

ACT001 通过抑制 P65 磷酸化降低胶质母细胞瘤细胞程序性死亡蛋白配体 1 的表达

张锦浩 刘沛东 张辰 李佳博 任泉 陈露露 孙锦章 王旭亚 张亮 杨学军

【摘要】 目的 探讨新型抗肿瘤药物 ACT001 对胶质母细胞瘤细胞核因子- κ B(NF- κ B)信号转导通路活性和细胞程序性死亡蛋白配体 1(PDL1)表达的影响。方法 采用生物信息学分析肿瘤基因组学图谱计划(TCGA)和中国脑胶质瘤基因组学图谱计划(CGGA)数据库中胶质瘤患者病理分级和预后与 P65 和 PDL1 mRNA 表达量的关系。CCK-8 法观察 ACT001 对 U87 细胞增殖活性的影响并计算细胞抑制率和 ACT001 半数抑制浓度,免疫荧光法检测 P65 蛋白在 U87 细胞中的定位变化,小干扰 RNA(siRNA)转染 U87 细胞,实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 P65 蛋白敲低效率,Western blotting 法检测不同转染组和不同浓度药物处理组 P65、磷酸化 P65(p-P65)和 PDL1 相对表达量。结果 (1)生物信息学分析显示,胶质瘤患者 P65 和 PDL1 mRNA 表达量随肿瘤病理分级的升高而呈上升趋势(均 $P < 0.05$),且 P65 和 PDL1 高表达组生存率和总生存期均低于低表达组(均 $P < 0.05$)。(2)细胞增殖活性检测显示,经不同药物浓度 ACT001(5、10、20、40、80、160 和 320 $\mu\text{mol/L}$)处理后,U87 细胞抑制率分别为 $(9.01 \pm 4.75)\%$ 、 $(17.03 \pm 2.91)\%$ 、 $(28.50 \pm 4.85)\%$ 、 $(45.50 \pm 5.15)\%$ 、 $(67.67 \pm 8.46)\%$ 、 $(83.02 \pm 5.79)\%$ 和 $(94.33 \pm 1.59)\%$,ACT001 对 U87 细胞的半数抑制浓度为 42.98 $\mu\text{mol/L}$ 。(3)免疫荧光法显示,经 50 $\mu\text{mol/L}$ ACT001 处理的 U87 细胞 P65 蛋白入核减少。(4)qRT-PCR 法显示,不同 siRNA 转染组 U87 细胞 P65 mRNA 表达量差异有统计学意义($F = 164.200, P = 0.000$),其中 si-P65-1 组($t = 13.290, P = 0.000$)和 si-P65-2 组($t = 12.730, P = 0.000$)P65 mRNA 表达量均低于 si-NC 组。(5)Western blotting 法显示,不同 siRNA 转染组 U87 细胞 P65($F = 681.300, P = 0.000$)、p-P65($F = 128.800, P = 0.000$)和 PDL1($F = 20.470, P = 0.002$)相对表达量差异有统计学意义,其中 si-P65-1 组和 si-P65-2 组 P65($t = 59.630, P = 0.000; t = 29.380, P = 0.000$)、p-P65($t = 24.370, P = 0.000; t = 13.460, P = 0.000$)和 PDL1($t = 6.025, P = 0.004; t = 6.728, P = 0.003$)相对表达量均低于 si-NC 组。(6)不同浓度药物处理组 U87 细胞 p-P65($F = 269.700, P = 0.000$)和 PDL1($F = 128.800, P = 0.000$)相对表达量差异有统计学意义,其中 ACT001 25 $\mu\text{mol/L}$ 组和 50 $\mu\text{mol/L}$ 组 p-P65($t = 19.750, P = 0.000; t = 24.640, P = 0.000$)和 PDL1($t = 12.690, P = 0.000; t = 19.230, P = 0.000$)相对表达量均低于正常对照组,ACT001 50 $\mu\text{mol/L}$ 组亦低于 25 $\mu\text{mol/L}$ 组($t = 5.288, P = 0.006; t = 2.868, P = 0.046$)。结论 ACT001 不仅可以抑制 U87 胶质瘤细胞的增殖,还可以通过抑制 P65 的磷酸化及核转位,从而抑制 PDL1 的表达,以改善胶质瘤的免疫抑制微环境,进而抑制胶质母细胞瘤进展。

【关键词】 胶质母细胞瘤; 倍半萜类; NF- κ B; 程序性细胞死亡受体 1; 配体; 细胞增殖; 转染; 显微镜检查,荧光; 免疫印迹法; 肿瘤细胞,培养的

ACT001 reduced the expression of programmed cell death protein ligand 1 in glioblastoma cells by inhibiting P65 phosphorylation

ZHANG Jin-hao, LIU Pei-dong, ZHANG Chen, LI Jia-bo, REN Xiao, CHEN Lu-lu, SUN Jin-zhang, WANG Xu-ya, ZHANG Liang, YANG Xue-jun

Department of Neurosurgery, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Corresponding author: YANG Xue-jun (Email: ydenny@126.com)

【Abstract】 Objective To investigate the anti-tumoral effect of ACT001, a novel antitumor

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2021.06.013

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:81872063)

作者单位:300052 天津医科大学总医院神经外科

通讯作者:杨学军,Email:ydenny@126.com

compound, on the nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway and programmed cell death protein ligand 1 (PDL1) expression in U87 glioblastoma cell line. **Methods** We analyzed the correlation between the expression of P65 and PDL1, pathological grade, and prognosis by introducing The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Chinese Glioma Genome Atlas (CGGA) databases. CCK-8 was used to observe the effect of ACT001 on the proliferation of U87 cells, and calculate the median inhibition concentration (IC50). Immunofluorescence staining was used to detect the effect of ACT001 on nuclear translocation of the transcription factor P65. U87 cells were transfected with small interference RNA (siRNA), and P65 knockdown efficiency was determined by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The relative expression of P65, phospho-P65 (p-P65) and PDL1 in different transfected groups and drug treatment groups were determined by Western blotting. **Results** 1) Bioinformatics analysis showed that gliomas with higher pathological grade harbored higher P65 and PDL1 expression ($P < 0.05$, for all). Moreover, patients with high expression of P65 and PDL1 mRNA predicted poor prognosis ($P < 0.05$, for all). 2) CCK-8 assay showed that treatment with different concentrations of ACT001 (5, 10, 20, 40, 80, 160 and 320 $\mu\text{mol/L}$), the inhibition rates of U87 cells were $(9.01 \pm 4.75)\%$, $(17.03 \pm 2.91)\%$, $(28.50 \pm 4.85)\%$, $(45.50 \pm 5.15)\%$, $(67.67 \pm 8.46)\%$, $(83.02 \pm 5.79)\%$ and $(94.33 \pm 1.59)\%$, respectively, and the IC50 was about 42.98 $\mu\text{mol/L}$. 3) Immunofluorescence staining showed that ACT001 inhibited nuclear translocation of P65. 4) qRT-PCR showed that the P65 mRNA expression of U87 cells in different siRNA transfected groups was statistically significant ($F = 164.200$, $P = 0.000$), and the mRNA expression of P65 in si-P65-1 group ($t = 13.290$, $P = 0.000$) and si-P65-2 group ($t = 12.730$, $P = 0.000$) was lower than that of si-NC group. 5) Western blotting showed that the relative expression of P65 ($F = 681.300$, $P = 0.000$), p-P65 ($F = 128.800$, $P = 0.000$) and PDL1 ($F = 20.470$, $P = 0.002$) in U87 cells of different siRNA transfection groups were statistically significant different. Among them, P65 ($t = 59.630$, $P = 0.000$; $t = 29.380$, $P = 0.000$), p-P65 ($t = 24.370$, $P = 0.000$; $t = 13.460$, $P = 0.000$) and PDL1 ($t = 6.025$, $P = 0.004$; $t = 6.728$, $P = 0.003$) in si-P65-1 group and si-P65-2 group were lower than those in si-NC group. 6) There were statistically significant differences in the relative expression of p-P65 ($F = 269.700$, $P = 0.000$) and PDL1 ($F = 128.800$, $P = 0.000$) in U87 cells treated with different concentrations of drugs. p-P65 ($t = 19.750$, $P = 0.000$; $t = 24.640$, $P = 0.000$) and PDL1 ($t = 12.690$, $P = 0.000$; $t = 19.230$, $P = 0.000$) in ACT001 25 $\mu\text{mol/L}$ group and 50 $\mu\text{mol/L}$ group were lower than those in normal control group, ACT001 50 $\mu\text{mol/L}$ group were also lower than those of 25 $\mu\text{mol/L}$ group ($t = 5.288$, $P = 0.006$; $t = 2.868$, $P = 0.046$). **Conclusions** ACT001 can inhibit the proliferation of U87 glioma cells. By inhibiting the phosphorylation and nuclear translocation of P65 in U87 cells, ACT001 decreased the expression of PDL1 to improve the immunosuppressive environment of glioblastoma and thus inhibit the progression of glioblastoma.

【Key words】 Glioblastoma; Sesquiterpenes; NF- κ B; Programmed cell death 1 receptor; Ligands; Cell proliferation; Transfection; Microscopy, fluorescence; Immunoblotting; Tumor cells, cultured

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81872063).

Conflicts of interest: none declared

胶质瘤是临床最常见的颅内原发性中枢神经系统肿瘤,其中以多形性胶质母细胞瘤(GBM)恶性程度最高,约占原发性中枢神经系统恶性肿瘤的47.1%^[1]。尽管以保护神经功能为前提的最大范围手术切除肿瘤,联合术后同步放化疗和替莫唑胺序贯化疗,以及肿瘤电场治疗(TTF)^[2-3]的应用可以改善预后,但遗憾的是,胶质母细胞瘤患者5年生存率仅为5.5%,其中位生存期也仅为14.6个月^[4],主要是由于中枢神经系统特有的血-脑屏障结构和胶质母细胞瘤特殊的免疫抑制微环境所致。有研究显示,免疫检查点如细胞程序性死亡蛋白1(PD1)及其配体(PDL1)^[5]、T细胞免疫球蛋白黏蛋白分子-3(TIM-3)^[6]在胶质母细胞瘤中呈高表达,且与不良预

后密切相关。因此,免疫治疗仍是改善胶质瘤患者预后的重要策略。从小白菊分离出来的小白菊内酯(PTL)具有广泛的抗炎症和抗肿瘤作用^[7],但在酸性和碱性条件下不稳定,水溶性差,口服生物利用率低^[8],通过改进其化学结构获得的含笑内酯(MCL)及其衍生物二甲氨基含笑内酯(DMAMCL)富马酸盐即ACT001,具有相对分子量低、稳定性强、易溶于水、毒性作用小、血-脑屏障通透性高等优点,可抑制胶质瘤的生长^[9-10]。业已证实,PTL可以显著抑制核因子- κ B(NF- κ B)和信号转导与转录激活因子3(STAT3)信号转导通路活性^[11]。NF- κ B作为转录因子,通过直接调控下游基因表达或与其他信号转导通路交联作用,在肿瘤的发生发展过程中

发挥重要的作用,已知其在乳腺癌和结肠癌中通过转录后调节以调控 PDL1 的表达^[12-13]。鉴于此,本研究探究 ACT001 是否能够通过抑制胶质母细胞瘤细胞 NF- κ B 信号转导通路活性,下调 PDL1 表达,改善免疫抑制微环境,进而抑制胶质母细胞瘤进展。

材料与方法

一、实验材料

1. 细胞来源 人胶质瘤细胞系 U87 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,在天津医科大学总医院神经病学研究所液氮中常规保存。

2. 试剂与设备 (1) 药品与试剂:ACT001 由南开大学药学院提供,DMEM 培养基和胎牛血清均购自美国 Gibco 公司,CCK-8 试剂盒为上海东仁化学科技公司产品,Lipofectamine RNAiMAX 转染试剂购自美国 Thermo 公司,小干扰 RNA (siRNA) 由苏州吉玛基因股份有限公司提供,P65 和兔抗人单克隆抗体(1:200)为美国 CST 公司产品,Alexa Fluor 594 标记的驴抗兔荧光 IgG II 抗(1:1000)由美国 Invitrogen 公司提供,体积分数为 1% 的 TritonX-100 溶液、RIPA 裂解液[按 1:100 比例加入蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF)和磷酸酶抑制剂]和 BCA 蛋白定量试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司,Trizol 溶液为美国 Ambion 公司产品,实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)试剂盒(Master Mix 试剂盒)和逆转录试剂盒为美国 Promega 公司产品,I 抗工作液包括兔抗人 P65 和磷酸化 P65(p-P65)单克隆抗体(1:1000)购自美国 CST 公司、兔抗人 PDL1 单克隆抗体(1:1000)购自美国 Abcam 公司、内参照物小鼠抗人 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(1:1000)购自北京中杉金桥生物技术有限公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗鼠和山羊抗兔 IgG II 抗(1:3000)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。(2) 仪器与设备:含 5% 二氧化碳的 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱由德国 Heraeus 公司提供,Synergy 2 多功能酶标仪由美国 BioTek 公司提供,IX73 倒置相差荧光显微镜为美国 Olympus 公司产品,凝胶成像分析系统购自美国 BD 公司。

二、实验方法

1. 生物信息学分析 肿瘤基因组学图谱计划(TCGA)数据从其官网(<https://cancergenome.nih.gov/>)下载,包含 695 例胶质瘤患者和 5 例正常对照者的转录组测序(RNA-seq)结果及其中 605 例胶质

瘤患者的总生存期(OS);中国脑胶质瘤基因组学图谱计划(CGGA)数据从其官网(<http://www.cgga.org.cn/>)下载,包含 325 例胶质瘤患者的 RNA-seq 测序结果及其中 222 例患者的总生存期。采用 R 语言数据分析软件(R version 4.0.2, <https://www.R-project.org/>)分析 TCGA 和 CGGA 数据库中胶质瘤病理分级和预后与 P65 和 PDL1 mRNA 表达量的关系,其中,图形绘制使用 ggplot 程序包(<https://ggplot2.tidyverse.org/>),生存分析使用 survival 程序包(<https://CRAN.R-project.org/package=survival>)和 survminer 程序包(<https://CRAN.R-project.org/package=survminer>),统计分析使用 ggsignif 程序包(<https://CRAN.R-project.org/package=ggsignif>)。

2. CCK-8 法检测细胞增殖活性 将 U87 细胞接种于 96 孔板,细胞接种数目为 2000 个/孔,每组设置 6 个平行孔,置于含 5% 二氧化碳的 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中接种 12 h,抽干原培养基,更换为含不同浓度 ACT001 的培养基 100 μ l,ACT001 终浓度分别为 5、10、20、40、80、160 和 320 μ mol/L;同时设置空白对照组(无 U87 细胞)和正常对照组(含 U87 细胞但不滴加 ACT001)。各组细胞均置于细胞培养箱中培养 48 h,每孔加入 CCK-8 溶液 10 μ l,静置 2 h 后于酶标仪上测定 450 nm 处光密度值(OD 值),计算细胞抑制率,细胞抑制率(%) = [(正常对照孔 OD_{450 nm} - 实验孔 OD_{450 nm}) / (正常对照孔 OD_{450 nm} - 空白对照孔 OD_{450 nm})] \times 100%,再采用 GraphPad 软件(<http://www.graphpad.com/>)绘制细胞抑制率与 ACT001 浓度的标准曲线,并计算 ACT001 半数抑制浓度(IC₅₀)。

3. 免疫荧光法检测 P65 蛋白在 U87 细胞中的定位变化 经 50 μ mol/L ACT001 处理的 U87 细胞和正常对照组 U87 细胞培养 48 h 后,去除培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)快速冲洗 5 min(\times 3 次),滴加体积分数为 4% 的多聚甲醛溶液固定 10 min,磷酸盐缓冲液摇洗 5 min(\times 3 次),加入体积分数为 1% 的 TritonX-100 溶液室温通透 10 min,磷酸盐缓冲液摇洗 5 min(\times 3 次),滴加体积分数为 5% 的山羊血清于 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h,弃血清,加入兔抗人 P65 单克隆抗体(1:200),4 $^{\circ}$ C 过夜孵育,次日弃 I 抗,磷酸盐缓冲液冲洗 5 min(\times 3 次)后加入 Alexa Fluor 594 标记的驴抗兔荧光 IgG II 抗(1:1000),避光湿盒孵育 1 h 后,弃 II 抗,磷酸盐缓冲液冲洗 5 min(\times 3 次)后滴加 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI),室温静置 5 min,以抗荧光衰减剂封片,避光条件下于倒置相差荧光

显微镜下观察,呈红色荧光的细胞即为 P65 蛋白的定位。

4. siRNA 转染 U87 细胞 首先将 U87 细胞接种于 6 孔板,细胞接种数目为 $(80 \sim 100) \times 10^3$ 个/孔,当细胞密度达 60%~80% 时进行转染。转染前,先将 6 孔板中完全培养基更换为无血清培养基,置于细胞培养箱中培养 30 min,每孔准备 2 支 1.50 ml 无菌 EP 管,一支加入 100 μ l 无血清培养基 + 6 μ l Lipofectamine RNAiMAX 转染试剂(A 管),另一支加入 100 μ l 无血清培养基 + 150 pmol siRNA (B 管)。将 A 管的转染试剂培养基混合物滴加至 B 管的 siRNA 培养基混合物,混匀,室温静置 15~20 min 后立即转染;将 200 μ l 混合物分别滴加至各自 6 孔板,混匀,P65 siRNA 由苏州吉玛基因股份有限公司进行设计合成,P65 干扰序列 1 (si-P65-1 组)为 5'-GAUGAAGACUUCUCCUCCATT-3'、P65 干扰序列 2 (si-P65-2 组)为 5'-CAGAUACAGACGAUCGUCATT-3'、无义序列 (si-NC 组)为 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',转染 12 h 后更换为完全培养基继续培养 48 h。

5. 实时定量聚合酶链反应检测 P65 蛋白敲低效率 经 siRNA 转染的 U87 细胞置于含 5% 二氧化碳的 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 48 h,Trizol 溶液提取 RNA,按照逆转录试剂盒的说明逆转录为 cDNA,行 qRT-PCR,PCR 引物序列为,P65 正向引物序列:5'-AAGATCTGCCGAGTGAACCG-3'、反向引物序列:5'-GCCTGGTCCCGTCAAATACA-3',内参照物甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)正向引物序列:5'-GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA-3'、反向引物序列:5'-GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT-3'。反应体系共 20 μ l,主要包括 cDNA 1 μ l、正向和反向引物各为 1 μ l、2 \times Master Mix 10 μ l、DEPC 水 7 μ l。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,循环 1 次;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,共循环 40 次。以 GAPDH 为内参照物计算 P65 蛋白相对表达量,计算公式为:相对表达量 = $2^{-(\Delta\text{CT}_{\text{实验组目的 RNA}} - \Delta\text{CT}_{\text{对照组目的 RNA}})}$ 。

6. Western blotting 法检测目的蛋白相对表达量 经 25 和 50 μ mol/L ACT001 处理的 U87 细胞以及正常对照组 U87 细胞培养 48 h 后,RIPA 裂解液(按 1:100 比例加入蛋白酶抑制剂 PMSF 和磷酸酶抑制剂)提取总蛋白,按照 BCA 蛋白定量试剂盒测定总蛋白浓度后,行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),采用聚偏二氟乙烯(PVDF)转

膜以及牛奶封闭后,滴加 I 抗工作液,包括兔抗人 P65、p-P65 和 PDL1 单克隆抗体以及内参照物小鼠抗人 β -actin 单克隆抗体(均 1:1000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,滴加辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠和山羊抗兔 IgG II 抗(1:3000)。凝胶成像分析系统采集 P65、p-P65 和 PDL1 条带结果,并采用 Image J 软件进行量化分析,以 β -actin 作为内参照物,计算目的蛋白的相对表达量。

7. 统计分析方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据处理与分析。呈正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,两两比较行 LSD-*t* 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

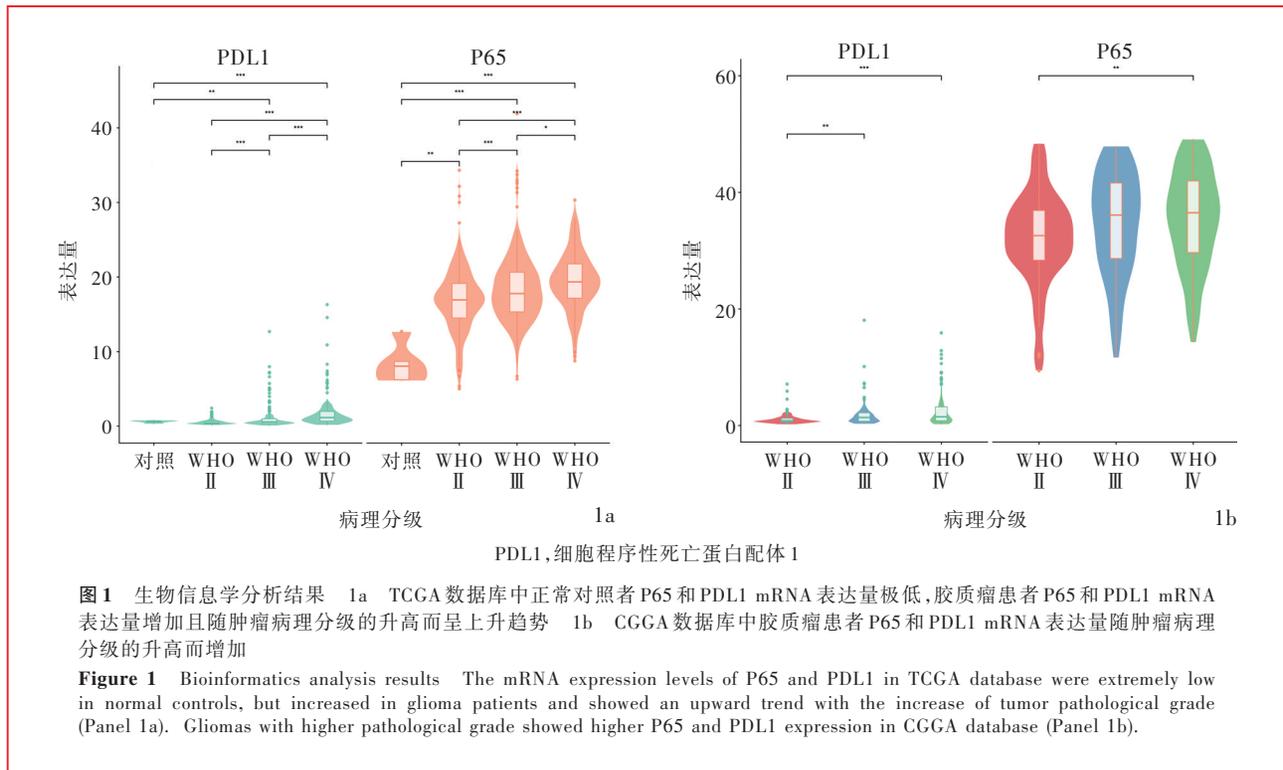
生物信息学分析显示,正常对照者 P65 和 PDL1 mRNA 表达量极低,胶质瘤患者 P65 和 PDL1 mRNA 表达量增加且随肿瘤病理分级的升高而呈上升趋势,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$,图 1);胶质瘤患者中 P65 和 PDL1 高表达组生存率和生存期均低于低表达组且差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$,图 2)。

细胞增殖活性检测结果显示,经不同药物浓度 ACT001 (5、10、20、40、80、160 和 320 μ mol/L) 处理后,U87 细胞抑制率分别为 $(9.01 \pm 4.75)\%$ 、 $(17.03 \pm 2.91)\%$ 、 $(28.50 \pm 4.85)\%$ 、 $(45.50 \pm 5.15)\%$ 、 $(67.67 \pm 8.46)\%$ 、 $(83.02 \pm 5.79)\%$ 和 $(94.33 \pm 1.59)\%$,从而最终得出 ACT001 对 U87 细胞的半数抑制浓度为 42.98 μ mol/L(图 3)。

免疫荧光染色显示,与正常对照组相比,经 50 μ mol/L ACT001 处理的 U87 细胞 P65 蛋白入核减少,表明 ACT001 主要通过减少 P65 蛋白入核以抑制 NF- κ B 信号转导通路活性(图 4)。

qRT-PCR 反应显示,不同 siRNA 转染组 U87 细胞 P65 mRNA 表达量差异具有统计学意义($P = 0.000$,表 1)。两两比较结果显示,si-P65-1 组($t = 13.290$, $P = 0.000$)和 si-P65-2 组($t = 12.730$, $P = 0.000$)P65 mRNA 表达量低于 si-NC 组。si-P65-1 组与 si-P65-2 组差异无统计学意义($t = 0.852$, $P = 0.427$),表明 si-P65-1 组和 si-P65-2 组较 si-NC 组敲低 P65 蛋白的效果显著。

Western blotting 法显示,不同 siRNA 转染组 U87 细胞 P65($P = 0.000$)、p-P65($P = 0.000$)和 PDL1($P =$



0.002) 相对表达量差异具有统计学意义(表 2)。两两比较显示, si-P65-1 组和 si-P65-2 组 P65 ($P = 0.000, 0.000$)、p-P65 ($P = 0.000, 0.000$) 和 PDL1 ($P = 0.004, 0.003$) 相对表达量低于 si-NC 组, si-P65-1 组与 si-P65-2 组之间差异无统计学意义(均 $P > 0.05$; 表 3, 图 5), 表明减少 U87 细胞 P65 磷酸化水平, 可以抑制 PDL1 的表达。不同浓度药物处理组 U87 细胞 P65 相对表达量差异无统计学意义 ($P = 0.904$), 然而, p-P65 ($P = 0.000$) 和 PDL1 ($P = 0.000$) 的相对表达量差异均具有统计学意义(表 4), 其中, ACT001 25 $\mu\text{mol/L}$ 组和 50 $\mu\text{mol/L}$ 组 p-P65 ($P = 0.000, 0.000$) 和 PDL1 ($P = 0.000, 0.000$) 相对表达量均低于正常对照组, ACT001 50 $\mu\text{mol/L}$ 组 p-P65 ($P = 0.006$) 和 PDL1 ($P = 0.046$) 相对表达量亦低于 25 $\mu\text{mol/L}$ 组(表 5, 图 6), 表明 ACT001 对 P65 的表达无明显影响, 但抑制 P65 磷酸化和 PDL1 表达, 且呈现药物浓度依赖性。

讨 论

胶质瘤尤其是胶质母细胞瘤恶性程度高、预后差, 许多针对胶质母细胞瘤的靶向药物均未能有效延长患者的中位生存期, 独特的免疫抑制微环境发挥重要作用。胶质母细胞瘤细胞表达的免疫检查点 PDL1 通过与肿瘤微环境中 T 淋巴细胞表达的

PDL1 结合, 诱导 T 淋巴细胞凋亡, 最终导致肿瘤细胞免疫逃逸。此外, 胶质母细胞瘤还通过调节白细胞介素-10(IL-10) 信号转导通路以促进正常单核细胞的 PDL1 表达^[14-15]。本研究对来自 TCGA 和 CGGA 数据库的胶质瘤患者进行生物信息学分析, 发现 PDL1 mRNA 表达量随胶质瘤病理分级的升高而呈上升趋势, 且高表达组生存率和总生存期均低于低表达组。免疫检查点 PDL1 在胶质瘤免疫抑制微环境中发挥重要作用, 本研究进一步通过实验证明, ACT001 通过降低胶质母细胞瘤细胞 PDL1 的表达, 以改善肿瘤免疫抑制微环境。

NF- κ B 作为转录因子, 通过直接调控下游基因的表达或与其他信号转导通路的交联作用, 在肿瘤的发生发展过程中发挥极其重要的作用^[16]。NF- κ B 转录因子家族包括 NF- κ B1(P50)、NF- κ B2(P52)、RelA(P65)、RelB 和 cRel, 且这些亚基之间可以形成多种同二聚体和异二聚体, 其中 P50/P65 是最常见的二聚体。多数情况下, P50/P65 二聚体通过与胞质中核因子- κ B 抑制蛋白(I κ B) 抑制因子家族(I κ B α 、I κ B β 和 I κ B ϵ) 中的任一结合, 而被锚定在胞质中以无活性状态存在; 多种刺激如细菌脂多糖(LPS) 或肿瘤坏死因子 α (TNF- α), 使 I κ B 激酶激活 I κ B 的丝氨酸磷酸化, 引起 I κ B 降解, 继而导致 P50/P65 二聚体磷酸化并移位入核, 再与特定基因

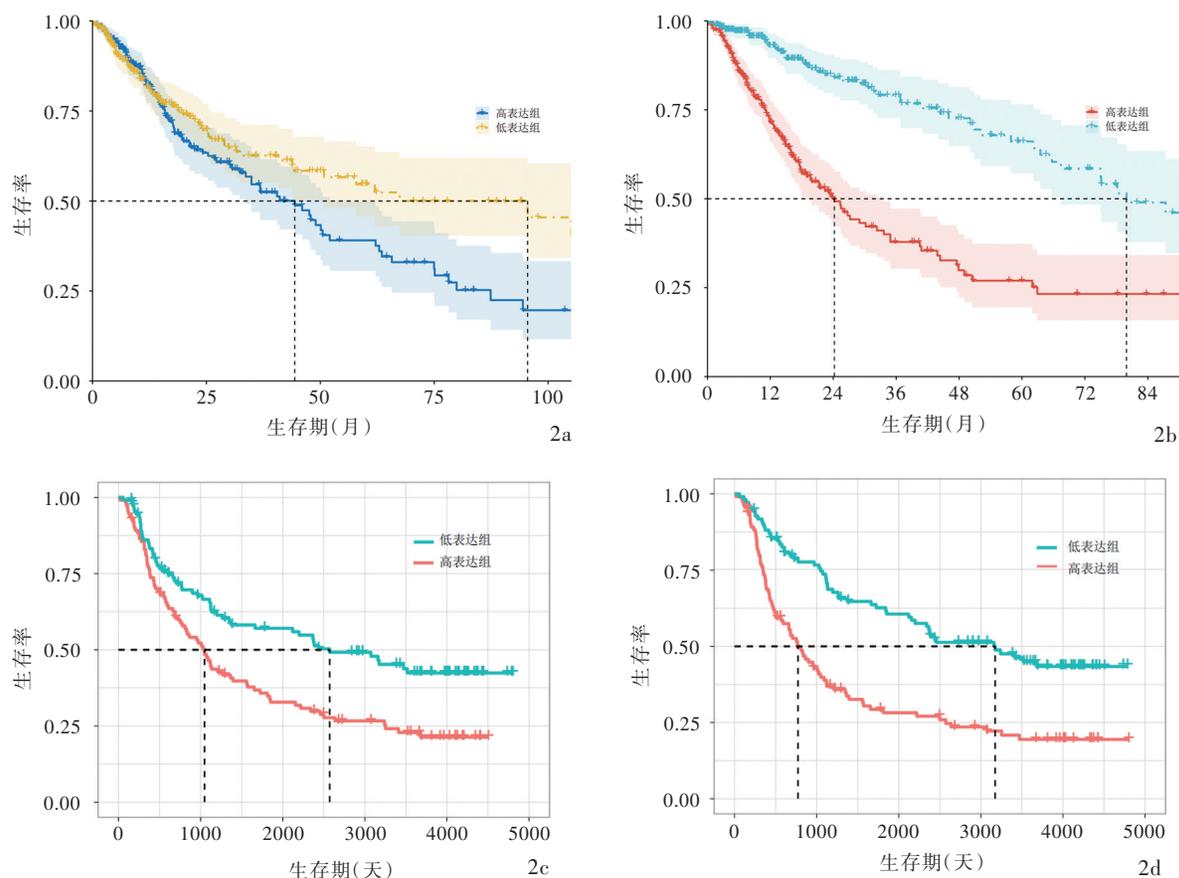


图2 生物信息学分析结果 2a TCGA数据库中胶质瘤患者P65 mRNA高表达组生存率和生存期均低于低表达组($P=0.05$) 2b TCGA数据库中胶质瘤患者PDL1 mRNA高表达组生存率和生存期均低于低表达组($P=0.000$) 2c CGGA数据库中P65 mRNA高表达组生存率和生存期均低于低表达组($P=0.001$) 2d CGGA数据库中PDL1 mRNA高表达组生存率和生存期均低于低表达组($P=0.000$)

Figure 2 Bioinformatics analysis results In TCGA database, the survival rate and survival time in the group with high P65 mRNA expression in glioma patients were lower than those in the group with low expression ($P=0.05$, Panel 2a). In TCGA database, the survival rate and survival time in the group with high PDL1 mRNA expression in glioma patients were lower than those in the group with low expression ($P=0.000$, Panel 2b). In CGGA database, the survival rate and survival time of the group with high P65 mRNA expression were lower than those of the group with low expression ($P=0.001$, Panel 2c). In CGGA database, the survival rate and survival time of the group with high PDL1 mRNA expression were lower than those of the group with low expression ($P=0.000$, Panel 2d).

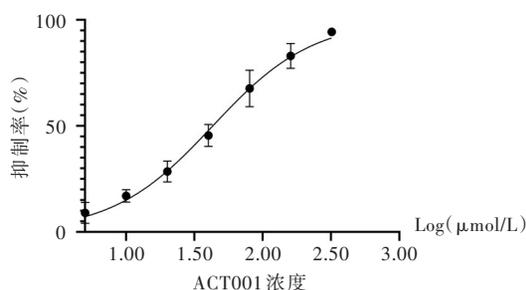
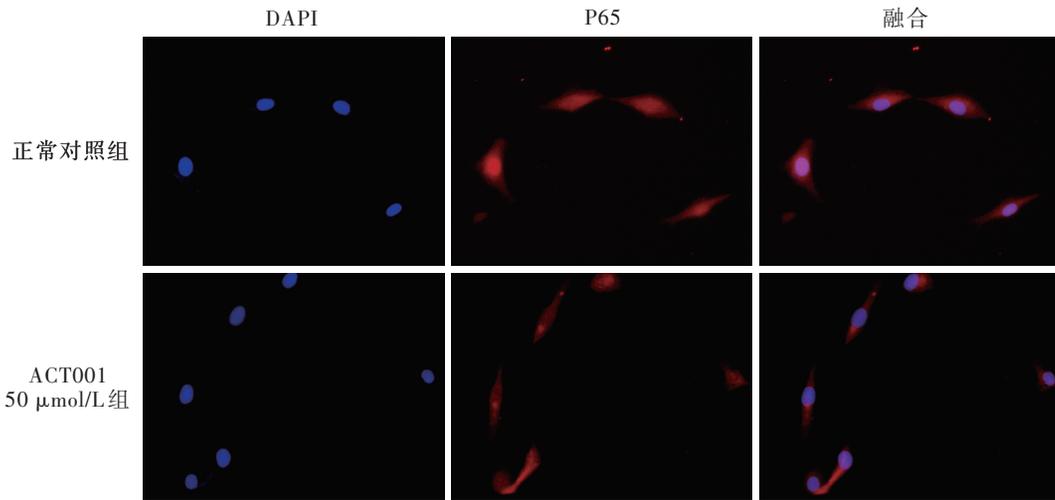


图3 细胞抑制率与ACT001浓度的标准曲线显示,随着ACT001药物浓度的升高,U87细胞抑制率逐渐升高

Figure 3 CCK-8 results suggested that ACT001 inhibited the proliferation of U87 cells in a dose-dependent manner.

的启动子区结合,参与其转录调控。激活的NF- κ B信号转导通路在胶质瘤的进展、迁移、多药耐药以及肿瘤相关免疫逃逸中发挥极其重要的作用^[17]。NF- κ B信号转导通路还通过与其他信号转导通路如STAT3、Notch和P53信号转导通路的交联作用,间接影响肿瘤进展^[16,18]。本研究生物信息学分析亦

显示,P65 mRNA表达量随胶质瘤病理分级的升高而呈上升趋势,且其发挥活性的是磷酸化形式即p-P65;Western blotting法显示,不同siRNA转染组U87细胞P65、p-P65和PDL1相对表达量差异有统计学意义,其中,si-P65-1组和si-P65-2组P65、p-P65和PDL1相对表达量均低于si-NC组,表明减少U87



DAPI,4',6-二咪基-2-苯基吡啶

图4 倒置相差荧光显微镜显示,正常对照组和 ACT001 50 μmol/L 组 P65 蛋白的表达定位变化,经 50 μmol/L ACT001 处理后 P65 蛋白入核减少 免疫荧光染色 ×400

Figure 4 Inverted phase contrast fluorescence microscopy showed the P65 expression and localization in U87 glioma cells in control group and ACT001 50 μmol/L group: the nuclear translocation was reduced in the ACT001 50 μmol/L group. Immunofluorescence staining ×400

表1 不同 siRNA 转染组 U87 细胞 P65 mRNA 表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Comparison of P65 mRNA expression in U87 cells transfected with different siRNA ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	P65 mRNA	F 值	P 值
si-NC 组	3	1.000		
si-P65-1 组	3	0.152 ± 0.007	164.200	0.000
si-P65-2 组	3	0.166 ± 0.031		

表2 不同 siRNA 转染组 U87 细胞 P65、p-P65 和 PDL1 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Comparison of the relative expression of P65, p-P65 and PDL1 in U87 cells transfected with different siRNA ($\bar{x} \pm s$)

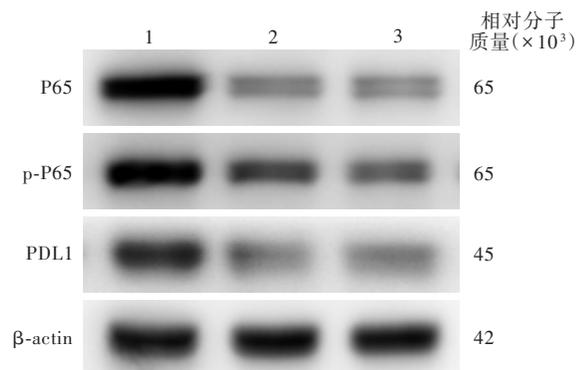
组别	例数	P65	p-P65	PDL1
si-NC 组(1)	3	1.000	1.000	1.000
si-P65-1 组(2)	3	0.290 ± 0.017	0.479 ± 0.030	0.568 ± 0.102
si-P65-2 组(3)	3	0.266 ± 0.035	0.376 ± 0.066	0.522 ± 0.100
F 值		681.300	128.800	20.470
P 值		0.000	0.000	0.002

p-P65, phospho-P65, 磷酸化 P65; PDL1, programmed cell death protein ligand 1, 细胞程序性死亡蛋白配体 1。The same for tables below

表3 不同 siRNA 转染组 U87 细胞 P65、p-P65 和 PDL1 相对表达量的两两比较

Table 3. Pairwise comparison of the relative expression of P65, p-P65 and PDL1 among groups transfected with different siRNA

组间两两比	P65		p-P65		PDL1	
	t 值	P 值	t 值	P 值	t 值	P 值
(1):(2)	59.630	0.000	24.370	0.000	6.025	0.004
(1):(3)	29.380	0.000	13.460	0.000	6.728	0.003
(2):(3)	0.861	0.438	2.014	0.114	0.449	0.676



1, si-NC 组; 2, si-P65-1 组; 3, si-P65-2 组。p-P65, 磷酸化 P65; PDL1, 细胞程序性死亡蛋白配体 1; β-actin, β-肌动蛋白

图5 Western blotting 法显示, si-P65-1 组和 si-P65-2 组 P65、p-P65 和 PDL1 相对表达量均低于 si-NC 组

Figure 5 Western blotting showed the relative expression of P65, p-P65 and PDL1 in si-P65-1 and si-P65-2 groups were lower than those in si-NC group.

表 4 不同浓度药物处理组 U87 细胞 P65、p-P65 和 PDL1 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

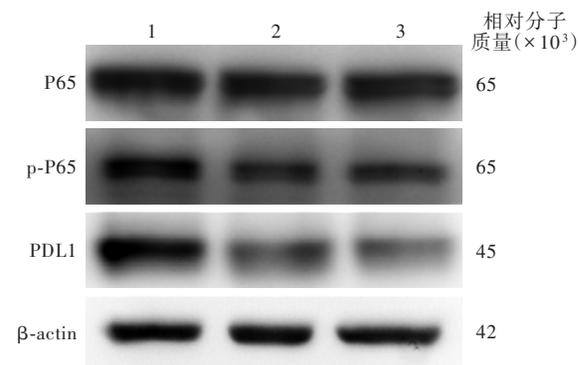
Table 4. Comparison of the relative expression of P65, p-P65 and PDL1 in U87 cells of different treatment groups

组别	例数	P65	p-P65	PDL1
正常对照组(1)	3	1.000	1.000	1.000
ACT001 25 $\mu\text{mol/L}$ 组(2)	3	0.979 \pm 0.086	0.720 \pm 0.020	0.571 \pm 0.048
ACT001 50 $\mu\text{mol/L}$ 组(3)	3	0.957 \pm 0.139	0.607 \pm 0.023	0.444 \pm 0.041
F 值		0.102	269.700	128.800
P 值		0.904	0.000	0.000

表 5 不同浓度药物处理组 U87 细胞 P65、p-P65 和 PDL1 相对表达量的两两比较

Table 5. Pairwise comparison of the relative expression of P65, p-P65 and PDL1 among different treatment groups

组间两两比	p-P65		PDL1	
	t 值	P 值	t 值	P 值
(1) : (2)	19.750	0.000	12.690	0.000
(1) : (3)	24.640	0.000	19.230	0.000
(2) : (3)	5.288	0.006	2.868	0.046



1, 正常对照组; 2, ACT001 25 $\mu\text{mol/L}$ 组; 3, ACT001 50 $\mu\text{mol/L}$ 组。p-P65, 磷酸化 P65; PDL1, 细胞程序性死亡蛋白配体 1; β -actin, β -肌动蛋白

图 6 Western blotting 法结果显示, ACT001 25 $\mu\text{mol/L}$ 组和 50 $\mu\text{mol/L}$ 组 p-P65 和 PDL1 相对表达量均低于正常对照组且呈药物浓度依赖性, 而 P65 相对表达量无明显变化

Figure 6 Western blotting showed the relative expression of p-P65 and PDL1 in the ACT001 treatment groups were lower than those in the control group in a dose-dependent manner, while the relative expression of P65 showed no difference.

细胞 P65 磷酸化水平, 可以抑制 PDL1 的表达。

ACT001 作为一种新型抗肿瘤药物, 业已完成中国和澳大利亚的胶质瘤 I 期临床试验。目前由天津医科大学总医院牵头, 正在天津医科大学总医院、中国医学科学院北京协和医院、首都医科大学附属北京天坛医院等 7 所医院开展 ACT001 单药以及 ACT001 联合替莫唑胺治疗复发胶质母细胞瘤的

II 期临床试验。本研究为一项体外实验, 细胞增殖活性检测显示, 经不同药物浓度 ACT001 (5、10、20、40、80、160 和 320 $\mu\text{mol/L}$) 处理后, U87 细胞抑制率分别为 (9.01 \pm 4.75)%、(17.03 \pm 2.91)%、(28.50 \pm 4.85)%、(45.50 \pm 5.15)%、(67.67 \pm 8.46)%、(83.02 \pm 5.79)% 和 (94.33 \pm 1.59)%, 从而得出 ACT001 对 U87 细胞的半数抑制浓度为 42.98 $\mu\text{mol/L}$ 。免疫荧光染色显示, 经 50 $\mu\text{mol/L}$ ACT001 处理的 U87 细胞 P65 蛋白入核减少, 表明 ACT001 通过减少 P65 蛋白入核以抑制 NF- κ B 信号转导通路活性。Western blotting 法显示, 不同浓度药物处理组 U87 细胞 p-P65 和 PDL1 相对表达量差异有统计学意义, 其中, ACT001 25 $\mu\text{mol/L}$ 组和 50 $\mu\text{mol/L}$ 组 p-P65 和 PDL1 相对表达量低于正常对照组, ACT001 50 $\mu\text{mol/L}$ 组 p-P65 和 PDL1 相对表达量亦低于 25 $\mu\text{mol/L}$ 组, 表明 ACT001 不仅可以抑制胶质瘤细胞的增殖, 还可以通过抑制 P65 的磷酸化及核转位, 从而抑制 PDL1 的表达, 以改善胶质瘤的免疫抑制微环境。我们课题组的前期研究显示, ACT001 可以抑制 STAT3 的磷酸化^[19-20]。提示 ACT001 可以作为一种多靶点药物治疗胶质母细胞瘤, 从而为 ACT001 最终应用于临床提供理论依据。

Lim 等^[12]和 Liu 等^[13]针对乳腺癌和结肠癌的研究显示, NF- κ B (P65) 作为转录因子, 通过结合 *Cops5* 基因启动子, 调控 COP9 信号小体 5 (CSN5) 的表达。CSN5 控制约 1/5 的蛋白质降解过程, 通过从 Cullin RING E3 泛素连接酶 (CRLs) 骨架移除激活蛋白 NEDD8, 使其失去活性^[21]。Lim 等^[12]业已证实 CSN5 可以调控 PDL1 的去泛素化, 减少其降解。因此, ACT001 是否通过抑制胶质母细胞瘤细胞 P65 的磷酸化, 降低 CSN5 表达量, 从而增加 PDL1 的泛素降解, 将是我们进一步的研究方向。

本研究通过体外实验证实, ACT001 可以抑制 P65 的磷酸化, 下调胶质母细胞瘤细胞 PDL1 的表达, 从而改善肿瘤免疫抑制微环境。后续将建立 GL261 脑胶质瘤细胞 C57BL/6 小鼠颅内原位种植模型, 验证 ACT001 对 P65、CSN5 和 PDL1 表达的调控。

利益冲突 无

参 考 文 献

[1] Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Vecchione-Koval T, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014[J]. Neuro Oncol,

- 2017, 19(suppl_5):v1-88.
- [2] Medical Administration, National Health Commission. Guidelines for diagnosis and treatment of glioma (2018 Edition) [J]. Zhonghua Shen Jing Wai Ke Za Zhi, 2019, 35:217-239.[国家卫生健康委员会医政医管局. 脑胶质瘤诊疗规范(2018年版)[J]. 中华神经外科杂志, 2019, 35:217-239.]
- [3] Mrugala MM, Engelhard HH, Dinh Tran D, Kew Y, Cavaliere R, Villano JL, Annenelie Bota D, Rudnick J, Love Sumrall A, Zhu JJ, Butowski N. Clinical practice experience with NovoTTF-100A™ system for glioblastoma: the patient registry dataset (PriDe)[J]. Semin Oncol, 2014, 41 Suppl 6:4-13.
- [4] Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, Colman H, Chakravarti A, Pugh S, Won M, Jeraj R, Brown PD, Jaeckle KA, Schiff D, Stieber VW, Brachman DG, Werner-Wasik M, Tremont-Lukats IW, Sulman EP, Aldape KD, Curran WJ Jr, Mehta MP. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma[J]. N Engl J Med, 2014, 370:699-708.
- [5] Liu S, Wang Z, Wang Y, Fan X, Zhang C, Ma W, Qiu X, Jiang T. PD-1 related transcriptome profile and clinical outcome in diffuse gliomas[J]. Oncoimmunology, 2017, 7:e1382792.
- [6] Li G, Wang Z, Zhang C, Liu X, Cai J, Wang Z, Hu H, Wu F, Bao Z, Liu Y, Zhao L, Liang T, Yang F, Huang R, Zhang W, Jiang T. Molecular and clinical characterization of TIM-3 in glioma through 1,024 samples[J]. Oncoimmunology, 2017, 6:e1328339.
- [7] Ghantous A, Sinjab A, Herceg Z, Darwiche N. Parthenolide: from plant shoots to cancer roots[J]. Drug Discov Today, 2013, 18:894-905.
- [8] Jin P, Madieh S, Augsburg LL. The solution and solid state stability and excipient compatibility of parthenolide in feverfew [J]. AAPS PharmSciTech, 2007, 8:E105.
- [9] Xi XN, Liu N, Wang QQ, Wu HT, He HB, Wang LL, Zhang TJ, Sun L, Yin Z, Chen Y, Lu YX. Pharmacokinetics, tissue distribution and excretion of ACT001 in Sprague-Dawley rats and metabolism of ACT001[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2019, 1104:29-39.
- [10] Zhang Q, Lu Y, Ding Y, Zhai J, Ji Q, Ma W, Yang M, Fan H, Long J, Tong Z, Shi Y, Jia Y, Han B, Zhang W, Qiu C, Ma X, Li Q, Shi Q, Zhang H, Li D, Zhang J, Lin J, Li LY, Gao Y, Chen Y. Guaianolide sesquiterpene lactones, a source to discover agents that selectively inhibit acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells[J]. J Med Chem, 2012, 55:8757-8769.
- [11] Kawasaki BT, Hurt EM, Kalathur M, Duhagon MA, Milner JA, Kim YS, Farrar WL. Effects of the sesquiterpene lactone parthenolide on prostate tumor - initiating cells: an integrated molecular profiling approach[J]. Prostate, 2009, 69:827-837.
- [12] Lim SO, Li CW, Xia W, Cha JH, Chan LC, Wu Y, Chang SS, Lin WC, Hsu JM, Hsu YH, Kim T, Chang WC, Hsu JL, Yamaguchi H, Ding Q, Wang Y, Yang Y, Chen CH, Sahin AA, Yu D, Hortobagyi GN, Hung MC. Deubiquitination and stabilization of P-L1 by CSN5[J]. Cancer Cell, 2016, 30:925-939.
- [13] Liu C, Yao Z, Wang J, Zhang W, Yang Y, Zhang Y, Qu X, Zhu Y, Zou J, Peng S, Zhao Y, Zhao S, He B, Mi Q, Liu X, Zhang X, Du Q. Macrophage-derived CCL5 facilitates immune escape of colorectal cancer cells via the p65/STAT3 - CSN5 - PD - L1 pathway[J]. Cell Death Differ, 2020, 27:1765-1781.
- [14] Nduom EK, Weller M, Heimberger AB. Immunosuppressive mechanisms in glioblastoma[J]. Neuro Oncol, 2015, 17 Suppl 7: vii9-14.
- [15] Wang Z, Zhang C, Liu X, Wang Z, Sun L, Li G, Liang J, Hu H, Liu Y, Zhang W, Jiang T. Molecular and clinical characterization of PD-L1 expression at transcriptional level via 976 samples of brain glioma [J]. Oncoimmunology, 2016, 5:e1196310.
- [16] Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer[J]. Mol Cancer, 2013, 12:86.
- [17] Puliappadamba VT, Hatanpaa KJ, Chakraborty S, Habib AA. The role of NF-kappaB in the pathogenesis of glioma [J]. Mol Cell Oncol, 2014, 1:e963478.
- [18] Cahill KE, Morshed RA, Yamini B. Nuclear factor-kappaB in glioblastoma: insights into regulators and targeted therapy [J]. Neuro Oncol, 2016, 18:329-339.
- [19] Tong L, Li J, Li Q, Wang X, Medikonda R, Zhao T, Li T, Ma H, Yi L, Liu P, Xie Y, Choi J, Yu S, Lin Y, Dong J, Huang Q, Jin X, Lim M, Yang X. ACT001 reduces the expression of PD-L1 by inhibiting the phosphorylation of STAT3 in glioblastoma [J]. Theranostics, 2020, 10:5943-5956.
- [20] Li JB, Tong LQ, Yi L, Liu PD, Xie Y, Wang XY, Yang XJ. ACT001 inhibits the neurosphere formation and stemness maintenance of U87 - MG glioma stem cells through STAT3 signaling pathway [J]. Zhonghua Shen Jing Wai Ke Za Zhi, 2019, 35:1160-1166.[李佳博, 童鹿青, 易立, 刘沛东, 解杨, 王旭亚, 杨学军. ACT001 通过 STAT3 信号通路抑制 U87-MG 胶质瘤干细胞的成球能力及干性维持的实验研究[J]. 中华神经外科杂志, 2019, 35:1160-1166.]
- [21] Milic J, Tian Y, Bernhagen J. Role of the COP9 signalosome (CSN) in cardiovascular diseases[J]. Biomolecules, 2019, 9:217.

(收稿日期: 2021-05-27)

(本文编辑: 彭一帆)

《中国现代神经疾病杂志》关于谨防盗用编辑部名义的声明

近日,有作者举报不法分子盗用《中国现代神经疾病杂志》编辑部名义给作者发送邮件,让作者添加其微信好友,借以窃取相关信息甚至进行钱财诈骗。这种行为严重违反了国家《关于维护互联网安全的决定》等法律法规,严重损害了我刊编辑部和作者的利益。

《中国现代神经疾病杂志》特此郑重声明:本刊迄今不曾以编辑个人名义请求添加作者微信好友,本刊使用网上采编系统进行稿件处理(www.xdjb.org),所有录用和缴费通知均由系统或公共邮箱(xdsjbbz@263.net.cn)发出,请广大作者提高安全意识,以免上当受骗。

若遇假冒我刊网站、盗用编辑部名义、伪造采编中心、中介、代理等不法事件,欢迎广大作者和读者向我刊提供相关线索!对于以我刊名义从事不法活动的个别网站、个人或微信号,我刊保留通过法律途径解决问题的权利。此声明长期有效,最终解释权归我刊所有。