

DOI:10.13350/j.cjpb.220211

• 论著 •

# 弓形虫 I 型和 II 型 ROP16 蛋白对人肺腺癌 A549 细胞增殖、周期和凋亡的影响\*

李琴惠<sup>1,2</sup>, 曾瑾<sup>1,2</sup>, 汪澎涛<sup>3</sup>, 杨宁爱<sup>3</sup>, 马磊<sup>1,2</sup>, 李佳铭<sup>3</sup>, 马慧慧<sup>3</sup>, 赵志军<sup>2,3,4\*\*</sup>

(1. 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 宁夏银川 750021; 2. 宁夏大学生命科学学院; 3. 宁夏医科大学总医院宁夏临床病原微生物重点实验室; 4. 宁夏医科大学总医院医学实验中心)

**【摘要】** 目的 探讨弓形虫 I 型和 II 型 ROP16 蛋白对人肺腺癌 A549 细胞增殖、周期和凋亡的影响及分子机制。方法 将构建好的 I 型和 II 型 ROP16 重组慢病毒表达载体(A549-RH ROP16、A549-Me49 ROP16)感染 A549 细胞,经嘌呤筛选稳定后获得单克隆过表达细胞株。实时荧光定量 PCR 和 Western blot 法鉴定过表达效果,免疫荧光法检测其定位。CCK-8 法测定 A549 细胞的增殖活性。流式细胞术检测细胞凋亡和周期变化水平。Western blot 法检测细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Cleaved Caspases-3、Caspase9、p53 和细胞周期相关蛋白 p21、CDK6、CyclinD1 的蛋白水平。结果 Western blot 和 q-PCR 检测结果显示,重组慢病毒表达载体转染 A549 细胞 72 h 后其 ROP16 mRNA 和蛋白都有明显表达( $P < 0.05$ )。cck8 检测结果显示, I 型 ROP16 蛋白抑制 A549 细胞增殖( $P < 0.05$ )。流式细胞术检测显示,与对照组比较, I 型 ROP16 过表达组中细胞凋亡率下降 20.69%, G1 期细胞百分由原来的 63.2% 升高到 83.2%。Western blot 结果显示促细胞周期 G1/S 转化因子 CDK6、CyclinD1 蛋白表达明显降低,而细胞周期蛋白依赖激酶抑制因子 p21 表达明显升高( $P < 0.05$ );促凋亡因子 Bax、Cleaved Caspases-3、Caspase9、p53 蛋白的表达明显升高,抗凋亡因子 Bcl-2 表达受到抑制( $P < 0.05$ )。而 II 型 ROP16 过表达组与对照组无显著性差异( $P > 0.05$ )。结论 I 型 ROP16 蛋白过表达可诱导人肺腺癌 A549 细胞周期停滞和细胞凋亡。

**【关键词】** 肺腺癌; A549 细胞; ROP16 蛋白; 细胞增殖; 细胞周期; 细胞凋亡**【中图分类号】** R382.5**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1673-5234(2022)02-0180-06

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Feb;17(2):180-185.]

## Role of *Toxoplasma* type I and II ROP16 on regulating the proliferation, cycle and apoptosis of human lung adenocarcinoma A549 cells

LI Qin-hui<sup>1,2</sup>, ZENG Jin<sup>1,2</sup>, WANG Peng-tao<sup>3</sup>, YANG Ning-ai<sup>3</sup>, MA Lei<sup>1,2</sup>, LI Jia-ming<sup>3</sup>, MA Hui-hui<sup>3</sup>, ZHAO Zhi-jun<sup>3,4</sup> (1. Key Laboratory of Ministry of Education for Conservation and Utilization of Special Biological Resources in the Western, Ningxia University, Yinchuan, 750021, China; 2. College of Life Science, Ningxia University; 3. Ningxia Key Laboratory of Clinical and Pathogenic Microbiology; 4. General Hospital of Ningxia Medical University)\*\*\*

**【Abstract】** **Objective** To study the effects on the proliferation, cycle and apoptosis of human lung adenocarcinoma A549 cell line by overexpression the genes of *Toxoplasma gondii* type I and II ROP16. **Methods** A549 cell lines were transfected with the recombinant lentiviral vectors (A549-RH ROP16, A549-Me49 ROP16) and after stable screening with purine, monoclonal overexpression cell lines were obtained. The efficiency of overexpression of ROP16 was detected by real-time fluorescent quantitative PCR and Western blot, moreover, its localization was detected by immunofluorescence staining. CCK-8 assay was performed to detect the cell proliferation and flow cytometry was used to test cell apoptosis and cell cycle. The protein levels of apoptosis-related proteins including Bcl-2, Bax, Cleaved Caspases-3, Caspase9, p53 and cell cycle-related proteins including p21, CDK6, CyclinD1 were analyzed by using western blotting.

**Results** The results of Western blot and q-PCR showed that the ROP16 mRNA and protein were significantly expressed higher in A549 cells 72 h after the recombinant lentiviral expression vector was transfected ( $P < 0.05$ ). The results of cck8 test showed that type I ROP16 protein could inhibit the proliferation of A549 cells significantly ( $P < 0.05$ ). As for flow cytometry results, compared with the control group, the apoptosis rate in the type I ROP16 overexpression group decreased by 20.69%, and the percentage of cells in G1 phase increased from 63.2% to 83.2%. Western blot results

\* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 81560333), 2018 年宁夏高等学校科学研究项目(No. NXY2018-103)。\*\* **【通讯作者】** 赵志军, E-mail: z15815z@163.com**【作者简介】** 李琴惠(1995-), 女, 甘肃定西人, 在读硕士研究生, 主要从事微生物与分子生物学研究。E-mail: 2831194181@qq.com

showed that the protein expressions of pro-cell cycle G1/S transforming factors CDK6 and CyclinD1 were significantly decreased, while the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 was significantly increased ( $P < 0.05$ ); pro-apoptotic factors Bax, Cleaved Caspases-3, Caspase9 and p53 protein were significantly increased, and the expression of anti-apoptotic factor Bcl-2 was inhibited ( $P < 0.05$ ). However, there was no significant difference between the type II ROP16 overexpression group and the control group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Type I ROP16 overexpression group can induce phosphorylation of STAT3 in human lung adenocarcinoma A549 cells, which in turn induces cell cycle arrest and apoptosis.

**【Key words】** lung adenocarcinoma; A549 cells; ROP16 protein; cell proliferation; cell cycle; cell apoptosis

肺癌(Lung cancer, LC)严重威胁人类健康,该疾病导致全球每年超过百万人死亡,其发病率排名第二,死亡率排名世界第一<sup>[1]</sup>。肺腺癌(Lung Adenocarcinoma, LUAD)作为一种非小细胞肺癌,占有LC的40%,其发病率逐年增高且呈现激增趋势。其恶性程度低,发展缓慢,但是因存在微转移病灶,即使在肺部病灶较小时也经常出现转移现象<sup>[2]</sup>。而且多数患者就诊已经到达中晚期,且目前的治疗手段存在一定的局限性,患者预后欠佳,例如靶向疗法其进展期及转移性肺癌的预后5年生存率仅为15%左右。而免疫疗法因其肿瘤微环境的复杂性和多样性,仅20%~40%的患者可产生应答<sup>[3]</sup>。因此,寻找新型肺腺癌的治疗手段。

弓形虫(*Toxoplasma Gondii*)是一种重要的机会致病性细胞内寄生原虫,可入侵大多数有核细胞,对人和家畜健康造成严重危害。研究表明弓形虫可能具有抗癌的作用<sup>[4-5]</sup>。恶性肿瘤患者较健康者易感染弓形虫,用弓形虫菌株或其培养上清等相关组分处理荷瘤小鼠能明显抑制黑色素瘤、卵巢癌、胰腺癌等癌细胞的生存,在体外能诱导多种癌细胞凋亡<sup>[6]</sup>。棒状体蛋白16(rhoptryprotein16, ROP16)作为弓形虫入侵宿主细胞的重要毒力因子,在弓形虫感染时可分泌到宿主细胞核,磷酸化宿主细胞的转录活化因子STAT3/6,进而干扰宿主细胞信号通路传导。ROP16蛋白可以诱导人神经母细胞瘤SH-SY5Y发生细胞凋亡和细胞周期阻滞<sup>[7]</sup>,诱导肝癌细胞HepG2发生凋亡<sup>[8]</sup>,但ROP16蛋白对肺腺癌细胞的调控研究鲜有报道。因此,本研究拟通过弓形虫ROP16重组载体转染至肺腺癌A549细胞,研究ROP16蛋白对肺腺癌细胞A549细胞增殖、周期和凋亡的影响,并探讨其作用机制。

## 材料与方法

### 1 材料

人肺腺癌A549细胞株均由本实验室液氮罐保存;DMEM培养基购自美国Gibco公司;胎牛血清购自美国BI公司;TRIzol试剂购自天根生化科技(北京)有限公司;实时荧光定量PCR试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司;细胞周期蛋白D1抗体(Cy-

clinD1)、 $\beta$ -actin抗体和活化的半胱天冬酶-3(Cleaved-caspases-3)抗体购自美国proteintech公司;p53抗体、Bax抗体、Bcl-2抗体、p21抗体和CDK6抗体、ROP16-flag抗体、半胱氨酸蛋白酶-9(caspase-9)抗体和p-STAT3抗体购自美国Abcam公司;细胞计数试剂盒-8(cellcountingkit-8, CCK-8)购自赛文创新生物科技(北京)有限公司;引物合成由上海生工生物工程公司完成。

### 2 方法

**2.1 细胞培养与转染** 复苏A549细胞,均用含DMEM培养基(100 mL/L胎牛血清)培养。将对数期的A549细胞均以 $3.0 \times 10^5$ 个/孔的密度接种于6孔板中,37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中培养。细胞融合度达到40%~50%时,倒掉培养板中培养液并加入新鲜培养基,按照试剂盒说明书对细胞进行转染,并将细胞分为对照组(A549)、阴性转染组(A549-HBLV)、过表达组(A549-RH ROP16、A549-Me49 ROP16)。转染后每隔24 h更换新鲜的DMEM培养基,72 h后收集细胞。

**2.2 实时定量PCR检测A549细胞中ROP16 mRNA的表达情况** 将上述收集的A549细胞组、A549-HBLV细胞组、A549-RH ROP16细胞组、A549-Me49 ROP16细胞组细胞分别提取其总RNA和总蛋白。按第一链cDNA合成试剂盒说明反转录成cDNA模板,用ROP16基因特异扩增引物:Forward(5'-CG-GCTGAAGTAGGTCTCGG-3')和Reverse(5'-GGT-GAAAGCTGGGTTTGGT-3'),以 $\beta$ -actin(Forward: 5'-CACTGTGCCCATCTACGA-3'; Reverse: 5'-TGATGTCACGCACGATTT-3')作为内参进行Real-Time PCR。PCR扩增参数:95℃ 3 min;95℃ 20 s, 55℃ 20 s,72℃ 20 s,共40个循环。采集检测数据,分析各组A549细胞中ROP16 mRNA表达水平。

**2.3 Western blot法检测A549细胞中ROP16蛋白的表达情况** 将上述收集的A549细胞组、A549-HBLV组和A549-ROP16组细胞分别提取其蛋白,进行SDS-PAGE电泳,湿转至PVDF膜,并于50 g/L脱脂奶粉溶液中封闭1 h。分别加入ROP16-flag和 $\beta$ -actin一抗,4℃孵育过夜。TBST清洗10 min,3次。

加对应的辣根过氧化物酶标记的二抗, 37 °C 孵 1 h。TBST 清洗 10 min, 3 次。加化学发光试剂, 避光显影, 曝光拍照。ImageJ 软件分析 ROP16 相对于  $\beta$ -actin 的表达水平。试验重复 3 次。

**2.4 免疫荧光法检测 ROP16 蛋白在 A549 细胞中的定位情况** 将处于对数期的 A549 细胞以  $3.0 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 6 孔板中, 当细胞融合度达到 40%~50% 时, 倒掉培养板中培养液并加入新鲜培养基, 按照试剂盒说明书对细胞进行转染。培养 72 h 后, 弃去培养基, PBS 漂洗。多聚甲醛固定 20 min, TritonX-100 室温打孔 30 min, 加入牛血清白蛋白 (BSA) 封闭 1 h。加入一抗 (1:200) 4 °C 孵育过夜, 加入荧光二抗湿盒 37 °C 孵育 1 h, 滴加 DAPI 避光孵育 15 min, 指甲油封片。于激光扫描聚焦显微镜下观察, 采集图像。

**2.5 CCK-8 法检测肺腺癌 A549 细胞增殖** 将处于对数期的 A549 细胞组、A549-HBLV 组和 A549-ROP16 组细胞接种在 96 孔板中, 密度为  $3 \times 10^4$  个/孔。培养 24 h, 48 h, 72 h 后, 加入 CCK-8。37 °C 孵育 2 h 后, 酶标仪 450 nm 测吸光度 ( $A_{450}$ ) 值。

**2.6 流式细胞术检测肺腺癌 A549 细胞周期和细胞凋亡** 将处于对数期的 A549 细胞组、A549-HBLV 组和 A549-ROP16 组细胞均以  $3.0 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 6 孔板中, 培养 48 h 后, 收集细胞。加预冷的 75% 乙醇, 4 °C 固定过夜。离心, 弃上清。加适量 PBS 清洗细胞, 除去乙醇。加入 PI 和 RNaseA, 4 °C 避光孵育 30 min, 上流式细胞仪检测细胞周期; 利用 AnnexinV-PE/7-AAD 试剂盒, 将结合缓冲液和细胞充分混合, 重悬细胞。完成后置入 AnnexinV-PE 和 7-AAD, 反应时间均为 10 min, 然后使用流式细胞仪察看细胞凋亡情况。

**2.7 Western blot 法检测肺腺癌 A549 细胞中 p-STAT3、细胞凋亡和细胞周期相关蛋白表达水平** 将处于对数期的 A549 细胞组、A549-HBLV 组和 A549-ROP16 组细胞均以  $3.0 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 6 孔板中, 每组设置 3 个复孔。培养 48 h 后, 收集细胞, 提取其总蛋白。SDS-PAGE 电泳, 湿转至 PVDF 膜, 并于脱脂奶粉溶液中封闭 1 h。分别加入 p-STAT3、Cleaved Caspases-3、Bcl-2、Bax、Caspase9、p53、p21、CDK6、CyclinD1 和  $\beta$ -actin 一抗, 4 °C 孵育过夜, TBST 清洗 10 min, 3 次。加对应的辣根过氧化物酶标记的二抗, 37 °C 孵育 1 h, TBST 清洗 10 min, 3 次。加化学发光试剂, 避光显影, 曝光拍照。ImageJ 软件分析相关蛋白相对于  $\beta$ -actin 的表达水平。

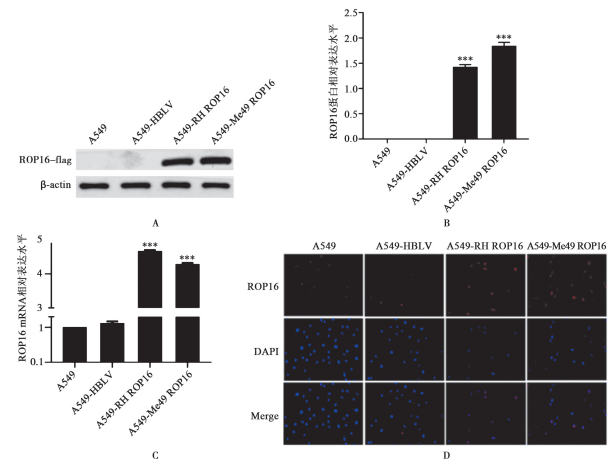
**2.8 统计学分析** 数据使用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 采用单因素方差分析进行多组数据间比较, 采

用 SNK-q 检验进行组间两两比较,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结果

### 1 A549 细胞中 ROP16 的表达及鉴定

实时荧光定量 PCR 检测结果显示, 与未转染组和阴性对照组相比, 在过表达组中, ROP16 蛋白 ( $F = 1339, P < 0.001$ ) 和 mRNA ( $F = 483.5, P < 0.001$ ) 均有明显表达 (图 1A, B, C), 这表明 ROP16 蛋白在 A549 细胞中成功表达。此外, 免疫荧光结果显示, 在转染 72 h 后, ROP16 蛋白几乎都在细胞核内表达 (图 1D)。这些结果表明, ROP16 蛋白已经在 A549 细胞中稳定表达。



A Western blot 检测 ROP16 蛋白在 A549 中的表达情况 B A549 细胞中 ROP16 细胞水平的定量分析 C q-PCR 检测 ROP16 在 A549 中的 mRNA 表达情况 D 免疫荧光检测 ROP16 在 A549 细胞中的定位情况 (荧光显微镜, 400 $\times$ )。\*\*\*  $P < 0.001$ 。

图 1 ROP16 mRNA 及蛋白在 A549 细胞中的表达情况

A The expression of ROP16 protein in A549 was detected by WB B Quantitative analysis of ROP16 cell level in A549 cells C THE mRNA expression of ROP16 in A549 was detected by Q-PCR D The localization of ROP16 in A549 cells was detected by immunofluorescence (fluorescence microscope, 400 $\times$ ).

Fig. 1 Expression of ROP16 mRNA and protein in A549 cells

### 2 ROP16 蛋白对 A549 细胞增殖的影响

CCK-8 检测结果显示 (表 1), 与未转染组和阴性对照组相比, 转染 I 型 ROP16 蛋白 24 h 可以显著抑制 A549 细胞增殖, 细胞活性降低 20%, 转染 48 h 和 72 h 时对 A549 细胞增殖的抑制效果显著, 分别降低 37% 和 55% ( $F = 157.2, P < 0.05$ ), 而 II 型 ROP16 蛋白对 A549 细胞增殖无明显影响 ( $P > 0.05$ )。

### 3 ROP16 蛋白对 A549 细胞周期的影响

流式检测结果显示 (图 2A 和 B), 培养 48 h 后, 与未转染组相比, 在 I 型过表达组中, G1 期百分比由原来的 63.21% 上升到 81.18%, 而 S 期和 G2 期所占比例下降 ( $F = 96.72, P < 0.05$ ), 而 II 型过表达组与未转染组无明显差别 ( $P > 0.05$ )。western blot 分析

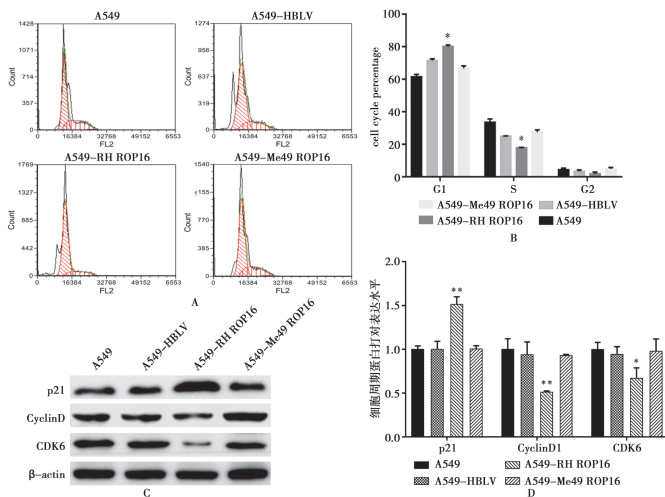


A549 细胞 G1 期相关蛋白的表达情况结果显示(图 2C 和 D),与未转染组和阴性对照组相比,在 I 型过表达组中,细胞周期抑制蛋白 p21 的表达明显上调,而 G1/S 周期相关蛋白 CDK6 和 CyclinD1 蛋白的表达明显下调( $F=19.44, P<0.05$ ),而 II 型过表达组与未转染组相比无明显差异( $P>0.05$ )。这表明 I 型 ROP16 蛋白调控 A549 细胞周期蛋白的表达,并使其停止在 G1 期,而 II 型 ROP16 蛋白对 A549 细胞周期无明显影响。

表 1 细胞增殖统计图  
Table 1 Cell proliferation statistics

组别 Group	细胞增殖(OD value) Cell proliferation			F 值 F value	P 值 P value
	24h(%)	48h(%)	72h(%)		
A549	1.000±0.001	1.000±0.012	0.974±0.085		
A549-HBLV	0.937±0.015	0.935±0.013	0.994±0.083		
A549-RH ROP16	0.809±0.040 *	0.632±0.049 **	0.454±0.153 **	157.2	<0.05
A549-Me49 ROP16	0.916±0.030	0.917±0.005	0.860±0.072		

注:与空白组和阴性对照组相比, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$   
Note: Compared with the blank group and the negative control group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$



A 流式分析 ROP16 过表达后对 A549 细胞周期影响情况 B A549 细胞周期蛋白流式结果分析 C WB 检测 ROP16 过表达后对 A549 细胞中 G1 期相关蛋白 p21, CDK6 和 CyclinD1 蛋白的表达情况 D A549 细胞周期蛋白的细胞水平的定量分析。与空白组和阴性对照组相比, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

图 2 流式细胞术和 western blot 检测 ROP16 蛋白对 A549 细胞周期的影响

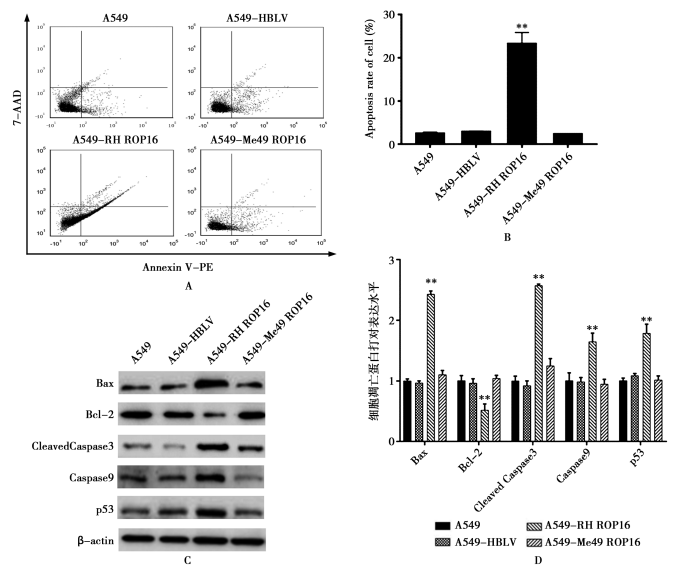
A Flow cytometry analysis of the influence of ROP16 overexpression on A549 cell cycle B WB was used to detect the expression of G1-related proteins P21, CDK6 and CyclinD1 in A549 cells after overexpression of ROP16 C quantitative analysis of A549 cell cyclin at the cellular level. Compared with the blank group and the negative control group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

Fig. 2 Effect of ROP16 protein on A549 cell cycle detected by flow cytometry and Western blot

#### 4 ROP16 蛋白对 A549 细胞凋亡的影响

流式检测结果显示(图 3A 和 B),在培养 48 h 后,

与未转染组和阴性对照组相比,在 I 型过表达组中,细胞凋亡明显增加( $F=196.4, P<0.01$ ),细胞凋亡率由原来的 2.62% 上升到 23.31%。western blot 检测结果显示(图 3C 和 D),与未转染组和阴性对照组相比,在 I 型过表达组中,促凋亡蛋白 Bax 的表达明显上调,而抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达明显下调( $F=63.97, P<0.01$ ),而 II 型过表达组与未转染组无明显差别( $P>0.05$ ),表明 I 型 ROP16 蛋白可以促进 A549 细胞发生凋亡,II 型 ROP16 蛋白无明显促进作用。而且,进一步结果表明,与未转染组和阴性对照组相比,在 I 型过表达组中, p53, Caspase9 和 Cleaved Caspase3 蛋白的表达明显上调( $F=63.97, P<0.01$ ),表明 I 型 ROP16 蛋白可能是通过线粒体途径诱导 A549 细胞发生凋亡。



A 流式分析 ROP16 过表达后对 A549 细胞凋亡影响情况 B A549 细胞周期蛋白流式结果分析 C WB 检测 ROP16 过表达后对 A549 细胞中凋亡相关蛋白 Bcl-2, Bax, Cleaved Caspases-3, Caspase-9, p53 蛋白的表达情况 D A549 细胞凋亡蛋白的细胞水平的定量分析。与空白组和阴性对照组相比, \*\* $P<0.01$ 。

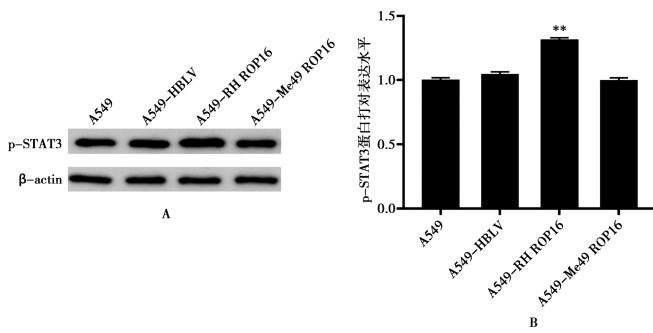
图 3 流式细胞术和 western blot 检测 ROP16 蛋白对 A549 细胞凋亡的影响

A Flow cytometry analysis of the influence of ROP16 overexpression on apoptosis of A549 cells B WB was used to detect the expression of apoptosis-related proteins Bcl-2, Bax, Cleaved Caspases-3, Caspase-9, and p53 in A549 cells after ROP16 overexpression C Cell level quantitative analysis of apoptotic proteins in A549 cells. Compared with the blank group and the negative control group, \*\* $P<0.01$

Fig. 3 Effects of ROP16 protein on apoptosis of A549 cells detected by flow cytometry and Western blot

#### 5 ROP16 对 A549 细胞 STAT3 蛋白的激活作用

培养 48 h 后 western blot 结果显示(图 4A 和 B),与未转染组和阴性对照组相比,在 I 型过表达组中, p-STAT3 的表达显著上调( $F=150.1, P<0.01$ ),而 II 型过表达组与未转染组无显著差别( $P>0.05$ ),表明 I 型 ROP16 蛋白可诱导 STAT3 发生磷酸化进而激活 STAT3,而 II 型 ROP16 蛋白则无此作用。



A Western blot 检测 ROP16 过表达后 A549 中 p-STAT3 蛋白的表达情况 B A549 细胞中 p-STAT3 细胞水平的定量分析。与空白组和阴性对照组相比, \* \*  $P < 0.01$ 。

图 4 Western blot 检测 ROP16 过表达后 A549 中 p-STAT3 蛋白的表达情况

A Western blot detects the expression of p-STAT3 protein in A549 after ROP16 overexpression B Quantitative analysis of p-STAT3 cell level in A549 cells. Compared with the blank group and the negative control group, \* \*  $P < 0.01$

Fig. 4 WB detection of p-STAT3 protein expression in A549 after ROP16 overexpression

## 讨论

肺癌是目前全球发病率及死亡率最高的恶性肿瘤,国际癌症研究机构在 2020 年发布的统计数据中显示全球约有 221 万 (11.4%) 新发肺癌患者,且约有 180 万患者 (18%) 死于该疾病<sup>[1]</sup>。其中肺腺癌 (LU-AD) 为常见的病理类型之一,其发病率及死亡率呈逐渐上升趋势。目前常规治疗肺癌的方式有为手术切除、放射治疗、化学治疗等,而这几种疗法并非对所有肺癌患者都适宜,例如手术治疗只有 20%~30% 的患者可以接受,化学治疗其临床副作用较大,患者生存质量较差,放射治疗对于远处转移的肿瘤效果欠佳,副作用同样较大。目前大多数肺癌患者诊断时就已为中晚期肺癌,大部分无手术机会,治疗难度大,效果较差。靶向治疗、免疫治疗是近十余年发展迅速,具有高度精确、高度适形、副作用少的优点。对于敏感基因突变的患者,靶向疗法已成为其标准治疗方案,如 EGFR 因突变的患者,已有吉非替尼、厄洛替尼等靶向药物用于患者治疗中<sup>[9]</sup>。但由于靶点的针对性、耐药基因的出现,肿瘤的异质性等原因,靶向治疗仍要进一步的研究。免疫治疗是继化疗、放疗、手术等传统治疗和分子靶向治疗备受关注。免疫治疗可以提高机体免疫系统对肿瘤细胞的敏感性,进而特异性杀伤肿瘤细胞。如程序性死亡受体 1 (PD-1)/程序性死亡配体 (PD-L1) 抑制剂等免疫检查点抑制剂在癌症的免疫治疗中具有不错的前景,其临床疗效与肿瘤突变负荷呈正相关关系<sup>[10]</sup>。但超免疫反应、假性进展以及肿瘤微环境的复杂性和多样性等问题使得免疫治疗需要进一步的研究。因此,寻找新的治疗靶点已成为对抗肺癌的一个

日益严峻的挑战。

ROP16 蛋白作为一个弓形虫入侵并增殖的重要毒力因子,当弓形虫侵入宿主有核细胞时,ROP16 蛋白被分泌且释放到胞质溶胶中,并通过核易位序列迅速转移到宿主细胞核内发挥作用<sup>[11]</sup>。研究发现,ROP16 蛋白序列存在丝氨酸/苏氨酸激酶区域,可发挥激酶活性,参与调节宿主细胞内 STAT3 和 STAT6 的活化过程,能诱导其发生磷酸化<sup>[12]</sup>,但不同菌株间存在差异,如 II 型弓形虫菌株入侵宿主细胞几乎没有任何 STAT3/6 磷酸化,而 I 型菌株则可引起强烈的磷酸化。Yamamoto 等<sup>[13]</sup>针对 ROP16 在宿主细胞内的磷酸化作用进行了相关研究,发现 II 型菌株因 ROP16 蛋白激酶第 503 位氨基酸因不存在关键亮氨酸残基从而不能持续激活 STAT3。本研究 Western blot 试验结果发现, I 型 ROP16 过表达组其 STAT3 磷酸化水平明显身高,而 II 型 ROP16 过表达组无明显 STAT3 磷酸化水平无明显变化。ROP16 蛋白可以诱导人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞 Bax、Bcl-2、p21 和 CDKs 的表达水平发生变化,进而诱导细胞发生细胞周期阻滞和部分细胞凋亡<sup>[7]</sup>。Marcela 等<sup>[14]</sup>研究发现弓形虫 ROP16 蛋白可通过表观遗传途径使宿主细胞周期蛋白 B1 基因启动子沉默进而导致细胞周期停滞。刁玉洁等<sup>[8]</sup>报道弓形虫 ROP16 蛋白可诱导肝癌细胞 HepG2 发生凋亡,与本试验研究结果一致。

信号传导与转录激活因子 3 (STAT3) 主要作为一个肿瘤促进因子参与肿瘤发生发展,包括调节下游肿瘤相关基因表达促进癌细胞增殖、抑制凋亡,通过表观机制 (例如 DNA 甲基化、染色体修饰) 调控基因表达,通过调控线粒体功能影响癌症进程<sup>[15]</sup>。在多样性胶质母细胞瘤 (GBM)<sup>[16]</sup> 中,STAT3 可以充当肿瘤抑制因子,在前列腺<sup>[17]</sup> 中 STAT3 的肿瘤起抑制作用,其中 STAT3 诱导 p19ARF 的表达,激活 p53 并抑制核糖体生物发生,诱导细胞衰老和凋亡,STAT3 的缺失破坏 STAT3-ARF-p53 轴促使肿瘤进展<sup>[18]</sup>。STAT3 和其他 STAT 也可以诱导 p21,导致细胞周期停滞或细胞衰老<sup>[19]</sup>。在肺、结肠、甲状腺、肝、皮肤、颈部、鼻咽、直肠、唾液腺和乳腺癌中 STAT3 作为肿瘤抑制因子<sup>[20]</sup>,Beatrice 等<sup>[21]</sup>报道 STAT3 信号的中断促进了肺肿瘤的发生发展。本研究在 I 型 ROP16 过表达组 p53 和 p21 的表达明显上调,与 Hafner 等<sup>[22]</sup>报道转录因子 p53 通过调节 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达进而激活线粒体凋亡途径,诱导 Cleaved Caspases-3、Caspase9 蛋白表达从而诱导细胞凋亡的研究结果一致。而在细胞周期调控中,p21 作为一种细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂,起着负调控的作用,p21 的高表达可导致细胞周期在 G1 期停滞<sup>[23]</sup>。

综上所述, I型 ROP16 过表达能够通过促进 STAT3 磷酸化, 进而调控肺腺癌细胞 A549 细胞凋亡, 抑制 A549 的增殖并导致其 G1 期细胞阻滞。这为 I型 ROP16 蛋白可能成为肺腺癌治疗的潜在靶向分子提供了理论基础。

#### 【参考文献】

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, 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): 209-249.
- [2] 王斌, 张雨洁. 肺腺癌的治疗现状[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(45): 113-115.
- [3] 殷悦, 张羽白, 邢丽娜. 肿瘤突变负荷对非小细胞肺癌免疫治疗疗效的预测价值[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2018, 17(9): 717-720.
- [4] Baird JR, Byrne KT, Lizotte PH, et al. Immune-mediated regression of established B16f10 melanoma by intratumoral injection of attenuated *Toxoplasma gondii* protects against rechallenge[J]. J Immunol, 2013, 190(1): 469-478.
- [5] Baird JR, Fox BA, Sanders KL, et al. Avirulent *Toxoplasma gondii* generates therapeutic antitumor immunity by reversing immunosuppression in the ovarian cancer microenvironment[J]. Cancer Res, 2013, 73(13): 3842-3851.
- [6] 张富强, 乔姣姣, 李浩然, 等. 刚地弓形虫抗肿瘤作用及其机制研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2020, 38(04): 496-501, 507.
- [7] Chang S, Shan X, Li X, et al. *Toxoplasma gondii* rhoptry protein Rop16 mediates partially sh-sy5y cells apoptosis and cell cycle arrest by directing ser15/37 phosphorylation of P53[J]. Int J Biol Sci, 2015, 11(10): 1215-1225.
- [8] 刁玉洁, 昌庆琛, 刘珍, 等. 弓形虫 rop16 蛋白诱导肝癌细胞凋亡的检测[J]. 肝胆外科杂志, 2016, 24(6): 466-468.
- [9] Hirsch FR, Scagliotti V, Mulshine JL, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments [J]. Lancet, 2017, 389(10066): 299-311.
- [10] Hellmann MD, Callahan MK, Awad MM, et al. Tumor mutational burden and efficacy of nivolumab monotherapy and in combination with ipilimumab in small-cell lung cancer[J]. Cancer Cell, 2019, 35(2): 329.
- [11] Denkers EY, Bzik DJ, Fox BA, et al. An inside Job: Hacking into Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Signaling Cascades by the Intracellular Protozoan *Toxoplasma Gondii*[J]. Infect Immun, 2012, 80(2): 476-482.
- [12] Chen L, Christian DA, Kochanowsky JA, et al. The *Toxoplasma gondii* virulence factor Rop16 acts in cis and trans, and suppresses T cell responses[J]. J Exp Med, 2020, 217(3): e20181757.
- [13] Yamamoto M, Standley DM, Takashima S, et al. A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase Rop16 determines the direct and strain-specific activation of stat3[J]. J Exp Med, 2009, 206(12): 2747-2760.
- [14] Sabou M, Doderer-Lang C, Leyer C, et al. *Toxoplasma gondii* Rop16 kinase silences the cyclin B1 gene promoter by hijacking host cell Uhrf1-dependent epigenetic pathways[J]. Cell Mol Life Sci, 2020, 77(11): 2141-2156.
- [15] Zou S, Tong Q, Liu B, et al. Targeting stat3 in cancer immunotherapy[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 145.
- [16] Iglesia ND, Konopka G, Puram SV, et al. Identification of a pten-regulated stat3 brain tumor suppressor pathway[J]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2008, 22(4): 449-462.
- [17] Pencik J, Schleder M, Gruber W, et al. Stat3 regulated ARF expression suppresses prostate cancer metastasis [J]. Nature Communications, 2015, 6(1): 7736.
- [18] Jan P, Robert W, Martin S, et al. Il-6/Stat3/Arf: The guardians of senescence, cancer progression and metastasis in prostate cancer[J]. Swiss Med weekly, 2015: 145.
- [19] Santarelli R, Carillo V, Romeo MA, et al. Stat3 phosphorylation affects P53/P21 axis and kshv lytic cycle activation[J]. Virology, 2019: 528.
- [20] Sebastian I, Heidi AN, Gerardo F. Stat3 and Stat5 Activation in Solid Cancers[J]. Cancers, 2019, 11(10): 1428.
- [21] Grabner B, Schramek D, Mueller KM, et al. Disruption of stat3 signalling promotes kras-induced lung tumorigenesis [J]. Nat Commun, 2015(6): 6285.
- [22] Hafner A, Bulyk ML, Jambhekar A, et al. The multiple mechanisms that regulate P53 activity and cell fate[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(4): 199-210.
- [23] Liu W, Liu X, Pan Z, et al. Ailanthone induces cell cycle arrest and apoptosis in melanoma B16 and A375 cells[J]. Biomolecules, 2019, 9(7): 275.

【收稿日期】 2021-10-21 【修回日期】 2022-01-03