

芍药苷调控 JAK/STAT3 通路干预 HepG2 细胞 PD-L1 表达的研究

万南燕^{1,2,3,4}, 蒋翠花^{2,3}, 高萌^{2,3}, 张健^{2,3}, 殷志琦⁴, 潘珂^{1*}

(¹中国药科大学中药学院天然药物化学系, 南京 210009; ²江苏省中医药研究院转化医学实验室, 南京 210028;

³南京中医药大学附属中西医结合医院 南京 210028;

⁴中国药科大学中药学院中药制药系 & 天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 南京 210009)

摘要 为探究芍药苷对程序性死亡受体-配体 1 (programmed cell death-Ligand 1, PD-L1) 表达的影响及作用机制, 研究采用干扰素 γ (IFN- γ) 诱导 HepG2 细胞建立体外 PD-L1 高表达细胞模型。采用 MTT 法检测芍药苷的细胞毒性, 通过流式细胞术、ELISA、RT-PCR 法检测其对 PD-L1 蛋白和 mRNA 表达的影响; 建立 HepG2 细胞和 Jurkat T 细胞共培养体系, ELISA 检测芍药苷干预后共培养 24 h 后的 IL-2 的表达, CCK-8 法检测药物干预后 T 细胞增殖情况, Western blot 检测芍药苷作用后 HepG2 细胞中 PD-L1、Janus 激酶 (Janus kinase, JAK) 和信号传导及转录激活因子 (signal transducers and activators of transcription, STAT3) 的蛋白表达。实验结果表明, 芍药苷能够显著下调 PD-L1 蛋白和 mRNA 的表达水平, 增加共培养体系中的 IL-2 的浓度, 促进 T 细胞显著增殖, 此外, 芍药苷能显著抑制 JAK 和 STAT3 的蛋白磷酸化。实验结果表明, 芍药苷能够下调 PD-L1 的表达, 其机制可能与 JAK/STAT3 通路有关。

关键词 芍药苷; 程序性死亡受体-配体 1; 肿瘤免疫逃逸; 免疫检查点

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2019)02-0213-09

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20190213

引用本文 万南燕, 蒋翠花, 高萌, 等. 芍药苷调控 JAK/STAT3 通路干预 HepG2 细胞 PD-L1 表达的研究[J]. 中国药科大学学报, 2019, 50(2): 213–221.

Cite this article as: WAN Nanyan, JIANG Cuihua, GAO Meng, et al. Paeoniflorin inhibits programmed cell death-1-ligand 1 expression in HepG2 cells by regulating JAK/STAT3 signal pathway[J]. J China Pharm Univ, 2019, 50(2): 213–221.

Paeoniflorin inhibits programmed cell death-1-ligand 1 expression in HepG2 cells by regulating JAK/STAT3 signal pathway

WAN Nanyan^{1,2,3,4}, JIANG Cuihua^{2,3}, GAO Meng^{2,3}, ZHANG Jian^{2,3}, YIN Zhiqi⁴, PAN Ke^{1*}

¹Department of Natural Medicinal Chemistry, School of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ²Laboratory of Translational Medicine, Jiangsu Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028;

³Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028; ⁴Department of TCMs Pharmaceuticals, School of TCM&State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract In order to explore the effect and its mechanism of paeoniflorin on PD-L1, a PD-L1 high expression cell model was established in interferon gamma (IFN- γ)-induced HepG2 cells. The cytotoxicity of paeoniflorin was detected by MTT assay. Flow cytometry, ELISA and RT-PCR were performed to detect protein and mRNA levels of PD-L1 regulated by paeoniflorin. In HepG2 cells and Jurkat T cell co-culture system, the expression of IL-2 was detected by ELISA. Besides, T cell proliferation was evaluated by CCK-8 method, and the protein expression levels of PD-L1, JAK and STAT3 after drug treatment were determined by Western blot. These results indicated that

收稿日期 2018-12-30 *通信作者 Tel:15062265230 E-mail:pan.ke.nj@gmail.com

基金项目 江苏高校优势学科建设工程资助项目

paeoniflorin could significantly down-regulate the levels of PD-L1 protein and mRNA. In addition, it increased the number of T cells and the concentration of IL-2 in the co-culture system. Furthermore, paeoniflorin could significantly inhibit the protein expression of JAK and STAT3. All the above experimental data indicated that paeoniflorin could down-regulate the expression of PD-L1, and its mechanism might be related to the JAK/STAT3 pathway.

Key words paeoniflorin; PD-L1; tumor immune escape; immune checkpoint

This study was supported by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions

肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界上最常见和最具侵袭性的肿瘤之一^[1-2]。尽管多激酶抑制剂在分子治疗方面取得了进展,但晚期 HCC 的预后仍然很差,5 年生存率为 3% ~ 11%^[3]。免疫逃逸是肿瘤发展的重要因素,程序性死亡配体 1(PD-L1)的过度表达参与肿瘤的免疫逃逸,与肿瘤的发生、发展及预后不良密切相关^[2,4]。PD-L1 是 PD-1 的配体,在肿瘤细胞和免疫细胞上均表达,而 PD-1 主要在活化的 T 细胞上表达。PD-L1 与 PD-1 的结合通过诱导 T 细胞的衰竭和凋亡来抑制 T 细胞效应功能,导致免疫抑制状态^[5]。研究表明 PD-L1/PD-1 信号通路在 T 细胞介导的肿瘤免疫应答中发挥重要作用,且针对 PD-1/PD-L1 的治疗性阻断已经证实可以使部分肿瘤患者具有持久的抗肿瘤反应^[6-7]。目前 HCC 的免疫治疗试验已发现组织学证实的肿瘤自发性消退,但患者反应率相对较低,并且基于抗体检查点抑制剂的不良反应和高成本限制了其应用^[8-9]。近年来,小分子抑制剂的研究逐步兴起,天然小分子对 PD-L1 调控的研究也取得了一定进展,挖掘潜在干扰 PD-1/PD-L1 表达的天然小分子可能是肿瘤治疗的新领域^[10-11]。

芍药苷(paeoniflorin)是一种单萜葡萄糖苷,作为天然植物药被广泛使用。芍药苷具有抗炎、镇痛、免疫调节、肝脏和神经保护、认知障碍改善和抗高血糖效应等药理作用^[12-13]。近年来临床前研究表明芍药苷对非小细胞肺癌、胃癌、肝癌和白血病等发挥抗肿瘤活性^[14-15],可通过调控 PI3K/AK、JAK/STAT3、NF- κ B 等多种通路调节机体免疫功能,抑制肿瘤生长^[16-17]。因此,推测芍药苷可能通过 JAK/STAT3 通路调节 PD-L1,参与肿瘤患者的免疫调控系统,增强抗肿瘤免疫应答。因此,本研究拟通过 IFN- γ 诱导的 HepG2 细胞模型探究芍药苷对 PD-L1 的调节作用及其作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

芍药苷(HPLC 面积归一化法测定纯度大于 99%,四川维克奇生物科技有限公司);胎牛血清(美国 Hyclone 公司);DMEM、胰蛋白酶、噻唑兰 MTT(江苏凯基生物技术股份有限公司);牛血清白蛋白(BSA)、IFN- γ (美国 R&D 公司);PD-L1 ELISA 检测试剂盒(美国 Protintech 公司)、IL-2 ELISA 检测试剂盒(美国 Novus 公司);PHA、PMA、Ruxolitinib(美国 Sigma 公司);BCA 蛋白定量试剂盒(南京建成生物工程研究所);二甲基亚砜 DMSO、RIPA 裂解液、PMSF、Anti-PD-L1 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);Trizol(美国 Life Technologies 公司),引物、DEPC 水(上海捷瑞生物工程有限公司);SYBR Green Real-time PCR Master Mix、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover[东洋纺(上海)生物科技有限公司];其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

全波长多功能酶标仪(美国赛默飞世尔科技有限公司);超速控温离心机(美国 Beckman Coulter 公司);荧光倒置显微镜(德国 Carl Zeiss 公司);A101439 电泳仪、QuantStudio™ Dx Real-Time PCR 循环仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 细胞株

人肝癌细胞株 HepG2 购自上海 ATCC 细胞库。HepG2 细胞用含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养液,在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 的饱和湿度条件下培养,每隔 3 天用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,按 1:3 比例进行传代,取对数期的细胞用于实验^[18]。

2 方法

2.1 PD-L1 高表达模型建立和药物溶解

IFN- γ 100 μ g 用去离子水 500 μ L 溶解为

0.2 mg/mL 母液,然后用 PBS 稀释为 400 ng/mL 储备液,0.22 μm 滤膜过滤待用。

取一定量的芍药苷,先用 DMSO 溶解至一定浓度,使 DMSO 浓度不超过药物最终使用浓度的 0.1%,然后用 DMEM 稀释至相应浓度。

2.1.1 ELISA 检测 IFN- γ 对 HepG2 细胞 PD-L1 表达的影响 取对数生长期 HepG2 细胞,以每孔 1×10^6 个细胞接种于 6 孔板中,细胞贴壁后分别给予含有 10、20、30 ng/mL IFN- γ 的 DMEM 培养基,培养 24 h 后,裂解细胞后收集上清液,用 ELISA 试剂盒测定上清液中 PD-L1 的含量。同时抽提各孔细胞总蛋白,采用 BCA 定量试剂盒检测蛋白浓度,以校正 PD-L1 浓度。

2.1.2 Real-time PCR 检测 IFN- γ 对 HepG2 细胞 PD-L1 表达的影响 HepG2 细胞按照“2.1.1”项下方法处理后,PBS 清洗细胞 2 次,用 Trizol 试剂提取细胞 RNA,酶标仪测定 $A_{260/280}$ 及其浓度。RNA 在 65 $^{\circ}\text{C}$ 条件下热变性 5 min 后,立即置于冰上,按照反转录试剂盒说明配制体系,使 RNA 反转录为 cDNA,反应参数分别为:37 $^{\circ}\text{C}$, 15 min; 50 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 98 $^{\circ}\text{C}$, 5 min。按照 PCR 试剂盒配制反应体系后进行反应,反应参数为 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 15 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 45 s。其中,95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 60 s; 共循环 40 次^[19]。测得基因引物序列见表 1。

2.1.3 流式细胞术检测 IFN- γ 对 HepG2 细胞 PD-L1 表达的影响 HepG2 细胞按照“2.1.1”项下方法处理后,用预冷的 PBS 清洗细胞两次,之后用胰酶消化收集离心后弃去上清液,细胞用 0.1% BSA 稀释的一抗稀释液(兔抗,1:400) 100 μL 重新悬浮,孵育 1 h 后,离心去上清液,用预冷 PBS 清洗两遍后,加入用 0.1% BSA 稀释的二抗稀释液(抗兔,1:8 000) 100 μL 重新悬浮,孵育 40 min 后,离心去上清液,用预冷 PBS 清洗两遍,加入 PBS 50 μL 重新悬浮后,用流式细胞术检测 PD-L1 蛋白的表达。

2.2 MTT 法检测芍药苷对 HepG2 细胞的活性的影响

取生长状态良好的 HepG2 细胞,消化后以每孔 1×10^4 个细胞的密度接种于 96 孔板中,待细胞贴壁后吸去培养基,加入不含血清的 DMEM 饥饿 8 h 后,分别给予 1、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的芍药苷,空白组加入不含血清的 DMEM,孵育 24 h 后吸去培养基,每孔加入含 5 mg/mL MTT 的空白培养基

100 μL ,孵育 4 h,吸去上清液,每孔加入 DMSO 150 μL ,酶标仪测定 490 nm 处的吸收度,计算细胞活力,实验平行 3 次。

2.3 检测芍药苷对 HepG2 细胞 PD-L1 表达的影响

2.3.1 ELISA 检测芍药苷对 HepG2 细胞 PD-L1 表达的影响 取对数生长期 HepG2 细胞,以每孔 1×10^6 个细胞接种于 6 孔板中,分别设置空白组(Control)、模型组(Model)和芍药苷给药组(20 $\mu\text{mol/L}$)。空白组每孔加入空白 DMEM 培养基,模型组每孔加入 30 ng/mL IFN- γ 的 DMEM 培养基,给药组每孔分别加入 30 ng/mL IFN- γ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 芍药苷的 DMEM 培养基,孵育 24 h 后,裂解细胞后收集上清液,用 ELISA 试剂盒测定上清液中 PD-L1 的含量。同时抽提各孔细胞总蛋白,采用 BCA 定量试剂盒检测蛋白浓度,以校正 PD-L1 浓度。

2.3.2 Real-time PCR 检测芍药苷对 HepG2 细胞 PD-L1 表达的影响 HepG2 细胞按照“2.3.1”项下方法处理后,PBS 清洗细胞 2 次,用 Trizol 试剂提取细胞 RNA,酶标仪测定 $A_{260/280}$ 及其浓度。RNA 在 65 $^{\circ}\text{C}$ 条件下热变性 5 min 后,立即置于冰上,按照反转录试剂盒说明配制体系,使 RNA 反转录为 cDNA,反应参数分别为:37 $^{\circ}\text{C}$, 15 min; 50 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 98 $^{\circ}\text{C}$, 5 min。按照 PCR 试剂盒配置反应体系后进行反应,反应参数为 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 15 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 45 s。其中,95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 60 s; 共循环 40 次。测得基因引物序列见表 1。

Table 1 Primer sequence for real-time PCR assay

Gene	Primer sequence
PD-L1	Forward 5'-GGTGGCCGACTACAAGCGAAT-3'
	Reverse 5'-AGCCCTCAGCCTGACATGTC-3'
GAPDH	Forward 5'-ACAACCTTTGCTATCGTGAAGG-3'
	Reverse 5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3'

2.3.3 流式细胞术检测芍药苷对 HepG2 细胞 PD-L1 表达的影响 HepG2 细胞按照“2.3.1”项下方法处理后,用预冷的 PBS 清洗细胞 2 次,之后用胰酶消化收集离心后弃去上清液,细胞用 0.1% BSA 稀释的一抗(1:400) 100 μL 重新悬浮,孵育 1 h 后,离心去上清液,用预冷 PBS 清洗两遍后,加入用 0.1% BSA 稀释的二抗(1:800) 100 μL 重新悬浮,孵育 40 min 后,离心去上清液,用预冷 PBS 清

洗两遍,加入 PBS 50 μL 重新悬浮后,用流式细胞仪检测 PD-L1 蛋白的表达。

2.4 T 细胞和 HepG2 细胞共培养

取对数生长期 HepG2 细胞,以每孔 1×10^5 个接种于 12 孔板中,分别设置空白组(Control)、模型组(Model)和芍药苷给药组(20 $\mu\text{mol/L}$)。给药后 1 h 加 IFN- γ ,孵育 24 h 后,用 PBS 清洗两遍后, Jurkat 细胞按照每孔 8×10^5 个细胞加入孔中,加入 10 $\mu\text{g/mL}$ PHA + 10 ng/mL PMA 孵育 24 h 后,收集上清液和 Jurkat 细胞,1 000 r/min 离心 5 min,分别检测 Jurkat 细胞活性和上清液中 IL-2 的浓度。

2.5 Western blot 分析

取对数生长期 HepG2 细胞,以每孔 1×10^6 个接种于 6 孔板中,分别设置空白组(Control)、模型组(Model)、芍药苷给药组(20 $\mu\text{mol/L}$)和抑制剂组。空白组每孔加入空白 DMEM 培养基,模型组每孔加入 30 ng/mL IFN- γ 的 DMEM 培养基,给药组每孔分别加入 30 ng/mL IFN- γ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 芍药苷的 DMEM 培养基,孵育 24 h 后, PBS 清洗细胞两次,用细胞刮刮取细胞,收集后 300 r/min 离心 5 min,分别加蛋白裂解液 60 μL 在冰上裂解 30 min,吹打细胞数次,收集裂解液,12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,用 BCA 试剂盒测定总蛋白浓度。将蛋白质样品稀释至相同且合适的浓度进行 SDS-PAGE 电泳(电泳参数:85 V、20 min; 120 V、80 min),然后转移至 PVDF 膜上在 5% 脱脂奶粉封闭液中室温封闭 1 h,加入一抗(1:1 000)于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,后加入二抗(1:2 000)室温孵育 2 h,采用电化学发光检测法(ECL 法)显色。对感光胶片条带进行灰度分析,以目的条带与内参照条带 GAPDH 的比值代表目的蛋白的相对表达量。

2.6 数据分析

相关实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 22.0 统计软件进行统计,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异显著。

3 结果

3.1 HepG2 细胞 PD-L1 高表达模型的建立

IFN- γ 刺激 HepG2 细胞 24 h 后,ELISA 检测结果显示:30 ng/mL IFN- γ 对于 PD-L1 的上调作用最为明显(图 1),PCR 检测结果证明 IFN- γ 对于 PD-L1 mRNA 的上调呈现剂量依赖性(图 2),流式

细胞术检测结果也进一步证明了这个结论(图 3)。

3.2 芍药苷对 HepG2 细胞活力的影响

通过 MTT 检测不同浓度的芍药苷对 HepG2 细胞存活率的影响。如图 4 显示,与正常对照组相比,1、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的芍药苷处理后的细胞活力明显大于 90%,无明显细胞毒性,故选择 20 $\mu\text{mol/L}$ 芍药苷作为药物安全浓度开展后续实验。

3.3 芍药苷对 HepG2 细胞 PD-L1 表达的影响

如图 5 所示,与正常对照组相比,模型组细胞 PD-L1 的表达水平显著增加。加入芍药苷后,PD-L1 的表达受到抑制。ELISA 检测 PD-L1 与流式细胞术检测结果一致(图 6),30 ng/mL IFN- γ 处理的细胞 PD-L1 的蛋白和 mRNA 表达水平显著增加。与模型组相比,给予 20 $\mu\text{mol/L}$ 的芍药苷 24 h 后,给药组 HepG2 细胞的 PD-L1 蛋白和 mRNA 的表达水平显著降低(图 7)。

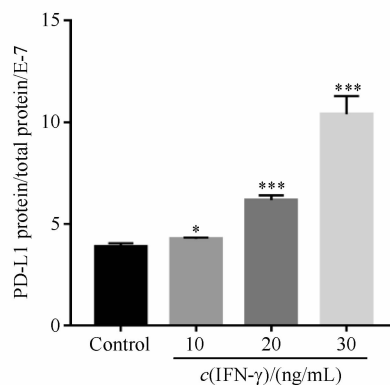


Figure 1 Effect of IFN- γ on PD-L1 expression in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with different concentration of IFN- γ for 24 h, and then PD-L1 was measured by ELISA ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs control group

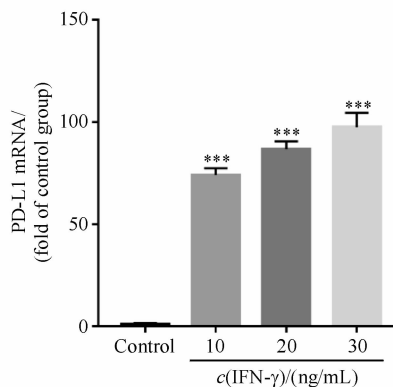


Figure 2 Effect of IFN- γ on PD-L1 mRNA expression of HepG2 cells. HepG2 cells were treated with different concentration of IFN- γ for 24 h, and then PD-L1 was measured by qPCR ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

*** $P < 0.001$ vs control group

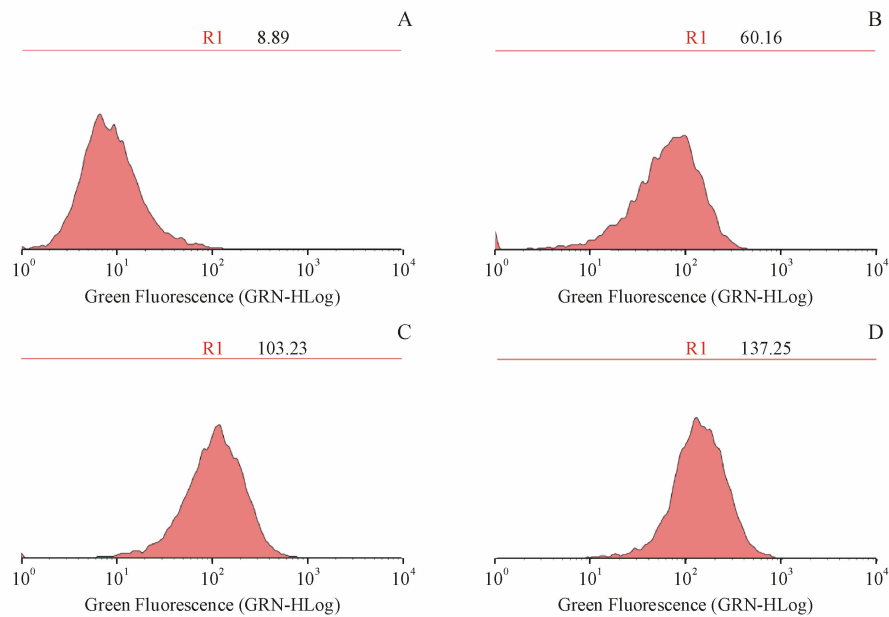


Figure 3 Effect of IFN- γ on PD-L1 protein expression of HepG2 cells. HepG2 cells were treated with different concentration of IFN- γ for 24 h, and then PD-L1 was measured by flow cytometry
A: Control group; B: HepG2 cell treated with 10 ng/mL IFN- γ ; C: HepG2 cell treated with 20 ng/mL IFN- γ ; D: HepG2 cell treated with 30 ng/mL IFN- γ

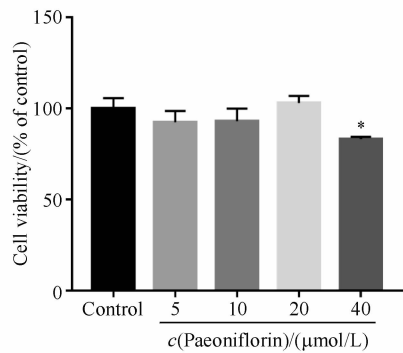


Figure 4 Effect of paeoniflorin on cell viability of HepG2 cells. HepG2 cells were treated with different concentration of paeoniflorin for 24 h, and then cell viability was measured by MTT assay ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
* $P < 0.05$ vs control group

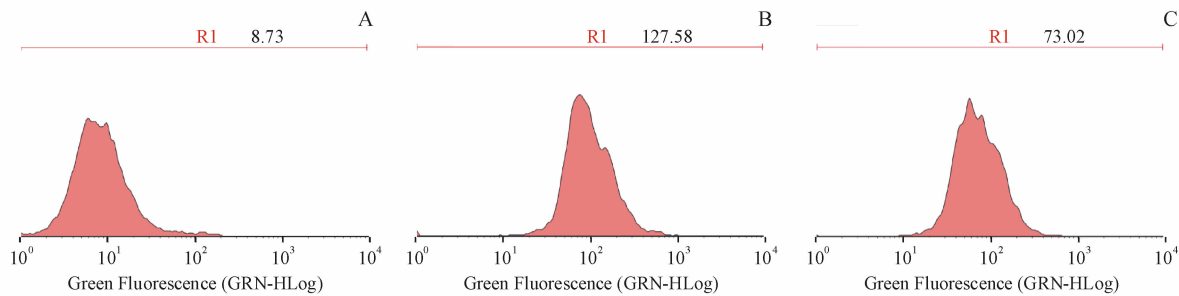


Figure 5 Effect of IFN- γ on PD-L1 protein expression of HepG2 cells. HepG2 cells were treated with different concentration of IFN- γ for 24 h, and then PD-L1 was measured by flow cytometry
A: Control group; B: HepG2 cell treated with 30 ng/mL IFN- γ ; C: HepG2 cell treated with 20 μ mol/L paeoniflorin in the absence or presence of 30 ng/mL IFN- γ for 24 h

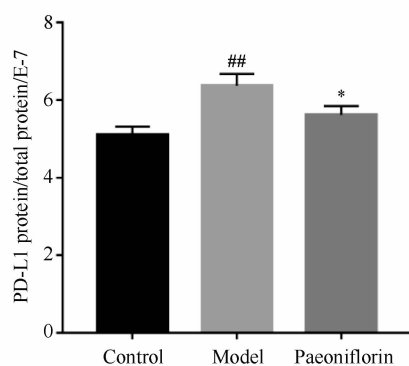


Figure 6 Effect of paeoniflorin on PD-L1 expression of HepG2 cells. HepG2 cells were treated with different concentration of IFN- γ for 24 h, and then PD-L1 concentration was measured by ELISA ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group

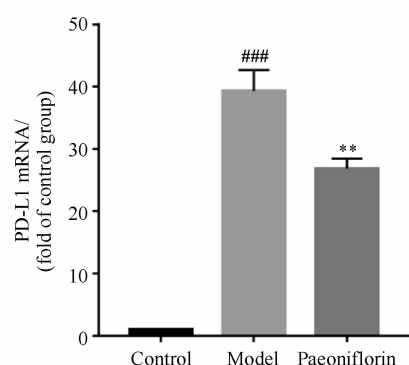


Figure 7 Effect of paeoniflorin on PD-L1 mRNA expression of HepG2 cells. HepG2 cells were treated with 20 $\mu\text{mol/L}$ paeoniflorin in the absence or presence of 30 ng/mL IFN- γ for 24 h, and then PD-L1 mRNA was measured by RT-PCR ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group

3.4 芍药苷对共培养体系中 T 细胞 IL-2 分泌的影响

为了检测芍药苷是否能够逆转 PD-L1 高表达的 HepG2 细胞对表达 PD-1 细胞的 T 细胞的抑制作用,将 IFN- γ 刺激的 PD-L1 高表达的 HepG2 细胞用芍药苷 20 $\mu\text{mol/L}$ 处理 24 h 后,与激活的 Jurkat T 细胞共孵育,24 h 后分别收集上清和 Jurkat T 细胞,检测 IL-2 的分泌水平和 T 细胞的增殖情况。如图 8 和 9 所示,模型组较空白组, HepG2 高表达 PD-L1,显著抑制 T 细胞的增殖活性,IL-2 的分泌也受到抑制。加药组与模型组相比,芍药苷显著逆转了高表达 PD-L1 的 HepG2 细胞对高表达 PD-1 的 T 细胞的细胞增殖抑制作用, T 细胞增殖活性显著增强,IL-2 的分泌水平也显著提高。

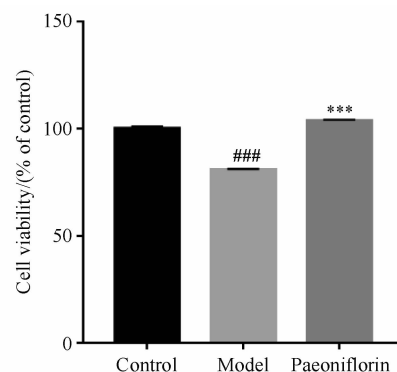


Figure 8 Effect of paeoniflorin on cell viability of Jurkat cells in co-culture system with HepG2 cells. HepG2 cells were treated with different concentration of IFN- γ for 24 h, and then the cell viability of Jurkat cells was measured by CCK-8 assay ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{***} $P < 0.001$ vs model group

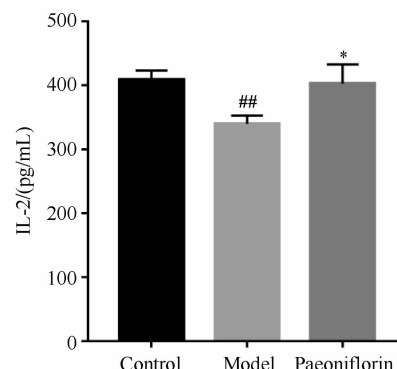


Figure 9 Effect of paeoniflorin on IL-2 secretion of Jurkat cells in co-culture system with HepG2 cells. HepG2 cells were treated with different concentration of IFN- γ for 24 h, and then IL-2 concentration was measured in cell-free supernatants using an ELISA kit ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group

3.5 芍药苷对 HepG2 细胞中 PD-L1、JAK 和 STAT3 磷酸化水平的影响

与正常组相比,IFN- γ 刺激下的模型组的 PD-L1、JAK 和 STAT3 的表达水平均显著上升。芍药苷干预后,PD-L1 的表达显著降低,与抑制剂作用结果类似。JAK、STAT3 的磷酸化水平在芍药苷作用后均有所降低(图 10)。

4 讨论

肿瘤免疫逃逸是肿瘤发生发展的重要原因之一,PD-L1 表达上调是肿瘤细胞的常见免疫逃避策略^[20],并预示着肿瘤治疗的预后不良。本研究采用 IFN- γ 刺激 HepG2 细胞 24 h,成功建立 PD-L1 高表达模型,评价天然小分子芍药苷对 PD-L1 的调控作用。实验结果证实芍药苷能够显著降低 PD-L1

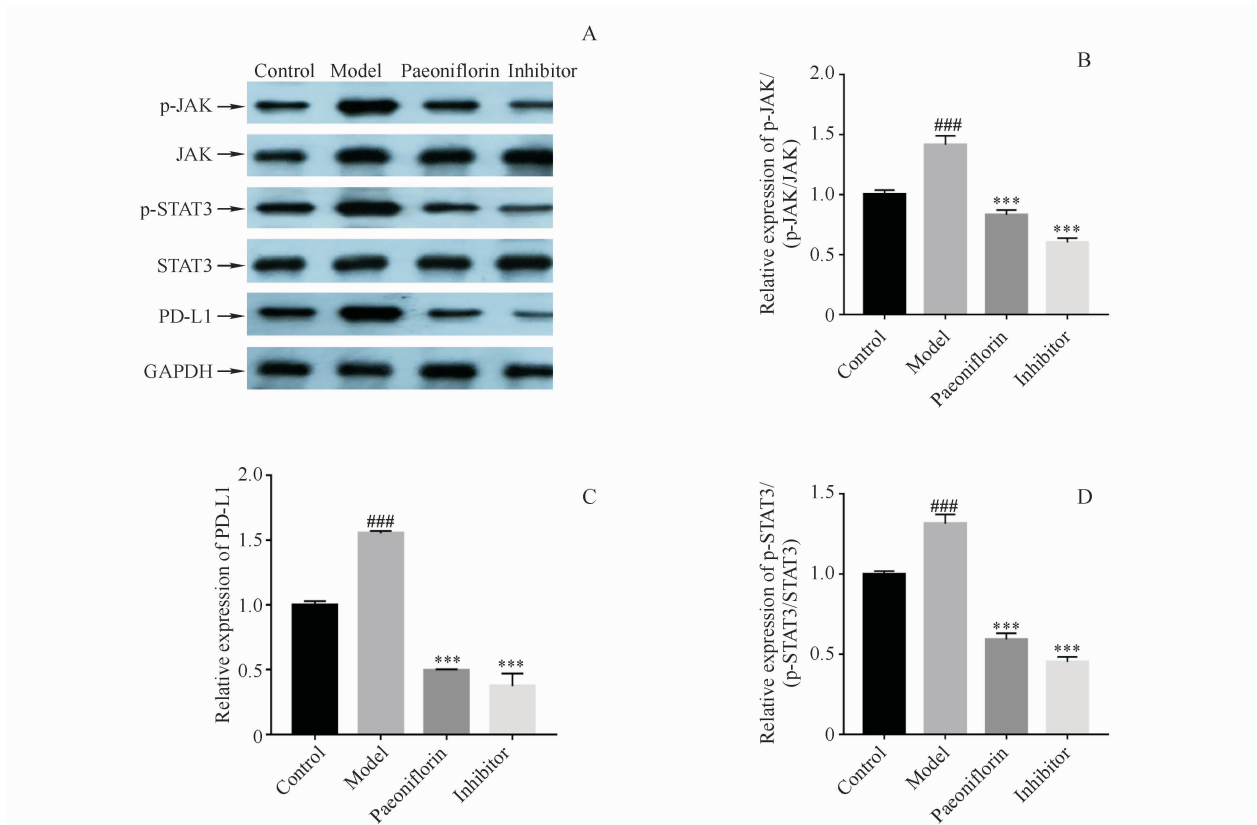


Figure 10 Effect of paeoniflorin on protein expression of JAK and STAT3 in HepG2 cells. Protein levels of PD-L1, JAK, p-JAK, STAT3, p-STAT3 were measured by Western blot in HepG2 cells treated with 20 $\mu\text{mol/L}$ paeoniflorin with or without IFN- γ in the absence or presence of JAK inhibitor INCB (A-D) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

$P < 0.001$ vs control group; *** $P < 0.001$ vs model group

的表达,降低 JAK、STAT3 的磷酸化水平,提示芍药苷可能通过 JAK/STAT3 通路抑制 PD-L1 的表达,从而改善肿瘤免疫逃逸。

目前,靶向免疫检查点 PD-1/PD-L1 和 CTLA-4 的抗体治疗晚期肝细胞癌的临床试验正在进行中,PD-1/PD-L1 抗体 nivolumab 在晚期 HCC 中的 I/II 期试验中显示出有利的结果,目前正在进行两项 III 期研究比较 PD-1/PD-L1 抗体和激酶抑制剂索拉非尼在 HCC 患者一二线治疗疗效,临床前研究数据明确了免疫检查点抑制剂在肿瘤治疗中的发展前景^[23],结果表明,抗 PD-1 抗体与局部治疗或其他靶向分子相结合药物是 HCC 的有效治疗策略。因此,免疫检查点抑制剂可以为 HCC 的治疗打开新的大门。但 PD-1/PD-L1 检查点抑制剂的高昂价格和所引起的严重免疫相关副反应限制了其在 HCC 中的应用。研究发现,天然小分子化合物如芹菜素、人参皂苷 Rg3、雷公藤甲素、青藤碱等均能抑制 PD-L1 的表达,显示了天然小分子下调 PD-L1 表达的潜力。

已有研究表明,实体瘤可通过上调肿瘤微环境中的 IFN- γ 诱导 PD-L1 表达,从而抑制抗肿瘤免疫应答^[5,24]。例如,肝细胞瘤细胞系 (HepG2, Hep3B 和 PLC) 暴露于 IFN- γ 或 IFN- α 后 PD-L1 的表达显著增加^[25]。本研究发现采用 IFN- γ 刺激 HepG2 细胞,PD-L1 蛋白和 mRNA 表达显著增加,说明模型成立。文献报道 PD-1/PD-L1 相互作用,引起 T 细胞凋亡和耗竭,抑制 T 细胞分泌 IL-2,从而减弱 T 细胞对肿瘤细胞的抑制作用,促进肿瘤的发生发展^[26]。本研究结果显示,HepG2 细胞经 IFN- γ 刺激后高表达 PD-L1,与活化的 Jurkat 细胞表达的 PD-1 结合,Jurkat 细胞活性显著下降,其分泌的 IL-2 较空白组相比显著降低。加入芍药苷干预后,T 细胞增殖显著增强,IL-2 的分泌水平较模型组也显著增加。由此说明芍药苷能够通过抑制 PD-L1 的表达,从而逆转 PD-L1 与 PD-1 结合后对 T 细胞活性的抑制作用。

JAK/STAT3 信号通路对免疫反应、细胞生长和分化等都发挥着至关重要的作用。细胞因子和

生长因子与激活非受体酪氨酸激酶 JAK 的膜受体结合, STAT 转录因子被活化的 JAK 磷酸化并二聚化, 后入核与相应 DNA 片段结合, 调控基因转录^[27]。STAT3 作为肿瘤发生过程中的癌蛋白已被广泛研究, 其信号转导通路的不断激活与肿瘤的发生发展密切相关^[28–29]。JAK/STAT3 通路在多种癌症中被证明与 PD-L1 的表达调控密切相关, STAT3 能结合到 PD-L1 启动子区域从而调控 PD-L1 的表达^[30]。文献研究证实芍药苷可通过调控 STAT3 表达抑制人胶质瘤细胞、胃癌细胞等肿瘤细胞增殖^[16–17]。本研究发现芍药苷能显著降低 IFN- γ 诱导的 HepG2 细胞的 PD-L1 的高表达, 降低细胞内 JAK、STAT3 的磷酸化水平, 进一步提示芍药苷具有通过抑制 JAK/STAT3 信号通路达到抑制 PD-L1 表达的作用。

综上所述, 芍药苷可能通过 JAK/STAT3 通路抑制 PD-L1 表达, 从而发挥改善肿瘤免疫逃逸的作用, 但仍需体内实验进一步验证。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, *et al.* Global cancer statistics[J]. *Ca Cancer J Clin*, 2011, **61**(2): 69–90.
- [2] Gao Q, Wang XY, Qiu SJ, *et al.* Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, **15**(3): 971–979.
- [3] Zhou J, Liu M, Sun H, *et al.* Hepatoma-intrinsic CCRK inhibition diminishes myeloid-derived suppressor cell immunosuppression and enhances immune-checkpoint blockade efficacy[J]. *Gut*, 2017, **67**(5): gutjnl-2017-314032.
- [4] Dai X, Pi G, Yang SL, *et al.* Association of PD-L1 and HIF-1 α coexpression with poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. *Transl Oncol*, 2018, **11**(2): 559.
- [5] Tian JP, Zhang J, Zhou JP, *et al.* Advances in small molecule inhibitors of PD-1/PD-L1 immune checkpoint pathway[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2019, **50**(1): 1–10.
- [6] Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy[J]. *Science*, 2015, **348**(6230): 56.
- [7] Zou W, Wolchok JD, Chen L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: mechanisms, response biomarkers, and combinations[J]. *Sci Transl Med*, 2016, **8**(328): 328rv4.
- [8] Greten TF, Xin WW, Korangy F. Current concepts of immune based treatments for patients with HCC: from basic science to novel treatment approaches[J]. *Gut*, 2015, **64**(5): 842–848.
- [9] Naidoo J, Page DB, Li BT, *et al.* Toxicities of the anti-PD-1 and anti-PD-L1 immune checkpoint antibodies[J]. *Ann Oncol*, 2015, **26**(12): 2375–2391.
- [10] Zhu H, Bengsch F, Svoronos N, *et al.* BET bromodomain inhibition promotes anti-tumor immunity by suppressing PD-L1 expression[J]. *Cell Rep*, 2016, **16**(11): 2829–2837.
- [11] Jiang Z, Yang Y, Yang Y, *et al.* Ginsenoside Rg3 attenuates cisplatin resistance in lung cancer by downregulating PD-L1 and resuming immune[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, **96**: 378–383.
- [12] Kim ID, Ha BJ. Paeoniflorin protects RAW 264.7 macrophages from LPS-induced cytotoxicity and genotoxicity[J]. *Toxicol In Vitro*, 2009, **23**(6): 1014–1019.
- [13] Liu DF, Wei W, Song LH. Protective effect of paeoniflorin on immunological liver injury induced by bacillus Calmette-Guerin plus lipopolysaccharide: modulation of tumour necrosis factor- α and interleukin-6 mRNA[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010, **33**(4): 332–339.
- [14] Lu JT, He W, Song SS, *et al.* Paeoniflorin inhibited the tumor invasion and metastasis in human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Bratisl Lek Listy*, 2014, **115**(7): 427–433.
- [15] Hung JY, Yang CJ, Tsai YM, *et al.* Antiproliferative activity of paeoniflorin is through cell cycle arrest and the Fas/Fas ligand-mediated apoptotic pathway in human non-small cell lung cancer A549 cells[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010, **35**(2): 141–147.
- [16] Xu RX, Nie XH, Jia OY, *et al.* Paeoniflorin inhibits human glioma cells via STAT3 degradation by the ubiquitin-proteasome pathway[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, **9**(default): 5611–5622.
- [17] Zheng YB, Xiao GC, Tong SL, *et al.* Paeoniflorin inhibits human gastric carcinoma cell proliferation through up-regulation of microRNA-124 and suppression of PI3K/Akt and STAT3 signaling[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, **21**(23): 7197–7207.
- [18] Zhao MG, Yang HM, Jiang CH, *et al.* Intervention effects of the triterpenoids from *Cyclocarya paliurus* on free fatty acids-induced steatosis in HepG2 cells[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2018, **49**(3): 333–340.
- [19] Wang YT, Zhao MG, Sheng XP, *et al.* Effect of triterpenic acid-enriched fraction from *Cyclocarya paliurus* on high glucose-induced pancreatic α cells insulin resistance[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2018, **49**(2): 215–221.
- [20] Ribas A. Adaptive immune resistance: how cancer protects from immune attack[J]. *Cancer Discov*, 2015, **5**(9): 915–919.
- [21] Elkhoeiry AB, Sangro B, Yau T, *et al.* Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial[J]. *Lancet*, 2017, **389**(10088): 2492.
- [22] Coombs MR, Harrison ME, Hoskin DW. Apigenin inhibits the inducible expression of programmed death ligand 1 by human and mouse mammary carcinoma cells[J]. *Cancer Lett*, 2016, **380**(2): 424–433.
- [23] Hato T, Goyal L, Greten TF, *et al.* Immune checkpoint blockade in hepatocellular carcinoma: current progress and future direc-

- tions[J]. *Hepatology*, 2014, **60**(5):1776–1782.
- [24] Abiko K, Matsumura N, Hamanishi J, *et al.* IFN- γ from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer[J]. *Br J Cancer*, 2015, **112**(9):1501–1509.
- [25] Muhlbauer M, Fleck M, Schutz C, *et al.* PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon- α and - γ and mediates T cell apoptosis[J]. *J Hepatol*, 2006, **45**:520–528.
- [26] Yang W, Chen PW, Li H, *et al.* PD-L1:PD-1 interaction contributes to the functional suppression of T-cell responses to human uveal melanoma cells *in vitro* [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, **49**(6):2518.
- [27] Niwa Y, Kanda H, Shikauchi Y, *et al.* Methylation silencing of SOCS-3 promotes cell growth and migration by enhancing JAK/STAT and FAK signalings in human hepatocellular carcinoma [J]. *Oncogene*, 2005, **24**:116–119.
- [28] Timofeeva OA, Tarasova NI, Zhang X, *et al.* STAT3 suppresses transcription of proapoptotic genes in cancer cells with the involvement of its N-terminal domain[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, **110**(4):1267–1272.
- [29] Choudhari S, Khan M, Harris G, *et al.* Deactivation of Akt and STAT-3 signaling promotes apoptosis, inhibits proliferation and enhances sensitivity of HCC cells to an anti-cancer agent, Atiprimod[J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, **67**:2377–2377.
- [30] Chen J, Jiang CC, Jin L, *et al.* Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer [J]. *Ann Oncol*, 2015, **27**(3):409–416.

· 本刊讯 ·

《中国药科大学学报》入选最新版北大中文核心期刊

近日,本刊收到北京大学图书馆的邮件通知,《中国药科大学学报》顺利入编《中文核心期刊要目总览》2017 年版(即第八版)之药学类的核心期刊。

北大中文核心期刊是由北京大学图书馆根据定量和定性评审筛选出的核心期刊,每 3 年评选一次。定量评价指标体系采用了 16 个评价指标,选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达 49 种,统计到的文献数量共计 93 亿余篇次,涉及期刊 13 953 种,参加核心期刊评审的学科专家近 8 千位,经过定量筛选和专家定性评审,从我国正在出版的中文期刊中评选出 1 981 种核心期刊。

被收录杂志皆为各专业各类杂志的佼佼者,是具有权威性和代表性的核心期刊。《中文核心期刊要目总览》一直是各大学、科研院所以及企事业单位进行科研评价、科研鉴定等的重要依据。

自 1992 年首次评选以来,《中国药科大学学报》已经连续入选 8 次,充分证明了本刊的办刊质量和办刊水平,也体现了广大读者、作者和业界专家对本刊的认可。在此,编辑部全体人员向一直支持本刊工作的各级领导、编委、专家、作者和读者致以深深的谢意!本刊将继续努力,为医药领域的科研人员提供更优质的服务,为我国医药事业的发展贡献力量。

(本刊编辑部)