

本文引文格式:薛子晗,高佳丰,涂丽,等. EGFR通过AKT/c-Jun途径上调PD-L1降低Hep3B细胞对索拉非尼的敏感性[J]. 右江民族医学院学报, 2025, 47(2): 215-224.

【论著与临床报道】

EGFR通过AKT/c-Jun途径上调PD-L1 降低Hep3B细胞对索拉非尼的敏感性

薛子晗, 高佳丰, 涂丽, 刘洋, 于滢, 唐小龙
(安徽理工大学医学院, 安徽淮南 232001)

摘要:目的 探究表皮生长因子受体(EGFR)在肝癌细胞对索拉非尼(SFB)敏感性中的作用及其与程序性死亡配体-1(PD-L1)的关系。方法 采用SFB单独处理Hep3B细胞以及SFB与表皮生长因子(EGF)联合处理Hep3B细胞,并通过CCK-8、克隆形成实验、EdU染色、JC-1染色等方法分析SFB和EGF对Hep3B细胞增殖能力的影响。采用基因敲低技术敲低EGFR验证EGFR对Hep3B细胞增殖能力的调控作用。通过WB、免疫荧光实验分析EGFR与PD-L1的关系。应用MK2206(AKT抑制剂)揭示EGFR上调PD-L1降低Hep3B细胞对SFB敏感性的分子机制。结果 SFB能够抑制Hep3B细胞增殖并促进其凋亡,而EGF激活EGFR后,能够降低Hep3B细胞对SFB敏感性,具体表现为细胞活力增加、增殖能力增强、凋亡水平降低。相反,EGFR敲低可提高细胞对SFB敏感性。EGFR活化能上调PD-L1表达,EGFR敲低则降低其表达。过表达PD-L1会降低Hep3B细胞对SFB敏感性,下调PD-L1则提高敏感性。EGFR可能位于AKT和c-Jun的上游,通过调控AKT和c-Jun的磷酸化来上调PD-L1表达。结论 EGFR通过AKT/c-Jun途径上调PD-L1,从而降低肝癌Hep3B细胞对SFB的敏感性。

关键词:癌,肝细胞;EGFR;AKT/c-Jun;索拉非尼;程序性死亡配体-1

中图分类号:R730.261

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2025)02-0215-10

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.004

EGFR upregulates PD-L1 via the AKT/c-Jun pathway to reduce the sensitivity of Hep3B cells to Sorafenib

XUE Zihan, GAO Jiafeng, TU Li, LIU Yang, YU Ying, TANG Xiaolong

(School of Medicine, Anhui University of Science & Technology, Huainan 232001, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role of epidermal growth factor receptor (EGFR) in the sensitivity of hepatocellular carcinoma (HCC) cells to Sorafenib (SFB) and its relationship with programmed death ligand-1 (PD-L1). **Methods** Hep3B cells were treated with SFB alone or a combination of SFB and epidermal growth factor (EGF). The effects of SFB and EGF on the proliferation ability of Hep3B cells were analyzed by methods such as CCK-8 assay, colony formation assay, EdU staining, and JC-1 staining. Gene knockdown technology was employed to knock down EGFR and verify its regulatory role in the proliferation of Hep3B cells. The relationship between EGFR and PD-L1 was analyzed through Western Blot (WB) and immunofluorescence assays. MK2206 (an AKT inhibitor) was applied to reveal the molecular mechanism by which EGFR upregulates PD-L1 and reduces the sensitivity of Hep3B cells to SFB. **Results** SFB inhibited the proliferation of Hep3B cells and promoted their apoptosis. After activation of EGFR by EGF, the sensitivity of Hep3B cells to SFB was reduced, as evidenced by increased cell viability, enhanced proliferation capacity, and decreased apoptosis levels. Conversely, EGFR knockdown increased cell sensitivity to SFB. EGFR activation upregulated PD-L1 expression, while EGFR knockdown reduced its expression. Overexpression of PD-L1 decreased the

基金项目:国家自然科学基金项目(82071862);国家级大学生创新训练项目(202310361120)

第一作者:薛子晗,大学生,E-mail:xuezihan12122023@163.com

通讯作者:唐小龙,博士,教授(三级),博士研究生导师,研究方向:肿瘤学,E-mail:txljd2006@126.com

sensitivity of Hep3B cells to SFB, whereas downregulation of PD-L1 increased sensitivity. EGFR may be upstream of AKT and c-Jun, and may upregulate PD-L1 expression by regulating the phosphorylation of AKT and c-Jun. **Conclusion** EGFR upregulates PD-L1 via the AKT/c-Jun pathway, thereby reducing the sensitivity of HCC Hep3B cells to SFB.

Key words: carcinoma, hepatocellular; EGFR; AKT/c-Jun; Sorafenib; programmed death ligand-1

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是原发性肝癌中的常见类型,在全球癌症相关死亡病因中位列第三,其具有较高的治疗失败率和不良预后风险,多数患者在确诊时已处于晚期,这使得治疗手段受到很大限制^[1-3]。索拉非尼(sorafenib, SFB)作为晚期 HCC 的一线治疗药物,主要通过抑制 RAF/MEK/ERK 信号通路直接抑制肿瘤生长,并且通过抑制血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)和血小板源性生长因子受体(platelet-derived growth factor receptor, PDGFR)来阻碍肿瘤新生血管形成,间接抑制肿瘤细胞的生长^[4]。然而,在临床实践中,HCC 患者对索拉非尼耐药现象极为普遍,耐药产生后,药物疗效显著降低^[4-5]。因此,探索提高肝癌细胞对索拉非尼敏感性的途径成为当前肝癌研究领域的关键任务。

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)作为一种跨膜糖蛋白,在多种恶性肿瘤中呈现过度表达的状态,其主要功能为促进细胞增殖并抑制细胞凋亡,常被视为原癌基因^[6]。大量研究表明^[6],EGFR 过表达不仅与包括 HCC 在内的癌症发病风险升高相关,而且与肿瘤耐药性的产生密切相关。有的研究表明,免疫检查点分子程序性死亡配体-1(programmed death ligand-1, PD-L1)不仅在肿瘤免疫逃逸过程中发挥关键作用,还与肿瘤耐药性密切相关^[7]。PD-L1 可通过激活多种代偿性信号通路,削弱索拉非尼对关键信号传导(如 RAF/MEK/ERK 等)的抑制效果,从而降低肝癌细胞对索拉非尼的敏感性^[7-8]。尽管 EGFR、PD-L1 在肿瘤发生发展中的重要性已被证实,但它们与 HCC 对索拉非尼耐药之间的关系仍不明确。本研究旨在分析 EGFR 与 PD-L1 的相关性,深入探讨 EGFR 通过上调 PD-L1 降低肝癌细胞对索拉非尼敏感性的分子机制,进而寻找提高肝癌细胞索拉非尼敏感性的方法,为肝癌的治疗提供有价值的实验依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞培养 Hep3B 肝癌细胞购自武汉赛维尔生物科技有限公司,使用含 10% 胎牛血清(杭州四季青生物有限公司)的 RPMI-1640 培养基(上海碧云天生物技术有限公司)进行培养,细胞培养条件设定为 37℃、5% CO₂ 的培养箱环境。

1.2 慢病毒转染 为敲低目标基因 EGFR(NM_005228.3),由上海生工生物技术有限公司构建并验证了 shEGFR 慢病毒载体,其中 shRNA1(3753):5'-CCGGCCTCCAGAGGATGTTCAATAACTCGAGTTATTGAACATCCTCTGGAGGTTTTTTG-3';shRNA2(3753):5'-CCGGGCTGGATGATAGACGCAGATACTCGAGTATCTGCGTCTATCATCCAGCTTTTTT-3';shRNA3(3755):5'-CCGGGCCACAAAGCAGTGAATTTATCTCGAGATAAATTCAGTCTTTGTGGCTTTTTTTG-3';shNC 为阴性对照。由上海生工生物技术有限公司构建并验证了 shPD-L1 慢病毒载体的序列 shRNA1(3166):5'-CCGGCGAATTACTGTGAAAGTCAATCTCGAGATTGACTTTCACAGTAATTCGTTTTTTT-3';shRNA2(3167):5'-CCGGGCTGCACTAATTGTCTATTGGCTCGAGCCAATAGACAATTAGTGCAGCTTTTTTTG-3';shRNA3(3168):5'-CCGGGGATCCAGTCACCTCTGAACACTCGAGTGTTCAGAGGTGACTGGATCTTTTTTTG-3';shNC 为阴性对照。将 Hep3B 细胞接种于 6 孔板内,根据细胞数量和病毒滴度计算所需的病毒液体积并进行细胞转染。转染 72 h 后,提取细胞蛋白质,通过 Western Blot 分别筛选出 EGFR 和 PD-L1 敲低效果最佳的细胞用于后续实验。

1.3 Western Blot 采用 RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司)从细胞中提取蛋白,将提取的蛋白与上样缓冲液按 4:1 的比例混合,于沸水中加热 20 min 制得蛋白样品。把定量后的样品加入 10% SDS-PAGE 凝胶的上样孔,进行电泳分离。分离后,将凝胶中的蛋白质转印至 PVDF 膜,在室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h。TBST 缓冲液清洗 3 次,每次 10 min。将膜置于一抗[EGFR 抗体(#4267)、p-EGFR 抗体(#3777)、PD-L1 抗体(#13684)、cleaved caspase-3 抗体(#9664)、caspase-3 抗体(#9662)、cleaved caspase-9 抗体(#9509)、caspase-9 抗体(#9502)、p-AKT 抗体(#4060)、AKT 抗体(#9272)、p-c-Jun 抗体(#3270)、c-Jun 抗体(#9165)、β-actin 抗体(#4970)],以上抗体均购自 Cell Signaling Technology 公司,4℃ 孵育过夜,次日将膜置于二抗中,室温孵育 1 h。最后,在 PVDF 膜上添加发光液,利用全自动凝胶成像分析系统检测,并通过 ImageJ V1.8.0 软件对蛋白条

带灰度值进行分析。

1.3.1 检测 EGFR 活化水平和 PD-L1 表达水平 将 Hep3B 细胞接种于培养皿内,待细胞铺满皿底后,在 EGF 组培养皿的培养液中加入浓度为 100 ng/mL 的 EGF(GMP 10605 HNAE,北京义翘神州科技股份有限公司),对照组不做处理,37 °C 继续培养 20 min 后,分别提取 EGF 组与对照组蛋白,进行蛋白质免疫印迹,检测 EGFR 活化水平和 PD-L1 表达水平。

1.3.2 检测 EGFR 低表达的 Hep3B 细胞的 PD-L1 表达水平 按照 1.2 的方法获得阴性对照组细胞(shNC)和 EGFR 敲低组细胞(shEGFR),对这两组细胞分别采用 3.5 μM SFB 处理,提取蛋白后检测 PD-L1 表达水平。

1.3.3 检测细胞凋亡分子 按照 1.2 的方法获得阴性对照组细胞、PD-L1 过表达细胞(PD-L1-OE)、PD-L1 敲低细胞(shPD-L1),阴性对照组细胞分为 2 组,1 组不处理,1 组采用 3.5 μM SFB 处理,PD-L1 过表达细胞采用 3.5 μM SFB 处理,分别提取蛋白后检测 cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 表达水平。

1.3.4 检测细胞信号通路关键分子活化水平 将 Hep3B 细胞接种于培养皿内,分为 3 组,1 组不做处理,1 组采用 100 ng/mL 的 EGF 处理,1 组采用 100 ng/mL 的 EGF 处理后再使用 AKT 抑制剂(MK2206)处理,提取蛋白后检测 AKT、c-Jun 活化水平和 PD-L1 表达水平。按照 1.2 的方法获得阴性对照组细胞(shNC)和 EGFR 敲低组细胞(shEGFR),阴性对照组细胞分成 2 组,1 组不做处理,1 组采用 100 ng/mL 的 EGF 处理,EGFR 敲低组细胞采用 100 ng/mL 的 EGF 处理,提取蛋白后检测 AKT、c-Jun 活化水平和 PD-L1 表达水平。

1.4 CCK-8 实验

1.4.1 检测细胞 IC₅₀ 将 Hep3B 细胞接种于 96 孔板,每孔约 4×10³ 个细胞,分为 5 组,每组分别采用 1 μM、2 μM、4 μM、8 μM、16 μM 的索拉非尼(Medchem Express 公司)进行处理。24 h 后,弃去孔内原培养基,每孔滴加 100 μL 工作液(上海碧云天生物技术有限公司)。继续培养 2 h 后,检测各组细胞在 450 nm 处的吸光度值,并通过 GraphPad Prism 8.0 软件计算 IC₅₀ 值。

1.4.2 检测 EGF 活化后细胞活力 将 Hep3B 细胞接种于 96 孔板,每孔约 4×10³ 个细胞,分为 2 组,EGF 组在细胞培养液中加入浓度为 100 ng/mL 的 EGF,对照组不进行处理。24 h 后,弃去孔内原培养基,每孔添加 100 μL 工作液(上海碧云天生物技术有限公司)。继续培养 2 h 后,检测各组细胞在 450 nm 处的吸光度值,分析细胞活力。

1.4.3 阴性对照组与 EGFR 敲低组细胞活力的比较

将阴性对照组细胞(shNC)和 EGFR 敲低组细胞(shEGFR)分别接种于 96 孔板,2 组同时采用 100 ng/mL 的 EGF 处理 24 h,其他步骤同 1.4.2。

1.4.4 索拉非尼处理后阴性对照组与 PD-L1 过表达组细胞活力的比较 将阴性对照组细胞(shNC)与 PD-L1 过表达组细胞(PD-L1-OE)分别接种于 96 孔板,将对照组细胞再分为 2 组,1 组不做处理,1 组采用 3.5 μM SFB 处理 24 h,同时 PD-L1 过表达组细胞采用 3.5 μM SFB 处理 24 h,其他步骤同 1.4.2。

1.5 EdU 增殖实验

1.5.1 分析 EGF 活化后细胞增殖能力 将 Hep3B 细胞接种于 24 孔板,分为 3 组,1 组不做处理,1 组采用 3.5 μM SFB 处理,1 组经 100 ng/mL 的 EGF 处理后再采用 3.5 μM SFB 处理,培养 24 h 后,更换为含 10 μM EdU(上海碧云天生物技术有限公司)的培养液。37 °C 孵育 2 h 后去除培养基,4%多聚甲醛固定细胞 15 min,Triton X-100(安徽美仑生物科技有限公司)透化细胞 15 min。然后加入 Click 反应液孵育 30 min,用 DAPI 染液染核 10 min。最后在倒置荧光显微镜下检测。

1.5.2 阴性对照组与 EGFR 敲低组细胞增殖能力的比较 将 EGFR 敲低组细胞(shEGFR)接种于 24 孔板,分为 2 组,1 组不做处理,1 组采用 3.5 μM SFB 处理,其他步骤同 1.5.1。

1.6 克隆形成实验

1.6.1 分析 EGF 活化后细胞克隆形成能力 将 Hep3B 细胞以每孔 1 000 个细胞接种于 6 孔板,分为 3 组,1 组不做处理,1 组采用 3.5 μM SFB 处理,1 组经 100 ng/mL 的 EGF 处理后再采用 3.5 μM SFB 处理。定期换液,2 周后去除培养液,先后用 4%多聚甲醛固定细胞 10 min 和 1%结晶紫染色 15 min,清洗后拍照记录克隆团数量。

1.6.2 阴性对照组与 EGFR 敲低组细胞克隆形成能力的比较 将阴性对照组细胞和 EGFR 敲低组细胞接种于 6 孔板,分别采用 3.5 μM SFB 处理,其他步骤同 1.6.1。

1.7 线粒体膜电位检测

1.7.1 分析 EGF 活化后细胞凋亡水平 将 Hep3B 细胞以每孔约 2×10⁵ 个细胞接种于 24 孔板,分为 3 组,1 组不做处理,1 组采用 3.5 μM SFB 处理,1 组经 100 ng/mL 的 EGF 处理后再采用 3.5 μM SFB 处理,24 h 后弃去药液,经 PBS 洗涤后,加入 JC-1 工作液(上海碧云天生物技术有限公司)避光孵育 30 min。后用 DAPI 染液染核 10 min。最后,在荧光显微镜下检测,并通过 ImageJ V1.8.0 软件分析细胞荧光强

度。

1.7.2 阴性对照组与 EGFR 敲低组细胞凋亡水平的比较 将阴性对照组细胞和 EGFR 敲低组细胞接种于 24 孔板,分别采用 $3.5 \mu\text{M}$ SFB 处理,其他步骤同 1.7.1。

1.8 间接免疫荧光 将 Hep3B 细胞、阴性对照组细胞(shNC)、EGFR 敲低组细胞(shEGFR)接种于含有盖玻片的 24 孔板,阴性对照组细胞(shNC)和 EGFR 敲低组细胞(shEGFR)分别用 100 ng/mL 的 EGF 处理 20 min,用 4%多聚甲醛固定 10 min。进行封闭处理后,加入一抗并于 4°C 孵育过夜。次日,添加荧光标记二抗并在 37°C 孵育 30 min。经 DAPI 复染细胞核后,在荧光显微镜下检测,并通过 ImageJ V1.8.0 软件分析细胞荧光强度。

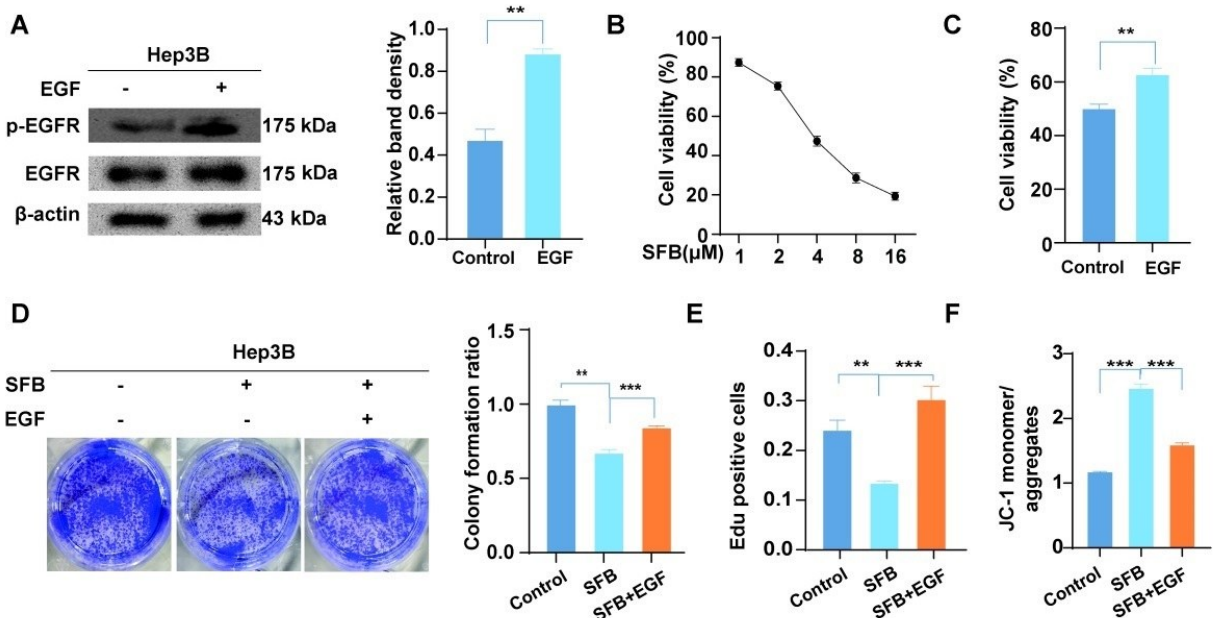
1.9 统计学方法 所有实验至少重复 3 次,数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 的形式表示,并使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析。两组数据间的差异通过 *t* 检验进行比较,而多组数据间的差异则通过单因素方差分析以及 Bonferroni 检验进行比较。 $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 EGFR 活化降低 Hep3B 细胞对索拉非尼敏感性

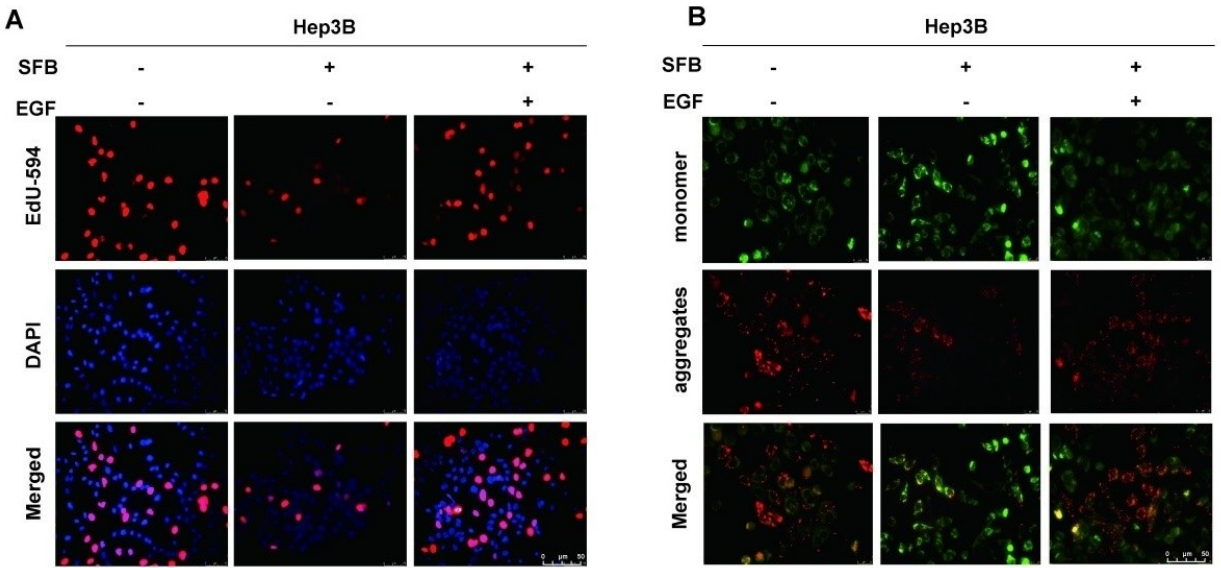
EGFR 与 EGF 结合后会形成二聚体并磷酸化,如图 1A 所示,用 EGF 处理 Hep3B 细胞,使 Hep3B 细胞中的 EGFR 显著活化为 p-EGFR。然后,使用不同浓度 SFB 处理 Hep3B 细胞,通过 CCK-8 实验检测细胞活

力,IC₅₀ 为 $3.39 \mu\text{M}$ (见图 1B)。因此,本研究采用与 IC₅₀ 相近的 SFB 浓度来进行后续实验。用 $3.5 \mu\text{M}$ SFB 分别处理 Hep3B 细胞(Control 组)和 EGFR 活化的 Hep3B 细胞(EGF 组)24 h 后检测细胞活力。结果表明,EGF 联合 SFB 处理的 Hep3B 细胞活力更高,SFB 处理的 Hep3B 细胞活力具体数值为 50.62%,EGFR 活化的 Hep3B 细胞活力为 63.13%,差异具有统计学意义($P < 0.01$)(见图 1C)。通过 EdU 和克隆形成实验分析 SFB 处理后 Hep3B 细胞和 EGFR 活化的 Hep3B 细胞增殖能力差异。结果显示,与 Control 组 Hep3B 细胞相比,SFB 处理后 EdU 阳性细胞数量减少,克隆团数量减少($P < 0.01$)。与 SFB 单独处理的 Hep3B 细胞相比,EGF 联合 SFB 处理的 Hep3B 细胞 EdU 阳性细胞量增多,克隆团数量也增多($P < 0.001$)(见图 1D、图 1E)。评估 SFB 诱导 Hep3B 细胞和 EGFR 活化的 Hep3B 细胞的凋亡水平。检测细胞线粒体膜电位结果显示,与 Hep3B 细胞相比,SFB 处理后 Hep3B 细胞的绿色荧光/红色荧光比值增大。具体比值:Hep3B 细胞为 1.193,SFB 处理后为 2.473,差异具有统计学意义($P < 0.001$)。与 SFB 单独处理的 Hep3B 细胞相比,EGF 联合 SFB 处理的 Hep3B 细胞绿色荧光/红色荧光比值减小。EGF 联合 SFB 处理为 1.617,差异具有统计学意义($P < 0.001$)(见图 1F)。EGFR 活化后细胞免疫荧光结果见图 2A、图 2B。



注:A为Western Blot检测EGFR活化水平;B、C为CCK-8实验检测细胞活力;D为克隆形成实验分析细胞增殖能力;E为EdU-594分析细胞增殖能力;F为JC-1染色评估细胞凋亡水平。 $** P < 0.01$, $*** P < 0.001$ 。

图1 EGFR活化降低Hep3B细胞对索拉非尼敏感性

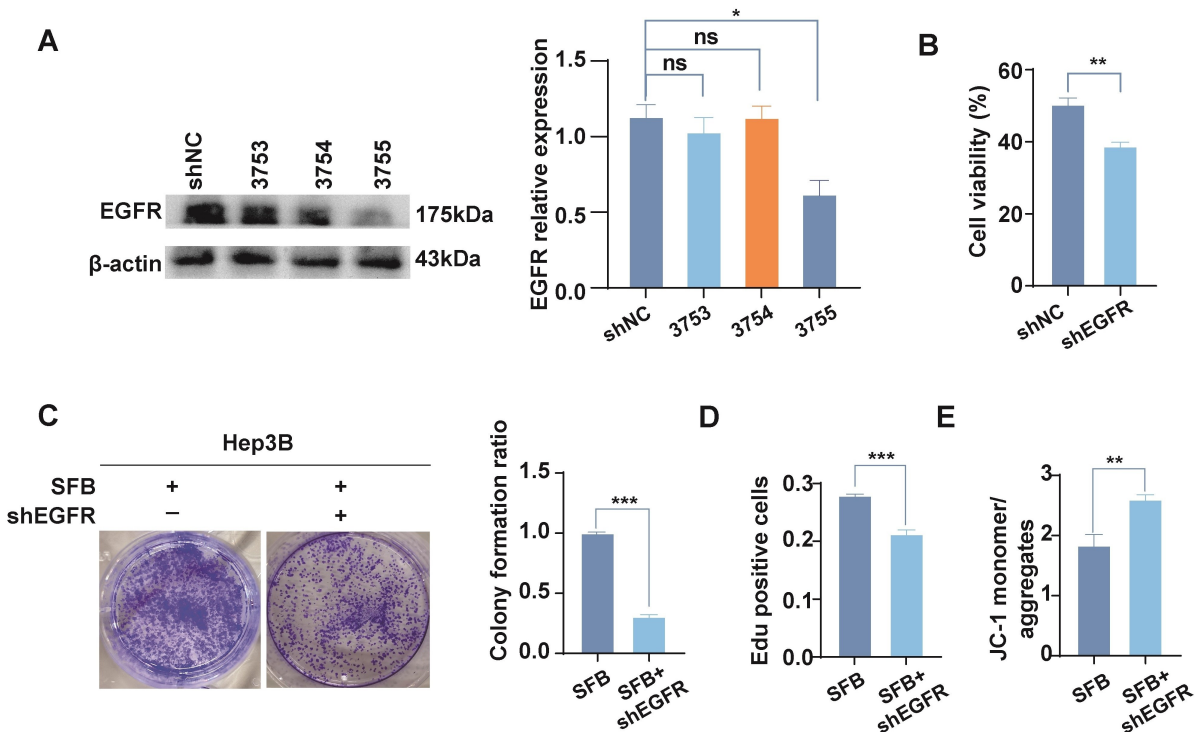


注:A 为 EdU-594 分析细胞增殖能力的免疫荧光;B 为 JC-1 染色评估细胞凋亡水平的免疫荧光。

图 2 EGFR 活化后细胞免疫荧光结果

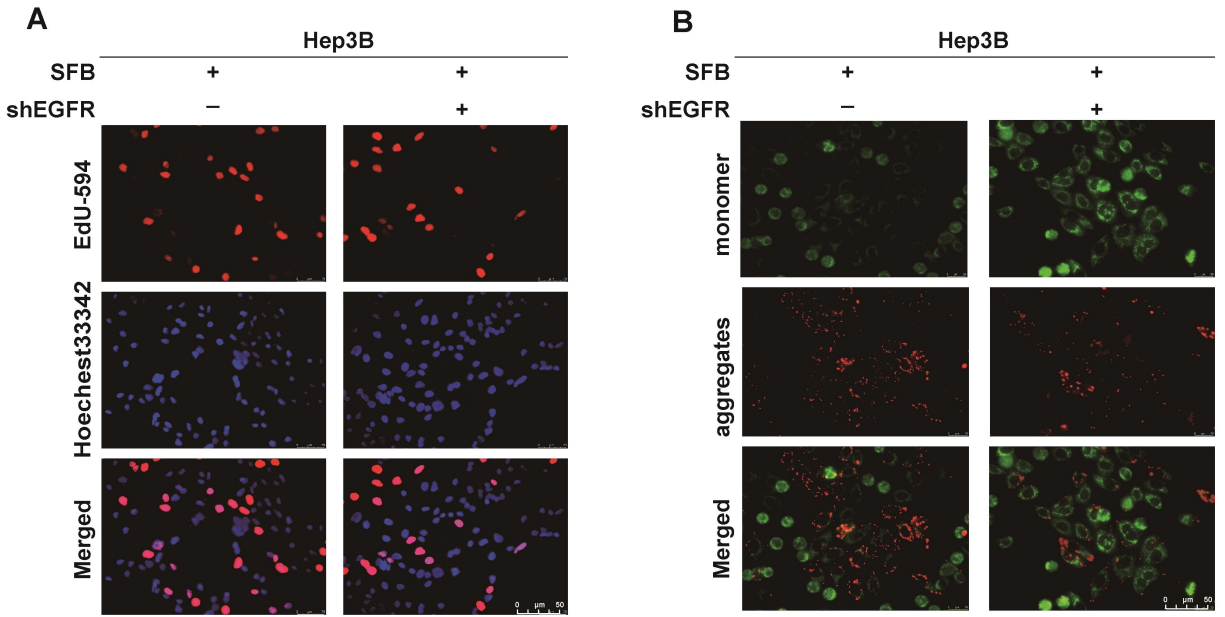
2.2 EGFR 敲低提高 Hep3B 细胞对索拉非尼敏感性
 通过 Western Blot 检测显示 shRNA3 成功敲低肝癌细胞中 EGFR, 建立 EGFR 低表达的 Hep3B 细胞 (Hep3BEGFR⁻), 见图 3A。CCK-8 实验检测索拉非尼对 EGF 处理的 Hep3B 细胞活力的影响, 结果表明 EGFR 敲低后 Hep3B 细胞 (shEGFR) 的活力降低 (P

<0.01), 见图 3B; 克隆形成实验结果 (见图 3C) 与 EdU-594 分析细胞增殖能力 (见图 3D) 均显示 EGFR 敲低后细胞增殖能力下降 ($P < 0.001$)。JC-1 染色评估 SFB 诱导肝癌细胞凋亡水平 (见图 3E), 表明 EGFR 敲低后 SFB 诱导肝癌细胞凋亡水平增加 ($P < 0.01$)。EGFR 敲低后细胞免疫荧光结果见图 4A、图 4B。



注:A 为 Western Blot 检测 EGFR 表达水平;B 为 CCK-8 实验检测细胞活力;C 为克隆形成实验分析细胞增殖能力;D 为 EdU-594 分析细胞增殖能力;E 为 JC-1 染色评估细胞凋亡水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 3 EGFR 敲低提高 Hep3B 细胞对索拉非尼敏感性

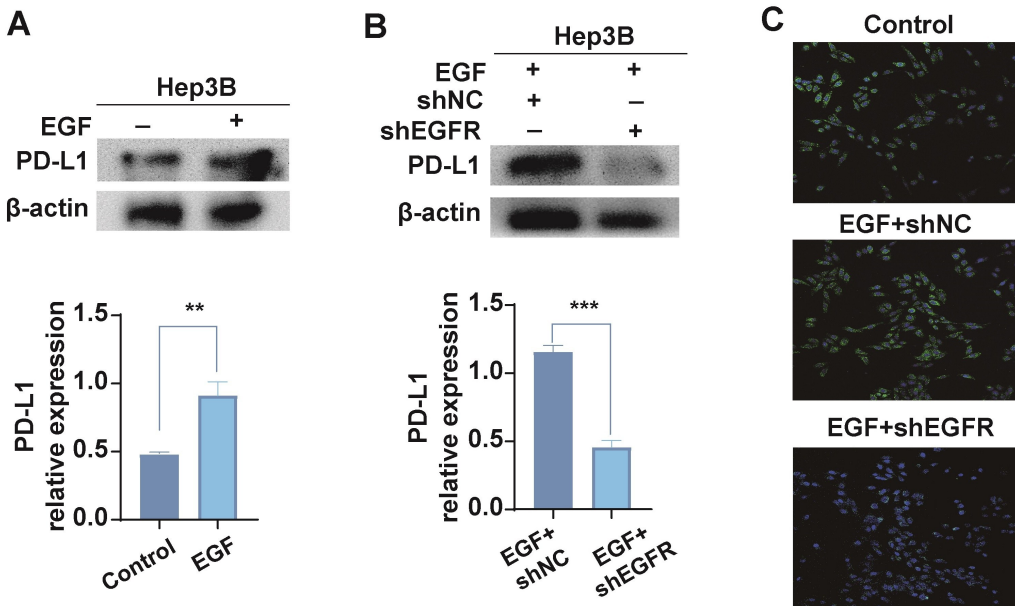


注:A为EdU-594分析细胞增殖能力的免疫荧光;B为JC-1染色评估细胞凋亡水平免疫荧光。

图4 EGFR敲低后细胞的免疫荧光结果

2.3 经 EGF 活化的 EGFR 使 PD-L1 表达上调
Western Blot 结果显示, 未经 EGF 处理的 Hep3B 细胞中 PD-L1 的相对表达量为 0.585, 而 EGF 处理后增至 0.932, EGF 处理后 Hep3B 细胞中 PD-L1 的表达水平显著上调, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$) (见图 5A), 表明 EGF 处理后 Hep3B 细胞中 PD-L1 的表达水平显著上调; Hep3B EGFR 敲低后 Hep3B 细胞的

PD-L1 表达水平相对于未经 EGF 处理的 Hep3B 细胞显著下降 ($P < 0.001$) (见图 5B)。间接免疫荧光实验结果显示, 与 EGF 未处理组相比, EGF 处理的 Hep3B 细胞中 PD-L1 表达水平显著上调; 而 EGF 处理的 Hep3B EGFR-细胞中 PD-L1 显著低于 EGF 未处理的和 EGF 处理的 Hep3B 细胞, 见图 5C。



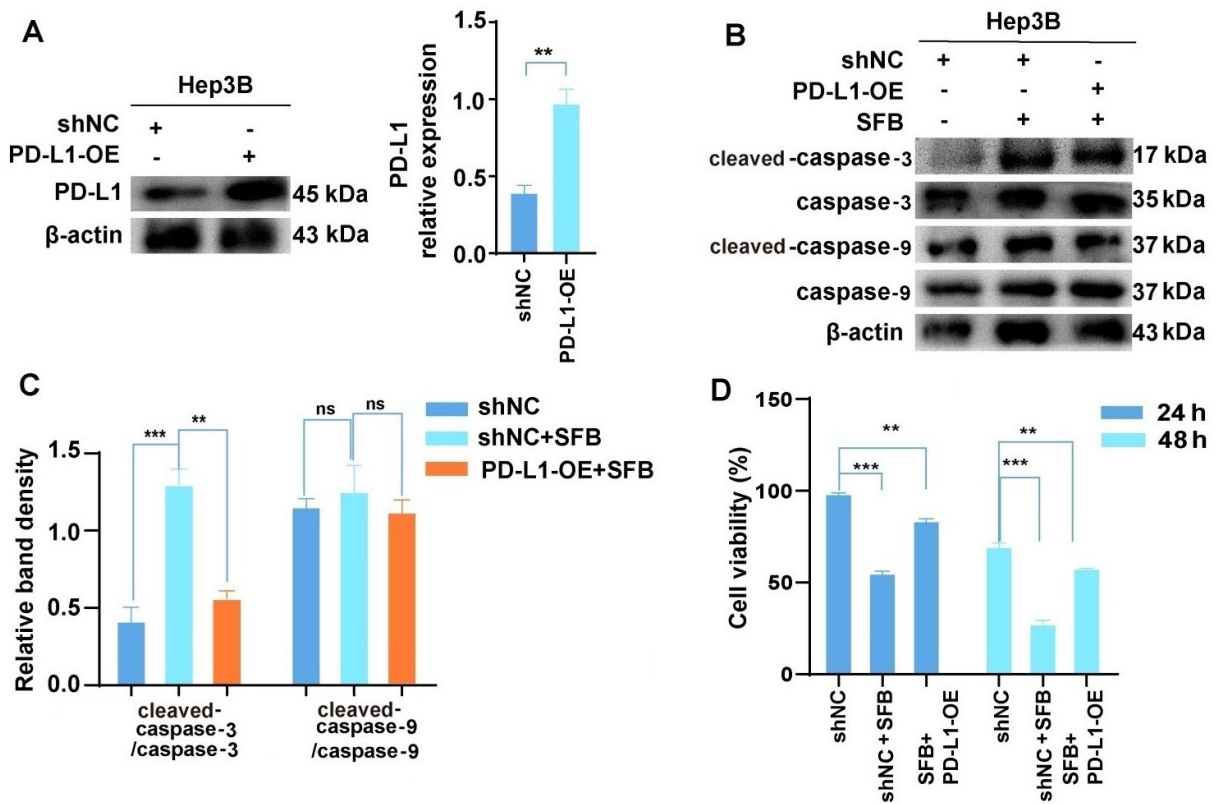
注:A、B为Western Blot检测PD-L1表达水平;C为免疫荧光检测PD-L1表达水平。

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图5 EGFR活化上调PD-L1

2.4 PD-L1 负调控 Hep3B 细胞对索拉非尼敏感性
为探究 PD-L1 对 Hep3B 细胞索拉非尼敏感性的影响,向 Hep3B 细胞中转染了 PD-L1 过表达慢病毒(上海生工生物技术有限公司),得到了稳定过表达 PD-L1 的 Hep3B 细胞(见图 6A)。为进一步分析 PD-L1 对 SFB 介导细胞凋亡水平的影响,通过 Western Blot 检测 SFB 处理后各组 Hep3B 细胞中 cleaved-caspase-3/caspase-3, cleaved-caspase-9/caspase-9 的表达水平。结果显示,与未经 SFB 处理的 Hep3B 细胞相比,SFB 处理的 Hep3B 细胞中 cleaved-caspase-3/caspase-3 显

著升高 ($P < 0.001$);而与 SFB 处理的 Hep3B 细胞相比,SFB 处理的 Hep3B PD-L1+ 细胞中 cleaved-caspase-3/caspase-3 显著下降 ($P < 0.01$),且与未经 SFB 处理的 Hep3B 细胞无明显差异;3 组细胞中的 cleaved-caspase-9/caspase-9 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)(见图 6B、图 6C)。通过 CCK-8 实验检测未处理的 Hep3B 细胞、SFB 处理的 Hep3B 细胞以及 SFB 处理的 PD-L1 过表达 Hep3B 细胞活力值,PD-L1 负调控 Hep3B 细胞对索拉非尼的敏感性,见图 6D。



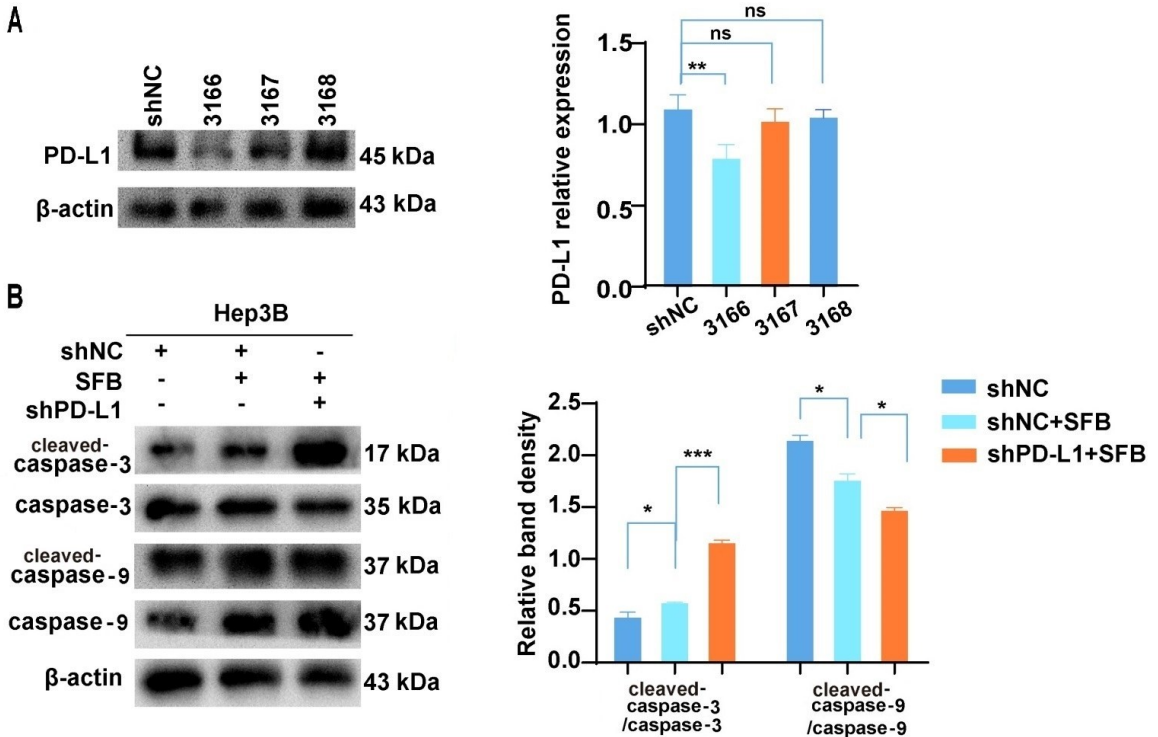
注:A为 Western Blot 检测 PD-L1 表达水平;B、C 为 Western Blot 检测凋亡蛋白活化水平;

D 为 CCK-8 实验检测细胞活力。* $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 6 过表达 PD-L1 降低 Hep3B 细胞对索拉非尼的敏感性

2.5 下调 PD-L1 提高 Hep3B 细胞对索拉非尼的敏感性
为进一步验证 PD-L1 与 Hep3B 细胞对索拉非尼敏感性之间的关系,需要从相反的方向进行实验,使用 PD-L1 敲低的 shRNA 慢病毒下调 PD-L1,观察肝癌细胞对索拉非尼敏感性的变化。首先通过 shRNA (3168)慢病毒转染构建了低表达 PD-L1 的 Hep3B 细胞(Hep3B PD-L1-)(见图 7A)。Western Blot 结果显示,SFB 处理的阴性对照组细胞中 cleaved-caspase-3/caspase-3 水平显著高于 shNC 组细胞 ($P < 0.05$);SFB 处理的 PD-L1 低表达的细胞 (shPD-L1) 中 cleaved-caspase-3/caspase-3 水平显著高于 SFB 处理的阴性对照组 ($P < 0.001$)(见图 7B);而 cleaved-caspase-9/caspase-9 的结果与此相反(见图 7B)。

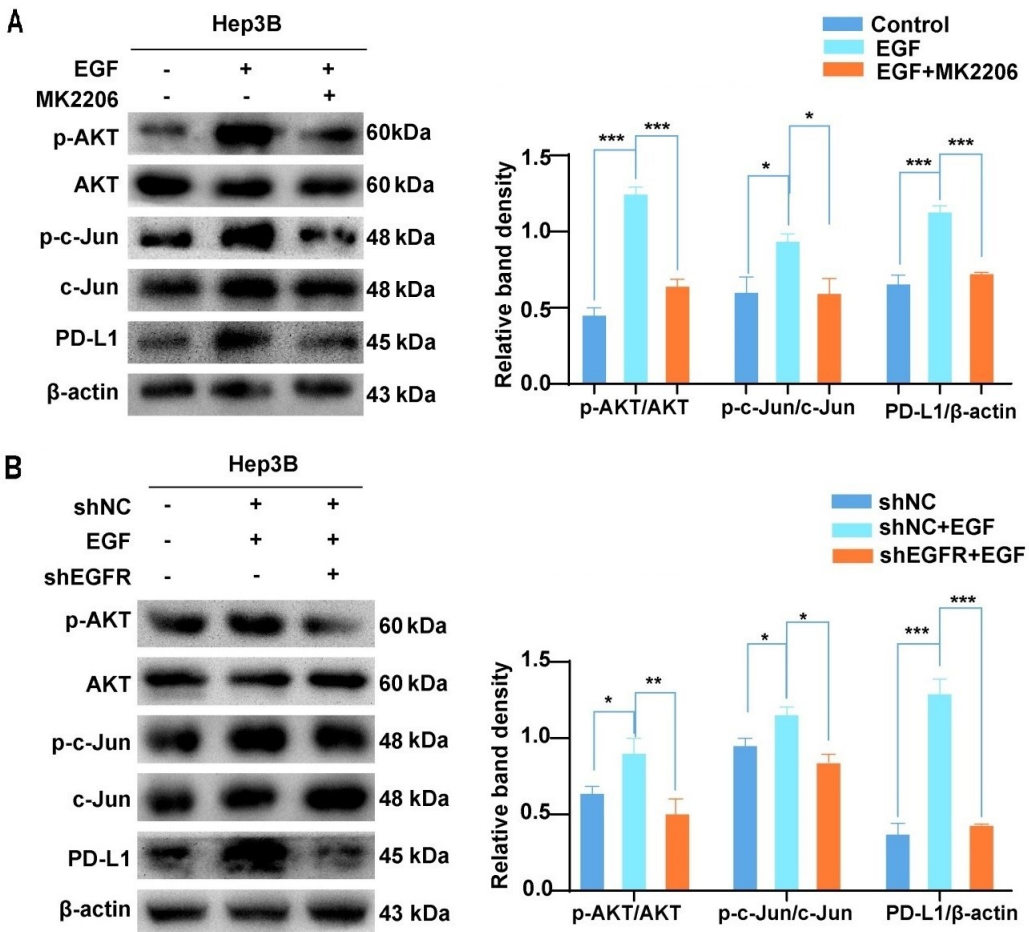
2.6 EGFR 通过 AKT/c-Jun 上调 PD-L1 表达水平
与 Hep3B 细胞相比,经 EGF 处理的 Hep3B 细胞 p-AKT ($P < 0.001$)和 p-c-Jun ($P < 0.05$)的水平显著升高,同时 PD-L1 的表达也明显上调 ($P < 0.001$);当采用 AKT 抑制剂(MK2206)与 EGF 联合处理时,相较于仅用 EGF 处理的 Hep3B 细胞,Hep3B 细胞中的 p-AKT ($P < 0.001$)和 p-c-Jun ($P < 0.05$)水平显著下降,见图 8A。为进一步验证 EGFR 与 AKT、c-Jun 及 PD-L1 之间的关系,与 EGF 处理的 Hep3B 细胞相比,EGF 处理的 Hep3B EGFR-细胞中的 p-AKT ($P < 0.01$)以及 p-c-Jun ($P < 0.05$)水平均显著下调,PD-L1 表达水平也下调 ($P < 0.001$),见图 8B。



注:A为 Western Blot 检测 PD-L1 表达水平;B为 Western Blot 检测凋亡蛋白活化水平。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 7 下调 PD-L1 提高 Hep3B 细胞对索拉非尼敏感性



注:A、B为 Western Blot 检测信号通路活化水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 8 EGFR 通过 AKT/c-Jun 上调 PD-L1 表达水平

3 讨论

自 2007 年 SHARP 研究公布 SFB 可有效延长晚期 HCC 患者生存期以来, SFB 已成为晚期 HCC 患者的一线标准治疗药物^[9-10]。然而, SFB 的耐药性是临床治疗中的一个关键问题。本研究旨在探讨 EGFR 在肝癌细胞对 SFB 敏感性中的作用及其与 PD-L1 的调控关系。EGFR 是一种跨膜蛋白, 在多种生理过程中发挥重要作用, 在肝癌中其高表达与肿瘤细胞的增殖和侵袭性密切相关^[11]。已有研究表明, SFB 对 EGFR 高表达的肝细胞癌(HCC)细胞的抑制效能显著减弱^[12], 本研究结果进一步证实了这一现象。通过多种实验手段系统地研究了 EGFR 活化对 Hep3B 细胞 SFB 敏感性的影响。结果显示 EGFR 活化后, 细胞对 SFB 的敏感性降低, 表现为细胞活力增加、增殖能力增强以及凋亡水平降低。

PD-L1 可通过激活多种代偿性信号通路, 削弱 SFB 对关键信号传导(如 RAF/MEK/ERK 等)的抑制效果, 从而降低肝癌细胞对 SFB 的敏感性^[13-14]。鉴于细胞内信号通路广泛联系, 且已有研究表明 PD-L1 受多种信号通路调控, 并在细胞增殖、凋亡中有重要作用^[15], 因此本研究着重探讨了 EGFR 与 PD-L1 的关系, 以深入探究 EGFR 在肝癌细胞中的作用机制。先前已有研究发现 EGFR 与 PD-L1 的相关性, 例如在非小细胞癌和卵巢癌中, EGFR 与其他的协同因子共同调控 PD-L1 的表达^[16-18]。本研究与先前的发现有相似之处, 但也存在差异。本研究中通过 Western Blot 和免疫荧光实验均证实了 EGFR 活化可上调 PD-L1 表达水平, 而 EGFR 敲低则降低 PD-L1 表达, 明确了在 Hep3B 细胞中 EGFR 通过 AKT/c-Jun 通路来调控 PD-L1。

随后, 本研究通过过表达和下调 PD-L1, 发现 PD-L1 对 Hep3B 细胞的 SFB 敏感性有重要影响。过表达 PD-L1 降低了细胞对 SFB 的敏感性, 这一结果与先前在其他肿瘤细胞中的研究发现具有相似性。例如, 在其他肿瘤系的研究中发现, 过表达 PD-L1 会激活某些抗凋亡信号通路, 从而降低细胞对化疗药物的敏感性^[19]。在 Hep3B 细胞中, 过表达 PD-L1 可能也是通过类似的机制干扰 SFB 的作用。SFB 主要通过抑制肿瘤细胞的增殖和诱导凋亡来发挥抗癌作用, PD-L1 过表达或许会影响 SFB 作用的相关靶点或者信号通路, 如王威等^[20]研究中提到的 Raf/MEK/ERK 信号通路, 从而使得 SFB 难以发挥抑制细胞增殖、诱导凋亡等作用。而下调 PD-L1 则提高了 SFB 敏感性, 这与其他研究结果部分一致^[21-22]。本研究进一步明确了 Hep3B 细胞中 EGFR 对 PD-L1 的调控关系。在 Hep3B 细胞中, PD-L1 对 SFB 敏感性的影响可能具有

其独特的细胞内分子机制。其中特定的转录因子或者信号分子可能与 PD-L1 协同作用, 影响 SFB 的药效。

在明确了 PD-L1 对 Hep3B 细胞 SFB 敏感性影响的基础上, 需要探究 EGFR 与 PD-L1 表达相关的分子机制及其与 SFB 敏感性之间的潜在联系。本研究结果表明, EGF 处理后 AKT 和 c-Jun 活化水平上调, 同时 PD-L1 表达上调, 表明 EGF 对 AKT、c-Jun 的活化以及 PD-L1 的表达具有促进作用; 而抑制 AKT 通路后, Hep3B 细胞中的 p-AKT 和 p-c-Jun 水平显著下降, 同时 PD-L1 表达下调, 这一现象提示 AKT 在 EGF 诱导的 p-c-Jun 和 PD-L1 上调进程中具有重要意义, EGFR 可能通过调控 p-AKT 和 p-c-Jun 的水平来上调 PD-L1 的表达, 即 p-AKT 和 p-c-Jun 可能是 EGFR 调控 PD-L1 表达的中间环节分子。并且, EGFR 敲低后, p-AKT, p-c-Jun 水平均显著下调, PD-L1 表达水平也下调, 明确表明了 EGFR 对 AKT、c-Jun 的磷酸化以及 PD-L1 的表达具有正向调控作用, EGFR 可能位于 AKT 和 c-Jun 的上游, 通过调控 AKT 和 c-Jun 的磷酸化来影响下游 PD-L1 的表达。

本研究虽然揭示了 EGFR 通过 AKT/c-Jun 上调 PD-L1 降低 Hep3B 细胞对 SFB 敏感性这一机制, 但细胞内的信号传导网络是极其复杂的, 这一机制可能并非是完全独立的。在许多研究^[23-25]中发现, 细胞内不同信号通路之间存在着广泛的交叉对话(Crosstalk)。因此, 在本研究中, 很可能存在其他信号通路与 AKT/c-Jun 通路相互作用来调节 PD-L1 的表达以及 SFB 的敏感性。这种相互作用可能会增强或削弱 AKT/c-Jun 通路对 PD-L1 表达的调控, 进而影响细胞对 SFB 的敏感性。这些潜在的相互作用需要进一步深入研究, 以全面理解在 Hep3B 细胞中 PD-L1 表达调控以及 SFB 敏感性的复杂机制。

4 结论

研究表明, EGFR 活化水平与 PD-L1 表达水平有关, EGFR 通过 AKT/c-Jun 上调 PD-L1 表达, 从而降低 Hep3B 细胞对 SFB 的敏感性。本研究为深入理解 SFB 耐药机制以及肝癌治疗策略提供了新的理论依据。然而, 仍需要进一步的研究来完善相关机制, 并探索其潜在的临床应用价值。

参考文献:

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2022[J]. CAA Cancer J Clin, 2022, 72(1): 7-33.
- [2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. GLOBAL cancer statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [3] LLOVET J M, CASTET F, HEIKENWALDER M, et al.

- Immunotherapies for hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, 19(3): 151-172.
- [4] XU Z H, DANG Y, DONG Y, et al. Anti-hepatocellular carcinoma activity of *Sorbaria sorbifolia* by regulating VEGFR and c-Met/apoptotic pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 324: 117758.
- [5] 王伟, 贾胜楠, 樊孙甫, 等. 二氢丹参酮通过抑制 Akt 信号通路激活来增强索拉非尼对肝细胞癌的抗癌作用(英文)[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2024, 51(6): 1445-1457.
- [6] GAO J F, HUO Z, SONG X Y, et al. EGFR mediates epithelial-mesenchymal transition through the Akt/GSK-3 β /Snail signaling pathway to promote liver cancer proliferation and migration[J]. *Oncol Lett*, 2024, 27(2): 59.
- [7] 徐永康, 吴建兵. 仑伐替尼在肝细胞癌中的耐药机制和对策研究进展[J]. *南昌大学学报(医学版)*, 2024, 64(2): 81-87.
- [8] 江博文, 舒畅, 赵向阳, 等. 外周血中性粒细胞-淋巴细胞比值、血小板-淋巴细胞比值对不可切除肝细胞癌经导管动脉化疗栓塞和靶向免疫治疗疗效及预后的预测价值[J]. *中华普通外科学文献(电子版)*, 2024, 18(2): 99-105.
- [9] ÖCAL O, KIMM M A, HOANG T P T, et al. Predictive value of platelet-to-lymphocyte and neutrophil-to-lymphocyte ratio in HCC treated with sorafenib and radioembolization[J]. *JHEP Rep*, 2024, 6(4): 100995.
- [10] 刘云朋, 高源, 张红梅, 等. 肿瘤微环境介导肝细胞癌索拉非尼耐药的研究进展[J]. *药物生物技术*, 2024, 31(2): 206-210.
- [11] 柴森. 甲胎蛋白联合甲胎蛋白-L3、碱性磷酸酶和酸性水解酶检测在肝细胞癌诊断中的应用[J]. *临床研究*, 2024, 32(7): 122-124.
- [12] 王学耀. 索拉非尼与敲低 STAT3 联合治疗抗 HCC 效果评价及机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2022.
- [13] 柳扬, 范伟, 丁洁. lncRNA SNHG16 通过调控 miR-570 对肝癌细胞索拉非尼耐药的机制研究[J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(11): 63-70.
- [14] 何华星, 刘璐琳, 刘颖茵, 等. 丁酸钠与索拉非尼可能通过 YAP 诱导铁死亡协同抑制肝癌细胞增殖[J]. *南方医科大学学报*, 2024, 44(7): 1425-1430.
- [15] 罗丹霞, 李玥滢, 张慧. PD-1/PD-L1 抑制剂治疗小细胞肺癌的药物经济学系统评价[J/OL]. *中国医院药学杂志*, 1-8[2024-11-18]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/42.1204.R.20241106.1857.008.html>.
- [16] SHEN X, JIN X L, FANG S, et al. EFEMP2 upregulates PD-L1 expression via EGFR/ERK1/2/c-Jun signaling to promote the invasion of ovarian cancer cells[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2023, 28(1): 53.
- [17] HSU P C, JABLONS D M, YANG C T, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) pathway, yes-associated protein (YAP) and the regulation of programmed death-ligand 1 (PD-L1) in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(15): 3821.
- [18] XIE Y L, DING J W, GAO J K, et al. Triptolide reduces PD-L1 through the EGFR and IFN- γ /IRF1 dual signaling pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 118: 109993.
- [19] XU R Y, LIU X K, LI A M, et al. C-Met up-regulates the expression of PD-L1 through MAPK/NF- κ Bp65 pathway [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2022, 100(4): 585-598.
- [20] 王威, 徐波, 闫素英. 新型抗肝癌化合物 CBI-5725 对 RAF/MEK/ERK 通路及癌细胞凋亡的影响[J]. *实用药物与临床*, 2019, 22(4): 342-348.
- [21] XU G L, NI C F, LIANG H S, et al. Upregulation of PD-L1 expression promotes epithelial-to-mesenchymal transition in sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma cells[J]. *Gastroenterol Rep (Oxf)*, 2020, 8(5): 390-398.
- [22] SHRESTHA R, PRITHVIRAJ P, BRIDLE K R, et al. Combined inhibition of TGF- β 1-induced EMT and PD-L1 silencing re-sensitizes hepatocellular carcinoma to sorafenib treatment[J]. *J Clin Med*, 2021, 10(9): 1889.
- [23] ADAO D M T, CHING C, FISH E J, et al. Endothelial cell-cardiomyocyte cross-talk; understanding bidirectional paracrine signaling in cardiovascular homeostasis and disease[J]. *Clin Sci(Lond)*, 2024, 138(21): 1395-1419.
- [24] PARK S H, TSUZUKI S, CONTINO K F, et al. Crosstalk between bone metastatic cancer cells and sensory nerves in bone metastatic progression[J]. *Life Sci Alliance*, 2024, 7(12): e202302041.
- [25] HONG Z J, XIE W, ZHUO H Q, et al. Crosstalk between cancer cells and cancer-associated fibroblasts mediated by TGF- β 1-IGFBP7 signaling promotes the progression of infiltrative gastric Cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15(15): 3965.

收稿日期: 2024-11-22; 修回日期: 2024-12-29

(本文编辑 覃洪舍)