

TPM1 调节口腔鳞癌的增殖、侵袭迁移及其机制研究

闫大勇 蔡晓清 郭乐乐 钟克涛 张 瑞

摘要 目的 探讨 TPM1 在口腔鳞癌组织中的表达情况及对人口腔鳞癌细胞恶性表型的影响。方法 通过 RT-PCR 检测口腔鳞癌组织和癌旁组织标本 TPM1 的表达情况。选取 CLA27 和 HSC3 细胞作为后续实验对象,构建 TPM1 干扰质粒。采用 RT-PCR 检测 TPM1 转染后表达效果,采用 CCK-8 检测细胞 0、24、48 和 72h 增殖情况,划痕实验检测细胞迁移,Transwell 检测细胞侵袭能力,Western blot 法检测 MMP 家族蛋白表达情况。结果 TPM1 在口腔鳞癌组织中高表达 ($P < 0.05$)。RT-PCR 结果显示敲减组 mRNA 表达显著低于空载组 ($P < 0.05$);过表达组 mRNA 表达显著高于空载组 ($P < 0.05$)。与空载组比较,敲减组细胞增殖、迁移和侵袭能力显著降低 ($P < 0.05$);过表达组细胞增殖、迁移和侵袭能力显著增高 ($P < 0.05$)。Western blot 法检测结果显示,相对于空载组敲减组 MMP9 蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.05$);过表达组 MMP9 蛋白表达水平显著上升 ($P < 0.05$)。结论 TPM1 在口腔鳞癌组织中呈现高表达,TPM1 可能通过调节 MMP9 蛋白显著影响口腔鳞癌细胞的增殖、迁移、侵袭能力。

关键词 TPM1 口腔鳞癌 MMP 增殖 侵袭

中图分类号 R78

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.10.022

TPM1 Regulates the Proliferation, Invasion and Migration of OSCC and Its Mechanism. Yan Dayong, Cai Xiaqing, Guo Lele, et al. Zhengzhou Central Hospital, Henan 450001, China

Abstract Objective To investigate the expression of TPM1 in oral squamous cell carcinoma and its effect on the malignant phenotype of human oral squamous cell carcinoma. **Methods** The expression of TPM1 in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and paracancerous tissues was detected by RT-PCR. We selected CLA27 and HSC3 cells as follow-up test objects to construct TPM1 interference plasmid. RT-PCR was used to detect the expression of TPM1, CCK-8 was used to detect cell proliferation at 0, 24, 48 and 72 hours. Scratch test was used to detect cell migration, Transwell was used to detect cell invasion, and Western blot was used to detect the expression of MMP family protein. **Results** TPM1 was highly expressed in OSCC ($P < 0.05$). RT-PCR showed that the mRNA expression in the knockdown group was significantly lower than that in the no-load group ($P < 0.05$), and that in the over expression group was significantly higher than that in the no-load group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the ability of proliferation, migration and invasion of knockdown group was significantly lower ($P < 0.05$), and the ability of proliferation, migration and invasion of overexpression group was significantly higher ($P < 0.05$). Western blot showed that the expression level of MMP9 in the knockdown group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$), and that in the over expression group was significantly higher ($P < 0.05$). **Conclusion** TPM1 is highly expressed in OSCC. TPM1 may affect the proliferation, migration and invasion of OSCC by regulating MMP9 protein.

Key words TPM1; Oral squamous cell carcinoma; MMPs; Proliferation; Invasion

口腔鳞癌是世界上最常见的口腔恶性肿瘤,每年有超过 27.5 万新发病例,将近 12.5 万患者因此死亡。因其复发率高、转移快、预后差等特点导致口腔鳞癌的 5 年生存率约为 50%^[1,2]。因此,研究口腔鳞癌发生、发展的分子机制,为口腔鳞癌诊治提供新的靶点,从而提高治疗效果,具有重要意义。

TPM1 (tropomyosin-1) 是原肌球蛋白家族成员,在肌肉细胞中通过钙离子调节肌肉收缩,而在非肌肉细胞中具有复杂的功能性^[3,4]。有研究表明原肌球蛋白的突变与心脏和骨骼肌疾病直接相关,而原肌球蛋白表达水平的改变与肿瘤的发生、发展密切相关^[5,6]。Shin 等^[7]首先报道了在乳腺癌中 TPM1 的表达下调并抑制肿瘤的进展,后续研究发现 TPM1 在肾癌细胞中表达水平上调,并且诱导细胞凋亡和抑制其侵袭^[8]。但目前 TPM1 是否对口腔鳞癌的细胞生物学行为有影响以及影响机制尚不明确。

基金项目:河南省高等学校重点科研项目(19A320071)

作者单位:450001 郑州市中心医院

通讯作者:张瑞,电子邮箱:zhangrui6404@163.com

本研究通过患者的组织样本分析 TPM1 在口腔鳞癌中的表达水平,通过构建 TPM1 干扰质粒,检测转染前后细胞增殖、迁移和侵袭功能以及 MMPs 蛋白表达水平的变化,初步探讨口腔鳞癌发生、发展的可能机制。

资料与方法

1. 组织标本采集:收集郑州市中心医院 2018 年 9 月~2019 年 5 月口腔鳞癌手术切除的肿瘤组织标本 30 例及癌旁组织标本 7 例。选择要求如下:①术前及术后病理证实为口腔鳞癌;②患者术前未行放疗、化疗及其他治疗;③术后病理取材部位包括表面区、中心区、深层浸润区、癌旁组织;④本研究纳入 30 例研究对象,其中,男性 17 例,女性 13 例,患者平均年龄 57.3 岁(27~71 岁),T₁ 期 12 例,T₂ 期 13 例;T₃ 期 5 例。所有程序经郑州市中心医院医学伦理学委员会审查批准,患者均签署知情同意书。

2. 细胞株与主要试剂:人口腔鳞癌细胞株 CLA27 和 HSC3(中国科学院上海细胞库),RPMI1640 培养基(美国 Invitrogen 公司),优质小牛血清(美国 Invitrogen 公司),GAPDH 抗体,MMPs 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司),TPM1 敲减以及过表达及其空白重组质粒(美国 GeneCopoeia 公司),Lipofectamine TM 2000 转染试剂(美国 Invitrogen 公司)。

3. 细胞转染:将适量细胞种至 6 孔板中,至细胞融合达到 60%~70% 时进行转染。在 150μl RPMI1640 中分别加入 5μl Lipofectamine TM 2000 和 4μg 质粒,室温静置 5min,轻轻混匀,孵育 20min。弃去原 6 孔板内的培养基,加入 RPMI1640 和混合物共 1ml,4~6h 之后再更换成含有血清的培养基。

4. RT-PCR 检测样本中 TPM1 的表达:Trizol 法提取组织/细胞总 RNA,使用反转录酶按说明书将其转录为 cDNA,再进行 PCR 反应,扩增条件为 95℃ 5min,95℃ 15s,60℃ 1min,共 40 个循环。内参基因为 GAPDH,使用 2^{-ΔCt} 法计算基因相对表达量。

5. 细胞增殖:将转染质粒 48h 后的细胞用胰酶消化并计数,按每孔 1500~2000 个细胞接种于 96 孔板内,每组 6 个复孔。各组细胞在 37℃、5% CO₂ 培养箱中分别培养 0、24、48、72h 后使用 CCK-8 测量。测量时每孔加入 10μl CCK-8 试剂和 100μl 培养基混合液,并设立空白对照孔,在培养箱内孵育 1h,酶标仪检测 450nm 波长处的吸光度值,注意检测时要除去气泡。

6. 细胞迁移:在 6 孔板中加入约 10⁶ 个细胞使过夜后细胞融合率达到 100%。第 2 天用 20μl 高压灭菌枪头比着直尺,垂直于标记的横线划痕。PBS 洗去脱落细胞时脱落的细胞,加入完全培养基 1 毫升/孔。放入 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。按 0、6、12、24h 取样,在 10 倍镜头下拍照。使用 Image J 软件计算面积,通过面积和高度计算平均距离。

7. 细胞侵袭:将培养基与 Matrigel 基质胶以 1:10 的比例混合后,在每个小室上室加入 90ml,孵育 4~6h,待其凝固后,将转染 48h 的细胞消化并计数,在上室加入 200μl 细胞悬液(含 1×10⁵ 个细胞),下室加入 800μl 培养液,培养 48h 后取出 Transwell 小室,将上室中残留细胞擦去,下室采用结晶紫染色 20min, PBS 冲洗 3~4 次后,对膜下方细胞采用观察并计数。每组重复 3 次。

8. Western blot 法检测:细胞转染 48h 后提取蛋白,检测蛋白浓度。每孔上样 20μg,使用 10% SDS-PAGE 胶电泳分离,之后转移至 PVDF 膜上。室温下 5% 脱脂牛奶封闭 2~3h, TBST 洗 3 次(每次 10min),随后一抗 4℃ 孵育,摇床过夜,次日 TBST 洗膜,二抗室温孵育 1~2h,洗膜 3 次之后显影,检测蛋白表达情况。

9. 统计学方法:采用 SPSS 22.0 统计学软件对数据进行统计分析,实验数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间采用 *t* 检验进行比较,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. TPM1 的表达水平:RT-PCR 检测结果显示,TPM1 在口腔鳞癌组织中相对表达水平显著高于人正常口腔组织中的表达水平,差异有统计学意义(*P* < 0.05,图 1)。

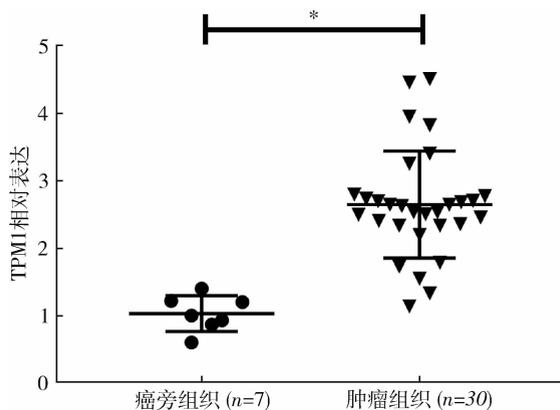


图 1 TPM1 在口腔鳞癌组织和正常组织中表达水平

* *P* < 0.05

2. 各组细胞系转染 TPM1 后相对表达量比较: 细胞转染后, 与空载组比较, 过表达组 TPM1 表达水平显著升高, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 敲减组

TPM1 表达水平显著降低, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2)。

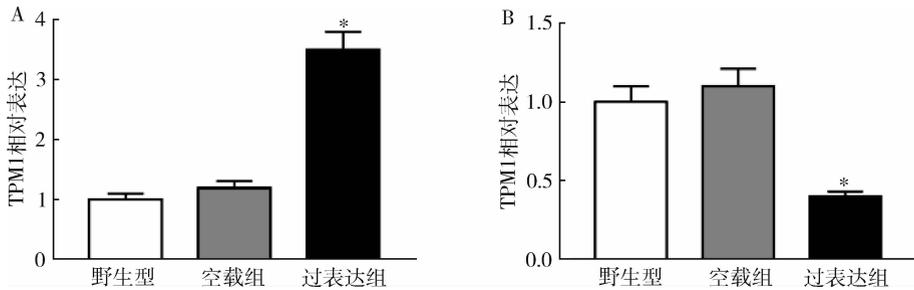


图 2 过表达以及敲减 TPM1 后 TPM1 表达水平变化

A. CLA27 细胞; B. HSC3 细胞; 与空载组比较, * $P < 0.05$

3. TPM1 表达水平对细胞增殖的影响: TPM1 过表达后, 细胞的增殖速度显著升高; 敲减 TPM1 后, 细

胞的增殖速度显著降低 ($P < 0.05$, 图 3)。

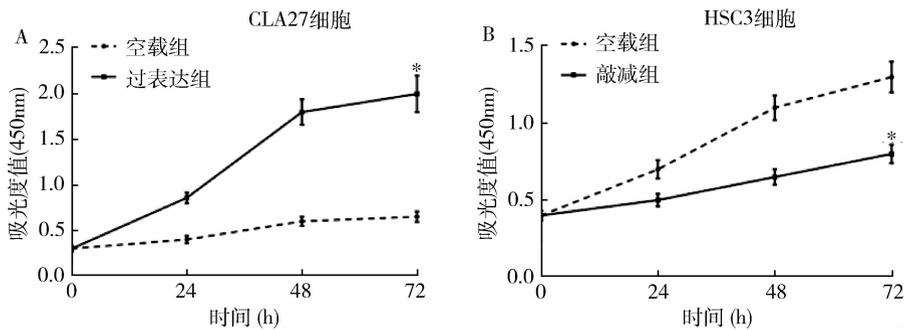


图 3 过表达以及敲减 TPM1 对口腔鳞癌细胞增殖活性的影响

A. 过表达 TPM1 促进细胞增殖; B. 敲减 TPM1 抑制细胞增殖; 与空载组比较, * $P < 0.05$

4. TPM1 表达水平对细胞迁移的影响: 划痕实验显示, 过表达 TPM1 后, 细胞的迁移速度显著升高; 敲减 TPM1 后, 细胞的迁移速度显著降低 ($P < 0.05$, 图 4)。

5. TPM1 表达水平对细胞侵袭的影响: Transwell 侵袭实验结果显示, 过表达 TPM1 后细胞的侵袭能力显著升高; 敲减 TPM1 后细胞的迁侵袭能力显著降低 ($P < 0.05$, 图 5)。

6. 干扰 TPM1 表达对 MMPs 表达水平的影响: 通过前期细胞功能学实验, 发现干扰 TPM1 的表达会影响细胞侵袭、迁移的能力。进一步通过 Western blot 法检测 MMPs 表达水平。结果显示, 过表达 TPM1 后 MMP9 的表达水平显著上升 ($P < 0.05$), MMP2 和 MMP7 的表达水平不受影响; 敲减 TPM1 后 MMP9 的表达水平显著下降 ($P < 0.05$), 然而 MMP2 和 MMP7 的表达水平不受影响 (图 6)。

讨 论

口腔鳞癌是头颈部鳞癌最常见的类型, 大约占口

腔恶性肿瘤的 90%。尽管口腔鳞癌的发生率和病死率最近逐渐降低, 但是其 5 年生存率仍然低于 50%^[9-11]。普遍认为, 淋巴结转移和远处转移是导致口腔鳞癌患者死亡的主要原因^[12]。因此, 阐明调节口腔鳞癌转移的潜在机制对于口腔鳞癌的治疗至关重要。但是, 口腔鳞癌转移的潜在分子机制至今尚不清楚。本研究通过 RT-PCR 检测口腔鳞癌组织和癌旁组织标本 TPM1 的表达情况, 选取 CLA27 和 HSC3 细胞作为后续实验对象, 构建 TPM1 干扰质粒。采用 RT-PCR 检测 TPM1 转染后表达效果, 采用 CCK-8 检测细胞 0、24、48 和 72h 增殖情况, 划痕实验检测细胞迁移, Transwell 检测细胞侵袭能力, Western blot 法检测 MMP 家族蛋白表达情况, 探究了 TPM1 在口腔鳞癌组织中的表达情况以及对人口腔鳞癌细胞恶性表型的影响, 这将有助于理解口腔鳞癌发生、发展的分子机制, 为口腔鳞癌的诊断治疗提供新的靶点。

TPMs 是一类原肌球蛋白, 有大约 40 种亚型, 它

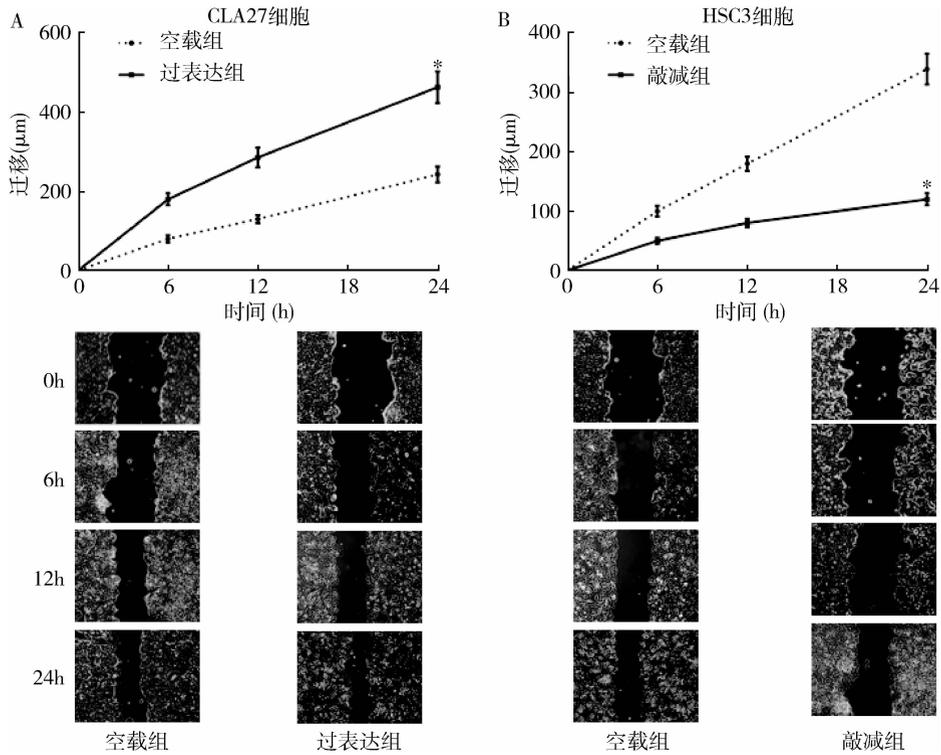


图4 过表达以及敲减 TPM1 对口腔鳞癌细胞迁移活性的影响 (×400)

A. 过表达 TPM1 促进细胞迁移; B. 敲减 TPM1 抑制细胞迁移; 与空载组比较, * P < 0.05

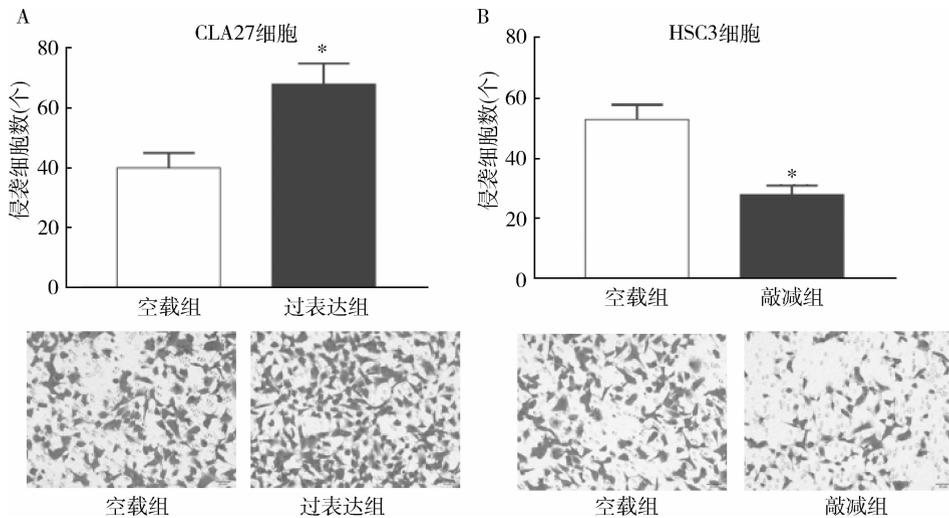


图5 过表达以及敲减 TPM1 对口腔鳞癌细胞侵袭活性的影响 (×400)

A. 过表达 TPM1 促进细胞侵袭; B. 敲减 TPM1 抑制细胞侵袭; 与空载组比较, * P < 0.05

们在应激纤维调节和肌动蛋白细胞骨架修饰中起关键作用^[13]。近年来,大量研究表明 TPMs 与肿瘤细胞的迁移、侵袭密切相关^[14, 15]。在所有原肌球蛋白家族成员中,TPM1 最常参与癌症的发展^[16]。研究表明,TPM1 作为重要的抗肿瘤基因在乳腺癌,结肠癌和膀胱癌在内的各种实体瘤中的表达均被下调^[17]。

最近的研究证实了 TPM1 在乳腺癌细胞中的抗肿瘤作用。Ras - ERK 信号通路通过抑制 TPM 的表达来抑制 TGF - β 诱导的应激纤维变化,从而导致肿瘤细胞更具侵袭性。此外,TPM1 过表达可诱导细胞凋亡并抑制肾癌细胞的侵袭^[8]。尽管许多研究表明 TPM1 在多种肿瘤类型中均具有抑癌作用,但其在口

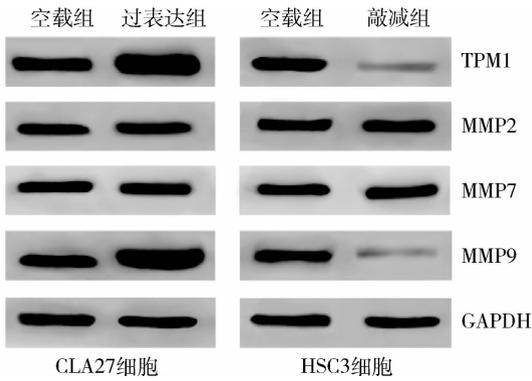


图 6 过表达以及敲减 TPM1 对 MMPs 蛋白表达的影响

腔鳞癌中的作用及其潜在机制仍然未知。

本研究探索了 TPM1 对口腔鳞状细胞癌细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响。研究发现 TPM1 在口腔鳞癌组织中高表达,提示 TPM1 可能是口腔鳞癌的不良预后指标。笔者分别在 CLA27 和 HSC3 细胞系过表达和敲低 TPM1,结果表明,TPM1 的过表达促进口腔鳞癌中的细胞增殖,敲减抑制了口腔鳞癌细胞增殖能力,说明干扰质粒成功转染了 CLA27 和 HSC3 细胞,并且调节了细胞中 TPM1 的表达。划痕实验显示过表达 TPM1 之后细胞的迁移能力显著增强,敲减之后迁移能力显著降低,说明 TPM1 表达对维持口腔鳞癌细胞的生长有重要作用。Transwell 实验发现过表达 TPM1 显著增强了细胞的侵袭能力,说明 TPM1 表达对维持口腔鳞癌细胞的迁移有重要作用。研究表明 MMPs 在调节肿瘤的侵袭、迁移和血管生成中发挥重要作用^[18]。本研究通过 Western blot 法检测表明 TPM1 的过表达显著上调 MMP9,而对 MMP2、MMP7 的表达没有影响,说明 TPM1 可能通过 MMP9 调节口腔鳞癌细胞的恶性表型。MMP9 主要来源于肿瘤细胞的分泌,其在肿瘤组织内的高表达可能在口腔鳞癌的侵袭和转移过程中起重要作用。该机制的发现有助于对口腔鳞癌侵袭和迁移的评价提供有意义的参数。但本研究仍然存在一些不足之处,TPM1 调节肿瘤发生、发展的机制有待于进一步探索,后续可通过动物实验进一步验证。

综上所述,TPM1 可能通过 MMP9 调节口腔鳞状细胞增殖、迁移和侵袭。TPM1 可能作为新型肿瘤标志物为口腔鳞状细胞癌的诊断治疗提供新的靶点。

参考文献

1 Najafi S, Payandeh M, Sadeghi M, *et al.* Phase II study of adjuvant docetaxel and carboplatin with/without doxorubicin and cyclophosphamide in triple negative breast cancer: a randomised controlled clinical

trial[J]. *Contemp Oncol: Pozn*, 2017, 21(1): 83-89

2 Noguti J, De Moura CF, De Jesus GP, *et al.* Metastasis from oral cancer: an overview[J]. *Cancer Genom Proteom*, 2012, 9(5): 329-335

3 丁迎, 马计, 方丽洁, 等. 自发性糖尿病大鼠的抑郁症行为与钙网织蛋白前体、原肌球蛋白 1、细胞分裂素活化蛋白激酶 1 和活化分裂素蛋白激酶 1 表达的关联[J]. *实用医学杂志*, 2019, 35(4): 552-556

4 许宁宁, 赵祥杰, 杨荣玲, 等. 原肌球蛋白过敏原的研究进展[J]. *食品与发酵科技*, 2019, 55(3): 83-85

5 Perry SV. Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function[J]. *J Muscle Res Cell Motil*, 2001, 22(1): 5-49

6 Touri K, Belguendouz H, Medjber O, *et al.* Propolis modulates NOS2/arginase-1 pathway in tropomyosin-induced experimental autoimmune uveitis[J]. *Inflammopharmacology*, 2018, 26(5): 1293-1303

7 Shin H, Kim D, Helfman DM. Tropomyosin isoform Tpm2.1 regulates collective and amoeboid cell migration and cell aggregation in breast epithelial cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(56): 95192-95205

8 Wang J, Guan J, Lu Z, *et al.* Clinical and tumor significance of tropomyosin-1 expression levels in renal cell carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(3): 1326-1334

9 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020[J]. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 2020, 70(1): 7-30

10 陈新, 徐文华, 周健, 等. 口腔鳞状细胞癌现状[J]. *口腔医学*, 2017, 37(5): 462-465

11 杨凯, 郭伟, 孙沫逸, 等. 口腔鳞状细胞癌时辰化疗中国专家共识[J]. *中国口腔颌面外科杂志*, 2019, 17(1): 7-12

12 Zhang WB, Wang Y, Mao C, *et al.* Oral squamous cell carcinoma with metastasis to the parotid lymph node[J]. *Chinese J Dent Res*, 2019, 22(3): 175-179

13 Gunning PW, Hardeman EC, Lappalainen P, *et al.* Tropomyosin-master regulator of actin filament function in the cytoskeleton[J]. *J Cell Sci*, 2015, 128(16): 2965-2974

14 Miao Q, Ma K, Chen D, *et al.* Targeting tropomyosin receptor kinase for cancer therapy[J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 175: 129-148

15 Farman GP, Rynkiewicz MJ, Orzechowski M, *et al.* HCM and DCM cardiomyopathy-linked α -tropomyosin mutations influence off-state stability and crossbridge interaction on thin filaments[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2018, 647: 84-92

16 Tang C, Wang J, Wei Q, *et al.* Tropomyosin-1 promotes cancer cell apoptosis via the p53-mediated mitochondrial pathway in renal cell carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5): 7060-7068

17 Pawlak G, McGarvey TW, Nguyen TB, *et al.* Alterations in tropomyosin isoform expression in human transitional cell carcinoma of the urinary bladder[J]. *Int J Cancer*, 2004, 110(3): 368-373

18 Liang S, Chang L. Serum matrix metalloproteinase-9 level as a biomarker for colorectal cancer: a diagnostic Meta-analysis[J]. *Biomarkers Med*, 2018, 12(4): 393-402

(收稿日期: 2020-04-08)

(修回日期: 2020-05-21)