

网络出版时间: 2019-3-22 16:44 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190321.1437.005.html>

## CCL18 对非小细胞肺癌细胞转录组的影响分析

许文娟, 宋雪燕, 丁璐, 孔帅, 徐光生, 王峰松

**摘要** 目的 拟探索在肺癌、乳腺癌等肿瘤组织中高表达的细胞趋化因子配体 18 (CCL18) 对非小细胞肺癌细胞 A549 转录组的影响, 分析其促进肿瘤发生发展的可能机制。方法

通过伤口愈合实验验证 CCL18 对 A549 迁移能力的影响; 通过提取总 RNA 进行测序的方法检测 CCL18 对转录组的影响; 通过 qPCR 对转录组测序结果进行验证。结果 趋化因子 CCL18 可促进包括 FOS、EGRI、FOSB 在内多个靶基因转录水平的改变, 检测结果显示与转录组测序结果一致。结论

CCL18 是一类特殊的在肺癌、乳腺癌等肿瘤组织中高表达的细胞趋化因子, 能够促进肿瘤细胞内多个基因转录或蛋白表达水平和活性的变化, 从而促进恶性肿瘤的发生和发展。

**关键词** 趋化因子配体 18; 非小细胞肺癌; 转录组

中图分类号 Q 28

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)03-0359-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.03.005

趋化因子配体 18 (chemokine CC-motif ligand 18, CCL18) 属于 C-C 结构趋化因子家族, 是一种参与炎症和免疫反应调节的 CCL 趋化因子, 主要由具有 M2 表型的单核细胞衍生细胞-肿瘤相关巨噬细胞分泌<sup>[1]</sup>, 其在血液或癌症间质中的表达与肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophages, TAMs) 转移和患者生存率降低密切相关。越来越多的证据显示: 旁分泌的 CCL18 在肿瘤的起始阶段起着非常重要的作用。CCL18 显示多种生物学功能, 包括趋化活性的适度激活<sup>[2]</sup>、免疫调节功能<sup>[3]</sup>、促进纤维化发展和癌症扩张等<sup>[4]</sup>。它的主要作用是结合并招募调节性 T 细胞, 抑制炎症趋化因子诱导的细胞吸引和将免疫细胞转化为抑制性细胞。

目前, 科学家们认为: 由于 CCL18 浓度、受体差异性表达或活化、所处环境和遗传背景的差异, CCL18 具有促炎或抗炎两种功能活性<sup>[5]</sup>。抗炎活性主要通过 CCL18 在健康人体中组成型的表达, 诱

导自适应调节性 T 细胞的产生而实现; 在过敏性哮喘、类风湿性关节炎、特发性肺纤维化等病患炎症条件下, 其则通过募集 Th2 细胞为主的炎症细胞来促进过敏性疾病的发生和发展, 从而达到促炎效果的发生。总体上, 从 CCL18 参与组织纤维化病变以及癌症发生和发展的观点来看, CCL18 可作为相关疾病诊断和预后的生物标志物以及临床上的治疗靶标。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 细胞系** A549 非小细胞肺癌细胞来源于美国模式培养物集存库 (ATCC)。

**1.1.2 主要试剂** DMEM、Opti-MEM 培养基购自美国 Invitrogen 公司; 血清购自美国 Hyclone 公司; 总 RNA 提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司。

**1.1.3 主要仪器** 二氧化碳培养箱 (型号: NU-5810E)、生物安全柜 (型号: NU-425-400S) 购自美国 NUAIRE 公司; 荧光定量 PCR 仪 (型号: Step One Plus ABI) 购自美国 Thermo 公司; 倒置荧光显微镜 (型号: DeltaVision) 购自美国 GE 公司; 微量核酸蛋白紫外分析仪 (型号: Genove Nano) 购自英国 JENWAY 公司。

#### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** A549 细胞培养于含 10% (V/V) 血清的达尔伯克改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 培养基 (含青霉素、链霉素双抗) 中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱培养。

**1.2.2 总 RNA 提取** 按照 Qiagen 试剂盒说明书的步骤标准进行, 并用微量核酸蛋白紫外分析仪对提取的总 RNA 进行测定, 计算总 RNA 的浓度。

**1.2.3 细胞划痕实验** 将 A549 细胞消化并铺展于细胞培养板中 (6 孔), 待细胞长至密度为 80% ~ 90%, 用含有 0.01% 牛血清白蛋白 (BSA) 的无血清培养基对细胞进行饥饿过夜处理; 利用灭菌的枪头在铺满细胞的培养皿上划线, 并将漂浮的细胞清洗干净; 加入含有 CCL18 (终浓度 40 ng/ml) 的无血清培养基于 37 °C 培养, 取划痕整齐、相对干净的损伤

2018-09-28 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81572283)

作者单位: 安徽医科大学生命科学院, 合肥 230032

作者简介: 许文娟, 女, 硕士研究生;

王峰松, 男, 博士, 副教授, 责任作者, E-mail: fengsongw@ahmu.edu.cn

区域为倒置显微镜下拍摄视野。在划痕后 0、12 h 对同一拍摄视野进行拍摄,以 0 h 时间点的平均划痕距离为 1 个单位,分别计算 12 h 内 A549 细胞迁移后多个点的划痕间距,取平均值。以上实验重复 3 次,每次 2 组。

**1.2.4 转录组测序** 以未经 CCL18 处理的细胞 A549C 为对照组,A549 细胞经 CCL18(终浓度 40 ng/ml)处理 24 h 后的 A549T 为处理组,收集样品,各 3 个生物学重复,每样品约含有  $2 \times 10^7$  个细胞,提取总 RNA 并检测后进行转录组测序,从样本提取到上机测序,严格检测样本。

**1.2.5 定量 Real-time PCR 检测** 检测 FOS、EGR1、FOSB 在 mRNA 水平的表达:① 所用引物均为华大基因公司合成,序列见表 3, $\beta$ -actin Sense: 5'-GGGACCTAGCTAACTACGTC-3'; Antisense: 5'-CAGTGATCTCTTTCTGCATC-3'。② 使用 TaKaRa 公司的 PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) 试剂盒,进行逆转录和 RT-PCR。③ 逆转录:按照试剂盒的要求配制逆转录反应液,总体系 10  $\mu$ l,总 RNA 总量最大不可超过 500 ng,轻柔混匀后按照 37  $^{\circ}$ C、15 min,85  $^{\circ}$ C、5 s,4  $^{\circ}$ C 的条件进行逆转录。④ 实时定量 PCR:选择 TaKaRa 公司试剂盒中的 TB GreenPremix Ex TaqII 进行操作,按照说明书配置反应液,总体系 20  $\mu$ l,其中 TB GreenPremix Ex TaqII(2  $\times$ ) 10  $\mu$ l,上下游引物各 1  $\mu$ l,逆转录反应模板(cDNA) 2  $\mu$ l,ROX Reference Dye 0.4  $\mu$ l,无菌去离子水 6  $\mu$ l。⑤ 根据 Step One Plus Real-Time PCR System(ABI) 的使用说明书进行操作仪器,具体 PCR 扩增条件为:预变性 95  $^{\circ}$ C、10 s,40 个循环反应:95  $^{\circ}$ C、5 s,60  $^{\circ}$ C、34 s,荧光信号在 60  $^{\circ}$ C 采集。⑥ 分析数据并绘制条形图。本实验重复 3 次,每次 3 个生物学重复。

**1.2.6 定量 PCR 数据分析** 采用  $\Delta\Delta CT$  法来分析各基因的相对表达差异倍数。根据 Real-time PCR 系统软件输出的相应的 CT 值,按照  $\Delta\Delta CT$  法计算: $\Delta\Delta CT = (\text{靶基因 CT 值} - \text{内参 CT 值})_{\text{处理组}} - (\text{靶基因 CT 值} - \text{内参 CT 值})_{\text{对照组}}$ ;与对照组比较,处理组中靶基因相对表达差异倍数的计算公式为: $N_{(\text{处理组}/\text{对照组})} = 2^{-\Delta\Delta CT}$ 。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 和 Graphpad Prism 6 和 Microsoft Excel 软件进行统计分析。计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示。根据不同数据特性,分别使用 Two-tailed Student's *t* 检验计算显著性差异。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 CCL18 对 A549 细胞迁移能力作用检测** 划痕实验结果如图 1A,根据方法 1.2.3 计算出 A549 细胞在划痕 12 h 后的整体划痕间距,结果显示经 DMEM + CCL18 组的 A549 细胞在 12 h 的伤口愈合的速度明显比 DMEM 组快( $t = 12.327, P < 0.001$ )。见图 1B。

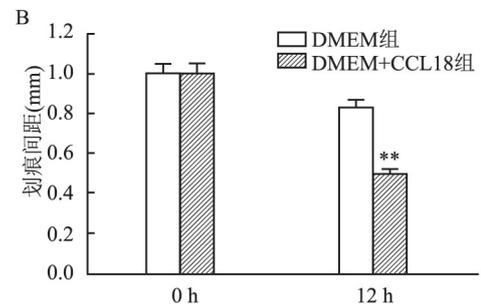
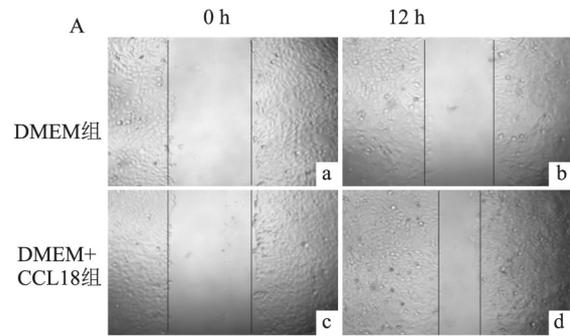


图 1 CCL18 对 A549 细胞迁移能力的影响

A: 划痕实验观察 DMEM 组与 DMEM + CCL18 组细胞的迁移情况  $\times 200$ ; a: DMEM 组 0 h 迁移情况; b: DMEM 组 12 h 迁移情况; c: DMEM + CCL18 组 0 h 迁移情况; d: DMEM + CCL18 组 12 h 迁移情况; B: CCL18 处理 0、12 h 后细胞划痕间距统计分析;与 DMEM 组比较: \*\*  $P < 0.01$

**2.2 CCL18 刺激 A549 细胞转录组变化情况检测与分析** 本课题组将转录组原始数据过滤后与基因组进行比对,通过 Bowtie2 建立参考基因组索引,然后使用 Tophat2 将过滤后的读数比对到参考基因组上,得到序列比对的基本信息统计,见表 1。基因表达模式分析,得到 RPKM 密度分布图,中等表达的基因占绝大多数,低表达和高表达的基因占比相对较小。R 语言 Pheatmap 软件包对样品和差异表达基因进行双向聚类分析,并采用 Euclidean 方法计算距离,层次聚类最长距离法(Complete Linkage)进行聚类,得到差异表达基因聚类图,见图 2。

采用 DESeq( version 1.18.0) 对基因表达进行差异分析,筛选差异表达基因的条件定义为:表达倍数差异  $\log_2\text{fold-change} > 1, P < 0.05$ 。通过数据分

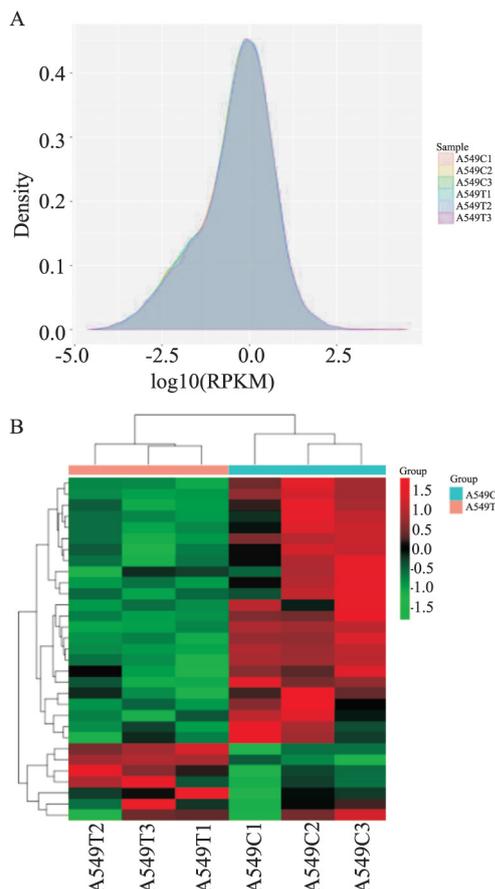


图2 转录组测序结果生物信息学初步分析结果

A: RPKM 密度分布图; B: 差异表达基因聚类分析图; 红色: 代表高表达水平基因; 绿色: 低表达水平基因

析,本研究得到了一系列的基因表达量的变化数据,其中 CCL18 刺激 24 h 的 A549 细胞中有 10 个基因转录水平呈现明显上调,另外有 21 个基因转录水平下调,具体基因见表 2、3。

**2.3 实时定量 PCR 检测蛋白表达水平** 荧光定量 PCR 结果显示,与 A549C 组比较,A549T 组中的 *FOS*、*EGR1*、*FOSB* 基因转录水平变化与转录组测序结果一致,其中 *FOS* ( $t = 3.818, P = 0.019$ )、*EGR1* ( $t = 5.616, P = 0.005$ )、*FOSB* ( $t = 10.235, P = 0.001$ ) 见图 3。引物序列见表 4。

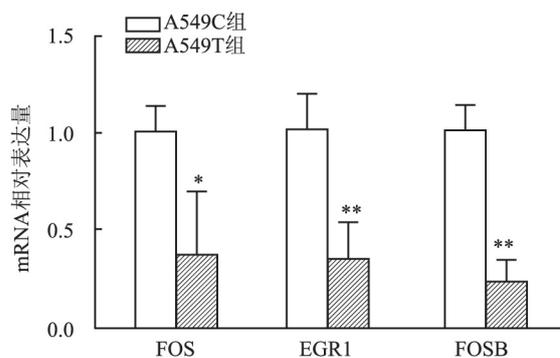


图3 CCL18 刺激 A549 细胞 24 h *FOS*、*EGR1*、*FOSB* mRNA 表达的变化  
与 A549C 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

表1 RNASeq Map 统计结果

样品名称	有效 读数	比对事件 总数	比对成功读段 总数	比对成功读段 总数占比	比对到多个 位置读长数目	比对到多个位置 读长占比	比对到唯一 位置读长数目	比对到唯一 位置读长占比
A549C1	45935490	40870511	38578285	83.98	904066	2.34	37674219	97.66
A549C2	43743652	38112695	36108361	82.55	834639	2.31	35273722	97.69
A549C3	44105142	38705931	36645333	83.09	835282	2.28	35810051	97.72
A549T1	47016950	41035367	39292659	83.57	815283	2.07	38477376	97.93
A549T2	46431366	40723736	38881235	83.74	831004	2.14	38050231	97.86
A549T3	42659420	37960881	35900289	84.16	831103	2.32	35069186	97.68

表2 转录上调基因列表

A549C	A549T	倍数变化	P 值	染色体	名称
8.16532277	21.86614018	2.67792723	0.00701715	12	<i>ADGRD1</i>
7.05641016	20.81298423	2.94951452	0.00494413	9	<i>CD274</i>
11.47226534	24.15464489	2.10548172	0.02587043	1	<i>SLC44A5</i>
6.18588916	15.57544616	2.51789933	0.03011459	8	<i>FOXH1</i>
3.47223683	10.96472805	3.15782839	0.03148229	3	<i>HESX1</i>
0.69405431	5.18692417	7.47336922	0.04469026	7	<i>KIAA1324L</i>
5.77959802	17.75587015	3.07216351	0.00924831	3	<i>ACAD11</i>
2.77291630	9.75510906	3.51799621	0.03290045	7	<i>AQP1</i>
1.33937706	7.53774099	5.62779606	0.03504964	5	<i>PCDHA11</i>
4.14719157	13.16131342	3.17354846	0.01959754	X	<i>TMSB15B</i>

表3 转录下调基因列表

A549C	A549T	倍数变化	P 值	染色体	名称
8. 92390728	2. 29435382	0. 25710194	0. 03341327	7	MRPS24
7. 17493812	0. 68402683	0. 09533557	0. 00705885	19	FAM83E
6. 45981896	0. 97617020	0. 15111417	0. 02685503	12	OAS2
573. 79814837	116. 73684262	0. 20344583	2. 94712E-3	5	EGR1
31. 13554449	14. 58609003	0. 46847069	0. 00916354	11	RAB38
2035. 95355324	390. 09411590	0. 19160266	7. 50327E-4	19	FOSB
8. 46888458	1. 93107370	0. 22801985	0. 02803252	3	C3orf20
20. 54827352	7. 88783509	0. 38386851	0. 02286601	2	SIX3
3. 37807466	0	0	0. 03603448	17	C17orf64
21. 57158066	9. 76978271	0. 45290064	0. 02507407	3	TM4SF19
8. 73754818	1. 93841062	0. 22184835	0. 02231124	10	CDHR1
9. 34599703	1. 92373697	0. 20583530	0. 02016176	16	CDH8
14. 39137634	5. 44387115	0. 37827314	0. 03556867	10	ENKUR
15. 64382269	6. 56965147	0. 41995180	0. 03826866	1	HFM1
13. 26996607	5. 20234168	0. 39203881	0. 04614039	10	C10orf10
9. 48756552	1. 89513354	0. 19974919	0. 01367710	15	SPINT1
23. 90990956	10. 91560187	0. 45653045	0. 02063270	15	FAM227B
1775. 65783643	708. 3928156	0. 39894669	2. 12576E-1	14	FOS
16. 18114991	6. 89699124	0. 42623616	0. 03534494	6	LRRC73
28. 47259943	11. 03660856	0. 38762209	0. 00239654	X	ZNF630
19. 30242908	6. 85445802	0. 35510857	0. 00757144	10	KLLN

表4 qPCR 引物序列

靶基因	引物序列(5'-3')
FOS	正义链: CACTCCAAGCGGAGACAGAC
	反义链: AGGTCATCAGGGATCTTGCAG
EGR1	正义链: ACCCCTCTGCTACTATTAAGGC
	反义链: TGGGACTGCTAGCTGCTATTG
FOSB	正义链: GCTGCAAGATCCCTACGAAG
	反义链: ACGAAGAAGTGTACGAAGGGTT

### 3 讨论

肿瘤是导致人类死亡的主要原因之一,随着技术的发展,肿瘤的细化类型以及发病机制越来越被大家所认识多样。在肿瘤微环境中最常见的免疫细胞是肿瘤相关性巨噬细胞,肿瘤相关巨噬细胞的水平与肿瘤的不良预后具有相关性,其分泌的趋化因子对新血管的形成、白细胞的招募和定位均具有非常重要的作用<sup>[6]</sup>。趋化因子是一种低分子量的细胞因子,与许多生命活动过程有关。CCL 趋化因子属于趋化因子家族,它通过一个由七次跨膜的 G 蛋白偶联受体组成的亚家族来指导白细胞在稳态和炎症中的定向迁移<sup>[7]</sup>,在肿瘤进展中起着关键作用。

CCL18 是近几年肿瘤相关领域研究的一个热点,它由组织驻留的抗原呈递细胞响应多种环境刺激而产生并可诱导免疫耐受。CCL18 具有炎症调节功能,包括募集并介导 Th2 细胞和嗜碱细胞、嗜碱性粒细胞的活化和巨噬细胞的成熟,并参与环境暴露

诱发的炎症反应。CCL18 在乳腺癌和肺癌中高度表达<sup>[6]</sup>。本课题组通过划痕实验得到结果显示 CCL18 在一定程度上促进了 A549 细胞的迁移,从表观遗传学的角度来看 CCL18 可能会对细胞内基因的转录水平产生调控作用。为此,本课题组分别对三组 CCL18 处理和未处理的 A549 细胞进行转录组测序,初步数据分析,CCL18 可促进包括 FOS、EGR1、FOSB 在内多个靶基因转录水平的下调,荧光定量 PCR 检测结果显示与转录组测序结果一致。

FOS 和 FOSB 同属于 Fos 基因家族成员(4 个成员: FOS/c-Fos、FOSB、FOSL1、FOSL2),它们能被生长因子、氧化应激等许多因素激活,同 JUN 蛋白家族结合形成二聚体,组装成激活蛋白-1(activating protein 1,AP-1)早期基因编码核转录因子复合物,特异性结合 5'-TGAGTCA-3'元件,调节下游基因的转录。在一些肿瘤组织(包括炎性乳腺癌、子宫内膜癌、结肠癌等)中,FOS 和 FOSB 表达水平高于癌旁组织,而在一些卵巢癌、胃癌、结直肠癌、慢性髓细胞性白血病、原发性乳腺癌等病患组织样品中,FOS/c-Fos 可能作为肿瘤抑制因子存在,随着肿瘤的发生和发展其表达水平呈下调趋势<sup>[8]</sup>。在肺癌中也有结果显示在癌前病变及早期癌中 c-Fos 表达却明显高于中、晚期癌<sup>[9]</sup>。多种参与肿瘤细胞侵袭性生长的基因的表达被报道可能受到 AP-1 活性的调控,包括通过促进 SMAD3/SMAD4/JUN/FOS 复合

物的形成来调节 TGF- $\beta$  介导的信号通路的活性, 从而在肿瘤形成和发展过程中, 通过抑制细胞分化、促进细胞增殖和转移能力而发挥重要作用。同时, AP-1 组分对细胞凋亡也具有调节功能, 但它会根据细胞类型的差异和凋亡刺激信号种类的不同而产生促进或拮抗作用。在本研究中, 由于 CCL18 的刺激, 非小细胞肺癌 A549 细胞 *FOS* 和 *FOSB* 转录水平显著降低, 这种变化是否会随着 CCL18 处理时间、浓度和细胞类型的不同带来结果上的差异以及具体分子机制仍有待于进一步的研究。

EGR1 是一种多功能性的转录调节因子, 在不同肿瘤组织的具体功能取决于其下游调节靶基因的差异。已有研究表明, 其在非小细胞肺癌中 EGR1 可以通过结合到 KRT18 的启动子上调节 KRT18 蛋白的表达水平从而削弱恶性肿瘤的发展<sup>[10]</sup>。综上所述显示: CCL18 作为肿瘤微环境中的重要一员, 它可通过对 *FOS*、*FOSB*、*EGR1* 三个具有转录调节功能关键靶基因转录水平的抑制性调控从而促进非小细胞肺癌的发生与发展。

#### 参考文献

- [1] Shi L, Zhang B, Sun X, et al. CC chemokine ligand 18 (CCL18) promotes migration and invasion of lung cancer cells by binding to Nir1 through Nir1-ELMO1/DOC180 signaling pathway [J]. *Mol Carcinog* 2016, 55(12): 2051–62.
- [2] Chenivresse C, Tsiopoulos A. CCL18-beyond chemotaxis [J]. *Cytokine* 2018, 109: 52–6.
- [3] Eriksson H D, Petrus P, Gao H, et al. Adipose and circulating CCL18 levels associate with metabolic risk factors in women [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016, 101(11): 4021–9.
- [4] Pivaresi A, Gombert M, Dieu-Nosjean M C, et al. CC chemokine ligand 18, an atopic dermatitis-associated and dendritic cell-derived chemokine, is regulated by staphylococcal products and allergen exposure [J]. *J Immunol* 2004, 173(9): 5810–7.
- [5] Tsiopoulos A, Chang Y, Ait Yahia S, et al. Role of CCL18 in asthma and lung immunity [J]. *Clin Exp Allergy*, 2013, 43(7): 716–22.
- [6] Chen J, Yao Y, Gong C, et al. CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PTPN3 [J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(4): 541–55.
- [7] Islam S A, Ling M F, Leung J, et al. Identification of human CCR8 as a CCL18 receptor [J]. *J Exp Med*, 2013, 210(10): 1889–98.
- [8] Trop-Steinberg S, Azar Y. AP-1 expression and its clinical relevance in immune disorders and cancer [J]. *Am J Med Sci*, 2017, 353(5): 474–83.
- [9] Kogan E A, Shtabskii A B, Sekamova S M, et al. Nuclear oncoprotein expression in lung precancer and cancer at various stages of tumor progression studies at the level of light- and electron-immunohistochemistry [J]. *Arkh Patol*, 1994, 56(6): 44–9.
- [10] Zhang H, Chen X, Wang J, et al. EGR1 decreases the malignancy of human non-small cell lung carcinoma by regulating KRT18 expression [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 5416.

## The effect of chemokine CCL18 on the transcriptome of NSCLC

Xu Wenjuan, Song Xueyan, Ding Lu, et al

(Dept of Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To investigate the role of chemokine CCL18, which is high-expressed in lung cancer and breast cancer, in transcription regulation of non-small lung cancer cell A549, and further to analyze the possible mechanisms of CCL18 in tumorigenesis and development. **Methods** Wound healing experiment was used to detect the effect of CCL18 on A549 cell migration. The effect of CCL18 on transcriptome was determined by sequencing analysis of total RNA of A549 cells. The results were verified by quantitative Real-time PCR/qPCR. **Results** Chemokine CCL18 could promote the changes in the transcription levels of multiple target genes including *FOS*, *EGR1* and *FOSB*. Gene expression analysis of A549 by qPCR was consistent with the sequencing results of transcriptome. **Conclusion** CCL18 is a kind of special chemokine that is highly expressed in lung cancer, breast cancer and other tumor tissues. Overexpression of CCL18 could change the transcription and protein expression levels of multiple genes in tumor cells and promote the tumorigenesis and development.

**Key words** CCL18; non-small lung cancer; transcriptome