

# 柚皮苷通过 cGAS-STING 信号通路对乳腺癌细胞增殖、凋亡和免疫逃逸的影响<sup>Δ</sup>

白文辉\*, 李 英, 李宗龙(青海红十字医院乳腺外科, 西宁 810000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)16-2012-05  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.16.10



**摘要** **目的** 探讨柚皮苷通过环鸟苷酸-腺苷酸合酶(cGAS)-干扰素基因刺激因子(STING)信号通路对乳腺癌细胞增殖、凋亡和免疫逃逸的影响。**方法** 将人乳腺癌细胞系MDA-MB-231分为空白组、柚皮苷低、中、高剂量组(50、100、200 μmol/L), RU.521组(cGAS抑制剂, 1 μmol/L)、柚皮苷高剂量+RU.521组(200 μmol/L柚皮苷+1 μmol/L RU.521), 各组细胞用相应药液分别处理48 h后, 检测MDA-MB-231细胞的增殖[以5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(EdU)阳性率和光密度(OD<sub>450</sub>)值计]、凋亡情况, 以及细胞中增殖细胞核抗原(PCNA)、p53、B7同源物1(B7H1)、程序性死亡受体1(PD-1)、cGAS、STING蛋白表达水平。除空白组外, 将上述各组MDA-MB-231细胞分别经相应药物处理48 h后, 再与NK细胞共孵育48 h, 检测共孵育体系上清液中颗粒酶B、肿瘤坏死因子α(TNF-α)、γ干扰素(IFN-γ)水平以及NK细胞的杀伤力。**结果** 与空白组比较, 柚皮苷各剂量组MDA-MB-231细胞的EdU阳性率、OD<sub>450</sub>值和PCNA、B7H1、PD-1蛋白表达水平均显著降低, 细胞凋亡率和p53、cGAS、STING蛋白表达水平均显著升高( $P<0.05$ ); RU.521组MDA-MB-231细胞上述指标的变化情况与柚皮苷各剂量组相反( $P<0.05$ )。与空白+NK组比较, 经不同浓度柚皮苷处理后的MDA-MB-231细胞与NK细胞共孵育体系上清液中颗粒酶B、TNF-α、IFN-γ水平及NK细胞杀伤力均显著升高( $P<0.05$ ), 而经RU.521处理后的共孵育体系中的上述指标均显著降低( $P<0.05$ )。**结论** 柚皮苷可通过激活cGAS-STING信号通路来抑制MDA-MB-231细胞增殖、免疫逃逸, 诱导其凋亡。

**关键词** 柚皮苷; 乳腺癌; 凋亡; 增殖; 免疫逃逸

## Effects of naringin on the proliferation, apoptosis and immune escape of breast cancer cells through cGAS-STING signaling pathway

BAI Wenhui, LI Ying, LI Zonglong (Dept. of Breast Surgery, Qinghai Red Cross Hospital, Qinghai Xining 810000, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To explore the effects of naringin on the proliferation, apoptosis and immune escape of breast cancer cells through the cyclic GMP-AMP synthase (cGAS)-stimulator of interferon gene (STING) signaling pathway. **METHODS** The human breast cancer cell line MDA-MB-231 was divided into blank group, naringin low-, medium-, and high-dose groups (50, 100 and 200 μmol/L), RU.521 group (cGAS inhibitor, 1 μmol/L) and high-dose naringin+RU.521 group (200 μmol/L naringin+1 μmol/L RU.521). After each group of cells was treated with their respective drug solutions for 48 h, the proliferation of MDA-MB-231 cells [measured by the positive rate of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) and the value of optical density (OD<sub>450</sub>)], apoptosis status, as well as the protein expression levels of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), p53, B7 homolog 1 (B7H1), programmed death-1 (PD-1), cGAS, and STING in the cells were measured. The MDA-MB-231 cells of the above groups were treated with corresponding drugs for 48 h respectively, and then co-incubated with NK cells for 48 h except blank group. The levels of granzyme B, tumor necrosis factor-α (TNF-α), interferon-γ (IFN-γ) in the supernatant of the co-incubation system and the killing power of NK cells were detected. **RESULTS** Compared with the blank group, the EdU positive rate, OD<sub>450</sub> value, and protein expression levels of PCNA, B7H1 and PD-1 in MDA-MB-231 cells of each dose group of naringin were significantly decreased, while the apoptotic rate and protein expression levels of p53, cGAS, and STING were significantly increased ( $P<0.05$ ). The changes of the above indicators in the MDA-MB-231 cells of the RU.521 group were opposite to those in each naringin dose group ( $P<0.05$ ). Compared with the blank+NK group, the levels of granzyme B, TNF-α, IFN-γ and the killing power of NK cells in the supernatant of the co-incubation system of MDA-MB-231 cells treated with different concentrations of naringin and NK cells were significantly increased ( $P<0.05$ ). However, the above indicators in the co-incubation system of MDA-MB-231 cells treated with RU.521 and NK cells were significantly decreased ( $P<0.05$ ). **CONCLUSIONS** Naringin can inhibit the proliferation and immune escape of MDA-MB-231 cells and induce their apoptosis by activating the cGAS-STING signaling pathway.

<sup>Δ</sup>基金项目 青海省卫生健康科研项目(No.2024-wjzdx-120)

\* 第一作者 副主任医师。研究方向: 乳腺肿瘤的相关治疗。E-

mail: yangkuang05743@163.com

**KEYWORDS** naringin; breast cancer; apoptosis; proliferation; immune escape

乳腺癌是一种高度异质性的恶性肿瘤,其发病率在我国女性恶性肿瘤中排名第一,并且逐年上升<sup>[1]</sup>。目前,乳腺癌的疗法多样,包括药物治疗、手术治疗、放射治疗等。尽管乳腺癌的治疗已取得了巨大进步,但现有疗法在改善乳腺癌患者预后方面的效果仍然有限<sup>[2]</sup>。据报道,不受控制的细胞增殖以及凋亡抑制是促进乳腺癌进展的主要原因之一<sup>[3]</sup>,免疫逃逸是乳腺癌恶性发展的关键过程<sup>[4]</sup>。因此,开发药物抑制肿瘤细胞增殖和免疫逃逸,诱导肿瘤细胞凋亡,对于乳腺癌的治疗意义重大。

柚皮苷是一种主要存在于芸香科柑橘类水果中的天然二氢黄酮,具有抗肿瘤活性<sup>[5]</sup>。已有研究报道,柚皮苷可抑制乳腺癌细胞增殖,诱导细胞凋亡<sup>[6]</sup>。但关于柚皮苷是否对乳腺癌细胞免疫逃逸也有影响尚未可知。已有研究表明,激活环鸟苷酸-腺苷酸合酶(cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)-干扰素基因刺激因子(stimulator of interferon gene, STING)信号通路可通过增强机体的抗肿瘤免疫力,抑制乳腺癌进展<sup>[7]</sup>;还有研究表明,柚皮苷可通过失活 cGAS-STING 信号通路改善缺血再灌注损伤大鼠的肠损伤,减轻炎症反应和氧化应激,抑制肠细胞凋亡<sup>[8]</sup>。基于此,本研究基于 cGAS-STING 信号通路,探究了柚皮苷对乳腺癌细胞增殖、凋亡和免疫逃逸的影响,旨在为乳腺癌的治疗提供参考依据。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括 BX53 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司)、SpectraMax iD5 型酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)、FACS Celesta 型流式细胞仪(美国 BD 公司)、Mini-PROTEAN Tetra 型蛋白电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

### 1.2 主要药品与试剂

柚皮苷对照品(纯度 $\geq 98\%$ ,批号 Y-006)购自成都瑞芬思生物科技有限公司;cGAS 抑制剂 RU.521(纯度 99.95%,批号 HY-114180)购自美国 MCE 公司;5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)染色试剂盒(批号 C0081L)购自上海碧云天生物技术股份有限公司;CCK-8 试剂盒(批号 C0038)购自广州研创生物科技发展有限公司;膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(annexin V-fluorescein isothiocyanate, Annexin V-FITC)/碘化丙啶(propidium iodide, PI)细胞凋亡检测试剂盒(批号 KGA1026)购自江苏凯基生物技术股份有限公司;兔源增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、p53、B7 同源物 1(B7 homolog 1, B7H1)、程序性死亡受体 1(programmed death-1, PD-1)、cGAS、STING、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G 二抗(批号分别为 ab92552、ab32389、ab205921、ab213480、ab224245、ab198951、ab181602、ab6721)均购自英国 Abcam 公司;人颗粒酶 B、肿瘤坏死

因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、 $\gamma$ 干扰素(interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )酶联免疫吸附分析试剂盒(批号分别为 20231105、20231109、20231226)均购自上海瓦兰生物科技有限公司。

### 1.3 细胞

人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 购自中国科学院细胞库/干细胞库;人外周血自然杀伤(natural killer, NK)细胞购自汇智和源生物技术(苏州)有限公司。

## 2 方法

### 2.1 柚皮苷及 cGAS-STING 信号通路对 MDA-MB-231 细胞增殖、凋亡的影响

#### 2.1.1 MDA-MB-231 细胞的分组与处理

将 MDA-MB-231 细胞接种于含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基中,置于 37 °C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞,以  $1 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 96 孔板中,分为空白组、柚皮苷低剂量组、柚皮苷中剂量组、柚皮苷高剂量组、RU.521 组、柚皮苷高剂量+RU.521 组,每组设置 6 个复孔。空白组 MDA-MB-231 细胞正常培养 48 h;柚皮苷低、中、高剂量组 MDA-MB-231 细胞分别用 50、100、200  $\mu\text{mol/L}$  柚皮苷处理 48 h<sup>[6]</sup>;RU.521 组 MDA-MB-231 细胞用 1  $\mu\text{mol/L}$  RU.521 处理 48 h<sup>[9]</sup>;柚皮苷高剂量+RU.521 组 MDA-MB-231 细胞用 200  $\mu\text{mol/L}$  柚皮苷和 1  $\mu\text{mol/L}$  RU.521 共同处理 48 h,处理结束后检测相应指标。

#### 2.1.2 MDA-MB-231 细胞增殖的检测

采用 EdU 细胞增殖检测法。收集“2.1.1”项下处理后的各组细胞,分别与 50  $\mu\text{mol/L}$  EdU 共孵育 2 h;用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min 后,用 2 mg/mL 甘氨酸中和,然后用 0.5% Triton X-100 透化细胞;随后,使用 4',6-二脒基-2-苯基咪唑(DAPI)对细胞核进行染色。使用荧光显微镜获得细胞图像,并计算 EdU 阳性率,EdU 阳性率=EdU 阳性细胞数/DAPI 阳性细胞总数 $\times 100\%$ 。

采用 CCK-8 法。按“2.1.1”项下方法分组、处理细胞后,每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液,孵育 2 h,使用酶标仪检测 450 nm 波长处的光密度(optical density, OD)。

#### 2.1.3 MDA-MB-231 细胞凋亡的检测

收集“2.1.1”项下处理后的各组细胞,用胰酶消化后调整细胞密度为  $1 \times 10^6$  个/mL,利用结合缓冲液重悬细胞后,每管加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 和 5  $\mu\text{L}$  PI 溶液,稍加混匀后室温避光孵育 10 min,使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况,凋亡率=(Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>细胞数+Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>细胞数)/总细胞数 $\times 100\%$ (“+”为阳性,“-”为阴性)。

#### 2.1.4 MDA-MB-231 细胞中 PCNA、p53、B7H1、PD-1、cGAS、STING 蛋白表达的检测

采用 Western blot 法。收集“2.1.1”项下处理后的各组细胞,使用预冷的 RIPA 缓冲液提取细胞总蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度。将 40  $\mu\text{g}$  蛋白进行电泳后转移

到聚偏二氟乙烯膜上,用5%脱脂牛奶封闭膜2 h,然后与PCNA、p53、B7H1、PD-1、cGAS、STING、GAPDH抗体(稀释比例分别为1:3 000、1:5 000、1:7 000、1:5 000、1:6 000、1:3 000、1:4 000)在4℃下孵育过夜。次日,用TBST缓冲液清洗3次后,加入二抗(稀释比例1:4 000),在室温下孵育1 h;以ECL试剂曝光、显影后,使用Image J软件分析蛋白条带灰度值。以目的蛋白与内参蛋白(GAPDH)的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。

2.2 柚皮苷调控cGAS-STING信号通路对MDA-MB-231细胞免疫逃逸的影响

2.2.1 细胞分组与干预

利用Transwell小室将“2.1.1”项下各组MDA-MB-231细胞分别与NK细胞共孵育48 h(MDA-MB-231细胞和NK细胞分别置于Transwell小室的上、下室,细胞密度分别为 $5\times10^4$ 、 $5\times10^5$ 个/小室),并依次命名为空白+NK组、柚皮苷低剂量+NK组、柚皮苷中剂量+NK组、柚皮苷高剂量+NK组、RU.521+NK组、柚皮苷高剂量+RU.521+NK组。除空白+NK组的MDA-MB-231细胞直接与NK细胞共孵育48 h外,其他各组的MDA-MB-231细胞需要先经过药物预处理48 h后再与NK细胞共孵育48 h。每组设置6个复孔,处理结束后检测相应指标。

2.2.2 共孵育体系上清液中颗粒酶B、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 水平的检测

收集“2.2.1”项下各组共孵育体系中的上清液,按照ELISA试剂盒说明书操作,检测其中颗粒酶B、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 的水平。

2.2.3 共孵育体系中NK细胞杀伤力的检测

按“2.2.1”项下方法将各组MDA-MB-231细胞、NK细胞共孵育48 h后,离心收集50  $\mu$ L上清液,置于新的96孔板中,每孔加入50  $\mu$ L乳酸脱氢酶孵育30 min,再加入50  $\mu$ L终止液终止反应1 h,使用酶标仪检测450 nm波长处的光密度(OD<sub>450</sub>)值。此外,分别将MDA-MB-231细胞( $5\times10^4$ 个)、NK细胞( $5\times10^5$ 个)、MDA-MB-231细胞( $5\times10^4$ 个,用10  $\mu$ L 30%Triton X-100干预处理)接种于96孔板中孵育48 h,离心收集50  $\mu$ L上清液,置于新的96孔板中,每孔加入50  $\mu$ L乳酸脱氢酶孵育30 min,再加入50  $\mu$ L终止液终止反应1 h后,检测其OD<sub>450</sub>值。按下式计算NK细胞杀伤力,NK细胞杀伤力(%)=(实验组OD<sub>450</sub>值-MDA-MB-231细胞单独培养的OD<sub>450</sub>值-NK细胞单独培养的OD<sub>450</sub>值)/(MDA-MB-231细胞在10  $\mu$ L 30%Triton X-100中孵育时的OD<sub>450</sub>值-MDA-MB-231细胞单独培养的OD<sub>450</sub>值) $\times$ 100%。

2.3 统计学分析

采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析。计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用SNK- $q$ 多重比较检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 柚皮苷调控cGAS-STING信号通路对MDA-MB-231细胞增殖、凋亡的影响

3.1.1 细胞增殖变化

与空白组比较,柚皮苷低、中、高剂量组MDA-MB-231细胞的EdU阳性率和OD<sub>450</sub>值均显著降低,且呈剂量依赖性( $P<0.05$ );而RU.521组的EdU阳性率和OD<sub>450</sub>值均显著升高( $P<0.05$ )。与柚皮苷高剂量组比较,柚皮苷高剂量+RU.521组MDA-MB-231细胞的EdU阳性率和OD<sub>450</sub>值均显著升高( $P<0.05$ ),结果见图1和表1。

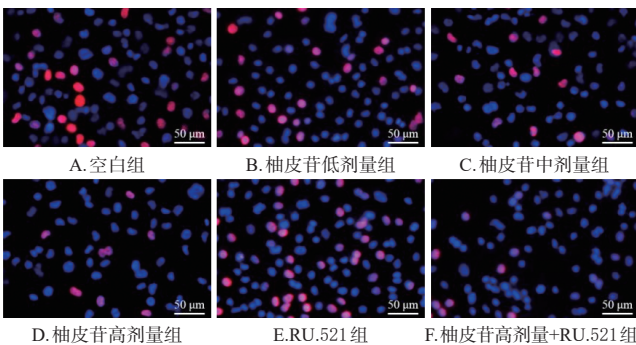


图1 各组MDA-MB-231细胞的增殖检测荧光图(EdU染色)

图1 各组MDA-MB-231细胞的增殖检测荧光图(EdU染色)

表1 各组MDA-MB-231细胞的EdU阳性率、OD<sub>450</sub>值和细胞凋亡率比较( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

组别	EdU阳性率/%	OD <sub>450</sub> 值	细胞凋亡率/%
空白组	32.89 $\pm$ 1.56	1.16 $\pm$ 0.09	5.88 $\pm$ 0.15
柚皮苷低剂量组	27.73 $\pm$ 1.25 <sup>a</sup>	1.01 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	9.23 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>
柚皮苷中剂量组	20.55 $\pm$ 0.97 <sup>ab</sup>	0.84 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>	17.63 $\pm$ 0.82 <sup>ab</sup>
柚皮苷高剂量组	12.68 $\pm$ 0.71 <sup>abc</sup>	0.46 $\pm$ 0.04 <sup>abc</sup>	29.65 $\pm$ 1.43 <sup>abc</sup>
RU.521组	38.44 $\pm$ 1.71 <sup>a</sup>	1.39 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	2.11 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>
柚皮苷高剂量+RU.521组	21.22 $\pm$ 0.98 <sup>d</sup>	0.81 $\pm$ 0.07 <sup>d</sup>	14.56 $\pm$ 0.69 <sup>d</sup>

a:与空白组比较, $P<0.05$ ;b:与柚皮苷低剂量组比较, $P<0.05$ ;c:与柚皮苷中剂量组比较, $P<0.05$ ;d:与柚皮苷高剂量组比较, $P<0.05$ 。

3.1.2 细胞凋亡变化

与空白组比较,柚皮苷低、中、高剂量组MDA-MB-231细胞凋亡率均显著升高( $P<0.05$ ),而RU.521组细胞凋亡率显著降低( $P<0.05$ );与柚皮苷高剂量组比较,柚皮苷高剂量+RU.521组MDA-MB-231细胞凋亡率显著降低( $P<0.05$ ),结果见图2和表1。

3.1.3 细胞中PCNA、p53、B7H1、PD-1、cGAS、STING蛋白表达变化

与空白组比较,柚皮苷低、中、高剂量组MDA-MB-231细胞中PCNA、B7H1、PD-1蛋白表达水平均显著降低,p53、cGAS、STING蛋白表达水平均显著升高,且上述变化呈剂量依赖性( $P<0.05$ );而RU.521组细胞中PCNA、B7H1、PD-1蛋白表达水平均显著升高,p53、cGAS、STING蛋白表达水平均显著降低( $P<0.05$ )。与柚皮苷高剂量组比较,柚皮苷高剂量+RU.521组MDA-MB-231细胞中PCNA、B7H1、PD-1蛋白表达水平均显著升高,p53、cGAS、STING蛋白表达水平均显著降低( $P<0.05$ )。结果见图3和表2。



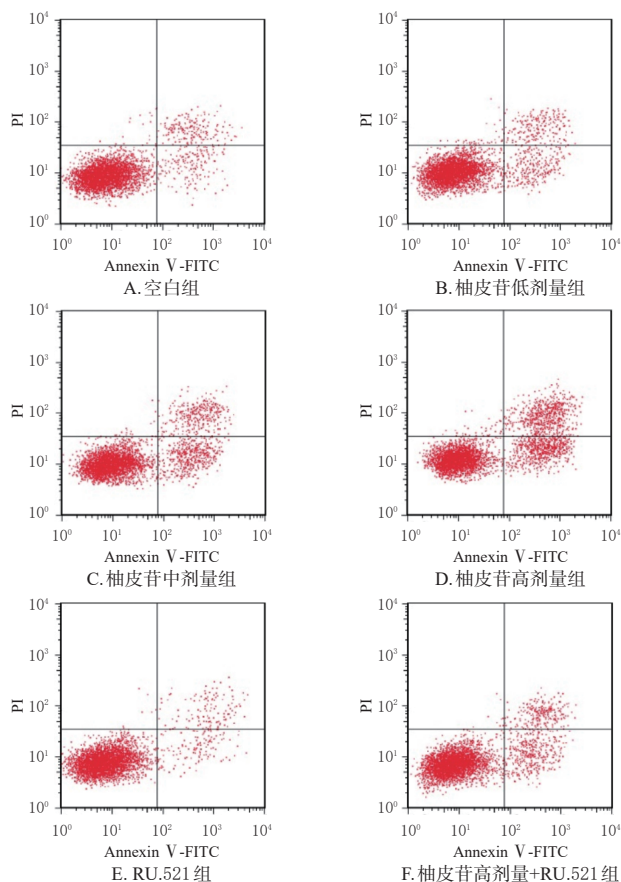
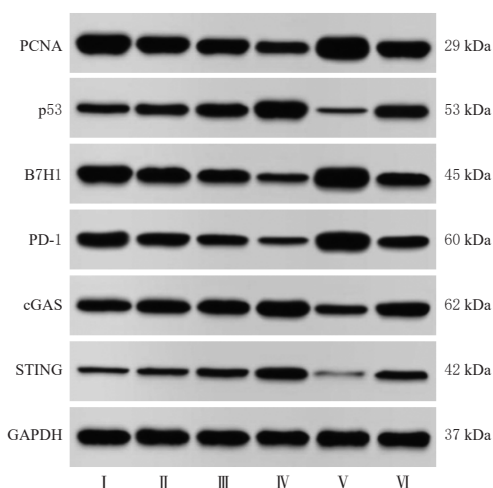


图2 各组MDA-MB-231细胞凋亡的流式细胞图



I: 空白组; II: 柚皮苷低剂量组; III: 柚皮苷中剂量组; IV: 柚皮苷高剂量组; V: RU.521组; VI: 柚皮苷高剂量+RU.521组。

图3 各组MDA-MB-231细胞中PCNA、p53、B7H1、PD-1、cGAS、STING蛋白表达的电泳图

### 3.2 柚皮苷调控cGAS-STING信号通路对MDA-MB-231细胞免疫逃逸的影响

#### 3.2.1 共孵育体系上清液中颗粒酶B、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 水平变化

与空白+NK组比较,柚皮苷低剂量+NK组、柚皮苷中剂量+NK组、柚皮苷高剂量+NK组共孵育体系上清液中颗粒酶B、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 水平均显著升高,且呈剂量依赖性( $P<0.05$ );RU.521+NK组共孵育体系上清液中的

表2 各组MDA-MB-231细胞中PCNA、p53、B7H1、PD-1、cGAS、STING蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

组别	PCNA	p53	B7H1	PD-1	cGAS	STING
空白组	1.86 $\pm$ 0.17	0.51 $\pm$ 0.05	1.43 $\pm$ 0.15	1.01 $\pm$ 0.14	0.78 $\pm$ 0.07	0.26 $\pm$ 0.02
柚皮苷低剂量组	1.62 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.78 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	1.21 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.89 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.89 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.39 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
柚皮苷中剂量组	1.31 $\pm$ 0.12 <sup>ab</sup>	0.99 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>	0.96 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>	0.65 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>	1.03 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>	0.51 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>
柚皮苷高剂量组	0.81 $\pm$ 0.07 <sup>abc</sup>	1.51 $\pm$ 0.14 <sup>abc</sup>	0.43 $\pm$ 0.04 <sup>abc</sup>	0.29 $\pm$ 0.04 <sup>abc</sup>	1.36 $\pm$ 0.12 <sup>abc</sup>	0.93 $\pm$ 0.09 <sup>abc</sup>
RU.521组	2.01 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	0.26 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	1.79 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	1.52 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	0.51 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
柚皮苷高剂量+RU.521组	1.36 $\pm$ 0.13 <sup>d</sup>	0.91 $\pm$ 0.07 <sup>d</sup>	0.93 $\pm$ 0.08 <sup>d</sup>	0.68 $\pm$ 0.07 <sup>d</sup>	0.99 $\pm$ 0.08 <sup>d</sup>	0.54 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup>

a: 与空白组比较,  $P<0.05$ ; b: 与柚皮苷低剂量组比较,  $P<0.05$ ; c: 与柚皮苷中剂量组比较,  $P<0.05$ ; d: 与柚皮苷高剂量组比较,  $P<0.05$ 。上述指标均显著降低( $P<0.05$ )。与柚皮苷高剂量+NK组比较,柚皮苷高剂量+RU.521+NK组共孵育体系上清液中的上述指标均显著降低( $P<0.05$ )。结果见表3。

表3 各组共孵育体系上清液中颗粒酶B、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 水平及共孵育体系中NK细胞杀伤力比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

组别	颗粒酶B/(pg/mL)	TNF- $\alpha$ /(pg/mL)	IFN- $\gamma$ /(pg/mL)	NK细胞杀伤力/%
空白+NK组	1.93 $\pm$ 0.14	23.44 $\pm$ 1.21	1.15 $\pm$ 0.09	8.66 $\pm$ 0.41
柚皮苷低剂量+NK组	2.81 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	29.86 $\pm$ 1.43 <sup>a</sup>	1.61 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	15.63 $\pm$ 1.72 <sup>a</sup>
柚皮苷中剂量+NK组	4.18 $\pm$ 0.21 <sup>ab</sup>	37.76 $\pm$ 1.85 <sup>ab</sup>	2.53 $\pm$ 0.14 <sup>ab</sup>	23.69 $\pm$ 1.14 <sup>ab</sup>
柚皮苷高剂量+NK组	7.56 $\pm$ 0.32 <sup>abc</sup>	48.85 $\pm$ 2.36 <sup>abc</sup>	4.17 $\pm$ 0.19 <sup>abc</sup>	40.58 $\pm$ 2.11 <sup>abc</sup>
RU.521+NK组	0.75 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	11.53 $\pm$ 0.54 <sup>a</sup>	0.43 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	3.65 $\pm$ 1.78 <sup>a</sup>
柚皮苷高剂量+RU.521+NK组	4.33 $\pm$ 0.19 <sup>d</sup>	32.65 $\pm$ 1.58 <sup>d</sup>	2.68 $\pm$ 0.12 <sup>d</sup>	22.71 $\pm$ 1.05 <sup>d</sup>

a: 与空白+NK组比较,  $P<0.05$ ; b: 与柚皮苷低剂量+NK组比较,  $P<0.05$ ; c: 与柚皮苷中剂量+NK组比较,  $P<0.05$ ; d: 与柚皮苷高剂量+NK组比较,  $P<0.05$ 。

#### 3.2.2 共孵育体系中NK细胞杀伤力变化

与空白+NK组比较,柚皮苷低剂量+NK组、柚皮苷中剂量+NK组、柚皮苷高剂量+NK组NK细胞杀伤力均显著升高,且呈剂量依赖性( $P<0.05$ );而RU.521+NK组的NK细胞杀伤力显著降低( $P<0.05$ )。与柚皮苷高剂量+NK组比较,柚皮苷高剂量+RU.521+NK组NK细胞杀伤力显著降低( $P<0.05$ )。结果见表3。

## 4 讨论

目前乳腺癌的治疗策略是化疗和放疗,但肿瘤的高侵袭性和治疗相关的不良反应,使患者预后仍面临重大挑战<sup>[10]</sup>。在乳腺癌的各种治疗方法中,天然产物具有突出的抗癌作用,效率更高,副作用更少<sup>[11]</sup>,是乳腺癌治疗候选药物的重要来源。

天然黄酮类药物柚皮苷已被证明具有抗癌潜力<sup>[12]</sup>。本研究亦证明了低、中、高剂量的柚皮苷均可抑制乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖,诱导其凋亡。PCNA作为支架蛋白,在DNA复制和修复中起重要作用,可用于评估细胞增殖能力<sup>[13]</sup>;p53则是细胞凋亡诱导的关键参与者<sup>[14]</sup>。本研究结果显示,低、中、高剂量柚皮苷均可下调MDA-MB-231细胞中PCNA蛋白的表达,上调p53蛋白的表达。这从蛋白水平上证明了柚皮苷对MDA-MB-231细胞增殖具有抑制作用,对细胞凋亡具有诱导作用。

在乳腺癌的早期阶段,免疫系统的效应细胞,特别是NK细胞,可通过分泌颗粒酶B、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 等细胞

毒性因子在消除肿瘤细胞中起着关键作用;NK 细胞杀伤力降低可导致癌细胞转移生长,诱导不良临床结局<sup>[15-16]</sup>。B7H1 是一种跨膜蛋白,其在肿瘤细胞免疫逃逸中起着至关重要的作用<sup>[17]</sup>;PD-1 可通过抑制 T 细胞的抗肿瘤活性,帮助肿瘤细胞逃避免疫系统的清除<sup>[18]</sup>。本研究结果显示,低、中、高剂量柚皮苷均可下调 MDA-MB-231 细胞中 B7H1、PD-1 蛋白的表达;同时,低、中、高剂量柚皮苷均可提高 MDA-MB-231 细胞与 NK 细胞共孵育体系上清液中颗粒酶 B、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  水平及 NK 细胞杀伤力。这表明柚皮苷可抑制乳腺癌细胞的免疫逃逸。

cGAS-STING 信号通路是抗肿瘤免疫过程中先天免疫反应的重要调节器,激活 cGAS-STING 信号通路可抑制乳腺癌细胞增殖<sup>[19]</sup>。本研究结果也显示,cGAS 抑制剂 RU.521 能促进 MDA-MB-231 细胞的增殖和免疫逃逸,抑制其凋亡。此外还发现,低、中、高剂量柚皮苷均可上调 MDA-MB-231 细胞 cGAS、STING 蛋白的表达,推测柚皮苷可能通过激活 cGAS-STING 信号通路来抑制 MDA-MB-231 细胞增殖、免疫逃逸,诱导其凋亡。为了验证此推测,本研究用 RU.521 进行了回复实验,结果显示,RU.521 逆转了高剂量柚皮苷对 MDA-MB-231 细胞的增殖、免疫逃逸及凋亡的影响,证明了推测的合理性。

综上所述,柚皮苷可通过激活 cGAS-STING 信号通路来抑制 MDA-MB-231 细胞增殖、免疫逃逸,诱导其凋亡。以上结果提示柚皮苷可能成为治疗乳腺癌的潜在有效药物之一。

## 参考文献

- [1] TANG W F, GAO Y, HONG S K, et al. GFPT1 accelerates immune escape in breast cancer by modifying PD-L1 via O-glycosylation[J]. BMC Cancer, 2024, 24(1):1071.
- [2] HU X L, WANG J, SHANG P, et al. Sauchinone inhibits breast cancer cell proliferation through regulating microRNA-148a-3p/HER-2 axis[J]. Thorac Cancer, 2023, 14(13):1135-1144.
- [3] WANG P E, QU H J, WANG L, et al. Silencing of circ-USPL1 represses breast cancer progression by targeting miR-1296-5p/MTA1 axis[J]. Thorac Cancer, 2023, 14(22):2198-2209.
- [4] JI S F, YU H, ZHOU D, et al. Cancer stem cell-derived CHI3L1 activates the MAF/CTLA4 signaling pathway to promote immune escape in triple-negative breast cancer[J]. J Transl Med, 2023, 21(1):721.
- [5] HE J, ZHANG H P. Research progress on the anti-tumor effect of naringin[J]. Front Pharmacol, 2023, 14:1217001.
- [6] LI H Z, YANG B, HUANG J, et al. Naringin inhibits growth potential of human triple-negative breast cancer cells by targeting  $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. Toxicol Lett, 2013, 220(3):219-228.

- [7] KA N, PARK M K, KIM S S, et al. NR1D1 stimulates antitumor immune responses in breast cancer by activating cGAS-STING signaling[J]. Cancer Res, 2023, 83(18):3045-3058.
- [8] GU L D, WANG F, WANG Y L, et al. Naringin protects against inflammation and apoptosis induced by intestinal ischemia-reperfusion injury through deactivation of cGAS-STING signaling pathway[J]. Phytother Res, 2023, 37(8):3495-3507.
- [9] 孟元元, 刘艳, 李俊, 等. 右美托咪定通过 cGAS-STING 通路介导的免疫调控机制对胃癌细胞恶性生物学行为的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2024, 40(5):945-951, 960.
- [10] MANJUNATH M, CHOUDHARY B. Triple-negative breast cancer: a run-through of features, classification and current therapies[J]. Oncol Lett, 2021, 22(1):512.
- [11] GAO S H, ZHANG X Y, LIU J, et al. Icariin induces triple-negative breast cancer cell apoptosis and suppresses invasion by inhibiting the JNK/c-Jun signaling pathway[J]. Drug Des Devel Ther, 2023, 17:821-836.
- [12] WANG Y, WANG Y S, YUAN C Y, et al. Naringin inhibits cisplatin resistance of ovarian cancer cells by inhibiting autophagy mediated by the TGF- $\beta$ /Smad2 pathway[J]. Transl Cancer Res, 2024, 13(6):2618-2628.
- [13] RØST L M, RÆDER S B, OLAISEN C, et al. PCNA regulates primary metabolism by scaffolding metabolic enzymes[J]. Oncogene, 2023, 42(8):613-624.
- [14] BROCKMUELLER A, BUHRMANN C, SHAYAN P, et al. Resveratrol induces apoptosis by modulating the reciprocal crosstalk between p53 and Sirt-1 in the CRC tumor microenvironment[J]. Front Immunol, 2023, 14:1225530.
- [15] 周慧, 李婕, 胡利娟, 等. 粉防己碱调节 cGAS-STING 信号通路对黑色素瘤细胞增殖、凋亡和免疫逃逸的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2025, 41(2):357-361.
- [16] ZHANG K J, TAN X L, GUO L. LncRNA TYMSOS facilitates breast cancer metastasis and immune escape through downregulating ULBP3[J]. iScience, 2023, 26(9):107556.
- [17] WONG J J W, SELBO P K. Light-controlled elimination of PD-L1<sup>+</sup> cells[J]. J Photochem Photobiol B, 2021, 225:112355.
- [18] CAI N, CHENG K, MA Y, et al. Targeting MMP9 in CTNNB1 mutant hepatocellular carcinoma restores CD8<sup>+</sup> T cell-mediated antitumour immunity and improves anti-PD-1 efficacy[J]. Gut, 2024, 73(6):985-999.
- [19] JIN Y L, WANG L J, JIN C X, et al. A novel inhibitor of poly(ADP-ribose)polymerase-1 inhibits proliferation of a BRCA-deficient breast cancer cell line via the DNA damage: activated cGAS-STING pathway[J]. Chem Res Toxicol, 2024, 37(4):561-570.

(收稿日期:2025-05-06 修回日期:2025-07-11)

(编辑:邹丽娟)