

单核细胞趋化蛋白-1经细胞外信号调节激酶通路对肺癌A549细胞增殖、侵袭转移的影响及机制*

黄 婷¹ 兰 蕙¹ 王琳琳¹ 韩垠超¹ 叶丽平^{1, 2△}

(锦州医科大学基础医学院, 1 病理生理学教研室, 2 生物人类学研究所, 锦州 121001)

摘要 目的: 研究单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 对非小细胞肺癌增殖、侵袭转移能力的影响及可能的作用机制。**方法:** 体外培养肺癌细胞株A549。细胞分为对照组, MCP-1组 (25、50、75、100 ng/mL), MCP-1 (75 ng/mL)+PD98059组 (100 μmol/mL), 抑制剂PD98059组 (100 μmol/L)。MTT法检测细胞增殖活力, 细胞划痕、Transwell侵袭实验分析细胞迁移侵袭能力。免疫印迹检测细胞外信号调节激酶 (t-ERK)、磷酸化细胞外信号调节激酶 (p-ERK)、基质金属蛋白酶-14 (MMP-14)、基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 及N-钙黏蛋白 (N-cadherin) 的表达。**结果:** 与对照组相比, MCP-1明显促进A549细胞的增殖、侵袭与转移; 免疫印迹结果显示, MCP-1可上调p-ERK、MMP-14、MMP-2及N-cadherin蛋白的表达; 应用ERK抑制剂PD98059可阻断上述作用。ERK总蛋白表达量差异无统计学意义。**结论:** MCP-1经ERK通路上调MMP-14、MMP-2及N-cadherin蛋白表达, 促进肺癌A549细胞增殖、侵袭与转移。

关键词 单核细胞趋化蛋白-1; 细胞外信号调节激酶; 非小细胞肺癌; 侵袭; 转移

Effect of MCP-1 on proliferation, invasion and metastasis of lung cancer A549 cells via ERK pathway and its mechanisms*

Huang Ting¹, Lan Hui¹, Wang Linlin¹, Han Yinchao¹, Ye Liping^{1, 2△}

(1. Department of Pathophysiology, 2. Biological Anthropology Institute, College of Basic Medical Sciences, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of MCP-1 on proliferation, invasion and metastasis of non-small cell lung cancer and its possible mechanism. **Methods:** Cell line A549 was cultured *in vitro* and divided into control group, MCP-1 group (25 ng/mL, 50 ng/mL, 75 ng/mL, 100 ng/mL), MCP-1+PD98059 group (75 ng/mL+100 μmol/mL) and PD98059 group (100 μmol/mL). MTT assay was used to detect cell proliferation. Cell scratch and Transwell invasion assay were performed to analyze cell migration and invasion ability. The protein expression of t-ERK, p-ERK, MMP-14, MMP-2 and N-cadherin was detected by Western blotting. **Results:** MCP-1 significantly promoted the proliferation, invasion and metastasis of A549 cells compared with the control group. Western blotting showed that MCP-1 could significantly promote the protein expression of p-ERK, MMP-14, MMP-2 and N-cadherin. The above effect of MCP-1 could be blocked by PD98059 (ERK inhibitor). There was no significant difference in the expression of total ERK protein between the groups. **Conclusion:** MCP-1 may up-regulate MMP-14, MMP-2 and N-cadherin proteins via ERK pathway to promote the proliferation, invasion and metastasis of lung cancer A549 cells. **Key words** monocyte chemoattractant protein-1; extracellular-signal regulated protein kinase; non-small cell lung cancer; invasion; metastasis

肺癌中非小型细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 多见, 且易转移, 是患者死亡的主要原因^[1]。研究表明, 多种细胞因子参与

调节肿瘤细胞的侵袭与转移。单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1/CCL2) 是调节巨噬细胞迁移和浸润的关键趋化因子之一^[2], 在神经胶质瘤, 卵巢癌, 前列腺癌等肿瘤组织中过表达, 经细胞外信号调节激酶 (extracellular-signal regulated kinase, ERK)、蛋白激酶B (protein kinase B, PKB) 等多条信号通路参与调节肿瘤细胞的侵袭与转移^[3-4]。N-钙

* 辽宁省科技厅计划项目 (2015020362); 锦州医科大学生物人类学创新团队项目 (JYLJ201702)

第1作者 E-mail: ht18341652980@163.com

△通信作者, E-mail: ye960519@126.com

收稿日期: 2019-10-24; 修回日期: 2020-01-14

黏蛋白 (N-cadherin) 是上皮-间质化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 重要标志物, 可使肿瘤细胞获得迁移能力^[5]。基质金属蛋白酶-14 (matrix metalloproteinase-14, MMP-14)、基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2), 主要参与细胞外基质的降解和代谢^[6]。MCP-1在NSCLC中表达上调, 与侵袭转移有关, 但机制尚不清楚。本研究外源性加入MCP-1, 探究MCP-1是否经ERK通路调节肺癌A549细胞N-cadherin、MMP-14及MMP-2的蛋白表达及其增殖、侵袭转移的影响, 对临床上早期诊断、靶点治疗及预后评估等具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料及分组

人肺癌细胞株A549细胞 (本室保存); 1640培养基 (美国Gibco); MCP-1 (美国Signalway Antibody); ERK通路抑制剂PD98059 (APEXIO)、胎牛血清 (美国CLARK Bioscience); Matrigel 基底胶 (BD)、Transwell 小室 (康宁生物技术有限公司); 抗p-ERK和抗t-ERK (Abbkine); 抗N-cadherin、抗MMP-2、抗MMP-14和抗 β -actin抗体 (博奥森生物技术有限公司); 二甲基亚砜 (美国Sigma公司)。

1.2 细胞培养

将肺癌A549细胞培养在含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中, 置于5%CO₂、37℃恒温细胞培养箱中培养, 每2 d更换培养液, 所有操作均在超净工作台中进行。实验均选用对数期生长细胞。待细胞贴壁生长铺满瓶壁70%~80%时无血清饥饿过夜。

1.3 分组

对照组, MCP-1组 (25、50、75、100 ng/mL), MCP-1组 (75 ng/mL) +PD98059组, PD98059组。ERK抑制剂PD98059终浓度为100 μ mol/L (提前30 min孵育)。

1.4 MTT法

取对数期细胞, 细胞计数, 调整细胞为 5×10^5 /mL, 以每孔100 μ L接种到96孔板中, 四周用PBS填充。5%CO₂, 37℃孵育至细胞贴壁, 去除培养基; 按实验分组加药, 设6个复孔; 孵育48 h后, 每孔加入20 μ L MTT溶液 (5 mg/mL), 继续培养4 h。终止培养, 去掉培养液。每孔加入150 μ L的DMSO, 置37℃摇床上低速振荡10 min,

使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪OD490 nm处测量各孔的吸光值。

细胞增殖率 = (实验组OD值/对照组OD值) \times 100%

1.5 划痕实验

取对数期细胞, 各组细胞按 5×10^5 个/孔接种到6孔板内, 待细胞铺满皿底后, 用200 μ L枪头垂直划痕, PBS洗3遍。按照实验分组加药。每组设2个复孔。在5%CO₂, 37℃孵育48 h后监测划痕宽度变化并照相, Image J软件分析划痕面积, 计算愈合率。

划痕愈合率 = (原始划痕面积 - 48 h后划痕面积) / 原始划痕面积 \times 100%

1.6 Transwell 侵袭实验

Matrigel胶于与1640培养液按1:9稀释, 每上室各加入60 μ L, 置于37℃、5%CO₂的培养箱中, 孵育4 h。取对数生长期细胞消化处理, 制成细胞悬液 (密度为 5×10^5 /mL), 每上室100 μ L。下室按分组加药, 孵育48 h。去除上孔培养基, 4%多聚甲醛固定10 min, 用结晶紫染色, PBS洗3次。采用倒置显微镜观察并拍照。

1.7 免疫印迹检测

取对数期生长细胞, 按实验分组加药后, 于冰上收刮不同处理组细胞, 裂解细胞, 采用BCA法定量蛋白后制成样品后, 进行SDS-PAGE电泳, 半干转膜至PVDF膜上, 5%脱脂牛奶室温封闭2 h后, 分别加入一抗, 4℃摇床孵育过夜。次日TBST洗膜, 室温孵育二抗90 min。用TBST洗3次后, 将ECL显影液均匀涂在PVDF膜上, 置于显影仪上显影, Image J软件计算分析蛋白灰度值。

1.8 统计学处理

以上实验至少重复3次, 运用SPSS 17.0软件分析数据, 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 细胞增殖能力

与对照组相比, MCP-1组随浓度增加明显促进细胞增殖 ($P < 0.05$), PD98059组增殖能力降低 ($P < 0.05$), 浓度75 ng/mL与100 ng/mL MCP-1组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。MCP-1+PD98059联合处理组细胞增殖能力低于MCP-1组 (75 ng/mL) ($P < 0.05$)。

表 1 不同浓度 MCP-1 作用下细胞增殖率与吸光度值 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effect of different concentrations of MCP-1 on cell proliferation rate and OD Value ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Group	Cell proliferation rate (%)	Absorbance (OD value)
Control	100	0.212 0±0.007
MCP-1 (25 ng/mL)	151.90*	0.308 0±0.008*
MCP-1 (50 ng/mL)	204.40*	0.414 0±0.010*
MCP-1 (75 ng/mL)	290.50*	0.589 0±0.008*
MCP-1 (100 ng/mL)	276.15*	0.575 0±0.008*
MCP-1+PD98059	214.18#	0.451 0±0.007#
PD98059	84.83*	0.179 0±0.004*

* $P<0.05$ vs control; # $P<0.05$ vs MCP-1 (75 ng/mL)

2.2 细胞迁移能力

与对照组 (11.34%±1.24%) 相比, MCP-1 (75 ng/mL) 组, A549 细胞迁移率提高 (51.33%±4.21%, $P<0.05$); MCP-1 联合 PD98059 处理组迁移率 (28.33%±5.60%) 慢于 MCP-1 组 ($P<0.05$)。与 MCP-1+PD98059 组相比, PD98059 组 (4.50%±0.70%) 迁移率明显减慢 ($P<0.05$) (图 1)。

2.3 细胞侵袭能力

与对照组 (115.00±4.05) 相比, MCP-1 组 (545.00±12.70) 穿透细胞数明显增多 ($P<0.05$); MCP-1 组与 MCP-1 联合 PD98059 组 (272.00±6.55) 相比, 细胞侵袭率有所降低 ($P<0.05$), 单用 PD9859 组细胞侵袭数目 (51.00±3.00) 降低 ($P<0.05$) (图 2)。

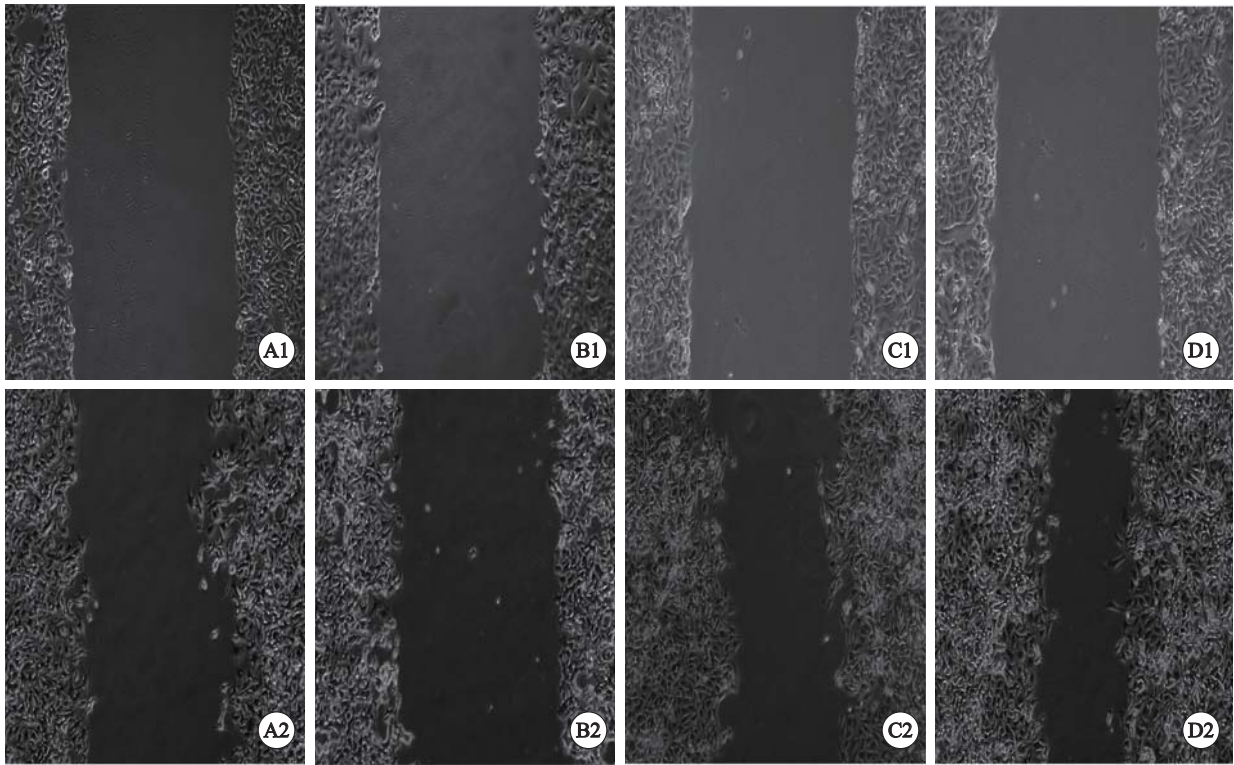


图 1 0 h (A1 ~ D1) 和 48 h (A2 ~ D2) MCP-1 与 PD98059 对 A549 细胞迁移的影响, 普通显微镜, ×10

Fig 1 Effect of MCP-1 and PD98059 on the migration of A549 cells after 0 h (A1-D1) and 48 h (A2-D2) treatment, conventional microscopy, ×10

A : Control ; B : PD98059 (100 μmol/L) group ; C : MCP-1+PD98059 (75 ng/mL+100 μmol/L) group ; D : MCP-1 (75 ng/mL) group

2.4 相关蛋白表达情况

实验结果显示 (图 3), 与对照组相比, 加入 MCP-1 处理后, MMP-14、N-cadherin、MMP-2 及 p-ERK 蛋白表达水平增高 ($P<0.05$), 总 ERK 蛋白量不变 ($P>0.05$); 与 MCP-1 组比较, PD98059 联合 MCP-1 组 MMP-14、N-cadherin、MMP-2 及 p-ERK 蛋白表达水平下降, 单用 PD98059 组, MMP-14、N-cadherin、MMP-2 及 p-ERK 蛋白表达明显下降 ($P<0.05$)。

3 讨论

MCP-1 的异常表达在肿瘤的发生和发展中有着重要的影响, 研究显示, MCP-1 在乳腺癌中活化 Smad3 和 p42/44 MAPK 信号通路促进癌细胞的迁移^[7]。在前列腺癌中, MCP-1 激活了包括 PKCδ、c-Src 和 AP-1 的信号转导途径, 抑制该途径特定成分均会降低 MCP-1 对细胞侵袭的影响^[8]。马钟玲等^[9]报道, MCP-1 在 NSCLC 组织中的表达高于其在

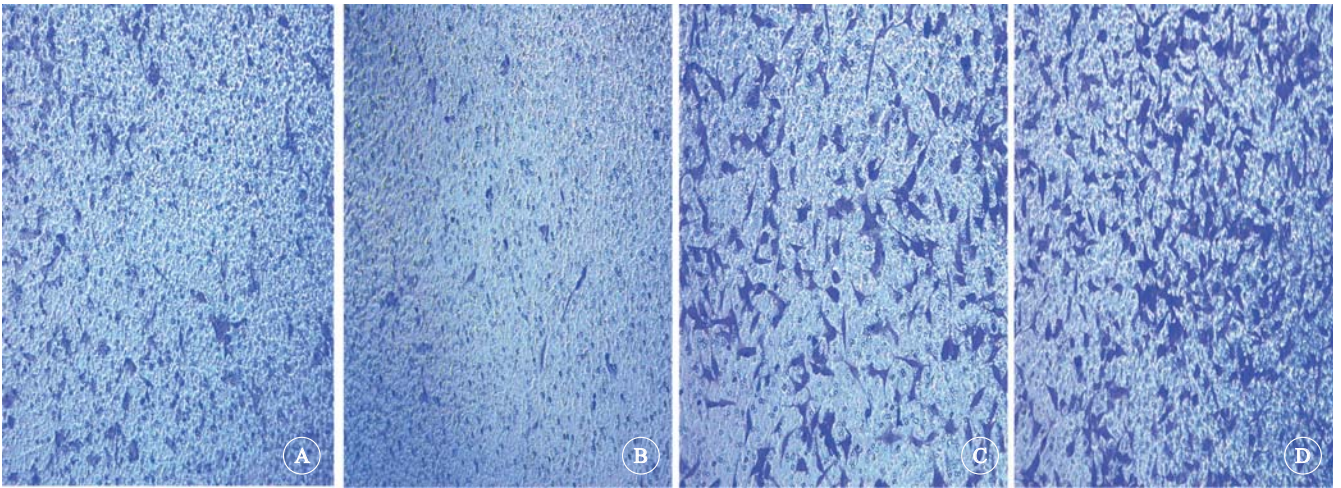


图2 MCP-1和PD98059对细胞侵袭能力的影响,倒置显微镜,×10

Fig 2 Effect of MCP-1 and PD98059 on cell invasion, inverted microscope, ×10

A: Control; B: PD98059 (100 μmol/L) group; C: MCP-1+PD98059 (75 ng/mL+100 μmol/L) group; D: MCP-1 (75 ng/mL) group

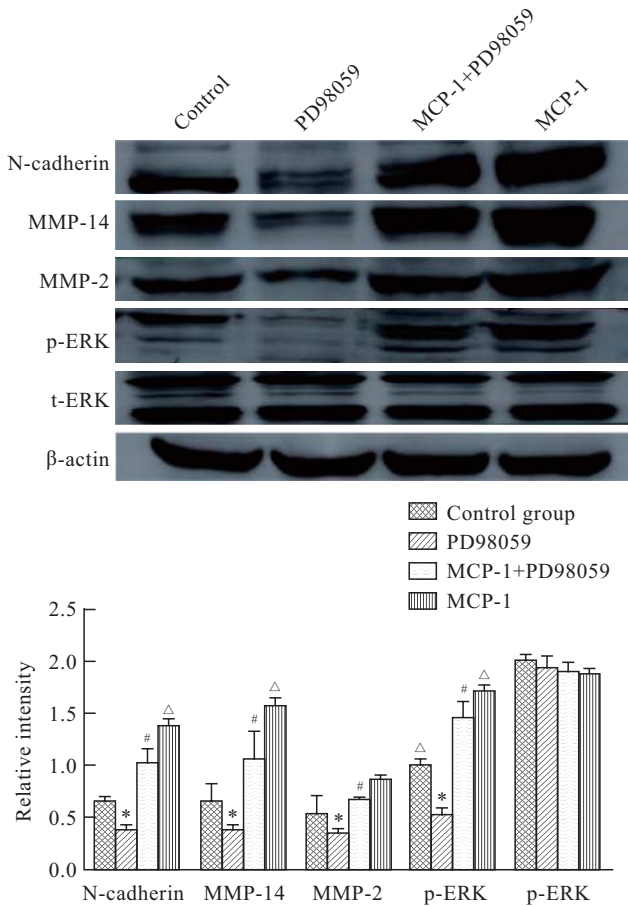


图3 MCP-1和PD98059对N-cadherin、MMP-14、MMP-2、t-ERK、p-ERK蛋白表达影响

Fig 3 Effect of MCP-1 and PD98059 on expression of N-cadherin, MMP-14, MMP-2, t-ERK, and p-ERK protein

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs MCP-1;

△ $P < 0.05$ vs MCP-1+PD98059

正常组织表达,且与肿瘤的分化、淋巴结是否转移及肿瘤分期有关,提示MCP-1与NSCLC的发生发展密切相关。ERK信号通路可调控各种细胞活动过程(如增殖,存活,分化和运动)等,在人类肿瘤中常被异常激活进而促进肿瘤的侵袭和转

移^[10]。PD98059是一种通过作用于其上游激酶而间接抑制ERK1/2的ERK抑制剂之一,可阻断外源性的刺激信号转导至胞内,进而影响细胞的生物学效应。

MMPs是参与肿瘤细胞侵袭和转移的主要蛋白酶家族,当ERK异常活化,可上调MMP-2、MMP-14等表达,使细胞外基质降解加快^[11],MMP-14高表达时可促进MMP-2的活化分泌,诱导家族其他发挥级联反应,进而加速对基底膜的溶解^[12]。Fan等^[5]研究表明,通过抑制ERK信号通路,能有效减弱EMT的发生。在滑膜肉瘤细胞中,MMP-14可诱导EMT增强,使N-cadherin的表达上调,提高侵袭能力^[13]。

本研究先按照浓度分组,用MTT实验筛选出MCP-1作用于A549细胞的最佳浓度75 ng/mL,再结合ERK信号通路抑制剂PD98059,通过MTT实验、划痕实验、Transwell侵袭实验进一步探究MCP-1对A549细胞作用情况。结果显示,与对照组相比,MCP-1明显促进细胞的增殖、侵袭转移,在应用PD98059作用后,细胞上述作用减弱,免疫印迹结果显示,在MCP-1的作用下p-ERK、N-cadherin、MMP-14、MMP-2蛋白表达水平增加,但总ERK蛋白表达量不变。而在加入ERK抑制剂PD98059作用后,上述蛋白表达量下降,进一步推测N-cadherin、MMP-14、MMP-2为ERK下游靶蛋白。

综上所述,MCP-1作用于肺癌A549细胞,可能通过磷酸化ERK信号通路,增加了ERK下游N-cadherin、MMP-14、MMP-2蛋白的表达,最终促进了肺癌细胞增殖、侵袭转移。本实验是对肺癌

侵袭转移研究的初步探讨, 希望能为未来预防和治
疗肺癌等疾病提供新的作用靶点。

参考文献

- [1] Guan X. Cancer metastases : challenges and opportunities[J]. Acta Pharm Sin B, 2015, 5 (5) : 402-418.
- [2] Hoh B L, Hosaka K, Downes D P, et al. Monocyte chemotactic protein-1 promotes inflammatory vascular repair of murine carotid aneurysms via a macrophage inflammatory protein-1alpha and macrophage inflammatory protein-2-dependent pathway[J]. Circulation, 2011, 124 (20) : 2243-2252.
- [3] Melgarejo E, Medina M A, Sanchez-Jimenez F, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 : a key mediator in inflammatory processes[J]. Biochem Cell Biol, 2009, 41 (5) : 998-1001.
- [4] Cai Z, Chen Q, Chen J, et al. Monocyte chemotactic protein 1 promotes lung cancer-induced bone resorptive lesions in vivo[J]. Neoplasia, 2009, 11 (3) : 228-236.
- [5] Fan M J, Liang S M, He P J, et al. Dusp6 inhibits epithelial-mesenchymal transition in endometrial adenocarcinoma via ERK signaling pathway[J]. Radiol Oncol, 2019, 53 (3) : 307-315.
- [6] Ling B, Watt K, Banerjee S, et al. A novel immunotherapy targeting MMP-14 limits hypoxia, immune suppression and metastasis in triple-negative breast cancer models[J]. Oncotarget, 2017, 8 (35) : 58372-58385.
- [7] Rego S, Swamydas M, Kidiyoor A, et al. Soluble tumor necrosis factor receptors shed by breast tumor cells inhibit macrophage chemotaxis[J]. Interferon Cytokine Res, 2013, 33 (11) : 672-681.
- [8] Lin T H, Liu H H, Tsai T H, et al. CCL2 increases alphavbeta3 integrin expression and subsequently promotes prostate cancer migration[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1830 (10) : 4917-4927.
- [9] 马钟铃, 秦思达, 张伯翔, 等. 非小细胞肺癌中 IL-8 与 MCP-1 的表达及其临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24 (3) : 394-397.
- [10] Gutschalk C M, Yanamandra A K, Linde N, et al. GM-CSF enhances tumor invasion by elevated MMP-2, -9, and -26 expression[J]. Cancer medicine, 2013, 2 (2) : 117-129
- [11] Wang X, Zhao X, Yi Z, et al. WNT5A promotes migration and invasion of human osteosarcoma cells via SRC/ERK/MMP-14 pathway [J]. Cell Biol Int, 2018, 42 (5) : 598-607.
- [12] Mohammad M A, Zeeneldin A A, Abd Elmageed Z Y, et al. Clinical relevance of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-14) in human breast cancer tissue[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 366 (1/2) : 269-275.
- [13] Liu M, Qi Y, Zhao L, et al. Matrix metalloproteinase-14 induces epithelial-to-mesenchymal transition in synovial sarcoma[J]. Hum Pathol, 2018, 80 (10) : 201-209.

解剖学杂志 2020 年第 43 卷第 2 期

doi : 10.3969/j.issn.1001-1633.2020.02.027

肝右动脉合并胆囊动脉变异一例*

闫旭升¹ 付天骄² 海 日³ 贾建新^{1△}

(包头医学院, 1 人体解剖学教研室, 2 2014 级临床本科 3 班, 3 2015 级临床本科 9 班, 包头 014040)

笔者在解剖一成年男性尸体时, 发现其肝右动脉及胆囊动脉存在变异, 现报道如下。

腹腔干在肠系膜上动脉上方分出脾动脉、胃左动脉、肝总动脉, 肝总动脉分出胃十二指肠动脉 (外径 2.44 mm) 和肝固有动脉左支 (外径 3.00 mm), 左支直接入肝左叶,

而本例变异的胆囊动脉 (外径 1.72 mm, 长 40.28 mm) 从胃十二指肠动脉起始处发出, 距肝总动脉 3.00 mm, 经过胆囊三角入胆囊。变异的肝右动脉起自肠系膜上动脉, 距离肝总动脉 22.30 mm, 其起点至肝门右侧的距离为 43.30 mm, 该变异的肝右动脉行于肝门静脉和肝总管的后方入肝右叶。

根据“中国人解剖学数值”记载, 国人胆囊动脉发自胃十二指肠动脉的出现率为 3.85%, 肝右动脉发自肠系膜上动脉的出现率为 3.76%, 故此两变异并非多见。在外科手术中, 应该了解这种变异的存在, 以免找不到或误伤。

* 包头医学院“花蕾计划”(2017BYJJ-HL-59)

第 1 作者 E-mail : Yanxs2004@sina.com

△ 通信作者, E-mail : jiajianxinx163.com

收稿日期 : 2019-04-26 ; 修回日期 : 2019-09-25