

芒柄花素诱导肺癌细胞焦亡并抑制PD-L1介导的免疫逃逸

张振勇¹, 李肖¹, 李保宏¹, 邹艺璇¹, 刘君秋¹, 陈子超^{2*}, 张振^{1*}

1. 山东中医药大学 中医药创新研究院, 山东 济南 250355

2. 山东中医药大学 实验中心, 山东 济南 250355

摘要: 目的 探究芒柄花素抑制非小细胞肺癌 (NSCLC) A549细胞的作用机制。方法 MTT法、细胞划痕和克隆形成实验考察芒柄花素 (20~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对A549细胞增殖、迁移和克隆形成的抑制作用; A549细胞预孵育芒柄花素24 h后, 使用Hoechst 33342细胞核染色定位, 加入经过Dil标记的Jurkat细胞 (人T淋巴细胞白血病细胞) 共培养30 min, 使用激光共聚焦拍摄2种细胞的共定位图像; 建立A549-Jurkat细胞共培养模型, MTT和结晶紫染色法检测芒柄花素对A549细胞活性的影响; 试剂盒法检测A549细胞线粒体膜电位 (JC-1染色) 和谷胱甘肽 (GSH) 水平探究芒柄花素对线粒体应激的诱导作用; Western blotting法考察芒柄花素对A549细胞线粒体应激后非经典焦亡相关蛋白和PD-L1蛋白表达的影响。结果 与对照组比较, 芒柄花素显著抑制A549细胞的增殖、迁移和克隆形成能力 ($P<0.01, 0.001$), 增强细胞共培养模型中T细胞的募集和杀伤作用 ($P<0.01, 0.001$); 芒柄花素可诱导A549细胞线粒体应激, 诱导线粒体膜电位下降, 显著降低细胞GSH水平 ($P<0.05, 0.01$), 显著上调bcl-2相关x蛋白 (BAX)、裂解的半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved-Caspase-3)、穿孔素蛋白E (Gasdermin E) -N蛋白表达诱导细胞焦亡 ($P<0.01, 0.001$), 同时显著下调p-磷酸化磷脂酰肌醇3激酶 (p-PI3K)、蛋白激酶B (Akt)、核因子 κB (NF- κB)、细胞程序性死亡-配体1 (PD-L1) 蛋白表达抑制免疫逃逸 ($P<0.05, 0.001$)。结论 芒柄花素具有诱导NSCLC细胞焦亡并阻断免疫逃逸的作用, 其机制为一方面可通过诱导A549细胞线粒体应激, 促进细胞焦亡招募T细胞, 增强肿瘤免疫; 另一方面抑制p-PI3K/Akt/NF- κB 信号轴, 进而降低PD-L1蛋白表达, 抑制A549细胞免疫逃逸。

关键词: 芒柄花素; 非小细胞肺癌; 线粒体应激; 细胞焦亡; 细胞程序性死亡-配体1 (PD-L1); 免疫逃逸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 05-0971-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.05.007

Formononetin induces pyroptosis in lung cancer cells and inhibits PD-L1-mediated immune escape

ZHANG Zhenyong¹, LI Xiao¹, LI Baohong¹, ZOU Yixuan¹, LIU Junqiu¹, CHEN Zichao², ZHANG Zhen¹

1. Innovation Institute of Chinese Medicine and Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Experimental Center, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: Objectives To investigate the mechanism of inhibition of non-small cell lung cancer (NSCLC) A549 cells by formononetin (formononetin). **Methods** MTT assay, cell scratch and clone formation assays were performed to investigate the inhibitory ability of formononetin (20—100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on proliferation, migration and clone formation of A549 cells. A549 cells were pre-incubated with formononetin for 24 h, and then the nuclear staining was performed by Hoechst 33342, and Dil-labeled Jurkat cells (human T-lymphocyte leukemia cells) were added to co-culture for 30 min, and the co-localization images of the two cells were captured by laser confocal microscopy. Mitochondrial membrane potential (JC-1 staining) and glutathione (GSH) of A549 cells were detected by kit method to investigate the induction effect of onondine on mitochondrial stress. The effects of

收稿日期: 2024-01-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21775061); 泰山学者青年专家计划项目 (tsqn202211136); 济南市“新高校20条”资助项目 (202228085); 山东省高等学校青创人才引育计划项目 (2021505031); 山东中医药大学青年创新团队支持计划项目 (22202105)

第一作者: 张振勇, 硕士研究生, 研究方向为中药免疫研究与药物创新。E-mail: zzydo_not_loaf@126.com

*共同通信作者: 张振, 教授, 研究方向为中药免疫研究与药物创新。E-mail: zhangzhen19801981@126.com

陈子超, 副教授, 研究方向为中药药效物质基础与药物创新。E-mail: chenzichao11@126.com

formononetin on non-classical pyroptosis-associated proteins and PD-L1 proteins after mitochondrial stress in A549 cells were examined by Western blotting. **Results** Formononetin inhibited the proliferation, migration, and clone-forming ability of A549 cells ($P < 0.01, 0.001$), and enhanced the recruitment and killing of T cells in the cell co-culture model ($P < 0.01, 0.001$). Formononetin induced mitochondrial stress, induced a decrease in the mitochondrial membrane potential, lowered the level of cellular GSH ($P < 0.05, 0.01$), and up-regulated Bax, cleaved-Caspase-3 in A549 cells, Gasdermin E-N protein expression induced cellular pyroptosis ($P < 0.01, 0.001$), while down-regulating p-PI3K, Akt, NF- κ B, PD-L1 protein expression inhibited immune escape ($P < 0.05, 0.001$). **Conclusion** Formononetin has the effect of inducing focal death of NSCLC cells and blocking immune escape. The mechanism is that formononetin can enhance tumor immunity by inducing mitochondrial stress in A549 cells and promoting cellular pyroptosis to recruit T cells on the one hand; on the other hand, it inhibits the p-PI3K/Akt/NF- κ B signaling axis, which in turn reduces the expression of PD-L1 protein and inhibits immune escape from A549 cells.

Key words: formononetin; non-small cell lung cancer; mitochondrial stress; cellular pyroptosis; programmed cell death-ligand 1 (PD-L1); immune escape

肺癌是全球发病率最高及预后较差的恶性肿瘤之一^[1]。非小细胞肺癌(NSCLC)是肺癌的主要类型, 占所有肺癌的80%~85%, 大多数新诊断的NSCLC患者已经处于晚期, 预后极差, 转移后5年生存率不足6%^[2-3]。由于NSCLC通常表现出细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)^[4-5]、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)、蛋白激酶B(Akt)等蛋白的异常高表达^[6], 导致免疫疗法低反应性和耐药性。尽管最近有研究指出通过化疗药物诱导癌细胞焦亡可协助增强癌症免疫疗法^[7-8], 但由于NSCLC易发生免疫逃逸, 使该治疗策略的效果严重受限^[9]。相较于经典的免疫疗法和化学疗法, 中药活性分子生物活性范围大, 在癌症免疫疗法领域具有重要价值, 从中发掘新的抗癌先导化合物是开发抗肿瘤新药的重要途径^[10]。

芒柄花素广泛存在于黄芪、葛根、鸡血藤等中药中^[11-12], 具有抗癌、抗炎、免疫调节的作用^[13-14]。然而, 芒柄花素抑制肺癌细胞生长及免疫逃逸的机制尚不清楚。本研究首先通过构建A549-Jurkat细胞共培养模型, 在表型方面考察芒柄花素对NSCLC生长、转移和免疫逃逸的抑制作用; 在分子层面考察芒柄花素诱导A549细胞线粒体应激并导致细胞焦亡、降低PD-L1以抑制肺癌细胞免疫逃逸的作用机制。

1 材料

1.1 细胞

人非小细胞肺癌A549(目录号SCSP-503)及人T淋巴细胞瘤Jurkat(目录号SCSP-513)细胞株购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。A549和Jurkat细胞使用含10%胎牛血清(FBS)的RPMI-1640培养基在37℃、5% CO₂的细胞培养箱中培养。

1.2 药品与试剂

芒柄花素(批号PS0215-0020, 质量分数≥98%)

购自成都普思生物科技股份有限公司; 二甲基亚砜(DMSO, 批号ST038)、细胞膜红色荧光探针(Dil, 批号C1036)、噻唑蓝(MTT, 批号ST316)、Triton X-100 Solution(批号ST797)、RIPA强裂解液(批号P0013B)和Hoechst 33342染料(批号C1022)购自上海碧云天生物公司; 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液(5×)(批号SW116-02)购自北京赛文创新生物科技有限公司; 牛血清白蛋白(BSA, 批号S12012)和植物血凝素(PHA, 批号812317)购自上海源叶公司; 佛波12-肉豆蔻酸13-醋酸(PMA, 批号P849986)购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 磷酸化磷脂酰肌醇3-激酶(p-PI3K)多克隆抗体(批号A0265)、蛋白激酶B(Pan-Akt)多克隆抗体(批号A18675)、核因子 κ B p65(NF- κ B p65)多克隆抗体(批号AP0475)、HRP标记的山羊抗兔单克隆抗体(批号AS014)、钙网蛋白(CRT)多克隆抗体(批号A1066)购自武汉爱博泰克生物公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体(批号GB11002)、细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)单克隆抗体(批号GB12339)、高迁移率族蛋白B1(HMGB1)多克隆抗体(批号GB11103)购自武汉塞维尔生物科技有限公司; 穿孔素蛋白E(Gasdermin E)多克隆抗体(批号ab215191)购自英国Abcam公司; 半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)多克隆抗体(批号AF6311), 裂解的半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶-3(cleaved-Caspase-3)多克隆抗体(批号AF7022)、bcl-2相关x蛋白(BAX)多克隆抗体(批号AF0120)和红色荧光标记二抗(批号S0013)抗体购自澳大利亚Affinity Biosciences公司; 绿色荧光标记二抗(批号SA00013-2)和 β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体(批号PTG81115-1-RR)购自武汉三鹰生物技术有限公司。

司;FBS(批号 SA301.02.V)购自 Cellmax 北京澳美细胞技术有限公司;RPMI 1640 基础培养基(批号 PM150110)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;还原型谷胱甘肽(GSH)含量检测试剂盒(批号 BC1175)和线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1,批号 M8650)购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 主要仪器

ECO 超净工作台、BB150 型 CO₂ 细胞恒温培养箱、Multiskan SkyHigh 全波长酶标仪和微量紫外可见分光光度计 NanoDrop (美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Centrifuge 5425R 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司);PowerPac HC 蛋白质垂直电泳仪、ChemiDocXRS 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);奥林巴斯倒置显微镜(日本 Olympus 公司);蔡司 LSM880+Fast Airyscan 激光共聚焦显微镜(德国 Carl Zeiss AG 公司)。

2 方法

2.1 药物溶液的配制

芒柄花素、PMA 使用 DMSO 稀释,PHA 使用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释。将芒柄花素配制成浓度为 100 mmol·L⁻¹ 的母液,将 PMA 配制成 50 μg·mL⁻¹ 的母液,将 PHA 配制成 1 g·mL⁻¹ 的母液,使用时用培养基稀释到所需浓度。

2.2 MTT 法检测细胞存活率

A549 细胞接种于 96 孔板中(每孔 3×10³ 个),待细胞贴壁后分别更换为含 0(对照组)、20、40、60、80、100 μmol·L⁻¹ 芒柄花素的培养基,继续培养 24、48 h,设置 5 个复孔。培养结束后,每孔加入 10 μL 的 MTT(5 mg·mL⁻¹),避光培养 4 h 后弃上清,使用 DMSO 溶解,通过酶标仪测定各孔在 490 nm 波长处的吸光度(A)值,计算细胞存活率,使用 Graphpad Prism 9.5 软件绘制细胞存活率柱状图。

2.3 细胞克隆形成实验

A549 细胞接种于 6 孔板中(每孔 500 个),待细胞贴壁后,分别加入 0(对照组)、20、40、60、80、100 μmol·L⁻¹ 芒柄花素继续培养 14 d,期间每 3 天更换含药培养基。培养结束时,弃去培养基,4% 多聚甲醛固定后结晶紫染色,使用相机拍摄结晶紫染色结果,并对图像使用 Image J 计数细胞克隆形成数,计算克隆率,绘制柱状图。

克隆形成率 = 克隆形成数/接种细胞数(500)

2.4 细胞划痕愈合实验

A549 细胞接种于 6 孔板中(每孔 5×10⁴ 个),使用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基培养 12 h。至细

胞增殖到融合度达到 90% 时使用 200 μL 枪头划痕,用 PBS 清洗后替换成含 0(对照组)、20、40 μmol·L⁻¹ 芒柄花素的培养基,拍摄 0 h 的图像,培育 48 h 后去上清拍摄 48 h 的图像。获得的图像使用 Image J 进行划痕面积统计并计算划痕迁移率。

划痕迁移率 = (0 h 划痕面积 - 48 h 划痕面积)/0 h 划痕面积

2.5 荧光标记染色及共聚焦图像拍摄

将 A549 细胞按照每皿 5×10³ 个的数量接种于共聚焦培养皿,待细胞贴壁后,分别加入 0(对照组)、20、40、60、80、100 μmol·L⁻¹ 芒柄花素孵育 24 h。使用 Hoechst 33342 细胞核染色用以定位 A549 细胞,待孵育 30 min 后弃去上清并使用 PBS 清洗,之后更换新的培养基,将使用 Dil 标记的 Jurkat 细胞按照 1.5×10⁴ 个每皿的密度加入共聚焦培养皿,孵育 30 min 后弃去上清并替换新的培养基。将培养皿置于蔡司共聚焦显微镜下,使用 346 nm 和 549 nm 波长的激光进行观察并拍摄图像,对于获取的图像使用 Image J 进行 Merge 处理。

2.6 细胞共培养模型的构建及芒柄花素干预

在共培养前, Jurkat 细胞铺于 6 孔板(每孔 5×10⁴ 个),使用 1 mg·mL⁻¹ PHA 和 50 ng·mL⁻¹ PMA 激活 48 h。显微镜下观察到 Jurkat 细胞呈现聚团增殖并分化出更多触角时,离心收集细胞,将 A549 细胞与 Jurkat 细胞按照 1:0、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5 比例分别加入 6 孔板和 96 孔板中共同培养 24 h, PBS 清洗悬浮的 Jurkat 细胞, MTT(5 mg·mL⁻¹)法检测 A549 细胞存活率,筛选细胞最佳配比;共培养后给予 0(对照组)、20、40、60、80、100 μmol·L⁻¹ 的芒柄花素孵育 24 h,孵育完成后去掉上清, PBS 清洗悬浮的 Jurkat 细胞,用 MTT(5 mg·mL⁻¹)和结晶紫(5 mg·mL⁻¹)染色观察细胞存活状态,使用相机拍摄结晶紫染色结果,使用 Image J 和 Graphpad 对实验结果量化。

2.7 免疫荧光检测 A549 细胞 PD-L1、HMGB1、CRT 蛋白表达情况

将 A549 细胞接种于 6 孔板中(每孔 5×10⁴ 个),待细胞贴壁后分别更换为含 0(对照组)、20、40、60、80、100 μmol·L⁻¹ 芒柄花素的培养基,继续培养 48 h。培养结束后吸取上清并使用 PBS 清洗,使用 4% 多聚甲醛固定 10 min, 0.2% 的 Triton-X100 试剂透化 10 min, 5% BSA 封闭 30 min, 分别加入 PD-L1、HMGB1、CRT 一抗, 4℃ 孵育 12 h, 一抗孵育结束后,对 PD-L1 和 CRT 使用绿色荧光二抗进

行标记,对HMGB1使用红色荧光二抗标记,室温孵育1 h,二抗孵育结束后加入Hoechst 33342于35 °C孵育30 min。孵育结束后置于荧光显微镜下进行观察。

2.8 GSH水平检测

将A549细胞接种于6孔板中(每孔 5×10^4 个),待细胞贴壁后,加入0(对照组)、20、40、60、80、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 芒柄花素继续培养48 h。培养结束后用细胞刮刀取下细胞,取下的细胞混悬液经过PBS洗涤和离心收集。加入蛋白去除试剂并混悬,离心取上清。取得的上清和配制的标准品在酶标仪测定25 °C下各孔412 nm波长处的 A 值,利用标准品的 A 值绘制标准曲线,并根据标准曲线计算各样本的GSH水平。

2.9 线粒体膜电位变化检测

将A549细胞接种于6孔板中(每孔 5×10^4 个),细胞贴壁后,分别加入0(对照组)、20、40、60、80、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 芒柄花素继续培养48 h。配制JC-1工作液,加入JC-1工作液后在倒置荧光显微镜下进行观察和图像拍摄。对于拍摄到的图像使用Image J进行荧光强度统计和多通道Merge处理,并计算相对荧光强度。

相对荧光强度=JC-1单独彩色通道的平均荧光强度/Merge图的平均荧光强度

2.10 Western blotting法检测相关蛋白表达

将A549细胞接种于6孔板中(每孔 5×10^4 个),细胞贴壁后,分别加入0(对照组)、20、40、60、80、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 芒柄花素继续培养48 h。使用RIPA裂

解液提取各组细胞总蛋白,NanoDrop测定蛋白质量浓度,加入上样缓冲液,100 °C环境下变性5 min。蛋白样品分别经10%、12%、6%的SDS-PAGE电泳,转至PVDF膜,5%脱脂牛奶封闭3 h,分别加入Bax、Caspase-3、cleaved-Caspase-3、Gasdermin E、Gasdermin E-N、p-PI3K、Pan-Akt、NF- κ B、PD-L1、 β -actin、GAPDH抗体(1:1 000稀释),4 °C孵育过夜。TBST清洗后,加入HRP标记的山羊抗兔IgG抗体,室温孵育2 h,滴加ECL显影液进行蛋白印迹成像,利用Image J软件进行蛋白条带灰度分析。

2.11 数据处理

使用Graphpad prism 9.5对数据进行处理和绘图,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个不同给药组之间的量化结果使用单因素方差分析,对于两组间的数据对比使用 t 检验。

3 结果

3.1 芒柄花素抑制A549细胞增殖及克隆形成

如图1所示,与对照组比较,芒柄花素作用24、48 h后,A549细胞存活率呈浓度相关性下降($P < 0.01$ 、 0.001),24 h IC_{50} 为66.77 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,48 h IC_{50} 为59.04 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

克隆形成实验结果显示,在加药孵育14 d后,对照组形成较密集的细胞群落,而给药处理后的各组形成的群落数量减少,群落形态不规则,尺寸较小,40、60、80、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 芒柄花素可显著抑制细胞克隆形成($P < 0.01$ 、 0.001)。

结果表明,芒柄花素可以抑制A549细胞生长增殖,并且呈现浓度相关性。

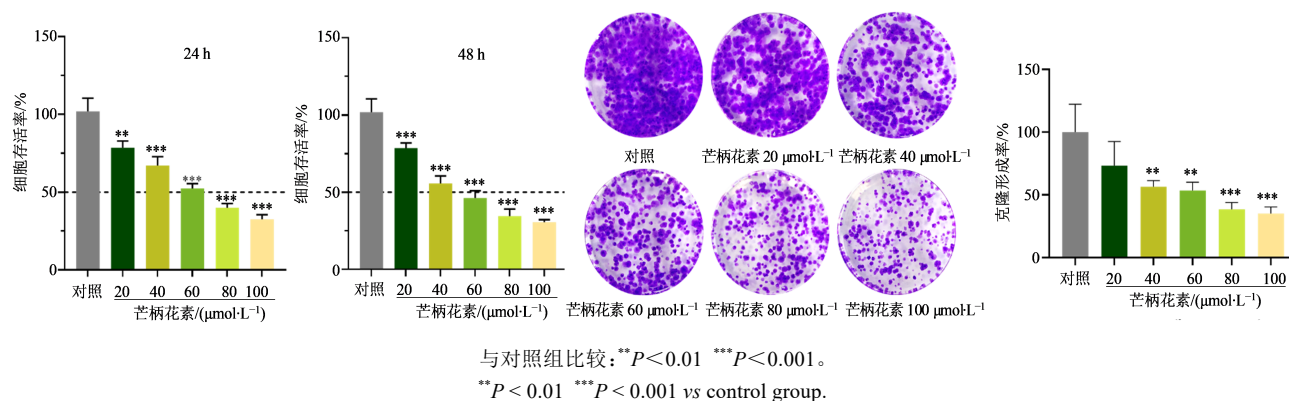


图1 芒柄花素抑制A549细胞药效评价($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 1 Evaluation of pharmacological effect of formononetin on inhibiting A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

3.2 芒柄花素抑制A549细胞迁移

为排除细胞毒性的直接杀伤作用,选取较低剂量的芒柄花素作用48 h。图2结果显示,相比于对

照组,20、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 芒柄花素处理后,肿瘤细胞的划痕愈合速度减缓,细胞间隙较大,细胞迁移率显著降低($P < 0.001$)。

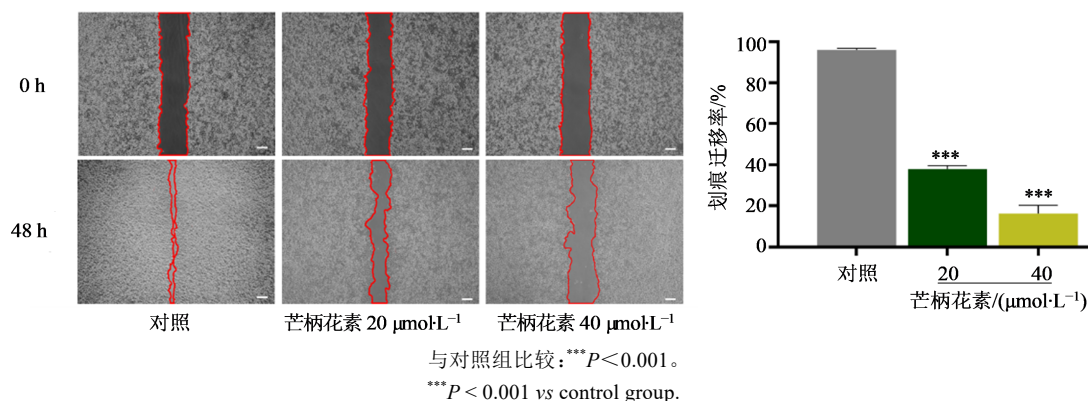


图 2 细胞划痕愈合实验验证芒柄花素抑制 A549 细胞迁移 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 2 Cell scratch healing assay verified that formononetin inhibited A549 cell migration ($\bar{x} \pm s, n=5$)

3.3 芒柄花素增强共培养中 T 细胞对癌细胞的杀伤作用

3.3.1 Jurkat 细胞与 A549 细胞共聚焦图像 使用 Dil 标记的 Jurkat 细胞与药物预处理后的 A549 细胞共培养。为排除细胞毒性的变量干扰,分别给予不同浓度的芒柄花素作用 24 h 后,加入经过 Dil 标记的 Jurkat 细胞共培养 30 min,使用激光共聚焦拍摄 2 种细胞的共定位图像。与对照组相比,芒柄花素作用后 A549 细胞募集了更多的 Jurkat 细胞,并与 Jurkat 细胞发生膜互作从而表现出更好的共定位效果,且呈浓度相关性(图 3)。

3.3.2 芒柄花素增强共培养中 T 细胞对癌细胞的杀伤作用 在 A549 细胞-Jurkat 细胞(1:3)的比例下,可见 A549 细胞明显的增殖抑制($P < 0.001$,图 4-A),并且和 1:4、1:5 组之间相比无显著性差异,且需要更少的 T 细胞即可达到相同的肿瘤杀伤作用。

因此,选择 1:3 细胞比例的条件,考察共培养模型中芒柄花素对 A549 细胞存活的抑制作用。结果显示,共培养条件下,与对照组比较,芒柄花素可显著抑制 A549 细胞的活性($P < 0.01, 0.001$),且具有浓度相关性,在 $60.34 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (IC_{50}) 就可以达到较好的抗肿瘤效果(图 4-C)。为了进一步探究 T 细胞是否会对芒柄花素的药效作用产生影响,通过结晶紫实验对比了有 T 细胞组和无 T 细胞组芒柄花素对 A549 的杀伤效果。结果显示,共培养条件下各浓度芒柄花素对 A549 活性的抑制效果较 A549 组显著增强($P < 0.01$)(图 4-B、D)。

3.3.3 芒柄花素对 A549 膜表面的 PD-L1 荧光信号强度的影响 根据文献报道^[15],T 细胞表面的 PD-1 可与癌细胞的 PD-L1 蛋白结合,导致癌细胞的免疫逃逸。由图 5 可知,经过芒柄花素作用后的 A549 膜表面的 PD-L1 荧光信号减弱,说明 A549 细胞膜上

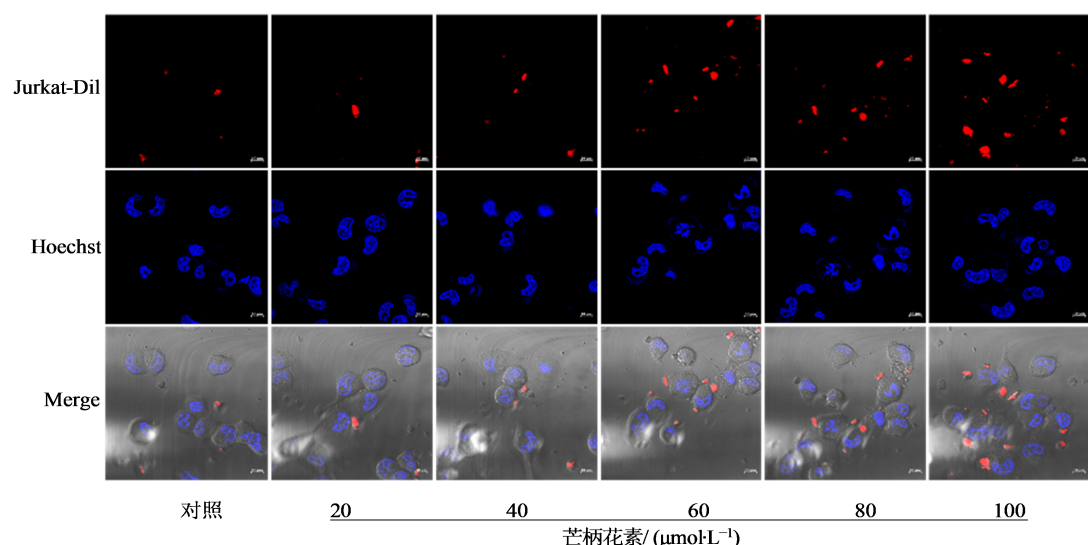


图 3 Jurkat 细胞与 A549 细胞共聚焦图像($\times 63$, 标尺 10 μm)

Fig. 3 Co-localization images of Jurkat cells with A549 cells ($\times 63$, scale bar is 10 μm)

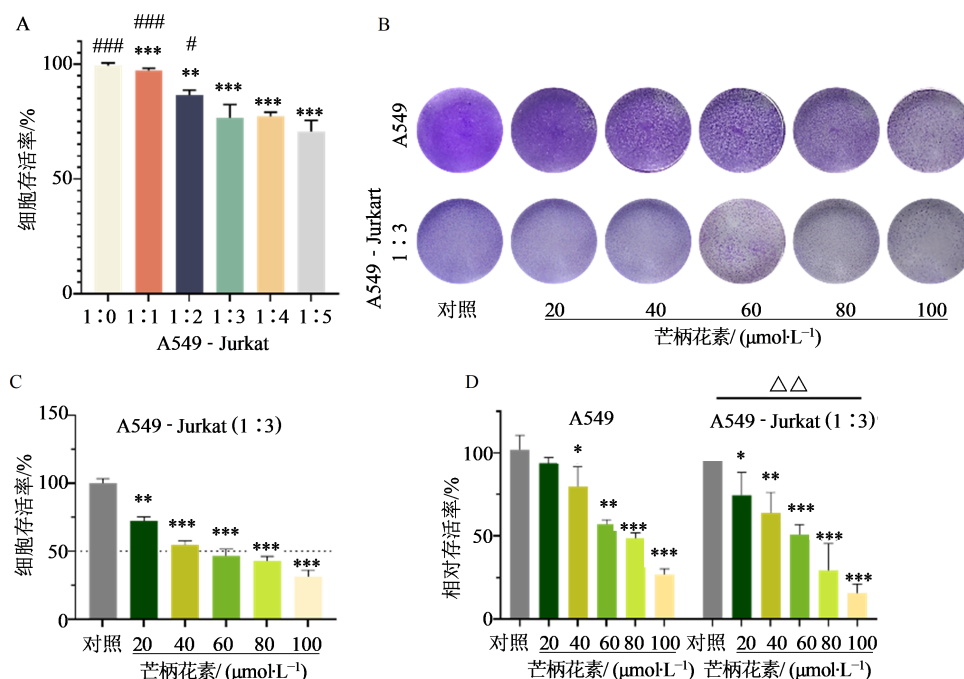


图 4 共培养体系中 Jurkat 细胞与 A549 细胞共聚焦图像及芒柄花素的干预效果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Co-localization images of Jurkat cells with A549 cells in co-culture system and effect of formononetin intervention ($\bar{x} \pm s, n=3$)

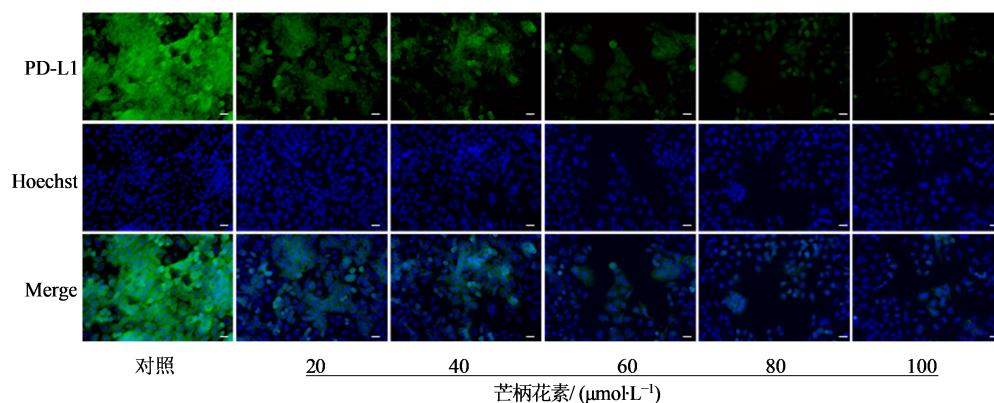


图 5 A549 细胞的 PD-L1 免疫荧光图像 ($\times 40$, 标尺 5 μm)

Fig. 5 PD-L1 immunofluorescence image of A549 cells ($\times 40$, scale bar is 5 μm)

PD-L1 水平下降。结果表明,芒柄花素可通过降低 PD-L1 蛋白表达抑制 A549 免疫逃逸以增强 Jurkat 细胞对 A549 细胞的攻击,该效果具有一定的浓度相关性。

3.4 芒柄花素诱导 A549 细胞线粒体应激并诱导焦亡

细胞内的 GSH 水平和线粒体膜电位变化可反

映线粒体应激状态。随着芒柄花素浓度的不断升高,芒柄花素 $> 40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时可显著降低 A549 细胞 GSH 水平 ($P < 0.05$) (图 6-A),线粒体膜电位出现明显变化,JC-1 聚合物(红色荧光)解聚形成单体(绿色荧光) (图 6-C),膜电位变化呈现浓度相关性(图 6-B)。根据文献报道^[16],细胞发生焦亡时会引发细胞膨胀破裂,并上调胞质内 CRT、下调核内 HMGB1

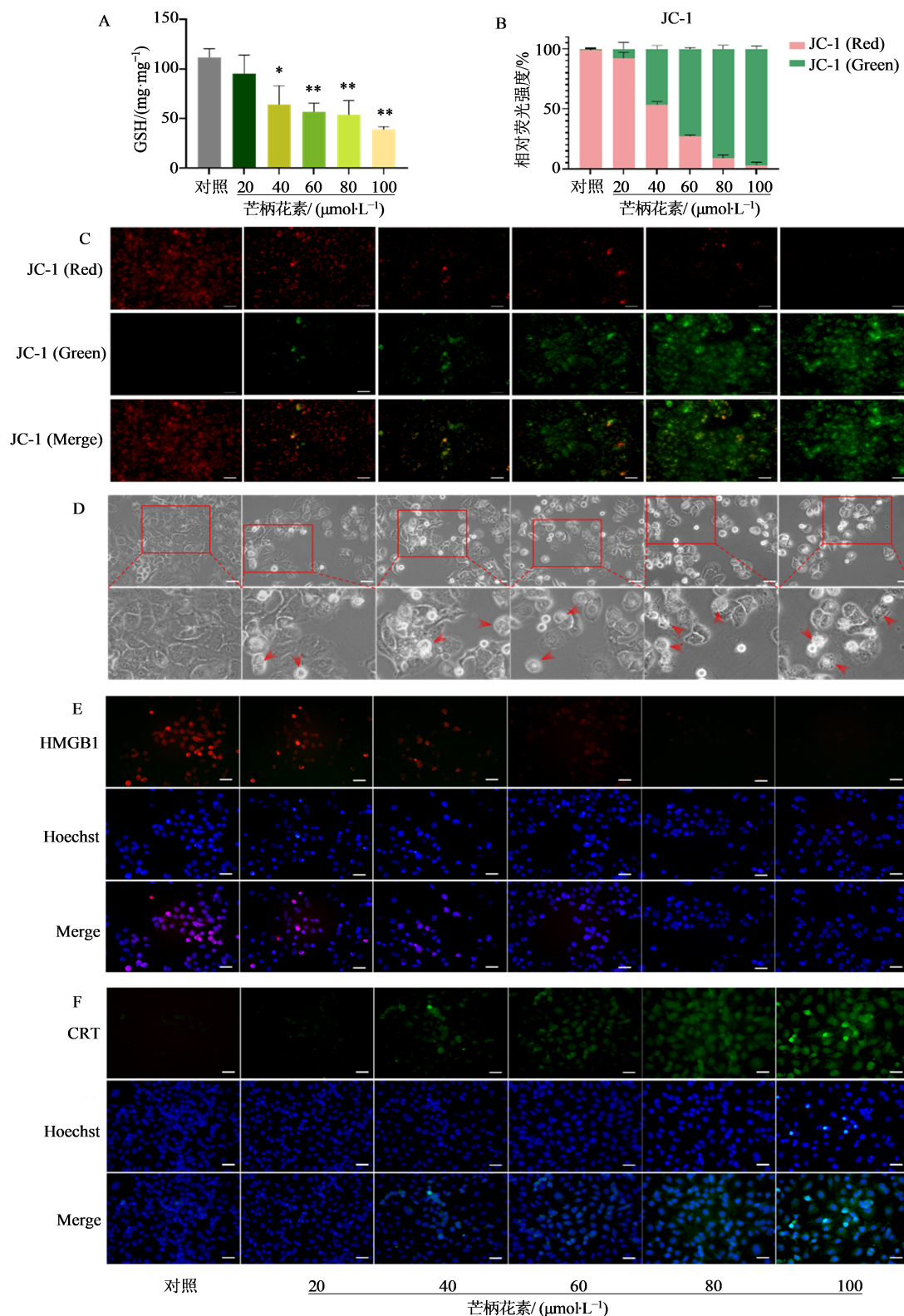


图 6 芒柄花素对 A549 细胞内 GSH 水平、线粒体膜电位、焦亡形态和 HMGB1、CRT 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

A-intracellular GSH content assay; B, C-fluorescence image of a mitochondrial membrane potential probe and quantification results ($\times 10$, Scale bar is 10 μm); D-optical images of cellular pyroptosis morphology of A549 cells ($\times 10$, Scale bar is 10 μm); E, F-HMGB1 and CRT immunofluorescence images ($\times 10$, scale was 10 μm); * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group.

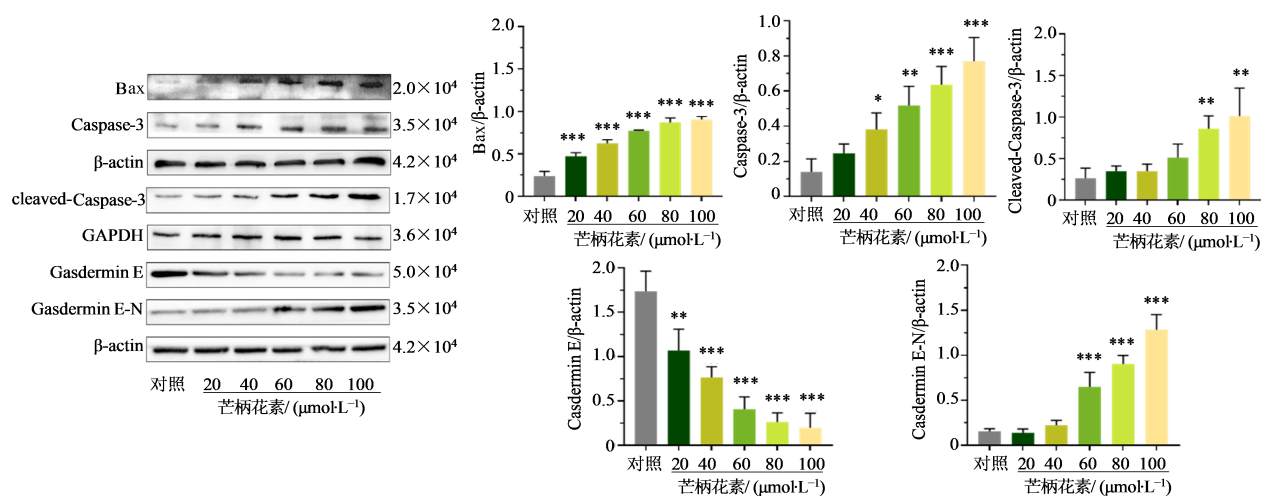
图 6 芒柄花素对 A549 细胞内 GSH 水平、线粒体膜电位、焦亡形态和 HMGB1、CRT 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

蛋白。与对照组相比,芒柄花素给药组可观察到细胞漂浮圆胀,并伴有膜破裂和泡状分泌物(图6-D);免疫荧光结果显示,芒柄花素作用后,A549细胞内CRT(绿色荧光)表达量增加,且核内HMGB1蛋白(红色荧光)表达量减少,这些变化表明芒柄花素干预下A549细胞发生了细胞焦亡(图6-E、F)。

3.5 芒柄花素可通过上调 Bax/Caspase-3/Gasdermin E 通路诱导 A549 细胞焦亡

细胞内线粒体损伤后将引发 Bax 蛋白上调,继而触发 cleaved-Caspase-3/Caspase-3 蛋白上调,cleaved-Caspase-3 蛋白可剪切 Gasdermin E 蛋白并暴露其 N 端,Gasdermin E-N 蛋白的上调是引发细胞

膜穿孔和细胞焦亡的重要指标^[17]。因此,本研究在蛋白层面对线粒体应激及细胞焦亡进行验证。各组蛋白表达量化结果的分析表明,与对照组比较,芒柄花素 $>20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时可显著上调 A549 细胞内 Bax 蛋白表达 ($P < 0.001$),芒柄花素 $>40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时显著上调 Caspase-3 蛋白表达 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$),芒柄花素 $>80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时显著上调 cleaved-Caspase-3 蛋白表达 ($P < 0.01$), $60 \sim 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的芒柄花素可显著引起 Gasdermin E 蛋白剪切并激活 Gasdermin E-N 蛋白 ($P < 0.001$),从而引发 Gasdermin E 蛋白下调 ($P < 0.001$) 和 Gasdermin E-N 蛋白的上调。结果见图 7。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图7 Western blotting 表征芒柄花素对 A549 细胞中相关蛋白表达影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Western blotting characterization of effect of formononetin on expression of related proteins in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.6 芒柄花素通过 p-PI3K/Akt/NF- κ B 通路降低 A549 细胞的 PD-L1 表达

PD-L1 蛋白表达受多种机制调控,其中 Bax 蛋白升高会引起 PI3K 蛋白升高^[18],p-PI3K 蛋白可通过上调其下游 Akt/NF- κ B 蛋白表达,进而上调 PD-L1 蛋白表达^[19]。Western blotting 结果显示,与对照组比较,芒柄花素 $>80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 显著降低 p-PI3K 蛋白表达 ($P < 0.05$),芒柄花素 $>20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 可显著下调 Pan-Akt 蛋白表达 ($P < 0.01, 0.001$),芒柄花素 $>60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 显著降低 NF- κ B p65 蛋白表达水平 ($P < 0.05, 0.001$),芒柄花素 $>40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 可显著降低 PD-L1 蛋白的表达水平 ($P < 0.001$)。结果见图 8。

4 讨论

本研究首先考察了芒柄花素具有抑制 NSCLC 细胞系 A549 细胞增殖、迁移和克隆形成的药效作

用,并通过细胞共培养模型发现芒柄花素可促进 T 细胞抗肿瘤免疫。如图 9 所示,通过机制研究发现,芒柄花素可诱导 A549 细胞线粒体应激,一方面导致 Bax/cleaved-Caspase-3/Gasdermin E-N 蛋白高表达促进细胞焦亡,招募 T 细胞;另一方面抑制 p-PI3K/Akt/NF- κ B 降低 PD-L1 蛋白表达,抑制 A549 细胞免疫逃逸,二者机制协同,促进抗肿瘤免疫,抑制 NSCLC。

细胞焦亡是一种具免疫原性的死亡形式,其引发机制涉及线粒体应激。在癌细胞发生焦亡的过程中,释放的免疫原性物质能够引发肿瘤环境中多项炎症指标变化,同时招募免疫细胞,从而促进抗肿瘤免疫反应。线粒体膜电位变化可视为线粒体应激指标,细胞线粒体应激后,胞内 Bax 水平上升,随后触发 Caspase-3 和 cleaved-Caspase-3 上调。研

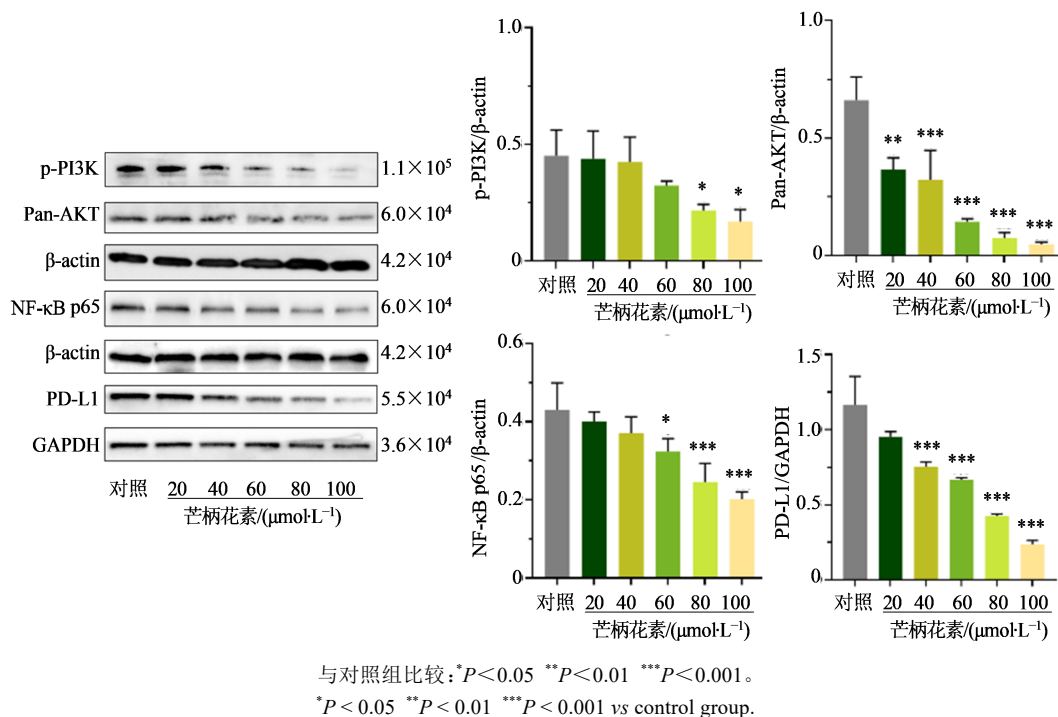


图8 芒柄花素通过抑制p-PI3K/Akt/NF-κB通路降低A549细胞的PD-L1蛋白表达($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Formononetin reduced PD-L1 expression in A549 cell by inhibiting p-PI3K/Akt/NF-κB pathway ($\bar{x} \pm s, n=3$)

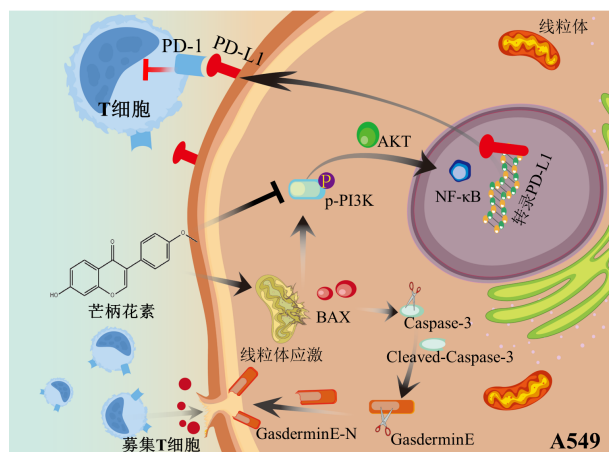


图9 芒柄花素诱导A549细胞焦亡并降低PD-L1表达

Fig. 9 Formononetin induced cellular pyroptosis and decreased PD-L1 expression in A549 cells

究表明,上调的cleaved-Caspase-3还可通过对Gasdermin E剪切使Gasdermin E-N端暴露,从而引发膜穿孔焦亡过程^[20]。尽管有研究揭示了芒柄花素对A549细胞中Bax和Caspase-3蛋白的上调作用,但对其激活产物cleaved-Caspase-3蛋白所引起的级联反应并未进行深入探讨^[21]。本研究实验结果证实,芒柄花素能够通过诱导A549细胞线粒体应激,通过Bax/cleaved-Caspase-3/Gasdermin E-N通路导致A549细胞焦亡并招募T细胞。

NSCLC高死亡率和预后差与PD-L1过表达高度相关。PD-L1可通过与毒性T细胞表面的PD-1结合抑制T细胞活性,这是NSCLC免疫逃逸的重要原因^[22];临床调查显示,仅有部分联合PD-L1单抗用药的NSCLC患者的术后生存期得到了显著延长^[23]。研究发现,胞内线粒体应激升高的BAX蛋白水平可促使PI3K蛋白升高,并通过其磷酸化形式p-PI3K调控其下游Akt、NF-κB等蛋白,促进细胞增殖并诱导PD-L1升高。因此,如何实现同时调控p-PI3K和Bax将成为开发NSCLC药物的关键^[24]。本研究发现,在诱导癌细胞线粒体应激的同时,芒柄花素还可以通过下调p-PI3K/Akt/NF-κB降低PD-L1表达。芒柄花素在达到一定剂量时会触发细胞焦亡并下调PD-L1,本研究推断在药物作用期间存在代偿作用促进这2种机制的同步发生,对此仍需进行深入研究。

芒柄花素是一种可以抑制NSCLC细胞生长、转移和免疫逃逸的中药活性单体。药效作用机制是通过诱导肿瘤细胞线粒体应激,激活非经典通路Caspase-3/Gasdermin E诱导细胞焦亡以招募T细胞,并抑制p-PI3K/Akt/NF-κB轴,降低PD-L1蛋白表达,协同促进抗肿瘤免疫。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Wagle N S, et al. Cancer statistics, 2023 [J]. CA: A Can J Clinic, 2023, 73(1): 17-48.
- [2] Duma N, Santana-Davila R, Molina J R. Non-small cell lung cancer: Epidemiology, screening, diagnosis, and treatment [J]. Mayo Clin Proc, 2019, 94(8): 1623-1640.
- [3] Cao W, Chen H D, Yu Y W, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: A secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. Chin Med J, 2021, 134(7): 783-791.
- [4] Aguiar P N, De Mello R A, Hall P, et al. Aguiar P N Jr, de Mello R A, Hall P, et al. PD-L1 expression as a predictive biomarker in advanced non-small-cell lung cancer: Updated survival data [J]. Immunotherapy, 2017, 9(6): 499-506.
- [5] Patil N S, Nabet B Y, Müller S, et al. Intratumoral plasma cells predict outcomes to PD-L1 blockade in non-small cell lung cancer [J]. Cancer Cell, 2022, 40(3): 289-300.e4.
- [6] Jin Y, Chen Y M, Tang H R, et al. Activation of PI3K/Akt pathway is a potential mechanism of treatment resistance in small cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2022, 28(3): 526-539.
- [7] Zhang Z B, Zhang Y, Xia S Y, et al. Gasdermin E suppresses tumour growth by activating anti-tumour immunity [J]. Nature, 2020, 579(7799): 415-420.
- [8] Xuzhang W D, Lu T T, Jin W Q, et al. Cisplatin-induced pyroptosis enhances the efficacy of PD-L1 inhibitor in small-cell lung cancer via GSDME/IL12/CD4Tem axis [J]. Int J Biol Sci, 2024, 20(2): 537-553.
- [9] Hong W J, Xue M, Jiang J, et al. Circular RNA circ-CPA4/let-7 miRNA/PD-L1 axis regulates cell growth, stemness, drug resistance and immune evasion in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1): 149.
- [10] Ren J L, Yang L, Qiu S, et al. Efficacy evaluation, active ingredients, and multitarget exploration of herbal medicine [J]. Trends Endocrinol Metab, 2023, 34(3): 146-157.
- [11] 廖佳伟, 金晨, 陈志, 等. 鸡血藤化学成分、药理作用研究进展及其质量标志物(Q-Marker)预测 [J]. 中草药, 2023, 54(20): 6866-6877.
- Liao J W, Jin C, Chen Z, et al. Research progress on chemical composition and pharmacological effect of *Spatholobi Caulis* and prediction of its quality markers [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(20): 6866-6877.
- [12] 王单单, 宁萌, 吴作敏, 等. 多指标综合评分法结合正交实验优选黄芪-葛根药对提取工艺 [J]. 中国药房, 2023, 34(1): 57-61.
- Wang D D, Ning M, Wu Z M, et al. Optimization of extraction technology for couplet medicinals of *Astragalus membranaceus-Puerariae Lobata* by multi-index comprehensive scoring method combined with orthogonal experiment [J]. China Pharm, 2023, 34(1): 57-61.
- [13] Fu H P, Li M D, Huan Y Q, et al. Formononetin inhibits microglial inflammatory response and contributes to spinal cord injury repair by targeting the EGFR/MAPK pathway [J]. Immunol Invest, 2023, 52(4): 399-414.
- [14] 张彦平, 邓康, 贾宁, 等. 芒柄花素对免疫抑制小鼠免疫功能影响的研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(3): 922-930.
- Zhang Y P, Deng K, Jia N, et al. The effect of formononetin on the immune function in immunosuppressed mice [J]. China Anim Husb Vet Med, 2020, 47(3): 922-930.
- [15] Dammeijer F, van Gulijk M, Mulder E E, et al. The PD-1/PD-L1-checkpoint restrains T cell immunity in tumor-draining lymph nodes [J]. Cancer Cell, 2020, 38(5): 685-700.e8.
- [16] Qin W J, Qiao L, Wang Q, et al. Advancing precision: A controllable self-synergistic nanoplatfrom initiating pyroptosis-based immunogenic cell death cascade for targeted tumor therapy [J]. ACS Nano, 2024, 18(2): 1582-1598.
- [17] Wang Y P, Gao W Q, Shi X Y, et al. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin [J]. Nature, 2017, 547(7661): 99-103.
- [18] Li Y S, Xia J W, Jiang N X, et al. Corin protects H₂O₂-induced apoptosis through PI3K/AKT and NF- κ B pathway in cardiomyocytes [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 97: 594-599.
- [19] Quan Z H, Yang Y, Zheng H M, et al. Clinical implications of the interaction between PD-1/PD-L1 and PI3K/AKT/mTOR pathway in progression and treatment of non-small cell lung cancer [J]. J Cancer, 2022, 13(13): 3434-3443.
- [20] Hu Z X, Lai Y J, Ma C Y, et al. Cordyceps militaris extract induces apoptosis and pyroptosis via caspase-3/PARP/GSDME pathways in A549 cell line [J]. Food Sci Nutr, 2021, 10(1): 21-38.
- [21] 张珊珊, 刘嗣同, 石洪爽, 等. 刺芒柄花素通过 FAK/AKT/Bcl-2 通路促进外阴鳞癌 SW962 细胞凋亡 [J]. 解剖科学进展, 2021, 27(6): 653-656.

- Zhang S S, Liu S T, Shi H S, et al. Formononetin promotes apoptosis in vulvar squamous cell carcinoma SW962 cells through the FAK/AKT/Bcl-2 pathway [J]. *Prog Anat Sci*, 2021, 27(6): 653-656.
- [22] Liu Z C, Wang T T, She Y L, et al. N6-methyladenosine-modified circIGF2BP3 inhibits CD8⁺ T-cell responses to facilitate tumor immune evasion by promoting the deubiquitination of PD-L1 in non-small cell lung cancer [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 105.
- [23] Provencio M, Serna-Blasco R, Nadal E, et al. Overall survival and biomarker analysis of neoadjuvant nivolumab plus chemotherapy in operable stage IIIA non-small-cell lung cancer (NADIM phase II trial) [J]. *J Clin Oncol*, 2022, 40(25): 2924-2933.
- [24] Rahmani M, Nkwocha J, Hawkins E, et al. Cotargeting BCL-2 and PI3K induces BAX-dependent mitochondrial apoptosis in AML cells [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(11): 3075-3086.

【责任编辑 兰新新】