

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.12.004

肺积方调控补体相关蛋白 CFHR5/MBL2/C9 抑制肺癌细胞迁移、侵袭及动物模型肺转移

罗斌^{1a,2}, 王衍鸿^{1a}, 刘佳君^{1b}, 刘诗卉^{1a}, 陆鑫熠^{1a}, 李佳轩^{1a}, 阙祖俊^{1b}, 田建辉^{1a,b} (1. 上海中医药大学附属市中医医院 a. 肿瘤临床医学中心; b. 肿瘤研究所, 上海 200071; 2. 上海中医药大学附属龙华医院 肿瘤科, 上海 200032)

[摘要] **目的:** 探讨肺积方对肺癌细胞迁移、侵袭及在动物模型中肺转移的影响及其可能的机制。**方法:** 利用 TNMplot 数据库、TCGA 数据库和 DAVID 数据库, 通过网络药理学方法分析补体相关蛋白 CFHR5/MBL2/C9 在肺转移瘤组织中的表达及其与免疫细胞浸润的关系, 以及相关的生物过程和信号通路。建立 2LL 细胞小鼠皮下移植瘤模型, 用 2 g/mL 肺积方汤液灌胃给药, 每次 0.2 mL, 连续干预 21 d, 观察肺积方对模型小鼠肺转移发生率、肺转移灶数目及肺组织 CFHR5/MBL2/C9 蛋白表达的影响。外泌体示踪实验观察 CTC-TJH-01 和 H1299 细胞分泌和吞噬外泌体的能力。采用不同质量浓度的肺积方冻干粉溶液处理 H1299 和 CTC-TJH-01 细胞, 采用 CCK-8、划痕愈合实验、Transwell 实验和 WB 法检测肺积方对肺癌细胞活力、侵袭、迁移和 CFHR5/MBL2/C9 蛋白表达的影响。**结果:** 网络药理学分析结果提示, CFHR5/MBL2/C9 蛋白在肺转移组织中呈高表达 ($P < 0.05$) 且与调控免疫应答中的补体系统密切相关。与对照组相比, 肺积方组模型小鼠的肺转移灶数量显著减少 ($P < 0.05$)。0~200 $\mu\text{g/mL}$ 肺积方对 H1299 和 CTC-TJH-01 细胞的活力均无显著影响 (均 $P > 0.05$)。CTC-TJH-01 和 H1299 细胞均可分泌并吞噬对方的外泌体。与 0 $\mu\text{g/mL}$ 肺积方对照组相比, 50~200 $\mu\text{g/mL}$ 肺积方组 H1299 和 CTC-TJH-01 细胞的迁移和侵袭能力均显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 细胞中的 CFHR5 和 MBL2 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中 CTC-TJH-01 细胞在 200 $\mu\text{g/mL}$ 肺积方溶液处理后 C9 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)。**结论:** 肺积方能够通过调控补体相关蛋白 CFHR5/MBL2/C9 抑制肺癌细胞的迁移和侵袭及模型小鼠的肺转移, 这可能与外泌体介导的细胞间通信有关。

[关键词] 肺积方; 肺癌; 转移; 外泌体蛋白; 补体系统

[中图分类号] R734.2; R730.52; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024) 12-1194-10

Feiji Formula inhibits the migration and invasion of lung cancer cells and lung metastasis in animal models by regulating complement-related proteins CFHR5/MBL2/C9

LUO Bin^{1a,2}, WANG Yanhong^{1a}, LIU Jiajun^{1a}, LIU Shihui^{1a}, LU Xinyi^{1a}, LI Jiaxuan^{1a}, QUE Zujun^{1b}, TIAN Jianhui^{1a,b} (1. a. Clinical Oncology Center; b. Cancer Research Institute, Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071, China; 2. Department of Oncology, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Feiji Formula on the migration and invasion of lung cancer cells, as well as lung metastasis in animal models and explore its possible mechanisms. **Methods:** TNMplot, TCGA, and DAVID databases were used to analyze the expression of complement-related proteins (CFHR5 [complement factor H-related protein 5], MBL2 [mannose-binding lectin 2], C9 [complement component 9]) in lung metastatic tissues and their relationship with immune cell infiltration, as well as related biological processes and signaling pathways. A subcutaneous xenograft mice model was established using 2LL cells. Mice were administered 2 g/mL Feiji Formula decoction (0.2 mL per dose) *via* oral gavage for 21 days. The effects of Feiji Formula on the incidence of lung metastasis, the number of lung metastatic nodules, and the protein expression of CFHR5/MBL2/C9 in the lung tissues of the model mice were observed. Exosome tracing assay was performed to observe the secretion and uptake of exosomes

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目 (No. 82104943); 国家自然科学基金面上项目 (No. 82174245); 上海市卫生健康委员会领军人才基金 (No. 2022LJ014); 上海市炎癌转化病证生物学前沿研究基地项目 (No. 2021 科技 03-12); 岐黄工程·第五批全国中医临床优秀人才项目 [No. 国中医药人教函 (2022) 239 号]

[作者简介] 罗斌 (1990—), 男, 医学博士, 主治医师, 从事中医药调控免疫防治肺癌的临床与基础研究。E-mail: luo2014bin@163.com

[通信作者] 田建辉, E-mail: tjhhawk@shutcm.edu.cn

by CTC-TJH-01 and H1299 cells. Different concentrations of Feiji Formula were applied to treat H1299 and CTC-TJH-01 cells, and its effects on cell viability, invasion, migration, and CFHR5/MBL2/C9 protein expression were detected by CCK-8, scratch healing assay, Transwell assay, and WB method. **Results:** Network pharmacology analysis showed that CFHR5/MBL2/C9 proteins were highly expressed in lung metastatic tissues (all $P < 0.05$) and were closely related to the complement system involved in immune response regulation. Compared with the control group, the Feiji Formula group demonstrated a significant reduction in the number of lung metastatic nodules ($P < 0.05$). Feiji Formula (0-200 $\mu\text{g/mL}$) had no significant effect on the viability of H1299 and CTC-TJH-01 cells (both $P > 0.05$). Both CTC-TJH-01 and H1299 cells could secrete and uptake each other's exosomes. Compared with the 0 $\mu\text{g/mL}$ control group, Feiji Formula at concentrations of 50-200 $\mu\text{g/mL}$ significantly inhibited the migration and invasion abilities of H1299 and CTC-TJH-01 cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and significantly reduced the protein expression levels of CFHR5 and MBL2 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Notably, the expression level of C9 protein in CTC-TJH-01 cells increased only after treatment with 200 $\mu\text{g/mL}$ Feiji Formula ($P < 0.05$). **Conclusion:** Feiji Formula can inhibit the migration and invasion of lung cancer cells as well as lung metastasis in model mice by regulating complement-associated proteins CFHR5/MBL2/C9. This effect may be related to exosome-mediated intercellular communication.

[Key words] Feiji Formula; lung cancer; metastasis; exosome proteins; complement system

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(12): 1194-1203. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.12.004]

在中国,肺癌的发病与病死人数均居恶性肿瘤首位,而转移是导致肺癌患者死亡的首要原因^[1-2]。随着液体活检技术的进步,逐渐证实外泌体参与了肿瘤细胞与靶器官之间的信息交流,并且参与形成靶器官的免疫抑制微环境^[3-5],为肿瘤细胞(种子)的定殖营造适应性的环境(土壤)。笔者团队前期的临床研究^[6]发现一组外泌体蛋白:补体因子H相关蛋白5(complement factor H-related protein 5, CFHR5)/补体成分9(complement component 9, C9)/甘露糖结合凝集素2(mannose-binding lectin 2, MBL2),可以预测肺癌的远端转移,并且在晚期患者中高表达,与患者的生存期密切相关。随着固有免疫系统在肿瘤免疫研究中的重要性逐渐凸显,补体系统在肿瘤防治中的作用也被重视起来^[7]。研究^[8-10]发现,CFHR5/C9/MBL2可以通过调节补体系统的经典途径、凝集素途径、旁路途径影响机体的免疫应答。肺积方是笔者所在团队临床中治疗肺癌转移的经验方,在临床与基础研究^[11-13]中均发现肺积方可以抑制肺癌的发生与发展,提高患者的生活质量。肺积方是否通过调控补体系统抑制肺癌转移尚不明确,本研究通过数据库分析和体内外实验进一步明确肺积方通过CFHR5/C9/MBL2蛋白对肺癌细胞恶性生物学行为的影响,为临床应用肺积方调节免疫系统防治肺癌提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 实验动物

雄性C57BL/6J小鼠16只,5~6周龄,体质量(20 ± 5)g,购自江苏集萃生物科技股份有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(苏)2023-0009]。实验动物饲养于上海中医药大学附属上海市中医医院无特定病原体(SPF)

级实验动物中心[实验动物使用许可证号:SYXK(沪)2020-0014]。实验动物饲养条件为恒温、恒湿(温度约24℃,湿度约60%),灯光每12h昼夜交替;摄食和饮水充足供给,垫料每3d更换1次,在SPF环境适应性饲养1周。研究方案经上海中医药大学附属上海市中医医院实验动物福利与伦理委员会审核批准(伦理审批号:2023012)。动物实验操作符合国家级及本院实验动物中心动物研究管理条例规定。

1.1.2 细胞

CTC-TJH-01细胞系由本研究组构建^[14],已入库中国典型培养物保藏中心(武汉);小鼠Lewis肺癌细胞(2LL细胞系)、H1299细胞系均购自中国科学院细胞库(上海)。细胞均常规培养。

1.1.3 肺积方冻干粉制备

肺积方由生黄芪30g、山慈菇15g、重楼30g、北沙参15g、鱼腥草15g、天冬15g、石上柏15g、石见穿15g、麦冬15g、茯苓15g、夏枯草15g、女贞子15g组成,实验所用饮片均购于上海市中医医院,所购生药均由GAP认证的基地生产,由上海市中医医院药剂科进行质量控制并制备成冻干粉,置于4℃冰箱保存,使用时用生理盐水溶解。

1.1.4 主要试剂与耗材

主要试剂:苏木精-伊红染液(C200401)购自珠海贝索生物技术有限公司,BCA定量试剂盒(ZJ101)和SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(PS105)均购自上海雅酶生物科技有限公司,C9抗体(DF3964)和MBL2抗体(DF4152)均购自Affbiotech公司,CFHR5抗体(GTX109982)购自GeneTex公司, β -actin抗体(ET1702)购自杭州华安生物技术有限公司,DAB显色试剂盒(DA1010)购自北京索莱宝科技有限公司,甲酸(A117)购自美国Thermo Fisher Scientific公司,RIPA裂解液(P0013c)购自碧云天生物技术有限公司

司,二硫苏糖醇(43819-5G)购自美国 Sigma 公司,BSA(A0332)购自上海生工生物工程有限公司,Trypsin(V5117)购自美国 Promega 公司,DAPI(C0020)购自 Affinity Biosciences 公司,CCK-8 试剂盒(CK04)购自日本同仁化学公司,ECL 化学发光试剂盒(SB-WB012)购自上海圣尔生物科技有限公司,外泌体示踪试剂盒(ESQ-G-001)购自华盈生物公司。

主要耗材:细胞计数板(80816)购自德国 IBIDI 公司,胰蛋白酶(T6325)购自上海麦克林生化科技有限公司,胎牛血清(1809249)购自以色列 BI 公司,DMEM 培养液(10-013-CVRC)和侵袭试剂盒/Transwell 小室均购自美国 CORNING 公司,青链霉素(SV30010)购自美国 Hyclone 公司,DMSO(D806647)购自上海麦克林生化科技有限公司。

1.1.5 主要仪器

罗氏细胞计数分析仪(Cedex XS)购自瑞士 Roche 公司,恒温细胞培养箱(MCO-18AIC)购自日本 SANYO 公司,石蜡切片机(RM2125RTS)购自德国 Leica 公司,化学发光成像仪(Tanon 5200)购自上海天能科技有限公司,多功能酶标仪(Synergy H4)购自美国 Biotek 公司,倒置荧光显微镜(DMI3000B)购自德国 Leica 公司,高速冷冻离心机(5804R/5418R)购自德国 Eppendorf 有限公司,超声破碎仪(JY96-II N)购自宁波新芝生物科技有限公司,MP Fastprep-24 匀浆仪(MP Fastprep-24 5G)购自美国 MP 公司,电子天平(AX324Z)购自上海奥豪斯国际贸易有限公司,全自动病理切片扫描仪(KF-PRO-120)购自宁波市江丰生物信息技术有限公司。

1.2 建立 2LL 细胞小鼠皮下移植瘤模型并观察肺积方对肺转移的影响

参照本课题组既往建立的方法^[15]造模。将对数生长期 2LL 细胞以 1×10^7 个/mL 混悬于无血清培养液,取 0.1 mL,采用胰岛素注射针经皮下注射至小鼠右侧腋下,建立小鼠皮下移植瘤肺转移模型。

造模第 7 天,将小鼠随机分为肺积方组和生理盐水对照组,每组 8 只。根据人-动物药物换算系数计算得到实验动物用药剂量为 2 g/mL,将肺积方冻干粉溶解成 2 g/mL 的汤液,每次灌胃给药 0.2 mL,连续干预 21 d。治疗结束后,采用 2% 戊巴比妥钠对小鼠进行麻醉,取出双肺,于显微镜下观察肺转移情况并计数转移灶数量,剪取部分组织放入 4% 多聚甲醛溶液中进行固定,备用。

1.3 CCK-8 法检测肺积方对 CTC-TJH-01 和 H1299 细胞活力的影响

收集对数生长期的 CTC-TJH-01 和 H1299 细胞,PBS 清洗 1 次,用配制的培养液[45 mL DMEM + 5 mL

FBS + 500 μ L 双抗($\times 100$)]调整细胞密度为 3×10^4 个/mL,取 100 μ L 加入 96 孔板中(3×10^3 个细胞/孔),放置在培养箱中培养 24 h 后,加入不同质量浓度(0、50、100、200、400、800 μ g/mL)的肺积方溶液,药物作用 48 h 后,再在每孔中加入 20 μ L CCK-8 溶液,继续培养 2 h,最后用酶标仪在 450 nm 波长下检测光密度(D)值,计算细胞存活率。细胞存活率=(实验组 D 值 - 空白组 D 值)/(对照组 D 值 - 空白组 D 值) \times 100%。实验重复 3 次。

1.4 Transwell 实验检测肺积方对 CTC-TJH-01 和 H1299 细胞侵袭、迁移的影响

侵袭实验:从 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中取出侵袭小室试剂盒,放到 24 孔板内并放置在室温环境中,待其恢复室温后分别在上室和下室中加 500 μ L 的无血清 DMEM 培养液,在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中放置 2 h 使 Matrigel 基质胶再水化。将 CTC-TJH-01 和 H1299 细胞进行培养、消化,用无血清培养液重悬细胞并调节至 1.6×10^5 个/mL,然后将 750 μ L 含 20% FBS 的含药培养液加到地下室,上室中加入 500 μ L 含药细胞悬液,置于培养箱中继续培养 16 h 后取出,弃去培养液,将小室置于带有 4% 多聚甲醛的 24 孔板中固定 10~15 min,弃去液体后用吉姆萨染液染色 5 min 后用清水轻洗,使用棉签棒轻轻除去小室内侧细胞,室温晾干小室。在显微镜下随机拍摄 5 个视野,计数侵袭细胞并行统计分析。迁移实验中上室不预铺 Metrigel 基质胶,其余步骤与侵袭实验相同。实验重复 3 次。

1.5 划痕愈合实验检测肺积方对 CTC-TJH-01 和 H1299 细胞迁移的影响

将 CTC-TJH-01 和 H1299 细胞接种于 6 孔板中(1×10^6 个/孔),在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 细胞培养箱中培养,形成覆盖孔底部合的单层细胞后,弃培养液并用 200 μ L 的移液器吸头尖端垂直于孔板轻轻划出垂线,形成交叉点,作为固定检测点,用冷 PBS 轻轻冲洗 2 次,加入不同质量浓度的肺积方溶液和无血清培养液后放入培养箱,24 h 后使用倒置显微镜观察细胞迁移情况,迁移率=[(初始划痕宽度-最终划痕宽度)/初始划痕宽度] \times 100%。上述实验重复 3 次。

1.6 WB 法检测肺积方溶液对 CTC-TJH-01 和 H1299 细胞中 CFHR5/C9/MBL2 蛋白表达的影响

将不同剂量肺积方溶液干预后的 CTC-TJH-01 和 H1299 细胞,使用冰 PBS 洗 1 遍,加入 RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min 后将裂解后的细胞吹下,转移至离心管,4 $^{\circ}$ C 下离心、收集上清液。BCA 法测定总蛋白量,各孔取 20 μ g 的蛋白制备上样溶液。根据试剂盒操作说明,配制 10% 分离胶及 5% 浓缩胶进行蛋白分离(浓缩胶电压 80 V、30 min,分离胶电压 120 V、

45 min)。将电泳分离后的蛋白质电转移(360 mA 电流 90 min)至甲醇活化的PVDF膜。转膜完成后,加入5% BSA封闭1 h,封闭后加入一抗:CFHR5、C9和MBL2抗体溶液(均1:1 000稀释),4℃摇床反应过夜;TBST洗膜5次,每次8 min,加入二抗IgG抗体溶液(1:2 500)室温摇床内反应90 min, TBST洗膜5次,每次8 min。根据ECL化学发光试剂盒制备显色混合液,将PVDF膜浸泡在显色液中数秒后,放在凝胶成像系统中显影并采集条带图像,采用Image J软件对目的蛋白和内参蛋白条带进行分析,计算条带灰度值。实验重复3次。

1.7 外泌体示踪实验观察CTC-TJH-01和H1299细胞分泌和吞噬外泌体的能力

根据外泌体示踪试剂盒的操作说明进行外泌体的提取、纯化与示踪实验检测。(1)外泌体提取:将CTC-TJH-01和H1299细胞用无血清培养基培养48 h后收集细胞上清液,离心去除细胞碎片和未贴壁的细胞(3 000 × g, 15 min),然后使用超速离心法在200 000 × g的离心力下离心120 min,以沉淀外泌体。(2)PKH26染色法标记外泌体:首先使用BCA浓度测定法确定外泌体蛋白量,然后将PKH26荧光染料用缓冲液按1:25稀释制备等体积的2 × 染色工作液(现配现用),将外泌体悬液与染色工作液按1:1体积混合,室温避光反应5 min,然后室温离心(1 000 × g, 2 min)纯化外泌体。(3)共培养:将来自CTC-TJH-01细胞的荧光标记外泌体加入H1299细胞培养体系中(Exo⁺组),同时将来自H1299细胞的荧光标记外泌体加入CTC-TJH-01细胞培养体系中(Exo⁺组),向细胞加入等量PBS作为对照(Exo⁻组),最后使用荧光显微镜观察荧光富集与分布情况。

1.8 IHC法检测肺积方对荷瘤小鼠肺组织中CFHR5/C9/MBL2蛋白表达的影响

将固定的肺组织进行石蜡包埋切片。切片置于60℃烤箱2 h后,于二甲苯中浸泡3次,每次10 min。梯度乙醇水化,将切片置于柠檬酸抗原修复液中,微波炉加热煮沸30 min,进行抗原修复,而后静置2 h以上,使其降至室温。PBS洗涤3次,每次5 min。在室温下用3% H₂O₂处理25 min, PBS洗涤3次,每次5 min。将水擦干,使用免疫组化笔圈出组织部位,滴5% BSA封闭1 h,随后去除BSA,滴加CFHR5、MBL2、C9抗体溶液(均1:100稀释),4℃过夜;再次洗涤后加入HRP标记的IgG二抗,37℃作用1 h,然后根据DAB试剂盒操作说明书进行显色,洗涤后进行苏木精覆盖,再次洗涤后浸入1%盐酸乙醇进行分化1~3 s,经氨水返蓝、流水清洗、乙醇脱水后,使用中性树脂封片,用数字病理切片扫描仪扫描,使用Image-Pro

Plus 6.0软件统计阳性细胞的D值,进行统计分析。

1.9 生物信息学方法挖掘在肺癌转移中CFHR5/C9/MBL2相关的疾病-靶点与免疫系统网络系统

采用TNMplot数据库(<https://tnmplot.com/analysis/>)评估CFHR5/C9/MBL2的mRNA在肺癌和肺转移瘤中的表达。下载并整理TCGA数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov>)中肺癌项目STAR流程下的RNAseq数据,提取FPKM格式的数据以及临床数据(去除正常+去除无临床信息),使用log₂(value+1)函数处理数据。基于R包-GSVA[1.46.0]中提供的ssGSEA算法^[16],根据文献^[17]中免疫细胞的标志物来计算CFHR5/C9/MBL2对应免疫浸润的情况;将CFHR5/C9/MBL2导入DAVID数据库,选择物种为homo sapiens,将gene symbol转换为gene ID,再将gene ID输入到KOBAS网站,对CFHR5/C9/MBL2进行GO功能分析和KEGG通路富集分析,明确其生物学意义。

1.10 统计学处理

实验数据采用GraphPad Prism 8.0软件进行数据统计分析。符合正态分布的计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用t检验进行两两比较;数据服从正态分布时,采用单因素方差分析进行组间差异比较;当数据不服从正态分布时,采用秩和检验。方差齐时采用最小显著差法进行两两比较;方差不齐时,采用Games-Howell法进行两两比较。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

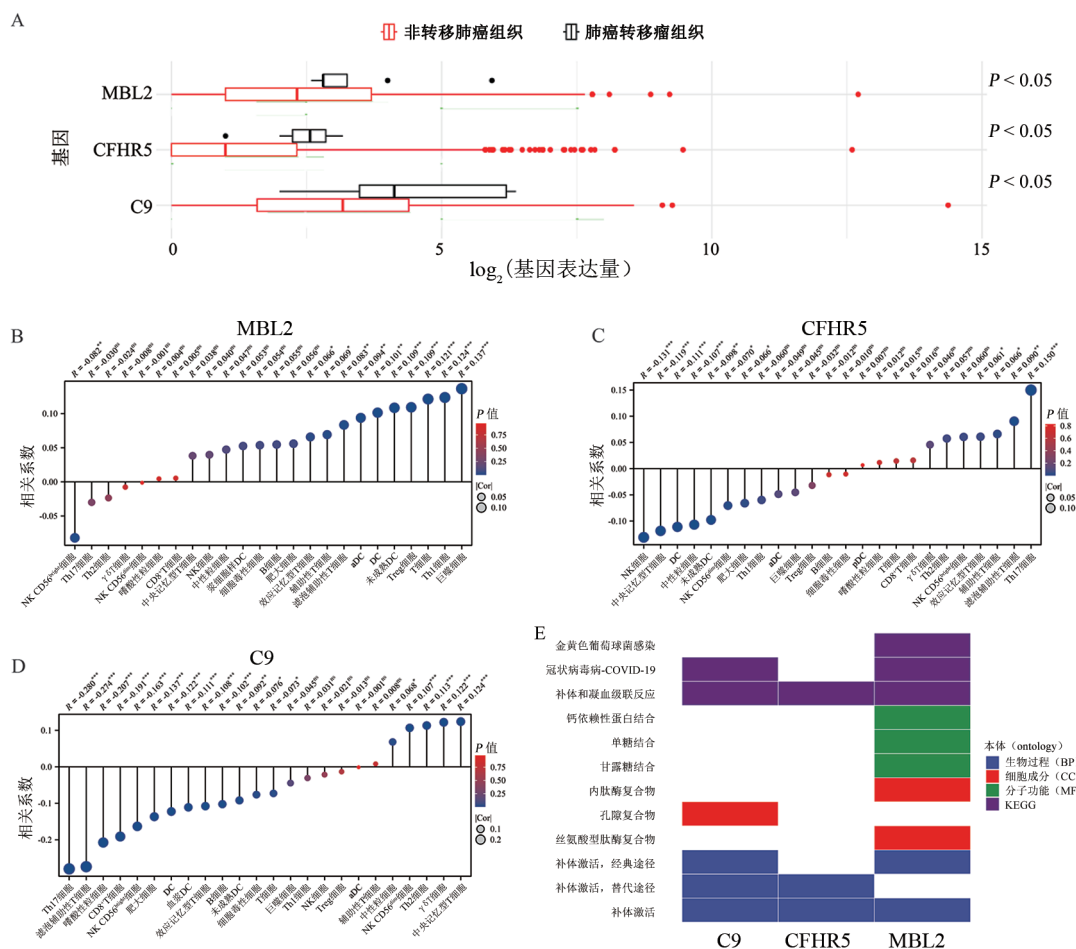
2.1 CFHR5/C9/MBL2基因在肺转移瘤组织中呈高表达且与补体功能有关

基于TNMplot工具分析肺癌(非转移与转移)患者组织中CFHR5/C9/MBL2基因在RNA水平的表达,结果(图1A)显示,肺转移瘤组织中CFHR5/C9/MBL2的mRNA表达水平均明显高于原发肺癌组织($P < 0.05$);分析CFHR5/C9/MBL2的表达与肺组织中免疫细胞浸润的关系,结果(图1B-D)显示,在肺癌中CFHR5/C9/MBL2与DC(及其亚群)、T细胞(及其亚群)、巨噬细胞、肥大细胞、中性粒细胞,以及Th1、Th2、Th17细胞等免疫细胞和细胞因子具有密切关系。

对CFHR5/C9/MBL2基因进行GO和KEGG富集分析。GO分析结果提示,在生物过程中,主要与补体和血液凝固级联反应(complement and coagulation cascade)、金黄色葡萄球菌感染及冠状病毒疾病-COVID-19相关,提示上述蛋白主要验证与免疫应答方面发挥生物学作用;在分子功能方面,与钙依赖性蛋白质结合(calcium-dependent protein binding)、单

糖结合 (monosaccharide binding) 以及甘露糖结合 (mannose binding) 密切相关, 提示上述蛋白与钙离子调控及糖类结合过程发挥作用; 而细胞组分富集分析结果显示, 差异表达基因主要集中在内肽酶复合物 (endopeptidase complex)、孔复合物 (pore complex)、丝氨酸型肽酶复合物 (serine-type peptidase complex), 提示这些基因在蛋白质水解过程

中具有重要作用。KEGG 信号通路富集分析表明, CFHR5/C9/MBL2 主要在补体激活的经典途径 (classical pathway of complement activation) 与替代途径 (alternative pathway of complement activation) 信号通路中存在显著表达 (图 1 E), 提示上述差异基因主要在免疫应答的补体激活途径中发挥作用。

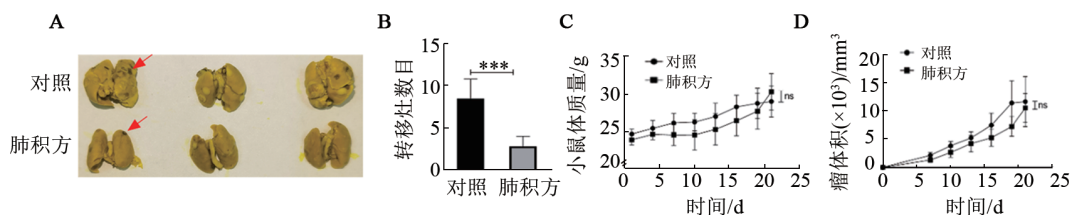


A: TNMplot 工具分析 CFHR5/C9/MBL2 的 RNA 在肺癌 (非转移与转移) 患者组织中的表达; B~D: 分析 CFHR5/C9/MBL2 的表达与肺组织中免疫细胞浸润的关系; E: CFHR5/C9/MBL2 基因的 GO 和 KEGG 富集分析结果。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; ns: $P > 0.05$ 。

图 1 CFHR5/MBL2/C9 在肺癌组织中的表达情况及疾病-靶点挖掘

2.2 肺积方抑制皮下移植瘤肺转移模型小鼠的肺转移在显微镜下计数治疗组与对照组的肺转移灶数目, 与对照组相比, 治疗组的肺转移灶数目明显减少

($P < 0.05$); 与对照组相比, 治疗组小鼠的体质量和移植瘤体积在第 21 天时无显著差异 (均 $P > 0.05$, 图 2)。



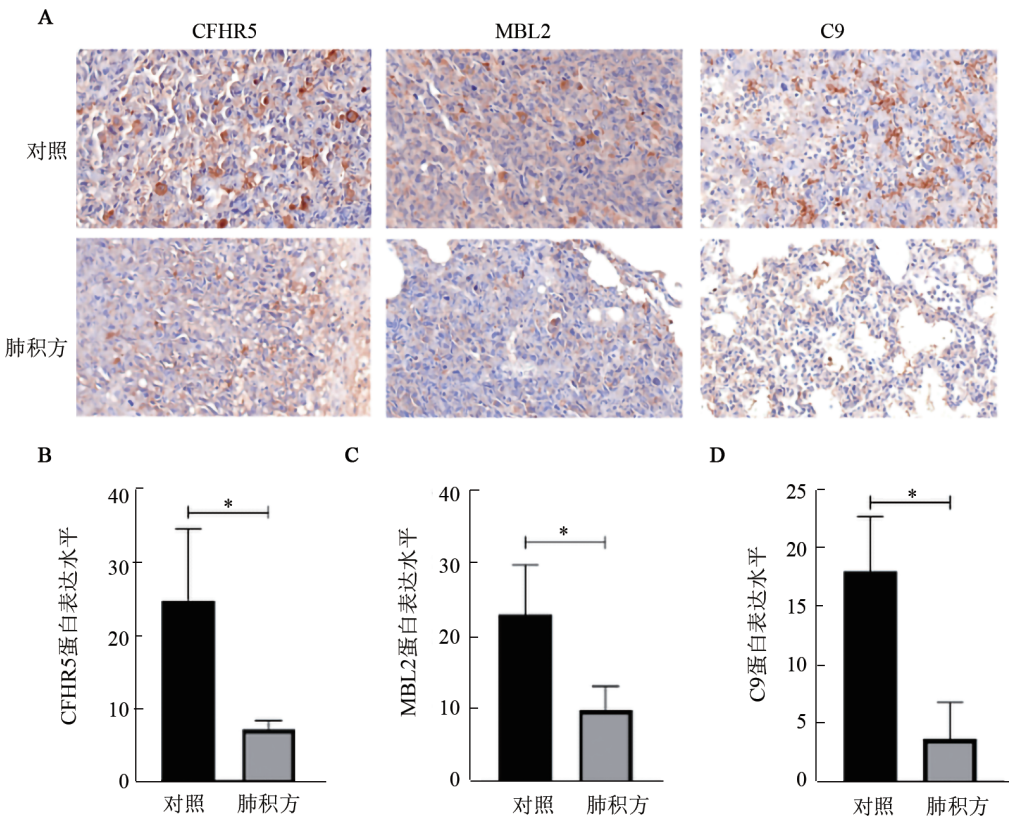
*** $P < 0.001$, ns: $P > 0.05$ 。

图 2 肺积方对尾静脉肺转移模型小鼠肺脏转移的防治作用

2.3 肺积方显著降低荷瘤小鼠肺组织中CFHR5、MBL2、C9蛋白的表达

IHC法检测结果(图3)显示,与对照组相比,治疗

组荷瘤小鼠肺组织中CFHR5、MBL2、C9蛋白的表达均显著降低(均 $P < 0.05$)。



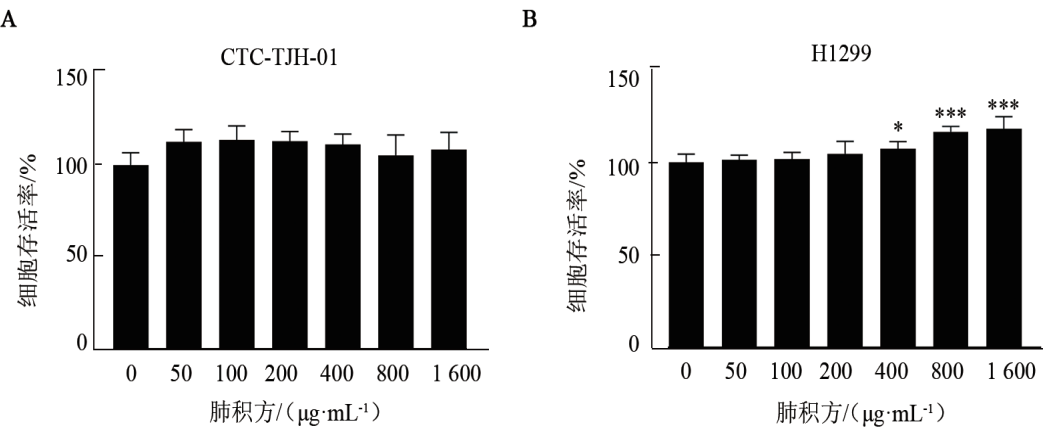
A: IHC法检测小鼠肺组织中外泌体蛋白CFHR5/MBL2/C9蛋白的表达($\times 200$); B~D: CFHR5(B)、MBL2(C)、C9(D)蛋白表达数据统计。* $P < 0.05$ 。

图3 肺积方治疗能够抑制荷瘤小鼠肺组织中外泌体蛋白CFHR5、MBL2、C9的表达

2.4 肺积方不影响CTC-TJH-01和H1299细胞的增殖

CCK-8实验检测结果显示,不同剂量肺积方处理CTC-TJH-01细胞48 h后,细胞活力无显著差异(图4A),而在高质量浓度(400~1 600 $\mu\text{g/mL}$)时,

H1299细胞存活率较0 $\mu\text{g/mL}$ 组显著上升($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$,图4B)。说明1~1 600 $\mu\text{g/mL}$ 肺积方溶液对CTC-TJH-01和H1299细胞增殖均无明显的抑制作用。



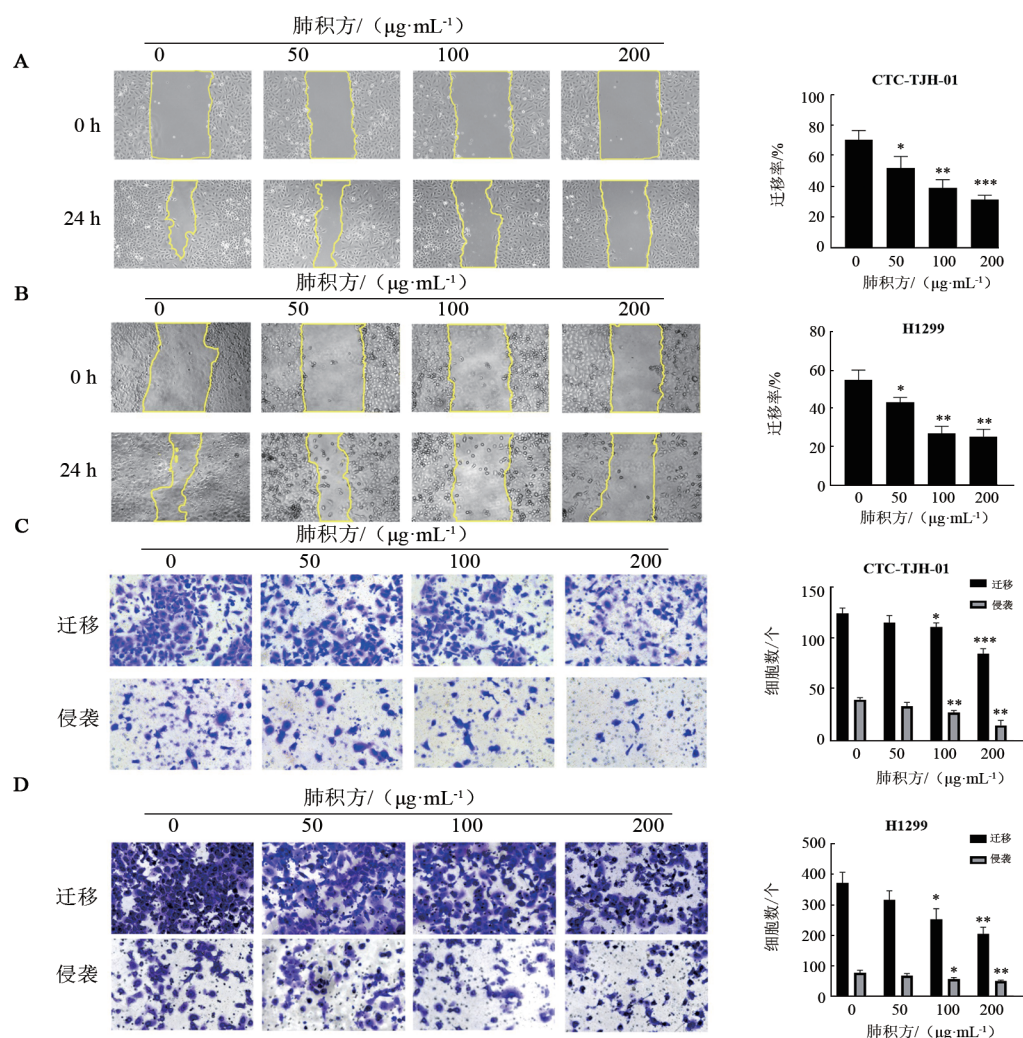
与0 $\mu\text{g/mL}$ 组相比,* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ 。

图4 不同剂量肺积方溶液对CTC-TJH-01(A)和H1299(B)细胞增殖的影响

2.5 肺积方抑制 CTC-TJH-01 和 H1299 细胞的侵袭和迁移

划痕愈合实验检测结果(图 5A、B)显示,与对照组(0 $\mu\text{g/mL}$)相比,50 $\mu\text{g/mL}$ 的肺积方溶液明显抑制 CTC-TJH-01 和 H1299 细胞的迁移($P < 0.05$),随着药

物质质量浓度的增加,其抑制作用逐渐增强($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。Transwell 实验检测结果(图 5C、D)显示,100、200 $\mu\text{g/mL}$ 的肺积方溶液对 CTC-TJH-01 和 H1299 细胞的迁移和侵袭均具有明显的抑制作用($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。



与 0 $\mu\text{g/mL}$ 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A、B: 划痕愈合实验检测不同剂量肺积方对 CTC-TJH-01(A) 和 H1299 细胞(B) 迁移能力的影响($\times 200$); C、D: Transwell 实验检测不同剂量肺积方对 CTC-TJH-01(C) 和 H1299 细胞(D) 侵袭、迁移能力的影响($\times 200$)。

图5 不同质量浓度肺积方对 CTC-TJH-01 和 H1299 细胞侵袭迁移作用的研究

2.6 CTC-TJH-01 和 H1299 细胞能够分泌并吞噬外泌体

外泌体示踪实验检测结果(图6)显示, CTC-TJH-01 细胞分泌的外泌体可被 H1299 细胞吞噬, 而 H1299 细胞分泌的外泌体可被 CTC-TJH-01 细胞吞噬, 被吞噬的外泌体主要分布在细胞质。

2.7 肺积方抑制 CTC-TJH-01 和 H1299 细胞 CFHR5、C9 和 MBL2 蛋白的表达

WB 法检测结果(图7)显示, 与 0 $\mu\text{g/mL}$ 肺积方对照组相比, 50~200 $\mu\text{g/mL}$ 肺积方溶液对 H1299 细

胞中 C9 蛋白的表达无显著影响, 而 CTC-TJH-01 细胞经 200 $\mu\text{g/mL}$ 肺积方溶液处理后其 C9 蛋白的表达水平显著上升($P < 0.05$); 50~200 $\mu\text{g/mL}$ 肺积方对 CTC-TJH-01 和 H1299 细胞中的 CFHR5 和 MBL2 蛋白均具有下调作用($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而且随着肺积方质量浓度的增加, 其抑制作用愈加显著。

3 讨论

肺癌细胞外泌体可以通过血液循环进入靶器官, 改变其免疫微环境, 参与恶性肿瘤的转移^[18-20]。

笔者所在团队前期研究^[6]显示,肺癌转移患者外周血浆中存在高表达的外泌体蛋白CFHR5、C9和MBL2,这些蛋白与机体免疫功能的补体系统密切相关^[21-22]。肿瘤细胞外泌体可以影响机体内的免疫系统,如胆管癌外泌体可以抑制NK细胞在肿瘤微环境中的浸润^[23]。本研究在临床研究的基础上进一步研究发现,

肺癌 CTC-TJH-01 和 H1299 细胞可以分泌外泌体且能够被其他肿瘤细胞吞噬,而肺积方可以抑制模型小鼠肺组织中CFHR5、C9和MBL2蛋白的表达,因此推测,肺癌高表达的外泌体蛋白可能通过调控补体途径而影响靶器官的免疫微环境。

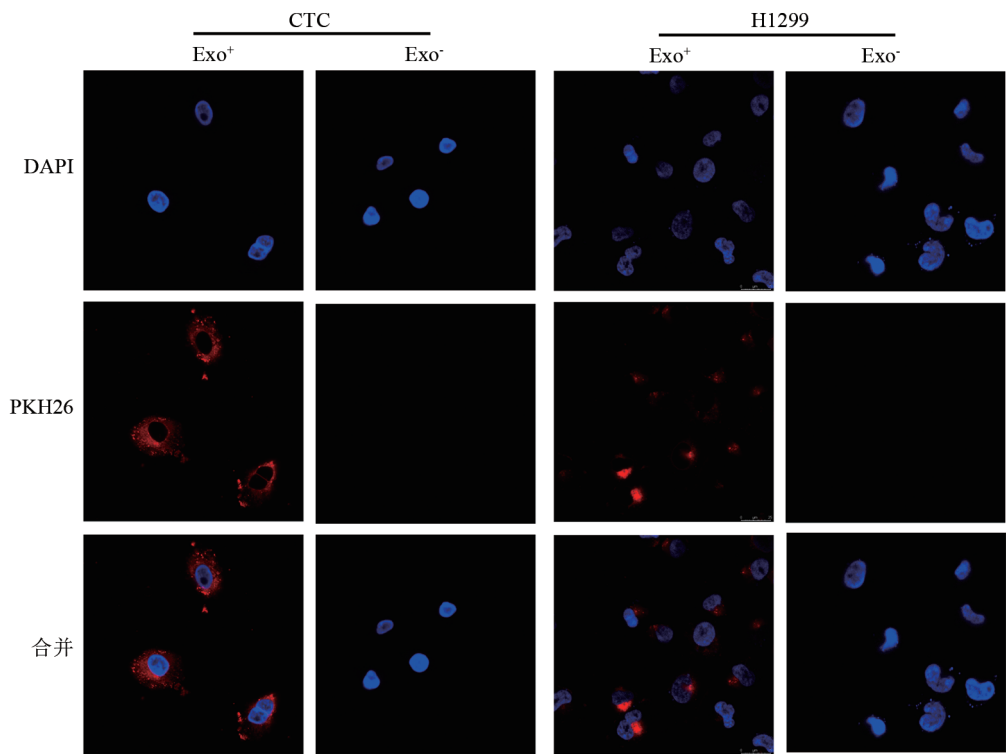
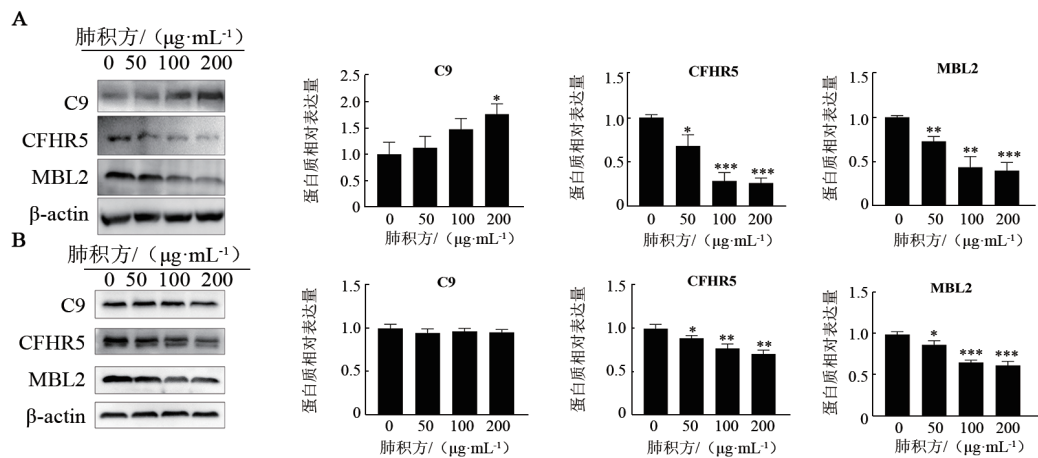


图6 PKH26标记的外泌体与肿瘤细胞共培养示踪实验(×200)



与0 μg/mL组相比,**P* < 0.05、***P* < 0.01、****P* < 0.001。

图7 肺积方对CTC-TJH-01(A)和H1299(B)细胞中CFHR5、C9和MBL2蛋白表达的影响

肺积方是本团队长期临床经验总结的验方,而肺部转移灶是判断临床转移防治的重要指标。前期研究^[24]发现,肺积方可以通过调节机体T细胞免疫应答机制防治肺癌转移。本研究证实,肺积方可以抑制2LL细胞皮下移植瘤模型小鼠肺转移,细胞实验证

实其可抑制肺癌 CTC-TJH-01 和 H1299 细胞的侵袭、迁移。中医药在抑制肿瘤转移方面的作用是多途径、多靶点的^[25],因此肺积方能否调节机体的补体系统发挥作用值得深入研究。余圆圆等^[26]研究发现,肺癌细胞源外泌体可能通过NF-κB信号通路促进肺癌

细胞的增殖、迁移、侵袭,而益气解毒方及其有效组分血根碱可以抑制NF- κ B抑制肺癌细胞的迁移侵袭;冯坤良等^[27]研究也发现,健脾化痰方在体外通过外泌体影响肝癌细胞的迁移、侵袭及上皮间质转化。本研究通过体内外实验证实肺积方能够调控补体系统蛋白CFHR5、C9和MBL2的表达,上述的研究结果提示,肺积方可能通过补体系统影响肺癌细胞的侵袭、转移。

复发转移仍然是导致恶性肿瘤患者死亡的主要因素,本团队前期围绕肺癌的复发转移创建核心病机“正虚伏毒”理论^[28],并从“邪之所凑,其气必虚”角度进一步阐述了术后患者转移发生过程中靶器官“正虚”的可能内涵^[29]。目前,免疫功能状态被认为是中医正气的主要内涵,有学者^[30]从融合中、西医学角度提出“免疫态”,认为中、西医在宏观与微观中存在稳态的相似性。本研究发现,肺积方可以通过调控CFHR5、C9和MBL2蛋白表达从而影响补体系统,从而科学解释了中医药防治肺癌转移可能的免疫机制。继以T细胞为主的肿瘤免疫治疗策略获得成功,靶向固有免疫途径的新策略越来越受到关注^[31],补体系统作为连接两者的重要纽带及补充,有望成为未来研究的新热点。

[参 考 文 献]

- BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263. DOI:10.3322/caac.21834.
- QI J L, LI M L, WANG L J, *et al.* National and subnational trends in cancer burden in China, 2005-20: an analysis of national mortality surveillance data[J/OL]. *Lancet Public Health*, 2023, 8(12): e943-e955[2024-07-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38000889/>. DOI:10.1016/S2468-2667(23)00211-6.
- TEAM C E. Five decades of advances in cancer research[J]. *Cell*, 2024, 187(7): 1567-1568. DOI:10.1016/j.cell.2024.02.044.
- JO H, SHIM K, JEOUNG D. Exosomes: diagnostic and therapeutic implications in cancer[J/OL]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(5): 1465 [2024-07-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37242707/>. DOI: 10.3390/pharmaceutics15051465.
- 罗斌, 阙祖俊, 田建辉. 肿瘤来源外泌体介导MDSC促进转移前微环境形成的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2023, 30(11): 987-991. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2023.11.008.
- LUO B, QUE Z J, LU X Y, *et al.* Identification of exosome protein panels as predictive biomarkers for non-small cell lung cancer [J/OL]. *Biol Proced Online*, 2023, 25(1): 29[2024-07-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37953280/>. DOI: 10.1186/s12575-023-00223-0.
- DEMARIA O, CORNEN S, DAËRON M, *et al.* Harnessing innate immunity in cancer therapy[J]. *Nature*, 2019, 574(7776): 45-56. DOI:10.1038/s41586-019-1593-5.
- IGLESIAS M J, SANCHEZ-RIVERA L, IBRAHIM-KOSTA M, *et al.* Elevated plasma complement factor H related 5 protein is associated with venous thromboembolism[J/OL]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 3280[2024-07-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37286573/>. DOI:10.1038/s41467-023-38383-y.
- AYKUT B, PUSHALKAR S, CHEN R N, *et al.* The fungal mycobiome promotes pancreatic oncogenesis *via* activation of MBL [J]. *Nature*, 2019, 574(7777): 264-267. DOI: 10.1038/s41586-019-1608-2.
- AFSHAR-KHARGHAN V. The role of the complement system in cancer[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(3): 780-789. DOI: 10.1172/JCI90962.
- 游捷, 施志明. 肺积方治疗非小细胞肺癌61例临床疗效评价[J]. *上海中医药杂志*, 2005, 39(6): 17-20. DOI:10.3969/j.issn.1007-1334.2005.06.007.
- 黄云胜, 施志明. 肺积方对肺癌免疫逃逸干预作用的临床研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2007, 27(6): 501-504. DOI:10.3321/j.issn:1003-5370.2007.06.006.
- 毕凌, 金沙, 郑展, 等. 肺积方对IDO诱导Lewis肺癌小鼠模型免疫逃逸的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(1): 69-74. DOI: 10.7661/CJIM.2016.01.0069.
- QUE Z J, LUO B, ZHOU Z Y, *et al.* Establishment and characterization of a patient-derived circulating lung tumor cell line *in vitro* and *in vivo*[J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 21[2024-07-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30718976/>. DOI: 10.1186/s12935-019-0735-z.
- 罗斌, 姚望, 阙祖俊, 等. 重楼皂苷VII下调S100A8抑制肺癌转移前微环境形成[J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(4): 454-458, 462. DOI:10.3969/j.issn.1000-484X.2021.04.014.
- YOSHIHARA K, SHAHMORADGOLI M, MARTÍNEZ E, *et al.* Inferring tumour purity and stromal and immune cell admixture from expression data[J/OL]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2612[2024-07-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24113773/>. DOI: 10.1038/ncomms3612.
- BINDEA G, MLECNIK B, TOSOLINI M, *et al.* Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer[J]. *Immunity*, 2013, 39(4): 782-795. DOI:10.1016/j.immuni.2013.10.003.
- 刘超, 裴圣林. 外泌体调控肺癌肿瘤微环境机制和临床应用的研究进展 [J]. *广西医科大学学报*, 2024, 41(3): 464-470. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.03.020.
- LI X X, YANG L X, WANG C, *et al.* The roles of exosomal proteins: classification, function, and applications[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 3061[2024-07-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36834471/>. DOI:10.3390/ijms24043061.
- ZHANG H Y, DENG T, LIU R, *et al.* Exosome-delivered EGFR regulates liver microenvironment to promote gastric cancer liver metastasis[J/OL]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15016[2024-07-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28393839/>. DOI:10.1038/ncomms15016.
- 秦子一, 唐文如, 谢晓丽. 补体系统在肿瘤免疫中的双重作用[J]. *中国免疫学杂志*, 2022, 38(14): 1777-1782. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2022.14.021.
- 路平, 魏少忠, 梁新军. 补体系统与肿瘤免疫的研究进展[J]. *中国肿瘤临床*, 2021, 48(13): 681-685. DOI: 10.3969/j.issn.1000-8179.2021.13.256.

- [23] 王新月, 王蔚琛, 张帆, 等. 胆管癌细胞外泌体对自然杀伤细胞功能影响[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2024, 31(11): 670-676. DOI: 10.16073/j.cnki.cjcp.2024.11.03.
- [24] LUO B, QUE Z J, ZHOU Z Y, *et al.* Feiji Recipe inhibits the growth of lung cancer by modulating T-cell immunity through indoleamine-2, 3-dioxygenase pathway in an orthotopic implantation model[J]. J Integr Med, 2018, 16(4): 283-289. DOI:10.1016/j.joim.2018.04.008.
- [25] 陈斌斌, 王洋, 唐文, 等. 无症状可辨视域下中医诊断思维应用策略述要[J]. 中医杂志, 2024, 65(7): 669-673. DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.07.002.
- [26] 余圆圆. 益气解毒方及其组分血根碱通过调控肺癌细胞源外泌体抑制巨噬细胞促进肺癌增殖转移作用的机制研究[D]. 上海: 上海中医药大学, 2020. DOI:10.27320/d.cnki.gszyu.2020.000501.
- [27] 冯坤良, 陈清莲, 谢春风, 等. 健脾化痰方体外通过外泌体影响肝癌细胞的迁移、侵袭及上皮间质转化[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(12): 1745-1751. DOI:10.19378/j.issn.1003-9783.2021.12.002.
- [28] 田建辉, 罗斌, 阙祖俊, 等. 癌症转移亚临床阶段核心病机“正虚伏毒”学说[J]. 上海中医药杂志, 2021, 55(10): 1-3, 13. DOI: 10.16305/j.1007-1334.2021.2105080.
- [29] 罗斌, 阙祖俊, 田建辉. 从转移前微环境探讨“邪之所凑, 其气必虚”理论对癌症转移防治的意义[J]. 广州中医药大学学报, 2023, 40(12): 3174-3179. DOI:10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2023.12.034.
- [30] XU A, ZHI Y. Immune states: integrated views of immunity by combining traditional Chinese medicine and modern medicine[J/OL]. Sci China Life Sci, 2024, 67: 2271-2273[2024-07-20]. <https://doi.org/10.1007/s11427-024-2614-7>. DOI: 10.1007/s11427-024-2614-7.
- [31] HU A K, SUN L, LIN H, *et al.* Harnessing innate immune pathways for therapeutic advancement in cancer[J/OL]. Signal Transduct Target Ther, 2024, 9(1): 68[2024-07-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38523155/>. DOI:10.1038/s41392-024-01765-9.

[收稿日期] 2024-07-23

[修回日期] 2024-12-20

[本文编辑] 黄静怡