doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.20.002

欧前胡素调节 Gas6/Axl 轴对膀胱癌荷瘤小鼠免疫功能的影响 *

刘志豪 [1] 谭万龙 [1△] 蓝创歆 [2] 朱俊逸 [2] 吴海渤 [2]

（1 南方医科大学南方医院泌尿外科 广东 广州 510515；2 惠州市中心人民医院泌尿外科 广东 惠州 516001）

摘要 目的：探讨欧前胡素（IMP）调节生长停滞特异蛋白 6（Gas6）/Axl 轴对膀胱癌荷瘤小鼠免疫功能的影响。**方法：**从 60 只 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠中随机选取 12 只小鼠作为对照组（CON 组），其余小鼠平均分为 Model 组、IMP 组、Gas6 组、IMP+Gas6 组，每组 12 只，往其左侧前肢皮下注射 0.2 mL 浓度为 1×10^7 个 /mL 的鼠源性膀胱癌肿瘤细胞系 T739 细胞溶液（Model 组和 IMP 组注射对照载体的 T739 稳转株细胞，Gas6 组和 IMP+Gas6 组注射过表达 Gas6 的 T739 稳转细胞株）造模。造模成功后，IMP 组及 IMP+Gas6 组通过腹腔注射 5 mg/kg 的 IMP；CON 组、Model 组及 Gas6 组通过腹腔注射等量的生理盐水，2 天 1 次，持续 5 次。测量小鼠肿瘤体积和重量；测定胸腺指数和脾脏指数；酶联免疫吸附测定（ELISA）法检测血清白介素 2（IL-2）、γ 干扰素（IFN-γ）、血管内皮生长因子（VEGF）水平；苏木精 - 伊红（HE）染色检查肿瘤组织病理变化；流式细胞术检测 T 细胞亚群；TUNEL 染色检测细胞凋亡；蛋白质印迹法（Western blot）检测 Gas6/Axl 通路相关蛋白表达。**结果：**Model 组肿瘤细胞整体上排列松散，出现不同程度的核固缩、核碎裂现象；IMP 则可以逆转该现象，使肿瘤细胞排列重新变得紧密，细胞核固缩程度提升，核碎裂现象降低；Model 组较 CON 组肿瘤体积、肿瘤质量、$CD8^+$ 细胞百分比、Gas6、Axl 蛋白水平、VEGF 水平显著增加（$P<0.05$），胸腺指数和脾脏指数、IL-2、IFN-γ、$CD4^+$ 细胞百分比、$CD4^+/CD8^+$、肿瘤细胞凋亡率显著下降（$P<0.05$）；与 Model 组相比，IMP 组胸腺指数和脾脏指数、IL-2、IFN-γ、$CD4^+$ 细胞百分比、$CD4^+/CD8^+$、肿瘤细胞凋亡率显著升高（$P<0.05$），肿瘤体积、肿瘤质量、$CD8^+$ 细胞百分比、Gas6、Axl 蛋白水平、VEGF 水平显著下降（$P<0.05$）；而 Gas6 组结果与 IMP 组趋势相反；而 IMP+Gas6 组的结果显示：IMP 能逆转 Gas6 过表达后对膀胱癌荷瘤小鼠的促瘤作用。**结论：**IMP 可能通过下调 Gas6/Axl 信号通路改善膀胱癌荷瘤小鼠免疫功能，从而产生抑瘤效果。

关键词：欧前胡素；Gas6/Axl 信号通路；膀胱癌；免疫功能

中图分类号：R-33；R737.14 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273（2023）20-3809-06

Effect of Imperatorin Regulating Gas6/Axl Axis on Immune Function of Bladder Cancer Bearing Mice*

LIU Zhi-hao[1], TAN Wan-long[1△], LAN Chuang-xin[2], ZHU Jun-yi[2], WU Hai-bo[2]

(1 Department of Urology Surgery, Southern Medical University Southern Hospital, Guangzhou, Guangdong, 510515, China; 2 Department of Urology Surgery, Huizhou Central People's Hospital, Huizhou, Guangdong, 516001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of imperatorin (IMP) on the immune function of bladder cancer bearing mice by regulating the growth arrest specific protein 6 (Gas6)/Axl axis. **Method:** 12 mice were randomly selected from 60 SPF grade male C57BL/6 mice as the control group (CON group). The remaining mice were evenly divided into Model group, IMP group, Gas6 group, and IMP+Gas6 group, with 12 mice in each group. A concentration of 0.2 mL was injected subcutaneously into their left forelimb at a concentration of 1×10^7/mL murine bladder cancer cell line T739 cell solution (model group and IMP group were injected with T739 stable transfection cell line of control vector, Gas6 group and IMP+Gas6 group were injected with T739 stable transfection cell line expressing Gas6) for modeling. After successful modeling, the IMP group and IMP+Gas6 group received intraperitoneal injection of 5 mg/kg of IMP. The CON group, Model group, and Gas6 group were injected with an equal amount of physiological saline via intraperitoneal injection, once every 2 days, for 5 consecutive times. Measure the volume and weight of mouse tumors. Measure thymus index and spleen index. Serum interleukin-2 (IL-2), γ Interferon (IFN-γ), vascular endothelial growth factor (VEGF) levels were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Hematoxylin eosin (HE) staining was used to examine the pathological changes of tumor tissue. T cell subpopulations was detected by flow cytometry. TUNEL staining was used to detect cell apoptosis. Western blot (Western blot) was used to detect the expression of Gas6/Axl pathway related proteins. **Results:** The tumor cells in Model group were loosely arranged, with pyknosis and Karyorrhexis in different degrees. IMP can reverse this phenomenon, making the tumor cell arrangement become compact again, the degree of nuclear pyknosis increases, and the Karyorrhexis phenomenon decreases. The model

* 基金项目：广东省自然科学基金项目（2017A030307037）

作者简介：刘志豪（1989-），男，硕士，主治医师，从事膀胱癌方向的研究，E-mail: lzh19888919@163.com

△ 通讯作者：谭万龙（1963-），男，博士，主任医师、教授，从事膀胱癌方向的研究，E-mail: tanwanlong@gmail.com

（收稿日期：2023-05-18 接受日期：2023-06-13）

group showed a significant increase in tumor volume, tumor mass, $CD8^+$ cell percentage, Gas6, Axl protein levels, and VEGF levels compared to the CON group ($P<0.05$), as well as thymus and spleen indices, IL-2, and IFN-γ, the percentage of $CD4^+$cells, $CD4^+/CD8^+$, and tumor cell apoptosis rate significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the Model group, the IMP group had thymic index, spleen index, IL-2, IFN-γ, the percentage of $CD4^+$cells, $CD4^+/CD8^+$ cells, and tumor cell apoptosis rate significantly increased ($P<0.05$), while tumor volume, tumor mass, percentage of $CD8^+$ cells, Gas6, Axl protein levels, and VEGF levels significantly decreased ($P<0.05$). The results of the Gas6 group showed opposite trends to those of the IMP group. The results of IMP+Gas6 group showed that IMP could reverse the tumor promoting effect of overexpression of Gas6 on bladder cancer bearing mice. **Conclusion:** IMP may improve the immune function of bladder cancer bearing mice by down-regulation of Gas6/Axl signaling pathway, thus producing anti-tumor effect.

Key words: Imperatorin; Gas6/Axl signaling pathway; Bladder cancer; Immune function

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.14 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2023)20-3809-06

前言

膀胱癌在全球癌症类型中排名第九，全世界每年约有430,000 例新发膀胱癌病例和 165,000 例膀胱癌患者死亡[1]。膀胱癌是一种使身体和心理衰弱的疾病,通常会导致严重的情绪困扰,如焦虑、抑郁和自杀倾向[2]。研究报道称,通过激活人体免疫系统可以根除恶性组织,从而达到治疗癌症的效果[3]。欧前胡素(IMP)是一种呋喃香豆素,研究报道称,IMP 表现出许多生物活性,如抗肿瘤、抗菌、抗病毒和抗氧化作用[4,5]。Mi C 等人[6]发现,在异种移植肿瘤模型中,IMP 可以抑制结肠癌生长,并阻断肿瘤血管生成。生长停滞特异蛋白 6(Gas6)/Axl 信号通路可以激活诸多不同的信号通路,与促进肿瘤细胞增殖、存活、迁移、侵袭、血管生成和免疫逃逸有关,是近年来的研究热点[7]。已有研究发现，下调 Gas6/Axl 信号通路可以促进免疫抑制进而改善肿瘤微环境[7]。有研究报道称,Gas6 过表达可激活受体 Axl 促进膀胱癌的细胞增殖和侵袭[8]。而负调节 Gas6/Axl 信号传导可以抑制黑色素瘤血管生成和肿瘤生长[9]。同时,IMP 对心血管系统和癌症起到改善作用[10]。目前 IMP 在膀胱癌上的研究尚未见报道,IMP 是否可以通过调节 Gas6/Axl 信号通路从而影响膀胱癌荷瘤小鼠免疫功能以及血管生成尚不清楚,基于以上研究目的,本研究进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 动物

60 只 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠(18±1)g 购自广东南模生物科技有限公司,生产许可证号:SCXK(粤)2022-0062。适宜温度(22-25℃)和湿度(50-60%)下自由采食和饮水。适应性喂养一周,本研究已获得本院动物伦理委员会的批准。

1.2 主要试剂

IMP(货号:SC11548)购自北京凯诗源生物科技有限公司;重组小鼠 Gas6 蛋白(货号:CSB-EP723418MO)购自武汉华美生物工程有限公司 CUSABIO® ;白介素 2(IL-2)试剂盒[货号:JK-(a)-E06502]购自上海晶抗生物工程有限公司;小鼠膀胱癌细胞 TTT739(货号:CE24300)购自北京科瑞思搏生物科技有限公司;γ 干扰素(IFN-γ)试剂盒(货号:EK-H12415)购自上海酶研生物科技有限公司;血管内皮生长因子(VEGF)试剂盒(货号:XY6153S/XY6153M/XY6153L) 购自上海烜雅生物科技有限公司;TUNEL 细胞凋亡试剂盒(货号:T2190)购自北京索莱宝科技有限公司;$CD4^+$ 抗体（货号:ab37722)、$CD8^+$ 抗体（货号:ab217344)、Gas6 一抗（货号:ab86059)、Axl 一抗（货号:ab215205)购自 Abcam。

1.3 Gas 慢病毒稳转株构建

鼠源的 GAS6 慢病毒颗粒(货号:MR209937L4V)及慢病毒对照颗粒(货号:PS100093V)购自 Origene 公司。通过慢病毒转染系统,根据说明书构建过表达小鼠来源 GAS6 的 TT739 稳转株及阴性对照质粒的 TT739 稳转细胞株。用于筛选和维持传代培养的嘌呤霉素的浓度为 10 和 2 μg/mL，筛选时间为 1 个月。

1.4 造模及分组

首先,随机选择 12 只小鼠作为空白对照组(CON 组),其余小鼠参考瞿小祥等人[11]文献造模,首先将过表达 GAS6 和对照载体的 T739 稳转细胞株用含 2 μg/mL 嘌呤霉素(puromycin)的 DMEM 培养基在 37℃,5%CO_2 下培养。小鼠随机分组，每组 12 只，分别为 Model 组、IMP 组、Gas6 组、IMP+Gas6 组。分别取处于对数生长期的细胞,从小鼠左侧前肢皮下注射 0.2 mL 浓度为 1×10^7 个 /mL 的细胞溶液,其中,model 组和 IMP 组注射对照载体的 T739 稳转株细胞,Gas6 组和 IMP+Gas6 组注射过表达 Gas6 的 T739 稳转细胞株。在注射 1 周后检查小鼠是否有瘤体生成,若触摸到有瘤体生成,则表明造模成功。IMP 组及 IMP+Gas6 组通过腹腔注射 5 mg/kg 的 IMP[12];CON 组、Model 组及 Gas6 组通过腹腔注射等量的生理盐水,2 天一次,持续 5 次。

1.5 标本采集

药物治疗结束第二天，用采血针通过腹主动脉采集 3 mL 血液,每组随机选取 6 只小鼠,将采集的血液置于 4℃离心机 3000 r/min,离心 10 min,获得上清液,将上清液保存在 -20℃用于酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测。每组另 6 只小鼠的外周血用于流式细胞术检查。12 只小鼠腹主动脉采血后,取出脾脏和胸腺称重,分出其中 6 只,取肿瘤组织样本固定于 4%多聚甲醛中用于病理检测和 TUNEL 染色,另 6 只小鼠肿瘤组织样本用于生长情况的测定以及蛋白水平测定。

1.6 肿瘤生长情况

取出肿瘤组织称重,用游标卡尺测量肿瘤样本的长度与宽度,并使用以下公式计算肿瘤体积。体积 =[(长度×宽度)/2]^3×0.5236[11]。

1.7 测定胸腺指数和脾脏指数

脾脏和胸腺称重后根据公式：脾脏（胸腺）指数 = 脾脏（胸腺）重量 / 体重×100%，计算脾脏、胸腺指数[13]。

1.8 ELISA 法检测血清 IL-2、IFN-γ、VEGF 水平

根据 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-2、IFN-γ、VEGF 水平。

1.9 苏木精 - 伊红（HE）染色检查肿瘤组织病理变化

将上述固定在 4%多聚甲醛的肿瘤组织标本经 75%乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋等步骤处理后，将标本用切片机切成 4 μm 厚度的薄片。将切片经苏木精及伊红染色处理，用中性树脂封片，最后于光学显微镜下观察肿瘤组织病理形态。

1.10 流式细胞术检测 T 细胞亚群

用密度梯度离心法收集外周血单个核细胞，按照试剂盒操作步骤加入 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 抗体试剂避光孵育 1h，用 FITC 标记的 $CD4^+$ 抗体检测 $CD4^+$ 细胞，利用 APC 标记的 $CD8^+$ 抗体检 $CD8^+$ 细胞，最后上机检测 $CD4^+$ 细胞和 $CD8^+$ 细胞百分比。

1.11 TUNEL 染色检测细胞凋亡

对肿瘤组织切片进行脱蜡和水合。加入 20 μg/mL 蛋白酶 K 工作液，加入 0.05% DAB 溶液在室温下显色 3 min。然后，将切片用苏木素染色，脱水，密封并固定。在光学显微镜下观察，并通过 Image J 软件分析阳性细胞的数量。凋亡率（%）= 凋亡细胞数 / 细胞总数×100%。

1.12 蛋白质印迹法（Western blot）检测 Gas6/Axl 通路相关蛋白表达

取肿瘤组织约 50 mg，加入裂解液和蛋白酶抑制剂提取总蛋白。通过 BCA 法定量总蛋白质。进行十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移到聚偏二氟乙烯（PVDF）膜上。用脱脂奶粉封膜 2 h，加入一抗 Gas6（1∶1000）、Axl（1∶1000）和 GAPDH 抗体（1∶1000），4℃下孵育过夜。然后用 TBST 洗涤膜，加入二抗（1∶10000），室温孵育 1h，洗涤。ECL 显影后，通过 Image J 软件分析蛋白灰度值。

1.13 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 进行数据分析，计量资料以平均值±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用 SNK-q 检验。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IMP 对小鼠肿瘤生长、胸腺指数和脾脏指数的影响

对比 CON 组，Model 组肿瘤体积、肿瘤重量显著增加（$P<0.05$），胸腺指数和脾脏指数显著减少（$P<0.05$）；与 Model 组相比，IMP 组肿瘤体积、肿瘤重量显著减少（$P<0.05$），胸腺指数和脾脏指数显著增多（$P<0.05$），而 Gas6 组则与 IMP 组趋势相反（$P<0.05$）；加入 IMP 可以逆转 Gas6 过表达对膀胱癌荷瘤小鼠的影响，对比 Gas6 组，IMP+Gas6 组肿瘤体积、肿瘤重量显著减少（$P<0.05$），胸腺指数和脾脏指数显著升高（$P<0.05$），见表 1，图 1。

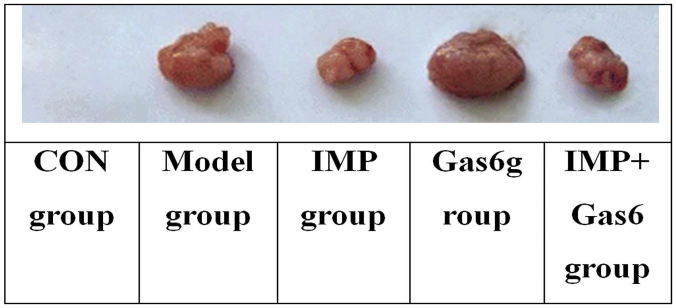

图 1 各组小鼠肿瘤标本的比较

Fig. 1. Comparison of tumor samples from each group of mice

表 1 各组小鼠肿瘤生长、胸腺指数和脾脏指数的比较（$\bar{x}\pm s$，n=6）

Table 1 Comparison of tumor growth, thymus index, and spleen index in each group of mice（$\bar{x}\pm s$，n=6）

Groups	Tumor volume(mm^3)	Tumor weight(g)	Thymus index(%)	Spleen index(%)
CON group	0.00±0.00	0.00±0.00	2.39±0.26	5.62±0.66
Model group	194.87±20.46[a]	0.47±0.04[a]	1.28±0.13[a]	3.65±0.37[a]
IMP group	71.62±6.15[b]	0.20±0.05[b]	2.13±0.24[b]	5.31±0.54[b]
Gas6 group	286.54±30.74[b]	0.67±0.09[b]	0.54±0.06[b]	1.99±0.20[b]
IMP+Gas6 group	134.67±10.34[c]	0.28±0.36[c]	1.78±0.15[c]	4.05±0.47[c]

Note: Compared with the CON group, [a]$P<0.05$. Compared with the Model group, [b]$P<0.05$. Compared with the Gas6 group, [c]$P<0.05$.

2.2 IMP 对小鼠血清 IL-2、IFN-γ、VEGF 水平的影响

与 CON 组相比，Model 组小鼠血清中 IL-2、IFN-γ 水平显著下降（$P<0.05$），VEGF 水平显著升高（$P<0.05$）；与 Model 组相比，IMP 组 IL-2、IFN-γ 水平显著升高（$P<0.05$），VEGF 水平显著降低（$P<0.05$），而 Gas6 组趋势相反（$P<0.05$）；但在 IMP+Gas6 组加入 IMP 后，IL-2、IFN-γ 水平相较 Gas6 组显著升高（$P<0.05$），VEGF 水平显著降低（$P<0.05$），见表 2。

2.3 IMP 对小鼠肿瘤组织病理变化的影响

Model 组小鼠肿瘤细胞整体上排列松散，出现不同程度的核固缩、核碎裂现象；IMP 则可以逆转该现象，使小鼠肿瘤细胞排列重新变得紧密，细胞核固缩程度提升，核碎裂现象降低；过表达 Gas6 后与 Model 组相比，Gas6 组小鼠肿瘤细胞排列变得更加松散，细胞核固缩程度减低，核碎裂现象增加；IMP 的加入则能逆转 Gas6 过表达后小鼠肿瘤细胞病理形态的改变，见图2。

表 2 各组小鼠血清中 IL-2、IFN-γ、VEGF 水平的比较($\bar{x}\pm s$,n=6)

Table 2 Comparison of IL-2, IFN-γ, VEGF of mice in each group($\bar{x}\pm s$,n=6)

Groups	IL-2(pg/mL)	IFN-γ(pg/mL)	VEGF(pg/mL)
CON group	26.43±3.26	0.90±0.11	27.64±1.12
Model group	15.32±1.88[a]	0.36±0.04[a]	56.43±4.76[a]
IMP group	23.54±2.76[b]	0.82±0.09[b]	31.54±2.76[b]
Gas6 group	7.64±0.72[b]	0.14±0.01[b]	85.32±7.88[b]
IMP+Gas6 group	18.46±1.45[c]	0.43±0.04[c]	52.46±4.45[c]

Note: Compared with the CON group, [a]P<0.05. Compared with the Model group, [b]P<0.05.Compared with the Gas6 group, [c]P<0.05.

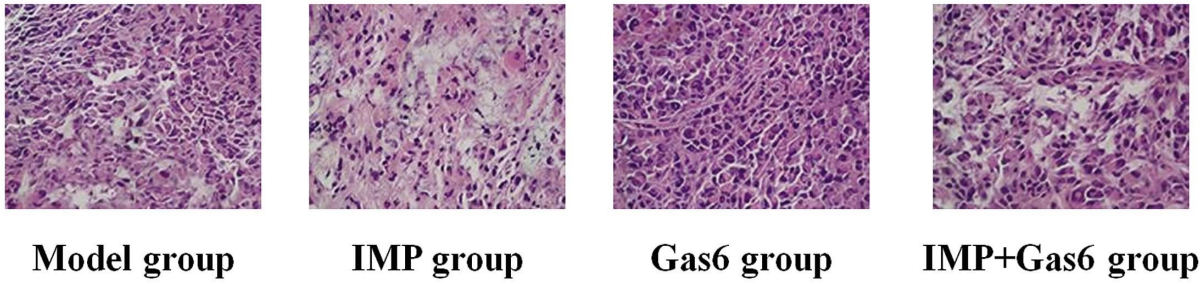

图 2 HE 染色检测肿瘤组织病理变化(×200)

Fig.2 HE staining for detecting pathological changes in tumor tissue(×200)

2.4 IMP 对小鼠 T 细胞亚群的影响

与 CON 组相比,Model 组小鼠 $CD4^+$ 细胞百分比、$CD4^+/CD8^+$ 显著下降(P<0.05),$CD8^+$ 细胞百分比显著升高(P<0.05);与 Model 组相比,IMP 组小鼠 $CD4^+$ 细胞百分比、$CD4^+/CD8^+$ 显升高(P<0.05),$CD8^+$ 细胞百分比显著降低(P<0.05),而 Gas6 组趋势相反(P<0.05);与 Gas6 组相比,IMP+Gas6 组 $CD4^+$ 细胞百分比、$CD4^+/CD8^+$ 显著升高(P<0.05),$CD8^+$ 细胞百分比显著降低(P<0.05),见表 3。

表 3 各组小鼠 T 细胞亚群的比较($\bar{x}\pm s$,n=6)

Table 3 Comparison of T cell subpopulations in each group of mice($\bar{x}\pm s$,n=6)

Groups	$CD4^+$(%)	$CD8^+$(%)	$CD4^+/CD8^+$
CON group	25.38±3.47	9.65±1.10	2.63±0.21
Model group	15.94±1.97[a]	14.65±2.16[a]	1.07±0.17[a]
IMP group	21.48±2.98[b]	9.85±1.95[b]	2.18±0.26[b]
Gas6 group	9.37±0.98[b]	21.53±2.89[b]	0.44±0.06[b]
IMP+Gas6 group	16.76±1.30[c]	14.34±2.51[c]	1.16±0.13[c]

Note: Compared with the CON group, [a]P<0.05. Compared with the Model group, [b]P<0.05. Compared with the Gas6 group, [c]P<0.05.

2.5 IMP 对小鼠肿瘤细胞凋亡的影响

与 Model 组相比,IMP 组小鼠肿瘤细胞凋亡率明显升高(P<0.05),而 Gas6 组趋势相反(P<0.05);与 Gas6 组相比,IMP+Gas6 组肿瘤细胞凋亡率显著升高(P<0.05),见图 3,见表 4。

2.6 IMP 对小鼠 Gas6/Axl 信号通路蛋白水平的影响

与 Model 组相比,IMP 组 Gas6、Axl 蛋白水平显著下调(P<0.05),而 Gas6 组趋势相反(P<0.05);与 Gas6 组相比,IMP+Gas6 组 Gas6、Axl 蛋白水平显著下调(P<0.05),见图 4,表 5。

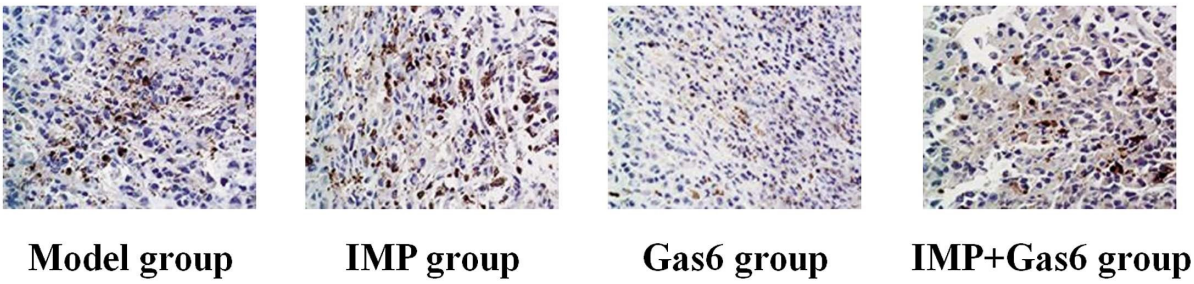

图 3 TUNEL 染色检测各组大鼠肿瘤细胞凋亡(×200)

Fig.3 TUNEL staining detection of tumor cell apoptosis in rats of each group(×200)

表 4 各组小鼠肿瘤细胞凋亡率的比较($\bar{x}\pm s$,n=6)

Table 4 Comparison of tumor cell apoptosis rates among different groups of mice($\bar{x}\pm s$,n=6)

Groups	Apoptosis(%)
Model group	12.38±1.37
IMP group	26.28±3.87[a]
Gas6 group	5.53±0.39[a]
IMP+Gas6 group	18.56±2.09[b]

Note: Compared with the Model group, [a]P<0.05. Compared with the Gas6 group, [b]P<0.05.

表 5 IMP 对小鼠 Gas6/Axl 信号通路蛋白水平的影响($\bar{x}\pm s$,n=6)

Table 5 Effect of IMP on the levels of Gas6/Axl signaling pathway proteins in mice($\bar{x}\pm s$,n=6)

Groups	Gas6/GAPDH	Axl/GAPDH
Model group	0.64±0.07	0.71±0.09
IMP group	0.35±0.05[a]	0.31±0.04[a]
Gas6 group	0.93±0.07[a]	0.91±0.08[a]
IMP+Gas6 group	0.58±0.06[b]	0.66±0.07[b]

Note: Compared with the Model group, [a]P<0.05. Compared with the Gas6 group, [b]P<0.05.

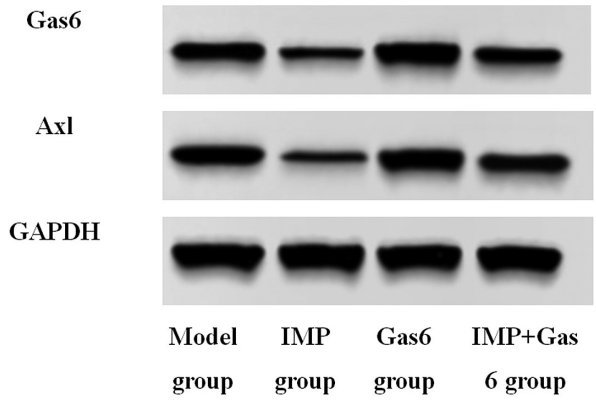

图 4 Western blot 检测 Gas6/Axl 信号通路蛋白水平

Fig.4 Western blot detection of Gas6/Axl signaling pathway protein levels

3 讨论

膀胱癌是常见的恶性肿瘤疾病之一,现阶段最佳的膀胱癌治疗需要结合手术、放疗、化疗和免疫疗法等多种方法[14]。尽管膀胱癌的治疗已经取得了重大进步,但是膀胱癌患者的总体生存率仍然较低[15]。因此,寻找新的膀胱癌治疗方法仍是我们急需解决的难题之一。已有多篇报道 IMP 对多种小鼠模型中的肿瘤转移具有强大的抑制作用,例如,Xu WW 等人[16]发现 IMP 可以抑制食管癌小鼠肿瘤的生长。Lv M 等人[12]通过体外实验发现,IMP 可以促进人骨肉瘤细胞凋亡,抑制其增殖,通过建立皮下肿瘤移植裸鼠模型发现,IMP 可以抑制人骨肉瘤的生长。因此,本研究通过构建膀胱癌小鼠模型来探究 IMP 对膀胱癌荷瘤小鼠肿瘤生长的影响。结果发现 Model 组小鼠肿瘤细胞整体上排列松散,出现不同程度的核固缩、核碎裂现象,肿瘤体积、肿瘤重量显著增加,表明造模成功。而 IMP 处理后小鼠肿瘤体积、肿瘤重量显著下降,提示 IMP 可抑制膀胱癌荷瘤小鼠肿瘤生长。

在缺乏足够的血液供应的情况下,实体瘤不能继续无限生长[17]。增加 VEGF 表达可以促进血管生成,加速肿瘤的生长和转移[18]。本研究发现 IMP 治疗后,VEGF 水平显著下降,表明 IMP 可以抑制血管生成,进而抑制膀胱癌的发展。机体的免疫系统在肿瘤的生长、发展以及转移过程中起到重要作用[19]。胸腺是 T 细胞分化、成熟的场所,脾脏是体液免疫、细胞免疫的发生中心,在调节免疫系统中起到重要作用[20]。本研究发现,IMP 治疗后胸腺指数和脾脏指数显著升高,表明 IMP 可能对膀胱癌荷瘤小鼠免疫系统产生影响。IL-2 是 T 细胞产生的免疫活性调节因子,在抗肿瘤方面起到积极作用[21]。IFN-γ 是一种免疫调节剂,可以由 NKT 细胞和 T 细胞产生,IFN-γ 的增加有助于抑制肿瘤生长[22]。Crispen PL[23]还发现,膀胱癌患者体内 $CD4^+$ 细胞百分比、$CD4^+/CD8^+$ 显著下降。在本研究中,Model 组小鼠 IL-2、IFN-γ、$CD4^+$ 细胞百分比、$CD4^+/CD8^+$ 显著下降,$CD8^+$ 细胞百分比显著升高,表明膀胱癌荷瘤小鼠免疫能力减弱,而 IMP 治疗后 IL-2、IFN-γ、$CD4^+$ 细胞百分比、$CD4^+/CD8^+$ 显著升高,表明 IMP 可能通过增加 $CD4^+$ 细胞水平提高机体的免疫能力,从而发挥抗膀胱癌的作用。

Gas6/Axl 是研究癌症免疫治疗的重要通路,Gas6/Axl 在内皮细胞中的过表达与其在血管生成和肿瘤生长中的需求有关[24]。下调 Gas6/Axl 信号传导会抑制黑色素瘤血管生成和肿瘤生长[9]。上调 Gas6/Axl 信号轴促进胰腺癌转移,重组 Gas6 蛋白可以促进患者来源的转移性肝外植体小鼠肿瘤细胞增殖[25]。在本研究中,Model 组小鼠 Gas6、Axl 蛋白高表达,而 IMP 治疗后 Gas6、Axl 蛋白显著下降,与前人研究结果一致,暗示 IMP 可能通过下调 Gas6/Axl 信号轴来改善免疫功能,发挥抗膀胱癌作用。为了进一步证实猜测,本研究用重组小鼠 Gas6 蛋白处理膀胱癌荷瘤小鼠以及 IMP 治疗的膀胱癌荷瘤小鼠,结果发现,重组 Gas6 蛋白促进了肿瘤的生长,且 IMP 逆转了重组 Gas6 蛋白对膀胱癌荷瘤小鼠的促瘤效果。

综上所述,IMP 可能通过下调 Gas6/Axl 信号通路改善免

疫功能,进而对膀胱癌荷瘤小鼠起到治疗效果。然而,IMP 是否可以调控其它癌症免疫治疗相关通路起到同样治疗效果,需要进一步探索。

参 考 文 献(References)

[1] Fernández MI, Brausi M, Clark PE, et al. Epidemiology, prevention, screening, diagnosis, and evaluation: update of the ICUD-SIU joint consultation on bladder cancer[J]. World J Urol, 2019, 37(1): 3-13

[2] Vartolomei L, Vartolomei MD, Shariat SF. Bladder Cancer: Depression, Anxiety, and Suicidality Among the Highest-risk Oncology Patients[J]. Eur Urol Focus, 2020, 6(6): 1158-1161

[3] Armitage JD, Newnes HV, McDonnell A, et al. Fine-Tuning the Tumour Microenvironment: Current Perspectives on the Mechanisms of Tumour Immunosuppression[J]. Cells, 2021, 10(1): 56

[4] 刘笑笑, 曹蔚, 王四旺. 欧前胡素的提取分离方法和药理学研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(20): 3954-3956

[5] 李晓强, 谭余庆, 李慧杰, 等. 欧前胡素药理作用及机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(18): 196-201

[6] Mi C, Ma J, Wang KS, et al. Imperatorin suppresses proliferation and angiogenesis of human colon cancer cell by targeting HIF-1α via the mTOR/p70S6K/4E-BP1 and MAPK pathways[J]. J Ethnopharmacol, 2017, 39(203): 27-38

[7] Tanaka M, Siemann DW. Gas6/Axl Signaling Pathway in the Tumor Immune Microenvironment[J]. Cancers (Basel), 2020, 12(7): 1850

[8] Mao S, Wu Y, Wang R, et al. Overexpression of GAS6 Promotes Cell Proliferation and Invasion in Bladder Cancer by Activation of the PI3K/AKT Pathway[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13(5): 4813-4824

[9] Lechertier T, Reynolds LE, Kim H, et al. Pericyte FAK negatively regulates Gas6/Axl signalling to suppress tumour angiogenesis and tumour growth[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 2810

[10] Nasser MI, Zhu S, Hu H, et al. Effects of imperatorin in the cardiovascular system and cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 38 (120): 109401

[11] 瞿小祥, 孔东波, 鲁小红, 等. 苦参碱经 TLR4/NF-κB 通路对膀胱癌小鼠免疫机制的调控作用[J]. 东南大学学报(医学版), 2021, 40 (6): 813-819

[12] Lv M, Xu Q, Zhang B, et al. Imperatorin induces autophagy and G0/G1 phase arrest via PTEN-PI3K-AKT-mTOR/p21 signaling pathway in human osteosarcoma cells in vitro and in vivo [J]. Cancer Cell Int, 2021, 21(1): 689

[13] 朱钊铭, 滕萍英, 黄桂红, 等. 龙船花抗炎有效部位探讨及对小鼠胸腺与脾脏指数的影响[J]. 环球中医药, 2019, 12(11): 1635-1639

[14] Crabb SJ, Douglas J. The latest treatment options for bladder cancer [J]. Br Med Bull, 2018, 128(1): 85-95

[15] 郭薇, 李爽, 李恂, 等. 辽宁省城市膀胱癌患者 10 年生存率及其影响因素分析[J]. 中国医科大学学报, 2022, 51(1): 38-42

[16] Xu WW, Huang ZH, Liao L, et al. Direct Targeting of CREB1 with Imperatorin Inhibits TGFβ2-ERK Signaling to Suppress Esophageal Cancer Metastasis[J]. Adv Sci (Weinh), 2020, 7(16): 2000925

[17] 王绍钧, 王锐, 朱冬波. 实体瘤靶向药物的研究进展 [J]. 中国药房, 2017, 28(8): 1149-1152

[18] Bakshi HA, Quinn GA, Nasef MM, et al. Crocin Inhibits Angiogenesis and Metastasis in Colon Cancer via TNF-α/NF-kB/ VEGF Pathways[J]. Cells, 2022, 11(9): 1502

[19] 杨龙, 白纯, 李先亮, 等. 免疫疗法治疗实体瘤研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(5): 626-630, 634

[20] Thapa P, Farber DL. The Role of the Thymus in the Immune Response[J]. Thorac Surg Clin, 2019, 29(2): 123-131

[21] Ren Z, Zhang A, Sun Z, et al. Selective delivery of low-affinity IL-2 to PD-1+ T cells rejuvenates antitumor immunity with reduced toxicity[J]. J Clin Invest, 2022, 132(3): e153604

[22] Paul S, Chhatar S, Mishra A, et al. Natural killer T cell activation increases iNOSCD206 M1 macrophage and controls the growth of solid tumor[J]. J Immunother Cancer, 2019, 7(1): 208

[23] Crispen PL, Kusmartsev S. Mechanisms of immune evasion in bladder cancer[J]. Cancer Immunol Immunother, 2020, 69(1): 3-14

[24] Tanaka M, Siemann DW. Therapeutic Targeting of the Gas6/Axl Signaling Pathway in Cancer[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(18): 9953

[25] Bellomo G, Rainer C, Quaranta V, et al. Chemotherapy-induced infiltration of neutrophils promotes pancreatic cancer metastasis via Gas6/AXL signalling axis[J]. Gut, 2022, 71(11): 2284-2299