

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

杨学鹏^{1*} 王兰² 柴居堂² 杨炜琦³

(¹顺平学鹏中医诊所, 保定 072253; ²河北省中医院肿瘤科, 石家庄 050000;

³保定市第一中心医院普外科, 保定 071000)

摘要 该文旨在探讨积雪草苷(Asiaticoside, ATS)调节T细胞免疫球蛋白和黏蛋白结构域3(TIM3)/半乳糖凝集素9(Gal9)信号轴对肺癌细胞上皮-间充质转化和免疫逃逸的影响。以不同浓度ATS(0、5、10、20、40、80 μmol/L)处理细胞筛选最佳作用浓度;将细胞分为对照(control)组、ATS组(25 μmol/L ATS)、ATS+pcDNA-NC组(25 μmol/L ATS+pcDNA-NC)和ATS+pcDNA-TIM3组(25 μmol/L ATS+pcDNA-TIM3),用CCK-8试剂盒、流式细胞术分别检测细胞的增殖和凋亡情况;用Transwell小室检测细胞的侵袭和迁移情况;用ELISA检测细胞中TNF-α、IFN-γ和IL-2水平;用Western blot检测细胞中E-cadherin、Vimentin、PD-L1、TIM3和Gal9蛋白表达水平。使用小鼠构建非小细胞肺癌(NSCLC)模型,并将其分为control组、ATS组、ATS+AAV-NC组和ATS+AAV-TIM3组,测量肿瘤体积和质量;免疫组化染色观察PD-L1、TIM3和Gal9蛋白表达情况。与control组相比,ATS组细胞存活率、细胞迁移数、细胞侵袭数以及Vimentin、PD-L1、TIM3和Gal9蛋白表达水平下降($P<0.05$),细胞凋亡率、TNF-α水平、IFN-γ水平、IL-2水平以及E-cadherin蛋白表达水平上升($P<0.05$);与ATS+pcDNA-NC组相比,ATS+pcDNA-TIM3组细胞存活率、细胞迁移数、细胞侵袭数以及Vimentin、PD-L1、TIM3和Gal9蛋白表达水平升高($P<0.05$),细胞凋亡率、TNF-α水平、IFN-γ水平、IL-2水平以及E-cadherin蛋白表达水平降低($P<0.05$)。体内肿瘤实验显示,与control组相比,ATS组小鼠肿瘤体积和质量均减小($P<0.05$),PD-L1、TIM3和Gal9蛋白水平降低;与ATS+AAV-NC组相比,ATS+AAV-TIM3组小鼠肿瘤体积和质量增加($P<0.05$),PD-L1、TIM3和Gal9蛋白水平增多。积雪草苷可能通过抑制TIM3/Gal9信号轴来抑制肺癌细胞上皮-间充质转化和免疫逃逸。

关键词 积雪草苷; T细胞免疫球蛋白和黏蛋白结构域3; 半乳糖凝集素9; 肺癌细胞; 免疫逃逸

Effects of Asiaticoside on Epithelial-Mesenchymal Transition and Immune Escape in Lung Cancer Cells by Regulating the TIM3/Gal9 Axis

YANG Xuepeng^{1*}, WANG Lan², CHAI Jutang², YANG Weiqi³

(¹Shunping Xuepeng Traditional Chinese Medicine Clinic, Baoding 072253, China;

²Department of Oncology, Hebei Provincial Traditional Chinese Medicine Hospital, Shijiazhuang 050000, China;

³Department of General Surgery, Baoding No.1 Central Hospital, Baoding 071000, China)

Abstract This study aims to investigate the effects of ATS (Asiaticoside) on epithelial-mesenchymal transition and immune escape in lung cancer cells by regulating the TIM3 (T cell immunoglobulin domain and mucin domain-3)/Gal9 (galectin-9) signaling axis. Cells were treated with different concentrations of ATS (0, 5, 10, 20, 40, 80 μmol/L) to screen for the optimal concentration. The cells were separated into control group, ATS

收稿日期: 2024-09-30 接受日期: 2024-10-21

*通信作者。 Tel: 18831277777, E-mail: qorx434068@163.com

Received: September 30, 2024 Accepted: October 21, 2024

*Corresponding author. Tel: +86-18831277777, E-mail: qorx434068@163.com

group (25 $\mu\text{mol/L}$ ATS), ATS+pcDNA-NC group (25 $\mu\text{mol/L}$ ATS+pcDNA-NC), and ATS+pcDNA-TIM3 group (25 $\mu\text{mol/L}$ ATS+pcDNA-TIM3). The CCK-8 assay kit and flow cytometry were used to detect cell proliferation and apoptosis. Transwell chamber was used to detect cell invasion and migration. ELISA was applied to detect the levels of TNF- α , IFN- γ , and IL-2 in cells. Western blot was applied to detect the expression of E-cadherin, Vimentin, PD-L1, TIM3, and Gal9 proteins in cells. BALB/c nude mice were used to construct NSCLC (non-small cell lung cancer) models, which were separated into control group, ATS group, ATS+AAV-NC group, and ATS+AAV-TIM3 group. Tumor volume and mass were measured. Immunohistochemical staining was applied to observe the expression of PD-L1 and Gal9 proteins. Compared with the control group, the cell survival rate, cell migration number, cell invasion number, Vimentin, PD-L1, TIM3, and Gal9 protein expression in the ATS group were lower ($P<0.05$), the apoptosis rate, TNF- α , IFN- γ , IL-2 levels, and E-cadherin protein expression were higher ($P<0.05$). Compared with the ATS+pcDNA-NC group, the cell survival rate, cell migration number, cell invasion number, Vimentin, PD-L1, TIM3, and Gal9 protein expression were higher in the ATS+pcDNA-TIM3 group ($P<0.05$), the apoptosis rate, TNF- α , IFN- γ , IL-2 levels, and E-cadherin protein expression were lower ($P<0.05$). *In vivo* tumor experiments showed that compared with the control group, the tumor volume and mass of mice in the ATS group were lower ($P<0.05$), and PD-L1 and Gal9 protein expression levels were lower. Compared with the ATS+AAV-NC group, the tumor volume and mass of mice in the ATS+AAV-TIM3 group were higher ($P<0.05$), and PD-L1 and Gal9 protein expression levels were higher. ATS may inhibit epithelial-mesenchymal transition and immune escape in lung cancer cells by suppressing the TIM3/Gal9 signaling axis.

Keywords Asiaticoside; T cell immunoglobulin domain and mucin domain-3; galectin 9; lung cancer cells; immune escape

肺癌是全球最常见的恶性肿瘤, 每年诊断出的病例超过210万例^[1]。此外, 肺癌是全球癌症相关死亡的主要原因, 据估计每天有350人死于这种恶性肿瘤^[2]。非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 是肺癌的主要组织学形式, 约占所有肺癌病例的85%^[3]。吸烟是NSCLC最重要的危险因素, 有证据表明, 戒烟与降低发病率和改善预后相关^[4]。尽管NSCLC治疗 (如靶向治疗和免疫治疗) 取得了进展, 但其发病率和死亡率仍然高得令人无法接受。因此, 确定新型有效的NSCLC治疗药物非常必要。积雪草苷 (Asiaticoside, ATS) 是从积雪草中分离出的三萜皂苷, 之前的证据表明, ATS具有多种生物学特性, 包括抗炎、抗光老化和免疫调节活性^[5-6]。此外, ATS在几种癌症中起着关键的调节作用。例如, ATS通过靶向miR-635/HMGA1轴抑制胃癌进展^[7], 还可以通过阻断Wnt/ β -Catenin信号转导抑制NSCLC细胞的生长和转移^[8]。T细胞免疫球蛋白和黏蛋白结构域3 (T cell immunoglobulin domain and mucin domain-3, TIM3) 是一种抑制性检查点蛋白, 是抗肿瘤免疫的调节因子和TIM家族的成员, 在肿瘤浸润淋巴细胞中高度表达^[9]。半乳糖凝集素9 (galectin-9, Gal9) 是半乳糖凝集素超家族成员, 为含有碳水

化合物识别域的可溶性蛋白质, 在上皮细胞、免疫细胞和巨噬细胞中高度表达^[10]。TIM3/Gal9通路在免疫系统中显示出抑制或激活作用, 可以维持和调节T细胞的功能和发育^[11]。在各种癌症中, TIM3和Gal9的相互作用抑制了由先天性和适应性免疫细胞介导的抗肿瘤免疫。因此, 阻断TIM3/Gal9信号轴是一种有前途的癌症治疗方法。本文旨在讨论ATS能否通过调节TIM3/Gal9信号轴来改善NSCLC细胞上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 和免疫逃逸。

1 材料与方法

1.1 细胞与动物

人非小细胞肺癌细胞 (A549细胞) 购于武汉普诺赛生命科技有限公司。收到细胞后, 将其放置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养2~4 h, 以便稳定细胞状态。静置完成后, 正常传代培养。

32只小鼠 (雄性, 4周龄, 15~17 g) 购于广州中医药大学 [许可证号: SYXK (粤) 2023-0347]; 将小鼠安置在SPF环境 (12 h光/暗循环, 湿度为50%~60%, 温度为22~24 $^{\circ}\text{C}$) 中, 其可自由获取食物和水, 适应72 h

后方可进行实验。本研究经保定市第一中心医院伦理委员会审批通过[批准号: 2023伦审第(32)号]。

1.2 试剂

ATS(纯度 $\geq 98\%$)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)固定液、放射免疫沉淀法(radioimmunoprecipitation assay, RIPA)裂解液、二辛可宁酸检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司; RPMI-1640培养基购于武汉普诺赛生命科技有限公司; 青/链霉素混合液(100 \times)双抗、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)均购于北京索莱宝科技有限公司; 细胞活力检测(CCK-8法)试剂盒购于安徽白鲨生物科技有限公司; Corning[®] Matrigel[®]基底膜基质购于德国Merck KGaA公司; 结晶紫、二甲苯购于上海麦克林生化科技股份有限公司; 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)和白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)的酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒以及细胞凋亡试剂盒均购于翌圣生物科技(上海)股份有限公司; Tris缓冲盐溶液购于上海源叶生物科技有限公司; 上皮性钙黏附蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)、TIM3、Gal9、GAPDH一抗和免疫组化染色试剂盒购于武汉三鹰生物技术有限公司; 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗购于艾柏森(北京)生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养和ATS浓度筛选 取出放置在液氮中冻存的A549细胞于37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中快速解冻, 600 r/min室温离心5 min。用RPMI-1640培养基、10% FBS和1%青/链霉素混合液(100 \times)双抗混合制备的完全培养基在5% CO₂、37 $^{\circ}\text{C}$ 的环境中孵育细胞。传代3次后, 将细胞接种于96孔板, 细胞接种密度是3 $\times 10^3$ 个/孔, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂的细胞培养箱中孵育24 h后, 加入不同浓度ATS(0、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$)。24或48 h后使用CCK-8试剂盒检测各个浓度下的细胞吸光度(D)值, 计算细胞存活率, 细胞存活率(%)=[(实验组 D 值-空白组 D 值)/(对照组 D 值-空白组 D 值)] $\times 100\%$ 。

1.3.2 细胞分组 将A549细胞分为4组, 对照(control)组, 正常培养; ATS组, 用25 $\mu\text{mol/L}$ ATS干预; ATS+pcDNA-NC组, 25 $\mu\text{mol/L}$ ATS干预同时转染pcDNA-NC质粒; ATS+pcDNA-TIM3组, 25 $\mu\text{mol/L}$ ATS干

预同时转染pcDNA-TIM3质粒。使用Lipofectamine 2000将指定质粒(1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)转染至A549细胞中。

1.3.3 CCK-8检测细胞增殖情况 A549细胞传代后以3 $\times 10^3$ 个/孔的密度接种在96孔无菌培养板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂的条件下孵育24 h后根据1.3.2中的分组, 转染细胞。48 h后每孔加入15 μL CCK-8溶液, 在培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂)中孵育2 h。最后, 用酶标仪测量450 nm波长处的吸光度值, 计算每组细胞存活率。

1.3.4 流式细胞术检测细胞凋亡情况 A549细胞传代后以3 $\times 10^5$ 个/孔的密度接种至6孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂的条件下孵育24 h, 根据1.3.2中的分组, 转染细胞。48 h后收集各组细胞, 用预冷的PBS洗涤2次, 加入5 μL 膜联蛋白荧光素(Annexin V-FITC)和5 μL 碘化丙啶(propidium iodide, PI)染液混匀, 避光染色15 min, 1 000 r/min室温离心5 min后用0.5 mL PBS重悬, 使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.3.5 Transwell小室检测细胞迁移和侵袭情况 用200 μL 无血清培养基重悬各组A549细胞(约1 $\times 10^4$ 个细胞), 放入上室。侵袭实验上室涂有Matrigel基质胶, 迁移实验上室未涂Matrigel基质胶; 将含有10% FBS的600 μL 培养基加入下室, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂孵育48 h后, 将下室中的细胞固定在4% PFA中, 并用0.5%结晶紫染色10 min。使用显微镜对细胞进行成像, 并随机选择5个区域进行侵袭和迁移细胞计数。

1.3.6 ELISA检测免疫逃逸相关因子TNF- α 、IFN- γ 和IL-2水平 将各组A549细胞与CD8⁺T细胞共培养48 h, 收集上清液, 按照ELISA试剂盒说明书检测TNF- α 、IFN- γ 和IL-2水平。取出4 $^{\circ}\text{C}$ 保存的ELISA试剂盒, 室温平衡30 min。配置洗涤液, 依次稀释标准品(7个浓度)和各组细胞上清液, 将稀释好的标准品和各组上清样品按照100 μL /孔依次加入预包被板孔中, 室温孵育120 min。洗涤液洗板5次, 加入稀释50倍的生物素化抗体, 室温孵育60 min; 洗板5次, 加入酶标记物, 室温避光孵育20 min; 洗板5次, 加入显色剂TMB溶液, 室温避光温育20 min; 加入终止液, 混匀后立即测量 D_{450} 值。以 D_{450} 值为纵坐标, 标准品浓度为横坐标, 绘制标准曲线; 代入各组样品 D_{450} 值算出样品的相应浓度水平。

1.3.7 Western blot检测E-cadherin、Vimentin、PD-L1、TIM3和Gal9蛋白表达情况 使用RIPA缓冲液从细胞中提取蛋白质, 并使用二辛可宁酸检测试剂

盒测定蛋白质浓度。用10% SDS-PAGE分离蛋白质样品,印迹转移到聚偏二氟乙烯膜上,并用5%脱脂牛奶室温封闭膜2 h。将膜与1:2 000比例稀释的E-cadherin、Vimentin、PD-L1、TIM3、Gal9和GAPDH一抗在4 °C下孵育过夜,并用Tris缓冲盐溶液冲洗3次,然后与1:1 000比例稀释的HRP标记的二抗室温孵育2 h。最后,使用增强型化学发光试剂盒检测蛋白质条带,并使用ImageJ软件进行分析。

1.3.8 建立异种移植瘤小鼠模型 将A549细胞(5×10^6)注射到小鼠右腋下,5天后将32只小鼠随机分为4组($n=8$), control组、ATS组、ATS+AAV-NC组和ATS+AAV-TIM3组。AAV病毒滴度为 1×10^{12} TU/mL,于第一次给药前尾静脉注射于小鼠体内。ATS组、ATS+AAV-NC组和ATS+AAV-TIM3组均灌胃10 mg/kg ATS, control组灌胃同剂量生理盐水。每2天一次,持续给药30天,给药结束后称量体重并对所有小鼠进行安乐死处理,收取移植瘤称重,并测量其长径和短径,计算体积。

1.3.9 苏木精-伊红(HE)和免疫组化染色 称量结束后将肿瘤组织固定在4% PFA中并包埋在石蜡中,将石蜡包埋的肿瘤组织切片(5 μ m),然后将切片脱蜡并水化。用苏木精染色组织切片5 min,然后用伊红染色2 min。之后,将切片在梯度(95%、80%和70%)酒精中脱水,用二甲苯透明化,并用中性树脂密封,在显微镜下观察HE染色结果。将水化后的组织切片放置于柠檬酸钠缓冲液(pH=6)中加热修复,再用5% BSA溶液室温封闭60 min。切片分别与1:500稀释的PD-L1、TIM3和Gal9一抗在4 °C下

孵育过夜,PBS润洗后与1:300稀释的HRP标记的二抗室温孵育30 min,用二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)进行显色,并用苏木精复染切片。使用显微镜观察免疫组化结果。

1.4 统计分析

采用SPSS 25.0软件统计分析,实验数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。用单因素方差分析(ANOVA)结合LSD-*t*检验比较组间差异。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ATS对A549细胞存活率的影响

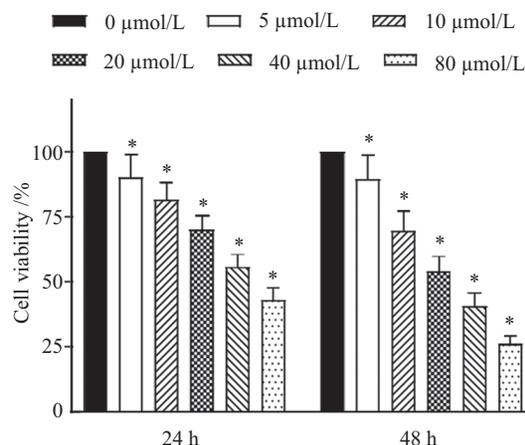
与0 μ mol/L ATS相比,用5、10、20、40、80 μ mol/L ATS处理24 h或48 h的A549细胞存活率均降低($P < 0.05$)(图1),经过GraphPad Prism软件计算,ATS处理细胞48 h,细胞活性被抑制50%时,ATS的浓度为26.25 μ mol/L。因此,本研究选取25 μ mol/L ATS进行后续实验。

2.2 ATS影响A549细胞增殖和凋亡

与control组比较,ATS组A549细胞存活率下降($P < 0.05$),凋亡率上升($P < 0.05$);与ATS+pcDNA-NC组比较,ATS+pcDNA-TIM3组A549细胞存活率升高($P < 0.05$),凋亡率降低($P < 0.05$)(图2)。

2.3 ATS抑制A549细胞侵袭和迁移

与control组比较,ATS组A549细胞侵袭和迁移数量减少($P < 0.05$);与ATS+pcDNA-NC组比较,ATS+pcDNA-TIM3组A549细胞侵袭和迁移数量增多($P < 0.05$)(图3)。

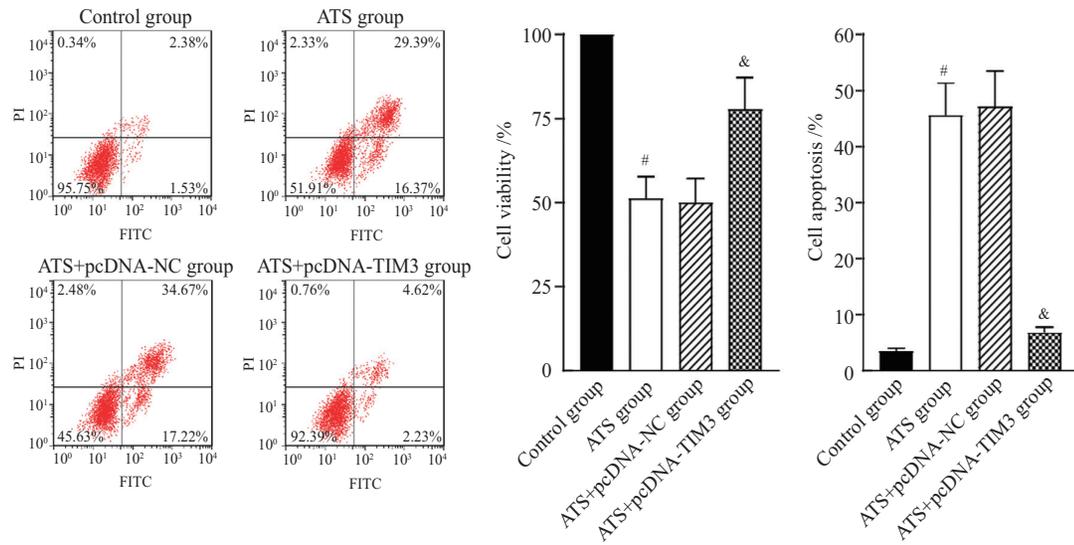


* $P < 0.05$, 与0 μ mol/L ATS比。 $n=6$ 。

* $P < 0.05$ compared with 0 μ mol/L ATS. $n=6$ 。

图1 不同浓度ATS对A549细胞存活率的影响

Fig.1 Effect of different concentrations of ATS on the viability of A549 cells

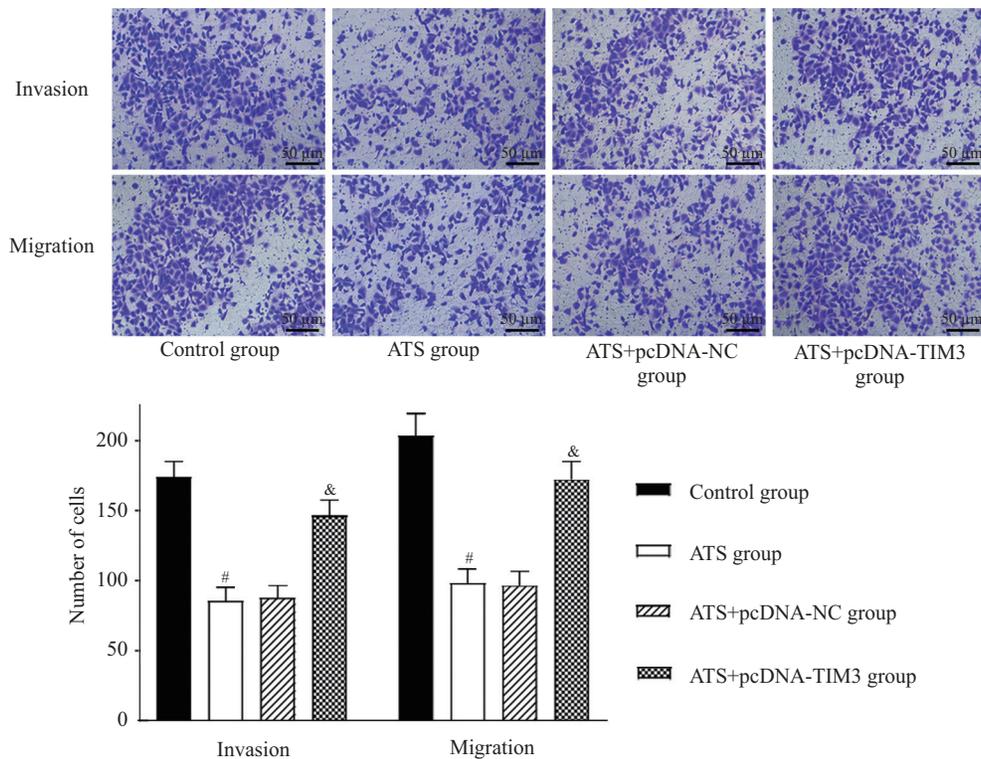


[#] $P < 0.05$ 与control组比; [&] $P < 0.05$, 与ATS+pcDNA-NC组比。

[#] $P < 0.05$ compared with the control group; [&] $P < 0.05$ compared with ATS+pcDNA-NC group.

图2 A549细胞增殖和凋亡情况比较

Fig.2 Comparison of A549 cell proliferation and apoptosis



[#] $P < 0.05$, 与control组比; [&] $P < 0.05$, 与ATS+pcDNA-NC组比。

[#] $P < 0.05$ compared with the control group; [&] $P < 0.05$ compared with ATS+pcDNA-NC group.

图3 A549细胞侵袭和迁移情况比较

Fig.3 Comparison of A549 cell invasion and migration

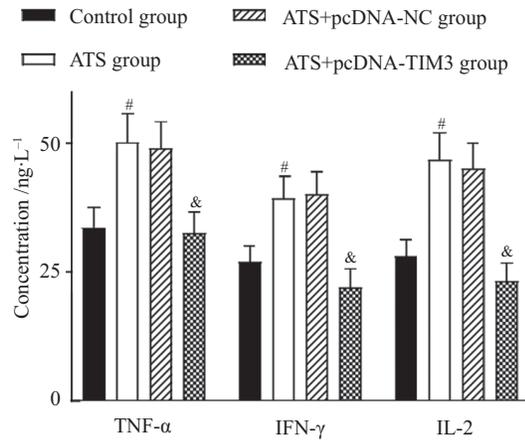
2.4 ATS降低TNF- α 、IFN- γ 和IL-2水平

与control组比较, ATS组细胞TNF- α 、IFN- γ 和IL-2水平升高($P < 0.05$); 与ATS+pcDNA-NC组比较, ATS+pcDNA-TIM3组细胞TNF- α 、IFN- γ 和IL-2水平

降低($P < 0.05$)(图4)。

2.5 ATS对E-cadherin、Vimentin、PD-L1、TIM3和Gal9蛋白表达的影响

与control组比较, ATS组A549细胞Vimentin、

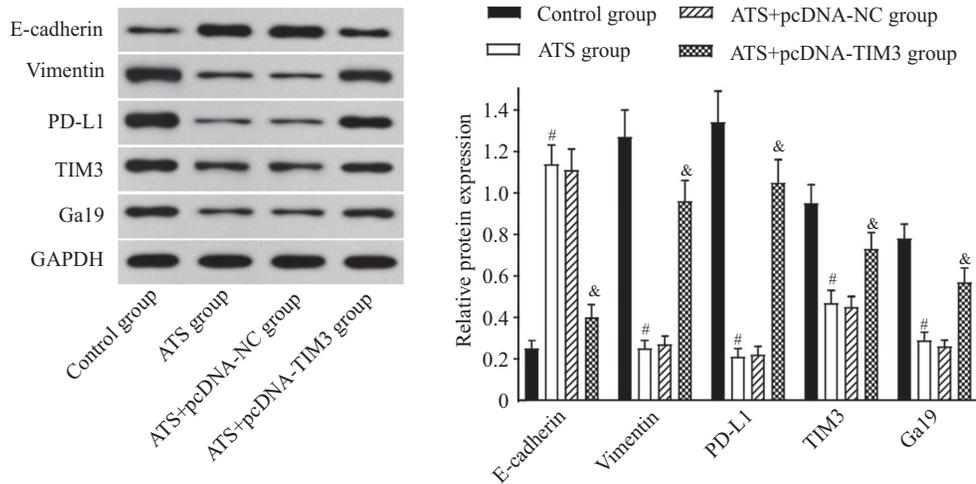


[#] $P < 0.05$, 与control组比; [&] $P < 0.05$, 与ATS+pcDNA-NC组比。 $n = 6$ 。

[#] $P < 0.05$ compared with the control group; [&] $P < 0.05$ compared with ATS+pcDNA-NC group. $n = 6$ 。

图4 各组细胞TNF- α 、IFN- γ 和IL-2水平

Fig.4 Levels of TNF- α , IFN- γ and IL-2 in each group



[#] $P < 0.05$, 与control组比; [&] $P < 0.05$, 与ATS+pcDNA-NC组比。

[#] $P < 0.05$ compared with the control group; [&] $P < 0.05$ compared with ATS+pcDNA-NC group。

图5 A549细胞E-cadherin、Vimentin、PD-L1、TIM3和Gal9蛋白条带及表达情况

Fig.5 Protein bands and expressions of E-cadherin, Vimentin, PD-L1, TIM3 and Gal9 in A549 cells

PD-L1、TIM3和Gal9蛋白表达下调($P < 0.05$), E-cadherin蛋白表达上调($P < 0.05$); 与ATS+pcDNA-NC组比较, ATS+pcDNA-TIM3组细胞Vimentin、PD-L1、TIM3和Gal9蛋白表达上调($P < 0.05$), E-cadherin蛋白表达下调($P < 0.05$)(图5)。

2.6 ATS抑制小鼠移植瘤生长

与control组相比, ATS组肿瘤生长缓慢, 体积和质量降低($P < 0.05$); 与ATS+AAV-NC组相比, ATS+AAV-TIM3组肿瘤快速生长, 体积和质量升高($P < 0.05$)(图6)。

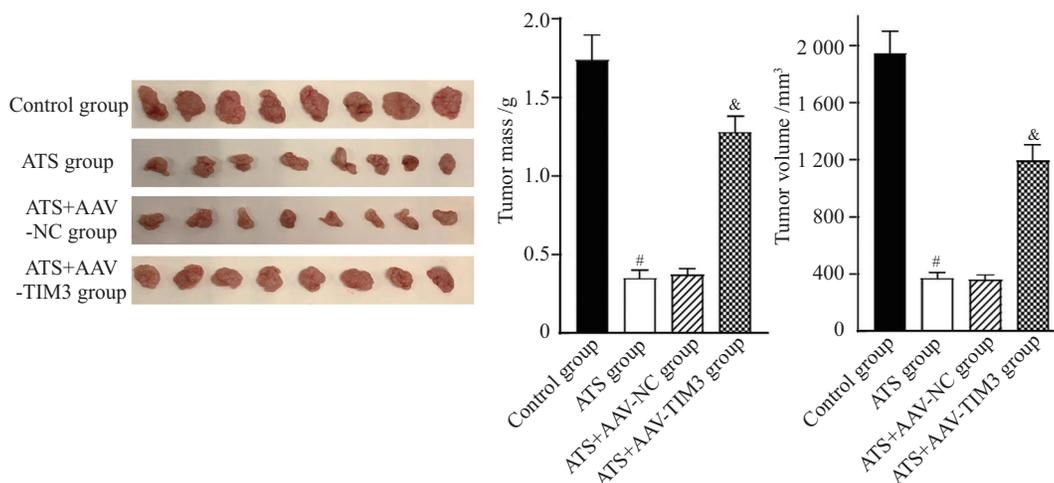
2.7 小鼠肿瘤的HE和免疫组化染色分析

HE染色图像显示, control组肿瘤细胞排列紊乱,

大小不一, 核质分界不清; 与control组相比, ATS组肿瘤细胞排列规则, 细胞结构清晰; 与ATS+AAV-NC组比较, ATS+AAV-TIM3组肿瘤细胞结构紊乱, 细胞大小、形态异常。免疫组化染色图像显示, 与control组相比, ATS组肿瘤细胞PD-L1、TIM3和Gal9蛋白水平下降; 与ATS+AAV-NC组比较, ATS+AAV-TIM3组PD-L1、TIM3和Gal9蛋白水平上升(图7)。

3 讨论

尽管NSCLC的检测和治疗有所改善, 但由于肿瘤的转移和复发, 患者的预后仍未能令人满意。EMT是一种生物学机制, 是包括NSCLC在内的多种类型



[#]*P*<0.05, 与control组比; [&]*P*<0.05, 与ATS+AAV-NC组比。 *n*=8。

[#]*P*<0.05 compared with control group, [&]*P*<0.05 compared with ATS+AAV-NC group. *n*=8.

图6 异种移植瘤生长情况

Fig.6 Growth of xenograft tumors

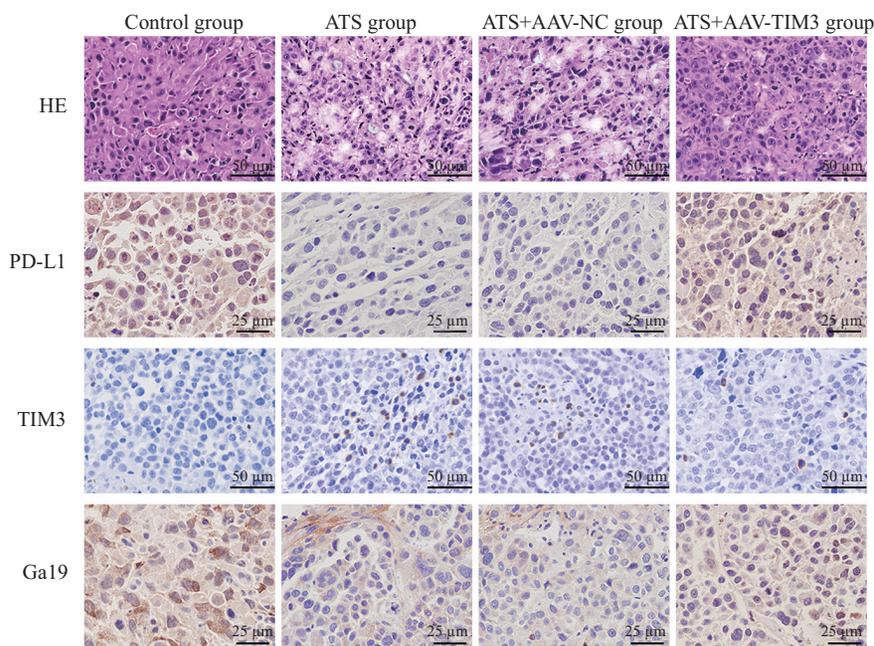


图7 异种移植瘤PD-L1和Ga19蛋白表达的HE和免疫组化染色图

Fig.7 HE and immunohistochemical staining of PD-L1 and Ga19 protein expression in xenograft tumors

癌症进展的关键过程^[12]。在此过程中, 上皮细胞获得间充质细胞的特征, 细胞运动性和迁移能力增强。EMT的特征在于上皮细胞标志物(例如 cytokeratins 和 E-cadherin)缺失, 间充质细胞标志物(例如 N-cadherin、Vimentin 和 纤连蛋白)的表达上调^[13]。EMT 受到转录因子的严格调控, 这些转录因子改变基因表达促进了上皮细胞表型向间质细胞表型的转变; EMT 还受多种细胞因子和生长因子的调节, 其可促使肿瘤细胞沿上皮-间充质表型轴以各种状态存在, 从癌症干细胞

过渡到循环肿瘤细胞^[14]。据报道, EMT可能引起肺部重塑并促进特发性肺纤维化发展, EMT还可促进 NSCLC 细胞侵袭和转移^[15]。HE 等^[16]指出, ATS 通过灭活 p65 NF-κB 和 p38 MAPK 来阻碍胰腺癌的 EMT。同样, HUANG 等^[17]发现 ATS 在三阴性乳腺癌中通过促进 PPARG 表达阻断 TGF-β/SMAD 信号转导从而抑制 EMT。本研究初步确定 ATS 能够影响 NSCLC 细胞生长, 抑制细胞增殖、迁移、侵袭和 Vimentin 蛋白表达, 促进细胞凋亡和 E-cadherin 蛋白表达。体内肿瘤实验

显示,ATS能够抑制异种移植瘤的生长。结果表明,ATS可能通过阻断EMT,抑制NSCLC细胞转移和侵袭,进而抑制肺癌的恶性发展。

TIM3/Gal9通路相关蛋白表达异常会导致各种疾病,如自身免疫性疾病、感染、癌症和妊娠并发症。许多研究表明,各种癌症中TIM3和Gal9水平均升高,阻断TIM3/Gal9偶联可能是髓系恶性肿瘤的潜在疗法,可阻止白血病进展^[18]。在乳腺癌实体瘤中,FLRT3/LPHN/TIM3/Gal9通路被认为参与TIM3和Gal9向细胞表面的转运^[19]。最近的研究表明TIM3在免疫细胞中过表达,Gal9在肿瘤细胞中过表达,两者均与前列腺癌的进展相关;同样,在肝细胞癌中观察到T细胞中TIM3和肝血窦内巨噬细胞中Gal9的表达水平均增加^[20]。在头颈鳞状细胞癌小鼠模型中使用抗TIM3单克隆抗体治疗减少了CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T细胞的数量并增加了CD8⁺T细胞的百分比,致使IFN- γ 的高表达^[21]。临床数据表明,NSCLC患者血清中TIM3和Gal9水平明显高于健康者,TIM3和Gal9表达水平的增加与肿瘤大小、肿瘤转移以及NSCLC进展到晚期都有相关性^[22]。因此,阻断TIM3和Gal9可以作为多种癌症的治疗策略。TIM3和PD-1已被报道在多种癌症中共表达,TIM3和PD-1在肿瘤浸润淋巴细胞上的共表达可降低IL-2、TNF- α 和IFN- γ 的水平,从而使肿瘤中T细胞发生功能障碍或损伤^[23]。有研究发现使用抗PD-1/PD-L1以及TIM3抗体进行免疫治疗有益于治疗各种化疗耐药性癌症,免疫疗法干预TIM3/Gal9和PD-1/PD-L1可以降低癌细胞耐药性。TIM3/Gal9相互作用被认为可以刺激或抑制先天免疫,具体取决于先天免疫细胞的类型,该途径对于维持抗原的免疫力至关重要,对于预防自身免疫也很重要。本研究结果显示,ATS干预后NSCLC细胞中PD-L1、TIM3和Gal9蛋白表达水平以及小鼠肿瘤中PD-L1、TIM3和Gal9蛋白表达水平均降低,细胞中免疫相关因子TNF- α 、IFN- γ 和IL-2水平升高。用ATS处理过表达TIM3的A549细胞,逆转了ATS对于NSCLC细胞活性和移植瘤生长的抑制作用。由此推测,ATS抑制肺癌恶性进展的作用机制可能与调控TIM3/Gal9信号轴有关。

综上所述,ATS可能通过抑制TIM3/Gal9轴遏制肺癌细胞发生EMT和免疫逃逸,可能作为一种有前途的治疗剂用于NSCLC治疗。但本研究尚存在不足之处:癌症的发生是复杂的,ATS对NSCLC细胞中

其他通路的调控有待被阐明,后续实验中需进一步证实ATS对肺癌的作用;另外,体内环境较于体外相对复杂,首过代谢可能会降低ATS药物利用率。

参考文献 (References)

- [1] ASHIQUE S, GARG A, MISHRA N, et al. Nano-mediated strategy for targeting and treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2023, 396(11): 2769-92.
- [2] SIEGEL R L, WAGLE N S, CERCEK A, et al. Colorectal cancer statistics, 2023 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(3): 233-54.
- [3] FOX A H, ALEXANDER M, FORCUCCI J A, et al. Biomarker testing for guiding precision medicine for patients with non-small cell lung cancer [J]. *Chest*, 2024, doi: 10.1016/j.chest.2024.08.006.
- [4] GARRIDO J, BERNAL Y, GONZÁLEZ E, et al. Beyond tobacco: genomic disparities in lung cancer between smokers and never-smokers [J]. *BMC Cancer*, 2024, 24(1): 951.
- [5] YAO M, WANG J, ZHANG J, et al. Asiaticoside attenuates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-caused injury of cardiomyocytes by inhibiting autophagy [J]. *J Appl Toxicol*, 2023, 43(6): 789-98.
- [6] TANG S, XIE X, WANG M, et al. Protective effects of asiaticoside on renal ischemia reperfusion injury *in vivo* and *in vitro* [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(4): 10235-43.
- [7] ZHANG C, JI X, CHEN Z, et al. Asiaticoside suppresses gastric cancer progression and induces endoplasmic reticulum stress through the miR-635/HMGA1 axis [J]. *J Immunol Res*, 2022, 2022(1): 1917585.
- [8] ZHANG Y N, LIU J Y, YANG G, et al. Asiaticoside inhibits growth and metastasis in non-small cell lung cancer by disrupting EMT via Wnt/ β -Catenin pathway [J]. *Environ Toxicol*, 2024, 39(11): 4859-70.
- [9] LU C, TAN Y. Promising immunotherapy targets: TIM3, LAG3, and TIGIT joined the party [J]. *Mol Ther Oncol*, 2024, 32(1): 200773.
- [10] MARIÑO K V, CAGNONI A J, CROCI D O, et al. Targeting galectin-driven regulatory circuits in cancer and fibrosis [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2023, 22(4): 295-316.
- [11] KANDEL S, ADHIKARY P, LI G, et al. The TIM3/Gal9 signaling pathway: an emerging target for cancer immunotherapy [J]. *Cancer Lett*, 2021, 510(1): 67-78.
- [12] SAADH M J, SHARMA P, NASER I H, et al. Epithelial-mesenchymal transition in chemoradiation-induced lung damage: mechanisms and potential treatment approaches [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2024, 38(8): e23790.
- [13] DEBNATH P, HUIREM RS, DUTTA P, et al. Epithelial-mesenchymal transition and its transcription factors [J]. *Biosci Rep*, 2022, 42(1): 20211754.
- [14] ROY S, SUNKARA R R, PARMAR M Y, et al. EMT imparts cancer stemness and plasticity: new perspectives and therapeutic potential [J]. *Front Biosci*, 2021, 26(2): 238-65.
- [15] PEREZ-OQUENDO M, MANSHOURI R, TIAN Y, et al. ZEB1 is regulated by K811 acetylation to promote stability, NuRD complex interactions, EMT, and NSCLC metastasis [J]. *Mol Cancer Res*, 2023, 21(8): 779-94.

- [16] HE Y, PENG X, ZHENG L, et al. Asiaticoside inhibits epithelial-mesenchymal transition and stem cell-like properties of pancreatic cancer PANC-1 cells by blocking the activation of p65 and p38MAPK [J]. *J Gastrointest Oncol*, 2021, 12(1): 196-206.
- [17] HUANG X, JIA Z, LI X, et al. Asiaticoside hampers epithelial-mesenchymal transition by promoting PPARG expression and suppressing P2RX7-mediated TGF- β /Smad signaling in triple-negative breast cancer [J]. *Phytother Res*, 2023, 37(5): 1771-86.
- [18] KIKUSHIGE Y, MIYAMOTO T, YUDA J, et al. A TIM-3/Gal-9 autocrine stimulatory loop drives self-renewal of human myeloid leukemia stem cells and leukemic progression [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(3): 341-52.
- [19] YASINSKA I M, SAKHNEVYCH S S, PAVLOVA L, et al. The Tim-3-galectin-9 pathway and its regulatory mechanisms in human breast cancer [J]. *Front Immunol*, 2019, 10(1): 1594.
- [20] PIAO Y, JIN X. Analysis of Tim-3 as a therapeutic target in prostate cancer [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(7): 1010428317716628.
- [21] LIU J F, WU L, YANG L L, et al. Blockade of TIM3 relieves immunosuppression through reducing regulatory T cells in head and neck cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 44.
- [22] GAO J, QIU X, LI X, et al. Expression profiles and clinical value of plasma exosomal Tim-3 and Galectin-9 in non-small cell lung cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 498(3): 409-15.
- [23] DU H, YI Z, WANG L, et al. The co-expression characteristics of LAG3 and PD-1 on the T cells of patients with breast cancer reveal a new therapeutic strategy [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 78: 106113.