DOI:10.16016/j.2097-0927.202404020

APE1 通过免疫抑制性肿瘤微环境介导结肠炎相关结直肠癌的发生发展

陈天一[1],李超凡[1],包灵波[1],陈 骞[1],胡那娜[2,3],杨宇馨[1],张 蕾[1],王 东[1] 400042 重庆,陆军特色医学中心肿瘤中心[1];400039 重庆,渝粤病理科学研究中心[2];401329 重庆,金凤实验室[3]

[摘要] **目的** 探讨脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶 1(apurinic/apyrimidinic endonuclease 1, APE1)在慢性肠道炎症向结肠炎相关性结直肠癌(colitis-associated colorectal cancer, CAC)转化过程中的调控机制。**方法** 将 C64S 点突变纯合子($APE1^{C64S}$)和野生型($APE1^{WT}$)小鼠分别按随机数字表法分为实验组与对照组,实验组应用氧化偶氮甲烷(azoxymethane, AOM)及葡聚糖硫酸钠盐(dextran sulfate sodium salt,DSS)溶液构建 CAC 体内模型,采用免疫组化及多重免疫荧光分析各组小鼠结肠组织 APE1 表达及免疫细胞浸润情况。通过慢病毒转染构建 APE1 稳定敲低的小鼠结肠癌 MC38 细胞系,并对 $APE1^{WT}$ 与 $APE1^{C64S}$ 小鼠进行皮下荷瘤实验以确定肿瘤细胞来源的 APE1 导致免疫抑制性肿瘤微环境,采用免疫组化及多重免疫荧光分析荷瘤标本 APE1、趋化因子(C-X-C 基序)配体 1[chemokine (C-X-C motif) ligand 1, CXCL1]表达及免疫细胞浸润情况。对来自陆军特色医学中心的 1 名 28 岁女性 CAC 患者的肿瘤标本采用免疫组化及多重免疫荧光分析肿瘤及邻近炎症组织中 APE1、CXCL1 的表达及免疫细胞浸润情况。**结果** 与对照组及 $APE1^{WT}$ 实验组相比,$APE1^{C64S}$ 实验组小鼠的疾病活动指数及肿瘤形成数量明显降低,多形核髓源抑制细胞(polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells, PMN-MDSCs)浸润显著减少,$CD4^+$及 $CD8^+$T 细胞显著增多($P<0.05$)。$APE1^{WT}$ 与 $APE1^{C64S}$ 皮下荷瘤小鼠肿瘤生长及各免疫细胞差异无统计学意义;而使用敲低 APE1 的肿瘤细胞进行荷瘤实验,发现肿瘤生长明显抑制,PMN-MDSCs 浸润减少,同时 $CD4^+$及 $CD8^+$T 细胞显著增多($P<0.05$)。在 CAC 患者肿瘤组织中 APE1 高表达、PMN-MDSCs 浸润增加,$CD8^+$T 细胞在肿瘤组织中较炎症组织浸润显著减少($P<0.05$)。**结论** 肿瘤细胞中 APE1 的氧化还原功能可促进 PMN-MDSCs 肿瘤浸润,同时减少 T 细胞的数量,从而形成免疫抑制性肿瘤微环境介导 CAC 的发生发展。

[关键词] 结肠炎相关性结直肠癌;炎症性肠病;脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶 1;多形核髓源性抑制细胞;结直肠癌;肿瘤微环境

[中图法分类号] R345; R730.23; R735.35 [文献标志码] A

APE1 mediates the occurrence and development of colitis-associated colorectal cancer through immunosuppressive tumor microenvironment

CHEN Tianyi[1], LI Chaofan[1], BAO Lingbo[1], CHEN Qian[1], HU Nana[2,3], YANG Yuxin[1], ZHANG Lei[1], WANG Dong[1]

[1]Cancer Center, Army Medical Center of PLA, Chongqing, 400042; [2]Yu-Yue Pathology Scientific Research Center, Chongqing, 400039; [3]Jinfeng Laboratory, Chongqing, 401329, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the regulatory mechanism of apurnic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) in the transformation of chronic intestinal inflammation to colitis-associated colorectal cancer (CAC). **Methods** C64S mutant ($APE1^{C64S}$) mice and APE1 wild type ($APE1^{WT}$) mice were randomly divided into experimental group and control group. *In vivo* CAC model was established by

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82073170)

[通信作者] 王 东,E-mail:dongwang64@hotmail.com

2097-0927/Copyright © 2024, 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/)

azoxymethane (AOM) and dextran sulfate sodium salt (DSS) solution. Immunohistochemistry (IHC) and multiple IHC (mIHC) assays were used to observe the expression of APE1 and immune cell infiltration in colon tissues of each group. A mouse colon cancer cell line MC38 with stable knockdown of APE1 was constructed by lentivirus transfection, and subcutaneous tumor bearing experiments were performed in $APE1^{WT}$ and $APE1^{C64S}$ mice to confirm that tumor cell-derived APE1 caused immunosuppressive tumor microenvironment. The expression of APE1 and CXCL1 [chemokine (C-X-C motif) ligand 1] and the infiltration of immune cells in tumor-bearing specimens were analyzed by IHC and mIHC assays. The tumor specimens of a 28-year-old female patient with CAC from Army Medical Center of PLA were analyzed for the expression of APE1 and CXCL1 and the infiltration of immune cells in the tumor and adjacent inflammatory tissues by IHC and mIHC assays. **Results** Compared with the control group and $APE1^{WT}$ erperimental group, $APE1^{C64S}$ erperimental group had significantly reduced disease activity index and tumor formation, polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells (PMN-MDSCs) infiltration, and $CD4^+$ and $CD8^+$T cells ($P<0.05$). No significant differences were observed in tumor growth and immune cells between $APE1^{WT}$ and $APE1^{C64S}$ mice bearing subcutaneous tumors. However, in the tumor-bearing experiment using tumor cells with knockdown of APE1, the tumor growth was significantly lower and the number of infiltrated PMN-MDSCs was reduced, while those of $CD4^+$ and $CD8^+$T cells were significantly increased ($P<0.05$). Furthermore, high expression of APE1 and increased infiltration of PMN-MDSCs were found in the tumor tissues of the young CAC patient, and $CD8^+$T cells were significantly reduced in the tumor tissues compared with the inflammatory tissues ($P<0.05$). **Conclusion** APE1-redox in tumor cells can promote the infiltration of PMN-MDSCs and reduce the number of T cells, thereby forming an immunosuppressive tumor microenvironment and mediating the occurrence and development of CAC.

[**Key words**] colitis-associated colorectal cancer; inflammatory bowel diseases; apurinic/apyrimidinic endonuclease 1; polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells; colorectal cancer; tumor microenvironment

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82073170). Corresponding author: WANG Dong, E-mail: dongwang64@hotmail.com

结肠炎相关性结直肠癌(colitis-associated colorectal cancer, CAC)是由慢性炎症性肠病(inflammatory bowel diseases, IBD)发展而来的结直肠恶性肿瘤。慢性炎症是恶性肿瘤发生和发展的主要驱动力。作为诱导结直肠癌(colorectal cancer, CRC)发生的风险因素,IBD长期反复发作的肠道慢性炎症导致不典型增生,并且有可能进一步发展为恶性肿瘤。CRC在IBD患者中发生的风险远高于一般人群[1-2]。与散发的CRC相比,具有IBD病史的CAC患者预后更差、死亡率更高[3]。IBD的长期慢性炎症是进一步发展为CAC的主要原因,但其机制,尤其是涉及中性粒细胞的机制,尚未完全清楚。

多形核髓源抑制细胞(polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells, PMN-MDSCs)是一类特殊的"中性粒细胞",通常与普通的中性粒细胞难以区分,并且能够通过多种机制抑制T细胞等免疫细胞[4],通常被认为是多种恶性肿瘤免疫治疗失败的重要原因之一[5]。已经证实在IBD中MDSCs的数量增多,且与肠道炎症的严重程度高度相关[6-7]。

脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶1(apurinic/apyrimidinic endonuclease 1, APE1)是一种具有DNA修复和氧化还原信号传导的双功能蛋白[8-9]。APE1氧化还原功能结构域能够介导包括核因子-κB(nuclear factor kappa-B, NF-κB)在内的多种转录因子与DNA结合,参与炎症调节、血管生成、细胞周期等多种生理或病理过程[10]。本课题组前期关于IBD的研究证明APE1通过NF-κB促进趋化因子(C-X-C基序)配体1[chemokine (C-X-C motif) ligand 1, CXCL1]的转录及分泌,进一步调控中性粒细胞趋化,并加重IBD模型小鼠的肠道炎症反应。但是目前尚未有证据能够在CAC中将APE1与中性粒细胞/PMN-MDSCs联系起来。

$APE1^{C64S}$点突变能够使APE1氧化还原功能缺失[11-12]。本研究通过$APE1^{C64S}$小鼠在氧化偶氮甲烷(azoxymethane, AOM)及硫酸葡聚糖钠盐溶液(dextran sulfate sodium salt, DSS)诱导下构建CAC动物模型,探讨APE1能否调控CAC的发生发展及其机制,为寻找CAC潜在的治疗靶点提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 实验小鼠

C57BL/6J 遗传背景的 APE1^{C64S} 雄性小鼠,6~10 周龄,体质量(22±3)g,由南京大学医学院模式动物研究所建立、陆军特色医学中心肿瘤中心实验室提供,上海吉凯基因科技股份有限公司进行基因型鉴定。C57BL/6J 雄性小鼠,6~10 周龄,体质量(22±3)g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司。所有小鼠饲养于陆军特色医学中心实验动物中心经过彻底消毒的独立通风笼具(individually ventilated cages, IVC)中,恒温恒湿恒压,定期消毒,以 12 h 为交替模拟昼夜循环。小鼠自由接触过滤空气、无菌水、灭菌饲料。通过耳标对老鼠个体进行区分标记。本研究动物实验经过陆军特色医学中心伦理委员会批准(批号:AMUWEC20247025)。

1.2 CAC 动物模型的构建及治疗

CAC 动物模型的构建:将 C64S 点突变纯合子(APE1^{C64S})小鼠和野生型(wild type, WT)小鼠(APE1^{WT})采用随机数字表法分为实验组[APE1^{WT}(n=6)、APE1^{C64S}(n=5)]与对照组[APE1^{WT}(n=5)、APE1^{C64S}(n=5)],实验组小鼠在实验第 0 天使用 10 mg/kg AOM(上海阿拉丁生化科技公司,#A169090)一次性腹腔注射;在实验第 7~11 天、第 28~32 天、第 49~53 天将小鼠唯一饮水源更换为 2.5%分子量为 36 000~50 000 的 DSS(MP Biomedicals,#9011-18)溶液,小鼠自由取用;其余实验时间小鼠饮用经过灭菌处理的饮用水。对照组小鼠在实验第 0 天腹腔注射等体积生理盐水,实验全程自由饮用经过灭菌处理的饮用水。

所有小鼠将在出现体质量减轻>20%、弓背或无法站立、体温变化>2 ℃或其他需要施行实验动物仁慈终点的情况时实施安乐死,否则将在 CAC 体内模型建立的第 100 天对小鼠麻醉后安乐死以收集血清、粪便以及结肠组织等标本。

1.3 疾病活动指数(disease activity index, DAI)评估

自实验第 0 天起,每日记录小鼠的体质量变化,观察大便含水量以及使用粪便隐血定性检测(邻联甲苯胺法)试剂盒(重庆蒙柏欧生物科技有限公司,# BM0188)检测便血情况。上述 3 个指标评分后相加的总和即为该小鼠的 DAI 评分。具体标准见表 1。

1.4 小鼠皮下荷瘤实验

在实验开始前 2 d 对小鼠腹股沟区域备皮。在实验第 1 天,按照 PBS 缓冲液:基质胶=3:1冰上配置注射介质,并重悬细胞。每只小鼠腹股沟皮下注射 5×10^{6}个细胞,随后每隔 1 d 观察、测量并记录小鼠皮下瘤成瘤长径及短径,肿瘤体积(mm^3)= 长径×短径^2×0.52。在出现肿瘤长径达到 14.5 mm 时对所有小鼠施行安乐死,解剖皮下瘤,记录肿瘤质量、长径、体积等数据,妥善保存标本以作后用。

表 1 小鼠疾病活动指数评分

评分指标	症状严重程度	评分
体质量变化	无体质量减轻或体质量减轻<1%	0 分
	体质量减轻 1%~5%	1 分
	体质量减轻>5%~10%	2 分
	体质量减轻>10%~20%	3 分
	体质量减轻>20%	4 分
粪便含水量	粪便正常	0 分
	粪便稀软	2 分
	粪便不成型或腹泻	4 分
便血	粪便正常,粪便隐血检测结果为(-)或(+)	0 分
	粪便隐血检测结果为(++)或(+++)	2 分
	肉眼可见的血便、肛周带血或粪便隐血检测结果为(++++)	4 分

1.5 细胞培养

小鼠结肠癌 MC38 细胞系由陆军特色医学中心肿瘤中心实验室提供。使用含有 10%胎牛血清(VivaCell,#C04001)和 1×青霉素-链霉素(武汉普诺赛生命科技有限公司,#PB180120)溶液的 RPMI1640 培养基(VivaCell,#C3010)培养在 37 ℃、5% CO_2 的恒温培养箱中。当细胞状态佳、无污染且生长至 80%左右时使用胰蛋白酶(武汉普诺赛生命科技有限公司,#PB180226)消化细胞,按照 1:3比例进行传代。

1.6 慢病毒转染

慢病毒的制备委托上海吉凯基因科技有限公司完成,靶点序列见表 2。细胞贴壁后加入慢病毒及 HitransG P 病毒感染增强剂(上海吉凯基因科技有限公司,#REVG005);转染完成后加入适当浓度的嘌呤霉素进行筛选。慢病毒靶点序列 APE1-shRNA(shAPE1)-1:5′-CCCGCTCTAAGAATGTTGGTT-3′;shAPE1-2:5′-CGGGTGATTGTGGCTGAATTT-3′;shAPE1-3:5′-GAAAGGTTTGGATTGGGTAAA-3′;Negative control-shRNA(shNC):5′-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3′。选取敲低效果最好的慢病毒进行后续实验。

1.7 Western blot 检测

将样本用含有蛋白酶磷酸酶抑制剂(MedChemExpress,#HY-K0013)的裂解缓冲液及超声处理仪裂解细胞;使用紫外分光光度法测定裂解蛋白样本浓度;样本经 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(上海碧云天生物技术有限公司,#P0286)高温变性后,加入至浓度为

4%~20%的预制胶(南京艾思易生物科技有限公司,# ET15420LGel),电泳 160 V;冰中 110 V 恒压转膜 90 min;5%脱脂奶粉(上海生工生物工程股份有限公司,#A600669)封闭,室温 65 r/min 摇床 1 h;孵育一抗,4 ℃过夜;次日孵育二抗,室温 65 r/min 摇床 1 h;使用极超敏 ECL 化学发光试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,#P0018FS)和化学发光成像系统显影。一抗:APE1(Proteintech,#10203-1-AP,1∶1 000);α-tubulin(武汉博士德,# BM1452,1∶1 000)。

1.8 组织样本

石蜡包埋结肠组织样本来自陆军特色医学中心病理科 2023 年确诊的 1 例 CAC 患者,女性,28 岁,IBD 病史 11 年。发病后第 2 年确诊 IBD,给予 5-ASA 口服治疗;发病后第 5 年自觉症状好转自行停药;发病后第 11 年出现腹痛、腹胀、肛门排期减少,考虑肠梗阻,行手术治疗,术后诊断为肠梗阻、IBD、横结肠腺癌(pT4N0Mx)。涉及人体组织标本相关研究经过陆军特色医学中心伦理委员会批准[批号:2024(127)]。

1.9 HE 染色

将组织在 4%组织细胞固定液(上海碧云天生物技术有限公司,#P0099)中固定,按照标准 HE 程序进行脱水、石蜡包埋及切片。所有切片标本 65 ℃×3 h 高温烤片后,经过二甲苯、梯度乙醇、蒸馏水脱蜡;苏木精 3 min 染细胞核;1%盐酸乙醇溶液分化;饱和碳酸锂溶液返蓝数;伊红溶液染细胞质 3 min;梯度乙醇、二甲苯等溶液脱水;中性树胶封片剂封片;使用奥林巴斯显微镜进行观察和图像采集。上述试剂由陆军特色医学中心肿瘤中心实验室提供。

1.10 免疫细胞化学技术

组织切片烤片后,根据一抗的使用说明使用柠檬酸钠缓冲液(pH=6.0)或 EDTA 缓冲液(pH=8.0)进行高压蒸汽修复抗原;冷却至室温后,使用内源性过氧化物酶阻断剂孵育标本 10 min;一抗 4 ℃孵育过夜。次日,37 ℃复温 1 h 后使用免疫组化二抗孵育 30 min;使用 DAB 染色,经过染核、分化、反蓝、脱水后使用封片剂封片;使用奥林巴斯显微镜进行观察和图像采集。一抗:APE1(Proteintech,#10203-1-AP,1∶200),CD8(北京中杉金桥,# MAB-0021),CXCL1(Proteintech,#12335-1-AP,1∶50)。

1.11 多重免疫荧光染色

根据 Opal 多重免疫荧光检测试剂盒(Akoya Biosciences,# NEL871001)说明书进行,组织切片烤片后使用二甲苯和梯度乙醇脱蜡;4%组织细胞固定液固定 20 min;抗原修复缓冲液微波热修复 20 min,自然冷却至室温;封闭液室温封闭 15 min;4 ℃孵育一抗过夜;次日 37 ℃复温 1 h 后,二抗标记液室温孵育 15 min;Opal 染料多色标记(Opal 480 标记 CD4、Opal 520 标记 CD45、Opal 570 标记 CD8、Opal 620 标记 CD14),室温孵育 15 min;DAPI 染液标记细胞核,室温 5 min;抗荧光淬灭封片剂封片后上机检测。一抗:CD4(Abcam,# ab183685,1∶1 000);CD8(Abcam,# ab217344,1∶2 000);CD14(Proteintech,#17000-1-AP,1∶2 000);CD45(Proteintech,# 20103-1-AP,1∶100);CXCL1(Proteintech,#12335-1-AP,1∶50)。

1.12 统计学分析

使用 GraphPad Prism v8.4.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用非配对 t 检验。$P<0.05$ 定义为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建 CAC 动物模型

鉴定为 C64S 点突变纯合子($APE1^{C64S}$)小鼠(图 1A)和野生型($APE1^{WT}$)小鼠进行随机分笼。实验组 $APE1^{C64S}$ 小鼠($n=5$)和 $APE1^{WT}$ 小鼠($n=6$)通过 AOM/DSS 构建 CAC 体内模型,对照组 $APE1^{C64S}$ 小鼠($n=5$)和 $APE1^{WT}$ 小鼠($n=5$)则给予安慰剂和正常饮水(图 1B)。在实验第 100 天时,观察到 $APE1^{WT}$ 实验组小鼠出现肛周肿物,而 $APE1^{C64S}$ 实验组小鼠肛周基本正常(图 1C)。结果显示,与 $APE1^{WT}$ 实验组相比,$APE1^{C64S}$ 实验组小鼠在 DSS 的 3 轮诱导过程中的体质量变化更小($P<0.01$,图 1D),便血及腹泻的情况更轻微,疾病活动指数评分更小($P<0.01$,图 1E)。

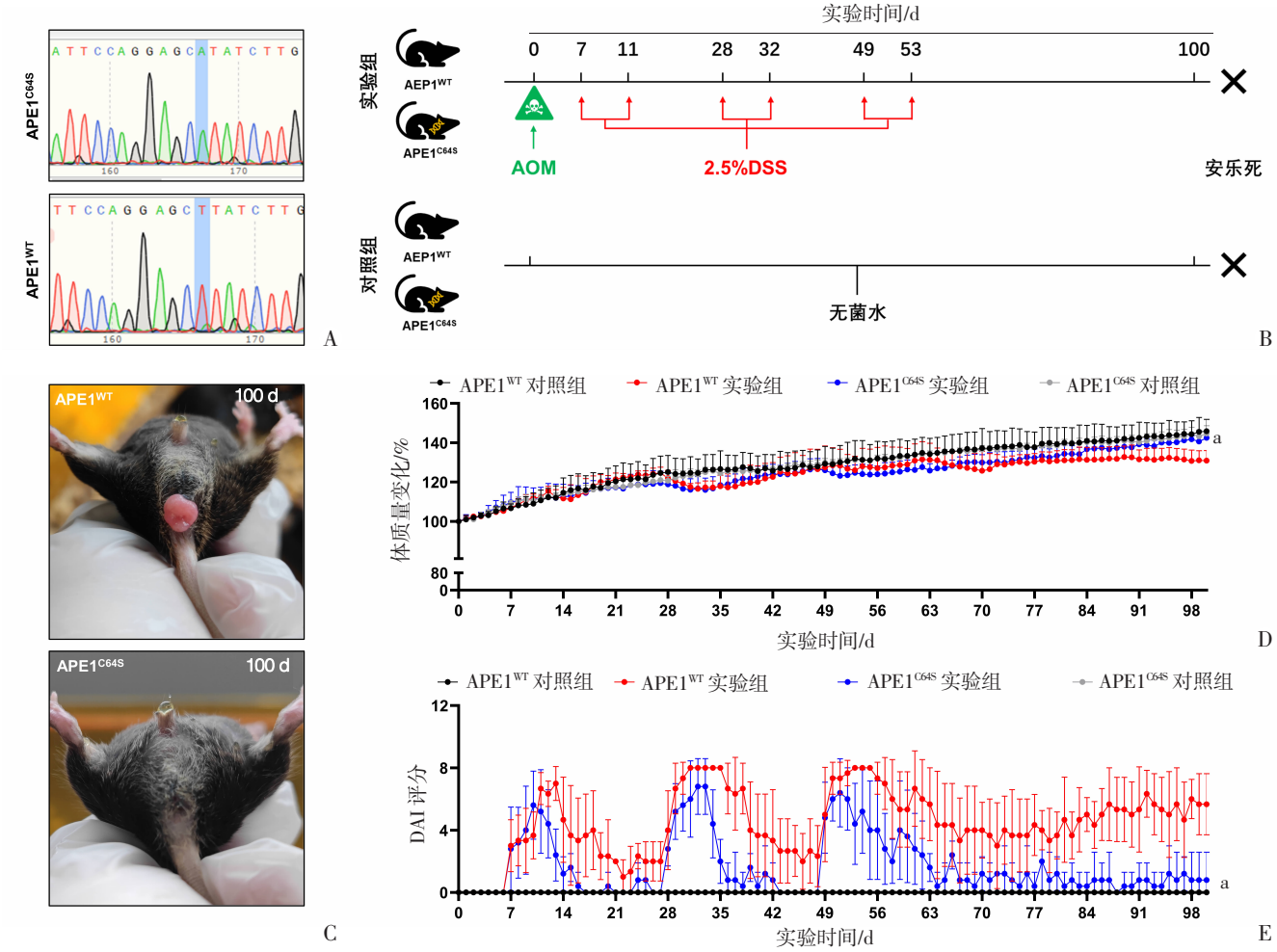
2.2 APE1 氧化还原功能缺失减少 CAC 发生

在实验第 100 天将各组小鼠安乐死后进行解剖,测量从肛门到阑尾的全结肠长度。与 $APE1^{C64S}$ 对照组和实验组相比,$APE1^{WT}$ 实验组小鼠结肠挛缩更明显(图 2A)。纵剖结肠后,观察到 $APE1^{C64S}$ 实验组小鼠成瘤数量更少,且肿瘤受累肠道的长度更短(图 2B~D)。HE 染色显示 CAC 体内模型建立后 $APE1^{WT}$ 小鼠结肠上皮出现腺癌,而在肉眼未见明显肿瘤的 $APE1^{C64S}$ 小鼠肠道组织中发现了肠上皮非典型增生(图 2E)。

2.3 APE1 氧化还原功能缺失导致 PMN-MDSCs 减少

为了检测在 $APE1^{C64S}$ 和 $APE1^{WT}$CAC 小鼠模型之间肿瘤中 PMN-MDSCs 是否有差异,使用 CD45 标记髓系来源细胞,CD14 标记 PMN-MDSCs,检测小鼠结肠组织标本中 PMN-MDSCs 以及 T 细胞的浸润情况(图 3A);应用免疫组化检测 CXCL1 的表达情况(图 3B)。结果显示,与 AOM/DSS 诱导的 $APE1^{WT}$ 小鼠相比,$APE1^{C64S}$

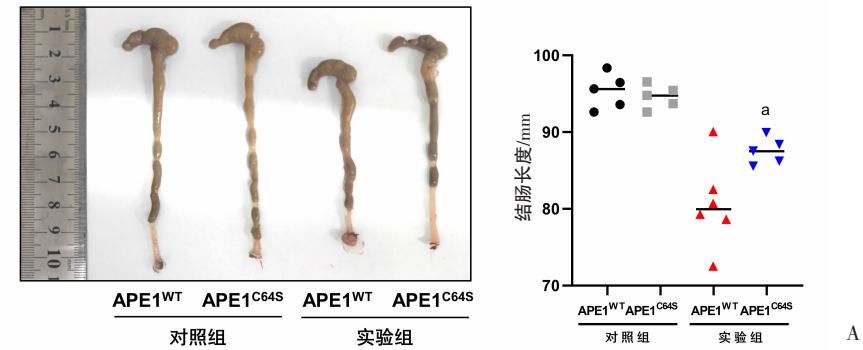
小鼠 PMN-MDSCs 浸润数量更少($P<0.01$,图 3C),而 $CD4^+$T 细胞($P<0.05$,图 3D)以及 $CD8^+$T 细胞($P<0.01$,图 3E)浸润显著增多。提示 APE1 氧化还原功能的缺失能够导致 PMN-MDSCs 浸润减少,并且改变了免疫抑制的肿瘤微环境(tumor microenvironment,TME),导致 CAC 形成受阻。



a:$P<0.01$,与 $APE1^{WT}$ 实验组比较

A:小鼠 APE1 基因型鉴定;B:实验流程图;C:$APE1^{WT}$ 实验组和 $APE1^{C64S}$ 实验组实验第 100 天小鼠肛周观察　$APE1^{WT}$ 实验组小鼠出现肛门肿物;D:各组小鼠体质量变化百分比;E:各组小鼠 DAI 评分

图 1　应用 AOM/DSS 构建 $APE1^{WT}$ 及 $APE1^{C64S}$ 小鼠 CAC 模型

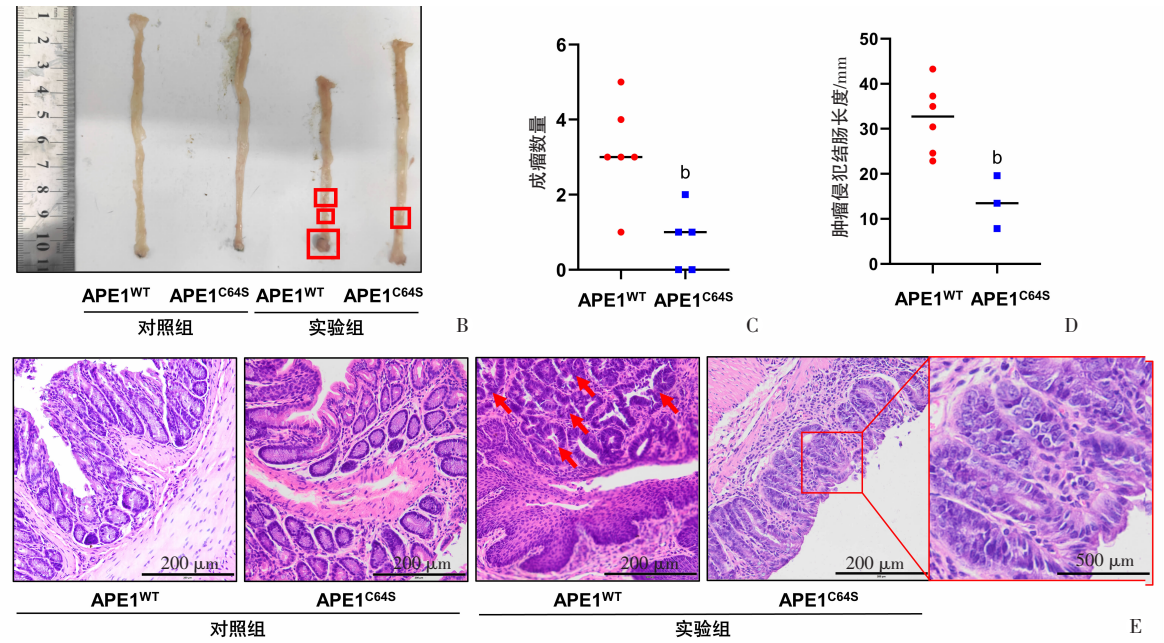


a:$P<0.05$,与 $APE1^{WT}$ 实验组比较

A:小鼠结肠解剖(左)及长度统计(右)

图 2　各组小鼠结肠形态及成瘤情况

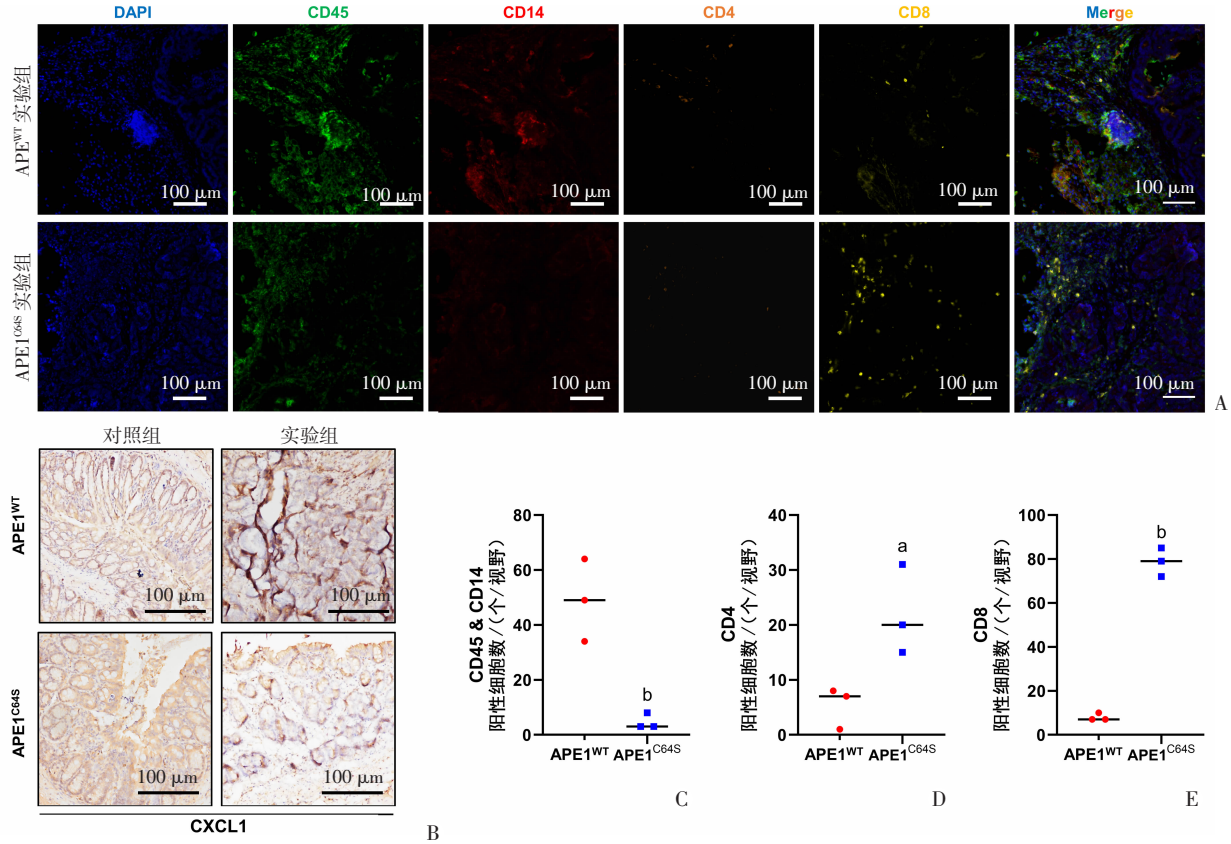
(图 2B~D 续下页)



b:$P<0.01$,与 $APE1^{WT}$ 实验组比较

B:小鼠结肠纵剖图　红色矩形内为肿瘤;C:小鼠结肠肿瘤数量分析;D:小鼠结肠肿瘤侵犯结肠长度分析;E:HE 染色观察各组小鼠结肠组织形态　红色箭头:示肿瘤组织

续图 2　各组小鼠结肠形态及成瘤情况



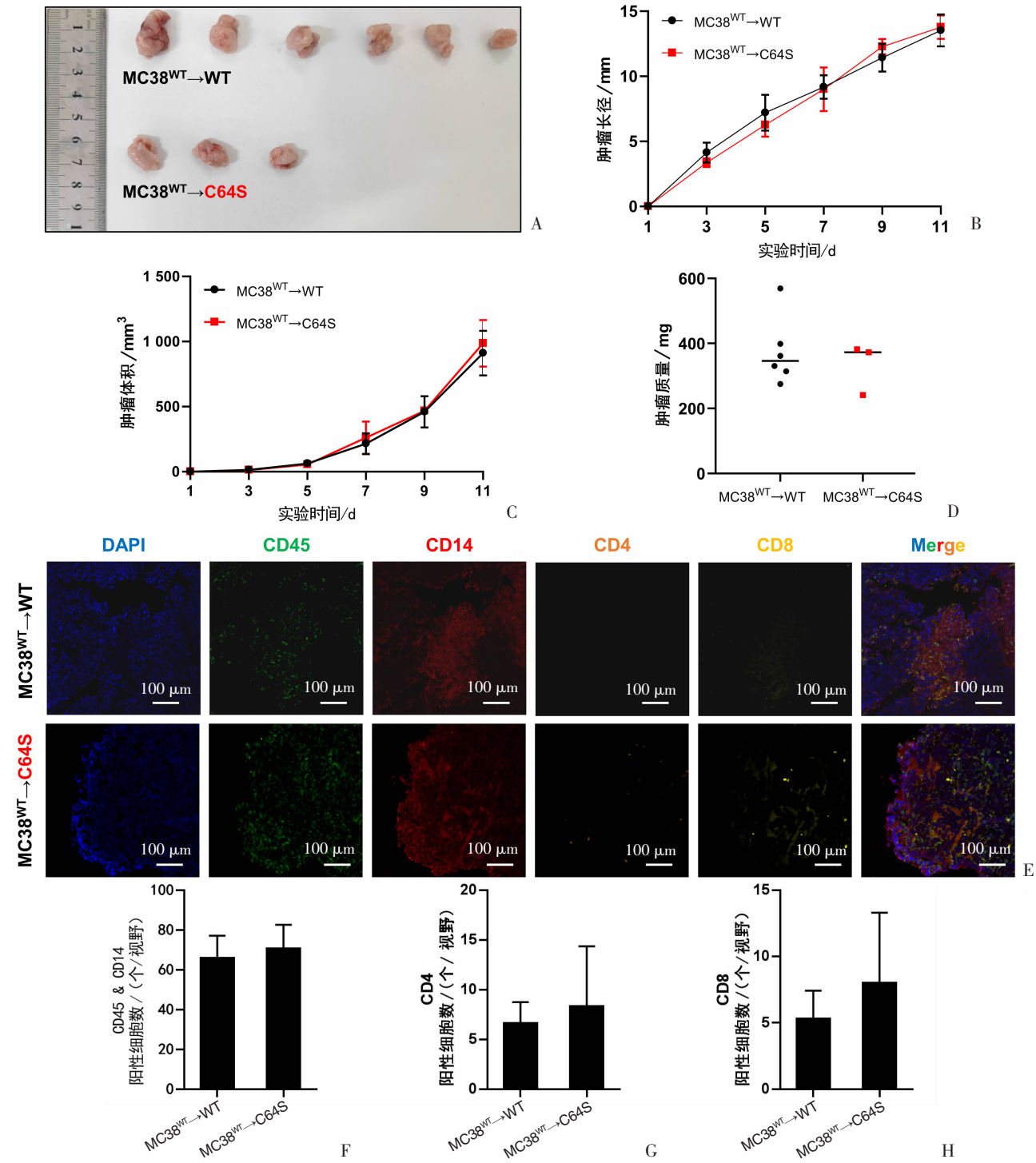
a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 $APE1^{WT}$ 实验组比较

A:多重免疫荧光染色检测各组小鼠结肠组织标本　使用 DAPI 标记细胞核、Opal 480 标记 CD4、Opal 520 标记 CD45、Opal 570 标记 CD8、Opal 620 标记 CD14;B:免疫组化检测各组小鼠肠道结肠组织石蜡包埋切片 CXCL1 的表达;C~E:$APE1^{WT}$ 实验组和 $APE1^{C64S}$ 实验组阳性细胞数统计分析

图 3　各组小鼠结肠组织中 PMN-MDSCs 浸润情况

2.4 宿主 APE1 氧化还原功能状态不影响移植成瘤

为了确定何种类型细胞的 APE1 氧化还原功能障碍导致 PMN-MDSCs 向肿瘤趋化减少,应用野生型 MC38 细胞对 $APE1^{WT}$ 小鼠($MC38^{WT}$→WT 组,$n=6$)和 $APE1^{C64S}$ 小鼠($MC38^{WT}$→C64S 组,$n=3$)进行皮下荷瘤。结果显示,2 组小鼠皮下荷瘤的长径、体积、肿瘤质量差异均无统计学意义(图 4A~D),肿瘤中 PMN-MDSCs、$CD4^+$T 细胞和 $CD8^+$T 细胞的数量也未观察到明显差异(图 4E~H)。提示小鼠 APE1 氧化功能缺失不影响移植瘤的生长。

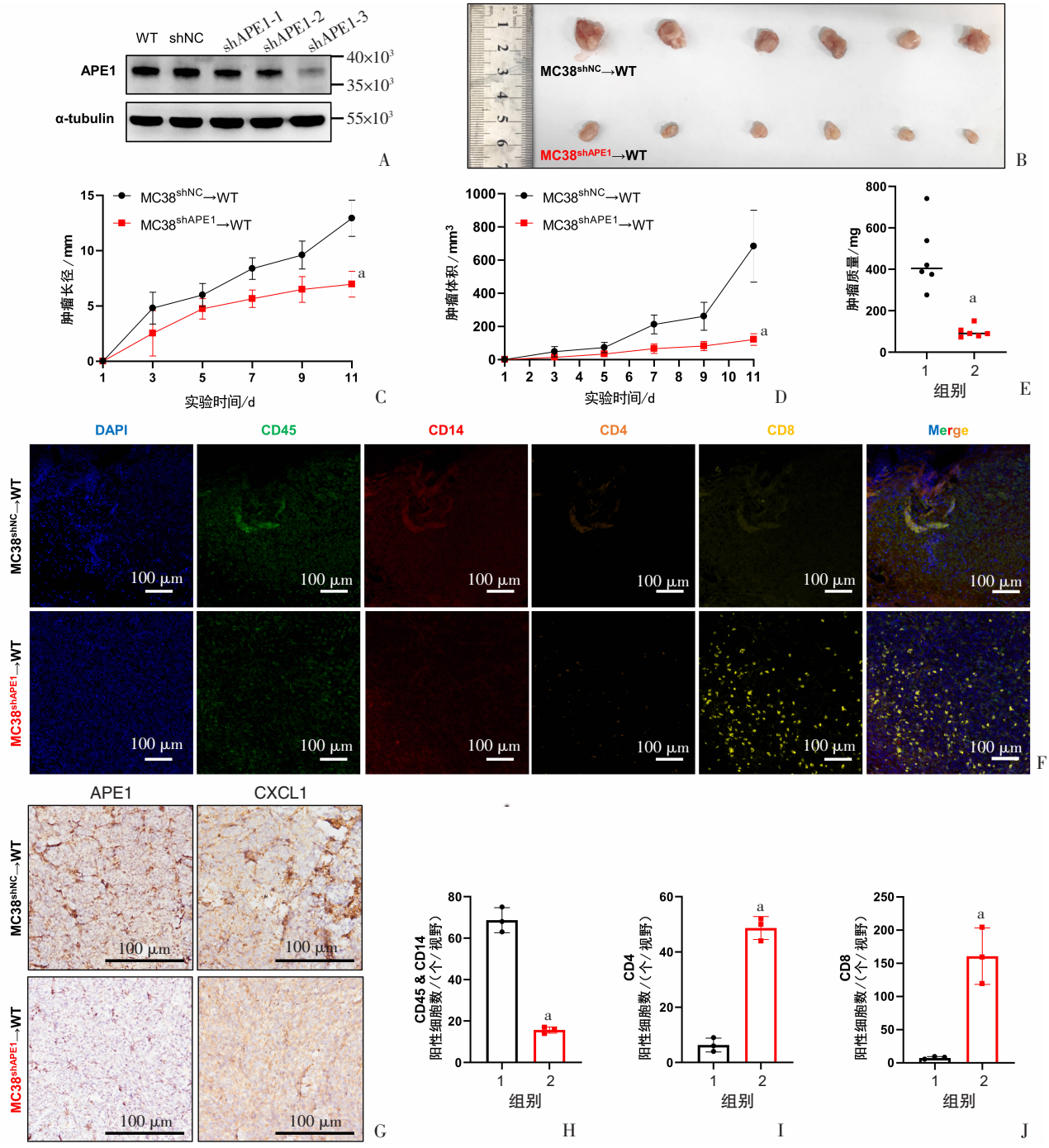


A:小鼠荷瘤标本;B:小鼠荷瘤长径变化;C:小鼠荷瘤体积变化;D:小鼠皮下瘤质量;E:多重免疫荧光染色检测小鼠荷瘤组织标本;F~H:染色阳性细胞数统计分析

图 4 $APE1^{WT}$ 和 $APE1^{C64S}$ 小鼠皮下荷瘤实验

2.5　肿瘤细胞 APE1 影响 PMN-MDSCs 向肿瘤趋化

对 MC38 细胞系进行 shAPE1 慢病毒转染,成功构建了稳定敲低 APE1 的细胞株(图 5A)。细胞分为 $MC38^{shNC}\rightarrow WT$ 组和 $MC38^{shAPE1}\rightarrow WT$ 组,分别使用 shNC 和 shAPE1 细胞株对野生型小鼠进行荷瘤实验($n=6$)。结果显示,相比于 shNC 细胞,shAPE1 细胞株荷瘤显示出更小的肿瘤长径、体积及质量($P<0.01$,图 5B~E)。对荷瘤组织内 PMN-MDSCs 及 T 细胞浸润情况进行检测(图 5F),并验证 APE1 及 CXCL1 的表达情况(图 5G)。结果显示,在 APE1 敲低的荷瘤组织中 CXCL1 表达较少。此外,多重免疫荧光染色显示,shAPE1 细胞皮下瘤出现了更少的 PMN-MDSCs 聚集($P<0.01$,图 5H),并出现更多的 $CD4^+$T 细胞($P<0.01$,图 5I)和 $CD8^+$T 细胞浸润($P<0.01$,图 5J)。以上结果显示,肿瘤细胞 APE1 的表达能够影响 PMN-MDSCs 向肿瘤的趋化,进而影响肿瘤免疫微环境。



a:$P<0.01$,与 $MC38^{shNC}\rightarrow WT$ 比较;1:$MC38^{shNC}\rightarrow WT$;2:$MC38^{shAPE1}\rightarrow WT$

A:Western blot 鉴定慢病毒转染 MC38 细胞敲低 APE1;B:小鼠荷瘤标本;C:小鼠荷瘤长径变化;D:小鼠荷瘤体积变化;E:小鼠皮下瘤质量;F:多重免疫荧光染色检测小鼠荷瘤组织标本;G:免疫组化检测小鼠荷瘤组织 APE1 及 CXCL1 的表达;H~J:阳性细胞数统计分析

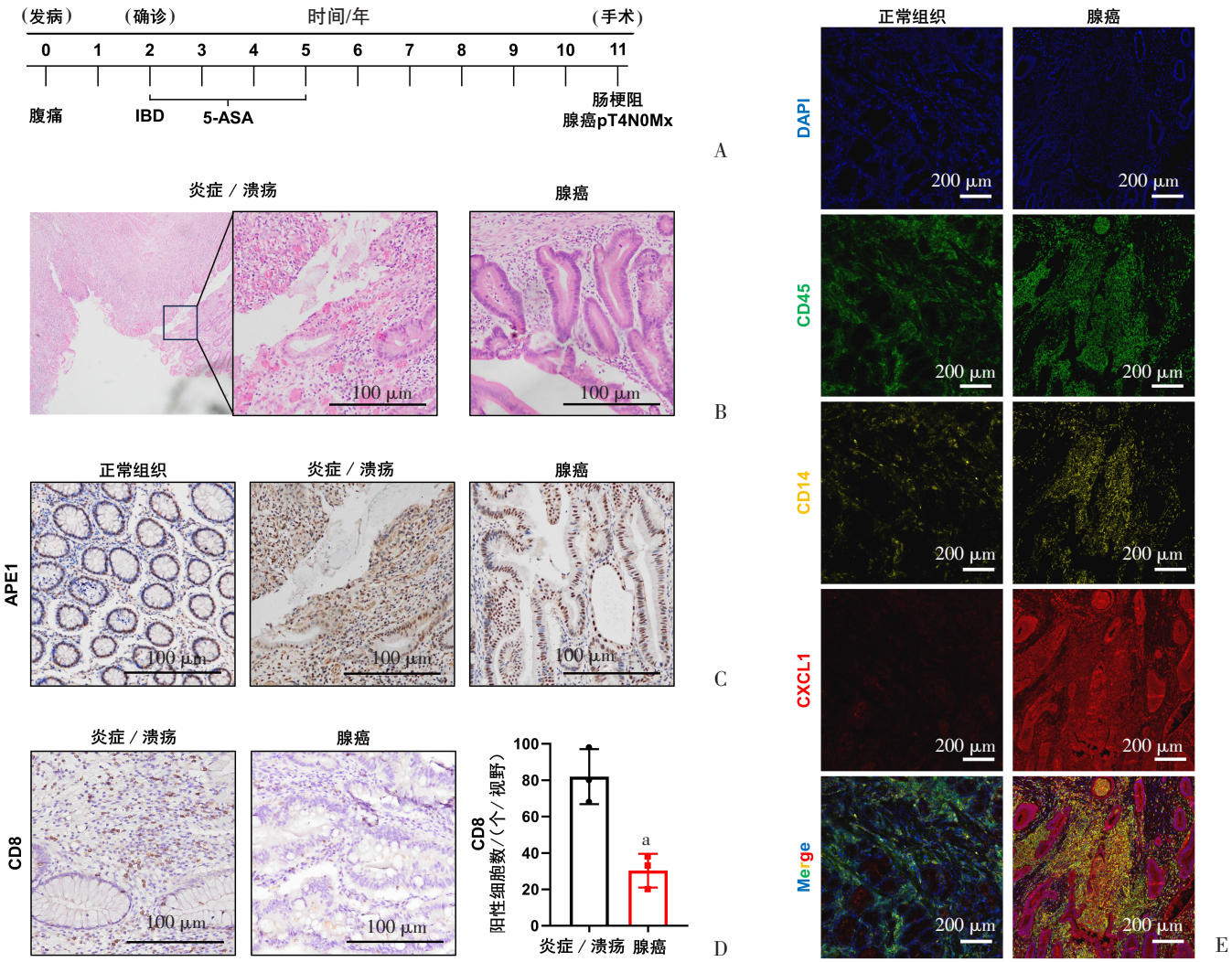
图 5　MC38 细胞 APE1 水平对 PMN-MDSCs 向肿瘤趋化的影响

2.6　CAC 患者肿瘤 APE1 表达增高且具有免疫抑制性 TME

对 1 例长达 11 年余 IBD 病史的 28 岁 CAC 患者肠道病理组织标本进行检测。该患者在发病后第 2 年被确诊为 IBD;确诊后口服 5-ASA 治疗,第 5 年自行停药;在第 11 年因急性发作肠梗阻进行手术,术后病理结果显示为高分化腺癌,癌组织侵及浆膜下并有神经侵犯,AJCC 分期:pT4N0Mx(图 6A、B)。对健康人结肠组织以及患者炎症/溃疡组织及肿瘤组织进行检测,免疫组化检测结果显示,与正常结肠组织相比,该名 CAC 患者炎症组织及肿瘤组织中 APE1 过表达(图 6C);然而,与溃疡附近的炎症组织相比,$CD8^+$T 细胞在肿瘤组织中浸润减少($P<0.01$,图 6D)。多重免疫荧光染色结果显示,与正常结肠组织相比,该名 CAC 患者肿瘤组织中 CXCL1 表达较正常组织增多,$CD14^+$细胞数量明显增多(图 6E)。结果证明这名 CAC 患者 APE1 表达增高,且具有免疫抑制性 TME。

3　讨论

本研究使用靶向 APE1 氧化还原功能点突变的 $APE1^{C64S}$ 小鼠观察 CAC 动物模型中 APE1 的作用,证明 APE1 能够通过其氧化还原途径影响 CAC 的形成和进展。APE1 通过其氧化还原作用调控 CXCL1 的表达,趋化 PMN-MDSCs 并能够抑制 $CD4^+$T 细胞和 $CD8^+$



A:患者病史;B:HE 染色观察患者结肠组织形态;C、D:免疫组化检测健康人及患者结肠组织中 APE1(C)和 CD8(D)的表达
a:$P<0.01$,与炎症/溃疡组织比较;E:多重免疫荧光染色检测患者及正常结肠组织标本

图 6　CAC 患者肠道 APE1 的表达与 PMN-MDSCs 聚集有关

T 细胞,形成免疫抑制性 TME 促进 CAC 发展;此外,通过 C64S 点突变使 APE1 氧化还原功能缺失能够改善长期炎症条件下的 CAC 形成和进展。

既往研究显示,抑制 APE1 的核酸内切酶功能能够影响 CRC[13]。此外,与正常黏膜相比,APE1 在 CRC 和淋巴结转移组织中过表达,并且与肿瘤进展和较差的生存率显著相关[14]。但在 CAC 中 APE1 的相关研究非常有限。本研究成功构建了 CAC 动物模型,并通过 C64S 点突变靶向 APE1 氧化还原功能的 $APE1^{C64S}$ 小鼠,证明了 APE1 能够影响 CAC 的形成和疾病进展。

IBD 中功能异常的免疫细胞大量浸润和肠道微生物的失调均可以引起 NF-κB 激活,是导致病情加重并向 CAC 转变的重要因素[1]。最近一项关于细胞焦亡的研究显示,在慢性炎症过程中,细胞焦亡会导致损伤相关的分子模式(damage-associated molecular patterns, DAMPs)的释放并通过 ERK1/2 信号通路诱导 CAC 发生[15]。多种途径激活 Wnt/β-Catenin 信号通路可以导致 CAC 发生[16-18]。此外,Toll 样受体(toll-like receptors, TLR)、JAK/STAT 信号通路、哺乳动物雷帕霉素靶复合物(mammalian target of rapamycin complex, mTOR)、自噬和氧化应激已被认为是 CAC 进展中存在的分子机制[19]。IBD 肠道中炎性细胞因子的异常表达和免疫抑制细胞的聚集形成了能够促进肿瘤生存的免疫抑制性微环境[20]。最近有研究将 5 个 IBD 与健康人的中性粒细胞差异基因(*AQP9*、*FCGR3B*、*GPR109B*、*PROK2* 和 *S100A12*)列为 IBD 向 CAC 转化的生物标志物,这将中性粒细胞与 IBD 的炎癌转化密切联系起来[19]。

APE1 诱导的免疫抑制性 TME 可能是 CAC 进展的原因之一。中性粒细胞参与的炎症会导致肠道菌群失调,生态失调通过产生反应性代谢物和致癌物并破坏上皮屏障而导致 CAC[21]。作为炎症的核心细胞之一,中性粒细胞与 IBD 向 CAC 转化的关系密不可分[22]。中性粒细胞与淋巴细胞比率升高已成为癌症总体生存率较差的预后指标[23]。有研究显示,中性粒细胞浸润较多的 UC 患者更容易发生 CAC[19]。中性粒细胞的多种作用,包括 ROS[24-25]、NETs[26] 等,已被证明与结直肠恶性肿瘤有关。

PMN-MDSCs 是一种癌症中髓系来源且功能异常的“中性粒细胞”,难以与普通的中性粒细胞区分,通常被认为是多种恶性肿瘤免疫治疗失败的重要原因之一[5]。在肿瘤中,大多数中性粒细胞是具有免疫抑制活性的 PMN-MDSCs,这导致了肿瘤进展及免疫治疗耐受[5, 27]。慢性炎症招募包括 MDSCs 及 N2 型肿瘤相关中性粒细胞在内的大量免疫抑制细胞,形成了能够促进肿瘤生存的免疫抑制微环境[28-29]。PMN-MDSCs 还可以通过产生 ROS 依赖性过氧亚硝酸盐抑制 T 细胞从而利于肿瘤生存[24]。已经证实在 IBD 中的 MDSCs 数量增多,且与肠道炎症的严重程度高度相关[6-7]。在结肠炎向结直肠癌的发展过程中,由粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)调控的 MDSCs 在病变中的积累进一步增加[30],而 MDSCs 的消耗可减轻 IBD 向 CAC 的转化[31]。

在包括 CRC 在内的多种恶性肿瘤中,T 淋巴细胞均与较好的预后相关[32]。$CD8^+$T 细胞是肿瘤免疫治疗成功的关键细胞,能够通过主要组织相容性复合体Ⅰ类分子(major histocompatibility complex-Ⅰ,MHC-Ⅰ)识别肿瘤抗原并释放细胞溶解颗粒和干扰素 γ(interferon-γ,IFN-γ)导致细胞死亡[33]。独立于激活 $CD8^+$效应 T 细胞的辅助角色,$CD4^+$T 细胞也有助于抗肿瘤免疫,在直接杀伤表达 MHC-Ⅱ类分子的肿瘤细胞之外,还能够通过动员髓系细胞间接消灭缺乏 MHC-Ⅱ类分子的肿瘤细胞[33]。然而,在 TME 中,程序性细胞死亡(programmed cell death-1, PD-1)表达的上调导致 T 细胞功能障碍并出现 T 细胞耗竭(T cell exhaustion)[34]。由此衍生而来的靶向 PD-1 及其配体 PD-L1 免疫检查点阻断疗法在临床上获得了巨大的成功,但仍有部分患者对这种治疗方法反应不佳。免疫抑制性 TME 以高含量 PMN-MDSCs 为特征,通过抑制 T 细胞、B 细胞和自然杀伤细胞(nature killer cell, NK cell)的激活和募集成为肿瘤免疫治疗的主要障碍[5, 27]。

本课题组在之前关于 IBD 的研究中发现,肠上皮细胞中 NF-κB 能够与 CXCL1 启动子结合,参与到 APE1 氧化还原作用调控 CXCL1 的表达和分泌;此外,研究还发现 APE1-NF-κB-CXCL1 轴能够影响中性粒细胞的趋化和功能,进一步影响 IBD 的疾病进展。哺乳动物中 APE1 的 N-末端结构域具有核定位和氧化还原活性,能够调节包括 NF-κB 在内的多种转录因子[35]。在 IBD,肠道中功能异常的免疫细胞大量浸润和肠道微生物的失调引起的 NF-κB 激活是导致病情加重并向 CAC 转变的重要因素[1]。CXCL1 在 IBD 中能够诱导中性粒细胞趋化[36],在机制上受到 NF-κB 调控[37]。此外,肿瘤细胞中的 NF-κB 活化较高,导致 CXCL1 高表达,并可以进一步通过激活 NF-κB 增加 CXCL1 自身的表达[37]。CRC 中 CXCL1 表达增高,且与 CRC 的疾病进展密切相关[38]。最近有研究意外地发现 CXCL1 可能通过诱导免疫抑制促进 CAC 的发生[39],但并没有进行进一步的研究。本研究证明肿瘤

细胞中的 APE1 氧化还原功能能够影响 CXCL1,从而趋化 PMN-MDSCs 向肿瘤细胞浸润,形成免疫抑制性 TME 以促进肿瘤进展。然而,在 CAC 中 APE1 调控 CXCL1 表达的机制是否有别于 IBD 需要进一步研究。

遗憾的是,本研究未进一步探讨 APE1 的碱基切除修复功能在 CAC 中的作用。慢性炎症导致的 DNA 损伤逐渐积累,并超出生理修复能力后会形成基因组不稳定的微卫星不稳定性(microsatellite instability,MSI)[40]。在 IBD 中,APE1 的过表达与 MSI 呈正相关[40],这些基因组的改变使 IBD 恶变的风险明显增加[41]。中性粒细胞能够产生 ROS,在生理条件下能够攻击病原体,但在长期炎症的累积下则能够促进肿瘤微环境中的癌症转移、血管生成和免疫抑制[24-25]。在慢性炎症组织中,中性粒细胞通过释放 ROS 等物质诱导 DNA 突变,进而引起肿瘤发生并促进肿瘤发展和转移[42-45]。在 CAC 中,APE1 碱基切除修复功能与炎癌转化过程中 DNA 损伤之间的关系有待于进一步深入研究。

确诊时年龄更小是发生结直肠癌的危险因素之一[46],青年人的Ⅲ期 CAC 患者预后较 50 岁以上老年人明显更差[47]。本研究通过对 1 名非常年轻(28 岁)的 CAC 患者的肠道组织进行检测,证明与正常结肠组织相比,患者的炎症(溃疡)及肿瘤部位的 APE1 和 CXCL1 表达更高,PMN-MDSCs 浸润更多。IBD 肠道组织中表达的 CXCL1 诱导 PMN-MDSCs 浸润,抑制 T 细胞并为肿瘤的发生发展提供合适的免疫微环境,避免肿瘤细胞被免疫监视发现,从而提高炎癌转化中肿瘤细胞存活的概率。

总之,本研究主要通过 C64S 点突变导致 APE1 氧化还原功能缺失的小鼠模型,证实 APE1 能够通过其氧化还原途径影响 CAC 的免疫微环境,并促进 CAC 的形成和进展。此外,通过 C64S 点突变使 APE1 氧化还原功能缺失,能够改善长期炎症条件下的 CAC 形成和进展。但本研究没有针对 APE1 氧化还原功能、DNA 损伤修复功能、介导转录因子与启动子结合的功能等开展针对性的检测指标,后续研究将进一步进行分析。

参考文献:

[1] KELLER D S, WINDSOR A, COHEN R, *et al*. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: review of the evidence [J]. Tech Coloproctol, 2019, 23(1): 3-13. DOI: 10.1007/s10151-019-1926-2.

[2] KOBAYASHI T, SIEGMUND B, LE BERRE C, *et al*. Ulcerative colitis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2020, 6(1): 74. DOI: 10.1038/s41572-020-0205-x.

[3] FANTINI M C, GUADAGNI I. From inflammation to colitis-associated colorectal cancer in inflammatory bowel disease: Pathogenesis and impact of current therapies[J]. Dig Liver Dis, 2021, 53(5): 558-565. DOI: 10.1016/j.dld.2021.01.012.

[4] ANTUAMWINE B B, BOSNJAKOVIC R, HOFMANN-VEGA F, *et al*. N1 versus N2 and PMN-MDSC: a critical appraisal of current concepts on tumor-associated neutrophils and new directions for human oncology[J]. Immunol Rev, 2023, 314(1): 250-279. DOI: 10.1111/imr.13176.

[5] WANG C X, ZHENG X C, ZHANG J L, *et al*. CD300ld on neutrophils is required for tumour-driven immune suppression [J]. Nature, 2023, 621(7980): 830-839. DOI: 10.1038/s41586-023-06511-9.

[6] GUAN Q D, MORENO S, QING G F, *et al*. The role and potential therapeutic application of myeloid-derived suppressor cells in TNBS-induced colitis[J]. J Leukoc Biol, 2013, 94(4): 803-811. DOI: 10.1189/jlb.0113050.

[7] OH S Y, CHO K A, KANG J L, *et al*. Comparison of experimental mouse models of inflammatory bowel disease [J]. Int J Mol Med, 2014, 33(2): 333-340. DOI: 10.3892/ijmm.2013.1569.

[8] WHITAKER A M, FREUDENTHAL B D. APE1: a skilled nucleic acid surgeon[J]. DNA Repair, 2018, 71: 93-100. DOI: 10.1016/j.dnarep.2018.08.012.

[9] TELL G, QUADRIFOGLIO F, TIRIBELLI C, *et al*. The many functions of APE1/Ref-1: not only a DNA repair enzyme[J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11(3): 601-620. DOI: 10.1089/ars.2008.2194.

[10] SHAH F, LOGSDON D, MESSMANN R A, *et al*. Exploiting the Ref-1-APE1 node in cancer signaling and other diseases: from bench to clinic[J]. NPJ Precis Oncol, 2017, 1: 19. DOI: 10.1038/s41698-017-0023-0.

[11] HASHIMOTO S, IMAOKA S. Protein-disulfide isomerase regulates the thyroid hormone receptor-mediated gene expression *via* redox factor-1 through thiol reduction-oxidation[J]. J Biol Chem, 2013, 288(3): 1706-1716. DOI: 10.1074/jbc.M112.365239.

[12] ORDWAY J M, EBERHART D, CURRAN T. Cysteine 64 of Ref-1 is not essential for redox regulation of AP-1 DNA binding[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(12): 4257-4266. DOI: 10.1128/MCB.23.12.4257-4266.2003.

[13] CODRICH M, COMELLI M, MALFATTI M C, *et al*. Inhibition of APE1-endonuclease activity affects cell metabolism in colon cancer cells *via* a p53-dependent pathway[J]. DNA Repair, 2019, 82: 102675. DOI: 10.1016/j.dnarep.2019.102675.

[14] HONG J Y, OH H H, PARK S Y, *et al*. Expression of

apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 in colorectal cancer and its relation to tumor progression and prognosis[J]. In Vivo, 2023, 37(5): 2070-2077. DOI: 10.21873/invivo.13304.

[15] TAN G, HUANG C Y, CHEN J Y, *et al*. HMGB1 released from GSDME-mediated pyroptotic epithelial cells participates in the tumorigenesis of colitis-associated colorectal cancer through the ERK1/2 pathway[J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 149. DOI: 10.1186/s13045-020-00985-0.

[16] XU H, LI J, CHEN H, *et al*. NHE8 deficiency promotes colitis-associated cancer in mice *via* expansion of Lgr5-expressing cells[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2019, 7(1): 19-31. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2018.08.005.

[17] SWAFFORD D, SHANMUGAM A, RANGANATHAN P, *et al*. The wnt-β-catenin-IL-10 signaling axis in intestinal APCs protects mice from colitis-associated colon cancer in response to gut microbiota[J]. J Immunol, 2020, 205(8): 2265-2275. DOI: 10.4049/jimmunol.1901376.

[18] ZHAO Q, BI Y, ZHONG J, *et al*. Pristimerin suppresses colorectal cancer through inhibiting inflammatory responses and Wnt/β-catenin signaling[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2020, 386: 114813. DOI: 10.1016/j.taap.2019.114813.

[19] ZHANG C, ZHANG J T, ZHANG Y L, *et al*. Identifying neutrophil-associated subtypes in ulcerative colitis and confirming neutrophils promote colitis-associated colorectal cancer[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1095098. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1095098.

[20] YIN Y, WAN J, YU J M, *et al*. Molecular pathogenesis of colitis-associated colorectal cancer: immunity, genetics, and intestinal microecology[J]. Inflamm Bowel Dis, 2023, 29(10): 1648-1657. DOI: 10.1093/ibd/izad081.

[21] NAGAO-KITAMOTO H, KITAMOTO S, KAMADA N. Inflammatory bowel disease and carcinogenesis[J]. Cancer Metast Rev, 2022, 41(2): 301-316. DOI: 10.1007/s10555-022-10028-4.

[22] LIN Y, CHENG L, LIU Y, *et al*. Intestinal epithelium-derived BATF3 promotes colitis-associated colon cancer through facilitating CXCL5-mediated neutrophils recruitment [J]. Mucosal Immunol, 2021, 14(1): 187-198. DOI: 10.1038/s41385-020-0297-3.

[23] MOLLINEDO F. Neutrophil degranulation, plasticity, and cancer metastasis[J]. Trends Immunol, 2019, 40(3): 228-242. DOI: 10.1016/j.it.2019.01.006.

[24] KENNEL K B, GRETEN F R. Immune cell - produced ROS and their impact on tumor growth and metastasis[J]. Redox Biol, 2021, 42: 101891. DOI: 10.1016/j.redox.2021.101891.

[25] ZHONG J H, LI Q J, LUO H Q, *et al*. Neutrophil-derived reactive oxygen species promote tumor colonization [J]. Commun Biol, 2021, 4(1): 865. DOI: 10.1038/s42003-021-02376-8.

[26] KONG X H, ZHANG Y, XIANG L W, *et al*. *Fusobacterium nucleatum*-triggered neutrophil extracellular traps facilitate colorectal carcinoma progression[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2023, 42(1): 236. DOI: 10.1186/s13046-023-02817-8.

[27] VEGLIA F, SANSEVIERO E, GABRILOVICH D I. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity[J]. Nat Rev Immunol, 2021, 21(8): 485-498. DOI: 10.1038/s41577-020-00490-y.

[28] ZHAO H K, WU L, YAN G F, *et al*. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 263. DOI: 10.1038/s41392-021-00658-5.

[29] WANG Y G, DING Y X, DENG Y J, *et al*. Role of myeloid-derived suppressor cells in the promotion and immunotherapy of colitis-associated cancer [J]. J Immunother Cancer, 2020, 8(2): e000609. DOI: 10.1136/jitc-2020-000609.

[30] MA N, LIU Q L, HOU L, *et al*. MDSCs are involved in the protumorigenic potentials of GM-CSF in colitis-associated cancer[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2017, 30(2): 152-162. DOI: 10.1177/0394632017711055.

[31] POH T W, MADSEN C S, GORMAN J E, *et al*. Downregulation of hematopoietic MUC1 during experimental colitis increases tumor-promoting myeloid-derived suppressor cells[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(18): 5039-5052. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0278.

[32] VAN DER LEUN A M, THOMMEN D S, SCHUMACHER T N. $CD8^+$ T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis[J]. Nat Rev Cancer, 2020, 20(4): 218-232. DOI: 10.1038/s41568-019-0235-4.

[33] KRUSE B, BUZZAI A C, SHRIDHAR N, *et al*. $CD4^+$ T cell-induced inflammatory cell death controls immune-evasive tumours[J]. Nature, 2023, 618(7967): 1033-1040. DOI: 10.1038/s41586-023-06199-x.

[34] THOMMEN D S, SCHUMACHER T N. T cell dysfunction in cancer[J]. Cancer Cell, 2018, 33(4): 547-562. DOI: 10.1016/j.ccell.2018.03.012.

[35] SIQUEIRA P B, DE SOUSA RODRIGUES M M, DE AMORIM Í S S, *et al*. The APE1/REF-1 and the hallmarks of cancer[J]. Mol Biol Rep, 2024, 51(1): 47. DOI: 10.1007/s11033-023-08946-9.

[36] WANG Y, ZHANG Y F, LIU Y, *et al*. Gut-liver axis: liver sinusoidal endothelial cells function as the hepatic barrier in colitis-induced liver injury[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 702890. DOI: 10.3389/fcell.2021.702890.

[37] KORBECKI J, BARCZAK K, GUTOWSKA I, *et al*.

*CXCL*1: gene, promoter, regulation of expression, mRNA stability, regulation of activity in the intercellular space[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(2): 792. DOI: 10.3390/ijms23020792.

[38] ZHUO C H, WU X Y, LI J, *et al*. Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 is associated with tumor progression and poor prognosis in patients with colorectal cancer[J]. Biosci Rep, 2018, 38(4): BSR20180580. DOI: 10.1042/BSR20180580.

[39] LIU Z Y, ZHENG M, LI Y M, *et al*. RIP3 promotes colitis-associated colorectal cancer by controlling tumor cell proliferation and CXCL1-induced immune suppression[J]. Theranostics, 2019, 9(12): 3659-3673. DOI: 10.7150/thno.32126.

[40] HOFSETH L J, KHAN M A, AMBROSE M, *et al*. The adaptive imbalance in base excision-repair enzymes generates microsatellite instability in chronic inflammation[J]. J Clin Invest, 2003, 112(12): 1887-1894. DOI: 10.1172/JCI19757.

[41] SAHAKIAN L, ROBINSON A M, SAHAKIAN L, *et al*. APE1/ref-1 as a therapeutic target for inflammatory bowel disease[J]. Biomolecules, 2023, 13(11): 1569. DOI: 10.3390/biom13111569.

[42] CANLI O, NICOLAS A M, GUPTA J, *et al*. Myeloid cell-derived reactive oxygen species induce epithelial mutagenesis[J]. Cancer Cell, 2017, 32(6): 869-883.e5. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.11.004.

[43] BUI T M, BUTIN-ISRAELI V, WIESOLEK H L, *et al*. Neutrophils alter DNA repair landscape to impact survival and shape distinct therapeutic phenotypes of colorectal cancer[J]. Gastroenterology, 2021, 161(1): 225-238.e15. DOI: 10.1053/j.gastro.2021.03.027.

[44] HE L Y, KANG Q M, CHAN K I, *et al*. The immunomodulatory role of matrix metalloproteinases in colitis-associated cancer[J]. Front Immunol, 2022, 13: 1093990. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1093990.

[45] SHORT S P, PILAT J M, BARRETT C W, *et al*. Colonic epithelial-derived selenoprotein P is the source for antioxidant-mediated protection in colitis-associated cancer[J]. Gastroenterology, 2021, 160(5): 1694-1708.e3. DOI: 10.1053/j.gastro.2020.12.059.

[46] HSIAO S W, YEN H H, CHEN Y Y. Chemoprevention of colitis-associated dysplasia or cancer in inflammatory bowel disease[J]. Gut Liver, 2022, 16(6): 840-848. DOI: 10.5009/gnl210479.

[47] HORIO Y, UCHINO M, IGETA M, *et al*. Risk factors for the postoperative recurrence of ulcerative colitis-associated colorectal cancer[J]. Int J Colorectal Dis, 2023, 38(1): 113. DOI: 10.1007/s00384-023-04410-z.

(收稿:2024-04-09;修回:2024-05-28)

(编辑 汪勤俭)