DOI:10.16016/j.1000-5404.201507155

CGI-58 抵抗 5-FU 诱导的巨噬细胞凋亡

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

[摘要] **目的** 观察 CGI-58 对 5-FU 诱导的巨噬细胞凋亡的影响,并探讨其作用及机制。**方法** 用 5-FU 处理巨噬细胞(PLKO)与 CGI-58 敲低(knockdown)的巨噬细胞(CGI-58 KD)后分别用 CCK-8 法检测其细胞增殖能力;流式细胞术检测其细胞周期与凋亡;Western blot 检测其凋亡蛋白(cleaved Caspase-3)的表达水平;Seahorse Assays 检测其线粒体功能。**结果** CCK-8 检测发现 CGI-58 KD + 5-FU 组细胞活力降低更明显($P<0.01$);流式细胞术结果显示经 5-FU 处理后,CGI-58 KD 组的细胞凋亡率明显高于 PLKO 组($P<0.01$),Western blot 检测发现 CGI-58 KD + 5-FU 组 cleaved Caspase-3 的表达水平明显高于 PLKO + 5-FU 组($P<0.01$);Seahorse Assays 检测发现 CGI-58 KD 组其基础耗氧率 OCR 明显降低($P<0.01$),ATP 生成减少($P<0.05$),ROS 表达增加($P<0.01$);抗氧化剂 NAC 处理可拮抗巨噬细胞 CGI-58 缺失诱导的 ROS 增加($P<0.05$)、5-FU 杀伤作用($P<0.05$)及 cleaved Caspase-3 表达水平。**结论** CGI-58 缺失可增强 5-FU 对巨噬细胞的杀伤作用并损伤巨噬细胞的线粒体功能,其作用机制可能是通过增加 ROS 的产生来实现的。

[关键词] CGI-58;5-FU;巨噬细胞;细胞凋亡

[中图法分类号] R329.24;R965;R979.1 [文献标志码] A

CGI-58 resists 5-FU induced macrophage apoptosis *in vitro*

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

[**Abstract**] Objective To determine the effect of CGI-58 on 5-fluorouracil (5-FU) induced macrophage apoptosis, and investigate the underlying mechanism. Methods CCK-8 assay was used to detect the effect of 5-FU on the proliferation of primary macrophage (PLKO) and CGI-58 knockdown macrophage (CGI-58 KD). Flow cytometry was used to test the cell cycle and apoptosis of PLKO and CGI-58 KD which were induced by 5-FU. Western blotting was employed to detect apoptosis protein (cleaved Caspase-3) and expression levels of 5-FU induced PLKO and CGI-58 KD. Seahorse assay was applied to test the mitochondrial function of PLKO and CGI-58 KD. Results CCK-8 assay found that the cell vitality of CGI-58 KD + 5-FU group was reduced significantly ($P<0.01$). Flow cytometry results showed that after 5-FU induction, the apoptotic rate of CGI-58 KD group was significantly higher than that of PLKO group ($P<0.01$). Western blotting showed that the expression level of cleaved Caspase-3 in CGI-58 KD + 5-FU group was obviously higher than that in PLKO + 5-FU group ($P<0.01$). Seahorse assay detected that the oxygen consumption rate of CGI-58 KD group was significantly decreased ($P<0.01$), ATP generation was reduced ($P<0.05$), and ROS expression was increased ($P<0.01$). Antioxidant N-acetyl-L-cysteine could antagonize ROS increase induced by CGI-58 deletion ($P<0.05$), 5-FU killing effect ($P<0.05$) and expression of cleaved Caspase-3. Conclusion CGI-58 deletion can strengthen the killing effect of 5-FU on macrophage and damage the mitochondrial function of macrophage through increasing ROS.

[**Key words**] CGI-58; 5-FU; macrophage; cell apoptosis

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China(81302136) and the General Program of National Natural Science Foundation of China(81172115). Corresponding author:Miao Hongming, E-mail: hongmingmiao@sina.com; Ruan Zhihua, E-mail: rzh123@163.com

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

[通信作者] 缪洪明,E-mail: hongmingmiao@sina.com

阮志华,E-mail: rzh123@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151204.1340.022.html(2015-12-04)

5-FU 作为结肠癌、头颈部肿瘤等实体肿瘤的常用化疗药物,其治疗作用不可替代[1-2],但临床上仍有50%以上的患者对 5-FU 化疗不敏感[3]。现在许多证据已表明肿瘤微环境在调控肿瘤发生发展过程中起重要作用,主要表现为影响肿瘤的恶性程度及化疗敏感性[4-5]。巨噬细胞是肿瘤微环境的重要组成成分[6-7],它对肿瘤的恶性进展起促进作用[8-10],然而其对化疗敏感性的影响目前尚不清楚。近年来研究发现,代谢重编程是肿瘤发生过程中最显著的生物学特性之一[11],且肿瘤微环境对其有调控作用[12-13]。巨噬细胞的脂代谢异常与多种肿瘤的恶性表型有关[14],但它在恶性肿瘤中的具体作用及对 5-FU 化疗敏感性的影响仍知之甚少。我们的前期实验证实,结肠癌巨噬细胞中脂质分解代谢显著增强,提示巨噬细胞的功能活性依赖于旺盛的能量代谢。我们猜测:干预巨噬细胞的物质能量代谢,可能会影响 5-FU 对巨噬细胞的杀伤作用。研究表明脂肪分解代谢的关键基因 CGI-58 参与调节线粒体功能[15],并在结肠癌巨噬细胞中的表达显著升高[16]。综上,我们推测:CGI-58 可抵抗 5-FU 对巨噬细胞的杀伤作用,其机制可能为 CGI-58 会促进脂肪分解和线粒体的有氧氧化作用。本研究以 CGI-58 敲低的巨噬细胞为研究对象,来探索 CGI-58 对 5-FU 化疗敏感性的影响和作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

巨噬细胞系 RAW264.7(PLKO)和 CGI-58 敲低(knockdown)的巨噬细胞系(CGI-58 KD)(由本实验室冻存),恒温恒湿 CO_2 培养箱(美国 Thermo Forma 公司),低速冷冻离心机(美国 Beckman 公司),高速冷冻离心机(日立公司,TGL-16G-A),Western blot 制胶、电泳、转膜、GelDoc2000 凝胶成像系统、显色曝光装置(Bio-rad),紫外分光光度计(Beckman),微孔板读数仪(Biotech),光学显微镜(日本 Olympus 公司),金属浴加热装置(Fisher Sci),多功能酶标读数仪(美国 Thermo Scientific 公司),Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)均由第三军医大学西南医院中心实验室提供,Seahorse 生物能量代谢监测仪(XFe96 Extracellular Flux Analyzer, Seahorse Bioscience, U.S.)由第三军医大学高原医学实验室提供。

1.2 主要试剂

DMEM 高糖型培养基(美国 HyClone 公司),胎牛血清(fetal bovine serum ,FBS,HyClone)0.25%胰蛋白酶(美国 HyClone 公司),DMSO(美国 BIOSHARP 公司),5-FU(#F6627,Sigma);RIPA 蛋白提取试剂盒、PIERCE BCA 蛋白浓度测定试剂盒等 Western 相关试剂均由上海碧云天生物工程公司提供,Cleaved Caspase-3 抗体(Goat pAb,Santa Cruz);CCK-8 细胞增殖试剂盒(C0037, Beyotime, China),细胞凋亡试剂盒 Annexin V-FITC (AO2001-02A-H, Sungene Biotech, China),细胞周期试剂盒(C1052, Beyotime, China),2′,7′-Dichlorofluorescin diacetate (DCFDA) (#D6883, Sigma),活性氧(ROS)抑制剂 N-乙酰半胱氨酸(N-Acetyl-L-cysteine,NAC)(#A7250,Sigma)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 将巨噬细胞(PLKO)和 CGI-58 敲低的巨噬细胞(CGI-58 KD)接种于常规培养基[DMEM 培养基 + 10%(体积比)FBS + 1%(体积比)青、链霉素(100 U/mL,100 μg/mL)],5% CO_2、37 ℃恒温恒湿培养。

1.3.2 CCK-8 细胞增殖实验 在 96 孔板中接种对数生长期的贴壁 PLKO 和 CGI-58 KD 细胞,同一培养条件分别培养 0、24、48、72 h,每孔 100 μL 的培养基中含 2 000 个细胞,每组 5 个复孔。37 ℃培育 12 h 后加入 5-FU 溶液(用 DMSO 溶解成浓度为 0.5 μmol/L),每隔 24 小时换液。每孔加入 100 μL 的 CCK-8 试剂混合液(10% DMEM 4 mL + 400 μL CCK-8 试剂)继续培育 80 min,终止培养,在酶标仪上选择波长 450 nm 处测定各孔光密度值[D(450)]。绘制生长曲线,实验重复 3 次。

1.3.3 细胞周期实验 收集 5-FU 处理 24 h 的对数生长期 PLKO 和 CGI-58 KD 贴壁细胞,细胞数量控制在 10×10^5 个之内,PBS 洗涤 2 次,75%的冰乙醇 −20 ℃固定 1 h,染色,用流式细胞仪检测细胞周期,Cell Quest 软件进行分析,实验重复 3 次。

1.3.4 细胞凋亡 Annexin V-FITC 法 收集 5-FU 处理 24 h 的对数生长期 PLKO 和 CGI-58 KD 贴壁细胞,细胞数达 1×10^5/mL,PBS 洗涤 1 次,100 μL 标记液常温避光孵育 15 min, PBS 再洗涤 1 次, 荧光(SA-FLOUS)溶液 4 ℃避光孵育 20 min 后送流式细胞仪分析数据,实验重复 3 次。

1.3.5 Western blot 检测 取 5-FU 处理 24 h 后的对数生长期 PLKO 和 CGI-58 KD 贴壁细胞,按总蛋白提取试剂盒及 PIERCE BCA 蛋白定量试剂盒说明分别提取细胞总蛋白并进行浓度测定。SDS-PAGE 电泳分离蛋白,250 mA 恒流转膜 2.5 h,5% BSA 溶液室温封闭 1 h,加一抗(cleaved Caspase-3,封闭液 1∶1 000 ~ 1∶5 000 稀释)4 ℃孵育过夜,加二抗(封闭液 1∶5000 稀释)室温孵育 1 h,PBST 洗 3 次,10 min/次,将 ECL 显影液均匀滴在膜上,暗室孵育 1 min 后置于 GelDoc2000 凝胶成像系统上分析处理,实验重复 3 次。

1.3.6　线粒体功能检测(Seahorse Assays)　细胞线粒体氧耗率(OCRs)采用 XF Cell Mito Stress Test Kit 试剂盒(Cat.#:101706100, Seahorse Bioscience, U.S.),于 XFe96 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience, U.S.)检测仪检测。

1.3.7　AMP:ATP 比率检测　参考第三军医大学中心实验室操作标准执行。

1.3.8　PLKO 和 CGI-58 KD 细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)产物测定　用 96 孔板培养对数期 PLKO 和 CGI-58 KD 贴壁细胞,在培养基中加入可穿透细胞膜、对活性氧敏感的探针 2′,7′-dichlorofluorescin diacetate (DCFDA,50 μmol/L),在 37 ℃ 的微孔板荧光计数仪内动态检测(每次 30 min,持续 6.5 h)微孔板底部的荧光强度(激发光 488 nm,吸收光 535 nm),实验重复 3 次。

1.3.9　活性氧(ROS)抑制剂N-乙酰半胱氨酸(NAC)对巨噬细胞(PLKO)与 CGI-58 敲低的巨噬细胞(CGI-58 KD)的 ROS 的影响　用 96 孔板培养对数期 PLKO 和 CGI-58 KD 贴壁细胞,饥饿 2 h,加入 NAC (10 mmol/L)处理 24 h 后进行 ROS 的测定(方法参照 1.3.8)。

1.3.10　CCK-8 和 Western blot 分别检测活性氧抑制剂 NAC 对 5-FU 诱导的 PLKO 与 CGI-58 KD 细胞增殖能力和凋亡的影响　取对数生长期的贴壁 PLKO 和 CGI-58KD 细胞,加 5-FU (0.5 μmol/L)和 NAC (10 mmol/L)处理 24 h 后进行 CCK-8 检测(方法参照 1.3.2)和 Western blot 检测(方法参照 1.3.5)。

1.4　统计学分析

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS18.0 统计软件进行分析,多个样本均数比较采用方差齐性检验,组间比较采用方差分析和 t 检验。

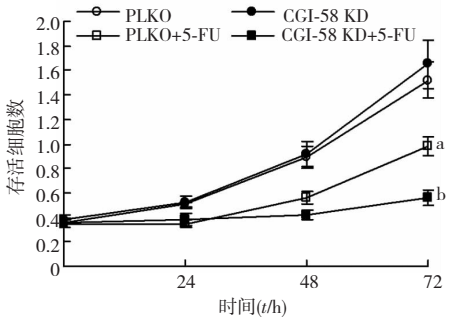
2　结果

2.1　CGI-58 缺失促进 5-FU 对巨噬细胞的杀伤作用

采用 CCK-8 法检测各组细胞的活力,结果显示,与对照组相比,5-FU 处理 24 h 后的 PLKO 和 CGI-58KD 细胞增殖活力降低,CGI-58KD + 5-FU 组细胞活力明显降低($P<0.01$,图 1),提示 CGI-58 缺失会促进 5-FU 对巨噬细胞的杀伤作用。

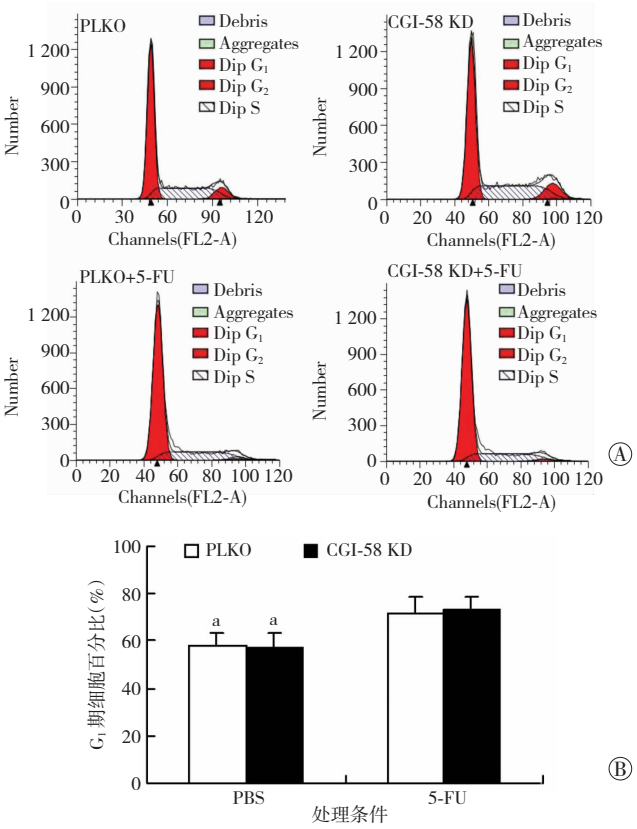
2.2　CGI-58 缺失对 5-FU 诱导的巨噬细胞周期阻滞无显著影响

通过流式细胞术检测各组细胞的细胞周期,发现经 5-FU 处理 24 h 后的 PLKO 和 CGI-58KD 两组细胞的 G_1 期细胞比例无明显差别($P>0.05$,图 2),这表明 CGI-58 缺失对 5-FU 诱导的巨噬细胞周期阻滞无显著影响。



a:$P<0.01$,与 PLKO 比较;b:$P<0.01$,与 CGI-58KD 和 PLKO + 5-FU 比较

图 1　CCK-8 检测各组细胞的增殖活力

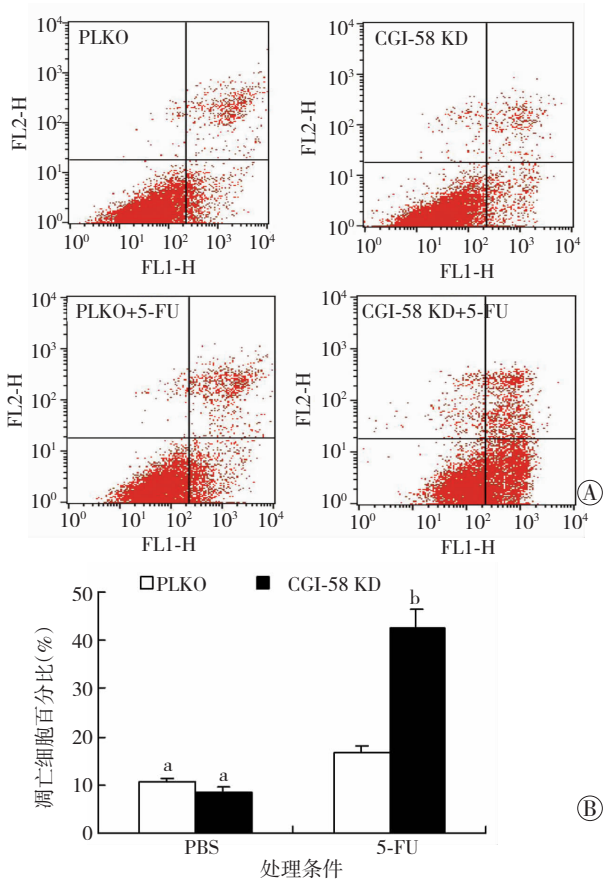


A:流式细胞术检测结果;B:各组细胞的细胞周期分布($n=3$, $\bar{x} \pm s$)　a:$P<0.01$,与 5-FU 比较

图 2　流式细胞术检测各组细胞周期

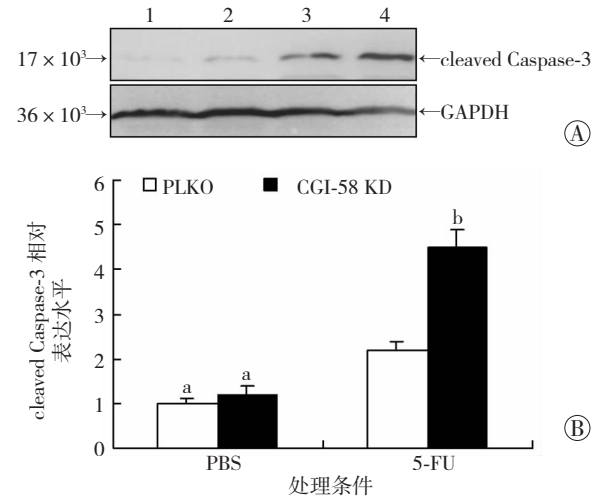
2.3　CGI-58 缺失促进 5-FU 诱导的巨噬细胞凋亡

通过流式细胞术检测各组细胞的细胞凋亡,发现经 5-FU 处理 24 h 后,CGI-58KD 组的细胞凋亡率明显高于 PLKO 组($P<0.01$,图 3);通过 Western blot 检测细胞凋亡蛋白 cleaved Caspase-3 的表达,发现与对照组相比,5-FU 组 cleaved Caspase-3 明显高表达,而且 CGI-58 KD + 5-FU 组 cleaved Caspase-3 的表达水平明显高于 PLKO + 5-FU 组($P<0.01$,图 4),表明 CGI-58 缺失促进了 5-FU 诱导的巨噬细胞凋亡。



A:流式细胞术检测结果;B:各组细胞凋亡率比较($n=3$,$\bar{x}\pm s$);a:$P<0.01$,与 5-FU 比较;b:$P<0.01$,与 PLKO 比较

图 3 流式细胞术检测各组细胞的凋亡

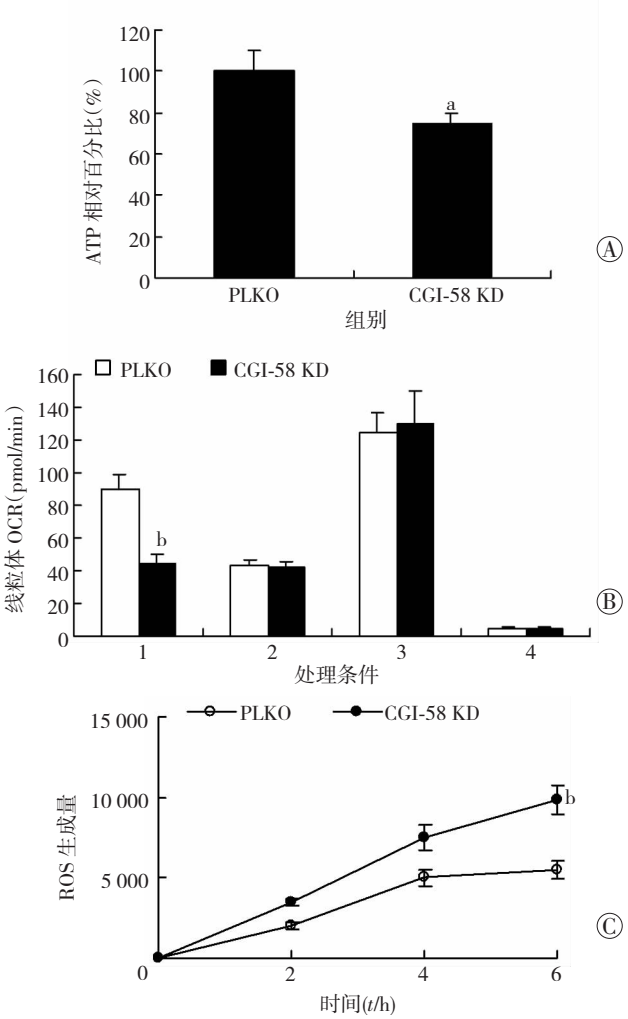


A:Western blot 检测结果;1:PLKO + PBS 组,2:CGI-58 KD + PBS 组,3:PLKO + 5-FU 组,4:CGI-58 KD + 5-FU 组;B:cleaved Caspase-3 蛋白相对表达量统计分析 a:$P<0.01$,与 5-FU 比较;b:$P<0.01$,与 PLKO 比较

图 4 Western blot 检测各组细胞的凋亡蛋白 cleaved Caspase-3 表达水平

2.4 CGI-58 缺失损伤线粒体功能

Seahorse Assays 检测 PLKO 与 CGI-58 KD 细胞的线粒体功能,发现与 PLKO 组相比,CGI-58KD 组其 ATP 生成减少($P<0.05$,图 5A),基础耗氧率 OCR 明显降低($P<0.01$,图 5B),ROS 表达增加($P<0.01$,图 5C),表明 CGI-58 缺失会损伤线粒体功能:OCR 降低,ATP 减少,ROS 增加。



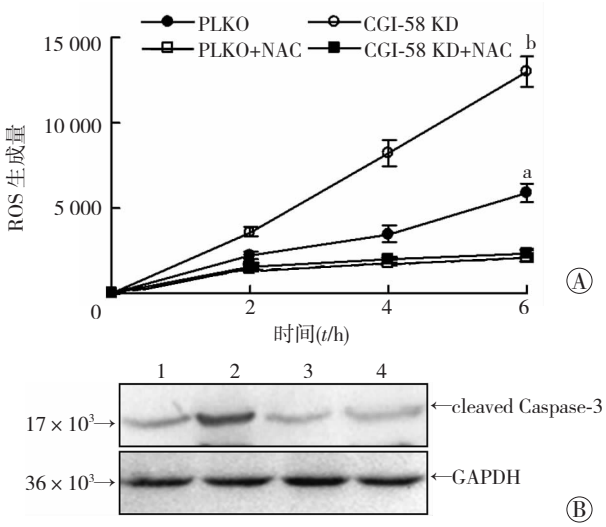
A:OCR 的表达水平;B:ATP 的表达水平 1:Basal;2:Oligomycin;3:FCCP;4:Rot + AntimycinA;C:ROS 的表达水平;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 PLKO 比较

图 5 Seahorse Assays 检测 PLKO 与 CGI-58KD 细胞的线粒体功能

2.5 抗氧化剂 NAC 处理可拮抗巨噬细胞 CGI-58 缺失诱导的 ROS 增加、5-FU 杀伤作用及 cleaved Caspase-3 表达水平

通过 Seahorse Assays 检测在 NAC 阻断下 PLKO 与 CGI-58 KD 的 ROS 表达量,发现 NAC 干预后 CGI-58KD 与 PLKO 的 ROS 表达量基本一致($P>0.05$,图 6A);CCK-8 检测了 NAC 阻断下的 PLKO、CGI-58

KD 与 PLKO + 5-FU、CGI-58 KD + 5-FU 4 组细胞的增殖活力,发现 NAC 干预后 5-FU 诱导 24 h 后的 PLKO 与 CGI-58 KD 的增殖活力无明显差别($P > 0.05$,表 1);Western blot 检测了上述 4 组细胞的凋亡蛋白 cleaved Caspase-3 的表达水平,发现 NAC 干预后 5-FU 诱导 24 h 后的 PLKO 与 CGI-58 KD 的 cleaved Caspase-3 的表达水平无统计学差异(图 6B)。这说明增强线粒体功能或者清除 ROS 可消除 CGI-58 缺失诱导的巨噬细胞凋亡增加。



A:NAC 阻断后 Seahorse Assays 检测 PLKO 与 CGI-58KD 巨噬细胞的 ROS 表达水平;B:NAC 阻断后 Western blot 检测 PLKO + 5FU 与 CGI-58KD + 5FU 凋亡蛋白 cleaved Caspase-3 的表达水平;1:PLKO + PBS + 5-FU 组,2:CGI-58 KD + PBS + 5-FU组,3:PLKO + NAC + 5-FU 组,4:CGI-58 KD + NAC + 5-FU 组;a:$P < 0.01$,与 PLKO + NAC 比较;b:$P < 0.01$,与 CGI-58KD + NAC 比较

图 6 NAC 干预后 PLKO 与 CGI-58 KD 两组细胞的 ROS 变化及 5FU 对两组细胞增殖和凋亡的影响

表 1 NAC 阻断后各组细胞在不同时间点的细胞增殖数比较(个,$n = 5$,$\bar{x} \pm s$)

组别	0 h	24 h	48 h	72 h
PLKO 组	0.36 ± 0.02	0.51 ± 0.02	0.90 ± 0.09	1.52 ± 0.15
CGI-58 KD 组	0.38 ± 0.04	0.52 ± 0.05	0.92 ± 0.10	1.65 ± 0.20
PLKO + 5-FU 组	0.34 ± 0.02	0.35 ± 0.03[a]	0.56 ± 0.05[a]	0.98 ± 0.08[a]
CGI-58 KD + 5-FU 组	0.36 ± 0.04	0.38 ± 0.05[b]	0.42 ± 0.04[b]	0.56 ± 0.06[b]
PLKO + 5-FU + NAC 组	0.36 ± 0.02	0.54 ± 0.02	0.82 ± 0.09	1.32 ± 0.15
CGI-58 KD + 5-FU + NAC 组	0.32 ± 0.04	0.48 ± 0.05	0.78 ± 0.10	1.25 ± 0.20

a:$P < 0.01$,与 PLKO + 5-FU + NAC 组比较;b:$P < 0.01$,与 CGI-58KD + 5-FU + NAC 组比较

3 讨论

5-FU 作为肿瘤治疗的重要基础化疗药物,其主要机制是通过体内相关代谢酶作用转化为活性代谢产物——磷酸脱氧核糖氟尿嘧啶核苷(FdUMP),后者与胸苷酸合成酶(TS)结合使游离的 TS 减少,从而抑制脱氧鸟苷酸(dUMP)生成脱氧胸苷酸(dTMP),导致 DNA 合成减少,同时 FdUMP 通过伪代谢物形式掺入 RNA 分子中,影响 RNA 及蛋白质的合成及功能,从而导致肿瘤细胞死亡[17],但其疗效常受耐药性的限制。因此,增强肿瘤对 5-FU 的敏感性,提高抗癌药物疗效已成为肿瘤临床治疗亟待解决的关键问题。目前国内外研究肿瘤对 5-Fu 的耐药机制主要有 TS、TK(胸苷酸合成酶)、DPD、叶酸代谢相关酶的活性改变,P-gp(P 糖蛋白)、Livin 基因、HSP27(热休克蛋白)的高表达,DNA 修复机制异常,信号传导异常,肿瘤血管生成及近期研究较热的肿瘤干细胞等[18-19],但在巨噬细胞和脂质代谢方面的机制研究甚少。我们知道肿瘤微环境通过多种特异因子、信号机制影响肿瘤的生物学特性,所以对肿瘤微环境进行调控可以作为肿瘤预防和化疗的新靶点。近年来的研究表明,肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)介导的炎性微环境在肿瘤恶性进展中起重要作用,如促进肿瘤发生发展、血管生成、增殖、定植与转移等,但 TAMs 具体活化机制尚不清楚,以往研究都聚焦在肿瘤细胞或其他间质细胞旁分泌的炎性因子对 TAMs 激活的影响,而近年研究认为间质细胞的代谢重编程在调节肿瘤生物学中起非常重要的作用[20-22],其中巨噬细胞自身代谢改变和激活与肿瘤的发生发展密切相关[23-24]。目前 TAMs 对 5-FU 等化疗药物的反应作用和敏感性的研究尚无报道。在前期实验中,我们发现结肠癌 TAMs 中脂质分解代谢显著增强,提示 TAMs 的功能活性依赖旺盛的能量代谢,于是我们猜测:干预巨噬细胞的物质能量代谢,可能会影响 5-FU 对巨噬细胞的杀伤敏感性。CGI-58 是一种新发现的促进脂肪分解的激动剂,广泛表达于人体各个组织器官[25-27],在调控脂肪代谢方面发挥至关重要的作用[16,28],同时又是调节线粒体功能的重要因子[16,25]。我们前期研究发现脂肪分解代谢的关键基因 CGI-58 在结肠癌 TAMs 中显著升高[16]。这表明结肠癌 TAMs 发生代谢重编程后脂质沉积可能与 CGI-58 功能缺失有关。本研究以 CGI-58 为切入点,从 TAMs 和脂代谢的角度寻找 5-FU 对巨噬细胞的影响和作用,旨在阐明 5-FU 对 CGI-58 特异性敲低的巨噬细胞的杀伤作用和机制,这对于探索肿瘤的化疗抵抗有重要意义。

本实验发现 CGI-58 缺失后可以明显增强 5-FU 对巨噬细胞的杀伤作用,主要是通过促进 5-FU 对巨噬细

胞的凋亡来体现的,而与 5-FU 对巨噬细胞的周期无关。进一步研究发现 CGI-58 缺失后会损伤巨噬细胞的线粒体功能,使其基础耗氧率 OCR 降低,ATP 生成减少而活性氧 ROS 生成增多。这些研究结果证实了我们的猜想:巨噬细胞中 CGI-58 缺失后使 TAMs 更容易抵抗 5-FU 的杀伤作用,而 CGI-58 缺失增强 5-FU 对巨噬细胞的杀伤作用是通过增加 ROS 的产生来实现的,这一点可能是引起肿瘤对 5-FU 等药物产生化疗抵抗的重要原因。

本研究通过探讨 5-FU 对 CGI-58 敲低的巨噬细胞的影响,发现 TAMs 可以引起肿瘤继发性耐药,线粒体脂质分解代谢可以影响肿瘤化疗敏感性,巨噬细胞 CGI-58 缺失后,可以增强 5-FU 诱导的巨噬细胞凋亡,解析了 5-FU 如何对巨噬细胞产生杀伤作用,揭示了 CGI-58 缺失后可增强巨噬细胞对 5-FU 的化疗敏感性进而抑制肿瘤的发生发展,此研究结果不仅为接下来的研究工作奠定了实验基础,也为临床上研究 5-FU 的化疗耐药提供了新的依据,并且对于寻找肿瘤的有效防治策略有重要的指导意义。

我们下一步需要在肿瘤细胞系,体内动物实验和临床上验证上述结论,明确巨噬细胞特异性敲低 CGI-58是否可以作为化学预防和治疗癌症的潜在分子靶点,进一步深入研究 CGI-58 是否对 5-FU 以外的其他化疗药物如奥沙利铂、伊立替康等诱导的巨噬细胞同样有抵抗作用,除 CGI-58 外脂质分解代谢的其他酶和基因如 MGLL、ATGL 等是否也有同样作用,为改进 5-FU 等化疗药物的疗效,提高肿瘤患者的生存率,改善预后提供新的治疗途径和理论基础。我们相信随着各种研究的不断深入,正确认识并调控巨噬细胞中 CGI-58 等基因将对肿瘤的临床治疗产生极其重要而深远的影响。

参考文献:

[1] Endo F, Nishizuka S S, Kume K, *et al*. A compensatory role of NF-κB to p53 in response to 5-FU-based chemotherapy for gastric cancer cell lines[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e90155. DOI: 10.1371/journal.pone.0090155

[2] Pullarkat S T, Stoehlmacher J, Ghaderi V, *et al*. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy[J]. Pharmacogenomics J, 2001, 1(1): 65 – 70. DOI:10.1038/sj.tpj.6500012

[3] Xavier C P, Lima C F, Rohde M, *et al*. Quercetin enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in MSI colorectal cancer cells through p53 modulation[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2011, 68(6): 1449 – 1457. DOI: 10.1007/s00280-011-1641-9

[4] Wei Y, Au L S. Role of Tumour Microenvironment in Chemoresistance[J]. Cancer Growth & Progression, 2005, 15: 285-321. DOI: 10.1007/1-4020-3414-8_17

[5] 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

[6] Coussens L M, Werb Z. Inflammation and cancer[J]. Nature, 2002, 420(6917): 860 – 867. DOI: 10.1038/nature01322

[7] Pollard J W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(1): 71 – 78. DOI:10.1038/nrc1256

[8] Nardin A, Abastado J P. Macrophages and cancer[J]. Front Biosci, 2008, 13(9): 3494 – 3505. DOI: 10.2741/2944

[9] 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

[10] Qian B Z. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis[J]. Cell, 2010, 141(1): 39 – 51. DOI:10.1016/j.cell.2010.03.014

[11] DeBerardinis R J, Lum J J, Hatzivassiliou G, *et al*. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation[J]. Cell Metab, 2008, 7(1): 11 – 20. DOI:10.1016/j.cmet.2007.10.002

[12] Chaffer C L, Weinberg R A. A perspective on cancer cell metastasis[J]. Science, 2011, 331(6024): 1559 – 1564. DOI: 10.1126/science.1203543

[13] Martinez-Outschoorn U E, Pavlides S, Howell A, *et al*. Stromal-epithelial metabolic coupling in cancer: integrating autophagy and metabolism in the tumor microenvironment[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2011, 43(7): 1045 – 1051. DOI:10.1016/j.biocel.2011.01.023

[14] Das S K, Eder S, Schauer S, *et al*. Adipose triglyceride lipase contributes to cancer-associated cachexia[J]. Science, 2011, 333(6039): 233 – 238. DOI: 10.1126/science.1198973

[15] Brown J M, Chung S, Das A, *et al*. CGI-58 facilitates the mobilization of cytoplasmic triglyceride for lipoprotein secretion in hepatoma cells[J]. J Lipid Res, 2007, 48(10): 2295 – 2305. DOI: 10.1194/jlr.M700279-JLR200

[16] Miao H, Ou J, Ma Y, *et al*. Macrophage CGI-58 deficiency activates ROS-inflammasome pathway to promote insulin resistance in mice[J]. Cell Rep, 2014, 7(1): 223 – 235. DOI:10.1016/j.celrep.2014.02.047

[17] Povey A C, Margison G P, Santibanez-Koref M F. Lung cancer risk and variation in MGMT activity and sequence[J]. DNA Repair (Amst), 2007, 6(8): 1134 - 1144. DOI:10.1016/j.dnarep.2007.03.022

[18] 盛雅萍, 郭伟剑. 5-氟尿嘧啶耐药机制及其治疗[J]. 国际肿瘤学杂志, 2006, 33(7): 502 - 505. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-422X.2006.07.008

[19] 韩勇, 寿成超. 影响5-FU疗效的研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2010, 37(21): 1255 - 1259. DOI:10.3969/j.issn.1000-8179.2010.21.014

[20] Mueller M M, Fusenig N E. Friends or foes-bipolar effects of the tumour stroma in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(11): 839 - 849. DOI:10.1038/nrc1477

[21] Valencia T, Kim J Y, Abu-Baker S, *et al*. Metabolic reprogramming of stromal fibroblasts through p62-mTORC1 signaling promotes inflammation and tumorigenesis[J]. Cancer Cell, 2014, 26(1): 121 - 135. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.05.004

[22] Roodhart J M, Daenen L G, Stigter E C, *et al*. Mesenchymal stem cells induce resistance to chemotherapy through the release of platinum-induced fatty acids[J]. Cancer Cell, 2011, 20(3): 370 - 383. DOI:10.1016/j.ccr.2011.08.010

[23] Prieur X, Roszer T, Ricote M. Lipotoxicity in macrophages: evidence from diseases associated with the metabolic syndrome[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1801(3): 327 - 337. DOI:10.1016/j.bbalip.2009.09.017

[24] Zhu X, Owen J S, Wilson M D, *et al*. Macrophage ABCA1 reduces MyD88-dependent Toll-like receptor trafficking to lipid rafts by reduction of lipid raft cholesterol[J]. J Lipid Res, 2010, 51(11): 3196 - 3206. DOI: 10.1194/jlr.M006486

[25] Brown J M, Betters J L, Lord C, *et al*. CGI-58 knockdown in mice causes hepatic steatosis but prevents diet-induced obesity and glucose intolerance[J]. J Lipid Res, 2010, 51(11): 3306 - 3315. DOI: 10.1194/jlr.M010256

[26] Yamaguchi T, Omatsu N, Morimoto E, *et al*. CGI-58 facilitates lipolysis on lipid droplets but is not involved in the vesiculation of lipid droplets caused by hormonal stimulation[J]. J Lipid Res, 2007, 48(5): 1078 - 1089. DOI: 10.1194/jlr.M600493-JLR200

[27] Subramanian V, Rothenberg A, Gomez C, *et al*. Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes[J]. J Biol Chem, 2004, 279(40): 42062 - 42071. DOI:10.1074/jbc.M407462200

[28] Yang X, Lu X, Liu J. Identification of a novel splicing isoform of murine CGI-58[J]. FEBS Lett, 2010, 584(5): 903 - 910. DOI:10.1016/j.febslet.2009.12.058

(**收稿**:2015-07-26;**修回**:2015-09-20)

(编辑 汪勤俭)