

安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目: B7-H3 分子通过 SIRT1/p53 信号途径抑制非小细胞肺癌细胞凋亡
作者: 郑霖, 钟剑鑫, 牛可, 徐晴, 凌惠娟, 朱亚玉, 陈兵, 陈礼文
网络首发日期: 2025-12-19
引用格式: 郑霖, 钟剑鑫, 牛可, 徐晴, 凌惠娟, 朱亚玉, 陈兵, 陈礼文. B7-H3 分子通过 SIRT1/p53 信号途径抑制非小细胞肺癌细胞凋亡[J/OL]. 安徽医科大学学报. <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20251218.1707.009>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

B7-H3 分子通过 SIRT1/p53 信号途径抑制非小细胞肺癌细胞凋亡

郑霖¹, 钟剑鑫², 牛可¹, 徐晴¹, 凌惠娟¹, 朱亚玉¹, 陈兵^{1,3}, 陈礼文^{1,4}

(安徽医科大学第二附属医院¹临床检验诊断学教研室、³检验科、⁴输血科, 合肥

230601; ²安徽医科大学第二临床医学院, 合肥 230032)

摘要 目的 探究组蛋白脱乙酰酶 Sirtuin-1 (SIRT1) /p53 信号途径在协同信号分子 B7-H3 抑制非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞凋亡中的作用。方法 GEPIA 2 平台进行基于 *B7-H3* 基因表达水平的 NSCLC 患者的生存分析; 基因集富集分析 (GSEA) 用于分析细胞凋亡基因集合中 *B7-H3* 分子的富集特征; 在 NSCLC 的 A549 细胞系中敲减 *B7-H3*, 通过 Western blot 检测 SIRT1 和 p53 的蛋白表达水平; 在 A549 细胞中过表达 *B7-H3*, 通过 Annexin V/PI 双染后流式细胞术分析细胞凋亡率; A549 细胞过表达 *B7-H3* 并敲减 *SIRT1*, 通过 Western blot 分别检测 p53 及凋亡相关蛋白 B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 和 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 的表达水平, Annexin V/PI 双染后流式细胞术分析细胞凋亡率。结果 *B7-H3* 高表达组的总体生存期显著低于低表达组 ($P<0.01$); *B7-H3* 显著富集在细胞凋亡信号通路及 p53 信号通路 ($P<0.05$); 与对照组相比, *B7-H3* 敲减组的 SIRT1 蛋白表达显著下调, p53 显著上调 (均 $P<0.001$); 而过表达 *B7-H3* 显著上调 SIRT1 蛋白表达 ($P<0.05$), 下调 p53 表达 ($P<0.01$), 凋亡通路相关蛋白 Bcl-2 与 Bax 的比值显著升高 ($P<0.001$); Annexin V/PI 双染法结果显示过表达 *B7-H3* (13.87%±0.82%) 的 A549 细胞凋亡率较对照组 (26.72%±4.13%) 下降 ($P<0.01$); 在过表达 *B7-H3* 细胞系中, 敲减 *SIRT1* 显著逆转细胞凋亡 ($P<0.05$), p53 蛋白表达上调 ($P<0.001$), Bcl-2/Bax 的比值显著降低 ($P<0.001$)。结论 B7-H3 分子通过 SIRT1/p53 信号途径抑制 NSCLC 细胞凋亡。

关键词 非小细胞肺癌; 细胞凋亡; 协同信号分子; B7-H3; SIRT1; p53

中图分类号 R734

文献标志码 A

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82404970); 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项目 (编号: 202304295107020019)

作者简介: 郑霖, 女, 硕士研究生;

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

B7-H3 molecule inhibits apoptosis of non-small cell lung cancer cells *via* the SIRT1/p53 signaling pathway

Zheng Lin¹, Zhong Jianxin², Niu Ke¹, Xu Qing¹, Ling Huijuan¹, Zhu Yayu¹, Chen Bing^{1,3},

Chen Liwen^{1,4}

(¹*Department of Linical Laboratory Diagnostics*, ³*Department of Laboratory Medicine*,

⁴*Department of Blood Transfusion, the Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University,*

Hefei 230601; ²The Second Clinical Medical College of Anhui Medical University, Hefei

230032)

Abstract Objective To explore the role of the histone deacetylase Sirtuin-1 (SIRT1)/p53 signaling pathway in promoting apoptosis of non-small cell lung cancer cells (NSCLC) induced by the co-stimulatory molecule B7-H3. **Methods** The GEPIA 2 platform was used for survival analysis of NSCLC patients based on *B7-H3* gene expression levels. The Gene Enrichment Analysis (GSEA) method was used to analyze the enrichment characteristics of *B7-H3* molecules in the gene set of cell apoptosis. In the non-small cell lung cancer A549 cell line, *B7-H3* was knocked down, and the protein expression levels of *SIRT1* and p53 were detected by Western blot. *B7-H3* was overexpressed in A549 cells and the apoptosis rate was analyzed by flow cytometry after Annexin V/PI double staining. Overexpression of *B7-H3* and knockdown of *SIRT1* were performed in A549 cell line. The expression levels of p53 and apoptosis-related proteins B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) and Bcl-2-associated X protein (Bax) were detected respectively by Western blot. Cell apoptosis rate was analyzed by flow cytometry after Annexin V/PI double staining. **Results** The overall survival of the B7-H3 high-expression group was significantly lower than that of the low-expression group ($P<0.01$). B7-H3 was significantly enriched in the cell apoptosis signaling pathway and the p53 signaling pathway ($P<0.05$). Compared with the control group, the expression of SIRT1 was significantly downregulated, and p53 was significantly upregulated in the *B7-H3* knockdown group (both $P<0.001$). Overexpression of B7-H3 significantly up-regulated SIRT1 protein expression ($P<0.05$), down-regulated p53 expression ($P<0.01$), and markedly increased the Bcl-2/Bax ratio of apoptosis-related proteins ($P<0.001$). The results of Annexin V/PI double staining showed that the apoptosis rate of A549 cells with overexpressed *B7-H3* decreased (the apoptosis rate of the control group was $26.72\%\pm 4.13\%$, while that of the *B7-H3* overexpression group was $13.87\%\pm 0.82\%$; $P<0.01$). In B7-H3-overexpressing cell lines, SIRT1 knockdown

significantly reversed apoptosis ($P<0.05$), up-regulated p53 protein expression ($P<0.001$), and markedly reduced the Bcl-2/Bax ratio ($P<0.001$). **Conclusion** B7-H3 molecule inhibits the apoptosis of non-small cell lung cancer cells *via* the SIRT1/p53 signaling pathway.

Key words non-small cell lung cancer; cell apoptosis; co-signalling molecules; B7-H3; SIRT1; p53

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82404970); Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2023AH053170); Clinical Medical Research Translational Project of Anhui Province (No. 202304295107020019).

Corresponding author Chen Liwen, E-mail: chenliwen@ahmu.edu.cn

在全球范围内,肺癌是最常见的癌症之一,也是癌症相关死亡的主要原因。2022年,全球新增肺癌病例接近250万,占有所有癌症新发病例的12.4%;肺癌死亡病例约有180万人,占有所有癌症死亡病例的18.7%^[1]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)为肺癌中最主要的类型,约占肺癌的85%^[2]。B7同源物3(B7 homolog 3, B7-H3)是协同信号分子B7蛋白家族的一员,在多种类型的癌症中均高表达,且与不良的临床预后相关。沉默信息调节因子1(sirtuin-1, SIRT1)是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD^+)依赖的III类组蛋白去乙酰化酶,它在多种细胞功能中发挥重要作用,参与细胞周期、DNA损伤反应、代谢、凋亡和自噬等过程^[3]。已有研究^[4]表明SIRT1通过去乙酰化负向调控肿瘤抑制因子p53, p53与细胞凋亡的多个途径密切相关,可使促凋亡蛋白Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)、p53上调的凋亡调控因子(p53 up-regulated modulator of apoptosis, PUMA)、Bcl-2拮抗/杀伤蛋白(Bcl-2 antagonist/killer, Bak)等高表达,抗凋亡蛋白B细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、B细胞淋巴瘤一超大(B-cell lymphoma-extra large, Bcl-xl)低表达^[5-6],从而促进肿瘤的发生发展。本课题组前期研究^[7-8]表明,B7-H3可通过磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶B信号通路(Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B signaling pathway, PI3K/AKT signaling pathway)调SIRT1。然而,B7-H3是否通过SIRT1/p53信号通路抑制NSCLC细胞凋亡目前尚未阐明。本研究拟通过探讨SIRT1/p53信号通路在B7-H3分子抑制NSCLC细胞凋亡中的作用,为NSCLC的治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 实验材料

NSCLC细胞株A549细胞(上海富恒生物技术有限公司);RPMI1640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: 16140089); 0.25%胰酶消化液、RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司, 货号: C0201、P0013B、P0012); 细胞凋亡试剂盒(上海贝博生物有限科技公司, 货号: BB-4101); B7-H3 抗体、p53 抗体(英国 Abcam 公司, 货号: ab227670、ab75754); SIRT1 抗体、Bcl-2 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号: 9475T、3498S); Bax 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司, 货号: 60267-1-Ig); β -actin 抗体、山羊抗兔(H+L) HRP、山羊抗小鼠(H+L) HRP(美国 Affinity 公司, 货号: BF0198、S0001、GAMHRP-015); Jet Prime 转染试剂(美国 Thermo Fisher 公司, 货号: 101000046); 过表达 *B7-H3* 质粒(上海吉玛制药技术有限公司; CCDS 32288.1, 1 605 bp)、敲减 *SIRT1* 质粒(上海吉玛制药技术有限公司; si*SIRT1*: 正义链 5' -GCGGGAAUCCAAAGGAUAATT-3', 反义链 5' -UUAUCCUUUGGAUUCGCTT-3'); 敲减 *B7-H3* 质粒(上海生工生物工程技术有限公司; si*B7-H3*: 正义链 5' -CUGAAACACUCUGACAGCAGCAAAU-3', 反义链 5' -UUUGCUUGUCAGAGUGUUUCAGTT-3');

1.2 实验仪器

细胞培养箱(上海力康生物医疗科技有限公司, 型号: HF90 /HF240); Western blot 显影仪(上海天能科技有限公司, 型号: JS-1070PEV); 流式细胞仪(美国贝克曼库尔特有限公司, 型号: C07821);

1.3 方法

1.3.1 生物信息学分析

GEPIA 2 平台是一个基于网络的交互式分析工具, 提供了基于 TCGA 和 GTEx 数据库中肿瘤和正常样本的基因表达分析。本研究通过 GEPIA 2 平台, 对 NSCLC 患者进行了基于 *B7-H3* 基因表达水平的生存分析。基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)分析是一种基因集富集分析算法, 用于评估一组预先定义的基因在按表型排序的基因列表中的分布情况, 以判断这些基因对表型的影响程度。本研究通过 GSEA 分析, 分析出与 *B7-H3* 相关的信号通路的基因合集, 从而确定与其相关的信号通路。

1.3.2 细胞培养

将 NSCLC 细胞株 A549 细胞传代至第 3 代, 培养于 10%的胎牛血清、1%青-链霉素的 RPMI1640 培养基中, 置于 5%CO₂、37℃、100%饱和湿度的培养箱中进行培养, 观察细胞形态、培养基颜色及细胞融合度, 适时进行换液及传代。

1.3.3 细胞分组和转染

将 A549 细胞以 1×10^6 个/孔的密度均匀接种至 6 孔板中, 待细胞融合度至 70%~80% 时, 使用 Jet Prime 转染试剂, 按照其说明书进行转染。使用的过表达 *B7-H3* 质粒、敲减 *SIRT1* 质粒及空载质粒均由上海吉玛制药技术有限公司进行构建合成, 敲减 *B7-H3* 质粒由上海生物工程技术有限公司构建合成。阴性对照 (negative control, NC) 组 (加入空载质粒 2.5 $\mu\text{g}/\text{孔}$)、敲减 *B7-H3* 组 (si-B7-H3 组, 加入敲减 *B7-H3* 的 si RNA 2.5 $\mu\text{g}/\text{孔}$)。阴性对照 (negative control, NC) 组 (加入空载质粒 2.5 $\mu\text{g}/\text{孔}$)、过表达 *B7-H3* 组 (OE-B7-H3 组, 加入过表达 *B7-H3* 质粒 2.5 $\mu\text{g}/\text{孔}$)、过表达 *B7-H3*+敲减 *SIRT1* 组 (OE-B7-H3+si-SIRT1 组, 加入过表达 *B7-H3* 质粒 2.5 $\mu\text{g}/\text{孔}$, 敲减 *SIRT1* 的 si RNA 2.5 $\mu\text{g}/\text{孔}$), 每组按照说明书各再加入 4 μL Jet Prime 脂质体转染试剂和 200 μL Jet Prime 转染缓冲液, 混合后静置 10 min 后加入相应处理孔中。

1.3.4 流式细胞术检测细胞凋亡

将 6 孔板内细胞上清液收集到 5 mL EP 管中, 6 孔板每孔加入 500 μL 胰酶, 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱消化 1~2 min, 加入 1 mL 细胞培养基终止消化, 轻轻吹打至细胞完全脱落, 将细胞悬液加入 5 mL EP 管中, 放置离心机以 1000 r/min 离心 5 min, 再用预冷 PBS 洗涤 2 次, 并将细胞转至流式管中, 每管约 1×10^6 个细胞。然后用 400 μL Annexin V 结合液重悬细胞, 每管加入 5 μL Annexin V-FITC 染液轻轻混匀后放置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光孵育 15 min, 再加入 5 μL PI 染液轻轻混匀, 放至 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内避光孵育 5 min。最后上机检测。

1.3.5 Western blot 实验

将各组细胞以 1×10^6 个/孔的密度均匀接种至 6 孔板中, 待融合度达 90% 时, 收集上清细胞, 并用细胞刮刀收集贴壁细胞, 用 PBS 洗涤 3 次后转移至 1.5 mL EP 管中, 分别加入含有 RIPA 强裂解液和 PMSF 的混合液 (RIPA : PMSF=100 : 1) 将细胞重悬, 放至 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱充分裂解细胞 30 min 左右, 直至无明显细胞沉淀。然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、14 000 r/min 离心 30 min。吸取上清液, 用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。根据 BCA 结果加入相应的体积的 5 \times 蛋白上样缓冲液 (蛋白上清液 : 5 \times 蛋白上样缓冲液=4 : 1), 振荡混匀后在 100 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中煮沸 10 min, 使蛋白完全变性。将煮过的蛋白放置在冰盒中快速冷却, 并放置在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 每孔上样 5 μL 蛋白样品, 电泳结束后将蛋白转移至 PVDF 膜, 将条带放入快速封闭液, 室温封闭 30 min, TBST 清洗条带 3 次, 每次 10 min。一抗按照其说明书进行稀释 (B7-H3 抗体 1 : 500, p53 抗体 1 : 1 000, SIRT1 抗体 1 : 1 000, Bcl-2 抗体 1 : 1 000, Bax 抗体 1 : 1 000, β -actin 抗体 1 : 5 000)。一抗孵育条带置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。用 TBST 清洗条带 3 次, 每次 10 min, 室温孵育二抗 [山羊抗兔 (H+L) HRP 1 : 3 000, 山羊抗

小鼠 (H+L) HRP 1 : 3 000]1.5 h, 再次用 TBST 清洗条带 3 次, 每次 10 min, 最后滴加显影液进行条带曝光。

1.4 统计学处理

使用 Flowjo 10.8 对流式结果进行分析及制图; ImageJ 软件对 Western blot 实验结果进行量化分析; 使用 GraphPad Prism 9 软件进行数据分析及制图, 各组实验重复 3 次, 数据用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, 三组采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 B7-H3 与细胞凋亡通路相关性分析

利用 GEPIA 2 平台分析 B7-H3 mRNA 表达水平与 NSCLC 患者生存预后的关系。共有 962 例参与分析, 以表达水平高于中位数的为高表达组, 低于中位数的为低表达组。结果显示 B7-H3 高表达组的总体生存期 (overall survival, OS) 低于低表达组 ($P<0.01$, 图 1A)。GSEA 分析显示, B7-H3 表达显著富集在细胞凋亡信号通路上[标准化富集分数 (normalized enrichment score, NES): 2.33, $P<0.05$, 图 1B]及 p53 相关的信号通路上 (NES: 2.26, $P<0.05$, 图 1C)。以上结果表明, B7-H3 高表达与 NSCLC 患者不良预后有关, 并且 B7-H3 与凋亡相关通路和 p53 信号通路显著相关。

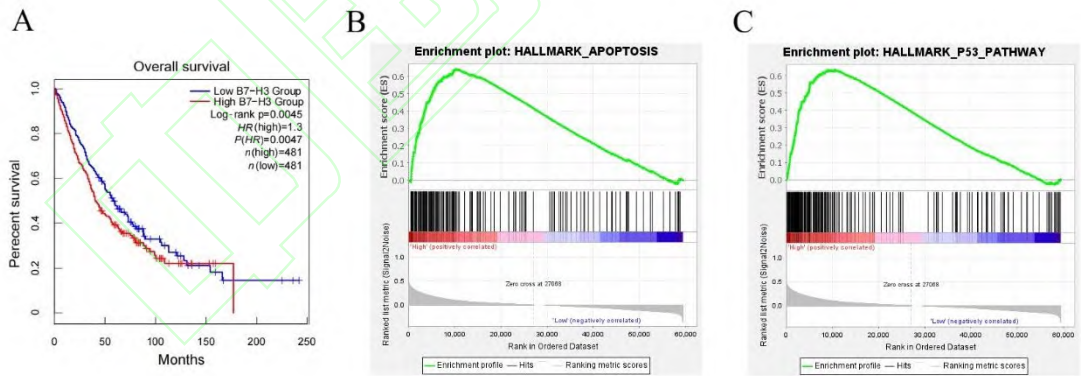


图 1 B7-H3 表达水平对 NSCLC 患者生存预后的影响及 B7-H3 表达相关信号通路的 GSEA 分析

Fig.1 The impact of B7-H3 expression levels on the prognosis of NSCLC patients and GSEA analysis of B7-H3-related signaling pathways

A: Survival curves of NSCLC patients with high and low expression of B7-H3 ($P<0.01$); B, C: GSEA analysis showed that the apoptosis and p53 signaling pathways were significantly associated with B7-H3.

2.2 敲减 *B7-H3* 对 SIRT1/p53 通路的影响

为探究 *B7-H3* 与 SIRT1/p53 通路之间的调控关系，通过 Western blot 实验观察 *B7-H3* 敲减后 SIRT1、p53 的蛋白表达情况。结果显示，与对照组相比，*si-B7H3* 组的 SIRT1 表达显著下调 ($t=7.87$, $P<0.001$)，p53 表达显著上调 ($t=10.73$, $P<0.001$) (图 2)，提示 *B7-H3* 分子调控 NSCLC 细胞 SIRT1/p53 通路。

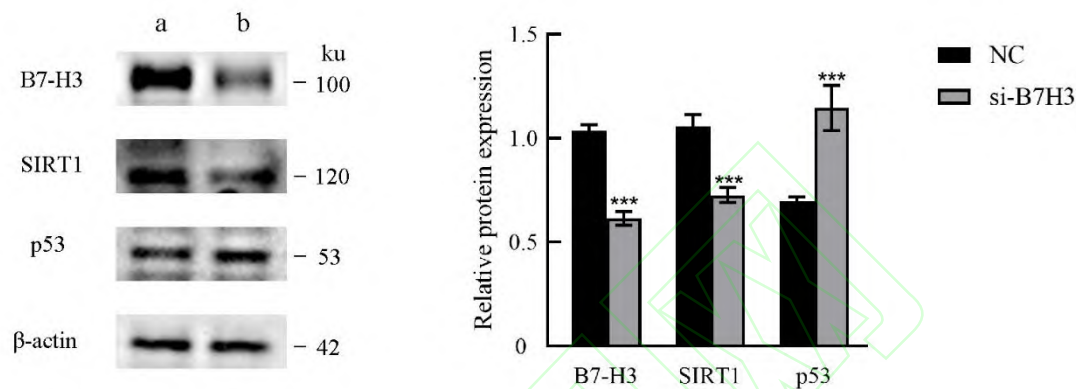


图2 Western blot检测敲减*B7-H3*的蛋白表达水平及其灰度值统计图

Fig.2 Western blot detection of *B7-H3* protein expression levels and grayscale value statistics after *B7-H3* knockdown.

a: NC group, b: *si-B7H3* group; *** $P<0.001$ vs NC group.

2.3 过表达 *B7-H3* 对 NSCLC 细胞凋亡的影响

为探究 *B7-H3* 对 NSCLC 细胞凋亡的影响，使用 Western blot 验证过表达 *B7-H3* 的效果，组中 *B7-H3* 的蛋白表达水平明显高于 NC 组 ($t=13.31$, $P<0.001$, 图 3A)。使用 Annexin V/PI 双染法，通过流式细胞术来分析细胞的凋亡率。结果表明，与 NC 组 (26.72% \pm 4.13%) 相比，OE-*B7H3* 组 (13.87% \pm 0.82%) 细胞凋亡率下降 ($t=5.29$, $P<0.01$)，提示 *B7-H3* 抑制细胞凋亡 (图 3B)。

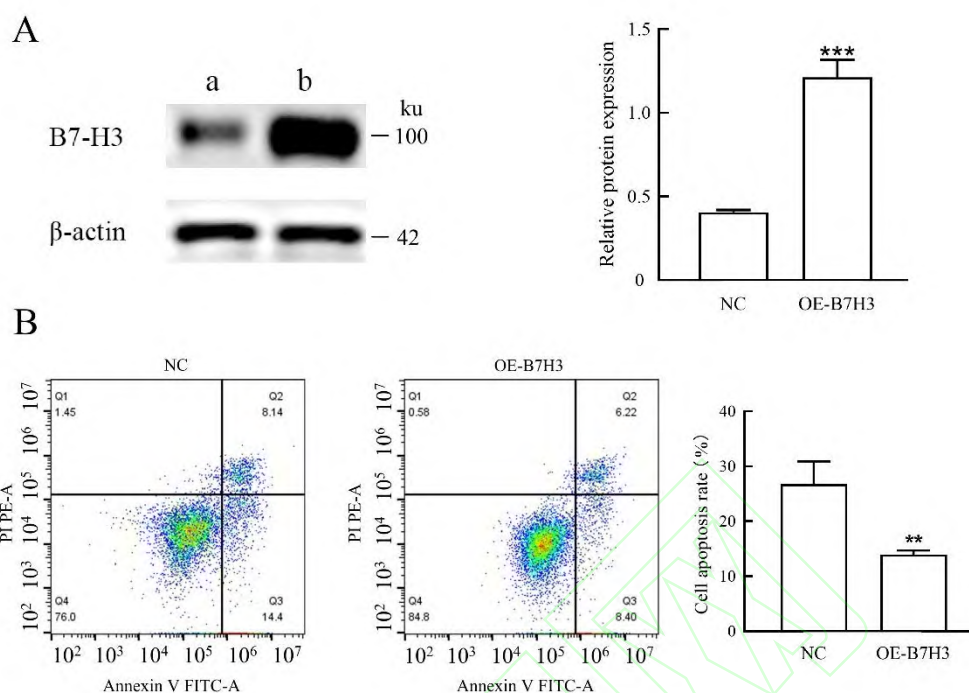


图3 过表达 *B7-H3* 对 NSCLC 细胞凋亡的影响

Fig.3 The effects of *B7-H3* overexpression on the apoptosis of NSCLC cells

A: Western blot detection of protein expression levels and grayscale value statistical analysis of *B7-H3* overexpression; B: Flow cytometry detection of cell apoptosis; a: NC group, b: OE-B7-H3 group; $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ vs NC group.

2.4 *B7-H3* 通过 SIRT1/p53 信号通路调控 NSCLC 细胞凋亡

通过流式细胞术来分析各组细胞的凋亡率, 结果表明与 NC 组 ($27.13\% \pm 3.57\%$) 相比, OE-B7-H3 组 ($15.04\% \pm 1.31\%$) 细胞凋亡率下降 ($t=6.32$, $P<0.01$), 但 OE-B7-H3+si-SIRT1 组 ($20.81\% \pm 1.43\%$) 对比 OE-B7-H3 组细胞凋亡率升高 ($t=2.02$, $P<0.05$, 图 4A)。使用 Western blot 实验进一步验证 (图 4B), 结果表明与 NC 组相比, OE-B7-H3 组 SIRT1 蛋白表达上调, p53 的表达下调 ($t=3.03$, $P<0.05$; $t=3.84$, $P<0.01$), 抗凋亡蛋白 Bcl-2 与促凋亡蛋白 Bax 比值升高 ($t=4.21$, $P<0.001$); 在过表达 *B7-H3* 细胞系中, 敲减 *SIRT1* 逆转 p53 表达和凋亡通路相关蛋白 Bcl-2 与 Bax 的比值 ($t=4.20$, $P<0.001$; $t=4.47$, $P<0.001$)。以上结果说明 *B7-H3* 通过 SIRT1 调控 p53 表达, 并通过 SIRT1/p53 信号通路抑制 NSCLC 细胞凋亡。

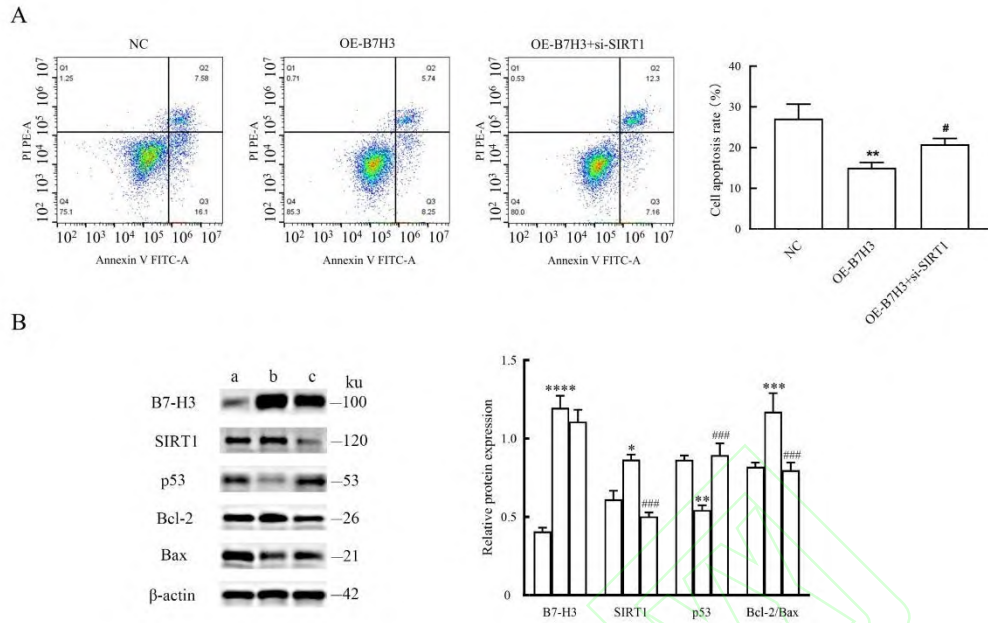


图 4 B7-H3 通过 SIRT/p53 信号通路调控 NSCLC 细胞凋亡

Fig.4 B7-H3 regulated the apoptosis of NSCLC cells through the SIRT1/p53 signaling pathway

A: Flow cytometry detection of cell apoptosis; B: Western blot detection of B7-H3, SIRT1, p53, Bcl-2, and Bax expression levels and grayscale value statistical analysis of A549 cells; a: NC group, b: OE-B7-H3 group, c: OE-B7H3 + si-SIRT1 group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs NC group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs OE-B7-H3 group.

3 讨论

本研究首先利用 GEPIA 2 平台进行基于 B7-H3 表达的 NSCLC 患者生存率的分析，结果显示 B7-H3 高表达的 NSCLC 患者生存率显著低于低表达患者，表明 B7-H3 是 NSCLC 患者预后不良因素。本课题组前期研究结果^[7-8]也显示，NSCLC 细胞表面 B7-H3 分子激活胞内 PI3K/AKT、JAK2/STAT3 和 Raf/MEK/ERK1/2 等多种信号通路，促进 NSCLC 细胞的增殖、迁移及抑制凋亡等过程。且 B7-H3 表达水平与肺腺癌 EGFR-TKI 靶向治疗继发性耐药存在相关性^[9]，这些研究结果都提示了 B7-H3 分子对 NSCLC 的促癌作用。本研究对细胞信号通路进行 GSEA 分析发现，B7-H3 显著富集在细胞凋亡相关信号通路及 p53 信号通路上，进一步提示了 B7-H3 可能通过抑制细胞凋亡的途径促进肿瘤存活。Li et al^[10]发现在胰腺癌细胞上调表达 B7-H3 分子后表皮生长因子受体（EGFR）和 ERK1/2 磷酸化水平（p-ERK1/2）

进一步增加, Sun et al^[11]的研究显示 B7-H3 可以通过与纤连蛋白相互作用抑制胃癌细胞的凋亡, 这些机制是否在 NSCLC 细胞中发挥作用有待进一步探究。

既往研究^[12]表明, Bcl-2 通过阻止促凋亡因子从线粒体释放至细胞质中而抑制凋亡。相反, Bax 通过增加线粒体外膜的通透性促进细胞凋亡, Bcl-2 与 Bax 的比值决定了细胞对凋亡信号的敏感度。在本研究中, 过表达 *B7-H3* 上调 Bcl-2 并下调 Bax 水平, 导致 Bcl-2 与 Bax 的比值升高, 最终抑制 NSCLC 细胞凋亡。有研究^[13-14]报道在结直肠癌(colorectal cancer, CRC)细胞中, B7-H3 的高表达与抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-xl 表达呈正相关, 与促凋亡蛋白 Bax 表达呈负相关, 该结果与本研究基本一致。研究已证实过表达 *B7-H3* 通过激活 JAK2-STAT3 信号增强 CRC 细胞的抗凋亡作用^[14], 但该机制是否在 NSCLC 发挥作用有待进一步探究。

本课题组前期研究^[7]表明, NSCLC 细胞中 B7-H3 可以通过 PI3K/AKT 通路调控 SIRT1。在本研究中, 进一步发现 B7-H3 调控 SIRT1 可抑制 NSCLC 细胞凋亡。SIRT1 在多种细胞事件中发挥关键作用, 特别是在衰老、癌症和细胞重编程等领域^[15]。SIRT1 还可以激活多种信号通路促进癌症的发生发展, Yamakuchi et al^[16]发现抑制 SIRT1 促进结肠癌细胞凋亡的发生。Zhang et al^[17]发现 SIRT1 通过 STAT3/MMP-13 信号通路抑制胃癌的增殖和转移。Wang et al^[18]的研究中证实 SIRT1 通过 p53/miR-101/KPNA3 轴促进结直肠癌的发生发展, SIRT1 是否通过此类机制在 NSCLC 发挥作用有待进一步研究。

在本研究中, 在过表达 *B7-H3* 的基础上敲减 *SIRT1* 后, NSCLC 细胞 p53 蛋白表达增加, 细胞凋亡增加, 证明了 B7-H3 可以通过调控 SIRT1/p53 途径来抑制细胞凋亡。p53 是公认的抑癌基因, 参与细胞周期阻滞、凋亡和 DNA 修复等过程^[19]。在细胞应激和炎症反应中, 核内 p53 蛋白发生乙酰化, 可使促凋亡级联反应中基因转录增加^[20]。SIRT1 通过以 NAD⁺ 依赖的方式在 c 端赖氨酸-382 残基上使 p53 去乙酰化^[4], 降低 p53 的转录活性, 同时也降低其下游蛋白如 p21 (细胞周期抑制剂) 和 p53 调节的 PUMA (凋亡调节剂) 的表达。因此, SIRT1 可以抑制 p53 依赖性的细胞周期阻滞和凋亡^[20]。乙酰化的 p53 在细胞内累积, 激活 p21、PUMA 和 Bax 等多种基因转录, 进而诱导细胞周期阻滞、衰老和凋亡^[21]。有研究报道 p53 可促进胃癌 AGS 细胞凋亡^[22]。在本研究中 B7-H3 通过上调 SIRT1, 使 p53 去乙酰化失活, 最终影响凋亡相关蛋白的表达, Bcl-2/Bax 的比值升高, 最终抑制 NSCLC 细胞的凋亡。

综上所述, 本研究结果表明, B7-H3 分子可以通过激活 SIRT1/p53 途径进而抑制 NSCLC 细胞凋亡, 研究结果为 B7-H3 分子的促肿瘤作用机制提供了重要的理论依据, 同时也为开发 NSCLC 靶向药物提供了潜在方向, 对 NSCLC 具有潜在治疗前景。

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): 229-63. doi: 10.3322/caac.21834.
- [2] Schabath M B, Cote M L. Cancer progress and priorities: Lung cancer[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2019, 28(10): 1563-79. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-19-0221.
- [3] Rahman S, Islam R. Mammalian Sirt1: insights on its biological functions[J]. *Cell Commun Signal*, 2011, 9: 11. doi: 10.1186/1478-811X-9-11.
- [4] Vaziri H, Dessain S K, Eaton E N, et al. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase[J]. *Cell*, 2001, 107(2): 149-59. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00527-x.
- [5] Nakano K, Vousden K H. *PUMA* a novel proapoptotic gene, is induced by p53[J]. *Mol Cell*, 2001, 7(3): 683-94. doi: 10.1016/s1097-2765(01)00214-3.
- [6] Bouvard V, Zaitchouk T, Vacher M, et al. Tissue and cell-specific expression of the p53-target genes: Bax, fas, mdm2 and Waf1/p21, before and following ionising irradiation in mice[J]. *Oncogene*, 2000, 19(5): 649-60. doi: 10.1038/sj.onc.1203366.
- [7] Liao H, Ding M, Zhou N, et al. B7-H3 promotes the epithelial-mesenchymal transition of NSCLC by targeting SIRT1 through the PI3K/AKT pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2022, 25(3): 79. doi: 10.3892/mmr.2022.12595.
- [8] Ding M, Liao H, Zhou N, et al. B7-H3-induced signaling in lung adenocarcinoma cell lines with divergent epidermal growth factor receptor mutation patterns[J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 8824805. doi: 10.1155/2020/8824805.
- [9] 杨 英, 丁 萌, 唐 伟, 等. B7-H3与肺腺癌EGFR-TKI靶向治疗继发性耐药的相关性研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(9): 1490-3, 1498. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.028.
- [9] Yang Y, Ding M, Tang W, et al. Study on the correlation between B7-H3 and acquired drug resistance of EGFR-TKI targeted therapy in lung adenocarcinoma[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2022, 57(9): 1490-3, 1498. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.028.
- [10] Li D, Wang J, Zhou J, et al. B7-H3 combats apoptosis induced by chemotherapy by delivering signals to pancreatic cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(43): 74856-68. doi:

10.18632/oncotarget.20421.

- [11] Sun M, Xie J, Zhang D, et al. B7-H3 inhibits apoptosis of gastric cancer cell by interacting with Fibronectin[J]. J Cancer, 2021, 12(24): 7518-26. doi: 10.7150/jca.59263.
- [12] Zhang S, Zhou C, Zhang D, et al. The anti-apoptotic effect on cancer-associated fibroblasts of B7-H3 molecule enhancing the cell invasion and metastasis in renal cancer[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 4119-27. doi: 10.2147/OTT.S201121.
- [13] Liu H, Tekle C, Chen Y W, et al. B7-H3 silencing increases paclitaxel sensitivity by abrogating Jak2/Stat3 phosphorylation[J]. Mol Cancer Ther, 2011, 10(6): 960-71. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0072.
- [14] Zhang T, Jiang B, Zou S T, et al. Overexpression of B7-H3 augments anti-apoptosis of colorectal cancer cells by Jak2-STAT3[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(6): 1804-13. doi: 10.3748/wjg.v21.i6.1804.
- [15] Tanner K G, Landry J, Sternglanz R, et al. Silent information regulator 2 family of NAD-dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(26): 14178-82. doi: 10.1073/pnas.250422697.
- [16] Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein C J. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(36): 13421-6. doi: 10.1073/pnas.0801613105.
- [17] Zhang S, Yang Y, Huang S, et al. SIRT1 inhibits gastric cancer proliferation and metastasis via STAT3/MMP-13 signaling[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(9): 15395-406. doi: 10.1002/jcp.28186.
- [18] Wang X W, Jiang Y H, Ye W, et al. SIRT1 promotes the progression and chemoresistance of colorectal cancer through the p53/miR-101/KPNA3 axis[J]. Cancer Biol Ther, 2023, 24(1): 2235770. doi: 10.1080/15384047.2023.2235770.
- [19] Bian J, Dannappel M, Wan C, et al. Transcriptional regulation of Wnt/ β -catenin pathway in colorectal cancer[J]. Cells, 2020, 9(9): 2125. doi: 10.3390/cells9092125.
- [20] Ong A L C, Ramasamy T S. Role of Sirtuin1-p53 regulatory axis in aging, cancer and cellular reprogramming[J]. Ageing Res Rev, 2018, 43: 64-80. doi: 10.1016/j.arr.2018.02.004.
- [21] Yamakuchi M, Lowenstein C J. miR-34, SIRT1 and p53: the feedback loop[J]. Cell Cycle, 2009, 8(5): 712-5. doi: 10.4161/cc.8.5.7753.

[22] 欧宏宇, 朱海宏, 朱文君, 等. 抗菌肽LL-37通过激活p53信号通路诱导胃癌AGS细胞凋亡[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(4): 571-6. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.04.013.

[22] Ou H Y, Zhu H H, Zhu W J, et al. Cathelicidin LL-37 induces apoptosis of gastric cancer AGS cells by activating p53 signaling pathway[J]. Acta Univ Med Anhui, 2021, 56(4): 571-6. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.04.013.

