

FGF3 在舌鳞癌中的表达及对舌鳞癌细胞增殖及迁移的影响*

张洋 魏向华 刘攀 敖登高娃 宿伟鹏 赵化荣

(新疆医科大学第一附属医院肿瘤科, 新疆 乌鲁木齐 830000)

【摘要】 目的 探讨成纤维生长因子 3(FGF3)在舌癌中的表达水平及对舌鳞状细胞癌 SCC-9 细胞增殖及迁移的影响。方法 收集 2015 年 1 月~2020 年 1 月新疆医科大学第一附属医院明确诊断的 40 例舌鳞状细胞癌组织及对应癌旁组织。将舌鳞癌细胞株 SCC-9 细胞分为空白组(正常培养 72 h)、FGF3 干预组(加入 100 ng/mL FGF3 进行干预后培养 72 h)、FGFR 抑制剂干预组(加入 100 nM FGFR 抑制剂后进行干预后培养 72 h)。采用免疫组化检测舌鳞状细胞癌及癌旁组织 FGF3 的表达;采用划痕实验、CCK-8 实验检测空白组、FGF3 干预组、FGFR 抑制剂干预组对舌鳞癌细胞迁移及增殖的影响。结果 在 40 例舌鳞癌及对应癌旁组织中,FGF3 高表达分别为 90%及 12.5%,两者具有显著的统计学差异($P<0.01$);划痕实验中,24 h 时,空白组、FGF3 干预组、FGFR 抑制剂干预组划痕面积百分比分别为:(13.106±0.907)%、(7.515±0.733)%、(21.099±1.113)%;与空白组比较,FGF3 干预组及 FGFR 抑制剂干预组划痕面积百分比差异均有统计学意义($P<0.05$)。CCK-8 实验的结果显示空白组、FGF3 干预组、FGFR 抑制剂干预组细胞的存活率为(100.000±4.026)%、(136.330±9.779)%、(83.199±4.954)%,与空白组比较,FGF3 干预组及 FGFR 抑制剂干预组细胞的存活率差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 FGF3 在舌鳞癌中高表达,促进舌鳞癌细胞系 SCC-9 细胞的增殖及迁移。

【关键词】 成纤维生长因子 3;舌鳞状细胞癌;细胞增殖;细胞迁移

【中图分类号】 R739.86 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2022.11.007

Expression of FGF3 in tongue squamous cell carcinoma and its effect on proliferation and migration of tongue squamous cell carcinoma cells

ZHANG Yang, WEI Xianghua, LIU Pan, Aodenggaowa, SU Weipeng, ZHAO Huarong

(Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the expression of fibroblast growth factor 3 (FGF3) in tongue cancer and its effect on the proliferation and migration of SCC-9 cells. **Methods** From January 2015 to January 2020, 40 cases of tongue squamous cell carcinoma and corresponding adjacent tissues were definitely diagnosed in the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University. The expression of FGF3 in 40 cases of tongue squamous cell carcinoma and adjacent tissues was detected by immunohistochemistry. The effects of blank group, FGF3 intervention group and FGFR inhibitor intervention group on the migration and proliferation of tongue squamous cell carcinoma cells were detected by scratch test and CCK-8 test. **Results** In 40 cases of tongue squamous cell carcinoma and corresponding adjacent tissues, the high expression of FGF3 was 90% and 12.5%. There was significant statistical difference between the two ($P<0.01$); in the scratch experimental group, at 24h, the percentage of scratch area in the blank group, FGF3 intervention group and FGFR inhibitor intervention group were (13.106±0.907)%, (7.515±0.733)% and (21.099±1.113)% respectively. There were significant differences in the percentage of scratch area between FGF3 intervention group and blank group and between FGFR inhibitor intervention group and blank group ($P<0.05$). The results of CCK-8 experiment showed that

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(2018D01C213)

通信作者:赵化荣,主任医师,研究生导师,E-mail:xydyfyzhr@163.com

引用本文:张洋,魏向华,刘攀,等.FGF3 在舌鳞癌中的表达及对舌鳞癌细胞增殖及迁移的影响[J].西部医学,2022,34(11):1595-1599. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3511.2022.11.007

the survival rates of cells in blank group, FGF3 intervention group and FGFR inhibitor intervention group were $(100.000 \pm 4.026)\%$, $(136.330 \pm 9.779)\%$ and $(83.199 \pm 4.954)\%$. There were significant differences between FGF3 intervention group and blank group, FGFR inhibitor intervention group and blank group ($P < 0.05$). **Conclusion** FGF3 is highly expressed in tongue squamous cell carcinoma and promotes the proliferation and migration of tongue squamous cell carcinoma cell line SCC-9.

【Key words】 FGF3; Squamous cell carcinoma of tongue; Cell proliferation; Cell migration

成纤维细胞生长因子(Fibroblast growth factors, FGFs)是由 FGF 基因家族编码的结构相关的一组蛋白质多肽。大量研究证实,FGFs 在多种肿瘤如肺癌^[1-2]、胃癌^[3]、卵巢癌^[4]、乳腺癌^[5]中均呈高表达,促进肿瘤的增殖,从而促进肿瘤的进展,但其在舌鳞状细胞癌中的作用鲜有报道。本研究旨在通过探讨成纤维细胞生长因子 3(Fibroblast growth factor 3, FGF3)在舌鳞癌及癌旁组织中的表达差异,以及体外实验探索 FGF3 对舌鳞癌细胞增殖和迁移的影响,进而了解 FGF3 在舌鳞癌发生中的地位,为口腔恶性肿瘤诊疗提出新的靶点和思路。

1 资料与方法

1.1 组织来源 收集 2015 年 1 月~2020 年 1 月新疆医科大学第一附属医院明确诊断的 40 例舌鳞状细胞癌组织及对应癌旁组织,所有标本均经病理证实。纳入标本均为初始治疗患者,手术前未行放化疗;无第二原发肿瘤。该研究获医院理论委员会审核同意。

1.2 主要材料 人舌鳞癌细胞 SCC-9 购自上海雅吉生物;胎牛血清(FBS)、CCK-8 细胞增殖/毒性检测试剂盒、Human FGF-3 Protein、PD173074(FGFR 抑制剂)分别购买于上海依科赛生物、北京全式金生物、美国 RD 公司及美国 MedChemExpress 公司。

1.3 免疫组织化学染色及判读标准 舌癌组织及癌旁组织切片厚度均为 $3 \mu\text{m}$,脱蜡、抗原修复处理后,分别在癌组织及癌旁组织滴加 FGF3 抗体(1:100 稀释),处理封片后显微镜下观察并拍照。两组实验均以 0.01 mol/L 磷酸缓冲盐溶液代替一抗作为阴性对照。采用半定量积分法评价染色结果。按免疫组化积分=染色强度评分 \times 细胞百分比评分,计算得出 1~5 分为低表达,6~12 分为高表达。

1.4 细胞培养 在 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ 恒温培养箱内,将 SCC-9 人舌鳞癌细胞放置于青霉素-链霉素双抗的 DMEM 高糖培养基,并添加 10% 胎牛血清进行培养。取对数生长期的细胞进行后续实验。

1.5 FGF3 干预条件摸索 取生长状态良好汇合率达 90% 的 SCC-9 细胞,用完全培养基制备成 5×10^4 cells/mL 单细胞悬液,接种培养,分别加入 $100 \mu\text{L}$ 不同浓度 FGF3 溶液(10、50、 100 ng/mL),同时设置空白对照组,每组 5 个重复,设置 3 个干预时间(24、48、

72 h)。干预完成后,弃去培养基,每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 配置好的 $10\% \text{ CCK-8}$ 溶液孵育,1 h 后用酶标仪测定 450 nm 处的 OD 值。计算不同浓度 FGF3 干预不同时间下 SCC-9 细胞存活率。

1.6 实验分组及细胞干预 空白组:将舌鳞癌细胞株 SCC-9 细胞正常培养 72 h;FGF3 干预组:将舌鳞癌细胞株 SCC-9 细胞中加入 100 ng/mL FGF3 进行干预后培养 72 h;FGFR 抑制剂干预组:将舌鳞癌细胞株 SCC-9 细胞中加入 100 nM FGFR 抑制剂后进行干预后培养 72 h。

1.7 划痕实验 按 1.6 实验分组干预细胞,每孔加入 $70 \mu\text{L}$ 密度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 单细胞悬液,在培养皿中间的 2 孔插件中,用镊子去除细胞长满的 Insert 区域后,产生一条划痕,其宽度为 $500 \mu\text{m}$,后加入 1 mL 无血清培养基于培养皿中,每隔 12 h 在同一区域拍照,对比各组细胞在 0 h 及 48 h 拍照记录各组细胞迁移情况,ImageJ 计算划痕面积,实验重复 3 次。

1.8 细胞增殖实验 采用含有胎牛血清、青-链霉素双抗溶液的高糖培养基培养口腔鳞癌细胞株 SCC-9 细胞并进行体外实验。按 1.6 实验分组干预,每孔加入 $10\% \text{ CCK-8}$ 溶液 $100 \mu\text{L}$,孵育 1 h 后用酶标仪 450 nm 波长检测 OD 值。计算不同分组干预下 SCC-9 细胞存活率。

1.9 统计学分析 运用 SPSS 20.0 软件进行数据处理,计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)描述,采用 F 检验对多组间计量资料比较, χ^2 检验用于计数资料间的比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FGF3 在舌鳞癌与癌旁组织中的表达 在 40 例舌鳞癌组织中,36 例 FGF3 高表达(90%)、4 例 FGF3 低表达(10%);在 40 例对应口腔癌旁组织中,5 例 FGF3 呈高表达(12.5%),35 例 FGF3 呈低表达(87.5%)。FGF3 在舌鳞癌的表达量显著高于对应癌旁组织,差异具有统计学意义($Z = 48.080, P < 0.001$),见图 1。

2.2 FGF3 干预浓度及时间的确定 根据预实验 SCC-9 生长曲线结果及不同浓度 FGF3、不同干预时间下 SCC-9 细胞存活率,采用 FGF3 浓度为 100 ng/mL 干预 72 h 进行后续实验,见表 1。

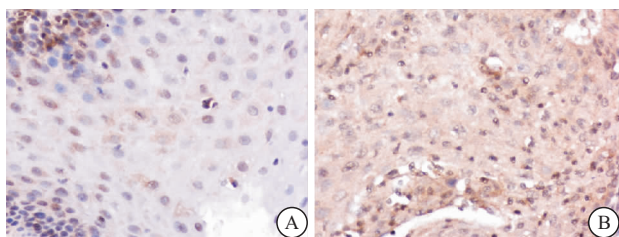


图 1 FGF3 在舌鳞癌与癌旁组织中的表达(200×)

Figure 1 Expression of FGF3 in tongue squamous cell carcinoma and adjacent tissues

注: A. 舌癌旁组织; B. 舌鳞癌组织

2.3 FGF3 对舌鳞癌细胞系 SCC-9 迁移能力的影响

与空白组比较, FGF3 干预组划痕面积修复愈合较快, FGFR 抑制剂干预组细胞的划痕面积修复愈合缓慢。12 h 时, FGF3 干预组划痕面积与空白组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 24 h 时, FGF3 干预组、FGFR 抑制剂干预组划痕面积与空白组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2、图 2。

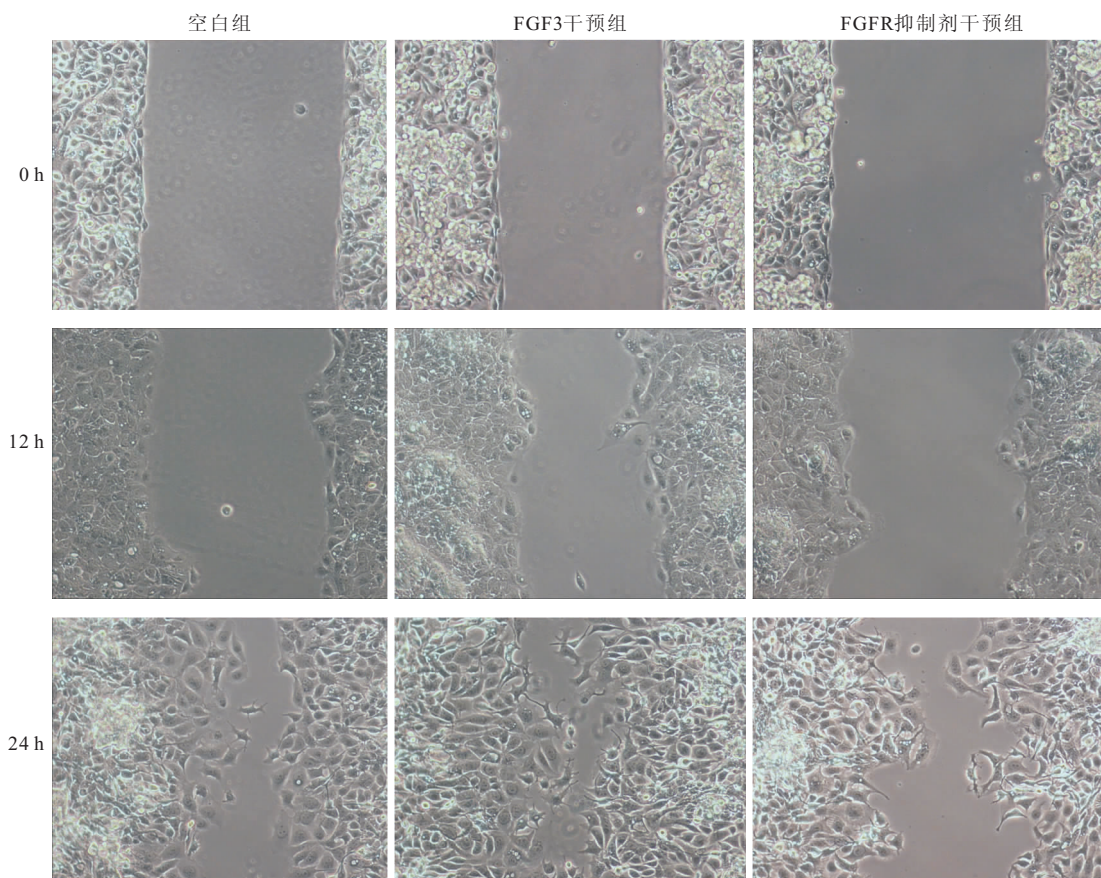


图 2 细胞划痕实验检测 FGF3 对 SCC-9 细胞迁移能力的影响(100×)

Figure 2 Effect of FGF3 on migration ability of SCC-9 cells detected by cell scratch test

2.4 FGF3 对舌鳞癌细胞系 SCC-9 增殖能力的影响

CCK-8 实验检测的结果显示, 空白组、FGF3 干预组、FGFR 抑制剂干预组细胞的存活率为 $(100.000 \pm 4.026)\%$ 、 $(136.330 \pm 9.779)\%$ 、 $(83.199 \pm 4.954)\%$ 。

表 1 FGF3 干预不同时间对 SCC-9 细胞增殖的作用结果($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of FGF3 intervention on SCC-9 cell proliferation at different time

组别	存活率(%)		
	干预 24 h	干预 48 h	干预 72 h
FGF3(0 ng/mL)组	100.000±5.952	100.000±7.130	100.000±2.531
FGF3(10 ng/mL)组	98.321±5.948	104.913±11.297	108.635±5.407 ^①
FGF3(50 ng/mL)组	100.570±5.179	109.765±4.292	117.582±7.529 ^{①②}
FGF3(100 ng/mL)组	104.941±5.669	116.930±3.209 ^③	130.715±5.543 ^{①②③}

注: 与 FGF3(0 ng/mL)组比较, ^① $P < 0.05$; 与 FGF3(10 ng/mL)组比较, ^② $P < 0.05$; 与 FGF3(50 ng/mL)组比较, ^③ $P < 0.05$

表 2 FGF3 干预不同时间对 SCC-9 细胞划痕的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of FGF3 intervention on scratch of SCC-9 cells at different times

组别	划痕面积(%)		
	0 h	12 h	24 h
空白组	52.378±0.574	45.965±1.236	13.106±0.907
FGF3 干预组	53.351±0.841	42.093±1.772 ^①	7.515±0.733 ^①
FGFR 抑制剂干预组	52.853±0.494	47.534±1.131 ^②	21.099±1.113 ^{①②}

注: 与空白组比较, ^① $P < 0.05$; 与 FGF3 干预组比较, ^② $P < 0.05$

细胞的存活率 FGF3 干预组显著高于空白组 ($P < 0.05$)、FGFR 抑制剂干预组显著低于空白组 ($P < 0.05$), 提示 FGF3 促进舌癌细胞增殖, FGF3 低表达抑制舌癌细胞增殖。见图 3。

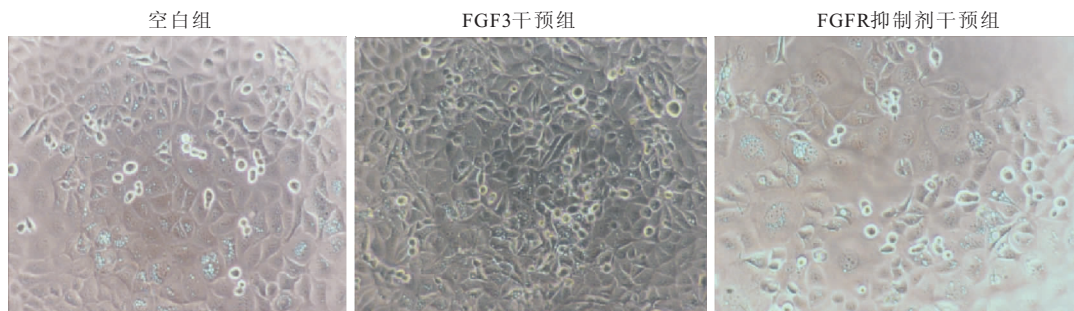


图 3 CCK-8 实验检测 FGF3 对 SCC-9 细胞增殖能影响(100×)

Figure 3 Effect of FGF3 on proliferation of SCC-9 cells detected by CCK-8 experiment

3 讨论

舌癌发病率呈逐年升高趋势,且年轻患者数量逐渐增加,化疗效果欠佳,因此探寻舌癌靶向治疗尤为重要^[6-8]。FGF3 是 FGFs 家族中的一员,其特点是 FGFs 与细胞膜上的成纤维生长因子受体(FGFRs)结合,将信号传递到胞内,激活 RAS-MAPK 信号通路、PI3K-AKT 信号通路,从而调控相关细胞增殖、凋亡、侵袭迁移等过程,并参与代谢调节、血管生成等病理生理学过程^[9-11]。FGF3 通过与 FGFR1 和 FGFR2 受体结合发挥生物学效应。FGFR 抑制剂(PD173074)可以对 FGFR1 和 FGFR2 受体进行有效的抑制,从而阻断 FGF3 发挥生物学效应^[12]。

已有研究证明,原癌基因 FGF3 在多种肿瘤如肺癌、肝癌、食管癌中高表达^[13-16]。卜晓红等^[17]对食管鳞癌及食管正常粘膜组织中 FGF3 进行检测,两者 FGF3 阳性率分别为 92%(55/60)及 50%(10/20),差异有统计学意义($P < 0.05$)。有研究显示^[18],膀胱癌中 FGF3 表达率为 74%,而在正常膀胱组织中不表达。FGF3 阳性表达强度越高,分期越晚,易出现膀胱癌复发。本研究与多数研究一致,FGF3 在舌鳞状细胞癌组织中的表达显著高于对应癌旁组织。

FGF3 参与恶性肿瘤迁移。王佳等^[19]研究显示,沉默 FGF3 和 FGF10 激活 Wnt/ β -catenin 信号通路减弱卵巢癌细胞迁移和侵袭能力。黄丽华等^[20]体内及体外研究显示,敲低 FGF3 结肠癌细胞迁移速度明显减缓;小鼠肿瘤体积明显小于空白对照组,显示了敲低 FGF3 抑制结肠肿瘤生长。本研究通过在舌鳞癌细胞中过表达及抑制 FGF3,显示 FGF3 高表达促进舌癌的迁移,此结论与 FGF3 在其他恶性肿瘤方面的研究一致。FGFs 作为促血管生成因子中的重要成员,由肿瘤细胞、巨噬细胞产生或由细胞外基质释放,并以自分泌或旁分泌的方式发挥作用^[21]。FGFs 促进纤维蛋白溶解酶原及胶原酶激活物质的分泌参与肿瘤的侵袭与转移。

FGFs 能诱发许多细胞产生典型的对生长因子的

反应,如刺激 DNA 的合成和细胞分裂,刺激细胞的增殖,并伴有促细胞分化。沈艺南等^[22]研究结果显示,FGF1、FGF2 mRNA 在肝癌细胞中高表达,并且研究发现 FGF1、FGF2 可刺激肝癌细胞增殖。Lu 等^[23]的研究显示,FGF13 增强非小细胞肺癌 A549 细胞株从 G1 到 S 期的转变过程,并促进了 A549 细胞的增殖。Gao 等^[24]的研究显示,FGF19 高表达的头颈鳞状细胞癌(HNSCC)预后不良。FGF19 扩增可激活 FGF 受体 4(FGFR4)依赖性 ERK / AKT-p70S6K-S6 信号通路,促进 HNSCC 细胞增殖,抑制 FGF19 可显著抑制 HNSCC 小鼠模型中的肿瘤生长。上述的研究显示 FGFs 促进恶性肿瘤的增殖,然而既往的研究多显示 FGF3 是重要的细胞间信号分子,调控许多胚胎发育和器官形成过程^[25-26],参与恶性肿瘤增殖的研究较少,本研究显示在舌鳞癌细胞中过表达 FGF3 可促进 SCC-9 的增殖,抑制 FGF3 可降低 SCC-9 的增殖,均与空白对照组有明显差异。提示 FGF3 为癌基因,可促进舌鳞癌细胞增殖。

4 结论

FGF3 在舌鳞癌组织中高表达,高于对应癌旁组织,FGF3 在舌鳞癌中为癌基因,促进舌鳞状细胞癌的增殖及迁移,初步概述 FGF3 在舌鳞状细胞癌 SCC-9 中的功能,有望为舌癌精准治疗提供新的研究思路,但是其作用机制仍需要进一步深入研究。

【参考文献】

[1] SUH Y, AMELIO I, GUERRERO URBANO T, *et al.* Clinical update on cancer: molecular oncology of head and neck cancer [J]. Cell Death Dis, 2014, 5(1): e1018.
 [2] NAUMNIK W, OSSOLIŃSKA M, PŁOŃSKA I, *et al.* Circulating Thrombospondin-2 and FGF-2 in Patients with Advanced Non-small Cell Lung Cancer: Correlation with Survival [J]. ADV EXP MED BIOL, 2015, 833: 9-14.
 [3] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
 [4] 张玉苓,李元昆,李幸丽. miR-506 和 FGF2 在上皮性卵巢癌中的

- 表达及临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2020, 12: 2132-2137.
- [5] 荀雪琼, 胡会永, 曹钦光, 等. 乳腺癌组织中 FGF-1、TIP30、TLR4、HIF-1 α 的表达及其与微血管密度的关系[J]. 西部医学, 2019, 31(7): 1034-1037.
- [6] HUI Q, JIN Z, LI X, *et al.* FGFfamily: From drug development to clinical application [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7): 1875.
- [7] GIACOMINI A, CHIODELLI P, MATARAZZO S, *et al.* Blocking the FGF/FGFR system as a "two-compartment" antiangiogenic/antitumor approach in cancer therapy[J]. *Pharmacol Res*, 2016, 107: 172-185.
- [8] 张宇, 牟方彪, 骆德平. 术前诱导化疗口腔颌面恶性肿瘤的近期疗效观察[J]. 西部医学, 2016, 28(4): 494-497.
- [9] XIE Y, SU N, YANG J, *et al.* FGF/FGFR signaling in health and disease [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 181.
- [10] STEHBENS S J, JU R J, ADAMS M N, *et al.* FGFR2-activating mutations disrupt cell polarity to potentiate migration and invasion in endometrial cancer cell models[J]. *J Cell Sci*, 2018, 131(15): jcs213678.
- [11] SZYBOWSKA P, KOSTAS M, WESCHE J, *et al.* Cancer Mutations in FGFR2 Prevent a Negative Feedback Loop Mediated by the ERK1/2 Pathway[J]. *Cells*, 2019, 8(6): 518.
- [12] GHEDINI G C, RONCA R, PRESTA M, *et al.* Future applications of FGF/FGFR inhibitors in cancer[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2018, 18(9): 861-872.
- [13] DIENSTMANN R, RODON J, PRAT A, *et al.* Genomic aberrations in the FGFR pathway: opportunities for targeted therapies in solid tumors[J]. *Ann Oncol*, 2014, 25(3): 552-563.
- [14] WANG W, CHEN T, LI H, *et al.* Screening a novel FGF3 antagonist peptide with anti-tumor effects on breast cancer from a phage display library [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(5): 7051-7058.
- [15] ARAO T, UESHIMA K, MATSUMOTO K, *et al.* FGF3/FGF4 amplification and multiple lung metastases in responders to sorafenib in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2013, 57(4): 1407-1415.
- [16] 赵惠, 陈建华. 食管鳞癌患者的基因变异及临床关联分析[J]. 肿瘤, 2020, 40(6): 409-420.
- [17] 卜晓红, 龚晓瑾, 陈晓. 食管鳞癌组织 FGF3 和 Podoplanin 表达及与预后相关性分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012, 19(9): 663-666.
- [18] 张永海, 谢丹, 罗俊航, 等. 膀胱移行细胞癌中成纤维细胞生长因子 3 基因表达与扩增的临床意义[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(36): 2556-2559.
- [19] 王佳, 朱克修. FGF3 和 FGF10 对人卵巢癌 SKOV3 细胞迁移和侵袭的影响及其与 Wnt/ β -catenin 信号通路的关系[J]. 肿瘤防治研究, 2018, 45(12): 970-975.
- [20] 黄丽华, 杜雪, 张孝卫, 等. 干扰 RNA 对 HT-29 细胞周期和凋亡活性的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(3): 458-461.
- [21] OLSEN S K, GARBI M, ZAMPIERI N, *et al.* Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors share structural but not functional homology with FGFs[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(36): 34226-34236.
- [22] 沈艺南, 何海冠, 王舟翀, 等. 肝细胞癌中 FGF 信号通路的作用机制及靶向治疗[J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(6): 871-873.
- [23] LU H, YIN M, WANG L, *et al.* FGF13 interaction with SHCBP1 activates AKT-GSK3 α/β signaling and promotes the proliferation of A549 cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2020, 21(11): 1014-1024.
- [24] GAO L, LANG L, ZHAO X, *et al.* FGF19 amplification reveals an oncogenic dependency upon autocrine FGF19/FGFR4 signaling in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Oncogene*, 2019, 38(13): 2394-2404.
- [25] KHOSRAVI F, AHMADVAND N, BELLUSCI S, *et al.* The Multifunctional Contribution of FGF Signaling to Cardiac Development, Homeostasis, Disease and Repair[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 672935.
- [26] BROTTO D, SORRENTINO F, CENEDESE R, *et al.* Genetics of Inner Ear Malformations: A Review[J]. *Audiol Res*, 2021, 11(4): 524-536.

(收稿日期: 2021-12-28; 修回日期: 2022-07-05; 编辑: 刘灵敏)