

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.04.004

· 基础研究 ·

食管鳞状细胞癌 YES-2 细胞顺铂耐药致其恶性生物学行为及 PD-L1 表达的变化

田聪, 贾云龙, 吕微, 张评梅, 王郁, 刘丽华(河北医科大学第四医院 肿瘤免疫科, 河北 石家庄 050035)

[摘要] **目的:** 探讨食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) YES-2 细胞顺铂(cis-dichlorodiammine platinum, CDDP) 耐药后(YES-2/CDDP-R) 细胞恶性生物学行为的变化和程序性死亡受体-配体 1(programmed cell death-ligand 1, PD-L1) 表达的变化。**方法:** 用 CDDP 由低质量浓度到高质量浓度(0.25~2.0 $\mu\text{g/ml}$) 间断冲击(间隔 15~25 d) 的方法处理 YES-2 细胞, 建立 CDDP 耐药细胞株 YES-2/CDDP-R。倒置显微镜下观察 YES-2/CDDP-R 细胞的形态学变化, MTT 法检测细胞对 CDDP 敏感性的变化, 划痕愈合实验检测耐药前后细胞迁移能力的变化, qPCR 和 Western blotting 检测耐药前后细胞中 PD-L1 mRNA 和蛋白表达水平的变化。**结果:** 经过 CDDP 梯度给药 9 个月后成功建立 YES-2/CDDP-R 细胞。显微镜下见 YES-2/CDDP-R 细胞的形态大小不一、胞内空泡及黑色颗粒明显增多且出现巨大细胞。与 YES-2 细胞比较, YES-2/CDDP-R 细胞的 IC_{50} 值显著升高, 表明其对 CDDP 的敏感程度降低($P<0.05$); YES-2/CDDP-R 细胞的增殖和迁移能力显著增强($P<0.05$ 或 $P<0.01$), PD-L1 mRNA 和蛋白表达水平显著升高(均 $P<0.01$)。**结论:** 成功建立的 CDDP 耐药细胞株 YES-2/CDDP-R 对 CDDP 的敏感程度降低, 其增殖和迁移能力增强。YES-2/CDDP-R 细胞中 PD-L1 表达水平升高, 提示 CDDP 耐药可能通过上调 YES-2 细胞 PD-L1 表达水平促进免疫逃逸。

[关键词] 食管鳞状细胞癌; YES-2 细胞; YES-2/CDDP-R 细胞; 顺铂; 化疗耐药; 程序性死亡受体-配体 1

[中图分类号] R735.1; R730.53 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)04-0365-05

Transformation of malignant biological behaviors and PD-L1 expression in esophageal squamous cell carcinoma YES-2 cell induced by CDDP resistance

TIAN Cong, JIA Yunlong, LYU Wei, ZHANG Pingmei, WANG Yu, LIU Lihua (Department of Tumor Immunotherapy, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050035, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the changes in malignant biological behaviors and expression of programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) YES-2 cell line after cis-dichlorodiammine platinum (CDDP) induction (YES-2/CDDP-R). **Methods:** YES-2 cells were treated with CDDP from low concentration to high concentration (0.25-2.0 $\mu\text{g/ml}$) with intermittent impact (15-25 days per concentration) to establish ESCC CDDP-resistant cell line YES-2/CDDP-R. The morphological change of YES-2/CDDP-R cells was observed under the inverted microscope. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) was used to detect cell sensitivity to CDDP. Wound healing assay was used to detect cell migration ability. qPCR and Western blotting were used to detect mRNA and protein expressions of PD-L1. **Results:** After CDDP gradient treatment for 9 months, YES-2/CDDP-R cells were successfully established. The morphology of the YES-2/CDDP-R cells showed uneven size, intracellular vacuoles and significantly increased black particles along with the appearance of huge cells. The IC_{50} of CDDP for YES-2/CDDP-R cells was significantly higher than that for parental cells, indicating decreased sensitivity to CDDP ($P<0.05$). Compared to the YES-2 cells, the proliferation and migration of YES-2/CDDP-R cells were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the mRNA and protein expressions of PD-L1 were significantly up-regulated (all $P<0.001$). **Conclusion:** YES-2 cells with CDDP resistance (YES-2/CDDP-R) were successfully established. The sensitivity of YES-2/CDDP-R cells to CDDP was significantly reduced while the abilities of cell proliferation and migration were

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81871894); 河北省自然科学基金资助项目(No. H2018206318)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81871894), and the Natural Science Foundation of Hebei Province (No. H2018206318)

[作者简介] 田聪(1992-), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫治疗的临床与基础研究, E-mail: tianconcong333@163.com

[通信作者] 刘丽华(LIU Lihua, corresponding author), 博士, 教授、主任医师, 博士生导师, 主要从事肿瘤免疫治疗的基础与临床应用研究, E-mail: lihualiu567@hotmail.com

enhanced. The up-regulation of PD-L1 in YES-2/CDDP-R cells suggests that CDDP-resistance could promote immune escape by inducing PD-L1 up-regulation.

[Key words] esophageal squamous cell carcinoma (ESCC); YES-2 cell; YES-2/CDDP-R cell; cis-dichlorodiammine platinum (CDDP); chemotherapy resistance; programmed cell death-ligand 1 (PD-L1)

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(4): 365-369. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.04.004]

食管癌为是全球最常见的消化道恶性肿瘤之一,90%以上病理学类型为食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell cancer, ESCC)。ESCC的治疗方法包括手术、放疗和化疗^[1]。顺铂(cis-dichlorodiammine platinum, CDDP)是ESCC化疗的重要基础用药,耐药是治疗失败的主要原因之一^[2-3]。因此,研究ESCC细胞化疗耐药后的恶性生物学行为改变及其机制对逆转耐药具有重要意义。程序性死亡受体-配体1(programmed death-ligand 1, PD-L1)主要表达于多种恶性肿瘤细胞表面^[4],与其受体PD-1结合后能够传递负向免疫调控信号,抑制T细胞活化或诱导其凋亡,形成免疫抑制性肿瘤微环境^[5]。以阻断PD-1/PD-L1通路为主的免疫检查点抑制剂凭借其疗效已成为肿瘤治疗新的里程碑。然而,免疫检查点抑制剂在临床上仍面临客观缓解率低等瓶颈。本研究通过检测ESCC YES-2细胞CDDP耐药前后其增殖、迁移能力和PD-L1表达水平的变化,为以PD-1/PD-L1抗体为核心的免疫联合治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

人ESCC细胞株YES-2由河北医科大学第四医院科研中心冻存。CDDP购于中国山东齐鲁制药公司,MTT试剂盒购自美国Sigma公司,RPMI 1640培养基及胎牛血清购自美国Gibco公司,TRIzol购自美国Invitrogen公司,qPCR试剂盒购于美国Promega公司,引物由上海生工合成。兔抗人PD-L1单克隆抗体购自美国Merck Millipore公司,辣根过氧化物酶(horse-radish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔单克隆抗体购自英国Abcam公司。

1.2 细胞培养及构建CDDP耐药细胞株YES-2/CDDP-R

YES-2细胞在含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素及100 μg/ml链霉素的RPMI 1640培养基中于37℃、5% CO₂培养箱中常规培养。待细胞汇合度达70%时,用含不同质量浓度(0.25~2.0 μg/ml)的CDDP培养基培养。首次用含0.25 μg/ml CDDP的培养基共培养48 h后,弃含药培养基,1~2 d换液洗弃死亡细胞,待细胞形成单克隆团块。细胞传代2~3次稳定生长后进入下个梯度药物筛选阶段,每个药物浓度重复作用1~2次,药物梯度每次升高0.25~0.5 μg/ml,至细胞可在0.5 μg/ml的CDDP培养液中维持培养,即

得到CDDP耐药细胞株YES-2/CDDP-R。相差显微镜下(×100)观察细胞的形态。

1.3 MTT法检测细胞对CDDP的敏感性

将YES-2和YES-2/CDDP-R细胞分别以 8×10^4 个/孔铺于96孔板,24 h后待细胞贴满孔底,加入含2.5~25 μg/ml的CDDP的培养基(质量浓度梯度为2.5 μg/ml),共培养24 h后每孔加入20 μl 0.5% MTT溶液培养4 h,弃去孔内液体后每孔加入100 μl 二甲基亚砜,摇床上低速振荡10 min,使结晶充分溶解,在酶标仪上于波长490 nm处检测各孔的光密度(D)值。GraphPad Prism 8软件计算细胞增殖被抑制一半时所需的药物浓度(IC₅₀),耐药指数(resistance index, RI)=YES-2/CDDP-R细胞IC₅₀/YES-2细胞IC₅₀。

1.4 划痕愈合实验检测细胞的迁移能力

重悬YES-2和YES-2/CDDP-R细胞,将 8×10^5 个细胞接种于培养皿中。细胞贴壁后,用200 μl枪尖快速在细胞上划过,PBS洗去划落细胞,继续培养24 h后,在倒置显微镜下拍摄划痕区,分析划痕愈合距离的变化。

1.5 qPCR检测细胞中PD-L1 mRNA的表达水平

分别提取YES-2和YES-2/CDDP-R细胞总RNA,以GAPDH作为内参照。用qPCR分别检测细胞内PD-L1 mRNA的表达水平。RNA逆转录为cDNA的反应条件:40℃ 60 min,25℃ 5 min,70℃ 5 min。得到的cDNA保存在-20℃冰箱中备用。PD-L1 mRNA扩增反应条件:94℃预变性3 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,共进行35个循环;72℃延伸5 min。PCR引物序列:PD-L1 F为5'-CCTACTGGCATTGCTGAACGCAT-3',R为5'-AC-CATAGCTGATCATGCAGCGGTA-3'; GAPDH F为5'-GTCACCTTCACCGTTCCAGTTTT-3',R为5'-CT-TAGTTGCGTTACACCCTTTCTT-3'。用2^{-ΔΔCT}法计算PD-L1 mRNA相对表达水平。

1.6 Western blotting检测细胞中PD-L1蛋白的表达水平

分别提取YES-2和YES-2/CDDP-R细胞的总蛋白,采用BCA法定量。各取含30 μg总蛋白样品,加入上样缓冲液和PBS配齐20 μl体系,95℃煮10 min,置于冰上冷却,进行SDS-PAGE、转PVDF膜,5%脱脂奶粉室温封闭2 h,TBST洗膜后,加入兔抗人PD-L1一抗(1:1 000),4℃孵育过夜。次日,TBST洗膜3次(10 min/次),

加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗(1:20 000)室温孵育 2 h,洗膜 3 次后,加入 ECL 化学发光液显色后用凝胶成像系统获取蛋白条带。以 GAPDH 为内参,Image J 软件分析蛋白条带的灰度值。

1.7 统计学处理

MTT、划痕愈合、qPCR 和 WB 等实验均重复 3 次。用 SPSS 21.0 统计学软件对数据进行分析处理,用 GraphPad Prism 8.0 软件绘图。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

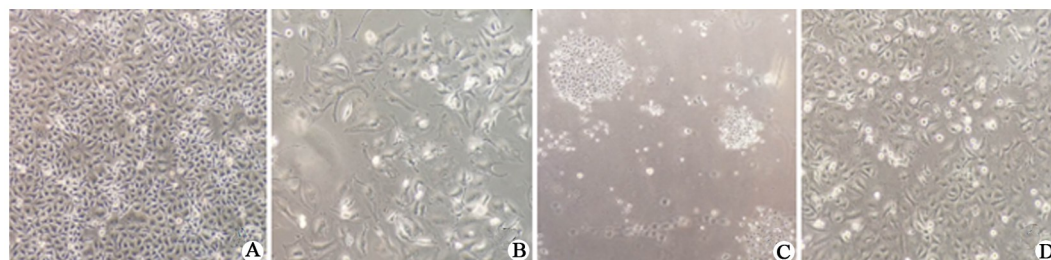
2 结果

2.1 成功建立 CDDP 耐药细胞株 YES-2/CDDP-R 使用 ESCC 细胞 YES-2 历时 9 个月梯度药物作用

筛选,成功建立 CDDP 耐药细胞株 YES-2/CDDP-R。在加入含 CDDP 培养基 4~7 d 后,倒置显微镜下可见较多的死亡细胞,在 25 d 左右时形成单细胞克隆,最终得到 YES-2/CDDP-R 细胞。与 YES-2 细胞比较,YES-2/CDDP-R 细胞的形态不一,细胞膜边界不清,细胞膜及细胞核折光度降低,细胞内空泡及黑色颗粒明显增多,出现巨大细胞(图 1)。

2.2 YES-2/CDDP-R 细胞对 CDDP 的敏感性显著降低

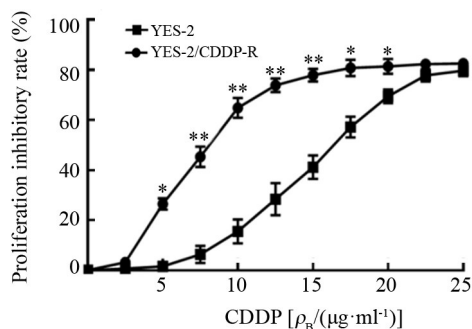
用不同浓度的 CDDP 干预 24 h 后,药物敏感性实验结果(图 2)显示,与 YES-2 细胞比较,YES-2/CDDP-R 细胞的 IC_{50} 值显著升高 [(16.69±0.20) vs (7.71±0.11) $\mu\text{g}/\text{ml}$; $t=1.595$, $P < 0.05$],细胞的耐药指数 RI 为 2.16。结果表明,在相同质量浓度的 CDDP 干预下,YES-2/CDDP-R 细胞的增殖能力增强、对 CDDP 的敏感性显著降低。



A: YES-2 cells; B: YES-2 cells with CDDP-treatment for 4 days; C: YES-2 cells with CDDP-treatment for 25 days; D: YES-2/CDDP-R cells

图 1 YES-2 和 YES-2/CDDP-R 细胞的形态($\times 100$)

Fig.1 The morphology of YES-2 and YES-2/CDDP-R cells ($\times 100$)



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs YES-2 cells

图 2 CDDP 对 YES-2 和 YES-2/CDDP-R 细胞增殖抑制率的影响

Fig.2 Effects of CDDP on proliferation inhibitory rates of YES-2 and YES-2/CDDP-R cells

2.3 YES-2/CDDP-R 细胞的迁移能力显著增强

划痕愈合实验结果(图 3)显示,YES-2/CDDP-R 细胞的划痕愈合率显著高于 YES-2 细胞($t=14.11$, $P < 0.01$)。结果表明,YES-2/CDDP-R 细胞的迁移能力较 YES-2 细胞显著增强。

2.4 YES-2/CDDP-R 细胞中 PD-L1 表达水平升高

qPCR 检测结果(图 4A)显示,YES-2/CDDP-R 细胞中 PD-L1 mRNA 的表达水平显著高于 YES-2 细胞($t=5.94$, $P < 0.01$),Western blotting 实验结果(图 4B)显示,YES-2/CDDP-R 细胞中 PD-L1 蛋白的表达水平显著高于 YES-2 细胞($t=6.95$, $P < 0.01$)。实验结果表明,YES-2/CDDP 细胞中 PD-L1 mRNA 和蛋白表达水平显著升高。

3 讨论

以 CDDP 为基础的两种药物联合治疗是晚期食管癌的主要化疗方式^[6-8]。CDDP 属于细胞周期非特异性药物,进入细胞后与 DNA 结合而阻断染色体复制,最终诱导细胞凋亡^[9]。建立体外耐药细胞系是研究肿瘤细胞耐药机制的前提和基础。本研究对 ESCC 细胞 YES-2 采用低质量浓度到高质量浓度并间断冲击的 CDDP 诱导方式^[10-11],成功构建 CDDP 耐药细胞株 YES-2/CDDP-R。与 YES-2 细胞比较,YES-2/CDDP-R 细胞的形态发生显著变化,其形态不一,细胞膜和细胞核折光度降低,细胞内空泡及黑色颗

粒明显增多,且以巨大细胞多见。进一步对细胞进行 CDDP 干预并使用 MTT 实验检测 YES-2/CDDP-R 细胞对 CDDP 的敏感性,结果显示 YES-2/CDDP-R 细胞较 YES-2 细胞对 CDDP 的 IC_{50} 值显著升高,细胞耐

药指数 RI 为 2.16,在同样的 CDDP 浓度下 YES-2/CDDP-R 细胞的增殖能力显著增强,表明其对 CDDP 耐药性提高。

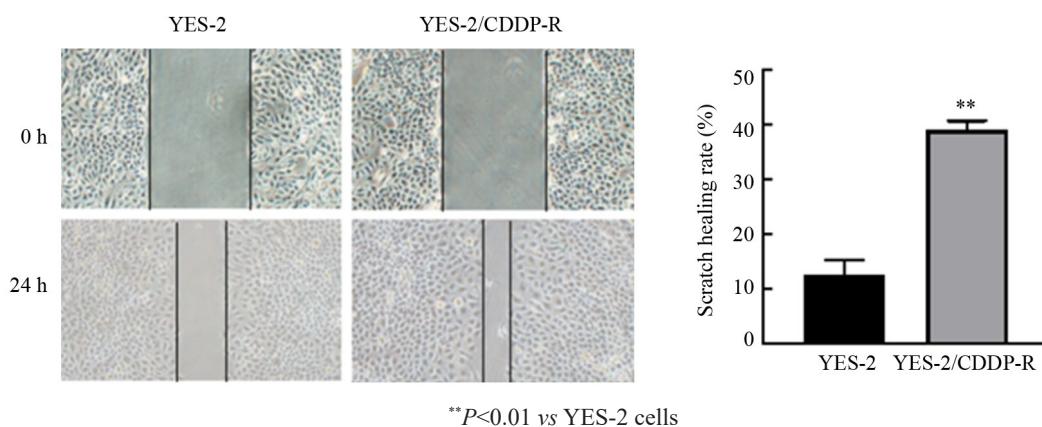


图3 CDDP对YES-2和YES-2/CDDP-R细胞迁移能力的影响

Fig.3 Effects of CDDP on the migration ability of YES-2 and YES-2/CDDP-R cells

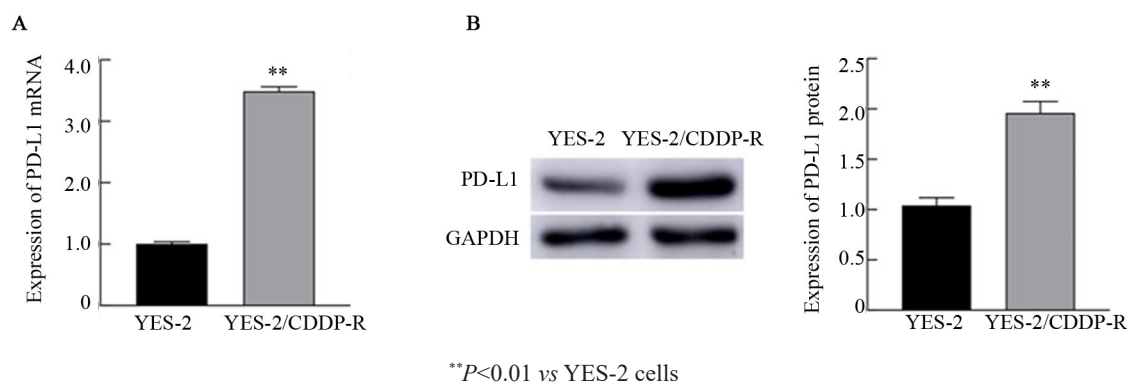


图4 YES-2和YES-2/CDDP-R细胞中PD-L1 mRNA(A)和蛋白(B)的表达

Fig.4 The mRNA (A) and protein (B) expressions of PD-L1 in YES-2 and YES-2/CDDP-R cells

既往研究^[12-14]表明,肿瘤细胞在产生耐药性后其恶性生物学行为可能发生变化。本研究通过划痕愈合实验发现,YES-2/CDDP-R 细胞划痕愈合能力较 YES-2 细胞增强。细胞间黏附特性的丧失是促进肿瘤细胞向周围组织侵袭和远处转移的重要原因。ZOU 等^[15]研究发现,肺癌细胞 CDDP 耐药后 Wnt 通路激活进而导致其迁移能力增强。另外,CAO 等^[16]在小鼠肿瘤模型中发现,PD-L1 可通过提高转录因子 Slug 和 Twist 的表达水平促进肿瘤的侵袭与转移,表明 PD-L1 升高可能促进肿瘤细胞的恶性生物学行为。多项研究表明,化疗可能通过上调肿瘤细胞中 PD-L1 表达参与免疫逃逸过程。MESNAGE 等^[17]通过上皮性卵巢癌组织免疫组化染色研究发现,在新辅助化疗后肿瘤微环境中 PD-L1 的表达水平显著升高;QIN 等^[18]证实,CDDP 可通过激活 ERK/MAPK 通路上调肝癌细胞 PD-L1 的表达水平。为明确 CDDP 耐药对

YES-2 细胞免疫逃逸能力的影响,本研究进一步对免疫检查点分子 PD-L1 的表达进行检测,结果显示 YES-2/CDDP 细胞中 PD-L1 mRNA 和蛋白水平均显著高于 YES-2 细胞,表明 YES-2 细胞在 CDDP 耐药后免疫逃逸能力显著增强。

PD-1/PD-L1 通路活化可诱导形成免疫抑制性肿瘤微环境,阻断该信号通路能够显著增强抗肿瘤免疫反应。靶向 PD-1/PD-L1 通路的免疫检查点抑制剂已凭借其坚实的理论基础和卓越的临床疗效获批用于治疗多种恶性肿瘤。然而,临床实践发现,由于 PD-L1 表达水平低及“冷肿瘤”等因素导致其单药治疗的客观缓解率仍较低^[19]。因此,寻找重塑肿瘤免疫微环境的手段可进一步改善免疫治疗的疗效。本研究在体外成功构建人 ESCC YES-2/CDDP-R 细胞,与 YES-2 细胞比较,其增殖和迁移能力增强,同时免疫检查点分子 PD-L1 表达水平升高,该结果提示在

ESCC 细胞在化疗耐药后其恶性生物学行为发生变化, 且免疫逃逸能力增强, 为以 PD-1/PD-L1 抗体为基础的免疫联合治疗提供了理论基础。

综上所述, 本研究通过建立 ESCC YES-2/CDDP-R 细胞证实, CDDP 耐药能够增强 YES-2 细胞的增殖和迁移能力并提高 PD-L1 表达水平, 表明 CDDP 耐药能够通过增强 YES-2 细胞的恶性生物学行为和免疫逃逸能力促进肿瘤进展。本研究为探索 ESCC 细胞 CDDP 耐药机制提供了实验数据, 并为以建立新免疫检查点抑制剂为基础的联合治疗策略提供新的实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] TU C C, HSU P K. The frontline of esophageal cancer treatment: questions to be asked and answered[J/OL]. *Ann Transl Med*, 2018, 6 (4): 83[2019-09-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5890033/>. DOI:10.21037/atm.2017.10.31.
- [2] BLUM MURPHY M A, ELIMOVA E, AJANI J A. Current concepts and future potential in neoadjuvant chemotherapy for esophageal cancer[J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016, 10(3): 383-392. DOI:10.1586/17474124.2016.1116936.
- [3] WU J B, WANG L, DU X H, et al. A-solanine enhances the chemosensitivity of esophageal cancer cells by inducing microRNA-138 expression[J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(3): 1163-1172. DOI: 10.3892/or.2018.6187.
- [4] O'DONNELL J S, LONG G V, SCOLYER R A, et al. Resistance to PD1/PDL1 checkpoint inhibition[J]. *Cancer Treat Rev*, 2017, 52: 71-81. DOI:10.1016/j.ctrv.2016.11.007.
- [5] BRYAN L J, GORDON L I. Blocking tumor escape in hematologic malignancies: the anti-PD-1 strategy[J]. *Blood Rev*, 2015, 29(1): 25-32. DOI:10.1016/j.blre.2014.09.004.
- [6] MIYANAGA S, NINOMIYA I, TSUKADA T, et al. Concentration-dependent radiosensitizing effect of docetaxel in esophageal squamous cell carcinoma cells[J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(2): 517-524. DOI:10.3892/ijo.2015.3291.
- [7] HASHIGUCHI T, NASU M, HASHIM O T, et al. Docetaxel, cisplatin and 5-fluorouracil adjuvant chemotherapy following three-field lymph node dissection for stage II/III N1, 2 esophageal cancer[J]. *Mol Clin Oncol*, 2014, 2(5): 719-724. DOI:10.3892/mco.2014.320.
- [8] CAO Y J, ZHANG L, KAMIMURA Y, et al. B7-H1 overexpression regulates epithelial-mesenchymal transition and accelerates carcinogenesis in skin[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(4): 1235-1243. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2217.
- [9] ZHANG Y F, LI C S, ZHOU Y, et al. Propofol facilitates cisplatin sensitivity via lncRNA MALAT1/miR-30e/ATG5 axis through suppressing autophagy in gastric cancer[J]. *Life Sci*, 2020, 244: 117280. DOI:10.1016/j.lfs.2020.117280.
- [10] XIAO M, GUO J F, XIE L S, et al. Let-7e suppresses DNA damage repair and sensitizes ovarian cancer to cisplatin through targeting PARP1[J/OL]. *Mol Cancer Res*, 2019, 18(3): 436-447[2019-09-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31722968>. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-18-1369.
- [11] XU W, CHEN Q, WANG Q, et al. JWA reverses cisplatin resistance via the CK2-XRCC1 pathway in human gastric cancer cells[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1551[2019-09-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4649833/>. DOI:10.1038/cddis.2014.517.
- [12] NIU Q, LIU Z H, GAO J, et al. MiR-338-3p enhances ovarian cancer cell sensitivity to cisplatin by downregulating WNT2B[J/OL]. *Yonsei Med J*, 2019, 60(12): 1146-1156[2019-09-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6881712/>. DOI: 10.3349/ymj.2019.60.12.1146.
- [13] MI L, ZHOU Y P, WU D, et al. ACSS2/AMPK/PCNA pathway-driven proliferation and chemoresistance of esophageal squamous carcinoma cells under nutrient stress[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20 (6): 5286-5296. DOI:10.3892/mmr.2019.10735.
- [14] 招志辉, 丘振文, 招远明, 黄芪多糖通过调控 miR-20a/TGFBR2 分子轴降低结直肠癌 HT-29/DDP 细胞的顺铂耐药性[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(4): 417-425. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.04.008.
- [15] ZOU A M, WU A B, LUO M H, et al. SHCBP1 promotes cisplatin induced apoptosis resistance, migration and invasion through activating Wnt pathway[J]. *Life Sci*, 2019, 235: 116798. DOI:10.1016/j.lfs.2019.116798.
- [16] CAO Y J, ZHANG L, KAMIMURA Y, et al. B7-H1 overexpression regulates epithelial-mesenchymal transition and accelerates carcinogenesis in skin[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(4): 1235-1243. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2217.
- [17] MESNAGE S J L, AUGUSTE A, GENESTIE C, et al. Neoadjuvant chemotherapy (NACT) increases immune infiltration and programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in epithelial ovarian cancer (EOC)[J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(3): 651-657. DOI: 10.1093/annonc/mdw625.
- [18] QIN X, LIU C, ZHOU Y, et al. Cisplatin induces programmed death-1-ligand 1 (PD-L1) over-expression in hepatoma H22 cells via Erk/MAPK signaling pathway[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2010, 56(Suppl): OL1366-OL1372.
- [19] HEDGE P S, CHEN D S. Top 10 challenges in cancer immunotherapy [J]. *Immunity*, 2020, 52(1):17-35. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.12.011.

[收稿日期] 2019-10-26

[修回日期] 2020-01-31

[本文编辑] 党瑞山