

# Rac1 促进异质型细胞叠套结构的形成

胡涛<sup>1,2#</sup>, 冯鹏飞<sup>2,3,4#</sup>, 李浩源<sup>1,2</sup>, 周鲁林<sup>2,5</sup>, 牛祖彪<sup>2</sup>, 黄一诺<sup>2,6</sup>, 王小宁<sup>3,4</sup>, 王晨曦<sup>2</sup>, 刘惠<sup>1</sup>, 吴成君<sup>1\*</sup>

1 大连理工大学生物医学工程学院, 辽宁 大连 116024

2 军事医学研究院生物工程研究所, 北京 100071

3 解放军医学院, 北京 100853

4 解放军总医院第二医学中心老年医学研究所 国家老年疾病临床医学研究中心 衰老与相关疾病研究北京市重点实验室, 北京 100853

5 山东第一医科大学附属省立医院老年血液肿瘤科, 山东 济南 250021

6 首都医科大学附属北京世纪坛医院肿瘤内科 肿瘤治疗性疫苗北京市重点实验室, 北京 100038

胡涛, 冯鹏飞, 李浩源, 周鲁林, 牛祖彪, 黄一诺, 王小宁, 王晨曦, 刘惠, 吴成君. Rac1 促进异质型细胞叠套结构的形成[J]. 生物工程学报, 2023, 39(10): 4123-4134.

HU Tao, FENG Pengfei, LI Haoyuan, ZHOU Lulin, NIU Zubiao, HUANG YINUO, WANG Xiaoning, WANG Chenxi, LIU Hui, WU Chengjun. Rac1 promotes the formation of heterotypic cell-in-cell structure[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(10): 4123-4134.

**摘要:** 异质型细胞叠套结构(heterotypic cell-in-cell structure, heCICs)与肿瘤发生和发展密切相关, 在生命科学研究中的重要性逐渐显露。Ras 相关 C3 肉毒毒素底物 1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, Rac1)属于经典的 Rho GTP 酶, 在细胞骨架以及细胞运动中起到关键调控作用。为研究 Rac1 在 heCICs 形成中的作用和机制, 利用活细胞示踪剂 cell-tracker 分别标记肿瘤细胞和免疫杀伤细胞, 建立 heCICs 模型。利用 Rac1 抑制剂 NSC23766 抑制 Rac1 活性后发现, 肿瘤细胞与免疫杀伤细胞之间的 heCICs 形成率显著降低。通过分子克隆技术获得重组质粒 pQCXIP-Rac1-EGFP, 进行病毒包装感染肿瘤细胞获得 Rac1 过表达细胞系。进一步检测 Rac1 过表达对 heCICs 形成能力的影响, 结果表明, Rac1 表达水平升高后, heCICs 形成率显著升高。本研究显示 Rac1 具有促进 heCICs 形成的作用, 这为 Rac1 作为细胞叠套相关疾病的药物治疗靶点奠定了研究基础。

**关键词:** 异质型细胞叠套结构; 肿瘤发生; Ras 相关 C3 肉毒毒素底物 1; 免疫治疗

资助项目: 国家自然科学基金(82072287, 32100608)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82072287, 32100608).

#These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. Tel: +86-411-84706009, E-mail: wcj5532@dlut.edu.cn

Received: 2023-02-09; Accepted: 2023-03-20; Published online: 2023-04-19

# Rac1 promotes the formation of heterotypic cell-in-cell structure

HU Tao<sup>1,2#</sup>, FENG Pengfei<sup>2,3,4#</sup>, LI Haoyuan<sup>1,2</sup>, ZHOU Lulin<sup>2,5</sup>, NIU Zubiao<sup>2</sup>, HUANG Yinuo<sup>2,6</sup>, WANG Xiaoning<sup>3,4</sup>, WANG Chenxi<sup>2</sup>, LIU Hui<sup>1</sup>, WU Chengjun<sup>1\*</sup>

1 School of Biomedical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China

2 Beijing Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

3 Chinese People's Liberation Army Medical School, Beijing 100853, China

4 Beijing Key Laboratory of Aging and Geriatrics, Institute of Geriatrics, the 2nd Medical Center, China National Clinical Research Center for Geriatric Disease, Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100853, China

5 Department of Geriatric Hematology and Oncology, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250021, Shandong, China

6 Beijing Key Laboratory of Therapeutics Vaccines, Department of Oncology, Beijing Shijitan Hospital of Capital Medical University, Beijing 100038, China

**Abstract:** Heterotypic cell-in-cell structures (heCICs) are closely related to tumor development and progression, and have become a new frontier in life science research. Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) belongs to the classic Rho GTPase, which plays a key role in regulating the cytoskeleton and cell movement. To investigate the role and mechanism of Rac1 in the formation of heCICs, tumor cells and immune killer cells were labeled with cell-tracker, respectively, to establish the heCICs model. Upon treatment with the Rac1 inhibitor NSC23766, the formation of heCICs between tumor and immune cells was significantly reduced. The plasmid pQCXIP-Rac1-EGFP constructed by gene cloning was packaged into pseudoviruses that subsequently infect tumor cells to make cell lines stably expressing Rac1. As a result, the formation of heCICs was significantly increased upon Rac1 overexpression. These results demonstrated a promotive role of Rac1 in heCICs formation, which may facilitate treating cell-in-cell related diseases, such as tumors, by targeting Rac1.

**Keywords:** heterotypic cell-in-cell structure; tumorigenesis; Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1; immunotherapy

细胞叠套结构(cell-in-cell structure, CICs)是一个或多个活细胞位于另一个活细胞内部所形成的细胞套细胞的特殊细胞结构,根据细胞来源可以分为同质型或异质型细胞叠套结构(homotypic or heterotypic cell-in-cell structure, hoCICs or heCICs)。早在1956年Humble等<sup>[1]</sup>就观察到了淋巴细胞在恶性细胞、有丝分裂细胞或骨髓巨角细胞内的运动,称为“伸入运动”。细胞叠套现象同样发生在某些生理环境

下,如胸腺哺育细胞内化发育中的T细胞,在T细胞成熟过程发挥保育作用<sup>[2]</sup>;疟原虫的生命周期涉及进入人类肝细胞和红细胞并在其中成熟,从而导致疟疾<sup>[3]</sup>。并且在某些特定病例中,CICs已成为疾病的一个诊断特征,如Rosai-Dorfman病、慢性骨髓增生性疾病和一些血液病<sup>[4-6]</sup>。研究表明CICs能够介导包括细胞死亡、有丝分裂监控、非整倍体产生、免疫自稳和胞内杀伤等在内的多种生物学效应<sup>[7-10]</sup>,广

泛地参与包括肿瘤发生、发展在内的多种重要的病理学和生理学过程,生命科学领域中新的研究热点<sup>[11-12]</sup>。因此,揭示 CICs 的形成机制和生物学功能具有重要意义。

近年来,关于 CICs 的机制不断被揭示。研究表明,黏附相关分子介导的细胞间黏附连接、RhoA-ROCK-pMLC2 信号通路调节的肌动球蛋白收缩以及 vinculin 富集的着力环是 hoCICs 形成的 3 个关键调控因素<sup>[7,13-15]</sup>。随着研究的不断深入,越来越多调控 hoCICs 形成的分子被发现, $\alpha$ -catenin 和 IL-8 通过影响细胞间黏附连接促进 hoCICs 形成<sup>[16-17]</sup>。CDKN2A 的缺失可以诱导 hoCICs 形成,其机制与 E-cadherin 的亚细胞再分布、F-肌动蛋白重排和 pMLC2 的降低紧密相关<sup>[18]</sup>。但是,heCICs 涉及到非同种类型细胞间的相互作用,研究起来相对复杂,关于 heCICs 形成的调控分子和机制研究相对滞后。研究表明正常的跨细胞迁移活动和调节它们的受体,包括细胞外游离钙和黏附分子,以及基于肌动蛋白的细胞骨架和细胞骨架连接蛋白在 heCICs 形成过程中发挥着关键作用<sup>[12]</sup>。另外 Wang 等<sup>[19]</sup>发现结肠上皮细胞和浸润淋巴细胞形成的 heCICs 与肿瘤恶性程度呈正相关,细胞炎性因子 IL-6 可以促进 heCICs 形成,这可能是肿瘤细胞适应和逃避宿主免疫防御的一条全新途径。这些都为 heCICs 分子机制的研究打下了一定的基础,但更加精细全面的分子机制亟待进一步探索。

Rac1 属于经典的 Rho GTP 酶,作为分子开关,能够在活性 GTP 结合态和非活性 GDP 结合态之间交替,通过一系列复杂的动态生化信号网络来调节细胞生物学的多个方面<sup>[20]</sup>,特别是在肌动蛋白细胞骨架、粘附和迁移的调节中起关键作用<sup>[21-22]</sup>;同时,也参与了细胞周期进展和细胞存活<sup>[23-25]</sup>。研究表明在 hoCICs 形成过

程中,组成性激活 Kras 突变体的表达可以导致 Rac1 的激活,从而增加上皮细胞的机械形变能力,使得其更有能力成为外部的靶细胞<sup>[13]</sup>,这与之前在成纤维细胞中的观察结果相似<sup>[26]</sup>,而关于 Rac1 对 heCICs 形成的调控作用和机制还未见报道。

本研究在建立 heCICs 模型的基础上,利用分子生物学和细胞生物学等手段,通过调控 Rac1 表达,确定了 Rac1 与 heCICs 形成的关系,为进一步深入研究 heCICs 形成的机制和生物学功能奠定基础,也为 heCICs 相关疾病的治疗提供了理论依据和新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系

人类胚胎肾细胞 HEK293FT、人乳腺癌细胞系 MDA-MB-436 (MM436),人肝癌亚历山大细胞 PLC/PRF/5 (PLC),人恶性非霍奇金淋巴瘤患者的自然杀伤细胞 NK-92MI 均由北京军事医学研究院保存提供。

### 1.2 试剂和仪器

试剂主要包括 DMEM 细胞培养基、RPMI-1640 培养基等均购自 MACGENE 公司,CellTracker<sup>TM</sup> Green CMFDA、CellTracker<sup>TM</sup> Orange CMTMR 购自 Thermo 公司,NSC23766 购自 Selleck 公司。Rac1 一抗购自 Proteintech 公司;GAPDH 一抗购自 ABclonal 公司。

仪器主要包括 Eppendorf 公司的离心机、NIKON 公司的宽场荧光显微镜、PerkinElmer 公司的转盘共聚焦显微镜、耶拿的实时定量荧光 PCR 仪、Wescor 公司的离心涂片机等。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 HeCICs 形成实验

将 MM436 细胞、PLC 细胞和 NK-92MI 细胞分别用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered

saline, PBS)洗涤离心后, 分别用 2 mL DMEM 基础培养基重悬 MM436 细胞和 PLC 细胞, 然后分别加入 2  $\mu$ L CellTracker™ Orange CMTMR; 同时, 用 2 mL RPMI-1640 基础培养基重悬 NK-92MI 细胞, 加入 2  $\mu$ L CellTracker™ Green CMFDA, 混匀之后, 在 37 °C 培养箱孵育 30 min。取出分别加入 4 mL DMEM 和 RPMI-1640 完全培养基终止染色, 离心后用 PBS 洗涤 2 遍, 然后各取  $3.0 \times 10^5$  个肿瘤细胞与 NK-92MI 细胞混合均匀, 铺入 12 孔板, 完全培养基培养 10 h 后收集细胞, 用 200  $\mu$ L PBS 重悬甩片, 之后固定封片, 利用荧光显微镜进行图形采集和 heCICs 计数。

### 1.3.2 Rac1 抑制实验

用 50  $\mu$ mol/L 的 Rac1 抑制剂 NSC23766 分别预处理 MM436 和 PLC 细胞 12 h, 按 1.3.1 所述方法将 NK-92MI 细胞染红, 将 MM436/PLC 细胞与 NK-92MI 细胞共孵育, 甩片固定, 用 0.2% Triton-X 100 破膜 5 min, Phalloidin-488 染色 30 min, 最后用含 DAPI 封片剂封片过夜, 对 heCICs 进行计数分析。

### 1.3.3 细胞划痕实验

用于验证 Rac1 抑制剂 NSC23766 发挥效用<sup>[27-28]</sup>。首先将所需要的工具, 包括直尺、记号笔等给予紫外消毒, 用记号笔在 6 孔板背面画数道平行线以均分各孔, 将 MM436 细胞及 PLC 细胞铺于 6 孔板, 待细胞生长汇合度达 80%–90% 后, 用 200  $\mu$ L 枪头沿直尺垂直于分割线对细胞划线, 操作确保用力均匀, 弃去培养基, 用 PBS 轻柔清洗 2 遍, 尽量保证划痕中无细胞残留。然后用 50  $\mu$ mol/L 的 NSC23766 处理细胞, 12 h 后换完全培养基继续培养细胞, 同时在显微镜下取划痕与平行线相交点拍照记为 0 h, 并记录拍照位置, 然后分别于 6、12、24、48 h 拍照留存, 结束后通过各时间段的划痕面

积计算细胞迁移率。

### 1.3.4 pQCXIP-Rac1-EGFP 表达载体的构建

利用软件 Snap-Gene 以 pBABE-Rac1-mCherry 质粒序列为模板, 设计聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 引物, 通过 PCR 扩增技术获得 *rac1* 基因片段, 引物序列见表 1。PCR 扩增程序: 98 °C 预变性 30 s; 98 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min 30 s, 共 32 个循环; 72 °C 延伸 2 min。载体 pQCXIP-EGFP-N1 用 *EcoR* I/*Age* I 双酶切, 回收线性化载体, 将 *rac1* 基因片段和线性化载体经同源重组后转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Trans10 感受态细胞中, 涂板过夜后挑选生长良好的单克隆菌落进行菌液 PCR, 阳性菌落经测序正确后进行质粒的扩增和提取, 获得重组表达载体 pQCXIP-Rac1-EGFP。

### 1.3.5 病毒包装和感染

将 HEK293FT 细胞以  $1.0 \times 10^6$  个/孔铺于 6 孔板内, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养过夜。当细胞汇合度为 80%–90% 时, 配制 A 液: 取 400 ng pQCXIP-EGFP-N1 质粒和 400 ng pQCXIP-Rac1-EGFP 质粒分别与 200 ng VSVG 和 250 ng Gag/Pol 包装质粒在 100  $\mu$ L Opti-MEM 培养基中混匀; B 液: 取 3.75  $\mu$ L Lipofectamine 2000 在 100  $\mu$ L Opti-MEM 培养基中混匀; 静置 5 min 后将 A 液与 B 液合并混匀, 继续静置 15 min 后共转入 HEK293FT 细胞中, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 6 h 后换完全培养基继续培养 48 h, 收集病毒上清液, 离心过滤去除细胞获得病毒滤液。将 MM436 细胞和 PLC 细胞分别以  $2.0 \times 10^5$  个/孔铺于 6 孔板中, 待细胞贴壁后每孔加入 1 mL DMEM 完全培养基、1 mL 病毒滤液和 2  $\mu$ L 聚凝胺混匀培养, 48 h 后加入嘌呤霉素 (1 g/L) 筛选细胞, 直至获得稳定表达增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein,

EGFP)或 Rac1-EGFP 融合蛋白的 MM436 细胞株和 PLC 细胞株。

### 1.3.6 RNA 提取和 RT-PCR 检测 mRNA 表达量

将目的细胞用预冷的 PBS 清洗 2–3 遍, 6 孔板每孔加入 1 mL Trizol 溶液, 冰上静置 5 min, 使用移液器充分吹打裂解细胞至溶液呈黏稠状, 将裂解液转入 1.5 mL 离心管中; 然后加入 200  $\mu$ L 三氯甲烷, 充分混匀后冰浴 2 min, 12 000 r/min、4  $^{\circ}$ C 离心 15 min, 吸取 400  $\mu$ L 上层水相至新离心管中; 加入 400  $\mu$ L 异丙醇, 上下缓慢颠倒混匀后冰浴 10 min, 12 000 r/min、4  $^{\circ}$ C 离心 10 min, 弃去上清, 用预冷的 75%乙醇洗涤沉淀后 12 000 r/min、4  $^{\circ}$ C 离心 5 min, 弃去上清后室温静置 5–10 min 晾干, 加入 20–40  $\mu$ L 预冷的 DEPC 水溶解。检测样品 RNA 浓度和纯度后, 取 1–2  $\mu$ g 进行反转录合成 cDNA (操作参考北京全式金生物技术股份有限公司反转录试剂盒说明书), 利用实时荧光定量聚合酶链式反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测其 mRNA 表达水平 (操作参考东洋纺公司 RT-PCR 试剂盒说明书), 引物序列见表 1。

### 1.3.7 Western blotting 检测

配制细胞裂解液: 100  $\mu$ L RIPA 中添加 1  $\mu$ L 蛋白酶抑制剂 (100 $\times$ ) 和 1  $\mu$ L 磷酸酶抑制剂 (100 $\times$ ), 裂解细胞后收集细胞裂解液于 1.5 mL 离心管中, 之后低温超声裂解 6 s, 停 9 s, 重复 5 次, 12 000 r/min、4  $^{\circ}$ C 离心 10 min, 取上

清液; BCA 法测定蛋白质浓度后, 在蛋白上清液中加入 5 $\times$ 上样缓冲液, 100  $^{\circ}$ C 金属浴 10 min。在进行蛋白电泳和转膜后, 将 PVDF 膜置于 5% 脱脂牛奶中室温封闭 1–2 h; 加入一抗 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, 第 2 天用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 加入二抗室温孵育 1–2 h, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 最后显影定影检测蛋白表达水平。一抗稀释比例: Rac1 为 1:1 000, GAPDH 为 1:3 000。

### 1.3.8 数据分析

采用 GraphPad Prism 软件进行数据分析, 通过双尾学生 *t* 检验进行差异检验, 标注平均值 $\pm$ 标准误 (SEM), 统计显著性阈值用\*:  $P < 0.05$ 、\*\*\*:  $P < 0.01$ 、\*\*\*\*:  $P < 0.001$ 、\*\*\*\*\*:  $P < 0.000 1$  标注。

## 2 结果与分析

### 2.1 HeCICs 模型的建立

选用 MM436 细胞和 PLC 细胞作为靶细胞, NK-92MI 作为效应细胞, 利用不同的活细胞示踪剂 cell-tracker 分别染色后, 以 1:1 的比例混合培养 10 h, 然后进行甩片固定, 利用荧光显微镜采集图像, 对 heCICs 进行统计分析。结果显示, NK-92MI 细胞在 MM436 细胞与 PLC 细胞中均能形成明显的 heCICs (图 1A)。利用转盘共聚焦显微镜发现 CellTracker<sup>TM</sup> Green CMFDA 标记的绿色的免疫细胞 NK-92MI 完整地存在于 CellTracker<sup>TM</sup> Orange CMTMR 标记的

表 1 PCR 及 RT-PCR 引物序列

Table 1 PCR and RT-PCR primers

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
PCR-rac1-F	ATCTCGAGCTCAAGCTTCATGCAGGCCATCAAGTGTG	37
PCR-rac1-R	CTTGCTCACCATGGTGGCCAACAGCAGGCATTTTCT	36
RT-PCR-rac1-F	TGGCTAAGGAGATTGGTGC	19
RT-PCR-rac1-R	CTTCGTCAAACACTGTCTTGAG	22
RT-PCR-hprt-F	CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT	21
RT-PCR-hprt-R	AGACGTTTCAGTCCTGTCCATAA	22

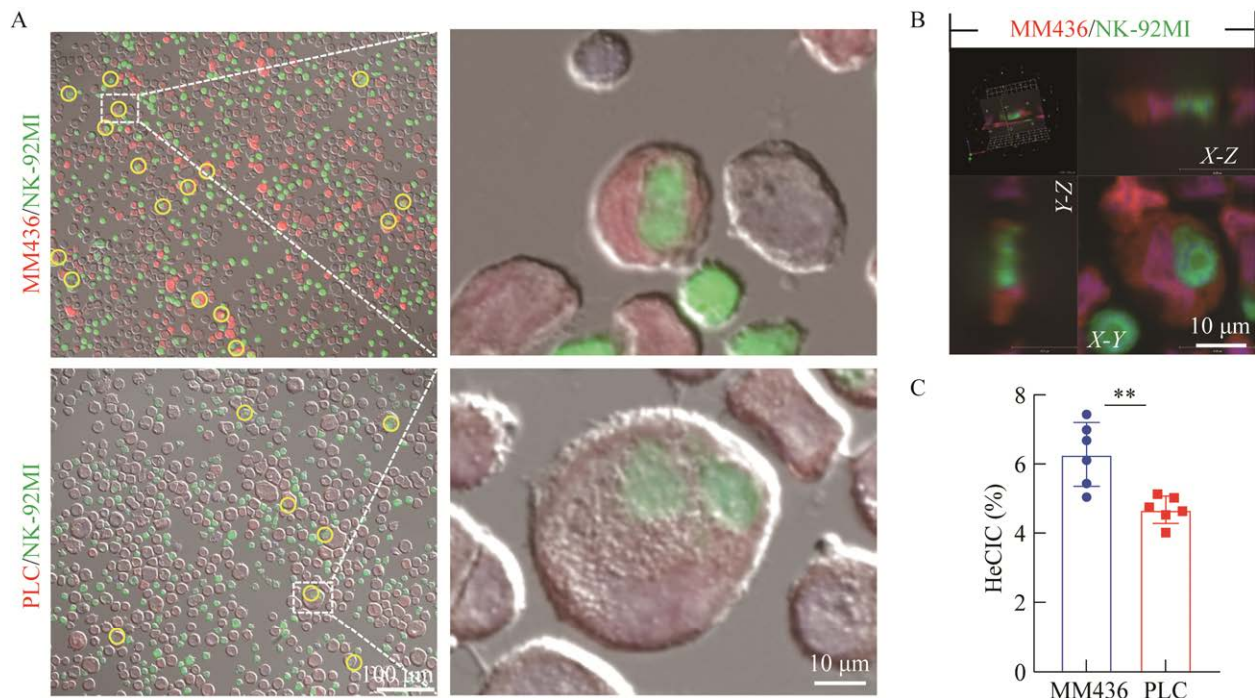


图1 HeCICs模型的建立

Figure 1 Establishment of heCICs model. A: Immunofluorescence diagrams show the heCICs formation between MM436/PLC (red) and NK-92MI (green) cells, the nucleus was stained by DAPI (blue), and the yellow circles indicate heCICs. B: 3D reconstruction image of heCICs formed between MM436 (red) and NK-92MI (green) cells. C: Quantification of the percentage of heCICs. \*\*:  $P < 0.01$ .

红色的肿瘤细胞内部,形成 heCICs (图 1B)。统计结果显示 MM436 细胞 heCICs 形成率在 6% 左右, PLC 细胞 heCICs 形成率在 4% 左右,略低于 MM436 细胞(图 1C)。

## 2.2 Rac1 抑制剂降低 heCICs 形成

将 MM436 细胞与 PLC 细胞分别用 50  $\mu\text{mol/L}$  的 Rac1 抑制剂 NSC23766 处理 12 h, 对照组用等体积 DMSO 处理, 通过细胞划痕实验(图 2A) 可以看出 MM436 和 PLC 抑制剂组细胞迁移率显著小于对照组(图 2B), 证明抑制剂组细胞 Rac1 活性被有效抑制; 然后按 1.3.2 方法将 NK-92MI 细胞染色后与靶细胞以 1:1 的比例混合培养 10 h, 进行固定染色, 利用荧光显微镜采集图像(图 2C), 对 heCICs 进行统计分析。结果显示, 在抑制 Rac1 后, MM436 细胞和 PLC

细胞内化免疫细胞 NK-92MI 形成 heCICs 的能力显著降低(图 2D)。在 Rac1 被抑制后, MM436 细胞 heCICs 形成率从 20% 降低到 12% 左右, PLC 细胞 heCICs 形成率从 2% 降到 0.5% 左右, 2 种肿瘤细胞的 heCICs 形成率变化趋势一致。

## 2.3 pQCXIP-Rac1-EGFP 表达载体的构建与鉴定

利用 Snap-Gene 软件设计重组表达载体 pQCXIP-Rac1-EGFP (图 3A), 根据表达载体的构建示意图, 将载体 pQCXIP-EGFP-N1 用 *EcoR* I / *Age* I 双酶切, 获得线性化载体; 同时经 PCR 扩增获得 *rac1* 基因片段, 将载体片段和目的片段凝胶回收, 同源重组, 提取重组质粒后, 送公司测序, 将测序结果与构建示意图比对后发现, *rac1* 基因正确插入载体中(图 3B), 无移码突变,

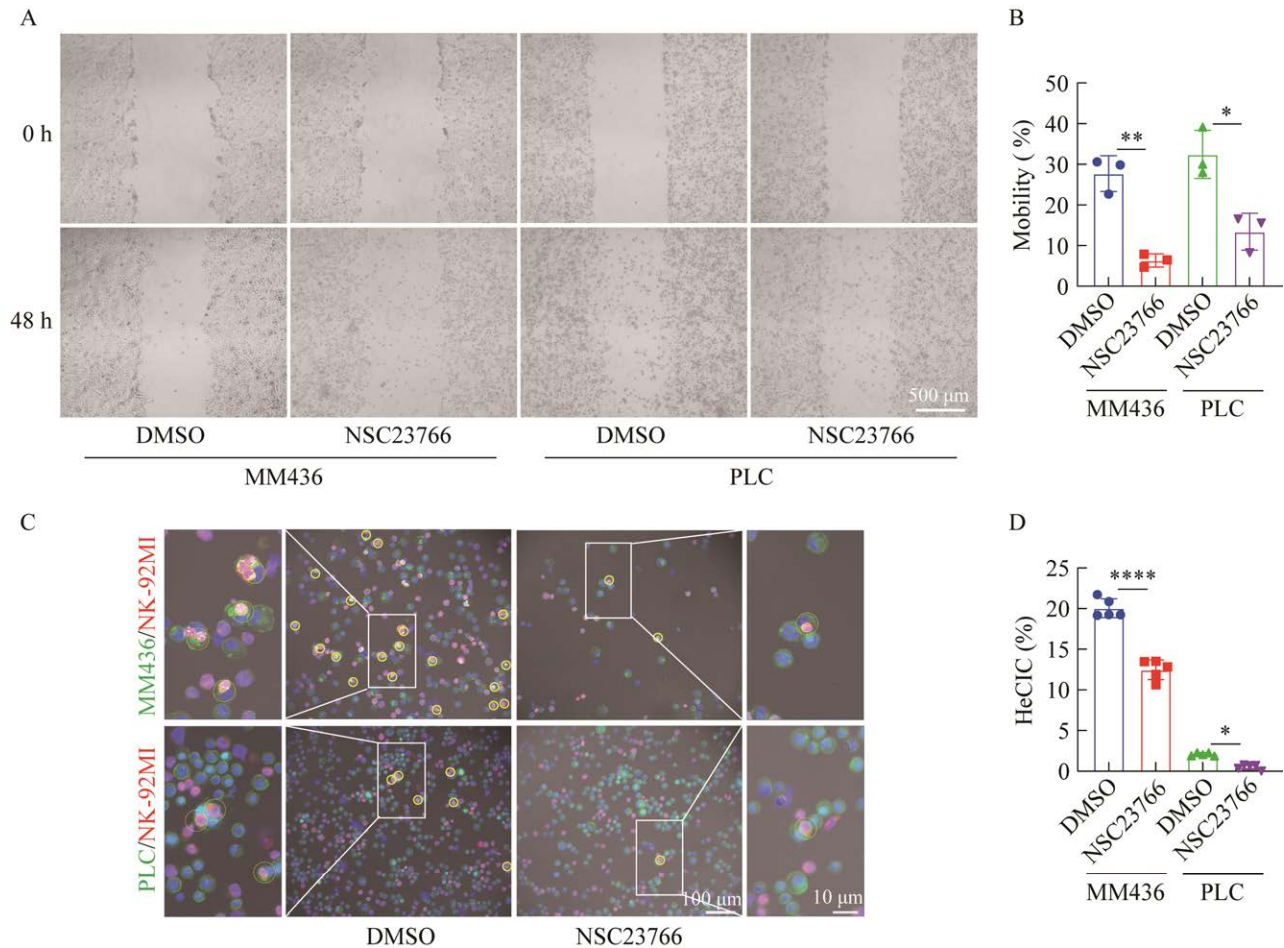


图2 Rac1 抑制剂降低 heCICs 的形成

Figure 2 Rac1 inhibitor reduces the formation of heCICs. A: Scratch photograph of MM436 and PLC cells after adding NSC23766 (50  $\mu\text{mol/L}$ ) for 48 h. B: Quantification of the percentage of mobility, mobility (%)=(scratch area at 0 h-scratch area at 48 h)/scratch area at 0 h $\times$ 100%. C: Immunofluorescence diagram shows the heCICs formation between MM436/PLC (green) and NK-92MI (red) cells after Rac1 inhibited, the nucleus was stained by DAPI (blue), and the yellow circles indicate heCICs. D: Quantification of the percentage of heCICs formation. \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*\*:  $P<0.0001$ .

峰值单一清晰,无碱基突变或缺失,且重组质粒能够完整表达 Rac1-EGFP 融合蛋白,提示重组表达载体 pQCXIP-Rac1-EGFP 构建成功。

#### 2.4 Rac1 过表达细胞系的构建与验证

利用 HEK293FT 细胞包装病毒,获得病毒液后感染 MM436 细胞和 PLC 细胞,48 h 后加药筛选,直到获得稳定表达绿色荧光的细胞系(图 4A),结果显示,Rac1-EGFP 绿色融合蛋白

在细胞核和细胞质中均有表达。提取稳定表达细胞系及空白对照组细胞的总 RNA,反转录得到 cDNA,采用 RT-PCR 检测发现 MM436 和 PLC 过表达细胞系中 Rac1 的 mRNA 水平相对于阴性对照组和空白对照组细胞显著上升(图 4B),且阴性对照组和空白对照组 Rac1 mRNA 表达无明显差异;接着提取稳定表达细胞系及空白对照组细胞的总蛋白,通过 Western blotting 发现

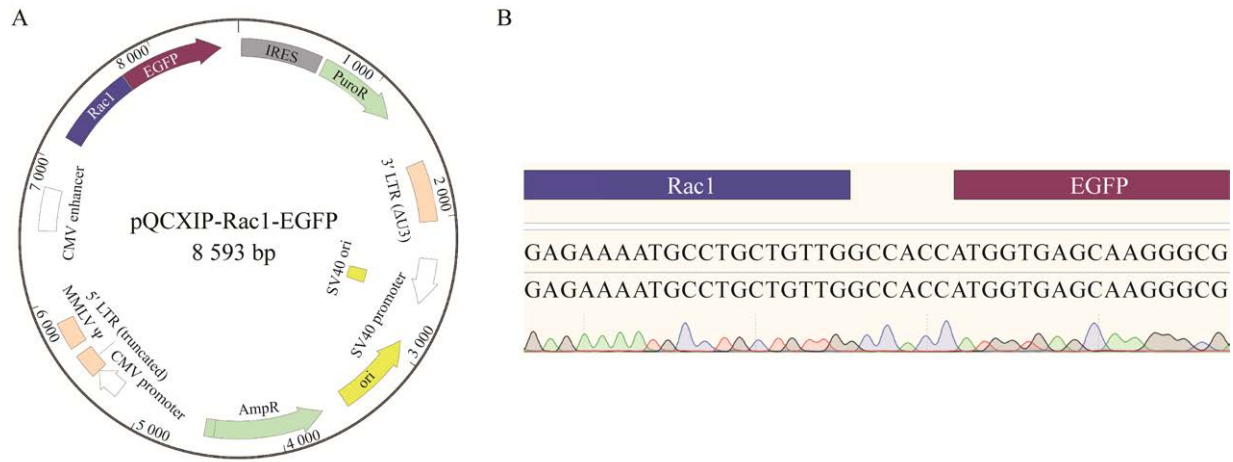


图3 pQCXIP-Rac1-EGFP 重组载体的构建

Figure 3 The construction of pQCXIP-Rac1-EGFP recombinant vector. A: Schematic graph of pQCXIP-Rac1-EGFP recombinant vector. B: The sequencing result of pQCXIP-Rac1-EGFP recombinant vector.

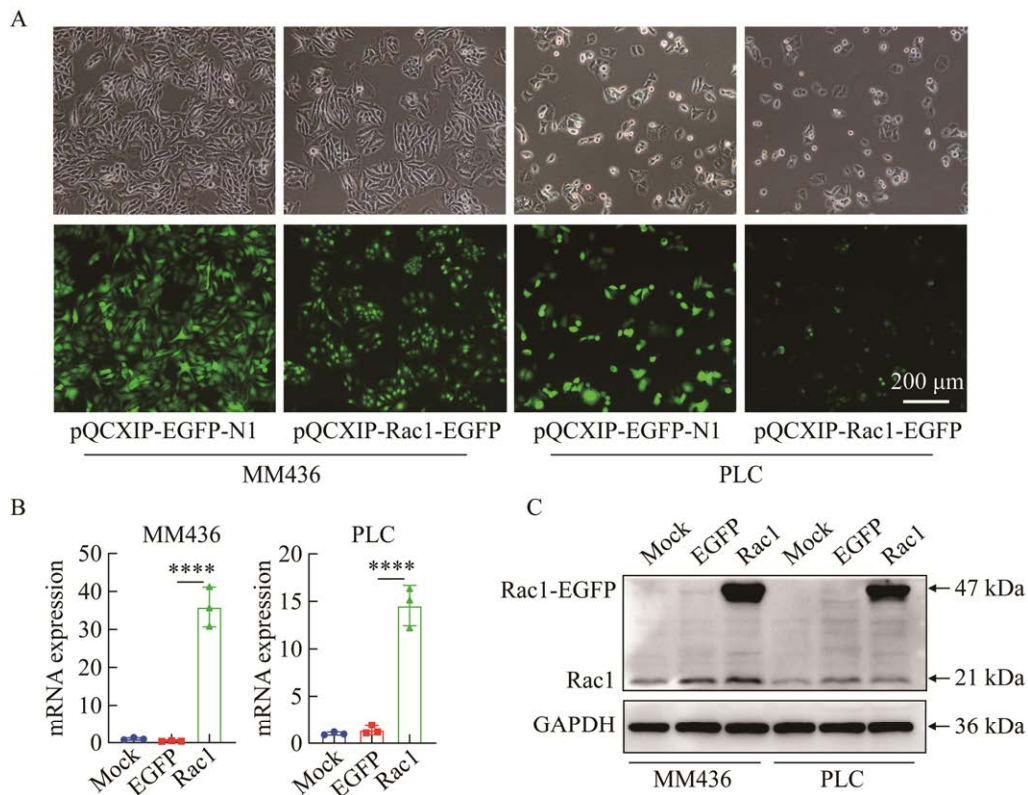


图4 Rac1 过表达细胞系的构建

Figure 4 Construction of Rac1 overexpression cell lines. A: Fluorescent photograph of MM436 and PLC cells upon Rac1 overexpression. B: The mRNA expression level of Rac1 in MM436 and PLC cells upon Rac1 overexpression. C: Western blotting analysis of Rac1 levels in MM436 and PLC cells upon Rac1 overexpression. \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .



MM436 细胞和 PLC 细胞的 Rac1 过表达组在相对分子质量 47 kDa 附近均检测到了清晰单一条带, 与预计蛋白相对分子质量相符, 而未在阴性对照组和空白对照组相应位置检出条带, 且对照组内源性 Rac1 蛋白表达无明显差异(图 4C), 提示 Rac1-EGFP 融合蛋白过表达细胞系构建成功。

### 2.5 Rac1 促进 heCICs 形成

将过表达 Rac1 的 MM436 细胞与 PLC 细胞及其对照组进行 heCICs 形成实验, 利用荧光显微镜采集图像(图 5A), 对 heCICs 结构进行统计分析。结果显示在肿瘤细胞中过表达 Rac1 其内化免疫细胞 NK-92MI 形成 heCICs 的能力显著升高(图 5B)。在过表达 Rac1 后, MM436 细胞 heCICs 形成率从 4% 升到 10% 左右, PLC 细胞 heCICs 形成率从 3% 升到 8% 左右, 2 种肿瘤细胞的 heCICs 形成率变化趋势一致。

## 3 讨论与结论

近些年 CICs 受到越来越多研究者的关注,

Almangush 等<sup>[29]</sup>发现 CICs 与早期口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)的侵袭性特征之间存在显著相关性, 可作为早期 OSCC 一个新的预后指标, 在常规病理实践中很容易被评估。不仅如此, CICs 在肿瘤治疗中也扮演着重要角色, 在前列腺癌治疗过程中, 化疗药尼达尼布通过促进 CICs 形成, 为肿瘤细胞提供一个安全的环境, 使其避免暴露于化学毒性药物, 进而导致耐药发生<sup>[30]</sup>。已有部分研究阐述了 CICs 的形成机制及其对癌症进展的影响<sup>[17,19]</sup>, 但是, 相关机制研究仍然匮乏。

Rac1 作为小 GTP 酶的重要分支, 参与肌动蛋白细胞骨架、黏附和迁移等过程<sup>[9-10]</sup>。有研究表明 Rac1 与依赖于异戊二烯酰化的细胞骨架动力学、细胞力学和上皮细胞脱落密切相关<sup>[31]</sup>, 并且有助于疾病的侵袭性, 在癌细胞增殖、肿瘤转移和抗治疗方面发挥关键作用<sup>[32]</sup>。Rac1 与多种癌症发展相关, 如肝癌<sup>[32]</sup>、黑色素瘤<sup>[33]</sup>、肺癌等<sup>[34]</sup>, 被视为肿瘤获得性和内在耐药性及

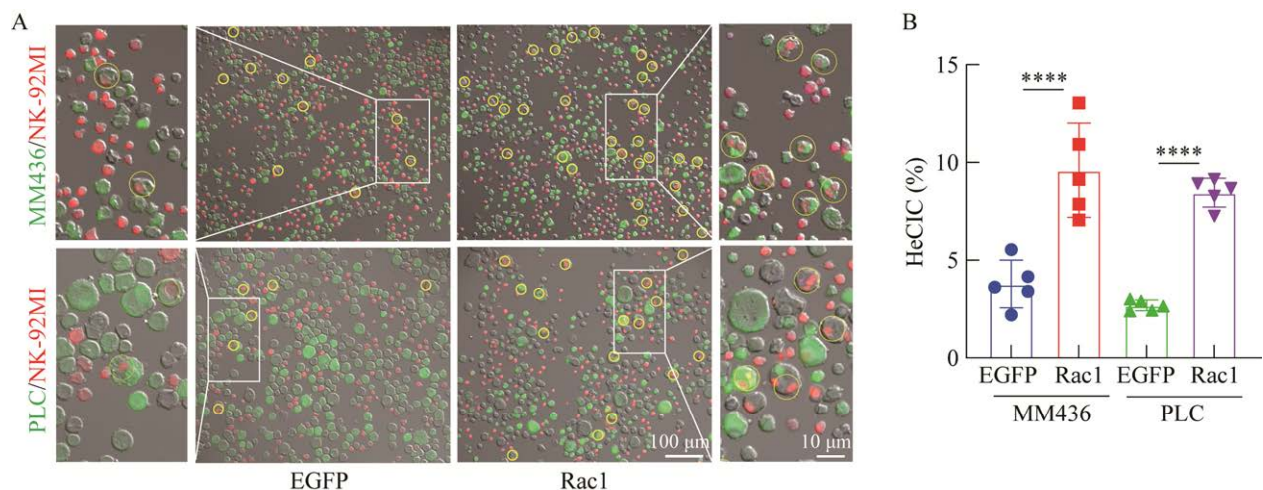


图 5 Rac1 促进 heCICs 形成

Figure 5 Rac1 improves the formation of heCICs. A: Immunofluorescence diagram shows the heCICs formation between MM436/PLC (green) and NK-92MI (red) cells upon Rac1 overexpression, the nucleus was stained by DAPI (blue), and the yellow circles indicate heCICs. B: Quantification of the percentage of heCICs formation. \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

其转移潜力的有效靶点。但是 Rac1 在 heCICs 形成过程中发挥的功能尚未明确, 其国内外文献资料相对匮乏。

本研究通过建立 heCICs 模型, 发现 MM436 细胞与 PLC 细胞能够与免疫细胞 NK-92MI 形成明显的 heCICs, 为后续 heCICs 研究奠定基础; 利用抑制剂 NSC23766 抑制 Rac1 活性后发现, 肿瘤细胞与 NK-92MI 细胞之间的 heCICs 形成率显著降低; 然后运用分子生物学和细胞生物学等手段, 构建 pQCXIP-Rac1-EGFP 重组质粒, 并且成功将重组质粒在 MM436 细胞和 PLC 细胞中稳定表达; 进一步研究发现 Rac1 表达与 heCICs 形成正相关, 表明 Rac1 表达升高是细胞 heCICs 形成率显著升高的重要原因之一。结合 Rac1 在 hoCICs 形成中的作用, 推测 heCICs 形成可能也与 Rac1 引起的 RhoA 活性变化和肌球蛋白收缩有关, 是由细胞-细胞黏附相关力的失衡引起的, 但具体的分子机制还有待进一步探索验证。

研究表明在乳腺癌患者肿瘤组织中发现大量肿瘤细胞内化淋巴细胞形成的 heCICs, 并且肿瘤在手术前通过化疗几乎完全消除, 表明肿瘤的消除可能是内部的淋巴细胞通过释放细胞因子增强了化疗的细胞毒性效应<sup>[35]</sup>。不仅如此, 前期研究 heCICs 过程中发现一种免疫杀伤新模式: 即免疫细胞通过钻入肿瘤细胞形成 heCICs, 从而从内部杀伤(in-cell killing)肿瘤细胞, 该杀伤方式具有比传统胞外杀伤(kiss-killing)更强的杀伤活性<sup>[36]</sup>。上述研究提示未来可能通过增强 Rac1 的表达提高 heCICs 的形成, 从而促进免疫杀伤达到肿瘤抑制效果。综上所述, 本研究为肿瘤的免疫治疗提供新的思路和策略, 也为 Rac1 作为 heCICs 相关疾病的药物治疗靶点提供了研究基础。

## REFERENCES

- [1] HUMBLE JG, JAYNE WHW, PULVERTAFT RJV. Biological interaction between lymphocytes and other cells[J]. *British Journal of Haematology*, 1956, 2(3): 283-294.
- [2] FAIS S. Cannibalism: a way to feed on metastatic tumors[J]. *Cancer Letters*, 2007, 258(2): 155-164.
- [3] KRAJCOVIC M, OVERHOLTZER M. Mechanisms of ploidy increase in human cancers: a new role for cell cannibalism[J]. *Cancer Research*, 2012, 72(7): 1596-1601.
- [4] TCHERNOV D, KVITT H, HARAMATY L, BIBBY TS, GORBUNOV MY, ROSENFELD H, FALKOWSKI PG. Apoptosis and the selective survival of host animals following thermal bleaching in zooxanthellate corals[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(24): 9905-9909.
- [5] TSUNODA R, NAKAYAMA M, HEINEN E, MIYAKE K, SUZUKI K, SUGAI N, KOJIMA M. Emperipolesis of lymphoid cells by human follicular dendritic cells *in vitro*[J]. *Virchows Archiv B*, 1992, 62(1): 69-78.
- [6] WAN QW, LIU J, ZHENG Z, ZHU HB, CHU XG, DONG Z, HUANG S, DU QS. Regulation of myosin activation during cell-cell contact formation by Par3-Lgl antagonism: entosis without matrix detachment[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2012, 23(11): 2076-2091.
- [7] OVERHOLTZER M, MAILLEUX AA, MOUNEIMNE G, NORMAND G, SCHNITT SJ, KING RW, CIBAS ES, BRUGGE JS. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion[J]. *Cell*, 2007, 131(5): 966-979.
- [8] LIANG JQ, NIU ZB, ZHANG B, YU XC, ZHENG Y, WANG CX, REN H, WANG MN, RUAN BZ, QIN HQ, ZHANG X, GU SZ, SAI XY, TAI YH, GAO LH, MA L, CHEN ZL, HUANG HY, WANG XN, SUN Q. p53-dependent elimination of aneuploid mitotic offspring by entosis[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2021, 28(2): 799-813.
- [9] MACKAY HL, MOORE D, HALL C, BIRKBAK NJ, JAMAL-HANJANI M, KARIM SA, PHATAK VM, PIÑON L, MORTON JP, SWANTON C, Le QUESNE J, MULLER PAJ. Publisher correction: genomic instability in mutant p53 cancer cells upon entotic engulfment[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 3540.

- [10] BENSELER V, WARREN A, VO M, HOLZ LE, TAY SS, Le COUTEUR DG, BREEN E, ALLISON AC, van ROOIJEN N, McGUFFOG C, SCHLITT HJ, BOWEN DG, McCAUGHAN GW, BERTOLINO P. Hepatocyte entry leads to degradation of autoreactive CD8 T cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(40): 16735-16740.
- [11] FAIS S, OVERHOLTZER M. Cell-in-cell phenomena in cancer[J]. Nature Reviews Cancer, 2018, 18(12): 758-766.
- [12] WANG XL, LI YL, LI JT, LI L, ZHU H, CHEN H, KONG R, WANG G, WANG YW, HU JS, SUN B. Cell-in-cell phenomenon and its relationship with tumor microenvironment and tumor progression: a review[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2019, 7: 311.
- [13] SUN Q, LUO TZ, REN YX, FLOREY O, SHIRASAWA S, SASAZUKI T, ROBINSON DN, OVERHOLTZER M. Competition between human cells by entosis[J]. Cell Research, 2014, 24(11): 1299-1310.
- [14] SUN Q, CIBAS ES, HUANG HY, HODGSON L, OVERHOLTZER M. Induction of entosis by epithelial cadherin expression[J]. Cell Research, 2014, 24(11): 1288-1298.
- [15] WANG MN, NIU ZB, QIN HQ, RUAN BZ, ZHENG Y, NING XK, GU SZ, GAO LH, CHEN ZL, WANG XN, HUANG HY, MA L, SUN Q. Mechanical ring interfaces between adherens junction and contractile actomyosin to coordinate entotic cell-in-cell formation[J]. Cell Reports, 2020, 32(8): 108071.
- [16] WANG MN, NING XK, CHEN A, HUANG HY, NI C, ZHOU CX, YU KT, LAN SC, WANG QW, LI SC, LIU H, WANG XN, CHEN ZL, MA L, SUN Q. Impaired formation of homotypic cell-in-cell structures in human tumor cells lacking alpha-catenin expression[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 12223.
- [17] RUAN BZ, WANG CX, CHEN A, LIANG JQ, NIU ZB, ZHENG Y, FAN J, GAO LH, HUANG HY, WANG XN, SUN Q. Expression profiling identified IL-8 as a regulator of homotypic cell-in-cell formation[J]. BMB Reports, 2018, 51(8): 412-417.
- [18] LIANG JQ, FAN J, WANG MN, NIU ZB, ZHANG ZR, YUAN L, TAI YH, CHEN ZL, SONG ST, WANG XN, LIU XQ, HUANG HY, SUN Q. CDKN2A inhibits formation of homotypic cell-in-cell structures[J]. Oncogenesis, 2018, 7(6): 50.
- [19] WANG S, LI LM, ZHOU YG, HE Y, WEI YS, TAO AL. Heterotypic cell-in-cell structures in colon cancer can be regulated by IL-6 and lead to tumor immune escape[J]. Experimental Cell Research, 2019, 382(1): 111447.
- [20] JAFFE AB, HALL A. RHO GTPASES: biochemistry and biology[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2005, 21: 247-269.
- [21] ETIENNE-MANNEVILLE S, HALL A. Rho GTPases in cell biology[J]. Nature, 2002, 420(6916): 629-635.
- [22] AELST LV, SOUZA-SCHOREY CD. Rho GTPases and signaling networks[J]. Genes & Development, 1997, 11(18): 2295-2322.
- [23] GU Y, FILIPPI MD, CANCELAS JA, SIEFRING JE, WILLIAMS EP, JASTI AC, HARRIS CE, LEE AW, PRABHAKAR R, ATKINSON SJ, KWIATKOWSKI DJ, WILLIAMS DA. Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases[J]. Science, 2003, 302(5644): 445-449.
- [24] CONIGLIO SJ, JOU TS, SYMONS M. Rac1 protects epithelial cells against anoikis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(30): 28113-28120.
- [25] SAHAI E, MARSHALL CJ. RHO-GTPases and cancer[J]. Nature Reviews Cancer, 2002, 2(2): 133-142.
- [26] ANDERSON KW, LI WI, CEZEAUX J, ZIMMER S. *In vitro* studies of deformation and adhesion properties of transformed cells[J]. Cell Biophysics, 1991, 18(2): 81-97.
- [27] 王春玲, 张荣芳, 陈峰杰, 周露, 姬颖华. MiR-509 靶向 Rac1 调节人肝癌 LM3 细胞侵袭和迁移及裸鼠模型的存活[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(5): 813-818.
- WANG CL, ZHANG RF, CHEN FJ, ZHOU L, JI YH. MiR-509 regulates growth, invasion and migration of human hepatocellular carcinoma LM3 cells and survival of nude mice[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2019, 35(5): 813-818 (in Chinese).
- [28] 张璐玢, 邹雪琴, 张歙丹, 高淑君, 刘雪, 潘玲丽, 赵杨静, 梁秀婷, 王荟, 朱彦玲, 邵启祥. RAC1 通过调节紧密连接蛋白 1 分布影响卵巢癌细胞的迁移和侵袭[J]. 江苏大学学报(医学版), 2020, 30(5): 408-413.
- ZHANG LB, ZOU XQ, ZHANG QD, GAO SJ, LIU X, PAN LL, ZHAO YJ, LIANG XT, WANG H, ZHU YL, SHAO QX. RAC1 inhibits the migration and invasion of human epithelial ovarian cancer cells by regulating the distribution of tight junction protein 1[J]. Journal

- of Jiangsu University (Medicine Edition), 2020, 30(5): 408-413 (in Chinese).
- [29] ALMANGUSH A, MÄKITIE AA, HAGSTRÖM J, HAGLUND C, KOWALSKI LP, NIEMINEN P, COLETTA RD, SALO T, LEIVO I. Cell-in-cell phenomenon associates with aggressive characteristics and cancer-related mortality in early oral tongue cancer[J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 843.
- [30] LIU JJ, WANG L, ZHANG YX, LI SB, SUN FZ, WANG G, YANG T, WEI D, GUO LX, XIAO HL. Induction of entosis in prostate cancer cells by nintedanib and its therapeutic implications[J]. *Oncology Letters*, 2019, 17(3): 3151-3162.
- [31] MARTÍNEZ-SÁNCHEZ LDC, NGO PA, PRADHAN R, BECKER LS, BOEHRINGER D, SOTERIOU D, KUBANKOVA M, SCHWEITZER C, KOCH T, THONN V, ERKERT L, STOLZER I, GÜNTHER C, BECKER C, WEIGMANN B, KLEWER M, DANIEL C, AMANN K, TENZER S, ATREYA R, et al. Epithelial RAC1-dependent cytoskeleton dynamics controls cell mechanics, cell shedding and barrier integrity in intestinal inflammation[J]. *Gut*, 2023, 72(2): 275-294.
- [32] SAUZEAU V, BEIGNET J, VERGOTEN G, BAILLY C. Overexpressed or hyperactivated Rac1 as a target to treat hepatocellular carcinoma[J]. *Pharmacological Research*, 2022, 179: 106220.
- [33] CANNON AC, URIBE-ALVAREZ C, CHERNOFF J. RAC1 as a therapeutic target in malignant melanoma[J]. *Trends in Cancer*, 2020, 6(6): 478-488.
- [34] PAYAPILLY A, GUILBERT R, DESCAMPS T, WHITE G, MAGEE P, ZHOU C, KERR A, SIMPSON KL, BLACKHALL F, DIVE C, MALLIRI A. TIAM1-RAC1 promote small-cell lung cancer cell survival through antagonizing Nur77-induced BCL2 conformational change[J]. *Cell Reports*, 2021, 37(6): 109979.
- [35] SAXENA S, BEENA KR, BANSAL A, BHATNAGAR A. Emperipolesis in a common breast malignancy[J]. *Acta Cytologica*, 2002, 46(5): 883-886.
- [36] SU Y, HUANG HY, LUO TZ, ZHENG Y, FAN J, REN H, TANG M, NIU ZB, WANG CX, WANG YQ, ZHANG ZR, LIANG JQ, RUAN BZ, GAO LH, CHEN ZL, MELINO G, WANG XN, SUN Q. Cell-in-cell structure mediates in-cell killing suppressed by CD44[J]. *Cell Discovery*, 2022, 8: 35.

(本文责编 陈宏宇)