·论　著·

整联蛋白 α5β1 通过介导 Gli1 表达影响基底细胞癌的生长与放疗敏感性*

李锦意,黄小辉,范国雄
广东省惠州市第三人民医院皮肤科,广东惠州 516000

摘　要:目的　探讨整联蛋白 α5β1 对基底细胞癌(BCC)生长和放疗敏感性的影响及分子机制。**方法**　采用免疫组织化学染色检测皮肤 BCC 组织及正常皮肤组织中 α5β1 的表达差异。将 A431 细胞随机分为对照 A 组(细胞正常培养)、pLEX-MCS 组(采用含 pLEX-MCS 的慢病毒转染细胞)、pLEX-α5β1 组(采用含 pLEX-α5β1 的慢病毒转染细胞)、pLEX-α5β1+Gli 家族锌指蛋白 1(Gli1)抑制剂组(采用含 pLEX-α5β1 的慢病毒转染细胞,并添加 100 μmol/L Gli1 抑制剂 GANT61 处理细胞)。采用实时荧光定量 PCR 和蛋白质免疫印迹法检测细胞内 α5β1 与 Gli1 的表达情况;采用 MTT 法和 5-乙炔基-2′-脱氧尿苷(EdU)染色检测细胞增殖能力;通过 Hoechst 33258 染色观察细胞凋亡形态;采用 Transwell 实验检测细胞的迁移与侵袭能力。再将 A431 细胞随机分为对照 B 组(细胞正常培养)、4 Gy 组(采用 4 Gy X 射线照射细胞)、pLEX-α5β1+4 Gy 组(采用含 pLEX-α5β1 的慢病毒转染细胞,再用 4 Gy X 射线照射细胞),采用 MTT 法检测细胞增殖活性,流式细胞术检测细胞凋亡情况。**结果**　α5β1 在皮肤 BCC 组织中的阳性表达率高于正常皮肤组织($P<0.05$)。与对照 A 组和 pLEX-MCS 组比较,pLEX-α5β1 组细胞中 α5β1 和 Gli1 mRNA 和蛋白表达水平均升高,细胞存活率升高,EdU 阳性细胞率升高,迁移细胞数与侵袭细胞数均增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 pLEX-α5β1 组比较,pLEX-α5β1+Gli1 抑制剂组细胞中 Gli1 mRNA 和蛋白表达水平均下降,细胞存活率降低,EdU 阳性细胞率降低,迁移细胞数与侵袭细胞数也均减少,差异有统计学意义($P<0.05$)。在处理后培养 24、48 和 72 h 时,与对照 B 组比较,4 Gy 组细胞增殖活性明显降低($P<0.05$);pLEX-α5β1+4 Gy 组细胞增殖活性较 4 Gy 组明显升高($P<0.05$)。4 Gy 组细胞凋亡率较对照 B 组明显升高($P<0.05$);pLEX-α5β1+4 Gy 组细胞凋亡率较 4 Gy 组明显降低($P<0.05$)。**结论**　α5β1 在 BCC 组织中高表达,能够促进 BCC 细胞增殖、迁移及侵袭,抑制细胞凋亡,并降低细胞的放疗敏感性,该作用可能与调控 Gli1 表达有关。

关键词:基底细胞癌;　α5β1;　Gli 家族锌指蛋白 1;　放疗敏感性
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.23.020　　**中图法分类号:**R739.5
文章编号:1673-4130(2022)23-2917-08　　**文献标志码:**A

Integrin α5β1 affects the growth and radiosensitivity of basal cell carcinoma by mediating the expression of Gli1*

LI Jinyi, HUANG Xiaohui, FAN Guoxiong
Department of Dermatology, Third People's Hospital of Huizhou, Huizhou, Guangdong 516000, *China*

Abstract: Objective　To explore the effect of integrin α5β1 on the growth and radiosensitivity of basal cell carcinoma (BCC) and its molecular mechanism. **Methods**　Immunohistochemical staining was used to detect the expression of α5β1 in skin BCC and normal skin tissues. A431 cells were randomly divided into control group A (cells with normal culture), pLEX-MCS group (transfected cells with pLEX-MCS lentivirus), pLEX-α5β1 group (transfected cells with pLEX-α5β1 lentivirus), pLEX-α5β1+Gli family zinc finger protein 1 (Gli1) inhibitor group (cells were transfected with pLEX-α5β1 lentivirus and treated with 100 μmol/L Gli1 inhibitor GANT61). The expression of α5β1 and Gli1 in cells were detected by real-time fluorescent quantitative PCR and Western blot. MTT assay and 5-ethynyl-2′-deoxyuridine (EdU) staining were used to detect cell proliferation ability. Apoptotic morphology was observed by Hoechst 33258 staining. Transwell assay was used to detect the migration and invasion ability of the cells. Then A431 cells were randomly divided into control group B (cells with normal culture), 4 Gy group (cells were irradiated with 4 Gy X-ray), pLEX-α5β1+4 Gy group (cells were transfected with pLEX-α5β1 lentivirus and irradiated with 4 Gy X-ray). MTT assay was used to detect cell proliferation activity, cell apoptosis was detected by flow cytometry. **Results**　The positive expres-

* **基金项目:**吴阶平医学基金会临床科研专项资助基金项目(320.6750.2021-01-08)。
作者简介:李锦意,女,医师,主要从事皮肤肿瘤、银屑病的临床研究。

sion rate of α5β1 in skin BCC tissues was higher than that in normal skin tissues ($P<0.05$). Compared with control group A and pLEX-MCS group, the mRNA and protein expression levels of α5β1 and Gli1 in pLEX-α5β1 group were increased, the cell survival rate was increased, the rate of EdU positive cells was increased, and the number of migrating cells and invading cells were increased, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared with the pLEX-α5β1 group, the expression levels of Gli1 mRNA and protein in the pLEX-α5β1+Gli1 inhibitor group were decreased, the cell survival rate was decreased, the rate of EdU positive cells was decreased, the number of migrating cells and invading cells were also decreased, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). At 24, 48 and 72 h of culture after treatment, the proliferation activity of cells in 4 Gy group was significantly lower than that in control group B ($P<0.05$), the proliferation activity of cells in pLEX-α5β1+4 Gy group was significantly higher than that in 4 Gy group ($P<0.05$). The apoptosis rate of cells in 4 Gy group was significantly higher than that in control group B ($P<0.05$). The apoptosis rate of cells in pLEX-α5β1+4 Gy group was significantly lower than that in 4 Gy group ($P<0.05$). **Conclusion**　α5β1 is highly expressed in BCC tissues, which can promote the proliferation, migration and invasion of BCC cells, inhibit cell apoptosis, and reduce the radiosensitivity of cells, which may be related to the regulation of Gli1 expression.

Key words: basal cell carcinoma;　α5β1;　Gli family zinc finger protein 1;　radiosensitivity

基底细胞癌(BCC)起源于表皮的最内层或毛囊外根鞘,属于源自基底细胞的常见恶性上皮肿瘤之一[1-2]。性别、年龄、紫外线辐射情况、吸烟史等都是BCC形成的影响因素[3]。BCC起病较为隐匿,因而易发生漏诊,其治疗后复发也极为常见。目前,药物和手术治疗BCC的效果欠佳[4]。放疗在手术耐受能力差且年龄较大的BCC患者中被广泛使用,然而,随着肿瘤细胞对放疗抵抗性的产生,需要增大照射剂量,但这一操作将会对正常组织造成严重损伤。整联蛋白又称为整合素,是一类黏附分子,属于异源二聚体跨膜糖蛋白,可介导细胞-细胞和细胞-细胞环境之间的相互作用,在多种类型的细胞中广泛表达,主要包括肿瘤细胞、内皮细胞、成纤维细胞和免疫细胞等[5]。整联蛋白α5β1作为整联蛋白家族的重要成员之一,由β1和α5亚基的二聚化形成,已知其在多种肿瘤中高表达,并参与调控肿瘤细胞生长、黏附、侵袭、迁移及肿瘤血管生成[6-7]。Gli家族锌指蛋白1(Gli1)是Hedgehog(Hh)信号通路远端的效应转录因子,Hh信号通路是多种生物学过程的重要介质,包括胚胎发生、成体组织稳态及肿瘤发生、发展。研究表明,Gli1的异常激活与多种恶性肿瘤的发生有关,例如乳腺癌、结肠癌、肝细胞癌及子宫内膜癌的发生等[8-9]。基于此,本研究检测了α5β1在BCC中的表达情况,并探究其对肿瘤细胞生长与放疗敏感性的影响及相关分子机制,旨在为以α5β1为靶点的BCC治疗提供实验依据。

1　资料与方法

1.1　一般资料　选取2020年6月至2021年6月本院皮肤科门诊收治的32例BBC患者的皮肤BBC组织标本为研究对象,标本来源患者均经临床和病理检查确诊,其中男20例,女12例;年龄38～69岁,平均(51.40±5.16)岁。以同期32例行非肿瘤性皮瓣移植手术患者的正常皮肤组织标本作为对照。对照标本来源患者中男17例,女15例;年龄40～68岁,平均(54.35±5.32)岁。所有患者术前均未经放疗、光动力及其他手段治疗,并已排除合并其他类型肿瘤。所有患者对本研究知情同意,并签署知情同意书。

1.2　仪器与试剂　A431细胞购于中国科学院基础医学研究所,Gli1抑制剂GANT61购于英国Abcam公司,胎牛血清、DMEM培养基和胰蛋白酶购于美国Gibco公司,免疫组织化学染色试剂盒购于江苏凯基生物有限公司,RNAiso Plus试剂盒、反转录试剂盒和实时荧光定量PCR试剂盒购于日本TaKaRa公司,二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒、4′,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染料、二喹啉甲酸(BCA)蛋白测定试剂盒和增强化学发光法(ECL)发光液购于碧云天生物技术研究所,聚偏氟乙烯(PVDF)膜和Transwell小室购于美国BD公司,MTT试剂盒、5-乙炔基-2′-脱氧尿苷(EdU)细胞增殖检测试剂盒及Hoechst 33258细胞凋亡染色试剂盒购于上海贝博生物科技有限公司,AnnexinV-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒购于北京百奥莱博科技有限公司,兔抗α5β1多克隆抗体、兔抗Gli1多克隆抗体、鼠抗3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体及辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗购于英国Abcam公司。重组慢病毒载体pLEX-MCS与pLEX-α5β1的构建、包装及滴度测定均由丰晖生物科技有限公司完成。其他实验试剂均为国产分析纯。BB150-2TCS型细胞培养箱购于美国Thermo Fisher Scientific公司,CX43型光学显微镜购于日本Olympus公司,C1Si型激光共聚焦显微镜购于日本Nikon公司,XSZ-220/20型X线深部治疗机购于丹东市康佳医用机厂,iMark型酶标仪购于美国Bio-Rad公司,DYY-16D型电泳系统购于北京六一仪器厂,FACSCanto Ⅱ型流式细胞仪购于美国BD公司。

1.3　方法

1.3.1 免疫组织化学染色　将皮肤 BBC 组织及正常皮肤组织标本在 4%多聚甲醛中固定，石蜡包埋，制成 4 μm 厚的切片。切片脱蜡，加入柠檬酸缓冲液煮沸，在 3% H_2O_2 溶液中消除内源性过氧化物酶，山羊血清室温封闭。滴加兔抗 α5β1 多克隆抗体(1∶200)，4 ℃孵育过夜。磷酸盐缓冲液(PBS)清洗，滴加 HRP 标记二抗(1∶1 000)，室温孵育 30 min，DAB 显色，苏木素复染，反复冲洗，脱水透明，中性树胶封片，干燥。通过光学显微镜观察染色情况并摄取图片，α5β1 阳性表达多呈棕黄色至棕褐色，随机选择 5 个视野，结果根据阳性细胞率与染色强度进行综合评定。阳性细胞率评分：<5%记 0 分，5%～25%记 1 分，>25%～50%记 2 分，>50%～75%记 3 分，>75%记 4 分。染色强度评分：未着色记 0 分，黄色记 1 分，棕黄色记 2 分，棕褐色记 3 分。两者分数相加<2 分为阴性，≥2 分为阳性。

1.3.2 细胞培养与转染　取 A431 细胞随机分为对照 A 组、pLEX-MCS 组、pLEX-α5β1 组、pLEX-α5β1+Gli1 抑制剂组。在各组 A431 细胞中添加含 10%胎牛血清、1%青-链霉素的 DMEM 培养基，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中过夜培养。调整细胞水平为 4×10^5/mL，取 100 μL 接种于 6 孔板，分别将含 pLEX-MCS 和 pLEX-α5β1 的慢病毒液加入对应组的细胞孔内进行转染，病毒转染复数(MOI)设为 50∶1。pLEX-α5β1+Gli1 抑制剂组细胞在转染时添加 100 μmol/L Gli1 抑制剂 GANT61。转染培养 4 h，收集细胞，换用新鲜培养液，添加 1 mg/L 嘌呤霉素进行筛选，获得稳定表达 α5β1 的 A431 细胞系。

1.3.3 实时荧光定量 PCR　采用 RNAiso Plus 试剂盒提取转染后的 A431 细胞总 RNA，测定 RNA 纯度与浓度。将 RNA 反转录合成 cDNA，以 cDNA 为模板，根据实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书进行扩增，反应条件：95 ℃ 3 min，1 个循环；95 ℃ 20 s，60 ℃ 15 s，72 ℃ 45 s，45 个循环。以 β-actin 为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 α5β1 和 Gli1 的 mRNA 表达水平。α5β1 上游引物：5′-CATCTTGGCATGCGCTCCA-3′，下游引物：5′-GTCTTGGTGAACTCGGCACT-3′；Gli1 上游引物：5′-GGACAACCGCCATCCAGACT-3′，下游引物：5′-GCCAGGGACACCTCCA-3′；β-actin 上游引物：5′-CTCGCTTCGGCAGCACA-3′，下游引物：5′-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3′。

1.3.4 蛋白质免疫印迹法(Western blot)　收集转染后的 A431 细胞，使用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白，BCA 法进行蛋白定量。制备 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶，在梳孔加入标本，电泳分离蛋白，转膜、封闭，TBST 缓冲液洗膜，加入一抗，4 ℃孵育过夜，次日 TBST 缓冲液再洗膜，加入二抗，室温孵育 2 h，ECL 发光液显色，凝胶成像系统扫描成像，采用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析目的蛋白 α5β1、Gli1 蛋白表达水平。

1.3.5 MTT 法　收集转染后的 A431 细胞，每孔中加入 20 μL MTT 混匀，继续培养 4 h，再加入 200 μL 二甲基亚砜(DMSO)，摇床振荡至结晶物完全溶解，酶标仪检测 490 nm 处各孔的吸光度(A)值，计算各组细胞存活率＝各组 A 值/对照孔 A 值×100%。

1.3.6 EdU 染色　收集转染后的 A431 细胞，调整水平后以 1×10^5 个/孔接种于 24 孔板，加入 10 μmol/L EdU 进行染色处理，PBS 清洗，再用 Apollo567 避光孵育 30 min，DAPI 染料染核，洗涤后封片，干燥，通过激光共聚焦显微镜观察细胞染色情况并摄取图片，红色荧光为 EdU 阳性细胞的细胞核，随机选择 5 个视野，计数该视野下 EdU 阳性细胞数与总细胞数，两者比值为 EdU 阳性细胞率。

1.3.7 Hoechst 33258 染色　收集转染后的 A431 细胞，PBS 清洗，4%多聚甲醛固定，加入 200 μL Hoechst 33258 染色液，室温避光孵育 10 min，PBS 再次清洗，滴加抗荧光猝灭剂封片，干燥，通过荧光显微镜观察各组细胞凋亡情况并摄取图片，细胞核呈蓝色，荧光浓染颗粒为凋亡细胞。

1.3.8 Transwell 实验　将 Matrigel 胶铺于 24 孔 Transwell 上室底部，置于 37 ℃培养箱内凝胶。将转染后的 A431 细胞水平调整为 2×10^4/mL，吸取 200 μL 移入 Transwell 上室，下室加入 600 μL 含 10%胎牛血清的新鲜培养液，培养 24 h 后用 4%多聚甲醛固定，0.1%结晶紫染色，PBS 清洗，通过光学显微镜观察并拍摄图像，随机选择 5 个视野计数侵袭细胞数。细胞迁移检测时在 Transwell 上室不铺 Matrigel 胶，其余步骤均与上述步骤相同。

1.3.9 细胞分组与放疗处理　取 A431 细胞随机分为对照 B 组、4 Gy 组、pLEX-α5β1+4 Gy 组。对照 B 组细胞正常培养，4 Gy 组细胞进行 4 Gy X 射线照射，pLEX-α5β1+4 Gy 组细胞进行转染 pLEX-α5β1 慢病毒处理后采用 4 Gy X 射线照射。将细胞按照 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板，采用 4 Gy X 射线照射(6 mV 射线垂直照射，剂量率为 200 cGy/min，源皮距为 100 cm)。在处理后培养 24、48、72 h 时采用 MTT 法检测各组细胞增殖活性 A 值。

1.3.10 流式细胞术　收集经放疗处理后的 A431 细胞，PBS 清洗，胰酶消化，离心后用 PBS 将沉淀重悬于 100 μL 染料结合缓冲液中，调整细胞水平为 1×10^6/mL，取 100 μL 悬液移入干净离心管中，加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI，涡旋混匀，室温避光静置 20 min，随后立即通过流式细胞仪测定细胞凋亡情况。

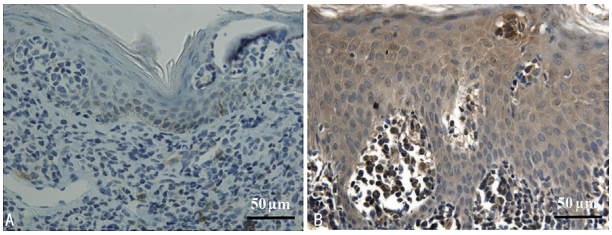
1.4 统计学处理　采用 SPSS22.0 软件及 GraphPad Prism 8.3 软件进行数据分析及绘图。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间比较采用方差分析，多组间两两比较采用 LSD-t 检验；计数资料以例数或

率表示，组间比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结　　果

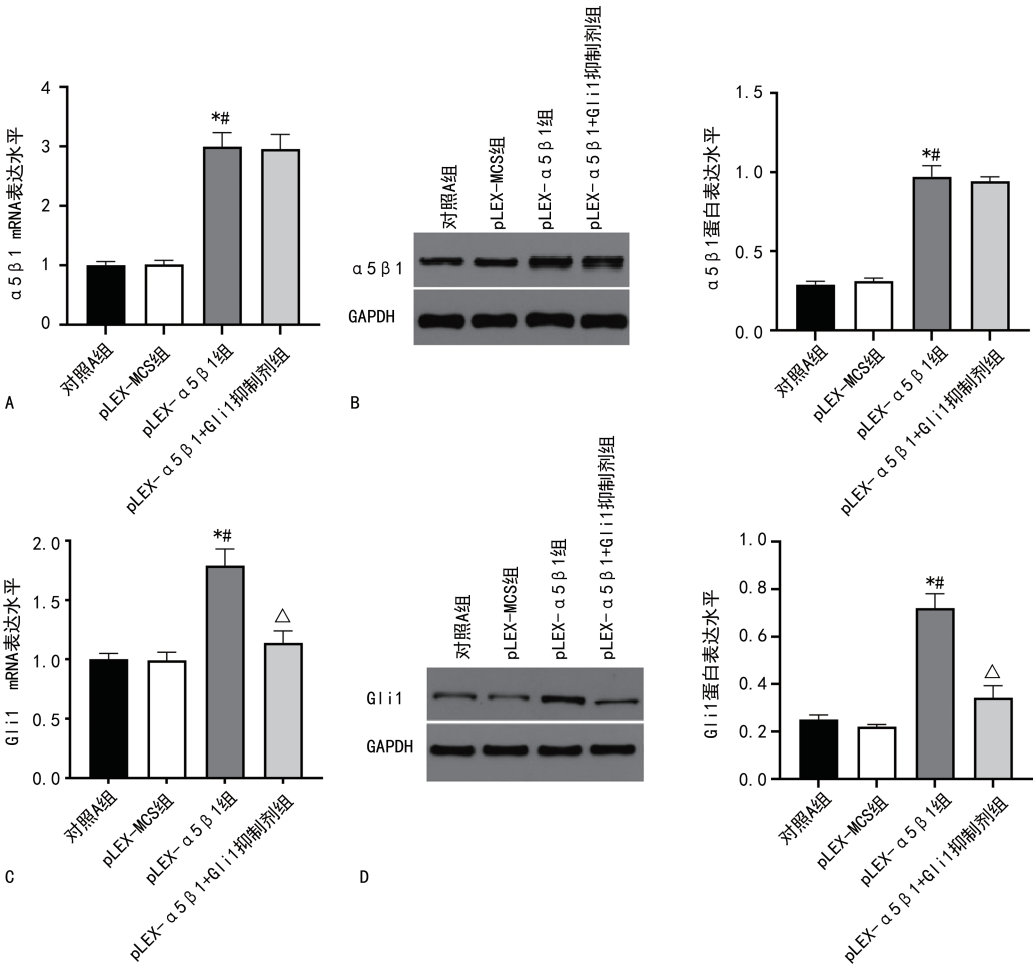
2.1 皮肤 BBC 组织及正常皮肤组织 α5β1 表达情况比较　相较于正常皮肤组织，皮肤 BBC 组织内有大量区域染色呈棕黄色至棕褐色，见图 1；皮肤 BBC 组织 α5β1 阳性表达率为 84.38%(27/32)，明显高于正常皮肤组织的 α5β1 阳性表达率[12.50%(4/32)]，差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 各组 A431 细胞中 α5β1 与 Gli1 表达情况比较　与对照 A 组和 pLEX-MCS 组比较，pLEX-α5β1 组细胞中 α5β1 mRNA 和蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$)；pLEX-α5β1+Gli1 抑制剂组 α5β1 mRNA 和蛋白表达水平与 pLEX-α5β1 组比较，差异无统计学意义($P>0.05$)，见图 2A、2B。pLEX-α5β1 组细胞中 Gli1 mRNA 和蛋白表达水平均明显高于对照 A 组和 pLEX-MCS 组($P<0.05$)；而与 pLEX-α5β1 组比较，pLEX-α5β1+Gli1 抑制剂组 Gli1 mRNA 和蛋白表达水平均明显下降($P<0.05$)，见图 2C、2D。



注：A 为正常皮肤组织；B 为皮肤 BBC 组织。

图 1　**免疫组织化学染色检测皮肤 BBC 组织及正常皮肤组织中 α5β1 的表达(×200)**



注：A 为实时荧光定量 PCR 检测的各组 A431 细胞中 α5β1 mRNA 表达水平比较；B 为 Western blot 检测的各组 A431 细胞中 α5β1 蛋白条带图及表达水平比较；C 为实时荧光定量 PCR 检测的各组 A431 细胞中 Gli1 mRNA 表达水平比较；D 为 Western blot 检测的各组 A431 细胞中 Gli1 蛋白条带图及表达水平比较；与对照 A 组比较，$^{*}P<0.05$；与 pLEX-MCS 组比较，$^{\#}P<0.05$；与 pLEX-α5β1 组比较，$^{\triangle}P<0.05$。

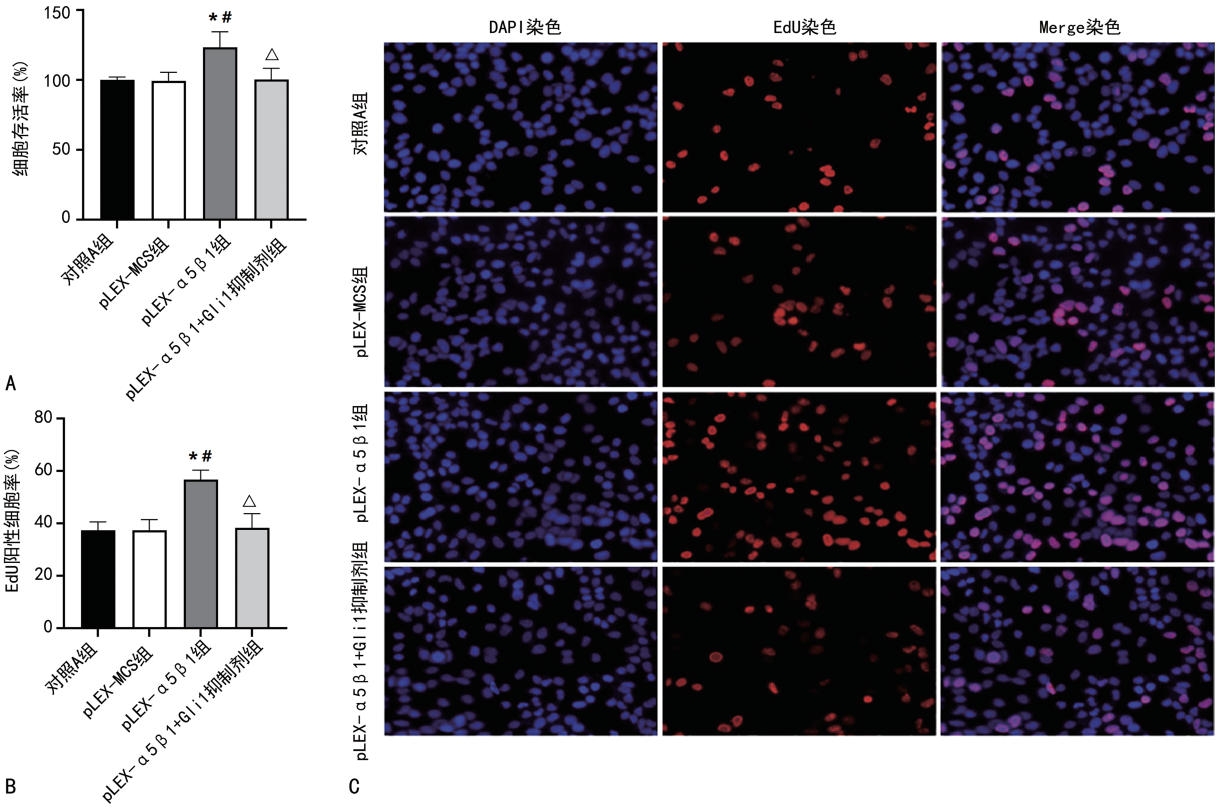
图 2　**各组 A431 细胞中 α5β1 与 Gli1 表达情况比较**

2.3 各组 A431 细胞增殖能力比较　MTT 法检测结果显示，与对照 A 组和 pLEX-MCS 组比较，pLEX-α5β1 组细胞存活率明显升高($P<0.05$)；与 pLEX-α5β1 组比较，pLEX-α5β1+Gli1 抑制剂组细胞存活率明显降低($P<0.05$)，见图 3A。EdU 染色结果显示，与对照 A 组和 pLEX-MCS 组比较，pLEX-α5β1 组 EdU 阳性细胞率明显升高($P<0.05$)；与 pLEX-α5β1 组比较，pLEX-α5β1+Gli1 抑制剂组 EdU 阳性细胞率明显降低($P<0.05$)，见图 3B、3C。

2.4 各组 A431 细胞凋亡形态检测结果　Hoechst

33258 染色结果显示,对照 A 组和 pLEX-MCS 组细胞内均出现较明显的细胞核浓缩,可见深色荧光浓染颗粒,偶见细胞核碎裂;而 pLEX-α5β1 组细胞内染色均匀,细胞核和细胞质未发生浓缩;相较于 pLEX-α5β1 组,pLEX-α5β1+Gli1 抑制剂组有细胞发生细胞核浓缩现象,呈深色荧光浓染,见图 4。

2.5　各组 A431 细胞迁移与侵袭能力比较　Transwell 实验结果显示,与对照 A 组和 pLEX-MCS 组比较,pLEX-α5β1 组迁移细胞数与侵袭细胞数均明显增加($P<0.05$);而相较于 pLEX-α5β1 组,pLEX-α5β1+Gli1 抑制剂组迁移细胞数与侵袭细胞数均明显减少($P<0.05$),见图 5。



注:A 为 MTT 法检测的各组 A431 细胞存活率比较;B 为各组 A431 细胞中 EdU 阳性细胞率比较;C 为 EdU 染色检测各组 A431 细胞增殖活性图(×100);与对照 A 组比较,* $P<0.05$;与 pLEX-MCS 组比较,# $P<0.05$;与 pLEX-α5β1 组比较,△ $P<0.05$。

图 3　各组 A431 细胞增殖能力检测结果

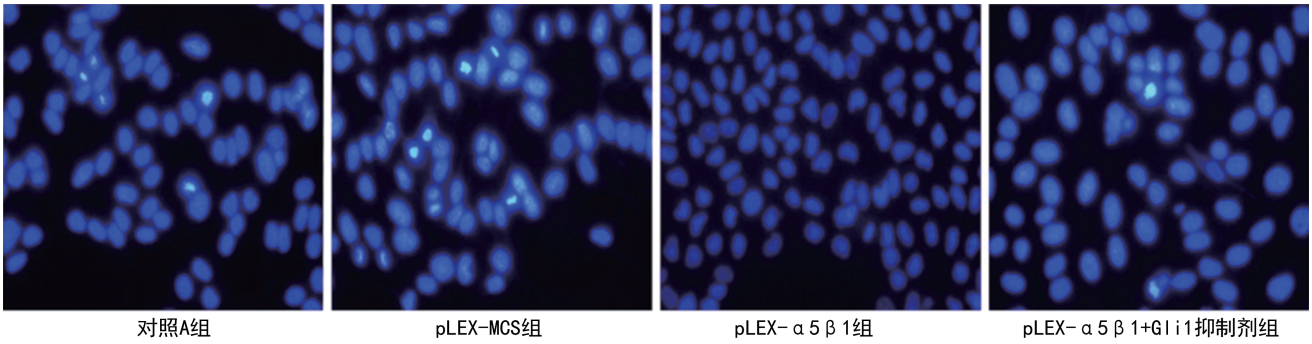


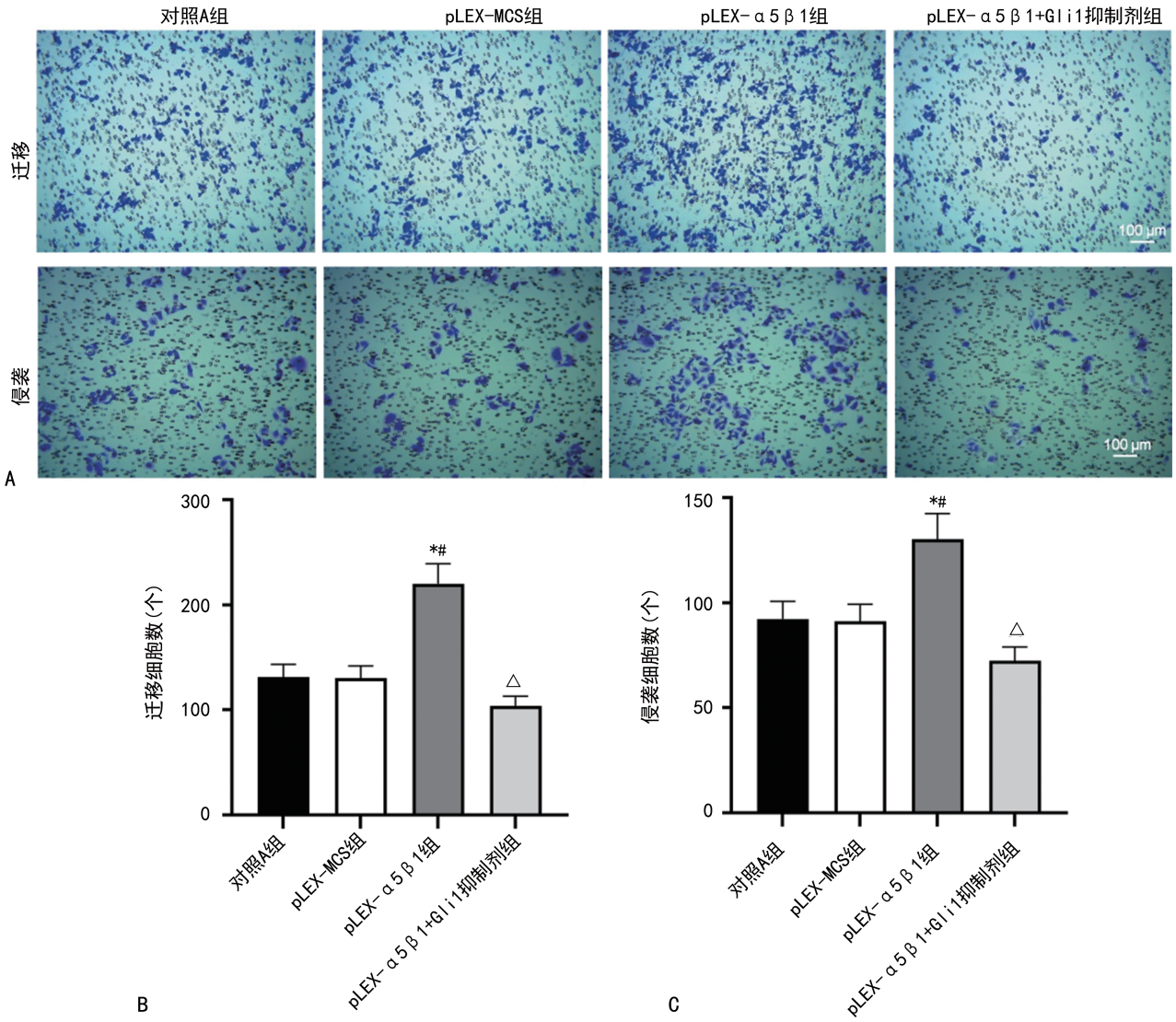
图 4　Hoechst 33258 **染色下各组** A431 **细胞凋亡形态**(×200)

2.6　A431 细胞对放疗的敏感性　MTT 法检测各组 A431 细胞增殖活性变化,结果显示,在处理后培养 24、48 和 72 h 时,与对照 B 组比较,4 Gy 组细胞增殖活性明显降低($P<0.05$);而 pLEX-α5β1+4 Gy 组细胞增殖活性较 4 Gy 组明显升高($P<0.05$),见表 1。流式细胞术检测放疗处理后细胞凋亡情况,结果显示,4 Gy 组细胞凋亡率较对照 B 组明显升高($P<0.05$);pLEX-α5β1+4 Gy 组细胞凋亡率较 4 Gy 组明显降低($P<0.05$),见图 6。

表 1　**不同培养时间各组** A431 **细胞增殖活性 A 值比较**($\bar{x}\pm s$)

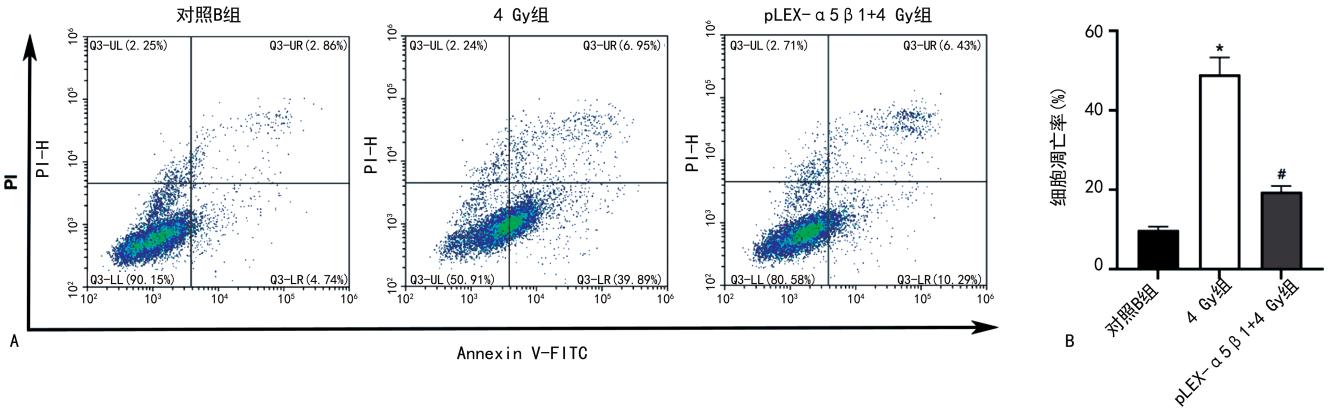
组别	24 h	48 h	72 h
对照 B 组	0.45±0.03	0.62±0.05	0.96±0.08
4 Gy 组	0.30±0.02*	0.41±0.04*	0.59±0.05*
pLEX-α5β1+4 Gy 组	0.41±0.03#	0.57±0.05#	0.84±0.07#

注:与对照 B 组比较,* $P<0.05$;与 4 Gy 组比较,# $P<0.05$。



注：A 为显微镜下各组迁移细胞与侵袭细胞图（×100）；B 为各组迁移细胞数比较；C 为各组侵袭细胞数比较；与对照 A 组比较，$^{*}P<0.05$；与 pLEX-MCS 组比较，$^{\#}P<0.05$；与 pLEX-α5β1 组比较，$^{\triangle}P<0.05$。

图 5　Transwell 实验检测各组 A431 细胞的迁移与侵袭能力



注：A 为各组流式细胞术检测结果；B 为各组细胞凋亡率比较；与对照 B 组比较，$^{*}P<0.05$；与 4 Gy 组比较，$^{\#}P<0.05$。

图 6　流式细胞术检测各组 A431 细胞凋亡情况

3　讨　　论

据报道，全球 BCC 的发病率在不断增加，我国约 70%的皮肤肿瘤为 BCC[2]。BCC 的治疗方式可分为局部治疗和全身治疗，其中局部治疗包括手术治疗、冷冻疗法、激光及药物治疗等，全身治疗包括使用化疗药物维莫德吉、索尼德吉等在内的方法。此外，光动力治疗和基因治疗目前也被应用到 BCC 的临床治疗中或已开展了大量的实验研究[10]。虽然大多数早期 BCC 属于低度恶性肿瘤，只发生局部病变且易于治疗，但晚期 BCC 的治疗方法仍然十分有限。目前，

晚期 BCC(包括转移性 BCC 和局部难治性 BCC)治疗难度大,治疗后 5 年复发率达 20%,且患者预后不佳。因此,进一步探索 BCC 的发病机制及与其发生相关的潜在生物标志物,并以此来寻找 BCC 治疗的新型方案,是目前临床研究的热点及重点。

整联蛋白由两个亚基组成,其中 α 亚基相对分子质量为(120～170)×10^3,β 亚基相对分子质量为(90～100)×10^3。人体内共有 18 个 α 亚基和 8 个 β 亚基,可以组装成至少 24 种具有不同结合特性、组织分布和生物学功能的 αβ 整联蛋白异二聚体,来充当组织和器官特异性配体的受体。在这 24 种整联蛋白亚型中,已发现多种亚型与肿瘤血管生成,肿瘤细胞增殖、迁移及侵袭有关,并参与调控肿瘤细胞对化疗和放疗的敏感性[6,11]。α5β1 是唯一已知的 α5 整联蛋白,作为跨膜蛋白其具有不同的结构域,包括决定 α5β1 多种功能的细胞外结构域、跨膜结构域和细胞质结构域。细胞外和跨膜结构域负责与细胞外基质蛋白或其他细胞外配体结合,并有助于后续相关信号通路的功能发挥,而细胞质结构域可以与细胞骨架相关蛋白相互作用以影响细胞迁移、侵袭和增殖。已有报道指出,α5β1 与癌细胞的失巢凋亡抗性或药物抗性有关[12-13];此外,α5β1 还与骨组织形成的维持和致动脉粥样硬化炎症的发生有关[14-15]。α5β1 的多种功能表明其表达失调可能导致包括癌症在内的多种疾病,目前研究已证实 α5β1 过表达可促进一些肿瘤的生长与转移,如 MITRA 等[16]研究表明,纤连蛋白与 α5β1 的结合导致了 α5 整联蛋白与 c-Met 直接结合(c-Met 位于 Src 和 FAK 的上游),α5β1 通过该作用激活 c-Met/FAK/Src 依赖性信号通路,从而促进卵巢癌细胞的侵袭和转移;MOROZEVICH 等[17]研究发现,在 MCF-7 人乳腺癌细胞中,α5β1 的高表达通过增强丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(AKT)、雷帕霉素靶蛋白(mTOR)和细胞外调节蛋白激酶 1/2(ERK1/2)的活性来促进乳腺癌细胞侵袭及对多柔比星的抗性。本研究中,α5β1 在皮肤 BCC 组织中异常表达,皮肤 BBC 组织 α5β1 阳性表达率明显高于正常皮肤组织($P<0.05$),进一步通过体外实验发现,A431 细胞过表达 α5β1 后,细胞的增殖、迁移与侵袭能力均提高,并抑制了细胞凋亡的发生。

放疗抵抗是肿瘤复发的主要原因之一,细胞与细胞外基质成分的黏附性是肿瘤化疗与放疗反应性的决定因素。目前,已有关于 α5β1 作为介导肿瘤放疗敏感性的重要调节因子的报道,如 DAMIANO 等[18]在研究中指出,α5β1 可促进 K562 慢性粒细胞白血病细胞与纤连蛋白结合,这种结合作用对化疗药物和 γ 辐射诱导的细胞凋亡均表现出一定的抵抗力;SHABANA 等[19]研究表明,α5β1 在胶质母细胞瘤中过表达,PR_b 是一种特异性靶向 α5β1 的纤连蛋白模拟肽,而含微小 RNA(miR)-603 的 PR_b 修饰的脂质体复合物能够明显增强胶质母细胞瘤干细胞对电离辐射的敏感性,这意味着 α5β1 的高表达可能影响了肿瘤细胞对放疗的敏感性。本研究结果显示,α5β1 在 A431 细胞中高表达降低了细胞对 4 Gy X 射线照射的敏感性,因此,靶向 α5β1 可能是提高肿瘤细胞放疗敏感性的有效方法之一。

α5β1 作为细胞表面受体发挥作用,能够激活导致肿瘤发生及进展的关键信号通路。以往研究表明,Hh 信号通路可能与 BCC 的进展有关,也是 BCC 发病机制启动的关键通路,Hh 信号通路的异常激活导致驱动 BCC 发生的靶基因的组成型激活,其中包括 Gli1[20-21]。BRENNAN-CRISPI 等[22]报道指出,在痣样基底细胞癌小鼠模型中桥粒钙黏蛋白 2(Dsg2)过表达,以自分泌和旁分泌方式诱导转录激活因子 3(Stat3)磷酸化并增加 Gli1 的表达水平,从而促进痣样基底细胞癌发展。在本研究中,A431 细胞高表达 α5β1 后其细胞内 Gli1 mRNA、蛋白的表达水平也明显升高。GANT61 是一种可渗透细胞的六氢嘧啶化合物,是 Gli 介导的基因反式激活的抑制剂,其已被证明在肿瘤细胞中具有抑制细胞生长和抗肿瘤干细胞活性的作用[23]。本研究使用 Gli1 抑制剂 GANT61 进行处理后,A431 细胞增殖、迁移与侵袭能力均显著下降,由此推测,α5β1 促进 BCC 细胞生长的生物学作用可能与其介导的 Gli1 表达水平升高相关。

综上所述,α5β1 在 BCC 中异常高表达,其高表达可提高 BCC 细胞增殖活性,促进 BCC 细胞的迁移与侵袭,并降低其对放疗的敏感性,该作用可能是通过介导 Gli1 表达来实现的。因此,以整联蛋白 α5β1 为靶点治疗 BCC 可能是一种潜在策略,但 α5β1 是否通过转录后水平直接调控 Gli1 的表达,有待后续进行相关研究证实。

参考文献

[1] HERMS F,BASSET-SEGUIN N. Emerging drugs for the treatment of basal cell carcinoma[J]. Expert Opin Emerg Drugs,2021,26(1):17-26.

[2] 张艳,范星. 基底细胞癌诊断及治疗研究进展[J]. 肿瘤预防与治疗,2020,33(12):943-948.

[3] BASSET-SEGUIN N,HERMS F. Update in the management of basal cell carcinoma[J]. Acta Derm Venereol,2020,100(11):adv00140.

[4] THOMSON J,HOGAN S,LEONARDI-BEE J,et al. Interventions for basal cell carcinoma of the skin[J]. Cochrane Database Syst Rev,2020,11(11):CD003412.

[5] COOPER J,GIANCOTTI F G. Integrin signaling in cancer: mechanotransduction, stemness, epithelial plasticity, and therapeutic resistance[J]. Cancer Cell,2019,35(3):347-367.

[6] MORENO-LAYSECA P,ICHA J,HAMIDI H,et al. Integrin trafficking in cells and tissues[J]. Nat Cell Biol,2019,21(2):122-132.

[7] 徐律韵,朱从健,陈洪. 整合素 α5β1 与肿瘤发生、发展相关性的研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志,2014,19(1):86-

89.
[8] MASTRANGELO E, MILANI M. Role and inhibition of GLI1 protein in cancer[J]. Lung Cancer (Auckl), 2018, 9: 35-43.
[9] LIU H, ZHANG W, WANG L, et al. GLI1 is increased in ovarian endometriosis and regulates migration, invasion and proliferation of human endometrial stromal cells in endometriosis[J]. Ann Transl Med, 2019, 7(22): 663.
[10] 廖晓容. 基底细胞癌的治疗进展[J]. 皮肤病与性病, 2017, 39(1): 31-32.
[11] KALLI A C, ROG T, VATTULAINEN I, et al. The integrin receptor in biologically relevant bilayers: insights from molecular dynamics simulations[J]. J Membr Biol, 2017, 250(4): 337-351.
[12] GUHA D, SAHA T, BOSE S, et al. Integrin-EGFR interaction regulates anoikis resistance in colon cancer cells [J]. Apoptosis, 2019, 24(11/12): 958-971.
[13] MOROZEVICH G E, KOZLOVA N I, SUSOVA O Y, et al. Hyperexpression of integrin α5β1 promotes resistance of MCF-7 human breast carcinoma cells to doxorubicin via ERK protein kinase down-regulation[J]. Biochemistry (Mosc), 2017, 82(9): 1017-1024.
[14] DI MAGGIO N, MARTELLA E, FRISMANTIENE A, et al. Extracellular matrix and α5β1 integrin signaling control the maintenance of bone formation capacity by human adipose-derived stromal cells[J]. Sci Rep, 2017, 7: 44398.
[15] AL-YAFEAI Z, YURDAGUL A J, PERETIK J M, et al. Endothelial FN (Fibronectin) deposition by α5β1 integrins drives atherogenic inflammation [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2018, 38(11): 2601-2614.
[16] MITRA A K, SAWADA K, TIWARI P, et al. Ligand-independent activation of c-Met by fibronectin and α(5)β(1)-integrin regulates ovarian cancer invasion and metastasis[J]. Oncogene, 2011, 30(13): 1566-1576.
[17] MOROZEVICH G E, KOZLOVA N I, USHAKOVA N A, et al. Implication of integrin alpha5beta1 in human breast carcinoma apoptosis and drug resistance[J]. Biomed Khim, 2011, 57(1): 77-84.
[18] DAMIANO J S, HAZLEHURST L A, DALTON W S. Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) protects the K562 chronic myelogenous leukemia cell line from apoptosis induced by BCR/ABL inhibition, cytotoxic drugs, and gamma-irradiation[J]. Leukemia, 2001, 15(8): 1232-1239.
[19] SHABANA A M, XU B, SCHNEIDERMAN Z, et al. Targeted liposomes encapsulating miR-603 complexes enhance radiation sensitivity of patient-derived glioblastoma stem-like cells[J]. Pharmaceutics, 2021, 13(8): 1115.
[20] JEE B A, LIM H, KWON S M, et al. Molecular classification of basal cell carcinoma of skin by gene expression profiling[J]. Mol Carcinog, 2015, 54(12): 1605-1612.
[21] PIETROBONO S, GAGLIARDI S, STECCA B. Non-canonical hedgehog signaling pathway in cancer: activation of GLI transcription factors beyond smoothened [J]. Front Genet, 2019, 10: 556.
[22] BRENNAN-CRISPI D M, OVERMILLER A M, TAMAYO-ORREGO L, et al. Overexpression of desmoglein 2 in a mouse model of gorlin syndrome enhances spontaneous basal cell carcinoma formation through STAT3-mediated Gli1 expression[J]. J Invest Dermatol, 2019, 139(2): 300-307.
[23] ZHANG Z, HAO C, ZHANG R, et al. A Gli inhibitor GANT61 suppresses cell proliferation, promotes cell apoptosis and induces G1/G0 cycle retardation with a dose- and time-dependent manner through inhibiting Notch pathway in multiple myeloma[J]. Cell Cycle, 2020, 19(16): 2063-2073.

(收稿日期:2022-02-10　修回日期:2022-06-20)

(上接第 2916 页)

[13] SHANKARAN S, LAPTOOK A R, PAPPAS A, et al. Effect of depth and duration of cooling on death or disability at age 18 months among neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: a randomized clinical trial[J]. JAMA, 2017, 318(1): 57-67.
[14] 陈信, 彭万胜, 张阵, 等. 选择性头部亚低温治疗新生儿缺氧缺血性脑病的疗效和安全性[J]. 中华危重病急救医学, 2018, 30(11): 1046-1050.
[15] 黄健, 唐晓霞. 亚低温联合促红细胞生成素治疗新生儿缺氧缺血性脑病疗效观察[J]. 海南医学, 2017, 28(22): 3728-3729.
[16] 刘翱搏, 李杨. 全身亚低温疗法在新生儿缺氧缺血性脑病治疗中的应用及其护理[J]. 解放军护理杂志, 2017, 34(6): 36-40.
[17] LI B, DASGUPTA C, HUANG L, et al. MiRNA-210 induces microglial activation and regulates microglia-mediated neuroinflammation in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. Cell Mol Immunol, 2020, 17(9): 976-991.
[18] 柏源. 全身亚低温对新生儿缺氧缺血性脑病的近期和远期治疗效果[J]. 吉林医学, 2021, 42(7): 1580-1581.
[19] 雷敏, 吴丽荣, 刘英. 芒果苷对缺氧缺血性脑损伤大鼠氧化应激反应及神经细胞凋亡的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27(12): 1037-1044.
[20] 果崇慧, 杨青. 神经节苷脂治疗新生儿缺氧缺血性脑病对患儿血清炎症相关细胞因子和 MMP-9 的影响[J]. 河北医药, 2018, 40(2): 219-223.
[21] 姜淑萍, 朱洪斌, 刘芳, 等. 新生儿缺氧缺血性脑病血清 HMGB1、脂蛋白 a 水平变化及临床意义[J]. 中国医药导报, 2021, 18(8): 25-28.
[22] 刘春丽, 梅花, 张亚昱, 等. 血清 GFAP 结合颅脑 MRI 检查在新生儿缺氧缺血性脑病中的临床价值[J]. 中国医师杂志, 2019, 21(11): 1621-1625.

(收稿日期:2022-02-10　修回日期:2022-07-05)