

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.11.004

· 基础研究 ·

易普利姆玛通过抑制 TGF- β 1/ERK 信号通路影响肺癌小鼠移植瘤组织中 T 淋巴细胞及 Bcl-2 mRNA 表达

刘芳^{1a}, 乔雨林², 严兆丹^{1b} (1. 湖北省中山医院 a. 呼吸内科; b. 内分泌科, 湖北 武汉 430000; 2. 武汉市汉阳医院神经内科, 湖北 武汉 430050)

[摘要] **目的:** 研究易普利姆玛(ipilimumab)通过抑制 TGF- β 1/ERK 信号通路对肺癌小鼠 T 淋巴细胞、Bcl-2 mRNA 表达的影响。**方法:** 将 45 只接种肺癌细胞 Lewis 的 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、低剂量组、高剂量组, 每组 15 只, 其中低剂量组给予 3 mg/kg 易普利姆玛, 高剂量组给予 5 mg/kg 易普利姆玛, 对照组给予同体积的 0.9% 氯化钠溶液。通过 WB、qPCR 检测易普利姆玛处理对 TGF- β 1/ERK 信号通路、Bcl-2 mRNA 表达的影响, 以及对免疫功能改善和移植瘤的抑制情况。**结果:** 给予易普利姆玛后, 低剂量组、高剂量组小鼠的瘤质量、体积显著低于空白对照组, 且随着剂量的增加抑瘤率也增加 ($P < 0.05$); 小鼠的胸腺系数和脾脏系数显著高于空白对照组, 且随着剂量的增加, 该系数也增加 ($P < 0.05$)。高、低剂量组小鼠给药后 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 细胞水平显著增加, 且显著高于对照组, 其中高剂量组给药后各水平显著高于低剂量组 ($P < 0.05$)。高、低剂量组小鼠给药后血清炎症因子水平显著增加, 均显著低于对照组, 且高剂量组血清 TNF- α 、IL-6、IL-3 水平显著低于低剂量组 (均 $P < 0.05$)。高、低剂量组小鼠给药后肿瘤组织中的 TGF- β 1、ERK1/2、p-ERK1/2、MEK 表达量显著降低, 高剂量组各蛋白水平显著低于低剂量组 ($P < 0.05$), 且高剂量组 TGF- β 1 表达阳性率最低 ($P < 0.05$)。高、低剂量组小鼠给药后肿瘤组织中的 Bcl-2 mRNA 表达量显著降低, 高剂量组表达水平显著低于低剂量组 ($P < 0.05$)。**结论:** 易普利姆玛可有效抑制 TGF- β 1/ERK 信号通路、改善机体免疫功能以及下调 Bcl-2 的表达, 从而抑制小鼠体内肺癌细胞 Lewis 生长, 发挥抗肿瘤作用。

[关键词] 肺癌; 易普利姆玛; TGF- β 1/ERK 信号通路; Bcl-2; T 淋巴细胞

[中图分类号] R734.2; R730.54; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)11-1203-06

Ipilimumab affects T lymphocytes and Bcl-2 mRNA expression in xenograft tissues of lung cancer-bearing mice by inhibiting TGF- β 1/ERK signaling pathway

LIU Fang^{1a}, QIAO Yulin², YAN Zhaodan^{1b} (1. a. Department of Respiratory Medicine; b. Department of Endocrinology, Zhongshan Hospital of Hubei Province, Wuhan 430000, Hubei, China; 2. Department of Neurology, Hanyang Hospital of Wuhan City, Wuhan 430050, Hubei, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of ipilimumab on T lymphocytes and Bcl-2 mRNA expression in lung cancer-bearing mice by inhibiting TGF- β 1/ERK signaling pathway. **Methods:** Forty-five C57 mice inoculated with Lewis lung cancer cells were randomly divided into control group, low dose ipilimumab group and high dose ipilimumab group with 15 mice in each. The low and high dose groups were given 3 mg/kg and 5 mg/kg ipilimumab respectively, while the control group was given 0.9% sodium chloride solution with the same volume. The effects of ipilimumab on TGF- β 1/ERK signaling pathway, Bcl-2 mRNA expression, immune function improvement and tumor inhibition in three groups were detected by WB and qPCR. **Results:** After administration of ipilimumab, the tumor weight and volume of mice in low-dose and high-dose groups were significantly lower than that of the control group, and the tumor inhibition rate increased in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). The thymus index and spleen index of mice were significantly higher than that of control group, which also increased in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). The levels of CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ cells in the high and low dose groups were significantly higher than those in the control group, with significantly higher levels in high dose group compared with the low dose group ($P < 0.05$). The levels of serum inflammatory factors were significantly lower than those in control group, and the levels of serum TNF- α , IL-6 and IL-3 in the high dose group were significantly lower than those in the low dose group ($P < 0.05$). The expressions of TGF- β 1, ERK1/2, p-ERK1/2 and MEK in tumor tissues of both high and low dose groups significantly decreased, with more lower levels in high dose group than in low dose groups (all $P < 0.05$), and the positive rate of TGF- β 1 ex-

[作者简介] 刘芳(1978-), 女, 硕士, 副主任医师, 主要从事间质性肺疾病相关的基础及临床研究, E-mail: liufang187f@qq.com

[通信作者] 严兆丹 (YAN Zhaodan, correspondence author), 硕士, 副主任医师, 主要从事糖尿病及其并发症的防治相关研究, E-mail: 149240383@qq.com

pression in high dose group was the lowest. The mRNA expression of Bcl-2 in tumor tissues of high and low dose groups decreased significantly after drug administration, with a significantly lower level in high dose group than that in low dose group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Ipilimumab can effectively inhibit TGF- β 1/ERK signaling pathway, improve immune function and down-regulate the expression of Bcl-2, thus inhibit the growth of Lewis lung cancer cells and play an antitumor role in mice.

[Key words] lung cancer; ipilimumab; TGF- β 1/ERK signaling pathway; Bcl-2; T lymphocyte

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(11): 1203-1208. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.11.004]

肺癌是我国男性发病率最高的肿瘤,且发病率、病死率呈现逐年增加的趋势,尽管早期肺癌可有效治疗,但治愈后存在复发风险,或者伴随脑转移,增加了治疗难度^[1-2]。目前放疗、化疗是治疗中晚期肺癌的主要手段,可一定程度延长生存时间,但疗效有限,且副反应较大。靶向疗法、免疫治疗等新型治疗手段因为疗效好、毒副作用小等特点已越来越受关注,其中易普利姆玛(ipilimumab)作为一种单克隆抗体,其作用机制是通过结合细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4)从而阻断CTLA-4与CD80或CD86的相互作用,激活T淋巴细胞,导致激活免疫系统,发挥抗肿瘤作用^[3-4]。已有研究^[5]显示,易普利姆玛可有效治疗肺癌,但肺癌的发生与进展是多种基因共同作用的复杂过程,B淋巴细胞瘤-2基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)介导的线粒体凋亡是细胞凋亡中的主要通路,TGF- β 1/ERK信号通路可调控胞质蛋白激酶、核转录因子的活化,从而促进肿瘤细胞的生长、增殖、转移^[6-7]。目前在肿瘤治疗过程中,发现当药物阻断一条信号通路时,肿瘤细胞往往通过自身调节使得其他信号通路代偿性激活,从而产生耐药性。因此推测,易普利姆玛的治疗肺癌作用不仅仅是阻断CTLA-4,目前对于其具体作用机制文献报道并不多见,因此本文以接种Lewis肺癌细胞的C57BL/6小鼠为模型,进一步探讨易普利姆玛的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

45只近交系C57BL/6雄性小鼠购自上海斯莱克动物中心,合格证号为SCXK(沪)2016-0005,体质量(20 \pm 2)g,周龄均为4周,实验前适应环境饲养1周。Lewis肺腺癌细胞株由上海中科院细胞生物研究所提供。易普利姆玛购自百时美施贵宝公司。GAPDH抗体、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、MEK1、ERK1/2、p-ERK均购自美国ABCAM公司,Bcl-2基因引物购自上海生工生物工程技术有限公司(引物序列见表1),逆转录试剂盒购自北京智杰方远科技有限公司,炎症因子检测试剂盒购自上海酶联生物科

技有限公司。QuantStudio[®] 3型实时荧光定量PCR系统购自赛默飞世尔科技公司,流式细胞仪购自美国Becton-Dickinson公司。

表1 引物序列

Tab. 1 Primer sequence

Gene name	Primer sequence (5' to 3')
Bcl-2	F: CCCTCCTCCAATACTCACTCTG
	R: TGACCCCATTCTCCTGATG
GADPH	F: TGCACCACCAACTGCTTAG
	R: GGATGCAGGGATGATGTTTC

1.2 荷Lewis肺腺癌细胞移植瘤小鼠的制备及其分组处理

取对数生长期的Lewis肺腺癌细胞,以胰酶(0.25%)消化后对细胞进行收集并计数,调整细胞密度至 1.0×10^7 个/ml。于C57BL/6雄性小鼠右侧腋下皮下接种0.2 ml细胞悬液,饲养于SPF级环境中,于14 d后可触及皮下肿瘤块,游标卡尺测量其直径约10 mm,即为移植瘤模型小鼠构建成功。按照随机数字表法将45只荷瘤小鼠分为3组,其中低剂量组给予3 mg/kg易普利姆玛,高剂量组给予5 mg/kg易普利姆玛,对照组给予同体积的生理盐水。3组小鼠均连续给药7次,1次/2 d。

1.3 观察肿瘤生长情况以及计算胸腺、脾脏指数

采用游标卡尺测量荷瘤的长和宽,计算瘤体积。用药第1天以及以后每2天测量荷瘤最大长径(a)、短径(b),瘤体体积(mm^3)= $\pi \times a \times b^2 / 8$ 。抑瘤率、胸腺指数及脾脏指数测定:小鼠于末次给药24 h后采用颈脱臼法进行处死,立即取瘤块、胸腺、脾脏,精密称质量后计算肿瘤生长抑制率、胸腺指数及脾脏指数。肿瘤生长抑制率=(1-给药组平均瘤质量/对照组平均瘤质量) $\times 100\%$;胸腺指数(mg/g)=胸腺质量/体质量;脾脏指数(mg/g)=脾脏质量/体质量。

1.4 流式细胞术检测易普利姆玛对荷瘤鼠免疫细胞水平的影响

分别于给药前、处死前摘眼球取眼静脉血10 ml,其中5 ml用EDTA处理得抗凝全血,以淋巴细胞分离液处理,获取外周血单核细胞,应用流式细胞仪计数外周血T细胞亚群指标(CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺)水

平,并计算其占淋巴细胞的百分数。

1.5 ELISA 检测易普利姆玛对荷瘤鼠血清炎症因子水平的影响

另外 5 ml 眼静脉血 3 000 r/min(半径为 13.5 cm)离心 10 min,上清液置入 EP 管中并保存于 -70 °C。应用酶联免疫吸附实验法检测 EP 管中血清 IL-6、IL-3 和 TNF-α 水平。

1.6 qPCR 检测易普利姆玛对移植瘤组织中 Bcl-2 mRNA 表达的影响

采用 qPCR 检测小鼠肿瘤组织中 Bcl-2 mRNA 的表达情况,小鼠处死后取肿瘤组织,置于液氮中研磨,采用 TRIzol 法分离肿瘤组织并提取 RNA,经过处理后采用荧光定量 PCR 仪检测 Bcl-2 mRNA 在肿瘤组织中的表达,以 GAPDH 为内参照,结果以 Bcl-2 mRNA 与 GAPDH 的比值表示。

1.7 WB 检测易普利姆玛对移植瘤组织中 TGF-β1/ERK1/2 信号通路相关蛋白表达的影响

提取移植瘤组织总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度。将待测蛋白行 SDS-PAGE 分离,电泳结束后进行蛋白转膜,将膜取出、清洗,进行一抗孵育和二抗孵育,底物化学发光法进行显影,检测蛋白质条带灰度,以 β-actin 为内参,计算 TGF-β1、ERK1/2、p-ERK1/2、MEK 相对含量。

1.8 免疫组化方法检测易普利姆玛对移植瘤组织中 TGF-β1 表达的影响

待移植瘤组织剥离后切取标本,用 10% 多聚甲醛进行固定,随后用石蜡包埋、切片。并参照 TGF-β1 检测试剂盒操作要求进行染色、切片。于显微镜下观察间质染色情况,其中着色为淡黄色至棕褐色者表明为阳性细胞,采用 4 级半定量积分法判定免疫组化结果。染色强度计分:0 分(无着色)、1 分(淡黄色)、2 分(棕黄色)、3 分(棕褐色)。每个切片上随机取 5 个视野(×400),统计 100 个细胞中染色情况,阳性细胞百分比为 0~5% 记为 0 分,5%~25% 记为 1 分,25%~50% 记为 2 分,50%~75% 记为 3 分,>75% 记为 4 分。每个视野中染色强度计分与阳性细胞百分比乘积在 9~12 分范围内表明为强阳性(+++),5~8 分表明为中性(++),1~4 分表明为弱阳性(+),0 分则表明阴性(-)。

1.9 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计分析软件,组间比较采用 *F* 检验,等级资料采用秩和检验。以 *P*<0.05 或 *P*<0.01 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 易普利姆玛治疗显著抑制移植瘤生长

给予易普利姆玛后,小鼠的瘤质量、体积均显著低于空白对照组;且随着剂量的增加,抑瘤率亦增加(均 *P*<0.05),见表 2。

表 2 肿瘤生长情况

Tab. 2 Tumor growth

Group	<i>n</i>	Mass (m/g)	Volume(V/mm ³)	Inhibition rate (%)
Control	15	1.36±0.28 [△]	1 276.16±321.65 [△]	-
Low-dose	15	0.72±0.23*	736.66±211.86*	47.06%
High-dose	15	0.54±0.12* [△]	466.47±130.74* [△]	60.29% [△]
<i>F/t</i>		7.766	5.868	5.876
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000

**P*<0.05 vs Control group; [△]*P*<0.05 vs Low-dose group

2.2 治疗后小鼠胸腺指数和脾脏指数明显增加

给予易普利姆玛后,小鼠的胸腺指数和脾脏指数显著高于空白对照组;且随着剂量的增加,指数亦增加(均 *P*<0.05),见图 1。

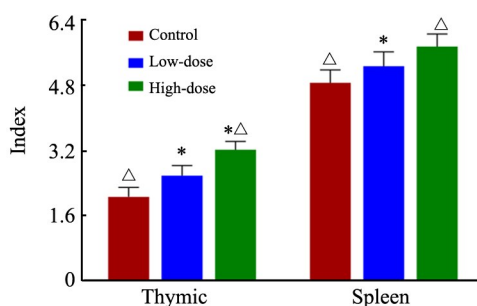
2.3 易普利姆玛治疗提高模型鼠外周血免疫细胞水平

高、低剂量组给药后小鼠的 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 细胞水平均显著增加,且显著高于对照组,其中高剂量组给药后各水平显著高于低剂量组(均 *P*<0.05),如表 3 和图 2 所示。

2.4 易普利姆玛治疗提高模型鼠血清炎症因子水平

高、低剂量组给药后小鼠血清炎症因子水平显著增加,均显著低于对照组,且高剂量组血清 TNF-α、IL-

6、IL-3 水平显著低于低剂量组(均 *P*<0.05),见表 4。



**P*<0.05 vs Control group; [△]*P*<0.05 vs Low-dose group

图 1 胸腺和脾脏系数

Fig.1 Thymus index and spleen index

表3 易普利姆玛治疗对荷瘤鼠外周血免疫细胞的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab.3 Effect of ipilimumab on peripheral blood immune cells of tumor-bearing mice($\bar{x}\pm s$)

Group	n	CD4 ⁺ (%)		CD8 ⁺ (%)		CD4 ⁺ /CD8 ⁺ (%)	
		Before	After	Before	After	Before	After
Control	15	25.64±3.13	21.53±2.56 ^{*▲}	19.34±2.51	16.24±3.41 ^{*▲}	1.32±0.25	1.33±0.31 ^{*▲}
Low-dose	15	24.28±3.06	33.36±4.11 ^{*△}	18.64±2.43	21.83±3.21 ^{*△}	1.30±0.26	1.52±0.19 ^{*△}
High-dose	15	25.24±3.36	40.36±4.11 ^{*△▲}	19.38±2.54	24.74±3.07 ^{*△▲}	1.30±0.23	1.64±0.27 ^{*△▲}
F		0.371	4.514	0.490	3.984	1.181	6.160
P		0.711	0.000	0.625	0.012	0.240	0.000

^{*}P<0.05 vs Before administration; [△]P<0.05 vs Control group; [▲]P<0.05 vs Low-dose group

2.5 移植瘤组织中 TGF-β1/ERK 信号通路相关蛋白表达

高、低剂量组小鼠给药后肿瘤组织中的 TGF-β1、ERK1/2、p-ERK1/2、MEK 表达量显著降低,其高剂量

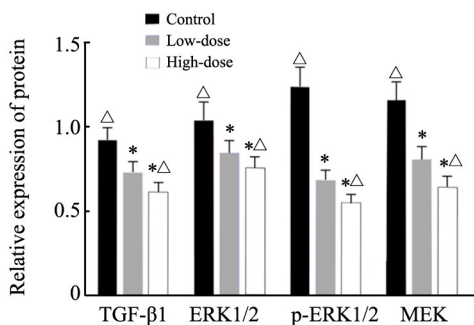
组各蛋白水平均显著低于低剂量组(均 P<0.05);且高剂量组表达阳性率最低,其次依次为低剂量组、空白对照组,见表5与图4。

表4 易普利姆玛治疗对荷瘤鼠血清炎症因子水平的影响[ρ_B/(ng·L⁻¹)]

Tab.4 Effect of ipilimumab on serum inflammatory factor levels in tumor-bearing mice [ρ_B/(ng·L⁻¹)]

Group	n	TNF-α		IL-6		IL-3	
		Before	After	Before	After	Before	After
Control	15	55.74±6.22	123.45±11.27 ^{*▲}	43.53±5.64	90.63±9.73 ^{*▲}	98.11±10.81	168.87±17.16 ^{*▲}
Low-dose	15	54.26±5.63	87.83±8.72 ^{*△}	44.69±5.78	68.26±8.34 ^{*△}	95.69±9.47	138.56±14.43 ^{*△}
High-dose	15	56.34±6.10	63.83±6.63 ^{*△▲}	42.75±5.66	54.46±6.34 ^{*△▲}	96.58±10.21	119.74±13.67 ^{*△▲}
F		0.385	5.987	0.595	6.382	0.756	16.614
P		0.701	0.000	0.553	0.000	0.317	0.000

^{*}P<0.05 vs Before administration; [△]P<0.05 vs Control group; [▲]P<0.05 vs Low-dose group



^{*}P<0.05 vs Control group; [△]P<0.05 vs Low-dose group

图2 移植瘤组织中 TGF-β1/ERK 信号通路相关蛋白表达水平
Fig.2 Expression of TGF-β1/ERK signaling pathway related proteins in xenograft tissues

2.6 Bcl-2 mRNA 表达情况

高、低剂量组小鼠给药后肿瘤组织中的 Bcl-2 mRNA 表达量显著降低,其中高剂量组表达水平显著低于低剂量组(均 P<0.05),见表6。

3 讨论

肺癌是由空气污染、吸烟、遗传等因素引起的恶性肿瘤,以非小细胞肺癌最为常见,由于癌症的早期

症状缺乏明显特性,确诊时基本已是晚期,使患者丧失最佳手术机会^[8-9]。目前针对肺癌的治疗以化疗、放疗为主,其中放疗过程中患者肺癌肿瘤部位与周

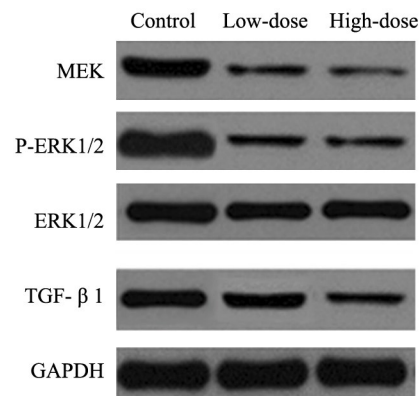


图3 移植瘤中 TGF-β1/ERK1/2 信号通路相关蛋白表达水平
Fig.3 Expression of TGF-β1/ERK1/2 signaling pathway related proteins in xenograft tissues

围正常组织的不规则位移区域存在一些不确定性因素,会造成脱靶、器官损伤等问题;化疗毒性大,患者耐受性较低,使得用药剂量和频率受限^[10]。随着医

学、药学的发展,靶向疗法、免疫治疗的优势已经逐步体现,肿瘤细胞表达的“肿瘤相关抗原理论”为有效的免疫应答、治疗提供了研究基础。易普利姆玛是一种重组的全人源免疫球蛋白 G1κ 单克隆抗体,可

结合 CTLA-4 并阻断 CTLA-4 与 CD80 或 CD86 的相互作用,促进 T 淋巴细胞活化增殖,从而侵入肿瘤组织发挥免疫抑制作用^[3,11]。

表5 移植瘤组织 TGF-β1 的表达情况(分)
Tab.5 Expression of TGF-β1 in xenograft tissues (Score)

Group	n	-	+	++	+++	Positive rate(%)
Control	15	31.37±6.31	18.64±3.73	25.48±4.63	27.53±3.64	70.56 [△]
Low-dose	15	48.68±4.67	17.74±3.21	19.70±3.11	15.69±2.55	52.53*
High-dose	15	57.84±7.73	12.68±2.20	16.79±2.34	15.47±2.36	43.72 ^{△△}

*P<0.05 vs Control group; [△]P<0.05 vs Low-dose group

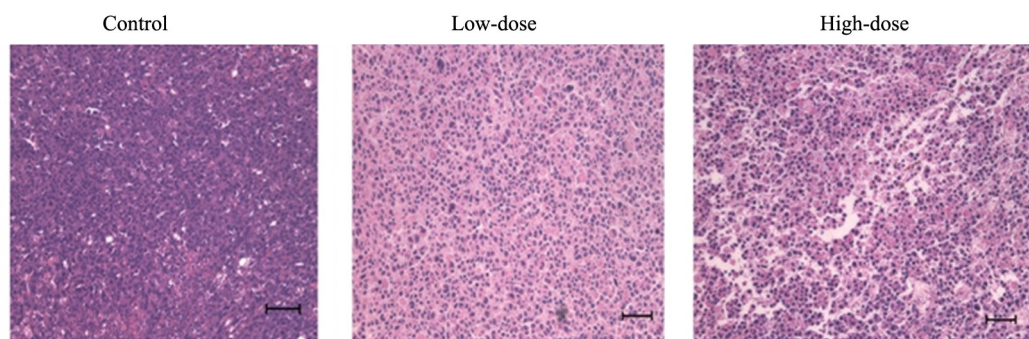


图4 TGF-β1 蛋白在肺癌移植瘤组织中的表达(×200)
Fig.4 Expression of TGF-β1 protein in lung cancer xenograft tissues (×200)

表6 Bcl-2 mRNA 表达情况
Tab.6 Expression of Bcl-2 mRNA

Group	n	Bcl-2 mRNA
Control	15	1.26±0.25 [△]
Low-dose	15	0.88±0.17*
High-dose	15	0.62±0.12 ^{△△}
F		6.532
P		0.000

*P<0.05 vs Control group; [△]P<0.05 vs Low-dose group

肺癌的发生与进展是多种基因共同作用的复杂过程,例如 Bcl-2 可抑制细胞凋亡,促进肿瘤的发生和转移,其在肺癌发展、转移过程中扮演重要角色; TGF-β1 信号通路的异常活化、TGF-β1 过度表达会激活细胞外调节蛋白激酶(ERK)1/2,最终导致肿瘤逃脱免疫监视,引起肿瘤转移。因此对于肿瘤的治疗,往往是多个信号通路同时抑制才能发挥最佳疗效^[12-13]。本研究以 Lewis 肺癌小鼠为模型,给予易普利姆玛后,小鼠的瘤质量、体积显著低于空白对照组,且随着剂量的增加抑瘤率升高,进一步证实易普利姆玛抑制肺癌效果显著。

肿瘤的形成、发展往往伴随免疫功能的降低,机体免疫器官的萎缩,其中脾脏、胸腺系数会降低,可作为

检测肿瘤免疫治疗的评价指标^[14]。本研究发现,给予易普利姆玛治疗后,小鼠的胸腺系数和脾脏系数显著高于空白对照组,且随着剂量的增加系数亦增加,表明易普利姆玛可有效改善小鼠体内免疫抑制状态,恢复胸腺、脾脏的损伤,促进机体免疫反应,从而发挥抗肿瘤作用。同时发现,高、低剂量组小鼠给药后 CD3⁺CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺以及血清 TNF-α、IL-6、IL-3 水平显著增加,其中高剂量组免疫细胞各水平显著高于低剂量组,而高剂量组血清炎症因子水平显著低于低剂量组,进一步证实易普利姆玛可调控机体免疫功能,从而发挥抗肿瘤效应。T 细胞介导的细胞免疫是机体抗肿瘤免疫的主要形式,其中 CD4⁺T 可通过释放免疫因子(IL-2、IL-4)辅助和诱导免疫反应,CD8⁺T 作为细胞毒 T 淋巴细胞直接杀伤带有致敏抗原肽-MHC 分子的肿瘤细胞,CD4/CD8 比值可反应机体免疫抑制效果^[15-16]。易普利姆玛通过与 CTLA-4 结合阻断共刺激信号,从而抑制 CTLA-4 对于 T 细胞活化的负调控作用,调节 T 细胞的增殖、分化,增强细胞和体液免疫应答,最终使肿瘤细胞坏死、凋亡或溶解^[17]。

TGF-β1/ERK 信号通路在肺癌侵袭和迁移过程中扮演重要角色,其中 TGF-β1 在肿瘤中高表达,可调控并激活细胞外调节蛋白激酶,使得细胞外信号传

入细胞内,并引起胞质蛋白激酶、核转录因子的活化,从而促进肿瘤细胞生长、转移;整个调控过程中,TGF- β 1、ERK1/2、p-ERK1/2、MEK是重要的信号调控、转导蛋白^[18-19]。本研究结果显示,给予易普利姆玛后,TGF- β 1/ERK信号通路相关蛋白表达量显著降低,且随着剂量的增加其表达量明显降低,表明易普利姆玛可抑制TGF- β 1/ERK信号通路,从而阻断信号转导,最终抑制肿瘤细胞生长。Bcl-2过度表达与恶性肿瘤的发生、发展关系密切,Bcl-2介导的线粒体凋亡是细胞凋亡中的主要通路,在肿瘤耐药机制中发挥重要作用^[20-21]。本研究结果显示,经治疗后两组患者Bcl-2 mRNA表达下降,高、低剂量组小鼠给药后肿瘤组织中的Bcl-2 mRNA表达量均显著降低,高剂量组表达水平显著低于低剂量组,表明易普利姆玛可显著降低Bcl-2表达。推测其可能通过诱导促凋亡因子BAX和BAK的寡聚化并转移至线粒体外膜上,使得凋亡因子(细胞色素C)释放到胞内基质中,最终引起肿瘤细胞死亡,从而发挥抗肿瘤作用。以上研究结果说明,易普利姆玛对于小鼠体内Lewis肺癌细胞的抑制作用可通过多个信号通路进行调控,从而综合发挥免疫调节和抗肿瘤作用。

综上所述,易普利姆玛可有效抑制TGF- β 1/ERK信号通路,改善机体免疫功能以及下调Bcl-2的表达,从而抑制小鼠体内Lewis肺癌细胞生长,发挥抗肿瘤作用。

[参 考 文 献]

- [1] 余焯, 吴华伟. 影像组学在肺癌中的应用进展[J]. 国际医学放射学杂志, 2018, 41(6): 646-649. DOI:10.19300/j.2018.Z6439zt.
- [2] 郝捷, 陈万青. 2012中国肿瘤登记年报[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2012.
- [3] 曹雨微, 单葵. 易普利姆玛治疗晚期黑色素瘤有效性和安全性的Meta分析[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(8): 909-915.
- [4] BUCHBINDER E I, DESAI A. CTLA-4 and PD-1 pathways: similarities, differences, and implications of their inhibition[J/OL]. Am J Clin Oncol, 2016, 39(1): 98-106[2019-07-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4892769/>. DOI: 10.1097/COC.0000000000000239.
- [5] TOMASINI P, KHOBTA N, GREILLIER L, et al. Ipilimumab: its potential in non-small cell lung cancer[J/OL]. Ther Adv Med Oncol, 2012, 4(2): 43-50[2019-07-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3296082/>. DOI:10.1177/1758834011431718.
- [6] 李洪霖, 李雁. 茚达明碱调控TGF- β /ERK信号通路抗肿瘤作用机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(5): 2149-2153.
- [7] 李小东, 包素珍, 李恒楠, 等. 加味四君子汤对脾气虚肺癌转移小鼠Fas和Bcl-2 mRNA表达的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2016, 30(5): 63-67. DOI:10.16306/j.1008-861x.2016.05.016.
- [8] 朱江红, 高云, 杨胜利, 等. 小剂量TP方案联合三维适形放疗治疗老年局部晚期非小细胞肺癌的临床观察[J]. 中国药房, 2014, 25(32): 3022-3024.
- [9] 王磊, 吕艳超, 许浩然, 等. 非小细胞肺癌组织中AKT1、PDCD4蛋白表达变化及意义[J]. 山东医药, 2016, 56(6): 16-18.
- [10] 蒋华勇, 王雅杰, 贾朝阳, 等. 诱导化疗后调强适形放疗治疗局部进展期非小细胞肺癌临床结果分析[J]. 医学研究杂志, 2014, 43(4): 95-99.
- [11] MILLS T A, ORLOFF M, DOMINGO-VIDAL M, et al. Parathyroid hormone-related peptide-linked hypercalcemia in a melanoma patient treated with ipilimumab: hormone source and clinical and metabolic correlates[J / OL]. Semin Oncol, 2015, 42(6): 909-914 [2019-07-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4663680/>. DOI:10.1053/j.seminoncol.2015.09.006.
- [12] BAEK S H, KO J H, LEE J H, et al. Ginkgolic acid inhibits invasion and migration and TGF- β -induced EMT of lung cancer cells through PI3K/akt/mTOR inactivation[J]. J Cell Physiol, 2017, 232(2): 346-354. DOI:10.1002/jcp.25426.
- [13] XU X J, JIN S, MA Y F, et al. MiR-30a-5p enhances paclitaxel sensitivity in non-small cell lung cancer through targeting BCL-2 expression[J]. J Mol Med, 2017, 95(8): 861-871. DOI: 10.1007/s00109-017-1539-z.
- [14] 侯玮婷, 罗佳波. 复方茯苓多糖口服液抗肿瘤作用和免疫调节功能的初步研究[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(2): 78-81. DOI: 10.13412/j.cnki.zyy1.2017.02.022.
- [15] GUY T V, TERRY A M, BOLTON H A, et al. Collaboration between tumor-specific CD4+ T cells and B cells in anti-cancer immunity[J / OL]. Oncotarget, 2016, 7(21): 30211-30229[2019-07-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5058675/>. DOI: 10.18632/oncotarget.8797.
- [16] VERDEIL G, FUERTES MARRACO S A, MURRAY T, et al. From T cell "exhaustion" to anti-cancer immunity[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1865(1): 49-57. DOI:10.1016/j.bbcan.2015.06.007.
- [17] HE M N, CHAI Y, QI J X, et al. Remarkably similar CTLA-4 binding properties of therapeutic ipilimumab and tremelimumab antibodies[J/OL]. Oncotarget, 2017, 8(40): 67129-67139[2019-07-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5620161/>. DOI: 10.18632/oncotarget.18004.
- [18] HONG S K, PARK J R, KWON O S, et al. Induction of integrin β 3 by sustained ERK activity promotes the invasiveness of TGF β -induced mesenchymal tumor cells[J]. Cancer Lett, 2016, 376(2): 339-346. DOI:10.1016/j.canlet.2016.04.012.
- [19] TSUBAKI M, YAMAZOE Y, YANAE M, et al. Blockade of the Ras/MEK/ERK and Ras/PI3K/Akt pathways by statins reduces the expression of bFGF, HGF, and TGF- β as angiogenic factors in mouse osteosarcoma[J]. Cytokine, 2011, 54(1): 100-107. DOI: 10.1016/j.cyto.2011.01.005.
- [20] 宋军, 姚辉, 王艳杰, 等. 四君子丸对Lewis肺癌小鼠肿瘤组织Bax和Bcl2表达的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(4): 648-652. DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.4.020.
- [21] 崔连鸷, 王博, 张晓伟, 等. 胰腺癌细胞外泌体通过激活线粒体凋亡途径促进 β 细胞凋亡[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(12): 2172-2178.

[收稿日期] 2019-06-12

[修回日期] 2019-09-18

[本文编辑] 黄静怡