

# 香烟烟雾激活肺癌细胞Wnt/ $\beta$ -catenin 信号途径的机制研究

李冬 万海英 姚懿雯 吴军录 权文强 周宏 张宇

同济大学附属同济医院检验科, 上海 200065

**[摘要]** **背景与目的:** 香烟烟雾诱导的炎性反应可显著促进肺肿瘤的生长, 本研究通过体内外实验明确香烟烟雾激活肺癌细胞Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径的机制。**方法:** 利用尾静脉注射鼠Lewis肺癌细胞方法建立小鼠肺癌模型, 然后采用香烟烟雾对其进行刺激, 诱发炎性反应。免疫组化方法检测小鼠和人肺肿瘤组织中CD68、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ )和无磷酸化 $\beta$ -catenin的表达。采用Transwell<sup>®</sup>插入式细胞培养皿共培养人巨噬细胞和人肺癌细胞株A549细胞。采用蛋白质印迹法(Western blot)检测A549细胞中无磷酸化 $\beta$ -catenin的表达及磷酸化的GSK-3 $\beta$ 和Akt蛋白的表达。**结果:** 免疫组化结果显示, 香烟烟雾刺激肺肿瘤负荷小鼠后, 其肿瘤组织中巨噬细胞CD68<sup>+</sup>、TNF- $\alpha$ 和无磷酸化 $\beta$ -catenin的表达均明显高于对照组。肺癌患者肿瘤组织中, CD68和TNF- $\alpha$ 的阳性表达均明显高于正常组织。肺腺癌和鳞癌的无磷酸化 $\beta$ -catenin的染色阳性率分别为68.9%和62.2%, 其阳性率与患者吸烟与否及肿瘤分期有关, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 并且CD68<sup>+</sup>的细胞数在无磷酸化 $\beta$ -catenin染色阳性的标本中显著升高( $P < 0.01$ )。Western blot检测结果显示, 不同浓度香烟抽提物(cigarette smoke extract, CSE)刺激共培养细胞后, A549细胞中无磷酸化 $\beta$ -catenin的表达随着CSE浓度的增加而显著上升。在加入TNF- $\alpha$ 中和抗体后, A549细胞中无磷酸化 $\beta$ -catenin的表达被抑制。用TNF- $\alpha$ 处理A549细胞后, 磷酸化的GSK-3 $\beta$ 和Akt蛋白在2 h后表达增加, 4 h后无磷酸化 $\beta$ -catenin蛋白表达也开始上调。**结论:** 香烟烟雾诱导肺肿瘤组织中巨噬细胞释放炎性反应因子TNF- $\alpha$ , 进而通过Akt/GSK-3 $\beta$ 途径激活肿瘤细胞中Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路。

**[关键词]** 巨噬细胞; 肺癌; 肿瘤坏死因子 $\alpha$ ; Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.12.001

中图分类号: R734.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2014)12-0881-08

**The study on mechanisms of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling activation by smoke from cigarette in lung cancer cell** LI Dong, WAN Hai-ying, YAO Yi-wen, WU Jun-lu, QUAN Wen-qiang, ZHOU Hong, ZHANG Yu (Department of Clinical Laboratory, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China)

Correspondence to: LI Dong E-mail: 186ld@163.com

**[Abstract]** **Background and purpose:** Cigarette smoke-induced inflammatory response remarkably promotes lung tumor growth. This study aimed to elucidate the mechanism of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling activation by cigarette smoke in lung cancer cells. **Methods:** To understand the effect of cigarette smoke on mice, a kind of metastatic lung cancer mouse model which was established by intravenous injection of Lewis lung carcinoma cells. By immunohistochemical analysis, we analyzed the expression of CD68 (macrophage marker), TNF- $\alpha$  and unphosphorylated  $\beta$ -catenin in mice and human lung cancer samples. To coculture human lung adenocarcinoma cell line A549 cells with macrophages, the "Transwell<sup>®</sup> Inserts" system was used in coculturing model. The expressions of unphosphorylated  $\beta$ -catenin, phosphorylated GSK-3 $\beta$  and Akt in A549 cells were detected by Western blot assay. **Results:** The immunohistochemical results showed positive staining for CD68, TNF- $\alpha$  and unphosphorylated  $\beta$ -catenin increased significantly in smoke-exposed mice compared to air exposure mice. In human lung cancer samples, CD68 and TNF- $\alpha$  expressions were significantly higher than in healthy lung tissue. The positive staining rates of unphosphorylated  $\beta$ -catenin in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma were 68.9% and 62.2%, respectively.

**基金项目:** 国家自然科学基金(81272603、81472179); 上海市浦江人才计划(13PJ1407300); 上海申康医院发展中心课题(SHDC22014008)。

**通信作者:** 李冬 E-mail:186ld@163.com

This positive rate had a relationship with smoking status and tumor stage, there was statistical significance (both  $P < 0.05$ ). It also showed the number of CD68<sup>+</sup> cells had a significant increase in tumors positive for unphosphorylated  $\beta$ -catenin ( $P < 0.01$ ). Western blot results showed that the expression of unphosphorylated  $\beta$ -catenin in A549 cells had a significant concentration-dependent increase of CSE after coculturing with macrophages. The neutralizing antibody against TNF- $\alpha$  could significantly suppressed unphosphorylated  $\beta$ -catenin in A549 cells. TNF- $\alpha$  exposure resulted in phosphorylation of GSK-3 $\beta$  and Akt in A549 cells after 2 h and the expression of unphosphorylated  $\beta$ -catenin increased 4 h later. **Conclusion:** Cigarette smoke induces TNF- $\alpha$  release from macrophages in lung tumor tissue, which could activate the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway of tumor cells through Akt/GSK-3 $\beta$ .

[**Key words**] Macrophages; Lung cancer; Tumor necrosis factor alpha; Wnt/ $\beta$ -catenin pathway

近年来, 慢性感染和炎症导致肿瘤的形成和发展已受到广泛关注。临床研究的结果显示, 巨噬细胞的数量与肺癌的预后关系紧密<sup>[1-2]</sup>。侵入肿瘤的巨噬细胞及其释放的大量可溶性的炎症介质如TNF- $\alpha$ 、IL-6等促进了肿瘤细胞的增殖、浸润和转移<sup>[3]</sup>。我们前期的体内、外试验研究结果显示, 香烟烟雾诱导的炎症反应不仅对人类肺癌细胞的生长具有明显的促进作用, 而且显著地促进肺癌小鼠模型的肿瘤生长, 增加了小鼠肺肿瘤的数目, 缩短了肿瘤负荷小鼠的生存期<sup>[4]</sup>。然而, 迄今为止, 有关炎症反应促进肿瘤发展的分子机制尚未完全阐明。

Wnt家族是由19个富含半胱氨酸的糖蛋白组成的蛋白家族, 它们不仅在胚胎发育和维持机体的自稳态中起关键作用, 而且在细胞的增殖、分化、运动以及抗凋亡过程中也起着重要作用<sup>[5]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路是Wnt家族信号网络的经典途径, 前期研究结果显示, 异常激活的Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路由于受其调控的相关基因和蛋白水平的改变, 导致细胞无限制增殖、生长, 从而促使肿瘤发生<sup>[6]</sup>。

本研究拟从香烟烟雾与肺肿瘤细胞Wnt/ $\beta$ -catenin信号的关系入手, 进一步揭示香烟烟雾诱导的炎症反应发挥肿瘤促进作用的分子机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 临床标本

收集同济大学附属同济医院82例手术切除的患者肺肿瘤标本, 其中37例鳞癌标本, 45例

腺癌标本, 对所有肿瘤标本做免疫组化检测。另外获取30例健康人肺组织标本作为阴性对照。在获取肺肿瘤标本时, 患者均未接受过任何治疗。实验设计通过医院伦理委员会批准, 患者均签署知情同意书。

#### 1.1.2 细胞株和小鼠

人肺腺癌细胞A549细胞和鼠Lewis肺癌细胞购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所细胞库。C57BL/6小鼠购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。

#### 1.1.3 主要试剂

DMEM培养基、胎牛血清、巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)购自美国Invitrogen公司, 青霉素、链霉素购自澳大利亚PAA Laboratories公司, Transwell<sup>®</sup>插入式细胞培养皿购自美国BD公司, 总蛋白裂解液、兔抗GSK-3 $\beta$ (pSer9)、Akt(pSer473)、total  $\beta$ -catenin抗体购自美国Cell Signalling Technology公司, 肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ )中和抗体购自美国R&D Systems公司, 免疫球蛋白IgG购自美国Santa Cruz公司, 鼠抗无磷酸化 $\beta$ -catenin抗体购自美国Millipore公司, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体、兔抗-TNF- $\alpha$ 抗体购自英国Abcam公司, 兔抗鼠抗体、鼠抗人-CD68购自丹麦Dako公司, 兔抗鼠-CD68购自美国Abbiotec公司,  $\beta$ -actin购自美国Sigma公司, EnVision<sup>®</sup>+System-HRP(AEC)试剂盒购自丹麦Dako公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细胞培养

细胞株以DMEM完全培养基(添加10%胎牛

血清、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素)常规培养。

#### 1.2.2 人巨噬细胞的采集、分离和培养

按照参考文献[5-6]的方法,用淋巴细胞分离液收集人外周血中的单个核细胞。经过PBS洗涤后,将细胞培养在含10%胎牛血清的DMEM培养液中,加50 ng/mL M-CSF培养7 d,使其分化为巨噬细胞,经形态学和巨噬细胞表面标志分子CD14、CD68鉴定后用于随后实验。

#### 1.2.3 动物模型的建立及香烟烟雾刺激方法

按照参考文献[1,7]的方法,将 $5 \times 10^5$ 个Lewis肺癌细胞通过尾静脉法注射到C57BL/6小鼠体内( $n=30$ )。7 d后,小鼠被随机平均分为2组,1组为吸烟组,1组为空气组。吸烟组中,小鼠暴露于香烟烟雾的环境中7 d,每天5次、每次20 min进行香烟烟雾刺激,小鼠在最后1次香烟烟雾刺激后24 h内被处死,进行小鼠肺肿瘤组织中巨噬细胞的浸润、TNF- $\alpha$ 及无磷酸化 $\beta$ -catenin的表达检测;空气组小鼠置于过滤空气环境中,作为对照。小鼠香烟烟雾暴露使用意大利Comerio VA公司吸烟机器(Ugo Basile 7025 rodent ventilator),将香烟点燃后,仪器恒定地以270 mL/min的固定速度产生烟雾并用1 800 mL/min的新鲜空气稀释后,直接释放入安置小鼠的有机玻璃盒内。该盒内的平均总悬浮颗粒物浓度在400~425 mg/m<sup>3</sup>之间。

#### 1.2.4 香烟提取物(cigarette smoke extract, CSE)的制备

按照参考文献[1,8]的方法,2支香烟点燃后,烟雾通过负压泵抽入20 mL无血浆的DMEM培养液中,燃烧速度为1支/min。然后将培养液pH值调至7.4,经0.2  $\mu$ m的滤菌器消毒,分装后-80  $^{\circ}$ C保存待用。以此浓度的CSE为100%。0.1%、0.25%和0.5%浓度的CSE是按体积比用无血浆的DMEM培养液稀释而成的。

#### 1.2.5 肺癌细胞与巨噬细胞共培养并用CSE处理

按照参考文献[1,5,8]的共培养方法,共培养使用孔径为0.4  $\mu$ m的Transwell<sup>®</sup>插入式细

胞培养皿,将对数生长期的A549细胞与巨噬细胞共培养在含10%胎牛血清的DMEM培养液中,常规培养72 h。具体方法:①CSE直接处理A549细胞,将A549细胞培养在6孔细胞培养板中,过夜后,将培养基弃去,PBS清洗1次,加入含不同浓度CSE的完全培养基,常规培养72 h后收集A549细胞总蛋白待测;②CSE处理共培养条件下的A549细胞与巨噬细胞,将A549细胞培养在6孔细胞培养板中,巨噬细胞培养在Transwell<sup>®</sup>培养皿中,过夜后将培养基弃去,PBS清洗1次,加入含不同浓度CSE的完全培养基,常规培养72 h后收集A549细胞总蛋白待测;③TNF- $\alpha$ 中和实验中,在CSE处理共培养条件下的A549细胞与巨噬细胞的同时,在培养基中加入10  $\mu$ g/mL的TNF- $\alpha$ 中和抗体或10  $\mu$ g/mL对照免疫球蛋白IgG。

#### 1.2.6 细胞总蛋白的提取及蛋白质印迹法(Western blot)检测

按照参考文献[5-6]的方法,A549细胞经PBS清洗后,用50~100  $\mu$ L的总蛋白裂解液裂解细胞,冰上放置1 h。4  $^{\circ}$ C,10 000 r/min离心15 min,上清液即为抽提的总蛋白。经BCA方法定量后,取40  $\mu$ g总蛋白与等体积2 $\times$ 上样缓冲液混合,100  $^{\circ}$ C煮沸3~5 min变性,上样于10%SDS聚丙烯酰胺凝胶上电泳。常规转膜,用含5%脱脂奶粉的TBS室温封闭1 h。加入用含5%脱脂奶粉的TBS-T稀释的一抗,4  $^{\circ}$ C温育过夜。经TBS-T充分洗涤,加入用含5%脱脂奶粉的TBS-T稀释的HRP-兔抗鼠抗体(1:2 000)以及HRP-羊抗兔抗体(1:5 000)室温反应1 h,TBS洗涤,用美国Cell Signalling Technology公司ECL化学发光试剂盒显影。

#### 1.2.7 免疫组化检测

用4%的甲醛溶液将肺肿瘤组织固定后,石蜡包埋、切片。切片经60  $^{\circ}$ C温育过夜后脱蜡,再将其放于0.01 mol/L柠檬酸缓冲液(pH=6.0)中,用微波炉于100  $^{\circ}$ C加热20 min进行抗原修复。切片用3%的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>抑制非特异性氧化酶后,在2%封闭液中温育60 min,然后加一抗4  $^{\circ}$ C温育过夜,根据EnVision<sup>®</sup>+System-HRP(AEC)试剂盒说明书进行二抗的温育和染色,复染使

用苏木精。这期间应用以下抗体: 兔抗-CD68(应用于鼠, 1:200)、鼠抗-CD68(应用于人, 1:100)、兔抗-TNF- $\alpha$ (1:100)和鼠抗-无磷酸化 $\beta$ -catenin(1:50)。CD68<sup>+</sup>细胞统计方法: 在肿瘤组织中随机选取6个显微镜高倍视野, 计数CD68<sup>+</sup>细胞总数, 然后除以6取得平均值, 即为每高倍视野CD68<sup>+</sup>细胞数目。

### 1.3 统计学处理

使用SPSS 17.0统计软件进行分析。数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。2组比较采用 $t$ 检验, 免疫组化检测采用四格表 $\chi^2$ 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠肺肿瘤组织中巨噬细胞的浸润、TNF- $\alpha$ 及无磷酸化 $\beta$ -catenin的表达

免疫组化染色结果表明, 在香烟烟雾的刺激下, 在肿瘤负荷小鼠的肺肿瘤组织中显示, 浸润到肿瘤组织中的巨噬细胞CD68<sup>+</sup>的数量显著高于空气对照组(图1、2)。肿瘤组织中TNF- $\alpha$ 的表达在吸烟组和空气对照组中的差异有统计学意义( $P<0.05$ )。吸烟组肺肿瘤中表达TNF- $\alpha$ 的炎性反应细胞明显多于空气对照组。在吸烟组的

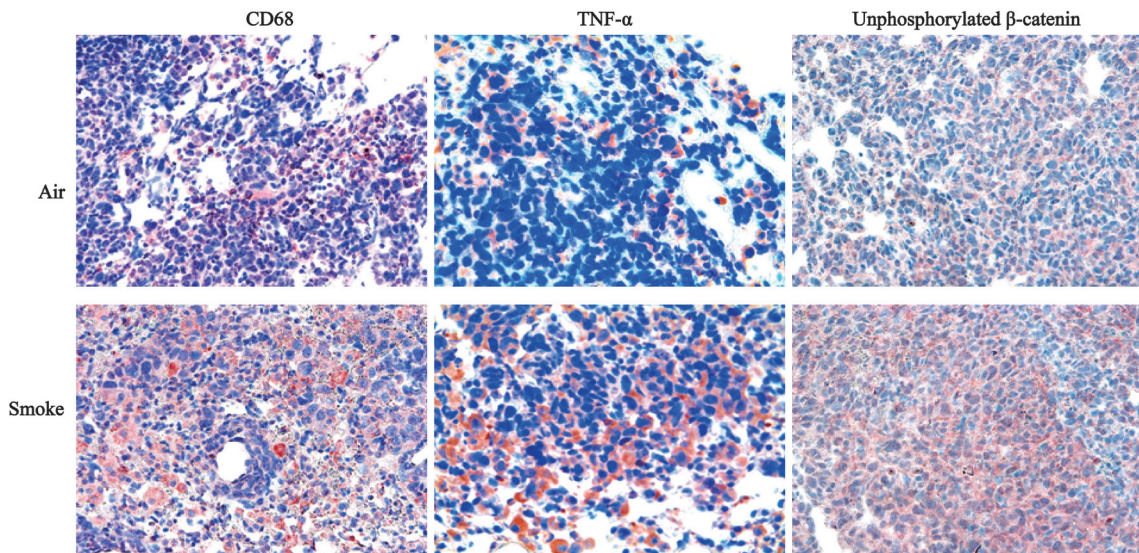


图1 空气对照组与吸烟组小鼠肺肿瘤组织CD68、TNF- $\alpha$ 及无磷酸化 $\beta$ -catenin免疫组化染色结果

Fig. 1 Immunohistochemical analysis of CD68, TNF- $\alpha$  and unphosphorylated  $\beta$ -catenin in smoke or air treated lung tumors of mice (EnVision,  $\times 200$ )

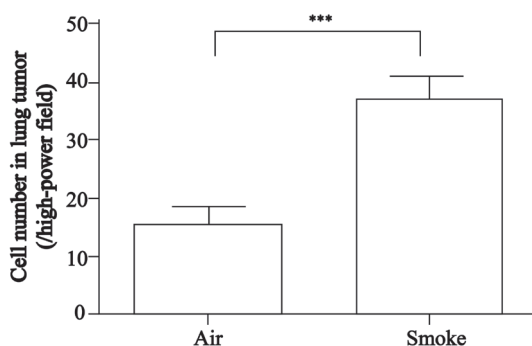


图2 CD68<sup>+</sup>细胞在空气组和吸烟组肺肿瘤组织中的计数

Fig. 2 Numbers of CD68<sup>+</sup> cells in lung tumor tissues of air group and smoke group

\*\*\*:  $P<0.001$ .

小鼠肺肿瘤细胞中无磷酸化 $\beta$ -catenin的表达显著高于空气对照组(图1)。

### 2.2 肺癌患者肿瘤组织CD68、TNF- $\alpha$ 和无磷酸化 $\beta$ -catenin的表达

免疫组化检测结果显示, 在全部检测的82例肺腺癌和鳞癌肿瘤组织中, CD68<sup>+</sup>的巨噬细胞以及TNF- $\alpha$ 表达阳性的炎性反应细胞数显著多于正常肺组织(图3)。无磷酸化 $\beta$ -catenin在肺腺癌和鳞癌肿瘤组织中的表达也显著高于正常组织(图3)。在肺腺癌肿瘤组织中, 有31例(68.9%)标本无磷酸化 $\beta$ -catenin染色阳性; 在肺鳞癌肿瘤组织中, 有23例(62.2%)标本无磷酸化 $\beta$ -catenin染色阳性(表1)。无磷酸化 $\beta$ -catenin的

阳性率与患者的吸烟状态和肿瘤的分期有关，在吸烟患者癌组织中，无磷酸化β-catenin阳性率高于不吸烟患者( $P<0.05$ )；III~IV期癌组织中无磷酸化β-catenin阳性率高于I~II期( $P<0.05$ ,

表1)。同时结果也发现，在无磷酸化β-catenin染色阳性的标本中，CD68染色阳性的细胞数明显高于无磷酸化β-catenin染色阴性肺癌标本的细胞数( $P<0.01$ , 图4)。

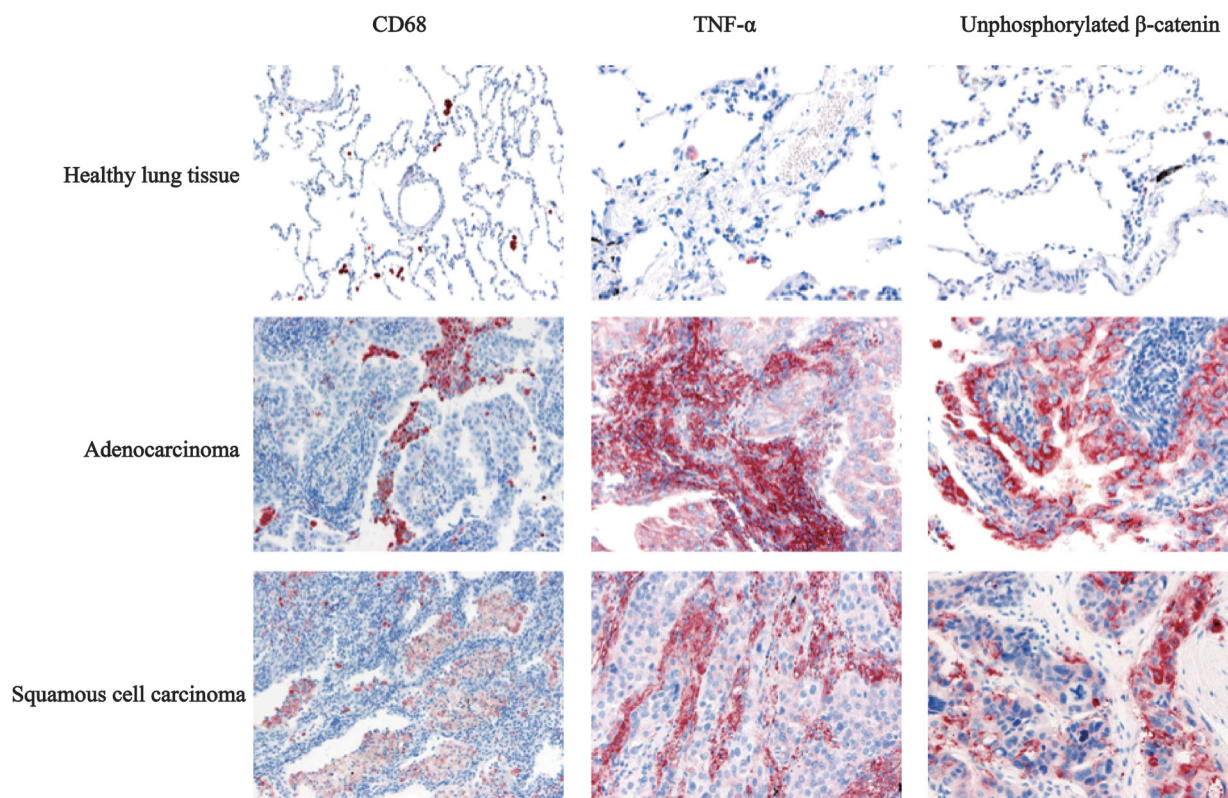


图3 NSCLC组织CD68、TNF-α及无磷酸化β-catenin的表达

Fig. 3 Immunohistochemical analysis of CD68, TNF-α and unphosphorylated β-catenin in NSCLC tissues

CD68: EnVision, ×100; TNF-α: EnVision, ×200; Unphosphorylated β-catenin: EnVision, ×200.

表1 在82例NSCLC组织中无磷酸化β-catenin组化检测及其临床病理特征关系

Tab. 1 The correlation of unphosphorylated β-catenin staining and clinicopathological features in 82 NSCLC tissues

Clinicopathologic feature	Case	Unphosphorylated β-catenin	P value
Gender			
Male	54	34(63.0%)	>0.05
Female	28	17(60.7%)	
Age/year			
<60	29	19(65.5%)	>0.05
≥60	53	36(67.9%)	
Smoking status			
Yes	56	50(89.3%)	<0.05
No	26	11(42.3%)	
Histological type			
Adenocarcinoma	45	31(68.9%)	>0.05
Squamous carcinoma	37	23(62.2%)	
Stage			
I - II	48	19(39.6%)	<0.05
III - IV	34	28(82.4%)	

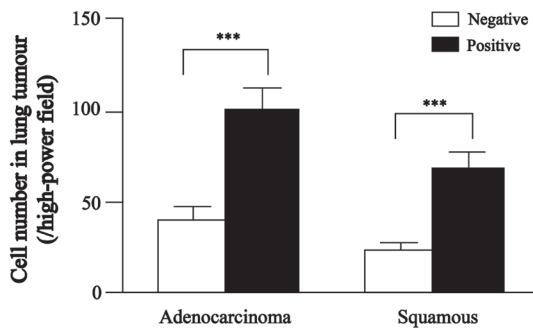


图4 CD68<sup>+</sup>细胞在无磷酸化 $\beta$ -catenin染色阳性和阴性的肺癌和肺鳞癌肿瘤组织中的计数

Fig. 4 CD68<sup>+</sup> cells counting in adenocarcinoma or squamous cell carcinoma with positive or negative unphosphorylated  $\beta$ -catenin staining

\*\*\*:  $P < 0.001$ .

### 2.3 巨噬细胞释放的TNF- $\alpha$ 激活肿瘤细胞Wnt/ $\beta$ -catenin途径

Western blot检测结果显示, 不同浓度(0%~0.5%)的CSE直接处理A549细胞72 h后, 无磷酸化 $\beta$ -catenin的表达无显著变化, 但是当A549细胞与巨噬细胞共培养后, 随着CSE浓度的增加, A549细胞中无磷酸化 $\beta$ -catenin的表达显著上调, 并显示出部分CSE剂量依赖性表达(图5A)。在巨噬细胞和A549细胞共培养条件下, 与对照组相比, 加入10  $\mu$ g/mL的TNF- $\alpha$ 中和抗体后显著抑制A549细胞无磷酸化 $\beta$ -catenin的表达(图5B)。用100 ng/mL的TNF- $\alpha$ 处理A549细胞, 磷酸化的GSK-3 $\beta$ 和Akt蛋白在TNF- $\alpha$ 处理2 h后就表达增加, 4 h后无磷酸化 $\beta$ -catenin蛋白表达也开始上调(图5C)。

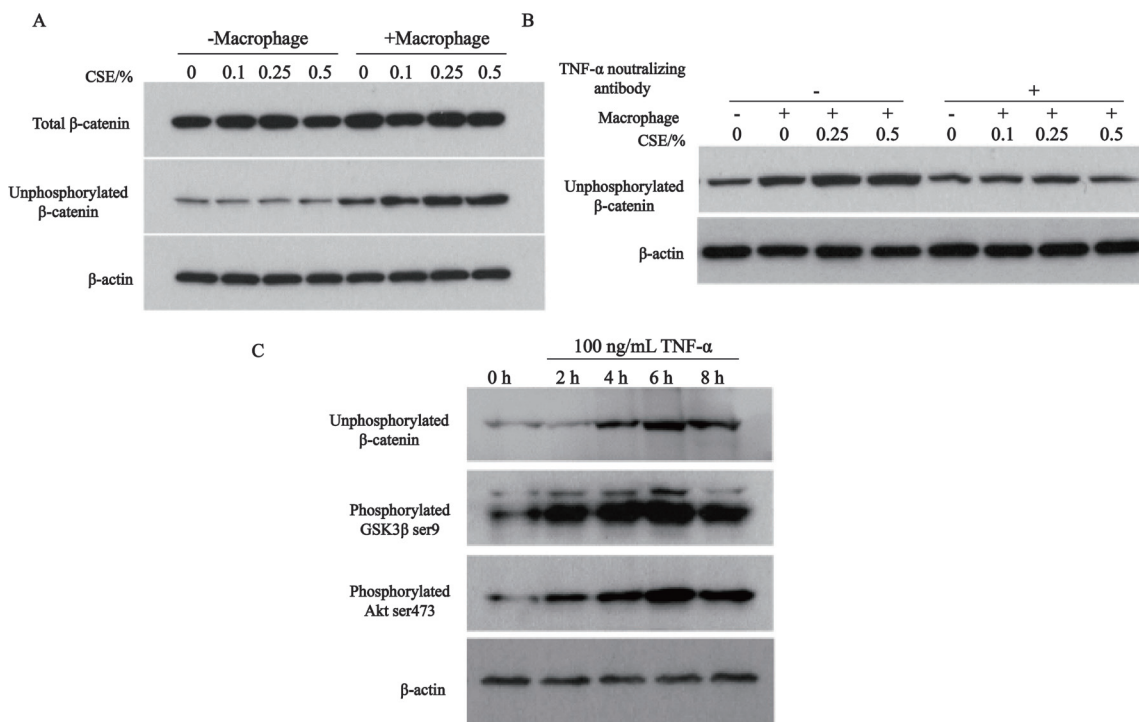


图5 TNF- $\alpha$ 激活Wnt/ $\beta$ -catenin途径

Fig. 5 TNF- $\alpha$  activated Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway

A: A549 cells were cocultured with macrophages and were exposed to 0%-0.5% CSE for 72 h; A549 cell lysates were analyzed by immunoblotting for the abundance of unphosphorylated  $\beta$ -catenin. B: TNF- $\alpha$  blocking antibody was applied to CSE-exposed A549 cells in cocultures with macrophages; After 72 h, the indicated proteins in A549 cells were analyzed by immunoblotting. C: A549 cells were treated by 100 ng/mL TNF- $\alpha$  for the indicated times; Expressions of the indicated proteins were detected by immunoblotting analysis.

## 3 讨 论

香烟作为导致肺癌的重要因素已被人们熟

知, 而其具有的促进肿瘤生长的特性, 目前也已被包括多项研究证实<sup>[1-2,8-9]</sup>。前期研究表明在采用注射肿瘤细胞、化学致癌物NNK或

*K-ras*转基因小鼠等方法导致的肺癌小鼠模型中, 香烟烟雾的刺激显著增加了肺肿瘤的生长<sup>[1,9]</sup>。有研究显示, 香烟烟雾刺激产生的炎症反应被认为可能关联到肺肿瘤的生长<sup>[1,9]</sup>。通过敲除小鼠髓系细胞p65或IKK $\beta$ 阻断炎症反应免疫细胞的NF- $\kappa$ B信号途径, 显著抑制香烟烟雾诱发的小鼠肺部炎症反应, 导致小鼠肺肿瘤生长阻滞<sup>[2,9]</sup>。本研究结果发现, 大量的巨噬细胞浸润到小鼠肺肿瘤组织中, 并且浸润到肿瘤组织的炎症反应细胞表达高浓度的TNF- $\alpha$ , 特别是当小鼠经过香烟烟雾刺激后, TNF- $\alpha$ 的表达进一步增加。在巨噬细胞中, TNF- $\alpha$ 表达主要由NF- $\kappa$ B途径控制, 是巨噬细胞分泌的主要炎症细胞因子<sup>[10]</sup>。

Wnt/ $\beta$ -catenin是胚胎肺组织发育的重要信号途径, 是Wnt蛋白家族的经典信号途径, 它的激活需要依赖细胞质中 $\beta$ -catenin蛋白的磷酸化<sup>[11]</sup>。当Wnt未与细胞膜上的配基结合时, 细胞质中的 $\beta$ -catenin被由GSK-3 $\beta$ 、酪蛋白激酶1、Axin和腺瘤结肠息肉病组成的破坏复合物磷酸化, 进而通过泛素-蛋白酶体途径被降解。而当Wnt与其配体Frizzled和低密度脂蛋白受体相关蛋白受体结合后, 通过激活磷酸化蛋白散乱蛋白, 进而破坏复合物的功能, 使其 $\beta$ -catenin蛋白不能被磷酸化。这样非磷酸化的 $\beta$ -catenin蛋白进入细胞核与相应的靶基因如*Cyclin D1*、*c-Myc*等结合, 进而启动这些基因的转录表达。近年的研究表明Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径的激活同样涉及肺肿瘤的发生、发展<sup>[12]</sup>。相关临床研究显示, 异常的Wnt/ $\beta$ -catenin表达可能是非小细胞肺癌预后较差的一个独立的标志<sup>[13]</sup>。香烟烟雾可以通过激活Wnt/ $\beta$ -catenin途径, 导致人正常支气管表皮细胞的恶性转变<sup>[14]</sup>。本研究表明, 人或小鼠的肺肿瘤组织均有非磷酸化 $\beta$ -catenin表达, 特别是经过香烟烟雾的刺激后, 无磷酸化 $\beta$ -catenin的表达显著增加, 提示Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径可能参与吸烟者肺癌的发病。

在本研究中, CSE诱导的A549细胞Wnt/ $\beta$ -catenin信号激活需要巨噬细胞的存在,

说明经香烟烟雾刺激后, 巨噬细胞释放的某些可溶性的因子可能参与肺癌细胞Wnt/ $\beta$ -catenin信号的激活。已有研究显示, Wnt/ $\beta$ -catenin信号的激活涉及TNF- $\alpha$ 诱导的胃癌形成过程<sup>[4]</sup>。本研究结果显示, TNF- $\alpha$ 的刺激显著激活肺腺癌A549细胞的Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径。在巨噬细胞与A549细胞共培养体系中加入TNF- $\alpha$ 中和抗体能显著地抑制无磷酸化 $\beta$ -catenin表达, 提示TNF- $\alpha$ 具有上调Wnt/ $\beta$ -catenin信号的功能。GSK-3 $\beta$ 是Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径的主要抑制因子, 它通过磷酸化 $\beta$ -catenin上一系列保守的丝氨酸和苏氨酸残基, 致使 $\beta$ -catenin蛋白降解<sup>[15]</sup>。Akt能够通过磷酸化GSK-3 $\beta$ 激活 $\beta$ -catenin的转录活性<sup>[4]</sup>。本研究通过Western blot检测证明, TNF- $\alpha$ 通过激活Akt信号途径, 致使GSK-3 $\beta$ 磷酸化并抑制GSK-3 $\beta$ 功能, 从而上调无磷酸化 $\beta$ -catenin的表达, 激活Wnt/ $\beta$ -catenin信号途径。

综上所述, 本研究结果显示, 香烟烟雾诱导了巨噬细胞的肿瘤浸润并激活其炎症反应因子如TNF- $\alpha$ 的表达和释放, 进而通过Akt/GSK-3 $\beta$ 途径激活肺肿瘤细胞Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路, 初步阐明香烟烟雾促进肺肿瘤发展的分子机制。

#### [参 考 文 献]

- [1] LI D, BEISSWENGER C, HERR C, et al. Expression of the antimicrobial peptide cathelicidin in myeloid cells is required for lung tumor growth [J]. *Oncogene*, 2014, 33(21): 2709-2716.
- [2] LI D, BEISSWENGER C, HERR C, et al. Myeloid cell RelA/p65 promotes lung cancer proliferation through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in murine and human tumor cells [J]. *Oncogene*, 2014, 33(10): 1239-1248.
- [3] TAKAHASHI-YANAGA F, KAHN M. Targeting Wnt signaling: can we safely eradicate cancer stem cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(12): 3153-3162.
- [4] OGUMA K, OSHIMA H, AOKI M, et al. Activated macrophages promote Wnt signalling through tumour necrosis factor- $\alpha$  in gastric tumour cells [J]. *EMBO J*, 2008, 27(12): 1671-1681.
- [5] LI D, WANG X, WU J L, et al. Tumor-produced versican V1 enhances hCAP18/LL-37 expression in macrophages through activation of TLR2 and vitamin D3 signaling to promote

- ovarian cancer progression in vitro [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56616.
- [6] 李冬, 王旋, 戴燕, 等. 抗菌肽LL-37在巨噬细胞促卵巢癌细胞增殖中的作用 [J]. 中华肿瘤杂志, 2013, 35(9): 660-665.
- [7] KIM S, TAKAHASHI H, LIN W W, et al. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis [J]. Nature, 2009, 457(7225): 102-106.
- [8] 李冬, 王旋, 周宏, 等. 阻断巨噬细胞NF $\kappa$ B-p65通路对香烟促进非小细胞肺癌NCI-H520细胞株增殖的影响 [J]. 肿瘤研究与临床, 2012, 24(9): 584-588.
- [9] TAKAHASHI H, OGATA H, NISHIGAKI R, et al. Tobacco smoke promotes lung tumorigenesis by triggering IKK $\beta$ - and JNK1-dependent inflammation [J]. Cancer Cell, 2010, 17(1): 89-97.
- [10] GRIVENNIKOV S I, KARIN M. Inflammation and oncogenesis: a vicious connection [J]. Curr Opin Genet Dev, 2010, 20(1): 65-71.
- [11] NEUMANN J, SCHAALE K, FARHAT K, et al. Frizzled1 is a marker of inflammatory macrophages, and its ligand Wnt3a is involved in reprogramming mycobacterium tuberculosis-infected macrophages [J]. FASEB J, 2010, 24(11): 4599-4612.
- [12] KONIGSHOFF M, EICHELBERG O. WNT signaling in lung disease: a failure or a regeneration signal? [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010, 42(1): 21-31.
- [13] XU X, SUN P L, LI J Z, et al. Aberrant Wnt1/ $\beta$ -catenin expression is an independent poor prognostic marker of non-small cell lung cancer after surgery [J]. J Thorac Oncol, 2011, 6(4): 716-724.
- [14] LEMJABBAR-ALAOUI H, DASARI V, SIDHU S S, et al. Wnt and Hedgehog are critical mediators of cigarette smoke-induced lung cancer [J]. PLoS One, 2006, 1: e93.
- [15] ANASTAS J N, MOON R T. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(1): 11-26.

(收稿日期: 2014-05-28 修回日期: 2014-07-30)

## 《中国癌症杂志》2015年征订启事

《中国癌症杂志》是由国家教育部主管、复旦大学附属肿瘤医院主办的全国性肿瘤学期刊, 读者对象为从事肿瘤基础、临床防治研究的中高级工作者。主要报道内容: 国内外研究前沿的快速报道、专家述评、肿瘤临床研究、基础研究、文献综述、学术讨论、临床病理讨论、病例报道、讲座和简讯等。《中国癌症杂志》已入选中文核心期刊、中国科技核心期刊及全国肿瘤类核心期刊, 并为中国科技论文统计源期刊, 先后被“中国期刊网”、“万方数据——数字化期刊群”和“解放军医学图书馆数据库(CMCC)”等收录。

《中国癌症杂志》为月刊, 大16开, 80页铜版纸(随文彩图), 每月30日出版, 单价10元, 全年120元。国际标准刊号1007-3639, 国内统一标准刊号CN31-1727/R, 邮发代号4-575。

读者可在当地邮局订阅, 漏订者可直接向本刊编辑部订阅。

也欢迎广大作者来稿。

主 编: 沈镇宙

联系地址: 上海市东安路270号复旦大学附属肿瘤医院内

《中国癌症杂志》编辑部

邮 编: 200032

电 话: 021-64188274; 021-64175590 × 83574

网 址: www.china-oncology.com

电子邮件: zgazzz@163.com