

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.10.011

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2016.10.011

睾丸孤核受体4(TR4)促进巨噬细胞向前列腺癌浸润

刘鹏举¹, 秦勇¹, 朱进², 刘渊¹, 顾海¹, 梅方¹, 丁献凡¹

(1. 杭州市红十字会医院泌尿外科, 杭州 310000; 2. 苏州大学附属第二医院泌尿外科, 江苏 苏州 215000)

[摘要] 目的: 研究前列腺癌TR4水平对巨噬细胞浸润的影响。方法: 用transwell体系进行巨噬细胞THP-1迁移实验, 在人体组织中研究睾丸孤核受体4(Testicular orphan receptor 4, TR4)水平和巨噬细胞标志物CD36的关系。结果: 过表达TR4促进了巨噬细胞向前列腺的迁移; 敲低TR4抑制了巨噬细胞向前列腺癌的迁移; 人体前列腺癌组织标本中TR4较高的患者, CD36表达较高。结论: 前列腺癌的TR4可能促进了巨噬细胞浸润。

[关键词] 前列腺癌; 睾丸孤核受体4; 巨噬细胞; 浸润

Testicular orphan receptor 4 (TR4) promotes human macrophage infiltration in prostate cancer

LIU Pengju¹, QIN Yong¹, ZHU Jin², LIU Yuan¹, GU Hai¹, MEI Fang¹, DING Xianfan¹

(1. Department of Urology, Hangzhou Red Cross Hospital, Hangzhou 310000; 2. Department of Urology, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou Jiangsu 215000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the role of testicular orphan receptor 4 (TR4) in the recruitment of human macrophage THP-1 cells in prostate cancer. **Methods:** Transwell system was used in the study of cellular migration to measure the THP-1 recruitment ability of prostate cancer (PCa) cells with varying levels of TR4; human PCa tissue was collected to study the relation of TR4 levels and CD36 levels by IHC staining. **Results:** Over-expression of TR4 increased THP-1 migration in PCa cells, knocking-down TR4 could decrease the THP-1 migration in PCa cells; IHC staining demonstrated that TR4 levels positively correlate with CD36 levels. **Conclusion:** TR4 may promote THP-1 cells infiltration in prostate cancer.

Keywords prostate cancer (PCa); testicular orphan receptor 4 (TR4); macrophage; invasion

前列腺癌(prostate cancer, PCa)转移是前列腺癌患者死亡的首要原因^[1], PCa转移的机制较为复杂, 目前发现, 肿瘤微环境的变化是导致前列腺癌转移的重要原因; 肿瘤微环境中的元素很多,

包括肿瘤细胞、非肿瘤细胞、细胞外基质, 细胞外液中的分子等等, 肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage, TAM)是肿瘤微环境中非常重要的一种炎症细胞, 它可以通过分泌细胞因

收稿日期 (Date of reception): 2016-06-05

通信作者 (Corresponding author): 丁献凡, Email: xianfan023@sina.cn

基金项目 (Foundation item): 杭州市卫生科技计划 (一般) 项目 (201450029)。This work was supported by general grant from Health and Family Planning Commission of Hangzhou (201450029), P. R. China.

子、趋化因子、生长因子等影响肿瘤的转移^[2-3], 因此, 人们希望通过影响TAM而阻止肿瘤的转移。睾丸孤核受体4(testicular orphan receptor 4, TR4), 广泛分布于体内各器官, 既往研究^[4]发现TR4在生长、发育、代谢等多方面起着重要作用。近来, 又有多项研究证实TR4可以促进前列腺癌的转移, 然而, 目前尚无TR4是否可以影响巨噬细胞向前列腺癌的浸润的研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和材料

TR4抗体购自美国R&D公司(PP-0107B-00); GAPDH抗体(6c5)和人CD36抗体(KP1)购自美国Santa Cruz公司; Western blotting显色试剂(Thermo Scientific ECL增强型)购自美国Thermo Scientific公司; MTT试剂盒(C0009)和RIPA裂解液(P0013B)购自碧云天公司; 孔径5 μm 的24孔板Transwell小室购自美国Corning公司(3421)。

1.2 细胞培养

人前列腺癌细胞系C4-2由苏州大学第二附属医院朱进医师馈赠, CWR22RV-1, 和人巨噬细胞系THP-1购自ATCC(American Type Culture Collection)。培养基分别为: 含10%小牛血清的RPMI 1640培养基(CWR22RV-1); 含10%小牛血清的DMEM培养基(C4-2), THP-1 cells含10%小牛血清+5 mM 2-羟基乙硫醇的RPMI1640培养基; 所有培养基内含2 mM L-左旋谷氨酰胺、100 IU/mL青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素, 培养皿置于37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的培养箱中培养。

1.3 TR4 基因表达调控

我们采用慢病毒系统调控TR4基因表达, 即利用pLKO.1-siTR4/scr、PAX2、PMD2.G三质粒系统用lipofectamine转染293T细胞产生携带TR4表达基因的慢病毒。步骤如下: 1)病毒制备: 转染前1 d, 把293T细胞铺板于10 cm培养皿中, 以转染时细胞融合为约60%为宜, 按lipofectamine说明书转染(三质粒比例为4:3:2, 一共24 μg)。4~6 h后, 弃去转染混合液, 加入10 mL新鲜培养基, 再12 h后, 更换新鲜培养基, 继续培养24 h后收病毒, 检测滴度; 2)感染: 慢病毒感染前1 d, 把PCa细胞铺板于10 cm培养皿中, 以感染时融合度在50%为

宜。感染当天, 从-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出病毒置于冰上融化, 弃去培养基, 把融化的病毒液与新鲜培养基1:1稀释, 加入培养皿(共8 mL), 并添加polybrene增加转染效率(终浓度6 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。24 h后弃去上清, 重复上述步骤进行第2次感染, 弃上清并加入新鲜培养基继续培养3 d后开始嘌呤霉素筛选。

1.4 巨噬细胞迁移实验方法

条件培养基(conditioned medium, CM)获取方法以(C4-2细胞为例, 6孔板): 第1天傍晚铺板, 以30%~40%融合度为宜, 第2天早晨细胞即完全贴壁并开始细胞扩增, 更换新鲜培养基, 第3天上午取培养基, 与新鲜培养基1:1混合, 即为CM, 放入-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。我们采用孔径为5 μm 的24孔板Transwell进行巨噬细胞迁移实验: 将THP-1细胞重悬, 计数, 调整细胞密度至 $5 \times 10^5/\text{mL}$, 取细胞悬液200 μL (1×10^5)加入Transwell上层小室。下层小室加入相应的条件培养基; 共培养16~24 h, 培养结束后, 将下层培养基并其中的THP-1细胞一起离心, 用100 μL PBS重悬, MTT计数法算得OD值, 每个实验重复3遍。

1.5 免疫组织化学

按照ABC法进行免疫组化: 55 $^{\circ}\text{C}$ 烤片2 h, 常规脱蜡, 采用高压修复法修复抗原, 3% H_2O_2 浸泡30 min去除内源性过氧化物酶, 5%胎牛血清封闭, 洗去血清, 加入一抗后将玻片放在湿盒中置于-4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, PBS清洗后加二抗, DAB显色。采用免疫反应积分法(immunoreactive score, IRS)来半定量TR4和CD36在组织中的表达量。

1.6 统计学处理

连续变量用均数 \pm 标准差的方式计数, 连续变量的两组之间对比采用t检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 成功建立 TR4 基因敲低前列腺癌细胞系

我们运用慢病毒感染(Lenti-virus)的方法成功建立了TR4敲低细胞系C4-2 siTR4及其对照组C4-2 scr, 建立了TR4过表达细胞系CWR22RV-1 TR4及其对照组CWR22RV-1 vector; 由Western blotting在蛋白水平验证, 结果见图1。

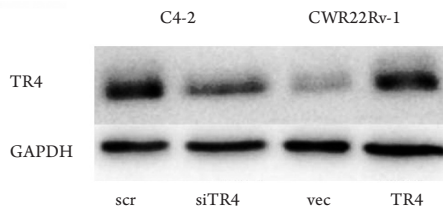


图1 Western blotting验证不同TR4水平细胞系
Figure 1 Western blotting to show manipulating efficiency of TR4 levels of cell lines

2.2 敲低 TR4 后, C4-2 细胞对巨噬细胞的招募能力下降; 过表达 TR4 后, CWR22RV-1 细胞对巨噬细胞的招募能力增强

建立不同TR4水平的PCa细胞系后, 我们首先利用Transwell体系研究不同TR4状态的条件培养基对THP-1细胞的招募能力; 我们将获取的条件培养基放在5 μM孔径的Transwell下层小室, 将200 μL(1×10⁵)THP-1细胞加入Transwell上层小室, 共培养16~24 h, 实验结束后, 将下层小室内的THP-1细胞收集、离心、重悬, 用MTT方法检测细胞数量, 用OD值记录, 结果发现: TR4敲低后, 来自于C4-2 siTR4的培养基招募THP-1细胞的能力明显下降(图2A); 过表达TR4后, 来自于CWR22RV-1 TR4细胞的条件培养基招募THP-1细胞的能力明显提高(图2B)。这些结果说明, PCa细胞中的TR4水平影响了肿瘤微环境, 从而导致其招募THP-1能力的变化。

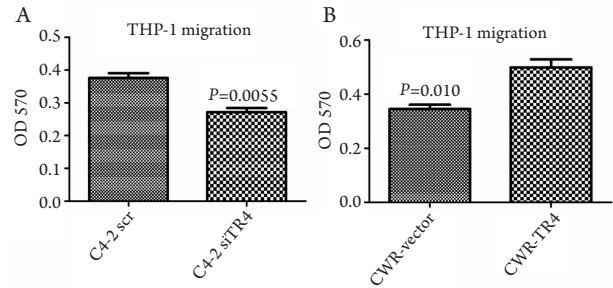


图2 THP-1细胞向不同TR4水平的PCa细胞迁移能力
Figure 2 Recruitment ability of THP-1 to PCa cells under different TR4 levels

2.3 人前列腺癌组织中, TR4 表达水平与巨噬细胞标志物 CD36 表达正相关

最后, 我们研究了人前列腺癌组织标本中的巨噬细胞是否和TR4表达水平有关, 我们用CD36作为巨噬细胞的标志物。我们收集了杭州市红十字会医院、苏州大学第二附属20例患者(10例Gleason3+3, 10例Gleason5+4), 进行IHC染色; 由于前期研究^[5]已经证实TR4与Gleason评分有关, 5+4的PCa患者TR4水平显著高于3+3组, 因此, 我们把20例患者分成Gleason3+3组和Gleason5+4组, 结果发现: Gleason5+4组的患者TR4较高(图3, 上排, 400×), CD36表达水平较高(图3, 下排, 400×), 两者表达呈正相关。前列腺癌细胞TR4可以促进巨噬细胞向前列腺癌组织的浸润。

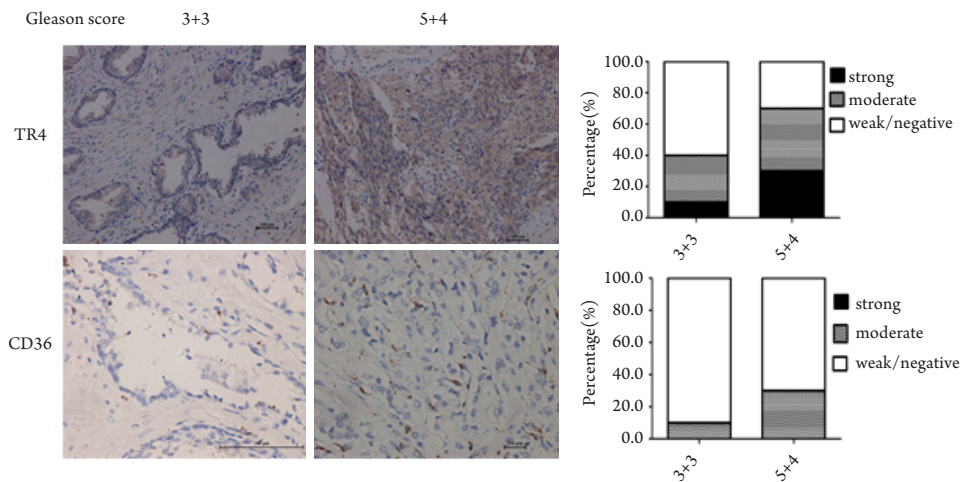


图3 不同Gleason评分组织中TR4和CD36的表达关系(免疫组化)
Figure 3 Expression of TR4 and CD36 in different Gleason scores (immunohistochemistry)

3 讨论

研究^[6]发现, 1/4的肿瘤与炎症有关。肿瘤微环境中的炎症现象主要表现为炎症细胞浸润, 包括中性粒细胞、巨噬细胞、树状突细胞、自然杀伤细胞等等, 它们通过分泌炎症因子、细胞因子、或与周围细胞发生交互作用影响着肿瘤的发生和进展; 其中肿瘤相关巨噬细胞(tumour-associated macrophages, TAM)在肿瘤微环境中发挥着重要作用, TAM通过分泌细胞因子, 生长因子, 趋化因子等等影响肿瘤的转移和进展^[3,6]; TAM同样影响了前列腺癌细胞的生物学行为^[7]。

人们目前期望能找到一些可行的方式去干扰TAM的浸润, 从而更有效地治疗前列腺癌。TR4是核受体超家族成员, 它对人体的作用较为广泛, 并且在男性生殖系统高表达^[8]; 我们^[9]曾开展了TR4和前列腺癌的早期研究, 结果发现TR4可以促进前列腺癌的进展, 并发现了CCL2/CCR2途径介导了这一现象, 众所周知, 完全阻断CCL2/CCR2并不能彻底阻断PCa的进展, 因此我们猜测TR4是否也可以通过其他方式促进前列腺癌的转移; Xie等^[10]曾报道在心血疾病的小鼠中敲除TR4后可以导致泡沫细胞(由巨噬细胞演变而来)减少, CD36可能介导了这一过程; Mahajan等^[11]也发现结核感染时巨噬细胞脂质通过与TR4的相互作用而调节了巨噬细胞的功能, 从而使结核杆菌存活; 受此启发, 我们开展了本研究, 结果发现前列腺癌中的TR4促进更多的巨噬细胞向肿瘤浸润, 然而, 这些被促进了局部浸润的巨噬细胞扮演的是促进肿瘤的角色还是抑制肿瘤的角色, 我们将在后续的研究中进行阐述。

总之, 本研究的意义在于发现了TR4是导致巨噬细胞浸润的原因, 如果后续的研究能够证实这些增加了的巨噬细胞促进了前列腺癌的转移, 那么将来我们将筛选抑制TR4的小分子化合物, 或许可能发现新的治疗前列腺癌转移的药物。

参考文献

1. 孙颖浩. 前列腺癌诊疗进展[J]. 上海医学, 2011, 34(7): 487-488. SUN Yinghao. Advances in diagnosis and treatment of prostate cancer[J]. Shanghai Medical Journal, 2011, 34(7): 487-488.
2. De Marzo AM, Nakai Y, Nelson WG. Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis[J]. Urol Oncol, 2007, 25(5): 398-400.
3. Zhu P, Baek SH, Bourk EM, et al. Macrophage/cancer cell interactions mediate hormone resistance by a nuclear receptor derepression pathway[J]. Cell, 2006, 124(3): 615-629.
4. 丁献凡, 俞世成, 李恭会. 睾丸孤核受体4研究进展[J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(10): 134-136. DING Xianfan, YU Shicheng, LI Gonghui. Recent advances in testicular receptor 4 (TR4)[J]. Chinese Journal of Clinicians: Electronic Version, 2013, 7(10): 134-136.
5. Ding X, Yang DR, Lee SO, et al. TR4 nuclear receptor promotes prostate cancer metastasis via upregulation of CCL2/CCR2 signaling[J]. Int J Cancer, 2015, 136(4): 955-964.
6. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer[J]. Nature, 2002, 420(6917): 860-867.
7. Zhu P, Baek SH, Bourk EM, et al. Macrophage/cancer cell interactions mediate hormone resistance by a nuclear receptor derepression pathway[J]. Cell, 2006, 124(3): 615-629.
8. Chang C, Da Silva SL, Ideta R, et al. Human and rat TR4 orphan receptors specify a subclass of the steroid receptor superfamily[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(13): 6040-6044.
9. Ding X, Yang DR, Lee SO, et al. TR4 nuclear receptor promotes prostate cancer metastasis via upregulation of CCL2/CCR2 signaling[J]. Int J Cancer, 2015, 136(4): 955-964.
10. Xie S, Lee YF, Kim E, et al. TR4 nuclear receptor functions as a fatty acid sensor to modulate CD36 expression and foam cell formation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(32): 13353-13358.
11. Mahajan S, Dkhar HK, Chandra V, et al. Mycobacterium tuberculosis modulates macrophage lipid-sensing nuclear receptors PPAR γ and TR4 for survival[J]. J Immunol, 2012, 188(11): 5593-5603.

本文引用: 刘鹏举, 秦勇, 朱进, 刘渊, 顾海, 梅方, 丁献凡. 睾丸孤核受体4(TR4)促进巨噬细胞向前列腺癌浸润[J]. 临床与病理杂志, 2016, 36(10): 1522-1525. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.10.011

Cite this article as: LIU Pengju, QIN Yong, ZHU Jin, LIU Yuan, GU Hai, MEI Fang, DING Xianfan. Testicular orphan receptor 4 (TR4) promotes human macrophage THP-1 infiltration in prostate cancer[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2016, 36(10): 1522-1525. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.10.011