DOI:10.16016/j.2097-0927.202410011

高原低氧改善肿瘤免疫微环境并抑制结直肠癌皮下肿瘤生长

赵思洁,王 猛,高 源,杨 芳,胡绍凡,缪洪明 陆军军医大学(第三军医大学)高原军事医学系病理生理学教研室,极端环境医学教育部重点实验室,重庆

[**摘要**] **目的** 探究高原低氧环境对结直肠癌体内生长及肿瘤微环境的影响。**方法** 采用随机数字表法将雄性6周龄BALB/C与C57BL/6小鼠(体质量18~20 g)各自分为2组,分别置于低压氧仓(10%氧气,海拔约5 600 m,高原低氧组)和SPF级动物实验中心(21%O_2,海拔约300 m,平原常氧组)饲养,C57BL/6小鼠每组8只,BALB/C小鼠每组7只。对C57BL/6小鼠皮下接种MC38、对BALB/C小鼠皮下接种CT26以构建结直肠癌皮下肿瘤模型。观察C57BL/6与BALB/C小鼠肿瘤大小并统计肿瘤质量。收集C57BL/6小鼠的肿瘤、外周血以及脾脏中的免疫细胞,流式细胞术对巨噬细胞、T淋巴细胞、IFN-γ^+T淋巴细胞以及髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells,MDSC)进行检测,分析这些免疫细胞在平原常氧和高原低氧环境下的变化情况。**结果** 与平原常氧组C57BL/6与BALB/C小鼠相比,高原低氧组2种小鼠皮下肿瘤生长都被显著抑制(0.17 *vs* 0.09 g,1.38 *vs* 0.51 g,$P<0.01$)与平原常氧组C57BL/6小鼠相比,高原低氧组C57BL/6小鼠肿瘤微环境中的M2巨噬细胞比例显著降低(22.13% *vs* 15.90%,$P<0.05$);MDSC比例减少(2.06% *vs* 1.05%,$P<0.01$),其中单核性MDSC(M-MDSC:Ly6C$^+$)亚群比例显著降低(60.97% *vs* 41.13%,$P<0.01$),而粒性MDSC(PMN-MDSC:Ly6G$^+$)比例无显著差异(10.97% *vs* 9.70%,$P>0.05$);CD8$^+$ T细胞比例显著升高(41.25% *vs* 51.18%,$P<0.01$),CD4$^+$T细胞比例降低(48.70% *vs* 41.93%,$P<0.05$);IFN-γ^+T、IFN-γ^+CD4$^+$T、IFN-γ^+CD8$^+$ T细胞比例均显著增高(28.58% *vs* 59.65%,23.33% *vs* 53.65%,36.9% *vs* 66.48%,$P<0.01$);外周血中CD4$^+$ T淋巴细胞和M1巨噬细胞比例都降低(84.98% *vs* 78.43%,5.86% *vs* 4.01%,$P<0.01$),MDSC及PMN-MDSC(Ly6G$^+$)比例增高(4.47% *vs* 16.43%,36.56% *vs* 62.97%,$P<0.01$);脾脏中CD8$^+$ T淋巴细胞比例和IFN-γ^+ CD8$^+$ T淋巴细胞比例都显著降低(33.05% *vs* 27.68%,5.13% *vs* 1.58%,$P<0.01$)。**结论** 高原低氧可以增强肿瘤微环境内免疫应答并抑制结直肠癌皮下肿瘤的生长,但却抑制全身性免疫应答。

[**关键词**] 高原;低氧;肿瘤微环境;结直肠癌;免疫应答
[**中图法分类号**] R364.4;R730.23;R735.35 [**文献标志码**] A

Plateau hypoxia improves tumor immune microenvironment and inhibits subcutaneous tumor growth of colorectal cancer

ZHAO Sijie, WANG Meng, GAO Yuan, YANG Fang, HU Shaofan, MIAO Hongming Department of Pathophysiology, Key Laboratory of Extreme Environmental Medicine of Ministry of Education, Faculty of High Altitude Military Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of plateau hypoxia on the growth and tumor

[**基金项目**] 重庆市博士后科学基金项目(CSTB2023NSCQ-BHX0221);陆军军医大学科技创新能力提升专项青年培育项目(2023XQN25)
[**通信作者**] 缪洪明,E-mail:hongmingmiao@sina.com

2097-0927/Copyright © 2025,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)
引用格式:赵思洁,王猛,高源,等. 高原低氧改善肿瘤免疫微环境并抑制结直肠癌皮下肿瘤生长[J]. 陆军军医大学学报,2025,47(01):38-50. DOI:10.16016/j.2097-0927.202410011.
Citation:ZHAO S J, WANG M, GAO Y, *et al*. Plateau hypoxia improves tumor immune microenvironment and inhibits subcutaneous tumor growth of colorectal cancer[J]. J Army Med Univ,2025,47(01):38-50. DOI:10.16016/j.2097-0927.202410011.

microenvironment of colorectal carcinoma *in vivo*. **Methods** A total of 16 male BALB/C mice (6 weeks old, weight 18-20 g) were randomly divided into plateau hypoxic group and plain normoxic group, with 8 mice in each group, while 14 male C57BL/6 mice were grouped in same way, with 7 mice in each group. The mice in the plateau hypoxic group were housed in a low-pressure oxygen (10%) chamber to simulate an altitude of approximately 5 600 m, while the mice of the other group was maintained in SPF-grade normal atmospheric conditions (21% oxygen, at an altitude of about 300 m). Colorectal tumor MC38 cells and colon adenocarcinoma CT26 cells were subcutaneously implanted into C57BL/6 mice and BALB/C mice, respectively to construct subcutaneous tumor-bearing mouse models. Then the tumor size and weight were measured in 4 groups of mice. After the tumor tissues, spleen and blood samples were collected in the C57BL/6 mice. Flow cytometry was used to determine the percentages of macrophages, T lymphocytes, IFN-γ^+T lymphocytes, and myeloid-derived suppressor cells (MDSC). The differences in these immune cells were compared between the cells from the plateau hypoxic group and those from the plain normoxic group. **Results** The weight of subcutaneous tumor mass was significantly inhibited in both C57BL/6 and BALB/C mice from the plateau hypoxic group than those from the 2 plain normoxic groups (0.17 *vs* 0.09 g, 1.38 *vs* 0.51 g, $P<0.01$). When compared with the immune cells from the tumor mass of the plain normoxic C57BL/6 mice, the percentage of M2-type macrophages was reduced in the tumor tissue from the plateau hypoxic mice (22.13% *vs* 15.90%, $P<0.05$), so was that of MDSC (2.06% *vs* 1.05%, $P<0.01$), particularly in the monocytic (M)-MDSC subgroup (60.97% *vs* 41.13%, $P<0.01$). While, no significant change was observed in the proportion of the polymorphonuclear (PMN)-MDSC subgroup (10.97% *vs* 9.70%, $P>0.05$). Additionally, the percentage of $CD4^+$ T cells was significantly reduced (48.70% *vs* 41.93%, $P<0.05$), whereas that of $CD8^+$ T cells was obviously increased (41.25% *vs* 51.18%, $P<0.05$), along with a notable rise in the proportions of IFN-γ^+ T, IFN-γ^+ $CD4^+$T and IFN-γ^+ $CD8^+$T cells (28.58% *vs* 59.65%, 23.33% *vs* 53.65%, 36.9% *vs* 66.48%, $P<0.01$). However, between the peripheral blood samples of the 2 groups of C57BL/6 mice, the proportions of M1-type macrophages and $CD4^+$ T cells were reduced (84.98% *vs* 78.43%, 5.86% *vs* 4.01%, $P<0.01$), and those of MDSC and PMN-MDC were increased (4.47% *vs* 16.43%, 36.56% *vs* 62.97%, $P<0.01$). In the spleen tissues, notable decreases were observed in the proportions of $CD8^+$T cells and IFN-γ^+ $CD8^+$T cells between the 2 groups (33.05% *vs* 27.68%, 5.13% *vs* 1.58%, $P<0.01$). **Conclusion** Plateau hypoxia improves the immune response within the tumor microenvironment, and inhibits subcutaneous tumor growth of colorectal cancer, but suppresses systemic immune response.

[**Key words**] plateau; hypoxia; tumor microenvironment; colorectal cancer; immune response

Supported by the Postdoctoral Science Fund of Chongqing (CSTB2023NSCQ-BHX0221) and the Special Project for Young Scholars of Science and Technology Innovation Capacity Promotion of Army Medical University (2023XQN25). Corresponding author: MIAO Hongming, E-mail: hongmingmiao@sina.com

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是发病率排名第3的常见恶性肿瘤。据相关研究统计,2022年全球癌症死亡人数总占比为60%,其中因CRC死亡的人数占全球癌症死亡人数的比例为9.6%,仅次于肺癌[1]。且由于饮食方式的改变及激素的滥用等各种因素,CRC的发病率仍在逐年上升,因此CRC愈发成为危害世界人民健康的重大疾病[2]。

高原环境的气候特点包括低压低氧、紫外线强、寒冷干燥,其中又以低氧对机体的影响最为显著[3-4]。尽管暴露于低氧环境中会导致人体的心血管、神经系统、以及心肺的永久性损害,但有些研究却报道相比于平原,高海拔低氧环境可以降低糖尿病和肥胖等代谢紊乱的患病率及肿瘤的发生率和病死率[5-7]。提示高原低氧可以通过调节机体代谢和免疫功能来影响肿瘤进展,但具体调控效应和机制尚不清楚。相关流行病学报道指出:生活在中等海拔(250~2 000 m)地区人群的CRC发病率和病死率较平原人群低[8];高海拔人群的CRC患病率和病死率比低海拔人群的低[7];包括CRC在内的实体肿瘤患者中,西藏地区人群的发病率和病死率低于广州地区的人群[9]。然而,也有流行

病学研究发现高海拔环境会提高癌症的发生率和病死率,如GARRIDO等[10]发现厄瓜多尔高海拔人群的癌症患病率和病死率较低海拔人群的高,并且厄瓜多尔高海拔地区居民患CRC的风险比低海拔地区居民高42.1%。可见,高原环境的确可以调控CRC的发生发展,但具体调控效应和作用机制尚待明晰。因此,本研究通过模拟高原低氧环境,探索高原低氧环境对CRC皮下肿瘤进展的影响及相关作用机制,来更好地为高原CRC患者提供治疗的新干预靶点和策略方案。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 CRC细胞系MC-38(C57BL/6鼠源)和CT26(BALB/c鼠源)由陆军军医大学高原军事医学系病理生理学教研室缪洪明课题组保存[11]。

1.1.2 实验动物 16只C57BL/6雄性小鼠及14只BALB/C雄性小鼠(6周龄,体质量18~20 g)均购自重庆恩斯维尔生物科技有限公司。实验动物饲养于陆军军医大学SPF级动物实验中心,饲养期间小鼠自由饮水、饮食,昼夜各半循环照明,温(22~24 ℃)湿(40%~70%)度恒定。研究中使用的所有方案经过陆军军医大学实验动物福利伦理委员会(AMUWEC20230464)与金凤实验室实验动物管理和使用委员会批准,涉及动物处理的程序符合实验动物护理机构的指南。

1.1.3 试剂 DMEM高糖培养基、胎牛血清购自上海Viva Cell公司;PBS、0.25%胰酶、DEPC水等购自上海碧云天生物技术公司;青-链霉素、4%多聚甲醛固定液购自北京Biosharp公司;小鼠肿瘤浸润组织淋巴细胞分离试剂盒(#P9000)购自北京Solarbio公司;细胞固定通透液购自美国Invitrogen公司;流式抗体PerCP/Cy5.5-CD45(#103132)、APC/Cy7-F4/80(#123118)、APC-CD206(#141708)、PE-CD11c(#117308)、PerCP/Cy5.5-Gr1(#108428)、FITC-Ly6C(#128006)、APC/Cy7-Ly6G(#127624)、AF700-CD45(#147716)、PE-CD3(#100206)、APC/Cy7-CD4(#100526)、PerCP/Cy5.5-CD8(#100734)、APC-CD11b(#101212)、APC-IFN-γ(#505810)及T细胞激活封闭试剂盒(#423303)均购自美国Bio Legend公司。

1.1.4 低压低氧仓 小型动物实验低压氧仓(购自上海塔望智能科技有限公司),带有活体动物排泄物清除系统,能够容纳约10个标准尺寸的鼠笼。设定温度:26 ℃,海拔:5 600 m,O_2:10%,CO_2:0.64%,湿度:20%~30%。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MC38与CT26细胞都用含5%胎牛血清、1%青-链霉素的DMEM高糖培养基培养于5%CO_2、37 ℃细胞培养箱中。每日观察,根据细胞生长至培养基变黄或死亡细胞偏多时及时更换培养基,培养瓶内细胞密度达到80%~90%时传代。

1.2.2 皮下瘤模型构建 采用随机数字表法将14只BALB/C与16只C57BL/6小鼠各自平均分为2组,分别置于低压氧仓(10%O_2、海拔约5 600 m,高原低氧组)和SPF级动物实验中心(21%O_2、海拔约300 m,平原常氧组)饲养。在各自环境适应1周后,对C57BL/6小鼠腹股沟区皮下接种3.0×10^6个MC38肿瘤细胞,对BALB/C小鼠腹股沟区皮下接种3.0×10^6个CT26肿瘤细胞以构建CRC皮下肿瘤模型。将小鼠放回各自环境继续饲养。2周后,将4组小鼠经0.3%戊巴比妥钠溶液麻醉后处死,随即收取肿瘤、C57BL/6小鼠的外周血与脾脏。测量4组小鼠肿瘤大小和质量。

1.2.3 流式细胞术分析检测外周血、脾脏和肿瘤微环境免疫细胞 对C57BL/6小鼠肿瘤、外周血、脾脏的巨噬细胞、T细胞、IFN-γ^+T细胞以及髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells,MDSC)进行流式细胞术检测,分析这些免疫细胞在平原常氧和高原低氧环境下的变化情况。

1.2.3.1 提取外周血免疫细胞 将外周血收集到肝素管中,轻轻晃动肝素管,避免血液凝固;再向肝素管中加入体积为血液一半的PBS,并用移液枪吹打混匀;另取15 mL离心管,先加入5 mL小鼠淋巴细胞分离液;将混匀后的血液沿管壁缓慢加入离心管中,使血液轻柔平铺到分离液上面;在室温下以700×*g*离心20 min;轻轻地吸取淋巴细胞层及分离液层细胞到15 mL新离心管中,并加入10 mL PBS轻轻混匀来洗涤细胞,然后在4 ℃下以500×*g*离心5 min;弃上清,加入红细胞裂解液进行裂红;离心去上清,PBS重悬备用。

1.2.3.2 提取脾脏免疫细胞 脾脏碾碎后用PBS将其通过40 μm筛网过滤到50 mL离心管中;在4 ℃下以700×*g*离心5 min;裂红后离心去上清,加入PBS重悬备用。

1.2.3.3 提取肿瘤免疫细胞 将肿瘤组织剪碎后与肿瘤消化液混匀,转入锥形瓶中;置于37 ℃恒温振荡器上,消化1.5 h;将消化液通过40 μm筛网过滤到离心管中,在4 ℃下以50×*g*离心10 min;取上清到新的离心管中,离心去上清,PBS重悬;离心去上清,每管用4 mL 4%percoll重悬;取新离心管,先加入4 mL 70%percoll,再将4%percoll细胞混合液沿着管壁缓慢

加入其中;在21 ℃以600×*g*离心20 min,取含肿瘤细胞和红细胞的中间层,裂红后加入PBS重悬备用。

1.2.3.4　流式细胞实验　①巨噬细胞染色:将巨噬细胞在4 ℃下进行胞外染色40 min,用2%多聚甲醛常温固定细胞20 min,将细胞在4 ℃下通透30 min,在4 ℃下进行胞内染色50 min。②T淋巴细胞染色:将T淋巴细胞在4 ℃下进行胞外染色40 min,在4 ℃条件下固定通透40 min,进行胞内染色50 min。③IFN-γ$^+$T淋巴细胞染色:将细胞种在6孔板中,每孔1 mL DMEM全培养基加1 mL激活剂,6 h后收样。各类细胞分析标志物如下:总巨噬细胞(CD45$^+$F4/80$^+$)、M1巨噬细胞(CD45$^+$F4/80$^+$CD11c$^+$CD206$^-$)、M2巨噬细胞(CD45$^+$F4/80$^+$CD11c$^-$CD206$^+$)、CD8$^+$ T淋巴细胞(CD45$^+$CD3$^+$CD4$^-$CD8$^+$)、CD4$^+$ T淋巴细胞(CD45$^+$CD3$^+$CD4$^+$CD8$^-$)、MDSC(CD11b$^+$Gr1$^+$)、单核髓源性抑制细胞(monocytic,M)-MDSC(CD11b$^+$Ly6C$^+$Ly6G$^-$)、粒性髓源抑制细胞(polymorphonuclear,PMN)-MDSC(CD11b$^+$Ly6C$^-$Ly6G$^+$)。

1.3　统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,组间比较采用双侧非配对*t*检验。采用GraphPad 8.3.0统计软件进行分析,*P*<0.05表示差异具有统计学意义。

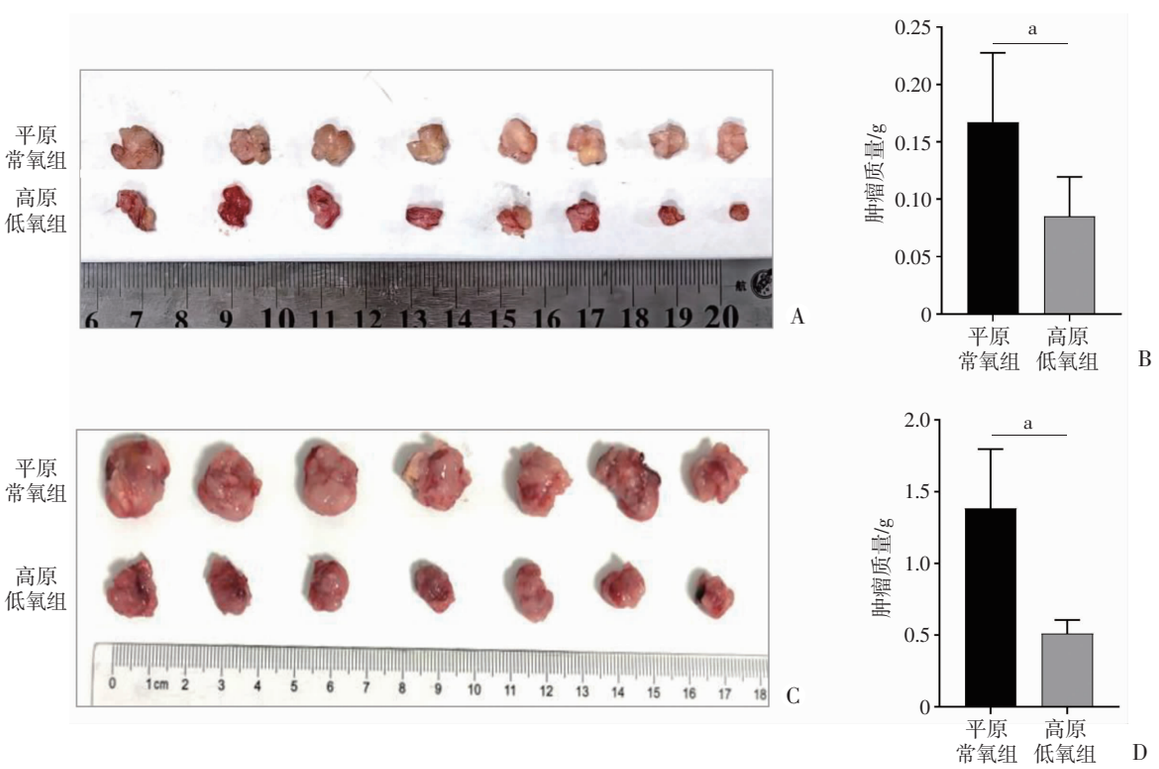
2　结果

2.1　高原低氧环境抑制小鼠CRC皮下肿瘤生长

与平原常氧组C57BL/6小鼠相比,高原低氧环境可以显著抑制皮下肿瘤生长(*P*<0.01,图1A、B);同样的结果在BALB/C小鼠中也得到了验证(*P*<0.01,图1C、D)。

2.2　高原低氧环境增强肿瘤微环境内免疫应答

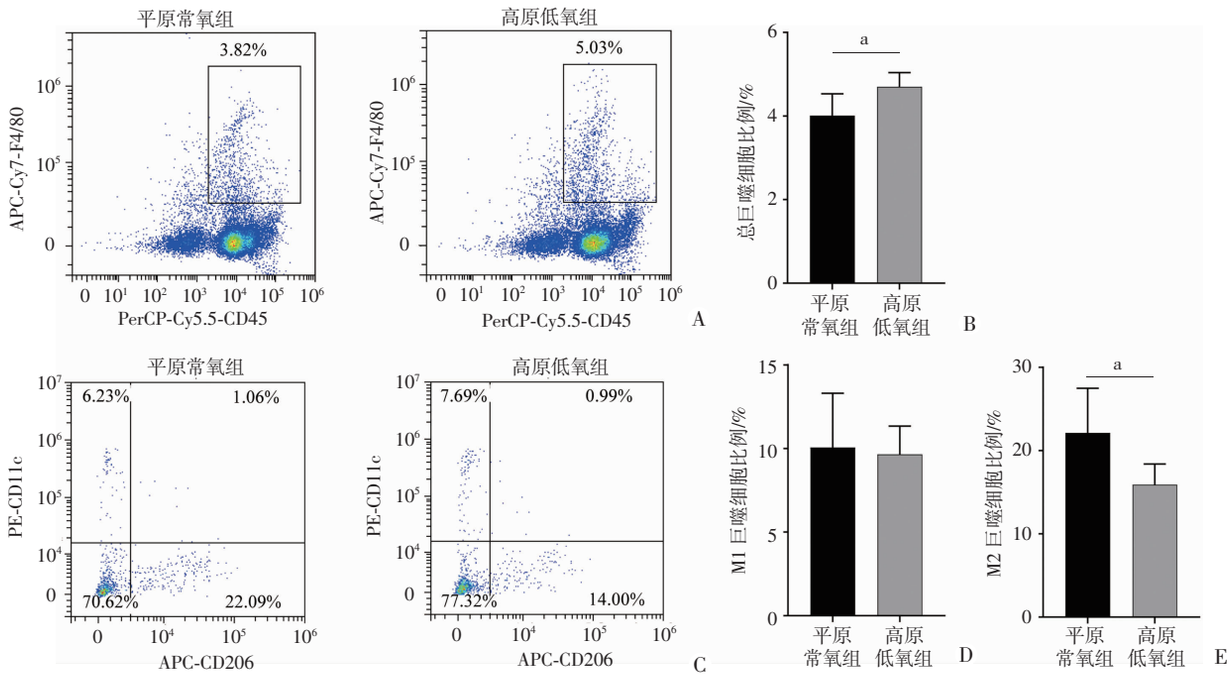
与平原常氧组小鼠相比,高原低氧组小鼠肿瘤微环境中总巨噬细胞比例增高(*P*<0.05,图2A、B),M1巨噬细胞比例无差异(图2C、D),但免疫抑制性的M2巨噬细胞比例显著降低(*P*<0.05,图2C、E)。MDSC比例降低(*P*<0.01,图3A、B),其中PMN-MDSC比例无差异(图3C、D),M-MDSC比例显著下降(*P*<0.01,图3C、E)。总T淋巴细胞比例升高(*P*<0.05,图4A、B),CD4$^+$ T淋巴细胞比例降低(*P*<0.05,图4C、D)、CD8$^+$ T淋巴细胞比例升高(*P*<0.01,图4C、E)。IFN-γ$^+$ T淋巴细胞比例升高(*P*<0.01,图5A、B),IFN-γ$^+$ CD4$^+$ T淋巴细胞比例升高(*P*<0.01,图5C、D)、IFN-γ$^+$ CD8$^+$ T淋巴细胞比例升高(*P*<0.01,图5E、F)。



a:*P*<0.01

A、B:高原与平原C57BL/6小鼠皮下肿瘤大体观察(*n*=8);C、D:高原与平原BALB/C小鼠皮下肿瘤大体观察(*n*=7)

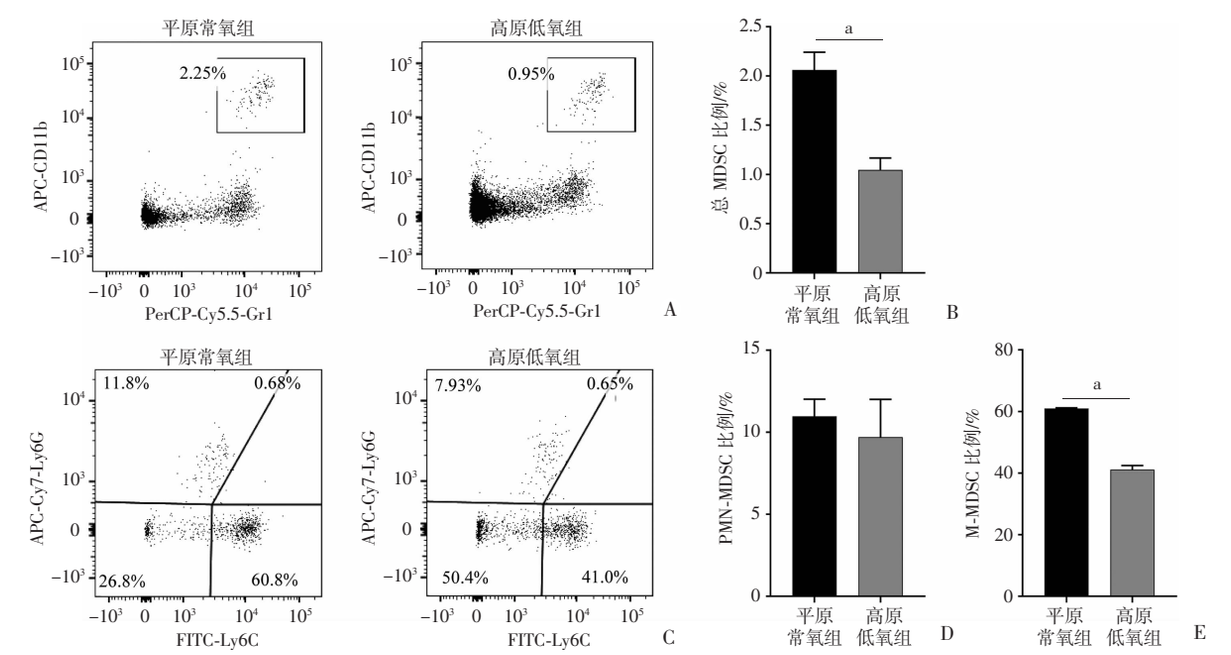
图1　高原低氧环境对小鼠CRC皮下肿瘤生长的影响($\bar{x}\pm s$)



a:P<0.05

A、B:流式细胞术检测肿瘤总巨噬细胞及比例分析;C~E:流式细胞术检测肿瘤M1、M2巨噬细胞及比例分析

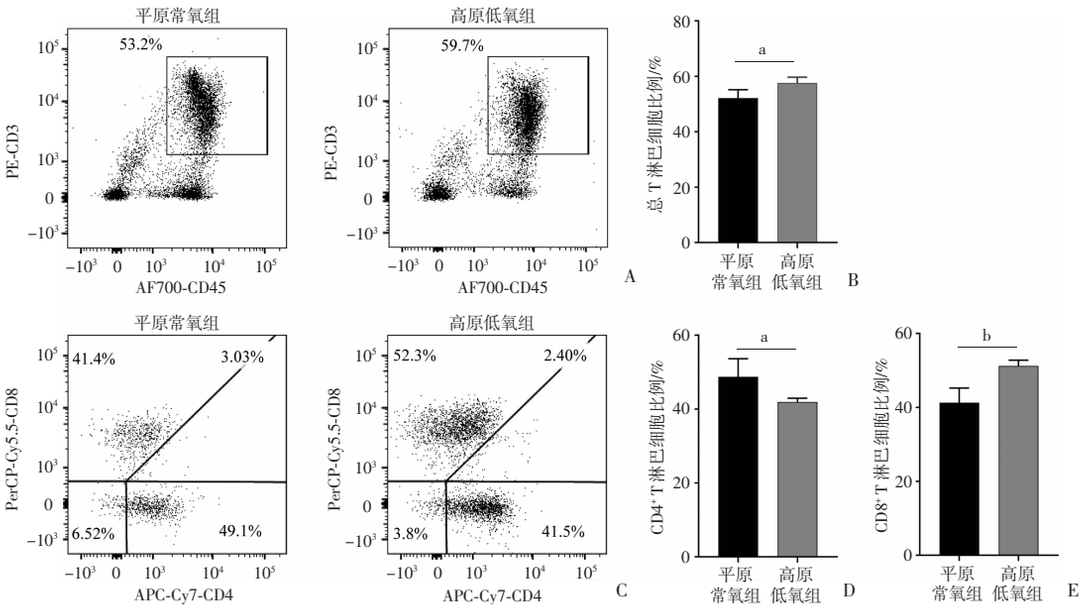
图2 高原低氧环境对CRC皮下肿瘤模型中肿瘤组织巨噬细胞的影响(n=3,$\bar{x}\pm s$)



a:P<0.01

A、B:流式细胞术检测总髓源性抑制细胞及比例分析;C~E:流式细胞术检测髓源性抑制细胞Ly6G$^+$、Ly6C$^+$亚群及比例分析

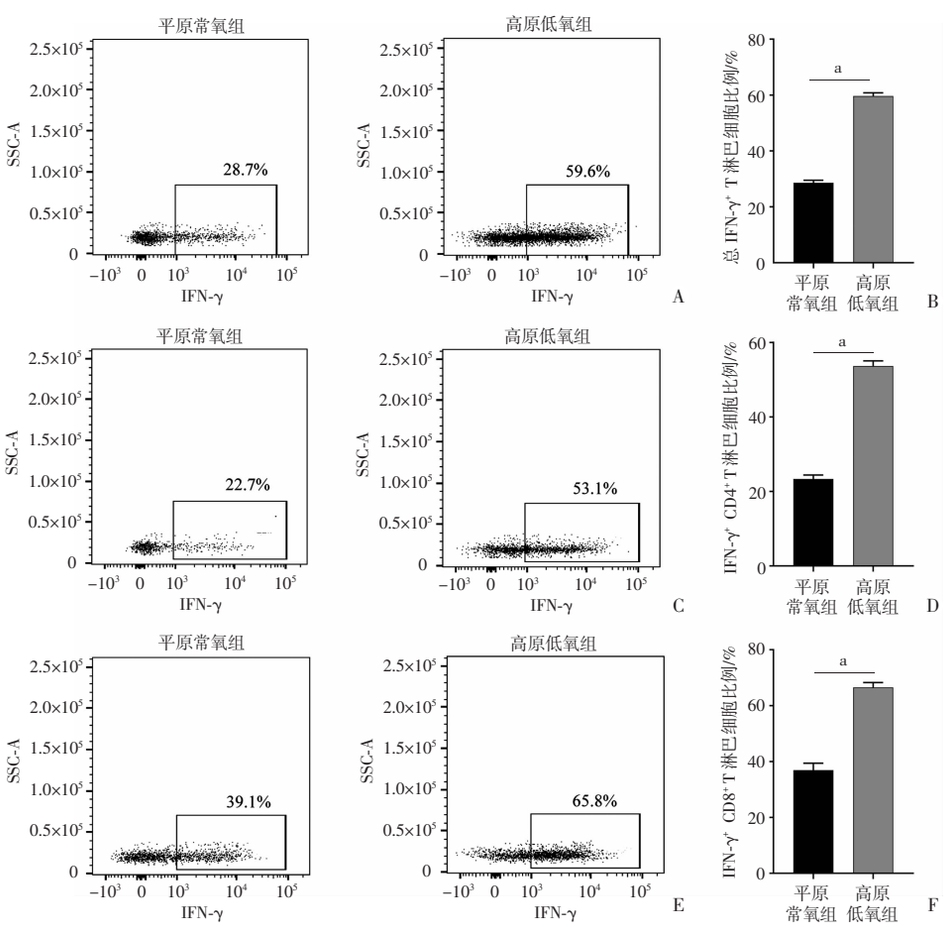
图3 高原低氧环境对CRC皮下肿瘤模型中肿瘤组织髓源性抑制细胞的影响(n=3,$\bar{x}\pm s$)



a:P<0.05,b:P<0.01

A、B:流式细胞术检测T淋巴细胞及比例分析;C～E:流式细胞术检测CD4$^+$ T、CD8$^+$ T淋巴细胞亚群及比例分析

图4　高原低氧环境对CRC皮下肿瘤模型中肿瘤组织T淋巴细胞的影响(n=3,$\bar{x}\pm s$)



a:P<0.01

A、B:流式细胞术检测IFN-γ$^+$ T淋巴细胞及比例分析;C、D:流式细胞术检测IFN-γ$^+$CD4$^+$T淋巴细胞及比例分析;E、F:流式细胞术检测IFN-γ$^+$CD8$^+$T淋巴细胞及比例分析

图5　高原低氧环境对CRC皮下肿瘤模型中肿瘤组织IFN-γ$^+$T淋巴细胞的影响(n=3,$\bar{x}\pm s$)

2.3　高原低氧环境抑制全身性免疫应答

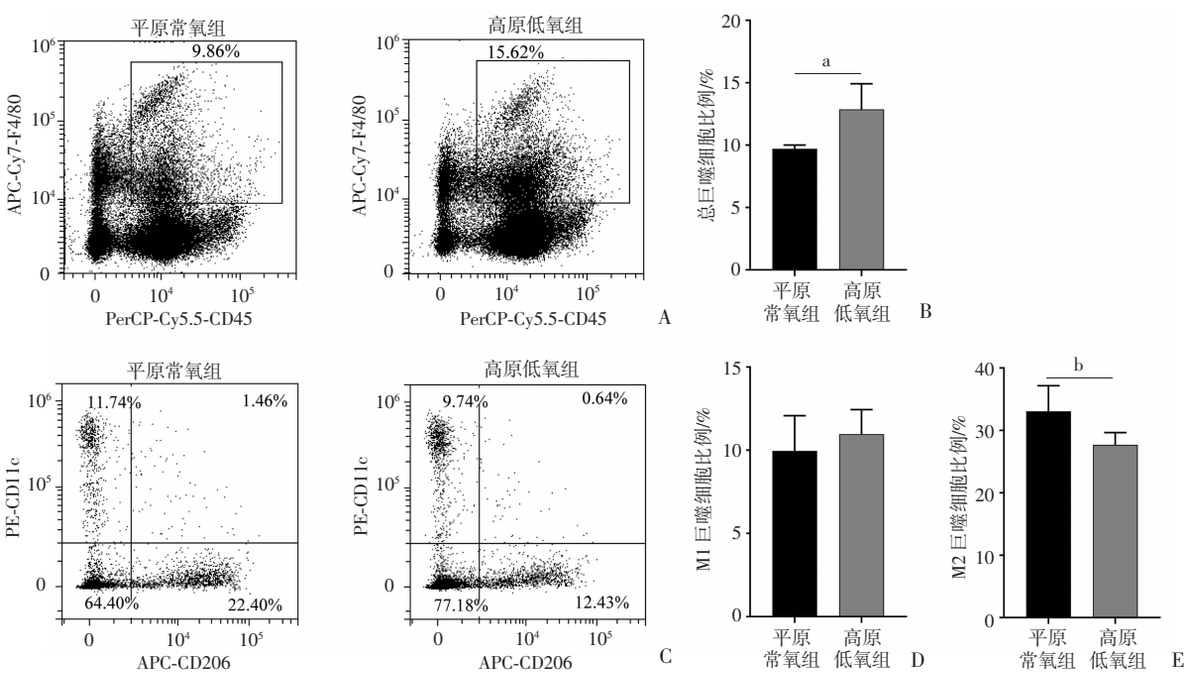
2.3.1　高原低氧环境抑制脾脏免疫应答　脾脏中免疫细胞的检测结果显示：与平原常氧组小鼠相比，高原低氧组小鼠脾脏组织中总巨噬细胞比例增高（$P<0.01$，图6A、B），但M1巨噬细胞比例无显著差异（图6C、D），M2巨噬细胞比例显著降低（图$P<0.05$，6C~E）。MDSC比例显著降低（$P<0.01$，图7A、B），其中PMN-MDSC及M-MDSC无差异（图7C~E）。总T淋巴细胞显著增高（$P<0.01$，图8A、B），$CD4^+$ T淋巴细胞比例增高（$P<0.05$，图8C、D），$CD8^+$ T淋巴细胞比例降低（$P<0.01$，图8C、E）。IFN-γ^+ T淋巴细胞比例降低（$P<0.05$，图9A、B），IFN-γ^+ $CD4^+$ T淋巴细胞比例显著降低（$P<0.05$，图9C、D）、IFN-γ^+ $CD8^+$ T淋巴细胞降低（$P<0.01$，图9E、F）。

2.3.2　高原低氧环境抑制外周血免疫应答　外周血中免疫细胞的检测结果显示：与平原常氧组小鼠相比，高原低氧组小鼠外周血中总巨噬细胞比例无差异（图10A、B），其中M1巨噬细胞比例降低（$P<0.01$，图10C、D），M2巨噬细胞比例无差异（图10C、E）。MDSC比例显著增高（$P<0.01$，图11A、B），其中PMN-MDSC增加（$P<0.01$，图11C、E），M-MDSC降低（$P<0.01$，图11D、E）。总T淋巴细胞比例增高（$P<0.01$，图12A、B），$CD4^+$ T淋巴细胞比例降低（$P<0.01$，图12C、D），$CD8^+$ T淋巴细胞比例增加（$P<0.01$，图12C、E）。IFN-γ^+ T淋巴细胞比例降低（$P<0.01$，图13A、B），IFN-γ^+ $CD4^+$ T淋巴细胞无差异（图13C、D）、IFN-γ^+ $CD8^+$ T淋巴细胞降低（$P<0.05$，图13E、F）。

3　讨论

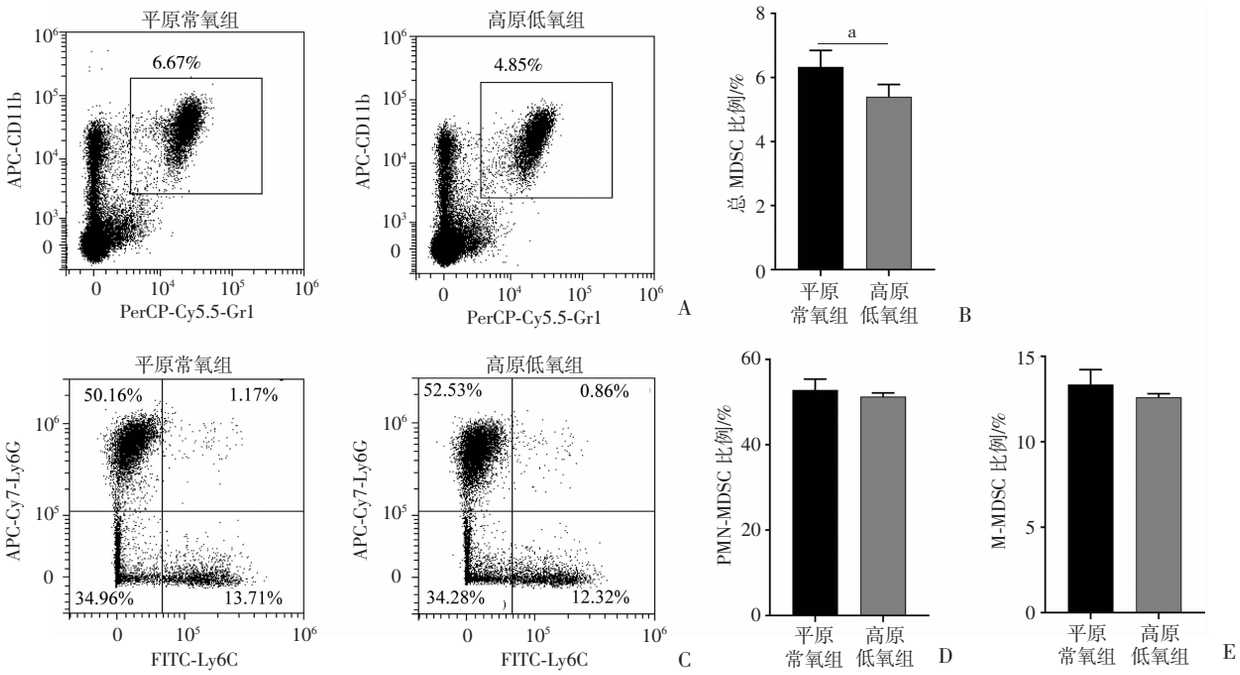
3.1　高原低氧环境对皮下肿瘤生长的影响

通过降低氧浓度来模拟高原低氧环境并进行皮下荷瘤实验，发现高原低氧环境可以显著抑制小鼠CRC皮下肿瘤的生长，这与目前大部分的相关流行病学分析结果吻合，且其他研究者的动物实验结果也同样指出低氧暴露可以降低肿瘤的发生率和减缓转移进程。SUNG等[12]在2011年通过研究发现降低环境氧浓度可以显著延长肿瘤的发生时间，主要通过使用*P53*缺陷小鼠来诱导肿瘤的发生；并且还提出降低环境氧浓度可以减少DNA损伤和基因组不稳定性，虽然与本研究的实验方法不太一致，但都认为低氧暴露抑制肿瘤。但厄瓜多尔地区的研究却与本研究结论相悖，这可能是因为厄瓜多尔地区的统计研究未对受试人群年龄阶段进行筛选区分，选择了全体年龄段的人群进行了癌症风险统计，而中国地区的相关流行病学研究则是选取15~50岁的青壮年人群作为研究对象，很大程度上规避了老年人群其他疾病风险对肿瘤风



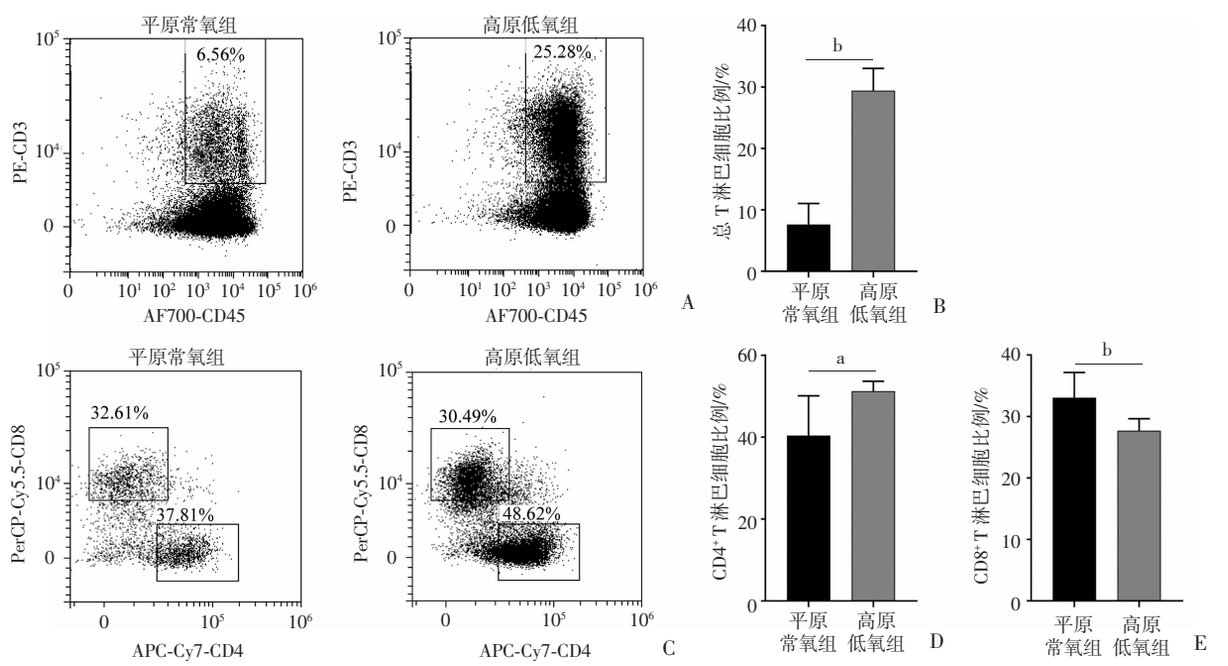
A、B：流式细胞术检测脾脏总巨噬细胞及比例分析　a：$P<0.01$；C~E：流式细胞术检测脾脏M1、M2巨噬细胞及比例分析　b：$P<0.05$

图6　高原低氧环境对CRC皮下肿瘤模型中脾脏巨噬细胞的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）



A、B:流式细胞术检测总髓源性抑制细胞及比例分析　a:$P<0.01$;C～E:流式细胞术检测髓源性抑制细胞Ly6G$^+$、Ly6C$^+$亚群及比例分析

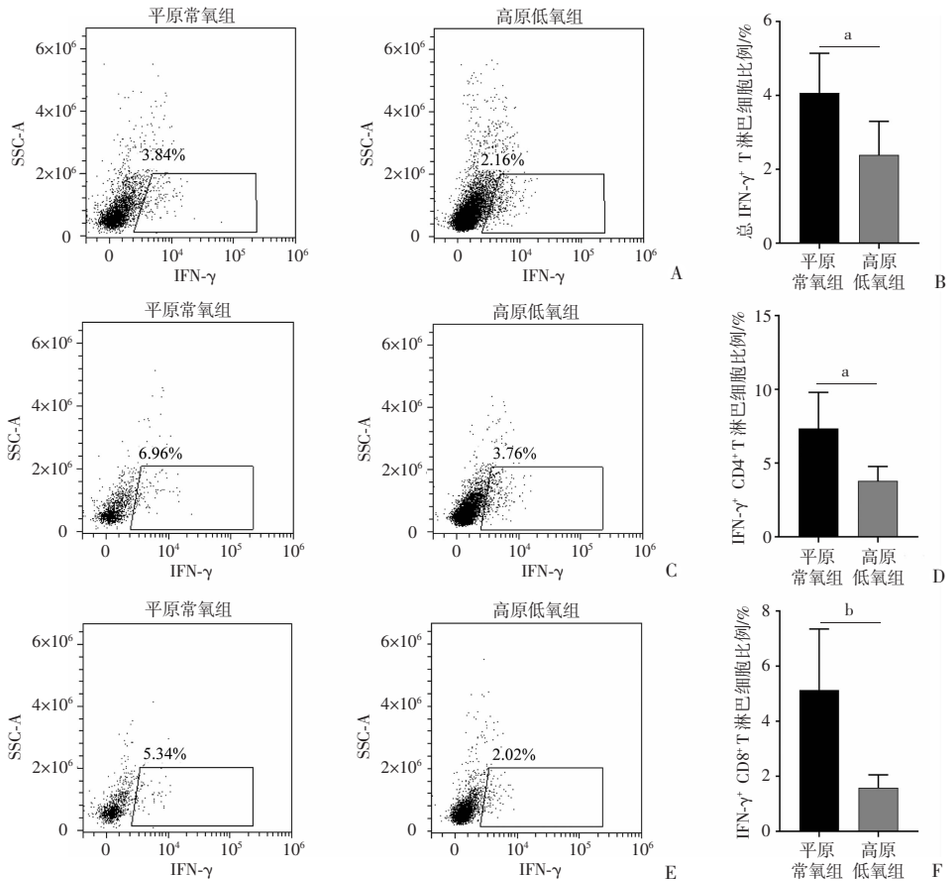
图7　高原低氧环境对CRC皮下肿瘤模型中脾脏髓源性抑制细胞的影响($n=3,\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A、B:流式细胞术检测T淋巴细胞及比例分析;C～E:流式细胞术检测CD4$^+$ T、CD8$^+$ T淋巴细胞亚群及比例分析

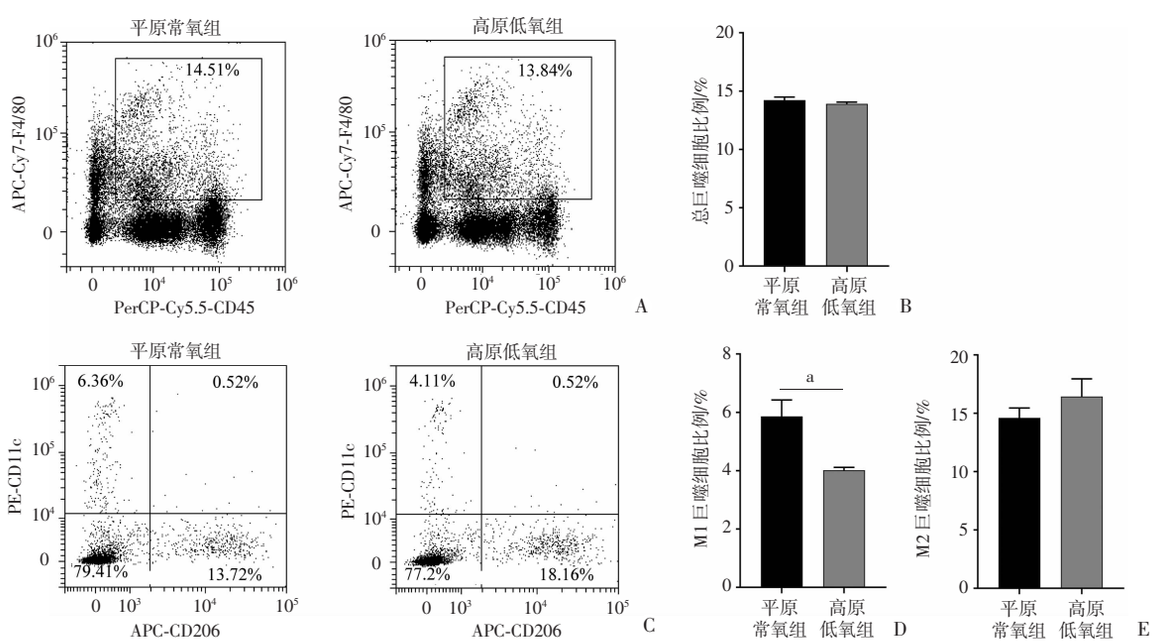
图8　高原低氧环境对CRC皮下肿瘤模型中脾脏T淋巴细胞的影响($n=3,\bar{x}\pm s$)



a:P<0.05,b:P<0.01

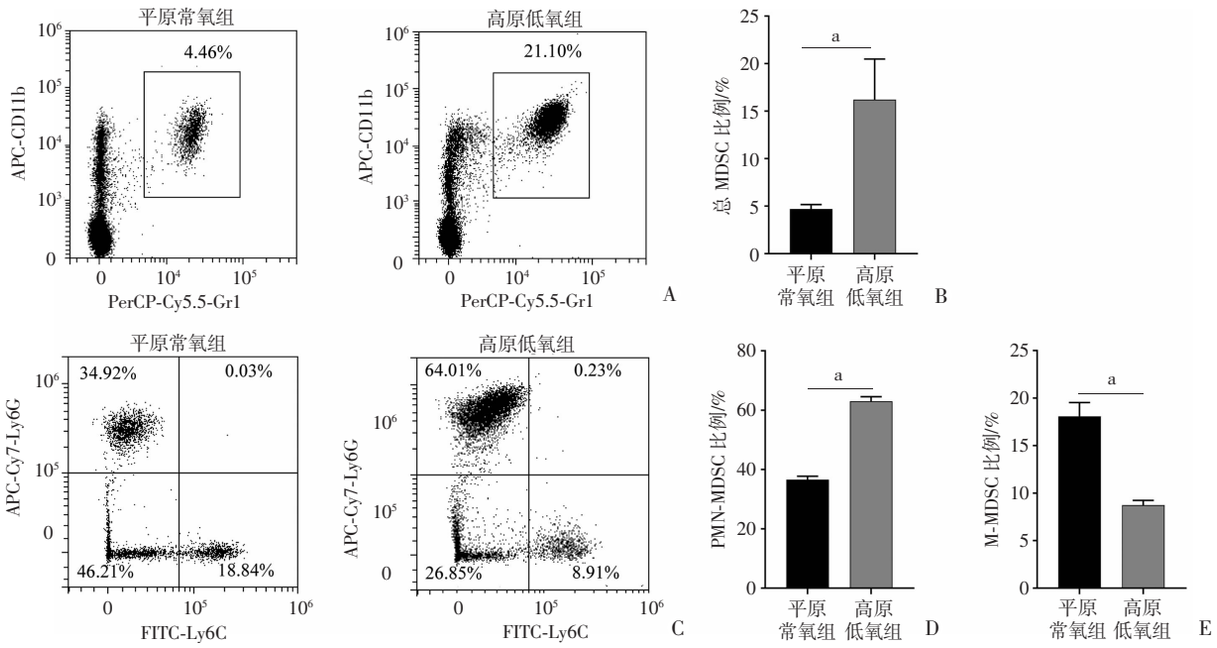
A、B:流式细胞术检测IFN-γ$^+$ T淋巴细胞及比例分析;C、D:流式细胞术检测IFN-γ$^+$CD4$^+$T淋巴细胞及比例分析;E、F:流式细胞术检测IFN-γ$^+$ CD8$^+$T淋巴细胞及比例分析

图9 高原低氧环境对CRC皮下肿瘤模型中脾脏IFN-γ$^+$T淋巴细胞的影响(n=3,$\bar{x}\pm s$)



A、B:流式细胞术检测外周血总巨噬细胞及比例分析;C~E:流式细胞术检测外周血M1、M2巨噬细胞及比例分析 a:P<0.01

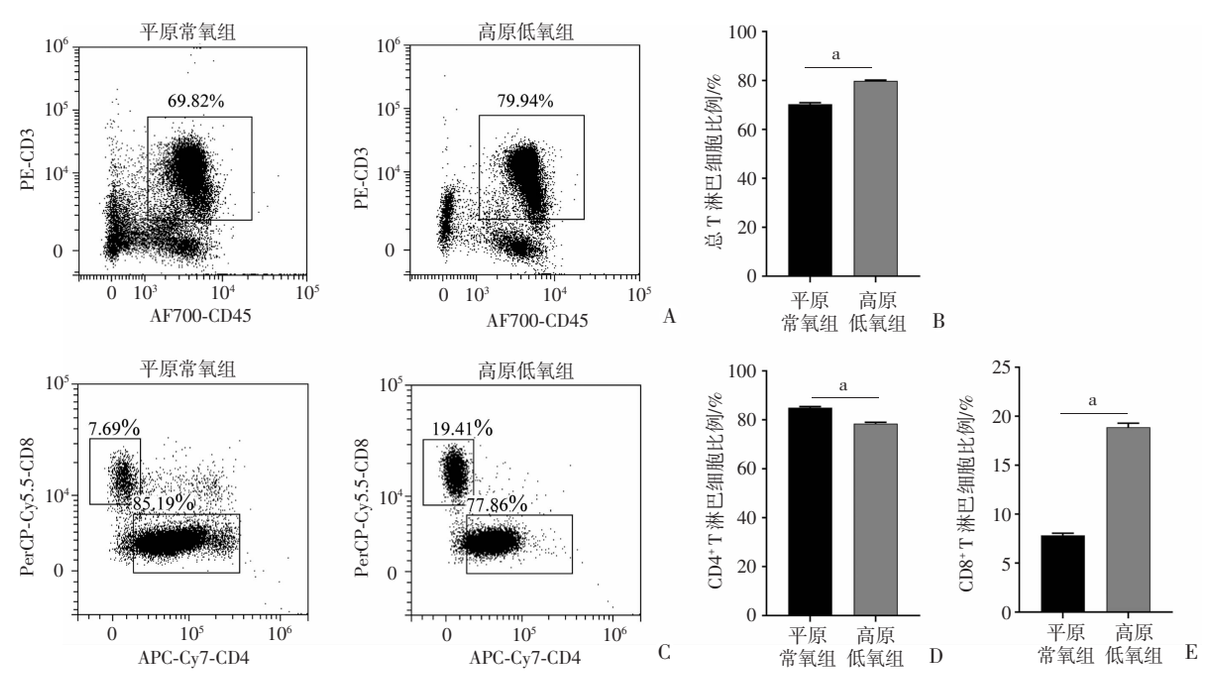
图10 高原低氧环境对CRC皮下肿瘤模型中外周血巨噬细胞的影响(n=3,$\bar{x}\pm s$)



a:P<0.01

A、B:流式细胞术检测总髓源性抑制细胞及比例分析;C～E:流式细胞术检测髓源性抑制细胞 $Ly6G^+$、$Ly6C^+$亚群及比例分析

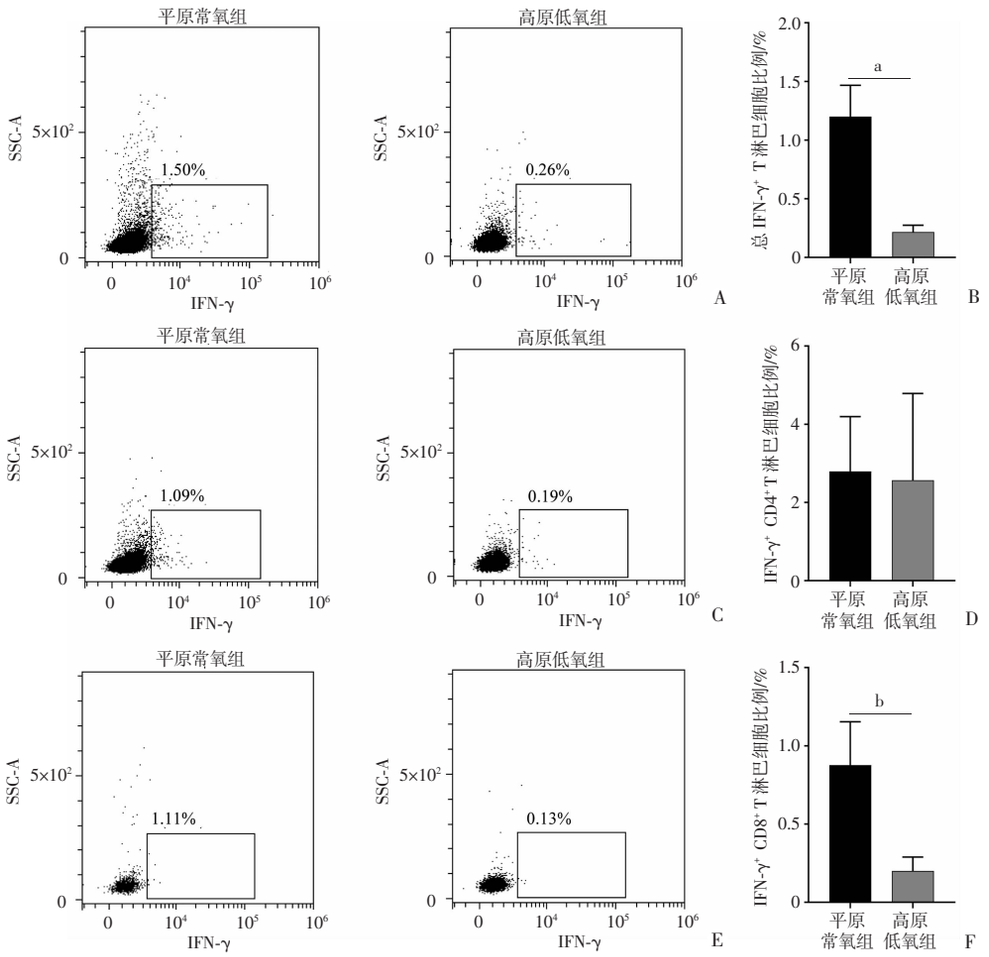
图11　高原低氧环境对CRC皮下肿瘤模型中外周血髓源性抑制细胞的影响(n=3,$\bar{x}\pm s$)



a:P<0.01

A、B:流式细胞术检测T淋巴细胞及比例分析;C～E:流式细胞术检测 $CD4^+$ T、$CD8^+$ T淋巴细胞亚群及比例分析

图12　高原低氧环境对CRC皮下肿瘤模型中外周血T淋巴细胞的影响(n=3,$\bar{x}\pm s$)



A、B:流式细胞术检测 IFN-γ$^+$ T淋巴细胞及比例分析 a:P<0.01;C、D:流式细胞术检测 IFN-γ$^+$ CD4$^+$ T淋巴细胞及比例分析;E、F:流式细胞术检测 IFN-γ$^+$ CD8$^+$ T淋巴细胞及比例分析 b:P<0.05

图13 高原低氧环境对CRC皮下肿瘤模型中外周血IFN-γ$^+$ T淋巴细胞的影响(n=3,$\bar{x}\pm s$)

险评估的影响;更有相关研究说明安第斯人的缺氧诱导因子*HIF-1α*高表达,藏人*HIF-1α*低表达,而*HIF-1α*高表达后会增加肿瘤侵袭性、组织扩张、转移,也会增加对放疗和化疗的耐药性,这也可能是厄瓜多尔地区有更高的病死率以及癌症风险的原因之一[7,9-10,13]。

3.2 高原低氧环境增强肿瘤微环境内免疫应答,却抑制全身性免疫应答

众所周知,肿瘤微环境低氧可以通过激活*HIF*通路、促进肿瘤血管生成和肿瘤细胞糖酵解来增强肿瘤生长和转移能力[14]。而本实验结果则提示低氧环境会抑制小鼠CRC皮下肿瘤生长,提示外部环境低氧与肿瘤内部低氧对肿瘤进展有着不同甚至相反的调控效应。肿瘤微环境是一个复杂且动态的生态系统,其特征包括低氧、免疫抑制、炎症反应,对肿瘤细胞干性、肿瘤侵袭、转移和放化疗敏感性具有重要影响[15]。在本次研究中,发现暴露于低氧低压的荷瘤小鼠的肿瘤微环境表现为免疫应答增强,但外周血和脾脏却表现为免疫应答被抑制。这可能与肿瘤微环境复杂的特殊性质、肿瘤细胞与免疫细胞的相互作用有关,毕竟肿瘤中的免疫细胞与外周血及脾脏中的免疫细胞在形态和功能上具有显著差异[16]。

长期暴露于高原低氧环境会对人体的多个系统造成损害,并会引发肺动脉高压、心脏肥大、红细胞增多、脑水肿、代谢紊乱(无氧糖酵解增加、酸碱平衡失调)等疾病[5]。另外,高原低氧可能通过提高健康细胞的代谢需求来降低葡萄糖、脂质、铁的可用性,以及通过使糖皮质激素水平升高来抑制T细胞功能,这些可能会是其引起全身免疫抑制的潜在原因[17-18]。然而,提前对高原环境进行预适应则可以提高心肺功能、增强机体氧利用能力、改善新陈代谢并提高机体免疫力,便于更好地适应高原环境、抑制急性肺水肿等高原疾病进程[19]。可见,高原低氧环境的利与弊与海拔

高度、暴露时间及连续性等因素密切相关,挖掘并合理利用中高海拔环境的益处将会为相关疾病治疗策略的开发提供更广阔的思路。

3.3 本研究的局限性及临床转化价值

但本研究仍然存在一定的局限性:①只构建了CRC的皮下瘤模型,未进行其他肿瘤类型、动物肿瘤模型的探索,不确定高原低氧对于其他类型和模型的肿瘤进展的调控效应是否一致;②只采用了单一的海拔高度进行实验研究,未设立海拔梯度进行实验,毕竟不同的海拔高度会给个体机能带来不同甚至相反的影响效果;③鉴于人体与小鼠对高原低氧适应的差异性,文中小鼠实验中反应的调控效应是否适用于人体仍有待深入探索。但总的来说,本研究结果与现有的一些流行病学统计分析结果吻合,可以为CRC的治疗策略提供新的思路和指导价值。

目前,高压氧仓治疗方式已经在临床中普遍应用,那么是否可以考虑低压氧仓的肿瘤相关临床应用呢?低压氧仓如今已经应用于高原的习服训练,小儿哮喘、心血管疾病以及糖尿病的治疗。并有研究[20]表明适度的低氧对疾病的治疗具有一定的辅助作用,未来应该考虑使用低压氧疗来延缓癌症患者的疾病进展或改善癌症患者的疾病预后。总而言之,高原低氧环境可能对癌症发生发展产生积极影响,但其具体调控机制尚不完全清楚。未来需要更多的研究来阐明高原低氧环境对不同类型癌症发生率和病死率的具体调控效应和作用机制,并探索高海拔或低氧疗法在癌症治疗中的应用潜力。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] 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.

[2] HOSSAIN M S, KARUNIAWATI H, JAIROUN A A, *et al*. Colorectal cancer: a review of carcinogenesis, global epidemiology, current challenges, risk factors, preventive and treatment strategies[J]. Cancers, 2022, 14(7): 1732. DOI: 10.3390/cancers14071732.

[3] BRITO J, SIQUES P, PENA E. Long-term chronic intermittent hypoxia: a particular form of chronic high-altitude pulmonary hypertension[J]. Pulm Circ, 2020, 10(1 Suppl): 5-12. DOI: 10.1177/2045894020934625.

[4] HOU Y, WANG X B, ZHANG Y, *et al*. Highland mate: Edible and functional foods in traditional medicine for the prevention and treatment of hypoxia-related symptoms[J]. Curr Opin Pharmacol, 2021, 60: 306-314. DOI: 10.1016/j.coph.2021.07.018.

[5] RICHALET J P, HERMAND E, LHUISSIER F J. Cardiovascular physiology and pathophysiology at high altitude[J]. Nat Rev Cardiol, 2024, 21(2): 75-88. DOI: 10.1038/s41569-023-00924-9.

[6] ZHOU J M, HE R F, SHEN Z Z, *et al*. Altitude and metabolic syndrome in China: beneficial effects of healthy diet and physical activity[J]. J Glob Health, 2023, 13: 04061. DOI: 10.7189/jogh.13.04061.

[7] CALDERÓN-GERSTEIN W S, TORRES-SAMANIEGO G. High altitude and cancer: an old controversy[J]. Respir Physiol Neurobiol, 2021, 289: 103655. DOI: 10.1016/j.resp.2021.103655.

[8] BURTSCHER J, MILLET G P, RENNER-SATTLER K, *et al*. Moderate altitude residence reduces male colorectal and female breast cancer mortality more than incidence: therapeutic implications?[J]. Cancers, 2021, 13(17): 4420. DOI: 10.3390/cancers13174420.

[9] ZHOU M G, WANG H D, ZHU J, *et al*. Cause-specific mortality for 240 causes in China during 1990-2013: a systematic subnational analysis for the global burden of disease study 2013[J]. Lancet, 2016, 387(10015): 251-272. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)00551-6.

[10] GARRIDO D I, GARRIDO S M. Cancer risk associated with living at high altitude in Ecuadorian population from 2005 to 2014[J]. Clujul Med, 2018, 91(2): 188-196. DOI: 10.15386/cjmed-932.

[11] 汪腾, 高源, 赵昆, 等. 小鼠THBS1基因敲除改善内脏脂肪免疫微环境并抑制结直肠癌腹腔种植转移[J]. 陆军军医大学学报, 2023, 45(18): 1907-1915. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202303119.
WANG T, GAO Y, ZHAO K, *et al*. Knockout of THBS1 gene improves immune microenvironment of visceral fat and inhibits intraperitoneal implantation and metastasis of colorectal cancer in mice[J]. J Army Med Univ, 2023, 45(18): 1907-1915. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202303119.

[12] SUNG H J, MA W Z, STAROST M F, *et al*. Ambient oxygen promotes tumorigenesis[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e19785. DOI: 10.1371/journal.pone.0019785.

[13] BAI J, LI L J, LI Y H, *et al*. Genetic and immune changes

in Tibetan high-altitude populations contribute to biological adaptation to hypoxia[J]. Environ Health Prev Med, 2022, 27: 39. DOI: 10.1265/ehpm.22-00040.

[14] SINGLETON D C, MACANN A, WILSON W R. Therapeutic targeting of the hypoxic tumour microenvironment[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2021, 18(12): 751-772. DOI: 10.1038/s41571-021-00539-4.

[15] WU Q H, YOU L, NEPOVIMOVA E, *et al*. Hypoxia-inducible factors: master regulators of hypoxic tumor immune escape[J]. J Hematol Oncol, 2022, 15(1): 77. DOI: 10.1186/s13045-022-01292-6.

[16] HIAM-GALVEZ K J, ALLEN B M, SPITZER M H. Systemic immunity in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2021, 21(6): 345-359. DOI: 10.1038/s41568-021-00347-z.

[17] THIERSCH M, SWENSON E R, HAIDER T, *et al*. Reduced cancer mortality at high altitude: the role of glucose, lipids, iron and physical activity[J]. Exp Cell Res, 2017, 356(2): 209-216. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.03.048.

[18] MEEHAN R T. Immune suppression at high altitude[J]. Ann Emerg Med, 1987, 16(9): 974-979. DOI: 10.1016/s0196-0644(87)80743-6.

[19] 陈海威, 张津津, 李良, 等. 不同习服方法对军人急进高原急性高原反应的干预效果比较[J]. 解放军医药杂志, 2018, 30(4): 104-106. DOI: 10.3969/j.issn.2095-140X.2018.04.027.
CHEN H W, ZHANG J J, LI L, *et al*. Effect comparison of different acclimatization methods in intervention of acute mountain sickness in military personnel during rapidly entering plateau[J]. Med Pharm J Chin PLA, 2018, 30(4): 104-106. DOI: 10.3969/j.issn.2095-140X.2018.04.027.

[20] 许琴,王瑜,沈才福,等.低压氧诊疗疾病的现状与研究进展[J].新疆医学,2020,50(02):118-120,123.
XU Q, WANG Y, SHEN C F, *et al*. Present situation and research progress of low pressure oxygen in diagnosis and treatment of diseases[J]. Xinjiang Med J, 2020, 50(2): 118-120,123.

(**收稿**:2024-10-08;**修回**:2024-12-06)

(编辑 刘秋池)