[文章编号] 1671-587X(2025)05-1407-08 DOI:10.13481/j.1671-587X.20250530

表面表达PD-L1纳米抗体的细菌外膜囊泡的生物学特性及其对PD-1/PD-L1信号通路的阻断作用

李智敏[1,2]，霍明歌[1]，管龙雪[1]，顾凡林[1]，梁丹丹[1]，刘倬睿[1]，王国庆[1]，关新刚[2]
（1. 北华大学医学技术学院临床检验系，吉林 吉林 132013；2. 台州学院医学院基础医学系，浙江 台州 318000）

[摘 要] **目的：**制备表面表达程序性细胞死亡配体1（PD-L1）纳米抗体的细菌外膜囊泡（OMV），探讨其结构特性、细胞相容性、细胞内分布及其对程序性细胞死亡受体1（PD-1）/PD-L1信号轴的阻断效果。**方法：**构建pET28a-ClyA-PD-L1nb原核表达载体，转化至大肠杆菌BL21（DE3）感受态细胞，通过超速离心法从转化PD-L1nb表达载体的BL21（DE3）单克隆菌落中分离OMV，利用组氨酸（His）标签进行蛋白纯化。采用透射电子显微镜和纳米粒径分析仪对OMV进行分析鉴定。将转化PD-L1nb表达载体的BL21（DE3）单克隆菌落所分离的OMV作为实验组，以未转化的BL21（DE3）单克隆菌落所分离的OMV作为对照组，采用Western blotting法检测2组OMV中ClyA-PD-L1nb融合蛋白表达情况，采用细胞计数试剂盒8（CCK-8）法检测OMV处理后小鼠巨噬细胞RAW264.7、小鼠三阴性乳腺癌细胞4T1和人胚胎肾细胞HEK293T活性，应用荧光成像技术观察OMV的肿瘤细胞内吞情况，采用流式细胞术检测PBS组、OMV-PD-L1nb组和aPD-L1＋OMV-PD-L1nb组OMV与肿瘤细胞表面PD-L1的结合效果。**结果：**十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE），大肠杆菌诱导后在预计相对分子质量（约49 000）附近出现明显加粗的蛋白条带，ClyA-PD-L1nb蛋白成功表达，纯化后泳道中无明显杂蛋白存在。利用超速离心法分离得到尺寸约120 nm的OMV-PD-L1nb，透射电子显微镜下呈现为尺寸均一的圆球形结构。Western blotting法，实验组OMV中检测到ClyA-PD-L1nb特异性条带。CCK-8法，经不同浓度OMV处理后，RAW 264.7细胞、4T1细胞和HEK293T细胞活性均接近100%。荧光成像，OMV-PD-L1nb被4T1细胞内吞后分散在细胞质中。与OMV-PD-L1nb组比较，aPD-L1＋OMV-PD-L1nb组细胞中平均荧光强度明显降低（$P<0.001$）。**结论：**成功制备并分离了表面表达PD-L1nb的OMV即OMV-PD-L1nb，其在小鼠巨噬细胞、肿瘤细胞和人胚胎肾细胞上显示出良好的相容性，可被肿瘤细胞内吞并成功阻断PD-1/PD-L1信号通路。

[关键词] 细菌外膜囊泡；程序性细胞死亡受体1；程序性细胞死亡配体1；纳米抗体；免疫检查点阻断
[中图分类号] R737.95 [文献标志码] A

[收稿日期] 2024-09-30 [录用日期] 2024-12-02
[基金项目] 吉林省教育厅科研项目（JJKH20180370KJ）；浙江省科技厅自然科学基金探索一般项目（LY23C100001）；浙江省台州市科技局科技发展计划项目（22gya03）
[作者简介] 李智敏（1998－），男，浙江省台州市人，在读硕士研究生，主要从事工程化细胞膜功能方面的研究。
[通信作者] 王国庆，副教授，硕士研究生导师（E-mail：wgq@beihua.edu.cn）；
关新刚，研究员，硕士研究生导师（E-mail：guanxg@ciac.ac.cn）

©《吉林大学学报（医学版）》编辑部，开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。
© Editorial Board of Journal of Jilin University（Medicine Edition）. Open access under CC BY-NC-ND license.

Biological properties of bacterial outer membrane vesicles surface-displaying PD-L1 nanobodies and their disrupting effects on PD-1/PD-L1 signaling pathway

LI Zhimin[1,2], HUO Mingge[1], GUAN Longxue[1], GU Fanlin[1], LIANG Dandan[1], LIU Zhuorui[1], WANG Guoqing[1], GUAN Xingang[2]

(1. Department of Clinical Laboratory Diagnostics, School of Medical Technology, Beihua University, Jilin 132013, China; 2. Department of Basic Medicine, School of Medical Science, Taizhou University, Taizhou 318000, China)

ABSTRACT Objective: To prepare the bacterial outer membrane vesicles (OMV) that can express programmed death ligand 1(PD-L1) nanobody on surface, and to discuss its structural characteristics, cell compatibility, intracellular distribution, and its blocking effect on the programmed cell death protein-1 (PD-1)/PD-L1 signaling axis. Methods: The pET28a-ClyA-PD-L1nb prokaryotic expression vector was constructed and transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) competent cells; the OMV was isolated from the BL21 (DE3) monoclonal colonies transformed with the PD-L1nb expression vector by ultracentrifugation; the protein purification was performed using the histidine (His) tag; transmission electron microscope and nanoparticle size analyzer were used to analyze and identify the OMV; the OMV isolated from the BL21 (DE3) monoclonal colonies transformed with the PD-L1nb expression vector was used as experimental group; the OMV isolated from the untransformed BL21 (DE3) monoclonal colonies was used as control group; Western blotting method was used to detect the expression levels of ClyA-PD-L1nb fusion protein in the OMV in two groups; cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to detect the activities of mouse macrophage RAW 264.7 cells, mouse triple-negative breast cancer 4T1 cells, and human embryonic kidney HEK293T cells after treated with OMV; fluorescence imaging technology was used to observe the tumor cell endocytosis of OMV; flow cytometry was used to detect the binding effect of OMV to the PD-L1 on surface of the tumor cells in PBS group, OMV-PD-L1nb group, and aPD-L1+OMV-PD-L1nb group. Results: The sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) results showed that after induction of *Escherichia coli*, significantly thickened protein bands appeared near the predicted relative molecular mass (about 49 000), and after purification, no obvious impurity proteins existed in the lanes; the OMV-PD-L1nb with a size of about 120 nm was isolated by ultracentrifugation, and it presented a uniform spherical structure under transmission electron microscope; the Western blotting results showed that the specific band of ClyA-PD-L1nb was detected in the OMV in experimental group; the CCK-8 assay results showed that after treated with different concentrations of OMV, the viabilities of the RAW 264.7 cells, 4T1 cells, and HEK293T cells were all close to 100%; the fluorescence imaging results showed that OMV-PD-L1nb was endocytosed by 4T1 cells and dispersed in the cytoplasm; compared with OMV-PD-L1nb group, the average fluorescence intensity in the cells in aPD-L1+OMV-PD-L1nb group was significantly decreased ($P<0.001$). Conclusion: The OMV surface-displaying PD-L1nb, OMV-PD-L1nb, is successfully prepared and isolated; OMV-PD-L1nb shows good compatibility on mouse macrophage cells, tumor cells, and human embryonic kidney cells, can be endocytosed by tumor cells, and successfully blocks the PD-1/PD-L1 signaling pathway.

KEYWORDS Bacterial outer membrane vesicles; Programmed cell death protein-1; Programmed cell death ligand 1; Nanobody; Immune checkpoint blockade

免疫检查点是一类表达于免疫细胞表面的受体分子，具有负性免疫调控功能[1-2]，其在生理状态下起到防止免疫反应过度以避免自身组织受损的作用。然而，在肿瘤发生发展过程中，肿瘤细胞通过高表达免疫检查点的配体分子，逃避免疫系统的识别与攻击[3-6]。

程序性细胞死亡受体1（programmed cell death protein-1，PD-1）主要表达于活化的T细胞、B细胞、NK细胞、活化的单核细胞和树突状细胞等免疫细胞表面[7-8]。程序性细胞死亡配体1（programmed cell death ligand 1，PD-L1）是PD-1的配体。PD-L1与T细胞表面PD-1受体结合后，可诱导T细胞衰竭，防止免疫系统过度激活[9]。研究[10-11]显示：PD-L1分子在多种恶性肿瘤细胞表面呈高水平表达，肿瘤细胞表达的PD-L1与PD-1结合后，可抑制T细胞增殖和细胞因子分泌，削弱靶向肿瘤的免疫应答。因此，靶向干扰PD-1/PD-L1信号通路已成为恶性肿瘤免疫治疗的重要策略之一[12-14]。目前国内外已开发出多种靶向PD-1或PD-L1的单克隆抗体，通过阻断PD-1/PD-L1信号通路激活抗肿瘤免疫应答，发挥免疫治疗作用[15-16]。

细胞膜囊泡是一类由细胞分泌或人工合成的新型药物递送载体，近年来在肿瘤、炎症和自身免疫性疾病等多种疾病治疗领域取得重要进展。细菌外膜囊泡（outer membrane vesicle，OMV）是由革兰阴性菌外膜起泡或爆炸裂解而生成的一类球状结构，其直径为10～250 nm。因其来源于天然生物膜材料，所以OMV具有良好的生物相容性，利用减毒菌株或益生菌制备的OMV免疫原性较低，近年来已成为肿瘤治疗中常用的药物递送载体[17-19]。此外，通过基因工程技术对细菌外膜蛋白基因进行改造，可制备表面表达功能性蛋白的OMV，从而拓展其靶向递送、免疫调控和肿瘤杀伤等功能。

本研究利用基因工程制备了表面表达PD-L1纳米抗体的OMV，即OMV-PD-L1nb，探讨OMV-PD-L1nb的结构特性、细胞相容性、细胞内分布及其对PD-1/PD-L1信号通路的阻断效果，为制备和开发新型免疫检查点抑制剂提供参考。

1 材料与方法

1.1 质粒、细胞、主要试剂和仪器 pET28a-ClyA-PD-L1nb质粒由苏州金唯智生物科技有限公司合成。BL21（DE3）感受态细胞购自北京博迈德基因技术有限公司，小鼠三阴性乳腺癌4T1细胞由北华大学医学技术学院临床检验系实验室细胞库提供。1%青-链霉素溶液、蛋白质相对分子质量标准品、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG（H+L）抗体、组氨酸（histidine，His）标签蛋白纯化试剂盒、极超敏增强化学发光法（enhanced chemiluminescence，ECL）试剂盒、二辛可宁酸（bicinchoninic acid，BCA）蛋白浓度测定试剂盒和细胞计数试剂盒8（cell counting kit-8，CCK-8）检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术公司，酵母提取物、胰蛋白胨、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside，IPTG）、苯甲基磺酰氟（phenylmethylsulfonyl fluoride，PMSF）、硫酸卡那霉素、改良Eagle培养基（Dulbecco's modified Eagle's medium，DMEM）和胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）均购自生工生物工程（上海）股份有限公司。超声波粉碎机购自上海净信实业发展有限公司，POWERPAC型电泳仪购自美国Bio-Rad公司，JEM1200EX透射电子显微镜购自日本JEOL公司，酶标仪购自瑞士TECAN公司，FV3000激光扫描共聚焦显微镜购自日本Olympus公司，Delsa™ NanoC纳米粒径分析仪和CytoFLEX LX流式细胞仪均购自美国Beckman Coulter公司。

1.2 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）法检测ClyA-PD-L1nb蛋白原核表达 将pET28a-ClyA-PD-L1nb质粒转化至大肠杆菌BL21（DE3）感受态细胞中，菌液均匀涂布于含卡那霉素LB固体培养基上，37 ℃过夜培养。挑取单个菌落于LB液体培养基中，37 ℃振荡过夜。扩大培养至波长600 nm处吸光度A(600)达到0.6～0.8时，加入IPTG至终浓度为0.5 mmol·L^{-1}，16 ℃继续培养16 h。离心收集菌体沉淀，用TEN缓冲液溶解沉淀后加入蛋白酶抑制剂PMSF（终浓度1 mmol·L^{-1}），超声破碎菌体。离心后取上清液进行SDS-PAGE分析。若在预计相对分子质量附近出现明显加粗蛋白条带，提示ClyA-PD-L1nb蛋白表达成功。

1.3 SDS-PAGE法检测ClyA-PD-L1nb蛋白纯化 利用ClyA-PD-L1nb蛋白中的His标签进行亲和层析以纯化目的蛋白。将混合均匀的50%His标签树脂装入亲和层析柱空柱管中，洗涤3次后加入细菌裂解液上清，收集流出液。用洗涤液洗柱

5次，洗脱液洗脱目的蛋白6～10次。收集洗脱组分，采用SDS-PAGE电泳分析目的蛋白纯度。

1.4 OMV-PD-L1nb制备 将表达ClyA-PD-L1nb融合蛋白的工程菌置于LB培养基中过夜培养。次日扩大培养至菌液A(600)达到0.6～0.8时，加入IPTG诱导蛋白表达，16 ℃培养16 h，4 ℃、5 000 g条件下离心10 min，收集上清。依次使用0.45 μm过滤器过滤，截留相对分子质量为100 000的超滤管浓缩，再经0.22 μm过滤器过滤浓缩液。于4 ℃、52 000 r·min^{-1}超速离心180 min。弃上清，吸取适量磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline，PBS）重悬沉淀，获得含有OMV-PD-L1nb悬液，分装后于－80 ℃保存。

1.5 OMV-PD-L1nb表征与鉴定 使用纳米粒径分析仪检测OMV粒径分布，使用透射电子显微镜观察其显微结构。采用BCA法测定分离OMV蛋白质浓度。采用Western blotting法鉴定OMV-PD-L1nb。以His抗体（1∶4 000）作为一抗，4 ℃孵育过夜；次日TBST洗涤3次后，加入辣根过氧化物酶标记的二抗（1∶1 000），洗涤后加入ECL底物显影并拍照。在相对分子质量约49 000处出现特异性清晰条带视为阳性，提示ClyA-PD-L1nb融合蛋白在OMV上成功表达。

1.6 CCK-8法检测不同浓度OMV-PD-L1nb作用后各组细胞活性 将RAW 264.7细胞、4T1细胞和HEK293T细胞分别以每孔5 000个细胞的密度接种于96孔细胞培养板，培养24 h后弃去旧培养基，更换终浓度分别为10、20、40、80和100 mg·L^{-1}的100 μL OMV-PD-L1nb完全培养基，每个浓度设置5个复孔。孵育48 h后，每孔加入10 μL CCK-8溶液，孵育3 h。使用酶标仪测定3种细胞在450 nm处A值，计算细胞活性。细胞活性＝（实验孔A值－空白孔A值）/（阴性对照孔A值－空白孔A值）×100%。

1.7 荧光成像技术观察OMV-PD-L1nb肿瘤细胞摄取情况 将无菌细胞爬片置于24孔细胞培养板底部，以每孔6×10^{4}个细胞的密度接种4T1细胞，置于37 ℃、5%CO_2培养24 h。弃去培养基，每孔加入100 mg·L^{-1} DiI荧光染料标记OMV-PD-L1nb，孵育4 h。弃去培养基，PBS缓冲液洗涤3次。加入4%多聚甲醛，37 ℃条件下固定细胞30 min。弃去多聚甲醛，PBS缓冲液洗涤3次。加入DAPI染色液（10 mg·L^{-1}），37 ℃避光染核10 min。弃去DAPI染色液，PBS缓冲液清洗3次，抗荧光淬灭封片液封片后，使用激光扫描共聚焦显微镜观察各组细胞摄取情况。

1.8 流式细胞术检测OMV-PD-L1nb与肿瘤细胞表面PD-L1结合情况 将4T1细胞以每孔2×10^{5}个细胞的密度接种于12孔细胞培养板中，每组设5复孔，随机分为PBS组、OMV-PD-L1nb组和aPD-L1＋OMV-PD-L1nb组，过夜培养。次日，弃去aPD-L1＋OMV-PD-L1nb组培养基，加入终浓度为20 mg·L^{-1} PD-L1抗体aPD-L1，孵育4 h。随后将3组培养基全部弃去，PBS组加入新鲜完全培养基，OMV-PD-L1nb组和aPD-L1＋OMV-PD-L1nb组均加入终浓度为100 mg·L^{-1} DiI荧光染料标记OMV-PD-L1nb，孵育4 h。消化各组细胞并收集细胞悬液，PBS缓冲液洗涤2次。使用流式细胞仪检测3组细胞中DiI荧光强度，以荧光强度评估OMV-PD-L1nb与4T1细胞表面PD-L1的结合情况。

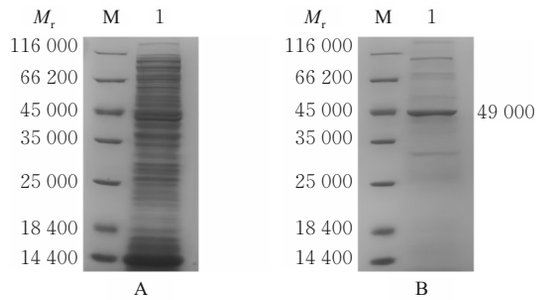
1.9 统计学分析 采用GraphPad Prism 9.4.1统计软件进行统计学分析。各组细胞活性和细胞中DiI荧光强度均符合正态分布，以$\bar{x}\pm s$表示，多组间样本均数比较采用单因素方差分析，组间样本均数两两比较采用SNK-q检验。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ClyA-PD-L1nb蛋白的原核表达和纯化 将转化pET28a-ClyA-PD-L1nb质粒的大肠杆菌裂解后取上清，SDS-PAGE分析结果显示：上清中在相对分子质量49 000附近出现明显增粗蛋白条带，提示ClyA-PD-L1nb在大肠杆菌中成功表达。使用His标签蛋白纯化试剂盒进行了蛋白纯化，结果显示：纯化后蛋白泳道中杂蛋白极少，提示获得较高纯度ClyA-PD-L1nb蛋白。见图1。

2.2 细菌OMV-PD-L1nb制备和表征 基于大肠杆菌BL21（DE3）成功表达ClyA-PD-L1nb，检测OMV分泌情况。采用超速离心法从表达ClyA-PD-L1nb融合蛋白的大肠杆菌分泌液中制备工程化囊泡。动态光散射结果显示：OMV-PD-L1nb平均粒径为120 nm。透射电子显微镜图像显示：所制备OMV-PD-L1nb呈现近似圆球形囊泡结构。见图2。

采用Western blotting法检测融合蛋白ClyA-PD-L1nb在OMV表面的表达情况，结果显示：OMV-PD-L1nb泳道在预期相对分子质量位置检测



A: Prokaryotic expression (M: Marker; Lane 1: ClyA-PD-L1nb bacterial solution supernatant); B: Purification (M: Marker; Lane 1: ClyA-PD-L1nb protein after purification).

图1 原核表达和纯化后ClyA-PD-L1nb蛋白SDS-PAGE电泳图

Fig. 1 SDS-PAGE electrophoregrams of ClyA-PD-L1nb protein after prokaryotic expression and purification

到单一清晰条带，空白OMV泳道未检测到对应蛋白条带，提示成功制备了表达ClyA-PD-L1nb蛋白的OMV。见图3。

2.3 OMV-PD-L1nb的细胞相容性分析 采用CCK-8法检测不同浓度OMV-PD-L1nb作用后3种细胞活性，结果显示：在不同浓度作用下，各组OMV-PD-L1nb细胞活性比较差异均无统计学意义（$P>0.05$），表明OMV-PD-L1nb具有良好的细胞相容性。见图4。

2.4 OMV-PD-L1nb在4T1细胞中摄取情况 激光扫描共聚焦显微镜检测结果显示：OMV-PD-L1nb与4T1细胞共孵育4 h后，细胞核周围胞浆区域内出现集中分布的点状红色荧光，证明OMV-PD-L1nb可被4T1细胞高效摄取并内吞。见图5。

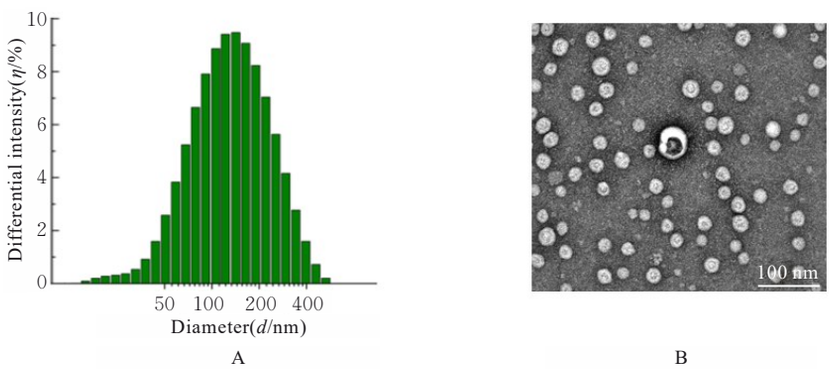
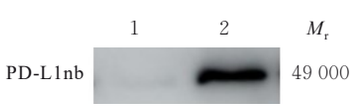


图2 OMV-PD-L1nb粒径分布(A)和形态表现(B)

Fig. 2 Size distribution (A) and morphology (B) of OMV-PD-L1nb



Lane 1: OMV-Blank; Lane 2: OMV-PD-L1nb.

图3 Western blotting法检测OMV中ClyA-PD-L1nb蛋白表达情况

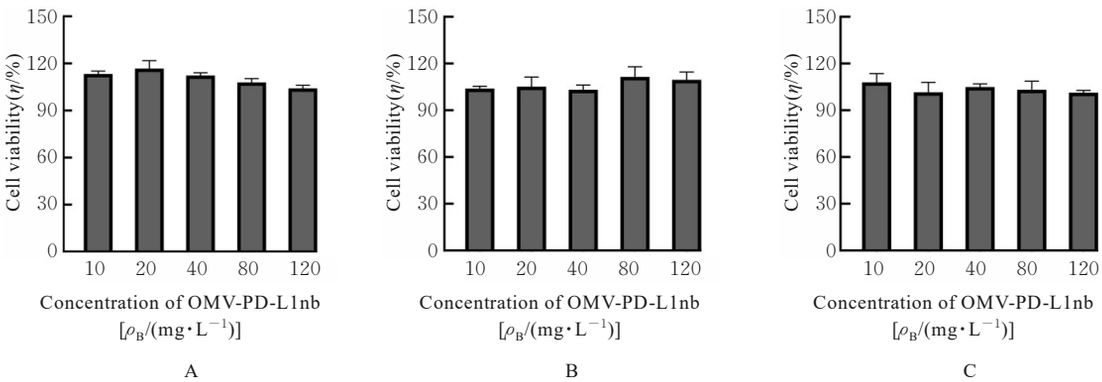
Fig. 3 Expression of ClyA-PD-L1nb protein in OMV detected by Western blotting method

2.5 OMV-PD-L1nb与4T1细胞表面PD-L1结合情况 流式细胞术结果显示：与OMV-PD-L1nb组比较，aPD-L1＋OMV-PD-L1nb组细胞中DiI平均荧光强度明显降低（$P<0.001$），提示OMV-PD-L1nb通过PD-1/PD-L1信号通路与4T1细胞结合。见图6。

3 讨 论

免疫检查点抑制剂阻断疗法在治疗癌症领域取得重要进展。该疗法通过将免疫检查点抑制剂与细胞外免疫检查点结合，阻断抑制性信号通路同时刺激免疫细胞，继而杀灭肿瘤细胞。免疫检查点抑制剂为晚期肿瘤患者提供了新的治疗选择，展示出良好的临床效果。然而在实际应用中，传统递送平台无法有效将免疫检查点抑制剂递送到肿瘤微环境，因此迫切需要开发新型靶向递送载体。

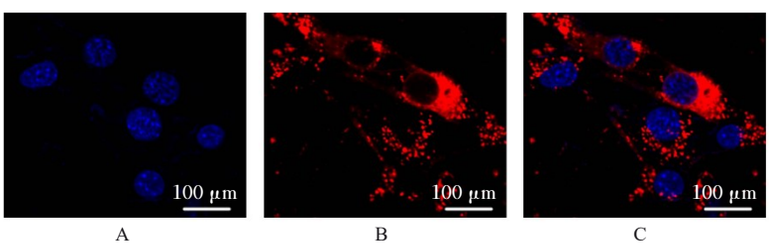
OMV作为药物递送载体，在靶向阻断PD-1/PD-L1信号通路的研究中展现出独特优势。JIN等[20]利用OMV共同递送胚胎干细胞衍生的肿瘤相关抗原和免疫检查点抑制剂PD-L1抗体，取得了良好的肿瘤治疗效果。CUI等[21]研究显示：使用涂有OMV-PD1的分子筛咪唑骨架8 (zeolitic imidazolate framework-8，ZIF-8）制备高效miRNA纳米递送系统并担载miR-34a，可协同OMV-PD1进一步触发免疫激活和检查点抑制，从而增强肿瘤治疗效果。SU等[22]设计了一种基因工程转铁蛋白受体介



A：RAW 264.7 cells；B：4T1 cells；C：HEK293T cells.

图 4　不同浓度 OMV-PD-L1nb 作用后 3 种细胞活性

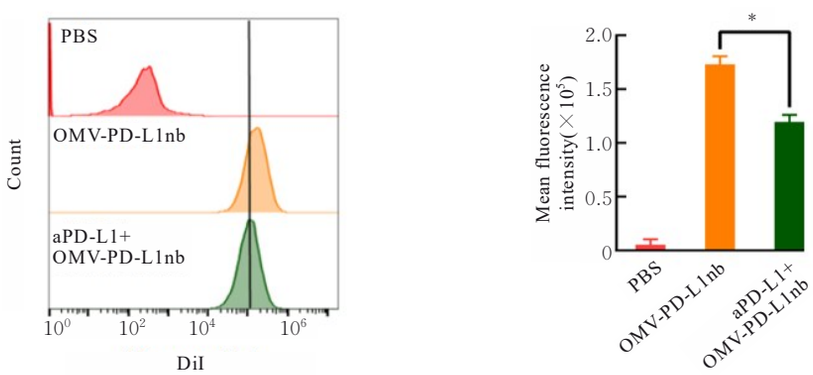
Fig. 4　Viabilities of three types of cells after treated with different concentrations of OMV-PD-L1nb



A：DAPI；B：DiI；C：Merge.

图 5　荧光染色检测 OMV-PD-L1nb 的 4T1 细胞内吞情况

Fig. 5　Cellular uptake of OMV-PD-L1nb by 4T1 cells detected by fluorescence staining



A：Flow cytometry diagram；B：Histogram. $^{*}P<0.001$ *vs* OMV-PD-L1nb group.

图 6　流式细胞术检测各组 4T1 细胞中平均荧光强度

Fig. 6　Mean fluorescence intensities in 4T1 cells in various groups detected by flow cytometry

导的溶酶体靶向嵌合体，并将其融合至 OMV 表面靶向 PD-L1，通过阻断 PD-1/PD-L1 通路抑制肿瘤生长。

OMV 是革兰阴性细菌分泌的天然纳米颗粒，含有大量来自亲本细菌外膜和周质成分，因此具有强免疫原性，是一种理想的先天免疫刺激剂和疫苗载体[23]。本研究成功制备并分离了表达 ClyA-PD-L1nb 的 OMV，其通过阻断 PD-1/PD-L1 信号通路来刺激免疫细胞肿瘤浸润，激发全身抗肿瘤免疫应答。OMV-PD-L1nb 不仅可以结合肿瘤细胞上 PD-L1，还可与肿瘤相关巨噬细胞（tumor associated macrophage，TAM）上的 Toll 样受体结合，从而通过经典激活途径使 TAM 敏感，同时阻断 PD-1/PD-L1 免疫检查点，增强免疫细胞介导的抗肿瘤免

疫效应[24]。

综上所述，本研究成功制备并分离了表面表达PD-L1nb的OMV，即OMV-PD-L1nb，其具有良好的生物相容性，可被4T1细胞高效内吞并分散于细胞质中。OMV-PD-L1nb可有效阻断PD-1/PD-L1信号通路，破坏PD-L1介导的免疫抑制肿瘤微环境。应用OMV-PD-L1nb介导的免疫联合治疗具有广阔的临床转化前景。

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：

李智敏参与论文设计、数据收集和论文撰写，霍明歌、管龙雪和顾凡林参与实验操作，梁丹丹和刘倬睿参与数据分析，王国庆参与论文设计，关新刚参与论文指导和审阅。

[参考文献]

[1] PATWEKAR M, SEHAR N, PATWEKAR F, et al. Novel immune checkpoint targets: a promising therapy for cancer treatments[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 126: 111186.

[2] SHARMA P, GOSWAMI S, RAYCHAUDHURI D, et al. Immune checkpoint therapy-current perspectives and future directions[J]. Cell, 2023, 186(8): 1652-1669.

[3] GE W F, SONG S Y, QI X C, et al. Review and prospect of immune checkpoint blockade therapy represented by PD-1/PD-L1 in the treatment of clear cell renal cell carcinoma[J]. Oncol Res, 2023, 31(3): 255-270.

[4] ZHANG Q, YANG C Y, GAO X S, et al. Phytochemicals in regulating PD-1/PD-L1 and immune checkpoint blockade therapy[J]. Phytother Res, 2024, 38(2): 776-796.

[5] 张蓝方，张明娟，许进秀，等. PD-1/PD-L1通路、Th17和Tregs细胞在肿瘤免疫中的作用[J]. 现代肿瘤医学，2023，31(18)：3519-3523.

[6] 罗丽波，任胜祥. KRAS和TP53共突变对肺腺癌生物学行为的影响[J]. 同济大学学报(医学版)，2024，45(03)：345-353.

[7] THOMMEN D S, PEEPER D S. Rational combination of cancer therapies with PD1 axis blockade[J]. Nat Rev Cancer, 2024. DOI: 10.1038/s41568-024-00727-1.

[8] ZHANG H, LIU L, LIU J B, et al. Roles of tumor-associated macrophages in anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy for solid cancers[J]. Mol Cancer, 2023, 22(1): 58.

[9] ZHOU Y J, LI G L, WANG J Y, et al. PD-L1: expression regulation[J]. Blood Sci, 2023, 5(2): 77-91.

[10] LI W, WU F L, ZHAO S L, et al. Correlation between PD-1/PD-L1 expression and polarization in tumor-associated macrophages: a key player in tumor immunotherapy[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2022, 67: 49-57.

[11] YIN S N, CHEN Z J, CHEN D G, et al. Strategies targeting PD-L1 expression and associated opportunities for cancer combination therapy[J]. Theranostics, 2023, 13(5): 1520-1544.

[12] AGOSTINI M, TRALDI P, HAMDAN M. Proteomic investigation of immune checkpoints and some of their inhibitors[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(17): 9276.

[13] XUE F X, REN X T, KONG C Y, et al. Polymeric PD1/PDL1 bispecific antibody enhances immune checkpoint blockade therapy[J]. Mater Today Bio, 2024, 28: 101239.

[14] FODA B M, MISEK S A, GALLO K A, et al. Inhibition of the Rho/MRTF pathway improves the response of BRAF-resistant melanoma to PD1/PDL1 blockade[J]. Int J Cancer, 2024, 155(7): 1303-1315.

[15] 钟丰羽，王 婷，古文姝，等. Pembrolizumab联合曲妥珠单抗治疗HER2阳性胃癌研究进展[J]. 现代医药卫生，2023，39(21)：3730-3735.

[16] 曹佳丽，熊枝繁，靳 泽，等. 免疫检查点抑制剂在肝细胞癌治疗中的研究进展[J]. 肿瘤防治研究，2023，50(5)：525-530.

[17] NASEER F, AHMAD T, KOUSAR K, et al. Formulation for the targeted delivery of a vaccine strain of oncolytic measles virus (OMV) in hyaluronic acid coated thiolated chitosan as a green nanoformulation for the treatment of prostate cancer: a viro-immunotherapeutic approach[J]. Int J Nanomedicine, 2023, 18: 185-205.

[18] JI P P, WU P Y, WANG L T, et al. Lysosome-targeting bacterial outer membrane vesicles for tumor specific degradation of PD-L1[J]. Small, 2024, 20(43): e2400770.

[19] LI Y C, ZHU T C, CHEN J, et al. Dual-targeted engineered bacterial outer membrane vesicles for hepatocellular carcinoma immunotherapy[J]. Adv Funct Mater, 2024, 34(41): 2401355.

[20] JIN M L, HUO D, SUN J J, et al. Enhancing immune responses of ESC-based TAA cancer vaccines with a novel OMV delivery system[J]. J Nanobiotechnology, 2024, 22(1): 15.

[21] CUI C Y, HE Q, WANG J J, et al. Targeted miR-34a

delivery with PD1 displayed bacterial outer membrane vesicles-coated zeolitic imidazolate framework nanoparticles for enhanced tumor therapy[J]. Int J Biol Macromol, 2023, 247: 125692.

[22] SU L Y, TIAN Y, ZHENG Q, et al. Anti-tumor immunotherapy using engineered bacterial outer membrane vesicles fused to lysosome-targeting chimeras mediated by transferrin receptor[J]. Cell Chem Biol, 2024, 31(6): 1219-1230.e5.

[23] CHEN X, LI P Z, LUO B, et al. Surface mineralization of engineered bacterial outer membrane vesicles to enhance tumor photothermal/immunotherapy[J]. ACS Nano, 2024, 18(2): 1357-1370.

[24] ZHENG K S, FENG Y P, LI L, et al. Engineered bacterial outer membrane vesicles: a versatile bacteria-based weapon against gastrointestinal tumors[J]. Theranostics, 2024, 14(2): 761-787.