

clinical prognosis and treatment of malignant tumors [J]. *Modern Oncology* 2022 30( 03) : 535 - 538.

[15] DENARDO DG RUFFELL B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy [J]. *Nat Rev Immunol* ,2019 ,19 ( 6) : 369 - 382.

[16] ZHONG L ZHANG Y LI M ,et al. E3 ligase FBXW7 restricts M2 - like tumor - associated macrophage polarization by targeting c - Myc [J]. *Aging( Albany NY)* 2020 ,12( 23) : 24394 - 24423.

[17] CAO M ,YAN H ,HAN X ,et al. Ginseng - derived nanoparticles alter macrophage polarization to inhibit melanoma growth [J]. *J Immunother Cancer* 2019 7( 1) : 326.

[18] DAI E ,HAN L ,LIU J ,et al. Autophagy - dependent ferroptosis drives tumor - associated macrophage polarization via release and uptake of oncogenic KRAS protein [J]. *Autophagy* ,2020 ,16 ( 11) : 2069 - 2083.

[19] XIA H LI S LI X ,et al. Autophagic adaptation to oxidative stress alters peritoneal residential macrophage survival and ovarian cancer metastasis [J]. *JCI Insight* 2020 5( 18) : e141115.

[20] CHANG CP SU YC LEE PH ,et al. Targeting NF -  $\kappa$ B by autophagy to polarize hepatoma - associated macrophage differentiation [J]. *Autophagy* 2013 9( 4) : 619 - 621.

( 编校: 徐萌)

## 基于 ROS/HIF - 1 通路探讨白花蛇舌草多糖对鼻咽癌裸小鼠肿瘤的抑制作用及机制

钟伦坤 周兴玮 朱佳丽 何 娴 何 露 陈 龙 胡文健 孙永东

### Exploring the tumor suppressive effect and mechanism of polysaccharides extracts from hedyotis diffusa on nasopharyngeal carcinoma nude mice based on ROS/HIF - 1 pathway

ZHONG Lunkun ZHOU Xingwei ZHU Jiali HE Xian HE Lu CHEN Long HU Wenjian SUN Yongdong  
*Department of Otolaryngology ,the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University ,Sichuan Luzhou 646000 ,China.*

**【Abstract】 Objective:** To investigate the tumor suppressive effect of polysaccharides extracts from hedyotis diffusa on nasopharyngeal carcinoma mice based on reactive oxygen species ( ROS ) /hypoxia - inducible factor - 1 ( HIF - 1 ) pathway and to elucidate its possible mechanism of action. **Methods:** Fifty - six BALB/c nude mice were inoculated with CNE - 2 cell suspension in the right axilla to induce nasopharyngeal carcinoma tumor formation. The tumor - forming nude mice were randomly divided into model group ,cisplatin group ( DDP 5 mg/kg) ,polysaccharides extracts from hedyotis diffusa low - dose group ( 50 mg/kg) ,polysaccharides extracts from hedyotis diffusa medium - dose group ( 100 mg/kg) ,polysaccharides extracts from hedyotis diffusa high - dose group ( 200 mg/kg) ,negative control group ( NC - siRNA) ,si - HIF - 1 $\alpha$  group ,si - HIF - 1 $\alpha$  + polysaccharide extracts from hedyotis diffusa group ,6 mice in each group ,and the remaining 6 nude mice as a control group. Each group was administered intraperitoneally at the corresponding doses for 14 consecutive days. The tumor weight and tumor volume of nude mice were measured. The histopathological changes of tumor were observed by hematoxylin - eosin ( HE) staining. The number of Treg cells in tumor tissues was detected by flow cytometry. The expression of Foxp3 in tumor tissues was detected by immunohistochemical staining. The apoptosis in tumor tissues was detected by fluorescent TUNEL staining. The ROS content in tumor tissues was detected by ELISA. The real - time fluorescence real - time PCR and Western blot were used to detect HIF - 1 $\alpha$  ,GLUT1 and HK2 mRNA and protein expression in tumor tissues ,respectively. **Results:** Compared with the model group ,the high - dose group of polysaccharides extracts from hedyotis diffusa significantly reduced tumor weight ,decreased Foxp3 ,HIF - 1 $\alpha$  ,GLUT1 ,and HK2 expression ,significantly reduced tumor volume ,decreased Treg cells and significantly increased apoptosis and ROS content (  $P < 0.01$  ) . Compared with si - HIF - 1 $\alpha$  group ,the expression of HIF - 1 $\alpha$  ,GLUT1 and HK2 was significantly decreased in si - HIF - 1 $\alpha$  + polysaccharides extracts from hedyotis diffusa group (  $P < 0.05$  ) . Compared with the model group ,the ROS content of si - HIF - 1 $\alpha$  + polysaccharides extracts from hedyotis diffusa group was significantly increased ,and the tumor weight and tumor volume were

**【收稿日期】** 2021 - 10 - 13      **【修回日期】** 2021 - 11 - 26  
**【作者单位】** 西南医科大学附属中医医院耳鼻喉科 四川 泸州 646000  
**【作者简介】** 钟伦坤( 1978—) 男 湖北利川人 副主任医师 主要从事中西医结合耳鼻喉疾病研究。E - mail: zhonglk@ swmu. edu. cn  
**【通讯作者】** 周兴玮( 1983—) 男 江西南昌人 副主任中医师 主要从事中西医结合耳鼻喉疾病研究。E - mail: 123902428@ qq. com

significantly reduced ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Polysaccharides extracts from *hedytotis diffusa* has inhibitory effect on nasopharyngeal carcinoma tumors in nude mice and its mechanism of action may be related to the reduction of HIF-1 $\alpha$ , GLUT1 and HK2 expression.

**【Key words】** polysaccharides extracts from *hedytotis diffusa*, nasopharyngeal carcinoma, ROS/HIF-1 pathway, tumor microenvironment

Modern Oncology 2022, 30(15): 2698-2706

**【摘要】** 目的: 基于活性氧(ROS)/缺氧诱导因子-1(HIF-1)通路探讨白花蛇舌草多糖对鼻咽癌裸小鼠肿瘤的抑制作用及其可能作用机制。方法: 56只BALB/c裸小鼠于右侧腋下接种CNE-2细胞悬液诱导鼻咽癌成瘤,成瘤后的裸小鼠随机分为:模型组、顺铂组(DDP 5 mg/kg)、白花蛇舌草多糖低剂量组(50 mg/kg)、白花蛇舌草多糖中剂量组(100 mg/kg)、白花蛇舌草多糖高剂量组(200 mg/kg)、阴性对照组(NC-siRNA)、si-HIF-1 $\alpha$ 组、si-HIF-1 $\alpha$ +白花蛇舌草多糖组,每组6只,剩余6只裸小鼠作为空白组。各组按相应剂量分别腹腔注射给药,连续14天。测定裸小鼠瘤重及肿瘤体积;苏木素-伊红(HE)染色观察肿瘤组织病理学变化;流式细胞术检测肿瘤组织Treg细胞数量;免疫组化染色检测肿瘤组织Foxp3表达;荧光TUNEL染色检测肿瘤组织细胞凋亡;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测肿瘤组织中ROS含量;实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测肿瘤组织HIF-1 $\alpha$ 、GLUT1、HK2 mRNA及蛋白表达。结果:与模型组比较,白花蛇舌草多糖高剂量组可明显降低肿瘤重量,降低Foxp3、HIF-1 $\alpha$ 、GLUT1、HK2表达,明显缩小瘤体积,降低Treg细胞数量,明显增加细胞凋亡及ROS含量( $P < 0.01$ )。与si-HIF-1 $\alpha$ 组比较,si-HIF-1 $\alpha$ +白花蛇舌草多糖组HIF-1 $\alpha$ 、GLUT1、HK2表达明显降低( $P < 0.05$ )。与模型组比较,si-HIF-1 $\alpha$ +白花蛇舌草多糖组ROS含量明显升高,瘤重及肿瘤体积明显减小( $P < 0.05$ )。结论:白花蛇舌草多糖对鼻咽癌裸小鼠肿瘤具有抑制作用,其作用机制可能与降低HIF-1 $\alpha$ 、GLUT1、HK2表达有关。

**【关键词】** 白花蛇舌草多糖;鼻咽癌;ROS/HIF-1通路;肿瘤微环境

**【中图分类号】** R739.63

**【文献标识码】** A

**DOI:** 10.3969/j.issn.1672-4992.2022.15.005

**【文章编号】** 1672-4992-(2022)15-2698-09

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是一种具有明显种族和地理分布的头颈部恶性肿瘤,在中国南部、北非和阿拉斯加等地发病率较高<sup>[1]</sup>。NPC已被证明是全世界与癌症相关的第三大死亡原因,环境因素在NPC发生中起重要作用,但遗传因素也参与NPC的发生<sup>[2]</sup>。目前,NPC的治疗主要采用放射治疗和(或)化学治疗相结合的方法,然而,放疗相关不良反应(如周围器官损害、黏膜炎、口干症、口臭和视力障碍等)仍然是NPC不可避免的问题<sup>[3]</sup>。因此,寻找一种更有效且毒性更低的治疗方式,以提高NPC患者的治疗效果,是急需解决的问题。

近年来,中医药靶向治疗在各类疾病治疗中逐渐凸显,如可减轻不良反应、增强抗肿瘤疗效等<sup>[4]</sup>。白花蛇舌草多糖(polysaccharides extracts from *hedytotis diffusa*, PEHD)是白花蛇舌草化学成分之一,研究者发现白花蛇舌草的乙醇提取物可抑制结肠癌HT-29细胞的增殖并诱导细胞凋亡,可通过活化Caspase9、Caspase3,激活Bax并下调Bcl-2、PCNA的基因表达,抑制结肠癌进展<sup>[5]</sup>。白花蛇舌草亲脂性提取物和粗多糖可抑制骨肉瘤S-180增殖<sup>[6]</sup>。白花蛇舌草粗多糖还对化学药物如环磷酰胺所致的免疫系统和造血系统损伤具有一定的保护作用<sup>[7]</sup>。此外,已有报道其对肝癌、肺癌、胃癌、宫颈癌、卵巢癌等亦有较好疗效<sup>[8-9]</sup>。由此,白花蛇舌草在抗肿瘤方面存在广阔前景,景艳等<sup>[10]</sup>报道白花蛇舌草多糖在一定浓度范围内能够明显抑制鼻咽癌CNE2细胞的增殖,诱导CNE2细胞凋亡,但其对鼻咽癌的作用机制仍不清楚。

活性氧(reactive oxygen species, ROS)作为短寿命的化学反应自由基,可由氧气通过胞内不同生理活动产生<sup>[11]</sup>。低氧诱导因子1(hypoxia inducible factor1, HIF-1)在细胞适应氧供应改变中起关键作用,可作为转录因子改变基因表

达<sup>[12]</sup>。然而,白花蛇舌草多糖能否通过ROS/HIF-1通路来抑制鼻咽癌的进展还有待进一步研究。因此,本研究旨在探讨白花蛇舌草多糖通过ROS/HIF-1通路对鼻咽癌裸小鼠肿瘤微环境中Treg细胞凋亡的影响,以期白花蛇舌草的开发利用提供依据,也为临床治疗鼻咽癌提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株及实验动物

人鼻咽癌CNE-2细胞株购自中国科学院上海细胞库;BALB/c裸小鼠56只(雌雄各半),SPF级,5周龄,体质量(18 $\pm$ 2)g,由成都达硕生物科技有限公司提供,使用许可证号:SYXK(川)2019-189,生产许可证号:SCXK(川)2020-030,裸小鼠饲养于恒温22~25℃、恒湿的SPF层流罩中。

### 1.2 主要试剂及仪器

RPMI 1640培养基(货号:C11875500BT)、胎牛血清(货号:16140063)购自美国GIBCO;白花蛇舌草多糖[白花蛇舌草(g):水(mL)为1:14,超声提取30~40 min,重复提取3次,合并上清液,旋转蒸发至原体积的1/4,seavage脱蛋白,加入乙醇,使乙醇浓度达到60%,静置4 h,析出多糖,质量分数达56%]购自四川省维克奇生物科技有限公司;顺铂(批号:20181021)购自江苏恒瑞医药;ROS测定试剂盒(货号:ZC-A4108)购自上海茁彩生物科技有限公司;相关一抗Foxp3(货号:ab20034)、HIF-1 $\alpha$ (货号:ab1)、GLUT1(货号:ab115730)、HK2(货号:ab209847)及生物素化山羊抗兔IgG(H+L)(货号:ab6721)购自英国Abcam;TB Green™ Premix Ex Taq™ II(货号:RR820A)购自宝日医生生物;Western细胞裂解液(货号:P0013)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(货号:P0009)购自Beyotime;ECL发光试剂盒(货号:KF001)购自Affinity;Cytoflex Beckman流式细胞仪购自美国贝克曼公司,

型号: cytoflex。

1.3 鼻咽癌 CNE-2 细胞裸小鼠移植瘤模型构建

人鼻咽癌 CNE-2 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养,细胞贴壁生长,取对数生长期细胞,采用 PBS 缓冲液调整细胞浓度为 5 × 10<sup>10</sup> / L 细胞悬液。裸小鼠适应性饲养 7 d 后,其中随机选取 48 只裸小鼠于右侧腋下接种上述细胞悬液 0.2 mL,以肿瘤直径 0.5 cm 为成瘤,皮下接种 7 d 后裸小鼠皮下均见结节。成瘤后的裸小鼠随机分为:模型组(NPC)、顺铂组(DDP,5 mg/kg)、白花蛇舌草多糖低剂量组(PEHD-L,50 mg/kg)、白花蛇舌草多糖中剂量组(PEHD-M,100 mg/kg)、白花蛇舌草多糖高剂量组(PEHD-H,200 mg/kg)、阴性对照组(NC-siRNA)、si-HIF-1α 组、si-HIF-1α + 白花蛇舌草多糖组(si-HIF-1α + PEHD-H),每组 6 只,剩余 6 只裸小鼠作为空白组(Control,Con)。

1.4 给药方法

参考贾羲等<sup>[8]</sup>的报道剂量,PEHD-L 组、PEHD-M 组、PEHD-H 组分别按 50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg 腹腔注射给药,DDP 组按 5 mg/kg 腹腔注射给药。NC-siRNA、si-HIF-1α 组、si-HIF-1α + PEHD-H 组,首先将针对 si-HIF-1α 表达质粒采用 Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 按制造商说明转染 CNE-2 细胞,制备细胞悬液,于右侧腋下接种,si-HIF-1α + PEHD-H 组再按 200 mg/kg 腹腔注射给药。Con 组及 NPC 组给予同等体积生理盐水腹腔注射,每天 1 次,共 14 d。

1.5 观察指标

1.5.1 测定裸小鼠肿瘤重量及肿瘤体积 第 3 d、6 d、9 d、12 d、14 d 采用游标卡尺测定一次移植瘤的长径(a)和短径(b),并计算各组肿瘤体积(V = 1/2 × a × b<sup>2</sup>)。2 周后裸小鼠经戊巴比妥钠(35 mg/kg)腹腔注射麻醉,处死,剥离移植瘤,称重。后将肿瘤组织分为 2 份,一份于 4% 多聚甲醛固定;另一份置于 -80 °C 冰箱保存,用于后续检测,Con 组采集裸小鼠鼻黏膜组织。

1.5.2 HE 染色观察肿瘤组织病理学变化 取肿瘤组织,经 4% 多聚甲醛固定 24 h 后,将组织标本放入含 30% 蔗糖的

4% 多聚甲醛中保存,石蜡包埋,连续切片,厚度 5 μm,苏木精-伊红(HE)染色,镜检观察组织病理情况。

1.5.3 流式细胞术检测肿瘤组织 Treg 细胞数量 取肿瘤组织,眼科剪剪成 1~2 mm 小块,于含 20% PBS 匀浆液中研磨至单细胞悬液,于 1 500 r/min 离心 25 min,沉淀 PBS 重悬,配成每 EP 管 1 × 10<sup>6</sup> 个细胞,按照 Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒说明书的步骤,向各组加入相应的荧光标记单抗(anti-CD4-FITC、anti-CD25-APC),轻轻混匀,置于冰上孵育 30 min。流式细胞仪检测并分析各组 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞在肿瘤组织中的百分率。

1.5.4 免疫组化染色检测肿瘤组织 Foxp3 表达 取肿瘤组织,经脱水、包埋、切片处理,使用 0.3% 过氧化氢抑制这些切片中的内源性过氧化物酶活性,滴加 10% 的正常山羊血清封闭,加入 Foxp3 抗体(1:200) 4 °C 过夜,后与辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgGs 二抗 37 °C 孵育 30 min,苏木素染色,镜检观察,并使用 Image-J 图像分析软件根据积分光密度( IOD) / 面积值确定 Foxp3 阳性染色的强度。

1.5.5 荧光 TUNEL 染色检测肿瘤组织细胞凋亡 取肿瘤组织,经脱水、包埋、切片处理,滴加 TUNEL 反应混合液,37 °C 孵育 60 min, PBS 清洗 3 次,滴加 DAPI 核染,甘油封片,荧光显微镜观察并拍片分析。

1.5.6 ELISA 检测肿瘤组织中 ROS 含量 取肿瘤组织,眼科剪剪成 1~2 mm 小块,加入 5 mL PBS 在冰上用玻璃匀浆器匀浆,再进行 2 次反复冻融,进一步破碎细胞膜,匀浆物以 5 000 r/min 离心 20 min,取上清液,按 ELISA 试剂盒测定 ROS 含量。

1.5.7 qRT-PCR 检测肿瘤组织 HIF-1α、GLUT1、HK2 mRNA 表达 使用 TRIzol 试剂盒按照制造商说明裂解组织,提取总 RNA,每个样品的总 RNA 约 5 μg,被逆转录成第一链 cDNA 用于 qRT-PCR 分析。使用 Takara TB Green<sup>™</sup> PreMix Ex Taq<sup>™</sup> 定量基因表达水平,以 β-actin 作为内参。qRT-PCR 反应条件:95 °C 初始变性 10 min,随后 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 10 s, 45 个循环,记录 CT 值,采用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 分析相对表达水平。引物序列如表 1。

表 1 引物序列  
Tab. 1 Primer sequences

Primer	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')
HIF-1α	AAGCAGTTCGCCAAGCCCTGAAAGC	TGGCAGTGGTAGTGGTGCATTAGCA
GLUT1	GGAACAGCCAGCCTACGCCACCATA	AGCAGCAGAGCCACCGTCATCAAGAT
HK2	AGCCGAACAGCCTGGACGAGAGCATT	CCACAGTGCATTCACCACGGCAACC
β-actin	CTCCATCGTCCACCGCAAATGCTTCT	GCTCCAACCGACTGCTGTACCTTC

1.5.8 Western blot 分析肿瘤组织 HIF-1α、GLUT1、HK2 蛋白表达 采用 RIPA 裂解组织提取蛋白质,冰上孵育离心后,收集上清液,用 BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度。后将上清液与 SDS-PAGE 样品加载缓冲液混合,并转移到 PVDF 膜上,在 5% 脱脂牛奶中室温封闭 2 h 后,将膜与抗 HIF-1α、GLUT1、HK2(1:500) 或 β-actin(1:2 000) 的一抗一起在 4 °C 孵育过夜。随后与辣根过氧化物酶(HRP)偶联的二级抗体(1:3 000)室温孵育 1 h,ECL 暗室显色,Bio-Rad 全能成像系统采集图像,Image-ProPlus 分析光密度,以 β-actin 为内参,对照组目标蛋白质相对含量为 1,计算各

组蛋白质的相对表达量,实验重复 3 次。

1.6 统计学方法

使用 SPSS 22.0 软件(IBM Corp.)对数据进行统计分析,数据表示为平均值 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ ),两组间均数比较采用 LSD-t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 白花蛇舌草多糖对鼻咽癌荷瘤裸小鼠移植瘤生长的影响

与 NPC 组比较,DDP 组、PEHD-L 组、PEHD-M 组、

PEHD-H组肿瘤重量均明显降低( $P < 0.01$ );与DDP组比较,PEHD-L组、PEHD-M组、PEHD-H组肿瘤重量均明显降低( $P < 0.01$ );给药后9 d、12 d,与NPC组相比,PEHD-L组、PEHD-M组、PEHD-H组瘤体积明显缩小( $P < 0.01$ );给药后14 d,与NPC组、DDP组相比,PEHD-H组裸小鼠肿瘤体积明显减小( $P < 0.01$ ,图1A)。NPC组:肿瘤细胞生长良好,肿瘤细胞间纤维组织将肿瘤分为小岛状,瘤细胞排列紧密,胞质丰富,胞核形态不一,可见核分裂象,偶见

少量细胞凋亡。DDP组:肿瘤组织体积较小,瘤细胞胞质丰富,胞核形态不一,凋亡细胞增多,部分瘤细胞排列松散,胞质空泡化。PEHD-L组:局部肿瘤细胞排列松散,瘤细胞间少量淋巴细胞和多量中性粒细胞浸润。PEHD-M组:肿瘤细胞排列松散,胞质减少,瘤细胞间较多淋巴细胞和少量中性粒细胞浸润。PEHD-H组:肿瘤组织体积明显缩小,肿瘤边缘肿瘤细胞胞核固缩,伴有少量淋巴细胞浸润(图1B)。

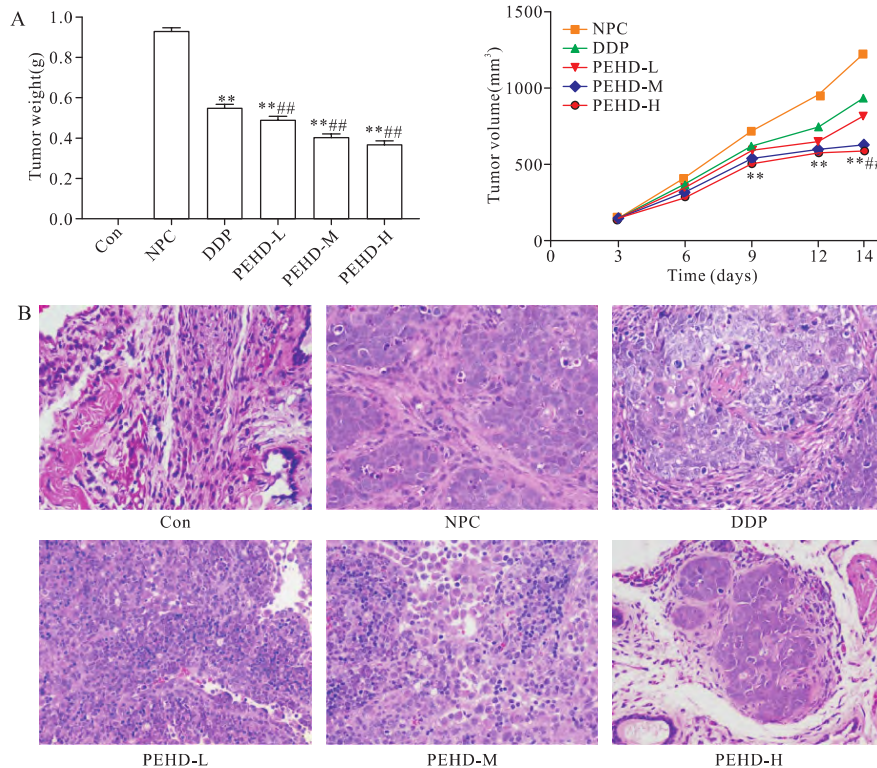


图1 各组裸小鼠移植瘤生长及组织病理变化

A: 肿瘤重量及肿瘤体积; B: 各组 HE 染色(×400)。与 NPC 组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与 DDP 组比较, ### $P < 0.01$ 。

Fig. 1 Growth and histopathological changes of transplanted tumors in each group of nude mice

A: Tumor weight and tumor volume. B: HE staining in each group (×400). Compared with the NPC group, \*\* $P < 0.01$ . Compared with the DDP group, ### $P < 0.01$ .

## 2.2 白花蛇舌草多糖对鼻咽癌荷瘤裸小鼠肿瘤细胞凋亡及 Treg 细胞的影响

TUNEL 荧光染色检测结果显示,与 NPC 组比较,DDP 组、PEHD-L 组、PEHD-M 组、PEHD-H 组肿瘤细胞凋亡明显增加( $P < 0.01$ );与 DDP 组比较,PEHD-M 组、PEHD-H 组肿瘤细胞凋亡明显增加( $P < 0.05$ ,图2)。

免疫组化检测结果显示,与 Con 组比较,NPC 组 Foxp3 表达明显增加( $P < 0.01$ );与 NPC 组比较,PEHD-L 组、PEHD-M 组、PEHD-H 组均明显降低 Foxp3 表达( $P < 0.05$ ,图3A-3B)。流式细胞检测结果显示,与 Con 组比较,NPC 组 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞明显增加( $P < 0.01$ );与 NPC 组比较,DDP 组、PEHD-L 组、PEHD-M 组、PEHD-H 组 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞均明显降低( $P < 0.01$ );与 DDP 组比较,PEHD-M 组、PEHD-H 组 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 细胞明显降低( $P < 0.05$ ,图3C-3D)。

## 2.3 白花蛇舌草多糖对鼻咽癌荷瘤裸小鼠肿瘤组织 ROS/

## HIF-1 通路的影响

Western blot 检测结果显示,与 Con 组比较,NPC 组 HIF-1 $\alpha$ 、GLUT1、HK2 蛋白表达明显升高( $P < 0.01$ );与 NPC 组比较,DDP 组、PEHD-M 组、PEHD-H 组 HIF-1 $\alpha$ 、HK2 蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ );与 DDP 组相比,仅 PEHD-H 组 HIF-1 $\alpha$ 、GLUT1、HK2 蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ ,图4A-4B)。qRT-PCR 检测结果显示,与 Con 组比较,NPC 组 HIF-1 $\alpha$ 、GLUT1、HK2 mRNA 表达明显升高( $P < 0.01$ );与 NPC 组比较,PEHD-M 组、PEHD-H 组 HIF-1 $\alpha$ 、GLUT1、HK2 mRNA 表达明显降低( $P < 0.05$ );与 DDP 组相比,仅 PEHD-H 组 HIF-1 $\alpha$ 、GLUT1、HK2 mRNA 表达明显降低( $P < 0.05$ ,图4C)。ELISA 检测结果显示,与 Con 组比较,NPC 组 ROS 含量明显降低( $P < 0.01$ ),与 NPC 组比较,PEHD-M 组、PEHD-H 组 ROS 含量明显升高( $P < 0.05$ ,图4D)。

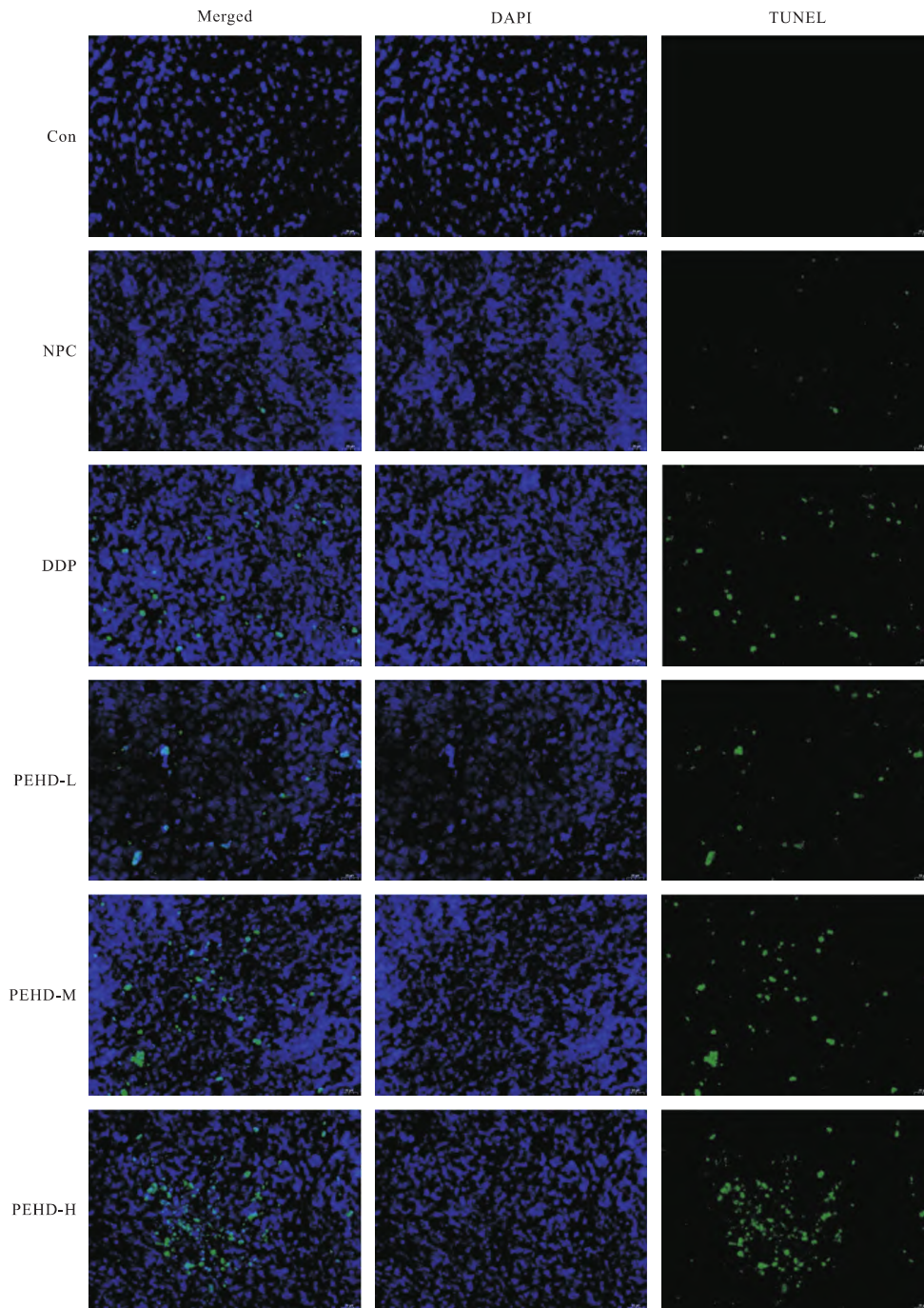


图2 各组裸小鼠 TUNEL 荧光染色( ×400)

Fig.2 TUNEL fluorescence staining of nude mice in each group ( ×400)

**2.4 ROS/HIF-1 通路抑制对鼻咽癌荷瘤裸小鼠移植瘤生长及 Treg 细胞的影响**

病理染色结果显示 ,NPC 组和 NC - siRNA 组肿瘤细胞生长良好 ,肿瘤细胞间纤维组织将肿瘤分为小岛状 ,瘤细胞排列紧密 ,胞质丰富 ,胞核形态不一 ,可见核分裂象 ,偶见少量细胞凋亡。si - HIF - 1 $\alpha$  组和 PEHD - H 组局部肿瘤细胞排列松散 ,部分细胞胞质减少 ,肿瘤细胞间少量淋巴细胞和多量中性粒细胞浸润。si - HIF - 1 $\alpha$  + PEHD - H 组细胞间见少量淋巴细胞和中性粒细胞浸润 ,偶见少量凋亡肿瘤样细胞(图 5A)。与 NPC 组比较 ,si - HIF - 1 $\alpha$  组、si - HIF - 1 $\alpha$  + PEHD - H 组瘤重及肿瘤体积明显减小(  $P < 0.05$  ,图 5B -

5C)。流式细胞术检测结果显示 ,与 NPC 组比较 ,si - HIF - 1 $\alpha$  组、PEHD - H 组、si - HIF - 1 $\alpha$  + PEHD - H 组 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞明显降低(  $P < 0.01$  ,图 5D)。Western blot 检测结果显示 ,与 NPC 组比较 ,si - HIF - 1 $\alpha$  组、PEHD - H 组、si - HIF - 1 $\alpha$  + PEHD - H 组 HIF - 1 $\alpha$ 、GLUT1、HK2 蛋白表达均明显降低;与 si - HIF - 1 $\alpha$  组及 PEHD - H 组比较 ,si - HIF - 1 $\alpha$  + PEHD - H 组 HIF - 1 $\alpha$ 、GLUT1、HK2 蛋白表达明显降低(  $P < 0.05$  ,图 5E - 5F)。ELISA 检测结果显示 ,与 NPC 组比较 ,si - HIF - 1 $\alpha$  组、PEHD - H 组、si - HIF - 1 $\alpha$  + PEHD - H 组 ROS 含量明显升高(  $P < 0.05$  ,图 5G)。

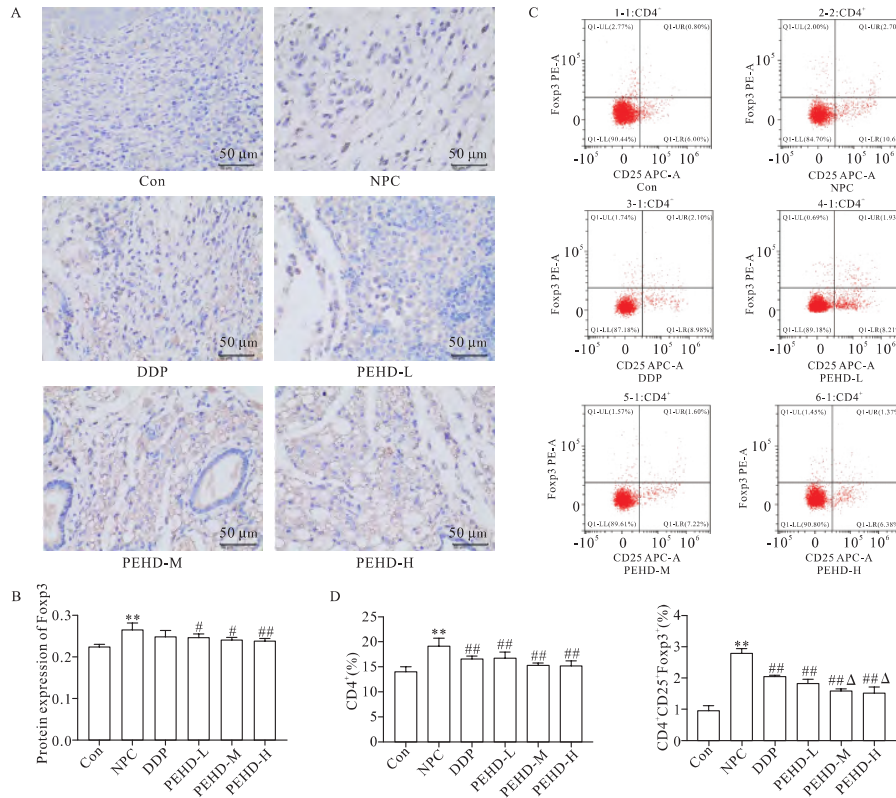


图3 各组裸小鼠 Treg 细胞变化

A: Fopx3 免疫组化染色代表性图片; B: 免疫组化 Fopx3 定量分析; C: 流式细胞图; D: CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Fopx3<sup>+</sup> Treg 细胞比例。与 Con 组比较, \*\**P* < 0.01; 与 NPC 组比较 #*P* < 0.05 ##*P* < 0.01; 与 DDP 组比较 Δ*P* < 0.05。

Fig. 3 Changes of Treg cells in each group of nude mice

A: Representative pictures of Fopx3 immunohistochemical staining. B: Quantitative analysis of immunohistochemical Fopx3. C: Flow cytometry. D: CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Fopx3<sup>+</sup> Treg cell ratio. Compared with the Con group, \*\**P* < 0.01. Compared with the NPC group #*P* < 0.05 ##*P* < 0.01. Compared with the DDP group Δ*P* < 0.05.

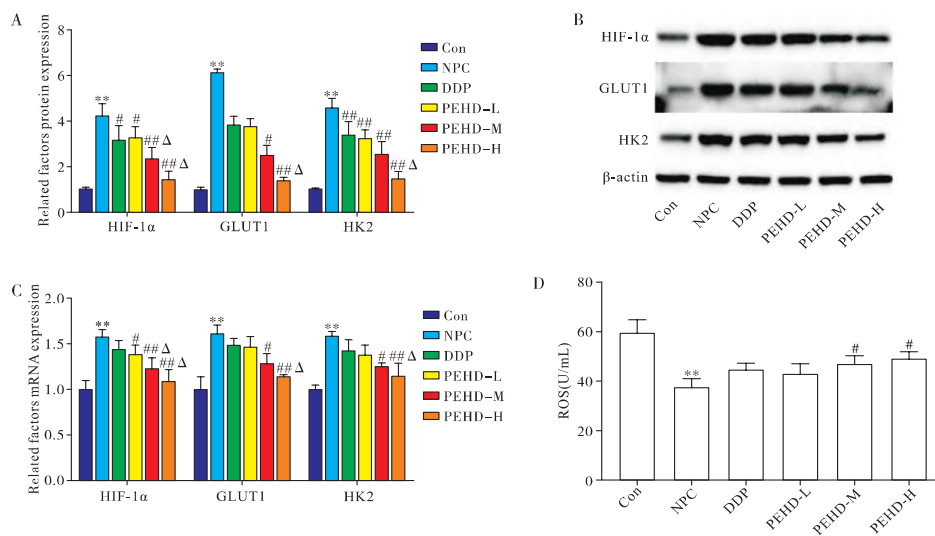


图4 各组裸小鼠 ROS/HIF - 1 通路相关因子变化

A: 相关因子蛋白表达; B: 蛋白条带; C: 相关因子 mRNA 表达; D: ROS 含量。与 Con 组比较, \*\**P* < 0.01; 与 NPC 组比较 #*P* < 0.05 ##*P* < 0.01; 与 DDP 组比较 Δ*P* < 0.05。

Fig. 4 Changes of ROS/HIF - 1 pathway related factors in nude mice of each group

A: Relative factors protein expression. B: Protein bands. C: Related factors mRNA expression. D: ROS content. Compared with the Con group, \*\**P* < 0.01. Compared with the NPC group #*P* < 0.05 ##*P* < 0.01. Compared with the DDP group Δ*P* < 0.05.

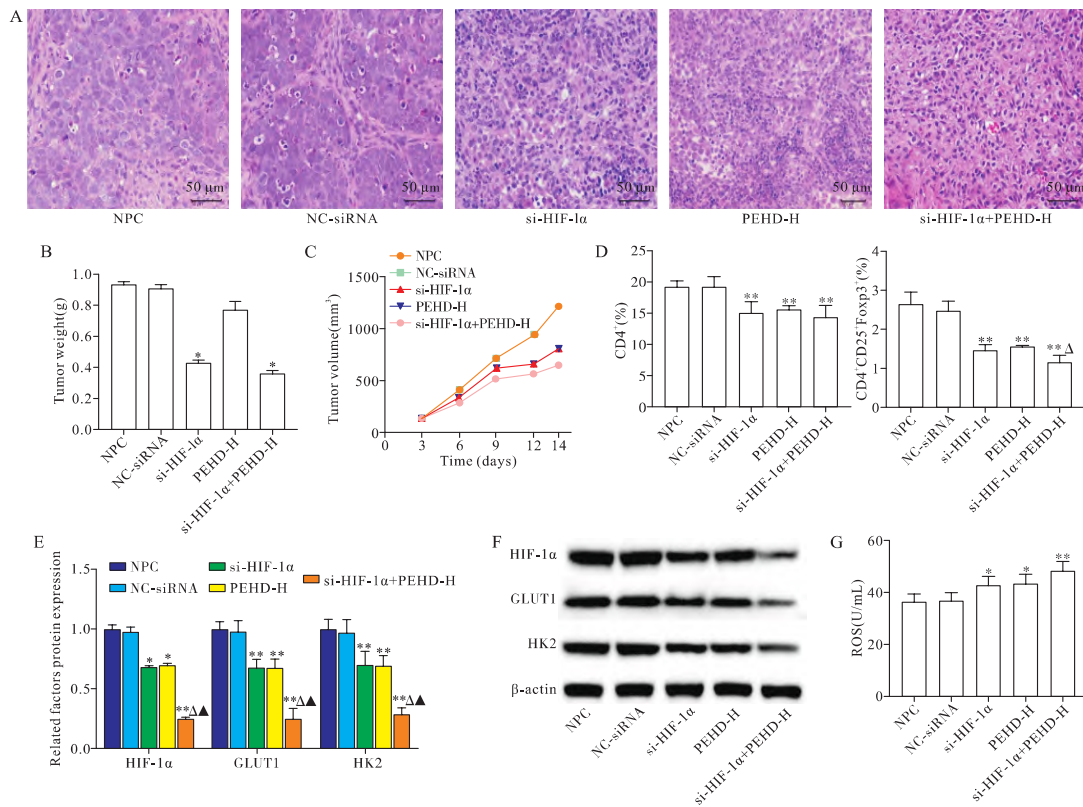


图 5 各组裸小鼠移植瘤生长及 Treg 细胞变化

A: 各组 HE 染色; B: 肿瘤重量; C: 肿瘤体积; D: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞比例; E: 相关因子蛋白表达; F: 蛋白条带; G: ROS 含量。与 NPC 组比较, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01; 与 si-HIF-1α 组比较, ΔP < 0.05; 与花蛇舌草多糖组比较, ▲P < 0.05。

Fig. 5 Growth of transplanted tumor and changes of Treg cells in nude mice in each group

A: HE staining in each group. B: Tumor weight. C: Tumor volume. D: Proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg cells. E: Relative factors protein expression. F: Protein bands. G: ROS content. Compared with NPC group, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01. Compared with si-HIF-1α group, ΔP < 0.05. Compared with flowering serpentine polysaccharide group, ▲P < 0.05.

### 3 讨论

肿瘤的发生发展不仅与肿瘤细胞本身相关,也与其生存的肿瘤微环境密切相关<sup>[13]</sup>。其中,T 细胞作为特异性免疫尤其是细胞免疫的主要成分在肿瘤的发生发展中发挥重要作用。在 T 细胞中,调节性 T 细胞(Treg)是具有显著免疫抑制作用的 T 细胞亚群,其特征在于表达 Foxp3、CD25 和 CD4 的细胞表型<sup>[14-15]</sup>。研究发现 Treg 在肿瘤等疾病中可以抑制其他细胞的免疫反应,是自我耐受的主要控制者,Treg 的缺失或功能异常会导致多种自身免疫相关疾病的发展,包括肿瘤<sup>[16]</sup>。Treg 数量在乳腺癌、胰腺癌患者中明显增加,且可抑制抗肿瘤免疫应答进而促进肿瘤进展<sup>[17-18]</sup>。因此,抑制 Treg 数量可能成为调节肿瘤微环境的重要靶点。此外,研究显示肺炎宁汤可降低 Lewis 肺癌裸小鼠肿瘤组织中 Treg 细胞数量,西黄丸可改善 T 淋巴细胞比例进而发挥抑瘤作用<sup>[19]</sup>。本研究首先从瘤重、肿瘤体积、肿瘤组织病理变化角度观察花蛇舌草多糖对鼻咽癌的影响,结果发现花蛇舌草多糖高剂量组明显降低肿瘤重量、缩小肿瘤体积并改善肿瘤组织病理变化。同时发现在鼻咽癌裸小鼠中肿瘤组织 Treg 细胞明显增加,Foxp3 表达明显升高,白花蛇舌草多糖高剂量组 Treg 细胞明显减少,Foxp3 表达明显降低,且 Treg 细胞的减少与白花蛇舌草多糖剂量呈正相关。推测白花蛇舌草多糖可能通过降低 Treg 细胞从而抑制鼻咽癌进展。为了阐释

Treg 细胞减少的原因,本实验应用 TUNEL 荧光染色检测了细胞凋亡,结果显示白花蛇舌草多糖中、高剂量组细胞凋亡明显增加,且凋亡与剂量呈正相关,表明白花蛇舌草多糖可能是通过促进细胞凋亡进而减少 Treg 细胞。

目前,鼻咽癌的发生发展机制尚不清晰,但研究显示 ROS 产生率的增加可抑制肿瘤细胞生长<sup>[20]</sup>。此外,HIF-1α 在各类癌症中上调,促进肿瘤细胞的存活、血管生成和转移<sup>[21]</sup>。研究报道 HIF-1α 在缺氧条件下促进 MCF-7 乳腺癌细胞增殖,且 HIF-1α 的下调抑制了非小细胞肺癌 NCI-H157 细胞的增殖<sup>[22-23]</sup>。此外,ROS 在肿瘤微环境中对浸润型 T 细胞活化的调控可能依赖代谢途径<sup>[24]</sup>。谢文强等<sup>[25]</sup>研究显示环境中的 ROS 与 T 细胞表型变化高度相关。GLUT1、HK2 作为 HIF-1α 的下游基因,是参与肿瘤微环境糖酵解的关键基因<sup>[26]</sup>。本研究结果表明,鼻咽癌裸小鼠 HIF-1α、GLUT1、HK2 mRNA 及蛋白表达明显升高,ROS 含量明显降低,而白花蛇舌草多糖高剂量组 HIF-1α、GLUT1、HK2 mRNA 及蛋白表达明显降低,ROS 含量明显升高。提示鼻咽癌进展与 ROS/HIF-1 通路相关。进一步抑制 ROS/HIF-1 通路发现,si-HIF-1α + 白花蛇舌草多糖组 Treg 细胞明显降低,肿瘤重量及肿瘤体积明显减小,表明白花蛇舌草多糖可能依赖 ROS/HIF-1 通路使 Treg 细胞减少进而抑制鼻咽癌的进展。

综上所述,本研究表明白花蛇舌草多糖可减少 Treg 细胞,并促进鼻咽癌细胞凋亡,其潜在机制可能与 ROS/HIF-1 通路相关。

#### 【参考文献】

- [1] HUANG SJ, TANG YY, LIU HM, et al. Impact of age on survival of locoregional nasopharyngeal carcinoma: An analysis of the surveillance epidemiology and end results program database 2004-2013 [J]. Clin Otolaryngol 2018, 43(5): 1209-1218.
- [2] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics 2017 [J]. CA Cancer J Clin 2017, 67(1): 7-30.
- [3] ZHANG Y, CHEN L, HU GQ, et al. Gemcitabine and cisplatin induction chemotherapy in nasopharyngeal carcinoma [J]. N Engl J Med 2019, 381(12): 1124-1135.
- [4] 鲁丽容, 潘珊, 杨荣, 冰镇乌梅汤含漱治疗鼻咽癌放疗后口干症的临床观察 [J]. 中医肿瘤学杂志, 2021, 3(04): 114-116.  
LU LR, PAN S, YANG R. Clinical observation of iced wumei decoction in the treatment of xerostomia in nasopharyngeal carcinoma patients after radiotherapy [J]. Journal of Oncology in Chinese Medicine 2021, 3(04): 114-116.
- [5] 朱恒舟, 桑天庆, 季漪, 等. 基于消癌解毒方中白花蛇舌草有效成分治疗肿瘤的靶点研究 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(05): 132-135, 276-277.  
ZHU HZ, SANG TQ, JI Y, et al. Study on target of treating tumors based on active constituents of hedyotis diffusa in xiaoai jiedu decoction [J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2020, 38(05): 132-135, 276-277.
- [6] 吴朗杰, 赵春燕, 战雨彬. 基于网络药理学和分子对接研究白花蛇舌草和半枝莲药对治疗宫颈癌的作用机制 [J]. 中草药, 2021, 52(04): 1049-1058.  
WU LJ, ZHAO CY, ZHAN LB. Effects of Hedyotis diffusa on cervical cancer [J]. Chinese Herbal Medicine, 2021, 52(4): 1049-1058.
- [7] 吴仪君, 刘小芳, 李万忠, 等. 白花蛇舌草不同极性部位抗血管生成及抗氧化活性研究 [J]. 中医药导报, 2018, 24(17): 50-54.  
WU YJ, LIU XF, LI WZ, et al. Study on anti-angiogenesis and antioxidant activity of different polarity fractions of baihuasheshecao [J]. Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacology 2018, 24(17): 50-54.
- [8] 贾羲, 王娟, 贾文瑞, 等. 白花蛇舌草多糖对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤抑制作用及机制研究 [J]. 中医学报, 2021, 36(01): 143-147.  
JIA X, WANG J, JIA WR, et al. Anti-tumor effect and mechanism of hedyotis diffusa polysaccharide on lewis lung cancer mice [J]. China Journal of Chinese Medicine 2021, 36(01): 143-147.
- [9] 王信, 马传江, 杨培民, 等. 白花蛇舌草抗炎、抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(19): 2420-2427.  
WANG X, MA CJ, YANG PM, et al. Research progress of anti-inflammatory and anti-tumor effects of hedyotis diffusa wild [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy 2020, 37(19): 2420-2427.
- [10] 景艳, 康敏, 刘津, 等. 白花蛇舌草多糖诱导鼻咽癌细胞凋亡及其机制研究 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2015, 29(07): 641-644.  
JING Y, KANG M, LIU J, et al. Mechanism of apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells induced by polysaccharides extracts from Hedyotis diffusa [J]. Journal of Clinical Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery 2015, 29(07): 641-644.
- [11] 鲁仕昱, 林辉. 白花蛇舌草干预大肠腺瘤的网络药理学研究 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2021, 29(05): 351-357.  
LU SY, LIN H. The network pharmacology study of Hedyotis diffusa on colorectal adenoma [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Digestion 2021, 29(05): 351-357.
- [12] LI Y, CHEN F, CHEN J, et al. Disulfiram/copper induces antitumor activity against both nasopharyngeal cancer cells and cancer-associated fibroblasts through ROS/MAPK and ferroptosis pathways [J]. Cancers (Basel) 2020, 12(1): 138.
- [13] WANG Y, CHEN W, LIAN J, et al. The lncRNA PVT1 regulates nasopharyngeal carcinoma cell proliferation via activating the KAT2A acetyltransferase and stabilizing HIF-1 $\alpha$  [J]. Cell Death Differ 2020, 27(2): 695-710.
- [14] MATAS-RICO E, FRIJLINK E, VAN DER HAAR ÀLA I, et al. Autotaxin impedes anti-tumor immunity by suppressing chemotaxis and tumor infiltration of CD8<sup>+</sup> T cells [J]. Cell Rep 2021, 37(7): 110013.
- [15] YAN M, HU J, YUAN H, et al. Dynamic regulatory networks of T cell trajectory dissect transcriptional control of T cell state transition [J]. Mol Ther Nucleic Acids 2021, 26: 1115-1129.
- [16] LI J, WANG S, WANG N, et al. Aiduqing formula inhibits breast cancer metastasis by suppressing TAM/CXCL1-induced Treg differentiation and infiltration [J]. Cell Commun Signal 2021, 19(1): 89.
- [17] MANDAPATHIL M, SZCZEPANSKI MJ, JACKSON EK, et al. Breast cancer cell-derived adenosine enhances generation and suppressor function of human adaptive regulatory T cells [J]. J Pers Med 2021, 11(8): 754.
- [18] LIU MF, JIN C, WU T, et al. Helios serves as a suppression marker to reduce regulatory T cell function in pancreatic cancer patients [J]. Immunol Res 2021, 69(3): 275-284.
- [19] WANG JY, GUO J, DONG CS, et al. Effects of Feiyaningdecoction, a compound traditional Chinese medicine, on iNOS and COX-2 expressions induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  in lung adenocarcinoma cell line [J]. J Chin Integ Med 2012, 10(6): 695-700.
- [20] 徐培声, 林嘉伟, 俞美声, 等. 顺铂通过 ROS 介导 CIC-3 上调诱导鼻咽癌细胞凋亡 [J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(06): 1091-1098.  
XU PS, LIN JW, YU MS, et al. Cisplatin induces apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells by up-regulates of the expressions of CIC-3 via ROS mediation [J]. Chinese Journal of Pathophysiology 2021, 37(06): 1091-1098.
- [21] ZHANG Y, YAN J, WANG L, et al. HIF-1 $\alpha$  promotes breast cancer cell MCF-7 proliferation and invasion through regulating miR-210 [J]. Cancer Biother Radiopharm 2017, 32(8): 297-301.
- [22] QIAN J, BAI H, GAO Z, et al. Downregulation of HIF-1 $\alpha$  inhibits the proliferation and invasion of non-small cell lung cancer NCI-H157 cells [J]. Oncol Lett 2016, 11(3): 1738-1744.
- [23] 赵婷婷, 邢鹏, 金锋, 等. 缺氧对人乳腺癌细胞系 MCF-7 生物学行为的影响 [J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(05): 1015-1019.  
ZHAO TT, XING P, JIN F, et al. The effects of hypoxia on the biological characteristics of human breast cancer cell line MCF-7 [J]. Modern Oncology 2014, 22(05): 1015-1019.
- [24] NI D, TANG T, LU Y, et al. Canonical secretomes, innate immune Caspase-1, -4/11-Gasdermin D non-canonical secretomes and exosomes may contribute to maintain Treg-ness for Treg im-



munosuppression tissue repair and modulate anti-tumor immunity via ROS pathways[J]. Front Immunol 2021, 12: 678201.

[25] 谢文强, 卢涣滋, 林冬佳, 等. ROS/HIF-1 信号通路调控口腔鳞状细胞癌肿瘤浸润 T 淋巴细胞分化的机制[J]. 口腔生物医学 2020, 11(04): 227-231, 241.

XIE WQ, LU HZ, LIN DJ, et al. The ROS/HIF-1 signaling path-

way regulates the differentiation of T lymphocytes in OSCC[J]. Oral Biomedicine 2020, 11(04): 227-231, 241.

[26] TAS I, VARLI M, SON Y, et al. Physciosporin suppresses mitochondrial respiration, aerobic glycolysis, and tumorigenesis in breast cancer[J]. Phytomedicine 2021, 91: 153674.

( 编校: 徐萌)

## 中子、<sup>137</sup>Cs γ 射线及混合辐射对淋巴细胞微核的影响

张睿凤, 张忠新, 柴栋静, 孟倩倩, 原雅艺, 柴栋良, 杨 彪, 段志凯, 党旭红

### Effects of neutrons, <sup>137</sup>Cs γ rays and mixed radiation on the micronuclear rate in lymphocytes

ZHANG Ruifeng, ZHANG Zhongxin, CHAI Dongjing, MENG Qianqian, YUAN Yayi, CHAI Dongliang, YANG Biao, DUAN Zhikai, DANG Xuhong

China Institute for Radiation Protection, Shanxi Taiyuan 030006, China.

**【Abstract】 Objective:** To compare the effects of neutrons, <sup>137</sup>Cs γ rays and mixed radiation of neutrons and γ rays on micronucleus (MN) rate, nuclear bridge (NPB) rate and nuclear bud (NBD) rate in human lymphocytes. **Methods:** Peripheral blood lymphocytes from the two volunteers were divided into control group, neutron group, <sup>137</sup>Cs γ rays group and neutron/γ rays mixed group. Cytokinesis-block analysis was used to analyze micronuclear rates, nuclear bridge rates and nuclear bud rates in human lymphocytes. **Results:** The CB micronuclear rates exposed neutron, <sup>137</sup>Cs γ rays and mixed radiation were significantly higher than control (P < 0.01). The CB micronuclear rates exposed neutron, mixed radiation were significantly higher than <sup>137</sup>Cs γ rays (P < 0.01). The CB micronuclear rates exposed neutron/γ rays mixed radiation were significantly higher than neutron radiation (P < 0.01). The nuclear bridge rates and nuclear bud rates induced by neutron/γ rays mixed radiation were significantly higher than control (P < 0.05).

**Conclusion:** With the micronuclear rate as the biological endpoint, the damage caused by neutron/γ ray mixed radiation was significantly worse than the same dose of single-energy neutrons and <sup>137</sup>Cs γ ray, indicating there may be some synergistic effect of on mixed radiation.

**【Key words】**neutron radiation, <sup>137</sup>Cs γ rays, neutron/γ ray mixed radiation, micronuclear, nuclear bridge, nuclear bud

Modern Oncology 2022, 30(15): 2706-2710

**【摘要】 目的:** 比较中子、<sup>137</sup>Cs γ 射线及中子/γ 射线混合照射对人淋巴细胞微核、核质桥和核芽的影响。方法: 将两名志愿者的外周血淋巴细胞随机分为对照组、中子、<sup>137</sup>Cs γ 射线和中子/γ 射线混合照射组, 用胞质分裂阻滞法分析不同处理组人淋巴细胞微核率、核质桥率以及核芽率的差异; 结果: 外周血淋巴细胞经中子、<sup>137</sup>Cs γ 射线和混合照射后的 CB 微核率高于对照组, 经中子和混合照射后的 CB 微核率高于 <sup>137</sup>Cs γ 射线照射组, 中子/γ 射线混合照射后的人淋巴细胞微核率高于中子照射组, 差异具有统计学意义 (P < 0.01); 中子/γ 射线混合照射诱导的核质桥率和核芽率高于对照组, 差异具有统计学意义 (P < 0.05)。结论: 以微核率为生物终点, 中子/γ 射线混合照射对人淋巴细胞引起的损伤严重, 说明混合照射可能存在一定的协同作用。

**【关键词】**中子辐射; <sup>137</sup>Cs γ 射线; 中子/γ 射线混合辐射; 微核; 核质桥; 核芽

**【中图分类号】**R730.5 **【文献标识码】**A **DOI:** 10.3969/j.issn.1672-4992.2022.15.006

**【文章编号】**1672-4992-(2022)15-2706-05

**【收稿日期】** 2022-01-20

**【修回日期】** 2022-03-08

**【作者单位】** 中国辐射防护研究院, 山西 太原 030006

**【作者简介】** 张睿凤 (1980—), 女, 山西太原人, 副研究员, 研究方向: 放射医学。E-mail: zrf2202362@126.com

**【通讯作者】** 党旭红 (1983—), 男, 山西临汾人, 研究员, 研究方向: 放射医学。E-mail: dangxuhong005@163.com