

瘦素激活肿瘤相关巨噬细胞促进乳腺癌细胞 MCF7的迁移及侵袭

曹红 王林 庞雪利 李矿发 苏敏 黄云秀 魏兰 陈婷梅*

(重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

摘要 该文探讨瘦素(leptin)激活肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)对乳腺癌细胞MCF7迁移及侵袭的影响及其作用机制。RT-PCR、FQ-PCR及Western blot检测THP1分化的巨噬细胞中CD206、TGF- β 及IL-10的表达。RT-PCR检测TAMs中leptin长受体Ob-Rb及短受体Ob-Rt的表达。细胞划痕试验和Transwell侵袭试验检测MCF7细胞的迁移及侵袭能力。Western blot检测TAMs中p-STAT3、p-ERK 1/2和p-AKT的表达。RT-PCR及Western blot检测TAMs中MMP2、MMP9的表达。结果表明, 经100 nmol/L PMA及20 ng/mL IL-4诱导成的巨噬细胞分子表型为CD206⁺TGF- β ^{High}IL-10^{High}。TAMs中leptin长受体Ob-Rb及短受体Ob-Rt均为高表达。经leptin刺激的TAMs条件培养基能明显增强MCF7细胞的迁移及侵袭能力。Leptin能显著提高TAMs中p-STAT3、p-ERK 1/2和p-AKT的表达($P < 0.05$), 且leptin能上调TAMs中MMP2和MMP9的表达; 而MAPK/ERK 1/2信号通路抑制剂PD98059能抑制MMP2的表达, JAK/STAT信号通路抑制剂AG490能抑制MMP9的表达($P < 0.05$)。以上结果表明, leptin能通过激活TAMs促进MCF7细胞的迁移和侵袭, 其机制可能与leptin通过MAPK/ERK 1/2信号通路上调TAMs中MMP2及通过JAK/STAT信号通路上调MMP9的表达有关。

关键词 瘦素; 肿瘤相关巨噬细胞; 乳腺癌MCF7细胞; 迁移; 侵袭

Tumor-associated Macrophages Activated by Leptin Promote Migration and Invasion of Breast Cancer MCF7 Cells

Cao Hong, Wang Lin, Pang Xueli, Li Kuangfa, Su Min, Huang Yunxiu, Wei Lan, Chen Tingmei*

(Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education; College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract This paper investigated the effect of tumor-associated macrophages activated by leptin on migration and invasion of MCF7 cells and explored its molecule mechanisms. The expressions of CD206, TGF- β and IL-10 were detected by RT-PCR, FQ-PCR and Western blot. *Ob-Rb* and *Ob-Rt* in TAMs were detected by RT-PCR. The migration and invasion of MCF7 cells were determined by cell scratch assay and Transwell chamber assay. The expressions of p-STAT3, p-ERK 1/2 and p-AKT in TAMs were detected by Western blot. The mRNA and protein expression of MMP2 and MMP9 in TAMs were detected by RT-PCR and Western blot. The results suggested that the phenotype of macrophage induced by PMA (100 nmol/L) and IL-4 (20 ng/mL) was CD206⁺TGF- β ^{High}IL-10^{High}.

收稿日期: 2013-09-06 接受日期: 2014-02-10

国家自然科学基金(批准号: 81272544)和重庆市自然科学基金计划(批准号: cstc2012jjA10011)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485555, E-mail: chentingmei@sohu.com

Received: September 6, 2013 Accepted: February 10, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81272544) and Natural Science Foundation of Chongqing (Grant No.cstc2012jjA10011)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485555, E-mail: chentingmei@sohu.com

网络出版时间: 2014-05-05 09:58 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.05.0289.html>

The conditional medium of TAMs activated by leptin significantly increased the migration and invasion of MCF7 cells. The expressions of p-STAT3, p-ERK 1/2 and p-AKT in TAMs were significantly enhanced by leptin ($P<0.05$). Furthermore, the mRNA and protein expressions of MMP2 and MMP9 in TAMs were remarkably up-regulated by leptin ($P<0.05$). However, the MAPK/ERK 1/2 inhibitor PD98059 could down-regulate the expression of MMP2 in TAMs treated with leptin ($P<0.05$), and JAK/STAT inhibitor AG490 could decrease the expression of MMP9 ($P<0.05$). In conclusion, leptin can enhance the migration and invasion of MCF7 cells via activating TAMs, which may be associated with the up-regulation of MMP2 and MMP9 in TAMs, through MAPK/ERK 1/2 and JAK/STAT signaling pathways, respectively.

Key words leptin; tumor-associated macrophages; breast cancer MCF7 cell; migration; invasion

肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)是肿瘤微环境中最主要的免疫群体。在肿瘤微环境中, TAMs能通过分泌一系列的细胞因子、化学因子及金属基质蛋白酶类等因子, 促进肿瘤的生长, 侵袭和转移等^[1-3]。较多临床证据表明, 在一些实体瘤如乳腺癌中, 肿瘤相关巨噬细胞的大量浸润与肿瘤的预后不良密切相关^[4]。

瘦素(leptin)是一种来源于脂肪细胞的多效激素。近年来, 肥胖乳腺癌症患者体内高表达的leptin与癌症的关系日益受到人们的关注。有文献报道称, leptin高表达及Ob-R阳性的乳腺癌患者发生癌转移的几率明显高于leptin低表达及Ob-R阴性的患者^[5]。有研究发现, 在肥胖乳腺癌患者中, leptin能明显促进乳腺癌的发生发展, 但其作用机制仍不明确。本研究以TAMs为研究对象, 通过检测leptin诱导TAMs分泌的侵袭转移相关因子的改变, 探讨其对乳腺癌迁移侵袭的影响及其可能的作用机制, 为leptin参与乳腺癌的发生发展提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂

人乳腺癌细胞株MCF7及人单核细胞株THP1均由重庆医科大学临床检验诊断学实验室保存。Leptin及IL-4购自Peprotech公司; PMA试剂购自碧云天公司; 胰酶、DMEM细胞培养基干粉、1640细胞培养基干粉及胎牛血清均购自Gibco公司; PCR相关的试剂盒均购自TaKaRa公司; Trizol试剂购自Invitrogen公司; Matrigel胶购于Sigma公司; Transwell小室(直径6.5 mm, 孔径8.0 μm)购于Millipore公司; 兔抗人MMP2、MMP9多克隆抗体购于Immunoway公司; 兔抗人AKT、p-AKT、ERK、p-ERK单克隆抗体及鼠抗人STAT3、p-STAT3单克隆抗体均购于

Cell Signalling Technology公司; 兔抗人TGF- β 购于Anbo公司; 兔抗人IL-10和小鼠抗 β -actin单克隆抗体购自Bioworld公司; 二抗均购自中杉金桥公司; PI3K-AKT、JAK/STAT3和MAPK/ERK 1/2信号通路抑制剂LY294002、AG490和PD98059均购自碧云天公司; 引物合成于上海 Invitrogen生物工程有限公司。

1.2 RT-PCR、FQ-PCR及Western blot检测肿瘤相关巨噬细胞的分子表型

将人单核细胞THP1按 $1\times 10^6/\text{mL}$ 接种于6孔板中, 细胞分为两组, 一组直接加入100 nmol/L PMA处理72 h后, THP1细胞转化为巨噬细胞; 另一组细胞在加入100 nmol/L PMA处理6 h后, 加入20 ng/mL IL-4继续处理66 h, THP1单核细胞转化为2型巨噬细胞^[6]。而后分别提取细胞的RNA, 用RT-PCR的方法检测细胞表面特异性分子CD206的表达。RT-PCR具体实验步骤: 先将RNA逆转录为cDNA, 然后进行PCR检测。CD206上游引物: 5'-ATG GGT GTC CGA ATC TCA G-3', 下游引物: 5'-CGA TCC CTT GTA GAG CAT A-3', 扩增片段长度为223 bp; 内参 β -actin上游引物: 5'-CTG GGA CGA CAT GGA GAA AA-3', 下游引物: 5'-AAG GAA GGC TGG AAG AGT GC-3', 扩增片段长度为564 bp。PCR反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 70 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 35个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。结果用Quantity One 4.6.2软件进行分析。

采用荧光定量PCR(fluorogenic quantitative PCR, FQ-PCR)的方法检测THP1细胞分化的巨噬细胞中TGF- β 、IL-10的表达。TGF- β 上游引物: 5'-CAT CAA CGG GTT CAC TAC C-3', 下游引物: 5'-CTC CGT GGA GCT GAA GCA-3', 扩增片段长度为166 bp。IL-10上游引物: 5'-AGA ACC AAG ACC CAG ACA TCA-3', 下游引物: 5'-GCA TTC TTC ACC TGC TCC

AC-3', 扩增片段长度为139 bp。内参 β -actin上游引物: 5'-CAC GAT GGA GGG GCC GGA CTC ATC-3', 下游引物: 5'-TAA AGA CCT CTA TGC CAA CAC AGT-3', 扩增片段为290 bp。反应条件为: 95 °C预变性1 min; 95 °C 30 s, 51 °C 30 s, 72 °C 20 s, 40个循环; 72 °C延伸10 min。每组设3个复孔并且重复3次, 结果按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因表达水平。

Western blot检测THP1细胞分化的巨噬细胞中TGF- β 、IL-10的表达: 取质量为120 μ g的总蛋白用10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离, 而后将蛋白转印至PVDF膜上, 用含5%脱脂奶粉的TBST于4 °C封闭4 h; 4 °C一抗(兔抗人TGF- β 、IL-10多克隆抗体, 稀释比例均为1:1 000)孵育过夜; 洗膜后, 室温二抗孵育1 h(山羊抗兔IgG, 稀释比例均为1:1 000); HRP化学发光试剂显色, Bio-Rad凝胶成像系统采集图像, 结果用Quantity One 4.6.2软件分析。

1.3 RT-PCR检测TAMs *Ob-R*的表达

将THP1细胞诱导为TAMs后, 去除含PMA及IL-4的培养基, PBS洗3次, 更换为含10%胎牛血清的1640培养基。按试剂盒说明步骤提取细胞的总RNA, 用RT-PCR法检测TAMs leptin受体(*Ob-R*)的表达。*Ob-Rb*上游引物: 5'-CAG AAG CCA GAA ACG TTT CAG-3', 下游引物: 5'-AGC CCT TGT TCT TCA CCA GT-3', 扩增片段长度为344 bp; PCR反应条件为: 95 °C预变性5 min; 95 °C 30 s, 51 °C 30 s, 70 °C 30 s, 35个循环; 72 °C延伸10 min。*Ob-Rt*上游引物: 5'-CAT TTT ATC CCC ATT GAG AAG TA-3', 下游引物: 5'-CTG AAA ATT AAG TCC TTG TGC CCA G-3', 扩增片段长度为273 bp; PCR退火温度为56 °C, 其余反应条件同*Ob-Rb*。结果用Quantity One 4.6.2软件进行分析。

1.4 细胞划痕实验检测经leptin处理的TAMs条件培养基(conditional medium, CM)对乳腺癌MCF7细胞迁移的影响

将单核细胞THP1诱导为TAMs后, 加入含2%胎牛血清的1640培养基, 分别用PBS(对照组)、100 ng/mL leptin(处理组)处理24 h, 然后收集各组的条件培养基(CM)。将MCF7细胞于无血清的DMEM培养基中培养16 h。在用条件培养基处理MCF7细胞前, 用10 μ L微量移液头在6孔板内垂直划痕, 而后PBS洗3次, 去除脱落细胞, 再加入收集的条件培养基, 于镜下观察处理0, 24 h后MCF7细胞迁移的变化并照相。

1.5 Transwell细胞侵袭实验检测经leptin处理的TAMs的条件培养基对乳腺癌MCF7细胞侵袭能力的影响

实验分组同1.4, 预先在每孔Transwell上室中加入50 μ L Matrigel(用无血清DMEM培养基按1:8稀释), 37 °C孵育30 min, Matrigel凝固, 吸出基质胶表面的液体。乳腺癌MCF7细胞经胰酶消化, 用PBS洗涤后使用DMEM无血清培养基重悬, 调整细胞浓度为 2×10^5 /mL。将Transwell小室放入每孔含500 μ L条件培养基的24孔板中, 每个小室加入200 μ L细胞悬液, 于37 °C、5% CO₂条件下培养24 h, 取出小室, 结晶紫染色, 然后在正置显微镜下观察小室滤膜底下室附着的乳腺癌细胞, 每组随机选取5个视野(200 \times), 计数每一视野内穿过膜的细胞数, 实验均重复3次。

1.6 Western blot检测leptin对TAMs中不同信号通路关键分子表达的影响

实验分为对照组和试验组。对照组、实验组分别于含无血清的1640培养基的TAMs中加入PBS及100 ng/mL leptin, 作用1 h后提取细胞总蛋白, 分别检测各组p-STAT3、p-AKT和p-ERK蛋白水平的变化。Western blot法一抗分别为鼠抗p-STAT3、STAT3单克隆抗体及兔抗p-AKT、AKT、p-ERK、ERK单克隆抗体, 稀释比例均为1:1 000; 二抗分别为山羊抗兔IgG及抗鼠IgG, 稀释比例均为1:1 000; HRP化学发光试剂显色, Bio-Rad凝胶成像系统采集图像, 结果用Quantity One 4.6.2软件分析。

1.7 RT-PCR、Western blot检测leptin对TAMs中MMP2和MMP9表达的影响

实验分为PBS对照组、leptin处理组、leptin+DMSO组和leptin+信号通路抑制剂处理组。在加入leptin处理前, 在leptin+DMSO组及leptin+信号通路抑制剂组分别加入DMSO及JAK/STAT、PI3K/AKT和MAPK/ERK信号通路抑制剂AG490(50 μ mol/L)、LY294002(10 μ mol/L)和PD980590(10 μ mol/L), 预处理1 h后, 各处理组加入100 ng/mL leptin, 对照组中加入PBS, 作用6 h后提取总RNA, 24 h后提取总蛋白, 分别检测各处理组MMP2、MMP9 mRNA及蛋白水平的变化。*MMP2*上游引物: 5'-AGA TCT TCT TCT TCA AGG ACC GGT T-3', 下游引物: 5'-GGC TGG TCA GTG GCT TGG GGT A-3', 扩增片段长度为225 bp。反应条件为: 预变性95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 32个循环; 72 °C延伸5 min。*MMP9*上游引

物: 5'-TCC CTG GAG ACC TGA GAA CC-3', 下游引物: 5'-GGC AAG TCT TCC GAG TAG TTT-3', 扩增片段长度为307 bp, 其退火温度为51 °C, 其余同MMP2的反应条件; 内参 β -actin上游引物: 5'-CTG GGA CGA CAT GGA GAA AA-3', 下游引物: 5'-AAG GAA GGC TGG AAG AGT GC-3', 扩增片段长度为564 bp。Western blot法一抗分别为兔抗MMP2、MMP9多克隆抗体, 按1:500稀释; 二抗为山羊抗兔IgG, 稀释比例为1:1 000。结果用Quantity One 4.6.2软件分析。

1.8 统计学分析

使用SPSS 17.0统计软件对实验数据进行单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

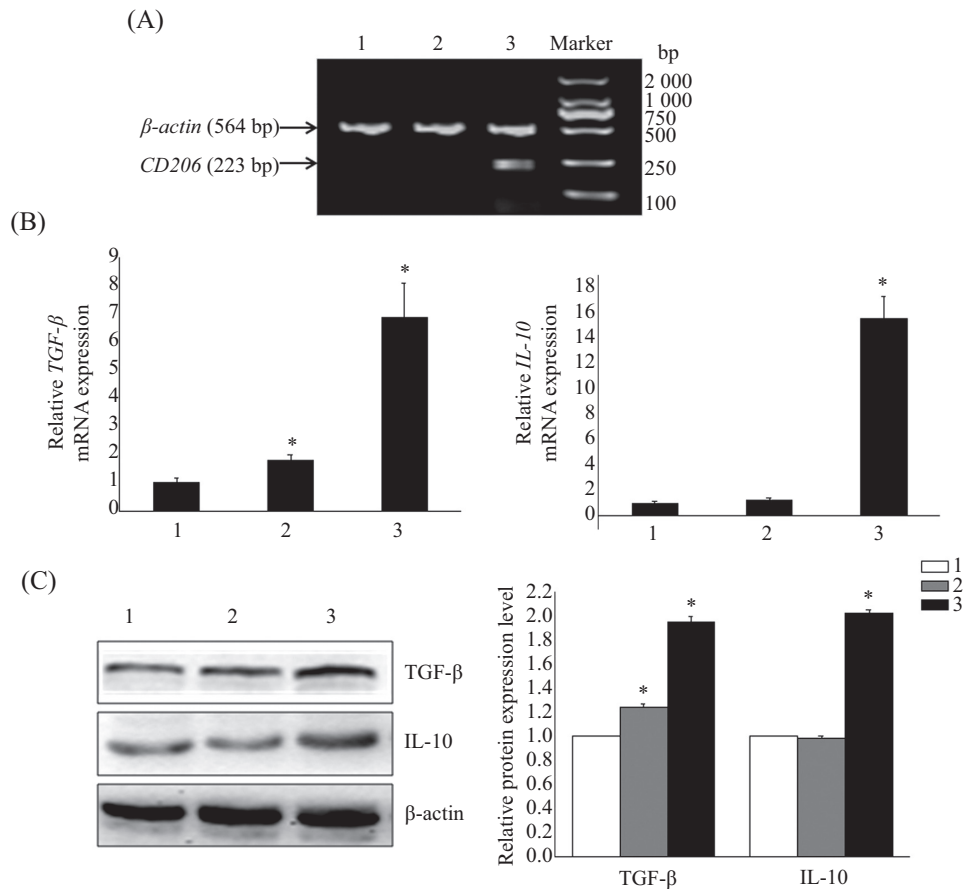
2 结果

2.1 TAMs分子表型的鉴定

RT-PCR检测结果显示: THP1经100 nmol/L PMA及20 ng/mL IL-4诱导成的巨噬细胞中TAMs的特异性分子CD206表达阳性(图1A); FQ-PCR及Western blot检测结果显示: 与对照组相比, 该巨噬细胞中TGF- β 和IL-10两种分子均为高表达($P < 0.05$)(图1B和1C)。以上结果与文献所报道的肿瘤相关巨噬细胞CD206⁺TGF- β ^{High}IL10^{High}的分子表型一致, 表明TAMs诱导成功, 可用于后续的实验研究^[2,6]。

2.2 TAMs中leptin受体的表达水平

RT-PCR检测结果显示, 在TAMs中, leptin长受体Ob-Rb及短受体Ob-Rt均为高表达(图2)。

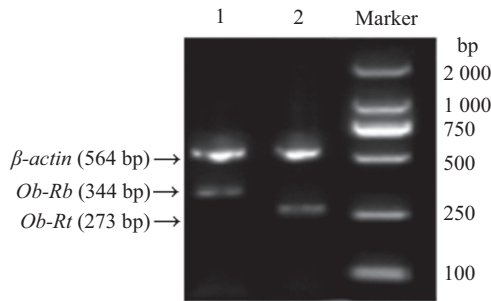


A: RT-PCR检测TAMs中CD206的表达; B: FQ-PCR检测TAMs中TGF- β 和IL-10的表达; C: Western blot检测TAMs中TGF- β 和IL-10的表达。1: 对照; 2: 100 nmol/L PMA; 3: 100 nmol/L PMA+20 ng/mL IL-4。* $P < 0.05$, 与对照比较。

A: the expression of CD206 in TAMs determined by RT-PCR; B: the expression of TGF- β and IL-10 in TAMs determined by FQ-PCR; C: the expression of TGF- β and IL-10 in TAMs determined by Western blot. 1: control; 2: 100 nmol/L PMA; 3: 100 nmol/L PMA+20 ng/mL IL-4. * $P < 0.05$ vs control group.

图1 RT-PCR、FQ-PCR及Western blot检测TAMs中CD206、TGF- β 和IL-10的表达

Fig.1 Expression of CD206, TGF- β and IL-10 in TAMs determined by RT-PCR, FQ-PCR and Western blot



1: leptin长受体; 2: leptin短受体。

1: Ob-Rb; 2: Ob-Rt.

图2 RT-PCR检测TAMs细胞Ob-Rb和Ob-Rt的表达

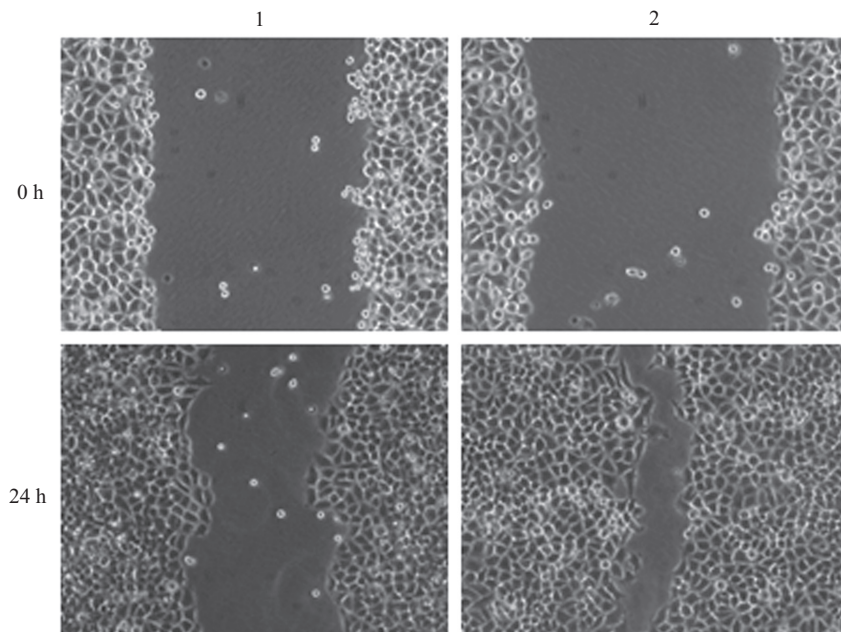
Fig.2 Expression of Ob-Rb and Ob-Rt in TAMs determined by RT-PCR

2.3 Leptin处理的TAMs条件培养基(CM)对乳腺癌细胞MCF7的迁移能力的影响

细胞划痕试验结果显示: 与空白对照组相比, 经leptin刺激TAMs得到的条件培养基能明显促进乳腺癌细胞MCF7划痕的愈合。结果表明, 该条件培养基能明显提高乳腺癌细胞MCF7的迁移能力(图3)。

2.4 Leptin处理的TAMs条件培养基(CM)对乳腺癌细胞MCF7的侵袭能力的影响

Transwell细胞侵袭试验结果显示: 对照组与leptin处理组穿膜细胞数分别为 58 ± 5 、 160 ± 7 , 两者差异有统计学意义($P < 0.05$), 说明经leptin处理的

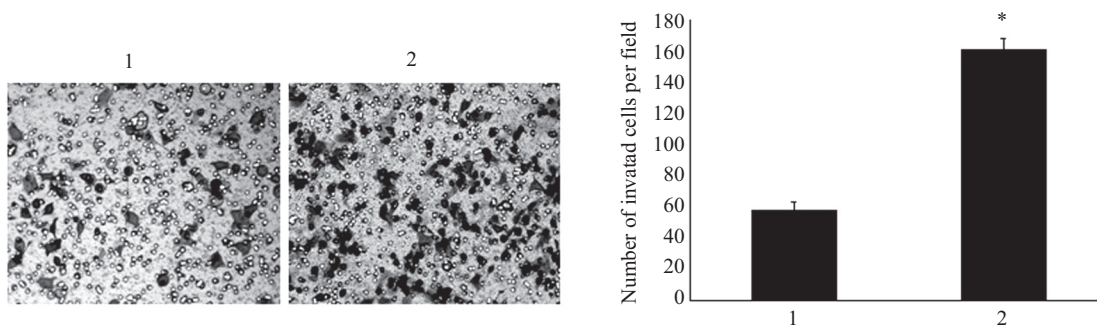


1: 对照组; 2: leptin处理TAMs条件培养基组。

1: conditional medium of control; 2: conditional medium of TAMs induced by leptin.

图3 划痕试验检测经leptin处理的TAMs条件培养基(CM)对MCF7细胞迁移的影响(100×)

Fig.3 Effect of conditional medium (CM) of TAMs induced by leptin on the migration capability of MCF7 cells was determined by cell scratch assay (100×)

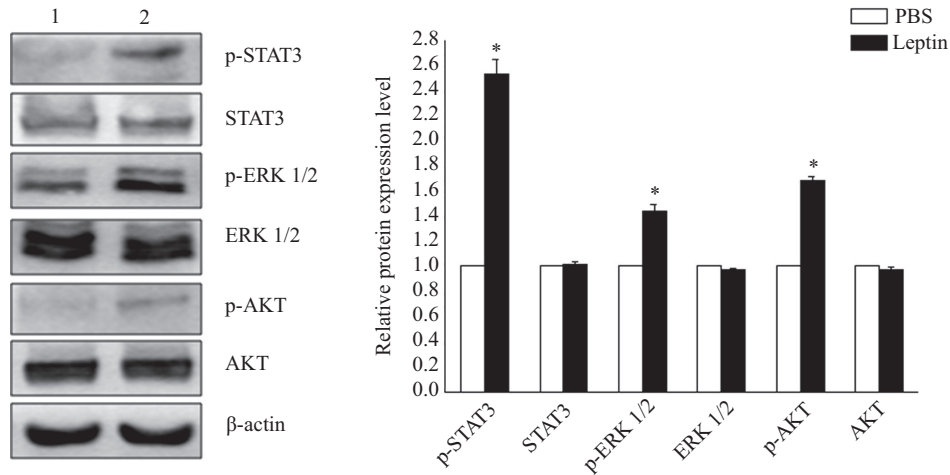


1: 对照组; 2: leptin处理TAMs条件培养基组。* $P < 0.05$, 与对照相比。

1: conditional medium of control; 2: conditional medium of TAMs induced by leptin. * $P < 0.05$ vs control group.

图4 Transwell侵袭试验检测经leptin处理的TAMs条件培养基(CM)对MCF7细胞侵袭的影响(200×)

Fig.4 Effect of conditional medium (CM) of TAMs induced by leptin on the invasion capability of MCF7 cells was determined by Transwell chamber assay (200×)

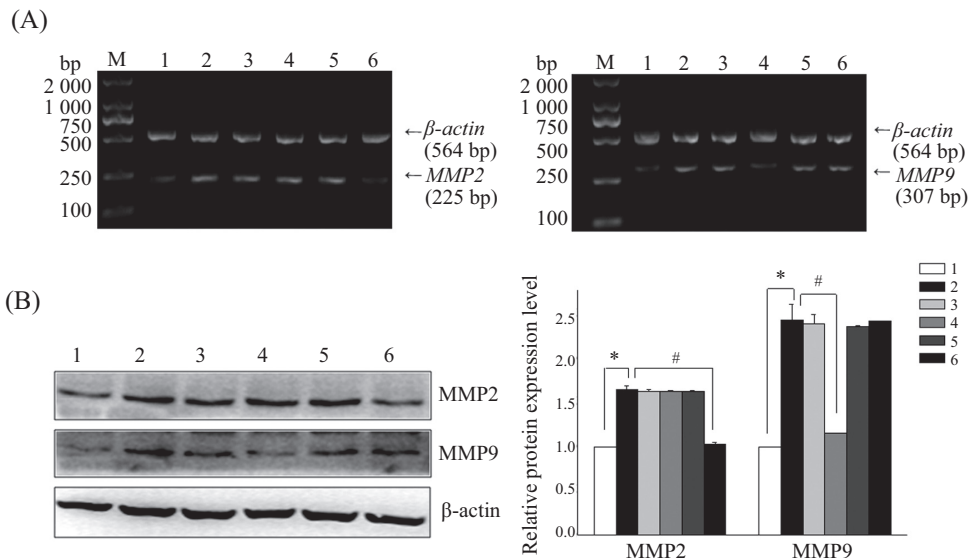


1: 对照组; 2: leptin处理组。* $P < 0.05$, 与对照相比。

1: control group; 2: leptin group. * $P < 0.05$ vs control group.

图5 Western blot检测leptin对TAM细胞p-STAT3、p-ERK和p-AKT表达的影响

Fig.5 Expression of p-STAT3, p-ERK and p-AKT in TAMs induced by leptin using Western blot



A: RT-PCR检测TAMs中MMP2和MMP9的表达; B: Western blot检测TAMs中MMP2和MMP9的表达。1: 对照组; 2: leptin处理组; 3: leptin +DMSO处理组; 4: leptin+50 $\mu\text{mol/L}$ AG490处理组; 5: leptin+10 $\mu\text{mol/L}$ LY294002处理组; 6: leptin+10 $\mu\text{mol/L}$ PD980590处理组。* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与leptin处理组相比。

A: the expression of MMP2 and MMP9 in TAMs detected by RT-PCR; B: the expression of MMP2 and MMP9 in TAMs detected by Western blot. 1: control group; 2: leptin group; 3: leptin+DMSO group; 4: leptin+50 $\mu\text{mol/L}$ AG490 group; 5: leptin+10 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 group; 6: leptin+10 $\mu\text{mol/L}$ PD980590 group. * $P < 0.05$ vs control group, # $P < 0.05$ vs leptin group.

图6 RT-PCR及Western blot检测leptin对TAMs中MMP2和MMP9表达的影响

Fig.6 Expression of MMP2 and MMP9 in TAMs induced by leptin determined with RT-PCR and Western blot

TAMs条件培养基能明显促进乳腺癌细胞的侵袭(图4)。

2.5 leptin对TAMs中p-STAT3、p-AKT和p-ERK表达的影响

Western blot检测结果表明: 与空白对照组相比, leptin能显著上调TAMs中p-STAT3、p-AKT、p-ERK 1/2的表达($P < 0.05$), 而对总STAT3、AKT、ERK 1/2

的表达无显著影响($P > 0.05$)(图5)。

2.6 leptin对TAMs分泌MMP2和MMP9的影响

由于leptin刺激TAMs的条件培养基能明显促进乳腺癌MCF7的迁移侵袭, 故本实验采用RT-PCR及Western blot检测了leptin处理TAMs后, 其分泌的侵袭转移相关因子的变化, 结果显示: MMP2和MMP9在mRNA及蛋白水平的表达均明显增加($P < 0.05$),

且MMP2分泌的升高能被PD98059抑制, 而MMP9的表达则能被AG490抑制, 该结果说明leptin作用于TAMs后, 可能主要通过激活MAPK/ERK1/2信号通路上调MMP2的表达, 通过JAK/STAT3信号通路上调MMP9的表达(图6A和6B)。

3 讨论

乳腺组织周围存在大量的脂肪细胞, 有研究指出脂肪细胞能够通过分泌多种因子促进乳腺癌的发生发展, leptin作为脂肪细胞分泌的重要脂肪素, 与乳腺癌的关系成为近年来研究的热点^[5,7]。临床统计发现, leptin及其受体在乳腺癌中的表达明显高于正常乳腺组织^[5,8-10]。且有研究证实, 恶性程度越高的乳腺癌, 其leptin及Ob-R的表达越高^[11]。肥胖患者体内高浓度的leptin与乳腺癌的不良预后密切相关^[12]。

TAMs是肿瘤微环境中的重要细胞组分, 具有M2型巨噬细胞的分子表型, 即CD206等特异性表面分子表达阳性, 且TGF- β 、IL-10等因子亦高表达^[13]。TAMs来源于单核细胞, 可以被肿瘤细胞分泌的多种趋化因子招募到肿瘤部位, 当巨噬细胞暴露于Th2细胞因子(如IL-4、IL-13)时, 能被诱导成M2型巨噬细胞^[1-2,6]。本实验由THP1诱导成的巨噬细胞具有该分子表型, 故将其作为TAMs用于后续的体外实验研究。

TAMs在肿瘤组织的大量浸润与肿瘤的预后不良密切相关^[4]。有研究发现, leptin能募集单核及巨噬细胞进入肿瘤组织中, 尤其在乳腺癌组织中, 高水平的leptin表达与TAMs在乳腺癌中的累积是密切相关的, 这也是导致肥胖乳腺癌患者产生不同预后的原因之一^[7,14]。肥胖患者乳腺癌高侵袭和高转移特性已成为乳腺癌治疗的难点^[12,15], 因此, 研究高浓度leptin与乳腺癌微环境中TAMs的交互对话, 与探究乳腺癌的发生发展具有重要意义。据文献报道, leptin能通过与其受体结合, 激活经典信号通路JAK/STATs、PI-3K/AKT和MAPK/ERK 1/2等, 促进乳腺癌的增殖、生长和转移^[13,16-18]。已有研究发现, 在单核细胞、粒细胞和巨噬细胞等造血细胞中, 均有Ob-R的表达^[19]。本研究证实, 在TAMs中, leptin长受体Ob-Rb及短受体Ob-Rt均为高表达, 且leptin能明显上调TAMs中p-STAT3、p-AKT和p-ERK 1/2的表达。

Leptin不仅能作为化学趋化因子募集巨噬细胞至脂肪及乳腺组织中, 而且能激活巨噬细胞, 分泌

VEGF及一些炎症介质, 如IL-1、IL-6及TNF- α 等, 发挥促癌作用^[13-14]。细胞划痕实验及Transwell细胞侵袭实验结果表明: leptin刺激TAMs分泌的条件培养基能明显促进乳腺癌细胞MCF7的迁移及侵袭。但参与乳腺癌迁移及侵袭的因子众多, 为确定TAMs分泌的何种因子参与了leptin对乳腺癌的促迁移及侵袭作用, 本研究对多种TAMs因子进行了筛选。PCR及Western blot结果表明, leptin明显促进TAMs中侵袭转移因子MMP2和MMP9的表达。国内外文献报道, 基质金属蛋白酶MMP2和MMP9在调节乳腺癌细胞迁移及侵袭过程中发挥了重要作用^[20-23]。本研究亦发现, 在加入JAK/STATs、MAPK/ERK 1/2和PI-3K/AKT信号通路的抑制剂预处理后, MAPK/ERK 1/2通路的抑制剂PD98059能明显抑制由leptin所诱导的TAMs中MMP2的表达, JAK/STATs通路的抑制剂AG490能明显抑制MMP9的表达, 而PI-3K/AKT通路的抑制剂LY294002处理前后无显著变化。该结果表明, leptin促进TAMs分泌MMP2可能是通过MAPK/ERK 1/2通路实现的, 而MMP9的分泌则可能是通过JAK/STAT3通路实现的。

本实验以TAMs为研究对象, 揭示了leptin可能通过作用于TAMs促进乳腺癌细胞MCF7的迁移和侵袭, 并推测该过程可能与leptin激活TAMs的MAPK/ERK 1/2和JAK/STAT3信号通路分别上调MMP2和MMP9的表达有关, 为乳腺癌的生物治疗提供了靶点和实验依据, 但其能否在体内发挥相同作用, 还有待体内试验的进一步证实。

参考文献 (References)

- 1 DeNardo DG, Barreto JB, Andreu P, Vasquez L, Tawfik D, Kohatkar N, *et al.* CD4⁺ T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell* 2009; 16(2): 91-102.
- 2 Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 2006; 42(6): 717-27.
- 3 Siveen KS, Kuttan G. Role of macrophages in tumour progression. *Immunol Lett* 2009; 123(2): 97-102.
- 4 Zeisberger SM, Odermatt B, Marty C, Zehnder-Fjällman AH, Ballmer-Hofer K, Schwendener RA. Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: A new and highly effective antiangiogenic therapy approach. *Br J Cancer* 2006; 95(3): 272-81.
- 5 Garofalo C, Koda M, Cascio S, Sulkowska M, Kanczuga-Koda L, Golaszewska J, *et al.* Increased expression of leptin and the leptin receptor as a marker of breast cancer progression: Possible role

- of obesity-related stimuli. *Clin Cancer Res* 2006; 12(5): 1447-53.
- 6 Tjiu JW, Chen JS, Shun CT, Lin SJ, Liao YH, Chu CY, *et al.* Tumor-associated macrophage-induced invasion and angiogenesis of human basal cell carcinoma cells by cyclooxygenase-2 induction. *J Invest Dermatol* 2009; 29(4): 1016-25.
- 7 Andò S, Catalano S. The multifactorial role of leptin in driving the breast cancer microenvironment. *Nat Rev Endocrinol* 2011; 8(5): 263-75.
- 8 Goodwin PJ, Ennis M, Fantus IG, Pritchard KI, Trudeau ME, Koo J, *et al.* Is leptin a mediator of adverse prognostic effects of obesity in breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(25): 6037-42.
- 9 Ishikawa M, Kitayama J, Nagawa H. Enhanced expression of leptin and leptin receptor (OB-R) in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10(13): 4325-31.
- 10 Karaduman, M, Bilici A, Ozet A, Sengul A, Musabak U, Alomeroglu M. Tissue leptin levels in patients with breast cancer. *J BUON* 2010; 15(2): 369-72.
- 11 Riolfi M, Ferla R, del Valle L, Piña-Oviedo S, Scolaro L, Micciolo R, *et al.* Leptin and its receptor are overexpression in brain tumors and correlate with the degree of malignancy. *Brain Pathol* 2010; 20 (2): 481-9.
- 12 Elme A, Utraiainen M, Kellokumpu-Lehtinen P, Palva T, Luoto R, Nikander R, *et al.* Obesity and physical inactivity are related to impaired physical health of breast cancer survivors. *Anticancer Res* 2013; 33(4): 1595-602.
- 13 Luo YP, Zhou H, Krueger J, Kaplan C, Liao D, Markowitz D, *et al.* The role of proto-oncogene Fra-1 in remodeling the tumor microenvironment in support of breast tumor cell invasion and progression. *Oncogene* 2010; 29(5): 662-73.
- 14 Gruen ML, Hao M, Piston DW, Hasty AH. Leptin requires canonical migratory signalling pathways for induction of monocyte and macrophage chemotaxis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293(5): C1481-8.
- 15 Grossmann ME, Ray A, Nkhata KJ, Malakhov DA, Rogozina OP, Dogan S, *et al.* Obesity and breast cancer: Status of leptin and adipone adiponectin in pathological processes. *Cancer Metastasis Rev* 2010; 29(4): 641-53.
- 16 Guo S, Liu M, Wang G, Torroella-Kouri M, Gonzalez-Perez RR. Oncogenic role and therapeutic target of leptin signaling in breast cancer and cancer stem cells. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1825(2): 207-22.
- 17 Catalano S, Giordano C, Rizza P, Gu G, Barone I, Bonofiglio D, *et al.* Evidence that leptin through STAT and CREB signalling enhances cyclin D1 expression and promotes human endometrial cancer proliferation. *J Cell Physiol* 2009; 218(3): 490-500.
- 18 Zheng Q, Dunlap SM, Zhu J, Downs-Kelly E, Rich J, Hursting SD, *et al.* Leptin deficiency suppresses MMTV-Wnt-1 mammary tumor growth in obese mice and abrogates tumor initiating cell survival. *Endocr Relat Cancer* 2011; 18(4): 491-503.
- 19 Lam QL, Lu L. Role of leptin in immunity. *Cell Mol Immunol* 2007; 4(1): 1-13.
- 20 Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 2010; 141(1): 39-51.
- 21 Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010; 141(1): 52-67.
- 22 Johansson N, Ahonen M, Kähäri VM. Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57(1): 5-15.
- 23 Slattery ML, John E, Torres-Mejia G, Stern M, Lundgreen A, Hines L, *et al.* Matrix metalloproteinase genes are associated with breast cancer risk and survival: the breast cancer health disparities study. *PLoS One* 2013; 8(5): e63165.