

## miR-146a-5p 靶向 *SMAD4* 抑制 人前列腺癌细胞系 PC-3 增殖和侵袭

刘彼得, 李 循, 王书恒, 靳宏勇, 张小安, 李九智\*

新疆维吾尔自治区人民医院 泌尿中心 泌尿外科研究室, 新疆 乌鲁木齐 830001

**摘要:**目的 探究 miR-146a-5p 可否靶向调控 *SMAD4* 对前列腺癌细胞增殖、侵袭的影响及其机制。方法 RT-qPCR 检测前列腺癌组织及各细胞系中 miR-146a-5p 的表达量,分析其表达与 Gleason 评分的关系;MTT 实验、BrdU 实验、集落生成实验、划痕实验、Transwell 小室法及裸鼠成瘤实验分析 miR-146a-5p 对前列腺癌细胞增殖、成瘤、迁移及侵袭等能力的影响;RT-qPCR 检测组织 *SMAD4* 的表达量,分析其与 miR-146a-5p 表达量的关系;荧光素酶报告基因实验分析 miR-146a-5p 与 *SMAD4* 的靶向关系,功能回复实验验证 miR-146a-5p/*SMAD4* 信号轴在前列腺癌中的作用;Western blot 检测 miR-146a-5p 及 *SMAD4* 对细胞核内 *SMAD2/SMAD3* 复合体表达量的影响,并通过荧光素酶报告基因实验及染色质免疫共沉淀实验探究 miR-146a-5p/*SMAD4/SMAD2/SMAD3* 信号轴对 *TIM3* 的靶向调控作用。结果 miR-146a-5p 在前列腺癌组织及细胞系中低表达( $P<0.05$ ),其表达量与 Gleason 评分负相关( $P<0.05$ ),且在 PC-3 细胞中的表达量最低;miR-146a-5p 抑制 PC-3 细胞的增殖及侵袭能力( $P<0.05$ );*SMAD4* 为 miR-146a-5p 的下游靶基因;*SMAD4* 促进 *SMAD2/SMAD3* 复合体入核并靶向激活 *TIM3*。结论 miR-146a-5p 靶向调控 *SMAD4* 抑制 PC-3 细胞的增殖及侵袭,*SMAD2/SMAD3/TIM3* 信号通路可能为其下游机制。

**关键词:** 前列腺癌; miR-146a-5p; *SMAD4*; *TIM3*

中图分类号: R737.25 文献标志码: A

DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2023.08.1215

## miR-146a-5p inhibits proliferation and invasion of prostate cancer cell line PC-3 by targeting *SMAD4*

LIU Bide, LI Xun, WANG Shuheng, JIN Hongyong, ZHANG Xiao'an, LI Jiuzhi\*

Department of Urology, Laboratory of Urology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830001, China

**Abstract: Objective** To explore the inhibition effect and mechanism of miR-146a-5p on proliferation and invasion of prostate cancer (PCa) cell line PC-3 by targeting *SMAD4*. **Methods** RT-qPCR was used to detect the expression of miR-146a-5p in PCa tissues and cell lines. The relevance of miR-146a-5p expression with Gleason score was also analyzed. MTT, BrdU experiment, cell colony formation experiment, scratch experiment, Transwell assay and nude mouse xenograft model experiment were conducted to detect the effect of miR-146a-5p on cell proliferation, tumorigenicity, migration and invasion. The expression of *SMAD4* in PCa tissues was detected by RT-qPCR, and the targeting relationship of *SMAD4* and miR-146a-5p was confirmed by double luciferase reporter gene assay and rescue

收稿日期: 2022-08-20 修回日期: 2023-01-06

基金项目: 新疆维吾尔自治区科学技术厅自治区自然科学基金(2017D01C102)

\* 通信作者 (corresponding author): xjljiuzhi@163.com

experiment. Western blot was used to detect the expression of *SMAD2/SMAD3* complex in nucleus affected by miR-146a-5p and *SMAD4*. Finally, double luciferase reporter gene assay and ChIP experiment were performed to examine the targeting regulation of *TIM3* by miR-146a-5p/*SMAD4/SMAD2/SMAD3* signaling axis. **Results** miR-146a-5p was low expressed in PCa tissues and cell lines; its expression was negatively correlated to Gleason score and had the lowest expression in PC-3 cells. miR-146a-5p inhibited the proliferation and invasion of PC-3 cells by targeting *SMAD4*. *SMAD2/SMAD3/TIM3* axis seemed to be the downstream mechanism of miR-146a-5p/*SMAD4* signaling pathway. **Conclusions** miR-146a-5p can inhibit the proliferation and invasion of PC-3 cells by targeting *SMAD4*, and the downstream mechanism might be related to the *SMAD2/SMAD3/TIM3* signaling pathway.

**Key words:** prostate cancer; miR-146a-5p; *SMAD4*; *TIM3*

前列腺癌 (prostate cancer, PCa) 为男性生殖系统最常见的恶性肿瘤,其发病率位居全球第二,是男性癌症患者死亡的第五大原因<sup>[1]</sup>。目前对于进展性 PCa 的治疗方法疗效有限,因此探究 PCa 进展的关键基因及信号通路,并进行个体化靶向精准治疗具有重要的意义。大量研究证实 miRNA 对 PCa 的发生及进展起到调控作用,有研究发现 miR-146a-5p 为 PCa 的抑癌基因,但其对 PCa 抑制作用的机制尚未完全阐明<sup>[2,3]</sup>。*SMAD4* 对肿瘤的发生及转移起重要作用,且有研究表明 *SMAD4* 可调控 PCa 的进展<sup>[4]</sup>。但 miR-146a-5p 能否通过靶向调控 *SMAD4* 从而促进 PCa 的进展目前尚不明确,故本研究探索了 miR-146a-5p 对 *SMAD4* 的靶向调控作用及其对 PCa 细胞生物学功能的影响,并初步探究了其深层分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 临床标本、细胞及裸鼠:收集 2019 年 04 月至 2020 年 04 月在新疆维吾尔自治区人民医院明确诊断为 PCa 并行根治性切除术的组织 30 例,所有患者术前均未接受内分泌治疗、放射治疗或化学治疗,同期以年龄进行 1:1 匹配,纳入 30 例良性前列腺增生 (benign prostatic hyperplasia, BPH) 组织。该研究已获得新疆维吾尔自治区人民医院伦理委员会批准 (2019030629),并取得患者知情同意。人前列腺正常上皮细胞系 RWPE-1 及人前列腺癌细胞系 22RV1、PC-3、Ava-82、C4-2、Du-145 和 RM-1 (中国科学院上海细胞研究所细胞库);SPF 级 BABL/c nude 雄性裸鼠 [兰州兽医研究所实验动物中心,合格证号:SYXK(甘)2020-0010],6~8 周龄,体质量

18~20 g。

1.1.2 主要试剂:DMEM 培养基 (Hyclone 公司);胎牛血清 (Gibco 公司);PCR 相关试剂 (TaKaRa 公司);BrdU 试剂、RIPA 裂解液和 BCA 试剂盒 (上海碧云天生物技术公司);引物 (上海生工生物工程有限公司);miR-146a-5p mimic、inhibitor 及阴性对照,*SMAD4*-siRNA、*SMAD4* 过表达慢病毒载体及阴性对照 (上海吉玛基因生物公司);荧光素酶报告基因载体、报告质粒及双荧光素酶活性检测试剂盒 (Promega 公司);ChIP 试剂盒 (Cell Signaling Technologies 公司);抗 *SMAD4* 抗体 (1:1 000)、抗 *SMAD2+SMAD3* 抗体 (1:1 000)、抗 p84 抗体 (1:5 000) 及抗 GAPDH 抗体 (1:5 000) (Abcam 公司);HRP-山羊抗兔二抗 (1:1 000) 和 HRP-山羊抗小鼠二抗 (1:1 000) (北京中杉金桥生物技术有限公司)。

干细胞培养基配方:DMEM 培养基+20 ng/mL 人表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)+20 ng/mL 人碱性成纤维细胞生长因子 (human basic fibroblast growth factor, hBFGF)+1×B27+1% 双抗+4 μg/mL 人重组胰岛素。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞的分组及处理:在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养细胞。将 PC-3 细胞分为 miR-146a-5p mimic 组、mimic-NC 组、miR-146a-5p inhibitor 组、inhibitor-NC 组;miR-146a-5p inhibitor + *SMAD4*-siRNA 组、miR-146a-5p inhibitor + scramble 组和 inhibitor-NC + scramble 组;*SMAD4* 组、*SMAD4*-vector 组、*SMAD4*-siRNA 组和 scramble 组,使用 Lipofectamine 2000 试剂盒向对数期增殖的细胞进行转染。

1.2.2 RT-qPCR 检测 miR-146a-5p 和 SMAD4 等 mRNA 的表达:使用 Trizol 提取组织及细胞中总 RNA,按照荧光定量试剂盒说明进行 RT-qPCR, U6 为 miR-146a-5p 的内参, GAPDH 为 SMAD4 及其他因子的内参。

1.2.3 Western blot 检测 SMAD4、SMAD2/3 的蛋白表达:提取组织及细胞蛋白质,定量蛋白浓度,10% SDS/PAGE 分离后转膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h,再与一抗 4 °C 摇床孵育过夜,洗膜后二抗室温摇床孵育 1 h, ECL 显色,用化学发光凝胶成像系统成像。

1.2.4 MTT 法检测细胞活性:细胞培养至 24、48、72 及 96 h,分别加入 MTT 试剂后使用酶标仪检测 490 nm 吸光度值,以测定细胞的活性状态。

1.2.5 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromodeoxyuridine, BrdU)标记实验检测细胞增殖能力:细胞接种于 6 孔板,加入 0.03 μg/mL 的 BrdU 孵育 3 h,用多聚甲醛固定 10 min,然后用过氧化物酶结合的抗 BrdU 抗体孵育 90 min,细胞核用 DAPI 复染,在荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.6 集落生成实验检测细胞自我更新能力:细胞接种于 6 孔板(100 个/孔),使用干细胞培养基培养细胞 7 d,显微镜下观察细胞集落形成情况并计数。

1.2.7 划痕实验检测细胞迁移能力:细胞接种于 6 孔板,当细胞增殖汇合至 80%左右时,用 10 μL 枪头均匀在孔中央划痕,继续培养 24 h,显微镜下观察并拍照。

1.2.8 Transwell 小室法检测细胞侵袭能力:取对数期增殖的各组细胞制备单细胞悬液(浓度为  $1 \times 10^5$  个/100 μL),向上室加入 100 μL 细胞悬液(不含血清的培养基),下室加入含 10% 胎牛血清的培养液 600 μL,培养 24 h 后取出小室,使用 4% 多聚甲醛固定,并使用结晶紫染色染色,在显微镜下观察并拍照。

1.2.9 双荧光素酶报告基因实验检测荧光素酶活性:构建 SMAD4 及 TIM3 的野生型和突变型荧光素酶报告基因质粒,将各质粒按实验分组转染至细胞,24 h 后使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测荧光素酶的活性。

1.2.10 染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)实验检测 SMAD2/SMAD3 与下游基因的亲和力:按照 ChIP 试剂盒说明书操作,使用

SMAD2/SMAD3 复合体及 IgG 抗体进行免疫沉淀反应,纯化 DNA 并使用 RT-qPCR 进行检测。

1.2.11 构建 PCa 裸鼠成瘤模型:随机将裸鼠分为 miR vector 组和 miR-146a-5p mimic 组,每组 15 只。将各组细胞制备成单细胞悬液( $1 \times 10^6$  个/mL),1 mL 细胞悬液注射入裸鼠前肢腋部皮下(vector 组注入左侧,mimic 组在右侧)。每组取 5 只检测移植瘤生长情况:从第 6 天开始,每隔 3 天测量肿瘤直径并计算肿瘤体积[肿瘤体积( $\text{mm}^3$ )=长径(mm)×短径<sup>2</sup>( $\text{mm}^2$ )×0.5],6 周后处死小鼠并取出移植肿瘤称重;每组取 10 只荷瘤小鼠观察生存期。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,组织中相关因子表达量不服从正态分布,以中位数(范围)表示,使用秩和检验进行组间分析,余数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,使用 *t* 检验及单因素方差分析进行组间分析,使用 Kaplan-Meier 法分析 miR-146a-5p 对荷瘤小鼠生存期的影响。

## 2 结果

### 2.1 miR-146a-5p 在 PCa 组织及细胞中低表达

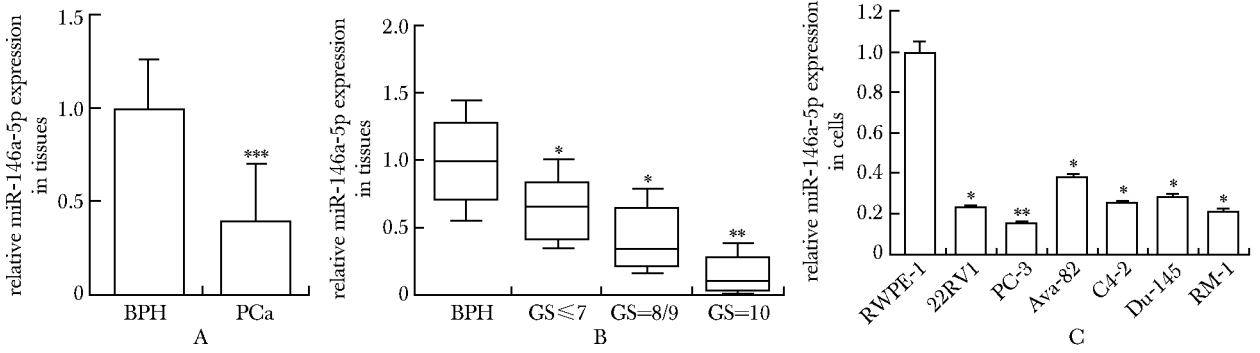
miR-146a-5p 在 PCa 组织中的表达量明显低于 BPH 组织( $P < 0.001$ )(图 1A),且其表达量随着 Gleason 评分的升高而显著降低(图 1B),PCa 细胞系中 miR-146a-5p 的表达明显低于前列腺正常上皮细胞,且 PC-3 细胞的表达量最低(图 1C),故选择 PC-3 细胞进行深入研究。

### 2.2 miR-146a-5p 抑制 PC-3 细胞的生物学功能

与对照组相比,miR-146a-5p mimic 显著抑制 PC-3 细胞的增殖、活性、自我更新能力、迁移及侵袭能力,而 miR-146a-5p inhibitor 明显提高了 PC-3 细胞的增殖、活性、自我更新能力、迁移及侵袭能力(图 2)。

### 2.3 SMAD4 为 miR-146a-5p 的下游靶基因

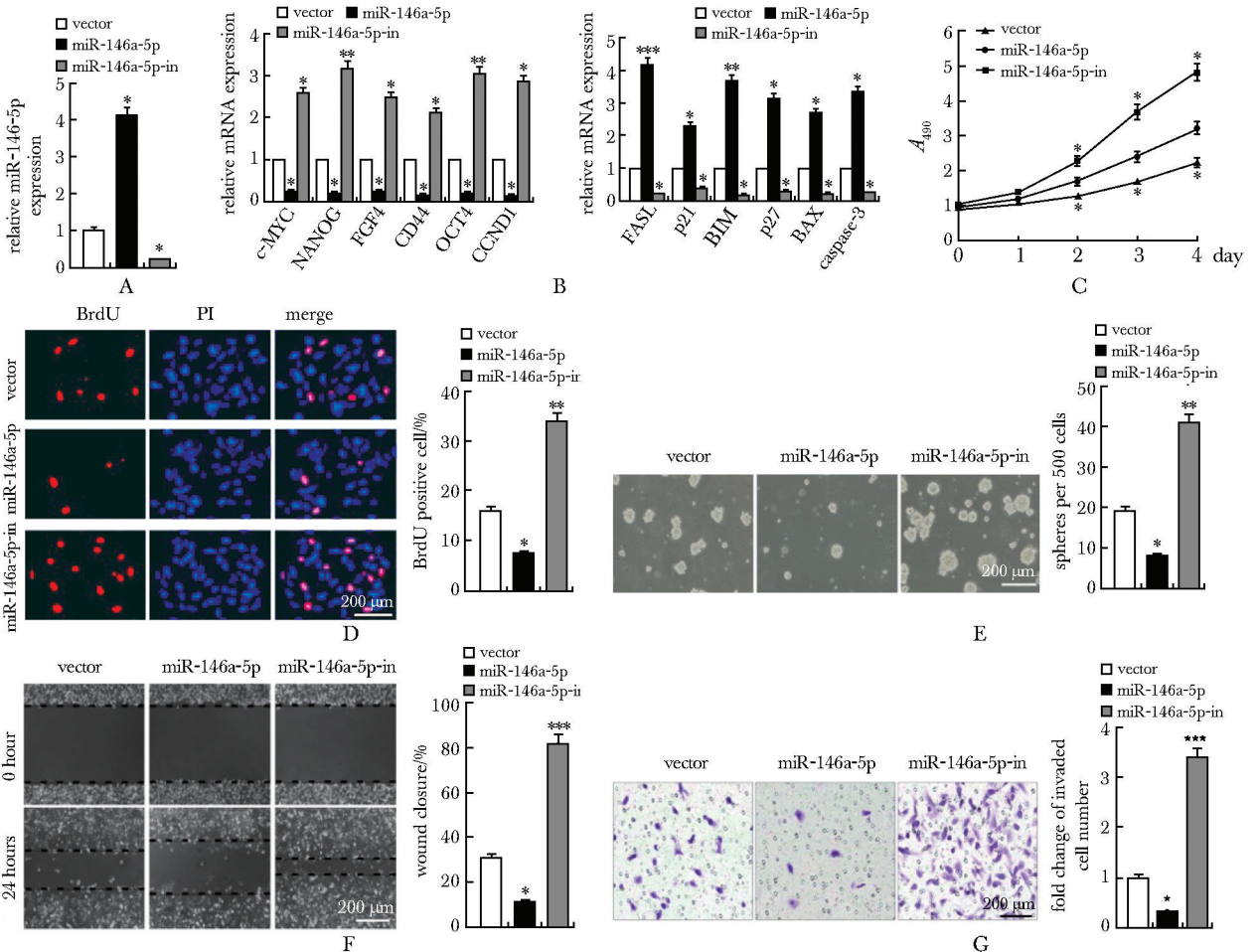
SMAD4 在 PCa 组织的表达明显高于 BPH 组织,且其表达与 miR-146a-5p 呈显著负相关(图 3A, B)。miR-146a-5p 可显著抑制 SMAD4 的蛋白表达,并能够明显抑制野生型 SMAD4 的荧光素酶活性,且 SMAD4-siRNA 能够显著抑制 miR-146a-5p inhibitor 对细胞侵袭能力的增强作用(图 3C~E)。



A. the expression of miR-146a-5p in PCa tissues [median (range),  $n=30$ ] and BPH tissues [median (range),  $n=30$ ] were detected by RT-qPCR;  $***P<0.001$  compared with BPH; B. the relationship between miR-146a-5p expression and Gleason score (GS) in PCa tissues;  $*P<0.05$  and  $**P<0.01$  compared with BPH respectively; C. the expression of miR-146a-5p in PCa cell lines were detected by RT-qPCR;  $*P<0.05$  and  $**P<0.01$  compared with RWPE-1 cells respectively.

图1 miR-146a-5p 在 PCa 组织及细胞中的表达情况

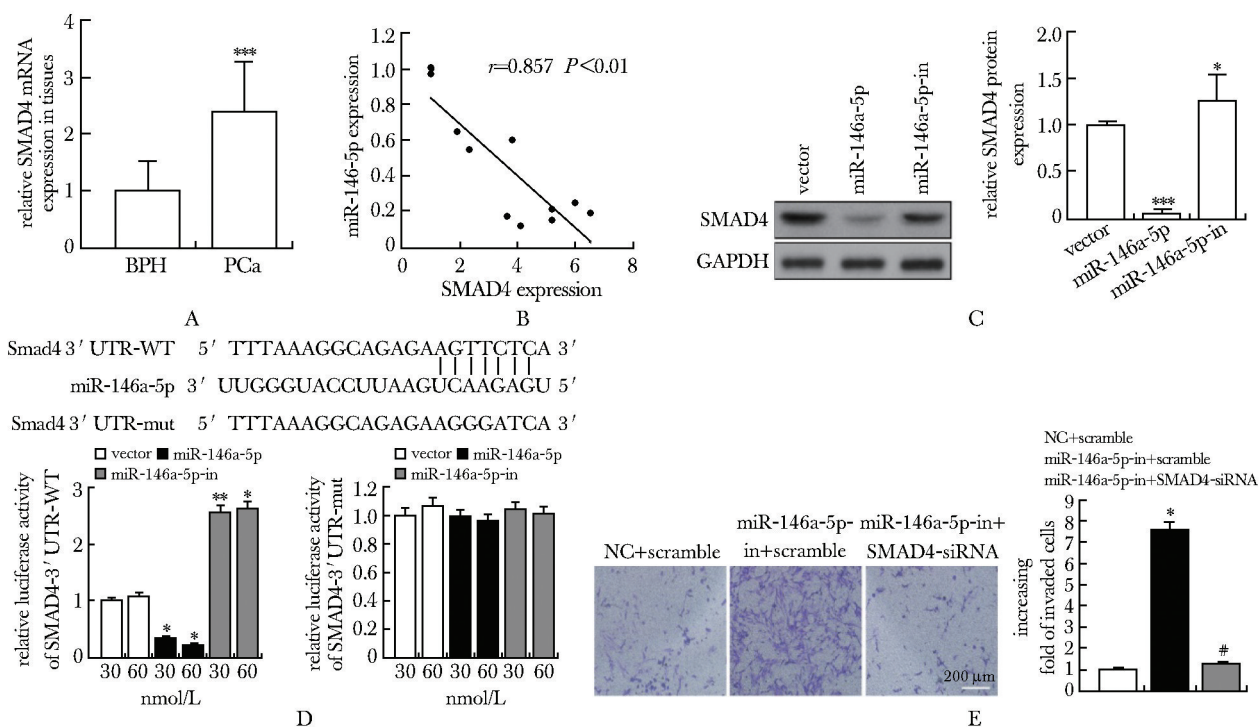
Fig 1 Expression of miR-146a-5p in PCa tissues and cell lines



A. the expression of miR-146a-5p was detected by RT-qPCR; B. RT-qPCR detected the expression of proliferation related genes (*c-MYC*, *NANOG*, *FGF4*, *CD44*, *OCT4*, *CCND1*) and apoptosis related genes (*FASL*, *p21*, *BIM*, *p27*, *BAX*, *caspase-3*); C. MTT assay detected cytoactive; D. BrdU experiment detected cell proliferation; E. colony formation experiment detected cell self-renewal ability; F. scratch experiment detected cell migration ability; G. Transwell assay detected cell invasion ability;  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$  compared with control respectively.

图2 miR-146a-5p 对 PC-3 细胞生物学行为的影响

Fig 2 Effect of miR-146a-5p on biological behavior of PC-3 cells ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )



A. the expression of SMAD4 in PC-3 tissues [median (range),  $n = 30$ ] and BPH tissues [median (range),  $n = 30$ ] were detected by RT-qPCR; \*\*\* $P < 0.001$  compared with BPH; B. the relationship between the expression of miR-146a-5p and SMAD4 in PC-3 tissues ( $P < 0.01$ ); C. Western blot detected the protein expression of SMAD4; \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared with control respectively; D. binding site of miR-146a-5p and SMAD4 was predicted by Targetscan, and double luciferase receptor experiment was conducted; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with control respectively; E. rescue experiment of Transwell assay; \* $P < 0.001$ , ### $P < 0.001$  compared with control respectively.

图3 验证 miR-146a-5p 与 SMAD4 靶向关系

Fig 3 Validation of the targeting relationship between miR-146a-5p and SMAD4 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

## 2.4 miR-146a-5p/SMAD4 信号轴下游分子机制的探索

miR-146a-5p 能够抑制 SMAD2/SMAD3 复合体的入核并抑制其与下游靶基因的结合能力(图 4A, B); SMAD4 可促进 SMAD2/SMAD3 复合体的入核(图 4C); SMAD4 能够明显提高野生型 TIM3 的荧光素酶活性,且 SMAD4 能够显著增强 TIM3 与 SMAD2/SMAD3 复合体的结合力(图 4D~F)。

## 2.5 miR-146a-5p 抑制 PC-3 细胞的成瘤能力

与对照组相比,miR-146a-5p mimic 能够显著抑制 PC-3 细胞的成瘤能力,并能够明显增加荷瘤小鼠的生存期(图 5)。

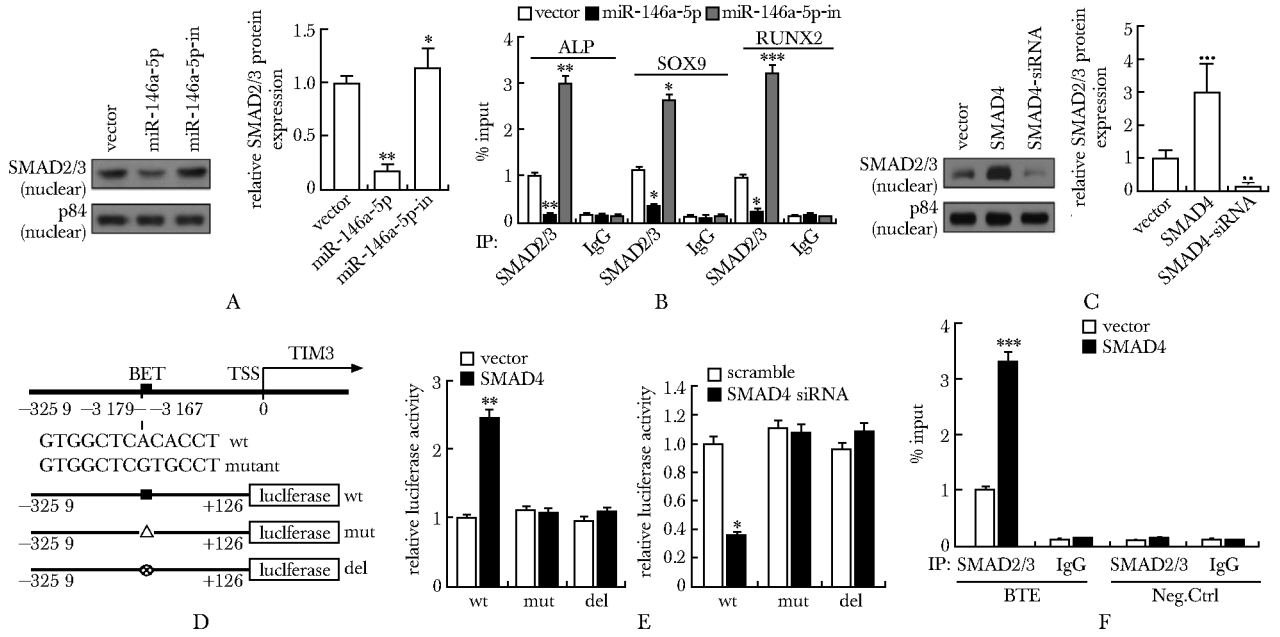
## 3 讨论

中国 PCa 发病率上升且生存率较低,已成为严重威胁中国男性健康的疾病,目前尚无治疗方案能

良好的逆转 PCa 的进展。近年来大量研究证明 miRNA 的表达失调与 PCa 的发生和进展密切相关,并且参与肿瘤的免疫逃逸,这为 PCa 的治疗提供了新的方向<sup>[5]</sup>。

miR-146 家族是免疫系统的关键调控因子,并且参与多种肿瘤的发生及进展<sup>[6]</sup>。miR-146a 是其中研究较多的分子,其对不同肿瘤的调控作用存在差异。PCa 方面的研究表明 miR-146a-5p 为抑癌基因,并具有作为生物标志物的潜力<sup>[3,7-9]</sup>。本研究从组织、细胞及动物实验水平也证实 miR-146a-5p 对 PCa 生物学行为的抑制作用,但目前缺乏对其下游调控机制(尤其是肿瘤免疫方面)的探索。

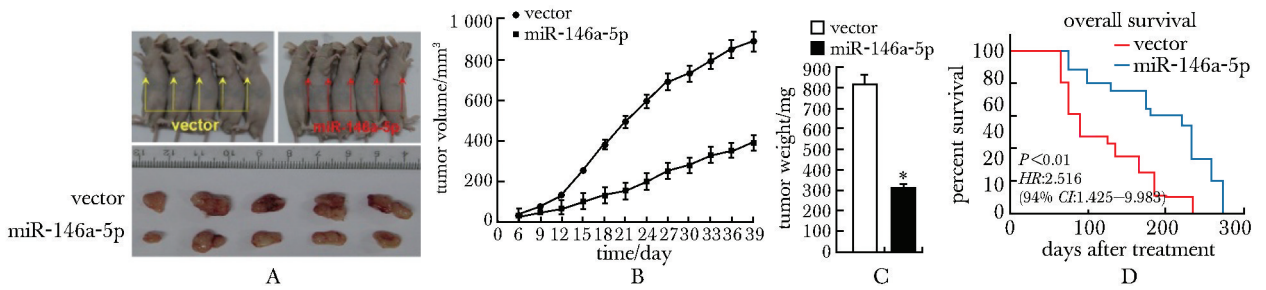
SMADs 是将 TGF- $\beta$  信号由细胞膜转入细胞核的信号蛋白,并与 DNA 及一些转录因子相互作用,研究表明 TGF- $\beta$ /SMADs 信号不仅能调节肿瘤细胞的生物学行为,亦参与调控肿瘤免疫<sup>[10]</sup>。研究表



A. Western blot detected the protein expression of *SMAD2/SMAD3* complex in nucleus after miR-146a-5p downregulation or upregulation; B. ChIP experiment detected the effect of miR-146a-5p on the function of *SMAD2/SMAD3* complex (*ALP*, *SOX9* and *RUNX2* are the known target gene of *SMAD2/SMAD3* complex); C. Western blot detected the protein expression of *SMAD2/SMAD3* complex in nucleus after *SMAD4* downregulation or upregulation; D. construction of dual luciferase reporter vector of *TIM3* gene promoter fragment; E. double luciferase receptor gene experiment; F. ChIP experiment; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared with control respectively.

图4 miR-146a-5p/*SMAD4* 信号轴下游通路的探索

Fig 4 Exploration of the downstream pathway of miR-146a-5p/*SMAD4* signaling axis ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



A. subcutaneous xenograft model in nude mice; B. tumor growth curve showed that miR-146a-5p inhibited the growth of xenograft; C. tumor weight was lighter in miR-146a-5p group than control; D. survival curve of subcutaneous xenograft model; \*\* $P < 0.01$  compared with control.

图5 miR-146a-5p 对 PCa 裸鼠移植瘤的影响

Fig 5 Effect of miR-146a-5p on PCa transplantation in nude mice ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

明 *SMAD4* 参与调控包括 PCa 在内多种肿瘤的生物行为,但目前尚无研究分析 PCa 中 miR-146a-5p 对 *SMAD4* 的靶向调控作用<sup>[4]</sup>。本研究证明 miR-146a-5p 能靶向抑制 *SMAD4* 的表达,从而减少 *SMAD2/SMAD3* 复合体入核并抑制信号转导,进而抑制 PCa 的生物行为。本研究还从肿瘤免疫的

角度更深层次的探索了 miR-146a-5p/*SMAD4/SMAD2/SMAD3* 信号轴的下游靶基因。

T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子 3 (T cell immunoglobulin and mucin domain protein 3, *TIM3*) 是表达在活化的 CD4<sup>+</sup>T 细胞表面的重要负调节因子,参与肿瘤的“免疫耗竭”,作为新的免疫检查点因子,具

有较大的研究价值。研究表明 *TIM3* 参与 PCa 的免疫调控,并具有作为 PCa 治疗靶点的潜力<sup>[11]</sup>。本研究结果证明 *SMAD2/SMAD3* 复合体能够靶向调控 *TIM3* 的表达,提示 *TIM3* 可能为 miR-146a-5p 抑制 PCa 进展的深层分子机制。

本研究的不足之处在于临床标本较少,且对照组没有选择癌旁正常前列腺组织;其次,由于条件限制,本研究没有深入分析 *SMAD4*、*SMAD2/SMAD3* 复

合体以及 *TIM3* 对 PCa 细胞生物学功能的影响以及对肿瘤免疫的调控作用。在未来的研究中将对 miR-146a-5p 抑制 PCa 进展的作用机制及对 PCa 免疫的调控作用进行深入的研究。

综上所述,本研究结果表明 miR-146a-5p 可通过抑制 *SMAD4* 表达对 PCa 起到抑制作用,*SMAD2/SMAD3/TIM3* 可能为其下游的作用靶点。

## 参考文献:

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68: 394-424.
- [2] Abramovic I, Ulamec M, Katusic Bojanac A, *et al.* miRNA in prostate cancer: challenges toward translation [J]. *Epigenomics*, 2020, 12: 543-558.
- [3] Iacona J, Lutz C. miR-146a-5p: expression, regulation, and functions in cancer[J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2019, 10: e1533. doi: 10.1002/wrna.1533.
- [4] Zhao M, Mishra L, Deng C. The role of TGF- $\beta$ /SMAD4 signaling in cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14: 111-123.
- [5] Zhang Z, Huang Q, Yu L, *et al.* The role of miRNA in tumor immune escape and miRNA-based therapeutic strategies[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 807895. doi: 10.3389/fimmu.2021.807895.
- [6] Testa U, Pelosi E, Castelli G, *et al.* miR-146 and miR-155: two key modulators of immune response and tumor development[J]. *Noncoding RNA*, 2017, 3:22. doi: 10.3390/ncrna3030022.
- [7] Puhka M, Thierens L, Nicorici D, *et al.* Exploration of extracellular vesicle miRNAs, targeted mRNAs and pathways in prostate cancer: relation to disease status and progression[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14: 532. doi: 10.3390/cancers14030532.
- [8] Zhang S, Liu C, Zou X, *et al.* MicroRNA panel in serum reveals novel diagnostic biomarkers for prostate cancer[J]. *PeerJ*, 2021, 9: e11441. doi: 10.7717/peerj.11441.
- [9] Fredsøe J, Rasmussen A, Mouritzen P, *et al.* Profiling of circulating microRNAs in prostate cancer reveals diagnostic biomarker potential[J]. *Diagnostics (Basel)*, 2020, 10: 188. doi: 10.3390/diagnostics10040188.
- [10] Maruyama T, Chen W, Shibata H. TGF- $\beta$  and cancer immunotherapy [J]. *Biol Pharm Bull*, 2022, 45: 155-161.
- [11] Jafari S, Molavi O, Kahroba H, *et al.* Clinical application of immune checkpoints in targeted immunotherapy of prostate cancer[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77: 3693-3710.