

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.02.001

• 基础研究 •

分泌蛋白 YKL-40 增强肿瘤细胞的上皮间质样转化 *

朱博文 虞海惠 罗 静 韩 笑 陈 慧 邵 荣[△]

(上海交通大学基础医学院药理学与化学生物学系 上海 200025)

摘要 目的:分泌糖蛋白 YKL-40 在多种晚期肿瘤病人的血液中显著升高,提示 YKL-40 蛋白的血浓度是肿瘤恶变的生物标志物。本研究 YKL-40 重组蛋白和过表达 YKL-40 肿瘤细胞对肿瘤细胞的上皮间质样转化的作用。**方法:**构建 YKL-40 过表达的纤维状乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 和非纤维状结肠癌细胞系 HCT-116,观察细胞形态学变化,收集细胞和细胞培养液用于 Western Blot(WB)检测 YKL-40 和上皮间质转化标记蛋白 Vimentin 和 N-cadherin。观察重组蛋白 YKL-40 对原代 MDA-MB-231 细胞在无血清条件下的细胞存活影响;另外,用细胞存活试剂盒检测 YKL-40 过表达 HCT-116 细胞在无血清的培养液中细胞存活情况。最后,用细胞侵袭试验检测 YKL-40 过表达 MDA-MB-231 细胞的侵袭力,并用 WB 和 Zymography 来测定细胞分泌 MMP9 蛋白的表达和酶活性。**结果:**YKL-40 过表达增强 MDA-MB-231 细胞的形态向上皮间质样转化,并显著提高 Vimentin、N-cadherin 蛋白的表达,但对 HCT-116 细胞无法诱导上皮间质样转化。在无血清培养基培养条件下,YKL-40 可以增强两种细胞的存活能力,并且 YKL-40 过表达的 MDA-MB-231 细胞增强了细胞的侵袭能力,促进了 MMP9 蛋白表达和蛋白活性。**结论:**YKL-40 可以增加肿瘤细胞的存活力,增强纤维状细胞向上皮间质样转化;并且,YKL-40 增加 MMP9 蛋白表达和活性,增强细胞侵袭力。YKL-40 是间质样肿瘤细胞 EMT 的增强子,此发现为抑制肿瘤恶变提供新靶点。

关键词:YKL-40;HCT-116;MDA-MB-231;上皮间质转化;肿瘤进展

中图分类号:R-33;R730.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)02-201-06

Secreted Protein YKL-40 Enhances Epithelial Mesenchymal Transition of Tumor Cells in Vitro*

ZHU Bo-wen, YU Hai-hui, LUO Jing, HAN Xiao, CHEN Hui, SHAO Rong[△]

(Department of pharmacology and chemical biology, College of Basic Medical Sciences, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200025, China)

ABSTRACT Objective: A large body of evidence has demonstrated that serum levels of secreted protein YKL-40 (CHI3L1) were elevated in a broad type of human advanced cancers, suggesting that serum levels of YKL-40 serve as a cancer biomarker for the malignancy. The current study is to investigate the effects of recombinant protein YKL-40 and YKL-40 over-expressed by tumor cells on tumor epithelial mesenchymal transition (EMT). **Methods:** Two cancer lines breast cancer cell line MDA-MB-231 that displays a fibroblastic phenotype and colon cancer cell line HCT-116 that does not exhibit the fibroblastic morphology were selected to enforce expression of ectopic YKL-40. After both cell lines were established to stably express YKL-40, the cell phenotype was observed. EMT markers vimentin and N-cadherin proteins were analyzed by Western Blot. The cell cultured media were collected to test YKL-40 levels. Control and HCT-116 cells expressing ectopic YKL-40 were used to test cell survival in the presence of serum free medium for 72 h via a live and dead kit. Concomitantly, recombinant protein YKL-40 was added to parental MDA-MB-231 cells to observe cell survival in the serum-free medium for 72h. MDA-MB-231 cells expressing YKL-40 were employed to examine cell invasion and cultured media were exploited to test MMP9 expression via WB and enzymatic activity via zymography. **Results:** MDA-MB-231 cells expressing YKL-40 displayed a more mesenchymal phenotype than control cells; whereas HCT-116 cells expressing YKL-40 showed subtle induction of a fibroblastic phenotype. MDA-MB-231 cells expressing YKL-40, but not HCT-116 cells expressing YKL-40, revealed elevated expression of vimentin and N-cadherin. YKL-40 or YKL-40-expressing tumor cells induced tumor cell survival. YKL-40-expressing MDA-MB-231 cells increased invasion and the expression and enzymatic activity of MMP9. **Conclusions:** YKL-40 has the ability to increase tumor cell survival and enhance EMT, pointing to YKL-40 as a therapeutic target for cancer treatment.

Key words: YKL-40; HCT-116; MDA-MB-231; Epithelial mesenchymal transition; Tumor progression

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R730.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)02-201-06

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81772512)

作者简介:朱博文(1996-),男,硕士研究生,主要研究方向:YKL-40 在肿瘤进展中的作用,E-mail:zbw54571@163.com

[△] 通讯作者:邵荣,男,博士生导师,研究员,主要研究方向:YKL-40 在肿瘤进展中的作用,E-mail:rongshao@sjtu.edu.cn

(收稿日期:2021-04-28 接受日期:2021-05-23)

前言

YKL-40, 又名 CHI3L1, 是一个 40kDa 的分泌糖蛋白, 属于几丁质酶样糖蛋白家族成员, 由 383 个氨基酸构成, 前 21 个氨基酸组成了信息多肽, 确保 YKL-40 蛋白分泌^[1]。YKL-40 是 1992 年首次在人骨肉瘤细胞株 MG-63 的培养液中被鉴定到^[2], 然而, 由于其催化中心位置的几丁质酶 -3 样催化结构域的关键氨基酸残基发生突变, 即必需的谷氨酸突变为亮氨酸, 因此 YKL-40 对几丁质酶底物失去催化活性^[3], 其蛋白功能域也尚未确认。近年来, 我们团队对寻找其功能域开展了大量研究, 发现它的结构功能域是由其氨基酸序列 334-345 的多元精氨酸(R)和赖氨酸(K)所构成, 该功能域能结合肝素, 激活胞膜上 YKL-40 受体蛋白, 从而诱导细胞内信息传递^[4]。十多年来, 多种类型的实体肿瘤中均被发现高 YKL-40 表达和分泌, 包括乳腺癌, 胆囊癌、肺癌、胶质母细胞瘤等^[5-6], 并且癌症患者的血清 YKL-40 水平升高和低生存率有极大关联^[7], 提示血清 YKL-40 水平可作为诊断和预后的生物标志。在 YKL-40 病理机制研究方面, 我们已报道 YKL-40 是血管再生因子, 其通过诱导膜受体 syndecan-1 和整合素 $\alpha v \beta 5$ 协同作用, 激活 FAK397 以及 ERK-1 和 ERK-2, 发挥血管生成作用^[8]。

在肿瘤的恶性进展中, 上皮间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)发挥着重要的作用^[9,10], 即上皮样肿瘤细胞转化为间质样强迁移性肿瘤细胞, 这一细胞形态学的变化过程是伴随着多种基因调节变化; 比如细胞上调 N-cadherin, vimentin, YKL-40 等, 也同时下调 E-cadherin 等^[11,12]。这些蛋白表达的变化显著增强细胞的迁移力和侵袭力, 有助于肿瘤细胞的转移^[13]。因此, 这些蛋白被称为上皮间质转化标记蛋白。近年来, YKL-40 与 EMT 之间的关系在逐渐进入人们的视野, 研究发现, 在表达和分泌 YKL-40 的前列腺癌和非小细胞肺癌中, YKL-40 可以调节上皮间质转化, 促进肿瘤转移和侵袭^[14,15]; 因此, YKL-40 作为一种肿瘤 EMT 标志物, 其病理学作用和临床意义得到了广泛关注。然而, YKL-40 是否能诱导 EMT 以及其调控的分子机制还需要进一步澄清。本研究利用 EMT 形态的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞和非 EMT 形态的 HCT-116 结肠癌细胞来探索 YKL-40 对 EMT 的作用及机制, 其研究发现对下一步针对 YKL-40 靶向药的研发提供重要理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

结肠癌细胞 HCT-116 和乳腺癌细胞 MDA-MB-231 购自 ATCC (美国); DMEM、RPMI1640 购自 Gibco 公司; 胰酶、FBS 购自美国 HyClone 公司; vimentin 抗体购自美国 DSHB 公司; N-cadherin 抗体购自美国 Themor fisher 公司; actin 抗体购自美国 sigma 公司; 蛋白酶抑制剂、转染试剂 Fugene6、活死细胞检测试剂 Calcein AM 和 Ethidium homodimer 购自美国 Themor fisher 公司; YKL-40 蛋白为本实验室自行纯化^[16]; 基质胶(Matrigel)购自于上海柏根生物公司; 培养皿、孔板及 Transwell 小室购自美国 Corning 公司, 电泳、转膜设备购自美国 Bio-Rad 公司; 显影设备是基因有限公司 ODYSSEY 双色红外成像系统。

1.2 方法

1.2.1 构建 YKL-40 过表达的 HCT-116 和 MDA-MB-231 细胞 将全长 YKL-40 cDNA 1149 碱基克隆于逆转录病毒 pCMV-neo 载体中, 加 Fugene6 转染试剂, 将 pCL 10A1 载体与 YKL-40-pCMV 或空载体 DNA 转染 293T 细胞。48 小时后收集上清液, 经 0.45- μ m 孔径过滤器过滤, 随之病毒感染 HCT-116 和 MDA-MB-231 细胞。48 小时后, 细胞培养液加入 800 μ g/mL G418 进行筛选, 耐药细胞被用于随后的研究。

1.2.2 Western Blot 检测 EMT 相关蛋白 对 100 mm 细胞培养皿培养的过表达 YKL-40HCT-116 和 MDA-MB-231 细胞, 用 100-200 l 细胞裂解液进行细胞裂解, 其裂解液含 6.52 mg/mL HEPES, 0.42 mg/mL NaF, 8.64 mg/mL NaCl, 0.2 mg/mL $MgCl_2$, 5% NP-40 和 1 $\times$ 蛋白酶抑制剂。20 分钟后, 对裂解细胞进行 13000 rpm 离心 10 分钟, 40 $^{\circ}C$; 离心后收集上清液并检测蛋白浓度。对于检测细胞分泌的 YKL-40, 用 35 mm 细胞培养皿, 收取 24 小时无血清培养基培养的上清液, 40 $^{\circ}C$, 13000 rpm 离心 10 分钟, 收集上清液。上述细胞裂解液和细胞培养液样品进行电泳、转膜、封闭。然后该膜用 YKL-40、vimentin、N-cadherin、actin 抗体在 40 $^{\circ}C$ 孵育过夜, 次日二抗在常温孵育 1-2 小时后显影。

1.2.3 MDA-MB-231 细胞生存能力检测 原代 MDA-MB-231 细胞于 100 mm 培养皿中进行常规培养, 待细胞密度 90% 时, 用胰蛋白酶消化、离心、计数, 12 孔板每孔加入 2×10^4 个细胞。设置实验组和对照组, 每组 4 个复孔, 待细胞贴壁后, 换用无血清培养基, 实验组每孔加入浓度 100 ng/mL 的重组 YKL-40 蛋白, 对照组不作处理。培养 72 小时, 在显微镜下观察记录细胞生存情况, 随后胰酶消化计数。

1.2.4 过表达 YKL-40 的 HCT-116 细胞生存能力检测 过表达 YKL-40 的 HCT-116 细胞和对照 control HCT-116 细胞于 100 mm 培养皿中进行常规培养, 待细胞密度 90% 时, 用胰蛋白酶消化、离心、计数, 12 孔板每孔加入 2×10^4 个细胞。实验组和对照组每组 3 个复孔, 待细胞贴壁后, 换用无血清培养基培养 72 小时, 分别加入活死细胞检测试剂 Calcein AM (1:2000) 和 Ethidium homodimer (1:500), 37 $^{\circ}C$, 30 分钟后, 用荧光显微镜鉴定细胞红色(细胞核染色)的死亡细胞和绿色(细胞质染色)的存活细胞, 并计数。

1.2.5 细胞侵袭试验 过表达 YKL-40 的 MDA-MB-231 和对照 control MDA-MB-231 细胞于 100 mm 培养皿中进行常规培养, 待细胞密度 90% 时, 用胰蛋白酶消化、离心、计数。在 12-well transwell 上室中加入浓度 1 mg/mL 的基质胶, 37 $^{\circ}C$ 孵育 30 分钟; 随后每孔加入 2×10^5 个 MDA-MB-231 细胞 (100 μ L 无血清培养基), 下室加入 600 μ L 含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 18 小时后固定上室细胞, 拍照计数。

1.2.6 明胶酶谱法分析 MMP9 活性 35 mm 细胞培养皿培养 YKL-40 过表达的 MDA-MB-231 细胞, 收取 24 小时无血清细胞培养基, 4 $^{\circ}C$, 13000 rpm 离心 10 分钟, 收集上清并浓缩。然后加入不含还原剂 (DDT) 的缓冲液, 该溶液含 200 mM Tris pH6.8, 8% SDS, 40% 丙三醇, 溴酚蓝。样品在含 1 mg/mL 明胶的 10% SDS-PAGE 进行电泳, 之后用 2.5% Triton X 室温下洗胶两次, 加入含 100 mM Tris pH 7.4, 10 mM $CaCl_2$, 150 mM NaCl, 0.02% NaN_3 的酶底物溶液, 37 $^{\circ}C$ 孵育过夜, 之后用 0.5% 的考马

斯染液:乙酸:水(4:1:5)室温染色 4-12 小时,最后用甲醇:乙酸:水(4:1:5)进行脱色。

1.3 统计学分析

所有定量结果用 GraphPad Prism 7.00 软件进行统计学分析,两组间比较使用 t 检验,多组间比较使用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 时,表示有统计学差异。

2 结果

2.1 YKL-40 过表达增强肿瘤细胞纤维状形态转化

我们采用纤维状乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和非纤维状过表达的结肠癌细胞 HCT-116 来探讨 YKL-40 对细胞形态学的作用。这两种原代细胞株均不表达 YKL-40。因此,我们用逆转

录病毒携带 YKL-40 基因将 YKL-40 稳转入两个细胞株。YKL-40 过表达的 MDA-MB-231 和 HCT-116 细胞构建完成后,检测上皮间质转化(EMT)相关蛋白。在 YKL-40 过表达的 MDA-MB-231 细胞中,vimentin 和 N-cadherin 蛋白表达明显上调(图 1A)。然而,HCT-116 过表达 YKL-40 细胞没有观察到 vimentin 和 N-cadherin 的表达(数据未显示)。在细胞形态学上,与对照组细胞相比,YKL-40 过表达的二个肿瘤细胞呈现出细长的纤维形态(图 1B),尤其 MDA-MB-231 细胞表达 YKL-40 明显细胞体变长,突出增加,提示 YKL-40 能增强肿瘤细胞 MDA-MB-231 EMT 的转化,而无法促进非 EMT 肿瘤细胞 HCT-116 向 EMT 转化。

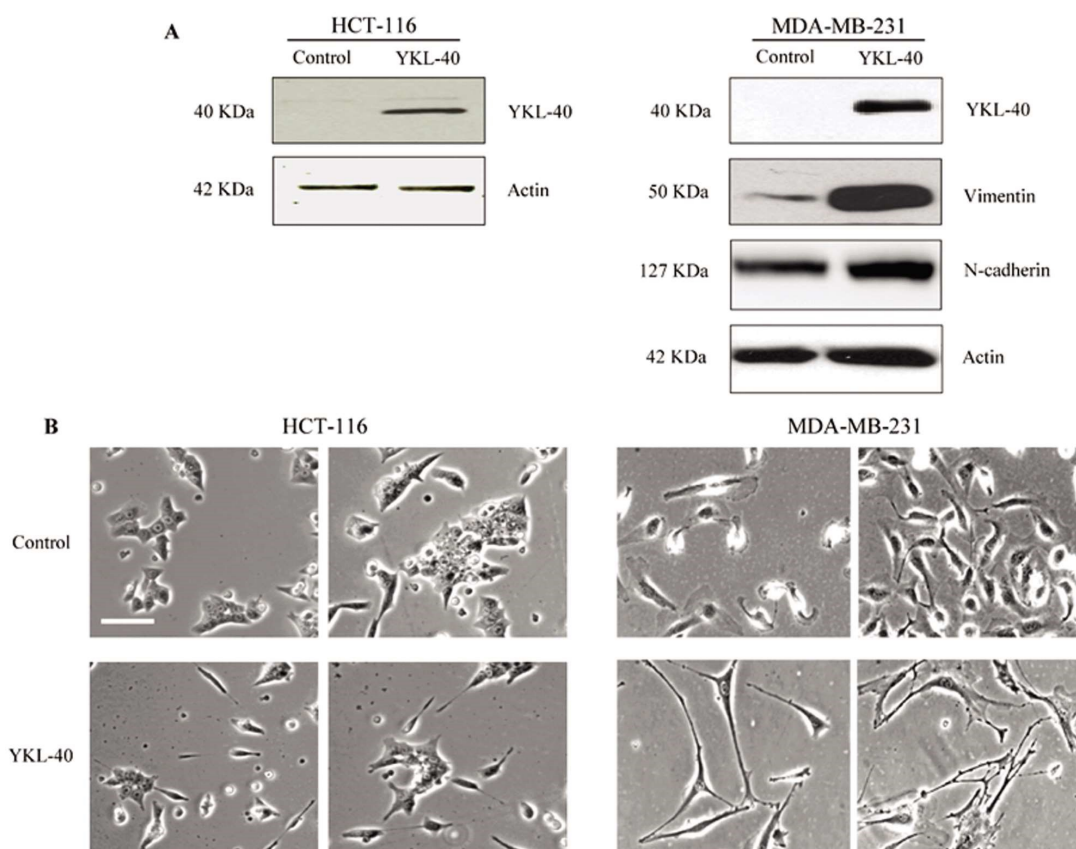


图 1 YKL-40 过表达能增强肿瘤细胞的纤维状形态转化

Fig.1 YKL-40-overexpressing tumor cells enhance fibroblast-like transformation

Note: A: Protein expression levels of YKL-40, Vimentin and N-cadherin in HCT-116 and MDA-MB-231 with ectopic expression of YKL-40 were examined by immunoblotting; B: Both HCT-116 and MDA-MB-231 cells engineered with vector control or YKL-40 gene were grown in cell plates and photographed. Scale bar=100 μ m

2.2 YKL-40 蛋白增强 MDA-MB-231 细胞存活能力

为了鉴定 YKL-40 蛋白是否能增强肿瘤细胞的存活力,我们采用原代不表达 YKL-40 蛋白的 MDA-MB-231 细胞进行检测。向在 12 孔板培养皿中培养的 MDA-MB-231 细胞无血清培养液中外加入重组 YKL-40 蛋白(100 ng/mL)(图 2)。72 小时后,YKL-40 蛋白处理的 MDA-MB-231 细胞数明显多于对照组,其统计结果显示有明显差异($P < 0.05$),这表明 YKL-40 可以增强细胞的存活能力。

2.3 HCT-116 细胞过表达 YKL-40 增强细胞存活

为了探究 YKL-40 过表达的肿瘤细胞是否也体现出细胞

生存力优越于不表达 YKL-40 的细胞,我们将对照和过表达 YKL-40 的 HCT-116 细胞培养于 12 孔板的培养皿中,经过 72 小时无血清培养基培养后,检测活细胞和死细胞的数目,如图 3,过表达 YKL-40 的 HCT-116 细胞存活是对照组的三倍,而死亡细胞与对照组相比下降 57%($P < 0.05$)。证实 YKL-40 蛋白或肿瘤细胞过表达 YKL-40 能增强细胞的存活。

2.4 YKL-40 过表达增强细胞侵袭力及其分子机制

最后,我们研究 YKL-40 对肿瘤细胞侵袭力的影响。使用基质胶的 Transwell 小室来评估细胞的侵袭力。我们发现 YKL-40 过表达的 MDA-MB-231 细胞侵袭能力是对照细胞的

四倍 ($P < 0.05$), 其结果表明 YKL-40 过表达增强了 MDA-MB-231 细胞的侵袭力(图 4A)。细胞的侵袭力主要是细胞分泌的基质金属蛋白酶(MMPs)来降解、消化细胞外的间质蛋白, 导致细胞迁移增加。为了探索 YKL-40 是否通过调节 MMP9 表达和活性来增强细胞侵袭力, 我们收集 YKL-40 过表

达的 MDA-MB-231 细胞培养液, 检测 MMP9 的表达和酶活性(图 4B)。结果显示 YKL-40 过表达的 MDA-MB-231 细胞表达分泌 MMP9 有活性的蛋白显著高于对照组细胞, 其酶活性也是显著大于对照组细胞。由此, 我们的结果表明 YKL-40 通过促进 MMP9 表达和活性, 从而增强细胞侵袭力。

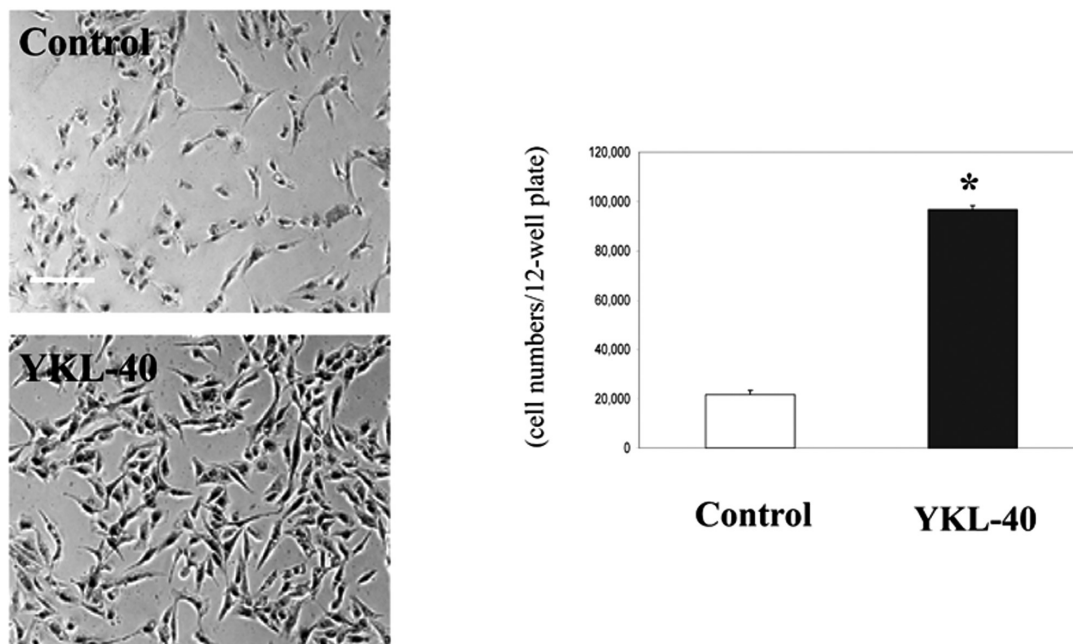


图2 YKL-40 蛋白增强 MDA-MB-231 细胞存活

Fig.2 YKL-40 promotes MDA-MB-231 cell survival

Note: MDA-MB-231 cells were treated with recombinant YKL-40 protein(100 ng/mL) for 72 h, cell numbers were analyzed. Scale bar=50 μ m n=4, compared with Control, * $P < 0.05$.

3 讨论

近十年来, 众多临床研究证据提示 YKL-40 可作为一种肿瘤生物标志物, 其病理机制以及对肿瘤发生发展的作用受到了极大关注^[17-19]。多种人体肿瘤病人的 YKL-40 血液浓度与肿瘤的进展和晚期转移呈显著的正相关, 包括脑胶质细胞瘤, 子宫肌瘤, 黑色素瘤和小细胞肺癌等^[20-22]。基因微阵列分析和基因表达序列分析也表明, 卵巢癌、脑肿瘤和乳腺癌组织中 YKL-40 的基因表达水平明显高于邻近的正常组织^[23], 且与肿瘤的大小, 转移程度明显相关。同样, 乳腺癌的 YKL-40 蛋白表达与肿瘤的血管再生、肿瘤的等级、Her2/neu 表达有显著性的正相关^[24]。由此, 临床研究检测血液和组织的 YKL-40 表达, 有助于癌症病人恶变和预后的诊断^[25]。在病理研究方面, YKL-40 对癌细胞增殖、存活和侵袭有明显的促进作用^[26,27]。尤其在肿瘤周围的炎症过程中, YKL-40 促进炎症反应, 加速肿瘤的生长和转移^[28]。近来, 在对 YKL-40 对肿瘤细胞的研究中, 发现了其与上皮间质转化有着密切的相关性。比如在前列腺癌和非小细胞肺癌中, 发现了 YKL-40 可以调控 EMT, 促进肿瘤的转移和侵袭^[14,15]。除此之外, YKL-40 也可促进乳腺上皮细胞的 EMT, 促进肿瘤进展, 血管生成^[29]。但是, YKL-40 是否能诱导 EMT 发生, 并调控 EMT 促进肿瘤细胞迁移的具体分子机制仍不十分清楚。

我们采用不表达 YKL-40、非 EMT 形态的结肠癌细胞 HCT-116 和 EMT 形态的乳腺癌细胞 MDA-MB-231, 通过 YKL-40 的异位表达和在培养基中外加入重组 YKL-40 蛋白,

来进一步探究 YKL-40 对不同肿瘤细胞是否有诱导或增强 EMT 的作用。我们发现 HCT-116 细胞在 YKL-40 过表达之后, 其细胞稍变长, 但还是维持原上皮形态, EMT 标记蛋白也未被诱导。相反, YKL-40 过表达的 MDA-MB-231 细胞形态更加细长, 形成典型的梭形间质形态; 并且其 EMT 相关蛋白 vimentin、N-cadherin 表达也明显升高, 这些结果表明 YKL-40 过表达能增强肿瘤细胞 EMT。并且 YKL-40 过表达的细胞或 YKL-40 重组蛋白刺激的细胞, 其存活能力明显增强, 同时也更加具有侵袭性, 其分子机制是上调 MMP-9 蛋白表达和活性, 以及可能高表达的 N-cadherin。但是, 对原上皮样肿瘤细胞, 单独引入 YKL-40 基因无法促进细胞向 EMT 转变; 然而, YKL-40 却能增加该肿瘤细胞的生存力, 提示 YKL-40 对不同的肿瘤细胞发挥着不一样的功能来支持肿瘤的生存与发展。我们这一发现与以往类似的报道相一致, Morera et al^[29] 报道了高表达 YKL-40 乳腺癌细胞株 D492HER2 与 YKL-40 不表达、非癌性细胞株 D492M 相比, 前者凸显了 EMT 的特征; 敲除 YKL-40 基因能抑制细胞的迁移力和 EMT 标记物的表达, 即抑制 EMT。但是, 作者没有证据证明过表达 YKL-40 于 D492M 细胞诱导 EMT。所以, 综合这些研究结果, 我们阐明 YKL-40 是 EMT 肿瘤细胞 EMT 的增强因子。这发现实际上也适用于解释为什么众多的癌症病人在癌症晚期的血液中, YKL-40 浓度有显著地提升, 而不是发生在癌症早期。而且, 我们可以判断肿瘤细胞 EMT 转变包含有多种基因参与的协同作用, 不局限于 YKL-40。

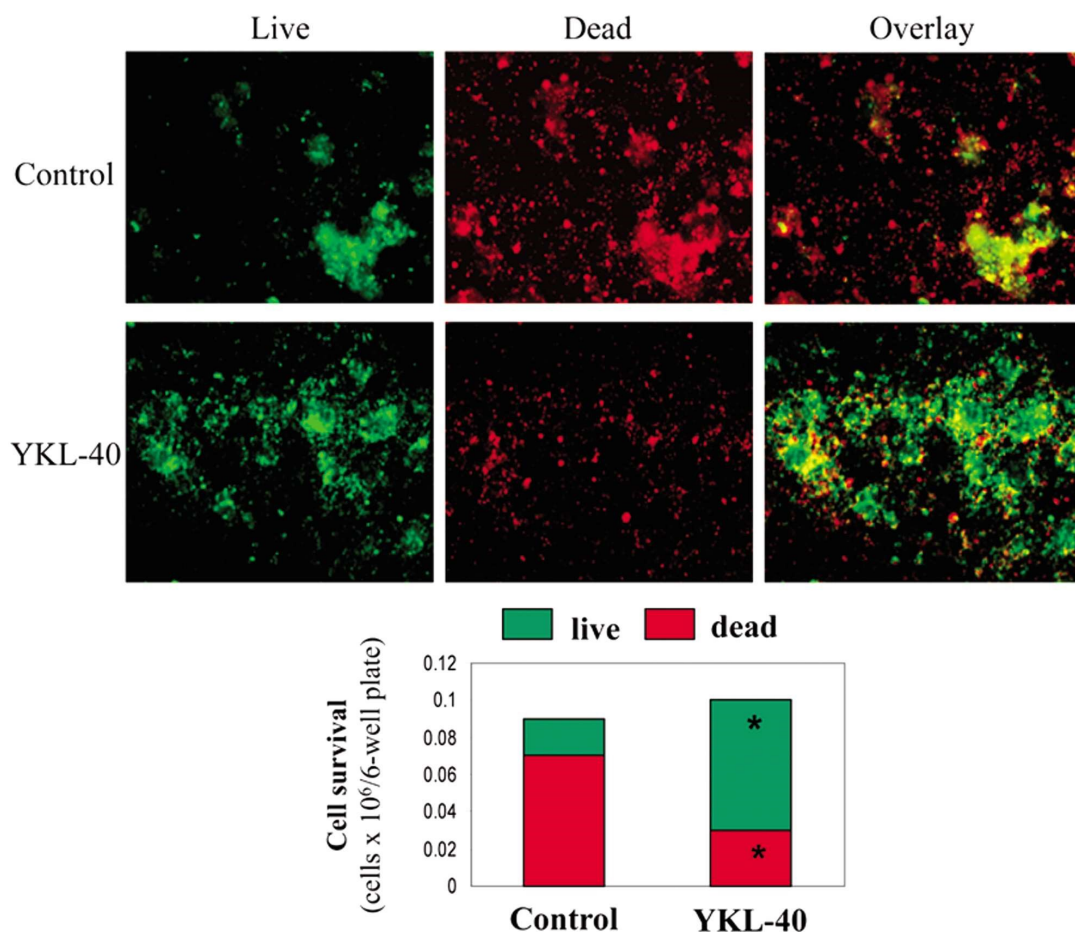


图3 过表达 YKL-40 在 HCT116 细胞中能增强细胞的存活

Fig.3 Ectopic expression of YKL-40 in HCT-116 cells promotes cell survival

Note: HCT-116 cells engineered with vector control or YKL-40 gene were cultured with serum-free medium for 72 h, live(green) and dead(red) cells were analyzed. n=3, compared with Control, * $P<0.05$.

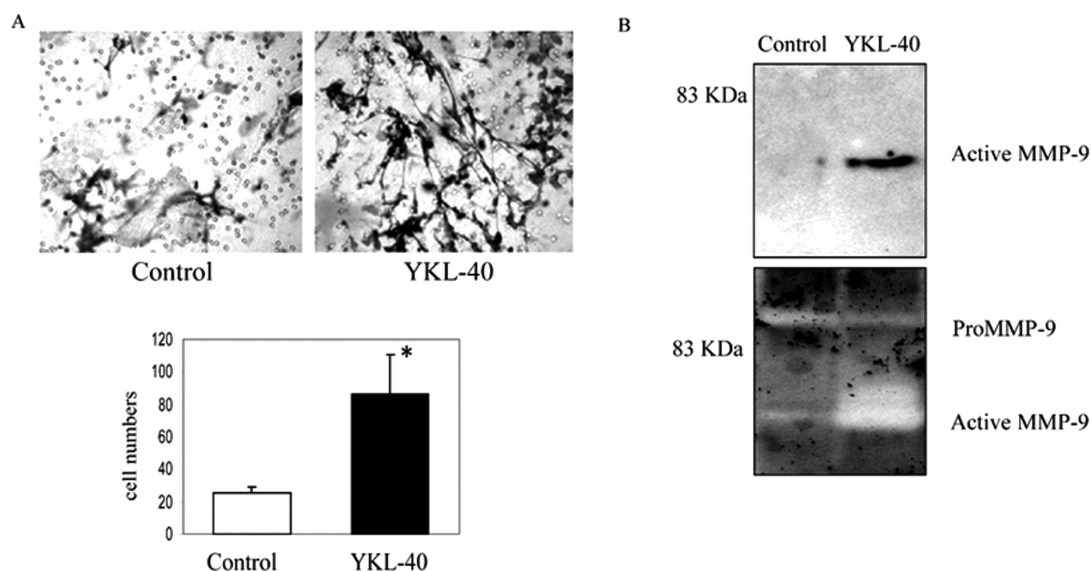


图4 YKL-40 过表达增强 MDA-MB-231 细胞侵袭力,并提升细胞 MMP9 分泌蛋白的表达和活性

Fig.4 Ectopic expression of YKL-40 in MDA-MB-231 cells promotes cell invasion and enhances the expression and activity of MMP9

Note: A: Cell count of MDA-MB-231 with engineered vector control or YKL-40 gene passing through transwell. n=5, * $P<0.05$; B: Protein expression level and activity of MMP9 were detected.

在对多种肿瘤细胞株进行 YKL-40 表达的筛选中,我们惊异地发现,其中绝大多数细胞株不表达或低表达 YKL-40,包括

乳腺癌细胞株 MDA-MB-231,MCF-7,MCF-10, 结肠癌细胞株 HCT-116,黑色素瘤细胞株 B16F10,子宫癌细胞株 Hela 等;相

反,仅有少部分细胞株表达 YKL-40,包括脑肿瘤细胞株 U87, GSDC,骨肉瘤细胞株 MG63(数据未显示)。这些不同细胞株原均来自于病人肿瘤组织的分离和培养,为何肿瘤组织表达大量的 YKL-40,但其细胞株不表达 YKL-40 至今我们无法有确凿有力的证据来说明,但是我们推测可能与体外的细胞培养有直接的关系。有些肿瘤细胞在脱离体内的肿瘤微环境后,在体外单层(monolayer)培养中,失去与周围其它间质、细胞相互作用,因而导致肿瘤细胞的自身基因的调节、改变,可能包含了 YKL-40 基因。因此,早期分离细胞株的 YKL-40 检测可能会证明我们的推测。

综上所述,我们发现 YKL-40 通过促进 EMT,增强肿瘤细胞的存活能力和侵袭力,证实了 YKL-40 与 EMT 的确切联系,其增强细胞迁移和侵袭的分子机制是归咎于上调 MMP9 和 N-cadherin。由此,YKL-40 可作为肿瘤恶变的生物标志物,为肿瘤治疗提供新靶点。

参考文献(References)

- [1] Fusetti F, Pijning T, Kalk KH, et al. Crystal structure and carbohydrate-binding properties of the human cartilage glycoprotein-39 [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(39): 37753-37760
- [2] Johansen JS, Williamson MK, Rice JS, et al. Identification of proteins secreted by human osteoblastic cells in culture. *J Bone Miner Res*[J], 1992, 7(5): 501-512
- [3] Rusak A, Jabłońska K, Dziegiel P. The role of YKL-40 in a cancerous process[J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2016, 70(0): 1286-1299
- [4] Ngernyuan N, Yan W, Schwartz LM, Oh D, et al. A Heparin Binding Motif Rich in Arginine and Lysine is the Functional Domain of YKL-40[J]. *Neoplasia*, 2018, 20(2): 182-192
- [5] Qin G, Li X, Chen Z, et al. Prognostic Value of YKL-40 in Patients with Glioblastoma: a Systematic Review and Meta-analysis [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(5): 3264-3270
- [6] Wan G, Xiang L, Sun X, et al. Elevated YKL-40 expression is associated with a poor prognosis in breast cancer patients [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(3): 5382-5391
- [7] Bian B, Li L, Yang J, et al. Prognostic value of YKL-40 in solid tumors: a meta-analysis of 41 cohort studies [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 259
- [8] Francescone RA, Scully S, Faibish M, et al. Role of YKL-40 in the angiogenesis, radioresistance, and progression of glioblastoma[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(17): 15332-439
- [9] Zhang Y, Weinberg RA. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities [J]. *Front Med*, 2018, 12 (4): 361-373
- [10] Ye X, Weinberg RA. Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression [J]. *Trends Cell Biol*, 2015, 25(11): 675-686
- [11] Ribatti D. Epithelial-mesenchymal transition in morphogenesis, cancer progression and angiogenesis[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 353(1): 1-5
- [12] Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(2): 69-84
- [13] Krebs AM, Mitschke J, Lasierra Losada M, et al. The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer[J]. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(5): 518-529
- [14] Hao H, Wang L, Chen H, et al. YKL-40 promotes the migration and invasion of prostate cancer cells by regulating epithelial mesenchymal transition[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(8): 3749-3757
- [15] Jefri M, Huang YN, Huang WC, et al. YKL-40 regulated epithelial-mesenchymal transition and migration/invasion enhancement in non-small cell lung cancer[J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 590
- [16] Shao R, Hamel K, Petersen L, et al. YKL-40, a secreted glycoprotein, promotes tumor angiogenesis[J]. *Oncogene*, 2009, 28(50): 4456-68
- [17] Ismail H, Helby J, Hölmich LR, et al. Measured and genetically predicted plasma YKL-40 levels and melanoma mortality [J]. *Eur J Cancer*, 2019, 121: 74-84
- [18] Krogh M, Christensen I, Bouwhuis M, et al. Prognostic and predictive value of YKL-40 in stage IIB-III melanoma[J]. *Melanoma Res*, 2016, 26(4): 367-76
- [19] Çiledağ A, Akın Kabalak P, Çelik G, et al. High serum YKL-40 level is associated with poor prognosis in patients with lung cancer [J]. *Turk Toraks*, 2018, 66(4): 273-279
- [20] Guo W, Wang J, Wei H. Serum YKL-40 Level Positively Correlates With Uterine Leiomyomas[J]. *Reprod Sci*, 2016, 23(11): 1559-1564
- [21] Johansen JS, Jensen BV, Roslind A, et al. Serum YKL-40, a new prognostic biomarker in cancer patients ? [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006, 15(2): 194-202
- [22] Karataş S, Şal V, Kahramanoğlu İ, et al. YKL-40 and cancer antigen 72-4 as new and promising diagnostic and prognostic markers for endometrial cancer[J]. *Turk J Obstet Gynecol*, 2018, 15(4): 235-242
- [23] Lau SH, Sham JS, Xie D, et al. Clusterin plays an important role in hepatocellular carcinoma metastasis [J]. *Oncogene*, 2006, 25 (8): 1242-1250
- [24] Shao R, Cao QJ, Arenas RB, et al. Breast cancer expression of YKL-40 correlates with tumour grade, poor differentiation, and other cancer markers[J]. *Br J Cancer*, 2011, 105(8): 1203-1209
- [25] Väänänen T, Kallio J, Vuolteenaho K, et al. High YKL-40 is associated with poor survival in patients with renal cell carcinoma: a novel independent prognostic marker[J]. *Scand J Urol*, 2017, 51(5): 367-372
- [26] Kzhyshkowska J, Yin S, Liu T, et al. Role of chitinase-like proteins in cancer[J]. *Biol Chem*, 2016, 397(3): 231-247
- [27] Li LL, Fan JT, Li DH, et al. Effects of a Small Interfering RNA Targeting YKL-40 Gene on the Proliferation and Invasion of Endometrial Cancer HEC-1A Cells [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2016, 26 (7): 1190-1195
- [28] Libreros S, Iragavarapu-Charyulu V. YKL-40/CHI3L1 drives inflammation on the road of tumor progression [J]. *J Leukoc Biol*, 2015, 98 (6): 931-936
- [29] Morera E, Steinhäuser SS, Budkova Z, et al. YKL-40/CHI3L1 facilitates migration and invasion in HER2 overexpressing breast epithelial progenitor cells and generates a niche for capillary-like network formation[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2019, 55(10): 838-853