

转化生长因子 $\beta 1$ 对膀胱癌细胞增殖与迁移能力的影响及其机制

陈鑫磊 余永波 李鹏 牛海涛

(青岛大学附属医院泌尿外科, 山东 青岛 266003)

[摘要] 目的 探讨转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 对膀胱癌 T24 细胞增殖、迁移能力的影响及其机制。方法 以浓度为 0、1、5、10、20、40 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- $\beta 1$ 处理 T24 细胞 24 h, 采用 MTT 法检测细胞的增殖活性, 采用细胞划痕方法检测其迁移能力, 采用 Western blot 检测细胞中程序性死亡配体-1 (PD-L1) 蛋白的相对表达量; 使用浓度为 5 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- $\beta 1$ 处理 T24 细胞 0、0.5、1、2、6、24 h, 采用 Western blot 实验检测细胞 PD-L1 蛋白及磷酸化丝苏氨酸蛋白激酶 (p-AKT) 和磷酸化细胞外调节激酶 (p-ERK) 蛋白的相对表达量; 将 T24 细胞分为 A~C 组, A 组使用正常培养基培养, B 组培养基中加入终浓度为 5 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- $\beta 1$ 培养, C 组培养基加入终浓度为 5 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- $\beta 1$ 及 SB431542 培养, Western blot 方法检测 A~C 组细胞中 PD-L1 相对表达量; 将 T24 细胞分为 D~G 组, D 组使用正常培养基培养, E 组培养基中加入终浓度为 5 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- $\beta 1$ 培养, F 组培养基中加入终浓度为 5 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- $\beta 1$ 、AKT 抑制剂 MK2206 培养, G 组培养基加入终浓度 5 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- $\beta 1$ 、ERK 抑制剂 U0126 处理 T24 细胞, 均处理 24 h, Western blot 方法检测 D~G 组细胞中 p-AKT、p-ERK 和 PD-L1 相对表达量。结果 浓度 0、1、5、10、20、40 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- $\beta 1$ 处理 T24 细胞 24 h, 其他浓度的 TGF- $\beta 1$ 处理 T24 细胞的增殖能力相较于 0 $\mu\text{g/L}$ 时均显著增强 ($t=3.59\sim 12.18, P<0.05$), 各浓度之间 T24 细胞的迁移率没有显著差异 ($P>0.05$), 浓度为 5 $\mu\text{g/L}$ 时相较于其他浓度, PD-L1 蛋白表达明显升高 ($t=3.22\sim 5.64, P<0.05$); 浓度为 5 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- $\beta 1$ 处理 T24 细胞 0、0.5、1、2、6、24 h 后, T24 细胞 PD-L1 蛋白表达随时间延长逐渐升高 ($F=199.20, P<0.05$), 并且处理时间为 0.5 h 相较于其他处理时间, p-AKT、p-ERK 表达量显著升高 ($t=6.26\sim 64.24, P<0.05$); B 组与 A 组比较, T24 细胞 PD-L1 蛋白表达水平明显升高 ($t=31.24, P<0.05$), C 组与 B 组比较, PD-L1 蛋白的表达水平降低 ($t=17.04, P<0.05$); E 组与 D 组比较, T24 细胞的 PD-L1、p-AKT、p-ERK 蛋白水平明显升高 ($t=9.44\sim 37.29, P<0.05$), G 组与 E 组比较, p-AKT、PD-L1 蛋白表达水平显著降低 ($t=104.40, 6.74, P<0.05$); F 组与 E 组比较, p-ERK、PD-L1 蛋白表达水平显著降低 ($t=24.26, 17.01, P<0.05$)。结论 TGF- $\beta 1$ 可以促进膀胱癌 T24 细胞增殖和细胞内 PD-L1 表达, 不影响其迁移, 其作用机制可能是通过促进细胞内 PD-L1、p-ERK 和 p-AKT 表达实现的。

[关键词] 膀胱肿瘤; 转化生长因子 $\beta 1$; 细胞增殖; 细胞运动; B7-H1 抗原; 蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶; 丝裂原活化蛋白激酶 3

[中图分类号] R737.14

[文献标志码] A

EFFECT OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR $\beta 1$ ON PROLIFERATION AND MIGRATION ABILITY OF BLADDER CANCER CELLS AND ITS MECHANISM

CHEN Xinlei, YU Yongbo, LI Peng, NIU Haitao (Department of Urology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) on the proliferation and migration ability of bladder cancer T24 cells and its mechanism. **Methods** T24 cells were treated with TGF- $\beta 1$ at concentrations of 0, 1, 5, 10, 20 and 40 $\mu\text{g/L}$ for 24 h. The proliferation activity of T24 cells was determined by methyl thiazolyl tetrazolium assay; their migration ability was detected by cell scratching method; the relative expression of programmed death ligand-1 (PD-L1) protein in T24 cells was detected by Western blot. T24 cells were treated with TGF- $\beta 1$ at a concentration of 5 $\mu\text{g/L}$ for 0, 0.5, 1, 2, 6 and 24 h. The relative expression of PD-L1 protein as well as phosphorylated serine-threonine protein kinase (p-AKT) and phosphorylated extracellular regulated kinase (p-ERK) proteins in T24 cells were detected by Western blot. T24 cells were divided into groups A to G. Group A was cultured with normal medium; group B was cultured with the medium containing TGF- $\beta 1$ at a final concentration of 5 $\mu\text{g/L}$; group C was cultured with the medium containing TGF- $\beta 1$ and SB431542 at a final concentration of 5 $\mu\text{g/L}$. The relative expression of PD-L1 in groups A to C was measured by Western blot. Group D was cultured with normal medium; group E was cultured with the medium containing TGF- $\beta 1$ at a final concentration of 5 $\mu\text{g/L}$; group F was cultured with the medium containing TGF- $\beta 1$ and AKT inhibitor MK2206 at a final concentration of 5 $\mu\text{g/L}$; group G was cultured with the medium

containing TGF- $\beta 1$ and ERK inhibitor U0126 at a final concentration of 5 $\mu\text{g/L}$. All T24 cells were treated for 24 h. The relative expression of p-AKT, p-ERK, and PD-L1 proteins in groups D to G was detected by Western blot. **Results** After T24 cells were treated

[收稿日期] 2022-11-19; [修订日期] 2023-01-18

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82071750); 国家自然科学基金面上项目(81972378)

[通讯作者] 牛海涛, Email: niuht0532@126.com

ted with TGF- β 1 at concentrations of 0, 1, 5, 10, 20 and 40 μ g/L for 24 h, the proliferation ability of T24 cells was significantly enhanced compared with that of T24 cells treated with TGF- β 1 at 0 μ g/L ($t=3.59-12.18, P<0.05$); the migration rate of T24 cells did not differ significantly between the concentrations ($P>0.05$); the PD-L1 protein expression was significantly higher in T24 cells treated with TGF- β 1 at 5 μ g/L than at other concentrations ($t=3.22-5.64, P<0.05$). After T24 cells were treated with TGF- β 1 at 5 μ g/L for 0, 0.5, 1, 2, 6 and 24 h, the PD-L1 protein expression in T24 cells gradually increased with time ($F=199.20, P<0.05$), and the p-AKT and p-ERK expression was significantly higher at 0.5 h than at other time points ($t=6.26-64.24, P<0.05$); the expression level of PD-L1 protein in T24 cells was significantly higher in group B than in group A ($t=31.24, P<0.05$) and decreased in group C compared with group B ($t=17.04, P<0.05$); the levels of PD-L1, p-AKT, and p-ERK proteins in T24 cells were significantly higher in group E than in group D ($t=9.44-37.29, P<0.05$), while the expression levels of p-AKT and PD-L1 proteins were significantly lower in group G than in group E ($t=104.40, 6.74, P<0.05$); the expression levels of p-ERK and PD-L1 proteins were significantly decreased in group F compared with group E ($t=24.26, 17.01, P<0.05$). **Conclusion** TGF- β 1 promotes the proliferation of bladder cancer T24 cells and PD-L1 expression in the cells without affecting their migration. The mechanism of action may be achieved by promoting the expression of PD-L1, p-AKT, and p-ERK in the cells.

[KEY WORDS] Urinary bladder neoplasms; Transforming growth factor beta1; Cell proliferation; Cell movement; B7-H1 antigen; Protein serine-threonine kinases; Mitogen-activated protein kinase 3

膀胱癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤之一,近年其发病率和死亡率呈现逐年增高的趋势^[1-2]。随着近年来医学技术不断发展,肿瘤免疫治疗已取得一定成效,为膀胱癌的治疗提供了新思路。转化生长因子 β 1(TGF- β 1)是一种多功能生长抑制因子,其在肿瘤早期能够促进正常细胞的分化并且能够抑制肿瘤细胞增殖,而在肿瘤晚期,TGF- β 1 则通过促进上皮-间充质转化(EMT)、刺激血管生成、诱导免疫抑制与肿瘤微环境形成等过程,发挥促进肿瘤进展的作用^[3-4]。PD-L1 是一种免疫检查点关键蛋白,与 T 细胞上的程序性死亡配体 1(PD-1)结合,导致肿瘤免疫抑制^[5]。目前关于 TGF- β 1 与膀胱癌相关性的研究并不多,本研究旨在探讨 TGF- β 1 对膀胱癌 T24 细胞增殖、迁移能力的影响及其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 细胞与试剂

膀胱癌细胞 T24 细胞系购买于中国科学院上海生物研究所细胞资源中心;TGF- β 1、SB431542、MK2206、U0126 购自美国 MedChemExpress 公司;Ecl 显影试剂购自美国 Millipore 公司;PD-L1、磷酸化的丝苏氨酸蛋白激酶(p-AKT)、磷酸化的细胞外调节激酶(p-ERK)蛋白、 α 肌动蛋白(α -ACTIN)抗体购自美国 CST 公司;二抗购自美国 Jackson ImmunoResearch 公司。

1.2 细胞培养

人膀胱癌细胞系 T24 细胞在 37 $^{\circ}$ C、含体积分数 0.05 CO₂ 条件下,在 RPMI1640 培养基(含体积分数 0.10 胎牛血清、 1×10^8 U/L 链霉素和 100 g/L 青霉素)中进行培养,当细胞密度到达 80% 以上,使用胰蛋白酶进行消化,使贴壁的 T24 细胞悬浮,加

入胎牛血清终止胰蛋白酶消化,以 1 000 r/min 离心 5 min 后重悬,细胞计数后进行后续实验。

1.3 MTT 法检测 TGF- β 1 对 T24 细胞的增殖能力的影响

取对数生长期的 T24 细胞均匀接种于 96 孔板(5 000 个/孔)内,继续培养 8 h 待 T24 细胞贴壁后;加入终浓度为 0、1、5、10、20、40 μ g/L 的 TGF- β 1 继续培养 24 h 后,每种浓度分别设置 5 个复孔;加入 20 μ L MTT 溶液(5 g/L)4 h 后,弃上清液;每孔加 150 μ L 二甲基亚砷,摇床上低速振荡 10 min,以酶联免疫检测仪检测波长 490 nm 处各孔吸光度值。

1.4 细胞划痕实验检测 TGF- β 1 对 T24 细胞迁移能力的影响

取对数生长期的 T24 细胞均匀接种于 12 孔板(25 000 个/孔)内培养,待细胞密度大于 90% 后弃上清液,PBS 清洗后,更换为无血清的 RPMI 1640 培养液培养,加入 0、1、5、10、20、40 μ g/L 的 TGF- β 1 培养 24 h 后,使用倒置显微镜 4 倍视野下观察细胞划痕愈合情况。

1.5 Western blot 方法检测 TGF- β 1 对于 T24 细胞 PD-L1 蛋白表达影响

按照 1.4 方法以终浓度 0、1、5、10、20、40 μ g/L 的 TGF- β 1 处理 T24 细胞 24 h,提取细胞中的总蛋白;将对数生长期的 T24 细胞分为 A~C 组,A 组使用正常培养基培养,B 组培养基中加入终浓度为 5 μ g/L 的 TGF- β 1 培养,C 组培养基中加入终浓度为 5 μ g/L 的 TGF- β 1 以及 SB431542 培养,均处理 24 h 后,提取细胞总蛋白。分别对以上蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,PVDF 转膜,然后封闭 0.5 h,使用 PD-L1 蛋白单克隆抗体进行孵育过夜后,以 α -ACTIN 为内参照,TBST 洗膜 3 次,二抗室温孵育

2 h, TBST 洗膜 3 次, ECL 显影液显影, 拍照并保存, 使用 Image J 软件对成像进行灰度值分析。

1.6 Western blot 方法检测 TGF-β1 对 T24 细胞中 p-ERK、p-AKT、PD-L1 蛋白表达的影响

按 1.4 方法以质量浓度 5 μg/L 的 TGF-β1 处理 T24 细胞 0、0.5、1、2、6、24 h 后, 提取细胞中总蛋白; 将对数生长期的膀胱癌 T24 细胞分为 D~G 组, D 组使用正常培养基培养, E 组培养基中加入终浓度为 5 μg/L 的 TGF-β1 培养, F 组培养基中加入终浓度为 5 μg/L 的 TGF-β1、AKT 抑制剂 MK2206 培养, G 组培养基中加入终浓度 5 μg/L 的 TGF-β1、ERK 抑制剂 U0126 处理 T24 细胞, 均培养 24 h 以后提取总蛋白; 分别对以上蛋白进行 Western blot 方法检测, 以 α-actin 作为内参照, 检测 p-ERK、p-AKT 以及 PD-L1 蛋白的表达情况。

1.7 统计学分析

使用统计学软件 SPSS 19 对数据进行统计学分析, 通过 GraphPad Prism 8 软件作图。实验独立重复 3 次, 结果取均值。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同浓度 TGF-β1 对 T24 细胞增殖能力影响

以浓度 0、1、5、10、20、40 μg/L 的 TGF-β1 处理 T24 细胞的吸光度值分别为 0.92 ± 0.02、1.02 ± 0.02、1.18 ± 0.06、1.23 ± 0.03、1.24 ± 0.06、1.16 ± 0.02。各浓度间 T24 细胞的增殖能力比较差异具有显著性 ($F = 48.30, P < 0.05$), 其他浓度的 TGF-β1 处理 T24 细胞的增殖能力相较于 0 μg/L 时均显著增强 ($t = 3.59 \sim 12.18, P < 0.05$)。

2.2 不同浓度 TGF-β1 对 T24 细胞迁移能力影响

浓度 0、1、5、10、20、40 μg/L 的 TGF-β1 处理 T24 细胞的迁移率分别为 0.19 ± 0.01、0.18 ± 0.01、0.20 ± 0.01、0.21 ± 0.01、0.24 ± 0.01、0.19 ± 0.01, 各

浓度间比较, T24 细胞的迁移率没有显著差异 ($P > 0.05$)。见图 1。

2.3 各处理组 T24 细胞中 PD-L1 表达情况比较

以浓度 0、1、5、10、20、40 μg/L 的 TGF-β1 处理 T24 细胞 24 h 后, T24 细胞中 PD-L1 的表达量分别为 0.84 ± 0.17、1.21 ± 0.16、1.53 ± 0.18、1.06 ± 0.12、1.09 ± 0.12、1.14 ± 0.11。各浓度间比较, T24 细胞的 PD-L1 表达量差异均具有显著性 ($F = 6.83, P < 0.05$), 在 TGF-β1 浓度为 5 μg/L 时相较于其他浓度, 差异具有显著性 ($t = 3.22 \sim 5.64, P < 0.05$)。浓度为 5 μg/L 的 TGF-β1 处理 T24 细胞 0、0.5、1、2、6、24 h 后, PD-L1 的相对表达量分别为 0.41 ± 0.04、0.51 ± 0.01、0.57 ± 0.01、0.68 ± 0.02、0.76 ± 0.02、1.09 ± 0.02。不同处理时间比较, T24 细胞 PD-L1 表达量均有显著差异, 且随时间延长逐渐升高 ($F = 199.20, P < 0.05$)。

A~C 组 T24 细胞中 PD-L1 蛋白的相对表达量分别为 0.67 ± 0.02、1.07 ± 0.01、0.85 ± 0.03, 三组间比较差异具有显著性 ($F = 244.60, P < 0.05$), 其中 B 组与 A 组比较, T24 细胞 PD-L1 蛋白表达量显著升高 ($t = 31.24, P < 0.05$), C 组与 B 组比较, T24 细胞 PD-L1 蛋白表达量降低 ($t = 17.04, P < 0.05$)。

D~G 组 T24 细胞中 PD-L1 蛋白的相对表达量分别为 0.65 ± 0.03、1.01 ± 0.03、0.76 ± 0.02、0.86 ± 0.01, 4 组间比较差异具有显著的意义 ($F = 115.20, P < 0.05$), 其中 E 组与 D 组比较, T24 细胞 PD-L1 表达量显著升高 ($t = 25.37, P < 0.05$), F、G 组与 E 组比较, 细胞 PD-L1 蛋白表达量均显著降低 ($t = 17.01、6.74, P < 0.05$)。

2.4 各处理组 T24 细胞中 p-AKT、p-ERK 的表达情况比较

以浓度为 5 μg/L 的 TGF-β1 处理 T24 细胞 0、0.5、1、2、6、24 h 后, 细胞中 p-AKT 的相对表达量分别为 0.34 ± 0.02、1.18 ± 0.02、0.94 ± 0.01、0.84 ± 0.03、0.37 ± 0.02、0.14 ± 0.02, p-ERK 的相对表达量

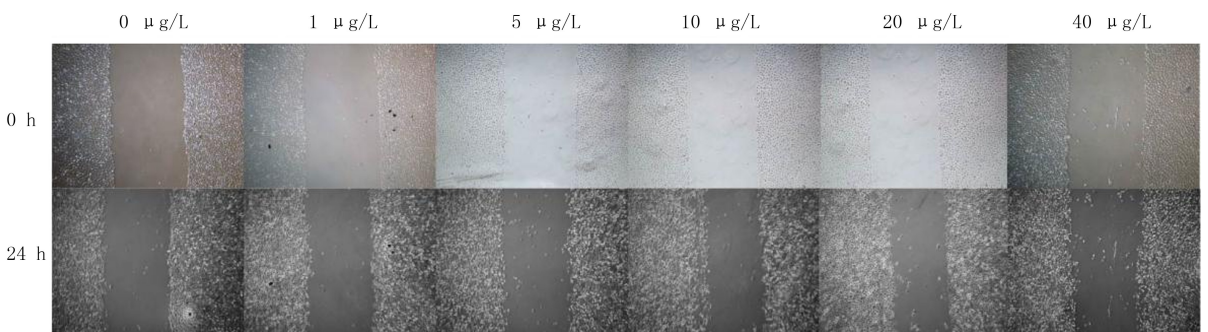


图 1 不同浓度的 TGF-β1 对 T24 细胞迁移能力的影响

分别为 0.34 ± 0.02 、 1.11 ± 0.02 、 0.96 ± 0.02 、 0.86 ± 0.01 、 0.66 ± 0.02 、 0.64 ± 0.06 。各处理时间相比较, p-AKT 及 p-ERK 表达量均具有显著性差异 ($F = 1\ 267.00$ 、 252.00 , $P < 0.05$), 其中加入 $5\ \mu\text{g/L}$ 的 TGF- β 1 处理 T24 细胞 0.5 h 时, 相较于其他处理时间, p-AKT、p-ERK 表达量均显著升高 ($t = 6.26 \sim 64.24$, $P < 0.05$)。

D~G 组 T24 细胞中 p-AKT 蛋白的相对表达量分别为 0.63 ± 0.02 、 0.94 ± 0.02 、 0.99 ± 0.01 、 0.07 ± 0.01 , p-ERK 蛋白的相对表达量分别为 0.80 ± 0.02 、 0.93 ± 0.03 、 0.60 ± 0.01 、 1.20 ± 0.03 , 4 组间比较, T24 细胞中 p-AKT、p-ERK 蛋白的相对表达量差异均具有显著性 ($F = 2\ 577.00$ 、 338.40 , $P < 0.05$); E 组与 D 组比较, T24 细胞中 p-AKT、p-ERK 表达显著升高 ($t = 37.29$ 、 9.44 , $P < 0.05$); G 组与 E 组比较, T24 细胞中 p-AKT 蛋白表达显著性降低 ($t = 104.40$, $P < 0.05$); F 组与 E 组相比较, T24 细胞中 p-ERK 蛋白表达显著降低 ($t = 24.26$, $P < 0.05$)。

3 讨 论

TGF- β 作为一种免疫抑制因子, 在促进肿瘤转移和抵抗治疗中发挥了重要作用^[6]。TGF- β 是体内许多细胞可以分泌的具有多种功能的多肽, 其可以影响细胞的生长、分化、黏附、迁移和凋亡等^[7]。TGF- β 在肿瘤的形成与发展中发挥两种不同的调节作用, 在肿瘤形成阶段, TGF- β 维持免疫自耐受性, 并通过调节上皮增殖、凋亡和分化来抑制肿瘤进展^[8-9], 而随着肿瘤的不断发展, TGF- β 的激活和信号传导发生异常, 导致其刺激肿瘤微环境 (TME) 内的血管生成、EMT、肿瘤成纤维细胞活化以及免疫抑制来促进疾病进展^[10-12]。TME 当中 TGF- β 的高表达与临床结局差以及肿瘤转移的可能性增高相关^[13-14], 并且有研究表明在膀胱癌中, TGF- β 1 的高表达与患者的预后不良相关^[15]。本研究结果显示, TGF- β 可以促进膀胱癌 T24 细胞的增殖, 但对 T24 细胞的迁移无显著影响。

已有研究表明 TGF- β 1 与 PD-L1 之间存在相关机制和功能联系^[16]。PD-1/PD-L1 检查点抑制剂可以特异性抑制 PD-1 和 PD-L1 的结合, 激活 T 细胞活性发挥对肿瘤的杀伤作用^[5]。在肿瘤患者中, 肿瘤细胞的 PD-L1 与 T 细胞表面的 PD-1 结合以后, T 细胞不能识别并清除肿瘤细胞, 从而促使肿瘤逃避了机体的免疫系统, 导致肿瘤细胞发生免疫逃逸^[17], 已有研究发现敲除小鼠的 TGF- β 基因会引

起严重的自身免疫性疾病^[18]。PD-1 对机体调节具有双重作用, 一方面其可以避免无效或者有害的免疫应答, 并与免疫耐受有关, 另一方面, 它可以通过阻碍保护性免疫导致肿瘤细胞的快速增长^[19]。PD-L1 是 PD-1 的配体, 通常在炎症时由部分免疫细胞和上皮细胞表达, 但其在肿瘤中表达则是肿瘤细胞的“自适应免疫制剂”, 发挥抗肿瘤作用^[20]。

本研究通过使用 1 、 5 、 10 、 20 、 $40\ \mu\text{g/L}$ 浓度的 TGF- β 1 处理膀胱癌 T24 细胞, 结果示各个浓度的 TGF- β 1 均提高了细胞中 PD-L1 蛋白的表达水平。随后, 在 $5\ \mu\text{g/L}$ 浓度的 TGF- β 1 处理 0、0.5、1、2、6、24 h 时, 观察到 PD-L1 随时间延长表达水平显著升高。为进一步研究 PD-L1 的表达水平与 TGF- β 1 的关系, 同时又使用了 TGF- β 1 与 TGF- β 1 抑制剂 SB4311542 进行处理, 发现比单独使用 TGF- β 1 处理, 其促进 PD-L1 表达的效果受到抑制, 说明 TGF- β 1 能够促进 T24 细胞 PD-L1 蛋白的表达。为了研究 TGF- β 1 促进 T24 细胞 PD-L1 蛋白的表达是否与 p-ERK、p-AKT 有关, 本研究使用浓度 $5\ \mu\text{g/L}$ 的 TGF- β 1 处理 T24 细胞, 检测 T24 细胞中 p-ERK、p-AKT 蛋白的水平, 发现在 0.5 h 时 p-ERK、p-AKT 蛋白表达已经显著升高; 为了进一步证实这个观点, 本研究又分别使用 AKT 抑制剂 MK2206 和 ERK 抑制剂 U0126 对 T24 细胞进行处理以后, 发现抑制 p-ERK、p-AKT 表达后, TGF- β 1 促进 T24 细胞中 PD-L1 表达水平的能力受到抑制, 可见 TGF- β 1 可能是通过 ERK、AKT 通路提高 T24 细胞 PD-L1 的表达。在对乳腺癌和肝癌研究中发现, PD-L1 与 TGF- β 1 表达显著正相关, 阻断 TGF- β 后, PD-L1 表达水平显著降低^[21-22]。由此可以认为 TGF- β 1 是通过促进膀胱癌 T24 细胞中 PD-L1 表达, 进而促进肿瘤细胞生长和发展, 但具体机制仍需进一步研究。

综上所述, TGF- β 1 可以促进膀胱癌 T24 细胞的增殖, 不影响其迁移, TGF- β 1 可能是通过促进细胞内 PD-L1、p-ERK 和 p-AKT 的表达促进肿瘤的生长和发展。

作者声明: 陈鑫磊、余永波、李鹏、牛海涛参与了研究设计; 陈鑫磊、牛海涛参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文。所有作者均声明不存在利益冲突。

【参考文献】

- [1] MAHDAVIFAR N, GHONCHEH M, PAKZAD R, et al. Epidemiology, incidence and mortality of bladder cancer and their relationship with the development index in the world[J].

Asian Pac J Cancer Prev, 2016,17(1):381-386.

[2] MARTINEZ RODRIGUEZ R H, BUISAN RUEDA O, IBARZ L. Bladder cancer: Present and future[J]. Med Clinica Engl Ed, 2017,149(10):449-455.

[3] HAQUE S, MORRIS J C. Transforming growth factor- β : A therapeutic target for cancer[J]. Hum Vaccines Immunother, 2017,13(8):1741-1750.

[4] ITATANI Y, KAWADA K, SAKAI Y. Transforming growth factor- β signaling pathway in colorectal cancer and its tumor microenvironment[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(23):5822.

[5] JIANG Y S, CHEN M, NIE H, et al. PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: Clinical implications and future considerations[J]. Hum Vaccin Immunother, 2019,15(5):1111-1122.

[6] NEWSTED D, BANERJEE S, WATT K, et al. Blockade of TGF- β signaling with novel synthetic antibodies limits immune exclusion and improves chemotherapy response in metastatic ovarian cancer models [J]. Oncoimmunology, 2019, 8(2): e1539613.

[7] SUZUKI H I, KIYONO K, MIYAZONO K. Regulation of autophagy by transforming growth factor- β (TGF- β) signaling [J]. Autophagy, 2010,6(5):645-647.

[8] BATLLE E, MASSAGUE J. Transforming growth factor- β signaling in immunity and cancer[J]. Immunity, 2019,50(4): 924-940.

[9] LI M O, FLAVELL R A. Contextual regulation of inflammation: A duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10[J]. Immunity, 2008, 28(4):468-476.

[10] PRINCIPE D R, DOLL J A, BAUER J, et al. TGF- β : Duality of function between tumor prevention and carcinogenesis[J]. Natl Cancer Inst, 2014,106(2):369.

[11] COLAK S, TEN DIJKE P. Targeting TGF- β signaling in cancer[J]. Trends Cancer, 2017,3(1):56-71.

[12] AKHURST R J, HATA A. Targeting the TGF β signalling pathway in disease[J]. Nat Rev Drug Discov, 2012,11(10): 790-811.

[13] CALON A, LONARDO E, BERENQUER-LLERGO A, et al. Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer[J]. Nat Genet, 2015, 47(4):320-329.

[14] AGAJANIAN M, RUNA F, KELBER J A. Identification of a PEAK1/ZEB1 signaling axis during TGF β /fibronectin-induced EMT in breast cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015,465(3):606-612.

[15] STOJNEV S, KRSTIĆ M, ĆUKURANOVIĆ KOKORIS J, et al. Prognostic impact of canonical TGF- β signaling in urothelial bladder cancer [J]. Medicina (Kaunas), 2019, 55(6):302.

[16] THOMA C. Bladder cancer: Mechanisms of anti-PDL1 resistance[J]. Nat Rev Urol, 2018,15(4):201.

[17] HAN Y Y, LIU D D, LI L H. PD-1/PD-L1 pathway: Current researches in cancer[J]. Am J Cancer Res, 2020,10(3):727-742.

[18] COOPER W A, TRAN T, VILAIN R E, et al. PD-L1 expression is a favorable prognostic factor in early stage non-small cell carcinoma[J]. Lung Cancer, 2015,89(2):181-188.

[19] SALMANINEJAD A, KHORAMSHAHI V, AZANI A, et al. PD-1 and cancer: Molecular mechanisms and polymorphisms[J]. Immunogenetics, 2018,70(2):73-86.

[20] OHAEGBULAM K C, ASSAL A, LAZAR-MOLNAR E, et al. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway[J]. Trends Mol Med, 2015, 21(1):24-33.

[21] SHIMA T, SHIMODA M, SHIGENOBU T, et al. Infiltration of tumor-associated macrophages is involved in tumor programmed death-ligand 1 expression in early lung adenocarcinoma[J]. Cancer Sci, 2020,111(2):727-738.

[22] CHATTERJEE S, CHATTERJEE A, JANA S, et al. Transforming growth factor beta orchestrates PD-L1 enrichment in tumor-derived exosomes and mediates CD8 T-cell dysfunction regulating early phosphorylation of TCR signalome in breast cancer[J]. Carcinogenesis, 2021,42(1):38-47.

(本文编辑 耿波 厉建强)

(上接第 110 页)

[23] ZHOU S Y, LAN Y, LI Y Q, et al. Hypoxic tumor-derived exosomes induce M2 macrophage polarization via PKM2/AMPK to promote lung cancer progression [J]. Cell Transplant, 2022,31:9636897221106998.

[24] WANG X, ZHOU Y, DONG K, et al. Exosomal lncRNA HMMR-AS1 mediates macrophage polarization through miR-147a/ARID3A axis under hypoxia and affects the progression of hepatocellular carcinoma[J]. Environ Toxicol, 2022,37(6): 1357-1372.

[25] HILL M, TRAN N. miRNA interplay: Mechanisms and consequences in cancer [J]. Dis Model Mech, 2021, 14(4): dmm047662.

[26] LI X Y, SONG H X, LIU Z R, et al. miR-1260b promotes cell migration and invasion of hepatocellular carcinoma by tar-

geting the regulator of G-protein signaling 22 [J]. Biotechnol Lett, 2018,40(1):57-62.

[27] ZHANG H B, ZHANG X L, YU J Y. Integrated analysis of altered lncRNA, circRNA, microRNA, and mRNA expression in hepatocellular carcinoma carrying TERT promoter mutations[J]. J Hepatocell Carcinoma, 2022,9:1201-1215.

[28] SHEN S, HUANG J, XU C, et al. ERK modulates macrophage polarization and alters exosome miRNA expression in diabetic nephropathy[J]. Clinical Laboratory, 2021,67(12).

[29] YOU Y, ZOU M, ZHOU ZHIHANG, et al. Hypoxia-induced exosomes promote hepatocellular carcinoma proliferation and metastasis via miR-1273f transfer[J]. Exp Cell Res, 2019,385(1):111649.

(本文编辑 耿波 厉建强)