

趋化因子 CXCL1 在增殖期婴幼儿血管瘤组织中表达研究及外源性 CXCL1 对血管瘤干细胞的影响

翟晓玥, 吴瑶, 姜寅, 谢娟, 李红红, 曹东升

摘要 **目的** 探索趋化因子 CXCL1 在增殖期婴幼儿血管瘤 (IH) 中的表达情况及外源性 CXCL1 对血管瘤干细胞 (HemSCs) 的影响。**方法** 免疫组化法检测 CXCL1 在增殖期 IH 标本中的表达情况。通过 CD133 免疫磁珠将 HemSCs 原代细胞从增殖期 IH 组织中分选出。设置 5 组不同浓度的 CXCL1 (0、10、20、50、100 ng/ml) 与 HemSCs 进行共培养, 通过细胞活率、迁移实验研究外源性 CXCL1 对 HemSCs 的影响。**结果** CXCL1 在增殖期 IH 间质组织中表达, 总体表达量低, 但在 IH 瘤内间质组织表达量高于瘤旁间质组织。其中 CXCL1 阳性面积率瘤内 (0.773 ± 0.101)% 相比瘤旁 (0.268 ± 0.081)%, 差异有统计学意义 ($t = 7.843, P < 0.001$)。外源性 CXCL1 促进 HemSCs 增殖, 不同浓度 CXCL1 加入 HemSCs 中培养 24、48、72 h 后, 差异均有统计学意义 ($F = 14.610, P < 0.001; F = 14.430, P < 0.001; F = 5.388, P < 0.01$)。但加入外源性 CXCL1 并不影响 HemSCs 的迁移能力。**结论** CXCL1 在增殖期 IH 瘤内间质表达高于瘤旁间质, 外源性 CXCL1 可促进 HemSCs 增殖。

关键词 趋化因子; CXCL1; 婴幼儿血管瘤; 血管瘤干细胞; 增殖

中图分类号 R 62

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)09-1385-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.008

婴幼儿血管瘤 (infantile hemangiomas, IH) 发生在约 4% ~ 5% 的婴儿中, 是儿童期最常见的良性肿瘤之一^[1], 发病机制不明。虽然大多数 IH 会发生自发性消退, 但根据肿瘤生长的位置不同, 部分 IH 仍会造成功能损害甚至危及生命^[2]。对于有干预指征的患儿宜行早期治疗。IH 是以内皮细胞异常增生和血管结构异常为特征的病变。血管瘤干细胞 (hemangioma stem cells, HemSCs) 被确定为 IH 的细

胞来源^[3]。既往研究^[4-5]中, 通过作用于 HemSCs, 可减少血管生成和促进成脂分化, 为 IH 的治疗提供了新的思路。趋化因子在肿瘤的发生发展中起着重要作用。CXCL1 作为趋化因子的一种, 在肿瘤 (包括肝癌和结肠癌) 的血管生成中发挥重要作用^[6-7]。Yamashita et al^[8] 采用人血管生成抗体阵列膜对增殖期与非增殖期 IH 的血液样本研究发现两者间 CXCL1 具有表达差异, 然而其在增殖期 IH 的组织中的表达尚无报道。该研究目的是探索 CXCL1 在增殖期 IH 组织中的表达情况及其对 HemSCs 的影响, 为 IH 的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 血管瘤病理组织 20 对瘤及瘤旁标本取自 2015 年 1 月—2021 年 6 月在安徽医科大学第二附属医院整形外科手术切除后经病理科确诊为 IH 增殖期的患儿。其中男 7 例, 女 13 例, 年龄 2 ~ 15 个月。本研究获得安徽医科大学第二附属医院伦理委员会批准, 征得患儿家属同意并签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂与仪器 CD133 免疫磁珠试剂盒 (德国 Miltenyi Biotec 公司), ECM 培养基 (美国 Sciencell 公司), PBS (美国 Hyclone 公司), 胎牛血清及胰酶 (美国 Gibco 公司), CXCL1 一抗 (美国 Santa Cruz 公司), 免疫组化试剂盒 (北京中杉金桥有限公司), CXCL1 重组蛋白 (上海生工生物工程股份有限公司), 细胞培养箱和超净台 (美国 Thermo Fisher 公司), 倒置和正置显微镜 (日本 Olympus 公司), 酶标仪 (上海科华生物工程股份有限公司)。

1.2 HemSCs 原代细胞分选 增殖期 IH 组织用 PBS 清洗去除表面血凝块, 用眼科剪和小镊子去除较大脂肪、筋膜组织。然后将剩余组织放入 5 ml 离心管中, 剪成 1 mm³ 大小的组织块, 加入等体积 0.25% IV 胶原酶置于 37 °C 水浴箱中消化 2 h。消化完全后用 200 目的无菌滤膜过滤, 获得单细胞悬液。每 1 × 10⁸ 个细胞加入 100 μl CD133 免疫磁珠充分混合。将细胞悬液加入分选柱中, 收集磁珠结

2022-01-10 接收

基金项目: 安徽省教育厅高校自然科学研究重点项目 (编号: KJ2020A184)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院整形外科, 合肥 230601

作者简介: 翟晓玥, 女, 硕士研究生;

曹东升, 男, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: 756278537@qq.com

合的 CD133 阳性细胞。以 5×10^5 个细胞/孔接种于 500 ng/ml 的纤维连接蛋白包被的 6 孔培养板中,置于 37°C 、5% CO_2 的细胞培养箱内。24 h 后传代接种。

1.3 免疫组化 染片前将石蜡切片脱蜡,枸橼酸钠抗原修复 15 min,过氧化物酶抑制剂处理 15 min,洗涤后破膜 10 min,再次洗涤后用 10% 山羊血清室温封闭 1 h,孵育一抗 CXCL1 后置于暗盒中 4°C 过夜。第 2 天洗涤后用反应增强液 15 min,二抗孵育 15 min 后 DAB 显色,苏木精染色后酒精梯度脱水,自然风干后封片,于正置显微镜下观察拍照。每例组化标本在 400 倍镜下随机取 5 处完整而不重复的视野进行定量分析,测定 CXCL1 蛋白免疫组化反应阳性面积的百分率和平均光密度,取每张切片的均值作为该例的测量值。

1.4 CCK-8 增殖实验 使用 CCK-8 法检测 HemSCs 细胞增殖能力。取对数生长期 HemSCs 细胞,经胰酶(含 0.25% EDTA)处理后用 ECM(含 0、10、20、50、100 ng/ml CXCL1,浓度设置参考 Cui et al^[9],0 ng/ml CXCL1 即为对照组)培养基重悬计数,2 000 个细胞/孔接种于 96 孔板。培养 24、48、72 h 后,每孔加入 CCK-8 20 μl ,细胞培养箱中放置 2 h 后,立刻在设置为 450 nm 波长的酶标仪上测吸光度(optical density, OD)。每组设置 5 个复孔,实验重复 3 次。

1.5 迁移实验 Transwell 小室用于检测 CXCL1 对 HemSCs 细胞迁移能力的影响。24 孔板(Transwell 下室)中每孔加入 500 μl 的 10% FBS ECM 培养基(含 50 ng/ml CXCL1)。上室加入 HemSCs 2.0×10^4 个细胞/孔,每孔加入 150 μl 的 10% FBS ECM 培养基。培养 24、48 h 后,将 24 孔板从培养箱中取出。小室在 4% 多聚甲醛中固定 20 min,棉签擦去上层细胞,PBS 洗涤 2 次。结晶紫染色 15 min 后再洗涤 2 次,棉签擦干后在倒置显微镜下观察拍照。每组设置 3 个复孔,实验重复 3 次。每个迁移小室复孔在 100 倍镜下随机取 3 处完整而不重复的视野进行定量分析,测定迁移细胞数量,取 3 个复孔的均值作为该组的测量值。

1.6 统计学处理 使用 Image J 对免疫组化图片和迁移细胞数量进行定量分析。采用 GraphPad Prism 8.0 对实验数据进行统计学分析及绘图。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用两独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CXCL1 在增殖期 IH 瘤内表达高于瘤旁 对增殖期 IH 标本进行 CXCL1 免疫组化染色发现 CXCL1 在增殖期 IH 间质中表达,血管中无表达,见图 1。总体 CXCL1 表达量不高,但瘤内间质中 CXCL1 表达量高于瘤旁。瘤内 CXCL1 阳性面积率为 $(0.773 \pm 0.101)\%$,而在瘤旁仅占 $(0.268 \pm 0.081)\%$,差异有统计学意义($t = 7.843, P < 0.001$)。瘤内 CXCL1 平均光密度 (1.238 ± 0.099) 高于瘤旁 (0.835 ± 0.150) ,差异有统计学意义($t = 4.487, P < 0.01$)。

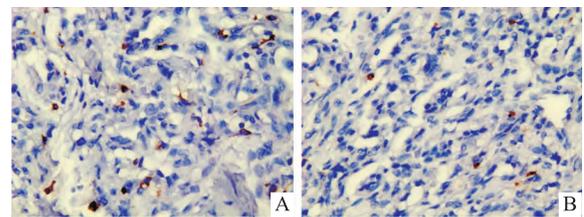


图1 增殖期 IH 免疫组化染色 $\times 400$
A: IH 组织; B: 瘤旁组织

2.2 HemSCs 原代分离和培养 经 CD133 免疫磁珠分选后,所得细胞形态均一,得到 HemSCs 原代细胞纯度较高。接种 4 h 后贴壁,细胞呈长梭形。P3 代培养 24 h 后光镜下拍照,见图 2。

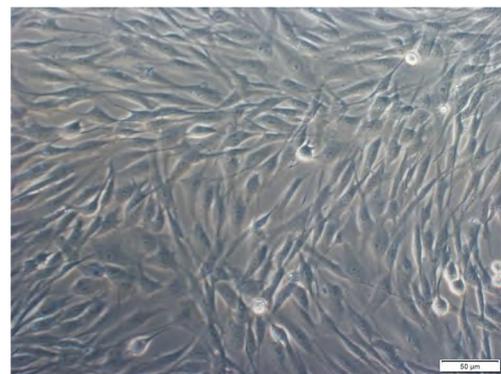


图2 HemSCs 原代细胞培养 $\times 200$

2.3 CXCL1 促进 HemSCs 增殖 设置 5 组重组蛋白 CXCL1 浓度(0、10、20、50、100 ng/ml)与提取的 HemSCs 原代细胞进行增殖实验,实验发现使用外源性 CXCL1 刺激后,HemSCs 细胞数相较于未刺激组增加,且 24、48、72 h 都有差异($F = 14.610, P < 0.001$; $F = 14.430, P < 0.001$; $F = 5.388, P < 0.01$)。

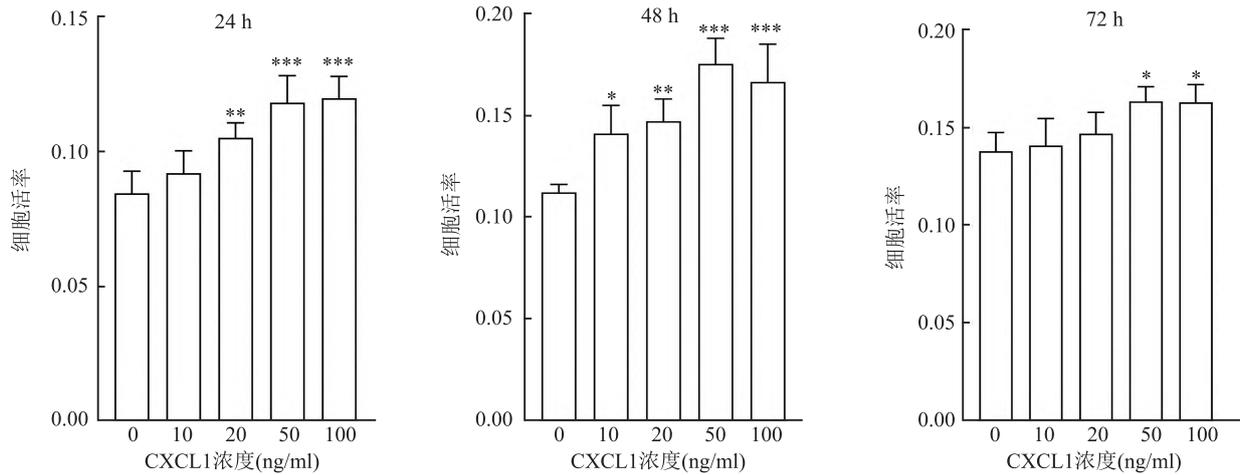


图3 不同浓度 CXCL1 对 HemSCs 的增殖影响

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

比较3个时间点的50和100 ng/ml CXCL1刺激后的细胞增殖率,发现差异无统计学意义($t = 0.261, P > 0.05$; $t = 0.785, P > 0.05$; $t = 0.098, P > 0.05$)。CXCL1促进HemSCs增殖,后续实验使用50 ng/ml作为CXCL1的浓度。见图3。

2.4 CXCL1对HemSCs迁移无影响 采用50 ng/ml CXCL1浓度对HemSCs进行迁移实验,结果发现对照组和CXCL1处理组间细胞数差异无统计学意义。培养24 h后对小室细胞计数统计分析得:对照组细胞数(122.0 ± 10.4)个,CXCL1处理组(127.8 ± 14.9)个,两者比较差异无统计学意义($t = 0.634, P > 0.05$)。培养48 h后对小室细胞计数统计分析得:对照组细胞数(348.8 ± 18.9)个,CXCL1处理组(356.5 ± 16.3)个,两者比较差异无统计学意义($t = 0.622, P > 0.05$)。由此得出CXCL1对HemSCs迁移无影响,见图4、5。

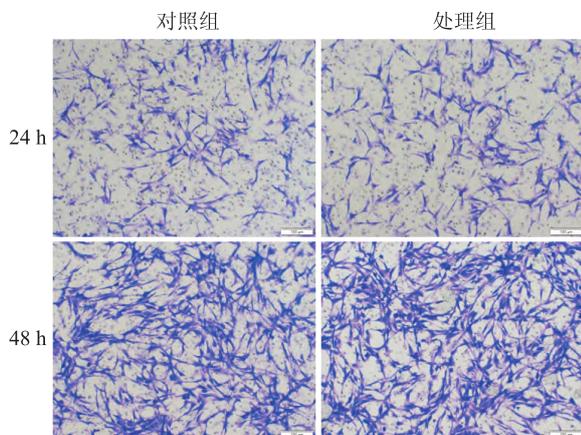
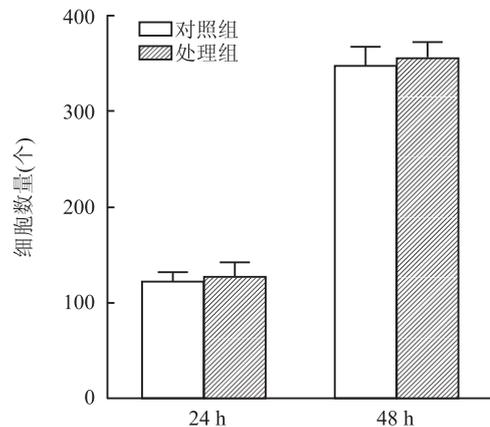
图4 50 ng/ml CXCL1对HemSCs迁移影响 $\times 100$ 

图5 CXCL1处理组与未加CXCL1对照组间迁移细胞数比较

3 讨论

在本研究中经免疫组化发现在增殖期IH组织中瘤内CXCL1蛋白阳性面积率和平均光密度高于瘤旁组织。基因在瘤内和瘤旁的差异性表达是研究疾病的重要依据。CXCL1在肝癌和乳腺癌中都具有瘤内和瘤旁的差异,研究^[9-10]发现CXCL1促进乳腺癌和肝癌细胞的增殖和迁移。趋化因子CXCL1对HemSCs的作用尚无研究。通过CD133免疫磁珠法提取IH组织中的HemSCs原代细胞。当使用外源性CXCL1作用于HemSCs时,与未加CXCL1的对照组比较细胞增殖能力增强。相较于CXCL1对肿瘤的生长和转移的影响,本研究得出外源性CXCL1对HemSCs原代细胞仅有增殖的影响。能否通过抑制CXCL1从而减弱HemSCs的增殖进而抑制增殖期IH的恶性进展有待后续进一步研究。

CXCL1 通过一系列下游通路促进肿瘤的恶性发展。比如通过 ERK/MMP2/9 通路促进乳腺癌的恶性发展^[10],通过 CXCL1 介导的 Akt 磷酸化促进胰腺癌的迁移和侵袭^[11]。CXCL1 对于 HemSCs 增殖作用更详细的机制有待进一步的研究。

综上所述,CXCL1 在增殖期 IH 瘤内间质中表达高于瘤旁间质,外源性 CXCL1 促进 HemSCs 增殖但对迁移无影响。CXCL1 与 HemSCs 间的通路联系及其对 IH 的治疗价值有待后续深入研究。

参考文献

- [1] Krowchuk D P, Frieden I J, Mancini A J, et al. Clinical practice guideline for the management of infantile hemangiomas[J]. *Pediatrics*, 2019,143(1):e20183475.
- [2] Tiemann L, Hein S. Infantile hemangioma: a review of current pharmacotherapy treatment and practice pearls[J]. *J Pediatr Pharmacol Ther*, 2020,25(7):586-99.
- [3] Harbi S, Wang R, Gregory M, et al. Infantile hemangioma originates from a dysregulated but not fully transformed multipotent stem cell [J]. *Sci Rep*, 2016,6: 35811.
- [4] Munabi N C, England R W, Edwards A K, et al. Propranolol targets hemangioma stem cells via cAMP and mitogen-activated protein kinase regulation[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016,5(1):45-55.
- [5] Wu Y, Li H, Xie J, et al. miR-139-5p affects cell proliferation, migration and adipogenesis by targeting insulin-like growth factor 1 receptor in hemangioma stem cells[J]. *Int J Mol Med*, 2020,45(2):569-77.
- [6] Wang D, Sun H, Wei J, et al. CXCL1 is critical for premetastatic niche formation and metastasis in colorectal cancer[J]. *Cancer Res*, 2017,77(13):3655-65.
- [7] Dahlquist K J V, Voth L C, Fee A J, et al. An autocrine role for CXCL1 in progression of hepatocellular carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2020,40(11):6075-81.
- [8] Yamashita T, Jinnin M, Makino K, et al. Serum cytokine profiles are altered in patients with progressive infantile hemangioma[J]. *Biosci Trends*, 2018,12(4):438-41.
- [9] Cui X, Li Z, Gao J, et al. Elevated CXCL1 increases hepatocellular carcinoma aggressiveness and is inhibited by miRNA-200a[J]. *Oncotarget*, 2016,7(40):65052-66.
- [10] Yang C, Yu H, Chen R, et al. CXCL1 stimulates migration and invasion in ER-negative breast cancer cells via activation of the ERK/MMP2/9 signaling axis[J]. *Int J Oncol*, 2019,55(3):684-96.
- [11] Wen Z, Liu Q, Wu J, et al. Fibroblast activation protein α -positive pancreatic stellate cells promote the migration and invasion of pancreatic cancer by CXCL1-mediated Akt phosphorylation[J]. *Ann Transl Med*, 2019,7(20):532.

Study on the expression of chemokine CXCL1 in infantile hemangioma tissues and the effect of exogenous CXCL1 on hemangioma stem cells

Zhai Xiaoyue, Wu Yao, Lou Yin, Xie Juan, Li Honghong, Cao Dongsheng

(Dept of Plastic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To explore the expression of chemokine CXCL1 in proliferative infantile hemangioma (IH), and to study the effect of exogenous CXCL1 on hemangioma stem cells (HemSCs). **Methods** Immunohistochemistry was used to explore the expression of CXCL1 in proliferative IH specimens. Primary HemSCs were isolated from IH tissues by CD133 magnetic beads. 5 groups of CXCL1 with different concentrations (0, 10, 20, 50 and 100 ng/ml) were co-cultured with HemSCs, and the effects of exogenous CXCL1 on HemSCs were studied by cell viability and migration experiments. **Results** CXCL1 was expressed in the interstitial tissues of proliferative IH. The overall expression of CXCL1 in proliferative IH was low, but the expression of CXCL1 in the proliferative IH interstitial tissues was higher than that of the adjacent interstitial tissues. The CXCL1 positive area rate was $(0.773 \pm 0.101)\%$ in the tumor compared with $(0.268 \pm 0.081)\%$ in the adjacent tumor, and the difference was statistically significant ($t = 7.843, P < 0.001$). Exogenous CXCL1 promoted the proliferation of HemSCs, and there were statistical differences after adding different concentrations of CXCL1 to HemSCs for 24, 48, and 72 h ($F = 14.610, P < 0.001$; $F = 14.430, P < 0.001$; $F = 5.388, P < 0.01$). But the exogenous CXCL1 did not affect the migration ability of HemSCs. **Conclusion** The expression of CXCL1 in proliferative IH interstitial tissues is higher than that in adjacent interstitial tissues, and exogenous CXCL1 promotes the proliferation of HemSCs.

Key words chemokine; CXCL1; infantile hemangioma; hemangioma stem cell; proliferation