

# 胶束莪术醇对卵巢癌相关巨噬细胞极化的影响

唐勤<sup>1</sup>,王晶<sup>2</sup>,陈冰<sup>4</sup>,汪生<sup>5</sup>,张敏敏<sup>2</sup>,张梦媛<sup>2</sup>,吴强<sup>1,3</sup>

**摘要** 目的 探讨纳米材料胶束莪术醇(MC)通过促进卵巢癌腹水M2型巨噬细胞向M1型极化调控卵巢癌免疫微环境的机制。方法 ①小鼠分组后,用鼠卵巢癌细胞株ID8构建卵巢癌腹水模型,观察体质量变化,收集肿瘤组织和腹水。流式细胞术检测肿瘤组织和腹水巨噬细胞CD86和CD206表达;Western blot法检测蛋白激酶B(PKB/Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)表达。②诱导人单核细胞白血病(THP-1)细胞转化M2型巨噬细胞(THP-1 M2 $\phi$ ),用10  $\mu$ g/ml的MC处理,流式法检测凋亡率;qRT-PCR法检测巨噬细胞甘露糖受体(CD206)、转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )和白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的mRNA表达;流式法检测CD86和CD206表达;Western blot法检测Akt/mTOR表达。结果 ①体内实验:给药后,MC组鼠平均体质量低于对照组;MC组肿瘤组织和腹水巨噬细胞CD206表达降低,CD86表达上调;MC组腹水Akt、mTOR磷酸化水平降低。②体外实验:用药前后THP-1 M2 $\phi$ 凋亡无差异;MC组CD206、TGF- $\beta$ 的mRNA表达及CD206蛋白表达明显低于对照组,同时IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 的mRNA和CD86蛋白表达明显高于对照组;MC组Akt、mTOR的磷酸化水平降低。结论 MC促进腹水巨噬细胞向M1极化调控卵巢癌免疫微环境,其机制可能与Akt/mTOR通路有关。

**关键词** 卵巢癌;免疫微环境;巨噬细胞;MC;Akt/mTOR

**中图分类号** R 737.31

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)05-0840-07  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.05.015

卵巢癌(ovarian cancer, OC)是常见妇科恶性肿瘤之一,病死率居女性恶性肿瘤第五位<sup>[1]</sup>。OC的

主要特征是发生腹膜下种植并引起大量腹水。腹水含有大量肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs),与B、T细胞等进行复杂的相互作用形成独特的肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)<sup>[2]</sup>。研究<sup>[3]</sup>表明OC中TAMs与单核细胞来源的巨噬细胞相似,主要为M2型巨噬细胞,标志物有TGF- $\beta$ 、CD206等,促进肿瘤进展和免疫抑制,M1是抑制性表型,标志物有IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、CD86等,抑制肿瘤进展和免疫促进。因此调控TME中M1/M2比例是当前免疫治疗关注的热点。莪术醇是中药莪术油有效单体成分,有抗肿瘤、改善TME等多种功能。前期课题组研究表明莪术醇能有效发挥抗OC作用并降低OC对顺铂耐药性<sup>[4-5]</sup>。该课题组在成功构建纳米材料包装的MC并初步证实了对OC生长起抑制作用的基础上,拟进一步探讨MC在治疗OC中对TAMs极化影响及可能机制。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞株及实验试剂** 人单核细胞THP-1(安徽医科大学基础实验室提供);鼠源性卵巢癌细胞ID8(东南大学医学院提供);胶束、MC(合肥工业大学合成);小鼠肿瘤解离试剂盒(130-096-730)、CD45磁珠(130-110-618)(德国美天旌技术有限公司);Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒(上海贝博公司);CD206(19.2,美国Thermo公司);CD11B(M1/70)、CD86(IT2.2)(GL-1)、CD206(C068C2)(美国Biolegend公司);p-Akt(AktT308-G12)、p-mTOR(EPR426(2))、mTOR(Y391)(英国Abcam公司);Akt(C67E7,美国CST公司); $\beta$ -actin(2D4H5,美国Proteintech公司);HRP-羊抗鼠、抗兔IgG(北京中杉金桥技术有限公司);逆转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司);qRT-PCR引物(安徽通用生物股份有限公司)。

**1.2 实验动物** 5周龄雌性SPF级C57BL/6J鼠30只,体质量(19 $\pm$ 1)g,购自杭州子源实验动物科技有限公司,许可证编号:SCXK(浙)2019-0004。饲养在温度、湿度适应的环境:温度22~24 $^{\circ}$ C,湿度40%~60%,昼夜12h节律,自由进食及饮水,适应1

2024-01-13 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82104633);安徽高校研究生科学研究项目(编号:YJS20210282);安徽高校自然科学基金项目(编号:2023AH053293、KJ2020A0200)

作者单位:安徽医科大学<sup>1</sup>基础医学院病理学教研室、<sup>5</sup>科研实验中心,合肥 230032

安徽医科大学第一附属医院<sup>2</sup>妇产科、<sup>3</sup>病理科,合肥 230022

<sup>4</sup>合肥工业大学化学与材料科学学院,合肥 230009

作者简介:唐勤,男,硕士研究生;

吴强,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: wuqiang@ahmu.edu.cn

周后进行实验。所有实验动物方案均获安徽医科大学动物伦理审查委员会批准,批号:LLSC20232266。

### 1.3 方法

**1.3.1 小鼠卵巢癌腹水模型的建立** 将 ID8 细胞以  $1 \times 10^7$  个/ml 浓度接种到腹腔,当小鼠体质量超过其初体质量 20% 时,随机分成 3 组 ( $n = 7$ ): ① 空白对照组:尾静脉注射 PBS;② 空载体组:尾静脉注射胶束 (5 mg/kg);③ MC 组:尾静脉注射 MC (2 mg/kg)。1 周给药 2 次,共 2 周。记录每日体质量,收集腹膜肿瘤组织和腹水用于后续免疫组化、流式细胞术和 Western blot 分析。

**1.3.2 肿瘤组织解离成单细胞悬液** 先将组织剪成直径 2~4 mm 的小块,按小鼠肿瘤解离试剂盒说明,将组织解离成单细胞悬液。

**1.3.3 免疫磁珠分选 CD45<sup>+</sup> 细胞** 按上述方法收集肿瘤组织单细胞悬液;收集小鼠腹水,裂解红细胞后,PBS 洗 2 遍;向组织单细胞悬液和腹水细胞中加入 250  $\mu$ l buffer 和 10  $\mu$ l CD45 磁珠 4  $^{\circ}$ C 孵育 15 min 后,2 ml buffer 清洗 2 遍,用柱塞冲洗出 CD45<sup>+</sup> 细胞,用于后续流式和 Western blot 分析。

**1.3.4 细胞培养及分组** THP-1 用含 10% 胎牛血清的 1640 培养基培养。THP-1 M2 型巨噬细胞分为:① 对照组:常规培养基;② 载体组:含 100  $\mu$ g/ml 胶束培养基;③ MC 组:含 10  $\mu$ g/ml 的 MC 培养基。

**1.3.5 CCK-8 测细胞活力** 收集 THP-1 细胞于 96 孔板,50 ng/ml 的佛波酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) 作用 48 h 分化为 M0 型巨噬细胞后,用 20 ng/ml 的 IL-4 和 IL-13 作用 48 h 极化为 M2 型,加入不同浓度的载体和 MC 作用 48 h 后,加入 CCK-8,37  $^{\circ}$ C 培养 4 h,检测 450 nm 波长吸光度,实验重复 3 次。细胞活力 = (实验组 - 无细胞培养基组) / (对照组 - 无细胞培养基组)  $\times$  100%。使用 Graphpad 回归模型计算半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)。

**1.3.6 流式检测细胞凋亡率** 用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞,按 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒说明书操作,使用流式分析仪检测,CytExpert 软件进行分析。

**1.3.7 qRT-PCR 检测 CD206、TGF- $\beta$ 、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  mRNA 相对量** 收集各组细胞,TRIzol 法提 RNA,使用逆转录试剂将 RNA 逆转录成 cDNA,按照 qPCR 试剂盒说明进行引物扩增,最终数据以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  值进行计算,引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')
GAPDH	F: CAGGAGGCATTGCTGATGAT R: GAAGGCTGGGGCTCATT
CD206	F: AAGGCGGTGACCTCACAAG R: AAAAGTCCAATTCTCGATGGTG
TGF- $\beta$	F: GGGACTATCCACCTGCAAGA R: CCTCTTGGCGTAGTAGTCCG
IL-1 $\beta$	F: CTAAAGCCCGCTGACAGA R: ACACCTGCTACTTCTTGCCCC
TNF- $\alpha$	F: CTCTTCTGCCTGCTGCACCTTTG R: ATGGGCTACAGGCTTGTCACTC

**1.3.8 流式检测肿瘤组织、腹水细胞和培养细胞 CD86 和 CD206 表达** 收集各组组织、腹水 CD45<sup>+</sup> 细胞及胰酶消化各组培养细胞,加入 5  $\mu$ l CD11B、CD206 和 CD86 抗体 4  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, PBS 清洗 2 遍后,加入 100  $\mu$ l PBS 重悬。使用流式细胞分析仪检测,CytExpert 软件进行分析。

**1.3.9 Western blot 检测腹水细胞和培养细胞中 Akt 和 mTOR 蛋白表达及其磷酸化水平** 提取各组小鼠腹水细胞及培养细胞蛋白,BCA 试剂盒检测蛋白浓度。8% SDS-PAGE 凝胶电泳,300 mA,200 min 转移到 PVDF 膜,封闭,加一抗 p-Akt (1 : 1 000)、Akt (1 : 1 000)、p-mTOR (1 : 1 000)、mTOR (1 : 1 000),4  $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜,二抗室温孵育 2 h, ECL 进行发光反应, $\beta$ -actin 作为内参。用 Image J 软件进行灰度分析。

**1.4 统计学处理** 使用 GraphPad Prism 9.0 进行统计学分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组均数间的比较采用单因素方差分析及其两两比较方法 LSD 法,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 造模后小鼠体质量及腹水和组织中 CD86、CD206 表达** 成功构造 ID8 卵巢癌腹水小鼠模型,平均 3 周后小鼠体质量和腹围增大。给药后第 7 天 MC 组腹水量减少,腹围缩小 (见图 1A),体质量较对照组和载体组下降明显 ( $P < 0.001$ , 见图 1B),MC 组 Ki67 表达下调 (见图 1C)。肿瘤组织流式结果 (见图 1D) 提示,与对照组相比,载体组 CD206 表达降低 ( $P < 0.01$ ),CD86 表达降低 ( $P < 0.000 1$ )。MC 组 CD206 表达降低,CD86 表达升高 ( $P < 0.000 1$ )。腹水细胞流式结果 (见图 1E) 提示,与对照组相比,载体组 CD86 和 CD206 表达差异无统计学意义;MC 组 CD206 表达降低 ( $P < 0.001$ ),CD86

表达升高 ( $P < 0.01$ )。

### 2.2 Western blot 检测腹水中 Akt 和 mTOR 蛋白表达及其磷酸化水平 Western blot 结果 (图 1F) 显

示,与对照组相比,载体组 Akt、mTOR 磷酸化水平差异无统计学意义;MC 组 Akt 磷酸化水平下降 ( $P < 0.05$ ),mTOR 磷酸化水平下降 ( $P < 0.01$ )。

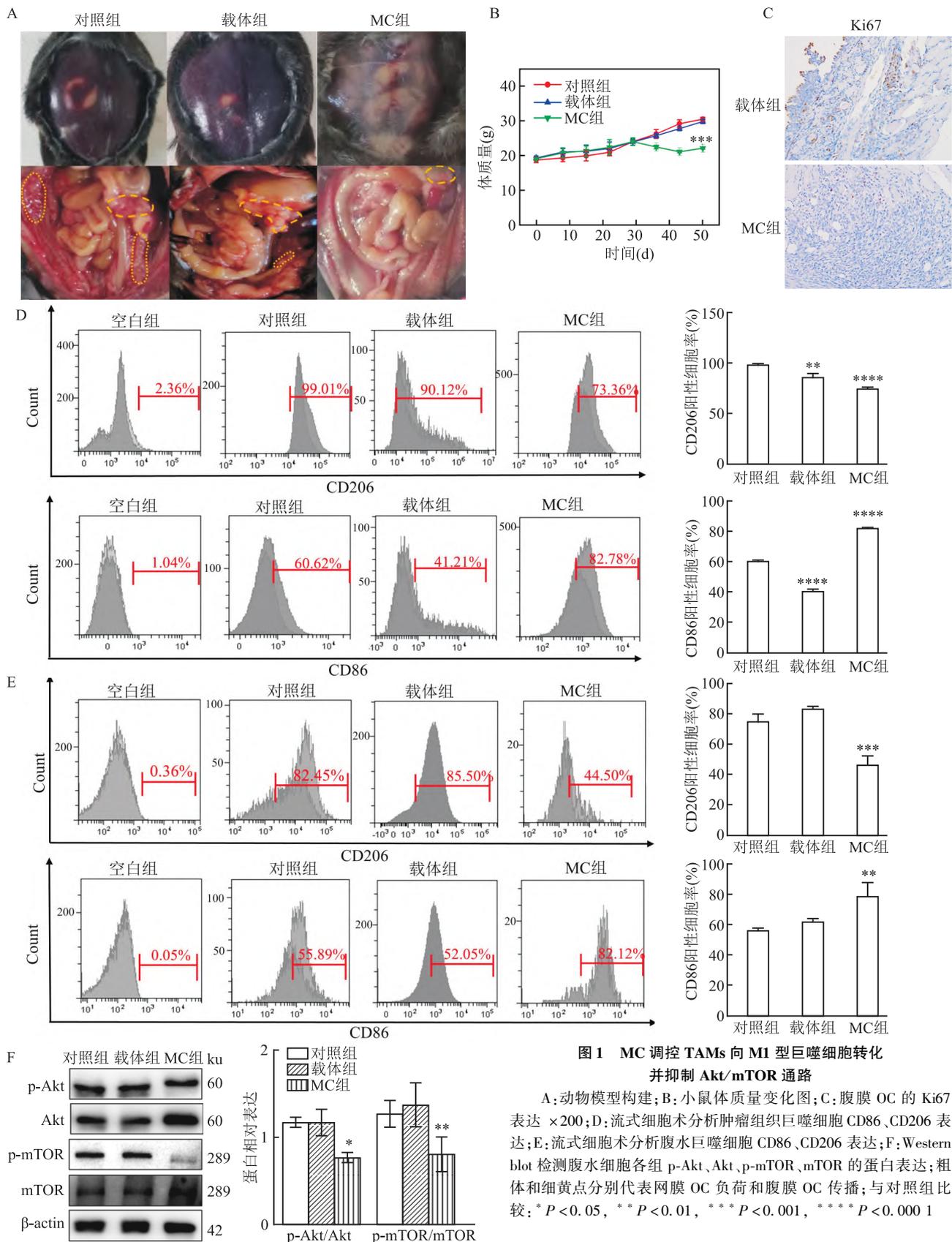


图1 MC 调控 TAMs 向 M1 型巨噬细胞转化并抑制 Akt/mTOR 通路

A: 动物模型构建; B: 小鼠体质量变化图; C: 腹膜 OC 的 Ki67 表达 ×200; D: 流式细胞术分析肿瘤组织巨噬细胞 CD86、CD206 表达; E: 流式细胞术分析腹水巨噬细胞 CD86、CD206 表达; F: Western blot 检测腹水细胞各组 p-Akt、Akt、p-mTOR、mTOR 的蛋白表达; 粗体和细黄点分别代表网膜 OC 负荷和腹膜 OC 传播; 与对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$

### 2.3 MC 对 THP-1 M2 型增殖力和凋亡的影响

CCK-8 结果(见图 2A)显示,不同浓度的载体对 THP-1 M2 型细胞活力无明显抑制。5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  和 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 MC 对 THP-1 M2 型细胞活力无明显抑制,20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 MC 可明显抑制细胞活力( $P < 0.05$ ),40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 MC 也可明显抑制细胞活力( $\text{IC}_{50} = 23.81 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $P < 0.0001$ )。故后续实验设定载体和 MC 浓度分别为 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  和 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。相比对照组,载体组和 MC 组细胞凋亡率差异无统计学意义(图 2B)。

### 2.4 MC 对 CD206、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ mRNA 表达和 CD86、CD206 表达的影响

细胞 qRT-PCR 结果(见图 3A)显示,与对照组和载体组相比,MC 组的 CD206 和 TGF- $\beta$  的 mRNA 表达降低( $P < 0.05$ );IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 表达升高( $P < 0.01$ )。流式结果显示,与对照组相比,载体组 CD206 和 CD86 表达差异无统计学意义(图 3B、3C);而 MC 组 CD206 表达降低( $P < 0.01$ ),CD86 表达升高( $P < 0.0001$ )。

### 2.5 Western blot 检测细胞中 Akt 和 mTOR 蛋白表达及其磷酸化水平

Western blot 结果(见图 3D)显示,相比对照组,载体组 Akt 和 mTOR 磷酸化表达差异无统计学意义;而 MC 组 Akt 磷酸化水平降低( $P < 0.01$ ),mTOR 磷酸化水平降低( $P < 0.0001$ )。

## 3 讨论

有研究<sup>[6]</sup>表明约 44.1% 的卵巢癌患者出现腹水。腹水的发生和进展与患者预后不良和疾病复发相关。已知 OC 的 TME 具有高度免疫抑制性,可以逃避免疫监视,导致肿瘤生长不受控制。TAMs 是 TME 中最丰富的免疫细胞,在上皮性 OC 中,TAMs 占腹膜肿瘤和腹水细胞的 50% 以上。TAMs 具有高度的可塑性和异质性。根据 TME 和细胞外刺激,巨噬细胞在光谱上表现出两种主要表型,抗肿瘤 M1 型和促肿瘤 M2 型。M2 型 TAMs 通过和 OC 细胞及其他免疫细胞相互作用,分泌 VEGF、EGF、IL-10 等细胞因子促进肿瘤转移、血管生成、化疗耐药和预后不良<sup>[7]</sup>。有研究<sup>[8]</sup>表明恶性肿瘤相关腹水的 M2 亚群频率越高,肿瘤分级越高,无进展生存期越短,相比之下,M1 型 TAMs 通过释放 ROS 和促炎细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  杀死癌细胞。卵巢癌中 TAMs 主要表现为 M2 型。有研究<sup>[9]</sup>表明增加肿瘤中 M1/M2 比率可改善预后,其中肿瘤 M2 型 TAMs 被复极化为抗肿瘤 M1 状态,已经成为免疫治疗的一种新模式,值得进一步研究。

莜术作为一种倍半萜类在生物系统中具有抗癌、抗炎、免疫调节和保护神经的作用。而莜术醇作

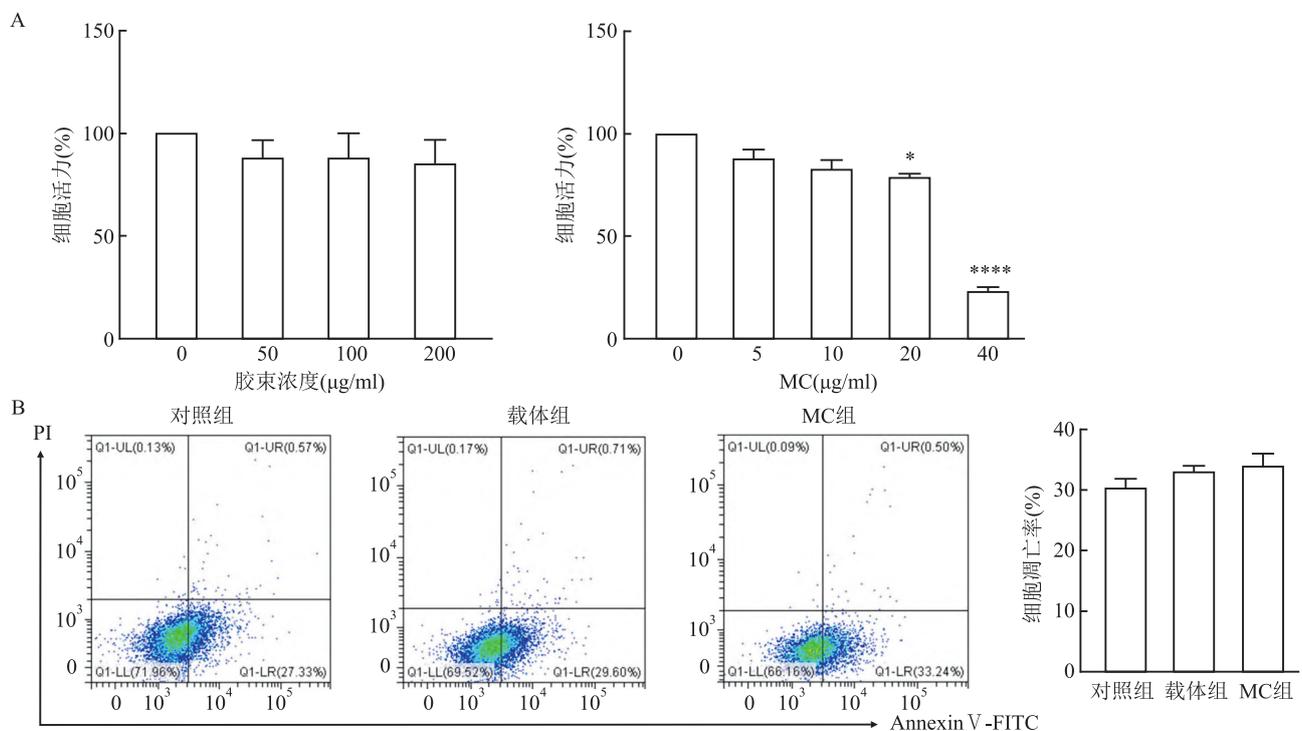


图2 载体和 MC 对 THP-1 M2 型细胞活力的影响

A:不同浓度载体和 MC 对 THP-1 M2 型细胞活力的影响;B:载体(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )和 MC(10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )对 THP-1 M2 型细胞凋亡的影响;与 0  $\text{ng}/\text{ml}$  组比较: \*  $P < 0.05$ , \* \* \* \*  $P < 0.0001$

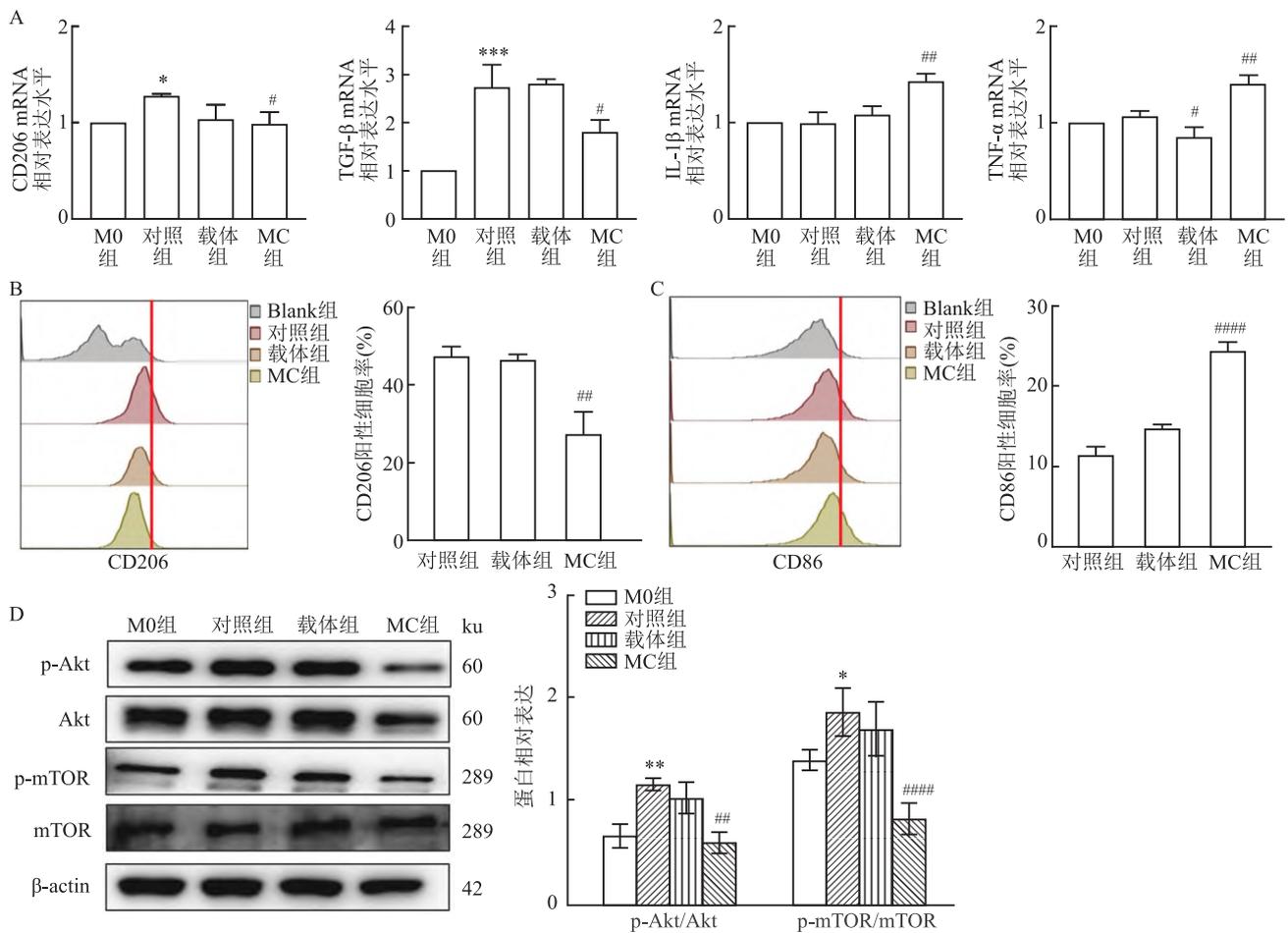


图3 MC调控THP-1 M2向M1型转化并抑制Akt/mTOR通路

A: qRT-PCR检测各组CD206、TGF-β、IL-1β、TNF-α的mRNA表达; B: 流式细胞术检测各组CD206表达; C: 流式细胞术检测各组CD86表达; D: Western blot检测各组p-Akt、Akt、p-mTOR、mTOR的蛋白表达; 与M0组比较: \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001; 与对照组比较: #P < 0.05, ##P < 0.01, ####P < 0.0001

为其中有效的单体成分,对多种癌细胞具有广泛的毒性,并通过各种信号级联的调节阻滞肿瘤细胞周期、诱导细胞凋亡来对抗癌症的发生和进展<sup>[10-11]</sup>。由于莪术醇本身几乎不溶于水,药效低,极大限制了实验研究和临床应用,该实验成功构建了纳米材料MC提高了水溶性和生物利用度并初步证明了对OC生长起抑制作用。为了进一步证实MC对OC中TAMs极化的影响,该实验在体内成功建立了小鼠OC腹水模型。实验表明MC能够明显抑制血性腹水的增加,有效的抑制卵巢癌细胞的生长。通过流式细胞术检测了腹膜组织和腹水细胞中M1和M2型巨噬细胞表面分子CD86和CD206蛋白表达,实验结果显示载体组腹膜组织中CD206和CD86阳性细胞均减少,这与该实验在体外细胞株上结果有所不同,该研究在体外比较了对照组、载体组、MC组三组,结果显示载体组与对照组之间CD206和CD86的表达并没有差异,因而该研究推测可能是由

于药物在小鼠体内代谢更加复杂,导致了载体组体内CD206和CD86表达的下调。而MC治疗组中肿瘤组织和腹水细胞的CD206阳性细胞均减少,CD86阳性细胞均增多,表明MC可以促进腹水M2型TAMs向M1型转化。然后,在体外细胞水平上建立THP-1 M2巨噬细胞与胶束载体和MC共培养模型,通过qRT-PCR和流式细胞术显示经MC处理后,CD206、TGF-β的mRNA表达及CD206蛋白表达明显低于对照组,同时IL-1β、TNF-α的mRNA和CD86蛋白表达明显高于对照组,表明MC促进M2型巨噬细胞向M1型转化。

该研究进一步对MC促进M2型巨噬细胞向M1转化机制进行初步研究。有研究<sup>[12]</sup>表明Akt/mTOR通路参与了M2-TAMs向M1-TAMs转化。Akt/mTOR通路在M2极化中起着重要作用,其作用机制包括: Akt/mTOR通路受到抑制后可诱导巨噬细胞向M1型极化,并释放促炎症因子;相反,

Akt/mTOR 通路的激活可导致巨噬细胞 M2 型分化,并抑制促炎因子的分泌<sup>[13]</sup>。有研究<sup>[14]</sup>表明,肉豆蔻素可以通过抑制 Akt/mTOR 信号通路抑制 M2-TAMs 的分化和极化来重塑 TME 从而抑制肺癌生长。该研究在体内外实验的结果均显示 MC 能够抑制 Akt/mTOR 的活化,提示 MC 促进巨噬细胞向 M1 表型转化,其机制可能与抑制 Akt/mTOR 通路有关。但是 MC 是否通过 Akt/mTOR 途径促进巨噬细胞 M2 向 M1 表型转化需要进一步研究。大量 M2-TAMs 与更具侵袭性的肿瘤特征相关,将 TAMs 从促肿瘤 M2 表型重编程为抗肿瘤 M1 表型是目前癌症治疗的潜在策略。该研究表明 MC 明显抑制了 M2-TAMs 极化,为 MC 介导的体内肿瘤生长抑制提供了机制研究。

### 参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Fuchs H E, et al. Cancer statistics, 2021[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(1): 7–33.
- [2] Worzfeld T, Finkernagel F, Reinartz S, et al. Proteotranscriptomics reveal signaling networks in the ovarian cancer microenvironment[J]. Mol Cell Proteomics, 2018, 17(2): 270–89.
- [3] Xia Y, Rao L, Yao H, et al. Engineering macrophages for cancer immunotherapy and drug delivery [J]. Adv Mater, 2020, 32(40): e2002054.
- [4] 张铭勋,张晨晨,蔡泽宇,等. 脂质体莪术醇联合顺铂抗人卵巢癌细胞作用和机制研究[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(9): 1430–5.
- [5] 杨清真,王 晶,宋永红,等. 脂质体莪术醇逆转卵巢癌顺铂耐药作用的机制[J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(7): 1106–11.
- [6] Zhang S, Xie B, Wang L, et al. Macrophage-mediated vascular permeability via VLA4/VCAM1 pathway dictates ascites development in ovarian cancer [J]. J Clin Invest, 2021, 131(3): e140315.
- [7] Flerin N C, Pinioti S, Menga A, et al. Impact of immunometabolism on cancer metastasis: A focus on T cells and macrophages [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2020, 10(9): a037044.
- [8] Tan Q, Liu H, Xu J, et al. Integrated analysis of tumor-associated macrophage infiltration and prognosis in ovarian cancer[J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(19): 23210–32.
- [9] Macciò A, Gramignano G, Cherchi M C, et al. Role of M1-polarized tumor-associated macrophages in the prognosis of advanced ovarian cancer patients[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 6096.
- [10] Wei W, Rasul A, Sadiqa A, et al. Curcumol: From plant roots to cancer roots[J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(8): 1600–9.
- [11] Wang J, Song Y, Zhang M, et al. A liposomal curcumol nanocomposite for magnetic resonance imaging and endoplasmic reticulum stress-mediated chemotherapy of human primary ovarian cancer [J]. J Mater Chem B, 2019, 7(18): 2938–47.
- [12] Anderson N R, Minutolo N G, Gill S, et al. Macrophage-based approaches for cancer immunotherapy[J]. Cancer Res, 2021, 81(5): 1201–8.
- [13] Vergadi E, Ieronymaki E, Lyroni K, et al. Akt signaling pathway in macrophage activation and M1/M2 polarization [J]. J Immunol, 2017, 198(3): 1006–14.
- [14] Jang H, Ojha U, Jeong J H, et al. Myriocin suppresses tumor growth by modulating macrophage polarization and function through the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. Arch Pharm Res, 2023, 46(7): 629–45.

## Effect of micellar curcumol on polarization of macrophages associated with ovarian cancer

Tang Qin<sup>1</sup>, Wang Jing<sup>2</sup>, Chen Bing<sup>4</sup>, Wang Sheng<sup>5</sup>, Zhang Minmin<sup>2</sup>, Zhang Mengyuan<sup>2</sup>, Wu Qiang<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Pathology, School of Basic Medical Sciences, <sup>5</sup>Research and Experiment Center, Anhui Medical University, Hefei 230032; <sup>2</sup>Dept of Obstetrics and Gynecology, <sup>3</sup>Dept of Pathology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022; <sup>4</sup>School of Chemistry and Chemical Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009)

**Abstract Objective** To investigate the mechanism of micellar curcumol (MC) regulating the immune microenvironment of ovarian cancer by promoting the polarization of M2-type macrophages to M1-type in ovarian cancer ascites. **Methods** ① After the mice were divided into groups, a mouse ovarian cancer ascites model was constructed by using the mouse ovarian cancer cell line ID8. Then weight changes were observed, tumor tissue and ascites were collected. The expression of CD86 and CD206 on macrophages of the tumor tissue and ascites was detected by flow cytometry. The expression of protein kinase B (PKB/Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) was detected by Western blot. ② A human monocytic leukemia cell line (THP-1) was induced to transform into M2 macrophage (THP-1 M2 macrophage) *in vitro*, and then treated with 10 μg/ml MC. The apoptosis was detected by flow cytometry.

## PKC/TRPV1 通路在大鼠三叉神经痛中的病理作用

吴贝贝<sup>1</sup>, 沈 莲<sup>1</sup>, 王元银<sup>1</sup>, 王烈成<sup>2</sup>

**摘要** **目的** 探究蛋白激酶 C(PKC)/瞬时感受器电位香草酸亚型 1(TRPV1)通路在大鼠三叉神经痛(TN)中的病理作用。**方法** 采用眶下神经慢性收缩术(ION-CCI)来创建大鼠 TN 的模型。将大鼠随机分为假手术组(Sham 组)、CCI 组、CCI + DMSO 组、CCI + GF109203X(双咪唑马来酰亚胺,一种 PKC 抑制剂)组。使用 Von Frey 毛刷检测大鼠的机械痛阈。采用 qRT-PCR 及 Western blot 分别检测三叉神经节(TG)内 PKC 和 TRPV1 表达量的变化。HE 染色观察 TG 的病理变化。**结果** CCI 组大鼠机械痛阈降低( $P < 0.05$ ),大鼠 TG 内的磷酸化的 PKC(p-PKC)和 TRPV1 表达显著增加( $P < 0.05$ )。组织病理学结果显示,与 Sham 组相比,CCI 组观察到 TG 出现明显的炎性细胞浸润增多、神经细胞肿胀等变化。注射 GF109203X 后降低了大鼠 TG 内 PKC 的磷酸化和 TRPV1 的表达,大鼠机械痛阈升高( $P < 0.05$ ),光学显

微镜下可见 TG 内细胞肿胀和炎症细胞有所减少。**结论** PKC/TRPV1 通路可能参与了大鼠的三叉神经痛。

**关键词** PKC;TRPV1;TG;三叉神经痛;机械痛阈

**中图分类号** R 745.11

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)05-0846-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.05.016

三叉神经痛(trigeminal neuralgia, TN)是发生在三叉神经分支的突发、严重、短暂的疾病<sup>[1]</sup>,其发病机制存在争议,目前认为脱髓鞘是 TN 发病的主要原因<sup>[2]</sup>。临床上对三叉神经痛的治疗较为棘手,一线药物卡马西平会有一系列并发症<sup>[3-4]</sup>,三叉神经根微血管减压、神经根切断术联合射频热凝术等治疗效果也不满意<sup>[5]</sup>。因此,有必要进一步探讨三叉神经痛的可能发病机制,以寻找更有效、精准的治疗方法。瞬时感受器电位香草酸亚型 1(transient receptor potential vanilloid subtype 1, TRPV1)通道属于 TRPV 家族,近年来 TRPV1 通道在病理性疼痛领域的作用日益受到关注<sup>[6]</sup>,也有研究<sup>[7]</sup>表明 TRPV1 在三叉神经性疼痛产生和发展中起着至关重要的作用。然而,TRPV1 的上游调控机制仍不清楚。蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)是一种在外周和中枢神经系统中广泛分布的磷脂和钙依赖性蛋白激

2024-02-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81971236)

作者单位:<sup>1</sup> 安徽医科大学口腔医学院,安徽医科大学附属口腔医院,安徽省口腔疾病研究重点实验室,合肥 230032

<sup>2</sup> 安徽医科大学基础医学院生理学教研室,合肥 230032

作者简介:吴贝贝,女,硕士研究生;

王烈成,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:wangliecheng@ahmu.edu.cn;

王元银,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:wyy1970548@sohu.com

etry. The mRNA levels of macrophage mannose receptor (CD206), transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), interleukin (IL)-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were detected by qRT-PCR. The expression of CD86 and CD206 was detected by flow cytometry, and Akt/mTOR expression and phosphorylation was detected by Western blot. **Results** ① *In vitro* study showed that the average body weight of the MC group was lower than that of the control group. Compared with the control group, CD206 expression of macrophages decreased in tumor tissue and ascites in the MC group, while the expression of CD86 increased. The Akt and mTOR phosphorylation level of macrophages in the MC group's ascites was lower than that in control group. ② *In vivo* study showed that there was no difference in apoptosis rate among the groups detected by flow cytometry. The mRNA expression level of CD206, TGF- $\beta$  and the protein expression level of CD206 in MC group were significantly lower than those in the control group, while the mRNA expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and the protein expression level of CD86 were significantly higher than those in the control group. Compared with the control group, the phosphorylation level of Akt and mTOR in the MC group decreased. **Conclusion** MC promotes M1 polarization of macrophages in ascites to regulate the immune microenvironment of ovarian cancer, which may be related to the Akt/mTOR pathway.

**Key words** ovarian cancer; immune microenvironment; macrophages; MC; Akt/mTOR