

LRP1B 对 Lewis 细胞增殖、迁移、侵袭及免疫微环境的影响

李艳, 闫屹, 嵇桂娟, 张文辉, 赵力, 陈碧, 陈昊*

(徐州医科大学附属医院呼吸与危重症医学科, 江苏 徐州 221002)

摘要:目的 探讨 LRP1B 基因对 Lewis 肺癌细胞增殖、迁移、侵袭及免疫微环境的影响。方法 采用 TCGA 数据库分析 LRP1B 基因在肺癌及其他癌种中的表达情况。使用 CRISPR/Cas9 技术构建 LRP1B 敲除的 Lewis 细胞 (KO 组), 选择野生型 Lewis 细胞作为对照组 (NC 组)。免疫印迹法验证上述 2 组细胞中 LRP1B 蛋白的表达。采用 CCK-8 法检测细胞存活率, 划痕实验和细胞侵袭实验检测细胞的迁移和侵袭能力。将制备好的 KO 组或 NC 组细胞悬液注射到 C57BL/6 小鼠右侧腋窝皮下, 分别标记为 KO 组小鼠和 NC 组小鼠, 观察小鼠皮下移植瘤生长情况, 流式细胞术检测荷瘤小鼠移植瘤中骨髓源性抑制细胞 (MDSC) 和 CD8⁺ T 细胞浸润的变化, 免疫组化法检测程序性死亡受体-1 (PD-1) 及其配体 (PD-L1) 的水平。结果 LRP1B 基因在肺腺癌和肺鳞癌组织中的表达水平明显高于癌旁组织。与 NC 组细胞相比, LRP1B 基因敲除后 KO 组细胞的增殖、迁移和侵袭能力均显著增加 ($P < 0.05$)。与 NC 组小鼠相比, KO 组小鼠形成的移植瘤体积明显增加 ($P < 0.05$); 移植瘤中 MDSC 比例显著增加、CD8⁺ T 细胞比例减少, PD-L1、PD-1 表达水平显著增加 ($P < 0.05$)。结论 LRP1B 基因敲除可促进 Lewis 肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 促进 PD-L1、PD-1 表达。

关键词: 肺癌; 低密度脂蛋白受体相关蛋白 1B; 免疫微环境; 免疫浸润细胞; 程序性死亡配体 1; 程序性死亡受体-1

中图分类号: R734.2 文献标志码: A 文章编号: 2096-3882(2024)02-0100-06

DOI: 10.3969/j.issn.2096-3882.2024.02.004

Effect of LRP1B on the proliferation, migration, invasion and immune microenvironment of Lewis cells

LI Yan, YAN Yi, JI Guijuan, ZHANG Wenhui, ZHAO Li, CHEN Bi, CHEN Hao*

(Department of Respiratory and Critical Medicine, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of LRP1B on the proliferation, migration, invasion and immune microenvironment of Lewis cells. **Methods** The expression of LRP1B gene in lung cancer and other cancers was analyzed using TCGA database. We constructed the LRP1B knock-out Lewis cells by CRISPR/Cas9 technique, and set as a KO group. Meanwhile, wild Lewis cells were used as a control (NC) group. Their expression of LRP1B was detected by Western blot. The cell viability was measured by CCK-8 assay. The cell migration and invasion abilities were evaluated by wound healing assay and Transwell assay. The cell suspensions from either the KO group or the NC group were injected into the right armpit of C57BL/6 mice and set as KO mice or NC mice, respectively. The tumor growth in both KO and NC mice was observed. The infiltration of bone marrow-derived suppressor cells (MDSCs) and CD8⁺ T cells in tumor-bearing mice was detected by flow cytometry. The levels of programmed death receptor -1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) were detected by immunohistochemistry. **Results** The expression of LRP1B gene in lung adenocarcinoma and lung squamous cell carcinoma was significantly higher than that in adjacent tissues ($P < 0.05$). Compared with the NC group, LRP1B gene knockout resulted in remarkably increased abilities of proliferation, migration and invasion of the cells in the KO group ($P < 0.05$). Furthermore, compared with the NC mice, the KO mice showed significant increases in the volumes of tumors ($P < 0.05$), increases in the percentage of MDSCs, decreases in the percentage of CD8⁺ T cells and increases in PD-L1 and PD-1 levels ($P < 0.05$). **Conclusions** Knockout of LRP1B gene may promote the proliferation, migration and invasion of Lewis cells, and stimulate the expression of PD-L1 and PD-1.

基金项目: 徐州市科技项目 (KC20063)

* 通信作者, E-mail: 86025618@qq.com

Key words: lung cancer; low-density lipoprotein receptor-related protein 1; immune microenvironment; immune infiltrating cells; programmed death-ligand 1; programmed death-1

肺癌是全球癌症相关死亡的主要原因,其中非小细胞肺癌(NSCLC)占肺癌病例的85%^[1]。近年来,尽管治疗方法有所改善,但NSCLC的死亡率仍然很高,5年生存率不到20%。免疫治疗在NSCLC的治疗中取得重大进展,肿瘤免疫微环境与免疫治疗效果密切相关,故研究肿瘤免疫微环境的影响因素具有重要的意义^[2]。低密度脂蛋白受体相关蛋白1B(LRP1B)是近年来发现的一种候选抑癌基因,在人类正常和肿瘤细胞中广泛表达,并调控肿瘤细胞黏附、增殖、分化和血管生成^[3]。研究发现,LRP1B在近50%的NSCLC细胞系中发生突变^[4]。LRP1B突变与肺癌高肿瘤突变负荷、较好的免疫治疗效果相关^[5-7],可作为免疫检查点抑制剂治疗的预测因子。目前LRP1B突变对免疫微环境的影响研究较少。本研究基于生物信息学发现LRP1B基因在肺癌中存在差异表达,然后以小鼠肺癌细胞系Lewis细胞为研究对象,探究敲除LRP1B对细胞生长、迁移、增殖的影响,并建立LRP1B基因敲除小鼠模型,研究LRP1B缺失对免疫浸润细胞和程序性死亡受体-1(PD-1)及其配体(PD-L1)的影响。

1 材料和方法

1.1 生物信息学分析 从癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA, <https://portal.gdc.cancer.gov/>)数据库中下载不同种类癌症的转录组数据,其中肺癌包括肺腺癌和肺鳞癌,提取LRP1B基因的表达量,得到差异表达图。

1.2 实验材料 小鼠Lewis肺癌细胞系和C57BL/6小鼠购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司。DMEM培养基、0.25%胰酶、胎牛血清、青霉素/链霉素和蛋白变性裂解液、CCK-8溶液购自大连美仑生物技术有限公司。LRP1B单克隆抗体、 β -actin单克隆抗体、CD11b、Gr-1、CD8、CD4、抗体购自Abcam公司。免疫组化PD-1和PD-L1一抗、EnVision聚合物购自北京中杉金桥生物技术有限公司。ECL化学发光检测试剂盒购自Proteintech公司。化学发光图像分析系统(Tanon-4600)购自上海天能科技有限公司。

1.3 细胞培养 小鼠Lewis肺癌细胞置于含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素和100 U/ml链霉素的培养基中,在37℃、95%空气和5% CO₂的恒温箱中培养。当细胞生长至80%~90%汇合度时进行传代培养。

1.4 慢病毒转染 使用Synthego公司的在线CRISPR基因敲除设计工具(<https://www.synthego.com/products/bioinformatics/crispr-design-tool>)设计合成目标sgRNA,并将其插入至lentiv2载体中,构建病毒包装质粒,并与辅助质粒共转染293T细胞,制备病毒。病毒感染Lewis细胞,并通过嘌呤霉素筛选后挑取单克隆,随后通过免疫荧光对敲除细胞进行鉴定,获取稳定敲除LRP1B基因的Lewis细胞。将LRP1B敲除的Lewis细胞设为KO组,选择野生型Lewis细胞作为对照组(NC组)。

1.5 免疫印迹法 将对数生长期细胞接种于细胞培养皿中,培养24 h后裂解细胞,测定蛋白浓度,每孔按30 μ g的蛋白样品进行电泳。电泳结束后,将分离的蛋白转印至PVDF膜。封闭后,一抗和二抗孵育,显色液显影,曝光。采集与分析蛋白条带灰度值,以 β -actin作为对照进行标准化。

1.6 CCK-8法 取对数生长期细胞,以 1×10^4 个细胞/ml的密度接种于96孔板中,100 μ l/孔,培养24 h、48 h、72 h细胞贴壁。加入10 μ l CCK-8溶液,并于37℃下孵育30 min。使用酶标仪检测450 nm处的光密度。

1.7 划痕实验 取对数生长期细胞,以 4×10^5 个细胞/孔的密度接种于6孔板。待细胞生长至贴壁融合,用200 μ l移液管尖刮取细胞。将分离的细胞用PBS清洗并去除后,加入培养基,在37℃、5% CO₂培养箱培养。在显微镜下观察细胞0 h、24 h、48 h后的划痕距离。采用Image J软件测量细胞划痕距离。细胞迁移率(%)=(0 h宽度-48 h宽度)/0 h宽度 $\times 100\%$ 。

1.8 细胞侵袭实验 稀释Matrigel胶,平铺于Transwell小室微膜上备用。取对数生长期细胞,以每孔 0.2×10^5 个细胞的密度接种于Transwell上室内,下室加入500 μ l含10%胎牛血清的培养基,放入37℃、5% CO₂的恒定培养箱培养。培养48 h后,取出上室,PBS洗涤、甲醛固定、结晶紫染色,在显微镜下观察各个小室侵袭细胞状况。随机选取5个视野($\times 200$)拍照,统计侵袭细胞数。

1.9 动物模型的建立 取4~6周龄C57BL/6雌性小鼠40只,12 h/12 h暗/光循环条件下饲养。当Lewis肺癌细胞生长到80%左右时,用胰蛋白酶消化,以1 000转/min离心5 min,PBS洗涤3次,在不含Matrigel血清的DMEM培养基中重新悬浮。将制

备好的 KO 组或 NC 组细胞悬液注射到 C57BL/6 小鼠右侧腋窝皮下,每只接种 1×10^5 个细胞,分别标记为 KO 组小鼠和 NC 组小鼠,每日定时观察小鼠皮下移植瘤生长情况。10 d 后 CO_2 吸入法处死小鼠,取出皮下肿瘤称重,并进行组织学检查。小鼠肿瘤体积计算公式为:体积 = $1/2 L1 \times (L2)^2$,其中 L1 为长轴,L2 为短轴。所有动物实验操作均经徐州医科大学动物伦理委员会批准(202209S094)。

1.10 流式细胞术 取 C57BL/6 小鼠肿瘤组织,用胶原酶消化制备单细胞悬液,每份细胞样品分成 3 份,分别标记骨髓源性抑制细胞(MDSC)($CD11b^+ / Gr-1^+$)、 $CD8^+T$ ($CD8^+$)。采用 FCS Express version 6 软件进行分析。

1.11 免疫组化法 采用免疫组化 EnVision 两步法进行实验。取小鼠肿瘤石蜡组织标本做 $3 \mu m$ 连

续切片,经脱蜡、热抗原修复及血清封闭,分别孵育 PD-1 和 PD-L1 一抗过夜,滴加二抗(Evenson 聚合物)后 DAB 显色,苏木精复染细胞核,中性树脂封片。细胞膜呈现染色的肿瘤细胞为阳性细胞。根据肿瘤细胞阳性细胞比率比较染色强度。

1.12 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。组间数据比较采用单因素或双因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LRP1B 在肺癌亚型及其他肿瘤中的表达 采用 TCGA 数据库分析不同肺癌亚型或其他肿瘤中 LRP1B 基因的表达。结果显示,在肺腺癌和肺鳞癌肿瘤组织中 LRP1B mRNA 的表达水平明显高于对应的癌旁组织,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

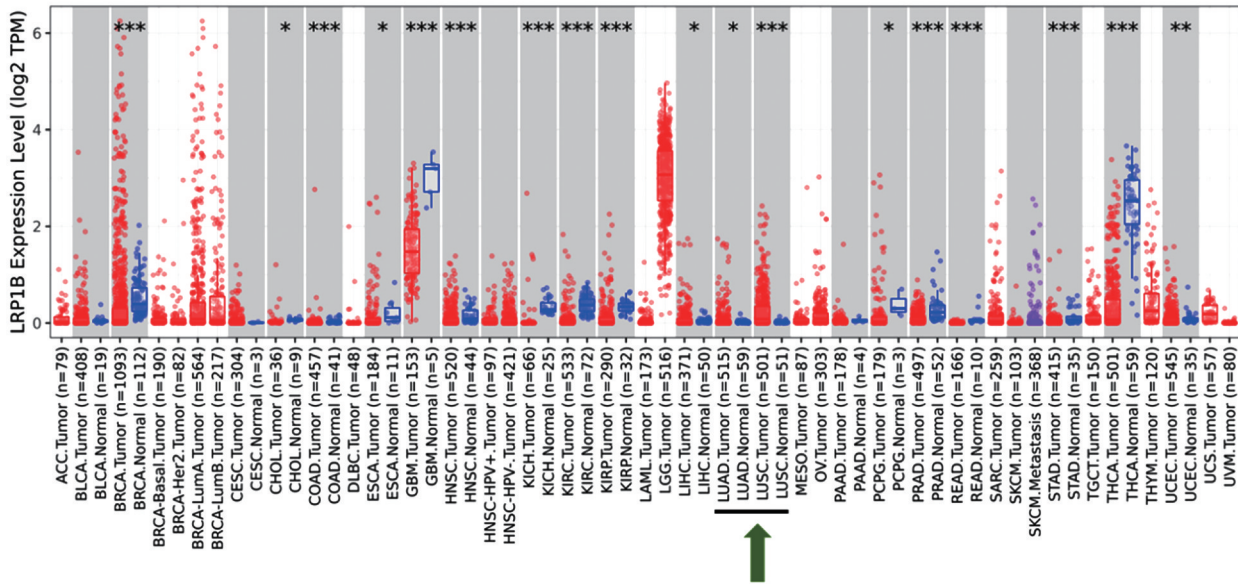
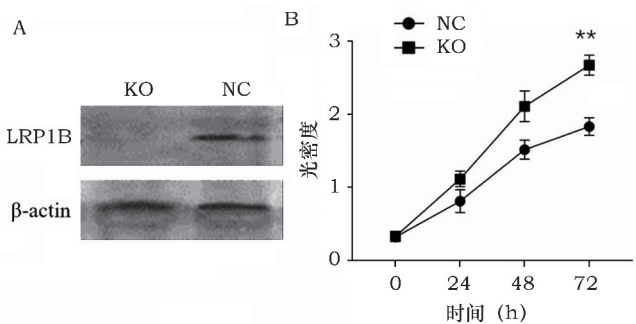


图 1 LRP1B 在肺癌亚型及其他肿瘤中的表达。与对应癌旁组织比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$

2.2 LRP1B 基因敲除对 Lewis 细胞增殖能力的影响 免疫印迹结果显示,与 NC 组细胞相比, KO 组细胞中未见 LRP1B 表达。体外培养 Lewis 细胞,通过 CCK-8 法检测培养 24 h、48 h、72 h 时 KO 组和 NC 组细胞的增殖能力。结果显示,KO 组细胞增殖能力较 NC 组明显增强,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 2)。

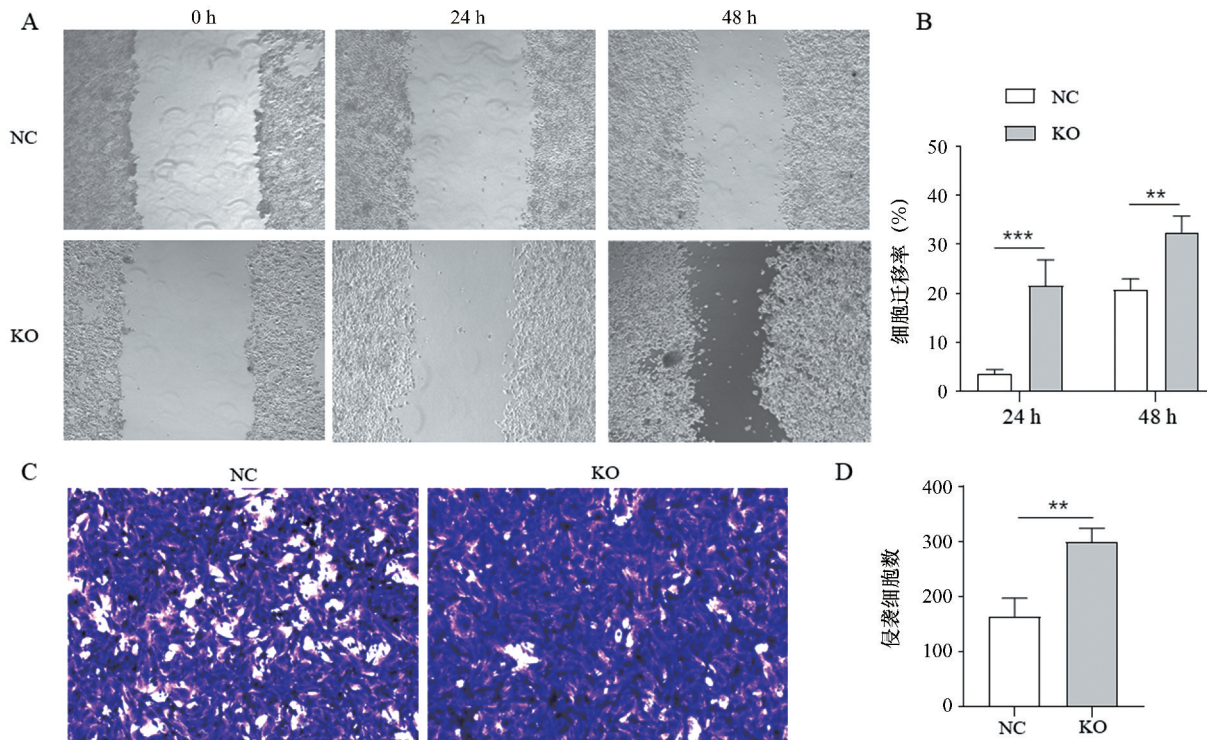


A. LRP1B 基因敲除后 Lewis 细胞中 LRP1B 蛋白表达情况; B. LRP1B 基因敲除对 Lewis 细胞增殖能力的影响。与 NC 组比较,** $P < 0.01$

图 2 LRP1B 基因敲除对 Lewis 细胞增殖能力的影响

2.3 LRP1B 基因敲除对 Lewis 细胞迁移和侵袭能力的影响 划痕实验结果显示,与 NC 组细胞相比, KO 组细胞 LRP1B 基因敲除后 24 h、48 h 时愈合能

力均增强,差异有统计学意义(图 3A、B)。细胞侵袭实验结果显示,与 NC 组相比, KO 组侵袭细胞数显著增加,差异有统计学意义($P < 0.01$,图 3C、D)。



A、B. 划痕实验检测 Lewis 细胞迁移能力($\times 100$) (A)和柱状图分析(B);C、D. 细胞侵袭实验检测 Lewis 细胞侵袭能力($\times 200$) (C)和柱状图分析(D)。与 NC 组比较, $** P < 0.01$, $*** P < 0.001$

图 3 LRP1B 基因敲除对 Lewis 细胞迁移和侵袭能力的影响

2.4 LRP1B 敲除对 C57BL/6 小鼠成瘤能力的影响 构建小鼠肺癌移植瘤模型后 6 周,手术完整剥离

肿瘤组织。结果显示注射 KO 组细胞的 C57BL/6 小鼠瘤体生长速度较 NC 组明显加快(图 4)。

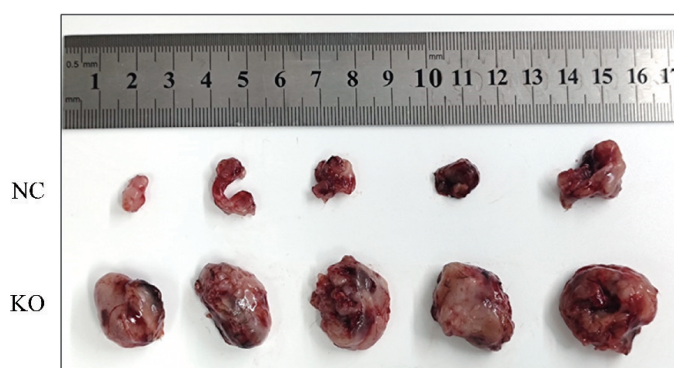


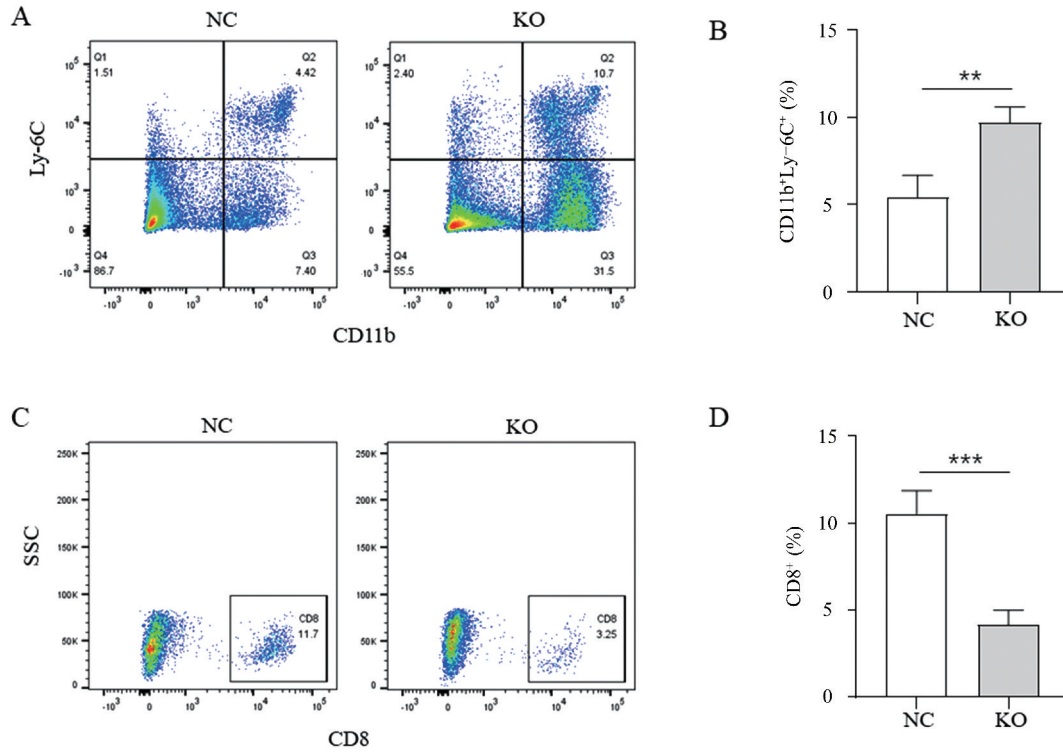
图 4 NC 组和 KO 组肺癌移植瘤外观比较图像($n = 5$)

2.5 LRP1B 敲除对荷瘤小鼠肿瘤组织中 MDSC 和 CD8⁺ T 细胞浸润的影响 流式细胞术结果显示, KO 组小鼠肺癌移植瘤内 MDSC 的比例较 NC 组小鼠明显增加,差异有统计学意义($P < 0.01$,图 5A、

B);与 NC 组小鼠相比, KO 组小鼠肺癌移植瘤内 CD8⁺ T 细胞比例显著下降,差异有统计学意义($P < 0.001$,图 5C、D)。

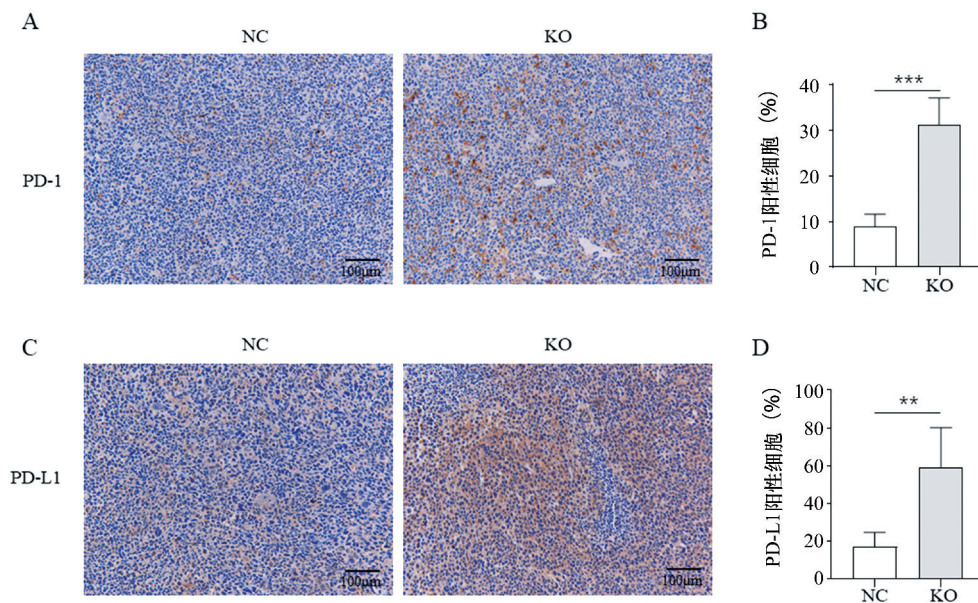
2.6 LRP1B 敲除对肺癌移植瘤内 PD-1 和 PD-L1

表达的影响 免疫组化结果显示,与 NC 组相比,平均明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图 6。



A, B. LRP18 敲除后荷瘤小鼠 MDSC 细胞浸润变化(A)和柱状图分析(B); C, D. LRP1B 敲除后荷瘤小鼠 CD8⁺ T 细胞浸润变化(C)和柱状图分析(D)。与 NC 组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图 5 LRP1B 敲除后荷瘤小鼠 MDSC 和 CD8⁺ T 细胞浸润变化



A, B. LRP1B 敲除后荷瘤小鼠 PD-1 免疫组化染色(A)和柱状图分析(B); C, D. LRP1B 敲除后荷瘤小鼠 PD-L1 免疫组化染色(C)和柱状图分析(D),与 NC 组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图 6 LRP1B 敲除后荷瘤小鼠肿瘤组织中 PD-1 和 PD-L1 的表达变化

3 讨论

LRP1B 是低密度脂蛋白受体家族成员之一,是一种重要的抑癌基因。LRP1B 与多种细胞外配体结合,包括携带纤维蛋白原和载脂蛋白的载脂蛋白 E,并可能参与细胞外配体清除,调节肿瘤微环境和细胞药物摄取。LRP1B 基因改变在肺癌的发病机制中非常重要,在近 50% 的非小细胞肺癌细胞系中,观察到 LRP1B 基因外显子纯合缺失或异常转录致 LRP1B 部分缺失的现象^[3]。LRP1B 缺失与肺癌细胞增殖、转移相关,而 LRP1B 过表达抑制肺癌细胞的增殖。LRP1B 突变也与结肠癌^[8]、胶质母细胞瘤^[9]、黑色素瘤^[10]、尿路上皮瘤、多发性骨髓瘤^[11]、前列腺癌^[12] 等多种癌症的发生和进展相关。研究发现,LRP1B 在肺癌与免疫治疗效果相关,可作为免疫治疗的预测因子,但关于 LRP1B 对肺癌免疫微环境影响的实验性研究较少。

本研究显示,TCGA 数据库分析显示,肺腺癌和肺鳞癌肿瘤组织中 LRP1B mRNA 的表达水平明显高于对应的癌旁组织。与正常的 Lewis 肺癌细胞相比,LRP1B 基因敲除后 Lewis 细胞的增殖、迁移、侵袭能力明显增强;接种至 C57BL/6 小鼠皮下后,移植瘤生长更快,肿瘤组织中 MDSC 比例明显升高,CD8⁺T 比例明显减少。这是首次在动物实验中验证 LRP1B 缺失对肿瘤免疫微环境的影响。

LRP1B 的缺失可能导致肿瘤微环境的改变,从而促进肿瘤生长,增强癌细胞的侵袭能力,影响免疫治疗疗效^[13]。研究发现,LRP1B 突变与多种癌症较好的免疫治疗生存结局有关^[5]。基因富集分析显示,LRP1B 突变与抗原处理提呈通路、T 细胞炎症基因表达谱相关,与较高的肿瘤突变负荷相关。在肺癌中,LRP1B 突变患者肿瘤突变负荷的中值高于野生型患者(组织:17.1 VS 6.0, $P=0.009$;血液:17.5 VS 2.4, $P=0.018$)^[5]。LRP1B 可用作免疫检查点抑制剂治疗的标志物^[7,14]。

PD-L1 与肿瘤的发生和侵袭性密切相关,PD-L1 作为免疫治疗的标记物,与 LRP1B 基因的关系尚不明确。而本研究发现,KO 组小鼠接种 LRP1B 敲除的 Lewis 肺癌细胞后,移植瘤 PD-L1 的表达增加,这可能是免疫治疗临床效果更好的原因。

综上,LRP1B 可能通过调节 CD8⁺T 淋巴细胞功能和免疫相关分子的表达,参与肿瘤免疫微环境的调控,从而影响免疫治疗效果。LRP1B 在肿瘤中诱导免

疫细胞浸润的机制尚不清楚,需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, et al. Cancer statistics, 2023 [J]. CA Cancer J Clin, 2023, 73(1): 17-48.
- [2] 俞丁宁,石映红,钱晖. CD8⁺T 细胞在肿瘤免疫治疗中的应用策略[J]. 江苏大学学报(医学版), 2022, 32(6): 532-536.
- [3] Liu CX, Musco S, Lisitsina NM, et al. Genomic organization of a new candidate tumor suppressor gene, LRP1B [J]. Genomics, 2000, 69(2): 271-274.
- [4] Beer AG, Zenzmaier C, Schreinlechner M, et al. Expression of a recombinant full-length LRP1B receptor in human non-small cell lung cancer cells confirms the postulated growth-suppressing function of this large LDL receptor family member [J]. Oncotarget, 2016, 7(42): 68721-68733.
- [5] Brown LC, Tucker MD, Sedhom R, et al. LRP1B mutations are associated with favorable outcomes to immune checkpoint inhibitors across multiple cancer types [J/OL]. J Immunother Cancer, 2021, 9(3): e001792.
- [6] Wang L, Yan K, He X, et al. LRP1B or TP53 mutations are associated with higher tumor mutational burden and worse survival in hepatocellular carcinoma [J]. J Cancer, 2021, 12(1): 217-223.
- [7] Chen H, Chong W, Wu Q, et al. Association of LRP1B mutation with tumor mutation burden and outcomes in melanoma and non-small cell lung cancer patients treated with immune check-point blockades [J/OL]. Front Immunol, 2019, 10: 1113.
- [8] Wang Z, Sun P, Gao C, et al. Down-regulation of LRP1B in colon cancer promoted the growth and migration of cancer cells [J/OL]. Exp Cell Res, 2017, 357(1): 1-8.
- [9] Tabouret E, Labussiere M, Alentorn A, et al. LRP1B deletion is associated with poor outcome for glioblastoma patients [J]. J Neurol Sci, 2015, 358(1-2): 440-443.
- [10] Langbein S, Szakacs O, Wilhelm M, et al. Alteration of the LRP1B gene region is associated with high grade of urothelial cancer [J]. Lab Invest, 2002, 82(5): 639-643.
- [11] Li B, Liu C, Cheng G, et al. LRP1B polymorphisms are associated with multiple myeloma risk in a Chinese Han population [J]. J Cancer, 2019, 10(3): 577-582.
- [12] Zheng H, Bai L. Hypoxia induced microRNA-301b-3p overexpression promotes proliferation, migration and invasion of prostate cancer cells by targeting LRP1B [J/OL]. Exp Mol Pathol, 2019, 111: 104301.
- [13] Prazeres H, Torres J, Rodrigues F, et al. Chromosomal, epigenetic and microRNA-mediated inactivation of LRP1B, a modulator of the extracellular environment of thyroid cancer cells [J]. Oncogene, 2011, 30(11): 1302-1317.
- [14] Lan S, Li H, Liu Y, et al. Somatic mutation of LRP1B is associated with tumor mutational burden in patients with lung cancer [J]. Lung Cancer, 2019, 132: 154-156.

收稿日期:2023-08-11 修回日期:2023-12-06

本文编辑:郭昊