

# 淋巴细胞趋化因子对乳腺癌 MCF-7 细胞的表柔比星药物敏感性及侵袭转移能力的影响

马 奇 王 佳 夏 添 松 王 水

**【摘要】 目的** 探讨淋巴细胞趋化因子(lymphotactin, XCL1)对人乳腺癌 MCF-7 细胞的表柔比星药物敏感性及侵袭转移能力的影响。**方法** 根据是否进行表柔比星及 XCL1 干预,将 MCF-7 细胞分为 4 组:对照组(MCF-7 NC),表柔比星单药组(MCF-7 E),XCL1 单药组(MCF-7 XCL1),联合干预组(MCF-7 XCL1+E)。用细胞计数试剂盒 8(CCK-8)及平板克隆实验观察 XCL1 干预后 MCF-7 细胞对表柔比星药物敏感性的影响。用 Transwell 法观察 XCL1 对 MCF-7 细胞侵袭转移能力的影响,并用免疫荧光法检测对照组和 XCL1 单药组埃兹蛋白(ezrin)及磷酸化埃兹蛋白(p-ezrin)的表达。用 Western blot 实验检测 4 组 E 钙黏蛋白(E-cadherin)、ezrin 及 p-ezrin 的表达水平。细胞生长抑制率的比较采用析因设计的方差分析,2 组均数比较采用 *t* 检验,多组均数比较采用单因素方差分析,两两比较用 LSD 法。**结果** 经 XCL1 处理 2 周后,表柔比星对 MCF-7 细胞的抑制作用降低(组间比较  $F=23.780, P<0.001$ ;不同浓度比较,  $F=160.602, P<0.001$ ;浓度因素和分组之间无交互作用,  $F=1.565, P=0.208$ )。XCL1 刺激 MCF-7 细胞后,各组(MCF-7 NC、MCF-7 XCL1、MCF-7 E 和 MCF-7 XCL1+E)细胞克隆形成率分别为(15.63±0.61)%、(19.47±1.94)%、(7.77±0.71)%和(12.37±1.55)%,差异有统计学意义( $F=41.925, P<0.001$ )。迁移实验中 MCF-7 XCL1 组的细胞穿膜数高于 MCF-7 NC 组(180.00±20.42 比 88.00±7.00,  $t=-7.382, P=0.002$ ),侵袭实验中 MCF-7 XCL1 组的细胞穿膜数也高于 MCF-7 NC 组(176.33±8.02 比 90.33±12.90,  $t=-9.808, P=0.001$ )。免疫荧光实验发现 XCL1 刺激后的 MCF-7 细胞中 p-ezrin 蛋白表达明显升高(MCF-7 XCL1:1.08±0.12, MCF-7 NC:0.65±0.11,  $t=-4.528, P=0.011$ )。Western blot 检测发现,4 组比较 E-cadherin 和 p-ezrin 表达的差异均有统计学意义( $F=6.317, 48.517, P$  均 $<0.050$ ),ezrin 表达差异无统计学意义( $F=0.868, P=0.497$ )。与 MCF-7 NC 组比较(1.10±0.09),MCF-7 E 组、MCF-7 XCL1 组和 MCF-7 XCL1+E 组 E-cadherin 表达均降低(0.65±0.22、0.67±0.14、0.71±0.11,  $P$  均 $<0.050$ );与 MCF-7 NC 组比较(0.37±0.07),MCF-7 XCL1 组和 MCF-7 XCL1+E 组 p-ezrin 表达升高(0.93±0.10、1.28±0.15,  $P$  均 $<0.050$ )。**结论** XCL1 可能通过增强 ezrin 蛋白磷酸化来增强乳腺癌 MCF-7 细胞的侵袭转移能力,同时降低其对表柔比星的药物敏感性。

**【关键词】** 乳腺肿瘤; 淋巴细胞趋化因子; 表柔比星; 抗耐药,肿瘤; 埃兹蛋白

**【中图法分类号】** R737.9 **【文献标志码】** A

**Effect of lymphotactin on epirubicin sensitivity and invasion and metastasis ability of human breast cancer MCF-7 cells** Ma Ge, Wang Jia, Xia Tiansong, Wang Shui. Department of Breast Surgery, First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Corresponding author: Wang Shui, Email: ws0801@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To explore the effect of lymphotactin (XCL1) on epirubicin sensitivity of human breast MCF-7 cells and invasion and metastasis ability of cells. **Methods** The MCF-7 cells were divided into four groups: the control group (MCF-7 NC) and three experimental groups (MCF-7 E group treated with epirubicin, MCF-7 XCL1 group treated with XCL1 and MCF-7 XCL1+E group treated with XCL1 plus epirubicin). CCK-8 assay and plate clone formation assay were used to measure the epirubicin sensitivity of MCF-7 cells after XCL1 treatment. Transwell assay was used to evaluate the migration and invasion ability of

MCF-7 cells. The expressions of ezrin and phosphorylated ezrin (p-ezrin) in the control group and MCF-7 XCL1 group were determined by immunofluorescence assay. The expressions of E-cadherin, ezrin and p-ezrin in four groups were detected by Western blot. The growth inhibition rates of cells were compared using variance analysis of factorial design. The mean values between two groups were compared using *t* test, the mean values among multiple groups were compared using single factor analysis of variance. Pairwise comparison was performed using LSD method. **Results** After 2-week treatment of XCL1, the inhibitory effect of epirubicin on MCF-7 cells was decreased (group comparison:  $F=23.780, P<0.001$ ; different concentrations of epirubicin:  $F=160.602, P<0.001$ ; no interaction between grouping and concentration of epirubicin:  $F=1.565, P=0.208$ ). The clone formation rates of MCF-7 NC, MCF-7 XCL1, MCF-7 E and MCF-7 XCL1 + E groups were  $(15.63\pm0.61)\%$ ,  $(19.47\pm1.94)\%$ ,  $(7.77\pm0.71)\%$  and  $(12.37\pm1.55)\%$ , respectively, indicating a significant difference ( $F=41.925, P<0.001$ ). The number of cells penetrating the membrane in the MCF-7 XCL1 group was significantly higher than that in the MCF-7 NC group (migration:  $180.00\pm20.42$  vs  $88.00\pm7.00, t=-7.382, P=0.002$ ; invasion:  $176.33\pm8.02$  vs  $90.33\pm12.90, t=-9808, P=0.001$ ). Immunofluorescence assay showed that the expression of p-ezrin protein was significantly increased in MCF-7 cells after XCL1 stimulation (MCF-7 XCL1:  $1.08\pm0.12$ , MCF-7 NC:  $0.65\pm0.11, t=-4.528, P=0.011$ ). Western blot analysis showed that the expressions of E-cadherin and p-ezrin among four groups were significantly different ( $F=6.317, 48.517$ , both  $P<0.050$ ), while there was no significant difference in ezrin expression ( $F=0.868, P=0.497$ ). Compared with the control group ( $1.10\pm0.09$ ), the expression of E-cadherin in MCF-7 E group, MCF-7 XCL1 group and MCF-7 XCL1 + E group was decreased ( $0.65\pm0.22, 0.67\pm0.14, 0.71\pm0.11$ , all  $P<0.05$ ). The expression of p-ezrin in MCF-7 XCL1 group and MCF-7 XCL1+E group ( $0.93\pm0.10, 1.28\pm0.15$ ) was increased compared with control group ( $0.37\pm0.07$ , both  $P<0.050$ ). **Conclusion** XCL1 can reduce the epirubicin sensitivity of human breast cancer MCF-7 cells and increase the invasion and metastasis ability of cells.

**【Key words】** Breast neoplasms; Lymphokines; Epirubicin; Drug resistance, neoplasm; Ezrin

炎症可以促进肿瘤的发生和发展<sup>[1]</sup>, 其中, 由炎症趋化因子介导的炎症细胞浸润是重要的一环。趋化因子依照其分子结构中 N 端半胱氨酸残基的排列顺序至少可分为 C ( $\gamma$ )、CC ( $\beta$ )、CXC ( $\alpha$ )、CX3C ( $\delta$ ) 4 个家族, 淋巴细胞趋化因子 (lymphotactin, XCL1) 属于 C 族趋化因子, 主要作用于 CD8<sup>+</sup>T 细胞和自然杀伤细胞<sup>[2]</sup>。XCL1 对肿瘤细胞的影响分为两个方面: 一方面, XCL1 通过趋化 T 细胞浸润肿瘤组织, 在局部和全身发挥抗肿瘤效应<sup>[2]</sup>; 另一方面, XCL1 又可以通过磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/雷帕霉素靶蛋白 (phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin, PI3K/AKT/mTOR) 信号通路促进肿瘤细胞的增殖<sup>[3]</sup>。目前, XCL1 对乳腺癌细胞的作用机制尚不清楚。本研究通过使用外源性人重组 XCL1 蛋白干预乳腺癌 MCF-7 细胞, 观察其对化疗药物的敏感性及其侵袭转移能力的影响, 并进一步探索其可能的机制。

## 材料与方法

### 一、实验材料

人乳腺癌细胞系 MCF-7 购自美国模式培养物

集存库 (American Type Culture Collection, ATCC), RPMI1640 培养基、FBS 购自加拿大 WISSENT 公司, PBS 购自美国 Hyclone 公司; 胰酶、GAPDH、DAPI、免疫荧光试剂盒购自中国 Beyotime 公司; 细胞计数试剂盒 8 (cell count kit 8, CCK-8) 试剂购于日本 Dojindo 公司; 表柔比星注射液购自美国辉瑞公司; BCA 蛋白定量分析试剂盒购自美国 Thermo 公司; 全蛋白提取试剂盒购自南京凯基公司。兔抗人埃兹蛋白 (ezrin) 抗体购自美国 Abcam 公司, 兔抗人磷酸化埃兹蛋白 (p-ezrin, T567) 抗体、E-cadherin 抗体购自美国 Cell Signal 公司, 人重组 XCL1 蛋白购自美国 R&D Systems 公司。增强型发光试剂 ECL、Transwell 小室购自美国 Millopore 公司; 基质胶 Matrigel 购自美国 BD 公司。

### 二、细胞培养和分组

细胞培养箱内环境为 37 °C、5% CO<sub>2</sub>。细胞培养液成分为含 10% FBS、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基, 细胞传代所用胰酶为 0.25% 胰酶。按照是否进行表柔比星及 XCL1 干预, 将细胞分为 4 组: 对照组 (MCF-7 NC)、表柔比星单药组 (MCF-7 E)、XCL1 单药组 (MCF-7 XCL1) 及联合干预组 (MCF-7 XCL1+E)。实验组细胞培养时

加入人重组 XCL1 蛋白,浓度为 50 nmol/L,处理时间为 2 周。Western blot 实验中表柔比星处理细胞时浓度为 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,处理时间为 24 h。

### 三、CCK8 实验测定细胞生长抑制率

将人重组 XCL1 蛋白处理 2 周后的 MCF-7 细胞(MCF-7 XCL1)与对照组细胞(MCF-7 NC)铺于 96 孔板,每孔 5 000 个。24 h 后细胞贴壁,分别加入质量浓度为 0、0.125、0.250、0.500、0.750、1.000、1.500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的表柔比星处理 24 h,每个浓度设置 3 个复孔,其中表柔比星浓度为 0 组为空白对照组,其余浓度各组为实验组。24 h 后,将培养板内培养液换为 110  $\mu\text{l}$  现配溶液(不含血清的 RPMI1640 培养液与 CCK8 溶液按体积比 1:10 配制),按照 CCK8 产品说明书操作,全程避光,继续培养 2 h 后酶标仪测定 450 nm 波长的吸光度。细胞生长抑制率 =  $(1 - \text{实验组测定值} / \text{空白对照组测定值}) \times 100\%$ ,以药物浓度为横轴,细胞生长抑制率为纵轴绘制细胞生长曲线。

### 四、平板克隆形成实验

将 MCF-7 NC 与 XCL1 处理 2 周的 MCF-7 XCL1 细胞用 1.000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  表柔比星处理 24 h 后收集活细胞重悬于 10% FBS 的 RPMI1640 培养基。测定细胞数,稀释后以每孔 600 个接种于 6 孔板中并设定 3 个复孔,在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  及饱和湿度的细胞培养箱中培养 14 d,用 PBS 洗 2 次后加 75% 乙醇固定。弃去乙醇后加适量结晶紫染色液染色 20 min, PBS 洗掉染色液,烘箱烘干。计数克隆数大于 50 个细胞的细胞团。克隆形成率 =  $(\text{克隆数} / \text{接种细胞数}) \times 100\%$ 。

### 五、细胞迁移和侵袭实验

在 24 孔板内 MCF-7 NC 组细胞加入 500  $\mu\text{l}$  RPMI1640 完全培养基, MCF-7 XCL1 组加入 500  $\mu\text{l}$  含重组 XCL1 的 RPMI1640 完全培养基。表柔比星对细胞具有杀伤作用,对细胞穿膜影响大,故不设表柔比星单药组。侵袭实验将 Matrigel 胶在冰上融化至液态。预冷的培养基与 Matrigel 胶按体积比 9:1 配制。枪头预冷后,向小室内加入 50  $\mu\text{l}$  稀释的 Matrigel 胶,培养箱内孵育 4 h,直至胶凝固。将 Transwell 小室置于 24 孔板中,小室内加入不含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基配制的未经处理的细胞悬液 200  $\mu\text{l}$ ,迁移实验细胞数量为每孔  $3 \times 10^4$  个,侵袭实验细胞数量为每孔  $5 \times 10^4$  个。迁移实验在培养箱中培养 24 h,侵袭实验培养 48 h 后乙醇固定,结晶紫染色 20 min。PBS 清洗 3 次,用棉球擦拭小室内表面,擦去小室内表面所有细胞,待完全干燥后倒置显微镜下观察染色细胞。取 5 个不同视野,比

较不同组间穿膜细胞数,实验重复 3 次,结果用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析。

### 六、Western blot 检测蛋白表达

提取待测细胞的总蛋白后用 BCA 法检测浓度,取等质量的总蛋白样品上样。用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶中行电泳分离(10% 分离胶和 5% 浓缩胶),电泳转印系统(Bio-Rad)湿法转膜,5% 封闭液室温下封闭 3 h,4  $^{\circ}\text{C}$  环境下 ezrin、p-ezrin(T567)、E 钙黏蛋白(E-cadherin)、鼠抗人 GAPDH 蛋白特异性一抗孵育过夜, TBST 漂洗 4 次,每次 5 min,用与一抗对应种属的辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h, TBST 漂洗 4 次后加入适量显影液。Western blot 结果用凝胶成像仪扫描,用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析,实验重复 3 次。

### 七、免疫荧光检测 ezrin 及 p-ezrin 蛋白表达

24 孔板内培养细胞生长至 50% 融合度时, PBS 冲洗 3 次,加入免疫染色固定液固定 10 min,免疫染色洗涤液清洗 3 次,封闭 1 h, ezrin、p-ezrin(T567) 蛋白特异性一抗孵育 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜,洗涤液洗涤 3 次,加入与一抗对应种属的荧光色素标记的二抗室温孵育 1 h,注意避光,洗涤液洗涤 3 次, DAPI 染色 4 min,甘油封片后用荧光显微镜观察。用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析结果,实验重复 3 次。

### 八、统计学处理

应用 SPSS 21.0 统计学软件,数据表示为  $\bar{x} \pm s$ 。细胞生长抑制率比较采用析因设计的方差分析;两组均数比较采用  $t$  检验; Western blot 试验检测不同组间蛋白表达差异时,多组均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法,  $P < 0.050$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、外源性 XCL1 处理后表柔比星对 MCF-7 细胞的生长抑制率发生改变

相同浓度的表柔比星处理 MCF-7 细胞 24 h 后,药物对于经 XCL1 处理 2 周后的 MCF-7 细胞的抑制作用降低,具体统计数据见表 1。结果证明 XCL1 处理后的 MCF-7 细胞对表柔比星的敏感性降低。

### 二、XCL1 降低表柔比星对 MCF-7 细胞克隆形成的抑制作用

各组(MCF-7 NC、MCF-7 XCL1、MCF-7 E 和 MCF-7 XCL1 + E)的克隆形成率分别为  $(15.63 \pm 0.61)\%$ 、 $(19.47 \pm 1.94)\%$ 、 $(7.77 \pm 0.71)\%$  及  $(12.37 \pm 1.55)\%$ , 4 组比较差异有统计学意义( $F =$



41.925,  $P<0.001$ )。如图 1、2 所示, MCF-7 细胞在外源性 XCL1 干预后, 与对照组 (MCF-7 NC) 相比, 细胞克隆能力增强 ( $t=-3.261, P=0.031$ )。MCF-7 细胞经 XCL1 处理后, 表柔比星对细胞克隆能力的抑制能力减弱 ( $t=-4.673, P=0.009$ )。

三、XCL1 处理后 MCF-7 细胞侵袭转移能力增强

应用 Transwell 小室迁移试验中 MCF-7 XCL1 组和 MCF-7 NC 组的穿膜细胞数分别为  $(88.00\pm7.00)$  个和  $(180.00\pm20.42)$  个, 2 组比较差异有统计学意义 ( $t=-7.382, P=0.002$ )。侵袭实验中 MCF-7 XCL1

组穿膜细胞数为  $(176.33\pm8.02)$  个, MCF-7 NC 组穿膜细胞数为  $(90.33\pm12.90)$  个, 2 组比较差异有统计学意义 ( $t=-9.808, P=0.001$ ) (图 3、4)。

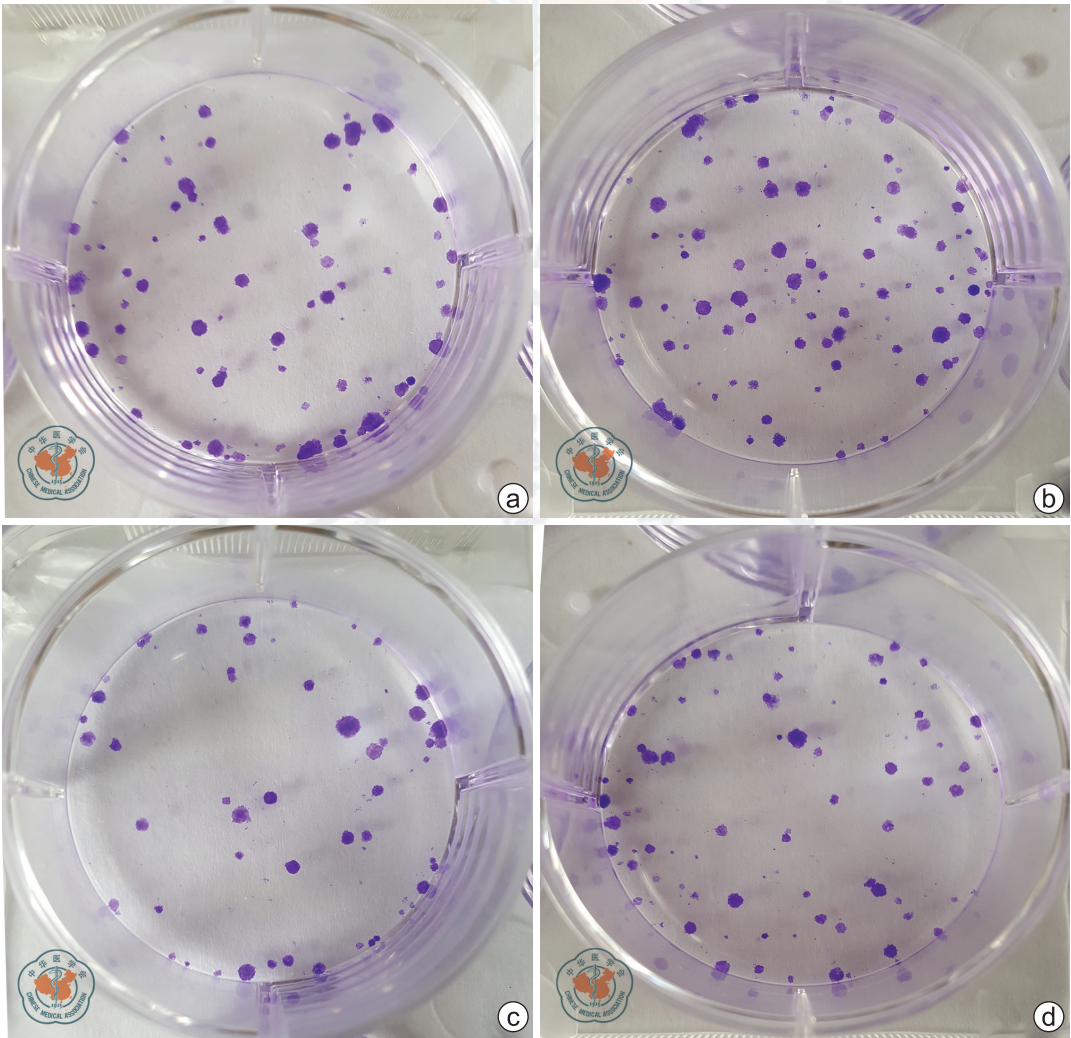
四、外源性 XCL1 下调 MCF-7 细胞中 E-cadherin 表达, 促进 ezrin 蛋白磷酸化

免疫荧光实验发现, ezrin 蛋白主要定位于细胞质与细胞膜, 经 XCL1 处理后的 MCF-7 细胞形态未发生明显变化。MCF-7 XCL1 组与 MCF-7 NC 组比较, ezrin 蛋白表达差异无统计学意义 (MCF-7 XCL1:  $1.43\pm0.10$ , MCF-7 NC:  $1.37\pm0.13, t=0.595, P=0.584$ ), p-ezrin 蛋白在 XCL1 处理后的 MCF-7 细胞

表 1 不同浓度表柔比星处理后 MCF-7 细胞的生长抑制率 (%)

组别	试验次数	0.125 $\mu\text{g/ml}$	0.250 $\mu\text{g/ml}$	0.500 $\mu\text{g/ml}$	0.750 $\mu\text{g/ml}$	1.000 $\mu\text{g/ml}$	1.500 $\mu\text{g/ml}$
MCF-7 NC	3	22.21 $\pm$ 1.11	32.15 $\pm$ 3.11	51.57 $\pm$ 3.40	60.83 $\pm$ 1.81	61.64 $\pm$ 2.05	62.26 $\pm$ 5.19
MCF-7 XCL1	3	21.39 $\pm$ 2.42	27.12 $\pm$ 2.66	40.93 $\pm$ 2.66	54.59 $\pm$ 3.23	56.41 $\pm$ 2.43	58.96 $\pm$ 5.48

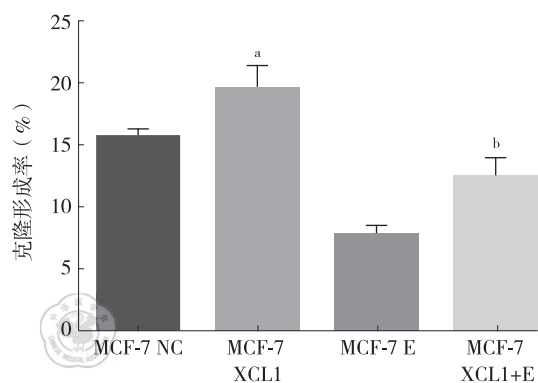
注: 组间比较  $F=23.780, P<0.001$ ; 不同浓度比较,  $F=160.602, P<0.001$ ; 浓度因素和分组之间无交互作用,  $F=1.565, P=0.208$



注: 图 a~d 分别为 MCF-7 NC、MCF-7 XCL1、MCF-7 E 和 MCF-7 XCL1+E 组

图 1 平板克隆实验检测各组 MCF-7 细胞的克隆形成能力





注:4组比较, $F=41.925$ , $P<0.001$ ;与 MCF-7 NC 组比较,<sup>a</sup> $P<0.050$ ;<sup>b</sup>与 MCF-7 E 组比较, $P<0.050$

图2 平板克隆实验检测 MCF-7 细胞克隆形成率

中表达明显升高(MCF-7 XCL1: $1.08 \pm 0.12$ , MCF-7 NC: $0.65 \pm 0.11$ ,  $t=-4.528$ ,  $P=0.011$ ,图5)。

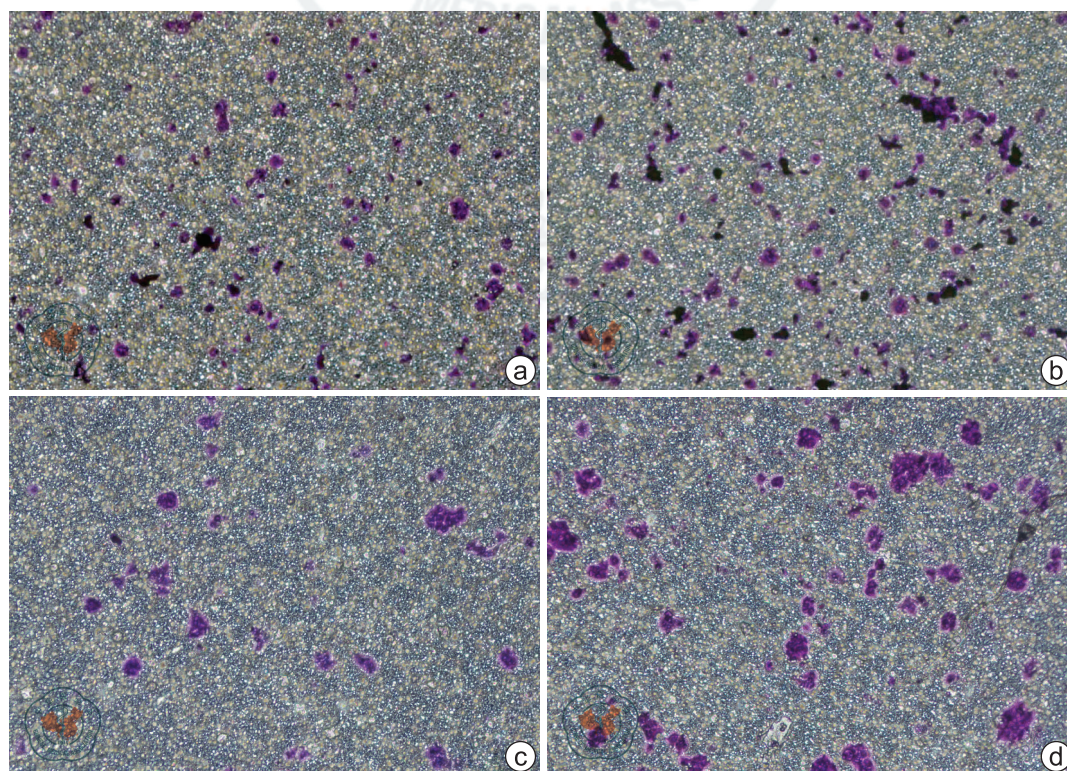
Western blot 检测发现,4组比较,E-cadherin 与 p-ezrin 表达差异有统计学意义( $F=6.317, 48.517$ ,  $P$ 均 $<0.050$ ),ezrin 表达差异无统计学意义( $F=0.868$ , $P=0.497$ ,图6,表2)。两两比较中,3个实验组 E-cadherin 表达水平平均低于对照组(MCF-7 E 组: $P=0.005$ , MCF-7 XCL1 组: $P=0.007$ , MCF-7 XCL1+E 组: $P=0.011$ ),而3个实验组之间两两比较差异无统计学意义( $P$ 均 $>0.050$ )。与 MCF-7 NC

组相比,MCF-7 E 组 p-ezrin 表达差异无统计学意义( $P=0.072$ ),MCF-7 XCL1 组和 MCF-7 XCL1+E 组表达升高( $P$ 均 $<0.001$ )。MCF-7 XCL1+E 组 p-ezrin 表达水平也高于 MCF-7 E 组( $P<0.001$ )和 MCF-7 XCL1 组( $P=0.003$ )。

## 讨 论

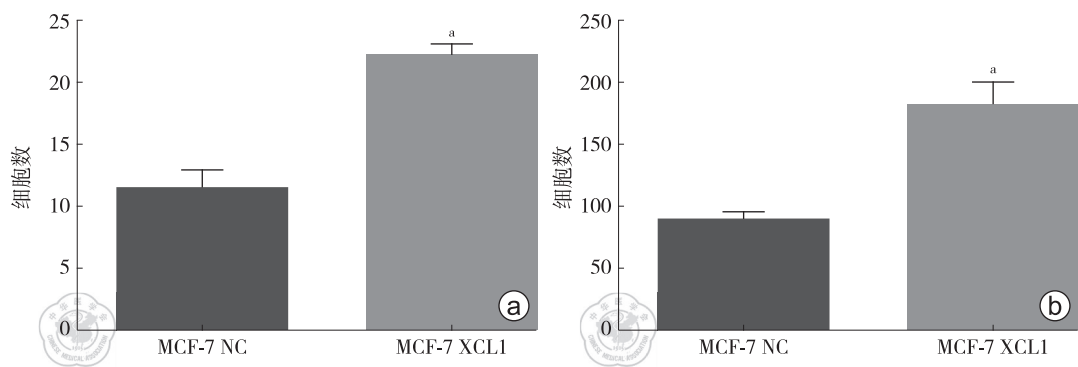
化疗是乳腺癌综合治疗中关键的一环,而化疗耐药正是乳腺癌化疗失败的常见原因之一。乳腺癌化疗过程中肿瘤细胞发生耐药可以促进肿瘤转移,加速疾病进展<sup>[4]</sup>。表柔比星作为目前常用的乳腺癌化疗药物,有研究证实其可以诱导乳腺癌细胞发生上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)并增强细胞的迁移及侵袭能力<sup>[5-6]</sup>。肿瘤细胞在 EMT 过程中获得干性的同时,侵袭、转移能力增强,同时产生了对化疗的耐药<sup>[7-8]</sup>。因此,EMT 是肿瘤细胞侵袭、转移、进入循环生存、靶器官定植以及药物抵抗的关键步骤。

炎症趋化因子是一类可以特异性募集和激活白细胞的小分子蛋白质,属于细胞因子中的一个超家族。根据趋化因子的结构及功能不同可分为4类:CXC( $\alpha$ )、CC( $\beta$ )、C( $\gamma$ )和 CX3C( $\delta$ )趋化因子。迄



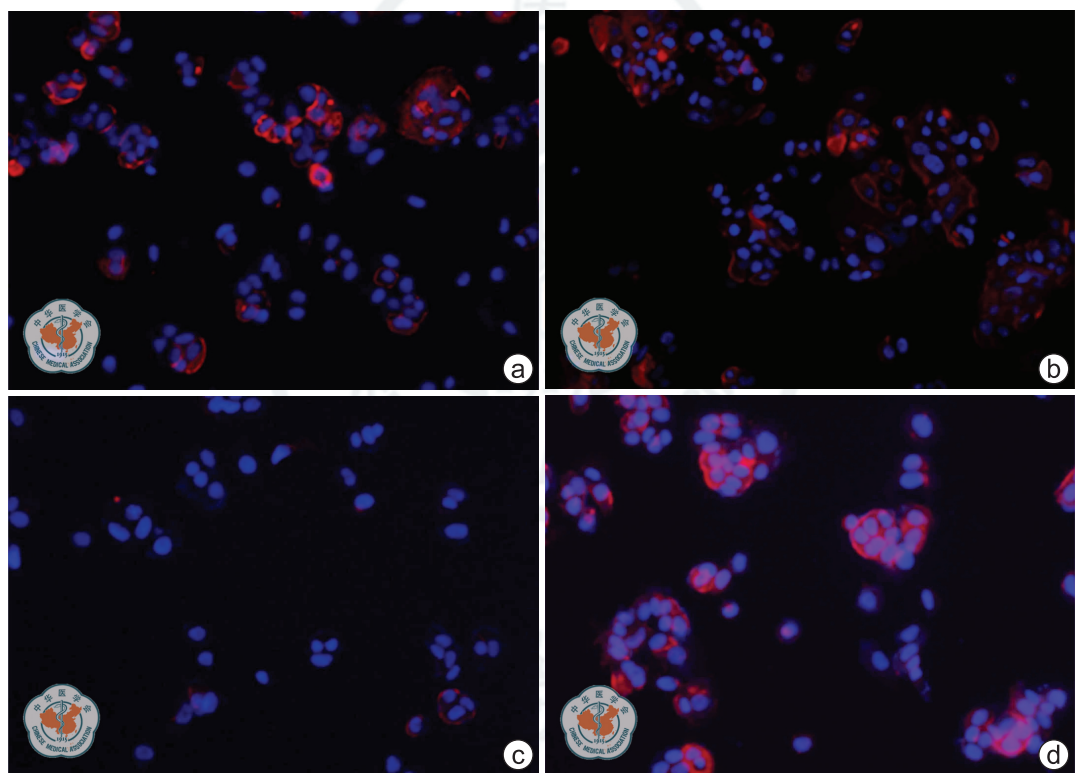
注:a、b图分别为 MCF-7 NC 组和 MCF-7 XCL1 组的迁移实验结果;c、d图分别为 MCF-7 NC 组和 MCF-7 XCL1 组的侵袭实验结果

图3 MCF-7 NC 组和 MCF-7 XCL1 组细胞 Transwell 迁移和侵袭实验(结晶紫  $\times 100$ )



注: \* $P<0.050$ ; a 图为迁移实验结果; b 图为侵袭实验结果

图 4 MCF-7 NC 组和 MCF-7 XCL1 组 Transwell 迁移和侵袭实验的穿膜细胞数



注: a, b 图为 MCF-7 NC 组和 MCF-7 XCL1 组 ezrin 蛋白表达; c, d 图为 MCF-7 NC 组和 MCF-7 XCL1 组 p-ezrin 蛋白表达

图 5 免疫荧光检测乳腺癌 MCF-7 细胞中 ezrin 蛋白表达(DAPI  $\times 200$ )

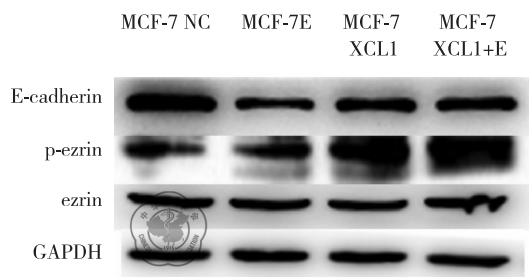


图 6 Western bolt 检测各组 MCF-7 细胞中 E-cadherin、ezrin 及 p-ezrin 的蛋白表达

表 2 各组 MCF-7 细胞中 E-cadherin、ezrin 及 p-ezrin 的蛋白表达

组别	试验次数	E-cadherin	p-ezrin	ezrin
MCF-7 NC	3	1.10 $\pm$ 0.09	0.37 $\pm$ 0.07	0.88 $\pm$ 0.11
MCF-7 E	3	0.65 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	0.54 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.96 $\pm$ 0.09
MCF-7 XCL1	3	0.67 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	0.93 $\pm$ 0.10 <sup>ab</sup>	1.00 $\pm$ 0.19
MCF-7 XCL1+E	3	0.71 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	1.28 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	1.00 $\pm$ 0.06
F 值		6.317	48.517	0.868
P 值		0.017	<0.001	0.497

注: <sup>a</sup> 与 MCF-7 NC 组比较,  $P<0.050$ ; <sup>b</sup> 与 MCF-7 XCL1+E 组比较,  $P<0.050$



今为止,C 家族趋化因子共发现两个成员 XCL1 和 XCL2。炎症趋化因子及受体对于肿瘤细胞的生物学行为的影响非常复杂,在趋化免疫细胞杀伤肿瘤细胞的同时,趋化因子又可以直接或间接促进肿瘤细胞的生长和转移,如 XCL1 就可以通过 JAK2/STAT3 通路促进非小细胞肺癌发生骨转移<sup>[9]</sup>。

在本研究中,一方面外源性 XCL1 刺激乳腺癌 MCF-7 细胞使其对表柔比星的药物敏感性降低。另一方面,迁移和侵袭实验证实,MCF-7 细胞的迁移和侵袭能力在外源性 XCL1 的刺激下得以增强。通过检测 XCL1 刺激后的 MCF-7 细胞,发现 EMT 的相关指标发生了明显的改变。ezrin 蛋白是细胞膜与骨架的连接蛋白,可以调节细胞的运动能力,调节细胞黏附和细胞极性,并且可能参与了细胞外基质的降解<sup>[10]</sup>。研究证实,ezrin 蛋白在侵袭性更高的乳腺肿瘤组织中表达上调,同时伴随着肿瘤细胞上皮型标志物 E-cadherin 蛋白的表达缺失,可以作为乳腺癌细胞发生 EMT 的新型标志物<sup>[11-12]</sup>。ezrin 可以通过影响 Src 激酶的磷酸化状态间接影响  $\beta$ -catenin 的磷酸化,最终影响细胞的黏附、侵袭能力<sup>[13]</sup>。这一系列现象均提示 ezrin 蛋白在乳腺癌细胞 EMT 过程中发挥了重要作用。在本研究中,笔者运用免疫荧光及 Western blot 方法分析了经过 XCL1 诱导刺激的 MCF-7 细胞中 ezrin 及 p-ezrin 蛋白的表达情况。联系上文述及的化疗药物导致化疗耐药、促进肿瘤转移等不良反应,本研究又分别用外源性 XCL1 和表柔比星药物处理 MCF-7 细胞,并联合使用 2 种方式刺激乳腺癌细胞模拟体内环境。结果显示,表柔比星及 XCL1 单药组 E-cadherin 蛋白表达均低于对照组,同时 ezrin 蛋白的磷酸化水平(p-ezrin)均明显升高。联合处理组 E-cadherin 蛋白表达较单药组无明显差异,而 p-ezrin 蛋白明显高于表柔比星及 XCL1 单药处理组,体现出 XCL1 及表柔比星处理的联合效应。这一现象说明当内环境中存在细胞因子 XCL1 时,表柔比星化疗诱导的乳腺癌细胞发生 EMT 的作用可能被进一步放大。由于发生 EMT 的肿瘤细胞对于化疗药物的敏感性降低,内环境中的 XCL1 可能参与了乳腺癌细胞对表柔比星的化疗耐药性产生过程。另一方面,这一结果说明在表柔比星耐药乳腺癌细胞株的 EMT 过程中,ezrin 蛋白发挥了关键的作用,提示 ezrin 蛋白可能作为乳腺癌 EMT

新的标志物。

肿瘤微环境中 XCL1 的存在可以诱导 ezrin 蛋白的磷酸化,增强乳腺癌细胞的侵袭转移能力,同时强化其对表柔比星化疗的耐受性。对 XCL1 及 ezrin 蛋白作用的进一步研究,可能对乳腺癌化疗药物耐药机制的研究和破解提供新的思路。

## 参 考 文 献

- [1] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell, 2011, 144(5):646-674.
- [2] Cao X, Zhang W, He L, et al. Lymphotactin gene-modified bone marrow dendritic cells act as more potent adjuvants for peptide delivery to induce specific antitumor immunity[J]. J Immunol, 1998, 161(11):6238-6244.
- [3] 白玉盘, 杨小利, 欧周罗. mTOR 信号通路介导产生 XCL1 可促进乳腺癌耐药细胞株的增殖[J]. 中国癌症杂志, 2014, 24(10):770-776.
- [4] Huang J, Li H, Ren G. Epithelial-mesenchymal transition and drug resistance in breast cancer[J]. Int J Oncol, 2015, 47(3):840-848.
- [5] Li QQ, Xu JD, Wang WJ, et al. Twist1-mediated adriamycin-induced epithelial-mesenchymal transition relates to multidrug resistance and invasive potential in breast cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(8):2657-2665.
- [6] Li W, Liu C, Tang Y, et al. Overexpression of Snail accelerates adriamycin induction of multidrug resistance in breast cancer cells[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2011, 12(10):2575-2580.
- [7] Meng F, Wu G. The rejuvenated scenario of epithelial-mesenchymal transition (EMT) and cancer metastasis [J]. Cancer Metastasis Rev, 2012, 31(3-4):455-467.
- [8] 张春影, 卢颖, 李青, 等. 上皮间质转化及其相关信号通路及乳腺癌干细胞的关系[J/CD]. 中华乳腺病杂志(电子版), 2015, 9(1):54-57.
- [9] Wang T, Han S, Wu Z, et al. XCR1 promotes cell growth and migration and is correlated with bone metastasis in non-small cell lung cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 464(2):635-641.
- [10] Clucas J, Valderrama F. ERM proteins in cancer progression [J]. J Cell Sci, 2015, 128(6):1253.
- [11] Yu Z, Sun M, Jin F, et al. Combined expression of ezrin and E-cadherin is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in breast cancer [J]. Oncol Rep, 2015, 34(1):165-174.
- [12] He J, Ma G, Qian J, et al. Interaction between ezrin and cortactin in promoting epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells [J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 1583-1596.
- [13] 何菁, 夏添松, 王水. 埃兹蛋白对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 侵袭转移能力影响的初步实验研究[J/CD]. 中华乳腺病杂志(电子版), 2015, 9(2):106-110.

(收稿日期:2016-11-08)

(本文编辑:刘军兰)

马奇, 王佳, 夏添松, 等. 淋巴细胞趋化因子对乳腺癌 MCF-7 细胞的表柔比星药物敏感性及侵袭转移能力的影响[J/CD]. 中华乳腺病杂志(电子版), 2017, 11(6):354-360.