

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201904010

· 论著 ·

CCL18-PITPNM3 配体受体轴在头颈鳞状细胞癌侵袭转移中的作用及分子机制研究

覃岳香¹, 刘勇², 汪俊程², 姚山虎³, 黄东海², 张欣², 陈志恒¹

(1. 中南大学湘雅三医院 健康管理科, 湖南 长沙 410013; 2. 中南大学湘雅医院 耳鼻咽喉头颈外科 耳鼻咽喉科 重大疾病研究湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410008; 3. 中南大学湘雅三医院 放射科, 湖南 长沙 410013)

摘要: **目的** 探讨 CCL18-PITPNM3 (CC chemokine ligand 18-phosphatidylinositol transfer protein 3, CCL18-PITPNM3) 配体受体轴在头颈鳞状细胞癌侵袭转移中的作用及其分子机制。**方法** 采用人重组蛋白 CCL18 处理头颈鳞状细胞癌 Tu686、6-10B 细胞, siRNA 下调 PITPNM3 的表达, 通过 CCK-8 (cell counting kit-8)、平板克隆实验、流式周期检测生长增殖能力的变化, 划痕愈合实验、Transwell 侵袭小室实验检测体外迁移侵袭能力的改变, qRT-PCR、Western blot 检测 EMT 分子标志物的表达情况。**结果** ①rhCCL18 处理头颈鳞状细胞癌 Tu686、6-10B 细胞后, 细胞划痕愈合率增加, 穿过 Transwell 聚碳酸酯膜的细胞明显增多, rhCCL18 处理 siRNA 下调 PITPNM3 的 Tu686、6-10B 细胞, 下调组细胞的迁移和侵袭能力较亲本细胞处理组明显减弱; ②rhCCL18 处理头颈鳞状细胞癌 Tu686、6-10B 细胞, mRNA 水平 E-cadherin 表达降低, Vimentin、N-cadherin、Fibronectin 表达升高; 蛋白质水平 E-cadherin 表达降低, Vimentin 表达升高。下调两株细胞的 PITPNM3 表达后 rhCCL18 再次处理, E-cadherin 下调和 Vimentin、N-cadherin、Fibronectin 上调均未显示出亲本细胞的明显趋势; ③rhCCL18 处理和下调 PITPNM3 对 Tu686、6-10B 6 组细胞的生存率、增殖及细胞周期无明显变化。**结论** CCL18-PITPNM3 配体受体轴可促进头颈鳞状细胞癌的体外侵袭转移能力, 可能与 EMT 转化相关。

关键词: 头颈鳞状细胞癌; CCL18; PITPNM3; 侵袭转移; 上皮-间质转化

中图分类号: R739.91

The role and molecular mechanism of CCL18-PITPNM3 ligand receptor axis in the invasion and metastasis of squamous cell carcinoma of the head and neck

QIN Yue-xiang¹, LIU Yong², WANG Jun-cheng², YAO Shan-hu³, HUANG Dong-hai², ZHANG Xin², CHEN Zhi-heng¹
(1. Health Management Center, the Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China; 2. Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Key Laboratory of Otolaryngology Major Diseases Research of Hunan Province, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 3. Department of Radiology, the Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role of CC chemokine ligand 18 (CCL18)-membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein 3 (PITPNM3) ligand receptor axis in the invasion and metastasis of squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) and its molecular mechanism. **Methods** Human recombinant protein CCL18 (rhCCL18) was used to stimulate SCCHN Tu686 and 6-10B cells. siRNA was used to down-regulate the expression of PITPNM3, and the growth and proliferation abilities were detected by cholecystokinin octapeptide (CCK-8), cloning formation assays and flow cytometry. The scratch healing assays and Transwell invasion chamber assays were performed to detect changes of migration and invasion abilities in vitro, and the expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT)

基金项目: 国家自然科学基金(81772903、81472696、81874133、81602684、81602389); 湖南省自然科学基金(2018JJ2630、2017JJ3488、2017JJ3456); 湖湘英才计划(2018RS3024)。

作者简介: 覃岳香, 女, 博士, 助理研究员。

通信作者: 陈志恒, Email: 873127193@qq.com; 张欣, Email: xinzhang@csu.edu.cn

molecular markers was detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot. **Results**

①In the Tu686 and 6-10B cells, rhCCL18 stimulation got the cell scratch healing rates increased with significantly elevated numbers of cells passing through Transwell polycarbonate membrane. After rhCCL18 stimulation, the Tu686 and 6-10B cells with down-regulated expression of PITPNM3 by siRNA didn't show any clear trends in the migration abilities and numbers of cells passing through Transwell polycarbonate membrane as the parental ones did. ②After treatment of Tu686 and 6-10B cells with rhCCL18, the expressions of E-cadherin at both mRNA level and protein level decreased, while the expressions of Vimentin at both levels and those of N-cadherin and Fibronectin at mRNA level increased. After rhCCL18 treatment, Tu686 and 6-10B cells with down-regulated expression of PITPNM3 by siRNA didn't show any clear trends in the expressions of E-cadherin, Vimentin, N-cadherin and Fibronectin as the parental ones did. ③The results of CCK-8, cloning formation and flow cytometry indicated that rhCCL18 stimulation and down-regulation of PITPNM3 did not lead to significant changes in the growth rates and proliferation as well as cell cycles of Tu686 and 6-10B cells. **Conclusion**

CCL18-PITPNM3 ligand receptor axis can promote the in vitro invasive and metastatic abilities of SCCHN, which may be related to EMT.

Key words: Squamous cell carcinoma of the head and neck; CC chemokine ligand 18; Embrane-associated phosphatidylinositol transfer protein 3; Metastasis; Epithelial-mesenchymal transition

头颈鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma of the head and neck, SCCHN)是头颈部最常见的恶性肿瘤,其发病率位居全球恶性肿瘤第六^[1]。尽管手术、放疗和化疗等多学科有效治疗已在临床实践中应用了数十年,但头颈鳞状细胞癌患者的预后仍然不理想^[2]。转移是头颈鳞状细胞癌患者死亡率高的主要原因之一,至今尚未完全阐明其因果关系^[3-5]。因此,探索头颈鳞状细胞癌侵袭与转移的分子机制,筛选出肿瘤细胞免疫治疗的干预靶点,具有重要的科研与临床意义。

肿瘤微环境是一个复杂的综合系统,多种稳定的基质细胞参与其中,如肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)^[6-7]。CC型趋化因子配体18(CC chemokine ligand 18, CCL18)是肿瘤微环境中M2型TAMs分泌的重要调控因子,在人类多种恶性肿瘤中高表达^[8-19],与肿瘤的发生和发展密切相关,可作为预测患者预后的独立指标^[20]。研究报道在乳腺癌、肺癌等多种恶性肿瘤中,CCL18可直接或间接促进肿瘤血管新生、抑制免疫、重塑肿瘤微环境而导致肿瘤的恶性进展^[20]。磷脂酰肌醇转移蛋白3(phosphatidylinositol transfer protein 3, PITPNM3)是CCL18的功能性受体,CCL18-PITPNM3可以激活钙离子信号、Pyk2通路或促进CSF-1的表达,增强细胞的增殖、迁移和侵袭能力^[20-21]。课题组前期研究发现M2型TAMs分泌的CCL18可经MTDH诱导上皮-间质转化(EMT)和肿瘤干性,促进头颈鳞状细胞癌细胞的迁移、侵袭与转移^[22-23]。但CCL18-PITPNM3配体受体轴在头颈鳞状细胞癌中的作用及分子机制尚不清楚。因此,本研究在此基础上,以头颈鳞状细

胞癌细胞株为研究工具,探究CCL18-PITPNM3配体受体轴在头颈鳞状细胞癌侵袭转移中的作用及分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料试剂

DMEM/F12细胞培养液(Hyclone,美国),1640细胞培养液RPMI(Hyclone,美国),无噬菌体优级胎牛血清(Gibco,美国),0.25%胰酶溶液(Gibco,美国),双抗(青链霉素混合液)(Gibco,美国),PITPNM3的小干扰RNA(si-PITPNM3)(广州锐博生物技术有限公司,中国),siRNA转染试剂盒(广州锐博生物技术有限公司,中国),E-cadherin蛋白兔多克隆一抗(Santa Cruz,美国),Vimentin蛋白兔多克隆一抗(Proteintech,美国),PITPNM3蛋白兔多克隆一抗(Novus,美国), β -actin蛋白小鼠单克隆一抗(Proteintech,美国),Cell Counting Kit检测试剂盒(七海复泰生物技术有限公司,中国),TRIzol RNA分离试剂(Life Technologies,美国),铺有Matrigel基质胶的Transwell小室(8 μ m规格,Chemicon公司,美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验细胞 选取了5株头颈鳞状细胞癌细胞(Tu686、6-10B、5-8F、FaDu和CNE2)及1株口腔黏膜癌前病变细胞(DOK)来检测PITPNM3的表达情况。根据实验结果及细胞株的生长特点、生物学特性,选取人口咽部鳞癌细胞株(Tu686)和人鼻咽部鳞癌细胞株(6-10B)作为实验细胞。Tu686细

胞来自于美国 Emory 大学 Gorgia Chen 实验室,培养用 DMEM/F12,1:1 混合培养液;6-10B 细胞来源于中南大学湘雅医学院中心实验室,培养 6-10B 细胞用 RPMI-1640 培养液。两株细胞株采用含 10% 无噬菌体优级胎牛血清、1% 双抗(青霉素和链霉素)的不同的完全培养液,置于 37°C、5% CO₂ 且 95% 湿度的细胞培养箱中常规培养。实验中所使用的细胞均生长状态良好且处于对数期。

1.2.2 si-PITPNM3 转染 Tu686、6-10B 细胞过程 严格按照锐博 siRNA 转染试剂盒说明书的操作步骤进行,采用 qRT-PCR 选择最佳转染效率的 siRNA-PITPNM3。选取处于对数生长期的 Tu686、6-10B 细胞种板,细胞融合度约 30%~40% 时予以脱血清处理 24 h,配制 siRNA 转染试剂复合物,静置 30 min 后加入无血清培养基中培养。转染 72 h 后提取总蛋白进行 Western blot 检测 PITPNM3 蛋白的下调效果。

1.2.3 rhCCL18 处理头颈鳞状细胞癌细胞 Tu686、6-10B 细胞分别接种于 6 孔板中,待贴壁 24 h,细胞密度约为 50% 时,予以无血清培养基培养 24 h 后每孔更换 2 ml 新鲜无血清培养液,以最佳作用浓度 20 ng/ml 的 rhCCL18 处理头颈鳞状细胞癌细胞,24 h 后重复处理一次,继续培养 24 h 后准备后续实验。实验共分为 6 组:①亲本细胞组(Blank);②对照组(NC);③实验组(si-PITPNM3);④亲本细胞 + rhCCL18 组(Blank + CCL18);⑤对照组 + rhCCL18 (NC + CCL18);⑥实验组 + rhCCL18 (si-PITPNM3 + CCL18)。

1.2.4 CCK-8 法 将处理后 Tu686 和 6-10B 各组细胞用 0.25% 的胰蛋白酶消化,接种于 96 孔板,每孔 2 000 个细胞,每组各设 3 个复孔,常规培养。6 h 后待细胞贴壁完好,取其中一块板作为 0 h 计时点,每 24 h 更换新鲜的含血清培养基。在 0、24、48、72、96 h 时间点弃除原培养液,每孔分别加 100 μ l CCK-8 培养液混合液(混合液配置方法:CCK-8:培养液 = 1:9),置于 37°C 培养箱中反应 1 h,采用 ELx800 吸收光酶标仪(主波长 450 nm、滤过波长 630 nm)测定吸光度值,绘制细胞生长曲线图。实验重复 3 次。

1.2.5 平板克隆形成实验 将处理后 Tu686 和 6-10B 各组细胞用 0.25% 的胰蛋白酶消化,接种于 6 孔板,细胞密度为 300 个/孔,常规培养 10~15 d。每 3 天更换含有 10% 血清和双抗的细胞培养液,出现肉眼可见的细胞克隆时终止培养。弃除原培养液,用 4°C 预冷的 PBS 缓冲液清洗 3 次,预冷的 4% 多聚甲醛固定 15 min,700 μ l 结晶紫染液染色

15 min,流水洗净后晾干。采集图像,用 Image J 软件计数克隆,并计算各组的克隆形成率,实验重复 3 次。

1.2.6 流式细胞术检测 将处理后 Tu686 各组细胞用 0.25% 的胰蛋白酶消化,制成细胞悬液转移至离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,以 PBS 溶液重悬、洗涤细胞 2 次,离心弃上清,每组细胞加入 1 ml 70% 乙醇重悬固定细胞 18 h,将已固定好的细胞 800 r/min 离心 10 min,收集细胞,加入 PBS 洗涤液,1 000 r/min 离心 5 min,洗涤 2 次;加入 500 μ l Binding Buffer,5 μ l RNase A 和 5 μ l PI 染色混匀,RT 避光 15 min;上机检测,记录激发波长 488 nm 处红色荧光。实验重复 3 次。

1.2.7 划痕愈合实验 将处理后 Tu686 和 6-10B 各组细胞用 0.25% 的胰蛋白酶消化制成细胞悬液,调整细胞密度为 3×10^5 个/ml,接种于 6 孔板常规培养,待细胞融合度 90% 以上时,予以脱血清处理 24 h,单层细胞贴壁融合度接近 100%,采用 10 μ l 无菌移液枪头进行细胞划痕,PBS 洗净漂浮细胞,无血清培养液培养。在 0 h 和 48 h 时,将划痕区域置于倒置显微镜下拍照,保证两次拍照所选区域一致。观察各组细胞的愈合能力,计算各组的划痕愈合率。实验重复 3 次。

1.2.8 Transwell 侵袭小室实验 将铺有 Matrigel 胶的小室置于紫外灯下照射 5 min,并用少量的无血清培养基水化。将处理后 Tu686 和 6-10B 各组细胞用 0.25% 的胰蛋白酶消化,接种于小孔上室,细胞密度 Tu686 为 2×10^4 个/ml,6-10B 为 1×10^4 个/ml,下室加入 600 μ l 含 10% 血清的培养液,常规培养 48 h。取出 Transwell 小室,用棉签轻轻擦除聚碳酸酯膜面上的凝胶和细胞,用预冷的 4% 多聚甲醛固定 15 min,600 μ l 结晶紫染液染色 15 min,流水冲洗并擦净,倒置显微镜高倍镜下随机选取 5 个视野拍照,用 Image J 软件计数穿透 matrigel 胶的细胞数。实验重复 3 次。

1.2.9 qRT-PCR 法 提取各组细胞总 RNA,ND2 000 核酸蛋白分析仪测定总 RNA 的浓度,OD260/OD280 值检测 RNA 的纯度,根据 All-in-One First-Strand cDNA Synthesis kit 试剂盒流程逆转录合成 cDNA。根据 All-in-One qPCR Mix 试剂盒流程配置 qRT-PCR 反应液体系,完成 qRT-PCR 反应,利用 ^{2- $\Delta\Delta$} Ct 法来计算各组目的基因的 mRNA 相对于 β -actin 的表达量。实验重复 3 次。所用引物序列见表 1。

1.2.10 蛋白质印记法(Western blot) 提取各组

表1 引物序列

| Gene | Primer Sequences (5' - 3') |
|----------------|-------------------------------|
| E-cadherin | Forward TCCATTCTTGGTCTACGCC |
| | Reverse CACCTTCAGCCAACCTGTTT |
| Vimentin | Forward TGGCACCTTTGACCTTGAA |
| | Reverse GGTCATCGTGATGCTGAGAA |
| N-cadherin | Forward TGGTGTATGCCGTGAGAAGC |
| | Reverse TTAAGGTTGGCTTCAGGCTCA |
| Fibronectin | Forward GGCCAGACTCCAATCCAGAG |
| | Reverse CCGAGCATTGTCATTCAAGG |
| β -actin | Forward CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT |
| | Reverse AGCACTGTGTGGCGTACAG |

细胞总蛋白,BCA 法测定细胞总蛋白浓度。总蛋白变性处理后,进行10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳。蛋白电泳分离后转膜至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,5%脱脂牛奶封闭1.5 h。兔抗人 PTPNM3、E-cadherin、Vimentin 多克隆抗体(1:1 000)于4℃冰箱过夜,37℃下复温孵育1 h。洗膜后,辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2 000)室温下孵育1 h。洗膜后,经化学发光剂显影曝光摄影。以鼠抗人 β -actin 抗体(1:2 000)检测 β -actin 含量作为内参照。实验重复3次。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。计量资料表示为 $\bar{x} \pm s$,两组比较采用 *t* 检验,3组及以上比较采用多样本的单因素方差检验(ANOVA)。所有统计学检验均为双侧检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 头颈鳞状细胞癌细胞株中 PTPNM3 的表达

通过 qRT-PCR 和 Western Blot 技术检测发现,与 DOK 细胞相比,Tu686、6-10B 细胞在 mRNA 和蛋白质水平均表现出高水平的 PTPNM3 表达,FaDu 细胞中 PTPNM3 的表达稍高,CNE2 中 PTPNM3 的表达较 DOK 细胞低,而 5-8F 中的表达水平较 DOK 细胞无明显差异。因此,本研究选取 Tu686、6-10B 细胞作为实验细胞($P < 0.01$,图 1A、B)。

2.2 下调头颈鳞状细胞癌细胞 Tu686 和 6-10B 细胞中 PTPNM3 的表达

采用3种不同序列的 siRNA 转染 Tu686 细胞株,提取各组细胞的 mRNA,使用 qRT-PCR 检测 PTPNM3

的表达情况,发现 si-PTPNM3-1 下调效果最明显($P < 0.001$,图 2A),因此,选择 si-PTPNM3-1 作为实验所用的 siRNA。采用 si-PTPNM3-1 转染 Tu686 及 6-10B 细胞,提取总蛋白进行 Western blot 检测下调效果,结果表明与 Blank、NC 组相比,两株细胞实验组中 PTPNM3 的表达量均显著降低(图 2B)。

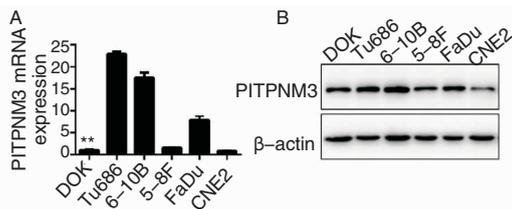


图1 头颈鳞状细胞癌细胞株中 PTPNM3 蛋白的表达 A: qRT-PCR 法检测各种头颈鳞状细胞癌细胞株中 PTPNM3 的表达(** $P < 0.01$); B: Western Blot 技术检测各种头颈鳞状细胞癌细胞株中 PTPNM3 的表达

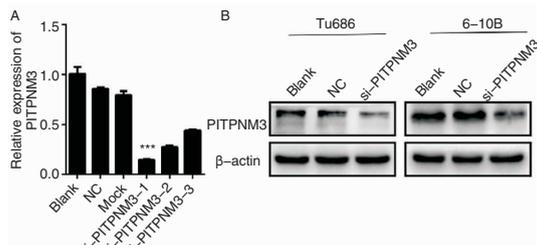


图2 下调头颈鳞状细胞癌细胞 Tu686 和 6-10B 细胞中 PTPNM3 的表达 A: qRT-PCR 检测发现 si-PTPNM3-1 下调效果最明显(*** $P < 0.001$); B: Western Blot 检测转染 si-PTPNM3 后 Tu686 和 6-10B 细胞株中 PTPNM3 均明显下调

2.3 CCL18-PTPNM3 配体受体轴对头颈鳞状细胞癌细胞的生长增殖能力无调控效应

用 rhCCL18 处理 Tu686、6-10B 的各组细胞,在 24、48、72 和 96 h 时间点 CCK-8 法检测发现两株细胞各组之间的生存率比较无统计学意义($P > 0.05$,图 3A、B)。该结果提示 CCL18-PTPNM3 配体受体轴对头颈鳞状细胞癌细胞的生长无调控效应。为进一步验证该结果,采用平板克隆形成实验观察 rh-CCL18 处理和 PTPNM3 下调后细胞的增殖情况,结果显示第 15 天时,Tu686、6-10 细胞的各组细胞集落的大小及数量均未无明显差异($P > 0.05$,图 3C、D)。流式周期检测发现 6 组细胞在 G1、G2 和 S 期均无明显差异($P > 0.05$),这表明 Tu686 细胞中 rh-CCL18 处理和转染 si-PTPNM3 对细胞周期均无影响(图 3E、F)。上述结果表明 CCL18-PTPNM3 配体受体轴对头颈鳞状细胞癌细胞的生长增殖能力无调控效应。

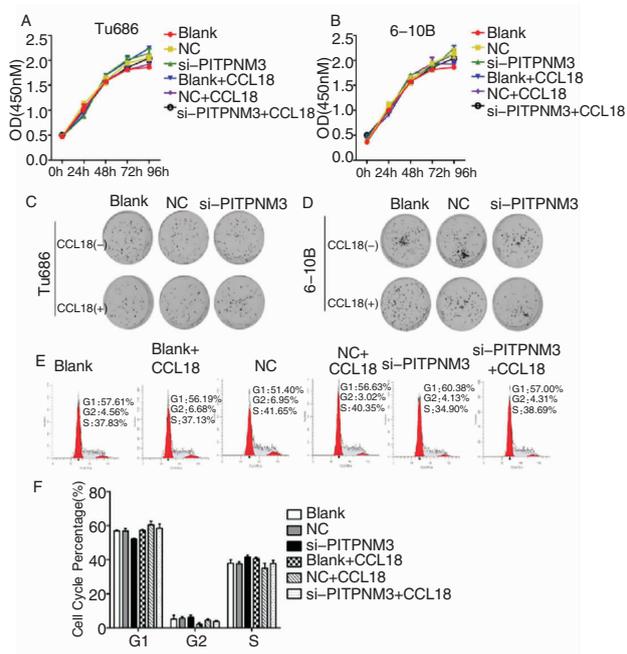


图 3 CCL18-PITPNM3 配体受体轴对头颈鳞状细胞癌细胞生长增殖能力的调控效应 A、B: CCK-8 检测提示 CCL18-PITPNM3 配体受体轴对头颈鳞状细胞癌细胞的生长无调控效应 ($P > 0.05$) ; C、D: 平板克隆形成实验观察 CCL18-PITPNM3 配体受体轴对头颈鳞状细胞癌细胞的增殖无影响 ($P > 0.05$) ; E、F: 流式周期检测 CCL18-PITPNM3 配体受体轴对 Tu686 细胞的周期无调控作用 ($P > 0.05$)

2.4 CCL18-PITPNM3 配体受体轴可促进头颈鳞状细胞癌细胞的体外迁移及侵袭

划痕愈合实验结果发现划痕 48 h 后, rhCCL18 处理的 3 组细胞划痕愈合率明显高于未处理的细胞组, rhCCL18 处理下调 PITPNM3 的细胞组, 较 Blank、NC 组相比, 该组细胞划痕愈合率明显降低。Tu686 细胞的六组划痕率分别为 Blank、NC、si-PITPNM、Blank + CCL18、NC + CCL18、si-PITPNM3 + CCL18: $(41.13 \pm 4.93)\%$ 、 $(45.49 \pm 1.99)\%$ 、 $(25.41 \pm 2.89)\%$ 、 $(71.64 \pm 6.70)\%$ 、 $(78.98 \pm 4.65)\%$ 、 $(62.16 \pm 4.21)\%$, 各组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$) ; 6-10B 细胞的 6 组划痕率分别为 Blank、NC、si-PITPNM、Blank + CCL18、NC + CCL18、si-PITPNM3 + CCL18: $(34.73 \pm 3.16)\%$ 、 $(36.73 \pm 2.87)\%$ 、 $(19.21 \pm 3.92)\%$ 、 $(58.19 \pm 2.08)\%$ 、 $(65.28 \pm 1.96)\%$ 、 $(43.27 \pm 5.73)\%$, 各组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4A、B)。

Transwell 侵袭小室实验与划痕愈合实验结果类似, 经过 48 h 培养后, rhCCL18 处理后 Tu686 和 6-10B 细胞穿透 Transwell 聚碳酸酯膜的细胞数明显

增多, 但下调 PITPNM3 的表达后予以 rhCCL18 处理发现, 下调组细胞穿过小室数量与 Blank 和 NC 组相比显著减少。Tu686 细胞的 6 组穿透 Transwell 聚碳酸酯膜的细胞数分别为 Blank、NC、si-PITPNM、Blank + CCL18、NC + CCL18、si-PITPNM3 + CCL18: 108 ± 6 、 99 ± 4 、 62 ± 3 、 173 ± 80 、 158 ± 7 、 100 ± 9 , 各组间差异具有统计学意义 ($P < 0.01$) ; 6-10B 细胞的 6 组 Transwell 聚碳酸酯膜的细胞数分别为 Blank、NC、si-PITPNM、Blank + CCL18、NC + CCL18、si-PITPNM3 + CCL18: 154 ± 7 、 127 ± 6 、 58 ± 4 、 276 ± 6 、 219 ± 8 、 139 ± 7 , 各组间差异具有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 4C、D)。这些结果表明 CCL18-PITPNM3 配体受体轴可促进头颈鳞状细胞癌细胞的体外迁移及侵袭。

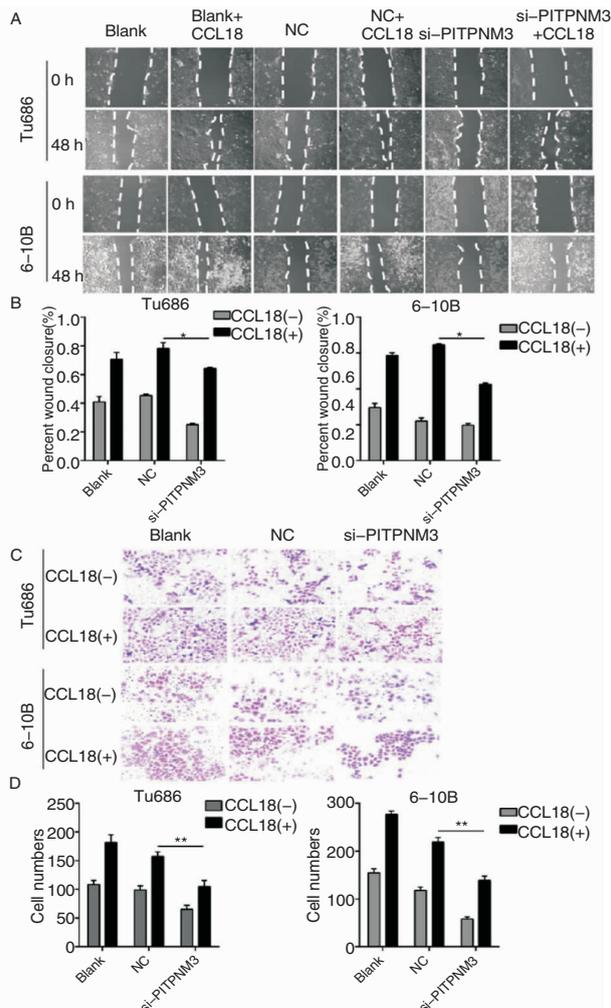


图 4 CCL18-PITPNM3 配体受体轴促进头颈鳞状细胞癌细胞的体外迁移及侵袭 A、B: 划痕愈合实验检测发现 CCL18-PITPNM3 配体受体轴促进头颈鳞状细胞癌细胞的体外迁移能力 ($* P < 0.05$) ; C、D: Transwell 侵袭小室实验检测发现 CCL18-PITPNM3 配体受体轴促进头颈鳞状细胞癌细胞的体外侵袭能力 ($** P < 0.01$)

2.5 CCL18-PITPNM3 配体受体轴可诱导头颈鳞状细胞癌 EMT 分子标志物的改变

qRT-PCR 检测结果提示, rhCCL18 处理头颈鳞状细胞癌 Tu686 和 6-10B 细胞后, 处理组较未处理组相比, mRNA 水平 E-cadherin 表达下调, Vimentin、N-cadherin 和 Fibronectin 表达上调, 差异均具有统计学意义。rhCCL18 处理下调 PITPNM3 基因的 Tu686 和 6-10B 细胞后, E-cadherin 下调和 Vimentin、N-cadherin、Fibronectin 上调均未显示出亲本细胞的明显趋势 ($P < 0.05$, 图 5A、B)。同样, 通过 Western Blot 检测得到类似结果, rhCCL18 处理头颈鳞状细胞癌 Tu686 和 6-10B 细胞 48 h 后 E-cadherin 蛋白表达减少, Vimentin 蛋白表达增加, 但下调 PITPNM3 后, 两株细胞中 E-cadherin 和 Vimentin 蛋白的改变趋势均被逆转 (图 5C)。这些结果提示 CCL18-PITPNM3 配体受体轴可诱导头颈鳞状细胞癌 EMT 分子标志物的改变。

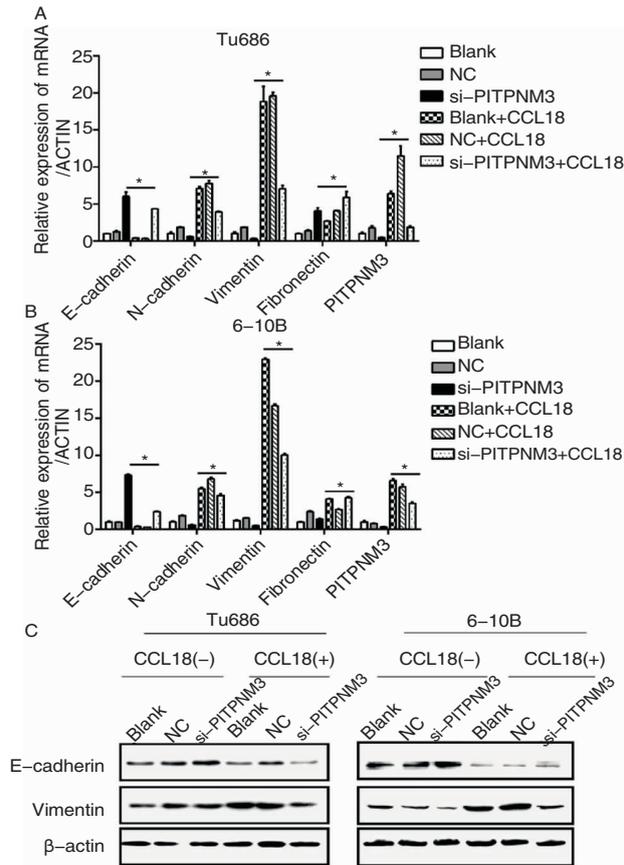


图5 CCL18-PITPNM3 配体受体轴可诱导头颈鳞状细胞癌 EMT 分子标志物的改变 A、B: qRT-PCR 检测 CCL18-PITPNM3 配体受体轴可诱导 Tu686 和 6-10B 细胞 EMT 分子标志物改变 (* $P < 0.05$); C: Western Blot 检测 CCL18-PITPNM3 配体受体轴可诱导 Tu686 和 6-10B 细胞 EMT 分子标志物改变

3 讨论

头颈鳞状细胞癌是全球第六大侵袭性恶性肿瘤^[1], 占头颈部恶性肿瘤的 90% 以上, 发病率呈逐年上升趋势, 转移是头颈鳞状细胞癌患者死亡率高的主要原因之一, 至今尚未完全阐明其分子机制^[3-5]。因此, 研究头颈鳞状细胞癌转移的机理, 找到肿瘤免疫治疗的干预靶点, 无论是科研还是临床都具有重要的指导价值。

作者前期研究发现 rhCCL18 体外处理头颈鳞状细胞癌 Tu686 和 6-10B 细胞 48 h 后, 两株细胞的侵袭转移能力增强, 且 EMT 分子标志物 E-cadherin 表达下调, Vimentin、N-cadherin 和 Fibronectin 表达上调^[22-23]。文献报道 CCL18 及其受体网络通过诱导整合素 b1 磷酸化、促进 MMP-3 表达和分泌、处理钙信号传导等方式调控恶性肿瘤细胞增殖、粘附、迁移、侵袭及血管生成与重塑等多个关键环节^[13, 20, 24-25]。本研究中通过划痕愈合实验和 Transwell 侵袭小室实验观察到 CCL18-PITPNM3 配体受体轴在体外促进头颈鳞状细胞癌细胞的迁移和侵袭潜能。该结果与乳腺癌^[8, 20], 肝细胞癌^[9] 和结肠癌^[16-17] 等恶性实体瘤中结果一致。这些表明 CCL18-PITPNM3 配体受体轴调控头颈鳞状细胞癌细胞自身的一些生物学行为, 如迁移运动能力, 基底膜降解和损伤、新生血管内皮细胞增生和重塑等。

EMT 与肿瘤侵袭转移密切相关, 目前 EMT 及其中间状态被确定为上皮衍生的恶性肿瘤进展的关键驱动因素^[7], EMT 的发生预示着肿瘤恶性进程。课题组长期致力于头颈鳞状细胞癌侵袭转移的分子机制研究, 特别关注 EMT 在头颈鳞状细胞癌侵袭转移中的作用, 发现 EMT 改变后的头颈鳞状细胞癌细胞恶性进展加速, 包括侵袭转移能力增强、能量代谢紊乱、“干性”增强和对治疗不敏感等^[21-22, 26-29]。在本研究中, 我们通过 qRT-PCR 和 Western Blot 检测发现 CCL18-PITPNM3 配体受体轴诱导头颈鳞状细胞癌 EMT 分子标志物改变, 与乳腺癌中的研究结果相符^[20]。该结果也提示 CCL18-PITPNM3 配体受体轴在体外促进头颈鳞状细胞癌细胞的迁移和侵袭可能与 EMT 分子标志物改变相关。

CCL18 不仅改变微环境信号通路, 直接参与肿瘤细胞的转化、存活和生长, 还能通过促进或抑制细胞重构和血管生成间接影响肿瘤生长增殖。目前关于 CCL18 对肿瘤细胞生长增殖的调控效应的研究

结果并不一致^[20,30-32]。在本研究结果提示 CCL18-PITPNM3 配体受体轴对头颈鳞状细胞癌细胞的生长增殖无明显调控效应,可能是因为体外实验 rh-CCL18 不能诱导具有调节细胞生长增殖功能的相关因子分泌,对头颈鳞状细胞癌细胞的生长增殖无调控效应。

总之,本研究结果证实 CCL18- PITPNM3 配体受体轴促进头颈鳞状细胞癌细胞的体外迁移和侵袭能力,可能与诱导 EMT 转化相关,但对头颈鳞状细胞癌细胞的增殖能力无调控效应。上述结果表明,CCL18- PITPNM3 配体受体轴在头颈鳞状细胞癌的侵袭转移中发挥了重要作用,有可能成为未来有效控制头颈鳞状细胞癌恶性进展的潜在干预靶点。

参考文献:

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*,2015,65(2):87-108.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. *CA Cancer J Clin*,2016,66(1):7-30.
- [3] Cavalli F. Tackling cancer: time for a global response[J]. *Lancet*,2016,387(10018):e13-e14.
- [4] Kamangar F, Doros GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(14):2137-2150.
- [5] Bhawe SL, Teknos TN, Pan Q. Molecular parameters of head and neck cancer metastasis[J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*,2011, 21(2):143-153.
- [6] Kodelja V, Müller C, Politz O, et al. Alternative macrophage activation-associated CC-chemokine-1, a novel structural homologue of macrophage inflammatory protein-1 alpha with a Th2-associated expression pattern[J]. *J Immunol*, 1998, 160(3):1411-1418.
- [7] Schraufstatter IU, Zhao M, Khaldoyanidi SK, et al. The chemokine CCL18 causes maturation of cultured monocytes to macrophages in the M2 spectrum[J]. *Immunology*,2012,135(4):287-298.
- [8] Litviakov N, Tsyganov M, Larionova I, et al. Expression of M2 macrophage markers YKL-39 and CCL18 in breast cancer is associated with the effect of neoadjuvant chemotherapy[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2018, 82(1):99-109.
- [9] Lin Z, Li W, Zhang H, et al. CCL18/PITPNM3 enhances migration, invasion, and EMT through the NF-kappaB signaling pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *Tumour Biol*,2016,37(3):3461-3468.
- [10] Lane D, Matte I, Laplante C, et al. CCL18 from ascites promotes ovarian cancer cell migration through proline-rich tyrosine kinase 2 signaling[J]. *Mol Cancer*,2016,15(1):58-60.
- [11] Wang Q, Li D, Zhang W, et al. Evaluation of proteomics-identified CCL18 and CXCL1 as circulating tumor markers for differential diagnosis between ovarian carcinomas and benign pelvic masses [J]. *Int J Biol Markers*, 2011,26(4):262-273.
- [12] Huang D, Song SJ, Wu ZZ, et al. Epstein-Barr virus-induced VEGF and GM-CSF drive nasopharyngeal carcinoma metastasis via recruitment and activation of macrophages[J]. *Cancer Res*,2017, 77(13):3591-3604.
- [13] Shi L, Zhang B, Sun X, et al. CC chemokine ligand 18(CCL18) promotes migration and invasion of lung cancer cells by binding to Nlr1 through Nlr1-ELM01/DOC180 signaling pathway [J]. *Mol Carcinog*, 2016, 55(12):2051-2062.
- [14] Schmid S, Le UT, Haager B, et al. Local concentrations of CC-Chemokine-Ligand 18 correlate with tumor size in non-small cell lung cancer and are elevated in lymph node-positive disease[J]. *Anticancer Res*,2016,36(9):4667-4671.
- [15] Tiev Kp Hua-Huy T, Kettaneh A, et al. Serum CC chemokine ligand-18 predicts lung disease worsening in systemic sclerosis[J]. *Eur Respir J*, 2011,38(6):1355-1360.
- [16] Sun Z, Du C, Xu P, et al. Surgical trauma-induced CCL18 promotes recruitment of regulatory T cells and colon cancer progression[J]. *J Cell Physiol*,2019, 234(4):4608-4616.
- [17] Yuan R, Chen Y, He X, et al. CCL18 as an independent favorable prognostic biomarker in patients with colorectal cancer[J]. *J Surg Res*,2013,183(1):163-169.
- [18] Meng F, Li W, Li C, et al. CCL18 promotes epithelial-mesenchymal transition, invasion and migration of pancreatic cancer cells in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Int J Oncol*,2015,46(3):1109-1120.
- [19] Ye H, Zhou Q, Zheng S, et al. Tumor-associated macrophages promote progression and the Warburg effect via CCL18/NF-kB/VCAM-1 pathway in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Cell Death Dis*,2018,9(5):453.
- [20] Chen J, Yao Y, Gong C, et al. CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PITPNM3[J]. *Cancer Cell*,2011,19(4):541-555.
- [21] Su S, Liao J, Liu J, et al. Blocking the recruitment of naive CD4(+) T cells reverses immunosuppression in breast cancer[J]. *Cell Res*,2017,27(4):461-482.
- [22] Qin Y, Wang J, Zhu G, et al. CCL18 promotes the metastasis of squamous cell carcinoma of the head and neck through MTDH-NF-kB signalling pathway[J]. *J Cell Mol Med*,2019,23(4):2689-2701.
- [23] She L, Qin Y, Wang J, et al. Tumor-associated macrophages derived CCL18 promotes metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. *Cancer Cell Int*,2018,18:120.
- [24] Lev S, Hernandez J, Martinez R, et al. Identification of a novel family of targets of PYK2 related to Drosophila retinal degeneration B (rdgB) protein[J]. *Mol Cell Biol*,1999,19(3):2278-2288.

(下转第392页)