

对乙酰氨基酚对 Lewis 肺癌荷瘤模型小鼠上皮屏障功能的影响

张雯琪^{1,2}, 杨昌硕¹, 郭虹^{1,2}, 赵慧¹, 庄朋伟^{1,2*}, 张艳军^{1,2*}

1. 天津中医药大学 省部共建组分中药国家重点实验室, 天津 301617

2. 方剂学教育部重点实验室 天津市中药药理学重点实验室, 天津 301617

摘要: 目的 考察对乙酰氨基酚对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠上皮屏障功能的影响, 为临床合理用药提供参考。方法 C57BL/6 小鼠的右腋处皮下接种 2×10^6 个 Lewis 肺癌细胞, 通过小鼠一般状态 and 肺组织表面转移灶考察对乙酰氨基酚对肿瘤肺转移的影响。利用病理组织形态、HE 染色、免疫组化等方法检测肿瘤转移情况, 同时采用 qRT-PCR 法检测屏障相关蛋白 Claudin 5、Occludin、ZO-1、DSG2 mRNA 表达水平, 探讨对乙酰氨基酚影响上皮屏障的潜在机制。结果 与对照组和模型组比较, 大体形态观察对乙酰氨基酚组小鼠肺组织出现了明显的肿瘤转移灶, 病理及免疫组织化学染色结果进一步显示对乙酰氨基酚组肺组织转移灶明显增加, qRT-PCR 结果显示对乙酰氨基酚组小鼠肺组织 Claudin 5、Occludin、ZO-1、以及 DSG2 等屏障相关蛋白 mRNA 表达均显著降低。结论 对乙酰氨基酚可以影响上皮屏障相关蛋白表达诱导上皮屏障功能障碍, 并可能继而有利于肿瘤转移。

关键词: 对乙酰氨基酚; Lewis 肺癌; 上皮屏障; 屏障蛋白; 肿瘤转移

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)07-1349-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.07.002

Effect and mechanism of acetaminophen on epithelial barrier function in tumor-bearing mice

ZHANG Wen-qi^{1,2}, YANG Chang-shuo¹, GUO Hong^{1,2}, ZHAO Hui¹, ZHUANG Peng-wei^{1,2}, ZHANG Yan-jun^{1,2}

1. State Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Key Laboratory of Prescription Medicine of Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To explore the barrier dysfunction induced by acetaminophen, and provide guidance for the clinical rational use of drugs. **Methods** 2×10^6 Lewis lung cancer cells were subcutaneously tumor-bearing in the right axillary of C57BL/6 mice. The general states of the mice were observed, and the tumor metastasis were detected by pathological morphology, HE and immunohistochemistry. At the same time, mRNA expression levels of barrier related proteins were detected by qRT-PCR, to explore the potential mechanism of acetaminophen affecting epithelial barrier. **Results** Compared with control and model groups, the lung tissue of mice in acetaminophen group showed obvious tumor metastasis. Pathological and immunohistochemical staining results further showed that the lung tissue metastasis was significantly increased in mice of acetaminophen group. qRT-PCR results showed that mRNA expressions of barrier related proteins such as Claudin 5, Occludin, ZO-1, and DSG2 were significantly decreased in lung tissues of mice in acetaminophen group. **Conclusion** Acetaminophen may reduce the expression of epithelial barrier-related proteins, induce epithelial barrier dysfunction, and then induce the risk of tumor metastasis.

Key words: acetaminophen; Lewis lung cancer; epithelial barrier; barrier protein; tumor metastasis

恶性肿瘤具有高转移和高致死率的特征^[1], 原发肿瘤转移以及术后肿瘤转移引起的复发是患者死亡的主要诱因^[2]。肿瘤转移的聚焦点多在血管新生、淋巴道转移等方面, 近年来, 上皮屏障功能作为抵

收稿日期: 2021-05-11

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目 (18JCZDJC99300)

作者简介: 张雯琪, 硕士研究生, 主要从事中药药理学相关研究。E-mail: 17622738901@163.com

*通信作者: 庄朋伟, 博士生导师, 主要从事中药药效特点发现及配伍优化设计关键技术研究。E-mail: zhuangpengwei@163.com

张艳军, 博士生导师, 主要从事复方中药药理及配伍规律研究。E-mail: zyjsunye@163.com

御肿瘤转移的重要途径越来越受到人们的关注^[3]。屏障相关蛋白主要由连接蛋白 (Claudin 5、Occludin、ZO-1)、桥粒芯糖蛋白 (DSG)、黏附分子 (E-cadherin)、细胞骨架蛋白 (Vinculin) 以及其他相关多功能蛋白 (β -catenin) 等组成^[4-5]。屏障相关蛋白的失调, 可导致上皮细胞、内皮细胞结构破坏, 促进或加重肿瘤转移^[6-7]。因此, 维持机体的屏障功能对预防肿瘤转移十分重要。

现代研究发现某些药物的毒副作用会对机体屏障产生一定影响, 如维甲酸可以降低角质形成细胞 DSG1 的表达, 破坏皮肤屏障功能^[8]。但药物诱导的上皮屏障相关蛋白的表达异常与肿瘤转移的关系尚无系统报道。发热疼痛等是恶性肿瘤患者的重要临床表现, 常用非甾体类抗炎药物进行对症治疗^[9-10], 但是些常用非甾体类抗炎药物的副作用会在一定程度上影响上皮屏障功能^[11-12]。对乙酰氨基酚也是临床上常用的非甾体类解热镇痛药^[13], 然而其对上皮屏障的影响尚无明确报道。本研究拟以对乙酰氨基酚为工具药, 探讨其对荷瘤实验小鼠上皮屏障相关蛋白表达及肿瘤转移的影响, 以期临床合理用药提供一定借鉴。

1 材料

1.1 实验动物及细胞株

SPF 级雌性 C57BL/6 纯系小鼠, 6 周龄, 体重 (18±2) g, 购于北京维通利华实验动物有限公司, 生产许可证号为 SCXK (京) 2016-0006。Lewis 肺癌细胞株 (LLC), 购于上海诺百生物科技有限公司 (编号 C01-BF)。

1.2 实验药物

对乙酰氨基酚片 (0.5 g/片), 中美天津史克制药有限公司, 批准文号: 国药准字 H12021118, 生产批号: 02171106。

1.3 主要试剂及仪器

胎牛血清 (货号: 10091148)、DMEM basic (1X) (货号: C11995500BT), Gibco 公司; 4%多聚甲醛 (货号: P1110)、HE 染色试剂 (货号: G1120)、SABC-POD 试剂盒 (货号: SA0011), 北京索莱宝科技有限公司; 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (H+L) (货号: A0208), 碧云天生物技术公司; 总 RNA 提取试剂盒 (货号: DP419)、反转录试剂盒 (货号: KR106)、PCR 扩增试剂盒 (货号: FP205), 天根生化科技 (北京) 有限公司; 上下游引物, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 中性树胶 (货

号: 10004160), 国药集团化学试剂有限公司。

5% CO₂ 恒温培养箱 (Thermo Scientific Cytoperm); 显微镜图像采集系统 (日本奥林巴斯株式会社); 实时定量 PCR 仪 (Bio-Rad CFX96 Touch 公司)。

2 方法

2.1 动物分组和给药方法

30 只 C57BL/6 小鼠, 采用随机数字表法进行随机分组, 分为对照组、模型组、对乙酰氨基酚组, 每组 10 只。模型组和对乙酰氨基酚组参考文献方法复制皮下荷瘤模型^[13], 在小鼠的右腋处 sc Lewis 肺癌细胞 (2×10⁶), 接种 7 d 后, 造模小鼠右腋下可触及瘤块, 即 Lewis 肺癌小鼠模型制备成功。

对照组、模型组小鼠 ig 给予蒸馏水; 对乙酰氨基酚组接种 Lewis 肺癌细胞前 3 d 开始 ig 给予对乙酰氨基酚 0.26 g/kg (该剂量为人与小鼠的等效剂量), 接种肿瘤细胞后每周给予对乙酰氨基酚 (0.26 g/kg) 3 d, 每天 2 次, 间隔 4 h, 连续 4 周。

2.2 一般情况观察

每天定期观察动物的精神活动状态、饮食和排便等状况。

2.3 肺表面转移灶计数

取出肺组织, 经生理盐水漂洗后在显微镜下观察肺表面转移灶。转移灶的计算方法: 转移灶为类圆形小突起呈结节状, 呈圆形的半透明点状, 部分可融合到一起^[14]。根据肺结节直径可将其分为 4 级: I 级 < 0.5 mm, 0.5 mm ≤ II 级 ≤ 1 mm, 1 mm < III 级 ≤ 2 mm, IV > 2 mm, 肺表面转移结节总数 = I × 1 + II × 2 + III × 3 + IV × 4。

2.4 HE 染色

将小鼠的左肺放入 4%多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片, 苏木-伊红染色, 在 50 倍镜下观察微小肿瘤转移灶。

2.5 免疫组化检测各组小鼠左肺组织中的癌胚抗原标志物表达

将小鼠的左肺放入 4%多聚甲醛固定, 常规石蜡切片脱蜡至水, 柠檬酸缓冲液进行抗原修复, 采用微波中火 8 min 至沸, 停火 8 min, 再低火 7 min; 3% H₂O₂ 溶液室温避光孵育 25 min, 洗涤 3 次, 每次 5 min; 3% BSA 室温封闭 30 min; 轻轻甩掉封闭液, 滴加一抗: 癌胚抗原 (1:200), 切片平放于湿盒内, 4 °C 孵育过夜; 第 2 天, 洗涤 3 次, 每次 5 min; 滴加 HRP 标记的山羊抗兔 (1:50), 室温孵育 50

min; 洗涤 3 次, 每次 5 min; DAB 显色; 苏木素染液复染细胞核, 脱水封片; 显微镜镜检左肺组织中的癌胚抗原标志物表达量。

2.6 Real-time PCR 法检测肺组织中屏障相关蛋白 mRNA 表达

提取小鼠肺组织的总 RNA, 采用 qRT-PCR 法检测肺组织中屏障相关蛋白 mRNA 表达水平。引物序列根据 Primer 3 软件设计 (引物序列见表 1), 经 NCBI 数据库检测, 由上海生工生物技术有限公司合成。提取 RNA、反转成 cDNA、扩增等步骤按照试剂盒说明书操作。扩增反应条件: 预变性 1 个循环: 95 °C, 15 min; 变性、退火/延伸 40 个循环: 变性 95 °C, 10 s; 退火/延伸 60 °C, 32 s; 65 °C, 32 s。数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因表达。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物名称	序列
Claudin 5 F	TGGTGCTGTGTCTGGTAGGATGG
Claudin 5 R	GTCACGATGTTGTGGTCCAGGAAG
ZO-1 F	AGTGCCCTCGAACCTCTACTCTAC
ZO-1 R	GCCTGGTGGTGAAGCTTGCTC
Occludin F	TGGCTATGGAGGCGGCTATGG
Occludin R	AAGGAAGCGATGAAGCAGAAGGC
DSG2 F	GAGAGGCGGCGTAGGAGGTG
DSG2 R	GGTGAGGAGGCTTCTGTGTTCTTC
GAPDH F	AAGAAGGTGGTGAAGCAGGCATC
GAPDH R	CGGCATCGAAGGTGGAAGAGTG

2.7 数据统计分析

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示, 应用 SPSS 23.0 统计软件进行数据处理。正态分布计量资料的组间比较采用单因素方差分析 (One Way ANOVA), 进行显著检验; 若是偏态分布则采用秩和检验, $P < 0.05$ 具有统计学差异。

3 结果

3.1 一般情况观察

与对照组相比, 模型组小鼠精神状态欠佳, 右腋处的肿瘤体积逐渐增大, 活动次数相对减少, 毛发晦暗无色, 站姿不稳等虚证表现。与模型组比较, 对乙酰氨基酚组小鼠出现了精神萎靡、双眼无神、眼裂变窄等精神状态, 活动次数明显减少, 毛发失去光泽, 无法正常站立等表现, 评估对乙酰氨基酚

组整体状态相比于模型组更为虚弱。

3.2 肺组织表面肿瘤转移灶

由图 1 和表 2 可知, 与对照组相比, 模型组小鼠的肺组织暗淡无光泽, 存在一定的病变, 观察到少量的微小转移灶; 与模型组相比, 对乙酰氨基酚组小鼠的肺组织出现了明显的肿瘤转移灶 (箭头所示, $P < 0.05$)。

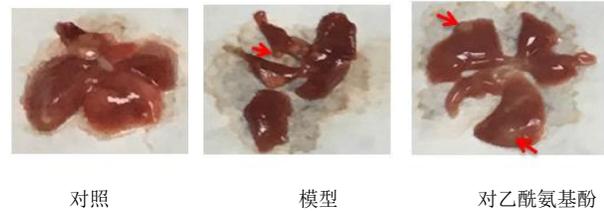


图 1 各组小鼠肺组织大体形态

Fig. 1 Gross morphology of lung tissue in mice of each group

表 2 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肺转移的情况 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Lung metastasis in tumor-bearing mice with Lewis lung cancer ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肺表面转移灶/个
对照	—	—
模型	—	2.00 ± 1.73
对乙酰氨基酚	0.26	7.50 ± 2.12*

与模型组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group

3.3 肺组织 HE 染色

如图 2 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠左肺组织未发现明显的转移灶, 但其形态发生改变, 大量的支气管上皮细胞脱落, 胞核固缩深染 (箭头所示); 与模型组相比, 对乙酰氨基酚组小鼠肺组织一侧可见大的肿瘤灶, 肿瘤细胞胞核较大、异型, 与周围组织分界明显且对周围组织造成挤压。

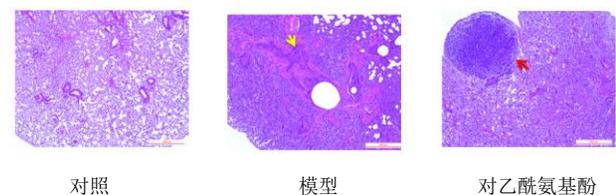


图 2 各组小鼠肺组织 HE 染色 (×50)

Fig. 2 HE staining of lung tissue of mice in each group (×50)

3.4 肺组织癌胚抗原免疫组化染色

如图 3 所示, 对照组无癌胚抗原表达, 与对照组相比, 模型组出现棕黄色癌胚抗原表达 (棕黄色代表阳性细胞); 与模型组相比, 对乙酰氨基酚组肺组织中的癌胚抗原呈现散在性分布且其表达量相对增加, 表明肺组织中存在肺癌的转移。

3.5 肺组织屏障相关蛋白的 mRNA 表达水平

如图 4 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠肺组织屏障相关蛋白 ZO-1、Occludin mRNA 的表达降低 ($P < 0.05$ 、 0.001), 而其他屏障相关蛋白 mRNA 的表达并未出现显著性差异; 与模型组比较, 对乙酰

氨基酚组小鼠肺组织 Claudin 5、Occludin 以及 DSG2 等屏障相关蛋白 mRNA 表达均显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

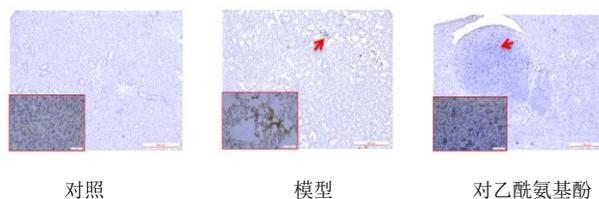
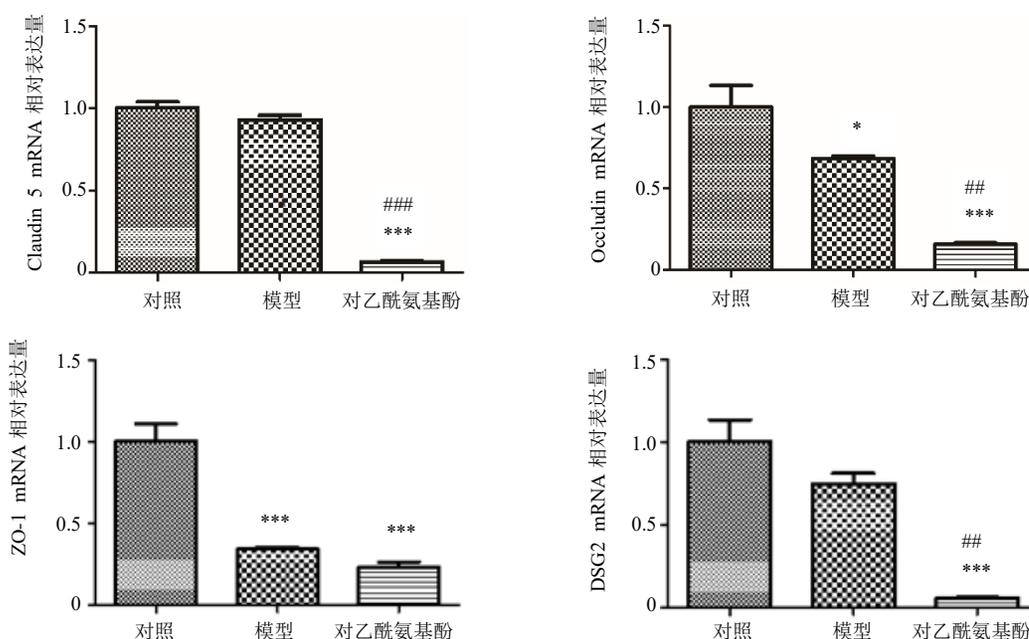


图 3 肺转移的免疫组化染色 (×50)

Fig. 3 Immunohistochemical staining of lung metastases (× 50)



与对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$
* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group

图 4 各组小鼠肺组织屏障相关蛋白 mRNA 的表达水平

Fig. 4 Expression of mRNA of barrier related protein in lung tissue of mice in each group

4 讨论

肿瘤的转移指肿瘤从原发部位通过一定途径到达其他部位继续生长的过程, 往往是肿瘤恶化及治疗失败导致患者死亡的重要原因。恶性肿瘤转移过程中突破上皮屏障是其实现转移的重要过程^[15], 因此维持上皮屏障功能是防治肿瘤转移的潜在关键环节^[16-17], 然而在肿瘤治疗过程中一些药物干预可能存在破坏上皮屏障功能作用^[18], 继而促进或加速肿瘤细胞的转移。明确肿瘤治疗过程中相关药物对上皮屏障功能的影响对指导临床安全合理用药具有重要意义。

在恶性肿瘤进展阶段, 由于肿瘤细胞异常代谢所产生内生性质热源, 大约有一半以上的患者会出现发热及癌痛, 治疗多用物理降温、非甾体类抗炎药以及糖皮质激素为主^[19-23]。对乙酰氨基酚为临床常用解热镇痛抗炎药, 但其对肿瘤患者的上皮屏障功能的影响尚无明确报道。本研究利用荷瘤小鼠模型首先考察了对乙酰氨基酚对肿瘤转移的影响, 通过肺组织大体形态观察以及病理组织切片染色结果发现其具有一定增加荷瘤小鼠肺部转移灶的作用。进一步对其屏障相关蛋白 mRNA 的表达进行了考察, 结果发现模型组相关屏障蛋白表达异常, 屏

障功能破坏的现象,而对乙酰氨基酚可以进一步导致 Claudin 5、Occludin 以及 DSG2 屏障蛋白 mRNA 表达降低,提示在肿瘤转移过程中可能存在对乙酰氨基酚进一步导致上皮屏障功能异常的现象。

本研究考察了对乙酰氨基酚对荷瘤实验小鼠上皮屏障功能以及肿瘤转移的影响,初步发现对乙酰氨基酚具有破坏上皮屏障的作用,具有潜在的促进肿瘤转移的作用,为临床合理用药提供了一定参考。但由于基础研究与临床实际用药在用药剂量、用药时间及时机的差异,其在临床对上皮屏障功能及肿瘤转移的作用以及其影响屏障功能的机制有待进一步深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张密霞,李怡文,张德生,等. 茯苓多糖对 Lewis 肺癌小鼠自发肺转移的抑制作用及其机制研究 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(6): 842-846.
- [2] 张密霞,张德生,庄朋伟,等. 茯苓多糖对 B16 黑色素瘤人工肺转移模型的影响 [J]. 天津中医药, 2014, 31(2): 98-101.
- [3] Jolly M K, Mani S A, Levine H. Hybrid epithelial/mesenchymal phenotype(s): The 'fittest' for metastasis? [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2018, 1870(2): 151-157.
- [4] Sawada N, Murata M, Kikuchi K, et al. Tight junctions and human diseases [J]. *Methods Mol Biol*, 2003, 36(3): 147-156.
- [5] Martin T A, Jiang W G. Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1788(4): 872-891.
- [6] Tabariès S, Siegel P M. The role of claudins in cancer metastasis [J]. *Oncogene*, 2017, 36(9): 1176-1190.
- [7] 李秋霞,罗茂林,李茹柳,等. 紧密连接蛋白 ZO-1 研究概述 [J]. 广州中医药大学学报, 2007(6): 523-526.
- [8] Zhang Y D, Zhang X J, Fan S S, et al. Desmoglein1 deficiency is a potential cause of cutaneous eruptions induced by Shuanghuanglian Injection [J]. *Molecules*, 2018, 23(6): 1477.
- [9] 罗云. 非甾体类抗炎药物抗癌作用的研究进展 [J]. 临床生物化学与检验学分册, 2001(6): 310-311.
- [10] 耿宝琴. 非甾体抗炎药和肿瘤的预防 [J]. 实用肿瘤杂志, 2010, 25(4): 383-385.
- [11] Chamoun-Emanuelli A M, Bryan L K, Cohen N D, et al. NSAIDs disrupt intestinal homeostasis by suppressing macroautophagy in intestinal epithelial cells [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 14534.
- [12] Bhatt A P, Gunasekara D B, Speer J, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced leaky gut modeled using polarized monolayers of primary human intestinal epithelial cells [J]. *ACS Infect Dis*, 2018, 4(1): 46-52.
- [13] 李春伢,兰静,宗政涛,等. 对乙酰氨基酚缓释制剂的安全性研究进展 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(6): 1250-1256.
- [14] 明海霞. 黄芪多糖联合顺铂对 Lewis 肺癌小鼠的抑瘤作用及机制研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.
- [15] 刘源. 补肾疏肝方对小鼠 Lewis 肺癌生长转移的抑制作用及其机制的实验研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2011.
- [16] 张子强. 水通道蛋白 5 促进肺癌增殖迁移及参与肺上皮屏障的作用和机制研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2010.
- [17] 程艳如. Claudin-3 蛋白缺失对黑色素瘤淋巴转移的影响与机制 [D]. 郑州: 郑州大学, 2020.
- [18] 赵亚铮,张媛媛,寇俊萍,等. 紧密连接在肿瘤转移中的作用研究进展 [J]. 海峡药学, 2017, 29(11): 1-5.
- [19] Oshima T, Miwa H, Joh T. Aspirin induces gastric epithelial barrier dysfunction by activating p38 MAPK via claudin-7 [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 295(3): C800-6.
- [20] 唐晨. 冰毯机在血液肿瘤 CAR-T 治疗并发细胞因子释放综合征高热患者中的应用 [J]. 当代护士: 下旬刊, 2020, 27(11): 43-44.
- [21] 张丽莉. 癌性发热患者降温方法护理研究进展 [J]. 河北医药, 2009, 31(24): 3419-3420.
- [22] Kathula S K, Shah K, Polenakovik H, et al. Cyclooxygenase II inhibitors in the treatment of neoplastic fever [J]. *Support Care Cancer*, 2003, 11(4): 258-259.
- [23] Tsavaris N, Zinelis A, Karabelis A, et al. A randomized trial of the effect of three non-steroid anti-inflammatory agents in ameliorating cancer-induced fever [J]. *J Intern Med*, 1990, 228(5): 451-455.
- [24] 方晓瑞. 糖皮质激素在肿瘤治疗中的合理应用 [J]. 现代诊断与治疗, 2017, 28(13): 2401-2402.

[责任编辑 刘东博]