

肿瘤机制研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002631

下调 PD-L1 表达对吉非替尼耐药性非小细胞肺癌细胞的影响

姬颖华¹, 杨晓煜², 孟祥丽¹, 王 瑾¹, 路 平¹

(1. 新乡医学院第一附属医院肿瘤科, 卫辉 453100; 2. 新乡医学院基础医学院病理科, 新乡 453003)

【摘要】目的:研究下调程序性细胞死亡配体 1(programmed cell death ligand 1, PD-L1)表达对吉非替尼耐药性(gefitinib-resistant, GR)非小细胞肺癌细胞的作用及机制。**方法:**通过 RT-qPCR 和 Western blot 检测各非小细胞肺癌细胞程序性细胞死亡 1(programmed cell death 1, PD1)和 PD-L1 mRNA 和其蛋白表达水平;获得 GR 细胞 H1703/GR, CCK-8 检测细胞活性, Western blot 检测 PD1 和 PD-L1 蛋白表达;转染 sh-PD-L1 进入 H1703/GR 细胞, CCK-8 检测细胞活性, 流式细胞术检测细胞凋亡, Western blot 检测 PI3K/Akt/mTOR 通路相关蛋白的表达;加入 PI3K/Akt/mTOR 通路激活剂 IGF-1, CCK-8 检测细胞活性, 流式细胞术检测细胞凋亡。**结果:**与人永生化肺上皮细胞株 16HBE 相比, 非小细胞肺癌细胞株 GLC82、A549、PC9、SK-MES-1、H1703、L78、H460、H661 中 PD1 和 PD-L1 mRNA 及蛋白表达均上调($P<0.05$, $P<0.01$), 选取 H1703 细胞进行后续实验;与 H1703 细胞相比, H1703/GR 细胞活性升高, PD1 和 PD-L1 蛋白表达均上调($P<0.01$);与 GR 组相比, GR+sh-PD-L1 组 H1703/GR 细胞活性明显降低, 细胞凋亡率明显增加, p-Akt/Akt 和 p-mTOR/mTOR 蛋白表达明显下调($P<0.01$);与 GR+sh-PD-L1 组相比, GR+sh-PD-L1+IGF-1 组 H1703/GR 细胞活性明显升高, 细胞凋亡率明显减少($P<0.01$)。**结论:**下调 PD-L1 表达可能通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路激活, 增强非小细胞肺癌对吉非替尼的敏感性。

【关键词】非小细胞肺癌;吉非替尼;PD1;PD-L1**【中图分类号】**R734.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2020-04-07

Effects of down-regulating PD-L1 expression on gefitinib-resistant non-small cell lung cancer cells

Ji Yinghua¹, Yang Xiaoyu², Meng Xiangli¹, Wang Jin¹, Lu Ping¹

(1. Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University;

2. Department of Pathology, School of Basic Medicine, Xinxiang Medical College)

【Abstract】Objective: To investigate the effect and mechanism of down-regulation of programmed cell death ligand 1(PD-L1) expression on gefitinib-resistant (GR) non-small cell lung cancer cells. **Methods:** The expression levels of programmed cell death 1 (PD1) and PD-L1 mRNA and protein in non-small cell lung cancer cells were detected by RT-qPCR and Western blot. GR cells H1703/GR were obtained. Cell activity was detected by CCK-8. Western blot was used to detect PD1 and PD-L1 protein expression. Sh-PD-L1 was transfected into H1703/GR cells, cell activity was detected by CCK-8, apoptosis was detected by flow cytometry, and PI3K/Akt/mTOR pathway-related protein expression was detected by Western blot. PI3K/Akt/mTOR pathway activator IGF-1 was added, cell activity was detected by CCK-8 and apoptosis was detected by flow cytometry. **Results:** Compared with human immortalized lung epithelial cell line 16HBE, the expressions of PD1 and PD-L1 mRNA and protein in non-small cell lung cancer cell lines GLC82, A549, PC9, SK-MES-1, H1703, L78, H460, and H661 were all up-regulated ($P<0.05$, $P<0.01$), and H1703 cells were selected for subsequent experiments. Compared with H1703 cells, H1703/GR cells increased activity, and both PD1 and PD-L1 protein expressions were up-regulated ($P<0.01$). Compared with GR group, GR+sh-PD-L1 group significantly reduced H1703/GR cell viability, increased apoptotic rate and decreased p-Akt/Akt and p-mTOR/mTOR protein expression ($P<0.01$). Compared with GR+sh-PD-L1 group, the activity of H1703/GR cells in GR+sh-PD-L1+IGF-1 group was significantly increased and the apoptosis rate was significantly reduced ($P<0.01$). **Conclusion:** Down-regulating PD-L1 expression enhances the sensitivity of non-small cell lung cancer to gefitinib by inhibiting activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway.

【Key words】non-small cell lung cancer; gefitinib; programmed cell death 1; programmed cell death ligand 1

作者介绍: 姬颖华, Email: sepd705855@sina.cn,

研究方向: 肿瘤化疗、靶向、免疫治疗。

通信作者: 路 平, Email: lupingdoctor@163.com。

基金项目: 河南省医学科技攻关计划资助项目(编号: 2018020369)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200717.1640.040.html>

(2020-07-20)

肺癌是全球第二大常见癌症。统计结果表明,男性肺癌患者的 5 年生存率为 15%,女性肺癌患者的 5 年生存率为 21%^[1]。非小细胞肺癌(non small cell lung cancer, NSCLC)患者占有肺癌患者的比例大于 84%,且在确诊时,大约 75%的 NSCLC 患者已经处于中、晚期,错过最佳治疗时间^[2]。吉非替尼是酪氨酸激酶,表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的选择性抑制剂可抑制肿瘤生长、转移和血管形成,诱导肿瘤细胞凋亡,对放疗和化疗具有敏感性^[3]。虽然吉非替尼已广泛用于晚期 NSCLC 的治疗,但是大多数 NSCLC 患者在几个月后对吉非替尼产生了耐药性^[4]。因此,寻找改变耐药性的机制非常重要。程序性细胞死亡 1(programmed cell death 1, PD1)和程序性细胞死亡配体 1(programmed cell death ligand 1, PD-L1)是重要的免疫检查点,在其配体 PD-L1 参与肿瘤微环境后,PD1 会抑制 T 效应,从而保护癌细胞免受免疫介导的排斥反应^[5]。已有研究表明,细胞 PD1/PD-L1 高表达可使小细胞肺癌细胞获得顺铂耐药性^[6]。因此,预测下调 PD1/PD-L1 高表达会使吉非替尼耐药性(gefitinib-resistant, GR)非小细胞肺癌细胞敏感。本研究主要探讨下调 PD-L1 表达对 GR 非小细胞肺癌细胞的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

RPMI-1640 培养基(上海中乔新舟生物科技有限公司,货号 ZQ-200),胎牛血清(上海联硕为生物科技有限公司,货号 100-700、15140122),青霉素和链霉素双抗溶液(北京百奥莱博科技有限公司,货号 QN2849),CCK-8 试剂盒(上海艾博抗生物技术有限公司,货号 ab228554),cDNA 逆转录试剂盒(北京优胜特生物技术有限公司,货号 YST0010),SYBR-Green PCR 试剂盒(赛默飞世尔科技公司,货号 4309155),BCA 试剂盒(上海经科化学科技有限公司,货号 JK-201),辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗、PD1、PD-L1、p-Akt、Akt、p-mTOR、mTOR、GAPDH 兔来源的单克隆抗体(上海艾博抗生物技术有限公司,货号 ab6728、ab52587、ab205921、ab8805、ab38449、ab2732、ab84400、ab28245),sh-PD-L1 和各种引物由苏州金唯智生物科技有限公司设计并合成,Lipofectamine 2000 转染试剂(杭州沃森生物技术有限公司,货号 11668027)。Akt-mTOR 通路诱导物 IGF-1(武汉禾元生物技术有限公司,

货号 HYC007M01)。JY04S-3C 凝胶成像系统购自北京海天友诚科技有限公司,CytoFLEX 流式细胞仪购自贝克曼库尔特生命科学公司。

1.2 细胞及培养

以人永生化肺上皮细胞株 16HBE 为对照,非小细胞肺癌细胞株 GLC82、A549、PC9、SK-MES-1、H1703、L78、H460、H661 购自美国典型培养物保藏中心。所有细胞在含体积分数为 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 g/mL 链霉素的 RPMI1640 培养基中,于温度 37℃、5%CO₂ 条件下培养。

1.3 GR 细胞的获得

H1703 细胞在低浓度吉非替尼(0.1 mol/L)条件下传代,并依次培养在浓度逐渐增加(0.3、1、3 mol/L)的吉非替尼中 6~8 周^[6]。用无药物处理平行培养的细胞作为对照。当 H1703 细胞可以在含有 3 mol/L 吉非替尼的培养基中正常生长时,认为 H1703 细胞具有吉非替尼抗性,称为 H1703/GR 细胞。

1.4 细胞分组及处理

分别设置对照组、GR 组、sh-PD-L1 组、GR+sh-PD-L1 组。对照组以正常培养基培养 H1703/GR 细胞;GR 组以含有 3 mol/L 吉非替尼的培养基培养 H1703/GR 细胞;sh-PD-L1 组以正常培养基培养转有 sh-PD-L1(序列:CCGGGCACT-AATTGCTCTATTGGGAAGCTCGAGTTCCTCAATAGACAATTAGT-GCTTTTGTG)的 H1703/GR 细胞;GR+sh-PD-L1 组以含有 3 mol/L 吉非替尼的培养基培养转有 sh-PD-L1 的 H1703/GR 细胞。

1.5 细胞转染

待 H1703/GR 细胞生长达 80% 融合,使用胰酶消化细胞,洗涤 2 遍后应用完全培养基将细胞调至 3.0×10^6 个/mL,取 200 L 细胞液接种至 6 孔板中培养 24 h。分别向 EP 管中加入 5 L Lipofectamine™ 2000、5 μL Lipofectamine™ 2000+sh-NC、5 L Lipofectamine™ 2000+5 L sh-PD-L1,室温静置 5 min 后混合,加入不含血清的 RPMI1640 培养基调整终体积至 2 mL,置于 37℃、5%CO₂、饱和湿度下培养 6 h 后,更换完全培养基继续培养,完成 H1703/GR 细胞转染。

1.6 RT-qPCR 检测 PD1 和 PD-L1 mRNA 表达水平

收集细胞,采用 Trizol 法提取细胞总 RNA,并利用 cDNA 逆转录试剂盒反转录合成 cDNA,之后用 SYBR-Green PCR 进行 qRT-PCR。反应程序:95℃预变性 30 s,95℃变性 10 s,60℃退火 30 s,35 个循环。以 β-actin 为内参,按照 2^{-ΔΔCt} 法计算相对表达量。引物序列见表 1。

1.7 Western blot 检测 PD1、PD-L1 及 PI3K/Akt/mTOR 通路相关蛋白表达

收集各组细胞并用 RIPA 裂解液提取总蛋白,并用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度,然后经 10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白并转移到聚偏二氟乙烯,接着用脱脂牛奶室温封闭蛋白 2 h,再加入兔来源的单克隆一抗(PD1 1:1 000、

PD-L1 1:1 000、p-Akt 1:500、Akt 1:1 000、p-mTOR 1:500、mTOR 1:1 000、GAPDH 1:1 000)在 4℃ 封闭过夜,接着加入对应山羊抗兔二抗(1:2 000)室温封闭 1 h,最后滴 ECL 曝光,以 GAPDH 为内参,使用 Quantity One 软件分析目标蛋白的相对表达水平。

表 1 RT-qPCR 引物序列

名称	引物序列
PD-L1	forward:5'-TCCACTCAATGCCTCAAT-3' reverse:5'-GAAGACCTCACAGACTCAA-3'
PD1	forward:5'-AAGTTTCAGGAAGGTCAG-3' reverse:5'-CTGGGCATGTGTAAAGGT-3'
β -actin	forward:5'-TGAGAGGGAAATCGTCCGTGAC-3' reverse:5'-AAGAAGGAAGGCTGGAAGAG-3'

1.8 CCK-8 检测细胞活性

将各处理组细胞再培养 24 h 后,加入 CCK-8 溶液,于 37℃ 恒温培养箱中继续培养 4 h,最后检测 450 nm 处光密度(optical density, OD)值。用各处理组细胞 OD 值与 0 h 细胞的 OD 值表示细胞活性。

1.9 流式细胞术检测细胞凋亡

在 6 孔板中培养细胞(1×10^6 个/孔)。细胞黏附后,吸出培养基,将细胞悬浮,4 000g 离心 5 min,并在 -20℃ 的 75% 预冷乙醇中固定过夜。离心后弃上清液,用 PBS 洗涤 2 次,重悬于 PBS 中,并用 10 μ L Annexin-V 和 PI 染色。通过流式细胞术分析细胞凋亡。细胞凋亡率(%)=早期细胞凋亡率(%) + 晚期细胞凋亡率(%)。

1.10 统计学处理

所有统计数据采用 SPSS 22.0 进行处理。实验数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据经 Shapiro-Wilk 检验发现均呈正态分布,多组比较进行 One-Way ANOVA 分析,2 组比较使用 SNK-q 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

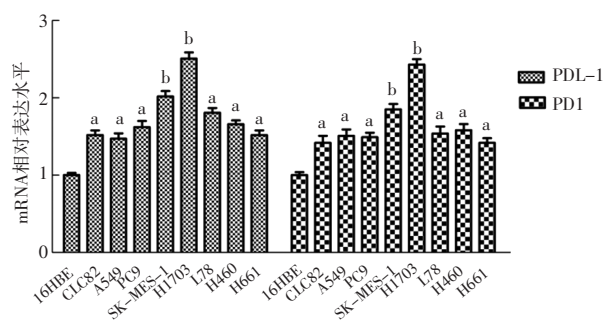
2 结果

2.1 非小细胞肺癌中 PD1 和 PD-L1 的表达水平

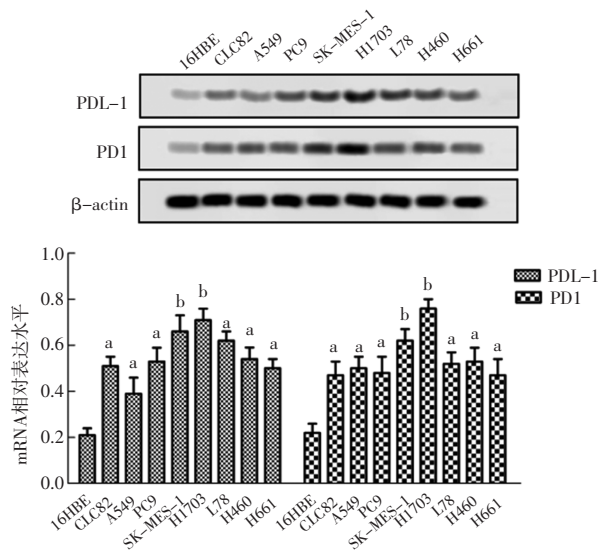
与人永生肺上皮细胞株 16HBE 相比,非小细胞肺癌细胞株 GLC82、A549、PC9、SK-MES-1、H1703、L78、H460、H661 中 PD1 和 PD-L1 mRNA 及蛋白表达均上调,且具有统计学意义($P<0.05$ 、 $P<0.01$)。选择上调最为明显的 H1703 细胞株做后续实验。结果如图 1 所示。

2.2 GR 细胞中 PD1 和 PD-L1 的表达

在不同浓度吉非替尼处理中,H1703/GR 细胞活性明显高于 H1703,且具有统计学意义($P<0.05$ 、 $P<0.01$;图 2A),说明 H1703/GR 细胞已经具有吉非替尼抗性。与 H1703 细胞相比,H1703/GR 细胞中 PD1 和 PD-L1 蛋白表达均上调,且具有统计学意义($P<0.01$;图 2B)。



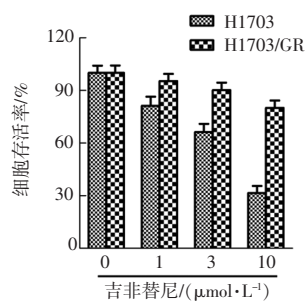
A. RT-qPCR 检测 PD1 和 PD-L1 mRNA 表达水平



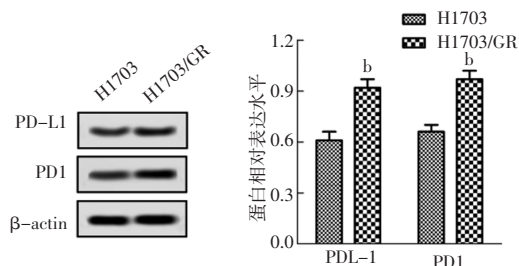
注:与人永生肺上皮细胞株 16HBE 相比, a: $P<0.05$, b: $P<0.01$

B. Western blot 检测 PD1 和 PD-L1 蛋白表达水平

图 1 非小细胞肺癌中 PD1 和 PD-L1 的表达水平



A. CCK-8 检测细胞活性



注:与 H1703 细胞相比, a: $P<0.05$, b: $P<0.01$

B. Western blot 检测 PD1 和 PD-L1 蛋白表达水平

图 2 GR 细胞中 PD1 和 PD-L1 的表达水平

2.3 下调 PD1/PD-L1 增强 GR 非小细胞肺癌细胞敏感性

与对照组相比,sh-PD-L1 组 H1703/GR 细胞中 PD-L1 蛋白表达明显下调,且具有统计学意义($P<0.01$;图 3A),说明转染成功。与对照组相比,GR 组 H1703/GR 细胞活性和细胞凋亡率均无明显变化,sh-PD-L1 组 H1703/GR 细胞活性明显降低,细胞凋亡率明显增加,且均具有统计学意义($P<0.01$;图 3B、C);与 GR 组相比,GR+sh-PD-L1 组 H1703/GR 细胞活性明显降低,细胞凋亡率明显增加,且均具有统计学意义($P<0.01$)。

2.4 下调 PD1/PD-L1 表达抑制 H1703/GR 细胞 PI3K/Akt/mTOR 通路激活

与对照组相比,GR 组 H1703/GR 细胞 p-Akt/Akt 和 p-mTOR/mTOR 蛋白表达均无明显变化,sh-PD-L1 组 H1703/GR 细胞 p-Akt/Akt 和 p-mTOR/mTOR 蛋白表达明显下调,且具有统计学意义($P<0.01$);与 GR 组相比,GR+sh-PD-L1 组 H1703/GR 细胞 p-Akt/Akt 和 p-mTOR/mTOR 蛋白表达明显下调,且具有统计学意义($P<0.01$)。具体如图 4 所示。

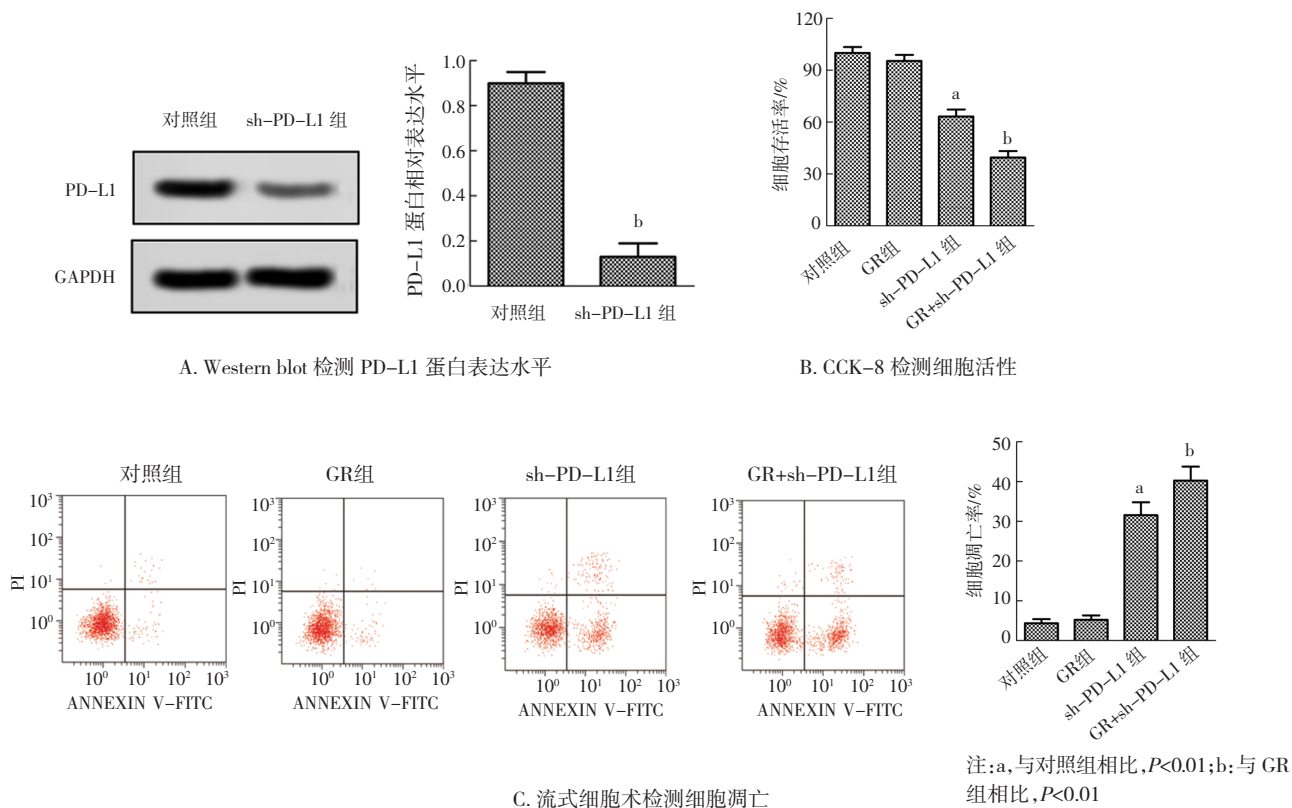


图 3 下调 PD1/PD-L1 增强 GR 非小细胞肺癌细胞敏感性

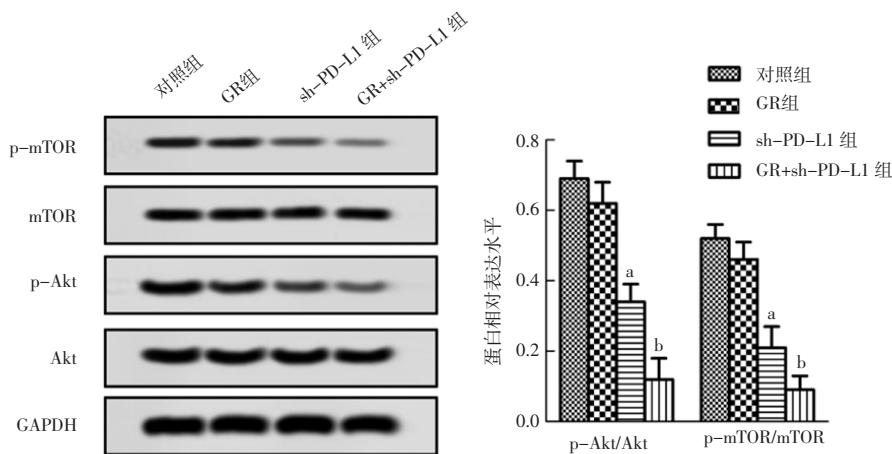
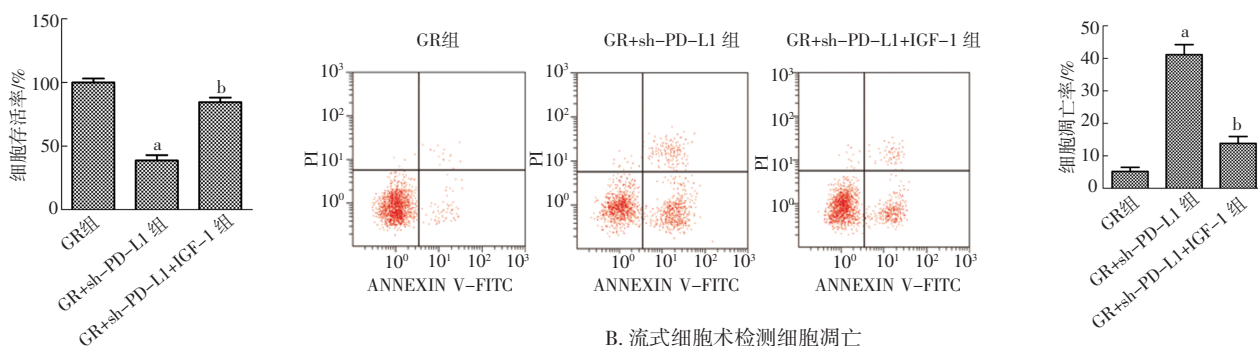


图 4 Western blot 检测 H1703/GR 细胞中 Akt 和 mTOR 蛋白磷酸化水平



A. CCK-8 检测细胞活性

注:a,与 GR 组相比, $P<0.01$;b;与 GR+sh-PD-L1 组相比, $P<0.01$

图5 激活 PI3K/Akt/mTOR 通路逆转下调 PD1/PD-L1 对 GR 非小细胞肺癌细胞的敏感性

2.5 激活 PI3K/Akt/mTOR 通路逆转下调 PD1/PD-L1 对 GR 非小细胞肺癌细胞的敏感性

与 GR 组相比,GR+sh-PD-L1 组 H1703/GR 细胞活性明显降低,细胞凋亡率明显增加,且均具有统计学意义($P<0.01$);与 GR+sh-PD-L1 组相比,GR+sh-PD-L1+IGF-1 组 H1703/GR 细胞活性明显升高,细胞凋亡率明显减少,且均具有统计学意义($P<0.01$)。具体如图 5 所示。

3 讨论

吉非替尼是一种小分子抑制剂,可抑制 EGFR 酪氨酸激酶的活性,已广泛用于治疗晚期 NSCLC 患者。已有研究报道,吉非替尼与其他抗癌药物联合给药可提高体内癌细胞的生长抑制。例如,吉非替尼与 L-抗坏血酸联合治疗非小细胞肺癌细胞可增强肿瘤抑制作用^[7];联合应用 S-1 和吉非替尼可提高肺癌细胞对放疗的敏感性^[8]。但是,使用吉非替尼和标准细胞毒性药物联合治疗的最常见问题是累加的细胞毒性和对药物的敏感性丧失^[9]。因此,对增加吉非替尼敏感性的基因调控和分子机制研究显得至关重要。本研究发现,GR 细胞 H1703/GR 中 PD1 和 PD-L1 蛋白表达均上调,说明 PD1/PD-L1 可能参与 GR 分子调控。

PD1 和 PD-L1 是免疫检查点蛋白,可在刺激 T 细胞受体后微调抗原特异性 T 细胞反应,对自我耐受至关重要。通过在肿瘤细胞表面和肿瘤微环境内表达 PD-L1,肿瘤特别选择了该途径,从而允许肿瘤直接抑制抗肿瘤溶细胞性 T 细胞活性^[10]。PD1/PD-L1 途径的诱导代表肿瘤细胞响应于内源性抗肿瘤活性而施加的适应性免疫抗性机制^[11]。PD1/PD-L1 在包括 NSCLC 在内的几种肿瘤类型中的过表达导致

抗肿瘤免疫反应的抑制,并且认为是逃避免疫监视的主要机制^[12]。已有研究表明,PD1 和 PD-L1 在非小细胞肺癌组织中高表达^[13]。本研究结果显示,非小细胞肺癌细胞株 GLC82、A549、PC9、SK-MES-1、H1703、L78、H460、H661 中 PD1 和 PD-L1 mRNA 及蛋白表达均上调。本研究还发现,相比 H1703 细胞,GR 细胞 H1703/GR 中 PD1 和 PD-L1 蛋白表达均上调,说明 PD1/PD-L1 还可能参与 GR 分子调控。为了验证该预测,下调 GR 细胞 H1703/GR 中的 PD-L1。研究结果表明,下调 PD-L1 可明显降低细胞活性并增加细胞凋亡率,从而增强对吉非替尼的敏感性。

下调 PD1/PD-L1 表达增强非小细胞肺癌对吉非替尼的敏感性可能涉及多种潜在的分子途径。本文就目前研究明确的 EGFR 主要下游通路之一 PI3K/Akt/mTOR 通路作一探讨^[14]。已有研究表明,EGFR 的酪氨酸磷酸化作为 PI3K 的对接位点,进而刺激磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸腺苷生成,促进 Akt 活化^[15]。本研究结果显示,下调 PD1/PD-L1 表达抑制 H1703/GR 细胞 PI3K/Akt/mTOR 通路激活。PI3K/Akt/mTOR 通路与细胞代谢、转录、胞质分裂和生物合成等密切相关,过度激活 PI3K/Akt/mTOR 通路可抑制细胞凋亡,促进肿瘤生长^[16-17]。例如,丹参酮 I 通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路,诱导细胞凋亡和自噬,减弱卵巢癌的恶性生物学特性^[18]。PI3K/Akt/mTOR 途径与吉非替尼在非小细胞肺癌细胞中的敏感性改善有关。例如,重楼皂苷 II 通过负调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,恢复了非小细胞肺癌耐吉非替尼 PC-9/ZD 细胞对吉非替尼的敏感性^[19];复方苦参注射液通过下调 PI3K/Akt/mTOR 通路和上调自噬增加非小细胞肺癌对吉非替尼的敏感性^[20]。本研究表

明,添加 PI3K/Akt/mTOR 通路激活剂 IGF-1 可逆转 PD-L1 表达下调对非小细胞肺癌对吉非替尼敏感性的增强作用。因此,下调 PD-L1 表达至少可通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路激活来增强非小细胞肺癌对吉非替尼的敏感性。

综上所述,下调 PD-L1 表达至少可通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路激活来增强非小细胞肺癌对吉非替尼的敏感性。这为治疗 GR 非小细胞肺癌提供了新的治疗策略。但是,更多的分子通路机制有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Brønserud MM, Iachina M, Green A, et al. Patient reported outcome data as performance indicators in surgically treated lung cancer patients [J]. Lung Cancer, 2019, 130: 143-148.
- [2] 曾 瑶, 孔双喜, 徐惠丽. 重楼皂苷 I 通过 Fas/FasL 信号通路增强顺铂对非小细胞肺癌 A549 细胞增殖及侵袭的抑制作用[J]. 医学分子生物学杂志, 2018, 15(5): 283-288, 301.
- Zeng Y, Kong SX, Xu HL. Polyphyllin I enhances the effects of cisplatin cell survival and invasion of non-small cell lung cancer A549 cell via Fas/FasL pathway[J]. J Med Mol Biol, 2018, 15(5): 283-288, 301.
- [3] Hirsch FR, Sequist LV, Gore I, et al. Long-term safety and survival with gefitinib in select patients with advanced non-small cell lung cancer: results from the US IRESSA Clinical Access Program(ICAP)[J]. Cancer, 2018, 124(11): 2407-2414.
- [4] Jin SD, He J, Li J, et al. miR-873 inhibition enhances gefitinib resistance in non-small cell lung cancer cells by targeting glioma-associated oncogene homolog 1[J]. Thorac Cancer, 2018, 9(10): 1262-1270.
- [5] Ingles Garces AH, Au L, Mason R, et al. Building on the anti-PD1/PD-L1 backbone: combination immunotherapy for cancer[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2019, 28(8): 695-708.
- [6] Yan F, Pang JX, Peng Y, et al. Elevated cellular PD1/PD-L1 expression confers acquired resistance to cisplatin in small cell lung cancer cells[J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0162925.
- [7] Lee KE, Hahm E, Bae S, et al. The enhanced tumor inhibitory effects of gefitinib and Lascorbic acid combination therapy in nonsmall cell lung cancer cells[J]. Oncol Lett, 2017, 14(1): 276-282.
- [8] Cui J, Wang MC, Zhang YM, et al. Combination of S-1 and gefitinib increases the sensitivity to radiotherapy in lung cancer cells[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2018, 81(4): 717-726.
- [9] Chen P, Huang HP, Wang Y, et al. Curcumin overcome primary gefitinib resistance in non-small-cell lung cancer cells through inducing autophagy-related cell death[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 254.
- [10] Khedri M, Abnous K, Rafatpanah H, et al. An optimized protocol for the in vitro generation and functional analysis of human PD1/PD-L1 signal[J]. J Recept Signal Transduct Res, 2018, 38(1): 31-36.
- [11] Barroso-Sousa R, Ott PA. Transformation of old concepts for a new era of cancer immunotherapy: cytokine therapy and cancer vaccines as combination partners of PD1/PD-L1 inhibitors[J]. Curr Oncol Rep, 2018, 21(1): 1.
- [12] Aung PP, Sukswai N, Nejati R, et al. PD1/PD-L1 expression in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm[J]. Cancers (Basel), 2019, 11(5): E695.
- [13] Giatromanolaki A, Koukourakis IM, Balaska K, et al. Programmed death-1 receptor(PD-1) and PD-ligand-1(PD-L1) expression in non-small cell lung cancer and the immune-suppressive effect of anaerobic glycolysis[J]. Med Oncol, 2019, 36(9): 76.
- [14] Zhao ZQ, Yu ZY, Li J, et al. Gefitinib induces lung cancer cell autophagy and apoptosis via blockade of the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. Oncol Lett, 2016, 12(1): 63-68.
- [15] Yu CC, Hung SK, Lin HY, et al. Targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway as an effectively radiosensitizing strategy for treating human oral squamous cell carcinoma *in vitro* and *in vivo*[J]. Oncotarget, 2017, 8(40): 68641-68653.
- [16] Zhou XS, Zhou R, Li QW, et al. Cardamonin inhibits the proliferation and metastasis of non-small-cell lung cancer cells by suppressing the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Anticancer Drugs, 2019, 30(3): 241-250.
- [17] 蔡明林, 李晓龙, 刘 刚. 右美托咪定通过调控 PTEN-PI3K/Akt 信号通路对骨肉瘤细胞侵袭和迁移能力的影响及机制研究[J]. 医学分子生物学杂志, 2019, 16(1): 35-40.
- Cai ML, Li XL, Liu G. Effects of dexmedetomidine on the invasion and migration of osteo-sarcoma cells by regulating epithelial mesenchymal transformation[J]. J Med Mol Biol, 2019, 16(1): 35-40.
- [18] Zhou J, Jiang YY, Chen H, et al. Tanshinone I attenuates the malignant biological properties of ovarian cancer by inducing apoptosis and autophagy via the inactivation of PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Cell Prolif, 2020, 53(2): e12739.
- [19] Zheng RZ, Jiang H, Li JH, et al. Polyphyllin II restores sensitization of the resistance of PC-9/ZD cells to gefitinib by a negative regulation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2017, 17(4): 376-385.
- [20] Zhang J, Qu ZP, Yao H, et al. An effective drug sensitizing agent increases gefitinib treatment by down regulating PI3K/Akt/mTOR pathway and up regulating autophagy in non-small cell lung cancer[J]. Biomedicine Pharmacother, 2019, 118: 109169.

(责任编辑:周一青)