

网络出版时间: 2017-5-22 17:45 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170522.1745.002.html

## Src 激酶和 p38 激酶在乙酰肝素酶促进人胃癌细胞迁移和侵袭中的作用及相互关系

胡灵丹, 那日苏\*, 马秀梅, 李时荣

**摘要** 目的 探讨 Src 激酶和 p38 激酶在乙酰肝素酶促进人胃癌细胞迁移和侵袭中的作用及相互关系。方法 实验设正常对照组(细胞未作其他处理)、人乙酰肝素酶重组蛋白处理组(5、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )以及提前 3 h 加入 Src 激酶特异性抑制剂 pp2(5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )或 p38 激酶特异性抑制剂 SB 203580(1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )再加入人乙酰肝素酶重组蛋白(10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )作用 24 h 组。利用划痕损伤实验和 Transwell 小室基质侵袭实验分别检测各处理组对人胃癌 MGC-803 细胞迁移和侵袭能力的影响;Western blot 法检测各处理组对人胃癌 MGC-803 细胞、高表达乙酰肝素酶的人胃癌 SGC-7901 细胞和乙酰肝素酶表达被下调的 SGC-7901-Heparanase(-)细胞中 Src 激酶、p38 激酶、磷酸化 Src 激酶(p-Src)和磷酸化 p38 激酶(p-p38)蛋白表达的影响。结果 与正常对照组比较,5 和 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  人乙酰肝素酶重组蛋白均能明显增强人胃癌 MGC-803 细胞迁移和侵袭能力( $P < 0.05$ );与未加抑制剂的人乙酰肝素酶重组蛋白比较,抑制剂 pp2 和 SB 203580 均能削弱人乙酰肝素

酶重组蛋白增强的人胃癌 MGC-803 细胞的迁移和基质侵袭能力( $P < 0.05$ )。10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  人乙酰肝素酶重组蛋白促进人胃癌 MGC-803 细胞 Src 激酶和 p38 激酶的磷酸化,而 SGC-7901-Heparanase(-)细胞中磷酸化的 Src 激酶和 p38 激酶表达水平较 SGC-7901 细胞明显下调( $P < 0.01$ );抑制剂 pp2 和 SB 203580 对人胃癌 SGC-7901 细胞中乙酰肝素酶蛋白表达无明显影响;在人胃癌 SGC-7901 细胞和 MGC-803 细胞中,Src 激酶的抑制剂 pp2 抑制磷酸化 p38 蛋白的表达,而 p38 激酶的抑制剂 SB 203580 对磷酸化 Src 蛋白表达无明显影响。结论 乙酰肝素酶可能通过促进 Src 激酶磷酸化或 p38 激酶的磷酸化或先促进 Src 激酶磷酸化再促进 p38 激酶的磷酸化,从而促进人胃癌细胞迁移和侵袭能力。乙酰肝素酶-Src 激酶磷酸化-p38 激酶磷酸化可能是人胃癌细胞内存在的与细胞迁移和侵袭有关的信号转导通路。

**关键词** 胃癌;乙酰肝素酶;Src 激酶;p38 激酶

中图分类号 R 361.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)07-0945-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.07.002

2017-03-13 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:30660065);中支地学校匹配经费(编号:X206017001)

作者单位:内蒙古医科大学附属医院病理科,呼和浩特 010059

作者简介:胡灵丹,女,硕士研究生;

马秀梅,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: doctor-maxiumei0471@126.com

\* 对本文具有同等贡献

乙酰肝素酶(heparanase)是目前发现的哺乳动物细胞中唯一能切割细胞外基质中硫酸乙酰肝素蛋白多糖(heparan sulfate proteoglycans, HSPGs)侧链硫酸乙酰肝素(heparan sulfate, HS)的内源性糖苷内切酶。前期研究<sup>[1]</sup>显示,乙酰肝素酶的高表达与胃癌

(LPS) on human intrahepatic biliary epithelial cells (HiBECs) *in vitro*. **Methods** The HiBECs were cultured *in vitro*. The cells were stimulated by LPS at different concentrations (0, 0.1, 1, 2, 4, 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and different time (24, 48, 72 h). The expression of IL-6 was measured by ELISA to determine the best concentration and time of LPS. Then we chose the best concentration and time of LPS to intervene the cells in the further experiments. The levels of mRNA expression of c-Myc and Mcl-1 were detected by fluorescence quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR). The proportion of p-STAT3/STAT3 protein and the expression of c-Myc and Mcl-1 protein in HiBECs were analyzed by Western blot. **Results** LPS upregulated the expression of IL-6, and reached its peak at 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 24 h ( $F = 16.492, 17.763, P < 0.001, P < 0.01$ ). LPS increased the mRNA expression of c-Myc and Mcl-1 ( $P < 0.01$ ). Meanwhile, The ratio of p-STAT3/STAT3 ( $P < 0.05$ ) protein and the expression of c-Myc ( $P < 0.001$ ) and Mcl-1 ( $P < 0.05$ ) protein were upregulated after stimulating with LPS. **Conclusion** The IL-6/STAT3 signal pathway can be activated by LPS in HiBECs, and LPS may promote the expression of c-Myc and Mcl-1 through this signal pathway.

**Key words** lipopolysaccharide; IL-6; STAT3; Mcl-1; c-Myc

侵袭较深、有脉管内瘤栓、有淋巴结转移和远处转移、临床分期高和高微血管密度有关,乙酰肝素酶在人胃癌高转移细胞 SGC-7901 中呈高表达,而在转移能力弱的人胃癌 MGC-803 细胞未见表达,利用 RNA 干扰技术将人胃癌 SGC-7901 细胞中的乙酰肝素酶表达下调后,不论在体外还是体内,均能抑制胃癌细胞侵袭、诱导血管形成和转移的能力<sup>[2-3]</sup>。研究<sup>[4-6]</sup>显示,乙酰肝素酶能引发细胞信号转导的级联反应,引起与肿瘤侵袭、血管形成和转移有关因子的表达,从而促进肿瘤侵袭、血管形成和转移。但乙酰肝素酶调节的信号转导通路,目前没有研究清楚,而且此研究也是目前研究的热点。该研究将探讨丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)信号转导通路中 p38 激酶和酪氨酸激酶 Src 在乙酰肝素酶促进人胃癌细胞迁移和侵袭中的作用以及之间的相互关系。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞系** 人胃癌 MGC-803 细胞由北京市肿瘤医院赠送,人胃癌 SGC-7901 细胞购自中国医学科学院上海生物细胞研究所。前期研究<sup>[6-7]</sup>显示乙酰肝素酶在人胃癌细胞 SGC-7901 中呈高表达,而在转移能力弱的人胃癌 MGC-803 细胞未见表达,通过 RNA 干扰技术,乙酰肝素酶表达被下调的人胃癌 SGC-7901 细胞被命名为人胃癌 SGC-7901-Heparanase(-) 细胞。人胃癌 MGC-803 细胞、人胃癌 SGC-7901 细胞和人胃癌 SGC-7901-Heparanase(-) 细胞均在含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 RPMI-1640 培养液中,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱内常规培养。细胞处于对数生长期时进行实验。

**1.2 主要试剂** 人乙酰肝素酶重组蛋白(用 PBS 稀释)、Src 激酶特异性抑制剂 pp2(用二甲亚砜稀释)和 p38 激酶特异性抑制剂 SB 203580(用二甲亚砜稀释)均购自加拿大 San Diego 公司;单克隆鼠抗人 p38 抗体、兔抗人 Src 抗体、多克隆兔抗人乙酰肝素酶抗体和单克隆鼠抗人 GAPDH 抗体均购自加拿大 Santa Cruz 公司;单克隆羊抗人磷酸化 p38(phospho-p38, p-p38)(Thr180/Tyr182)抗体和兔抗人磷酸化-Src(phospho-Src, p-Src)抗体(Tyr416)均购自美国 Cell Signaling 公司;RPMI-1640 培养基购自美国 Gibco 公司;FBS 购自杭州四季青公司;Transwell 小室和 Matrigel 均购自美国 Becton Dickinson 公司。

**1.3 划痕迁移实验** 按每孔  $2 \times 10^5$  个将人胃癌

MGC-803 细胞接种于 6 孔板,待细胞贴壁,并长满板底的 90% 以上,选取每孔的中央部位,以 200  $\mu$ l 枪头在培养板底部划一损失区域,用不含 FBS 的培养基洗涤 2 次,24 h 后在显微镜下观察细胞移动情况,设正常对照组(细胞未作其他处理)、加入人乙酰肝素酶重组处理组(5 和 10  $\mu$ g/ml)和提前 3 h 加入 Src 激酶特异性抑制剂 pp2(5  $\mu$ mol/L)或 p38 激酶特异性抑制剂 SB 203580(1  $\mu$ mol/L)再加入人乙酰肝素酶重组蛋白(10  $\mu$ g/ml)作用 24 h 组。实验重复 3 个样本,计算平均值,以检测人乙酰肝素酶重组蛋白对人胃癌 MGC-803 细胞迁移能力的影响以及抑制剂 pp2 或 SB 203580 对人乙酰肝素酶重组蛋白调控的人胃癌 MGC-803 细胞迁移能力的影响。迁移距离( $\mu$ m) = 最初划痕时损失区域的宽度 - 24 h 后损失区域的宽度。

**1.4 基质侵袭实验** 细胞基质侵袭实验在 Transwell 小室中进行,滤膜孔径 8  $\mu$ m。将 Matrigel 用不含 FBS 的 RPMI-1640 培养基按 1 : 1.5 稀释,取 100  $\mu$ l 加入到 Transwell 小室的上室中,室温下干燥 1 h,并用无 FBS 的 RPMI-1640 培养基洗 2 次,将小室置入预先加入 2 ml 含有 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基的 6 孔板内。以无血清的 RPMI-1640 培养基制成  $1 \times 10^5$  /ml 的单细胞悬液,分别取 2 ml 加入上室内,置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内孵育 4 h 后取出,以棉签小心刮除滤膜上面的细胞,侵袭并黏附到膜下的细胞以甲醇固定,HE 染色计数,每张膜在光镜下( $\times 400$ )随机取 9 个视野计数侵袭的细胞数,实验重复 3 个样本,计算平均值,以检测人乙酰肝素酶重组蛋白对人胃癌 MGC-803 细胞基质侵袭能力的影响以及抑制剂 pp2 或 SB 203580 对人乙酰肝素酶重组蛋白调控的人胃癌 MGC-803 细胞基质侵袭能力的影响。

**1.5 Western blot 实验** 在 6 孔板内分别培养人胃癌 MGC-803、SGC-7901 和 SGC-7901-Heparanase(-) 细胞,待生长到 80%,根据实验需要设正常对照组、处理组、作用 24 h 组,用预冷的 PBS 将人胃癌 MGC-803、SGC-7901 或 SGC-7901-Heparanase(-) 细胞漂洗 3 次,立即加入 300  $\mu$ l 细胞裂解液(海门碧云天生物技术研究所),反复抽吸,使成蛋清状,4 °C、14 000 r/min 离心 5 min,取上清液,紫外分光光度法测定总蛋白浓度。取 40  $\mu$ g 蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭非特异性抗原,分别加入 1 : 500 稀释的鼠抗人 p38 抗体、兔抗人 Src 抗体、兔抗人乙酰肝素酶抗体、

p-p38 (Thr180/Tyr182) 抗体、p-Src 抗体 (Tyr416) 或鼠抗人 GAPDH 抗体  $4^{\circ}\text{C}$  过夜, 用含 0.1% Tween 20 的 TBS 洗膜, 加入 1:1 000 稀释的带荧光标记的二抗, 室温下作用 1 h, 洗膜后在避光条件下将膜置于 Odessey CLX 红外激光成像系统进行扫描, 并对条带进行光密度 (optical density, OD) 值分析。其中 GAPDH 为内参照。并计算目的产物条带 OD 值/GAPDH 产物条带 OD 值的比值, 作为目的产物的相对表达量。每组实验重复 3 次, 取均值。

1.6 统计学处理 使用 SPSS 13.0 软件进行  $t$  检验, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 以  $\alpha = 0.05$  为检验水准。

## 2 结果

2.1 人乙酰肝素酶重组蛋白对人胃癌 MGC-803 细胞迁移和基质侵袭能力的影响 经划痕迁移实验显示, 人胃癌 MGC-803 细胞的迁移距离, 处理组均明

显高于正常对照组 ( $t = 9.8, 19.6$ ); 且  $10 \mu\text{g/ml}$  处理组明显高于  $5 \mu\text{g/ml}$  处理组 ( $t = 9.8$ ), 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。这表明, 人乙酰肝素酶重组蛋白能促进人胃癌 MGC-803 细胞的迁移, 而且人胃癌 MGC-803 细胞的迁移距离随人乙酰肝素酶重组蛋白浓度的增加而增强 (图 1A、B)。经人乙酰肝素酶重组蛋白作用 24 h 的人胃癌 MGC-803 细胞, 再经 4 h 的 Transwell 小室试验显示, 人胃癌 MGC-803 细胞穿过小室的细胞数, 处理组均明显高于正常对照组 ( $t = 3.15, 7.75$ ), 且  $10 \mu\text{g/ml}$  处理组高于  $5 \mu\text{g/ml}$  处理组 ( $t = 3.15$ ), 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (图 1C、D)。这表明, 人乙酰肝素酶重组蛋白能促进人胃癌 MGC-803 细胞的基质侵袭能力, 并且随人乙酰肝素酶重组蛋白浓度的增加而增强。

2.2 抑制 Src 激酶和 p38 激酶后人乙酰肝素酶重

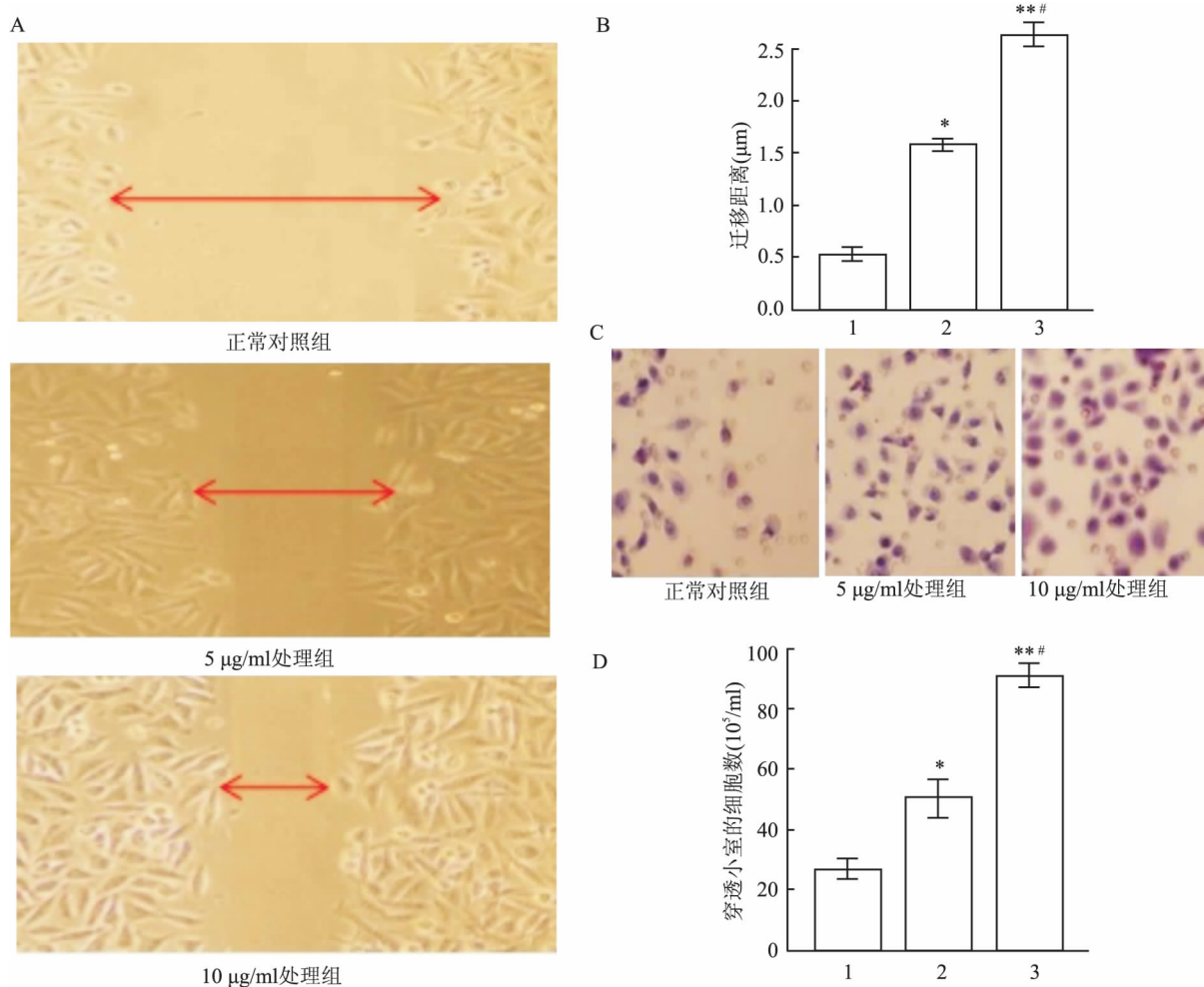


图1 人重组乙酰肝素酶蛋白对人胃癌细胞迁移和基质侵袭能力的影响  $\times 400$

A: 划痕迁移实验显示的细胞迁移; B: 细胞迁移的统计分析图; C: 侵袭细胞数目; D: 侵袭细胞数目的统计分析图; 1: 正常对照组; 2:  $5 \mu\text{g/ml}$  处理组; 3:  $10 \mu\text{g/ml}$  处理组; 与正常对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与  $5 \mu\text{g/ml}$  处理组比较: #  $P < 0.05$

组蛋白对人胃癌 MGC-803 细胞的迁移和基质侵袭能力的影响 用 5 μmol/L Src 激酶的特异性抑制剂 pp2 或 1 μmol/L p38 激酶特异性抑制剂 SB 203580 预处理人胃癌 MGC-803 细胞 3 h 后,再加入 10 μg/ml 人乙酰肝素酶重组蛋白作用 24 h,经划痕迁移实验显示,人胃癌 MGC-803 细胞的迁移距离较单纯由 10 μg/ml 人乙酰肝素酶重组蛋白作用 24 h 的人胃癌 MGC-803 细胞迁移距离明显变短 ( $t = -13.00, -11.92, P < 0.01$ ) (图 2A); 经 Transwell 小室试验显示,人胃癌 MGC-803 细胞穿过小室的细胞数较单纯由 10 μg/ml 人乙酰肝素酶重组蛋白作用 24 h 后穿过小室的细胞数明显减少 ( $t = -85.23, -83.93, P < 0.01$ ) (图 2B)。可见,Src 激酶的特异性抑制剂 pp2 和 p38 激酶特异性抑制剂 SB 203580 均能削弱人乙酰肝素酶重组蛋白增强人胃癌 MGC-803 细胞的迁移和基质侵袭能力。

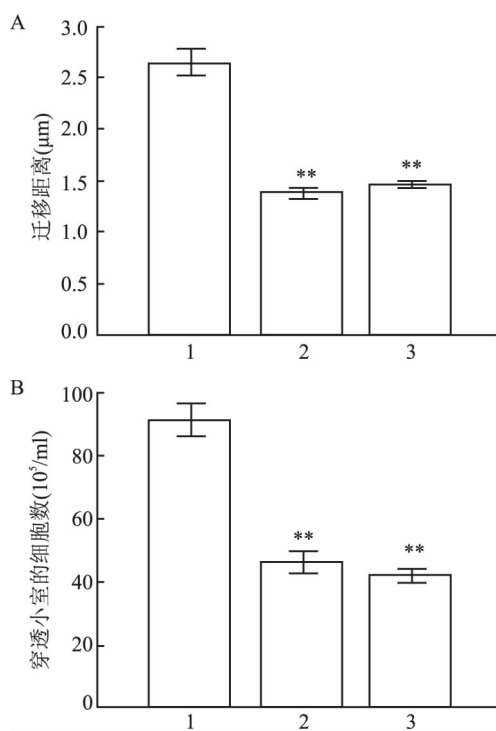


图 2 抑制 Src 激酶和 p38 激酶后人乙酰肝素酶重组蛋白对人胃癌 MGC-803 细胞迁移和基质侵袭能力的影响

A: 人胃癌 MGC-803 细胞相对迁移距离; B: 人胃癌 MGC-803 细胞侵袭能力; 1: 10 μg/ml 处理组; 2: pp2+处理组; 3: SB203580+处理组; 与 10 μg/ml 处理组比较: \*\*  $P < 0.01$

2.3 人乙酰肝素酶重组蛋白对人胃癌 MGC-803 细胞中 p-Src 和 p-p38 蛋白表达的影响 经 Western blot 检测显示,与正常对照组相比,10 μg/ml 处理组作用人胃癌 MGC-803 细胞 24 h 后,p-Src 和 p-p38

蛋白表达均明显升高 ( $t = 13.85, 20.11, P < 0.01$ ),而 Src 和 p38 蛋白表达均无明显变化(图 3)。

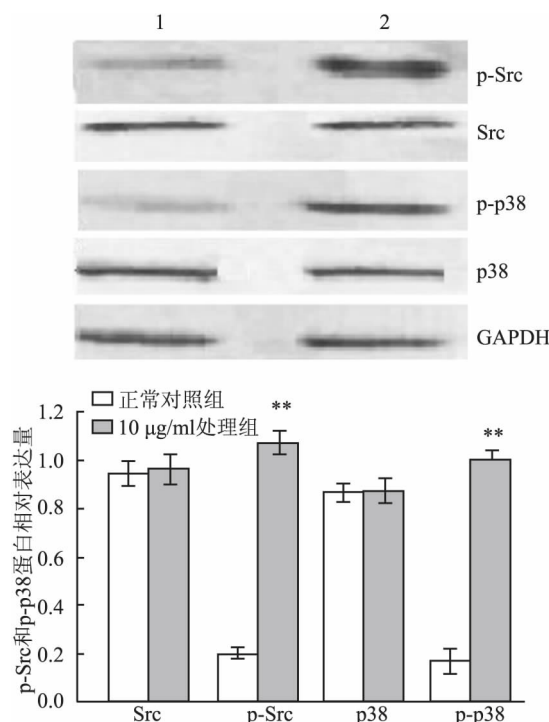


图 3 Western blot 法检测人乙酰肝素酶重组蛋白对人胃癌 MGC-803 细胞 p-Src 和 p-p38 蛋白表达的影响

1: 正常对照组; 2: 10 μg/ml 处理组; 与正常对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

2.4 SGC-7901-Heparanase(-) 细胞中 p-Src 和 p-p38 蛋白的表达 Western blot 检测显示,与高表达乙酰肝素酶的人胃癌 SGC-7901 细胞相比,SGC-7901-Heparanase(-) 细胞中 p-Src 和 p-p38 蛋白表达明显下降 ( $t = -24.78, -44.52, P < 0.01$ ) (图 4)。

2.5 Src 激酶和 p38 激酶特异性抑制剂对人胃癌 SGC-7901 细胞中乙酰肝素酶蛋白表达的影响 5 μmol/L pp2 和 1 μmol/L SB 203580 作用人胃癌 SGC-7901 细胞 24 h 后,经 Western blot 检测显示,人胃癌 SGC-7901 细胞中乙酰肝素酶蛋白的表达无明显变化(图 5)。

2.6 Src 激酶特异性抑制剂对人胃癌细胞中 p-p38 蛋白表达的影响和 p38 激酶特异性抑制剂对人胃癌细胞中 p-Src 蛋白表达的影响 经 Western blot 检测显示,5 μmol/L 的 pp2 作用人胃癌 SGC-7901 和 MGC-803 细胞 24 h 后,细胞中 p-p38 蛋白表达均明显降低 ( $t = -13.47, -25.76, P < 0.01$ ) (图 6)。而 1 μmol/L 的 SB 203580 作用人胃癌 SGC-7901 和

MGC-803 细胞 24 h 后, 细胞中 p-Src 的表达均无明显变化(图 7)。

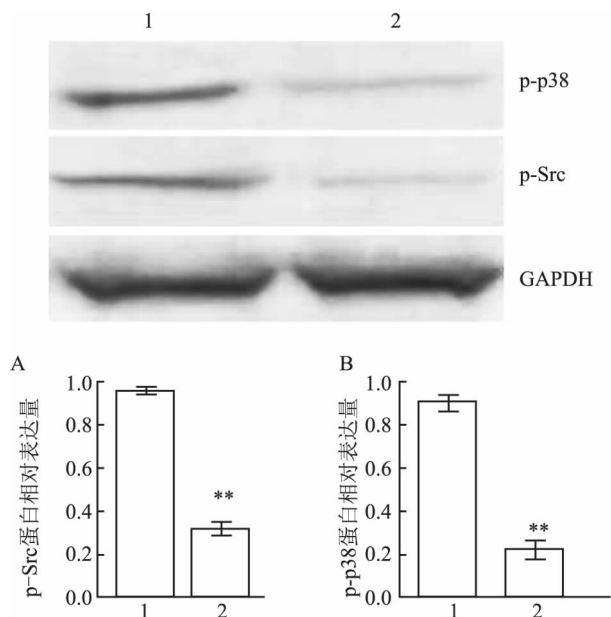


图 4 Western blot 法检测人胃癌 SGC-7901 细胞乙酰肝酶表达下调对 p-Src 和 p-p38 蛋白表达的影响

A: p-Src 蛋白表达; B: p-p38 蛋白表达; 1: SGC-7901 细胞组; 2: SGC-7901-Heparanase(-) 细胞组; 与 SGC-7901 细胞组比较: \*\*  $P < 0.01$

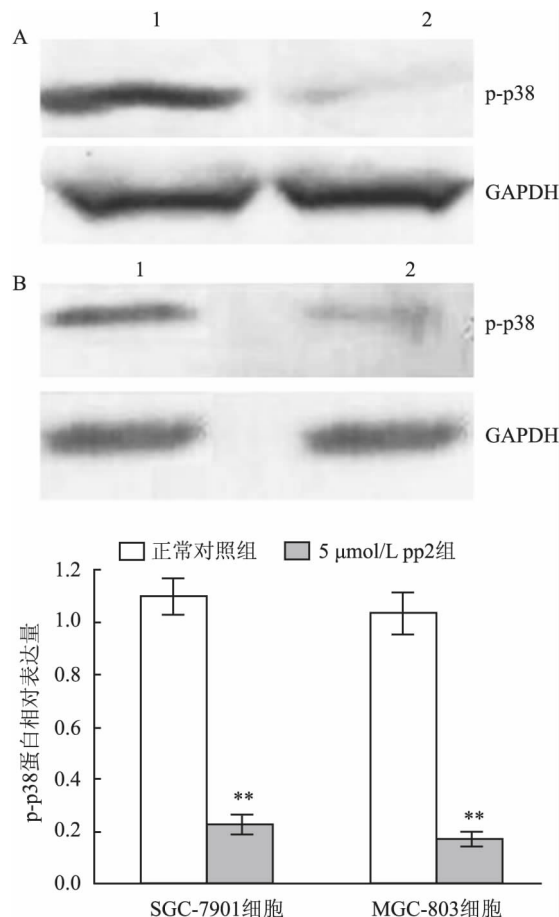


图 6 Src 激酶特异性抑制剂对人胃癌细胞中 p-p38 蛋白表达的影响

A: SGC-7901 细胞; B: MGC-803 细胞; 1: 正常对照组; 2: 5 μmol/L pp2 组; 与正常对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

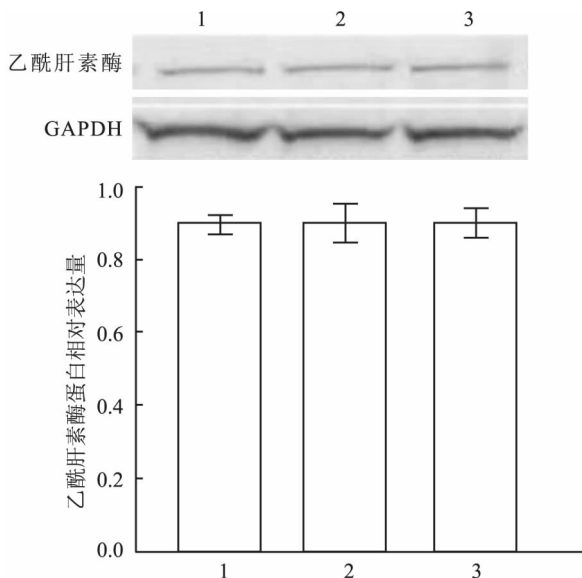


图 5 Src 激酶和 p38 激酶特异性抑制剂对人胃癌 SGC-7901 细胞中乙酰肝酶蛋白表达的影响

1: 正常对照组; 2: 5 μmol/L pp2 组; 3: 1 μmol/L SB 203580 组

### 3 讨论

大量研究<sup>[2]</sup>已显示, 乙酰肝酶促进肿瘤侵

袭、血管形成和转移。目前研究<sup>[4-6]</sup>显示乙酰肝酶促进肿瘤侵袭、血管形成和转移的机制有两种, 一种是依赖乙酰肝酶的酶活性切割细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 和基底膜 (basement membrane, BM) 主要结构成分 HSPG 中的 HS。HS 分子被乙酰肝酶分解, 会产生两方面的影响: ① 细胞外屏障作用被分解, 促进细胞的移动, 与炎症、肿瘤的侵袭和转移有关; ② 释放 HS 结合的生物活性的促进血管生成和生长的因子<sup>[8]</sup>。另一种机制是乙酰肝酶能引发细胞信号转导的级联反应, 引起与肿瘤侵袭、血管形成和转移有关因子的表达, 从而促进肿瘤侵袭、血管形成和转移<sup>[4-6]</sup>。

MAPKs 是细胞内普遍存在的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。研究<sup>[7]</sup>证实, MAPKs 信号转导通路存在于大多数细胞内, 在将细胞外刺激信号转导至细胞及其核内, 并引起细胞生物学反应的过程中具有至关重要的作用。最近研究<sup>[7, 9-10]</sup>显示, MAPKs 信

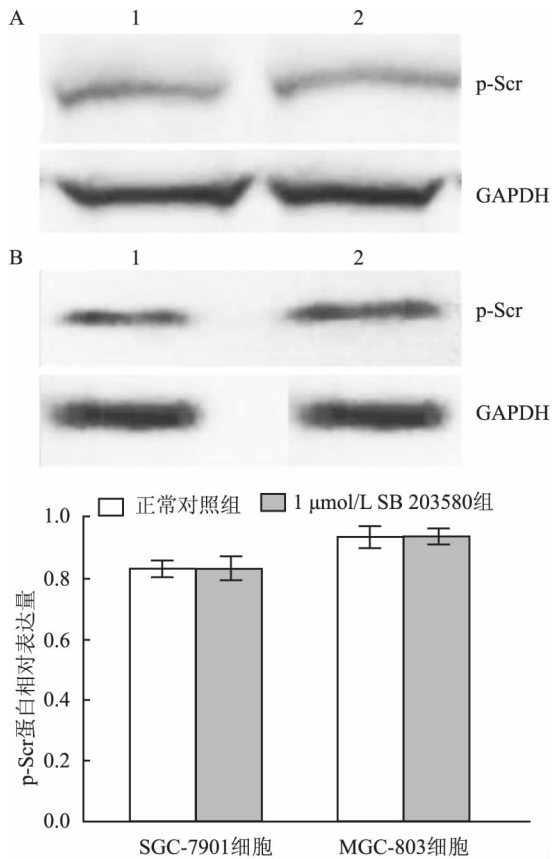


图7 p38 激酶特异性抑制剂对人胃癌细胞中 p-Src 蛋白表达的影响  
A:SGC-7901 细胞;B:MGC-803 细胞;1:正常对照组;2:1 μmol/L SB 203580 组

号转导通路中的 p38 通过参与细胞移动、蛋白酶的诱导等与肿瘤侵袭和转移有关。Src 是第一个被发现的癌基因,但目前研究显示其致癌性很弱,是一个多功能细胞内酪氨酸激酶,主要是和膜受体、类固醇激素受体、G 蛋白调节通路、信号转导物如 MAPKs、信号转导和转录活化因子 (signal transducer and activator of transcriptions, STATs)、局部黏附激酶 (focal adhesion kinase, FAK)、适配蛋白像 P130CAS 等相互作用,起到信号转导的作用,参与大量生理和肿瘤的形成过程,像增殖、分化、存活、移动和血管形成,而且是目前肿瘤研究<sup>[11-13]</sup> 的热点内容。

本研究中显示处理组可明显增强人胃癌 MGC-803 细胞的迁移和侵袭能力,并具有浓度依赖性,即随着浓度的加大这种促进能力增强。本研究也显示,人乙酰肝素酶重组蛋白能明显促进人胃癌 MGC-803 细胞 Src 激酶和 p38 激酶磷酸化,即明显促进人胃癌 MGC-803 细胞 p-Src 和 p-p38 蛋白表达;然而,5 μmol/L Src 激酶的抑制剂 pp2 和 1 μmol/L p38 激酶的抑制剂 SB 203580 均能明显削弱

人乙酰肝素酶重组蛋白促进的人胃癌 MGC-803 细胞迁移和侵袭的能力,而在乙酰肝素酶表达被下调的人胃癌 SGC-7901-Heparanase(-) 细胞中 p-Src、p-p38 蛋白表达均降低,pp2 和 SB 203580 对人胃癌 SGC-7901 细胞中乙酰肝素酶的表达无影响。本研究表明,在人胃癌细胞中,乙酰肝素酶可能通过促进 Src 激酶和 p38 激酶的磷酸化促进人胃癌细胞迁移和侵袭能力。而且,在本研究显示,Src 激酶的特异性抑制剂 pp2 抑制人胃癌 SGC-7901 和 MGC-803 细胞中 p-p38 的表达,而 p38 激酶特异性抑制剂 SB 203580 对人胃癌 SGC-7901 和 MGC-803 细胞中 p-Src 的表达无影响。这表明,在人胃癌细胞中,Src 激酶可调节 p38 激酶磷酸化。

综上所述,乙酰肝素酶可能通过促进 Src 激酶磷酸化或 p38 激酶的磷酸化或先促进 Src 激酶磷酸化再促进 p38 激酶的磷酸化,从而促进人胃癌细胞迁移和侵袭能力,乙酰肝素酶-Src 激酶磷酸化、乙酰肝素酶-p38 激酶磷酸化或乙酰肝素酶-Src 激酶磷酸化-p38 激酶磷酸化可能是人胃癌细胞内存在的与细胞迁移和侵袭有关的信号转导通路。

参考文献

[1] 马秀梅,孙勤暖,任明姬,等. 胃癌乙酰肝素酶和 NF-κB 表达与临床病理特征和血管形成的关系[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2007, 16(1): 12-8.

[2] 马秀梅,王栓柱,于宏,等. 沉默乙酰肝素酶对人胃癌细胞侵袭迁移能力的影响[J]. 肿瘤, 2009, 29(10): 924-8.

[3] 怀娜,于虹,马秀梅. 沉默乙酰肝素酶基因对胃癌生物学行为的影响[J]. 中华肿瘤杂志, 2010, 32(9): 645-9.

[4] Zhang L, Ngo J A, Wetzel M D, et al. Heparanase mediates a novel mechanism in lapatinib-resistant brain metastatic breast cancer [J]. Neoplasia, 2015, 17(1): 101-13.

[5] Riaz A, Ilan N, Vlodaysky I, et al. Characterization of heparanase-induced phosphatidylinositol 3-kinase-AKT activation and its integrin dependence [J]. J Biol Chem, 2013, 288(17): 12366-75.

[6] Cao L, Chen X, Xiao X, et al. Resveratrol inhibits hyperglycemia-driven ROS-induced invasion and migration of pancreatic cancer cells via suppression of the ERK and p38 MAPK signaling pathways [J]. Int J Oncol, 2016, 49(2): 735-43.

[7] Su Y, Wan D, Song W. Dryofragin inhibits the migration and invasion of human osteosarcoma U2OS cells by suppressing MMP-2/9 and elevating TIMP-1/2 through PI3K/AKT and p38 MAPK signaling pathways [J]. Anticancer Drugs, 2016, 27(7): 660-8.

[8] Vlodaysky I, Friedmann Y, Elkin M, et al. Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis [J]. Nat Med, 1999, 5(7): 793-802.

[9] Kim J H, Cho E B, Lee J, et al. Emetine inhibits migration and

- invasion of human non-small-cell lung cancer cells *via* regulation of ERK and p38 signaling pathways [J]. *Chem Biol Interact*, 2015, 242: 25–33.
- [10] Yang Y, Cheon S, Jung M K, et al. Interleukin-18 enhances breast cancer cell migration *via* down-regulation of claudin-12 and induction of the p38 MAPK pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 459(3): 379–86.
- [11] Liu W, Kovacevic Z, Peng Z, et al. The molecular effect of metastasis suppressors on Src signaling and tumorigenesis: new therapeutic targets [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(34): 35522–41.
- [12] Lai Y H, Chen M H, Lin S Y, et al. Rhodomycin A, a novel Src-targeted compound, can suppress lung cancer cell progression *via* modulating Src-related pathways [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(28): 26252–65.
- [13] Mader C C, Oser M, Magalhaes M A, et al. An EGFR-Src-Arg-cortactin pathway mediates functional maturation of invadopodia and breast cancer cell invasion [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(5): 1730–41.

## Role and relationship of Src kinase and p38 kinase in heparanase promoting the migration and invasion of human gastric cancer cells

Hu Lingdan, Na Risu, Ma Xiumei et al

(Dept of Pathology, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059)

**Abstract** *Objective* To study the role and relationship of Src kinase and p38 kinase in heparanase promoting migration and invasion of human gastric cancer cells. *Methods* Rats were divided into 3 groups. The first group was normal control group (no other treatment to the cells); the second group was treated with human recombinant heparanase protein (5  $\mu\text{g/ml}$  and 10  $\mu\text{g/ml}$ ), and the third group was added into Src kinase specific inhibitor pp2 (5 mol/L) or p38 kinase specific inhibitor SB 203580 (1 mol/L) 3 hours in advance, and then was treated by human recombinant heparanase protein (10  $\mu\text{g/ml}$ ) for 24 hours. Scratch wound assay and Transwell chamber stromal invasion assay were used to detect the effects of each treatment group on the migration and invasion ability of human gastric cancer MGC-803 cell. Western blot was used to detect the effects of each treatment group on the expression of Src kinase, p38 kinase, phosphorylation of Src kinase (p-Src) and phosphorylation of p38 kinase (p-p38) in human gastric cancer cell line MGC-803 cells, SGC-7901 cells and the SGC-7901-Heparanase (-) in which the expression of heparanase was down regulated. *Results* Compared with the normal control group, both 5 and 10  $\mu\text{g/ml}$  recombinant heparanase protein could significantly enhance the migration and invasion ability of human gastric cancer MGC-803 cell ( $P < 0.05$ ); compared with human recombinant heparanase protein group without inhibitors, both Src kinase specific inhibitor pp2 and p38 kinase specific inhibitor SB 203580 could weaken the migration and invasion ability of the MGC-803 cell, which was enhanced by recombinant human heparanase protein ( $P < 0.05$ ). Human recombinant heparanase protein (10  $\mu\text{g/ml}$ ) could promote the phosphorylation of Src kinase and p38 kinase in human gastric cancer MGC-803 cells, and the expression level of phosphorylation of Src kinase and p38 kinase in SGC-7901-Heparanase (-) cells was lower than that in SGC-7901 cells ( $P < 0.01$ ). Src kinase specific inhibitor pp2 and p38 kinase specific inhibitor SB 203580 had no obvious effect on the expression of heparanase protein in human gastric cancer SGC-7901 cells. In human gastric cancer SGC-7901 cells and MGC-803 cells, Src kinase inhibitor pp2 inhibited the expression of p-p38 protein, while p38 kinase inhibitor SB 203580 had no significant effect on the expression of p-Src protein. *Conclusion* Heparanase, probably through promoting the phosphorylation of Src kinase or p38 kinase, or probably through first promoting the phosphorylation of Src kinase and then the phosphorylation p38 kinase, promotes the migration and invasion ability of human gastric cancer cell. Heparanase-Src kinase phosphorylation-p38 kinase phosphorylation may be the signal transduction pathway related to cell migration and invasion in human gastric cancer cells.

**Key words** gastric cancer; heparanase; Src kinase; p38 kinase