

付佳,曹宇勃,刘飒.褪黑素调控NF- κ B信号通路调节胃癌小鼠Th1/Th2免疫平衡及其机制[J].中国比较医学杂志,2022,32(9):90-96,108.

Fu J, Cao YB, Liu S. Melatonin regulates the NF- κ B signaling pathway to regulate Th1/Th2 immune balance in mice with gastric cancer and its mechanism [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(9): 90-96, 108.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.09.013

褪黑素调控NF- κ B信号通路调节胃癌小鼠Th1/Th2免疫平衡及其机制

付佳,曹宇勃,刘飒*

(中国医科大学附属第四医院 第二肿瘤内科,沈阳 110000)

【摘要】 目的 探究褪黑素调控NF- κ B信号通路调节胃癌小鼠Th1/Th2免疫平衡的机制。方法 将50 μ g (约含有细胞 1×10^6 个)胃癌细胞一次性注射到小鼠左侧前肢皮下,在建模7d后触摸到瘤体生成提示胃癌移植瘤小鼠模型建模成功。10只健康小鼠作为对照组,建模成功的小鼠分为模型组、模型+褪黑素组,每组10只。模型+褪黑素组皮下多点注射褪黑素(10 mg/kg,每天1次,21d),其余组注射等量的生理盐水。采用游标卡尺、天平测量各组肿瘤体积、重量。通过免疫组化检测肿瘤组织中Ki67和Bcl2评估胃癌细胞增殖和凋亡。通过ELISA检测外周血IFN- γ 和IL-4的水平。通过流式细胞术检测外周血Th1和Th2细胞比例。通过qPCR和Western blot检测肿瘤组织和淋巴细胞中NF- κ B mRNA和蛋白水平。**结果** 与对照组相比,模型组、模型+褪黑素组的肿瘤体积、质量、Ki67和Bcl2染色强度、IL-4水平、Th2细胞比例、NF- κ B mRNA和蛋白表达均显著升高($P < 0.05$),IFN- γ 水平、Th1比例、Th1/Th2比值显著降低($P < 0.05$);与模型组相比,模型+褪黑素组的肿瘤体积、质量、Ki67和Bcl2染色强度、IL-4水平、Th2细胞比例、NF- κ B mRNA和蛋白表达均显著降低($P < 0.05$),IFN- γ 水平、Th1比例、Th1/Th2比值显著升高($P < 0.05$)。**结论** 褪黑素可能通过调控NF- κ B通路抑制胃癌移植瘤小鼠模型的肿瘤生长,并调节Th1/Th2平衡。

【关键词】 胃癌;褪黑素;Th1细胞;Th2细胞;NF- κ B;免疫

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2022)09-0090-07

Melatonin regulates the NF- κ B signaling pathway to regulate Th1/Th2 immune balance in mice with gastric cancer and its mechanism

FU Jia, CAO Yubo, LIU Sa*

(the Second Department of Oncology, the 4th Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110000, China)

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of melatonin regulating Th1/Th2 immune balance via targeting nuclear factor (NF)- κ B signaling pathway in mice with gastric cancer. **Methods** Gastric cancer cells (50 μ g, approximately 1×10^6 cells) were injected subcutaneously into the left forelimb of mice. After 7 days of modeling, tumor formation was felt, indicating that the model of transplanted gastric cancer tumor was successfully established. Ten healthy mice were used as the control group, whereas successfully modeled mice were divided into model and model+melatonin groups ($n = 10$ mice per group). The model+melatonin group was subcutaneously injected daily with melatonin (10 mg/kg,

[作者简介]付佳(1988—),女,硕士,住院医师,研究方向:肿瘤内科。E-mail: jiopklnmg11@163.com

[通信作者]刘飒(1966—),女,博士,研究方向:肿瘤内科。E-mail: 276058547@qq.com

1 time/d, 21 d), whereas the other groups were injected with the same amount of normal saline. Tumor volumes and masses were measured using a vernier caliper and balance, respectively. Proliferation and apoptosis of gastric cancer cells in tumor tissues were assessed by immunohistochemical detection of Ki67 and Bcl2. Levels of interferon (IFN)- γ and interleukin (IL)-4 in peripheral blood were detected by ELISA. Ratios of Th1 to Th2 cells in peripheral blood were detected by flow cytometry. Levels of NF- κ B mRNA and protein were detected by qPCR and Western blot, respectively, in tumor tissues and lymphocytes. **Results** Contrast with the control group, the tumor volumes and masses, Ki67 and Bcl2 staining intensities, IL-4 levels, percentage of Th2 cells, NF- κ B mRNA and protein expression levels were significantly increased ($P < 0.05$), and the IFN- γ levels, the percentage of Th1 cells and Th1/Th2 ratio were significantly decreased in model and model+melatonin groups ($P < 0.05$). Contrast with model group, tumor volumes and masses, Ki67 and Bcl2 staining intensities, IL-4 levels, percentage of Th2 cells, NF- κ B mRNA and protein expression levels were significantly decreased ($P < 0.05$) and the IFN- γ levels, the percentage of Th1 cells and Th1/Th2 ratio were significantly increased in the model+melatonin group ($P < 0.05$). **Conclusions** Melatonin may inhibit tumor growth in mouse models of gastric cancer and regulate the balance of Th1/Th2 by regulating the NF- κ B pathway.

【Keywords】 gastric cancer; melatonin; Th1 cells; Th2 cells; NF- κ B; immunity

调查统计显示,每年新发的胃癌病人和因胃癌死亡的病人接近 80 万~100 万例,占全部的恶性肿瘤 5.7%和 8.2%,胃癌的发病率和死亡率分别排名第 6 和第 2^[1],严重威胁了人类的生命健康,因此,急需更全面有效的治疗手段。目前,研究显示免疫抑制在肿瘤的发生和进展中起着重要的作用,Th1 型免疫细胞可通过促进干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 的表达提高机体的免疫反应,从而抑制胃癌的增殖和侵袭^[2]。Th2 细胞则发挥免疫抑制作用,并通过白介素-4 (interleukin-4, IL-4) 等的表达促进肿瘤生长、血管生成和进展^[3]。患者外周血中的 Th1/Th2 平衡向 Th1 偏移可提高机体免疫力促进胃癌的清除^[4]。褪黑素是一种人体内产生的吲哚胺,主要由松果体在应对黑暗时产生,近年来研究发现褪黑素具有抗癌作用,细胞研究表明褪黑素会抑制胃癌细胞的增殖,但是其体内抗胃癌能力尚不明确^[5]。也有研究表明褪黑素具有提高机体免疫力的作用^[6],但是其是否具有调节胃癌免疫抑制的作用仍不清楚。核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路的激活会调控细胞的转录功能,从而调节胃癌细胞增殖、分化、转移、炎症反应^[7]。此外,NF- κ B 通路还参与 T 淋巴细胞向 Th1/Th2 的分化^[8]。本研究旨在分析褪黑素调控 NF- κ B 信号通路调节胃癌小鼠 Th1/Th2 免疫平衡及其机制

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

雄性 SPF 级 BALB/c 小鼠共 30 只,6~8 周龄,体重 18~22 g,均由上海斯莱克实验动物中心提供

[SCXK(沪)2019-0020],饲养于锦州医科大学[SYXK(辽)2019-0007]。本研究通过了锦州医科大学的医学伦理委员会审批(2020PS001K),实验的全过程均遵循了 3R 的原则,给予人道主义关怀。

1.1.2 细胞

人胃癌细胞 MKN45(ATCC[®] CCL-185,美国)。

1.2 主要试剂与仪器

胃癌细胞载体 microcarrier 6 (ELYON BIO 公司,美国);DMEM 培养基血清和抗体 (Invitrogen 公司,美国);褪黑素 (>99%,YT1414,北京伊塔生物,中国);Ki67 (ab15580)、Bcl2 (ab182858) 免疫组化染色抗体 (Abcam 公司,美国);ELISA 试剂盒 (碧云天公司,中国);兔单克隆 P65 抗体 (ab32536)、标记 HRP 的山羊抗兔二抗以及兔单克隆 GAPDH 抗体 (ab181602) (购自美国的 Abcam 公司);RNeasy Mini 相关的试剂盒、TRIzol (购自德国的 QIAGEN GmbH 公司);SYBR Premix Ex Taq[™] 试剂盒 (购自中国的 TaKaRa 公司);PVDF 膜 (购自美国的 Millipore 公司);BD Golgi Stop[™] 试剂盒 (BD-554715,上海创赛科技,中国)。Nanodrop 2000 的仪器和 ECL 的显色试剂盒 (购自美国的 Thermo Fisher 公司);大鼠的 Th1/Th2 表型相关的抗体试剂以及流式细胞仪 (购自美国的 Becton Dickinson 公司);PCR 仪 (ABI7900,ABI 公司,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型制备

根据文献^[9]利用正常免疫小鼠构建胃癌移植瘤。首先,将 MKN45 细胞放置于 DMEM 的培养基中进行培养 (内含链霉素 0.1 mg/mL、10% 的胎牛血清、青霉素 100 U/mL)。细胞的培养环境为温度

37℃、湿度 95%以及 CO₂ 浓度 5%的培养箱中培养。之后再向其中加入细胞载体 microcarrier 6 使之饱和,同时加入 100 ng/mL 的 SDF-1 α 和 VEGF 并共同孵育 3 h。然后将 50 μ g 的(约含有细胞 1 \times 10⁶ 个胃癌细胞)一次性注射到小鼠左侧前肢皮下,在建模 7 d 后可以触摸瘤体的生成即说明成功建模。

1.3.2 实验分组

20 只建模成功的小鼠分为模型组、模型+褪黑素组,每组 10 只;10 只健康小鼠为对照组。模型+褪黑素组小鼠在其肿瘤附近皮下多点注射 10 mg/kg 的褪黑素,每日 1 次,其余组注射等量的生理盐水^[10]。干预 21 d(建模后 28 d)后,通过颈椎脱臼处死小鼠,取出胃组织或者肿瘤组织,通过眼眶采集外周血。

1.3.3 肿瘤生长情况

观察肿瘤的具体生长的情况,于第 28 天的时候统计肿瘤具体的重量和体积,采用游标卡尺测量小鼠的皮下肿瘤的具体大小情况,然后对体积进行计算,公式则为:体积 = [(长度 \times 宽度)/2]³ \times 0.5236。

1.3.4 免疫组化染色检测肿瘤组织中 Ki67 和 Bcl2 蛋白

通过检测 Ki67 和 Bcl2 蛋白分析细胞增殖和凋亡情况。将组织在 10%甲醛中固定,后包埋在石蜡中,切成 4 μ m 厚的切片。然后把切片置于表面被 0.1%浓度的聚 L 赖氨酸涂满的载玻片上,脱蜡(二甲苯),用梯度浓度的乙醇(浓度由高到低为 100%~70%)逐步的水合,之后再用 PBS 给予洗涤。通过 pH=6.0 的柠檬酸钠缓冲液处理切片后给予热诱导的修复。在室温情况下,用 30%浓度过氧化氢将玻片处理约 10 min 的时长从而达到对内源性的过氧化物酶封闭的作用。用 PBS 仔细的冲洗之后,在室温的情况下用牛血清的白蛋白(浓度为 5%)给予 10 min 时长的玻片封闭。之后,将它们与 Ki67 或者 Bcl2 抗体(经过 1:100 的比例稀释)在 4℃的情况下过夜孵育。用 PBS 仔细的洗涤后,将各个玻片和特定的被生物素化二抗放置于 37℃的情况下给予 60 min 时长的孵育。通过和苏木精、3,3-二胺联苯胺复染。于显微镜下仔细的观察,利用半定量法进行分析,染色的强度 = 染色评分(0~3 分) \times 染色范围(0~4 分)。

1.3.5 ELISA 检测外周血 IFN- γ 和 IL-4

小鼠外周血离心(4℃,12000 r/min,20 min)后

利用移液枪将上层的全部血清慢慢的吸出之后,向里面加入相应的抗体孵育 2 h 的时长之后再往里面加适量的显色剂,10 min 时长反应结束后将其终止。然后对 450 nm 位置的吸光度给予检测,根据试剂盒提供的标准曲线算出 IL-4、IFN- γ 的浓度。

1.3.6 流式细胞术检测外周血 Th1、Th2 细胞

利用不同梯度的离心把淋巴细胞层从外周血里面抽吸出来,获得了全部的淋巴细胞。分别加入 2 μ L 的佛波酯/离子霉素混合物以及 2 μ L 的布雷非德菌素 A/莫能霉素混合物,在 37℃下孵育 6 h。然后加入 3 μ L 的表面 CD4 荧光抗体,避光孵育 30 min。接下来,加入 300 μ L 的固定/透化试剂后在 4℃下孵育 30 min。向样本中加入 IFN- γ 或 IL-4 荧光抗体各 2 μ L,4℃下孵育 30 min。样本通过流式细胞仪分析,结果使用 FlowJo(Tree Star Inc.,美国)软件实施分析。CD4⁺IFN- γ ⁺ 作为 Th1 细胞,CD4⁺IL-4⁺ 则作为 Th2 细胞。

1.3.7 RT-qPCR 检测肿瘤组织中 NF- κ B mRNA

利用 TRIzol 试剂在 1.3.4 里面的淋巴细胞内或者组织中将总的 RNA 提取处理,并采用 Nanodrop 2000 仪器实施定量。通过 RNeasy Mini 的相关试剂盒逆转录全部的 mRNA,相应的 RT-qPCR 反应则采用 SYBR Premix Ex TaqTM 实施:95℃情况下反应时长 2 min,58℃情况下反应时长 20 s,然后在 72℃情况下反应时长 20 s(此步骤则循环 40 次),以 GAPDH 作为此次研究的内参,2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法将相对的 NF- κ B 表达水平计算出来。

1.3.8 Western blot 检测肿瘤组织中 NF- κ B 蛋白

将 1.3.4 里面的淋巴细胞内或者组织全部的裂解之后经过离心(温度设置为 4℃,速度设置为 12000 r/min,时长设置 5 min)将总蛋白全部的收集。通过 SDS-PAGE(浓度为 10%)将蛋白质分离,并将蛋白转至 PVDF 膜上。加入浓度为 5%的脱脂牛奶(温度为室温条件,时长设置为 2 h)封闭之后加入按照 1:500 比例稀释的 NF- κ B 抗体于 4℃情况下给予 8 h 时长的孵育,洗涤结束后向其中加入二抗(按照 1:2000 比例稀释,温度为室温条件,时长设置为 1 h)。条带则采用 ECL 给予可视化的处理,GAPDH 为此次研究的内参,分析相对的 NF- κ B 蛋白的表达具体情况。

1.4 统计学方法

统计学则采用 SPSS 19 软件分析,用平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)代表计数,用方差分析(ANOVA)评估,两两对比用 SNK- q 检验,以 $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 褪黑素对胃癌小鼠模型肿瘤生长的影响

与对照组比较,模型组、模型+褪黑素组的肿瘤体积和重量均显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,模型+褪黑素组的肿瘤体积和重量均显著降低 ($P < 0.05$),见表 1。

2.2 褪黑素对胃癌小鼠模型胃癌细胞增殖和凋亡的影响

与对照组比较,模型组、模型+褪黑素组的 Ki67 和 Bcl2 染色强度均显著增强 ($P < 0.05$);与模型组比较,模型+褪黑素组的 Ki67 和 Bcl2 染色强度均显著减弱 ($P < 0.05$),见图 1 和表 2。

2.3 褪黑素对胃癌小鼠模型 Th1 和 Th2 标志细胞因子表达水平的影响

与对照组比,模型组、模型+褪黑素组的 IFN- γ 水平显著降低,IL-4 水平显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比,模型+褪黑素组的 IFN- γ 显著升高,IL-4 水平显著降低 ($P < 0.05$),见表 3。

2.4 褪黑素对胃癌小鼠模型 Th1/Th2 水平的影响

与对照组相比,模型组、模型+褪黑素组的外周血中 Th1 比例和 Th1/Th2 比值均显著降低 ($P < 0.05$),Th2 细胞比例显著升高 ($P < 0.05$);与模型组相比,模型+褪黑素组的外周血中 Th1 比例及 Th1/

Th2 的比值升高明显 ($P < 0.05$),Th2 细胞的比例降低明显 ($P < 0.05$),见图 2 和表 4。

表 1 褪黑素对胃癌小鼠模型肿瘤生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of melatonin on tumor growth in a nude mouse model of gastric cancer

组别 Groups	体积 (mm^3) Volume	重量 (g) Mass
对照组 Control group	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
模型组 Model group	281.24 \pm 27.63 [*]	0.31 \pm 0.04 [*]
模型+褪黑素组 Model+melatonin group	173.55 \pm 24.72 ^{*#}	0.20 \pm 0.03 ^{*#}

注:与对照组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

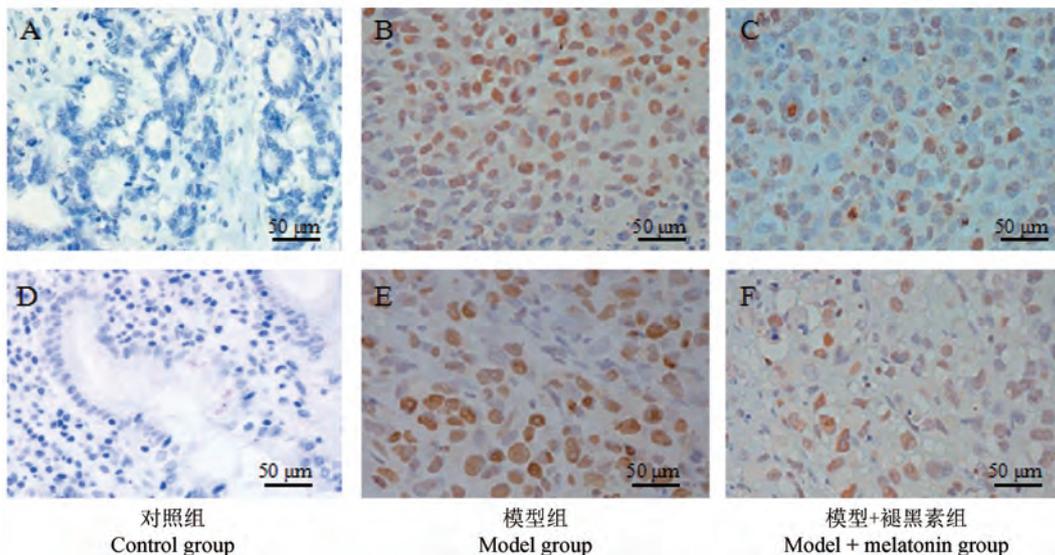
表 2 褪黑素对胃癌小鼠模型胃癌组织中 Ki67、Bcl2 染色强度的影响

Table 2 Effect of melatonin on the intensity of Ki67, Bcl2 staining in gastric cancer tissues of mouse models of gastric cancer

组别 Groups	Ki67 染色强度 Ki67 staining intensity	Bcl2 染色强度 Bcl2 staining intensity
对照组 Control group	1.12 \pm 0.13	0.97 \pm 0.10
模型组 Model group	6.43 \pm 0.72 [*]	5.62 \pm 0.68 [*]
模型+褪黑素组 Model+melatonin group	2.15 \pm 0.27 ^{*#}	1.98 \pm 0.26 ^{*#}

注:与对照组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.



注:A~C:蛋白 Ki67 的免疫组化染色;E~F:蛋白 Bcl2 的免疫组化染色。

图 1 免疫组化染色检测褪黑素对胃癌小鼠模型胃癌组织中蛋白 Ki67 和蛋白 Bcl2 表达水平的影响

Note. A~C, Immunohistochemical staining of protein Ki67. E~F, Immunohistochemical staining of protein Bcl2.

Figure 1 Effect of melatonin on the expression levels of protein Ki67 and protein Bcl2 in gastric cancer tissue of gastric cancer mouse model detected by immunohistochemical staining

2.5 褪黑素对胃癌小鼠模型肿瘤组织中 NF-κB 表达水平的影响

与对照组比,模型组、模型+褪黑素组的肿瘤组织中 NF-κB mRNA 和蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比,模型+褪黑素组 NF-κB mRNA 和蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$),见图 3 和表 5。

2.6 褪黑素对胃癌小鼠模型淋巴细胞中 NF-κB 表达水平的影响

与对照组比,模型组、模型+褪黑素组的淋巴细胞中 NF-κB mRNA 和蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比,模型+褪黑素组的 NF-κB mRNA 和蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$),见图 4 和表 6。

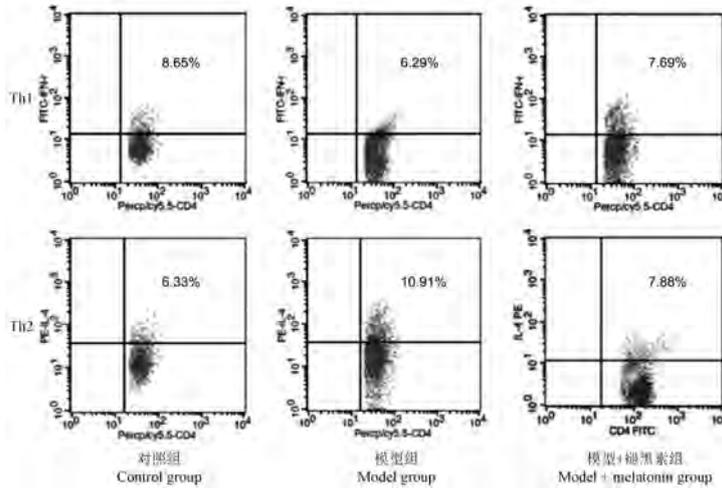


图 2 褪黑素对胃癌小鼠模型 Th1、Th2 细胞水平的影响

Figure 2 Effect of melatonin on the Th1, Th2 level of gastric cancer mouse model

表 3 褪黑素对胃癌小鼠模型 IFN-γ 和 IL-4 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of melatonin on the expression of IFN-γ and IL-4 in a mouse model of gastric cancer

组别 Groups	IFN-γ (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)
对照组 Control group	86.95 ± 9.74	7.26 ± 0.68
模型组 Model group	52.26 ± 6.85*	15.32 ± 1.71*
模型+褪黑素组 Model+melatonin group	81.46 ± 11.09**	10.14 ± 1.13**

注:与对照组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$ 。
Note. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

表 4 褪黑素对胃癌小鼠模型 Th1/Th2 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of melatonin on Th1/Th2 levels in mouse models of gastric cancer

组别 Groups	Th1	Th2	Th1/Th2
对照组 Control group	8.68 ± 0.75	6.37 ± 0.65	1.36 ± 0.12
模型组 Model group	6.33 ± 0.71*	11.02 ± 1.14*	0.57 ± 0.07*
模型+褪黑素组 Model+melatonin group	7.62 ± 0.86**	7.85 ± 0.84**	0.97 ± 0.11**

注:与对照组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$ 。
Note. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

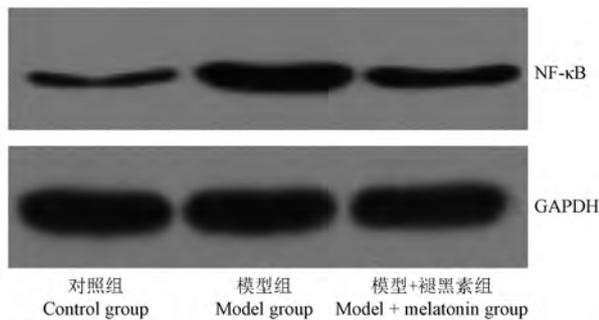


图 3 褪黑素对胃癌小鼠模型肿瘤组织中 NF-κB 蛋白相对的表达水平的影响

Figure 3 Effect of melatonin on the expression of NF-κB protein in the tumor tissue of a mouse model of gastric cancer

表 5 褪黑素对胃癌小鼠模型肿瘤组织中 NF-κB mRNA 和蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of melatonin on the expression levels of NF-κB mRNA and protein in tumor tissues of gastric cancer mouse models

组别 Groups	NF-κB mRNA	NF-κB 蛋白 NF-κB Protein
对照组 Control group	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.07
模型组 Model group	4.56 ± 0.42*	3.92 ± 0.36*
模型+褪黑素组 Model+melatonin group	2.17 ± 0.20**	1.86 ± 0.17**

注:与对照组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$ 。
Note. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

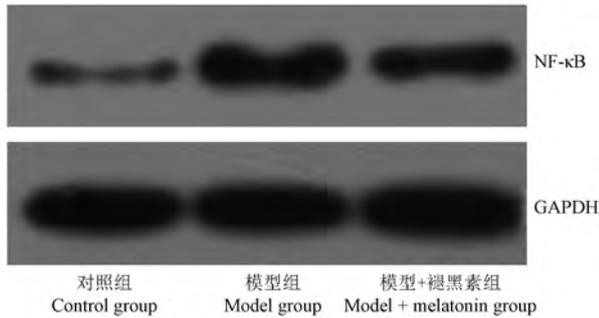


图 4 褪黑素对胃癌小鼠模型淋巴细胞中 NF-κB 蛋白表达水平的影响

Figure 4 Effect of melatonin on the expression of NF-κB protein in lymphocytes in mouse models of gastric cancer

表 6 褪黑素对胃癌小鼠模型淋巴细胞中 NF-κB 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 Effect of melatonin on the expression of NF-κB in lymphocytes in mouse models of gastric cancer

组别 Groups	NF-κB mRNA	NF-κB 蛋白 NF-κB Protein
对照组 Control group	1.00±0.01	1.00±0.09
模型组 Model group	4.92±0.48*	4.48±0.43*
模型+褪黑素组 Model+melatonin group	2.75±0.26**	2.21±0.21**

注:与对照组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

3 讨论

我国大部分胃癌患者在确诊时已处于中晚期,这使患者的死亡率大大升高^[11]。胃癌细胞的恶性增殖是导致治疗失败的主要原因^[12],寻找有效的抑制胃癌细胞增殖和促进其凋亡的药物对于胃癌治疗具有重要的临床意义。

褪黑素具有抗衰老、抗炎、促进睡眠、以及血管舒张和抗纤维化的功能^[13]。近年来,褪黑素的抗癌作用被逐渐发现,研究表明褪黑素可以抑制胰腺癌^[14]、卵巢癌^[15]、乳腺癌^[16]等的进展。最新研究发现褪黑素也具有抑制胃癌的功能,细胞实验结果表明褪黑素可通过介导自噬抑制胃癌细胞的增殖^[17]。Ki67 是肿瘤细胞有丝分裂必不可少的蛋白,NF-κB 蛋白的升高会促进 Ki67 蛋白的表达,从而促进胃癌细胞增殖^[18]。Bcl2 是经典的抗凋亡蛋白,Bcl2 蛋白的过表达是导致胃癌发生和进展的重要因素,并且 Bcl2 蛋白的表达也被 NF-κB 通路调控^[19]。本研究利用胃癌细胞构建了胃癌移植瘤小

鼠模型,结果表明皮下注射褪黑素可显著的抑制肿瘤组织的生长,并抑制肿瘤组织中增殖标志蛋白 Ki67 和抗凋亡蛋白 Bcl2 的表达。此外,胃癌组织中 NF-κB mRNA 和蛋白表达水平均显著升高,提示褪黑素则可在转录和翻译的水平上抑制 NF-κB 的表达。Colombo 等^[20]的研究表明褪黑素可通过抑制 NF-κB 通路的水平抑制乳腺癌和胃癌的进展。也有研究显示褪黑素通过抑制 NF-κB 通路抑制 COX-2 的表达,从而起到抗血液肿瘤的作用^[21]。本次研究结果表明褪黑素可在 mRNA 和蛋白的水平上抑制 NF-κB 的表达,从而 Ki67 和 Bcl2 蛋白的表达,这会降低胃癌细胞的增殖能力并诱导其凋亡,从而抑制胃癌移植瘤模型的生长,起到抗胃癌作用。

为进一步分析褪黑素抗胃癌的机制,本研究也基于 Th/Th2 从免疫的水平上分析褪黑素的胃癌机制。研究发现免疫抑制参与胃癌的发生、生长和转移,机体免疫能力的降低导致体内生成的癌变细胞无法清除,从而导致肿瘤的发生^[22]。此外,机体免疫力的降低,以及肿瘤细胞的免疫逃逸特性,导致肿瘤组织不受限的生长并发生转移^[23]。Th1/Th2 细胞均是由 CD4⁺T 淋巴细胞分化而来的两个亚群,其中 Th1 细胞介导免疫和炎症反应,Th1 会通过分泌 IFN-γ 来促进炎症反应,并解除免疫抑制,促进肿瘤被免疫系统清除^[24]。Th2 细胞功能与 Th1 细胞相反,其可通过分泌 IL-4、IL-10 等诱导免疫抑制缓解炎症反应^[25]。在肿瘤中,Th2 细胞分化比例升高,介导免疫抑制,Th2 比例的升高也与胃癌患者不良预后有关^[26]。此外,Th1/Th2 细胞的分化和功能也受到 NF-κB 通路的调节,研究表明 H₂S 会通过介导 NF-κB 通路 Th1/Th2 失衡,从而加剧脂多糖诱导的肺炎^[27]。也有研究显示细辛素对胶原性关节炎的改善与 NF-κB 通路的下调和 Th1/Th2 平衡的回调有关^[28]。为分析褪黑素对胃癌动物模型 Th1/Th2 的影响,本研究利用免疫系统正常的小鼠构建胃癌移植瘤模型,结果表明与健康小鼠比较,胃癌模型小鼠外周血中 IFN-γ 的水平降低,IL-4 的水平升高,Th1 细胞比例和 Th1/Th2 比值显著降低,而 Th2 细胞比例升高,此外,淋巴细胞中 NF-κB mRNA 和蛋白的水平均显著升高,这说明胃癌移植瘤裸鼠模型中出现 Th1/Th2 的失衡,并且出现免疫抑制。而褪黑素不但提高了 IFN-γ、Th1 细胞比例和 Th1/Th2 水平,抑制了 IL-4 和 Th2 的水平,还在 mRNA 和蛋白的水平上显著抑制了淋巴细胞中 NF-κB 的

表达。刘静等^[29]的研究表明体内褪黑素的升高会促进 CD4⁺T 淋巴细胞的活化,从而提高机体的免疫力。也有研究表明褪黑激素可通过平衡重症肌无力中的外周血 Th1/Th2 比例发挥免疫调节作用^[30]。本次研究结果表明胃癌会引起 Th1 的降低和 Th2 的升高,从而影响机体的免疫反应诱发免疫抑制,而褪黑素则可通过的提高 NF- κ B 的表达提高 Th1 细胞比例并抑制 Th2 细胞分化,从而使失衡的 Th1/Th2 向 Th1 偏移,并促进 IFN- γ 的分泌抑制 IL-4 的分泌,解除免疫抑制,进而起到抗胃癌的功能。

此外,本次研究也存在某些局限性。首先,本研究是定性额,只提示了褪黑素一定程度上具有抗胃癌和调节 Th1/Th2 的作用,但是其治疗胃癌的剂量、安全性仍需要动物和临床研究。关于 NF- κ B 在褪黑素抗胃癌中的必要性仍需要挽救实验验证。并且褪黑素调控胃癌中 NF- κ B 的表达的分子机制仍需要深入研究。

综上所述,褪黑素可能通过调控 NF- κ B 通路抑制胃癌移植瘤小鼠模型的肿瘤生长,并调节 Th1/Th2 平衡。提示褪黑素可能是治疗胃癌的有潜力的药物。

参考文献:

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Rocha GA, de Melo FF, Cabral MMDA, et al. Interleukin-27 is abrogated in gastric cancer, but highly expressed in other Helicobacter pylori-associated gastroduodenal diseases [J]. *Helicobacter*, 2020, 25(1): 12667-12667.
- [3] 谭静, 林亚平, 赵欢, 等. 艾灸对胃荷瘤大鼠瘤体内 Th1、Th2 类细胞因子表达的影响 [J]. *免疫学杂志*, 2019, 35(12): 1061-1066.
- [4] 叶旭星, 何钦, 徐斌, 等. Th1/Th2 平衡与胃癌前病变危险因素及病理积分相关性分析 [J]. *中国现代医生*, 2016, 54(5): 1-3.
- [5] Huang Y, Yuan K, Tang M, et al. Melatonin inhibiting the survival of human gastric cancer cells under ER stress involving autophagy and Ras-Raf-MAPK signalling [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(3): 1480-1492.
- [6] 李清, 王杰玉, 张晓丹, 等. 子宫腺肌病小鼠的药物疗效及其疼痛机制 [J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(5): 516-520.
- [7] Fan H, Zhang S, Zhang Y, et al. FERMT1 promotes gastric cancer progression by activating the NF- κ B pathway and predicts poor prognosis [J]. *Cancer Biol Ther*, 2020, 21(9): 815-825.
- [8] Wang Z, Zhuo F, Chu P, et al. Germacrone alleviates collagen-induced arthritis via regulating Th1/Th2 balance and NF- κ B activation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 518(3): 560-564.
- [9] 毕研贞, 孔令斌, 高鹏飞, 等. 基于 microcarrier 6 构建正常免疫小鼠人胃癌移植模型 [J]. *中国肿瘤临床*, 2017, 44(5): 199-203.
- [10] 刘畅, 张宗恺, 贾佳, 等. 褪黑素介导小鼠肝 H22 肿瘤细胞自噬作用的研究 [J]. *现代肿瘤医学*, 2019, 27(5): 26-31.
- [11] Gao K, Wu J. National trend of gastric cancer mortality in China (2003-2015): a population-based study [J]. *Cancer Commun*, 2019, 39(1): 24-29.
- [12] Miwa T, Kanda M, Umeda S, et al. Homeobox C10 influences on the malignant phenotype of gastric cancer cell lines and its elevated expression positively correlates with recurrence and poor survival [J]. *Ann Surg Oncol*, 2019, 26(5): 1535-1543.
- [13] Sun C, Liu L, Wang L, et al. Melatonin: a master regulator of plant development and stress responses [J]. *J Integr Plant Biol*, 2021, 63(1): 126-145.
- [14] Tamtaji OR, Mirhosseini N, Reiter RJ, et al. Melatonin and pancreatic cancer: current knowledge and future perspectives [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 5372-5378.
- [15] Zare H, Shafabakhsh R, Reiter RJ, et al. Melatonin is a potential inhibitor of ovarian cancer: molecular aspects [J]. *J Ovarian Res*, 2019, 12(1): 26-29.
- [16] Amin N, Shafabakhsh R, Reiter RJ, et al. Melatonin is an appropriate candidate for breast cancer treatment: based on known molecular mechanisms [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(8): 12208-12215.
- [17] 朱辉, 江婷婷, 黄晓琪, 等. 自噬增强拮抗褪黑素诱导的胃癌细胞增殖抑制作用 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2019, 28(4): 324-330.
- [18] Cui Y, Huang S, Cao J, et al. Combined targeting of vascular endothelial growth factor C (VEGFC) and P65 using miR-27b-3p agomir and lipoteichoic acid in the treatment of gastric cancer [J]. *J Gastrointest Oncol*, 2021, 12(1): 121-132.
- [19] Yu JH, Zheng JB, Qi J, et al. Bile acids promote gastric intestinal metaplasia by upregulating CDX2 and MUC₂ expression via the FXR/NF- κ B signalling pathway [J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(3): 879-892.
- [20] Colombo J, Jardim-Perassi BV, Ferreira JPS, et al. Melatonin differentially modulates NF- κ B expression in breast and liver cancer cells [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2018, 18(12): 1688-1694.
- [21] Tang YL, Sun X, Huang LB, et al. Melatonin inhibits MLL-rearranged leukemia via RBFOX3/hTERT and NF- κ B/COX-2 signaling pathways [J]. *Cancer Lett*, 2019, 443(1): 167-178.

(下转第 108 页)