[文章编号] 1671-587X(2026)04-1011-11 DOI:10.13481/j.1671-587X.20260413

*TPX2*沉默通过调节Wnt/β-catenin信号通路对非小细胞肺癌A549细胞免疫逃逸的抑制作用

颜妃大[1]，陈鸣娣[2]，梁智伟[3]

（1. 广东医科大学附属第二医院胸外科，广东 湛江 524003；2. 广东医科大学附属第二医院重症医学科，广东 湛江 524003；3. 广东医科大学附属第二医院急诊科，广东 湛江 524003）

[摘 要] **目的：**探讨非洲爪蟾驱动蛋白样蛋白2靶向蛋白（TPX2）对非小细胞肺癌A549细胞免疫逃逸的影响，并阐明其作用机制。**方法：**采用脂质体转染法将*TPX2*小干扰RNA干扰质粒（si-TPX2）及其阴性对照质粒（si-NC）转染至A549细胞中，分为空白对照组、si-TPX2组和si-NC组。收集A549细胞条件培养基（CM）处理$CD8^+$ T淋巴细胞，分为$CD8^+$ T组、$CD8^+$ T+CM/blank组、$CD8^+$ T+CM/si-NC组和$CD8^+$ T+CM/si-TPX2组。采用②无翅型MMTV整合位点家族蛋白（Wnt）/β-连环蛋白（β-catenin）信号通路激活剂CHIR-99021预处理转染后的A549细胞，分为si-NC组、si-TPX2组、si-NC+CHIR-99021组和si-TPX2+CHIR-99021组。采用Transwell小室建立A549细胞与$CD8^+$ T淋巴细胞共培养体系，分为A549组、A549si-NC组、A549si-TPX2组、A549/T组、A549si-NC/T组、A549si-TPX2/T组、A549si-NC+CHIR-99021/T组和A549si-TPX2+CHIR-99021/T组。细胞计数试剂盒8（CCK-8）法检测各组细胞存活率，流式细胞术检测各组细胞中人白细胞抗原DR（HLA-DR）、程序性死亡配体1（PD-L1）水平及细胞凋亡率，酶联免疫吸附试验（ELISA）检测各组细胞上清液中干扰素γ（IFN-γ）、肿瘤坏死因子α（TNF-α）、白细胞介素2（IL）-2、转化生长因子β（TGF-β）和IL-10水平，乳酸脱氢酶（LDH）释放法检测$CD8^+$ T淋巴细胞对各组A549细胞的杀伤作用，实时荧光定量PCR（RT-qPCR）法检测各组细胞中*TPX2* mRNA表达水平；Western blotting法检测各组细胞中β-catenin蛋白表达水平。**结果：**与$CD8^+$ T+CM/blank组比较，$CD8^+$ T+CM/si-TPX2组$CD8^+$ T淋巴细胞存活率、细胞表面分子HLA-DR水平及细胞上清液中IFN-γ、TNF-α和IL-2水平均明显升高（$P<0.05$）。与A549si-TPX2组比较，A549si-TPX2/T组细胞存活率明显降低（$P<0.05$）。与A549/T组比较，A549si-TPX2/T组A549细胞存活率明显降低（$P<0.05$），A549细胞凋亡率和细胞死亡率均明显升高（$P<0.05$）。与空白组比较，si-TPX2组A549细胞中β-catenin总蛋白和核蛋白表达水平、细胞表面分子PD-L1水平及细胞上清液中TGF-β和IL-10水平均明显降低（$P<0.05$）。与si-TPX2组比较，si-TPX2+CHIR-99021组A549细胞表面分子PD-L1水平及细胞上清液中TGF-β和IL-10水平均明显升高（$P<0.05$）。与A549si-TPX2/T组比较，A549si-TPX2+CHIR-99021/T组A549细胞存活率明显升高（$P<0.05$），细胞凋亡率和细胞死亡率均明显降低（$P<0.05$）。**结论：***TPX2*基因沉默可抑制非小细胞肺癌A549细胞免疫逃逸，其机制与阻断Wnt/β-catenin信号通路活化有关。

[关键词] 肺肿瘤；癌，非小细胞肺；免疫逃逸；Xklp2靶向蛋白；Wnt/β-catenin信号通路；杀伤作用

[中图分类号] R734.2 [文献标志码] A

[收稿日期] 2025-09-26 [录用日期] 2025-12-03

[基金项目] 广东省卫健委医学科学技术研究基金项目（B2025347）

[作者简介] 颜妃大（1991—），男，广东省湛江市人，主治医师，医学硕士，主要从事胸外科基础和临床方面的研究。

[通信作者] 梁智伟，主治医师（E-mail：Zhiwei9543@163.com）

©《吉林大学学报（医学版）》编辑部，开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University（Medicine Edition）. Open access under CC BY-NC-ND license.

Inhibitory effect of *TPX2* silencing on immune escape in non-small cell lung cancer A549 cells by regulating Wnt/β-catenin signaling pathway

YAN Feida[1], CHEN Mingdi[2], LIANG Zhiwei[3]

(1. Department of Thoracic Surgery, Second Affiliated Hospital, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524003, China; 2. Department of Intensive Care Medicine, Second Affiliated Hospital, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524003, China; 3. Department of Emergency, Second Affiliated Hospital, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524003, China)

ABSTRACT **Objective**: To investigate the effect of targeting protein for targeting protein for xenopus kinesin-like protein 2 (TPX2) on immune escape in the non-small cell lung cancer A549 cells, and to clarify its mechanism. **Methods**: The TPX2 small interfering RNA plasmid (si-TPX2) and its negative control plasmid (si-NC) were transfected into the A549 cells using the liposome transfection method; the cells were divided into blank control group, si-TPX2 group, and si-NC group. The conditioned medium (CM) from A549 cells was collected and used to treat the $CD8^+$ T lymphocytes; the cells were divided into $CD8^+$ T group, $CD8^+$ T+CM/blank group, $CD8^+$ T+CM/si-NC group, and $CD8^+$ T+CM/si-TPX2 group. The transfected A549 cells were pretreated with the wingless-type MMTV integration site family (Wnt)/β-catenin signaling pathway activator CHIR-99021; the cells were divided into si-NC group, si-TPX2 group, si-NC+CHIR-99021 group, and si-TPX2+CHIR-99021 group. A co-culture system of A549 cells and $CD8^+$ T lymphocytes was established using Transwell chambers; the cells were divided into A549 group, A549si-NC group, A549si-TPX2 group, A549/T group, A549si-NC/T group, A549si-TPX2/T group, A549si-NC+CHIR-99021/T group, and A549si-TPX2+CHIR-99021/T group. Cell counting kit-8(CCK-8) method was used to detect the survival rates of the cells in various groups; flow cytometry was used to detect the levels of human leukocyte antigen DR (HLA-DR), and programmed death-ligand 1 (PD-L1) and apoptotic rate in the cells in various groups; enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) method was used to detect the levels of interferon-γ (IFN-γ), tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-2 (IL-2), transforming growth factor-β (TGF-β), and IL-10 in supernatant of the cells in various groups; lactate dehydrogenase (LDH) release assay was used to detect the killing effect of $CD8^+$ T lymphocytes on A549 cells; real-time fluorescence quantitative PCR(PT-qPCR) method was used to detect the expression levels of *TPX2* mRNA in the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression level of β-catenin protein in the cells in various groups. **Results**: Compared with $CD8^+$ T+CM/blank group, the survival rate of $CD8^+$ T cells, the level of HLA-DR on cell surface, and the levels of IFN-γ, TNF-α, and IL-2 in the supernatant in $CD8^+$ T+CM/si-TPX2 group were significantly increased ($P<0.05$). Compared with A549si-TPX2 group, the survival rate of A549 cells in A549si-TPX2/T group was significantly decreased ($P<0.05$). Compared with A549/T group, the survival rate of A549 cells in A549si-TPX2/T group was further decreased ($P<0.05$), while the apoptotic rate and mortality rate of A549 cells were significantly increased ($P<0.05$). Compared with blank group, the expression levels of total and nuclear β-catenin protein, the level of PD-L1 on cell surface, and the levels of TGF-β and IL-10 in the supernatant of A549 cells in si-TPX2 group were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with si-TPX2 group, the level of PD-L1 on A549 cell surface and the levels of TGF-β and IL-10 in the supernatant in si-TPX2+CHIR-99021 group were significantly increased ($P<0.05$). Compared with A549si-TPX2/T group, the survival rate of A549 cells in A549si-TPX2+CHIR-

99021/T group was significantly increased ($P<0.05$), while the apoptotic rate and mortality rate of A549 cells on A549 cells were significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion**: *TPX2* gene silencing inhibits immune escape in non-small cell lung cancer A549 cells, and its mechanism is related to blocking the activation of the Wnt/β-catenin signaling pathway.

KEYWORDS Lung neoplasms; Carcinoma, non-small-cell lung; Immune escape; Targeting protein for Xklp2; Wnt/β-catenin signaling pathway; Killing effect

肺癌的发病率和疾病负担高居所有恶性肿瘤之首，其中以非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer，NSCLC）为主。尽管免疫治疗显著改善了部分NSCLC患者的预后，但仍面临耐药性和免疫逃逸等重大挑战，导致患者应答率低，5年生存率低于20%[1]，亟需开发更有效的治疗策略。程序性死亡受体1（programmed death receptor 1，PD-1）及其配体程序性死亡配体1(programmed death-ligand 1，PD-L1)是抑制性免疫检查点分子，在肿瘤微环境中PD-L1表达上调可抑制T淋巴细胞活性，促进免疫逃逸[2]。PD-1/PD-L1轴检查点阻断的免疫疗法可激活$CD8^+$ T淋巴细胞免疫杀伤功能[3]，其在肿瘤内浸润程度与肺腺癌患者良好预后相关[4-5]。但$CD8^+$ T淋巴细胞耗竭可引起PD-1等抑制性受体高表达及细胞毒性因子分泌能力降低，从而介导肿瘤细胞免疫逃逸[6]和NSCLC患者的抗PD-1治疗耐药[7]。

近年研究[8]显示：无翅型MMTV整合位点家族蛋白(wingless-type MMTV integration site family，Wnt）/β-连环蛋白（β-catenin）信号通路在调控肿瘤免疫微环境中发挥重要作用，其异常激活可介导NSCLC免疫逃逸和免疫治疗耐药。DU等[9]研究显示：敲低β-catenin可通过下调胶质母细胞瘤细胞中PD-L1表达，进而促进$CD8^+$ T淋巴细胞的活化与肿瘤浸润，从而抑制肿瘤生长。因此，靶向调控Wnt/β-catenin信号通路可能为逆转NSCLC免疫抑制提供新策略。Xklp2靶向蛋白（targeting protein for Xklp2，TPX2）作为一种微管相关蛋白，在NSCLC、胰腺癌、肝癌和乳腺癌等恶性肿瘤中高表达，与肿瘤增殖、侵袭及不良预后密切相关[10-11]。研究[11]显示：TPX2通过激活下游Wnt/β-catenin信号通路促进NSCLC转移和化疗耐药，且其表达与PD-L1呈正相关关系[12]。因此，靶向TPX2疗法可能会改善肿瘤免疫抑制，但其是否通过调控Wnt/β-catenin通路影响NSCLC免疫逃逸尚不明确。本研究以人NSCLC A549细胞为研究对象，探讨*TPX2*基因沉默对A549细胞免疫逃逸的影响，并进一步研究其作用机制是否与调控Wnt/β-catenin信号通路有关，旨在为克服NSCLC免疫治疗耐受提供潜在干预靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 人NSCLC A549细胞购自美国ATCC公司，人外周血$CD8^+$ T淋巴细胞购自上海富衡生物科技有限公司。小干扰TPX2 RNA（small intervention RNA-TPX2，si-TPX2）干扰质粒及其阴性对照质粒（si-NC）由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。杜尔贝科改良伊格尔培养基（Dulbecco's modified Eagle medium，DMEM）高糖培养基和胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）购自美国HyClone公司；1%青-链霉素溶液（双抗）、1%青-链霉素-两性霉素B溶液（三抗）和增强型细胞计数剂盒8（cell counting kit-8，CCK-8）溶液购自武汉普诺赛生命科技有限公司，Lipo8000™转染试剂、乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）细胞毒性检测试剂盒和Annexin Ⅴ-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司，Wnt/β-catenin信号通路激活剂CHIR-99021（纯度：99.46%）购自美国MCE公司，0.4 μm聚碳酸酯膜的Transwell小室购自美国Corning公司，兔抗TPX2单克隆抗体(ab252945)、兔抗β-catenin单克隆抗体(ab305261)、小鼠抗GAPDH单克隆抗体（ab8245）和兔抗组蛋白H3（phospho Ser10）单克隆抗体（ab308373）购自英国Abcam公司，FITC标记的抗人白细胞抗原DR（human leukocyte antigen DR，HLA-DR）抗体和PE标记的抗人PD-L1抗体购自美国BioLegend公司，干扰素γ（interferon-gamma，IFN-γ）、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-alpha，TNF-α）、白细胞介素（interleukin，IL）-2、转化生长因子β（transforming growth factor-beta，TGF-β）和IL-10酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）检测试剂盒购自美国R&D公司，PrimeScript™ RT Master Mix（Perfect Real Time）和TB Green®

Premix Ex Taq™ Ⅱ（Tli RNaseH Plus）购自日本TaKaRa公司。Applied Biosystems™ 7500 Fast型实时荧光定量PCR（real-time fluorescence quantitative PCR，RT-qPCR）仪、iBright™ FL1500型凝胶成像系统、Varioskan LUX型多功能酶标仪和Vios iDx 255型CO_2培养箱购自美国Thermo Fisher Scientific公司，CytoFLEX型流式细胞仪购自美国Beckman Coulter公司。

1.2 细胞培养、转染和条件培养基（conditioned medium，CM）制备 使用含有10% FBS和1%双抗的DMEM高糖培养基贴壁培养A549细胞，使用含有10% FBS和1%三抗的DMEM高糖培养基悬浮培养$CD8^+$ T淋巴细胞。培养条件：37 ℃、5% CO_2，当细胞密度＞80%时进行1∶2传代。将A549细胞接种至6孔细胞培养板中（每孔2×10^5个细胞），过夜培养后，使用Lipo8000™转染试剂将si-TPX2和si-NC质粒分别转染至A549细胞中，分为si-TPX2组和si-NC组，另设立空白对照组。采用RT-qPCR法和Western blotting法检测转染细胞中*TPX2* mRNA和蛋白表达水平。将转染后的A549细胞置于无血清DMEM高糖培养基中培养24 h，收集上清，经0.45 μm滤膜过滤得到CM，分别命名为CM/blank、CM/si-NC和CM/si-TPX2。

1.3 A549细胞与$CD8^+$ T淋巴细胞共培养体系建立 将Transwell小室置于24孔细胞培养板中，于上室接种$CD8^+$ T淋巴细胞（每孔1×10^6个细胞），下室接种预先贴壁处理的A549细胞（每孔2×10^5个细胞）[13]，共培养24 h用于后续实验。

1.4 实验分组和给药 ①为研究*TPX2*基因对A549细胞免疫逃逸的影响，使用不同CM培养$CD8^+$ T淋巴细胞24 h，分为$CD8^+$ T＋CM/blank组、$CD8^+$ T＋CM/si-NC组和$CD8^+$ T＋CM/si-TPX2组，另设不经任何处理的$CD8^+$ T淋巴细胞作为$CD8^+$ T组。采用Transwell小室建立A549细胞与$CD8^+$ T淋巴细胞共培养体系，分为A549/T组、A549si-NC/T组和A549si-TPX2/T组，另设单独培养的A549细胞为A549组，以及已转染si-TPX2、si-NC的A549细胞为A549si-TPX2组和A549si-NC组。②为研究*TPX2*基因是否通过调控Wnt/β-catenin通路影响A549细胞免疫逃逸，采用10 μmol·L^{-1} Wnt/β-catenin通路激活剂CHIR-99021［溶媒：5%DMSO＋40% 聚乙二醇（Polyethylene glycol，PEG）300＋5% Tween-80＋50%生理盐水］处理转染后的A549细胞48 h[14]，分为空白组si-NC组、si-TPX2组、si-NC＋CHIR-99021组和si-TPX2＋CHIR-99021组。再采用Transwell小室建立A549细胞与$CD8^+$ T淋巴细胞共培养体系，分为A549/T组、A549si-NC/T组、A549si-TPX2/T组、A549si-NC＋CHIR-99021/T组和A549si-TPX2＋CHIR-99021/T组。

1.5 RT-qPCR法检测各组细胞中*TPX2* mRNA表达水平 收集各组细胞提取总RNA，取1 μg RNA进行反转录反应，RT-qPCR反应体系按试剂盒说明书配制。引物序列：*TPX2*正向引物5′-ACCTTGCCCTACTAAGATT-3′，*TPX2*反向引物5′-AATGTGGCACAGGTTGAGC-3′；β-肌动蛋白（*β-actin*）正向引物5′-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3′，*β-actin*反向引物5′-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3′。两步法PCR扩增程序：预变性95 ℃、30 s；PCR反应：95 ℃、5 s，60 ℃、20 s，共40个循环；熔解曲线分析：95 ℃、5 s，60 ℃、1 min，每5 ℃采集1次信号；50 ℃冷却30 s。采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算各组细胞中*TPX2* mRNA表达水平。

1.6 Western blotting法检测各组细胞中TPX2蛋白表达水平 收集各组细胞提取总蛋白和核蛋白。取20 μg总蛋白和核蛋白样品经变性处理，进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE），以溴酚蓝指示迁移终点。随后将蛋白转移至聚偏二氟乙烯（polyvinylidene fluoride，PVDF）膜，用5%脱脂牛奶封闭1 h。膜经含吐温的Tris缓冲盐溶液（Tris-buffered saline with Tween，TBST）洗涤后，分别与TPX2（总蛋白）、β-catenin（总蛋白＋核蛋白）、组蛋白H3（Histone H3，核蛋白内参）和GAPDH（总蛋白内参）（稀释比例均为1∶1 000）一抗4 ℃孵育过夜，再与辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记的二抗（1∶10 000）室温孵育1 h。增强化学发光（enhanced chemiluminescence，ECL）法显影后，通过化学发光成像系统捕获信号，采用Image J软件分析目的条带与对应内参条带灰度值，计算细胞中TPX2和β-catenin蛋白表达水平。β-catenin蛋白表达水平＝β-catenin（总蛋白）/GAPDH＋β-catenin（核蛋白）/Histone H3。

1.7 CCK-8法检测各组细胞存活率 将各组细胞（每孔2×10^3个细胞）接种于96孔细胞培养板中，

并按分组要求进行培养和处理，每孔加入10 μL CCK-8溶液，继续孵育3 h，采用酶标仪于450 nm波长处检测各孔吸光度(A)值。细胞存活率＝（实验孔A值－空白孔A值）/（对照孔A值－空白孔A值）×100%。

1.8 流式细胞术检测各组细胞表面HLA-DR和PD-L1水平及各组细胞凋亡率 收集各组细胞（每管5×10^5个细胞），$CD8^+$ T淋巴细胞加入5 μL FITC荧光标记的抗HLA-DR抗体，A549细胞加入5 μL PE荧光标记的抗PD-L1抗体，轻轻混匀避光孵育30 min，去除细胞聚集体，采用流式细胞仪在488 nm激发光和530 nm发射光处检测各组细胞表面HLA-DR和PD-L1水平。收集各组A549细胞（每管5×10^5个细胞），用195 μL Annexin Ⅴ-FITC结合液重悬细胞，依次加入5 μL Annexin Ⅴ-FITC和10 μL碘化丙啶（propidium iodide，PI）染色液轻轻混匀，25℃避光孵育15 min。检测Annexin Ⅴ-FITC，FL2通道检测PI信号。采用FlowJo软件分析细胞凋亡情况，计算细胞凋亡率。细胞凋亡率＝凋亡细胞数/细胞总数×100%。

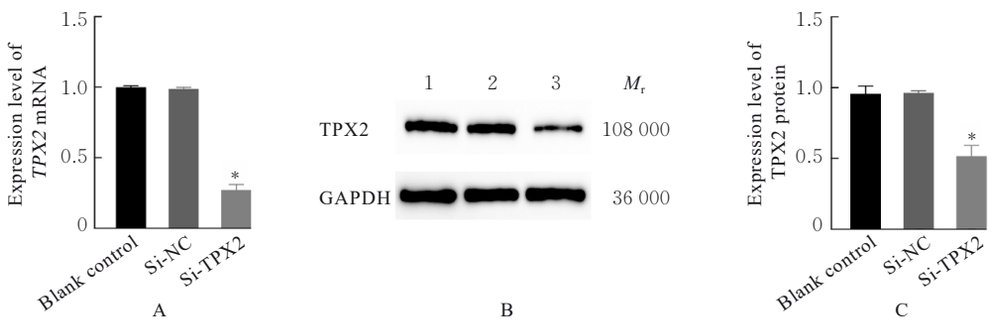
1.9 ELISA法检测各组细胞上清液中IFN-γ、TNF-α、IL-2、TGF-β和IL-10水平 将各组细胞离心，收集上清液，按照ELISA试剂盒说明书操作，检测$CD8^+$ T淋巴细胞上清液中IFN-γ、TNF-α和IL-2水平，以及A549细胞上清液中TGF-β和IL-10水平。

1.10 LDH释放法检测$CD8^+$ T淋巴细胞对A549细胞的杀伤作用 收集各组细胞上清液加样于样品孔中，另设置空白孔和总LDH孔，每孔加入100 μL LDH检测工作液，混匀，室温避光孵育20 min，加入20 μL终止液，混匀。于酶标仪450 nm处测定A值，计算细胞死亡率。细胞死亡率＝（样品孔A值－空白孔A值）/（LDH孔A值－空白孔A值）×100%。以细胞死亡率代表$CD8^+$ T淋巴细胞对A549细胞的杀伤能力。

1.11 统计学分析 采用SPSS 21.0软件进行统计学分析。各组细胞中*TPX2* mRNA表达水平、TPX2和β-catenin蛋白表达水平、细胞存活率、HLA-DR和PD-L1水平、细胞凋亡率、细胞死亡率以及细胞上清液中IFN-γ、TNF-α、IL-2、TGF-β和IL-10水平均符合正态分布，以$\bar{x}\pm s$表示，多组间样本均数比较采用单因素方差分析，两组间样本均数比较采用两独立样本t检验。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组A549细胞中*TPX2* mRNA和蛋白表达水平 与空白对照组或si-NC组比较，si-TPX2组A549细胞中*TPX2* mRNA和TPX2蛋白表达水平明显降低（$P<0.05$）。见图1。

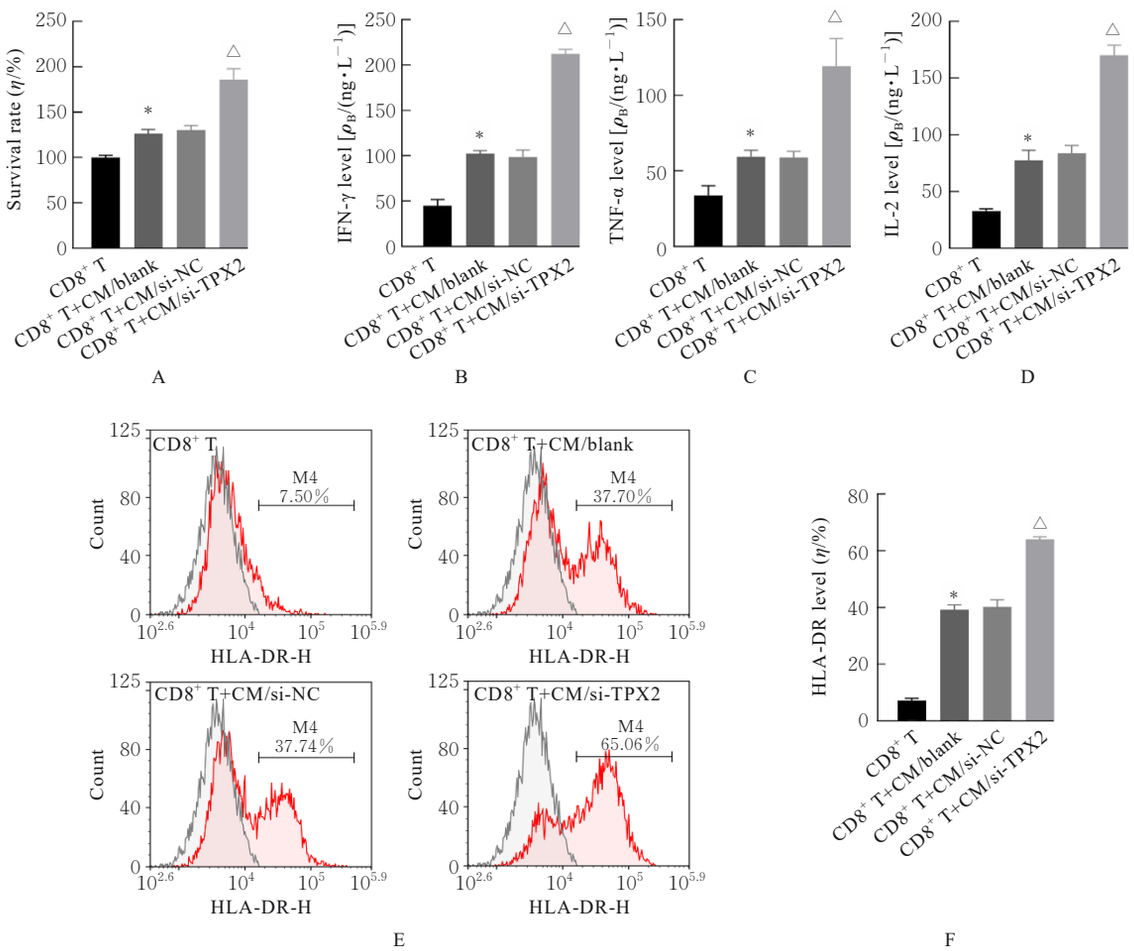


A: Expression level of *TPX2* mRNA; B: Electrophoregram of expression of TPX protein; C: Expression level of TPX2 protein (Lane 1: Blank control group; Lane 2: Si-NC group; Lane 3: Si-TPX2 group). *$P<0.05$ vs blank control group.

图1 RT-qPCR和Western blotting法检测各组A549细胞中TPX2 mRNA和蛋白表达

Fig. 1 Expressions of *TPX2* mRNA and protein in A549 cells in various groups detected by RT-qPCR and Western blotting methods

2.2 各组$CD8^+$ T淋巴细胞存活率、HLA-DR水平及细胞上清液中IFN-γ、TNF-α和IL-2水平 与$CD8^+$ T组比较，$CD8^+$ T＋CM/blank组$CD8^+$ T淋巴细胞存活率、HLA-DR水平及细胞上清液中IFN-γ、TNF-α和IL-2水平均明显升高（$P<0.05$）。与$CD8^+$ T＋CM/blank组比较，$CD8^+$ T＋CM/si-TPX2组CD8＋ T淋巴细胞存活率、HLA-DR水平及细胞上清液中IFN-γ、TNF-α和IL-2水平均明显升高（$P<0.05$），而$CD8^+$ T＋CM/si-NC组上述指标差异无统计学意义（$P>0.05$）。见图2。



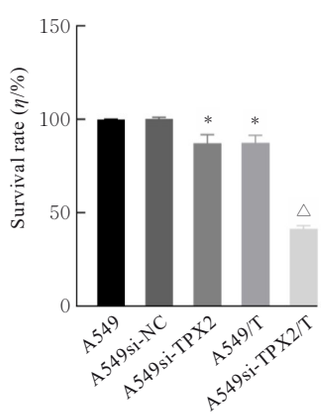
A：Survival rate；B－D：Levels of IFN-γ，TNF-α and IL-2 in cell supernatant；E：Flow cytometry diagram；F：HLA-DR level. $^{*}P<0.05$ compared with $CD8^{+}$ T group；$^{*}P<0.05$ compared with $CD8^{+}$ T+CM/blank group.

图 2 各组 $CD8^{+}$ T 淋巴细胞存活率、HLA-DR 水平及细胞上清液中 IFN-γ、TNF-α 和 IL-2 水平

Fig. 2 Survival rates of $CD8^{+}$ T lymphocytes, levels of HLA-DR, and levels of IFN-γ, TNF-α, and IL-2 in cell supernatant in various groups

2.3 各组 A549 细胞存活率 与 A549 组比较，A549si-TPX2 组和 A549/T 组 A549 细胞存活率明显降低（$P<0.05$），而 A549si-NC 组 A549 细胞存活率差异无统计学意义（$P>0.05$）。与 A549si-TPX2 组比较，A549si-TPX2/T 组 A549 细胞存活率明显降低（$P<0.05$）。见图 3。

2.4 各组 A549 细胞存活率、凋亡率和死亡率 与 A549 组比较，A549/T 组 A549 细胞存活率明显降低（$P<0.05$），而 A549 细胞凋亡率和细胞死亡率均明显升高（$P<0.05$）。与 A549/T 组比较，A549si-TPX2/T 组 A549 细胞存活率进一步降低（$P<0.05$），而 A549 细胞凋亡率及细胞死亡率均明显升高（$P<0.05$）；A549si-NC/T 组上述指标差异无统计学意义（$P>0.05$）。见图 4。

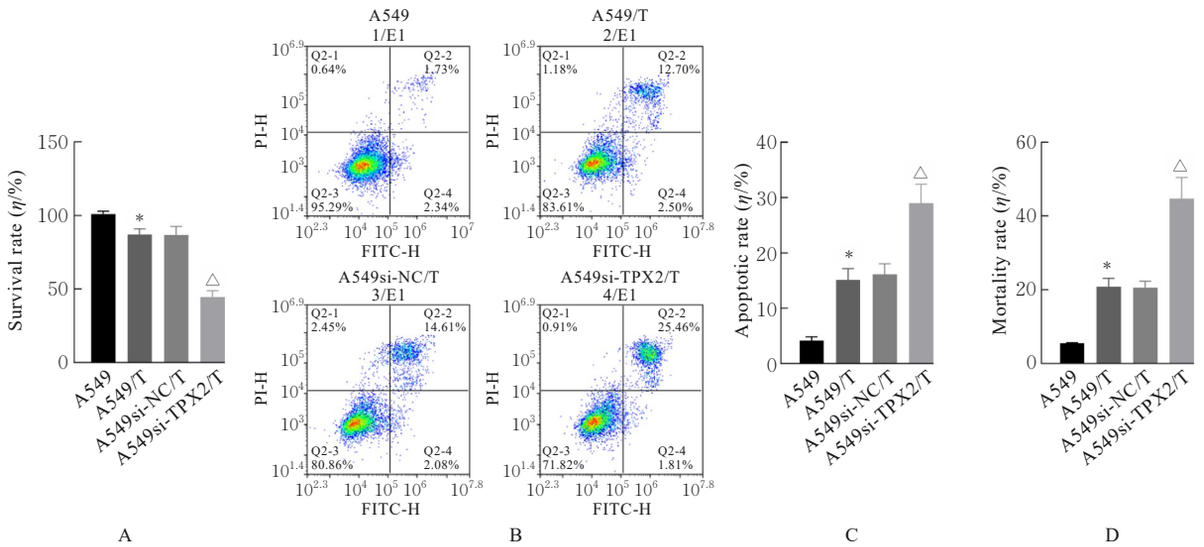


$^{*}P<0.05$ compared with A549 group；$^{\triangle}P<0.05$ compared with A549 si-TPX2 group.

图 3 CCK-8 法检测各组 A549 细胞存活率

Fig. 3 Survival rates of A549 cells in various groups detected by CCK-8 method

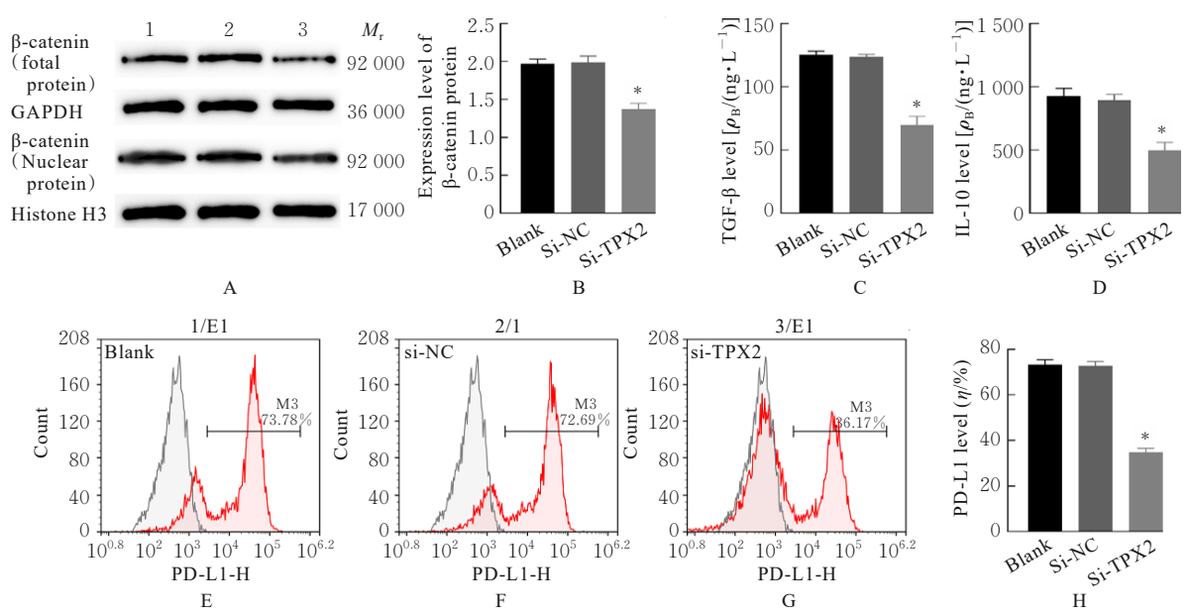
2.5 各组A549细胞中β-catenin蛋白表达水平和TGF-β、IL-10及PD-L1水平 与空白组比较，si-TPX2组A549细胞中β-catenin总蛋白和核蛋白表达水平、细胞表面分子PD-L1水平及细胞上清液中TGF-β和IL-10水平均明显降低($P<0.05$)，而si-NC组上述指标差异无统计学意义($P>0.05$)。见图5。



A: Survival rate; B: Flow cytometry diagram; C: Apoptotic rate; D: Mortality rate. $^{*}P<0.05$ compared with A549 group; $^{\triangle}P<0.05$ compared with A549/T group.

图4 CCK-8法、流式细胞术和LDH细胞毒性实验检测各组A549细胞存活率、凋亡率和死亡率

Fig. 4 Survival rates , apoptotic rates, and mortality rates of A549 cells in various groups detected by CCK-8, flow cytometry, and LDH cytotoxicity assay



A: Electrophoregram of expression of β-catenin protein(Lane 1:Blank group; Lane 2: Si-NC group; Lane 3:Si-TPX2 group); B:Expression level of β-catenin protein in cells; C,D: Levels of TGF-β and IL-10 in cell supernatant; E—G: Flow cytometry diagrams(E:Blank group; F:Si-NC group; G:Si-TPX2 group); H:PD-L1 level in cells. $^{*}P<0.05$ compared with blank group.

图5 Western blotting法、ELISA法和流式细胞术检测各组A549细胞中β-catenin蛋白表达水平、TGF-β和IL-10和PD-L1水平和细胞凋亡率

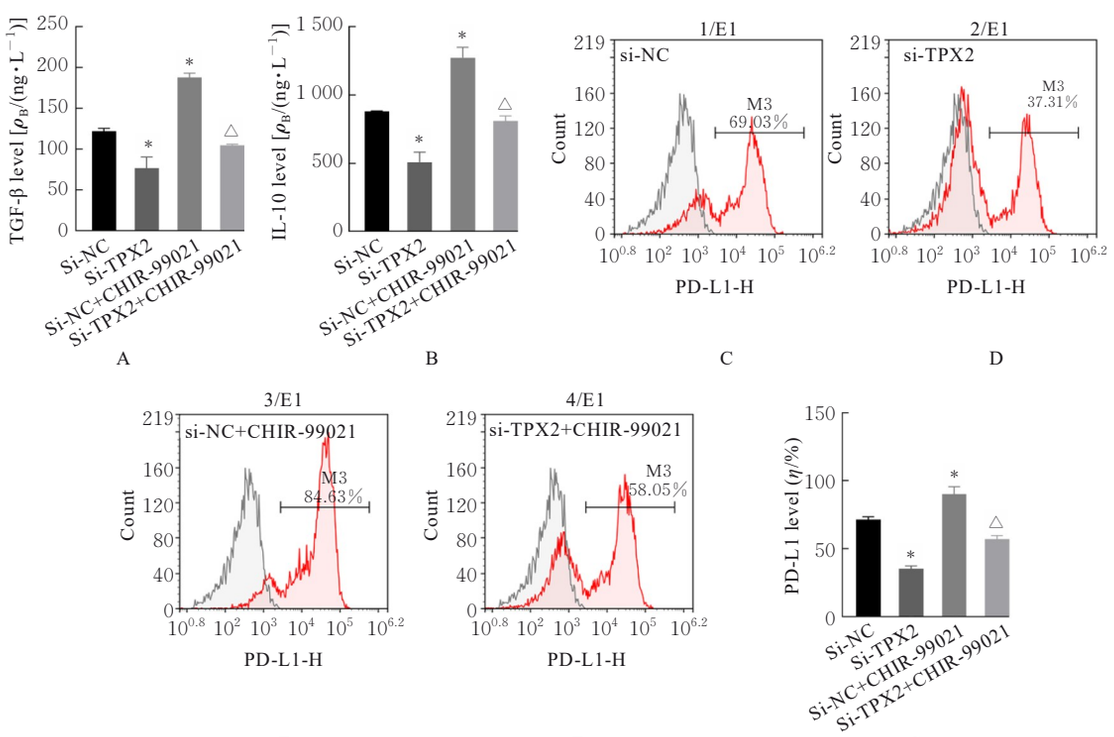
Fig. 5 Expression levels of β-catenin protein, levels of TGF-β, IL-10, and PD-L1 and apoptotic rates in A549 cells in various groups detected by Western blotting method, ELISA method, and flow cytometry

2.6　各组A549细胞中PD-L1水平及细胞上清液中TGF-β和IL-10水平　与si-NC组比较，si-TPX2组A549细胞表面PD-L1水平及细胞上清液中TGF-β和IL-10水平均明显降低（$P<0.05$），而si-NC+CHIR-99021组PD-L1水平及细胞上清液中TGF-β和IL-10水平均明显升高（$P<0.05$）。与si-TPX2组比较，si-TPX2+CHIR-99021组A549细胞表面PD-L1水平及细胞上清液中TGF-β和IL-10水平均明显升高（$P<0.05$）。见图6。

2.7　各组A549细胞存活率、细胞凋亡率和细胞死亡率　与A549/T组比较，A549si-TPX2/T组A549细胞存活率明显降低（$P<0.05$），细胞凋亡率及细胞死亡率均明显升高（$P<0.05$），A549si-NC/T组A549细胞存活率、细胞凋亡率和细胞死亡率差异无统计学意义（$P>0.05$）。与A549si-NC/T组比较，A549si-NC+CHIR-99021/T组A549细胞存活率明显升高（$P<0.05$），细胞凋亡率及细胞死亡率明显降低（$P<0.05$）。与A549si-TPX2/T组比较，A549si-TPX2+CHIR-99021/T组A549细胞存活率明显升高（$P<0.05$），细胞凋亡率和细胞死亡率均明显降低（$P<0.05$）。见图7。

3　讨　论

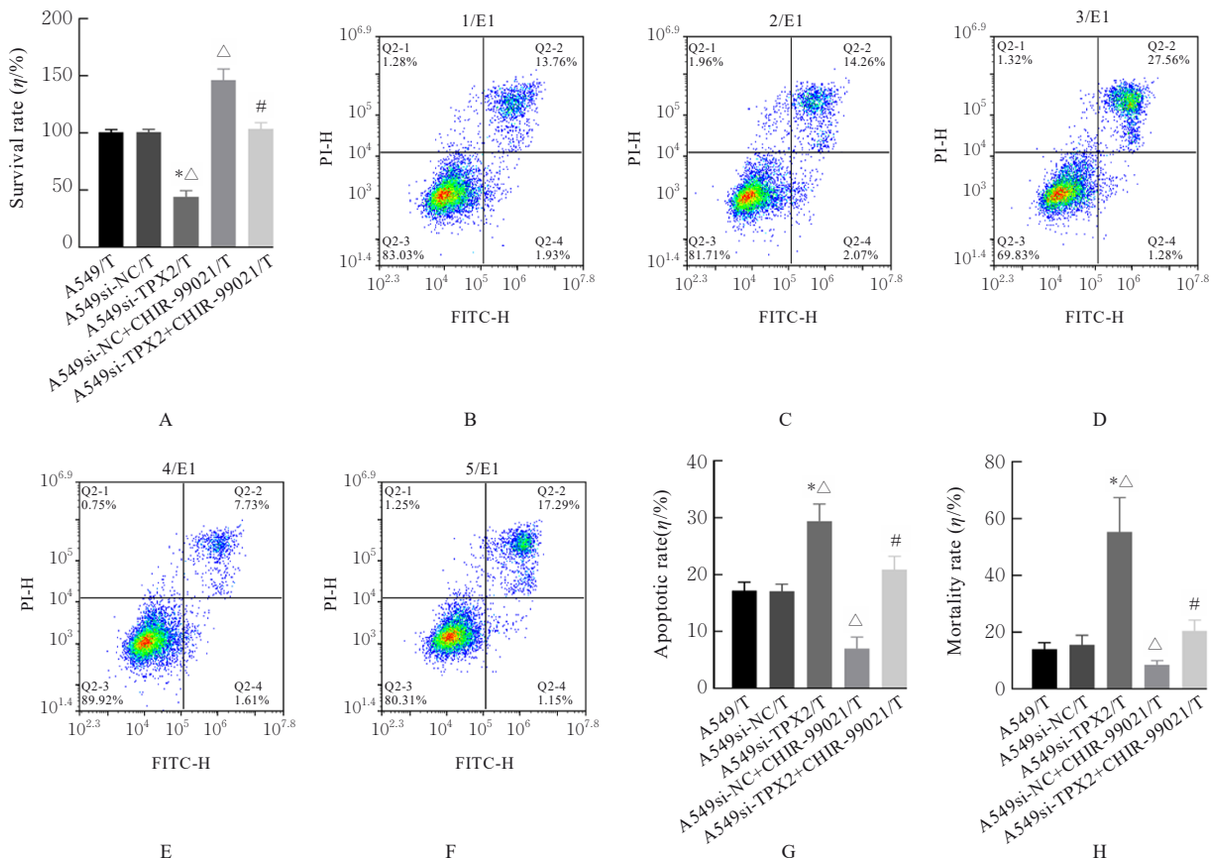
NSCLC的发生发展与机体免疫监视功能失衡密切相关。在生理状态下，免疫系统能够识别并清除恶性转化的细胞，然而，NSCLC细胞可通过多种机制逃避免疫攻击，形成免疫逃逸。例如，肿瘤细胞可分泌免疫抑制因子如TGF-β和IL-10，强烈抑制效应免疫细胞的功能，从而形成免疫抑制性微环境[15]。此外，细胞表面免疫检查点分子的上调以及多种免疫抑制因子的分泌，已被广泛认为是NSCLC实现免疫逃逸的重要途径[16-17]。$CD8^+$ T淋巴细胞是抗肿瘤免疫的核心效应细胞，其主要通过T淋巴细胞受体识别肿瘤抗原，并在共刺激信号作用下活化、增殖和分化为细胞毒性T淋巴细胞，进而通过释放IFN-γ、TNF-α、IL-2及颗粒酶等效应分子直接杀伤肿瘤细胞[18-19]。WEN等[20]研究显示：$CD8^+$ T淋巴细胞耗竭引起IFN-γ水平降低，PD-1水平升高，从而促进NSCLC的免疫逃逸和治疗耐药性。导致这一耗竭状态的因素多样，包括持



A，B：Levels of TGF-β and IL-10 in cell supernatant；C—F：Flow cytometry diagrams（C：Si-NC group；D：Si-TPX2 group；E：Si-NC+CHIR-99021 group；F：Si-TPX2+CHIR-99021 group）；G：Level of PD-L1. $^*P<0.05$ compared with si-NC group；$^\triangle P<0.05$ compared with si-TPX2 group.

图6　ELISA法和流式细胞术检测各组A549细胞中TGF-β、IL-10及PD-L1水平

Fig. 6　Levels of TGF-β, IL-10, and PD-L1 in A549 cells in various groups detected by ELISA method and flow cytometry



A：Surival rate；B－F：Flow cytometry diagrams（B：A549T group；C：A549si-NC/T groups；D：A549si-TPX2/T group；E：A549si-NC＋CHIR-99021/T group；F：A549si-TPX2＋CHIR-99021/T group）；G：Apoptotic rate；H：Mortality rate. $^{*}P<0.05$ compared with A549/T group；$^{\triangle}P<0.05$ compared with A549si-NC/T group；$^{\#}P<0.05$ compared with A549si-TPX2/T group.

图7　CCK-8法、流式细胞术和LDH细胞毒性实验检测各组A549细胞存活率、凋亡率和死亡率

Fig. 7　Survival rates, apoptotic rates, and mortality rates of A549 cells in various groups detected by CCK-8 methwod, flow cytometry, and LDH cytotoxicity assay

续性抗原刺激、多种抑制性受体的持续表达、表观遗传学改变、转录因子调控、代谢失调以及细胞因子谱的改变[21]。因此，恢复$CD8^+$ T淋巴细胞的细胞毒性功能、逆转其耗竭状态，已成为改善NSCLC免疫治疗响应的潜在策略。

TPX2在NSCLC中高表达，可促进NSCLC转移和恶性进展，与预后不良有关[22]。ZHU等[23]研究显示：TPX2在肺腺癌中与免疫抑制因子IL-10呈正相关关系，且TPX2沉默可抑制A549细胞增殖和迁移。目前，关于TPX2在NSCLC中的研究主要集中于恶性生物学行为的调控，然而，该分子在NSCLC免疫逃逸中的作用鲜有报道。本研究通过沉默*TPX2*基因，发现其可显著增强$CD8^+$ T淋巴细胞的毒性功能，表现为$CD8^+$ T淋巴细胞表面活化标志物HLA-DR表达上调，细胞存活率升高，且细胞上清液中IFN-γ、TNF-α和IL-2水平明显升高。进一步研究显示：A549细胞进行单独的*TPX2*基因沉默或与$CD8^+$ T淋巴细胞共培养均能显著抑制细胞增殖，但*TPX2*沉默的A549细胞与$CD8^+$ T淋巴细胞共培养时，其增殖活性显著低于单独*TPX2*沉默的A549细胞。另一方面，与$CD8^+$ T淋巴细胞共培养时，*TPX2*基因沉默可显著抑制A549细胞的增殖并诱导其凋亡，同时提高$CD8^+$ T淋巴细胞对A549细胞的杀伤敏感性，从而有效抑制A549细胞的免疫逃逸。该结果与ZHANG等[24]报道的TPX2在调控胰腺癌中免疫细胞功能及恶性进展中的作用一致。提示*TPX2*基因沉默与$CD8^+$ T淋巴细胞共培养在抑制A549细胞增殖上表现出显著的协同作用。尽管单独*TPX2*沉默能一定程度抑制细胞活力，但其主要效应在于显著增强$CD8^+$ T淋巴细胞对A549细胞的杀伤功能，从而发挥更强的抗增殖作用。

在机制层面，本研究证实*TPX2*基因沉默可

下调A549细胞内β-catenin的蛋白表达水平。Wnt/β-catenin信号通路在肿瘤发生发展及免疫调节中具有多重生物学功能。DING等[25]研究表明：*TPX2*沉默可通过抑制Wnt/β-catenin信号通路诱导人肝癌细胞凋亡。WANG等[26]研究显示：脂肪非典型钙粘蛋白4（FAT atypical cadherin 4，FAT4）过表达通过β-catenin依赖性机制诱导PD-L1发生异常糖基化并促进其降解，从而在宫颈癌免疫活性小鼠模型中显著增强细胞毒性T淋巴细胞的抗肿瘤免疫活性。此外，研究[27]已证实Wnt/β-catenin信号通路异常激活与免疫逃逸和免疫检查点抑制剂耐药显著相关，该现象在膀胱癌[28]、腺样囊性癌[29]和NSCLC[30]等肿瘤中均有报道。本研究结果显示：*TPX2*基因沉默导致A549细胞上清液中TGF-β和IL-10分泌减少，同时细胞表面分子PD-L1表达下调；而使用CHIR-99021激活Wnt/β-catenin信号通路后，可逆转*TPX2*基因沉默对免疫抑制因子释放、PD-L1表达及免疫逃逸的抑制效应；表明*TPX2*基因可能通过正向调控Wnt/β-catenin通路促进NSCLC的免疫逃逸。

由于本研究采用的共培养体系为Transwell非接触式，A549细胞与$CD8^+$ T淋巴细胞被物理隔开，二者无法直接接触，因此A549细胞表面PD-L1与$CD8^+$ T淋巴细胞表面PD-1之间可能难以发生直接相互作用，从而削弱了该信号轴在介导免疫逃逸中的主导作用。PEURA等[30]研究显示：免疫抑制因子TGF-β和IL-10上调可引起$CD8^+$ T淋巴细胞耗竭。XIONG等[31]研究在宫颈癌细胞与$CD8^+$ T淋巴细胞的共培养模型中也发现：YTHDF1过表达可通过促进TGF-β和IL-10分泌，显著抑制$CD8^+$ T淋巴细胞的杀伤活性，且该效应并不依赖于PD-L1信号。结合上述研究与本研究结果，推测在*TPX2*基因调控A549细胞免疫逃逸的过程中，更倾向于促进TGF-β和IL-10等免疫抑制因子的分泌，进而导致$CD8^+$ T淋巴细胞耗竭；而PD-L1/PD-1通路在本实验条件下可能仅起次要作用，其作用程度低于可溶性免疫抑制因子。

综上所述，*TPX2*基因沉默通过抑制Wnt/β-catenin信号通路，进而抑制免疫抑制因子分泌及降低PD-L1表达，导致$CD8^+$ T淋巴细胞对A549细胞杀伤活性增强，达到抑制免疫逃逸的作用。本研究不仅明确了TPX2在NSCLC免疫逃逸中的功能，还阐明了Wnt/β-catenin通路在其间的关键介导作用，为深入解析NSCLC免疫微环境调控提供了新视角。然而，本研究仍存在一定局限，未来需进一步探讨TPX2调控Wnt/β-catenin信号通路的具体分子机制，以及在体内环境下该机制对肿瘤免疫逃逸的影响，为NSCLC的免疫治疗提供更坚实的理论基础和潜在靶点。

利益冲突声明：

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明：

颜妃大和陈鸣娣参与实验操作、数据分析及论文撰写，梁智伟参与研究设计、论文审阅及修改。

[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): 229-263.

[2] WANG S L, NIE F J, YIN Q Y, et al. Periodontitis promotes tumor growth and immune evasion *via* PD-1/PD-L1[J]. Cancer Immunol Immunother, 2024, 74(1): 22.

[3] MOSEMAN J E, RASTOGI I, JEON D, et al. PD-1 blockade employed at the time $CD8^+$ T cells are activated enhances their antitumor efficacy[J]. J Immunother Cancer, 2025, 13(5): e011145.

[4] BISCHOFF P, TRINKS A, OBERMAYER B, et al. Single-cell RNA sequencing reveals distinct tumor microenvironmental patterns in lung adenocarcinoma[J]. Oncogene, 2021, 40(50): 6748-6758.

[5] SONG P, LI W B, GUO L, et al. Identification and validation of a novel signature based on NK cell marker genes to predict prognosis and immunotherapy response in lung adenocarcinoma by integrated analysis of single-cell and bulk RNA-sequencing[J]. Front Immunol, 2022, 13: 850745.

[6] MCLANE L M, ABDEL-HAKEEM M S, WHERRY E J. CD8 T cell exhaustion during chronic viral infection and cancer[J]. Annu Rev Immunol, 2019, 37: 457-495.

[7] ZHU X H, LI K, LIU G C, et al. Microbial metabolite butyrate promotes anti-PD-1 antitumor efficacy by modulating T cell receptor signaling of cytotoxic CD8 T cell[J]. Gut Microbes, 2023, 15(2): 2249143.

[8] MUTO S, ENTA A, MARUYA Y, et al. Wnt/β-catenin signaling and resistance to immune checkpoint inhibitors: from non-small-cell lung cancer to other

cancers[J]. Biomedicines, 2023, 11(1): 190.
[9] DU L Y, LEE J H, JIANG H F, et al. β-Catenin induces transcriptional expression of PD-L1 to promote glioblastoma immune evasion[J]. J Exp Med, 2020, 217(11): e20191115.
[10] WANG J, ZHENG H, HE H, et al. TPX2 serves as a cancer susceptibility gene and is closely associated with the poor prognosis of endometrial cancer[J]. Genet Res, 2022, 2022: 5401106.
[11] HU J R, HE Q, TIAN T, et al. Transmission of exosomal TPX2 promotes metastasis and resistance of NSCLC cells to docetaxel [J]. Onco Targets Ther, 2023, 16: 197-210.
[12] LIU X L, WANG W Y, CHEN B, et al. Integrative analysis based on the cell cycle-related genes identifies TPX2 as a novel prognostic biomarker associated with tumor immunity in breast cancer[J]. Aging, 2024, 16(8): 7188-7216.
[13] XU Y F, TAN X L, YANG Q, et al. Akkermansia muciniphila outer membrane protein regulates recruitment of $CD8^+$ T cells in lung adenocarcinoma and through JAK-STAT signalling pathway [J]. Microb Biotechnol, 2024, 17(7): e14522.
[14] LEE S Y, CHAE M K, YOON J S, et al. The effect of CHIR 99021, a glycogen synthase kinase-3β inhibitor, on transforming growth factor β-induced tenon fibrosis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2021, 62(15): 25.
[15] ANTONIA S J, VANSTEENKISTE J F, MOON E. Immunotherapy: beyond anti - PD-1 and anti-PD-L1 therapies[J]. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2016(36): e450-e458.
[16] GENOVA C, DELLEPIANE C, CARREGA P, et al. Therapeutic implications of tumor microenvironment in lung cancer: focus on immune checkpoint blockade[J]. Front Immunol, 2022, 12: 799455.
[17] YANG L, LI A T, YU W N, et al. Blockade of purine metabolism reverses macrophage immunosuppression and enhances anti-tumor immunity in non-small cell lung cancer[J]. Drug Resist Updat, 2025, 78: 101175.
[18] SCHENKEL J M, FRASER K A, VEZYS V, et al. Sensing and alarm function of resident memory $CD8^+$ T cells[J]. Nat Immunol, 2013, 14(5): 509-513.
[19] MENARES E, GÁLVEZ-CANCINO F, CÁCERES-MORGADO P, et al. Tissue-resident memory $CD8^+$ T cells amplify anti-tumor immunity by triggering antigen spreading through dendritic cells [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 4401.
[20] WEN H, ZHANG P P, ZHAO J, et al. Metabolic alterations driven by LDHA in CD8+ T cells promote immune evasion and therapy resistance in NSCLC[J]. Sci Rep, 2025, 15(1): 24440.
[21] DOLINA J S, VAN BRAECKEL-BUDIMIR N, THOMAS G D, et al. $CD8^+$ T cell exhaustion in cancer[J]. Front Immunol, 2021, 12: 715234.
[22] ZHOU F, WANG M, AIBAIDULA M, et al. TPX2 promotes metastasis and serves as a marker of poor prognosis in non-small cell lung cancer [J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e925147.
[23] ZHU M X, WANG X P, ZHANG Q, et al. Integrative analysis confirms TPX2 as a novel biomarker for clinical implication, tumor microenvironment, and immunotherapy response across human solid tumors[J]. Aging, 2024, 16(3): 2563-2590.
[24] ZHANG Z G, LIU Z X, YAO Y, et al. Exploring the clinical significance of TPX2 in pancreatic cancer: from biomarker to immunotherapy[J]. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2025, 398(6): 6843-6864.
[25] DING L, ZHANG S H, CHEN S J, et al. Effect and mechanism of lentivirus-mediated silencing of TPX2 gene on proliferation and apoptosis of human hepatoma cells[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(5): 8352-8358.
[26] WANG D Y, WU S Y, HE J X, et al. FAT4 overexpression promotes antitumor immunity by regulating the β-catenin/STT3/PD-L1 axis in cervical cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2023, 42(1): 222.
[27] SWEIS R F, SPRANGER S, BAO R Y, et al. Molecular drivers of the non-T-cell-inflamed tumor microenvironment in urothelial bladder cancer [J]. Cancer Immunol Res, 2016, 4(7): 563-568.
[28] SRIDHARAN V, GJINI E, LIAO X Y, et al. Immune profiling of adenoid cystic carcinoma: PD-L2 expression and associations with tumor-infiltrating lymphocytes[J]. Cancer Immunol Res, 2016, 4(8): 679-687.
[29] MUTO S, OZAKI Y, YAMAGUCHI H, et al. Tumor β-catenin expression is associated with immune evasion in non-small cell lung cancer with high tumor mutation burden[J]. Oncol Lett, 2021, 21(3): 203.
[30] PEURA A, TURPIN R, LIU R X, et al. Soft matrix promotes immunosuppression in tumor-resident immune cells *via* COX-FGF2 signaling[J]. Nat Commun, 2025, 16(1): 4908.
[31] XIONG J, HE L, CHAI X S, et al. YTHDF1 boosts the lactate accumulation to potentiate cervical cancer cells immune escape[J]. Cell Death Dis, 2024, 15(11): 843.