

FOXJ2 转录激活胃癌细胞 PD-L1 表达并抑制 T 细胞抗肿瘤免疫的研究

王 佩^{1,2}, 曹田宇², 周 云³, 张晓慧², 张文尧², 王 晨⁴, 聂勇战², 王 新³, 白飞虎⁵, 卢媛媛², 赵晓迪²

(1. 宁夏医科大学, 宁夏 银川 750004; 2. 空军军医大学第一附属医院, 陕西 西安 710032; 3. 空军军医大学第二附属医院, 陕西 西安 710000; 4. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069; 5. 海南医学院第二附属医院, 海南 海口 571199)

摘要: [目的] 研究免疫检查点 PD-L1 在胃癌细胞中的转录调控机制; 探讨转录因子 FOXJ2 对 PD-L1 的转录调控, 两者表达的相关性及其与胃癌患者预后的关系; 揭示 FOXJ2 在调控 T 细胞抗肿瘤免疫中发挥的生物学功能。 [方法] 利用生物信息学方法筛选能够调控 PD-L1 的转录因子; 免疫组化及免疫荧光检测 FOXJ2 和 PD-L1 在胃癌临床标本中的表达以及 FOXJ2 与 CD8⁺ T 细胞浸润的关系; qRT-PCR 与 Western blot 检测 FOXJ2 和 PD-L1 在胃癌细胞中的表达; ChIP 实验验证 FOXJ2 与 PD-L1 基因启动子的直接相互作用; 胃癌细胞与 T 细胞共培养实验检测 T 细胞对肿瘤细胞的杀伤能力; 流式细胞术检测肿瘤细胞中 PD-L1 表达情况及 T 细胞中 TNF- α 和 IFN- γ 的表达情况。 [结果] JASPAR 和 PROMO 数据库筛选出 24 个可能调控 PD-L1 的候选转录因子; 癌症公共数据库显示 FOXJ2 与 PD-L1 的表达呈正相关 ($P < 0.05$), 高表达 FOXJ2 的胃癌患者生存期明显缩短 ($P < 0.01$)。 FOXJ2 在胃癌组织中的表达较癌旁组织显著上调, 且与 PD-L1 的表达呈正相关关系 ($R = 0.629, P < 0.01$)。 qRT-PCR 与 Western blot 证实胃癌细胞中敲低 FOXJ2 表达后 PD-L1 表达下降。 ChIP 实验证实 FOXJ2 与 PD-L1 基因启动子区域的直接相互作用。 下调胃癌细胞中 FOXJ2 表达后, T 细胞对肿瘤细胞的杀伤能力增强; 流式细胞术显示肿瘤细胞中的 PD-L1 下降, 而 T 细胞中 TNF- α 和 IFN- γ 的表达升高。 [结论] FOXJ2 与 PD-L1 表达和胃癌患者的生存密切相关, 阻断 FOXJ2 对 PD-L1 的转录调控有望成为胃癌免疫治疗的新靶点。

关键词: 胃癌; 肿瘤免疫; FOXJ2; PD-L1

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2021)12-0933-09

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2021.12.A009

FOXJ2 Inhibits T Cells Anti-tumor Immunity Through Transcriptional Activation of PD-L1 Expression in Gastric Cancer Cells

WANG Pei^{1,2}, CAO Tian-yu², ZHOU Yun³, ZHANG Xiao-hui², ZHANG Wen-yao², WANG Chen⁴, NIE Yong-zhan², WANG Xin³, BAI Fei-hu⁵, LU Yuan-yuan², ZHAO Xiao-di²

(1. Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. The First Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; 3. The Second Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710000, China; 4. College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China; 5. The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 571199, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the regulatory effect of FOXJ2 on PD-L1 expression in gastric cancer (GC). [Methods] Bioinformatics methods were performed to screen transcription factors for regulating PD-L1. The expression of FOXJ2 and PD-L1 in GC specimens was detected by qRT-PCR and Western blot. The relationship between FOXJ2 and CD8⁺ T cell was explored by immunohistochemistry and immunofluorescence. The ChIP experiments were conducted to verify the interaction between FOXJ2 and PD-L1 promoter. Co-culturing GC cell and T cell were used to detect the killing ability of T cells on tumor cells. Flow cytometry was used to detect the expression of PD-L1 in tumor cells and the expression of TNF- α and IFN- γ in T cells. [Results] JASPAR and PROMO databases predicted 24 candidate transcription factors that may regulate PD-L1. The cancer public databases showed that the expression of FOXJ2 and PD-L1 were positively correlated ($P < 0.05$) in GC. The high expression of FOXJ2 correlated with poor GC patient prognosis ($P < 0.01$). The tissue microarrays revealed that the expression of FOXJ2 in GC tissues was higher than that in adjacent tissues, and it was positively correlated with the expres-

收稿日期: 2021-10-22; 修回日期: 2021-11-04

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFC1313101); 国家自然科学基金 (82073197)

通信作者: 赵晓迪, E-mail: leedyzhao@fmmu.edu.cn

sion of PD-L1 ($R=0.629$, $P<0.01$). The expression of PD-L1 decreased if FOXJ2 was downregulated by siRNA in GC cells. ChIP experiments confirmed the direct interaction between FOXJ2 and PD-L1 gene promoter region. When FOXJ2 was downregulated, the killing ability of T cells on tumor cells was enhanced; the expression of PD-L1 decreased in tumor cells, whereas TNF- α and IFN- γ increased in T cells. [Conclusion] FOXJ2 is closely related to the survival and prognosis of patients with gastric cancer, and blocking the transcriptional regulation of FOXJ2 on PD-L1 is expected to be a new immunotherapy target in GC.

Key words: gastric cancer; immunotherapy; FOXJ2; PD-L1

当前胃癌主要治疗方式包括手术、化疗和放疗。然而,多达三分之二的患者未能从这些治疗中受益。研究发现,癌细胞中的免疫检查点除了支持免疫逃避外,还支持包括增殖、转移、糖酵解、DNA 修复和化疗耐药等癌症特征^[1]。因此,联合应用免疫检查点抑制剂可抑制一系列免疫依赖性和非依赖性的肿瘤发生过程,实现肿瘤治疗的目的。

程序性细胞死亡蛋白-1(programmed cell death protein-1,PD-1,由 PDCD1 编码)和程序性死亡配体-1(programmed cell death-ligand-1,PD-L1,由 CD274 编码)是维持免疫稳态的重要蛋白质,也是控制 T 细胞活动的主要免疫检查点。各种类型的癌症高表达 PD-L1,并利用 PD-L1/PD-1 信号通路来逃避 T 细胞介导的肿瘤免疫。阻断 PD-1/PD-L1 通路在晚期癌症患者中显示出显著的抗肿瘤作用,被公认为是开发新的免疫检查点阻断和联合疗法的金标准^[2]。然而,PD-L1 在几种实体瘤中的治疗反应率却十分有限^[3]。因此,探讨 PD-L1 的表达机制,并制定潜在的治疗策略和探索新的生物标志物,提高对免疫治疗的反应率,能够为癌症患者带来实质性益处。叉头盒基因-J2(Forkherad box J2,FOXJ2)是 Forkhead 盒家族的新成员,在肿瘤的发生、进展和转移中发挥重要作用^[4-6]。

本文旨在研究免疫检查点 PD-L1 在胃癌细胞中的转录调控机制;明确转录因子 FOXJ2 对 PD-L1 的转录调控、在胃癌中的表达模式、两者表达的相关性及其与胃癌患者预后的关系;并通过敲低胃癌细胞中 FOXJ2 的表达,与 T 细胞共培养,希望能初步揭示 FOXJ2 和 PD-L1 在 T 细胞抗肿瘤免疫中可能发挥的生物学功能。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

人胃癌细胞 SGC-7901、GES、AGS、MGC-803、BGC-823、MKN28、MKN45 细胞系由空军军医大学肿瘤生物学国家重点实验室长期保存。所有细胞使用含有 10%胎牛血清(美国 Gibco)的 DMEM 培养基(美国 Gibco)培养,并置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中。

1.2 组织样本

两个商品化的胃癌组织芯片(DC-Sto01035)购自 Avilabio 公司(中国西安),包含来自 40 个胃癌组织、40 个配对的相邻非肿瘤组织的样本。该组织芯片的所有样本在临床和病理学上均显示正确标记,所有患者均知情同意。40 例胃癌患者芯片的基本临床病理信息见 <http://www.avilabio.com/public/details?productId=59162&searchText=dc-sto01035>。

1.3 细胞培养与转染

FOXJ2 的 siRNA 和阴性对照 siRNA(中国擎科)设计并合成。转染前,将 MKN45 细胞接种在六孔板,当细胞融合度达 30%~50%时,FOXJ2 的 siRNA 和阴性对照分别使用 GP-Transfect mate(中国吉玛)转染细胞,转染后 48 h 和 72 h 分别提取 RNA 和蛋白质进行后续实验。siRNA 的引物序列如下: FOXJ2-siRNA-1F:GUUCCUAUUGGACAAUUGATT; FOXJ2-siRNA-1R:UCAAUUGUCCAAUAGGAACTT; FOXJ2-siRNA-2F:GCAUUGAGCAGUCACAAUUTT; FOXJ2-siRNA-2R:AAUUGUGACUGCUCAAUGCTT; FOXJ2-siRNA-3F:CAUCACAUUGCCAAUCUGUTT; FOXJ2-siRNA-3R:ACAGAUUGGCAAUGUGAUGTT。

1.4 RNA 提取与实时定量 PCR 检测

收集对数生长期细胞,使用 Trizol 试剂盒(美国 Invitrogen)说明书提取总 RNA。得到的总 RNA 在微量核酸/蛋白定量仪上定量浓度,保证所测 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.8~2.0 之间。提取的 RNA 首先反转录产生 cDNA,后使用 SYBR-Green 体系进行 PCR 反应。*GAPDH* 在组织中的表达相对恒定,因此作为内参,引物序列分别为:*FOXJ2* F:TCAGCCATGAGC-CAAGTGAA;*FOXJ2* R:GGGCGATTGTATCCTGCTGA;*PD-L1* F:TTGCTGAACGCCCCATACAA;*PD-L1* R:TCCAGATGACTTCGGCCTTG;*GAPDH* F:AGAAGCTGGGGCTCATTTG;*GAPDH* R:AGGGGCCATCCACAGTCTTC。PCR 反应程序为 95 °C 预变性 30 s,95 °C 5 s,60 °C 30 s,扩增 40 个循环。 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析实时定量 PCR 数据。

1.5 蛋白提取与 Western blot 检测

收集对数生长期细胞,加入约 100 μ L RIPA 裂解液(含 Cocktail 蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂),置于冰上裂解 10 min;超声后 4 °C 离心并提取上清,BCA 法进行蛋白定量。取适量体积的蛋白加入 5 $\times$ 上样缓冲液,经 100 °C、变性 10 min 后用 10%的 SDS-PAGE 进行凝胶电泳。电泳结束后将蛋白转移至 NC 膜,用 1 $\times$ 快速封闭液室温封闭 15 min。移除封闭液后,分别加入 FOXJ2(Bioss,bs-16166,1:1 000)、PD-L1(CST,13684S,1:1 000)、GAPDH(CST,5174S,1:1 000)、 β -actin(Proteintech,66009-1,1:1 000)一抗,4 °C 孵育过夜。TBST 5 min/次,洗涤 3 次后加入对应的二抗(Anti-mouse IgG HRP-Linked Antibody,CST,7076S,1:1 000;Anti-rabbit IgG HRP-Linked Antibody,CST,7074S,1:1 000),室温孵育 1 h。TBST 5 min/次,洗涤 3 次后使用 ECL 化学发光液,在 Bio-Rad ChemiDox XRS 凝胶成像系统中显影。

1.6 免疫荧光

石蜡切片在 60 °C 烤片 1 h,随后二甲苯脱蜡 10 min。依次加入乙醇中进行梯度脱水,后用蒸馏水冲洗 1 min;双氧水冲洗 1 min。将配制好的 EDTA 修复液在微波炉上加热,沸腾后将脱苯的组织切片放入高压锅中,上汽开始计时 2 min,关闭微波炉,冷却至室温后 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,然后滴加正常山羊血清,放置于湿盒中室温封闭 20 min。甩去切片上的封闭液后,滴加按 1:300 比例稀释的 FOXJ2、CD8 抗体后置于湿盒,4 °C 孵育过夜。次日清晨将湿盒

取出并恢复至室温,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,滴加二抗室温孵育 1 h,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,最后加入 DAPI 染色细胞核及适量抗淬灭剂,自然晾干后用甘油配制的封片剂封片,4 °C 避光保存,镜下观察。

1.7 免疫组织化学

采用 SP 法,按试剂盒说明书操作步骤进行。胃癌组织芯片在二甲苯中脱蜡并在乙醇中梯度水化,置于 PBS;使用 EDTA 柠檬酸盐修复液(pH=6)在高压锅中还原产物,冷却至室温;组织芯片用 PBS 冲洗 3 次(5 min/次)并浸泡于 3% H₂O₂ 中 10 min 以阻断内源性过氧化物酶;PBS 洗涤后加入山羊血清封闭 15 min;加入兔抗 FOXJ2 多克隆一抗(Bioss,bs-16166,1:400)、兔抗 PD-L1(CST,13684S,1:300)单克隆一抗,放置在保湿盒中 4 °C 孵育过夜。室温孵育半小时后,PBS 漂洗,加入生物素标记的二抗(1:2 000),放置于保湿盒中室温孵育 30 min,PBS 洗涤;加入 DAB 试剂后根据观察控制显色时间,蒸馏水冲洗;苏木素染色约 1 min,蒸馏水冲洗后脱水透明,中性树胶封片后备用。强度估计如下:强染色(3),中等染色(2),弱染色(1)或阴性染色(0)。计数方法:H-score=强度 $\times$ 阳性细胞/上皮细胞总数 $\times$ 100%,用来评定芯片的强度和范围。H-score<90 被认为是 FOXJ2、PD-L1 阴性或低表达, $\geq$ 90%被认为是高表达。

1.8 ChIP 实验

SGC-7901 细胞培养待融合度达 30%~50%后进行转染,转染 48 h 后收样,室温下加入 1%甲醛进行固定,并进行后续 ChIP 检测实验。根据 Thermo 公司所产 ChIP 操作试剂盒进行实验,PCR 检测染色质免疫共沉淀得到的 DNA 片段,进一步利用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果。*PD-L1* 基因启动子区设计 5 对引物,引物序列如下:*PD-L1*-ChIP-NC F:TGAGGA-ATTACCACACTGTC;*PD-L1*-ChIP-NC R:TATGTAGC-CAACAGACACATG;*PD-L1*-ChIP-1 F:CACAGCCTG-TTTTCAATCTC;*PD-L1*-ChIP-1 R:TATTAGTAATGT-GAGGATTCG;*PD-L1*-ChIP-2 F:TCTGTGATACAATC-AGAATG;*PD-L1*-ChIP-2 R:GGCTTGAGCCACCGTC-CCTG;*PD-L1*-ChIP-3 F:AAGGGGTAACCTTAAGCTC-TTAC;*PD-L1*-ChIP-3 R:GATTTTCACCGGAAGAGT-TTC;*PD-L1*-ChIP-4 F:ACTATAGGGAAACAAAGGGAC;*PD-L1*-ChIP-4 R:TTGTCATGCTTGTTTAAAC。

1.9 CCK-8 试验

采用 CCK-8 试剂盒(中国翊胜)进行试验,根据

说明书检测细胞增殖能力和活力。细胞与 CCK-8 反应溶液在 37 ℃ 孵育 2 h 后,450 nm 波长下测量光密度(OD)值,量化细胞的增殖能力和生存能力。

1.10 细胞共培养

MKN45 细胞铺板于六孔板中,待融合度达到 30%~50%后转染 FOXJ2 的 siRNA。转染后 24 h,将 T 细胞加入到六孔板中,与 MKN45 细胞共同培养。

1.11 流式细胞术

MKN45 与人活性 T 细胞共培养 24 h 后,吸取上清中的人活性 T 细胞于离心管中离心得到细胞沉淀。胰酶消化收集 MKN45 的 NC 组及转染 siRNA 的各组细胞,PBS 洗 3 次后,Zombie NIR 染料(BioLegend,#423105)重悬细胞,室温避光染色 30 min 后,用流式洗液(BioLegend,#420201)洗涤。MKN45 细胞和 BV421-conjugated anti-PD-L1 (BioLegend,#329714)于 4 ℃ 避光孵育 30 min 后,用流式洗液清洗 2 次,使用流式细胞仪(索尼,SA3800)上机检测。T 细胞用固定缓冲液(BioLegend,#420801)室温避光孵育 20 min,流式洗液清洗 1 次。接着用细胞内染色透化洗涤缓冲液(BioLegend,#421002)对细胞进行透化。T 细胞和 BV421-conjugated anti-IFN- γ (BioLegend,#502531)和 PE-conjugated anti-TNF- α (BioLegend,#502908)室温避光染色 20 min,洗涤 2 次后流式细胞仪上机检测。所有数据采用 FlowJO 10 软件进行分析。

1.12 数据库

利用 JASPAR 数据库(<http://jaspar.genereg.net/>)和 PROMO 数据库(http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3)来筛选靶向 PD-L1 的转录因子;用 TIMER 数据库(<https://cistrome.shinyapps.io/timer/>)来初步探索 FOXJ2 与 PD-L1 的表达相关性;UncoLnc 数据库(<http://www.oncolnc.org/>)来揭示 FOXJ2 表达与胃癌患者预后的关系。用 Kaplan-Meier PLOTTER 数据库(<https://kmplot.com/analysis/>)分析 FOXJ2 的表达与胃癌患者总生存期(overall survival,OS)、首次进展生存期(first progression,FP)、进展后生存期(post progression survival,PPS)的关系。

1.13 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件统计分析,计量数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分

析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 数据库筛选靶向调控 PD-L1 的转录因子

为了筛选 PD-L1 的转录因子,我们利用 JASPAR 和 PROMO 数据库筛选了 IRF1、STAT4、FOXP3、FOXJ2 等 24 个靶向 PD-L1 的转录因子(Figure 1A)。TIMER 数据库结果表明 FOXJ2 与 PD-L1 的表达呈正相关(Figure 1B)。UcoLnc 数据库揭示 FOXJ2 表达越高,胃癌患者的预后越差(Figure 1C)。Kaplan-Meier PLOTTER 分析显示 FOXJ2 的表达与胃癌患者的 OS、FP、PPS 相关(Figure 1D)。FOXJ2 在胃癌中的研究鲜有报道,因此我们进行下一步研究。PD-L1/PD-1 信号通路作为最经典的检查点通路之一,能够介导肿瘤诱导的免疫抑制,从而实现免疫逃逸^[8]。因此我们认为,在胃癌患者中,FOXJ2 通过调控 PD-L1/PD-1 信号转导,使得免疫监视中断,从而促进癌细胞的存活。

2.2 FOXJ2 表达及与胃癌患者预后的关系

较癌旁正常组织相比,FOXJ2 和 PD-L1 在胃癌组织中显著高表达(Figure 2A)。统计分析发现,FOXJ2 在胃癌中高表达具有统计学意义($P<0.001$)(Table 1)。FOXJ2 在胃癌组织中高表达,并且 FOXJ2 的表达越高,PD-L1 的表达也越高,FOXJ2 与 PD-L1 的表达具有相关性($R=0.6290$, $P<0.05$)(Figure 2B)。TIMER 数据库进一步提示,FOXJ2 的高表达与 CD8⁺ T 细胞、CD8⁺ naive T 细胞表达呈负相关,且与 M2 巨噬细胞、辅助 T 细胞(Treg)表达呈正相关(Figure 2C)。这一证据提示,FOXJ2 的高表达可能促进肿瘤的免疫逃逸。FOXJ2 的表达与 CD8⁺ T 细胞的浸润存在负相关关系,即 FOXJ2 的表达越高,CD8⁺ T 细胞的浸润越少(Figure 2D)。

2.3 FOXJ2 和 PD-L1 在胃癌细胞中的表达

Western blot 实验显示,在胃癌细胞 MKN45 中,PD-L1 和 FOXJ2 蛋白均呈高表达(Figure 3A)。利用 siRNA 敲低 FOXJ2 后,PD-L1 的蛋白表达量下降(Figure 3B),qRT-PCR 结果也显示 PD-L1 的 mRNA 表达下调(Figure 3C)。

为了验证 FOXJ2 对 PD-L1 的转录调控作用,我们在胃癌细胞中进行了 ChIP 实验。首先,结合

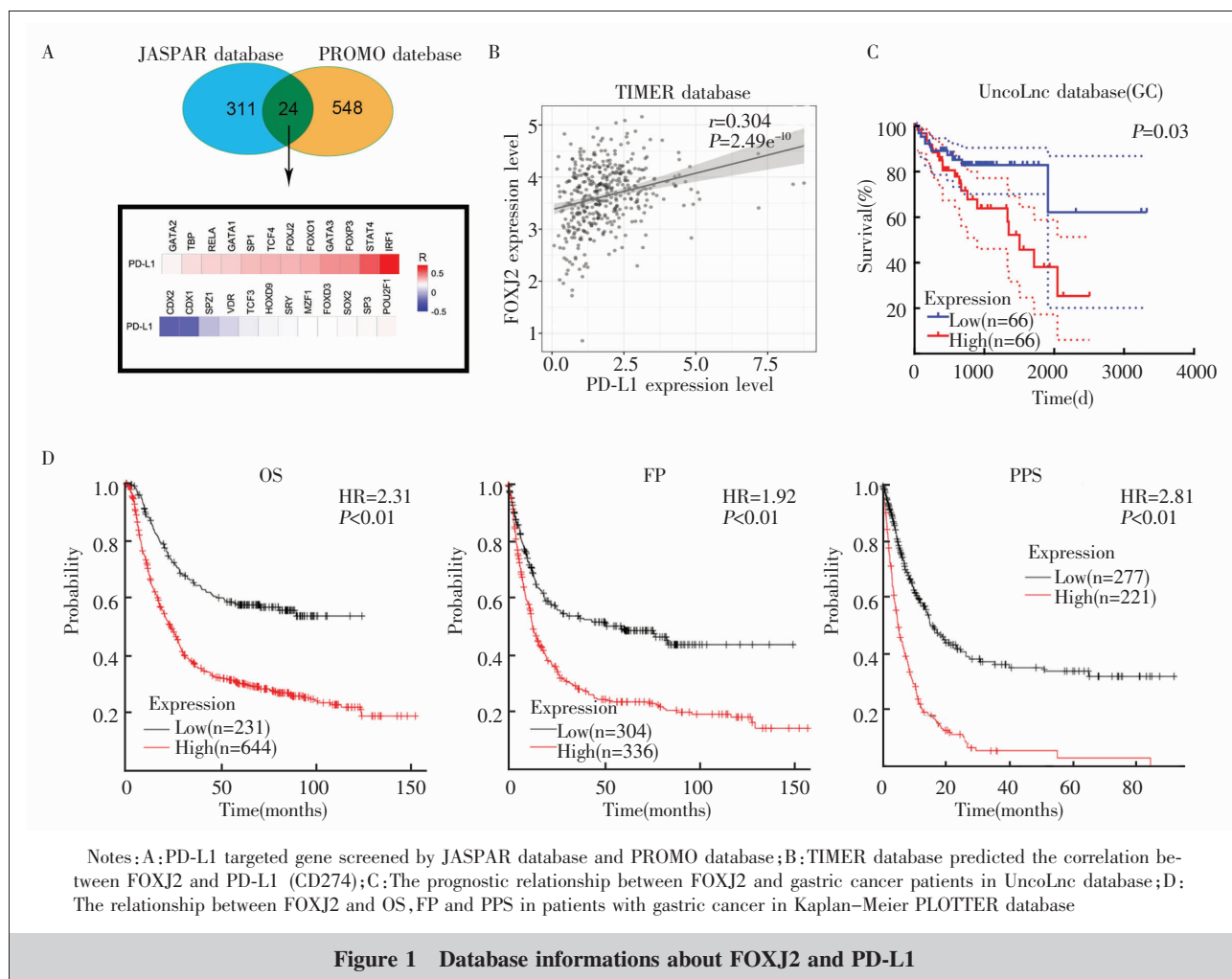


Figure 1 Database informations about FOXJ2 and PD-L1

Table 1 Expression of FOXJ2 in gastric cancer and adjacent tissues

Group	N	FOXJ2 expression		χ^2	P
		Positive	Negative		
Gastric cancer	40	27	13	37.13	<0.001
Adjacent tissues	40	1	39		

Note: Statistical analysis was performed by the Pearson's χ^2 test

JASPAR 数据库 (<http://jaspar.genereg.net/>), 我们预测出 FOXJ2 在 PD-L1 启动子区域有 4 个结合位点 (ChIP1~4) (Figure 4A)。接着, 针对每一个结合区域, 我们设计 4 条特异性引物并进行 PCR 和琼脂糖电泳实验。结果显示, 与无 FOXJ2 抗体组相比, 第 3、4 对引物在 FOXJ2 抗体组 PCR 数值有差异, 并且在琼脂糖凝胶中显出特异条带, 说明 FOXJ2 能够结合到 PD-L1 启动子区域 (Figure 4B~4C)。

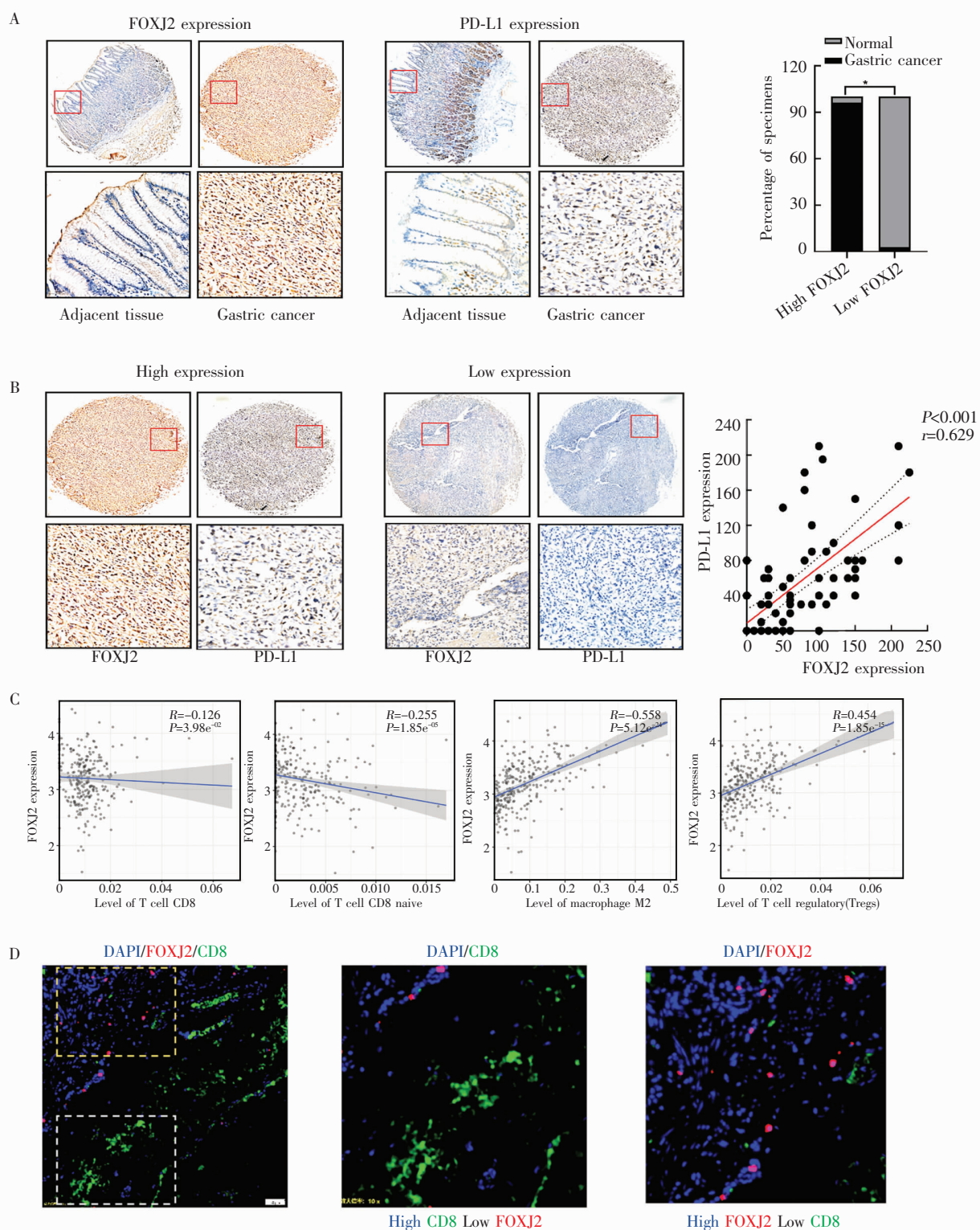
2.4 FOXJ2 在 T 细胞抗肿瘤免疫中的功能

我们敲低 FOXJ2 后, 将其与人 T 细胞共培养, 利用流式细胞术检测肿瘤细胞中 PD-L1 和人 T 细

胞中 TNF- α 和 IFN- γ 的表达。结果表明, 敲低 FOXJ2 表达后, 肿瘤细胞中的 PD-L1 表达下降至 27.0% 和 34.0%, 而人 T 细胞里的 TNF- α 和 IFN- γ 均有所上升, 分别为 23.2% 和 25.9% (Figure 5A~5B); 同时, 利用 CCK-8 检测肿瘤细胞的存活情况, 发现肿瘤细胞的活性明显降低, 具有统计学意义 ($P<0.05$; $P<0.001$) (Figure 5C)。这一结果进一步表明, 下调肿瘤细胞中 FOXJ2 的表达可以降低肿瘤细胞中的 PD-L1 水平, 增加 T 细胞中 TNF- α 和 IFN- γ 等对肿瘤的杀伤能力, 减少免疫逃逸。

3 讨论

胃癌是最常见的消化系统肿瘤, 仍然是全球癌症相关死亡的主要原因之一。早期胃癌的症状不明显, 大多数胃癌发现时已是晚期。对于晚期胃癌患者的治疗, 目前仍以化疗方案为主, 但由于化疗耐药的



Notes: A: Expressions of FOXJ2 and PD-L1 in gastric cancer and cancer adjacent tissues; B: The high and low expressions of FOXJ2 and PD-L1 in gastric cancer and its correlation; C: The correlation between FOXJ2 expression and T cell CD8⁺, T cell CD8⁺ naive, macrophage M2 and Tregs in TIMER database; D: Immunofluorescence results showed the relationship between FOXJ2 and T cell CD8⁺; *: $P<0.001$, vs normal tissues

Figure 2 Relationship between FOXJ2 and clinical prognosis of gastric cancer patients

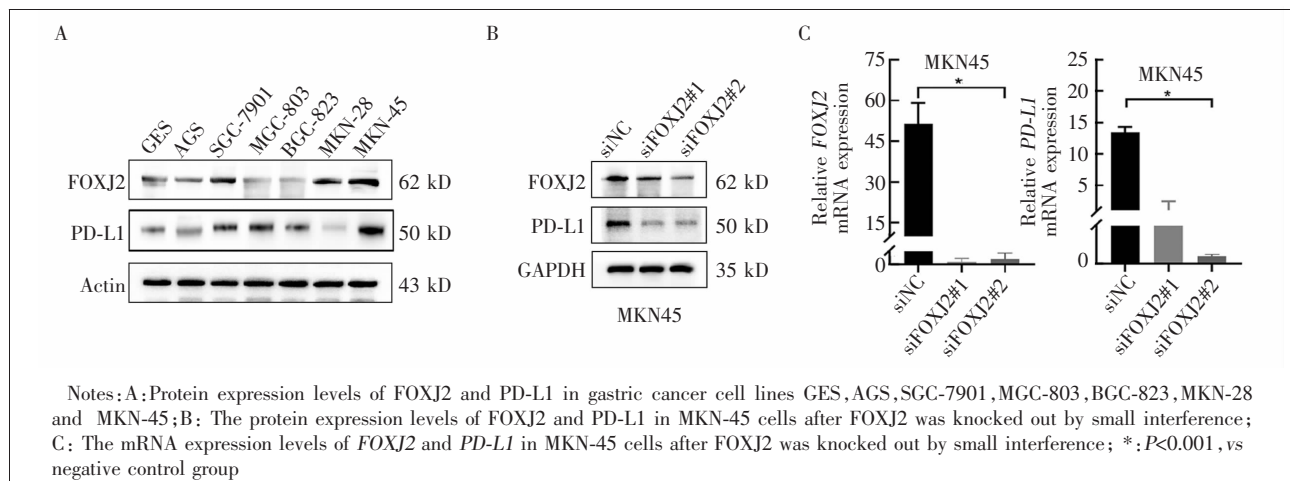


Figure 3 The expressions of FOXJ2 and PD-L1 in gastric cancer

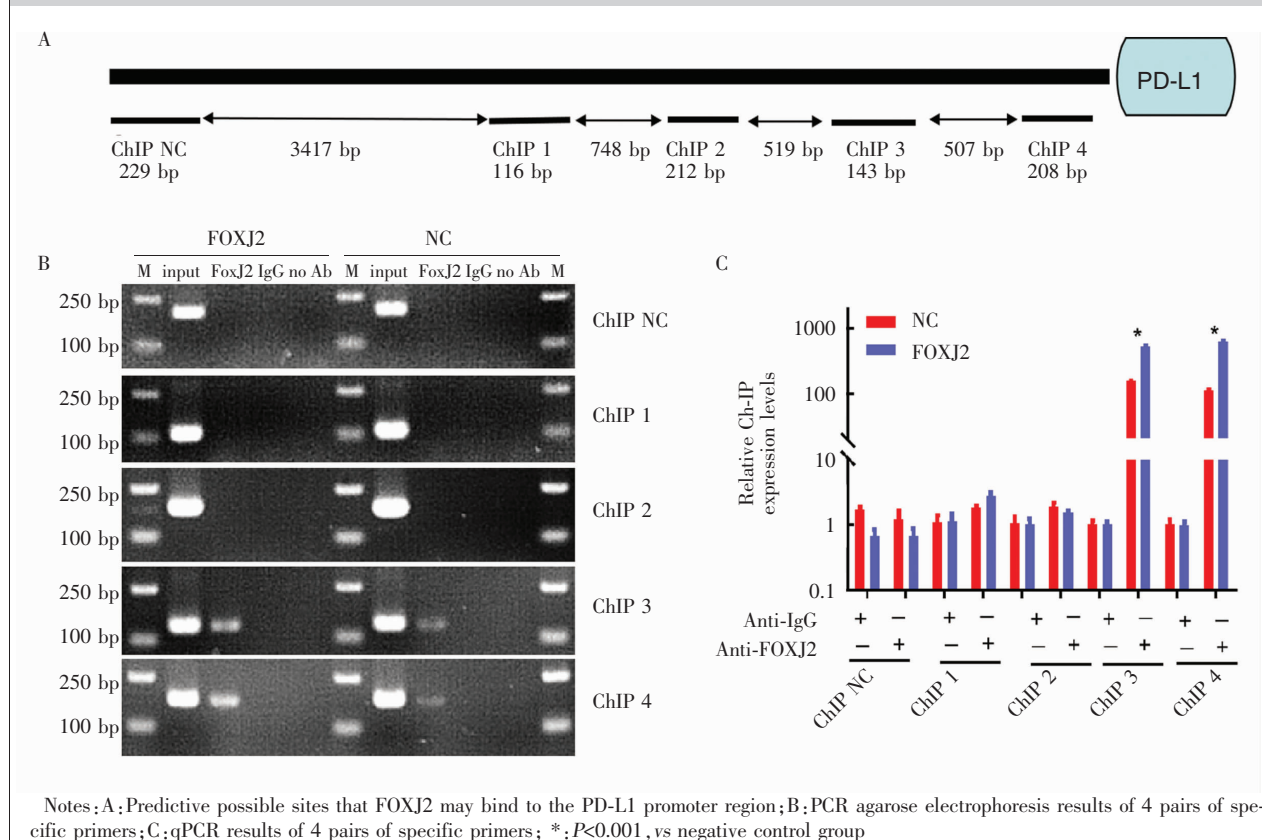


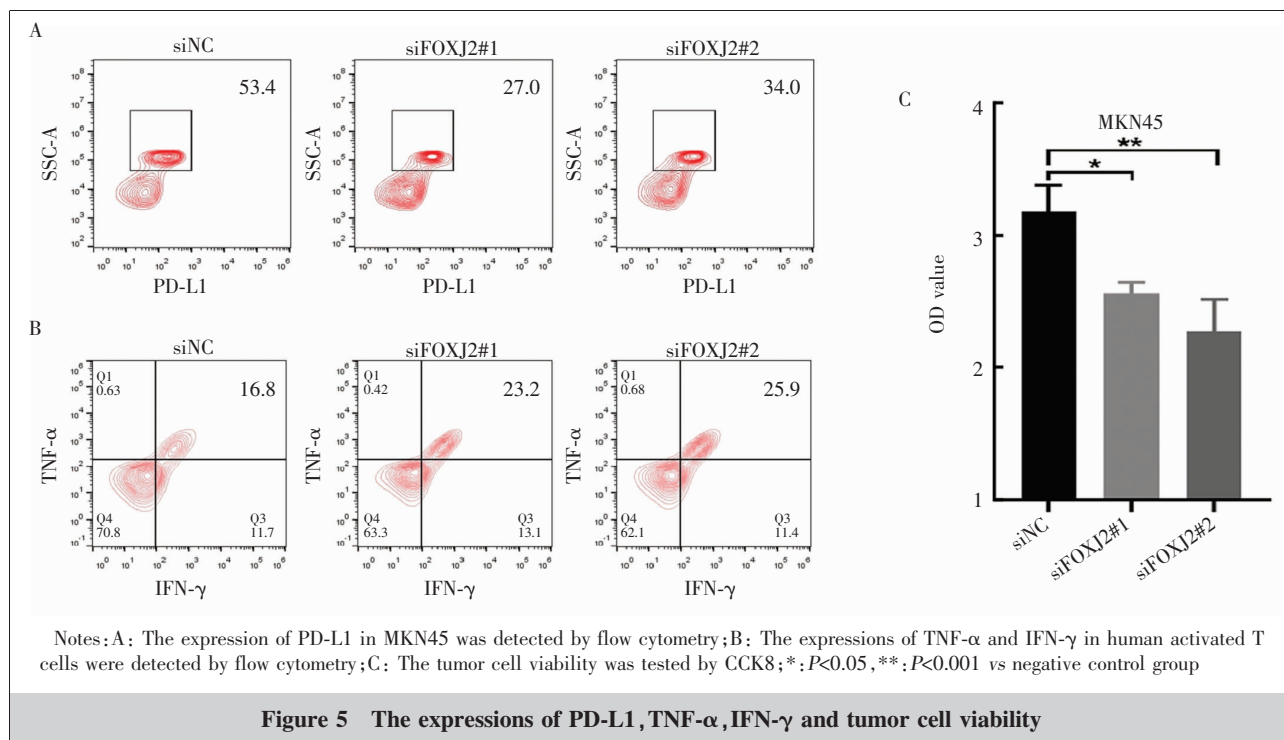
Figure 4 CHIP experiment results of FOXJ2 and PD-L1

出现,使得大多数患者中位生存期小于1年^[8]。尽管胃癌的发病率在下降,但胃癌患者的预后仍然较差。因此,早期筛查并且选择合适的治疗方法对于降低胃癌的死亡率至关重要。

PD-L1 结合 PD-1 维持免疫耐受,同时发挥损伤抗肿瘤免疫的作用。许多肿瘤可以上调 PD-L1 的表

达,从而抑制抗肿瘤的 T 细胞应答并实现免疫逃逸^[9]。近年来众多研究发现,靶向 PD-1 或 PD-L1 的阻断性抗体已经彻底改变了癌症免疫治疗现状。因此,对 PD-L1 功能的抑制有望成为治疗癌症的新方法。

FOX 家族因子是共享进化上保守的 DNA 结合域的转录因子,称为“叉头”或“翼状螺旋”域^[10]。越来



越多的证据表明,FOX 家族成员在许多癌症中异常表达,并参与增殖、分化、黏附、迁移和侵袭等多种细胞活动过程^[9,11-12]。FOXJ2 是 FOX 家族的一员,分布于人体的不同器官和组织中^[11]。据报道 FOXJ2 在多种癌症中异常表达,包括鼻咽癌、神经胶质瘤和非小细胞肺癌等^[13-15]。然而其在胃癌中的研究仍不清楚。

本研究利用生物信息学技术筛选出可能调控免疫检查点 PD-L1 的转录因子 FOXJ2。对 40 例胃癌组织和癌旁组织免疫组织化学的研究中,胃癌患者中 FOXJ2 与 PD-L1 均显著高表达。体外细胞实验敲低 FOXJ2 后,PD-L1 在 mRNA 及蛋白水平的表达均下降。ChIP 实验验证了 FOXJ2 对 PD-L1 的直接相互作用。MKN45 细胞与人 T 细胞共培养后,下调胃癌细胞中的 FOXJ2 表达,使 T 细胞对肿瘤细胞的杀伤能力增强;流式细胞术发现肿瘤细胞中的 PD-L1 下降,T 细胞中 TNF- α 和 IFN- γ 的表达升高。另一方面,免疫荧光揭示了 FOXJ2 与 CD8⁺ T 细胞的浸润关系,即胃癌患者中高表达 FOXJ2 蛋白,其 CD8⁺ T 细胞的浸润明显降低。该发现与文献所报道的内容相一致,即癌细胞中的 PD-L1 与 PD-1 之间的结合能够激活含有 Src 同源区 2 结构域的磷酸酶 (SPH2) 细胞受体(TCR)通路,从而抑制 T 细胞活性^[16],实现免疫逃逸。

PD-1/PD-L1 免疫检查点的相互作用是肿瘤免疫逃逸的主要调节因子,阻断或下调肿瘤细胞中 PD-L1 的表达有利于打破免疫负调控,增强人体对肿瘤的免疫力。基因敲低和化学抑制信号通路的方法已被证明可有效抑制细胞内 PD-L1 的产生^[17]。本研究发现 FOXJ2 对 PD-L1 的调控关系是一种新的有前景的胃癌治疗策略。尽管近年来科学家们发现基于 PD-1/PD-L1 信号通路的免疫疗法在治疗多种人类癌症方面表现出前所未有的疗效,然而只有一部分患者对治疗表现出客观反应,一小部分患者完全反应^[18]。因此未来仍需进行体内试验观察 FOXJ2 对 PD-L1 的调控是否具有治疗潜力。然而,我们的研究仍存在一定的局限性。虽然初步揭示了 FOXJ2 对 PD-L1 的调控关系,其潜在的病理生理机制仍不清楚。因此,未来将更进一步探讨 FOXJ2 对 PD-L1 的表观调控机制。

参考文献:

- [1] Davern M, Lysaght J. Cooperation between chemotherapy and immunotherapy in gastroesophageal cancers[J]. Cancer Lett, 2020, 495: 89-99.
- [2] Cha JH, Chan LC, Li CW, et al. Mechanisms controlling PD-L1 expression in cancer[J]. Mol Cell, 2019, 76(3): 359-370.

- [3] Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, et al. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients; indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(49): 17174–17179.
- [4] Yu C, Chen LL, Yie L, et al. Targeting FoxM1 inhibits proliferation, invasion and migration of nasopharyngeal carcinoma through the epithelial-to-mesenchymal transition pathway[J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(5): 2402–2410.
- [5] Lei OY, Xiao SJ, Liu P, et al. Forkhead box C1 induces epithelial-mesenchymal transition and is a potential therapeutic target in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(6): 8003–8009.
- [6] Zhou ZJ, Zhang L, Xie B, et al. FOXC2 promotes chemoresistance in nasopharyngeal carcinomas via induction of epithelial mesenchymal transition[J]. *Cancer Lett*, 2015, 363(2): 137–145.
- [7] Li HX, Zheng CH, Jin M, et al. PD-1/PD-L1 axis as a potential therapeutic target for multiple sclerosis: a T cell perspective[J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15: 716747.
- [8] Smyth EC, Nilsson M, Grabsch HI, et al. Gastric cancer[J]. *Lancet*, 2020, 396(10251): 635–648.
- [9] 沙梦玲, 巩玉森. 程序性死亡配体 1、肿瘤浸润淋巴细胞、FoxP3+调节性 T 细胞在非小细胞肺癌中的表达及意义[J]. *肿瘤学杂志*, 2021, 27(1): 36–41.
Sha ML, Gong YS. Expression of programmed death ligand 1, tumor infiltrating lymphocyte and FoxP3+ regulatory T cell in non-small cell lung cancer and their significance [J]. *Journal of Chinese Oncology*, 2021, 27(1): 36–41.
- [10] Kaufmann E, Knöchel W. Five years on the wings of fork head[J]. *Mech Dev*, 1996, 57(1): 3–20.
- [11] Wang YY, Yang SY, Ni QC, et al. Overexpression of forkhead box J2 can decrease the migration of breast cancer cells[J]. *Cell Biochem*, 2012, 113(8): 2729–2737.
- [12] Qiang Y, Wang FR, Yan SJ, et al. Abnormal expression of Forkhead Box J2 (FOXJ2) suppresses migration and invasion in extrahepatic cholangiocarcinoma and is associated with prognosis[J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(6): 2449–2458.
- [13] Shan Y, Chang T, Shi S, et al. FoxJ2 overexpression is associated with poor prognosis, progression, and metastasis in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10: 3733–3741.
- [14] Qiu Xj, Ji B, Yang LX, et al. The role of FoxJ2 in the migration of human glioma cells[J]. *Pathol Res Pract*, 2015, 211(5): 389–397.
- [15] Yang QC, Cao XJ, Tao GH, et al. Effects of FOXJ2 on TGF-1-induced epithelial-mesenchymal transition through Notch signaling pathway in non-small lung cancer[J]. *Cell Biol Int*, 2017, 41(1): 79–83.
- [16] Schildberg FA, Klein SR, Freeman GJ, et al. Coinhibitory pathways in the B7-CD28 ligand-receptor family[J]. *Immunity*, 2016, 44(5): 955–972.
- [17] Wu YL, Chen WY, Xu ZP, et al. PD-L1 distribution and perspective for cancer immunotherapy-blockade, knock-down, or inhibition[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2022.
- [18] Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN, et al. Regulation and function of the PD-L1 checkpoint[J]. *Immunity*, 2018, 48(3): 434–452.