

I-131 联合 PD-1 中和抗体或 LY294002 显著调节甲状腺癌免疫微环境并增强免疫细胞活化

陈卓, 杨国栋, 罗高潮*

(长江大学附属黄冈中心医院, 湖北 黄冈 438000)

【摘要】目的 旨在评估放射性碘-131 (I-131) 联合 PD-1 中和抗体或 PI3K 抑制剂 LY294002 对甲状腺癌的治疗效果及对免疫微环境的影响, 特别是其对肿瘤抗原释放、免疫检查点调控及免疫细胞活化的作用。**方法** BCPAP 细胞和 TPC1 细胞分为对照组、I-131 单独处理组、I-131 联合 PD-1 中和抗体处理组及 I-131 联合 PI3K 抑制剂 LY294002 处理组。CCK8 法检测细胞增殖, Transwell 检测细胞迁移与侵袭, ELISA 法检测细胞培养上清液中的肿瘤抗原 (CEA、TG) 水平, qRT-PCR 和 Western blotting 检测免疫相关分子 (如 PD-L1、MHC-I、FoxP3、 γ H2AX、p-STAT1、STAT1、HLA-ABC) 的表达。在免疫细胞共培养实验中, 将 I-131 处理后的甲状腺癌细胞与健康志愿者外周血单个核细胞共培养, 检测免疫细胞活化情况, 并通过 ELISA 法检测 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 和 IL-10 等细胞因子的变化。此外, 利用 TCGA 数据库进一步分析 *PDCD1* (*PD-1*) 和 *CD274* (*PD-L1*) 在甲状腺癌组织中的表达及分期差异。**结果** I-131 处理显著降低 BCPAP 和 TPC1 细胞的增殖、迁移和侵袭, 以及细胞中肿瘤抗原 CEA 和 TG 的释放; 联合 PD-1 中和抗体或 LY294002 处理进一步减少肿瘤抗原的释放, 表现出明显的协同效应。在免疫相关分子表达方面, I-131 处理显著下调 PD-L1 的表达, 同时上调 HLA-A、HLA-B、HLA-C 和 MHC-I 的表达, 联合 PD-1 中和抗体或 LY294002 可进一步增强这种调节作用。Western blotting 结果显示, γ H2AX、p-STAT1 和 HLA-ABC 在 I-131 处理后下降, 而 STAT1 总量基本不变。免疫细胞共培养实验中, I-131 处理可显著增加 IFN- γ 浓度, 且联合治疗显著提高 IFN- γ 水平。同时 IL-2 和 TNF- α 水平均显著上升, IL-10 下降, 进一步提示免疫活化的增强。此外, PD-1/PD-L1/FoxP3 表达变化进一步证实 I-131 可增强免疫反应; TCGA 数据库分析显示, *PDCD1* 在正常组织表达水平高于肿瘤组织, 且随分期递减。**结论** I-131 抑制 BCPAP 和 TPC1 细胞增殖、迁移、侵袭、免疫检查点分子表达, 上调抗原呈递分子, 并伴随 γ H2AX、p-STAT1 表达下调, 细胞因子浓度发生变化。联合免疫治疗 (PD-1 中和抗体/LY294002) 则可进一步提升免疫增强效果。因此, 该联合免疫治疗方式可能是甲状腺癌的新的治疗方法之一。

【关键词】 碘-131; 甲状腺癌; PD-1; LY294002; 免疫微环境

中图分类号: R730.5

文献标识码: A

文章编号: 2096-8965 (2025) 04-0067-10

I-131 combined with PD-1 neutralizing antibody or LY294002 significantly modulates immune microenvironment of thyroid cancer and enhances immune cell activation

Chen Zhuo, Yang Guodong, Luo Gaochao*

(Huanggang Central Hospital of Yangtze University, Huanggang 438000, Hubei, China)

【 Abstract 】 Objective This study aims to evaluate the therapeutic efficacy of radioactive iodine-131 (I-131) combined with PD-1 neutralizing antibody or PI3K inhibitor LY294002 in the treatment of thyroid cancer, as well

收稿日期: 2025-04-09; 修回日期: 2025-09-24

基金项目: 湖北省自然科学基金联合基金项目 (JCZRLH202500859)

通信作者: 罗高潮 (1980-), 男, 湖北大冶人, 副主任医师, 主要从事甲状腺相关疾病研究, E-mail: 27636186@qq.com

as its impact on the immune microenvironment, especially its effects on tumor antigen release, immune checkpoint regulation and immune cell activation. **Methods** BCPAP and TPC1 cells were divided into a control group, a group treated with I-131 alone, a group treated with I-131 combined with a PD-1 neutralizing antibody, and a group treated with I-131 combined with PI3K inhibitor LY294002. CCK8 was used to detect cell proliferation, Transwell assay was employed to assess cell migration and invasion, ELISA kits were applied to monitor tumor antigen (CEA, TG) levels in the cell culture supernatant, qRT-PCR and Western blotting were used to analyze the expression of immune-related molecules (e.g., PD-L1, MHC-I, FoxP3, γ H2AX, p-STAT1, STAT1, HLA-ABC). In the immune cell co-culture experiment, I-131-treated thyroid cancer cells were co-cultured with PBMCs from healthy volunteers to detect immune cell activation, and ELISA was performed to measure cytokines including IFN- γ , IL-2, TNF- α , and IL-10. In addition, TCGA database was utilized to further analyze the protein expression of *PDCDI*(PD-I) and *CD274*(PD-LI) in thyroid cancer tissues across different stages. **Results** I-131 treatment significantly reduced the proliferation, migration, and invasion of BCPAP and TPC1 cells, as well as the release of tumor antigens CEA and TG. Combination treatment with PD-1-neutralizing antibody or LY294002 further reduced the release of tumor antigens, demonstrating an obvious synergistic effect. Regarding the expression of immune-related molecules, I-131 treatment significantly downregulated PD-L1 expression while significantly upregulating the expression of HLA-A, HLA-B, HLA-C, and MHC-I. Combination treatment with a PD-1-neutralizing antibody or LY294002 could further enhance this regulatory effect. Western blotting results showed that γ H2AX, p-STAT1, and HLA-ABC were decreased after I-131 treatment, while total STAT1 remained largely unchanged. I-131 treatment significantly increased IFN- γ concentrations in immune cell co-culture experiments, and combination treatment significantly increased IFN- γ levels. Meanwhile, IL-2 and TNF- α levels were significantly elevated, whereas IL-10 was decreased, indicating enhanced immune activation. In addition, changes in the expression of PD-1/PD-L1/FoxP3 further confirmed that I-131 enhanced the immune response. TCGA database analysis showed that the expression level of *PDCDI* in normal tissues was higher than that in tumor tissues, and decreased with advancing stage. **Conclusion** I-131 inhibits the proliferation, migration, invasion of BCPAP and TPC1 cells, suppresses the expression of immune checkpoint molecules, and upregulates antigen-presenting molecules, accompanied by downregulation of γ H2AX and p-STAT1 expression, and changes in cytokine concentrations. Combined immunotherapy (PD-1 neutralizing antibody/LY294002) can further improve the immune enhancement effect. Therefore, this combined immunotherapy modality may be one of the new treatment methods for thyroid cancer.

[Keywords] I-131; Thyroid cancer; PD-1; LY294002; Immune microenvironment

放射性碘-131 (I-131) 是分化型甲状腺癌 (Differentiated Thyroid Carcinoma, DTC) 的常用标准治疗方法, 常用于清除手术后的残留癌变组织或者处理出现复发的癌症^[1-2]。虽然 I-131 治疗对于大多数患者都有很好的效果, 但也可能因为患者体内肿瘤微环境的不同而存在个体差异^[3]。除直接起杀伤作用外, 研究也认为 I-131 可通过调节肿瘤免疫微环境等作用来发挥更广泛的效应^[4]。近年研究发现, 放射性碘可激活肿瘤抗原, 上调 PD-L1 分子表达水平, 释放免疫刺激信号, 促进免疫系统识别、杀伤肿瘤^[5]。放射性碘也可引起 DNA 损伤修复机制活化 (如 γ H2AX 磷酸化), 激活 JAK/STAT 通路 (如 STAT1 信号磷酸化), 参与免疫相关分子的改变, 调节免疫应答^[6-8]。

尽管 I-131 可能在免疫微环境中起作用, 但是

对于将 I-131 与免疫检查点抑制剂联用后, 肿瘤抗原和免疫调节分子是否会上调, 抑或是下调尚缺乏系统研究。而保持免疫相关细胞因子的平衡 (如 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 和 IL-10) 可有效发挥抗肿瘤免疫效应^[9-10]。但 I-131 在此方面的作用机制还不明确。基于此, 本研究以体外细胞实验入手, 探讨 I-131 与 PD-1 中和抗体或者 PI3K 抑制剂 LY294002 联合治疗对于肿瘤抗原 (CEA, TG) 释放、免疫检查点分子 (PD-L1) 和抗原呈递分子 (MHC-I) 的影响。本研究也运用癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库分析 *PDCDI* (PD-I) 和 *CD274* (PD-LI) 在甲状腺癌组织中的表达特征和分期差异。因此, 本研究或可为未来临床中 I-131+免疫治疗联合应用的治疗方式提供一定理论依据和可行方案。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

DTC 细胞系 BCPAP (北纳生物, BNCC358025), 人乳头状甲状腺癌细胞系 TPC1 (北纳生物, BNCC337912), 外周血单个核细胞 (Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC) (雅裕生物, CAPB01221004), RPMI-1640 培养基 (Invitrogen, 12633020), 胎牛血清 (Invitrogen, A5669701), CCK8 试剂盒 (诺唯赞, A311-01), Matrigel 胶 (康宁, 354234), 癌胚抗原 (CEA) ELISA 试剂盒 (Abcam, ab108667), 甲状腺球蛋白 (TG) ELISA 试剂盒 (Abcam, ab213613), 干扰素- γ (IFN- γ) ELISA 试剂盒 (Abcam, ab100540), TRIzol (Thermo, 15596026), SYBR Green qPCR 试剂盒 (TaKaRa, RR820A), BCA 试剂盒 (Beyotime, P0012S), ECL 显色试剂 (Thermo, 34577), PD-L1/CD274 抗体 (Proteintech, 66248-1-Ig), HLA Class I ABC 抗体 (Proteintech, 15240-1-AP), GAPDH 抗体 (Proteintech, 10494-1-AP), γ H2AX 抗体 (Proteintech, 83307-2-RR), Phospho-STAT1 抗体 (Proteintech, 82674-10-RR), STAT1 抗体 (Proteintech, 10144-2-AP), Goat Anti-Rabbit IgG 抗体 (Proteintech, SA00001-2), Goat Anti-Mouse IgG 抗体 (Proteintech, SA00001-1)。qRT-PCR 引物由上海生工生物公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

BCPAP 和 TPC1 细胞在 RPMI-1640 培养基中添加 10% 胎牛血清, 于 37°C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。

1.2.2 细胞分组

将细胞分为 4 组进行实验: 对照组 (Control 组)、I-131 处理组 (I-131 组)、联合处理组 (I-131+PD-1 抗体组) 和信号通路验证组 (I-131+LY294002 组)。具体分组如下: 对照组不做任何处理; I-131 处理组用 10 μ Ci/mL I-131 处理细胞 24 h; 联合处理组用 I-131 与 10 μ g/mL PD-1 中和抗体共同处理细胞^[11-12]; 信号通路验证组则使用 I-131 与 20 μ mol/L PI3K 抑制剂 LY294002 共同处理细胞^[13]。

1.2.3 免疫细胞共培养

将 I-131 处理后的 BCPAP 和 TPC1 细胞与健康志愿者的 PBMC 共培养。首先, 分离外周血中的 PBMC, 并将细胞浓度调整至 1 $\times$ 10⁶/mL。然后, 将 PBMC 与 I-131 处理后的 BCPAP 和 TPC1 细胞按 1:1 的比例接种到含 10% 胎牛血清 RPMI-1640 培

养基的 24 孔板里。I-131 以 10 μ Ci/mL 的浓度处理甲状腺癌细胞 24 h, 处理结束后用 PBS 清洗细胞 3 次, 以去除未吸收的 I-131。将细胞置于 37°C、5% CO₂ 的培养环境中, 共培养 48 h, 模拟肿瘤微环境中的免疫反应。共培养结束后, 收集细胞培养上清液和细胞, 用于后续分析。

1.2.4 CCK8 检测

参照 1.2.2 细胞分组的方法将 BCPAP 和 TPC1 细胞分为四组。细胞的接种密度为 8 $\times$ 10³/mL。处理 24 h 后用 PBS 清洗细胞 1 次, 去除药物。每孔加入 10% 的 CCK8 试剂, 将细胞置于 37°C、5% CO₂ 的培养环境中继续培养 1.5 h。在酶标板中于 450 nm 波长处检测光密度值。

1.2.5 Transwell 检测

Matrigel 胶在冰上解冻, 用预冷无血清培养基按 1:8 稀释并均匀铺于 Transwell 上室膜表面。37°C 孵育 30 min 使胶凝固。取 100 μ L (1 $\times$ 10⁵ 细胞) 的无血清培养基细胞接种至上室, 600 μ L 的含 10% 胎牛血清培养基于下室。将细胞置于 37°C、5% CO₂ 的培养环境中, 培养 24 h。取出小室置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 30 min, 0.1% 结晶紫染色 20 min。用棉签轻擦上室未迁移细胞, PBS 冲洗残留染料。显微镜下观察穿过的细胞。迁移实验与侵袭实验类似, 但省略基质胶铺板步骤, 直接接种细胞至未包被的 Transwell 小室, 于 37°C、5% CO₂ 的培养环境中, 培养 36 h。

1.2.6 ELISA 检测

细胞培养上清液中 CEA、TG 及 PBMC 分泌的 IFN- γ 水平采用 ELISA 法检测。各组细胞培养上清液及 PBMC 分泌液经过离心后, 使用 ELISA 试剂盒按照标准操作流程分析, 测定 CEA、TG 和 IFN- γ 的浓度。

1.2.7 qRT-PCR 检测

使用 TRIzol 试剂提取各实验组细胞的总 RNA, 并测定其浓度和纯度。之后采用逆转录试剂将 RNA 逆转录为 cDNA, 作为后续 qRT-PCR 扩增的模板。扩增反应使用 SYBR Green qPCR 试剂盒, 检测 *PD-L1*、*MHC-I* (*HLA-A*、*HLA-B*、*HLA-C*)、*PD-1*、*GAPDH* 和 *FoxP3* 等免疫相关基因的 mRNA 表达水平。引物信息见表 1。

1.2.8 Western blotting 检测

使用 RIPA 裂解液提取各实验组细胞的总蛋白, 按照试剂说明书进行裂解和离心。经过 BCA 法进行蛋白浓度的定量后, 样品被加载到 SDS-PAGE 凝胶中进行分离, 并转移至聚偏氟乙烯膜上。使用

表 1 qRT-PCR 扩增引物序列

Table 1 qRT-PCR amplification primer sequences

基因	基因ID	产物长度 (bp)	正向引物序列 (5' →3')	反向引物序列 (5' →3')
<i>PD-L1</i>	29126	121	CATTTGCTGAACGCCCCATAC	TCCAGATGACTTCGGCCTTG
<i>HLA-A</i>	3105	168	TCACAGACTGACCGAGCGAA	CAGGGCGATGTAATCCTTGC
<i>HLA-B</i>	3106	138	CCAGTTCGTGAGGTTCGACA	CTCTCTCGGTCAGTCTGTGC
<i>HLA-C</i>	3107	198	TACATCGCCCTGAACGAGGA	GTGTGTCTTTGGGGGTTCTG
<i>GAPDH</i>	2597	132	CAAATTCCATGGCACC GTCA	GACTCCACGACGTACTCAGC
<i>PD-1</i>	5133	114	CAGTTCCAAACCCTGGTGGT	GGCTCCTATTGTCCCTCGTG
<i>FoxP3</i>	50943	123	GCTGCAGCTCTCAACGGT	TTGAGGGAGAAGACCCAGT

5%牛血清白蛋白进行膜的封闭, 封闭时间为 1 h。随后, 将膜分别孵育于稀释的PD-L1、MHC-I和内参 GAPDH 抗体溶液中, 4℃下过夜。第 2 天, 用 TBST 洗涤膜 3 次, 接着加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 在室温下孵育 1 h。最后, 用 ECL 显色试剂进行显影。

1.2.9 临床数据库分析

利用 TCGA - 甲状腺癌 (Thyroid Cancer, THCA) 数据库 (UALCAN 平台) 对 *PDCDI* 和 *CD274* 的 mRNA 表达水平进行分析, 包含正常组织与肿瘤组织的比较, 以及不同病理分期 (Stage I ~IV) 的差异。统计学方法采用 Wilcoxon 秩和检验和 Kruskal - Wallis H 检验。

1.2.10 统计分析

所有实验都独立重复 3 次。数据以均值±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间差异通过方差分析进行评估, 采用 Tukey 方法进行后续多重比较, 统计显著性设定为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 I-131 联合 PD-1 中和抗体或 LY294002 显著抑制 BCPAP 和 TPC1 细胞的增殖、迁移和侵袭

CCK8 结果显示, I-131 处理可明显抑制 BCPAP 和 TPC1 细胞的增殖活性。与单独 I-131 处理相比, I-131 联合 PD-1 中和抗体或 LY294002 可进一步降低细胞增殖水平, 其中 I-131+LY294002 组抑制作用最为显著; 单独的 PD-1 中和抗体或 LY294002 处理对 BCPAP 与 TPC1 的增殖无明显影响, 表明 PD-1 中和抗体或 LY294002 单独处理对细胞的影响较小 (见图 1A ~ B)。此外, 本研究旨在评估 I-131 联合 PD-1 中和抗体或 PI3K 抑制剂 LY294002 对甲状腺癌的治疗效果, 所以后续的实验未再增加单独的 PD-1 中和抗体或 LY294002 处理组。Transwell 结果表明, I-131 处理显著降低 BCPAP 和 TPC1 细胞的迁移和侵袭能力。与单独

I-131 处理相比, I-131 联合 PD-1 中和抗体或 LY294002 后, 抑制细胞迁移和侵袭的作用进一步增强, 其中 I-131+LY294002 组表现出最强的抑制效果 (见图 1C ~ D)。

2.2 I-131 联合 PD-1 中和抗体或 LY294002 显著抑制 BCPAP 和 TPC1 细胞中的 CEA 和 TG 释放

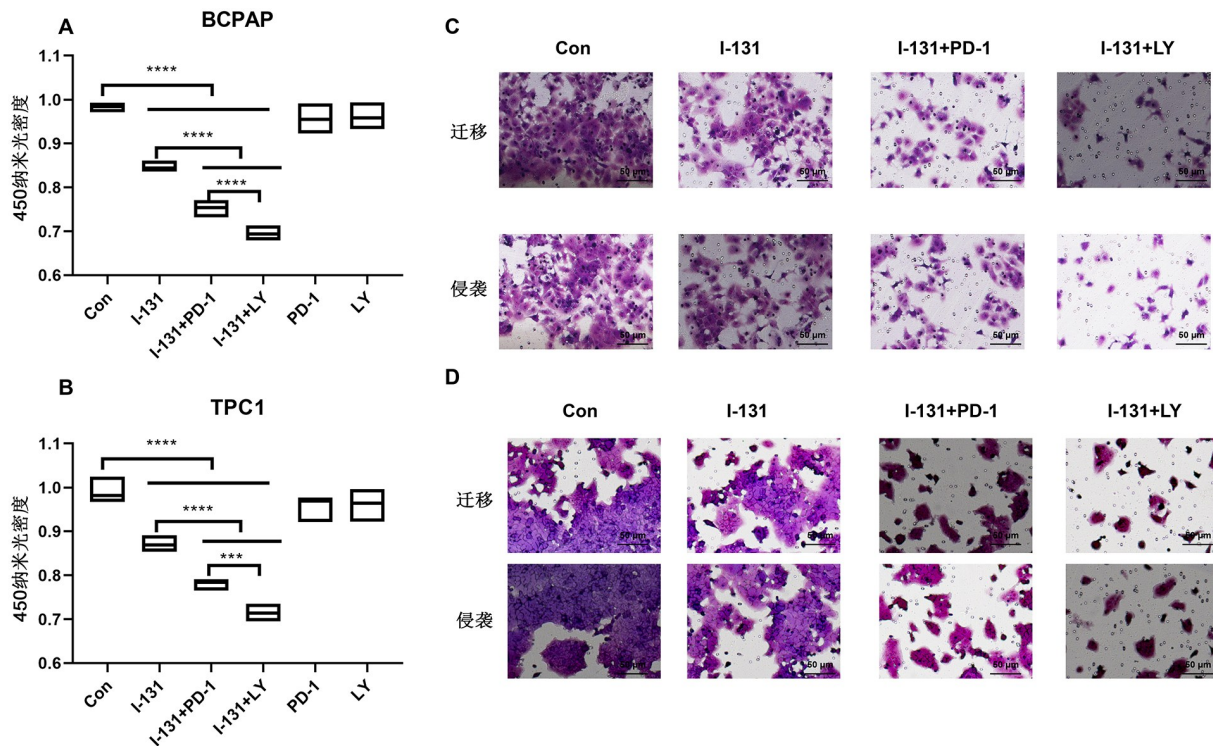
ELISA 结果显示, I-131 处理可显著降低 BCPAP 和 TPC1 细胞中 CEA 和 TG 的释放 ($P<0.0001$)。在 I-131 联合 PD-1 中和抗体或 LY294002 处理的组别中, 肿瘤抗原释放的量显著低于单独 I-131 处理组 ($P<0.0001$) (见图 2)。

2.3 I-131 联合 PD-1 中和抗体或 LY294002 显著调节 BCPAP 和 TPC1 细胞中 PD-L1 和 HLA 类分子的表达

qRT-PCR 结果表明, I-131 处理可显著影响 BCPAP 和 TPC1 细胞中免疫相关分子的表达。在 I-131 单独处理组中, *PD-L1* 的表达水平明显下降, *HLA-A*、*HLA-B* 和 *HLA-C* 分子的表达显著增加。与 I-131 单独处理组相比, I-131 联合 PD-1 中和抗体或 LY294002 处理可进一步增强这种调节作用, 特别是在 *HLA* 类分子的表达上联合治疗组的效果显著优于单独 I-131 组 ($P<0.0001$) (见图 3)。表明 I-131 可抑制免疫检查点分子 PD-L1 的表达并促进抗原呈递分子 *HLA* 的上调, 可能有助于增强免疫应答, 尤其在与免疫治疗联合使用时。

2.4 I-131 联合 PD-1 中和抗体或 LY294002 调控 BCPAP 和 TPC1 细胞中多种免疫相关分子及信号蛋白的表达

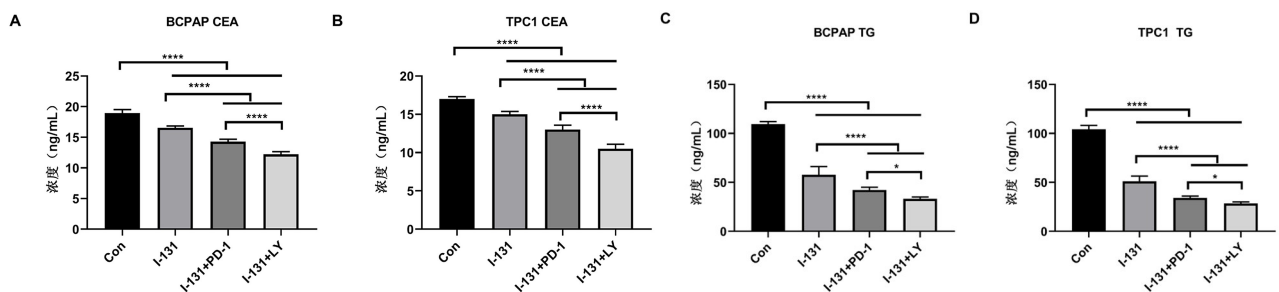
Western blotting 分析表明, I-131 处理显著下调 BCPAP 和 TPC1 细胞中 PD-L1 的蛋白表达, 并上调 MHC-I 的表达。I-131 联合 PD-1 中和抗体或 LY294002 可进一步抑制 PD-L1 的表达, 同时增强 MHC-I 的表达, 在联合处理组中, I-131+LY294002 组的抑制效果最为显著。此外, I-131 处理后 γ H2AX 和 p-STAT1 均下降, 联合处理组中也进一



BCPAP 和 TPC1 细胞分别接受 I-131、I-131+PD-1 中和抗体或 I-131+LY294002、PD-1 中和抗体、LY294002 处理。A: CCK8 检测 BCPAP 细胞增殖; B: CCK8 检测 TPC1 细胞增殖; C: Transwell 检测 BCPAP 细胞迁移和侵袭; D: Transwell 检测 TPC1 细胞迁移和侵袭。*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。Con: 对照组, Control; LY: LY294002。

图1 I-131 联合 PD-1 中和抗体或 LY294002 对 BCPAP 和 TPC1 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

Figure 1 Effects of I-131 combined with PD-1 neutralizing antibody or LY294002 on proliferation, migration, and invasion of BCPAP and TPC1 cells



BCPAP 和 TPC1 细胞分别接受 I-131、I-131+PD-1 中和抗体或 I-131+LY294002 处理。A: ELISA 检测 BCPAP 细胞中 CEA 的浓度变化; B: ELISA 检测 TPC1 细胞中 CEA 的浓度变化; C: ELISA 测定 BCPAP 细胞中 TG 的释放情况; D: ELISA 测定 TPC1 细胞中 TG 的释放情况。* $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$ 。Con: 对照组, Control; LY: LY294002。

图2 I-131 联合 PD-1 中和抗体或 LY294002 对 BCPAP 和 TPC1 细胞肿瘤抗原释放的影响

Figure 2 Effects of I-131 combined with PD-1 neutralizing antibody or LY294002 on tumor antigen release from BCPAP and TPC1 cells

步降低, 而 STAT1 总蛋白水平基本保持稳定。HLA-ABC 的表达在 I-131 处理后亦呈下降趋势, 联合处理组中下降更为明显 (见图4)。

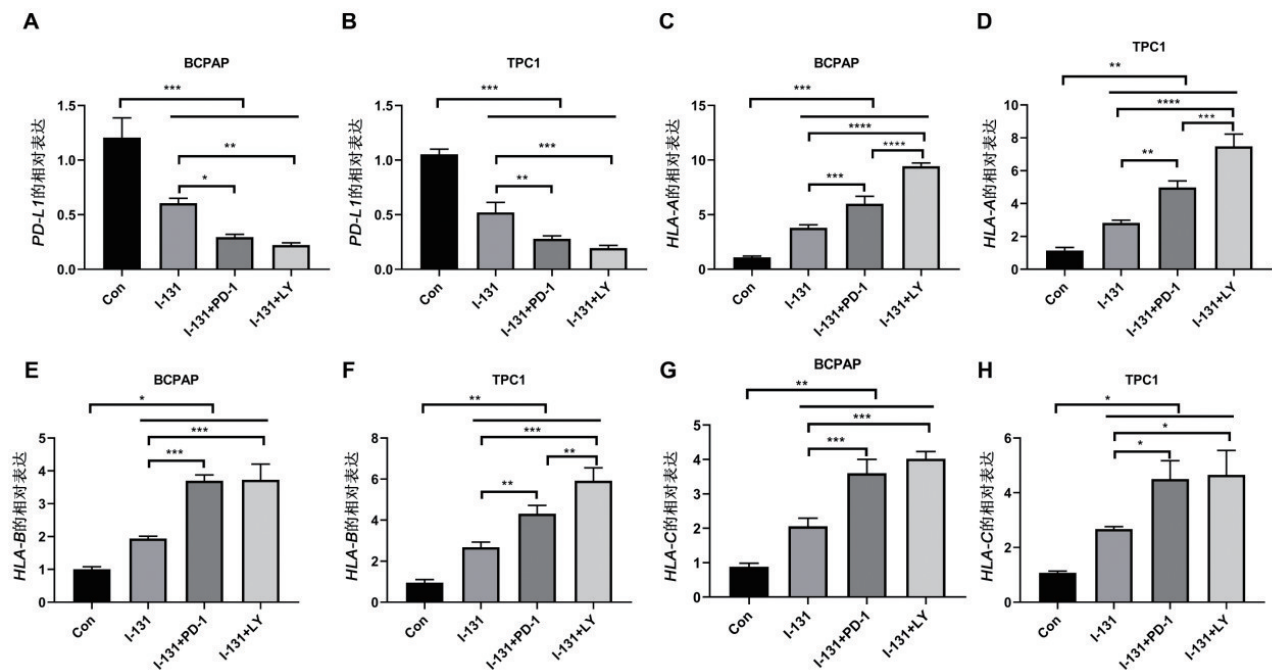
2.5 I-131 联合 PD-1 中和抗体或 LY294002 显著调节免疫细胞共培养中 BCPAP 和 TPC1 细胞的 PD-1、PD-L1 和 FoxP3 表达

在免疫细胞共培养实验中, 将 I-131 处理后的 BCPAP 和 TPC1 细胞与健康志愿者 PBMC 共培养。

结果显示, PD-1 和 PD-L1 的表达明显下降, FoxP3 的表达则有所增加。联合使用 PD-1 中和抗体或 LY294002 时, 这些变化得到了进一步强化, 特别是在 I-131+LY294002 组中, PD-1 和 PD-L1 的抑制效果及 FoxP3 的上调最为显著 (见图5)。

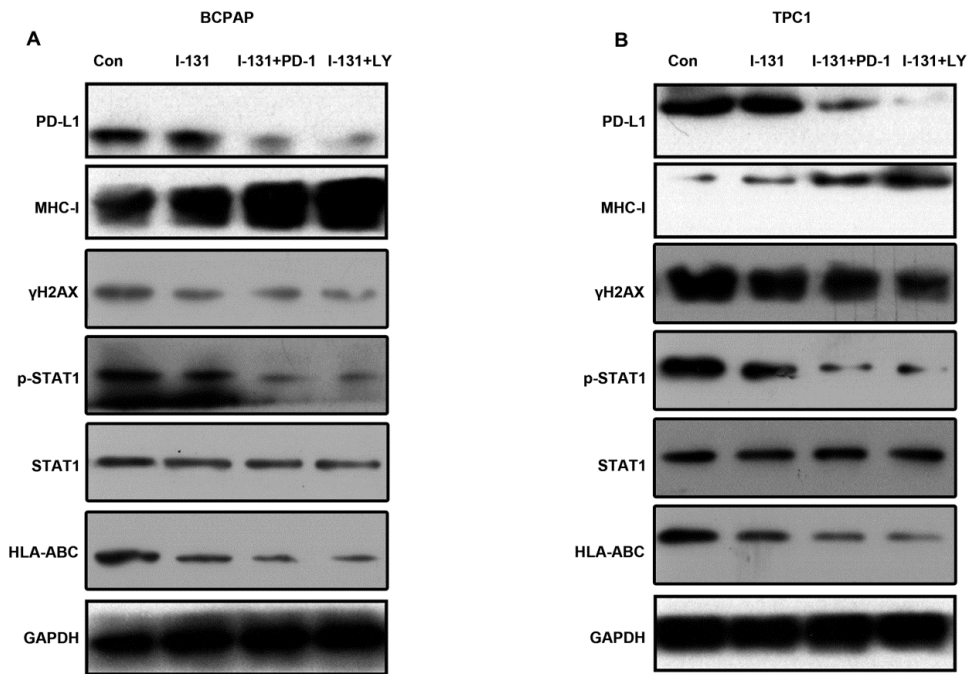
2.6 免疫细胞共培养中 I-131 联合 PD-1 中和抗体或 LY294002 对细胞因子分泌的影响

在免疫细胞共培养结果中, 发现经 I-131 处理



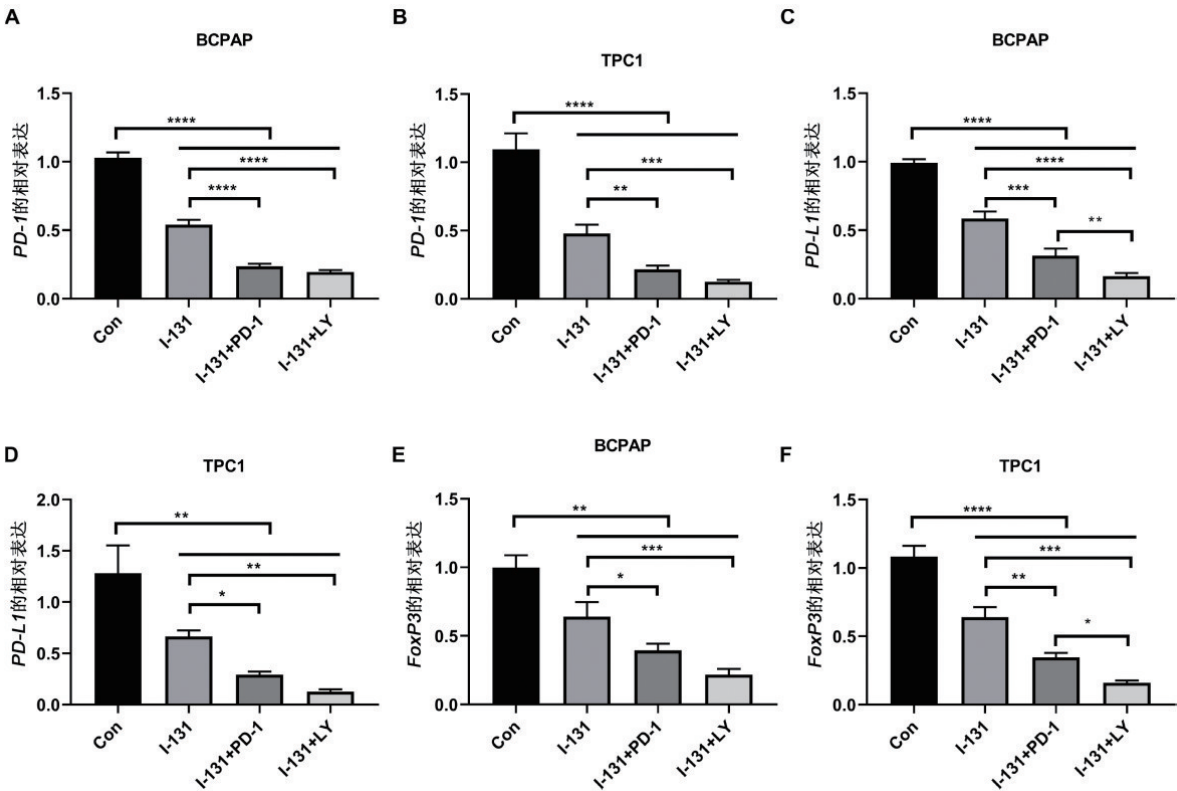
BCPAP 和 TPC1 细胞分别接受 I-131、I-131+PD-1 中和抗体或 I-131+LY294002 处理。A: qRT-PCR 检测 BCPAP 细胞中 *PD-L1* 水平; B: qRT-PCR 检测 TPC1 细胞中 *PD-L1* 水平; C: qRT-PCR 检测 BCPAP 细胞中 *HLA-A* 水平; D: qRT-PCR 检测 TPC1 细胞中 *HLA-A* 水平; E: qRT-PCR 检测 BCPAP 细胞中 *HLA-B* 水平; F: qRT-PCR 检测 TPC1 细胞中 *HLA-B* 水平; G: qRT-PCR 检测 BCPAP 细胞中 *HLA-C* 水平; H: qRT-PCR 检测 TPC1 细胞中 *HLA-C* 水平。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。Con: 对照组, Control; LY: LY294002。

图3 I-131联合PD-1中和抗体或LY294002对BCPAP和TPC1细胞中*PD-L1*和*HLA*类分子表达的影响
Figure 3 Effects of I-131 combined with PD-1 neutralizing antibody or LY294002 on expression of *PD-L1* and *HLA* class molecules in BCPAP and TPC1 cells



BCPAP 和 TPC1 细胞分别接受 I-131、I-131+PD-1 中和抗体或 I-131+LY294002 处理。A: Western blotting 检测 BCPAP 细胞中 PD-L1、MHC-I、 γ H2AX、p-STAT1、STAT1 及 HLA-ABC 的蛋白水平; B: Western blotting 检测 TPC1 细胞中上述分子的蛋白水平。Con: 对照组, Control; LY: LY294002。

图4 I-131联合PD-1中和抗体或LY294002对BCPAP和TPC1细胞中免疫相关分子及通路蛋白表达的影响
Figure 4 Effects of I-131 combined with PD-1 neutralizing antibody or LY294002 on expression of immune-related molecules and pathway proteins in BCPAP and TPC1 cells



BCPAP 和 TPC1 细胞分别接受 I-131、I-131+PD-1 中和抗体或 I-131+LY294002 处理 (I-131 处理过后与健康志愿者 PBMC 共培养)。A: qRT-PCR 检测 BCPAP 细胞中 *PD-1* 水平; B: qRT-PCR 检测 TPC1 细胞中 *PD-1* 水平; C: qRT-PCR 检测 BCPAP 细胞中 *PD-L1* 水平; D: qRT-PCR 检测 TPC1 细胞中 *PD-L1* 水平; E: qRT-PCR 检测 BCPAP 细胞中 *FoxP3* 水平; F: qRT-PCR 检测 TPC1 细胞中 *FoxP3* 水平。**P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, *****P*<0.0001。Con: 对照组, Control; LY: LY294002。

图5 免疫细胞共培养中 I-131 联合 PD-1 中和抗体或 LY294002 对 BCPAP 和 TPC1 细胞中免疫相关分子表达的影响
Figure 5 Effects of I-131 combined with PD-1 neutralizing antibody or LY294002 on expression of immune-related molecules in BCPAP and TPC1 cells in immune cell co-culture

后, BCPAP 和 TPC1 与 PBMC 共培养均可升高 PBMC 产生的 IFN- γ 浓度 (见图 6A ~ B); 联合 PD-1 中和抗体或 LY294002 处理组可进一步提高 IFN- γ 的分泌量, 尤其在 I-131+LY294002 组中, IFN- γ 浓度显著增加。另外, 联合处理还可促进 IL-2、TNF- α 水平升高 (见图 6C ~ F)。与此同时, I-131 处理还会使免疫抑制性细胞因子 IL-10 含量显著减少, 而联合 PD-1 中和抗体或 LY294002 则会进一步降低 IL-10 的水平 (见图 6G ~ H)。

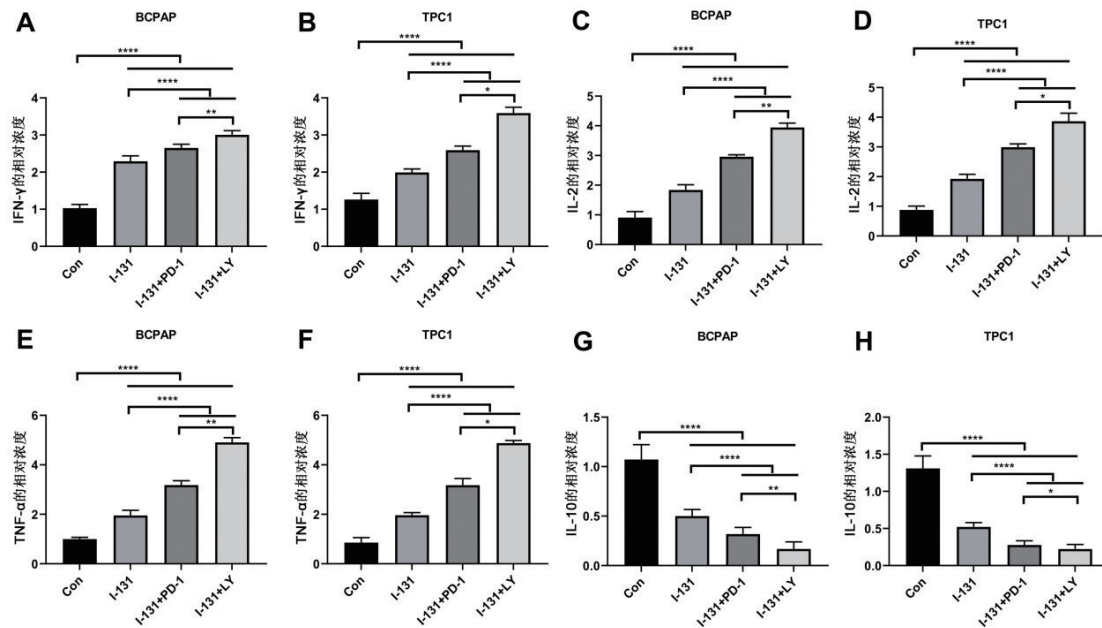
2.7 *PDCD1* 与 *CD274* 在 THCA 组织中的表达及分期差异分析

在 TCGA 数据库中进一步分析 *PDCD1* 和 *CD274* 在 THCA 组织中的表达情况。结果显示, *PDCD1* 在正常甲状腺组织中的表达水平显著高于各分期肿瘤组织 (见图 7A, 表 2), 且随着病理分期的进展呈下降趋势。分组比较结果提示, 正常组织与 Stage I ~ IV 之间差异均有统计学意义, I 期与 II、III、IV 期之间差异有统计学意义, 而 II 期与 IV 期、III 期与 IV 期之间差异无统计学意义 (见表 2)。在不

同样本类型的比较中, *PDCD1* 在正常组织中的表达显著高于原发肿瘤组织 (*P*<0.001) (见图 7B)。 *CD274* 在正常组织与肿瘤组织间的表达差异无统计学意义 (*P*=0.75) (见图 7C)。

表2 TCGA 数据库中甲状腺癌不同分期 *PDCD1* 表达水平的多重比较

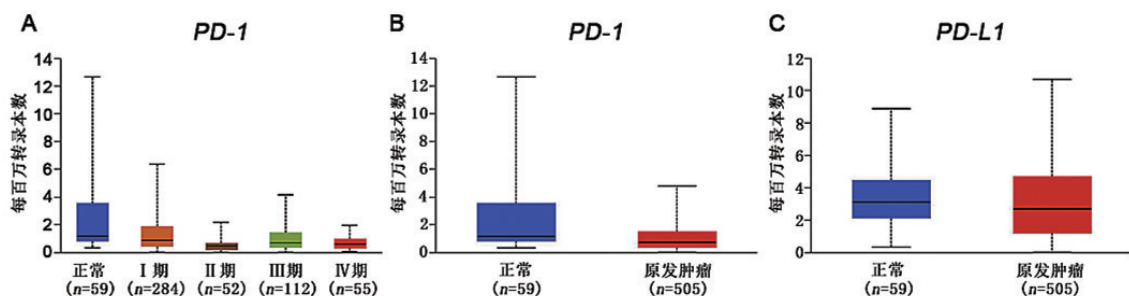
Table 2 Statistical comparison of <i>PDCD1</i> expression levels across different stages of thyroid cancer in TCGA database	
比较组别	<i>P</i> 值
正常 vs. I 期	3.71E-02
正常 vs. II 期	1.62E-04
正常 vs. III 期	2.06E-03
正常 vs. IV 期	6.41E-04
I 期 vs. II 期	3.50E-07
I 期 vs. III 期	6.76E-03
I 期 vs. IV 期	6.17E-04
II 期 vs. III 期	2.52E-02
II 期 vs. IV 期	3.67E-01
III 期 vs. IV 期	3.36E-01



BCPAP 和 TPC1 细胞分别接受 I-131、I-131+PD-1 中和抗体或 I-131+LY294002 处理 (I-131 处理过后与健康志愿者 PBMC 共培养)。A~B: ELISA 法检测 IFN- γ 水平; C~D: ELISA 法检测 IL-2 水平; E~F: ELISA 法检测 TNF- α 水平; G~H: ELISA 法检测 IL-10 水平。* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.000 1。Con: 对照组, Control; LY, LY294002。

图 6 免疫细胞共培养中 I-131 联合 PD-1 中和抗体或 LY294002 对细胞因子分泌的影响

Figure 6 Effects of I-131 combined with PD-1 neutralizing antibody or LY294002 on cytokine secretion in immune cell co-culture



A: *PDCD1* 在不同分期甲状腺癌组织中的表达; B: *PDCD1* 在正常组织与甲状腺癌组织中的表达; C: *CD274* 在正常甲状腺组织与甲状腺癌组织中的表达。

图 7 TCGA 数据库中 *PDCD1* 和 *PD-L1* 在甲状腺癌组织中的表达特征

Figure 7 Expression characteristics of *PDCD1* and *PD-L1* in thyroid cancer tissues from TCGA database

3 讨论

本研究探讨了 I-131 与 PD-1 中和抗体或 PI3K 抑制剂 LY294002 联合使用时对 DTC 细胞增殖、迁移和侵袭的影响, 以及对 DTC 免疫微环境的调节作用, 特别是在肿瘤抗原 (CEA、TG) 释放、免疫检查点分子 PD-L1 和抗原呈递分子 MHC-I 的调控方面。结果表明, I-131 可对甲状腺癌细胞发挥治疗效果, 还可以通过改善免疫微环境增强免疫反应, 进一步提升治疗效果。

肿瘤抗原 (CEA、TG) 是肿瘤细胞的标志性分子, 在肿瘤的免疫监视中起作用, 而 CD8⁺ T 细

胞是免疫监视的主要执行者^[14]。在 DTC 的治疗过程中, CEA 和 TG 作为两种常用的肿瘤标志物, 不仅可以用于判定肿瘤的治疗情况, 也被认为与肿瘤侵袭程度相关^[15]。I-131 通过诱导肿瘤抗原的释放, 可调动免疫系统对肿瘤细胞进行识别与攻击^[16]。本研究结果表明, I-131 处理后, BCPAP 和 TPC1 细胞的增殖、迁移、侵袭能力均较弱; 同时 I-131 处理后的 BCPAP、TPC1 细胞中 CEA、TG 分泌量也相应下降, 与之前报道相符^[17]。此外, 结合使用 PD-1 中和抗体或者 LY294002 也能够使得细胞增殖、迁移、侵袭及肿瘤抗原分泌量减少, 提示免疫治疗联合 I-131 起到增强抗肿瘤免疫作用, 从而达到更好

的治疗效果。

PD-L1 和 MHC-I 是控制肿瘤免疫逃逸、抗原递呈的重要分子^[18-19]。PD-L1 与 PD-1 结合可负向调节 T 细胞活性, 导致肿瘤逃逸免疫监视^[20]。DTC 中 PD-L1 表达水平与肿瘤免疫逃逸能力及患者预后相关^[21]。本研究表明, I-131 处理后, PD-L1 表达下调且 MHC-I 上调, 促进抗原递呈功能, I-131 处理增加了对肿瘤的免疫识别作用。同时, I-131 联合使用 PD-1 中和抗体或 LY294002 也使 I-131 作用增强, 说明这种联合可能有利于提高疗效。 γ H2AX、p-STAT1 蛋白含量在 I-131 处理后均有所降低, 提示 I-131 可能会通过 DNA 损伤反应以及 JAK/STAT 通路参与免疫调控, 其具体的作用机制有待后续进一步研究。

本研究采用 PD-1 中和抗体作为免疫治疗的联合药物, 通过解除免疫抑制和调节信号通路增强 I-131 的治疗效果。PD-1 中和抗体通过阻断 PD-1 与 PD-L1 的结合, 恢复 T 细胞功能, 从而增强免疫反应^[22]。研究表明, PD-1 中和抗体与放射性治疗联合使用能够增强免疫原性, 提高疗效^[23]。本研究选择 LY294002 作为信号通路调节剂, 意图通过调节 PI3K 通路增强免疫应答, 促进 I-131 的治疗效果。PI3K 抑制剂 LY294002 可通过抑制 PI3K/Akt 通路的激活, 调节肿瘤细胞和免疫细胞的功能^[24]。PI3K/Akt 通路在肿瘤的生长、转移及免疫逃逸中发挥重要作用^[25-26]。

本研究将 I-131 和免疫治疗 (PD-1 中和抗体) 及通路抑制剂 (PI3K 抑制剂) 联合运用, 进行系统研究, 探讨了 I-131 对于 DTC 增殖、迁移、侵袭以及免疫微环境的影响, 特别是 DTC 肿瘤抗原释放、免疫检查点分子、抗原递呈分子的调节作用。已有研究指出 I-131 免疫调节的作用^[25-26], 基于此, 本研究将 I-131 与免疫检查点抑制剂以及 PI3K 抑制剂联用, 首次探讨其联合治疗潜能, 为后续临床治疗提供理论依据。同时, 对免疫细胞共培养实验结果可知, IFN- γ 、IL-2、TNF- α 等促炎因子在联合治疗组升高, IL-10 水平降低, 提示 I-131 可通过重构细胞因子网络增强抗肿瘤免疫效应。

PD-1 抗体或 LY294002 单药组对细胞的增殖无明显影响。后续研究在实验设计中未设置 PD-1 抗体或 LY294002 单药组的另一个主要原因是研究重点在于联合治疗效应。有研究提示, PD-1/PD-L1 抗体在部分肿瘤中虽能增强免疫反应, 但在甲状腺癌等免疫“冷肿瘤”中单药作用有限^[27-29]; 而 LY294002 虽能抑制 PI3K/Akt 通路, 但通常需要与

放射或免疫治疗联合应用才能发挥更显著的抗肿瘤效应^[30-31]。

本研究也有一定的局限性。缺乏动物实验与临床样本对结论的验证。有关 I-131 对免疫微环境作用的机制还不清楚。此外, 本研究重点是探讨 I-131 联合免疫治疗对甲状腺癌免疫微环境的作用, 并不是研究其耐药的机制, 因此并未用 I-131 耐药株, 以后的实验可以引入耐药细胞模型探究 I-131 耐药的相关机制。TCGA 数据库结果显示, *PDCDI* 在正常组织中高表达并随分期降低, 而 *CD274* 差异不显著, 提示 I-131 联合免疫治疗作用主要依赖于 PD-1 相关通路而非肿瘤内的 PD-L1 单独调节, 这一点需要后续研究进一步证实。

4 结论

用 I-131 联合 PD-1 中和抗体或 PI3K 抑制剂 LY294002 处理可显著增强 DTC 细胞免疫反应, 抑制肿瘤抗原释放, 调节免疫相关分子的表达而发挥治疗作用。同时, 本研究观察到 γ H2AX、p-STAT1 下降, 且细胞因子谱也有所变化 (IFN- γ 、IL-2、TNF- α 升高, IL-10 降低), 说明联合治疗可以从多方面增强免疫效应。TCGA 数据表明, *PDCDI* 在甲状腺癌中起到免疫学作用。由此可知, I-131 联合免疫治疗具有促进免疫反应、克服治疗耐药的作用, 对 DTC、滤泡状甲状腺癌及一些其他类型的肿瘤来说是潜在的研究方向。

参考文献

- [1] 倪萃, 苏景阳, 林胜友. 酪氨酸激酶抑制剂治疗放射性碘难治性分化型甲状腺癌研究进展[J]. 浙江临床医学, 2024, 26(4): 603-605.
- [2] NGUYEN N C, ANIGATI E M, DESAI N B, et al. Radioactive iodine therapy in differentiated thyroid cancer: An update on dose recommendations and risk of secondary primary malignancies[J]. Semin Nucl Med, 2024, 54(4): 488-496.
- [3] 刘诗琪, 王辉, 冯方. 甲状腺癌碘-131 治疗抵抗发生的分子机制研究进展[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2024, 44(7): 915-921.
- [4] GUO J, XIONG H, LIU H, et al. Radioiodine based biomedical carriers for cancer theranostics[J]. Coordination Chemistry Reviews, 2023, 497: 215430.
- [5] 任虎威. 碘-131 标记 PD-L1 单抗对三阴性乳腺癌内照射治疗疗效研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2024.
- [6] HARIHARAN S, SEETHASHANKAR S, KANNAN N, et al. Enhanced γ -H2AX foci frequency and altered gene expression in participants exposed to ionizing radiation

- during I-131 nuclear medicine procedures[J]. Nucl Med Mol Imaging, 2024, 58(6): 341-353.
- [7] JAFARPOUR S M, SHEKARCHI B, BAGHERI H, et al. The radioprotective effects of melatonin and nanoselenium on DNA double-strand breaks in peripheral lymphocytes caused by I-131[J]. Indian J Nucl Med, 2021, 36(2): 134-139.
 - [8] HU Y, ZHOU N, ZHU Q. Curcumin inhibits proliferation and invasion of papillary thyroid carcinoma cells by inhibiting the JAK2 / STAT3 pathway[J]. J Buon, 2021, 26(4): 1635-1641.
 - [9] MIRLEKAR B. Tumor promoting roles of IL-10, TGF- β , IL-4, and IL-35: Its implications in cancer immunotherapy [J]. SAGE Open Med, 2022, 10: 20503121211069012.
 - [10] ZHANG S, GAN X, QIU J, et al. IL-10 derived from Hepatocarcinoma cells improves human induced regulatory T cells function via JAK1 / STAT5 pathway in tumor microenvironment[J]. Mol Immunol, 2021, 133: 163-172.
 - [11] DE SOUSA LINHARES A, BATTIN C, JUTZ S, et al. Therapeutic PD-L1 antibodies are more effective than PD-1 antibodies in blocking PD-1/PD-L1 signaling[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 11472.
 - [12] YANG W, CHEN P W, LI H, et al. PD-L1: PD-1 interaction contributes to the functional suppression of T-cell responses to human uveal melanoma cells in vitro[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(6): 2518-2525.
 - [13] LU J, CHEN M, GAO S, et al. LY294002 inhibits the Warburg effect in gastric cancer cells by downregulating pyruvate kinase M2[J]. Oncology Letters, 2018, 15(4): 4358-4364.
 - [14] DEL PRETE A, SALVI V, SORIANI A, et al. Dendritic cell subsets in cancer immunity and tumor antigen sensing [J]. Cell Mol Immunol, 2023, 20(5): 432-447.
 - [15] HAMIDI S, HOFMANN M C, IYER P C, et al. Review article: New treatments for advanced differentiated thyroid cancers and potential mechanisms of drug resistance[J]. Frontiers in Endocrinology, 2023, 14: 1176731.
 - [16] LIN R, MA B, LIU N, et al. Targeted radioimmunotherapy with the iodine-131-labeled caerin 1.1 peptide for human anaplastic thyroid cancer in nude mice[J]. Annals of Nuclear Medicine, 2021, 35(7): 811-822.
 - [17] IYER P. Thyroid cancer[M]. //Thyroid and Parathyroid Disorders in Children. Kariba: CRC Press, 2020: 57-64.
 - [18] BOREEL D F, SANDKER G G, ANSEMS M, et al. MHC-I and PD-L1 expression is associated with decreased tumor outgrowth and is radiotherapy-inducible in the murine head and neck squamous cell carcinoma model MOC1[J]. Molecular Imaging and Biology, 2024, 26(5): 835-846.
 - [19] SARI G, ROCK K L. Tumor immune evasion through loss of MHC class-I antigen presentation[J]. Curr Opin Immunol, 2023, 83: 102329.
 - [20] PERRY J A, SHALLBERG L, CLARK J T, et al. PD-L1-PD-1 interactions limit effector regulatory T cell populations at homeostasis and during infection[J]. Nature Immunology, 2022, 23(5): 743-756.
 - [21] ZANTUT-WITTMANN D E, BARRETO I S, LAUS A C, et al. PD-L1 and MCL-1 markers and the relationship with prognostic characteristics of differentiated thyroid carcinoma[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2023, 570: 111931.
 - [22] IOANNOU N, HAGNER P R, STOKES M, et al. Triggering interferon signaling in T cells with avadomide sensitizes CLL to anti-PD-L1 / PD-1 immunotherapy[J]. Blood, 2021, 137(2): 216-231.
 - [23] BOUSTANI J, LECOESTER B, BAUDE J, et al. Anti-PD-1/anti-PD-L1 drugs and radiation therapy: Combinations and optimization strategies[J]. Cancers, 2021, 13(19): 4893.
 - [24] FU X Z, WANG Y. Interferon - γ regulates immunosuppression in septic mice by promoting the Warburg effect through the PI3K / AKT / mTOR pathway[J]. Molecular Medicine, 2023, 29(1): 95.
 - [25] WU X, PU L, CHEN W, et al. LY294002 attenuates inflammatory response in endotoxin-induced uveitis by downregulating JAK3 and inactivating the PI3K / Akt signaling[J]. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 2022, 44(4): 510-518.
 - [26] MENG D, HE W, ZHANG Y, et al. Development of PI3K inhibitors: Advances in clinical trials and new strategies [J]. Pharmacological Research, 2021, 173: 105900.
 - [27] MEHNERT J M, VARGA A, BROSE M S, et al. Safety and antitumor activity of the anti-PD-1 antibody pembrolizumab in patients with advanced, PD-L1-positive papillary or follicular thyroid cancer[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 196.
 - [28] LI X, GAO S, SHAN C, et al. Advances in PD-1/PD-L1 pathway inhibitors in the treatment of thyroid cancer: Mechanisms and clinical therapeutic perspectives[J]. Front Immunol, 2025, 16: 1643421.
 - [29] PINHEIRO NETO A, LUCCHESI H L, VALSECCHI V, et al. Immunotherapy for patients with thyroid cancer: A comprehensive appraisal[J]. Chin Clin Oncol, 2024, 13 (3): 36.
 - [30] LEE C M, FUHRMAN C B, PLANELLES V, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition by LY294002 radiosensitizes human cervical cancer cell lines[J]. Clinical Cancer Research, 2006, 12(1): 250-256.
 - [31] GUNDA V, BUCUR O, VARNAU J, et al. Blocks to thyroid cancer cell apoptosis can be overcome by inhibition of the MAPK and PI3K / AKT pathways[J]. Cell Death Dis, 2014, 5(3): e1104.