低频磁场通过调控MDSCs的功能抑制结肠癌的生长

任靖^{1,2}, 窦环¹, 沈苏南¹, 侯亚义^{1*}, 王婷婷^{1*}

1. 南京大学医学院, 医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093;

2. 徐州医科大学基础医学院江苏脑病重点实验室, 徐州 221004

*联系人, E-mail: yayihou@nju.edu.cn; wangtt@nju.edu.cn

2018-11-01 收稿, 2019-01-07 修回, 2019-01-09 接受, 2019-03-04 网络版发表

国家重点研发计划(2017YFA0104303)和国家自然科学基金(81572354, 81772542)资助

摘要 磁场生物效应是当前生物医学工程学界的研究热点. 磁场对人类自身的影响与健康效应已引起人们的普遍关注, 涉及对中枢神经系统、血液和免疫系统、血管与内分泌系统等效应的研究, 其中引人注目的是低频磁场在肿瘤治疗方面的应用. 前期研究发现, 低频磁场能够明显抑制肝癌、肺癌和黑色素瘤细胞的增殖和调控免疫细胞来发挥抑瘤作用. 本研究将进一步探究低频磁场(0.4 T, 7.5 Hz)对结肠癌细胞的生长和髓系来源的抑制性细胞(MDSCs)的影响. 本研究建立了小鼠结肠癌移植瘤模型, 通过流式细胞术、免疫组化、实时定量PCR、蛋白质印记等技术研究了低频磁场对结肠癌和MDSCs的影响. 结果发现, 低频磁场明显抑制CT26结肠癌移植瘤模型的肿瘤生长, 降低了肿瘤组织中的Ki-67阳性细胞数. 低频磁场降低了肿瘤组织中MDSCs的细胞比例并减弱了MDSCs的抑制功能. 体外实验发现低频磁场通过抑制了 $Gp91^{phox}$ 和 $P47^{phox}$ 的表达降低了MDSCs的活性氧(ROS)产生, 抑制了MDSCs的功能, 进而发挥对结肠癌治疗作用.

关键词 低频磁场, 结肠癌, 髓系来源的抑制性细胞, 活性氧, $Gp91^{phox}$, $P47^{phox}$

结肠癌是消化道常见的恶性肿瘤, 其发生被认为与饮食、环境、遗传等密切相关. 随着饮食习惯及生活环境的迅速改变, 我国结肠癌的发病率也不断攀升. 手术切除是局部早期结肠癌的主要治疗方式, 同时化疗和放疗可以增加结肠癌患者治愈的机会. 虽然放疗和化疗在过去表现出较好的治疗效果, 但大约三分之二的结肠癌患者不可避免地死于肿瘤的复发和转移, 而且其毒性和副作用是结肠癌治疗的瓶颈. 因此, 寻求新的结肠癌治疗手段和策略至关重要.

磁场对肿瘤发展的生物学效应已被广泛研究^[1,2]. 流行病学研究表明, 童年期白血病风险增加与居住区磁场有关^[3]. 尽管许多动物研究探究了磁场的致癌性

和安全性, 并未提供磁场暴露致癌作用的直接证据^[4,5]. 值得注意的是, 低频磁场因为其具有对细胞和组织非侵入性, 非电离和非热效应的特性, 已被用于研究各种疾病, 包括癌症、疼痛和痉挛状态的减少^[1,6,7].

许多研究发现磁场能通过提高细胞内 Ca^{2+} 浓度、增强细胞氧化应激反应、调控细胞凋亡信号通路等方式诱导细胞凋亡^[8-10]. 体外实验发现低频磁场能够通过ROS产生抑制前列腺癌细胞生长并诱导细胞凋亡和细胞周期停滞^[9]. 体内研究证实了低频磁场的抗肿瘤作用, 包括促进肿瘤体积减小、存活时间延长^[11,12]. 关于磁场抑制肿瘤生长的作用, Strieth等人^[13-15]用磁场强度不等的静磁场对荷瘤的仓鼠进行暴露, 发现磁场暴露

引用格式: 任靖, 窦环, 沈苏南, 等. 低频磁场通过调控MDSCs的功能抑制结肠癌的生长. 科学通报, 2019, 64: 869-878

Ren J, Dou H, Shen S N, et al. LF-MF suppresses the colon cancer via regulating the function of MDSCs (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 869-878, doi: 10.1360/N972018-00603

能够降低肿瘤微血管的红细胞流速和血流量,增加血小板在血管内皮细胞黏附作用,降低血管内皮生长因子受体的表达,进而减少了肿瘤组织局部血供。研究发现磁场有增强化疗药物疗效的作用,静磁场联合紫杉醇对荷瘤小鼠进行治疗发现磁场可以增强紫杉醇的杀伤效果^[14]。El-Bialy和Rageh^[16]也发现在荷Ehrlich腹水瘤小鼠治疗过程中,10 mT的极低频磁场联合顺铂能够改变细胞膜通透性明显增强顺铂的治疗效果。我们前期研究探究了不同参数的低频磁场对胃癌细胞的抑制作用,在我们的磁场系统中选择了7.5 Hz作为低频磁场的最适频率^[17]。我们还发现低频磁场(0.4 T, 7.5 Hz)抑制胃癌、肝细胞癌和黑色素瘤细胞的生长,并调控了荷瘤小鼠的免疫系统^[17~20]。在黑色素瘤肺转移小鼠模型中,我们发现低频磁场调控了炎性细胞因子在血清中的水平并调控了调节性T细胞(Treg)的分化^[19]。在小鼠肝癌模型中,我们发现低频磁场促进外周血中CD4阳性和CD8阳性T细胞的极化,调控了辅助性T细胞17(Th17)/Treg平衡并减弱了脾脏中Treg细胞的抑制功能。同时,低频磁场减少了肝癌细胞中F4/80阳性巨噬细胞的数量并显著增加树突状细胞的数量^[18]。髓系来源的抑制性细胞(MDSCs)是近年广泛研究的具有免疫抑制功能的细胞群,且其在多种疾病中的作用正日益受到关注。在肿瘤部位和感染区域,MDSCs呈现募集活化,参与免疫逃逸、免疫耐受以及炎性反应等病理过程^[21~23]。然而,低频磁场在结肠癌治疗过程中是否参与调控了MDSCs在体内的比例和功能尚不清楚。本研究通过建立CT26结肠癌小鼠模型,探究了低频磁场(0.4 T, 7.5 Hz)对小鼠结肠癌生长的抑制作用。同时本研究以MDSCs为主要的关注点,进一步探究低频磁场对MDSCs的影响。结果发现低频磁场明显抑制CT26结肠癌移植瘤模型的肿瘤生长,降低了肿瘤组织中MDSCs的细胞比例,并通过抑制了*Gp91^{phox}*和*P47^{phox}*减弱了MDSCs的抑制功能。本研究在结肠癌动物模型上进一步证实了低频磁场(0.4 T, 7.5 Hz)对肿瘤的抑制作用,提示我们低频磁场可能具有广谱的抗肿瘤作用并展现出诱人的生物医学领域的应用前景。

1 材料和方法

(i) 主要试剂与仪器。小鼠结肠癌细胞系CT26购自美国模式菌种收集中心。FBS(货号: 10099-141-FBS)和RPMI1640培养基(货号: 61870044)均购于美国Gibco公司。细胞培养板(货号: 430165)购自上海康宁公司;

RNA反转试剂盒(货号: RR037A)购自日本Takara公司; TRIZOL Reagent(货号: 15596026), PCR引物序列购自美国Invitrogen公司。本研究使用的低频旋转磁疗仪如之前所述^[17~19]。低频旋转磁疗仪器如图1所示。

(ii) 动物模型。将 5×10^5 个CT26细胞注射到雌性BALB/c小鼠(6~8周)的腋下右侧。用低频磁场(0.4 T, 7.5 Hz)或假磁场照射BALB/c荷瘤小鼠35 d(2 h/d)。使用公式 $V=(ab^2)/2$ 计算肿瘤体积^[24,25], 其中 a 是肿瘤块长轴, b 是短轴。所有动物的实验均经过南京大学医学院附属鼓楼医院医学伦理委员会批准。

(iii) 细胞培养。小鼠结肠癌CT26细胞和MDSCs均培养于10%FBS的RPMI1640培养基并置于37℃, 5% CO₂的细胞培养箱中。操作均在超净工作台中完成。

(iv) 实时荧光定量PCR。Trizol法提取细胞总RNA, 检测RNA纯度。取1 μg RNA进行逆转录得模板, 稀释相应cDNA进行荧光定量PCR检测*Arg-1*, *iNOS-2*, *Gp91^{phox}*, *P47^{phox}*和*S100A8/A9*的表达水平。相关引物如下: *Arg1*上游: 5'-CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG-3', 下游: 5'-GGAGCTGTCATTAGGGACATCA-3'; *iNOS-2*上游: 5'-CCTCACCTACTTCC-3', 下游: 5'-TGAGGGCTGACACAAGG-3'; *S100A9*上游: 5'-GCA-CAGTTGGCAACCTTTATG-3', 下游: 5'-TGATTGTCCTGGTTTGTGTCC-3'; *S100A8*上游: 5'-AAATCACCATGCCCTCTACAAG-3', 下游: 5'-CCCACCTTTATCACCATCGCAA-3'; *P47^{phox}*上游: 5'-AGAACAGAGTCATCCACAC-3', 下游: 5'-GCTACGTTATTCTTGCCATC-3'; *Gp91^{phox}*上游: 5'-TCACATCCTCTACCAAAACC-3', 下游: 5'-CCTTTATTTTCCCCATTCT-3'; *GAPDH*上游: 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTG-3', 下游: 5'-GGGGTCGTTGATGGCAACA-3'。反应在荧光定量PCR仪(StepOnePlus™, Life Technologies公司)中进行, 得到的各基因C_t值, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法分析目的基因表达, *GAPDH*为内参。

(v) Western blot 检测。MDSC细胞经过磁场照射处理后, PBS洗两次并收集。使用裂解液(P0013, 上海碧云天生物技术公司)裂解收集的细胞, 将裂解产物进行离心(15000×g, 20 min), 并收集上清。使用BCA试剂盒(P0009, 上海碧云天生物技术公司)检测蛋白质浓度。蛋白样品在SDS聚丙烯酰胺凝胶中分离, 并转移到PVDF膜上, 经过封闭、孵一抗、洗膜、孵二抗、洗膜和使用曝光显影获得蛋白条带图像。过程中使用的小鼠一

图 1 (网络版彩色)低频旋转磁仪器. (a) 安排两对扇形NdFeB永磁体以建立磁场, 目标位置的磁场是最大通量密度约为0.4 T. (b) 具有类似结构的小型仪器, 可在Thermo Scientific Forma Series II 3120 CO₂培养箱中安装并用于细胞实验

Figure 1 (Color online) Magnetic field exposure system. Two pairs of fan-shaped NdFeB permanent magnets were arranged to establish magnetic fields. (b) The smaller instrument with similar structure to generate 0.4 T and 7.5 Hz LF-MF installed in Thermo Scientific Forma Series II 3120 Water-Jacketed CO₂ Incubators

抗GAPDH(cell signaling technology, #5174, 1:1000), P47^{phox}(cell signaling technology, #4312, 1:1000)和Gp91^{phox}(Santa Cruz Biotechnology, sc-130549, 1:1000); 辣根过氧化物酶标记的二抗(A0208, 1:2000)和ECL显影液(P0018M) 购于上海碧云天生物技术公司.

(vi) MDSCs流式检测. 将待测细胞收集于流式管中, 4℃, 300×g离心5 min, 弃上清. 每管加入等量APC-CD11b(# 47-0112-82, Ebioscience)和PE-GR-1(# 25-5931-82, Ebioscience)流式抗体, 4℃孵育30 min, 每管加入1 mL PBS清洗掉未结合的抗体, PBS重悬后上机检测, 检测时流式细胞仪(FACS Calibur, BD)选择APC及PE通道, 通过圈定双阳性群来确定MDSCs细胞. 实

验流式抗体均购买于Ebioscience公司.

(vii) 细胞凋亡实验. MDSCs细胞在经过相应时间磁场照射后, 收集于流式管进行细胞凋亡检测. 细胞进行清洗两遍(300×g离心5 min), 倒掉上清后每管加200 μL 1×的结合缓冲液重悬细胞. 每管加入1 μL Annexin V-FITC, 混匀, 避光放入4℃冰箱15 min; 每管加2 μL PI(终浓度1 μg/mL), 混匀, 避光室温放置5 min后流式细胞仪(FACS Calibur, BD)检测.

(viii) 磁珠分离MDSCs细胞. 为了纯化分离MDSC, 根据制造商的说明使用MDSC分离试剂盒(130-094-538, Miltenyi Biotec)进行分离^[26].

(ix) MDSCs抑制T细胞增殖实验. 首先分离CD4⁺ T

细胞. 取小鼠脾脏, 进行研磨后过200目筛网. 用红细胞裂解液裂解红细胞后得到脾脏总细胞. 利用小鼠CD4⁺ T细胞磁珠分选试剂盒(130-116-480, Miltenyi Biotec)分选, 参照说明书, 分离获得小鼠脾脏CD4⁺ T细胞. 经流式细胞术检测, 分离获得的CD4⁺ T细胞纯度大于95%. 使用细胞CFSE增殖试剂盒(C34554, thermofisher), 按照制造商使用说明对CD4⁺ T进行CFSE荧光标记. 10⁵细胞每孔, 按照1:1的比例与处理后的MDSCs进行共培养, 共培养体系中加入1 μ g/mL的anti-CD3抗体、0.5 μ g/mL anti-CD28抗体和2 ng/mL的IL-2, 共培养3 d后, 收集T细胞, 流式细胞仪(FACS Calibur, BD)检测.

(x) 免疫组化. 肿瘤组织使用福尔马林固定并进行石蜡包埋. 之后蜡样本二甲苯脱蜡, 梯度酒精脱水, 用0.3%的过氧化氢处理标本15 min进行内源性过氧化物酶的灭活. 组织在0.01 mol/L柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)中用煮沸(15 min), 自然冷却20 min; 5%的BSA封闭后孵育Ki-67抗体(#9449, 1:200, cell signaling technology)过夜; 之后孵育生物素标记二抗, DAB/H₂O₂反应染色, 苏木素复染, 中性树胶封片.

(xi) 细胞ROS水平检测. 使用DCFDA法检测MDSCs中ROS的水平. 将处理后的MDSCs分别收至流式管中, 加入1 mL细胞培养基, 加入1 μ L DCFDA试剂(S0033, 上海碧云天生物技术公司)以及100 ng/mL LPS(S1732-0.5 mg, 上海碧云天生物技术公司), 置于37°C恒温的CO₂培养箱, 培养20 min, 期间每隔5 min震摇1次. 然后离心去上清, 细胞培养基清洗3次上机检测, 随后立刻用流式细胞仪(FACS Calibur, BD)选择FITC通道进行检测.

(xii) 统计学方法. 本研究所运用的统计学软件为SPSS 16.0以及Prism 5.0(version 5.0, Graphpad Software Inc.). 所有数据以mean $\pm$ S.E.M表示, 多组间比较采用单因素方差分析. 两组比较采用*t*-test, *P*<0.05为具有显著差异. 实验结果均重复3次以上. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001.

2 结果

2.1 低频磁场抑制结肠癌小鼠肿瘤的生长

为了探究低频磁场对结肠癌的治疗作用, 首先建立了CT26结肠癌小鼠模型. 检查了低频磁场在CT26结肠癌小鼠模型中的生物学效应. 接种CT26细胞的小鼠暴露于假磁场或低频磁场(0.4 T, 7.5 Hz)中35 d(2 h/d).

结果显示, 与假磁组相比, 照磁组的小鼠肿瘤生长明显受到抑制(图2(a)和(b)), 但两组小鼠的脾脏重量和体积并没有明显差异(图2(c)和(d)). Ki-67免疫组化染色显示, 照磁组肿瘤组织中的Ki-67阳性细胞要明显少于假磁组(图2(e)和(f)). 这些结果表明低频磁场明显抑制了结肠癌小鼠肿瘤的生长, 但是对小鼠其他器官并没有显著的影响.

2.2 低频磁场降低肿瘤中MDSCs的细胞比例并减弱MDSCs的抑制功能

为了进一步探究低频磁场对MDSCs的影响, 分别检测了治疗后小鼠的骨髓、脾脏、肿瘤和外周血中的MDSCs的比例. 结果显示, 低频磁场能够明显降低了肿瘤组织中MDSCs的细胞比例(图3(a)和(b)). 然而, 低频磁场对小鼠骨髓、脾脏和外周血中的MDSCs细胞比例没有影响(图3(a)和(b)). 既然低频磁场能够明显降低了肿瘤组织中MDSCs的细胞比例, 那么低频磁场是否影响了肿瘤中MDSCs的功能. 我们进一步对肿瘤组织中的MDSCs进行了分离并检测了其T细胞增殖抑制功能的影响. 如图3(c)和(d)显示, 照磁组肿瘤中的MDSCs对T细胞增殖的抑制作用明显减弱. 低频磁场明显抑制了MDSCs的功能.

2.3 体外低频磁场抑制MDSCs的功能

结肠癌模型中, 低频磁场治疗后肿瘤组织中的MDSCs的抑制功能明显降低. 那么, 低频磁场是否能够在体外影响的骨髓来源的MDSCs功能? 我们分离骨髓来源的MDSCs, 磁珠分离进一步纯化MDSCs(图4(a)). 首先我们检测了低频磁场对MDSCs活力和细胞凋亡的影响. 结果显示, 低频磁场照射(0, 2和4 d, 2 h/d)对体外培养的MDSCs的活力和细胞凋亡没有明显影响(图4(b)和(c)). 接下来我们用照磁后的MDSCs进行MDSCs抑制实验, 评估MDSCs的功能情况. 如图4(d)和(e), 体外磁场照射后的MDSCs对T细胞增殖的抑制功能明显减弱. MDSCs体外照射磁场获得了与动物模型中一致的结果. 总之, 低频磁场对MDSCs的活力和细胞凋亡没有影响却减弱了其抑制功能.

2.4 低频磁场通过抑制Gp91^{phox}和P47^{phox}的表达降低MDSCs中ROS产生

为了进一步探究低频磁场影响MDSCs功能的机制, 检测与MDSCs中的其功能相关的基因(*Arg-1*,

图 2 (网络版彩色)低频磁场抑制CT26结肠癌鼠的肿瘤生长. 用低频磁场(0.4 T, 7.5 Hz)或假磁场将照射BALB/c荷瘤小鼠(每组 $n=4$)35 d(2 h/d). (a) 低频磁场治疗后肿瘤照片. (b) 在低频磁场治疗期间的肿瘤生长曲线和肿瘤质量统计. (c) 治疗后小鼠脾脏的代表图. (d) 小鼠脾脏的平均重量. (e) Ki-67免疫组织化学染色的代表图. 比例尺, 100 μm . (f) Ki-67免疫组织化学染色后统计Ki-67的阳性细胞数目. * $P<0.05$ 和*** $P<0.001$

Figure 2 (Color online) LF-MF inhibit tumor growth of CT26 colorectal carcinoma murine model. BALB/c mice ($n=4$ each group) subcutaneously inoculated with CT26 cells (5×10^5) were exposed to LF-MF (0.4 T, 7.5 Hz) or Sham MF for 35 d (2 h/d). (a) Representative images of tumors after treatment of MF or Sham MF. (b) Growth curve and weight of tumors was calculated during treatment of MF or Sham MF. (c) Representative images of spleen. (d) The average weight of spleen. (e), (f) Representative images of immunohistochemical (IHC) staining for Ki-67. Scale bars, 100 μm . Positive cells of Ki-67 were counted. Data represent one of two independent experiments. Data represent Mean $\pm$ SEM. * $P<0.05$ and *** $P<0.001$

iNOS-2, *Gp91^{phox}*, *P47^{phox}*和*SI00A8/A9*)的表达. 如图5(a)所示, 动物模型中低频磁场照射明显降低了*Gp91^{phox}*和*P47^{phox}*信使RNA水平. 鉴于*Gp91^{phox}*和*P47^{phox}*作为NADPH氧化酶亚基在ROS产生中的重要作^[27], 我们推测低频磁场可能影响了MDSCs的ROS的产生. 流式细胞术检测发现, 照磁组小鼠模型肿瘤组织中的MDSCs表现出较低的ROS水平(图5(b)和(c)). 既然小鼠模型中低频磁场降低了MDSCs中ROS的水平, 那么体外磁场照射是否能影响MDSCs细胞ROS水平? 我们接下来分离骨髓来源的MDSCs细胞并进行低频磁场照射. 我们发现体外磁场照射明显降低了MDSCs ROS水平(图5(d)和(e)). 同时发现低频磁场降低了MDSCs中*Gp91^{phox}*和*P47^{phox}*信使RNA和蛋白水平(图5(f)和(g)). 以上结果

显示, 低频磁场能够通过抑制*Gp91^{phox}*和*P47^{phox}*的表达降低MDSCs ROS的产生. ROS作为MDSCs发挥T细胞增殖抑制功能的重要媒介, 结果提示低频磁场通过抑制了MDSCs的ROS产生减弱MDSCs的抑制功能, 进而抑制了肿瘤的生长.

3 讨论

CT26结肠癌小鼠模型中, 我们发现低频磁场(0.4 T, 7.5 Hz)明显抑制了小鼠结肠癌的生长, 减少了肿瘤组织中Ki-67的阳性表达. 这与在肝癌模型和路易斯肺癌模型中得出的结论是一致的. 前期实验我们发现低频磁场抑制胃癌、肝细胞癌、肺癌和黑色素瘤细胞的增殖. 低频磁场也有可能直接参与对结肠癌细胞

图3 (网络版彩色)低频磁场降低了肿瘤中MDSCs的细胞比例并减弱了MDSCs的抑制功能。(a), (b) 流式细胞术检测治疗后小鼠的骨髓、脾脏、肿瘤和外周血中的MDSCs的比例并进行统计分析。(c) 磁珠分离肿瘤组织中MDSCs, MDSCs抑制试验检测MDSCs功能的改变。CFSE亚群T细胞比例代表图。(d) 对CFSE亚群T细胞比例的统计分析。* $P<0.05$ 和** $P<0.01$

Figure 3 (Color online) LF-MF reduces the proportion of MDSCs cells in tumors and attenuates the suppressive function of MDSCs. (a), (b) Flow cytometry analyzed the proportion of MDSCs in the bone marrow, spleen, tumor, and peripheral blood of mice. (c) Magnetic beads separated MDSCs from tumor tissue and MDSCs suppression assays were performed. (d) Statistical analysis of CFSE subpopulation of T cell. * $P<0.05$ and ** $P<0.01$

增殖的抑制。本研究并未研究低频磁场对结肠癌细胞的直接作用,而是从体内出发以在肿瘤免疫中发挥着重要的MDSCs为对象进行深入探究。

MDSC是一群未成熟和异质性的细胞群体,与成熟髓系来源的成熟细胞(巨噬细胞、树突状细胞以及中性粒细胞等)有着显著的区别。MDSCs由两大亚群细胞组成:粒细胞或多形核MDSCs(G-MDSC)和单核细胞样MDSC(M-MDSC)。在小鼠中MDSCs被定义为表达髓系

抗原GR-1和CD11b的细胞($CD11b^{+}GR-1^{+}$)^[28]。目前认为,MDSCs发挥免疫抑制功能主要依赖于精氨酸酶(ARG-1)^[29],一氧化氮合酶(iNOS)^[28],ROS^[30,31],IL-1 β ^[32],IDO^[33]等因子的产生。G-MDSCs抑制T细胞的免疫反应是抗原依赖性的,主要通过ROS发挥免疫抑制功能^[30,31]。我们结果显示低频磁场降低了肿瘤中MDSCs的细胞比例并减弱了MDSCs的抑制功能。为了进一步探究低频磁场影响MDSCs功能的机制,检测了

图 4 (网络版彩色)低频磁场体外抑制MDSCs的功能。(a) 流式细胞术检测磁珠分离前后的MDSCs比例。(b) 低频磁场照射后, MDSCs细胞活力检测。(c) 低频磁场照射后, MDSCs细胞凋亡检测。(d) 低频磁场照射后, MDSCs抑制试验检测MDSCs功能的改变。CFSE亚群T细胞比例代表图。(e) 对CFSE亚群T细胞比例的统计分析。* $P < 0.05$

Figure 4 (Color online) LF-MF inhibits the function of MDSCs *in vitro*. (a) Flow cytometry was used to determine the proportion of MDSCs before and after magnetic bead separation. (b) The cell viability of MDSCs after the treatment with LF-MF was analyzed. (c) The cell apoptosis of MDSCs after the treatment with LF-MF. (d) MDSCs suppression assays were performed after the treatment with LF-MF. (e) Statistical analysis of CFSE subpopulation of T cell. * $P < 0.05$

与MDSCs中的MDSCs功能相关的基因(*Arg-1*, *iNOS-2*, *Gp91^{phox}*, *P47^{phox}*和*S100A8/A9*)的表达。结果发现动物模型中低频磁场照射明显降低了*Gp91^{phox}*和*P47^{phox}*信使RNA水平。照磁组小鼠模型肿瘤组织中的MDSCs表现出较低的ROS水平。我们发现低频磁场通过抑制*Gp91^{phox}*和*P47^{phox}*的表达降低MDSCs中ROS的产生。这样一来, MDSCs通过ROS发挥对T细胞的免疫抑制作用将明显降低。鉴于G-MDSCs抑制T细胞的免疫反应主要通过ROS发挥功能, 我们怀疑低频磁场是否改变了MDSCs两大亚群的分群。这个问题需要我们在接下来的工作中进一步探索。

关于磁场对ROS产生的研究已有不少报道并且结论不一致。尽管在许多情况下, 磁场增加人类、小鼠、大鼠细胞和植物中的ROS水平, 但也有许多研究表明磁场照射能够降低ROS水平或对ROS的产生没有影响^[34]。在静磁场照射1 h后(150~200 mT), 大豆中的ROS产生增加并增强种子萌发和幼苗生长^[35]。人羊膜上皮细胞在低频电磁场(0.4 mT, 50 Hz)照射15 min后, ROS水平显著增加并诱导*EGFR*簇的表达^[36]。神经小胶质细胞在电磁场(1 mT, 50 Hz)照射4 h后, 细胞内的Ca(2+)和ROS水平降低^[37]。人外周血中性粒细胞在静

磁场(60 mT)下照射15 min, 细胞内ROS的产生明显降低^[38]。我们的实验中小鼠MDSCs细胞在低频磁场(0.4 T, 7.5 Hz)2 h后, 细胞ROS水平明显降低。造成这种结果差异的因素是多种的, 包括磁场的类型、磁场的强度、频率、暴露时间、测定的时间点以及实验对象。系统的研究磁场对各种生物样品ROS的影响有助于我们全面深入地了解磁场的生物效应进而推动磁场尤其是低频旋转磁场等在内的动态磁场在生物医学领域的应用。

4 结论

本研究通过CT26结肠癌小鼠模型, 发现了低频磁场(0.4 T, 7.5 Hz)明显抑制了小鼠结肠癌的生长, 减少了肿瘤组织中Ki-67的阳性表达。而且低频磁场明显降低了结肠癌肿瘤组织中MDSCs的细胞比例并减弱了MDSCs的抑制功能。体外实验发现低频磁场通过抑制了*Gp91^{phox}*和*P47^{phox}*的表达降低了MDSCs的活性氧(ROS)产生, 抑制了MDSCs的功能, 进而对结肠癌发挥治疗作用。本研究从免疫细胞MDSCs入手, 发现了新的磁场发挥生物效应的调控方式, 为结肠癌的治疗提供了潜在辅助治疗手段。

图 5 低频磁场通过抑制了 $Gp91^{phox}$ 和 $P47^{phox}$ 的表达降低了 MDSCs 的 ROS 产生。(a) 实时荧光定量 PCR 检测小鼠肿瘤组织中 MDSCs 的 *Arg-1*, *iNOS-2*, $Gp91^{phox}$, $P47^{phox}$ 和 *S100A8/A9* 信使 RNA 水平变化。(b) 流式细胞术检测小鼠肿瘤组织中 MDSCs 的 ROS 水平。(c) 对 (b) 图中 DCFDA 平均荧光强度的统计分析。(d) 骨髓来源的 MDSCs 进行体外照射低频磁场 (2 d, 2 h/d), 流式细胞术检测 MDSCs 的 ROS 水平。(e) 对 (d) 图中 DCFDA 平均荧光强度的统计分析。(f) 骨髓来源的 MDSCs 进行体外照射低频磁场 (2 d, 2 h/d), 实时荧光定量 PCR 检测 MDSCs 的 $Gp91^{phox}$ 和 $P47^{phox}$ 信使 RNA 水平变化。(g) 骨髓来源的 MDSCs 进行体外照射低频磁场 (2 d, 2 h/d), Western Blot 检测 $Gp91^{phox}$ 和 $P47^{phox}$ 蛋白表达变化。* $P < 0.05$ 和 ** $P < 0.01$

Figure 5 LF-MF reduces the ROS production in MDSCs by inhibiting the expression of $Gp91^{phox}$ and $P47^{phox}$. (a) Q-PCR was performed to detect the mRNA expression of *Arg-1*, *iNOS-2*, $Gp91^{phox}$, $P47^{phox}$, and *S100A8/A9* in MDSCs of tumor tissues. (b), (c) Flow cytometry was used to detect ROS levels in MDSCs in mouse tumors tissues. Statistical analysis of the mean fluorescence intensity of DCFDA. (d), (e) Bone marrow-derived MDSCs were exposed to LF-MF *in vitro* (2 d, 2 h/d) and flow cytometry was used to detect ROS levels in MDSCs. Statistical analysis of the mean fluorescence intensity of DCFDA. (f) Bone marrow-derived MDSCs were exposed to a LF-MF *in vitro* (2 d, 2 h/d) and Q-PCR was used to detect changes in $Gp91^{phox}$ and $P47^{phox}$ mRNA levels in MDSCs. (g) Bone marrow-derived MDSCs were exposed to a LF-MF *in vitro* (2 d, 2 h/d) and Western Blot detected the protein level of $Gp91^{phox}$ and $P47^{phox}$. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$

参考文献

- Ghodbane S, Lahbib A, Sakly M, et al. Bioeffects of static magnetic fields: Oxidative stress, genotoxic effects, and cancer studies. *Biomed Res Int*, 2013, (4): 1–12
- Lagroye I, Percherancier Y, Juutilainen J, et al. ELF magnetic fields: Animal studies, mechanisms of action. *Prog Biophys Mol Biol*, 2011, 107: 369–373
- Humans IWGotEoCrt. Non-ionizing radiation, part 1: Static and extremely low-frequency (ELF) electric and magnetic fields. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 2002, 80: 1–395
- Juutilainen J. Do electromagnetic fields enhance the effects of environmental carcinogens? *Radiat Prot Dosimetry*, 2008, 132: 228–231
- Juutilainen J, Kumlin T, Naarala J. Do extremely low frequency magnetic fields enhance the effects of environmental carcinogens? A meta-analysis of experimental studies. *Int J Radiat Biol*, 2006, 82: 1–12
- Chung M K, Yu W J, Kim Y B, et al. Lack of a co-promotion effect of 60 Hz circularly polarized magnetic fields on spontaneous development of lymphoma in AKR mice. *Bioelectromagnetics*, 2010, 31: 130–139
- Mariucci G, Villarini M, Moretti M, et al. Brain DNA damage and 70-kDa heat shock protein expression in cd1 mice exposed to extremely low frequency magnetic fields. *Int J Radiat Biol*, 2010, 86: 701–710
- Li J, Ma Y, Li N, et al. Natural static magnetic field-induced apoptosis in liver cancer cell. *ElectroMagn Biol Med*, 2014, 33: 47–50
- Koh E K, Ryu B K, Jeong D Y, et al. A 60-Hz sinusoidal magnetic field induces apoptosis of prostate cancer cells through reactive oxygen species. *Int J Radiat Biol*, 2008, 84: 945–955
- Zhang X, Liu X, Pan L, et al. Magnetic fields at extremely low-frequency (50 Hz, 0.8 mT) can induce the uptake of intracellular calcium levels in

- osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396: 662–666
- 11 de Seze R, Tuffet S, Moreau J M, et al. Effects of 100 mT time varying magnetic fields on the growth of tumors in mice. *Bioelectromagnetics*, 2000, 21: 107–111
- 12 Bellossi A, Desplaces A. Effect of a 9 mT pulsed magnetic field on C3H/BI female mice with mammary carcinoma. A comparison between the 12 Hz and the 460 Hz frequencies. *In Vivo*, 1991, 5: 39–40
- 13 Strieth S, Strelczyk D, Eichhorn M E, et al. Static magnetic fields induce blood flow decrease and platelet adherence in tumor microvessels. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7: 814–819
- 14 Gellrich D, Becker S, Strieth S. Static magnetic fields increase tumor microvessel leakiness and improve antitumoral efficacy in combination with paclitaxel. *Cancer Lett*, 2014, 343: 107–114
- 15 Delle Monache S, Angelucci A, Sanità P, et al. Inhibition of angiogenesis mediated by extremely low-frequency magnetic fields (ELF-MFS). *PLoS ONE*, 2013, 8: e79309
- 16 El-Bialy N S, Rageh M M. Extremely low-frequency magnetic field enhances the therapeutic efficacy of low-dose cisplatin in the treatment of ehrlich carcinoma. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 189352
- 17 Wang T, Nie Y, Zhao S, et al. Involvement of midkine expression in the inhibitory effects of low-frequency magnetic fields on cancer cells. *Bioelectromagnetics*, 2011, 32: 443–452
- 18 Nie Y, Chen Y, Mou Y, et al. Low frequency magnetic fields enhance antitumor immune response against mouse H22 hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE*, 2013, 8: e72411
- 19 Nie Y, Du L, Mou Y, et al. Effect of low frequency magnetic fields on melanoma: Tumor inhibition and immune modulation. *BMC Cancer*, 2013, 13: 582
- 20 Tang R, Xu Y, Ma F, et al. Extremely low frequency magnetic fields regulate differentiation of regulatory T cells: Potential role for ROS-mediated inhibition on akt. *Bioelectromagnetics*, 2016, 37: 89–98
- 21 Gabrilovich D I, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9: 162–174
- 22 Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, et al. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8⁺ T cell tolerance in cancer. *Nat Med*, 2007, 13: 828–835
- 23 Lu T, Ramakrishnan R, Altiok S, et al. Tumor-infiltrating myeloid cells induce tumor cell resistance to cytotoxic T cells in mice. *J Clin Invest*, 2011, 121: 4015–4029
- 24 Jiang Y, Li X, Yang W, et al. PKM2 regulates chromosome segregation and mitosis progression of tumor cells. *Mol Cell*, 2014, 53: 75–87
- 25 Ren J, Ding L, Zhang D, et al. Carcinoma-associated fibroblasts promote the stemness and chemoresistance of colorectal cancer by transferring exosomal lncRNA H19. *Theranostics*, 2018, 8: 3932–3948
- 26 Xu Y, Zhao W, Wu D, et al. Isolation of myeloid-derived suppressor cells subsets from spleens of orthotopic liver cancer-bearing mice by fluorescent-activated and magnetic-activated cell sorting: Similarities and differences. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7: 7545–7553
- 27 Ju Kim M, Shin K S, Chung Y B, et al. Immunohistochemical study of P47^{phox} and GP91^{phox} distributions in rat brain. *Brain Res*, 2005, 1040: 178–186
- 28 Dolcetti L, Peranzoni E, Ugel S, et al. Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *Eur J Immunol*, 2010, 40: 22–35
- 29 Pallett L J, Gill U S, Quaglia A, et al. Metabolic regulation of hepatitis b immunopathology by myeloid-derived suppressor cells. *Nat Med*, 2015, 21: 591–600
- 30 Dong G, You M, Fan H, et al. 17 β -estradiol contributes to the accumulation of myeloid-derived suppressor cells in blood by promoting TNF- α secretion. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2015, 47: 620–629
- 31 Corzo C A, Condamine T, Lu L, et al. HIF-1 α regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Exp Med*, 2010, 207: 2439–2453
- 32 Guo C, Hu F, Yi H, et al. Myeloid-derived suppressor cells have a proinflammatory role in the pathogenesis of autoimmune arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2016, 75: 278–285
- 33 Holmgaard R B, Zamarin D, Li Y, et al. Tumor-expressed IDO recruits and activates MDSCs in a Treg-dependent manner. *Cell Rep*, 2015, 13: 412–424
- 34 Wang H, Zhang X. Magnetic fields and reactive oxygen species. *Int J Mol Sci*, 2017, 18, doi: 10.3390/ijms18102175
- 35 Shine M B, Guruprasad K N, Anand A. Effect of stationary magnetic field strengths of 150 and 200 mT on reactive oxygen species production in soybean. *Bioelectromagnetics*, 2012, 33: 428–437
- 36 Sun L, Chen L, Bai L, et al. Reactive oxygen species mediates 50-Hz magnetic field-induced EGF receptor clustering via acid sphingomyelinase activation. *Int J Radiat Biol*, 2018, 94: 1–7
- 37 Duong C N, Kim J Y. Exposure to electromagnetic field attenuates oxygen-glucose deprivation-induced microglial cell death by reducing intracellular Ca²⁺ and ROS. *Int J Radiat Biol*, 2016, 92: 195–201
- 38 Poniedziałek B, Rzymiski P, Karczewski J, et al. Reactive oxygen species (ROS) production in human peripheral blood neutrophils exposed *in vitro* to static magnetic field. *ElectroMagn Biol Med*, 2013, 32: 560–568

Summary for “低频磁场通过调控MDSCs的功能抑制结肠癌的生长”

LF-MF suppresses the colon cancer via regulating the function of MDSCs

Jing Ren^{1,2}, Huan Dou¹, Sunan Shen¹, Yayi Hou^{1*} & Tingting Wang^{1*}

¹ State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Medical School, Nanjing University, Nanjing 210093, China;

² Jiangsu Key Laboratory of Brain Disease Bioinformation, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China

* Corresponding authors, E-mail: yayihou@nju.edu.cn; wangtt@nju.edu.cn

The biological effect of magnetic field is a hot topic in biomedical engineering. The influence of magnetic fields on human health has caused the widespread concern, involving the study of magnetic field in central nervous system, blood and immune system, vascular and endocrine system, among which the most attractive application is usage of low frequency magnetic fields (LF-MF) in the tumor treatment. Our previous studies showed that LF-MF significantly inhibited the proliferation of liver cancer, lung cancer and melanoma cells, and regulated the immune cells to exert anti-tumor effect. We have found that LF-MF exposure was associated with activation of macrophages and dendritic cells, enhanced profiles of CD4⁺ T and CD8⁺ T lymphocytes, the balance of Th17/Treg in tumor-bearing mice. In cancer, myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) demonstrating one of the key players engaged in tumor immunosuppression. This study will further explore the role of LF-MF in the growth of colon cancer and function of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs). In this study, mouse colon cancer xenografts models were established and the tumor-bearing mice were exposed to a LF-MF (0.4 T, 7.5 Hz) for 35 days. The tumor growth and tumor weight were measured. Immunohistochemical staining for Ki-67 in tumor tissue was performed. Flow cytometry analyzed the proportion of MDSCs in the bone marrow, spleen, tumor, and peripheral blood of mice. Magnetic beads separated MDSCs from tumor tissues and MDSCs suppression assays were performed. Q-PCR was performed to detect the mRNA expression of *Arg-1*, *iNOS-2*, *Gp91^{phox}*, *P47^{phox}*, and *S100A8/A9* in MDSCs from tumor tissues. The reactive oxygen species(ROS)level in MDSCs was analyzed by flow cytometry. Western blot was used to detect the protein level of *Gp91^{phox}*, *P47^{phox}* and GAPDH. Results showed that LF-MF inhibited the tumor growth in the CT26 colon cancer xenograft model, and decreased the number of Ki-67 positive cells in the tumor tissues. LF-MF reduced the proportion of MDSCs in tumor tissues and attenuated the inhibitory function of MDSCs. *In vitro*, LF-MF had no effect on cell viability and cell apoptosis of MDSCs. In addition, LF-MF reduced the production of reactive oxygen species in MDSCs by inhibiting the expression of *Gp91^{phox}* and *P47^{phox}*. With the reduced the production of reactive oxygen species, the inhibitory function of MDSCs was attenuated by LF-MF. Together, our present study demonstrated that LF-MF obviously suppressed the development of colon cancer via regulating the expansion and function of MDSCs. LF-MF suppressed the inhibitory function of MDSCs by reducing the production of reactive oxygen species with the decreased expression of *Gp91^{phox}* and *P47^{phox}*. Our studies reveal a novel mechanism behind the anti-tumor effect of LF-MFs on colon cancer and provide a potentially useful adjunct therapy for treatment of colon cancer.

LF-MF, colon cancer, myeloid-derived suppressor cells, reactive oxygen species, *Gp91^{phox}*, *P47^{phox}*

doi: 10.1360/N972018-00603