

◆特邀栏目◆

照射诱导自噬对三阴性乳腺癌中 PD-L1 介导免疫抑制的影响*

林春香, 韦可璇, 宋秋露, 赵伟**

(广西医科大学附属武鸣医院放疗科, 广西南宁 530199)

摘要:三阴性乳腺癌(Triple Negative Breast Cancer, TNBC)中外泌体(Exosomes)携带的细胞程序性死亡-配体 1 (Programmed Cell Death Ligand 1, PD-L1)与肿瘤微环境(Tumor Microenvironment, TME)免疫抑制相关。为探讨照射能否调节 PD-L1 的表达从而改善 TME 的作用,本研究首先通过 RT-qPCR 和 Western blot 检测自噬抑制剂氯喹(Chloroquine, CQ)、自噬激活剂雷帕霉素(Rapamycin, Rapa)及蛋白酶体抑制剂 MG132 在联合或不联合照射下 PD-L1、LC3B 和 P62 蛋白的表达情况;其次,采用细胞免疫荧光检测照射前后 PD-L1 的表达及定位改变;再次,采用 Western blot 检测照射前后外泌体中 PD-L1 (sEVs-PD-L1)的表达;最后,采用生物信息学对 ATG7 与乳腺癌预后、信号通路的相关性进行分析。结果显示:PD-L1 在 TNBC 中的表达高于非三阴性乳腺癌(non-TNBC);PD-L1 可通过自噬-溶酶体降解,照射后诱导自噬可以促进 PD-L1 的胞浆转移及下调 sEVs-PD-L1 的表达,具体机制可能与信号转导和转录激活因子 3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3, STAT3)的激活及外泌体转运相关。上述结果说明照射可以通过影响自噬及外泌体的发生,使 PD-L1 在微环境中表达下调,进而调控肿瘤介导的免疫抑制。

关键词:照射;外泌体;自噬;PD-L1;免疫调控

中图分类号:R737.9 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2023)03-0605-09

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20230523.001

三阴性乳腺癌(Triple Negative Breast Cancer, TNBC)是一种特殊亚型的乳腺癌,其雌激素受体(Estrogen Receptor, ER)、孕激素受体(Progesterone Receptor, PR)和原癌基因 *HER2* 均为阴性,极易发

生远处转移和复发。TNBC 进展快、预后差且缺少特异性治疗手段,因此免疫治疗是 TNBC 探索的方向之一。长期以来乳腺癌一直被认为是免疫学上的一种“冷”肿瘤,但是与其他亚型的乳腺癌相比, TNBC

收稿日期:2022-10-15

修回日期:2022-11-26

* 广西自然科学基金项目(2017JJA10748),广西医疗卫生适宜技术开发与推广应用项目(S201808),广西高校生物分子医学研究重点实验室开放课题项目(GXBMR201604),南宁市武鸣区科学研究与技术开发计划项目(20200213),广西壮族自治区卫生健康委员会西医类别自筹经费科研课题(Z20201311)和南宁市武鸣区重点研发计划项目(20210124)资助。

【第一作者简介】

林春香(1996-),女,在读硕士研究生,主要从事放射肿瘤学研究。

【**通信作者】

赵伟(1981-),男,博士,副教授,主要从事放射肿瘤学研究, E-mail: zwei1112@126.com。

【引用本文】

林春香, 韦可璇, 宋秋露, 等. 照射诱导自噬对三阴性乳腺癌中 PD-L1 介导免疫抑制的影响[J]. 广西科学, 2023, 30(3): 605-613.

LIN C X, WEI K X, SONG Q L, et al. Effect of Radiation Induced Autophagy on PD-L1 Mediated Immunosuppression in Triple Negative Breast Cancer [J]. Guangxi Sciences, 2023, 30(3): 605-613.

免疫原性更强^[1-3],提示免疫治疗已成为 TNBC 治疗新的希望。但实际上 TNBC 免疫检查点抑制剂单药治疗反应率不高,其中的原因尚未明确。

信号转导和转录激活因子 3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3, STAT3) 的过度表达^[4]、外泌体 (Exosomes) 携带的细胞程序性死亡-配体 1 (Programmed Cell Death Ligand 1, PD-L1) 抑制肿瘤微环境^[5] (Tumor Microenvironment, TME) 可能是 TNBC 免疫检查点抑制剂单药治疗效果差的原因。激活的 STAT3 不仅与肿瘤增殖、血管生成和转移有关,还能促进免疫抑制因子的表达,同时阻碍 Th1 细胞^[6,7] 分泌细胞因子从而抑制 TNBC 的肿瘤微环境。肿瘤细胞分泌的外泌体富含免疫抑制蛋白,如 PD-L1,其能使免疫细胞失活,并进一步阻止免疫细胞识别和杀伤肿瘤细胞^[8,9]。目前,尚无靶向调控 PD-L1 转运、STAT3 降解并诱导 TME 重塑的方法。

放射治疗是包括乳腺癌在内多种恶性肿瘤治疗的三大治疗手段之一,对恶性肿瘤细胞有直接杀伤作用,对 TME 的组成部分也有至关重要的影响。以往的研究认为放射治疗具有免疫抑制作用^[10],包括较大的单组分辐射剂量 (15 - 20 Gy) 可能会永久地减少血流^[11];放射治疗会引起免疫抑制相关分子 (如肿瘤坏死因子、白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、白细胞介素 10 和转化生长因子 β ^[12,13]) 及细胞 (如肿瘤相关巨噬细胞^[14]、髓系抑制细胞和调节性 T 细胞) 的聚集增多,同时引起淋巴细胞亚群损伤和功能受到抑制^[15]。然而目前更多的研究认为放射治疗可以增强肿瘤细胞和 TME 的免疫敏感性,刺激肿瘤中更多的免疫细胞浸润和活化^[16-18]。另外,照射可以诱导自噬的发生,细胞自噬与肿瘤的发生发展关系密切,并且自噬-溶酶体途径参与了多种物质的转运^[19,20],但是细胞自噬调控 PD-L1 转运及与调节 STAT3 的机制尚未明确。本研究利用照射诱导肿瘤细胞发生自噬,探讨自噬对 PD-L1 和 STAT3 溶酶体降解的影响,为改善肿瘤微环境的免疫抑制及 TNBC 治疗提供一个新策略。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 细胞与慢病毒载体

人乳腺癌细胞 TNBC 细胞株 (MDA-MB-231、BT-549)、非三阴性乳腺癌 (non-TNBC) 细胞株 (MCF-7、BT-474) 及 Jurkat 购自武汉普诺赛生命科

技有限公司。根据 ATG7 基因 (Gene ID: 10533) 设计的重组慢病毒敲低载体 sh-ATG7 和空载体 vector (阴性对照) 购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司。

1.1.2 主要材料与试剂

自噬激活剂雷帕霉素 (Rapamycin, Rapa) 购自美国 Sigma 公司,自噬抑制剂氯喹 (Chloroquine, CQ) 及蛋白酶体抑制剂 MG132、外泌体抑制剂 GW4869 购自 MedChemExpress, 抗体 LC3B、P62、PD-L1 购自美国 Abcam 公司, E-cadherin、Vimentin 购自赛信通 (上海) 生物试剂有限公司。GAPDH 抗体、山羊抗兔 IgG (H+L) 和驴抗兔 IgG (H+L) 均购自上海碧云天生物技术有限公司, β -actin 购自圣克鲁斯生物技术 (上海) 有限公司, BCA 蛋白定量试剂盒、RIPA 裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司, 杜尔贝科改良伊格尔培养基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)、1640 培养基、胎牛血清 (FBS) 购自美国 GIBCO 公司, 青霉素、链霉素混合液和 PBS 缓冲液购自北京索莱宝科技有限公司, 增强型化学发光 (ECL) 试剂盒 (货号 34577) 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

乳腺癌细胞培养于含 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素混合液的 DMEM, 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中, 取对数生长期细胞用于后续研究。雷帕霉素的浓度为 20 nmol/L, 氯喹的浓度为 25 μ mol/L, MG132 的浓度为 5 mmol/L, GW4869 的浓度为 20 μ mol/L。在照射前 6 h 加入以上浓度的药物, MG132 在预定的实验终点前 2 h 加入。照射组细胞采用直线加速器 6MV-X 进行照射, 照射剂量为 8 Gy^[21,22], 照射视野为 40 cm \times 40 cm, X 射线辐射装置购自瑞典 Elekta 公司。

1.2.2 慢病毒转染

选取处于对数生长期的 MDA-MB-231 细胞进行慢病毒转染, 待细胞铺满孔的 50% 时, 按照说明书将慢病毒敲低载体 sh-ATG7 及空载慢病毒分别转染 MDA-MB-231 细胞, 经嘌呤霉素筛选后获得稳定转染的细胞株。采用 Western blot 及 RT-qPCR 验证转染效率。

1.2.3 RT-qPCR 检测 mRNA 表达

使用 TRIZOL 法提取细胞中总 RNA, 并使用 5 \times PrimeScript RT Master Mix 逆转录成 cDNA。

根据 SYBR Green qPCR Master Mix 说明书步骤进行 RT-qPCR 检测。

1.2.4 Western blot 检测蛋白表达

用 RIPA 液裂解各组细胞, 离心收集蛋白, 测定蛋白浓度, 用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白, 将蛋白转移到 PVDF 膜上, TBST 缓冲液洗膜 3 次, 室温封闭 20 min, 分别加入一抗 P62、LC3B (均 1:2 000 稀释), PD-L1、E-cadherin、Vimentin、 β -actin、GAPDH (均 1:1 000 稀释), 4 °C 孵育过夜, 加入二抗 (1:1 000) 室温孵育 1 h, 使用 ECL 显色。

1.2.5 免疫荧光检测蛋白表达

弃去培养基, 用 PBS 缓冲液洗涤细胞 3 次, 加入 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min, 再用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 用免疫封闭液封闭 1 h。4 °C 孵育相应一抗过夜, 用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 37 °C 孵育荧光二抗 1 h, 再用 DAPI 染细胞核 5 min。设置未照射 (NC) 和照射 (IR, 8 Gy) 两个处理。在 EVOS FL 自动显微镜下观察细胞 PD-L1 蛋白的绿色荧光焦点数。

1.2.6 外泌体的提取与鉴定

将乳腺癌细胞 MDA-MB-231 置于 T175 培养瓶中培养, 使用无外泌体完全培养基培养, 当细胞密度达 80% 左右时, 给予 8 Gy X 射线照射, 继续培养 24 h, 然后收集细胞上清。通过差速超速离心法提取未照射 (NC) 与照射 (IR) 处理的外泌体, 用透射电子显微镜观察外泌体的形态, 纳米颗粒追踪分析 (NTA) 外泌体的粒径大小, Western blot 检测外泌体标志蛋白 CD63、TSG101、ALIX 的表达。

1.2.7 生物信息学分析

通过在线数据库 GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) 的 survival 模块验证自噬关键基因 ATG7 与乳腺癌预后的相关性; 利用数据库的 Correlation 模块对 ATG7 与 STAT1、STAT2、STAT3 的关联性进行分析。

1.3 统计学方法

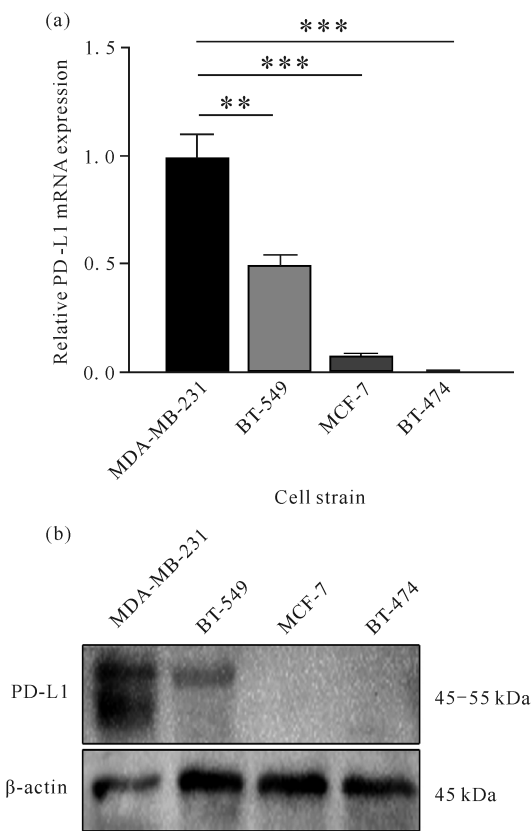
采用 GraphPad prism 8.0 进行统计分析作图。采用单因素方差分析或独立性 t 检验进行数据组间分析, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 PD-L1 在乳腺癌细胞中的差异表达

通过 RT-qPCR [图 1(a)] 和 Western blot [图 1(b)] 检测 TNBC 细胞株 (MDA-MB-231、BT-549) 及

non-TNBC 细胞株 (MCF-7、BT-474) 中 PD-L1 的表达, 结果表明, TNBC 细胞株中 PD-L1 的 mRNA 和蛋白表达均高于 non-TNBC。



* * indicates $P < 0.01$, * * * indicates $P < 0.001$.

图 1 PD-L1 在乳腺癌细胞中的差异表达

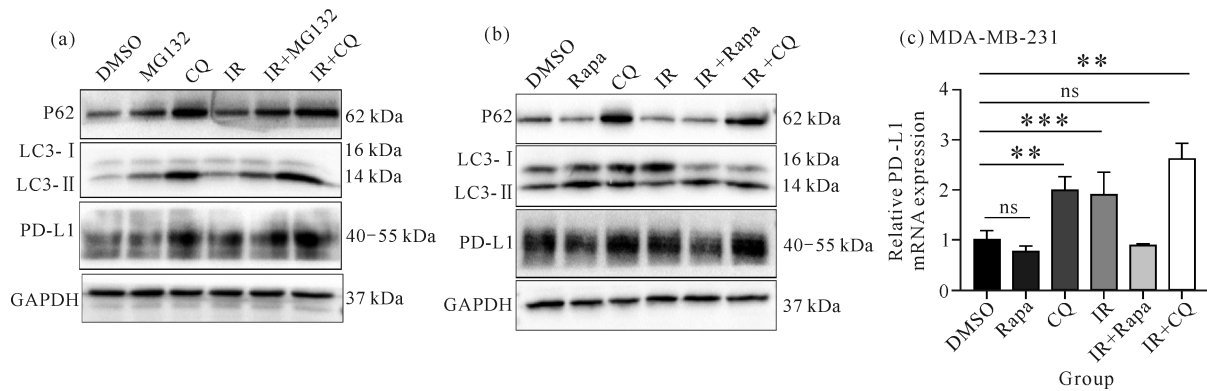
Fig. 1 Differential expression of PD-L1 in breast cancer cells

2.2 蛋白酶体和自噬-溶酶体对 PD-L1 表达的影响

为进一步了解 PD-L1 降解的主要途径, 使用自噬抑制剂 CQ、自噬激活剂 Rapa 及蛋白酶体抑制剂 MG132 进行联合或不联合照射 (IR), 二甲基亚砜 (DMSO) 为阴性对照。Western blot 的结果显示, 单用 MG132 几乎不能上调 PD-L1 的表达; 而单用 CQ 虽然可以上调 PD-L1 的表达, 但是效果不显著 [图 2(a)]。当联合照射时, PD-L1 的表达明显提高。当使用自噬激活剂 Rapa 时, PD-L1 的表达下调, 联合照射不能使 PD-L1 恢复至 DMSO 组水平 [图 2:(b)(c)], 说明自噬-溶酶体途径可能是 PD-L1 降解的主要途径。

2.3 照射对 TNBC 细胞中 PD-L1 表达及转运的影响

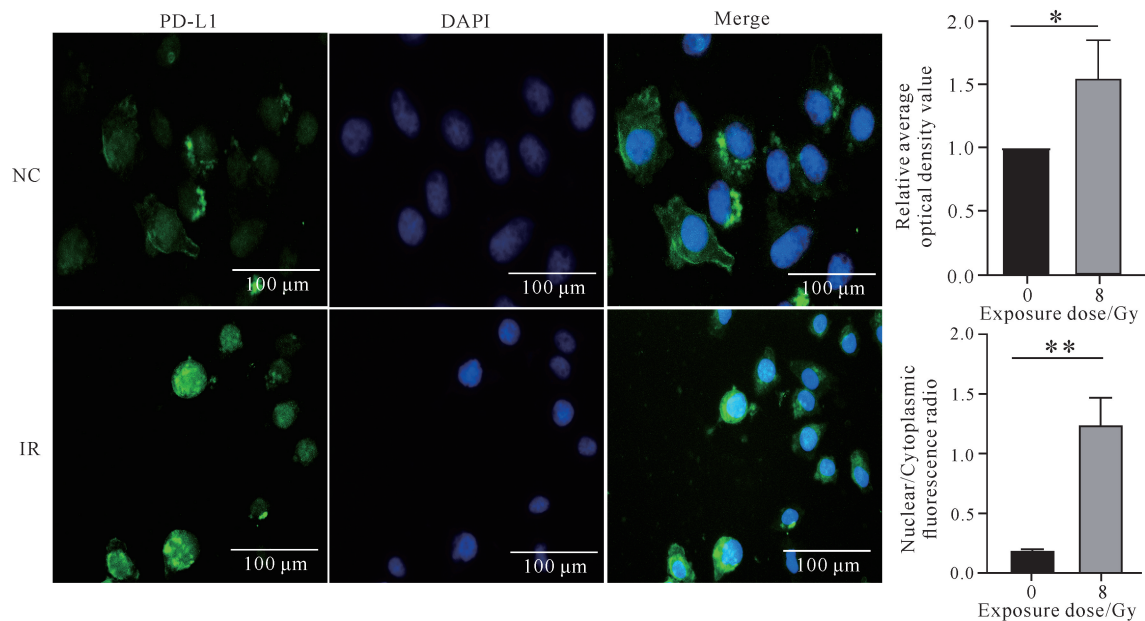
免疫荧光结果显示, 照射后 MDA-MB-231 细胞的 PD-L1 蛋白在细胞内的荧光焦点数增多 (图 3)。免疫荧光结果表明照射促进了 PD-L1 的内吞并向胞



ns indicates no statistical significance, * * indicates $P < 0.01$, * * * indicates $P < 0.001$.

图2 蛋白酶体和自噬-溶酶体对PD-L1表达的影响

Fig. 2 Effects of proteasomes and autophagy lysosomes on PD-L1 expression



Compared with the NC group, * indicates $P < 0.05$, * * indicates $P < 0.01$.

图3 照射对TNBC细胞中PD-L1表达及转运的影响

Fig. 3 Effects of irradiation on PD-L1 expression and transport in TNBC cell

内转移,即照射过程中细胞的内吞-外排途径可以调节PD-L1的表达。

2.4 照射对TNBC细胞中sEVs-PD-L1表达的影响

为确定照射对肿瘤微环境中PD-L1的作用,通过差速超速离心法分离细胞培养上清,获得纯化的外泌体。NTA结果发现外泌体粒径大小为160 nm左右[图4:(a)(b)]。透射电子显微镜下,可见有明显的膜结构,呈近似半球状的囊泡结构[图4(c)]。Western blot验证了外泌体蛋白标志CD63、TSG101、ALIX的表达呈阳性[图4(d)]。同时,透射电子显微镜及NTA发现,与未照射组相比,经过8

Gy照射增加了细胞外囊泡的整体释放,然而Western blot检测结果显示,8 Gy照射后相同数量囊泡下的sEVs-PD-L1表达却下降[图4(d)]。以上结果提示照射可能促进细胞表面PD-L1内吞并转移至溶酶体降解,促使sEVs-PD-L1表达下降从而改善TME。

2.5 ATG7与乳腺癌预后及信号通路的相关性分析

利用在线数据库GEPIA验证自噬关键基因ATG7与乳腺癌预后的相关性,结果表明ATG7的低表达与乳腺癌不良预后有关,同时ATG7与STAT3相关性最强(图5),说明ATG7可能与STAT3信号通路的调控相关。

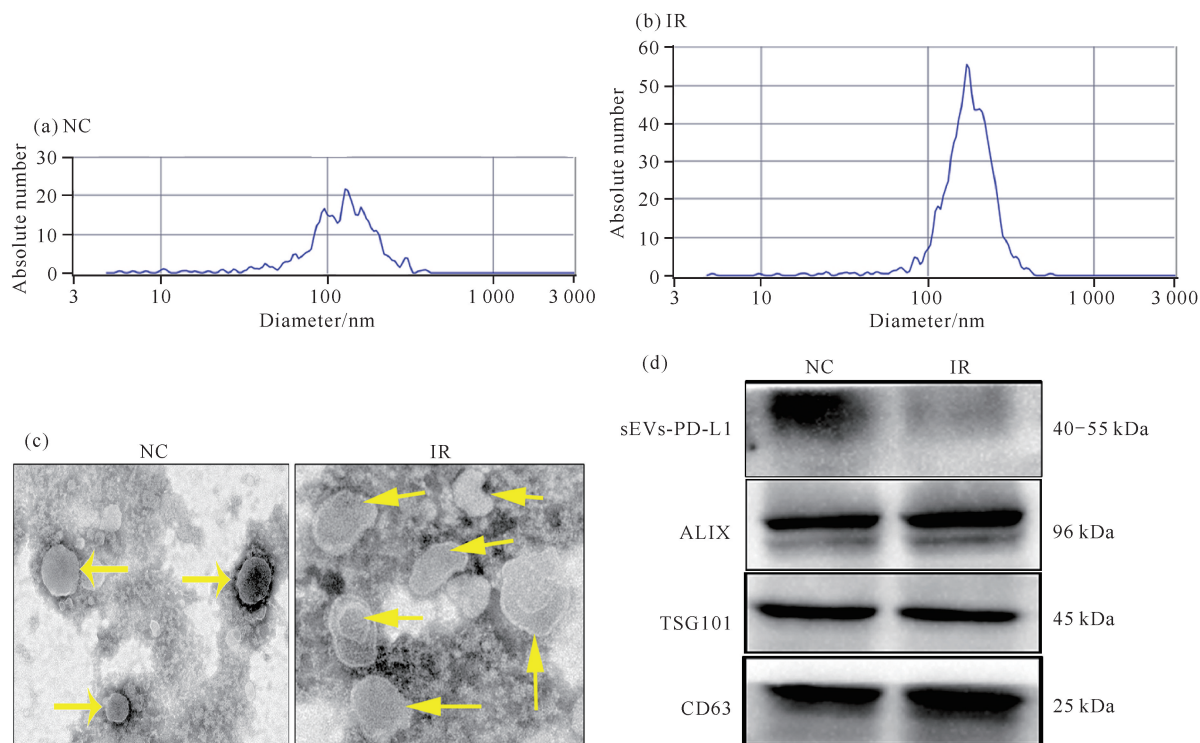


图 4 照射对 TNBC 细胞中 sEVs-PD-L1 表达的影响

Fig. 4 Effect of irradiation on expression of sEVs-PD-L1 from TNBC cells

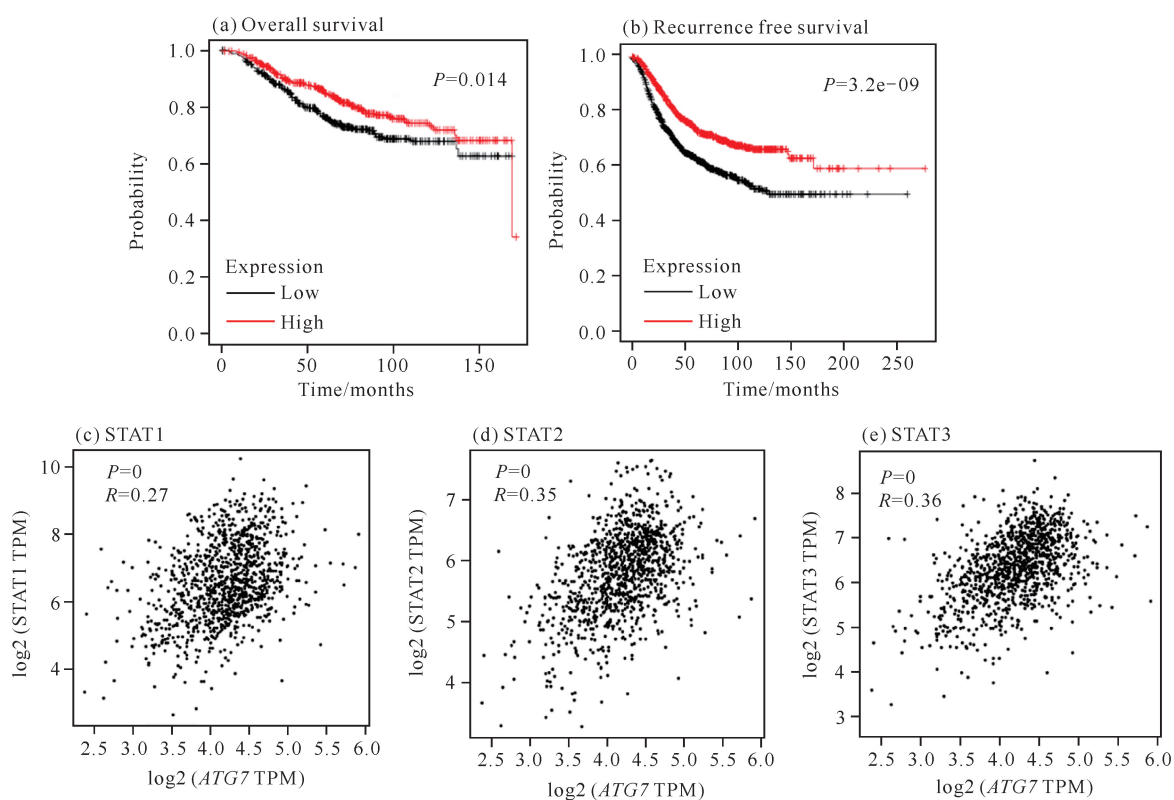
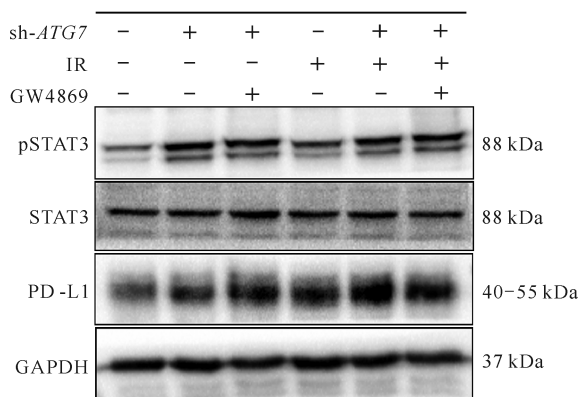


图 5 ATG7 与乳腺癌预后及信号通路的相关性分析

Fig. 5 Correlation analysis of ATG7 with prognosis and signal pathway of breast cancer

2.6 抑制自噬和(或)抑制外泌体释放对细胞 PD-L1 表达及 STAT3 激活的影响

利用慢病毒介导 *ATG7* 的沉默,使用外泌体抑制剂 GW4869 阻碍外泌体的释放,结果表明,与空白对照组相比,单独照射组可激活 STAT3,提高 PD-L1 的表达;与单独沉默 *ATG7* 相比,联合使用 GW4869 可使 PD-L1 的表达升高,并且照射可在上述分组中进一步提高 PD-L1 的表达(图 6)。照射、抑制自噬、抑制外泌体释放均可提高 PD-L1 的表达,其中照射和抑制自噬提高 PD-L1 的表达与 STAT3 的激活有关。



+ indicates gene knockdown/irradiation using GW4869 inhibitor, - indicates not used.

图 6 抑制自噬和(或)抑制外泌体释放对 PD-L1 表达及 STAT3 激活的影响

Fig. 6 Effects of inhibition of autophagy and/or exocrine release on PD-L1 expression and STAT3 activation

3 讨论

三阴性乳腺癌被认为是最具致命性的乳腺癌亚型,具有高度侵袭性,而且对当前的治疗方法(包括免疫治疗)反应较差。近几年来肿瘤的免疫治疗如雨后春笋崛起,主流医学曾有过很多关于实体瘤中 T 细胞浸润与术后预后相关的报道,总体上支持 T 细胞数量越多,特别是 CD8⁺ T 细胞的数量越多预后效果越好的结论^[23]。本课题组致力于放射治疗与细胞自噬相互作用的研究^[24,25],同时了解到细胞自噬对各种刺激产生的胞外小泡的数量和命运起着决定性的作用^[26-28],而这些外泌体^[9,29]是 TME 的重要组成部分。在胶质母细胞瘤^[30]以及人类黑色素瘤细胞^[5]等多种肿瘤中的研究显示,外泌体中的 PD-L1 具有抑制 T 细胞功能的作用,导致 TME 处于免疫抑制状态。乳腺癌中还存在 STAT3 的过度激活,而肿瘤细

胞中激活的 STAT3 不仅可以抑制免疫刺激介质的产生,还可以促进免疫抑制因子的释放,从而导致 TME 中 STAT3 相关 T 细胞免疫抑制^[31]。然而细胞自噬与外泌体囊泡的转运关系以及照射诱导细胞自噬与 STAT3 信号通路的关系仍不明确。

目前在 TNBC 中,尚不清楚照射是否能调节 PD-L1 的转运及表达进而调控 TME。本研究在细胞免疫荧光实验中发现,照射处理上调了 MDA-MB-231 细胞 PD-L1 的表达,同时使 PD-L1 发生了核转位,核转位的 PD-L1 增多意味着细胞内吞而来的 PD-L1 减少了,进而可能会导致 TME 中 sEVs-PD-L1 的减少,减轻 TME 的免疫抑制。本研究虽然对 sEVs-PD-L1 的表达进行了检测,结果也证实了照射可以下调 sEVs-PD-L1,但是仍缺乏对 TME 免疫状态的直接检测。而照射诱导的 PD-L1 核转位可能由于低氧而引起 STAT3 的激活^[32],照射^[33]及低氧环境^[34]均会诱导自噬的发生,照射联合诱导自噬是否会促进 STAT3 的降解以及它们之间的联系尚未明确。

本研究发现,在 TNBC 中 PD-L1 的表达受到自噬-溶酶体途径及内吞-外泌体途径的共同调节,而不是蛋白酶体途径,抑制自噬及抑制外泌体释放均使 PD-L1 表达增加。为进一步证明抑制自噬与 PD-L1 的关系,通过沉默 *ATG7* 联合或不联合照射发现,抑制自噬及照射均激活了 STAT3,上调了 PD-L1 的表达。从以上结果可以看出,不管是照射还是抑制自噬最终都是 STAT3 的激活使 PD-L1 表达上调,但是本研究缺乏对过表达 *ATG7* 后是否会降解 STAT3 的研究,后期会继续补充该方面实验。因此,照射联合自噬激活剂或许可以靶向降解 STAT3,为减轻或解除免疫抑制提供新思路。乳腺癌存在 STAT3 的过度激活,STAT3 曾被认为是“不可成药”靶点,与化疗耐药、放射抗拒有关;STAT3 使得巨噬细胞向 M2 极化,产生诸如白细胞介素-10、白细胞介素-23 和转化生长因子-β 等免疫抑制因子,STAT3 促进了免疫抑制的 TME,参与调节早期肿瘤生长和后期转移阶段^[35]。

综上所述,照射可以促进 PD-L1 的核转位,减少 TME 中 sEVs-PD-L1 的分泌,并且照射诱导的细胞自噬可能会降解 STAT3,减轻 TME 的抑制,照射联合自噬诱导可产生协同增效的抗肿瘤作用,为 TNBC 治疗提供新思路。同时本研究的结果就细胞自噬方面而言,再一次验证了 TNBC 的治疗不是抑制自噬,

而是利用照射诱导的自噬性细胞死亡, 后续还需要更多体内外实验去阐述诱导自噬对杀伤 TNBC 的影响, 并且还需进一步通过细胞实验及体内动物实验证明照射改变外泌体释放及其内容物进而调节肿瘤免疫抑制。

4 结论

本研究发现了 TNBC 细胞中照射诱导 PD-L1 的降解与细胞自噬相关的可能作用机制。照射过程中, 抑制自噬可通过激活 STAT3 上调 PD-L1 的表达, 而激活自噬可通过溶酶体清除 PD-L1 从而减轻其介导的免疫抑制。此外, 照射还可以诱导细胞自噬继而选择性降解照射后转运至胞内的 PD-L1, 降低外泌体中 PD-L1 (sEVs-PD-L1) 的表达。总而言之, 本研究以 PD-L1 为靶点, 探索照射过程中其降解减少的主要途径, 为分析 TNBC 中抗 PD1/PD-L1 抑制剂疗效低的原因提供了一种新思路, 也为 TNBC 联合免疫治疗策略提供了新依据。

参考文献

- [1] BARROSO-SOUSA R, JAIN E, COHEN O, et al. Prevalence and mutational determinants of high tumor mutation burden in breast cancer [J]. *Annals of Oncology*, 2020, 31(3):387-394.
- [2] MITTENDORF E A, PHILIPS A V, MERIC-BERNSTAM F, et al. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer [J]. *Cancer Immunology Research*, 2014, 2(4):361-370.
- [3] DENKERT C, VON MINCKWITZ G, DARB-ESFAHANI S, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3 771 patients treated with neoadjuvant therapy [J]. *The Lancet Oncology*, 2018, 19(1):40-50.
- [4] ZOU S L, TONG Q Y, LIU B W, et al. Targeting STAT3 in cancer immunotherapy [J]. *Molecular Cancer*, 2020, 19:145.
- [5] CHEN G, HUANG A C, ZHANG W, et al. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response [J]. *Nature*, 2018, 560(7718):382-386.
- [6] HASHIMOTO S, HASHIMOTO A, MUROMOTO R, et al. Central roles of STAT3-mediated signals in onset and development of cancers: tumorigenesis and immunosurveillance [J]. *Cells*, 2022, 11:2618.
- [7] KORTYLEWSKI M, YU H. Role of Stat3 in suppressing anti-tumor immunity [J]. *Current Opinion in Immunology*, 2008, 20:228-233.
- [8] YANG Y, LI C W, CHAN L C, et al. Exosomal PD-L1 harbors active defense function to suppress T cell killing of breast cancer cells and promote tumor growth [J]. *Cell Research*, 2018, 28(8):862-864.
- [9] CHEN J, SONG Y, MIAO F, et al. PDL1-positive exosomes suppress antitumor immunity by inducing tumor-specific CD8⁺ T cell exhaustion during metastasis [J]. *Cancer Science*, 2021, 112(9):3437-3454.
- [10] FRIEDMAN E J. Immune modulation by ionizing radiation and its implications for cancer immunotherapy [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2002, 8(19):1765-1780.
- [11] CHIN M S, FRENIERE B B, BONNEY C F, et al. Skin perfusion and oxygenation changes in radiation fibrosis [J]. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2013, 131(4):707-716.
- [12] HINIKER S M, CHEN D S, REDDY S, et al. A systemic complete response of metastatic melanoma to local radiation and immunotherapy [J]. *Translational Oncology*, 2012, 5(6):404-407.
- [13] HARRIS T J, HIPKISS E L, BORZILLARY S, et al. Radiotherapy augments the immune response to prostate cancer in a time-dependent manner [J]. *The Prostate*, 2008, 68(12):1319-1329.
- [14] LAOUI D, VAN OVERMEIRE E, DE BAETSELIER P, et al. Functional relationship between tumor-associated macrophages and macrophage colony-stimulating factor as contributors to cancer progression [J]. *Frontiers in Immunology*, 2014, 5:489.
- [15] PARKER J J, JONES J C, STROBER S, et al. Characterization of direct radiation-induced immune function and molecular signaling changes in an antigen presenting cell line [J]. *Clinical Immunology*, 2013, 148:44-55.
- [16] DE MARTINO M, DAVIAUD C, VANPOUILLEBOX C. Radiotherapy: an immune response modifier for immunoncology [J]. *Seminars in Immunology*, 2021, 52:101474.
- [17] MCLAUGHLIN M, PATIN E C, PEDERSEN M, et al. Inflammatory microenvironment remodelling by tumour cells after radiotherapy [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2020, 20(4):203-217.
- [18] RUCKERT M, FLOHR A S, HECHT M, et al. Radiotherapy and the immune system: more than just immune suppression [J]. *Stem Cells*, 2021, 39(9):1155-

- 1165.
- [19] HAO M G, YEO S K, TURNER K, et al. Autophagy blockade limits HER2 + breast cancer tumorigenesis by perturbing HER2 trafficking and promoting release via small extracellular vesicles [J]. *Developmental Cell*, 2021, 56(3):341-355.
- [20] XU M M, REN L, FAN J H, et al. Berberine inhibits gastric cancer development and progression by regulating the JAK2/STAT3 pathway and downregulating IL-6 [J]. *Life Sciences*, 2022, 290:120266.
- [21] ZHAO W, HU H B, MO Q Y, et al. Function and mechanism of combined PARP-1 and BRCA genes in regulating the radiosensitivity of breast cancer cells [J]. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2019, 12(10):3915-3920.
- [22] 赵伟, 殷雪, 朱小东, 等. 聚腺苷二磷酸核糖聚合酶-1 抑制剂对乳腺癌易感基因突变乳腺癌细胞放射敏感性的影响及调控机制 [J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2016, 36(3):168-172.
- [23] MAIBACH F, SADOZAI H, SEYED J S M, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and their prognostic value in cutaneous melanoma [J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11:2105.
- [24] 卢小迪, 朱小东, 赵伟, 等. 自噬相关基因 ATG5 沉默增加鼻咽癌裸鼠移植瘤的放射敏感性 [J]. *上海医学* 2015, 38(2):151-154, 90.
- [25] CHEN Z T, ZHAO W, QU S, et al. PARP-1 promotes autophagy via the AMPK/mTOR pathway in CNE-2 human nasopharyngeal carcinoma cells following ionizing radiation, while inhibition of autophagy contributes to the radiation sensitization of CNE-2 cells [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2015, 12(2):1868-1876.
- [26] FADER C M, SÁNCHEZ D, FURLÁN M, et al. Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in K562 cells [J]. *Traffic*, 2008, 9(2):230-250.
- [27] MURROW L, MALHOTRA R, DEBNATH J. ATG12-ATG3 interacts with Alix to promote basal autophagic flux and late endosome function [J]. *Nature Cell Biology*, 2015, 17(3):300-310.
- [28] MINAKAKI G, MENGES S, KITTEL A, et al. Autophagy inhibition promotes SNCA/alpha-synuclein release and transfer via extracellular vesicles with a hybrid autophagosome-exosome-like phenotype [J]. *Autophagy*, 2018, 14(1):98-119.
- [29] MASHOURI L, YOUSEFI H, AREF A R, et al. Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance [J]. *Molecular Cancer*, 2019, 18:75.
- [30] RICKLEFS F L, ALAYO Q, KRENZLIN H, et al. Immune evasion mediated by PD-L1 on glioblastoma-derived extracellular vesicles [J]. *Science Advances*, 2018, 4(3):eaar2766.
- [31] JIN J, LI Y, ZHAO Q J, et al. Coordinated regulation of immune contexture: crosstalk between STAT3 and immune cells during breast cancer progression [J]. *Cell Communication and Signaling*, 2021, 19(1):50.
- [32] HOU J W, ZHAO R C, XIA W Y, et al. PD-L1-mediated gasdermin C expression switches apoptosis to pyroptosis in cancer cells and facilitates tumour necrosis [J]. *Nature Cell Biology*, 2020, 22(10):1264-1275.
- [33] CLASSEN F, KRANZ P, RIFFKIN H, et al. Autophagy induced by ionizing radiation promotes cell death over survival in human colorectal cancer cells [J]. *Experimental Cell Research*, 2019, 374(1):29-37.
- [34] BAI X W, ZHOU Y M, YOKOTA Y, et al. Adaptive antitumor immune response stimulated by bio-nanoparticle based vaccine and checkpoint blockade [J]. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 2022, 41(1):132.
- [35] JONES L M, BROZ M L, RANGER J J, et al. STAT3 establishes an immunosuppressive microenvironment during the early stages of breast carcinogenesis to promote tumor growth and metastasis [J]. *Cancer Research*, 2016, 76(6):1416-1428.

Effect of Radiation Induced Autophagy on PD-L1 Mediated Immunosuppression in Triple Negative Breast Cancer

LIN Chunxiang, WEI Kexuan, SONG Qiulu, ZHAO Wei^{* *}

(Department of Radiation Oncology, Wuming Hospital Affiliated to Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530199, China)

Abstract: Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) carried by exosomes in Triple Negative Breast Cancer (TNBC) is associated with immunosuppression of Tumor Microenvironment (TME). In order to explore whether irradiation can regulate the expression of PD-L1 and improve the effect of TME, RT-qPCR and Western blot were used to detect the expression of PD-L1, LC3B, and P62 proteins in autophagy inhibitor Chloroquine (CQ), autophagy activator Rapamycin (Rapa), and proteasome inhibitor MG132 under combined or non combined irradiation. Secondly, the expression and localization of PD-L1 before and after irradiation were detected by immunofluorescence. Thirdly, the expression of PD-L1 (sEVs-PD-L1) in exosomes before and after irradiation was detected by Western blot. Finally, bioinformatics was used to analyze the correlation between *ATG7* and breast cancer prognosis and signaling pathways. The results showed that the expression of PD-L1 in TNBC was higher than that in non-TNBC. PD-L1 can be degraded by autophagy and lysosome, while autophagy induction after irradiation can promote the cytoplasmic transfer of PD-L1 and down-regulate the expression of sEVs-PD-L1. The specific mechanism may be related to the activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) and exosome transport. The above results show that irradiation can down-regulate the expression of PD-L1 in the microenvironment by affecting the occurrence of autophagy and exosomes, thereby regulating tumor-mediated immunosuppression.

Key words: irradiation; exosomes; autophagy; PD-L1; immune regulation

责任编辑: 唐淑芬



微信公众号投稿更便捷

联系电话: 0771-2503923

邮箱: gxkx@gxas.cn

投稿系统网址: <http://gxkx.ijournal.cn/gxkx/ch>