

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.05.008

· 基础研究

IFN- γ 和 IL-4 对人乳腺癌细胞系 MCF-7 成瘤性、黏附能力的影响及其机制

段红洁¹, 张爱民^{2 Δ} , 牛秀琰^{1,2}, 李宏钊¹, 刘文星¹, 张宏健¹, 邓为民¹(1. 天津医科大学基础医学院免疫学系, 天津, 300070; 2. 中国人民武装警察部队后勤学院附属医院检验科, 天津, 300162)

[摘要] **目的:** 探讨 Th1 类细胞因子 IFN- γ 和 Th2 类细胞因子 IL-4 对 MCF-7 细胞的成瘤、黏附能力的调节作用及其相关机制。**方法:** 常规体外培养人乳腺癌细胞系 MCF-7。以前期工作中筛选出的以有效剂量 rhIFN- γ (100 ng/ml) 或 rhIL-4(10 ng/ml) 或细胞因子稀释液分别处理细胞 96 h 后, 应用半定量 RT-PCR 法、Western blotting 技术、双层软琼脂集落形成实验、细胞体外黏附实验等观察 IFN- γ 和 IL-4 对细胞 VEGF 表达、致瘤性和黏附侵袭特性的影响, 并对其相关信号通路机制进行分析。**结果:** IFN- γ 或 IL-4 可分别抑制或促进人乳腺癌细胞 MCF-7 的成瘤和黏附能力。分子机制研究表明, 与对照组相比, rhIFN- γ 可抑制 MCF-7 细胞 VEGF、MMP-9 的基因转录和蛋白表达水平, 抑制 Raf/MEK/ERK 信号通路; rhIL-4 可促进 MCF-7 细胞的 VEGF、MMP-2 和 MMP-9 的基因转录和蛋白表达水平, 促进 PI3K/AKT、Raf/MEK/ERK 信号通路激活。**结论:** 肿瘤微环境中, IFN- γ 和 IL-4 可分别抑制和促进人乳腺癌细胞系 MCF-7 的 VEGF 表达和体外成瘤、黏附能力, 其机制可能与 PI3K/AKT、Raf/MEK/ERK 信号通路相关。

[关键词] IFN- γ ; IL-4; 乳腺癌; MCF-7 细胞; 成瘤性; 细胞黏附

[中图分类号] R737.9; R730.51

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)05-0597-06

Study on the mechanism of IFN- γ or IL-4 in regulating tumorigenicity and cell adhesion of human breast cancer cell line MCF-7 and its mechanism

Duan Hongjie¹, Zhang Aimin^{2 Δ} , Niu Xiulong^{1,2}, Li Hongzhao¹, Liu Wenxing¹, Zhang Hongjian¹, Deng Weimin¹(1. Department of Immunology, College of Basic Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Logistics University of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China)

[Abstract] **Objective:** To study whether and how Th1-type cytokine IFN- γ and Th2-type cytokine IL-4 regulating tumorigenicity and adhesion of human breast cancer cells. **Methods:** Human breast cancer MCF-7 cells were treated with rhIFN- γ at 100 ng/ml or rhIL-4 at 10 ng/ml. At 96 hours after treatment, VEGF mRNA and protein levels were determined by semi-quantitative RT-PCR and Western blotting analysis, tumorigenicity by double layer soft-agar colony formation test and cell adhesion by matrigel adhesion assay respectively. **Results:** IFN- γ inhibited while IL-4 enhanced significantly tumorigenic and adhesive activities of MCF-7 cells. Compared with the control, rhIFN- γ significantly decreased mRNA and protein levels of VEGF and MMP-9 and down-regulated the Raf/MEK/ERK signaling pathway. On the contrary, rhIL-4 significantly increased mRNA and protein levels of VEGF, MMP-2 and MMP-9 and up-regulated the PI3K/AKT and Raf/MEK/ERK signaling pathways. **Conclusion:** IFN- γ and IL-4 may regulate human breast cancer cell adhesion and tumorigenicity, at least partially, through regulation of PI3K/AKT and Raf/MEK/ERK signal pathways.

[Key words] IFN- γ ; IL-4; breast cancer; MCF-7 cell; tumorigenicity; cell adhesion

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(5): 597-602]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81273552, No. 30901985);天津市自然科学基金资助项目(No. 15JCYBJC26000)。Projects supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81273552, No. 30901985), and the Tianjin Natural Science Foundation(No. 15JCYBJC26000)

[作者简介] 段红洁(1988-),女,河北省石家庄市人,硕士生,主要从事乳腺癌生物治疗的研究, E-mail: duanhongjieaa@163.com; 张爱民(1970-),女,天津市人,学士,主管技师,主要从事乳腺癌内分泌耐药机制方面的研究, E-mail: zhang_ai_min@sina.com。 Δ 为共同第一作者

[通信作者] 邓为民(Deng Weimin, corresponding author), E-mail: dengweimin@tjmu.edu.cn

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 发病率仅次于宫颈癌, 在女性恶性肿瘤中位居第 2 位。雌激素受体(estrogen receptor, ER)的表达水平和肿瘤微环境中细胞因子水平的变化, 是决定肿瘤发生发展的两大重要因素。一方面, 作为雌激素依赖性肿瘤, 乳腺癌组织中 ER 亚型的表达水平与肿瘤的恶性行为及内分泌治疗敏感性密切相关^[1-3]; 另一方面, 肿瘤患者体内可出现 Th1/Th2 平衡偏移, 即呈现 Th2 类细胞因子(主要是 IL-4)优势表达状态, 这种改变可显著抑制由 Th1 类细胞因子(主要是 IFN- γ)介导的抗肿瘤免疫效应^[4-5]。本课题组的前期研究^[6]结果证实, 改变人乳腺癌细胞株 MCF-7 的 ER 亚型(ER α /ER β)表达水平, 可影响肿瘤细胞 IFN- γ 的自分泌水平, 在一定程度上调节肿瘤微环境的 Th 平衡。有研究^[7-9]表明, 除大多数免疫细胞外, 上皮细胞和上皮源性肿瘤细胞可检测到 IFN- γ R 和 IL-4R 的表达。前期研究^[10]表明, IFN- γ 和 IL-4 可直接作用于 MCF-7 细胞, 影响其体外增殖水平和凋亡特性, 影响肿瘤细胞的细胞周期分布。因此, 本研究在原有工作基础上, 进一步观察 IFN- γ 和 IL-4 能否直接影响乳腺癌细胞株 MCF-7 的 VEGF 表达水平、体外成瘤和黏附特性, 并对其作用机制和可能的信号转导通路进行探索, 为以 IFN- γ 为主的细胞因子免疫疗法的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RPMI-1640 培养基、胎牛血清(FBS)购自中美合资兰州民海生物工程有限公司, TRIzol、LipofectamineTM 2000、G418 为美国 Invitrogen 公司产品; Easy Script First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 购自 TransGen 公司, 2 × Taq PCR MasterMix、100 bp DNA Ladder Marker 购自天根生化科技有限公司; rhIFN- γ 、rhIL-4 购自 PeproTech 公司; 抗 VEGF 抗体、抗 MMP-2 抗体、抗 MMP-9 抗体、抗 β -actin 抗体(小鼠源性)、HRP 标记的羊抗兔二抗、羊抗小鼠二抗为美国 Santa Cruz 公司产品, 人工基底膜基质凝胶 Matrigel、抗细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK)抗体为美国 BD 公司产品, 抗磷酸化 ERK1/2(Thr202/Tyr204)抗体、抗 AKT 抗体及抗磷酸化 AKT(Ser473)抗体为美国 Cell Signaling 公司产品。

1.2 细胞株和细胞处理

人乳腺癌细胞系 MCF-7 购于中国科学院上海细胞生物研究所, 常规培养于含有 10% FBS、100 U/ml

青霉素、100 μ g/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养液。本课题组经 MTT 法分别确定了对 MCF-7 细胞生长具有活性作用的 rhIFN- γ 和 rhIL-4 的有效作用浓度及时间, 以模拟肿瘤细胞微环境的 Th1 或 Th2 优势状态^[10]。故本研究分别采用 100 ng/ml rhIFN- γ 或 10 ng/ml IL-4 作用 96 h(细胞分别命名为 M/IFN- γ 和 M/IL-4), 观察其对细胞体外成瘤和黏附能力的影响。

1.3 半定量 RT-PCR 法检测基因转录水平

取对数生长期细胞 1×10^6 个, 按 TRIzol 试剂说明书抽提细胞总 RNA, 经逆转录反应合成 cDNA, 反应条件参照 E-asy Script First-Strand cDNA Synthesis Super Mix 逆转录说明书进行。引物由中国大连 TaKaRa 生物科技公司合成, 序列如下: VEGF, sense 5'-AGGAGGGCAGAATCATCACC-3', antisense 5'-CAAGGCCACAGGGATTTTCT-3'; MMP-2, sense 5'-GGCCTGTACTCCTGAGAT-3', antisense 5'-GGCATCCAGGTTATCGGGGA-3'; MMP-9, sense 5'-GCAGAGATGCGTGGAGAGTC-3', antisense 5'-GGCTGTACACGCCAGTGAAG-3'; β -actin, sense 5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3', antisense 5'-TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC-3'。PCR 反应体系: cDNA 1.0 μ l, 2 × Master Mix 10 μ l, 上、下游引物各 0.5 μ l, 加双蒸水至总体积 20 μ l。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min 预变性; 94 $^{\circ}$ C 30 s 变性, 55 $^{\circ}$ C 45 s 退火, 72 $^{\circ}$ C 1 min 延伸, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应结束后, 取 PCR 反应液 5 μ l 于 1.2% 琼脂糖凝胶电泳。结果应用美国 Bio-Rad 公司的 Quantity One 4.5.6 软件进行分析, 以 β -actin 作为内参照, 以靶基因/ β -actin 光密度的比值作为 mRNA 的相对表达量。

1.4 Western blotting 技术检测蛋白表达水平

对数生长期的 MCF-7 细胞经 rhIFN- γ 或 rhIL-4 处理 96 h 后, 收集细胞, 常规提取蛋白, 以 BCA 法测定蛋白含量。取 30 μ g 蛋白经 10% SDS-PAGE 进行分离后, 转移至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入一抗 4 $^{\circ}$ C 温和震荡过夜, TBST 洗涤 3 次, 特异性 HRP 标记二抗温育 1 h, TBST 洗涤 3 次后, 经化学发光试剂盒检测信号强度。以 β -actin 作为内参, 蛋白的相对表达丰度以目的蛋白与 β -actin 灰度的比值表示, 进行半定量分析。

1.5 细胞体外黏附能力的检测

Matrigel 凝胶加入 96 孔培养板, 每孔加 10 μ g/25 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵箱孵育过夜, 吸去多余液体, 超净台内吹干。PBS 洗孔 2 次, 每孔加入 2% BSA 75 μ l, 于

37 °C 孵箱封闭 1 h。细胞常规消化后离心,用含 0.1% BSA 的 RPMI 1640 重悬,调整细胞密度为 4×10^5 个/ml,100 μ l/孔接种 96 孔板。每组细胞设 5 个复孔。37 °C 孵育 1 h,除去培养基,PBS 洗涤 3 次,去除未黏附细胞。加入 0.5% MTT(PBS 配制)100 μ l/孔,37 °C、5% CO₂ 孵箱中继续培养 4 h,离心弃上清后,加入 DMSO 100 μ l/孔,充分振荡至细胞内的紫蓝色结晶完全溶解,置酶标仪上测定波长为 490 nm 时的光密度(D_{490})值。计算黏附抑制率(IR)(%) = (对照组 D_{490} - 实验组 D_{490}) / 对照组 $D_{490} \times 100\%$ 。

1.6 细胞体外成瘤能力的检测

将含 0.5% 底层琼脂、20% FBS 的 RPMI 1640 培养基充分混匀,按每孔 1 ml 立即加入 6 孔板中,室温凝固备用;用含 0.3% 上层琼脂、20% FBS 的 RPMI 1640 培养基调整细胞密度为 1×10^4 /ml,加至铺有底层琼脂的 6 孔板中,每孔 1 ml,每组细胞设 3 个复孔。37 °C、5% CO₂ 孵箱中连续培养 2 周。倒置显微镜下应用 ACT-2U 软件捕捉图像,计

数上、中、下、左、右 5 个不同视野的集落形成数目。

1.7 统计学处理

采用 SPSS11.0 软件进行统计学分析,数据以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差别具有统计学意义。

2 结果

2.1 rhIFN- γ 和 rhIL-4 对癌细胞成瘤能力的影响

双层软琼脂集落形成实验结果表明,rhIFN- γ 和 rhIL-4 可分别抑制和促进人乳腺癌细胞 MCF-7 的体外成瘤能力。如图 1 所示,连续培养 2 周后,各组细胞均能在软琼脂中形成集落;倒置显微镜下观察拍照并计数集落形成数目,与阴性对照组 MCF-7 相比 [(112.00 \pm 3.95) 个],M/IFN- γ 组的集落形成数目明显减少 [(74.12 \pm 1.11) 个],约为对照组的 66% ($P < 0.01$); M/IL-4 组的集落形成数目显著增多 [(144.23 \pm 4.89) 个],为对照组的 1.29 倍 ($P < 0.05$)。

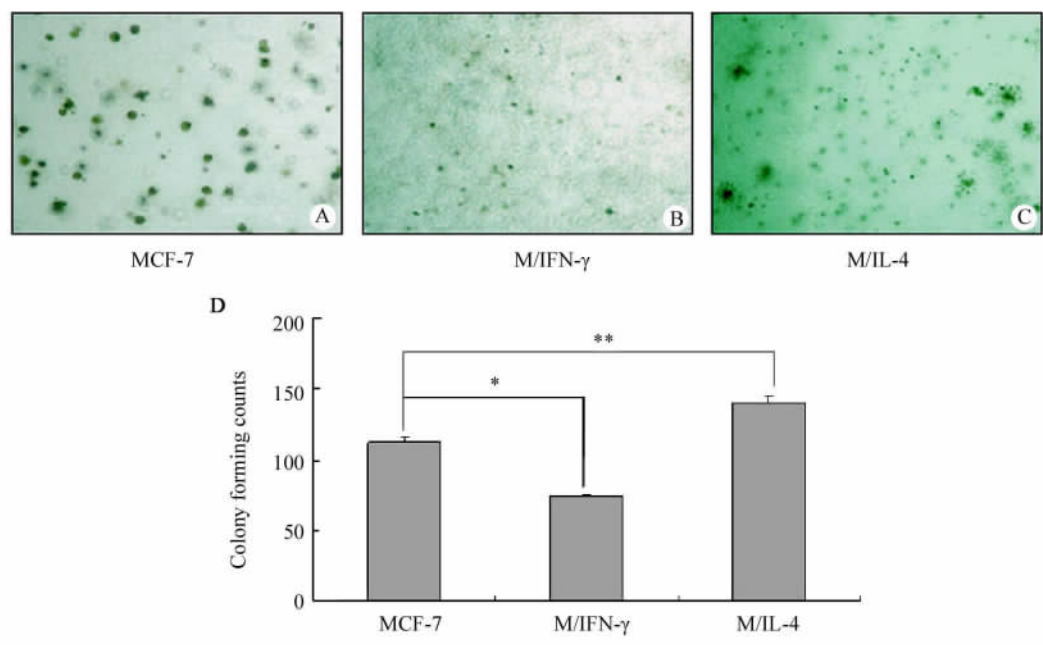


图 1 rhIFN- γ 和 rhIL-4 对 MCF-7 细胞成瘤能力的影响(双层软琼脂集落形成实验)

Fig. 1 Effects of rhIFN- γ or rhIL-4 on tumorigenicity of MCF-7 cells (Double layer soft-agar colony formation test)

A, B, C: Colonies formed by MCF-7 cells, M/IFN- γ and M/IL-4 cells in double layer soft-agar ($\times 40$);

D: Comparison of colonies formed by MCF-7 cells, M/IFN- γ and M/IL-4 cells

2.2 rhIFN- γ 和 rhIL-4 对癌细胞黏附能力的影响

细胞黏附实验结果表明,rhIL-4 可促进人乳腺癌细胞 MCF-7 的体外黏附能力。如图 2 所示,与阴

性对照组 MCF-7 相比(100%),M/IFN- γ 组黏附 Matrigel 的能力无显著差异 [(95.71 \pm 4.13) %] ($P > 0.05$); M/IL-4 组黏附 Matrigel 的能力显著增

强[(128. 57 ± 5. 97)%], 约为对照组的 1. 29 倍 (*P* < 0. 05)。

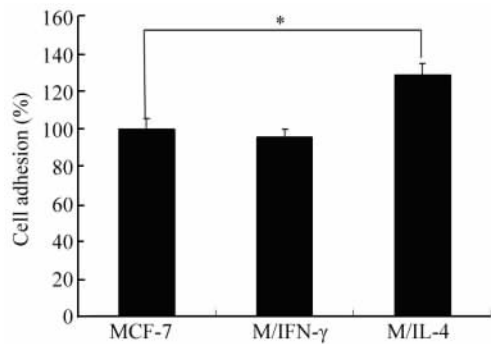


图2 rhIFN- γ 和 rhIL-4 对 MCF-7 细胞黏附能力的影响
Fig. 2 Effects of rhIFN- γ or rhIL-4 on adhesion ability of MCF-7 cells

2.3 rhIFN- γ 和 rhIL-4 对细胞 VEGF 表达水平的影响

VEGF 是公认的具有代表性的血管发生相关因子,与恶性肿瘤的生长、转移具有密切关系。RT-PCR 和 Western Blotting 检测结果表明, rhIFN- γ 和 rhIL-4 可分别抑制和促进 MCF-7 细胞 VEGF 的表达水平。如图 3A、3B 所示,与阴性对照组 MCF-7 相比, rhIFN- γ 可显著抑制 MCF-7 细胞 VEGF 的 mRNA 和蛋白表达水平 (*P* < 0. 01), 而 rhIL-4 可显著促进 VEGF 的 mRNA 和蛋白表达水平 (*P* < 0. 01)。各组细胞的 mRNA 表达水平分别为: MCF-7 为 (0. 71 ± 0. 03), M/IFN- γ 为 (0. 45 ± 0. 02), M/IL-4 为 (1. 11 ± 0. 07); 蛋白表达水平分别为: MCF-7 为 (1. 12 ± 0. 08), M/IFN- γ 为 (0. 78 ± 0. 03), M/IL-4 为 (1. 36 ± 0. 11)。

2.4 rhIFN- γ 和 rhIL-4 对细胞基质金属蛋白酶表达水平的影响

基质金属蛋白酶可促进细胞外基质的蛋白降解,进而促进肿瘤细胞的迁移和侵袭。应用 RT-PCR 和 Western Blotting 技术分别检测细胞的 MMP-2、MMP-9 的表达水平,图 4 结果显示,与阴性对照组 MCF-7 相比, rhIFN- γ 对细胞 MMP-2 的表达水平无明显影响;而 rhIL-4 可显著促进 MCF-7 细胞 MMP-2 的表达水平 (*P* < 0. 01)。各组细胞的 MMP-2 表达水平: mRNA 水平, MCF-7 为 (0. 11 ± 0. 00), M/IFN- γ 为 (0. 09 ± 0. 00), M/IL-4 为 (0. 52 ± 0. 12); 蛋白表达水平, MCF-7 为 (0. 35 ± 0. 02), M/IFN- γ 为 (0. 28 ± 0. 03), M/IL-4 为 (1. 21 ± 0. 12)。 rhIFN- γ 可显著抑制 MMP-9 的表达水平;而 rhIL-4 可促进 MCF-7 细胞 MMP-9 的表达水平 (*P* < 0. 01)。

各组细胞的 MMP-9 表达水平: mRNA 水平, MCF-7 为 (0. 29 ± 0. 03), M/IFN- γ 为 (0. 09 ± 0. 00), M/IL-4 为 (0. 67 ± 0. 07); 蛋白表达水平, MCF-7 为 (1. 00 ± 0. 10), M/IFN- γ 为 (0. 81 ± 0. 03), M/IL-4 为 (1. 21 ± 0. 13)。

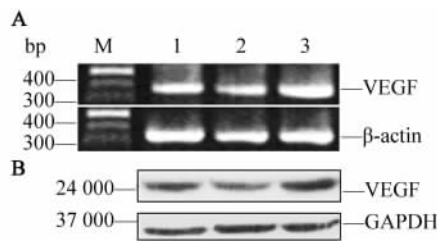


图3 rhIFN- γ 和 rhIL-4 对 MCF-7 细胞 VEGF 表达水平的影响

Fig. 3 Effects of rhIFN- γ or rhIL-4 on the expression of VEGF in MCF-7 cells

M: Marker; 1: MCF-7; 2: M/IFN- γ ; 3: M/IL-4
A: Expression of VEGF mRNA in MCF-7 cells by RT-PCR; B: Expression of VEGF protein in MCF-7 cells by Western blotting

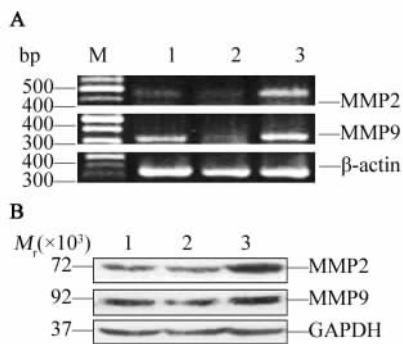


图4 rhIFN- γ 和 rhIL-4 对 MCF-7 细胞 MMP-2、MMP-9 表达的影响 [RT-PCR (A) 和 Western blotting (B)]

Fig. 4 Effects of rhIFN- γ or rhIL-4 on the expression of MMP-2 and MMP-9 in MCF-7 cells (RT-PCR [A] and Western blotting [B])

M: Marker; 1: MCF-7; 2: M/IFN- γ ; 3: M/IL-4
A: Expression of MMPs mRNA in MCF-7 cells ; B: Expression of MMPs protein in MCF-7 cells

2.5 rhIFN- γ 和 rhIL-4 对 MCF-7 细胞中 Akt 和 Erk 活性的影响

Western blotting 技术检测信号通路 PI3K/AKT 和 Raf/MEK/ERK 中 AKT 和 ERK 的磷酸化水平,图 5 结果显示,与阴性对照组 MCF-7 相比, rhIFN- γ 对 AKT 的磷酸化水平无显著作用,可抑制 Erk 的磷酸

化水平;rhIL-4 可分别促进 MCF-7 细胞 AKT 和 ERK 的磷酸化水平。表明 rhIFN- γ 主要通过抑制 Raf/MEK/ERK 信号通路,发挥对 MCF-7 细胞成瘤性和体外黏附能力的抑制作用;rhIL-4 主要经 PI3K/AKT 和 Raf/MEK/ERK 信号途径,发挥对 MCF-7 细胞成瘤性和体外黏附能力的促进作用。

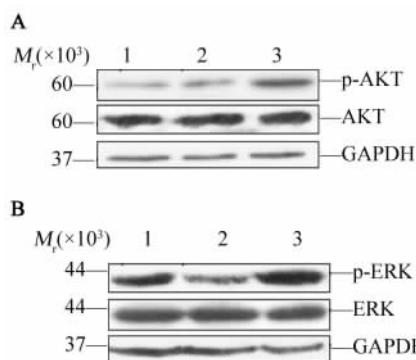


图5 rhIFN- γ 和 rhIL-4 对 MCF-7 细胞 AKT 和 ERK 活性的影响

Fig. 5 Regulation of AKT or ERK activities in MCF-7 cells by rhIFN- γ or rhIL-4

A: Phosphorylation status of AKT in MCF-7 cells;
B: Phosphorylation status of ERK in MCF-7 cells
1: MCF-7; 2: M/IFN- γ ; 3: M/IL-4

3 讨论

肿瘤微环境是影响肿瘤生长、黏附、侵袭、转移的关键因素,是近年来抗肿瘤免疫的研究热点。免疫活性细胞产生的细胞因子是构成肿瘤微环境的重要组成部分,其中以 IFN- γ 为主的 Th1 类细胞因子可激活 NK 细胞、CTL 细胞、巨噬细胞的活性而发挥杀瘤作用;反之,IL-4 可诱导肿瘤相关的巨噬细胞中组织蛋白酶的活性,间接促进肿瘤的生长和侵袭^[11-13]。临床研究^[14-15]也表明,肿瘤患者体内的细胞因子水平出现明显的 Th 失衡,呈 Th1 向 Th2 偏移、Th2 类细胞因子优势表达状态。除免疫活性细胞外,肿瘤细胞亦可自分泌 IFN- γ 和 IL-4,可能在一定程度上调节自身生长微环境的 Th 平衡,以抵抗肿瘤免疫监视^[6,16-18]。本课题组的工作重点在于模拟肿瘤微环境中的 IFN- γ 和 IL-4 水平,观察其对肿瘤细胞生物学行为的直接影响,为以 IFN- γ 为主的细胞因子免疫疗法的临床研究提供基础实验依据。

前期工作^[10]表明,rhIFN- γ 100 ng/ml 或 rhIL-4 10 ng/ml 作用人乳腺癌细胞 MCF-7 96 h,可分别对细胞的体外增殖发挥显著抑制或促进作用,本研究拟进一步观察此微环境中 IFN- γ 和 IL-4 对 MCF-7

细胞体外成瘤和黏附、侵袭能力的影响。双层软琼脂集落形成是检测肿瘤细胞体外成瘤能力的重要指标,细胞克隆形成率越高,肿瘤的恶性程度越高。本研究结果发现,rhIFN- γ 可显著抑制乳腺癌细胞的体外成瘤能力,而 rhIL-4 则对细胞的成瘤活性有促进作用。肿瘤侵袭转移是一个非常复杂的过程,包括细胞迁移、黏附和入侵等一系列事件,其中肿瘤细胞脱落、黏附并突破细胞外基质是肿瘤转移的关键步骤^[19]。本研究采用细胞黏附实验检测细胞与人工基底膜凝胶 Matrigel 的黏附能力,可在一定程度上反映肿瘤细胞的黏附、侵袭、转移能力。结果发现,rhIL-4 可促进细胞的黏附活性,进而易化肿瘤的转移进程,促进肿瘤扩散;而 rhIFN- γ 则对细胞的黏附活性没有影响。

新生血管形成是肿瘤生长、血行转移的促发因素,在众多促血管生成因子中 VEGF 是公认的介导新生血管形成的关键因素。本研究结果表明,rhIFN- γ 和 rhIL-4 对 MCF-7 细胞的 VEGF 表达具有相反的调节作用,rhIFN- γ 可抑制 VEGF 的 mRNA 和蛋白表达水平,rhIL-4 则可上调 VEGF 表达。表明 rhIFN- γ 可降低肿瘤组织的微血管密度、抑制肿瘤细胞的氧分和营养获取,进而抑制肿瘤的进一步扩散生长。

基质金属蛋白酶 MMP-2 和 MMP-9 可降解基底膜的重要成分 IV 型胶原,在促进肿瘤细胞迁移和侵袭过程中发挥着重要作用^[20]。本研究结果显示,rhIL-4 对 MCF-7 细胞的黏附侵袭能力的促进作用,与其上调细胞 MMP-2、MMP-9 的表达水平密切相关。rhIFN- γ 仅对 MMP-9 的 mRNA 和蛋白表达水平具有抑制作用,对 MMP-2 的表达水平没有影响。磷脂酰肌醇-3-激酶/丝苏氨酸蛋白激酶(phosphatidylinositol 3 kinase/serine-threonine kinase, PI3K/AKT) 信号通路在调控细胞生存、肿瘤血管发生和细胞迁移中发挥重要作用,在多种肿瘤中均检测到 AKT 表达水平和活性的增强^[21];细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK) 是有丝分裂原激活蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK) 家族中的一个亚族,受多种乳腺癌细胞转化生长因子调控,可控制细胞的增殖^[22]。本研究结果显示,rhIFN- γ 可抑制 ERK 活化,rhIL-4 则促进 AKT 和 ERK 活化,这表明 rhIFN- γ 至少部分通过抑制 PI3K/AKT 信号通路,直接对 MCF-7 细胞成瘤性和血管形成发挥抑制作用;rhIL-4 则可诱导 PI3K/AKT 和 Raf/MEK/ERK 信号通路活化,对肿瘤成瘤和黏附侵袭发挥促进作用。

综上所述,肿瘤微环境中 Th1/Th2 平衡可直接调节人乳腺癌细胞系 MCF-7 的体外成瘤和转移能力。此外,本课题组的相关研究^[10]与其他临床报道^[23-24]证实,IFN- γ 也可促进乳腺癌细胞的 ER β 亚型表达,提高乳腺癌细胞对他莫昔芬的敏感性,这表明 IFN- γ 与 ER β 表达水平在乳腺癌的发展中可能存在交互作用。但是,体内真实的肿瘤微环境是非常复杂的,多种细胞(包括肿瘤细胞自身)均可分泌或旁分泌细胞因子,在一定程度上影响并引起 Th 失衡。因此,目前 Th1 类细胞因子 IFN- γ 、IL-2 等虽然已经部分用于肿瘤患者的临床治疗,但疗效并不理想,这与患者体内的 Th 失衡未能有效纠正有直接关系。

[参 考 文 献]

- [1] Han SJ, Guo QQ, Wang T, et al. Prognostic significance of interactions between ER alpha and ER beta and lymph node status in breast cancer cases [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14 (10): 6081-6084.
- [2] Platet N, Cathiard AM, Gleizes M, et al. Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2004, 51(1): 55-67.
- [3] Kerdivel G, Flouriot G, Pakdel F. Modulation of estrogen receptor alpha activity and expression during breast cancer progression [J]. *Vitam Horm*, 2013, 93: 135-160.
- [4] Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, et al. Tumor-infiltrating CD8⁺ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(15): 1949-1955.
- [5] Sharma A, Khan R, Joshi S, et al. Dysregulation in T helper 1/T helper 2 cytokine ratios in patients with multiple myeloma [J]. *Leuk Lymphoma*, 2010, 51(5):920-927.
- [6] 牛秀珑, 叶路, 毛立群, 等. 雌激素受体亚型对乳腺癌 MCF-7 细胞生长及微环境中 Th 平衡的影响 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2011, 18(5): 490-495.
- [7] Kmiecik M, Payne KK, Idowu MO, et al. Tumor escape and progression of HER-2/neu negative breast cancer under immune pressure [J]. *J Transl Med*, 2011, 9: 35.
- [8] Chen C, Guo L, Shi M, et al. Modulation of IFN- γ receptor 1 expression by AP-2 α influences IFN- γ sensitivity of cancer cells [J]. *Am J Pathol*, 2012, 180(2): 661-671.
- [9] García-Tuñón I, Ricote M, Ruiz AA, et al. Influence of IFN-gamma and its receptors in human breast cancer [J]. *BMC Cancer*, 2007, 7: 158.
- [10] 牛秀珑, 毛立群, 叶路, 等. IFN- γ 和 IL-4 对乳腺癌细胞 MCF-7 生长及雌激素受体亚型影响的观察 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2011, 18(20): 1581-1584.
- [11] duPre SA, Redelman D, Hunter KW Jr. Microenvironment of the murine mammary carcinoma 4T1: Endogenous IFN-gamma affects tumor phenotype, growth, and metastasis [J]. *Exp Mol Pathol*, 2008, 85(3):174-188.
- [12] Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework [J]. *Cell*, 2006, 127(4):679-695.
- [13] Gocheva V, Wang HW, Gadea BB, et al. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion [J]. *Genes Dev*, 2010, 24(3):241-255.
- [14] Berry KK, Varney ML, Dave BJ, et al. Expression of interleukin-8 in human metastatic endometrial carcinoma cells and its regulation by inflammatory cytokines [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2001, 11(1): 54-60.
- [15] Kyo S, Kanaya T, Takakura M, et al. A case of cervical cancer with aggressive tumor growth: possible autocrine growth stimulation by G-CSF and IL-6 [J]. *Gynecol Oncol*, 2000, 78(3 Pt 1): 383-387.
- [16] Stassi G, Todaro M, Zerilli M, et al. Thyroid cancer resistance to chemotherapeutic drugs via autocrine production of interleukin-4 and interleukin-10 [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(20): 6784-6790.
- [17] Prokopcuk O, Liu Y, Henne-Bruns D, et al. Interleukin-4 enhances proliferation of human pancreatic cancer cells: evidence for autocrine and paracrine actions [J]. *Br J Cancer*, 2005, 92(5): 921-928.
- [18] Conticello C, Pedini F, Zeuner A, et al. IL-4 protects tumor cells from anti-CD95 and chemotherapeutic agents via up-regulation of antiapoptotic proteins [J]. *J Immunol*, 2004, 172(9): 5467-5477.
- [19] Tang Z, Geng G, Huang Q, et al. Prognostic significance of tissue factor pathway inhibitor-2 in pancreatic carcinoma and its effect on tumor invasion and metastasis [J]. *Med Oncol*, 2010, 27(3): 867-875.
- [20] Bar JK, Grelewski P, Popiela A, et al. Type IV collagen and CD44v6 expression in benign, malignant primary and metastatic ovarian tumors: correlation with Ki-67 and p53 immunoreactivity [J]. *Gynecol Oncol*, 2004, 95(1): 23-31.
- [21] Cheng GZ, Park S, Shu S, et al. Advances of AKT pathway in human oncogenesis and as a target for anti-cancer drug discovery [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2008, 8(1): 2-6.
- [22] 王仲照, 王杉, 朱凤雪, 等. 乳腺癌中 ERK 表达及其与临床病理特征的相关性研究 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2002, 24(4): 360-362.
- [23] 周艳, 姜军, 张毅, 等. 雌激素受体 β 及其剪切变异体表达与雌激素受体阻滞剂治疗耐药的关系 [J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(20): 1999-2001.
- [24] Gruvberger-Saal SK, Bendahl PO, Saal LH, et al. Estrogen receptor beta expression is associated with tamoxifen response in ER alpha-negative breast carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13 (7): 1987-1994.

[收稿日期] 2015 -04 -02

[修回日期] 2015 -08 -10

[本文编辑] 阮芳铭