DOI:10.16016/j.1000-5404.201507142

巨噬细胞在结肠癌 CT-26 细胞获得性 5-FU 耐药中的作用

陈玉娟,张 璇,郝丽君,缪洪明,梁后杰 (400038 重庆,第三军医大学西南医院肿瘤科)

[摘要] **目的** 探讨巨噬细胞在结肠癌 CT26 细胞对 5-FU 产生获得性耐药过程中的作用及其机制。**方法** 分别用正常培养基(NM)、巨噬细胞培养上清(CM)及预先用低剂量 5-FU 处理过的巨噬细胞培养上清[CM(5-FU)]处理 CT-26 细胞,并给予 10 μmol/L 5-FU 处理,用 CCK-8 检测各组细胞增殖情况,PI/Annexin-V 流式细胞术检测各组细胞凋亡情况及 Western blot 检测各组细胞凋亡信号通路。建立 CT26 小鼠皮下移植瘤模型,应用上述条件培养基处理联合 5-FU 化疗,动态观察移植瘤生长情况。**结果** 检测细胞凋亡情况发现,5-FU 处理组 CT26 细胞的凋亡细胞百分比显著高于对照组($P<0.05$);Western blot 检测结果显示 5-FU 处理组凋亡相关蛋白 cleaved caspase-3 及 P-JNK 的表达较对照组显著上调($P<0.05$);Western blot 检测结果及结肠癌 CT26 细胞小鼠移植瘤模型发现 P-JNK 抑制剂可显著抑制由 5-FU 诱导的 CT26 细胞 Caspase-3 凋亡信号通路的激活;CCK-8 检测结果及小鼠移植瘤模型中均发现 CM(5-FU)能够显著降低 CT26 细胞对 5-FU 的化疗敏感性;细胞凋亡检测及 Western blot 检测结果发现 CM(5-FU)可抑制由 5-FU 诱导的 P-JNK/Caspase-3 凋亡信号通路的激活。**结论** 5-FU 可激活结肠癌 CT-26 细胞的 P-JNK 依赖的 Caspase-3 凋亡信号通路以发挥抗癌作用;5-FU 诱导的巨噬细胞可导致结肠癌 CT26 细胞产生 5-FU 获得性耐药,其机制可能是 5-FU 诱导的巨噬细胞上清可拮抗 CT-26 细胞中 5-FU 激活的 P-JNK/Caspase-3 凋亡信号。

[关键词] 巨噬细胞;结肠癌;5-FU;耐药

[中图法分类号] R329.24;R735.35;R915 [文献标志码] A

Role of macrophage in secondary resistance to 5-FU in colorectal cancer cell line CT-26

Chen Yujuan, Zhang Xuan, Hao Lijun, Miao Hongming, Liang Houjie (Department of Oncology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine whether macrophage participates in secondary chemoresistance to 5-fluorouracil (5-FU) in colorectal cancer cell line CT26 and explore the underlying mechanism. **Methods** CT26 cells were cultured in normal medium (NM), macrophage-conditioned medium (CM) or 5-FU-treated macrophage-conditioned medium [CM(5-FU)], followed by 10 μmol/L 5-FU treatment. CCK-8 assay was used to detect cell proliferation, PI/Annexin-V assay was used to detect cell apoptosis, and Western blotting was used to detect the expression of apoptosis related proteins. Furthermore, subcutaneous tumor-bearing mouse models were established. Growth of xenografts was observed after 5-FU treatment in different culture media. **Results** Compared with the non-treatment control group, 5-FU treatment induced apoptosis in CT26 cells ($P<0.05$) and up-regulated expression of p-JNK and cleaved caspase-3 ($P<0.05$). P-JNK inhibitor could significantly inhibit the activation of caspase-3 signaling pathway induced by 5-FU treatment in the xenografts. P-JNK-dependent caspase-3 signaling pathway in the cells cultured with CM(5-FU) was

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(81302136);国家自然科学基金面上项目(81172115)

[通信作者] 梁后杰,E-mail: lianghoujie@sina.com

缪洪明,E-mail: hongmingmiao@sina.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151204.1340.019.html(2015-12-04)

significantly inhibited, and the resistance of CT26 cells to 5-FU was induced. **Conclusion** 5-FU inhibits the growth of CT26 cells by activating p-JNK-dependent caspase-3 pathway. Macrophage treated with 5-FU can induce secondary resistance to 5-FU in CT26 cells. The culture supernatant of 5-FU-induced macrophage can inhibit p-JNK/caspase-3 signaling activated by 5-FU in CT26 cells.

[**Key words**] macrophage; colorectal cancer; 5-FU; chemoresistance

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81172115) and the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China(81302136). Corresponding author: Liang Houjie, E-mail: lianghoujie@sina.com; Miao Hongming, E-mail: hongmingmiao@sina.com

以5-FU为基础的化疗在结直肠癌(特别是复发和晚期结直肠癌)的治疗中仍起着重要作用[1]。但有超过1/2的患者存在耐药现象,其中绝大多数患者是在连续使用5-FU化疗后敏感性降低而对5-FU产生的获得性耐药[2]。通过研究5-FU耐药机理认为肿瘤微环境在介导肿瘤获得性耐药和抵抗细胞凋亡的生理性调节中发挥了重要作用[3-4]。而巨噬细胞是浸润性肿瘤细胞微环境的重要组成成分,其与肿瘤的发生、发展、转移、侵袭密切相关[5-6],但与耐药的关系尚无研究。本研究以结肠癌细胞为研究对象,旨在阐明巨噬细胞与5-FU获得性耐药的关系,并探讨揭示巨噬细胞引起结肠癌细胞5-FU耐药的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

50只BABL/C雌性小鼠由第三军医大学动物实验中心提供,年龄6~8周,体质量18~20 g。

1.2 主要材料和仪器

结肠癌CT26细胞、巨噬细胞RAW264.7由本实验室保存。恒温CO_2培养箱、超灵敏度化学发光系统(美国BIO-RAD公司)、全自动酶标仪(美国BIO-RAD公司)、5804R高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司)由第三军医大学西南医院中心实验室提供,流式细胞仪(美国BIO-RAD公司)由第三军医大学西南医院病理研究所提供。DMEM培养基购自美国Gibco公司,胎牛血清购自以色列BI公司。胰蛋白酶购自美国Sigma公司。CCK-8试剂盒购自日本同仁公司,细胞凋亡检测试剂盒购自上海贝博生物公司。鼠抗人Cleaved Caspase-3、p-JNK单克隆抗体均购自美国Cell Signaling公司。兔抗人β-actin单克隆抗体及二抗(羊抗鼠和羊抗兔)均购于北京中杉金桥生物技术有限公司。JNK信号转导通路特异性阻断剂SP600125购于美国Serologllcais公司。5-FU由第三军医大学西南医院肿瘤科提供。DFMO购自英国Tocris公司。蛋白质抽提试剂试剂盒、BCA蛋白质定量试剂购自碧云天生物技术研究所。

1.3 细胞培养

小鼠结肠癌细胞和巨噬细胞应用常规RPMI 1640培养基+10%胎牛血清+1%青链霉素,培养于37 ℃、5% CO_2的温箱中。

1.4 预先经5-FU处理的巨噬细胞培养上清的收集

将10 mmol/L 5-FU原液用2.5%胎牛DMEM稀释至10 μmol/L,混匀并加14 mL至已扩增贴壁的巨噬细胞中,37 ℃、5% CO_2的温箱培养24 h后,再加6 mL培养24 h,收集培养上清即为CM(5-FU),-20 ℃保存。

1.5 CCK-8检测

在96孔板中接种小鼠结肠癌细胞CT26(100 μL/孔)。将培养板放在培养箱中预培养(37 ℃,5% CO_2)。待细胞贴壁后用正常培养基(NM组)、巨噬细胞培养上清(CM组)、预先用10 μmol/L 5-FU处理过的巨噬细胞培养上清[CM(5-FU)组]、正常培养基加10 μmol/L 5-FU(NM+5-FU组)、巨噬细胞培养上清加10 μmol/L 5-FU(CM+5-FU组)、预先用5-FU处理过的巨噬细胞培养上清加10 μmol/L 5-FU[CM(5-FU)+5-FU组]处理24 h,向每孔加入10 μL CCK溶液。将培养板在培养箱内孵育1~4 h后,用酶标仪测定波长450 nm处的光密度值[D(450)]。

1.6 细胞凋亡检测

将CT26细胞接种于6孔板中,分组同1.5,离心收集6组悬浮细胞,弃培养基,用冷PBS洗涤细胞2次。用400 μL 1× Binding Buffer悬浮细胞,细胞数为1×10^6/mL。在细胞悬浮液中加入5 μL Annexin V-FITC,轻轻混匀后于2~8 ℃避光条件下孵育15 min;加入10 μL PI后轻轻混匀于2~8 ℃避光条件下孵育5 min;1 h内用流式细胞仪或荧光显微镜检测。

1.7 Western blot检测蛋白表达

在6孔板中接种小鼠结肠癌细胞CT26。将培养板放在培养箱中预培养(37 ℃,5% CO_2)。分组同1.5,收集6组细胞提取总蛋白,紫外分光光度法测定

总蛋白浓度,行10%、15%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),蛋白上样量20 μL/孔;在垂直电泳槽中电泳后转膜至硝酸纤维素膜上,5% TBST封闭4 h,加入稀释Cleaved Caspase-3、p-JNK、c-JUN的一抗(工作浓度1∶300)4 ℃孵育过夜;TBST洗膜10 min×3次,加入稀释的二抗(工作浓度1∶2 000)孵育3 h,增强化学发光(ECL)荧光试剂显影。以β-actin为内参照,凝胶成像分析系统处理数据,以Cleaved Caspase-3、p-JNK与内参照的灰度比值作为两者蛋白的相对表达量。

1.8 动物饲养和模型的建立

选6~8周的雌性BALB/c小鼠饲养于12 h阳光照、12 h黑暗的清洁级动物实验室,以5×10^6皮下接种结肠癌细胞CT26,待移植瘤最大直径长至0.5 cm左右时,用3种条件培养基[NM、CM、CM(5-FU)]行瘤周皮下注射(75 μL/只,2 d注射1次)及P-JNK抑制剂(SP600125配制成浓度10 μmol/L,行瘤周皮下注射,100 μL/只,2 d注射1次)进行干预处理分组(每组至少3只),然后用5-FU化疗(5-FU行腹腔内注射,50 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$,1次/d),动态观察并记录移植瘤生长情况。待小鼠处死后,收集肿瘤标本进行免疫组化或WB证实TS和凋亡相关通路的变化。

1.9 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 18.0统计软件进行方差分析及t检验。

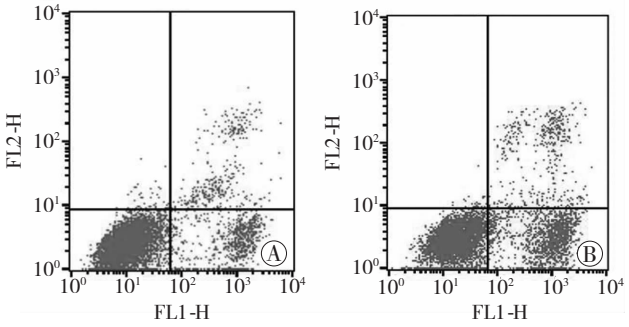
2 结果

2.1 5-FU可诱导结肠癌CT26细胞凋亡以发挥抗癌作用

流式细胞仪检测结果表明,5-FU处理组CT26细胞凋亡数目较对照组显著增加,NM+5-FU组凋亡细胞百分比[(27.31±2.33)%]较NM组[(13.2±1.68)%]显著升高($P<0.05$,图1)。Western blot检测结果显示,NM+5-FU组细胞凋亡相关蛋白Cleaved Caspase-3表达较NM组也显著升高(图2)。由此,提示5-FU可能是通过激活结肠癌CT26细胞Caspase-3凋亡信号来发挥抗癌作用。

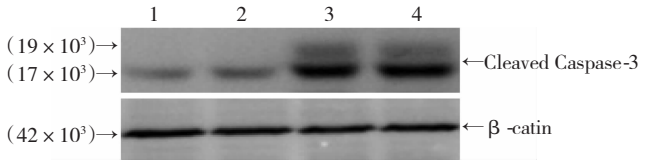
2.2 5-FU激活结肠癌细胞CT26凋亡信号是依赖于P-JNK

Western blot检测发现NM+5-FU组结肠癌CT26细胞P-JNK表达量较对NM组也显著增加(图3)。由此我们假设:5-FU诱导结肠癌CT26细胞凋亡通路的激活是依赖于P-JNK的。用P-JNK特异性抑制剂(SP600125)及5-FU同时处理结肠癌CT26细胞24 h后,提取蛋白做Western blot检测结果显示,NM+JNK inhibitor+5-FU组较NM+5FU组凋亡相关蛋白Cleaved Caspase-3的表达显著降低(图4),说明P-JNK抑制剂能显著抑制由5-FU诱导的结肠癌CT26细胞凋亡途径的激活,进一步验证了5-FU激活结肠癌细胞CT26凋亡信号是依赖于P-JNK的这一假说。



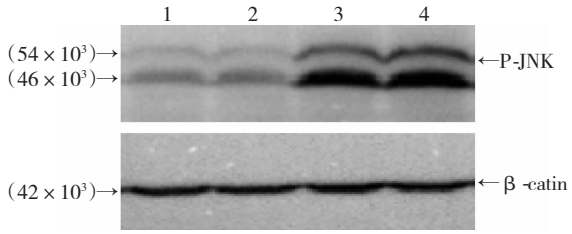
A:NM组;B:NM+5-FU组

图1 PI/Annexin-V流式细胞仪检测CT26细胞的凋亡情况



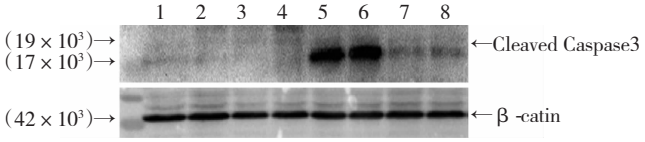
1,2:NM;3,4:NM+5-FU

图2 Western blot检测CT26细胞凋亡相关蛋白caspase-3的表达



1,2:NM;3,4:NM+5-FU

图3 Western blot检测CT26细胞P-JNK的表达



1,2:NM;3,4:NM+JNK inhibitor;5,6:NM+5-FU;
7,8:NM+JNK inhibitor+5-FU

图4 Western blot检测CT26细胞P-JNK的表达

2.3 小鼠体内移植瘤模型验证了5-FU激活结肠癌细胞CT26凋亡信号是依赖于P-JNK

建立小鼠结肠癌CT26细胞移植瘤模型,用P-JNK

特异性抑制剂(SP600125)行瘤周皮下注射抑制 P-JNK 信号通路后,用 5-FU 行腹腔内注射观察疗效。结果显示,NM + JNK inhibitor 组用或不用 5-FU 化疗肿瘤平均直径的变化量较 NM 组显著减少($P < 0.05$,图 5),NM + JNK inhibitor + 5-FU 组肿瘤明显较 NM + 5-FU 组大($P < 0.05$,图 5),说明用 P-JNK 特异性抑制剂抑制 P-JNK 信号通路后再给予 5-FU 化疗,其化疗效果明显降低。提示 5-FU 诱导结肠癌细胞 CT26 凋亡是依赖于 P-JNK 信号通路的激活的。

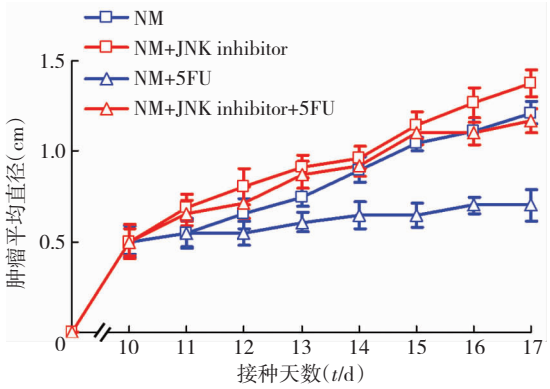


图 5　小鼠移植瘤模型肿瘤生长情况

2.4　5-FU 可诱导巨噬细胞引起结肠癌细胞对 5-FU 产生获得性耐药

NM、CM 和 CM(5-FU)处理结肠癌 CT26 细胞并给予 10 μmol/L 的 5-FU 处理 24 h 后,用 CCK-8 测定 3 种处理条件下 5-FU 的化疗敏感性。结果显示,CM(5-FU)组用 5-FU 处理前后细胞存活数的减少量较 NM 组明显降低($P < 0.05$,图 6),对 5-FU 的敏感性明显降低;而 CM 组用 5-FU 处理前后细胞存活数的减少量与 NM 组差异无统计学意义($P > 0.05$,图 6)。随后,将 5-FU 可诱导巨噬细胞引起结肠癌细胞对 5-FU 产生获得性耐药这一发现在小鼠体内实验中进行验证。将小鼠结肠癌 CT26 细胞分成 6 组,分别用 NM、CM 和 CM(5-FU)瘤周注射处理后,给或不给予 5-FU 腹腔注射化疗,结果显示:CM(5-FU)组用或不用 5-FU 化疗肿瘤平均直径的变化量较 NM 组显著减少($P < 0.05$,图 7),化疗敏感性显著降低,而 CM 组用或不用 5-FU 化疗肿瘤平均直径的变化量较 NM 组则差异无统计学意义($P > 0.05$,图 7),且 CM(5-FU) + 5-FU 组肿瘤明显较 NM + 5-FU 组大($P < 0.05$,图 7),但 CM + 5-FU 组与 NM + 5-FU 组肿瘤大小差异无统计学意义($P > 0.05$,图 7)。提示 5-FU 可诱导巨噬细胞引起结肠癌细胞对 5-FU 产生获得性耐药。

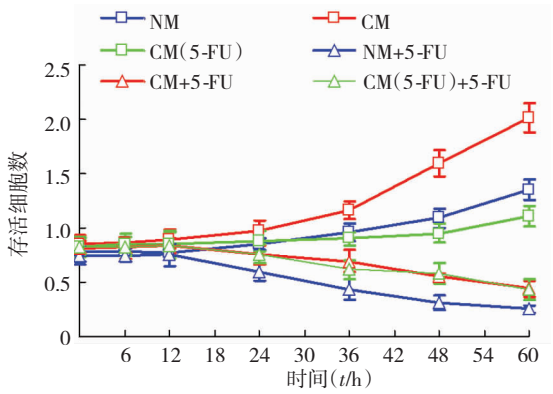
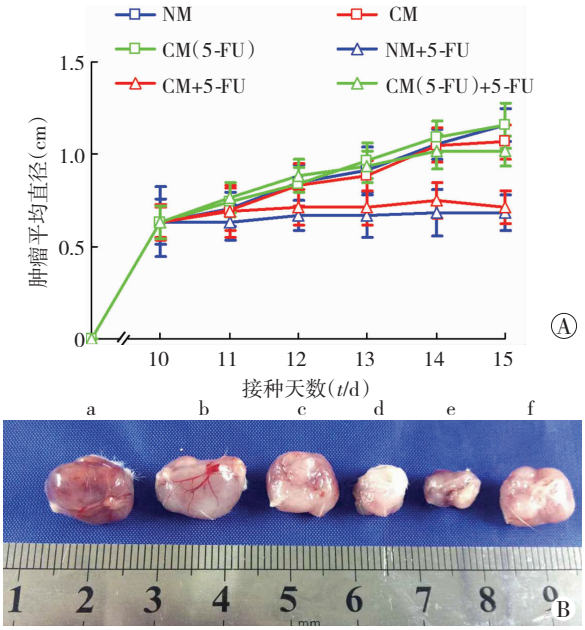


图 6　CCK8 法检测 CT26 细胞增殖情况

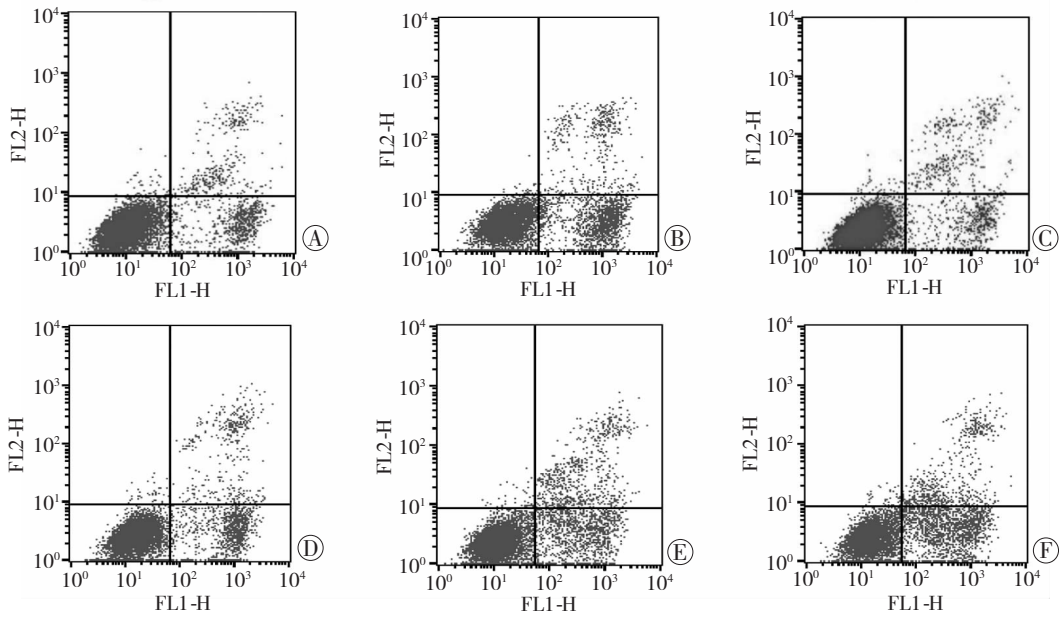


A:小鼠移植瘤模型肿瘤生长情况 B:小鼠移植瘤模型化疗结束后移植瘤大体观　a:NM 组;b:CM 组;c:CM(5-FU)组;d:NM + 5-FU 组; e:CM + 5-FU 组;f:CM(5-FU) + 5-FU 组

图 7　小鼠移植瘤模型观察肿瘤生长情况

2.5　5-FU 可诱导巨噬细胞通过抑制 P-JNK/Caspase-3 凋亡通路的激活,引起结肠癌细胞对 5-FU 产生获得性耐药

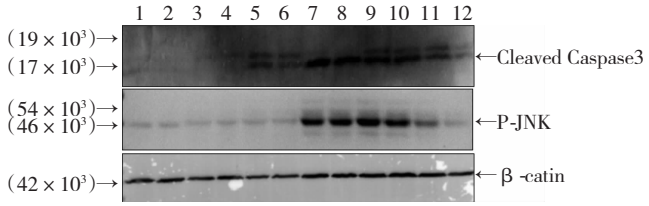
NM、CM 和 CM(5-FU)处理结肠癌 CT26 细胞,并给予 10 μmol/L 5-FU 处理 24 h 后,用流式细胞仪检测细胞凋亡情况,结果发现:CM(5-FU)组用或不用 5-FU 处理,凋亡细胞百分比的变化量较 NM 组显著降低($P < 0.05$,图 8),说明 CM(5-FU)显著减少由 5-FU 诱导的结肠癌 CT26 细胞的细胞凋亡数目,而 CM 组与 NM 组差异无统计学意义($P > 0.05$,图 8)。Western blot 检测发现 CM(5-FU) + 5-FU 组凋亡相关蛋白 Cleaved Caspase-3、P-JNK 表达较 NM + 5-FU 组明显降



A:NM 组;B:NM+5-FU 组; C:CM 组; D:CM+5-FU 组;E:CM(5-FU)组; F: CM(5-FU)+5-FU 组

图 8 CT26 细胞凋亡情况的 PI/Annexin-V 流式细胞仪检测结果

低(图 9),说明 CM(5-FU)能显著抑制由 5-FU 有诱导的 P-JNK 依赖的 Caspase-3 凋亡通路的激活,而 CM 则无此作用。因此,初步证实了 5-FU 可诱导巨噬细胞引起结肠癌细胞对 5-FU 产生获得性耐药,其机制可能是通过抑制 P-JNK/Caspase-3 凋亡通路的激活的。



1、2:NM 组;3、4:CM 组;5、6:CM(5-FU)组;7、8:NM+5-FU 组;9、10:CM+5-FU 组;11、12:CM(5-FU)+5-FU 组

图 9 Western blot 检测 CT26 细胞 Caspase-3 及 P-JNK 的表达

3 讨论

传统观念认为化疗药物是通过直接作用于核酸、微管蛋白及其他化疗作用靶点来发挥抗癌活性的。但随着分子肿瘤学的发展,越来越多的研究发现信号传导通路与肿瘤化疗耐药密切相关,且近年研究证实化疗药物也可通过诱导肿瘤细胞发生细胞凋亡来发挥作用,而很多化疗抵抗的发生也正是通过抑制了由化疗药物诱导的细胞凋亡信号通路的激活来实现的[7]。5-FU 是尿嘧啶 5 位上的氢被氟取代的衍生物。它在细胞内转变为 5-氟尿嘧啶脱氧核苷酸(5-FdUMP),能与胸苷酸合成酶(TS)结合成不解离的复合物,阻止脱氧尿苷酸(dUMP)甲基化转变为脱氧胸苷酸(dTMP),从而影响 DNA 的合成,诱导细胞凋亡来产生抗癌作用[2]。我们前期实验也证实 5-FU 可诱导结肠癌 CT26 细胞发生细胞凋亡以发挥其抗癌作用。

进一步研究发现 5-FU 诱导的细胞凋亡信号通路的激活是 P-JNK 依赖的。C-Jun 氨基末端激酶(JNK)是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族的一个主要成员,参与调节细胞生长、发育、分裂、死亡以及细胞间的功能等一系列生命活动[8]。新近研究表明,JNK 既有促进凋亡又有抑制凋亡的作用,这取决于细胞类型、刺激的性质和其他信号通路的活性等[9]。本课题组实验发现 P-JNK 在由 5-FU 诱导的细胞凋亡信号通路的激活中发挥了重要作用,而 P-JNK 特异性抑制剂(SP600125)能显著降低由 5-FU 诱导的细胞凋亡数。因此我们初步证实了 5-FU 对结肠癌 CT26 细胞发挥抗癌效应可能是通过激活其 P-JNK 依赖的 Caspase-3 的凋亡信号通路。

新近研究认为肿瘤微环境在介导肿瘤获得性耐药和抵抗细胞死亡的生理性调节中发挥了重要作用[3-4]。在肿瘤微环境中富含多种细胞,包括肿瘤细

胞和免疫细胞,如淋巴细胞、树突状细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞等,其中巨噬细胞是浸润性肿瘤细胞微环境的重要组成成分,它可通过复杂的自分泌与旁分泌途径在促进肿瘤的生长、转移、侵袭等方面扮演着重要的角色[10],但其在肿瘤化疗耐药中的作用尚无研究。本研究初步证实了 5-FU 可诱导巨噬细胞引起结肠癌细胞对 5-FU 产生获得性耐药,且机制可能是通过抑制了由 5-FU 激活的 P-JNK/Caspase-3 凋亡信号通路。

综上所述,本研究进一步验证了 5-FU 可能是通过激活结肠癌 CT26 细胞 P-JNK 依赖的 Caspase-3 的凋亡信号通路以发挥抗癌效应,且初步阐明了巨噬细胞在 5-FU 获得性耐药中的重要作用,其可能是通过抑制由 5-FU 诱导的 P-JNK 依赖的 Caspase-3 的凋亡信号通路的激活来拮抗其抗癌作用。

参考文献:

[1] Chintala L, Vaka S, Baranda J, *et al*. Capecitabine versus 5-fluorouracil in colorectal cancer: where are we now? [J]. Oncol Rev, 2011, 5(2): 129 – 140. DOI:10.1007/s12156 – 011 – 0074 – 3

[2] Yang S Y, Miah A, Sales K M, *et al*. Inhibition of the p38 MAPK pathway sensitises human colon cancer cells to 5-fluorouracil treatment [J]. Int J Oncol, 2011, 38(6): 1695 – 1702.

[3] Wei Y, Au L S. Role of Tumour Microenvironment in Chemoresistance[J]. Cancer Growth & Progression, 2006, 15: 285 – 321.

[4] Castells M, Thibault B, Delord J P, *et al*. Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(8): 9545 – 9571. DOI: 10.3390/ijms13089545

[5] Noy R, Pollard J W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy[J]. Immunity, 2014, 41(1): 49 – 61. DOI:10.1016/j.immuni.2014.06.010

[6] Qian B Z, Pollard J W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis[J]. Cell, 2010, 141(1): 39 – 51. DOI:10.1016/j.cell.2010.03.014

[7] Weng H, Huang H, Dong B, *et al*. Inhibition of miR-17 and miR-20a by oridonin triggers apoptosis and reverses chemoresistance by derepressing BIM-S [J]. Cancer Res, 2014, 74(16): 4409 – 4419. DOI:10.1158/0008 – 5472.CAN – 13 – 1748

[8] 侯炳旭, 冯丽英. JNK 信号通路介导的凋亡在疾病中的作用[J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(17): 1819 – 1825.

[9] Sabapathy K. Role of the JNK pathway in human diseases [J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2012, 106: 145 – 169. DOI: 10.1016/B978 – 0 – 12 – 396456 – 4.00013 – 4

[10] Biswas S K, Allavena P, Mantovani A. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions[J]. Semin Immunopathol, 2013, 35(5): 585 – 600. DOI:10.1007/s00281 – 013 – 0367 – 7

(**收稿**:2015-07-23;**修回**:2015-09-22)

(编辑 汪勤俭)