

尿激酶型纤溶酶原激活因子调控人头颈部鳞状细胞癌转移的功能与机制研究

白艳萍, 崔晓波*

(内蒙古医科大学附属医院 耳鼻咽喉科, 内蒙古 呼和浩特 010050)

【摘要】目的 探究尿激酶型纤溶酶原激活因子(urokinase-type plasminogen activator, PLAU)在头颈部鳞状细胞癌中的表达以及转移中的作用, 并对其相关分子机制进行研究。**方法** 实验室培养人咽鳞癌细胞株FaDu细胞与人喉癌细胞株TU686细胞; 使用siRNA靶向敲减/过表达PLAU基因后, 利用qRT-PCR和Western Blot实验验证转染效率; Transwell与细胞划痕实验检测肿瘤细胞的侵袭、迁移能力变化情况; 检测N-钙黏蛋白、锌指转录蛋白、波形蛋白在HNSCC细胞中表达的情况, 分析其表达与PLAU对肿瘤远处转移的相关性。**结果** PLAU在HNSCC中高表达, 组间差异有统计学意义($P < 0.05$), 且晚期或复发转移性HNSCC中的PLAU明显高表达于早期或原位癌。过表达PLAU有促进喉癌细胞转移的能力, PLAU可能调控N-钙黏蛋白、锌指转录蛋白、波形蛋白等诱导头颈部肿瘤的转移组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** PLAU可能是通过细胞-间充质转化过程促进HNSCC的迁移和侵袭。

【关键词】 头颈部鳞状细胞癌; 尿激酶型纤溶酶原激活因子; 转移

中图分类号: R739.91

文献标识码: A

文章编号: 2095-512X(2024)01-0006-05

STUDY ON THE FUNCTION AND MECHANISM OF PLAU IN REGULATING THE METASTASIS OF HUMAN HNSCC

BAI Yanping, CUI Xiaobo*

(Department of Otolaryngology, The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China)

【Abstract】 Objective This topic is to study the expression of PLAU in head and neck squamous cell carcinoma and its role in metastasis, and to study its related molecular mechanism. **Methods** Cultivate human pharyngeal squamous cell carcinoma cell line FaDu and human laryngeal cancer cell line TU686 in the laboratory. After targeted knockdown/overexpression of the PLAU gene using siRNA, the transfection efficiency was validated using qRT-PCR and Western Blot experiments; Transwell and cell scratch assay were used to detect changes in the invasion and migration ability of tumor cells; Detect the expression of N-cadherin, zinc finger transcription protein, and vimentin in HNSCC cells, and analyze their correlation with PLAU in distant tumor metastasis. **Results** PLAU was highly expressed in HNSCC, and the difference between the groups was statistically significant ($P < 0.05$), and PLAU in advanced or recurrent metastatic HNSCC was significantly overexpression in early or Carcinoma in situ. The overexpression of PLAU has the ability to promote the metastasis of laryngeal cancer cells. PLAU may regulate the metastasis of head and neck tumors induced by N-cadherin, zinc finger transcription protein, Vimentin, etc. The difference between groups is statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** PLAU may promote the migration and invasion of HNSCC induced cell mesenchymal transition.

【Keywords】 Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC); Urokinase type plasminogen activator (PLAU); Metastasis

头颈癌是全球第七大常见癌症^[1], 2021年中国确诊头颈癌患者约14.8万, 每年有7.8万患者因头颈部肿瘤死亡^[2]。头颈部恶性肿瘤中较多见的有喉

癌、鼻咽癌、下咽癌等, 以男性居多。头颈部恶性肿瘤常出现转移, 最常见的远处转移部位是肺部, 转移者预后较差, 中位生存期仅几个月。头颈部鳞状

收稿日期: 2023-04-18; 修回日期: 2023-07-22

第一作者: 白艳萍(1992—), 女, 2020级在读硕士研究生。E-mail: 1534715459@qq.com

*通信作者: 崔晓波, 男, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师。研究方向: 头颈部肿瘤方向。E-mail: cxbgh@sina.com

细胞癌具有发病部位多、病理类型复杂^[3]、极易发生淋巴转移及复发等特性。

肿瘤细胞在机体内想要转移必须先突破包裹在其周围的细胞外基质成分,为此,肿瘤细胞自身分泌多种蛋白酶来分解细胞外基质,如丝氨酸蛋白酶。尿激酶型纤溶酶原激活因子(urokinase-type plasminogen activator, uPA, 别名PLAU)正是丝氨酸蛋白酶类中的一种,广泛存在于血液及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中。越来越多的研究^[4]证据表明PLAU在多种恶性肿瘤的增殖、转移和血管生成过程中发挥着重要作用,并且存在作为诊断生物标志物和治疗靶点的可能性。目前,PLAU在人头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)细胞中的表达水平,对肿瘤细胞的迁移和侵袭的影响以及相关调控机制尚未见报道。PLAU可以激活纤溶酶原,降解肿瘤细胞周围的基质,促进肿瘤细胞发生上皮-间质转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT),进而促进肿瘤细胞发生转移^[5]。EMT与肿瘤细胞的侵袭和转移有着密切的关系。在这一过程中,多种蛋白及转录因子如锌指蛋白Slug、Snaili等均可下调E-钙黏着蛋白(E-cadherin, E-cad)的表达而促进EMT,本研究设计实验验证EMT过程中的关键蛋白与PLAU的相关性,探究PLAU调控肿瘤细胞转移的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人咽鳞状癌细胞FaDu细胞、人喉癌细胞TU686细胞(购自上海中科院细胞库),靶向PLAU基因敲减/过表达质粒(北京唯创博精生物科技有限公司设计合成),RPMI-1640培养基(Hyclone,美国),胎牛血清(Biological Industries,美国),胰蛋白酶(Gibco),蛋白提取试剂盒(购自上海碧云天生物公司),WB电泳凝胶配置试剂盒(购自北京雷根生物技术有限公司),细胞RNA提取试剂盒(购自武汉赛维尔生物科技有限公司),qRT-PCR试剂盒(购自武汉赛维尔生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与转染 人咽鳞状癌细胞FaDu细胞和TU686细胞使用RPMI1640培养基、10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素双抗,于37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养,将两株细胞分为对照组(siCtrl)、敲减组1(siPLAU#1)、敲减组2(siPLAU#2)、过表达组

(PLAU)以及过表达对照组(Ctrl)。将处理好的细胞配置成 2×10^5 /mL的细胞悬液,铺于6孔板中,每孔加2 mL细胞悬液,待细胞贴壁后,加入敲减/过表达转染质粒及转染试剂,在培养箱中共同培养48 h,转染效率如图1,进行下一项实验。

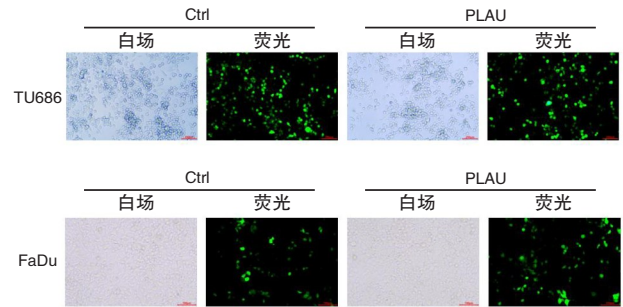


图1 转染效率图

Fig.1 Transfection efficiency diagram

1.2.2 qRT-PCR和Western Blot qRT-PCR:各组细胞RNA使用RNA提取试剂盒提取,再使用逆转录试剂盒将提取出的RNA逆转录为cDNA,上机进行qRT-PCR扩增,实验重复3次,数据以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量。Western Blot:取一定数量的各组细胞,裂解细胞提取蛋白,在10%的SDS-PAGE胶中电泳分离蛋白,将分离开的蛋白转移至PVDF膜上,封闭液封闭2 h,于4℃冰箱中孵育一抗过夜,二抗孵育1 h, TBST洗膜后曝光成像,实验重复3次。

1.2.3 细胞迁移和侵袭实验 细胞迁移实验:收集一定数量处理好的各组细胞,配置成 2×10^5 /mL个的细胞悬液,铺于6孔板中,每孔加2 mL细胞悬液,待细胞贴壁并生长至85%,使用灭菌的200 μ L枪头垂直于6孔板中央十字划线,并于6孔板底部记号笔标记,更换无血清RPMI-1640培养基,分别与0 h、24 h、48 h倒置显微镜拍照,实验重复3次。细胞侵袭实验:收集一定数量处理好的各组细胞,将细胞铺入24孔板上层Transwell小室中,每室100 μ L,下层24孔板中加入500 μ L 20%血清的RPMI-1640培养基。培养48 h后,多聚甲醛固定细胞,0.1%结晶紫染色,PBS洗去多余颜色,拍照,实验重复3次。

1.3 统计学方法

所有数据实验均运用SPSS 25.0软件进行分析,采用非配对的t检验进行两组之间的比较。3组及以上的比较,采用方差分析,并采用多重分析两两比较。实验均重复3次,数据结果记录均采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)来呈现。检验水准为 $\alpha=0.05$, $P < 0.05$ 说明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 qRT-PCR 和 Western Blot 验证人 HNSCC 细胞株 TU686 与 FaDu 细胞中敲减/过表达 PLAU 结果

qRT-PCR 实验分别检测 TU686、FaDu 细胞中敲减组 1、敲减组 2 与对照组中 PLAU mRNA 浓度后进行数据分析。结果如图 2A 所示, TU686、FaDu 细胞中敲减组 1 与敲减组 2 的 PLAU mRNA 相对表达量显著低于对照组, 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

Western Blot 实验分别检测 TU686、FaDu 细胞中敲减组 1、敲减组 2 与对照组中 PLAU 蛋白表达水平, 结果如图 2B 所示, TU686、FaDu 细胞中敲减组 1 与敲减组 2 的 PLAU 蛋白表达水平显著低于对照组, 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

qRT-PCR 检测 TU686、FaDu 细胞中过表达组与对照组结果如图 2C 所示, 过表达组的 PLAU mRNA 相对表达量显著高于对照组, 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

Western Blot 检测 TU686、FaDu 细胞中过表达组与对照组结果如图 2D 所示, 过表达组的 PLAU 蛋白表达水平量显著高于对照组, 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。综上所述, PLAU mRNA 以及蛋白的

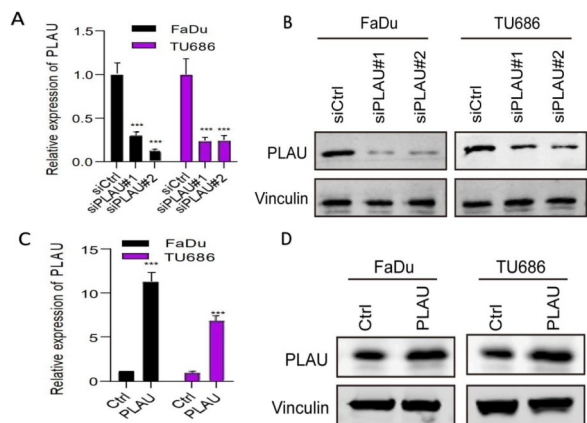


图2 敲减/过表达 PLAU 基因后 HNSCC 细胞中 PLAU mRNA 以及蛋白的表达情况

Fig.2 mRNA and protein expression of Knock-down/OverExpressed PLAU gene in HNSCC cells

注: (A) qRT-PCR 和 (B) Western Blot 检测敲减 PLAU 后 FaDu 和 TU686 细胞中的表达情况。(C) qRT-PCR 和 (D) Western Blot 检测过表达 PLAU 后 FaDu 和 TU686 细胞中的表达情况。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

(A) qRT-PCR and (B) Western Blot were used to detect the expression of FaDu and TU686 cells after Knock-down PLAU. (C) qRT-PCR and (D) Western Blot were used to detect the expression of PLAU in FaDu and TU686 cells after OverExpressed PLAU. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

表达水平均可提示, 敲减 PLAU 基因使得 HNSCC 细胞中 PLAU mRNA 相对表达量明显降低, 而过表达 PLAU 使得 HNSCC 细胞中 PLAU 蛋白相对表达水平明显升高。

2.2 敲减/过表达 PLAU 对头颈部鳞状细胞癌细胞迁移和侵袭能力的影响

2.2.1 细胞划痕实验结果 划痕实验 24 h 后 TU686 细胞株中 PLAU 过表达组相较于对照组迁移面积增加 (见图 3A), PLAU 敲减组相较于对照组迁移面积降低 (见图 3B)。通过 24 h 后迁移率发现, PLAU 过表达组的细胞迁移面积高于对照组, 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明过表达 PLAU 可促进细胞的迁移能力; 而敲减 PLAU 后, 细胞迁移面积低于对照组, 组间差异同样具有统计学意义 ($P < 0.05$)。这表明敲减 PLAU 后 HNSCC 细胞迁移能力下降。

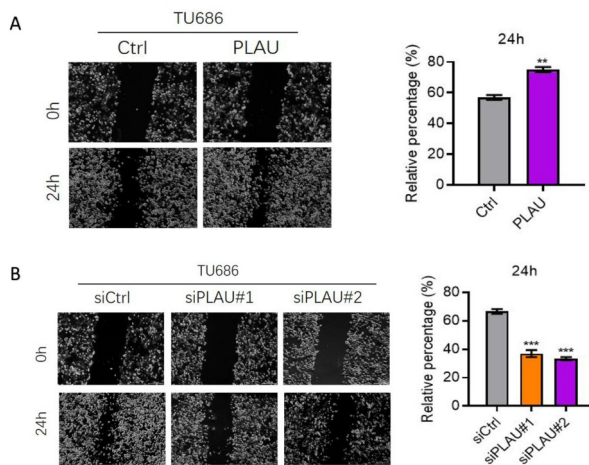


图3 PLAU 改变对 TU686 细胞株细胞迁移能力的影响。 (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

Fig.3 The effect of changes in PLAU on the cell migration ability of TU686 cell line. (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

注: (A) 划痕实验 24 h 后 TU686 细胞株中 PLAU 过表达组相较于对照组迁移面积增加 ($P < 0.01$)。

(B) 划痕实验 24 h 后 TU686 细胞株中 PLAU 敲减组相较于对照组迁移面积降低 ($P < 0.001$)。

(A) After 24 hours of Wound-Healing, the migration area of the TU686 cell line in the PLAU Overexpression group increased compared to the control group ($P < 0.01$).

(B) After 24 hours of Wound-Healing, the migration area of the PLAU Knock-down group in TU686 cell line decreased compared to the control group ($P < 0.001$).

2.2.2 Transwell 细胞侵袭实验结果 Transwell 细胞侵袭实验检测过表达 PLAU 后 TU686 与 FaDu 细胞迁移能力的改变, 结果发现, 24 h 时 PLAU 过表达组穿过基底膜的细胞数多于对照组, Transwell 转移率

上升(t 值分别为18.15、7.943, $P < 0.05$), 组间差异有统计学意义(见图4A); 分别敲减PLAU后TU686和FaDu细胞相比于对照组穿过基底膜的细胞数均下降, Transwell转移率均下降(t 值分别为6.424、8.061, $P < 0.05$), 组间差异有统计学意义(见图4B)。

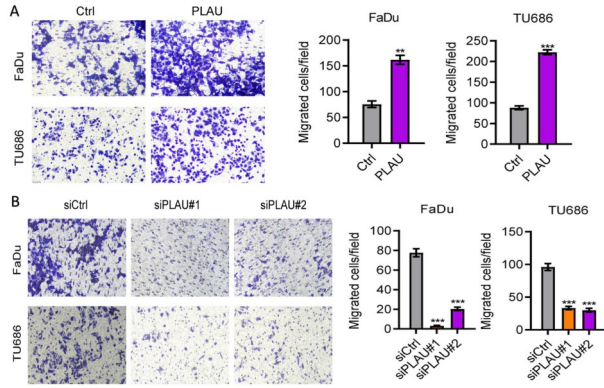


图4 PLAU改变对TU686和FaDu细胞株细胞侵袭能力的影响。
(** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

Fig.4 The effect of changes in PLAU on the invasive ability of TU686 and FaDu cell lines.
(** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

注: (A)左图为TU686与FaDu细胞PLAU过表达组对比对照组穿过基底膜的细胞数增多, 右图为转移细胞数统计分析图(** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$), 组间差异具有统计学意义。(B)左图为TU686与FaDu细胞敲减PLAU组对比对照组穿过基底膜的细胞数减少, 右图为转移细胞数统计分析图(** $P < 0.001$), 组间差异具有统计学意义。

(A) The left figure shows an increase in the number of cells crossing the basement membrane in the TU686 and FaDu cell PLAU Overexpression groups compared to the control group. The right figure shows a statistical analysis of the number of metastatic cells (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$), with statistically significant differences between the groups.

(B) The left figure shows a decrease in the number of cells crossing the basement membrane in the TU686 and FaDu Knock-down PLAU groups compared to the control group, while the right figure shows a statistical analysis of the number of metastatic cells (** $P < 0.001$), with statistically significant differences between the groups.

2.3 PLAU可能通过调节N-Cad、Vimentin、Slug参与HNSCC细胞的EMT过程

为了进一步阐明PLAU在EMT通路中的作用, 本研究采用Western Blot实验分别在FaDu和TU686细胞株检测了EMT相关标志物。研究发现在过表达PLAU组中, N-钙黏蛋白(N-Cad)、锌指转录蛋白(Slug)、波形蛋白(Vimentin)的蛋白表达水平较对照组明显上调(图5A), 而在敲减PLAU组中, 上述蛋白水平明显下调(见图5B)。因此, PLAU与EMT过程中的N-Cad、Vimentin、Slug存在明显正相关性, PLAU可通过调节EMT过程中关键蛋白来影响HNSCC细胞的迁移和侵袭能力。

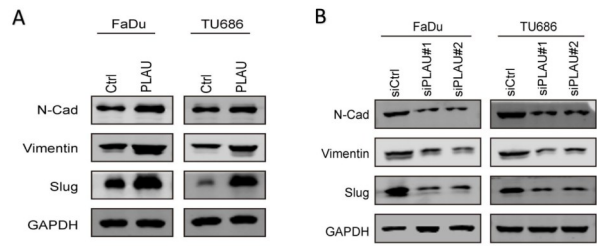


图5 PLAU改变对TU686和FaDu细胞株EMT过程中关键蛋白的影响

Fig.5 The effect of PLAU changes on key proteins during EMT in TU686 and FaDu cell lines

注: (A)PLAU过表达后FaDu和TU686细胞株中N-钙粘蛋白(N-Cad)、锌指转录蛋白(Slug)、波形蛋白(Vimentin)的表达水平较对照组明显上调。(B)PLAU敲减后FaDu和TU686细胞株中N-钙粘蛋白(N-Cad)、锌指转录蛋白(Slug)、波形蛋白(Vimentin)的表达水平较对照组明显降低。

(A) After Overexpression of PLAU, the expression levels of N-Cad, Slug, and vimentin in FaDu and TU686 cell lines were significantly upregulated compared to the control group. (B) After PLAU Knock-down, the expression levels of N-Cad, Slug, and vimentin in FaDu and TU686 cell lines were significantly reduced compared to the control group.

3 讨论

通过对TCGA的分析, 发现PLAU在多种肿瘤中表达, 结果表明PLAU在HNSCC、前列腺癌、食管癌、子宫内膜癌等多种癌细胞中存在差异表达。通过分析TCGA数据库下载的发生局部晚期或复发转移性HNSCC数据集, 显示TCGA样本中HNSCC肿瘤组织中的PLAU转录水平显著升高。PLAU高表达可显著降低前列腺癌、食管癌、子宫内膜癌患者的总体生存期。

纤溶酶原激活物尿激酶, 也称为纤溶酶原激活剂, 是一种将纤溶酶原转化为纤溶酶的丝氨酸蛋白酶, 可水解细胞外基质, 重塑蛋白并激活生长因子^[6]。越来越多的证据^[7]表明, PLAU在各种恶性肿瘤中均存在一定的作用。然而, 在HNSCC中PLAU的研究有限, 因此, 其作用在很大程度上仍然未知。在本研究中, 我们评估了PLAU在HNSCC中的表达和预后。

免疫组织学染色结果证实了HNSCC细胞中PLAU的上调。这表明它在HNSCC的发生和发展过程中发挥了重要的致癌作用。值得一提的是, PLAU的表达水平与肿瘤分级显著相关。通过基因富集分析可以观察到细胞黏附、EMT过程的增强以及细胞外基质的异常, 可以推测PLAU上调可促进HNSCC肿瘤的迁移和侵袭, 并与临床上患者淋巴转移和远端转移的发生息息相关。根据上述实验结

果,我们可以得出敲减PLAU可以抑制HNSCC细胞的迁移和侵袭。而过表达PLAU可以促进HNSCC细胞的迁移和侵袭。与此同时,PLAU还与EMT过程中的其他调节因子(N-Cad、Vimentin、Slug)有明显的正相关性。结果与BLASI等^[8]的研究结果一致,他们构建了COX回归模型并验证了GEO数据库中的生存结果。多种类型的PLAU基因型改变,包括mRNA上调、扩增和错义突变等,均可以在很大程度上导致PLAU的过度表达。这些结果与我们的观察结果一致,表明在HNSCC中PLAU诱导的EMT过程需要N-钙黏蛋白、锌指转录蛋白、波形蛋白参与^[9]。本研究可以明确PLAU在HNSCC中起到致癌基因和有效生物标志物的作用,且通过HNSCC中的EMT过程调节增殖和迁移。因此,我们可以根据PLAU表达水平的依赖性来制定HNSCC的个体化医疗策略。

综上所述,我们可以得出PLAU在HNSCC中表达上调,促进HNSCC肿瘤的侵袭和迁移,并且与EMT过程中的关键蛋白成正相关性;通过敲低PLAU可以显著抑制肿瘤细胞的侵袭和转移,并抑制肿瘤细胞的EMT过程。本研究表明PLAU是HNSCC的促癌基因之一,且可能通过诱导上皮细胞-间充质转化过程促进HNSCC的迁移和侵袭,可作为HNSCC患者潜在治疗靶点和一种新的生物诊断标志物。

(上接第5页)

- biophysical effects and related mechanisms of low-intensity pulsed ultrasound[J]. Chinese Journal of Medical Physics, 2019(5):605-609.
- [10]郭霜,满江位,姜春倩,等.低强度脉冲超声的生物物理学效应及相关机制的研究进展[J].中国医学物理学杂志,2019,36(5):605-609.
- [11]PENG X, SHIHAO S, XUEPING L, et al. Low-intensity pulsed ultrasound treatment at an early osteoarthritis stage protects rabbit cartilage from damage via the integrin/focal adhesion kinase/mitogen-activated protein kinase signaling pathway[J]. Ultrasound Med, 2015,34:61-69.
- [12]FEI S, JIN X, WEN CJ, et al. Low-intensity pulsed ultrasound alleviates osteoarthritis condition through focal adhesion kinase-mediated chondrocyte proliferation and differentiation [J]. CARtilAge, 2020,12(3):196-203.
- [13]AKEMI K A, IKUO Y, TAKASHI O, et al. Low-intensity pulsed ultrasound stimulation for mandibular condyle osteoarthritis lesions in rats [J]. Oral Diseases, 2018,24:600-610.
- [14]WANG Y, WU C F, QIN Y, et al. Multi-angle investigation of the fractal characteristics of nanoscale pores in the lower cambrian niutitang shale and their implications for CH₄

参考文献

- [1]张志愿,孙树洋.转化医学视角下头颈癌人性肿瘤异种移植瘤模型队列的研究愿景[J].华西口腔医学杂志,2021,39(6):617-623.
- [2]XIA C, DONG X, LI H. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants[J]. Chin Med J, 2022,135(5):584-590
- [3]李冬梅,吕祎梅,道日娜.窄带成像内镜技术对于喉部增生性病筛查的意义.内蒙古医科大学学报,2020,42(5):459-463.
- [4]BREDEMEIER M, EDIMIRIS P, MACH P, et al. Gene expression signatures in circulating tumor cells correlate with response to therapy in metastatic breast cancer[J]. Clin Chem, 2017,63(10):1585-1593
- [5]刘复生,刘彤华.肿瘤病理学[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1997:188
- [6]ARGIRIS A. Head and neck cancer[J]. Lancet,2008,371(9625):1695-1709
- [7]卢兴国,徐根波,王彩花,等.癌症患者尿激酶型纤溶酶原激活物及其受体检测的临床意义[J].实用癌症杂志,2002,17(5):530-532
- [8]BLASI F, SIDENIUS N. The urokinase receptor: focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling[J]. FEBS Lett, 2010,584(9):1923-1930
- [9]BURKLY L C, MICHAELSON J S, ZHENG T S. TWEAK/Fn14 pathway: an immunological switch for shaping tissue responses [J]. Immunol Rev, 2011,244(1):99-114
- adsorption[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2021,21:156-167.
- [15]廖建钊,夏天.细胞外基质在骨关节炎发生、发展中的作用及临床研究价值 [J]. 中国组织工程研究, 2022, (4): 1937-1943.
- [16]DENG J, FUKUSHIMA Y, NOZAKIKI, et al. Anti-inflammatory therapy for temporomandibular joint osteoarthritis using mRNA medicine encoding interleukin-1 receptor antagonist[J]. Pharmaceutics, 2022,14(1785):1-14.
- [17]WU Z Y, LUAN Z W, ZHANG X H, et al. Chondro-protective effects of polydatin in osteoarthritis through its effect on restoring dysregulated autophagy via modulating MAPK, and PI3K/Akt signaling pathways [J]. Scientific Reports, 2019,9:13906.
- [18]YAN X, WANG W Y. The effect of calcitonin on chondrocyte inflammatory response and p38 MAPK signaling pathway[D]. North China University of Science and Technology, 2015.
- [19]ZHANG Z Y, YUAN L C, LIU Y F, et al. Integrated cascade nanozyme remodels chondrocyte inflammatory microenvironment in temporomandibular joint osteoarthritis via inhibiting ROS-NF-κB and MAPK pathways[J]. Adv Healthc Mater, 2023,12(10):e2203195.