

PD-L1对人口腔鳞状细胞癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响

曾洁¹, 俞雪燕², 罗婷³, 徐江¹

(1. 石河子大学第一附属医院口腔科, 新疆 石河子 832000; 2. 石河子大学第一附属医院病理科, 新疆 石河子 832000; 3. 新疆维吾尔自治区儿童医院检验科, 新疆 乌鲁木齐 830000)

[摘要] **目的:** 探讨程序性细胞死亡配体1 (PD-L1) 在口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 细胞中的表达及其对OSCC CAL27细胞生物学行为的影响, 阐明其可能的作用机制。**方法:** 采用Western blotting法检测口腔上皮HOK细胞和OSCC CAL27、TCA8113和SCC15细胞中PD-L1蛋白表达水平。免疫荧光染色法检测CAL27细胞中PD-L1蛋白表达和定位情况。将CAL27细胞分为对照组 (转染si-NC) 和si-PD-L1组 (转染si-PD-L1), Western blotting法检测2组细胞干扰效率, CCK-8法检测不同时间点2组细胞增殖活性, 平板克隆实验检测2组细胞克隆形成数, 细胞划痕愈合实验检测2组细胞划痕愈合率, Transwell小室实验检测2组细胞中迁移和侵袭细胞数。**结果:** OSCC细胞中PD-L1蛋白表达水平平均高于HOK细胞 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), PD-L1在CAL27细胞的细胞质和细胞核中均有表达。CCK-8法和平板克隆实验, 与对照组比较, 不同时间点si-PD-L1组CAL27细胞增殖活性明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 克隆形成数明显减少 ($P < 0.01$)。细胞划痕愈合实验, 与对照组比较, si-PD-L1组CAL27细胞划痕愈合率明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。Transwell小室实验, 与对照组比较, si-PD-L1组CAL27细胞中迁移和侵袭细胞明显减少 ($P < 0.01$)。**结论:** PD-L1在OSCC细胞中的表达高于口腔正常上皮细胞, 敲低PD-L1表达可抑制OSCC细胞增殖、克隆形成及迁移和侵袭能力。

[关键词] 口腔鳞状细胞癌; 程序性细胞死亡配体1; 细胞增殖; 细胞迁移; 细胞侵袭

[中图分类号] R739.8 **[文献标志码]** A

Effect of PD-L1 on proliferation, migration, and invasion of human oral squamous carcinoma cells

ZENG Jie¹, YU Xueyan², LUO Ting³, XU Jiang¹

(1. Department of Stomatology, First Affiliated Hospital, Shihezi University, Shihezi 832000, China;
2. Department of Pathology, First Affiliated Hospital, Shihezi University, Shihezi 832000, China;
3. Department of Laboratory, Children's Hospital, Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the expression of programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) in the oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells and its effect on biological behavior of the OSCC CAL27 cells, and to clarify the possible mechanism. **Methods:** Western blotting method was used to detect the expression levels of PD-L1 protein in the oral epithelial HOK cells and OSCC CAL27, TCA8113, and SCC15 cells;

[收稿日期] 2023-03-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82160572)

[作者简介] 曾洁 (1996—), 女, 新疆维吾尔自治区博乐市人, 在读硕士研究生, 主要从事口腔颌面部肿瘤基础和临床方面的研究。

[通信作者] 徐江, 教授, 硕士研究生导师 (E-mail: 1437759520@qq.com)

immunofluorescence staining method was used to detect the expression and localization of PD-L1 protein in the CAL27 cells. The CAL27 cells were divided into control group (transfected with si-NC) and si-PD-L1 group (transfected with si-PD-L1). Western blotting method was used to detect the interference efficiency of the cells in two groups; CCK-8 assay was used to detect the proliferative activities of the cells in two groups at different time points; plate clone formation assay was used to detect the numbers of clone formation of the cells in two groups; cell scratch healing assay was used to detect the scratch healing rates of the cells in two groups; Transwell chamber assay was used to detect the numbers of migration and invasion cells in two groups. **Results:** The expression level of PD-L1 protein in the OSCC cells was higher than that in the HOK cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); PD-L1 expressed in the cytoplasm and nucleus of the CAL27 cells. The CCK-8 assay and plate clone formation assay results showed that compared with control group, the proliferative activities of the CAL27 cells in si-PD-L1 group at different time points were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the numbers of clone formation were significantly decreased ($P < 0.01$). The cell scratch healing assay results showed that compared with control group, the scratch healing rates of the cells in si-PD-L1 group were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The Transwell chamber assay results showed that compared with control group, the numbers of migration and invasion cells in si-PD-L1 group were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion:** The expression of PD-L1 in the OSCC cells is higher than that in normal oral epithelial cells, and knocking down PD-L1 expression can inhibit the proliferation, clone formation, migration and invasion capabilities of the OSCC cells.

KEYWORDS Oral squamous cell carcinoma; Programmed cell death-ligand 1; Cell proliferation; Cell migration; Cell invasion

口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 约占口腔癌的 90%, 是一个严重的全球健康问题, 也是世界范围内重大的公共健康威胁^[1-2], 其5年生存率仅为 30%, 局部和远处转移及局部复发是 OSCC 患者不良预后的主要影响因素^[3], 因此研究 OSCC 的发生发展机制和寻找新的诊疗靶标至关重要。

程序性细胞死亡配体 1 (programmed cell death-ligand 1, PD-L1) 常与程序性细胞死亡受体 1 (programmed cell death receptor-1, PD-1) 相互作用, 进而导致针对肿瘤细胞的免疫应答失活^[4]。研究^[5-6]显示: PD-L1 在多种癌症中过表达, 如黑色素瘤、肾上腺皮质癌和脑肿瘤等, 并与患者的预后呈负相关关系。田国永等^[7]研究发现: PD-L1 在 OSCC 组织中高表达, 其高表达可缩短患者的生存期, 并与淋巴结转移等有关。但关于 PD-L1 在 OSCC 中发挥作用的具体分子机制尚未完全阐明。本研究探讨 PD-L1 在 OSCC 细胞系中的表达, 通过敲低 PD-L1 表达分析其对 OSCC CAL27 细胞增殖、克隆形成、迁移和侵袭能力的影响, 为 OSCC 的诊断和治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 口腔上皮 HOK 细胞购自河北北纳生物科技有限公司, OSCC CAL27 和 SCC15 细胞购自美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC) 细胞库, OSCC TCA8113 细胞购自上海吉凯基因医学科技有限公司。兔抗 PD-L1 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司, β -actin 抗体、辣根酶标记山羊抗兔 IgG、辣根酶标记山羊抗鼠 IgG 和山羊抗兔 IgG/FITC 二抗均购自北京中杉金桥生物技术有限公司, CCK-8 试剂盒购自米鼠 (西安) 生物技术有限公司, 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 片段购自苏州吉玛基因股份有限公司, 引物序列见表 1。

表 1 PD-L1 siRNA 引物序列
Tab. 1 Primer sequences of PD-L1 siRNA

Primer	Sequence(5'-3')
Si-PD-L1	F:GCAGUGACCAUCAAGUCCUTT
	R:AGGACUUGAUGGUCACUGCTT
Si-NC	F:UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	R:ACGUGACACGUUCGGAGAATT

1.2 Western blotting 法检测口腔上皮HOK细胞和OSCC细胞中PD-L1蛋白表达水平 收集生长状态良好的HOK、CAL-27、SCC-15和TCA8113细胞,采用RIPA裂解液分离总蛋白,蛋白定量后,将总蛋白(约0.8 g)上样进行SDS-PAGE电泳,湿转至PVDF膜,无蛋白快速封闭液封闭15 min,采用稀释的一抗PD-L1(1:1 000)和 β -actin(1:5 000)4℃下孵育过夜。隔天采用含0.2%吐温的TBS(TBST)洗涤6次,每次5 min,将膜与二抗山羊抗兔IgG(H+L)-HRP(1:15 000)和山羊抗鼠IgG(H+L)-HRP(1:20 000)孵育2 h,再次将膜洗净,采用蛋白成像系统(Tanon5200)检测蛋白条带灰度值,采用Image J软件进行灰度值分析,计算细胞中PD-L1蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/ β -actin蛋白条带灰度值。

1.3 免疫荧光染色法检测CAL27细胞中PD-L1蛋白表达和定位情况 常规培养HOK和CAL27细胞,12孔细胞培养板爬片,培养24 h后细胞密度为60%~70%,1×PBS缓冲液漂洗2 min,共3次,室温下多聚甲醛固定15 min,再次1×PBS缓冲液漂洗,0.2% Triton-X-100透化3 min,1×PBS缓冲液洗净,37℃条件下采用5%BSA封闭30 min,吸尽封闭液后加入一抗PD-L1(1:500),4℃湿盒内孵育过夜。第2天室温下复温30 min,PBS缓冲液洗净,暗室内孵育二抗(1:50)2 h,PBS缓冲液漂洗,DAPI染核30 min后立即用抗荧光淬灭剂封片,倒置荧光显微镜下观察PD-L1蛋白表达和定位情况并拍照,其中绿色荧光代表PD-L1蛋白表达。

1.4 CAL27细胞分组和转染 取对数生长期CAL27细胞分为对照组(转染si-NC)和si-PD-L1组(转染si-PD-L1),消化离心后于6孔细胞培养板内铺板,保证培养24 h后细胞密度约为70%,PBS缓冲液洗净后加入2 mL无血清培养基,分别加入Lipofectamine 2000和PD-L1 siRNA混匀的转染试剂,静置15 min,加入弃去原培养基且PBS缓冲液洗净的6孔细胞培养板中,培养4~6 h后直接更换为完全培养基,48 h转染结束后收集细胞,进行后续研究。

1.5 CCK-8法检测2组CAL27细胞增殖活性 细胞分组见“1.4”。细胞转染后,以每孔2 000个细胞的密度铺板于96孔细胞培养板中,每组至少3个

复孔,最边缘孔加入PBS缓冲液,37℃培养2 h使细胞贴壁,避光条件下每孔加入CCK-8试剂10 μ L,继续培养24、48、72和96 h,采用分光光度计检测波长450 nm处吸光度(A)值,重复测量3次,计算平均值,以A值平均值表示细胞增殖活性。

1.6 平板克隆形成实验检测2组CAL27细胞克隆形成率 细胞分组见“1.4”。6孔细胞培养板中每孔加入3 000个细胞,每组重复3孔,37℃继续培养10 d终止,PBS缓冲液温和洗涤3次,4%冰多聚甲醛固定15 min,PBS缓冲液再次温和洗涤,4℃冰箱内结晶紫染色15 min,PBS缓冲液洗净多余染色,晾干后拍照。细胞克隆计数的标准为显微镜下每个克隆含有的细胞数大于50个。

1.7 细胞划痕实验检测2组CAL27细胞划痕愈合率 细胞分组见“1.4”。6孔细胞培养板中接种细胞,确保第2天细胞密度达90%以上,200 μ L无菌枪头竖直划痕,PBS缓冲液轻轻洗除划痕细胞,加入无血清培养基继续培养,0、24和48 h时显微镜下观察拍照,采用Image J软件计算划痕部位的迁移面积,并计算划痕愈合率。划痕愈合率=(起始划痕面积-迁移后划痕面积)/起始划痕面积 \times 100%。

1.8 Transwell小室实验检测2组CAL27细胞中迁移和侵袭细胞数 细胞迁移实验:于Transwell小室上层加入 5×10^4 个悬浮于200 μ L无血清培养基的细胞,在下室添加600 μ L完全培养基,培养24 h后,取出小室,PBS缓冲液洗涤2次,冰甲醇固定20 min,然后用0.5%结晶紫室温染色30 min,棉签轻轻擦拭小室内部并晾干,显微镜下观察染色细胞并随机选取5个视野进行细胞计数,5个视野迁移细胞数均值即为迁移细胞数,代表细胞迁移能力。细胞侵袭实验:将Matrigel基质胶加入Transwell小室内均匀平铺,然后将小室置于37℃培养箱静置2 h,使胶充分凝固,取出小室,小心吸去上层液体,再加入100 μ L无血清培养基,继续在37℃培养箱中静置30 min,使胶充分水化,再次吸尽小室上层液体,后续实验步骤和侵袭细胞计数同细胞迁移实验。

1.9 统计学分析 采用SPSS 26.0和GraphPad Prism 9.0统计软件进行统计学分析。细胞中PD-L1蛋白表达水平、细胞增殖活性、克隆形成率、划痕愈合率、迁移细胞数和侵袭细胞数均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用

LSD-*t*检验, 2组间样本均数比较采用两独立样本 *t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

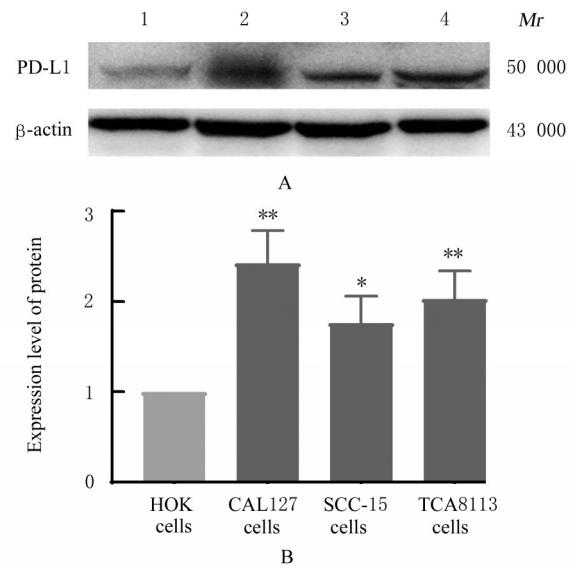
2 结果

2.1 OSCC细胞中PD-L1蛋白表达水平及CAL27细胞中PD-L1蛋白表达和定位情况 与HOK细胞比较, CAL27、SCC15和TCA8113细胞中PD-L1蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。CAL27细胞中PD-L1蛋白表达水平最高, 且CAL27易培养, 生长分裂增殖快, 细胞状态佳, 故选择CAL27细胞进行后续实验。免疫荧光染色显示: CAL27细胞的细胞质和细胞核中均有PD-L1表达, 与HOK细胞比较, PD-L1在CAL27细胞的细胞质中表达较强。见图1和2。

2.2 2组CAL27细胞中PD-L1蛋白表达水平 与对照组比较, si-PD-L1组细胞中PD-L1蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 表明 si-PD-L1在CAL27细胞中干扰有效。见图3。

2.3 2组CAL27细胞增殖活性和克隆形成数 CCK-8作用24、48、72和96 h后, 与对照组比较, si-PD-L1组CAL27细胞增殖活性明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。平板克隆形成实验结果显示: 与对照组 (534.2个 \pm 4.3个) 比较, si-PD-L1组CAL27细胞克隆形成数 (257.8个 \pm 2.5个) 明显减少 ($P < 0.01$)。见图4和5。

2.4 2组CAL27细胞划痕愈合率 划痕后24和48 h, 与对照组比较, si-PD-L1组细胞划痕距离更



Lane 1: HOK cells; Lane 2: CAL27 cells; Lane 3: SCC15 cells; Lane 4: TCA8113 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with HOK cells.

图1 Western blotting法检测不同细胞中PD-L1蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 1 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expression of PD-L1 protein in different cells detected by Western blotting method

宽, 划痕面积更大, 划痕愈合率明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图6和7。

2.5 2组CAL27细胞中迁移细胞数和侵袭细胞数 与对照组 (274.2个 \pm 11.4个) 比较, si-PD-L1组细胞中迁移细胞数 (115.3个 \pm 5.0个)

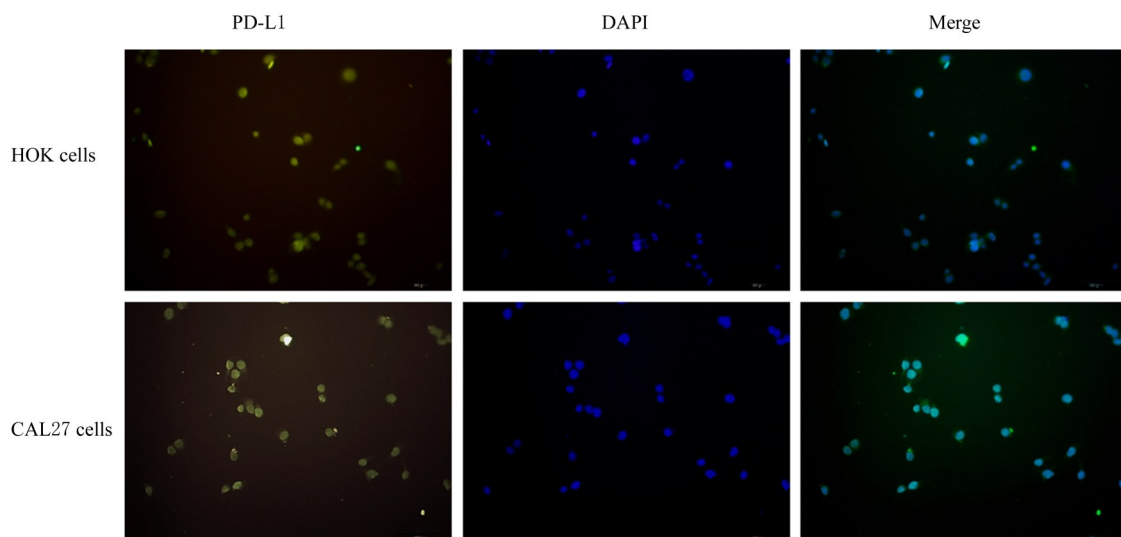
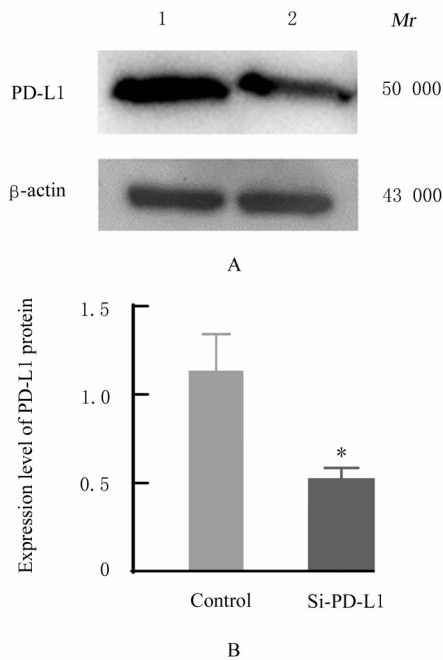


图2 HOK细胞和CAL27细胞中PD-L1蛋白表达情况(免疫荧光, $\times 200$)

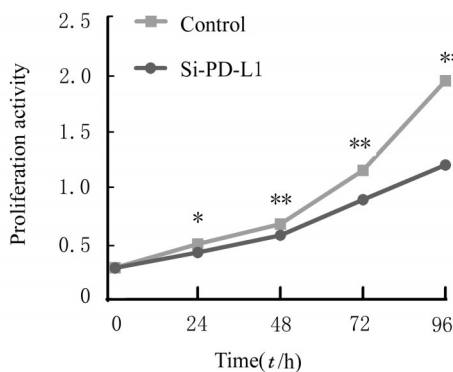
Fig. 2 Expression of PD-L1 protein in HOK cells and CAL27 cells (Immunofluorescence, $\times 200$)



Lane 1: Control group; Lane 2: Si-PD-L1 group. * $P < 0.05$ compared with control group.

图3 Western blotting法检测2组CAL27细胞中PD-L1蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 3 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expression of PD-L1 protein in CAL27 cells in two groups detected by Western blotting method

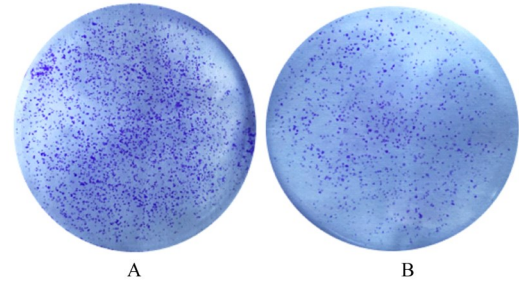


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group.

图4 CCK-8法检测不同时间点2组CAL27细胞增殖活性

Fig. 4 Proliferation activities of CAL27 cells in two groups at different time points detected by CCK-8 assay

明显减少 ($P < 0.01$); 与对照组 (247.9个 \pm 8.2个) 比较, si-PD-L1组细胞中侵袭细胞数 (154.7个 \pm 13.7个) 明显减少 ($P < 0.01$)。见图8和9。



A: Control group; B: Si-PD-L1 group.

图5 平板克隆形成实验检测2组CAL27细胞克隆形成情况(结晶紫)

Fig. 5 Clone formation of CAL27 cells in two groups detected by plate clone formation assay (Crystal violet)

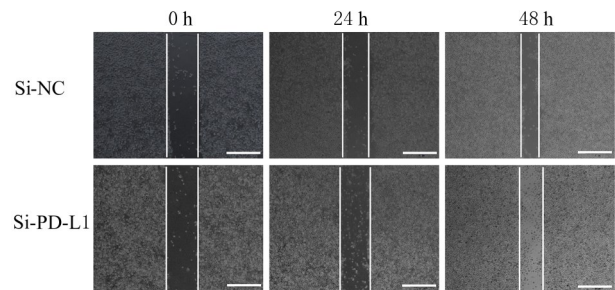
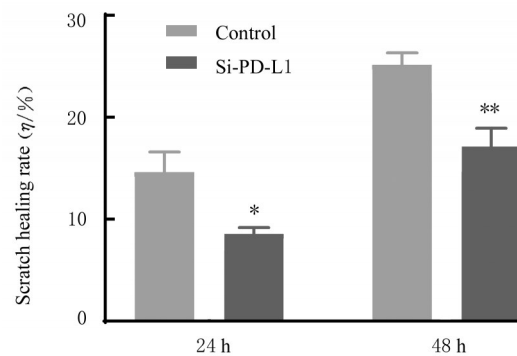


图6 细胞划痕愈合实验检测2组CAL27细胞划痕愈合情况(Bar=200 μm)

Fig. 6 Scratch healing of CAL27 cells in two groups detected by cell scratch healing assay (Bar=200 μm)



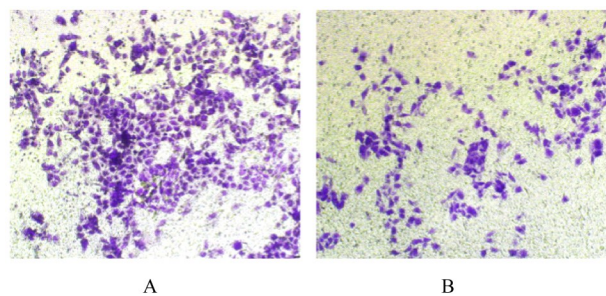
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

图7 2组CAL27细胞划痕愈合率

Fig. 7 Scratch healing rates of CAL27 cells in two groups

3 讨论

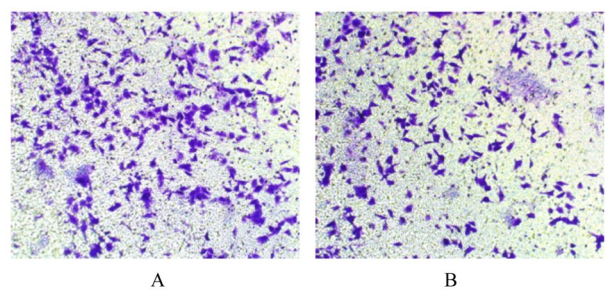
近年来, 尽管OCSS在外科手术和放疗等综合治疗方面取得了很大的进步, 但OSCC患者的预后仍较差^[8]。研究OSCC发生发展的分子生物学机制, 可为OSCC患者的治疗和预后判断提供理论依据^[9]。免疫治疗逐渐成为癌症治疗的有效手段, 且



A: Control group; B: Si-PD-L1 group.

图8 Transwell小室实验检测2组CAL27细胞迁移情况(结晶紫, $\times 100$)

Fig. 8 Migration of CAL27 cells in two groups detected by Transwell chamber assay(Crystal violet, $\times 100$)



A: Control group; B: Si-PD-L1 group.

图9 Transwell小室实验检测2组CAL27细胞侵袭情况(结晶紫, $\times 100$)

Fig. 9 Invasion of CAL27 cells in two groups detected by Transwell chamber assay (Crystal violet, $\times 100$)

抗PD-1/PD-L1治疗前景良好, PD-L1已成为免疫肿瘤学中的关键蛋白^[10-11], 其与PD-1的相互作用发生于肿瘤微环境, 能够抑制下游信号传导和T淋巴细胞多种生物学功能, 包括细胞活化、增殖和分泌细胞因子等^[12]。PD-L1与肿瘤的进展有紧密关联^[13], 但目前关于PD-L1在OSCC中作用的报道较少。

为了探讨PD-L1与OSCC之间的关系, 本研究采用Western blotting法检测PD-L1在3种OSCC细胞中的表达情况, 结果显示: 在OSCC细胞中PD-L1蛋白特异性高表达; 免疫荧光染色结果显示: PD-L1蛋白在CAL27细胞的细胞质和细胞核中均有表达, 且在口腔上皮HOK细胞中PD-L1蛋白表达较弱, 提示PD-L1有可能参与OSCC的发生发展过程。为进一步研究PD-L1是否影响OSCC细胞的生物学行为, 本研究利用siRNA技术敲低CAL27细胞中的PD-L1表达后, 细胞的增殖能力减弱, 单个细胞克隆形成能力明显减弱, 细胞

迁移和侵袭能力均降低, 本研究结果与ZHENG等^[14]研究结果一致。本研究结果表明: PD-L1通过促进细胞增殖、克隆形成、迁移和侵袭在OSCC中发挥重要作用, 提示敲低PD-L1可能是OSCC的潜在治疗方法。

PD-L1作为B7蛋白家族中的一员, 在多种肿瘤细胞中发挥重要的调控作用^[15-18]。LIU等^[19]发现: PD-L1可促进乳腺癌细胞的生长, 沉默PD-L1可导致乳腺癌细胞自发凋亡和多柔比星诱导的细胞凋亡增加。上调PD-L1表达可促进胃癌细胞生长^[20], 下调PD-L1表达后胃癌细胞的黏附、迁移和侵袭能力均减弱, 并且PD-L1在胃癌细胞中可以通过上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)促进其侵袭和迁移^[21]。QU等^[22]证实: PD-L1在卵巢癌细胞中高表达, 通过特异性siRNA敲低PD-L1基因, 可抑制卵巢癌细胞的生长和迁移, 降低肿瘤的增殖、抑制肿瘤的细胞周期进展和肿瘤的侵袭。在前列腺癌中, 上调PD-L1表达可以增强肿瘤微环境中的免疫抑制, 从而促进癌症的发生发展^[23]。

综上所述, PD-L1在OSCC细胞中特异性高表达, 敲低PD-L1表达可以抑制OSCC细胞的增殖、迁移和侵袭。本研究结果为OSCC的靶向治疗提供了理论依据, 但PD-L1调控OSCC生物学行为的具体机制有待进一步研究。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

曾洁参与论文选题、实验设计、数据分析和论文撰写, 俞雪燕和罗婷参与实验操作和数据收集, 徐江参与论文中统计学分析和论文审校。

[参考文献]

- [1] CHAVES F N, BEZERRA T M M, MORAES D C, et al. Loss of heterozygosity and immunoexpression of PTEN in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma[J]. *Exp Mol Pathol*, 2020, 112: 104341.
- [2] 李玮柏, 曹娟, 郭秀, 等. 肿瘤相关巨噬细胞来源IL-6通过上调肿瘤细胞中LIF表达对口腔鳞状细胞癌CAL27细胞侵袭和迁移的促进作用[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2022, 48(4): 946-953.
- [3] PRINCIPE S, ZAPATER-LATORRE E, ARRIBAS L, et al. Salivary IL-8 as a putative predictive biomarker of radiotherapy response in head and neck cancer

- patients[J]. *Clin Oral Investig*, 2022, 26(1): 437-448.
- [4] DAVE K, ALI A, MAGALHAES M. Increased expression of PD-1 and PD-L1 in oral lesions progressing to oral squamous cell carcinoma: a pilot study[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 9705.
- [5] CROCE C M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer[J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(10): 704-714.
- [6] YU Y, CAO X C. miR-190-5p in human diseases[J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 257.
- [7] 田国永, 鹿国英, 吕志军, 等. PD-1/PD-L1在口腔鳞状细胞癌中表达意义及对疾病预后价值研究[J]. *实用口腔医学杂志*, 2021, 37(6): 841-844.
- [8] ZHANG Y H, WANG A F, ZHANG X H, et al. lncRNA LINC01296 promotes oral squamous cell carcinoma development by binding with SRSF1 [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 6661520.
- [9] SUN S, WANG J, LIU J, et al. miR-302b suppresses tumor metastasis by targeting Frizzled 6 in OSCC[J]. *J Dent Res*, 2021, 100(7): 739-745.
- [10] CHA J H, CHAN L C, LI C W, et al. Mechanisms controlling PD-L1 expression in cancer [J]. *Mol Cell*, 2019, 76(3): 359-370.
- [11] WHITESIDE T L. Head and neck carcinoma immunotherapy: facts and hopes [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(1): 6-13.
- [12] JIANG Y S, CHEN M, NIE H, et al. PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2019, 15(5): 1111-1122.
- [13] TANG Q, CHEN Y, LI X J, et al. The role of PD-1/PD-L1 and application of immune-checkpoint inhibitors in human cancers [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 964442.
- [14] ZHENG B X, REN T T, HUANG Y, et al. Apatinib inhibits migration and invasion as well as PD-L1 expression in osteosarcoma by targeting STAT3 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(2): 1695-1701.
- [15] NIU M K, LIU Y M, YI M, et al. Biological characteristics and clinical significance of soluble PD-1/PD-L1 and exosomal PD-L1 in cancer [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 827921.
- [16] HU X L, WANG J, CHU M, et al. Emerging role of ubiquitination in the regulation of PD-1/PD-L1 in cancer immunotherapy[J]. *Mol Ther*, 2021, 29(3): 908-919.
- [17] 程 然, 徐小元. PD-1/PD-L1免疫抑制剂在HBV感染相关肝细胞癌中的有效性及安全性分析[J]. *临床肝胆病杂志*, 2022, 38(9): 2160-2164.
- [18] 李 林, 杨双宁, 秦国慧, 等. 基于UHPLC-Q-Orbitrap HRMS的PD-1抑制剂治疗的晚期肺腺癌患者血清代谢组学研究[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2022, 57(5): 631-634.
- [19] LIU S W, CHEN S, YUAN W G, et al. PD-1/PD-L1 interaction up-regulates MDR1/P-gp expression in breast cancer cells via PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(59): 99901-99912.
- [20] MU L S, YU W T, SU H L, et al. Relationship between the expressions of PD-L1 and tumour-associated fibroblasts in gastric cancer [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 1036-1042.
- [21] 赵丽丽, 赵文文, 赵文飞, 等. 沉默PD-L1基因表达抑制胃癌细胞黏附、迁移、侵袭及上皮间质转化[J]. *现代肿瘤医学*, 2022, 30(15): 2716-2722.
- [22] QU Q X, XIE F, HUANG Q, et al. Membranous and cytoplasmic expression of PD-L1 in ovarian cancer cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(5): 1893-1906.
- [23] YANG S J, ZHANG Q Y, LIU S, et al. PD-1, PD-L1 and PD-L2 expression in mouse prostate cancer[J]. *Am J Clin Exp Urol*, 2016, 4(1): 1-8.