

文章编号 1006-8147(2017)04-0295-05

论 著

炎症因子 IL-23 对黑色素瘤细胞增殖侵袭及双向分化的影响

文明明¹, 马跃美¹, 赵秀兰^{2,3}, 张丹芳², 赵楠², 李岩磊², 林贤², 董学易², 刘芳²

(1.天津医科大学外科手术学教研室, 天津 300070; 2.天津医科大学病理学教研室, 天津 300070; 3.天津医科大学总医院病理科, 天津 300052)

摘要 目的:检测白细胞介素-23(IL-23)在黑色素瘤中的表达并探讨 IL-23 对黑色素瘤细胞双向分化及增殖、侵袭能力的影响。方法:将 IL-23 降表达质粒转染至黑色素瘤细胞系 MUM-2B 中,使 MUM-2B 中 IL-23 外源性降表达,观察 IL-23 转染前、后 MUM-2B 细胞形态学改变;MTT、细胞划痕和 Transwell 侵袭实验检测对增殖、迁移及侵袭能力的影响;Western blot 检测转染前、后 MUM-2B 中 IL-23 和相关蛋白(Vimentin、Snail、N-cadherin 和 MMP-2)表达变化情况;免疫荧光检测 IL-23、Vimentin 和 MMP-2 表达部位,明胶酶谱检测 MMP-2、MMP-9 活性。结果:转染后 MUM-2B 的细胞形态发生明显改变。细胞的增殖、迁移及侵袭能力显著减弱。IL-23 降表达,N-cadherin、Vimentin、NF- κ B、Snail 和 MMP-2 表达明显下调,MMP-2、MMP-9 活性显著降低。结论:IL-23 可促进黑色素瘤细胞向间叶样表型转变,并促进黑色素瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。

关键词 黑色素瘤;IL-23;增殖;迁移;侵袭

中图分类号 R36

文献标志码 A

Effects of IL-23 on the herin proliferation, invasion and bi-differentiation of melanoma cells

WEN Ming-ming¹, MA Yue-mei¹, ZHAO Xiu-lan^{2,3}, ZHANG Dan-fang², ZHAO Nan², LI Yan-lei², LIN Xian², DONG Xue-yi², LIU Fang²
(1.Department of Operative Surgery, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2.Department of Pathology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 3.Department of Pathology, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

Abstract **Objective:** To examine the expression of IL-23 in melanoma cells and its effect on the proliferation, invasion and bi-differentiation. **Methods:** To establish stable IL-23 knockdown cells, MUM-2B cells were stably transfected with sh-IL-23 and sh-control vectors. The changes of MUM-2B cells morphology were detected after IL-23 transfection by using microscope. The proliferation of MUM-2B cells was determined by MTT, the migration of MUM-2B cells was determined by the wound healing assay. And the invasion of MUM-2B cells was detected by Transwell experiment. The changes of the expression of related protein(Vimentin, Snail, N-cadherin and MMP-2) in MUM-2B cells were detected by Western blot after transfection of IL-23. Using immunofluorescence, the sites of the expression of related protein (IL-23, Vimentin and MMP-2) were detected. The expression activities of MMP-2 and MMP-9 were analyzed by Gelatin Zymography. **Results:** After IL-23 knockdown, the morphology of MUM-2B cells showed significant changes. IL-23 knockdown significantly decreased the abilities of MUM-2B cells to proliferate, invade and migrate. Compared with MUM-2B-control cells, knockdown the expression of IL-23 significantly down-regulated the expression of N-cadherin, Vimentin, NF- κ B, Snail and MMP-2. Importantly, MUM-2B cells knockdown IL-23 demonstrated decreased the expression activities of MMP-2 and MMP-9. **Conclusion:** IL-23 contributes to transfection of mesenchymal-like phenotype and facilitates the proliferation, migration and invasion of melanoma cells.

Key words malignant melanoma; IL-23; proliferation; migration; invasion

恶性黑色素瘤(malignant melanoma, MM)是源于黑色素细胞的恶性肿瘤,是一种恶性程度高、迁徙能力强的皮肤肿瘤。其发病率在全球范围呈现上升趋势,正日益威胁着人类的生命健康。皮肤是恶性黑色素瘤的主要发病部位,约占皮肤恶性肿瘤死亡率的75%,侵袭与转移是恶性黑色素瘤患者死亡的主要原因。研究恶性黑色素瘤的发生及发展具有重

要的意义^[1-2]。双向分化恶性肿瘤是指肿瘤同时向上皮样组织和间叶样组织分化,所谓上皮样分化和间叶样分化是指肿瘤细胞的形态和组织排列两个方面。恶性黑色素瘤就是一种常见的双向分化恶性肿瘤^[3]。由炎症细胞和炎症因子组成的肿瘤微环境,对肿瘤细胞的增殖、生存、转移起重要作用,是肿瘤形成不可缺少的一个因素^[4-5]。白细胞介素-23(IL-23)作为肿瘤微环境中的一个重要炎症细胞因子,可与细胞表面膜受体复合物结合,激活 STAT3 和 NF- κ B 等下游信号通路,发挥其生物学功能^[6-8]。其主要由

基金项目 国家自然科学基金面上项目基金资助(81572872)

作者简介 文明明(1989-),男,硕士在读,研究方向:炎症与肿瘤血管生成关系的研究;通信作者:马跃美, E-mail:maym@tmu.edu.cn。

激活的巨噬细胞和树突状细胞分泌,肿瘤细胞自身也能分泌,但研究较少,本研究从肿瘤细胞自身分泌 IL-23 角度探讨 IL-23 在黑色素瘤双向分化过程中的作用,进而研究其对侵袭与转移的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人黑色素瘤细胞株 MUM-2B 购自中国医学科学院基础医学院细胞资源中心。

1.1.2 实验试剂 RPMI-1640 培养基购自美国 Neuronbc 公司,胎牛血清购自中国 Thermo 公司。IL-23 表达质粒(Catalog No.:HSH012859-LVRU6GP)和对照质粒(Catalog No.:CSHCTR001-LVRU6GP)购自 GeneCopoeia, Inc.。Transwell 小室购自美国 FALCON 公司。兔抗人多克隆抗体 IL-23、鼠抗人多克隆抗体 NF- κ B、兔抗人多克隆抗体 β -actin 均购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,兔抗人多克隆抗体 Snail、兔抗人多克隆抗体 Vimentin 均购自美国 Abcam 公司。山羊抗兔 IgG 抗体、山羊抗鼠 IgG 抗体均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞系和培养条件 人黑色素瘤细胞系 MUM-2B 按常规培养模式进行培养:MUM-2B 培养基为 RPMI-1640,添加 10%胎牛血清(FBS)。培养条件为 37℃,5%CO₂ 恒温环境。

1.2.2 细胞转染及稳定克隆筛选 在进行转染前,提前两天将 $1.3 \sim 1.5 \times 10^6$ 的 293T 细胞移入 10 cm 细胞皿进行培养,板内加入 10 mL 含 10%热灭活胎牛血清的 DMEM 培养基,使细胞在进行转染时达到 70%~80%融合率。在 5% CO₂ 条件下,37℃培养细胞。往无菌 EP 管加入慢病毒 ORF/shRNA 表达质粒和 5.0 μ L LentiPac HIV 混合试剂,用 Opti-MEM I 稀释至 200 μ L。在另一无菌 EP 管内,用 Opti-MEM I 稀释 15 μ L EndoFectin 转染试剂。边轻柔进行涡旋,边往 DNA 和 LentiPac HIV 试剂的混合溶液中滴加以上稀释 EndoFectin 转染试剂。不可颠倒添加顺序。室温孵育该溶液 10~25 min,使 DNA-EndoFectin 复合物产生。将 DNA-EndoFectin 慢病毒复合物加入细胞板,轻柔涡旋平板使复合物分散。细胞在 CO₂ 条件下,37℃过夜培养(8~14 h),以加入 2%~5%热灭活胎牛血清、青霉素和链霉素的新鲜培养基更换旧培养基,培养基中加入 1/500 体积的 TiterBoost 试剂并继续在 CO₂ 条件下,以 37℃继续培养。转染 48 h 后收集培养基,以 500 \times g 离心 10 min 去除细胞碎片,可获得含慢病毒颗粒的培养基。离心后,以 0.45 μ m 的低蛋白结合 PES 过滤膜过滤该培养基,收集病毒

液。在进行慢病毒感染前 24 h,于 6 孔板对细胞进行铺板培养,细胞培养至 70%~80%。各孔加入培养基(添加 10%热灭活胎牛血清、青霉素-链霉素双抗溶液),在 5%CO₂ 条件下,37℃培养过夜。以培养基稀释 Polybrene 至 10 μ g/mL,内含 5%热灭活胎牛血清和青霉素-链霉素双抗。第二天加入稀释的病毒液和稀释的 Polybrene, Polybrene 的终浓度为 5 μ g/mL。24 h 后换回正常培养液,正常培养至荧光亮起,加入嘌呤霉素筛选至 90%细胞发出荧光。

1.2.3 细胞形态检测 在细胞培养状态下,将稳转细胞置于倒置显微镜下观察转染前后形态的改变。

1.2.4 Western blot 法检测 用细胞裂解液裂解细胞,提取其总蛋白,在 10%聚丙烯酰胺凝胶中电泳。PVDF 膜转膜 1.5 h,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入一抗,4℃孵育过夜,次日恢复室温后与相应二抗作用 2 h, TBST 漂洗,加入发光液显影、定影、照相。

1.2.5 细胞划痕实验 将细胞接种于 6 孔板,用 100 μ L Tip 头对其表面进行划痕, PBS 洗掉游离细胞后,加入培养基,此时记为 0 h,随机取 5 个视野,在倒置显微镜下观察细胞从划痕向中央迁移的情况,分别于 0、12、24 h 拍照测量划痕距离,并计算迁移率。

1.2.6 细胞侵袭实验 将 Transwell 小室包被 Matrigel 胶并在培养箱中过夜,次日消化细胞并用无血清的培养液重悬,将细胞悬液接种于上室,下室用含血清常规培养液,培养 48 h 后取出 Transwell 小室,甲醇固定,结晶紫染色,分析细胞侵袭能力。

1.2.7 MTT 实验检测转染后细胞增殖情况 取对数生长期的细胞常规消化离心重悬后,调整细胞浓度至 1×10^5 个/mL 后分别接种到 9 个 96 孔板,每组设 5 个复孔,并每组设置一组完全培养基为对照组,第 2 天开始每天同一时间点分别取出 1 个 96 孔板,加入 50 μ L 1 \times MTT 溶液,在 37℃培养箱孵育 4 h 后,弃去培养液,加入 150 μ L DMSO,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解,在酶联免疫检测仪 490 nm 波长处检测各孔的吸光度(OD)值。

1.2.8 免疫荧光 制备细胞爬片,将玻片放到培养板中,将细胞悬液滴在玻片上,待细胞爬 50%左右时,吸出培养液,用 PBS 冲洗 3 遍。冷甲醇固定,加入-20℃预冷的甲醇,放在冰上 20 min。PBS 漂洗 3 遍。打孔,封闭,0.5% Triton 穿孔 15 min。加用 5%血清稀释的一抗,37℃,1.5 h。PBS 漂洗 3 遍,避光加二抗,37℃,2 h。PBS 漂洗 3 次,加 DAPI 染色 2 min,封片照相。

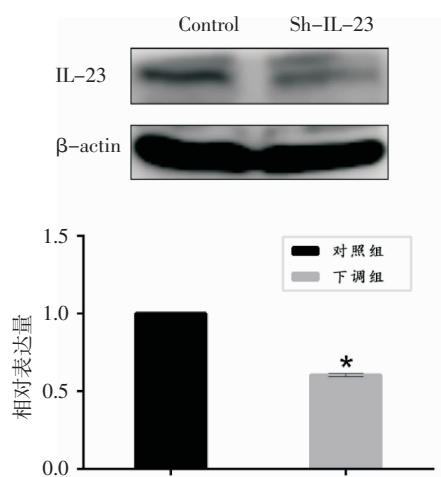
1.2.9 明胶酶谱检测 MMP-2 和 MMP-9 的表达活性 将细胞接种到 24 孔板无血清培养基培养,每

孔 500 μL , 48 h 后收集上清液, 12 000 r/min, 离心 10 min, 进一步取上清液进行明胶酶谱检测。以含 0.1% 明胶的 10% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳至溴酚兰进入阳极缓冲液为止, 分离凝胶, 2.5% Triton-X100 洗胶 4 次, 每次 30 min。将胶完全浸入明胶酶孵育液 (50 mmol/L pH7.5 Tris-HCl、10 mmol/L CaCl_2 、200 mol/L NaCl、1 $\mu\text{mol/L}$ ZnCl_2) 中, 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 42 h, 常规考马斯亮蓝染色, 脱色液脱色至复染带清晰, 图像分析系统测定凝胶中 MMPs 活性条带活性水平。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 21.0 统计软件进行统计分析, 计量资料采用 t 检验, 计数资料采用 χ^2 检验。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-23 对黑色素瘤细胞形态的影响 MUM-2B 细胞转染 IL-23 降表达质粒, 构建 MUM-2B-Sh-IL-23 下调模型 (图 1)。在倒置显微镜下观察发现, MUM-2B-Sh-IL-23 下调组细胞与对照组细胞 (MUM-2B-Control) 相比, 其形态发生了明显改变, 细胞变大变圆, 伪足减少 (图 2)。结果表明, IL-23 能在黑色素瘤双向分化过程中促进细胞向间叶样表型转化。



* $P < 0.05$

图 1 MUM-2B 细胞转染 IL-23shRNA 和 Control shRNA

Fig 1 MUM-2B cells were stably transfected with sh-IL-23 and sh-Control vectors

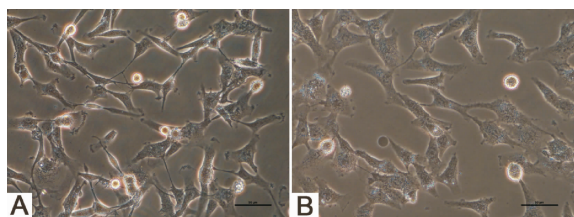


图 2 IL-23 降表达后 MUM-2B 细胞形态改变 ($\times 200$)

Fig 2 After IL-23 knockdown, the morphology of MUM-2B cells showed significant changes ($\times 200$)

2.2 IL-23 对黑色素瘤细胞增殖的影响 用 MTT 增殖实验检测下调 IL-23 后 MUM-2B 细胞增殖能力的变化情况 (图 3)。实验结果表明, MUM-2B 细胞降表达 IL-23 后, 与对照组相比, 其细胞增殖能力显著降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明 IL-23 具有促进 MUM-2B 细胞的增殖能力。

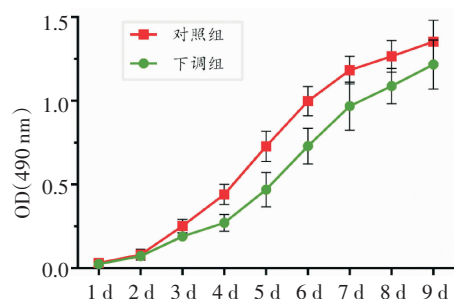


图 3 IL-23 对 MUM-2B 细胞增殖能力的影响

Fig 3 The effect of IL-23 on proliferation ability of MUM-2B cells

2.3 IL-23 对黑色素瘤细胞迁移运动能力的影响 用细胞划痕实验检测下调 IL-23 后 MUM-2B 细胞迁移运动能力的变化情况 (图 4)。实验结果表明, MUM-2B 细胞降表达 IL-23 后, 与对照组相比, 在 12、24 h 时间点, 其细胞迁移运动能力显著降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果表明, IL-23 可加强 MUM-2B 细胞的迁移运动能力。

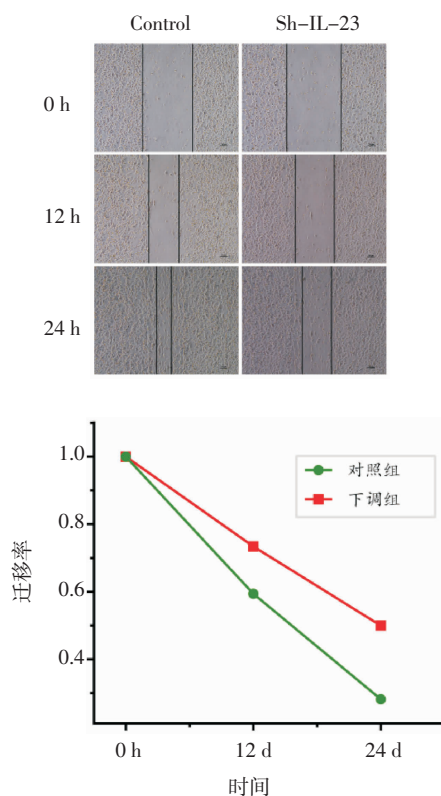
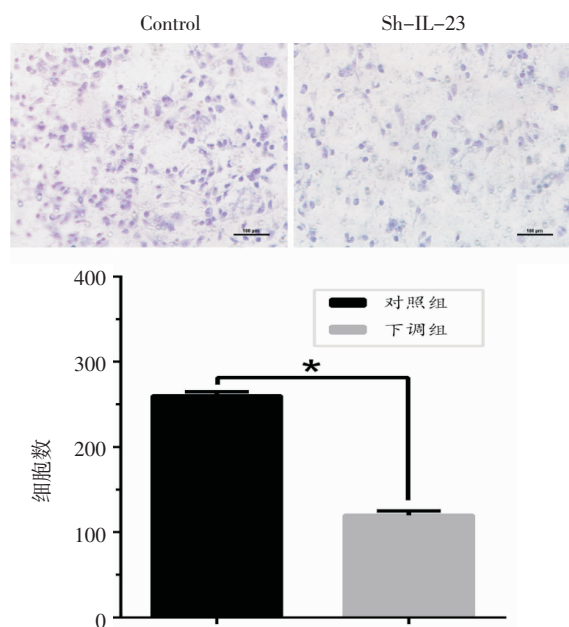


图 4 IL-23 对 MUM-2B 细胞迁移能力的影响 ($\times 40$)

Fig 4 The effect of IL-23 on migration ability of MUM-2B cells ($\times 40$)

2.4 IL-23 对黑色素瘤细胞侵袭能力的影响 用 Transwell 侵袭实验检测下调 IL-23 后 MUM-2B 细胞侵袭能力的变化情况 (图 5)。实验结果表明, MUM-2B 细胞降表达 IL-23 后, 与对照组相比, 细胞穿透滤膜至小室背面的细胞数显著降低, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。结果表明, IL-23 可增强 MUM-2B 细胞的侵袭能力。

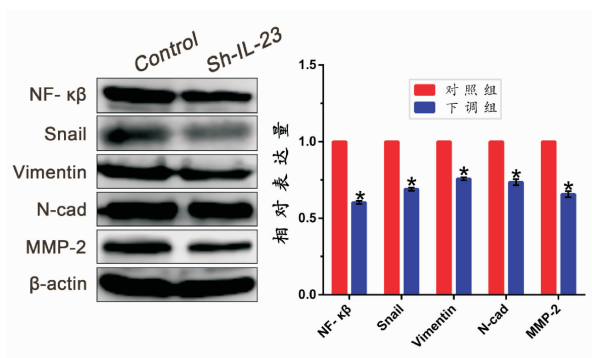


* $P<0.05$

图 5 IL-23 对 MUM-2B 细胞侵袭能力的影响 ($\times 100$)

Fig 5 The effect of IL-23 on invasion ability of MUM-2B cells ($\times 100$)

2.5 IL-23 对黑色素瘤细胞相关蛋白表达的影响 降表达 MUM-2B 黑色素瘤细胞 IL-23, Western blot 结果显示间叶样表型蛋白 N-cadherin、Vimentin 降低, MMP-2 表达降低, 相关调节蛋白 NF- κ B、Snail 表达也显著降低 (图 6)。免疫荧光结果也进一步证明此结果 (图 7)。



* $P<0.05$

图 6 Western blot 检测降表达 IL-23 后 MUM-2B 细胞相关蛋白表达变化

Fig 6 The changes of the expressions of related protein in MUM-2B cells were detected by Western blot after IL-23 knockdown

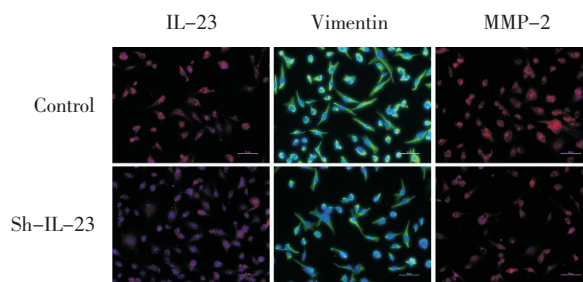


图 7 免疫荧光检测降表达 IL-23 后 MUM-2B 细胞 Vimentin 和 MMP-2 表达变化 ($\times 200$)

Fig 7 The changes of the expressions of Vimentin and MMP-2 in MUM-2B cells were detected by immunofluorescence staining after IL-23 knockdown ($\times 200$)

2.6 IL-23 对黑色素瘤细胞 MMP-2 和 MMP-9 表达活性的影响 通过明胶酶谱实验, 我们发现与对照组相比, MUM-2B 细胞降表达 IL-23 后, 可明显降低肿瘤细胞 MMP-2 和 MMP-9 活性 (图 8)。

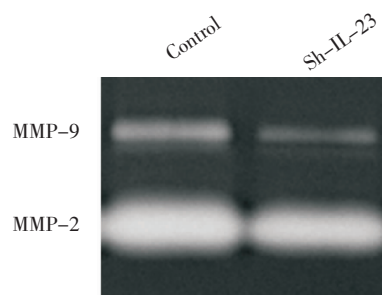


图 8 IL-23 对 MUM-2B 细胞 MMP-9 和 MMP-2 表达活性的影响

Fig 8 The effect of IL-23 on MMP-9 and MMP-2 expression activities of MUM-2B cells

3 讨论

恶性黑色素瘤系是由存在于表皮、真皮或黏膜上皮内的黑色素细胞恶变而成^[9]。黑色素瘤恶性程度高, 发病比较隐匿, 提高对该病的认识进行早期诊断是提高治愈率的关键, 大多数皮肤恶性黑色素瘤早期症状不明显, 缺乏对该病的认识则容易被忽视。病理形态上, 恶性黑色素瘤的形态结构多样, 具有双向分化特点^[10]。常见的双向分化恶性肿瘤有恶性黑色素瘤、滑膜肉瘤、腺泡型横纹肌肉瘤、间皮肉瘤及上皮样肉瘤等^[3]。早在 1863 年, Virchow 就猜测肿瘤起源于慢性炎症。这一早期的假说引发了后续一系列的关于肿瘤和炎症关系的研究^[11]。由炎症细胞和炎症因子组成的肿瘤微环境, 对肿瘤细胞的增殖、生存、转移起重要作用, 是肿瘤形成不可缺少的一个方面。此外, 炎症细胞还能够产生生长因子和细胞因子, 它们可以活化下游不同的转录因子 NF- κ B、AP-1、STAT、SMAD 等, 产生一些肿瘤促进因子,

诱导细胞增殖和存活因子的生成,促进肿瘤发生以及肿瘤细胞的生长和存活^[12-13]。IL-23 作为肿瘤微环境中的一个重要炎性细胞因子,主要由肿瘤相关巨噬细胞自身分泌,肿瘤细胞自身也能分泌,但研究较少^[14-15]。本实验发现降表达 IL-23 后,MUM-2B 的细胞形态发生明显改变,细胞变大变圆,伪足明显减少,而且蛋白水平上,IL-23 降表达,间叶样表型蛋白 N-cadherin 和 Vimentin 表达明显下降,结果说明 IL-23 可促进黑色素瘤细胞向间叶样表型转变。实验结果还发现核转录因子 NF- κ B 和 Snail 表达也明显减少。所以我们可以推测 IL-23 可能通过 NF- κ B 调节 Snail 进而在黑色素瘤双向分化过程中促进细胞向间叶样转化达到使肿瘤细胞自身变形。MMPs 是一类与肿瘤侵袭相关的锌依赖性肽链内切酶家族,其相关的信号传导通路参与了肿瘤细胞的生长、肿瘤侵袭及肿瘤血管的形成^[16],目前发现的 MMPs 有很多种,MMP-2、MMP-9 等与肿瘤的侵袭和迁移相关。本文明胶酶谱分析降表达 IL-23 的 MUM-2B 细胞的 MMP-2 和 MMP-9 活性明显降低,说明 IL-23 可通过调节 MMP-2 和 MMP-9 的活性促进黑色素瘤细胞的侵袭。细胞功能学实验也进一步证明 IL-23 降表达,黑色素瘤 MUM-2B 细胞的增殖、迁移及侵袭能力显著减弱,说明 IL-23 可促进黑色素瘤的增殖、迁移及侵袭。

综上所述,本研究认为 IL-23 可促进黑色素瘤细胞向间叶样表型转变,并促进黑色素瘤的增殖、迁移和侵袭。但是 IL-23 促进黑色素瘤细胞向间叶样表型转变的内在机制很复杂,调节 Snail 的表达可能只是其中的某一个环节,因此 IL-23 在黑色素瘤中的其他作用机制,还有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] Caini S, Boniol M, Botteri E, et al. The risk of developing a second primary cancer in melanoma patients: a comprehensive review of the literature and meta-analysis[J]. J Dermatol Sci, 2014, 75(1): 3
- [2] Zbytek B, Carlson J A, Granese J, et al. Current concepts of metastasis in melanoma[J]. Expert Rev Dermatol, 2008, 3(5): 569
- [3] 杨举伦. 双向分化肿瘤的病理诊断[J]. 诊断病理学杂志, 1997, 4(3): 164
- [4] Schreiber R D, Old L J, Smyth M J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion[J]. Science, 2011, 331(6024): 1565
- [5] Feng S, Chen X M, Wang J F, et al. Th17 cells associated cytokines and cancer[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(19): 4032
- [6] von S B, Leung P S, Yong M C, et al. Combined anti-CD40 and anti-IL-23 monoclonal antibody therapy effectively suppresses tumor growth and metastases[J]. Cancer Res, 2014, 74(9): 2412
- [7] Lyakh L, Trinchieri G, Provezza L, et al. Regulation of interleukin-12/interleukin-23 production and the T-helper 17 response in humans[J]. Immunol Rev, 2008, 226: 112
- [8] Boniface K, Blom B, Liu Y J, et al. From interleukin-23 to T-helper 17 cells: human T-helper cell differentiation revisited [J]. Immunol Rev, 2008, 226: 132
- [9] 赵尔增, 岳茂兴. 肛管直肠原发性恶性黑色素瘤临床病理特点[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(2): 225
- [10] 纪小龙, 申明识. 黏膜黑色素瘤的常见临床病理特点[J]. 诊断病理学杂志, 2002, 9(2): 50
- [11] Keibel A, Singh V, Sharma M C. Inflammation, microenvironment, and the immune system in cancer progression[J]. Curr Pharm Des, 2009, 15(17): 1949
- [12] Atsumi T, Singh R, Sabharwal L, et al. Inflammation amplifier, a new paradigm in cancer biology[J]. Cancer Res, 2014, 74(1): 8
- [13] Capece D, Fischietti M, Verzella D, et al. The inflammatory microenvironment in hepatocellular carcinoma: a pivotal role for tumor-associated macrophages[J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 187204
- [14] Langowski J L, Zhang X, Wu L, et al. IL-23 promotes tumour incidence and growth[J]. Nature, 2006, 442(7101): 461
- [15] Zhang L, Li J, Li L, et al. IL-23 selectively promotes the metastasis of colorectal carcinoma cells with impaired Socs3 expression via the STAT5 pathway[J]. Carcinogenesis, 2014, 35(6): 1330
- [16] Seftor R E, Seftor E A, Koshikawa N, et al. Cooperative interactions of laminin 5 gamma2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1-matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma[J]. Cancer Res, 2001, 61(17): 637

(2017-01-15 收稿)