

肺癌细胞促进单核吞噬细胞 MAPK 相关通路活化诱导炎症细胞因子表达上调的研究

姜鉴芳, 史新惠, 张淑平, 柯 星, 曹 艳, 王 鹏, 黄 蕾, 黄珮珺, 潘世扬, 王 芳(南京医科大学第一附属医院检验学部, 南京 210029)

【摘要】 目的 通过建立人单核吞噬细胞系(THP-1)和人肺腺癌细胞系(SPC-A1)共培养体系,检测共培养体系中 THP-1 的炎症细胞因子 mRNA 表达水平和丝裂原活化蛋白激酶通路(MAPK)的表达情况,初步阐明肺癌微环境对 THP-1 中炎症细胞因子表达的影响。**方法** 体外培养 SPC-A1 细胞系、THP-1 细胞系,并建立二者共培养体系,设置 THP-1 单独培养组为对照组。24 h 后,收集各组 THP-1 细胞,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-Time PCR)检测白细胞介素(IL)-1 β 、-6、-8 及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的 mRNA 表达水平;Western blot 检测 MAPK 通路蛋白 c-Jun 氨基末端激酶及其磷酸化形式(JNK/p-JNK)、丝裂原活化蛋白激酶 p38 亚单位及其磷酸化形式(p38 MAPK/p-p38 MAPK)、细胞外调节蛋白激酶及其磷酸化形式(ERK/p-ERK)的表达。**结果** 共培养 24 h 后,共培养组 THP-1 的 IL-1 β 、IL-8 mRNA 表达水平均明显高于对照组($P < 0.05$),分别为对照组的 5.81、4.21 倍;Western blot 结果显示共培养组 p38 MAPK、p-p38 MAPK 的表达水平均明显高于对照组($P < 0.05$)。**结论** 肺癌细胞可引起肺癌环境中单核吞噬细胞中 p38 MAPK 通路的活化,进而诱导 IL-1 β 、IL-8 mRNA 表达上调,有利于肿瘤炎症微环境的维持和促进肿瘤的进展。

【关键词】 人单核吞噬细胞系; 共培养; 人肺腺癌细胞系; 细胞因子; MAPK 通路

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.23.020 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)23-3282-03

Study on upregulation of expression of inflammatory cytokines induced by MAPK signaling related pathway of mononuclear phagocytes promoted by lung cancer cells LOU Jian-fang, SHI Xin-hui, ZHANG Shu-ping, KE Xing, CAO Yan, WANG Peng, HUANG Lei, HUANG Pei-jun, PAN Shi-yang, WANG Fang (Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

【Abstract】 Objective To establish the co-culture system of mononuclear phagocyte system (THP-1) and human lung adenocarcinoma cell line (SPC-A1), detect the expression of mRNA of inflammatory cytokines in the THP-1 cell line and MAPK pathways in the co-culture system, and preliminarily indicate the effect of lung cancer microenvironment on the expression of inflammatory cytokines in THP-1 cell line. **Methods** The SPC-A1 and THP-1 cell lines were cultured in vitro, and the co-culture system was established. The single cultured THP-1 cell line was set as control group. 24 h after culturing, THP-1 cells were collected and real-time PCR was used to detect interleukin (IL) 1 β , IL6 and IL8, and the expression of tumor necrosis factor α (TNF α) mRNA. The western blot analysis was used to detect the expression of JNK/p-JNK, p38 MAPK/p-p38 MAPK, ERK/p-ERK and ERK. **Results** 24 h after co-culturing, the expression levels of IL1 β and IL8 in the co-cultured group was obviously higher than those in the control group, and was 5.81 and 4.21 fold higher than the control group, respectively ($P < 0.05$). Western blot analysis showed that the expression levels of p38 MAPK/p and p38 MAPK in the co-cultured group was significant higher than those in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The lung cancer cells could active the p38 MAPK signaling pathway in monocyte macrophage cells and induce further upregulation of the expression of IL1 β , IL8 mRNA, which might be benefit for the maintenance of tumor microenvironment and tumor progression.

【Key words】 human mononuclear phagocyte system; co-culture; human lung adenocarcinoma cell line; cytokine; MAPK pathway

单核吞噬细胞在多种实体肿瘤的局部环境中存在,并且可以分泌一系列炎症细胞因子,如白细胞介素(IL)-8、-1 β ,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等。炎症细胞因子的表达有助于肿瘤炎症微环境的建立和维持,IL-8在肿瘤炎症微环境的维持中具有一定作用,并且有利于肿瘤细胞的侵袭和转移,其在肿瘤环境中的表达常与单核吞噬细胞的密度呈正相关。而 IL-1 β 可以促进靶细胞内血管内皮生长因子-C(VEGF-C)的表达^[1]。肺癌是常见的恶性肿瘤之一,是癌症相关死亡的首要因素^[2]。非小细胞肺癌(NSCLC)在肺癌中占主导地位,其肿瘤环境中相关细胞因子的表达在其进展中有着不可或缺的作用。已有

研究表明,NSCLC组织中 IL-8 的表达明显高于健康对照组,并且晚期组明显高于早期组,在有淋巴结转移组明显高于无转移组^[3]。为了探讨肺癌微环境对人单核吞噬细胞炎症细胞因子表达的影响及其机制,本研究以人肺腺癌细胞系(SPC-A1)和人单核细胞系(THP-1)建立体外共培养体系,模拟肺癌细胞生长的微环境,研究 THP-1 中炎症细胞因子表达水平的改变和丝裂原活化蛋白激酶通路(MAPK)相关的活化情况,探索单核吞噬细胞在肿瘤微环境中的相关作用和机制。

1 材料与方法

1.1 材料 THP-1 细胞株、SPC-A1 细胞株购自中科院上海

细胞库, RPMI1640 培养液购自 Hyclone 公司, 胎牛血清(FBS) 购自美国 Gibco 公司。

1.2 仪器与试剂 ABI 2720 型和 ABI 7500 型基因扩增仪为美国 Applied Biosystem(ABI)公司产品, 电泳系统和电转移系统购自 Bio-Rad 公司。兔抗人 p38 MAPK、p-p38 MAPK 单克隆抗体; JNK、p-JNK 单克隆抗体; ERK、p-ERK 单克隆抗体均购自 Cellsignal 公司。反转录试剂盒购自 Takara 公司, 扩增引物由 Takara 公司设计。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养及体外共培养体系的建立 SPC-A1、THP-1 细胞株生长于含有 10% FBS 的 RPMI1640 培养基中, 取对数期细胞行共培养实验。SPC-A1 接种于 24 孔板中, 1×10^5 /孔, 予完全培养基培养; THP-1 细胞接种于基底膜为 $0.4 \mu\text{m}$ 微孔聚酯纤维膜的 transwell 共培养小室内, 5×10^5 /孔。待相互作用 24 h 后, 收集小室内 THP-1 细胞。同时设置对照组(THP-1 单独培养组), 每组各设 3 复孔。独立实验重复 3 次。

1.3.2 RNA 提取及实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-Time PCR) 采用 miRNeasy Mini Kit(美国 Qiagen 公司)提取 THP-1 细胞 RNA, RNA 溶于 $20 \mu\text{L}$ RNAase-free H_2O 中, 并测纯度和浓度, A260/280 在 $1.8 \sim 2.0$ 范围内。反转录反应采用 Takara 公司的反转录试剂盒, 总体系为 $20 \mu\text{L}$, 其中 $5 \times$ Prime Script RT Master Mix $4 \mu\text{L}$, RNA 溶液 $16 \mu\text{L}$, 取 300 ng 总 RNA 上样量。反应条件: 37°C 15 min, 85°C 5 s; 4°C 冷却。Real-Time PCR 采用 Takara 公司引物(表 1)及 SYBR Premix EX Taq II 和 ABI 7500 型基因扩增仪, 总体系 $20 \mu\text{L}$, 其中 $10 \mu\text{L}$ $2 \times$ SYBR Premix EX Taq II, $6 \mu\text{L}$ dd H_2O , 相应上、下游引物各 $1 \mu\text{L}$, $2 \mu\text{L}$ cDNA 模板。以内源性 β -actin 作参照。扩增条件: 95°C 预变性 30 s, 95°C 5 s, 64°C 退火延伸 34 s, 共 45 个循环, PCR 结束后 60°C 作熔解曲线, 结束反应。扩增结果炎症细胞因子相对表达量采用公式 $\text{Ca}/\text{Cb} = 2^{-(\Delta\text{Ct}_a - \Delta\text{Ct}_b)}$ ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{目的基因}} - \text{Ct}_{\beta\text{-actin}}$) 计算(a 为共培养后 THP-1 样本, b 为单独培养 THP-1 样本)。

表 1 各细胞因子扩增引物序列		
名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
IL-1 β	CAC GAT GCA CCT GTA	GTT GCT CCA TAT CCT
	CGA TCA	GTC CCT
IL-6	AAC CTG AAC CTT CCA	TCT GGC TTG TTC CTC
	AAG ATG G	ACT ACT
IL-8	GCC TTC CTG ATT TCT	TGC ACT GAC ATC TAA
	GCA GCT	GTT CTT TAG CAC
TNF- α	ATG AGC ACT GAA AGC	GAG GGC TGA TTA GAG
	ATG ATC C	AGA GGT C

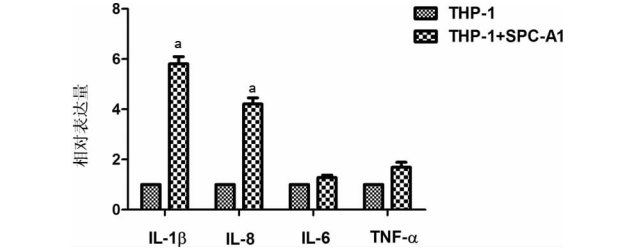
1.3.3 Western blot 检测 MAPK 通路相关蛋白的表达 收集 THP-1 细胞, 裂解蛋白溶液, BCA 法测浓度, 取 $20 \mu\text{g}$ 蛋白上样量。与 $2 \times$ 十二烷基硫酸钠(SDS)充分混匀, 100°C 煮沸 5 min 使蛋白变性后, 上样, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳, 浓缩胶电压 60 V , 分离胶电压 80 V , 待溴酚蓝欲跑出而尚未跑出分离胶时终止电泳, 使用聚偏氟乙烯(PVDF)膜进行转膜操作, 100 mA 转膜 100 min 。取出 PVDF 膜, 在含 5% 脱脂牛奶的 $1 \times$ TBST 中室温封闭 2 h, 加入兔抗人 p38 MAPK、p-p38 MAPK 单克隆抗体; JNK、p-JNK 单克隆抗体; ERK、p-ERK 单克隆抗体; 一抗用时以含 5% 脱脂牛奶的 $1 \times$ TBST (含 0.1% 吐温的 Tris-HCl 缓冲盐溶液) $1:1\,000$ 稀释, 4°C 孵育过夜。 $1 \times$ TBST 洗膜 3 次, 每次 15 min; 加二抗(辣根过氧化物酶标记的 IgG), $1:3\,000$ 稀释, 室温孵育 1 h, $1 \times$

TBST 洗膜 3 次, 每次 15 min; 加电化学(ECL)发光液(A、B 液等量混合), 避光, 暗室曝光。同时以鼠抗人 GAPDH 抗体($1:800$ 稀释)检测管家基因 GAPDH 含量作为内参照。独立实验重复 3 次。条带图像用 Image J 软件进行吸光度值的分析。

1.4 统计学处理 应用 SPSS13.0 和 GraphPad Prism Software 5.0 统计软件进行分析; 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 组间比较采用独立样本 t 检验; 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 THP-1 与 SPC-A1 共培养 24 h 后炎症细胞因子的表达水平 THP-1 与 SPC-A1 共培养 24 h 后, 与对照组相比, THP-1 细胞 IL-8 和 IL-1 β 的表达水平明显增高, 分别为对照组的 (4.21 ± 0.43) 、 (5.81 ± 0.69) 倍, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 而 IL-6、TNF- α 表达水平较对照组分别增高了 (1.27 ± 0.18) 、 (1.69 ± 0.34) 倍, 与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1。各细胞因子扩增的熔解曲线, 见图 2。



注: 与对照组比较, $^a P < 0.05$ 。
图 1 共培养 24 h 后 THP-1 中各细胞因子的 mRNA 表达水平

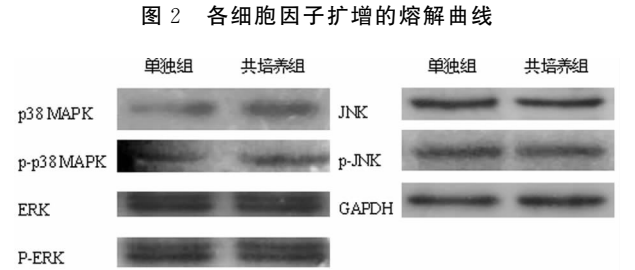
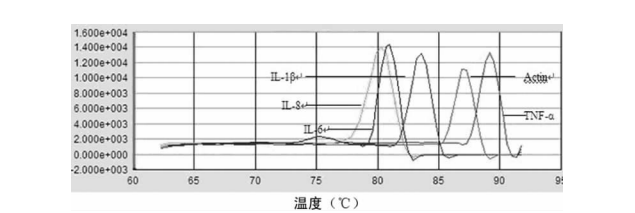
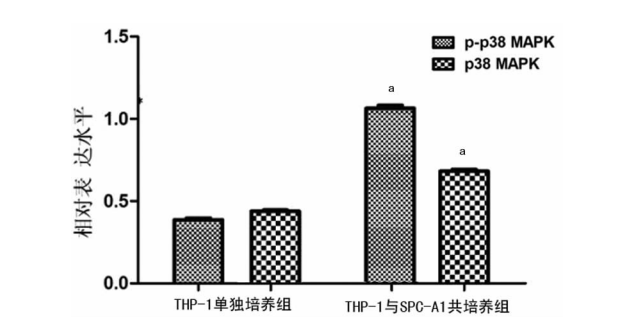


图 2 各细胞因子扩增的熔解曲线
图 3 THP-1 与 SPC-A1 共培养前后 MAPK 通路相关蛋白的表达



注: 与单独培养组比较, $^a P < 0.05$ 。
图 4 THP-1 与 SPC-A1 共培养 24 h 后 p-p38 MAPK/p38 MAPK 表达水

2.2 THP-1 与 SPC-A1 共培养 24 h 后 MAPK 通路相关蛋白

的表达 Western blot 结果显示(图 3), THP-1 与 SPC-A1 共培养 24 h 后, 其 p38 MAPK、p-p38 MAPK 的表达水平较对照组明显升高(图 4, 均 $P < 0.05$), 而 p-ERK、ERK、p-JNK、JNK 的表达水平与对照组相比无明显差异。

3 讨 论

肿瘤微环境中的单核吞噬细胞对肿瘤的发展、肿瘤微环境的维持有一定作用, 为探究肺癌微环境中单核吞噬细胞的相关作用, 本研究利用 THP-1 和 SPC-A1 建立共培养体系, 以研究肺癌细胞对 THP-1 细胞炎性细胞因子表达的影响及其相关机制。存在于肿瘤微环境中的单核吞噬细胞称之为肿瘤相关巨噬细胞(TAM), 对 TAM 的召集和激活有助于肿瘤进展。单核吞噬细胞表达许多细胞因子, 一定程度上促进了肿瘤细胞的增殖和存活, 如 IL-8、IL-1 β 、TNF- α 、转化生长因子- β (TGF- β) 等。

除了在炎症进展中发挥重要作用, IL-8 还参与促进肿瘤血管生成, 内皮细胞和癌细胞的增殖和存活及促进肿瘤细胞的迁移, 可参与多种疾病的发生机制^[4]。IL-1 β 对恶性肿瘤的进展也具有一定的正向调控作用。已有研究表明, 在与乳腺癌细胞系 HCC1954 共培养的环境中, 单核吞噬细胞的 IL-1 β 表达迅速增高, 以自分泌或旁分泌的方式发挥了作用, 并最终介导了乳腺癌细胞中环氧化酶-2(COX-2) 的表达上调, 与乳腺癌的侵袭性密切相关^[5]。共培养实验结果显示, THP-1 细胞中 IL-8、IL-1 β 表达水平出现显著上调, 其中 IL-8 增高了 4.21 倍, 而 IL-1 β 增高了 5.81 倍。提示肺癌细胞生长微环境可诱导单核吞噬细胞中 IL-1 β 、IL-8 mRNA 表达上调。

研究显示, 肿瘤环境中一些信号通路可发生活化, 较为常见的有 MAPK 通路、核因子- κ B 通路(NF- κ B 通路)等, 这些通路经诱导活化后最终可调节相关细胞因子表达上调, 发挥促进肿瘤进展的作用^[6-7]。ERK、JNK、p38 MAPK 是 MAPK 信号途径中主要的三类途径, 其中 ERK 途径主要与生长因子引起的相关应激有关, 而 JNK 途径和 p38 MAPK 途径主要与炎症和应激有关。p38 MAPK 是 MAPK 家族成员之一, 也是细胞内重要的信号传导系统, 介导了机体细胞的增殖、分化、分裂及凋亡等多种病理生理过程^[8]。p38 MAPK 可通过活化 Caspase 家族成员或使抗凋亡蛋白失活, 引起细胞凋亡。但也有研究表明, 一些恶性肿瘤中高度活化的 p38 MAPK 可能通过促进细胞过度增殖、抑制凋亡, 参与致癌。在 NSCLC 的进展中, p38 MAPK 通路也表现出双重性, p38 的激活可以诱导细胞凋亡, 但同时也对 NSCLC 的发生发展具有促进作用, 如 p38 可作为黏附蛋白参与 NSCLC 的转移^[9]。激活的 p38 MAPK 可激活一些转录因子, 进而调节参与细胞反应的细胞因子, 如 TNF- α 、IL-1、IL-8、血管细胞黏附分子等的表达^[10]。本研究结果显示, THP-1 细胞与 SPC-A1 细胞共培养 24 h 后, 与 THP-1 单独培养组相比 p-p38 MAPK 和 p38 MAPK 表达明显增高, 其 p38 MAPK 通路是活化的, 提示在共培养体系中, 肺癌细胞诱导该环境中 THP-1 细胞的 p38 MAPK 通路活化。

在肿瘤的维持和进展中, 免疫细胞如单核吞噬细胞可通过表达的细胞因子参与组织重建、炎症和免疫, 发挥抗肿瘤免疫作用。但在更多的情况下这些高表达的细胞因子往往还参与促进肿瘤的进展, 在肿瘤的生长和转移中发挥了正向调控作用。如 TAM 可表达多种刺激肿瘤细胞增殖和存活的细胞因子, 肿瘤环境中大量的 TAM 与恶性肿瘤的早期转移有明显相关^[11]。也有体外共培养实验证实, 通过将巨噬细胞与肿瘤细胞共培养后, 巨噬细胞分泌的物质可刺激肿瘤细胞的增殖。

TAM 在肿瘤生长中的作用也因肿瘤类型的不同而呈现差异。

综上所述, 肺癌细胞可作用于 THP-1 细胞, 使其炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-8 mRNA 表达水平增高, 同时伴有相应信号通路蛋白 p-p38MAPK 和 p38MAPK 的表达水平显著增高, 提示可能通过 p38MAPK 信号通路的活化引起下游炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-8 mRNA 表达增高, 在肿瘤炎症微环境的维持和肿瘤的进展中发挥一定作用。

参考文献

- [1] Watari K, Nakao S, Fotovati A, et al. Role of macrophages in inflammatory lymphangiogenesis; Enhanced production of vascular endothelial growth factor C and D through NF-kappaB activation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 377(3): 826-831.
- [2] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2893-2917.
- [3] 徐承平, 卞修武, 王清, 等. 非小细胞肺癌组织芯片中白介素-8 的表达 [J]. *中国肺癌杂志*, 2007, 10(5): 386-390.
- [4] Sunaga N, Imai H, Shimizu K, et al. Oncogenic KRAS-induced interleukin-8 overexpression promotes cell growth and migration and contributes to aggressive phenotypes of non-small cell lung cancer [J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(8): 1733-1744.
- [5] Hou Z, Falcone DJ, Subbaramaiah K, et al. Macrophages induce COX-2 expression in breast cancer cells; role of IL-1 β autoamplification [J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(5): 695-702.
- [6] Olsnes C, Olofsson J, Aarstad HJ. MAPKs ERK and p38, but not JNK phosphorylation, modulate IL-6 and TNF- α secretion following OK-432 in vitro stimulation of purified human monocytes [J]. *Scand J Immunol*, 2011, 74(2): 114-125.
- [7] 崔嵩, 刘学锋, 吴斌. NF- κ B 在肿瘤中的研究进展 [J]. *现代肿瘤医学*, 2009, 17(1): 134-137.
- [8] Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(8): 537-549.
- [9] Forest V, Campos L, Vergnon JM, et al. Characterization of the focal adhesion complex in human non-small cell lung cancer cell lines [J]. *Anticancer Res*, 2005, 25(6B): 4135-4139.
- [10] Ferrer I, Friguls B, Dalfó E, et al. Early modifications in the expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK), stress-activated kinases SAPK/JNK and p38, and their phosphorylated substrates following focal cerebral ischemia [J]. *Acta Neuropathol*, 2003, 105(5): 425-437.
- [11] Solinas G, Schiarea S, Liguori M, et al. Tumor-conditioned macrophages secrete migration-stimulating factor; a new marker for M2-polarization, influencing tumor cell motility [J]. *J Immunol*, 2010, 185(1): 642-652.