

PI3K 和 MEK 抑制剂抑制选择性激活的巨噬细胞促乳腺癌细胞浸润迁移的研究

陈静琦,曾波航,朱必胜,侯开连

Study on Inhibitors of PI3K/MEK Prevent Alternatively Activated Macrophages from Promoting Breast Cancer Cell Invasion and Migration

Chen Jingqi, Zeng Bohang, Zhu Bisheng, Hou Kailian

Department of Oncology, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China

Abstract: Objective To interpret new molecular targets for breast cancer therapy and investigated the molecular mechanism of alternatively activated macrophages (M2)'s promotion in breast cancer invasion and migration. **Methods** Mononuclear cells were isolated from peripheral blood of normal adults by density gradient centrifugation, and alternatively activated M2 *in vitro*. Activation of M2 to breast cancer signal molecules was detected by Western blot. The inhibition function of PI3K/ERK inhibitors to (M2)'s promotion in breast cancer migration was evaluated by invasion assay and wound assay. **Results** To simulate breast cancer microenvironment, we co-cultured M2 and breast cancer MDA-MB-231 cells. In the co-cultur system, the inhibitors, LY294002 of PI3K, U0126 of MEK, inhibiting (M2)'s activation to breast cancer PI3K/ERK in 6,12 h. The two inhibitors can prevent (M2) from promoting breast cancer invasion and migration. **Conclusion** The inhibitors of PI3K/MEK prevent M2 from promoting breast cancer invasion and migration. They can be new targets of breast cancer therapy.

Key words: Breast cancer; Alternatively activated macrophages; PI3K; ERK; Invasion and migration

摘要:目的 探讨选择性激活的巨噬细胞(M2)促进乳腺癌浸润迁移的分子机制,为治疗乳腺癌提供新的分子靶点。**方法** 用密度梯度离心法,从健康成人外周血中分离单个核细胞,体外诱导选择性激活巨噬细胞(M2)。用 Western blot 的方法检测 M2 对乳腺癌信号分子的激活;用浸润迁移实验和划痕实验检测 PI3K 和 ERK 抑制剂对 M2 促乳腺癌迁移的抑制作用。**结果** 模拟乳腺癌微环境,把 M2 与乳腺癌 MDA-MB-231 细胞共培养,证明 PI3K 抑制剂 LY294002 和 MEK 抑制剂 U0126 作用于乳腺癌细胞,可以在 6、12 h 抑制 M2 对乳腺癌 PI3K/ERK 的激活;两种抑制剂可以抑制 M2 促进乳腺癌浸润迁移的作用。**结论** PI3K 和 MEK 抑制剂可以抑制 M2 促进乳腺癌浸润迁移,PI3K/ERK 可以成为抑制 M2 作用的新靶点。

关键词: 乳腺癌;选择性激活的巨噬细胞;PI3K;ERK;浸润迁移

中图分类号:R737.9 文献标识码:A

0 引言

在不同的微环境因素作用下巨噬细胞走向不同的激活状态,执行不同的功能^[1]。经典激活的巨噬细胞的功能是 Th1 细胞免疫反应中的效应细胞;选择性激活的巨噬细胞(M2)的功能主要是诱

导 Th2 型免疫反应,参与免疫抑制和组织修复^[2]。在肿瘤微环境因素的作用下,巨噬细胞被选择性激活,形成肿瘤相关巨噬细胞,M2 与肿瘤相关巨噬细胞的表型与功能相似^[3]。在以往的研究中,我们已经证明 M2 促进乳腺癌浸润、迁移。在本文中,我们把选择性激活的巨噬细胞与乳腺癌细胞共培养,模拟肿瘤组织微环境,同时用 PI3K 抑制剂 LY294002 和 ERK 上游 MEK 抑制剂 U0126 处理乳腺癌细胞,证明 U0126 和 LY294002 可以抑制 M2 促进乳腺癌浸润迁移的作用,进一步研究选择性激活的巨噬细胞促进乳腺癌细胞浸润迁移的

收稿日期:2012-06-26;修回日期:2012-10-11

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81172537);广州市属高校科技计划项目资助课题(08A080)

作者单位:510260 广州,广州医学院第二附属医院肿瘤科

作者简介:陈静琦(1966-),女,博士,副主任医师,主要从事肿瘤微环境对乳腺癌作用的研究

机制,为抑制肿瘤微环境促乳腺癌浸润迁移提供新的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

从广州市中心血站取健康成人外周血白细胞,利用从 ATCC 购买的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞系;Transwell 培养板购于 Corning 公司;PI3K、ERK 和 beta-actin 抗体购于 Cell Signal Corporation 公司;PI3K 抑制剂 LY294002 和 MEK 抑制剂 U0126 均购于 Merk 公司;IL-4 购于 R&D 公司。

1.2 细胞培养

从 ATCC 获得 MDA-MB-231,在完全培养液中培养(含 10% 胎牛血清的 DMEM)。人单核细胞取自广州血液中心(中国,广州)的健康志愿者外周血的单个核细胞。人外周血细胞铺在 Ficoll-Hypaque(Pharmacia Corporation, Peapack, N. J.)上层,用密度梯度离心法进一步分离去除红细胞,以 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 接种于 6 或 24 孔板,在 DMEM(Gibco)培养液中培养,37°C 孵育 2 h 后,反复洗去悬浮细胞后,贴壁细胞在完全培养液中培养。培养 3 天后,用加入含 45 ng/ml 人 IL-4 或 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 脂多糖(LPS)的新鲜完全培养液培养,激活单核细胞。在第 7 天获得光学显微镜下形态不同的 IL-4 激活的巨噬细胞(M2)、LPS 激活的巨噬细胞(M1)和未激活的巨噬细胞(Ua),见图 1。通过此方法获得的贴壁细胞中超过 95% 为 CD14⁺ 细胞(结果未展示)。

1.3 Western blot 检测

用抑制剂 LY294002、U0126 处理乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 2 h,然后把选择性激活的巨噬细胞、未激活的巨噬细胞与乳腺癌细胞共培养 12 h,在共培养 6、12 h,收集培养、诱导成功的 MDA-MB-231 细胞,加入混有蛋白酶抑制剂(Merk)的 RIPA 裂解液(150 nM NaCl,1% NP-40,0.5% 钠脱氧胆酸盐,0.1% SDS,50 mM Tris pH8.0),提取细胞总蛋白,作蛋白定量。制备电泳 SDS 凝胶后,每个泳道加入 10~50 μg 提取蛋白、电泳,蛋白转移至 PVDF 膜(Millipore),洗膜,孵育一抗,洗膜,用标记辣根过氧化酶的对应的 IgG 二抗(cell signaling technology,CST)孵育。抗原抗体结合用化学发光剂(ECL, Thermo)观测。

1.4 Transwell 侵袭实验

在 Transwell 上层小室(24 孔,直径 8 μm ,Corning)底部膜的下表面被 10 μl 纤维连接蛋白

(40 $\mu\text{g}/\text{ml}$,Roche),4°C 放置 48 h;把 50 μl Matrigel(用无血清培养液 1:3 稀释,R&D)加入 Transwell 的嵌套内,37°C 孵育 30 min。用 LY294002 和 U0126 处理乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 2 h,消化收集不同激活状态的巨噬细胞和乳腺癌细胞,用无血清培养液(DMEM-F12 加入 2% B27、胰岛素 140 $\text{u}/100 \text{ml}$ 和 0.4% BSA)制细胞悬液,把乳腺癌细胞加入 Transwell 上室(10^5 细胞/孔),在下室接种不同激活状态的巨噬细胞,下层小室加 20% 的胎牛血清。培养 8 h 后,用棉签去除 Transwell 上层小室内的基质胶,用多聚甲醛固定黏附在 Transwell 上层小室膜下表面的侵袭细胞,用结晶紫(0.005%,Sigma)染色,在 400 倍的光学显微镜下,随机选取 10 个视野计数,同时拍摄图片,独立实验重复三次。

1.5 划痕实验

乳腺癌细胞的迁移能力用划痕实验分析。在 90% 铺满单层 MDA-MB-231 细胞的培养皿上,用 LY294002 和 U0126 处理 MDA-MB-231 细胞 2 h,用 10 μl 移液枪尖端轻轻划痕,洗去脱落细胞,用相差显微镜拍摄划痕区 0 h 的图像,标记需拍照处。在无血清的培养体系中,在 Transwell 上层小室内加入 M2、Ua($10^6/\text{ml}$)与划痕后的乳腺癌细胞共培养 12 h,观察细胞的迁移情况并拍照,测量共培养前后划痕的宽度,进行统计分析。

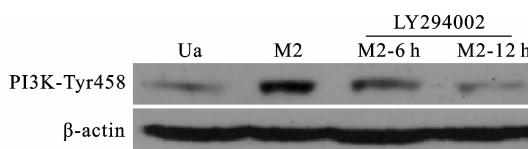
1.6 统计学方法

用 *t* 检验统计分析迁移的细胞数和细胞迁移的距离。所有数据均采用 SPSS17.0 版本统计软件进行分析。

2 结果

2.1 PI3K 抑制剂 LY294002 抑制 M2 对乳腺癌细胞 PI3K 的磷酸化激活

用 PI3K 抑制剂 LY294002 处理乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 2 h,然后把 M2 与乳腺癌细胞共培养 12 h,在共培养 6、12 h 分别提取 MDA-MB-231 细胞蛋白,用 Western blot 的方法,检测促乳腺癌迁移信号通路上的关键分子 PI3K 的磷酸化激活状态,发现 M2 可以在共培养 1 h 磷酸化激活 MDA-MB-231 细胞的 PI3K;Ua 没有磷酸化激活共培养的乳腺癌细胞 PI3K 的作用;PI3K 抑制剂 LY294002 可以持续 12 h 抑制 M2 对 MDA-MB-231 细胞中 PI3K 的磷酸化激活,见图 2。



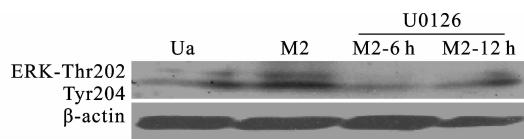
After MDA-MB-231 cells were treated by LY294002 for 2 h, M2 and MDA-MB-231 were co-cultured for 6, 12 h. Then the total protein were extracted, and Western blot were performed to detect the phosphorylation of PI3K. Our data indicated that Ua did not activate PI3K, and M2 activated PI3K, and LY294002 could persistently inhibit PI3K activation for 12 h.

图 2 PI3K 抑制剂 LY294002 抑制选择性激活的巨噬细胞 (M2) 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 PI3K 的磷酸化激活

Figure 2 The PI3K inhibitor, LY294002, inhibited M2's phosphorylation activation in breast cancer MDA-MB-231 cells PI3K

2.2 MEK 抑制剂 U0126 抑制 M2 对乳腺癌细胞 ERK 的磷酸化激活

用 MEK 抑制剂 U0126 处理乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 2 h, 然后把 M2、Ua 与乳腺癌细胞共培养 12 h, 在共培养 6、12 h 分别提取 MDA-MB-231 细胞蛋白, 用 Western blot 法检测 MEK 下游促乳腺癌迁移信号通路上的关键分子 ERK 的磷酸化激活状态, 发现 M2 可以在共培养 1 h 磷酸化激活 MDA-MB-231 细胞的 ERK; Ua 没有磷酸化激活共培养的乳腺癌细胞 ERK 的作用; ERK 抑制剂 U0126 可以持续 12 h 抑制 M2 对 MDA-MB-231 细胞中 ERK 的磷酸化激活, 见图 3。



After MDA-MB-231 cells were treated by U0126 for 2 h, M2 and MDA-MB-231 were co-cultured for 6, 12 h. Then the total protein were extracted, and Western blot were performed to detect the phosphorylation of ERK. Our data indicated that Ua did not activate ERK, and M2 activated ERK, and U0126 could persistently inhibit ERK activation for 12 h.

图 3 ERK 上游 MEK 抑制剂 U0126 抑制选择性激活的巨噬细胞 (M2) 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 ERK 的磷酸化激活

Figure 3 The MEK inhibitor, U0126, inhibited M2 to activate ERK in MDA-MB-231 breast cancer cells

2.3 LY294002 和 U0126 抑制 M2 促乳腺癌浸润迁移

为了检测在 LY294002、U0126 处理后的乳腺

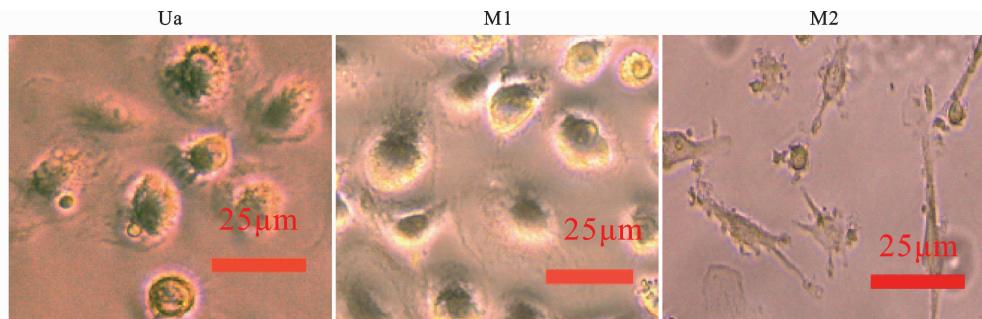
癌细胞浸润迁移能力, 我们进行了 Transwell 侵袭实验, 结果发现 M2 比 Ua 使乳腺癌 MDA-MB-231 发生浸润迁移的平均每个视野的细胞数提高 10 倍, LY294002 和 U0126 抑制 M2 促乳腺癌浸润迁移的作用, 见图 4。

为了检测在 LY294002、U0126 处理后的乳腺癌细胞迁移能力, 我们进行了划痕实验, 结果发现 M2 与 Ua 比, 使乳腺癌 MDA-MB-231 发生迁移的能力强。LY294002 和 U0126 抑制 M2 促乳腺癌迁移的作用。说明 M2 通过 PI3K、ERK 促浸润迁移相关的信号分子促进乳腺癌浸润迁移, 见图 5。

3 讨论

远处转移是乳腺癌患者死亡的主要原因, 手术、化疗、放疗、内分泌治疗等多种治疗手段不能进一步改善乳腺癌的治疗效果, 纠其原因认为肿瘤微环境对肿瘤转移起关键作用^[4]。早在 1889 年 Peget 就提出了“种子-土壤”学说, 认为肿瘤转移是特殊的肿瘤细胞(种子)在适宜的环境(土壤)中发生、发展的结果。肿瘤相关巨噬细胞(tumor associated macrophages, TAMs)是肿瘤微环境中的主要免疫细胞, 大量研究表明 TAMs 在肿瘤细胞的“教育”下, 丧失了递呈抗原引发抗肿瘤免疫的功能, 而起到促进肿瘤转移的作用^[5], TAMs 在肿瘤组织中的分布密度和患者预后相关^[1]。Bingle 等^[6]用 Meta 分析的方法分析了一系列肿瘤的临床病例研究结果, 证明巨噬细胞浸润密度越高, 80% 以上的病例预后越差。乳腺癌的研究表明肿瘤相关巨噬细胞与患者的预后呈负相关^[7-8]。

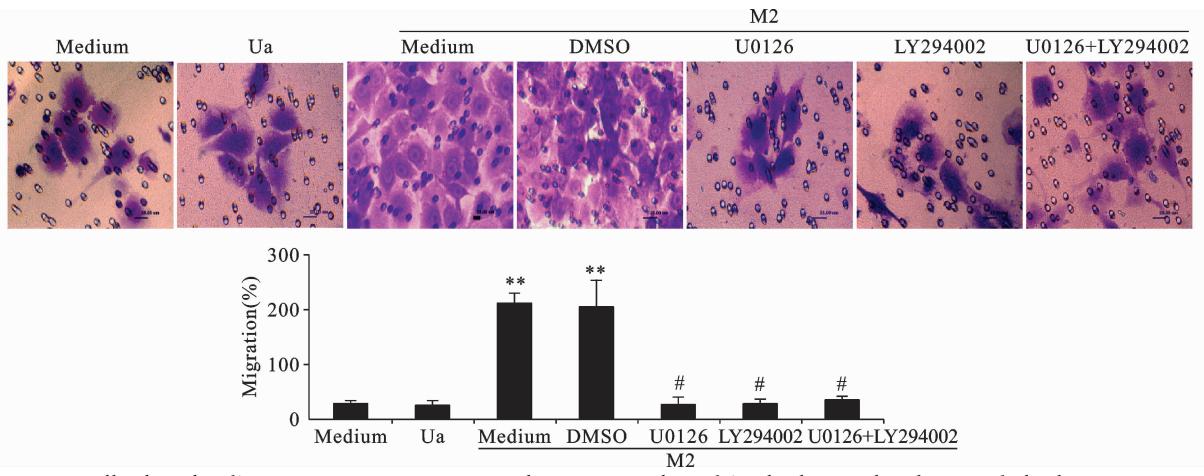
临床研究的进展推动乳腺癌治疗思路的变化。降低肿瘤基质中 TAMs 的数量, 重塑肿瘤生长微环境, 可以明显抑制肿瘤转移, 提出了靶向 TAMs 治疗乳腺癌的新思路^[9]。TAMs 是一种分化终末期的细胞, 不可能应用针对快速增长的乳腺癌细胞的化疗、放疗等手段去清除 TAMs。TAMs 通过分泌大量的细胞因子促进乳腺癌进展, 我们的前期研究已经证明 TAMs 通过分泌 CCL18 促进乳腺癌浸润迁移^[10], CCL18 是一种 CC 型趋化因子, 而 CC 型趋化因子与乳腺癌细胞表面的 GPCR 结合可以激活一系列信号分子, ERK/AKT-PI3K 信号通路是与肿瘤细胞迁移密切相关的



Ua: represented unactivated macrophages; M1: represented classically activated macrophages; M2: represented alternatively activated macrophages

图1 不同激活状态的巨噬细胞光学显微镜下形态

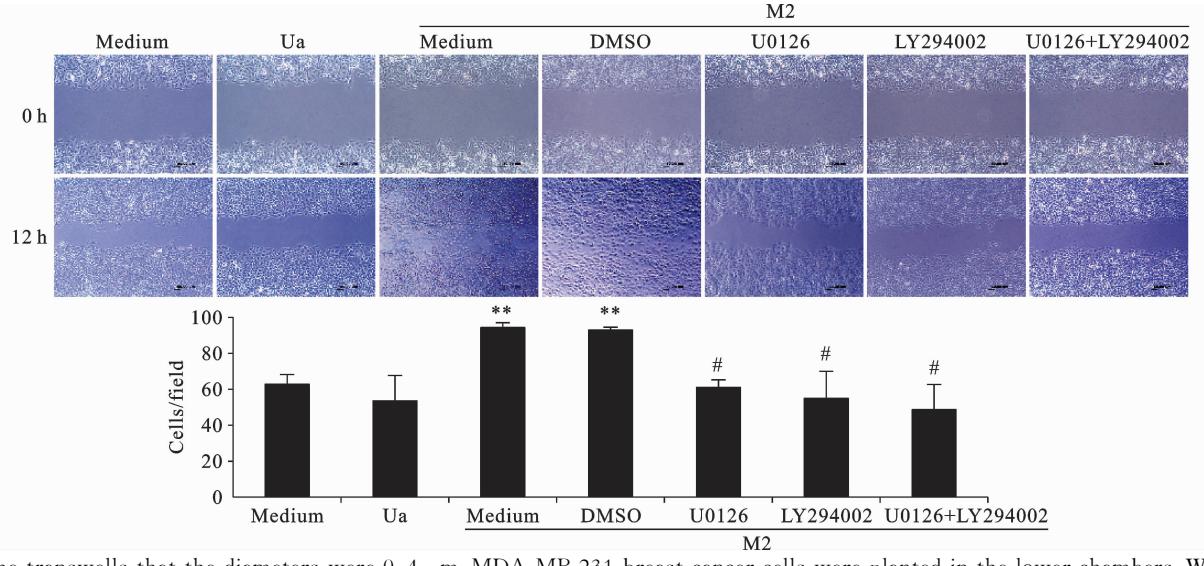
Figure 1 The morphology under light microscope of different activated state macrophages



In the transwells that the diameters were $8\text{ }\mu\text{m}$, macrophages were planted in the lower chambers, and the breast cancer cells which were treated by LY294002/U0126, were planted in the inserts with matrigel. After macrophages and MDA-MB-231 cells were co-cultured for 8 h, we found that Ua did not promote breast cancer cells invasion, and M2 promoted breast cancer cells invasion, and LY294002 and U0126 inhibited M2 to promote breast cancer invasion (**: $P < 0.001$, #: $P < 0.001$)

图4 PI3K抑制剂LY294002和MEK抑制剂U0126抑制M2促乳腺癌MDA-MB-231细胞浸润迁移的作用

Figure 4 The inhibitors of PI3K and MEK, LY294002 and U0126, inhibited M2's promotion in breast cancer MDA-MB-231 cells invasion and migration



In the transwells that the diameters were $0.4\text{ }\mu\text{m}$, MDA-MB-231 breast cancer cells were planted in the lower chambers. When the density of MDA-MB-231 cells reach 90%, the inhibitors were used to treat MDA-MB-231 for 2 h. When wound healing assay was performed, different activated states macrophages were planted in the upper wells. After macrophages and MDA-MB-231 cells were co-cultured for 12 h, we found that Ua did not promote breast cancer cells migration, and M2 promoted breast cancer cells migration, and LY294002 and U0126 inhibited M2 to promote breast cancer migration (**: $P < 0.001$, #: $P < 0.001$; $n = 3$)

图5 PI3K抑制剂LY294002和MEK抑制剂U0126抑制M2促乳腺癌MDA-MB-231细胞迁移的作用

Figure 5 The inhibitors of PI3K and MEK, LY294002 and U0126, inhibited M2's promotion in breast cancer MDA-MB-231 cells migration

的信号,所以我们检测了通路中的关键分子 ERK/PI3K,进一步研究 TAMs 作用的分子机制,寻找抑制 TAMs 作用的治疗分子靶点。目前靶向巨噬细胞成功的例子是攻击巨噬细胞所表达的半胱氨酸蛋白酶 C13 家族 Legumain,可以引发强烈的 CD8⁺ T 对 TAMs 的免疫反应,明显降低肿瘤组织中浸润 TAMs 的数量,减少 TAMs 释放的 TGF-β、TNF-α、MMP-9 和 VEGF 等细胞因子,抑制肿瘤血管生成、肿瘤生长和转移^[11]。这一策略已经在鼠的转移性乳腺癌、结肠癌和非小细胞肺癌模型中得到证实。但因为 CD8⁺ T 细胞在体内的广泛激活,很难避免自身免疫性疾病的发生,限制了这种方法的应用。LY294002 是一种能够阻断三磷酸酰肌醇蛋白激酶(PI3K)细胞信号通路的蛋白酶抑制剂,被广泛应用于 PI3K 信号转导通路的特性研究中;U0126 是 ERK 上游 MEK1/2 的特异性抑制剂,可以特异性抑制 ERK 的磷酸化激活,在 ERK 信号通路功能的研究中应用广泛。本文利用两种抑制剂的特性,在研究与 TAMs 表形功能相似的 M2 作用于乳腺癌细胞引起乳腺癌内 PI3K、ERK 信号分子磷酸化激活的基础上,证明在乳腺癌细胞中用 PI3K、MEK 抑制剂抑制 M2 激活的乳腺癌细胞内的信号通路,从而抑制 TAMs 促进乳腺癌浸润迁移的作用。但在本实验中,联合应用两种抑制剂,并没有进一步增强抑制乳腺癌细胞浸润迁移的作用,我们需要进一步研究 ERK、PI3K 信号分子所参与的整体信号通路对乳腺癌迁移的作用,从而阐明 ERK、PI3K 信号分子在整体信号通路中的作用,从更深入的层面阐明 M2 促进乳腺癌浸润迁移的分子机制。本实验研究结果为抑制乳

腺癌的浸润和转移提供了新的分子靶点。

参考文献:

- [1] Laoui D, Movahedi K, Van Overmeire E, et al. Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions[J]. Int J Dev Biol, 2011, 55(7-9): 861-7.
- [2] Martinez FO, Sica A, Mantovani A, et al. Macrophage activation and polarization[J]. Front Biosci, 2008, 13: 453-61.
- [3] Lawrence T. Macrophages and NF-κB in cancer[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2011, 349: 171-84.
- [4] Watanabe MA, Oda JM, Amarante MK, et al. Regulatory T cells and breast cancer: implications for immunopathogenesis[J]. Cancer Metastasis Rev, 2010, 29(4): 569-79.
- [5] Szala S. Angiogenesis and immune suppression; yin and yang of tumor progression? [J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2009, 63: 598-612.
- [6] Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression; implications for new anti-cancer therapies[J]. J Pathol, 2002, 196(3): 254-65.
- [7] Condeelis J, Pollard JW. Macrophages; obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis[J]. Cell, 2006, 124(2): 263-6.
- [8] Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(1): 71-8.
- [9] Rogers TL, Holen I. Tumour macrophages as potential targets of bisphosphonates[J]. J Transl Med, 2011, 9: 177.
- [10] Chen JQ, Yao YY, Gong C, et al. CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PITPNM3 [J]. Cancer Cell, 2011, 19(4): 541-55.
- [11] Luo Y. Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer[J]. J Clin Invest, 2006, 116(8): 2132-41.

[编辑校对:黄圆玲]