

本文引用:曾琴,刘萍,邹湘渝,等. Src 激酶抑制剂 PP2 对人舌鳞状细胞癌 Tca8113 细胞迁移和侵袭能力的影响 [J]. 新乡医学院学报,2018,35(9):780-783. DOI:10.7683/xyxyxb.2018.09.007.

【基础研究】

Src 激酶抑制剂 PP2 对人舌鳞状细胞癌 Tca8113 细胞迁移和侵袭能力的影响

曾 琴^{1,2}, 刘 萍^{1,2}, 邹湘渝^{1,2}, 聂敏海^{1,2}

(1. 西南医科大学附属口腔医院牙周黏膜科,四川 泸州 646000;2. 西南医科大学口腔颌面修复重建和再生实验室,四川 泸州 646000)

摘要: 目的 探讨 Src 激酶抑制剂 PP2 对人舌鳞状细胞癌 Tca8113 细胞迁移和侵袭能力的影响。方法 将对数生长期的 Tca8113 细胞分为 0、1、5、10、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PP2 组,分别加入 0、1、5、10、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Src 激酶抑制剂 PP2 进行培养,采用划痕实验和 Transwell 迁移实验检测 Tca8113 细胞的迁移能力,Transwell 侵袭实验检测 Tca8113 细胞的体外侵袭能力。结果 PP2 作用 24 h 时,0、1、5、10、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PP2 组细胞迁移率随 PP2 浓度的增加逐渐降低 ($P < 0.05$),穿膜细胞数随 PP2 浓度的增加逐渐减少 ($P < 0.05$),细胞侵袭个数随 PP2 浓度的增加逐渐减少 ($P < 0.05$)。结论 Src 激酶抑制剂 PP2 可以抑制人舌鳞状细胞癌细胞 Tca8113 的迁移和侵袭能力。

关键词: Src 激酶抑制剂;PP2;迁移;侵袭;Tca8113 细胞

中图分类号: R739.86 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2018)09-0780-04

Effect of Src kinase inhibitor PP2 on migration and invasion of human oral tongue squamous cell carcinoma Tca8113 cells

ZENG Qin^{1,2}, LIU Ping^{1,2}, ZOU Xiang-yu^{1,2}, NIE Min-hai^{1,2}

(1. Department of oral Medicine, the Affiliated Hospital of Stomatology, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; 2. Laboratory of Oral and Maxillo Facial Reconstruction and Regeneration, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of Src kinase inhibitor PP2 on the migration invasion of human oral tongue squamous cell carcinoma Tca8113 cells. **Methods** Tca8113 cells in logarithmic phase were collected and divided into 0, 1, 5, 10, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PP2 group. The cells in the 0, 1, 5, 10, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PP2 group were treated with different concentrations of Src kinase inhibitor PP2 (0, 1, 5, 10, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) respectively. The migration ability of Tca8113 cells was detected by the scratch test and Transwell assay. The invasion ability of Tca8113 cells was detected by Transwell chamber. **Results** At 24 h after intervened by PPA, the migration rate of Tca8113 cells decreased with the increase of PP2 concentration in the 0, 1, 5, 10, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PP2 group ($P < 0.05$). The number of transmembrane cells in the 0, 1, 5, 10, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PP2 group reduced with the increase of PP2 concentration ($P < 0.05$). The number of invasion cells in the 0, 1, 5, 10, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PP2 group decreased with the increase of PP2 concentration ($P < 0.05$). **Conclusion** Src kinase inhibitor PP2 can inhibit the invasion and migration of human oral tongue squamous cell carcinoma Tca8113 cells.

Key words: Src kinase inhibitor; PP2; migration; invasion; Tca8113 cells

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是头颈部最常见的恶性肿瘤之一,而舌鳞状细胞癌(tongue squamous cell carcinoma, TSCC)又是 OSCC 中最常见的类型,其主要特点为进展迅速、浸

润范围广、预后差^[1]。影响 TSCC 预后最重要的因素是原位侵袭和远处转移。因此,抑制肿瘤的侵袭和转移是 TSCC 防治的关键。Src 基因是最早发现的有内在酪氨酸激酶活性的人类癌基因。Src 激酶是一种不需要受体和膜相关信号转导的蛋白激酶,对肿瘤细胞的分化、增殖和侵袭均有调控作用,其异常活化与肿瘤的高转移性和预后不良关系密切^[2]。本研究旨在探讨 Src 蛋白激酶抑制剂 PP2 对 TSCC Tca8113 细胞侵袭和迁移能力的影响。

DOI:10.7683/xyxyxb.2018.09.007

收稿日期:2017-12-03

基金项目:泸州医学院联合自然科学科研项目(编号:2013LZLY-J32)。

作者简介:曾 琴(1990-),女,四川泸州人,硕士研究生在读,研究方向:口腔黏膜病防治。

通信作者:聂敏海(1967-),男,四川自贡人,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:口腔黏膜病防治;E-mail:51709463@qq.com。

1 材料与方法

1.1 细胞来源 人 TSCC Tca8113 细胞株由西南医科大学口腔颌面修复重建和再生实验室提供。

1.2 主要试剂与仪器 Src 激酶抑制剂 PP2 购自 Selleck 中国上海蓝木化工有限公司,磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline,PBS)、二甲基亚砷(dimethyl sulphoxide,DMSO)、胎牛血清购自北京索莱宝生物科技有限公司,改良型 PRMI-1640 培养液、胰蛋白酶消化液购自北京赛默飞世尔生物化学制品有限公司,Matrigel 基质胶、FACSverse 流式细胞仪购自美国 BD 公司,Transwell 小室购自美国 Corning 公司,Thermo Multiskan Go 型全自动酶标仪购自 Thermo 中国科技公司,MCO-15AC 型 CO₂ 细胞培养箱购自日本三洋公司,KDC-1044 型低速离心机购自安徽中科中佳仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 将 Tca8113 细胞置于含体积分数 10% 胎牛血清和质量分数 1% 青链霉素 RPMI-1640 培养液中,于含体积分数 5% CO₂、37 ℃ 饱和湿度条件下培养,1~2 d 换液 1 次,观察细胞的生长情况,取对数生长期细胞进行实验。

1.3.2 PP2 溶液配置 Src 激酶抑制剂 PP2 溶于 DMSO 中,将其配制成浓度为 1 mmol · L⁻¹ 的溶液,使用时以不含血清的培养液稀释,获得 1、5、10、20 μmol · L⁻¹ 的工作液。

1.3.3 划痕实验检测 Tca8113 细胞的迁移能力 取对数生长期细胞,调整其密度为 5 × 10⁸ L⁻¹,接种于 6 孔板,每孔 2 mL,置于含体积分数 5% CO₂、37 ℃ 培养箱中培养,待细胞贴壁并生长融合至约 90% 时,以 200 μL 微量移液枪枪头垂直于细胞表面均匀划痕,PBS 洗涤去除脱落细胞。将细胞分为 0、1、5、10、20 μmol · L⁻¹ PP2 组,分别加入含 0、1、5、10、20 μmol · L⁻¹ PP2 的体积分数 1% 胎牛血清培养液,每组设 2 个复孔;将 6 孔板置入 37 ℃ 含体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养。于培养 24 h 时,用倒置显微镜拍照,计算细胞迁移率。细胞迁移率 = (原划痕宽度 - 现划痕宽度) / 原划痕宽度 × 100%。

1.3.4 Transwell 迁移实验检测 Tca8113 细胞的迁移能力 取对数生长期细胞,PBS 洗涤 3 次,消化、收集细胞,调整其密度为 5 × 10⁸ L⁻¹ 的单细胞悬液,

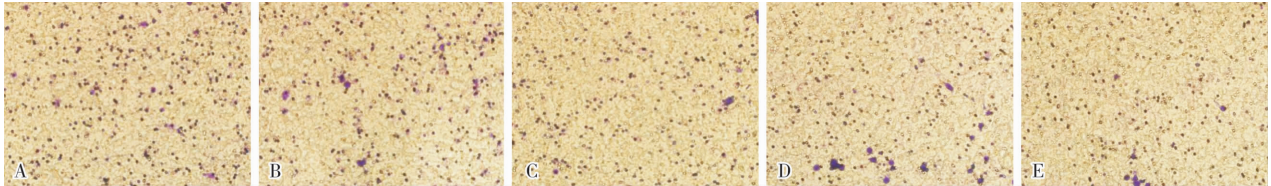
将细胞分为 0、1、5、10、20 μmol · L⁻¹ PP2 组,Transwell 小室上室内加入含 0、1、5、10、20 μmol · L⁻¹ PP2 的无血清单细胞悬液 200 μL,下室加入 600 μL 培养液,将 24 孔板置于 37 ℃ 含体积分数 5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h 后,分别取出 Transwell 小室,PBS 清洗,甲醛固定 30 min,清洗,自然晾干,体积分数 0.1% 结晶紫染色 20 min,PBS 清洗,以棉签小心擦除滤膜上面的细胞,200 倍光学显微镜下计数,计算穿膜细胞数。实验重复 3 次,取均值。

1.3.5 Transwell 小室法检测 Tca8113 细胞的侵袭能力 Transwell 小室的滤膜孔径为 8 μm,基质胶 4 ℃ 过夜冻融,将 Matrigel 基质胶用不含血清的 RPMI-1640 培养液按 1 : 8 的比例稀释,取 100 μL 铺在 transwell 小室的上室中,均匀铺满小室底部的聚碳酸酯膜上,并置于 37 ℃ 含体积分数 5% CO₂ 培养箱中孵育 2 h 后,水化基底膜 15 min。取对数生长期细胞,PBS 洗涤 3 次,消化、收集细胞,得到密度为 5 × 10⁸ L⁻¹ 的单细胞悬液,并将细胞分为 0、1、5、10、20 μmol · L⁻¹ PP2 组。Transwell 小室上室内分别加入含 0、1、5、10、20 μmol · L⁻¹ PP2 的无血清单细胞悬液 200 μL,下室加入 600 μL 培养液,将 24 孔板置于 37 ℃ 体积分数 5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h 后,分别取出 Transwell 小室,PBS 清洗,甲醛固定 30 min,清洗,自然晾干,用体积分数 0.1% 结晶紫染色 20 min,PBS 清洗,以棉签小心擦除滤膜上面的细胞,200 倍光学显微镜下计数,计算细胞侵袭个数。实验重复 3 次,取均值。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PP2 对人 TSCC Tca8113 细胞迁移能力的影响 结果见表 1。PP2 作用 24 h 时,0、1、5、10、20 μmol · L⁻¹ PP2 组细胞迁移率组间两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),且随 PP2 浓度的增加细胞迁移率逐渐降低;PP2 作用 Tca8113 细胞 24 h 后,0、1、5、10、20 μmol · L⁻¹ PP2 组穿膜细胞数组间两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),且随着 PP2 浓度的增加穿膜细胞数逐渐减少;见图 1。



A:0 μmol · L⁻¹ PP2 组;B:1 μmol · L⁻¹ PP2 组;C:5 μmol · L⁻¹ PP2 组;D:10 μmol · L⁻¹ PP2 组;E:20 μmol · L⁻¹ PP2 组。

图 1 PP2 干预 24 h 后 Tca8113 细胞的穿膜细胞数(结晶紫染色, ×200)

Fig 1 The number of transmembrane cells of Tca8113 cells after 24 h intervention by PP2 (crystal violet staining, ×200)

表 1 各组 Tca8113 细胞迁移能力的比较

Tab.1 Comparison of migration ability of Tca8113 cells in the groups (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞迁移率/%	穿膜细胞数
0 μmol · L ⁻¹ PP2 组	10.6 ± 0.7	236.6 ± 15.3
1 μmol · L ⁻¹ PP2 组	9.3 ± 0.4 ^a	199.5 ± 19.8 ^a
5 μmol · L ⁻¹ PP2 组	7.1 ± 0.4 ^{ab}	166.5 ± 12.5 ^{ab}
10 μmol · L ⁻¹ PP2 组	4.2 ± 0.6 ^{abc}	134.5 ± 12.9 ^{abc}
20 μmol · L ⁻¹ PP2 组	3.1 ± 0.1 ^{abcd}	66.5 ± 10.4 ^{abcd}

注:与 0 μmol · L⁻¹ PP2 组比较^a*P* < 0.05;与 1 μmol · L⁻¹ PP2 组比较^b*P* < 0.05;与 5 μmol · L⁻¹ PP2 组比较^c*P* < 0.05;与 10 μmol · L⁻¹ PP2 组比较^d*P* < 0.05。

2.2 PP2 对人 TSCC Tca8113 细胞体外侵袭能力的影响 0、1、5、10、20 μmol · L⁻¹ PP2 组细胞侵袭个数分别为 240.4 ± 19.0、188.5 ± 16.1、148.3 ± 30.9、113.0 ± 9.0、41.6 ± 14.4。0、1、5、10、20 μmol · L⁻¹ PP2 组细胞侵袭个数组间两两比较差异均有统计学意义(*P* < 0.05),且随 PP2 浓度的增加细胞侵袭个数逐渐减少。

3 讨论

口腔颌面部恶性肿瘤中约 90% 为 OSCC,其中约 70% 为 TSCC^[3]。TSCC 的高侵袭性和高转移性导致其病死率和复发率较高,每年确诊的 TSCC 病例中约 50% 死亡,患者 5 a 生存率仍然很低^[4],侵袭和远处转移是造成其死亡最重要的因素。而实现浸润和转移的主要原因是恶性肿瘤细胞的黏附能力降低使其迁移能力增强^[5-6]。

目前,TSCC 的治疗方法主要采用手术治疗为主,辅以放射、化学治疗的综合性序列治疗。这些传统的治疗方法对患者创伤大,并发症多,易复发和转移。目前为止,尚未找到治疗 TSCC 的新靶点来替代传统治疗。

Src 激酶为非受体酪氨酸蛋白激酶,目前发现的家族成员有 11 个,分别为 Brk、Blk、Frk、Fyn、Fgr、Hck、Lyn、Lck、Src、c-Src 和 Yes^[7],Src 蛋白是原癌

基因 c-Src 的主要产物,也是目前研究最多的成员之一。有研究表明,c-Src 和 SFKs 参与了前列腺癌、结肠癌、卵巢癌、肺癌等恶性肿瘤的发生、发展^[8-9]。Src 参与多种信号通路,可能对肿瘤细胞的增殖、分化、黏附及侵袭有调控作用,其高表达或表达异常与肿瘤的高转移性和预后不良密切相关^[10],抑制 Src 激酶的活性可抑制多种恶性肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移。PP2 是一种广泛使用的阻断非受体型酪氨酸激酶 Src 活性的复合物^[11],也是 Src 激酶的选择性抑制剂。杜军等^[12]研究发现,在乳腺癌细胞中,PP2 可使肿瘤细胞的运动和黏附能力减弱,可能是由于肌动蛋白细胞骨架解聚,细胞极性消失导致的。CHIANG 等^[13]研究发现,Src 激酶抑制剂 PP2 可抑制膀胱癌细胞的体外侵袭能力,且有浓度依赖性;PP2 对膀胱癌细胞的侵袭作用可能是由蛋白激酶 B 信号通路介导的,蛋白激酶 B 活性的降低导致膀胱癌细胞体外侵袭能力减弱。但关于 PP2 对口腔鳞状细胞癌的作用研究鲜有报道。因此,本研究通过 Src 激酶抑制剂 PP2 干预 TSCC Tca8113 细胞,检测其侵袭和迁移能力的变化,以期寻找抗肿瘤治疗的新靶点提供理论依据。

本研究结果显示,PP2 对 Tca8113 细胞的侵袭能力有抑制作用,且随浓度的增加抑制效果越明显。Transwell 迁移实验结果显示,在一定浓度范围内,随着 PP2 干预浓度升高,细胞迁移率逐渐降低,该结果与划痕实验结果相一致,由此可推测 Src 激酶抑制剂 PP2 能明显抑制人 TSCC Tca8113 细胞的迁移能力。

综上所述,Src 激酶抑制剂 PP2 对 TSCC Tca8113 细胞的侵袭和迁移能力有抑制作用,但 PP2 具体通过什么信号通路来减弱肿瘤细胞的侵袭和迁移能力目前尚不清楚。吴向晖等^[14]研究发现,miR-320 可通过靶向 Rab11 调控宫颈癌 SiHa 细胞的增殖、侵袭及迁移,PP2 是否也是通过 miR-320 的调控

来抑制 TSCC Tca8113 细胞的侵袭和迁移,有待进一步研究。

参考文献:

[1] JEMAL A,BRAY F,CENTERE M M,*et al.* Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*,2011,61(2):69-90.

[2] NTANASIS-STATHOPOULOS I,FOTOPOULOS G,TZANNINIS I G,*et al.* The emerging role of tyrosine kinase inhibitors in ovarian cancer treatment;a systematic review[J]. *Cancer Invest*,2016,34(7):313-339.

[3] 张晓艳,程俊,许华丽,等. A 型钾离子通道对人舌鳞癌 Tca8113 细胞增殖的影响[J]. *口腔医学研究*,2017,33(4):440-443.

[4] 谢红军. Shp2 在口腔鳞癌中的表达及对其生物学行为的影响[D]. 济南:山东大学,2014.

[5] LOFFEK S,ZIGRINO P,MAUCH C. Tumor-stroma interactions:their role in the control of tumor cell invasion and metastasis[J]. *J Dtsch Dermatol Ges*,2006,4(6):496-503.

[6] FRIEDL P,WOLF K. Tumour-cell invasion and migration:diversity and escape mechanisms[J]. *Nature Reviews Cancer*,2003,3(5):362-374.

[7] SUMMY J M,GALLICK G E. Src family kinases in tumor progression and metastasis[J]. *Cancer Metastasis Rev*,2003,22(4):337-358.

[8] WHEELER D L,IIDA M,DUNN E F. The role of Src in solid

tumors[J]. *Oncologist*,2009,14(7):667-678.

[9] KIM LC,SONG L,HAURA E B. Src kinases as therapeutic targets for cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*,2009,6(10):587-595.

[10] KONG D,CHEN F,SIMA N I. Inhibition of focal adhesion kinase induces apoptosis in bladder cancer cells via Src and the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway[J]. *Exp Ther Med*,2015,10(5):1725-1731.

[11] FRAUENSTEIN K,TIGGES J,SOSHILOV A A,*et al.* Activation of the aryl hydrocarbon receptor by the widely used Src family kinase inhibitor 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(dimethylethyl)pyrazolo-[3,4-d]pyrimidine (PP2) [J]. *Arch Toxicol*,2015,89(8):1329-1336.

[12] 杜军,戈应滨,顾洛. Src 激酶抑制剂 PP2 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞黏附、迁移能力的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*,2008,28(7):850-854.

[13] CHIANG G J,BILLMEYER B R,CANES D,*et al.* The src-family kinase inhibitor PP2 suppresses the *in vitro* invasive phenotype of bladder carcinoma cells via modulation of Akt[J]. *Bju International*,2015,96(3):416-422.

[14] 吴向晖,黄鹏翀,秦海霞. miR-320 靶向 Rab11 对宫颈癌细胞增殖、侵袭及迁移的影响[J]. *新乡医学院学报*,2017,34(10):885-888,895.

(本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博)

《新乡医学院学报》2018 年征订启事

《新乡医学院学报》(Journal of Xinxiang Medical University)创刊于 1984 年,是新乡医学院主管主办、国内外公开发行的综合性医学学术期刊。国际标准连续出版物号:ISSN 1004-7239,国内统一连续出版物号:CN 41-1186/R。现为月刊,每月 5 日出版,大 16 开本,每期 80 页。本刊设有专家论坛、专题报告、国家自然科学基金专题评述、基础研究、临床研究、技术与方法、护理研究、综述、医学教育研究、名院·名科·名医等栏目。编辑部对来稿审理及时并严格执行“三审制”,对国家级、省部级科研基金项目资助的研究性论文优先发表。

本刊为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、中国精品科技期刊、中国高校优秀科技期刊、河南省一级期刊,目前被《中国学术期刊(光盘版)全文检索数据库》、《万方数据-数字化期刊群》、美国《化学文摘》、美国《乌利希期刊指南》、英国《公共卫生数据库》(Global Health)、《中国学术期刊文摘》、《中国医学文摘》、《中国药学文摘》等国内外权威性数据库、文摘期刊收录,标志着在本刊发表的论文将有机会被国内外著名检索系统收录,这对提高作者知名度及论文的影响力不无裨益。欢迎国内外医药工作者踊跃投稿。欢迎广大订户前往当地邮局订阅,邮发代号:36-145,每期定价 10.00 元,全年 120.00 元。编辑部地址:河南省新乡市金穗大道东段新乡医学院学报编辑部,邮政编码:453003。电话:0373-3029086,传真:0373-3831371,网址:www. xxyxyxb. com,E-mail:xxyxyxb@ 163. com。

本刊编辑部