

细胞外基质硬度对原代人前列腺癌细胞炎症因子表达的影响

李睿智^{1,2} 牟洁³ 祝海⁴ 李菁¹ 王栋¹

(1 青岛大学青岛医学院慢病研究院,山东 青岛 266071; 2 青岛大学基础医学院;

3 康复大学生命科学与健康学院; 4 青岛市市立医院泌尿外科)

[摘要] **目的** 探讨细胞外基质(ECM)硬度对原代人前列腺癌细胞炎症因子表达的影响。**方法** 将原代人前列腺癌细胞分别接种于 0.1 g/L(A 组)和 8 g/L(B 组)ECM 溶液孵育过的培养皿中进行培养,使用明场显微镜观察两组细胞生长形态,并于接种第 4 天时通过实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)和蛋白免疫印迹(WB)实验分别检测两组细胞中炎症因子 C-C 基序趋化因子配体 2(CCL2)、CXC 趋化因子配体 10(CXCL10)、细胞间黏附分子 1(ICAM1)、白细胞介素-32(IL-32)的 mRNA 和蛋白相对表达水平。**结果** 明场显微镜观察结果显示,接种第 24 小时, A 组细胞逐渐发生聚集并形成细胞片结构, B 组细胞则呈现出多层细胞堆积生长的细胞团形态。RT-qPCR 实验结果显示, B 组细胞中炎症因子 CCL2、CXCL10、ICAM1、IL-32 mRNA 的相对表达水平显著高于 A 组($t=5.30\sim16.23, P<0.05$)。WB 实验结果显示, B 组细胞中的 ICAM1、IL-32 和 CCL2 蛋白相对表达水平显著高于 A 组($t=2.78\sim14.72, P<0.05$), CXCL10 蛋白相对表达水平在 A、B 两组间无明显差异($P>0.05$)。**结论** 硬度较低的 ECM 基底可促进原代人前列腺癌细胞中炎症因子 CCL2、CXCL10、ICAM1、IL-32 的表达。

[关键词] 前列腺肿瘤; 原代细胞培养; 细胞外基质; 硬度; 细胞因子类

[中图分类号] R737.25 **[文献标志码]** A

Influence of extracellular matrix stiffness on the expression of inflammatory factors in primary human prostate cancer cells LI Ruizhi, MU Jie, ZHU Hai, LI Jing, WANG Dong (Institute of Chronic Diseases, Qingdao Medical College of Qingdao University, Qingdao 266071, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the influence of extracellular matrix (ECM) stiffness on the expression of inflammatory factors in primary human prostate cancer cells. **Methods** Primary human prostate cancer cells were inoculated into culture dishes pre-incubated with 0.1 g/L ECM solution (group A) or 8 g/L ECM solution (group B), and bright-field microscopy was used to observe cell morphology. On day 4 of culture, RT-qPCR and Western blot were used to measure the relative mRNA and protein expression levels of the inflammatory factors C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2), C-X-C motif chemokine ligand 10 (CXCL10), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1), and interleukin-32 (IL-32) in cells. **Results** Bright-field microscopy showed that at 24 hours after inoculation, the cells in group A gradually aggregated and formed sheet-like structures, while those in group B exhibited multilayered cell aggregates. RT-qPCR showed that compared with group A, group B had significantly higher relative mRNA expression levels of the inflammatory factors CCL2, CXCL10, ICAM1, and IL-32 ($t=5.30-16.23, P<0.05$). Western blot showed that compared with group A, group B had significantly higher relative protein expression levels of ICAM1, IL-32, and CCL2 ($t=2.78-14.72, P<0.05$), while there was no significant difference in the relative protein expression level of CXCL10 between groups A and B ($P>0.05$). **Conclusion** Soft ECM substrate can promote the expression of the inflammatory factors CCL2, CXCL10, ICAM1, and IL-32 in primary human prostate cancer cells.

[KEY WORDS] Prostatic neoplasms; Primary cell culture; Extracellular matrix; Hardness; Cytokines

前列腺癌在全球范围内的发病率及死亡率呈快速上升趋势。前列腺的细胞构成包括管腔细胞、基底细胞、中间态细胞、神经内分泌细胞以及基质细胞。大部分前列腺癌属于腺癌类型,特点是管腔细胞的大量增生^[1-3]。高危或转移性前列腺癌患者在

经过内分泌治疗后大多数会发展成为去势抵抗性前列腺癌,即使使用靶向雄激素信号通路的新一代药物进行治疗,患者仍会面临耐药性问题^[4]。肿瘤微环境在肿瘤发生发展和耐药性的产生中具有重要作用,微环境细胞外基质(ECM)可以调节肿瘤细胞的增殖、转移、分化和耐药性等^[5]。微环境中的炎症因子在肿瘤发展过程中也起着重要作用^[6]。本课题组前期利用细胞系建立体外培养模型,发现培养皿中的 ECM 基底硬度可影响血管内皮细胞的细胞因子分泌以及前列腺癌细胞可塑性^[7-9],但尚未探讨其在

[收稿日期] 2025-03-13; **[修订日期]** 2025-06-28

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82472967);山东省自然科学基金面上项目(ZR2023MH327);青岛市自然科学基金原创探索项目(23-2-1-193-zyyd-jch);青岛大学“医学+”学科集群联合探索项目;青岛市医疗卫生重点学科建设项目

[通信作者] 王栋, Email: dongwang@qdu.edu.cn

原代人肿瘤细胞培养过程中的影响。为了更好地贴近临床转化,本研究探讨 ECM 基底硬度对原代人前列腺癌细胞炎症因子表达的调控作用,旨在为前列腺癌相关研究提供新的思路和研究模型。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂

DMEM/F12 培养基、二抗购自美国 Invitrogen 公司,胎牛血清、链霉素、青霉素、N-2、B-27、Trizol 试剂均购买于美国 Thermo Fisher 公司,二氢睾酮(DHT)、Y27632、Chir99021 均购自美国 Selleck 公司,上皮生长因子购自美国 PeproTech 公司,A83-01 购自美国 Bio-Techne 公司,PBS 购自武汉普诺赛生命科技有限公司;I 型胶原酶、胰蛋白酶、ECL 化学发光试剂均购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司,反转录试剂盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司;DAPI 荧光染料购自德国 Sigma-Aldrich 公司,驴血清(NDS)购自北京索莱宝生物科技有限公司,ECM 试剂(Matrigel Matrix)购自美国 Corning 公司,4%多聚甲醛固定液、Triton X-100、蔗糖均购自上海阿拉丁生化科技有限公司;抗前列腺特异性抗原(PSA)以及 C-C 基序趋化因子配体 2(CCL2)均购买于武汉三鹰生物技术有限公司;细胞角蛋白 8(CK8)抗体购买于美国 Santa Cruz 公司;细胞间黏附分子 1(ICAM1)购自杭州华安生物技术有限公司;白细胞介素-32(IL-32)、CXC 趋化因子配体 10(CXCL10)均购自成都正能生物技术有限责任公司;CK5 抗体、肿瘤蛋白 P63(P63)抗体、实验用枪头耗材均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 细胞培养

原代人前列腺癌细胞为本实验室自行分离培养冻存^[2-3],复苏后使用含有 2%胎牛血清、100 kU/L 的青霉素、100 mg/L 的链霉素、1×N-2、1×B-27、2 μmol/L Chir99021、10 nmol/L DHT、10 μg/L 上皮生长因子、0.2 μmol/L A83-01 以及 5 μmol/L Y27632 的 DMEM/F12 培养基,置于 37℃、含体积分数 0.05 CO₂、湿度 95%培养箱中进行培养。

1.3 免疫荧光染色实验观察原代人前列腺癌细胞关键生物标志物表达情况

取培养至融合度约 50%的细胞,4%多聚甲醛固定 15 min,0.05% Triton X-100 透化 10 min,封闭液(5%驴血清、0.05% Triton X-100、1×PBS)封闭 1 h,加入一抗(CK5、CK8、PSA)溶液室温孵育 2 h,PBS 洗涤后加入二抗避光孵育 1 h,再次洗涤后

用 DAPI 染色 30 min,封片后利用 Leica SP8 激光共聚焦显微镜进行成像分析。

1.4 细胞分组及处理

将原代人前列腺癌细胞分为 A、B 两组,A 组细胞接种于 ECM 溶液孵育过的培养皿中进行培养,处理过程如下:取 2 mL ECM 溶液(0.1 g/L)^[8],加入至 35 mm 细胞培养皿中并室温孵育 1 h,用 PBS 清洗 1 次,而后接种原代人前列腺癌细胞(每皿含 2×10⁵个细胞);B 组细胞使用硬度较低的 ECM 胶面进行培养,处理过程如下:将 1 mL ECM 溶液(8 g/L)加至 35 mm 细胞培养皿中,在培养箱中孵育 30 min,使底部形成 ECM 水凝胶,而后接种原代人前列腺癌细胞(每皿含 2×10⁵个细胞)。两组细胞分别在接种后第 2、24 小时时使用明场显微镜观察细胞形态,4 d 后进行实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)和蛋白免疫印迹(WB)实验。

1.5 RT-qPCR 实验检测两组细胞各细胞因子 mRNA 相对表达水平

取培养 4 d 的 A、B 组细胞,加入 1 g/L I 型胶原酶进行消化,用吸管吸打悬液直至 ECM 消化完全为止,然后 1 000 r/min 离心 4 min 后收集细胞沉淀,使用 Trizol 试剂提取两组细胞总 RNA,使用反转录试剂盒反转录为 cDNA,使用 ABI QuantStudio 3 RT-qPCR 系统进行检测。以 GAPDH 为内参基因,采用 2^{-ΔΔCT}的方法计算目的基因的相对表达水平。引物序列见表 1。

表 1 引物名称及序列

名称	序列	长度(bp)
CCL2	F:5'-AGAATCACCAGCAGCAAGTGTC-3'	23
	R:5'-TCCTGAACCCACTTCTGCTTGG-3'	22
CXCL10	F:5'-GTGGCATTCAAGGAGTACCTC-3'	21
	R:5'-TGATGGCCTTCGATTCTGGATT-3'	22
ICAM1	F:5'-ATGCCCAGACATCTGTGTCC-3'	20
	R:5'-GGGGTCTCTATGCCCAACAA-3'	20
IL-32	F:5'-TGGCGGCTTATTATGAGGAGC-3'	21
	R:5'-CTCGGCACCGTAATCCATCTC-3'	21
GAPDH	F:5'-TCCCATCACCATCTTCCA-3'	18
	R:5'-CATCACGCCACAGTTTCC-3'	18

1.6 WB 实验检测两组细胞中各细胞因子蛋白相对表达水平

取培养 4 d 的 A、B 组细胞,裂解后测定蛋白浓度,进行 SDS-PAGE 电泳,湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上,5% BSA-TBST 溶液室温封闭 1 h,加入一抗(CCL2、CXCL10、ICAM1、IL-32)4℃孵育过夜,加入 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h,使用 ECL

化学发光试剂显影并曝光成像,使用 ImageJ 软件计算各条带灰度值,以 GAPDH 为内参,计算目的蛋白相对表达水平。目的蛋白相对表达水平为目的蛋白条带灰度值与内参蛋白条带灰度值的比值。

1.7 统计学处理

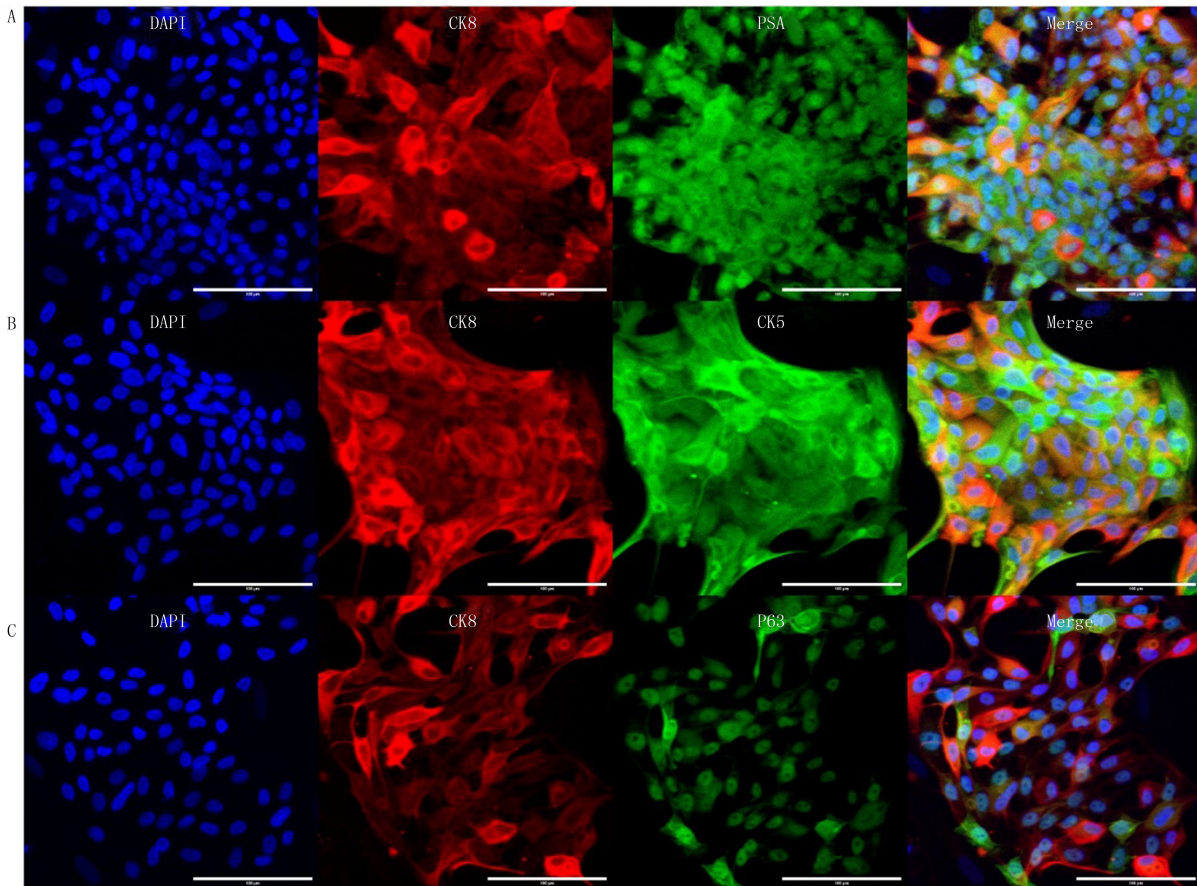
采用 GraphPad Prism 9.0 软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 Student *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差

异有统计学意义。

2 结 果

2.1 原代人前列腺癌细胞中关键生物标志物的表达情况

免疫荧光染色实验结果显示,原代人前列腺癌细胞中管腔细胞标志物 CK8、PSA 以及基底细胞标志物 CK5、P63 表达阳性。见图 1。



A:CK8 与 PSA 共染色,B:CK8 与 CK5 共染色,C:CK8 与 P63 共染色;DAPI 标记细胞核;免疫荧光染色,630 倍

图 1 原代人前列腺癌细胞关键生物标志物表达情况

2.2 两组细胞生长形态比较

明场显微镜观察结果显示,在接种第 2 小时时,A 组和 B 组细胞为单细胞离散状态。接种第 24 小时时,A 组细胞逐渐发生聚集并形成细胞片结构,B 组细胞则呈现出多层细胞堆积生长的细胞团形态。见图 2。

2.3 两组细胞中各炎症因子 mRNA 相对表达水平比较

RT-qPCR 实验结果显示,B 组细胞中炎症因子 *CCL2*、*CXCL10*、*ICAM1*、*IL-32* mRNA 相对表达水平显著高于 A 组($t = 5.30 \sim 16.23, P < 0.05$),详见表 2。

2.4 两组细胞中各炎症因子的蛋白相对表达水平比较

WB 实验结果显示,B 组细胞中的 *ICAM1*、*IL-32* 和 *CCL2* 蛋白相对表达水平显著高于 A 组($t = 2.78 \sim 14.72, P < 0.05$);而两组间 *CXCL10* 蛋白相对表达水平相比较无明显差异($P > 0.05$)。见图 3、表 3。

表 2 A、B 组细胞中 *CCL2*、*CXCL10*、*ICAM1*、*IL-32* mRNA 相对表达水平比较($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	<i>CCL2</i>	<i>CXCL10</i>	<i>ICAM1</i>	<i>IL-32</i>
A 组	1.015±0.221	1.001±0.040	1.016±0.228	1.001±0.055
B 组	21.433±3.935	13.918±4.222	3.586±0.152	11.218±2.221

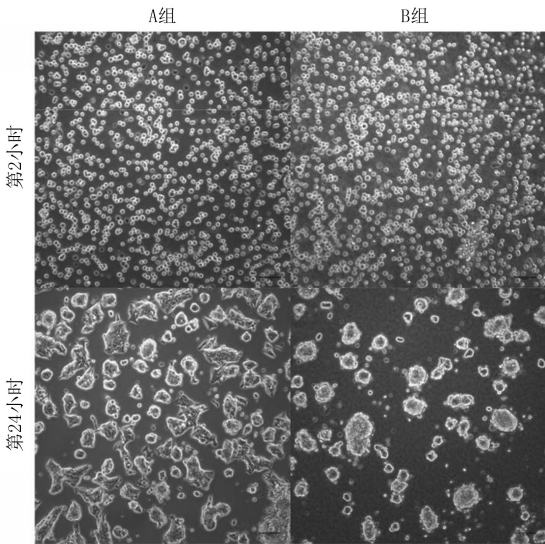


图 2 两组细胞生长形态比较(100 倍)

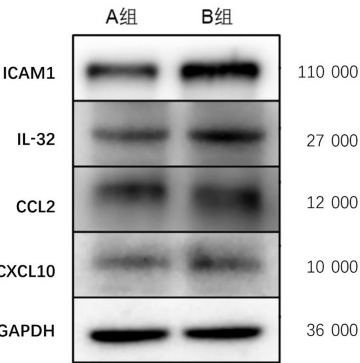


图 3 A、B 组细胞中 ICAM1、IL-32、CCL2 和 CXCL10 蛋白表达水平

表 3 A、B 组细胞中 CCL2、CXCL10、ICAM1、IL-32 蛋白相对表达水平 (n=3,x±s)

组别	CCL2	CXCL10	ICAM1	IL-32
A 组	1.000±0.169	1.000±0.182	1.000±0.080	0.952±0.309
B 组	1.504±0.216	1.325±0.146	1.779±0.045	1.518±0.170

3 讨 论

据最新研究预测,2025 年美国的前列腺癌发病率将位于男性肿瘤首位(30%),死亡率位列第二位(11%)^[10-12],对公共卫生构成严峻挑战。传统前列腺癌的体外研究模型一般是利用人前列腺癌细胞 LNCaP、22Rv1、PC-3 等细胞系进行构建,这些细胞系在体外经过长时间传代培养,已与前列腺癌细胞的原始生物学特征存在较大差异^[13-15]。为此,本课题组前期建立了小鼠前列腺干细胞和原代人前列腺癌细胞的体外培养方法,用于前列腺癌的体外药物筛选和病理机制研究^[1,3]。免疫荧光染色结果显示,本研究使用的原代人前列腺癌细胞呈现管腔细胞标志物 CK8 和 PSA 以及基底细胞标志物 CK5

和 P63 阳性,说明其为具有腺癌表型的中间态前列腺癌细胞。

肿瘤微环境在肿瘤的发生发展过程中发挥重要作用^[16],以胶原为主要成分的 ECM 不仅是肿瘤微环境的主要组成成分,还可以调节肿瘤细胞的生长、分化、迁移、耐药性等生物学行为^[5,17]。在疾病发展过程中,细胞可通过分泌细胞因子促进纤维化进程,进而引起 ECM 性质(如硬度)的改变,而 ECM 硬度的改变又会进一步作用于细胞,从而影响疾病进展^[8-9]。传统体外研究中,细胞通常在硬质培养皿底部进行培养。在培养皿底部孵育 ECM 溶液可使其表面包被一层 ECM 蛋白分子,但其杨氏模量大约在 3×10^9 kPa 左右,与体内肿瘤微环境中 ECM 的硬度(kPa 级)仍差异悬殊,难以精准模拟体内微环境。本课题组前期探究了 ECM 硬度对 LNCaP 细胞可塑性的影响,硬度较低(杨氏模量 1×10^3 kPa)的 ECM 能更好地维持 LNCaP 细胞的管腔细胞特征,而硬度较高(杨氏模量 2×10^4 kPa)的 ECM 能使 LNCaP 细胞呈现出中间态细胞表型。为了更好地贴近临床转化,本研究利用原代人前列腺癌细胞探讨 ECM 基底硬度在细胞培养中的影响。明场显微镜观察结果显示,在接种 2 h 后,A 组(使用硬的 ECM 基底进行培养)和 B 组(使用硬度较低的 ECM 基底进行培养)原代人前列腺癌细胞均为单细胞离散状态;而接种 24 h 后,A 组细胞逐渐发生聚集并形成细胞片结构,B 组细胞则呈现出多层细胞堆积生长的细胞团形态,提示 ECM 硬度对原代人前列腺癌细胞的生长形态有明显影响。

炎症因子在前列腺癌的发生发展过程中发挥重要作用。研究表明,CCL2 在前列腺癌细胞中高表达,其可促进前列腺癌细胞的增殖、迁移等生物学过程,并促进肿瘤微环境中血管生成^[18-19]。CXCL10 可促进前列腺癌细胞的侵袭能力^[20-22]。ICAM1 可促进前列腺癌细胞的增殖和侵袭^[23],并对其维持前列腺癌干细胞生物学特性具有重要作用^[24]。IL-32 与多种因子协同作用可影响肿瘤的发生发展,例如 IL-32 可通过调控 NF- κ B 信号通路促进多种肿瘤的增殖、侵袭和血管生成^[25]。本研究中,RT-qPCR 实验结果显示,与 A 组相比较,B 组细胞中炎症因子 CCL2、CXCL10、ICAM1、IL-32 的 mRNA 相对表达水平显著上调。WB 实验结果显示,与 A 组相比,B 组细胞中 CCL2、ICAM1 和 IL-32 蛋白相对表达水平显著上调,CXCL10 的表达无显著变化。上述结果提示,硬度较低的 ECM 基底能够促进上述

炎症因子在原代人前列腺癌细胞中的表达,但蛋白和基因水平存在一定差异,有待进一步探讨。

本研究具有一定局限性。实验中采用的 ECM 基底硬度约为 1 kPa,而人前列腺癌肿瘤组织的实际硬度可能大于这个数值,有必要在后续的临床研究中准确检测前列腺癌肿瘤组织的硬度,并在体外构建具有相应杨氏模量的 ECM 基底,以更好地模拟前列腺癌患者体内肿瘤微环境。此外,鉴于前列腺癌肿瘤微环境中的细胞类型众多,如成纤维细胞、血管细胞、神经细胞等,未来的研究中可在细胞培养体系中加入更多细胞类型,以探讨 ECM 硬度对肿瘤微环境各细胞间相互作用的影响。

综上所述,硬度较低的 ECM 基底可以促进原代人前列腺癌细胞当中炎症因子 CCL2、CXCL10、ICAM1、IL-32 的表达,但其具体分子机制有待进一步深入研究。本研究有望为前列腺癌相关探索提供新的思路和研究模型。

作者声明:所有作者均参与了研究的设计及论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

[1] MU J, LI R Z, ZHENG Y, et al. Human intermediate prostate cancer stem cells contribute to the initiation and development of prostate adenocarcinoma[J]. Stem Cell Res Ther, 2024,15(1):296.

[2] TANG D G. Understanding and targeting prostate cancer cell heterogeneity and plasticity[J]. Semin Cancer Biol, 2022,82: 68-93.

[3] XU Y L, MU J, ZHOU Z X, et al. Expansion of mouse castration-resistant intermediate prostate stem cells *in vitro* [J]. Stem Cell Res Ther, 2022,13(1):299.

[4] REBELLO R J, OING C, KNUDSEN K E, et al. Prostate cancer[J]. Nat Rev Dis Primers, 2021,7:9.

[5] ANDERSON N M, SIMON M C. The tumor microenvironment[J]. Curr Biol, 2020,30(16):R921-R925.

[6] ZHAO H K, WU L, YAN G F, et al. Inflammation and tumor progression: Signaling pathways and targeted intervention[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021,6(1):263.

[7] MA L, YIN L, ZHU H, et al. Two-dimensional vascularized liver organoid on extracellular matrix with defined stiffness for modeling fibrotic and normal tissues[J]. J Tissue Eng, 2024, 15:20417314241268344.

[8] SHEN L, SONG X Y, XU Y L, et al. Patterned vascularization in a directional ice-templated scaffold of decellularized matrix[J]. Eng Life Sci, 2021, 21(10):683-692.

[9] YU Y L, LENG Y, SONG X Y, et al. Extracellular matrix stiffness regulates microvascular stability by controlling endo-

thelial paracrine signaling to determine pericyte fate[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2023,43(10):1887-1899.

[10] HAN B F, ZHENG R S, ZENG H M, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. J Natl Cancer Cent, 2024,4 (1):47-53.

[11] SIEGEL R L, KRATZER T B, GIAQUINTO A N, et al. Cancer statistics, 2025[J]. CA A Cancer J Clin, 2025,75(1): 10-45.

[12] ZHENG R S, ZHANG S W, ZENG H M, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2016[J]. J Natl Cancer Cent, 2022, 2(1):1-9.

[13] GAO D, CHEN Y. Organoid development in cancer genome discovery[J]. Curr Opin Genet Dev, 2015,30:42-48.

[14] 郑雨,马磊,李睿智,等. 细胞外基质硬度对人前列腺癌细胞可塑性调控作用的研究[J]. 精准医学杂志, 2024,39(3):222-225,231.

[15] LI J J, SHEN M M. Prostate stem cells and cancer stem cells [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2019,9(6):a030395.

[16] CHEN L, XU Y X, WANG Y S, et al. Prostate cancer microenvironment: Multidimensional regulation of immune cells, vascular system, stromal cells, and microbiota[J]. Mol Cancer, 2024,23(1):229.

[17] GE R B, WANG Z W, CHENG L. Tumor microenvironment heterogeneity an important mediator of prostate cancer progression and therapeutic resistance [J]. NPJ Precis Oncol, 2022,6(1):31.

[18] ROGIC A, PANT I, GRUMOLATO L, et al. High endogenous CCL2 expression promotes the aggressive phenotype of human inflammatory breast cancer[J]. Nat Commun, 2021,12 (1):6889.

[19] ZHANG J, PATEL L, PIENTA K J. CC chemokine ligand 2 (CCL2) promotes prostate cancer tumorigenesis and metastasis[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2010,21(1):41-48.

[20] ALASSAF E, MUELLER A. The role of PKC in CXCL8 and CXCL10 directed prostate, breast and leukemic cancer cell migration[J]. Eur J Pharmacol, 2020,886:173453.

[21] WIGHTMAN S C, UPPAL A, PITRODA S P, et al. Oncogenic CXCL10 signalling drives metastasis development and poor clinical outcome[J]. Br J Cancer, 2015,113(2):327-335.

[22] WU Q, DHIR R, WELLS A. Altered CXCR3 isoform expression regulates prostate cancer cell migration and invasion[J]. Mol Cancer, 2012,11:3.

[23] LI W J, XU J J, CHENG L, et al. RelB promotes the migration and invasion of prostate cancer DU145 cells *via* exosomal ICAM1 *in vitro* [J]. Cell Signal, 2022,91:110221.

[24] LI C, LIU S W, YAN R P, et al. CD54-NOTCH1 axis controls tumor initiation and cancer stem cell functions in human prostate cancer[J]. Theranostics, 2017,7(1):67-80.

[25] HAN F, MA J X. Pan-cancer analysis reveals IL32 is a potential prognostic and immunotherapeutic biomarker in cancer[J]. Sci Rep, 2024,14(1):8129.