

雪胆素片联合阿霉素增强细胞免疫原性死亡的抗肝癌作用研究

王 森^{1,2}, 戴婷婷³, 钟荣玲², 夏 智², 罗利霞^{1,2}, 宁 青², 宋 捷^{1,2*}, 谢 林^{1,4*}

1. 南京中医药大学附属中西医结合医院 第三临床医学院, 江苏 南京 210028
2. 江苏省中医药研究院 国家中医药管理局中药释药系统重点实验室, 江苏 南京 210028
3. 东部战区总医院肿瘤内科, 江苏 南京 210002
4. 南京中医药大学附属中西医结合医院 骨伤科, 江苏 南京 210028

摘要: **目的** 研究雪胆素片联合阿霉素协同抗肝癌的作用, 以及对细胞免疫原性死亡相关蛋白表达的调控。**方法** 采用高效液相色谱法对雪胆素片主要成分进行分析; 采用 MTT 法考察雪胆素片与阿霉素联合使用对人肝癌 HepG2 细胞存活率的影响; 采用平板克隆观察雪胆素片与阿霉素联合使用对 HepG2 细胞集落形成的影响; 采用流式细胞仪分析雪胆素片与阿霉素联合使用对 HepG2 细胞凋亡率和细胞周期的影响; 采用免疫荧光检测免疫原性细胞死亡关键指标钙网蛋白 (calreticulin, CRT) 和高迁移率蛋白 1 (high mobility group protein B1, HMGB1) 表达; 采用 ELISA 法检测细胞内外三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 浓度。建立小鼠肝癌 H₂₂ 细胞皮下移植瘤模型观察雪胆素片与阿霉素联合使用的体内抗肿瘤效果; 采用免疫组化法检测小鼠肿瘤组织 CRT 和 HMGB1 表达; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色法观察雪胆素片与阿霉素联合使用对小鼠心肌毒性的影响。**结果** 雪胆素片联合阿霉素对 HepG2 细胞具有浓度相关性的细胞毒性和促凋亡作用, 可促进 CRT 膜外暴露, HMGB1 向胞外分泌, ATP 胞外浓度增加; 雪胆素片联合阿霉素可抑制 H₂₂ 细胞小鼠皮下移植瘤的生长, 提高免疫能力, 延长其生存期, 增加小鼠皮下肿瘤组织内 CRT 和 HMGB1 蛋白阳性表达的细胞数量。**结论** 雪胆素片联合阿霉素的抗肝癌作用可能与调节免疫原性死亡相关蛋白表达有关。

关键词: 雪胆素片; 阿霉素; 免疫原性死亡; 钙网蛋白; 高迁移率蛋白 1; 三磷酸腺苷

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2022)11 - 3367 - 09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.11.012

Anti-hepatocellular carcinoma effect of combination of Xuedansu Tablets with doxorubicin on enhancing immunogenic cell death

WANG Sen^{1, 2}, DAI Ting-ting³, ZHONG Rong-ling², XIA Zhi², LUO Li-xia^{1, 2}, NING Qing², SONG Jie^{1, 2}, XIE Lin^{1, 4}

1. The Third Clinical Medical College, Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China
2. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Drug Release System, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China
3. Department of oncology, General Hospital of Easter Theater Command, Nanjing 210002, China
4. Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

Abstract: Objective To study the synergistic effect of Xuedansu Tablets (雪胆素片) combined with doxorubicin against liver cancer, and the regulation of cell immunogenic death-related proteins expressions. **Methods** The main components of Xuedansu Tablets were analyzed by high performance liquid chromatography; Effect of Xuedansu Tablets combined with doxorubicin on survival rate of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells was investigated by MTT method; Effect of Xuedansu Tablets combined with

收稿日期: 2022-02-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81873055); 全国中医药创新骨干人才培训项目 (19ZYCXGG-2)

作者简介: 王 森, 硕士研究生, 研究方向为中药学。E-mail: lookforward163@163.com

*通信作者: 谢 林, 主任医师, 主要从事脊柱退行性疾病研究。E-mail: wtc66@126.com

宋 捷, 副研究员, 主要从事中药药理抗肿瘤研究。E-mail: songjie_pharmacy@163.com

doxorubicin on colony formation of HepG2 cells was detected by plate cloning; Flow cytometry was used to analyze the effect of Xuedansu Tablets combined with doxorubicin on apoptosis rate and cell cycle of HepG2 cells; Immunofluorescence was used to detect expressions of calreticulin (CRT) and high mobility protein 1 (HMGB1) which are key indicators of immunogenic cell death; Intracellular and extracellular adenosine triphosphate (ATP) concentrations were detected by ELISA. H₂₂ tumor-bearing mice model was established to observe *in vivo* antitumor effect of Xuedansu Tablets combined with doxorubicin; CRT and HMGB1 expressions of tumor tissue in mice were detected by immunohistochemistry; Hematoxylin-eosin (HE) staining method was used to observe the effect of Xuedansu Tablets combined with doxorubicin on myocardial toxicity in mice. **Results** Xuedansu Tablets combined with doxorubicin had concentration-dependent cytotoxic and pro-apoptotic effects on HepG2 cells, which could promote the extracellular exposure of CRT, secretion of HMGB1 into extracellular, and increase in extracellular concentration of ATP; Xuedansu Tablets combined with doxorubicin inhibited the growth of subcutaneous transplanted tumors in H₂₂-cell mice, improved immunity, prolonged their survival, increased the number of cells expressing CRT and HMGB1 proteins in subcutaneous tumor tissues of mice. **Conclusion** Anti-hepatocellular carcinoma effect of Xuedansu Tablets combined with doxorubicin may be related to the regulation of immunogenic death-related proteins expressions.

Key words: Xuedansu Tablets; doxorubicin; immunogenic cell death; calreticulin; high mobility protein 1; adenosine triphosphate

肝细胞癌是一种常见的致命恶性肿瘤，也是全球第5大癌症死亡原因，具有复发率高、预后较差的特点^[1]。目前在肝癌的治疗方式中，化疗占据重要位置^[2]。研究发现，蒽环类等^[3-8]传统化疗药物在诱导细胞凋亡的同时，还能够促进钙网蛋白 (calreticulin, CRT)、高迁移率蛋白 B1 (high mobility group protein B1, HMGB1)、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 等损伤相关分子 (damage-associated molecule patterns, DAMPs) 的释放，促进抗原提呈到树突状细胞 (dendritic cell, DC)，激活细胞毒性 T 细胞 (cytotoxic T cells, CTL)，从而诱导细胞免疫原性死亡 (immunogenic cell death, ICD)^[9-10]，ICD 可将濒死或死亡的癌细胞转化为免疫“疫苗”，增强抗肿瘤免疫的能力^[11]，通过上调 CD8⁺、CD4⁺ T 细胞的表达，以及下调免疫抑制细胞的表达，最终改善免疫微环境^[12]。因此，ICD 的合理运用有望在肿瘤治疗领域发挥巨大作用。

阿霉素是一种能够诱导 ICD 的代表性蒽环类化疗药物。研究发现，阿霉素与淫羊藿素、紫草素等药物联合使用可增强细胞免疫原性，从而发挥更有效的抗肿瘤作用^[12-14]。雪胆素片是一类具有清热解毒作用的中成药，由葫芦科雪胆属植物提取的雪胆素制成。雪胆素的主要成分雪胆甲素和雪胆乙素对多种恶性肿瘤均有明显的抑制作用^[15]。本课题组前期研究发现，雪胆素片能够增强阿霉素的抗肿瘤作用，同时伴随细胞膜外 CRT 表达的上调，但其作用机制尚不明确。因此本研究探究雪胆素片联合阿霉素对肝癌细胞增殖、集落形成、凋亡和 ICD 相关蛋白表达的影响以及潜在的作用机制，以期提供一种

有效的肝癌治疗策略。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 ICR 小鼠，体质量 18~22 g，4 周龄，购自蚌埠依诺佳生物科技有限公司，动物许可证号 SCXK (苏) 2021-0025。动物饲养于江苏省中医药研究院动物实验室，独立通风屏障系统，自由进食饮水。动物实验经江苏省中西医结合医院伦理委员会批准 (批准号 AEW-20210426-139)。

1.2 细胞

人肝癌 HepG2 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心；小鼠肝癌 H₂₂ 细胞购自上海拜力生物技术有限公司。

1.3 药品与试剂

二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 C11078099) 购自上海麦克林生化科技有限公司；MTT (批号 H25N11B130393) 购自上海源叶生物科技有限公司；雪胆素片 (批号 20042201, 10 mg/片) 购自云南一枝蒿制药有限公司；盐酸阿霉素 (批号 25316-40-9) 购自南京康满林化工实业有限公司；DMEM 不完全高糖培养液、胰蛋白酶、细胞周期检测试剂盒 (批号 20190505)、DAPI 凋亡试剂盒 (批号 KGA215) 购自江苏凯基生物技术股份有限公司；PBS 购自武汉塞维尔生物科技有限公司；胎牛血清 (批号 21051001) 购自 Cell Biologics 公司；色谱级甲醇 (批号 21010355) 购自 Tedia 公司；结晶紫染料 (批号 20170525) 购自凯基生物技术股份有限公司；Annexin V-FITC/碘化丙啶 (PI) 凋亡试剂盒 (批号 A91231) 购自杭州联科生物技术股份有限公司；

乙醇(批号 20210908)购自国药集团化学试剂有限公司;雪胆甲素对照品(批号 HAO62805198,质量分数 $\geq 98\%$)购自 Herbest 公司;雪胆素乙对照品(批号 RFS-X03502002012,质量分数 $\geq 98\%$)购自成都瑞芬思德丹生物科技有限公司;4%多聚甲醛(批号 71033600)购自 Biosharp 公司;牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA,批号 EZ4567D106)购自 BioFroxx 公司;CRT 兔单克隆抗体(批号 ab92516)、HMGB1 兔单克隆抗体(批号 ab79823)购自英国 Abcam 公司;羊抗兔 IgG 抗体(批号 AA44181)购自 Bioworld 公司;增强型 ATP 试剂检测盒(批号 052421210390)购自碧云天生物技术有限公司。

1.4 仪器

培养板、细胞培养瓶(美国 Corning 公司);SPECTRA MAX 190 型酶标仪(Molecular Devices 公司);普通光学显微镜、倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);HH-4 型水浴锅(上海维诚仪器公司);台式离心机(德国 Heraeus 公司);Agilent 1260 型高效液相色谱仪;KQ5200 型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Fresco 21 型冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Synergy H1 型酶标仪(美国 BioTek 公司)。

2 方法

2.1 雪胆素片和阿霉素溶液的制备

称取 5 mg 阿霉素粉末溶于 1 mL DMSO 中,配制成质量浓度为 5 mg/mL 的母液,于 4 °C 保存,临用时将母液用培养基稀释 1000 倍配制成质量浓度为 5 mg/L 的溶液,随后使用培养基逐级稀释到所需浓度。雪胆素片研磨粉碎后,称取 40 mg 溶于 1 mL DMSO-完全培养基(1:9)的溶液中,随后逐级稀释到所需浓度,给药体系中 DMSO 的终质量分数不超过 0.1%。

2.2 高效液相色谱定性分析雪胆素片主要成分

2.2.1 色谱条件 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m),流动相为水(A)-甲醇(B),梯度洗脱:0~23 min, 25%~45% B; 23~35 min, 45% B; 体积流量为 1 mL/min; 检测波长为 210 nm; 进样量为 10 μ L; 柱温为 20 °C。通过与已知对照品相匹配的保留时间(t_R)和光谱来识别成分。

2.2.2 混合对照品的制备 取雪胆甲素、雪胆乙素置于 5 mL 量瓶中,加甲醇定容至 5 mL,分别制备雪胆甲素对照品溶液、雪胆乙素对照品溶液、混合

对照品溶液,临用时用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,于 4 °C 保存。另以甲醇配制阴性对照 1 瓶。

2.2.3 供试品溶液的制备 取雪胆素片,研细,精密称定 0.14 g,精密加入甲醇 5 mL,超声处理 10 min,放冷,用甲醇补足减失质量,摇匀,用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,于 4 °C 保存。

2.3 MTT 法检测雪胆素片联合阿霉素对 HepG2 细胞存活率的影响

HepG2 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 不完全高糖培养基,于 5% CO₂、37 °C 的恒温培养箱中培养。取处于对数生长期的 HepG2 细胞,接种于 96 孔板,每孔 8000 个。培养 24 h 后分别给予不同质量浓度雪胆素片(20、40、80、120、160、200 mg/L)、阿霉素(0.05、0.10、0.50、1.00、2.50、5.00 mg/L)及雪胆素片(20~200 mg/L)+阿霉素(0.05 mg/L)处理细胞,以不含药液的培养基作为对照,以不含细胞的培养基作为调零孔,培养 24 h 后,每孔加入 10 μ L MTT 溶液(5 mg/L),37 °C 孵育 4 h 后,每孔加入 100 μ L DMSO 溶液,振荡 10 min 后置于酶标仪中测定 490 nm 处的吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{调零}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{调零}})$$

2.4 平板克隆检测雪胆素片联合阿霉素对 HepG2 细胞增殖的影响

取处于对数生长期的 HepG2 细胞,接种于 6 孔板中,每孔 1000 个。在培养箱中培养 6 d 后换液,分别给予雪胆素片(80 mg/L)、阿霉素(0.05 mg/L)及雪胆素片(80 mg/L)+阿霉素(0.05 mg/L)处理细胞,以不含药液的培养基作为对照,在培养箱中培养 3 d 后吸弃旧培养液,用 PBS 洗 2 遍,甲醇固定 20 min 后,按照结晶紫染色试剂盒说明书操作,干燥后观察增殖情况并拍照记录。

2.5 流式细胞术检测 HepG2 细胞凋亡和细胞周期

取处于对数生长期的 HepG2 细胞,接种于 6 孔板上,每孔 1×10^6 个,培养 24 h 后分别给予雪胆素片(80 mg/L)、阿霉素(0.05 mg/L)及雪胆素片(80 mg/L)+阿霉素(0.05 mg/L),进行细胞周期实验给药时增加雪胆素片(40 mg/L)组及雪胆素片(40 mg/L)与阿霉素(0.05 mg/L)联合给药组,以不含药液的培养基作为对照,孵育 24 h 后收集细胞,用冷的 PBS 洗涤细胞 2 遍,根据 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒和细胞周期试剂盒说明书操作,利用流式细胞仪检测细胞凋亡和周期。

2.6 免疫荧光检测 HepG2 细胞 ICD 相关蛋白表达

取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 接种于 24 孔板中, 每孔 5×10^4 个, 培养 24 h 后分别给予雪胆素片 (80 mg/L)、阿霉素 (0.05 mg/L) 及雪胆素片 (80 mg/L) + 阿霉素 (0.05 mg/L), 以不含药液的培养基作为对照, 继续孵育 24 h 后吸弃培养基, PBS 漂洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 20 min; 1% BSA 封闭 30 min, 分别滴加 CRT 和 HMGB1 单克隆抗体稀释液 50 μ L, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育过夜; 第 2 天滴加二抗, 避光孵育 60 min; 按照 DAPI 凋亡试剂盒说明书进行核染。染色完毕后滴加封片液 50 μ L 于 24 孔板中, 于激光共聚焦显微镜上进行荧光检测并拍照。

2.7 ELISA 检测 HepG2 细胞 ATP 分泌

取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 接种于 6 孔板上, 每孔 5×10^5 个, 置于 5% CO₂ 培养箱中过夜培养, 分别给予雪胆素片 (80 mg/L)、阿霉素 (0.05 mg/L) 及雪胆素片 (80 mg/L) + 阿霉素 (0.05 mg/L), 以不含药液的培养基作为对照, 孵育 24 h 后根据 ATP 检测试剂盒说明书操作, 利用多功能酶标仪的化学发光功能进行检测。

2.8 H₂₂ 肝癌细胞小鼠皮下移植瘤模型的建立

收集处于对数生长期的 H₂₂ 细胞, 用高糖培养基调整细胞浓度至 2×10^7 个/mL。用一次性注射器注射到小鼠右侧腋下, 每只注射 0.1 mL, 注射 24 h 后将小鼠随机分为 4 组, 分别为模型组、雪胆素片 (500 mg/kg) 组、阿霉素 (3 mg/kg) 组和联合给药组, 给药剂量同单用组保持一致, 常规饲养, 每天记录小鼠生存状况。雪胆素片溶于 0.9% 氯化钠溶液中, 小鼠 ig 给药, 1 次/d; 阿霉素溶于 0.9% 氯化钠溶液中, 尾 iv 给药, 每 3 天 1 次; 联合组给药方式与周期均同单用组保持一致。小鼠共分为 2 批, 第 1 批每组 5 只, 12 d 后脱颈椎法处死, 剥离移植瘤组织、脾脏、心脏, 称取瘤体与脾脏质量。另一批每组 7 只, 每 3 天使用游标卡尺测量 1 次肿瘤体积, 共测量 5 次, 记录小鼠 60 d 内的生存情况

$$\text{肿瘤体积} = \text{长} \times \text{宽}^2 / 2$$

$$\text{脾脏指数} = \text{脾脏质量} / \text{体质量}$$

2.9 免疫组化检测小鼠皮下移植瘤模型肿瘤组织 ICD 相关蛋白表达

将各组小鼠瘤组织保存于福尔马林中, 组织用石蜡包埋, 切片脱蜡, 0.3% H₂O₂ 孵育 30 min。使用 PBS 冲洗切片 3 次, 转移至柠檬酸盐抗原修复液中高压加热, 室温冷却, 加入 CRT 和 HMGB1 单克隆

抗体后 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。第 2 天, 切片用 PBS 洗涤, 加入经生物素标记的二抗, 室温孵育 1 h^[6]。切片用 DAB 显色后苏木素复染, 脱水后用中性树脂封片, 于显微镜下观察 CRT 和 HMGB1 表达情况。

2.10 小鼠皮下移植瘤模型心脏病理 HE 染色

取各组小鼠心脏组织, 用 10% 中性缓冲福尔马林固定, 石蜡包埋, 连续切成 4 μ m 切片, 65 $^{\circ}$ C 烤箱中烘烤 3 h 后用二甲苯洗 3 次, 梯度乙醇冲洗 2 次, 苏木素染色, 流水冲洗后用盐酸-乙醇溶液分化, 氨水返蓝, 流水洗后用伊红复染, 浸入梯度乙醇中, 二甲苯透明, 中性树脂封片^[7], 风干后拍照观察小鼠心肌毒性。

2.11 统计学分析

所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学分析使用 GraphPad Prism 9.0 软件, 组间比较采用配对 *t* 检验。

3 结果

3.1 雪胆素片主要有效成分的定性分析

本研究选择 210 nm 为检测波长, 利用高效液相色谱对雪胆素片主要成分进行定性分析。如图 1 所示, 雪胆素片的主要成分为雪胆甲素和雪胆乙素。

3.2 雪胆素片联合阿霉素对 HepG2 细胞存活率的影响

如图 2 所示, 阿霉素和雪胆素片抑制 HepG2 细胞增殖, 呈剂量相关性。单独给药时, 雪胆素片 (80

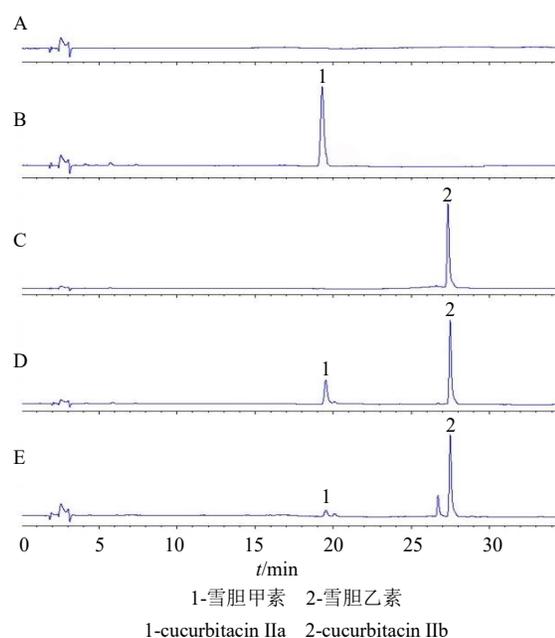


图 1 空白溶剂 (A)、雪胆甲素对照品 (B)、雪胆乙素对照品 (C)、混合对照品 (D) 和雪胆素片 (E) 的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC of blank solvent (A), cucurbitacin IIa reference (B), cucurbitacin IIb reference (C), mixed reference (D) and Xuedansu Tablets (E)

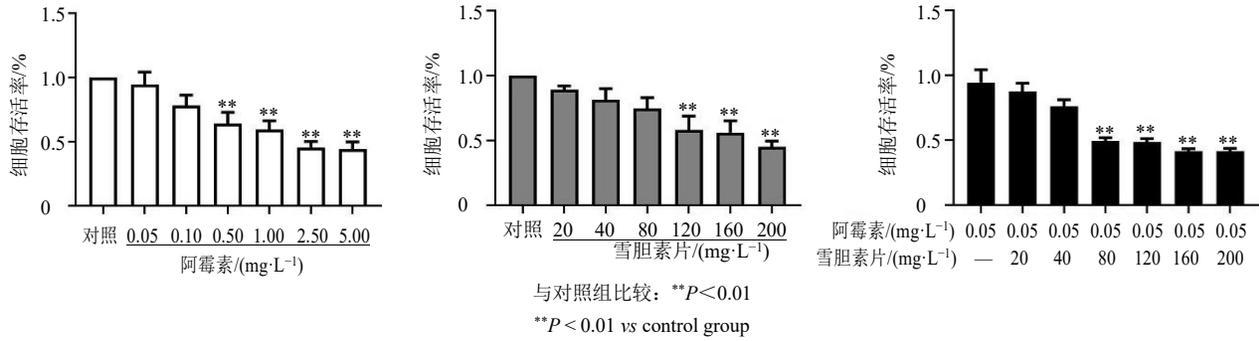


图2 雪胆素片联合阿霉素对 HepG2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of Xuedansu Tablets combined with doxorubicin on survival rate of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

mg/L) 抑制率为 21.37%，阿霉素 (0.05 mg/L) 抑制率为 0.52%，而雪胆素片 (80 mg/L) 联合阿霉素 (0.05 mg/L) 抑制率则达到 51.15%，呈现较强的协同抗肝癌作用，差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。因此后续体外实验选择 80 mg/L 雪胆素片联合 0.05 mg/L 阿霉素。

3.3 雪胆素片联合阿霉素对 HepG2 细胞集落形成的影响

如图 3-A 所示，与对照组相比，阿霉素 (0.05 mg/L) 组、雪胆素片 (80 mg/L) 组和联合给药组细胞集落形成数量均有减少，其中联合组的抑制作用最明显，表明雪胆素片联合阿霉素抑制肿瘤能力最强。

3.4 雪胆素片联合阿霉素对 HepG2 细胞凋亡和周期的影响

如图 3-B 所示，不同组别药物处理 HepG2 细胞

24 h 后，对照组、阿霉素 (0.05 mg/L) 组、雪胆素片 (80 mg/L) 组和联合给药组细胞凋亡率分别为 17.31%、19.86%、48.8%、61.6%，说明雪胆素片与阿霉素联用后诱导 HepG2 细胞凋亡的能力增强。

如图 3-C 所示，不同组别药物处理 HepG2 细胞 24 h 后，各组 G₂/M 期细胞数量均高于对照组；与阿霉素组相比，雪胆素片 (40 mg/L) 联合阿霉素 (0.05 mg/L) 组 G₂/M 期的细胞数量明显增多，雪胆素片 (80 mg/L) 联合阿霉素 (0.05 mg/L) 组 G₂/M 期细胞数虽然没有增加，但出现凋亡亚峰。上述结果提示低质量浓度 (40 mg/L) 的雪胆素片与阿霉素联用可诱导 HepG2 细胞有丝分裂停滞在 G₂/M 期，高质量浓度 (80 mg/L) 的雪胆素片与阿霉素联用诱导 HepG2 细胞凋亡。

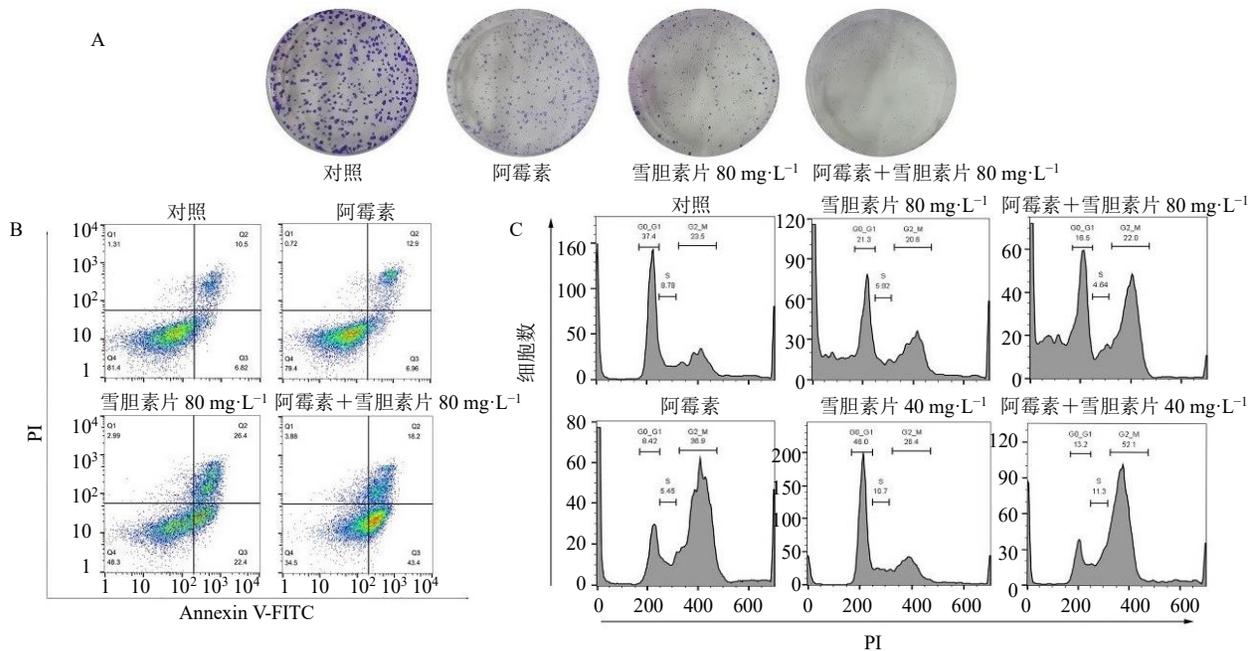


图3 雪胆素片联合阿霉素对 HepG2 细胞集落形成 (A)、细胞凋亡 (B) 和细胞周期 (C) 的影响

Fig. 3 Effect of Xuedansu Tablets combined with doxorubicin on colony formation (A), apoptosis (B) and cell cycle of HepG2 cells

3.5 雪胆素片联合阿霉素对 HepG2 细胞 CRT 和 HMGB1 蛋白表达的影响

CRT 在 ICD 早期转位到细胞膜上,同时细胞释放 HMGB1。免疫荧光检测结果(图 4)显示,雪胆素片(80 mg/L)与阿霉素(0.05 mg/L)联合处理后 HepG2 细胞 CRT 明显暴露于细胞膜;同样,联合组处理过的 HepG2 细胞中 HMGB1 向外分泌。说明雪胆素片(80 mg/L)与阿霉素(0.05 mg/L)联合处理后促使 CRT 暴露于细胞膜,并促进 HMGB1 向胞外

分泌。

3.6 雪胆素片联合阿霉素对 HepG2 细胞 ATP 释放的影响

如图 5 所示,阿霉素(0.05 mg/L)组、雪胆素片(80 mg/L)组和联合组内 ATP 浓度均低于对照组,其中雪胆素片组和联合组有统计学意义($P < 0.01$)。与对照组相比,联合组胞外 ATP 浓度显著升高($P < 0.01$),提示雪胆素片(80 mg/L)与阿霉素(0.05 mg/L)联合使用促进 ATP 由胞内向胞外分泌。

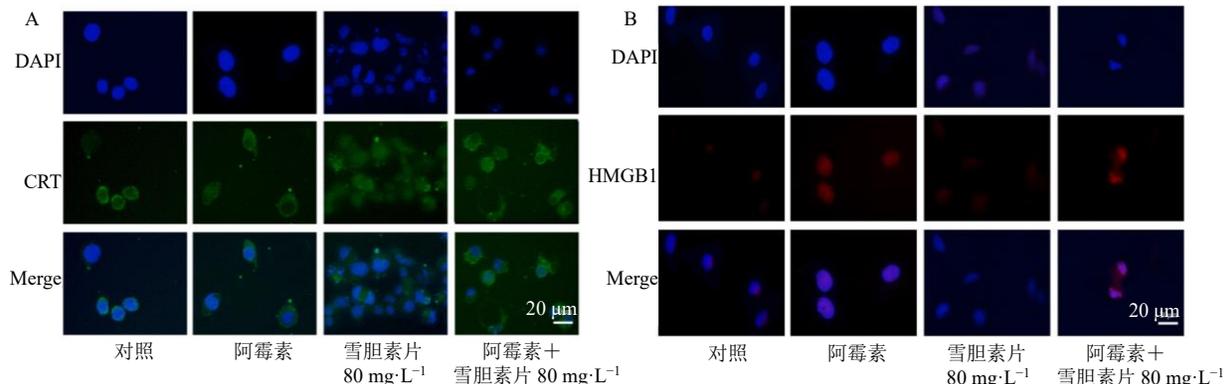


图 4 雪胆素片联合阿霉素对 HepG2 细胞 CRT (A) 和 HMGB1 (B) 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of Xuedansu Tablets combined with doxorubicin on CRT and HMGB1 protein expressions of HepG2 cells

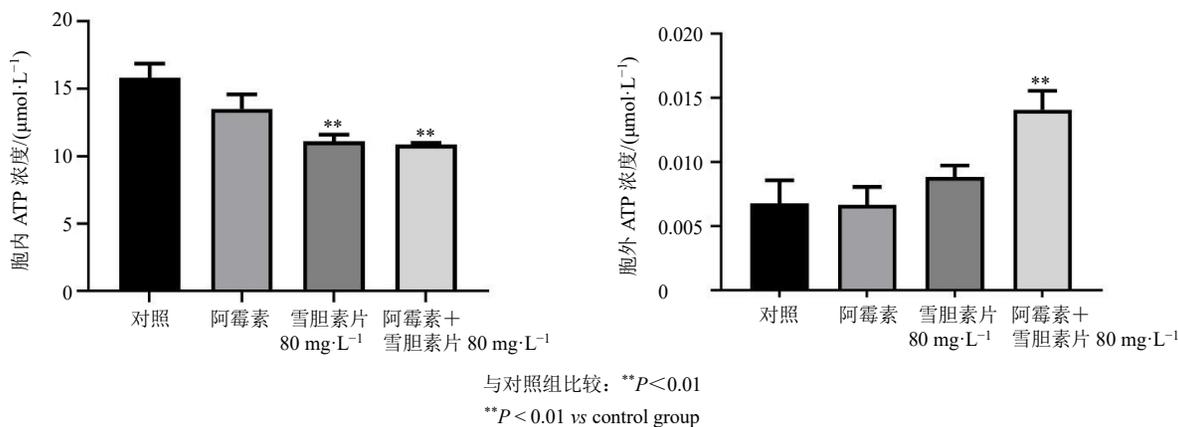


图 5 雪胆素片联合阿霉素对 HepG2 细胞 ATP 释放的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 5 Effect of Xuedansu Tablets combined with doxorubicin on ATP release of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.7 雪胆素片联合阿霉素对小鼠皮下移植瘤模型移植瘤生长及生存周期的影响

小鼠 sc H₂₂ 细胞建立异位移植瘤模型,模型组小鼠肿瘤体积持续增大,小鼠逐渐出现运动迟缓、食欲不佳、立毛等症状。在给药 12 d 后取小鼠肿瘤组织并拍照(图 6-A),雪胆素片(500 mg/kg)、阿霉素(3 mg/kg)以及联合给药组小鼠移植瘤体积增长速度比模型组明显减缓,联合组肿瘤体积抑制程度最大,抗肿瘤作用显著增强(图 6-B, $P < 0.01$),

并且在一定程度上改善阿霉素单用所致的小鼠脾脏指数降低现象(表 1)。60 d 生存期观察结果(图 6-C)显示,联合组小鼠生存质量最高,死亡率最低。

3.8 雪胆素片联合阿霉素对小鼠皮下移植瘤模型肿瘤组织 CRT 和 HMGB1 蛋白表达的影响

如图 7 所示,与模型组相比,雪胆素片(500 mg/kg)与阿霉素(3 mg/kg)联合给药组 CRT 和 HMGB1 蛋白阳性表达的细胞数量明显增多,与体外实验中对 HepG2 细胞调控作用一致。

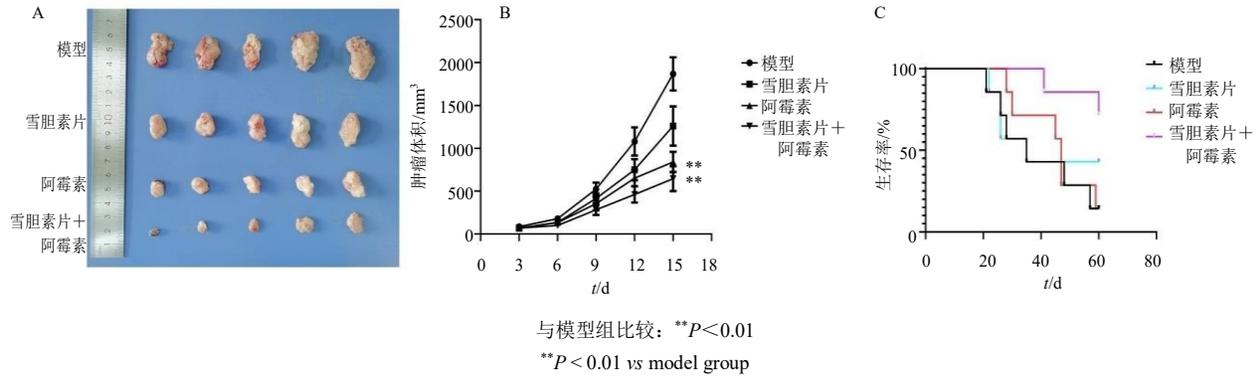


图6 雪胆素片联合阿霉素对小鼠皮下移植瘤模型肿瘤体积 (A) 和生存期 (B) 的影响 (n = 7)

Fig. 6 Effect of Xuedansu Tablets combined with doxorubicin on tumor volume (A) and survival time of subcutaneous tumor mice model (n = 7)

表1 雪胆素片联合阿霉素对小鼠皮下移植瘤模型瘤质量和脾脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effect of Xuedansu Tablets combined with doxorubicin on tumor weight and spleen index of subcutaneous tumor mice model ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	瘤质量/g	脾脏指数
模型	—	1.959 ± 0.496	7.832 ± 0.180
雪胆素片	500	1.569 ± 0.314	6.596 ± 0.169
阿霉素	3	0.965 ± 0.354*	4.321 ± 0.039*
雪胆素片+阿霉素	500+3	0.366 ± 0.249**	5.429 ± 0.049

与模型组比较: *P < 0.05 **P < 0.01

*P < 0.05 **P < 0.01 vs model group

3.9 雪胆素片联合阿霉素对小鼠皮下移植瘤模型心肌毒性的影响

如图8所示, 模型组和雪胆素片 (500 mg/kg) 组小鼠心肌细胞未见明显病理变化; 阿霉素 (3 mg/kg) 组小鼠心肌细胞坏死及空泡样变化明显; 阿霉素与雪胆素片联合使用后, 小鼠心肌细胞坏死及空泡样变化有显著改善, 表明雪胆素片与阿霉素联合使用后能够减轻阿霉素的心肌毒性。

4 讨论

雪胆素片是由葫芦科雪胆属植物提取的“雪胆

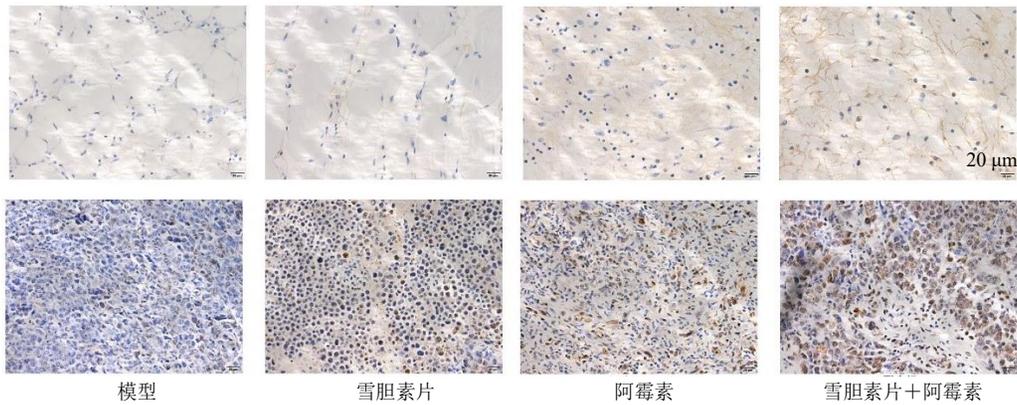


图7 雪胆素片联合阿霉素对小鼠皮下移植瘤模型肿瘤组织 CRT 和 HMGB1 蛋白表达的影响

Fig. 7 Effect of Xuedansu Tablets combined with doxorubicin on CRT and HMGB1 protein expressions in tumor tissues of subcutaneous tumor mice model

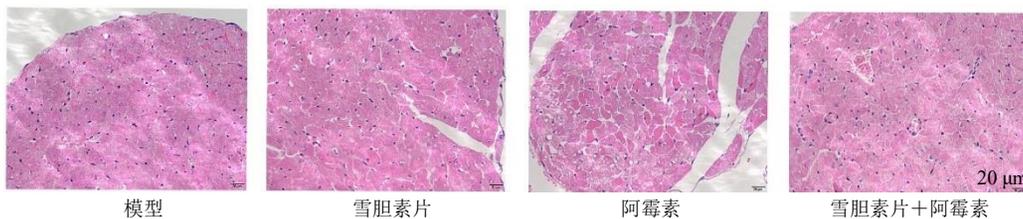


图8 雪胆素片联合阿霉素对小鼠皮下移植瘤模型心肌毒性的影响

Fig. 8 Effect of Xuedansu Tablets combined with doxorubicin on myocardial toxicity of subcutaneous tumor mice model

素”制成的口服片剂,雪胆素主要成分为雪胆甲素和雪胆乙素,以雪胆甲素为主^[18],是葫芦素类化合物的一种。雪胆素对胃癌、肺癌、乳腺癌等恶性肿瘤均有抑制作用^[19-28]。目前文献报道的关于雪胆素抗肿瘤作用机制主要有:抑制细胞增殖和侵袭能力;阻滞细胞周期在 G₂/M 期;诱导细胞凋亡;干扰表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)/丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路^[19,26];破坏肌动蛋白细胞骨架等^[20,27]。此外,研究发现,雪胆甲素还可以通过保护免疫系统和调节免疫功能抑制二甲苯葱诱导的小鼠乳腺肿瘤^[21];通过抑制 Aurora A、信号转导与转录激活因子 3(signal transducers and activators of transcription 3, STAT3)以及 Cofilin 等信号通路多靶点协同抑制人肺癌细胞系 NCI-H460 和 A549 增殖并促进细胞凋亡^[22];通过抑制 Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)通路激活,从而抑制胃癌细胞 SGC-7901 的增殖及其迁移能力^[23]。同时,研究发现葫芦素类化合物不仅在单独用药时表现出良好的抗肿瘤活性^[24],而且在药物联用方面也表现出一定优势,如葫芦素 B 与吉西他滨等联用治疗胰腺癌等肿瘤,低剂量的葫芦素 E 加强顺铂对乳腺癌细胞的抑制作用等^[29]。尽管雪胆素在肿瘤治疗中表现出一定的潜力,但是对于雪胆素及雪胆素片对肿瘤的治疗缺乏系统的体内外研究,对于其是否能作为化疗辅助药物从而减少化疗药物的使用剂量和不良反应尚未有报道。本研究发现雪胆素片可以抑制 HepG2 细胞活力,与阿霉素联用有效抑制细胞集落的形成;细胞凋亡和周期结果显示,联用时低质量浓度雪胆素片阻滞细胞周期,高质量浓度时导致凋亡,提示雪胆素片联合阿霉素能够提高抗肿瘤效果。

在阿霉素等化疗药物诱导 ICD 激发机体免疫系统抗肿瘤的过程中,DAMPs 的表达起到了至关重要的作用,DAMPs 通过与免疫细胞上的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)结合增强机体抗肿瘤免疫反应^[30]。CRT、HMGB1、ATP 是细胞免疫原性死亡的 3 种关键 DAMPs。肿瘤细胞免疫原性死亡释放的 CRT,能够被抗原呈递细胞识别^[31],可作为一种“eat me”信号被 DC 细胞吞噬^[32]。HMGB1 能够与 DC 细胞表面的 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)结合,激活促炎细胞因子的产生,阻止 DC 吞噬的肿瘤抗原降解^[33]。细胞外 ATP 被视为凋亡细胞释放的一种“find me”的信号,既

可以作为归巢信号,也可以作为 NOD 样受体热蛋白结构域 3(NOD-like receptors family pyrin domain containing 3, NLRP3)炎症体的激活剂,快速募集 DC 细胞到肿瘤组织^[34]。通过药物联用增强化疗药物的 ICD 已成为未来肿瘤研究的重要课题之一,然而雪胆素是否能够通过与阿霉素联用增强免疫原性死亡提高抗肿瘤活性尚未有报道。本研究中雪胆素片与阿霉素联合处理后 CRT 在细胞膜表面的暴露程度与 HMGB1 向外分泌的程度远高于阿霉素单用组,胞外 ATP 浓度也显著增加。免疫组化结果显示小鼠肿瘤组织内 CRT 与 HMGB1 蛋白表达上调,提示雪胆素片与阿霉素联合使用增强细胞 ICD。

综上所述,本研究发现雪胆素片与阿霉素联用能够促进细胞凋亡,阻滞细胞周期,以及诱导 CRT 与 HMGB1 的表达;同时增强抗肿瘤活性,提高小鼠皮下移植瘤模型脾脏指数,延长小鼠生存时间,减弱阿霉素对小鼠的心肌毒性,上调肿瘤组织内 CRT 与 HMGB1 蛋白表达,其机制可能与促进细胞 ICD 有关。后续研究将聚焦于雪胆素片与阿霉素联合使用诱导 HepG2 细胞的 ICD 过程,及其对 DC 细胞吞噬作用和 T 淋巴细胞活化程度的影响。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Liu H T, Jiang M J, Deng Z J, *et al.* Immune checkpoint inhibitors in hepatocellular carcinoma: Current progresses and challenges [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 737497.
- [2] 田焜,唐贵菊,王继婷,等. 化疗药治疗肝细胞癌的研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2020, 47(12): 1088-1093.
- [3] Krysko O, Aaes T L, Bachert C, *et al.* Many faces of DAMPs in cancer therapy [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4(5): e631.
- [4] Krysko O, Aaes T L, Kagan V E, *et al.* Necroptotic cell death in anti-cancer therapy [J]. *Immunol Rev*, 2017, 280(1): 207-219.
- [5] Kepp O, Senovilla L, Vitale I, *et al.* Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death [J]. *Oncoimmunology*, 2014, 3(9): e955691.
- [6] Hou W, Zhang Q, Yan Z, *et al.* Strange attractors: DAMPs and autophagy link tumor cell death and immunity [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4(12): e966.
- [7] Garg A D, Martin S, Golab J, *et al.* Danger signalling during cancer cell death: Origins, plasticity and regulation [J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21(1): 26-38.
- [8] Ahmed A, Tait S W G. Targeting immunogenic cell death

- in cancer [J]. *Mol Oncol*, 2020, 14(12): 2994-3006.
- [9] Garg A D, Dudek-Peric A M, Romano E, et al. Immunogenic cell death [J]. *Int J Dev Biol*, 2015, 59(1/2): 131-140.
- [10] Garg A D, Agostinis P. Cell death and immunity in cancer: From danger signals to mimicry of pathogen defense responses [J]. *Immunol Rev*, 2017, 280(1): 126-148.
- [11] Galluzzi L, Vacchelli E, Pedro J M B S, et al. Classification of current anticancer immunotherapies [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(24): 12472-12508.
- [12] Yu Z, Guo J F, Hu M Y, et al. Icaritin exacerbates mitophagy and synergizes with doxorubicin to induce immunogenic cell death in hepatocellular carcinoma [J]. *ACS Nano*, 2020, 14(4): 4816-4828.
- [13] Li J B, Zhou S, Yu J, et al. Low dose shikonin and anthracyclines coloaded liposomes induce robust immunogenetic cell death for synergistic chemo-immunotherapy [J]. *J Control Release*, 2021, 335: 306-319.
- [14] de Lima L I, Faria R S, Franco M S, et al. Combined paclitaxel-doxorubicin liposomal results in positive prognosis with infiltrating lymphocytes in lung metastasis [J]. *Nanomedicine*, 2020, 15(28): 2753-2770.
- [15] 张金芳, 张晓瑞, 郑敏思, 等. 葫芦素类化合物的药理作用研究进展 [J]. *医药导报*, 2020, 39(12): 1710-1716.
- [16] 丁文波, 宁青, 夏智, 等. 双丹胶囊联合 5-FU 对肝癌细胞 Huh-7 及荷瘤小鼠协同抗肿瘤作用研究 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(23): 5762-5769.
- [17] 刘博佳, 宁青, 钟荣玲, 等. 羽扇豆醇对人肝癌细胞 HepG2 和 SK-HEP-1 侵袭、转移的影响及机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(24): 6028-6035.
- [18] 苏健. 高效液相色谱法测定雪胆素片中雪胆素甲的含量 [J]. *云南中医学院学报*, 2014, 37(2): 21-23.
- [19] Zhang J, Song Y F, Liang Y, et al. Cucurbitacin IIa interferes with EGFR-MAPK signaling pathway leads to proliferation inhibition in A549 cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 132: 110654.
- [20] Boykin C, Zhang G, Chen Y H, et al. Cucurbitacin IIa: A novel class of anti-cancer drug inducing non-reversible actin aggregation and inhibiting survivin independent of JAK2/STAT3 phosphorylation [J]. *Br J Cancer*, 2011, 104(5): 781-789.
- [21] 吴璐璐, 田瑜, 龚令熙, 等. 雪胆素甲对小鼠乳腺肿瘤的抑制作用及其机制 [J]. *医药导报*, 2020, 39(11): 1471-1476.
- [22] 陈育林, 咸婧, 肖翠, 等. 雪胆素甲诱导非小细胞肺癌系 NCI-H460 和 A549 的凋亡效应及其作用机制初探 [J]. *中国药理学通报*, 2017, 33(7): 922-927.
- [23] 曹淑君, 初向华, 李宗莉, 等. 雪胆素甲对胃癌细胞 SGC-7901 增殖和侵袭能力的影响 [J]. *精准医学杂志*, 2020, 35(6): 540-544.
- [24] Cai Y E, Fang X F, He C W, et al. Cucurbitacins: A systematic review of the phytochemistry and anticancer activity [J]. *Am J Chin Med*, 2015, 43(7): 1331-1350.
- [25] Torres-Moreno H, Marcotullio M C, Velázquez C, et al. Cucurbitacin IIb, a steroidal triterpene from *Ibervillea sonorae* induces antiproliferative and apoptotic effects on cervical and lung cancer cells [J]. *Steroids*, 2020, 157: 108597.
- [26] Liang Y, Zhang T H, Ren L, et al. Cucurbitacin IIb induces apoptosis and cell cycle arrest through regulating EGFR/MAPK pathway [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2021, 81: 103542.
- [27] 任帅. 雪胆素乙对人前列腺癌细胞增殖的抑制作用及其分子机制研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2013.
- [28] Zeng Y J, Wang J, Huang Q W, et al. Cucurbitacin IIa: A review of phytochemistry and pharmacology [J]. *Phytother Res*, 2021, 35(8): 4155-4170.
- [29] 王文雪, 牟艳玲, 姚庆强. 葫芦素类化合物的抑瘤作用及其作用机制和联合用药研究进展 [J]. *中国药房*, 2017, 28(19): 2712-2717.
- [30] Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Decoding cell death signals in inflammation and immunity [J]. *Cell*, 2010, 140(6): 798-804.
- [31] Orr A W, Pedraza C E, Pallero M A, et al. Low density lipoprotein receptor-related protein is a calreticulin coreceptor that signals focal adhesion disassembly [J]. *J Cell Biol*, 2003, 161(6): 1179-1189.
- [32] Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death [J]. *Nat Med*, 2007, 13(1): 54-61.
- [33] Exner R, Sachet M, Arnold T, et al. Prognostic value of HMGB1 in early breast cancer patients under neoadjuvant chemotherapy [J]. *Cancer Med*, 2016, 5(9): 2350-2358.
- [34] Fucikova J, Moserova I, Truxova I, et al. High hydrostatic pressure induces immunogenic cell death in human tumor cells [J]. *Int J Cancer*, 2014, 135(5): 1165-77.

[责任编辑 李亚楠]