

整合素 $\beta 3$ 通过激活 MAPK/ERK 途径 促进鼻咽癌细胞转移*

李飞¹, 李超怡¹, 何越¹, 陈佩玲¹, 陈俊汝¹, 王家胜¹,
李春谋², 曾茂桢¹, 宋琳³, 张擎^{1,4}

1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275
2. 中山大学附属第七医院, 广东 深圳 518107
3. 惠州学院生命科学学院, 广东 惠州 516007
4. 中山大学深圳研究院, 广东 深圳 518057

摘要: 鼻咽癌(NPC, nasopharyngeal carcinoma)作为我国南方及东南亚地区高发的一种头颈部恶性肿瘤, 远端转移和局部复发是导致其治疗失败的主要原因。本研究通过对不同转移能力的鼻咽癌细胞进行分析, 发现整合素 $\beta 3$ (ITGB3, integrin $\beta 3$) 在高转移鼻咽癌细胞中的表达明显高于低转移鼻咽癌细胞。随后的研究表明 ITGB3 的上调表达促进了鼻咽癌细胞迁移、侵袭、克隆形成以及黏附能力, 同时促进了鼻咽癌细胞增殖并抑制其凋亡水平。进一步地, 本研究发现, ITGB3 主要通过激活 MAPK/ERK 途径, 进而促进鼻咽癌细胞迁移、侵袭、克隆形成以及黏附。因此, 研究揭示了 ITGB3 对鼻咽癌细胞转移的调控作用及其分子机制, 为鼻咽癌细胞转移防治与治疗提供了新的理论基础。

关键词: 鼻咽癌; 整合素 $\beta 3$; 肿瘤转移; MAPK/ERK 途径

中图分类号: Q257 **文献标志码:** A **文章编号:** 2097-0137 (2024) 02-0139-11

Integrin $\beta 3$ promotes metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells by activating the MAPK/ERK pathway

LI Fei¹, LI Chaoyi¹, HE Yue¹, CHEN Peiling¹, CHEN Junru¹, WANG Jiasheng¹,
LI Chunmou², ZENG Maozhen¹, SONG Lin³, ZHANG Qing^{1,4}

1. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China
2. The Seventh Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Shenzhen 518107, China
3. School of Life Sciences, Huizhou University, Huizhou 516007, China
4. Institute of Sun Yat-sen University in Shenzhen, Shenzhen 518057, China

* 收稿日期: 2023-08-31 录用日期: 2023-11-03 网络首发日期: 2023-12-04
基金项目: 广东省自然科学基金(2021A1515011209); 广东省基础与应用基础研究项目(2022A1515140100);
广州市科技计划项目(202002030416); 深圳市科技创新委员会基础研究计划(JCYJ20210324120812035)
作者简介: 李飞(1992年生), 男; 研究方向: 肿瘤生物学; E-mail: lifei67@mail.sysu.edu.cn
李超怡(1996年生), 女; 研究方向: 肿瘤生物学; E-mail: sjtulichaoyi@sjtu.edu.cn
何越(1994年生), 男; 研究方向: 生物与医药; E-mail: heyue35@mail2.sysu.edu.cn
(李飞、李超怡、何越并列第一作者)
通信作者: 宋琳(1975年生), 女; 研究方向: 中医药防治痴呆机制; E-mail: drsonglin@163.com
张擎(1966年生), 男; 研究方向: 分子药理学; E-mail: lsszq@mail.sysu.edu.cn
(宋琳、张擎为共同通信作者)

Abstract: Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is a prevalent head and neck malignancy in South China and Southeast Asia, often leading to treatment failure due to distal metastasis and local recurrence. This study showed a significant increase in the expression of integrin $\beta 3$ (ITGB3) in highly metastatic NPC cells compared to poorly metastatic NPC cells. This study further elucidates that upregulation of ITGB3 expression not only enhances the migratory, invasive, clonogenic, and adhesive capacities of NPC cells, but also promotes their proliferation and inhibiting apoptosis. Mechanistically, ITGB3 primarily activates the MAPK/ERK pathway, as a result, enhancing the migratory, invasive, clonogenic, and adhesive capabilities of NPC cells. These findings in the study reveal the regulatory effect and molecular mechanism of ITGB3 on NPC cell metastasis, providing a new theoretical basis for the prevention and treatment of NPC cell metastasis.

Key words: nasopharyngeal carcinoma; integrin $\beta 3$; tumor metastasis; MAPK/ERK pathway

鼻咽癌(NPC, nasopharyngeal carcinoma)作为鼻咽部上皮组织高发的头颈部恶性肿瘤,具有明显的地域分布特征,主要分布于东南亚、北非以及我国南方等地区(Lei et al., 2020)。全球每年约有 8.65 万例鼻咽癌确诊病例,其中有 5 万人死亡(Lao et al., 2020)。目前,鼻咽癌治疗手段主要包括放射治疗、化学治疗以及同步放化疗,尽管鼻咽癌对放射治疗敏感性较高,但放疗后往往出现鼻咽癌复发和远端转移,其中约有 50% 的鼻咽癌病人因远端转移的发生而治疗失败。虽然在过去数十年中放化疗与外科手术治疗效果已经有了明显的提高,但是由于存在较高概率的远端转移与局部复发的发生,目前鼻咽癌患者的生存率并不高(Chang et al., 2004; Li et al., 2020)。值得注意的是,复发性鼻咽癌对放射治疗的耐受性比原发性鼻咽癌更强(Lo et al., 2012),同时对于复发性鼻咽癌的抢救性治疗,包括再放射、抢救性鼻咽部切除术等方式往往会导致严重的颅神经损伤以及放射性坏死等迟发毒性,进而严重影响鼻咽癌患者生活质量(Lee et al., 2012)。而肿瘤转移是鼻咽癌治疗失败与复发的主要原因,远端转移引起的复发性鼻咽癌更是鼻咽癌治疗中所面临的最严峻的挑战(Bensouda et al., 2011)。因此,探索鼻咽癌转移发生发展的分子机制对于发展鼻咽癌靶向治疗策略以及改善鼻咽癌治疗效果具有重要的临床意义。

鼻咽癌转移是一个复杂而连续的过程,涉及到多种癌基因的级联激活与调控。大量研究数据表明,不同转移程度的鼻咽癌肿瘤组织中存在大量差异性表达蛋白分子、LncRNA、miRNA 以及 circ-RNA, 这些不同表达情况的蛋白与 RNA 往往

在鼻咽癌转移调控中起着重要的调控作用,或者共同参与构成了鼻咽癌复杂的转移调控网络(Zhao et al., 2018; Li et al., 2020)。其中,鼻咽癌细胞中不同表达水平的 LncRNA、miRNA 以及 circ-RNA 最终往往通过调节鼻咽癌细胞中肿瘤转移相关调控蛋白,进而发挥对鼻咽癌转移的调控作用,这也构成了鼻咽癌转移的复杂的调控过程,进一步筛选不同转移程度鼻咽癌细胞中差异表达分子,探索鼻咽癌中不同分子之间复杂的调控过程可能对于解析鼻咽癌转移的分子调控机制具有重要的研究价值。

整合素作为重要的质膜组成成分,以多种方式参与不同的细胞生物学功能,如细胞黏附和迁移、细胞增殖和分化、器官发育和组织再生、炎症和肿瘤转移等(Shimaoka et al., 2002)。在肿瘤生物学中,整合素介导的细胞-细胞和细胞-外基质的相互作用是肿瘤细胞从血管外渗和通过结缔组织迁移的重要前提,整合素介导的细胞间黏附影响着细胞行为的变化并在肿瘤细胞转移到远端组织和器官的过程中发挥着关键的调控作用(Couchman et al., 1999; Bachmann et al., 2019)。其中,整合素 $\beta 3$ (ITGB3, integrin $\beta 3$) 作为主要的整合素亚型之一,除了介导血小板的聚集并参与血栓形成外,ITGB3 的表达与激活还与多种肿瘤的侵袭和转移密切相关(Pecheur et al., 2002; Desgrosellier et al., 2009)。ITGB3 可以通过与细胞外基质中的配体结合介导细胞黏附、细胞增殖、转移等效应,也可不依赖于配体的结合而发挥对细胞重编程的作用(Sequin et al., 2015)。同时,ITGB3 可通过激活 KRAS/Ra1B-NF- κ B 通路诱导肿瘤细胞干性的产生并促进其自我更新,引起肿瘤细胞对 EGFR 抑制

剂如埃洛替尼等抗肿瘤药物产生抗性(Sequin et al., 2014)。然而, 对于ITGB3在鼻咽癌中的表达及其对鼻咽癌转移的调控作用目前并没有详细的研究, 进一步探索ITGB3在鼻咽癌转移中的调控作用及其分子机制对于发展更加准确的鼻咽癌转移检测与防治策略具有重要的临床应用潜力。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

真核表达质粒pEF6/His-ITGB3、慢病毒载体质粒pCDH-CMV-His-ITGB3-EF1-copGFP、慢病毒包装质粒psPAX2、pMD2.G(实验室保存)。鼻咽癌细胞系6-10B、5-8F、S26、S18均由中山大学肿瘤防治中心孙蕊医生馈赠, 所有细胞均已通过短串联重复序列(STR, short tandem repeat)验证。

RPMI-1640培养基、PBS buffer购自Cytiva; 胎牛血清、胰酶(+EDTA)购自美国Gibco; 所有抗体均购自Abcam公司; LY3214996(中国Target-Mol); CCK-8(日本Dojindo); 凋亡检测试剂盒(美国BD); 结晶紫染色液(中国碧云天); LipoFilter细胞转染试剂(中国汉恒生物); 总RNA提取试剂RNAiso Plus、反转录试剂盒RT Reagent Kit RR047A、实时荧光定量PCR(qRT-PCR, quantitative real-time PCR)试剂盒(Takara)。

全自动倒置荧光显微镜(日本Nikon); 荧光定量PCR仪(美国Applied Biosystems); 化学发光成像系统(中国Tanon); 流式细胞仪CytoFLEX(德国Beckman); 多功能酶标仪(奥地利Tecan)。

1.2 Western blot

收集鼻咽癌细胞, 加入含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液进行冰上裂解20 min提取总蛋白, 12 000 \times g离心5 min去除细胞碎片, 采用BCA蛋白定量试剂盒按照说明书进行蛋白浓度测定, 加入蛋白上样缓冲液, 煮沸10 min, 取10 μ L进行SDS-PAGE电泳, 120 V恒压电泳1 h, 再恒流200 mA转膜2 h将蛋白转移至PVDF膜上, 0.05 g/mL脱脂奶粉室温进行膜封闭2 h, 加入相应待检测蛋白一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜。第2天先TBST洗膜3次, 每次10 min, 加入相应的HRP标记的二抗室温孵育1 h, 再次TBST洗3次, 每次10 min, 最后滴加ECL化学发光液于天能化学发光成像系统进行成像记录蛋白表达。

1.3 qRT-PCR

收集正常培养的鼻咽癌细胞, 按照总RNA提取试剂RNAiso Plus reagent说明书进行总RNA提取, 以30 μ L无RNA酶DEPC水溶解洗脱获得总RNA, 进行RNA浓度测定。获得总RNA后, 采用Takara反转录试剂盒RT Reagent Kit RR047A参照说明书进行基因组DNA去除和反转录获得cDNA。随后参照ITGB3检测引物(Murray et al., 2017)(表1)进行qRT-PCR检测ITGB3在鼻咽癌细胞中的表达。参照试剂盒说明书配制qRT-PCR反应体系, 然后以95 $^{\circ}$ C预变性30 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 35 s进行40个循环, 最后以95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s采集溶解曲线, 以GAPDH为内参, 根据检测所得CT值计算ITGB3相对表达量。

表1 qRT-PCR引物序列

Table 1 Primers used in qRT-PCR

引物名称	引物序列(5'-3')
ITGB3 Forward	CCACACGAGGCGTGAACCTC
ITGB3 Reverse	CTTCAGGTTACATCGGGGTGA
GAPDH Forward	CAGCAAGAGCACAAGAGGAA
GAPDH Reverse	GTGGTGGGGGACTGAGTGT

1.4 ITGB3过表达细胞系构建

瞬时转染ITGB3过表达细胞系构建采用LipoFilter直接瞬时转染pEF6/His-ITGB3质粒获得。稳定过表达ITGB3鼻咽癌细胞系首先采用pCDH-CMV-His-ITGB3-EF1-copGFP、psPAX2、pMD2.G三质粒按照2:2:1共同转染HEK293T细胞, 48 h后收集ITGB3过表达慢病毒上清感染鼻咽癌细胞, 待病毒感染48 h后进行细胞传代培养, 鼻咽癌细胞状态稳定后, 用流式细胞仪筛选出带绿色荧光的稳定转染细胞系, 最后通过Western blot检测ITGB3的表达以确定ITGB3过表达稳定细胞系是否构建成功。

1.5 细胞迁移实验

将Culture-Insert放入24孔细胞培养板, 随后收集鼻咽癌细胞并接种至24孔板中, $\varphi=5\%$ CO₂ 37 $^{\circ}$ C培养12 h后取出Culture-Insert使其形成细胞划痕, 于荧光显微镜下拍照记录细胞划痕的宽度, 更换新鲜 $\varphi=10\%$ FBS RPMI-1640培养基并在ITGB3过表达组加入LY3214996(10 nmol/L)或等体积PBS培养24 h, 再次于荧光显微镜下采用同样拍摄参数拍照记录细胞划痕的宽度。

1.6 细胞侵袭实验

首先在 24 孔细胞培养板中放置孔径为 8 μm 的 Transwell 小室, 在小室中加入 200 μL Matrigel (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h, 吸去上层水分。随后收集鼻咽癌细胞进行细胞计数, 分别接种 1×10^5 个细胞至 Transwell 上层小室, $\varphi=5\%$ CO_2 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后取出 Transwell 小室, 用棉签轻轻去除小室上层未侵袭的鼻咽癌细胞, 4 g/mL 多聚甲醛固定 20 min 固定下层侵袭细胞, 结晶紫(0.001 g/mL)染色 15 min, PBS 洗 3 遍, 荧光显微镜下选取随机视野拍照记录鼻咽癌细胞侵袭数量。

1.7 克隆形成实验

收集鼻咽癌细胞, 进行细胞计数, 按照每孔 400 个细胞接种至 24 孔细胞培养板, 每培养 48 h 更换一次培养基, 直至肉眼可见单细胞克隆的形成, 于荧光显微镜 488 nm 激发光下观察记录单克隆大小。随后去除培养基上清并加入 PBS 洗 2 遍, 4 g/mL 多聚甲醛固定 20 min, 0.001 g/mL 结晶紫染色 15 min, PBS 洗 3 遍去除结晶紫染液, 直接拍照记录鼻咽癌细胞克隆大小与数量。

1.8 细胞黏附实验

取 500 μL 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的纤连蛋白均匀加入到 24 孔板, 室温放置 1 h 后吸去上清液。按照每孔 1×10^4 个细胞将不同实验条件处理后的鼻咽癌细胞接种至纤连蛋白包被好的 24 孔板, 37 $^{\circ}\text{C}$ $\varphi=5\%$ CO_2 培养箱孵育 15 min, PBS 轻轻洗两遍去除未黏附细胞, 4 g/mL 多聚甲醛固定 20 min, 每孔加入 0.001 g/mL 结晶紫染色 15 min, PBS 洗去多余结晶紫染液后于荧光显微镜观察记录鼻咽癌细胞黏附。

1.9 CCK8 细胞增殖检测

胰酶消化收集鼻咽癌细胞, 取 100 μL 共 3×10^3 个细胞接种至 96 孔板, 同时设置只加入 100 μL 培养基作为空白对照, 在 ITGB3 过表达组加入 LY3214996 或等体积 PBS, 37 $^{\circ}\text{C}$ $\varphi=5\%$ CO_2 培养 24 h, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 3 h, 通过酶标仪检测 450 nm 吸光值。

1.10 流式细胞仪分析细胞凋亡

分别收集 pEF6/His 和 pEF6/His-ITGB3 转染鼻咽癌细胞, PBS 洗 3 次, 1 mL PBS 重悬, 将细胞调整到 1×10^6 cells/mL, 取 100 μL 细胞悬液到流式管,

加 5 μL FITC Annexin V 和 5 μL 7-AAD 染色液混匀, 室温避光 15 min, 加 400 μL Annexin V Binding Buffer, 进行流式细胞仪分析细胞凋亡。

1.11 统计学分析

所有实验均进行 3 次或 3 次以上重复, 结果数据采用平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)形式表示, 两组间样本比较采用配对或非配对双侧 Student's *t*-test, 对于 3 组以上样本间比较采用 one-way ANOVA 进行检验。数据分析与绘图采用 GraphPad Prism 5 进行, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 以及*** $P < 0.001$ 均认为具有显著性统计学差异。

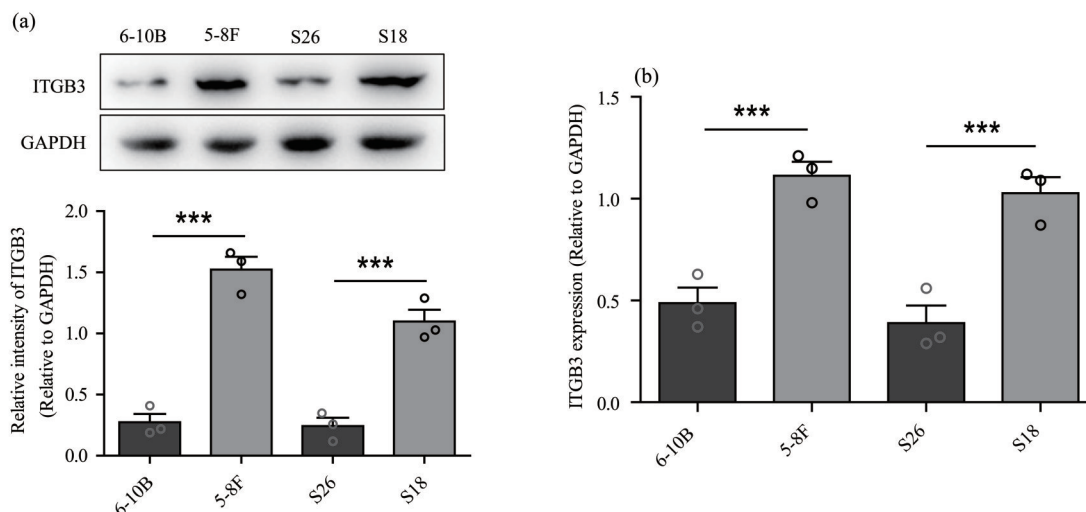
2 结果与分析

2.1 高转移鼻咽癌细胞伴随高 ITGB3 表达

ITGB3 的上调表达与多种肿瘤的增殖、转移等恶性发展过程密切相关(Zheng et al., 2019), 为了探索在鼻咽癌中 ITGB3 的表达与鼻咽癌转移之间的相互关系, 我们首先收集了高转移能力的鼻咽癌细胞系 5-8F 和 S18 以及低转移能力的鼻咽癌细胞系 6-10B 和 S26, 并通过 Western blot 对其 ITGB3 表达进行检测。结果表明, 高转移鼻咽癌细胞 5-8F 和 S18 中 ITGB3 表达明显高于低转移鼻咽癌细胞 6-10B 和 S26(图 1a)。同时, qRT-PCR 检测也进一步表明高转移鼻咽癌细胞 5-8F 和 S18 中 ITGB3 表达明显高于低转移鼻咽癌细胞 6-10B 和 S26(图 1b), 这提示 ITGB3 的表达与鼻咽癌转移能力的上调存在正相关关系。

2.2 ITGB3 的上调表达促进鼻咽癌细胞转移

为了进一步阐明鼻咽癌细胞中 ITGB3 的上调表达与鼻咽癌转移之间的关系, 我们分别选择转移能力较低和转移能力较高的鼻咽癌代表性细胞系 6-10B 和 5-8F 进行 ITGB3 过表达细胞系的构建。在通过荧光显微镜观察到 GFP(ITGB3)慢病毒成功感染 6-10B 和 5-8F 细胞并通过 Western blot 检测到 ITGB3 上调表达后(图 2a~b), 对 ITGB3 过表达鼻咽癌细胞迁移和侵袭能力进行检测。其中, 细胞迁移实验表明, 与未进行 ITGB3 过表达组相比, ITGB3 过表达明显促进了鼻咽癌细胞 6-10B 和 5-8F 的迁移能力(图 2c)。同时, 细胞侵袭结果表明, ITGB3 过表达也明显促进了鼻咽癌细胞 6-10B 和 5-8F 侵袭能力(图 2d)。因此, 实验数据表明鼻咽



(a) Western blot检测鼻咽癌细胞6-10B、5-8F、S26和S18中ITGB3表达,GAPDH作为内参蛋白;(b) qRT-PCR检测鼻咽癌细胞6-10B、5-8F、S26和S18中ITGB3表达,GAPDH基因作为内参。数据表示为Mean \pm SD (** $P < 0.001$)。

图1 不同转移能力鼻咽癌细胞中ITGB3表达检测

Fig. 1 Detection of ITGB3 expression in NPC cells with different metastatic abilities

癌细胞中ITGB3的上调表达促进了鼻咽癌细胞的转移能力。

2.3 ITGB3高表达促进鼻咽癌细胞克隆形成与黏附能力

在肿瘤细胞远端转移过程中,细胞黏附和克隆性增殖能力是肿瘤细胞远端转移与形成次级转移灶的关键基础(Aceto et al., 2014)。为了研究ITGB3的上调表达对鼻咽癌细胞克隆性增殖能力的影响,我们利用体外克隆形成实验检测上调表达ITGB3的6-10B和5-8F的克隆形成能力。在6-10B和5-8F中过表达ITGB3并培养10~15 d后,与对照组相比,ITGB3的上调表达使得鼻咽癌细胞克隆形成能力增强(图3a~b)。由于6-10B和5-8F携带了GFP的表达,通过荧光显微镜进行单克隆大小观察与单克隆细胞计数,我们发现ITGB3的过表达在单克隆水平上也促进了鼻咽癌细胞的克隆性增殖能力(图3c~d)。同时,细胞黏附实验表明,与对照组相比,ITGB3过表达促进了鼻咽癌细胞黏附能力(图3e~f)。因此,鼻咽癌细胞中ITGB3的高表达促进了鼻咽癌细胞的转移并上调了鼻咽癌次级转移灶的形成能力。

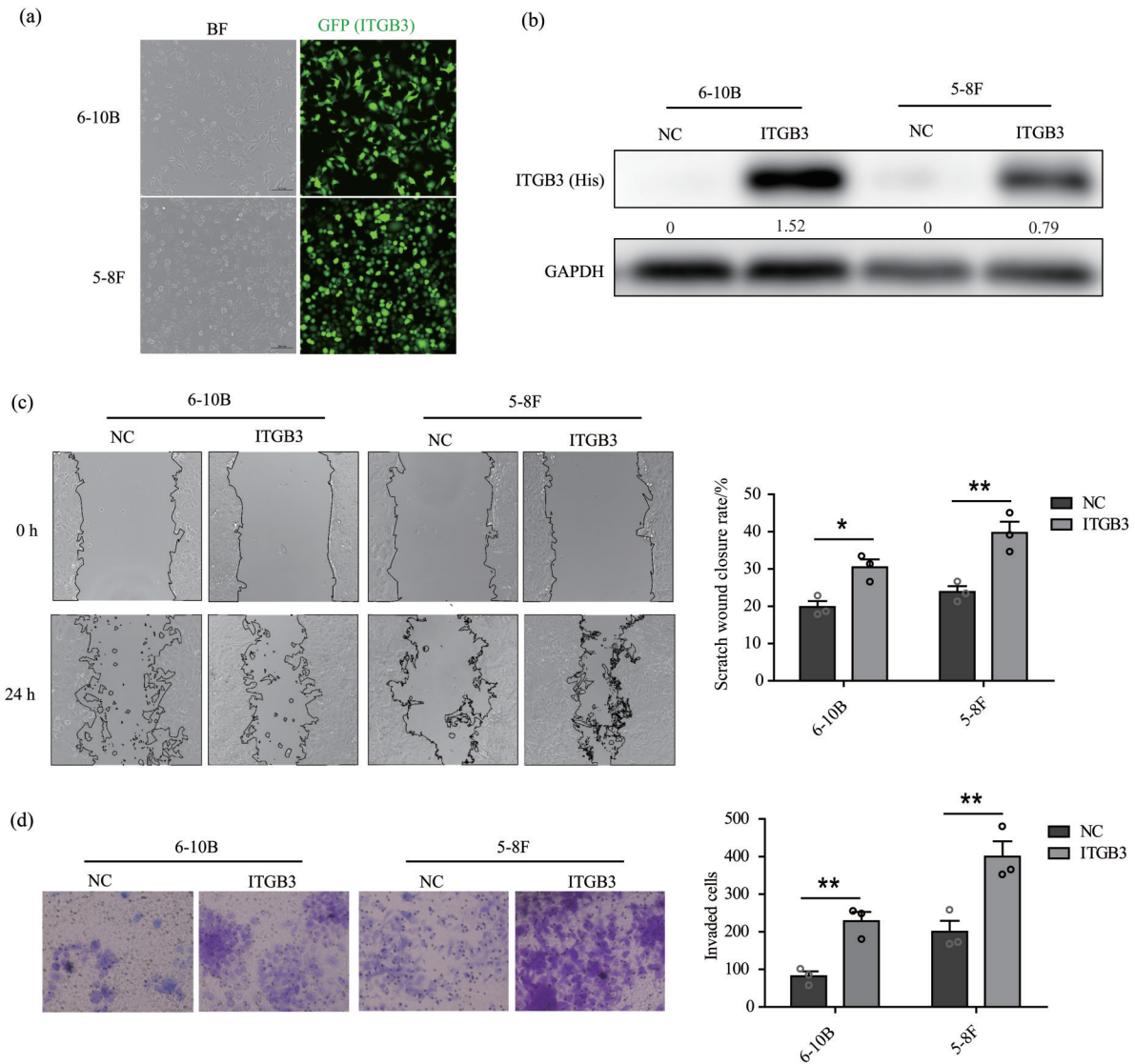
2.4 ITGB3促进鼻咽癌细胞增殖并抑制其凋亡

恶性增殖是肿瘤细胞恶性发展的常见现象,为了探索ITGB3的上调表达对鼻咽癌增殖的调控作用,本研究首先通过CCK8细胞增殖实验对鼻咽癌细胞增殖能力进行检测。结果表明,与未进行

ITGB3过表达的鼻咽癌细胞相比,ITGB3的过表达促进了鼻咽癌细胞的增殖能力(图4a),提示ITGB3的高表达促进了鼻咽癌细胞的恶性发展。随后,通过对鼻咽癌细胞中抗凋亡蛋白Bcl-2和促凋亡蛋白Bax的检测,发现ITGB3的过表达促进了鼻咽癌细胞中Bcl-2的表达并抑制了Bax的表达(图4b~c),表明ITGB3的表达促进了鼻咽癌细胞的生存能力。最后,通过流式细胞仪对鼻咽癌细胞凋亡水平的检测,进一步验证了ITGB3的表达抑制了鼻咽癌细胞凋亡(图4d~e)。因此,本研究数据表明ITGB3的高表达促进了鼻咽癌细胞增殖并抑制其凋亡,进而促进了鼻咽癌的恶性发展进程。

2.5 ITGB3通过激活MAPK/ERK途径促进鼻咽癌细胞转移

整合素可通过激活PI3K/AKT和RAS-MAPK等多种信号传导途径,参与细胞增殖、分化、凋亡和细胞骨架构建等调控(Hamidi et al., 2018; Luo et al., 2018)。通过Western blot检测,我们发现在鼻咽癌中虽然ITGB3的上调对AKT有一定程度的磷酸化激活,但是ITGB3对ERK1/2的磷酸化激活更加明显(图5a)。因此在进一步的研究中,我们结合ERK1/2磷酸化激酶抑制剂LY3214996处理,探索了ITGB3介导ERK1/2磷酸化激活与鼻咽癌细胞生存与转移的调控关系。首先,Western blot检测表明,虽然ITGB3促进了Bcl-2的表达并抑制了Bax



(a) 荧光显微镜观察ITGB3过表达慢病毒感染效率; (b) 采用His标签抗体进行Western blot检测ITGB3过表达细胞中ITGB3表达;以GAPDH为内参计算ITGB3/GAPDH相对灰度值; (c) 细胞迁移实验检测ITGB3过表达前后鼻咽癌细胞迁移能力。迁移率 = [(迁移后细胞面积 - 迁移前细胞面积)/视野总面积] × 100%; (d) 细胞侵袭实验检测ITGB3过表达前后鼻咽癌细胞侵袭能力变化。侵袭细胞数由3个随机视野进行细胞计数所得。数据表示为Mean ± SD (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)。

图2 整合素 $\beta 3$ 促进鼻咽癌细胞迁徙与侵袭

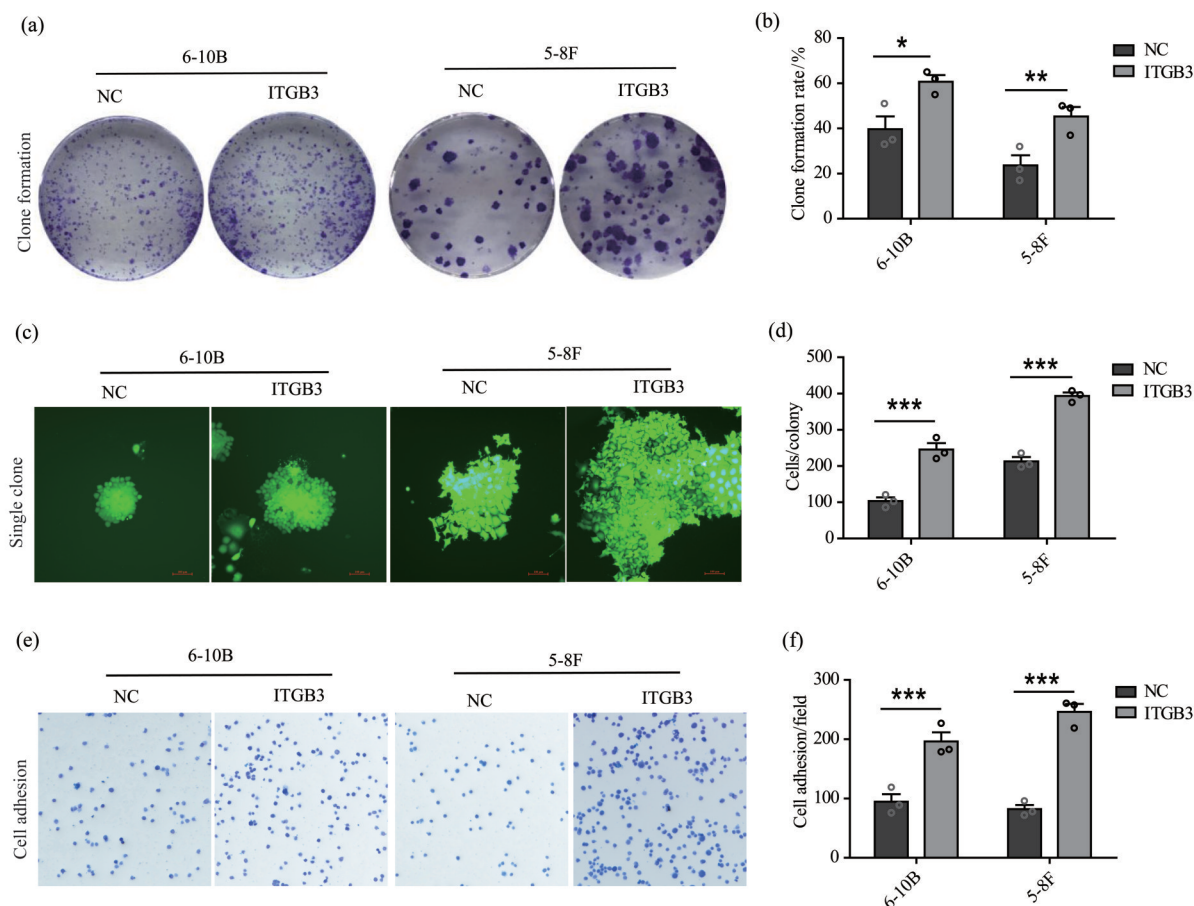
Fig. 2 Integrin $\beta 3$ promoting the migration and invasion of NPC cells

的表达,但是LY3214996的处理明显逆转了ITGB3介导的Bcl-2上调和Bax下调(图5b),表明ITGB3通过激活MAPK/ERK途径促进了鼻咽癌细胞抗凋亡能力。随后,细胞迁移和侵袭实验表明,虽然ITGB3高表达促进了鼻咽癌细胞迁移和侵袭能力,但是LY3214996的处理逆转了ITGB3介导的鼻咽癌细胞迁移和侵袭能力上调(图5c~d)。克隆形成实验和细胞黏附实验同样表明,LY3214996的处理逆转了ITGB3促进的鼻咽癌细胞克隆形成能力和黏附能力(图5e~f)。因此,研究结果表明,鼻咽癌细胞中

ITGB3的高表达通过激活MAPK/ERK途径,进而发挥促进鼻咽癌细胞生存与转移的作用。

3 讨论

我国南方地区尤其是广东地区是鼻咽癌的高发区域,虽然医学的进步和人们生活方式的变化,使得鼻咽癌患者的生存率正逐步提高,但仍有大部分的鼻咽癌患者治疗效果欠佳。同时,由于生活环境的恶化,鼻咽癌的发病率却在逐年升高。而鼻咽癌一旦发生转移,靶向治疗的手段少之又



(a, b) 克隆形成实验检测 ITGB3 过表达前后鼻咽癌细胞克隆能力。克隆形成率 = (肉眼可见克隆数/接种细胞数) × 100%; (c, d) 荧光显微镜观察克隆形成实验中单克隆细胞数; (e, f) 细胞黏附实验检测 ITGB3 过表达前后鼻咽癌细胞黏附能力变化。黏附细胞数由 3 个随机视野进行细胞计数所得。数据表示为 Mean ± SD (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)。

图3 整合素 $\beta 3$ 促进鼻咽癌细胞克隆形成与黏附

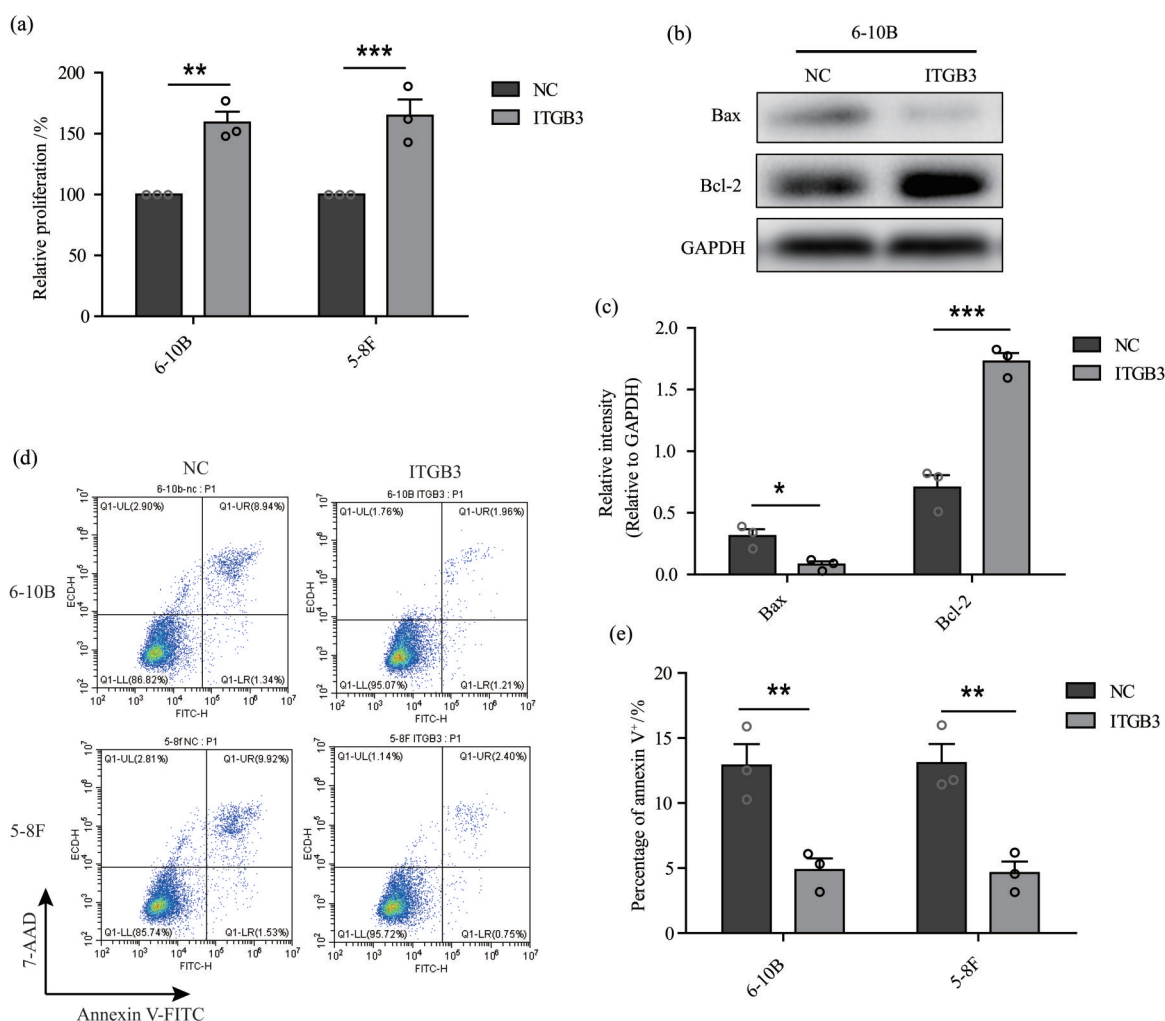
Fig. 3 Integrin $\beta 3$ promoting the clone formation and adhesion of NPC cells

少。因此, 深入了解鼻咽癌高转移的分子机制对阻断或控制鼻咽癌的转移、提高鼻咽癌患者生存率和改善患者生存质量等具有重要价值。

在正常上皮细胞中, 整合素的表达量很低, 而在肿瘤细胞中, 由于肿瘤微环境中的层粘连蛋白、胶原和纤连蛋白的变化, 肿瘤细胞中的整合素会被上调并被激活(Mamuya et al., 2012)。然而, 整合素在肿瘤发展中可能具有双重身份, 既可促进亦可抑制肿瘤的转移, 例如在肿瘤发展到极度恶性的程度前, 由整合素激活的 TGF- β 可能抑制肿瘤的转移(Ludlow et al., 2005)。同时也可能促进了肿瘤的发展(Moore et al., 2014), 比如抑制整合素 $\beta 3$ 的表达会抑制肿瘤细胞的黏附能力, 进而抑制了肿瘤细胞的迁移和侵袭特性(Sun et al., 2015)。在本研究中, 我们利用迁移实验和 Transwell 侵袭实验验证了上调的整合素 $\beta 3$ 促进了

鼻咽癌细胞的转移。同时, 鼻咽癌细胞中过表达 ITGB3 使肿瘤细胞克隆形成能力与黏附能力增强, 表明 ITGB3 的表达在介导鼻咽癌转移的过程中可能更多的参与了诱导肿瘤细胞后期的侵入血管转移到远端器官的过程, 而 ITGB3 上调的肿瘤细胞黏附和克隆形成能力使得其可在转移灶中定植并获得高克隆性增殖能力。此外, 在转移过程中, 肿瘤细胞往往会遭受各种凋亡刺激, 进而限制了肿瘤细胞在转移过程中的生存(Townson et al., 2003)。我们的研究表明 ITGB3 在促进鼻咽癌细胞转移的同时, 也促进了鼻咽癌细胞抗凋亡能力, 表明 ITGB3 的表达可促进鼻咽癌细胞抵抗转移中的凋亡刺激, 进而保证鼻咽癌细胞的生存并促进其转移进程。

目前的研究表明, ITGB3 在不同肿瘤中往往以独特的方式介导肿瘤细胞的转移。比如, G9A



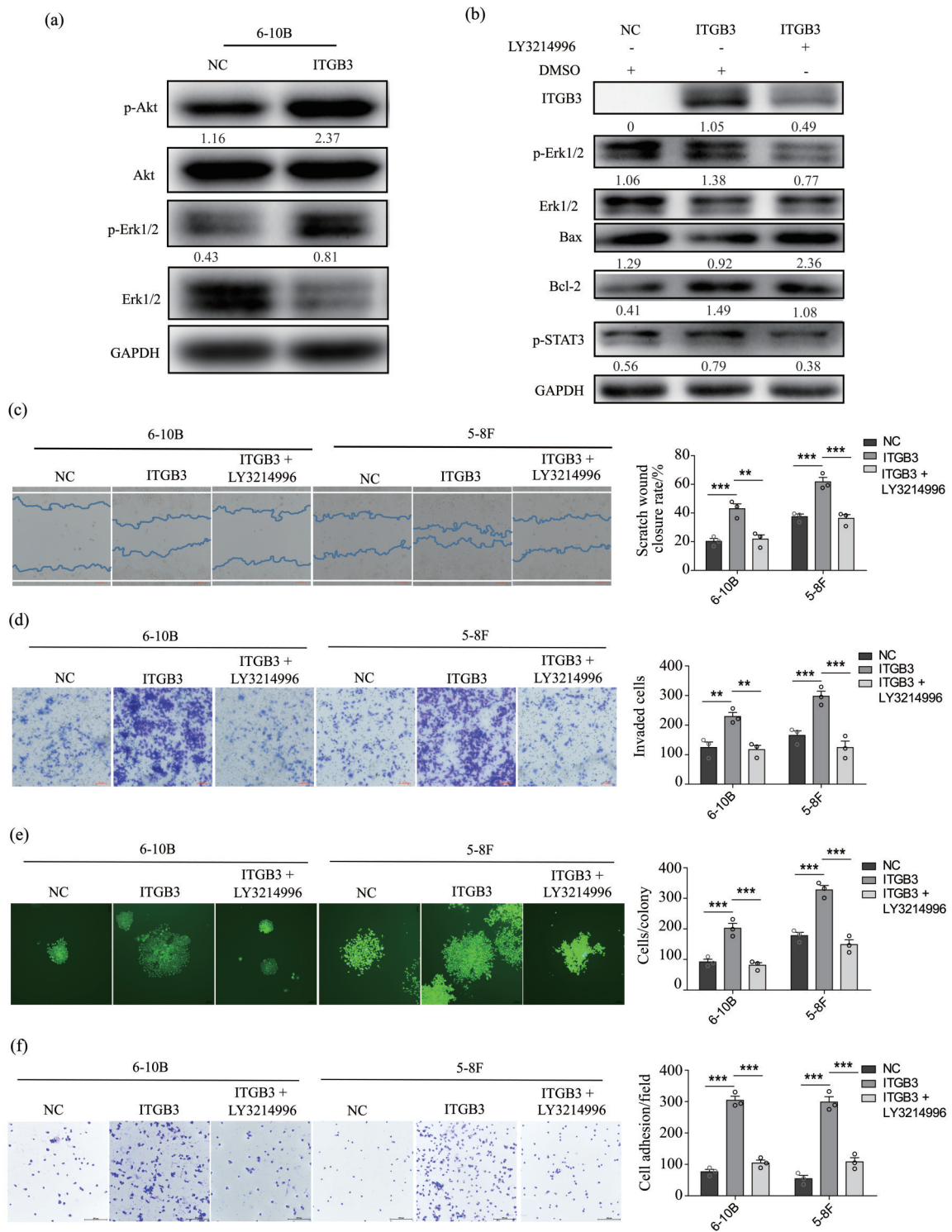
(a) CCK-8细胞增殖实验检测ITGB3过表达前后鼻咽癌细胞增殖水平; (b~c) Western blot分析ITGB3过表达前后鼻咽癌细胞中Bcl-2和Bax表达; 以GAPDH为内参计算Bax/GAPDH和Bcl-2/GAPDH相对灰度值; (d~e) Annexin V-FITC/7-AAD标记检测ITGB3过表达前后鼻咽癌细胞凋亡水平。数据表示为Mean \pm SD (* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001)。

图4 整合素 β 3促进鼻咽癌细胞增殖并抑制其凋亡

Fig. 4 Integrin β 3 promoting the proliferation of NPC cells and inhibiting the apoptosis

上调的ITGB3以SET结构域依赖性方式促进胃癌转移(Hu et al., 2018), 低氧介导的ITGB3则通过增强TGF- β 信号促进乳腺癌恶性发展(Sesé et al., 2017)。而在胰腺癌中, ITGB3通过招募C-Src到其胞质末端并将其激活, 导致肿瘤细胞锚定依赖性降低, 进而促进了肿瘤细胞转移(Desgrosellier et al., 2009)。在我们的研究中, 我们首次发现鼻咽癌中ITGB3的表达主要通过激活MAPK/ERK途径, 进而促进鼻咽癌细胞转移。在后续的研究中, 进一步详细阐明MAPK/ERK途径的激活与鼻咽癌转移的具体调控机制, 对于以ITGB3和MAPK/ERK途径为靶向的鼻咽癌联合治疗策略的开发具有重要的推动意义。

然而, 对于高转移鼻咽癌细胞中ITGB3高表达的分子机制, 目前并没有充分的研究。值得注意的是, 鼻咽癌往往伴随EB病毒的感染, 而EB病毒编码的LMP1可介导肿瘤细胞中转移促进蛋白如EGFR的表达进而促进肿瘤的发生发展(Kung et al., 2008; Li et al., 2020)。虽然我们的研究采用了EB病毒阴性的鼻咽癌细胞系, 但是对于鼻咽癌中ITGB3的上调表达是否与EB病毒的感染程度以及LMP1的表达相关还需后续更多的临床研究进行明确。此外, 整合素是血小板中一类主要的受体蛋白家族, 并与大部分肿瘤发展进程与转移密切相关(Cui et al., 2016)。最新的研究表明, 肿瘤病人血液样本及其细胞外囊泡中ITGB3的表达明显升



(a) Western blot 分析 ITGB3 过表达前后鼻咽癌细胞中磷酸化 AKT、总 AKT、磷酸化 ERK1/2 以及总 ERK1/2 表达; 以 GAPDH 为内参计算相应蛋白表达相对灰度值; (b) Western blot 分析 ITGB3 过表达前后以及 ITGB3 过表达结合 LY3214996 处理鼻咽癌细胞中磷酸化 ERK1/2、总 ERK1/2、Bax 以及 Bcl-2 表达; 以 GAPDH 为内参计算相应蛋白表达相对灰度值; (c~f) 细胞迁移实验(c)、侵袭实验(d)、克隆形成实验(e)以及细胞黏附实验(f)分别检测 ITGB3 过表达前后以及 ITGB3 过表达结合 LY3214996 处理鼻咽癌细胞迁移能力、侵袭能力、克隆形成能力以及黏附能力。数据表示为 Mean \pm SD (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)。

图 5 整合素 $\beta 3$ 通过激活 MAPK/ERK 途径促进鼻咽癌转移

Fig. 5 Integrin $\beta 3$ promoting NPC metastasis by activating the MAPK/ERK pathway

高,同时,血小板可通过分泌细胞外囊泡进入鼻咽癌细胞,进而上调鼻咽癌细胞 ITGB3 的表达,促进鼻咽癌细胞远端转移(Li et al., 2022)。对于高转移鼻咽癌细胞中 ITGB3 的高表达是否由血小板细胞外囊泡上调引起,仍然缺乏直接的证据。而我们检测的鼻咽癌细胞系在长期的培养过程中并未接触血小板细胞外囊泡,因此,在后续的研究中,进一步从肿瘤细胞内部基因表达调控的变化入手,以及结合临床样本与小鼠实验对肿瘤微环境中的特定细胞引起肿瘤细胞基因表达模式的改变的分子机制进行深入的探索,将更有利于阐明鼻咽癌转移的增强与 ITGB3 上

调的相关机制。

临床上,转移能力高的肿瘤细胞往往具有更强的耐药性并表现出不良预后。肿瘤耐药性的获得在一定程度上与整合素和细胞外基质的相互作用相关(Zutter, 2007)。为检测 ITGB3 的表达是否增强了鼻咽癌的耐药性,在后续研究中,可利用 CCK-8 检测过表达 ITGB3 前后鼻咽癌细胞对抗肿瘤药物(如阿霉素、顺铂等)的敏感性,从而让我们对 ITGB3 促进鼻咽癌恶性发展的分子机制有更深入的了解,同时推动以 ITGB3 为靶标的鼻咽癌治疗手段的发展应用。

参考文献:

- ACETO N, BARDIA A, MIYAMOTO D, et al, 2014. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis[J]. *Cell*, 158(5): 1110-1122.
- BACHMANN M, KUKKURAINEN S, HYTÖNEN V P, et al, 2019. Cell adhesion by integrins [J]. *Physiol Rev*, 99(4): 1655-1699.
- BENSOUDA Y, KAIKANI W, AHBEDDOU N, et al, 2011. Treatment for metastatic nasopharyngeal carcinoma [J]. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*, 128(2): 79-85.
- CHANG J T C, KO J Y, HONG R L, 2004. Recent advances in the treatment of nasopharyngeal carcinoma [J]. *J Formos Med Assoc*, 103(7): 496-510.
- COUCHMAN J R, WOODS A, 1999. Syndecan-4 and integrins: Combinatorial signaling in cell adhesion [J]. *J Cell Sci*, 112(20): 3415-3420.
- CUI H, TAN Y X, ÖSTERHOLM C, et al, 2016. Heparanase expression upregulates platelet adhesion activity and thrombogenicity [J]. *Oncotarget*, 7(26): 39486-39496.
- DESGROSELLIER J S, BARNES L A, SHIELDS D J, et al, 2009. An integrin $\alpha v \beta 3$ -c-*Src* oncogenic unit promotes anchorage-independence and tumor progression [J]. *Nat Med*, 15(10): 1163-1169.
- HAMIDI H, IVASKA J, 2018. Every step of the way: Integrins in cancer progression and metastasis [J]. *Nat Rev Cancer*, 18(9): 533-548.
- HU L, ZANG M D, WANG H X, et al, 2018. G9A promotes gastric cancer metastasis by upregulating ITGB3 in a SET domain-independent manner [J]. *Cell Death Dis*, 9(3): 278.
- KUNG C P, RAAB-TRAUB N, 2008. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces expression of the epidermal growth factor receptor through effects on Bcl-3 and STAT3 [J]. *J Virol*, 82(11): 5486-5493.
- LAO T D, LE T A H, 2020. Epidemiology incidence and mortality of Nasopharynx Cancer in Southeast Asia: An update report [J]. *Adv Life Sci-Pak*, 7(2): 86-90.
- LEE A W M, LIN J C, NG W T, 2012. Current management of nasopharyngeal cancer [J]. *Semin Radiat Oncol*, 22(3): 233-244.
- LEI X X, LIU Y, WANG J X, et al, 2020. SOX1 promotes differentiation of nasopharyngeal carcinoma cells by activating retinoid metabolic pathway [J]. *Cell Death Dis*, 11(5): 1-15.
- LI F, XU T, CHEN P, et al, 2022. Platelet-derived extracellular vesicles inhibit ferroptosis and promote distant metastasis of nasopharyngeal carcinoma by upregulating ITGB3 [J]. *Int J Biol Sci*, 18(15): 5858-5872.
- LI F, ZHAO X, SUN R, et al, 2020. EGFR-rich extracellular vesicles derived from highly metastatic nasopharyngeal carcinoma cells accelerate tumour metastasis through PI3K/AKT pathway-suppressed ROS [J]. *J Extracell Vesicles*, 10(1): e12003.
- LO W C, WANG C P, KO J Y, et al, 2012. Salvage treatment for isolated regional failure of nasopharyngeal carcinoma after primary radiotherapy [J]. *Ann Surg Oncol*, 19(3): 1001-1008.
- LUDLOW A, YEE K O, LIPMAN R, et al, 2005. Characterization of integrin $\beta 6$ and thrombospondin-1 double-null mice [J]. *J Cellular Mol Med*, 9(2): 421-437.

- LUO J, YAO J F, DENG X F, et al, 2018.14, 15-EET induces breast cancer cell EMT and cisplatin resistance by up-regulating integrin $\alpha v \beta 3$ and activating FAK/PI3K/AKT signaling[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 37(1): 1-11.
- MAMUYA F A, DUNCAN M K, 2012. αv integrins and TGF- β -induced EMT: A circle of regulation[J]. *J Cell Mol Med*, 16(3): 445-455.
- MOORE K M, THOMAS G J, DUFFY S W, et al, 2014. Therapeutic targeting of integrin $\alpha v \beta 6$ in breast cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 106(8): dju169.
- MURRAY I R, GONZALEZ Z N, BAILY J, et al, 2017. αv integrins on mesenchymal cells regulate skeletal and cardiac muscle fibrosis[J]. *Nat Commun*, 8: 1118.
- PECHEUR I, PEYRUCHAUD O, SERRE C M, et al, 2002. Integrin $\alpha v \beta 3$ expression confers on tumor cells a greater propensity to metastasize to bone[J]. *FASEB J*, 16(10): 1266-1268.
- SEGUIN L, DESGROSELLIER J S, WEIS S M, et al, 2015. Integrins and cancer: Regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance[J]. *Trends Cell Biol*, 25(4): 234-240.
- SEGUIN L, KATO S, FRANOVIC A, et al, 2014. An integrin $\beta 3$ -KRAS-RalB complex drives tumour stemness and resistance to EGFR inhibition[J]. *Nat Cell Biol*, 16(5): 457-468.
- SESÉ M, FUENTES P, ESTEVE-CODINA A, et al, 2017. Hypoxia-mediated translational activation of ITGB3 in breast cancer cells enhances TGF- β signaling and malignant features *in vitro* and *in vivo*[J]. *Oncotarget*, 8(70): 114856-114876.
- SHIMAOKA M, TAKAGI J, SPRINGER T A, 2002. Conformational regulation of integrin structure and function[J]. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 31: 485-516.
- SUN L, LIU B, LIN Z, et al, 2015. miR-320a acts as a prognostic factor and Inhibits metastasis of salivary adenoid cystic carcinoma by targeting ITGB3 [J]. *Mol Cancer*, 14: 96.
- TOWNSON J, NAUMOV G, CHAMBERS A, 2003. The role of apoptosis in tumor progression and metastasis[J]. *Curr Mol Med*, 3(7): 631-642.
- ZHAO C X, ZHU W BA Z Q, et al, 2018. The regulatory network of nasopharyngeal carcinoma metastasis with a focus on EBV, lncRNAs and miRNAs[J]. *Am J Cancer Res*, 8(11): 2185-2209.
- ZHENG Z Q, LI Z X, ZHOU G Q, et al, 2019. Long noncoding RNA FAM225A promotes nasopharyngeal carcinoma tumorigenesis and metastasis by acting as ceRNA to sponge miR-590-3p/miR-1275 and upregulate ITGB3 [J]. *Cancer Res*, 79(18): 4612-4626.
- ZUTTER M M, 2007. Integrin-mediated adhesion: Tipping the balance between chemosensitivity and chemoresistance[J]. *Adv Exp Med Biol*, 608: 87-100.

(责任编辑 张冰)