

· 论 著 ·

CCL18 通过整合素聚集促进乳腺癌 SK-3<sup>rd</sup> 细胞浸润和迁移\*

陈静琦, 朱必胜, 侯开连

(广州医科大学附属第二医院肿瘤科, 广东广州 510260)

**摘要:**目的 探讨整合素在 CCL18 促进乳腺癌 SK-3<sup>rd</sup> 细胞浸润和迁移过程中的作用, 以阐明 CCL18 促进乳腺癌细胞浸润和迁移的分子机制。方法 用流式细胞检测技术检测 CCL18 作用下乳腺癌 SK-3<sup>rd</sup> 细胞表面整合素的聚集; 采用 Western blot 检测黏着斑激酶(FAK)的激活; 用浸润迁移实验检测乳腺癌 SK-3<sup>rd</sup> 细胞的浸润迁移。用 siRNA 转染检测沉默 SK-3<sup>rd</sup> 细胞整合素  $\beta 1$  的表达。结果 CCL18 促进乳腺癌 SK-3<sup>rd</sup> 细胞表面整合素的聚集; 从而促进整合素介导的 FAK 磷酸化激活。在 CCL18 作用下, 乳腺癌 SK-3<sup>rd</sup> 细胞浸润和迁移的细胞数增多 10 倍 ( $P < 0.01$ ); 用 siRNA 转染检测沉默 SK-3<sup>rd</sup> 细胞整合素  $\beta 1$  的表达, 可以使 CCL18 作用下的 SK-3<sup>rd</sup> 细胞浸润和迁移数量明显减少。结论 CCL18 通过整合素聚集可促进乳腺癌细胞浸润和迁移。

**关键词:** 乳腺肿瘤; CCL18; 肿瘤浸润; 细胞运动; 整合素类

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.12.004

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)12-1419-03

CCL18 for promoting breast cancer SK-3<sup>rd</sup> cells invasion via integrin aggregation\*

Chen Jingqi, Zhu Bisheng, Hou Kailian

(Department of Oncology, Second Affiliated Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510260, China)

**Abstract: Objective** To explore the role of integrin in CCL18 for promoting breast cancer SK-3<sup>rd</sup> cells invasion and migration process to illuminate the molecular mechanism of CCL18 for promoting breast cancer SK-3<sup>rd</sup> cells invasion and migration process.

**Methods** The flow cytometry was adopted to detect CCL18-induced integrin aggregation; Western blot was used to detect the focal adhesion kinase(FAK) activation, the infiltrating migrationin experiment was adopted to determine the invasion and migration of SK-3<sup>rd</sup> cells and the siRNAs transfection was used to detect the expression of silence integrin  $\beta 1$ . **Results** CCL18 promoted the integrin  $\beta 1$  aggregation in breast cancer SK-3<sup>rd</sup> cell surface and further promoted the integrin-mediated phosphorylated activation of FAK. Under the reaction of CCL18, the cells number of SK-3<sup>rd</sup> cellular invasion and migration was increased by ten times ( $P < 0.01$ ), which was obviously decreased by siRNA silenced integrin  $\beta 1$ . **Conclusion** CCL18 promotes breast cancer invasion and migration via integrin aggregation.

**Key words:** breast neoplasms; CCL18; tumor-infiltrating; cell movement; integrins

整合素是介导细胞与细胞外基质相互作用的主要分子, 其中整合素  $\beta 1$  主要介导细胞与纤维粘连蛋白(FN)的黏附<sup>[1]</sup>。以前认为细胞与细胞外基质的黏附抑制细胞的迁移, 但现在研究认为, 肿瘤细胞只有黏附于细胞外基质, 才可以抵抗失巢性凋亡, 而迁移就是细胞在细胞外基质上伸出伪足, 在伪足的前缘依靠整合素形成黏附, 而细胞体的后缘则去黏附, 使得整个细胞体前移, 整个细胞在细胞外基质上爬行, 从而实现肿瘤的浸润和迁移<sup>[2]</sup>。但是, 什么样的机制调控了肿瘤细胞这个黏附与去黏附的过程, 目前还不清楚。

趋化因子分为 CXCL、CC、C 等几种类型, 大量研究已经证明趋化因子及其受体在肿瘤的浸润和迁移中起关键的作用, 例如 SDF-1 作用于受体 CXCR4 促进肿瘤迁移, CCL5、CCL2 在肿瘤转移中均起关键的作用<sup>[3]</sup>。但在趋化因子促进肿瘤趋化的过程中, 发挥黏附功能的整合素起什么样的作用, 还没有充分证明。CCL18 是一种 CC 型的趋化因子<sup>[4]</sup>, 本研究前期已经证明乳腺癌细胞表达 CCL18 的受体 P1TPNM3, CCL18 通过作用于 P1TPNM3 产生乳腺癌细胞的趋化作用, 从而促进乳腺

癌浸润和迁移<sup>[5]</sup>, 本文将进一步研究 CCL18 促进乳腺癌 SK-3<sup>rd</sup> 细胞浸润和迁移的分子机制, 探讨整合素在 CCL18 促迁移过程中的作用, 为靶向肿瘤微环境的治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 利用从 ATCC 购买的乳腺癌 SKBR3 细胞系构建 SK-3<sup>rd</sup> 细胞系; Transwell 培养板购自 Corning 公司, 微孔直径为 0.4  $\mu\text{m}$ ; FN 购自美国 Roche 公司。细胞培养板购自 Corning 公司; CCL18 蛋白购自 R&D 公司; 整合素  $\alpha 5\beta 1$  抗体购自美国 Millipore 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 在完全培养基(含 10% 胎牛血清的 DMEM)中培养 SK-3<sup>rd</sup> 细胞。

**1.2.2 流式细胞检测** 用 CCL18(20 ng/mL)处理 SK-3<sup>rd</sup> 乳腺癌细胞 1 h, 然后用 PBS 洗涤细胞, 再用鼠抗人整合素  $\alpha 5\beta 1$  抗体 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育细胞 15 min, 用同型抗体作为对照, PBS 洗涤后, 再加入 PE 标记的荧光二抗(BD Biosciences), 避光情况下室温孵育 20 min, 然后用流式细胞仪(BD Biosciences) 检测乳腺癌

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81272900); 广州市属高校科技计划资助项目(08A080)。 作者简介: 陈静琦(1966—), 教授, 博士研究生, 硕士生导师, 主要从事肿瘤微环境对乳腺癌作用的研究。

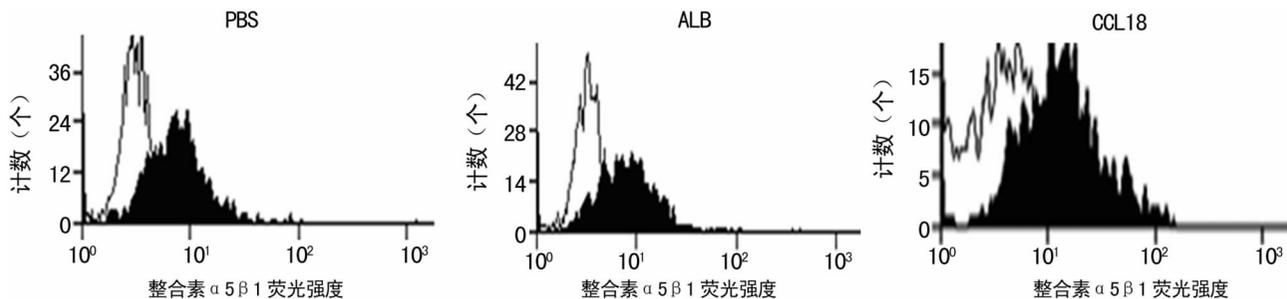


图 1 CCL18 促进乳腺癌 SK-3<sup>rd</sup> 细胞表面整合素  $\alpha 5 \beta 1$  的聚集

细胞整合素  $\alpha 5 \beta 1$  的聚集情况。以非相关蛋白人血清蛋白 (ALB) 处理组和未处理组 (PBS) 为对照。独立重复实验 3 次。

**1.2.3 Western blot 检测** 收集培养、诱导成功的细胞, 加入混有蛋白酶抑制剂 (Merk) 的 RIPA 裂解液 (150 nmol NaCl, 1% NP-40, 0.5% 去氢醋酸酸钠, 0.1% 十二烷基硫酸钠 (SDS), 50 mmol 三羟甲基氨基甲烷, pH 8.0), 提取细胞总蛋白, 作蛋白定量。制备电泳 SDS 凝胶后, 每个泳道加入 10~50  $\mu\text{g}$  提取蛋白电泳, 蛋白转移至 PVDF 膜 (Millipore), 洗膜, 孵育针对 Tyr397-黏着斑激酶 (FAK) 和  $\beta$ -actin 的一抗 (美国 CST 公司), 洗膜, 用标记辣根过氧化酶的对应的 IgG 二抗 (美国 CST 公司) 孵育。抗原抗体结合用化学发光剂 (Thermo) 观测。在培养板包被或不包被 FN 的条件下, 用 Western blot 的方法检测 CCL18 对乳腺癌 SK-3<sup>rd</sup> 细胞 FAK 的影响。独立重复实验 3 次。

**1.2.4 靶向整合素  $\beta 1$  的 siRNA 转染** 胰酶消化 SK-3<sup>rd</sup> 细胞, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM (Gibco) 悬浮细胞, 37  $^{\circ}\text{C}$  放置。使 siPORT NeoFX 转染试剂 (Ambion) 和 OPTI-MEM I 培养基 (Invitrogen) 恢复至室温。根据说明书溶解 siPORT NeoFX 在 OPTI-MEM I 培养基中, 常温下孵育 10 min。把 siRNA 按所需的终浓度 (30 nmol) 溶解在 OPTI-MEM I 培养基中。混合溶解的 siRNA 和转染试剂, 常温下孵育 10 min, 把混合液加入培养板, 再把细胞悬液加到转染混合物上面, 轻摇培养板。转染细胞在正常培养条件下培养 48 h, 然后用于黏附实验。整合素  $\beta 1$  的 siRNA-1 上游引物: 5'-GGA AAU GGU GUU UGC AAG U-3', 下游引物: 5'-ACU UGC AAA CAC CAU UUC C-3'; 整合素  $\beta 1$  的 siRNA-2 上游引物: 5'-AAU GUA ACC AAC CGU AGC ATT-3', 下游引物: 5'-ACU UGC AAA CAC CAU UUC C-3'。

**1.2.5 Transwell 侵袭实验** 在 Transwell 上层小室 (24 wells, 8  $\mu\text{m}$ , Corning) 底部膜的下表面铺 10  $\mu\text{L}$  FN (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Roche), 4  $^{\circ}\text{C}$  放置 48 h; 把 50  $\mu\text{L}$  Matrigel (用无血清培养基 1:3 稀释, R&D) 加入 Transwell 的嵌套内, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min。消化收集 SK-3<sup>rd</sup> 乳腺癌细胞, 用无血清培养基 (DMEM-F12 加入 2% B27、胰岛素 140 IU 和 0.4% BSA) 制细胞悬液, 把乳腺癌细胞加入 Transwell 上室 (105 cells/well), 下层小室加 20% 的胎牛血清和 CCL18 蛋白。培养 8 h 后, 用棉签去除 Transwell 上层小室内的基质胶, 用多聚甲醛固定黏附在 Transwell 小室膜下表面的侵袭细胞, 用结晶紫 (0.005%, sigma) 染色, 在 400 倍的光学显微镜下, 随机选取 10 个视野计数, 同时拍摄图片, 独立重复实验 3 次。在 CCL18 存在 (un 组) 或 CCL18 不存在 (con 组) 的条件下, 在 Transwell 培养板中, 检测

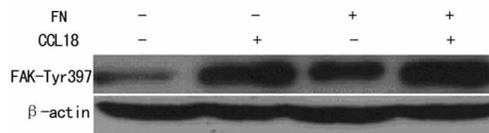
转染整合素  $\beta 1$ -siRNA (si-int-1 组、si-int-2 组) 的乳腺癌 SK-3<sup>rd</sup> 细胞浸润迁移功能 ( $n=3$ ), 以单用转染试剂 (mock 组)、转染绿色荧光蛋白 (GFP) 的 siRNA (si-GFP 组) 为对照。

## 2 结果

### 2.1 CCL18 促进 SK-3<sup>rd</sup> 乳腺癌细胞表面整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 的聚集

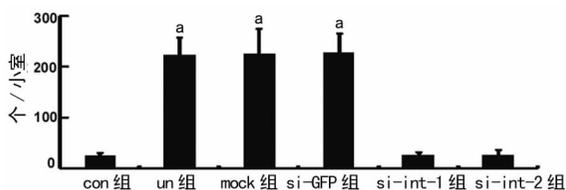
乳腺癌细胞与细胞外基质的黏附在乳腺癌的浸润和迁移过程中起关键的作用, 整合素是乳腺癌细胞表面的黏附分子, 故在乳腺癌细胞黏附和浸润迁移中起关键的作用, 本结果表明 CCL18 作用于乳腺癌细胞, 引起 SK-3<sup>rd</sup> 细胞表面整合素  $\alpha 5 \beta 1$  的聚集 (图 1), 从而启动了乳腺癌细胞黏附于细胞外基质的过程。

**2.2 CCL18 促进 SK-3<sup>rd</sup> 乳腺癌细胞中 FAK 的磷酸化激活** 本研究用 CCL18 和细胞外基质 FN 处理乳腺癌 SK-3<sup>rd</sup> 细胞, 用 Western blot 检测 FAK 的磷酸化激活, 结果观察到 CCL18 可以使 SK-3<sup>rd</sup> 细胞中在 Tyr397 位点磷酸化 FAK 蛋白量升高, 表明 CCL18 可以磷酸化激活 FAK, 见图 2。



+: 阳性; -: 阴性。

图 2 CCL18 引起乳腺癌 SK-3<sup>rd</sup> 细胞中 FAK 的激活



$^{\ast}$ :  $P < 0.01$ , 与 con 组比较。

图 3 各组 SK-3<sup>rd</sup> 乳腺癌细胞浸润和迁移比较

### 2.3 CCL18 通过整合素促进 SK-3<sup>rd</sup> 乳腺癌细胞浸润和迁移

在证明 CCL18 可以引起整合素在乳腺癌细胞表面聚集的基础上, 进一步把针对整合素  $\beta 1$  的 siRNA 通过脂质体转染入乳腺癌细胞, 经过 48 h 沉默整合素  $\beta 1$  的表达, 检测 CCL18 对乳腺癌 SK-3<sup>rd</sup> 细胞浸润和迁移的影响, 结果发现, 在 Transwell 侵袭实验中, 与没有 CCL18 处理组比较, CCL18 使乳腺癌 SK-3<sup>rd</sup> 细胞浸润迁移数量增加 10 倍 ( $P < 0.01$ , 图 3), 转染 GFP siRNA 或单纯加入脂质体 (mock) 没有影响 CCL18 促乳腺癌细胞浸润和迁移的作用, 转染靶向整合素  $\beta 1$  的 siRNA-1 和 siRNA-2 可以抑制 CCL18 促进乳腺癌细胞浸润和迁移的作用,

使浸润和迁移细胞数恢复到没有 CCL18 作用的水平 ( $P > 0.05$ , 图 3), 证明 CCL18 通过促进整合素的聚集可促进乳腺癌细胞浸润和迁移。

### 3 讨 论

以前的研究认为细胞的黏附抑制肿瘤细胞的浸润和迁移, 但细胞黏附功能的系统研究认为, 细胞的黏附分为细胞与细胞外基质的黏附和细胞与细胞之间的黏附<sup>[6]</sup>, 如果没有细胞与周围细胞或细胞外基质的黏附, 细胞就会出现失巢性凋亡, 就不能维持增殖、迁移的生物学功能<sup>[7]</sup>。肿瘤细胞在周围环境的支撑下, 在微环境中生物活性因子的诱导下, 运动能力增强, 浸润和迁移的能力增强<sup>[8]</sup>, 实质上肿瘤细胞的迁移是细胞在细胞外基质上的一种滚动样的爬行。整合素是肿瘤细胞表面的黏附分子, 是细胞外基质成分的受体<sup>[9]</sup>, 介导肿瘤细胞与细胞外基质的黏附<sup>[10]</sup>。整合素发挥黏附功能, 首先表现为聚集<sup>[11]</sup>, 而且肿瘤细胞周围的生物活性因子可以作用于肿瘤细胞, 诱导整合素的聚集, 从而促进肿瘤细胞的黏附功能。

趋化因子促进肿瘤细胞的趋化<sup>[11-12]</sup>。CCL18 在乳腺癌微环境中, 是一种来源于肿瘤相关巨噬细胞 (tumor associated macrophages, TAM) 的 CC 型趋化因子<sup>[13]</sup>, 在本研究前, 关于 CCL18 的研究主要集中在 CCL18 对树突状细胞、淋巴细胞的趋化作用<sup>[14]</sup>, 还少有研究 CCL18 对肿瘤细胞的作用, 严重影响了这种趋化因子功能的阐明。本课题的前期研究证明 CCL18 与乳腺癌细胞表面受体 P1TPNM3 结合, 促进乳腺癌浸润和迁移, CCL18 可促进乳腺癌细胞黏附于细胞外基质<sup>[5]</sup>。

在本研究证明 TAM 来源的 CCL18 作用于乳腺癌细胞, 促进乳腺癌细胞表面整合素  $\alpha 5\beta 1$  的聚集, 整合素的聚集引起黏着斑形成, 从而促进乳腺癌细胞黏附。整合素  $\alpha 5\beta 1$  的配体是细胞外基质中的 FN, CCL18 引起整合素  $\alpha 5\beta 1$  聚集的同时, 引起乳腺癌细胞内 FAK 的磷酸化激活, 从而进一步激活细胞内的信号传导通路, 同时也证明沉默整合素  $\beta 1$ , 抑制 CCL18 促进乳腺癌细胞黏附的功能, 可以抑制 CCL18 促进乳腺癌浸润和迁移的作用。说明整合素介导的乳腺癌细胞黏附于细胞外基质是乳腺癌浸润和迁移的关键步骤, 初步阐明了 CCL18 促进乳腺癌浸润和迁移的机制, 为抑制 CCL18 促乳腺癌浸润迁移提供了实验依据。

### 参考文献:

[1] Raymond K, Faraldo MM, Deugnier MA, et al. Integrins in mammary development[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2012, 23(5):599-605.  
 [2] Crowe DL, Shuler CF. Regulation of tumor cell invasion by extracellular matrix[J]. *Histol Histopathol*, 1999, 14(2):665-671.

[3] Lechner MG, Russell SM, Bass RS, et al. Chemokines, costimulatory molecules and fusion proteins for the immunotherapy of solid tumors[J]. *Immunotherapy*, 2011, 3(11):1317-1340.  
 [4] Struyf S, Van Damme J. The role of plasma chemokines in cancer[J]. *Verh K Acad Geneesk Belg*, 2007, 69(3):149-165.  
 [5] Chen JQ, Yao YY, Gong C, et al. CCL18 from Tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via P1TPNM3[J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(4):541-555.  
 [6] Bourbouli D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion[J]. *Semin Cancer Biol*, 2010, 20(3):161-168.  
 [7] Crowe DL, Shuler CF. Regulation of tumor cell invasion by extracellular matrix[J]. *Histol Histopathol*, 1999, 14(2):665-671.  
 [8] Ito K, Ralph SJ. Inhibiting galectin-1 reduces murine lung metastasis with increased CD4(+) and CD8(+) T cells and reduced cancer cell adherence[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2012, 29(6):561-572.  
 [9] Scaringi C, Minniti G, Caporello P, et al. Integrin inhibitor cilengitide for the treatment of glioblastoma: a brief overview of current clinical results[J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(10):4213-4223.  
 [10] Singh R, Lillard JW Jr, Singh S. Chemokines: key players in cancer progression and metastasis [J]. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2011(3):1569-1582.  
 [11] Kim CH, Lee KH, Lee CT, et al. Aggregation of beta2 integrins activates human neutrophils through the I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B pathway[J]. *J Leukoc Biol*, 2004, 75(2):286-292.  
 [12] Lee HJ, Jo DY. The role of the CXCR4/CXCL12 axis and its clinical implications in gastric cancer[J]. *Histol Histopathol*, 2012, 27(9):1155-1161.  
 [13] Tang X. Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer [J]. *Cancer Lett*, 2013, 332(1):3-10.  
 [14] Schutyser E, Richmond A, Van Damme J. Involvement of CC chemokine ligand 18(CCL18) in normal and pathological processes[J]. *J Leukoc Biol*, 2005, 78(1):14-26.

(收稿日期:2013-11-12 修回日期:2013-12-20)

欢迎投稿

欢迎订閱