DOI:10.16016/j.1000-5404.202002046

Lewis 肺腺癌对小鼠肠道干细胞及其微环境的影响

徐珍妮[1],欧 静[1],王 钰[2],雷旭丹[3],黄灵潇[3],王 涛[1],王锋超[1],高继宁[1],王军平[1],粟永萍[1],刘登群[1,3]
400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系:防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆市纳米医学工程研究中心[1],火箭军医学教研室[2];610041 成都,四川省肿瘤医院·研究所,四川省癌症防治中心,电子科技大学医学院,放射肿瘤学四川省重点实验室[3]

[**摘要**] **目的** 探讨 Lewis 肺腺癌(Lewis lung cancer,LLC)对小鼠肠道干细胞及其微环境的影响。**方法** 比较不同接种方式(皮下接种和静脉移植)在 C57BL/6J 小鼠肺部形成肺腺癌的能力差异。通过 HE、BrdU 免疫染色和 qPCR 检测 LLC 对肠道形态、增殖动力学、肠道干细胞及其微环境相关基因、肠上皮细胞紧密连接及炎症因子表达的影响。使用 EdU 染色评价 LLC 条件培养基(LLC-CM)对 IEC-6 细胞增殖的影响。使用 LLC 细胞和 LLC-CM 观察肺腺癌对肠类器官生长的影响。**结果** 静脉移植 LLC 细胞较皮下接种荷瘤更易在小鼠肺部形成肺腺癌。肺腺癌导致绒毛和隐窝长度较对照组显著增加($P<0.01$),BrdU 阳性细胞数量和 Ki67 基因 mRNA 水平显著高于对照组($P<0.05$)。LLC-CM 可增加 EdU 阳性 IEC-6 细胞数量($P<0.05$)。肺腺癌小鼠肠组织中肠道干细胞标志物基因(Lgr5、Olfm4、Axin2)表达水平显著下降,微环境相关基因(Wnt3)表达水平降低($P<0.05$)。肺腺癌引起肠上皮 ZO-1 免疫染色以及 ZO-1 和 OCLN mRNA 表达显著降低,IL-1β 和 TNF-α 的 mRNA 含量显著增加($P<0.05$)。LLC 细胞和 LLC-CM 均抑制肠类器官生长。**结论** Lewis 肺腺癌能够破坏肠道干细胞及其微环境,为肺癌与肠道交互作用提供了新的实验依据。

[**关键词**] Lewis 肺腺癌;肠道干细胞;微环境;肿瘤
[**中图法分类号**] R322.45;R730.23; R734.2 [**文献标志码**] A

Eftect of Lewis lung cancer on mouse intestinal stem cells and their microenvironment

XU Zhenni[1], OU Jing[1], WANG Yu[2], LEI Xudan[3], HUANG Lingxiao[3], WANG Tao[1], WANG Fengchao[1], GAO Jining[1], WANG Junping[1], SU Yongping[1], LIU Dengqun[1,3] [1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department of Anti-radiation Medicine, Chongqing Engineering Research Center for Nanomedicine, Institute of Combined Injury, [2]Department of Rocket Force Medicine, College of Preventive Military Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [3]Sichuan Provincial Key Laboratory of Radiation Oncology, Sichuan Cancer Hospital & Institute, Sichuan Provincial Cancer Center, School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu, Sichuan Province, 610041, China

[**Abstract**] Objective To investigate the changes in intestinal stem cells (ISCs) and their microenvironment in a mouse model bearing Lewis lung cancer (LLC). Methods We compared the tumorigenicity of LLC cells in mice following subcutaneous transplantation and tail vein injection of the cells. HE staining, immunostaining and qPCR were used to analyze how LLC affected the intestinal morphology, cell proliferation dynamics, ISCs and their niche-related genes, intestinal epithelial cell tight junctions, and the expression of inflammatory cytokines. We also evaluated the effect of LLC conditioned medium (LLC-CM) on

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81673089,81874255);四川省科技厅应用基础研究计划(2020YJ0458);四川省肿瘤医院课题(YBR2019003)
[**通信作者**] 刘登群,E-mail:dengqunliu@163.com

the proliferation of cultured IEC-6 cells using EdU staining, and observed the growth of intestinal enteroids co-cultured with LLC cells or in the presence of LLC-CM. **Results** Tail vein injection more efficiently induced the formation of LLC in mice than subcutaneous transplantation of LLC cells. The mice bearing LLC exhibited significantly increased length of the mucosal villi and depth of the crypts ($P<0.01$), and had more BrdU-positive cells and a higher level of Ki67 mRNA expression in the intestines as compared with the control mice ($P<0.05$). LLC-CM obviously promoted the incorporation of EdU in IEC-6 cells. The tumor-bearing mice showed significantly decreased expression of ISC markers and microenvironment-related genes (including Lgr5, Olfm4, Axin2, and Wnt3) in the intestines ($P<0.05$), where the staining signals of ZO-1 and the mRNA expression of TJP1 and OCLN was significantly decreased and the mRNA levels of IL-1β and TNF-α were markedly increased ($P<0.05$). Both LLC and LLC-CM significantly inhibited the growth of cultured mouse intestinal organoids **Conclusions** LLC disrupts the ISCs and their niche in mice, which provides new evidence of the interaction between lung cancer and the gastrointestinal tract.

[**Key words**] Lewis lung cancer; intestinal stem cells; microenvironment; tumor

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81673089, 81874255), the Applied Basic Research Program of Science & Technology Department of Sichuan Province (2020YJ0458), and the Sichuan Provincial Cancer Hospital Research Program (YBR2019003). Corresponding author: LIU Dengqun, E-mail: dengqunliu@163.com

肠道干细胞是哺乳动物肠上皮维持快速更新的细胞学基础,肠道干细胞稳态维持受到潘氏细胞、巨噬细胞等微环境细胞提供的多种分子信号调控[1]。电离辐射、炎症等因素很容易对肠道干细胞及其微环境细胞造成损伤,从而导致机体出现腹泻、感染等临床症状[2]。肿瘤能够对机体产生多方面的影响,包括对原发脏器、转移脏器的影响,此外肿瘤还可通过外泌体等多种生物活性物质作用于其他脏器[3-4]。肺癌是我国最常见的肿瘤类型,以往对肺癌的研究主要集中在肺癌发生和转移相关领域。随着系统生物学的发展,肺肠轴交互作用正成为近期肺癌研究的新热点[5]。如研究表明肠道菌群等肠道因素能够影响肺癌的临床治疗效果[6-7],但目前肺癌是否影响肠道干细胞及其微环境尚不清楚。因此,本研究建立稳定了 Lewis 肺腺癌(Lewis lung cancer,LLC)小鼠动物模型,并使用该模型和肠类器官培养技术观测 Lewis 肺腺癌对小鼠肠道组织形态、细胞增殖动力学、肠道干细胞及其微环境相关基因、细胞紧密连接和炎症因子表达的影响,探讨肺腺癌是否导致肠道干细胞及其微环境破坏,为深入认识肺癌进展过程中肺肠轴交互作用提供新的实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

C57BL/6J 雄性小鼠购自北京华阜康生物科技有限公司,8~12 周龄,体质量 18~22 g,于本实验室 SPF 动物房中饲养。动物实验符合陆军军医大学实验动物伦理委员会相关要求。按接种方式分为皮下接种组和静脉接种组,以未接种的小鼠作为正常对照组。

1.2 细胞系

小鼠 Lewis 肺腺癌细胞株(LLC 细胞)购自中科院上海细胞库(目录号:TCM 7),由本实验室保存。用高糖 DMEM 培养基(HyClone 公司)并添加 10% 胎牛血清(BI 公司)进行培养,同时加入 1% 青霉素-链霉素双抗(碧云天公司)防止细菌污染。大鼠空肠隐窝上皮细胞株 IEC-6 由本实验保存。每 2 天换液,保持细胞处于旺盛生长状态。

1.3 细胞培养及接种动物

LLC 细胞接种于 10 cm 平皿,生长至 80% 融合后收集细胞,调整细胞悬液体积使细胞数为 1×10^7/mL。1% 戊巴比妥钠麻醉小鼠,消毒后皮下接种组在小鼠右腋皮下注射 0.1 mL 细胞悬液,轻压进针处防止液体流出。静脉接种组向 0.1 mL 细胞悬液中加入 0.2 mL 无血清培养基并混匀,经小鼠尾静脉缓慢注入 LLC 细胞,按压进针处防止液体漏出。接种后 21 d 取材。

1.4 LLC 细胞条件培养基制备与注射

按 1×10^6/孔接种 LLC 细胞,待 LLC 细胞生长至 80% 融合时,更换为含 1% FBS 的 DMEM 培养基(LLC 组)。空白孔内加入同样培养基作为对照组(Control)。培养 3 d 后收集培养基。0.22 μm 孔径针式滤器进行过滤后用 1.5 mL 离心管分装并于-20 ℃冰箱保存。小鼠每天经尾静脉注射 0.3 mL LLC 条件培养基(LLC-CM 组)或对照培养基(对照组),连续注射 5 d 后取材。

1.5 肠类器官培养

颈椎脱臼处死小鼠,酒精消毒腹部皮肤后分离中段小肠,使用预冷 PBS 冲洗肠腔内容物,纵向剖开肠管,将小肠剪成 2~3 mm 小块组织,加入 5 mmol/L

EDTA/PBS 溶液后冰浴 30 min。移去 EDTA 溶液,预冷 PBS 洗涤组织 2 次,用吸管吹打组织释放肠隐窝。70 μm 孔径细胞筛过滤悬液,按照每 10 μL Matrigel 中 100 个隐窝进行重悬并接种。LLC 共培养使用 6 孔板,板内或 Transwell 小室内接种 1×10^6 LLC 细胞。LLC-CM 实验使用 96 孔板接种。分别加入正常(对照组)和含有 25%、50% LLC-CM(LLC-CM 组)的小鼠肠类器官培养基进行实验。

1.6 组织取材与染色

取材前 90 min 腹腔注射 BrdU。小肠组织经中性甲醛固定过夜,常规脱水石蜡包埋并切片。石蜡切片脱蜡至水后进行 HE 染色或免疫染色。pH=6.0 枸橼酸盐缓冲液煮沸 15 min 进行抗原修复,含 1% Triton X-100 的封闭液室温封闭 30 min,滴加大鼠抗 BrdU 抗体(1∶200,Abcam 公司)、兔抗 ZO-1 抗体(1∶500,ProteinTech 公司)、山羊抗 Lysozyme 抗体(1∶500,Santa Cruz 公司),4 ℃孵育过夜。PBS 洗去未结合一抗后加入 AlexFluo 488 或 594 荧光二抗(1∶1000),室温避光孵育 30 min。洗去未结合二抗并复染 DAPI 封片。

1.7 EdU 染色

将盖玻片置于 12 孔板底部,接种 IEC-6 细胞到孔板内进行培养,待细胞生长至 80%后用于实验。实验组在培养基中加入终浓度为 25%的 LLC-CM,对照组加入同等体积对照培养基,作用 24 h 后进行染色。EdU 染色试剂盒购自广州锐博生物科技有限公司(C10310-1),具体染色流程按试剂盒操作说明进行。

1.8 定量 PCR 检测

肠组织经液氮速冻后保存于-80 ℃冰箱。使用 RNAiso 裂解组织并提取 RNA,经 Nano2000 测定 RNA 浓度与纯度。用 TaKaRa 公司 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 进行反转录获取 cDNA。引物由华大基因公司进行合成,序列见表 1。使用 SYBR® Premix *Ex Taq*™ Ⅱ配制反应液,Bio-Rad 荧光定量 PCR 仪进行扩增和检测。PCR 反应程序为:95 ℃预变性 5 min,95 ℃ 10 s,60 ℃ 10 s,72 ℃ 10 s,40 次循环。获取样本对应基因的 Ct 值,按照 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法进行数据处理,使用 β-actin 作为内参基因。

1.9 图像采集及数据统计学分析

使用 Olympus BX51 显微镜采集细胞和明场图像,使用 Leica LSM SP5 共聚焦显微镜采集荧光染色图像。使用 Image J 软件测定小肠组织形态学指标。使用 GraphPad Prism 7.0 进行数据统计分析,两组间数据比较采用 *t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 静脉移植 LLC 细胞较皮下移植更容易形成肺腺癌

LLC 细胞对 C57BL/6J 小鼠进行右腋皮下荷瘤和尾静脉移植荷瘤 21 d 后取材。静脉接种组荷瘤小鼠在 21 d 时大体状况良好,体质量较正常对照组小鼠无明显差异,未见肿瘤所致恶病质样改变。取材时皮下接种组小鼠肿瘤直径可达 1.5~2 cm,但肺部大体观察未见明显肿瘤,而静脉接种组小鼠肺部均可形成肿瘤组织,成瘤率达 100%。HE 染色可见静脉接种组荷瘤小鼠肺部有明显肿瘤生长(图 1)。证实静脉接种 LLC 细胞较皮下接种更容易形成肺腺癌,本课题后续实验均采用静脉接种荷瘤方式。

2.2 肺腺癌促进肠隐窝细胞增殖但抑制肠道干细胞相关基因表达

LLC 组和对照组小肠 HE 染色见图 2A,两组肠隐窝密度差异无统计学意义($P>0.05$,图 2B)。LLC 组肠隐窝深度为(118.2±1.5)μm,显著高于对照组[(80.9±1.5)μm,$P<0.01$,图 2C]。LLC 组肠绒毛长度为(262.5±6.9)μm,显著长于对照组[(222.1±3.6)μm,

表 1 不同基因 qPCR 检测所用引物序列与片段长度

基因名称	正义链(5′→3′)	反义引物(5′→3′)	产物/bp
Lgr5	CTCCCAGGTCTGGTGTGTTG	GAGGTCTAGGTAGGAGGTGAAG	149
Olfm4	ACTGTCCGAATTGACATCATGG	TTCTGAGCTTCCACCAAAACTC	135
Axin2	AGTGCAAACTCTCACCCACC	TCGCTGGATAACTCGCTGTC	196
Mki67	ACGCCTGGTTACTATCAAAAGG	CAGACCCATTTACTTGTGTTGGA	208
Tjp1	GCCTTGGCCTAGCATACACA	GGTAAGGCATTCCTGCTGGT	288
Ocln	TCCGGCCGCCAAGGTTC	CATAGCCTCTGTCCCAAGCAA	360
Il1b	ACCTCACAAGCAGAGCACAA	TTGGCCGAGGACTAAGGAGT	200
Tnf-α	ATGGCCTCCCTCTCATCAGT	TTTGCTACGACGTGGGCTAC	97
Wnt3	TGGAACTGTACCACCATAGATGAC	ACACCAGCCGAGGCGATG	103
Bhlha15	GCTGACCGCCACCATACTTAC	TGTGTAGAGTAGCGTTGCAGG	178
Lyz1	ATGGAATGGCTGGCTACTATGG	ACCAGTATCGGCTATTGATCTGA	310
β-actin	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	154

$P<0.01$,图 2D]。BrdU 染色结果显示 LLC 组小鼠(图 3A)肠隐窝中 BrdU 阳性细胞多于对照组(图 3B),两组差异有统计学意义($P<0.01$,图 3C)。LLC 组小肠增殖细胞标志物 Ki67 基因的 mRNA 水平显著高于对照组($P<0.05$,图 3D)。qPCR 结果证实肺腺癌组肠道干细胞标志物基因 Lgr5、Olfm4 和 Axin2 较对照组明显降低,同时维持肠道干细胞所需的 Wnt3 基因 mRNA 含量也显著降低($P<0.05$,图 4)。结果证实肺腺癌导致小鼠肠隐窝细胞增殖水平增加,但肠道干细胞活性显著降低。

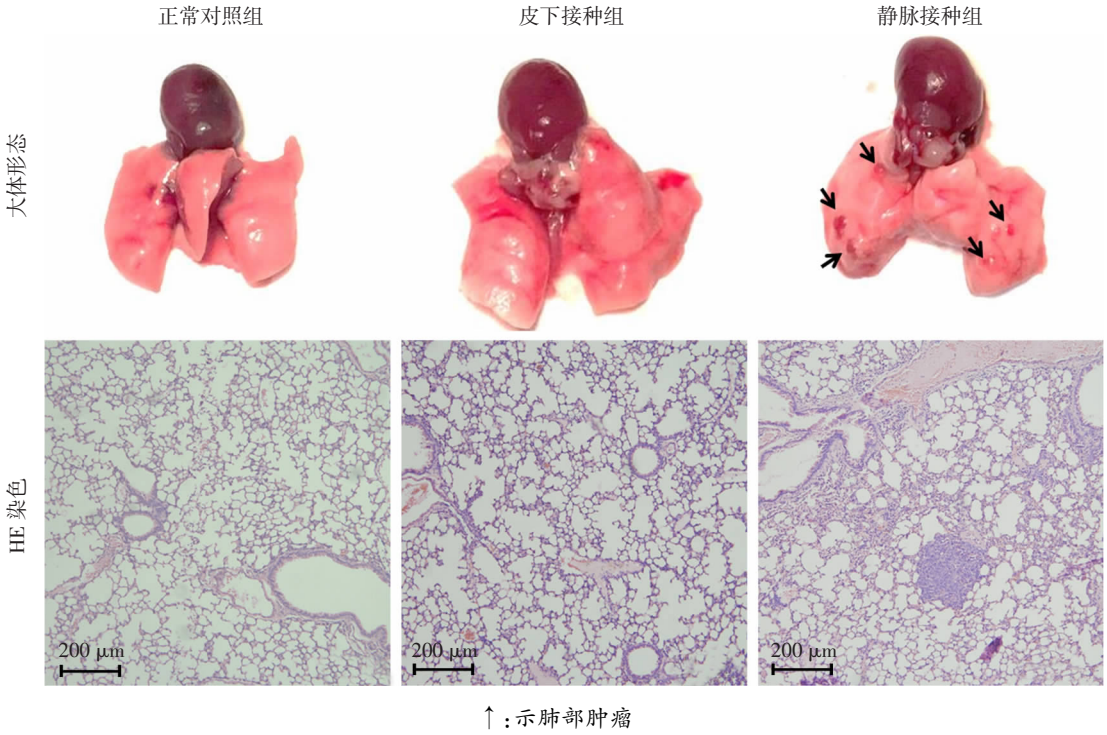
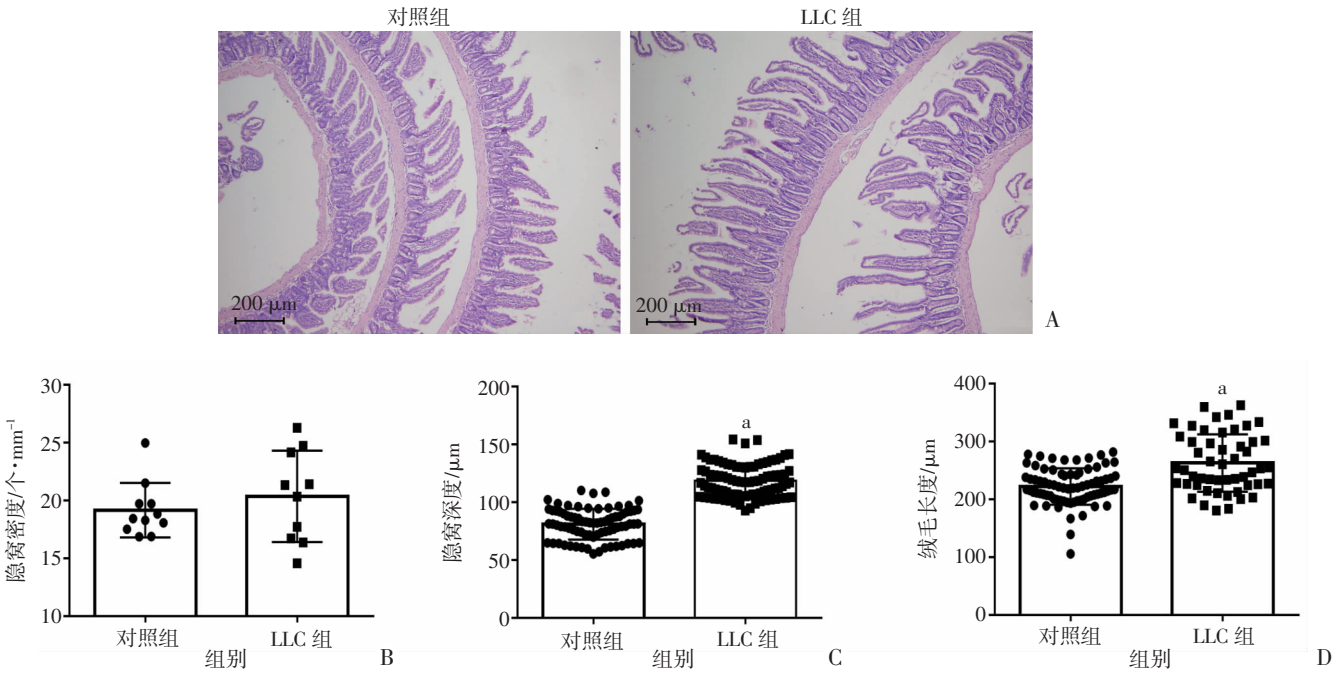
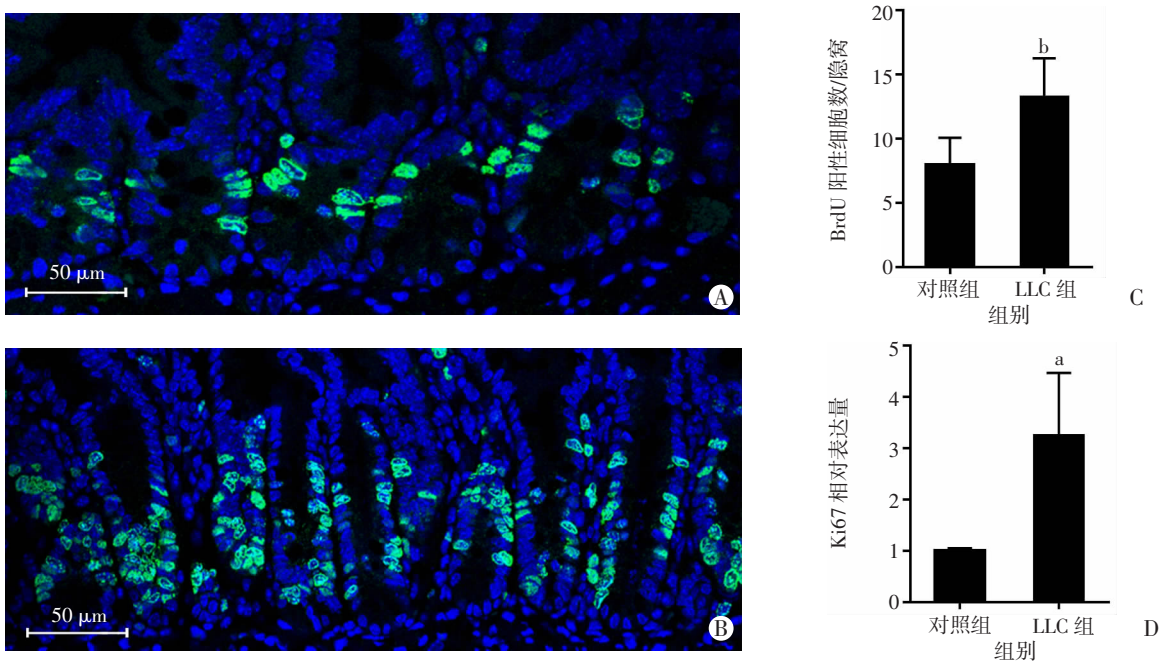


图 1　皮下和静脉接种 LLC 细胞 21 d 后小鼠肺大体形态和 HE 染色观察



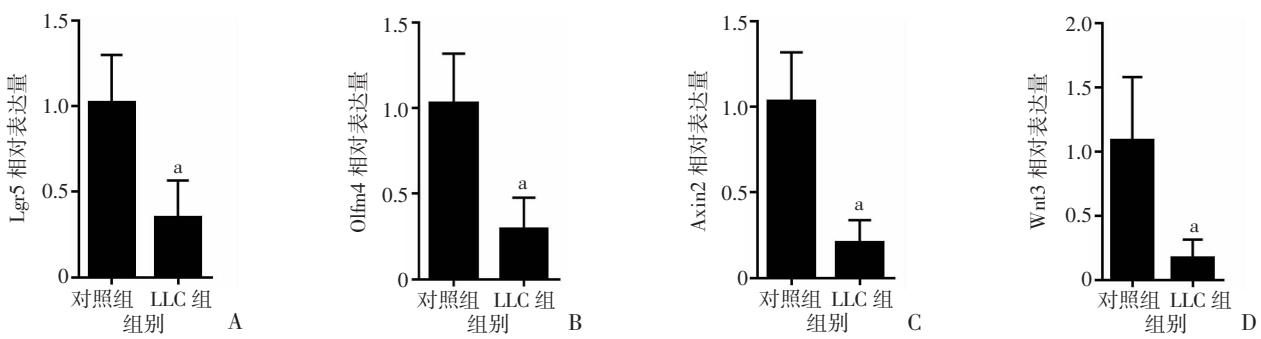
A:HE 染色观察小肠组织形态;B:肠隐窝密度分析;C:肠隐窝深度分析;D:肠绒毛长度分析　a:$P<0.01$,与对照组比较

图 2　两组小肠组织形态和肠隐窝密度、深度及绒毛长度变化　($n=3$)



A:对照组 BrdU 染色;B:LLC 组 BrdU 染色;C:BrdU 阳性细胞数统计分析　b:$P<0.01$,与对照组比较;D:Ki67 基因的 mRNA 含量　a:$P<0.05$,与对照组比较

图 3　两组肠上皮细胞增殖能力比较



A:Lgr5;B:Olfm4;C:Axin2;D:Wnt3　　a:$P<0.05$,与对照组比较

图 4　qPCR 检测两组小鼠肠道干细胞及微环境相关基因表达

2.3　肺腺癌破坏肠上皮细胞紧密连接

ZO-1(TJP1)免疫荧光染色证实肺腺癌小鼠肠绒毛 ZO-1 染色强度较正常小鼠明显减弱,同时肠隐窝底部潘氏细胞溶菌酶(Lysozyme)的阳性信号也减弱(图 5A、B)。qPCR 检测结果证实肺腺癌小鼠肠组织中的 TJP1 和 OCLN 基因的 mRNA 含量较对照组显著降低(图 5C、D,$n=3$)。本结果证实肺腺癌可引起小鼠肠上皮细胞间的紧密连接蛋白和其 mRNA 水平降低,提示肺腺癌可导致肠黏膜通透性降低。

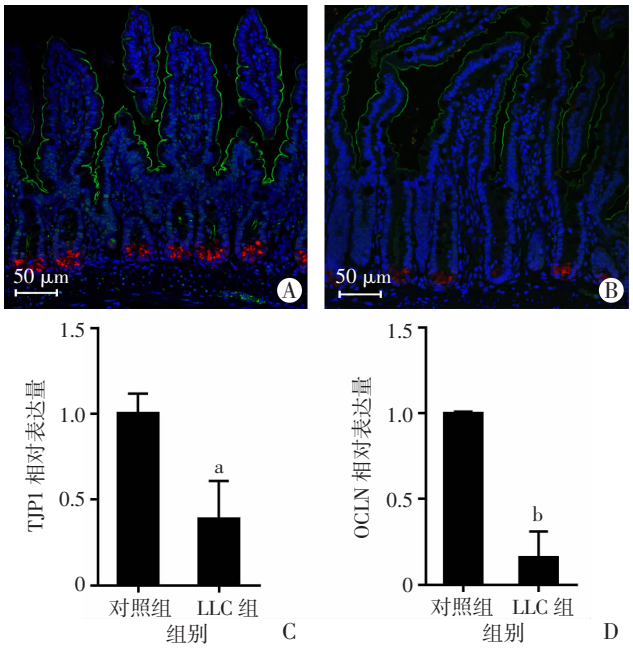
2.4　肺腺癌小鼠肠道炎症因子表达水平增加

qPCR 检测肺腺癌小鼠肠组织中促炎因子的表达情况,结果显示肺腺癌小鼠肠道内促炎因子 IL-1β 和 TNF-α 的 mRNA 含量显著增加($P<0.01$,图 6)。表明肺腺癌能够增加肠道炎症反应,这可能是肺腺癌损伤肠道干细胞微环境的机制之一。

2.5　LLC 细胞抑制肠类器官生长

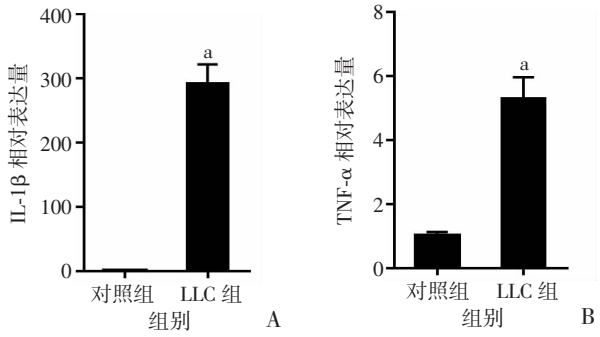
肠类器官是研究肠道干细胞的理想体外模型,因此本课题使用 LLC 细胞与肠类器官共培养评价肺腺癌对肠道干细胞的影响。实验结果显示正常小鼠肠隐窝能够在培养后 6 d 形成肠类器官(图 7A),但在培养体系中加入 LLC 细胞会显著减少肠类器官形成(图 7B)。将 LLC 细胞接种到 Transwell 小室与肠隐窝进行共培养,同样发现肠类器官显著减少(图 7C)。统计结果显示 LLC 细胞直接共培养 24 h 可显著降低肠类

器官形成效率($P<0.01$,图 7D)。因此,LLC 细胞对肠类器官生长具有抑制作用。



A:对照组 ZO-1 免疫荧光染色;B:LLC 组 ZO-1 免疫荧光染色;C:TJP1 基因 mRNA 含量　a:$P<0.05$,与对照组比较;D:OCLN 基因 mRNA 水平　b:$P<0.01$,与对照组比较

图 5　两组小鼠肠黏膜通透性及肠组织中 TJP1 和 OCLN mRNA 水平　($n=3$)

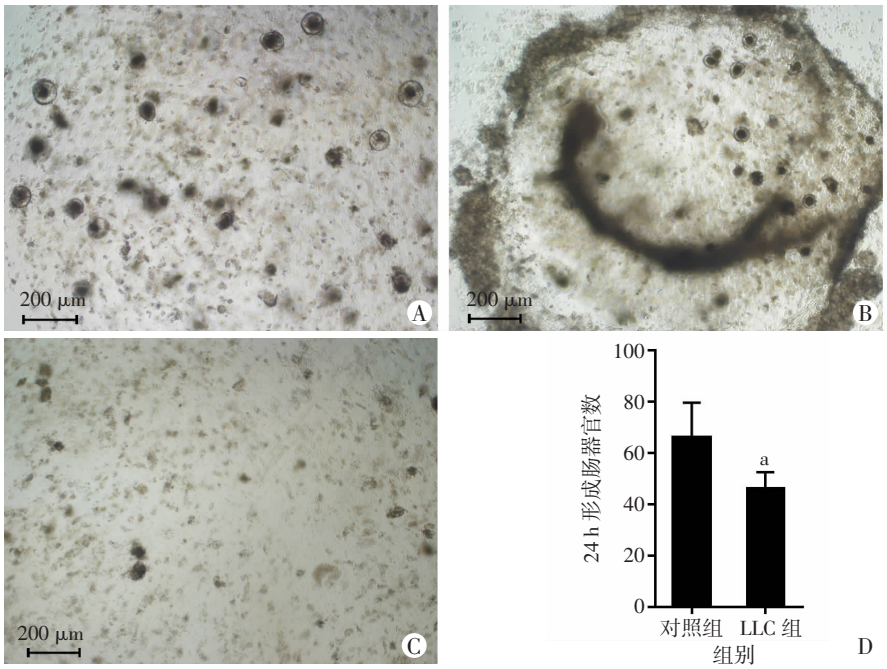


A:IL-1β;B:TNF-α　a:$P<0.01$,与对照组比较

图 6　肺腺癌小鼠肠组织中炎症因子 mRNA 水平增加　($n=3$)

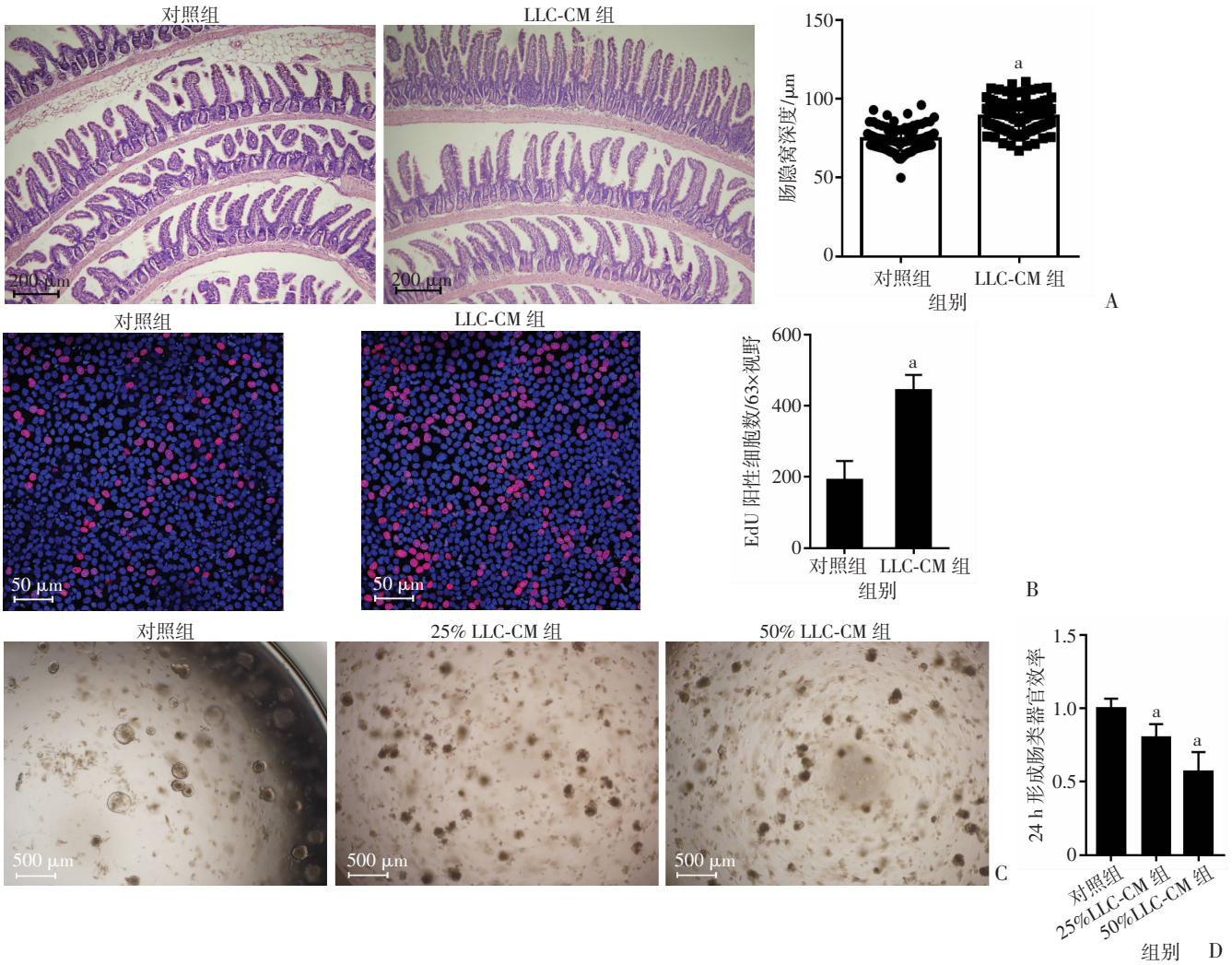
2.6　LLC-CM 促进肠上皮细胞增殖并抑制肠类器官生长

对正常小鼠连续 5 d 经尾静脉分别注射 LLC-CM 和对照培养基,结果显示 LLC-CM 组肠隐窝平均深度为(88.7±0.9)μm,显著高于对照组[(74.6±0.7)μm,$P<0.01$,图 8A]。向肠上皮细胞株 IEC-6 中加入 25% LLC-CM 培养 24 h 可显著增加 EdU 阳性细胞数量($P<0.01$,图 8B)。使用 LLC-CM 培养肠类器官细胞时,培养体系中加入 25%和 50% LLC-CM 培养 3 d 后肠类器官体积明显减小(图 8C),接种后 24 h 形成肠类器官效率明显降低($P<0.01$,图 8D)。因此,LLC-CM 与 Lewis 肺腺癌具有相同的体内体外效应。



A:肠隐窝单独培养 6 d;B:肠隐窝与 LLC 细胞共培养 6 d;C:肠隐窝与 Transwell 小室内 LLC 细胞共培养 6 d;D:LLC 直接与肠隐窝共培养 24 h 抑制肠类器官形成　a:$P<0.01$,与对照组比较

图 7　LLC 肺腺癌细胞抑制肠类器官体形成



A: LLC-CM 增加小鼠肠隐窝深度;B: LLC-CM 作用 24 h 增加 EdU 阳性 IEC-6 细胞数量;C:LLC-CM 中培养 3 d 肠类器官体积减小;D: LLC-CM 作用 24 h 可降低肠类器官形成效率　a: $P<0.01$,与对照组比较

图 8　LLC-CM 对小鼠肠道、IEC-6 细胞和肠类器官生长的影响

3　讨论

肺癌是临床最常见的肿瘤,其中肺腺癌等非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占全部肺癌病例的 80%。以往观点主要认为肺癌发生后会引起肺通气功能下降,进而引发机体多脏器处于缺氧状态[8]。最近研究提示肺癌与机体肠道之间存在复杂的相互作用,本研究主要探讨 Lewis 肺腺癌对肠道干细胞及其微环境的影响。

Lewis 肺腺癌细胞株 LLC 细胞来源于 C57BL/6J 小鼠,是目前建立小鼠肺腺癌动物模型所使用的主要细胞类型[9]。多使用该细胞株进行右腋皮下接种来研究 LLC 细胞对机体的相应影响,本研究发现皮下接种 LLC 细胞后原位肿瘤生长速度很快,但小鼠肺部并不能形成明显肿瘤,不能很好地模拟肺腺癌对肠道的影响;而静脉接种的成瘤率达到 100%,解剖后可见肺脏表面有明显肿瘤生长,部分呈亮泡状,HE 染色可见典型的肿瘤组织。因此,本研究使用静脉接种 LLC 细胞建立肺腺癌动物模型。

肠上皮细胞始终处于快速更新状态,位于肠隐窝底部的 Lgr5 阳性活跃肠干细胞是正常肠上皮更新的主要动力来源。本研究发现,肺腺癌小鼠体内肠干细胞相关基因 Lgr5、Olfm4、Axin2 的 mRNA 水平明显下降。Wnt3 是维持肠道干细胞的重要生长因子,其 mRNA 含量也显著降低,因此肺腺癌可抑制肠道干细胞及其微环境相关基因表达。肠类器官作为一种评估肠道干细胞功能的新方法目前已经广泛使用[10-11],本实验结果证实 LLC 细胞与肠类器官共培养时,肠类器官生长受到明显抑制。因此,体内和体外结果均支持肺腺癌能够抑制肠道干细胞活性这一结论。在肺腺癌

抑制肠道干细胞活性的同时,Lewis 肺腺癌小鼠和注射 LLC-CM 小鼠的肠隐窝中 BrdU 阳性细胞数量均明显增加。我们推测这可能是由于肿瘤导致肠道干细胞活性降低时,位于隐窝中上部的前体细胞通过增加自身增殖代偿性补充肠上皮细胞更新所致。

小肠上皮结构和功能的完整性是机体隔离肠腔内病原体的重要屏障,紧密连接是肠上皮细胞间的主要连接类型。组成紧密连接的两种主要成分是 ZO-1 和 Occludin 蛋白,本实验结果和文献[8]报道证实 Lewis 肺腺癌可导致 ZO-1 染色强度降低,qPCR 结果证实 TJP1 和 OCLN 基因的 mRNA 表达水平下降。此外,我们还发现 Lewis 肺腺癌组肠道中促炎因子 IL-1β 和 TNF-α 较正常小鼠显著增加。肠上皮细胞间紧密连接的减少和炎症反应增加会引起肠黏膜通透性增加,肠道菌群及其代谢产物入血引发机体感染的概率随之上升[12-13]。目前肿瘤外分泌领域特别是肿瘤外泌体的研究报道越来越多[14],本研究使用 LLC-CM 处理小鼠、IEC-6 肠上皮细胞株和肠类器官都取得和肺腺癌小鼠相似的实验结果。因此,我们推测肺腺癌细胞的外泌体可能是其引起肠道干细胞微环境效应的主要成分,本课题组将在后续研究中纯化 LLC 细胞外泌体并开展相关研究。

综上,本研究发现,Lewis 肺腺癌可抑制肠道干细胞活性并引起肠黏膜屏障改变,为深入认识临床肺癌患者胃肠道症状提供了新的实验依据,并为通过改善胃肠道功能来辅助肿瘤患者临床治疗提供了新线索。

参考文献:

[1] GEHART H, CLEVERS H. Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(1): 19-34. DOI: 10.1038/s41575-018-0081-y.

[2] STACEY R, GREEN J T. Radiation-induced small bowel disease: latest developments and clinical guidance[J]. Ther Adv Chronic Dis, 2014, 5(1): 15-29. DOI: 10.1177/2040622313510730.

[3] SAITO M, SUZUKI H, KONO K, *et al*. Treatment of lung adenocarcinoma by molecular-targeted therapy and immunotherapy[J]. Surg Today, 2018, 48(1): 1-8. DOI: 10.1007/s00595-017-1497-7.

[4] SCHAAIJ-VISSER T B, DE WIT M, LAM S W, *et al*. The cancer secretome, current status and opportunities in the lung, breast and colorectal cancer context[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1834(11): 2242-2258. DOI: 10.1016/j.bbapap.2013.01.029.

[5] KNAPP S. Gut to lung[J]. Gut, 2016, 65(4): 544-545. DOI: 10.1136/gutjnl-2015-310599.

[6] GUI Q F, LU H F, ZHANG C X, *et al*. Well-balanced commensal microbiota contributes to anti-cancer response in a lung cancer mouse model[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(2): 5642-5651. DOI: 10.4238/2015.May.25.16.

[7] JIN Y P, DONG H, XIA L L, *et al*. The diversity of gut microbiome is associated with favorable responses to anti-programmed death 1 immunotherapy in Chinese patients with NSCLC[J]. J Thorac Oncol, 2019, 14(8): 1378-1389. DOI: 10.1016/j.jtho.2019.04.007.

[8] 郭娜娜, 刘学军, 杜毓峰, 等. 肺癌对肠黏膜屏障的损伤机制[J]. 当代医学, 2018, 24(9): 11-13. DOI: 10.3969/j.issn.1009-4393.2018.09.004.
GUO N N, LIU X J, DU Y F, *et al*. Damage mechanism of intestinal mucosal barrier in mouse lung cancer model[J]. Contemp Med, 2018, 24(9): 11-13. DOI: 10.3969/j.issn.1009-4393.2018.09.004.

[9] 韩潇, 刘登群, 罗丹, 等. 骨髓嵌合促进 Lewis 肺腺癌细胞体内生长及转移的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2018, 40(21): 1932-1935. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201808111.
HAN X, LIU D Q, LUO D, *et al*. Bone marrow transplantation promotes tumor growth and lung metastasis in C57BL/6 subcutaneouos tumor-bearing mice [J]. J Third Mil Med Univ, 2018, 40(21): 1932-1935. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201808111.

[10] SATO T, CLEVERS H. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications[J]. Science, 2013, 340(6137): 1190-1194. DOI: 10.1126/science.1234852.

[11] 欧静, 徐珍妮, 刘登群, 等. 3D 培养体系中不同肠上皮细胞株形成肠类器官潜能的比较及应用[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(1): 31-38. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201907198.
OU J, XU Z N, LIU D Q, *et al*. Potential capacities of different intestinal epithelial cell lines to form enteroids in 3D culture system: comparison and application[J]. J Third Mil Med Univ, 2020, 42(1): 31-38. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201907198.

[12] LYONS J D, MITTAL R, FAY K T, *et al*. Murine lung cancer increases $CD4^+$ T cell apoptosis and decreases gut proliferative capacity in Sepsis[J]. PLoS ONE, 2016, 11(3): e0149069. DOI: 10.1371/journal.pone.0149069.

[13] MITTAL R, CHEN C W, LYONS J D, *et al*. Murine lung cancer induces generalized T-cell exhaustion[J]. J Surg Res, 2015, 195(2): 541-549. DOI: 10.1016/j.jss.2015.02.004.

[14] HESSVIK N P, LLORENTE A. Current knowledge on exosome biogenesis and release[J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(2): 193-208. DOI: 10.1007/s00018-017-2595-9.

(**收稿**:2020-02-10;**修回**:2020-03-16)

(编辑 汪勤俭)