor immunity by targeting PD-L1 for proteasomal degradation [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2346.
- [33] YANG L, HUANG F, MEI J, et al. Posttranscriptional control of PD-L1 expression by 17beta-estradiol via PI3K/Akt signaling pathway in ERalpha-positive cancer cell lines [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2017, 27(2): 196-205.
- [34] QUANDT D, JASINSKI-BERGNER S, MULLER U, et al. Synergistic effects of IL-4 and TNF-alpha on the induction of B7-H1 in renal cell carcinoma cells inhibiting allogeneic T cell proliferation [J]. *J Transl Med*, 2014, 12(1): 151.
- [35] BOES M, MEYER-WENTRUP F. TLR3 triggering regulates

- PD-L1 (CD274) expression in human neuroblastoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2015, 361(1): 49-56.
- [36] COELHO M A, DE CARNE TRECESSON S, RANA S, et al. Oncogenic RAS signaling promotes tumor immunoresistance by stabilizing PD-L1 mRNA [J]. *Immunity*, 2017, 47(6): 1083-99 e6.
- [37] MAO R, TAN X, XIAO Y, et al. Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 promotes expression of programmed cell death-ligand 1 in non-small-cell lung cancer cells [J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(9): 3174-83.
- [38] QIN G, WANG X, YE S, et al. NPM1 upregulates the transcription of PD-L1 and suppresses T cell activity in triple-negative breast cancer [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1669.
- [39] CHEN X M. MicroRNA signatures in liver diseases [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(14): 1665-72.
- [40] GONG A Y, ZHOU R, HU G, et al. MicroRNA-513 regulates B7-H1 translation and is involved in IFN-gamma-induced B7-H1 expression in cholangiocytes [J]. *J Immunol*, 2009, 182(3): 1325-33.
- [41] WANG X, LI J, DONG K, et al. Tumor suppressor miR-34a targets PD-L1 and functions as a potential immunotherapeutic target in acute myeloid leukemia [J]. *Cell Signal*, 2015, 27(3): 443-52.
- [42] CORTEZ M A, IVAN C, VALDECANAS D, et al. PDL1 regulation by p53 via miR-34 [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2016, 108(1): djv303.
- [43] CHEN L, GIBBONS D L, GOSWAMI S, et al. Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression [J]. *Nat Commun*, 2014, 5(1): 5241.
- [44] FUJITA Y, YAGISHITA S, HAGIWARA K, et al. The clinical relevance of the miR-197/CKS1B/STAT3-mediated PD-L1 network in chemoresistant non-small-cell lung cancer [J]. *Mol Ther*, 2015, 23(4): 717-27.
- [45] SHAO L, HE Q, WANG J, et al. MicroRNA-326 attenuates immune escape and prevents metastasis in lung adenocarcinoma by targeting PD-L1 and B7-H3 [J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1): 145.
- [46] XU S, TAO Z, HAI B, et al. miR-424(322) reverses chemoresistance via T-cell immune response activation by blocking the PD-L1 immune checkpoint [J]. *Nat Commun*, 2016, 7(1): 11406.
- [47] ZHAO L, YU H, YI S, et al. The tumor suppressor miR-138-5p targets PD-L1 in colorectal cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(29): 45370-84.
- [48] AUDRITO V, SERRA S, STINGI A, et al. PD-L1 up-regulation in melanoma increases disease aggressiveness and is mediated through miR-17-5p [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(9): 15894-911.
- [49] CIOFFI M, TRABULO S M, VALLESPINOS M, et al. The miR-25-93-106b cluster regulates tumor metastasis and immune evasion via modulation of CXCL12 and PD-L1 [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(13): 21609-25.
- [50] LASTWIKA K J, WILSON W, 3RD, LI Q K, et al. Control of PD-L1 expression by oncogenic activation of the AKT-mTOR pathway in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(2): 227-38.
- [51] LI C W, LIM S O, XIA W, et al. Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity [J]. *Nat Commun*, 2016, 7(1): 12632.
- [52] MCCUBREY J A, STEELMAN L S, BERTRAND F E, et al. GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(10): 2881-911.
- [53] ZHANG J, BU X, WANG H, et al. Cyclin D-CDK4 kinase destabilizes PD-L1 via cullin 3-SPOP to control cancer immune surveillance [J]. *Nature*, 2018, 553(7686): 91-5.
- [54] MEZZADRA R, SUN C, JAE L T, et al. Identification of CMTM6 and CMTM4 as PD-L1 protein regulators [J]. *Nature*, 2017, 549(7670): 106-10.
- [55] YANG Y, HSU J M, SUN L, et al. Palmitoylation stabilizes PD-L1 to promote breast tumor growth [J]. *Cell Res*, 2019, 29(1): 83-6.
- [56] XU F F, SUN H M, FANG R P, et al. The modulation of PD-L1 induced by the oncogenic HBXIP for breast cancer growth [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 10: 1038.
- [57] BURR M L, SPARBIER C E, CHAN Y C, et al. CMTM6 maintains the expression of PD-L1 and regulates anti-tumour immunity [J]. *Nature*, 2017, 549(7670): 101-5.
- [58] MAHER C M, THOMAS J D, HAAS D A, et al. Small-molecule sigma1 modulator induces autophagic degradation of PD-L1 [J]. *Mol Cancer Res*, 2018, 16(2): 243-55.
- [59] SHANG M, YANG H, YANG R, et al. The folate cycle enzyme MTHFD2 induces cancer immune evasion through PD-L1 up-regulation [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1940.
- [60] GAO Y, NIHIRA N T, BU X, et al. Acetylation-dependent regulation of PD-L1 nuclear translocation dictates the efficacy of anti-PD-1 immunotherapy [J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(9): 1064-75.
- [61] ROBAINAS M, OTANO R, BUENO S, et al. Understanding the role of PD-L1/PD1 pathway blockade and autophagy in cancer therapy [J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10: 1803-7.
- [62] ZHAO Y, WANG X X, WU W, et al. EZH2 regulates PD-L1 expression via HIF-1alpha in non-small cell lung cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 517(2): 201-9.
- [63] HADERK F, SCHULZ R, ISKAR M, et al. Tumor-derived exosomes modulate PD-L1 expression in monocytes [J]. *Sci Immunol*, 2017, 2(13): eaah5509.
- [64] WEI Y, XIAO X, LAO X M, et al. Immune landscape and therapeutic strategies: new insights into PD-L1 in tumors [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(3): 867-87.
- [65] CHEN L, HAN X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(9): 3384-91.
- [66] LEE C M, TANNOCK I F. The distribution of the therapeutic monoclonal antibodies cetuximab and trastuzumab within solid tumors [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10(1): 255.
- [67] ZARGANES-TZITZIKAS T, KONSTANTINIDOU M, GAO Y, et al. Inhibitors of programmed cell death 1 (PD-1): a patent review (2010-2015) [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2016, 26(9): 973-7.
- [68] TAN S, ZHANG C W, GAO G F. Seeing is believing: anti-PD-1/PD-L1 monoclonal antibodies in action for checkpoint blockade tumor immunotherapy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2016, 1(1): 16029.
- [69] PARK J J, THI E P, CARPIO V H, et al. Checkpoint inhibition through small molecule-induced internalization of programmed death-ligand 1 [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1222.