

网络出版时间: 2023-05-31 09:53:41 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/34.1065.R.20230529.1633.015.html>

Pirfenidone 通过癌相关成纤维细胞抑制胆道肿瘤侵袭

魏亦成^{1,2,3}, 王紫怡⁴, 李 炜⁵, 殷佩浩^{1,2,3,5}

摘要 目的 探究吡非尼酮(PFD)通过癌相关成纤维细胞(CAF)抑制胆道肿瘤侵袭的相关机制。方法 从胆道肿瘤患者的肿瘤组织中提取原代CAF,运用Western blot方法检测CAF的标志蛋白:波形蛋白(VIM), α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA),成纤维细胞激活蛋白(FAP)。鬼笔环肽实验显示成纤维细胞骨架功能。ELISA和Western blot实验验证正常成纤维细胞(NF)与CAF的TGF- β 表达差异。通过CAF中加入PFD观察CAF的功能变化。ELISA、实时荧光定量PCR(qRT-PCR)和Western blot实验验证CAF的TGF- β 表达变化。通过皮下瘤小鼠模型验证血清中TGF- β 的变化。胶原收缩实验观察CAF胶原收缩功能的改变。明胶酶谱实验观察CAF的培养基中的MMP2、MMP9的变化。Western blot方法检测CAF中SMAD信号通路蛋白变化。结果 CAF的相关标志蛋白VIM, α -SMA,FAP均高表达,且CAF的丝状肌动蛋白(F-actin)表达丰富。ELISA实验显示CAF的TGF- β 表达增强。Western blot实验验证CAF的胶原功能更强。

Western blot实验、PCR实验和相关现象实验说明PFD能抑制CAF的胶原生成和TGF- β 表达。SMAD信号通路相关蛋白实验证明PFD能通过抑制TGF- β /SMAD信号通路从而影响肿瘤侵袭。结论 癌症患者中提取的CAF的功能以胶原生成成为主,而PFD通过TGF- β /SMAD信号通路抑制CAF的胶原产生和胶原重塑相关过程从而起到抑制肿瘤侵袭的作用。

关键词 Pirfenidone; 癌相关成纤维细胞; TGF- β /SMAD通路; 胆囊癌; 胆管癌; 胶原收缩; 侵袭

中图分类号 R 735.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)06-0975-08
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.017

胆囊癌(gallbladder cancer,GBC)和胆管癌(cholangiocarcinoma,CCA)目前发病率在高收入国家呈上升趋势,由于胆道肿瘤的侵袭性较强导致肿瘤恶性程度高和预后较差^[1]。肿瘤的侵袭能力与肿瘤微环境(tumor microenvironment,TME)具有密切关系,其中癌相关成纤维细胞(cancer associated fibroblast,CAF)在肿瘤微环境中起到了重要作用。在CAF的过去研究中指出存在多种功能不同的CAF,例如炎症CAF和肌成纤维细胞CAF(myofibroblast-like CAF,myCAF)^[2]。其中myCAF与胶原蛋白的产生相关^[3]并且能够增加细胞外基质的刚度^[4],是TME形成和重塑的重要因素。

吡非尼酮(Pirfenidone,PFD)是一种新型抗纤维化剂,被批准用于特发性肺纤维化和其他纤维化相

2023-03-21 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81873137);上海市普陀区临床特色专病建设项目(编号:2020tszb03);上海市普陀区中心医院教学课题(编号:Y-446)

作者单位:¹安徽医科大学上海普陀中心临床学院,上海 200062

²安徽医科大学第五临床医学院,合肥 230032

³上海中医药大学中西医结合肿瘤介入研究所,上海 200062

⁴华东理工大学药学院,上海 200237

⁵上海中医药大学附属普陀医院普外科,上海 200062

作者简介:魏亦成,男,硕士研究生;

殷佩浩,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: yinpeihao@shutem.edu.cn

were analyzed. The relationship between SPP1, PD-L1, and M2-polarized macrophages in HCC tissue was also analyzed. **Results** The expression of SSP1, PD-L1 and CD163 increased in HCC tissues compared with para-carcinoma tissues. The expression of SSP1, PD-L1 and CD163 were all related to the BCLC staging ($P < 0.05$), but were not related to age and sex. The expression of SSP1 was elevated in HCC patients with large tumor diameter and multiple intrahepatic tumors, PD-L1 was elevated in HCC patients with multiple intrahepatic tumors and HBV infection. SSP1, PD-L1 and CD163 were related to the prognosis, and high expression patients had lower 3-year OSR and OST compared to low expression patients. Cox analysis showed the BCLC staging, SPP1 and PD-L1 were independent prognostic factors. The expression of SPP1 and PD-L1 were positively correlated with M2 macrophages in HCC. **Conclusion** SPP1, PD-L1 and CD163 can be used to evaluate the biological behaviors of HCC, and the positive expression of SPP1 and PD-L1 suggests that HCC patients may have a poor prognosis.

Key words hepatocellular carcinoma; tumor microenvironment; macrophage; SPP1; PD-L1

关疾病^[5]。PFD 可以通过抑制 TGF- β 的释放从而抑制 SMAD 通路和胶原蛋白产生,具有抗纤维化和抗炎特性,表明 PFD 能够抑制肌成纤维细胞功能^[6]。如果 PFD 能够改变肿瘤微环境中的 myCAF 功能,则对于抑制肿瘤侵袭具有重要意义。该研究就此提出假设 PFD 能否通过改变 CAF 的功能来影响相关肿瘤微环境从而抑制胆道肿瘤侵袭,并且探索 PFD 作用于 CAF 的相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 DMEM 细胞培养基、双抗、胰酶(含 EDTA)(美国 Gibco 公司);胎牛血清(FBS)(德国 BI 公司);TGF- β ELISA 试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);兔源 FAP 抗体(英国 Abcam 公司, ab53066)、兔源 p-smad3 抗体(美国 CST 公司, 9520S)、兔源 smad2/3(美国 CST 公司, 8685S)、兔源 COL1A1(英国 Abcam 公司, ab138492)、兔源 COL3A1(美国 NOVUS 公司, NB600-594)、兔源 COL4A1(美国 CST 公司, 50273)、兔源 p-smad2 抗体(美国 CST 公司, 18338)、鼠源 VIM(美国 CST 公司, 5741S)、鼠源 α -SMA(英国 Abcam 公司, ab124964)、鼠源 β -actin(英国 Abcam 公司, ab6276);PFD(平湖市正远医药科技有限公司)。

1.1.2 主要仪器 超低温冰箱(青岛海尔集团公司)、全波长酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、凝胶电泳仪、电泳槽、ChemiDoc MP 成像仪(美国 BIO-RAD 公司)、离心机(德国 Hettich 公司)。

1.1.3 细胞 该课题选取胆囊 CAF、胆管 CAF、胆囊正常成纤维细胞(normal fibroblast, NF)、胆管 NF 作为实验对象,胆囊 NF 来自安徽来尔文科技有限公司,公司提供细胞相关验证报告。GBC-SD 人胆囊癌细胞,来自美国模式培养物集存库 ATCC 细胞库。组织来源的 CAF,从胆囊癌和胆管癌患者的癌组织中分离得到。胆管 NF,从正常胆管组织分离得到。细胞培养条件是 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂。所有参与这项研究的患者均表示同意。该研究及相关课题经上海普陀区中心医院伦理委员会批准(伦理批准号: PTEC-A-2021-29-1)。

1.1.4 实验动物 雄性 BALB/c 裸鼠 10 只(6~8 周龄 30~40 g/只)和购自上海市计划生育科学研究所动物实验经营部,生产许可证号: SCXK(苏)2018-0006。动物实验均在上海普陀区中心医院 SPF 级动物实验室进行,饲养条件为(22 \pm 2) $^{\circ}$ C、湿

度 60%、明暗周期为 12 h/12 h,自由进食和饮水。将小鼠单侧皮下接种 GBC-SD 人胆囊癌细胞形成皮下瘤小鼠模型。2 周后肿瘤成型后进行随机分组,以 BALB/c 裸鼠 5 只为 PFD 给药组,以其余 BALB/c 裸鼠 5 只为正常对照。PFD 给药组每天灌胃 1 次,每次 PFD 250 mg/kg,对照组给予生理盐水,共 2 周。2 周后收集两组 BALB/c 裸鼠血清进行后续研究。该研究已获得上海普陀区中心医院伦理委员会批准(批件号: DWEC-A-202206013)。

1.2 方法

1.2.1 原代 CAF 细胞提取 在培养皿中加入适量的生理盐水后将所取患者组织标本块置于其中,将多余脂肪、边缘残留组织清理掉,加入适当 10% 双抗 D-Hanks 溶液清洗组织至澄清,用眼科剪将其剪碎至糊状。将组织碎末转移到离心管中,加入适量 D-Hanks 溶液完全淹没组织,离心后弃去上清液。关灯避光,加入胶原酶,封口膜封住管口,置于 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床中 150 r/min 振荡 1 h。加入完全培养基吹打离散组织后离心 5 min 来清洗胶原酶,重复此步骤 3 次,待胶原酶全部去除后加入培养基转移至小培养皿中放入培养箱中孵育。

1.2.2 细胞分组 根据实验目的将 CAF 分成 4 组:胆囊 CAF 组;胆管 CAF 组,分别培养 24 h;胆囊 CAF + PFD 组,胆囊 CAF 加入 PFD 后作用 24 h;胆管 CAF + PFD 组,胆管 CAF 加入 PFD 后作用 24 h,其中 PFD 浓度 0.3 mg/ml,作用时间为 24 h。

1.2.3 条件培养基 当 CAF 增长到 80% 的浓度时,培养基被无血清的培养基取代。处理 48 h 后,收集细胞悬液作为条件培养基。高速离心后收集条件培养基,然后通过 0.22 μ m 微孔膜过滤,在 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 Western blot 检测细胞蛋白表达 取对数成长期的细胞铺板,48 h 后去培养基,用 PBS 清洗 3 次后,用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 CST 细胞裂解液进行蛋白裂解,置于冰上裂解 15 min 后,运用离心机离心提取蛋白。弃去沉淀后,取上清液,使用 BCA 蛋白检测试剂盒进行蛋白定量。用 10% 的 SDS-PAGE 分离等量的细胞裂解物,并将分离后的蛋白转移到 PVDF 膜上。用 5% BSA 封闭 1 h 后,按照蛋白分子量大小分离不同条带,将条带与一抗孵育,一抗有 FAP(1:1 000)、 α -SMA(1:2 000)、VIM(1:1 000)、 β -actin(1:5 000)、COL1A1(1:1 000)、COL3A1(1:1 000)、COL4A1(1:1 000)、p-smad2(1:1 000)、p-smad3(1:1 000)、

smad2/3 (1 : 1 000)。在 4 °C 条件下孵育一抗 12 h, 用 TBST 漂洗 3 次后, 与二抗在常温下孵育 1 h。再用 TBST 漂洗 3 次, 使用化学发光显色法进行显色, 用 Image J 软件进行蛋白表达分析, 每组试验分别独立重复 3 次, 进行统计。

1.2.5 ELISA 检测 TGF- β 水平 收集 CAF 的条件培养基和小鼠血清作为样品。使用酶联免疫吸附测定试剂盒测定 TGF- β 水平。将 100 μ l 样品加入抗体包被的 96 孔板的每个孔中, 然后在室温下孵育 2 h。将 100 μ l 的工作检测溶液加到每个孔中, 在加入 100 μ l 底物溶液之前, 将板在室温下再孵育 1 h。加入 50 μ l 终止液后终止工作。在分光光度计中设置波长为 450 nm, 读取相应吸光度。每个样品设立 3 个复孔, 分别独立重复 3 次实验, 进行统计。

1.2.6 胶原收缩实验 将 CAF 悬浮液在无血清培养基和 I 型胶原溶液中混合, 制备胶原凝胶。最终细胞密度为 1.5×10^5 个/ml, 胶原浓度为 1 mg/ml。将 0.5 ml 混合物加入到 24 孔板的每个孔中, 在 37 °C 下聚合 30 min。将基质从培养皿底部轻轻分离, 基质中的成纤维细胞在完全培养基中培养 48 h, 其中不含或含有 PFD。每隔 24 h 白光下拍摄。通过 Image J 软件对凝胶的表面积进行量化。收缩百分比使用公式 $100\% \times \text{凝胶表面积} / \text{孔表面积}$, 绘制为初始基质面积。每组收缩试验分别独立重复 3 次, 进行统计。

1.2.7 鬼笔环肽染色 将细胞固定后, 用 0.1% Triton X-100 渗透, 并用 5% BSA 在 PBS 中封闭 30 min。然后用 Alexa-Fluor 488 Phalloidin (A12379, Thermo Fisher Scientific) 染色细胞, 以观察丝状 F-肌动蛋白。每种细胞分别铺 3 个共聚焦皿, 独立进行染色观察。

1.2.8 明胶酶谱实验 将来自 CAF 条件培养基在非还原性样品缓冲液中以 1 : 1 稀释, 并在含有 0.1% 明胶的 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA) 上在 125 V 下分离 150 min。通过在室温下与复性缓冲液 (2.5% Triton X-100 在水中稀释) 孵育 30 min 来去除 SDS。凝胶在显影缓冲液中洗涤 30 min, 然后在 37 °C 的新鲜显影缓冲液中培养 48 h。凝胶用考马斯蓝染色。每组实验独立重复 3 次, 观察现象。

1.2.9 Transwell 实验 在 Transwell 小室的底膜使用基质胶铺底后, 置入 Transwell 专用 24 孔板中。将处理后的细胞分别与 300 μ l 无血清培养基混合后加入小室内; 之后向小室下的孔中加入 700 μ l 含

10% FBS 培养基。共培养 48 h 后, 弃去培养基, 使用甲醇将膜表面的细胞固定。使用结晶紫染色后, 将小室晾干, 在显微镜下拍照, 在光学显微镜下计数细胞。每个样品铺 3 个小室, 每组实验独立重复 3 次, 进行统计。

1.2.10 CCK-8 实验 细胞铺板于 96 孔板中, 并在 24 h 内加入 PFD 作用。24 h 后, 使用 CCK-8 检测方法评估细胞活力, 设置 3 个孔, 分别独立重复 3 次实验, 进行统计。

1.2.11 mRNA 表达水平检测 qRT-PCR 检测 TGF- β 的 mRNA 表达水平。设计引物如下核苷酸序列 F: TATTGAGCACCTTGGGCACTGTTG; R: CCTTAACCTCTCTGGGCTTGTTC 方向 (5'-3'); 根据 EZ-press RNA Purification Kit 提取总 RNA, 用逆转录试剂盒提取 cDNA, 使用染料法 qPCR 检测试剂盒进行 qRT-PCR 检测。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism 7.0 和 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行组间比较, 两样本间比较用 student-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代 CAF 提取及功能观察 分别从患者胆囊癌组织和胆管癌组织中提取原代 CAF 细胞, 将其名称定义为胆囊 CAF 和胆管 CAF。分别提取 2 种 CAF 的蛋白后, 通过 Western blot 检测标志蛋白表达。如图 1A 所示, Western blot 实验显示细胞中的 CAF 标志蛋白 FAP, Vimentin, α -SMA 均表达, 从而验证 CAF 的身份。通过鬼笔环肽实验分别对胆囊 CAF 和胆管 CAF 染色, 图 1B 显示其成纤维细胞骨架胶原蛋白丰富且呈束状分布, 这提示 2 种 CAF 的功能可能与胶原蛋白相关从而影响肿瘤微环境。

2.2 CAF 中的 TGF- β 分泌和胶原生成 由于 TGF- β /SMAD 信号通路与成纤维细胞的胶原收缩和生成功能有重要联系^[6], 所以通过 ELISA 和 Western blot 实验进行进一步研究, 实验分组为胆囊 NF 组, 胆管 NF 组, 胆囊 CAF 组, 胆管 CAF 组。ELISA 实验表明胆囊 CAF 和胆管 CAF 的 TGF- β 分泌分别强于正常成纤维细胞 (3116.67 ± 567.65), 差异有统计学意义 ($F = 82.09, P < 0.05$)。同时通过 Western blot 检测胆囊 CAF 和胆管 CAF 中胶原蛋白显示, COL1A1, COL3A1, COL4A1 相较于正常 NF 明显表达增高, 两者差异有统计学意义

($F_{COL1A1} = 54.39$, $F_{COL3A1} = 112.00$, $F_{COL4A1} = 186.90$, $P < 0.05$)。同时研究也表明胆囊 CAF 和胆管 CAF 中 TGF- β /SMAD 信号通路的标志蛋白 p-smad2, p-smad3, smad2/3 表达相较于正常 NF 增高, 差异有统

计学意义 ($F_{p-smad2} = 90.04$, $F_{p-smad3} = 162.20$, $P < 0.05$)。这提示胆囊 CAF 和胆管 CAF 相比 NF 具有更强的 TGF- β 分泌, 并且激活 TGF- β /SMAD 通路来促进胶原生成。见图 2。

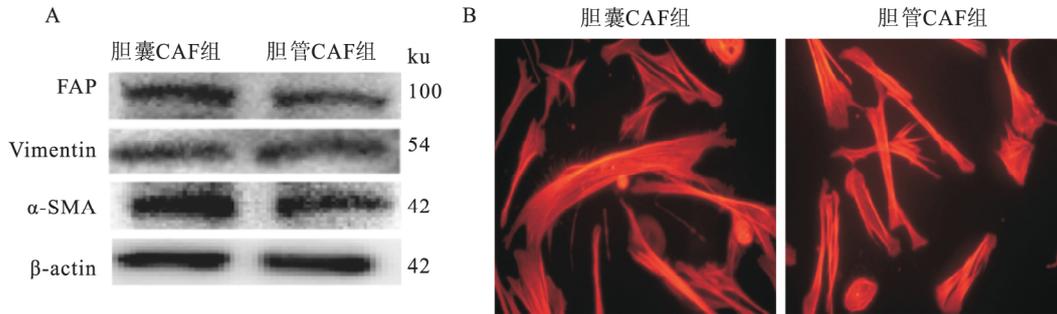


图1 原代 CAF 提取及功能观察

A: 各组 FAP、 α -SMA 及 VIM 蛋白的免疫印迹图; B: CAF 荧光显微镜拍摄图 $\times 400$

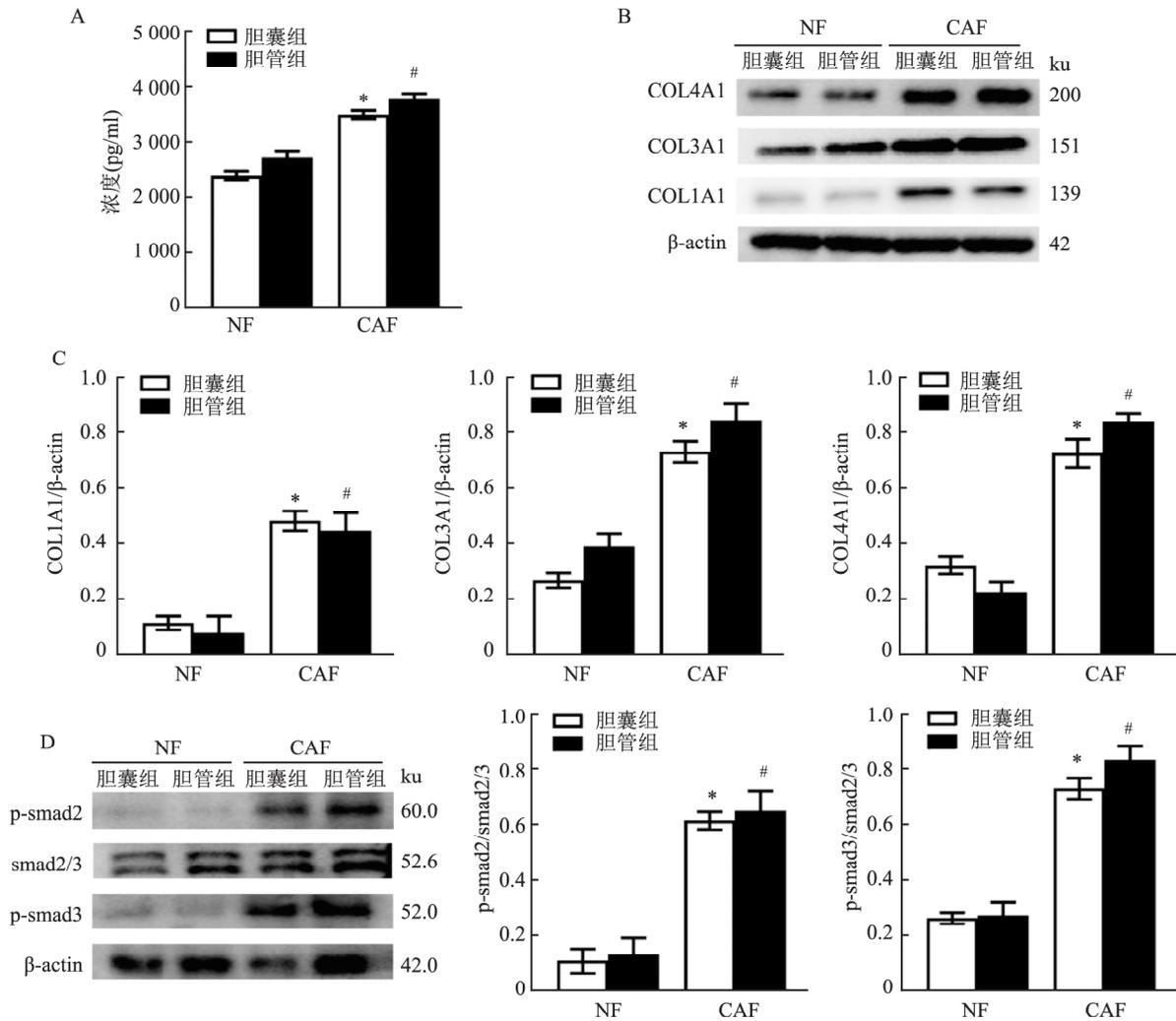


图2 CAF 中的 TGF- β 分泌和胶原生成

A: 各组细胞 TGF- β 分泌水平; B: 各组 COL1A1, COL3A1 和 COL4A1 蛋白的免疫印迹图; C: 各组 COL1A1, COL3A1 和 COL4A1 半定量分析结果; D: 各组 p-smad2, p-smad3 和 smad2/3 蛋白的免疫印迹图; 与胆囊 NF 组比较: * $P < 0.05$; 与胆管 NF 组比较: # $P < 0.05$

2.3 PFD 抑制 CAF 对 TGF-β 分泌和胶原生成的影响 为了研究 PFD 对于 CAF 中 TGF-β 分泌和胶原生成的影响,研究分组分为胆囊 CAF 组,胆管 CAF 组,胆囊 CAF + PFD 组,胆管 CAF + PFD 组。根据图 3A, CCK-8 实验患者胆囊 CAF 和胆管 CAF 在 0.6、1.2、2.4、3.6、7.2、14.4 mg/ml PFD 处理后与对照组 0 mg/ml PFD 处理后细胞存活率比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。故研究选择对两种细胞存活率无影响的 PFD 药物浓度为 0.3 mg/ml。结果如图 3B 所示, qRT-PCR 实验表明 PFD 组相比对照组 TGF-β 的 mRNA 表达水平明显降低,差异有统计学意义 ($F = 549.3, P < 0.05$)。图 3C 显示 ELISA 实验表明 PFD 能明显抑制 CAF 中 TGF 分泌 (2895.42 ± 855.96), 差异有统计学意义 ($F = 121.00, P < 0.05$)。同时图 3D 显示 Western blot 分析表明 PFD 能抑制胆囊 CAF 和胆管 CAF 的胶原蛋白表达,差异有统计学意义 ($F_{COL1A1} = 29.94, F_{COL3A1} = 405.90, F_{COL4A1} = 479.10, P < 0.05$)。在图 3E、F 动物实验中相同条件下的 GBC-SD 患者胆囊癌细胞皮下瘤裸鼠模型中, PFD 组相比对照组的血清 TGF-β 浓度明显降低 (364.52 ± 220.60), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 PFD 对 CAF 功能的作用 为了研究 PFD 对

CAF 胶原收缩和重塑的影响进行了相关实验,图 4A、B 为胶原收缩实验,结果显示,胆囊 CAF 细胞加入 PFD 后与对照组 24、48 h 收缩具有明显差异,胆管 CAF 细胞加入 PFD 后与对照组 24 h 收缩差异不明显,但是 48 h 收缩具有明显差异,结果显示 PFD 能够明显减弱胶原凝胶的收缩功能,两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。胶原收缩与癌相关成纤维细胞的基质重塑能力密切相关。图 4C 的明胶酶谱实验表明 PFD 对 CAF 分泌的 MMP2 和 MMP9 具有抑制作用。MMP2 和 MMP9 是胶原重塑和肿瘤微环境形成的重要因素,这说明了 PFD 能通过 CAF 对肿瘤微环境的改变起到作用。

2.5 PFD 通过 SMAD 信号通路影响 CAF 功能及肿瘤微环境 研究^[6]表明, PFD 能够抑制 TGF-β 产生和相关的胶原蛋白产生。图 5 显示 PFD 可以抑制 CAF 中 TGF-β 下游的 SMAD 信号通路, p-smad2, p-smad3 磷酸化蛋白明显受到抑制,差异有统计学意义 ($F_{p-smad2} = 193.4, F_{p-smad3} = 575.2, P < 0.05$)。说明 PFD 可能是通过 SMAD 信号通路来抑制胶原蛋白的产生和重塑功能。为了研究 CAF 对肿瘤微环境的影响,进行了 Transwell 实验,收集胆囊 CAF 组,胆管 CAF 组,胆囊 CAF + PFD 组,胆管 CAF + PFD 组的条件培养基,在相同条件下验证患者胆囊癌

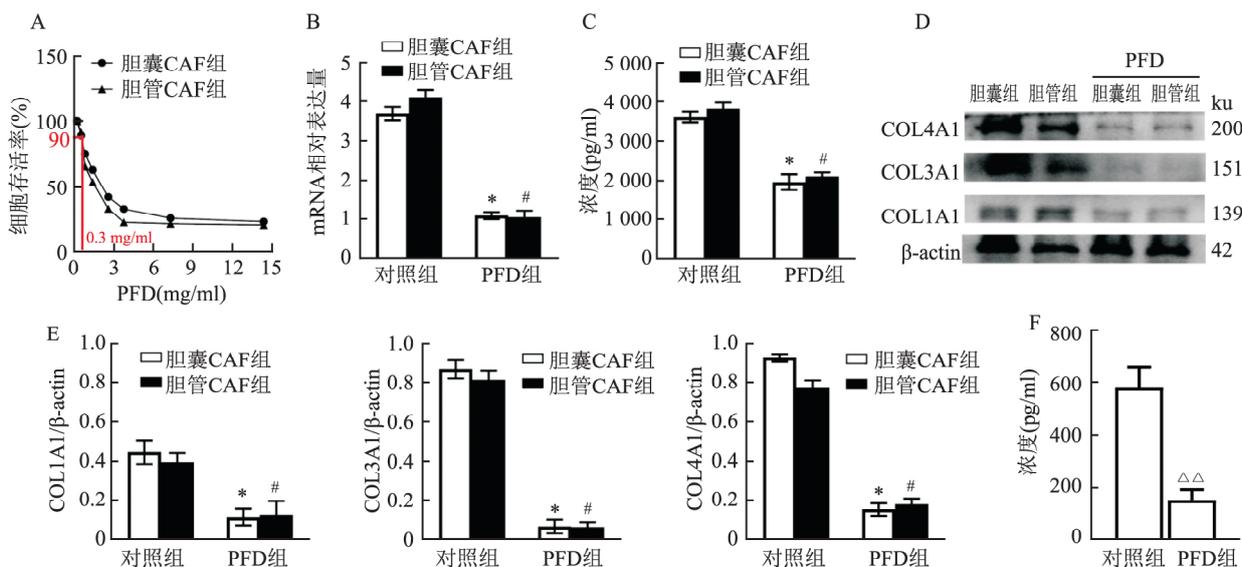


图 3 PFD 抑制 CAF 对 TGF-β 分泌和胶原生成的影响

A: 用 PFD 处理胆囊 CAF 和胆管 CAF 24 h 后胆囊 CAF 和胆管 CAF 的细胞活力; B: 各组细胞 TGF-β 的 mRNA 表达水平; C: 各组细胞 TGF-β 分泌水平; D: 各组 COL1A1, COL3A1 和 COL4A1 蛋白的 Western blot 图; E: 各组 COL1A1, COL3A1 和 COL4A1 半定量分析结果; F: 各组皮下瘤小鼠模型的血清 TGF-β 水平; 与胆囊 CAF 组比较: * $P < 0.05$; 与胆管 CAF 组比较: # $P < 0.05$; 与对照组比较: $\Delta\Delta P < 0.05$

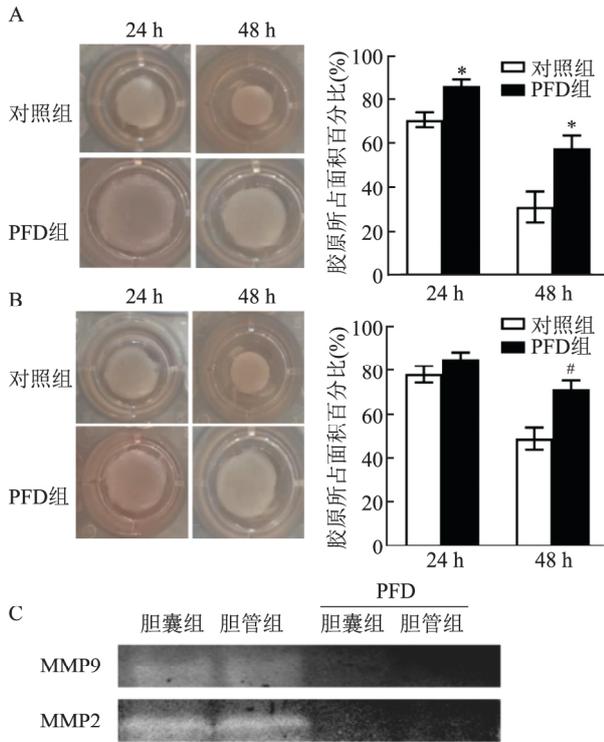


图4 PFD对CAF功能的作用

A: 胆管CAF的胶原收缩试验白光24、48 h; B: 胆管CAF的胶原收缩试验白光24、48 h; C: 明胶酶谱实验; 与胆管CAF对照组比较: * P < 0.05; 与胆管CAF对照组比较: # P < 0.05

GBC-SD 细胞的侵袭能力的变化,结果显示 PFD 能够改变肿瘤微环境从而抑制肿瘤细胞侵袭 (534.82 ± 56.45), 差异有统计学意义 (F = 123.6, P < 0.05)。

3 讨论

肿瘤微环境与肿瘤的发生发展和化疗耐药性密切相关,关系到肿瘤的侵袭功能并且影响肿瘤预后。多数胆囊癌和胆管癌患者术后复发率较高和化疗效果较差,这与肿瘤微环境是密切相关的。伴随对肿瘤微环境的研究增多,研究表明 CAF 是组成肿瘤微环境重要部分,由于 CAF 具有异质性,不同 CAF 的功能具有明显区别。其中注意到胆道肿瘤中的 CAF 具有 myCAF 类似功能,可以通过胶原蛋白的生成和重塑对肿瘤微环境的改变起到重要作用。

在胆囊相关研究中表明胆囊癌的周围组织的肌动蛋白染色百分比与正常相比更高,而肌动蛋白是 myCAF 重要标志。肌动蛋白影响细胞质中应力纤维和束状组织,并且与胶原凝集相关^[7]。在 CAF 的研究中表明 TGF-β 能够激活 CAF 的相关功能从而促进肿瘤细胞的侵袭^[8]。该研究通过提取原代

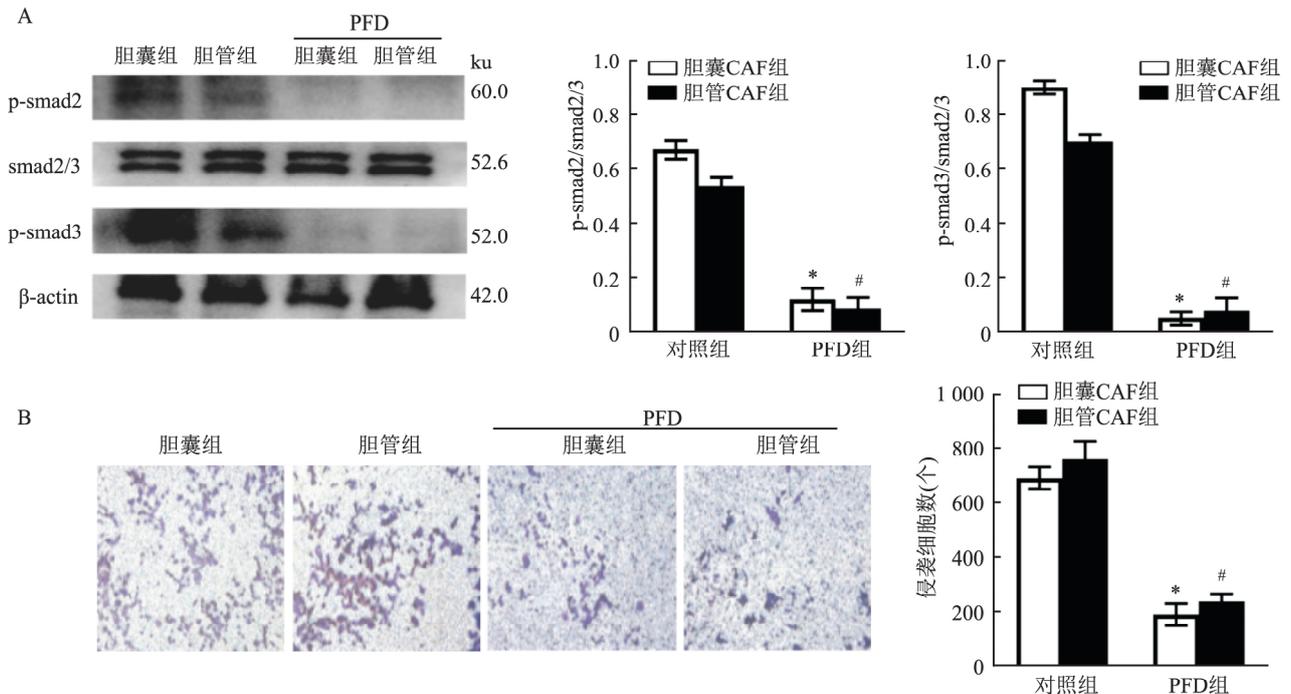


图5 PFD通过SMAD信号通路影响CAF功能及肿瘤微环境

A: 各组细胞 p-smad2、p-smad3 及 smad2/3 蛋白的免疫印迹图; B: Transwell 结晶紫染色 ×100; 与胆管CAF组比较: * P < 0.05; 与胆管CAF组比较: # P < 0.05

CAF 进行了鬼笔环肽实验并且验证了 TGF- β 相关通路蛋白,从而证实了 TGF- β 信号通路在胆道 CAF 中的高表达,说明原代 CAF 具有 myCAF 的类似功能。在胆管癌肿瘤微环境中胶原的改变和重塑最肿瘤侵袭起到了重要作用^[9]。该研究也通过胶原蛋白的 Western blot 实验进行了验证。

PFD 是一类具有广泛的抗纤维化和抗炎特性的药物。PFD 能过通过调节前胶原转录和限制成纤维细胞活化和分化为肌成纤维细胞来减缓纤维化^[6]。Pirfenidone 对不同类型的癌症具有抗肿瘤潜力,在非小细胞肺癌中能提高化疗的敏感性提高肿瘤治疗效果^[10]。肿瘤微环境研究^[11]表明 Pirfenidone 具有通过靶向 CAF 促进乳腺癌细胞上皮间质转化 (EMT) 和干细胞特征的作用。TGF- β 在纤维化中起到了重要作用,通过 Western blot 实验表明 PFD 能明显抑制 CAF 的 TGF- β 分泌。TGF- β 通路主要由 TGF- β 受体介导的 Smad 和非 Smad 信号通路组成。其中,活化的 TGF- β 与 TGF- β 受体 2 结合并激活 TGF- β 受体 1,导致 Smad2 和 Smad3 的磷酸化,磷酸化后形成 Smad 复合物,然后转运到细胞核以调节胶原蛋白和纤连蛋白,影响组织纤维化。

由于 CAF 在肿瘤基质中对恶性肿瘤的发生和发展起到了促进作用。如果能改变胶原生成和胶原重塑的进程,对肿瘤的发生和发展起到抑制作用。其中有对 CAF 选择性缺失 I 型胶原的小鼠的研究表明, I 型胶原在肿瘤微环境中的主导力是 I 型胶原-刚度途径,在 I 型胶原所产生的机械限制与其刚度介导的作用发生变化时, I 型胶原可能对肿瘤的侵袭起到促进作用^[12]。通过 Western blot 实验表明 PFD 能够抑制胶原蛋白的生成,进一步运用胶原收缩和明胶酶谱实验证实 PFD 能够明显改变 CAF 的胶原收缩和重塑功能,这提示 PFD 通过胶原收缩和重塑改变了胶原的机械限制和刚度作用,随后通过 Transwell 实验表明 PFD 能够改变 CAF 这一功能从而抑制肿瘤细胞的侵袭。为了寻求 PFD 的作用机制,验证了 TGF- β 下游通路,最后通过 Western blot 实验证实 PFD 主要是通过抑制 TGF- β 影响下游的 SMAD 信号通路起作用。

综上所述,该研究通过胆囊 CAF 和胆管 CAF 的原代细胞提取,提示在肿瘤微环境下 TGF- β /SMAD 信号通路影响 CAF 的胶原合成,其中 PFD 可以通过抑制 TGF- β 的产生来阻断 SMAD 信号通路

的激活和改变肿瘤微环境从而抑制肿瘤侵袭。

参考文献

- [1] Valle J W, Kelley R K, Nervi B, et al. Biliary tract cancer [J]. *Lancet*, 2021, 397(10272): 428-44.
- [2] hlund D, Handly-Santana A, Biffi G, et al. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer [J]. *J Exp Med*, 2017, 214(3): 579-96.
- [3] 应充慧,朱子诚,孙思勤,等. TGF β 1-Sp1 信号通路靶向调控豚鼠巩膜成纤维细胞分泌与合成胶原表达的研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(5): 677-81.
- [4] Zeltz C, Alam J, Liu H, et al. α 11 β 1 integrin is induced in a subset of cancer-associated fibroblasts in desmoplastic tumor stroma and mediates *in vitro* cell migration [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(6): 765.
- [5] Lee E G, Lee T H, Hong Y, et al. Effects of low-dose pirfenidone on survival and lung function decline in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF): results from a real-world study [J]. *PLoS One*, 2021, 16(12): e0261684.
- [6] Lv Q, Wang J, Xu C, et al. Pirfenidone alleviates pulmonary fibrosis *in vitro* and *in vivo* through regulating Wnt/GSK-3 β / β -catenin and TGF- β 1/Smad2/3 signaling pathways [J]. *Mol Med*, 2020, 26(1): 49.
- [7] Krishnamurthy K, Febres-Aldana C A, Melnick S, et al. Morphological and immunophenotypical analysis of the spindle cell component in adenomyomatous hyperplasia of the gallbladder [J]. *Pathologica* 2021, 113(4): 272-9.
- [8] Huang M, Fu M, Wang J, et al. TGF- β 1-activated cancer-associated fibroblasts promote breast cancer invasion, metastasis and epithelial-mesenchymal transition by autophagy or overexpression of FAP- α [J]. *Biochem Pharmacol* 2021, 188: 114527.
- [9] Chen Z, Guo P, Xie X, et al. The role of tumour microenvironment: a new vision for cholangiocarcinoma [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(1): 59-69.
- [10] Branco H, Oliveira J, Antunes C, et al. Pirfenidone sensitizes NCI-H460 non-small cell lung cancer cells to paclitaxel and to a combination of paclitaxel with carboplatin [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(7): 3631.
- [11] Es H A, Cox T R, Sarafraz-Yazdi E, et al. Pirfenidone reduces epithelial-mesenchymal transition and spheroid formation in breast carcinoma through targeting cancer-associated fibroblasts (CAFs) [J]. *Cancers (Basel)* 2021, 13(20): 5118.
- [12] Bhattacharjee S, Hamberger F, Ravichandra A, et al. Tumor restriction by type I collagen opposes tumor-promoting effects of cancer-associated fibroblasts [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(11): e14.

(下转第 988 页)

colony formation assay were designed for assessing the radiosensitizing effect of Au@ Uio-66-NH₂ nanoparticles on cancer cells; a subcutaneous tumor-bearing mouse model was constructed to evaluate the radiosensitizing effect and biological safety of Au@ Uio-66-NH₂ nanoparticles *in vivo*. **Results** The characterization results demonstrated good stability of Au@ Uio-66-NH₂ NPs in water solutions; the CCK-8 assay showed a more favorable biological safety profile of Au@ Uio-66-NH₂ nanoparticles compared with Au nanoparticles. Meanwhile, the group of Au@ Uio-66-NH₂ nanoparticles combining with radiotherapy had a favorable cell-killing effect; the animal experiment also proved supportive evidence for the radiosensitizing effect and biological safety of Au@ Uio-66-NH₂ nanoparticles *in vivo*. **Conclusion** The toxicity of Au@ Uio-66-NH₂ nanoparticles is significantly lower than that of Au nanoparticles, and it shows obvious radiosensitization effect, which has good clinical application prospects.

Key words Uio-66-NH₂; gold; nanoparticles; breast cancer; radiosensitization

(上接第 981 页)

Pirfenidone inhibits the invasion of biliary tract tumors through cancer associated fibroblast

Wei Yicheng^{1 2 3}, Wang Ziyi⁴, Li Wei⁵, Yin Peihao^{1 2 3 5}

(¹Shanghai Putuo Central School of Clinical Medicine, Anhui Medical University Shanghai 200062;

²The Fifth School of Clinical Medicine, Anhui Medical University Hefei 230032;

³Interventional Cancer Institute of Chinese Integrative Medicine Shanghai University of Traditional Chinese Medicine Shanghai 200062; ⁴School of Pharmacy East China University of Science and Technology Shanghai 200237; ⁵Dept of General Surgery Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine Shanghai 200062)

Abstract Objective To study the mechanism of Pirfenidone (PFD) inhibiting the invasion of biliary tract tumors through cancer associated fibroblasts (CAF). **Methods** Primary CAF were extracted from the tumor tissues of patients with biliary tract tumor, and the marker proteins of CAF, including vimentin (VIM), α -smooth muscle actin (α -SMA) and fibroblast activating protein (FAP) were detected by Western blot. Phalloidin experiment showed the function of fibroblast cytoskeleton. ELISA and Western blot were used to verify the difference of TGF- β expression between normal fibroblasts (NF) and CAF. The functional change of CAF was observed by adding PFD to CAF. The expression of TGF- β in CAF was verified by ELISA, quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blot. The change of TGF- β in serum was verified by subcutaneous tumor mouse model. The change of collagen contractile function in CAF was observed by collagen contractile test. The changes of MMP2 and MMP9 in CAF medium were observed by gelatin enzyme assay. The changes of SMAD signaling pathway protein in CAF were detected by Western blot. **Results** The related marker proteins VIM, α -SMA and FAP of CAF were highly expressed, and the filamentous actin (F-actin) of CAF was abundant. ELISA showed that the expression of TGF- β in CAF was enhanced. Western blot experiment confirmed that CAF had stronger collagen function. Western blot, PCR and related phenomenon experiments showed that PFD could inhibit collagen production and TGF- β expression in CAF. SMAD signaling pathway-related protein experiments demonstrated that PFD could affect tumor invasion by inhibiting TGF- β /SMAD signaling pathway. **Conclusion** The function of CAF extracted from cancer patients is dominated by collagen production, while PFD inhibits the collagen production and collagen remodeling related processes of CAF through TGF- β /SMAD signaling pathway to inhibit tumor invasion.

Key words Pirfenidone; cancer-associated fibroblast; TGF- β /SMAD pathway; gallbladder cancer; cholangiocarcinoma; collagen contraction; invasion