

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.33.004
文章编号: 1005-8982 (2018) 33-0019-05

膀胱癌中巨噬细胞浸润与膀胱癌化疗耐药的研究

康川疆¹, 周艳², 姜睿¹

(1. 西南医科大学附属医院 泌尿外科, 四川 泸州 646000;
2. 四川省遂宁市第三人民医院 儿科, 四川 遂宁 629000)

摘要:目的 探究膀胱癌分泌趋化因子生长调节基因 5(CXCL5)招募巨噬细胞对膀胱癌化疗耐药的影响。**方法** 应用 Transwell 小室招募实验检测不同处理条件下对人急性单核细胞白血病细胞系(THP-1)招募能力改变;使用 Western blot 测定 CXCL5、PARP/cleaved-PARP 蛋白水平改变;通过 qRT-PCR 检测 CXCL5 的 mRNA 水平改变;使用 MTT 实验测定巨噬细胞及多柔比星处理对膀胱癌增殖能力的影响。**结果** 膀胱癌细胞相对正常膀胱上皮细胞招募更多的 THP-1 ($P < 0.05$);膀胱癌细胞相对正常膀胱上皮细胞 CXCL5 在蛋白水平和 mRNA 水平表达上调 ($P < 0.05$);膀胱癌细胞中 CXCL5 敲减能抑制膀胱癌细胞对 THP-1 细胞的招募能力 ($P < 0.05$);巨噬细胞与膀胱癌细胞共培养后再加入多柔比星 cleaved-PARP 上调减弱,细胞存活率增加 ($P < 0.05$)。**结论** 膀胱癌细胞能分泌 CXCL5 招募过多的巨噬细胞促进膀胱癌化疗耐药。

关键词: 膀胱癌;趋化因子生长调节基因 5;巨噬细胞;多柔比星耐药
中图分类号: R737 **文献标识码:** A

Effect of macrophage infiltration on chemotherapy resistance of bladder cancer

Chuan-jiang Kang¹, Yan Zhou², Rui Jiang¹

(1. Department of Urology Surgery, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Department of Pediatrics, The third people's Hospital of Suining, Suining, Sichuan 629000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of macrophage infiltration on chemotherapy resistance of bladder cancer and potential mechanisms. **Methods** Macrophage recruitment rate was assessed with Transwell chamber. The protein level of CXCL5 and PARP/cleaved-PARP were measured by Western-blot or qRT-PCR. Proliferation rate of macrophage and bladder cancer cells induced by Doxorubicin were detected by MTT assay. **Results** Bladder cancer cells recruited more THP-1 than normal bladder epithelial cells did ($P < 0.05$). The protein and mRNA level of CXCL5 in bladder cancer cells were increased significantly compared with normal bladder epithelial cells. The recruitment ability of bladder cancer cells was downregulated greatly with CXCL5 knockdown. After co-cultured with macrophage, the apoptosis rate of bladder cancer cells was suppressed by Doxorubicin. **Conclusions** Bladder cancer cells recruit macrophages by secreting CXCL5, which assists development of chemotherapy-resistance of bladder cancer.

Keywords: bladder cancer; CXCL5; macrophage; Doxorubicin-resistance

膀胱癌是泌尿系统常见肿瘤之一,因其发病率高、术后复发率高以及致死率高等特点导致膀胱癌治疗颇为困难^[1]。膀胱癌微环境在肿瘤进展和治疗中发挥重要功能^[2],肿瘤相关巨噬细胞(tumor associated

macrophages, TAMs) 是肿瘤微环境的重要组成部分, 相对于癌旁组织, 肿瘤组织中肿瘤相关巨噬细胞明显增加, 被激活为 M2 型巨噬细胞后释放大量的细胞因子, 促进膀胱癌的进展^[3]。

趋化因子生长调节基因 5[chemokine (C-X-C motif) ligand 5, CXCL5] 属于趋化因子 CXC 中 ELR 趋化因子的一员, 最新研究发现 CXCL5 具有促进肿瘤增殖、血管形成、粒细胞趋化及促进炎症反应等功能^[4-5], 本研究旨在探究膀胱癌通过分泌 CXCL5 招募巨噬细胞以及巨噬细胞对膀胱癌化疗耐药性的影响, 为膀胱癌治疗提供新的诊疗思路。

1 材料与方法

1.1 材料

人正常膀胱上皮细胞 SV-HUC-1、人膀胱癌细胞系 T24、253J 及人急性单核细胞白血病细胞系 THP-1 细胞均自中国科学院昆明细胞库, DMEM 培养基和 RPMI-1640 培养基购于美国 Life Technologies 公司, 胎牛血清购于杭州四季青生物工程材料有限公司, 佛波酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)、IL-4 购自美国 Sigma-Aldrich 公司, Transwell 小室购自美国 Corning 公司, Fibronectin 购自美国 Life Technologies 公司, RNA 提取试剂盒购自上海飞捷生物技术有限公司, RNA 反转试剂盒及 PCR kit 购自日本 TaKaRa 公司, CXCL5 敲减 shRNA 慢病毒购自上海吉凯基因化学技术有限公司, CXCL5 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司, PARP/cleaved-PARP 购自美国 Cell Signaling Technology (CST) 公司。

1.2 细胞培养及 shRNA 慢病毒转染

膀胱癌细胞 T24、253J 使用含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基培养, 人正常膀胱上皮细胞 SV-HUC-1 和急性单核细胞白血病细胞系 THP-1 细胞使用含 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养基培养, 培养基内加入 100 $\mu\text{g/ml}$ 青霉素和链霉素 (Sigma, USA), 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳 CO_2 培养箱, 每 2 ~ 3 天对细胞换液处理, 贴壁细胞每 4 ~ 5 天通过胰酶消化进行传代处理, THP-1 细胞离心重悬进行传代处理。每次实验前使用 160 nmol/L PMA 细胞培养 24 h, 诱导 THP-1 细胞分化成巨噬细胞。shRNA 慢病毒预实验感染确定 T24 细胞 MOI 值为 5、253J 细胞 MOI 值为 10。调整细胞密度将 T24、253J 细胞接种于 6 孔板中, 转染前用 DMEM 培养液清洗细胞, 使用 Complete Medium 稀

释 polybrene 至终浓度 50 $\mu\text{g/ml}$, 细胞加入 5 $\mu\text{g/ml}$ 的 polybrene 和相应体积病毒转染 T24、253J 细胞 48 h 后, 使用 2 ~ 3 $\mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素进行细胞筛选 2 ~ 3 周, 荧光显微镜下检测荧光蛋白表达, 实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测 CXCL5 的 mRNA 和蛋白表达。

1.3 人正常膀胱上皮细胞和膀胱癌细胞条件培养基提取

人正常膀胱上皮细胞和膀胱癌细胞正常培养, 胰酶消化离心后重悬, 调整细胞数量为 2.0×10^6 个/皿接种于 10 cm 皿中, 待细胞贴壁后更换无血清培养基, 将 10 cm 皿置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养 48 h, 吸取细胞上清液离心去除细胞碎屑, 吸取离心后上清液置入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻保存备用。

1.4 THP-1 源性巨噬细胞条件培养基提取

THP-1 细胞离心重悬, 细胞计数并按 2.0×10^6 个/皿接种于 10 cm 皿中, PMA 诱导培养 24 h, 更换新的培养基, 再加入 20 ng/ml 的 IL-4 继续培养 24 h, 更换无血清培养基, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养 48 h, 吸取细胞上清液离心去除细胞碎屑, 吸取离心后上清液置入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻保存备用。

1.5 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法检测膀胱癌细胞增殖能力变化

膀胱癌细胞正常培养, 待细胞生长至 70%~80% 消化进行细胞计数, 调整细胞密度为 3.0×10^5 个/ml, 按照每孔 200 μl 接种于 96 孔板中, 待细胞贴壁后实验组按照 1 : 1 比例加入巨噬细胞条件培养基共培养 36 h, 加入浓度为 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 多柔比星, 每种处理设置 5 个复孔, 将 96 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养 24 h, 吸去上清液, 每孔加入含有 10% MTT 的培养基培养 4 h, 吸去上清液加入 150 μl DMSO/孔, 置于微量振荡器匀速振荡 10 min, 对照组未加入巨噬细胞条件培养基。应用酶联免疫检测仪在 490 nm 处检测光密度 (OD) 值, 做出细胞生长曲线。

1.6 THP-1 细胞招募实验

取 5 μm Transwell 小室, 倒置放置于 10 cm 皿中, 小室下室膜上滴加 20 μl Fibronectin 并均匀铺满, 放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中 4 ~ 6 h 备用。THP-1 正常培养, 离心后使用无血清培养基重悬, 细胞计数并调整细胞密度为 2.5×10^5 个/ml, 取出已包被 Fibronectin 的小室取出置于 24 孔板中, 小室下室加入 1 : 1 稀释的无血清条件培养基, 上室加入 200 μl 的 THP-1 细胞悬液, 将 24 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养

箱培养 36 h, 棉签擦拭小室上室细胞, 使用 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 清洗加入结晶紫染色 20 min, 再次使用 PBS 清洗小室并使用棉签擦拭上室残留细胞, 显微镜随机选取 5 个视野拍照, 实验重复 3 次。

1.7 实时荧光定量 PCR 检测相关 mRNA 表达

使用胰酶消化并传代细胞接种于 6 孔板中, 待细胞密度至 60% ~ 70% 时按照飞捷 RNAfast 200 试剂说明书操作提取 RNA, cDNA 模板通过 RNA 逆转录获得, 逆转录体系参照 TaKaRa Prime Script™ RT Master Mix 试剂说明书。CXCL5 的 mRNA 表达检测使用 TaKaRa SYBR @ PrimixEx Taq™ II 反应体系, 引物序列: 正向 5'-GACGGTGGAAACAAGGAAAA-3', 反向 5'-GCTTAAGCGGCAACATAGG-3'。使用 β -actin 作为内参, 正向 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3', 反向 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'。mRNA 的表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算方法进行分析。T24 和 253J 两种细胞系未加入 CXCL5 敲减 shRNA 慢病毒作为对照。

1.8 Western blot 检测相关蛋白表达

使用胰酶消化并传代细胞接种于 6 孔板中, 待细胞密度至 60% ~ 70% 时加入细胞裂解液提取蛋白, 使用 BCA 法测定所提取蛋白浓度。取 30 μ g 蛋白使用 SDS-PAGE 凝胶进行分离并转膜处理, PVDF 膜使用 5% 脱脂牛奶常温封闭 1 h, 加入目的抗体 CXCL5、PARP/cleaved-PARP、 β -actin, 放置在 4℃ 冰箱摇床慢摇过夜孵育。使用 TBST 洗膜液洗膜 10 min \times 3 次, 加入二抗孵育, 并置于常温摇床 1 h, TBST 洗膜液洗膜 10 min \times 3 次, 使用 ECL 显影液进行显影。目的蛋白表达量通过与内参蛋白 β -actin 标准化后得到相对比值。

1.9 统计学方法

数据分析采用 SPSS 18.0 统计软件, 计量数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 对计量资料组间比较采用多因素方差分析及 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 膀胱癌细胞与正常膀胱上皮细胞招募 THP-1 细胞

SV-HUC-1 组招募 THP-1 细胞数 (85.400 ± 5.528), 膀胱癌细胞 T24 和 253J 组招募 THP-1 细胞数分别为 (288.200 ± 6.028) 和 (348.600 ± 8.583), 与正常膀胱上皮细胞比较, 差异有统计学意义 ($t = 42.950$

和 44.650 , 均 $P = 0.000$), 显示膀胱癌细胞相对正常膀胱上皮细胞招募更多的 THP-1 细胞。

2.2 膀胱癌细胞与正常膀胱上皮细胞 CXCL5 表达水平

T24 组与 253J 组膀胱癌细胞 CXCL5 的 mRNA 表达水平分别为 (5.871 ± 0.345)、(6.238 ± 0.472), 与正常膀胱上皮细胞 (1.000 ± 0.413) 比较, 差异有统计学意义 ($t = 15.680$ 和 14.470 , 均 $P = 0.000$), CXCL5 在膀胱癌细胞中表达升高。见图 1。

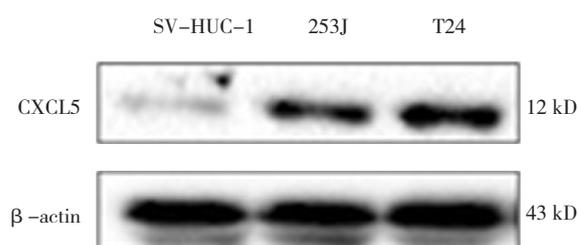


图 1 SV-HUC-1、253J、T24 细胞 CXCL5 蛋白表达情况

2.3 膀胱癌细胞 CXCL5 敲减对 THP-1 细胞浸润的影响

敲减膀胱癌细胞 CXCL5 表达见图 2。膀胱癌细胞系 T24 敲低组招募 THP-1 细胞数, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。253J 细胞敲低组招募 THP-1 细胞数, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 显示 CXCL5 敲减抑制膀胱癌细胞对 THP-1 细胞招募能力。见表 1。

2.4 THP-1 源性巨噬细胞对膀胱癌对多柔比星抵抗性的影响

膀胱癌细胞系 T24 共培养组细胞存活率, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。253J 共培养组细胞存活率, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), THP-1 源性巨噬细胞共培养可以增强膀胱癌细胞对多柔比星的抵抗性。见表 2。

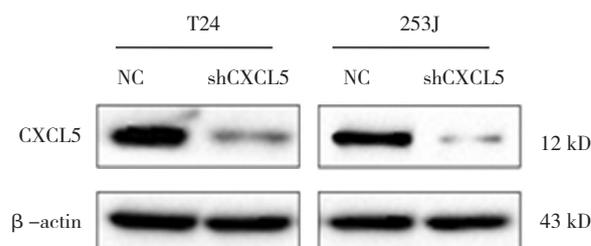


图 2 T24、253J 细胞 CXCL5 敲减后 CXCL5 蛋白水平

表 1 膀胱癌细胞 CXCL5 敲减后招募巨噬细胞比较
($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 招募细胞数 | t 值 | P 值 |
|-----------|----------------|--------|-------|
| T24 细胞系 | | | |
| 对照组 | 87.200 ± 2.588 | 10.390 | 0.000 |
| CXCL5 敲低组 | 33.400 ± 8.583 | | |
| 253J 细胞系 | | | |
| 对照组 | 65.600 ± 3.209 | 19.160 | 0.000 |
| CXCL5 敲低组 | 24.200 ± 1.924 | | |

表 2 THP-1 源性巨噬细胞影响膀胱癌对
多柔比星的抵抗性 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 细胞存活率/% | t 值 | P 值 |
|----------|-----------------|-------|-------|
| T24 细胞系 | | | |
| 对照组 | 100.000 ± 9.424 | 3.450 | 0.008 |
| 共培养组 | 118.953 ± 7.872 | | |
| 253J 细胞系 | | | |
| 对照组 | 100.000 ± 6.236 | 2.750 | 0.030 |
| 共培养组 | 109.534 ± 4.616 | | |

3 讨论

肿瘤微环境是肿瘤发生、发展过程中重要机制, TAMs 在肿瘤进展中发挥重要功能, 既往报道发现 TAMs 在肾癌^[6]、肝癌^[7]、肺癌等^[8]多种恶性肿瘤疾病中浸润增加, 本研究发现在膀胱癌中, 膀胱癌细胞招募 TAMs 能力高于正常膀胱上皮细胞, TAMs 很可能在膀胱癌恶性进展中起到关键作用。

CXCL5 是 CXC 族趋化因子成员^[9], 趋化因子主要作用是作为化学引诱物介导细胞特异性迁移, 吸引相关炎症细胞的组织浸润。研究发现 CXCL5 在前列腺癌^[10]、乳腺癌^[11]、胰腺恶性肿瘤^[12]和肾癌^[13]中高表达, 而有关 CXCL5 在膀胱癌中对 TAMs 招募作用尚未报道。本研究通过实验发现膀胱癌细胞 CXCL5 表达高于正常膀胱上皮细胞, 且 CXCL5 敲减能抑制膀胱癌细胞对 THP-1 细胞招募能力, 说明 CXCL5 在膀胱癌细胞对 THP-1 细胞招募过程中发挥重要功能。

TAMs 促进肿瘤的生长、侵袭和转移, 同时 TAMs 高浸润增强多种恶性肿瘤如乳腺癌或胃癌患者对化疗药物耐药及引起预后不良^[14-16], 因此笔者想要探讨肿瘤相关巨噬细胞对膀胱癌细胞化疗耐药产生的影响,

发现共培养后加入多柔比星相对多柔比星对照组化疗药物对膀胱癌细胞杀伤作用明显下降, 说明肿瘤相关巨噬细胞可以促进膀胱癌细胞对多柔比星的化疗耐药性。

综上所述, 膀胱癌细胞通过分泌过多的 CXCL5 招募巨噬细胞, 同时招募的肿瘤相关巨噬细胞能够反向性作用于膀胱癌细胞, 增强膀胱癌的化疗耐药性, 对膀胱癌的治疗提供了新的思路。

参 考 文 献:

- [1] CHEN Z, HE A, LIU Y, et al. Recent development on synthetic biological devices treating bladder cancer[J]. Synth Syst Biotechnol, 2016, 1(4): 216-220.
- [2] QIAN B Z, POLLARD J W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis[J]. Cell, 2010, 141(1): 39-51.
- [3] SONG W, MAZZIERI R, YANG T, et al. Translational significance for tumor metastasis of tumor-associated macrophages and epithelial-mesenchymal transition[J]. Front Immunol, 2017(8): 1106.
- [4] ZHU X, QIAO Y, LIU W, et al. CXCL5 is a potential diagnostic and prognostic marker for bladder cancer patients[J]. Tumour Biol, 2016, 37(4): 4569-4577.
- [5] GAO Y, GUAN Z, CHEN J, et al. CXCL5/CXCR2 axis promotes bladder cancer cell migration and invasion by activating PI3K/AKT-induced upregulation of MMP2/MMP9[J]. Int J Oncol, 2015, 47(2): 690-700.
- [6] KOVALEVA O V, SAMOILOVA D V, SHITOVA M S, et al. Tumor Associated Macrophages in Kidney Cancer[J]. Anal Cell Pathol (Amst), 2016(2016): 9307549.
- [7] CAPECE D, FISCHIETTI M, VERZELLA D, et al. The inflammatory microenvironment in hepatocellular carcinoma: a pivotal role for tumor-associated macrophages[J]. Biomed Res Int, 2013(2013): 187204.
- [8] SCHMALL A, AL-TAMARI H M, HEROLD S, et al. Macrophage and cancer cell cross-talk via CCR2 and CX3CR1 is a fundamental mechanism driving lung cancer[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2015, 191(4): 437-447.
- [9] 倪锋, 杜永辉, 郑亮, 等. 血清 CXCL5 对膀胱癌患者外科治疗后复发的影响[J]. 实用癌症杂志, 2017(9): 1444-1446.
- [10] KUO P L, CHEN Y H, CHEN T C, et al. CXCL5/ENA78 increased cell migration and epithelial-to-mesenchymal transition of hormone-independent prostate cancer by early growth response-1/snail signaling pathway[J]. J Cell Physiol, 2011, 226(5): 1224-1231.
- [11] HSU Y L, HOU M F, KUO P L, et al. Breast tumor-associated osteoblast-derived CXCL5 increases cancer progression by ERK/MSK1/Elk-1/snail signaling pathway[J]. Oncogene, 2013, 32(37): 4436-4447.

- [12] LI A, KING J, MORO A, et al. Overexpression of CXCL5 is associated with poor survival in patients with pancreatic cancer[J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(3): 1340-1349.
- [13] NAJJAR Y G, RAYMAN P, JIA X, et al. Myeloid-derived suppressor cell subset accumulation in renal cell carcinoma parenchyma is associated with intratumoral expression of IL1beta, IL8, CXCL5, and Mip-1alpha[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(9): 2346-2355.
- [14] 张培, 曹守波. 自噬介导的肿瘤相关巨噬细胞调控机制的研究进展[J]. *实用肿瘤学杂志*, 2018(2): 130-134.
- [15] YANG C, HE L, HE P, et al. Increased drug resistance in breast cancer by tumor-associated macrophages through IL-10/STAT3/bcl-2 signaling pathway[J]. *Med Oncol*, 2015, 32(2): 352.
- [16] ZHANG J, YAN Y, YANG Y, et al. High infiltration of tumor-associated macrophages influences poor prognosis in human gastric cancer patients, associates with the phenomenon of EMT[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(6): e2636.

(王荣兵 编辑)