

刘兆华,王彦君,申明,等. 黄芪多糖对肺肿瘤转移前微环境中 HIF-1 和 S100A8/A9 蛋白表达及肺转移的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(7): 871-879.

Liu ZH, Wang YJ, Shen M, et al. Effect of *Astragalus* polysaccharides on HIF-1 and S100A8/A9 protein expression in the pre-metastatic niche of lung tumors and lung metastasis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(7): 871-879.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.07.005

黄芪多糖对肺肿瘤转移前微环境中 HIF-1 和 S100A8/A9 蛋白表达及肺转移的影响

刘兆华^{1,2,3,4},王彦君⁵,申明^{1,2,3,4},陈彦文¹,李杨^{1,2,3,4},
杨玲玲¹,梁乾坤¹,明海霞^{1,2,3,4*}

(1. 甘肃中医药大学基础医学院,兰州 730000;2. 甘肃中医药大学中西医结合基础学科,兰州 730000;
3. 甘肃中医药大学重大疾病分子医学与中医药防治研究重点实验室,兰州 730000;4. 甘肃省中医药防治
慢性疾病重点实验室,兰州 730000;5. 甘肃中医药大学附属医院,兰州 730000)

【摘要】 目的 观察不同浓度黄芪多糖(*Astragalus* polysaccharides, APS)通过干预肺转移前微环境(Pre-metastatic niche, PMNs)对 HIF-1 和 S100A8/A9 蛋白的影响,初步阐明 APS 对肺 PMNs 中的作用靶点及对肿瘤肺转移影响的分子机制。**方法** SPF 级 C57BL/6J 小鼠 90 只,除空白组外,其余 75 只用荧光素酶(LUC)标记的 Lewis 肺癌细胞 1×10^6 个通过小鼠尾静脉注射构建 PMNs 模型,并随机分成 5 组:模型组、低剂量组(灌服黄芪多糖 50 mg/kg)、中剂量组(灌服黄芪多糖 100 mg/kg)、高剂量组(灌服黄芪多糖 200 mg/kg)、芬戈莫德(FTY720)组(腹腔注射 FTY720 1 mg/kg),每组 15 只。观察不同浓度黄芪多糖对 PMNs 中 HIF-1 和 S100A8/A9 蛋白的影响,同时用小动物活体成像及 HE 染色评估肺部转移情况。接种瘤细胞次日低、中、高各剂量组按剂量灌胃给药,每天 1 次,共 28 d。FTY720 通过腹腔注射每 2 d 1 次间隔给药。在前 14 d 通过小动物活体成像动态观察肺肿瘤转移情况,并在第 14 天每组随机取出 5 只采用 Western Blot 及 RT-qPCR 技术检测多功能蛋白聚糖、纤维连接蛋白和赖氨酰氧化酶等在肿瘤转移前微环境中具有标志性的蛋白进一步验证模型成功。在第 28 天取肺组织采用苏木精-伊红(HE)染色观察小鼠肺组织病理学改变,并采用 Western Blot 及 RT-qPCR 技术检测 28 d 所取的肺组织中 HIF-1 和 S100A8/A9 蛋白和基因的表达,取材前 12 h 禁食不禁水。**结果** HE 染色观察小鼠肺组织发现,与空白组相比模型组小鼠肺组织中出现大面积肺泡壁增厚和粒细胞浸润,并出现少量肿瘤转移灶;与模型组相比,高剂量组和 FTY720 组小鼠的肿瘤转移灶点明显减少,肺组织趋于正常。RT-qPCR、Western Blot 检测结果显示:与空白组比较,模型组小鼠肺中 HIF-1, S100A8, S100A9 基因和蛋白表达显著升高($P < 0.05$);而与模型组相比,FTY720 组和 APS 各组上述蛋白和基因表达均下降($P < 0.05$)。**结论** 黄芪多糖可通过调控肺肿瘤转移前微环境中 HIF-1、S100A8、S100A9 的表达水平减少肿瘤细胞肺转移。

【关键词】 肺癌;黄芪多糖;芬戈莫德;肿瘤转移;转移前微环境

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 07-0871-09

【基金项目】 甘肃省“双一流”科研重点项目(GSSYLXM-05),甘肃省自然科学基金项目(20JR5RA178, 20JR10RA320),甘肃省中医药研究中心开放课题(zyzx-2020-zx2),甘肃中医药大学科学研究与创新基金项目(2020KCZD-4, 2021KCZD-1),甘肃中医药大学中西医结合基础学科科研培育项目(2022-2023-8, 2023-2024-8),兰州市科技计划项目(2020-ZD-55, 2021-1-96),甘肃省教育科技创新项目(2021CXZX-745)。

Funded by the “Double First-Rate” Scientific Research Key Project of Gansu Province (GSSYLXM-05), Natural Science Foundation Project of Gansu Provincial Department of Science and Technology (20JR5RA178, 20JR10RA320), Open Project of Gansu Research Center of Traditional Chinese Medicine (zyzx-2020-zx2), Scientific Research and Innovation Fund Project of Gansu University of Chinese Medicine (2020KCZD-4, 2021KCZD-1), Scientific Research and Cultivation Project of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine in Gansu University of Chinese Medicine (2022-2023-8, 2023-2024-8), Lanzhou Science and Technology Project (2020-ZD-55, 2021-1-96), Education Science and Technology Innovation Project of Gansu Province (2021CXZX-745).

【作者简介】 刘兆华(1998—),男,在读硕士研究生,研究方向:肿瘤的生物学区性及中医药防治的基础。Email:1219945989@qq.com
【通信作者】 明海霞(1976—),女,教授,硕士生导师,博士,研究方向:肿瘤的生物学区性及中医药防治的基础。Email:18909429885@163.com

Effect of *Astragalus* polysaccharides on HIF-1 and S100A8/A9 protein expression in the pre-metastatic niche of lung tumors and lung metastasis

LIU Zhaoxua^{1,2,3,4}, WANG Yanjun⁵, SHEN Ming^{1,2,3,4}, CHEN Yanwen¹, LI Yang^{1,2,3,4},
YANG Lingling¹, LIANG Qiankun¹, MING Haixia^{1,2,3,4*}

(1. School of Basic Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China. 2. Basic Discipline of Integrative Traditional Chinese and Western Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000. 3. Gansu University Key Laboratory for Molecular Medicine & Chinese Medicine Prevention and Treatment of Major Diseases, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000. 4. Key Laboratory of Chronic Diseases for Prevention and Treatment of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000. 5. Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000)

Corresponding author: MING Haixia. E-mail: 18909429885@163.com

[Abstract] Objective To observe the effects of different concentrations of *Astragalus* polysaccharides (APS) on hypoxia-inducible factor (HIF)-1 and S100A8/A9 protein expression in the lung pre-metastatic niche (PMN), and to investigate the targets of APS in lung PMNs and its molecular mechanisms in relation to lung tumor metastasis. **Methods** Ninety specific-pathogen-free C57BL/6J mice were used, of which 15 were set as the blank control group. A PMN model was constructed in the remaining 75 mice by tail vein injection of 1×10^6 luciferase-labeled Lewis lung cancer cells. These 75 mice were divided randomly into five groups ($n = 15$ per group): model, low-dose (APS 50 mg/kg), medium-dose (APS 100 mg/kg), high-dose (APS 200 mg/kg), and fingolimod (FTY720, injected intraperitoneally 1 mg/kg) groups. APS was administered by gavage at the respective prescribed dose once a day on the day after inoculation of tumor cells and FTY720 was administered once every 2 days. The effects of different concentrations of APS on HIF-1 and S100A8/A9 proteins in the PMN was observed and lung metastasis was assessed by hematoxylin/eosin (HE) staining. On day 14, five mice from each group were randomly selected and lung tissues were removed and multifunctional proteoglycans, fibronectin, and lysyl oxidase were detected by Western Blot and Real-time quantitative PCR (RT-qPCR), and histopathological changes in the lung were observed by HE staining. Protein and gene expression levels of HIF-1 and S100A8/A9 in lung tissues taken at 28 days were also detected by Western Blot and RT-qPCR. Mice were fasted but had access to water for 12 h before sampling. **Results** HE staining revealed alveolar wall thickening and granulocyte infiltration with a few tumor metastases in lung tissues in the model group. Tumor metastatic foci were significantly reduced and the lung tissues tended to be normal in the high-dose and FTY720 groups compared with the model group. HIF-1, S100A8, and S100A9 protein and gene expression levels were significantly higher in the lungs of mice in the model groups compared with the blank group ($P < 0.05$), according to Western Blot and RT-qPCR. In contrast, the above protein and gene expression levels were decreased in the FTY720 group and all APS groups compared with the model group ($P < 0.05$). **Conclusions** APS can reduce lung metastasis of tumor cells by regulating the expression levels of HIF-1, S100A8 and S100A9 in the PMN of lung tumors.

[Keywords] lung cancer; *Astragalus* polysaccharides; fingolimod; tumor metastasis; pre-metastatic niche
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

据相关统计结果显示,全球每年新发肺癌病例约 209.3 万例,死亡约 176.1 万例,在所有恶性肿瘤中一直居高不下^[1]。虽然在现在科学治疗模式下,可以使用各种治疗方法包括手术、放化疗、生物疗法以及靶向治疗。但不容乐观的是,手术切除后的 5 年生存率仅为 20% ~ 25%^[2]。对于中后期的患者来说,放化疗虽然有一定的疗效,但副作用大大

增加,5 年内的生存率不足 15%^[3]。其中肿瘤转移是肺癌患者死亡的主要原因,其前提是由原发肺癌细胞来源的分泌因子构建的肿瘤转移前微环境 (pre-metastatic niche, PMNs)。因此,抑制 PMNs 的形成,对肿瘤的复发和转移具有一定的积极意义。中医认为“最虚之处,便是客邪之地”,机体某一局部的“最虚”,是形成 PMNs 的必要条件,所以肿瘤

巩固治疗期间的原则是“先安未受邪之地”,从而起到预防转移的作用^[4]。

在邹伟等^[5]关于小鼠肿瘤模型的研究中发现,髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)能够定向趋向性迁移到机体的某些特定部位,并与相应器官的纤维连接蛋白(fibronectin, FN)表位相结合,这在机体中进行转移的癌细胞提供了大量的附着点位,且能够通过特异性诱导钙结合炎性蛋白 S100A8/A9 的表达从而募集更多的 MDSCs,形成恶性循环。MDSCs 来源于未分化成熟的骨髓细胞,能够抑制包括由免疫 T 细胞、自然杀伤细胞等介导的免疫应答,从而成为 PMNs 构建中的关键因素。另有研究显示,在胰腺癌中,缺氧诱导因子 1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)可通过上调分泌 MCP-1,促进 PMNs 中炎性和纤维化微环境的形成,因此将 HIF 作为靶点针对肿瘤相关免疫治疗可能成为新的方向^[6]。现代药理学研究表明,黄芪多糖(*Astragalus polysaccharide*, APS)具有调节机体免疫、增强巨噬细胞活性、抗肿瘤等作用,故选用药物黄芪多糖以 S100A8/A9、HIF-1 为靶点进行研究,通过小动物活体成像,HE 染色及对肿瘤转移前微环境中相关标志性蛋白的检测,验证肺肿瘤转移前微环境的模型构建,并初步阐明 APS 对肺 PMNs 中的作用靶点及对肺转移影响的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

采用 49 ~ 56 日龄的 SPF 级 C57BL/6 健康小鼠雌雄各半共 90 只,体重(18 ± 2)g,购于福贝斯(北京)生物技术有限公司【SCXK(京)2019-0010】,分笼饲养于甘肃中医药大学实验动物中心【SYXK(甘)2020-0009】。饮水和进食自由,饲养环境适宜,通风设备齐全,按期消毒,温度(23 ± 2)℃,湿度(45 ± 15)%,光照时间约为 12 h/12 h 明暗周期,所有操作均经甘肃中医药大学实验动物伦理委员会审批(2021-150)。

1.1.2 细胞

荧光素酶(LUC)标记的 Lewis 鼠源性肺腺癌细胞株(lewis lung carcinoma cells, LLC)购自上海丰晖生物(CLO720)。

1.1.3 主要试剂与仪器

黄芪多糖(批号:C29J9Y53671,上海源叶生物

有限公司),纯度大于 70%;芬戈莫德(批号:32034, MCE 公司);胎牛血清(批号:12A349, ExCell Bio 公司);青链霉素混合液(批号:P1400, Solarbio 公司);S100A8 抗体(批号:21 × 5531, Affinity 公司);S100A9 抗体(批号:56m0698, Affinity 公司);HIF-1 抗体(批号:44461, GeneTex 公司);抗体内参(批号:66j9958, ImmunoWay 公司);组织细胞裂解液(批号:R0010, Solarbio 公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号:PC0020, Solarbio 公司);SYBR Green 荧光染料(批号:H1108051, YEASEN 公司);超敏 ECL(批号:P10100A, 新赛美公司);蛋白磷酸酶抑制剂(批号:P1260, Solarbio 公司);SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(批号:P1200, Solarbio 公司)。

-80℃超低温冰箱(海尔, DW-86L338J, 中国);二氧化碳培养箱(HERAcell VIOS 160i, 美国);酶标仪(SpectraMax 190, 美国);基因扩增 PCR 仪(S1000, 美国);普通 PCR 仪(TC-96, 中国);分光光度计(NanoDrop 2000C, 美国);小动物活体成像仪(IVIS Spectrum, Caliper Life Sciences, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

LUC 标记的小鼠 Lewis 肺癌(LLC)细胞加入新鲜 DMEM 培养液中,培养箱为 95%空气与 5% CO₂ 混合的气体环境,温度为(36.5 ± 0.5)℃。定期采用显微镜对肿瘤细胞的生长状态进行观察,及时进行细胞传代,并选取对数期的肿瘤细胞进行实验。

1.2.2 模型建立、动物分组及给药

制备肺癌转移前微环境模型,将 C57BL/6 小鼠随机分为空白组、模型组、低剂量组(灌服黄芪多糖 50 mg/kg)、中剂量组(灌服黄芪多糖 100 mg/kg)、高剂量组(灌服黄芪多糖 200 mg/kg)、芬戈莫德组(腹腔注射 FTY720 1 mg/kg),每组 15 只。除正常组外,将 LUC 标记的 LLC 细胞悬液(1×10^6 /mL) 0.1 mL 注射在小鼠的尾静脉上。FTY720 组在肿瘤接种 24 h 后,腹腔注射,给药剂量为 1 mg/kg, 2 d 1 次,间隔给药持续 4 周。APS 各组在肿瘤接种 24 h 后按计划分量给药,每天 1 次,持续 4 周。模型组给同剂量的生理盐水。

1.2.3 小动物活体成像

在接种后的第 3、7、14 天采用小动物活体成像技术监测小鼠体内肿瘤荧光信号的表达。将各组小鼠经过腹部褪毛后腹腔注射荧光素酶底物(15 mg/mL),采用 0.8%的戊巴比妥钠对小鼠进行麻

醉,15 min 后将小鼠采取仰卧体位放入 Lumina III 操作台进行活体成像检测。通过 IVIS Spectrum 系统拍照,其中高强度信号显示为红色,低强度信号为紫色。

1.2.4 HE 染色

取小鼠肺肿瘤部位组织进行病理检测,采用常规方法制作切片,依次加入二甲苯 I 20 min,二甲苯 II 15 min,无水乙醇 6 min,75%乙醇 6 min,用水冲洗片刻,苏木精染色 4 ~ 6 min,自来水冲洗,伊红染色 5 min,用水冲洗,采用无水乙醇脱水 1 ~ 2 s,再放入石炭酸二甲苯脱水 2 ~ 3 s,并采用中性树脂胶封固。

1.2.5 Western Blot

检测各组小鼠肺组织中 S100A8、S100A9 和 HIF-1 蛋白的表达。处死小鼠,取出肺组织,加入细胞裂解液和 PIR 混合液(10 μ L/mg)进行匀浆,并在冰上裂解 15 min,离心 10 min (12 000 r/min),取上清液保存。使用分光光度计进行蛋白浓度测定。并根据相应蛋白的分子量依据说明书配置所需的浓缩胶和分离胶,用移液枪加入制胶板中。取蛋白样品上样,电泳应采用 80 V 恒压 0.5 h 后转 120 V 约 1 h,电泳完成后取出凝胶,对照标准蛋白条带线,确定样品蛋白的所在区域,将电泳凝胶与 PDVF 结合,排出气泡,电泳槽转印,恒流 220 mA,30 min。转印结束后,取出 PDVF 膜置入封闭液中(含 4%脱脂奶粉 TBST 溶液)进行封闭 2 h。取出 PDVF 膜用 TBST 缓冲液洗去残留封闭液,根据抗体说明书配置一抗并将孵育盒放入 4℃摇床过夜,再用 TBST 液洗 3 ~ 4 次,每次 8 ~ 10 min,然后配置二抗放摇床孵育 2 ~ 3 h,用 TBST 洗去残留液。加入 ECL 发光液显色至条带清晰,使用成像仪拍照保存结果,并使用 Image J 软件进行分析。

1.2.6 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)

取小鼠肺组织 75 mg 用无菌剪刀剪碎并将其放入生理盐水中浸泡清洗,并加入 TRIzol 溶液 1.5 mL,将其放入匀浆机中充分研磨,4℃,12 000 r/min 离心 15 min,取出后静置 3 min,加入氯仿 0.3 mL,将其充分混匀,随后再静置 4 min 后离心 15 min,取上层清液加入 0.75 mL 异丙醇,充分混匀后再次离心 15 min,取出后弃掉上清液,留下沉淀物;将 75%乙醇加入沉淀中混匀,再次离心 10 min,轻轻倒掉上清液,留取沉淀,置于超净台开风机吹干,再向管中

加入 DEPC 水 20 μ L 溶解,并使用分光光度计测量纯度,将提取后的 RNA 进行逆转录,以 cDNA 为模板,配制相应的反应体系,使用 PCR 仪进行扩增。反应结束后保存结果,并进行 3 次生物学重复。采用 Livak 法对实验数据进行定量分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 8 软件对数据进行统计学分析,计量资料采用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)进行统计描述,组间两两比较采用 *t* 检验方法,多组计量资料采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺肿瘤转移前微环境模型的验证

2.1.1 Western Blot 法检测肺组织中 VCAN、LOX 和 FN 的蛋白表达情况

Western Blot 检测结果显示:对于 VCAN、LOX、FN 的蛋白表达,与空白组比较,模型组的 VCAN、LOX、FN 蛋白的表达量均显著提高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。从蛋白水平验证肺肿瘤转移前微环境模型的成功建立(见图 1)。

2.1.2 RT-qPCR 法检测肺组织中 VCAN、LOX 和 FN 的 mRNA 表达情况

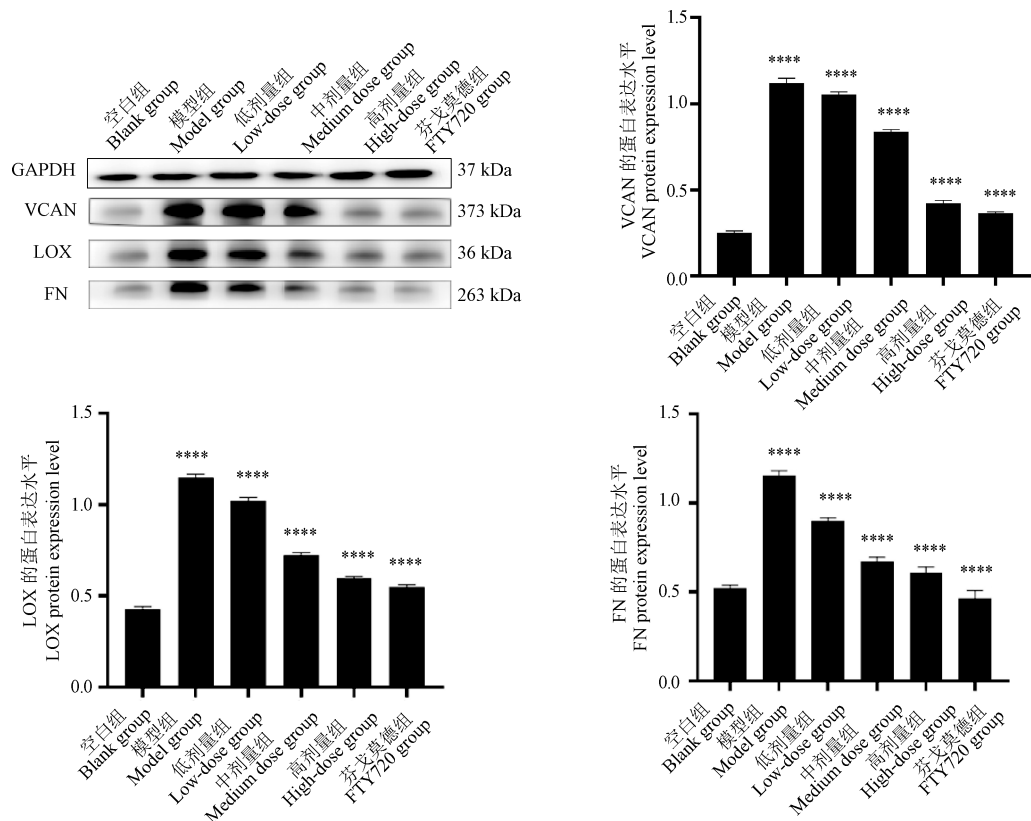
RT-qPCR 法检测肺组织发现:与空白组比较,模型组中 VCAN、LOX 和 FN mRNA 的表达量均显著提高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。从基因水平上验证肺肿瘤转移前微环境模型的成功建立(见表 1)。

2.2 IVIS 的监测和评价

根据小动物活体成像监测结果表明,通过对小鼠尾静脉注射肺癌细胞后第 3 天即可在小鼠尾部检测到较为明显的荧光信号,在第 7 天监测到肿瘤细胞明显在小鼠肺部聚集并随着天数增加而增多。一方面进一步验证了肺肿瘤转移前微环境模型的成功建立;另一方面经过荧光分析发现,相较于模型组,低、中、高剂量组及 FTY720 四组小鼠荧光生物发光增加的强度在逐渐降低,其中高剂量组和 FTY720 组降低得较为明显(见图 2)。

2.3 HE 染色观察转移灶

通过对小鼠肺组织切片进行 HE 染色分析,观察小鼠肺组织中的肿瘤转移灶情况,结果如图 3 所示。与空白组相比,模型组小鼠肺组织中出现大面积肺泡壁增厚和粒细胞浸润,并出现少量肿瘤转移



注：与空白组相比，**** $P < 0.0001$ 。（下图/表同）

图 1 Western Blot 法检测肺组织中 VCAN、LOX、FN 的蛋白表达水平

Note. Compared with blank group, **** $P < 0.0001$. (The same in the following figures and tables)

Figure 1 Protein expression levels of VCAN, LOX and FN in lung tissues were detected by Western Blot

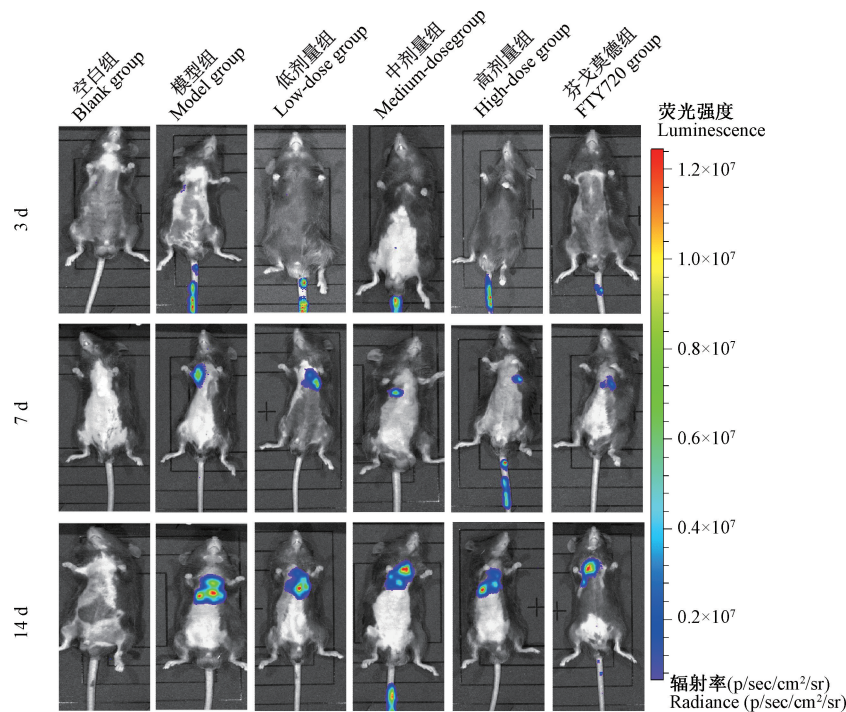


图 2 各组小鼠前 14 d 小动物活体成像检测

Figure 2 Animals in each group were imaged in the first 14 days

表 1 RT-qPCR 法检测肺组织中 VCAN、LOX 和 FN 的 mRNA 表达情况($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 mRNA expression of VCAN, LOX and FN in lung tissue was detected by RT-qPCR($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别 Groups	VCAN	LOX	FN
空白组 Blank group	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型组 Model group	8.91 ± 3.41 **	54.12 ± 3.20 ****	40.65 ± 1.81 ****
低剂量组 Low-dose group	3.49 ± 1.75	11.52 ± 4.78	25.36 ± 7.78
中剂量组 Medium-dose group	2.75 ± 1.77	9.76 ± 5.98	5.15 ± 2.87
高剂量组 High-dose group	1.73 ± 0.47	5.67 ± 2.45	2.51 ± 0.56
芬戈莫德组 FTY720 group	1.77 ± 0.18	0.68 ± 0.10	1.30 ± 0.34

注:与空白组相比, ** $P < 0.01$ 。
Note. Compared with blank group, ** $P < 0.01$.

灶,可以看到肺组织中存在的大量异型、核质比高、胞浆略嗜碱性的肿瘤细胞。与模型组相比,高剂量组和 FTY720 组小鼠的肿瘤转移灶点明显减少,肺组织趋于正常,表明一定浓度的 APS 对肺肿瘤细胞的转移有抑制作用(见图 3)。

2.4 RT-qPCR 法检测肺组织中 S100A8、S100A9 和 HIF-1 的 mRNA 的表达情况

RT-qPCR 法检测肺组织发现:与空白组比较,模型组中 S100A8、S100A9、HIF-1 mRNA 的表达量显著提高,差异具有显著性 ($P < 0.05$)。而与模型组比较,各治疗组中 S100A8、S100A9、HIF-1 mRNA 的表达量均显著下降,并依次呈阶梯状递减,表明

高剂量组与 FTY720 组治疗效果相比其他组更好,差异具有显著性($P < 0.05$)(见图 4)。

2.5 Western Blot 法检测肺组织中 S100A8、S100A9 和 HIF-1 的蛋白表达情况

Western Blot 检测结果显示:对于 S100A8、S100A9、HIF-1 的蛋白表达,与空白组比较,模型组中 S100A8、S100A9、HIF-1 蛋白的表达量显著提高,差异具有显著性($P < 0.05$)。而与模型组相比,各治疗组中 S100A8、S100A9、HIF-1 的蛋白表达量均显著下降,并依次呈阶梯状递减,其中高剂量组和 FTY720 组较其他组治疗效果更好,差异具有显著性 ($P < 0.05$)(见图 5)。

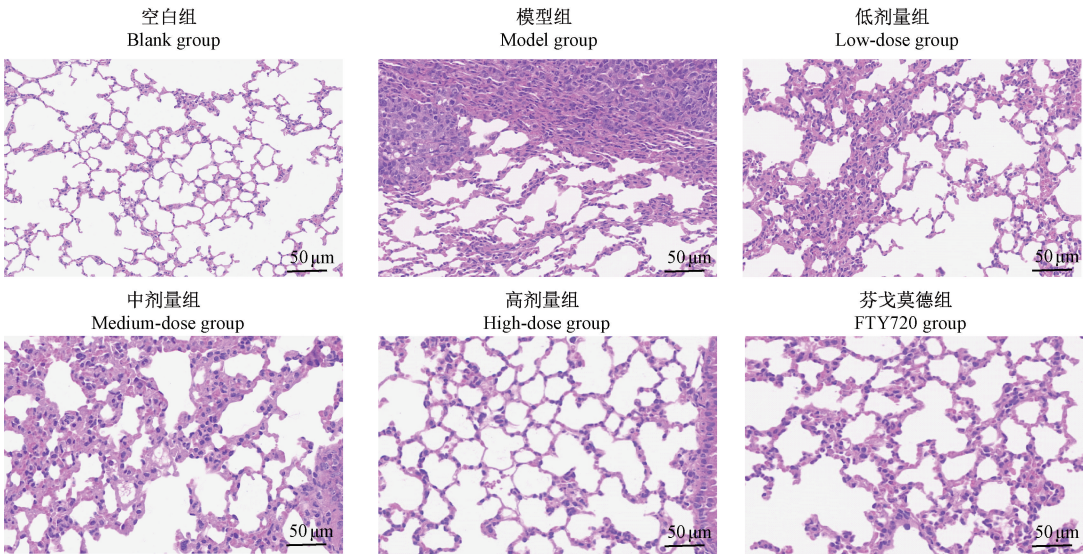
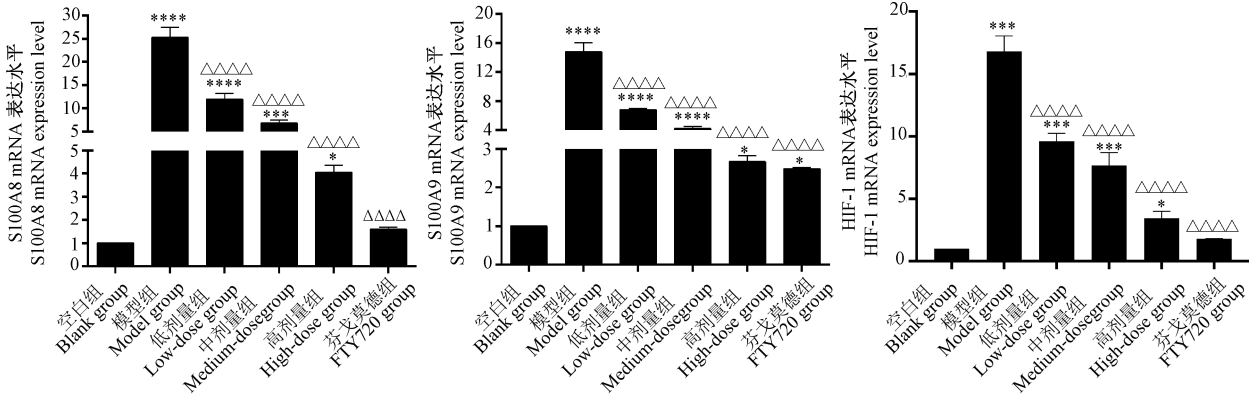


图 3 各组小鼠第 28 天肺组织 HE 染色

Figure 3 HE staining was performed on lung tissues of mice in each group on the 28th day



注:与空白组相比, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$;与模型组相比, ΔΔΔΔ $P < 0.0001$ 。(下同)

图 4 RT-qPCR 法检测肺组织中 S100A8、S100A9、HIF-1 mRNA 的表达水平

Note. Compared with blank group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Compared with model group, ΔΔΔΔ $P < 0.0001$. (The same in the following figures)

Figure 4 mRNA expression levels of S100A8, S100A9 and HIF-1 in lung tissues were detected by RT-qPCR

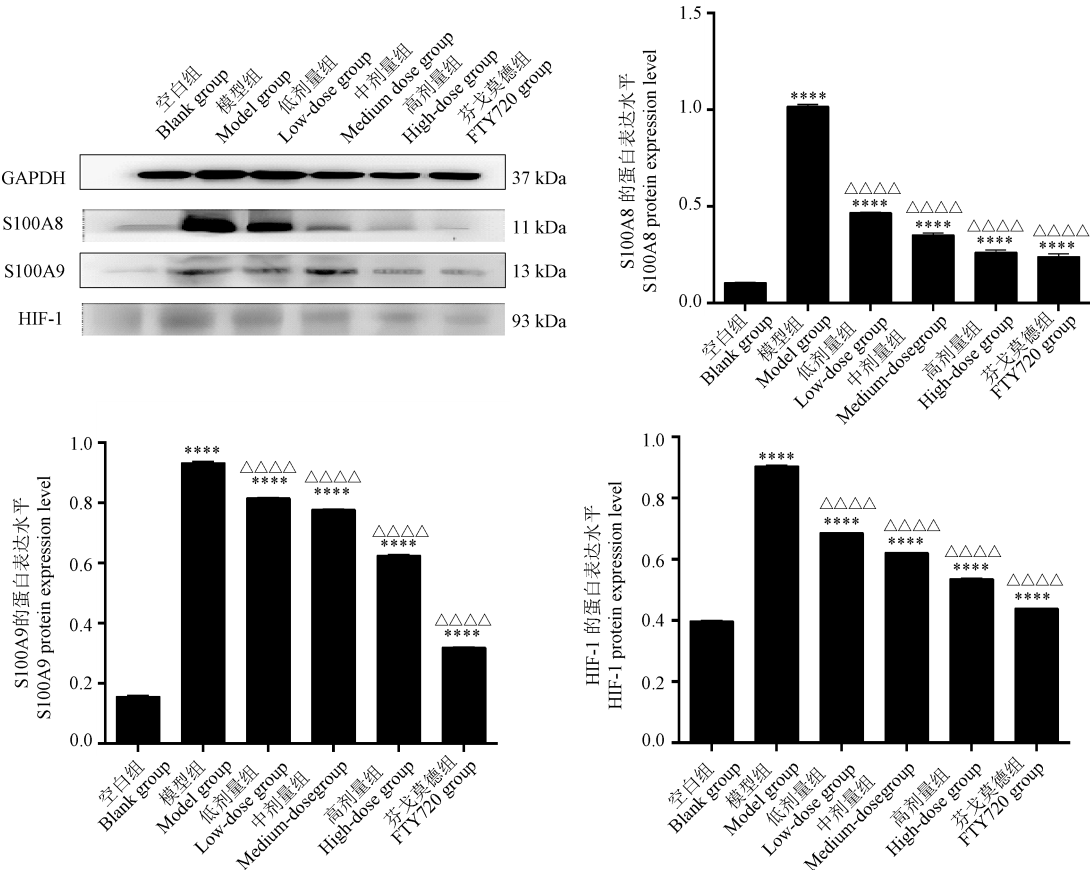


图 5 Western Blot 法检测肺组织中 S100A8、S100A9、HIF-1 的蛋白表达水平

Figure 5 Protein expression levels of S100A8, S100A9 and HIF-1 in lung tissues were detected by Western Blot

3 讨论

非小细胞肺癌是起源于支气管黏膜、腺体和肺泡上的恶性肿瘤,占据我国城市人口中恶性肿瘤死

亡原因的首位,尽管近年来其诊断和治疗方面取得了一定的进展,但 5 年生存率仅 13% 左右。早在 1889 年, Paget^[7] 就提出了“种子与土壤”假说用于解释肿瘤的转移。在后来的研究中, Kaplan 等^[8] 最

早提出了“转移前微环境(PMN_s)”概念。认为原发性肿瘤来源的分泌因子在转移前特异性的到达待转移组织中,通过改变其微环境,从而构建一个适合原发性肿瘤转移的环境即 PMN_s,最终形成转移病灶。因此,如果能有效抑制 PMN_s 的形成,对控制肿瘤的复发和转移会有一定的积极作用。

本实验首先根据小动物活体成像观察了小鼠在第 3、7、14 天中 LLC 细胞在体内通过血液转移到肺的情况。既揭示了肿瘤细胞向肺部的转移进程,同时也作为评价转移前微环境模型构建成功与否的方法之一。而实验结果显示,在对小鼠前 14 d 进行观察时,小动物活体成像能准确反映接种 LUC 标记的 LLC 小鼠的肺部肿瘤生长情况,并通过在 3、7、14 d 分别对小鼠肺组织进行取材观察,与前 3 d 相比,第 14 天时肺组织能够肉眼可见类圆形、半透明状的凸起病灶。

目前有研究发现,CD11b⁺ MDSCs 可以通过表达多功能蛋白聚糖(versican, VCAN)来构建 PMN_s^[9],同时有研究表明,在 PMN_s 形成的低氧环境下极大的促进赖氨酰氧化酶(lysyl oxidase, LOX)生成,LOX 能够使癌细胞的黏附能力下降,进而促进癌细胞的迁移^[10-11]。而 BMDCs 高表达 FN 受体 $\alpha 4 \beta 1$,并特异性的与靶器官 FN 表位结合,进一步诱导 MDSCs 迁移,共同构建肺转移前微环境。故选择具有标志性 VCAN、LOX、FN 蛋白通过 RT-qPCR 以及 Western Blot 技术进一步验证肿瘤转移前微环境模型构建。在本实验中,Western Blot 及 RT-qPCR 结果均显示空白组小鼠与模型组小鼠在这些标志性蛋白的表达间存在差异,进一步验证了肺肿瘤转移前微环境造模的成功。

同时,在 HE 染色的结果中发现,通过观察模型组小鼠,发现肿瘤细胞在肺部聚集数量较多,细胞形态及排列呈不规则状,大多分布在气管周围,而且有形成较明显的转移灶。在肿瘤转移前微环境的形成过程中,营造一个炎性微环境至关重要,而黄芪多糖可有效减少小气管周围如中性粒细胞等炎性细胞的数量,说明黄芪多糖能通过干预转移前炎性微环境,可有效减少肿瘤细胞在肺中的种植或生长。

有报道称在肿瘤的缺氧微环境下能使 HIFs 高表达,而表达上调的 HIFs 又能够提高它的转录活性从而进一步增加其基因突变的几率,促使肿瘤的增殖和迁移加剧^[12-13]。HIF-1 由 α 和提取物 β 两个

亚基组成,最早是在肝癌细胞株 Hep3B 经缺氧环境下诱导在细胞核中提取物发现的一种转录因子。在 HIF- α 家族目前已经发现的有 HIF-1 α 、HIF-2 α 、HIF-3 α 等因子,而其中 HIF-1 α 在肿瘤细胞中对于调节低氧环境、改变糖代谢机制中起着十分重要的作用^[14],能够影响如 VEGF、IL-8、IL-6 及 TNF- α 等原癌基因和免疫因子的表达,从而加速肿瘤发展的进程^[15]。研究表明,HIF-1 能通过参与多种靶基因调控使细胞和组织适应缺氧环境,也能够通过促进肿瘤细胞的血管生成,加速肿瘤的转移^[16]。同时肿瘤内缺氧环境促进 LOX 生成,LOX 的生成也依赖 HIF,其被认为是 PMN_s 形成的初始关键因素^[17]。在本实验中,RT-qPCR 结果显示低、中、高剂量组中检测相关因子 HIF-1 的 mRNA 表达均低于模型组,提示黄芪多糖可能通过降低 HIF-1 的 mRNA 表达,减少 HIF-1 生成,进而影响 PMN_s 的形成。Western Blot 的结果与 RT-qPCR 相一致。

PMN_s 的形成机制比较复杂,研究发现钙结合蛋白 S100A8/A9 在 PMN_s 形成过程中有重要作用。钙结合蛋白 S100A8 和 S100A9 是 S100 超家族的重要成员,细胞内通常以二聚体的形式存在,在髓细胞中大量表达,如循环单核细胞和中性粒细胞,并在炎症反应中被上调^[18]。它的主要作用一方面是与一些特定糖蛋白受体结合通过激活炎性通路促进炎性环境的形成;另一方面能够与髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)上的受体结合促进 MDSCs 集聚从而抑制机体的免疫调节^[19-20],促进 PMN_s 的形成。其中 S100A8/A9 的过表达能够特异性的诱导 MDSCs 的集聚,而 MDSCs 能通过表达整合素、多功能蛋白聚糖来动态重塑、建立 PMN_s。正因为钙结合蛋白 S100A8/A9 的机制与 PMN_s 的形成联系密切,所以其在 PMN_s 的表达情况以及能否作为靶点用于临床诊治值得探讨和研究。而在本实验的研究中 RT-qPCR 结果显示低、中、高剂量组中检测相关因子 S100A8、S100A9 的 mRNA 表达均低于模型组,提示黄芪多糖可能通过降低 S100A8/A9 的 mRNA 表达,减少 S100A8/A9 生成,进而影响 PMN_s 的形成,这与 Western Blot 结果一致。

综上,本实验研究发现,黄芪多糖能够通过下调 HIF-1、S100A8、S100A9 因子的表达,抑制肺转移前微环境的形成,从而减少肿瘤细胞向远端靶器官的转移。但其具体的免疫学机制仍需进一步研究。

参 考 文 献(References)

- [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] 李蔚勃. 100 例肺癌患者的临床特征及生存率分析 [J]. 临床医学研究与实践, 2016, 1(27): 10-11.
Li WB. Clinical features and survival rate analysis of 100 patients with lung cancer [J]. Clin Res Pract, 2016, 1(27): 10-11.
- [3] 谢红, 吴敬波, 向莉. 用近距离放射疗法治疗非小细胞肺癌的研究进展 [J]. 当代医药论丛, 2016, 14(1): 14-17.
Xie H, Wu JB, Xiang L. Research progress of brachytherapy for non-small cell lung cancer [J]. Contemp Med Symp, 2016, 14(1): 14-17.
- [4] 范洪桥, 刘丽芳, 熊家青, 等. 从中医学角度探讨护场与恶性肿瘤的传舍 [J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(9): 1853-1854.
Fan HQ, Liu LF, Xiong JQ, et al. Discussion on relationship between nursing field and transmission of malignant tumors from perspective of TCM [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2019, 46(9): 1853-1854.
- [5] 邹伟, 张婷婷, 曹玉珠, 等. 肿瘤转移前微环境形成机制的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(10): 1348-1352.
Zou W, Zhang TT, Cao YZ, et al. Research progress of mechanism of pre-metastatic niches formation [J]. Chin Pharmacol Bull, 2018, 34(10): 1348-1352.
- [6] 李辰, 苟菲, 张天锋. S100A11/HIF-1 α 在胰腺癌组织中的表达及与肿瘤恶性程度的关系 [J]. 实验与检验医学, 2020, 38(1): 184-186, 198.
Li C, Gou F, Zhang TF. Expression of S100A11 and HIF-1 α in pancreatic cancer and their relationship with malignant degree of the tumor [J]. Exp Lab Med, 2020, 38(1): 184-186, 198.
- [7] Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast [J]. Cancer Metastasis Rev, 1989, 8(2): 98-101.
- [8] Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche [J]. Nature, 2005, 438(7069): 820-827.
- [9] 魏华民, 花宝金. 髓源性抑制细胞在构筑转移前微环境促肿瘤转移中的作用 [J]. 中国癌症杂志, 2017, 27(6): 516-520.
Wei HM, Hua BJ. Role of myeloid-derived suppressor cells in premetastatic niche formation and tumor metastasis promotion [J]. Chin Oncol, 2017, 27(6): 516-520.
- [10] Acharyya S, Oskarsson T, Vanharanta S, et al. A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis [J]. Cell, 2012, 150(1): 165-178.
- [11] Joo YN, Jin H, Eun SY, et al. P2Y2R activation by nucleotides released from the highly metastatic breast cancer cell MDA-MB-231 contributes to pre-metastatic niche formation by mediating lysyl oxidase secretion, collagen crosslinking, and monocyte recruitment [J]. Oncotarget, 2014, 5(19): 9322-9334.
- [12] Lu Y, Sui J, Liu Y, et al. Association between hypoxia-inducible factor-1 α gene polymorphisms and risk of chronic hepatitis B and hepatitis B virus-related liver cirrhosis in a Chinese population: a retrospective case-control study [J]. Gene, 2015, 564(1): 96-100.
- [13] 王时光, 单远洲, 周联明, 等. 缺氧微环境下 HIF-1 α 对胰腺癌细胞上皮间质转化及侵袭迁移的影响 [J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(11): 1704-1709.
Wang SG, Shan YZ, Zhou LM, et al. Effect of HIF-1 α on the epithelial mesenchymal transition and invasion and migration of pancreatic cancer cells under hypoxic condition [J]. J Mod Oncol, 2016, 24(11): 1704-1709.
- [14] Semenza GL. The hypoxic tumor microenvironment: a driving force for breast cancer progression [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1863(3): 382-391.
- [15] 雷达, 李永利, 祁军安. HuR 和 HIF-1 α 在肝癌组织中的表达及其与患者的预后的关系 [J]. 中国临床研究, 2016, 29(9): 1160-1163.
Lei D, Li YL, Qi JA. Expressions of HuR and HIF-1 α in hepatocellular carcinoma tissues and their association with prognosis of patients [J]. Chin J Clin Res, 2016, 29(9): 1160-1163.
- [16] Samanta D, Semenza GL. Metabolic adaptation of cancer and immune cells mediated by hypoxia-inducible factors [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2018, 1870(1): 15-22.
- [17] 李丹丹, 崔守焯, 贾立敏, 等. 肿瘤转移中预转移微环境形成的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(6): 962-965.
Li DD, Cui SY, Jia LM, et al. Research progress of the pre-metastatic niche in tumor metastasis [J]. J Mod Oncol, 2018, 26(6): 962-965.
- [18] Asakura M, Karaki F, Fujii H, et al. Vildagliptin and its metabolite M20.7 induce the expression of S100A8 and S100A9 in human hepatoma HepG2 and leukemia HL-60 cells [J]. Sci Rep, 2016, 6: 35633.
- [19] 黄茂, 陈露, 彭棋, 等. 结直肠癌患者外周血 MDSCs 与 S100A9 水平及其临床意义探讨 [J]. 重庆医科大学学报, 2019, 44(11): 1463-1468.
Huang M, CHEN L, Peng Q, et al. The levels of MDSCs and S100A9 in peripheral blood of patients with colorectal cancer and their clinical significance [J]. J Chongqing Med Univ, 2019, 44(11): 1463-1468.
- [20] Scalea JR, Lee YS, Davila E, et al. Myeloid-derived suppressor cells and their potential application in transplantation [J]. Transplantation, 2018, 102(3): 359-367.

[收稿日期] 2023-01-13