

• 口腔医学 •

文章编号: 1002-0217(2019) 01-0075-05

PI3K/AKT 信号通路在促进口腔鳞癌侵袭转移中的作用

赵晓苇, 周静萍, 毕于蓝, 汪佳颖, 于 瑞, 王维康, 李先振

(皖南医学院 口腔医学院, 安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 研究 PI3K/AKT 信号通路在 TNF- α 诱导上皮间质转化(EMT) 发生时促口腔鳞癌侵袭转移中的作用。方法: 采用免疫蛋白印迹实验(western blot) 方法、实时荧光定量 RT-PCR, 分别从蛋白质、mRNA 水平检测炎症微环境中 PI3K/AKT 信号通路抑制剂作用前后关键因子表达变化。结果: TNF- α 作用后, PI3K/AKT 信号通路中关键因子 AKT 蛋白表达升高, E-钙黏蛋白 mRNA 表达降低, 而加入相应抑制剂 LY294002 后, AKT 的蛋白表达被抑制, E-钙黏蛋白较前者表达升高。结论: 抑制 PI3K/AKT 信号通路可降低 TNF- α 诱导 EMT 发生促口腔鳞癌细胞侵袭转移的作用。

【关键词】口腔鳞癌细胞; 肿瘤坏死因子- α ; 上皮间质转化; 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B

【中图分类号】R 739.8 **【文献标志码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2019.01.022

Role of PI3K/AKT signaling pathway in promoting invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma

ZHAO Xiaowei, ZHOU Jingping, BI Yulan, WANG Jiaying, YU Rui, WANG Weikang, LI Xianzhen

School of Stomatology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To observe the role of PI3K/AKT signaling pathway in promoting the invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma induced by TNF- α in patients with epithelial-mesenchymal transition (EMT). **Methods:** Western blot and real-time PCR were performed to detect the expression of key factors in inflammatory microenvironment before and after treatment with PI3K/AKT signal pathway inhibitor. **Results:** After TNF- α treatment, the expression of key factor AKT protein in PI3K/AKT signaling pathway was increased and E-cadherin mRNA expression was significantly decreased. The protein expression of PI3K/AKT was significantly inhibited after addition of corresponding inhibitor LY294002, and E-cadherin expression was significantly higher than that of the former. **Conclusion:** Inhibition of PI3K/AKT signaling pathway can weaken the role of EMT induced by TNF- α in promoting the invasion and metastasis of oral squamous carcinoma cells.

【Key words】oral squamous cell carcinoma; TNF- α ; epithelial-mesenchymal transition; PI3K/AKT

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目(201710368026); 皖南医学院大学生科研资助金项目(WK2016S11)

收稿日期: 2018-04-16

作者简介: 赵晓苇(1997-), 女, 2015 级口腔医学专业本科生, (电话) 15856982866, (电子信箱) 646679086@qq.com;

周静萍, 女, 教授, (电子信箱) 378686050@qq.com, 通信作者。

- [6] KUKREJA RA, DESAI MR, SABNIS RB, et al. Fluid absorption during percutaneous nephrolithotomy: does it matter[J]? J Endourol 2002, 16(4): 221-224.
- [7] ZHONG W, ZENG G, WU K, et al. Does a smaller tract in percutaneous nephrolithotomy contribute to high renal pelvic pressure and postoperative fever[J]? J Endourol 2008, 22(9): 2147-2151.
- [8] 刘欣, 姚宝庚, 朱欧奇, 等. 两种微创碎石手术治疗复杂性输尿管上段嵌顿性结石的疗效分析[J]. 实用临床医药杂志, 2015, 19(23): 124-125.
- [9] SONG G, GUO X, NIU G, et al. Advantages of tubeless mini-percutaneous nephrolithotomy in the treatment of preschool children under 3 years old[J]. J Pediatr Surg 2015, 50(4): 655-658.
- [10] 韩志刚, 陈鑫, 刘晓东, 等. 微创经皮肾镜钬激光碎石术治疗嵌顿性输尿管上段结石 68 例疗效分析[J]. 微创泌尿外科杂志, 2015, 4(5): 286-288.
- [11] MAURICES, LUTZT, JENSR, et al. Complications in percutaneous nephrolithotomy[J]. Europurol 2007, 51(4): 899-906.
- [12] 陈颖虎, 冉启华, 廖小强, 等. 经皮肾镜碎石取石术治疗上尿路结石 35 例分析[J]. 中国误诊学杂志, 2012, 12(3): 668.
- [13] 乔光华. 45 例上尿路结石致重度肾积水的临床治疗[J]. 中国实用医药, 2013, 8(16): 122-123.

口腔鳞癌占头颈部恶性肿瘤发病率第 1 位^[1]，其恶性程度较高，浸润性较强，易于复发和转移是其致死的主要原因^[2]。晚期口腔鳞癌多呈浸润性生长甚至远处转移，外科手术难以完全切除，而且传统的化疗效果也难以满意。上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT) 已被证明在促进原发肿瘤的侵袭和转移中起着关键的作用^[3]，前期研究结果显示: TNF- α 可以通过稳定表达转录因子 snail 促进口腔鳞癌细胞 EMT 的发生^[4]，但其过程中有众多信号转导通路的参与。

异常激活的 PI3K/AKT 信号通路已被证实与多种肿瘤的发生发展密切相关。PI3K 激活的关键因子 AKT 可以通过磷酸化作用于其下游靶蛋白 Bad、caspase9、mTOR 等从而促进细胞增殖，因此 AKT 在抗细胞凋亡中起到重要作用^[5]。

多项研究表明 PI3K/AKT 信号通路均可上调核转录因子 snail 的表达诱导肿瘤细胞发生 EMT，促进肿瘤细胞发生侵袭、转移，该过程是一个复杂的过程，关于其在口腔鳞癌中的研究相对较少。我们在口腔鳞癌细胞系中模拟炎症微环境，探究信号通路抑制剂作用前后关键因子的表达。观察 PI3K/AKT 信号通路在调控转录因子 snail 的表达诱导发生 EMT 中的作用，探讨口腔鳞癌发生侵袭转移的相关分子机制，寻找新的诊断标记物，并为实施新的治疗策略提供有力的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 人鳞癌 HN4、HN6、CAL27 细胞(ATCC 公司)；DMEM-F12 培养基(GIBCO 公司，美国)、TNF- α (Peprotech 公司，美国)、RealMaster Mix RT-PCR 试剂盒(天根，北京)、PI3K/AKT 信号通路抑制剂(LY294002)、鼠抗 AKT(碧云天，上海)、VS-840-KU 超净工作台(净化设备厂，苏州)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及传代 人鳞癌 HN4、HN6、CAL27 细胞于 DMEM-F12 完全培养液常规培养。细胞生长至 80%~90% 时，用 0.25% 胰蛋白酶消化铺板，培养一段时间待达到一定密度且细胞状态良好时，更换无血清培养液 12 h，使细胞同步化生长。

1.2.2 HN4、HN6、CAL27 口腔鳞癌细胞处理 本实验主要分为以下 3 组: 对照组、TNF- α 组、LY294002 组。对照组: 未加 TNF- α 、LY294002 的 HN4、HN6、CAL27 口腔鳞癌细胞; TNF- α 组: 浓度为 10 μ g/L 的 TNF- α 分别刺激 HN4、HN6、CAL27; LY294002 组:

浓度为 20 μ mol/L 的 LY294002 处理细胞，1 h 后加入浓度为 10 μ g/L 的 TNF- α 继续刺激。

1.2.3 蛋白质免疫印迹法(western blot) 取 TNF- α 组、LY294002 组细胞分别作用一段时间，并取相应对照组同时加入蛋白裂解液和 PMSF 提取细胞总蛋白。用 10%SDS-PAGE 凝胶将蛋白进行电泳分离，湿法转印至 NC 膜上，转膜结束后 5% 牛奶室温封闭 1 h，加入 AKT、P-AKT(Ser473) 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，二抗室温孵育 1.5 h，加显影液后放入化学发光分析仪中曝光获取图像信息，Image lab 软件扫描获取灰度值，校正内参，分析蛋白质表达情况。

1.2.4 实时荧光定量 PCR(real-time PCR) 取 72 h 的对照组、TNF- α 组、LY294002 组的细胞，采用 Trizol 试剂提取各细胞样本的总 RNA，将总 RNA 逆转录为 cDNA 后使用 7500ABI real-time PCR 仪，选用 β -actin 作为内参基因，目的基因引物序列如表 1 所示，上述过程均按试剂盒说明书步骤进行。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 相对定量法进行组间基因差异表达比较，获取数据。

1.3 统计学分析 实验中所有数据均使用 Graphpad Prism 6 软件进行统计分析并绘图，至少重复 10 次，单因素方差分析多组间差异， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 实时荧光定量 RT-PCR 所需引物序列

引物序列	基因名称
E-钙黏蛋白	F: AGGAGAGCGGTGGTCAAAGA
	R: GGTGCAACGCTCGTTACGACT

2 结果

2.1 TNF- α 作用前后、LY294002 抑制剂作用后口腔鳞癌细胞形态学变化(图 1) TNF- α 作用 72 h 前后口腔鳞癌细胞 HN4、HN6、CAL27 形态学变化。典型的鳞状上皮细胞形态发生改变，细胞间连接也变为松散，间距拉大，形成长梭状，与成纤维细胞形态相似，提示 TNF- α 作用于口腔鳞癌细胞后，可能逐渐发生了 EMT 的形态学改变。

抑制剂(LY294002) 与 TNF- α 联合作用 72 h 后口腔鳞癌细胞 HN4、HN6、CAL27 形态学表现为大多数细胞仍可见典型的上皮细胞形态，细胞拉长不明显，细胞间排列也较为紧密，提示 LY294002 处理 HN4、HN6、CAL27 细胞后，口腔鳞癌细胞的 EMT 发生可能受到一定程度的抑制。

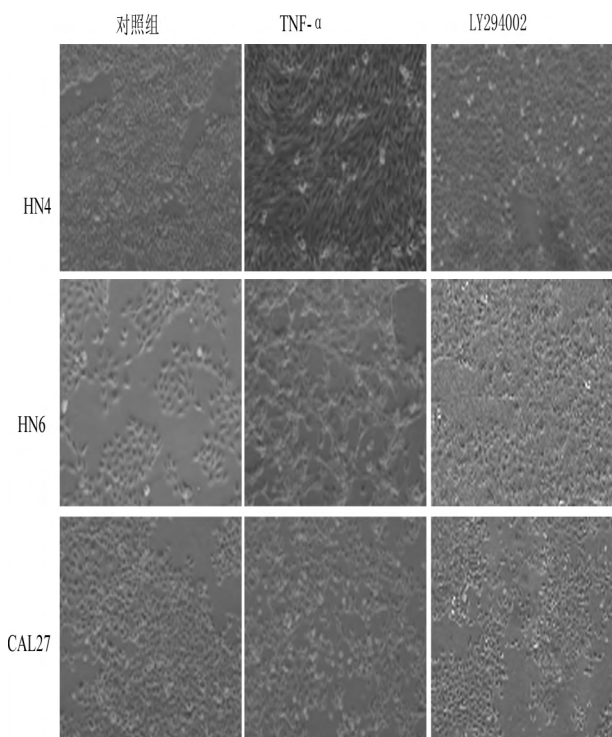
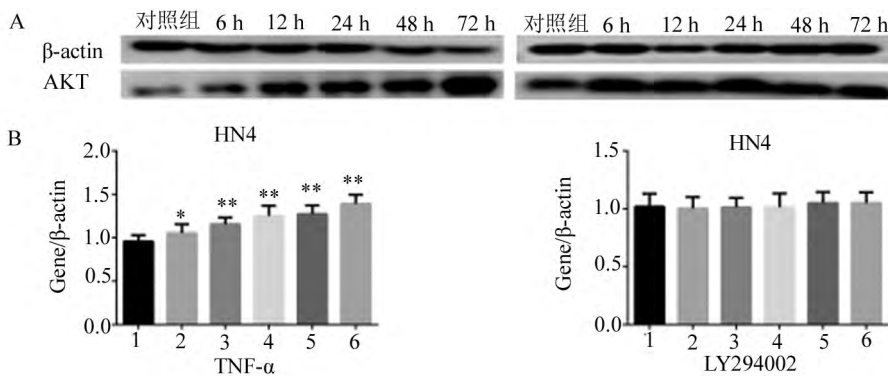


图1 TNF-α作用前后和LY294002抑制剂作用后口腔鳞癌细胞形态学变化(×100)

2.2 蛋白质免疫印迹法(western blot)检测TNF-α、

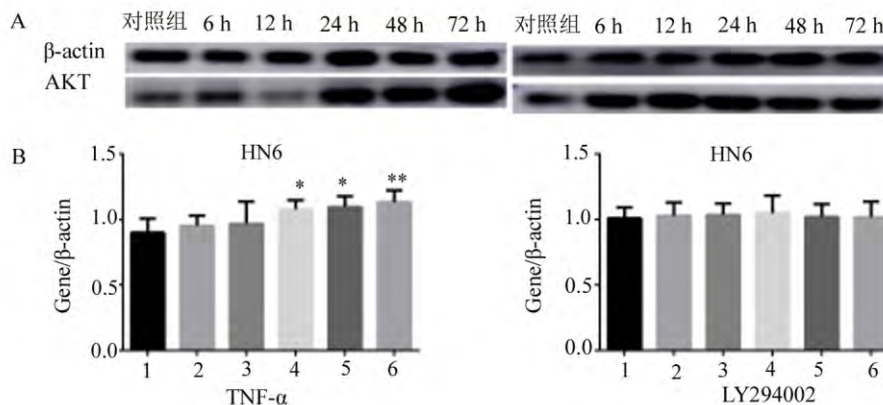
LY294002作用于口腔鳞癌细胞, AKT、P-AKT (Ser473)的蛋白表达 见图2~4。TNF-α分别刺激HN4、HN6、CAL27口腔鳞癌细胞6、12、24、48、72 h后与相应对照组同时收样, 每组实验各重复10次, 检测TNF-α作用于口腔鳞癌细胞后AKT、P-AKT的蛋白表达(图2A、3A、4A), 结果如下: 发现TNF-α作用后, PI3K/AKT信号通路中关键因子AKT蛋白表达上调, 且具有时间依赖性(图2B、3B、4B), HN4 ($F = 25.28, P < 0.01$)、HN6 ($F = 7.937, P < 0.01$)、CAL27 ($F = 7.267, P < 0.01$) 差异有统计学意义; P-AKT(Ser473)无明显变化趋势, 差异无统计学意义, $P > 0.05$ 。

在上述实验基础上, 用LY294002处理HN4、HN6、CAL27细胞, 1 h后加入TNF-α继续刺激6、12、24、48、72 h后与相应对照组, 每组实验各重复10次, 通过western blot检测AKT的蛋白表达(图2A、3A、4A), 结果如下: 可见LY294002作用后, AKT表达无明显变化趋势, HN4 ($F = 0.3763, P > 0.05$)、HN6 ($F = 0.1768, P > 0.05$)、CAL27 ($F = 0.7092, P > 0.05$) 差异无统计学意义, $P > 0.05$ (图2B、3B、4B)。



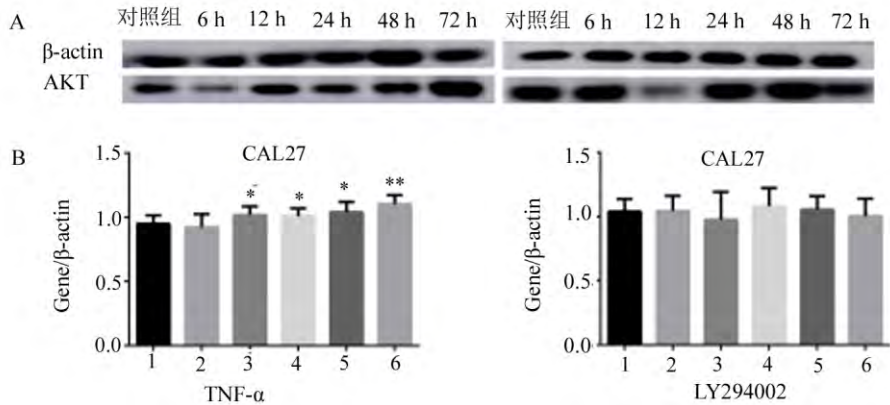
1.对照组; 2.6 h; 3.12 h; 4.24 h; 5.48 h; 6.72 h; * $P < 0.05$, ** $P < 0.0001$ 。

图2 western blot检测TNF-α、LY294002作用于HN4后AKT蛋白表达



1.对照组; 2.6 h; 3.12 h; 4.24 h; 5.48 h; 6.72 h; * $P < 0.001$, ** $P < 0.0001$ 。

图3 western blot检测TNF-α、LY294002作用于HN6后AKT蛋白表达



1.对照组; 2.6 h; 3.12 h; 4.24 h; 5.48 h; 6.72 h; * P<0.05 ,** P<0.0001。

图4 western blot 检测 TNF-α、LY294002 作用于 CAL27 后 AKT 蛋白表达

2.3 实时荧光定量 PCR 检测 E-钙黏蛋白表达情况

在 western blot 基础上 ,TNF-α 刺激口腔鳞癌细胞 HN4、HN6、CAL27 细胞 72 h ,结果显示 E-钙黏蛋白的表达低于对照组 ,HN4、HN6、CAL27 中分别是相应对照组的 0.190 倍($P<0.01$)、0.182 倍($P<0.01$)、0.366 倍($P<0.01$) ,提示 TNF-α 刺激后诱导细胞发生 EMT; 而用 LY294002 抑制剂处理口腔鳞癌细胞后 ,E-钙黏蛋白表达均较单纯 TNF-α 刺激升高 ,

HN4、HN6、CAL27 比 TNF-α 组分别相对升高 1.70 倍($P<0.01$)、2.30 倍($P<0.01$)、1.30 倍($P<0.01$) ; 而低于对照组 ,HN4、HN6、CAL27 中分别是对照组的 0.325 倍($P<0.01$)、0.418 倍($P<0.01$)、0.476 倍($P<0.01$) ,提示通路特异性抑制剂作用后 ,EMT 的发生受到一定程度的抑制 ,说明抑制 PI3K/AKT 信号通路能够在一定程度上抑制 EMT 的发生(图 5)。

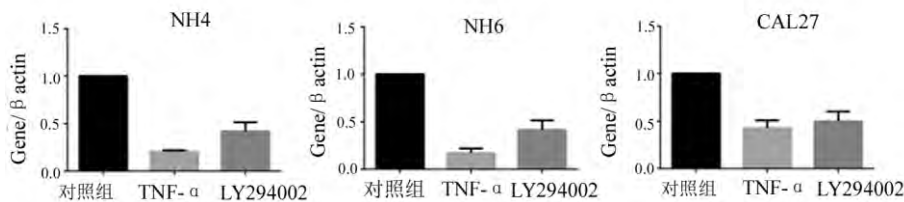


图5 实时荧光定量 PCR 检测 TNF-α 以及抑制剂作用前后 HN4、HN6、CAL27 细胞中 E-钙黏蛋白的表达

3 讨论

浸润性生长和发生远处转移是导致口腔鳞状细胞癌生存率低的主要原因 ,EMT 现象的发生是鳞癌侵袭和转移的关键一步 ,它使得上皮细胞获得间质表型或成纤维样特性 ,其主要标志是上皮标志物 E-钙黏蛋白缺失^[6]。研究证实肿瘤微环境中持续低剂量的 TNF-α 可以通过上调转录因子 snail 的表达 ,促进口腔鳞癌细胞发生 EMT^[4]。当肿瘤细胞发生 EMT 时 ,其由上皮细胞向间充质细胞转化 ,此时上皮标志物丢失 ,即 E-钙黏蛋白的表达会降低 ,相应的间充质标志物表达上升 ,这种变化会使细胞丧失极性 ,获得间质表型 ,形态拉长似成纤维细胞 ,细胞的黏附力下降 ,易于突破基底膜向下浸润 ,向周围及远处转移。实验中 ,我们发现在 TNF-α 作用后 ,典型的鳞状上皮细胞即铺路石样形态发生变化 ,表现为成纤维样特性 ,形态细长 ,且细胞间的连接减少 ,

空隙增大; 我们通过 RT-PCR 检测发现在 TNF-α 作用后 ,E-钙黏蛋白的表达明显降低 ,提示肿瘤细胞可能发生 EMT。

AKT 是 PI3K/AKT 信号通路的中心调节效应分子。通路中 PI3K 和 mTOR 可分别调节 Thr308 和 Ser473 这两个 AKT 的磷酸化位点(P-AKT) ,当两位点均磷酸化后 ,则可致 AKT 被完全活化 ,继而激活 mTOR ,使其下游靶分子 4EBP1 和 p70S6K 介导肿瘤细胞蛋白合成增加^[7]。因此 AKT 是连接细胞存活、增殖、凋亡和细胞代谢途径的重要节点^[8]。本实验在前期研究的基础上^[9-10] ,外源性 TNF-α 作用于体外培养的口 腔鳞癌细胞 ,western blot 检测 PI3K/AKT 信号通路中上述关键因子表达 ,结果显示 AKT 蛋白表达明显升高 ,且具有时间依赖性。说明 TNF-α 刺激后 ,PI3K/AKT 信号通路被激活 ,关键因子 AKT 表达上升。

为了进一步验证口腔鳞癌细胞侵袭转移的发生与 PI3K/AKT 信号通路的关系,我们再应用通路特异性抑制剂 LY294002 与 TNF- α 联合处理。发现细胞形态与对照组相似,基本保留上皮细胞形态;利用 western blot 检测抑制剂作用于口腔鳞癌细胞后,发现 AKT 的蛋白表达与对照组相似,无明显变化趋势,表明通路抑制剂作用后,AKT 表达下降,PI3K/AKT 信号通路在一定程度上被抑制。同时我们通过 RT-PCR 发现,E-钙黏蛋白的表达均升高,即 LY294002 作用于口腔鳞癌细胞后,通过 PI3K/AKT 信号通路抑制了炎症因子 TNF- α 通过调节 snail 促进 EMT 发生的能力,说明抑制 PI3K/AKT 信号通路可降低口腔鳞癌细胞侵袭转移的作用。但 E-钙黏蛋白的表达较对照组仍降低,这可能是由于该基因表达同时受多个信号通路调控,可能有其他信号通路参与所致,如由于在功能上 MAPK 与 PI3K/AKT 信号通路十分相似,因为研究表明他们之间存在一定的联系。人们发现 MAPK 的活性可以被 PI3K 的抑制剂减弱,比如在几内亚猪嗜中性粒细胞中,可以部分抑制血小板活化因子诱导激活 MAPK 的活性;wortmannin(一种 PI3K 的 P110 亚基的特异性抑制剂)会阻断 CD3 抗体诱导的 T 细胞 ERK2 的活化及在兔骨骼肌中 MAPK 的活化。Rane 等分别在 SB203580(MAPK 通路信号抑制剂)、wortmannin、LY294002 存在和不存在的条件下检测乙酰甲硫氨酸-亮氨酸-苯丙氨酸刺激的嗜中性粒细胞中的 AKT Ser473 的磷酸化水平,最终结果发现,SB203580、wortmannin、LY294002 可以抑制 AKT 磷酸化,说明 PI3K 和 MAPK 均可以调节 AKT 的活性^[11]。或者也可能是通路中存在负反馈调节机制,以上这些都仍待我们进一步研究。

综上所述,本研究显示 TNF- α 可通过上调 PI3K/AKT 信号通路中关键因子,增强口腔鳞癌细胞侵袭转移的能力,而通路特异性抑制剂作用后,

TNF- α 促进口腔鳞癌细胞侵袭转移的能力明显受到抑制,表明 PI3K/AKT 信号通路与口腔鳞癌细胞侵袭转移的作用密切相关。我们在研究中也发现,肿瘤细胞的侵袭转移并非单一通路所调控,与其他通路之间的具体相互关系还有待进一步研究,只有对这些通路更为彻底的研究,并在此基础上采取特定的措施,才有望完全抑制肿瘤细胞侵袭转移能力。

【参考文献】

- [1] 陈新,徐文华,周健,等.口腔鳞状细胞癌现状[J].Stomatology, 2017, 37(5): 462-465.
- [2] BAVLE RM, VENUGOPAL R, KONDA P *et al.* Molecular classification of oral squamous cell carcinoma [J]. J Clin Diagn Res, 2016, 10(9): 18-21.
- [3] DE CRAENE B, BERX G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression [J]. Nature Reviews Cancer, 2013, 13: 97-110.
- [4] 高振林,杨聪翀,许小会,等. TNF- α 调控基质金属蛋白酶促口腔癌细胞侵袭转移的实验研究[J]. 口腔医学, 2014, 34(1): 9-12.
- [5] 韦柳婷,冯洁,莫书荣. PI3K-Akt 信号通路与肿瘤相关性的研究进展[J]. 肿瘤学杂志, 2014, 20(4): 331-336.
- [6] 赵志娟,袁宏伟,韦玄,等. 上皮间质转化相关基因在口腔鳞癌中的相关性及其与临床病理特征的关系研究[J]. 临床口腔医学杂志, 2014, 30(9): 515-519.
- [7] 凡丞,鲁照明,张幸丽,等. 食管鳞癌 Eca109 细胞中 PI3K/AKT/mTOR 信号通路对 LSD1 的调控作用[J]. 郑州大学学报(医学版), 2017, 52(5): 531-535.
- [8] MORALES-RUIZ M, SANTEL A, RIBERA J *et al.* The role of akt in chronic liver disease and liver regeneration [J]. Seminars in Liver Disease, 2017, 37(1): 11-16.
- [9] ZHOU JP, TAO DT, XU Q *et al.* Expression of E-cadherin and vimentin in oral squamous cell carcinoma [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(3): 3150-3154.
- [10] ZHOU JP, GAO ZL, ZHOU ML *et al.* Snail interacts with Id2 in the regulation of TNF- α -induced cancer cell invasion and migration in OSCC [J]. Am J Cancer Res, 2015, 5(5): 1680-1691.
- [11] 袁向飞,陆敏. Ras/MAPK 与 PI3K/Akt 信号转导通路及其相互作用[J]. 国际检验医学杂志, 2006(3): 261-263.