

CCR10 的表达对非小细胞肺癌细胞在增殖、迁移和侵袭的影响

侯智亮 王文波

摘要 目的 本研究旨在探讨趋化因子受体 10 (chemokine receptor 10, CCR10) 的表达对 NSCLC 细胞在增殖、迁移和侵袭方面的影响。方法 应用基因工程技术将 CCR10siRNA 导入 NSCLC 细胞中, 干扰 CCR10 的正常表达, 进而研究 CCR10 对 NSCLC 细胞在增殖、迁移和侵袭等功能方面的影响。结果 转染了 CCR10siRNA 的人 NSCLC 腺癌细胞 A549 的细胞增殖率明显低于空白对照组和阴性对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 空白对照组与阴性对照组的细胞增殖率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与空白对照组及阴性对照组比较, 转染了 CCR10siRNA 的人 NSCLC 腺癌细胞 A549 的细胞迁移率明显低于空白对照组及阴性对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 空白对照组和阴性对照组的细胞迁移率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。转染了 CCR10siRNA 的人 NSCLC 腺癌细胞 A549 的细胞侵袭率明显低于空白对照组及阴性对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 空白对照组及阴性对照组的细胞侵袭率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 CCR10 促进 NSCLC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力, CCR10 可能参与非小细胞肺癌的发生、发展、侵袭及转移过程。

关键词 非小细胞肺癌 CCR10 增殖 迁移 侵袭

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.05.023

Effects of CCR10 Expression on Proliferation, Migration and Invasion of NSCLC Cells. Hou Zhiliang, Wang Wenbo. Department of Microtrauma Surgery, Henan Provincial Chest Hospital, Henan 450002, China

Abstract Objective To investigate the effects of CCR10 expression on proliferation, migration and invasion of NSCLC cells. **Methods** CCR10 siRNA was conducted into humanlung adenocarcinoma cellA549 (A549) to interfere with the normal expression ofCCR10, and then to study how dose CCR10 have effects on cell proliferation, migrationand invasion in NSCLC. **Results** The results of MTT showed that the proliferation rate of A549 conducted withCCR10 siRNA was significantly decreased compared with Negative Control (NC) and Mock ($P < 0.05$). The proliferation rate of A549 in NC compared with Mock has nostatistical significance ($P > 0.05$). The results of Transwell cell migration assay showed that the migration rate ofA549 conducted with CCR10 siRNA was significantly decreased compared with NC and Mock($P < 0.05$). The proliferation rate of A549 in NC compared with Mock has nostatistical significance ($P > 0.05$). The results of Transwell cell invasion assay showed that the invasion rate ofA549 conducted with CCR10 siRNA was significantly decreased compared with NC and Mock($P < 0.05$). The invasion rate of A549 in NC compared with Mock has nostatistical significance ($P > 0.05$). **Conclusion** CCR10 may contribute to cell proliferation, migration and invasion in NSCLC, and associated with the occurrence and development of NSCLC.

Key words non - small cell lung cancer; CCR10; Proliferation; Migration; Invasion

近年来研究证实,肺癌细胞可表达多种趋化因子和趋化因子受体,趋化因子和趋化因子受体构成的复杂网络在肺癌的发生、发展过程当中发挥着重要作用,其共同参与肿瘤细胞的黏附、增殖、抗凋亡及血管生成等病理生理过程^[1,2]。然而有关趋化因子受体 CCR10 与 NSCLC 之间的关系迄今国内外文献都尚未见报道。本研究旨在探讨 CCR10 的表达对 NSCLC 细胞在增殖、迁移和侵袭方面的影响,探讨 CCR10 的

表达与 NSCLC 发生、发展的关系,为探讨 NSCLC 的发病机制、预后判断等研究提供参考资料,为后续 NSCLC 的临床靶向治疗提供理论依据。

对象与方法

1. 对象:实验细胞和主要试剂:NSCLC 腺癌细胞 A549 购自中国科学院昆明动物研究所;MTT 购自中国江苏碧云天生物技术公司;Transcell 小室购自美国 Corning 公司;GAPDH 购自美国 Invitrogen 公司;SYBRGreenFP205 购自中国江苏碧云天生物技术公司;PBS 粉购自福州迈新生物技术开发有限公司;An-

作者单位:450002 河南省胸科医院

通讯作者:侯智亮,电子邮箱:hnhouzhiliang@126.com

nexin - V - Fluosstainingkit 购自瑞士 Roche 公司;二甲基亚砷(DMSO)购自中国江苏碧云天生物技术公司;MTT 购自中国江苏碧云天生物技术公司;Transwell 小室购自美国 Corning 公司;GAPDH 购自美国 Invitrogen 公司;SYBRGreenFP205 购自中国江苏碧云天生物技术公司。实验分组:空白对照组即无处理组(MOCK 组)、阴性对照组(NC 组)以及实验组(CCR10siRNA 组)。

2. 方法:(1) CCR10siRNA 的合成:CCR10siRNA 的设计参考已有的文献,并在 GeneBank 中检索确认,CCR10siRNA 的合成交由美国 Invitrogen 公司完成。CCR10siRNA 的序列如下::CCR10siRNA:上游引物:5' - GCUGGAUACUGCCGAUCUA - 3';下游引物:5' - UAGAUCGGCAGAUCCAGC - 3'。GAPDH:上游引物:5' - GACAGTCAGCCGCATCTTCT - 3';下游引物:5' - AAATGAGCCCCAGCCTTCTC - 3'。(2) 转染:取人 NSCLC 腺癌细胞 A549 处于对数生长期的细胞,将细胞用胰酶消化制备成单细胞悬液;用 10% 胎牛血清、无抗生素培养液调整细胞浓度至 2×10^4 /ml,接种于 6 孔板中,每孔 2.5ml 细胞悬液,每组细胞设立 5 个复孔,置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 48h;48h 后取出细胞培养板,倒去培养液,每孔加入 10% 胎牛血清、无抗生素培养液 1500μl;取 1.0 微升/孔 siRNA,用 50μl OptiMEM 培养液稀释,轻轻摇匀后室温孵育 5min;取 1.0 微升/孔 Lipofectamine2000,用 250μl OptiMEM 培养液稀释,轻轻摇匀后室温孵育 5min;将上述两种混合物混合,室温孵育 20min 后加入 6 孔板中,轻轻摇晃孔板使其混匀;将 6 孔板置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养,24h 后收集细胞。(3) MTT 法测定细胞增殖:取人 NSCLC 腺癌细胞 A549 对数生长期的细胞,制备单细胞悬液。分别调整细胞浓度至 2×10^4 个/毫升,分别接种于 96 孔板中,每孔 100μl 细胞悬液,每组细胞设立 6 个复孔,不含细胞只加培养液的孔作为调零组,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养;分别于 24、48、72、96h 后取出细胞培养板,每孔加入 0.5% MTT 溶液 10μl,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养 4h;终止培养:1200r/min 离心 10min 后,小心吸弃培养液,每孔中加入 150μl DMSO,放于水平摇床上,室温缓慢振荡 20min,使形成的结晶充分溶解;于酶标仪 490nm 处读取各孔的吸光度值 A_{490} 。记录结果,以时间为横坐标,吸光值为纵坐标绘制细胞生长曲线。(4) Transwell 细胞迁移实验:将细胞培养试剂和 Transwell

chamber 置于 37℃ 水浴箱中温浴 5min;制备单细胞悬液:取人 NSCLC 腺癌细胞 A549 对数生长期的细胞,用胰酶将细胞消化制备成单细胞悬液。用 PBS 和无血清培养基各洗涤 1 次;用无血清培养基悬浮细胞计数,调整细胞浓度至 2×10^5 个/毫升;接种细胞:在下室(24 孔板底部)加入含 10% 胎牛血清的培养基 600μl,上室加入单个细胞悬液 150μl,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养 6h(注意操作时尽量不要产生气泡);6h 后取出细胞培养板,倒去培养基,用 PBS 洗两次;染色:取出 chamber,吸干上室液体,用湿棉签擦去上室底模表明未穿过膜的细胞。将 chamber 置于甲醇溶液中,室温固定 20min。取出 chamber,吸干上室液体,将 chamber 置于结晶紫染液中,室温染色 20min。自来水冲洗 5min × 3 次;取下底模,室温晾干,移至载玻片上,中性树胶封片;显微镜下随机选择 5 个无交叉重复的视野,计数穿通滤膜的细胞数并取其平均值。(5) Transwell 细胞侵袭实验:将 Marigel 置于 4℃ 冰箱中过夜。待其完全融化后,用 4℃ 的 PBS 将其稀释呈 1mg/ml 的浓度。在 chamber 上室底部垂直滴入 50μl 的 Marigel 稀释液,37℃ 孵育使其成胶状;将 chamber 放入培养板中,在上室加入 300μl 预温的无血清培养基,室温下静置 30min,使基质胶水化。再吸去剩余培养液。将细胞培养试剂和 Transwellchamber 置于 37℃ 水浴箱中温浴 5min;制备单细胞悬液:取人 NSCLC 腺癌细胞 A549 对数生长期的细胞,用胰酶将细胞消化制备成单细胞悬液。用 PBS 和无血清培养基各洗涤 1 次;用无血清培养基悬浮细胞计数,调整细胞浓度至 2×10^5 个/毫升;接种细胞:在下室(24 孔板底部)加入含 10% 胎牛血清的培养基 600μl,上室加入单个细胞悬液 150μl,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养 24h;24h 后取出细胞培养板,倒去培养基,用 PBS 洗两次;染色:取出 chamber,吸干上室液体,用湿棉签擦去上室底模表明未穿过膜的细胞。将 chamber 置于甲醇溶液中,室温固定 20min。取出 chamber,吸干上室液体,将 chamber 置于结晶紫染液中,室温染色 20min。自来水冲洗 5min × 3 次;取下底模,室温晾干,移至载玻片上,中性树胶封片;显微镜下随机选择 5 个无交叉重复的视野,计数穿通滤膜的细胞数并取其平均值。

3. 统计学方法:应用 SPSS 16.0 统计学软件对数据进行统计分析。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. CCR10 对人 NSCLC 腺癌细胞 A549 增殖的影响:转染不同试剂后各组细胞连续 24、48、72 及 96h 后所测得的 A 值见表 1, MOCK 组、NC 组、CCR10siRNA 组 96h 后细胞增殖率分别为 26.51% ±

1.69%、27.22% ± 2.23%、17.34% ± 1.51%,转染了 CCR10siRNA 的人 NSCLC 腺癌细胞 A549 的细胞增殖率明显低于 MOCK 组及 NC 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),MOCK 组和 NC 组的细胞增殖率比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 CCR10 对人 NSCLC 腺癌细胞 A549 A 值的影响

组别	24h	48h	72h	96h
MOCK 组	0.48 ± 0.11	1.02 ± 0.11	1.53 ± 0.32	1.78 ± 0.19
NC 组	0.47 ± 0.13	0.98 ± 0.12	1.55 ± 0.24	1.76 ± 0.23
CCR10siRNA 组	0.48 ± 0.12	0.67 ± 0.13 * #	0.97 ± 0.25 * #	1.12 ± 0.31 * #

与 MOCK 组比较,* $P < 0.05$;与 NC 组相比,# $P < 0.05$

2. CCR10 对人 NSCLC 腺癌细胞 A549 迁移的影响:转染了 CCR10siRNA 的人 NSCLC 腺癌细胞 A549 的细胞迁移率明显低于 MOCK 组及 NC 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),MOCK 组和 NC 组的细胞迁移率比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$,表 2,图 1)。

表 2 人 NSCLC 腺癌细胞 A549 迁移实验的穿膜细胞数

组别	24h
MOCK 组	105 ± 9
NC 组	99 ± 3
CCR10siRNA 组	71 ± 4 * #

与 MOCK 组比较,* $P < 0.05$;与 NC 组比较,# $P < 0.05$

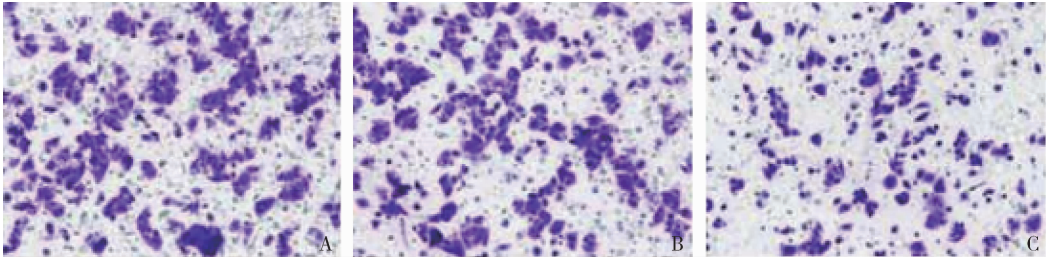


图 1 CCR10 对人 NSCLC 腺癌细胞 A549 迁移的影响(结晶紫染色, × 200)

A. MOCK;B. NC;C. CCR10 - siRNA

3. CCR10 对人 NSCLC 腺癌细胞 A549 侵袭的影响:MOCK 组、NC 组、CCR10siRNA 组 24h 后穿过基膜的细胞数分别为 84 ± 3、87 ± 5、52 ± 3 个,转染了 CCR10siRNA 的人 NSCLC 腺癌细胞 A549 的细胞侵袭率明显低于 MOCK 组及 NC 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),MOCK 组和 NC 组的细胞侵袭率相比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$,表 3,图 2)。

表 3 人 NSCLC 腺癌细胞 A549 侵袭实验的穿膜细胞数

组别	24h
MOCK 组	84 ± 3
NC 组	87 ± 5
CCR10siRNA 组	52 ± 3 * #

与 MOCK 组比较,* $P < 0.05$;与 NC 组比较,# $P < 0.05$

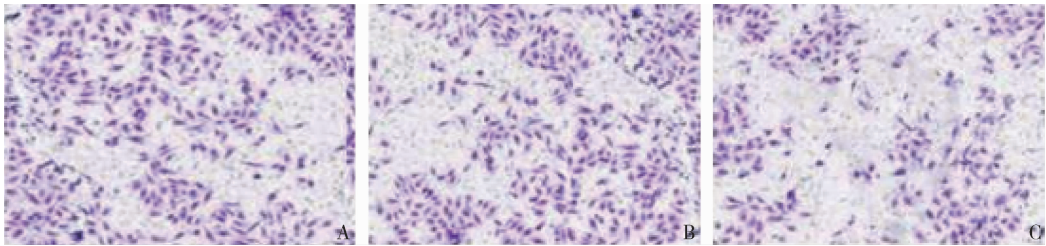


图 2 CCR10 对人 NSCLC 腺癌细胞 A549 侵袭的影响(结晶紫染色, × 200)

A. MOCK;B. NC;C. CCR10 - siRNA

讨 论

趋化因子受体 CCR10, 又称孤儿受体 GPR2, 系 CC 族趋化因子受体成员之一, Marchese 等于 1994 年首次克隆到 CCR10 基因的读码区, 它编码了人类趋化因子受体 CCR10 的 363 个氨基酸, 其基因定位于人类染色体 17q21.1 ~ q21.3。在蛋白质序列上, 人类 CCR10 与 IL-8 受体有 51% 的同源性。人类 CCR10 在成年人睾丸和小肠中表达量最高, 于胎儿肺、肾中中等量表达, 于成年人脾、胸腺、淋巴结等器官组织中表达量最低^[3]。在细胞水平上, 人类 CCR10 由唾液腺、小肠、大肠、阑尾及扁桃腺中的 IgA 抗体分泌细胞选择性表达^[4]。CCR10 的特异性配体为 CCL27 和 CCL28^[5-7]。以往的研究发现 CCR10 与银屑病、过敏性接触性皮炎等炎性反应性疾病有关^[8,9]。近年来愈来愈多文献报道 CCR10 与肿瘤关系密切, 其在恶性神经胶质瘤、皮肤 T 细胞淋巴瘤、黑色素瘤、成人 T 细胞淋巴瘤以及皮肤鳞状细胞癌等肿瘤中均有表达^[10-14]。

然而有关 CCR10 与 NSCLC 之间的关系迄今国内外文献尚未见报道。本研究应用基因工程技术将 CCR10siRNA 导入 NSCLC 细胞中, 干扰 CCR10 的正常表达, 进而研究 CCR10 对 NSCLC 细胞在增殖、迁移和侵袭等功能方面的影响。MTT 实验结果显示, 转染了 CCR10siRNA 的人 NSCLC 腺癌细胞 A549 的细胞增殖率明显低于空白对照组和阴性对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 空白对照组与阴性对照组的细胞增殖率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。以上结果表明, CCR10 对 NSCLC 细胞的增殖可能有促进作用。

Transwell 细胞迁移实验结果显示, 转染了 CCR10siRNA 的人 NSCLC 腺癌细胞 A549 的细胞迁移率明显低于空白对照组及阴性对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 空白对照组和阴性对照组的细胞迁移率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。以上结果提示, CCR10 可能促进 NSCLC 细胞的迁移。Chen 等^[10]研究 CCR10 对神经胶质瘤迁移方面的影响也得出类似的结果。Transwell 细胞侵袭实验结果显示: 转染了 CCR10siRNA 的人 NSCLC 腺癌细胞 A549 的细胞侵袭率明显低于空白对照组及阴性对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 空白对照组及阴性对照组的细胞侵袭率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。这些实验现象表明, CCR10 有助于 NSCLC 细胞的侵袭作用。Chen 等^[10]对神经胶质瘤的研究也观察到类

似的现象。

综上所述, CCR10 可能促进 NSCLC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力, CCR10 可能与非小细胞肺癌的发生、发展、侵袭及转移有关。CCR10 有望成为 NSCLC 早期诊断和预后判断的重要参考指标, 可能成为 NSCLC 的分子治疗靶点。

参考文献

- 1 蒋春萍, 王强, 罗光成, 等. 调节性 T 细胞趋化因子受体表达与系统性红斑狼疮相关性研究进展[J]. 中华风湿病学杂志, 2017, 21(3): 195-198
- 2 崔丰和, 黄江平, 周前, 等. CXC 趋化因子受体 5 及其配体 CXCL13 在非小细胞肺癌中的表达及意义[J]. 广东医学, 2016, 37(16): 2416-2419
- 3 康玲, 彭诗元, 秦源, 等. CCL28 通过增强 MMP-2 活力促进滋养细胞浸润功能[J]. 现代妇产科进展, 2017, 26(5): 337-341
- 4 Na Xiong, Yaoyao Fu, Shaomin Hu, *et al.* CCR10 and its ligands in regulation of epithelial immunity and diseases[J]. Protein Cell, 2012, 3(8): 571-580
- 5 朱梦远. Th22 细胞在肾脏疾病中的作用研究进展[J]. 国际泌尿系统杂志, 2017, 37(1): 10-14
- 6 张沛枫, 邹美银, 汪美华, 等. 辅助性 T 淋巴细胞 22 及其特征性细胞因子白细胞介素-22 的研究进展[J]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2016, 10(3): 257-260
- 7 钱希颖, 金立德, 曹霞, 等. CCL27 CCL28 及 CCR10 在癫痫小鼠急性期表达增高[J]. 重庆医学, 2015, 24: 3331-3333
- 8 王卓敏, 李迎春, 张壮, 等. LNMTea8113 舌癌细胞中 CCR10 下游分子鉴定[J]. 现代肿瘤医学, 2013, 21(12): 2644-2647
- 9 Riis JL, Johansen C, Vestergaard C, *et al.* Kinetics and differential expression of the skin-related chemokines CCL27 and CCL17 in psoriasis, atopic dermatitis and allergic contact dermatitis[J]. Exp Dermatol, 2011, 20(10): 789-794
- 10 Chen L, Liu X, Zhang HY, *et al.* Upregulation of chemokine receptor CCR10 is essential for glioma proliferation, invasion and patient survival[J]. Oncotarget, 2014, 5(16): 6576-6583
- 11 Notohamiprodjo M, Segerer S, Huss R, *et al.* CCR10 is expressed in cutaneous T-cell lymphoma[J]. Int J Cancer, 2005, 115(4): 641-647
- 12 Kuhnelt-Leddihn L, Muller H, Eisendle K, *et al.* Overexpression of the chemokine receptors CXCR4, CCR7, CCR9, and CCR10 in human primary cutaneous melanoma: a potential prognostic value for CCR7 and CCR10? [J]. Arch Dermatol Res, 2012, 304(3): 185-193
- 13 Hashikawa K, Yasumoto S, Nakashima K, *et al.* Microarray analysis of gene expression by microdissected epidermis and dermis in mycosis fungoides and adult T-cell leukemia/lymphoma[J]. Int J Oncol, 2014, 45(3): 1200-1208
- 14 Kai H, Kadono T, Kakinuma T, *et al.* CCR10 and CCL27 are overexpressed in cutaneous squamous cell carcinoma[J]. Pathol Res Pract, 2011, 207(1): 43-48

(收稿日期: 2017-09-12)

(修回日期: 2017-09-12)