

本文引文格式:赵禹博,唐嘉铭,李关杰,等. CCL20对未分化甲状腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J]. 右江民族医学院学报, 2026, 48(1): 8-12.

【论著与临床报道】

CCL20对未分化甲状腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响

赵禹博,唐嘉铭,李关杰,庄高建,柳林,王俊英,周晶晶,罗国庆

(广州医科大学附属清远医院,清远市人民医院甲乳外科,广东 清远 511518)

摘要:目的 探讨 C-C 基序趋化因子配体 20(CCL20)在未分化甲状腺癌(ATC)中的表达及其对 ATC 细胞生物学行为的影响,阐明其可能的作用机制。**方法** 采用 qRT-PCR 实验以及 Western Blot 实验检测 Nthy-ori-3-1 和 ATC 细胞中 CCL20 的 mRNA 及蛋白表达水平;使用慢病毒 shCCL20 感染 ATC 细胞敲减 CCL20,采用 qRT-PCR 方法检测 CCL20 的敲减效率;采用 CCK-8 实验、伤口愈合实验、Transwell 实验以及平板克隆形成实验检测敲减 CCL20 后 ATC 细胞增殖、迁移、侵袭和克隆形成能力的变化。**结果** 与甲状腺正常细胞 Nthy-ori-3-1 相比,ACT-1 和 8305C 细胞中 CCL20 的 mRNA 水平和蛋白表达水平均显著升高($P < 0.01$)。CCK-8、伤口愈合、Transwell 以及平板克隆形成实验结果显示,敲减 CCL20 后 ATC 细胞增殖、迁移、侵袭以及克隆形成能力均降低($P < 0.05$)。**结论** CCL20 是 ATC 恶性行为的驱动因子,敲减 CCL20 可抑制 ATC 细胞增殖、迁移、侵袭和克隆形成能力。

关键词:未分化甲状腺癌;C-C 基序趋化因子配体 20;肿瘤细胞增殖;肿瘤细胞迁移;肿瘤细胞侵袭

中图分类号:R736.1

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2026)01-0008-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2026.01.002

Effects of CCL20 on proliferation, migration, and invasion of anaplastic thyroid carcinoma cells

ZHAO Yubo, TANG Jianuo, LI Guanjie, ZHUANG Gaojian, LIU Lin,
WANG Junying, ZHOU Jingjing, LUO Guoqing

(Department of Thyroid and Breast Surgery, Qingyuan Hospital Affiliated to Guangzhou Medical University, Qingyuan People's Hospital, Qingyuan 511518, Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of C-C motif chemokine ligand 20 (CCL20) in anaplastic thyroid carcinoma (ATC) and its impacts on the biological behaviors of ATC cells, as well as to elucidate its underlying mechanisms. **Methods** qRT-PCR and Western Blot assays were employed to detect the mRNA and protein expression levels of CCL20 in Nthy-ori-3-1 and ATC cells. ATC cells were infected with lentiviral shCCL20 to knock down CCL20, and the knockdown efficiency of CCL20 was detected by qRT-PCR. CCK-8 assay, wound healing assay, Transwell assay, and colony formation assay were utilized to assess the changes in the proliferation, migration, invasion, and colony-forming ability of ATC cells after CCL20 knockdown. **Results** Compared with Nthy-ori-3-1 normal thyroid cells, the mRNA levels and protein expression levels of CCL20 in both ACT-1 and 8305C cells were significantly elevated ($P < 0.01$). The results of CCK-8, wound healing, Transwell, and colony formation assays demonstrated that the proliferation, migration, invasion, and colony-forming ability of ATC cells were reduced after CCL20 knockdown ($P < 0.05$). **Conclusion** CCL20 is a driving factor for the malignant behaviors of ATC. Knockdown of CCL20 can inhibit the proliferation, migration, invasion, and colony-forming ability of ATC cells.

Key words: anaplastic thyroid carcinoma; C-C motif chemokine ligand 20; tumor cell proliferation; tumor cell migration; tumor cell invasion

基金项目:清远市人民医院人才引进启动经费(15001019001414)

第一作者:赵禹博,博士,研究方向:肿瘤的发病机制及其靶点验证,E-mail:j2456097832@qq.com

通讯作者:罗国庆,博士,研究方向:肿瘤的发病机制及其靶点验证,E-mail:luogouqing2025@sina.com

甲状腺癌在全球范围内是最普遍的内分泌恶性肿瘤,其发病率持续上升。2020 年,全球报告的新发病例大约为 431 000 例,死亡病例约为 35 000 例^[1]。根据病理特征,甲状腺癌可以分为几种类型,包括乳头状癌、滤泡状癌、髓样癌和未分化癌。尽管未分化甲状腺癌(anaplastic thyroid carcinoma, ATC)仅占甲状腺癌的 1%~2%,但其却造成了近 50%的甲状腺癌相关死亡,且中位生存期仅为 3~6 个月^[2]。ATC 以其高度的侵袭性、化疗耐药性及早期转移特征而闻名,目前仍缺乏有效的治疗方法。基础研究表明,ATC 的恶性进展与肿瘤微环境的重塑存在密切关系^[3]。C-C 基序趋化因子配体 20 (C-C motif chemokine ligand 20, CCL20)作为 CCR6 受体的配体,已被证实多种实体瘤中通过调控免疫抑制及上皮-间质转化促进转移。具体来说,在结直肠癌中,CCL20 通过 CXCL2-CXCR2 通路促进乳腺癌细胞的干细胞特性^[4];同时,CCL20 也促进了乳腺上皮细胞的迁移与侵袭^[5]。然而,关于 CCL20 在未分化甲状腺癌中的功能研究仍显不足,其具体作用机制及潜在的靶向干预能力尚未明确。本研究旨在探讨 CCL20 在 ATC 细胞中的表达,通过在 ACT-1 和 8305C 细胞中敲减 CCL20,分析其对细胞增殖、迁移侵袭以及克隆形成能力的影响,为 ATC 的诊断和治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 细胞培养所用的 RPMI-1640 培养基、DMEM 培养基、青霉素/链霉素及胰蛋白酶均购自 Gibco Life Technologies(美国);胎牛血清来源于依科赛生物(澳大利亚);TRIzol(赛默飞世尔科技公司,美国);反转录试剂盒及 Taq Pro Universal SYBR 混合物(南京诺唯赞,中国);BCA 蛋白试剂盒(索莱宝,中国)、CCK-8 试剂盒(新赛美生物科技,中国)、Matrigel 胶(BD,美国)、Transwell 小室(Corning,美国)以及伤口愈合插件(NEST,中国)。实验设备包括 CO₂ 恒温培养箱(ESCO Micro Pte Ltd,新加坡)、凝胶成像系统(伯乐生命医学,美国)及酶标仪(SPECTRO Star,美国)。

1.2 细胞培养 人甲状腺正常细胞 Nthy-ori-3-1 及人 ATC 细胞系 ACT-1 和 8305C 均购自 ATCC 细胞库。Nthy-ori-3-1 细胞、ACT-1 细胞和 8305C 细胞分别使用 RPMI-1640、DMEM 和 MEM 完全培养基中培养。所有细胞的培养条件均为 5% CO₂, 37 °C 恒温培养。

1.3 构建稳转细胞株 在对数生长期,将 ACT-1 和 8305C 细胞接种于 24 孔板中,当细胞汇合度达到 30%~50%时,换入含有 2 μg Polybrene 的完全培养基,添加 5 μL 滴度为 1×10⁸ TU/mL 的慢病毒悬液以敲减 CCL20(shCCL20),与阴性对照组(NC, Negative

control)慢病毒进行对照,轻轻混匀后继续培养 16~24 h,感染结束后更换新鲜培养基以去除病毒残留。72 h 后可观察荧光强度并检测慢病毒感染效率。

1.4 qRT-PCR 实验 通过 TRIzol 法提取总 RNA,使用反转录试剂盒构建 20 μL 的逆转录反应体系,将其转录为 cDNA。反应体系包括 4 μL 的 5×All-in-one qRT SuperMix、1 μL 的 Enzyme Mix、1 μg 的模板 RNA,并用 RNase-free ddH₂O 补足至 20 μL;轻轻吹打混匀后短暂离心,随后在 PCR 仪中执行逆转录程序:50 °C 反应 15 min,85 °C 处理 5 s,最后在 4 °C 保存。获得 cDNA 后构建 20 μL 的 qPCR 反应体系,包括 10 μL 的 2×Taq Pro Universal SYBR qPCR Green Master Mix、2 μL 的 cDNA、0.4 μL 上游引物、0.4 μL 下游引物和 7.2 μL 的 ddH₂O;混匀后分装至标记好的八联管中,短暂离心去除气泡后置于 PCR 仪,反应程序设置为 95 °C 预变性 30 s(1 次循环),随后为 95 °C 变性 5 s 和 60 °C 退火延伸 30 s(40 次循环)。GAPDH 作为内参,使用 2^{-ΔΔCt} 法计算相对表达水平。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Gene	Sequence (5' to 3')
CCL20 Fw	TCCACCTCTGCGGCGAATC
CCL20 Rv	GCATTGATGTCACAGCCTTCATTG
GAPDH Fw	CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC
GAPDH Rv	ACCAAATCCGTTGACTCCGA

1.5 Western Blot 实验 收集 ACT-1 和 8305C 细胞,使用 RIPA 裂解液提取蛋白,通过 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,上样 60 ng,恒压 160V 进行 50 min 电泳。转膜后将 PVDF 膜在室温封闭 2 h(5%脱脂牛奶封闭)后用 TBST 洗 3 次,每次 10 min。一抗 4 °C 过夜。第 2 天 TBST 洗 3 次后加入二抗(1:10 000)室温孵育 2 h 后洗涤。显影后使用 ImageJ 软件进行半定量分析。所用抗体包括 anti-CCL20(84413-3-RR, Proteintech)和 anti-GAPDH(60004-1-Ig, Proteintech)。

1.6 平板克隆形成实验 将对数生长期的处理组(敲减 CCL20 的 ACT-1 和 8305C 细胞)及对照组细胞消化,按照 1000 个细胞/孔铺在 6 孔板中。于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,每 3 天更换培养基,持续 14 d。终止培养后,4%多聚甲醛固定(15 min),1%结晶紫染色 15 min。弃去染液,PBS 轻柔洗涤,晾干后拍照记录克隆形成情况。

1.7 伤口愈合实验(细胞划痕实验) 处理组及对照组细胞消化后加入伤口愈合插件的孔中(3.5×10⁴ 细胞/孔)。待细胞融合度达约 90%时移除插件。PBS 清洗后加入新鲜培养基。分别于划痕形成后 0 h 及 24

h 拍照,使用 ImageJ 软件分析并计算愈合率。

1.8 Transwell 细胞迁移实验 在 24 孔板下室加入 600 μL 完全培养基。将处理组及对照组细胞消化、重悬,调整密度为 1×10⁵ 个细胞/孔(200 微升/腔),接种于 Transwell 小室上腔。培养 48 h 后,取出小室并用 PBS 漂洗 3 次,接下来用 4% 多聚甲醛固定 30 min 后使用 1% 结晶紫染色 5 min。湿棉签擦去上室未迁移细胞。倒置显微镜下拍照,使用 ImageJ 软件计数下室迁移细胞并分析。

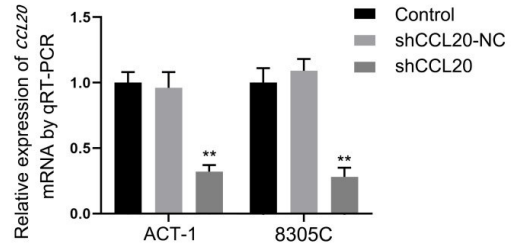
1.9 Transwell 细胞侵袭实验 实验步骤参考 1.8 迁移实验。差异在于:在接种细胞前,需预先在 Transwell 小室上腔膜均匀铺布 100 μL Matrigel 基质胶,置于 37 °C 孵育 2 h。后续细胞接种(密度 1×10⁵ 个细胞/腔)、培养(48 h)、固定、染色、清洗及计数分析方法均同迁移实验。

1.10 统计学方法 采用 GraphPad Prism 8.0 软件对实验数据进行统计学分析,正态分布计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ATC 细胞中 CCL20 的表达水平 与 Nthy-ori-3-1 细胞相比,ACT-1 和 8305C 细胞中 CCL20 的 mRNA 水平和蛋白表达水平均显著升高($P < 0.01$)。见图 1。

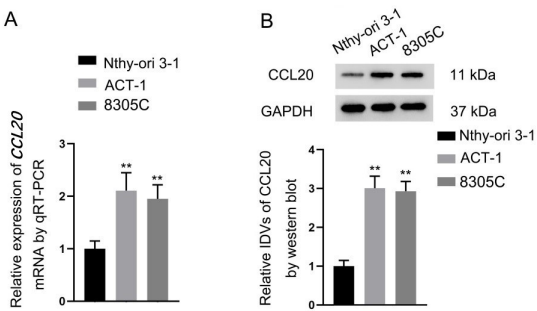
2.2 ACT-1 和 8305C 细胞 CCL20 的敲减效率 通过 qRT-PCR 实验评估在 ACT-1 和 8305C 细胞中 CCL20 的表达情况。结果显示,与对照组(shCCL20-NC 组)相比,shCCL20 组中 CCL20 的表达水平显著降低($P < 0.01$),证明了在 ACT-1 和 8305C 细胞中成功实现了 CCL20 的敲减。见图 2。



注:与 shCCL20-NC 组相比,** $P < 0.01$, $n = 3$ 。

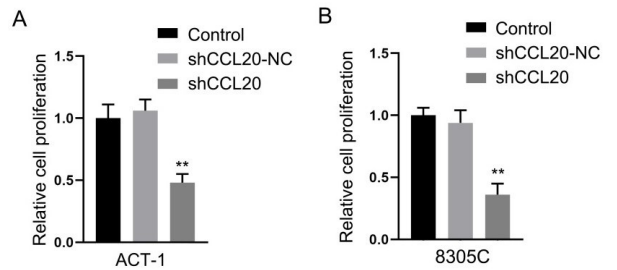
图 2 qRT-PCR 实验检测 CCL20 在 ACT-1 细胞和 8305C 细胞的敲减效率

2.3 敲减 CCL20 后 ACT-1 和 8305C 细胞增殖和克隆形成能力的变化 在敲减 CCL20 后,通过 CCK-8 实验分析细胞的增殖能力。结果显示,与 shCCL20-NC 组相比,shCCL20 组的 ACT-1 和 8305C 细胞的增殖活性显著降低($P < 0.01$)。平板克隆形成实验的结果表明,shCCL20 组中 ACT-1 和 8305C 细胞的克隆形成数量明显减少。见图 3 和图 4。



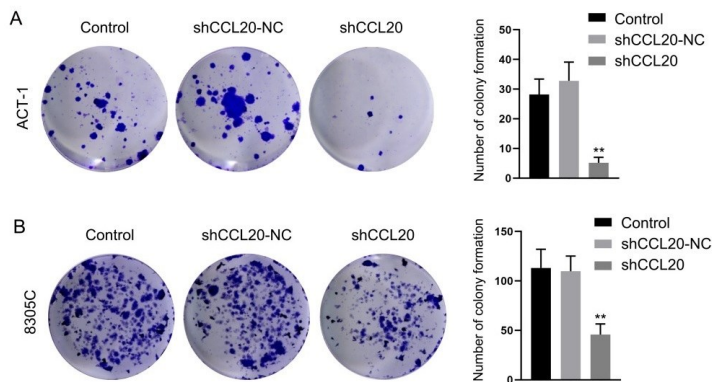
注:与 Nthy-ori-3-1 组相比,** $P < 0.01$, $n = 3$ 。

图 1 qRT-PCR(A)和 Western Blot 实验(B)检测 ACT-1 和 8305C 细胞中 CCL20 的 mRNA 水平和蛋白表达



注:与 shCCL20-NC 组相比,** $P < 0.01$, $n = 3$ 。

图 3 CCK-8 法检测敲减 CCL20 后 ACT-1 细胞(A)和 8305C 细胞(B)增殖能力的变化

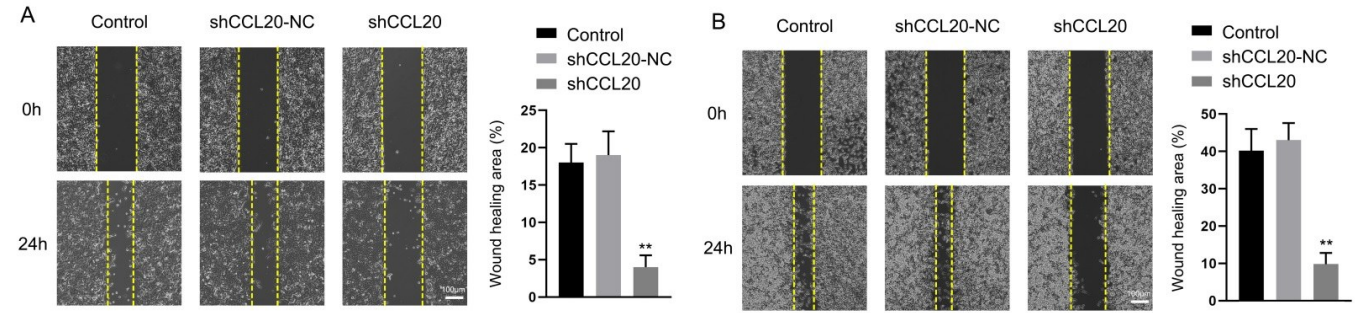


注:** $P < 0.01$, $n = 3$ 。

图 4 平板克隆实验检测敲减 CCL20 后 ACT-1 细胞(A)和 8305C 细胞(B)克隆形成能力的变化(扫描图)。

2.4 敲减 CCL20 后 ACT-1 和 8305C 细胞划痕愈合能力变化 进行划痕实验后,24 h 观察 ACT-1 和 8305C 细胞的划痕情况,与 shCCL20-NC 组相比,

shCCL20 组的细胞划痕距离显著增宽,面积增大,划痕愈合能力显著下降($P < 0.01$)。见图 5。

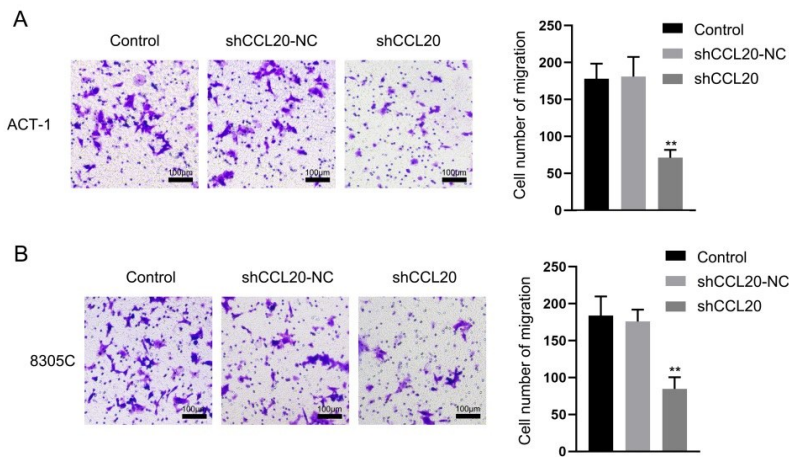


注:与 shCCL20-NC 组相比, ** $P < 0.01$, $n = 3$ 。

图 5 划痕实验检测敲减 CCL20 后 ACT-1 细胞(A)和 8305C 细胞(B)的划痕愈合情况。比例尺=100 μm 。

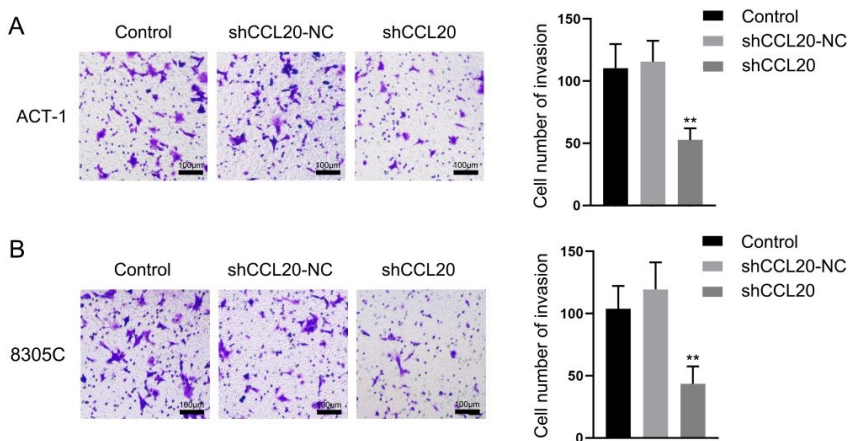
2.5 敲减 CCL20 后 ACT-1 和 8305C 细胞迁移和侵袭能力变化 Transwell 实验结果显示,与 shCCL20-

NC 组相比,shCCL20 组 ACT-1 和 8305C 细胞的迁移和侵袭能力均显著降低($P < 0.01$)。见图 6 和图 7。



注:与 shCCL20-NC 组相比, ** $P < 0.01$, $n = 3$ 。

图 6 Transwell 小室实验检测敲减 CCL20 后 ACT-1 细胞(A)和 8305C 细胞(B)的迁移情况。比例尺=100 μm 。



注:与 shCCL20-NC 组相比, ** $P < 0.01$, $n = 3$ 。

图 7 Transwell 小室实验检测敲减 CCL20 后 ACT-1 细胞(A)和 8305C 细胞(B)的侵袭情况。比例尺=100 μm 。

3 讨论

目前,ATC 的研究主要集中在揭示其高度侵袭性及耐药性的分子机制^[6]。已知肿瘤微环境的重塑是 ATC 的核心特征,其中趋化因子介导的免疫逃逸及转移途径尤为关键^[7-8]。尽管针对 MAPK、PI3K 等信号通路的靶向药物在临床试验中显示了一定的疗效,但总体应答率仍偏低且复发风险较高^[9]。因此,寻找新的 ATC 特异性靶点并阐明其调控网络仍然是该领域亟需突破的方向。本研究以分泌蛋白 CCL20 为切入点,从 ATC 的恶性生物学行为的视角,通过细胞模型探讨 ATC 发生和发展的新机制,为 ATC 提供辅助诊断、干预治疗及预后指导可能的靶标。

已有研究表明^[10],CCL20 在多种肿瘤中发挥重要作用。例如,CircSMARCC1 通过 miR-1322/CCL20/CCR6 信号通路调节前列腺癌细胞与肿瘤相关巨噬细胞之间的相互作用,从而促进肿瘤进展;分枝杆菌通过 miR-1322/CCL20 轴及 M2 极化促进结直肠癌的转移^[11];脂滴积聚通过 CCL20/CCR6 轴介导人肝细胞癌中巨噬细胞的存活与 Treg 的招募^[12];结直肠癌细胞分泌的 CCL20 通过 FOXO1/CEBPB/NF- κ B 信号通路招募调节性 T 细胞,促进化疗耐受性^[13]。本研究发现 CCL20 在 ACT-1 和 8305C 细胞中显著高表达。研究显示^[14],肿瘤相关巨噬细胞通过 CCL20-CCR6 轴促进膀胱癌的转移。CAF 释放的外泌体 CREB1 通过正向调控 CCL20 促进甲状腺癌细胞的进展和免疫逃逸^[15]。本研究通过迁移、侵袭及增殖实验发现,稳定敲减 CCL20 后,ACT-1 和 8305C 细胞的增殖率显著下降,迁移及侵袭能力显著降低。这些结果表明,CCL20 是维持 ATC 恶性表型的关键因子,其功能丧失可显著抑制细胞的增殖、迁移及侵袭能力。

本研究与 CCL20 在其他癌种中的作用机制研究相一致,本研究发现 CCL20 是 ATC 恶性行为的驱动因子,拓展了对 ATC 信号调控网络的理解,为开发靶向 CCL20 的单克隆抗体、小分子抑制剂或基因治疗策略提供了理论依据,同时也为临床上应对 ATC 缺乏有效疗法的困境开辟了新的治疗途径。

参考文献:

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.

[2] CHEN D W, LANG B H H, MCLEOD D S A, et al. Thyroid cancer[J]. *Lancet*, 2023, 401(10387): 1531-1544.

[3] LU LN, WANG JR, HENDERSON YC, et al. Anaplastic transformation in thyroid cancer revealed by single-cell transcriptomics[J]. *J Clin Invest*, 2023, 133(11): e169653.

[4] ZHANG R, DONG MX, TU J, et al. PMN-MDSCs modulated by CCL20 from cancer cells promoted breast cancer cell stemness through CXCL2-CXCR2 pathway[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 97.

[5] MUSCELLA A, VETRUGNO C, MARSIGLIANTE S. CCL20 promotes migration and invasiveness of human cancerous breast epithelial cells in primary culture[J]. *Mol Carcinog*, 2017, 56(11): 2461-2473.

[6] BALOCH Z W, ASA S L, BARLETTA J A, et al. Overview of the 2022 WHO classification of thyroid neoplasms[J]. *Endocr Pathol*, 2022, 33(1): 27-63.

[7] PAN Z F, XU T, BAO L S, et al. CREB3L1 promotes tumor growth and metastasis of anaplastic thyroid carcinoma by remodeling the tumor microenvironment[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 190.

[8] HAN P Z, YE W D, YU P C, et al. A distinct tumor microenvironment makes anaplastic thyroid cancer more lethal but immunotherapy sensitive than papillary thyroid cancer[J]. *JCI Insight*, 2024, 9(8): e173712.

[9] CRACOLICI V, CIPRIANI N A. High-grade non-anaplastic thyroid carcinomas of follicular cell origin: a review of poorly differentiated and high-grade differentiated carcinomas[J]. *Endocr Pathol*, 2023, 34(1): 34-47.

[10] XIE T, FU D J, LI Z M, et al. CircSMARCC1 facilitates tumor progression by disrupting the crosstalk between prostate cancer cells and tumor-associated macrophages via miR-1322/CCL20/CCR6 signaling[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 173.

[11] XU C C, FAN L N, LIN Y F, et al. Fusobacterium nucleatum promotes colorectal cancer metastasis through miR-1322/CCL20 axis and M2 polarization[J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1980347.

[12] WANG Y C, CHEN W B, QIAO S, et al. Lipid droplet accumulation mediates macrophage survival and Treg recruitment via the CCL20/CCR6 axis in human hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Mol Immunol*, 2024, 21(10): 1120-1130.

[13] WANG D, YANG L, YU W N, et al. Colorectal cancer cell-derived CCL20 recruits regulatory T cells to promote chemoresistance via FOXO1/CEBPB/NF- κ B signaling[J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1): 215.

[14] NAKAGAWA R, IZUMI K, HIRATSUKA K, et al. Tumor-associated macrophages promote bladder cancer metastasis through the CCL20-CCR6 axis[J]. *Neoplasia*, 2025, 60: 101103.

[15] ZHENG C, HEI H, ZHAI Y F, et al. CAFs-released exosomal CREB1 promotes cell progression and immune evasion in thyroid cancer via the positive regulation of CCL20[J]. *Autoimmunity*, 2025, 58(1): 2458324.

收稿日期: 2025-09-16; 修回日期: 2025-10-23

(本文编辑 覃黎黎)