DOI:10.16016/j.1000-5404.202102001

miR-382-5p 通过 Akt/mTOR 信号通路影响乳腺癌肿瘤相关巨噬细胞极化

周 华,王园园,林子晶,明 佳 400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院乳甲外科

[**摘要**] **目的** 探讨乳腺癌肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages,TAMs)中 miR-382-5p 的表达对巨噬细胞极化表型以及乳腺癌生物学特性的影响和可能机制。**方法** 收集 2018-2020 年本院 25 例临床乳腺癌患者的肿瘤相关巨噬细胞及配对癌旁组织巨噬细胞,用 qRT-PCR 检测 miR-382-5p 的表达;利用 miR-382-5p 过表达慢病毒转染小鼠腹腔巨噬细胞(mouse peritoneal macrophages,PMs),qRT-PCR、Western blot 检测巨噬细胞的 M1/M2 极化指标(iNOS、TNF-α、Arg-1、IL-10 等)、miR-382-5p 以及 Akt/mTOR 信号通路变化,采用流式细胞仪检测 CD86、CD206 的表达;将 4T1 细胞与 TAMs、过表达 miR-382-5p 的 TAMs 共培养或培养上清液处理后,CCK-8 实验检测 4T1 细胞的增殖能力,Transwell 实验检测 4T1 细胞的侵袭能力,细胞划痕实验检测 4T1 细胞的迁移能力。**结果** 25 例临床标本的乳腺癌 TAMs 的 miR-382-5p 表达水平较配对癌旁组织巨噬细胞明显降低($P<0.05$);与对照组比较,过表达 miR-382-5p 的 TAMs 的 M1 型极化标记物(iNOS、TNF-α、CD86 等)的表达水平升高,M2 型极化标记物(Arg-1、IL-10、CD206)的表达水平降低($P<0.05$);Akt/mTOR 信号通路相关蛋白磷酸化水平明显降低($P<0.05$);4T1 细胞的增殖、侵袭、迁移能力被抑制($P<0.05$)。**结论** miR-382-5p 可能通过改变乳腺癌 TAMs 的极化状态影响乳腺癌细胞的侵袭、迁移等过程;其机制可能与 miR-382-5p 介导 Akt/mTOR 信号通路调节巨噬细胞极化相关。

[**关键词**] 乳腺癌;肿瘤相关巨噬细胞;microRNA;Akt/mTOR 信号通路
[**中图法分类号**] R394.3; R730.23; R737.9 [**文献标志码**] A

miR-382-5p affects polarization of tumor-associated macrophages in breast cancer through Akt/mTOR signaling pathway

ZHOU Hua, WANG Yuanyuan, LIN Zijing, MING Jia Department of Breast and Thyroid Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of microRNA-382-5p (miR-382-5p) expression in breast cancer tumor-associated macrophages (TAMs) on the polarization phenotype of macrophages as well as the biological characteristics of breast cancer, and to explore its possible mechanism. **Methods** Breast cancer TAMs and their paring macrophages from adjacent tissues of 25 breast cancer patients treated in our hospital between 2018 and 2020 were collected, and the expression of miR-382-5p was detected by qRT-PCR. Mouse peritoneal macrophages (PMs) were transfected with miR-382-5p over-expressed lentivirus. The changes of M1/M2 polarization indicators (iNOS, TNF-α, Arg-1, IL-10, etc.) and the expression of miR-382-5p and Akt/mTOR signaling pathway were determined by qRT-PCR and Western blotting, and the expression of CD86 and CD206 were tested using flow cytometry. After the 4T1 mouse breast cancer cells were co-cultured with TAMs and TAMs overexpressing miR-382-5p, respectively, or treated with the corresponding supernatants, the proliferative capacity of 4T1 cells was subsequently tested by CCK-8 assay, the invasion ability and the migration ability of 4T1 cells were observed using Transwell assay and cell scratch assay,

[**基金项目**] 重庆医科大学附属第二医院"宽仁英才"骨干人才项目(KY2019G016);重庆市科学技术委员会社会事业与民生保障科技创新专项(CSTC2018jscx-msybX0020);重庆市渝中区科技计划项目(20160104)

[**通信作者**] 明 佳,E-mail:mjia1001@sina.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

respectively. **Results** The level of miR-382-5p in breast cancer TAMs was significantly lower than that in macrophages of pairing adjacent tissues ($P<0.05$). Compared with the control group, the levels of M1-phenotype polarization markers (iNOS, TNF-α, CD86, etc.) were increased, while those of M2 indicators (Arg-1, IL-10, CD206) were decreased in the miR-382-5p overexpressed group ($P<0.05$), and the phosphorylation levels of the proteins related to Akt/mTOR signaling pathway were reduced ($P<0.05$). In addition, the abilities of proliferation, invasion and migration of 4T1 cells were all inhibited in the miR-382-5p overexpressed group as compared with the TAMs group ($P<0.05$). **Conclusion** miR-382-5p may possibly play a vital role in the invasion and migration processes of breast cancer cells by affecting the polarization phenotypes of TAMs, and the mechanism may be associated with miR-382-5p mediated Akt/mTOR signaling pathway in the regulation of macrophage polarization.

[**Key words**] breast cancer; tumor-associated macrophages; microRNA; Akt/mTOR signaling pathway

Supported by the "Kuanren Yingcai" Backbone Talents Project of the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University (KY2019G016), the Program of Science and Technology Innovation Special Project for Social and Livelihood of Chongqing Science and Technology Commission (CSTC2018jscx-msyhu0020), and the Project of Science and Technology Plan of Yuzhong District, Chongqing (20160104). Corresponding author: MING Jia, E-mail: mjia1001@sina.com

巨噬细胞是一种具有高度可塑性的细胞,在不同的环境刺激下可分化为 M1 和 M2 极化表型[1]。Toll 样受体(Toll-like receptors, TLR)的配体(如 LPS 或 IFN-γ)可诱导巨噬细胞极化为 M1 表型,促进炎症反应,对肿瘤细胞具有杀伤作用;而当巨噬细胞受到辅助型 T 细胞 2(T helper 2,Th2)型细胞因子(如 IL-4 或 IL-13)的刺激时,则会转化为 M2 表型,抑制炎症反应并促进肿瘤的进展。肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages,TAMs)占间质细胞的比例可达 50%以上,通过介导免疫抑制、促进血管生成和肿瘤转移等,在肿瘤微环境(tumor microenvironment,TME)中起着至关重要的作用[2-4]。研究表明,TAMs 多为 M2 样巨噬细胞[5],其浸润数量与乳腺癌的恶性程度和转移风险等高度相关[6]。TAMs 从 M1 表型向 M2 表型的转化是肿瘤进展的关键事件,而阻断 TAMs 在肿瘤微环境中的功能可能是抑制肿瘤发展的潜在治疗策略[1-2]。因此,一些针对 M2 分化巨噬细胞的策略已经在临床环境中进行了测试,例如,抑制 TAMs 分化,阻断 TAMs 激活和将 TAMs 重编程到 M1 型[7-9]等。然而,导致 TME 中 TAMs 不同表型转化的分子机制尚不完全清楚。

微 RNA(microRNA,miRNA)是一类小型非编码 RNA,长度为 18~25 个核苷酸,通过与靶基因的 3'UTR 非编码区结合导致 mRNA 降解或阻断其翻译从而在转录后水平抑制基因表达[10]。近年来,miRNAs 通过调控巨噬细胞极化相关基因的表达,已成为巨噬细胞极化的重要调节因子[11-12]。miR-382-5p 作为一种抑癌性 miRNA,在包括乳腺癌在内的多种肿瘤的发生、发展过程中具有重要的作用[13-15],但 miR-382-5p 在 TME 中的作用机制目前尚不清楚。本研究探讨了 miR-382-5p 在乳腺癌 TAMs 中的表达和功能,发现 miR-382-5p 在乳腺癌 TAMs 中表达水平显著降低,可能通过改变巨噬细胞的极化状态,在乳腺癌进展和转移等过程中发挥了重要作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂

4T1 小鼠乳腺癌细胞株、THP-1 人外周血的单核细胞株、Raw264.7 小鼠巨噬细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库;miRNA-up-慢病毒(MI0000799)购自上海吉凯基因化学技术有限公司;RPMI1640 培养基和南美胎牛血清购自 Gibco 公司;TNF-α 抗体、IL-10 抗体购自 Abcam 公司;p-Akt 抗体、Akt 抗体、p-mTOR 抗体、mTOR 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司;IL-6 抗体、Arg-1 抗体、β-actin 抗体购自上海碧云天生物技术公司;CD86(Fitc 标记)、CD206(APC 标记)抗体购自 Thermo Fisher Scientific 公司;反转录试剂盒和 TB Green™ Premix *Ex Taq*™(Tli RNase H Plus)试剂盒购自 TaKaRa 公司;PolyA 加尾法 microRNA 反转录试剂盒和 PCR 引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司;Western blot 相关试剂购自碧云天生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 临床标本 乳腺癌临床样本及配对癌旁组织来自 2018-2020 年本院行手术治疗的 25 例乳腺癌患者,均经术后病理确诊乳腺癌,临床病理资料完整。本研究由重庆医科大学附属第二医院伦理研究委员会批准(2018 年科伦审第 42 号),所有患者知情同意。

1.2.2 原代巨噬细胞的分离及培养 将收集的乳腺癌组织及配对的癌旁组织(至少离肿瘤 2 cm)转移

至培养皿中,用灭菌 PBS 浸泡并洗涤。将组织剪碎成约 1 mm^3 的碎块,加入Ⅳ型胶原蛋白酶(2 mg/mL)和透明质酸酶(0.25 mg/mL)后转移至离心管中。恒温摇床(37 ℃, 180 r/min)消化 2 h,每 15 min 吹打 1 次。消化所得细胞悬液经 40 μm 筛网过滤,PBS 冲洗残留在筛网上的组织块,将滤过的液体收集至离心管,高速离心(2 000 r/min,5 min)后,PBS 重悬细胞,利用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离巨噬细胞[16],吸取交界处的环状白色细胞层,PBS 洗涤 2 次,离心后收集细胞用于后续实验。

1.2.3 细胞株培养及传代 4T1、THP-1、Raw264.7 细胞培养在饱和湿度的培养箱(37 ℃、5% CO_2)中,培养基采用 RPMI1640 培养基(10% FBS、1%双抗),胰酶(0.25%)消化传代,每 2~3 天传代 1 次。

1.2.4 PMs 的提取及培养 小鼠处死后在 75%酒精浸泡 1~2 min,仰卧位固定于解剖板上,注射器吸取 5 mL 含双抗的 RPMI1640 培养基注射进小鼠腹腔,棉球轻揉小鼠腹部,利用注射器将小鼠腹腔液转移至 15 mL 离心管中,离心(4 ℃,1 000 r/min,10 min),弃上清,用含双抗的 RPMI1640 培养基洗涤 1 次,收集 PMs 细胞培养在 RPMI1640 培养基(10% FBS、1%双抗)中,置于饱和湿度的培养箱(37 ℃、5% CO_2)中常规培养[17],收集对数生长期细胞,用于后续实验。

1.2.5 实验分组 为检测过表达 miR-382-5p 后 TAMs 极化指标、Akt/mTOR 通路蛋白表达的变化,将 TAMs 细胞分 2 组,①对照组:正常培养的 TAMs 细胞;②miR-382-5p 组:转染 miR-382-5p 过表达慢病毒颗粒的 TAMs。为检测过表达 miR-382-5p 的 TAMs 对 4T1 乳腺癌细胞生物学特性的影响,实验分为 3 组,①对照组:正常培养的 4T1 细胞;②TAMs 组:4T1 细胞与 TAMs 细胞共培养或 TAMs 的培养上清液处理;③miR-382-5p 组:4T1 细胞与过表达 miR-382-5p 的 TAMs 共培养或 TAMs 的培养上清液处理。

1.2.6 细胞转染 将 PMs 原代细胞消化后重悬,细胞计数板计数,接种至 6 孔板中(5×10^5/孔),每孔加入 2 mL 培养基,24 h 后更换培养基并加入感染增强液 A,分别加入慢病毒颗粒液或阴性慢病毒转染液,轻摇混匀,37 ℃培养 12 h 后根据细胞状态可更换培养基,转染 72 h 后,在显微镜下通过绿色荧光强弱判断 PMs 细胞转染效率。加入嘌呤霉素(2 μg/mL)筛选稳转株,qRT-PCR 进行验证。

1.2.7 巨噬细胞体外诱导 TAMs:PMs 原代细胞与 4T1 细胞利用 Transwell 小室(0.4 μm)共培养 24 h[18];Mφ 型巨噬细胞:Raw264.7 细胞培养贴壁或 THP-1 细胞用 50 mg/mL PMA 诱导贴壁;M1 型巨噬细胞:Raw264.7 细胞或贴壁的 THP-1 细胞用 20 ng/mL IFN-γ 联合 500 ng/mL LPS 诱导 24 h;M2 型巨噬细胞:Raw264.7 细胞或贴壁的 THP-1 细胞用 20 ng/mL IL-4 诱导 24 h。

1.2.8 qRT-PCR 实验 采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,将总 RNA 逆转录成 cDNA(反应条件:42 ℃-2 min→4 ℃;37 ℃-15 min→85 ℃-5 s→4 ℃)后进行 qRT-PCR 检测;miR-382-5p 检测用 PolyA 加尾法将 microRNA 反转录成 cDNA(反应条件:37 ℃-60 min→85 ℃-5 min→4 ℃)后再进行 qRT-PCR 检测。TNF-α、iNOS、IL-10、Arg-1 等以 β-actin 为内参,miR-382-5p 以 U6 为内参,具体引物序列见表 1。反应条件:96 ℃-30 s→(95 ℃-5 s→55 ℃/60 ℃-30 s)×40 cycles。反应结束后,实验结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算并分析。

1.2.9 流式细胞仪检测极化指标 收集 6 孔板中的 PMs 细胞,PBS 重悬细胞洗涤 2 次,细胞计数后加入 4%多聚甲醛固定细胞(10 min),PBS 吹打重悬洗涤 2 次,加入适量 0.1% Triton 通透 5 min,PBS 洗涤 2 次,离心后加入 CD86(Fitc 标记)、CD206(APC 标记)抗体,在避光环境下冰上孵育 30 min,PBS 洗涤 2 次后弃上清,加入 400 μL PBS,把离心后已孵育好抗体的细胞吹打重悬,流式细胞仪检测细胞极化指标。

1.2.10 CCK-8 检测细胞增殖能力 将各组 PMs 细胞(1×10^6 个/皿)接种于 6 cm 培养皿中,体外培养 24 h 后收集上清液,离心(2 000 r/min,5 min)后吸取上清液,按 1∶1比例加入含 20% FBS RMPI1640 培养基混合后制成巨噬细胞上清液。将 4T1 细胞以 5×10^3/孔,接种于 96 孔细胞培养板,每组设 4 个复孔,待细胞贴壁后记为 0 h,换液并加入各组 TAMs 上清液 100 μL 或等量 10% FPS 培养基,分别于 24、48、72 h 各时间点

表 1 qRT-PCR 引物

引物名称	上游序列	下游序列
TNF-α	5′-CGCTGAGGTCAATCTGCCCAAGTAC-3′	5′-GGGGGCTGGGTAGAGAATGGATG-3′
IL-10	5′-AAGGCAGTGGAGCAGGTGAAGAG-3′	5′-GCAGGTGTTTTAGCTTTTCATTTTG-3′
iNOS	5′-CCTTGGTGAAGGGACTGAGC-3′	5′-CAACGTTCTCCGTTCTCTTGC-3′
Arg-1	5′-CTTGGCTTGCTTCGGAACTC-3′	5′-GGAGAAGGCGTTTGCTTAGTTC-3′
β-actin	5′-ACCCCGTGCTGCTGACCGAG-3′	5′-TCCCGGCCAGCCAGGTCCA-3′
miR-382-5p	5′-GAAGTTGTTCGTGGTGGATTCG-3′	

加入 10 μL CCK-8 溶液,37 ℃,5% CO_2,细胞培养箱中孵育 2 h 后,利用酶标仪分别检测各孔细胞 450 nm 波长处的光密度值[D(450)]。

1.2.11　划痕实验　　在 6 孔板的背面用黑色记号笔画 6 条标线。将 4T1 细胞均匀接种至 6 孔板中(5×10^5/孔),将各组巨噬细胞接种至 Transwell 小室内(5×10^5/孔),分开培养至细胞贴壁,当 4T1 细胞长满 90%视野后,用 200 μL 移液枪枪头在 6 孔板内垂直背面的横线进行均匀划痕,PBS 洗涤 2 次,去除漂浮的细胞,加入无血清培养基,电子显微镜下拍照并记为 0 h。将各组的 Transwell 小室移至对应分组的 6 孔板中共培养,更换为无血清培养基,24 h 后移除上室,显微镜下拍照并记录。

1.2.12　Transwell 侵袭实验　　水化 Matrigel 基质胶基底膜,将 4T1 细胞接种于上室(1×10^4/孔)并加入 100 μL 含 BSA(0.2%)无血清培养基,下室加入 500 μL 的 PMs、TAMs、过表达 miR-382 的 TAMs 细胞悬液(1×10^5/mL,10% FBS)。24 h 后弃上层培养基,用 4%多聚甲醛进行固定(30 min),PBS 洗涤 2 次,0.1%结晶紫染色 30 min,PBS 洗涤 3 次,棉签拭去上室未迁移细胞,适当风干后显微镜下随机选取 5 个视野拍照并计数穿膜细胞数。

1.2.13　Western blot 实验　　取对数生长期细胞,RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 试剂盒测定蛋白浓度,煮沸(100 ℃,10 min),-20 ℃冰箱保存。凝胶按分子量要求制备,每孔蛋白上样量为 30 μg,电泳(恒压 100 V,100 min),0.2 μm PVDF 转膜(恒流 250 mA,60~120 min),快速封闭液室温摇床封闭 30 min,TBST 洗膜后孵育一抗(1∶1 000)4 ℃冰箱过夜,TBST 洗膜 3 次(10 min/次),加对应的二抗(1∶5 000)室温摇床孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次(10 min/次),ECL 特超敏化学发光液按 1∶1比例避光混合后在显像仪中显色成像。

1.3　统计学分析

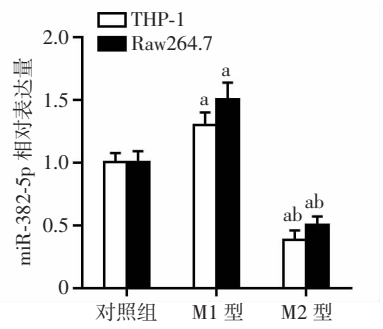
采用 SPSS 24.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组配对样本采用配对样本 t 检验,两组独立样本采用独立样本 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$。

2　结果

2.1　miR-382-5p 在肿瘤相关巨噬细胞中的表达变化

2.1.1　miR-382-5p 在乳腺癌临床样本中的表达　　miR-382-5p 在乳腺癌 TAMs 中相对表达量为 1.79±2.02,明显低于癌旁巨噬细胞(4.56±5.17,$P<0.05$)。

2.1.2　miR-382-5p 在不同极化巨噬细胞株中的表达　　THP-1 细胞株中,与对照组比较,M1 型巨噬细胞的 miR-382-5p 表达升高,M2 型巨噬细胞的 miR-382-5p 表达降低,而与 M2 型比较,M1 型巨噬细胞的 miR-382-5p 表达升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);在 Raw264.7 细胞株中结果相同,见图 1。

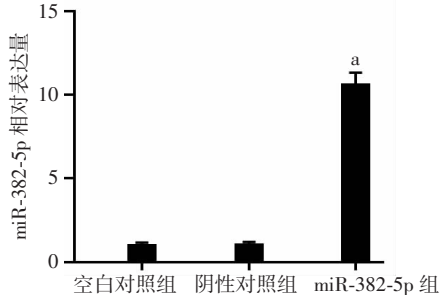


a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 M1 型比较

图 1　miR-382-5p 在不同极化巨噬细胞中的表达

2.2　过表达 miR-382-5p 对巨噬细胞极化表型的影响

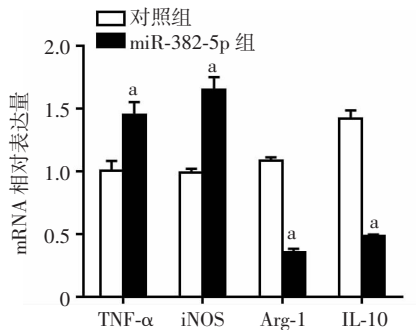
2.2.1　miR-382-5p 过表达慢病毒转染效率验证　　转染 miR-382-5p 过表达慢病毒后,TAMs 中 miR-382-5p 表达水平较空白对照组升高(9.62±0.42)倍,较阴性对照组升高(9.55±0.42)倍,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 2)。



a:$P<0.05$,与空白对照组和阴性对照组比较

图 2　TAMs 中 miR-382-5p 过表达慢病毒转染效率验证

2.2.2　miR-382-5p 对巨噬细胞极化标志物 mRNA 表达的影响　　与对照组比较,miR-382-5p 组 TNF-α、iNOS 的 mRNA 表达升高;而 Arg-1、IL-10 的 mRNA 表达降低,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 3)。



a:$P<0.05$,与对照组比较

图 3　miR-382-5p 对极化标志物 mRNA 表达的影响

2.2.3　miR-382-5p 对巨噬细胞极化标志物蛋白表达的影响　　与对照组相比,miR-382-5p 组 TNF-α、IL-6 的蛋白表达升高;而 Arg-1、IL-10 的蛋白表达降低,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 4)。

2.2.4　流式细胞仪检测 miR-382-5p 对巨噬细胞极化的影响　　与对照组比较,TAMs 组 CD86 阳性细胞数比例降低,CD206 阳性细胞数比例升高,差异有统计学意义($P<0.05$,表 2);与 TAMs 组比较,miR-382-5p 组 CD86 阳性细胞数比例升高 45.97%,CD206 阳性细胞数比例降低 47.64%,差异具有统计学意义($P<0.05$,表 2)。

表 2　miR-382-5p 对 TAMs 中 CD86 和 CD206 蛋白表达的影响($\%$, $\bar{x}\pm s$)

组别	CD86(M1 型细胞)	CD206(M2 型细胞)
对照组	0.24±0.18	0.26±0.17
TAMs 组	0.12±0.04[a]	49.51±3.14[a]
miR-382-5p 组	46.09±4.81[b]	1.87±0.37[b]

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 TAMs 组比较

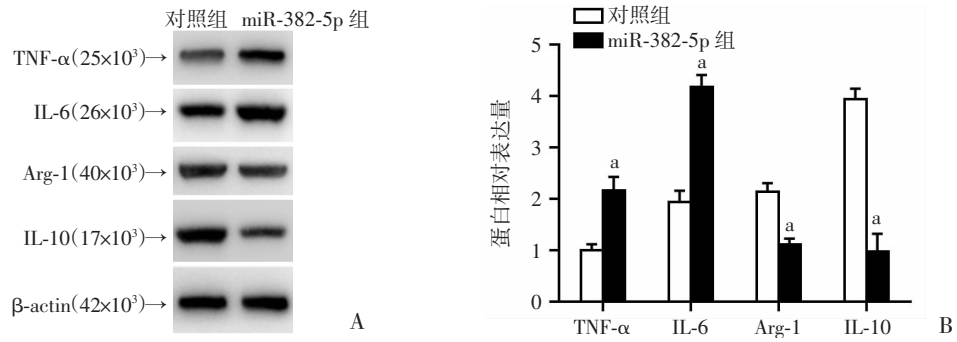
2.3　miR-382-5p 对 Akt/mTOR 信号通路蛋白表达水平的影响

与对照组比较,过表达 miR-382-5p 组 TAMs 中 p-Akt 表达量降低 0.74±0.14,p-mTOR 降低 0.96±0.23,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 5);而 Akt 降低 0.13±0.15,mTOR 降低 0.07±0.14,差异无统计学意义(图 5)。

2.4　过表达 miR-382-5p 的巨噬细胞对乳腺癌细胞生物特性的影响

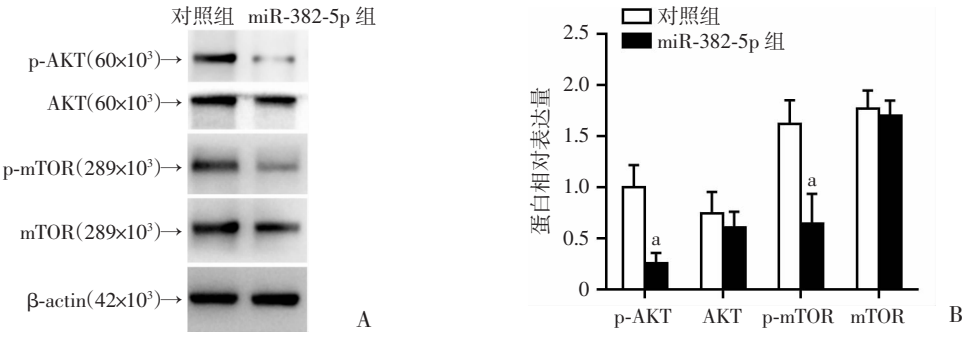
2.4.1　TAMs 中过表达 miR-382-5p 对 4T1 细胞增殖能力的影响　　细胞培养 72 h 时,与对照组比较,TAMs 组在 450 nm 处光密度值升高 0.63±0.17,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 6);而与 TAMs 组比较,miR-382-5p 组在 450 nm 处光密度值降低 0.88±0.13,差异有统计学意义($P<0.05$,图 6)。

2.4.2　TAMs 中过表达 miR-382-5p 对 4T1 细胞侵袭能力的影响　　如图 7 所示,对照组、TAMs 组和 miR-382-5p 组穿膜细胞数分别为(54.67±7.02)、(100.67±14.01)、(32.67±9.02)个。与对照组比较,TAMs 组穿膜细胞数增加 0.84 倍,差异有统计学意义($P<0.05$);而与 TAMs 组比较,miR-382-5p 组穿膜细胞数减少 0.68 倍,差异具有统计学意义($P<0.05$)。



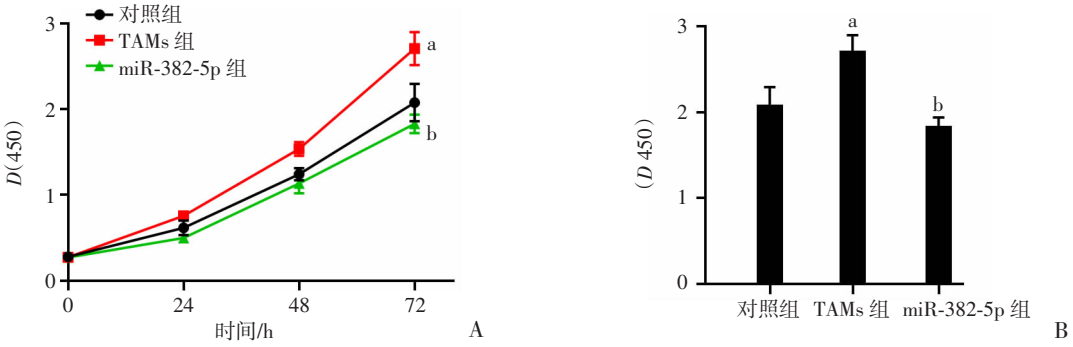
A:Western blot 检测结果;B:蛋白相对表达量　a:$P<0.05$,与对照组比较

图 4　miR-382-5p 对极化标志物蛋白表达的影响



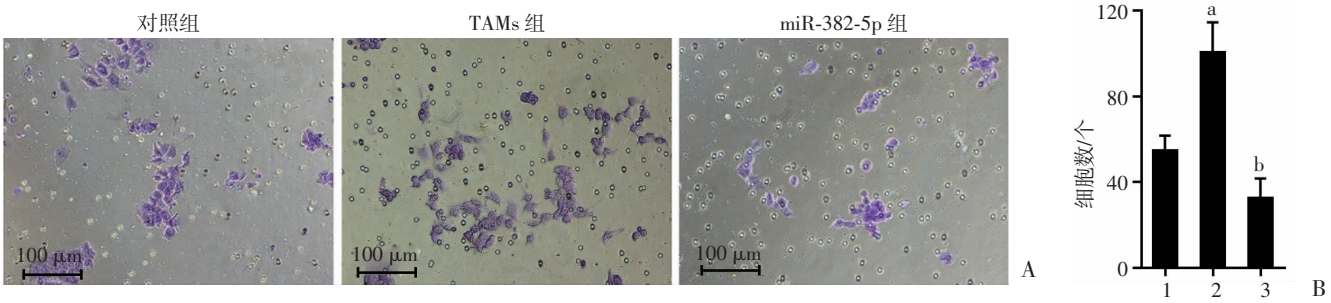
A:Western blot 检测结果;B:蛋白相对表达量　a:$P<0.05$,与对照组比较

图 5　miR-382-5p 对 Akt/mTOR 信号通路蛋白表达的影响



A:CCK-8 实验结果;B:72 h 各组光密度值比较　a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 TAMs 组比较

图 6　CCK-8 实验检测 TAMs 中过表达 miR-382-5p 对 4T1 细胞增殖能力的影响



A:Transwell 侵袭实验(0.1%结晶紫);B:各组侵袭细胞数比较　1:对照组,2:TAMs 组,3:miR-382-5p 组;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 TAMs 组比较

图 7　Transwell 实验检测各组 4T1 细胞侵袭能力

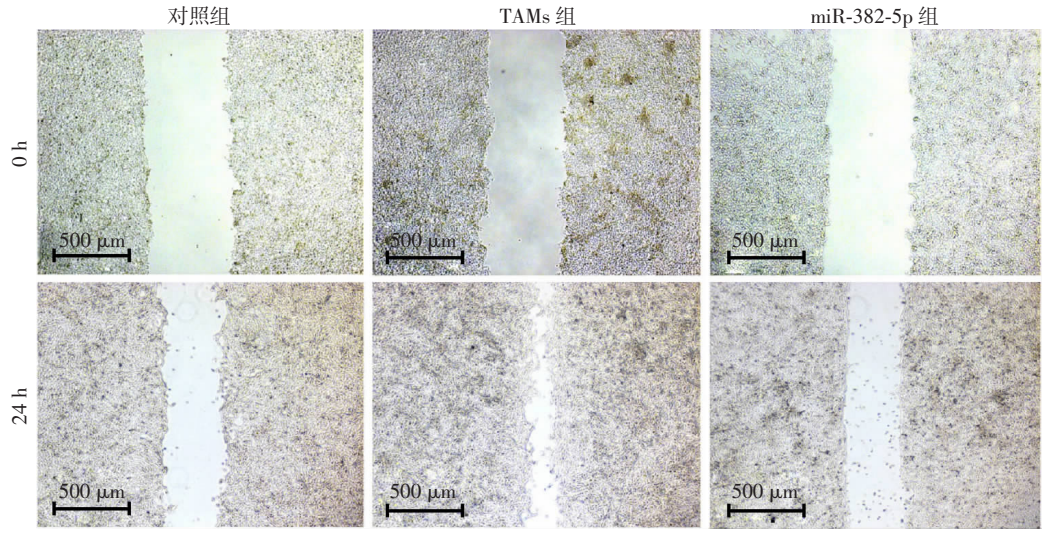


图 8　细胞划痕实验检测 TAMs 中过表达 miR-382-5p 对 4T1 细胞迁移能力的影响

2.4.3　TAMs 中过表达 miR-382-5p 对 4T1 细胞迁移能力的影响　　如图 8 所示,对照组 3 个视野细胞的相对迁移率为 1.00±0.14,TAMs 组的相对迁移率为 2.46±0.44,miR-382-5p 组的相对迁移率为 1.33±0.09;与对照组比较,TAMs 组的细胞迁移率增加 1.46 倍,差异有统计学意义($P<0.05$);与 TAMs 组比较,miR-382-5p 组细胞迁移率减少 0.46 倍,差异有统计学意义($P<0.05$)。

3　讨论

miRNA 是一类调节基因表达的小核糖核酸,目前已有多种 miRNAs 被证实参与巨噬细胞极化。例如,

let7c 通过靶向 C/EBP-δ 促进 TAMs 的 M2 极化[19]；miR-21 通过靶向 STAT3 抑制 TAMs 向 M2 极化[20]；miR-222 可抑制 TAMs 向肿瘤部位的募集等[21]。本研究通过检测临床乳腺癌标本及其配对癌旁组织,发现 miR-382-5p 在乳腺癌 TAMs 中的表达水平明显低于癌旁组织的巨噬细胞。由于 TAMs 多为 M2 型的巨噬细胞,本研究检测了 miR-382-5p 在不同极化表型巨噬细胞中的表达水平,结果显示在 THP-1 细胞和 Raw264.7 细胞中均出现了相同的变化趋势:与对照组比较,M1 型巨噬细胞的 miR-382-5p 相对表达量升高,而 M2 型巨噬细胞的 miR-382-5p 相对表达量降低,这与在临床乳腺癌标本中观察到的现象一致。为探究 miR-382-5p 对巨噬细胞极化的影响,通过 LV-miR-382-5p 过表达慢病毒转染 TAMs,发现过表达 miR-382-5p 后, TAMs 中 M1 型细胞因子(TNF-α、iNOS 等)的 mRNA 和蛋白表达水平增加,而 M2 型细胞因子(Arg-1、IL-10 等)的 mRNA 和蛋白表达水平明显降低。同时,流式细胞分析结果显示过表达 miR-382-5p 的 TAMs 的 CD206 表达水平降低,CD86 水平升高,提示 miR-382-5p 可能影响巨噬细胞中 M1/M2 型细胞因子的释放,诱导 TAMs 向 M1 型极化,并抑制 M2 型极化。

Akt/mTOR 信号通路是一条高度进化和保守的信号通路,广泛参与细胞的增殖、凋亡、分化等过程[22]。研究表明,Akt/mTOR 信号通路是影响巨噬细胞极化的重要通路之一:Akt/mTOR 通路受到抑制后可诱导巨噬细胞向 M1 型极化,并释放促炎症因子;相反,Akt/mTOR 通路的激活可导致 M2 型分化,并抑制促炎因子的分泌[23]。为进一步探究 miR-382-5p 调节巨噬细胞极化的分子机制,本研究检测过表达 miR-382-5p 后 TAMs 中 Akt/mTOR 信号通路相关蛋白的表达水平,结果显示,尽管 Akt、mTOR 蛋白表达变化差异无统计学意义,但 p-Akt、p-mTOR 蛋白表达水平被明显抑制,提示 miR-382-5p 可能抑制 TAMs 的 Akt/mTOR 通路磷酸化水平。因此,我们推测 miR-382-5p 可能通过 Akt/mTOR 信号通路介导了 TAMs 的可塑性调节。而在 miR-382-5p 的靶分子预测中,发现 NKAP(nuclear factor-κB activating protein)可能是其潜在的靶基因。有报道 NKAP 是 Akt/mTOR 通路的重要调节分子,可促进 Akt/mTOR 通路及其下游分子激活[24]。有趣的是,NKAP 同样可能参与 Notch 信号通路[25]、NF-κB 的调节[26],而这些分子和信号通路在巨噬细胞极化中同样具有重要意义[27]。在后续的实验中,我们将针对这些分子和信号通路间的相互作用展开更深入的研究。

细胞的增殖、侵袭和转移能力是肿瘤细胞主要的恶性生物学行为。在肿瘤微环境中,TAMs 可刺激血管生成,促进肿瘤转移,抑制免疫等[1-4]。本研究显示,TAMs 能明显提高 4T1 细胞的增殖、侵袭和迁移能力。这些结果表明 TAMs 对乳腺癌细胞的恶性生物学行为具有促进作用,而过表达 miR-382-5p 能在一定程度上逆转这些改变,从而抑制乳腺癌细胞的进展。

综上,本研究显示,miR-382-5p 在 TAMs 和 M2 极化的巨噬细胞中表达下调;其可能通过影响 Akt/mTOR 信号通路介导巨噬细胞极化状态的调节;而过表达 miR-382-5p 可以逆转 TAMs 的促乳腺癌增殖、迁移的作用。本研究揭示了 miR-382-5p 在 TME 中的作用和可能机制,为临床上开展以 TAMs 为靶点的抗癌策略提供新的数据支持和潜在目标分子。

参考文献:

[1] KOMOHARA Y, FUJIWARA Y, OHNISHI K, *et al*. Tumor-associated macrophages: potential therapeutic targets for anti-cancer therapy[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2016, 99(Pt B): 180-185. DOI: 10.1016/j.addr.2015.11.009.

[2] MANTOVANI A, MARCHESI F, MALESCI A, *et al*. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2017, 14(7): 399-416. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.217.

[3] PINTON L, MASETTO E, VETTORE M, *et al*. The immune suppressive microenvironment of human gliomas depends on the accumulation of bone marrow-derived macrophages in the center of the lesion[J]. J Immunother Cancer, 2019, 7(1): 58. DOI: 10.1186/s40425-019-0536-x.

[4] WEI C, YANG C, WANG S, *et al*. Crosstalk between cancer cells and tumor associated macrophages is required for mesenchymal circulating tumor cell-mediated colorectal cancer metastasis[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 64. DOI: 10.1186/s12943-019-0976-4.

[5] TANG X, MO C, WANG Y, *et al*. Anti-tumour strategies aiming to target tumour-associated macrophages[J]. Immunology, 2013, 138(2): 93-104. DOI: 10.1111/imm.12023.

[6] HONKANEN T J, TIKKANEN A, KARIHTALA P, *et al*. Prognostic and predictive role of tumour-associated macrophages in HER2 positive breast cancer[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 10961. DOI: 10.1038/s41598-019-47375-2.

[7] EDELMAN M J, WANG X, HODGSON L, *et al*. Phase Ⅲ randomized, placebo-controlled, double-blind trial of celecoxib in addition to standard chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer with cyclooxygenase-2 overexpression: CALGB 30801 (Alliance)[J]. J Clin Oncol, 2017, 35(19): 2184-2192. DOI: 10.1200/JCO.2016.71.3743.

[8] BUTOWSKI N, COLMAN H, DE GROOT J F, *et al*. Orally administered colony stimulating factor 1 receptor inhibitor

PLX3397 in recurrent glioblastoma: an ivy foundation early phase clinical trials consortium phase Ⅱ study[J]. Neuro Oncol, 2016, 18(4): 557-564. DOI: 10.1093/neuonc/nov245.

[9] REID T, ORONSKY B, SCICINSKI J, *et al*. Safety and activity of RRx-001 in patients with advanced cancer: a first-in-human, open-label, dose-escalation phase 1 study[J]. Lancet Oncol, 2015, 16(9): 1133-1142. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)00089-3.

[10] NASSAR F J, NASR R, TALHOUK R. MicroRNAs as biomarkers for early breast cancer diagnosis, prognosis and therapy prediction[J]. Pharmacol Ther, 2017, 172: 34-49. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2016.11.012.

[11] LIU G, ABRAHAM E. MicroRNAs in immune response and macrophage polarization[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013, 33(2): 170-177. DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.300068.

[12] ESSANDOH K, LI Y, HUO J, *et al*. MiRNA-mediated macrophage polarization and its potential role in the regulation of inflammatory response[J]. Shock, 2016, 46(2): 122-131. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000604.

[13] FENG J, QI B, GUO L, *et al*. miR-382 functions as a tumor suppressor against esophageal squamous cell carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(23): 4243-4251. DOI: 10.3748/wjg.v23.i23.4243.

[14] WANG J, CHEN C, YAN X, *et al*. The role of miR-382-5p in glioma cell proliferation, migration and invasion[J]. OncoTargets Ther, 2019, 12: 4993-5002. DOI: 10.2147/OTT.S196322.

[15] ZHENG S, LI M, MIAO K, *et al*. SNHG1 contributes to proliferation and invasion by regulating miR-382 in breast cancer[J]. Cancer Manag Res, 2019, 11: 5589-5598. DOI: 10.2147/CMAR.S198624.

[16] 杨芳, 伍菲凡, 王晓燕, 等. Ficoll 和 Percoll 法分离结直肠癌相关巨噬细胞的比较[J]. 实用医学杂志, 2015(9): 1394-1398. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2015.09.004.
YANG F, WU F F, WANG X Y, *et al*. A comparative study of tumor-associated macrophages isolation in colorectal carcinoma by Ficoll-Hy-paque density gradient centrifugation and Percoll density gradient centrifugation[J]. J Prac Med, 2015(9): 1394-1398. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2015.09.004.

[17] 代朦, 靳鑫, 雷优扬, 等. 过表达 miR-382 的肿瘤相关巨噬细胞对三阴性乳腺癌生物学特性的影响[J]. 第三军医大学学报, 2018, 40(15): 1375-1382. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201801107.
DAI M, JIN X, LEI Y Y, *et al*. Effect of miR-382 overexpressing tumor-associated macrophages on biological properties of triple-negative breast cancer 4T1 cells[J]. J Third Mil Med Univ, 2018, 40(15): 1375-1382. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201801107.

[18] 靳鑫, 倪田根, 王宁, 等. PGC-1α 通过线粒体介导巨噬细胞极化状态的机制研究[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(1): 56-62. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201808139.
JIN X, NI T G, WANG N, *et al*. Mechanism of mitochondria-mediated PGC-1α in macrophage polarization[J]. J Third Mil Med Univ, 2019, 41(1): 56-62. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201808139.

[19] BANERJEE S, XIE N, CUI H, *et al*. MicroRNA let-7c regulates macrophage polarization[J]. J Immunol, 2013, 190(12): 6542-6549. DOI: 10.4049/jimmunol.1202496.

[20] WANG Z, BRANDT S, MEDEIROS A, *et al*. MicroRNA 21 is a homeostatic regulator of macrophage polarization and prevents prostaglandin E2-mediated M2 generation[J]. PLoS ONE, 2015, 10(2): e0115855. DOI: 10.1371/journal.pone.0115855.

[21] LI Y, ZHAO L, SHI B, *et al*. Functions of miR-146a and miR-222 in tumor-associated macrophages in breast cancer[J]. Sci Rep, 2015, 5: 18648. DOI: 10.1038/srep18648.

[22] POPOVA N V, JUCKER M. The role of mTOR signaling as a therapeutic target in cancer[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(4): 1743. DOI: 10.3390/ijms22041743.

[23] VERGADI E, IERONYMAKI E, LYRONI K, *et al*. Akt signaling pathway in macrophage activation and M1/M2 polarization[J]. J Immunol, 2017, 198(3): 1006-1014. DOI: 10.4049/jimmunol.1601515.

[24] MA Q, HOU L, GAO X, *et al*. NKAP promotes renal cell carcinoma growth *via* AKT/mTOR signalling pathway[J]. Cell Biochem Funct, 2020, 38(5): 574-581. DOI: 10.1002/cbf.3508.

[25] PAJEROWSKI A G, NGUYEN C, AGHAJANIAN H, *et al*. NKAP is a transcriptional repressor of notch signaling and is required for T cell development[J]. Immunity, 2009, 30(5): 696-707. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.02.011.

[26] CHEN D, LI Z, YANG Q, *et al*. Identification of a nuclear protein that promotes NF-kappaB activation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 310(3): 720-724. DOI: 10.1016/j.bbrc.2003.09.074.

[27] ZHOU D, HUANG C, LIN Z, *et al*. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways[J]. Cell Signal, 2014, 26(2): 192-197. DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.11.004.

(收稿:2021-02-01;修回:2021-04-27)

(编辑 汪勤俭)