DOI: 10.16016/j.1000-5404.201510155

结肠癌组织中补体 C5a/C5aR 通路活化上调 FGL2 的表达

陈立颖[1],朱 莹[1],封 奕[1],杨 菲[1],郭 波[2],朱 波[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军肿瘤诊治研究所[1];400038 重庆,第三军医大学基础医学部病原微生物教研室[2])

[摘要] **目的** 探讨补体 C5a/C5aR 通路在结肠癌发病中对纤维介素蛋白-2 凝血酶原酶(fibrinogen-like protein 2,FGL2)的调节机制,明确补体系统在结肠癌发病中的功能和作用。**方法** 收集 2013 年 12 月至 2015 年 7 月第三军医大学西南医院普外科、新桥医院消化科 15 例经病理活检确诊的住院临床结肠癌患者癌及癌旁组织。采用免疫组织化学方法检测结肠癌患者癌及癌旁组织中补体活化片段 C5b-9、活化 C3 及 C5aR 的表达,佐证补体系统在结肠癌中的活化状态;进一步通过体内外实验(Western blot)验证结肠癌患者癌及癌旁组织 MAPK 信号通路中 P38 的磷酸化水平及 FGL2 的沉积,明确结肠癌发病中补体 C5a/C5aR 通路与二者的调节关系。**结果** 免疫组织化学及 Western blot 实验证实结肠癌患者癌组织 C5b-9、活化 C3 及 C5aR 的表达明显高于癌旁组织,FGL2 的沉积亦显著高于癌旁组织;体外结果提示 C5a 能促进巨噬细胞系 Raw264.7MAPK 通路中 P38 的磷酸化水平($P=0.0013$)及 FGL2 的产生能力($P=0.0071$),加入 C5aR 阻断剂之后,二者表达随之减弱。**结论** C5a/C5aR 通路能通过 MAPK 信号途径中的 P38 信号完成对 FGL2 的调节作用进而参与结肠癌的发病进程。

[关键词] 补体;结肠癌;C5a/C5aR 通路;FGL2
[中图法分类号] R392.12;R730.23;R735.35 [文献标志码] A

C5a/C5aR signaling pathway mediates FGL2 expression in colon cancer

Chen Liying[1], Zhu Ying[1], Feng Yi[1], Yang Fei[1], Guo Bo[2], Zhu Bo[1] ([1]Institute of Cancer, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]Department of Pathogenic Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the role of C5a/C5aR pathway in colon cancer, and investigate the regulatory mechanism of C5a/C5aR pathway in the expression of fibrinogen-like protein 2 (FGL2). **Methods** Fifteen colon cancer patients were recruited from general surgery department of Southwest Hospital and gastroenterology department of Xinqiao Hospital from December 2013 to July 2015. Immunohistochemical staining was used to assess the expression of complement activation fragments C5b-9, activated C3 and C5aR and the FGL2 deposition in colon cancer tissues to verify the complement activation. Western blotting was used to detect the phosphorylation level of P38 in MAPK signaling pathway and the FGL2 expression in colon cancer tissues to clarify the interaction of C5a/C5aR pathway and FGL2 expression. **Results** The activation fragments C5b-9, activated C3 and C5aR showed higher expression in colon cancer tissues than in the paratumor tissues. Furthermore, the expression of FGL2 in colon cancer tissues was higher than that in the paratumor tissues. Moreover, the MAPK signaling pathway was activated in the colon cancer tissues. C5a could promote the phosphorylation level of P38 in MAPK signaling pathway and the FGL2 expression in Raw264.7. However, C5aR antagonist could attenuate the expressions. **Conclusion** C5a/C5aR signaling pathway plays a significant role in the development of colon cancer *via* regulation of FGL2 expression.

[**Key words**] complement; colon cancer; C5a/C5aR pathway; fibrinogen-like protein 2

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81222031)
[通信作者] 郭 波,E-mail:guobomail@gmail.com
朱 波,E-mail:b.davis.zhu@gmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151207.1704.029.html(2015-12-07)

Supported by the General Program of Natural Science Foundation of China (81222031). Corresponding author: Guo Bo, E-mail: guobomail@gmail.com; Zhu Bo, E-mail: b.davis.zhu@gmail.com

现目前肿瘤领域相关文献提示一种新型凝血因子FGL2的表达异常与肿瘤的发病密切相关,如在卵巢癌、胃癌等肿瘤患者局部组织中均能检测到大量FGL2的沉积,并且发现这些肿瘤患者大都处于高凝状态,提示FGL2与肿瘤的发生密切相关[1]。

补体活化过程中产生的活化片段C5a具有强大的生物学活性[2-4]。在对临床许多疾病及动物模型如脓毒症、急性脑脊髓膜炎等进行研究时证实患者外周血中有大量补体活化片段C5a的产生,病变局部亦能检测到大量补体C5分子活化片段C5b-9、活化C3及C5aR的沉积,提示补体C5a/C5aR通路能参与疾病的发生及进展;同时在急性肝损伤发病中亦佐证补体C5a/C5aR通路能通过对FGL2的调节作用参与疾病的进程[5-10]。可见补体在炎症的发生中意义重大,然而补体在肿瘤中的具体作用及调控分子机制并不清楚[11-13]。在临床肿瘤患者中往往可以观察到其机体处于高凝状态,凝血酶、凝血活酶及凝血酶原时间表达异常,而FGL2作为一种新型凝血分子发挥强大促凝效应,或在肿瘤患者高凝状态里存在负面影响,提示肿瘤不良预后[14-15]。我们以临床结肠癌患者作为研究对象,从体内外角度研究补体C5a/C5aR通路在结肠癌发病中对FGL2的调节作用,为日后临床运用C5aR阻断剂治疗结肠癌提供实验数据。

1 材料与方法

1.1 病例选择

选取经病理检测确诊的、2013年12月至2015年7月第三军医大学西南医院普外科结肠癌患者石蜡包埋组织15例,其中男性7例,女性8例,平均年龄52.46岁;同时在第三军医大学新桥医院消化科收取结肠癌患者癌及癌旁组织2例,其中50岁男性1例,53岁女性1例,所选病例均排除其他器质性疾病。

1.2 细胞株及主要试剂

巨噬细胞株Raw264.7保存于第三军医大学全军免疫学研究所,RPMI1640购自HyClone公司,小牛血清购自天津灏洋生物制品生物有限公司,蛋白裂解液购自罗氏公司;C5aR阻断剂购自上海吉尔生化有限公司;C5aR、C5b-9一抗购置于美国Abcam公司;P38及p-P38一抗购自Cell signaling Technology公司;FGL2一抗购自Abnova公司。

1.3 细胞培养及蛋白提取

用富含10%小牛血清,100 U/mL链霉素,100 U/mL青霉素的培养基培养小鼠巨噬细胞株Raw264.7后,传代2次,调整细胞浓度为1×10^5接种于6孔板中,37 ℃(5% CO_2)孵箱孵育至细胞长至约80%,分别用C5a、C5aR阻断剂对细胞进行刺激(其中C5aR阻断剂组于刺激之前40 min加入,检测FGL2表达时,刺激时间为24 h,检测P38磷酸化水平时,刺激时间为5 min)后,6孔板弃去培养基,PBS涮洗2遍,加入蛋白裂解液(每孔60 μL),冰上裂解并刮取细胞,振荡裂解5次后置于冰上裂解1 h,4 ℃,20 000 × *g* 离心10 min,取上清液,检测浓度。根据30 μg的蛋白量计算蛋白上样体积并按比例加入5 × Loading Buffer混匀煮沸15 min使蛋白充分变性后进行Western blot实验。

1.4 Western blot检测Raw264.7细胞FGL2、磷酸化P38及总P38蛋白的表达

将处理完成之后的蛋白样品进行10% ~12% SDS-PAGE电泳,然后电转移至PVDF膜上,5% BSA室温封闭2 h,按照1∶1 000的比例稀释FGL2一抗、1∶1 200比例稀释p-P38及P38一抗,4 ℃孵育过夜;次日,TBST振荡洗涤8 min × 5次,按1∶3 000稀释相应二抗室温孵育1 h,再次TBST振荡洗涤8 h × 5次,ECL发光显色液曝光处理,β-actin作为内参照。

1.5 Western blot检测临床结肠癌患者癌及癌旁组织C5aR、FGL2蛋白表达

分别称取从第三军医大学新桥医院收集得到的2例结肠癌患者癌及癌旁组织样本约50 mg后,将其分别置于研钵中并标记,每个研钵加入1 mL蛋白裂解液冰上充分研磨组织,收取组织蛋白后4 ℃,20 000 × *g* 离心10 min,取上清液,检测浓度,而后进行Western blot实验,方法同材料与方法部分1.4.

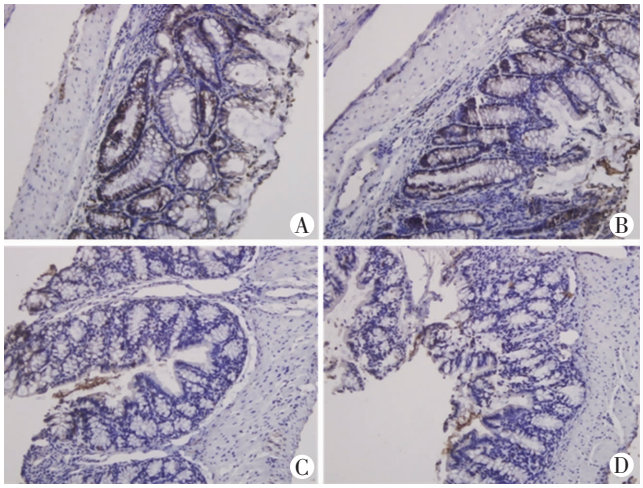
1.6 免疫组织化学检测临床结肠癌患者癌及癌旁组织C5b-9、C3、C5aR、FGL2的表达

将材料方法1.1中收取自第三军医大学西南医院的15例结肠癌蜡块进行切片,而后按照二甲苯 × 2次,每次15 min,按无水乙醇,90%、80%、70%、60%、50%乙醇的顺序常规脱蜡处理后,加入柠檬酸钠缓冲液(0.01 mol/L,pH = 6.0)微波修复20min进行抗原修复,再用3% H_2O_2室温孵育10 min封闭组织中内源性过氧化物酶活性,而后5% BSA室温封闭1 h后按照1∶200稀释度稀释C5b-9、活化C3、C5aR、FGL2一抗,4 ℃冰箱孵育过夜。次日PBS洗涤5 min × 3次,按照相应抗体按照1∶200的稀释度配置HRP标记二抗,室温孵育1 h,PBS洗涤(方法同前)后DAB镜下观察染色程度并用苏木精复染,中性树脂封片,观察并采集图像。

2 结果

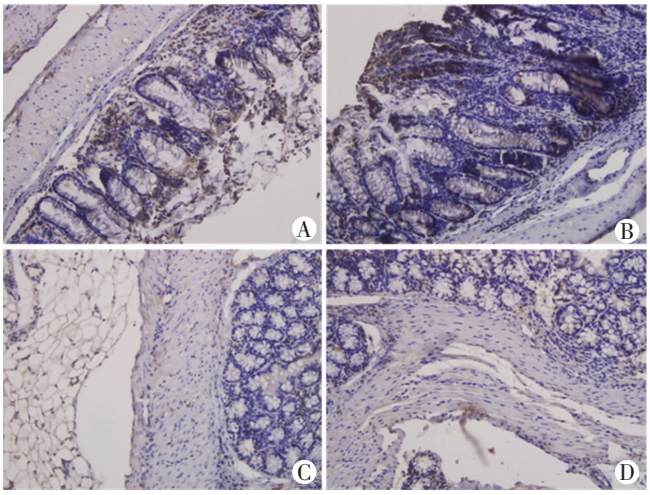
2.1 补体 C5 活化片段 C5b-9 及上游活性片段活化 C3 在结肠癌组织中表达升高

15 例临床结肠癌患者癌组织中,补体 C5 分子下游活性片段 C5b-9 及上游活化 C3 的表达明显高于相应癌旁组织,可以发现癌组织周围 C5b-9 及活化 C3 的沉积较癌旁组织明显呈现棕褐色,染色深,面积大(图 1、2)。



A:患者Ⅰ癌组织;B:患者Ⅱ癌组织;C:患者Ⅰ癌旁组织;D:患者Ⅱ癌旁组织

图 1 免疫组化检测 C5b-9 在结肠癌及癌旁组织中的表达(SABC×200)

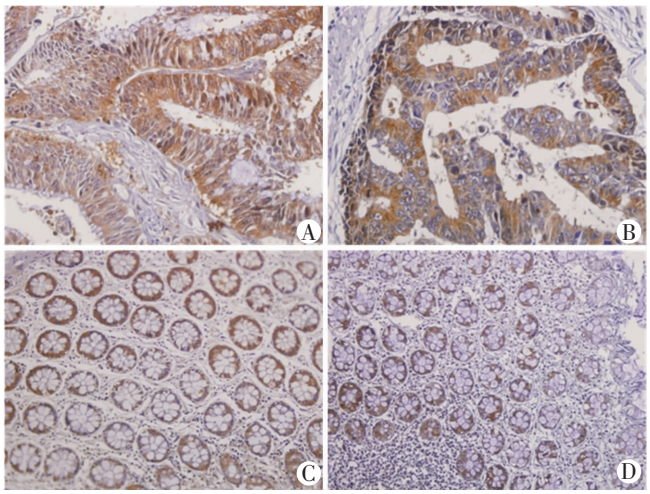


A:患者Ⅰ癌组织;B:患者Ⅱ癌组织;C:患者Ⅰ癌旁组织;D:患者Ⅱ癌旁组织

图 2 免疫组化检测活化 C3 在结肠癌及癌旁组织中的表达(SABC×200)

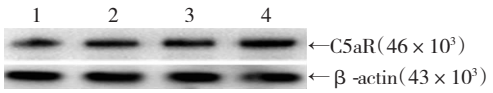
2.2 补体 C5 分子受体 C5aR 在结肠癌组织中表达升高

刚才的实验表明在结肠癌患者癌组织中补体 C5 分子的广泛活化,同时检测补体 C5 分子的受体的 C5aR 的表达,免疫组织化学结果提示 C5aR 固有表达于结肠癌患者癌及癌旁组织中(图 3),进一步 Western blot 结果证实在结肠癌患者癌组织中 C5aR 的表达明显高于癌旁组织(图 4),阐明补体 C5a/C5aR 通路或在结肠癌发病中发挥重要作用。



A:患者Ⅰ癌组织;B:患者Ⅱ癌组织;C:患者Ⅰ癌旁组织;D:患者Ⅱ癌旁组织

图 3 免疫组化检测 C5aR 在结肠癌及癌旁组织中的表达(SABC×200)



1:患者Ⅰ癌旁组织;2:患者Ⅰ癌组织;3:患者Ⅱ癌旁组织;4:患者Ⅱ癌组织

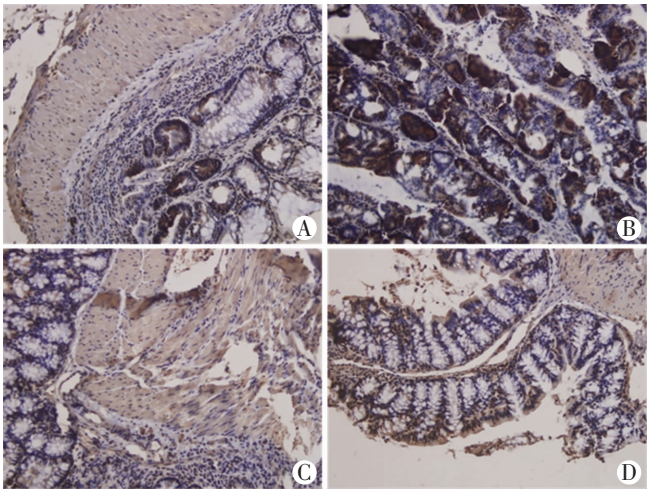
图 4 Western blot 检测 C5aR 在结肠癌及癌旁组织中的表达

2.3 新型凝血因子 FGL2 的表达在结肠癌组织中显著上调

15 例结肠癌患者癌组织中 FGL2 的沉积明显高于癌旁组织(图 5),从组织切片上可以观察发现结肠癌癌组织中 FGL2 的表达呈片状分布,Western blot 实验亦证实在结肠癌患者癌组织中 FGL2 表达显著较癌旁组织上调(图 6)。

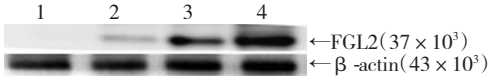
2.4 C5aR 阻断剂能减低 C5a 刺激巨噬细胞株 Raw264.7 分泌 FGL2 的能力

由于在结肠癌研究中发现巨噬细胞是较为重要的靶向调节细胞同时巨噬细胞也是 FGL2 的主要来源和产生细胞,所以选择巨噬细胞 Raw264.7 作为研究对象,辅以 C5a 及 C5aR 阻断剂作为研究手段,结果显示 C5a 确能促进巨噬细胞株 Raw264.7 分泌 FGL2 的能力,而一旦加入 C5aR 阻断剂后,FGL2 的产生随之减弱(图 7)。



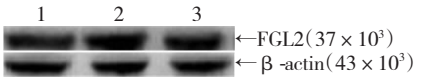
A:患者Ⅰ癌组织;B:患者Ⅱ癌组织;C:患者Ⅰ癌旁组织;D:患者Ⅱ癌旁组织

图5 免疫组化 FGL2 在结肠癌及癌旁组织中的表达(SABC×200)



1:患者Ⅰ癌旁组织;2:患者Ⅰ癌组织;3:患者Ⅱ癌旁组织;4:患者Ⅱ癌组织

图6 Western blot 检测结肠癌及癌旁组织中 FGL2 的表达

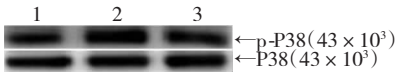


1:Med 组(对照组);2:C5a 刺激组;3:C5aR 阻断剂组

图7 Western blot 检测 C5a 刺激巨噬细胞株 Raw264.7 产生 FGL2 的能力

2.5 C5a/C5aR 通路通过 MAPK 信号途径调节 FGL2 表达

为了进一步明确 FGL2 的调节机制,我们检测在巨噬细胞株 Raw264.7 中 MAPK 信号通路的活化水平,结果显示 C5a 能明显促进巨噬细胞 P38 的磷酸化水平,而加入 C5aR 阻断剂之后,磷酸化水平随之减弱,进一步验证 FGL2 的调节过程受到 C5a/C5aR 通路予以完成并且通过 MAPK 信号中的 P38 途径使然(图8)。



1:Med 组(对照组);2:C5a 刺激组;3:C5aR 阻断剂组

图8 Western blot 检测 C5a 刺激巨噬细胞株 Raw264.7 P38 的磷酸化水平

3 讨论

结肠癌不良的预后很大程度上是因为肿瘤的转移,然而肿瘤转移的发生机制并不清楚,有文献报道补体 C5 分子在肺癌、卵巢癌的转移里起着促癌细胞迁移作用[16-17]。研究表明,补体的活化能促进慢性炎症发生,介导血管生成,激活肿瘤相关信号通路。同时,从文献中也不难得知补体 C5 分子活化片段如 C5b,C3a 等确与肿瘤的转移具有明显相关性且与肿瘤的临床分期具有潜在关联[18-21]。

FGL2 作为一种糖化蛋白,隶属纤维蛋白原家族,其在细胞的黏附、凝固,迁移功能的维持方面发挥着重要作用,目前认为 FGL2 能促进血管内微血栓形成,诱发缺血再灌注损伤,促使机体处于高凝状态,影响细胞功能,最终参与疾病进程,但就 FGL2 在肿瘤发生进展和转移方面的研究甚少,仅发现 FGL2 能促进癌细胞生长及肿瘤微血管生成并且对其在恶性肿瘤如乳腺癌、肺癌、胃癌、食管癌、宫颈癌中的表达进行检测时发现异常上调。FGL2 有可能作为一种新的生物标志物,提示肿瘤的不良预后[14-15]。

本文的研究中,我们首次发现补体 C5a/C5aR 通路可以调节 MAPK 信号中的 P38 信号途径促进 FGL2 的表达,影响结肠癌发病进程。对临床结肠癌患者进行观察时,我们大都发现患者体内的凝血系统表现异常,这与我们的研究结果相互印证,但患者体内高凝状态的产生是否依赖于补体 C5a/C5aR 通路予以调节不得而知,在我们的文章中只给出了直接调节的依据,但具体机制有待探明。接下来的研究,我们拟采取多种结肠癌细胞系以及更多的结肠癌患者作为研究对象,着重探讨补体系统参与肿瘤的具体机制。从图1和图2中我们可以看出,补体 C5 分子的活化产物 C5b-9 及上游活化片段 C3b 的表达在结肠癌组织中明显升高,所以作为补体活化级联途径中的重要参与者,C3a 是否能通过与其受体 C3aR 结合参与致瘤作用或 C5b 招募形成的膜攻击复合物 MAC 能否影响疾病进程也是我们下一步研究方向,尽管通过我们的体外实验(图7,图8)获得了补体 C5a/C5aR 通路调节 FGL2 的直接证据,并初步阐明此调节作用依赖 MAPK 信号途径中的 P38 来完成,但有且也只是在巨噬细胞系中予以证实,若要明确其具体机制,还需采用更多的细胞系或临床获得组织原代细胞予以佐证。

参考文献:

[1] Yan J, Kong L Y, Hu J, *et al*. FGL2 as a Multimodality Regulator of Tumor-Mediated Immune Suppression and Therapeutic Target in Gliomas[J]. J Natl Cancer Inst, 2015,107

(8): djv137. DOI:10.1093/jnci/djv137

[2] Kolev M, Dimeloe S, Le-Friec G, *et al*. Complement Regulates Nutrient Influx and Metabolic Reprogramming during Th1 Cell Responses[J]. Immunity, 2015, 42(6): 1033 - 1047. DOI:10.1016/j.immuni.2015.05.024

[3] Lee M S, Jones T, Song D Y, *et al*. Exploitation of the complement system by oncogenic Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus for cell survival and persistent infection[J]. PLoS Pathog, 2014, 10(9): e1004412. DOI:10.1371/journal.ppat.1004412

[4] Ellegard R, Crisci E, Andersson J, *et al*. Impaired NK Cell Activation and Chemotaxis toward Dendritic Cells Exposed to Complement-Opsonized HIV-1[J]. J Immunol, 2015, 195(4): 1698 - 1704.

[5] Xu R, Lin F, Bao C, *et al*. Complement 5a receptor-mediated neutrophil dysfunction is associated with a poor outcome in sepsis[J]. Cell Mol Immunol, 2016, 13(1): 103 - 109.

[6] Lupu F, Keshari R S, Lambris J D, *et al*. Crosstalk between the coagulation and complement systems in sepsis[J]. Thromb Res, 2014,133 Suppl 1: S28 - S31. DOI:10.1016/j.thromres.2014.03.014

[7] Yuan Y, Ren J, Gu G, *et al*. The effect of human complement C3 protein applied at different times in treatment of polymicrobial sepsis[J]. Inflamm Res, 2012, 61(6): 581 - 589. DOI:10.1007/s00011 - 012 - 0448 - 4

[8] Jia Q, Li C, Xia Y, *et al*. Association between complement C3 and prevalence of fatty liver disease in an adult population: a cross-sectional study from the Tianjin Chronic Low-Grade Systemic Inflammation and Health (TCLSIHealth) cohort study[J]. PLoS One,2015, 10(4): e0122026.

[9] Husain M, Wu D, Saber A T, *et al*. Intratracheally instilled titanium dioxide nanoparticles translocate to heart and liver and activate complement cascade in the heart of C57BL/6 mice[J]. Nanotoxicology, 2015, 9(8): 1013 - 1022. DOI: 10.3109/17435390.2014.996192

[10] Mook-Kanamori B B, Brouwer M C, Geldhoff M, *et al*. Cerebrospinal fluid complement activation in patients with pneumococcal and meningococcal meningitis[J]. J Infect, 2014, 68(6): 542 - 547.

[11] Hui L, Chen Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil[J]. Cancer Lett,2015, 368(1): 7 - 13. DOI:10.1016/j.canlet.2015.07.039

[12] Shukla H D, Mahmood J, Vujaskovic Z. Integrated proteogenomic approach for early diagnosis and prognosis of cancer[J]. Cancer Lett, 2015, 369(1): 28 - 36.

[13] Downs-Canner S, Magge D, Ravindranathan R, *et al*. Complement Inhibition: A Novel Form of Immunotherapy for Colon Cancer[J]. Ann Surg Oncol, 2015, [Epub ahead of print].

[14] Birkhauser F D, Koya R C, Neufeld C, *et al*. Dendritic cell-based immunotherapy in prevention and treatment of renal cell carcinoma: efficacy, safety, and activity of Ad-GM·CAIX in immunocompetent mouse models[J]. J Immunother,2013, 36(2): 102 - 111. DOI:10.1097/CJI.0b013e31827bec97

[15] Rabizadeh E, Cherny I, Wolach O, *et al*. Increased activity of cell membrane-associated prothrombinase, fibrinogen-like protein 2, in peripheral blood mononuclear cells of B-cell lymphoma patients[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e109648.

[16] Vatandoust S, Price T J, Ullah S, *et al*. Metastatic Colorectal Cancer in Young Adults: A Study From the South Australian Population-Based Registry[J]. Clin Colorectal Cancer, 2015, [Epub ahead of print].

[17] Murakami T, Hiroshima Y, Zhang Y. *et al*. Improved disease-free survival and overall survival after fluorescence-guided surgery of liver metastasis in an orthotopic nude mouse model[J]. J Surg Oncol, 2015, 112(2): 119 - 124.

[18] Hasty P, Montagna C. Chromosomal Rearrangements in Cancer: Detection and potential causal mechanisms[J]. Mol Cell Oncol 2014, 1(1): e29904.

[19] Maar M, Wakewich P, Wood B, *et al*. Strategies for Increasing Cervical Cancer Screening Amongst First Nations Communities in Northwest Ontario, Canada[J]. Health Care Women Int, 2014, 6: 1 - 18. DOI:10.1080/07399332.2014.959168

[20] Sharifnia T, Rusu V, Piccioni F, *et al*. Genetic modifiers of EGFR dependence in non-small cell lung cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(52): 18661 - 18666.

[21] Bonavita E, Gentile S, Rubino M, *et al*. PTX3 is an extrinsic oncosuppressor regulating complement-dependent inflammation in cancer[J]. Cell, 2015, 160(4): 700 - 714. DOI:10.1016/j.cell.2015.01.004

(收稿:2015-10-27;修回:2015-11-28)

(编辑 吴培红)