

· 基础研究 ·

肥大细胞通过 TGF- β /MMP2 信号通路促进肾癌细胞侵袭迁移的研究

陈玉乐, 吕伟, 杨文杰, 刘天杰, 李磊

(西安交通大学第一附属医院泌尿外科, 陕西西安 710061)

Mast cells promote invasion and migration of renal carcinoma cells through TGF β /MMP2 signaling pathway

CHEN Yu-le, LÜ Wei, YANG Wen-jie, LIU Tian-jie, LI Lei

(Department of Urology, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the effects of mast cells on invasion and migration of renal cell carcinoma (RCC) and the molecular mechanism. Methods The conditioned medium of human mast cell line HMC-1 was extracted and used to culture renal cell carcinoma OSRC-2 cells. Transwell assay was used to detect the migration and invasion of OSRC-2 cells *in vitro*. Real time RT-PCR and Western blot assays were performed to determine MMP2 and MMP9 expressions. Then migration, invasion and MMP2 expression of OSRC-2 cells were evaluated after treatment with TGF- β , or HMC-1 conditioned medium plus TGF- β signal inhibitor SB431542. Results HMC-1 conditioned medium significantly enhanced migration and invasion capacity of OSRC-2 cells *in vitro*. MMP2 expression of OSRC-2 cells could be induced by exogenous TGF- β or HMC-1 conditioned medium. HMC-1 conditioned medium-mediated OSRC-2 migration and invasion could be abrogated by SB431542. Conclusion Mast cells promote invasion and migration of renal carcinoma cells through TGF- β /MMP2 signaling pathway.

KEY WORDS: renal carcinoma; mast cells; invasion; metastasis; transforming growth factor β ; matrix metalloproteinase 2

摘要:目的 探讨肥大细胞对肾癌侵袭迁移能力的影响及分子机制。方法 提取人肥大细胞系 HMC-1 的条件培养基并用其培养肾癌 OSRC-2 细胞,通过 Transwell 实验检测 OSRC-2 细胞体外迁移及侵袭能力的变化;采用实时定量聚合酶链反应(real time RT-PCR)及 Western blot 实验检测 OSRC-2 细胞基质金属蛋白酶 2(MMP2)和基质金属蛋白酶 9(MMP9)的 mRNA 和蛋白的表达变化;通过人 TGF- β 重组蛋白处理 OSRC-2 细胞,并通过 real time RT-PCR 检测 MMP2 mRNA 的表达变化;TGF- β 信号抑制剂 SB431542 与 HMC-1 条件培养基联合处理 OSRC-2 细胞,通过 real time RT-PCR 检测 OSRC-2 细胞 MMP2 mRNA 的表达变化,通过 Transwell 实验检测 OSRC-2 细胞体外迁移及侵袭能力变化。结果 HMC-1 条件培养基可显著提高 OSRC-2 细胞的体外迁移及侵袭能力并促进 MMP2 表达。人 TGF- β 重组蛋白亦可促进 OSRC-2 细胞 MMP2 表达。加入 TGF- β 信号抑制剂 SB431542 可抑制 HMC-1 条件培养基引起的 OSRC-2 细胞 MMP2 表达及体外侵袭迁移。结论 肥大细胞可通过分泌 TGF- β 上调肾癌细胞 MMP2 表达,进而促进侵袭转移。

关键词:肾癌;肥大细胞;侵袭;转移;转化生长因子 β ;基质金属蛋白酶 2

中图分类号:R737.11

文献标志码:A

DOI:10.3969/j.issn.1009-8291.2019.11.017

肾癌是泌尿系统肿瘤中死亡率最高的疾病,约 1/3 的肾癌患者会因肿瘤转移而死亡^[1]。进一步阐明肾癌侵袭转移的分子机制对于提高肾癌治疗效果具有积极意义。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)类,如基质金属蛋白酶 2(MMP2)和基质金属蛋白酶 9(MMP9)在肾癌等肿瘤转移中发挥重要作用^[2]。研究表明,肿瘤细胞和间质细胞之间的相互作用与肿瘤进展过程关系密切。既往研究中我们发现,肥大细胞这一特殊类型间质

细胞在肾癌组织中聚集并对肾癌血管形成过程产生影响^[3]。国内有学者初步发现肥大细胞可促进肾癌的侵袭迁移^[4]。然而,肥大细胞是否可通过 MMPs 影响肾癌侵袭转移尚不清楚。本研究通过体外实验初步探讨了肥大细胞对肾癌体外侵袭迁移与 MMPs 的影响以及可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与抗体 逆转录试剂盒及 SYBR Premix Ex Taq II 购自宝生物(大连)有限责任公司。Fast200 总 RNA 极速抽提试剂盒购自上海飞捷生物技术有限公司。Dulbecco's Modified Eagle Media-

收稿日期:2019-05-06

修回日期:2019-07-30

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 81872093)

通信作者:李磊,研究员,主任医师。E-mail:lilydr@163.com

作者简介:陈玉乐(1983-),男(汉族),博士,助理研究员。研究方向:泌尿系肿瘤进展分子机制。E-mail:cylxdwyd@126.com

F12 (DMEM-F12) 培养基及 Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) 培养基购自 Gibco 公司。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自杭州四季青公司。Millicell 小室购自 Millipore 公司。重组人 TGF- β 蛋白购自 R&D 公司,溶解于无菌磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS),使用时以 0 nmol/L(对照)、100 nmol/L、400 nmol/L 等终浓度培养细胞。MMP2、MMP9 及 GAPDH 抗体购自 Abcam 公司。Matrigel 购自 BD 公司。SB431542 购自 Selleck 公司,溶解于二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),使用时以 100 nmol/L 终浓度培养细胞。

1.2 细胞培养 人肾癌 OSRC-2 细胞系由西安交通大学泌尿外科研究所冻存保种,于含 100 mL/L FBS 的 DMEM-F12 常规培养。人肥大细胞 HMC-1 细胞系购自 ATCC 公司,于含 100 mL/L FBS 的 IMDM 常规培养。培养箱条件为 37℃、5%CO₂(体积分数)。

1.3 HMC-1 细胞条件培养基收集 取对数生长期的 HMC-1 细胞, PBS 离心洗涤后以不含 FBS 的 DMEM-F12 悬浮。调整细胞浓度后以 5×10^6 个/皿的密度接种到 10 cm 培养皿,培养基为 10 mL 不含 FBS 的 DMEM-F12。培养 24 h 后用孔径为 0.44 μ m 的滤器过滤细胞上清液。使用时与新鲜无 FBS 的 DMEM-F12 按 1 : 1 混合后再加入 100 mL/L 的 FBS,对照组则用新鲜 DMEM-F12 加入 100 mL/L 的 FBS。

1.4 RT-PCR 实验 采用 RT-PCR Fast200 总 RNA 极速抽提试剂盒提取细胞总 RNA,定量后按 400 ng 上样量进行逆转录反应。定量逆转录反应产物后调整浓度为 0.2 g/L,按 1 μ L 上样量(即 200 ng)以 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 real time RT-PCR 反应。PCR 反应引物序列如下:GAPDH 上游 5'-ATGGGGAAGGTGAAGGTCGG-3',下游 5'-GACGGTGCCATGGAATTTGC-3';MMP2 上游 5'-ACAAAGAGTTGGCAGTGCAATA-3',下游 5'-CCGCATGGTCTCGATGGTAT-3';MMP9 上游 5'-GTCATCCAGTTTGGTGTCGC-3',下游 5'-GGACCACAACCTCGTCATCGT-3'。

1.5 Transwell 迁移实验 胰酶消化 OSRC-2 细胞,加入含 100 mL/L FBS 的 DMEM 终止消化。PBS 洗细胞 3 次以去除 FBS。无 FBS DMEM-F12 重悬细胞后计数并调整细胞密度至 1.25×10^5 个/mL。

向 millicell 小室的上室加入 200 μ L 细胞悬液,即 2.5×10^4 个 OSRC-2 细胞。下室加入含 100 mL/L FBS 的 DMEM-F12。随后将培养板置于培养箱内培养 24 h。取出 millicell 小室,用棉签擦去上室的细胞。PBS 洗小室 3 次后将下室细胞置于多聚甲醛固定液中固定 10 min。再用 PBS 洗小室 3 次,随后将下室置于 1 mL/L 结晶紫溶液染色 5 min。PBS 洗去残留结晶紫后置于显微镜下观察。取 10 个随机视野($\times 200$)计数穿膜细胞个数并以其平均数代表体外迁移能力。

1.6 Transwell 侵袭实验 无 FBS DMEM-F12 以 1 : 5 的比例稀释 matrigel,以 50 μ L/孔铺于 millicell 小室的上室,置于 37℃培养箱 4 h 使其凝固。随后向上室加入 1×10^5 个无 FBS DMEM-F12 悬浮的 OSRC-2 细胞,下室加入含 100 mL/L FBS 的 DMEM-F12。其余操作同 Transwell 迁移实验。

1.7 Western blot 实验 胰酶消化 OSRC-2 细胞,计数后以 2×10^6 个/皿的密度接种于 10 cm 培养皿。培养箱培养 6~8 h 使细胞贴壁。随后弃培养上清,加入含或不含 HMC-1 细胞条件培养基的 DMEM-F12 培养 48 h,用人膀胱癌 UMUC-3 细胞系总蛋白用作 MMP9 阳性对照。蛋白提取及 Western blot 实验按照课题组所在实验室常规步骤进行^[5]。MMP2、MMP9 及 GAPDH 一抗分别按 1 : 1 000、1 : 1 000 及 1 : 10 000 进行稀释。免疫印迹结果通过 odyssey 显影系统进行显影。

1.8 统计学分析 所有实验重复 3 次,所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 Graphpad 6.0 软件通过 *t* 检验对两组间差异进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肥大细胞对肾癌细胞体外侵袭转移能力的影响

提取肥大细胞 HMC-1 的条件培养基,并用其培养人肾癌 OSRC-2 细胞 48 h 后通过 Transwell 实验检测了 OSRC-2 细胞体外迁移及侵袭能力变化(图 1A)。体外迁移实验显示对照组及 HMC-1 条件培养基处理组穿膜细胞数分别为 (78.33 ± 9.02) 个和 (500.3 ± 35.88) 个,差异有统计学意义($P < 0.05$);体外侵袭实验显示对照组及 HMC-1 条件培养基处理组穿膜细胞数分别为 (51.33 ± 13.37) 个和 (302.70 ± 22.56) 个,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 1B)。

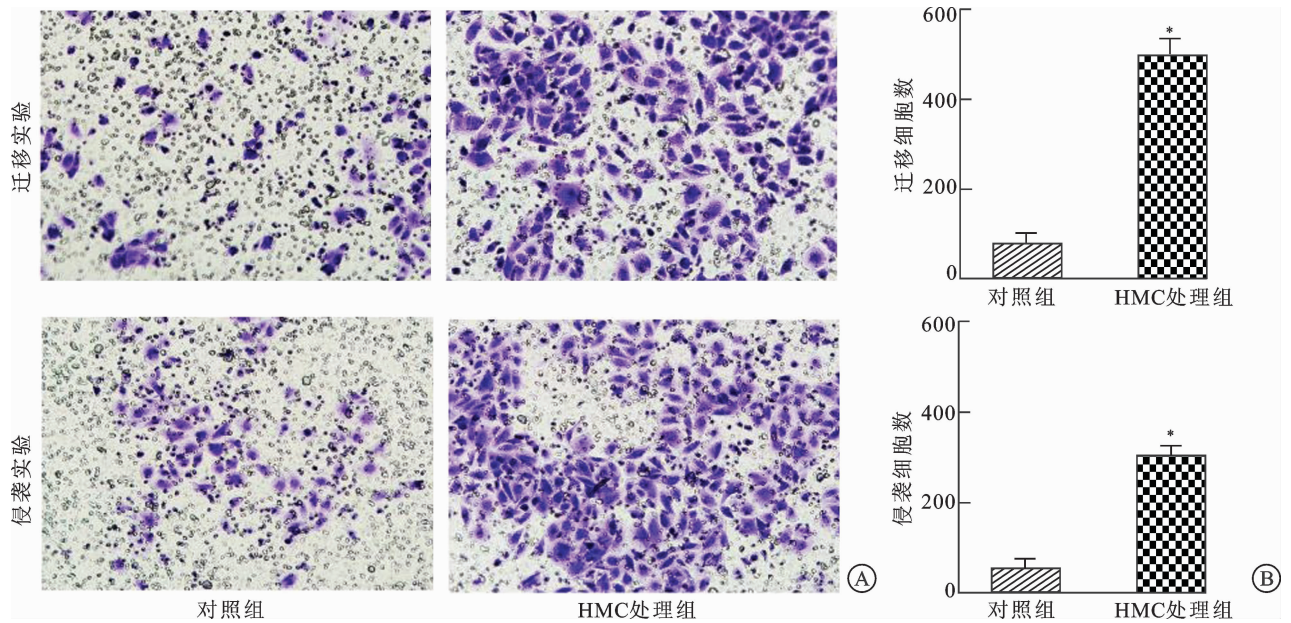


图1 肥大细胞对肾癌细胞体外迁移、侵袭能力的影响

A: Transwell 迁移和侵袭细胞实验图; B: 体外迁移和侵袭实验细胞计数及其柱状图 * $P < 0.05$ 。

2.2 肥大细胞对肾癌细胞体外 MMP2、MMP9 表达的影响 通过 real time RT-PCR 实验检测经 HMC-1 条件培养基处理后 OSRC-2 细胞 MMP2、MMP9 表达变化,发现肥大细胞可显著促进 OSRC-2 细胞 MMP2 mRNA 表达,但对 MMP9 mRNA 表达无明显

影响(图 2A)。Western blot 实验进一步证实经 HMC-1 条件培养基处理后 OSRC-2 细胞 MMP2 蛋白表达水平明显上升。但在两组细胞中均未检测到 MMP9 蛋白表达(图 2B)。

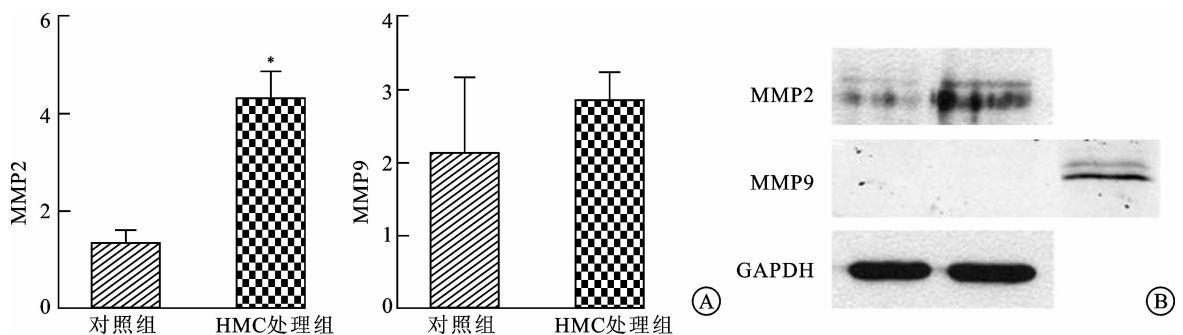


图2 肥大细胞对肾癌细胞 MMP2、MMP9 表达的影响

A: RT-PCR 检测结果, * $P < 0.05$; B: Western blot 检测结果。

2.3 TGF- β 信号在肥大细胞介导的肾癌侵袭迁移及 MMP2 表达中的作用 不同浓度重组人 TGF- β 蛋白处理 OSRC-2 细胞 48 h,提取总 RNA 后通过 real time RT-PCR 实验检测 MMP2 表达情况,结果表明 TGF- β 可呈浓度依赖性地促进 OSRC-2 细胞 MMP2 表达(图 3A)。随后在普通培养及 HMC-1 条件培养基培养的 OSRC-2 细胞加入 TGF- β 信号抑制剂 SB431542,经 real time RT-PCR 实验发现 SB431542

可抑制 HMC-1 条件培养基引起的 MMP2 上调,但对普通培养的 OSRC-2 细胞 MMP2 表达无明显抑制作用(图 3B)。这一结果表明肥大细胞可通过分泌 TGF- β 促进肾癌细胞 MMP2 表达。此外,通过 Transwell 实验进一步发现,SB431542 可抑制 HMC-1 条件培养基引起的 OSRC-2 细胞体外迁移及侵袭(图 3C、D)。

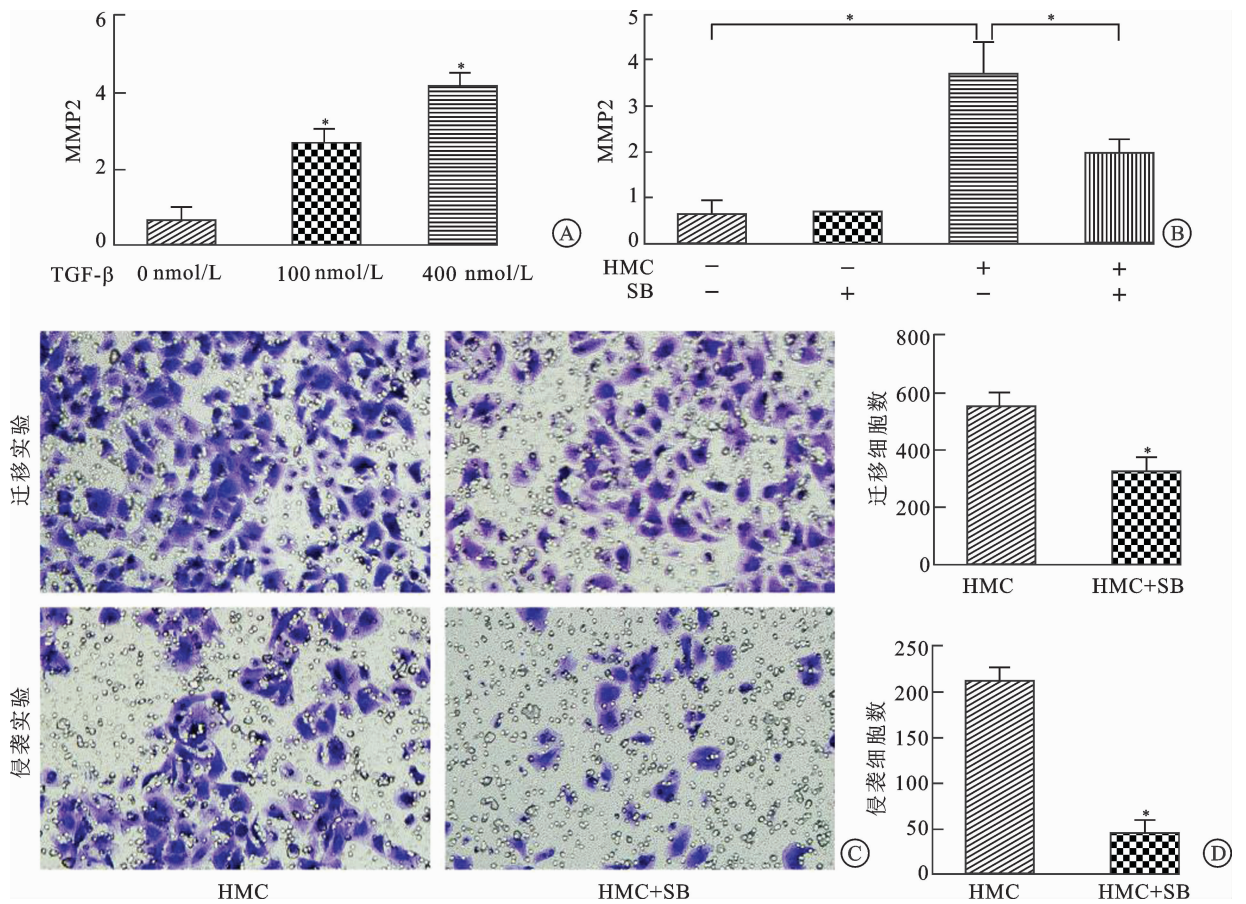


图3 TGF-β信号在肥大细胞诱导的肾癌侵袭迁移及MMP2表达中的作用

A: real time RT-PCR 检测外源性 TGF-β 对 OSRC-2 细胞 MMP2 表达的影响, * $P < 0.05$; B: real time RT-PCR 检测 SB431542 对 HMC-1 条件培养基诱导的 OSRC-2 细胞 MMP2 表达的影响, * $P < 0.05$; C: Transwell 实验检测 SB431542 对 HMC-1 条件培养基诱导的 OSRC-2 细胞体外外迁移、侵袭的影响; D: 迁移和侵袭细胞计数, * $P < 0.05$ 。

3 讨论

肿瘤转移是一个极其复杂的过程,大致需要经历脱离原发病灶、穿过基底膜进入血管、随血液循环流动、逸出血管到达远隔组织并形成转移灶等多个步骤^[6]。肿瘤细胞离开原发部位后,必须降解并穿过介于肿瘤细胞与血管内皮细胞之间的由细胞外基质组成的基底膜才能进入血管,实现远处转移。研究发现,包括肾癌细胞在内的多种实体肿瘤细胞均可分泌多种蛋白酶,如 MMPs、丝氨酸蛋白酶等。这些酶类可有效降解细胞外基质,从而有助于肿瘤转移。其中,MMP2 和 MMP9 是研究较多的蛋白酶类成员,可显著促进肾癌的侵袭转移^[7]。MMPs 隶属锌依赖性肽链内切酶,可降解细胞外基质的多种成分,如胶原、纤维连接蛋白等^[8]。MMPs 对细胞外基质的降解一方面可消除肿瘤侵袭屏障,使肿瘤更易侵犯邻近组织;另一方面,细胞外基质降解后细胞因子的释放也可促进肿瘤生长及血管形成^[8]。此外,MMPs 也可通过切割细胞粘附关键分子等机制改变肿瘤细胞的运动能力。例如 MMP2 对层黏蛋白 5 的剪切可促

进肿瘤的运动能力^[9]。

TGF-β 是肿瘤微环境中的重要成分之一,可由肿瘤细胞及间质细胞等多种成分分泌^[2]。TGF-β 介导的下游信号激活是 MMP2 表达的重要调控因素之一^[10]。同时,肥大细胞可通过分泌 TGF-β 参与多种病理生理过程^[11]。TGF-β 与其受体结合后可通过 Smad 依赖或非依赖方式介导信号转导,调控肿瘤侵袭转移^[12]。早期研究表明,TGF-β 在肾癌等肿瘤具有较高的表达水平,且血清与尿中的 TGF-β 水平与肾癌患者预后呈负相关^[13]。近年来的多项研究表明,TGF-β 在肾癌侵袭转移中具有重要作用,其机制包括诱导上皮细胞间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)和干细胞表型^[14]、Fascin1 的表达等^[15]。在胶质瘤等恶性肿瘤中,TGF-β 介导的 MMP2 和 MMP9 表达也是其促进肿瘤侵袭转移的重要机制^[10]。此前已有学者发现肾癌组织中的 TGF-β 表达与 MMP2 呈正相关^[16]。在本研究中,我们通过添加外源性 TGF-β 处理肾癌 OSRC-2 细胞系,发现 MMP2 转录水平上调,提示肾癌中 TGF-β 也可能通过促进 MMP2 表达参与侵袭转移。

近几年来,间质成分在肿瘤发生与发展中的作用引起了科学界的广泛关注。一方面,肿瘤细胞可通过分泌趋化因子招募并激活间质细胞,导致间质细胞在肿瘤微环境中聚集和成熟。另一方面,间质细胞分泌的大量活性介质又可促进肿瘤细胞的恶性生物学行为,包括增殖、转移和血管形成等^[17]。作为肿瘤微环境中的重要一员,肥大细胞可分泌多种具有促进血管形成作用的活性分子,包括血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、成纤维细胞生长因子2(fibroblast growth factor 2, FGF2)和组胺等^[18]。我们的前期研究证实,肥大细胞可在肾癌组织聚集并促进肾癌血管形成以及抗血管靶向治疗抵抗^[3]。在本研究中,我们通过肥大细胞 HMC-1 细胞系的条件培养基处理肾癌 OSRC-2 细胞,发现肥大细胞条件培养基可明显提高肾癌细胞的体外侵袭迁移水平,表明肥大细胞不仅可促进肾癌血管形成,也可直接促进肾癌细胞的侵袭与迁移。

研究表明,肥大细胞可分泌丰富的 TGF- β ,是某些病理生理条件下 TGF- β 的重要来源之一^[19]。同时,肥大细胞的功能也受到 TGF- β 的调节。因此, TGF- β 是肿瘤细胞与肥大细胞“对话”的重要媒介^[2]。在本研究中,我们通过体外实验对肥大细胞引起的肾癌侵袭迁移机制进行了初步探讨,发现肥大细胞可通过分泌 TGF- β 促进肾癌 MMP2 表达,进而促进侵袭迁移。后续研究尚需通过动物实验等验证肥大细胞在肾癌侵袭转移中的作用,并进一步阐明肥大细胞分泌的 TGF- β 促进肾癌 MMP2 表达的详细分子机制。

参考文献:

- [1] WILLIAMSON SR, TANEJA K, CHENG L. Renal cell carcinoma staging: pitfalls, challenges, and updates[J]. *Histopathology*, 2019, 74(1): 18-30.
- [2] KRSTIC J, SANTIBANEZ JF. Transforming growth factor-beta and matrix metalloproteinases: Functional interactions in tumor stroma-infiltrating myeloid cells[J]. *Sci World J*, 2014, 2014: 521754.
- [3] CHEN Y, LI C, XIE H, et al. Infiltrating mast cells promote renal cell carcinoma angiogenesis by modulating PI3K \rightarrow AKT \rightarrow GSK3 β \rightarrow AM signaling[J]. *Oncogene*, 2017, 36(20): 2879-2888.
- [4] 吕不凡, 陈志雄, 蒋其龙, 等. 浸润性肥大细胞对肾癌细胞的侵袭与迁移能力的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2019, 35(2): 129-132.
- [5] CHEN Y, LI L, ZENG J, et al. Twist confers chemoresistance to anthracyclines in bladder cancer through upregulating P-glycoprotein[J]. *Chemotherapy*, 2012, 58(4): 264-272.
- [6] LÓPEZ-SOTO A, GONZALEZ S, SMYTH MJ, et al. Control of metastasis by NK cells[J]. *Cancer Cell*, 2017, 32(2): 135-154.
- [7] LU H, CAO X, ZHANG H, et al. Imbalance between MMP-2, 9 and TIMP-1 promote the invasion and metastasis of renal cell carcinoma via SKP2 signaling pathways[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(10): 9807-9813.
- [8] YADAV L, PURI N, RASTOGI V, et al. Matrix metalloproteinases and cancer-roles in threat and therapy[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(3): 1085-1091.
- [9] EGBLAD M, WERB Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(3): 161-174.
- [10] ZHENG Y, MIU Y, YANG X, et al. CCR7 mediates TGF-beta1-induced human malignant glioma invasion, migration, and epithelial-mesenchymal transition by activating MMP2/9 through the nuclear factor kappaB signaling pathway[J]. *DNA Cell Biol*, 2017, 36(10): 853-861.
- [11] ZHANG W, WU K, HE W, et al. Transforming growth factor beta 1 plays an important role in inducing CD4(+)CD25(+) forkhead box P3(+) regulatory T cells by mast cells[J]. *Clin Exp Immunol*, 2010, 161(3): 490-496.
- [12] XIE F, LING L, VAN DAM H, et al. TGF-beta signaling in cancer metastasis[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2018, 50(1): 121-132.
- [13] ANANTH S, KNEBELMANN B, GRUNING W, et al. Transforming growth factor beta1 is a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor and a critical growth factor for clear cell renal carcinoma[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(9): 2210-2216.
- [14] SINGLA M, KUMAR A, BAL A, et al. Epithelial to mesenchymal transition induces stem cell like phenotype in renal cell carcinoma cells[J]. *Cancer Cell Int*, 2018, 18: 57.
- [15] HUANG W, CEN S, KANG XL, et al. TGF- β 1-induced Fascin1 promotes cell invasion and metastasis of human 786-0 renal carcinoma cells[J]. *Acta Histochem*, 2016, 118(2): 144-151.
- [16] YANG SD, SUN RC, MU HJ, et al. The expression and clinical significance of TGF-beta1 and MMP2 in human renal clear cell carcinoma[J]. *Int J Surg Pathol*, 2010, 18(2): 85-93.
- [17] DE NOLA R, MENGA A, CASTEGNA A, et al. The crowded crosstalk between cancer cells and stromal microenvironment in gynecological malignancies: Biological pathways and therapeutic implication[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(10): 2401.
- [18] SAMMARCO G, VARRICCHI G, FERRARO V, et al. Mast cells, angiogenesis and lymphangiogenesis in human gastric cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9): 2106.
- [19] HÜGLE T, HOGAN V, WHITE KE, et al. Mast cells are a source of transforming growth factor beta in systemic sclerosis[J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(3): 795-799.

(编辑 魏毛毛)