

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.23.005

肿瘤微环境中 ROS 介导 IgG 表达对膀胱癌细胞增殖和侵袭能力的影响 *

车志飞¹ 吴遥西¹ 杨杰⁴ 金应霞³ 钟静静¹ 梁培育^{1△} 李浩勇^{2△}

(1 海南医学院第一附属医院泌尿外科 海南 海口 570100; 2 武汉大学人民医院泌尿外科 湖北 武汉 430060;

3 武汉大学第一临床学院中心实验室 湖北 武汉 430060; 4 海南医学院第二附属医院泌尿外科 海南 海口 570100)

摘要 目的:探讨肿瘤微环境(TME)中活性氧(ROS)介导免疫球蛋白 G(IgG)表达对膀胱癌 EJ 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。**方法:**临床收集的 18 例膀胱癌患者样本,通过 Western blot 法检测膀胱癌和癌旁正常组织样本中 IgG 表达量。利用免疫荧光染色(IF)技术分别对膀胱癌组织和癌旁正常组织中 ROS 和 IgG 分子进行共定位和相对定量分析。将活性氧清除剂 N-乙酰基-L-半胱氨酸(NAC)加入膀胱癌细胞 EJ 中,实验分为 3 组:空白组(EJ 细胞)、阴性对照组(EJ+PBS)、实验组(EJ+PBS+NAC),10 mM NAC 药物处理 48 小时后,运用 DHE-ROS 荧光探针技术和 Western blot 实验检测药物 NAC 对 ROS 和 IgG 相对表达水平的影响;通过克隆集落形成实验、划痕实验、Transwell 实验检测去除 ROS 后对膀胱癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响。**结果:**人体膀胱癌组织中 ROS 和 IgG 分子表达水平显著高于癌旁正常组织($P<0.001$);荧光显微镜显示膀胱肿瘤组织中正常膀胱尿路上皮细胞组织被肿瘤细胞严重破坏,结构紊乱不规则,IgG 和 ROS 表达水平平均升高,而癌旁组织膀胱尿路上皮组织的结构均匀规则;NAC 药物处理 EJ 细胞后,与空白组和阴性对照组相比 ROS 和 IgG 表达显著降低,同时实验组细胞的增殖、迁移和侵袭能力明显下降($P<0.01$)。**结论:**ROS 和 IgG 在临床膀胱癌组织和体外膀胱癌细胞株 EJ 中均显著高表达,在肿瘤微环境中 ROS 通过调控 IgG 表达,从而促进膀胱癌细胞的增殖、迁移、侵袭。ROS 和 IgG 可能成为膀胱癌早期诊断和生物治疗的临床新靶点。

关键词:活性氧(ROS);免疫球蛋白 G(IgG);膀胱癌;肿瘤微环境(TME)

中图分类号:R-33; R737.14 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2022)23-4423-07

Effects of ROS-mediated IgG Expression in Tumor Microenvironment on Cell Proliferation and Invasion of Bladder Cancer Cells*

CHE Zhi-fei¹, WU Yao-xi¹, YANG Jie⁴, JIN Ying-xia³, ZHONG Jing-jing¹, LIANG Pei-yu^{1△}, LI Hao-yong^{2△}

(1 Department of Urology Surgery, The First Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou, Hainan, 570100, China;

2 Department of Orthopedics, Renmin Hospital of WuHan University, Wuhan, Hubei, 430060, China;

3 Wuhan University People's Hospital Central Laboratory, Wuhan, Hubei, 430060, China;

4 Department of Urology Surgery, The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou, Hainan, 570100, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of reactive oxygen species(ROS)-mediated immunoglobulin G (IgG) expression on the proliferation, migration and invasion of bladder cancer cell line EJ in the tumor microenvironment (TME). **Methods:** The IgG expression in bladder cancer and adjacent normal tissue samples was detected by Western blot from 18 clinical patients with bladder cancer. Then, the co-localization and relative quantification analysis of ROS and IgG molecules were measured with immunofluorescence staining technology (IF) in bladder cancer tissues and adjacent normal tissues, respectively. The bladder cancer cells EJ were treated with the drug N-acetyl-L-cysteine (NAC), a reactive oxygen species scavenger, for 48 hours with 10mM NAC, and then the experiment was divided into three groups: the blank group (EJ cells), the negative control group (EJ+PBS), the experimental group (EJ+PBS+NAC). The DHE-ROS fluorescent probe technology and Western blot was used to detect the effect of drug NAC on the relative expression levels of ROS and IgG. The effects of removing ROS on the proliferation, migration and invasion of bladder cancer cell line EJ were detected by clonal colony formation assay, wound healing assay, and Transwell assay. **Results:** The expression levels of ROS and IgG in human bladder cancer tissues were significantly higher than those in para-carcinoma tissues ($P<0.001$). Immunofluorescence stain of bladder cancer tissues showed that the normal bladder urothelial cells in tumor tissue was severely damaged by tumor cells, with disordered and irregular structure, and the expression levels of IgG and ROS were increased, while the structure of bladder urothelial cells was uniform and regular in para-carcinoma tissue. After the drug NAC treatment of bladder cancer EJ cells, compared with the blank group and the negative control group, the expressions levels of ROS and IgG were significantly decreased, and the proliferation, migration and invasion abilities of bladder cancer EJ cells in the experimental group were significantly declined ($P<0.01$). **Conclusions:** ROS and IgG were significantly

* 基金项目:海南省社会发展重点项目(ZDYF2019122;ZDYF2020136);海南省自然科学基金青年基金项目(818QN317);

海南医学院教育科研课题(HYYB202054);海南省研究生创新科研课题(Qhyb2021-57)

作者简介:车志飞(1987-),博士研究生,主要研究方向:肿瘤学,E-mail: 982429547@qq.com,电话:15936566903

△ 通讯作者:梁培育(1965-),博士生导师,主要研究方向:肿瘤学,E-mail: 1076447336@qq.com,电话:13976616788;

李浩勇(1974-),硕士生导师,研究方向:肿瘤学,E-mail: haoyli5118@126.com,电话:17764060728

(收稿日期:2022-03-28 接受日期:2022-04-23)

highly expressed in clinical bladder cancer tissues and vitro EJ cells. In the tumor microenvironment, ROS via regulating IgG expression promotes the proliferation, migration and invasion of bladder cancer cells. ROS and IgG may be new clinical targets for the early diagnosis and biological therapy of bladder cancer.

Key words: Reactive Oxygen Species (ROS); Immunoglobulin G (IgG); Bladder Cancer; Tumor Microenvironment (TME)

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

Article ID: 1673-6273(2022)23-4423-07

前言

膀胱癌是泌尿生殖系统最常见的恶性疾病之一,在所有泌尿生殖系统恶性肿瘤中占第二位,近年来膀胱癌的发病率和死亡率正在逐年上升,且晚期转移性膀胱癌的远期生存率较低^[1]。目前膀胱癌的临床治疗中,现有的 HER-2、H-ras 等靶向治疗效果并不理想,因此,亟需进一步探究膀胱癌发生转移的具体分子机制^[1,2]。

传统免疫学观点认为人免疫球蛋白 G(Immunoglobulin G, IgG)仅由 B 淋巴细胞和浆细胞产生,最新研究表明结直肠癌、乳腺癌、宫颈癌等肿瘤组织可分泌大量 IgG 可促进肿瘤细胞的生长和转移,并且与肿瘤分级分期及临床预后密切相关^[3]。本研究团队,前期通过慢病毒载体 siRNA 干扰技术敲低膀胱癌 EJ 细胞的 IGHG1 基因(IgG 的基因名)和动物实验,已证明膀胱癌细胞 EJ 中 IgG 促进肿瘤细胞的增殖、凋亡和迁移,与膀胱癌的发生及恶性生物学行为直接相关^[4,5]。但是,IgG 在膀胱癌转移过程中的上游调控机制仍不清楚。

活性氧(Reactive oxygen species, ROS)是机体氧化应激反应和信号传导的重要介质。ROS 过量产生诱导 DNA 氧化损伤、蛋白质肽链断裂、线粒体功能障碍等,引起基因突变或染色体组不稳定,从而导致炎症、神经退行性疾病、癌症的发生^[6,7]。近年来,国内外大量研究发现,癌细胞中活性氧高表达水平,并且 ROS 在癌症进展中起着重要作用^[8]。Attapol 等发现在胆管癌中,高水平 ROS 通过氧化反应诱导 IgG 表达,进而调控胆管癌细胞的转移^[9]。然而,膀胱癌细胞是如何被激活表达 IgG 的具体分子机制尚不明确,因此我们需要进一步深入研究。本研究运用组织 Western blot 和免疫荧光技术研究 IgG 和 ROS 在膀胱癌中的表达变化,通过细胞药物实验和功能实验探究 ROS 对 IgG 和膀胱癌细胞增殖、迁移、侵袭能力的影响;旨在为膀胱癌早期诊断与治疗提供新的有效靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 人膀胱癌 EJ 细胞株购买于武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.1.2 组织样本 随机选择自武汉大学人民医院泌尿外科从 2019 年 9 月至 2020 年 7 月收治的 18 例膀胱癌患者,通过根治性膀胱全切术获取膀胱组织,相对应的癌旁组织均取自距离肿瘤边缘 2 cm 以上的正常组织。样本切除后分别迅速放入液氮和多聚甲醛固定液中,用于 Western Blot 和免疫荧光染色实验。

1.1.3 主要试剂 试剂:RPMI-1640 培养基、胰酶、胎牛血清、青霉素 - 链霉素双抗 (Gibco 公司),SDS-PAGE 电泳凝胶试剂(上海维奥生物科技有限公司),蛋白 marker、PVDF 膜(Milli-

pore 公司),BCA 蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(上海碧云天生物科技有限公司),基质胶(BD 公司),DHE-ROS 活性氧检测试剂盒(上海贝博生物公司),N-乙酰基-L-半胱氨酸(Sigma 公司)。

抗体:一抗:IgG (ab109489) 购于 abcam 公司,GAPDH (5174) 购于 CST 公司;

二抗:山羊抗小鼠二抗(美国 Li-COR 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 EJ 细胞使用 RPMI-1640 培养基、10% 胎牛血清和 1% 青霉素 - 链霉素溶液配成的完全培养基进行培养,置于 37 °C、5% CO₂ 无菌环境的细胞培养箱内培养^[2]。细胞实验分为三组:EJ 细胞为空白组,EJ 细胞 +PBS 溶液为阴性对照组,EJ 细胞 +PBS 溶液 +NAC 药物为实验组(活性氧清除药物:N-乙酰基-L-半胱氨酸简称 NAC;说明:NAC 药物用 PBS 溶液溶解,实验组加入 NAC 10mM,培养 48 小时)。

1.2.2 蛋白质提取及 Western blot 实验 组织蛋白提取:随机选取 18 例样本中 9 例组织进行称量,通过计算加入适量蛋白提取液(按比例 RIPA:PhosSTOP:PMSF=100:4:1),然后放置组织研磨仪中进行研磨,取上清放冰上静止充分裂解 30 分钟,超声碎蛋白 30 秒。随后将样品放入低温离心机,条件:12000 r/min,4 °C,离心 30 分钟,取少量上清用 BCA 蛋白定量试剂盒测蛋白浓度;按 4:1 比例加入 5× 蛋白上样缓冲液,100 °C 煮 5 分钟,冷却后放 -70 °C 冰箱保存。

细胞蛋白提取:细胞生长至 70%~80% 融合度时,PBS 洗涤 3 遍用胰酶消化 1 分钟,终止消化,离心弃上清,PBS 洗涤 3 遍,加入适量蛋白提取液(按上述比例),后续步骤与组织蛋白提取方法相同。

Western blot 实验:按照说明书配制 SDS-PAGE 电泳凝胶,将蛋白样品按 60 μg/孔上样,然后电泳分离,转膜 90 分钟、封闭 2 小时,一抗孵育(按照抗体说明书稀释)4 °C 过夜;TBST 洗膜 3 遍,放入相应荧光二抗(1:15000 稀释)中避光室温孵育 1 小时。使用 Licor dyssey 红外成像仪器(Li-COR 公司)检测荧光信号,应用 imageJ 软件计算 IgG 与 GAPDH 的灰度值。

1.2.3 免疫荧光染色 (IF) 膀胱癌和癌旁组织的新鲜冰冻切片,室温下加上清洗液,再滴加 DHE 活性氧染色工作液,在 37 °C 培养箱避光孵育 30 分钟,荧光显微镜拍照。接下来再用 4% 多聚甲醛固定,5% BSA 封闭 2 小时;将一抗 IgG(1:150)加入组织切片中孵育过夜,二抗孵育 2 小时,染核。正置荧光显微镜下观察采集图像。

1.2.4 DHE 法检测细胞 ROS 含量 将 EJ 细胞接种于 6 孔板中分为 3 组:EJ、EJ+PBS、EJ+PBS+NAC,10 mM NAC 药物处理 48 小时后,加入 20 μL DHE 荧光探针染料工作液,室温避光孵育 60 分钟,采用全自动荧光显微镜观察荧光强度并拍照。

应用 Image Pro-Plus 软件计算每组细胞内 ROS 水平。

1.2.5 细胞增殖能力检测: 平板克隆形成实验 将对数生长期的 EJ 细胞以每孔 500 个分别接种到 6 孔板中培养, 药物培养 48 小时后, 75% 酒精固定, 0.05% 结晶紫染色, 集落在显微镜下成像, 用 ImageJ 软件计算细胞个数。每组实验均重复三次取平均值。

1.2.6 细胞迁移能力检测: 划痕实验 EJ 细胞接种到 6 孔板中培养, 随机分为 3 组:EJ、EJ+PBS、EJ+PBS+NAC, NAC 药物处理, 当细胞生长到 80% 愈合度时, 用 1 毫升无菌枪头划痕; 分别于 0 h 及 24 h 时间点在倒置显微镜下采集图像, 用 ImageJ 软件计算划痕面积, 评估伤口愈合程度: 伤口愈合率 = (0 h 划痕面积 - 24 h 划痕面积) / 0 h 划痕面积 × 100%。实验重复 3 次计算均值与标准差。

1.2.7 细胞侵袭能力检测: Transwell 小室实验 将基质胶与无血清培养基按 1:8 比例稀释, 混合均匀后加入至 Transwell 小室底部。随后将细胞胰酶消化处理, 分别把各组 200 μL 含有 1×10^5 个细胞的无血清培养基加入上室, 同时将 600 μL 含有 20% FBS 的培养基加到下室, 放置无菌培养箱中培养 48 小时后, 多聚甲醛固定, 结晶紫染色, 放置室温晾干, 在倒置显微镜下观察拍照并用 ImageJ 计算细胞侵袭数量。实验进行三次生物学重复。

1.3 统计学方法

所有数据均通过 SPSS 23.0 进行统计分析和运用 Graphpad 9.0 软件作图, 每个实验进行 3 次生物学重复, 实验数据表示为均值(Mean)± 标准差(SD), 各组数据之间差异采用 t 检验或单因素方差分析(ANOVA)处理; $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 IgG 和 ROS 在人膀胱癌组织中显著高表达

通过 Western blot 实验定量分析 18 例膀胱癌组织和对应癌旁正常组织中 IgG 的表达量, 结果表明膀胱癌组织中 IgG 表达量显著高于癌旁正常组织; 膀胱癌中 IgG 高表达, 其相对表达量为 (0.98 ± 0.08) , 而癌旁组织中 IgG 低表达, 其相对表达量为 (0.05 ± 0.04) , 差异具有显著统计学意义($P < 0.001$)(图 1A、B)。同时, 运用 IF 技术对 9 例膀胱癌组织和对应癌旁正常组织中 IgG 和 ROS 表达进行相对定量和共定位分析, 结果表明膀胱癌组织中 IgG 和 ROS 表达水平均显著高于癌旁正常组织, 另外癌旁组织中 IgG 和 ROS 几乎不表达。通过免疫荧光染色对膀胱癌临床样本组织和对应癌旁组织的细胞形态结构做了对比, 荧光显微镜下发现肿瘤组织中正常的膀胱尿路上皮组织细胞被肿瘤细胞严重破坏, 细胞形态结构紊乱极不规则, 同时 IgG 和 ROS 表达水平升高(图 1C)。

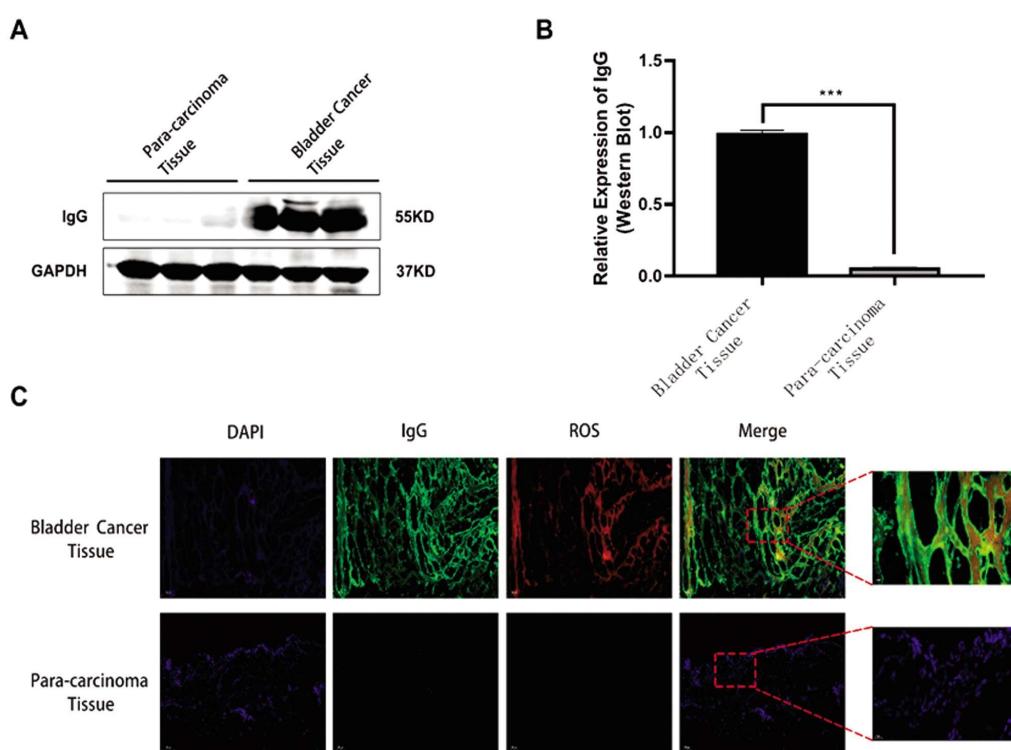


图 1 IgG 和 ROS 在膀胱癌组织和癌旁组织中的相对表达情况

Fig.1 Relative expression of IgG and ROS in bladder cancer and para-carcinoma tissues

Note: Data B were expressed as Mean ± SD, n=9. *** $P < 0.001$, comparison between bladder cancer tissue and paracancer tissue. Data C were showed that the green fluorescence was IgG expression level, red fluorescence was ROS expression level, and blue fluorescence was DAPI staining. Original image enlargement: $\times 100$, $\times 400$; Scale: 100 μm, 20 μm.

(A,B: Western blot 实验表明膀胱癌组织中 IgG 表达量显著高于癌旁组织; C: 组织免疫荧光表明膀胱癌组织中 IgG 和 ROS 表达水平均显著高于癌旁组织)。

(A, B: Western blot showed that IgG expression of bladder cancer tissues was significantly higher than para-carcinoma tissues. C: Immunofluorescence showed that the expression levels of IgG and ROS in bladder cancer tissues were significantly higher than those in para-carcinoma tissues.)

2.2 ROS 对膀胱癌细胞株 EJ 中 IgG 表达的影响

以 10mM NAC 加入至膀胱癌细胞株 EJ 中, 将实验分为 3 组: EJ 细胞(空白组)、EJ+PBS(阴性对照组)和 EJ+PBS+NAC(药物实验组)。通过 DHE 荧光探针技术分别对 3 组细胞的 ROS 表达水平进行检测, 结果显示实验组细胞的 ROS 平均荧光强度值(20.33 ± 2.52)明显低于空白组(121.33 ± 11.50)和阴

性对照组(121 ± 13.75); 实验组分别与空白组和阴性对照组进行统计分析差异具有统计学意义($P < 0.001$), 而空白组与阴性对照组相比较无统计学差异($P > 0.05$)。用 Western blot 实验分别检测 3 组不同处理的细胞实验中 IgG 的相对表达量, 结果显示在 EJ 细胞中, 与空白组和阴性对照组相比, 实验组的 IgG 蛋白表达水平明显降低, 具有显著性统计学差异($P < 0.001$)。

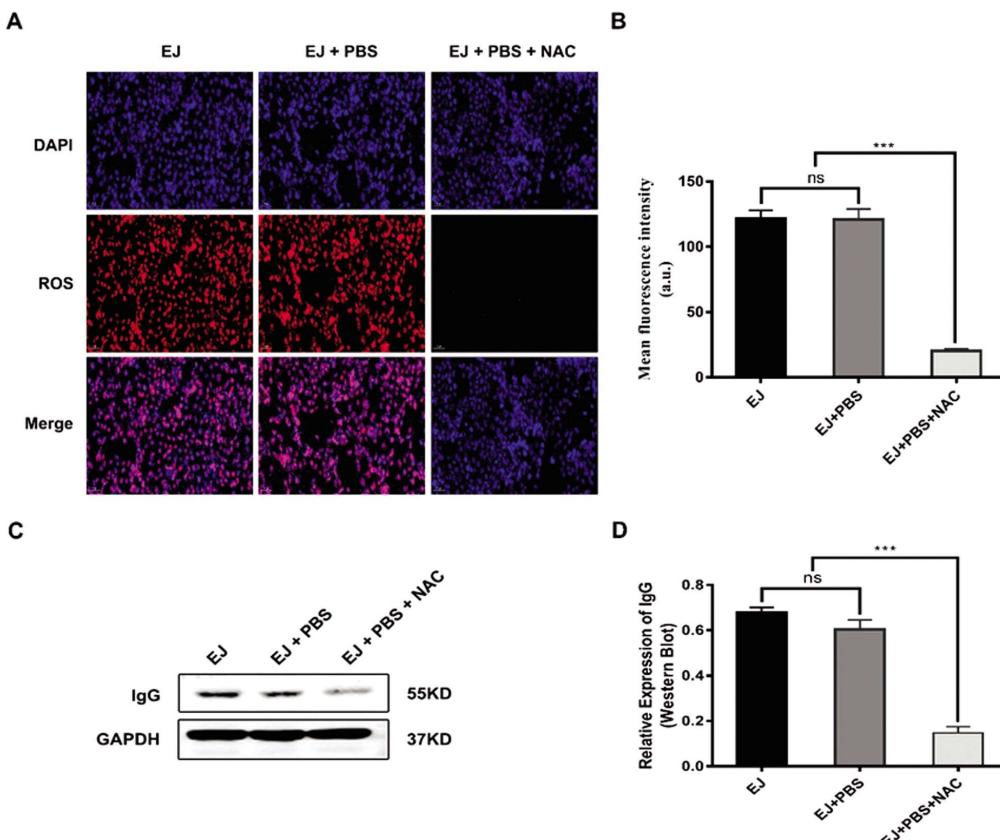


图 2 经过不同处理的 3 组膀胱癌细胞 EJ 中 ROS 和 IgG 表达情况

Fig.2 ROS and IgG expression in three groups of bladder cancer cells EJ through different treatment

Note: Data A were showed that the red fluorescence was ROS expression level, and blue fluorescence was DAPI staining. Original image enlargement: $\times 200$; Scale : $50 \mu\text{m}$. Data B and D were expressed as Mean \pm SD, n=3. *** $P < 0.001$, ns indication no statistical difference, comparison between EJ, EJ+PBS and EJ+PBS+NAC.

(A,B:ROS 水平检测:DHE 活性氧荧光探针分别对 3 组细胞进行标记, 荧光显微镜下观察发现实验组的 ROS 水平明显低于正常组和阴性对照组;C,D:Western blot 实验检测 3 组经不同处理的 EJ 细胞 IgG 的相对表达情况。)

(A, B: ROS level detection: DHE-ROS fluorescence probe was used to label the cells of the three groups, and the fluorescence microscope were observed that the ROS level of the experimental group was significantly lower than the normal group and negative control group. C, D: Western blot assay was used to detect the relative expression of IgG in EJ cells treated with different treatments.)

2.3 ROS 对膀胱癌细胞株 EJ 增殖能力的影响

通过平板克隆形成实验结果如图所示, 与 EJ 和 EJ+PBS 组相比较, EJ+PBS+NAC 组细胞的集落数目明显减少, 具有显著统计学差异($P < 0.01$); 而 EJ 和 EJ+PBS 组相比, 差异无统计学意义。此实验结果表明药物 NAC 清除 EJ 细胞中 ROS 后, 导致膀胱癌细胞 EJ 的增殖能力明显减弱。

2.4 ROS 对膀胱癌细胞株 EJ 迁移能力的影响

运用划痕实验检测 ROS 对 EJ 细胞迁移能力的影响, 结果显示: EJ、EJ+PBS、EJ+PBS+NAC 三组细胞 24 h 伤口愈合率分别为(75.52 ± 6.33)%, (74.85 ± 7.51)%, (42.53 ± 5.68)%, 其中实验组(EJ+PBS+NAC)细胞的伤口愈合面积明显减少, 与空白

组(EJ)和阴性对照组(EJ+PBS)比较差异具有显著统计学意义($P < 0.01$)。根据此实验结果, 我们认为 ROS 被 NAC 清除后, 抑制膀胱癌细胞 EJ 的迁移能力。

2.5 ROS 对膀胱癌细胞株 EJ 侵袭能力的影响

通过 Transwell 实验在显微镜下观察穿越过小室基底膜的细胞数, 探索 ROS 被清除后对 EJ 细胞侵袭能力的影响, 结果显示: 实验组(EJ+PBS+NAC: 71.67 ± 9.29)穿过小室的细胞数目均明显低于正常组(EJ: 249.67 ± 17.01)和阴性对照组(EJ+PBS: 248 ± 23.64), 组间差异具有显著统计学意义($P < 0.001$), 而空白组和阴性对照组相比差异无统计学意义。

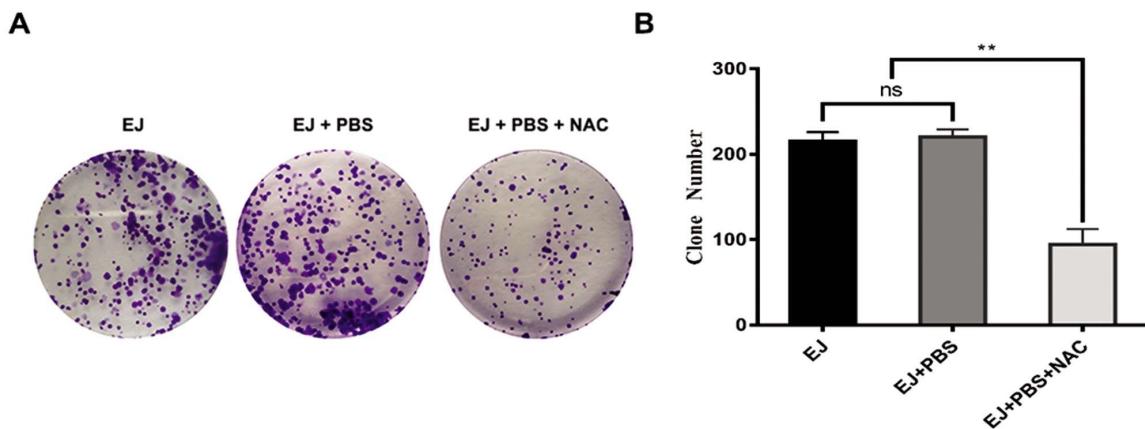


图 3 NAC 清除 EJ 细胞中 ROS 后,细胞增殖情况

Fig.3 Cell proliferation after ROS removed by NAC in EJ cells

Note: Data B were expressed as Mean \pm SD, n=3. ** $P < 0.01$, ns indication no statistical difference, comparison between EJ, EJ+PBS and EJ+PBS+NAC.

(A,B: 平板克隆形成实验的代表性图像和定量分析柱状图,实验进行三次重复。)

(A, B: Representative images and quantitative analysis bars of the plate clone formation experiment, which was repeated three times.)

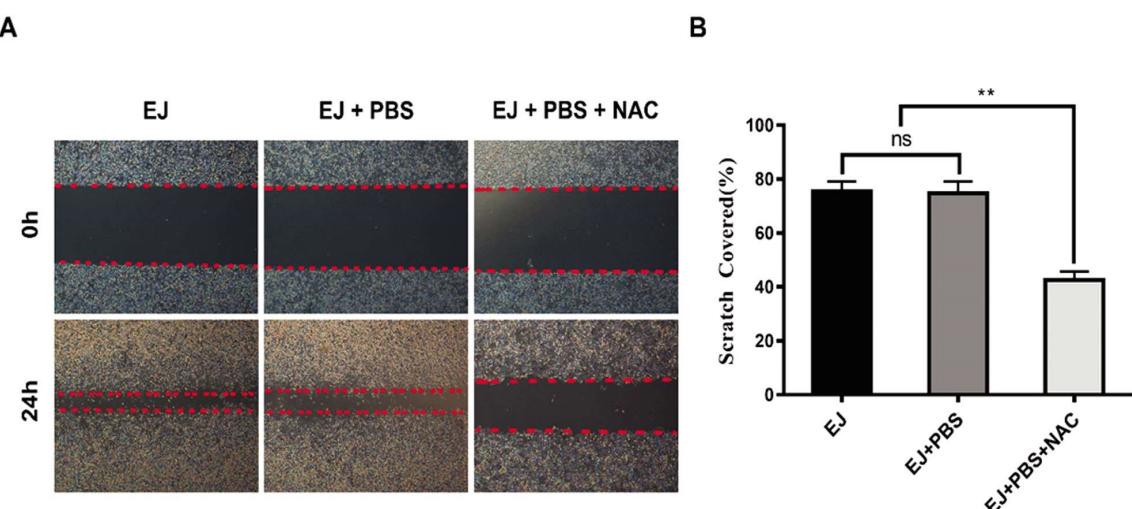


图 4 NAC 清除 EJ 细胞中 ROS 后,3 组细胞的迁移情况

Fig.4 The migration of three groups of cells after ROS removed by NAC in the EJ cells

(A: 空白组、阴性对照组、实验组细胞在 0 h 和 24 h 划痕实验的代表性图像;B:3 组伤口愈合率定量分析柱状图,实验进行三次重复。)

(A: Scratch assay revealed that representative images of the blank group, negative control group and experimental group cells at 0 h and 24 h. B: The histogram of quantitative analysis of wound healing rate in the three groups. The experiment was repeated for three times.)

3 讨论

ROS 是真核细胞线粒体内经过一系列化学反应产生的含氧活性分子,具有高反应性,主要包括过氧化氢(H_2O_2)、超氧化物(O_2^-)、超氧阴离子(O_2^-)、羟基自由基($\cdot OH$)、激发态氧(1O_2)等^[10]。在正常机体中,ROS 在细胞信号转导中发挥着不可或缺的生理作用^[11];然而当外界异常环境刺激或病理条件下,ROS 产生与清除之间失去平衡,造成细胞内 ROS 不断积累或异常升高,引发 DNA 碱基氧化损伤或 DAN 双链断裂,致使原癌基因激活或是抑癌基因失活,进而促进肿瘤的发生与发展^[11,12]。最新研究表明,肿瘤微环境(Tumor microenvironment, TME)常处于氧化应激状态,ROS 高水平;在乳腺癌中活性氧通过介导 TME 各组分间相互作用调控肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移^[13]。研究发现肿瘤细胞分泌表达的 IgG 多样性受限制,不发挥抗体

性能,相反却驱动肿瘤细胞的发育及恶性生物学行为^[14,15]。最近,Qin 等在前列腺癌中证明了单克隆抗体 RP215 特异性识别肿瘤源性 IgG 重链恒定区 CH1 结构域上的 N- 糖基化位点,阻断 RP215 特异性结合有效减少肿瘤源性 IgG 的生成,进而抑制前列腺癌的进展^[16]。越来越多的实验数据表明,IgG 不仅在肿瘤组织的癌巢中高表达,同时也在肿瘤微环境(TME)中有大量沉积,与肿瘤的恶性进展和不良预后呈正相关^[17]。有研究发现在小鼠肝脏中 ROS 通过 NF-KB 信号通路诱导 IgG 过表达,参与调控细胞表型以及疾病的发生和进展^[18]。但是膀胱癌中 ROS 与 IgG 之间的调控关系以及 ROS 如何调控膀胱癌细胞增殖、侵袭和转移的作用机制尚不清楚。

本研究的结果显示,IgG 和 ROS 在膀胱癌组织中均高表达,在癌旁正常组织中都几乎不表达;通过组织免疫荧光染色结果显示,临床患者样本的膀胱癌肿瘤区域均能同时观察到

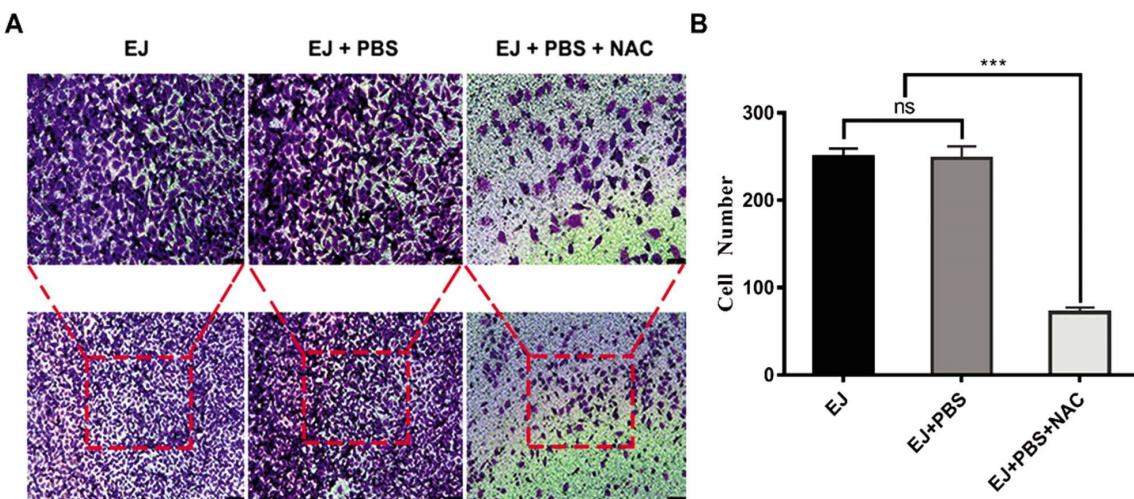


图 5 NAC 清除 EJ 细胞中 ROS 后,3 组细胞的侵袭情况

Fig.5 The invasion of cell after ROS removed by NAC in the EJ cells

Note: Data B were expressed as Mean \pm SD, n=3. *** P<0.01, comparison between EJ, EJ+PBS and EJ+PBS+NAC. Randomly selected 5 fields for statistical counting in each group of cells, original image magnification: $\times 100, \times 200$; Scale: 100 μm , 50 μm .

(A,B:Transwell 小室实验检测 3 组细胞的侵袭能力,倒置显微镜下观察到实验组侵袭细胞数目明显少于正常组和阴性对照组。) (A, B: The invasive ability of cell in the three groups was detected by Transwell assay. The inverted microscope showed that the number of invasive cells in the experimental group was significantly less than that in the normal group and the negative control group.)

ROS 与 IgG 表达, 这表明在膀胱癌组织中 ROS 与 IgG 的表达水平在某种程度上可能存在一定的联系。因此, ROS 和 IgG 可能在一定程度上参与了膀胱癌的癌变。膀胱癌组织中这些结果与 EJ 细胞中 ROS 和 IgG 的相对表达水平以及其他恶性疾病中的研究结果一致, 初步推测 ROS 与 IgG 高表达可能是膀胱癌的潜在治疗靶点。我们假设如果 ROS 通过介导 IgG 过表达调控膀胱癌的恶性生物学表型, 那么使用活性氧清除剂 NAC 处理膀胱癌细胞 EJ 后, 可抑制 EJ 细胞中 IgG 表达和恶性进展。因此, 为了进一步探究膀胱癌中 ROS 与 IgG 之间的调控关系以及在膀胱癌表型恶性进展中的作用, 本研究通过在实验组 EJ 细胞中加入 NAC 药物处理后, 利用蛋白免疫印迹法和 DHE-ROS 荧光探针技术检测 ROS 和 IgG 的相对表达水平; 结果表明在膀胱癌细胞 EJ 中, ROS 被 NAC 清除后, 明显抑制了 IgG 的蛋白表达量。随后, 通过细胞功能实验表明 ROS 被 NAC 清除后, 膀胱癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力明显减小; 同时, 结合本课题组前期研究成果肿瘤源性 IgG 调控膀胱癌细胞的恶性生物学行为, 本研究证明了在肿瘤微环境(TME)中 ROS 通过介导 IgG 过表达调控膀胱癌的增殖、侵袭和转移。近年来, 研究表明, ROS 通过 NF-KB 信号通路作用于 IgG, 影响基因表达和细胞免疫调节, 诱发恶性疾病形成^[19,2]; 也有研究提出, ROS 可能通过 TGF-β 信号通路介导 IgG 过表达, 促进肿瘤细胞的发生与发展^[20]。因此, 我们推测 ROS 可能通过 NF-KB 信号通路或 TGF-β 信号通路调节 IgG 表达调节膀胱癌的侵袭和转移, 或者是 ROS 直接调控 IgG, 形成 ROS-IgG 信号轴, 抑制 T 细胞活性介导肿瘤细胞免疫逃逸^[17,21,22], 从而促进肿瘤的恶性生长。

综上所述, 本研究表明 ROS 和 IgG 表达水平的升高与膀胱癌患者肿瘤的发生密切相关, 同时通过 NAC 药物去除 ROS 后可以明显抑制膀胱癌细胞 IgG 的表达量以及细胞增殖、迁移

和侵袭能力。目前 ROS 和 IgG, 与 NF-KB 信号通路、TGF-β 信号通路、肿瘤细胞免疫逃逸以及 RP215 之间的分子调节机制尚不清楚, 需要进一步深入研究阐明, 为针对 ROS 和 IgG 为靶点的早期精准诊断、膀胱癌治疗与预后奠定理论基础和提供新的思路。

参 考 文 献(References)

- Mao M, Yang L, Hu J, et al. Oncogenic E3 ubiquitin ligase NEDD4 binds to KLF8 and regulates the microRNA-132/NRF2 axis in bladder cancer[J]. Exp Mol Med, 2022, 54(1): 47-60
- Li H, Li Q, Ma Z, et al. AID modulates carcinogenesis network via DNA demethylation in bladder urothelial cell carcinoma [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(4): 251
- Kdimati S, Mullins C S, Linnebacher M. Cancer-Cell-Derived IgG and Its Potential Role in Tumor Development [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22 (21): 11597
- 吴遥西, 李浩勇, 周治彦, 等. IGHG1 基因对膀胱癌细胞增殖凋亡及迁移的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(11): 15-21
- Liang P Y, Li H Y, Zhou Z Y, et al. Overexpression of immunoglobulin G prompts cell proliferation and inhibits cell apoptosis in human urothelial carcinoma[J]. Tumour Biol, 2013, 34(3): 1783-1791
- Maciejczyk M, Heropoltanska-Pliszka E, Pietrucha B, et al. Antioxidant Defense, Redox Homeostasis, and Oxidative Damage in Children With Ataxia Telangiectasia and Nijmegen Breakage Syndrome [J]. Front Immunol, 2019, 10: 2322
- Poprac P, Jomova K, Simunkova M, et al. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases[J]. Trends Pharmacol Sci, 2017, 38(7): 592-607
- Hu J, Li Y, Li H, et al. Targeting Epstein-Barr virus oncogene LMP1-mediated high oxidative stress suppresses EBV lytic reactivation and sensitizes tumors to radiation therapy[J]. Theranostics, 2020, 10(26): 11921-11937

- [9] Titapun A, Luvira V, Srisuk T, et al. High Levels of Serum IgG for Opisthorchis viverrini and CD44 Expression Predict Worse Prognosis for Cholangiocarcinoma Patients after Curative Resection [J]. Int J Gen Med, 2021, 14: 2191-2204
- [10] Zhao S, Zang G, Zhang Y, et al. Recent advances of electrochemical sensors for detecting and monitoring ROS/RNS [J]. Biosens Bioelectron, 2021, 179: 113052
- [11] Wang P, Gong Q, Hu J, et al. Reactive Oxygen Species (ROS)-Responsive Prodrugs, Probes, and Theranostic Prodrugs: Applications in the ROS-Related Diseases[J]. J Med Chem, 2021, 64(1): 298-325
- [12] Li Q, Liu Y, Dai X, et al. Nanozymes Regulate Redox Homeostasis in ROS-Related Inflammation[J]. Front Chem, 2021, 9: 740607
- [13] Malla R R, Kamal M A. ROS-Responsive Nanomedicine: Towards Targeting the Breast Tumor Microenvironment [J]. Curr Med Chem, 2021, 28(28): 5674-5698
- [14] Tang J, Zhang J, Liu Y, et al. Lung squamous cell carcinoma cells express non-canonically glycosylated IgG that activates integrin-FAK signaling[J]. Cancer Lett, 2018, 430: 148-159
- [15] Jiang H, Kang B, Huang X, et al. Cancer IgG, a potential prognostic marker, promotes colorectal cancer progression [J]. Chin J Cancer Res, 2019, 31(3): 499-510
- [16] Qin C, Sheng Z, Huang X, et al. Cancer-driven IgG promotes the development of prostate cancer through the SOX2-ClG pathway[J]. Prostate, 2020, 80(13): 1134-1144
- [17] Wang Z, Geng Z, Shao W, et al. Cancer-derived sialylated IgG promotes tumor immune escape by binding to Siglecs on effector T cells [J]. Cell Mol Immunol, 2020, 17(11): 1148-1162
- [18] Chang L, Zhang Z, Li W, et al. Liver-X-receptor activator prevents homocysteine-induced production of IgG antibodies from murine B lymphocytes via the ROS-NF-kappaB pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 357(3): 772-778
- [19] Gilljam K M, Holm K L, Zahoor M, et al. Differential Effects of Reactive Oxygen Species on IgG versus IgM Levels in TLR-Stimulated B Cells[J]. J Immunol, 2020, 204(8): 2133-2142
- [20] Chang C H, Pauklin S. ROS and TGFbeta: from pancreatic tumour growth to metastasis[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1): 152
- [21] Xu Q, Deng X, Zhang B, et al. A study of the possible role of Fab-glycosylated IgG in tumor immunity [J]. Cancer Immunol Immunother, 2021, 70(7): 1841-1851
- [22] Zhang N, Deng H, Fan X, et al. Dysfunctional Antibodies in the Tumor Microenvironment Associate with Impaired Anticancer Immunity[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(23): 5380-5390

(上接第 4469 页)

- [23] 曹梦远, 徐永妮, 叶伟, 等. IL-33 / ST2 信号通路在疾病中作用的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2013, 41(6): 71-75
- [24] 吉挺. IL-33/ST2 信号通路与炎症性肠病的研究进展[J]. 医学综述, 2014, 20(12): 2134-2137
- [25] Dakota I, Munawar M, Pranata R, et al. Diagnostic prediction model in subjects with low-risk unstable angina pectoris/non-ST segment Elevation Myocardial Infarction [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2021, 25(16): 5145-5152
- [26] Raygan F, Etminan A, Mohammadi H, et al. Serum Levels of Growth Differentiation Factor-15 as an Inflammatory Marker in Patients with

- Unstable Angina Pectoris[J]. J Tehran Heart Cent, 2021, 16(1): 15-19
- [27] 艾民, 颜昌福, 夏福纯, 等. 银杏酮酯滴丸对 PCI 术后相关心肌损伤及再发心绞痛随访研究[J]. 四川医学, 2017, 38(2): 148-150
- [28] 刘利宏, 曹华, 黎鹏, 等. 银杏酮酯滴丸对冠状动脉粥样硬化血液流变学指标的影响[J]. 四川医学, 2017, 38(3): 271-273
- [29] 李霄, 张银华. 银杏酮酯滴丸联合氯吡格雷在非心源性脑梗死二级预防中的疗效分析 [J]. 国际中医中药杂志, 2017, 39(10): 883-886
- [30] 赵菊馨, 吴金海. 银杏酮酯滴丸联合替罗非班对冠心病患者 PCI 术后血清 CK-MB、cTn I 水平及 MACE 发生率的影响 [J]. 西北药学杂志, 2020, 35(6): 915-920