

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research阿帕替尼调控 HMGB1/RAGE 通路对胃癌
细胞增殖、凋亡和免疫逃逸影响的研究

Research of the effects of apatinib on the proliferation, apoptosis, and immune escape of gastric cancer cells by adjusting the HMGB1/RAGE pathway

闫明霞¹, 董升镇², 林娜娜³,
贺延新⁴, 鲁杰⁵

(1. 康复大学青岛医院(青岛市市立医院)急诊科, 山东 青岛 266071; 2. 康复大学青岛中心医院放射物理科, 山东 青岛 266042; 3. 康复大学青岛中心医院放射科, 山东 青岛 266042; 4. 康复大学青岛中心医院消化内科, 山东 青岛 266042; 5. 康复大学青岛医院(青岛市市立医院)本部胃肠外科, 山东 青岛 266011)

YAN Ming-xia¹,
DONG Sheng-zhen², LIN Na-na³,
HE Yan-xin⁴, LU Jie⁵

(1. Emergency Department, Qingdao Hospital of Rehabilitation University (Qingdao Municipal Hospital), Qingdao 266071, Shandong Province, China; 2. Radiation Physics Department, Qingdao Central Hospital, University of Health and Rehabilitation Sciences, Qingdao 266042, Shandong Province, China; 3. Radiology Department, Qingdao Central Hospital, University of Health and Rehabilitation Sciences, Qingdao 266042, Shandong Province, China; 4. Department of Gastroenterology, Qingdao Central Hospital, University of Health and Rehabilitation Sciences, Qingdao 266042, Shandong Province, China; 5. Department of Gastrointestinal Surgery, Qingdao Hospital of Rehabilitation University (Qingdao Municipal Hospital), Qingdao 266011, Shandong Province, China)

基金项目: 青岛市医药卫生科研指导项目(2023-WJZD189)

作者简介: 闫明霞(1989-)女, 主治医师, 从事胃肠外科、疝与腹壁外科的临床工作和研究

通信作者: 鲁杰, 副主任医师

MP: 17561788065

E-mail: mmun7@163.com

摘要:目的 研究阿帕替尼(APa)调控高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)/晚期糖基化终末产物受体(RAGE)通路对胃癌细胞增殖、凋亡和免疫逃逸的影响。方法

将SGC-7901细胞随机分为空白对照组、低剂量实验组(20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Apa 干预48 h)、中剂量实验组(40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Apa 干预48 h)、高剂量实验组(60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Apa 干预48 h)、HMGB1组(60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Apa 与100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ HMGB1重组因子联合干预48 h),以APa和人HMGB1重组因子分组干预后利用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(Edu)染色、免疫荧光染色Ki67检测各组SGC-7901细胞增殖;利用流式细胞实验、Hoechst 33342/PI双染、免疫荧光法检测各组SGC-7901细胞凋亡;利用蛋白质印迹实验检测各组SGC-7901细胞HMGB1/RAGE信号通路蛋白表达。构建活化外周血单个核细胞(PBMC)或NK细胞与SGC-7901细胞的共培养体系,同法分组及药物干预后利用CCK-8法检测T细胞与NK细胞对每组SGC-7901细胞杀伤率;利用流式细胞实验检测各组PBMC与SGC-7901细胞共培养体系中活化CD8⁺T细胞比例;免疫荧光染色检测各组PBMC与SGC-7901细胞共培养体系中SGC-7901细胞程序性死亡受体1(PD-1)、程序性死亡配体-1(PD-L1)表达;利用酶联免疫吸附测定(ELISA)法测定PBMC与SGC-7901细胞共培养体系中免疫细胞因子白细胞介素(IL)-6、 γ 干扰素(IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-2产生水平。**结果** 空白组、低、中、高剂量实验组和HMGB1组Edu阳性率分别为(86.23 $\pm$ 5.30)%、(65.81 $\pm$ 4.65)%、(43.16 $\pm$ 4.52)%、(20.19 $\pm$ 3.79)%和(82.45 $\pm$ 5.27)%,凋亡率分别为(4.37 $\pm$ 1.19)%、(23.05 $\pm$ 2.14)%、(41.87 $\pm$ 2.69)%、(62.04 $\pm$ 3.12)%和(5.91 $\pm$ 1.28)%,HMGB1蛋白相对表达水平分别为1.15 $\pm$ 0.07、0.79 $\pm$ 0.05、0.43 $\pm$ 0.04、0.10 $\pm$ 0.02和1.13 $\pm$ 0.06,RAGE蛋白相对表达水平分别为1.23 $\pm$ 0.08、0.85 $\pm$ 0.06、0.47 $\pm$ 0.05、0.14 $\pm$ 0.03和1.21 $\pm$ 0.07,PD-1阳性表达率分别为(58.13 $\pm$ 3.70)%、(45.37 $\pm$ 2.84)%、(32.06 $\pm$ 3.01)%、(21.47 $\pm$ 2.31)%和(54.87 $\pm$ 3.53)%,T细胞杀伤率分别为(10.12 $\pm$ 1.34)%、(23.45 $\pm$ 1.62)%、(37.06 $\pm$ 2.08)%、(51.29 $\pm$ 2.73)%和(12.01 $\pm$ 1.61)%,活化CD8⁺T细胞比例分别为(7.21 $\pm$ 0.53)%、(12.42 $\pm$ 0.81)%、(17.93 $\pm$ 0.75)%、(23.07 $\pm$ 0.64)%和(7.93 $\pm$ 0.56)%,IL-6水平分别为(28.31 $\pm$ 3.26)、(46.02 $\pm$ 4.18)、(65.43 $\pm$ 3.70)、(86.15 $\pm$ 4.39)和(31.04 $\pm$ 3.48) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$,上述指标,低、中、高剂量实验组与空白对照组比较,HMGB1组与高剂量实验组比较降低,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** APa可抑制胃癌细胞增殖及免疫逃逸,促进其凋亡,可能是通过阻止HMGB1/RAGE信号通路激活实现的。

关键词: 阿帕替尼;高迁移率族蛋白 B1/晚期糖基化终末产物受体;胃癌;增殖;凋亡;免疫逃逸

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.08.012

中图分类号:R735.2

文献标志码:A

文章编号:1001-6821(2026)08-1122-08

Abstract: Objective To discuss the effects of apatinib (APa) on proliferation, apoptosis, and immune escape of gastric cancer cells by adjusting the high mobility group box 1 (HMGB1)/receptor for advanced glycosylation end products (RAGE) pathway. **Methods** SGC-7901 cells were randomly separated into blank control group, low-dose experimental group (intervention with $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Apa for 48 hours), medium-dose experimental group (intervention with $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Apa for 48 hours), high-dose experimental group (intervention with $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Apa for 48 hours) and HMGB1 group (intervention with $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Apa combined with $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ HMGB1 recombinant factor for 48 hours). After intervention with APa and human HMGB1 recombinant factor, cell counting kit-8 (CCK-8) method, 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (Edu) staining, and immunofluorescence staining Ki67 were used to measure the proliferation of SGC-7901 cells in each group. Flow cytometry, Hoechst 33342/PI double staining, and immunofluorescence were performed to measure apoptosis of SGC-7901 cells in each group. Western blot was performed to detect the expression of HMGB1/RAGE signaling pathway proteins of SGC-7901 cells in various groups. A co-culture system of activated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) or NK cells with SGC-7901 cells was constructed. After grouping and drug intervention, the CCK-8 method was performed to detect the killing rates of T cells and NK cells against SGC-7901 cells in each group. Flow cytometry was used to measure the proportion of activated CD8^+ T cells in the co-culture system of PBMCs and SGC-7901 cells in each group. Immunofluorescence staining was performed to measure the expression of programmed cell death protein 1 (PD-1) and programmed cell death ligand 1 (PD-L1) in the co-culture system of PBMC and SGC-7901 cells in various groups. In addition, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to measure the levels of immune cytokines interleukin (IL)-6, interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and IL-2 production in the co-culture system of PBMC and SGC-7901 cells. **Results** The Edu positive rates in blank control group, the low-dose experimental group, medium-dose experimental group, high-dose experimental group and HMGB1 group were $(86.23 \pm 5.30)\%$, $(65.81 \pm 4.65)\%$, $(43.16 \pm 4.52)\%$, $(20.19 \pm 3.79)\%$ and $(82.45 \pm 5.27)\%$, respectively; the apoptosis rates were $(4.37 \pm 1.19)\%$, $(23.05 \pm 2.14)\%$, $(41.87 \pm 2.69)\%$, $(62.04 \pm 3.12)\%$ and $(5.91 \pm 1.28)\%$, respectively; the relative expression levels of HMGB1 protein were 1.15 ± 0.07 , 0.79 ± 0.05 , 0.43 ± 0.04 , 0.10 ± 0.02 and 1.13 ± 0.06 , respectively; the RAGE protein expression levels were 1.23 ± 0.08 , 0.85 ± 0.06 , 0.47 ± 0.05 , 0.14 ± 0.03 and 1.21 ± 0.07 , respectively; the PD-1 positive expression rates were $(58.13 \pm 3.70)\%$, $(45.37 \pm 2.84)\%$, $(32.06 \pm 3.01)\%$, $(21.47 \pm 2.31)\%$ and $(54.87 \pm 3.53)\%$, respectively; the T cell killing rates were $(10.12 \pm 1.34)\%$, $(23.45 \pm 1.62)\%$, $(37.06 \pm 2.08)\%$, $(51.29 \pm 2.73)\%$ and $(12.01 \pm 1.61)\%$, respectively; the proportions of activated CD8^+ T cells were $(7.21 \pm 0.53)\%$, $(12.42 \pm 0.81)\%$, $(17.93 \pm 0.75)\%$, $(23.07 \pm 0.64)\%$ and $(7.93 \pm 0.56)\%$, respectively; the IL-6 production levels were (28.31 ± 3.26) , (46.02 ± 4.18) , (65.43 ± 3.70) , (86.15 ± 4.39) and $(31.04 \pm 3.48) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. Compared the blank control group with the low-dose experimental group, medium-dose experimental group and high-dose experimental group, compared the HMGB1 group with the high-dose experimental group, the differences of above indexes were all statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion**

APa can inhibit the proliferation and immune escape of gastric cancer cells, promote their apoptosis, possibly by blocking the activation of the HMGB1/RAGE signaling pathway.

Key words: apatinib; high mobility group box 1/receptor for advanced glycosylation end products; gastric cancer; proliferation; apoptosis; immune escape

胃癌是临床中诊断最多与最致命的消化系统癌症之一,全球年发病率大约是 3.2/100 000,通常在晚期被诊断出来,导致患者通常预后较差,整体生存率不高,是全球癌症相关死亡的第五大原因,如今仍然是全球主要的健康挑战^[1-2]。免疫逃

逸在胃癌进展与质量中起到关键作用,通过招募肿瘤相关免疫细胞来重塑肿瘤免疫微环境,下调程序性死亡配体-1(programmed cell death ligand 1,PD-L1)表达,可抑制胃癌免疫逃逸,进而提升胃癌治疗效果^[3-4]。高迁移率族蛋白 B1(high mobility

group box 1, HMGB1)/晚期糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycosylation end products, RAGE)信号通路可调控肿瘤的发生发展,与胃癌淋巴结转移、TNM分期和肿瘤浸润有关,敲低HMGB1与RAGE表达,可抑制糖酵解,进而减轻胃癌细胞增殖与迁移^[5]。HMGB1/RAGE信号通路还可介导肿瘤免疫微环境和免疫逃逸过程,下调HMGB1表达水平可促使肿瘤相关巨噬细胞M1极化,进而阻断肿瘤相关巨噬细胞介导的癌细胞免疫逃逸^[6],特异性敲除RAGE可通过阻碍多形核髓源性抑制细胞募集、浸润和激活来抑制肝细胞癌的转移和免疫逃逸^[7],由此可知,HMGB1/RAGE可作为抵抗胃癌免疫逃逸与恶性进展的潜在作用靶标。阿帕替尼(apatinib, APa)是全球第一个在晚期胃癌治疗中被证实安全有效的小分子抗血管生成靶向药物,可调控胃癌患者体内免疫微环境与免疫功能,抑制机体炎症,对胃癌具有较好的疗效^[8]。研究显示,APa可显著促进胃癌细胞凋亡和自噬、阻滞胃癌细胞周期进程并抑制胃癌细胞增殖、侵袭和迁移^[9],还可通过其抗血管生成作用抑制骨肉瘤细胞转移与免疫逃逸^[10],但APa是否可抑制胃癌免疫逃逸,目前还不清楚。本研究旨在研究APa调控HMGB1/RAGE通路对胃癌细胞增殖、凋亡和免疫逃逸的影响,为APa在临床胃癌治疗中抵抗免疫逃逸提供更多理论依据。

材料与方法

1 实验材料

细胞 人胃癌细胞系SGC-7901、人原代自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)细胞、人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),均购自安徽合肥万物生物科技有限公司。

药品、试剂与仪器 甲磺酸阿帕替尼片:规格:每片0.425 g,批号:2503082,批准文号:国药准字H20140105,江苏恒瑞医药股份有限公司生产;细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)、羊抗兔二抗、双苯并咪唑H 33342(bisBenzimide H 33342, Hoechst 33342)/碘化丙啶(propidium iodide, PI)双染试剂盒、人细胞表面分化群(cluster of differentiation, CD)3/CD28 T细胞激活磁珠和Alexa Fluor® 488-羊抗兔二抗,均由美国MCE公司生产;人HMGB1重组因子、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(5-

Ethynyl-2'-deoxyuridine, Edu)检测试剂盒、荧光素异硫氰酸酯(Fluorescein isothiocyanate, FITC)-CD8与免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)抗人抗体、Alexa Fluor® 647-羊抗小鼠二抗、兔抗人B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、增殖细胞的相关抗原(Antigen Ki-67, Ki67)、程序性死亡受体1(programmed cell death protein 1, PD-1)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、RAGE、PD-L1与HMGB1一抗、小鼠人抗BCL2相关X蛋白(BCL2-associated X protein, Bax)一抗和人白细胞介素(interleukin, IL)-6、 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-2酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒,均由英国Abcam公司生产。

SuPerMax 3000AL多功能酶标仪,上海闪谱生物科技有限公司产品;FSX100双目荧光倒置显微镜,日本Olympus公司产品;iQue® 3流式细胞分析仪,德国Sartorius公司产品;miniVE垂直电泳与印迹系统,美国Cytiva公司产品。

2 实验方法

2.1 SGC-7901细胞培养以及分组干预

快速解冻人PBMC、原代NK细胞与SGC-7901细胞(第1代),洗涤,以培养基重悬,接种在T25培养瓶内平铺培养,细胞培养箱内环境条件:5% CO₂、37℃、70%~80%湿度, PBMC培养基为原代巨噬细胞专用培养基, NK细胞培养基为原代NK细胞专用培养基, SGC-7901细胞培养基为RPMI-1640+1%双抗+10%胎牛血清,传代培养2次后细胞状态趋于稳定,因而选用第3代细胞进行后续实验^[10]。

预实验用0、10、20、40、60、80、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度梯度干预SGC-7901细胞48 h, CCK-8结果显示, IC₅₀值为45.13 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 结合文献^[9], 设置APa干预浓度为20、40、60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 取SGC-7901细胞接种在24孔板, 培养至对数期, 采用20、40、60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ APa干预, 分别设为低剂量实验组、中剂量实验组、高剂量实验组, APa采用0.1%二甲基亚砷溶解配制成浓度为20、40、60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液; 采用60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ APa和100 ng·mL⁻¹ HMGB1重组因子^[11]联合干预, 设为HMGB1组, 正常培养的SGC-7901细胞以0.1% DMSO干预并设为空白对照组, 细胞干预48 h。

2.2 利用 CCK - 8 法、Edu 染色、免疫荧光染色 Ki67 检测各组 SGC - 7901 细胞增殖^[10]

CCK - 8 法:取 SGC - 7901 细胞接种在 96 孔板,培养至对数期后按 2.1 中方法用 Apa 和 HMGB1 重组因子分组干预 48 h,以每孔 10 μ L 孵育 CCK - 8 试剂,1.5 h 后利用酶标仪测定吸光度,检测波长为 450 nm,将各组吸光度记为 $A_{450\text{ nm}}$,以此作为各组细胞活力评估指标。

Edu 染色:取 2.1 中分组干预 48 h 后的各组 SGC - 7901 细胞,孵育 Edu 试剂,按照 Edu 检测试剂盒操作说明行 Edu 染色,进行 Hoechst 33342 复染,洗涤,利用荧光显微镜拍摄细胞图像,进行细胞计数,分析量化各组细胞 Edu 阳性率。

免疫荧光染色:取 2.1 中分组干预 48 h 后的各组 SGC - 7901 细胞,磷酸盐缓冲液洗涤,10% 甲醛固定,0.3% Triton X - 100 透化,3% 双氧水清除细胞内过氧化氢酶,进行抗原修复后加入 5% 羊血清覆没细胞,室温封闭后加入 Ki67 (1:100) 兔抗人 - 抗溶液覆没细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 16 h,洗涤后加入 Alexa Fluor[®] 488 - 羊抗兔二抗 (1:500) 溶液覆没细胞,室温避光孵育 1.5 h,避光洗涤,利用荧光显微镜拍摄细胞图像,进行细胞计数,分析量化各组细胞 Ki67 阳性率。

2.3 利用流式细胞实验、Hoechst 33342/PI 双染、免疫荧光染色 Bax 与 Bcl - 2 检测各组 SGC - 7901 细胞凋亡^[9-10]

流式细胞实验:取 2.1 中分组干预 48 h 后的各组 SGC - 7901 细胞,磷酸盐缓冲液洗涤后重悬,计数,每组取 5×10^5 个细胞,重悬在 500 μ L 磷酸盐缓冲液,加入 Annexin V - FITC 5 μ L 与 PI 2.5 μ L 混匀,避光孵育,洗涤后行流式检测,以 Flow Jo 软件分析各组细胞凋亡率。

Hoechst 33342/PI 双染:取 2.1 中分组干预 48 h 后的各组 SGC - 7901 细胞,磷酸盐缓冲液洗涤,避光孵育 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Hoechst 33342,10min 后洗涤,避光孵育 15 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PI 10min 后洗涤,利用荧光显微镜拍摄细胞图像,计数凋亡细胞(呈红色荧光)数与总细胞数,分析量化各组细胞凋亡指数。

免疫荧光染色:取 2.1 中分组干预 48 h 后的各组 SGC - 7901 细胞,按 2.2 中方法对细胞 Bax 与 Bcl - 2 进行免疫荧光染色,兔抗人 Bcl - 2 一抗与小鼠人抗 Bax 一抗稀释比均为 1:100, Alexa Fluor[®] 488 - 羊抗兔二抗与 Alexa Fluor[®] 647 - 羊抗小鼠二抗稀释比均为 1:500,利用荧光显微镜拍摄细胞图像,定量 Bcl - 2 (绿色)与 Bax (红色)荧光强度,以红色/绿色荧光强

度比值表示 Bax/Bcl - 2。

2.4 利用蛋白质印迹 (Western blot) 检测各组 SGC - 7901 细胞 HMGB1/RAGE 信号通路蛋白表达^[9]

取 2.1 中分组干预 48h 后的各组 SGC - 7901 细胞,采用预冷 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,以沸水浴煮沸变性,以每孔 20 μg 进行蛋白上样,120 恒压电泳 75 min,40 mA 稳流湿转 90 min,聚偏二氟乙烯膜浸入 5% 脱脂牛奶,室温下进行蛋白封闭,加入 GAPDH (1:2 000)、RAGE (1:1 000)、HMGB1 (1:2 000) 兔抗人 - 抗溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 16h、洗膜,加入羊抗兔二抗 (1:2 500) 溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h、洗膜,蛋白显色后拍摄其图像,定量灰度值,用内参 GAPDH 作为对照分子各组细胞 HMGB1、RAGE 相对表达。

2.5 建立细胞共培养体系以及分组干预

取对数期 SGC - 7901 细胞,接种在 24 孔 Transwell 小室上层,用人 CD3/CD28 T 细胞激活磁珠活化对数期 PBMC 后接种在小室下层,或者在小室下层接种人原代 NK 细胞,效应细胞 (PBMC、NK) 与靶细胞 (SGC - 7901) 接种比例为 1:1^[12],来建立共培养体系,按 2.1 中方法用 Apa 和 HMGB1 重组因子分组干预 48 h。

2.6 T 细胞与 NK 细胞杀伤实验^[12]

于 96 孔 Transwell 培养板中建立效应细胞 (PBMC、NK) 与靶细胞 (SGC - 7901) 的共培养体系,于 96 孔 Transwell 培养板单独接种 PBMC 或 NK 细胞设为对照效应细胞,将单独接种的 SGC - 7901 细胞设为对照靶细胞,均按 2.1 中方法用 Apa 和 HMGB1 重组因子分组干预 48 h 后采用 CCK - 8 法测定各组细胞活力,记为 $A_{450\text{ nm}}$,分析计算各组 T 细胞或 NK 细胞杀伤率。

杀伤率 = $[1 - (\text{共培养 } A_{450\text{ nm}} - \text{对照效应细胞 } A_{450\text{ nm}}) / \text{对照靶细胞 } A_{450\text{ nm}}] \times 100\%$

2.7 流式细胞仪检测各组 PBMC 与 SGC - 7901 细胞共培养体系中活化 CD8⁺ T 细胞比例^[12]

取分组干预 48 h 后的各组 PBMC 与 SGC - 7901 细胞共培养体系中 PBMC,磷酸盐缓冲液洗涤,计数,每组取约 5×10^5 个细胞,重悬在 500 μ L 磷酸盐缓冲液,加入 FITC - CD8 抗体 1 μ L,以加入 IgG 抗体孵育的细胞作为空白对照,洗涤后行流式检测,以 Flow Jo 软件分析各组 PBMC 中活化 CD8⁺ T 细胞比例。

2.8 免疫荧光染色检测 PBMC 与 SGC - 7901 细胞共培养体系中 SGC - 7901 细胞 PD - 1 与 PD - L1 表达^[10]

取分组干预 48 h 后的各组 PBMC 与 SGC - 7901

细胞共培养体系中 SGC - 7901 细胞,洗涤后按“2.2”中方法对细胞 PD - 1 与 PD - L1 进行免疫荧光染色,利用荧光显微镜拍摄细胞图像,进行细胞计数,分析量化各组细胞 PD - 1 与 PD - L1 阳性率。

2.9 利用 ELISA 法测定 PBMC 与 SGC - 7901 细胞共培养体系中免疫细胞因子 IL - 6、IFN - γ 、TNF - α 和 IL - 2 水平^[12]

取分组干预 48h 后的各组 PBMC 与 SGC - 7901 细胞共培养体系中培养基,离心清除细胞碎片,采用酶标仪测定培养基上清中 IL - 6、IFN - γ 、TNF - α 和 IL - 2 水平,具体操作方法按照 ELISA 试剂盒说明书指导进行。

3 统计学处理

用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析进行多组间比较,两两之间进一步比较行 SNK - q 检验。

结 果

1 APa 对 SGC - 7901 细胞增殖的影响

Edu 与免疫荧光染色结果显示:空白对照组 Edu 与 Ki67 阳性表达很强,低剂量实验组、中剂量实验组、高剂量实验组细胞 Edu 与 Ki67 阳性表达随其剂量的升高而逐渐减弱, HMGB1 组细胞 Edu 与 Ki67 阳性表达相较于高剂量实验组增强且与空白对照组相似。

与空白对照组相比,低剂量实验组、中剂量实验组、高剂量实验组细胞 Edu 阳性率、细胞活性、

Ki67 阳性率均显著降低,并呈剂量依赖性 ($P < 0.05$);与高剂量实验组相比, HMGB1 组细胞 Edu 阳性率、细胞活性和 Ki67 阳性率均显著升高 (均 $P < 0.05$),见表 1。

2 APa 对 SGC - 7901 细胞凋亡的影响

流式细胞实验与 Hoechst 33342/PI 双染结果显示:空白对照组细胞稍有凋亡,低剂量实验组、中剂量实验组、高剂量实验组凋亡细胞随其剂量的升高而逐渐增加, HMGB1 组凋亡细胞相较于高剂量实验组减少且与空白对照组相似。

免疫荧光染色结果显示:空白对照组细胞 Bax 阳性表达较弱,而 Bcl - 2 阳性表达较强;低剂量实验组、中剂量实验组、高剂量实验组细胞 Bax 阳性表达随其剂量的升高而逐渐增强,而 Bcl - 2 阳性表达随其剂量的升高而逐渐减弱; HMGB1 组细胞 Bax 阳性表达相较于高剂量实验组减弱,而 Bcl - 2 阳性表达增强且均与空白对照组相似。

与空白对照组相比,低剂量实验组、中剂量实验组、高剂量实验组细胞凋亡率、凋亡指数、Bax/Bcl - 2 均显著升高,并呈剂量依赖性 (均 $P < 0.05$);与高剂量实验组相比, HMGB1 组细胞凋亡率、凋亡指数、Bax/Bcl - 2 均显著降低 (均 $P < 0.05$),见表 2。

3 APa 对 SGC - 7901 细胞 HMGB1/RAGE 信号通路蛋白表达的影响

空白对照组、低、中、高剂量试验组和 HMGB1 组的 HMGB1 的相对表达水平分别为 1.15 ± 0.07 、 0.79 ± 0.05 、 0.43 ± 0.04 、 0.10 ± 0.02 和 1.13 ± 0.06 ,

表 1 各组 SGC - 7901 细胞 5 - 乙炔基 - 2' - 脱氧尿苷 (Edu) 阳性率、细胞活性、Ki67 阳性率、凋亡率、凋亡指数和 B 淋巴细胞瘤 - 2/BCL2 相关 X 蛋白 (Bax/Bcl - 2) 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of 5 - Ethynyl - 2' - deoxyuridine (Edu) positivity rate, cell viability, and Ki67 positivity rate, apoptosis rate, apoptosis index and B - cell lymphoma - 2/BCL2 - associated X protein (Bax/Bcl - 2) ratio in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	Edu positivity rate (%)	cell viability (<i>A</i> _{450nm})	Ki67 positivity rate (%)	Apoptosis rate (%)	Apoptosis index (%)	Bax/Bcl - 2
Blank control	6	86.23 $\pm$ 5.30	0.92 $\pm$ 0.07	81.45 $\pm$ 6.12	4.37 $\pm$ 1.19	7.27 $\pm$ 1.85	0.13 $\pm$ 0.03
Low - dose experimental	6	65.81 $\pm$ 4.65 *	0.68 $\pm$ 0.06 *	60.73 $\pm$ 5.83 *	23.05 $\pm$ 2.14 *	26.93 $\pm$ 2.70 *	0.30 $\pm$ 0.02 *
Medium - dose experimental	6	43.16 $\pm$ 4.52 *#	0.45 $\pm$ 0.04 **	37.36 $\pm$ 4.12 *#	41.87 $\pm$ 2.69 **	47.21 $\pm$ 3.68 **	0.48 $\pm$ 0.05 **
High - dose experimental	6	20.19 $\pm$ 3.79 ** Δ	0.24 $\pm$ 0.03 ** Δ	17.53 $\pm$ 3.47 ** Δ	62.04 $\pm$ 3.12 ** Δ	67.13 $\pm$ 4.06 ** Δ	0.69 $\pm$ 0.06 ** Δ
HMGB1	6	82.45 $\pm$ 5.27 $\blacktriangle$	0.89 $\pm$ 0.05 $\blacktriangle$	77.89 $\pm$ 6.04 $\blacktriangle$	5.91 $\pm$ 1.28 $\blacktriangle$	9.14 $\pm$ 2.09 $\blacktriangle$	0.15 $\pm$ 0.04 $\blacktriangle$

Blank control group: Normal cultivation; Low - dose experimental group: Intervention with 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Apa for 48 hours; Medium - dose experimental group: Intervention with 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Apa for 48 hours; High - dose experimental group: Intervention with 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Apa for 48 hours; HMGB1 group: Intervention with 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Apa combined with 100 ng $\cdot \text{mL}^{-1}$ HMGB1 recombinant factor for 48 hours. Compared with blank control group, * $P < 0.05$; Compared with low - dose experimental group, # $P < 0.05$; Compared with medium - dose experimental group, $\Delta P < 0.05$; Compared with high - dose experimental group, $\blacktriangle P < 0.05$.

RAGE 蛋白相对表达水平分别为 1.23 ± 0.08 、 0.85 ± 0.06 、 0.47 ± 0.05 、 0.14 ± 0.03 和 1.21 ± 0.07 。与空白对照组相比,低、中、高剂量实验组 SGC-7901 细胞 HMGB1 和 RAGE 蛋白相对表达水平均显著降低,并呈剂量依赖性(均 $P < 0.05$);与高剂量实验组相比, HMGB1 组细胞 HMGB1 和 RAGE 蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.05$),见图 1。

4 APa 对 T 细胞与 NK 细胞杀伤 SGC-7901 细胞能力的影响

与空白对照组相比,低、中、高剂量实验组 T 细胞与 NK 细胞杀伤率均显著升高,并呈剂量依赖性(均 $P < 0.05$);与高剂量实验组相比, HMGB1 组 T 细胞与 NK 细胞杀伤率均显著降低(均 $P < 0.05$),见表 2。

5 APa 对共培养体系下 PBMC 中活化 CD8⁺ T 细胞比例以及 SGC-7901 细胞 PD-1、PD-L1 表达的影响

流式细胞实验结果显示:空白对照组 PBMC 中活化 CD8⁺ T 细胞较少,低、中、高剂量实验组 PBMC 中活化 CD8⁺ T 细胞随其剂量的升高而逐渐增加, HMGB1 组 PBMC 中活化 CD8⁺ T 细胞相较于高剂量实验组减少且与空白对照组相似。

免疫荧光染色结果显示:空白对照组细胞 PD-1、PD-L1 阳性表达较强,低、中、高剂量实验组细胞 PD-1、PD-L1 阳性表达随其剂量的升高而逐渐减弱, HMGB1 组细胞 PD-1、PD-L1 阳性表达增强且均与空白对照组相似。

与空白对照组相比,低、中、高剂量实验组 PBMC 中活化 CD8⁺ T 细胞比例均升高, SGC-7901 细胞 PD-1、PD-L1 阳性率均显著降低,并呈剂量依

性($P < 0.05$);与高剂量实验组相比, HMGB1 组 PBMC 中活化 CD8⁺ T 细胞比例显著降低, SGC-7901 细胞 PD-1、PD-L1 阳性率均显著升高($P < 0.05$),见表 2。

6 APa 对共培养体系下免疫细胞因子产生水平的影响

与空白对照组相比,低、中、高剂量实验组 IL-6、IFN- γ 、TNF- α 和 IL-2 产生水平均显著升高,并呈剂量依赖性(均 $P < 0.05$);与高剂量实验组相比, HMGB1 组 IL-6、IFN- γ 、TNF- α 和 IL-2 产生水平均显著降低(均 $P < 0.05$),见表 3。

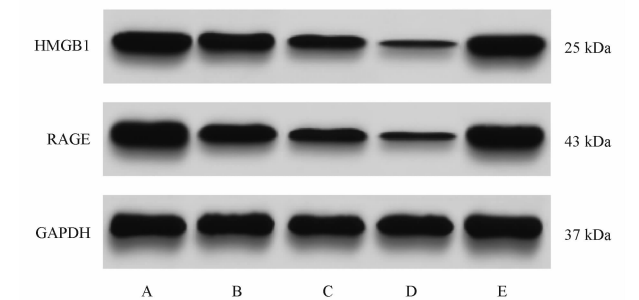


图 1 蛋白质印迹检测各组 SGC-7901 细胞高迁移率族蛋白 B1/晚期糖基化终末产物受体(HMGB1/RAGE)信号通路蛋白相对表达水平

Figure 1 Western blot was used to detect the relative expression level of high mobility group box 1/receptor for advanced glycosylation end products (HMGB1/RAGE) signaling pathway proteins of SGC-7901 cells in each group

A: Blank control group, B: Low-dose experimental group, C: Medium-dose experimental group, D: High-dose experimental group, E: HMGB1 group.

表 2 共培养体系下各组 T 细胞与自然杀伤细胞(NK)细胞杀伤率、各组 PBMC 中活化 T 细胞表面分化群 8⁺ (CD8⁺) T 细胞比例以及 SGC-7901 细胞程序性死亡受体 1(PD-1)、程序性死亡配体-1(PD-L1)阳性率的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of killing rates of T cells and natural killer cell (NK) cells in each group, proportion of activated cluster of differentiation 8 positive (CD8⁺) T cells in each group of PBMCs, as well as the positive rates of programmed cell death protein 1 (PD-1) and programmed cell death ligand 1 (PD-L1) on SGC-7901 cells under the co-culture system ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Killing rates of T cells (%)	Killing rates of NK cells (%)	Proportion of activated CD8 ⁺ T cells (%)	PD-1 positivity rate (%)	PD-L1 positivity rate (%)
Blank control	6	10.12 ± 1.34	14.75 ± 1.60	7.21 ± 0.53	58.13 ± 3.70	63.54 ± 4.27
Low-dose experimental	6	23.45 ± 1.62 *	27.38 ± 2.15 *	12.42 ± 0.81 *	45.37 ± 2.84 *	50.35 ± 3.76 *
Medium-dose experimental	6	37.06 ± 2.08 **	41.69 ± 2.34 **	17.93 ± 0.75 **	32.06 ± 3.01 **	36.21 ± 3.30 **
High-dose experimental	6	51.29 ± 2.73 ** ^Δ	56.12 ± 3.07 ** ^Δ	23.07 ± 0.64 ** ^Δ	21.47 ± 2.31 ** ^Δ	23.12 ± 2.62 ** ^Δ
HMGB1	6	12.01 ± 1.61 [▲]	16.03 ± 2.12 [▲]	7.93 ± 0.56 [▲]	54.87 ± 3.53 [▲]	59.76 ± 4.19 [▲]

Dose and refer to table 1. Compared with blank control group, * $P < 0.05$; Compared with low-dose experimental group, # $P < 0.05$; Compared with medium-dose experimental group, ^Δ $P < 0.05$; Compared with high-dose experimental group, [▲] $P < 0.05$.

表3 共培养体系下白细胞介素6(IL-6)、 γ 干扰素(IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素2(IL-2)产生水平($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Production levels of interleukin6 (IL-6), interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin2 (IL-2) under co-culture system ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	IL-6 (ng · L ⁻¹)	IFN- γ (ng · L ⁻¹)	TNF- α (ng · L ⁻¹)	IL-2 (ng · L ⁻¹)
Blank control	6	28.31 ± 3.26	21.80 ± 2.61	31.26 ± 3.94	26.93 ± 2.51
Low-dose experimental	6	46.02 ± 4.18 *	35.74 ± 2.80 *	47.30 ± 3.27 *	41.25 ± 3.03 *
Medium-dose experimental	6	65.43 ± 3.70 *#	51.29 ± 3.32 *#	68.72 ± 3.60 *#	57.82 ± 3.34 *#
High-dose experimental	6	86.15 ± 4.39 *# Δ	69.37 ± 3.45 *# Δ	90.54 ± 4.31 *# Δ	71.64 ± 4.02 *# Δ
HMGB1	6	31.04 ± 3.48 $\blacktriangle$	23.61 ± 2.53 $\blacktriangle$	34.03 ± 3.67 $\blacktriangle$	29.07 ± 2.49 $\blacktriangle$

Dose and refer to table 1. Compared with blank control group, * $P < 0.05$; Compared with low-dose experimental group, # $P < 0.05$; Compared with medium-dose experimental group, $\Delta P < 0.05$; Compared with high-dose experimental group, $\blacktriangle P < 0.05$.

讨 论

胃癌的高患病率和对患者预后的不利影响使其成为国际上持续存在的重大健康问题,如今的标准治疗方法是手术切除,辅以化疗和放疗,近年来,还开发了靶向治疗和免疫疗法,但会存在耐药、个体差异等不足,表现出有限的疗效,从而促使人们探索新的治疗方法来提高胃癌生存率和生活质量^[13-14]。肿瘤微环境的动态演变导致的胃癌免疫逃逸在其恶性进展中发挥着关键作用,通过改善肿瘤微环境与免疫功能来抑制免疫逃逸,可有效阻止胃癌进展^[3-4,15]。APa是临床常用抗癌药物,主要通过靶向抗血管生成途径来治疗胃癌,目前用于晚期胃癌的三线标准治疗,疗效较好^[16]。APa已被证明能调控肿瘤相关中性粒细胞募集、增殖与浸润,改善胃癌患者体内免疫微环境与免疫功能,在临床上增强晚期胃癌的抗PD-1免疫疗法的疗效^[8,17],由此推测APa可能对胃癌免疫逃逸具有明显抑制作用。本研究结果显示,以APa干预人胃癌SGC-7901细胞,可呈剂量依赖性的降低SGC-7901细胞Edu阳性率、细胞活性、Ki67阳性率,并升高SGC-7901细胞凋亡率、凋亡指数、Bax/Bcl-2,与前人研究^[16]结果相似,本研究进一步证实了APa的抗胃癌作用,解释了APa可呈剂量依赖性的诱导胃癌细胞凋亡并抑制其增殖。建立效应细胞(PBMC、NK)与靶细胞(SGC-7901)的共培养体系后进行T细胞与NK细胞杀伤实验,结果显示,APa可呈剂量依赖性的增强T细胞与NK细胞对SGC-7901细胞的杀伤率;建立PBMC与SGC-7901细胞的共培养体系后进行ELISA与流式检测,结果显示,APa可呈剂量依赖性的提升活化CD8⁺T细胞比例,并升高免疫细胞因

子IL-6、IFN- γ 、TNF- α 与IL-2产生水平,且免疫荧光染色结果显示,APa可呈剂量依赖性的增强PD-1与PD-L1阳性表达,与前人研究^[8,17]结果相比,本研究首次在体外证实了APa可呈剂量依赖性的抑制PD-1/PD-L1免疫检查点,促进免疫杀伤细胞活性增殖,增加免疫杀伤因子产生释放,进而抑制胃癌细胞免疫逃逸。

HMGB1是重要的肿瘤调控因子,在胃癌中显著高表达,可通过促进RAGE表达诱导胃癌细胞增殖和迁移,表明靶向HMGB1/RAGE通路进行干预是有前景的胃癌治疗方式^[18]。HMGB1/RAGE信号通路还与肿瘤相关巨噬细胞激活、肿瘤免疫微环境的动态演变以及免疫逃逸密切相关,降低HMGB1表达可通过抑制PD-1/PD-L1免疫检查点而阻止胶质母细胞瘤的免疫逃逸^[19],而下调RAGE可抑制神经胶质瘤的恶性进展、侵袭和免疫逃逸^[20],表明HMGB1与RAGE可作为抵抗胃癌免疫逃逸的潜在作用靶点。本研究Western blot检测结果显示,APa可呈剂量依赖性的降低SGC-7901细胞HMGB1与RAGE蛋白表达,与前人研究^[5-6]结果相比,本研究首次证实了HMGB1/RAGE通路参与介导APa对胃癌细胞增殖及免疫逃逸的抑制作用,而拯救实验结果显示,以APa和人HMGB1重组因子联合干预,可减弱以APa单独干预对胃癌细胞的抗增殖及促凋亡作用,消除APa单独干预对PD-1/PD-L1免疫检查点的抑制作用,拮抗APa单独干预对免疫杀伤细胞活性增殖以及免疫杀伤因子产生释放的促进作用,降低APa单独干预对胃癌细胞免疫逃逸的抑制作用,最终揭示APa是通过下调HMGB1来抑制胃癌细胞增殖及免疫逃逸,并促进其凋亡的。已有研究证实HMGB1/RAGE信号通路下游机制复杂,可调控核因子 κ B、基质金属蛋白酶9、Bax、PD-L1等,本研究证实了APa可通过抑制

HMGB1/RAGE 信号通路下调 PD - 1、PD - L1 并降低 Bax/Bcl - 2 比值,初步阐明了其下游调控机制,但还存在一定局限性,后续还需通过网络药理学、免疫共沉淀、分子对接等研究进行深入全面探讨。此外,本研究缺乏基因沉默/过表达等更直接的干预手段来进一步验证机制,且尚未进行体内验证,需进行后续实验来对 Apa 抑制胃癌免疫逃逸的机制进行深入探究。

本研究提示:APa 可诱导胃癌细胞凋亡,降低其增殖活性,抑制 PD - 1/PD - L1 免疫检查点,增强 T 细胞与 NK 细胞对胃癌细胞的杀伤力,进而抑制胃癌细胞免疫逃逸,阻止 HMGB1/RAGE 信号通路激活可能是 APa 起到上述作用的药理机制,本研究证实了 APa 对胃癌免疫逃逸的抵抗作用,并初步阐明了其药理机制,为 APa 在胃癌治疗中的合理应用提供了新的理论依据,对于改善胃癌免疫治疗效果可发挥一定积极作用。

参考文献:

- [1] MOTT T, GRAY C. Gastric Cancer: Rapid evidence review[J]. *Am Fam Physician*, 2025, 111(2):140—145.
- [2] AJANI JA, D' AMICO TA, BENTREM DJ, *et al.* Gastric cancer, version 2. 2025, NCCN clinical practice guidelines in oncology [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2025, 23(5):169—191.
- [3] ZHANG T, LI Y, ZHAI E, *et al.* Intratumoral fusobacterium nucleatum recruits tumor - associated neutrophils to promote gastric cancer progression and immune evasion[J]. *Cancer Res*, 2025, 85(10):1819—1841.
- [4] QI H, MA X, MA Y, *et al.* Mechanisms of HIF1A - mediated immune evasion in gastric cancer and the impact on therapy resistance[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2024, 40(1):87—113.
- [5] ZHOU Y, LIU SX, ZHOU YN, *et al.* Research on the relationship between RAGE and its ligand HMGB1, and prognosis and pathogenesis of gastric cancer with diabetes mellitus[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(3):1339—1350.
- [6] LIU L, LI Y, LI B. Interactions between cancer cells and tumor - associated macrophages in tumor microenvironment[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2025, 1880(3):189344—189402.
- [7] ZHANG Z, HUANG W, HU D, *et al.* E - twenty - six - specific sequence variant 5 (ETV5) facilitates hepatocellular carcinoma progression and metastasis through enhancing polymorphonuclear myeloid - derived suppressor cell (PMN - MDSC) - mediated immunosuppression[J]. *Gut*, 2025, 74(7):1137—1149.
- [8] 杨丙雨, 谈丽彩, 陈建华. 参白扶正颗粒与阿帕替尼联合治疗胃癌的临床疗效及对体内免疫微环境的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 33(8):593—598.
- [9] LIU X, ZHENG Q, YU Q, *et al.* Apatinib regulates the growth of gastric cancer cells by modulating apoptosis and autophagy [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2021, 394(5):1009—1018.
- [10] ZHENG B, ZHOU C, QU G, *et al.* VEGFR2 promotes metastasis and PD - L2 expression of human osteosarcoma cells by activating the STAT3 and RhoA - ROCK - LIMK2 pathways [J/OL]. *Front Oncol*, 2020, 10:543562—543571. 2020 - 09 - 09 [2025 - 09 - 22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33014879/>.
- [11] AMORNSUPAK K, THONGCHOT S, THINYAKUL C, *et al.* HMGB1 mediates invasion and PD - L1 expression through RAGE - PI3K/AKT signaling pathway in MDA - MB - 231 breast cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2022, 22(1):578—590.
- [12] 耿天祥, 王娅菲, 张杰. 根皮素对 NK 细胞杀伤人胃癌 SGC - 7901 细胞的增强效应[J]. 热带医学杂志, 2023, 23(4):470—475.
- [13] LIU - BURDOWSKI J, PARK J. Treatment of early gastric cancer [J]. *Surg Clin North Am*, 2025, 105(1):55—63.
- [14] SUNDAR R, NAKAYAMA I, MARKAR SR, *et al.* Gastric cancer [J]. *Lancet*, 2025, 405(10494):2087—2102.
- [15] KAN L, YU Y, WANG Y, *et al.* The application of organoids in investigating immune evasion in the microenvironment of gastric cancer and screening novel drug candidates[J]. *Mol Cancer*, 2025, 24(1):125—149.
- [16] WANG W, WANG T, ZHANG Y, *et al.* Gastric cancer secreted miR - 214 - 3p inhibits the anti - angiogenesis effect of apatinib by suppressing ferroptosis in vascular endothelial cells[J]. *Oncol Res*, 2024, 32(3):489—502.
- [17] LUO Q, DONG Z, XIE W, *et al.* Apatinib remodels the immunosuppressive tumor ecosystem of gastric cancer enhancing anti - PD - 1 immunotherapy [J]. *Cell Rep*, 2023, 42(5):112437—112460.
- [18] TANG T, WANG S, CAI T, *et al.* High mobility group box 1 regulates gastric cancer cell proliferation and migration via RAGE - mTOR/ERK feedback loop [J]. *J Cancer*, 2021, 12(2):518—529.
- [19] WEI Y, ZHOU K, WANG C, *et al.* Exosomal miR - 142 - 3p from M1 - polarized macrophages suppresses cell growth and immune escape in glioblastoma through regulating HMGB1 - mediated PD - 1/PD - L1 checkpoint [J]. *J Neurochem*, 2025, 169(1):e16224—e16236.
- [20] ZHANG IY, LIU S, ZHANG L, *et al.* RAGE ablation attenuates glioma progression and enhances tumor immune responses by suppressing galectin - 3 expression [J]. *Neuro Oncol*, 2023, 25(5):886—898.

(本文编辑:崔兰卿 收稿日期 2025 - 09 - 22)