

欧前胡素调节 ThPOK 表达对胃癌细胞恶性生物学行为的影响^Δ

陈 兰^{1*}, 夏伶俐¹, 陈 颖¹, 张 刚¹, 文 峰^{2#} (1. 江汉大学附属武汉市第六医院消化内科, 武汉 430015; 2. 中部战区总医院消化内科, 武汉 430012)

中图分类号 R965; R735.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)02-0191-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.02.10



摘要 **目的** 探究欧前胡素(IMP-SD)调节含锌指和 BTB 结构域 7B(ThPOK)表达对胃癌(GC)细胞恶性生物学行为的影响。**方法** 取人 GC 细胞 MKN-7, 分为对照组(不给药), IMP-SD 低、中、高浓度组(分别给予 40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 的 IMP-SD), si-ThPOK 和 si-NC 组[先给予 160 $\mu\text{mol/L}$ 的 IMP-SD, 再分别转染 ThPOK 小分子干扰 RNA(si-ThPOK)及其阴性对照(si-NC)]。经相应处理后, 检测各组细胞的克隆形成、迁移、侵袭能力及凋亡情况, 自然杀伤(NK)细胞的杀伤作用, T 细胞的分布情况, 以及 ThPOK、程序性死亡受体 1(PD-1)及其配体(PD-L1)的表达情况。**结果** 与对照组比较, IMP-SD 各浓度组的细胞克隆数、迁移细胞数、侵袭细胞数和 PD-1、PD-L1 蛋白的表达均显著降低或下调, 细胞凋亡率、NK 细胞的杀伤活性、CD4⁺ T 细胞比例、CD4⁺ T 细胞比例与 CD8⁺ T 细胞比例的比值(CD4⁺ T/CD8⁺ T)、ThPOK 蛋白的表达均显著升高或上调, 且有浓度依赖性($P<0.05$); 与 IMP-SD 高浓度组和 si-NC 组比较, si-ThPOK 组的细胞克隆数、迁移细胞数、侵袭细胞数和 PD-L1、PD-1 蛋白的表达均显著升高或上调, 细胞凋亡率、NK 细胞的杀伤活性、CD4⁺ T 细胞比例、CD4⁺ T/CD8⁺ T、ThPOK 蛋白的表达均显著降低或下调($P<0.05$)。**结论** IMP-SD 可能通过促进 ThPOK 蛋白的表达, 从而减弱 GC 细胞的克隆形成、迁移、侵袭能力, 促进其凋亡, 抑制其免疫逃逸。**关键词** 欧前胡素; ThPOK; 胃癌细胞; 免疫逃逸; 恶性生物学行为

Effects of imperatorin on malignant biological behavior of gastric cancer cells by regulating ThPOK expression

CHEN Lan¹, XIA Lingli¹, CHEN Ying¹, ZHANG Gang¹, WEN Feng² (1. Dept. of Gastroenterology, Wuhan Sixth Hospital Affiliated to Jiangnan University, Wuhan 430015, China; 2. Dept. of Gastroenterology, Central Theater Command General Hospital, Wuhan 430012, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effects of imperatorin (IMP-SD) on malignant biological behavior of gastric cancer (GC) cells by regulating zinc finger and BTB domain 7B (ThPOK). **METHODS** Human GC cells MKN-7 were used as the research object and then divided into control group (no treatment), IMP-SD low-, medium- and high-concentration groups (40, 80 and 160 $\mu\text{mol/L}$ IMP-SD), si-ThPOK and si-NC group [treated with 160 $\mu\text{mol/L}$ IMP-SD and then transfected with ThPOK small interfering RNA (si-ThPOK) or its negative control (si-NC)]. After treatment, cell clone formation, migration and invasion abilities and apoptosis of MKN-7 cells were detected; the killing activity of NK cells, T cells classification, the protein expressions of ThPOK, programmed death-1 (PD-1) and programmed death-ligand 1 (PD-L1) were all determined. **RESULTS** Compared with the control group, the number of cell clones, migration number, invasion number, and the protein expressions of PD-1 and PD-L1 were decreased or down-regulated significantly in IMP-SD groups, while the cell apoptotic rate, NK cell killing activity, CD4⁺ T proportion, the ratio of CD4⁺ T proportion and CD8⁺ T proportion (CD4⁺ T/CD8⁺ T), and the protein expression of ThPOK were increased or up-regulated significantly, in a concentration-dependent manner ($P<0.05$). Compared with IMP-SD high-concentration group and si-NC group, the number of cell clones, migration number, invasion number, and the protein expressions of PD-1 and PD-L1 were increased or up-regulated significantly in si-ThPOK group, while the cell apoptotic rate, NK cell killing activity, CD4⁺ T proportion, CD4⁺ T/CD8⁺ T, and the protein expression of ThPOK were decreased or down-regulated significantly ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** IMP-SD may reduce the clonal formation, migration and invasion abilities of GC cells, promote their apoptosis and inhibit their immune escape by promoting ThPOK expression. **KEYWORDS** imperatorin; ThPOK; gastric cancer cells; immune escape; malignant biological behavior

^Δ 基金项目 武汉市医学科研项目(No.WX20C29)
* 第一作者 副主任医师, 硕士。研究方向: 消化系统肿瘤。E-mail: 15927583670@163.com
通信作者 副主任医师, 硕士。研究方向: 消化系统肿瘤内镜治疗。E-mail: n16bgn@163.com

近年来, 尽管胃癌(gastric cancer, GC)的发病率和相关死亡率持续降低, 但 2020 年全球新发病例近 109 万、死亡病例约 77 万, GC 仍是全球第三大癌症死亡原因^[1]。GC 患者确诊时常处于晚期, 主要通过手术切除治

疗,但可因转移、复发而导致患者总体预后不佳。研究指出,转移、免疫逃逸和对治疗的抵抗与GC患者的不良预后密切相关^[2]。肿瘤细胞的免疫逃逸是其通过修饰自身表面抗原、募集抑制性免疫细胞/分子及改变肿瘤组织周围微环境等途径来逃避机体免疫系统的监控、识别及攻击,从而继续分裂生长的过程^[3]。因此,了解GC细胞的免疫逃逸机制并开发针对该机制的药物,对于GC的临床治疗具有重要的意义。

欧前胡素(imperatorin, IMP-SD)能抑制肿瘤细胞的活力,使细胞周期停滞,抑制喉癌、横纹肌肉瘤、骨肉瘤和GC等肿瘤细胞的增殖、迁移,并促进其凋亡^[4-7]。含锌指和BTB结构域7B(zinc finger and BTB domain 7B, ThPOK)是POZ结构域Krüppel样锌指(POZ domain Krüppel-like zinc finger, POK)家族成员,对成熟辅助性T细胞的稳态和分化至关重要,可控制CD4⁺T细胞的分化并调节其功能,在直肠癌、胸腺癌、GC细胞的免疫逃逸过程中具有重要作用^[8-9]。ThPOK转录沉默元件可抑制ThPOK的表达,从而启动肠黏膜中CD4⁺肠上皮淋巴细胞的分化^[10]。可见,调控ThPOK的表达是调节T细胞分化的重要机制。此外,过表达的ThPOK可减弱GC细胞的活力,增加T细胞的分化,并可通过诱导精子尾部富含PG的重复序列1使胞外信号调节激酶信号通路失活,从而抑制GC细胞的免疫逃逸^[11]。然而,IMP-SD能否通过调节ThPOK的表达来影响GC细胞免疫逃逸等恶性生物学行为尚不明确。基于此,本研究拟探讨IMP-SD对GC细胞多种恶性生物学行为的影响,并探讨相应作用的发挥是否与调控ThPOK的表达有关,以期对GC有效治疗药物的研发及应用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所有主要仪器包括NanoFCM型流式细胞仪(厦门福流生物科技有限公司),ChemiDoc™型化学发光成像仪、Criterion™型垂直电泳仪(美国Bio-Rad公司),CX40M型显微镜[舜宇光学科技(集团)有限公司],Forma™ Steri-Cult型CO₂细胞培养箱、Multiskan SkyHigh型生物酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)等。

1.2 主要药品与试剂

IMP-SD对照品(批号M71520230321,纯度≥95.0%)购自美国MSD公司;GC细胞专用培养基RPMI-1640、胎牛血清、青-链霉素双抗溶液(货号分别为PM150110、164210-50、PB180120)均购自武汉普诺赛生命科技有限公司;鼠源ThPOK单克隆抗体、鼠源程序性死亡受体1(programmed death-1, PD-1)单克隆抗体、兔源程序性死亡受体配体1(programmed death-ligand 1, PD-L1)单克隆抗体、兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体(货号分别为GTX83353、GTX20256、GTX635975、GTX100118)均购自美国GenTex公司;

CD4⁺、CD8⁺荧光抗体和山羊抗兔、山羊抗鼠IgG(H&L)二抗(批号分别为ab95591、ab210372、ab6702、ab6708)均购自英国Abcam公司;人CD4⁺T、CD8⁺T细胞检测试剂盒(货号分别为TBDCH100154、TBDCH100140)均购自上海研瑾生物科技有限公司;人自然杀伤(natural kill, NK)细胞检测试剂盒(货号qy-1953R)购自齐一生物科技(上海)有限公司;CCK-8试剂(批号96992)购自德国Merck公司;Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(批号MA0220)购自大连美仑生物技术有限公司;基质胶(批号AC-M082704)购自百普赛斯生物科技有限公司;Lipofectamine 2000转染试剂(批号11668019)购自美国Thermo Fisher Scientific公司;ThPOK小分子干扰RNA(si-ThPOK)及其阴性对照(si-NC)(批号分别为siB112503026314-1-5、siB108436814-123-1-5)均购自广州市锐博生物科技有限公司。

1.3 细胞

人GC细胞MKN-7(货号CL-0574)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;人外周血CD8⁺T细胞(货号PRI-H-00121)购自上海中乔新舟生物科技有限公司;人外周血CD4⁺T细胞(货号ABC-TC3993)购自北京百奥创新科技有限公司;人NK细胞(货号CP-H168)购自武汉益普生物科技有限公司。

2 方法

2.1 IMP-SD干预浓度筛选

采用CCK-8法检测、筛选。取对数生长期的MKN-7细胞,按每孔3 000个接种于96孔板中,待细胞贴壁生长后,分别加入含不同浓度IMP-SD[0(对照)、20、40、80、160、200 μmol/L^[12]]的含胎牛血清、青-链霉素双抗的RPMI-1640培养基(以下称“完全培养基”),并设置不含药物、不含细胞的空白对照(每浓度设置6个复孔)。培养48 h后,每孔加入CCK-8试剂10 μL,孵育2 h,使用酶标仪在450 nm波长处检测各孔的吸光度,并计算细胞存活率[细胞存活率=(实验孔吸光度值-空白对照孔吸光度值)/(对照孔吸光度值-空白对照吸光度值)×100%]和半数抑制浓度(IC₅₀),以确定后续实验IMP-SD的低、中、高浓度。

2.2 MKN-7细胞分组与干预

取对数生长期的MKN-7细胞,随机分为对照组,IMP-SD低、中、高浓度组(L-IMP-SD组、M-IMP-SD组、H-IMP-SD组),si-NC组和si-ThPOK组,每组设置6个复孔。对照组细胞加入完全培养基;IMP-SD各浓度组细胞分别加入含相应浓度IMP-SD(根据“2.1”项下结果设置)的完全培养基;si-NC、si-ThPOK组细胞经含高浓度IMP-SD的完全培养基处理后,分别转染si-NC、si-ThPOK(以si-NC组的ThPOK表达较H-IMP-SD组基本不变且si-ThPOK组的ThPOK表达较H-IMP-SD组显著下降为转染成功)。

2.3 MKN-7细胞克隆形成能力检测

采用克隆形成实验检测。取对数生长期的MKN-7细胞,按“2.2”项下方法分组、处理。培养10 d(每3 d更换培养基并重新给药)后,弃去培养基,细胞以4%多聚甲醛溶液固定30 min,再以0.1%结晶紫染液染色30 min;移除染液,细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗,风干后,使用显微镜观察并记录各组的细胞克隆数(>10个细胞即算1个克隆)。

2.4 MKN-7细胞迁移和侵袭能力检测

均采用Transwell实验检测。取对数生长期的MKN-7细胞,经消化后以PBS漂洗,并以不含血清的RPMI-1640培养基重悬,制成 1×10^5 个/mL的细胞悬液。取上述悬液100 μ L,加至Transwell小室上层;取完全培养基600 μ L,置于小室下层。上层细胞按“2.2”项下方法分组、处理。培养24 h后,收集穿膜细胞,以4%多聚甲醛溶液固定30 min,再以0.1%结晶紫染液染色10 min,自然风干后,使用显微镜观察并记录各组的迁移细胞数。以基质胶处理小室上层,其余操作同前,使用显微镜观察并记录各组的侵袭细胞数。

2.5 MKN-7细胞凋亡检测

采用流式细胞术检测。取对数生长期的MKN-7细胞,按“2.2”项下方法分组、处理。培养24 h后,收集各组细胞,以PBS漂洗后,加入binding buffer 200 μ L重悬;加入Annexin V-FITC染液5 μ L,于室温下孵育10 min;加入PI染液10 μ L,于避光条件下孵育10 min,使用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。

2.6 NK细胞对MKN-7细胞的杀伤作用检测

采用乳酸脱氢酶释放法检测。取对数生长期的MKN-7细胞,按“2.2”项下方法分组、处理。培养24 h后,收集各组细胞,与NK细胞(各组MKN-7细胞与NK细胞的数量比均为1:10)混合,于37 $^{\circ}$ C下共同培养6 h;收集细胞,加入乳酸脱氢酶50 μ L,于室温下孵育30 min,使用酶标仪于450 nm波长处检测其光密度(OD₄₅₀)值,再按相应试剂盒说明书方法计算NK细胞杀伤活性。

2.7 MKN-7细胞的T细胞分布情况检测

采用流式细胞术检测。取对数生长期的MKN-7细胞,按“2.2”项下方法分组、处理。培养24 h后,收集各组细胞,分别与CD4⁺T、CD8⁺T细胞(各组MKN-7细胞与T细胞的数量比均为1:10)混合,于37 $^{\circ}$ C下共同培养6 h;收集细胞,分别加入CD4⁺、CD8⁺荧光抗体(稀释比例均为1:500),于室温下避光孵育20 min;收集细胞,以PBS重悬后,使用流式细胞仪分析CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞比例及两者比值(CD4⁺T/CD8⁺T)。

2.8 MKN-7细胞中ThPOK、PD-1、PD-L1蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取对数生长期的MKN-7

细胞,按“2.2”项下方法分组、处理。培养24 h后,收集各组细胞,提取蛋白。蛋白经定量、变性后进行电泳分离、转膜、封闭;洗膜后,加入ThPOK、PD-1、PD-L1、GAPDH一抗(稀释比例分别为1:500、1:1 000、1:1 000、1:5 000),于4 $^{\circ}$ C下孵育过夜;洗膜后,加入相应二抗(稀释比例均为1:5 000),于室温下孵育1 h,使用化学发光试剂显影后,于化学发光成像仪下成像。使用Image J软件,以GAPDH为内参,量化各目的蛋白的表达情况。

2.9 统计学方法

采用SPSS 26.00软件对数据进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用SNK-*q*检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 IMP-SD干预浓度的筛选结果

经0、20、40、80、160、200 μ mol/L IMP-SD干预后,细胞存活率随其浓度的增加而逐渐降低,IC₅₀为168.42 μ mol/L,遂确定以40、80、160 μ mol/L作为后续实验的低、中、高浓度。结果见图1。

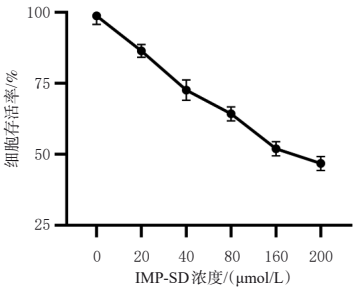
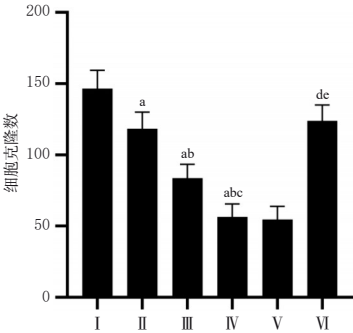


图1 不同浓度IMP-SD对细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.2 IMP-SD对MKN-7细胞克隆形成能力的影响

与对照组比较,L-IMP-SD、M-IMP-SD、H-IMP-SD组的细胞克隆数均显著降低,且有浓度依赖性($P < 0.05$);与H-IMP-SD组、si-NC组比较,si-ThPOK组的细胞克隆数显著升高($P < 0.05$)。结果见图2、图3。



I: 对照组; II: L-IMP-SD组; III: M-IMP-SD组; IV: H-IMP-SD组; V: si-NC组; VI: si-ThPOK组; a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与L-IMP-SD组比较, $P < 0.05$; c: 与M-IMP-SD组比较, $P < 0.05$; d: 与H-IMP-SD组比较, $P < 0.05$; e: 与si-NC组比较, $P < 0.05$ 。

图2 各组细胞克隆数比较($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

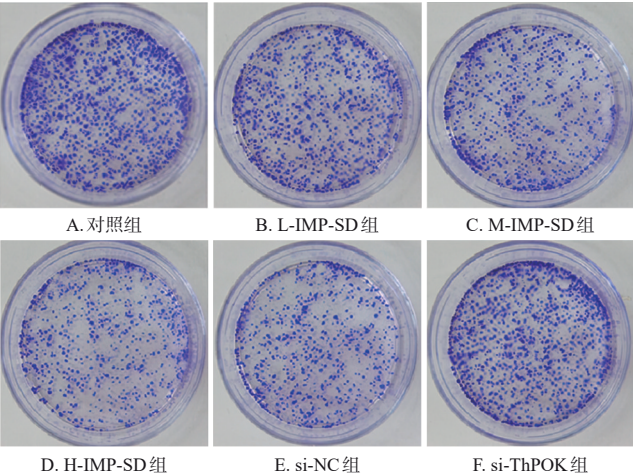


图3 各组细胞克隆形成情况比较(培养皿直径=6 cm)

3.3 IMP-SD对MKN-7细胞迁移和侵袭的影响

与对照组比较,L-IMP-SD、M-IMP-SD、H-IMP-SD组的迁移细胞数、侵袭细胞数均显著减少,且有浓度依赖性($P<0.05$);与H-IMP-SD组、si-NC组比较,si-ThPOK组的迁移细胞数、侵袭细胞数均显著升高($P<0.05$)。结果见表1、图4。

组别	迁移细胞/个	侵袭细胞/个
对照组	144.28±9.46	123.79±8.62
L-IMP-SD组	111.35±8.34 ^a	92.51±6.76 ^a
M-IMP-SD组	84.56±6.03 ^{ab}	76.46±5.25 ^{ab}
H-IMP-SD组	52.68±4.27 ^{abc}	53.44±3.95 ^{abc}
si-NC组	50.96±5.64	51.25±5.68
si-ThPOK组	124.57±6.71 ^{de}	106.55±7.01 ^{de}

a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与L-IMP-SD组比较, $P<0.05$; c: 与M-IMP-SD组比较, $P<0.05$; d: 与H-IMP-SD组比较, $P<0.05$; e: 与si-NC组比较, $P<0.05$ 。

3.4 IMP-SD对MKN-7细胞凋亡的影响

与对照组[(2.96±0.28)%]比较,L-IMP-SD、M-IMP-SD、H-IMP-SD组细胞的凋亡率[(18.47±1.29)%、(31.85±2.57)%、(49.55±3.64)%]均显著升高,且有浓度依赖性($P<0.05$);与H-IMP-SD组、si-NC组[(47.26±3.78)%]比较,si-ThPOK组细胞的凋亡率[(12.78±3.19)%]显著降低($P<0.05$)。结果见图5。

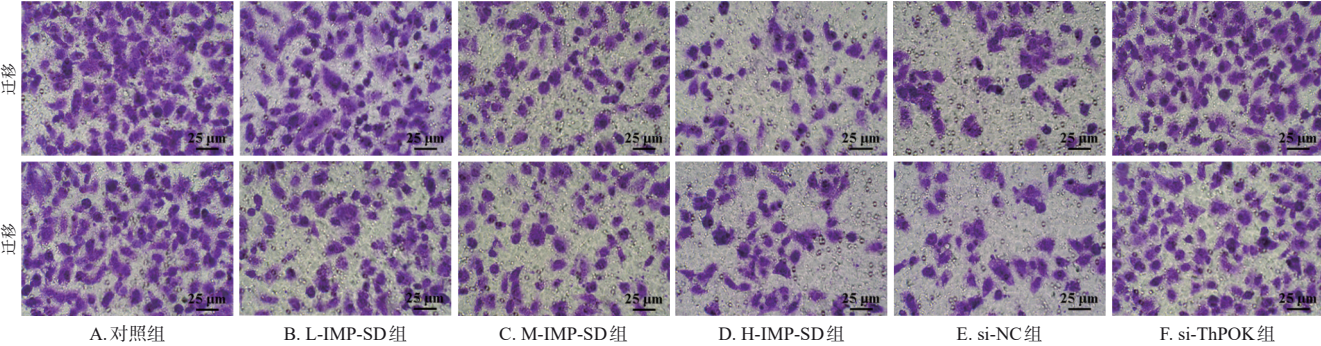


图4 各组细胞迁移和侵袭情况的显微图

3.5 IMP-SD对NK细胞杀伤活性的影响

与对照组[(8.50±0.43)%]比较,L-IMP-SD、M-IMP-SD、H-IMP-SD组细胞的NK细胞杀伤活性[(16.28±0.54)%、(28.77±1.08)%、(43.39±1.24)%]均显著升高,且有浓度依赖性($P<0.05$);与H-IMP-SD组、si-NC组[(42.67±1.36)%]比较,si-ThPOK组细胞的NK细胞杀伤活性[(14.95±1.07)%]显著降低($P<0.05$)。

3.6 IMP-SD对MKN-7细胞中T细胞分布情况的影响

与对照组比较,L-IMP-SD、M-IMP-SD、H-IMP-SD组的CD4⁺T细胞比例和CD4⁺T/CD8⁺T均显著升高,且有浓度依赖性($P<0.05$);与H-IMP-SD组、si-NC组比较,si-ThPOK组的CD4⁺T细胞比例和CD4⁺T/CD8⁺T均显著降低($P<0.05$);而各组的CD8⁺T细胞比例比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。结果见表2。

3.7 IMP-SD对MKN-7细胞中相关蛋白表达的影响

与对照组比较,L-IMP-SD、M-IMP-SD、H-IMP-SD组细胞中ThPOK蛋白的表达显著上调,PD-L1、PD-1蛋白的表达均显著下调,且有浓度依赖性($P<0.05$);与H-IMP-SD组、si-NC组比较,si-ThPOK组细胞中ThPOK蛋白的表达显著下调,PD-L1、PD-1蛋白的表达均显著上调($P<0.05$)。结果见表3、图6。

4 讨论

GC是全球第四大常见癌症、第三大癌症死亡原因,在全球范围内造成了严重的健康负担^[1]。由于GC早期症状不明显、定期筛查率低,大多数患者在确诊时已处于晚期,手术切除和围手术期化疗的效果有限,加之转移率、复发率较高,导致GC患者的总体预后不佳^[1]。因此,阐释GC发生发展的具体机制并挖掘新的治疗策略是有必要的。

IMP-SD是香豆素类天然化合物,具有抑制肿瘤细胞增殖、诱导细胞凋亡的活性,并可增强多种抗肿瘤药物的细胞毒性^[4-6]。IMP-SD能拮抗三磷酸腺苷结合转运蛋白G家族成员2(ATP-binding cassette subfamily G member 2, ABCG2)的活性,并可浓度依赖性地逆转ABCG2蛋白介导的多重耐药性,以提高治疗药物用于ABCG2高表达恶性肿瘤患者的有效性^[4]。以往研究表明,IMP-SD对人横纹肌肉瘤和喉癌细胞表现出明显的

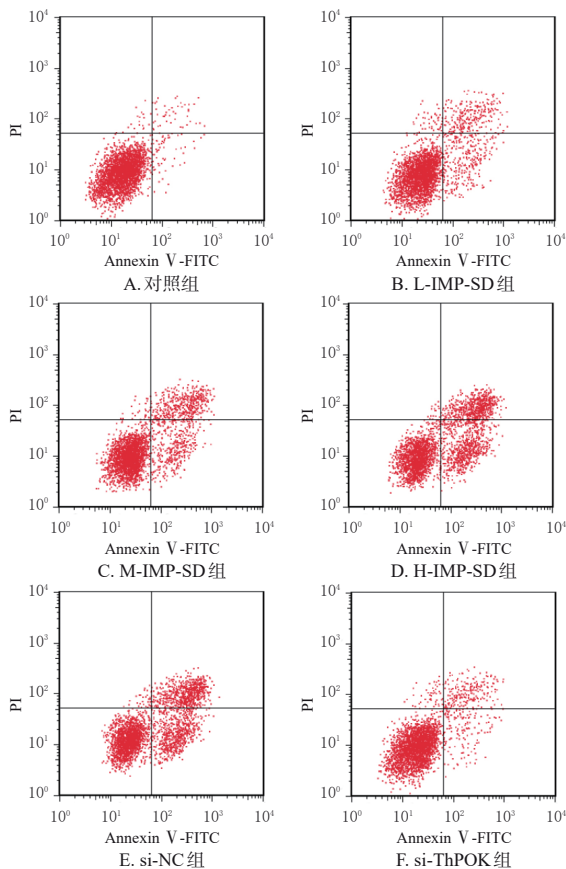


图5 各组细胞凋亡情况的流式图

表2 各组细胞中T细胞分布情况比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	CD4 ⁺ T细胞比例/%	CD8 ⁺ T细胞比例/%	CD4 ⁺ T/CD8 ⁺ T
对照组	14.53 ± 1.25	24.76 ± 1.78	0.58 ± 0.08
L-IMP-SD组	20.82 ± 1.63 ^a	23.39 ± 1.62	0.89 ± 0.12 ^a
M-IMP-SD组	30.77 ± 1.79 ^{ab}	24.76 ± 2.03	1.24 ± 0.11 ^{ab}
H-IMP-SD组	41.64 ± 3.28 ^{abc}	25.43 ± 2.77	1.63 ± 0.18 ^{abc}
si-NC组	40.51 ± 3.46	24.82 ± 2.95	1.63 ± 0.21
si-ThPOK组	18.12 ± 3.51 ^{de}	24.77 ± 2.75	0.73 ± 0.13 ^{de}

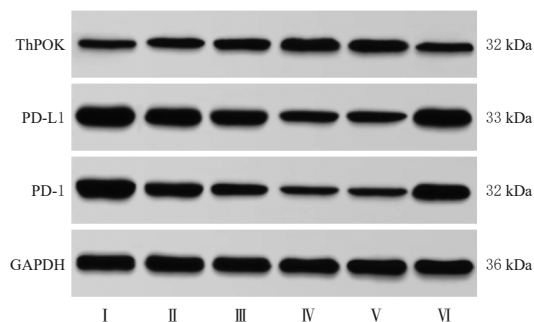
a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与L-IMP-SD组比较, $P < 0.05$; c: 与M-IMP-SD组比较, $P < 0.05$; d: 与H-IMP-SD组比较, $P < 0.05$; e: 与si-NC组比较, $P < 0.05$ 。

表3 各组细胞中相关蛋白表达情况比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	ThPOK	PD-L1	PD-1
对照组	0.47 ± 0.08	1.76 ± 0.18	1.45 ± 0.15
L-IMP-SD组	0.63 ± 0.12 ^a	1.43 ± 0.16 ^a	1.08 ± 0.17 ^a
M-IMP-SD组	0.78 ± 0.13 ^{ab}	1.16 ± 0.12 ^{ab}	0.73 ± 0.07 ^{ab}
H-IMP-SD组	0.94 ± 0.15 ^{abc}	0.73 ± 0.08 ^{abc}	0.45 ± 0.08 ^{abc}
si-NC组	0.91 ± 0.21	0.71 ± 0.18	0.44 ± 0.17
si-ThPOK组	0.53 ± 0.12 ^{de}	1.55 ± 0.15 ^{de}	1.12 ± 0.18 ^{de}

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与L-IMP-SD组比较, $P < 0.05$; c: 与M-IMP-SD组比较, $P < 0.05$; d: 与H-IMP-SD组比较, $P < 0.05$; e: 与si-NC组比较, $P < 0.05$ 。

生长抑制作用,这种作用主要是通过阻滞与特定基因表达变化相关的细胞周期进程而实现的^[6]。研究指出,IMP-SD可通过第10号染色体上缺失的磷酸酶及张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)/磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白/p21信号通路靶向上调人骨



I: 对照组; II: L-IMP-SD组; III: M-IMP-SD组; IV: H-IMP-SD组; V: si-NC组; VI: si-ThPOK组。

图6 IMP-SD对细胞中相关蛋白表达影响的电泳图

肉瘤细胞中的PTEN,使细胞周期停滞,从而抑制骨肉瘤细胞的增殖、迁移^[6]。另有研究指出,IMP-SD可下调环磷腺苷应答元件结合蛋白1的表达,从而阻断食管癌细胞的侵袭,进而减弱成纤维细胞旁分泌对肿瘤血管生成和转移的影响^[13]。还有研究指出,IMP-SD可浓度依赖性地抑制人GC细胞的生长,诱导DNA片段化,使细胞周期停滞在G₁期并促进其凋亡^[7]。以上研究均证实,IMP-SD具有抗肿瘤活性。本研究也得出了相似的结果,即IMP-SD能抑制GC细胞的活力,可浓度依赖性地抑制GC细胞的克隆形成、迁移、侵袭,并诱导其凋亡。

ThPOK是转录因子POK家族成员,其Krüppel样锌指结构域(负责与DNA结合)和调节性POZ/BTB结构域(介导与其他因子的相互作用)对成熟辅助性T细胞的稳态和分化至关重要,与CD4⁺ T细胞的功能密切相关,也是介导CD4⁺ T细胞转化的关键结构^[14]。过表达的ThPOK可抑制GC细胞的活力,可促进与GC细胞共培养的T细胞的活化,进而抑制GC细胞的免疫逃逸^[11]。此外,GC细胞可提高CD4⁺ T细胞中ThPOK的表达,促进CD4⁺ T细胞的分化,使后者参与GC细胞的免疫逃逸^[15]。效应细胞在免疫系统的监视下优先清除免疫原性高的肿瘤细胞,而肿瘤细胞的有效清除需要CD4⁺ T和CD8⁺ T细胞^[16-17]。其中,CD4⁺ T细胞对适应性免疫应答的发生和维持具有核心调控作用;CD8⁺ T细胞与肿瘤细胞的免疫反应有关,可识别肿瘤细胞的表面抗原并转移、浸润至细胞内部,从而杀死肿瘤细胞,释放更多的抗原,进一步激活T淋巴细胞介导的免疫反应;两者比例失衡(如CD8⁺ T细胞耗竭而CD4⁺ T细胞生成)可促进免疫逃逸的发生^[18]。NK细胞是一种先天免疫细胞,在先天免疫防御中发挥重要作用,是抵御恶性肿瘤的第一道防线,其活力降低与GC进展有关^[2]。PD-1/PD-L1对肿瘤细胞免疫逃逸至关重要,肿瘤细胞可通过高表达PD-L1而与CD8⁺ T细胞表面的PD-1结合,抑制T细胞的活化,从而协助肿瘤细胞逃避免疫监视,实现免疫逃逸^[19]。本研究结果表明,经IMP-SD处理后,MKN-7细胞中ThPOK蛋白的表达、NK细胞杀伤活性,CD4⁺ T细胞比例、CD4⁺ T/CD8⁺ T均显著升高或上调,PD-L1/PD-1蛋

白的表达均显著下调;而转染 si-ThPOK 后,细胞上述指标的变化趋势则刚好与 H-IMP-SD 组相反。这表明,IMP-SD 能够促进 ThPOK 蛋白的表达,抑制 GC 细胞的免疫逃逸。

综上所述,IMP-SD 可能通过促进 ThPOK 蛋白的表达,从而减弱 GC 细胞的克隆形成、迁移、侵袭能力,促进其凋亡,抑制其免疫逃逸。但本研究仅基于细胞水平进行了相关探索,尚需通过体内实验进一步对结果进行验证。

参考文献

- [1] MA X X, JIA S Q, WANG G J, et al. TRIM28 promotes the escape of gastric cancer cells from immune surveillance by increasing PD-L1 abundance[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1):246.
- [2] MAO D L, ZHOU Z J, CHEN H X, et al. Pleckstrin-2 promotes tumor immune escape from NK cells by activating the MT1-MMP-MICA signaling axis in gastric cancer[J]. *Cancer Lett*, 2023, 572:216351.
- [3] MILIOTIS C, MA Y L, KATOPODI X L, et al. Determinants of gastric cancer immune escape identified from non-coding immune-landscape quantitative trait loci[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1):4319.
- [4] WU C P, MURAKAMI M, LI Y C, et al. Imperatorin restores chemosensitivity of multidrug-resistant cancer cells by antagonizing ABCG2-mediated drug transport[J]. *Pharmaceuticals*, 2023, 16(11):1595.
- [5] GRABARSKA A, SKALICKA-WOŹNIAK K, KIELBUS M, et al. Imperatorin as a promising chemotherapeutic agent against human larynx cancer and rhabdomyosarcoma cells[J]. *Molecules*, 2020, 25(9):2046.
- [6] LV M C, XU Q X, ZHANG B, et al. Imperatorin induces autophagy and G₀/G₁ phase arrest via PTEN-PI3K-AKT-mTOR/p21 signaling pathway in human osteosarcoma cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1):689.
- [7] AM J U, GONG W J, SU Y, et al. Imperatorin shows selective antitumor effects in SGC-7901 human gastric adenocarcinoma cells by inducing apoptosis, cell cycle arrest and targeting PI3K/Akt/m-TOR signalling pathway[J]. *J BUON*, 2017, 22(6):1471-1476.
- [8] GAO Y Y, ZAMISCH M, VACCHIO M, et al. NuRD complex recruitment to ThPOK mediates CD4⁺ T cell lineage differentiation[J]. *Sci Immunol*, 2022, 7(72):eabn5917.
- [9] MARIANI F, SENA, PEDRONI M, et al. Th inducing POZ-Krüppel factor(ThPOK) is a key regulator of the immune response since the early steps of colorectal carcinogenesis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1):e54488.
- [10] TEREKHOVA M, SWAIN A, BOHACOVA P, et al. Single-cell atlas of healthy human blood unveils age-related loss of NKG2C⁺GZMB⁺CD8⁺ memory T cells and accumulation of type 2 memory T cells[J]. *Immunity*, 2024, 57(1):188-192.
- [11] CHEN Y, JIANG L L, XIA L L, et al. ThPOK inhibits the immune escape of gastric cancer cells by inducing STPG1 to inactivate the ERK pathway[J]. *BMC Immunol*, 2022, 23(1):16.
- [12] 景红梅, 樊海燕, 黄小勇, 等. 欧前胡素抑制人肾癌 786-O 细胞增殖并促进其凋亡[J]. *山西医科大学学报*, 2023, 54(10):1323-1330.
- [12] JING H M, FAN H Y, HUANG X Y, et al. Imperatorin inhibits proliferation and promotes apoptosis of human renal carcinoma cell line 786-O[J]. *J Shanxi Med Univ*, 2023, 54(10):1323-1330.
- [13] XU W W, HUANG Z H, LIAO L, et al. Direct targeting of CREB1 with imperatorin inhibits TGF β -ERK signaling to suppress esophageal cancer metastasis[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2020, 7(16):2000925.
- [14] NUNES-CABAÇO H, RAMALHO-DOS-SANTOS A, PIRES A R, et al. Human CD4 T cells from thymus and cord blood are convertible into CD8 T cells by IL-4[J]. *Front Immunol*, 2022, 13:834033.
- [15] 黄丽芳. 胃癌细胞对 CD4⁺ T 细胞 ThPOK 蛋白表达的影响及其与 CD4⁺ T 细胞亚群分化的关系[D]. 南昌:南昌大学, 2017.
- [15] HUANG L F. Effect of gastric cancer cells on ThPOK protein expression in CD4⁺ T cells and its relationship with CD4⁺ T cell subsets differentiation[D]. Nanchang: Nanchang University, 2017.
- [16] BASU J, REIS B S, PERI S, et al. Essential role of a ThPOK autoregulatory loop in the maintenance of mature CD4⁺ T cell identity and function[J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(8):969-982.
- [17] ANDREWS L P, VIGNALI K M, SZYMCAK-WORKMAN A L, et al. A Cre-driven allele-conditioning line to interrogate CD4⁺ conventional T cells[J]. *Immunity*, 2021, 54(10):2209-2217.e6.
- [18] OUYANG Y, GU Y, ZHANG X H, et al. AMPK α_2 promotes tumor immune escape by inducing CD8⁺ T-cell exhaustion and CD4⁺ Treg cell formation in liver hepatocellular carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2024, 24(1):276.
- [19] CHAKRABARTI J, KOH V, STEELE N, et al. Disruption of Her2-induced PD-L1 inhibits tumor cell immune evasion in patient-derived gastric cancer organoids[J]. *Cancers*, 2021, 13(24):6158.

(收稿日期:2024-06-07 修回日期:2024-10-16)

(编辑:张元媛)