

王佳,李丽,黎冰林,等. 抑制巨噬细胞 Act 1 表达对黑色素瘤肺转移的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(4): 1 – 6.  
Wang J, Li L, Li BL, et al. Targeted suppression of macrophage Act1 inhibits the lung metastasis of melanoma cells in mice [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(4): 1 – 6.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 04. 001

抑制巨噬细胞 Act 1 表达对黑色素瘤肺转移的影响

王 佳<sup>1</sup>,李 丽<sup>1</sup>,黎冰林<sup>1</sup>,卢 鑫<sup>1</sup>,王丽京<sup>1</sup>,杨永霞<sup>2\*</sup>

(1. 广东药科大学 生命科学与生物制药学院,广州 510006; 2. 广东药科大学 医药信息工程学院, 510006)

【摘要】 目的 本文通过建立黑色素瘤肺转移模型,研究巨噬细胞 NF-κB 活化因子 1(nuclear factor kappa B activator 1, Act 1)对黑色素瘤肺转移的影响。方法 以抑制巨噬细胞 Act 1 表达的小鼠(anti-Act 1)为研究对象,通过尾静脉注射 B16-F10 细胞诱导肺转移模型,采用 HE 染色法检测小鼠肺组织的转移情况;免疫组化方法分析肿瘤细胞的增殖指数和白细胞、巨噬细胞的浸润情况。结果 与 C57 小鼠相比,在尾静脉注射 B16-F10 细胞 20 d 后,实验组 anti-Act 1 小鼠肺组织转移灶面积、数量较少;Ki67、CD45、CD68 表达量较低。结论 靶向抑制巨噬细胞 Act 1 表达能够显著减轻黑色素瘤肺转移程度。

【关键词】 Anti-Act 1 小鼠;黑色素瘤;肺转移模型;巨噬细胞

【中图分类号】 R-33 【文献标识码】 A 【文章编号】1671-7856(2019) 04-0001-06

Targeted suppression of macrophage Act1 inhibits the lung metastasis of melanoma cells in mice

WANG Jia<sup>1</sup>, LI Li<sup>1</sup>, LI Binglin<sup>1</sup>, LU Xin<sup>1</sup>, WANG Lijing<sup>1</sup>, YANG Yongxia<sup>2\*</sup>

(1. School of Life Science and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China.  
2. College of Medical Information Engineering, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of nuclear factor kappa B activator 1(Act1) on lung metastasis of melanoma in mice. **Methods** Mice were genetically engineered to enable the targeted suppression of Act1 in macrophages (anti-Act1). The lung metastasis model was generated by tail vein injection of B16-F10 melanoma cells. The extent of lung metastasis was assessed pathology using HE staining of lung tissues. The infiltration of CD45<sup>+</sup> leukocytes and CD68<sup>+</sup> macrophages and the proliferation index of tumor cells in lung tissues were evaluated by immunohistochemistry. **Results** The anti-Act1 mice developed fewer metastatic and micro-metastatic foci, with reduced CD45<sup>+</sup> leukocyte and CD68<sup>+</sup> macrophage infiltration in the lung tissues, when compared with the C57 control mice. Cells of metastatic and micro-metastatic foci in the anti-Act1 mice demonstrated a reduced proliferation index, when compared with those of control animals. **Conclusions** Targeted suppression of Act1 in macrophages inhibits the lung metastasis of murine melanoma.

【Keywords】 Anti-Act 1 mice; melanoma; lung metastasis model; macrophage

黑色素瘤是高度恶性的肿瘤,在肿瘤发生的早期就会发生远端转移<sup>[1]</sup>。在我国,虽然黑色素瘤的发生率较低,但其远处转移预后很差,5 年生存率低

于 5%<sup>[2]</sup>。侵袭与转移是恶性肿瘤最显著的生物学特征,在肿瘤的治疗过程中,阻止肿瘤细胞的侵袭与转移尤为重要,这也是治疗肿瘤成败的关键因

[基金项目] 国家自然科学基金项目(3177080418)。

[作者简介] 王佳(1993—),女,硕士研究生,研究方向:病理学与病理生理学。E-mail: wangjia315@163.com

[通信作者] 杨永霞(1979—),女,博士,教授,研究方向:生物波谱与代谢组学。E-mail: yangyongxia@gdpu.edu.cn

素。小鼠黑色素瘤细胞 B16-F10 具有高转移特性,已被广泛地用于研究肿瘤发生、转移过程的相关参数,是研究肿瘤侵袭转移的理想模型<sup>[3]</sup>。

越来越多的研究表明,机体体内微环境的改变与肿瘤的发生与发展密切相关<sup>[4-5]</sup>。TAM (肿瘤相关巨噬细胞)被认为是肿瘤发生、发展和侵袭、转移最为重要的细胞之一<sup>[6]</sup>。近年来的研究发现,TAM 可以分泌多种炎症因子、生长刺激因子、蛋白水解酶和一些细胞因子<sup>[7]</sup>,这些因子既能降解肿瘤细胞外基质,还能促进肿瘤中血管的形成<sup>[8]</sup>。TAM 可构成实体瘤细胞群体的 50% ~ 80%,TAM 浸润与乳腺癌、结直肠癌、肝癌、宫颈癌和肺癌的不良预后密切相关<sup>[9]</sup>。NF- $\kappa$ B 活化因子 1 (NF- $\kappa$ B activator 1, Act 1)在机体免疫反应的作用极为广泛,是 NF- $\kappa$ B 和 C/EBP 介导的炎症反应下游信号通路的重要分子<sup>[10]</sup>。而 NF- $\kappa$ B 在炎症、先天免疫和癌症中起着至关重要的作用<sup>[11]</sup>,且 NF- $\kappa$ B 信号通路能促进癌细胞的生长和生存<sup>[12]</sup>。已有文献表明 NF- $\kappa$ B 信号通路与肿瘤相关,且都强调了这种转录因子在癌症研究中的重要性<sup>[13]</sup>。Act 1 主要介导 IL-17 信号通路的活化并参与炎症反应。Welte 等研究发现,IL-17 能够促进乳腺癌的发生与发展<sup>[14]</sup>。此外已有研究发现,通过 IL-17B/IL-17BR 信号传导,能够促进人的骨髓干细胞与乳腺癌肿瘤细胞的转移<sup>[15]</sup>。Act 1 的缺少会抑制 IL-17 诱导的 NF- $\kappa$ B 通路被激活<sup>[16]</sup>。且通过小鼠过敏性哮喘模型发现,上皮细胞中 Act 1 的缺失能减轻 IL-25 引起的 Th2 型免疫反应和肺部炎症<sup>[17]</sup>。

鉴于 NF- $\kappa$ B 信号能够促进癌细胞的生长,且巨噬细胞与肿瘤的发生与发展密切相关。目前,Act 1 在肿瘤中的作用研究很少。因此,本研究以巨噬细胞 Act 1 表达被靶向抑制的小鼠(anti-Act 1)为研究对象,采用尾静脉注射 B16-F10 细胞,诱导小鼠肺转移模型,探讨巨噬细胞 Act 1 在肿瘤转移过程中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

Anti-Act 1 小鼠构建于 C57BL/6 背景,由中国科学院上海细胞生物学研究所构建并赠送<sup>[18]</sup>。6~8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 24 只(体重 18~22 g)从广东省医学实验动物中心[SCXK(粤)2013-0002]购买,饲养于广东药科大学 SPF 级动物中心[SYXK

(粤)2017-0125]。所有的动物实验都是按照中国动物实验指南及其他相关国际准则进行的实验[动物福利伦理审批号:gdpulac2017026]。小鼠恶性黑色素瘤 B16-F10 细胞系(B16, ATCC, CCL-247)从密歇根大学耿建国实验室获得。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 实验动物 anti-Act 1 小鼠的鉴定

剪取 anti-Act 1 小鼠的尾部,提取 DNA,PCR 扩增目的片段基因,PCR 引物 1:5'-CTG GTG CAG ACA GCC TAG CTG-3',引物 2:5'-CCT GCG AGC TAAAGT CCT GGA-3' (Invitrogen),基因扩增产物条带为 250 bp。对基因鉴定为阳性的小鼠,提取腹腔巨噬细胞,采用 Western blot 法检测巨噬细胞上 Act 1 的表达情况。化学发光显影仪避光显影和拍摄。实验所用抗体为 Act 1 (Santa Cruz)、 $\beta$ -actin (Bioworld)。

#### 1.2.2 细胞培养

小鼠恶性黑色素瘤 B16-F10 细胞系(B16, ATCC, CCL-247)在 DMEM 培养基(10%胎牛血清、200 mg/mL 链霉素和 200 U/mL 青霉素),温度 37℃,5% CO<sub>2</sub>/95%的培养箱中维持生长。

#### 1.2.3 体内肺转移模型的建立

C57BL/6 和 anti-Act 1 雄性小鼠各 12 只,分别设为对照组和实验组,参照 Qi 等<sup>[19]</sup>的方法建立体内肺转移模型。将 B16-F10 细胞( $1 \times 10^5/0.2$  mL)通过尾静脉的注射方法,分别注射到 C57BL/6 和 anti-Act 1 的体内。20 d 后腹腔注射氯胺酮 10 mg/kg、阿托品 1 mg/kg、盐酸西拉唑 20 mg/kg 麻醉,颈部脱臼处死小鼠。

#### 1.2.4 肺组织病理组织学观察

处死 C57BL/6 和 anti-Act 1 小鼠后,取肺组织,平铺在滤纸上,观察肺组织转移的结节数。再将其置于 4%的多聚甲醛液中固定过夜,脱水后石蜡包埋,切片,HE 染色。显微镜下观察肺组织肿瘤转移的情况。

#### 1.2.5 免疫组化法检测肺组织 Ki67、CD45、CD68 的表达

采用常规石蜡切片(3  $\mu$ m),通过 Ki67 (Abcam)、CD45 (Proteintech)和 CD68 (Proteintech)对肺、肺转移灶部位进行特异性染色,显微镜下观察肿瘤细胞的增殖情况和炎症浸润程度。石蜡切片脱蜡后,高温高压抗原修复 8 min,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-甲醇溶液中孵育 30 min,10% BSA 阻滞 1 h,

切片用兔抗鼠 Ki67 ( Abcam )、CD45 ( Proteintech ) 和 CD68 ( Proteintech ) 进行抗体孵育,4℃ 过夜,孵育二抗(兔抗,中杉金桥),DAB 染色,苏木素复染。光学显微镜拍摄并记录分析。并运用免疫荧光法检测肺组织转移灶上巨噬细胞 Act 1 的表达情况,荧光显微镜避光拍摄。实验所用抗体为兔抗鼠 CD68 ( Proteintech )、Act 1 ( Santa Cruz )、FITC ( Life Technologies ) 标记二抗。

1.3 统计学数据分析

对上述所得实验数据,采用 SPSS 软件进行统计分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 anti-Act 1 小鼠的鉴定

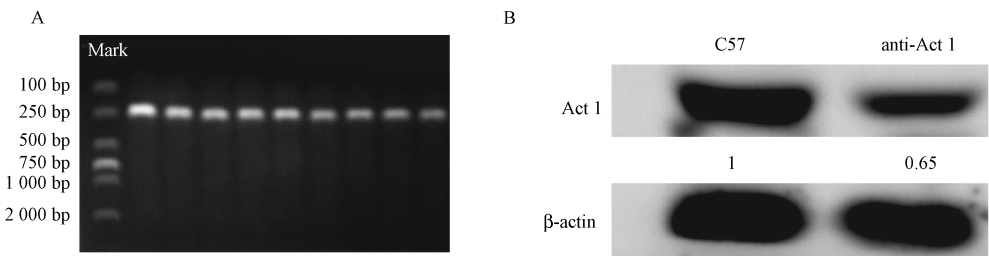
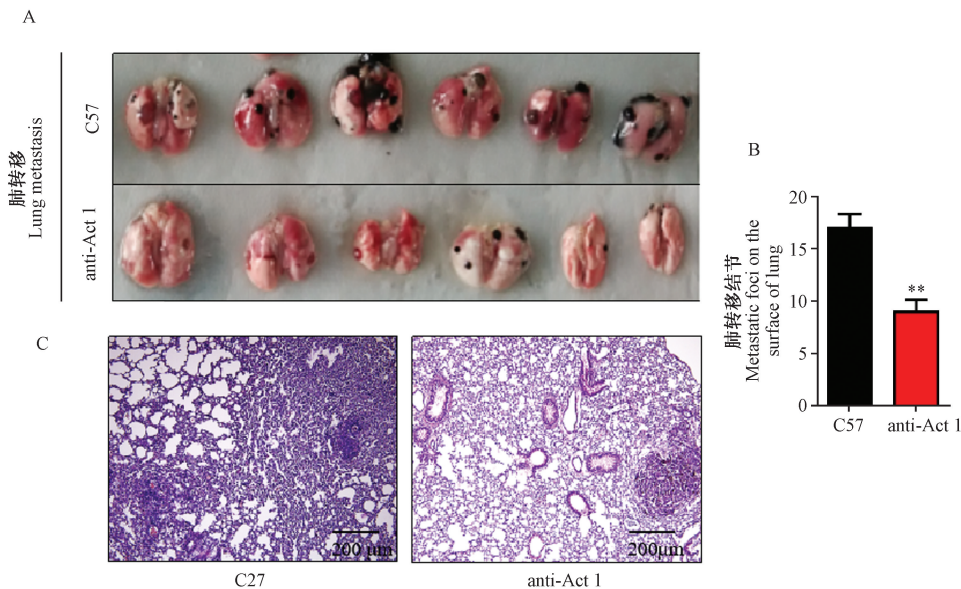


图 1 (A) Anti-Act 1 小鼠基因型鉴定;(B) Western blot 技术检测小鼠腹腔巨噬细胞 Act 1 的表达  
Figure 1 (A) Genotype characterization of the anti-Act 1 mice;(B) Act 1 expression in peritoneal macrophages as determined by western blotting



注:与 C57 小鼠相比,anti-Act 1 小鼠体内肺结节数减小,\*\*  $P < 0.01$ 。  
图 2 C57 和 anti-Act 1 小鼠肺部肿瘤转移的情况( $\times 10$ )  
Note.Compared with C57 mice, the number of lung nodules in anti-Act 1 mice were decreased, \*\*  $P < 0.01$ .  
Figure 2 Comparison of lung metastasis in the lung tissues of C57 and anti-Act 1 mice



### 2.3 靶向抑制巨噬细胞 Act 1 对小鼠肺组织 B16-F10 肿瘤细胞增殖的影响

细胞增殖指数是评价肿瘤严重程度的关键因素,Ki67 可以反映细胞增殖的情况。免疫组化的结果如图 3 所示,与 C57 小鼠相比,anti-Act 1 小鼠的 Ki67 的表达量明显减少。通过统计增殖指数(阳性细胞数/总细胞数),结果显示 anti-Act 1 小鼠的肿瘤细胞增殖程度低于 C57 小鼠,且具有统计学差异( $P<0.01$ )。

### 2.4 靶向抑制巨噬细胞 Act 1 对小鼠肺组织炎症细胞浸润的影响

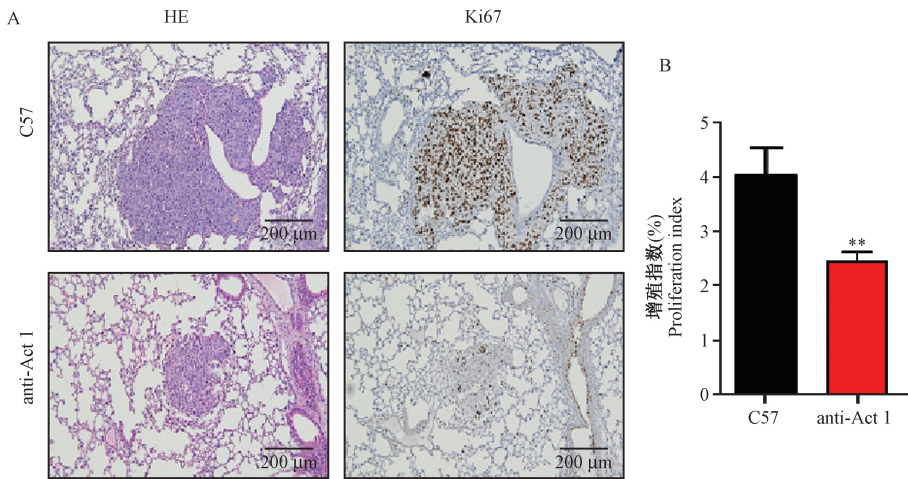
免疫组化的结果如图 4 所示,白细胞标记物 CD45 和巨噬细胞标记物 CD68 主要表达于肺转移灶的肿瘤实质部位。与 C57 小鼠相比,anti-Act 1 小鼠的 CD45 和 CD68 的表达量明显减少,且均具有明显的统计学差异( $P<0.01$ )。结果提示,白细胞和巨噬细胞在肿瘤转移部位的浸润数量明显减小。免疫荧光的结果如图 5 所示,在 C57 小鼠肺转移灶中,Act1 与巨噬细胞的标记物 CD68 均有表达,且有大量共定位;然而,在 anti-Act 1 小鼠中,两者的共定位甚少。进一步证明,在 anti-Act 1 小鼠的巨噬细胞上 Act 1 的表达被靶向抑制了,且此类巨噬细胞在肿瘤转移部位的浸润数量明显减小。

## 3 讨论

肿瘤一旦发生转移,就会对包括化疗、放疗和

免疫疗法在内的大多数疗法产生耐药性。远端转移的黑色素瘤患者预后极差,中位生存时间仅为 8 个月<sup>[20]</sup>。转移是导致癌症相关死亡最主要的原因之一。肿瘤的发生发展与肿瘤细胞所处环境有密切关联,肿瘤微环境涉及多种免疫细胞和炎症因子,巨噬细胞参与其中且与多种肿瘤发生与发展密切相关<sup>[21]</sup>。Act 1 作为 IL-17 信号通路必需的衔接蛋白,可与 IL-17RA 和 TRAF6 形成复合体,活化 NF- $\kappa$ B 等信号通路<sup>[22]</sup>。本研究利用巨噬细胞 Act 1 表达被靶向抑制的小鼠(anti-Act 1)为研究对象,探讨与研究了与 NF- $\kappa$ B 活化相关的 Act 1 对黑色素瘤肺转移的影响。

本实验研究结果表明,在 B16-F10 的人工肺转移实验中,与 C57 小鼠相比,Anti-Act 1 小鼠可显著抑制转移灶的数目,同时通过 HE 染色,显微镜下观察发现,Anti-Act 1 小鼠的转移灶肿瘤组织面积小,片状坏死部位少,提示靶向抑制巨噬细胞 Act 1 的表达,具有抗恶性肿瘤转移的能力。细胞增殖指数是评价肿瘤严重程度的关键因素,ki67 可以反映细胞增殖情况。在 anti-Act 1 小鼠的肺部转移灶的肿瘤部位,ki67 的表达量明显降低,表明抑制巨噬细胞 Act 1 的表达能明显抑制肿瘤转移部位的细胞增殖。Anti-Act 1 小鼠肿瘤的恶化程度较低,这也进一步说明了抑制巨噬细胞 Act 1 的表达能在一定程度上减慢肿瘤细胞向肺转移的速度。肿瘤组织中 TAM 浸润与肿瘤发展以及不良预后相关,TAM 可分泌 TNF- $\alpha$ 、EGF、

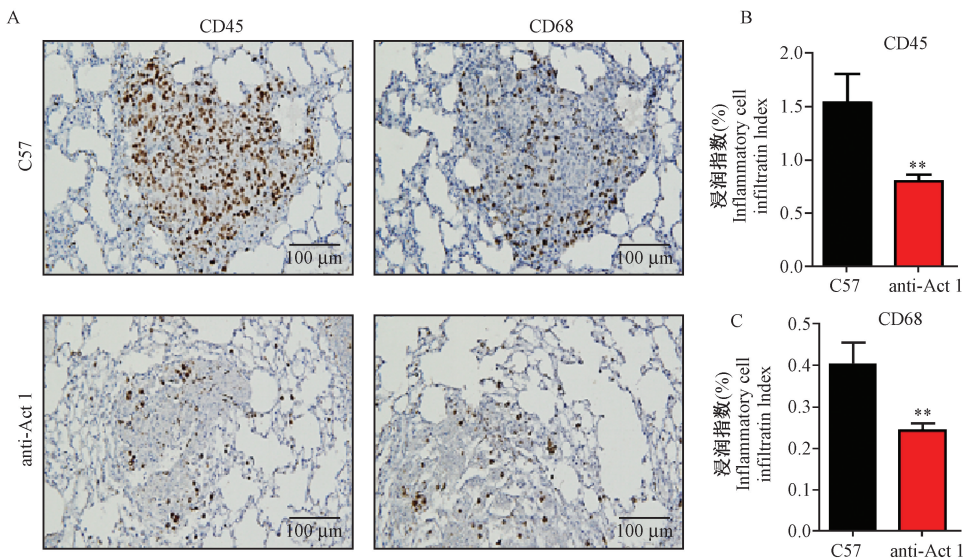


注:与 C57 小鼠相比,anti-Act 1 小鼠体内 Ki67 表达量下降,\*\* $P<0.01$ 。

图 3 C57 和 anti-Act 1 小鼠肺部肿瘤细胞增殖情况( $\times 10$ )

Note.Compared with C57 mice, the expression of Ki67 in the anti-Act 1 micewere decreased, \*\* $P<0.01$ .

Figure 3 Tumor cell proliferation in the metastatic lung lesions of C57 and anti-Act 1 mice



注:与 C57 小鼠相比,anti-Act 1 小鼠体内 CD45、CD68 表达量均下降, \*\*  $P < 0.01$ 。

图 4 C57 和 anti-Act 1 小鼠肺部炎症细胞浸润情况( $\times 20$ )

Note.Compared with C57 mice, the expressions of CD45 and CD68 were decreased in anti-Act 1 mice, \*\*  $P < 0.01$ .

Figure 4 Inflammatory cell infiltration in the lung tissues of C57 and anti-Act 1 mice

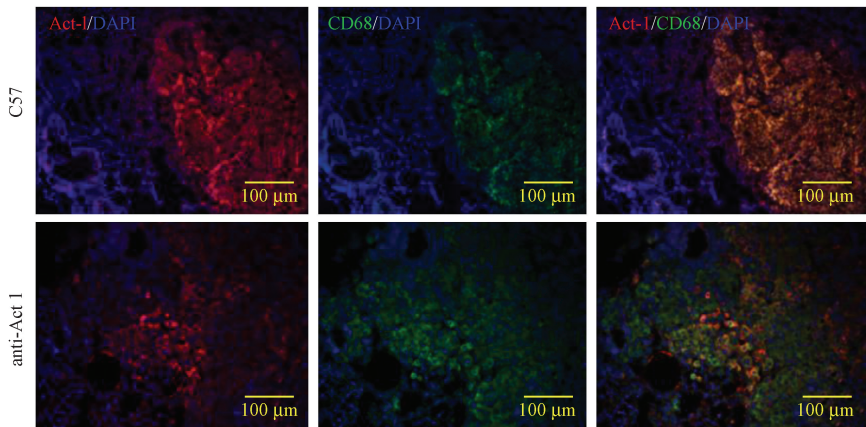


图 5 免疫荧光法检测小鼠肺转移灶中巨噬细胞与 Act 1 的共表达情况( $\times 20$ )

Figure 5 Act 1 expression in the lung-resident macrophages. Immunofluorescence staining

IL-6 等因子促进肿瘤细胞的增殖与存活<sup>[23]</sup>。同时,也观察到,在肿瘤转移灶部位及其周围,白细胞和巨噬细胞的浸润明显减少。实验结果表明抑制巨噬细胞 Act 1 的表达,能够减缓肿瘤微环境中炎症细胞的浸润。

综上所述,靶向抑制巨噬细胞 Act 1 的表达具有抗黑色素瘤肺转移的效应,这种效应可能是由于抑制了肿瘤细胞的侵袭性和增殖能力,减弱了炎症因子的浸润能力。本研究结果为临床上抗肿瘤转移治疗提供了理论基础。但其抑制肿瘤细胞侵袭和转移的分子机制还有待深入研究。

参考文献:

[ 1 ] Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, et al. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation [J]. Physiol Rev, 2004, 84(4): 1155-1228.

[ 2 ] Inoue T, Cavanaugh PG, Steck PA, et al. Differences in transferrin response and numbers of transferrin receptors in rat and human mammary carcinoma lines of different metastatic potentials [J]. J Cell Physiol, 1993, 156(1): 212-217.

[ 3 ] 朱莺娇, 赖晓兰, 赵坤, et al. CB6F1 小鼠黑色素瘤 B16-F10 细胞移植瘤模型的建立 [J]. 肿瘤研究与临床, 2015, 27(5): 316-319.

[ 4 ] Hui L, Chen Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil

- [J]. *Cancer Lett*, 2015, 368(1): 7–13.
- [ 5 ] Ansell SM, Vonderheide RH. Cellular composition of the tumor microenvironment [J]. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2013, 33: 91.
- [ 6 ] Qian F, Engst S, Yamaguchi K, et al. Inhibition of tumor cell growth, invasion, and metastasis by EXEL-2880 (XL880, GSK1363089), a novel inhibitor of HGF and VEGF receptor tyrosine kinases [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(20): 8009–8016.
- [ 7 ] De Palma M, Biziato D, Petrova TV. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(8): 457–474.
- [ 8 ] Wu P, Wu D, Zhao L, et al. Inverse role of distinct subsets and distribution of macrophage in lung cancer prognosis; a meta-analysis [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(26): 40451–40460.
- [ 9 ] Zhou K, Yan Y, Zhao S, et al. Clinical application and prognostic assessment of serum Tumor Associated Material (TAM) from esophageal cancer patients [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18(24): 3870–3876.
- [ 10 ] Li X, Commane M, Nie H, et al. Act1, an NF-kappa B-activating protein [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(19): 10489–10493.
- [ 11 ] Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF-kB signaling pathways [J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(8): 695–708.
- [ 12 ] Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker [J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(8): 715–723.
- [ 13 ] Chaturvedi MM, Sung B, Yadav VR, et al. NF-kappaB addiction and its role in cancer: ‘one size does not fit all’ [J]. *Oncogene*, 2011, 30(14): 1615–1630.
- [ 14 ] Welte T, Zhang XHF. Interleukin-17 could promote breast cancer progression at several states of the disease [J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: 804347.
- [ 15 ] Goldstein RH, Reagan MR, Anderson K, et al. Human bone marrow-derived MSCs can home to orthotopic breast cancer tumors and promote bone metastasis [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(24): 10044–10050.
- [ 16 ] Chang SH, Park H, Dong C. Act1 adaptor protein is an immediate and essential signaling component of interleukin-17 receptor [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(47): 35603–35607.
- [ 17 ] Swaidani S, Bulek K, Kang Z, et al. The critical role of epithelial-derived Act1 in IL-17- and IL-25-mediated pulmonary inflammation [J]. *J Immunol*, 2009, 182(3): 1631–1640.
- [ 18 ] 李艺丹. 第一部分:核定位 Act1 介导组蛋白 H3 第 14 位赖氨酸乙酰化和组织因子的转录调控;第二部分:穿心莲内酯 (Andro)抗炎与抗血栓机制的研究 [D], 2009.
- [ 19 ] Qi C, Wei B, Zhou W, et al. P-selectin-mediated platelet adhesion promotes tumor growth [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(9): 6584–6596.
- [ 20 ] Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(36): 6199–6206.
- [ 21 ] Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis [J]. *Nature*, 2005, 434(7035): 864–870.
- [ 22 ] Velichko S, Zhou X, Zhu L, et al. A novel nuclear function for the interleukin-17 signaling adaptor protein Act1 [J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0163323.
- [ 23 ] Huey MG, Minson KA, Earp HS, et al. Targeting the TAM receptors in leukemia [J]. *Cancers (Basel)*, 2016, 8(11): E101.

〔收稿日期〕2018–11–30