

肿瘤微环境趋化因子通过与细胞因子受体 互作参与 HCC 诱导的炎症反应

韩鑫鑫¹, 梁浩源¹, 唐玉莲², 倪安妮³, 陆瑞群², 李曙波², 李根亮²

(1. 右江民族医学院临床医学院 2016 级, 广西 百色 533000;

2. 右江民族医学院, 广西 百色 533000;

3. 右江民族医学院研究生学院 2018 级, 广西 百色 533000)

摘要:目的 探讨肿瘤微环境(TM)中趋化因子参与肝细胞癌(HCC)引起的炎症反应的可能机制。方法 提取肿瘤组织(TM组)和癌旁组织(对照组)总RNA并通过RNA-seq和生物信息学手段分析趋化因子相关差异表达基因的功能及其编码蛋白的互作情况,并以RT-qPCR验证实验结果。结果 TM中共有43个趋化因子相关差异表达基因,它们被富集到2个KEGG信号通路、5个生物学过程和2个细胞组分,其中大量趋化因子相关基因参与炎症反应、免疫反应、趋化性、细胞对IL-1的反应和细胞对肿瘤坏死因子的反应过程。尤其值得一提的是,涉及趋化性的7个基因(ACKR3、CCL20、CCL3、CCL5、CCR4、CCR6、PTGDR2)中,有6个参与细胞因子-细胞因子受体信号通路、5个参与免疫反应、4个参与炎症反应;涉及细胞因子-细胞因子受体信号通路的134个基因中有7个参与炎症反应。结论 TM中趋化因子通过与细胞因子受体互作的方式参与HCC诱导的炎症反应。

关键词:趋化因子;细胞因子-细胞因子受体互作;肿瘤微环境;癌,肝细胞

中图分类号:R392.12

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2019)06-0610-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2019.06.003

Chemokines are involved in the HCC induced- inflammatory response via interaction with cytokine receptor in tumor microenvironment

Han Xinxin¹, Liang Haoyuan¹, Tang Yulian², Ni Anni³, Lu Ruiqun², Li Shubo², Li Genliang²

(1. Grade 2016, School of Clinical Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;

2. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;

3. Grade 2018 of Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the possible mechanism of chemokines which are involved in hepatocellular carcinoma (HCC) -induced inflammatory response in tumor microenvironment (TM). **Methods** Total RNA was extracted from tumor tissues (TM group) and paracancerous tissues (control group) and the function of chemokine-related differentially expressed genes and the interaction of their encoded proteins were analyzed by RNA-seq and bioinformatics ways. RT-qPCR was used to verify the experiment results. **Results** There were 43 chemokine-related differentially expressed genes in the TM, they were enriched into 2 KEGG

基金项目:国家级大学生创新创业训练计划项目(201810599006);广西自然科学基金项目(2016GXNSFAA380177、2015 GXNSFAA139219)

通讯作者简介:李根亮(1970-),男,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:分子免疫学及表观遗传机制,E-mail:ligenliang@163.com

signal pathways, 5 biological processes and 2 cellular components. Most of chemokine-related genes were involved in processes such as inflammatory response, immune response, chemotaxis, cellular response to interleukin-1 and cellular response to tumor necrosis factor. It was worth mentioning that 6 out of the 7 genes involved in chemotaxis (ACKR3, CCL20, CCL3, CCL5, CCR4, CCR6, PTGDR2) were participated in the signaling pathway of cytokine-cytokine receptor interaction, 5 were involved in the immune response, 4 were involved in the inflammatory response. Seven out of the 134 genes involved in the signaling pathway of cytokine-cytokine receptor interaction were involved in the inflammatory response. **Conclusion** Chemokines in the TM participate in the HCC-induced inflammatory responses via interacting with cytokine receptors.

Key words: chemokine; cytokine-cytokine receptor interaction; tumor microenvironment; carcinoma, hepatocellular

国内肿瘤学研究表明,包括趋化因子在内的细胞因子广泛参与肿瘤的发生发展以及浸润转移过程^[1]。趋化因子是一类重要的细胞因子,具有广泛生物活性,对细胞活化迁移、机体免疫功能及许多疾病的发生发展具有重要的调节作用^[2-3]。因此,趋化因子已经成为肿瘤领域以及靶向治疗领域中的研究热点^[4]。与趋化因子功能相关的细胞因子种类很多,如参与免疫应答的白细胞介素(IL)等^[4-5]。肿瘤微环境(TM)是癌细胞生存的内部环境。TM中癌细胞过度增殖和异常分化刺激体内免疫细胞产生趋化因子,影响TM内各种细胞的迁移运动及炎症反应。肝细胞癌(HCC)是常见恶性肿瘤之一,但趋化因子如何参与HCC引起的炎症反应过程还有待进一步研究。为了探讨这一科学问题,本研究通过建立小鼠HCC模型,分别提取瘤体组织作为TM,并取癌旁组织作对照。然后通过RNA-seq分析两组样本中的差异表达基因,并将之与基因数据库数据进行比对,获得趋化因子相关差异表达基因,再通过生物信息学手段分析这些基因的功能,以分析趋化因子参与HCC引起的炎症反应的可能机制。研究结果可为从TM角度分析趋化因子的临床应用提供基础理论数据。

1 材料和方法

1.1 实验材料 肝癌组织和癌旁组织(本实验室构建的肝癌模型小鼠)分别作为TM组和对照组^[6]。

1.2 总RNA提取 RNA提取及RNA-seq RNA提取、RNA-seq、质量检测、组装及clean reads筛选按常规程序完成^[6]。同组内等量取各样本总RNA($n=40$)混合成混合总RNA样本。

1.3 趋化因子相关差异表达基因的筛选 首先以“肿瘤微环境(tumor microenvironment)、血液(blood)及小鼠(Mus musculus)”为关键词,在NCBI的基因数据库进行检索,再利用DAVID在线软件对所搜索得到的基因进行功能富集,筛选出趋化因子相关基因;并将这些基因和TM RNA-seq测序结果中的差异表达基因进行比对,获得趋化因子相关差异表达基因。之

所以检索词选择“肿瘤微环境及血液”,是因为本研究的目的主要是分析TM中趋化因子参与的炎症反应,而血液指标又容易进行临床检测,且TM中的趋化因子也极易扩散到血液中。

1.4 趋化因子相关差异表达基因的功能分析 通过DAVID在线软件,对以上获得的趋化因子相关差异表达基因进行功能富集。

1.5 相关差异表达基因编码蛋白的互作分析 通过STRING 11.0版本软件在线对趋化因子相关基因表达编码蛋白进行互作分析,以此评价TM血清中趋化因子相关差异表达基因在分布和功能上的相关性。

1.6 差异表达基因的RT-qPCR 利用筛选出在两类样本中都表达的差异表达基因进行RT-qPCR分析,内参基因为RN18s,检测相关基因的表达情况^[6]。

2 结果

通过比对分析,我们共筛选出43个趋化因子相关差异表达基因。对这些基因进行功能富集,共得到2个KEGG信号通路、5个生物学过程(BP)和2个细胞组分(CC),见图1。从两个CC可以看出,大量趋化因子相关基因编码蛋白分布于胞外区域。而从5个BP可以看出,这些基因编码蛋白参与的生物学过程,包括炎症反应(17个基因)、免疫反应(10个基因)、趋化性(7个基因)、细胞对白介素1的反应(6个基因)和细胞对肿瘤坏死因子的反应(6个基因)等。2条信号通路则分别是细胞因子与细胞因子受体的相互作用(13个基因)和类风湿关节炎(8个基因)。尤其值得一提的是,参与趋化性的7个基因(ACKR3、CCL20、CCL3、CCL5、CCR4、CCR6、PTGDR2)全部参与细胞对肿瘤坏死因子的反应,且其中有6个参与细胞因子-细胞因子受体信号通路,5个参与免疫反应,4个参与炎症反应。另外,参与细胞因子-细胞因子受体信号通路的134个基因中有7个参与炎症反应。相关基因编码蛋白的互作情况见图2。趋化因子相关差异表达基因的RT-qPCR引物及在TM中的表达情况见表1和图3。RT-qPCR与RNA-seq的数据比较表明,两种方法所

得结果一致。

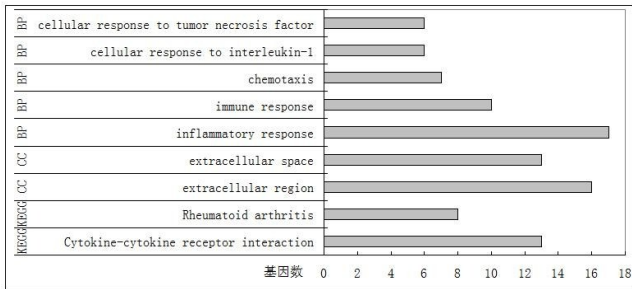


图 1 肝癌 TM 中趋化因子相关差异表达基因的生物学功能

注:BP:生物学过程,CC:细胞组分,KEGG:信号通路

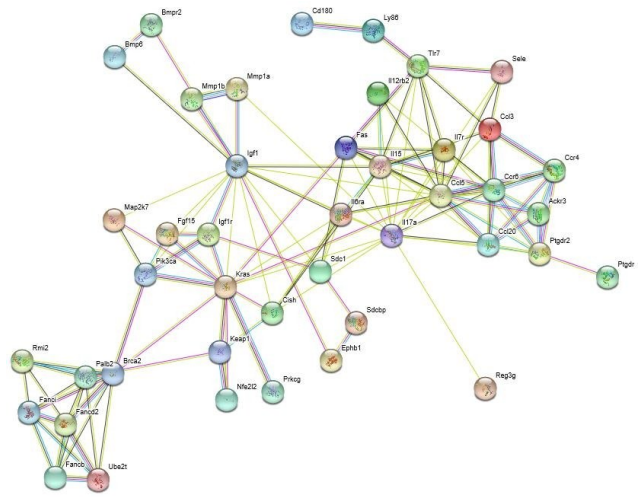


图 2 肝癌 TM 中趋化因子相关差异表达基因编码蛋白的相互作用

表 1 基因 RT-qPCR 引物

基因	5'-引物	3'-引物
RN18s	GGTGAAGGTCGGTGTGAACG	CTCGCTCCTGGAAGATGGTG
Fancd2	CAAAATCAGCTAGGTGTGGATCA	CCAGGCCATTAACAAACTCTTCT
Fas	GCCAACCTGAAAAGTAGGCTG	CGTTTGGCTTCTTTACCCACC
Il6ra	GCCACCGTTACCCTGATTTG	TCCTGTGGTAGTCCATTCTCTG
Palb2	TCGACTTCAGCGTGCCAAAA	AGAGTGGCTTAGCTGTGAGGA
Ube2t	AACGGTCTCCGCGGTTCC	GTGAGGCTCTCTGCATGATCT

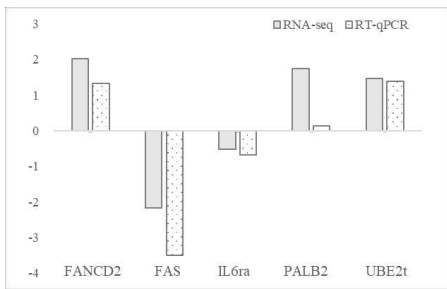


图 3 趋化因子相关差异基因在肝癌 TM 中的相对表达情况(与对照组相比)

注:内参基因为 RN18s;图中数值是以 3 为底的对数值。数据表明,两种方法所得结果一致

3 讨论

本研究通过从 NCBI 数据库中下载 TM 及血清相关基因,构建基因比对数据库,进而通过比对从测序数据中筛选出 IL1 α 、IL1r1、IL6r1、CCL2、CCL7、CCL12、FAS、PALB2、UBE2T 等大量趋化因子相关差异表达基因。这些基因参与的生物学过程主要包括炎症反应、免疫反应、趋化性、细胞对 IL-1 的反应等,而这个过程与信号通路细胞因子与细胞因子的相互作用相关。

趋化性是指运动细胞根据化学刺激物即趋化因子

的化学浓度梯度定向运动或生长的特性^[7]。趋化因子作为一类重要的细胞因子,已经被确定为大量疾病的重要介导物质,临床上可根据它们在细胞迁移以及炎症反应过程中的不同作用来预测疾病的发生^[8]。在慢性 HCV 感染过程中,IL-2 的分泌在肝蛋白中占据主导地位^[9]。趋化因子在癌症发生发展中的作用已被广泛研究和证实,如 CCR1-CCL3 轴可促进肝细胞癌的发展^[10],肿瘤衍生的 CCL5 可以抑制 T 细胞反应并促进小鼠乳腺癌的体内生长^[11],肿瘤细胞表达的 TLR4 可能与趋化因子如 CCL20 的诱导有关^[12],乳腺癌生长和转移受 CXCR7 介导的 STAT3 激活和肿瘤微环境的调节^[13]。另外,趋化因子也参与自身免疫性疾病的发生,如 CCR6 能够调控类风湿性关节炎等自身免疫性关节炎中的 Th 细胞的功能^[14]。

本研究结果表明,参与趋化性的 7 个基因中有 6 个参与细胞因子-细胞因子受体信号通路,表明趋化因子相关分子在 HCC 中是通过细胞因子信号通路起作用的。而参与趋化性及细胞因子-细胞因子受体信号通路的基因中的大多数还参与免疫反应和炎症反应,表明趋化因子相关基因的功能在通过细胞因子-细胞因子受体信号通路起作用的过程中主要是参与 HCC 中的免疫反应和炎症反应。这些结果说明 TM 中的趋化因子是通过与细胞因子受体互作的方式参与 HCC

诱导炎症反应的。

我们的实验数据还给我们提示了治疗 HCC 的一种可能方式,即通过制备肝癌微环境趋化因子相关分子的抗血清或功能抑制剂,来抑制趋化因子参与的异常细胞因子-细胞因子受体信号通路,从而调控细胞迁移,以控制 HCC 引起的炎症反应,进而抑制 HCC 的发生、发展。实验结论可为肿瘤临床精准靶向治疗的研究提供实验资料。我们的分析结果还显示,趋化因子相关差异表达基因还参与了类风湿关节炎(RA)信号通路,表明 HCC 发生中还可能会伴随着 RA 的发生,这还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 许烂漫,何进科,张天晓,等. 骨髓间充质干细胞免疫调节作用对急性肝功能衰竭大鼠肝再生的影响[J]. 中华传染病杂志,2016,34(2):97-102.
- [2] Khan MA, Khurana N, Ahmed RS, et al. Chemokines: A potential therapeutic target to suppress autoimmune arthritis [J]. *Curr Pharm Des*, 2019, 25(27):2937-2946.
- [3] Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular end of helium under flow conditions [J]. *Nature*, 1999, 398:718.
- [4] 董智琦,文国容,虞必光. 趋化因子及其受体在肿瘤发生发展中作用的研究进展[J]. 安徽医药,2018,22(6):1011-1014.
- [5] 谢广成,郭妮君,王莹,等. EV-A71 感染小鼠巨噬细胞诱导促炎细胞因子和趋化因子反应[J]. 病毒学报,2016,32(3):308-315.
- [6] Li L, Ni AN, Yu MY. Pretumor microenvironment of hepatocellular carcinoma: Cancerization or anticancerization? [J]. *Gene*, 2019, 701:46-54.
- [7] 赵立峰,卢静,邱丽芳,等. IL-37 及其抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. 右江民族医学院学报,2019,41(2):214-218.
- [8] Williams AE, José RJ, Brown JS, et al. Enhanced inflammation in aged mice following infection with *Streptococcus pneumoniae* is associated with decreased IL-10 and augmented chemokine production [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 308(6):L539-549.
- [9] Yang YF, Tomorrow M, Iwasaki M, et al. IL-12 as well as IL-2 upregulates CCR5 expression on T cell receptor-triggered human CD4⁺ and CD8⁺ T cells [J]. *J Clin Immunol*, 2001, 21(2):116-125.
- [10] Yang X, Lu P, Fujii C, et al. Essential contribution of a chemokine, CCL3, and its receptor, CCR1, to hepatocellular carcinoma progression [J]. *Int J Cancer*, 2006, 118(8):1869-1876.
- [11] Adler EP, Lemken CA, Katchen NS, et al. A dual role for tumor-derived chemokine RANTES (CCL5) [J]. *Immunol Lett*, 2003, 90(2-3):187-94.
- [12] Wang L, Liu Q, Sun Q, et al. TLR4 signaling in cancer cells promotes chemoattraction of immature dendritic cells via autocrine CCL20 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 366(3):852-856.
- [13] Wani N, Nasser MW, Ahirwar DK, et al. C-X-C motif chemokine 12/C-X-C chemokine receptor type 7 signaling regulates breast cancer growth and metastasis by modulating the tumor microenvironment [J]. *Breast Cancer Res*, 2014, 16(3):R54. doi:10.1186/bcr3665.
- [14] Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, et al. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model [J]. *J Exp Med*, 2007, 204(12):2803-2812.

收稿日期:2019-10-30;修回日期:2019-11-07