

• 论 著 •

桃叶珊瑚苷通过调节 PD-1/PD-L1 信号通路介导的免疫逃逸对肺癌细胞放疗敏感性的影响

贺介甫, 杜 钢, 周福星, 李 星[△]

巴彦淖尔市医院放疗科, 内蒙古巴彦淖尔 015000

摘要:目的 探究桃叶珊瑚苷(Aucubin)通过调节程序性死亡受体-1(PD-1)/程序性死亡受体配体-1(PD-L1)信号通路介导的免疫逃逸对肺癌细胞放疗敏感性的影响及其作用机制。方法 0~300 $\mu\text{mol/mL}$ 的 Aucubin 处理人肺癌细胞 NCI-H1299, MTT 检测细胞活力。将细胞分为正常对照组(Control 组)、放疗组(6 Gy 组)、Aucubin 组、Aucubin+放疗组(Aucubin+6 Gy 组), 克隆形成实验和 Edu 实验检测细胞增殖水平, 流式细胞仪检测细胞凋亡, 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞培养液上清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素(IL)-2 水平, 蛋白质印迹法(Western blot)检测 PD-1、PD-L1 蛋白表达。建立肺癌小鼠移植瘤模型, 分为对照组(Control 组)、放疗组(5 Gy 组)、Aucubin 组和 Aucubin+5 Gy 组。测量移植瘤体积与质量, ELISA 检测 TNF- α 、IFN- γ 、IL-2 水平, Western blot 检测 PD-1、PD-L1 蛋白表达。结果 与 0 $\mu\text{mol/mL}$ 比较, 25~125 $\mu\text{mol/mL}$ 的 Aucubin 能降低细胞活力, 选择 100 $\mu\text{mol/mL}$ 的 Aucubin 进行后续实验。与 Control 组比较, 6 Gy 组和 Aucubin 组细胞克隆形成数、Edu 阳性率、TNF- α 水平及 PD-1、PD-L1 蛋白表达水平降低($P<0.05$), 细胞凋亡率及 IFN- γ 、IL-2 水平升高($P<0.05$); Aucubin+6 Gy 组细胞克隆形成数、Edu 阳性率、TNF- α 水平及 PD-1、PD-L1 蛋白表达水平低于 6 Gy 组和 Aucubin 组($P<0.05$), 细胞凋亡率及 IFN- γ 、IL-2 水平高于 6 Gy 组和 Aucubin 组($P<0.05$)。小鼠移植瘤实验表明, 与 Control 组比较, 5 Gy 组和 Aucubin 组小鼠移植瘤体积和质量、TNF- α 水平及 PD-1、PD-L1 蛋白表达水平降低($P<0.05$), IFN- γ 、IL-2 水平升高($P<0.05$); Aucubin+5 Gy 组小鼠移植瘤体积和质量、TNF- α 水平及 PD-1、PD-L1 蛋白表达水平低于 5 Gy 组和 Aucubin 组($P<0.05$), IFN- γ 、IL-2 水平高于 5 Gy 组和 Aucubin 组($P<0.05$)。结论 Aucubin 可能通过阻断 PD-1/PD-L1 信号通路介导的免疫逃逸增强肺癌细胞放疗敏感性。

关键词:桃叶珊瑚苷; 程序性死亡受体-1/程序性死亡受体配体-1 信号通路; 肺癌; 免疫逃逸; 放疗敏感性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2024.12.006

中图法分类号:R734.2

文章编号:1673-4130(2024)12-1435-07

文献标志码:A

Effect of Aucubin on the radiosensitivity of lung cancer cells by regulating the immune escape mediated by PD-1/PD-L1 signaling pathway

HE Jiefu, DU Gang, ZHOU Fuxing, LI Xing[△]

Department of Radiotherapy, Bayannur Hospital, Bayannur, Inner Mongolia 015000, China

Abstract: **Objective** To explore the Aucubin by regulating programmed death-1 (PD-1)/programmed death ligand-1 (PD-L1) signaling pathway mediated immune escape the influence of radiation sensitivity on the lung cancer cells and its mechanism of action. **Methods** Human lung cancer cell line NCI-H1299 was treated with 0—300 $\mu\text{mol/mL}$ Aucubin, and cell viability was detected by MTT assay. Cells were divided into normal control group (Control group), radiotherapy group (6 Gy group), Aucubin group, Aucubin+radiotherapy group (Aucubin+6 Gy group). Cell proliferation were detected by colony formation assay and Edu assay. Cell apoptosis was detected by flow cytometry. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) and interleukin (IL)-2 in the supernatant of cell culture medium were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The protein expressions of PD-1 and PD-L1 were detected by Western blot. A mouse model of lung cancer xenograft was established and divided into Control group, radiotherapy group (5 Gy group), Aucubin group, and Aucubin+5 Gy group. The volume and mass of transplanted tumor were measured. ELISA was used to detect the levels of TNF- α , IFN- γ , and IL-2, and Western blot was used to detect the protein expressions of PD-1 and PD-L1. **Results** Compared with 0 $\mu\text{mol/mL}$ Aucubin, 25—125 $\mu\text{mol/mL}$ Aucubin could reduce cell viability, and 100 $\mu\text{mol/mL}$ aucubin was selected for subsequent experi-

ments. Compared with the Control group, cell clone formation number, Edu positive rate, TNF- α level, PD-1 and PD-L1 protein expression levels were significantly decreased ($P < 0.05$), and the apoptosis rate, IFN- γ and IL-2 levels were significantly increased ($P < 0.05$) in the 6 Gy group and the Aucubin group. Compared with the 6 Gy group and Aucubin group, the Aucubin + 6 Gy group had significantly lower cell colony formation number, Edu positive rate, TNF- α level, PD-1 and PD-L1 protein expression levels ($P < 0.05$), and significantly higher apoptosis rate, IFN- γ and IL-2 levels ($P < 0.05$). Compared with the Control group, the trasplanted tumor volume and weight, TNF- α level and PD-1 and PD-L1 protein expression levels in the 5 Gy group and Aucubin group were decreased ($P < 0.05$), while IFN- γ and IL-2 levels were increased ($P < 0.05$). Compared with the 5 Gy group and Aucubin group, the Aucubin + 5 Gy group had significantly lower transplanted tumor volume and mass, TNF- α level and PD-1 and PD-L1 expression levels ($P < 0.05$), and significantly higher IFN- γ and IL-2 levels ($P < 0.05$). **Conclusion** Aucubin may enhance the radiosensitivity of lung cancer cells by blocking the immune escape mediated by PD-1/PD-L1 signaling pathway.

Key words: Aucubin; programmed death-1/programmed death ligand-1 signaling pathway; lung cancer; immune escape; radiosensitivity

肺癌是男性患者中常见的癌症,是男性癌症死亡的主要原因,也是女性癌症死亡的第二大原因,吸烟是其主要危险因素^[1]。因为肺癌发病率逐年升高,死亡率也很高,是严峻的公共卫生问题,给社会带来巨大的负担^[2]。桃叶珊瑚苷(Aucubin)是一种环烯醚萜苷高活性化合物,广泛存在于传统药材中,具有抗氧化、抗衰老、抗炎、抗纤维化、抗癌等生物效应,因此引起了医疗界的广泛关注^[3]。研究表明 Aucubin 可抑制肺癌细胞的增殖、侵袭和迁移,促进肺癌细胞的凋亡,抑制肺癌的进展^[4]。程序性死亡受体-1(PD-1)/程序性死亡受体配体-1(PD-L1)轴介导的免疫抑制在肿瘤进展中起着至关重要的作用。PD-1 在活化的 T 细胞、B 细胞、树突状细胞和自然杀伤细胞中高度表达,而 PD-L1 在几种类型的肿瘤细胞中表达。PD-1 信号通常被癌症细胞劫持以逃避免疫监视,因此,阻断 PD-1 和 PD-L1 之间的相互作用可将 T 细胞从疲劳状态中解救出来,增强 T 细胞反应并恢复对癌症细胞的免疫反应^[5-6]。研究表明靶向 PD-1 和 PD-L1 的免疫检查点抑制剂对晚期非小细胞肺癌的治疗有明显的益处^[7]。同时也有研究表明, Aucubin 通过抑制肝细胞癌细胞中的蛋白激酶 B/ β -连环蛋白信号通路抑制 PD-L1 表达,对肝细胞癌发挥抗肿瘤活性,并通过抑制蛋白激酶 B/ β -连环蛋白/PD-L1 轴增强顺铂的抗肿瘤活性^[8]。但 Aucubin 对肺癌细胞放疗敏感性的影响及作用机制尚不清楚,本文基于 PD-1/PD-L1 信号通路,探讨 Aucubin 通过调节 PD-1/PD-L1 信号通路介导的免疫逃逸对肺癌细胞放疗敏感性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料来源 人肺癌细胞 NCI-H1299 (iCell-h153)购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司, Aucubin(HY-N0664)购自 MCE 公司, BALB/c-nu 小鼠 [SCXK(鄂)2021-0025]购自武汉有度生物科技有限公司, MTT 检测试剂盒(ZY111105)购自上海泽叶生物科技有限公司; Edu 检测试剂盒(E-CK-A376)购自

武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,人或裸鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素(IL)-2 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司,抗体 PD-1(AF7695)、PD-L1(AF7710)、 β -actin(AF0003)及山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(A0208)均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与活力检测 将 NCI-H1299 细胞在 DMEM 培养基(10%胎牛血清)中培养(37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2)、传代。取对数生长期细胞使用不同浓度(0、25、50、75、100、125 $\mu\text{mol/mL}$)的 Aucubin 处理细胞 24 h,向细胞中加入 20 μL MTT 溶液,再孵育 4 h,用废弃孔中的上清液终止培养。向每个孔中加入 150 μL 二甲基亚砜,然后振荡 10 min。随后在 ELISA 监测仪上测定每个孔的吸光度(490 nm),并记录结果。

1.2.2 细胞分组与处理 实验分为正常对照组(Control 组)、放疗组(6 Gy 组)、Aucubin 组、Aucubin+放疗组(Aucubin+6 Gy 组)。6 Gy 组使用 6 Gy 剂量的 6MV-X 线照射 NCI-H1299 细胞^[9], Aucubin 组使用 100 $\mu\text{mol/mL}$ 的 Aucubin 处理 NCI-H1299 细胞 24 h。Aucubin + 6Gy 组使用 100 $\mu\text{mol/mL}$ 的 Aucubin 处理细胞 24 h 后,用 6 MV-X 线(6 Gy)照射 NCI-H1299 细胞。Control 组给予等量生理盐水正常培养。

1.2.3 克隆形成实验 按照 1.2.2 中的方法分组并处理细胞。将各组细胞(约 800 个)接种在 60 mm 培养皿中,一式 3 份,并孵育 10 d。使用甲醛固定菌落(20 min),并使用含 1.5%亚甲蓝的甲醇溶液染色(15 min)。染色后进行拍照观察,并对含有 50 个以上细胞的菌落进行计数。

1.2.4 细胞增殖水平检测 取对数生长期的 NCI-H1299 细胞按照 1.2.2 中的分组处理培养细胞 24 h,将各组细胞与 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 Edu 溶液孵育 2 h

(37 ℃)。磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次后,每孔加入 1 mL 的 4%多聚甲醛固定细胞 15 min(室温),用 PBS 洗涤后,弃上清液,每孔加入 1 mL 的 0.3% TritonX-100 在室温下孵育 20 min。弃掉上清液,用 PBS 洗涤细胞 3 次,弃上清液。随后,每孔加入 500 μL Click 反应液混合,轻轻摇晃混匀,避光孵育 30 min(室温),弃上清液,然后使用 PBS 洗涤细胞 3 次。弃上清液,每孔加入 500 μL DAPI 溶液,室温避光孵育 10 min 对细胞核进行染色,弃掉上清液,PBS 冲洗细胞 3 次,共聚焦显微镜下观察拍照,并计算 Edu 阳性细胞率。

1.2.5 细胞凋亡检测 按照 1.2.2 中的分组处理培养细胞 24 h。获取细胞培养液,离心后弃上清液收集细胞,PBS 洗涤 1 次重悬细胞,离心弃上清液,PBS 洗涤 1 次,离心后弃上清液,加入 500 μL 的 1×Annexin V Binding Buffer 重悬细胞,然后加入 4 μL Annexin V-FITC 和 4 μL PI 共同孵育(室温、15 min)。使用流式细胞仪进行荧光分析,检测细胞凋亡情况。

1.2.6 炎症因子水平检测 按照 1.2.2 中的分组处理培养细胞 24 h,取细胞培养液离心获得上清液,严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作,检测细胞培养液上清中 TNF-α、IFN-γ、IL-2 水平。

1.2.7 PD-1 和 PD-L1 蛋白表达检测 按照 1.2.2 中的分组处理培养细胞,收集各组细胞培养液,PBS 洗涤,将沉淀的细胞在 RIPA 缓冲液中裂解 45 min 后提取总蛋白。通过二辛可宁酸测定试剂盒测定蛋白质浓度。使用等量的蛋白质通过 10%SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质样品,后将目标蛋白转移到 PVDF 膜上,用含有 0.1%吐温-20(TBST)的 Tris 缓冲盐水洗涤 PVDF 膜,并用 5%脱脂乳封闭 2 h(室温)。TBST 洗涤 3 次后,与一抗 PD-1、PD-L1、β-actin 孵育过夜(4 ℃),后与二抗山羊抗兔 IgG 共同孵育 1 h(室温)。用化学发光试剂观察蛋白质印迹信号,Image J 软件对目的蛋白进行定量。

1.2.8 小鼠移植瘤实验 将 NCI-H1299 细胞皮下注射于 BALB/c-nu 小鼠(4 周龄)右后大腿,建立肺癌细胞移植瘤模型。后随机分成 4 组,分别为 Control 组、放疗组(5 Gy 组)、Aucubin 组和 Aucubin+5 Gy 组。每组 6 只。1 周后给予各组小鼠相应药物治疗。Control 组小鼠腹腔注射等量的生理盐水,5 Gy 组以 5 Gy/3 d 的剂量进行放疗^[10],Aucubin 组腹腔注射 5 mg/kg/d 的 Aucubin^[8],Aucubin+5 Gy 组腹腔注射 5 mg/kg/d 的 Aucubin 和 5 Gy/3 d 剂量的放疗。每周测定一次瘤体积,4 周后处死小鼠分离肿瘤,测量肿瘤体积与质量,ELISA 检测肿瘤组织中 TNF-α、IFN-γ 和 IL-2 水平,蛋白质印迹法检测肿瘤组织中 PD-1、PD-L1 蛋白表达。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件对数据进行处理和分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析或 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为

差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Aucubin 对 NCI-H1299 细胞活力的影响 与 0 μmol/mL 比较,25~125 μmol/mL 的 Aucubin 能降低 NCI-H1299 细胞活力(*P* < 0.05),但 125 μmol/mL 的 Aucubin 细胞活力相对于 100 μmol/mL 有所增加,因此选择 100 μmol/mL 的 Aucubin 进行后续实验。见表 1。

表 1 Aucubin 对 NCI-H1299 细胞活力的影响($\bar{x} \pm s$)		
浓度	<i>n</i>	细胞活力(%)
0 μmol/mL	6	100.00 ± 0.00
25 μmol/mL	6	95.43 ± 4.85
50 μmol/mL	6	88.76 ± 3.09 ^a
75 μmol/mL	6	81.08 ± 1.67 ^a
100 μmol/mL	6	72.92 ± 1.14 ^a
125 μmol/mL	6	77.45 ± 1.06 ^a
<i>F</i>		105.494
<i>P</i>		< 0.001

注:与 0 μmol/mL 比较,^a*P* < 0.05。

2.2 Aucubin 对 NCI-H1299 细胞增殖的影响 与 Control 组比较,6 Gy 组和 Aucubin 组 NCI-H1299 细胞克隆形成数和 Edu 阳性率降低(*P* < 0.05);Aucubin+6 Gy 组 NCI-H1299 细胞克隆形成数和 Edu 阳性率低于 6 Gy 组和 Aucubin 组(*P* < 0.05)。见图 1、2 和表 2。

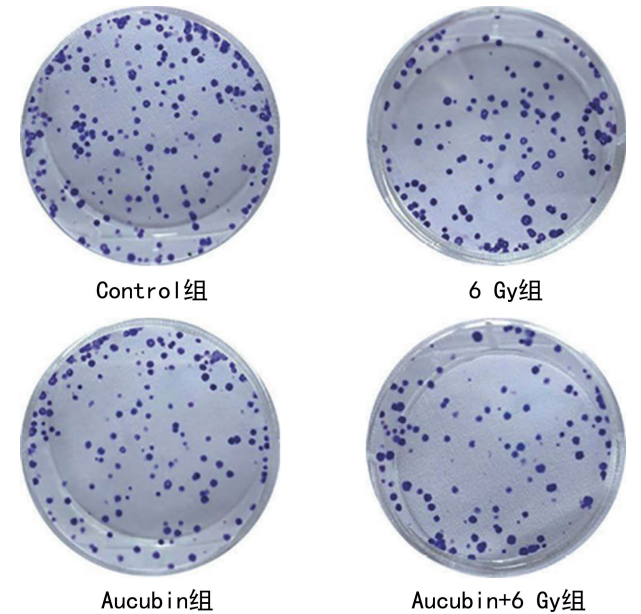


图 1 克隆形成实验检测 Aucubin 对 NCI-H1299 细胞增殖的影响

2.3 Aucubin 对 NCI-H1299 细胞凋亡的影响 与 Control 组比较,6 Gy 组和 Aucubin 组 NCI-H1299 细胞凋亡率升高(*P* < 0.05);Aucubin+6 Gy 组 NCI-H1299 细胞凋亡率高于 6 Gy 组和 Aucubin 组(*P* < 0.05)。见表 3、图 3。

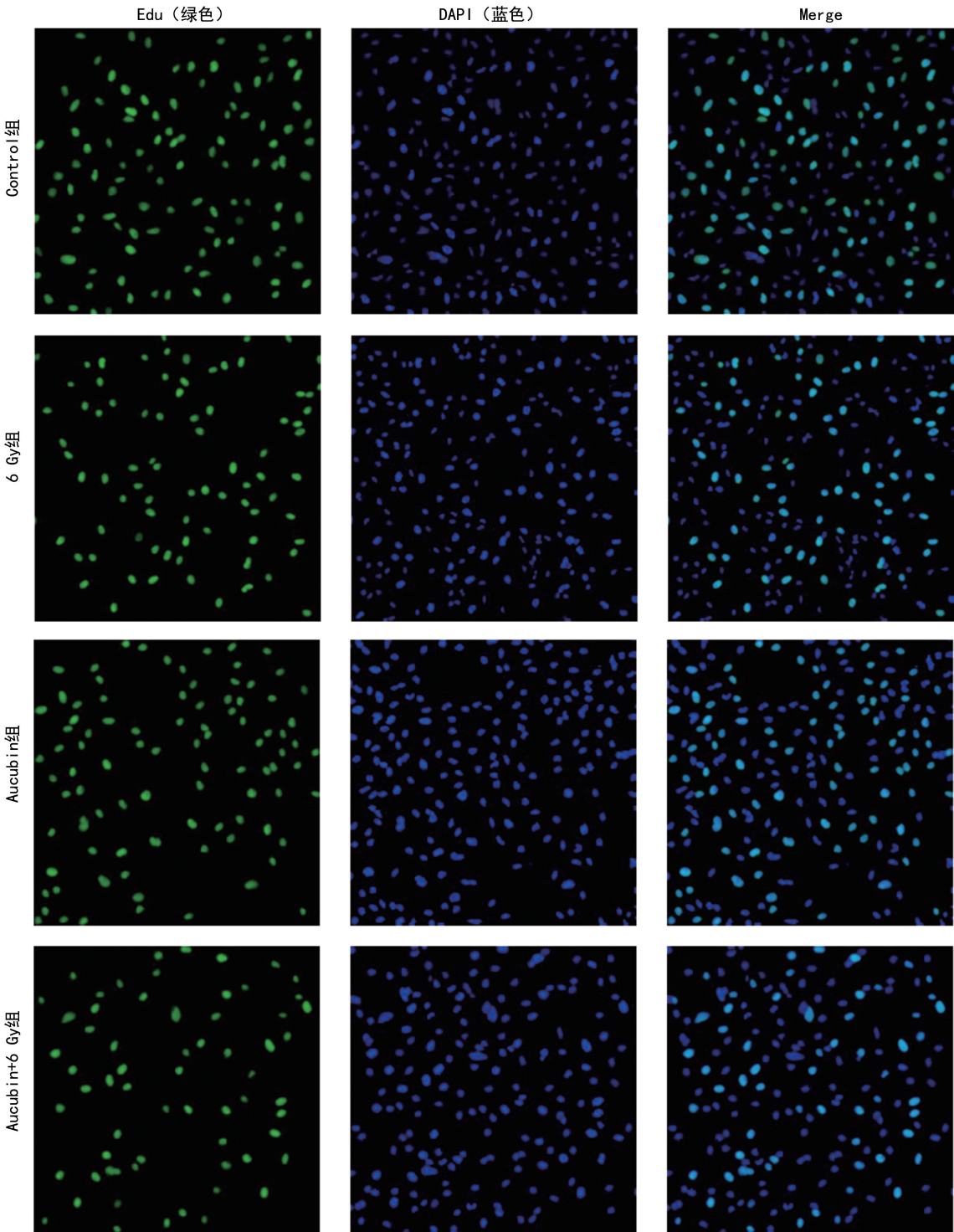


图 2 Edu 检测 Aucubin 对 NCI-H1299 细胞增殖的影响 (×400)

表 2	Aucubin 对 NCI-H1299 细胞增殖的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)	
组别	Edu 阳性率 (%)	克隆形成数 (个)
Control 组	53.17 ± 3.16	112.06 ± 5.14
6 Gy 组	38.45 ± 1.61^{ab}	84.67 ± 3.03^{ab}
Aucubin 组	44.06 ± 2.05^{ab}	95.89 ± 3.27^{ab}
Aucubin+6 Gy 组	32.58 ± 1.06	73.28 ± 2.62
<i>F</i>	102.921	123.497
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注:与 Control 组比较,^a $P<0.05$;与 Aucubin+6 Gy 组比较,^b $P<0.05$ 。

表 3	Aucubin 对 NCI-H1299 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$)	
组别	<i>n</i>	细胞凋亡率 (%)
Control 组	6	3.16 ± 0.74
6 Gy 组	6	15.92 ± 1.02^{ab}
Aucubin 组	6	12.47 ± 1.53^{ab}
Aucubin+6 Gy 组	6	23.28 ± 2.64
<i>F</i>		153.642
<i>P</i>		<0.001

注:与 Control 组比较,^a $P<0.05$;与 Aucubin+6 Gy 组比较,^b $P<0.05$ 。

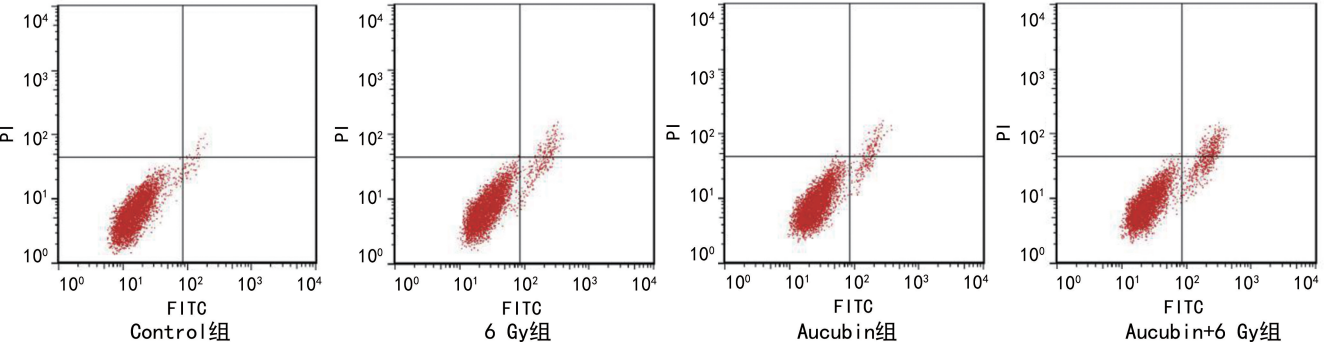


图 3 流式细胞仪检测 Aucubin 对 NCI-H1299 细胞凋亡的影响

2.4 Aucubin 对 NCI-H1299 细胞炎症因子水平的影响 与 Control 组比较,6 Gy 组和 Aucubin 组 NCI-H1299 细胞 TNF- α 水平降低($P<0.05$),IFN- γ 和 IL-2 水平升高($P<0.05$);Aucubin+6 Gy 组 NCI-H1299 细胞 TNF- α 水平低于 6 Gy 组和 Aucubin 组($P<0.05$),IFN- γ 和 IL-2 水平高于 6 Gy 组和 Aucubin 组($P<0.05$)。见表 4。

表 4 Aucubin 对 NCI-H1299 细胞炎症因子水平的影响($n=6,\bar{x}\pm s,\text{pg/mL}$)			
组别	TNF- α	IFN- γ	IL-2
Control 组	153.46 $\pm$ 10.91	123.14 $\pm$ 5.65	36.47 $\pm$ 2.16
6 Gy 组	87.25 $\pm$ 7.64 ^{ab}	173.28 $\pm$ 7.44 ^{ab}	75.62 $\pm$ 5.34 ^{ab}
Aucubin 组	115.47 $\pm$ 6.33 ^{ab}	148.03 $\pm$ 6.25 ^{ab}	58.61 $\pm$ 3.27 ^{ab}
Aucubin+6 Gy 组	73.62 $\pm$ 4.15	193.51 $\pm$ 9.42	84.24 $\pm$ 6.85
<i>F</i>	127.275	104.156	117.304
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 Control 组比较,^a $P<0.05$;与 Aucubin+6 Gy 组比较,^b $P<0.05$ 。

2.5 Aucubin 对 NCI-H1299 细胞 PD-1 和 PD-L1 蛋白表达的影响 与 Control 组比较,6 Gy 组和 Aucubin 组 NCI-H1299 细胞 PD-1 和 PD-L1 蛋白表达水平降低($P<0.05$);Aucubin+6 Gy 组 NCI-H1299 细胞 PD-1 和 PD-L1 蛋白表达水平低于 6 Gy 组和 Aucubin 组($P<0.05$)。见图 4、表 5。

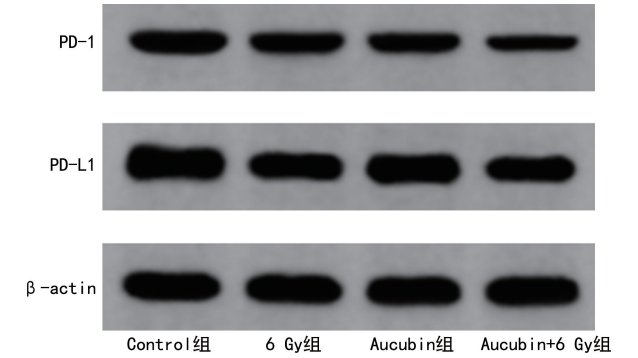


图 4 Aucubin 对 NCI-H1299 细胞 PD-1 和 PD-L1 蛋白表达的影响

2.6 Aucubin 对移植瘤生长、炎症水平及 PD-1 和

PD-L1 蛋白表达的影响 与 Control 组比较,5 Gy 组和 Aucubin 组小鼠移植瘤体积和质量、TNF- α 水平及 PD-1、PD-L1 蛋白表达水平降低($P<0.05$),IFN- γ 、IL-2 水平升高($P<0.05$);Aucubin+5 Gy 组小鼠移植瘤体积和质量、TNF- α 水平及 PD-1、PD-L1 蛋白表达水平低于 5 Gy 组和 Aucubin 组($P<0.05$),IFN- γ 、IL-2 水平高于 5 Gy 组和 Aucubin 组($P<0.05$)。见表 6~8、图 5。

表 5 Aucubin 对 NCI-H1299 细胞 PD-1 和 PD-L1 蛋白表达水平的影响($n=6,\bar{x}\pm s$)		
组别	PD-1	PD-L1
Control 组	1.07 $\pm$ 0.06	1.35 $\pm$ 0.08
6 Gy 组	0.75 $\pm$ 0.03 ^{ab}	0.93 $\pm$ 0.05 ^{ab}
Aucubin 组	0.82 $\pm$ 0.04 ^{ab}	1.12 $\pm$ 0.07 ^{ab}
Aucubin+6 Gy 组	0.62 $\pm$ 0.02	0.83 $\pm$ 0.03
<i>F</i>	132.062	85.701
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注:与 Control 组比较,^a $P<0.05$;与 Aucubin+6 Gy 组比较,^b $P<0.05$ 。

表 6 Aucubin 对移植瘤体积的影响($n=6,\bar{x}\pm s,\text{mm}^3$)			
组别	第 2 周	第 3 周	第 4 周
Control 组	173.42 $\pm$ 9.58	288.29 $\pm$ 20.41	397.85 $\pm$ 21.62
Aucubin 组	146.53 $\pm$ 5.37 ^{ab}	213.28 $\pm$ 11.51 ^{ab}	314.52 $\pm$ 17.97 ^{ab}
5 Gy 组	128.67 $\pm$ 4.42 ^{ab}	181.43 $\pm$ 8.67 ^{ab}	263.18 $\pm$ 11.45 ^{ab}
Aucubin+5 Gy 组	108.95 $\pm$ 4.10	158.72 $\pm$ 5.83	235.86 $\pm$ 10.52
<i>F</i>	114.706	116.501	117.991
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 Control 组比较,^a $P<0.05$;与 Aucubin+5 Gy 组比较,^b $P<0.05$ 。

表 7 Aucubin 对移植瘤 TNF- α 、IFN- γ 和 IL-2 水平的影响($n=6,\bar{x}\pm s,\text{pg/mL}$)			
组别	TNF- α	IFN- γ	IL-2
Control 组	78.32 $\pm$ 4.52	347.16 $\pm$ 12.34	22.35 $\pm$ 1.64
Aucubin 组	64.15 $\pm$ 2.73 ^{ab}	439.47 $\pm$ 18.15 ^{ab}	36.47 $\pm$ 1.95 ^{ab}
5 Gy 组	55.83 $\pm$ 3.06 ^{ab}	515.62 $\pm$ 22.43 ^{ab}	45.18 $\pm$ 3.06 ^{ab}

续表 7Aucubin 对移植瘤 TNF- α 、IFN- γ 和 IL-2 水平的影响($n=6,\bar{x}\pm s,\text{pg/mL}$)

组别	TNF- α	IFN- γ	IL-2
Aucubin+5 Gy 组	46.94 $\pm$ 1.85	541.34 $\pm$ 25.72	57.34 $\pm$ 4.12
<i>F</i>	105.029	111.088	158.645
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 Control 组比较,^a*P*<0.05;与 Aucubin+5 Gy 组比较,^b*P*<0.05。

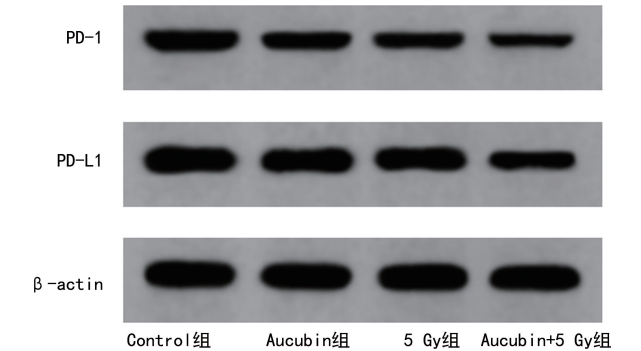


图 5Aucubin 对移植瘤 PD-1 和 PD-L1 蛋白表达的影响

表 8Aucubin 对移植瘤质量及 PD-1、PD-L1 蛋白表达水平的影响($n=6,\bar{x}\pm s$)

组别	移植瘤质量(g)	PD-1	PD-L1
Control 组	1.34 $\pm$ 0.10	0.85 $\pm$ 0.06	1.13 $\pm$ 0.09
Aucubin 组	1.15 $\pm$ 0.06 ^{ab}	0.62 $\pm$ 0.04 ^{ab}	0.98 $\pm$ 0.06 ^{ab}
5 Gy 组	0.86 $\pm$ 0.06 ^{ab}	0.49 $\pm$ 0.05 ^{ab}	0.72 $\pm$ 0.05 ^{ab}
Aucubin+5 Gy 组	0.72 $\pm$ 0.03	0.33 $\pm$ 0.02	0.59 $\pm$ 0.03
<i>F</i>	103.812	143.086	95.205
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 Control 组比较,^a*P*<0.05;与 Aucubin+5 Gy 组比较,^b*P*<0.05。

3 讨 论

肺癌是一种死亡率很高的癌症,铂类药物是大多数肺癌患者的治疗药物,但越来越多的患者对化疗药物出现了耐药性,患者预后较差。因此新的治疗药物及治疗策略有待开发^[11]。放疗是用于肺癌的重要治疗方式,至少一半以上的肺癌患者需要一次放疗才能治愈或缓解^[12]。放疗易产生放疗抗性,因此对增强癌细胞放疗敏感性的研究仍是一个巨大的挑战。Aucubin 是一种从中草药中分离出来的天然环烯醚萜类化合物,特别是玄参科、车前草科和茜草科,具有抗炎、抗氧化、抗癌等多种有益特性^[13]。据报道 Aucubin 是一种低毒化合物,不易对癌症患者造成二次伤害,通过诱导肿瘤细胞凋亡来抑制肿瘤的生长,减轻癌症引起的器官炎症损伤,是一种很有前途的抗癌药物^[14]。也有研究表明,Aucubin 能抑制细胞增殖、促进细胞凋亡,对癌细胞化疗敏感性有一定的增强作用^[8]。本研究中放疗和 Aucubin 处理后 NCI-H1299

细胞活力、细胞克隆形成数及增殖水平降低,细胞凋亡率升高;二者联合应用后,NCI-H1299 细胞活力和增殖水平进一步降低,细胞凋亡率进一步升高。小鼠移植瘤实验也进一步证明,Aucubin 在肺癌的放疗中具有协同作用。表明 Aucubin 能降低肺癌细胞活力,抑制其增殖,促进细胞凋亡,且能够增强肺癌细胞的放疗敏感性,抑制肺癌的发展。

近年来 PD-1 及 PD-L1 的免疫检查点抑制剂为治疗肺癌患者提供了一种新方法^[15]。免疫逃避是癌症的特征之一,PD-1/PD-L1 信号通路介导的肿瘤诱导免疫检查点使癌症细胞能在肿瘤微环境中逃避宿主免疫反应,PD-L1 在肿瘤细胞中呈高表达,可抑制 T 细胞活化和效应功能,从而促进肿瘤的发展,阻断 PD-1/PD-L1 信号通路可将 T 细胞从疲劳状态中解救出来,恢复对癌症细胞的免疫反应,有效地抑制肿瘤进展^[16]。AI 等^[17]报道称肿瘤细胞通过 PD-L1 的过度表达来逃避宿主的免疫监视,PD-L1 在肿瘤微环境中的异常高表达可归因于多种致癌信号的激活和 IFN- γ 等炎症因子的诱导。LIU 等^[18]研究表明,癌症细胞通过抑制 IFN- γ 产生,CD8⁺ T 细胞增殖或溶瘤活性,促进 TNF- α 产生来绕过免疫监视。PAL 等^[19]研究表明,TNF- α 可增强肺癌细胞对离子辐射的敏感性,抑制细胞迁移,肺癌患者中高 TNF- α 水平与肺癌进展呈负相关。放疗是延长患者生存时间、提高生活质量的一种有希望的治疗策略,放射耐药性的发展经常导致放疗失败,制订改进策略以克服肺癌的放射耐药性至关重要^[20]。ZHANG 等^[21]报道在癌症 H460 细胞异种移植裸鼠中,查尔科莫菌素和放疗联合治疗通过上调内质网应激蛋白和激活异种移植瘤组织中的蛋白激酶 R 样内质网激酶,可明显促进肿瘤生长抑制。本研究中 Aucubin 干预 NCI-H1299 细胞后降低 TNF- α 水平及 PD-1、PD-L1 蛋白表达水平,升高 IFN- γ 和 IL-2 水平,与放疗联合后其作用效果进一步增强;小鼠移植瘤实验表明,Aucubin 与放疗抑制肺癌裸鼠移植瘤生长,对降低小鼠移植瘤组织 TNF- α 水平及 PD-1、PD-L1 蛋白表达水平,增加 IFN- γ 、IL-2 水平具有协同作用。表明 Aucubin 可能通过抑制 PD-1/PD-L1 信号通路介导的免疫逃逸增强肺癌细胞的放疗敏感性。

综上所述,Aucubin 能增强肺癌细胞的放疗敏感性,其作用机制可能与抑制 PD-1/PD-L1 信号通路介导的免疫逃逸有关。未来仍需建立不同的细胞及动物模型对 Aucubin 增强肺癌细胞的放疗敏感性进行探究,为扩大 Aucubin 在肺癌治疗中的应用提供参考。

参考文献

[1] SCHABATH M B,COTE M L. Cancer progress and pri-

- orities; lung cancer [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2019, 28(10):1563-1579.
- [2] WU F, WANG L, ZHOU C. Lung cancer in China: current and prospect[J]. *Curr Opin Oncol*, 2021, 33(1):40-46.
- [3] ZENG X, GUO F, OUYANG D. A review of the pharmacology and toxicology of aucubin[J]. *Fitoterapia*, 2020, 140(1):104443-104451.
- [4] 梅凡, 姚峰, 朱磊, 等. 桃叶珊瑚苷对肺癌细胞增殖、侵袭的抑制作用及对 TGF- β 1/SOX7 通路的影响[J]. *湖北中医药大学学报*, 2021, 23(4):10-14.
- [5] YI M, ZHENG X, NIU M, et al. Combination strategies with PD-1/PD-L1 blockade: current advances and future directions[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1):28-38.
- [6] DERMANI F K, SAMADI P, RAHMANI G, et al. PD-1/PD-L1 immune checkpoint: potential target for cancer therapy[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(2):1313-1325.
- [7] XIA L, LIU Y, WANG Y. PD-1/PD-L1 blockade therapy in advanced non-small-cell lung cancer: current status and future directions[J]. *Oncologist*, 2019, 24(1):S31-S41.
- [8] GAO Z X, ZHANG Z S, QIN J, et al. Aucubin enhances the antitumor activity of cisplatin through the inhibition of PD-L1 expression in hepatocellular carcinoma[J]. *Phytomedicine*, 2023, 112(1):1-11.
- [9] LIU N, WANG Y A, SUN Y, et al. Inhibition of aurora a enhances radiosensitivity in selected lung cancer cell lines [J]. *Respir Res*, 2019, 20(1):230-244.
- [10] 李修炜, 王记南, 张健. 基于 PAK6 和 Wnt/ β -catenin 信号通路的苦参碱对肺癌放疗敏感性的影响研究[J]. *中草药*, 2021, 52(2):447-453.
- [11] RYU H, KIM H J, SONG J Y, et al. A small compound KJ-28d enhances the sensitivity of non-small cell lung cancer to radio- and chemotherapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(23):6026-6038.
- [12] BROWN S, BANFILL K, AZNAR M C, et al. The evolving role of radiotherapy in non-small cell lung cancer [J]. *Br J Radiol*, 2019, 92(1104):20190524.
- [13] KARTINI K, IRAWAN M A, SETIAWAN F, et al. Characteristics, isolation methods, and biological properties of Aucubin[J]. *Molecules*, 2023, 28(10):4154-4164.
- [14] SHAO M, KUANG Z, WANG W, et al. Aucubin exerts anticancer activity in breast cancer and regulates intestinal microbiota[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 16:4534411.
- [15] MA L, DIAO B, HUANG Z, et al. The efficacy and possible mechanisms of immune checkpoint inhibitors in treating non-small cell lung cancer patients with epidermal growth factor receptor mutation [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2021, 41(12):1314-1330.
- [16] TANG B, YAN X, SHENG X, et al. Safety and clinical activity with an anti-PD-1 antibody JS001 in advanced melanoma or urologic cancer patients[J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1):7-22.
- [17] AI L, XU A, XU J. Roles of PD-1/PD-L1 pathway: signaling, cancer, and beyond[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1248(1):33-59.
- [18] LIU Y, LIU X, ZHANG N, et al. Berberine diminishes cancer cell PD-L1 expression and facilitates antitumor immunity via inhibiting the deubiquitination activity of CSN5[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(12):2299-2312.
- [19] PAL S, YADAV P, SAINIS K B, et al. TNF- α and IGF-1 differentially modulate ionizing radiation responses of lung cancer cell lines[J]. *Cytokine*, 2018, 101(1):89-98.
- [20] ZHANG P, HE D, SONG E, et al. Celecoxib enhances the sensitivity of non-small-cell lung cancer cells to radiation-induced apoptosis through downregulation of the Akt/mTOR signaling pathway and COX-2 expression [J]. *PLoS One*, 2019, 14(10):e0223760.
- [21] ZHANG S R, ZHANG X C, LIANG J F, et al. Chalcemoracin inhibits cell proliferation and increases sensitivity to radiotherapy in human non-small cell lung cancer cells via inducing endoplasmic reticulum stress-mediated paraptosis[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(6):825-834.

(收稿日期:2023-12-12 修回日期:2024-04-26)

(上接第 1434 页)

- [17] KOMATSU N, TAKAYANAGI H. Mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis-immune cell-fibroblast-bone interactions[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2022, 18(7):415-429.
- [18] YOKOTA K, SATO K, MIYAZAKI T, et al. Characterization and function of tumor necrosis factor and interleukin-6-induced osteoclasts in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2021, 73(7):1145-1154.
- [19] PANDOLFI F, FRANZA L, CARUSI V, et al. Interleukin-6 in rheumatoid arthritis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15):5238.
- [20] THOMPSON A E, POPE J E. The erratic C-reactive protein; a novel outcome measure for longitudinal disease activity in rheumatoid arthritis[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2022, 40(7):1411-1416.
- [21] IBRAHIM S, SARHAT E. Evaluation of serum levels of interleukin-6, fetuin-a, lipocalin-2, and C-reactive protein in rheumatoid arthritis patients[J]. *Georgian Med News*, 2022, 331:42-45.
- [22] CHALKOU K, VICKERS A J, PELLEGRINI F, et al. Decision curve analysis for personalized treatment choice between multiple options[J]. *Med Decis Making*, 2023, 43(3):337-349.

(收稿日期:2023-12-22 修回日期:2024-03-22)