

枸杞多糖抑制口腔癌细胞增殖、迁移及免疫逃逸的机制研究[△]

李锦宇*, 徐晓雨, 王钰卓(安徽医科大学附属滁州医院/滁州市第一人民医院口腔科, 安徽 滁州 239000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)17-2134-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.17.09



摘要 目的 探索枸杞多糖调节T细胞免疫球蛋白黏蛋白3(TIM3)/半乳糖凝集素9(Gal-9)信号通路对口腔癌细胞增殖、迁移和免疫逃逸的影响。方法 将口腔癌KB、CAL27细胞分为对照组、低浓度枸杞多糖组(200 μg/mL)、高浓度枸杞多糖组(400 μg/mL)、pcDNA-NC组(转染pcDNA-NC质粒)、pcDNA-TIM3组(转染pcDNA-TIM3质粒)、高浓度枸杞多糖+pcDNA-NC组(400 μg/mL枸杞多糖+转染pcDNA-NC质粒)、高浓度枸杞多糖+pcDNA-TIM3组(400 μg/mL枸杞多糖+转染pcDNA-TIM3质粒)。测定细胞的增殖、迁移、侵袭能力, T细胞杀伤率, 细胞上清液中干扰素 γ (IFN- γ)、白细胞介素2(IL-2)水平, 以及细胞中TIM3、Gal-9 mRNA表达, 以及细胞中吲哚胺2,3-双加氧酶1(IDO1)、程序性死亡受体配体1(PD-L1)、TIM3、Gal-9蛋白表达。结果 与对照组比较, 低、高浓度枸杞多糖组2种细胞的克隆形成率、划痕愈合率、侵袭细胞数以及IDO1、PD-L1蛋白和TIM3、Gal-9 mRNA及其蛋白表达水平均显著降低/减少($P < 0.05$), 增殖抑制率、T细胞杀伤率和IFN- γ 、IL-2水平均显著升高($P < 0.05$); 与对照组、pcDNA-NC组比较, pcDNA-TIM3组2种细胞的克隆形成率、划痕愈合率、侵袭细胞数以及IDO1、PD-L1蛋白和TIM3、Gal-9 mRNA及其蛋白表达水平均显著升高/增加($P < 0.05$), 增殖抑制率、T细胞杀伤率和IFN- γ 、IL-2水平均显著降低($P < 0.05$); 与高浓度枸杞多糖组、高浓度枸杞多糖+pcDNA-NC组比较, 高浓度枸杞多糖+pcDNA-TIM3组2种细胞的克隆形成率、划痕愈合率、侵袭细胞数以及IDO1、PD-L1蛋白和TIM3、Gal-9 mRNA及其蛋白表达水平均显著升高/增加($P < 0.05$), 增殖抑制率、T细胞杀伤率和IFN- γ 、IL-2水平均显著降低($P < 0.05$)。结论 枸杞多糖可能通过抑制TIM3/Gal-9信号通路来抑制口腔癌细胞增殖、迁移和免疫逃逸。
关键词 枸杞多糖; 口腔癌; T细胞免疫球蛋白黏蛋白3; 半乳糖凝集素9; 增殖; 迁移; 免疫逃逸

Study on the mechanism of *Lycium barbarum* polysaccharides inhibiting the proliferation, migration and immune escape of oral cancer cells

LI Jinyu, XU Xiaoyu, WANG Yuzhuo (Dept. of Stomatology, the Affiliated Chuzhou Hospital of Anhui Medical University/Chuzhou First People's Hospital, Anhui Chuzhou 239000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the effects of *Lycium barbarum* polysaccharides on the proliferation, migration, and immune escape of oral cancer cells by regulating the T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3 (TIM3)/galectin-9 (Gal-9) signaling pathway. **METHODS** Human oral cancer cells KB and CAL27 were assigned to control group, *L. barbarum* polysaccharides low-concentration group (200 μg/mL), *L. barbarum* polysaccharides high-concentration group (400 μg/mL), pcDNA-NC group (transfection of pcDNA-NC plasmid), pcDNA-TIM3 group (transfection of pcDNA-TIM3 plasmid), high concentration of *L. barbarum* polysaccharides+pcDNA-NC group (400 μg/mL *L. barbarum* polysaccharides + transfection of pcDNA-NC plasmid), and high concentration of *L. barbarum* polysaccharides+pcDNA-TIM3 group (400 μg/mL *L. barbarum* polysaccharides + transfection of pcDNA-TIM3 plasmid). The proliferation, migration and invasion abilities of the cells, T cell killing rate as well as the levels of interferon- γ (IFN- γ) and interleukin-2 (IL-2) in the cell supernatant were measured. mRNA expressions of TIM3 and Gal-9 and protein expressions of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1), programmed death-ligand 1 (PD-L1), TIM3 and Gal-9 in the cells were also determined. **RESULTS** Compared with control group, the clone formation rate, scratch healing rate, the number of invasive cells, protein expressions of IDO1 and PD-L1, mRNA and protein expressions of TIM3 and Gal-9 in both cell types of *L. barbarum* polysaccharide low- and high-concentration groups were decreased significantly ($P < 0.05$), while the proliferation inhibition rate, T cell killing rate, and the levels of IFN- γ and IL-2 were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with control group and pcDNA-NC group, the clone formation rate, scratch healing rate, the number of invasive cells, and protein expressions of IDO1 and PD-L1, mRNA and protein expressions of TIM3 and Gal-9 in both cell types of the pcDNA-TIM3 group were all significantly increased ($P < 0.05$), while the proliferation inhibition rate, T cell killing rate, IFN- γ and IL-2 levels were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with *L. barbarum* polysaccharides high-concentration group and high concentration of *L. barbarum* polysaccharides+pcDNA-NC group, the clone formation rate, scratch healing rate, the number of invasive cells, and protein expressions of IDO1 and PD-L1, mRNA and protein expressions of TIM3 and Gal-9 in both cell types of high concentration of *L. barbarum* polysaccharides+pcDNA-TIM3 group were significantly

[△]基金项目 安徽省自然科学基金项目(No.2408085QB059)

* 第一作者 主治医师。研究方向: 口外、口内修复。E-mail:

18326905112@163.com

increased ($P < 0.05$), while the proliferation inhibition rate, T cell killing rate, and the levels of IFN- γ and IL-2 were significantly decreased ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS** *L. barbarum* polysaccharides may inhibit the proliferation, migration, and immune escape of oral cancer cells by suppressing TIM3/Gal-9 signaling pathway.

KEYWORDS *Lycium barbarum* polysaccharides; TIM3; galectin-9; oral cancer; proliferation; migration; immune escape

口腔癌是指发生在唇、牙龈、舌等部位的恶性肿瘤,90%以上为鳞状细胞癌^[1]。作为常见肿瘤,其发病率和死亡率较高,新发病例占有癌症的2%^[1-2]。据统计,由于其早期症状隐匿,全球超半数口腔癌患者确诊时已处于晚期,尽管采取了手术、放化疗等手段进行治疗,患者的总生存期仍未得到明显改善,5年生存率仅40%左右^[3-4]。因此,探索新型靶向治疗策略对口腔癌的治疗具有重要意义。

枸杞多糖是枸杞的重要功能成分,具有调节免疫、抗癌等多种活性^[5],且可促进人舌鳞状癌细胞的凋亡^[6]。T细胞免疫球蛋白黏蛋白3(T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3, TIM3)为负性免疫调节因子,可与半乳糖凝集素9(galectin-9, Gal-9)结合,从而调控免疫功能;且TIM3/Gal-9信号通路与癌症(包括前列腺癌、乳腺癌、头颈癌等)的发生密切相关^[7]。已有研究发现,TIM3/Gal-9信号通路在口咽、头颈部鳞状细胞癌中发挥着重要作用,在人乳头瘤病毒阳性的口咽、头颈部鳞状细胞癌患者中,CD4⁺T细胞内的Gal-9表达量增加^[8]。近年的研究表明,下调TIM3/Gal-9信号通路可抑制肺癌细胞免疫逃逸,而枸杞多糖可抑制胆囊癌细胞的免疫逃逸^[9-10]。因此,笔者推测枸杞多糖也可能通过调控TIM3/Gal-9信号通路来影响口腔癌细胞的免疫逃逸。基于以上背景,本研究主要探讨枸杞多糖对口腔癌细胞增殖、迁移和免疫逃逸的影响,并从TIM3/Gal-9信号通路角度出发探索其可能的作用机制,以期为临床有效治疗口腔癌提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

XSP-17C型倒置显微镜购自上海光密仪器有限公司;RMR-2208L型酶标仪购自南京焯创科技有限公司;BB15型细胞培养箱购自美国Thermo Fisher Scientific公司;QuantStudio[®]3型qRT-PCR仪购自美国Applied Biosystems公司;5200T型凝胶成像仪购自上海天能生命科学有限公司。

1.2 主要药品与试剂

枸杞多糖对照品(批号wkq-08032,纯度98%)购自四川维克奇生物科技有限公司;pcDNA-NC质粒、pcDNA-TIM3质粒(批号分别为MG53241-UT、HG10390-ACG)均购自北京义翘神州科技股份有限公司;Lipofectamine 2000试剂、DMEM培养基(批号分别为11668019、11965092)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;CCK-8、MTT细胞增殖检测试剂盒(批号

分别为BB-4202、BB-4201)均购自上海贝博生物科技有限公司;干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素2(interleukin-2, IL-2)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为97024ES96、97029ES96)均购自翌圣生物科技(上海)有限公司;兔抗人吲哚胺2,3-双加氧酶1(indoleamine 2,3-dioxygenase 1, IDO1)、程序性死亡受体配体1(programmed death-ligand 1, PD-L1)、TIM3、Gal-9、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体和山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(批号分别为ab211017、ab205921、ab241332、ab314081、ab9485、ab205718)均购自英国Abcam公司;TIM3、Gal-9、 β -肌动蛋白(β -actin)的引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司设计并合成。

1.3 细胞

人口腔癌KB、CAL27细胞均购自美国ATCC公司(批号分别为21A11C21L11、CRL-2095)。

2 方法

2.1 细胞培养

取KB、CAL27细胞分别接种于DMEM培养基中(含有10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素),并将其放入培养箱内(温度为37℃,CO₂浓度为5%)进行培养。在此期间,培养液需定时更换,并使用对数生长期细胞进行后续实验。

2.2 枸杞多糖给药浓度筛选

将KB、CAL27细胞接种于96孔板中,密度为 3×10^3 个/孔。实验设置不同质量浓度(50、100、200、400、800 $\mu\text{g/mL}$ ^[7])的枸杞多糖组、对照组(含细胞和空白培养基),每组设置6个复孔;同时设置空白组(不含细胞,仅含空白培养基)。将细胞置于培养箱内进行常规培养,24 h后加入枸杞多糖或空白培养基,继续培养48 h,加入CCK-8溶液(10 μL /孔)进行培养,1 h后测定各孔吸光度(A)值,并计算细胞存活率。细胞存活率(%)=(实验组A值-空白组A值)/(对照组A值-空白组A值) $\times 100\%$ 。

2.3 细胞分组、培养

将KB、CAL27细胞分别分为对照组、低浓度枸杞多糖组、高浓度枸杞多糖组、pcDNA-NC组、pcDNA-TIM3组、高浓度枸杞多糖+pcDNA-NC组、高浓度枸杞多糖+pcDNA-TIM3组,每组设置6个复孔。其中,对照组进行正常培养;低浓度枸杞多糖组使用200 $\mu\text{g/mL}$ 的枸杞多糖处理48 h;高浓度枸杞多糖组使用400 $\mu\text{g/mL}$ 的枸杞多糖处理48 h;pcDNA-NC组、pcDNA-TIM3组仅使用Lipofectamine 2000试剂将pcDNA-NC、pcDNA-TIM3质粒分别转染至KB、CAL27细胞24 h;高浓度枸杞多糖+

pcDNA-NC 组使用 Lipofectamine 2000 试剂将 pcDNA-NC 质粒转染至 KB、CAL27 细胞, 24 h 后再使用 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的枸杞多糖处理 48 h; 高浓度枸杞多糖+pcDNA-TIM3 组使用 Lipofectamine 2000 试剂将 pcDNA-TIM3 质粒转染至 KB、CAL27 细胞, 24 h 后再使用 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的枸杞多糖处理 48 h。质粒转染按照 Lipofectamine 2000 试剂说明书进行, KB、CAL27 细胞的转染效率均在 70%~80% 之间, 与相关文献报道相符^[11]。

2.4 细胞增殖能力考察

2.4.1 克隆形成实验

取对数生长期 KB、CAL27 细胞, 接种于培养皿中 (2×10^3 个/皿), 细胞分组、给药同“2.3”项下, 持续培养 2 周, 肉眼可观察到克隆形成后弃去培养液, 使用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗后用 4% 多聚甲醛固定, 30 min 后加入 Giemsa 染液进行染色, 10 min 后再次进行清洗并干燥, 然后使用倒置显微镜进行观察, 计算克隆形成率。克隆形成率 (%) = 形成的克隆数/接种的细胞数 $\times 100\%$ 。

2.4.2 MTT 实验

取对数生长期 KB、CAL27 细胞, 接种于 96 孔板中 (2×10^3 个/孔), 细胞分组、给药、培养同“2.3”项下, 并设置空白组 (不含细胞的培养基)。随后分别加入 5 mg/mL MTT 溶液 (20 $\mu\text{L}/\text{孔}$) 进行培养, 4 h 后弃去上清液, 然后加入二甲基亚砜 (150 $\mu\text{L}/\text{孔}$) 进行培养, 10 min 后使用酶标仪在波长 570 nm 处对每个孔的 A 值进行测定, 并计算细胞增殖抑制率。增殖抑制率 (%) = (对照组 A 值 - 实验组 A 值) / (对照组 A 值 - 空白组 A 值) $\times 100\%$ 。

2.5 细胞迁移、侵袭能力测定

2.5.1 迁移能力考察

取对数生长期 KB、CAL27 细胞, 接种于 6 孔板中 (2×10^5 个/孔), 细胞分组、给药、培养同“2.3”项下。培养结束后, 使用枪头制造划痕, 然后加入 PBS 冲洗被划掉的细胞, 并置于显微镜下观察、拍照 (0 h), 接着将细胞放入培养箱 (37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2) 中进行培养, 24 h 后再次置于显微镜下观察、拍照。使用 Image J 软件分析 0、24 h 的划痕宽度, 并计算划痕愈合率。划痕愈合率 (%) = (0 h 划痕宽度 - 24 h 划痕宽度) / 0 h 划痕宽度 $\times 100\%$ 。

2.5.2 侵袭能力考察

取对数生长期 KB、CAL27 细胞, 接种于 6 孔板中 (2×10^5 个/孔), 细胞分组、给药、培养同“2.3”项下。培养结束后, 将细胞 (200 μL) 加到 Transwell 小室的上室 (含有 Matrigel 基质胶), 并在 Transwell 小室的下室中加入培养基 (含 20% 胎牛血清, 添加量 600 μL), 继续培养 24 h; 清洗上室, 接着使用 4% 多聚甲醛进行固定, 20 min 后进行染色 (以 0.1% 结晶紫染液染 20 min)。使用显微镜观察, 每次随机选择 5 个视野进行侵袭细胞计数。

2.6 T 细胞杀伤率测定

取对数生长期 KB、CAL27 细胞, 以 1×10^4 个/孔接

种于 96 孔板中, 常规培养至贴壁。按“2.3”项下方法分组并加入对应药物, 预处理靶细胞 48 h 后, 弃去含药培养基, 加入同批次药物预处理 48 h 的细胞因子诱导杀伤细胞 (1×10^5 个/孔), 补充新鲜含药培养基至总体积为 100 μL , 启动共培养 (此时为共培养 0 h)。同时设置释放对照组: (1) 靶细胞自发释放组 (1×10^4 个靶细胞/孔 + 100 μL 无药培养基); (2) 效应细胞自发释放组 (1×10^5 个效应细胞/孔 + 100 μL 无药培养基); (3) 最大释放组 (1×10^4 个靶细胞/孔 + 100 μL 无药培养基; 共培养结束前 1 h 加入 Triton X-100, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h)。释放对照组与实验组同步培养 (不加药)。共培养 48 h 后, 以 $300 \times g$ 离心 5 min, 小心吸取每孔上清液 50 μL 至新的 96 孔板中。向所有检测孔中加入乳酸脱氢酶释放试剂孵育 1 min, 随后加入乳酸脱氢酶检测液避光孵育 30 min, 最后使用酶标仪测定各孔 A 值 (波长 450 nm 处), 并计算 T 细胞杀伤率。T 细胞杀伤率 (%) = (实验组 A 值 - 靶细胞自发释放组 A 值 - 效应细胞自发释放组 A 值) / (最大释放组 A 值 - 靶细胞自发释放组 A 值) $\times 100\%$ 。

2.7 细胞上清液中 IFN- γ 、IL-2 水平测定

采用 ELISA 法测定。取对数生长期 KB、CAL27 细胞, 接种于 6 孔板中 (2×10^5 个/孔), 常规培养至贴壁。按“2.3”项下方法分组并加入对应药物, 预处理靶细胞 48 h 后, 弃去含药培养基。每孔加入经同批次药物预处理 48 h 的 $\text{CD}8^+$ T 细胞 (2×10^6 个/孔), 同时补充新鲜含药培养基至适宜体积, 启动共培养 (此时为共培养 0 h)。共培养 48 h 后, 以 $300 \times g$ 离心 5 min, 收集上清液。按 ELISA 试剂盒说明书操作检测细胞上清液中 IFN- γ 、IL-2 水平。

2.8 细胞中 TIM3、Gal-9 mRNA 表达测定

采用 qRT-PCR 法测定。取对数生长期 KB、CAL27 细胞, 接种于 6 孔板中 (2×10^5 个/孔), 细胞分组、给药、培养同“2.3”项下。培养结束后, 采用 Trizol 试剂提取细胞中总 RNA, 并测定其浓度, 然后使用反转录试剂盒将其反转录为 cDNA, 并以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 反应。反应体系: $2 \times \text{SYBR Green Mix}$ 10 μL , 正、反向引物各 0.8 μL , cDNA 2 μL , ddH₂O 6.4 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火/延伸 30 s, 循环 40 次。以 β -actin 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各目的基因的表达水平。引物序列及产物扩增长度见表 1。

表 1 引物序列及产物扩增长度

基因	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')	产物扩增长度/bp
TIM3	CTACATCGGAGCAGGGTA	CTGAGGGAGGGAGGTTG	197
Gal-9	TCTGGGACTATTCAAGGAGGTC	CAGGAGGCATGTGCTGATGAT	235
β -actin	CTCGCCTTGCCGATCC	GGGGTACTTCAGGGTGAGGA	126

2.9 细胞中 IDO1、PD-L1、TIM3、Gal-9 蛋白表达检测

采用 Western blot 法检测。取对数生长期 KB、CAL27 细胞, 接种于 6 孔板中 (2×10^5 个/孔), 细胞分组、给药、培养同“2.3”项下。培养结束后, 加入 RIPA 裂解液

进行裂解以提取细胞中总蛋白,测定总蛋白浓度,经过电泳(电压120 V,电泳时间120 min)、转膜(电流200 mA,转膜时间90 min)后,使用5%脱脂牛奶封闭;2 h后进行清洗,接着加入IDO1、PD-L1、TIM3、Gal-9、GAPDH抗体(稀释比例均为1:1 000),4 °C孵育过夜;加入二抗(稀释比例为1:5 000),室温孵育1 h;加入ECL显影,并使用Image J软件对各组条带的灰度值进行分析,以目的蛋白与内参蛋白(GAPDH)条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达水平。

2.10 统计学方法

采用SPSS 25.0软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步的组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 不同浓度枸杞多糖对口腔癌细胞存活率的影响

与对照组比较,不同质量浓度枸杞多糖组KB、CAL27细胞的存活率均显著降低($P<0.05$),结果见表2。综合考虑在保证具有显著抑制细胞活性的作用的同时,避免过高质量浓度对细胞造成毒性破坏,本研究选择了在细胞活性被抑制约50%时的质量浓度400 $\mu\text{g/mL}$ 作为高浓度,以及1个具有明显抑制效果的中间质量浓度200 $\mu\text{g/mL}$ 作为低浓度,进行后续相关研究。

表2 各组细胞的存活率比较($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

组别	KB细胞	CAL27细胞
对照组	98.96 \pm 0.74	99.26 \pm 0.85
50 $\mu\text{g/mL}$ 枸杞多糖组	85.64 \pm 7.33 ^a	88.62 \pm 7.52 ^a
100 $\mu\text{g/mL}$ 枸杞多糖组	74.61 \pm 6.87 ^a	76.59 \pm 8.01 ^a
200 $\mu\text{g/mL}$ 枸杞多糖组	59.84 \pm 6.12 ^a	62.34 \pm 6.57 ^a
400 $\mu\text{g/mL}$ 枸杞多糖组	43.92 \pm 5.05 ^a	45.15 \pm 5.32 ^a
800 $\mu\text{g/mL}$ 枸杞多糖组	36.15 \pm 4.26 ^a	39.62 \pm 4.67 ^a

a:与对照组比较, $P<0.05$ 。

3.2 枸杞多糖对口腔癌细胞增殖的影响

与对照组比较,低、高浓度枸杞多糖组2种细胞的克隆形成率均显著降低($P<0.05$),增殖抑制率均显著升高($P<0.05$),且高浓度枸杞多糖组的作用强于低浓度

枸杞多糖组($P<0.05$);与对照组、pcDNA-NC组比较,pcDNA-TIM3组2种细胞的克隆形成率均显著升高($P<0.05$),增殖抑制率均显著降低($P<0.05$);与高浓度枸杞多糖组、高浓度枸杞多糖+pcDNA-NC组比较,高浓度枸杞多糖+pcDNA-TIM3组2种细胞的克隆形成率均显著升高($P<0.05$),增殖抑制率均显著降低($P<0.05$)。结果见表3、图1。

表3 各组细胞的克隆形成率、增殖抑制率比较($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

组别	KB细胞		CAL27细胞	
	克隆形成率	增殖抑制率	克隆形成率	增殖抑制率
对照组	77.22 \pm 8.14	8.31 \pm 0.09	79.36 \pm 8.21	8.43 \pm 0.12
低浓度枸杞多糖组	60.16 \pm 6.48 ^a	21.54 \pm 2.82 ^a	58.35 \pm 6.06 ^a	23.16 \pm 2.86 ^a
高浓度枸杞多糖组	41.53 \pm 4.72 ^{ab}	40.85 \pm 5.16 ^{ab}	39.42 \pm 4.03 ^{ab}	42.38 \pm 5.09 ^{ab}
pcDNA-NC组	76.45 \pm 7.63	8.25 \pm 0.08	80.12 \pm 8.35	8.39 \pm 0.11
pcDNA-TIM3组	92.78 \pm 9.35 ^{ac}	1.12 \pm 0.04 ^{ac}	95.16 \pm 9.41 ^{ac}	1.16 \pm 0.05 ^{ac}
高浓度枸杞多糖+pcDNA-NC组	42.27 \pm 4.85	41.46 \pm 5.44	40.38 \pm 4.11	43.11 \pm 5.02
高浓度枸杞多糖+pcDNA-TIM3组	73.36 \pm 7.51 ^{ac}	14.63 \pm 2.78 ^{ac}	75.14 \pm 7.82 ^{ac}	16.03 \pm 2.80 ^{ac}

a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与低浓度枸杞多糖组比较, $P<0.05$;c:与pcDNA-NC组比较, $P<0.05$;d:与高浓度枸杞多糖组比较, $P<0.05$;e:与高浓度枸杞多糖+pcDNA-NC组比较, $P<0.05$ 。

3.3 枸杞多糖对口腔癌细胞迁移、侵袭的影响

与对照组比较,低、高浓度枸杞多糖组2种细胞的划痕愈合率和侵袭细胞数均显著降低/减少($P<0.05$),且高浓度枸杞多糖组较低浓度枸杞多糖组降低/减少得更明显($P<0.05$);与对照组、pcDNA-NC组比较,pcDNA-TIM3组2种细胞的划痕愈合率和侵袭细胞数均显著升高/增加($P<0.05$);与高浓度枸杞多糖组、高浓度枸杞多糖+pcDNA-NC组比较,高浓度枸杞多糖+pcDNA-TIM3组2种细胞的划痕愈合率和侵袭细胞数均显著升高/增加($P<0.05$)。结果见图2、图3和表4。

3.4 枸杞多糖对口腔癌细胞免疫逃逸的影响

与对照组比较,低、高浓度枸杞多糖组2种细胞的T细胞杀伤率和IFN- γ 、IL-2水平均显著升高($P<0.05$),IDO1、PD-L1蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$),且高浓度枸杞多糖组上述指标变化较低浓度枸杞多糖组更

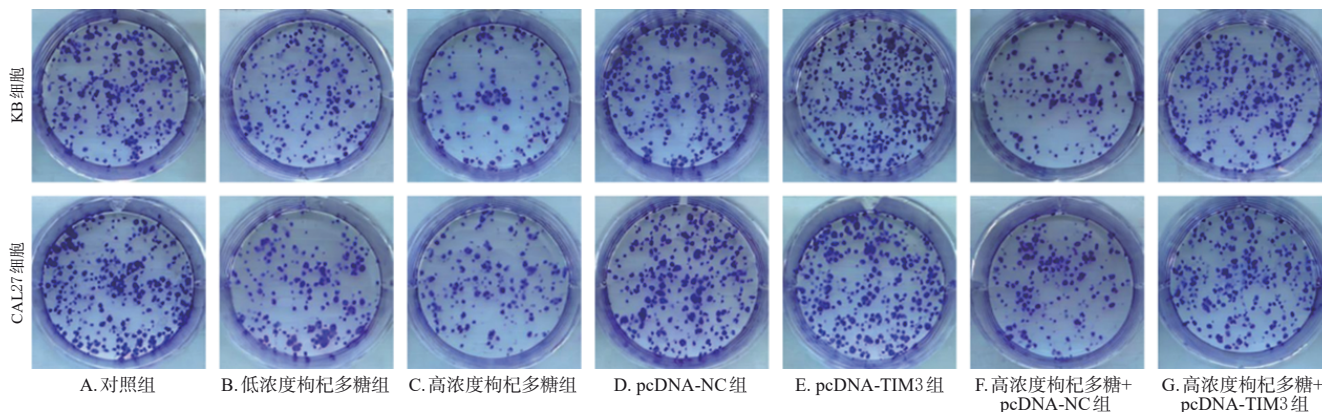


图1 各组细胞克隆形成实验结果(培养皿直径:60 mm)

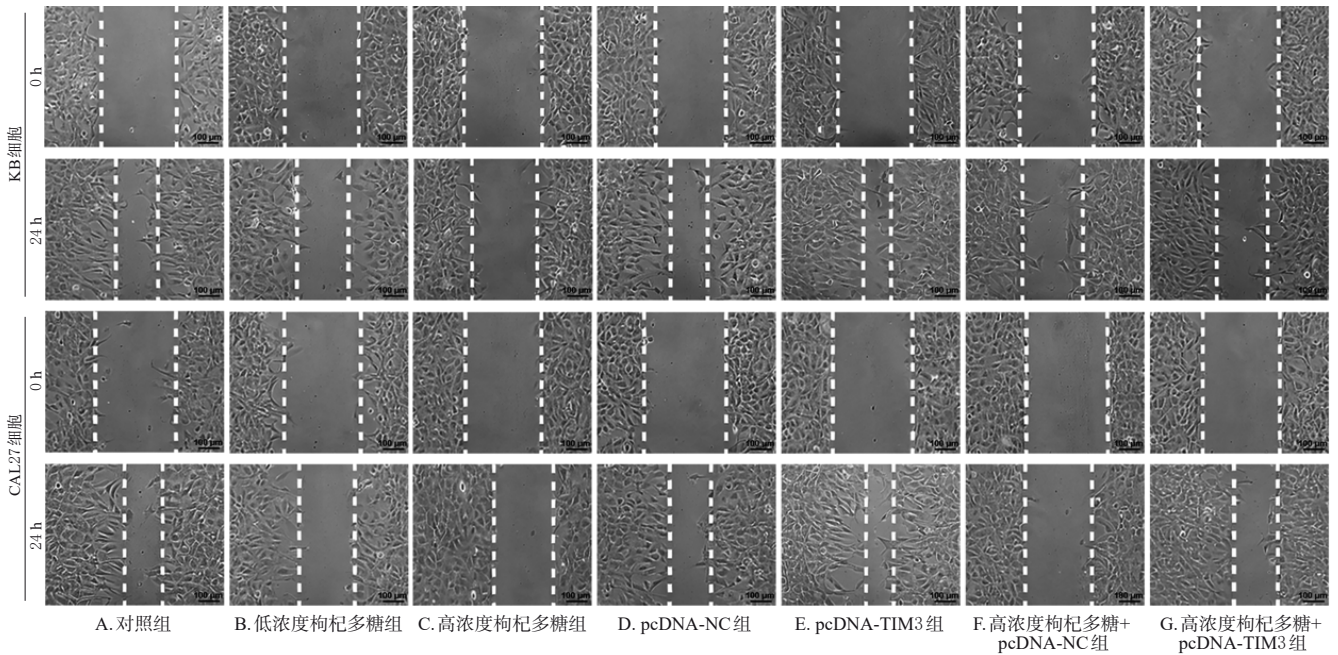


图2 各组细胞的划痕实验结果(标尺:100 μm)

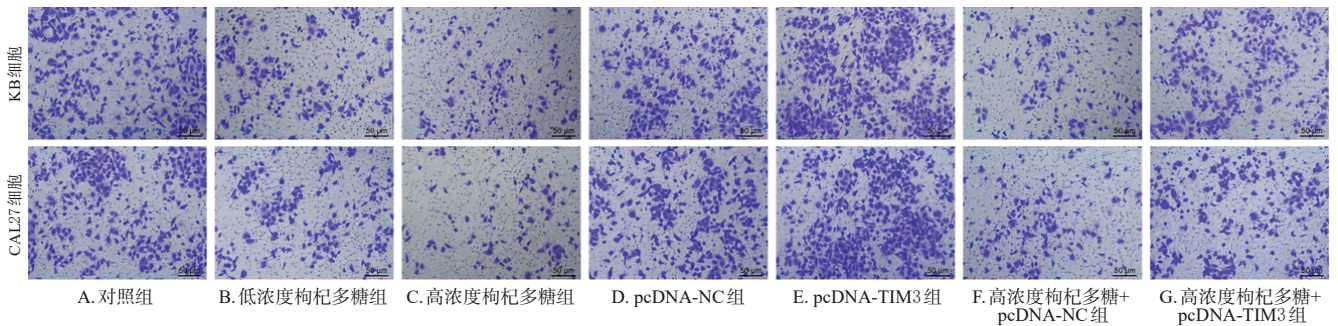


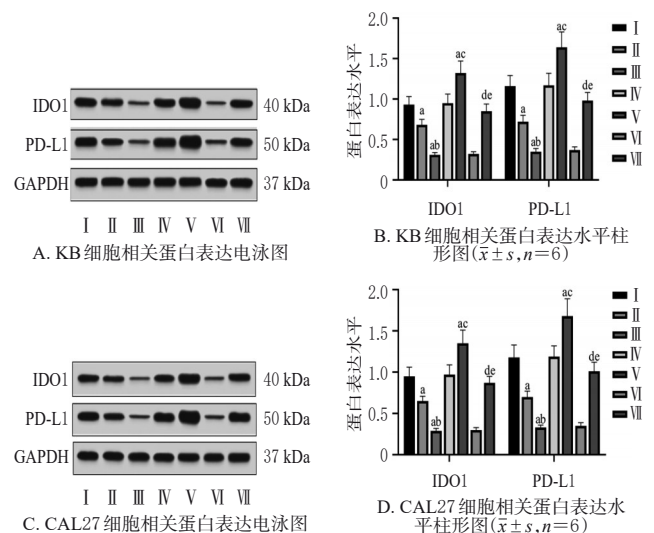
图3 各组细胞的Transwell小室实验结果(标尺:50 μm)

表4 各组细胞的划痕愈合率、侵袭细胞数比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	KB细胞		CAL27细胞	
	划痕愈合率/%	侵袭细胞数/个	划痕愈合率/%	侵袭细胞数/个
对照组	45.62 ± 3.78	91.64 ± 8.32	46.78 ± 4.02	92.74 ± 8.45
低浓度枸杞多糖组	31.27 ± 2.51 ^a	67.02 ± 5.98 ^a	29.05 ± 2.49 ^a	65.83 ± 5.91 ^a
高浓度枸杞多糖组	19.16 ± 2.24 ^{ab}	42.71 ± 4.45 ^{ab}	17.96 ± 2.15 ^{ab}	41.35 ± 4.21 ^{ab}
pcDNA-NC组	46.38 ± 3.85	92.34 ± 8.69	45.79 ± 3.91	93.61 ± 9.06
pcDNA-TIM3组	60.26 ± 6.31 ^{ac}	135.42 ± 13.09 ^{ac}	62.15 ± 6.40 ^{ac}	137.14 ± 13.26 ^{ac}
高浓度枸杞多糖+pcDNA-NC组	19.74 ± 2.36	43.85 ± 4.49	18.21 ± 2.19	42.26 ± 4.32
高浓度枸杞多糖+pcDNA-TIM3组	38.91 ± 3.62 ^{de}	84.53 ± 8.16 ^{de}	40.12 ± 3.71 ^{de}	86.04 ± 8.23 ^{de}

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与低浓度枸杞多糖组比较, $P < 0.05$; c: 与pcDNA-NC组比较, $P < 0.05$; d: 与高浓度枸杞多糖组比较, $P < 0.05$; e: 与高浓度枸杞多糖+pcDNA-NC组比较, $P < 0.05$ 。

明显($P < 0.05$); 与对照组、pcDNA-NC组比较, pcDNA-TIM3组2种细胞的T细胞杀伤率和IFN- γ 、IL-2水平均显著降低($P < 0.05$), IDO1、PD-L1蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$); 与高浓度枸杞多糖组、高浓度枸杞多糖+pcDNA-NC组比较, 高浓度枸杞多糖+pcDNA-TIM3组2种细胞的T细胞杀伤率和IFN- γ 、IL-2水平均显著降低($P < 0.05$), IDO1、PD-L1蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$)。结果见图4、表5。



I: 对照组; II: 低浓度枸杞多糖组; III: 高浓度枸杞多糖组; IV: pcDNA-NC组; V: pcDNA-TIM3组; VI: 高浓度枸杞多糖+pcDNA-NC组; VII: 高浓度枸杞多糖+pcDNA-TIM3组; a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与低浓度枸杞多糖组比较, $P < 0.05$; c: 与pcDNA-NC组比较, $P < 0.05$; d: 与高浓度枸杞多糖组比较, $P < 0.05$; e: 与高浓度枸杞多糖+pcDNA-NC组比较, $P < 0.05$ 。

图4 各组细胞中IDO1、PD-L1蛋白表达检测结果

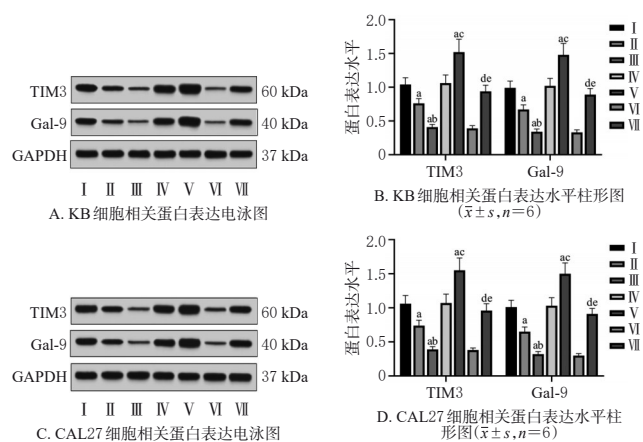
表5 各组细胞的T细胞杀伤率和IFN- γ 、IL-2水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	KB细胞			CAL27细胞		
	T细胞杀伤率/%	IFN- γ /(ng/L)	IL-2/(ng/L)	T细胞杀伤率/%	IFN- γ /(ng/L)	IL-2/(ng/L)
对照组	14.03 \pm 1.56	26.14 \pm 3.06	28.57 \pm 3.41	15.21 \pm 1.62	27.35 \pm 3.11	29.39 \pm 3.52
低浓度枸杞多糖组	28.72 \pm 3.01 ^a	32.82 \pm 3.74 ^a	35.76 \pm 3.88 ^a	29.51 \pm 3.20 ^a	34.62 \pm 3.81 ^a	36.81 \pm 3.91 ^a
高浓度枸杞多糖组	45.54 \pm 4.62 ^{ab}	41.54 \pm 4.81 ^{ab}	46.62 \pm 5.06 ^{ab}	46.89 \pm 4.71 ^{ab}	42.39 \pm 4.79 ^{ab}	47.73 \pm 5.13 ^{ab}
pcDNA-NC组	13.86 \pm 1.51	25.69 \pm 2.85	27.35 \pm 3.29	14.62 \pm 1.53	26.81 \pm 2.89	28.41 \pm 3.25
pcDNA-TIM3组	6.79 \pm 0.60 ^{ac}	13.24 \pm 1.51 ^{ac}	15.34 \pm 1.63 ^{ac}	6.53 \pm 0.61 ^{ac}	12.16 \pm 1.43 ^{ac}	14.25 \pm 1.65 ^{ac}
高浓度枸杞多糖+pcDNA-NC组	47.60 \pm 4.87	41.96 \pm 4.84	46.25 \pm 4.98	48.03 \pm 4.89	43.15 \pm 4.90	48.11 \pm 5.02
高浓度枸杞多糖+pcDNA-TIM3组	32.37 \pm 3.43 ^{cd}	29.08 \pm 3.15 ^{cd}	30.14 \pm 3.52 ^{cd}	31.42 \pm 3.39 ^{cd}	28.36 \pm 3.08 ^{cd}	29.74 \pm 3.46 ^{cd}

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与低浓度枸杞多糖组比较, $P < 0.05$; c: 与pcDNA-NC组比较, $P < 0.05$; d: 与高浓度枸杞多糖组比较, $P < 0.05$; e: 与高浓度枸杞多糖+pcDNA-NC组比较, $P < 0.05$ 。

3.5 枸杞多糖对口腔癌细胞中TIM3、Gal-9 mRNA及其蛋白表达的影响

与对照组比较, 低、高浓度枸杞多糖组2种细胞中TIM3、Gal-9 mRNA及其蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$), 且高浓度枸杞多糖组2种细胞中上述指标水平均较较低浓度枸杞多糖组降低得更明显($P < 0.05$); 与对照组、pcDNA-NC组比较, pcDNA-TIM3组2种细胞中TIM3、Gal-9 mRNA及其蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$); 与高浓度枸杞多糖组、高浓度枸杞多糖+pcDNA-NC组比较, 高浓度枸杞多糖+pcDNA-TIM3组2种细胞中TIM3、Gal-9 mRNA及其蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$)。结果见图5、表6。



I: 对照组; II: 低浓度枸杞多糖组; III: 高浓度枸杞多糖组; IV: pcDNA-NC组; V: pcDNA-TIM3组; VI: 高浓度枸杞多糖+pcDNA-NC组; VII: 高浓度枸杞多糖+pcDNA-TIM3组; a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与低浓度枸杞多糖组比较, $P < 0.05$; c: 与pcDNA-NC组比较, $P < 0.05$; d: 与高浓度枸杞多糖组比较, $P < 0.05$; e: 与高浓度枸杞多糖+pcDNA-NC组比较, $P < 0.05$ 。

图5 各组细胞中TIM3、Gal-9蛋白表达检测结果

4 讨论

枸杞作为传统药食两用植物, 具有养肾生精、祛病延年之功效^[12], 其活性成分枸杞多糖已被证实具有显著的抗肿瘤活性^[13]。IFN- γ 能够上调PD-L1表达, 并能促

表6 各组细胞中TIM3、Gal-9 mRNA表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	KB细胞		CAL27细胞	
	TIM3 mRNA	Gal-9 mRNA	TIM3 mRNA	Gal-9 mRNA
对照组	0.97 \pm 0.10	1.00 \pm 0.11	0.98 \pm 0.11	1.01 \pm 0.10
低浓度枸杞多糖组	0.58 \pm 0.05 ^a	0.61 \pm 0.07 ^a	0.56 \pm 0.05 ^a	0.59 \pm 0.06 ^a
高浓度枸杞多糖组	0.26 \pm 0.03 ^{ab}	0.32 \pm 0.04 ^{ab}	0.24 \pm 0.03 ^{ab}	0.30 \pm 0.03 ^{ab}
pcDNA-NC组	0.99 \pm 0.11	1.02 \pm 0.13	1.00 \pm 0.09	1.02 \pm 0.11
pcDNA-TIM3组	1.31 \pm 0.15 ^{ac}	1.38 \pm 0.17 ^{ac}	1.33 \pm 0.16 ^{ac}	1.41 \pm 0.18 ^{ac}
高浓度枸杞多糖+pcDNA-NC组	0.23 \pm 0.03	0.30 \pm 0.03	0.21 \pm 0.04	0.28 \pm 0.03
高浓度枸杞多糖+pcDNA-TIM3组	0.85 \pm 0.09 ^{cd}	0.81 \pm 0.08 ^{cd}	0.87 \pm 0.08 ^{cd}	0.79 \pm 0.08 ^{cd}

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与低浓度枸杞多糖组比较, $P < 0.05$; c: 与pcDNA-NC组比较, $P < 0.05$; d: 与高浓度枸杞多糖组比较, $P < 0.05$; e: 与高浓度枸杞多糖+pcDNA-NC组比较, $P < 0.05$ 。

进口腔鳞状细胞癌细胞的迁移、侵袭和增殖^[14]。在接受抗程序性死亡受体1治疗的口腔鳞状细胞癌患者中, IFN- γ 和IL-2水平均显著升高^[15]。此外, IDO1已被筛选为口腔鳞状细胞癌特异性的新型免疫相关因子; 而PD-L1表达与免疫细胞浸润相关^[16]。本研究结果显示, 使用不同质量浓度枸杞多糖干预KB、CAL27细胞后, 细胞克隆形成率、侵袭细胞数及划痕愈合率均显著下降/减少, 增殖抑制率均显著升高; 此外, T细胞杀伤率、免疫相关因子(包括IFN- γ 、IL-2)水平均显著升高, 免疫逃逸标志物IDO1和PD-L1的蛋白表达水平均显著降低。这提示枸杞多糖对口腔癌细胞增殖、迁移及免疫逃逸均具有明显的抑制作用。

本研究进一步分析发现, 使用枸杞多糖干预KB、CAL27细胞后, 细胞中TIM3、Gal-9 mRNA及其蛋白表达水平均显著降低。其中, TIM3属于一种免疫检查点, 可在多种免疫细胞内表达, 在免疫应答和免疫耐受中发挥重要作用^[17]。Gal是一类由共同氨基酸序列定义的凝集素家族, 可参与调控细胞生长、凋亡和固有/获得性免疫等多种生物学功能; Gal-9作为Gal家族一员, 具有多种生物学功能(如调控细胞增殖、迁移、侵袭)和强大的免疫调节作用^[18]。当TIM3被其配体Gal-9激活时, 可通过负向调节T细胞等效应细胞功能, 对免疫系统产生抑制作用; 二者共同构成的“轴”可参与调节肿瘤生长、自身免疫以及感染期间的免疫应答^[19]。已有研究发现, 阻断TIM3/Gal-9信号通路可有效抑制胶质瘤进展^[20]。基于这一生物学背景及文献证据, 为验证TIM3/Gal-9信号通路在枸杞多糖抗肿瘤作用中的关键地位, 本研究在高浓度枸杞多糖作用基础上, 转染pcDNA-TIM3质粒以构建TIM3过表达模型, 并设置高浓度枸杞多糖+pcDNA-NC组作为空载体对照。结果显示, TIM3过表达可显著减弱高浓度枸杞多糖对KB、CAL27细胞增殖、迁移、侵袭及免疫逃逸的抑制作用, 具体表现为细胞的克隆形成率、划痕愈合率及侵袭细胞数显著升高/增加, 同时细胞增殖率、T细胞杀伤率及免疫因子IFN- γ 、IL-2水平降低, 免疫逃逸标志物IDO1、PD-L1蛋白表达水平升高。这进

一步验证了TIM3/Gal-9信号通路在枸杞多糖调控口腔癌免疫微环境和免疫逃逸中的核心作用。

综上所述,枸杞多糖对口腔癌细胞增殖、迁移和免疫逃逸具有抑制作用,其作用机制可能与抑制TIM3/Gal-9信号通路有关。但本研究也存在一定不足:首先,当前研究仅限于细胞实验,还需通过动物模型(如异种移植瘤模型)进一步评估枸杞多糖的体内抗肿瘤及免疫调节作用。其次,机制研究不深入,需结合磷酸化蛋白质组学和通路抑制剂解析TIM3/Gal-9信号通路的下游信号(如Janus激酶/信号转导子和转录激活子、核因子- κ B)变化;需通过流式细胞术检测分化簇69/分化簇107a和Western blot法分析剪切型胱天蛋白酶3等指标变化,以探究枸杞多糖对T细胞活化和肿瘤细胞生物学行为的影响。

参考文献

- [1] RODRÍGUEZ-MOLINERO J, MIGUELÁÑEZ-MEDRÁN B D C, PUENTE-GUTIÉRREZ C, et al. Association between oral cancer and diet: an update[J]. *Nutrients*, 2021, 13(4):1299.
- [2] WANG R, WANG Y. Fourier transform infrared spectroscopy in oral cancer diagnosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(3):1206.
- [3] ABATI S, BRAMATI C, BONDI S, et al. Oral cancer and precancer: a narrative review on the relevance of early diagnosis[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 17(24):9160.
- [4] MOTLOKWA P K, TSIMA B M, MARTEI Y M, et al. Disparities in oral cancer stage at presentation in a high HIV prevalence setting in sub-Saharan Africa[J]. *JCO Glob Oncol*, 2022, 8:e2100439.
- [5] MA L J, AI F F, XIAO H Y, et al. *Lycium barbarum* polysaccharide reverses drug resistance in oxaliplatin-resistant colon cancer cells by inhibiting PI3K/AKT-dependent phosphomannose isomerase[J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15:1367747.
- [6] 姜鸣,李卓能. 枸杞多糖通过p53信号通路调节人舌鳞状癌CAL-27细胞增殖和凋亡[J]. *临床口腔医学杂志*, 2022, 38(3):140-143.
- [7] KANDEL S, ADHIKARY P, LI G F, et al. The TIM3/Gal9 signaling pathway: an emerging target for cancer immunotherapy[J]. *Cancer Lett*, 2021, 510:67-78.
- [8] DONG J F, CHENG L J, ZHAO M C, et al. Tim-3-expressing macrophages are functionally suppressed and expanded in oral squamous cell carcinoma due to virus-induced Gal-9 expression[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(5):1010428317701651.
- [9] 杨学鹏,王兰,柴居堂,等. 积雪草苷调节TIM3/Gal9轴对肺癌细胞上皮-间充质转化和免疫逃逸的影响[J]. *中国细胞生物学学报*, 2024, 46(11):1945-1953.
- [10] 辛国军,张亚文,雷鹏,等. 枸杞多糖通过下调PD-L1表达抑制胆囊癌细胞增殖、侵袭及免疫逃逸的实验研究[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2024, 29(6):521-525.
- [11] LIAO X Y, LIU C Y, HE J F, et al. Combination of checkpoint inhibitors with radiotherapy in esophageal squamous cell carcinoma treatment: a novel strategy[J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(5):5011-5021.
- [12] QIANG X, XIA T, GENG B B, et al. Bioactive components of *Lycium barbarum* and deep-processing fermentation products[J]. *Molecules*, 2023, 28(24):8044.
- [13] SUN L N, ZUO C L, LIU X X, et al. Combined photothermal therapy and *Lycium barbarum* polysaccharide for topical administration to improve the efficacy of doxorubicin in the treatment of breast cancer[J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(12):2677.
- [14] 吴堰霖,宿颖,尹盼盼,等. 干扰素 γ 诱导人口腔鳞癌细胞建立体外PD-L1高表达细胞模型及其对细胞生物学行为的影响[J]. *北京口腔医学*, 2022, 30(5):305-309.
- [15] FENG L, YIN K, ZHANG S, et al. Anti-PD-1 therapy is beneficial for the survival of patients with oral squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Manag Res*, 2022, 14:2723-2731.
- [16] HASEGAWA M, AMANO Y, KIHARA A, et al. Guanylate binding protein 5 is an immune-related biomarker of oral squamous cell carcinoma: a retrospective prognostic study with bioinformatic analysis[J]. *Cancer Med*, 2024, 13(13):e7431.
- [17] SAUER N, JANICKA N, SZLASA W, et al. TIM-3 as a promising target for cancer immunotherapy in a wide range of tumors[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2023, 72(11):3405-3425.
- [18] ZHANG M P, LIU C, LI Y, et al. Galectin-9 in cancer therapy: from immune checkpoint ligand to promising therapeutic target[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2024, 11:1332205.
- [19] MITTELBERGER J, SEEFRIED M, LÖB S, et al. The expression of TIM-3 and Gal-9 on macrophages and Hofbauer cells in the placenta of preeclampsia patients[J]. *J Reprod Immunol*, 2024, 164:104296.
- [20] NI X R, WU W C, SUN X Q, et al. Interrogating glioma-M2 macrophage interactions identifies Gal-9/Tim-3 as a viable target against PTEN-null glioblastoma[J]. *Sci Adv*, 2022, 8(27):eabl5165.

(收稿日期:2025-05-27 修回日期:2025-07-28)

(编辑:林静)