

牙龈卟啉单胞菌感染食管癌细胞诱导 M2 型巨噬细胞极化促进食管癌进展

郭静宜^{1,2}, 原翔^{2,3}, 石林林^{2,3}, 张秀森³, 孔金玉^{2,3}, 张顶彧^{1,2}, 高社干^{2,3}

摘要 目的 探讨牙龈卟啉单胞菌(Pg)感染食管癌细胞对肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)的极化及其功能变化的影响。方法 采用ELISA方法检测食管鳞状细胞癌(ESCC)细胞系上清及Pg感染的ESCC细胞系上清细胞因子分泌情况;构建ESCC细胞与巨噬细胞体外共培养模型,采用qPCR、细胞免疫荧光及流式细胞术方法检测TAMs表面标志的变化情况;采用ELISA方法检测共培养TAMs分泌细胞因子的影响;使用共培养TAMs的条件培养基(CM)培养ESCC细胞,采用CCK-8、克隆形成实验、划痕实验及Transwell实验评估TAMs对ESCC细胞的增殖、迁移及侵袭能力的影响。结果 Pg感染的ESCC细胞白细胞介素(IL)-6、IL-10表达量升高($P < 0.01$);与Pg感染的ESCC细胞共培养的TAMs表面CD163及CD206表达量升高($P < 0.001$);Pg感染的ESCC细胞共培养的TAMs分泌细胞因子IL-6、IL-10相对升高($P < 0.01$);Pg感染的ESCC细胞共培养的TAMs能够增强ESCC细胞增殖、迁移和侵袭能力(均 $P < 0.05$)。结论 Pg感染ESCC细胞可诱导其分泌细胞因子,重塑TAMs向M2型免疫抑制表型极化,从而促进ESCC细胞的恶性生物学行为。

关键词 食管鳞癌;牙龈卟啉单胞菌;细胞因子;THP-1细胞;巨噬细胞

中图分类号 R 735.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)05-0780-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.013

食管癌(esophageal cancer, EC)是恶性程度较高的消化系统肿瘤^[1],常见组织学类型为食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)^[2]。牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingival-*

is, Pg)是一种革兰阴性厌氧菌,可以通过其毒力因子引起宿主免疫功能异常,成为肿瘤潜在危险因素^[3]。本课题组前期研究^[4]表明, Pg与ESCC的发生发展具有正相关性。巨噬细胞是机体固有免疫的重要组成部分之一,可塑性极强,在肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)中不同因素影响下会分化为不同亚群,具备不同的功能,参与调控肿瘤组织免疫反应。巨噬细胞主要分两种表型:M1抗肿瘤型和M2促肿瘤型^[5]。肿瘤相关巨噬细胞(tumor associated macrophages, TAMs)是肿瘤组织中浸润的巨噬细胞,是TME中最丰富的细胞之一^[6]。现有研究多为TAMs如何调控癌症的侵袭迁移,对肿瘤细胞如何影响巨噬细胞极化的机制研究尚未明确。该研究首次通过探寻Pg感染ESCC细胞对巨噬细胞极化及其功能变化的影响,探讨ESCC发病机制,为ESCC病因学提供数据支持,为免疫治疗提供潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞与细菌 人ESCC细胞株KYSE140、KYSE150购自中国科学院细胞库;人单核细胞白血病细胞株(THP-1)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;标准Pg菌株来源于ATCC细胞库。

1.1.2 主要试剂 PMA购自美国Sigma公司;白细胞介素(interleukin, IL)-4购自美国PeproTech公司。RPMI-1640培养基、FBS、胰蛋白酶均购自美国Gibco公司;青-链霉素购自北京索莱宝科技有限公司; β -巯基乙醇购自武汉普诺赛生命科技有限公司;CD11b-FITC购自美国Thermo Fisher公司、CD68-BV421购自美国BD公司、CD206-PE购自美国Biolegend公司。引物由金唯智生物科技有限公司合成。Human IL-6 ELISA Kit、Human IL-10 ELISA Kit购自杭州联科生物技术股份有限公司。

1.1.3 主要仪器设备 CO₂培养箱(美国Thermo Fisher公司)、厌氧培养箱(美国Shellab公司)、激光共聚焦显微镜(德国Zeiss公司)、流式细胞仪(美国

2022-11-22 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81702820);河南省医学科技攻关省部共建重点项目(编号:SBJ202102199);河南省重点研发与推广专项项目(编号:222102310115)

作者单位:¹ 河南科技大学基础医学院与法医学院, 洛阳 471003

² 河南省微生态与食管癌防治重点实验室, 河南省肿瘤表观遗传重点实验室, 洛阳 471003

³ 河南科技大学第一附属医院, 河南科技大学临床医学院, 洛阳 471003

作者简介:郭静宜,女,硕士研究生;

高社干,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: gsg112258@163.com

Cytek 公司)、多功能酶标仪(美国 Biotek 公司)、荧光定量 PCR 仪(美国 Bio Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与实验分组 将不同分化程度的 ESCC 细胞系 KYSE140 和 KYSE150 采用完全培养基(RPMI-1640 + 10% FBS + 1% 青 - 链霉素), 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 按 1 : 4 比例传代。THP-1 细胞采用完全培养基(RPMI-1640 + 10% FBS + 1% 青 - 链霉素 + 0.05 mmol/L β-巯基乙醇) 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养。2 ~ 3 d 换液, 4 ~ 5 d 按 1 : 2 ~ 1 : 4 比例传代, 取对数生长期细胞进行后续实验。实验分组: ① M0 组: 将 THP-1 细胞以 4×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 加入 50 ng/ml PMA 培养 48 h, 细胞由悬浮状态变为贴壁状态, 即为 M0 巨噬细胞; ② M2 组: M0 细胞中加入 20 ng/ml IL-4 培养 3 d, 即为 M2 型巨噬细胞; ③ KYSE150CM 组: 将 KYSE150 细胞培养 3 d, 收集细胞培养上清液, 1 000 r/min 离心 5 min 去除沉淀获得 KYSE150CM; ④ KYSE150 (Pg +) CM 组: Pg 感染 KYSE150 细胞 3 d, 收集细胞培养上清液, 1 000 r/min 离心 5 min 去除沉淀获得 KYSE150 (Pg +) CM; ⑤ TAMKYSE150 组: 取 50% KYSE150CM 加上 50% 新鲜完全培养基培养 M0 细胞, 即为 TAMKYSE150; ⑥ TAMKYSE150 + (Pg) 组: 取 50% KYSE150 (Pg +) CM 加上 50% 新鲜完全培养基培养 M0 细胞, 即为 TAMKYSE150 (Pg +); ⑦ M0-CM 组: 将 THP-1 诱导而来的 M0 细胞培养 3 d, 收集培养上清液, 1 000 r/min 离心 5 min 去除沉淀获得 M0-CM; ⑧ TAMKYSE150-CM 组: 采用 KYSE150CM 共培养巨噬细胞后, 去除 TAMs 培养上清液, 更换为新鲜完全培养基, 培养 3 d 收集上清液, 1 000 r/min 离心 5 min 去除沉淀获得 TAMKYSE150-CM; ⑨ TAMKYSE150 (Pg +) -CM 组: 采用 KYSE150 (Pg +) CM 共培养巨噬细胞后, 去除 TAMs 培养上清液, 更换为新鲜完全培养基, 培养 3 d 收集上清液, 1 000 r/min 离心 5 min 去除沉淀获得 TAMKYSE150 (Pg +) -CM。

1.2.2 菌株培养与感染 标准菌株 Pg 采用 BHI 液体培养基于 85% N₂、5% CO₂、10% H₂、37 °C 厌氧培养箱中培养。细菌复苏后传代至第 2 或第 3 代处于对数生长期时, 吸取 300 μl 菌液于石英比色皿中, 利用紫外分光光度计, 检测 600 nm 下的吸光度, 取 600 nm 下吸光度值在 1 ~ 2 之间的细菌进行梯度传代或感染细胞。细菌感染, 根据 600 nm 下吸光度值计算菌液浓度为 1×10^9 CFU/ml 时对应的菌液体

积, 吸取相应体积菌液, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 去除培养基, 加入 1 ml 无菌 PBS 重悬, 获得 1×10^9 CFU/ml Pg 菌液。根据感染复数 (multiplicity of infection, MOI) = 20, 即细菌与细胞比例为 20 : 1, 吸取相应体积菌液加入细胞培养基, 进行细胞感染。

1.2.3 ELISA 实验 按照说明书步骤准备好检测细胞培养上清液, 在包被好抗体的板孔中加入 100 μl 标准品工作液或样本, 50 μl 抗体, 室温孵育 2 h; 洗板 6 次, 加入 100 μl 辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素, 室温孵育 45 min; 洗板 6 次; 每孔加入 100 μl 显色底物溶液, 室温孵育 10 min 左右; 每孔加入 100 μl 终止液; 立即在 450 nm 波长检测吸光度值。

1.2.4 细胞免疫荧光 将不同条件下处理过的巨噬细胞消化重悬计数, 细胞密度按 1×10^3 个/孔接种于玻璃底共聚焦小皿, 放入培养箱孵育 24 h 以上, 4% 多聚甲醛室温固定 1 h, 0.2% TritonX-100 透化 5 ~ 10 min, 5% BSA 封闭 1 h, 1% BSA 稀释抗体, 一抗 CD68 (1 : 50)、CD206 (1 : 100) 4 °C 过夜, PBS 洗涤 3 次, 荧光二抗室温避光孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次, DAPI 核染色, 激光共聚焦显微镜拍照。

1.2.5 qRT-PCR 实验 使用 TRIzol 分别提取 Pg 感染与未感染的 KYSE150 细胞、Pg 感染与未感染的 KYSE140 细胞、M0 细胞、M2 细胞、与 KYSE150 共培养的 TAMs、与 Pg 阳性 KYSE150 细胞共培养的 TAMs 总 RNA, 测量 RNA 浓度后将 RNA 逆转录为 cDNA。采用 qPCR 方法检测 CD206、CD163 等 mRNA 相对表达量, 每组样本重复 3 次。IL-6 上游引物 5'-CCCAGGAGAAGATTCCAAAGATGTA-3', 下游引物 5'-GTCGAGGATGTACCGAATTTGTTT-3'; IL-10 上游引物 5'-GTGAAGACTTTCTTTCAAACAAAG-3', 下游引物 5'-CTGCTCCACTGCCTTGCTCTTATT-3'; CD163 上游引物 5'-GCAAACCTCAGAATGCTGCTACTTGA-3', 下游引物 5'-CAGTAATGGTGAAGGGACTCAGGTT-3'; CD206 上游引物 5'-TTGAATACTGTG-GTGAGCTGAAAGG-3', 下游引物 5'-GGCAAATC-CAG-TTGTTAAGGTGTTTC-3'。95 °C 5 min, 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 39 个循环。按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达水平。

1.2.6 流式细胞术 将 M0 细胞、M2 细胞、与 KYSE150 共培养的 TAMs、与 Pg 阳性感染的 KYSE150 细胞共培养的 TAMs 分别消化下来, PBS 洗涤 2 遍, 2 000 r/min 离心 5 min 去上清液, 200 μl PBS 重悬细胞转移至流式管, 一抗 CD11b-FITC、CD68-BV421、CD206-PE 染色, 4 °C 避光孵育 30 min, 加 300 μl PBS 洗涤

未结合染料,离心去上清液后加入 300 μ l PBS 重悬细胞上机检测。

1.2.7 CCK-8 实验 将 KYSE150 细胞按 1×10^3 个/孔接种于 96 孔板,每组设置 3 个复孔,加上与 Pg 感染或未感染的 KYSE150 细胞共培养的 TAMs 条件培养基以及对照组含血清培养基作为趋化条件,分别在 0、12、24、36、48 h 每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液,37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 1 h,使用多功能酶标仪在 450 nm 处检测吸光度值,绘制细胞生长曲线。

1.2.8 克隆形成实验 将 KYSE150 细胞按 1×10^3 个/孔接种于 6 孔板中,待细胞贴壁,将培养基更换为与 Pg 感染或未感染的 KYSE150 细胞共培养的 TAMs CM,37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 2 周,一周 2 次换液,当细胞形成肉眼可见的克隆时,吸去培养基,PBS 洗涤 3 次,4% 多聚甲醛固定,结晶紫染色后,PBS 洗涤,拍照使用 Image J 计数细胞克隆数。

1.2.9 划痕实验 将 KYSE150 细胞按 4×10^5 个/孔接种于底部画好横线的 6 孔板中,待细胞长至 80% 划痕,PBS 洗涤漂浮细胞,加上与 Pg 感染或未感染的 KYSE150 细胞共培养的 TAMs CM,显微镜拍照 0、24 h 划痕愈合情况,使用 Image J 软件测量不同时间点划痕面积,进行统计。

1.2.10 Transwell 实验 将饥饿过的 KYSE150 细胞重悬于无血清培养基接种于 Transwell 小室上室,加上与 Pg 感染或未感染的 KYSE150 细胞共培养的 TAMs CM 为趋化条件,37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 24 ~ 48 h 终止。吸去培养基,用棉签去除未侵袭入膜的细胞,PBS 洗涤小室,4% 多聚甲醛固定,结晶紫染色后,光学显微镜下拍照计数细胞量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 26.0 和 GrapPad Prism 8.0 对实验数据进行统计学分析及制图,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组数据比较采用独立样本 *t* 检验,3 组或以上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 IL-6、IL-10 在 Pg 感染的食管癌细胞中的表达 为观察 Pg 感染对 ESCC 细胞的影响,通过 ELISA 方法检测细胞上清液中 IL-6、IL-10 的浓度变化,利用 qRT-PCR 方法检测感染与未感染 Pg 的 ESCC 细胞 IL-6、IL-10 mRNA 转录水平的变化。qRT-PCR 结果显示:Pg 感染 ESCC 细胞系后,KYSE140 细胞系 IL-6 mRNA 表达较未感染组升高 [(2.46 ± 0.10) vs (1.69 ± 0.04) , $P < 0.01$],KYSE150 细胞系

IL-6 mRNA 表达较未感染组升高 [(3.57 ± 0.04) vs (1.29 ± 0.06) , $P < 0.001$]、KYSE140 细胞系 IL-10 mRNA 表达较未感染组升高 [(3.34 ± 0.08) vs (2.53 ± 0.05) , $P < 0.01$]、KYSE150 细胞系 IL-10 mRNA 表达较未感染组升高 [(2.57 ± 0.04) vs (1.29 ± 0.06) , $P < 0.01$] (图 1A)。ELISA 结果显示:Pg 感染 ESCC 细胞系后,KYSE140 细胞系分泌的细胞因子 IL-6 水平较未感染组升高 [$(1\ 650.07 \pm 31.86)$ pg/ml vs $(1\ 150.81 \pm 13.46)$ pg/ml, $P < 0.001$]、KYSE150 细胞系分泌细胞因子 IL-6 水平较未感染组升高 [$(3\ 001.03 \pm 59.81)$ pg/ml vs $(1\ 313.80 \pm 77.85)$ pg/ml, $P < 0.001$]、KYSE140 细胞系分泌的细胞因子 IL-10 水平较未感染组升高 [$(2\ 646.70 \pm 16.33)$ pg/ml vs $(1\ 111.23 \pm 32.14)$ pg/ml, $P < 0.0001$]、KYSE150 细胞系分泌的细胞因子 IL-10 水平较未感染组升高 [$(2\ 926.56 \pm 57.68)$ pg/ml vs $(1\ 393.58 \pm 35.07)$ pg/ml, $P < 0.001$] (图 1B)。综上,Pg 感染 ESCC 细胞系 IL-6、IL-10 mRNA 转录水平及 ESCC 细胞分泌的细胞因子 IL-6、IL-10 水平均有所升高,差异有统计学意义。

2.2 Pg 对 ESCC 细胞调控 M2 型 TAMs 极化的影响

2.2.1 流式细胞术检测与 Pg 感染的 ESCC 细胞共培养的 TAMs 表面标记物变化 为观察 Pg 感染与未感染 ESCC 细胞 CM 对 TAMs 极化的影响,采用流式细胞术方法检测 M0 细胞、M2 细胞、与 KYSE150 共培养的 TAMs 细胞及与 Pg 感染的 KYSE150 共培养的 TAMs 细胞表面 M2 型巨噬细胞标记物 CD206 的表达水平。流式结果显示:与 KYSE150CM 组比较,KYSE150(Pg+)CM 组 CD206⁺TAMs 比例升高,差异有统计学意义 [$(20.90 \pm 1.25)\%$ vs $(60.97 \pm 0.81)\%$, $P < 0.0001$]。见图 2。

2.2.2 qRT-PCR 检测 Pg 感染对共培养 TAMs 表面标记物表达水平的影响 为观察 Pg 感染与未感染 ESCC 细胞 CM 对 TAMs 极化的影响,分别提取 M0 细胞、M2 细胞、与 KYSE150 共培养的 TAMs 细胞及与 Pg 感染的 KYSE150 共培养的 TAMs 细胞总 RNA,通过 qRT-PCR 检测各分组转录因子的表达水平。qRT-PCR 结果显示:Pg 感染 ESCC 细胞后,KYSE150(Pg+)CM 组 TAMs CD206 mRNA 表达量比 KYSE150CM 组 CD206 mRNA 表达量高 [(5.10 ± 0.42) vs (1.60 ± 0.45) , $P < 0.001$]、KYSE150(Pg+)CM 组 TAMs CD163 mRNA 表达量比 KYSE150CM 组 TAMs CD163 mRNA 表达量高 [(6.30 ± 0.50) vs

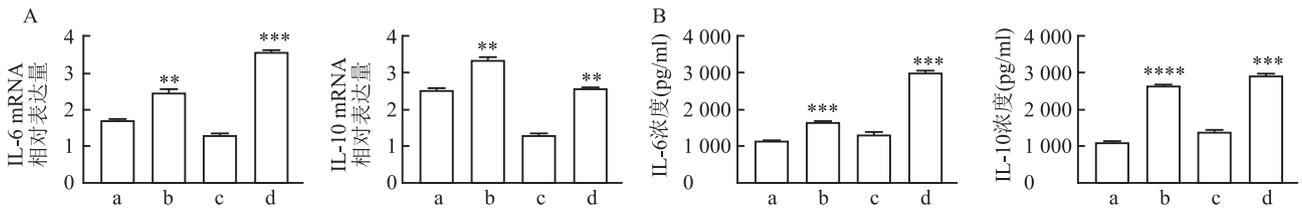


图1 Pg感染对ESCC细胞IL-6、IL-10表达的影响

A: qRT-PCR检测ESCC细胞转录因子表达水平变化; B: ELISA法检测ESCC细胞分泌细胞因子浓度变化; a: KYSE140组; b: KYSE140 + Pg组; c: KYSE150组; d: KYSE150 + Pg组; 与Pg未感染组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

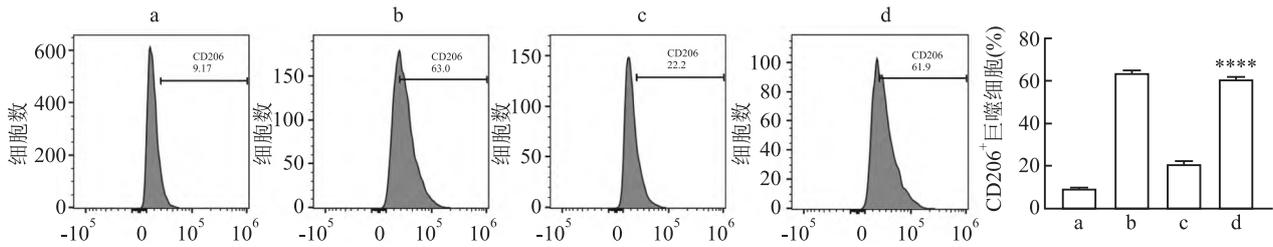


图2 流式细胞术检测与Pg感染的ESCC细胞共培养的TAMs CD206比例变化

a: M0组; b: M2组; c: KYSE150CM组; d: KYSE150(Pg+)CM组; 与KYSE150CM组比较: **** $P < 0.0001$

(2.35 ± 0.12), $P < 0.001$], 差异有统计学意义。见图3。

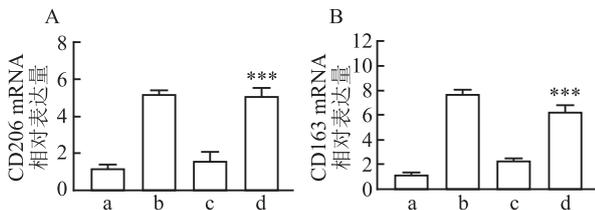


图3 qRT-PCR检测与Pg感染的KYSE150细胞共培养的TAMs CD206 mRNA、CD163 mRNA表达水平变化

A: TAMs CD206 mRNA相对表达量; B: TAMs CD163 mRNA相对表达量; a: M0组; b: M2组; c: KYSE150CM组; d: KYSE150(Pg+)CM组; 与KYSE150CM组比较: *** $P < 0.001$

2.2.3 免疫细胞荧光检测与Pg感染的ESCC细胞共培养的巨噬细胞表面标记物变化 为观察Pg感染与未感染ESCC细胞CM对TAMs极化的影响,将M0细胞、M2细胞、与KYSE150共培养的TAMs细胞及与Pg感染的KYSE150共培养的TAMs细胞,消化重悬接种于共聚焦小皿,激光共聚焦显微镜观察。结果显示:与KYSE150CM组比较, M0 + KYSE150(Pg+)CM组, M2型巨噬细胞表面标记物CD206与巨噬细胞表面标志物CD68共定位增加,即M2型巨噬细胞表面标志物CD206表达升高。见图4。

2.3 Pg感染ESCC细胞对共培养TAMs分泌IL-6、IL-10水平的影响 采用ELISA方法检测

与KYSE150细胞或Pg感染的KYSE150细胞共培养的TAMs分泌细胞因子水平的变化。结果显示: TAMKYSE150组TAMs分泌IL-6水平较M0组升高[(662.78 ± 59.15) pg/ml vs (232.85 ± 19.10) pg/ml, $P < 0.01$], TAMKYSE150(Pg+)组分泌IL-6水平较TAMKYSE150组进一步升高[(1183.11 ± 44.12) pg/ml vs (662.78 ± 59.15) pg/ml, $P < 0.01$]; TAMKYSE150组TAMs分泌IL-10水平较M0组升高[(419.61 ± 12.63) pg/ml vs (175.72 ± 6.70) pg/ml, $P < 0.001$], TAMKYSE150(Pg+)组分分泌IL-10水平较TAMKYSE150组进一步升高[(1163.64 ± 35.07) pg/ml vs (419.61 ± 12.63) pg/ml, $P < 0.01$]。见图5。

2.4 Pg感染ESCC细胞调控M2型TAMs极化对ESCC细胞恶性增殖的影响 为观察与Pg感染的ESCC细胞共培养后TAMs对ESCC细胞增殖、迁移、侵袭能力变化,将ESCC细胞分为3组,对照组加入M0-CM培养,实验组分别加入TAMKYSE150-CM, TAMKYSE150(Pg+)-CM培养后进行CCK-8、克隆形成实验、划痕实验及Transwell实验。CCK-8细胞增殖活性实验结果显示:与对照组M0-CM比较, TAMKYSE150-CM组促进ESCC细胞增殖能力增强, TAMKYSE150(Pg+)-CM组比TAMKYSE150-CM组促进ESCC细胞增殖能力进一步增强, 差异有统计学意义($F = 108.03$, $P < 0.01$), 见图6A。克隆形成实验结果显示:与对照组M0-CM比较,

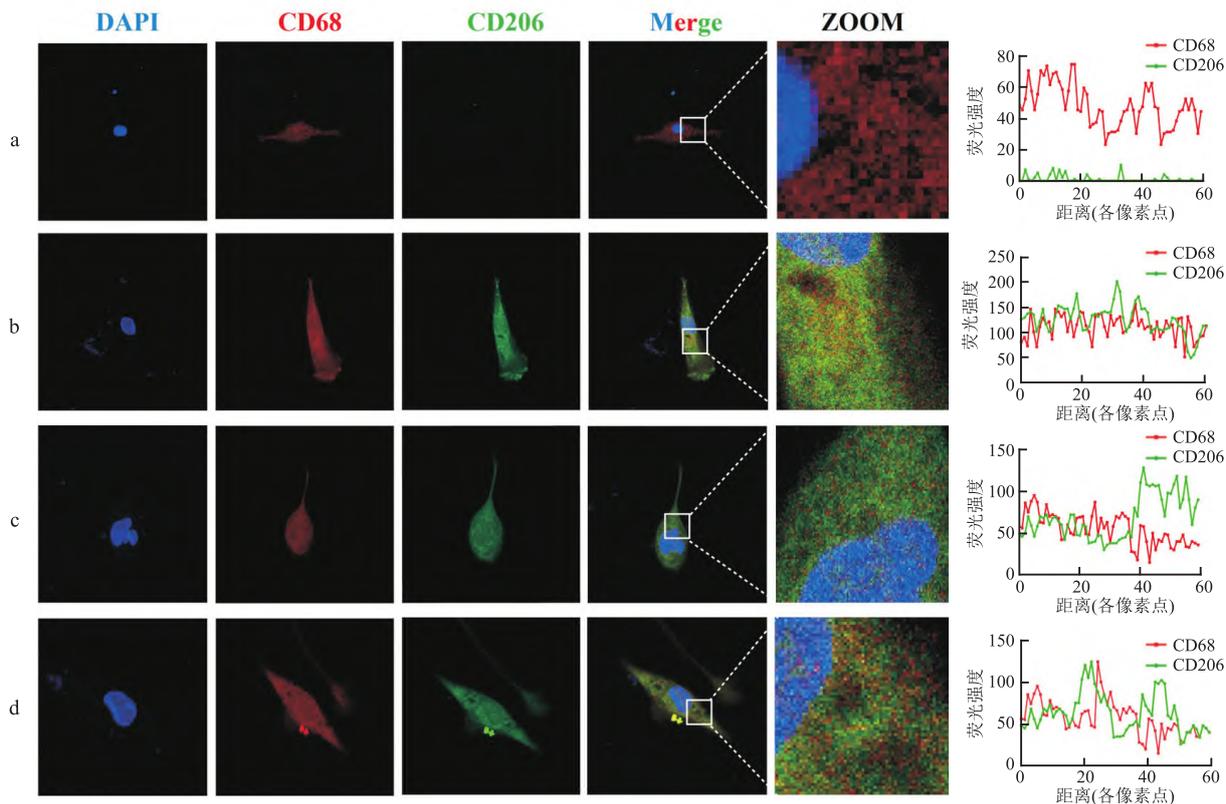


图4 免疫细胞荧光检测与Pg感染的KYSE150细胞共培养的TAMs CD206表达水平变化 ×400
a: M0组; b: M2组; c: KYSE150-CM组; d: KYSE150(Pg+)CM组

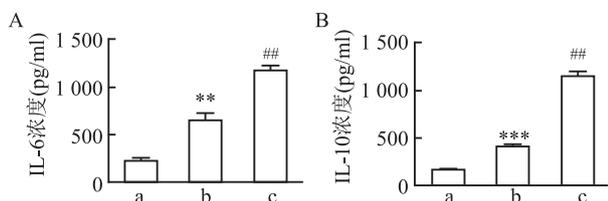


图5 ELISA法检测Pg感染ESCC细胞对共培养TAMs分泌细胞因子水平的影响

A: ELISA法检测共培养TAMs分泌IL-6水平变化; B: ELISA法检测共培养TAMs分泌IL-10水平变化; a: M0组; b: TAMKYSE150组; c: TAMKYSE150(Pg+)组; 与M0组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与TAMKYSE150组比较: ## $P < 0.01$

TAMKYSE150-CM组促进ESCC细胞增殖能力增强, TAMKYSE150(Pg+)-CM组比TAMKYSE150-CM组促进ESCC细胞增殖能力进一步增强, 差异有统计学意义($F = 610.18, P < 0.05$), 见图6B。

划痕实验结果显示: 与对照组M0-CM比较, TAMKYSE150-CM组促进ESCC细胞迁移能力增强, TAMKYSE150(Pg+)-CM组比TAMKYSE150-CM组促进ESCC细胞迁移能力进一步增强, 差异有统计学意义($F = 3539.502, P < 0.01$)。见图7。

Transwell实验结果显示: 与对照组M0-CM比较, TAMKYSE150-CM组促进ESCC细胞侵袭能力增强, TAMKYSE150(Pg+)-CM组比TAMKYSE150-CM组促进ESCC细胞侵袭能力进一步增强, 差异有统计学意义($F = 482.553, P < 0.05$)。见图8。

3 讨论

食管癌的发病机制复杂, 其中微生物感染是主要高危因素之一。随着细菌调控免疫作用被发现, 其对肿瘤免疫影响相关机制的研究得到越来越多的关注^[7]。以微生物为靶点的治疗对食管癌的预防、早期发现与治疗均具有重要意义。研究^[8]发现, Pg感染ESCC细胞介导TME中T淋巴细胞免疫抑制, 协助ESCC细胞免疫逃逸, 从而维持自身定植。巨噬细胞是TME中数量最多的固有免疫细胞, 可以有效清除病原菌。在此, 本研究重点关注Pg感染ESCC细胞对TME中巨噬细胞的影响, 进而研究Pg对微环境的改变及其对肿瘤进展的影响。

肿瘤发生发展过程中常常伴有感染引起的炎症, 肿瘤细胞分泌相关细胞因子作用于募集的免疫细胞, 改变其细胞形态及功能, 从而改变TME, 进而

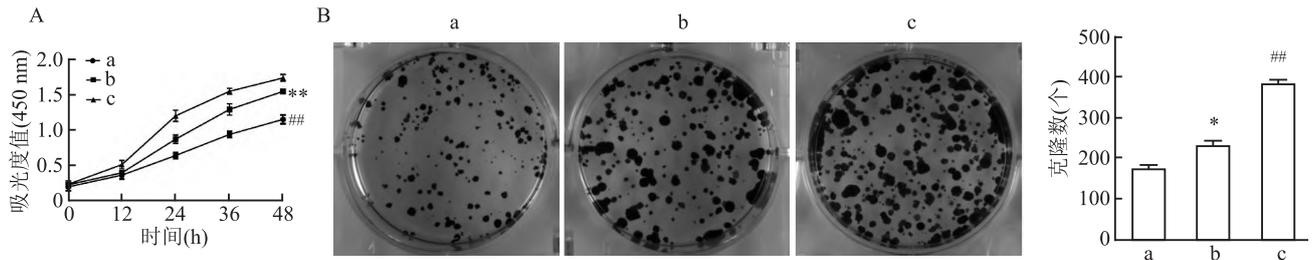


图6 与Pg感染的ESCC细胞共培养的TAMs对ESCC细胞增殖的影响

A: CCK-8法检测TAMs对ESCC细胞增殖的影响; B: 克隆形成实验检测TAMs对ESCC细胞增殖的影响; a: M0-CM组; b: TAMKYSE150-CM组; c: TAMKYSE150(Pg+)-CM组; 与M0-CM组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与TAMKYSE150-CM组比较: ## $P < 0.01$

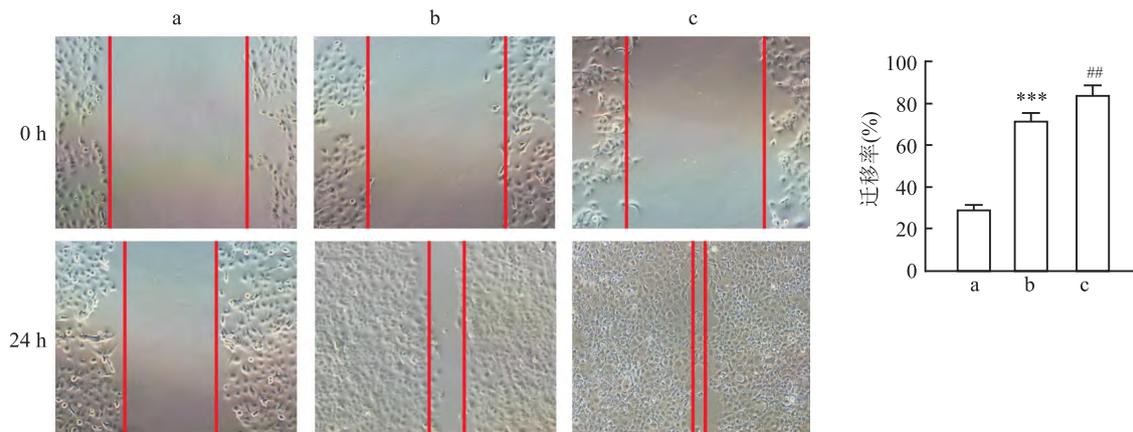


图7 与Pg感染的ESCC细胞共培养的TAMs对ESCC细胞迁移的影响 ×200

a: M0-CM组; b: TAMKYSE150-CM组; c: TAMKYSE150(Pg+)-CM组; 与M0-CM组比较: *** $P < 0.001$; 与TAMKYSE150-CM组比较: ## $P < 0.01$

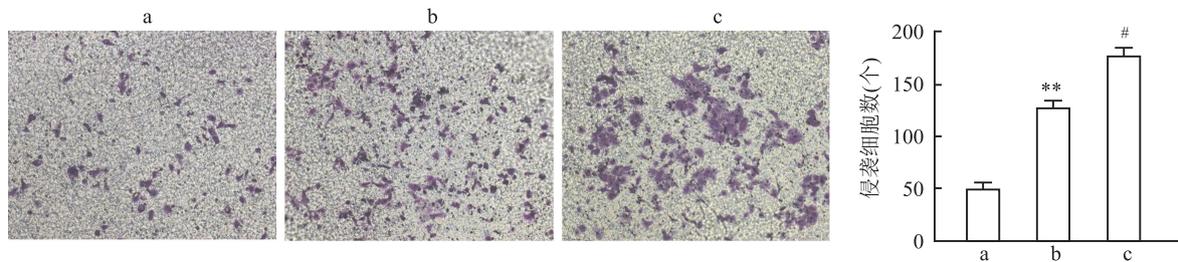


图8 与Pg感染的ESCC细胞共培养的TAMs对ESCC细胞侵袭的影响 ×200

a: M0-CM组; b: TAMKYSE150-CM组; c: TAMKYSE150(Pg+)-CM组; 与M0-CM组比较: ** $P < 0.01$; 与TAMKYSE150-CM组比较: # $P < 0.05$

助力肿瘤细胞逃避机体的免疫识别与攻击^[9]。在微环境中不同细胞因子和趋化因子的作用下, TAMs可极化为不同亚型, 从而发挥不同的功能。在TME中, TAMs向M2型极化是一个多因素、多步骤的复杂病理过程^[10]。病原菌可以通过调控宿主产生不同的细胞因子而间接调控巨噬细胞的极化状态, 从而抑制宿主免疫系统, 使病原菌得以逃避宿主免疫系统的防御及杀伤。研究^[11]发现结肠癌细胞分泌的IL-4影响TAMs的M2极化。具核梭杆菌感染

通过TLR4依赖性机制促进巨噬细胞向M2型极化^[12]。本研究通过检测Pg感染对ESCC细胞的影响, 发现Pg感染促进ESCC细胞中IL-6、IL-10的分泌水平。为了进一步探究Pg感染ESCC细胞对TAMs调控作用, 本研究建立Pg感染的ESCC细胞与TAMs共培养模型, 证实与Pg感染ESCC细胞共培养的TAMs表面M2型标志物表达量升高, 提示Pg可以促进ESCC细胞调控M2型TAMs极化。同时, Pg感染ESCC细胞促进共培养TAMs分泌IL-6、

IL-10 水平升高。

M2 型 TAMs 通常被认为在肿瘤进展过程中抑制炎症反应和促进肿瘤免疫逃逸^[13]。本研究利用与 Pg 感染或未感染的 ESCC 细胞共培养的 TAMs CM 再去培养 ESCC 细胞,观察其对肿瘤细胞功能变化的影响。实验结果表明,被 Pg 感染的 ESCC 细胞极化的 TAMs,可以进一步促进 ESCC 细胞的增殖,迁移及侵袭能力。但 Pg 如何通过刺激 ESCC 上调 IL-6、IL-10 的分子机制尚不清楚,以及极化后的 TAMs 促进 ESCC 恶性生物学行为的详细机制仍需进一步的研究。

综上所述,本研究初步探究了 Pg 感染 ESCC 细胞通过诱导肿瘤细胞分泌 IL-6、IL-10 介导 TAMs 向 M2 型极化,将 TAMs 重塑为免疫抑制表型,从而促进食管癌细胞恶性进展,并揭示了 Pg 对巨噬细胞极化的调节作用,有助于今后更好的解析 EC 的微环境变化,为临床上开展以 TAMs 为靶点的抗肿瘤免疫治疗奠定理论基础。

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): 209-49.

[2] Miller K D, Nogueira L, Mariotto A B, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019[J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(5): 363-85.

[3] Darveau R P, Hajishengallis G, Curtis M A. *Porphyromonas gingivalis* as a potential community activist for disease[J]. *J Dent Res*, 2012, 91(9): 816-20.

[4] Gao S G, Yang J Q, Ma Z K, et al. Preoperative serum immunoglobulin G and A antibodies to *porphyromonas gingivalis* are potential serum biomarkers for the diagnosis and prognosis of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 17.

[5] Arora S, Dev K, Agarwal B, et al. Macrophages; their role, activation and polarization in pulmonary diseases[J]. *Immunobiology*, 2018, 223(4/5): 383-96.

[6] Morrison C. Immuno-oncologists eye up macrophage targets[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(6): 373-4.

[7] Schwabe R F, Jobin C. The microbiome and cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(11): 800-12.

[8] Yuan X, Liu Y, Li G, et al. Blockade of immune-checkpoint B7-H4 and lysine demethylase 5B in esophageal squamous cell carcinoma confers protective immunity against *P. gingivalis* infection[J]. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7(9): 1440-56.

[9] Mc Allister F, Housseau F, Sears C L. Microbiota and immune responses in colon cancer; more to learn[J]. *Cancer J*, 2014, 20(3): 232-6.

[10] Mantovani A, Sozzani S, Locati M, et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes[J]. *Trends Immunol*, 2002, 23(11): 549-55.

[11] Lin X, Wang S, Sun M, et al. Correction to: miR-195-5p/NOCTH2-mediated EMT modulates IL-4 secretion in colorectal cancer to affect M2-like TAM polarization[J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 122.

[12] Chen T, Li Q, Wu J, et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes M2 polarization of macrophages in the microenvironment of colorectal tumours via a TLR4-dependent mechanism[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2018, 67(10): 1635-46.

[13] Noy R, Pollard J W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy[J]. *Immunity*, 2014, 41(1): 49-61.

Porphyromonas gingivalis infection of esophageal cancer cells induces M2 macrophage polarization and promotes esophageal cancer progression

Guo Jingyi^{1,2}, Yuan Xiang^{2,3}, Shi Linlin^{2,3}, Zhang Xiuse³, Kong Jinyu^{2,3}, Zhang Dingyu^{1,2}, Gao Shegan^{2,3}

⁽¹⁾ Basic Medical College of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003;

⁽²⁾ Henan Key Laboratory of Microbiome and Esophageal Cancer Prevention and Treatment, Henan Key

Laboratory of Cancer Epigenetics, Luoyang 471003; ⁽³⁾ The First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Clinical Medicine College of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003)

Abstract Objective To investigate the effect of *Porphyromonas gingivalis* (Pg) infection of esophageal cancer cells on the polarization of tumor associated macrophages (TAMs) and functional changes. **Methods** The secretion of tumor-related cytokines in the supernatant of Pg infected and uninfected esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells was detected by ELISA. A co-culture model of ESCC cells and macrophages *in vitro* was established,

MBL2 作为男性肝癌患者预后标志物的分析与验证

王延峰^{1,2}, 韩嘉奇^{1*}, 张 静¹

摘要 目的 探究甘露糖结合凝集素 2 (MBL2) 基因表达对肝细胞癌 (HCC) 细胞系增殖和预后的影响。方法 采用生物信息学方法分析 MBL2 在不同性别 HCC 患者中的表达及其对 HCC 患者预后的影响。利用 qRT-PCR 和 Western blot 检测基因的 mRNA 和蛋白表达水平。MTT 实验和细胞克隆形成实验检测细胞增殖能力;采用流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡的变化。基因集富集分析 (GSEA) 筛选 MBL2 富集的相关信号通路。结果 生物信息学分析和 qRT-PCR 结果显示, MBL2 在男性 HCC 患者中的表达高于女性患者, 并且与 HCC 患者预后相关;与对照组比较, MBL2 过表达后 Huh7 细胞和 MHCC-97H 细胞的活力和克隆形成率下降, 细胞周期转化受阻, 细胞凋亡数增加;GSEA 和 Western blot 结果表明, MBL2 富集在细胞周期信号通路上, 过表达 MBL2 能够抑制 CDK4 蛋白表达, 促进 P16 和 BAX 蛋白表达。结论

MBL2 在 HCC 组织中表达下调, 与男性 HCC 患者预后相关, 并且参与细胞增殖过程。MBL2 可能是男性 HCC 患者治疗的潜在靶点。

关键词 肝癌; MBL2; 预后; 增殖; 凋亡

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)05-0787-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.014

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是原发性肝癌的主要组织学亚型, 原发性肝癌是 2020 年全球第六大最常见的癌症和第三大癌症死亡原因, 男性的发病率和病死率比女性高 2~3 倍, 且预后较差^[1]。HCC 的发生是一个涉及多种风险因素的复杂过程。慢性肝炎病毒感染、吸烟和过度饮酒是男性患者常见的危险因素^[2]。早期筛查、诊断和治疗是改善 HCC 预后的关键。然而, 性别相关的诊断、预后标志物的缺乏, 高转移和复发率等因素直接降低了手术切除后 HCC 患者的生存率^[3-4]。甘露糖结合凝集素 2 (mannose binding lectin 2, MBL2) 位于人类 10 号染色体, 在先天免疫系统中起着重要作用, 而在恶性肿瘤中的关键作用是免疫监测, MBL2 基因变异是癌症风险增加的因素之一^[5]。目前, 在儿童血液肿瘤中发现, MBL2 基因的多态性与中性粒细胞减少症发生相关^[6]。而 MBL2 在 HCC 中的作用尚不清楚。该研究利用生物信息学技术分析 MBL2 在不同性别 HCC 患者中的表达, 细胞实验探究其对 HCC 细胞增殖的作用, 为不同性别 HCC 患者个性化治疗提供新的靶点。

2023-02-03 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81860444)

作者单位: ¹ 延安大学医学院, 延安 716000

² 延安大学附属医院检验科, 延安 716000

作者简介: 王延峰, 男, 主管检验师;

张 静, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yadxzj@

yau.edu.cn

* 对本文具有同等贡献

and the changes of TAMs surface markers were detected by qPCR, cellular immunofluorescence and flow cytometry. Cytokines secreted by TAMs after co-culture were detected by ELISA. ESCC cells were cultured using conditioned medium of co-cultured TAMs, and the effects of TAMs on the proliferation, migration and invasion of esophageal cancer cells were evaluated by CCK-8, Wound-healing assay and Transwell assay. **Results** The expression quantity of IL-6 and IL-10 of Pg-infected ESCC cells increased ($P < 0.01$). The contents of CD163 and CD206 on the surface of TAMs co-cultured with Pg-infected ESCC cells increased ($P < 0.001$). The cytokines IL-6 and IL-10 secreted by TAMs co-cultured with Pg-infected ESCC cells relatively increased ($P < 0.01$). TAMs co-cultured with Pg-infected ESCC cells were able to enhance ESCC cells proliferation, migration and invasion (all $P < 0.05$). **Conclusion** Pg infection of ESCC cells can induce the secretion of cytokines, remodel TAMs to polarize toward the M2-type immunosuppressive phenotype, thereby promoting the malignant biological behavior of ESCC cells. This study provides data support for the etiology of esophageal cancer and potential target molecules for clinical immunotherapy targeting TAMs.

Key words esophageal squamous cell carcinoma; *Porphyromonas gingivalis*; cytokines; THP-1 cells; macrophages