

DOI: 10.16305/j.1007-1334.2026.z20250510003

苦参-土茯苓通过 cGAS-STING 通路的 TBK1 激活 I 型干扰素调节非小细胞肺癌肿瘤免疫应答

吴勇汇¹, 于凤至², 曹亚娟¹, 顾 瞻¹, 范 瑞¹, 彭艳斌¹, 梁志伟¹, 沙巴吐拉·艾斯卡¹, 苏明亮¹, 印瑾璐^{1,2}, 王丽新¹

1. 同济大学附属上海市肺科医院中西医结合科(上海 200433); 2. 上海中医药大学研究生院(上海 201203)

【摘要】 目的 探究苦参-土茯苓作为一种潜在的固有免疫调节剂在非小细胞肺癌治疗中的作用及分子机制。**方法** 采用细胞计数试剂盒(CCK-8)法检测苦参-土茯苓对非小细胞肺癌 A549 细胞活力的影响。分别使用苦参-土茯苓、干扰素刺激 DNA(ISD)、环状 GMP-AMP(cGAMP)、脂多糖(LPS)、聚肌苷酸[poly(I:C)]处理 C57BL/6 小鼠腹腔巨噬细胞,采用实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)法检测其 I 型干扰素[CXC 趋化因子配体 10(CXCL10)、 β 干扰素(*IFN- β*)、白细胞介素-6(*IL-6*)]mRNA 的表达。使用 TANK 结合激酶 1(TBK1)抑制剂(TBK1-IN-1)和苦参-土茯苓处理 A549 细胞,分别采用 RT-qPCR 法和 Western blot 法检测 A549 细胞中 I 型干扰素蛋白及其 mRNA 的表达。使用苦参-土茯苓或苦参-土茯苓+TBK1 抑制剂处理 A549 细胞后,采用 Western blot 法检测 TBK1、磷酸化 TBK1(p-TBK1)、干扰素调节因子 3(IRF3)、磷酸化 IRF3(p-IRF3)蛋白的表达。**结果** CCK-8 结果显示苦参-土茯苓能够抑制 A549 细胞增殖,其半抑制浓度(IC₅₀)为 103.2 g/L。在野生型小鼠腹腔巨噬细胞及 A549 细胞中,苦参-土茯苓各组 I 型干扰素 mRNA 的表达水平明显高于对照组($P<0.05$);ISD、cGAMP 能够增强苦参-土茯苓诱导 I 型干扰素 mRNA 表达的作用($P<0.05$),而 LPS 和 poly(I:C)对该作用无明显影响($P>0.05$)。在环鸟苷酸合成酶基因(*cGAS*)敲除(*cGAS*^{-/-})和干扰素激活蛋白基因(*STING*)敲除(*STING*^{-/-})的小鼠腹腔巨噬细胞中,敲除 *cGAS* 和 *STING* 并未影响苦参-土茯苓诱导 I 型干扰素表达($P>0.05$)。在经 TBK1 抑制剂处理的 A549 细胞中,苦参-土茯苓组 I 型干扰素的表达高于对照组及 TBK1 抑制剂+苦参-土茯苓组,差异有统计学意义($P<0.05$)。苦参-土茯苓能明显提高 TBK1、IRF3 蛋白的表达和磷酸化水平($P<0.05$, $P<0.01$),且该作用能被 TBK1 抑制剂抑制($P<0.01$)。**结论** 苦参-土茯苓能够抑制非小细胞肺癌细胞增殖,其作用机制可能通过调控 cGAS-STING 通路的 TBK1,从而激活 I 型干扰素反应调控抗肿瘤免疫应答。

【关键词】 非小细胞肺癌;苦参;土茯苓;肿瘤免疫治疗;I 型干扰素;巨噬细胞;作用机制;中药研究

Regulation of tumour immune response by activation of type I interferon via TBK1 of cGAS-STING pathway by Sophorae Flavescentis Radix-Smilacis Glabrae Rhizoma in non-small cell lung cancer

WU Yonghui¹, YU Fengzhi², CAO Yajuan¹, GU Zhan¹, FAN Rui¹, PENG Yanbin¹, LIANG Zhiwei¹, SHABATULA Asika¹, SU Mingliang¹, YIN Jinjin^{1,2}, WANG Lixin¹

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82004115);上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划项目(ZY2021-2023-0302);上海市中医药管理局综合医院中西医结合专项(ZHYY-ZXYJHZX-202107);国家中医药管理局中西医协同旗舰科室建设项目(2024);上海市中医药(临床类)重点学科建设项目(shzyzdsk-2024106)

[作者简介] 吴勇汇,男,博士研究生,主要从事中医药防治肺部肿瘤研究工作

[通信作者] 王丽新,主任医师,教授,博士研究生导师;

E-mail: 1701005@tongji.edu.cn

1. Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai Pulmonary Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200433, China; 2. Graduate School, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To investigate the effect and molecular mechanisms of the Sophorae Flavescentis Radix (Kushen)-Smilacis Glabrae Rhizoma (Tufuling) as a potential

innate immune modulator in the treatment of non-small cell lung cancer. **Methods** The Cell Counting Kit (CCK-8) assay was used to evaluate the effect of Kushen-Tufuling on the activity of non-small cell lung cancer A549 cells. C57BL/6 mouse peritoneal macrophages (MPMs) were treated with Kushen-Tufuling, interferon stimulatory DNA (ISD), cyclic GMP-AMP (cGAMP), lipopolysaccharide (LPS) or polyinosinic acid [poly(I:C)], and the mRNA expression of type I interferons (*CXCL10*, *IFN- β* , *IL-6*) was detected by real-time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR). The A549 cells were treated with a TANK-binding kinase 1 (TBK1) inhibitor (TBK1-IN-1) and Kushen-Tufuling, and RT-qPCR and Western blot were used to detect the protein and mRNA expression of type I interferons. The A549 cells were treated with Kushen-Tufuling or Kushen-Tufuling+TBK1 inhibitor, and Western blot was used to detect the expression of TBK1, phosphorylated TBK1 (p-TBK1), interferon regulatory factor 3 (IRF3) and phosphorylated IRF3 (p-IRF3) proteins. **Results** CCK-8 assay results indicated that the Kushen-Tufuling could inhibit A549 cell proliferation, with a half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) value of 103.2 g/L. In both wild-type MPMs and A549 cells, the expressions of type I interferons mRNA in each Kushen-Tufuling group were significantly higher than in the control group ($P<0.05$); ISD and cGAMP could enhance the effect of Kushen-Tufuling in inducing the expression of type I interferon mRNA ($P<0.05$), while LPS and poly(I:C) had no significant effect on this effect ($P>0.05$). In *cGAS* gene knockout (*cGAS*^{-/-}) and *STING* gene knockout (*STING*^{-/-}) MPMs, the knockout of *cGAS* or *STING* genes did not affect the induction of type I interferons expression by Kushen-Tufuling ($P>0.05$). In the TBK1 inhibitor-treated A549 cells, the expression of type I interferons in the Kushen-Tufuling group was significantly higher than in the control and TBK1 inhibitor+Kushen-Tufuling groups ($P<0.05$). **Conclusion** Kushen-Tufuling can inhibit the proliferation of non-small cell lung cancer cells, potentially by modulating TBK1 in cGAS-STING pathway, thereby activating the type I interferons response and regulating anti-tumor immunity.

Keywords: non-small cell lung cancer; Kushen; Tufuling; tumor immunotherapy; type I interferons; macrophage; mechanism of action; Chinese materia medica research

根据 2022 年全球癌症统计报告,全球肺癌新发病例近 250 万例,占癌症发病总数的 12.4%;死亡病例约 180 万例,占癌症死亡总数的 18.7%。^[1]非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占肺癌死亡总数的 85%,而且其发病率在全世界范围内呈逐年增加的趋势^[1]。肺癌的传统治疗方式包括手术切除、化学疗法(简称“化疗”)、放射治疗(简称“放疗”)以及靶向治疗等,但多数患者确诊时已是晚期,不适宜于上述治疗方式,且其 5 年生存率不足 15%^[2]。随着现代医学技术对肿瘤发病机制的深入挖掘,抗肿瘤免疫治疗应运而生,通过促进免疫系统识别癌变细胞及其分泌的异常物质,发挥其免疫监控功能以激活免疫细胞,从而清除癌变细胞达到防治肿瘤的目的^[3]。

I 型干扰素(type I interferon)是固有免疫系统的重要组成部分,其因宿主细胞内的模式识别受体(PRRs)对病原体特殊成分的识别而激活,受到细胞内外信号级联事件的精细调控,其通过调节固有免疫应答,抗血管生成,促进肿瘤细胞凋亡,调节肿瘤免疫微环境等发挥直接或间接的抗肿瘤作用^[4]。肿瘤细胞释放的 DNA 物质被环鸟腺苷酸合成酶(cGAS)识别,在腺苷三磷酸(ATP)与鸟苷三磷酸(GTP)的作用下合成环状 GMP-AMP(cGAMP),激活干扰素激活蛋白(STING)使其从内质网转运至高尔基体,招募并激活 TANK 结合激酶 1(TBK1),进而激

活并磷酸化干扰素调节因子 3(IRF3),从而诱导 I 型干扰素表达,调节固有免疫应答来清除肿瘤细胞^[5-6]。由此可见, I 型干扰素反应的激活对抗肿瘤免疫治疗至关重要。寻找有效的肿瘤免疫治疗药物,探索其对 I 型干扰素反应的作用机制,具有重要科学意义及临床价值。

肺癌属中医学“肺岩”“肺积”范畴,中医认为,肺癌是人体正气虚损为主,在此基础上形成血瘀、痰凝、毒聚等病理因素,日久形成肺积。其基本病机为气、血、痰、瘀壅结于肺,导致肺宣降失常,以咳嗽、咯血、胸痛、发热、气急等为主要临床表现。因此,清热解毒化湿成为肺癌治疗的基本治则之一^[7]。团队基于同济大学附属上海市肺科医院中西医结合科治疗肺癌的“衡法理论”,紧密围绕中医药调控肺癌免疫的作用开展一系列深入研究。苦参-土茯苓是本课题组临床治疗肺癌疗效显著的经验方药对,广泛用于同济大学附属上海市肺科医院晚期肺癌患者的抗肿瘤治疗,具有清热利湿、凉血解毒的功效,可调节患者免疫功能、缓解癌性疼痛等。苦参对多种恶性肿瘤具有较好的治疗效果,可延长患者生存时间、改善疼痛、出血等临床症状、提高生活质量等^[8-9]。基础研究^[10]表明,土茯苓中的组分可以显著抑制肿瘤细胞活性,抗肿瘤血管生成等。因此,苦参、土茯苓可能是潜在的抗肺癌免疫治疗药物。本研究基于苦参-土茯苓通过调控 I 型干扰素

反应激活免疫应答,探究清热解毒复方苦参-土茯苓对肿瘤的抑制作用及机制,为中医药抗肿瘤治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 野生型 SPF 级 C57BL/6 小鼠,雄性,5~6 周龄,体质量为 (20 ± 2) g,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司。*cGAS*基因敲除(*cGAS*^{-/-})和*STING*基因敲除(*STING*^{-/-})的 SPF 级 C57BL/6 完全性基因敲除(KO)小鼠,雄性,5~6 周龄,体质量为 (20 ± 2) g,受赠于同济大学附属上海市肺科医院医学转化中心。小鼠饲养于同济大学附属上海市肺科医院动物实验中心,饲养室保持良好通风,饲养温度为 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$,湿度为 $(50\pm 10)\%$,12 h 循环光照,正常饲养 1 周以适应环境后实验。动物实验方案经同济大学附属上海市肺科医院动物实验伦理委员会审批通过(伦理审批号:TJAA11321101)。

1.1.2 细胞 人 NSCLC A549 细胞,购于中国科学院细胞库。小鼠腹腔巨噬细胞分别提取自野生型、*cGAS*^{-/-}及*STING*^{-/-}的 C57BL/6 小鼠。

1.1.3 药物与试剂 苦参、土茯苓(批号分别为 20210710200478、20210710200747),购于同济大学附属上海市肺科医院中药房。苦参-土茯苓药液制备方法:苦参、土茯苓按照 1:1 的比例配制;将二者在水中浸泡 30 min 后经大火煮沸,后转小火继续煎煮 20 min,制成水煎剂;将得到的水煎剂用 100 目的筛网过滤,浓缩至浓度为生药 680 g/L,保存于 -80°C 冰箱,备用。

细胞计数试剂盒(CCK-8)(批号:CK04-500T),日本同仁化学研究所;干扰素刺激 DNA 钠(ISD 钠)、聚肌苷酸[poly(I:C)]、TBK1 抑制剂 TBK1-IN-1、2',3'-cGAMP 钠盐(批号分别为 HY-160225、HY-107202、HY-134968、HY-100564A),美国 MedChemExpress 公司;巯基乙酸盐(批号:STBMFTM12DP),美国 Sigma-Aldrich 公司;转染试剂 Lipofectamine 2000(批号:11668019),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;放射免疫沉淀法(RIPA)蛋白裂解缓冲液、二辛可酸(BCA)蛋白检测试剂盒(批号分别为 PC103、PA115),上海雅酶生物科技有限公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单抗、IRF3 单抗、TBK1 单抗(批号分别为 A19056、A2172、A3458),武汉爱博泰克生物科技有限公司;磷酸化 IRF3(p-IRF3)(Ser396)(D6O1M)单抗、磷酸化 TBK1(p-TBK1)(Ser172)

(D52C2)单抗、辣根过氧化物酶(HRP)结合的二抗(批号分别为 29047、5483、7074),美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.1.4 主要仪器 电子天平(型号:ME104TE),瑞士 METTLER TOLEDO 公司;多功能酶标仪(型号:Varioskan LUX),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Flex real-time PCR 系统(型号:QuantStudio 6),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;脱色摇床(型号:E0020),上海碧云天生物技术有限公司;电泳仪(型号:1658033),美国 Bio-Rad 公司;成像系统(型号:12003154),美国 Bio-Rad 公司。

1.2 细胞培养 常规培养/传代:A549 细胞和野生型小鼠腹腔巨噬细胞分别培养于含体积分数 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的 DMEM 和 RPMI 1640 培养基中,置于体积分数 5%CO₂、37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱,根据生长状况进行传代培养,待细胞生长至约 90% 融合状态可用于实验。

1.3 检测指标与方法

1.3.1 CCK-8 法检测细胞活力 取对数生长期的 A549 细胞,进行计数,调整细胞密度为 5×10^4 个/mL,接种于 96 孔板中。分别设置空白组、对照组、不同浓度(0 g/L, 17 g/L, 34 g/L, 68 g/L, 136 g/L)苦参-土茯苓组,每组设置 6 个复孔,每孔加入 100 μL A549 细胞悬液。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5%CO₂的恒温培养箱中培养 24 h,待完全贴壁后,换液,对照组加入 100 μL DMEM 培养基,给药组加入 100 μL 不同浓度的含药培养基。于培养箱中培养 24 h 后,换液,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 1 遍,每孔加入 100 μL DMEM 培养基和 10 μL CCK-8 试剂。于培养箱中避光培养 1.5 h 后,检测 450 nm 处各孔的光密度(OD)值,计算细胞活力和半抑制浓度(IC₅₀)。细胞活力计算公式:细胞活力(%)=(OD_{给药组}-OD_{空白组})/(OD_{对照组}-OD_{空白组}) $\times 100\%$ 。

1.3.2 I 型干扰素 mRNA 表达的检测

1.3.2.1 干预方法 苦参-土茯苓调控 I 型干扰素表达实验:分别取对数生长期的 A549 细胞、野生型小鼠腹腔巨噬细胞,加入含苦参-土茯苓的培养基[终浓度为 0 g/L, 17 g/L(低), 34 g/L(中), 68 g/L(高)],分别处理 24 h、4 h 后,检测相关 mRNA 表达。

分别取两种 KO 小鼠腹腔巨噬细胞,加入含苦参-土茯苓的培养基(终浓度为 34 g/L),处理 4 h 后,检测相关 mRNA 表达。

苦参-土茯苓联合干扰素刺激 DNA (ISD)、

cGAMP、脂多糖(LPS)、poly(I:C)、TBK1-IN-1 调控 I 型干扰素表达实验:取小鼠腹腔巨噬细胞或对数生长长期的 A549 细胞,用含 34 g/L 苦参-土茯苓的培养基分别联合 0.1% ISD 钠、0.1% cGAMP 钠、0.1% LPS、0.5% poly(I:C)、10 μ mol/L TBK1-IN-1 给药进行干预,处理 4 h 后,检测相关 mRNA 表达。

1.3.2.2 实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)法检测相关 mRNA 表达 到达实验预定时间后,采用 TRIzol 试剂提取总 RNA。用 PrimeScript RT 试剂盒合成 cDNA。使用 SYBR Green Master Mix 在 QuantStudio 6 Flex real-time PCR 系统上进行实时荧光定量 PCR。引物由上海擎科生物公司构建,引物序列见表 1。GAPDH 作为内源性对照。反应条件:50 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;95 $^{\circ}$ C 变性 10 min,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,90 $^{\circ}$ C 延伸 15 s,共 40 个循环。各组均设 3 个复孔。所有 mRNA 水平均与 GAPDH 进行归一化,并用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行量化。

表 1 引物序列表

基因 (人源)	引物序列	引物长度/bp
GAPDH	上游:5'-GAAATGAATGGGCAGCCG-3'	18
	下游:5'-GAGTTAAAAGCAGCCCTGGTG-3'	21
CXCL10	上游:5'-TGCTGCCTTATCTTTCTGACT-3'	21
	下游:5'-TCGATTTTGCTCCCCTCTGG-3'	20
IFN- β	上游:5'-ATGACCAACAAGTGTCTCCTCC-3'	22
	下游:5'-GGAATCCAAGCAAGTTGTAGCTC-3'	23
IL-6	上游:5'-ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG-3'	23
	下游:5'-CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG-3'	23

注:GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因,CXCL10 为 CXCL 趋化因子配体 10 基因,IFN- β 为 β 干扰素基因,IL-6 为白细胞介素-6 基因。

1.3.3 Western blot 检测相关蛋白表达 取对数生长长期的 A549 细胞,加入含苦参-土茯苓的培养基[终浓度为 0 g/L,34 g/L(中),68 g/L(高)],或取对数生长长期的 A549 细胞,加入含苦参-土茯苓的培养基(终浓度为 34 g/L)及 10 μ mol/L TBK1-IN-1 处理 24 h 后,检测相关蛋白表达。

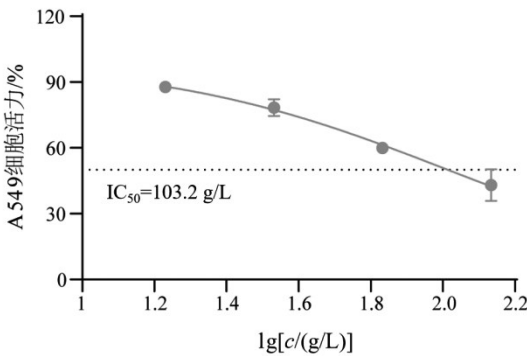
用添加了蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的放射免疫沉淀(RIPA)裂解缓冲液提取总蛋白。使用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离等量蛋白质,并转膜至聚偏二氟乙烯膜上,室温下用封闭液封闭 2 h;将其与兔源 p-IRF3(Ser396)(D6O1M)单抗、兔源 p-TBK1(Ser172)(D52C2)、兔源 GAPDH 单抗、兔源 IRF3 单抗、兔源 TBK1 单抗在

4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。室温下用含吐温-20 的 Tris-HCl 溶液(TBST)充分洗涤 3 次后,用 HRP 结合的二抗对膜进行孵育 1h。最后,加入 ECL 显色液曝光显影,用化学发光图像分析系统拍摄照片,使用 ImageJ 软件对蛋白条带进行分析。

1.4 统计学方法 使用 SPSS 22.0 统计学软件对所有数据进行统计。正态分布资料连续性变量统计描述采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,非正态分布资料连续性变量统计描述采用中位数表示。数据符合正态分布及方差齐性时,采用方差分析;数据不符合正态分布及方差齐性时,采用 Mann-Whitney U 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计意义。

2 结果

2.1 对 A549 细胞增殖的影响 CCK-8 实验结果显示,苦参-土茯苓呈剂量依赖性地抑制 A549 细胞增殖,其 IC₅₀ 为 103.2 g/L。见图 1。

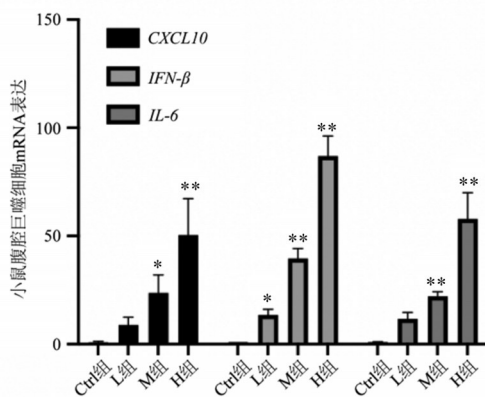


注:IC₅₀ 为半数抑制浓度。

图 1 不同浓度苦参-土茯苓对 A549 细胞活力的影响($n=6, \bar{x}\pm s$)

2.2 对小鼠腹腔巨噬细胞 I 型干扰素反应的影响 为进一步明确苦参-土茯苓是否可以调控 I 型干扰素反应,我们提取了 C57BL/6 小鼠腹腔巨噬细胞,采用 RT-qPCR 法检测 CXCL10、IFN- β 、IL-6 的 mRNA 表达水平。结果显示,苦参-土茯苓中、高剂量组的 CXCL10、IFN- β 、IL-6 表达水平均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2。其中,高剂量组的 CXCL10、IFN- β 、IL-6 表达水平均高于低、中剂量组,差异有统计学意义($P<0.05$)。低剂量组 CXCL10、IL-6 的表达水平与对照组相比则无明显差异($P>0.05$)。结果提示,苦参-土茯苓可显著促进小鼠腹腔巨噬细胞 I 型干扰素反应。

2.3 对 A549 细胞 I 型干扰素反应的影响 我们进一步以 A549 肺癌细胞为模型,采用 RT-qPCR 法检

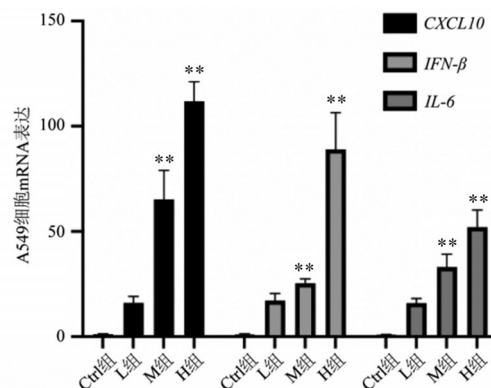


注: *CXCL10* 为 CXC 趋化因子配体 10 基因, *IFN-β* 为 β 干扰素基因, *IL-6* 为白细胞介素-6 基因。Ctrl 组为对照组, L 组为低剂量组, M 组为中剂量组, H 组为高剂量组。与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $n = 3, \bar{x} \pm s$ 。

图2 苦参-土茯苓干预后各组小鼠腹腔巨噬细胞 I 型干扰素应答相关基因表达比较

测 *CXCL10*、*IFN-β*、*IL-6* 的 mRNA 表达水平。结果显示, 苦参-土茯苓各剂量组的 *CXCL10*、*IFN-β*、*IL-6* 表达水平均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3。其中, 高剂量组的 *CXCL10*、*IFN-β*、*IL-6* 表达水平均高于低、中剂量组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。低剂量组 I 型干扰素表达与对照组相比无

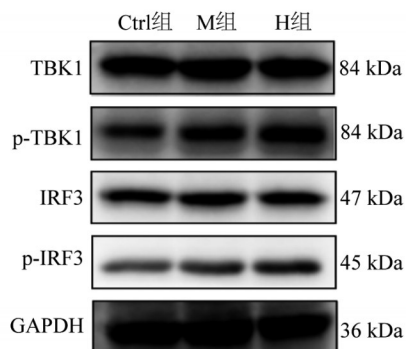
明显差异 ($P > 0.05$)。结果提示, 苦参-土茯苓可显著促进 A549 细胞 I 型干扰素反应。



注: *CXCL10* 为 CXC 趋化因子配体 10 基因, *IFN-β* 为 β 干扰素基因, *IL-6* 为白细胞介素-6 基因。Ctrl 组为对照组, L 组为低剂量组, M 组为中剂量组, H 组为高剂量组。与对照组相比, ** $P < 0.01$; $n = 3, \bar{x} \pm s$ 。

图3 苦参-土茯苓干预后各组 A549 细胞 I 型干扰素应答相关基因表达比较

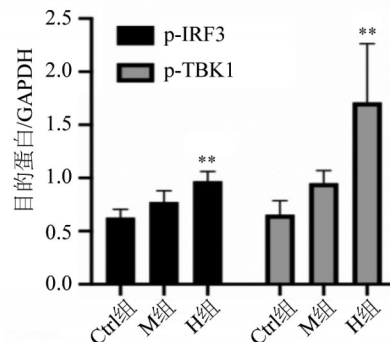
2.4 对 A549 细胞 TBK1、IRF3 磷酸化的影响 结果显示, 苦参-土茯苓中、高剂量组的 TBK1、IRF3 的磷酸化水平高于对照组, 见图 4。结果提示, 苦参-土茯苓可显著激活 I 型干扰素信号通路分子活化。



注: Ctrl 组为对照组, M 组为中剂量组, H 组为高剂量组。IRF3 为干扰素调节因子 3, p-IRF3 为磷酸化 IRF3, TBK1 为 TANK 结合激酶 1, p-TBK1 为磷酸化 TBK1, GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。与 Ctrl 组相比, ** $P < 0.01$; $n = 3, \bar{x} \pm s$ 。

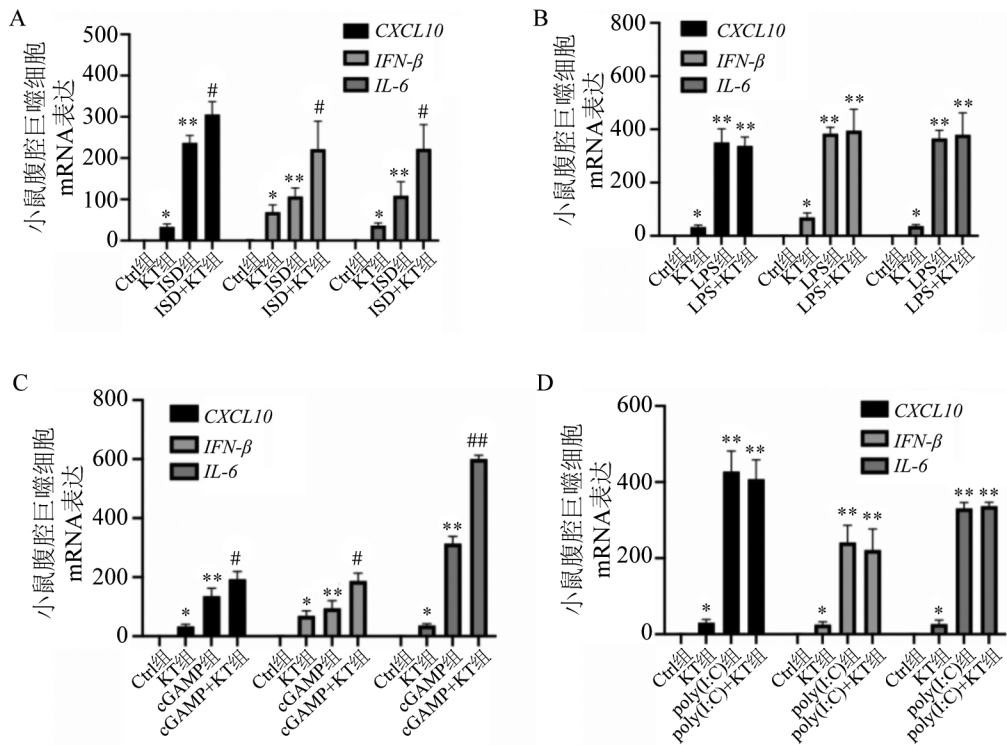
图4 苦参-土茯苓干预后各组 A549 细胞 TBK1、IRF3 蛋白磷酸化比较

2.5 苦参-土茯苓通过 cGAS-STING 信号通路激活 I 型干扰素反应 结果显示, 苦参-土茯苓(KT)组、ISD 组、cGAMP 组、poly (I:C) 组的 *CXCL10*、*IFN-β*、*IL-6* 表达水平均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 5。其中, ISD+ 苦参-土茯苓组和 cGAMP+ 苦参-土茯苓组的 *CXCL10*、*IFN-β*、*IL-6* 表达水平分别高于 ISD 组和 cGAMP 组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。而 LPS+ 苦参-土茯苓组和



poly (I:C)+ 苦参-土茯苓组的 *CXCL10*、*IFN-β*、*IL-6* 表达水平与 LPS 组和 poly (I:C) 组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果提示, ISD、cGAMP 能够增强苦参-土茯苓诱导 I 型干扰素 mRNA 表达的作用, 苦参-土茯苓可能是通过 cGAS-STING 信号通路激活 I 型干扰素反应。

2.6 对 KO 小鼠腹腔巨噬细胞 I 型干扰素的影响 结果显示, 苦参-土茯苓组、cGAS^{-/-}+ 苦参-土茯苓



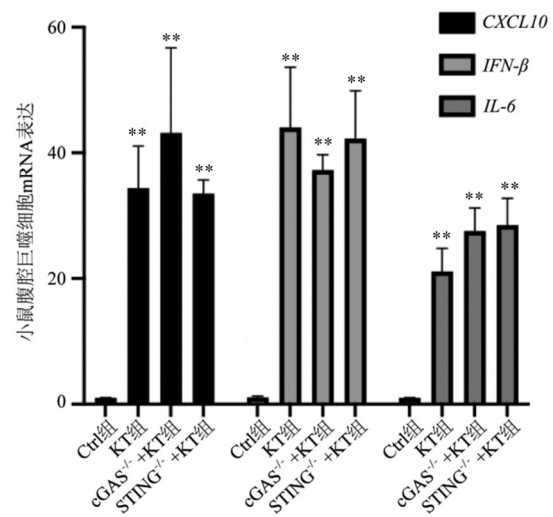
注:A为苦参-土茯苓联合干扰素刺激DNA(ISD)调控I型干扰素表达结果,B为苦参-土茯苓联合脂多糖(LPS)调控I型干扰素表达结果,C为苦参-土茯苓联合环状GMP-AMP(cGAMP)调控I型干扰素表达结果,D为苦参-土茯苓联合聚肌苷酸[poly(I:C)]调控I型干扰素表达结果。Ctrl组为对照组,KT组为苦参-土茯苓组,ISD+KT组为ISD+苦参-土茯苓组,LPS+KT组为LPS+苦参-土茯苓组,cGAMP+KT组为cGAMP+苦参-土茯苓组,poly(I:C)+KT组为poly(I:C)+苦参-土茯苓组。与Ctrl组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与ISD/LPS/poly(I:C)/cGAMP组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$;n=3, $\bar{x}\pm s$ 。

图5 cGAS-STING信号通路活化协同苦参-土茯苓激活I型干扰素应答

组、*STING*^{-/-}+苦参-土茯苓组的*CXCL10*、*IFN-β*、*IL-6*表达水平均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见图6。除对照组外,其余各组两两之间差异无统计学意义($P>0.05$)。结果提示,苦参-土茯苓激活I型干扰素反应不依赖于cGAS、STING,而可能是通过cGAS-STING通路级联信号激活下游分子活化。

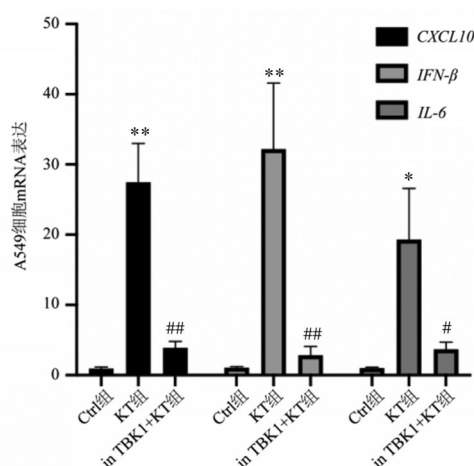
2.7 苦参-土茯苓通过促进TBK1磷酸化激活I型干扰素反应 结果显示,苦参-土茯苓组*CXCL10*、*IFN-β*、*IL-6*表达水平高于TBK1抑制剂+苦参-土茯苓组和对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见图7。TBK1抑制剂+苦参-土茯苓组与对照组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。结果提示,TBK1抑制剂能够有效逆转苦参-土茯苓对I型干扰素反应的激活作用。

我们进一步采用Western blot法检测了cGAS-STING信号通路分子TBK1、IRF3蛋白表达。结果显示,与对照组相比,苦参-土茯苓组的p-TBK1、p-IRF3表达水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);与苦参-土茯苓组相比,苦参-土茯苓+TBK1抑制剂组的p-TBK1、p-IRF3表达水平明显降低($P<0.01$),说明



注:*CXCL10*为CXC趋化因子配体10,*IFN-β*为β干扰素,*IL-6*为白细胞介素-6。Ctrl组为对照组,KT组为苦参-土茯苓组,*cGAS*^{-/-}+KT组为环鸟苷酸合成酶基因敲除+苦参-土茯苓组,*STING*^{-/-}+KT组为干扰素激活蛋白基因敲除+苦参-土茯苓组。与Ctrl组相比,** $P<0.01$;n=3, $\bar{x}\pm s$ 。

图6 各组基因敲除小鼠腹腔巨噬细胞I型干扰素相关基因表达比较



注: CXCL10 为 CXCL 趋化因子配体 10, IFN-β 为 β 干扰素, IL-6 为白细胞介素-6。Ctrl 组为对照组, KT 组为苦参-土茯苓组, in TBK1+KT 组为苦参-土茯苓+TANK 结合激酶 1(TBK1)抑制剂组。与 Ctrl 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 KT 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$ 。

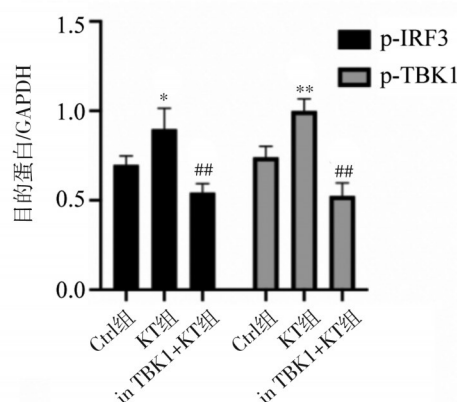
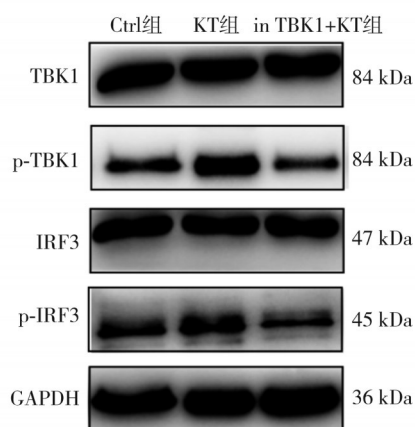
图 7 苦参-土茯苓靶向 TBK1 上调 A549 细胞 CXCL10、IFN-β、IL-6 mRNA 表达

苦参-土茯苓对 TBK1、IRF3 蛋白磷酸化的作用能被 TBK1 抑制剂所抑制。见图 8。以上结果提示,苦参-土茯苓可激活 I 型干扰素反应发挥肺癌抗肿瘤免疫应答作用, TBK1 是苦参-土茯苓潜在的作用靶点,受 cGAS-STING 信号转导活化,从而激活 I 型干扰素反应。

3 讨论

I 型干扰素反应受到细胞内外信号级联事件的精细调控。①DNA 病毒激活第二信使 cGAMP: 肿瘤发生时,会导致胞浆中双链 DNA(dsDNA)增多,从而被 cGAS 识别,在 ATP 与 GTP 的作用下合成 cGAMP,以激活 STING,并使其从内质网转运至高

尔基体,招募并激活 TBK1,进而激活 IRF3,使其发生磷酸化并入核,或激活 IκB 激酶(IKK),从而磷酸化核因子 κB(NF-κB),诱导 I 型干扰素及其他细胞因子的产生,激活固有免疫系统,调节固有免疫应答来清除肿瘤细胞^[11];②RNA 病毒激活 RIG-I 样受体(RLRs): RLRs 可识别胞质中的病毒 RNA 和 poly(I:C),随即招募线粒体抗病毒信号(MAVS),进而招募肿瘤坏死因子受体相关因子 3(TRAF3)和 TBK1,激活的 TBK1 磷酸化 IRF3 触发其二聚化和核易位,激活 I 型干扰素基因表达^[12];③Toll 样受体(TLR)激活 TIR 结构域衔接蛋白(TRIF): TLR3 和 TLR4 可通过 TRIF 依赖途径激活下游信号,通过 TRIF 相关接头分子(TRAM)间接招募 TRIF,与受体相互作用蛋白 1(RIP1)和 TRAF3 相互作用,激活 TBK1,进而磷酸化 IRF3,诱导 I 型干扰素的产生^[13];④TLR7/TLR9 激活转录因子 IRF7 等: TLR7/9 受到病毒或相应配体刺激后,位于胞质的 IRF7 会与 TBK1/IKK ϵ 作用并磷酸化 TBK1/IKK ϵ ,激活 IFN-β 和 α 干扰素(IFN-α)基因^[14]。由此可见, TBK1 是固有免疫过程的关键介质,在多条固有免疫信号通路中具有重要作用。TBK1 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白,属于非经典 IKK 成员。TBK1 上游受不同模式识别分子调控激活信号级联过程,当 TBK1 激活后,诱导磷酸化 IRF3/7 入核,刺激 I 型干扰素的表达^[15]。TBK1 激活后诱导表达的 I 型干扰素则可以促进树突状细胞活化和成熟,使其向淋巴结迁移,激活肿瘤特异性 CD8⁺ T 细胞,以促进肿瘤抗原递呈并特异性地杀死肿瘤细胞。



注: Ctrl 组为对照组, KT 组为苦参-土茯苓组, in TBK1+KT 组为苦参-土茯苓+TBK1 抑制剂组。IRF3 为干扰素调节因子 3, p-IRF3 为磷酸化 IRF3, TBK1 为 TANK 结合激酶 1, p-TBK1 为磷酸化 TBK1, GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。与 Ctrl 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 KT 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$ 。

图 8 苦参-土茯苓靶向 TBK1 上调 A549 细胞 p-TBK1、p-IRF3 表达

在 A549 细胞活性检测实验中,本研究发现,苦参-土茯苓呈剂量依赖性地抑制 A549 细胞活性。在 RT-qPCR 实验中,小鼠腹腔巨噬细胞及 A549 细胞的苦参-土茯苓组 I 型干扰素的表达水平均高于对照组,这提示苦参-土茯苓可以调节细胞中 I 型干扰素的表达。在 Western blot 检测中, A549 细胞苦参-土茯苓组 p-TBK1 和 p-IRF3 的表达高于对照组,提示苦参-土茯苓可以激活 p-TBK1 和 p-IRF3。上述结果表明,苦参-土茯苓在细胞水平上能抑制肿瘤细胞活性,并调控 I 型干扰素表达。

为验证 I 型干扰素激活的具体方式,本研究使用苦参-土茯苓、ISD、cGAMP、LPS 以及 poly(I:C) 处理小鼠腹腔巨噬细胞,并检测 *CXCL10*、*IFN- β* 、*IL-6* mRNA 表达。RT-qPCR 结果显示,苦参-土茯苓组、ISD 组、cGAMP 组、LPS 组、poly(I:C) 组的 *CXCL10*、*IFN- β* 、*IL-6* mRNA 表达水平均高于对照组。其中 ISD+KT 组和 cGAMP+KT 组的 *CXCL10*、*IFN- β* 、*IL-6* mRNA 表达水平高于 ISD 组和 cGAMP 组,而 LPS+KT 组和 poly(I:C)+KT 组相较于 LPS 组和 poly(I:C) 组上述 mRNA 表达则无显著差异。为进一步明确其作用的靶点,本研究使用了 *cGAS*^{-/-}、*STING*^{-/-} 以及野生型 C57BL/6 小鼠分别提取小鼠腹腔巨噬细胞进行进一步验证。我们观察到,经苦参-土茯苓干预后, *cGAS*^{-/-} 组、*STING*^{-/-} 组小鼠腹腔巨噬细胞中 I 型干扰素表达水平与野生型组小鼠的 I 型干扰素表达水平无明显差异。这提示苦参-土茯苓调节 I 型干扰素表达,可能是通过激活 cGAS-STING 通路并级联激活下游信号分子实现的。本研究进一步运用苦参-土茯苓及 TBK1 抑制剂处理 A549 细胞,结果提示 TBK1 抑制剂使苦参-土茯苓激活的 I 型干扰素反应受到抑制。在 Western blot 实验中,经苦参-土茯苓处理后,苦参-土茯苓组细胞 p-TBK1、p-IRF3 的表达高于对照组,当给予 TBK1 抑制剂后,苦参-土茯苓对 p-TBK1、p-IRF3 的激活作用受到了抑制,在蛋白水平上验证了 RT-qPCR 的实验结果。综合以上结果表明, TBK1 是苦参-土茯苓潜在的作用靶点,且 cGAS-STING 通路信号的活化对苦参-土茯苓靶向 TBK1 发挥着重要作用。

本研究在中医理论指导下,探索抗肿瘤免疫治疗中药,为中医药抗肿瘤治疗提供参考;同时初步明确了清热解毒复方“苦参-土茯苓”通过 cGAS-STING 信号活化的 TBK1 激活 I 型干扰素反应调控肺癌抗肿瘤免疫应答,为清热解毒中药调控肺癌抗

肿瘤免疫应答提供依据。然而,本研究尚存在一些科学问题值得进一步解析,如苦参-土茯苓影响 TBK1 磷酸化确切作用位点,以及靶向 TBK1 调控的生物学功能,如何诱导 IRF3 转录入核等。

参考文献:

- [1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *Ca Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] CHEN P, LIU Y, WEN Y, et al. Non-small cell lung cancer in China[J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2022, 42(10): 937-970.
- [3] LAHIRI A, MAJI A, POTDAR P D, et al. Lung cancer immunotherapy: progress, pitfalls, and promises [J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 40.
- [4] YU R, ZHU B, CHEN D. Type I interferon-mediated tumor immunity and its role in immunotherapy [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(3): 191.
- [5] SAMSON N, ABLASSER A. The cGAS-STING pathway and cancer[J]. *Nat Cancer*, 2022, 3(12): 1452-1463.
- [6] LIU Z, WANG D, ZHANG J, et al. cGAS-STING signaling in the tumor microenvironment [J]. *Cancer Lett*, 2023, 577: 216409.
- [7] 施文杰,曾崎冈,戴勇. 中医药诊治肺结节研究进展[J]. *中医药临床杂志*, 2023, 35(12): 2433-2438.
- [8] 张丽红,庄志江,崔云,等. 基于 PI3K/AKT/mTOR 信号通路探讨苦参碱对非小细胞肺癌 A549 细胞的作用[J]. *国医论坛*, 2025, 40(3): 72-78.
- [9] 周晓梅,董方,曹勇,等. 复方苦参注射液联合治疗非小细胞肺癌临床研究进展[J]. *河北中医*, 2025, 47(7): 1229-1232.
- [10] 占天为,宋志坚. 中药土茯苓抗肿瘤的临床应用及作用机制研究进展[J]. *中医临床研究*, 2023, 15(21): 145-148.
- [11] ZHAO H, WU L, YAN G, et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 263.
- [12] DING C, SONG Z, SHEN A, et al. Small molecules targeting the innate immune cGAS-STING-TBK1 signaling pathway [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(12): 2272-2298.
- [13] YUM S, LI M, FANG Y, et al. TBK1 recruitment to STING activates both IRF3 and NF- κ B that mediate immune defense against tumors and viral infections[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(14): e2100225118.
- [14] CHEN Y, ZHANG S, QU L. The protective effect of Artemisia Capillaris Thunb. Extract against UVB-induced apoptosis and inflammation through inhibiting the cGAS/STING pathway [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2024, 258: 112989.
- [15] TONG Z, ZOU J P, WANG S Y, et al. Activation of the cGAS-STING-IRF3 axis by type I and II interferons contributes to host defense[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(35): e2308890.

编辑:杨轶舜

收稿日期:2025-05-10