

# 基于 JAK2/STAT3/PDL1 通路研究白术内酯 II 对肺癌小鼠细胞凋亡的影响

赵云辉, 蒋宗莹, 王艳杰\*

辽宁中医药大学中西医结合学院, 沈阳 110847

**摘要:**通过观察白术内酯 II (atractylenolide II, AT-II) 对 Lewis 肺癌小鼠 JAK2/STAT3/PDL1 通路的影响, 探究其对小鼠肿瘤组织细胞凋亡的作用机制。建立肺癌小鼠模型, 成瘤后, 将小鼠随机分为 4 组, 即模型组、白术内酯 II 低、中、高剂量组, 每组 10 只。白术内酯 II 低、中、高剂量组灌胃 0.2 mL 白术内酯 II (剂量依次为 25、50、100 mg/kg), 1 次/d, 模型组灌胃等体积溶剂, 1 次/d。各组连续干预 21 d, 末次给药后 24 h, 处死小鼠, 分离肿瘤组织、脾组织。观察各组肿瘤体积随时间变化, 计算脾指数、肿瘤生长抑制率; 采用 TUNEL 荧光染色法观察各组肿瘤组织细胞凋亡情况; 采用 Western blot 法测定肿瘤组织 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、PDL1 蛋白表达情况; 免疫荧光法测定 p-JAK2、p-STAT3、F4/80<sup>+</sup>、CD206<sup>+</sup> 表达。于脾指数而言, 给药组与模型组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与模型组相比, 白术内酯 II 低、中、高剂量组的肿瘤体积、肿瘤质量显著减小 ( $P < 0.05$ ); 肿瘤生长抑制率明显提高; TUNEL 法荧光染色显示: 与模型组相比, 白术内酯 II 低剂量组细胞凋亡指数差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 白术内酯 II 中剂量组细胞凋亡指数升高 ( $P < 0.05$ ), 白术内酯 II 高剂量组细胞凋亡指数显著升高 ( $P < 0.01$ ); Western blot 实验结果显示: 给药组肿瘤组织中 p-JAK2、p-STAT3、PDL1 蛋白的表达较模型组显著降低; 免疫荧光实验测定 p-JAK2、p-STAT3、CD206<sup>+</sup> 给药组显著降低 ( $P < 0.01$ )、F4/80<sup>+</sup> 无显著差异 ( $P > 0.05$ )。以上实验结果表明 AT-II 能够基于 JAK2/STAT3 通路调控 PDL1 表达, 影响 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织细胞凋亡。

**关键词:** Lewis 肺癌小鼠; 白术内酯 II; PDL1 蛋白; 凋亡

中图分类号: R34

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)9-1457-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.9.001

## Effect of whittenolactone II on apoptosis of lung cancer mice based on JAK2/STAT3/PDL1 pathway

ZHAO Yun-hui, JIANG Zong-ying, WANG Yan-jie\*

College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine,  
Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

**Abstract:** This study aims to investigate the effect of atractylenolide II (AT-II) on JAK2/STAT3/PDL1 pathway in Lewis lung cancer mice, and explore its mechanism on apoptosis of tumor cells in mice. The mice were randomly divided into four groups: model group, AT-II low, middle and high dose groups ( $n = 10$  in each group). 0.2 mL of AT-II (25, 50, 100 mg/kg) was given intragastrically to the low, middle and high dose groups once a day, and the same volume of solvent was given intragastrically to the model group once a day. Twenty-four hours after the last administration, the tumor tissues and spleen tissues were separated. The changes of tumor volume, spleen index and tumor growth inhibition rate were observed, and the apoptosis of tumor cells was observed by TUNEL fluorescence staining. The expression of JAK2, p-JAK2, STAT3, p-STAT3 and PDL1 protein was detected by Western blot, and the expression of p-JAK2, p-STAT3, F4/80<sup>+</sup> and CD206<sup>+</sup> was detected by immunofluorescence. There was no statistical difference of spleen index in each group ( $P > 0.05$ ). Compared with the model group, the volume and quality of the tumor in the low, middle and high dose groups of atractylodes macrocephala were signifi-

收稿日期: 2024-03-25 接受日期: 2024-07-31

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (81202789); 辽宁省自然科学基金指导计划 (2019-ZD-0950); 辽宁省教育厅一般项目 (LJKM20221311)

\* 通信作者 Tel: 86-015940157054; E-mail: 15940157054@163.com

cantly decreased ( $P < 0.05$ ), the growth inhibition rate was significantly increased, tunnel staining showed that compared with the model group, there was no significant difference in apoptosis index in the low dose group ( $P > 0.05$ ), but significantly increased in middle and high dose groups, the results of Western blot showed that the expression of p-JAK2, p-STAT3 and PDL1 in the tumor tissues of the treated group was significantly lower than that of the model group. The levels of p-JAK2, p-STAT3 and CD206<sup>+</sup> were significantly lower than those of the model group ( $P < 0.01$ ), while the levels of F4/80<sup>+</sup> were not significantly different ( $P > 0.05$ ). These results suggest that AT-II can modulate the expression of PDL1 based on JAK2/STAT3 pathway and influence tumor cell apoptosis in Lewis lung cancer mice.

**Key words:** Lewis lung cancer mice; atractylenolide II; PDL1 protein; apoptosis

肺癌是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一,也是癌症死亡的主要原因。在我国早期肺癌多以手术治疗为主,然而,一经发现多是中晚期,通常化疗为患者主要治疗手段,但是长期化疗会有不同程度的毒副作用,且易产生耐药性。培土生金法在临床的应用中有较好的疗效<sup>[1]</sup>,能够提高患者生活质量。本课题组研究发现参苓白术散等培土生金中药复方可以有效抑制肺癌增殖,且能够有效促进肺癌细胞凋亡与自噬<sup>[2,3]</sup>。白术是参苓白术散中的君药,它的提取物中最重要的小分子成分是名为白术内酯的化合物<sup>[4]</sup>,其中白术内酯 II (atractylenolide II, AT-II) 这一倍半萜单体,具有抗氧化、抗炎、抗癌等功能<sup>[4]</sup>。本课题的前期实验也证明了 AT-II 在体外可以抑制肺癌细胞的迁徙和转移<sup>[5,6]</sup>,但 AT-II 能否对体内肺癌细胞的凋亡产生影响尚不明确,故本文对 AT-II 是否可以影响肺癌小鼠模型肺癌细胞的凋亡做了初步探索。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

4~6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 40 只,体质量 18~22 g,购于辽宁长生生物技术股份有限公司,实验动物生产许可证号: NO. SCXK(辽)2020-0002。于辽宁中医药大学动物实验中心 SPF 级动物房饲养,小鼠生活环境为 12 h 白 12 h 黑,以早上 8 时和晚上 8 时为时间节点,温度 ( $22 \pm 1$ ) °C,湿度 45%~55%,自由进食饮水。适应性喂养一周后再建立模型。所有实验动物研究方法均遵循辽宁中医药大学伦理委员会的相关规定和要求,且获得本院动物护理和使用委员会批准审核,批准号: 21000042023048。

### 1.2 细胞株

小鼠 Lewis 肺癌细胞株购自南京凯基生物科技发展有限公司。

### 1.3 主要试剂与仪器

白术内酯 II (分析标准品, HPLC  $\geq 98\%$ , 批号: B20055, 上海源叶生物科技有限公司); RIPA 裂解

液(批号: 20221112, Solarbio); PMSF(批号: P0100, Solarbio); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号: 092622221125, Solarbio); DAPI(批号: D106471, 阿拉丁试剂上海有限公司)。

DY CZ-24DN 双垂直蛋白电泳仪(北京六一生物科技有限公司); WD-9413B 凝胶成像系统(北京六一生物科技有限公司); ELX-800 酶标仪(BIOTEK); DH36001B 电热恒温培养箱(天津泰斯特仪器有限公司); RM2235 石蜡切片机(Leica); QH01-9030A 电热恒温鼓风干燥箱(精宏实验设备有限公司)。

### 1.4 模型制备及给药

Lewis 肺癌细胞培养于 37 °C 含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内,选取对数生长期的细胞制作细胞悬液,浓度为  $2 \times 10^6$  个/mL。40 只雄性 C57BL/6 小鼠适应性喂养 7 d。采用左侧腋窝皮下注射 0.2 mL Lewis 肺癌细胞悬液于小鼠体内,接种后继续饲养 7 d,可扪及质地较硬肿块,则肿瘤组织形成,待其体积达到 50 mm<sup>3</sup>,视为模型建立成功。将造模成功的小鼠随机分为模型组(model, Mod)、白术内酯 II 低、中、高剂量组(L-AT-II、M-AT-II、H-AT-II),每组 10 只。参照课题组前期的实验方法<sup>[6]</sup>,白术内酯 II 低、中、高剂量组灌胃 0.2 mL 白术内酯 II (剂量依次为 25、50、100 mg/kg), 1 次/d,模型组灌胃等体积溶剂,1 次/d。各组连续干预 21 d,末次给药后 24 h,处死小鼠,分离肿瘤组织、脾组织,4% 多聚甲醛固定,部分液氮冻存后放入 -80 °C 超低温冰箱中保存,用于后续检测。

### 1.5 观察小鼠肿瘤生长情况,测定小鼠脾指数、肿瘤生长抑制率

造模成功后在给药第 3、6、9、12、15、18、21 d 分别测定小鼠肿瘤体积;药物干预 21 d 后麻醉处死小鼠,无菌分离肿瘤组织、脾组织,并测定小鼠体质量、脾质量、肿瘤质量、肿瘤体积,并计算脾指数、肿瘤生长抑制率:脾指数 = 脾质量/小鼠体重;肿瘤体积 =

(长径 × 短径<sup>2</sup>)/2; 肿瘤生长抑制率 = (模型组平均肿瘤质量 - 给药组平均肿瘤质量)/模型组平均肿瘤质量 × 100%。

### 1.6 Western blot 实验检测 p-JAK2、p-STAT3、PDL1 的蛋白表达

取小鼠肿瘤组织,匀浆,使用加入 PMSF 的 RIPA 裂解液(每 1 mL RIPA 加入 10 μL PMSF),严格按照蛋白裂解步骤提取蛋白,BCA 法进行蛋白定量、依次进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转印至 PVDF 膜、室温密封 1 h,洗膜并加一抗(JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、PDL1,稀释比例分别为 1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:500),4 ℃ 孵育过夜,洗膜加二抗(羊抗兔 IgG-HRP,稀释比例为 1:3 000),室温孵育 2 h,选用 GAPDH 作为内参,洒匀 ECL 发光液,凝胶成像系统导出图片。

### 1.7 免疫荧光法检测蛋白表达

取小鼠肿瘤组织,进行包埋切片,然后进行免疫荧光染色。将切片架分别浸于 I 级和 II 级二甲苯中脱蜡各 15 min;依次浸入 95%、85%、75% 乙醇各 1 min;PBS 漂洗,5 min × 3 次;置于抗原修复液中,高温低火修复 10 min;PBS 漂洗,5 min × 3 次;切片用吸水纸擦干,滴加山羊血清至完全覆盖组织,湿盒内室温 15 min;一抗用 PBS 稀释,滴加至完全覆盖组织,湿盒内 4 ℃ 过夜;PBS 漂洗,5 min × 3 次;滴加荧光二抗,室温孵育 60 min;PBS 漂洗,5 min × 3 次;擦干周围液体,滴加 DAPI 至完全覆盖组织以复染核;PBS 漂洗,5 min × 3 次;擦干周围液体,滴加抗荧光淬灭剂,盖玻片封片。于荧光显微镜下观察染色效果并拍照。

### 1.8 TUNEL 荧光染色法检测凋亡情况

取小鼠肿瘤组织,进行包埋切片,然后进行 TUNEL 染色。透化,滴加 0.1% Triton X-100(0.1% 柠檬酸钠盐配置)50 μL,室温放置 8 min;PBS 漂洗,5 min × 3 次;配制 TUNEL 反应液(TDT 酶、荧光标记液按 1:9 配制,即用即配,冰上操作)。擦干标本周围,滴加 TUNEL 反应液 50 μL;保湿、避光、37 ℃ 孵育 60 min;PBS 漂洗,5 min × 3 次;DAPI 复染,取出切片,滴加 DAPI 至完全覆盖组织,避光复染 5 min;PBS 漂洗,5 min × 3 次。取出切片,滴加荧光淬灭剂封片,显微镜下观察染色效果,并拍照。

### 1.9 数据统计与分析

采用 GraphPad Prism9.5.1 软件进行统计学分析,结果以平均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用单因素方差(ANOVA)分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 实验结果

### 2.1 AT-Ⅱ 对 Lewis 肺癌小鼠脾指数、肿瘤生长抑制率、肿瘤体积的影响

与模型组相比,白术内酯 II 低、中、高剂量组小鼠的脾指数统计学差异不显著( $P > 0.05$ )(见表 1)。与模型组相比,白术内酯 II 低、中、高剂量组的肿瘤体积和肿瘤质量明显下降,有统计学差异( $P < 0.05$ )(见表 2);白术内酯 II 低、中、高剂量组的肿瘤生长抑制率逐渐增加(见表 2);随着时间的变化,与模型组相比,给药组肿瘤体积增长缓慢(见图 1、图 2)。

表 1 AT-Ⅱ 对各组 Lewis 肺癌小鼠脾指数的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effects of AT-Ⅱ on spleen index of Lewis lung cancer mice in each group( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	脾指数 Spleen index
Mod	1.04 ± 0.04
L-AT-Ⅱ	1.08 ± 0.11
M-AT-Ⅱ	0.95 ± 0.12
H-AT-Ⅱ	0.96 ± 0.04

表 2 AT-Ⅱ 对各组 Lewis 肺癌小鼠肿瘤生长抑制率的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effects of AT-Ⅱ on tumor-inhibition rate of Lewis lung cancer mice in each group( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	肿瘤体积 Tumor volume (mm <sup>3</sup> )	肿瘤质量 Tumor mass (mg)	肿瘤生长抑制率 Tumor- inhibition rate (%)
Mod	457.24 ± 69.40	439.60 ± 41.94	-
L-AT-Ⅱ	362.89 ± 42.50 *	348.77 ± 39.42 *	20.64%
M-AT-Ⅱ	281.97 ± 27.36 **	254.79 ± 14.64 **	38.33%
H-AT-Ⅱ	272.73 ± 28.97 **	257.88 ± 29.32 **	40.35%

注:与 Mod 相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,下同。

Note:Compared with Mod,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,the same below.

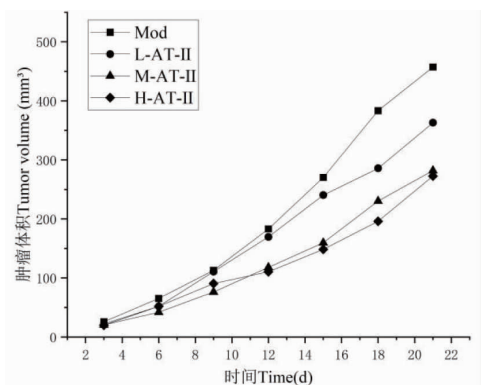


图 1 各组 Lewis 肺癌小鼠肿瘤体积变化( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 1 Change in tumor volume of Lewis lung cancer mice in each group( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

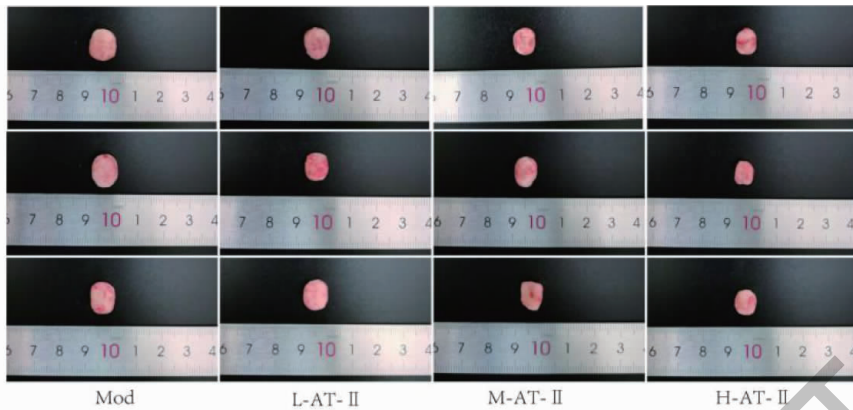


图2 各组 Lewis 肺癌小鼠肿瘤图

Fig. 2 The tumor picture of Lewis lung cancer mice in each group

## 2.2 AT-II 对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织 p-JAK2、p-STAT3、PDL1 蛋白表达的影响

与模型组相比,白术内酯 II 低、中、高剂量组

p-JAK2、p-STAT3、PDL1 蛋白的表达均显著降低 ( $P < 0.01$ ) (见图 3、表 3)。

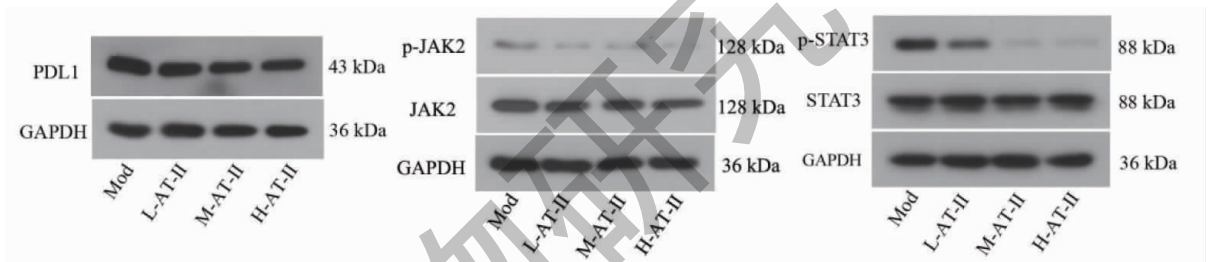


图3 AT-II 对各组 Lewis 肺癌小鼠 p-JAK2、p-STAT3、PDL1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 3 Effect of AT-II on the expression of p-JAK2, p-STAT3 and PDL1 of Lewis lung cancer mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

表3 各组 Lewis 肺癌小鼠 p-JAK2、p-STAT3、PDL1 蛋白表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 The expression of p-JAK2, p-STAT3 and PDL1 of Lewis lung cancer mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	p-JAK2/JAK2	p-STAT3/STAT3	PDL1
Mod	0.74 ± 0.01	1.09 ± 0.03	1.20 ± 0.00
L-AT-II	0.28 ± 0.02 **	0.57 ± 0.01 **	0.96 ± 0.01 **
M-AT-II	0.23 ± 0.02 **	0.12 ± 0.01 **	0.86 ± 0.02 **
H-AT-II	0.21 ± 0.03 **	0.10 ± 0.00 **	0.85 ± 0.02 **

## 2.3 免疫荧光染色结果

免疫荧光实验分析显示与模型组相比,白术内酯 II 低、中、高剂量组 p-JAK2 的表达均显著降低 ( $P < 0.01$ ), p-STAT3 较模型组在白术内酯 II 低剂量组的表达统计学差异不显著 ( $P > 0.05$ ),在白术内酯 II 中剂量组的表达统计学差异显著 ( $P < 0.01$ ),在白术内酯 II 高剂量组的表达有统计学差异 ( $P < 0.05$ ) (见图 4、表 4)

F4/80<sup>+</sup> 标志为总巨噬细胞, CD206<sup>+</sup> 标志为 M2 型巨噬细胞, 实验分析显示, 较模型组白术内酯 II 低、中、高剂量组中 M2 型的极化显著降低 ( $P < 0.01$ ); 总巨噬细胞差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (见图 4、表 4)。

## 2.4 AT-II 对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织细胞凋亡的影响

如图 2 所示, 凋亡细胞为红色, 蓝色为 DAPI 染

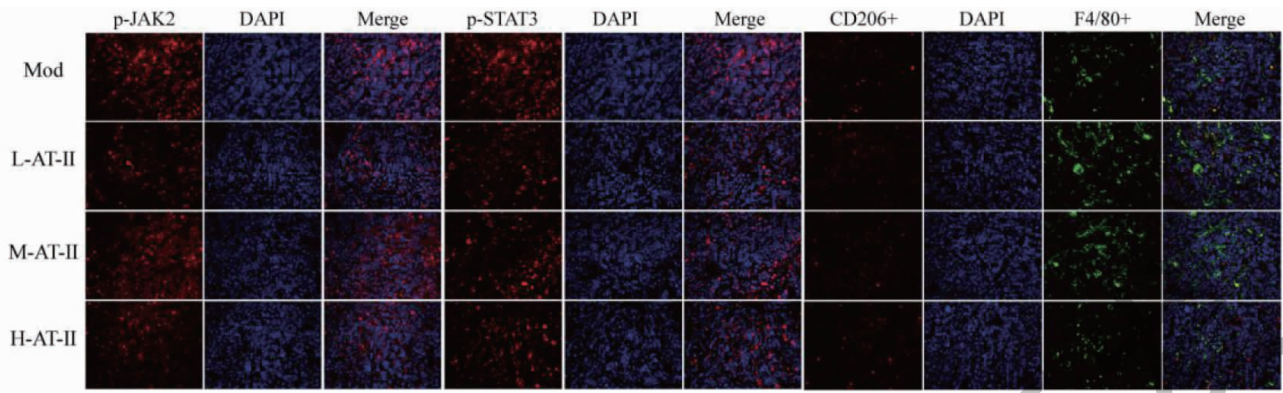


图 4 各组 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织免疫荧光(×400)

Fig. 4 Immunofluorescence in tumor tissues of mice with Lewis lung cancer in each group(×400)

表 4 各组 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织免疫荧光结果( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 4 Results of immunofluorescence in tumor tissues of mice with Lewis lung cancer( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	p-JAK2	p-STAT3	F4/80 <sup>+</sup>	CD206 <sup>+</sup>
Mod	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.02
L-AT-II	0.66 ± 0.04**	0.93 ± 0.03	0.96 ± 0.16	0.65 ± 0.12**
M-AT-II	0.57 ± 0.03**	0.82 ± 0.03*	1.05 ± 0.06	0.64 ± 0.14**
H-AT-II	0.51 ± 0.02**	0.66 ± 0.04**	1.09 ± 0.13	0.56 ± 0.05**

色。模型组有少量细胞凋亡,白术内酯 II 低、中、高剂量组凋亡细胞较模型组有不同程度的增加(见图 5)。分析图片并计算细胞凋亡指数,数据显示与模型组相比,白术内酯 II 低剂量组细胞凋亡指数无明

显差异( $P > 0.05$ ),白术内酯 II 中剂量组细胞凋亡指数升高( $P < 0.05$ ),白术内酯 II 高剂量组细胞凋亡指数显著升高( $P < 0.01$ )(见表 5)。

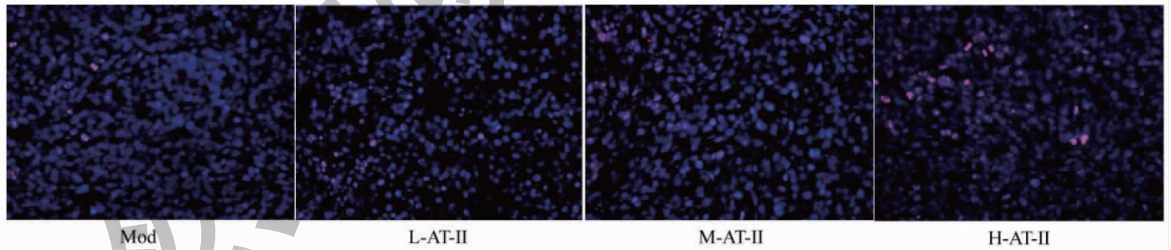


图 5 AT-II 对各组 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织细胞凋亡的影响(×400)

Fig. 5 Effect of AT-II on cell apoptosis rate in tumor tissue of Lewis lung cancer mice in each group(×400)

表 5 各组 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织细胞凋亡指数( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 5 Cell apoptosis rate in tumor tissue of Lewis lung cancer mice in each group( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	细胞凋亡指数 Cell apoptosis rate (%)
Mod	14.18 ± 1.22
L-AT-II	39.21 ± 8.23
M-AT-II	52.34 ± 16.58*
H-AT-II	72.83 ± 18.90**

### 3 讨论与结论

国际癌症研究机构编制的 GLOBOCAN 2022 发布癌症发病率和死亡率估计数,提供了全球癌症负担的最新情况,其中肺癌的死亡率和发病率都居首位<sup>[7]</sup>。在世界范围内肺癌仍然是癌症死亡的主要原因,并且肺癌病例和死亡人数也在上升。肺癌患者手术后癌细胞残留的风险很高,化疗和放疗是最常见的临床治疗策略,但总是伴随着许多副作用。近年来中医药成为一个热门话题,中药单体的相关

研究也越来越多,为肺癌提供了一种有希望的治疗方法,也可能是治疗老年晚期癌症患者的一种有前景的策略<sup>[8]</sup>。本研究中的白术内酯Ⅱ在一系列肿瘤细胞系<sup>[9,10]</sup>中表现出抗增殖、抗转移和免疫调节活性,因此它是治疗多种癌症的潜在候选药物<sup>[11]</sup>。

中医治疗肺癌最基本的理论是在机体免疫力过弱、肿瘤生长能力过强的情况下,通过“扶正”“祛邪”来调节机体失衡。“扶正”即增强机体的抗癌免疫力,而“祛邪”则直接抑制肿瘤细胞的生长、增殖、侵袭和迁移,促进其凋亡<sup>[12]</sup>。中药是中医治疗肺癌最重要的部分,可以调节肺癌细胞的增殖、凋亡、粘附和迁移,抑制肿瘤血管生成,改变宿主免疫系统,抑制肿瘤生长<sup>[13]</sup>,中医药在治疗相关症状控制中的作用日益突出。据统计在治疗肺癌的用药中,白术的使用尤为多<sup>[14]</sup>,它的主要药效成分是白术内酯、苍术酮等挥发油,提取物中最重要的小分子成分就是白术内酯,其最常见成分是白术内酯Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ,以往药理研究发现其具有抗肿瘤作用<sup>[15,16]</sup>。细胞凋亡在过去的三十年中得到了广泛的研究,并被确定为细胞发育和程序性死亡的主要机制,诱导细胞凋亡是药物杀伤肿瘤细胞的重要机制,所以本实验初步探索了 AT-Ⅱ对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织细胞凋亡的影响。

JAK2/STAT3 信号通路与机体多种功能相关,参与细胞增殖、分化、凋亡、免疫调节等重要生物学过程,一般认为,过度激活的 JAK2/STAT3 的信号通路可以促进细胞增殖、调节细胞周期以及各种肿瘤的发生发展<sup>[17]</sup>。异常激活的磷酸化 JAK2 招募 STAT3 蛋白,STAT3 在 JAK2 的作用下发生磷酸化,最后以二聚体的形式被转移到细胞核,最终结合 PD-L1 启动子并进行转录过程<sup>[18]</sup>。有数据表明通过下调 JAK2/STAT3/PDL1 信号通路可以抑制癌细胞的增殖和侵袭,促进细胞凋亡<sup>[19]</sup>。多项研究表明,JAK/STAT 信号通路是肿瘤细胞 PDL1 表达的上游关键信号通路<sup>[20]</sup>,这为肿瘤的临床治疗提供了巨大价值。

PDL1 在肿瘤微环境中表达于肿瘤和免疫细胞上,在肿瘤细胞表面表达的 PDL1 与 PD1 在肿瘤浸润淋巴细胞上结合,可向细胞内传递抑制性信号,减弱效应 T 细胞反应<sup>[21]</sup>,甚至可以诱导 T 细胞凋亡,抑制 T 细胞杀死肿瘤细胞,导致肿瘤细胞免疫逃逸。阻断 PDL1,肿瘤特异性 T 细胞扩增增加,凋亡 T 细胞数量相对减少,免疫系统有所恢复,肿瘤免疫

逃逸减少,肿瘤细胞凋亡增加。有实验证明,PDL1 降解后,T 细胞介导的细胞毒性增加,对肿瘤细胞杀伤力增加<sup>[22]</sup>,促进癌细胞凋亡。因此,阻断 PDL1 可能会恢复免疫系统对肿瘤细胞的杀伤作用,增加肿瘤细胞凋亡。另外肿瘤微环境对肿瘤的发生发展起着很大作用,PDL1 在肿瘤相关巨噬细胞中的表达比在肿瘤细胞中的表达更稳定,而在肿瘤微环境中,肿瘤相关巨噬细胞是 PDL1 表达的主要来源<sup>[23]</sup>。

巨噬细胞分为经典活化型(M1 型)和替代活化型(M2 型),其中 M1 型巨噬细胞具有抑癌作用;而 M2 型巨噬细胞,对肿瘤有一定的促进作用。目前的研究认为,F4/80 是巨噬细胞的经典通用标志物,既识别 M1 型又识别 M2 型巨噬细胞,被广泛用于标记总巨噬细胞;CD206 是 M2 型巨噬细胞的常用标志物。

本课题主要采用 Western blot 法、免疫荧光法测定各组 Lewis 肺癌小鼠模型肿瘤组织相关蛋白的表达,并用 TUNEL 检测法观察细胞凋亡情况。实验结果表明,给药 AT-Ⅱ后抑制了 JAK2、STAT3 的活化与磷酸化,降低 PDL1 蛋白的表达,增加肿瘤细胞凋亡。各组 F4/80<sup>+</sup> 巨噬细胞表达量无差异,但 AT-Ⅱ能够降低肿瘤组织 CD206<sup>+</sup> 的比例,说明 AT-Ⅱ通用调控 PDL1 的表达影响了 M2 型肿瘤相关巨噬细胞的极化。同时测定各组 Lewis 肺癌小鼠的肿瘤体积、重量,并计算肿瘤生长抑制率,结果证明,AT-Ⅱ中、高剂量组对肿瘤的治疗效果显著。说明 AT-Ⅱ可以通过抑制 JAK2/STAT3/PDL1 通路,诱导 Lewis 肺癌小鼠模型肿瘤组织细胞的凋亡。进一步为中药可诱导肿瘤组织细胞凋亡,用于治疗 and 干预肺癌发生发展提供了有力的科学依据。

#### 参考文献

- 1 Wang F, Wu WG, Wang Q, et al. Method of reinforcing earth to strengthen metal plus chemotherapy for non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2017, 28: 802-808.
- 2 Zhang YT, Liu YX, Jiang ZY, et al. Study of I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B pathway about regulation of autophagy in Lewis lung cancer mice through reinforcing shenlingbaizhu powder [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol* (世界科学技术-中医药现代化), 2022, 24: 1487-1494.
- 3 Zhang YT, Liu YX, Jiang ZY, et al. Intervention effect of Shenling Baizhu powder on tumor apoptosis in Lewis lung

- cancer mice through TLR4/MyD88 pathway [J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharm* (中医药导报), 2021, 27:41-45.
- 4 Bailly C. Atractylenolides, essential components of atractyloides-based traditional herbal medicines; antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 891:173735.
  - 5 Zhang Y, Liu Y, Wang J, et al. Atractylenolide II inhibits tumor-associated macrophages (TAMs)-induced lung cancer cell metastasis [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2022, 44:227-237.
  - 6 Jiang ZY, Zhao YH, Zhang YT, et al. Atractyloide II inhibits A549 cell migration by reversing M2 type macrophage polarization and regulating PDL1 expression [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2023, 35:1857-1863.
  - 7 Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74:229-263.
  - 8 Xue D, Han SY, Jiang ST, et al. Comprehensive geriatric assessment and traditional Chinese medicine intervention benefit symptom control in elderly patients with advanced non-small cell lung cancer [J]. *Med Oncol*, 2015, 32:114.
  - 9 Tian S, Ren L, Liu C, et al. Atractylenolide II suppresses glycolysis and induces apoptosis by blocking the PADI3-ERK signaling pathway in endometrial cancer cells [J]. *Molecules*, 2024, 29:939.
  - 10 Dou SH, Yang C, Zou DF, et al. Atractylenolide II induces cell cycle arrest and apoptosis in breast cancer cells through ER pathway. [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2021, 34:1449-1458.
  - 11 Jiang Y, Guo KB, Wang PP, et al. The antitumor properties of atractylenolides; molecular mechanisms and signaling pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 155:113699.
  - 12 Zhang L, Zhang FY, Li GF. Traditional Chinese medicine and lung cancer—from theory to practice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 137:111381.
  - 13 Ye L, Jia YN, Sanders AJ, et al. Traditional Chinese medicine in the prevention and treatment of cancer and cancer metastasis [J]. *Oncol Lett*, 2015, 10:1240-1250.
  - 14 Duan HJ, Ning YM, Wu GT, et al. Visualization analysis of TCM syndromes and medication rules of non-small cell lung cancer [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2023, 39:87-92.
  - 15 Yang C, Nasser M, Zhu S, et al. Antitumor activity of atractylenolide II on breast cancer cells through regulation of estrogen receptor protein expression and NF- $\kappa$ B signaling pathways [J]. *J Carcinog Mutagen*, 2019, 10:1-9.
  - 16 Zhang D, Li XF, Song DQ, et al. Atractylenolide III induces apoptosis by regulating the Bax/Bcl-2 signaling pathway in human colorectal cancer HCT-116 Cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Anticancer Drugs*, 2021, 33:30-47.
  - 17 Zhou QL, Huang JS, Ji GL. The review of the relationship between the JAK-STAT signaling pathway and apoptosis of cancer cell [J]. *J Gannan Med Univ* (赣南医学院学报), 2022, 42:792-799.
  - 18 Marzec M, Zhang Q, Goradia A, et al. Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1) [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105:20852-20857.
  - 19 Chen Y, Li F, Li D, et al. Atezolizumab and blockade of LncRNA PVT1 attenuate cisplatin resistant ovarian cancer cells progression synergistically via JAK2/STAT3/PD-L1 pathway [J]. *Clin Immunol*, 2021, 227:108728.
  - 20 Zhu JF, Li Y, Lv X. IL411 enhances PD-L1 expression through JAK/STAT signaling pathway in lung adenocarcinoma [J]. *Immunogenetics*, 2023, 75:17-25.
  - 21 Topalian SL, Weiner GJ, Pardoll DM. Cancer immunotherapy comes of age [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29:4828-4836.
  - 22 Wang HB, Yao H, Li CS, et al. HIP1R targets PD-L1 to lysosomal degradation to alter T cell-mediated cytotoxicity [J]. *Nat Chem Biol*, 2019, 15:42-50.
  - 23 Ye H, Yu WW, Li YL, et al. AIM2 fosters lung adenocarcinoma immune escape by modulating PD-L1 expression in tumor-associated macrophages via JAK/STAT3 [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2023, 19:2269790.