

肿瘤相关巨噬细胞通过EMT促进乳腺癌的浸润转移

宋瑞卉 张宝刚 李洪利 尹崇高 董惠 郭文君*

(潍坊医学院病理学教研室, 潍坊 261053)

摘要 探讨肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)是否通过上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transitions, EMT)促进乳腺癌浸润转移。免疫组化检测80例乳腺浸润性导管癌中TAMs标记物CD68、E-cadherin和Vimentin的表达。结果显示, 乳腺浸润性导管癌中CD68阳性表达率明显高于正常乳腺组织, CD68阳性表达与分化程度、淋巴结转移程度相关, 与E-cadherin表达呈负相关, 与Vimentin表达呈正相关。分离新鲜肿瘤组织中的TAMs, 细胞免疫荧光鉴定TAMs分离成功; 乳腺癌MCF-7细胞在TAMs条件培养基培养后: 细胞形态学发生改变; Transwell侵袭实验表明, 细胞侵袭转移力增强; Western blot结果显示, 细胞中E-cadherin表达明显减少, Vimentin表达明显增多。由此可得出, TAMs与乳腺癌的浸润转移过程密切相关, TAMs可促进MCF-7细胞发生EMT进而促进乳腺癌的浸润转移。

关键词 乳腺癌; 肿瘤相关巨噬细胞; 上皮-间质转化; 浸润转移

Tumor-associated Macrophages Promote Invasion and Metastasis of Breast Cancer by EMT

Song Ruihui, Zhang Baogang, Li Hongli, Yin Chonggao, Dong Hui, Guo Wenjun*

(Department of Pathology, Weifang Medical College, Weifang 261053, China)

Abstract To investigate the mechanism of the tumor-associated macrophages (TAMs) promoting invasion and metastasis of breast cancer, TAMs marker CD68, E-cadherin and Vimentin expression were detected in 80 invasive ductal carcinoma specimens by immunohistochemistry. The positive rate of CD68 in invasive ductal carcinomas was significantly higher than that in normal breast tissue. The expression of CD68 was significantly associated with tumor differentiation and lymph node metastasis and was negatively correlated with E-cadherin expression while it was positively correlated with Vimentin expression. TAMs were separated from fresh invasive ductal carcinoma tissue and were confirmed by immunofluorescence. After being cultured in TAMs-conditioned medium, the MCF-7 cells morphological changed, the results of Transwell assay showed the invasion and metastasis ability of cells were obviously increased, and the results of Western blot showed that the expression of E-cadherin was significantly down-regulated and the expression of Vimentin was significantly up-regulated. The conclusion is that TAMs are closely related to invasion and metastasis of breast cancer and promoted MCF-7 cells invasion and metastasis

收稿日期: 2012-12-11 接受日期: 2013-01-25

国家自然科学基金(批准号: 81072068)、山东省中青年科学家科研奖励基金(博士基金)(批准号: 2010BSB14050、BS2011YY060)、山东省高等学校科技计划(批准号: J12LK03)、潍坊市科学技术局(批准号: 201104092、20112052)和潍坊医学院青年科技创新基金(批准号: K11QC1002)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0536-8068957, E-mail: wjg8213047@yahoo.com.cn

Received: December 11, 2012 Accepted: January 25, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81072068), the Young and Middle-aged Scientists Research Awards Foundation of Shandong Province (Grant No.2010BSB14050, BS2011YY060), Foundation of Shandong Educational Committee (Grant No.J12LK03), Weifang Science and Technology Bureau (Grant No.201104092, 20112052) and Weifang Medical College Youth Science and Technology Innovation Fund (Grant No.K11QC1002)

*Corresponding author. Tel: +86-536-8068957, E-mail: wjg8213047@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2013-04-24 11:13 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130424.1113.004.html>

by inducing EMT.

Key words breast cancer; tumor-associated macrophage; epithelial-mesenchymal transitions; invasion and metastasis

乳腺癌是危害女性健康的最常见恶性肿瘤之一,近年发病率逐年上升且呈年轻化趋势^[1]。虽然乳腺癌在早期诊断和综合治疗方面已有很大的进步,但远期生存率却无明显提高。而乳腺癌的预后好坏与肿瘤的浸润转移有一定的关系,研究乳腺癌的浸润转移机制对于寻找临床治疗的分子靶点,提高患者生存率和延长生存时间具有重要的意义。

肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)是外周循环血液中的单核细胞在肿瘤来源的细胞因子和趋化因子作用下迁移到肿瘤微环境中增殖、分化形成的^[2]。研究发现, TAMs可以通过表达一些生长因子和细胞因子等来增强肿瘤细胞的浸润转移能力,并通过促进肿瘤血管淋巴管生成,抑制微环境免疫反应促进肿瘤的进展^[3]。由于TAMs在一些恶性肿瘤的发生和进展过程中具有重要作用,因此有望成为肿瘤治疗的新靶点。虽然有研究表明TAMs在乳腺癌中具有促肿瘤作用^[4],但在乳腺癌浸润转移中的机制尚不完全明确。

TAMs与肿瘤细胞之间的相互作用可促进肿瘤的生长和侵袭转移,而上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transitions, EMT)却是肿瘤细胞侵袭转移的首要步骤。上皮-间质转化是指上皮样细胞失去极性,经过细胞骨架重塑,转变成具有迁移能力的间充质表型的过程,其不仅参与胚胎发生与器官发育,而且在肿瘤形成、浸润转移以及组织纤维化等病理过程中发挥重要作用。目前,已发现EMT存在于多种上皮来源的恶性肿瘤中,与肿瘤细胞的浸润和远处转移密切相关^[5]。随着对EMT发生机制研究的深入,发现可有多种途径诱导EMT的发生,如环境因素、转录抑制因子等,因此本实验拟采用免疫组化、Transwell侵袭实验、Western blot等方法,探讨在乳腺浸润性导管癌中TAMs是否通过EMT促进肿瘤的浸润转移,为乳腺癌的治疗提供新的思路。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 临床资料 收集潍坊医学院附属医院病理科2009-2012年手术切除的乳腺浸润性导管癌标本

80例,其中伴淋巴结转移者40例,不伴转移者40例。患者为25~75岁女性。以上患者术前均未接受化疗和放疗且经病理诊断明确,有完整的临床资料。另选取80例乳腺癌肿块5 cm以外的乳腺组织作为对照,组织学切片证实均为正常乳腺组织。

1.1.2 主要试剂 鼠抗人CD68单克隆抗体(ZM-0464)、鼠SP-9002及兔SP-9001检测试剂盒和FITC标记山羊抗鼠IgG(ZF-0312)均购于北京中杉金桥生物技术公司; RPMI-1640培养基和胎牛血清购于美国Hyclone公司; Matrigel购自北京威格拉斯生物技术公司; Transwell小室购自美国Corning公司; 兔抗人E-cadherin单克隆抗体(bs-1519R)及兔抗人Vimentin单克隆抗体(bs-0756R)购于北京博奥森生物技术公司; MCF-7细胞由潍坊医学院科研中心实验室提供。

1.2 方 法

1.2.1 免疫组化 免疫组化SP法检测CD68、E-cadherin及Vimentin在乳腺浸润性导管癌中和CD68在正常组织中的表达。三者对应一抗浓度均为1:100,用PBS代替一抗做阴性对照。按SP法试剂盒说明书操作。CD68阳性结果判断: 每张切片在400倍镜下随机选择10个视野,计数200个细胞,阳性细胞<10%为阴性, ≥10%为阳性。E-cadherin阳性结果判断参考Tanaka改良定量记分法^[6]。Vimentin阳性结果判断标准: ≤20%判定为Vimentin低表达; >20%判定为Vimentin高表达。

1.2.2 TAMs的分离 TAMs的分离参照Sierra等^[7]的方法。将手术切除的新鲜肿瘤组织切成2 mm大小的碎片,用含0.3%胶原酶的PBS在37 °C下消化1 h,制成细胞悬液; 70 μm无菌不锈钢网过滤,形成单细胞悬液; 将悬液离心、PBS冲洗,用不含血清的RPMI-1640培养基重悬加入培养瓶中,37 °C、5% CO₂孵育箱中培养40 min; 用RPMI-1640培养基冲掉没有黏附的细胞。免疫荧光标记法(巨噬细胞标记物CD68)鉴定贴壁细胞。无血清培养基培养细胞24 h,收集TAMs培养液(内含TAMs分泌多种的因子及酶如: EGF、TNF-α、基质金属蛋白酶等)作为TAMs条件培养基,为下一步实验做准备。

1.2.3 细胞免疫荧光 将TAMs消化接种于24孔

板中, 室温4%多聚甲醛固定, 0.3% TritonX-100透化, 1% BSA室温封闭; 加入CD68单克隆抗体(浓度1:100) 4 °C过夜; 加FITC标记的二抗, 室温避光孵育; 染核封片, 观察。PBS代替一抗做阴性对照。

1.2.4 细胞培养 MCF-7细胞分为两组: (1)空白对照组: 普通培养基, 不进行任何处理; (2)实验组: TAMs条件培养基。细胞置37 °C、5% CO₂孵育箱中培养72 h后, 进行下述实验。

1.2.5 细胞形态学观察 光学显微镜下观察两组细胞形态学的改变。

1.2.6 Transwell小室 参照Ries等^[8]的方法, 在Transwell小室中铺Matrigel制成人工基质胶层, 取对照组和实验组各200 μL(2×10⁵/mL)细胞悬液加入上室, 下室为10%胎牛血清+RPMI-1640培养液, 500 μL/孔, 于37 °C、5% CO₂孵育箱中培养24 h, 固定染色。每组实验做3个复孔, 相同实验重复3次。高倍镜(200×)下随机对5个视野的细胞进行连续计数, 取均值。

1.2.7 Western blot检测MCF-7细胞中E-cadherin及Vimentin的表达 将实验组和空白组细胞培养72 h后, 裂解并提取蛋白, 按王二云等^[9]的方法进行Western blot, 检测E-cadherin和Vimentin的表达。

1.3 统计学处理

采用SPSS16.0统计软件进行相关统计学分析。计数资料比较采用 χ^2 检验, 两组定量数据之间比较采

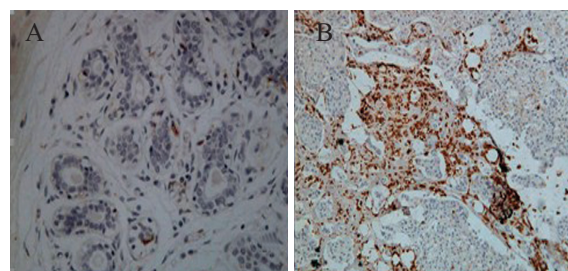
用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学结果

CD68定位于巨噬细胞细胞质, 阳性染色为棕黄或棕褐色颗粒, 不着色为阴性(图1)。E-cadherin定位于细胞膜, 阳性染色为棕褐色颗粒(图2B和2E); Vimentin定位于细胞质, 阳性染色为棕褐色颗粒(图2C和2F)。

在癌巢及癌间质均有大量CD68阳性的细胞浸

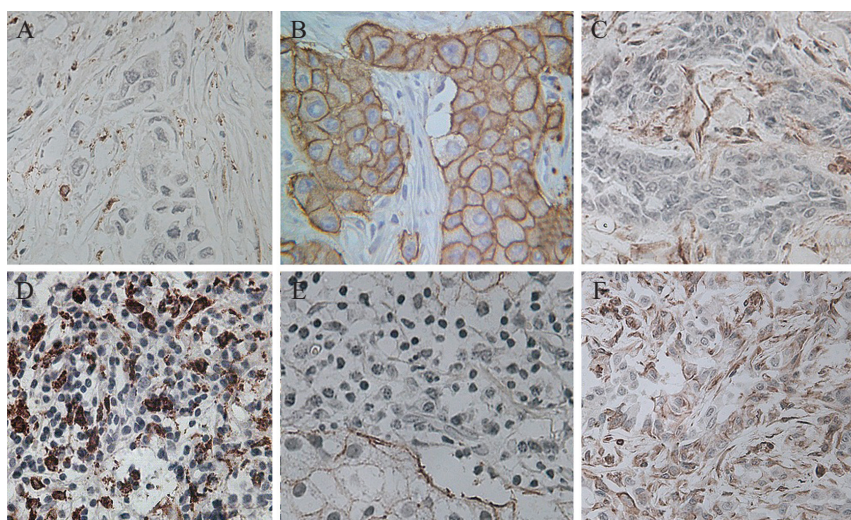


A: CD68在正常乳腺组织中的表达(400×); B: CD68在乳腺浸润性导管癌中的表达(100×)。

A: expression of CD68 in normal breast tissue(400×); B: Expression of CD68 in invasive ductal carcinoma(100×).

图1 CD68在正常乳腺组织和乳腺浸润性导管癌中的免疫组化检测

Fig.1 Expression of CD68 in normal breast tissue and invasive ductal carcinoma by immunohistochemical staining



A: CD68低表达; B: E-cadherin高表达; C: Vimentin低表达; D: CD68高表达; E: E-cadherin低表达; F: Vimentin高表达。

A: low expression of CD68; B: high expression of E-cadherin; C: low expression of Vimentin; D: high expression of CD68; E: low expression of E-cadherin; F: high expression of Vimentin.

图2 CD68、E-cadherin和Vimentin在乳腺浸润性导管癌中的表达(400×)

Fig.2 Expression of CD68, E-cadherin and Vimentin in invasive ductal carcinoma by immunohistochemical staining(400×)

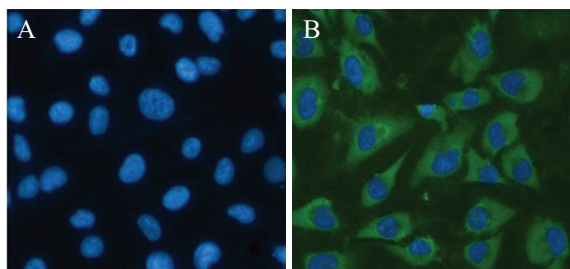
润, 阳性表达率为80%(64/80, 图1B), 在正常乳腺组织中其阳性表达率为25%(20/80, 图1A), 差异有统计学意义($P<0.05$)。CD68表达与肿瘤分化程度、淋巴结转移相关($P<0.05$); 而与患者年龄、肿瘤大小及ER、PR、c-erbB-2等临床病理特征无显著性相关($P>0.05$); 与E-cadherin表达呈负相关($P<0.05$), 与Vimentin表达呈正相关($P<0.05$, 图2)(表1)。

2.2 TAMs的分离鉴定

CD68表达于巨噬细胞细胞质, 阳性物质在细胞质内染色后发绿色荧光(图3B), PBS为一抗时, 胞浆呈阴性(图3A)。目前, 通过对TAMs的鉴定, 明确CD68是巨噬细胞特异性分子标志物^[10], 所以CD68

表1 CD68的表达与浸润性导管癌中不同临床参数的关系
Table 1 The relationship between CD68 expression and clinical features of breast cancer patients

变量 Variables		CD68的表达 CD68 expression		P值 P value
		Positive	Negative	
Age(years)	<50	30	6	0.500
	>51	34	10	
Tumor size(cm)	≤5 cm	28	8	0.653
	>5 cm	36	8	
Tumor differentiation	I	11	2	0.014
	II	26	1	
	III	27	13	
Lymph node metastasis	Yes	37	3	0.005
	No	27	13	
Estrogen receptor	Positive	36	5	0.074
	Negative	28	11	
Progesterone receptor	Positive	33	7	0.576
	Negative	31	9	
c-erbB-2	Positive	20	5	1.000
	Negative	44	11	
E-cadherin	Positive	19	12	0.001
	Negative	45	4	
Vimentin	Positive	48	7	0.020
	Negative	16	9	



A: CD68阴性的细胞; B: CD68阳性的细胞。
A: CD68-negative cells; B: CD68-positive cells.

图3 细胞免疫荧光结果(400×)

Fig.3 The result of immunofluorescence(400×)

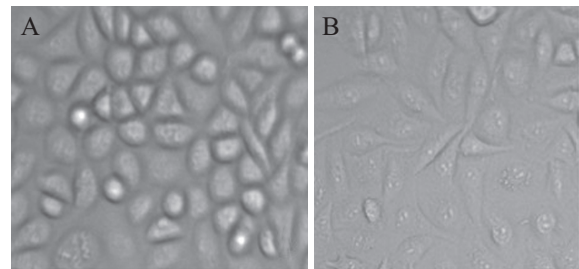
阳性的细胞即为乳腺癌组织中分离得到的TAMs。

2.3 细胞形态学观察

倒置显微镜观察两组MCF-7细胞的形态, 发现对照组细胞较钝圆, 排列紧密, 融合度高; TAMs条件培养基培养的细胞, 细胞伪足不同程度地增多, 细胞变得细长呈梭形, 细胞间融合度降低(图4)。

2.4 TAMs条件培养基能够促进MCF-7细胞的体外侵袭转移能力

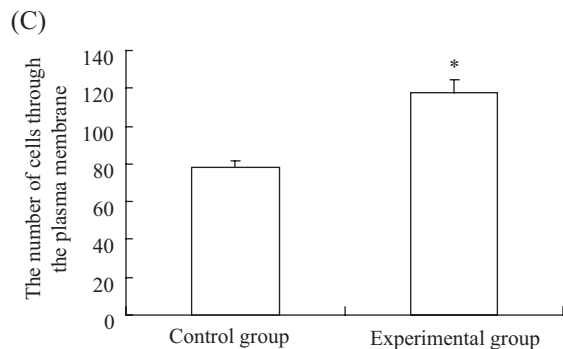
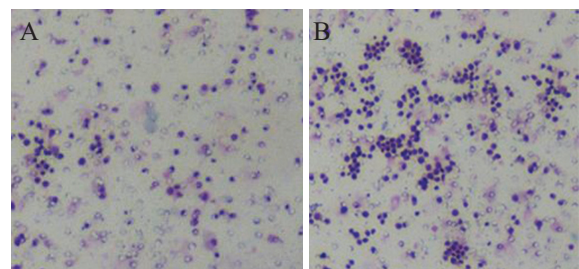
结果显示, 加入TAMs条件培养基的实验组中迁



A: 普通培养基中的MCF-7细胞; B: TAMs条件培养基中的MCF-7细胞。
A: MCF-7 cells in normal medium; B: MCF-7 cells in TAMs-conditioned medium.

图4 实验组和对照组中MCF-7细胞的形态学的改变(200×)

Fig.4 Morphological changes of MCF-7 cells in the experimental group and the control group(200×)



A: 对照组; B: 实验组; C: Transwell小室检测的直方图, * $P<0.05$ 。

A: control group; B: experimental group; C: histogram of Transwell assay, * $P<0.05$.

图5 TAMs条件培养基对MCF-7细胞侵袭性的影响(200×)

Fig.5 The influence of MCF-7 cells invasiveness by TAMs-conditioned medium(200×)

移细胞数(图5B)比对照组显著增加(图5A); 对照组穿透基质膜细胞数为(76±6)个, 实验组为(115±5)个, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图5C)。TAMs条件培养基能够增强MCF-7细胞的体外侵袭转移能力。

2.5 Western blot检测MCF-7细胞中E-cadherin及Vimentin蛋白的表达

检测结果显示, 实验组MCF-7细胞经过TAMs条件培养基的培养后, E-cadherin表达量比对照组明显减少, 而Vimentin表达量明显增多(图6)。

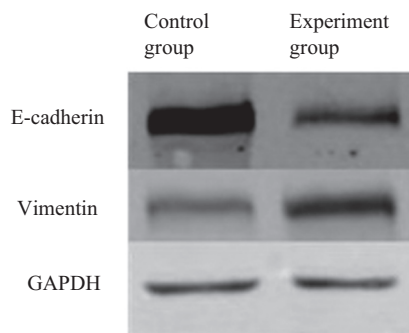


图6 Western blot法检测MCF-7细胞中E-cadherin、Vimentin蛋白的表达情况

Fig.6 Expression of E-cadherin and Vimentin in MCF-7 cells by Western blot

3 讨论

肿瘤微环境是指肿瘤发生发展和浸润转移的局部稳态环境, 在肿瘤细胞的增殖、血管形成、侵袭和转移中有重要作用。大量研究结果表明, TAMs作为肿瘤微环境中的重要炎症细胞, 在肿瘤组织中高度浸润, 与肿瘤的发生、发展及不良预后密切相关。

已有研究表明, TAMs可与肿瘤细胞相互作用, 在肿瘤微环境中通过分泌多种生长因子和细胞因子来增强肿瘤细胞的浸润转移能力, 促进血管和淋巴管生成, 诱导微环境的免疫抑制状态而促进肿瘤的发生发展^[3]。TAMs浸润密度与乳腺癌的预后密切相关, 是乳腺癌患者预后指标之一。免疫组化显示, 在乳腺浸润性导管癌中CD68阳性率明显高于正常乳腺组织, 有淋巴结转移者明显高于无淋巴结转移者; 组织学分级越高CD68阳性率越高; 而与患者年龄、肿瘤大小及激素受体状态等临床病理特征无显著性相关。

肿瘤浸润转移指恶性肿瘤细胞脱离其原发部

位, 通过各种渠道转运到其他组织继续增殖生长, 并形成同样性质肿瘤的过程。EMT是肿瘤发生浸润转移的第一步^[11], EMT的发生使上皮细胞失去了细胞极性及与基底膜连接等上皮表型特征, 而获得高迁移、侵袭、抗凋亡及降解细胞外基质等间质表型特征。本研究中, 用TAMs条件培养基培养后的MCF-7细胞形态发生改变, 伪足不同程度增多且变得细长, 细胞融合度降低, 失去上皮特性, 显示更多的间质细胞样特性, 提示发生了一定程度的EMT。

EMT通过促使上皮细胞失去极性、减弱细胞间黏附力及增强细胞运动性等生物学改变, 导致细胞极性和紧密连接的破坏, 并改变细胞骨架重塑的过程, 使得肿瘤细胞侵袭性增强进而获得远处转移的能力^[12-13]。本研究中Transwell小室侵袭实验发现, 在TAMs培养基中的MCF-7细胞比在普通培养基中的细胞侵袭和转移能力显著提高, 提示当MCF-7细胞发生EMT后细胞极性丧失, 细胞间黏附较差, 浸润侵袭能力增强。EMT的发生不仅使细胞表型发生改变, 而且细胞标记物也发生改变: 上皮样细胞标记物表达的下调如E-cadherin、细胞角蛋白等, 间质样细胞标记物表达的上调如Vimentin、N-cadherin等^[14]。免疫组化结果显示, CD68与E-cadherin表达呈负相关, 而与Vimentin表达呈正相关。同时, 通过Western blot对两组细胞中EMT标志性蛋白分子进行检测, 与对照组相比, 实验组细胞中E-cadherin表达明显减少, 而Vimentin表达明显增多, 从而进一步证明EMT的发生。研究发现, E-cadherin表达下调, Vimentin表达上调, 可以促进肿瘤细胞发生表型改变, 更易脱离肿瘤组织发生局部侵袭或远处转移^[15]。

本研究通过对乳腺癌浸润转移的研究, 结果表明, TAMs能够诱导乳腺癌细胞发生EMT, 增强其浸润转移能力, 为乳腺癌的治疗预后提供了新的思路。

参考文献 (References)

- 1 Kim K, Zang R, Choi SC, Ryu SY, Kim JW. Current status of gynecological cancer in China. *J Gynecol Oncol* 2009; 20(2): 72-6.
- 2 Coffelt SB, Hughes R, Lewis CE. Tumor-associated macrophages: Effectors of angiogenesis and tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1796(1): 11-8.
- 3 Siveen KS, Kuttan G. Role of macrophages in tumour progression. *Immunol Lett* 2009; 123(2): 97-102.
- 4 Leek RD, Harris AL. Tumor-associated macrophages in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002; 7(2): 177-89.
- 5 Klymkowsky MW, Savagner P. Epithelial-mesenchymal tran-

- sition: A cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am J Pathol* 2009; 174(5): 1588-93.
- 6 Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000; 6(1): 127-34.
- 7 Sierra JR, Corso S, Caione L, Cepero V, Conrotto P, Cignetti A, *et al.* Tumor angiogenesis and progression are enhanced by Sema4D produced by tumor-associated macrophages. *J Exp Med* 2008; 205(7): 1673-85.
- 8 Ries C, Egea V, Karow M, Kolb H, Jochum M, Neth P. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: Differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood* 2007; 109(9): 4055-63.
- 9 王二云, 赵丽丽, 高倩, 杨秋梅, 杨公社. 脂肪间充质干细胞体外分化成心肌样细胞. *中国生物化学与分子生物学报*(Wang Eryun, Zhao Lili, Gao Qian, Yang Qiumei, Yang Gongshe. *In vitro* differentiation of rat adipose-derived stem cells into cardiomyocytes. *Chin J Biochem Mol Biol*) 2009; 25(9): 855-60.
- 10 Ma J, Liu L, Che G, Yu N, Dai F, You Z. The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. *BMC Cancer* 2010; 10: 112.
- 11 Beach JR, Hussey GS, Miller TE, Chaudhury A, Patel P, Monslow J, *et al.* Myosin II isoform switching mediates invasiveness after TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(44): 17991-6.
- 12 Cardiff RD. Epithelial to mesenchymal transition tumors: Fallacious or snail's pace? *Clin Cancer Res* 2005; 11(24 Pt 1): 8534-7.
- 13 Cowin P, Rowlands TM, Hatsell SJ. Cadherins and catenins in breast cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17(5): 499-508.
- 14 Sarrió D, Rodríguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res* 2008; 68(4): 989-97.
- 15 Zuo JH, Zhu W, Li MY, Li XH, Yi H, Zeng GQ, *et al.* Activation of EGFR promotes squamous carcinoma SCC10A cell migration and invasion via inducing EMT-like phenotype change and MMP-9-mediated degradation of E-cadherin. *J Cell Biochem* 2011; 112(9): 2508-17.