

## • 药理与临床 •

# 18 $\beta$ -甘草次酸增强固有免疫细胞中 I 型干扰素响应进而协同抑制肝癌生长的机制研究

李 硕, 白金钊<sup>#</sup>, 刘闰平\*

北京中医药大学中药学院, 北京 100029

**摘要:** **目的** 在固有免疫细胞中明确 18 $\beta$ -甘草次酸对 I 型干扰素通路的激动活性, 并评价其在肝癌模型小鼠中的协同抑瘤作用。**方法** CCK-8 法检测 18 $\beta$ -甘草次酸对 RAW264.7 巨噬细胞增殖的影响; qRT-PCR 法检测 18 $\beta$ -甘草次酸对免疫细胞 [RAW264.7 细胞、小鼠骨髓来源巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophages, BMDM)、小鼠骨髓来源树突状细胞 (bone marrow-dendritic cells, BMDC)] 中干扰素  $\beta$ 1 (interferon beta 1, *Ifnb1*)、干扰素刺激基因 15 (interferon stimulated gene 15, *Isg15*) 和干扰素诱导蛋白 1 (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1, *Ifit1*) mRNA 表达的影响; qRT-PCR 法检测 18 $\beta$ -甘草次酸与干扰素  $\alpha$ 2 (interferon alpha 2, IFN $\alpha$ 2) 联用对免疫细胞中 *Isg15* 和 *Ifit1* mRNA 表达的影响; Western blotting 法检测 18 $\beta$ -甘草次酸对 IFN $\alpha$ 2 诱导的 RAW264.7 细胞 Janus 激酶 1 (Janus kinase 1, JAK1)、酪氨酸激酶 2 (tyrosine kinase 2, TYK2)、信号传导及转录激活因子 1 (signal transducers and activators of transcription 1, STAT1) 和 STAT2 磷酸化水平的影响。C57BL/6 小鼠通过原位移植瘤手术建立肝癌模型, 随机分为模型组、奥沙利铂组和奥沙利铂+18 $\beta$ -甘草次酸组, 给予奥沙利铂和 18 $\beta$ -甘草次酸治疗, 评价小鼠体质量变化、肿瘤质量、脾质量、肝质量和肝脏系数。**结果** 18 $\beta$ -甘草次酸显著升高了 *Ifnb1*、*Isg15* 和 *Ifit1* 的 mRNA 表达水平 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ), 协同增强了 IFN $\alpha$ 2 诱导的 *Isg15* 和 *Ifit1* 的 mRNA 表达 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ); 18 $\beta$ -甘草次酸促 I 型干扰素的活性可能依赖于其对 IFN $\alpha$ 2 诱导的下游信号转导关键蛋白 JAK1、TYK2、STAT1、STAT2 磷酸化的增强作用 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ )。18 $\beta$ -甘草次酸与奥沙利铂联用显著抑制了小鼠肝细胞瘤原位移植瘤的恶性生长 ( $P < 0.01$ ), 并改善了奥沙利铂毒性相关的体质量下降。**结论** 18 $\beta$ -甘草次酸能够激活 JAK-STAT 信号并诱导 I 型干扰素下游 ISGs 的表达, 同时能与奥沙利铂协同抑制肝癌生长, 从而发挥激活肿瘤免疫的作用。

**关键词:** 18 $\beta$ -甘草次酸; I 型干扰素; 巨噬细胞; 树突状细胞; 肝癌; 免疫调控

**中图分类号:** R285.5      **文献标志码:** A      **文章编号:** 0253-2670(2022)16-5034-10

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.16.013

## 18 $\beta$ -Glycyrrhetic acid enhances response of type I interferon in innate immune cells and inhibits hepatocellular carcinoma growth

LI Shuo, BAI Jin-zhao, LIU Run-ping

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

**Abstract: Objective** To identify the regulative effects of 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid (18 $\beta$ -Ga) on type I interferon (IFN-I) responses in innate immune cells, and evaluate its antitumor effects in hepatocellular carcinoma (HCC) model mice. **Methods** CCK-8 assay was performed to detect the effect of 18 $\beta$ -Ga on proliferation of RAW264.7 cells. qRT-PCR was used to detect the effect of 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid on interferon beta 1 (*Ifnb1*), interferon stimulated gene 15 (*Isg15*) and interferon-induced protein 1 (*Ifit1*) mRNA expressions in immune cells [RAW264.7 cells, mouse bone marrow-derived macrophages (BMDM), mouse bone marrow-derived dendritic cells (BMDC)]. qRT-PCR analysis was used to detect the mRNA levels of *Isg15* and *Ifit1* upon 18 $\beta$ -Ga and IFN $\alpha$ 2 administration in immune cells. The phosphorylation levels of Janus kinase 1 (JAK1), tyrosine kinase 2 (TYK2), signal transducers

收稿日期: 2022-05-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82004029); 北京市科技新星项目 (Z201100006820025, Z211100002121167); 中华中医药学会青年人才托举工程 (CACM-2020-QNRC2-04)

作者简介: 李 硕, 硕士研究生, 研究方向为天然产物的免疫活性。E-mail: ls18845611672@163.com

\*通信作者: 刘闰平, 教授, 博士生导师, 研究方向为消化系统疾病机制和潜在治疗靶点的转化医学研究。E-mail: liurunping@bucm.edu.cn

#共同第一作者: 白金钊, 硕士研究生, 研究方向为中药消化药理。E-mail: baijz@foxmail.com

and activators of transcription 1 (STAT1) and STAT2 were detected by western blotting. Hepatocellular carcinoma model was established by orthotopic tumor transplantation, and model mice were randomly divided into model group, oxaliplatin group, oxaliplatin + 18 $\beta$ -Ga group. Mice were treated with oxaliplatin and 18 $\beta$ -Ga after modeling. Body weight, tumor weight, spleen weight, liver weight and liver coefficient were evaluated. **Results** 18 $\beta$ -Ga significantly increased the mRNA levels of *Ifnb1*, *Isg15* and *Ifit1* expression ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ) and facilitated IFN $\alpha$ 2-induced *Isg15* and *Ifit1* expressions ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ). IFN-I-promoting activity of 18 $\beta$ -Ga may depend on the enhancement of JAK1, TYK, STAT1, and STAT2 phosphorylation ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ). The combination of 18 $\beta$ -Ga and oxaliplatin significantly inhibited the tumor growth of hepatocellular carcinoma orthotopic xenograft tumors in mice ( $P < 0.01$ ), and improved the weight loss associated with oxaliplatin toxicity. **Conclusion** 18 $\beta$ -Ga has significant stimulatory effects on immune response by enhancing JAK-STAT signaling and inducing the ISGs expression in response to IFN-I. Meanwhile, 18 $\beta$ -Ga can synergistically inhibit the growth of liver cancer with oxaliplatin, thereby activating tumor immunity.

**Key words:** 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid; type I interferon; macrophage; dendritic cell; hepatocellular carcinoma; immunoregulation

中医药的发展源远流长, 历久弥新。中医药已在非典型性肺炎、新型冠状病毒肺炎、肺癌、乳腺癌、慢性炎症等免疫相关疾病的治疗中展现了其特色治疗优势<sup>[1-2]</sup>。中医对免疫的理解主要体现在“正气存内, 邪不可干; 邪之所凑, 其气必虚”, 所谓扶正, 即为提高机体免疫能力<sup>[3]</sup>。现代研究显示, 中药及其活性成分在免疫相关疾病的治疗中具有多层次、多靶点、稳定免疫系统、增强细胞免疫同时抑制炎症因子等特点<sup>[2]</sup>。如人参具有“大补元气”的功效, 其活性成分人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 通过下调细胞程序性死亡-配体 1 (programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1) 恢复 T 细胞对癌细胞的细胞毒性<sup>[4]</sup>; 黄芪具有“补气升阳”之效, 黄芪中的黄芪多糖是中国农业农村部批准使用的免疫增强剂, 能够调节固有免疫和适应性免疫系统<sup>[5]</sup>; 甘草具有“补脾益气、清热解毒”的功效, 多篇研究报道了甘草及其活性成分能够通过调控核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 通路缓解溃疡性结肠炎、肝缺血再灌注损伤、急性肾损伤等疾病<sup>[6-8]</sup>。

固有免疫是宿主抵御病原微生物的第一道防线, 也是人类炎症性疾病的重要调节剂<sup>[9]</sup>。I 型干扰素 (type I interferons, IFN-I) 通过促进抗原呈递和自然杀伤细胞功能, 同时抑制炎症信号和细胞因子的产生, 在维持固有免疫稳态中发挥着重要作用。IFN-I 家族由 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\delta$ 、IFN- $\epsilon$ 、IFN- $\kappa$ 、IFN- $\tau$  和 IFN- $\omega$  7 种成员构成<sup>[10]</sup>。IFN-I 可以由大多数细胞感知病原体后分泌, 以巨噬细胞和树突状细胞为代表的固有免疫细胞是其主要来源<sup>[11]</sup>。IFN-I 以自分泌或旁分泌方式结合在由干扰素- $\alpha/\beta$  二聚体受体 1 (interferon alpha/beta receptor 1, IFNAR1) 和 IFNAR2 亚基构成的异质二聚体跨膜受体上, 随后激活 Janus 激酶 1 (Janus kinase 1, JAK1) 和酪氨酸

激酶 2 (tyrosine kinase 2, TYK2), 并参与信号传导及转录激活因子 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 聚集、酪氨酸磷酸化和二聚物形成的过程。磷酸化的 STAT1 和 STAT2 形成二聚物并转移至核内, 与干扰素调节因子 9 (interferon regulatory factors, IRF9) 结合形成干扰素刺激基因因子 3 (interferon-stimulated gene factor 3, ISGF3), 随后激活干扰素刺激基因 (interferon-stimulated genes, ISGs) 的转录<sup>[12]</sup>。ISGs 可以通过正负向调控的方式平衡 IFN-I 介导的病原体识别与非特异性免疫应答, 现已发现的 ISGs 分子有 300 多种, 包括 *Isg15*、干扰素诱导蛋白 1 (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1, *Ifit1*)、寡腺苷酸合成酶 (oligoadenylate synthase, OAS) 等<sup>[13]</sup>。因其特殊活性, 近年来以 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  为代表的 IFN-I 作为一种细胞因子在临床中被广泛研究和应用。多项研究表明, IFN-I 在多种实体肿瘤与血液系统恶性肿瘤中能够抑制肿瘤生长, 延长患者生存期。对其抗肿瘤活性机制的研究主要涉及激活免疫系统、抑制基因组甲基化、IFN-I 通路靶点激活以及 IFN-I 产物 ISGs 作用等方面<sup>[14-16]</sup>。有研究者证明树突状细胞、巨噬细胞通过非特异性免疫系统环鸟苷酸-腺苷酸合成酶 (cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)-干扰素基因刺激蛋白 (stimulator of interferon gene, STING) 途径产生 IFN-I<sup>[17]</sup>, IFN-I 能够直接或间接激活特定的免疫细胞, 发挥强烈的 T 细胞反应, 发挥对肿瘤的识别与消杀作用<sup>[18]</sup>。

本课题组前期研究发现, 甘草水提物具有显著的 IFN-I 激活作用, 并初步提示发挥该作用的单体成分可能是 18 $\beta$ -甘草次酸。因此, 本研究首先在体外系统探究了 18 $\beta$ -甘草次酸对 IFN-I 活性的调控作用及其具体作用靶点, 随后利用小鼠原位肝癌模型

阐明其药理作用,为中药单体成分在 IFN-I 相关疾病的治疗提供实验证据和数据支撑。

## 1 材料

### 1.1 细胞

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 和小鼠肝癌细胞 Hep1-6 购自美国 ATCC。

### 1.2 动物

SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠,体质量 20~25 g, 8 周龄,由斯贝福(北京)实验动物科技有限公司提供,许可证号 SCXK(京)2019-0010。动物饲养于符合 SPF 标准的 12 h 光暗交替环境中,自由进食饮水。所有动物实验和研究经北京中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号 BUCM-4-2020083001-3011),并严格按照章程执行。

### 1.3 药品与试剂

18 $\beta$ -甘草次酸(批号 471-53-4,质量分数 $\geq$ 98%)购自成都普思生物科技股份有限公司;鼠源重组蛋白 IFN $\alpha$ 2、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)、白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)购自苏州近岸蛋白质科技股份有限公司;DMEM 培养基、RPMI 1640 培养基、胎牛血清购自以色列 BI 公司;青霉素-链霉素(批号 10378016)购自美国 Invitrogen 公司;橄榄油(批号 8001-25-0)购自 Baker Dream 公司;奥沙利铂(oxaliplatin, OXA, 批号 61825-94-3)购自上海源叶生物科技有限公司;CCK-8 检测试剂盒购自新赛美公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;RNA 提取试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司;Western blotting 高灵敏度化学发光检测试剂盒购自北京兰博利德生物技术有限公司; $\beta$ -actin 抗体(批号 66009-1-Ig)、t-JAK1 抗体(批号 66466-1-Ig)、p-JAK1 抗体(批号 AP0530)、t-TYK2 抗体(批号 67411-1-Ig)、p-TYK2 抗体(批号 AP0543)、t-STAT1 抗体(批号 A12075)、p-STAT1 抗体(批号 AP0453)、t-STAT2(批号 A3588)、p-STAT2 抗体(批号 AP0284)购自美国 Proteintech 公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体购自上海爱必信生物科技有限公司。

### 1.4 仪器

HERA cellvios 160i 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);CKX53 型倒置光学显微镜(日本 Olympus 公司);Spectramax i3x 型酶标仪(美

国 Molecular Devices 公司);5424R 型冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);Quant Studio™ 6 Flex 型 qRT-PCR 仪(美国 ABI 公司);ChemiDoc™ MP Imaging System(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

RAW264.7 细胞和 Hep1-6 细胞用含 1%青霉素-链霉素、10%胎牛血清的 DMEM 培养基,于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱中培养。根据细胞生长状态,2~3 d 进行换液。当细胞密度达到 80%~85%时,按 1:3 进行传代培养。

### 2.2 小鼠骨髓来源巨噬细胞(bone marrow-derived macrophages, BMDM)和小鼠骨髓来源树突状细胞(bone marrow-dendritic cells, BMDC)的提取与培养

选用 8~10 周龄雄性 C57BL/6 小鼠,脱颈处死后,剔除腿部肌肉及骨盆和股骨的剩余软组织,剪开腿骨两端,12 000 $\times$ g 离心 2 min,收集小鼠骨髓细胞。将收集的细胞培养于含 10%胎牛血清、10% L929 细胞上清的 RPMI 1640 培养基中,第 3、5 天换液。培养 7 d 后,用刮板收集成熟的 BMDM。

将小鼠骨髓细胞培养于含 10%胎牛血清、20 ng/mL GM-CSF、10 ng/mL IL-4 的 RPMI 1640 培养基中,第 2、4 天半量换液。第 6 天,收集悬浮及疏松贴壁生长的细胞,重新铺板后培养 1~2 d,收集悬浮细胞即为成熟的 BMDC。

### 2.3 CCK-8 法检测 RAW264.7 细胞增殖

取处于对数生长期的 RAW264.7 细胞,以 1 $\times$ 10<sup>4</sup> 个/mL 接种于 96 孔板中,每孔 100  $\mu$ L,细胞贴壁后,分别加入不同浓度的含药培养基 100  $\mu$ L,使得 18 $\beta$ -甘草次酸的最终浓度为 1.25、5、20、40、60、80、120、160  $\mu$ mol/L,每个浓度均设置 3 个复孔,对照组加入不含药物的培养基。培养 24 h 后,弃去培养基,每孔加入 100  $\mu$ L 含 10% CCK-8 溶液的培养基,37 °C 避光孵育 1 h,采用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(A)值,计算细胞存活率。

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

### 2.4 qRT-PCR 检测 RAW264.7 细胞、BMDM、BMDC 中 *Ifnb1*、*Isg15* 和 *Ifit1* mRNA 表达

RAW264.7 细胞、BMDM 和 BMDC 分别以 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 个/孔接种于 6 孔板中,于 37 °C 培养箱中孵育过夜后,更换新鲜培养基孵育 1 h,加入不同浓度的药物,使得 18 $\beta$ -甘草次酸的最终浓度为 20、40、60

μmol/L; 培养 1 h 后, 相应的孔中加入 IFNα2 (50 ng/mL)。继续培养 8 h 后, 按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1, 将次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶 1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1, *Hprt1*) 为内参。

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')
<i>Hprt1</i>	F: CAGACTTTGTTGGATTTGAAA R: GCTCATCTTAGGCTTTGTAT
<i>Ifnb1</i>	F: CAGCTCCAAGAAAGGACGAAC R: GGCAGTGTAACTCTTCTGCAT
<i>Isg15</i>	F: GGTGTCCGTGACTAACTCCAT R: TGGAAAGGTAAGACCGTCCT
<i>Ifit1</i>	F: CTGAGATGTCACTTCACATGGAA R: GTGCATCCCCAATGGGTTCT

### 2.5 Western blotting 检测 RAW264.7 细胞中 t-JAK1、p-JAK1、t-TYK2、p-TYK2、t-STAT1、p-STAT1、t-STAT2 和 p-STAT2 蛋白表达

RAW264.7 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中, 于 37 °C 培养箱中孵育过夜后, 更换新鲜培养基孵育 1 h, 加入 50 ng/mL 的 IFNα2 培养, 分别于 0.5、1、2、4、6 h 弃去培养基, 使用 RIPA 裂解缓冲液裂解细胞, 提取总蛋白。

RAW264.7 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中, 于 37 °C 培养箱中孵育过夜后, 更换新鲜培养基孵育 1 h, 加入不同浓度的药物使得 18β-甘草次酸的最终浓度为 20、40、60 μmol/L; 培养 1 h 后, 相应的孔中加入 50 ng/mL 的 IFNα2。继续培养 1 h 后, 弃去培养基, 使用 RIPA 裂解缓冲液裂解细胞, 提取总蛋白。

蛋白与 Loading Buffer 预混并加热变性, 蛋白样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 于脱脂牛奶中封闭, 分别加入相应抗体, 4 °C 孵育过夜; TBST 漂洗后, 加入相应二抗孵育 1 h。使用 ChemiDoc™ MP Imaging System 软件进行成像, 使用 Quantity One 软件进行图像分析。

### 2.6 动物分组、造模及给药

18 只 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠通过手术建立肝癌模型。麻醉机麻醉小鼠并剃去腹部毛发, 用酒精及碘伏棉球为剃毛部位消毒, 沿剑突下方约 0.5 cm 处剪开长度约 1.5 cm, 用 PBS 润湿棉签将肝大叶挤出, 使用微量注射器吸取 50 μL Hep1-6 细胞悬液 (约  $4 \times 10^6$  个), 沿肝脏边缘注射。将肝大叶挤

回原位后, 逐层缝合伤口。再次对伤口消毒以防感染, 将手术后小鼠放入干净鼠笼中, 观察小鼠状态。

手术后随机分为模型组、奥沙利铂 (7.5 mg/kg) 组和奥沙利铂 (7.5 mg/kg) + 18β-甘草次酸 (100 mg/kg) 组, 每组 6 只。手术 5 d 后, 奥沙利铂组和奥沙利铂+18β-甘草次酸组 ip 奥沙利铂, 模型组 ip 葡萄糖生理盐水, 每 2 天 1 次, 持续 2 周。奥沙利铂+18β-甘草次酸组于第 1 次 ip 奥沙利铂后 1 d 开始, ig 用含 5%二甲基亚砜的橄榄油配制的 18β-甘草次酸溶液, 其他组 ig 含 5%二甲基亚砜的橄榄油, 每 2 天 1 次, 持续 2 周 (造模及给药流程见图 1), 并记录小鼠体质量变化。末次给药 24 h 后, 小鼠麻醉处死, 取肝脾脏, 称定肿瘤、肝脏、脾脏质量, 计算肝脏指数。

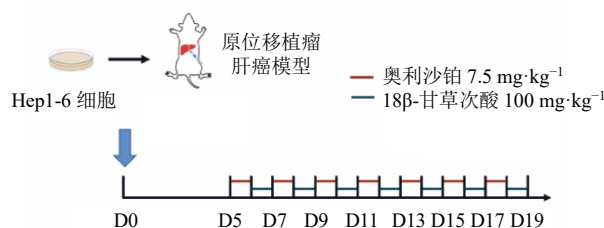


图 1 造模及给药流程

Fig. 1 Modeling and dosing delivery process

### 2.7 统计学分析

实验数据采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行分析, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用 One-way ANOVA 分析。

## 3 结果

### 3.1 18β-甘草次酸对 RAW264.7 细胞增殖的影响

RAW264.7 细胞是药物体外评价的常用细胞系。如图 1 所示, 18β-甘草次酸浓度在 75.33 μmol/L 时 RAW264.7 细胞存活率下降至 50%。因此, 选择无明显细胞毒性的 20、40 和 60 μmol/L 分别作为低、中、高剂量进行后续研究。

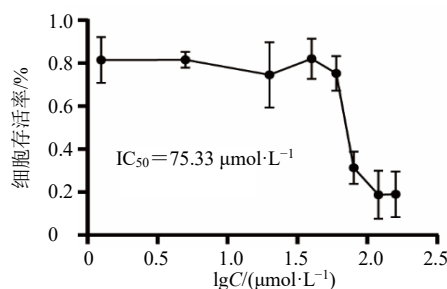


图 1 18β-甘草次酸对 RAW264.7 细胞增殖的影响

Fig. 1 Effect of 18β-glycyrrhetic acid on proliferation of RAW264.7 cells

### 3.2 18β-甘草次酸促进 IFN-I 响应

首先在 RAW264.7 细胞中评价了单独给予高、中、低 3 个剂量的 18β-甘草次酸对 IFN-I 响应的作⽤。如图 2-A 所示，在 RAW264.7 细胞中，与对照组相比，18β-甘草次酸中、高剂量组 *Ifnb1*、*Isg15* 和 *Ifit1* mRNA 表达水平均显著升高 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )，其中高剂量组更为明显，呈剂量相关性。巨噬细胞和树突状细胞均为 IFN-I 的主要来源，而 RAW264.7 细胞并无明显的分化倾向，无法针对性评价 18β-甘草次酸调节 IFN-I 响应的主要靶细胞。因此，从小鼠腿骨中提取并培养原代 BMDM 与 BMDC，考查 18β-甘草次酸对 2 种免疫细胞中 IFN-I 的特异性作

用。如图 2-B 所示，在 BMDM 中，18β-甘草次酸各剂量组 *Isg15* 和 *Ifit1* mRNA 表达水平均显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ )，18β-甘草次酸低、中剂量组 *Ifnb1* mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )，其中低剂量组效果最佳，以上作⽤并没有显著的剂量相关性，可能与高剂量下 BMDM 对 18β-甘草次酸耐受较差，存在一定细胞毒性相关。如图 2-C 所示，在 BMDC 中，18β-甘草次酸低、高剂量组 *Ifnb1* mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )，而 *Isg15* 和 *Ifit1* mRNA 表达水平均无明显变化。表明与树突状细胞相比，18β-甘草次酸在巨噬细胞中具有更强的 IFN-I 激活作⽤。

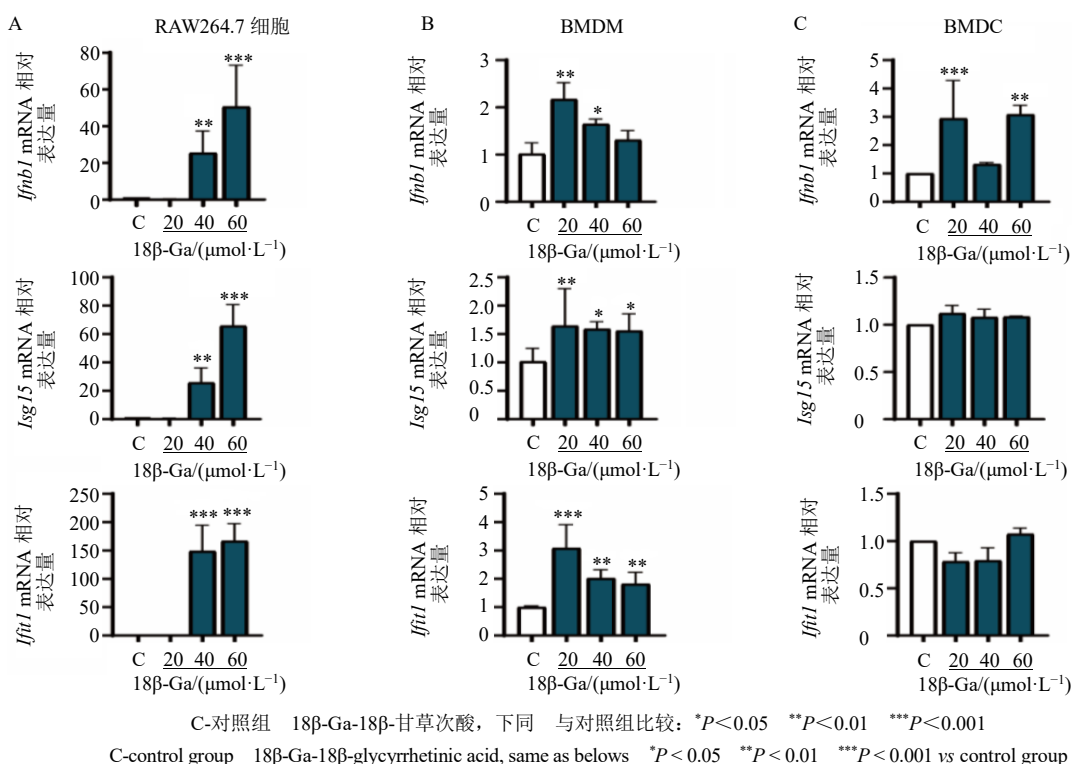


图 2 18β-甘草次酸对 RAW264.7 细胞、BMDM 和 BMDC 中 *Ifnb1*、*Isg15* 和 *Ifit1* mRNA 表达的影响

Fig. 2 Effect of 18β-glycyrrhetic acid on *Ifnb1*, *Isg15* and *Ifit1* mRNA expressions of RAW264.7 cells, BMDM and BMDC

### 3.3 18β-甘草次酸促进 IFNα2 诱导的下游信号转导和 ISGs 表达

IFN-α 是 IFN-I 的多效性细胞因子，目前已用于肝炎病毒、流感病毒等多种病毒感染性疾病及淋巴瘤、黑色素瘤等多种癌症的临床治疗<sup>[19]</sup>。然而，治疗所需剂量大导致了明显的不良反应，严重限制了其在临床的广泛应用<sup>[20]</sup>。与低毒性、可以增敏 IFN-I 活性的天然产物的联用将有望降低 IFN-α 的使用剂量，从而提高其临床顺应性。因此，接下来

探究了 18β-甘草次酸与 IFNα2 合用对 3 种免疫细胞的影响。如图 3-A 所示，在 RAW264.7 细胞中，IFNα2 增强了 IFN-I 诱导基因 *Isg15* 和 *Ifit1* 的 mRNA 表达，与不同剂量的 18β-甘草次酸合用后总体呈剂量相关性的增强：与对照组相比，高剂量的 18β-甘草次酸与 IFNα2 合用后 *Isg15* mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.001$ )，中、高剂量的 18β-甘草次酸与 IFNα2 合用后 *Ifit1* mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。如图 3-B 所示，在 BMDM 中，IFNα2 诱导



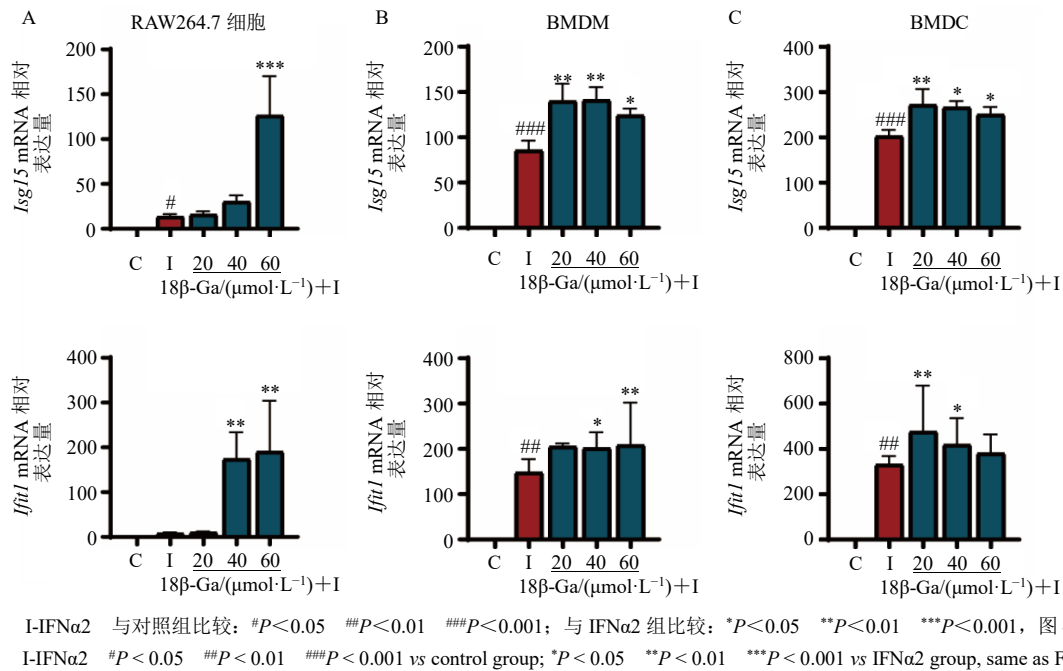


图3 18β-甘草次酸与 IFNα2 合用对 RAW264.7 细胞、BMDM 和 BMDC 中 *Isg15* 和 *Ifit1* mRNA 表达的影响

Fig. 3 Effect of 18β-glycyrrhetic acid combined with IFNα2 on *Isg15* and *Ifit1* mRNA expressions of RAW264.7 cells, BMDM and BMDC

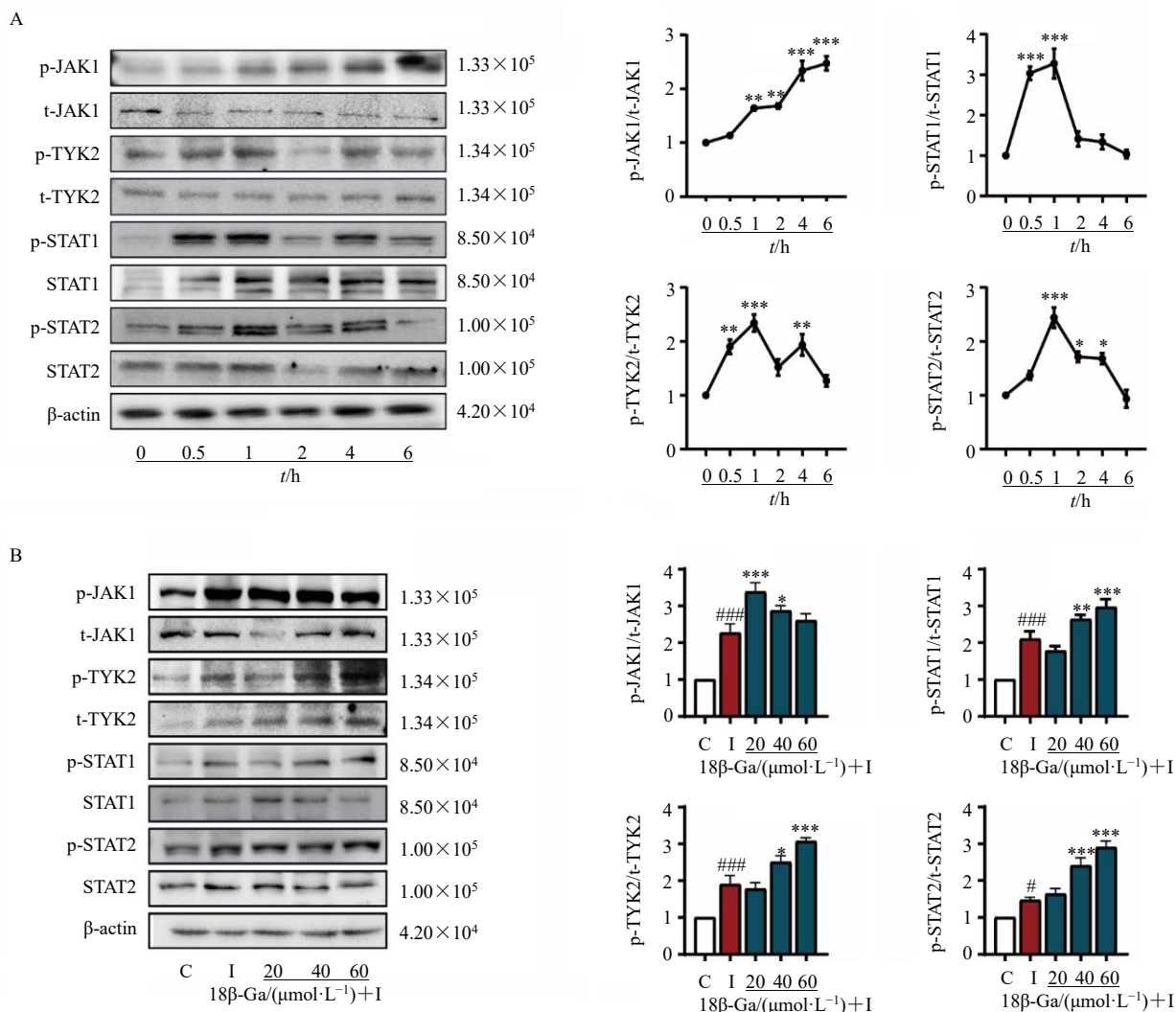
了 IFN-I 下游 *Isg15* 和 *Ifit1* 的 mRNA 表达水平 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )；当与不同剂量的 18β-甘草次酸合用后，与对照组相比，*Isg15* mRNA 表达水平均显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )；中、高剂量的 18β-甘草次酸与 IFNα2 合用后 *Ifit1* mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。如图 3-C 所示，在 BMDC 中，IFNα2 显著增加了 *Isg15* 和 *Ifit1* 的 mRNA 表达 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )；与对照组相比，各剂量的 18β-甘草次酸与 IFNα2 合用后 *Isg15* mRNA 表达水平均显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )；低、中剂量的 18β-甘草次酸与 IFNα2 合用后 *Ifit1* 的 mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。18β-甘草次酸与 IFNα2 协同作用在 BMDM 和 BMDC 中均无显著的剂量相关性。上述结果表明，18β-甘草次酸与 IFNα2 合用能够增强其激活下游 IFN-I 诱导基因的作用。由于在 RAW264.7 细胞中 18β-甘草次酸与 IFNα2 合用作用最强，且呈良好的剂量相关性，后续实验将选择 RAW264.7 细胞作为细胞模型探究其作用机制。

### 3.4 18β-甘草次酸促进 JAK1、TYK2 与 STATs 依赖的信号转导

为了确定 18β-甘草次酸与 IFNα2 协同作用的具体分子靶点，首先探究了 IFNα2 在 RAW264.7 细胞中激活下游事件的最佳时间，分别考察了在给予

IFNα2 后 0.5、1、2、4、6 h 时，IFN-I 下游信号转导关键蛋白 JAK1、TYK2 与 STATs 的磷酸化水平。如图 4-A 所示，t-JAK1 在给予 IFNα2 后降低，而 p-JAK1 随时间持续增加。与对照组相比，JAK1 磷酸化水平随作用时间而升高，在 1 h 时具有显著性差异 ( $P < 0.01$ )，并在 6 h 达到最高点 ( $P < 0.001$ )。IFNα2 对 t-TYK2 无明显影响，但显著升高了 p-TYK2 的水平，在 1 h 时作用最强 ( $P < 0.001$ )。t-STAT1、p-STAT1、t-STAT2、p-STAT2 均在 1 h 时达到峰值，随后降低。IFNα2 刺激细胞 1 h 后，与对照组相比，STAT1 和 STAT2 的磷酸化水平均显著升高 ( $P < 0.001$ )。综合考虑上述结果，选择 1 h 作为 IFNα2 的诱导时间。

接下来考察了 IFNα2 联合不同剂量 18β-甘草次酸对 JAK1、TYK2 与 STATs 磷酸化的影响。如图 4-B 所示，IFNα2 刺激 1 h 后，IFNα2 增加了 JAK1、TYK2、STAT1、STAT2 的磷酸化水平 ( $P < 0.05$ 、 $0.001$ )。与 IFNα2 相比，低剂量的 18β-甘草次酸降低了 t-JAK1 的水平，低、中剂量的 18β-甘草次酸显著增强了 JAK1 磷酸化水平 ( $P < 0.05$ 、 $0.001$ )。不同剂量的 18β-甘草次酸均增加了 t-TYK2 水平，中、高剂量的 18β-甘草次酸显著增强了 TYK2 的磷酸化水平 ( $P < 0.05$ 、 $0.001$ )。低剂量 18β-甘草次酸增加



A-IFNα<sub>2</sub> 刺激 RAW264.7 细胞 0.5~6 h, t-JAK1、p-JAK1、t-TYK2、p-TYK2、STATs 和 p-STATs 蛋白表达; B-18β-甘草次酸与 IFNα<sub>2</sub> 合用后, t-JAK1、p-JAK1、TYK2、p-TYK2、STATs 和 p-STATs 蛋白表达  
A-protein expressions of t-JAK1, p-JAK1, t-TYK2, p-TYK2, t-STATs and p-STAT after IFNα<sub>2</sub> stimulated RAW264.7 cells for 0.5—6 h; B-t-JAK1, p-JAK1, t-TYK2, p-TYK2, t-STATs and p-STATs protein expressions after 18β-glycyrrhethinic acid combined with IFNα<sub>2</sub>

图 4 18β-甘草次酸与 IFNα<sub>2</sub> 合用对 RAW264.7 细胞 JAK1、TYK2 和 STATs 磷酸化的影响

Fig. 4 Effect of 18β-glycyrrhethinic acid combined with IFNα<sub>2</sub> on JAK1, TYK2 and STATs phosphorylation in RAW264.7 cells

了 t-STAT1、t-STAT2 的水平,而中、高剂量 18β-甘草次酸降低了 t-STAT1、t-STAT2 的水平,中、高剂量的 18β-甘草次酸显著升高了 STAT1 和 STAT2 的磷酸化水平 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )。提示 18β-甘草次酸增强了 IFNα<sub>2</sub> 诱导的 JAK1、TYK2 与 STATs 的激活,促进了 IFN-I 下游信号转导,是 18β-甘草次酸协同增强 IFN-I 响应的内在机制。

### 3.5 18β-甘草次酸对小鼠肝细胞癌原位移植瘤生长的影响

如图 5-A、B 所示,与模型组相比,单用奥沙利铂改善了肝癌模型小鼠的体质量下降,减小了肿

瘤体积;如图 5-C 所示,单用奥沙利铂组肿瘤质量降低为模型组的 1/3 ( $P < 0.05$ ),在一定程度上增加了脾脏质量,并降低了肝质量及肝脏指数 ( $P < 0.05$ )。18β-甘草次酸与奥沙利铂合用后进一步改善了小鼠的体质量下降;且肿瘤质量仅为奥沙利铂组的一半 ( $P < 0.01$ ),肝质量及肝脏指数结果也明显优于奥沙利铂组 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。此外,协同给药后脾质量有明显升高 ( $P < 0.05$ ),提示 18β-甘草次酸可能增强了机体的免疫反应。因此,18β-甘草次酸可能通过增强肿瘤免疫反应,协同奥沙利铂的抗肿瘤活性,抑制小鼠原位肝细胞癌的生长。

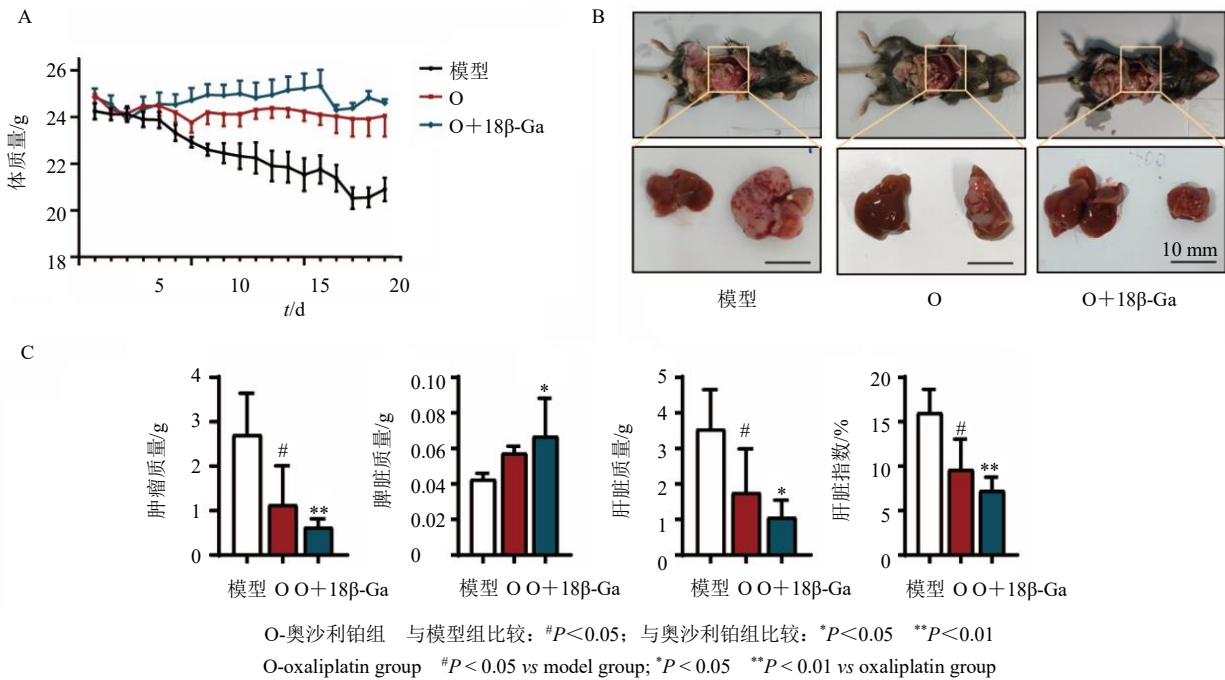


图5 18β-甘草次酸对原发性肝癌小鼠体质量 (A)、肿瘤和肝组织形态 (B) 及肿瘤质量、脾脏质量、肝脏质量、肝脏指数 (C) 的影响

Fig. 5 Effect of 18β-glycyrrhetic acid on body weight (A), tumor and liver tissue morphology (B), and tumor weight, spleen weight, liver weight, liver index (C) in hepatocellular carcinoma mice

#### 4 讨论

甘草是我国传统中药，有“国老”之称<sup>[21]</sup>，其主要活性成分 18β-甘草次酸已被证明具有抗感染、消炎<sup>[22-23]</sup>、保肝<sup>[24]</sup>、抗肿瘤<sup>[25]</sup>等多种功效。目前对 18β-甘草次酸的药理作用机制的研究主要集中于 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) /NF-κB、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) -蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、mTOR/STAT3 等经典炎症通路<sup>[26]</sup>。IFN-I 被认为是慢性炎症性疾病的枢纽，然而，目前 18β-甘草次酸对 IFN-I 的作用尚不明确。本研究中，18β-甘草次酸单独使用或与 IFNα2 合用均能够增强固有免疫细胞中 IFN-I 诱导基因的表达，且在合用时作用更强。这一发现不仅确定了 18β-甘草次酸是一种潜在的 IFN-I 天然激动剂，而且为 18β-甘草次酸治疗免疫低下相关疾病的作用机制提供了新的思路。

当前研究认为，18β-甘草次酸通过加重细胞 DNA 损伤、激活 p53 促凋亡通路、增加活性氧的形成等途径诱导肝癌细胞凋亡<sup>[27-28]</sup>。已有研究证明，固有免疫系统识别肿瘤细胞并激活适应性免疫系统发挥消杀作用依赖于 IFN-I 信号的激活<sup>[29]</sup>。鉴于体外实验中 18β-甘草次酸对 IFN-I 的免疫调节作用及

IFN-I 的肿瘤免疫调节作用，推测增强 IFN-I 响应、逆转免疫抑制性肿瘤微环境可能是其抗肿瘤的新机制。因此，基于 18β-甘草次酸在 IFN-I 介导的免疫应答中的作用，构建小鼠肝癌模型来评价其潜在肿瘤免疫药理作用。化学诱导肝癌模型和移植肝癌模型是目前最为常用的小鼠肝癌模型，然而，化学诱导法的诱癌时间较长，一般为 24~48 周<sup>[30]</sup>；人源肿瘤异种移植操作较为复杂且成本高，且因为缺乏完整的免疫功能而不适用于肿瘤免疫疗法研究<sup>[31]</sup>。因此，本研究通过将鼠源肝癌细胞系 Hep1-6 细胞的细胞悬液直接注射到小鼠肝大叶建立同种原位移植瘤模型，该模型具有成本相对较低、成活率高、成瘤速度快、具有完整的免疫微环境和肝微循环环境等优点。通过与一线化疗药物奥沙利铂合用，18β-甘草次酸显著抑制了原位肝癌的恶性生长，并改善了奥沙利铂毒性相关的体质量下降。一方面，18β-甘草次酸与奥沙利铂联用后可能通过增强 IFN-I 介导的抗肿瘤免疫提高化疗药物对癌细胞的化学敏感性；另一方面，奥沙利铂是一类免疫治疗药物，通过诱导肿瘤细胞发生免疫原性细胞死亡，在细胞表面产生一种“吃我”的信号分子，使得肿瘤细胞更容易被固有免疫细胞识别并吞噬<sup>[32-33]</sup>，18β-甘草次



酸增强 IFN-I 介导的固有免疫的作用有助于奥沙利铂诱导抗肿瘤免疫应答。尽管奥沙利铂已广泛用于直肠癌、肺癌、肝癌等恶性肿瘤的治疗,但是还存在一些不良反应,单独给药存在着患者响应率低、可能引起细胞因子风暴等隐患,与其他小分子化疗药的联用也产生了患者依从性差、失败率高等问题<sup>[29]</sup>。本研究提示,与 18 $\beta$ -甘草次酸的联合用药有望改善奥沙利铂的不良反应,还为 IFN-I 的天然小分子激动剂与化疗药物联用在抗肿瘤中的作用机制提供了新的思路。

综上所述,本研究证明了 18 $\beta$ -甘草次酸能够显著激活 JAK-STAT 信号并诱导 IFN-I 下游 ISGs 的表达,同时阐明了 18 $\beta$ -甘草次酸与奥沙利铂协同激活肿瘤免疫从而抑制肝癌生长的作用。这些发现不仅为全面理解 18 $\beta$ -甘草次酸的免疫调节作用提供了新的见解,并且为 18 $\beta$ -甘草次酸与具有肿瘤细胞免疫原性的化疗药物联用的抗肿瘤新策略研究提供了实验证据和新的思路。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 林跃家, 秦鉴. 中药对新型冠状病毒疾病防治及相关药物研发的启示 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2022, 20(9): 205-208.
- [2] 杨菊, 范治国. 中药对机体免疫功能的调节作用 [J]. 中国药业, 2021, 30(22): 125-127.
- [3] 徐晓楠, 方钰发, 王妍. 中医阴阳与免疫的关系初探 [J]. 四川中医, 2019, 37(2): 25-27.
- [4] 郑厚胜, 郑斯文, 王英平, 等. 人参皂昔 Rg<sub>3</sub> 对环磷酰胺致免疫功能低下小鼠的免疫调节作用 [J]. 中成药, 2021, 43(11): 3202-3206.
- [5] 秦书敏, 林静瑜, 黄可儿. 黄芪的免疫调节作用研究概述 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(3): 699-702.
- [6] 禹铁牛. 异甘草素预处理对大鼠肝缺血再灌注损伤炎症反应及 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路的影响 [D]. 衡阳: 南华大学, 2021.
- [7] 陈仪. 甘草泻心汤对溃疡性结肠炎大鼠 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 炎症信号通路的调控作用研究 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2021.
- [8] 文丹, 廖媛, 李健春, 等. 异甘草素通过 Smad3/Arid2-IR/NF- $\kappa$ B 轴改善顺铂诱导的急性肾损伤小鼠炎症反应 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(6): 25-30.
- [9] Turvey S E, Broide D H. Innate immunity [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 125(2): S24-S32.
- [10] Pestka S, Krause C D, Walter M R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors [J]. *Immunol Rev*, 2004, 202: 8-32.
- [11] Taki S. Type I interferons and autoimmunity: Lessons from the clinic and from IRF-2-deficient mice [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002, 13(4/5): 379-391.
- [12] Jiang J, Zhao M, Chang C, et al. Type I interferons in the pathogenesis and treatment of autoimmune diseases [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2020, 59(2): 248-272.
- [13] Ivashkiv L B, Donlin L T. Regulation of type I interferon responses [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(1): 36-49.
- [14] Borden E C. Interferons  $\alpha$  and  $\beta$  in cancer: Therapeutic opportunities from new insights [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(3): 219-234.
- [15] Bracci L, Proietti E, Belardelli F. IFN-alpha and novel strategies of combination therapy for cancer [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1112: 256-268.
- [16] Tagliaferri P, Caraglia M, Budillon A, et al. New pharmacokinetic and pharmacodynamic tools for interferon-alpha (IFN-alpha) treatment of human cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2005, 54(1): 1-10.
- [17] Woo S R, Fuertes M B, Corrales L, et al. STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors [J]. *Immunity*, 2014, 41(5): 830-842.
- [18] Duong E, Fessenden T B, Lutz E, et al. Type I interferon activates MHC class I-dressed CD11b<sup>+</sup> conventional dendritic cells to promote protective anti-tumor CD8<sup>+</sup> T cell immunity [J]. *Immunity*, 2022, 55(2): 308-323.
- [19] Borden E C. Interferons  $\alpha$  and  $\beta$  in cancer: Therapeutic opportunities from new insights [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(3): 219-234.
- [20] Ferrantini M, Capone I, Belardelli F. Interferon-alpha and cancer: Mechanisms of action and new perspectives of clinical use [J]. *Biochimie*, 2007, 89(6/7): 884-893.
- [21] 罗子宸, 张雯, 杨瑞, 等. 甘草“调和诸药”生物药剂学机制的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(1): 267-277.
- [22] Quan W Y, Kong S Z, Ouyang Q Q, et al. Use of 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid nanocrystals to enhance anti-inflammatory activity by improving topical delivery [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2021, 205: 111791.
- [23] Chen B D, Zhu D C, Xie C L, et al. 18 $\beta$ -Glycyrrhetic acid inhibits IL-1 $\beta$ -induced inflammatory response in mouse chondrocytes and prevents osteoarthritic progression by activating Nrf2 [J]. *Food Funct*, 2021, 12(18): 8399-8410.
- [24] Wu S Y, Wang W J, Dou J H, et al. Research progress on the protective effects of licorice-derived 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid against liver injury [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(1): 18-26.

- [25] Cai Y E, Xu Y Q, Chan H F, *et al.* Glycyrrhetic acid mediated drug delivery carriers for hepatocellular carcinoma therapy [J]. *Mol Pharm*, 2016, 13(3): 699-709.
- [26] 徐宛婷. 18 $\beta$ -甘草次酸抗肺癌活性及其相关机制的研究 [D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2021.
- [27] 赵冬, 刘秋梦, 梁慧芳, 等. 18 $\beta$ -甘草次酸通过抑制信号传导与转录激活因子 3 的激活能够增强人肝癌细胞对索拉非尼的敏感性 [J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(8): 1445-1447.
- [28] 李姗姗. 18 $\beta$ -甘草次酸诱导肝癌细胞凋亡的机制探讨 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [29] Gajewski T F, Corrales L. New perspectives on type I IFNs in cancer [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2015, 26(2): 175-178.
- [30] 单鹏, 宁厚法. 小鼠原发性肝癌模型的研究进展 [J]. *医学综述*, 2018, 24(20): 4010-4015.
- [31] 蒋林含, 谭晓霞, 李俊, 等. 肝癌人源肿瘤异种移植模型的应用研究进展 [J]. *解放军医学杂志*, 2021, 46(10): 1029-1033.
- [32] 冯兵. 基于奥沙利铂前药的纳米载药系统增强肿瘤化疗—免疫治疗效果的研究 [D]. 上海: 中国科学院大学 (中国科学院上海药物研究所), 2019.
- [33] Ahmad S. Platinum-DNA interactions and subsequent cellular processes controlling sensitivity to anticancer platinum complexes [J]. *Chem Biodivers*, 2010, 7(3): 543-66.

[责任编辑 李亚楠]