

淫羊藿素抑制外泌体介导的黑色素瘤肺转移及机制初探

屠书梅^{1,2,3}, 刘玉萍^{2,3}, 陈彦^{2,3*}

(1. 江苏大学, 江苏 镇江 212013; 2. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210028;
3. 江苏省中医药研究院, 中药组分与微生态研究中心, 江苏 南京 210028)

摘要: 本研究从体内外考察淫羊藿素 (icaritin, ICT) 对外泌体 (exosomes, Exo) 诱导的小鼠黑色素瘤 B16BL6 细胞肺转移的影响, 并探讨其潜在分子机制。收集 B16BL6 细胞培养上清液, 超速离心法提取 Exo, 使用透射电镜和 Western blotting 对 Exo 进行表征, BCA 法对 Exo 总蛋白进行定量分析。细胞划痕实验考察 ICT 对 Exo 诱导的 B16BL6 细胞迁移能力的影响。建立 C57BL/6 小鼠黑色素瘤实验性转移模型, 动物实验获得南京中医药大学伦理委员会的同意, H&E 染色考察 ICT 体内抑制 Exo 介导的黑色素瘤转移作用。ELISA 及免疫荧光检测转移组织中促炎因子白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、S100 钙结合蛋白 A8/A9 复合物 (S100 calcium-binding protein A8/A9 complex, S100A8/A9)、血清淀粉样蛋白 A (serum amyloid A, SAA) 及纤连蛋白 (fibronectin) 的表达。免疫组化及 Western blotting 检测 ICT 对 Exo 诱导的转移组织相关蛋白干扰素基因刺激因子 (stimulator of interferon gene, STING)、磷酸化 STING (p-STING)、TANK 结合激酶 1 (TANK-binding kinase 1, TBK1) 和磷酸化的 TBK1 (p-TBK1) 的表达情况。结果表明, 所提取的外泌体粒径为 (149.33 ± 2.68) nm、多分散系数为 (0.192 ± 0.02) 、zeta 电位为 (-32.22 ± 0.50) mV, 电镜下呈现茶托样双层膜结构, 测得蛋白浓度为 (838.66 ± 62.14) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。ICT 浓度为 5、10 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 能够抑制 Exo 诱导的 B16BL6 细胞迁移。ICT 能够抑制 Exo 介导的黑色素瘤肺转移, 抑制肺组织中促炎因子 S100A8/A9、SAA 和 IL-6 的表达, 能够抑制转移肺组织的 p-STING 和 p-TBK1 的表达。本研究结果表明, ICT 能够明显抑制 Exo 诱导的肿瘤转移, 且与 STING 通路的失活有关。

关键词: 淫羊藿素; 外泌体; 黑色素瘤; 肿瘤转移; STING

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)03-0778-08

Inhibition of exosomes-mediated melanoma metastasis by icaritin

TU Shu-mei^{1,2,3}, LIU Yu-ping^{2,3}, CHEN Yan^{2,3*}

(1. Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2. Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China; 3. Multi-component of Traditional Chinese Medicine and Microecology Research Center, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

Abstract: This study investigated the mechanism by which icaritin (ICT) inhibits exosomes-induced lung metastasis of B16BL6 mouse melanoma cells. The culture supernatant of B16BL6 cells was collected for extraction of exosomes by ultracentrifugation and their characterization by transmission electron microscopy and Western blotting. Exosomal protein was quantified by BCA. A wound-healing assay was used to determine the effect of ICT on the migratory ability of B16BL6 cells induced by exosomes. After establishing an experimental melanoma lung metastasis model in C57BL/6 mice, we used H&E staining to study the ability of ICT to inhibit exosomes-induced melanoma metastasis. Animal experiments were approved by the Ethics Committee of Nanjing University of

收稿日期: 2020-08-11; 修回日期: 2020-10-01.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81903858, 81873016); 江苏省科教强卫医学重点人才项目 (ZDRCA2016036); 江苏省卫生健康委科研项目面上项目 (H2019097).

*通讯作者 Tel: 86-25-85608672, E-mail: ychen202@hotmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1317

Chinese Medicine. ELISA and immunofluorescence were used to detect pro-inflammatory factors interleukin 6 (IL-6), S100 calcium-binding protein A8/A9 complex (S100A8/A9), serum amyloid A (SAA) and fibronectin in metastatic tumors. The expression of metastatic tissue-related proteins stimulator of interferon gene (STING), phospho-STING (p-STING), TANK-binding kinase 1 (TBK1) and phospho-TBK1 (p-TBK1) was detected by immunohistochemistry or Western blotting. The results showed that the particle size of exosomes was 149.33 ± 2.68 nm, the polydispersity index (PDI) was 0.192 ± 0.02 , the zeta potential was -32.22 ± 0.50 mV, and the particles had classic tea tray-like membrane structure under TEM. The protein concentration of exosomes was measured to be $838.66 \pm 62.14 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The results of the cell scratch test showed that ICT can inhibit exosomes-induced migration of B16BL6 cells at a concentration of 5, 10, and $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. *In vivo* experimental results also showed that ICT can inhibit exosomes-induced metastasis of melanoma to the lungs and can significantly inhibit the expression of pro-inflammatory factors S100A8/A9, SAA and IL-6 in lung tissue, and inhibit the expression of p-STING and p-TBK1 in metastatic lung tissue. Taken together, these results indicated that ICT can significantly inhibit exosomes-induced tumor metastasis, and the inhibition is related to the inactivation of STING in metastatic foci.

Key words: icaritin; exosome; melanoma; tumor metastasis; STING

肿瘤转移是肿瘤患者预后不良最终导致死亡的重要原因^[1], 其中肺转移是多种恶性肿瘤最常见以及患者死亡率较高的器官转移^[2], 且目前缺少有效的治疗手段。近年来的研究发现, 肿瘤在发生转移时, 会分泌一种微小囊泡——外泌体 (exosomes, Exo), 促进肿瘤的转移^[3]。Exo 的直径在 30~150 nm, 内含蛋白质、脂质和核酸等不同成分, 可作为细胞间通讯的关键参与者, 从而传递信息^[4,5]。Exo 促进肿瘤转移的机制可能与炎症因子的浸润密切相关。Peinado 等^[6]发现小鼠尾静脉注射黑色素瘤细胞系 B16-F10 细胞分泌的 Exo 后, 肺组织中相关因子热休克蛋白、S100 钙结合蛋白 A8 (S100 calcium-binding protein A8, S100A8) 和 S100 钙结合蛋白 A9 (s100 calcium-binding protein A9, S100A9) 蛋白表达升高。有学者表明, 肿瘤细胞分泌的 Exo, 含有双链 DNA, 可以激活细胞内 DNA 传感器黑素瘤缺乏因子 2 (absent in melanoma 2, AIM2), 触发炎症反应^[7]。环磷酸鸟苷-腺苷酸合成酶 (cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate synthase, cGAS) 作为 DNA 感受器, 同样可以识别 Exo 中双链 DNA^[8], 进而产生 2'-3' cGAMP。2'-3' cGAMP 可激活干扰素基因刺激因子 (stimulator of interferon gene, STING), 使 STING 构象改变进而招募 TANK 结合激酶 1 (TANK-binding kinase 1, TBK1) 使其磷酸化, 接着磷酸化干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3) 并移位至细胞核中, 产生 I 型干扰素 (interferon, IFN) 和趋化因子, 触发炎症反应。因此, 针对炎症的研究是治疗肿瘤转移的新策略和方法。

淫羊藿 (*Epimedium Folium*) 作为传统的补肾补虚中药, 在民间沿用已有千年历史, 具有补肾阳、强筋骨和祛风湿等传统功效, 在治疗肺部肿瘤中应用频率较高。

而淫羊藿素 (icaritin, ICT, 图 1) 是淫羊藿中的有效活性成分, 属异戊烯基黄酮类化合物, 也是淫羊藿活性成分淫羊藿苷体内代谢的主要产物, 具有抗炎和抗肿瘤转移的作用, 但其抗肿瘤转移的机制尚不明确。

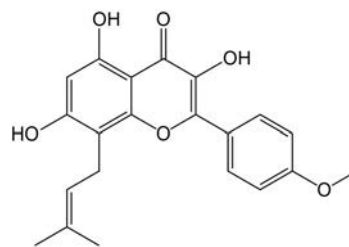


Figure 1 Chemical structure of icaritin (ICT)

本研究通过构建 Exo 诱导的黑色素瘤体内外转移模型, 考察了 ICT 对肿瘤肺转移的作用, 旨在证明 ICT 能够抑制 Exo 介导的肿瘤转移。通过 ELISA 检测转移肺组织中炎症因子 S100A8/A9、血清淀粉样蛋白 A (serum amyloid A, SAA) 和白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 的表达, 计算机模拟 ICT 与 STING 结合, 并用 Western blotting 和免疫组化实验考察了 cGAS/STING 通路中关键蛋白的表达, 初步探索了 ICT 抑制 Exo 介导的黑色素瘤肺转移的机制, 为中药淫羊藿用于临床防治肿瘤转移提供重要指导。

材料与方法

细胞株 小鼠恶性黑色素瘤 B16BL6 细胞, 购于和园生物有限公司。B16BL6 细胞培养于含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 1% 的青-链霉素的 DMEM 完全培养基, 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。

实验动物 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠, 由南京中医药大学动物实验中心提供, 合格证号: SCXK (苏)

2018-0007。鼠龄为4~5周,体重为18~22 g,动物实验获得南京中医药大学伦理委员会的同意。

药物与试剂 ICT(纯度≥98%,批号:118525-40-9,上海源叶生物科技有限公司);高糖DMEM培养基、胰蛋白酶(上海源培生物科技股份有限公司);FBS(以色列BI公司);二甲亚砜(DMSO,美国Sigma公司);BCA检测试剂盒、蛋白Marker(Thermo Fisher Scientific公司);蛋白酶抑制剂(北京鼎国昌盛生物技术有限公司);磷酸酶抑制剂(江苏凯基生物科技发展有限公司);肿瘤易感基因101(tumor susceptibility gene 101, TSG101)(14497-1-AP, Proteintech公司);phospho-STING(p-STING, Ser366)(Ab-AF7416, Affinity公司);STING(D2P2F, Cell Signaling Technology);CD9(ab92726)、p-NAK/TBK1(phospho S172, ab109272)、NAK/TBK1(ab40676)(Abcam公司);Goat anti-rabbit IgG(H&L)-HRP(BS13278, Bioworld technology公司)。

仪器 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);TDZ5-WS台式低速离心机(湖南星科科技有限公司);TOMY-SX500高压蒸汽灭菌器(日本TOMY公司);HERA Cell 150i CO₂培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司);Thermo MULTISKAN GO酶标仪(赛默飞科技有限公司);凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

Exo的提取、表征及蛋白浓度测定

Exo的提取 收集处于对数生长期的B16BL6细胞上清液,采用梯度-超速离心的方法提取Exo,4℃条件下300×g离心10 min,2 000×g离心15 min和12 000×g离心30 min,去除细胞及细胞碎片,上清用0.22 μm的无菌过滤膜过滤除菌,4℃下100 000×g离心70 min,收集沉淀,PBS洗涤,最后用200 μL PBS重悬。

Exo的表征 取Exo 10 μL,加入纯水稀释至1 mL,用马尔文激光粒径仪测定Exo的平均粒径、多分散系数(PDI)及zeta电位。将载有Formvar支持膜的铜网置于蜡板上,在膜上滴加1滴Exo的PBS重悬液。红外灯下照射5 min,滴加1滴1%磷钨酸,室温下风干10 min,置于透射电镜下观察Exo的外观形态。

Western blotting检测外泌体特异性蛋白 取Exo样品,加入5×蛋白样品上样缓冲液,于100℃干式混匀器中加热10 min变性。取蛋白样品(20 μg总蛋白量)进行电泳、转膜、洗涤封闭,分别结合一抗(CD9和TSG101稀释倍数均为1:1 000)于4℃过夜,洗涤,室温下结合二抗(二抗的稀释倍数为1:20 000)孵育2 h后,洗涤,ECL发光法检测蛋白条带。

Exo的总蛋白浓度测定 采用BCA法测定Exo的总蛋白浓度。取10 μL Exo,加入高效RIPA裂解液15 μL,共计25 μL,涡旋混匀,作为待测样品。取BCA试剂盒,按试剂A:试剂B=50:1,制备工作液。在96孔板中分别加入各个稀释浓度的蛋白质标准品(25~2 000 μg·mL⁻¹)和待测样品各25 μL,然后每孔加入200 μL工作液,振荡器上震荡1 min,37℃孵育30 min,采用全波长酶标仪测定各孔562 nm处吸光度值。根据标准曲线计算Exo的总蛋白浓度。

划痕实验考察ICT对Exo诱导的B16BL6细胞迁移的影响 当B16BL6细胞融合度为80%~90%时,用胰蛋白酶消化并重悬至单个细胞,以每孔3×10⁵个细胞接种于6孔板,于37℃、5%的CO₂环境下培养至细胞贴壁长成单层细胞。10 μL枪头沿着6孔板直径在细胞培养板上垂直划痕,PBS轻轻冲洗3次后,拍照记录(0 h)。实验组设置空白对照组、Exo组、ICT剂量组(5、10和20 μmol·L⁻¹),Exo组与ICT组均给予10 μg·mL⁻¹ Exo。继续培养24 h后,于倒置显微镜下拍照,并计算划痕愈合度,分析细胞迁移情况。

$$\text{迁移率}(\%) = \frac{\text{初始划痕面积} - 24\text{h后划痕面积}}{\text{初始划痕面积}} \times 100\%$$

ICT对Exo诱导的B16BL6细胞小鼠体内实验性转移的影响 建立小鼠黑色素瘤肺转移实验性模型。取对数生长期的B16BL6,消化后离心,重悬于PBS中,调整细胞密度为每毫升5×10⁵个,每只C57BL/6小鼠尾静脉接种200 μL细胞悬液。小鼠接种肿瘤细胞后,按体重随机分为模型组、Exo组、Exo+ICT(10 mg·kg⁻¹)组、Exo+ICT(20 mg·kg⁻¹)组。隔天Exo组和Exo+ICT组小鼠尾静脉Exo处理,每只鼠20 μg,隔天1次,一共进行10次。同时给药组腹腔注射给予ICT(10和20 mg·kg⁻¹),隔天给药。21天后小鼠摘眼球取血,处死小鼠,剥离小鼠肺组织,拍照并称量,记录转移肺结节数目并对肺组织进行H&E染色来分析肺转移。

ICT对Exo诱导的体内转移肺组织炎症因子的影响 取出肺组织,加入蛋白裂解液匀浆,反复冻融4~5次,12 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清,BCA测定蛋白浓度。按照ELISA试剂盒的操作方法(标准品的稀释、加样温育、加检测抗体、洗板、加酶温育、洗板、显色、终止及测定)检测肺组织中炎症因子S100A8/A9、SAA和IL-6因子的释放。采用免疫荧光法考察纤连蛋白fibronectin的表达,取4%多聚甲醛固定的肺组织,蔗糖脱水、OCT包埋、冰冻切片、封闭、孵一抗、二抗、DAPI复染、荧光淬灭封片液封片,荧光显微镜观察拍摄。

分子对接 下载化合物的*.mol格式文件,用

Chem Office 软件将化合物结构保存为*.mol2 格式, 经加氢、赋予力场后, 保存为SD 格式, 备用。STING 蛋白结构下载于PDB 数据库, PDB ID 为4F5FD。蛋白经加氢、准备、赋予力场后, 定义其原配体的位置为活性位点, 球状半径设为9。采用Discovery studio 3.5 平台的Cdocker 模块进行对接。

免疫组化检测 p-STING、fibronectin 在肺组织中的表达 肺组织浸入4% 多聚甲醛溶液中固定, 固定的肺组织经脱水、石蜡包埋、切片、脱蜡, 将切片浸入0.01 mol·L⁻¹ 柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0), 微波炉加热修复抗原; PBS 清洗, 3% BSA 的PBS 溶液封闭, 然后滴加一抗, 4 °C 过夜; PBS 清洗, 滴加二抗, 室温孵育 1.5 h; DAB 室温显色; 蒸馏水洗涤; 苏木素轻度复染、脱水、透明、封片; 最后镜检并采集图像。

Western blotting 检测 p-STING、STING、p-TBK1 和 TBK1 在肺组织中的表达 取 50 mg 的肺组织, 加预冷的蛋白裂解液冰上研磨, -80 °C 冻融过夜, 然后 4 °C 条件下, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集上清。利用 BCA 法测定样品蛋白浓度。取适量肺上清, 加入 5× 蛋白样品上样缓冲液, 于干式混匀器中 100 °C 蛋白加热变性 10 min。配胶、上样、SDS-PAGE 电泳后转膜, TBST 缓冲液配制的 5% 脱脂奶粉封闭, 一抗孵育, 4 °C 过夜, 加入二抗, 室温孵育 2 h, 最后化学发光曝光显影。

统计学分析 应用 GraphPad 8.0 软件进行统计分析。所有实验均独立重复 3 次, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组分别与对照组进行单因素方差分析。

结果

1 Exo 的表征

从对数生长期的小鼠黑色素瘤 B16BL6 细胞上清液中提取 Exo, 马尔文粒径仪检测粒径和电位, 结果表明, 所提取的 Exo 平均粒径约为 (149.33 ± 2.68) nm, 分散均匀, 多分散系数为 (0.192 ± 0.02), zeta 电位为 (-32.22 ± 0.50) mV, 呈负电荷。电镜下显示: Exo 形态均匀, 具有茶托样的双层膜结构, 大小约在 100 nm 左

右 (图 2A)。BCA 法检测 Exo 的蛋白含量, 标准曲线为 $y = 0.796 5x + 0.009 4$, 计算含量为 (838.66 ± 62.14) μg·mL⁻¹。Western blotting 实验结果表明, 所提取的外泌体能够表达 TSG101 和 CD9 外泌体标记性蛋白 (图 2B), 以 B16BL6 细胞的裂解物及 B16BL6 细胞衍生的微囊泡作为对照。

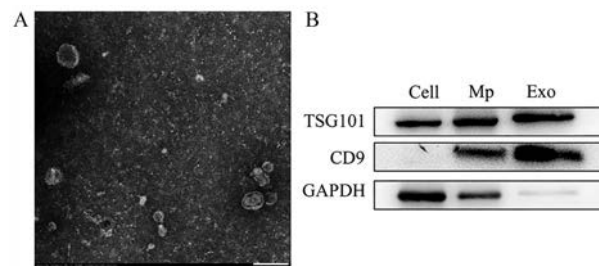


Figure 2 Preparation and characterization of exosomes (Exo). A: Morphology of Exo detected by transmission electron. Scale bar: 200 nm; B: Expressions of tumor susceptibility gene 101 (TSG101), CD9, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in Exo from B16BL6 cell line, using lysed B16BL6 cells (cell) and B16BL6 cell-derived microvesicles (Mp) as controls

2 ICT 对 Exo 诱导的 B16BL6 细胞迁移的影响

通过划痕法考察不同浓度的 ICT (5, 10 和 20 μmol·L⁻¹) 抑制 Exo (10 μg·mL⁻¹) 诱导的黑色素瘤 B16BL6 水平迁移能力 (图 3)。结果发现, Exo (10 μg·mL⁻¹) 刺激 24 h 后, 能够明显诱导细胞迁移; 而给予 ICT 后, 随着 ICT 浓度的提高, 细胞划痕的愈合程度呈递减趋势。图 3 是以 0 和 24 h 两个时间点为例, 发现 24 h 时, 对照组的划痕区域的黑色素瘤细胞发生明显迁移, 而 Exo 组较对照组发生更明显的迁移 ($P < 0.01$); 而随着 ICT 药物浓度的增加, 划痕区域细胞迁移的数目呈降低趋势, ICT 浓度为 20 μmol·L⁻¹ 时, 对 B16BL6 细胞的迁移抑制率高达 90% 以上 ($P < 0.001$), 几乎完全抑制 B16BL6 细胞的水平迁移。

3 ICT 对 Exo 诱导的 B16BL6 体内转移的影响

为了考察 ICT 对 Exo 诱导的 B16BL6 黑色素瘤体

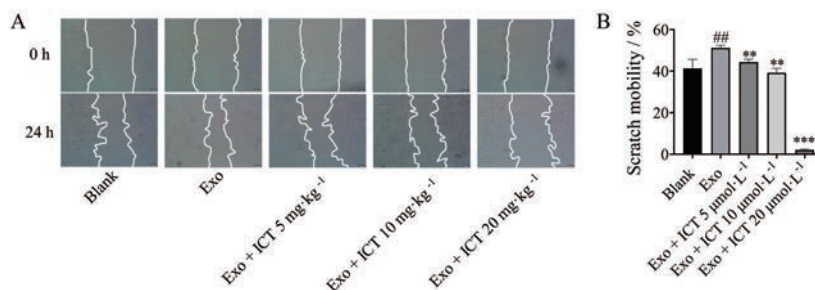


Figure 3 Effect of different concentrations of ICT on Exo-induced migration of B16BL6 cells. $##P < 0.05$ vs blank group; $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ vs Exo group

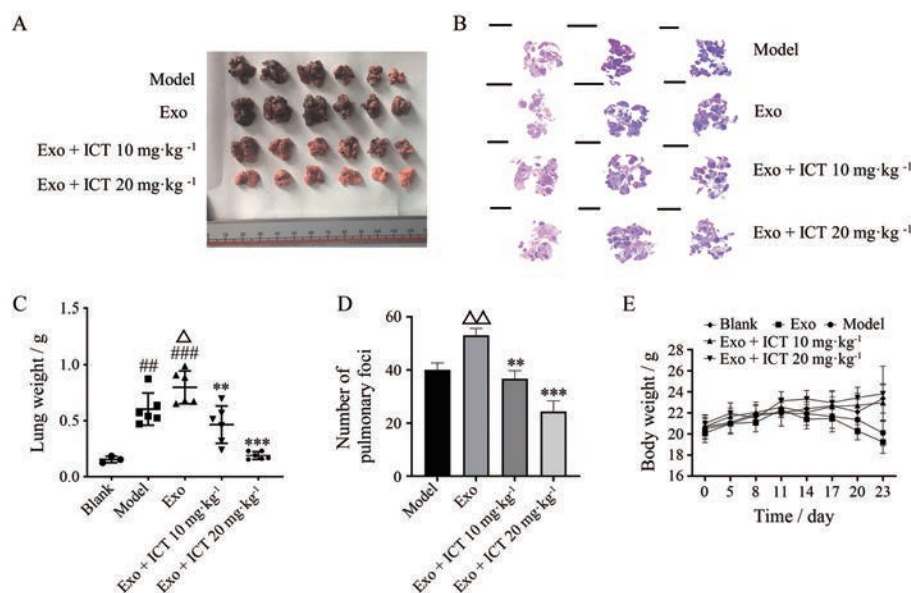


Figure 4 Effect of ICT on Exo-induced B16BL6 cell lung metastasis *in vivo*. A: The lung size; B: H&E stain histological analysis of lung, scale bar: 5 mm; C: The lung weight; D: The number of pulmonary foci; E: The body weight. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $###P < 0.01$, $####P < 0.001$ vs blank group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model group; $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ vs Exo group

内转移情况,本研究构建了黑色素瘤实验性肺转移模型。尾静脉接种 B16BL6 细胞,同时给予 Exo 以及 10 和 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ICT,21 天后将小鼠处死,取出肺脏,进行拍照、称量肺重以及 H&E 染色。图 4 结果显示,Exo 组与模型组相比,肺部肿瘤转移结节数明显增多(图 4A、B、D),肺质量异常增加(图 4C),体重异常降低(图 4E),表明 Exo 能够促进 B16BL6 的肺转移;而腹腔注射给予 ICT 能有效减少肺转移结节数目,并降低肺重,逆转体重异常降低,抑制肿瘤的肺转移。ELISA 实验结果如图 5 所示,ICT 抗小鼠黑色素瘤肺转移的作用可能与抑制炎症因子的表达有关。肺组织中,Exo 组的 IL-6、SAA 和 S100A8/9 的含量与模型组相比较存在显著性差异,而 ICT ($20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组明显抑制了促炎细胞因子 SAA、S100A8/A9 和 IL-6 的释放(图 5A~C)。同时免疫荧光结果显示,Exo 组的纤连蛋白(fibronectin)的表达增多,ICT 能够抑制 fibronectin 的表达(图 5D)。

4 ICT 与 STING 的分子对接

由于 STING 通路的激活与炎症因子的释放相关,故运用分子模拟 CDocker 对 ICT 与 STING 的对接能力进行分析。研究报道 C-178 是 STING 小分子抑制剂^[9],因此将 C-178 作为阳性参照。分子对接结果表明: C-178 分子能够与 STING 蛋白的氨基酸残基 238 位精氨酸(Arg238)和 253 位苏氨酸(Thr263)分别形成分子间氢键,还与氨基酸残基 167 位酪氨酸(Tyr167)、Thr263 和 264 位脯氨酸(Pro264)分别形成共轭作用力。ICT 能够与 STING 蛋白的氨基酸残基 Arg238、241 位丝氨

酸(Ser241)、260 位谷氨酸(Glu260)形成分子间氢键,还与 Tyr167 形成共轭作用力,与氨基酸残基 159 位亮氨酸(Leu159)、Pro264 形成疏水作用力(图 6)。

ICT 和 C-178 与 STING 的对接有共同的氨基酸残基 Arg238、Tyr167 和 Pro264,且结合模式有一定的相近性。ICT 和 C-178 与 STING 的相互作用的能量打分接近,分别为 32.57 和 30.123。综合对接能量打分和对接模式分析,淫羊藿素结构稳定,能够与 STING-CTD 活性位点相结合。

5 ICT 抑制 Exo 诱导的 B16BL6 体内转移的机制初探

为了进一步考察 ICT 抑制 Exo 诱导的 B16BL6 体内转移的机制,基于分子对接结果的同时,本研究通过免疫组化考察 ICT 对 Exo 介导的转移肺组织中 p-STING 和 fibronectin 的表达,Western blotting 实验考察了 ICT 对 Exo 介导的转移肺组织中 p-STING、STING、p-TBK1 和 TBK1 的表达影响。结果如图 7 所示,Exo 组小鼠肺组织中, fibronectin 和 p-STING 的表达较模型组增多;与 Exo 组相比,ICT 组小鼠肺组织中 fibronectin 和 p-STING 的表达下降(图 7A);由图 7B 可知,Western blotting 实验表明,Exo 组小鼠肺组织中 p-STING、STING、p-TBK1 和 TBK1 蛋白表达升高;而 ICT 组,尤其是高剂量组,蛋白表达下降。

讨论

原位肿瘤与转移灶之间的对话是促进肿瘤发生转

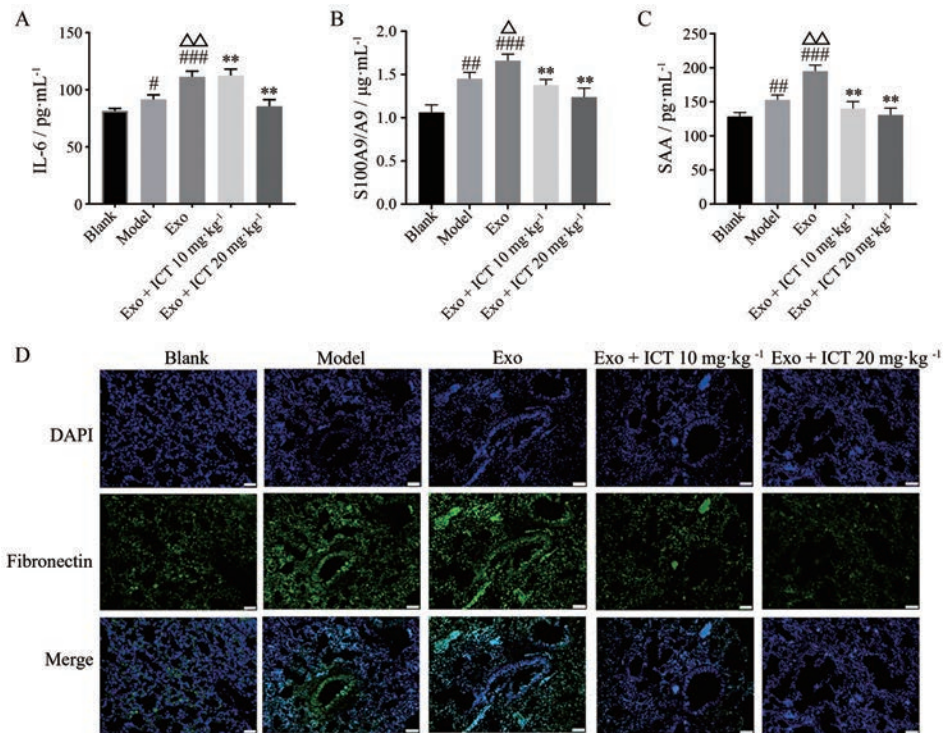


Figure 5 Inflammatory factors effect of ICT on Exo-induced B16BL6 cell lung metastasis in the lung. A-C: ELISA was used to detect the content of interleukin 6 (IL-6, A), S100 calcium-binding protein A8/A9 complex (S100A8/9, B), and serum amyloid A (SAA, C) in the lung of each group; D: Immunofluorescence method was used to detect the content of fibronectin in the lung. Scale bar: 50 μm. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$ vs blank group; [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ vs model group; ^{**} $P < 0.01$ vs Exo group

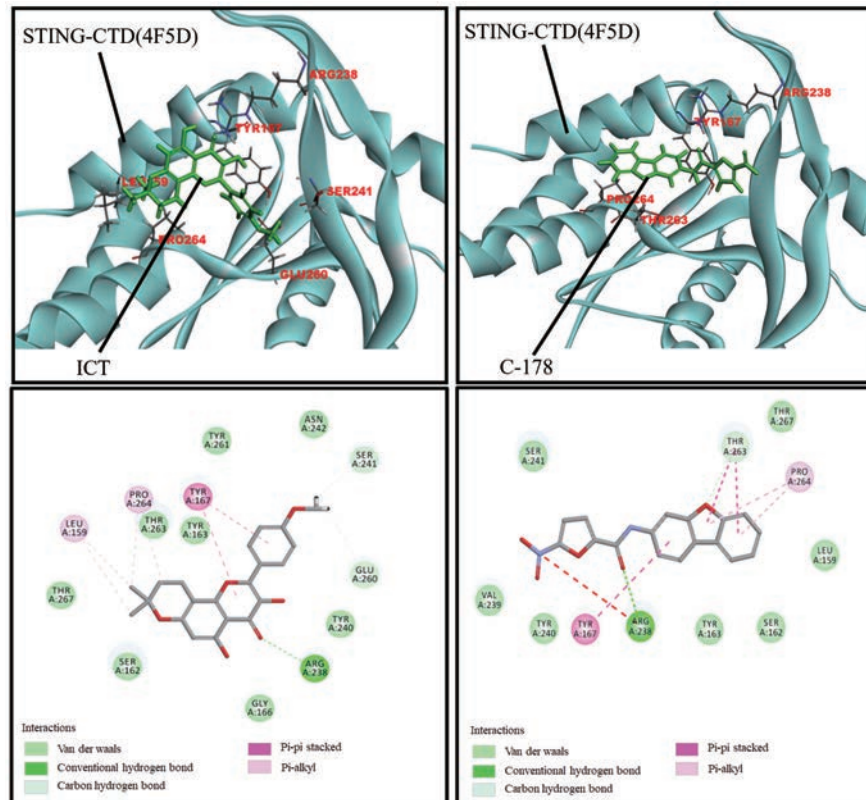


Figure 6 Docking pattern of ICT-STING and C-178-STING

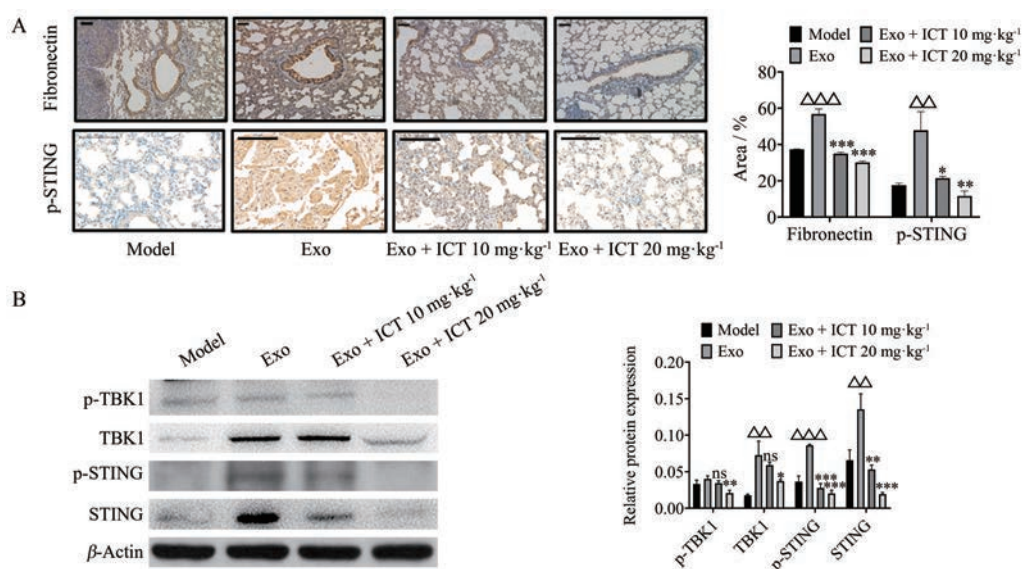


Figure 7 Effect of ICT on Exo-induced B16BL6 cell lung metastasis-related proteins of lung. A: Immunohistochemical method was used to detect the content of fibronectin (scale bar: 50 μm), p-STING (scale bar: 100 μm) in the lung of black mice; B: Western blotting method was used to detect the changes of p-TBK1, TBK1, p-STING, and STING protein contents in the lungs of black mice. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs model; $^{ns}P > 0.05$, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs Exo group

移的重要因素。原位肿瘤持续释放趋化因子和胞外囊泡等加剧肿瘤转移的发生, 其中外泌体被发现是原位肿瘤和继发转移灶之间的桥梁, 在肿瘤细胞转移过程中起了决定性的作用。因此, 本研究采用Exo作为诱导剂, 建立体内外转移模型。研究认为, 肿瘤细胞衍生的Exo加剧肿瘤细胞和局部组织的炎症是其促进肿瘤转移的重要机制。结果发现, 通过ELISA检测转移组织中炎症因子的表达, Exo的诱导可促使S100A8/S100A9、IL-6和SAA炎症相关因子的表达升高, 加重B16BL6的肺转移。IL-6是调节细胞增殖与分化的一种多效细胞因子, 具有多种控制稳态功能如免疫应答、急性期反应及造血功能。有研究表明, IL-6能够通过激活STAT3的激活, 从而促进SAA的释放^[10]。而SAA是一种主要由肝脏合成的高度保守的急性期蛋白, 能够刺激自身的转录以及促炎性S100A8和S100A9蛋白的转录, 增强了肿瘤细胞对纤连蛋白的黏附, 并促进肿瘤细胞的迁移和侵袭^[11]。免疫荧光实验证明, Exo组纤连蛋白表达同样增多。炎症相关的S100A8和S100A9是S100家族的钙结合蛋白, 研究表明高表达S100A8/A9能诱导黑色素瘤细胞发生转移^[12]。综上所述, 研究Exo介导的肿瘤转移能够探寻有效的治疗转移的药物。

文献^[13]报道, ICT对多种肿瘤如前列腺癌、肾癌、胃癌、肺癌及骨肉瘤等均有不同程度的抑制作用, 但其具体的机制尚不明确。B16BL6黑色素瘤实验性转移模型是目前常用的转移动物模型, 本研究发现, ICT可

以显著抑制Exo诱导的B16BL6细胞水平迁移, 并可以显著抑制由Exo诱导的肿瘤肺转移。另外, ICT能够降低S100A8/A9和IL-6等炎症因子的表达。

研究表明, DNA是肿瘤细胞衍生的Exo荷载并传递的重要内容, 恶性肿瘤细胞的染色体不稳定, 易产生断裂的双链DNA, 可由Exo携带进入受体细胞。而这种遗传不稳定性可激活模式识别受体信号cGAS-STING信号, 促进肿瘤的发生发展和转移^[14]。此外, IL-6的表达与STING通路的激活也有关, 在STING缺失的小鼠中, IL-6表达受到抑制^[15]。那么, ICT抑制炎症因子的表达是否与STING相关呢? 本研究首先利用分子模拟CDocker对ICT与STING的对接能力进行分析, 发现ICT与STING蛋白的活性位点CTD结合。然后, 对小鼠体内实验性转移模型中转移肺进行免疫组化和Western blotting实验, 发现ICT能够抑制p-STING、STING、TBK1和p-TBK1的表达。

STING通路在肿瘤转移中扮演了重要的角色。STING的高表达, 一方面可以招募免疫抑制细胞如Treg细胞, 帮助肿瘤细胞逃避免疫; 另一方面可激活吡啶胺2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO), 促进肿瘤的增长转移。因而, STING的抑制剂的开发得到了广泛关注, 然而目前针对STING的报道较少, 主要有C-178、C-176、H-151和astin C^[14]。ICT能够抑制STING的表达, 有作为STING的抑制剂开发的前景, 但是具体机制和应用有待于进一步研究。

作者贡献: 陈彦负责实验设计和文章审核等工作; 屠书

梅和刘玉萍参与实验并进行数据分析, 负责完成文章撰写及文章修改等工作。

利益冲突: 所有作者声明不存在利益冲突。

References

- [1] Steeg PS. Targeting metastasis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16: 201-218.
- [2] Zhang H, Yu Y, Zhou L, et al. Circulating tumor microparticles promote lung metastasis by reprogramming inflammatory and mechanical niches *via* a macrophage-dependent pathway [J]. *Cancer Immunol Res*, 2018, 6: 1046-1056.
- [3] Li K, Chen Y, Li A, et al. Exosomes play roles in sequential processes of tumor metastasis [J]. *Int J Cancer*, 2019, 144: 1486-1495.
- [4] Record M, Carayon K, Poirot M, et al. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1841: 108-120.
- [5] Alenquer M, Amorim MJ. Exosome biogenesis, regulation, and function in viral infection [J]. *Viruses*, 2015, 7: 5066-5083.
- [6] Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET [J]. *Nat Med*, 2012, 18: 883-891.
- [7] Lian Q, Xu J, Yan S, et al. Chemotherapy-induced intestinal inflammatory responses are mediated by exosome secretion of double-strand DNA *via* AIM2 inflammasome activation [J]. *Cell Res*, 2017, 27: 784-800.
- [8] Sharma A, Johnson A. Exosome DNA: critical regulator of tumor immunity and a diagnostic biomarker [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235: 1921-1932.
- [9] Haag SM, Gulen MF, Reymond L, et al. Targeting STING with covalent small-molecule inhibitors [J]. *Nature*, 2018, 559: 269-273.
- [10] Lee JW, Stone ML, Porrett PM, et al. Hepatocytes direct the formation of a pro-metastatic niche in the liver [J]. *Nature*, 2019, 567: 249-252.
- [11] Hansen MT, Forst B, Cremers N, et al. A link between inflammation and metastasis: serum amyloid A1 and A3 induce metastasis, and are targets of metastasis-inducing S100A4 [J]. *Oncogene*, 2015, 34: 424-435.
- [12] Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H, et al. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis [J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8: 1369-1375.
- [13] Tan HL, Chan KG, Pusparajah P, et al. Anti-cancer properties of the naturally occurring aphrodisiacs: icariin and its derivatives [J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7: 191.
- [14] Tu SM, Liu YP, Chen Y. Research progress of cGAS-STING in tumor metastasis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 398-406.
- [15] Abdullah A, Zhang M, Frugier T, et al. STING-mediated type-I interferons contribute to the neuroinflammatory process and detrimental effects following traumatic brain injury [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15: 323.