

CCL21 对胃癌 SGC-7901 细胞发生上皮间质转化的影响

史冠男¹,袁媛²,彭琼¹,戴夫¹

(1. 合肥市第一人民医院消化内科,安徽 合肥 230061;2. 合肥市滨湖医院中心实验室,安徽 合肥 230051)

摘要:目的 研究 CCL21 能否参与诱导胃癌 SGC-7901 细胞发生上皮间质转化。方法 取不同浓度(0、50、100、150 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)的 CCL21 作用胃癌 SGC-7901 细胞,划痕试验检测该细胞侵袭能力。镜下观察该细胞形态的变化。Western blot 分别检测 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、MMP-9 的蛋白表达。结果 150 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 CCL21 作用胃癌 SGC-7901 细胞后,较其它浓度侵袭能力强,同时使胃癌 SGC-7901 细胞的胞体逐渐变为长梭状,部分可见伪足生成。E-cadherin 蛋白表达下降($P < 0.05$),N-cadherin、Vimentin、MMP-9 蛋白表达升高($P < 0.05$)。结论 CCL21 可能参与诱导胃癌 SGC-7901 细胞发生上皮间质转化。

关键词:上皮间质转化;趋化因子;胃癌

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.01.030

Effects of CCL21 on inducing epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer cells SGC-7901

SHI Guannan¹,YUAN Yuan²,PENG Qiong¹,DAI Fu¹

(1. Department of Gastroenterology, The First People's Hospital of Hefei, Hefei, Anhui 230061, China;

2. The Central Laboratory in Binhu Hospital, Hefei, Anhui 230051, China)

Abstract: Objective To investigate whether CCL21 can induce epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer cells SGC-7901.

Methods SGC-7901 cells were induced by CCL21 in different concentration (0, 50, 100, 150 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) and then the ability of invasion and metastasis was detected by scratch testing. Morphological changes in forms were observed. The protein expressions of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, MMP-9 were detected by Western blot. **Results** After being induced by CCL21 in 150 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, SGC-7901 cells achieved faster ability of invasion and metastasis. SGC-7901 cells formed into a long spindle and pseudopod could be seen. The expressions of N-cadherin, Vimentin, and MMP-9 rose ($P < 0.05$) while that of E-cadherin obviously descended ($P < 0.05$). **Conclusions**

CCL21 may induce epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer cell and promote the invasion and metastasis.

Key words: Epithelial-mesenchymal transition; Chemokine; Gastric cancer

胃癌的早期转移是困扰临床治疗和基础研究的一大难题。恶性肿瘤转移的过程中大部分都有上皮间质转化(Epithelial-mesenchymal transitions, EMT)的参与,其中转化生长因子- $\beta 1$ (Transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)已被公认并广泛作用于诱导 EMT 的发生^[1]。近年来,关于趋化因子家族是否参与、介导或启动恶性肿瘤的转移已成为国内外探讨热点。其中,C-C 趋化因子受体 7(C-C chemokine receptortype 7, CCR7)及其配体 21[Chemokine(C-C motif) ligand 21, CCL21]已被报告可能参与调控如卵巢癌^[2]、乳腺癌^[3]、胰腺癌^[4]等多种肿瘤发生 EMT,但趋化因子是否通过 EMT 在胃癌转移中

发生作用,报告甚少,本文旨在初探该方面机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系 胃癌细胞 SGC-7901 由合肥市滨湖医院中心实验室提供。

1.2 主要试剂 本研究采用主要试剂:胎牛血清-(天杭,浙江,中国),RPMI 1640 培养基-(Hyclone, 美国),E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)-(Sigema, 美国);CCL21、 β -actin 一抗、二抗(中杉金桥,北京,中国)。0.25%胰酶、PBS(滨湖实验室配置,合肥)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养及分组 复苏并接种 SGC-7901 细胞,待细胞进入对数生长期后将其分组:分为阴性对照组(A组,仅加含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液),实验组(B组,加入 150 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CCL21),阳性对照组(C组,2 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TGF- $\beta 1$)。

基金项目:安徽省合肥市重点科技项目(JZ201512250023)

通信作者:戴夫,男,主任医师,博士生导师,研究方向:消化系统病,E-mail:hfsdf@sina.com

1.3.2 细胞划痕试验 将细胞铺于6孔板中,每孔加入约 5×10^5 个SGC-7901细胞、过夜。按顺序分别加入0、50、100、150 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的CCL21,10 μL 枪头垂直划痕,后置于培养箱继续培养48 h,取样、拍照。

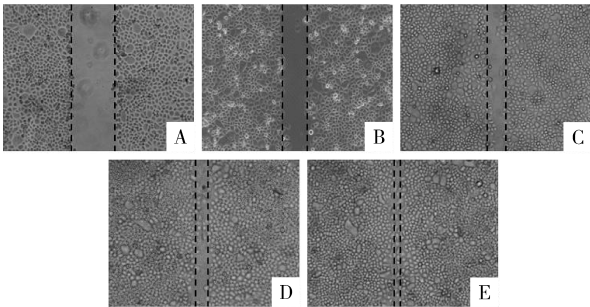
1.3.3 观察细胞形态 CCL21($150 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)作用SGC-7901细胞48 h后,光学显微镜观察该细胞发生的形态学变化,并拍照。

1.3.4 Western blot 检测 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、MMP-9 的蛋白表达 将三组细胞分别按常规方法制备电泳蛋白标本,每组分别取40 μg 上样,进行SDS-PAGE电泳。电泳结束后转膜;5%脱脂奶粉的TBST液封闭1 h;一抗浓度1:500,4 $^{\circ}\text{C}$ 、孵育过夜、洗膜;二抗浓度1:5 000,室温、孵育1 h。最后显影、定影。

1.4 统计学方法 SPSS13.0分析统计实验结果。实验均重复3次,计量资料结果均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。计数资料以例及率表示,组间比较为 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

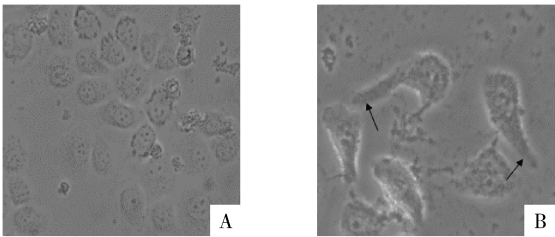
2.1 不同浓度 CCL21 作用后 SGC-7901 细胞的侵袭转移能力 分别加入0、50、100、150 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的CCL21培养SGC-7901细胞48 h,见150 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养组细胞生长速度快,划痕愈合最早,缩窄最明显($P < 0.05$),见图1,据此,选取150 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为本实验CCL21的处理浓度。



注:A.复苏后贴壁生长的胃癌SGC-7901细胞;B.加入0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CCL21生长48 h细胞;C.加入50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CCL21生长48 h细胞;D.加入100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CCL21生长48 h细胞;E.加入150 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CCL21生长48 h细胞。划痕愈合率=(1-两划痕间距)×100%。

图1 细胞划痕图(×200)

2.2 CCL21 ($150 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 48 h 后 SGC-7901 细胞形态的变化 光镜下分别观察:对照组SGC-7901细胞贴壁后胞体呈类似椭圆型,见图2A;CCL21($150 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)处理48 h的SGC-7901细胞,胞体可变成梭状,部分细胞有生成伪足,见图2B。



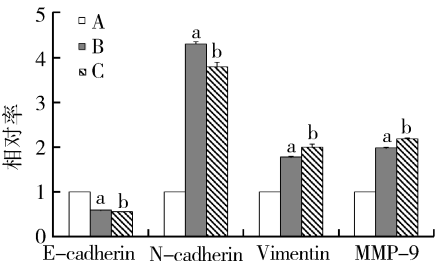
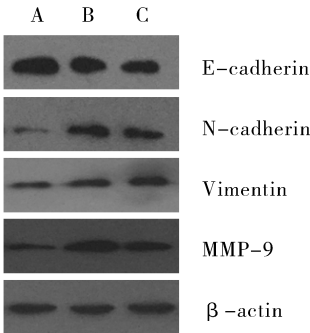
注:A.正常SGC-7901;B.150 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CCL21处理48 h后的SGC-7901;箭头所指方向为伪足形成。

图2 CCL21作用前后SGC-7901形态学变化

2.3 CCL21 ($150 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理前后 EMT 相关指标蛋白水平变化 CCL21($150 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)处理SGC-7901细胞48 h后,实验组E-cadherin蛋白表达较阴性对照组下降($P < 0.05$),N-cadherin、Vimentin、MMP-9蛋白表达较阴性对照组明显升高($P < 0.05$)。而阳性对照组结果与实验组表达基本一致,实验组与阳性对照组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1及图3。

表1 三组细胞 EMT 相关蛋白表达水平比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	E-cadherin	N-cadherin	Vimentin	MMP-9
A组	1	1	1	1
B组	0.59 ± 0.01	4.30 ± 0.06	1.77 ± 0.29	1.97 ± 0.02
C组	0.56 ± 0.01	3.79 ± 0.11	1.99 ± 0.08	2.19 ± 0.12



注:A.阴性对照组,B.150 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CCL21作用组(实验组),C.阳性对照组;与阴性对照组比较,^a $P < 0.05$;与阴性对照组比较,^b $P < 0.05$ 。

图3 EMT相关指标蛋白水平变化

3 讨论

恶性肿瘤的转移扩散主要是通过 EMT 使其在结构、黏附、迁移能力等方面实现上皮细胞向间质细胞的过渡,在这改变过程中,TGF- β 被公认是 EMT 上游的一个关键始动因子,该信号通路激活可最终使上皮表型(E-cadherin)下降,间质表型(N-cadherin、Vimentin、MMP-9 等)升高,从而最终实现肿瘤的转移扩散^[5-6]。CCL21-CCR7 因其可能参与肿瘤细胞向淋巴结转移而被高度关注。研究已发现在甲状腺癌^[7]、肺癌^[8]、前列腺癌^[9]等肿瘤中 CCL21-CCR7 可能与该肿瘤淋巴管的形成高度关联。而 Chang 等^[10]已证实在胃癌组织中 CCR7 与淋巴结转移可能关联密切。

尽管目前 EMT 与趋化因子 CCL21-CCR7 之间发生关联的机制不明,但已有很多学者及研究提出 CCL21-CCR7 可能通过 EMT 在恶性肿瘤转移中发生作用。Rcutter 等^[11]认为肿瘤在长期低氧的微环境中,大量自由基及转录因子被激活,从而进一步启动 EMT 通路。Hedin 等^[12]认为趋化因子通过诱导释放蛋白水解酶,后降解细胞外基质和基底膜,来增强肝癌的侵袭能力,这一过程正符合 EMT 的基本生物学反应。

本研究发现,胃癌 SGC-7901 细胞在 $150 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CCL21 刺激作用下,该细胞转移能力最强,同时光镜下观察见 CCL21 作用后的 SGC-7901 细胞,胞体由椭圆形或圆形变化为长梭状,部分细胞见伪足生成,迁移距离明显增加,说明 CCL21 从形态学上可以影响胃癌 SGC-7901 细胞发生间质细胞样改变;而蛋白标志物的变化发现:上皮来源的表型标志物 E-cadherin 下调,而间质细胞表型标志物 N-cadherin、vimentin、MMP-9 较阴性对照组表达上调,说明胃癌 SGC-7901 细胞发生了 EMT 的特征性变化,进一步验证了趋化因子 CCL21 可能通过 EMT 影响胃癌 SGC-7901 细胞。

综上所述,趋化因子 CCL21 可能通过 EMT 通路参与诱导胃癌 SGC-7901 细胞的侵袭转移。本研究是在胃癌细胞中初步研究趋化因子与 EMT 的关系,研究结果将为肿瘤微环境诱导上皮间质转化促进胃癌侵袭与转移提供新依据,但趋化因子参与调控 EMT 的具体分子机制及通路不明,有待进一步深

入研究。

参考文献

- [1] ZENG Y,ZHU J,SHEN D,et al. Repression of Smad4 by miR205 moderates TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in A549 cell lines[J]. Int J Oncol,2016,49(2):700-708.
- [2] CHENG S,HAN L,GUO J,et al. The essential roles of CCR7 in epithelial-to-mesenchymal transition induced by hypoxia in epithelial ovarian carcinomas[J]. Tumour Biol,2014,35(12):12293-12298.
- [3] PANG MF,GEORGOUDAKI AM,LAMBUT L,et al. TGF- β 1-induced EMT promotes targeted migration of breast cancer cells through the lymphatic system by the activation of CCR7/CCL21-mediated chemotaxis[J]. Oncogene,2016,35(6):748-760.
- [4] 刘庆,陈芳芳,段唐海,等. CCL21 通过上皮间质转化促进胰腺癌 Panc-1 细胞的迁移[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2015,31(1):6-9.
- [5] VAN MEETEREN LA,TEN DIJKE P. Regulation of endothelial cell plasticity by TGF- β [J]. Cell Tissue Res,2012,347(1):177-186.
- [6] 陈应超,李泽文,周洁,等. 转移抑制基因 1 和基质金属蛋白酶-9 在鼻咽癌中表达的相关性及临床意义[J]. 安徽医药,2016,20(2):304-307.
- [7] WAGNER PL,MOO TA,ARORA N,et al. The chemokine receptors CXCR4 and CCR7 are associated with tumor size and pathologic indicators of tumor aggressiveness in papillary thyroid carcinoma[J]. Ann Surg Oncol,2008,15(10):2833-2841.
- [8] SHI JY,YANG LX,WANG ZC,et al. CC chemokine receptor-like 1 functions as a tumour suppressor by impairing CCR7-related chemotaxis in hepatocellular carcinoma[J]. J Pathol,2015,235(4):546-558.
- [9] HUANG X,SU K,ZHOU L,et al. hypoxia preconditioning of mesenchymal stromal cells enhances PC3 cell lymphatic metastasis accompanied by VEGFR-3/CCR7 activation[J]. J Cell Biochem,2013,114(12):2834-2841.
- [10] CHANG WJ,DU Y,ZHAO X,et al. Inflammation-related factors predicting prognosis of gastric cancer[J]. World J Gastroenterol,2014,20(16):4586-4596.
- [11] RCUTER S,GUPTA SC,CHATURVEDI MM,et al. Oxidative stress,inflammation,and cancer:How are they linked? [J]. Free Radic Biol Med,2010,49(11):1603-1616.
- [12] HEDIN KE. Chemokines; new, key players in the pathobiology of pancreatic cancer[J]. Int J Gastrointest Cancer,2002,31(1/3):23-29.

(收稿日期:2016-08-10,修回日期:2016-09-17)