

双氢青蒿素对非小细胞肺癌细胞诱导的 CD8⁺T 细胞抗肿瘤免疫应答的影响

王南楠¹,刘宇¹,凌惠娟¹,牛可¹,朱亚玉¹,陈礼文²

摘要 目的 探讨青蒿素衍生物双氢青蒿素(DHA)对非小细胞肺癌(NSCLC)细胞诱导的CD8⁺T细胞抗肿瘤免疫功能的调控作用。方法 将NSCLC细胞系A549细胞分为二甲基亚砜(DMSO)对照组和DHA处理组;分别用DMSO和不同浓度的DHA(25、50和100 μmol/L)处理A549细胞,根据半抑制浓度(IC₅₀)选择最适浓度的DHA处理A549细胞0、24、48、72 h;CCK-8法和集落形成实验检测DHA对A549细胞增殖和集落形成能力的影响;密度梯度离心法分离健康个体外周血单个核细胞(PBMC),经黏附贴壁法去除单核细胞,随后与丝裂霉素C预处理的A549细胞按照10:1比例共培养,2周后采用流式细胞术分别检测CD8⁺T细胞比例及其穿孔素和颗粒酶B的表达水平。结果 与对照组相比,25、50和100 μmol/L DHA处理24 h后的A549细胞增殖的抑制率均升高($P < 0.01$);DHA对A549细胞的IC₅₀为46.26 μmol/L;依据IC₅₀浓度检测50 μmol/L DHA处理A549细胞0、24、48、72 h的细胞抑制率分别为1.53%、53.50%、63.84%和69.91%,分别与前一观察时间点即0、24和48 h相比,细胞抑制率均增高($P < 0.01$);集落形成实验结果显示,与对照组相比,DHA处理组的A549细胞集落形成数减少($P < 0.01$);流式细胞术结果显示,与对照组相比,DHA预处理组的A549细胞在共培养体系中诱导的CD8⁺T细胞的比例、表达穿孔素和颗粒酶B的CD8⁺T细胞比例均更高($P < 0.01$)。结论 DHA能够抑制NSCLC细胞生长,促进NSCLC细胞诱导的CD8⁺T细胞抗肿瘤免疫应答。

关键词 双氢青蒿素;非小细胞肺癌;肿瘤免疫;CD8⁺T细胞;穿孔素;颗粒酶B

中图分类号 R 392.12

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)03-0424-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.009

肺癌是一种发病率和病死率均高的疾病。据统

计^[1],每年全球大约有200万例新增肺癌病例和180万肺癌死亡病例,其中约一半发生在亚洲。在2020年,中国约有85万例新确诊肺癌病例和71.5万例肺癌死亡病例^[2]。肺癌中80%~85%为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)。中晚期NSCLC患者主要使用放疗、免疫治疗和靶向药物治疗等手段,这些全身治疗方法虽然能给患者带来较好的治疗效果,但也存在明显的毒副作用。目前,从中草药中开发毒性低、疗效高的抗癌药物是包括NSCLC在内的肿瘤治疗药物研究的热点。

青蒿素是一种从已知的中草药黄花蒿中提取出的化合物,双氢青蒿素(dihydroartemisinin, DHA)是该化合物的第一代衍生物^[3],1973年屠呦呦等^[4]用硼氢化钠还原青蒿素并合成了DHA,它具有强大的抗疟活性以及低毒性和安全性。近年来,青蒿素及DHA等药物被发现在包括肺癌在内的多种癌症中发挥抗癌作用,但其具体的抗癌机制仍需进一步探究。该研究旨在探讨DHA对NSCLC细胞生长及其诱导的CD8⁺T细胞免疫应答的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要材料 NSCLC细胞系A549细胞(上海富恒生物技术有限公司);外周血来源于同一健康志愿者;RPMI-1640培养基(上海源培生物科技股份有限公司,货号:L210KJ);胎牛血清(美国Gibco公司,货号:10091148);CCK-8试剂盒、0.25%胰酶消化液、1%青-链霉素、二甲基亚砜DMSO(上海碧云天生物技术有限公司,货号:C0037、C0201、ST488S、ST038);DHA(美国Selleck公司,货号:S2290);人外周血淋巴细胞分离液(Ficoll)、0.1%结晶紫染液(北京索莱宝科技有限公司,货号:P8900、G1062);CD3单抗(德国Nobimpex公司,货号:B104-0005);抗人CD3-FITC、抗人穿孔素-PE和抗人颗粒酶B-PC5.5(美国BioLegend公司,货号:300405、308195、372211);抗人CD8-APC(武汉Elabscience公司,货号:E-AB-F1110E);固定破膜剂(美国赛默飞世尔科

2024-01-15 接收

基金项目:安徽省高校自然科学研究重点项目(编号:2023AH053170);安徽省临床医学研究转化专项项目(编号:202304295107020019)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院¹检验科、²输血科,合肥230601

作者简介:王南楠,女,硕士研究生;

陈礼文,男,副教授,主任技师,博士生导师,责任作者, E-mail:chenliwen@ahmu.edu.cn

技公司,货号:88-8824);丝裂霉素 C(美国 GpBio 公司,货号:GC12353);重组人白介素(interleukin-2, IL-2)(美国 Peprotech 公司,货号:200-02);

1.1.2 主要仪器 CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo 公司,型号:HF90/HF240);多功能酶标仪(济南爱来宝仪器设备有限公司,型号:ST-960);流式细胞仪(美国贝克曼库尔特公司,型号:CytoFLEX)

1.2 方法

1.2.1 实验药物配置 DHA 用 DMSO 充分溶解并配置成 50 mmol/L 的母液, -20 °C 保存;IL-2 开盖前以 10 000 ~ 12 000 r/min 离心 30 s,用 PBS 充分溶解,配置成 50 000 U/ml 的溶液, -20 °C 保存。

1.2.2 A549 细胞培养 A549 细胞使用含 10% 的胎牛血清和 1% 青 - 链霉素的 RPMI-1640 培养基在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养,待到细胞密度长至 80% ~ 90% 左右进行传代,后续实验采用第 3 代细胞。

1.2.3 CCK-8 实验 将 A549 细胞以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,置于培养箱中贴壁过夜,对照组和 DHA 组分别加入 DMSO 和不同浓度的(25、50、100 μmol/L) DHA 培养 24、48、72 h,配置 CCK-8 试剂与 RPMI-1640 培养基混合溶液(1:10),弃去 96 孔板中的旧培养基,在 3 个不同待测时间均加入 100 μl/孔的 CCK-8 混合液,置于 37 °C 培养箱反应 1 h,酶标仪检测各孔 450 nm 处的吸光度值并计算细胞抑制率和半抑制浓度(half maximal inhibitory concentrate, IC₅₀),根据 IC₅₀ 分析和实验结果选择最适宜的浓度和处理时间,后续实验 DHA 处理组均采用该浓度和时间。

1.2.4 集落形成实验 将 A549 细胞分为对照组和 DHA 组,铺到 6 孔板上,贴壁过夜后,分别予以 DMSO 和 50 μmol/L(即 A549 细胞 IC₅₀ 临近浓度)的 DHA 处理 24 h,胰酶消化,用 RPMI-1640 培养基重悬,调整细胞浓度为 1×10^3 个/孔并接种于新 6 孔板中,37 °C 培养箱中培养 8 d,弃去旧培养基,1 ml/孔甲醇固定 30 min,0.1% 结晶紫染液 1 ml/孔染色 30 min,染色结束后拍照,用 ImageJ 软件计算集落形成数,实验重复 3 次。

1.2.5 A549 细胞与淋巴细胞共培养 10 μg/ml 丝裂霉素预处理对照组、DHA 组(50 μmol/L) A549 细胞 2.5 h,胰酶消化重悬后调整细胞浓度为 5×10^4 个/ml,加入提前用 1 μg/ml CD3 单抗预包被的 12 孔板中,放入培养箱中等待 A549 细胞贴壁。用 ED-

TA 管抽取健康志愿者新鲜血液 20 ml,缓慢加入 Ficoll 分离液中并形成明显的分层界面,室温下 2 500 r/min 离心 20 min。离心后用无菌巴氏吸管小心吸取白膜层,即淋巴细胞层, PBS 洗涤细胞后离心 3 次,每次 1 500 r/min、10 min,得到外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)。将 PBMC 用 RPMI-1640 培养基重悬并接种于培养皿中,培养箱静置培养 1.5 h 后吸取上清液并分离出淋巴细胞,调整细胞浓度为 5×10^5 个/ml,加入经预处理的 A549 细胞并建立 1 ml 共培养体系,每 2 d 添加 200 U/ml 的 IL-2 并进行 1 次半量换液,培养 2 周。

1.2.6 流式细胞术检测 CD8⁺T 细胞的数量及功能 吸取上述共培养的 12 孔板中培养液,1 000 r/min 离心 5 min 后去上清液,加入配置好的 CD8-APC、CD3-FITC 抗体稀释液(1:20),避光孵育 15 min。使用固定破膜试剂对 T 淋巴细胞进行固定破膜,然后加入颗粒霉素 B-PC5.5 和穿孔素-PE 抗体稀释液(1:20),避光条件下室温反应 15 min, PBS 重悬细胞,于流式细胞仪上机完成流式细胞检测,实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 使用 Graph Pad Prism 9 软件进行数据分析及绘图,使用 ImageJ 软件对图片结果进行量化,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DHA 对 A549 细胞生长的影响 CCK-8 法检测结果显示,与 0 μmol/L 的 DMSO 对照组抑制率(2.01%)相比,25、50 和 100 μmol/L 的 DHA 对 A549 细胞 24 h 增殖的抑制率分别为 23.56%、53.50% 和 91.26%,均高于对照组(*t* = 6.75、18.43、33.17,均 *P* < 0.01)。见图 1A。计算出 A549 细胞的 IC₅₀ 为 46.26 μmol/L。接着比较 IC₅₀ 临近浓度(50 μmol/L) DHA 处理 A549 细胞在不同时间的细胞抑制率,结果显示 24、48、72 h 的细胞抑制率分别为 53.50%、63.84% 和 69.91%,呈现时间依赖性增加(*t* = 61.35、12.35、7.33,均 *P* < 0.01)。见图 1B。进一步采用集落形成实验检测 DHA 对 A549 细胞的作用,结果显示,DHA 处理 24 h 后的 A549 细胞集落形成明显减少(*t* = -8.97, *P* < 0.01)。见图 1C、D。以上结果表明 DHA 以时间依赖方式和浓度依赖方式抑制 A549 细胞的生长。

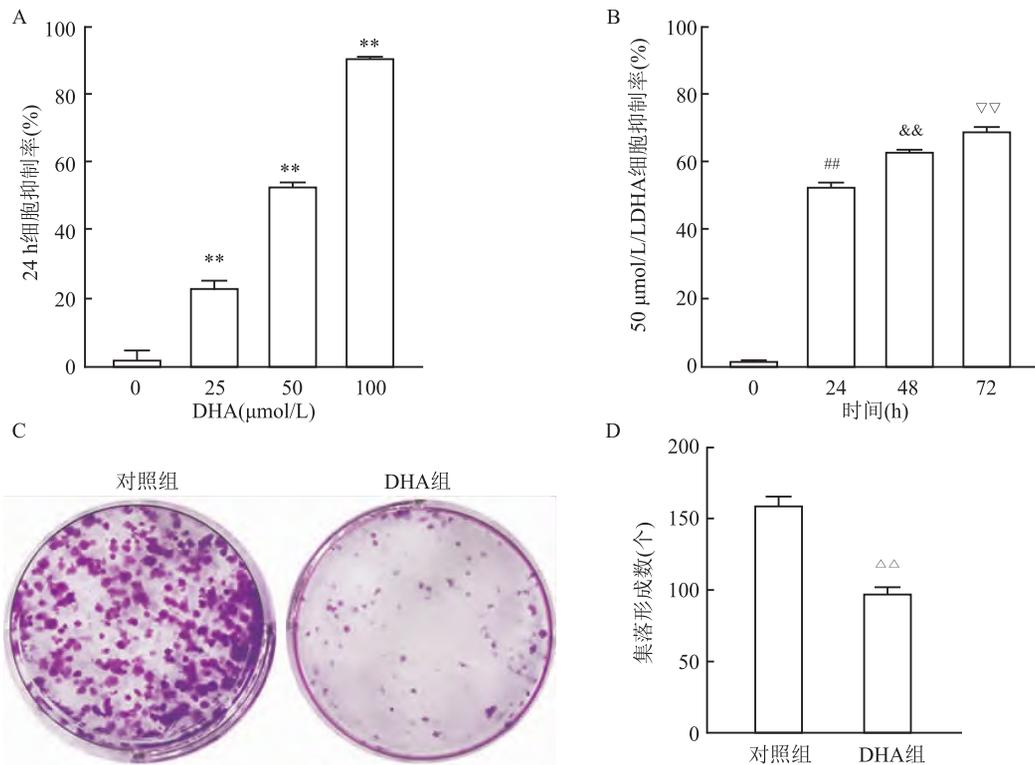


图1 DHA对A549细胞的生长的影响

A:不同浓度DHA处理24 h对A549细胞的细胞抑制率; B:50 μmol/L DHA处理0、24、48、72 h A549细胞抑制率的比较; C:50 μmol/L的DHA处理24 h后培养8 d的集落形成实验结晶紫染色图; D:集落形成实验结果比较;与0 μmol/L比较: ** P < 0.01;与0 h比较:## P < 0.01,与24 h比较: && P < 0.01;与48 h比较:▽▽ P < 0.01;与对照组比较: △△ P < 0.01

2.2 DHA处理对A549细胞诱导的CD8⁺T细胞增殖的影响 流式细胞术检测结果显示,与对照组相比,50 μmol/L DHA处理组的CD8⁺T细胞数量上升。见图2A。对照组和DHA处理组的CD8⁺T细胞的比例分别为51.95% ± 2.77%和73.58% ± 5.77%,其差异具有统计学意义(t = 5.86, P < 0.01)。见图2B。表明DHA预处理的NSCLC A549细胞能够刺激CD8⁺T细胞的生长。

2.3 DHA处理对共培养体系中CD8⁺T细胞的抗肿瘤免疫应答的影响 流式细胞术检测结果显示,对照组和DHA处理组表达穿孔素的CD8⁺T细胞比例分别为0.62% ± 0.54%和4.46% ± 0.05%。见图3A、B。表达颗粒酶B的CD8⁺T细胞比例分别为2.63 ± 0.56%和9.67 ± 0.70%。见图3C、D。与对照组相比,DHA处理组的CD8⁺T细胞表达的穿孔素和颗粒酶B水平均明显提升(t = 13.58、12.35,

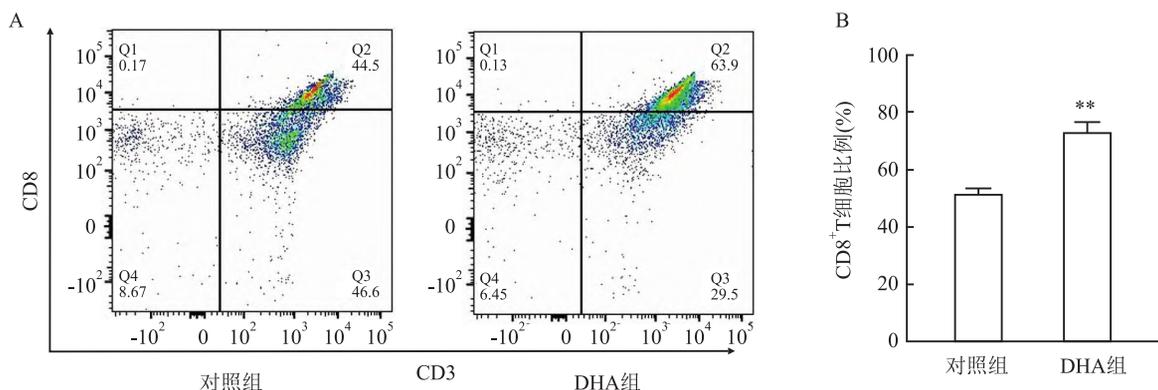
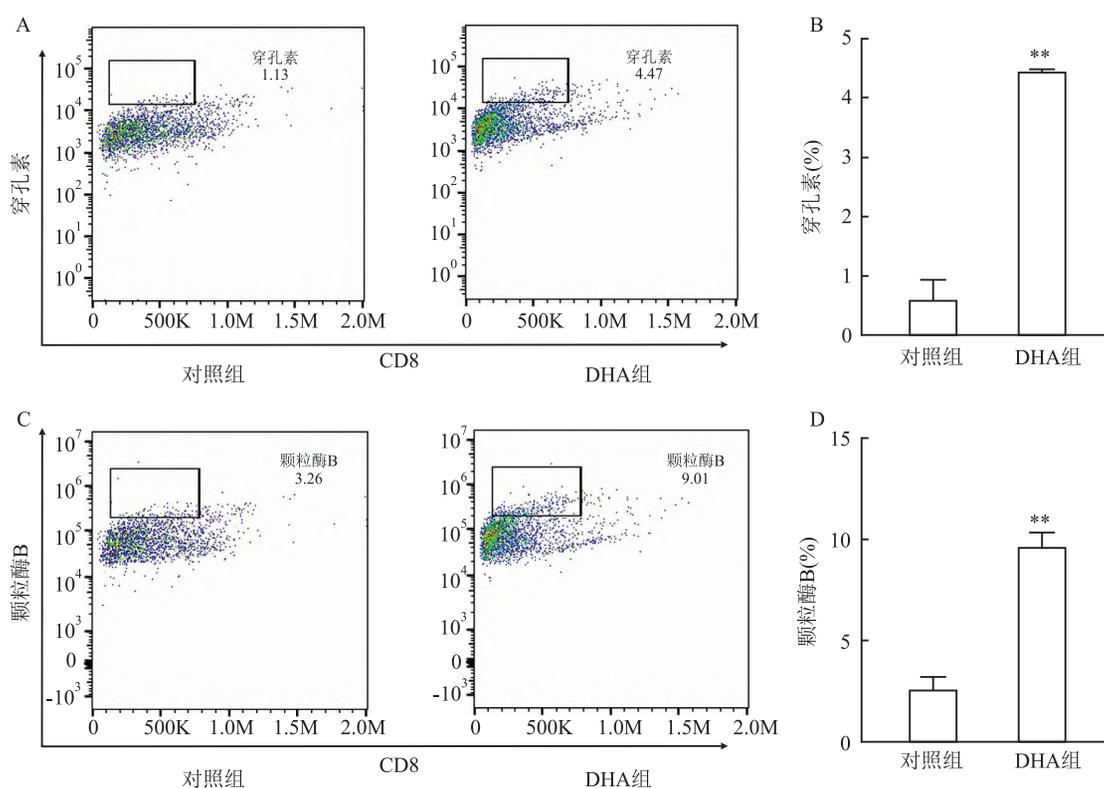


图2 流式细胞术检测两组CD8⁺T细胞比例

A:共培养体系中对照组、DHA组流式细胞术检测CD8⁺T细胞数量; B:共培养体系中对照组、DHA组CD8⁺T细胞的量化结果比较;与对照组比较: ** P < 0.01

图3 流式细胞术检测 CD8⁺T 细胞功能

A: 对照组、DHA 组 CD8⁺T 细胞表达穿孔素的水平; B: 对照组、DHA 组 CD8⁺T 细胞表达穿孔素的量化结果; C: 对照组、DHA 组 CD8⁺T 细胞表达颗粒酶 B 的水平; D: 对照组、DHA 组 CD8⁺T 细胞表达颗粒酶 B 水平的量化结果; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

均 $P < 0.01$)。以上结果均表明 DHA 预处理的 NSCLC A549 细胞能够诱导 CD8⁺T 细胞的抗肿瘤免疫功能。

3 讨论

本研究结果表明, DHA 能够抑制 NSCLC 的生长和集落形成能力。Liao et al^[5] 研究表明, DHA 能够通过将 NSCLC A549 细胞的细胞周期停滞于 G₁ 期来抑制细胞增殖并诱导细胞凋亡。Han et al^[6] 研究表明, DHA 能诱导细胞铁死亡从而刺激内质网应激和 DNA 损伤, 最终促进癌症免疫原性细胞死亡, 同时, DHA 还能激活免疫细胞, 在 NSCLC 荷瘤小鼠中表现出优异的抗癌疗效。胡冰琪等^[7] 研究表明, DHA 能够抑制 NSCLC 的迁移、侵袭和血管生成拟态。这些都证明了 DHA 能够通过多种机制发挥抗肿瘤作用。此外, DHA 还对多种肿瘤具有抗癌效果。例如, Rac1 siRNA 可通过抑制核因子 κ B 活化来促进 DHA 对结肠癌的抗癌作用^[8], DHA 还能通过增加肝癌细胞内活性氧的水平从而促进肝癌细胞凋亡^[9]。另外, DHA 还能通过调节细胞周期蛋白的信号传导来抑制胃癌细胞的生长和侵袭^[10]。以

上研究均表明 DHA 具有广泛抑制肿瘤的作用, 很可能是癌症治疗的新方向。

CD8⁺T 细胞在抗肿瘤免疫应答中起到重要作用, CD8⁺T 细胞的浸润增加表明可能产生有效的抗肿瘤免疫反应。本研究结果显示 DHA 处理的 A549 细胞能够明显提升 CD8⁺T 细胞的比例, 这表明 DHA 处理的 A549 细胞能够诱导抗肿瘤免疫。Hu et al^[11] 研究表明, 在建立的 NSCLC 小鼠模型中, DHA 能够通过抑制共信号分子 CD276 的表达来抑制 NSCLC 的增殖和侵袭, 且对健康组织无明显毒副作用, 另外, 该研究还表明, DHA 能够通过阻断 B7-H3 来诱导肿瘤中 CD8⁺T 细胞的浸润。Han et al^[12] 实验结果也表明, 在结直肠癌中, DHA 以诱导细胞铁死亡的方式抑制肿瘤生长并增强了 CD8⁺T 细胞的肿瘤浸润能力, 此外, DHA 还能够增强程序性死亡受体配体-1 免疫检查点抑制剂的疗效。这些研究结果均表明 DHA 能够刺激肿瘤微环境中 CD8⁺T 细胞的浸润, 与本研究结果一致。

本研究还表明 DHA 处理的 A549 细胞能够刺激 CD8⁺T 细胞表达穿孔素和颗粒酶 B, 诱导 CD8⁺T 细胞的抗肿瘤免疫应答。活化的细胞毒性 T 淋巴

细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)是体内最有效的免疫效应细胞,能通过多种途径发挥抗肿瘤免疫效应。一般认为,肿瘤免疫中 CTL 主要通过两种途径诱导肿瘤细胞死亡,即穿孔素-颗粒酶途径和 Fas-FasL 途径^[13]。Zhang et al^[14] 研究结果显示,在黑色素瘤肺转移的小鼠模型中,DHA 增加了肿瘤中 CTL 的浸润及其颗粒酶 B 分泌的水平,研究结果在一定程度上与本研究一致。也有其他研究^[15] 证明,在胰腺癌中,适当浓度的 DHA 有利于 T 细胞亚群的扩增并上调穿孔素和颗粒酶 B 的表达。但 DHA 诱导 CD8⁺T 细胞免疫应答的具体机制仍不清楚,细胞因子在其中发挥的作用也仍待进一步研究。

综上所述,本研究表明 DHA 能够抑制 NSCLC 细胞的增殖,同时 DHA 促进了 NSCLC A549 细胞 CD8⁺T 细胞抗肿瘤免疫应答。该研究结果为 DHA 在 NSCLC 治疗中的应用提供了实验依据,DHA 可能会成为肿瘤免疫治疗的新策略。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-49.
- [2] Chen P, Liu Y, Wen Y, et al. Non-small cell lung cancer in China[J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2022, 42(10): 937-70.
- [3] Klayman D L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China[J]. *Science*, 1985, 228(4703): 1049-55.
- [4] Dai X, Zhang X, Chen W, et al. Dihydroartemisinin: a potential natural anticancer drug[J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(2): 603-22.
- [5] Liao K, Li J, Wang Z. Dihydroartemisinin inhibits cell proliferation via AKT/GSK3 beta/cyclinD1 pathway and induces apoptosis in A549 lung cancer cells[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(12): 8684-91.
- [6] Han N, Yang Z Y, Xie Z X, et al. Dihydroartemisinin elicits immunogenic death through ferroptosis-triggered ER stress and DNA damage for lung cancer immunotherapy[J]. *Phytomedicine*, 2023, 112: 154682.
- [7] 胡冰琪,周静,黄俊峰,等. 双氢青蒿素抑制非小细胞肺癌细胞迁移侵袭和血管生成拟态的初步研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(5): 766-71.
- [8] Sun H, Meng X, Han J, et al. Anti-cancer activity of DHA on gastric cancer - an *in vitro* and *in vivo* study[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(6): 3791-800.
- [9] Wu L, Cheng Y, Deng J, et al. Dihydroartemisinin inhibits proliferation and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell by upregulating tumor necrosis factor via JNK/NF-kappaB pathways[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 9581327.
- [10] Fan H N, Zhu M Y, Peng S Q, et al. Dihydroartemisinin inhibits the growth and invasion of gastric cancer cells by regulating cyclin D1-CDK4-Rb signaling[J]. *Pathol Res Pract*, 2020, 216(2): 152795.
- [11] Hu B Q, Huang J F, Niu K, et al. B7-H3 but not PD-L1 is involved in the antitumor effects of dihydroartemisinin in non-small cell lung cancer[J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 950: 175746.
- [12] Han W, Duan X, Ni K, et al. Co-delivery of dihydroartemisinin and pyropheophorbide-iron elicits ferroptosis to potentiate cancer immunotherapy[J]. *Biomaterials*, 2022, 280: 121315.
- [13] Tang R, Xu J, Zhang B, et al. Ferroptosis, necroptosis, and pyroptosis in anticancer immunity[J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 110.
- [14] Zhang Q, Jin L, Jin Q, et al. Inhibitory effect of dihydroartemisinin on the proliferation and migration of melanoma cells and experimental lung metastasis from melanoma in mice[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 727275.
- [15] Zhou Z H, Chen F X, Xu W R, et al. Enhancement effect of dihydroartemisinin on human $\gamma\delta$ T cell proliferation and killing pancreatic cancer cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 17(3): 850-7.

Effect of dihydroartemisinin on anti-tumor immune response of CD8⁺ T cells induced by non-small cell lung cancer cells

Wang Nannan¹, Liu Yu¹, Ling Huijuan¹, Niu Ke¹, Zhu Yayu¹, Chen Liwen²

(¹Dept of Clinical Laboratory, ²Dept of Blood Transfusion, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the regulatory effect of artemisinin derivative dihydroartemisinin (DHA) on anti-tumor immune function of CD8⁺T cells induced by non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. **Methods** NSCLC A549 cells were divided into DMSO control group and DHA treatment group. A549 cells were treated with DMSO and DHA at different concentrations (25, 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$), and the optimal concentration of DHA was selected to treat A549 cells for 0, 24, 48 and 72 h according to half maximal inhibitory concentrate (IC_{50}). CCK-8 method and colony formation test were used to detect the effect of DHA on the proliferation and colony formation

网络出版时间:2024-03-21 18:19:05 网络出版地址:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.010

内皮素-1 调控 SOCC/TGF- β 参与房颤大鼠发生心房纤维化

贾卓然¹,代曼玉¹,梁士楚²,吴健¹,薛杨诚¹,张定欣¹,沈兵³,赵韧¹

摘要 目的 探讨内皮素-1(ET-1)对心房颤动(AF)大鼠心房纤维化的作用和机制。**方法** 14只成年雄性SD大鼠随机分配为对照(NC)组、房颤(AF)组;采用连续1周每日尾静脉注射1次氯化钙-乙酰胆碱混合液0.1 ml/100 g的方法建立AF大鼠模型,NC组同等方式注射等量生理盐水;各组均在第1天及第8天记录窦性或AF心电图,超声心动图监测心房大小和心功能;采用HE染色及Masson染色观察心房组织纤维化情况;采用Western blot法检测心房组织中内皮素-1(ET-1)、I型胶原(COL-I)、转化生长因子(TGF)- β 、钙库操纵性钙通道(SOCC)蛋白Orai1和基质相互作用分子1(STIM1)的表达;培养小鼠心房肌细胞HL-1细胞,以梯度浓度的ET-1处理24 h后,采用Western blot法观察HL-1细胞ET-1/SOCC/TGF- β 信号通路中TGF- β 、Orai1及STIM1蛋白表达变化;利用siRNA转染方法敲低HL-1细胞中Orai1表达,以合适浓度的ET-1处理细胞24 h,Western blot检测HL-1细胞中TGF- β 蛋白的表达情况。**结果** 与NC组相

比,超声心动图显示AF大鼠心脏左房内径(LAD)增加($P < 0.05$);HE和Masson染色结果显示AF组大鼠心房组织纤维化($P < 0.05$),Western blot检测结果提示AF组心房组织中ET-1、Orai1、STIM1、TGF- β 、COL-I蛋白表达较NC组增加($P < 0.05$)。ET-1处理HL-1细胞后,HL-1细胞Orai1、STIM1、TGF- β 蛋白表达增多($P < 0.05$)。敲低HL-1细胞中Orai1表达后,ET-1的处理不再使TGF- β 的表达上调。**结论** AF大鼠心房组织ET-1表达增多,并通过ET-1/SOCC/TGF- β 信号通路促进心房纤维化。

关键词 内皮素-1;心房颤动;心房纤维化;Orai1;基质相互作用分子1;TGF- β ;HL-1细胞

中图分类号 R 541.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)03-0429-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.010

2024-02-06 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81970446)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院心内科,合肥 230032

²四川大学华西医院心脏内科,成都 610041

³安徽医科大学基础医学院生理学教研室,合肥 230032

作者简介:贾卓然,女,硕士研究生;

赵韧,女,主任医师,副教授,博士生导师,责任作者,E-mail: zhaoren@ahmu.edu.cn

心房颤动(atrial fibrillation, AF)是最常见的心律失常,我国成年人AF患病率为1.6%,较之前明显升高^[1]。心房结构重构和电重构引发并维持AF,目前认为,心房纤维化是AF主要病理基础,但心房纤维化的发生发展的机制研究缺乏,对于心房纤维化的有效干预靶点仍有待探究。内皮素系统在维持心血管稳态中发挥重要作用,是治疗心血管系统疾病的重要靶标之一。大量研究^[2-4]发现,AF患者外

ability of A549 cells. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy individuals were isolated by density gradient centrifugation. After monocytes were removed by adhesion method, A549 cells pretreated with mitomycin C were co-cultured with PBMCs at 10:1 ratio. After 2 weeks, flow cytometry was used to detect the proportion of CD8⁺T cells and the expression levels of perforin and granzyme B. **Results** Compared with the control group, the proliferation inhibition rates of A549 cells increased after treatment with 25, 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA for 24 h ($P < 0.01$). The IC₅₀ of DHA on A549 cells was 46.26 $\mu\text{mol/L}$. According to IC₅₀ concentration analysis, the inhibition rates of A549 cells treated with 50 $\mu\text{mol/L}$ DHA for 0, 24, 48 and 72h were 1.53%, 53.50%, 63.84% and 69.91%, and the cells inhibition rates of A548 cells increased compared with the previous observation time point, namely 0, 24 and 48 h ($P < 0.01$). The colony formation assay showed that the colony formation number of A549 cells in DHA treated group decreased compared with the control group ($P < 0.01$). Flow cytometry results showed that compared with the control group, the proportion of CD8⁺T cells induced by A549 cells in the co-culture system and the proportion of CD8⁺T cells expressing perforin and granzyme B were higher in DHA pretreatment group ($P < 0.01$). **Conclusion** DHA inhibits the growth of NSCLC cells and promotes anti-tumor immune response of CD8⁺T cells induced by NSCLC cells.

Key words dihydroartemisinin; non-small cell lung cancer; tumor immunity; CD8⁺T cells; perforin; granzyme B