

CCL23 及其受体 CCR1 与人上皮性卵巢癌细胞顺铂耐药的研究

孙磊, 张英, 朱颖, 李泽莲, 颜士杰, 肖兰

摘要 目的 研究趋化因子配体 23 (CCL23) 及趋化因子受体 1 (CCR1) 与人上皮性卵巢癌细胞顺铂耐药的关系。方法 qRT-PCR 法检测人上皮性卵巢癌细胞顺铂耐药细胞 C13K 及其敏感细胞 OV2008 中 CCL23 及 CCR1 表达; 慢病毒转染使 OV2008 细胞过表达 CCL23, 嘌呤霉素筛选阳性克隆, 倒置荧光显微镜及 qRT-PCR 观察和检测慢病毒稳定转染效果; BX471 (CCR1 受体拮抗剂) 干预, 平板克隆及 CCK-8 法分别检测细胞增殖活力及顺铂半数抑制浓度 (IC_{50}); Western blot 检测细胞 CCL23、CCR1 基因及耐药蛋白 YAP 表达。结果 qRT-PCR 结果显示, C13K 中 CCL23 及 CCR1 表达均高于 OV2008 ($P < 0.01$); 荧光显微镜下慢病毒转染 OV2008 细胞满视野绿色荧光表达, CCL23 过表达组细胞 CCL23 mRNA 水平明显上升 ($P < 0.001$), 成功建立 OV2008 细胞 CCL23 稳定表达株, CCL23 过表达组细胞 CCR1 mRNA 表达却无改变; CCL23 过表达后 OV2008 细胞增殖加速, 对顺铂耐受性增加, 相对于空白对照组及慢病毒空载体组细胞差异有统计学意义 ($P < 0.01$); BX471 可抑制细胞 CCR1 及 CCL23 表达, 同时降低细胞增殖活性, 增加细胞对顺铂敏感性, 抑制细胞中耐药蛋白 YAP 表达。结论 CCL23/CCR1 趋化因子受体轴参与人上皮性卵巢癌细胞顺铂耐药, 其机制可能与 CCL23/CCR1 调控下游效应因子 YAP 表达有关。

关键词 上皮性卵巢癌; CCL23; CCR1; 顺铂耐药

中图分类号 R 737.31

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)02-0272-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.02.019

上皮性卵巢癌 (epithelial ovarian cancer, EOC) 是卵巢癌中最为常见的类型之一, 因其发病隐匿, 多数患者就诊时常为晚期, 且规范治疗后易发生铂类耐药导致患者预后较差。该课题组前期研究发现^[1], EOC 组织趋化因子配体 23 (C-C chemokine ligand 23, CCL23) 及趋化因子受体 1 (C-C chemokine

receptor 1, CCR1) 表达水平明显高于正常卵巢上皮组织, 提示 CCL23 及其受体 CCR1 可能参与 EOC 发生发展过程。为了进一步了解 CCL23 及其受体 CCR1 与 EOC 顺铂耐药之间关系, 该研究采用慢病毒转染将 CCL23 导入 CCL23 表达较低的 OV2008 细胞, 再联合 CCR1 抑制剂 BX471, 旨在探讨 CCL23/CCR1 趋化因子受体轴在 EOC 顺铂耐药中的作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料与主要试剂 细胞株: 人 EOC 耐药细胞 C13K 及人 EOC 敏感细胞 OV2008 均为安徽医科大学免疫实验室保存; 1640 培养基、PBS 购自美国 Hyclone 公司; 胎牛血清购自德国 GIBCO 公司; RIPA 裂解液、BCA 法蛋白浓度定量试剂盒、CCK-8 检测试剂盒、ECL 显色试剂盒购自上海碧云天公司; BX471 试剂购自上海碧云天公司; TRIzol 试剂购自美国 InvitroGen 公司; 逆转录试剂盒、RT-PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; CCL23 抗体及 CCR1 抗体购自美国 Abcam 公司; YAP 抗体购自美国 CST 公司; LV5-CCL23 过表达慢病毒购自上海吉玛公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 C13K 细胞和 OV2008 细胞用含 15% 胎牛血清的 1640 培养液, 在 5% CO_2 、37 °C 条件下, 饱和湿度培养箱中培养。

1.2.2 细胞转染 ① 转染前 1 d 在 6 孔板中以 $(1 \sim 1.5) \times 10^6$ 个/孔接种相应浓度处于对数期 OV2008 细胞; ② 转染分组: CCL23 过表达组及空载体组; ③ 按照 MOI 值为 75 行慢病毒转染, 37 °C 孵育箱中孵育, 48 ~ 72 h 后在荧光显微镜下观察转染效率; ④ 待细胞长至 70% ~ 80% 时, 5 μ g/ml 嘌呤霉素筛选 14 d, 得到 CCL23 过表达及空载体 OV2008 阳性克隆株。

1.2.3 倒置荧光显微镜观察细胞荧光表达 倒置荧光显微镜下观察处于对数生长期 CCL23 过表达及空载体 OV2008 阳性克隆内绿色荧光表达, 图片经图像处理软件 Image J 统一进行处理以获得更好

2020-08-26 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (编号: 81603138); 安徽省中央引导地方科技发展专项项目 (编号: 2017070802D149); 安徽省高校优秀拔尖人才培养项目 (编号: gxgwf2019006)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院妇产科, 合肥 230022

作者简介: 孙磊, 男, 硕士研究生;

肖兰, 女, 研究员, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: emma_02000@163.com

的显示结果。

1.2.4 平板克隆 空白对照 OV2008 细胞、CCL23 过表达及空载体 OV2008 阳性克隆株分别以 500 个/孔细胞接种于 6 孔板中,并轻轻转动,使细胞分散均匀。置于 5% CO₂、37 °C,饱和湿度培养箱中培养 10~14 d。当 6 孔板中出现肉眼可见的克隆时,终止培养,弃去上清液,PBS 小心浸洗 2 次。2 ml 甲醇固定细胞 15 min,弃去固定液,加适量吉姆萨液染色 15~30 min,流水缓慢洗去染液,空气中干燥。计数细胞克隆数目,计算克隆形成率。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.5 CCK-8 检测顺铂 IC₅₀及细胞增殖活性 空白对照 OV2008 细胞、CCL23 过表达及空载体 OV2008 阳性克隆株分别以 1×10^4 个/孔浓度接种于 96 孔板,24 h 后更换含有不同浓度顺铂培养基(顺铂浓度:0、1、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$),设 5 个复孔。48 h 后每孔加入 10 μl 的 CCK-8,孵育箱培养 4 h,酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 OD 值;另一板同时每个孔再加入 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 BX471 工作液,设 5 个复孔,余下步骤同上。

1.2.6 qRT-PCR 检测 CCL23、CCR1 mRNA 表达水平 Trizol 法提取细胞 RNA,反转录合成 cDNA,反应条件为 37 °C、15 min;80 °C、5 s;4 °C、5 min。合成 cDNA 后进行 qRT-PCR 实验, β -actin 为内参对照,反应条件为 95 °C、30 s;95 °C、5 s,60 °C、34 s,40 次循环,每组设 3 个复孔。实验结果按 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各组细胞中 CCL23 mRNA 相对表达量,实验重复 3 次。CCL23 基因引物序列,上游:GCTGACTGCTG-CATCTCCTACAC;下游:GGCTTGGAGCACTCGCT-GTTC。CCR1 基因引物序列,上游:GGGAAAGGTG-GCCAAACACT;下游:TGCTCATGTTGGAAGAA-GTCC; β -actin 基因引物序列,上游:GTGGCCGAG-GACTTTGATTG,下游:CCTGTAACAACGCATCT-CATATT。

1.2.7 Western blot 检测 CCL23、CCR1、YAP 蛋白水平 采用 RIPA 裂解液裂解细胞,BCA 试剂盒定量,SDS-PAGE 中行电泳分离,转移至 PVDF 膜。用封闭液封闭 2 h,之后加入一抗过夜,二抗孵育 2 h,用 ECL 观察印迹并使用成像系统检测印迹并拍照,实验结果用图像处理软件 Image J 统计 CCL23、CCR1、YAP 蛋白表达情况。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析。计量资料经正态性检验符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验和单因素方差分

析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞 C13K 与 OV2008 中 CCL23、CCR1 mRNA 表达 qRT-PCR 结果显示 C13K 中 CCL23 及 CCR1 mRNA 表达水平均高于 OV2008,表达水平分别为 (5.53 ± 1.23) 、 (1.07 ± 0.46) ($t = -5.853, P < 0.01$)、 (4.36 ± 0.52) 、 (1.10 ± 0.56) ($t = -7.414, P < 0.01$),差异有统计学意义。

2.2 倒置荧光显微镜观察细胞内荧光表达 荧光显微镜下可见 CCL23 过表达及空载体 OV2008 阳性克隆株生长状态良好,满视野绿色荧光表达,见图 1。

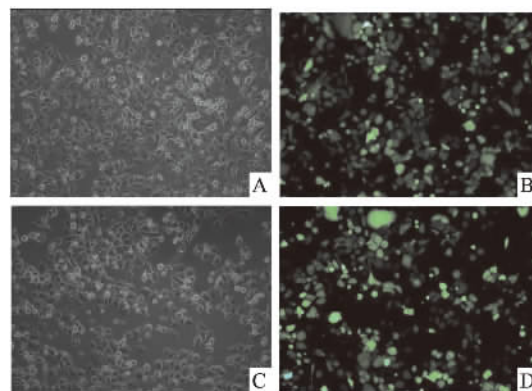


图 1 转染细胞荧光表达 $\times 200$

A: 空载体组细胞照片; B: 空载体组荧光照片; C: CCL23 过表达组细胞照片; D: CCL23 过表达组荧光照片

2.3 慢病毒稳定转染 OV2008 细胞 CCL23 及 CCR1 mRNA 表达 qRT-PCR 证实 CCL23 过表达 OV2008 阳性克隆株 CCL23 mRNA 表达增加,空白对照 OV2008 细胞、空载体及 CCL23 mRNA 过表达 OV2008 细胞阳性克隆株 CCL23 mRNA 表达分别为 (0.98 ± 0.29) 、 (1.08 ± 0.56) 及 (3211.16 ± 184.09) ,差异有统计学意义 ($F = 912.249, P < 0.001$),三者 CCR1 mRNA 表达水平分别为 (1.08 ± 0.19) 、 (1.04 ± 0.36) 和 (1.03 ± 0.31) ,差异无统计学意义 ($F = 0.021, P > 0.05$)。

2.4 CCL23 过表达对细胞存活率及顺铂 IC₅₀ 的影响 顺铂作用 48 h, CCL23 过表达 OV2008 细胞存活率提高 ($F = 26.980, P < 0.01$), CCL23 过表达 OV2008 细胞 IC₅₀ 为 $(9.50 \pm 0.65) \mu\text{mol/L}$,高于空白对照 OV2008 细胞 IC₅₀ $(5.36 \pm 0.61) \mu\text{mol/L}$ 及慢病毒空载体 OV2008 细胞 IC₅₀ $(5.56 \pm 0.65) \mu\text{mol/L}$ ($F = 39.859, P < 0.01$),见图 2、3 和表 1。

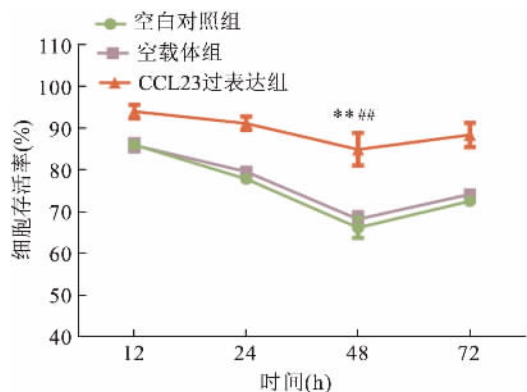
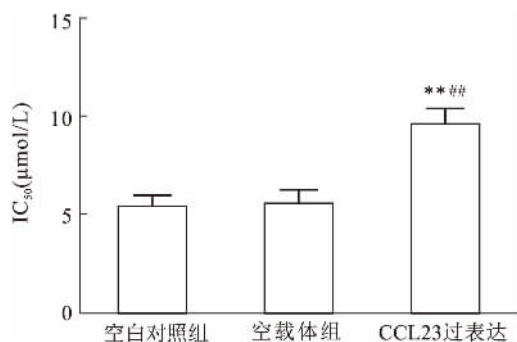


图2 顺铂作用时间对细胞存活率的影响

与空白对照组比较: ** $P < 0.01$; 与空载体组比较: ### $P < 0.01$ 表1 转染细胞存活率比较(%, $\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	顺铂(-)	顺铂(+)
空白对照	94.67 ± 2.51	65.67 ± 2.08
空载体	96.67 ± 1.53	67.33 ± 1.52
CCL23 过表达	95.67 ± 2.52	83.67 ± 5.13 * ##

与空白对照组比较: ** $P < 0.01$; 与空载体组比较: ### $P < 0.01$ 图3 CCL23 过表达对细胞 IC₅₀ 的影响与空白对照组比较: ** $P < 0.01$; 与空载体组比较: ### $P < 0.01$

2.5 CCL23 过表达对细胞克隆形成影响 肉眼可见 CCL23 过表达 OV2008 细胞克隆形成能力高于空白对照组及空载体组 OV2008 细胞, CCL23 过表达 OV2008 细胞平均克隆形成率为(61.00 ± 7.55)%, 空白对照 OV2008 细胞平均克隆形成率为(28.53 ± 2.60)%, 慢病毒空白载体 OV2008 细胞平均克隆形成率为(34.47 ± 3.83)%, 差异有统计学意义($F = 32.825, P < 0.01$), 见图4。

2.6 BX471 干预前后细胞存活率及顺铂 IC₅₀ 比较

BX471 联合顺铂处理空白对照 OV2008 细胞、CCL23 过表达 OV2008 细胞及空载体 OV2008 细胞 48 h, 与单独顺铂处理细胞比较, 联合 BX471 干预后三组细胞对顺铂 IC₅₀ 均有所下降, CCL23 过表达组由(8.98 ± 0.27) μmol/L 降至(4.46 ± 0.45) μmol/L

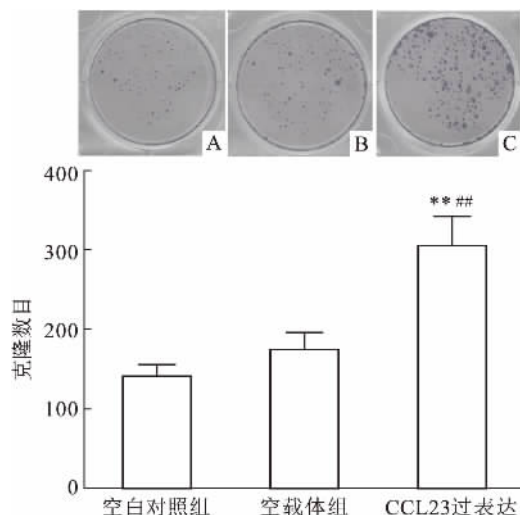
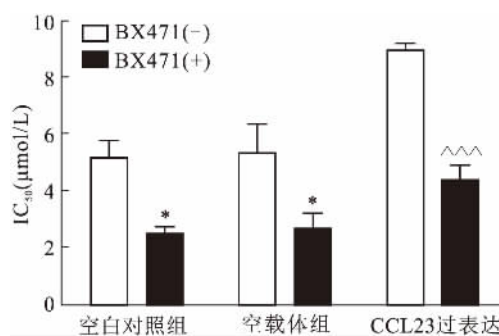


图4 细胞克隆形成能力改变

A: 空白对照组; B: 空载体组; C: CCL23 过表达组; 与空白对照组比较: ** $P < 0.01$; 与空载体组比较: ### $P < 0.01$

($t = 15.093, P < 0.001$), 空白对照组由(5.19 ± 0.59) μmol/L 降至(2.51 ± 0.25) μmol/L ($t = 7.234, P < 0.01$), 空白载体组由(5.37 ± 1.01) μmol/L 降至(2.67 ± 0.56) μmol/L ($t = 4.059, P < 0.01$), 空白对照 OV2008 细胞存活率($t = 17.000, P < 0.001$)、空载体 OV2008 细胞存活率($t = 9.384, P < 0.001$)及 CCL23 过表达 OV2008 细胞存活率($t = 6.08, P < 0.01$)均下降, 见图5及表2。

图5 BX471 干预前后细胞 IC₅₀ 比较与同组 BX471(-) 比较: * $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ 表2 BX471 干预前后转染细胞存活率比较(%, $\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	空白对照组	空载体组	CCL23 过表达组
BX471(-)	95.00 ± 2.00	95.67 ± 4.16	96.33 ± 2.08
BX471(+)	55.33 ± 3.51 ***	58.00 ± 5.56 ***	75.67 ± 5.51 △△

与同组 BX471(-) 比较: *** $P < 0.001$, △△ $P < 0.01$

2.7 BX471 干预前后各组细胞 CCL23、CCR1 及 YAP 蛋白表达

Western blot 结果显示: BX471 处

理各组细胞前, CCL23 过表达后, OV2008 细胞中 CCL23 蛋白升高, 而 CCR1 及 YAP 蛋白无改变, BX471 处理各组细胞后, 细胞中 CCR1 蛋白表达均有所抑制 ($t_{\text{空白}} = 30.074$, $t_{\text{空载体}} = 27.174$, $t_{\text{过表达}} = 24.470$, 均 $P < 0.01$), CCL23 蛋白水平亦降低 ($t_{\text{空白}} = 23.687$, $t_{\text{空载体}} = 38.312$, $t_{\text{过表达}} = 34.237$, 均 $P < 0.01$), 同时细胞中 YAP 蛋白水平亦有所降低 ($t_{\text{空白}} = 17.271$, $t_{\text{空载体}} = 23.396$, $t_{\text{过表达}} = 27.717$, 均 $P < 0.01$), 见图 6。

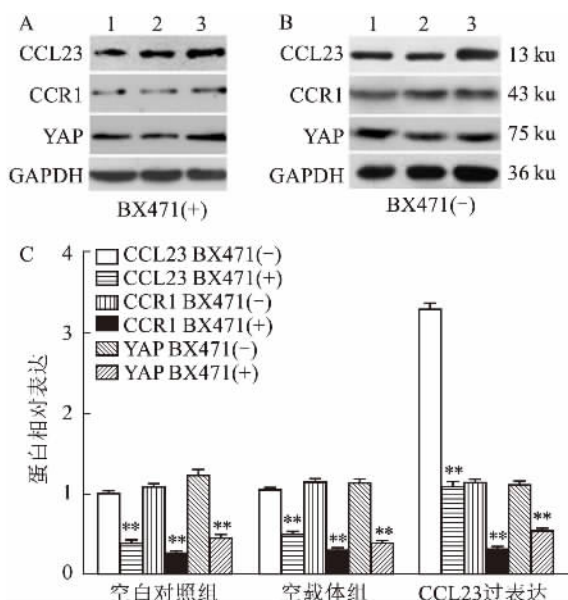


图 6 BX471 处理前后各组细胞蛋白的变化

A: BX471 处理前各组细胞蛋白表达; B: BX471 处理后各组细胞蛋白表达; C: 各组蛋白灰度值分析统计图; 1: 空白对照组; 2: 空载体组; 3: CCL23 过表达组; 与同组 BX471(-) 比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

趋化因子作为组成细胞因子的重要部分, 在癌症的发生与发展过程发挥着重要作用。例如, Han et al^[2] 发现 CCL7 能够加快非小细胞肺癌的侵袭、迁移和骨转移, 同时 CCL7 的表达与患者预后呈负相关; 陆进等^[3] 研究指出 CCL23 与肝癌患者预后相关; Su et al^[4] 研究则表明 CCL20 与卵巢癌多柔比星耐药相关。

本研究中, 我们进一步发现人 EOC 顺铂耐药细胞中 CCL23 与 CCR1 的 mRNA 水平均明显高于人 EOC 顺铂敏感细胞, 表明 CCL23 与 CCR1 高表达可能参与人 EOC 顺铂耐药。我们通过慢病毒稳定转染使顺铂敏感细胞 OV2008 过表达 CCL23, 体外细胞试验结果提示: 过表达 CCL23 增加了 OV2008 细

胞对顺铂耐受性, 提高了细胞增殖活性。这与 Lu et al^[5] 通过高通量基因组学测序得出 CCL23 等多个趋化因子在卵巢癌中可能作为耐药基因的结果相符。而 CCL23 过表达并未能改变细胞中 CCR1 水平, 针对这一现象我们对 CCL23/CCR1 介导的 EOC 顺铂耐药机制进行了初步探讨。

CCR1 作为多个趋化因子的受体, 可与不同配体结合后发挥功能, 抑制 CCR1 可阻断其配体发挥相应功能。Kato et al^[6] 研究发现敲除 CCR1 后会降低高表达 CCL5 的前列腺癌细胞对紫杉烷耐药性。CCR1 是 CCL23 唯一特异性受体, 可与 CCL23 特异性结合, 发挥多种生物学功能^[7]。Hwang et al^[8] 指出 CCL23 结合 CCR1 后促进了内皮细胞血管生成和迁移, CCR1 拮抗剂可抑制内皮细胞血管生存及迁徙。针对 CCL23 需与 CCR1 特异性结合才发挥作用这一特征, 本研究运用 CCR1 拮抗剂 BX471^[9], 旨在探讨抑制 CCR1 阻断其结合配体 CCL23 对 EOC 顺铂耐药的作用。结果显示 BX471 干预后各组细胞 CCR1 与 CCL23 表达均明显下调, 细胞对顺铂的 IC_{50} 与增殖活性亦受到一定抑制, 细胞中 YAP 蛋白表达出现下调。YAP 为 HIPPO 通路的一个下游因子, 与多种肿瘤细胞的耐药相关^[10-11]。由此推论: CCL23/CCR1 趋化因子受体轴在 EOC 细胞顺铂耐药中发挥作用, CCR1 抑制剂 BX471 可能通过与 CCL23 竞争性结合 CCR1, 阻断 CCL23 对其下游效应因子 YAP 的调控, 从而恢复 OV2008 细胞对顺铂敏感性。

综上所述, CCL23/CCR1 趋化因子受体轴通过调控细胞耐药蛋白 YAP, 参与人 EOC 细胞顺铂耐药, 本研究有助于阐明 CCL23/CCR1 趋化因子受体轴作为上皮性卵巢癌潜在治疗靶点的可行性。但 CCL23/CCR1 趋化因子受体轴通过激活哪些下游信号通路参与卵巢癌侵袭转移及耐药还需进一步探索。

参考文献

- [1] 冯星浩, 颜士杰, 肖 兰, 等. CCL23-CCR1 趋化因子轴在上皮性卵巢癌疾病进展中的作用 [J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(5): 780-5.
- [2] Han S, Wang T, Chen Y, et al. High ccl7 expression is associated with migration, invasion and bone metastasis of non-small cell lung cancer cells [J]. Am J Transl Res, 2019, 11(1): 442-52.
- [3] 陆 进, 杨 月, 俞 鹏, 等. 肝细胞癌组织 CC 趋化因子配体 23(CCL23) 表达的生物信息学分析及意义 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2019, 35(10): 903-9.

- [4] Su S, Sun X, Zhang Q, et al. CCL20 Promotes ovarian cancer chemotherapy resistance by regulating ABCB1 expression [J]. *Cell Struct Funct*, 2019,44(1) : 21 – 8.
- [5] Lu X, Lu J, Liao B, et al. Driver pattern identification over the gene co-expression of drug response in ovarian cancer by integrating high throughput genomics data [J]. *Scientific Reports*, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-16286-5.
- [6] Kato T, Fujita Y, Nakane K, et al. Ccr1/ccl5 interaction promotes invasion of taxane-resistant pc3 prostate cancer cells by increasing secretion of mmps 2/9 and by activating erk and rac signaling [J]. *Cytokine*, 2013,64(1) : 251 – 7.
- [7] Faura J, Bustamante A, Penalba A, et al. CCL23: a chemokine associated with progression from mild cognitive impairment to alzheimer's disease [J]. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2020,73(4) : 1585 – 95.
- [8] Hwang J, Son K, Kim C W, et al. Human cc chemokine ccl23, a ligand for ccr1, induces endothelial cell migration and promotes angiogenesis [J]. *Cytokine*, 2005,30(5) : 254 – 63.
- [9] Zhu Y, Gao X M, Yang J, et al. C-c chemokine receptor type 1 mediates osteopontin-promoted metastasis in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Science*, 2018,109(3) : 710 – 23.
- [10] Xiao L, Shi X Y, Zhang Y, et al. Yap induces cisplatin resistance through activation of autophagy in human ovarian carcinoma cells [J]. *Onco Targets Ther*, 2016,9: 1105 – 14.
- [11] Noguchi S, Saito A, Nagase T. Yap/taz signaling as a molecular link between fibrosis and cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2018,doi: 10.3390/ijms19113674.

CCR1/CCL23 axis is involved in human epithelial ovarian cancer cells cisplatin resistance

Sun Lei, Zhang Ying, Zhu Ying, et al

(*Dept of Gynaecology and Obstetrics, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022*)

Abstract Objective To investigate the role of CCL23 and CCR1 in human epithelial ovarian cancer cells cisplatin resistance. **Methods** The expression of CCL23 and CCR1 in human epithelial ovarian cancer cisplatin resistant cells C13K and cisplatin sensitive cells OV2008 was detected by Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) . CCL23 over expression vector was constructed in OV2008 cells and the positive clones were selected by puromycin. The transfection efficiency was observed by fluorescence microscopy and qRT-PCR. After treated with BX471(CCR1 antagonist) , cell proliferation and the half inhibitory concentration of cisplatin(IC₅₀) were assessed by plate clone formation assay and CCK-8 assay respectively. The protein expression of CCL23, CCR1 and YAP(yes-associated protein) was detected by Western blot. **Results** qRT-PCR showed that the expression of CCL23 and CCR1 in C13K cells was higher than that in OV2008 cells ($P < 0.01$) . Fluorescence microscopy showed that recombinant OV2008 cells were full of green fluorescence. The mRNA level of CCL23 in CCL23 overexpressing cells significantly increased ($P < 0.001$) which proved that the CCL23 gene over expression of OV2008 cells was successfully constructed, but the mRNA level of CCR1 had no significant change ($P > 0.05$) . Plate clone formation assay and CCK-8 assay showed that the proliferation ability and cisplatin resistance of OV2008 cell line overexpressing CCL23 increased compared to the empty vector of OV2008 cell line and normal OV2008 cell line ($P < 0.01$) . BX471 inhibited the expression of CCL23 and CCR1 , meanwhile, downregulated the expression of YAP. Cell proliferation was inhibited and cisplatin sensitivity increased after treated with BX471. **Conclusion** CCR1/CCL23 axis is involved in EOC cells cisplatin resistance and its mechanism may be related to the regulation of downstream effector YAP by CCL23 and CCR1.

Key words epithelial ovarian cancer; CCL23; CCR1; cisplatin resistance