

金丝桃苷通过下调PD-L1表达发挥抗非小细胞肺癌作用研究

董靖雯, 况泽安, 殷明晓, 刘晓嘉, 刘 阳, 邓洪斌*

(中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: 研发能阻断免疫检查点程序性死亡分子1/程序性死亡配体1 (PD-1/PD-L1) 相互作用的小分子药物是下一代肿瘤免疫疗法的新方向。本研究对金丝桃苷下调非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞中PD-L1表达发挥抗肿瘤作用及机制进行了研究。利用Western blot、流式细胞术、PD-1/PD-L1相互作用分析检测金丝桃苷对NSCLC细胞内和细胞膜表面PD-L1蛋白表达水平的影响; 荧光定量PCR和Western blot检测金丝桃苷对PD-L1 mRNA和c-Myc蛋白的影响; 细胞阻抗法和结晶紫法检测金丝桃苷对共培养T细胞杀伤肿瘤细胞的效果; Lewis荷瘤小鼠检测金丝桃苷的体内抑瘤效果。结果表明, 金丝桃苷能分别以浓度依赖性和时间依赖性方式下调H1975、HCC827细胞中以及细胞膜表面PD-L1的水平, 这与其抑制NSCLC细胞中PD-L1 mRNA的表达水平有关。机制研究发现, 金丝桃苷可降低H1975、HCC827细胞中转录因子c-Myc的蛋白表达量, 从而在转录水平下调PD-L1的表达。此外, 金丝桃苷可促进共培养的T细胞对H1975细胞的杀伤作用。小鼠荷瘤实验证实(所有动物实验均遵循中国医学科学院医药生物技术研究所伦理委员会的规定), 金丝桃苷可显著抑制C57BL/6小鼠中Lewis移植瘤的生长。25 mg·kg⁻¹金丝桃苷处理荷瘤小鼠后, 可使瘤体体积减小48.3%。以上结果说明, 金丝桃苷通过降低NSCLC细胞中c-Myc的蛋白表达量, 在转录水平抑制PD-L1的表达, 从而发挥抗肿瘤作用。本研究为金丝桃苷在肿瘤免疫治疗中的潜在应用奠定了基础。

关键词: 程序性死亡配体1; c-Myc; 免疫检查点抑制剂; 金丝桃苷

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)10-2817-08

Hyperoside exerts its anti-tumor activity by reducing the PD-L1 level in non-small cell lung cancer

DONG Jing-wen, KUANG Ze-an, YIN Ming-xiao, LIU Xiao-jia, LIU Yang, DENG Hong-bin*

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Blocking the binding of programmed death 1 (PD-1) on the T cells and programmed death ligand 1 (PD-L1) on the tumor cells has become a hotspot in the field of tumor immunotherapy. Small-molecule checkpoint inhibitor targeting PD-1/PD-L1 axis is the new direction of tumor immunotherapy. In the present study, we investigated the anti-tumor role of hyperoside by regulating the PD-L1 level in non-small cell lung cancer (NSCLC). Changes of total PD-L1 and membrane PD-L1 levels were determined by Western blot, flow cytometry, and PD-1/PD-L1 interaction assays. The expression of mRNA level of PD-L1 was detected by real-time PCR. The cytotoxicity of activated human T cells toward co-cultured tumor cells was measured by cell impedance assay and crystal violet experiment. The antitumor effect of hyperoside *in vivo* was examined by C57BL/6 mice bearing Lewis xenograft tumor. Western blot and flow cytometry assay showed that hyperoside significantly downregulated the abundance of PD-L1 in H1975 and HCC827 cells in dose- and time-dependent manner. PD-1/PD-L1 binding assay revealed that hyperoside reduced the binding of tumor cells to recombinant PD-1 protein. In addition, hyperoside decreased

收稿日期: 2021-07-26; 修回日期: 2021-08-16.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973366, 81773782).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63169876, E-mail: hdeng@imb.pumc.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1092

the abundance of c-Myc, a key transcriptional regulator of PD-L1, in H1975 and HCC827 cells. Cell impedance and crystal violet staining indicated that hyperoside enhanced the killing activity of co-cultured T cells toward tumor cells. Animal experiments (all animal experiments were conducted in accordance with the Animal Ethics Committee of the Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences) revealed that hyperoside treatment displayed significant suppression in the growth of Lewis tumor xenografts in C57BL/6 mice with an inhibition rate of 48.3% at 25 mg·kg⁻¹. Our results demonstrate that hyperoside exerts its anti-NSCLC activity by reducing the PD-L1 level. Our study provides an important material basis and scientific basis for developing hyperoside into a new small molecule drug for tumor immunotherapy.

Key words: programmed death ligand 1; c-Myc; immune checkpoint inhibitor; hyperoside

据世界卫生组织 (WHO) 统计, 在多种癌症中, 肺癌以 11.6% 的发病率高居首位, 其中肺癌死亡人数在癌症总死亡人数的占比高达 18.4%^[1]。依据病因可将肺癌分为原发性肺癌和继发性肺癌, 而非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 属于原发性肺癌中最为常见的类型, 约占 85%~90%^[2]。目前, 虽然多种治疗手段用于 NSCLC 的治疗, 包括化学治疗、手术治疗、放射治疗和靶向治疗等, 但肺癌的临床治疗仍面临巨大考验, 肺癌患者五年生存率仍低于 21%^[3]。近年来, 随着免疫检查点的发现和免疫治疗的兴起, 免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitor, ICI) 已被广泛应用于多种恶性肿瘤的临床治疗中。

ICI 的发现改变了 NSCLC 治疗前景^[4]。T 细胞表面的程序性死亡分子 1 (programmed death 1, PD-1) 和肿瘤细胞表面的程序性死亡配体 1 (programmed death ligand 1, PD-L1) 是一对重要的免疫检查点, 阻断 PD-1 和 PD-L1 的结合已经成为目前包括 NSCLC 在内的肿瘤免疫治疗的研究热点^[5]。研究表明, NSCLC 可高表达 PD-L1 蛋白, 是其抑制免疫微环境中 T 细胞激活的关键因素^[6]。一些靶向 PD-1/PD-L1 免疫检查点的抗体药物在临床治疗中显示出令人鼓舞的治疗效果, 如 PD-1 单抗帕博利珠单抗 (pembrolizumab)、纳武单抗 (nivolumab), 以及 PD-L1 单抗阿维单抗 (avelumab)、度伐鲁单抗 (durvalumab) 和阿特朱单抗 (atezolizumab)。但这些单抗药物也存在生产成本低、临床患者应答率低以及诱发免疫相关不良事件 (immune-related adverse events, irAE) 等局限性^[7]。与抗体药物相比, 小分子药物在口服生物利用度、组织和肿瘤渗透性以及生产成本等方面具有天然优势, 基于小分子药物的 ICI 策略在肿瘤免疫治疗领域引起了广泛的兴趣。

天然活性物质治疗肿瘤在稳定瘤体积、调节机体免疫功能、减轻化疗毒副作用等方面具有独特疗效, 从传统中药中寻找抗肿瘤药物已被证明是一种有效可行的手段^[8]。金丝桃苷 (hyperoside) 是一种天然的黄酮醇苷类化合物, 存在于金丝桃科、蔷薇科、桔梗科、唇形

科等多种植物的果实与全草中。研究表明, 金丝桃苷具有抗炎、抗氧化、抗纤维化和心肌保护等多种药理学作用^[9,10], 对心脑血管缺血、肝纤维化和冠心病等疾病具有一定的治疗效果^[11]。目前, 有关金丝桃苷作为免疫检查点抑制剂应用于肿瘤免疫治疗方面的研究还未见报道。本研究以 NSCLC 细胞为研究对象, 对金丝桃苷下调 NSCLC 细胞中 PD-L1 的表达、激活 T 细胞活性从而发挥肿瘤作用进行了研究。

材料与方法

主要试剂及材料 DMEM、RPMI 1640 培养基、胎牛血清 (FBS)、胰蛋白酶 (trypsin)、青霉素/链霉素溶液购自美国 Hyclone 公司; 丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠 (SDS)、Tris 碱、过硫酸铵及 Tween-20 均购自美国 Amresco 公司; PVDF 膜购自美国 Millipore 公司; Clarity™ Western ECL substrate、iScript™ cDNA Synthesis Kit、iTaq™ Universal SYBR Green Supermix 试剂盒均购自美国 BIO-RAD 公司; RNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司; PD-L1 (E1L3NR) 抗体、leukocyte surface antigen CD47 (D3O7P) 抗体、IDO1 (indoleamine 2,3 dioxygenase 1) (D5J4E) 抗体、phospho-NF- κ B p65 (nuclear factor kappa-B p65) (S536) 抗体、phospho-c-Jun (60A8) 抗体、phospho-STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) (Y705) 抗体、c-Myc (D84C12) 抗体、GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (D16H11) 抗体和辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗兔 IgG、HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 均购自美国 Cell Signaling 公司; VigoFect 转染试剂购自北京威格拉斯生物技术有限公司; CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity 试剂盒购自美国 Promega 公司; 金丝桃苷购自上海诗丹得生物技术有限公司。

细胞培养 人非小细胞肺癌细胞 H1975 和 HCC827 细胞购自中国医学科学院基础医学研究所, Lewis 肺癌细胞 (LLC) 由本室保存。H1975 和 HCC827 均用 RPMI 1640 培养, Lewis 肺癌细胞用 DMEM 培养。培

培养基中加入10% FBS、1% 双抗,并置于培养箱(37 °C、5% CO₂)中进行培养。

流式细胞术检测细胞膜表面PD-L1 在6孔板中,细胞经药物处理相应时间后,用PBS清洗2次。加入胰酶进行消化,1 000 r·min⁻¹离心5 min,并用PBS漂洗2次。用PBS溶液配制荧光抗体(1:1 000),混匀后加入到细胞中进行染色,放在4 °C冰箱中避光孵育20 min后,1 000 r·min⁻¹离心5 min,去除荧光染料,并用PBS洗涤1次。用300目筛网进行过滤,避免堵塞仪器。流式细胞仪检测(冰上避光放置)。

PD-L1-PD-1蛋白相互作用实验^[12] 将H1975细胞接种于24孔板中(1×10⁵个/孔),在无菌培养箱(37 °C、5% CO₂)内培养至细胞贴壁,约24 h后,更换培养基并加入对照DMSO或5、10 μmol·L⁻¹浓度金丝桃苷处理。药物作用结束后,吸除培养基并用PBS清洗3次,4%多聚甲醛室温固定细胞15 min。去掉多聚甲醛后用PBS洗2次,每孔加入50 ng PD-1重组蛋白,PBS溶液100 μL,室温静置1 h。PBS冲洗2次后用绿色荧光标记的人IgG Fc段(可结晶片段)抗体进行标记,PBS溶液稀释荧光抗体(1:1 000),4 °C静置30 min。取出后PBS冲洗2次,进行Hoechst染料染色,PBS溶液1:1 000稀释染料,15 min后对细胞核进行标记。染色结束后PBS冲洗,用荧光显微镜进行拍照记录。

MTT法测定细胞存活率 将细胞消化后,在加样槽中混匀细胞并配制成细胞悬液,使细胞数量达到每毫升1×10⁵个,取100 μL细胞悬液接种到96孔细胞培养板中。在无菌培养箱(37 °C、5% CO₂)内培养至细胞贴壁。用培养基将金丝桃苷稀释到浓度为5、10和20 μmol·L⁻¹,加入96孔培养板中,3个复孔平行操作,以空白培养基为空白对照。在无菌培养箱(37 °C、5% CO₂)内培养24 h后,每个孔加入5 mg·mL⁻¹ MTT 20 μL,培养4 h后用真空泵吸除上清,加入100 μL二甲亚砜,震荡20 min后,在570 nm处测定光吸收。

实时荧光定量PCR(qRT-PCR) 将细胞接种于6孔板后,用10 μmol·L⁻¹金丝桃苷处理12 h。使用RNA提取试剂盒提取细胞中的总RNA,接着使用iScriptTM cDNA Synthesis Kit试剂盒进行逆转录合成cDNA。按照iTaqTM Universal SYBR Green Supermix试剂盒进行操作,加入适当染料、引物、cDNA模板后,上机检测各组细胞中PD-L1 mRNA的变化。qRT-PCR引物序列为:PD-L1 (forward: 5'-TCACTTGGTAATTCTGGAGC-3'; reverse: 5'-CTTTGAGTTTGTATCTTGGATGCC-3'); GAPDH (forward: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'; reverse: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3')。

细胞阻抗法和结晶紫染色法检测T细胞介导的肿瘤细胞杀伤实验

细胞阻抗法 金丝桃苷5、10 μmol·L⁻¹处理肿瘤细胞后,加入Jurkat细胞共培养,通过xCELLigence系统(ACEA Biosciences,美国)检测Jurkat细胞对肿瘤细胞杀伤活性。将50 μL培养基加入16孔培养板中,连接仪器,对基数和仪器状态进行检测。取出培养板,每孔接种8×10³个H1975细胞,室温静置30 min待细胞贴壁。连接仪器,每30 min进行一次监测分析。24 h后,加入5、10 μmol·L⁻¹金丝桃苷,每组3个复孔。处理24 h后,以1:4的比例加入Jurkat细胞[通过植物血凝素(PHA)、佛波醇乙酯(PMA)共同刺激激活]。每隔15 min记录测量细胞指数。结果由ACEA Biosciences提供的RTCA软件实时分析。

结晶紫染色法^[12] H1975细胞按1×10⁵个/孔接种于24孔板中,待细胞贴壁后加入5、10 μmol·L⁻¹金丝桃苷处理24 h,以1:4的比例加入已激活的Jurkat细胞。共培养48 h后弃去培养基。用预冷的PBS冲洗2次后,用4 °C预冷的甲醇固定10 min;弃去甲醇,用0.2%结晶紫染色液覆盖细胞染色10 min,用PBS漂洗细胞数次后拍照。

Western blot 将细胞接种于6孔板后,用金丝桃苷处理相应时间后,每孔加入适量裂解液(50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl pH = 7.5、1% Triton-100、150 mmol·L⁻¹ NaCl、2 mmol·L⁻¹ EDTA、1 mmol·L⁻¹ 钒酸钠、50 mmol·L⁻¹ NaF、1 mmol·L⁻¹ PMSF、1 mg·mL⁻¹ aprotinin、1 mmol·L⁻¹ leupeptin),用细胞刮刀刮下,10 min涡旋震荡1次,冰浴30 min,然后4 °C、12 000 ×g离心15 min,收集上清液即为蛋白提取液。用标准Bradford方法测定样品的蛋白浓度,配制所有样品至同样浓度,100 °C煮样10 min。10% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,半干法将蛋白转至PVDF膜。转膜结束后,将其放入含5%脱脂奶粉的TBST(20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl、150 mmol·L⁻¹ NaCl、0.1% Tween-20, pH = 7.6)中振荡封闭1 h。封闭后的膜切取对应分子量的条带装入杂交袋与一抗溶液(1:1 000稀释)于4 °C孵育过夜,TBST洗膜3次,以洗去未结合的一抗。与辣根过氧化物酶标记的二抗溶液(抗兔二抗1:2 000稀释、抗鼠二抗1:5 000稀释)在室温孵育1~2 h后,TBST洗膜3次,按照ClarityTM Western ECL substrate试剂盒说明书进行显色,通过Tanon-5100凝胶成像系统(天能公司)捕获并分析图像。

实验动物 C57BL/6小鼠,雌性,6~8周龄,体重18~20 g,SPF级。购自北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证编号:SCXK(京)2019-0008。实验单位许可证编号:SYXK(京)2017-0023。所有动物实验均

通过中国医学科学院医药生物技术研究所实验动物管理与动物福利伦理委员会审查批准。

小鼠肺癌移植瘤实验 将小鼠进行称重分组后,在小鼠右侧腋下接种 1×10^6 个 Lewis 肺癌细胞。接种 72 h 后,配制金丝桃苷 (12.5 和 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 腹腔注射给药, PBS 溶液腹腔注射为空白对照,每日给药 1 次,共给药 14 天。每两天测量一次小鼠体重;给药第 3 天开始,每隔两天测量一次瘤体积。结束给药两天后,处理小鼠,分离瘤组织拍照称重,取出部分组织进行免疫组化实验。

免疫组化 将小鼠肿瘤组织取出后,加入 10% 福尔马林进行固定,剪成合适小块后,加热石蜡进行包埋。将包埋后的组织固定切片,连续切成多个连接组织薄片,从中挑选较完整的薄片,每个样本挑选切片 3~5 张。固定组织切片于玻片上,晾干并在 60°C 恒温箱中烘干 1 h。按照文献报道的方法^[13]进行脱蜡水化和抗原修复,滴加一抗室温孵育 1 h 或 4°C 孵育过夜。使用 PBS 冲洗 5 min,重复 3 次。弃去 PBS 溶液后,加入二抗于 37°C 孵育 30 min。使用 PBS 洗 5 min,重复 3 次。DAB 显色 5 min,自来水冲洗。苏木素室温复染 1 min,自来水冲洗 10 min 后吹风机吹干。接着,进行脱水处理: 80% 乙醇 (2 min) → 95% 乙醇 (2 min) → 100% 乙醇 (5 min) → 100% 乙醇 (5 min) → 二甲苯 (5 min) → 二甲苯 (5 min)。最后使用中性树脂封片,于显微镜下观察拍照。

数据统计与处理 每组实验重复 3 次,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 具有显著性差异。

结果

1 金丝桃苷下调 NSCLC 细胞中 PD-L1 的表达

以 NSCLC 细胞 (H1975 和 HCC827) 为研究对象,本研究检测了金丝桃苷对肿瘤细胞中 PD-L1 总蛋白表达的影响。将不同浓度 (0 、 2 、 5 和 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的金丝桃苷分别作用于 H1975 和 HCC827 细胞 24 h 后,Western blot 检测 PD-L1 的变化。结果显示,金丝桃苷可以剂量依赖性地下调 PD-L1 的表达,在 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下金丝桃苷即可发挥明显的下调作用 (图 1A)。金丝桃苷 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用于 H1975 和 HCC827 细胞不同时间 (0 、 3 、 6 、 12 和 24 h) 后,Western blot 检测结果表明,金丝桃苷对 PD-L1 的下调作用具有时间依赖性, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 金丝桃苷作用 24 h 可以明显下调 PD-L1 的表达水平 (图 1B)。本研究还考察了金丝桃苷对 H1975 细胞中其他免疫检查点如 CD47 和 IDO1 的影响,发现其对 CD47 和 IDO1 的表达没有明显的抑制作用 (图 1C),说明金丝桃苷特异性降低 NSCLC 细胞中免疫检查点 PD-L1 的表达。由于肿瘤免疫治疗药物并不直接杀伤肿瘤细胞,本研究进一步检测了金丝桃苷的细胞毒性。MTT 结果表明, $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内的金丝桃苷作用 H1975 和 HCC827 细胞 24 h 后,对细胞增殖活性无明显影响 (图 1D)。以上结果表明,金丝桃苷可以剂量和时间依赖性地下调 NSCLC 细胞中 PD-L1 的表达。

2 金丝桃苷降低 NSCLC 细胞膜表面 PD-L1 的表达水平

PD-L1 是一种膜蛋白,其分泌至肿瘤细胞膜表面后与 T 细胞表面的 PD-1 相互作用,从而发挥免疫抑制作

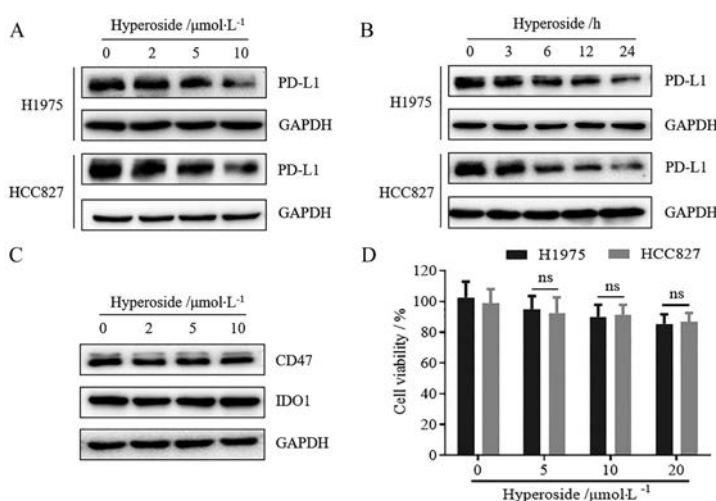


Figure 1 Hyperoside decreases programmed death ligand 1 (PD-L1) expression in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. A, B: H1975 and HCC827 cells were treated with different concentrations of hyperoside for 24 h (A), or treated with $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ hyperoside for the indicated time (B), expression levels of PD-L1 were detected by Western blot; C: H1975 cells were pre-treated with indicated concentrations of hyperoside, leukocyte surface antigen CD47 and indoleamine 2,3 dioxygenase 1 (IDO1) expression levels were detected by Western blot; D: H1975 and HCC827 cells were treated with different concentrations of hyperoside for 24 h, cell viability was measured by MTT assay. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ns: No significant difference

用^[6]。为了进一步确定金丝桃苷是否可以下调NSCLC细胞膜表面PD-L1的表达,本研究用金丝桃苷处理H1975细胞24 h,流式细胞术检测膜表面PD-L1的变化情况。结果表明,5和10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 金丝桃苷作用后可显著降低细胞膜表面的PD-L1水平,其中10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 金丝桃苷可使膜表面PD-L1平均荧光强度降低50%左右(图2A)。

此外,本研究还将金丝桃苷预处理24 h后的H1975细胞与重组的人PD-1-Fc蛋白(PD-1和IgG可结晶片段融合蛋白)相互作用,利用绿色荧光标记的IgG Fc抗体,在荧光显微镜上观察PD-1/PD-L1蛋白的结合情况。结果表明,金丝桃苷可减少H1975细胞与PD-1-Fc的结合。5和10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 金丝桃苷抑制率分别约为30.6%和36.1%(图2B)。以上结果证实,金丝桃苷可显著降低NSCLC细胞膜表面PD-L1的水平。

3 金丝桃苷诱导NSCLC细胞中c-Myc降解

为探讨金丝桃苷下调PD-L1的内在机制,本研究首先用qRT-PCR的方法检测了金丝桃苷对PD-L1 mRNA水平的影响。结果显示,与对照组相比,金丝桃苷(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)作用H1975和HCC827细胞12 h后,可降低细胞中PD-L1 mRNA水平(图3A),提示金丝桃苷通过转录途径下调NSCLC细胞中PD-L1表达。现有研究表明,转录因子NF- κ B p65、c-Jun、STAT3和

c-Myc均可在转录水平促进PD-L1 mRNA的表达^[6]。本研究结果证实,金丝桃苷作用H1975细胞后,不影响NF- κ B p65、c-Jun、STAT3的磷酸化水平(图3B),提示金丝桃苷促进PD-L1 mRNA表达不依赖上述转录因子的激活。由于转录因子c-Myc可与PD-L1的启动子结合从而在转录水平上调NSCLC中PD-L1的表达^[14,15],接下来本研究检测了金丝桃苷对NSCLC细胞中c-Myc的影响。Western blot结果表明,金丝桃苷可剂量依赖性和时间依赖性降低H1975和HCC827细胞中c-Myc的蛋白表达量(图3C、D)。以上结果说明,金丝桃苷通过降低转录因子c-Myc的蛋白表达量,在转录水平抑制NSCLC细胞中和细胞膜表面PD-L1的表达。

4 金丝桃苷增强共培养的T细胞对肿瘤细胞的杀伤活性

鉴于金丝桃苷可以下调肿瘤细胞内和膜表面PD-L1表达水平,本研究进一步检测金丝桃苷对T细胞功能的影响。分别将DMSO和金丝桃苷处理的H1975细胞与PMA/PHA激活的Jurkat T细胞按照1:4比例共同培养,利用细胞阻抗分析仪检测金丝桃苷对共培养的T细胞对肿瘤细胞的杀伤活性的影响。结果表明,PD-1/PD-L1的相互作用会抑制Jurkat T细胞对H1975细胞的杀伤作用,而金丝桃苷(5和10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)作用后可增强Jurkat T细胞对H1975细胞的杀伤活性(图4A)。本研

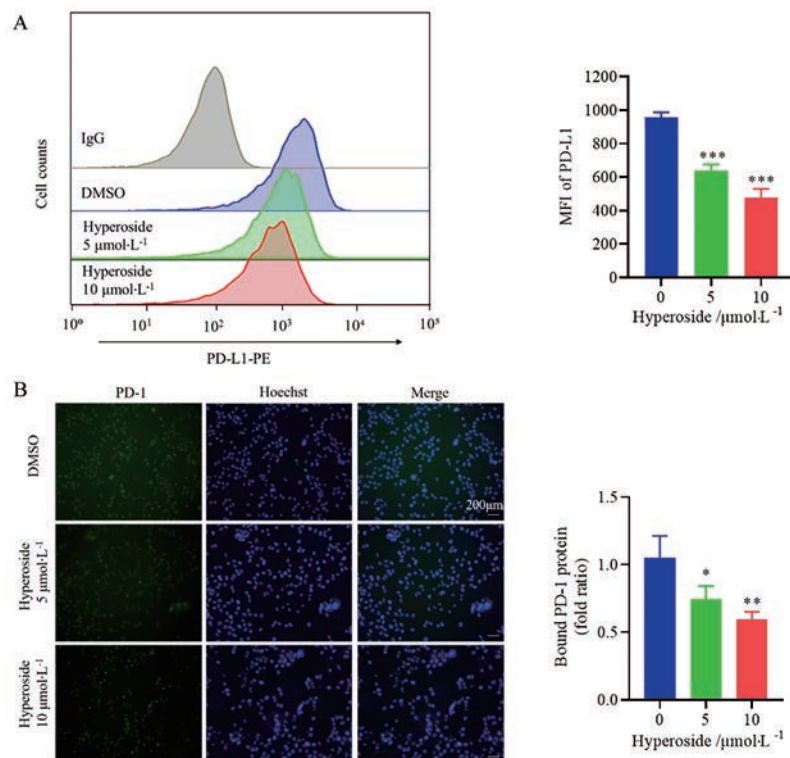


Figure 2 Hyperoside decreases the abundance of PD-L1 on surface of NSCLC cell. A: H1975 cells were treated with hyperoside (5 and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 h, the plasma membrane PD-L1 was detected by flow cytometry. Statistic of PD-L1 mean fluorescence intensity (MFI) is shown in right; B: PD-L1/PD-1 binding assay in H1975 cells treated with hyperoside (5 and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 24 h). Bound PD-1 was calculated according to the intensity of green fluorescence (scale bar, 200 μm). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs DMSO group

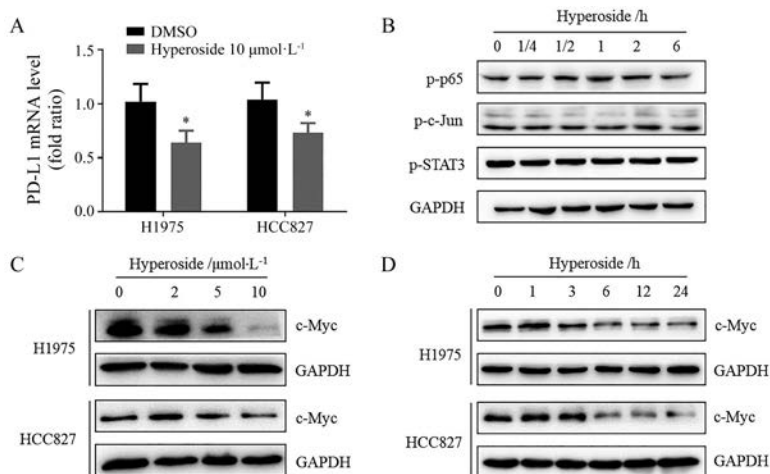


Figure 3 Hyperoside attenuates the abundance of c-Myc. A: Quantitative RT-PCR analysis of the mRNA level of PD-L1 in H1975 and HCC827 cells treated with hyperoside ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 12 h); B: H1975 cells were treated with $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ hyperoside for the indicated time, the phosphorylation levels of nuclear factor kappa-B p65 (NF- κB p65), c-Jun, and phospho-signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) were measured by Western blot; C, D: H1975 and HCC827 cells were treated with different concentrations of hyperoside for 24 h (C), or treated with $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ hyperoside for the indicated time (D), the expression levels of c-Myc were detected by Western blot. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs DMSO group

究利用结晶紫染色实验对上述结果进行验证。与对照组相比, 金丝桃苷可剂量依赖性增强Jurkat T细胞对H1975细胞的杀伤活性, 表现在不同浓度金丝桃苷给药组染色较浅, 其中5和 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 给药组抑制率分别约为23.3%和46.3% (图4B)。以上实验表明, 金丝桃苷可以增强共培养细胞中Jurkat T细胞对肿瘤细胞的杀伤作用。

5 金丝桃苷抑制Lewis肺癌荷瘤小鼠肿瘤的生长

利用小鼠肺癌移植瘤模型, 本研究进一步探究了金丝桃苷的体内抗肿瘤效果。Lewis肺癌小鼠皮下荷瘤实验结果表明, 与对照组相比, 金丝桃苷可显著抑制小鼠体内移植瘤的生长, 12.5 和 $25 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 金丝桃苷给药组的抑瘤率分别为48%和48.3% (图5A~C)。此

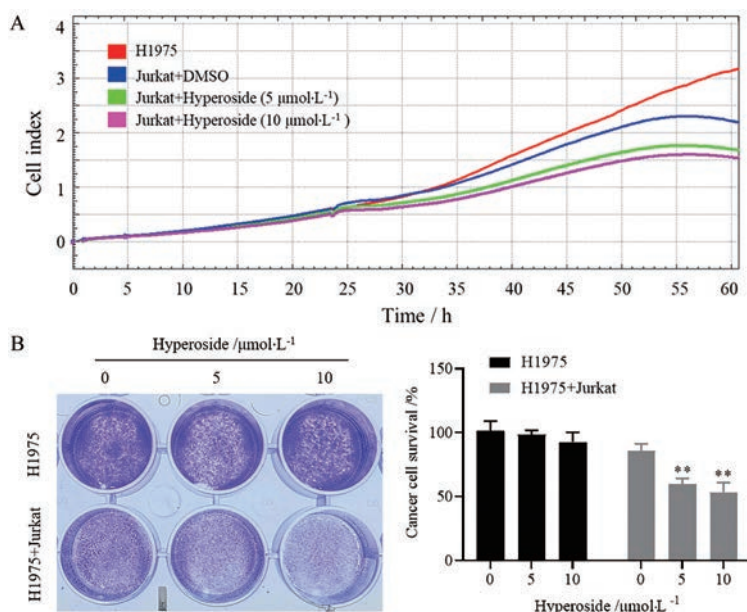


Figure 4 Hyperoside recovers the cytotoxicity of T cells. A: Cell impedance assay analyzing Jurkat T cells-mediated tumor cell killing in H1975 cells treated with hyperoside (5 or $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 h. Jurkat T cells were activated by $100 \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ phytohemagglutinin (PHA) plus $50 \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA); B: Activated Jurkat T cell was co-cultured with H1975 cells in 12-well plates for 2 days in the presence of hyperoside, the surviving tumor cells were visualized by crystal violet staining. Relative fold ratios of surviving cell intensity are shown. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs H1975+Jurkat DMSO group

外, 给药过程中对小鼠体重进行称量, 发现金丝桃苷给药组较对照组相比, 体重无显著性差异 (图 5D)。

此外, 本研究用免疫组化法检测了各组小鼠肿瘤中 PD-L1 和活化的细胞凋亡蛋白激酶 3 (cleaved-caspase 3) 等指标的变化。结果表明, 金丝桃苷可以使肿瘤组织中的 PD-L1 表达降低, 并使凋亡指示蛋白 cleaved-caspase 3 增加 (图 5E), 表明金丝桃苷通过降低 PD-L1 表达后, 可以抑制肿瘤细胞的增殖并促进肿瘤细胞的凋亡。

讨论

肺癌是最常见的致死性癌症之一, 其中 85% 的肺癌为非小细胞肺癌。随着免疫检查点疗法在临床的应用, 单克隆抗体类免疫检查点抑制剂取得突破性进展。目前临床上应用的主要为靶向细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (CTLA-4) 抗体 [包括伊匹单抗 (ipilimumab) 和曲美母单抗 (tremelimumab)] 和靶向 PD-1/PD-L1 抗体 (帕博利珠单抗和纳武单抗等多种单抗)。相对于单抗类药物, 小分子抑制剂目前研究较少。2016年, CA-170 获得美国 FDA 新药研究申请, 成为小分子肿瘤免疫治疗重要里程碑之一^[16], 揭开了小分子免疫检查点抑制剂的研发热潮, 随后, 一系列靶向 PD-1/PD-L1 的小分子抑制剂被报道^[17]。小分子药物的优势主要包括口服生物利用度高、生产和管理成本低以及具有跨越细胞

膜进入肿瘤细胞内靶点的能力等。此外, 小分子药物的半衰期较短, 降低了它们产生不良反应的机会。因此, 小分子免疫检查点阻断剂是肿瘤免疫治疗药物的下一个研发热点。

近年来, 国内外针对 PD-1/PD-L1 小分子抑制剂的研究引起了广泛关注。研究发现, BMS-8、BMS-202、异烟酸类化合物以及间苯二酚类衍生物可以直接阻止 PD-1/PD-L1 的结合^[18]。本课题组以往的研究也证实, 天然产物苦豆碱衍生物 SA-49 和小檗碱 (BBR) 可以下调肿瘤细胞中 PD-L1 表达促进抗肿瘤免疫作用^[13,19]。本研究发现, 金丝桃苷可以明显下调 NSCLC 细胞中和细胞膜表面 PD-L1 的表达, 且可以激活共培养的 T 细胞对 NSCLC 的杀伤活性。进一步的机制研究发现, 金丝桃苷通过降低转录因子 c-Myc 的蛋白表达量, 在转录水平抑制 PD-L1 的表达, 从而发挥其抗肿瘤作用。此外, 在小鼠 Lewis 肺癌皮下移植瘤模型中, 金丝桃苷亦显示了良好的抗肿瘤活性。

转录因子 c-Myc 参与多种基因的表达, 包括调节细胞增殖、生长、自我更新、分化和凋亡。c-Myc 在多种人类肿瘤中过度表达, 并促进肿瘤的发生发展^[20]。此外, c-Myc 可以直接与 PD-L1 基因的启动子结合, 从转录水平促进 PD-L1 的表达^[21]。在小鼠肿瘤和人肿瘤细胞中抑制 c-Myc 的表达, 可导致 CD47 和 PD-L1 在

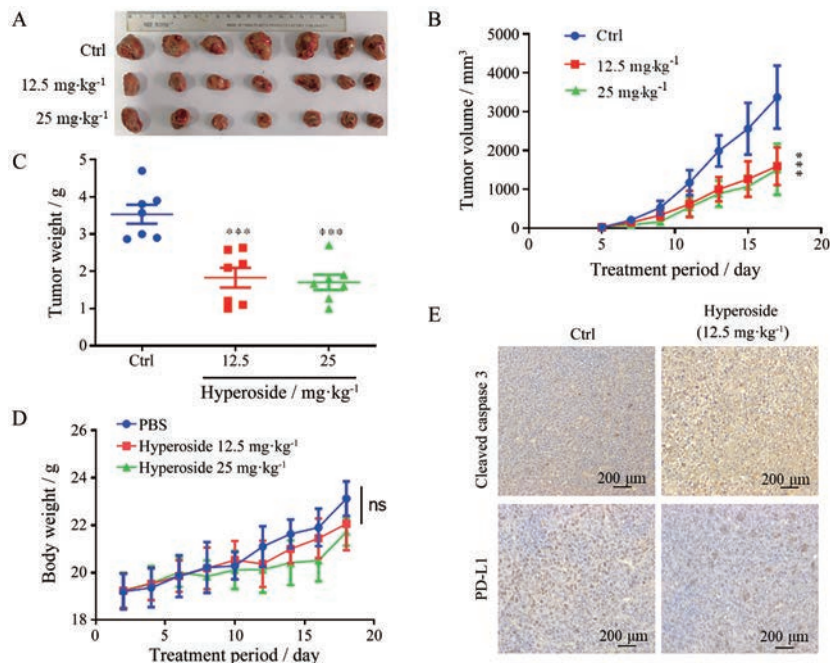


Figure 5 Hyperoside suppresses tumor xenograft growth *in vivo*. C57BL/6 mice with subcutaneous Lewis tumor were i.p. treated with PBS (Ctrl) or hyperoside (12.5 and 25 mg·kg⁻¹). A: *Ex vivo* observation of the tumors from the treated mice; B: The tumor volume of the mice treatment with PBS or hyperoside was monitored; C: Comparison of the weight of the tumors from the mice treatment with PBS or hyperoside; D: The body weight curves of the mice measured every two days; E: Representative immunohistochemistry (IHC) staining results for PD-L1 and cleaved cysteine-requiring aspartate protease 3 (caspase 3) (scale bar, 200 μ m). *** $P < 0.001$ vs PBS group

mRNA 和蛋白质水平的降低, 进而增强抗肿瘤免疫应答^[21]。本研究发现金丝桃苷可降低 c-Myc 的蛋白表达量, 进而抑制 PD-L1 mRNA 和蛋白的表达, 但金丝桃苷对 NSCLC 细胞中 CD47 的表达却没有影响, 说明 NSCLC 中 CD47 的表达可能还受到其他因子的调控, 其机制还有待进一步研究。研究表明, c-Myc 蛋白的稳定性受泛素-蛋白酶体通路的调控, 肿瘤细胞中高表达的去泛素化酶 USP37 可稳定肺癌中 c-Myc 蛋白进而促进肿瘤进展^[22]。因此, 推测金丝桃苷可能通过抑制 USP37 活性降低肺癌细胞中 c-Myc 的表达。

本研究为肿瘤免疫治疗提供了一种替代策略。作为一种天然活性小分子化合物, 金丝桃苷具有较好的组织和肿瘤渗透性, 易于分布在肿瘤微环境中调控免疫细胞的活性。此外, 金丝桃苷是一种临床上广泛使用的药物, 安全性好, 对正常细胞的毒性较小。因此, 金丝桃苷有望成为一种新型的肿瘤免疫治疗候选药物, 可与 PD-1、CTLA-4 等抗体药物联用, 进一步改善临床上这些免疫检查点抑制剂的疗效。由于金丝桃苷的口服生物利用度较低, 本研究中金丝桃苷体内给药方式是通过腹腔给药, 金丝桃苷通过口服灌胃给药激活免疫细胞增强抗肿瘤效果的剂量还需要进一步进行研究。金丝桃苷的半衰期较短, 后期可通过结构改造和改变剂型等进一步提高金丝桃苷的靶向性和生物活性。本研究为将金丝桃苷发展成为一个新的肿瘤免疫治疗小分子药物提供了科学依据。

作者贡献: 董靖雯负责主要实验操作、部分实验设计、结果分析与统计; 况泽安、殷明晓、刘晓嘉和刘阳负责部分实验实施; 刘阳负责文献检索和数据分析; 邓洪斌负责实验设计、结果分析、论文撰写与修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [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] Reck M, Popat S, Reinmuth N, et al. Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [J]. *Ann Oncol*, 2014, 25 Suppl 3: iii27-iii39.
- [3] Lu T, Yang X, Huang Y, et al. Trends in the incidence, treatment, and survival of patients with lung cancer in the last four decades [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 943-953.
- [4] Mielgo-Rubio X, Uribealrrea EA, Cortes LQ, et al. Immunotherapy in non-small cell lung cancer: update and new insights [J]. *J Clin Transl Res*, 2021, 7: 1-21.
- [5] Borst J, Busselaar J, Bosma DMT, et al. Mechanism of action of PD-1 receptor/ligand targeted cancer immunotherapy [J]. *Eur J Immunol*, 2021, 51: 1911-1920.
- [6] Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and function of the PD-L1 checkpoint [J]. *Immunity*, 2018, 48: 434-452.
- [7] Kourie HR, Klastersky J. Immune checkpoint inhibitors side effects and management [J]. *Immunotherapy*, 2016, 8: 799-807.
- [8] Zhang L, Zhang FY, Li GF. Traditional Chinese medicine and lung cancer--from theory to practice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 137: 111381.
- [9] Huang J, Tong X, Zhang L, et al. Hyperoside attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis development in mice [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 550955.
- [10] He S, Yin X, Wu F, et al. Hyperoside protects cardiomyocytes against hypoxia-induced injury via upregulation of micro-RNA138 [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23: 286.
- [11] Ye P, Yang XL, Chen X, et al. Hyperoside attenuates OVA-induced allergic airway inflammation by activating Nrf2 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 44: 168-173.
- [12] Li CW, Lim SO, Xia W, et al. Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12632.
- [13] 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: 2299-2312.
- [14] Kim EY, Kim A, Kim SK, et al. MYC expression correlates with PD-L1 expression in non-small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2017, 110: 63-67.
- [15] Zhou C, Che G, Zheng X, et al. Expression and clinical significance of PD-L1 and c-Myc in non-small cell lung cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019, 145: 2663-2674.
- [16] Yan SJ, Sun L, Wan GH. The mechanism and research progress of drug resistance of PD-1/PD-L1 immunotherapy in tumors [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 1728-1734.
- [17] Li K, Tian H. Development of small-molecule immune checkpoint inhibitors of PD-1/PD-L1 as a new therapeutic strategy for tumour immunotherapy [J]. *J Drug Target*, 2019, 27: 244-256.
- [18] Cheng B, Ren Y, Niu X, et al. Discovery of novel resorcinol dibenzyl ethers targeting the programmed cell death-1/programmed cell death-ligand 1 interaction as potential anticancer agents [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 8338-8358.
- [19] Zhang N, Dou Y, Liu L, et al. SA-49, a novel aloperine derivative, induces MITF-dependent lysosomal degradation of PD-L1 [J]. *EBioMedicine*, 2019, 40: 151-162.
- [20] Wang C, Zhang J, Yin J, et al. Alternative approaches to target Myc for cancer treatment [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6: 117.
- [21] Casey SC, Tong L, Li Y, et al. MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1 [J]. *Science*, 2016, 352: 227-231.
- [22] Pan J, Deng Q, Jiang C, et al. USP37 directly deubiquitinates and stabilizes c-Myc in lung cancer [J]. *Oncogene*, 2015, 34: 3957-3967.