

文章编号: 1000-5862(2014)04-0367-03

# 盐酸埃克替尼对 ACC-M 细胞 MMP-2、 E-cadherin 蛋白表达的影响

杨彩玲<sup>1</sup>, 韩金红<sup>2</sup>, 王伟新<sup>1</sup>, 崔卫刚<sup>2\*</sup>

(1. 新乡医学院第一附属医院口腔科, 河南 卫辉 453100; 2. 新乡医学院基础医学院, 河南 新乡 453003)

**摘要:** 盐酸埃克替尼是一种表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂, 利用免疫细胞化学方法和间接免疫荧光联合流式细胞技术, 检测它在体外对人涎腺腺样囊性癌细胞株(ACC-M) MMP-2、E-cadherin 蛋白表达的影响。结果表明: 盐酸埃克替尼可降低 MMP-2 蛋白表达, 增加 E-cadherin 蛋白表达, 可抑制人涎腺腺样囊性癌 ACC-M 细胞的浸润、转移。

**关键词:** 盐酸埃克替尼; ACC-M 细胞; MMP-2; E-cadherin

**中图分类号:** R 734.2

**文献标志码:** A

## 0 引言

盐酸埃克替尼是我国自主研发的第一种表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂, 可抑制人表皮细胞癌、胃腺癌细胞的生长增殖<sup>[1-2]</sup>, 它通过负性调控 AKT 信号通路抑制非小细胞肺癌的生长<sup>[3]</sup>, 在体外可抑制人舌鳞癌 Tca8113 细胞的生长、增殖<sup>[4-5]</sup>, 但是它对人涎腺腺样囊性癌 ACC-M 细胞的作用如何, 还未见相关研究报道。笔者拟通过体外研究, 探讨该抑制剂对体外培养的人涎腺腺样囊性癌 ACC-M 细胞 MMP-2、E-cadherin 蛋白表达的影响, 探讨其是否可抑制 ACC-M 细胞的浸润、转移。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

细胞培养箱(美国, Forma 公司), 流式细胞仪(德国, Partec 公司), 人癌细胞株 ACC-M(人涎腺腺样囊性癌细胞, 上海, 上海交通大学口腔医学院), 盐酸埃克替尼(杭州, 浙江贝达药业有限公司), RPMI1640 培养基(美国, Gibco 公司), 新生小牛血清(杭州, 杭州四季青生物工程材料公司), MMP-2、E-cadherin(美国, Santa Cruz 公司), 通用型 S-P 超敏试剂盒、DAB 试剂盒(北京, 北京中杉金桥生物技术公司)。

### 1.2 实验方法

1) 细胞培养: 人涎腺腺样囊性癌 ACC-M 细胞, 将含有  $1.0 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$  链霉素、 $1.0 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$  青霉素, 以及含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基, 放在温度为  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的恒温培养箱中培养, 每 2 d 换 1 次培养液, 当细胞贴壁生长密度达到 80% 左右时, 传代。

2) 免疫细胞化学检测: 在 6 孔培养板内进行细胞爬片, 当细胞生长后的密度大于  $1.0 \times 10^8 \text{ 个} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 按照  $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的浓度配制盐酸埃克替尼溶液, 分别加入相应标记孔中, 放在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的恒温培养箱内培养 48 h。MMP-2 与 E-cadherin 蛋白一抗工作液浓度均为 1: 100, 在阴性对照组里, 用 PBS 液代替一抗工作液。严格按照说明书的染色步骤进行染色, 并在光镜下观察结果: MMP-2 蛋白与 E-cadherin 蛋白的阳性结果均表现为细胞质着棕黄色颗粒, 它们的阴性结果均表现为不着色。

3) 流式细胞仪检测: 在培养瓶中进行细胞的平行接种, 当细胞生长后的密度大于  $1.0 \times 10^8 \text{ 个} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 按照  $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的浓度配制盐酸埃克替尼溶液, 分别加入相应培养瓶中, 使每个培养瓶中抑制剂的作用时间达到 48 h, 收集细胞, 加入  $-20^\circ\text{C}$  的 75% 乙醇固定细胞。取单细胞悬液  $1.0 \times 10^6 \text{ 个} \cdot \text{L}^{-1}$ , 加入鼠抗人单克隆抗体工作液 0.1 mL (MMP-2 1: 100; E-cadherin 1: 100), 采用室温孵育,

收稿日期: 2014-05-10

基金项目: 新乡医学院高学历人才基金(GXLZZ2008-09)资助项目。

通信作者: 杨彩玲(1970-), 女, 河南新乡人, 副教授, 副主任医师, 主要从事口腔肿瘤发病机制研究。

崔卫刚(1978-), 男, 河南孟州人, 副教授, 博士, 主要从事神经肿瘤的研究。

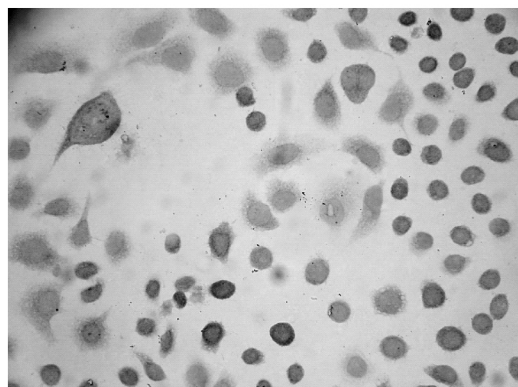
30 min 后进行 PBS 洗涤,加入 100  $\mu\text{L}$  羊抗鼠 FITC-IgG 二抗工作液,采用避光室温孵育 30 min 后再进行 PBS 洗涤,加入 0.1 mL 的 PBS 进行 500 目铜网的过滤后,上机检测.蛋白表达定量分析用  $F_i$  (荧光指数) 表示,当  $F_i > 1.0$  时,结果为阳性表达;当  $F_i \leq 1.0$  时,结果为阴性表达.实验重复 3 次.

4) 统计:应用 SPSS13.0 软件进行统计学处理,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用析因设计方差分析,检验水准  $\alpha = 0.05$ .

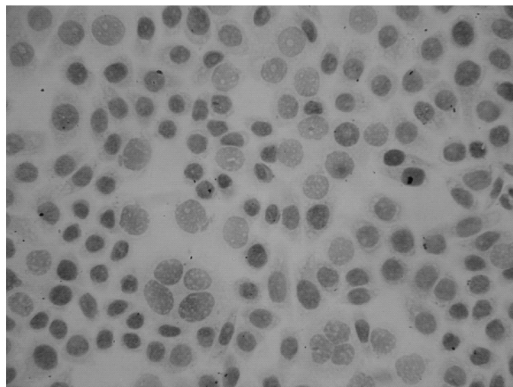
## 2 结果

### 2.1 免疫细胞化学染色

免疫化学染色表明:盐酸埃克替尼作用 ACC-M 细胞后,MMP-2 蛋白与 E-cadherin 蛋白的表达均发生变化.与参照组相对比,MMP-2 蛋白细胞胞质染色阳性率明显降低(见图 1);E-cadherin 蛋白细胞胞质染色阳性率明显增加(见图 2).

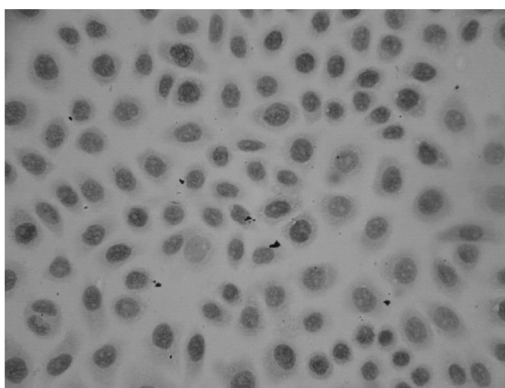


(a) 0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸埃克替尼作用 48 h

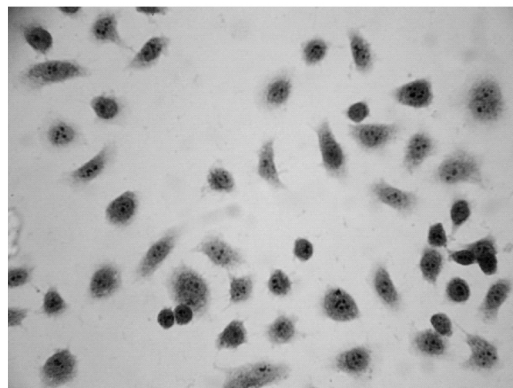


(b) 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸埃克替尼作用 48 h

图 1 MMP-2 蛋白的表达(SP,  $\times 400$ )



(a) 0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸埃克替尼作用 48 h



(b) 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸埃克替尼作用 48 h

图 2 E-cadherin 蛋白的表达(SP,  $\times 400$ )

### 2.2 间接免疫荧光流式定量检测

间接免疫荧光流式定量检测结果表明:0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸埃克替尼作用 ACC-M 细胞 48 h 后,MMP-2 蛋白的  $X_{\text{Mode}}$  值为  $7.4 \pm 0.58$ ,E-cadherin 的  $X_{\text{Mode}}$  值为  $7.9 \pm 0.64$ .20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸埃克替尼作用 ACC-M 细胞 48 h 后,MMP-2 蛋白与 E-cadherin 蛋白的表达均发生变化.MMP-2 蛋白的  $X_{\text{Mode}}$  值为  $5.7 \pm 0.43$ ,E-cadherin 的  $X_{\text{Mode}}$  值为  $8.6 \pm 0.71$ .根据  $X_{\text{Mode}}$  值计算蛋白的 FI 值:MMP-2 蛋白的 FI 值为  $0.967 \pm 0.001$ ,E-cadherin 蛋白的 FI 值为  $1.011 \pm 0.001$ .MMP-2 蛋白呈阴性表达,E-cadherin 蛋白呈阳性表达.

## 3 讨论

细胞外基质和基底膜对维持细胞外基质蛋白结构的稳定起着极其重要的作用.细胞间同质粘附力下降,或者细胞对细胞外基质的异质粘附力升高,均可导致肿瘤侵袭转移的发生.证明基质金属蛋白酶几乎能降解细胞外基质的各种蛋白成分,在肿瘤细胞的浸润转移中具有关键性作用,其家族成员 MMP-2 由于定位于细胞穿透基质的突出部位,故最易和肿瘤细胞的侵袭生长发生关联<sup>[6]</sup>.据相关实验显示,它在 ACC-M(肺高转移细胞株)中的表达高于

ACC-2 表明 ACC-M 的肺高转移能力可能与 MMP-2 的高表达有关<sup>[7]</sup>。本实验用  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸埃克替尼作用 MMP-2 蛋白 48 h, 并分别对其进行免疫细胞化学检测和流式细胞仪检测。结果显示, 埃克替尼作用后, MMP-2 蛋白表达降低, 呈现阴性表达。

E-cadherin 是一种钙依赖性跨膜糖蛋白, 可通过细胞接触抑制阻碍肿瘤细胞的去分化与恶性增殖, 还可通过保持细胞黏附性, 抑制肿瘤细胞的浸润或转移。E-cadherin 蛋白在人类的许多肿瘤中如肺癌、口腔鳞状细胞癌等表达异常<sup>[8-9]</sup>, 表现为不表达或异位表达。表达强度与恶性肿瘤的组织分级呈负相关<sup>[9-10]</sup>。E-cadherin 蛋白的表达可以预测酪氨酸激酶抑制剂的敏感性和临床疗效<sup>[11-12]</sup>。本实验用  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸埃克替尼作用 E-cadherin 蛋白 48 h, 并分别对其进行免疫细胞化学检测和流式细胞仪检测。结果显示, 盐酸埃克替尼作用后, E-cadherin 蛋白表达增高, 呈现阳性表达。

综上所述, 盐酸埃克替尼通过降低 MMP-2 蛋白的含量, 增加 E-cadherin 蛋白的含量, 可能抑制肿瘤的侵袭、转移, 但关于其中更深入的作用机制尚需进一步的深入研究。

## 4 参考文献

- [1] Gao Zhenzhen, Chen Wei, Zhang Xiaohua, et al. Icotinib, a potent and specific EGFR tyrosine kinase inhibitor, inhibits growth of squamous cell carcinoma cell line A431 through negatively regulating AKT signaling [J]. *Biomed Pharmacother* 2013, 67(5): 351-356.
- [2] Camidge D R. Icotinib: kick-starting the Chinese anticancer drug industry [J]. *Lancet Oncol* 2013, 14(10): 913-914.
- [3] Shi Yuankai, Zhang Li, Liu Xiaoping, et al. Icotinib versus gefitinib in previously treated advanced non-small-cell lung cancer (ICOGEN): a randomised double-blind phase 3 non-inferiority trial [J]. *Lancet Oncol* 2013, 14(10): 953-961.
- [4] 杨彩玲, 韩新光. 盐酸埃克替尼对人舌鳞状细胞癌 Tca8113 细胞增殖的影响 [J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2008, 43(4): 701-703.
- [5] 杨彩玲, 韩新光, 于春亚. 盐酸埃可替尼对人舌鳞状细胞癌 Tca8113 细胞周期及 CyclinD1、P27 表达的影响 [J]. *郑州大学学报: 医学版* 2011, 46(1): 82-85.
- [6] Taniwaki K, Fukamachi H, Komori K, et al. Stroma-derived matrix metalloproteinase (MMP)-2 promotes membrane type 1-MMP-dependent tumor growth in mice [J]. *Cancer Res* 2007, 67(9): 4311-4319.
- [7] 卢友光, 周鸿鹰, 丁林灿, 等. 涎腺腺样囊性癌高、低转移细胞系基因表达谱及基质金属蛋白酶表达差异 [J]. *中华医学遗传学杂志* 2006, 23(5): 505-510.
- [8] Eimoneim H M, Zaghloul N M. Expression of E-cadherin, N-cadherin and snail and their correlation with clinicopathological variants: an immunohistochemical study of 132 invasive ductal breast carcinomas in Egypt [J]. *Clinics (Sao Paulo)* 2011, 66(10): 1765-1771.
- [9] Hashimoto T, Soeno Y, Maeda G, et al. Progression of oral squamous cell carcinoma accompanied with reduced e-cadherin expression but not cadherin switch [J]. *Plos One* 2012, 7(10): e47899.
- [10] Wells A, Yates C, Shepard C R, et al. E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas [J]. *Clin Exp Metastasis* 2008, 25(6): 621-628.
- [11] Yauch R L, Januario T, Eberhard D A, et al. Epithelial versus mesenchymal phenotype determines in vitro sensitivity and predicts clinical activity of erlotinib in lung cancer patients [J]. *Clin Cancer Res* 2005, 11(24): 8686-8698.
- [12] Witta S E, Gemmill R M, Hirsch F R, et al. Restoring E-cadherin expression increases sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer cell lines [J]. *Cancer Res* 2006, 66(2): 944-950.

## Influence of Icotinib Hydrochloride upon the Protein Expression of ACC-M Cells MMP-2 and E-cadherin

YANG Cai-ling<sup>1</sup>, HAN Jin-hong<sup>2</sup>, WANG Wei-xin<sup>1</sup>, CUI Wei-gang<sup>2\*</sup>

(1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the First Affiliated Hospital, Xinxiang Medical University, Weihui Henan 453100, China;

2. School of Basic Medical Science, Xinxiang Medical University, Xinxiang Henan 453003, China)

**Abstract:** Icotinib hydrochloride is a kind of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, whose influence upon the protein expression of ACC-M cells MMP-2 and E-cadherin can be tested by way of immunocytochemistry and the technique of indirect immunofluorescence together with flow cytometry. The results show that icotinib hydrochloride can reduce the protein expression of MMP-2, but increase that of E-cadherin, thus it can be used to restrain the infiltration and metastasis of ACC-M cells.

**Key words:** icotinib hydrochloride; ACC-M cells; MMP-2; E-cadherin

(责任编辑: 刘显亮)