

CCL8 通过 JAK1/STAT3 信号通路促进人皮肤鳞状细胞癌进展的作用及机制

史高峰, 过云, 杨敏烈
(江南大学附属医院烧伤创伤诊疗中心, 江苏 无锡 214000)

【摘要】目的: 探究 CC 趋化因子配体 8(CCL8)对皮肤鳞状细胞癌(CSCC)进展的作用及机制。**方法:** 收集人皮肤鳞状细胞癌组织及正常皮肤组织,通过组织免疫荧光染色检测 CCL8 的表达。构建 myc-CCL8 过表达质粒并合成 CCL8 siRNA,在人皮肤鳞癌细胞 A431 中过表达或敲低 CCL8 后,CCK-8 检测细胞增殖能力,Transwell 检测细胞的迁移及侵袭能力,Western blot 检测细胞上皮-间充质转化(EMT)相关蛋白(E-cadherin、ZO-1、SNAIL、N-cadherin)的表达及 JAK1/STAT3 信号通路的变化。**结果:** CCK-8 在正常皮肤组织中几乎不表达,而在 CSCC 组织中表达水平升高($P<0.05$)。CCL8 可显著促进 A431 细胞的增殖、迁移及侵袭能力($P<0.05$)。CCL8 可显著激活 A431 细胞 JAK1/STAT3 通路,上调 SNAIL、N-cadherin 蛋白表达,下调 E-cadherin、ZO-1 蛋白表达($P<0.05$)。**结论:** CCL8 在 CSCC 细胞中高表达,通过 JAK1/STAT3 通路促进 CSCC 细胞 EMT 过程,从而促进 CSCC 细胞增殖、迁移和侵袭,为临床治疗 CSCC 提供思路。

【关键词】 皮肤鳞状细胞癌;CC 趋化因子配体 8;增殖;侵袭;迁移;JAK1/STAT3 通路
【中图分类号】 R739.5 **【文献标志码】** A

Effect and mechanism of CCL8 promoting the progression of human skin squamous cell carcinoma via JAK1/STAT3 pathway

SHI Gao-feng, GUO Yun, YANG Min-lie
(Burn Trauma Treatment Center, Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuxi 214000, Jiangsu, China)

【Abstract】Objective: To explore the effect and potential mechanisms of CC chemokine ligand 8 (CCL8) in cutaneous squamous cell carcinoma (CSCC). **Methods:** Collecting human skin squamous cell carcinoma tissue and normal skin tissue, and detect the expression of CCL8 through tissue immunofluorescence staining. After overexpression or inhibition of CCL8 in human skin squamous cell carcinoma cell line A431 using construction of myc-CCL8 overexpression plasmid or CCL8 siRNAs, cell viability, migration and invasion ability were detected. The expression levels of cell Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) related proteins (E-cadherin, ZO-1, SNAIL, N-cadherin) and JAK1/STAT3 pathway was detected by Western blot experiment. **Results:** Compared with barely expressed in normal skin tissue, CCL8 was increased expressed in CSCC tissue ($P<0.05$). CCL8 could significantly promote the proliferation, migration, and invasion ability of A431 cells ($P<0.05$). CCL8 could remarkably activate the JAK1/STAT3 pathway in A431 cells, upregulate the expression of SNAIL and N-cadherin proteins, and downregulate the expression of E-cadherin and ZO-1 proteins ($P<0.05$). **Conclusion:** CCL8 is up-regulated expressed in CSCC cells and can promote the EMT process of CSCC cells through the JAK1/STAT3 pathway, thereby facilitating CSCC cell proliferation, migration, and invasion, which provides ideas for clinical treatment of CSCC.

【Key words】 Skin squamous cell carcinoma; CC chemokine ligand 8; Proliferation; Invasion; Migration; JAK1/STAT3 pathway

皮肤鳞状细胞癌(cutaneous squamous cell carcinoma, CSCC)是一种起源于表皮和/或附属器的角质细胞恶性增殖的常见癌症^[1]。皮肤鳞状细胞癌的病因相对复杂,主要包括紫外线照射、放射线接触、慢性皮肤溃疡、遗传因素、病毒感染、化学物质接

触、慢性炎症和刺激以及免疫系统功能低下等^[2]。目前, CSCC 的治疗手段包括手术、放疗、化疗和表皮生长因子受体抑制剂靶向治疗等^[3]。大部分患者经过治疗后预后良好,但一旦发生转移,则预后不良^[4]。CC 趋化因子配体 8(CC chemokine ligand 8,

CCL8)属于 CC 趋化因子家族成员^[6],有研究发现其在黑色素瘤^[6]、乳腺癌^[7]等多种恶性肿瘤组织中表达异常,并与多种恶性肿瘤的发生发展有关。然而,目前 CCL8 在皮肤鳞状细胞癌中的表达和临床意义无相关报道,本研究就 CCL8 对人皮肤鳞状细胞癌细胞的影响进行探讨。

1 材料与方法

1.1 CSCC 组织及细胞系

选取 2024 年 1 月至 2024 年 12 月江南大学附属医院收治的 CSCC 患者术后组织和正常皮肤组织 5 对为研究对象。本研究已获得伦理委员会批准,相关患者均已签署知情同意书。A431 人鳞状细胞癌细胞购于 Cellcook。

1.2 主要试剂和抗体

CCL8 (ABclonal, A6977), Snail (ABclonal, A11794), N-cadherin (N-cad) (ABclonal, A19083), E-cadherin (E-cad) (ABclonal, A20798), GAPDH (ZENBIO, 10494-1-AP); JAK1 (ABclonal, A11963); Phospho-Jak1 (Tyr1034/1035) (CST, # 74129); STAT3 (ABclonal, A22434); Phospho-STAT3-Y705 (ABclonal, AP0070)。HRP 酶标缀合羊抗兔 IgG (H+L) (Proteintech, SA00001-2); Cell Counting Kit-8 (MCE, HY-K0301), BCA 蛋白检测试剂盒 (Thermo, 23227)。

1.3 组织免疫荧光染色

取病理结果为皮肤鳞状细胞癌患者的石蜡切片,脱蜡:将切片置 60℃ 恒温箱中烘烤 10 min 后,再将切片放二甲苯中 10 min 后,依次将切片放入 100% 无水乙醇 5 min、85% 无水乙醇 5 min、75% 无水乙醇 5 min 进行脱蜡和水化。抗原修复:将组织切片置于 0.01 mmol/L 柠檬酸抗原缓冲溶液 (pH 6.0) 的修复盒中,将其置于高压锅中微沸煮 15 min,自然冷却到室温后置于 PBS 中在脱色摇床上晃动洗 3 次,5 min/次;BSA 封闭:滴加 3% BSA 孵育 30 min;一抗孵育:轻甩干封闭液,在切片上滴加一定比例配好的一抗,切片置于湿盒中,4℃ 过夜;二抗孵育:用 PBS 在脱色摇床上将切片洗 3 次,5 min/次,洗完滴加适量的按一定比例配好的二抗,室温避光孵育 1 h;细胞核染色:用 PBS 在脱色摇床上将切片洗 3 次,5 min/次,用 DAPI 进行细胞核染色 15 min;用抗淬灭剂封片,使用荧光显微镜采集图像进行分析。

1.4 Western blot 检测蛋白表达

通过广州友茗生物有限公司构建 pcDNA3.1-myc-CCL8 和 pcDNA3.1-myc-NC 质粒,同时合成 CCL8

siRNA,将其转染 A431 细胞系,转染后 48 h 收集细胞,提取细胞总蛋白并利用 BCA 试剂盒法测定蛋白浓度。将蛋白上样量调整为 20 μg/孔进行上样,通过 SDS-PAGE 进行电泳,然后湿转移到 0.22 μm 的聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene, PVDF) 膜上。转膜完成后制备 5% 脱脂奶粉,室温封闭 1 h,制备 CCL8、EMT 相关抗体、JAK1/STAT 3 信号通路相关蛋白一抗,在 4℃ 进行过夜孵育。PBS 清洗 3 次后,制备 HRP 偶联二抗,将膜与二抗在室温下孵育 1 h。PBS 清洗 3 次后,应用 ECL 试剂检测 CCL8 和 EMT 蛋白条带。上述抗体分别为:抗兔 CCL8 抗体 (1:1 000);抗兔 Snail 抗体 (1:1 000);抗兔 N-cadherin 抗体 (1:1 000);抗兔 E-cadherin 抗体 (1:1 000);抗兔 JAK1 抗体 (1:1 000);抗兔 Phospho-Jak1 抗体 (1:1 000);抗兔 STAT 3 抗体 (1:1 000);抗兔 Phospho-STAT 3-Y705 抗体 (1:1 000);抗兔 GAPDH 抗体 (1:1 000)。二抗:山羊抗兔 IgG (H+L)-HRP 抗体 (1:3 000)。

1.5 RT-qPCR 检测 mRNA 的表达:

收集 CCL8 过表达及敲低的 A431 细胞,利用 TRIzol 法从细胞中分离总 RNA,反转录为 cDNA。反转录条件:25℃,5 min;42℃,30 min;85℃,5 s。使用 PerfectStart Green qPCR SuperMix 试剂盒对 CCL8 基因进行 qPCR 反应,CCL8 引物序列:上游 5'-TGGAGAGCTACACAAGAATCACC-3',下游 5'-TGGTCCAGATGCTTCATGGAA-3'。PCR 反应扩增采用两步法,条件:94℃ 预变性 30 s;94℃,5 s;60℃,30 s,共 40 个循环。构建溶解曲线,结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 展示。每组分别设立 3 个复孔,结果取均值。

1.6 Transwell 检测细胞迁移能力

Transwell 小室 (未包被基质胶,孔径 8.0 μm) 放置:在孔板下室 (24 孔板) 加入培养基 500 μL,然后将 Transwell 小室置于 24 孔板内,在小室上室加入 200 μL 细胞悬液,细胞数为 30 000 个/孔,置培养箱中培养 24 h。培养 24 h 后弃掉小室中的培养基,用 PBS 洗 2 次,3 min/次。将小室放入 24 孔板中,加入多聚甲醛 600 μL,室温固定 30 min。固定完成后取出小室,弃小室中残留的固定液,用 PBS 洗 2 次,每次 3 min。将小室转移到预先加入 0.1% 结晶紫溶液的孔中,使染色液完全浸没膜,室温染色 15~30 min。用 ddH₂O 洗 2 次,每次 3 min 以去除残留的结晶紫。实验结束后用棉签轻轻擦拭小室的上侧以去除非特异性染色,自然晾干后,进行显微镜拍照和镜检计数。

1.7 Transwell 检测细胞侵袭能力

Transwell 小室准备:把 -20℃ 下贮存的无菌铺好基质胶的 Transwell 小室取出,置 37℃ 培养箱中静

置 30 min。然后加入 100 μ L/孔的无血清培养基,于培养箱放置 30 min,进行基底膜水化。将制备好的 Transwell 小室置于 24 孔板内,取细胞悬液 200 μ L 加入上室,细胞数为 30 000 个/孔,培养箱中培养 24 h。培养 24 h 后弃掉小室中的培养基,用 PBS 洗 2 次,每次 3 min。将小室放入 24 孔板中,加入多聚甲醛 500 μ L,室温固定 30 min。固定完成后取出小室,弃小室中残留的固定液,用 PBS 洗 2 次,每次 3 min。将小室转移到预先加入 0.1%结晶紫溶液的孔中,使染色液完全浸没膜,室温染色 15~30 min。用 ddH₂O 洗 2 次,每次 3 min 以去除残留的结晶紫。实验结束后用棉签轻轻擦拭小室的上侧以去除非特异

性染色,自然晾干后,进行显微镜拍照和镜检计数。

1.8 统计学分析

采用 GraphPad Prism10.0 统计包对数据进行分析,计量资料以均数 \pm 标准差表示,组间比较采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计数意义。

2 结果

2.1 CCL8 在 CSCC 组织中高表达

研究结果显示,CCL8 在正常皮肤组织中几乎不表达,在 CSCC 组织中表达量升高($P<0.05$)。见图 1。

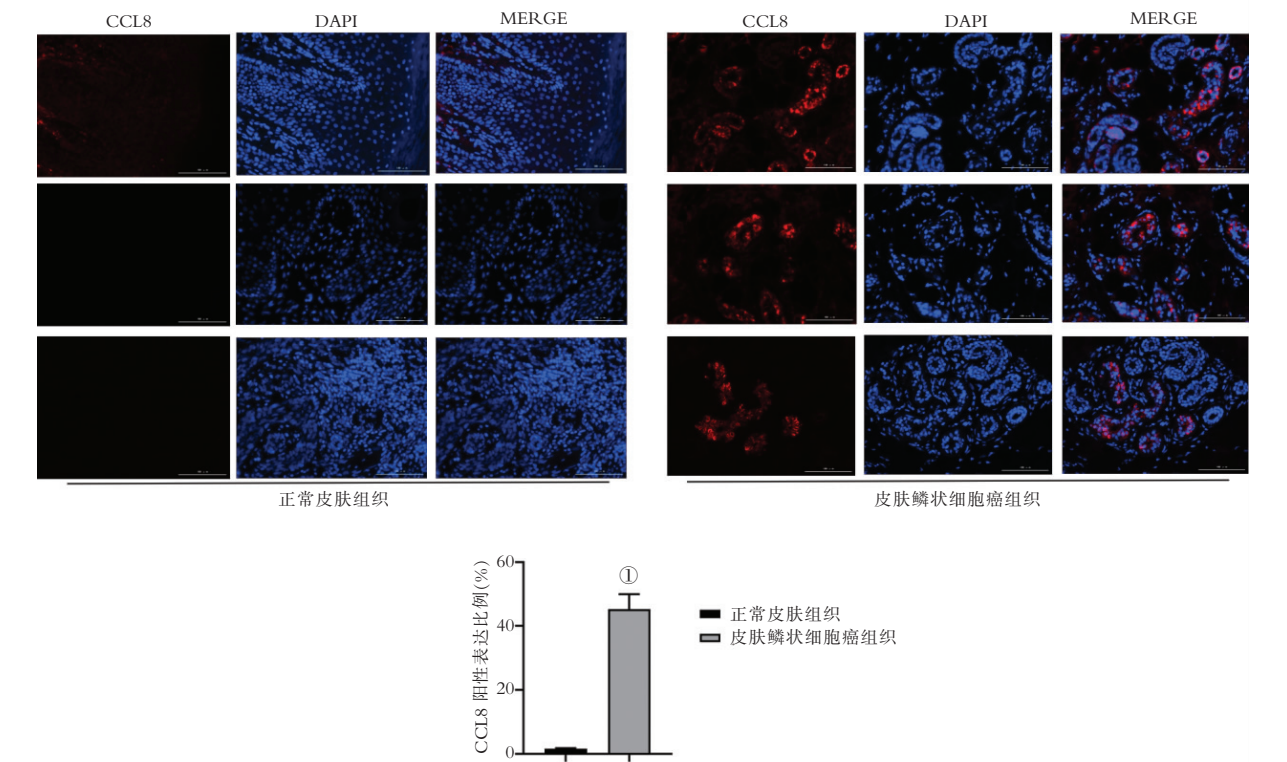


图 1 组织免疫荧光染色检测人正常皮肤及 CSCC 组织中 CCL8 的表达($\times 100$)
红色荧光:CCL8;蓝色荧光:DAPI 标记的细胞核。① $P<0.05$,与正常皮肤组织相比。

2.2 CCL8 促进 A431 细胞增殖水平

对 A431 细胞分别过表达及敲低 CCL8,RT-qPCR 和 Western blot 检测 CCL8 表达量的变化。结果表明:与对照组相比,A431 细胞系过表达 CCL8 后 CCL8 的 mRNA 和蛋白表达水平升高($P<0.05$)。见图 2A-B。与对照组相比,A431 细胞系敲低 CCL8 后 CCL8 的 mRNA 和蛋白表达水平下降($P<0.05$)。见图 2C-D。CCK-8 结果显示,与对照组相比,过表达 CCL8 组的 A431 细胞在转染后 72 h 增殖水平增加,96 h 增加更为显著($P<0.05$)。见图 2E。与对照组相比,A431 细胞系敲低 CCL8 后细胞增殖水平下降,且随时间增加,其在转染 72 h 及 96 h 下降更为显著($P<0.05$)。见图 2F。

2.3 CCL8 促进 A431 细胞迁移

Transwell 结果显示,与对照组相比,过表达 CCL8 组 A431 细胞迁移能力增加($P<0.05$)。见图 3A-B。与对照组相比,敲低 CCL8 组 A431 细胞迁移能力下降($P<0.05$)。见图 3C-D。

2.4 CCL8 促进 A431 细胞侵袭

Transwell 结果显示,与对照组相比,过表达 CCL8 组 A431 细胞侵袭能力增加($P<0.05$)。见图 4A 及 4B。与对照组相比,敲低 CCL8 组 A431 细胞侵袭能力下降($P<0.05$)。见图 4C-D。

2.5 CCL8 可通过 JAK1/STAT3 通路促进 A431 细胞 EMT 过程

对 A431 细胞分别过表达及敲低 CCL8,通过

Western blot 检测 EMT 相关蛋白及 JAK1/STAT3 通路的变化。结果表明:与对照组相比,过表达 CCL8 后 A431 细胞中 SNAIL、N-cadherin 及 p-JAK1、p-STAT3 的蛋白表达升高($P<0.05$),E-cadherin、ZO-1 的蛋白表达下降($P<0.05$)。与对

照组相比,敲低 CCL8 后 A431 细胞中 SNAIL、N-cadherin 及 p-JAK1、p-STAT3 的蛋白表达下降($P<0.05$),E-cadherin、ZO-1 的蛋白表达升高($P<0.05$)。见图 5。

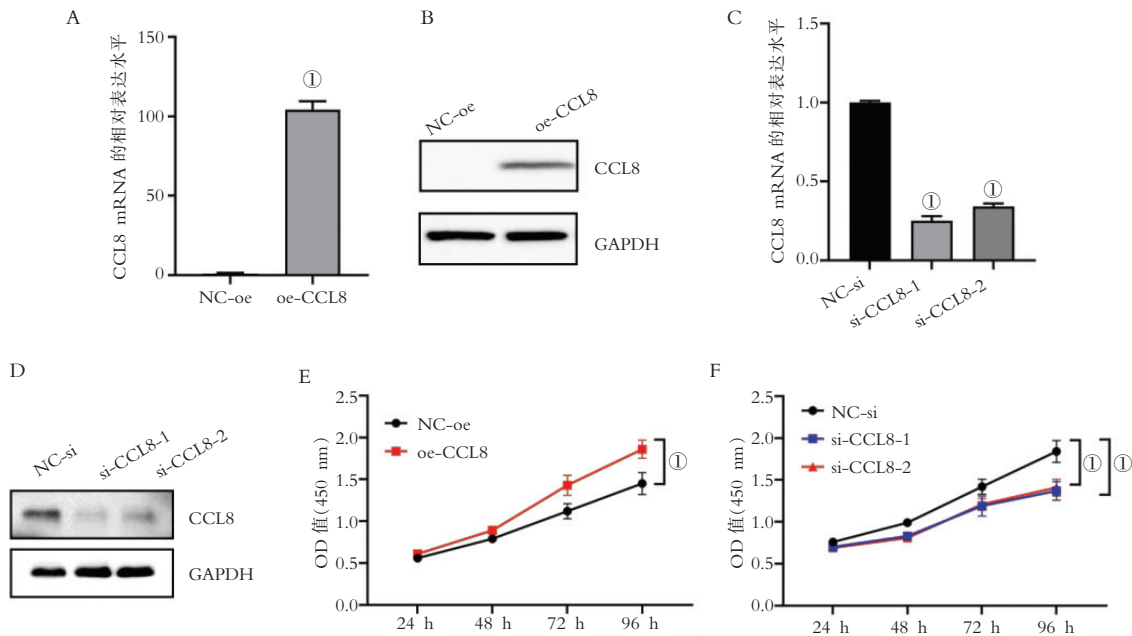


图 2 CCL8 对 A431 细胞活力的影响($n=3$)

A. NC-oe 组和 oe-CCL8 组细胞 CCL8 mRNA 的表达,① $P<0.05$,与 NC-oe 组相比;B. NC-oe 组和 oe-CCL8 组细胞 CCL8 蛋白的表达;C. NC-si 组和 si-CCL8 组细胞 CCL8 mRNA 的表达,① $P<0.05$,与 NC-si 组相比;B. NC-si 组和 si-CCL8 组细胞 CCL8 蛋白的表达;E. NC-oe 组和 oe-CCL8 组细胞增殖能力的变化,① $P<0.05$,与 NC-oe 组相比;F. NC-si 组和 si-CCL8 组细胞增殖能力的变化。① $P<0.05$,与 NC-si 组相比。

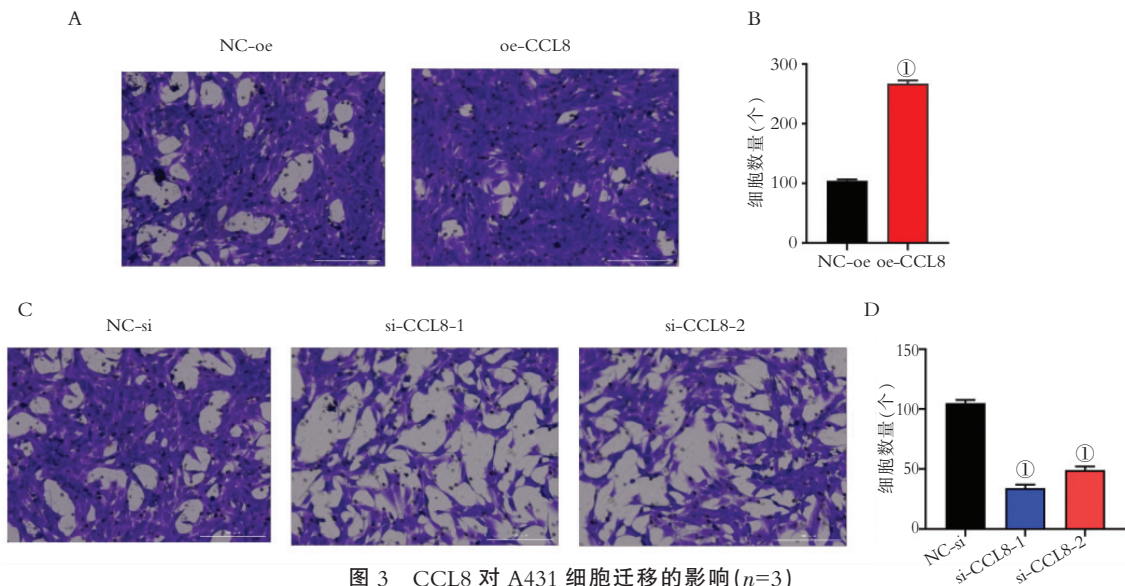


图 3 CCL8 对 A431 细胞迁移的影响($n=3$)

A. NC-oe 组和 oe-CCL8 组细胞迁移能力;B. NC-oe 组和 oe-CCL8 组细胞迁移的数量,① $P<0.05$,与 NC-oe 组相比;C. NC-si 组和 si-CCL8 组细胞迁移能力;D. NC-si 组和 si-CCL8 组细胞迁移的数量。① $P<0.05$,与 NC-si 组相比。

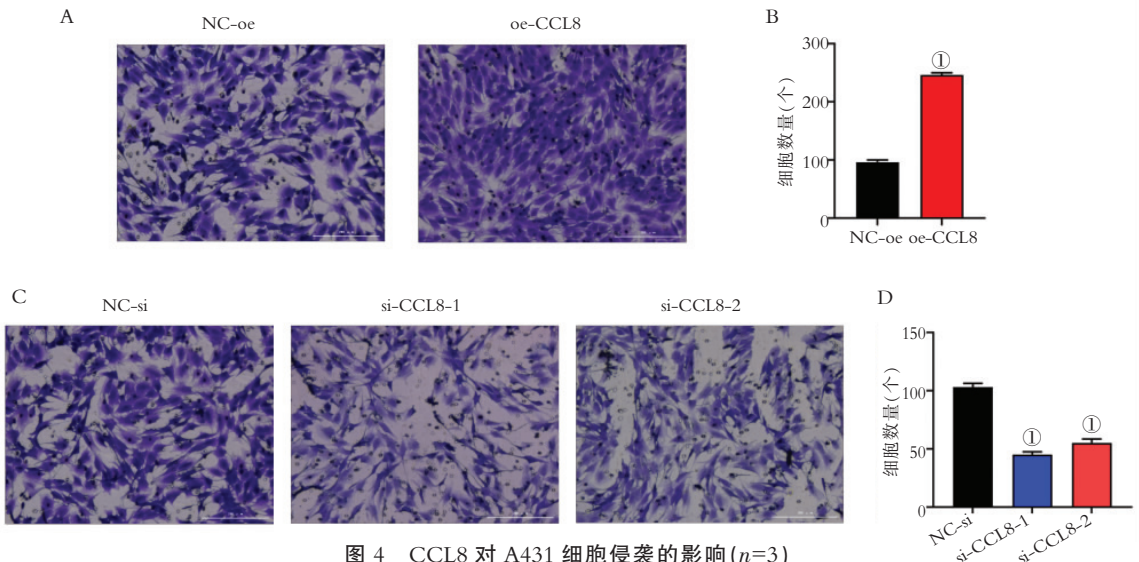


图4 CCL8对A431细胞侵袭的影响(n=3)
A. NC-oe组和oe-CCL8组细胞侵袭能力;B. NC-oe组和oe-CCL8组细胞侵袭的数量,① $P<0.05$,与NC-oe组相比;
C. NC-si组和si-CCL8组细胞侵袭能力;D. NC-si组和si-CCL8组细胞侵袭的数量。① $P<0.05$,与NC-si组相比。

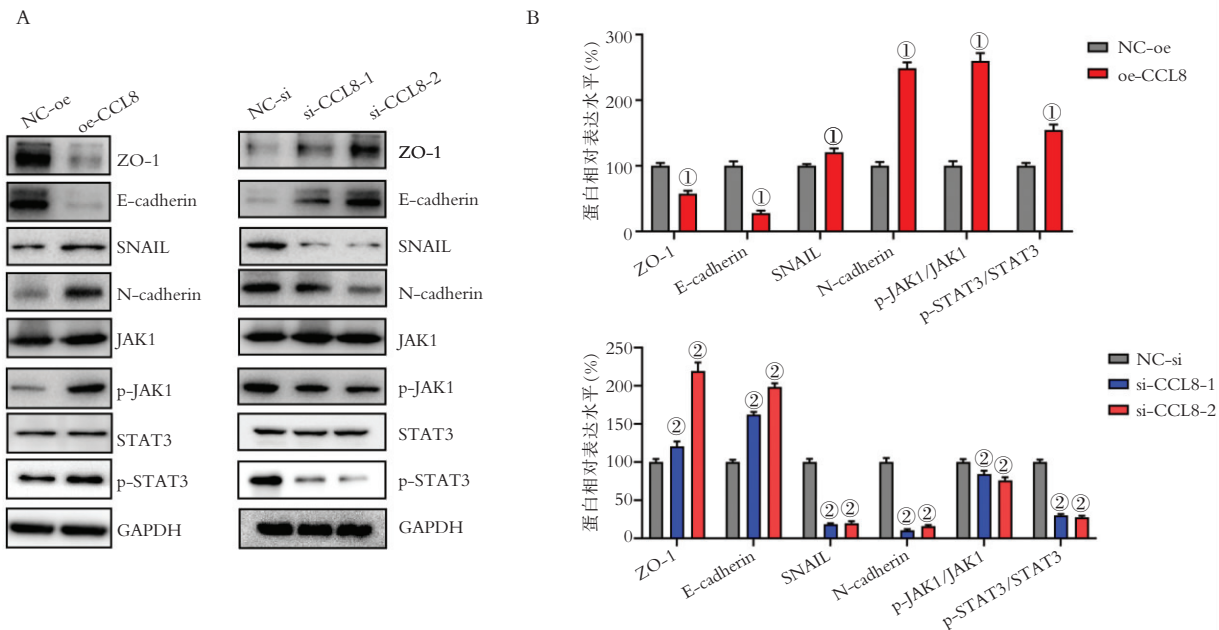


图5 CCL8对A431细胞的EMT关键蛋白及JAK1/STAT3通路的影响(n=3)
A. NC-oe组,oe-CCL8组,NC-si组和si-CCL8组细胞E-cadherin,ZO-1,SNAIL、N-cadherin及JAK1/STAT3通路的表达水平;
B. NC-oe组和oe-CCL8组蛋白量化结果。① $P<0.05$,与NC-oe组相比;② $P<0.05$,与NC-si组相比。

3 讨论

CSCC是我国常见的一种皮肤恶性肿瘤,其发病率逐年增高且侵袭性高,易发生早期转移。虽然CSCC可通过手术、化疗或免疫治疗等取得一定的治疗效果,但当CSCC患者出现远处转移后治疗效果较差且总体生存率较低、长期预后较差^[8]。趋化因子配体CCL8可以通过与单核细胞、NK细胞和T细胞在内的免疫细胞上表达的包括CCR1、CCR2B、CCR3和CCR5在内的趋化因子受体结合,

进而介导宿主炎症反应^[5]。CCL8在脑胶质瘤^[9]、乳腺癌^[7]和肺癌^[10]的发生及转移中发挥作用,但其在人皮肤鳞癌中的临床意义及潜在作用机制并无相关报道。为探究CCL8在CSCC中的临床意义及潜在的调控机制,本研究收集临床CSCC组织及正常皮肤组织,通过组织免疫荧光染色方法检测CCL8的表达水平,结果表明与正常皮肤组织相比,CCL8在CSCC组织中的表达量升高。进一步研究通过转染过表达质粒或者siRNA对人皮肤鳞癌A431细胞系中的CCL8分别进行过表达及敲低,在细胞水平探究其促进CSCC进展的潜在作用机制。结果表

明, A431 细胞系过表达 CCL8 可促进人皮肤鳞癌细胞增殖、侵袭和迁移能力, 而 A431 细胞系敲低 CCL8 可抑制人皮肤鳞癌细胞增殖、侵袭和迁移能力。以上研究结果均提示 CCL8 可能促进 CSCC 疾病进展, 为 CSCC 的机制研究提供新的靶点。

JAK-STAT 通路是一条由 50 多个配体、30 多个受体、4 个 JAK 激酶及 6 个转录激活因子 STAT 蛋白组成的进化上保守的跨膜信号转导通路, 其通过将细胞外的化学信号转入细胞内部, 参与细胞的分化、免疫反应、血管生成以及肿瘤发展等许多重要的生物学过程^[11]。有研究^[12]表明 IL-10 通过 JAK1/STAT3 信号通路促进子宫内皮癌上皮细胞-内皮细胞的转化, 进而促进血管生成过程。少突胶质细胞中 SERPINH1 激活 JAK1/STAT3 信号通路, 影响 N-cadherin 和 E-cadherin 等 EMT 标志物的表达, 进而促进脑胶质瘤生长和 EMT 进展^[13]。肺癌顺铂耐药的患者肿瘤组织中毛细血管扩张性共济失调症突变蛋白(ATM)高表达, 其可以上调顺铂耐药的细胞 PD-L1 的表达, 该过程是通过激活 JAK/STAT3 信号来实现的, 进而促进 EMT 过程及肺癌细胞对顺铂耐药^[14]。研究^[15]表明 EMT 过程被激活后, 可以促进口腔鳞状细胞癌的转移及恶性进展。本研究通过 Western blot 检测发现, 过表达 CCL8 后 A431 细胞 SNAIL、N-cadherin 蛋白及 p-JAK1、p-STAT3 显著上调表达($P < 0.05$), E-cadherin、ZO-1 蛋白显著下调表达($P < 0.05$)。抑制 CCL8 表达后 A431 细胞 SNAIL、N-cadherin 蛋白及 p-JAK1、p-STAT3 显著下调表达($P < 0.05$), E-cadherin、ZO-1 蛋白显著上调表达($P < 0.05$), 说明 CCL8 可能通过 JAK1/STAT3 信号通路来促进皮肤鳞状细胞癌细胞 EMT 过程, 进而促进人皮肤鳞状细胞癌进展。

综上, CCL8 通过激活 JAK1/STAT3 信号通路来促进细胞 EMT 过程, 从而促进人皮肤鳞癌 A431 细胞增殖、侵袭及迁移能力, 为皮肤鳞状细胞癌的治疗提供潜在的靶点和候选标记物。

参考文献

[1] 淡克娜, 熊霞. BCAT1 促进人皮肤鳞状细胞癌细胞增殖迁移和

侵袭[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2024, 33(1): 7-12.

[2] 姚佳雯, 时永强. 皮肤鳞状细胞癌组织 miR-20a、miR-196a 表达水平与临床病理特征和预后的关系[J]. 检验医学与临床, 2024, 21(16): 2390-2395.

[3] 陈赵慧, 杨今言, 李丽华, 等. miR-27a 靶向 FOXG1 调控皮肤鳞状细胞癌细胞增殖、侵袭及迁移的研究[J]. 现代生物医学进展, 2024, 24(13): 2428-2433.

[4] 胡新红, 曹天宇, 蔺建苹, 等. miR-204 靶向 SOX4 抑制皮肤鳞状细胞癌的发展[J]. 现代生物医学进展, 2024, 24(14): 2626-2633.

[5] 王宏宇, 黄海云, 刘晓玲. CCL8 相关通路与过敏性疾病[J]. 生命的化学, 2021, 41(10): 2119-2124.

[6] Barbai T, Fejös Z, Puskas LG, *et al.* The importance of micro-environment: the role of CCL8 in metastasis formation of melanoma[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(30): 29111-29128.

[7] Farmaki E, Chatzistamou I, Kaza V, *et al.* A CCL8 gradient drives breast cancer cell dissemination[J]. *Oncogene*, 2016, 35(49): 6309-6318.

[8] 魏艳, 王丽娟, 周艳, 等. SIRT3 在皮肤鳞状细胞癌中的作用[J]. 山西医科大学学报, 2024, 55(7): 820-827.

[9] 程诗琦. CCL8 在脑胶质瘤中表达的临床意义及相关机制研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2020.

[10] Halvorsen EC, Hamilton MJ, Young A, *et al.* Maraviroc decreases CCL8-mediated migration of CCR5(+) regulatory T cells and reduces metastatic tumor growth in the lungs[J]. *OncoImmunology*, 2016, 5(6): e1150398.

[11] Sims NA. The JAK1/STAT3/SOCS3 axis in bone development, physiology, and pathology[J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2020, 52(8): 1185-1197.

[12] Yu Z, Zhang Q, Wei S, *et al.* CD146⁺ CAFs promote progression of endometrial cancer by inducing angiogenesis and vasculogenic mimicry via IL-10/JAK1/STAT3 pathway[J]. *Cell Communication and Signaling*, 2024, 22(1): 170.

[13] Wang S, Sun Z, Wang C, *et al.* The JAK1/STAT3 pathway mediates the effects of SERPINH1 on glioma EMT[J]. *International Immunopharmacology*, 2025, 157: 114731.

[14] Shen M, Xu Z, Xu W, *et al.* Inhibition of ATM reverses EMT and decreases metastatic potential of cisplatin-resistant lung cancer cells through JAK/STAT3/PD-L1 pathway[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2019, 38(1): 149.

[15] 杨清, 王治林, 钟越, 等. 转录-蛋白质组联合分析白藜芦醇通过 EMT 抑制口腔鳞状细胞癌的转移机制[J]. 川北医学院学报, 2025, 40(3): 283-289.

(收稿日期: 2025-06-20

修回日期: 2025-07-25)