

和基础^[7-8]。

本实验采用 CLSM 结合死菌与活菌荧光染色技术, 观察对比不同浓度的赤藓糖醇对体外实验条件下 24 h 变异链球菌单菌种生物膜结构的影响。从实验结果中发现, 阴性对照组 24 h 生物膜厚度明显高于赤藓糖醇实验组, 并且随着赤藓糖醇浓度的增加, 变异链球菌生物膜厚度变薄, 各层细菌密度降低, 细菌之间的黏结性降低, 各层活菌百分比也随浓度的增加而减少, 说明赤藓糖醇对变异链球菌生物膜结构有影响, 并且影响程度和赤藓糖醇浓度成反比, 随浓度增加, 影响效果也更加明显。本研究结果证实了赤藓糖醇对变异链球菌生物膜结构的影响作用, 以往研究也证实了赤藓糖醇能够抑制变异链球菌产酸, 减少唾液和牙菌斑中变异链球菌的数量、黏附以及降低葡糖基转移酶 (GTF) 和果糖基转移酶 (FTF) 等固有酶表达的作用等^[9-13]。赤藓糖醇对变异链球菌生物膜的抑制作用可能是由于赤藓糖醇不能被变异链球菌利用, 通过竞争性抑制变异链球菌的磷酸烯醇式丙酮酸依赖性磷酸转化酶系统, 从而抑制变异链球菌对糖类的吸收、转运。因为不同浓度的赤藓糖醇的作用强弱不同, 所以导致出现不同浓度间抑制效果的差异性^[14]。

总之, 赤藓糖醇能够影响变异链球菌生物膜结构, 减少生物膜中细菌数量; 但是, 关于赤藓糖醇对变异链球菌生物膜结构产生影响的具体机制以及不同浓度间作用的差异还需要在以后的研究中做进一步的探讨。

参考文献

- [1] 韩春妮, 何芳雁, 代蓉, 等. 赤藓糖醇对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用 [J]. 昆明医科大学学报, 2014, 35 (8): 9-11.
- [2] 马超, 王静. 赤藓糖醇基复合相变材料的研究进展 [J]. 材料导报, 2021, 35 (11): 11180-11187.
- [3] Livesey G. Health potential of polyols as sugar replacers, with emphasis on low glycaemic properties [J]. Nutr Res Rev, 2003, 16 (2): 163-191.
- [4] Munro I C, Bernt W O, Borzelleca J F, et al. Erythritol: an interpretive summary of biochemical, metabolic, toxicological and clinical data [J]. Food Chem Toxicol, 1998, 36 (12): 1139-1174.
- [5] 肖素荣, 李京东. 赤藓糖醇的特性及应用 [J]. 中国食物与营养, 2008, 13 (5): 26-28.
- [6] 唐子圣, 朱敏, 刘正. 变异链球菌生物膜结构观察 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24 (2): 103-106.
- [7] He J, Tu Q, Ge Y, et al. Taxonomic and functional analyses of the supragingival microbiome from caries-affected and caries-free hosts [J]. Microb Ecol, 2018, 75 (2): 543-554.
- [8] Solbiati J, FriasLopez J. Metatranscriptome of the oral microbiome in health and disease [J]. J Dent Res, 2018, 97 (5): 492-500.
- [9] 姚军, 张佳丽. 赤藓糖醇对变异链球菌作用机制的实验研究 [J]. 华西口腔医学杂志, 2012, 30 (1): 22-24.
- [10] 杨秀娟, 姚军. 赤藓糖醇和木糖醇对变异链球菌黏附的影响 [J]. 国际口腔医学杂志, 2012, 39 (2): 155-158.
- [11] 姚军, 张帆, 杨秀娟, 等. 赤藓糖醇抑制变异链球菌在牛奶中产酸的实验研究 [J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2013, 23 (8): 492-494.
- [12] 姚军, 张琰君, 张佳丽, 等. 赤藓糖醇对嗜酸乳杆菌影响配方奶中乳酸代谢量的定量分析 [J]. 中华口腔医学杂志, 2015, 50 (7): 408-412.
- [13] Park Y N, Jeong S S, Zeng J, et al. Anti-cariogenic effects of erythritol on growth and adhesion of Streptococcus mutans [J]. Food Sci Biotechnol, 2014, 23 (5): 1587-1591.
- [14] 樊明文, 周学东. 牙体牙髓病学 [M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 23-27.

• 基础研究 •

IGF1R/PI3K/Akt 通路及其调控对非小细胞肺癌血管生成拟态形成影响的研究

福建医科大学附属第二医院胸外科 (泉州 362000) 李荣宾 黄延延¹ 林贤宾 杨建胜

【摘要】 目的 为非小细胞肺癌 (NSCLC) 的治疗探索一个潜在的分子靶标。方法 通过 qPCR、Western blot、免疫组化检测 NSCLC 组织和癌旁组织 KLF16、IGF1R 表达情况; 通过抑制 IGF1R/PI3K/Akt 通路活化, 检测相关靶标 MMP2 和 MMP9 的表达; 通过 IGF1R/PI3K/Akt 通路抑制剂 LY294002 干预血管生成拟态 (VM) 形成。结果 与癌旁组织相比, 免疫组化、Western blot 和 qPCR 提示, KLF16 在 NSCLC 组织中表达降低, 且随着 NSCLC 级别提高, 表达量递减。NSCLC 组织中存在明显 IGF1R 阳性, 且 IGF1R 阳性表达量随着 NSCLC 级别增高而递增。同时, Western blot 和 Matrigel 三维细胞培养结果表明, 随着 IGF1R/PI3K/Akt 通路抑制剂浓度增加, IGF1R/PI3K/Akt 通路相关蛋白质、MMP2、MMP9 表达水平也随之降低, 肿瘤 VM 形成随之减少。结论 NSCLC VM 的形成与 IGF1R/PI3K/Akt 信号通路有关, KLF16 在 NSCLC 中的表达趋势与 IGF1R 表达相反, 两者之间是否存在调控关系需进一步验证。

【关键词】 非小细胞肺癌; 抗血管生成; KLF16; IGF1R/PI3K/Akt; 血管生成拟态

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (2019J01477)

¹ 福建医科大学附属第二医院超声医学科

【中图分类号】R734.2 【文献标识码】A 【文章编号】1002-2600(2023)03-0112-04

肺肿瘤细胞高度增殖和侵袭是肺癌患者高死亡率的主要原因,丰富的新生血管是肿瘤细胞快速增殖、高度侵袭和复发的重要间质结构。肺癌血管生成机制和抑制肿瘤血管新生是肺癌治疗的关键问题^[1]。血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)是高侵袭性肿瘤的一种新的肿瘤血管生成模式,在乳腺癌、肝癌、胶质瘤、卵巢癌及前列腺癌中均可见^[2-3],非小细胞肺癌(NSCLC)亦可见,且随肿瘤恶性程度增加 VM 现象更加明显^[4]。胰岛素生长因子 1 受体(IGF1R)是酪氨酸蛋白激酶受体家族的主要成员,在肺癌等大多数肿瘤高表达,参与增殖分化、侵袭、转移和抗凋亡等生物学效应。靶向 IGF1R 抑制剂和单克隆抗体可有效抑制肺癌细胞生长转移,提高肺癌对放化疗的敏感性^[5]。研究表明,IGF1R 的跨膜信号转导主要通过 PI3K-PKB/Akt 和 Ras-Raf-MAPK 两条通路,前者被证实与 VM 的形成密切相关^[6]。Kruppel 样转录因子(KLF)是一类含有 3 个高度保守的串联锌指结构的蛋白质分子,具有调控基因表达的功能,其中 KLF16 在调节细胞增殖、分化及肿瘤干细胞维持中具有关键作用^[7]。在 NSCLC 中,IGF1R/PI3K/Akt 通路 with 肿瘤 VM 形成的关系是本研究关注的重点,对转录因子 KLF16 与 IGF1R 的动态改变是否存在调控关系进行验证。

1 材料与方法

1.1 材料: 1) 标本:取自我院原发性 NSCLC 手术切除组织标本及活检病例,标本离体后即投入 4% 福尔马林固定,癌旁组织同法固定。2) 细胞与试剂:非小细胞肺癌细胞系(A549 细胞)购于中国科学院细胞库;IGF1R/PI3K/Akt 通路抑制剂(LY294002)购买自上海碧云天生物有限公司;鼠抗兔基质金属蛋白酶-2(MMP2)、基质金属蛋白酶-9(MMP9)、KLF16、 β -actin、GAPDH 抗体购自英国 Abcam 公司;鼠抗兔磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)、磷酸化磷脂酰肌醇-3 激酶(p-PI3K)、蛋白激酶 B(Akt)、磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)、IGF1R 抗体购于美国 Santa Cruz 公司。TRIzol 试剂盒、Tween、DAB 显色剂、苏木素购于上海赛默飞世尔科技有限公司。KLF16 qPCR 试剂盒购于北京博奥森生物有限公司。

1.2 方法:

1.2.1 免疫组化分析:病理切片经脱蜡、水化后置 0.01 mol/L, pH 值为 6.0 的柠檬酸缓冲液内进行高温修复抗原,冷却后用 TBS 缓冲液冲洗;在 5% 山羊血清封闭后,加一抗 IGF1R 于 4 °C 冰箱过夜;清除组织过氧化物酶,加二抗,并在 37 °C 孵育 30 min;用含 Tween 的 PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;加入 DAB 显色剂反应后冲洗;苏木紫复染,酒精分化, PBS 返蓝处理,封片;用光学显微镜观察非小细胞肺癌标本及癌旁组织标本 IGF1R 阳性表达情况。

1.2.2 VM 形成检测: 1) 从 -20 °C 冰箱取出保存的 Matrigel, 4 °C 过夜使成液态。2) 取 24 孔培养板每孔加入 300 μ L Matrigel 原液,小心摇动使之均匀分布于孔的各个部位。37 °C 培养箱内孵育 30 min 待其凝固。3) 用 0.25% 胰酶消化各组细胞使成单细胞悬液,接种 1 mL 细胞悬液,分别置于常氧及缺氧条件下继续培养。4) 24 h 后终止培养,在显

微镜下观察各组 VM 结构,并在显微拍照后应用 Image J V1.8.0 软件对结果进行定量分析。

1.2.3 qPCR 检测:采用 TRIzol 试剂盒提取 NSCLC、癌旁组织及 A549 细胞总 RNA,检测纯度后逆转录获得 cDNA;KLF16 mRNA 正向引物序列为 5'-GTGAACATTAACCTG-CACACGGT-CGG-3',反向引物序列为 5'-GGACGCGTG-GCGTGTCCGACGTTATG-3';以 U6 作为内参,正向引物序列为 5'-CCTCGTTCTTCGCACATATACACA-3,反向引物序列为 5'-TAACGGTGCAGCCGAGGTATCGT-3'。PCR 程序设定:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 30 s,60 °C 退火 10 s,70 °C 延伸 30 s,共循环 30 次。相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算。

1.2.4 Western blot 分析:采用 BCA 试剂盒提取样本蛋白质;加 SDS-DTT 上样缓冲液后沸水浴 5 min,冰浴 10 min,离心 5 min;取上清 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,采用电转法使凝胶上蛋白转至 PVDF 膜;PVDF 膜经 1% 封闭液封闭,孵育一抗,4 °C 过夜;使用 TBST 液洗去非特异结合抗体,0.5% 封闭液封闭;孵育二抗 1.5 h;TBST 液洗去非特异结合抗体;浸于曝光液后,使用 Millipore ECL WB 检测系统观察免疫标记;抗体包括 MMP2、MMP9、Akt、p-Akt、PI3K、p-PI3K。所有目标蛋白均使用 Image J V1.8.0 软件测量灰度值,经与 β -actin 或 GAPDH 对比作定量分析。

1.3 统计学方法:采用 SPSS 23.0 软件进行分析。正态分布的计量资料以均数士标准差表示,多组比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 Bonferroni 法分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC、癌旁组织 IGF1R 表达水平:免疫组化分析表明,NSCLC 癌旁组织基本无 IGF1R 阳性表达,NSCLC 组织有明显 IGF1R 阳性表达,且阳性表达随着肺癌级别增高表达递增($P < 0.05$,图 1)。

2.2 干预情况下 IGF1R/PI3K/Akt 通路对 NSCLC VM 生成的影响:利用肺癌细胞系 A549 正常传代培养,Matrigel 三维培养出现肿瘤 VM,加入不同浓度该通路抑制剂 LY294002 干预 VM 生成。结果表明,当 LY294002 浓度为 25、50 μ mol/L 时,能够明显抑制 A549 肺癌细胞系生成肿瘤 VM,并且随浓度升高抑制作用更明显($P < 0.05$,图 2)。

2.3 NSCLC 组织、细胞 KLF16 mRNA 表达情况:qPCR 分析 KLF16 mRNA 在不同级别的肺癌组织、癌旁组织及肺癌细胞中的表达水平。相较于癌旁组织,KLF16 mRNA 在肺癌组织及肺癌细胞中的表达明显降低($P < 0.01$),且随着肺癌级别增加,其表达量递减($P < 0.05$,图 3)。

2.4 NSCLC 组织 KLF16 蛋白表达情况:标本按 NSCLC 病理分级分为低级别组(I~II 级)和高级别组(III~IV 级)。经原代培养扩增并提取蛋白后经 Western blot 分析 KLF16 在肺癌及癌旁组织的表达。相对于癌旁组织(N1~N4),KLF16 在肺癌组织(T1~T4)中的表达水平明显降低($P < 0.05$,图 4)。

2.5 干预情况下 IGF1R 下游的 PI3K/Akt 通路表达情况：正常传代的 A549 细胞加入该通路抑制剂 LY294002 干预，经 Western blot 检测，相对于对照组，p-PI3K、p-Akt 蛋白表达明显降低，PI3K/Akt 通路被抑制 ($P < 0.05$)。同时，

细胞侵袭性相关蛋白 MMP2 和 MMP9 表达也随之减少 ($P < 0.05$)。此外，随抑制剂浓度增加，MMP2、MMP9 及 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达也随之降低 ($P < 0.05$)。见图 5。

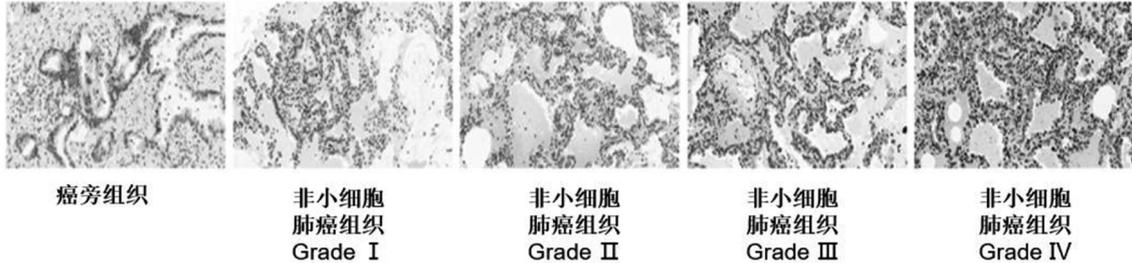
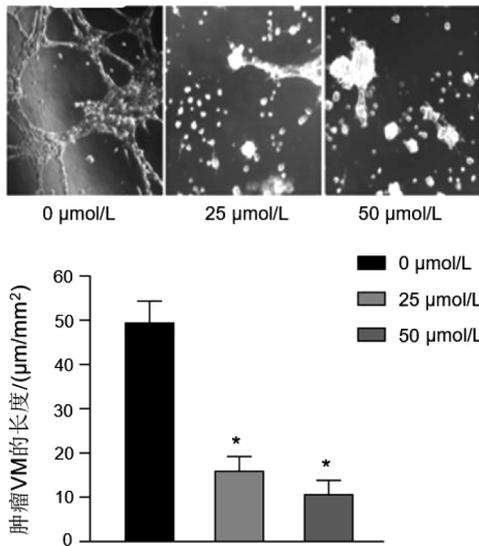
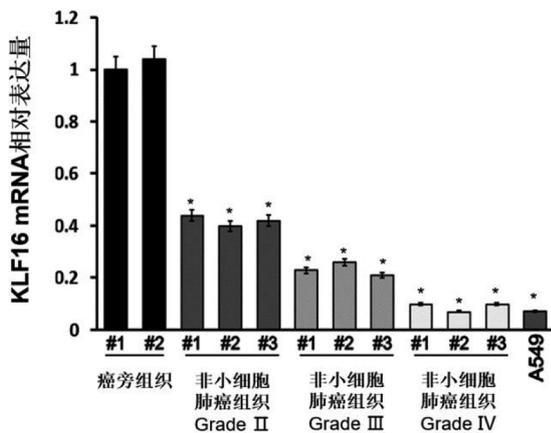


图 1 IGF1R 在癌旁组织、不同级别癌组织表达的免疫组化染色图谱



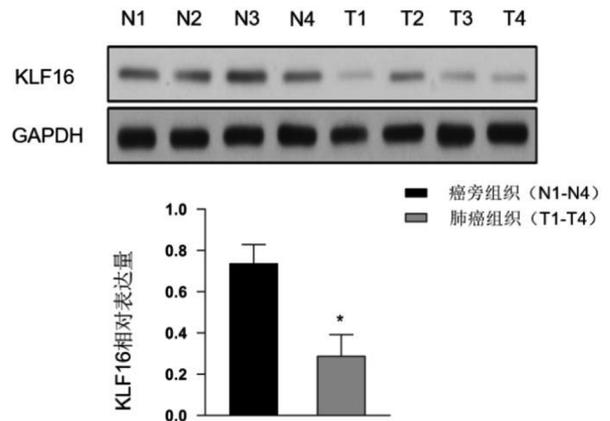
注：与 0 μmol/L 组比较，* $P < 0.05$ 。

图 2 干预情况下 IGF1R/PI3K/Akt 通路对 NSCLC VM 生成的影响



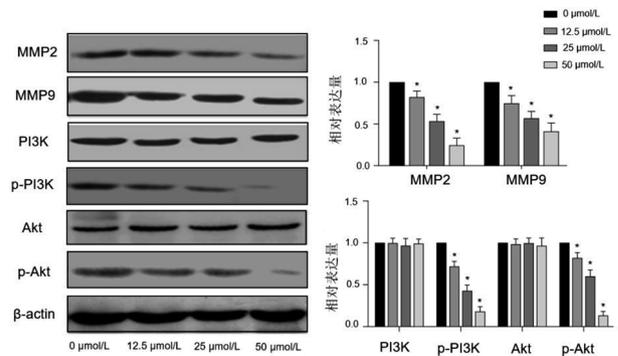
注：与癌旁组织比较，* $P < 0.05$ 。

图 3 不同级别肺癌组织、癌旁组织及肺癌细胞中 KLF16 mRNA 表达水平



注：与癌旁组织比较，* $P < 0.05$ 。

图 4 KLF16 蛋白在肺癌及旁组织的表达情况



注：与 0 μmol/L 组比较，* $P < 0.05$ 。

图 5 干预情况下 IGF1R/PI3K/Akt 通路表达情况

3 讨论

抗血管生成策略的诞生是肿瘤治疗新的里程碑。肿瘤血管生成无论是在结构，还是生物学特性上都不同于正常血管，因此，对于肿瘤血管构筑的研究意义重大^[8]。VM 最早发现在黑色素瘤细胞中^[9]，是对传统肿瘤血管生成表现的重要补充^[2,8]。与经典的血管构成不同，VM 不依赖血管内皮细胞，而是由高侵袭性肿瘤细胞通过自身变形和细胞外基质重塑形成的类血管结构。传统的肿瘤血管抑制治疗仅仅针对肿瘤血管内皮细胞依赖性血管^[10]，而 VM 的发现使人们认

识到, 只有同时抑制内皮细胞依赖性血管和血管生成拟态, 才能达到良好的治疗效果^[11-12]。

IGF1R 是参与肿瘤增殖、分化、侵袭等生物学行为的关键因子, 在 NSCLC 中 IGF1R 表达越高, 患者疾病生存期则越短^[13]。近年来的研究发现, IGF1R 在肿瘤 VM 形成中的作用, 与其参与调控肿瘤细胞外基质重塑有关^[14]。Hess 等^[11]研究发现, 在黑色素瘤细胞形成 VM 的过程中, IGF1R/PI3K/Akt 调节膜型基质金属蛋白酶 1 (MT1-MMP) 的功能, 其在金属蛋白酶组织抑制因子-2 (TIMP-2) 的协同作用下活化 MMP-2, 分解层黏连蛋白 5 γ 2 链为 γ 2' 和 γ 2X 片段, 沉积于肿瘤细胞外基质中, 促进 VM 形成。Li 等^[12]研究结果表明, 高侵袭性胶质瘤细胞中 VM 的形成与 MT1-MMP、MMP2 和 MMP9 的高表达相关。

本研究我们在 NSCLC 组织中也发现 IGF1R 表达呈阳性, 且随着肺癌级别的升高而递增。实验中采用特异性抑制剂抑制 IGF1R/PI3K/Akt 通路活化后, 肺癌 A549 细胞的侵袭性相关蛋白 MMP2 和 MMP9 表达随之减少, 同时肿瘤 VM 的形成受到抑制。该实验结果表明, IGF1R/PI3K/Akt 通路及肺癌 VM 的形成存在一定的关系。同时我们在研究中还发现, 作为调控基因表达的转录因子 KLF16, 在肺癌组织中的表达明显低于癌旁组织, 并且肿瘤级别越高, KLF16 的表达越低。这一趋势与 IGF1R 在肺癌组织中的表达情况相反, 两者之间是否存在相关的调控关系需进一步验证。

综上所述, 本项目以人 NSCLC 及细胞系为研究对象, 是基于 IGF1R/PI3K/Akt 信号通路与血管生成拟态相关机制的研究。探索 KLF16 与 IGF1R/PI3K/Akt 信号通路及肺癌血管生成拟态形成的关系, 有望成为肺癌肿瘤血管生成研究的新思路, 为抗肿瘤血管生成的治疗提供理论基础和分子靶点。

参考文献

- [1] Williamson S C, Metcalf R L, Trapani F, et al. Vasculogenic mimicry in small cell lung cancer [J]. Nat Commun, 2016, 7: 13322.
- [2] Hendrix M J, SefTOR E A, SefTOR R E, et al. Tumor cell vascular mimicry: Novel targeting opportunity in melanoma [J]. Pharmacol Ther, 2016, 159: 83-92.
- [3] SefTOR R E, Hess A R, SefTOR E A, et al. Tumor cell vasculogenic mimicry: from controversy to therapeutic promise [J]. Am J Pathol, 2012, 181 (4): 1115-1125.
- [4] Ding J, Jia X, Zuo B, et al. A novel monoclonal antibody targeting a novel epitope of VE cadherin inhibits vasculogenic mimicry of lung cancer cells [J]. Oncol Rep, 2018, 39 (6): 2837-2844.
- [5] Kim T R, Cho E W, Paik S G, et al. Hypoxia-induced SM22 α in A549 cells activates the IGF1R/PI3K/Akt pathway, conferring cellular resistance against chemo- and radiation therapy [J]. FEBS Lett, 2012, 586 (4): 303-309.
- [6] Park B R, Lee S A, Moon S M, et al. Anthracycline-induced caspase-dependent apoptosis through IGF1R/PI3K/AKT pathway inhibition in A549 human non-small lung cancer cells [J]. Oncol Rep, 2018, 39 (6): 2769-2776.
- [7] Srivastava A K, Wang Y, Huang R, et al. Human genome meeting 2016: Houston, TX, USA. 28 February-2 March 2016 [J]. Hum Genomics, 2016, 10 (Suppl 1): 12.
- [8] Spiliopoulos K, Peschos D, Batistatou A, et al. Vasculogenic mimicry: lessons from melanocytic tumors [J]. In Vivo, 2015, 29 (3): 309-317.
- [9] Maniotis A J, Folberg R, Hess A, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry [J]. Am J Pathol, 1999, 155 (3): 739-752.
- [10] Frisch C M, Zimmermann K, Zilleßen P, et al. Non-small cell lung cancer cell survival crucially depends on functional insulin receptors [J]. Endocr Relat Cancer, 2015, 22 (4): 609-621.
- [11] Hess A R, SefTOR E A, SefTOR R E, et al. Phosphoinositide 3-kinase regulates membrane Type 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 activity during melanoma cell vasculogenic mimicry [J]. Cancer Res, 2003, 63 (16): 4757-4762.
- [12] Li Y, Sun B, Zhao X, et al. MMP-2 and MMP-13 affect vasculogenic mimicry formation in large cell lung cancer [J]. J Cell Mol Med, 2017, 21 (12): 3741-3751.
- [13] Zhao S, Qiu Z, He J, et al. Insulin-like growth factor receptor 1 (IGF1R) expression and survival in non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7 (10): 6694-704.
- [14] Gest C, Mirshahi P, Li H, et al. Ovarian cancer: Stat3, RhoA and IGF-1R as therapeutic targets [J]. Cancer Lett, 2012, 317 (2): 207-217.

• 基础研究 •

复合麻醉剂对衰老大鼠认知能力及神经细胞凋亡的影响

福建省福州市第二医院麻醉科 (福州 350001) 林 辉

【摘要】 目的 探讨复合麻醉剂对衰老大鼠认知能力及神经细胞凋亡的影响。方法 构建 D-半乳糖致衰老大鼠模型, 通过腹腔镜注射的方式对实验大鼠进行戊巴比妥钠、氯胺酮及复合麻醉剂 (盐酸右旋美托咪定 + 咪达唑仑 + 盐酸羟考酮) 干预, 通过水迷宫及平衡木实验测试不同实验组的大鼠的运动及认知能力, 通过原位末端转移酶标记技术 (TUNEL)