

重楼皂苷VII对胰腺癌 PANC-1 细胞增殖、迁移与侵袭作用及机制研究

何昊¹, 刘杨², 钱小英¹, 靳曼菲¹, 郑蕾^{1*}, 成昭¹

1. 西安医学院药学院, 陕西 西安 710021

2. 空军军医大学药理学系, 陕西 西安 710032

摘要: 目的 研究重楼皂苷VII对人胰腺癌 PANC-1 细胞增殖、迁移与侵袭作用及机制。方法 采用 MTT 法检测重楼皂苷VII对 PANC-1 细胞存活率的影响; 观察重楼皂苷VII对 PANC-1 细胞形态的影响; 采用划痕实验和 Transwell 小室法考察重楼皂苷VII对 PANC-1 细胞迁移和侵袭能力的影响; 采用流式细胞术检测重楼皂苷VII对 PANC-1 细胞凋亡的影响; 采用 Western blotting 法检测重楼皂苷VII对 PANC-1 细胞半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3)、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-associated X protein, Bax)、聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (poly ADP-ribose polymerase, PARP)、DNA 酶抑制物 (inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease, ICAD) 和程序性死亡分子配体-1 (programmed death ligand 1, PD-L1) 蛋白表达的影响。结果 重楼皂苷VII可抑制 PANC-1 细胞存活率, 显著抑制 PANC-1 细胞迁移和侵袭能力 ($P < 0.01$), 显著诱导 PANC-1 细胞凋亡 ($P < 0.05, 0.01$), 显著升高 PANC-1 细胞中凋亡相关蛋白 Cleaved Caspase-3、PARP、Bax 表达水平 ($P < 0.01$), 显著降低 pro-PARP、ICAD、Bcl-2、PD-L1 蛋白表达水平 ($P < 0.05, 0.01$)。结论 重楼皂苷VII能够抑制 PANC-1 细胞增殖、迁移和侵袭, 并可能通过下调 PD-L1 表达诱导 PANC-1 细胞凋亡。

关键词: 重楼皂苷VII; 胰腺癌 PANC-1 细胞; 增殖; 凋亡; 程序性死亡分子配体-1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)07-1981-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.07.015

Effect and mechanism of polyphyllin VII on proliferation, migration and invasion of pancreatic cancer PANC-1 cells

HE Hao¹, LIU Yang², QIAN Xiao-ying¹, JIN Man-fei¹, ZHENG Lei¹, CHENG Zhao¹

1. School of Pharmacy, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China

2. School of Pharmacy, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of polyphyllin VII on proliferation, migration and invasion of human pancreatic cancer PANC-1 cells. **Methods** MTT assay was used to detect the effect of polyphyllin VII on viability of PANC-1 cells. Effect of polyphyllin VII on morphology of PANC-1 cells was observed. Effect of polyphyllin VII on cell migration and invasion were detected by wound scratch assay and Transwell chamber. Effect of polyphyllin VII on apoptosis was detected by flow cytometry. Western blotting was used to detect the effect of polyphyllin VII on expressions of cysteine protease-3 (Caspase-3), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-associated X protein (Bax), poly ADP-ribose polymerase (PARP), inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease (ICAD), and programmed death ligand 1 (PD-L1) in PANC-1 cells. **Results** Survival rate of PANC-1 cells was inhibited, migration and invasion of PANC-1 cells were significantly inhibited ($P < 0.01$), cell apoptosis was significantly induced ($P < 0.05, 0.01$), expressions of apoptosis-related proteins Cleaved Caspase-3, PARP, Bax were significantly increased ($P < 0.01$), and expressions of pro-PARP, ICAD, Bcl-2, and PD-L1 were significantly reduced by polyphyllin VII ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Polyphyllin VII can inhibit proliferation, migration and invasion of PANC-1 cells, and may induce PANC-1 cell apoptosis by down-regulating PD-L1 expression.

Key words: polyphyllin VII; PANC-1 cells; proliferation; apoptosis; programmed death ligand 1

收稿日期: 2020-11-10

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (81603265); 陕西省创新人才推进计划-青年科技新星项目 (2019KJXX-057); 陕西省高校青年杰出人才支持计划 (05041904); 陕西省科技厅面上项目 (2021JM-489); 国家级大学生创新训练项目 (201911840017)

作者简介: 何昊 (1985—), 副教授, 博士, 从事中药抗肿瘤及免疫研究。Tel: (029)86177545 E-mail: hehao313@163.com

*通信作者: 郑蕾, 副教授, 博士。Tel: (029)86177548 E-mail: zhengleixa@163.com

胰腺癌发病率位居肿瘤第10位,死亡率位居第4位,患者的5年生存率仅有9%^[1]。2017年我国新增约8.36万胰腺癌新发病例和8.51万死亡病例^[2]。胰腺癌恶性程度高、侵袭转移能力强,且由于胰腺的解剖位置较深,早期临床症状隐匿不易诊断,超过85%患者初次诊断时癌细胞已经出现局部浸润或转移,预后效果不佳^[3]。手术结合化疗是目前胰腺癌临床治疗的主要手段,但由于胰腺癌细胞的特性,传统化疗药物极易出现耐药性,因此,抗胰腺癌的新药开发迫在眉睫。中药及其活性成分具有良好的抗肿瘤作用。重楼为百合科植物云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand-Mazz. 或七叶一枝花 *P. polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara 的干燥根茎,主要分布于云南、四川、陕西等地,性微寒、味苦^[4]。七叶一枝花为秦巴山区特色太白七药之一,为清热解毒类中药,用于治疗痈疮、咽喉肿痛、毒蛇咬伤等。现代药理学研究表明,甾体皂苷为重楼中发挥主要药效作用的成分,其苷元主要为薯蓣皂苷元和偏诺皂苷元2类,重楼皂苷VII为具有偏诺皂苷元的皂苷类化合物,具有良好的抗肿瘤活性^[5-6]。本研究考察了重楼皂苷VII对人胰腺癌 PANC-1 细胞增殖、迁移及侵袭的影响,为重楼皂苷用于抗肿瘤治疗提供基础。

1 材料

1.1 细胞

PANC-1 细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.2 药品与试剂

重楼皂苷 VII (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 76296-75-8) 购自成都普菲德生物技术有限公司; DMEM 高糖培养基、胎牛血清、青链霉素混合液购自美国 HyClone 公司; 四甲基偶氮唑蓝噻唑蓝 (MTT)、二甲基亚砷 (DMSO) 购自美国 Sigma 公司; Hoechst 33258 染料购自美国 MedChemExpress 公司; Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司; Transwell 小室购自美国 Corning 公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (批号 20180406) 购自上海七海复泰生物科技有限公司; RIPA 细胞裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒购自陕西先锋生物科技有限公司; 程序性死亡分子配体-1 (programmed death ligand 1, PD-L1) 蛋白抗体 (批号 00071664)、半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 抗体 (批号 00027610)、聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (poly ADP-ribose polymerase,

PARP) 抗体 (批号 00022011)、DNA 酶抑制物 (inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease, ICAD) 抗体 (批号 00021351)、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体 (批号 00045121)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-associated X protein, Bax) 抗体 (批号 00039510)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 10004129) 购自美国 Proteintech 公司; 羊抗鼠二抗 (批号 115-035-003) 购自美国 Jackson ImmunoResearch Laboratories。

1.3 仪器

3111 型 CO₂ 培养箱、Multiskan GO 自动全波长酶标仪、MicroPure 超纯水机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); IX73 倒置荧光显微镜 (日本 Nikon 公司); CJ-2S104 超净工作台 (天津泰斯特仪器有限公司); AX224ZH 分析电子天平 (美国 OHAUS 公司); Accuri C6 流式细胞仪 (美国 BD 公司); ChemiDoc XRS⁺ 化学发光成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

PANC-1 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 高糖培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

2.2 重楼皂苷VII母液的配制

重楼皂苷VII溶于 DMSO 配制成 100 mmol/L 母液, 分装保存于 -20 °C 冰箱。临用时用 DMEM 高糖培养基稀释至不同浓度。

2.3 重楼皂苷VII对 PANC-1 细胞存活率的影响

取处于对数生长期的 PANC-1 细胞, 0.25% 胰蛋白酶消化, 用 DMEM 高糖培养基重悬, 以 1×10^5 /mL 接种于 96 孔板中, 100 μ L/孔, 于培养箱中培养 24 h。设置对照组及重楼皂苷VII (0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00、16.00 μ mol/L) 组, 弃去培养基, 给药组分别加入 100 μ L 不同浓度的重楼皂苷VII溶液, 对照组加入不含药物的培养基, 培养 24 h 后, 弃去培养基, PBS 缓冲液洗涤 2 次, 每孔加入 100 μ L MTT 溶液 (0.5 mg/mL), 于 37 °C 孵育 4 h, 弃去上清液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 采用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度 (A), 计算细胞存活率。

2.4 重楼皂苷VII对 PANC-1 细胞形态的影响

取处于对数生长期的 PANC-1 细胞, 0.25% 胰蛋白酶消化, 用 DMEM 高糖培养基重悬, 以 1.5×10^5 /mL 接种于 6 孔板中, 2 mL/孔, 于培养箱中培

养 24 h。设置对照组及重楼皂苷VII (0.5、1.0、2.0 $\mu\text{mol/L}$) 组, 弃去培养基, 给药组分别加入 2 mL 不同浓度的重楼皂苷VII溶液, 对照组加入不含药物的培养基, 培养 24 h 后, 弃去培养基, PBS 缓冲液洗涤 2 次, 加入 2 mL 70%冰乙醇固定 30 min, PBS 缓冲液洗涤, 加入 2 mL Hoechst 33258 染液 (5 $\mu\text{g/mL}$), 避光染色 15 min, PBS 缓冲液洗涤, 于倒置荧光显微镜下观察并拍照。

2.5 重楼皂苷VII对 PANC-1 细胞迁移和侵袭的影响

2.5.1 重楼皂苷VII对 PANC-1 细胞水平迁移能力的影响

取处于对数生长期的 PANC-1 细胞, 0.25% 胰蛋白酶消化, 用 DMEM 高糖培养基重悬, 以 $1.5 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 6 孔板中, 2 mL/孔, 待细胞贴壁后, 弃去培养基。设置对照组及重楼皂苷VII (0.5、1.0、2.0 $\mu\text{mol/L}$) 组, 给药组分别加入 2 mL 不同浓度的重楼皂苷VII溶液, 对照组加入不含药物的培养基, 于培养箱中培养, 分别于 0、12、24、48 h 在倒置显微镜下观察并拍照。

2.5.2 重楼皂苷VII对 PANC-1 细胞垂直迁移能力的影响

Transwell 小室置于 24 孔板中, 取处于对数生长期的 PANC-1 细胞, 0.25% 胰蛋白酶消化, 用 DMEM 高糖培养基重悬, 以 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 Transwell 小室中。设置对照组及重楼皂苷VII (0.5、1.0、2.0 $\mu\text{mol/L}$) 组, 给药组 Transwell 小室下室分别加入 600 μL 不同浓度的重楼皂苷VII溶液 (重楼皂苷VII母液以 20% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基稀释), 对照组加入不含药物的培养基, 于培养箱中培养 24 h。弃去 Transwell 小室中培养基, PBS 缓冲液洗涤, 甲醇固定 20 min, 0.1% 结晶紫溶液染色 3 min, PBS 缓冲液洗涤, 用棉签擦去小室内细胞, 于显微镜下观察细胞。

2.5.3 重楼皂苷VII对 PANC-1 细胞侵袭能力的影响

Transwell 小室置于 24 孔板中, 按照 1:3 将 Matrigel 胶用预冷的无血清培养基稀释, 40 μL /孔, 均匀铺于 Transwell 小室底部, 于培养箱中孵育 5 h, 弃去小室内残余液体。取处于对数生长期的 PANC-1 细胞, 0.25% 胰蛋白酶消化, 用 DMEM 高糖培养基重悬, 以 $4 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 Transwell 小室中。后续操作同“2.5.2”项步骤。

2.6 重楼皂苷VII对 PANC-1 细胞凋亡的影响

取处于对数生长期的 PANC-1 细胞, 以 $1.5 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 6 孔板中, 2 mL/孔, 于培养箱中培养 24 h。设置对照组及重楼皂苷VII (0.5、1.0、2.0

$\mu\text{mol/L}$) 组, 弃去培养基, 给药组分别加入 2 mL 不同浓度的重楼皂苷VII溶液, 对照组加入不含药物的培养基, 培养 24 h 后, 弃去培养基, 收集细胞, 按照 Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒说明书染色, 采用流式细胞仪进样分析。

2.7 重楼皂苷VII对 PANC-1 细胞 Caspase-3、PARP、ICAD、Bcl-2、Bax 和 PD-L1 蛋白表达的影响

取处于对数生长期的 PANC-1 细胞, 以 $1.5 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 T25 培养瓶中, 培养 24 h, 弃去培养基。设置对照组、重楼皂苷VII (1 $\mu\text{mol/L}$) 组, 给药组加入 2 mL 重楼皂苷VII溶液, 对照组加入不含药物的培养基, 分别培养 0、12、24、48 h, 收集细胞, 按照 RIPA 裂解液说明书提取蛋白, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度, 加入上样缓冲液于 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热变性。蛋白样品经 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 洗涤后分别加入 Caspase-3、PARP、ICAD、Bcl-2、Bax 和 PD-L1 抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 洗涤后加入羊抗鼠二抗, 于室温孵育 2 h, 洗涤后加入 ECL 发光液, 采用化学发光成像系统曝光。

2.8 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 重楼皂苷VII对 PANC-1 细胞存活率的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, 重楼皂苷VII组细胞存活率降低, 呈剂量相关性, 重楼皂苷VII对 PANC-1 细胞的半抑制浓度 (50% inhibitory concentration, IC_{50}) 值为 $(1.27 \pm 0.18) \mu\text{mol/L}$, 因此选择 0.5、1.0、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 重楼皂苷VII进行后续研究。

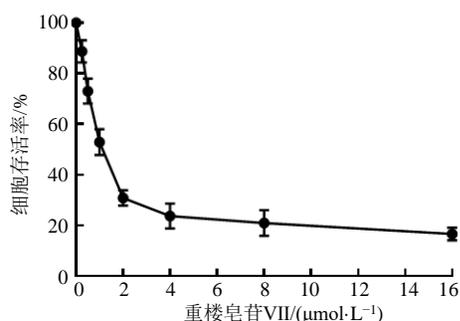


图 1 重楼皂苷 VII 对 PANC-1 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of polyphyllin VII on viability of PANC-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 重楼皂苷VII对 PANC-1 细胞形态的影响

如图 2 所示,与对照组比较,重楼皂苷VII组细胞形态发生变化,出现颗粒状凋亡小体,镜下可见核浓缩和核碎裂。

3.3 重楼皂苷VII对 PANC-1 细胞迁移和侵袭的影响

如图 3 所示,与对照组比较,重楼皂苷VII组 PANC-1 细胞迁移率显著降低 ($P < 0.01$),且呈剂量和时间相关性;如图 4 所示,与对照组比较,重楼皂苷VII组从小室上层透过聚碳酸酯膜进入下室的细胞数显著减少 ($P < 0.01$),呈剂量相关性,表明重楼皂苷VII可抑制 PANC-1 细胞的迁移和侵袭能力。

3.4 重楼皂苷VII对 PANC-1 细胞凋亡的影响

如图 5、表 1 所示,与对照组比较,重楼皂苷VII (0.5 $\mu\text{mol/L}$) 组中末期凋亡细胞比例显著升高 ($P <$

0.01),重楼皂苷VII (1.0、2.0 $\mu\text{mol/L}$) 组早期凋亡细胞和中末期凋亡细胞比例均显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01) 表明重楼皂苷VII可诱导 PANC-1 细胞凋亡。

3.5 重楼皂苷VII对 PANC-1 细胞 Caspase-3、PARP、ICAD、Bcl-2、Bax 和 PD-L1 蛋白表达的影响

如图 6 所示,与对照组比较,重楼皂苷VII组 Cleaved Caspase-3、PARP、Bax 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$), pro-PARP、ICAD、Bcl-2 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01),且呈时间相关性,表明重楼皂苷VII可促进 PANC-1 细胞凋亡。如图 7 所示,重楼皂苷VII组 PD-L1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$),呈时间相关性,表明重楼皂苷VII诱导 PANC-1 细胞死亡可能与下调 PD-L1 表达相关。

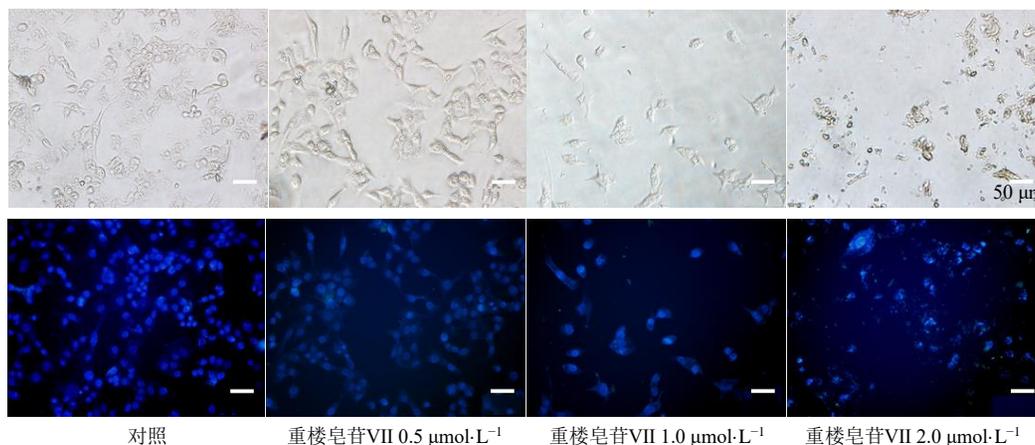
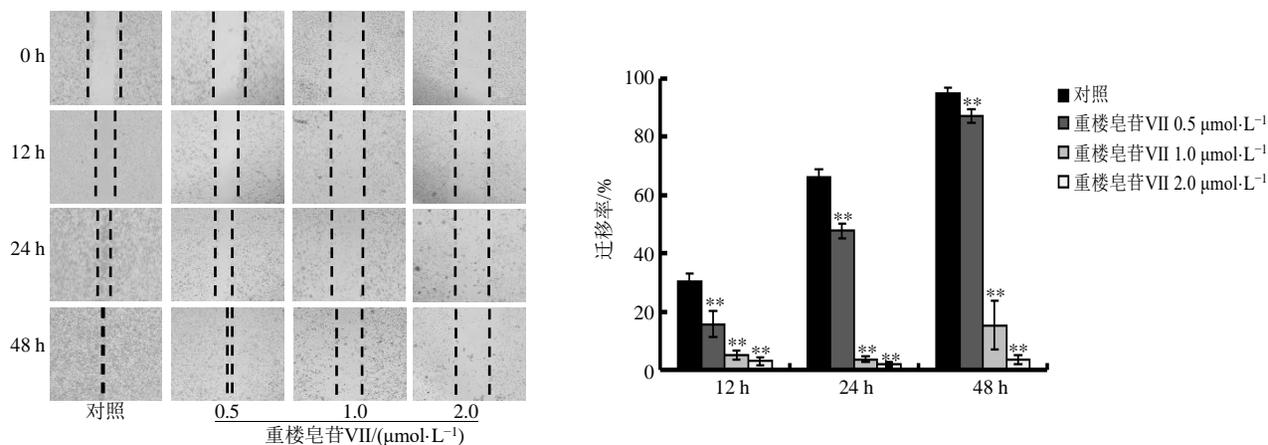


图 2 重楼皂苷VII对 PANC-1 细胞形态的影响 (×200)

Fig. 2 Effect of polyphyllin VII on morphology of PANC-1 cells (× 200)



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下图同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as belows

图 3 重楼皂苷VII对 PANC-1 细胞水平迁移的影响 (×40; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of polyphyllin VII on horizontal migration of PANC-1 cells (× 40; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

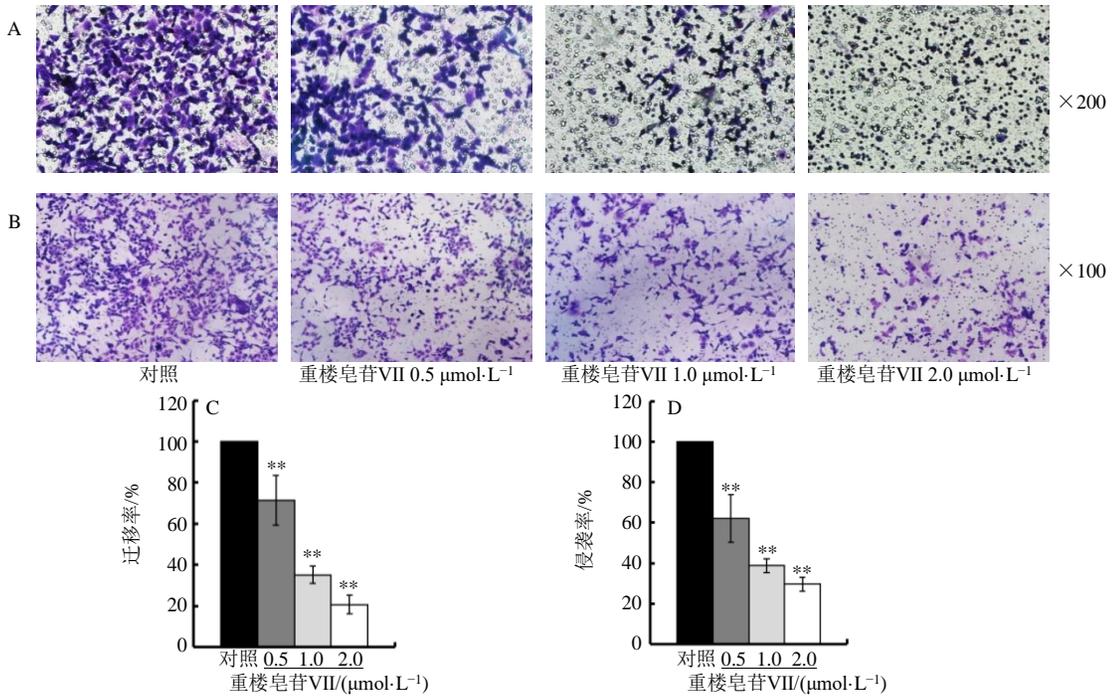


图4 重楼皂苷VII对PANC-1细胞垂直迁移(A、C)及侵袭(B、D)的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effect of polyphyllin VII on vertical migration (A, C) and invasion (B, D) of PANC-1 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

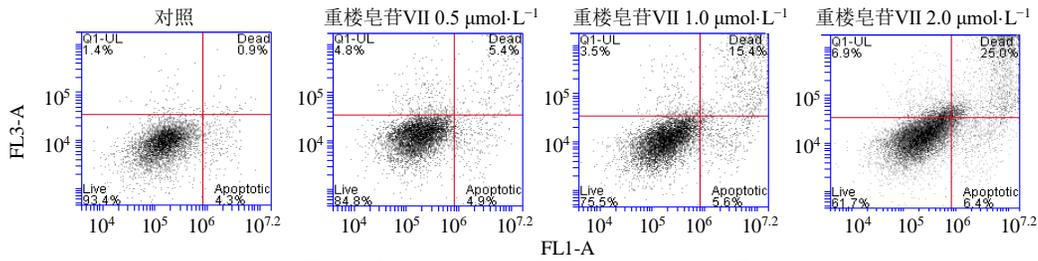


图5 重楼皂苷VII对PANC-1细胞凋亡的影响

Fig. 5 Effect of polyphyllin VII on apoptosis of PANC-1 cells

表1 重楼皂苷VII对PANC-1细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of polyphyllin VII on apoptosis of PANC-1 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	早期凋亡细胞比例/%	中末期凋亡细胞比例/%
对照	—	3.86 ± 0.40	1.06 ± 0.15
重楼皂苷VII	0.5	5.07 ± 0.67	$6.07 \pm 0.76^{**}$
	1.0	$5.63 \pm 0.55^*$	$15.77 \pm 2.47^{**}$
	2.0	$7.13 \pm 0.75^{**}$	$28.07 \pm 2.87^{**}$

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

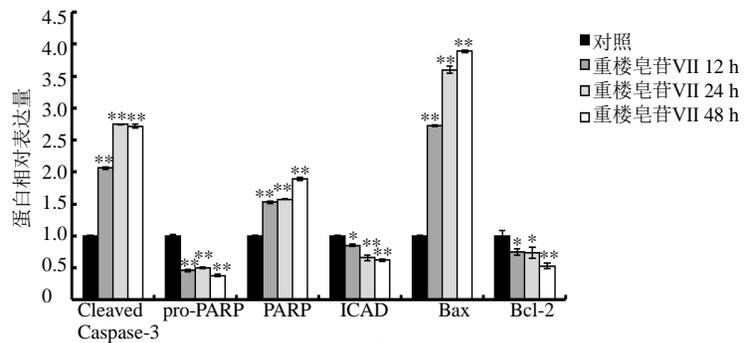
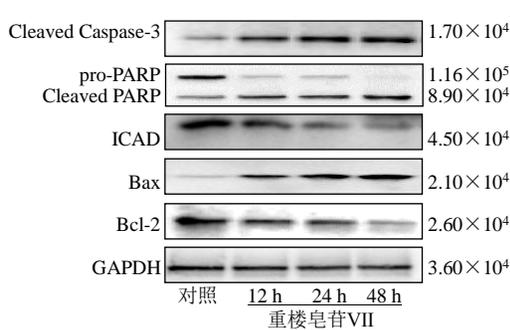


图6 重楼皂苷VII对PANC-1细胞中凋亡相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effect of polyphyllin VII on expressions of apoptosis-associated proteins in PANC-1 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

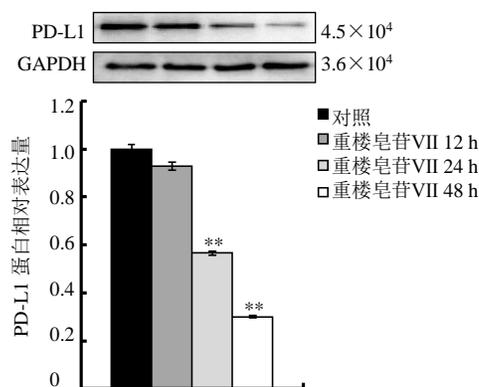


图7 重楼皂苷VII对PANC-1细胞中PD-L1蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Effect of polyphyllin VII on PD-L1 expression in PANC-1 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

胰腺癌侵袭性强,早期易转移,患者生存率较低。天然产物是抗肿瘤药物研发的重点来源^[6],从中药中寻找具有抗胰腺癌作用的活性成分具有重要意义。重楼皂苷VII为中药重楼中的主要活性成分,课题组前期研究发现重楼皂苷VII具有较好的抗肿瘤作用,能够抑制肿瘤细胞增殖、迁移与侵袭,并可通过抑制磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)和核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)通路诱导肿瘤细胞凋亡^[7]。本研究结果显示,重楼皂苷VII可抑制PANC-1细胞增殖、迁移和侵袭,诱导PANC-1细胞凋亡。

PD-1/PD-L1是一对免疫共刺激因子,PD-1表达于T细胞表面和初级B细胞表面,PD-L1作为其配体,在肿瘤细胞及浸润的淋巴细胞均有表达。正常情况下,PD-1通过PD-L1发挥免疫调控作用,PD-1/PD-L1通路的激活可减少免疫反应对正常组织的损伤,避免自身免疫疾病^[8-9]。PD-1/PD-L1还可参与肿瘤免疫逃逸,其激活可降低肿瘤局部微环境T细胞的免疫效应,使肿瘤细胞逃避机体免疫监视和杀伤,促进肿瘤发生;阻断PD-1/PD-L1通路可逆转肿瘤免疫微环境,增强内源性抗肿瘤免疫效应^[10]。肿瘤细胞能够通过上调PD-L1表达来逃避T细胞识别,从而避免免疫杀伤^[8,11]。本研究结果显示,与对照组比较,重楼皂苷VII可显著上调PANC-1

细胞中凋亡相关蛋白Cleaved Caspase-3、PARP、Bax表达水平,显著降低pro-PARP、ICAD、Bcl-2、PD-L1蛋白表达水平,表明重楼皂苷VII可诱导PANC-1细胞凋亡。

综上所述,重楼皂苷VII能够抑制PANC-1细胞增殖、迁移和侵袭,诱导其凋亡,同时可能通过下调PD-L1蛋白表达参与免疫调节。

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, Jemal A. Cancer statistics, 2020 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(1): 7-30.
- [2] 徐晓慧, 曾新颖, 王黎君, 等. 1990年与2017年中国胰腺癌疾病负担分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 2019, 40(9): 1084-1088.
- [3] Zheng W, Lu S L, Cai H L, et al. Deguelin inhibits proliferation and migration of human pancreatic cancer cells *in vitro* targeting hedgehog pathway [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(4): 2761-2765.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 271-272.
- [5] Pang D, Li C, Yang C, et al. Polyphyllin VII promotes apoptosis and autophagic cell death via ROS-inhibited AKT activity, and sensitizes glioma cells to temozolomide [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 1805635.
- [6] Wang Y, Zhong J, Bai J J, et al. The application of natural products in cancer therapy by targeting apoptosis pathways [J]. *Curr Drug Metab*, 2018, 19(9): 739-749.
- [7] He H, Xu C, Zheng L, et al. Polyphyllin VII induces apoptotic cell death via inhibition of the PI3K/Akt and NF- κ B pathways in A549 human lung cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(2): 597-606.
- [8] Keir M E, Butte M J, Freeman G J, et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity [J]. *Annu Rev Immunol*, 2008, 26: 677-704.
- [9] Saresella M, Rainone V, Al-Daghri N M, et al. The PD-1/PD-L1 pathway in human pathology [J]. *Curr Mol Med*, 2012, 12(3): 259-267.
- [10] Pardoll D M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(4): 252-264.
- [11] Chen L P, Flies D B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(4): 227-242.

[责任编辑 李亚楠]