

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.07.008

· 临床研究 ·

食管鳞状细胞癌患者血清 HMGB1 和 IDO 水平的变化及其临床意义

崔雯瑄, 赵薇, 尚晓雅, 杜彦艳, 颜晰, 马鸣(河北医科大学第四医院 检验科, 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的:** 检测食管鳞状细胞癌(ESCC)患者血清中高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)和吲哚胺-2,3-双加氧酶(IDO)的表达水平并探讨两者与临床病理特征及淋巴细胞亚群的相关性。**方法:** 选取2021年3月至2022年8月在河北医科大学第四医院初次住院治疗的95例ESCC患者作为ESCC组,另选取40例健康体检人群作为对照组。ELISA法检测全部研究对象的血清HMGB1和IDO水平及不同组ESCC细胞培养上清中HMGB1、IDO和p65水平,流式细胞术检测全部研究对象外周血淋巴细胞亚群水平。WB法检测仅敲低HMGB1基因表达或敲低HMGB1后再加入NF- κ B信号通路激活剂对ESCC细胞HMGB1、IDO和p65表达的影响。**结果:** ESCC组患者血清HMGB1和IDO水平明显高于对照组(均 $P<0.01$);血清HMGB1和IDO表达水平升高是ESCC临床进展的独立危险因素(均 $P<0.01$),二者联合检测对ESCC临床进展预测价值更高($P<0.01$);血清HMGB1和IDO与ESCC患者的T分期、N分期和临床分期有明显关联(均 $P<0.05$);ESCC组患者血清HMGB1与外周血CD3⁺T细胞、CD4⁺T细胞、B细胞和NK细胞绝对计数值呈显著负相关,而与Treg细胞百分率呈显著正相关(均 $P<0.05$),血清IDO与外周血CD3⁺T细胞百分率和绝对计数值、CD4⁺T细胞百分率和绝对计数值、CD8⁺T细胞和B细胞绝对计数值呈显著负相关,而与Treg细胞百分率呈显著正相关(均 $P<0.05$);血清HMGB1和IDO表达水平呈显著正相关($P<0.01$)。si-HMGB1组KYSE30和ECA109细胞及其培养上清液中IDO和p65表达水平明显低于si-NC组和si-HMGB1+PMA组(均 $P<0.05$)。**结论:** 血清HMGB1和IDO与ESCC临床进展和机体免疫功能密切相关,具有成为ESCC肿瘤标志物和免疫治疗新靶点的潜力。HMGB1可能通过NF- κ B信号通路促进IDO表达,进行双靶点联合治疗可能会取得更好的疗效。

[关键词] 高迁移率族蛋白1;吲哚胺-2,3-双加氧酶;淋巴细胞亚群;食管鳞状细胞癌;联合治疗

[中图分类号] R735.1;R730.3;R446.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)07-0603-09

Changes of serum HMGB1 and IDO levels in patients with esophageal squamous cell carcinoma and their clinical significance

CUI Wenxuan, ZHAO Wei, SHANG Xiaoya, DU Yanyan, YAN Xi, MA Ming (Department of Clinical Laboratory, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression levels of high mobility group protein 1 (HMGB1) and indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) in serum of patients with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and their correlation with clinicopathologic features and lymphocyte subsets. **Methods:** Ninety-five ESCC patients initially hospitalized in the Fourth Hospital of Hebei Medical University from March 2021 to August 2022 were selected as the ESCC group, and the other 40 healthy subjects who underwent physical examination were selected as the control group. The serum levels of HMGB1 and IDO of all subjects and the contents of HMGB1, IDO and p65 in the supernatant of ESCC cell culture in different groups were detected by ELISA. The lymphocyte subsets in the peripheral blood of all subjects were detected by flow cytometry. WB was performed to determine the effect of HMGB1 knockdown as well as HMGB1 knockdown followed by addition of NF- κ B signaling pathway activator on the expression levels of HMGB1, IDO and p65 in ESCC cells. **Results:** The serum levels of HMGB1 and IDO in ESCC group were significantly higher than those in control group (all $P<0.01$). Elevated serum HMGB1 and IDO levels were the independent risk factors for clinical progression of ESCC (all $P<0.01$), and their combined detection showed a higher predictive value for the clinical progression of ESCC ($P<0.01$). Serum HMGB1 and IDO levels were significantly correlated with T stage, N stage and clinical stage in ESCC patients (all $P<0.05$); Serum HMGB1 levels in ESCC group was negatively correlated with the absolute counts of CD3⁺T cells, CD4⁺T cells, B cells and NK cells in peripheral blood, and positively correlated with Treg cell percentage (all $P<0.05$); while serum IDO levels was negatively correlated with percentage and absolute count of CD3⁺T cells, CD4⁺T cells, and absolute counts of CD8⁺T cells and B cells in peripheral blood,

[基金项目] 河北省财政厅政府资助临床医学优秀人才课题(冀财预复[2020]397号);河北省三三三人才工程资助课题(No. A20203003)

[作者简介] 崔雯瑄(1997—),女,硕士生,初级检验师,主要从事食管癌诊断及免疫治疗临床研究,E-mail:cwx1910@126.com

[通信作者] 马鸣,E-mail:maming19830419@163.com

but positively correlated with the percentage of Treg cells (all $P < 0.05$). Serum HMGB1 was positively correlated with IDO ($P < 0.01$). The expression levels of IDO and p65 in KYSE30 and ECA109 cells and their culture supernatant in si-HMGB1 group were significantly lower than those in si-NC group and si-HMGB1+PMA group (all $P < 0.05$). **Conclusion:** Serum HMGB1 and IDO are closely related to the clinical progression of ESCC and immune function of ESCC patients, and have the potential to serve as tumor markers and new immunotherapy targets of ESCC. HMGB1 may promote IDO expression through NF- κ B signaling pathway, and dual-target combination therapy may achieve better efficacy.

[Key words] high mobility group box 1 (HMGB1); indoleamine-2, 3-dioxygenase (IDO); lymphocyte subsets; esophageal squamous cell carcinoma (ESCC); combination therapy

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(7):603-611. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.07.008]

食管癌是常见的消化道恶性肿瘤之一,在中国以食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)为主^[1]。ESCC起病隐匿,早期诊断率低且预后差^[2]。因此,寻找新的有助于ESCC早期辅助诊断的肿瘤标志物和治疗靶点至关重要。高迁移率族蛋白B1(high mobility group box 1, HMGB1)是一种高度保守的核蛋白, HMGB1在ESCC组织中高表达,与不良预后密切相关^[3];同时也是一种典型的损伤相关分子模式(damage associated molecular pattern, DAMP)的分子,细胞受损或坏死后会被释放到胞外刺激免疫系统,是免疫系统早期预警信号,与肿瘤的发生发展亦密切相关^[4]。吡啶胺-2, 3-双加氧酶(indoleamine-2, 3-dioxygenase, IDO)是催化色氨酸-犬尿氨酸途径代谢的关键酶^[5], IDO在ESCC组织中异常高表达,通过抑制机体免疫功能促进肿瘤细胞免疫逃逸,与肿瘤的发生发展密切相关^[6]。HMGB1^[7]和IDO^[8]均可通过外泌体释放至胞外,参与肿瘤的发生发展和机体的免疫调控。目前有关血清中HMGB1和IDO与ESCC患者临床进展及免疫功能相关性的研究甚少,因此,本研究分析血清HMGB1和IDO与ESCC患者临床病理特征及外周血淋巴细胞亚群水平的相关性,深入探究ESCC细胞中HMGB1和IDO表达的相互促进作用及相关机制,旨在为ESCC辅助诊断和免疫靶向治疗提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 研究对象、主要试剂和仪器

选取2021年3月至2022年8月在河北医科大学第四医院初次住院治疗的95例ESCC患者作为ESCC组,所有患者均通过影像和病理确诊为ESCC并且具有完整的临床资料,临床(或病理)分期诊断标准依据2022年中国临床肿瘤学会出版的《食管癌诊疗指南》^[9]。ESCC组中,男性68例、女性27例,年龄范围为37~87岁,中位年龄67岁。另选取同时期来本院进行健康体检的健康人群40例作为对照组,其中男性27例、女性13例,年龄范围为47~83岁,中位年龄64岁。两组研究对象性别和年龄无统计学差

异(均 $P > 0.05$)。ESCC细胞KYSE30和ECA109由河北医科大学第四医院科研中心惠赠。本研究已通过河北医科大学第四医院伦理委员会批准(审查编号:2021KS037)。

ELISA检测试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司,单克隆抗体CD127-APC购自美国BD公司,单克隆抗体CD45-FITC、CD4-PE、CD4-FITC、CD8-ECD、CD3-PC5、CD(16+56)-PE、CD19-ECD、CD25-PE及红细胞裂解液、荧光微球和Navios流式细胞分析仪均购自美国Beckman Coulter公司,RPMI 1640培养基、胎牛血清均购自美国BI公司,NC-siRNA质粒和HMGB1-siRNA质粒购自吉玛基因公司,Lipo2000购自美国Invitrogen公司,NF- κ B信号通路激活剂佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)购自美国MCE公司, HMGB1、IDO、p65兔源性单克隆抗体和二抗均购自英国Abcam公司,PHOMO酶标仪购自郑州安图生物工程有限公司,全自动凝胶成像仪购自英国Syngene UK公司。

1.2 外周血采集和细胞培养

全部研究对象在空腹条件下采集2 mL肘静脉血,置于含乙二胺四乙酸二钾(EDTA- K_2)抗凝采血管中,用于外周血淋巴细胞亚群检测;采集3 mL肘静脉血置于无抗凝剂采血管中,分离血清,保存于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 备检血清HMGB1和IDO。

KYSE30细胞和ECA109细胞用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基,在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱中培养。待细胞呈对数生长期时进行NC-siRNA和HMGB1-siRNA质粒转染及加入PMA,实验分为空白对照组(未加入质粒)、si-NC组(加入NC-siRNA质粒)、si-HMGB1组(加入HMGB1-siRNA质粒)和si-HMGB1+PMA组(加入HMGB1-siRNA质粒,24 h后再加入100 nmol/L PMA)。

1.3 ELISA法检测血清和细胞培养上清中HMGB1和IDO水平

用加样枪向每个反应孔分别加100 μL 血清或倍比稀释的标准品, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 反应90 min;洗板1次,向每个反应孔加100 μL 生物素化抗体工作液, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 反应60 min;

重复洗板3次,在洁净的吸水纸上拍干;向每个反应孔加100 μL酶结合物工作液,37 °C反应30 min;洗板5次,在洁净的吸水纸上拍干;向每个反应孔加90 μL底物溶液,37 °C反应15 min;最后,向每个反应孔加50 μL终止液,立即用PHOMO酶标仪检测光密度(D)值;以标准品的浓度为横坐标,D值为纵坐标,绘制标准曲线,计算血清中HMGB1和IDO水平。

1.4 流式细胞术检测外周血淋巴细胞各亚群的百分率和绝对计数值

准备三个5 mL玻璃试管,第一管加入20 μL抗凝全血和CD45、CD3、CD4、CD8混合抗体2 μL,第二管加入20 μL抗凝全血和CD45、CD3、CD(16+56)、CD19混合抗体2 μL,第三管加入20 μL抗凝全血和CD45、CD4、CD127、CD25混合抗体2 μL,震荡混匀,室温避光处理15 min;加入红细胞裂解液150 μL,震荡混匀,室温避光处理15 min;加入1 mL生理盐水,1 220×g离心5 min,弃上清,每管各加入20 μL流量计数荧光微球,上机检测。Kaluza Analysis软件分析CD3⁺T、CD4⁺T(CD3⁺CD4⁺)、CD8⁺T(CD3⁺CD8⁺)、B(CD3⁺CD19⁺)、NK(CD3⁺CD16⁺CD56⁺)和调节性T细胞(Treg细胞)(CD4⁺CD25⁺CD127^{Low})的百分率和绝对计数值。

1.5 WB法检测ESCC细胞HMGB1、IDO和p65表达量

细胞培养48 h后,收集细胞并加入RIPA蛋白裂解液50 μL,充分混匀裂解,留上清液,弃沉淀,利用BCA试剂测定蛋白浓度,根据上清液体积加入适量的上样缓冲液,于100 °C沸水浴中进行变性处理10 min,得到最终的蛋白样品。12% SDS-PAGE恒压电泳120 min,将蛋白转移至PVDF膜上,5%的脱脂奶粉常温封闭2 h,加入用TBST稀释的HMGB1(1:10 000)、IDO(1:1 000)、p65(1:10 000)和GAPDH(1:5 000)一抗,4 °C下处理至少16 h,洗膜后再加入TBST稀释的二抗(1:10 000)处理1 h,ECL化学发光液曝光,Image J软件对HMGB1、IDO、p65和GAPDH条带灰度值进行检测。

1.6 统计学处理

各实验均独立重复3次。采用SPSS 26.0软件进行统计分析,GraphPad Prism 9.3.1软件作图。呈正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,呈偏态分布的用中位数

(M)[全距(Q)]表示。对照组与ESCC组HMGB1、IDO、外周血淋巴细胞亚群差异比较采用Mann-Whitney U检验,多因素Logistic回归和受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)分析HMGB1和IDO与ESCC患者临床进展的关系, χ^2 检验分析HMGB1和IDO与ESCC患者临床病理特征的关联,Spearman相关性分析ESCC组血清HMGB1和IDO的相关性及两者与淋巴细胞各亚群的相关性。单因素ANOVA分析多组间HMGB1、IDO和p65表达水平,组间两两比较采用Bonferroni校正检验。两组间比较采用两独立样本t检验。以 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ESCC患者血清中HMGB1和IDO呈高水平

ELISA检测结果(图1)显示,ESCC组患者血清HMGB1和IDO中位值水平明显高于对照组($Z = -6.098$ 、 -4.515 ,均 $P < 0.01$)。

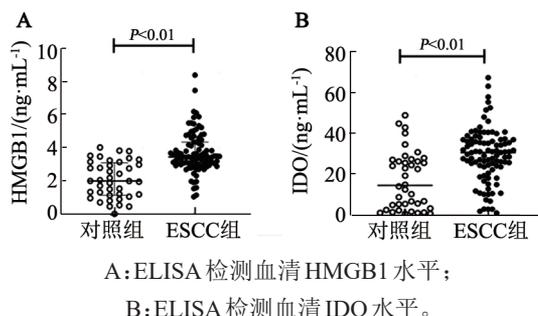


图1 对照组与ESCC组血清HMGB1和IDO水平比较

2.2 血清HMGB1和IDO对ESCC患者临床进展的预测价值

多因素Logistic回归分析结果(表1)显示,血清HMGB1和IDO表达水平升高是ESCC患者临床进展的独立危险因素(均 $P < 0.01$)。ROC分析结果(图2、表2)显示,HMGB1和IDO对ESCC患者临床进展均具有一定的预测价值,其中HMGB1和IDO联合检测曲线下面积最大(AUC=0.892),预测ESCC临床进展的敏感度为84.5%,特异度为84.6%,提示两者联合检测的预测价值更高($P < 0.01$)。

表1 血清HMGB1和IDO与ESCC患者临床进展的关系

临床指标	β	S.E.	Wald χ^2	OR	95%CI	P
HMGB1/(ng·mL ⁻¹)	1.669	0.488	11.716	5.306	2.041, 13.796	0.001
IDO/(ng·mL ⁻¹)	0.074	0.026	8.047	1.076	1.023, 1.133	0.005

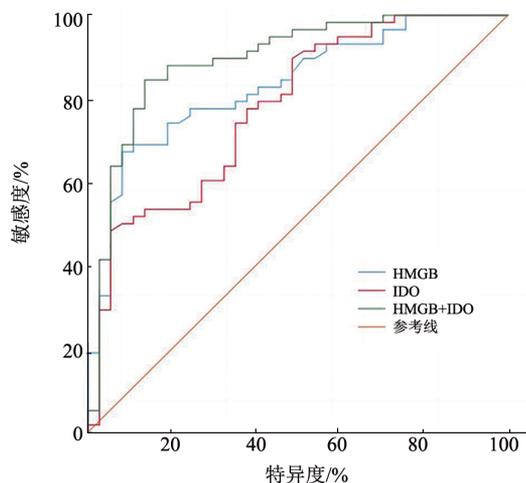


图2 ESCC组血清HMGB1和IDO的ROC曲线分析

2.3 血清HMGB1和IDO与ESCC患者临床病理特征的关系

以ROC曲线分析得到的HMGB1和IDO截断值为界值,将不同水平HMGB1、IDO的ESCC组患者分为低值组(<3.56 ng/mL, <35.82 ng/mL)和高值组(≥3.56 ng/mL, ≥35.82 ng/mL)。结果(表3、4)显示,血清HMGB1和IDO与ESCC患者的T分期、N分期和临床分期有明显关联(均P<0.05),与年龄、性别和M分期无明显关联(均P>0.05)。

2.4 对照组和ESCC组外周血淋巴细胞亚群水平比较

ESCC组外周血CD3⁺T、CD4⁺T、CD8⁺T、NK细胞的绝对计数值及B细胞百分率和绝对计数值的中位值水平均明显低于对照组,而Treg细胞百分率中位值水平明显高于对照组,差异有统计学意义(均P<0.05,表5)。两组外周血CD3⁺T、CD4⁺T、CD8⁺T、NK细胞百分率和Treg细胞绝对计数值中位值水平及CD4⁺/CD8⁺T细胞比值差异无统计学意义(均P>0.05)。

2.5 ESCC组血清HMGB1、IDO与外周血淋巴细胞亚群的相关性分析

ESCC组患者血清HMGB1与外周血CD3⁺T、CD4⁺T、B和NK细胞绝对计数值均呈显著负相关,而与Treg细胞百分率呈显著正相关(均P<0.05,表6);与CD3⁺T细胞百分率、CD4⁺T细胞百分率、CD8⁺T细胞百分率和绝对计数值、CD4⁺/CD8⁺T细胞比值、B细胞百分率、NK细胞百分率和Treg细胞绝对计数值无明显相关性(均P>0.05)。血清IDO与外周血CD3⁺T细胞百分率和绝对计数值、CD4⁺T细胞百分率和绝对计数值、CD8⁺T细胞和B细胞绝对计数值呈显著负相关,而与Treg细胞百分率呈显著正相关(均P<0.05,表6);与CD8⁺T细胞百分率、CD4⁺/CD8⁺T细胞比值、B细胞百分率、NK细胞百分率和绝对计数值、Treg细胞绝对计数值无明显相关性(均P>0.05)。

表2 ESCC组血清HMGB1和IDO的ROC曲线分析

临床指标	AUC	95%CI	P	敏感度/%	特异度/%	截断值
HMGB1/(ng·mL ⁻¹)	0.832	0.750,0.914	<0.001	67.2	91.9	3.56
IDO/(ng·mL ⁻¹)	0.777	0.682,0.873	<0.001	48.3	94.6	35.82
HMGB1+IDO	0.892	0.822,0.963	<0.001	84.5	84.6	-

表3 ESCC患者血清HMGB1与临床病理特征的关系

临床病理特征	N	血清HMGB1水平[n(%)]		χ ²	P
		低值组	高值组		
年龄					
<67	47	23(43.4)	24(57.1)	1.771	0.183
≥67	48	30(56.6)	18(42.9)		
性别					
男	68	36(67.9)	32(76.2)	0.787	0.375
女	27	17(32.1)	10(23.8)		
T分期					
T1~T2	22	17(32.1)	5(11.9)	5.357	0.021
T3~T4	73	36(67.9)	37(88.1)		
N分期					
N0	33	31(58.5)	2(4.8)	27.514	<0.001
N1~N3	62	22(41.5)	40(95.2)		
M分期					
M0	89	52(98.1)	37(88.1)	2.462	0.117
M1	6	1(1.9)	5(11.9)		
临床分期					
I~II	37	34(64.2)	3(7.1)	29.673	<0.001
III~IV	58	19(35.8)	39(92.9)		

表4 血清IDO与ESCC患者临床病理特征的关系

临床病理特征	N	血清IDO水平[n(%)]		χ^2	P
		低值组	高值组		
年龄					
<67	47	33(50.8)	14(46.7)	0.138	0.710
≥67	48	32(49.2)	16(53.3)		
性别					
男	68	47(72.3)	21(70.0)	0.054	0.817
女	27	18(27.7)	9(30.0)		
T分期					
T1~T2	22	20(30.8)	2(6.7)	5.415	0.020
T3~T4	73	45(69.2)	28(93.3)		
N分期					
N0	33	31(47.7)	2(6.7)	13.483	<0.001
N1~N3	62	34(52.3)	28(93.3)		
M分期					
M0	89	60(92.3)	29(90.0)	0.128	0.720
M1	6	5(7.7)	1(3.3)		
临床分期					
I~II	37	35(53.8)	2(6.7)	17.282	<0.001
III~IV	58	30(46.2)	28(93.3)		

表5 对照组与ESCC组外周血淋巴细胞亚群水平比较

临床指标	对照组(N=40)	ESCC组(N=95)	Z	P
CD3 ⁺ T细胞/%	68.92(36.33)	71.46(38.00)	- 1.624	0.104
CD3 ⁺ T细胞/(×10 ⁹ 个/L)	0.97(1.07)	0.83(1.61)	- 3.197	0.001
CD4 ⁺ T细胞/%	39.54(33.44)	40.97(41.29)	- 0.855	0.392
CD4 ⁺ T细胞/(×10 ⁹ 个/L)	0.56(0.81)	0.44(1.08)	- 2.614	0.009
CD8 ⁺ T细胞/%	23.08(31.38)	26.04(40.70)	- 1.887	0.059
CD8 ⁺ T细胞/(×10 ⁹ 个/L)	0.34(0.54)	0.29(0.62)	- 1.988	0.047
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T细胞	1.66(4.79)	1.57(3.97)	- 1.002	0.316
B细胞/%	8.25(14.39)	7.26(15.94)	- 2.190	0.029
B细胞/(×10 ⁹ 个/L)	0.12(0.24)	0.07(0.25)	- 4.299	<0.001
NK细胞/%	16.86(39.75)	17.05(39.73)	- 0.005	0.996
NK细胞/(×10 ⁹ 个/L)	0.23(0.69)	0.20(0.59)	- 2.214	0.027
Treg细胞/%	1.58(3.21)	2.06(5.42)	- 3.980	<0.001
Treg细胞/(×10 ⁹ 个/L)	0.02(0.05)	0.02(0.06)	- 0.485	0.628

表6 ESCC患者血清HMGB1和IDO与外周血淋巴细胞亚群相关性分析

临床指标	HMGB1/(ng·mL ⁻¹)		IDO/(ng·mL ⁻¹)	
	r	P	r	P
CD3 ⁺ T细胞/%	0.035	0.738	- 0.307	0.003
CD3 ⁺ T细胞/(×10 ⁹ 个/L)	- 0.246	0.016	- 0.264	0.010
CD4 ⁺ T细胞/%	- 0.122	0.239	- 0.231	0.024
CD4 ⁺ T细胞/(×10 ⁹ 个/L)	- 0.257	0.012	- 0.228	0.026
CD8 ⁺ T细胞/%	0.176	0.088	- 0.060	0.564
CD8 ⁺ T细胞/(×10 ⁹ 个/L)	- 0.124	0.231	- 0.231	0.025
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T细胞	- 0.121	0.244	- 0.115	0.267
B细胞/%	- 0.098	0.344	- 0.183	0.077
B细胞/(×10 ⁹ 个/L)	- 0.225	0.028	- 0.231	0.025
NK细胞/%	- 0.065	0.532	0.194	0.060
NK细胞/(×10 ⁹ 个/L)	- 0.267	0.009	0.033	0.752
Treg细胞/%	0.401	<0.001	0.263	0.010
Treg细胞/(×10 ⁹ 个/L)	0.007	0.943	0.018	0.862

2.6 ESCC 患者血清 HMGB1 和 IDO 水平呈正相关

Spearman 相关性分析检验 ESCC 组患者血清中 HMGB1 和 IDO 水平之间的相关性, 结果(图3)显示, 两者呈显著正相关($r=0.319, P<0.01$)。

2.7 敲低 HMGB1 基因表达对 KYSE30 和 ECA109 细胞 IDO 蛋白表达水平的影响

在 KYSE30 细胞(图 4A)和 ECA109 细胞(图 4B)中, 与 si-NC 组相比, si-HMGB1 组 HMGB1、IDO 和 p65 表达水平明显降低, 差异有统计学意义(均 $P<0.05$); 空白对照组 HMGB1、IDO 和 p65 表达水平与 si-NC 组相比无明显变化(均 $P>0.05$)。

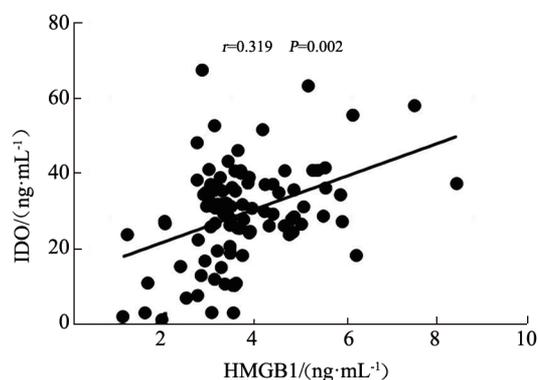
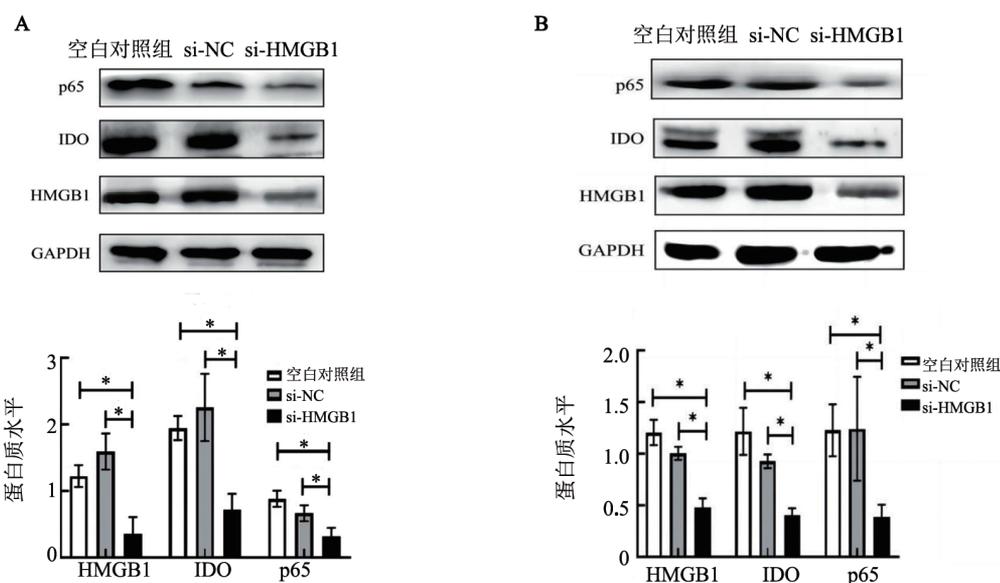


图3 ESCC 组患者血清 HMGB1 和 IDO 水平呈正相关



* $P<0.05$ 。

图4 转染HMGB1-siRNA对KYSE30(A)、ECA109(B)细胞中HMGB1、IDO和p65表达的影响

2.8 敲低 HMGB1 基因表达后再加入 PMA 促进 KYSE30 和 ECA109 细胞中 IDO 的表达

在 KYSE30 细胞中(图 5A), 与 si-HMGB1 组相比, si-HMGB1+PMA 组的 IDO 和 p65 表达水平明显升高, 差异有统计学意义($t = -4.061, -2.898$, 均 $P<0.05$), si-HMGB1 组和 si-HMGB1+PMA 组的 HMGB1 表达水平无明显差异($t = -2.400, P>0.05$); 在 ECA109 细胞中(图 5B), 与 si-HMGB1 组相比, si-HMGB1+PMA 组 IDO 和 p65 表达水平明显升高, 差异有统计学意义($t = -27.421, -2.807$, 均 $P<0.05$), si-HMGB1 组和 si-HMGB1+PMA 组的 HMGB1 表达水平无明显差异($t = -2.395, P>0.05$)。

2.9 PMA 逆转敲低 KYSE30 和 ECA109 细胞中 HMGB1 引起培养上清和 IDO 表达水平的降低

在 KYSE30 和 ECA109 细胞培养上清中(表 7), 与空白对照组和 si-NC 组相比, si-HMGB1 组 HMGB1 含量显著降低(均 $P<0.05$); si-HMGB1+PMA 组和

si-HMGB1 组 HMGB1 含量无显著差异($P>0.05$)。与空白对照组和 si-NC 组相比, si-HMGB1 组 IDO 含量显著降低($P<0.05, P<0.01$); si-HMGB1+PMA 组 IDO 含量显著高于 si-HMGB1 组($P<0.05, P<0.01$)。空白对照组、si-NC 组和 si-HMGB1+PMA 组培养上清中 HMGB1、IDO 含量无显著差异($P>0.05$)。

3 讨论

本研究发现, ESCC 患者血清 HMGB1 和 IDO 水平明显高于健康人群且与患者临床病理特征密切相关, 推测对 ESCC 临床进展具有一定的预测价值, 与 JIA 等^[6]和 TSUJIMOTO 等^[10]研究结果相似。结果提示血清 HMGB1 和 IDO 具有成为 ESCC 标志物的潜力, 两者联合检测更有助于预测患者临床进展程度。

本研究还发现, 血清 HMGB1 水平与外周血淋巴细胞亚群密切相关。在肿瘤微环境中, 高水平的 HMGB1 可通过 NF- κ B 信号通路激活髓源性抑制细

胞(myeloid-derived suppressor cell, MDSC), 诱导Treg细胞扩增^[11]。同时, HMGB1与Treg细胞表面的晚期糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end product, RAGE)相互作用, 激活NF- κ B信号通路, 使Treg细胞产生IL-10, 可抑制CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的功能^[12-13]。但本研究结果显示, 血清HMGB1与CD8⁺T细胞无显著相关性, 可能与HMGB1对免疫细胞的双重调控作用密切相关: HMGB1可通过HMGB1/PI3K/Akt/mTOR信号通路诱导DC成熟, DC通过共刺激信号促使CD8⁺T细胞的活化^[14-15]; 但同时, HMGB1也会抑制CD8⁺T细胞功能。这两种相反的作用可能会导致本研究出现血清

HMGB1与CD8⁺T细胞无显著相关性的结果。KAM等^[16]发现, 高表达HMGB1的ESCC组织在瘤周区域富集高度表达促血管生成基因的B细胞, 可促进肿瘤组织血管生成, 故外周血中的B细胞数量会相对减少, 这与本研究结果一致。TIM-3与HMGB1结合可以使NK细胞的溶细胞活性和细胞毒性分子下调, 抑制NK细胞的抗肿瘤作用^[17]。因此, 血清HMGB1可能通过促进Treg细胞、抑制CD4⁺T细胞、B细胞和NK细胞的功能, 达到免疫抑制的效果。提示HMGB1可能具有成为ESCC肿瘤免疫治疗新靶点的潜力。

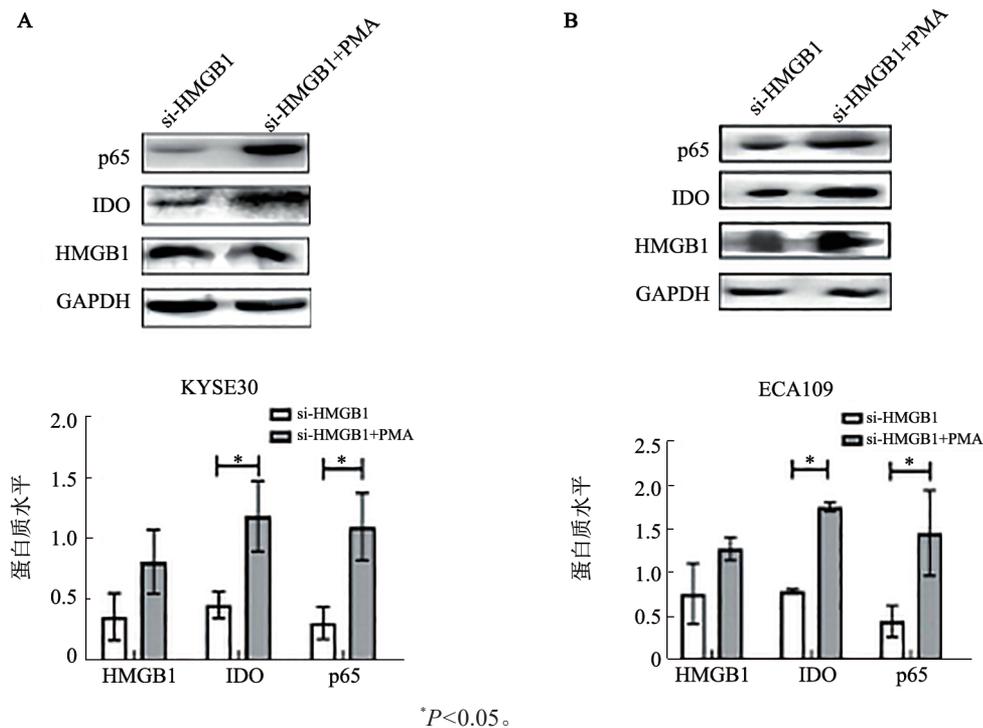


图5 敲低HMGB1基因后再加入PMA对KYSE30(A)、ECA109(B)细胞中HMGB1、IDO和p65表达的影响

表7 KYSE30和ECA109细胞各组培养上清液HMGB1和IDO水平比较

组别	KYSE30		ECA109	
	HMGB1/(ng·mL ⁻¹)	IDO/(ng·mL ⁻¹)	HMGB1/(ng·mL ⁻¹)	IDO/(ng·mL ⁻¹)
空白对照组	0.13±0.02*	1.02±0.22*	0.17±0.05*	1.00±0.13**
si-NC组	0.11±0.01*	0.73±0.09*	0.15±0.01*	1.03±0.03**
si-HMGB1组	0.06±0.01	0.30±0.06	0.04±0.01	0.31±0.04
si-HMGB1+PMA组	0.10±0.02*	1.02±0.14*	0.12±0.03*	1.18±0.11**

与si-HMGB1组相比, *P<0.05, **P<0.01。

肿瘤微环境中异常高表达的IDO具有抑制抗肿瘤免疫反应和促进肿瘤细胞转移的能力, 其中, 肿瘤免疫逃逸的相关机制是目前研究较为广泛的方向。本研究发现, ESCC患者血清IDO与外周血CD3⁺T细胞百分率和绝对计数值、CD4⁺T百分率和绝对计数

值和CD8⁺T细胞绝对计数值呈显著负相关, 其机制可能是, 由于色氨酸分解代谢产物犬尿氨酸与芳香烃受体相互作用, 抑制T细胞增殖并诱导其凋亡^[18]。LI等^[19]通过免疫组织化学染色的方法检测乳腺癌中IDO、Treg细胞和MDSC的表达水平, 结果发现, 三者

呈正相关,即MDSC可表达IDO,并通过Treg细胞扩增促进免疫耐受。本研究结果显示,ESCC患者血清IDO与外周血Treg细胞百分率呈明显的正相关,与LI等^[19]研究结果相似。本研究还发现血清IDO与B细胞绝对计数值呈显著负相关,这可能是由于血清IDO可分解色氨酸,产生具有细胞毒性的犬尿氨酸,抑制CD4⁺T细胞增殖,促进CD4⁺T细胞凋亡^[20],导致B细胞活化的第二信号消失,B细胞无法进行增殖分化,故B细胞数量与血清IDO呈负相关。除此之外,本研究结果显示血清IDO与NK细胞无相关性。有学者^[21]认为,IDO参与的犬尿氨酸途径是一种强大的免疫调节机制,犬尿氨酸增加会抑制NK细胞活化受体(NKp30和NKG2D)的表达,从而抑制NK细胞的活化;但是,还有研究结果^[22]显示,IDO可以维持NK细胞的细胞毒性作用。以上两种IDO对NK细胞相反的作用可能会导致本研究出现血清IDO与NK细胞无相关性的结果。因此,ESCC患者血清IDO可能通过诱导Treg细胞扩增、抑制CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞和B细胞增殖活化,进而促进肿瘤发生发展。

在抗肿瘤免疫反应中,淋巴细胞亚群的绝对计数值要比百分率更好地反映机体的免疫功能。本研究发现,ESCC患者免疫功能明显低于健康人群,与高水平的血清HMGB1和IDO密切相关,提示血清HMGB1和IDO可能通过调控淋巴细胞功能达到抑制机体抗肿瘤免疫反应的作用,HMGB1和IDO具有成为ESCC免疫治疗新靶点的潜力。

本研究中,HMGB1和IDO在血清中的含量呈显著的正相关。截至目前,尚未见探索肿瘤组织中HMGB1和IDO之间直接调控关系的研究,仅有既往研究提示二者之间可能存在相关的调控机制。过表达的HMGB1可通过NF- κ B信号通路促进HeLa细胞增殖和侵袭^[23];HIV-1 Tat蛋白通过NF- κ B途径提高IDO的表达活性,同样可以促进HeLa细胞增殖和侵袭^[24]。肿瘤微环境中的HMGB1可通过NF- κ B信号通路激活MDSC^[11],MDSC可产生高水平的免疫抑制分子(如IDO)来抑制T细胞功能^[25]。由此可以初步推测,HMGB1可能通过NF- κ B信号通路促进IDO的表达。根据以上文献报道,本课题组设计相关实验,在敲低HMGB1基因表达后再加入PMA处理,结果显示,IDO水平明显升高,而HMGB1水平仅稍微升高,这可能是由于NF- κ B信号通路激活诱导HMGB1受体的表达,进而促进HMGB1的表达^[26]。此结果提示HMGB1和IDO与NF- κ B信号通路密切相关,说明血清中的HMGB1和IDO可能是由于ESCC细胞内HMGB1水平增加,激活NF- κ B信号通路,促进IDO的表达,进而HMGB1和IDO释放至胞外。

肿瘤患者病情复杂多样,单一的疗法具有一定的局限性,而多种方法联合治疗实现优势互补,可提高临床治疗效果。KANG等^[27]发现,EGFR/HER2抑制剂吉非替尼和拉帕替尼与IGF-1R抑制剂林西替尼联合使用克服了单一疗法的耐药性,使抗肿瘤疗效增强。基于HMGB1和IDO之间的潜在关联性,应用HMGB1和IDO抑制剂进行双靶点联合治疗比单独抑制HMGB1或IDO的活性来进行肿瘤免疫治疗可能具有更好的疗效。

本研究具有一定的局限性,如收集的ESCC病例均为2021年至2022年的病例,未能评估HMGB1和IDO与患者生存期的相关性。本研究仅初步探究了血清HMGB1和IDO与ESCC临床进展和患者免疫功能的相关性,还需进一步探究其潜在机制。未探究是否可以在动物水平干预HMGB1和IDO的表达,以达到治疗ESCC的效果。后续会继续收集分析临床数据和进行动物实验验证。

综上所述,ESCC患者血清HMGB1和IDO水平与ESCC患者临床进展和机体免疫功能密切相关。本研究初步探究了HMGB1和IDO之间的调控关系,以及两者可能影响机体免疫功能的相关机制。为ESCC临床辅助诊断和双靶点联合治疗提供新的思路。

[参考文献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [2] ZHAO W J, LIU Y, GUO J, *et al.* Prognostic biomarkers identification in esophageal cancer based on WGCNA and single-cell analysis[J/OL]. *Dis Markers*, 2022, 2022: 6595778[2023-03-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36569220/>. DOI: 10.1155/2022/6595778.
- [3] GUAN H, ZHONG M, MA K Y, *et al.* The comprehensive role of high mobility group box 1 (HMGB1) protein in different tumors: a pan-cancer analysis[J]. *J Inflamm Res*, 2023, 16: 617-637. DOI: 10.2147/JIR.S386898.
- [4] WU E Q, ZHU J X, MA Z Y, *et al.* Gastric alarmin release: a warning signal in the development of gastric mucosal diseases[J/OL]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1008047[2023-03-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36275647/>. I: 10.3389/fimmu.2022.1008047.
- [5] LABADIE B W, BAO R Y, LUKE J J. Reimagining IDO pathway inhibition in cancer immunotherapy *via* downstream focus on the tryptophan-kynurenine-aryl hydrocarbon axis[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(5): 1462-1471. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-2882.
- [6] JIA Y L, WANG H Y, WANG Y, *et al.* Low expression of Bin1, along with high expression of IDO in tumor tissue and draining lymph nodes, are predictors of poor prognosis for esophageal squamous cell cancer patients[J]. *Int J Cancer*, 2015, 137(5): 1095-1106. DOI: 10.1002/ijc.29481.

- [7] DU X Y, ZHANG X Y, DONG J, *et al.* Irradiation-induced exosomal HMGB1 to confer radioresistance *via* the PI3K/AKT/FOXO3A signaling pathway in ESCC[J/OL]. *J Transl Med*, 2022, 20(1): 507 [2023-03-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36335371/>. DOI: 10.1186/s12967-022-03720-0.
- [8] AKBAR S, RAZA A, MOHSIN R, *et al.* Circulating exosomal immunological checkpoints and cytokines are potential biomarkers to monitor tumor response to anti-PD-1/PD-L1 therapy in non-small cell lung cancer patients[J/OL]. *Front Immunol*, 2023, 13: 1097117[2023-03-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC9890181/>. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1097117.
- [9] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会. 中国临床肿瘤学会(CSCO)食管癌诊疗指南-2022[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2022: 1-69.
- [10] TSUJIMOTO H, HORIZUCHI H, TAKAHATA R, *et al.* Impact of perioperative high mobility group box chromosomal protein 1 expression on long-term outcomes in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2020, 35(5): 788-794. DOI: 10.1111/jgh.14854.
- [11] JIN S L, YANG Z Z, HAO X, *et al.* Roles of HMGB1 in regulating myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment[J]. *Biomark Res*, 2020, 8(1): 1-8. DOI: 10.1186/s40364-020-00201-8.
- [12] LI POMI F, BORGIA F, CUSTURONE P, *et al.* Role of HMGB1 in cutaneous melanoma: state of the art[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(16): 9327[2023-03-10]. <https://doi.org/10.3390/ijms23169327>. DOI: 10.3390/ijms23169327.
- [13] ROJAS A, SCHNEIDER I, LINDNER C, *et al.* The RAGE/multiligand axis: a new actor in tumor biology[J/OL]. *Biosci Rep*, 2022, 42(7): BSR20220395[2023-03-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35727208/>. DOI: 10.1042/BSR20220395.
- [14] LI R T, ZOU X J, HUANG H Y, *et al.* HMGB1/PI3K/Akt/mTOR signaling participates in the pathological process of acute lung injury by regulating the maturation and function of dendritic cells[J/OL]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1104[2023-03-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32636835/>. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01104.
- [15] FENG J, LIU Y L, ZHUANG N, *et al.* EDA-E7 activated DCs induces cytotoxic T lymphocyte immune responses against HPV expressing cervical cancer in human setting[J/OL]. *Vaccines*, 2023, 11(2): 320 [2023-03-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC9965802/>. DOI: 10.3390/vaccines11020320.
- [16] KAM N W, WU K C, DAI W, *et al.* Peritumoral B cells drive proangiogenic responses in HMGB1-enriched esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Angiogenesis*, 2022, 25(2): 181-203. DOI: 10.1007/s10456-021-09819-0.
- [17] JIANG W, LI F L, JIANG Y, *et al.* Tim-3 blockade elicits potent anti-multiple myeloma immunity of natural killer cells[J/OL]. *Front Oncol*, 2022, 12: 739976[2023-03-10]. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.739976>. DOI: 10.3389/fonc.2022.739976.
- [18] ZHAI L J, BELL A, LADOMERSKY E, *et al.* Immunosuppressive IDO in cancer: mechanisms of action, animal models, and targeting strategies[J/OL]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1185[2023-03-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32612606/>. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01185.
- [19] LI F X, ZHAO Y, WEI L J, *et al.* Tumor-infiltrating Treg, MDSC, and IDO expression associated with outcomes of neoadjuvant chemotherapy of breast cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2018, 19(8): 695-705. DOI: 10.1080/15384047.2018.1450116.
- [20] BRACHO-SANCHEZ E, HASSANZADEH A, BRUSKO M A, *et al.* Dendritic cells treated with exogenous indoleamine 2, 3-dioxygenase maintain an immature phenotype and suppress antigen-specific T cell proliferation[J/OL]. *J Immunol Regen Med*, 2019, 5: 100015[2023-03-10]. <https://doi.org/10.1016/j.regen.2019.100015>. DOI: 10.1016/j.regen.2019.100015.
- [21] ALMINEN A. Immunosuppressive network promotes immunosenescence associated with aging and chronic inflammatory conditions[J]. *J Mol Med*, 2021, 99(11): 1553-1569. DOI: 10.1007/s00109-021-02123-w.
- [22] KAI S, GOTO S, TAHARA K, *et al.* Indoleamine 2, 3-dioxygenase is necessary for cytolytic activity of natural killer cells[J]. *Scand J Immunol*, 2004, 59(2): 177-182. DOI: 10.1111/j.0300-9475.2004.01378.x.
- [23] PANG X A, ZHANG Y, ZHANG S L. High-mobility group box 1 is overexpressed in cervical carcinoma and promotes cell invasion and migration *in vitro*[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(2): 831-840. DOI: 10.3892/or.2016.5317.
- [24] BAHRAOUI E, SERRERO M, PLANÈS R. HIV-1 Tat-TLR4/MD2 interaction drives the expression of IDO-1 in monocytes derived dendritic cells through NF- κ B dependent pathway[J/OL]. *Sci Rep*, 2020, 10: 8177[2023-03-10]. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64847-y>. DOI: 10.1038/s41598-020-64847-y.
- [25] WANG Y Y, FAN X W, WU X W. *Ganoderma lucidum* polysaccharide (GLP) enhances antitumor immune response by regulating differentiation and inhibition of MDSCs *via* a CARD9-NF- κ B-IDO pathway[J/OL]. *Biosci Rep*, 2020, 40(6): BSR20201170[2023-03-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32530032/>. DOI: 10.1042/BSR20201170.
- [26] 高啸, 沈莹. HMGB1-RAGE/TLRs-NF- κ B 信号通路中关键蛋白的表达与糖尿病肾病的关系[J]. *转化医学杂志*, 2020, 9(6): 331-334, 339. DOI: 10.3969/j.issn.2095-3097.2020.06.003.
- [27] KANG J, GUO Z Z, ZHANG H Q, *et al.* Dual inhibition of EGFR and IGF-1R signaling leads to enhanced antitumor efficacy against esophageal squamous cancer[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(18): 10382[2023-03-10]. <https://doi.org/10.3390/ijms231810382>. DOI: 10.3390/ijms231810382.

[收稿日期] 2023-03-30

[修回日期] 2023-06-18

[本文编辑] 黄静怡