

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.03.007

· 基础研究 ·

IL-22 通过激活 STAT3 信号轴损害 NK 细胞功能并促进膀胱癌细胞顺铂耐药

杨云杰¹, 陈杨², 刘艺³, 关礼贤², 梁耿祺²(1. 华南理工大学附属第六医院 小儿外科, 广东 佛山 528200; 2. 华南理工大学附属第六医院 泌尿外科, 广东 佛山 528200; 3. 华南理工大学附属第六医院 消化内科, 广东 佛山 528200)

[摘要] **目的:** 探讨 IL-22 通过 STAT3 信号轴损害 NK 细胞功能并促进膀胱癌细胞耐药的机制。**方法:** 常规培养 T24 细胞, 用梯度递增法构建耐药 T24/顺铂(DDP)细胞。将细胞分为对照组(不处理)、DDP 组、IL-22 组、IL-22 + DDP 组、IL-22 + anti-IL-22 组、IL-22 + DDP + Stattic(STAT3 抑制剂)组。qPCR 法检测各组 T24 细胞中 IL-22、cyclin D1、Bcl-2 mRNA 的表达, WB 法检测各组细胞中 BAX、BCL2 和 p-STAT3 的表达, CCK-8 法检测各组细胞的增殖活性, 流式细胞术检测各组细胞的凋亡, ELISA 检测各组细胞上清液中乳酸脱氢酶(LDH)、TNF- α 、IFN- γ 、颗粒酶 B(GzmB) 和穿孔素(PRF)蛋白的水平。**结果:** T24/DDP 细胞对 DDP 敏感性降低($P < 0.05$); 其耐药相关基因 P-糖蛋白(P-gp)、肺耐药蛋白(LRP)、多药耐药相关蛋白 1(MRP1) 和 IL-22 及其受体表达水平均明显升高(均 $P < 0.05$), 说明 T24/DDP 细胞构建成功。与对照组比较, DDP 组 T24 细胞的增殖活力明显降低、凋亡率升高、BAX 蛋白表达升高、BCL2 表达下降(均 $P < 0.05$); 与 DDP 组比较, IL-22 + DDP 组 T24 细胞的增殖活力明显升高、凋亡率明显下降、BAX 蛋白表达降低、BCL2 表达升高(均 $P < 0.05$), 表明 IL-22 通过调节 BAX/Bcl-2 的表达促进 T24 细胞对 DDP 耐药性。与对照组比较, IL-22 组 T24 细胞总细胞和核中 p-STAT3 表达水平均明显升高(均 $P < 0.05$); 与 IL-22 组比较, IL-22 + anti IL-22 组 T24 细胞中 p-STAT3 水平明显降低($P < 0.05$), 说明 IL-22 激活 T24 细胞中 STAT3 的磷酸化过程, 并促进其转核。与对照组比较, DDP 组 T24 与 NK92 细胞共培养上清液中 LDH、TNF- α 、IFN- γ 、GzmB 及 PRF 蛋白水平均明显升高(均 $P < 0.05$), 与 DDP 组比较, IL-22 + DDP 组共培养上清液中上述蛋白水平均明显降低(均 $P < 0.05$); 与对照组比较, IL-22 组共培养上清液中 LDH、TNF- α 、IFN- γ 、GzmB 及 PRF 蛋白水平均明显降低(均 $P < 0.05$); 与 IL-22 组比较, IL-22 + Stattic 组共培养上清液中上述蛋白水平均明显升高(均 $P < 0.05$), 说明 IL-22 可降低 NK92 细胞对 T24 细胞的毒性, STAT3 抑制剂可逆转此作用。与 DDP 组比较, IL-22 + DDP 组 T24 细胞增殖活力明显升高($P < 0.05$); 与 IL-22 + DDP 组比较, IL-22 + DDP + Stattic 组 T24 细胞增殖活力明显降低($P < 0.05$); 与 DDP 组比较, IL-22 + DDP 组 T24 细胞的凋亡率明显升高($P < 0.05$); 与 IL-22 + DDP 组比较, IL-22 + DDP + Stattic 组 T24 细胞的凋亡率明显升高($P < 0.05$), 说明 IL-22 调控 STAT3 影响 T24 细胞 DDP 耐药性及 NK 细胞免疫功能。**结论:** IL-22 通过激活 STAT3 信号轴促进 T24 细胞的 DDP 耐药性, 抑制 NK 细胞功能。

[关键词] 膀胱癌; T24 细胞; NK 细胞; IL-22; 顺铂; STAT3

[中图分类号] R737.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2026) 03-0280-08

IL-22 impairs NK cell function and promotes cisplatin resistance in bladder cancer cells *via* activating the STAT3 signaling axis

YANG Yunjie¹, CHEN Yang², LIU Qi³, GUAN Lixian², LIANG Gengqi² (1. Department of Pediatric Surgery, the Sixth Affiliated Hospital of South China University of Technology, Foshan 528200, Guangdong, China; 2. Department of Urology Surgery, the Sixth Affiliated Hospital of South China University of Technology, Foshan 528200, Guangdong, China; 3. Department of Gastroenterology, the Sixth Affiliated Hospital of South China University of Technology, Foshan 528200, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism by which IL-2 promotes bladder cancer cell resistance by impairing NK cell function *via* the STAT3 signalling axis. **Methods:** Bladder cancer T24 cells were routinely cultured, and cisplatin-resistant T24/DDP cells were established through stepwise dose-escalation method. Cells were divided into the following groups: control, DDP, IL-22, IL-22 + DDP, IL-22 + anti-IL-22, and IL-22 + DDP + Stattic (a STAT3 inhibitor). The mRNA expression of IL-22, cyclin D1, and

[基金项目] 2022 年度佛山市自筹经费类科技创新项目(2220001005778)

[作者简介] 杨云杰, 硕士, 副主任医师

[通信作者] 杨云杰(扫码获取作者通信方式)



BCL2 was detected using qRT-PCR. Protein expression of BAX, BCL2, and phosphorylated STAT3 (p-STAT3) was analyzed using WB. Cell proliferation and apoptosis were assessed using the CCK-8 assay and flow cytometry, respectively. The levels of lactate dehydrogenase (LDH), TNF- α , IFN- γ , granzyme B (GzmB), and perforin (PRF) in the supernatant were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** T24/DDP cells exhibited significantly reduced sensitivity to DDP ($P < 0.05$), accompanied by markedly elevated expression levels of drug resistance-associated genes (P-glycoprotein[P-gp], lung drug resistance protein[LRP], and multidrug resistance-associated protein 1[MRP1]), as well as IL-22 and its receptor (all $P < 0.05$), indicating successful establishment of DDP-resistant cells. Compared with the control group, the DDP group showed decreased proliferation, increased apoptosis, upregulated BAX protein expression, and downregulated Bcl-2 protein expression in T24 cells (all $P < 0.05$). Compared with the DDP group, the IL-22 + DDP group showed significantly increased proliferative activity, decreased apoptosis rate, downregulated BAX, and upregulated BCL expression (all $P < 0.05$), suggesting that IL-22 promotes DDP resistance in T24 cells by modulating BAX/BCL2 expression. Compared with the control group, IL-22 stimulation significantly increased total and nuclear p-STAT3 expression in T24 cells (all $P < 0.05$), and this increase was significantly attenuated by pre-treatment with an IL-22 neutralizing antibody (IL-22 + anti-IL-22 group) ($P < 0.05$), indicating that IL-22 activates STAT3 phosphorylation and promotes its nuclear translocation in T24 cells. In the T24-NK92 co-culture system, the levels of LDH, TNF- α , IFN- γ , GzmB, and PRF in the supernatant were significantly increased in the DDP group compared with the control group (all $P < 0.05$). Co-treatment with IL-22 and DDP significantly reduced the levels of these cytotoxicity-related factors compared to the DDP group (all $P < 0.05$). Furthermore, IL-22 treatment alone significantly decreased the levels of these factors compared to the control group (all $P < 0.05$), while the addition of the STAT3 inhibitor Stattic (IL-22 + Stattic group) reversed this suppression, leading to significant elevations in these factors (all $P < 0.05$). These findings indicate that IL-22 diminishes the cytotoxicity of NK92 cells against T24 cells, which can be reversed by STAT3 inhibition. Regarding chemoresistance, T24 cell proliferative activity was significantly higher in the IL-22 + DDP group than in the DDP group ($P < 0.05$). This enhancement was abolished by Stattic, as evidenced by significantly lower activity in the IL-22 + DDP + Stattic group compared to the IL-22 + DDP group ($P < 0.05$). Consistently, the apoptosis rate was significantly decreased in the IL-22 + DDP group compared with the DDP group ($P < 0.05$), and Stattic co-treatment significantly increased the apoptosis rate compared to the IL-22 + DDP group ($P < 0.05$). These findings indicate that IL-22 regulates both DDP resistance in T24 cells and NK cell-mediated immune function via the STAT3 pathway. **Conclusion:** IL-22 promotes DDP resistance in T24 bladder cancer cells and suppresses NK cell function *via* activating the STAT3 signaling axis.

[Key words] bladder cancer; T24 cells; NK cells; IL-22; cisplatin; STAT3

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(3): 280-287. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.03.007]

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一,根据癌细胞浸润程度不同可分为非肌层浸润性膀胱癌(non-muscle-invasive bladder cancer, NMIBC)和肌层浸润性膀胱癌(muscle invasive bladder cancer, MIBC)两种^[1]。膀胱癌患者存在转移风险高、治疗方式少(主要通过膀胱切除)和生存率低(仅手术治疗5年生存率不足50%)等问题^[2]。目前,手术治疗辅助化疗、免疫治疗是常用治疗策略^[3],但顺铂(cisplatin, DDP)等抗癌药物的广泛应用使肿瘤出现靶向耐药性,膀胱癌患者也常因微转移形成化疗耐药导致预后极差^[4]。研究^[5]表明,自然杀伤(NK)细胞能通过抑制c-Myc等癌症因子增强膀胱癌细胞对DDP敏感性,而DDP也会通过上调自然杀伤细胞活化性受体(natural killer group 2D, NKG2D)配体激活NK细胞,增强其对膀胱癌细胞的识别和杀伤^[6]。因此,进一步研究膀胱癌中与免疫功能相关的耐药机制将有助于发现新的治疗靶点,克服膀胱癌患者对DDP等化疗药物耐药。信号转导与转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)在多种细胞生理进程中发挥调控作用。研究^[7-8]表明,

JAK2/STAT3 信号通路可以调控抗凋亡基因(如Bcl-2)和细胞周期蛋白(如cyclin D1),STAT3通过将细胞因子和生长因子刺激与靶基因转录联系起来,促进肿瘤细胞耐药;此外,肿瘤细胞中STAT3的激活能通过复杂的机制抑制NK细胞的抗肿瘤免疫^[9]。NK细胞作为固有免疫的重要效应细胞,其功能受损是肿瘤免疫逃逸的关键机制。STAT3的异常激活会抑制NK细胞成熟、迁移及细胞毒性分子的分泌,从而削弱其杀伤能力^[10],说明STAT3对耐药性和免疫功能的有调控能力。白细胞介素-22(IL-22)是一种多效性细胞因子,参与多种炎症进程和免疫反应^[11],在胃癌、肺癌和乳腺癌等多种肿瘤中表达上调^[12-14]。IL-22能在肝癌细胞中促进STAT3的磷酸化促进有丝分裂并产生凋亡抑制因子^[15],还能在肠道菌群改善、胰岛素抵抗和口腔黏膜创伤修复等进程中与STAT3协同发挥作用^[16-18],说明IL-22-STAT3轴具有重要生物学效应。IL-22还可以促进乳腺癌细胞抵抗NK细胞介导的裂解,从而诱导免疫逃逸^[19]。虽没有明确结果显示IL-22激活乳腺癌细胞中STAT3以降低其对NK细胞介导细胞毒性的敏感性,但有研究证实,STAT3可通

过复杂的机制损害NK细胞的抗肿瘤免疫功能^[20]。因此,本研究将探究膀胱癌细胞耐药相关IL-22-STAT3轴与NK细胞介导杀伤之间的关系,为膀胱癌化疗耐药提供新的分子机制解释。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂与仪器

人膀胱癌细胞T24和NK92细胞均购自上海雅吉生物科技有限公司。胎牛血清、青霉素-链霉素均购自美国Gibco公司,RPMI 1640培养基购自美国HyClone公司,TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司,RIPA裂解液、CCK-8试剂均购自碧云天生物技术有限公司,蛋白酶/磷酸酶抑制剂购自Roche公司,DDP、MTT试剂均购自Sigma-Aldrich公司,STAT3抑制剂Stattic和重组IL-22均购自北京百奥莱博科技有限公司,IL-22中和抗体购自武汉艾美捷科技有限公司,一抗BAX(ab32503)、Bcl-2(ab182858)、p-STAT3(ab32143)、STAT3(ab68153)、GAPDH(ab9485)、H3(ab4729)及辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔IgG(ab6721)均购自Abcam公司,ELISA试剂盒购自Bio-Rad公司,反转录试剂盒和SYBR Real-time PCR试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司,FITC-Annexin V/PI细胞凋亡试剂盒购自上海泽叶科技有限公司。酶标仪和恒温振荡培养箱均购自美国Thermo Fisher公司,流式细胞仪购自Beckman Coulter公司。

1.2 细胞培养、处理及分组

常规培养T24细胞,耐药T24/DDP细胞通过梯度递增法构建。初始使用0.1 μmol/L的DDP处理T24细胞72 h,恢复培养2周后逐步提升浓度至0.5 μmol/L持续刺激6个月。所有细胞培养均在含10%胎牛血清+1%青霉素-链霉素的RPMI 1640培养基,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养。实验分组如下:探究IL-22与膀胱癌发生发展的相关性时,分为T24组(正常培养)和T24/DDP组(诱导耐药的T24/DDP耐药细胞);探究IL-22调控STAT3影响膀胱癌细胞生物学行为时,分为对照组(未处理)、DDP组(20 μmol/L DDP处理48 h)、IL-22组(50 ng/mL重组IL-22处理24 h)、IL-22 + DDP组(50 ng/mL重组IL-22处理24 h后,用20 μmol/L的DDP处理48 h)、IL-22 + anti IL-22组(用浓度10 μg/mL的IL-22中和抗体预处理1 h后,再用50 ng/mL重组IL-22处理24 h)、IL-22 + DDP + Stattic组(50 ng/mL重组IL-22处理胞24 h后,先用10 μmol/L Stattic处理6 h,再用20 μmol/L DDP处理48 h)。

1.3 qPCR法检测各组T24细胞中IL-22、cyclin D1、

Bcl-2等分子mRNA的表达

用TRIzol试剂提取各组T24细胞的总RNA,检测其纯度和浓度后用反转录试剂盒将其反转录为cDNA,用SYBR Real-time PCR试剂盒进行扩增,PCR反应条件:94℃ 15 min;94℃ 15 s、60℃ 30 s,共40个循环。以GAPDH作为内参基因,用2^{-ΔΔCt}法计算目的基因的相对表达水平。PCR引物:IL-22正向引物为5'-CAGCCAGACATCAGGAAGGA-3',反向引物为5'-TGGGTCTCCAGGTATCCAAC-3'; Cyclin D1正向引物为5'-GCTGCGAAGTGGAAACCATC-3',反向引物为5'-CCTCCTTCTGCACACATTTGAA-3'; Bcl-2正向引物为5'-TTGGATCAGGGAGTTGGAAG-3',反向引物为5'-TGTCCCTACCAACCA GAAGG-3'; P-糖蛋白[P-glycoprotein, P-gp]正向引物为5'-GGGCACAAACCAGACAACAT-3',反向引物为5'-TCCGCTCTTCACCTTCAGAT-3'; 肺耐药蛋白(lung drug resistance protein, LRP)正向引物为5'-CTGCAGGCCAACACCATCA-3',反向引物为5'-GCCCAAAGGCTGTGTTGAAG-3'; 多耐药相关蛋白1(multidrug resistance-associated protein 1,MRP1)正向引物为5'-GTCGGAACAAGTCGTGCCTG-3',反向引物为5'-CAAAGCCTCCACCTCCTCA-3',IL-22R正向引物为5'-AGCTGCCTTCTTCACTTG-3',反向引物为5'-TTGCTCTGCCTCTTATTC-3'; GAPDH正向引物为5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3',反向引物为5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'。

1.4 WB法检测各组细胞中BAX、Bcl-2和p-STAT3的表达

用RIPA裂解液提取各组细胞的总蛋白,用Micro BCA试剂盒进行蛋白定量,用SDS-PAGE进行分离后转膜和封闭,滴加BAX(稀释比例1:1 000)、Bcl-2(稀释比例1:2 000)、p-STAT3(稀释比例1:1 000)、STAT3(稀释比例1:1 000)及GAPDH(稀释比例1:1 000)一抗,4℃下处理16 h,HRP标记山羊抗兔IgG(稀释比例1:5 000)室温下处理1 h,加入ECL显影,用Odyssey CLx系统采集图像,以GAPDH或STAT3为内参,用Image Studio 5.2软件完成定量分析。

1.5 MTT法或CCK-8法检测各组细胞的增殖活性

取对数生长期的细胞,以4 × 10³/孔接种于96孔板,用0、2.5、5、10、20、40和80 μmol/L的DDP处理48 h后,每孔中滴加0.25 mg/mL MTT或10% CCK-8试剂,培养4 h,用酶标仪检测570 nm处的光密度(D)值,以D值代表细胞的增殖活力,计算IC₅₀值。以“[1 - (实验组D值 - 空白组D值)/(对照组D值 - 空白组D值)] × 100%”计算细胞增殖抑制率。

1.6 流式细胞术检测各组细胞的凋亡

按1.2节中方法处理细胞,将细胞密度调整至 1×10^6 个/mL的细胞悬液,取100 μ L该细胞悬液,用FITC-Annexin V/PI细胞凋亡试剂盒,按照说明书处理染色步骤处理细胞,通过流式细胞仪检测各组T24细胞的凋亡情况。

1.7 ELISA 检测各组细胞乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)的释放

T24细胞和NK92细胞密度分别调整至 5×10^4 和 2.5×10^5 个/mL,每孔添加100 μ L细胞悬液,在96孔板中37 $^{\circ}$ C共培养24 h,离心后取上清液,按照ELISA试剂盒产品说明书检测个孔中细胞LDH的释放情况,以相对释放率%表示细胞死亡程度。

1.8 统计学处理

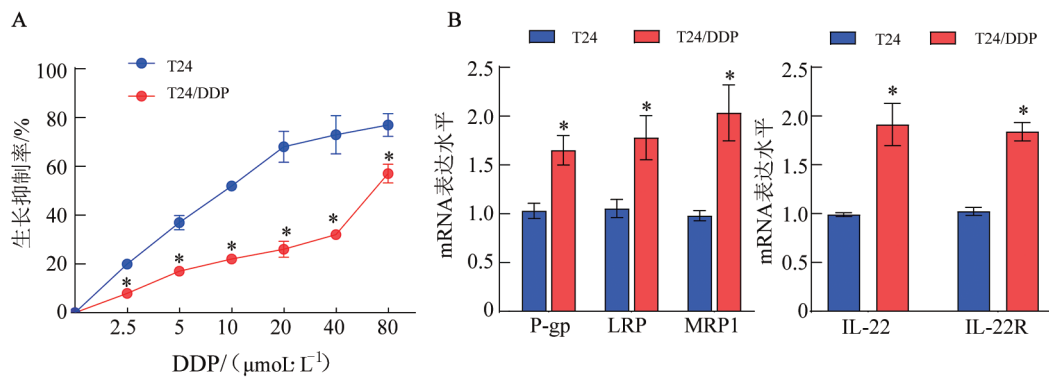
以上实验均独立重复3次。用Graphpad Prism 9软件对实验数据进行统计分析及绘图。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组样本间的比较采用

独立样本t检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 T24/DDP细胞对DDP敏感性降低可能与其耐药基因P-gp、LRP、MRP1和IL-22及其受体表达水平升高有关

MTT法检测结果(图1A)显示,与T24细胞比较,T24/DDP组细胞对DDP的敏感性明显降低($P < 0.05$), IC_{50} 值也明显升高[(10.37 ± 0.73) μ mol/L vs (75.57 ± 11.18) μ mol/L, $P < 0.05$],说明T24/DDP组细胞耐药性的增强。qPCR法检测结果(图1B)显示,与T24细胞比较,T24/DDP细胞中耐药基因P-gp、LRP、MRP1、IL-22和IL-22R mRNA的表达水平明显升高(均 $P < 0.05$)。实验结果说明,T24/DDP细胞对DDP敏感性降低,可能与其耐药基因P-gp、LRP、MRP1和IL-22及其受体表达水平升高有关。



A: MTT实验检测DDP对T24细胞和T24/DDP细胞生长的影响; B: qPCR检测T24细胞和T24/DDP细胞中耐药相关基因和IL-22及IL-22R mRNA的表达水平。与T24细胞比较, $P < 0.05$ 。

图1 DDP对T24和T24/DDP细胞生长、耐药基因和IL-22及其受体表达的影响

2.2 IL-22通过调节BAX和Bcl-2的表达促进T24细胞对DDP耐药性

CCK-8法检测结果(图2A)显示,与对照组比较,DDP组细胞的增殖活力明显降低($P < 0.05$);与DDP组比较,IL-22 + DDP组细胞的增殖活力明显升高($P < 0.05$),表明IL-22增强T24细胞对DDP的敏感性。流式细胞术检测结果(图2B)显示,与对照组比较,DDP组细胞的凋亡率明显升高($P < 0.05$);与DDP组比较,IL-22 + DDP组细胞的凋亡率明显降低($P < 0.05$),表明IL-22可部分抑制DDP诱导的T24细胞凋亡。WB法检测结果(图2C)显示,与对照组比较,DDP组细胞中BAX蛋白的表达明显升高($P < 0.05$),BCL2的表达明显降低($P < 0.05$);与DDP组比较,IL-22 + DDP组细胞中BAX蛋白的表达明显降低($P < 0.05$),BCL2的表达明显升高($P <$

0.05),表明IL-22可部分抑制DDP诱导的T24细胞中BAX和BCL2的表达。实验结果说明,IL-22可通过调控凋亡相关蛋白影响T24细胞在DDP环境中的活力,提示IL-22可以调控T24细胞的DDP耐药性。

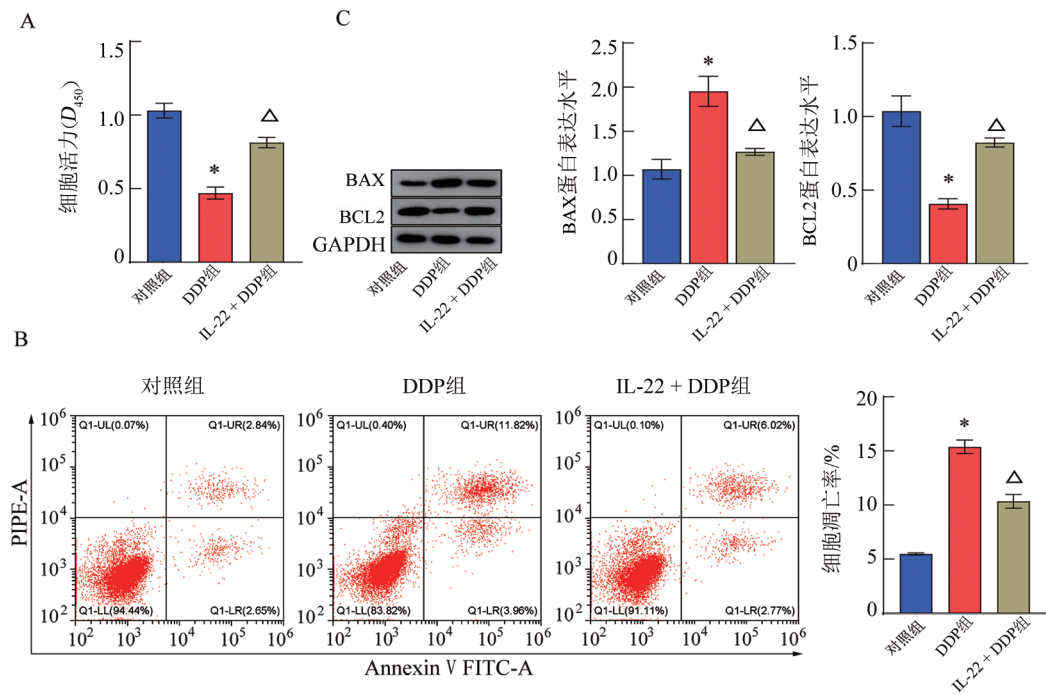
2.3 IL-22激活T24细胞中STAT3的磷酸化,并促进其入核

WB法检测结果(图3A)显示,与对照组比较,IL-22组细胞中p-STAT3表达水平显著升高($P < 0.05$);与IL-22组比较,IL-22 + anti IL-22组细胞中p-STAT3表达水平明显下降($P < 0.05$),说明IL-22可调节T24细胞中STAT3磷酸化水平。进一步对核/质STAT3的表达水平进行检测,结果(图3B)显示,IL-22的刺激下,STAT3在细胞核中的表达显著上升($P < 0.05$),而在细胞质中表达显著下降($P < 0.05$),表明IL-22可以促进STAT3核转位。

2.4 IL-22 通过调控 STAT3 影响 T24 细胞 DDP 耐药性及 NK 细胞免疫功能

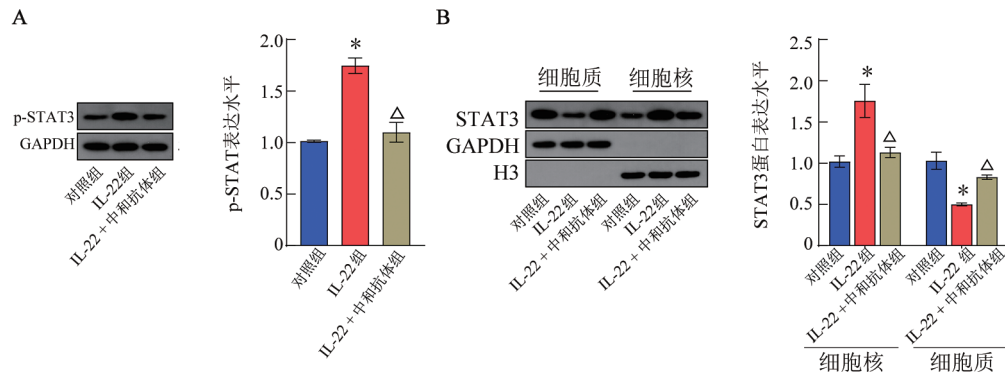
ELISA 检测结果(图 4)显示,与对照组比较,DDP 组 T24 细胞与 NK92 细胞共培养上清液中 LDH、TNF- α 、IFN- γ 、颗粒酶 B 及穿孔素蛋白水平均显著升高(均 $P < 0.05$);与 DDP 组比较,IL-22 + DDP 组共培养上清液中上述蛋白的水平均明显降低(均 $P < 0.05$),说明 DDP 可增强 NK92 细胞对 T24 细胞的毒性,而 IL-22 则可部分抑制这种作用。

为探究 IL-22 对 STAT3 的调控作用,用 STAT3 抑制剂 Stattic 和 IL-22 共同处理共培养细胞,ELISA 检测结果(图 5)显示,与对照组比较,IL-22 组共培养上清液中 LDH、TNF- α 、IFN- γ 、颗粒酶 B 及穿孔素蛋白水平显著降低($P < 0.05$);与 IL-22 组比较,IL-22 + Stattic 组共培养上清液中上述蛋白的水平均明显升高($P < 0.05$),说明 IL-22 可降低 NK92 细胞对 T24 细胞的毒性,而 Stattic 则可逆转 IL-22 对 T24 细胞的作用。



A: CCK-8 法检测细胞增殖活力; B: 流式细胞术检测细胞凋亡率; C: WB 法检测各组细胞中 BAX、BCL2 的表达。与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 DDP 组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图 2 IL-22 调控膀胱癌细胞的 DDP 耐药性



A: WB 法检测 T24 细胞中 STAT3 磷酸化水平; B: WB 法检测 T24 细胞核与细胞质中 STAT3 蛋白表达水平。对照组比较, * $P < 0.05$; 与 IL-22 组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

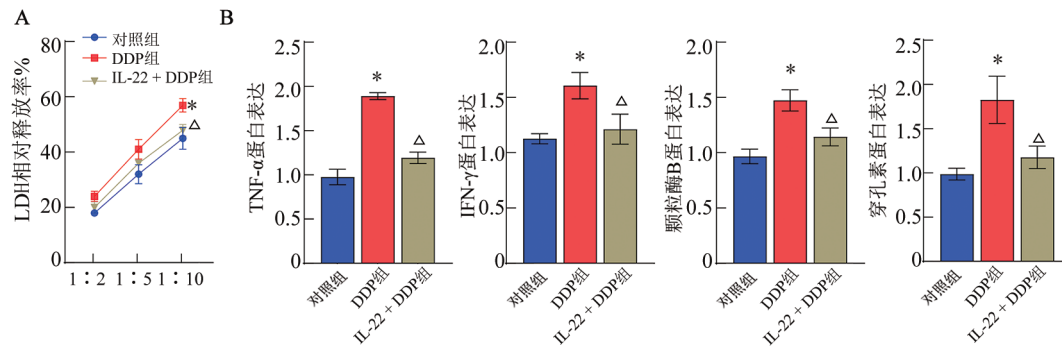
图 3 IL-22 对 T24 细胞中 p-STAT3 蛋白表达的影响

在耐药性实验中,用 CCK-8 法检测 T24 细胞的增殖活性,结果(图 6A)显示,与 DDP 组比较,IL-22 + DDP 组 T24 细胞活性明显升高($P < 0.05$);与 IL-22 +

DDP 组比较,IL-22 + DDP + Stattic 组 T24 细胞的增殖活性明显降低($P < 0.05$),表明 IL-22 可通过提高 STAT3 磷酸化水平增强 T24 细胞对 DDP 耐受性。流

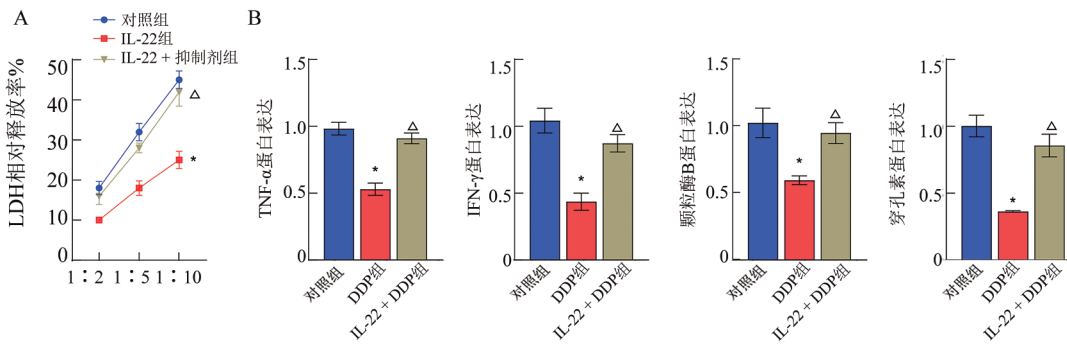
式细胞术检测结果(图6B)显示,与DDP组比较,IL-22 + DDP组T24细胞的凋亡率显著降低($P < 0.05$);与IL-22 + DDP组比较,IL-22 + DDP + Stattic组T24细胞的凋亡率明显升高($P < 0.05$),说明IL-22通过提高STAT3磷酸化水平促进T24细胞的存活。细胞活

性与凋亡检测均能说明IL-22通过磷酸化STAT3增强T24细胞对DDP的耐药性。实验结果说明,IL-22通过调控STAT3磷酸化影响T24细胞对DDP的耐药性和NK细胞的免疫功能。



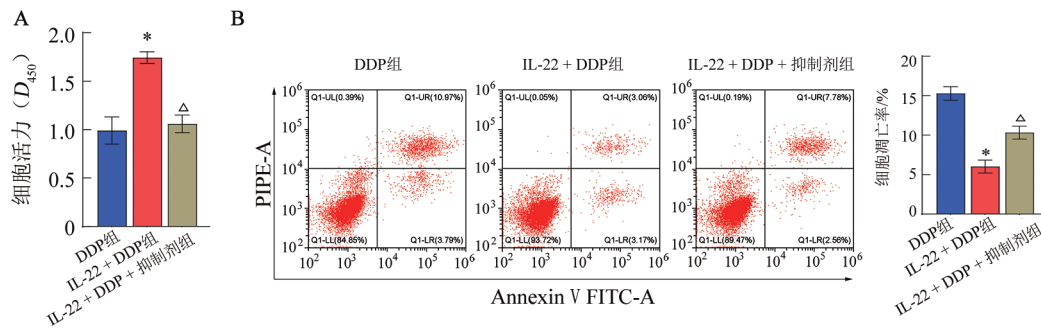
A:ELISA 检测与各组 T24 细胞和 NK92 细胞共培养后 LDH 的释放水平;B:ELISA 检测共培养细胞上清液中 TNF- α 、IFN- γ 、颗粒酶 B 和穿孔素蛋白水平。与对照组比较,* $P < 0.05$;与 DDP 组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图4 IL-22 逆转 DDP 处理后 NK92 细胞对 T24 细胞的杀伤能力



A:ELISA 检测共培养细胞上清液 LDH 释放水平;B:ELISA 检测共培养细胞上清液中 TNF- α 、IFN- γ 、颗粒酶 B 及穿孔素蛋白水平。与对照组比较,* $P < 0.05$;与 DDP 组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图5 STAT3 抑制剂逆转 IL-22 对 NK92 细胞杀伤能力的抑制作用



A:CCK-8 法检测各组 T24 细胞的增殖活性;B:流式细胞术检测各组 T24 细胞的凋亡水平。与 DDP 组比较,* $P < 0.05$;与 IL-22 + DDP 组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图6 STAT3 抑制剂逆转 IL-22 介导的 T24 细胞对 DDP 的耐药

3 讨论

膀胱癌具有高复发率、高病死率和预后较差的特点^[21]。目前,针对膀胱癌的主要治疗手段仍为化

疗、放疗搭配手术,但患者总生存率依然处于较低水平^[22],其中一个主要原因便是肿瘤细胞耐药的产生。DDP 是常用的抗癌药物,但由于耐药性的出现,化疗有效率仅在 35%~60%,且总体预后较差^[23]。因此,

迫切需要弄清膀胱癌发生发展的机制,以寻找新的治疗靶点、开发新化疗药物。本研究证实了在T24细胞中,IL-22可以激活调控STAT3,介导肿瘤细胞的耐药性和免疫抑制。本研究表明,IL-22可能作为减轻膀胱癌DDP耐药的潜在治疗靶点。

IL-22是IL-10细胞因子家族蛋白中的一种,发挥多种重要的生物学功能^[24],其在肿瘤进程中的机制研究一直是热点。IL-22-IL-22RA1轴可通过STAT3信号促进胰腺肿瘤干细胞的致瘤性^[25],IL-22也能在直肠癌中影响肿瘤细胞的增殖与迁移^[26]。对其他类型肿瘤的研究^[27]表明,IL-22与耐药有关,如IL-22通过刺激AKT和ERK信号通路使肺癌细胞产生对靶向表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂的抗性。目前,尚没有关于IL-22调控膀胱癌细胞耐药的报道。本研究通过DDP处理T24细胞成功建立耐药T24/DDP细胞,同时发现,与T24细胞比较,T24/DDP细胞中IL-22表达显著上调,表明T24细胞获得耐药性与IL-22有关,用重组IL-22处理T24细胞,增强T24细胞对DDP耐药性,并抑制其凋亡。

STAT3常通过Janus激酶(Janus kinase, JAK)介导的磷酸化被细胞因子和生长因子激活,在大多数肿瘤中过度激活,与患者不良预后相关。长期以来,自发性靶向IL-16/JAK/STAT3信号通路被认为是预防肿瘤发生发展和耐药的有效策略^[28]。已知IL-22与其异源二聚体受体(IL-22R1/IL-10R2)结合后,能够激活STAT3、NF- κ B、MAPK和AKT等信号通路^[24,29],提示在膀胱癌中IL-22同样可能激活调控STAT3。本研究发现,IL-22可使T24细胞中STAT3磷酸化水平显著上升,IL-22中和抗体可抑制这一作用,表明IL-22对T24细胞中的STAT3具有激活与调控作用。对STAT3下游的靶基因表达进行检测后发现,IL-22还可使T24细胞中Bcl-2、cyclin D1的表达上调,用STAT3抑制剂处理后则下调,这表明IL-22可以通过激活STAT3及其下游通路在膀胱癌中发挥作用。研究^[30]显示,在结直肠癌细胞中,IL-22能通过激活STAT3促进IL-8的表达与分泌,从而使得FOLFOX化疗方案的失败,基于上述研究结果,有理由推测IL-22可通过STAT3调控T24细胞的耐药性。IL-22处理T24细胞后其耐药性明显增强,抑制STAT3通路则可减弱其对DDP的耐药性。实验结果说明,IL-22能通过激活STAT3调控T24细胞的耐药性。

此外,有研究^[31]显示,肿瘤细胞中的STAT3活化可通过多种机制显著损害NK细胞抗肿瘤免疫能力。在前列腺癌中,当JAK/STAT3通路和程序性死亡-配体1(PD-L1)受到联合抑制时,肿瘤细胞从NK细胞杀伤作用中逃逸的能力也显著降低^[32],提示IL-22-

STAT3通路对膀胱癌细胞生存的促进作用可能与免疫功能相关。因此,进一步研究了IL-22是否通过STAT3调节NK细胞对T24细胞的杀伤能力,结果发现,IL-22可明显抑制NK92细胞对T24细胞的杀伤作用,STAT3抑制剂可明显抑制IL-22的这种作用。实验结果说明,IL-22-STAT3能通过调节NK细胞的杀伤能力影响免疫功能,影响膀胱癌进程。尽管本研究已证明IL-22在T24细胞生物学行为中的作用,并初步建立“T24/DDP细胞分泌IL-22激活STAT3进而抑制NK细胞功能”的逻辑关联,揭示了IL-22-STAT3轴在调节NK细胞介导的细胞毒性和化疗耐药中的作用,但仍存在一些关键问题需明确:本研究通过用外源性IL-22模拟耐药微环境的效应,抑制NK细胞功能并增强肿瘤细胞耐药,并观察到STAT3抑制剂可逆转外源性IL-22对NK细胞的抑制作用,然而,这些结果尚未通过中和性抗体阻断实验直接证实耐药肿瘤细胞分泌的内源性IL-22是介导NK细胞功能抑制的核心因素。未能完全排除“耐药微环境中其他细胞因子(如IL-6、TGF- β)协同参与NK细胞抑制”的可能性,在肿瘤-免疫微环境的细胞间交互作用研究中,中和性抗体阻断内源性细胞因子活性是验证“特定细胞因子介导细胞间调控作用”的经典且必要策略;此外,当前研究以体外细胞模型验证为主,缺乏基于体内肿瘤模型和临床样本的分析。针对上述局限性,未来研究拟从以下方面展开,以完善证据链并拓展研究深度,首先是补充中和性抗体阻断实验,构建“耐药膀胱癌细胞-NK细胞共培养体系”,通过抗IL-22中和抗体(或IL-22R拮抗剂)预处理,检测阻断内源性IL-22后分析NK细胞功能和肿瘤耐药性变化;此外,利用膀胱癌异种移植模型以及收集临床样本验证IL-22-STAT3信号轴在“耐药-免疫抑制”中的作用,为其临床转化价值提供更有力的证据。

综上,本研究整合肿瘤细胞内在信号与免疫微环境调控,揭示IL-22-STAT3轴的双重致病机制,成功在膀胱癌细胞中证实了IL-22可以通过STAT3影响NK细胞的免疫功能,并促进膀胱癌细胞对DDP的耐药性。这一发现不仅有望改善膀胱癌患者的临床预后,也可能为其他IL-22高表达的肿瘤(如结直肠癌、乳腺癌)提供治疗新思路。

[参考文献]

- [1] 杜君,段鹏强,张超,等.术前全身炎症反应指数对中高危非肌层浸润性膀胱癌预后的影响[J].中国肿瘤临床,2023,50(16):829-833. DOI:10.12354/j.issn.1000-8179.2023.20230616.
- [2] HERMANS T J N, VOSKUILEN C S, VAN DER HEIJDEN M S, et al. Neoadjuvant treatment for muscle-invasive bladder cancer: The past, the present, and the future[J]. Urol Oncol, 2018, 36(9):

- 413-422. DOI:10.1016/j.urolonc.2017.10.014.
- [3] SPIESS P E, AGARWAL N, BANGS R, et al. Bladder cancer, version 5.2017, NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2017, 15(10): 1240-1267. DOI: 10.6004/jnccn.2017.0156.
- [4] 陈兴宇. 膀胱癌肿瘤免疫微环境调控机制探索及临床应用研究[D]. 长沙: 中南大学, 2023.
- [5] 王柱. 自然杀伤细胞在膀胱癌治疗中的作用及机制研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2023.
- [6] GASSER S, ORSULIC S, BROWN E J, et al. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor[J]. *Nature*, 2005, 436(7054): 1186-1190. DOI: 10.1038/nature03884.
- [7] LI L J, LI C P, MIAO F L, et al. Cyclanoline reverses cisplatin resistance in bladder cancer cells by inhibiting the JAK2/STAT3 pathway[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2024, 24(18): 1360-1370. DOI:10.2174/0118715206304668240729093158.
- [8] LV J C, WU Q K, LI K, et al. Lysine N-methyltransferase SETD7 promotes bladder cancer progression and immune escape via STAT3/PD-L1 cascade[J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(12): 3744-3761. DOI:10.7150/ijbs.87182.
- [9] HASHIMOTO S, HASHIMOTO A, MUROMOTO R, et al. Central roles of STAT3-mediated signals in onset and development of cancers: tumorigenesis and immunosurveillance[J]. *Cells*, 2022, 11(16): 2618. DOI:10.3390/cells11162618.
- [10] 刘军, 杜恒, 马彬. miR-590 通过靶向 STAT3 增强 NK 细胞对膀胱癌的免疫功能[J]. *现代肿瘤医学*, 2023, 31(21): 3914-3920. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2023.21.003.
- [11] PERUSINA LANFRANCA M, LIN Y W, FANG J Y, et al. Biological and pathological activities of interleukin-22[J]. *J Mol Med*, 2016, 94(5): 523-534. DOI:10.1007/s00109-016-1391-6.
- [12] 蒋茂芹, 赖铭裕, 谢芳, 等. 胃癌组织中 IL-22BP、IL-22、STAT3 的表达变化及意义[J]. *山东医药*, 2017, 57(25): 16-19. DOI:10.3969/j.issn.1002-266X.2017.25.005.
- [13] 任冠颖. 乳腺癌外周血 Th22、IL-22 的表达及与临床分期、Ca153 的相关性研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.
- [14] 马雪梅, 王晶, 马雷, 等. 肺癌患者外周血中 Th22 细胞及效应因子 IL-22 的表达和临床意义[J]. *中国现代医生*, 2020, 58(13): 11-14.
- [15] HE G B, KARIN M. NF- κ B and STAT3-key players in liver inflammation and cancer[J]. *Cell Res*, 2011, 21(1): 159-168. DOI: 10.1038/cr.2010.183.
- [16] 胡红杰, 司红彬. 羧甲基化鸡骨草多糖通过 IL-4/STAT6 和 IL-22/STAT3 调节肠道菌群改善 CTX 诱导的免疫抑制和肠道损伤[C]//中国畜牧兽医学学会兽医药理毒理学会第十三次全国会员代表大会暨第十七次学术研讨会论文集. 南宁, 2023: 224. DOI: 10.26914/c.cnkihy.2023.099313.
- [17] 刘宏飞, 孙婷婷, 田稼荟, 等. IL-22/STAT3 信号通路在慢性间歇低氧致胰岛素抵抗中的作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(10): 1678-1682. DOI:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.10.012.
- [18] 李善勇, 张光炜, 张天奇. IL-22 激活角质形成细胞 STAT3 修复小鼠口腔黏膜创伤实验研究[J]. *临床和实验医学杂志*, 2019, 18(15): 1586-1590. DOI:10.3969/j.issn.1671-4695.2019.15.006.
- [19] BRIUKHOVETSKA D, SUAREZ-GOSALVEZ J, VOIGT C, et al. T cell-derived interleukin-22 drives the expression of CD155 by cancer cells to suppress NK cell function and promote metastasis[J]. *Immunity*, 2023, 56(1): 143-161.e11. DOI:10.1016/j.immuni.2022.12.010.
- [20] 袁琴, 姚霏, 刘敏, 等. 玉屏风散通过 STAT3 改善肝细胞肝癌免疫抑制微环境中 NK 细胞活性的机制研究[J]. *南通大学学报(医学版)*, 2023, 43(3): 211-215. DOI: 10.16424/j.cnki.cn32-1807/r.2023.03.003.
- [21] 索栋梁, 赵彬, 王薇薇, 等. 知柏地黄汤加减联合吡柔比星对非肌层浸润性膀胱癌术后患者肿瘤标志物、免疫功能和生活质量的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2022, 31(11): 1542-1545, 1586. DOI: 10.3969/j.issn.1008-8849.2022.11.017.
- [22] SHAFI S, AUNG T N, XIROU V, et al. Quantitative assessment of Siglec-15 expression in lung, breast, head, and neck squamous cell carcinoma and bladder cancer[J]. *Lab Invest*, 2022, 102(10): 1143-1149. DOI:10.1038/s41374-022-00796-6.
- [23] 黄垣堤, 沈崇星, 李金瑾, 等. 线粒体靶向小分子 IR-780 对顺铂耐药膀胱癌细胞的杀伤效应[J]. *第三军医大学学报*, 2021, 43(23): 2570-2576. DOI:10.16016/j.1000-5404.202106190.
- [24] TRIVELLA D B B, FERREIRA-JÚNIOR J R, DUMOUTIER L, et al. Structure and function of interleukin-22 and other members of the interleukin-10 family[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(17): 2909-2935. DOI:10.1007/s00018-010-0380-0.
- [25] 薛婧. IL-22/IL-22RA1 轴通过 STAT3 信号促使胰腺肿瘤干细胞的干性和致瘤性[C]//中国生理学会基础生物学专业委员会第二次全国基础生物学学术会议论文集. 吉首, 2017: 28.
- [26] 赵航, 郭燕, 许元鸿. 白介素 22 在直肠癌患者外周血中的表达水平及其对直肠癌细胞增殖和迁移的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2016, 26(19): 58-62. DOI:10.3969/j.issn.1005-8982.2016.19.012.
- [27] WANG X M, XU J L, CHEN J, et al. IL-22 confers EGFR-TKI resistance in NSCLC via the AKT and ERK signaling pathways[J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 1167. DOI:10.3389/fonc.2019.01167.
- [28] ZOU S L, TONG Q Y, LIU B W, et al. Targeting STAT3 in cancer immunotherapy[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 145. DOI: 10.1186/s12943-020-01258-7.
- [29] SAXTON R A, HENNEBERG L T, CALAFIORE M, et al. The tissue protective functions of interleukin-22 can be decoupled from pro-inflammatory actions through structure-based design[J]. *Immunity*, 2021, 54(4): 660-672.e9. DOI:10.1016/j.immuni.2021.03.008.
- [30] WU T Y, WANG Z C, LIU Y, et al. Interleukin 22 protects colorectal cancer cells from chemotherapy by activating the STAT3 pathway and inducing autocrine expression of interleukin 8[J]. *Clin Immunol*, 2014, 154(2): 116-126. DOI:10.1016/j.clim.2014.07.005.
- [31] CACALANO N A. Regulation of natural killer cell function by STAT3[J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 128. DOI:10.3389/fimmu.2016.00128.
- [32] XU L J, SHEN M J, CHEN X D, et al. Adipocytes affect castration-resistant prostate cancer cells to develop the resistance to cytotoxic action of NK cells with alterations of PD-L1/NKG2D ligand levels in tumor cells[J]. *Prostate*, 2018, 78(5): 353-364. DOI: 10.1002/pros.23479.

[收稿日期] 2025-11-06

[修回日期] 2026-01-15

[本文编辑] 向正华