文章编号:1005-6947(2005)10-0744-04

·实验研究·

NK-4 抑制结肠癌细胞增殖的机制初探

李静喆, 张辉, 张仲良, 张永清, 李其棠

(甘肃省兰州市第一人民医院 肿瘤外科, 甘肃 兰州 730050)

摘要:目的 探讨肝细胞生长因子及其受体(HGF/c-Met)拮抗剂对结肠癌细胞的作用及其与MEK/ERK 信号通路的关系,明确以 HGF/c-Met 为靶点治疗结肠癌的细胞内信号传导机制。**方法** 分别将 HGF 及选择性 c-Met 拮抗剂 NK-4 作用于结肠癌细胞系 LoVo,运用 MTT 法分别于 0,6,12,24h 检测细胞增殖状态;流式细胞仪观察两者对细胞凋亡的影响。采用 Western blot 检测药物作用前后 c-Met,p-c-Met,MEK2 和 p-ERK 及其靶基因产物 C-myc 的表达。**结果** NK-4 组呈剂量依赖性方式抑制结肠癌细胞增殖,促进其凋亡,并使 p-c-Met 及 MEK2/ERK 通路相关蛋白表达下调,而 HGF 组则使其表达上调;同时处理 24h 后,空白组 与 NK-4 组(1μg/mL)中 p-c-Met,MEK2,p-ERK 及 C-myc 蛋白表达水平比值分别为 2.58,1.89,1.67 和 2.21($P<0.01$),而与 HGF(50ng/mL)组相关蛋白比值为 0.46,0.71,068 和 0.58($P<0.01$)。**结论** 选择性 HGF 拮抗剂 NK-4 抗结肠癌可能通过阻断 MEK2/ERK 信号传导通路影响肿瘤细胞增殖与凋亡,以 HGF/c-Met 为靶点的结肠癌信号通路阻断治疗具有可行性和有效性 。

关键词:结肠肿瘤/病理学; 细胞增殖; NK-4

中图分类号:R735.35 **文献标识码**:A

Premliminary study of NK-4 inhibition on proliferation of colon cancer cells

LI Jing-zhe, ZHANG Hui, ZHANG Zhong-liang, ZHANG Yong-qing, LI Qi-tang

(Department of Tumor Surgery, the First People's Hospital Of Lanzhou, Lanzhou 730050, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of selective HGF/cMet inhibitor-NK-4 against colon cancer and reveal the potential signaling pathway mechanism of NK-4 effect on colon cancer cell. **Methods** LoVo colon cancer cells were treated with NK-4 (a selective inhibitor of c-Met phosphorylation) at different times. MTT assay and flow cytometry were used to measure cell proliferation and apoptosis. The expression of c-Met, p-c-Met, MEK2, p-ERK and C-myc were measured by Western blot. **Results** In NK-4-treated group, cells proliferation were inhibited and apoptosis induced in a dose -dependent manner, and resulted in significant downregulation of p-c-Met and MEK2/ERK pathway-related protein. The effect of HGF/on LoVo was the opposite. The ratios of p-c-Met, MEK2, p-ERK and C-myc expression between blank group and the NK-4(1μg/mL)-treated for 24h group were 2.58, 1.89, 1.67 and 2.21($P<0.01$), and for HGF(50mg/mL) group were 0.46, 0.71, 068, 0.58($P<0.01$), respectively. **Conclusions** The results showed that selective c-Met inhibitor -NK-4 may inhibit proliferation and induce apoptosis of colon cancer cell lines LoVo through blockade of MEK2/ERK signaling pathway. It may be a new target of selective HGF/c-Met inhibitor effect on colon cancer.

Key words: Colonic Neoplasms/pathol; Cells Proliferation; NK-4

CLC number: R735.35 **Document code**: A

基金项目:甘肃省兰州市科技局科学技术发展基金资助项目(2004332)。

收稿日期:2004-07-06; **修订日期**:2005-05-30。

作者简介:李静喆(1962-),男,山西运城人,甘肃省兰州市第一人民医院副主任医师,主要从事胃肠道肿瘤基础与临床方面的研究。

通讯作者:张辉 电话:13141316992(手机); E-mail:zhanghui1019@sina.com。

肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)及其受体(c-Met)在相当一部分人类肿瘤中存在高表达,并与恶性肿瘤发生、发展及转移密切相关[1]。其信号转导以及它与其他细胞因子的关系正日益受到关注。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)级联中 MEK/ERK 是细胞信号转导的重要途径,可被多种炎症因子、生长因子和环境应激反应等激活而导致细胞增殖[2]。研究[3]表明 NK-4(一个带有 HGFN 端氨基 Kringle 结构域的缩合肽),通过与 HGF 竞争与其受体 c-Met 的结合来抑制肿瘤的侵袭生长,扮演着肿瘤血管形成的抑制因子。本实验将结肠癌细胞株 LoVo 作为研究体系,观察选择性 c-Met 磷酸化抑制剂 NK-4 对体外培养的 LoVo 细胞增殖与凋亡的影响,检测 MEK/ERK 信号通路相关蛋白的变化,以期探讨选择性 c-Met 磷酸化抑制剂对结肠癌细胞内信号传导的作用机制。

1　材料与方法

1.1　材料

结肠癌细胞株 LoVo 由协和医科大学基础部提供;RPMI-1640 培养基、胰蛋白酶购自美国 Gibcobrl 公司;胎牛血清购自美国 HyClone 公司;四甲基偶氮唑盐(MTT),二甲基亚砜(DMSO),HGF 购自美国 Sigma 公司;NK-4,兔抗人 c-Met,MEK2,p-ERK 及 C-myc 多克隆抗体购自美国 Santa Cruse 公司;鼠抗人 p-c-Met 多克隆抗体购自美国 Sigma 公司;b-actin 单克隆抗体购自 Sigma 公司;膜联蛋白(Annexin)V-FITC 细胞凋亡试剂盒由北京大学医学免疫中心提供。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养　人结肠癌细胞系 LoVo,用含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基于 37℃ 5% CO_2 细胞孵箱中传代培养。至 80% 汇满后无血清培养 16h,药物干预。实验分为 3 组:(1)对照组(不加任何干预剂);(2)NK-4 组(加入 NK-4,使终浓度为 0μg/mL,0.5μg/mL,1.0μg/mL 和 1.5μg/mL);(3)HGF 组(加入 HGF,使终浓度为 0ng/mL,25ng/mL,50n g/mL 和 75ng/mL)。

1.2.2　结肠癌细胞增殖率变化(MTT 法)　3 组细胞于 0,6,12,24h 分别加入 MTT 5mg/mL,继续培养 4h;每孔加入 DMSO 200μL,酶标仪测定 540nm 吸收值,绘制生长曲线。

1.2.3　流式细胞仪检测细胞凋亡　治疗组(即 NK-4 组和 HGF 组)培养基中分别加入 NK-4(终浓度为 1μg/mL)和 HGF(终浓度为 50 ng/mL)处理细胞;于 24h 消化细胞,PBS 洗涤后,加入 10μL Annexin Ⅴ-FITC 和 5μL 的碘化丙啶(PI),轻轻混匀,避光,室温反应 15min 或 4℃ 反应 30min。加入 300μL Binding Buffer,立即上机(流式细胞仪)检测氩离子激光功率 200mW,波长 488nm。资料用 CELLTIL 细胞周期分析软件处理。

1.2.4　细胞核蛋白提取与 Western blot[4]　(1)细胞核蛋白提取:根据 Ming[5] 方法提取 LoVo 细胞核蛋白。(2)蛋白浓度测定方法(Bradford 法):以牛血清蛋白(BSA)作为标准品,根据蛋白定量试剂盒(美国 Bio-Rad 公司)的说明绘制蛋白定量标准曲线,于分光光度计 500nm 下测光密度值,计算提取液蛋白浓度。(3)核蛋白样品(20mg)经 10% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳后,电转移至硝酸纤维素膜(NC)(Millipore 公司);10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后电转移到 NC 膜(Millipore 公司),封闭后,加入一抗及二抗(辣根过氧化物酶结合的抗体,中山生物公司)。用 ECL(英国 Amersham 公司)化学发光试剂盒检测杂交信号。用密度扫描仪(ZEISS 全自动图像分析仪,VIDAS 数据分析)测定条带的吸光度值(A 值),c-Met, p-c-Met, MEK2, p-ERK, C-myc 与内参照(b-actin)灰度值比值表示其相对表达强度。重复 3 次独立实验。

1.3　统计学处理

实验结果用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 SPSS 10.0 软件分析结果。比较分析采用单因素方差分析。

2　结　果

2.1　HGF 及 NK-4 对人结肠癌细胞株 LoVo 增殖的影响

不同浓度 HGF 加入培养基后的第 6,12,24h,用 MTT 法测定细胞生长,与相应空白对照组相比,LoVo 细胞增殖水平增加,呈现剂量依赖性;而加入不同浓度 c-Met 抑制剂的 NK-4 组,则细胞增殖受到抑制,呈剂量依赖性(图 1~3)。

图1 HGF及NK-4对结肠癌LoVo细胞增殖的影响

图2 不同浓度HGF处理结肠癌LoVo细胞后其生长曲线的变化

图3 不同浓度NK-4处理结肠癌LoVo细胞后其生长曲线的变化

2.2 HGF及NK-4对LoVo细胞凋亡的影响

LoVo细胞24h自然凋亡率为18.3%，HGF（50ng/mL）处理24h后细胞凋亡率为12.1%，两者差异有显著性（$P<0.01$）；NK-4（1μg/mL）处理组为33.2%，与HGF处理组相比，两者差异有显著性（$P<0.01$）（图4）。

对照组 HGF组 NK-4组

图4 HGF及NK-4对LoVo细胞凋亡的影响

2.3 加入HGF及NK-4对LoVo细胞中c-Met，p-c-Met蛋白表达的影响

Western blot示：1.0μg/mL NK-4处理（图5）细胞后，不同时间点（给药后第0，6，12，24h及48h）c-Met磷酸化活性与对照组比较逐渐降低（对照百分数为0.46±0.08比1.00±0.11，$P<0.01$）；而50ng/mL HGF处理（图6）后则c-Met磷酸化活性逐渐增强（对照百分数为2.58±0.23比1.00±0.11，$P<0.01$），两者均呈时间依赖趋势。同时，细胞内c-Met水平较对照细胞差异均无显著意义（对照百分数为1.21±0.16比1.00±0.13，$P>0.05$）（附表）。

2.4 MEK2/ERK信号通路在HGF及NK-4处理细胞中的作用

1.0μg/mL NK-4处理LoVo细胞24h可引起ERK磷酸化活性下调，同时其上游激酶MEK2及下游靶基因C-myc蛋白表达水平下降，空白对照组与p-ERK，MEK2，C-myc蛋白表达水平比值分别为1.67，1.89和2.21（$P<0.01$）；而50ng/mL HGF处理LoVo细胞24h可引起ERK磷酸化活性上调，同时其上游激酶MEK2及下游靶基因C-myc蛋白表达水平增高，空白对照组与p-ERK，MEK2，C-myc蛋白表达水平比值分别为0.68，0.71和0.58（$P<0.01$）（图7，附表）。

图5 1μg/mL NK-4对c-Met及磷酸化c-Met表达的影响

图6 50ng/mL HGF对c-Met及磷酸化c-Met表达的影响

图7 HGF及NK-4对LoVo细胞MEK2/ERK通路相关蛋白表达的影响

附表　HGF 及 NK-4 处理 LoVo 细胞 24h MEK2/ERK 通路相关蛋白及 p-c-Met 表达变化($\bar{x} \pm s$,%)

分组	MEK2	p-ERK	C-myc	p-c-Met
空白对照	0.82 ±0.09	0.93 ±0.10	1.21 ±0.08	1.00 ±0.11
HGF 组	1.70 ±0.12†	1.37 ±0.62†	2.09 ±0.26†	2.58 ±0.23†
NK-4 组	0.64 ±0.05†	0.56 ±0.08†	0.55 ±0.11†	0.46 ±0.08†

注:以上每组数据为实验重复3 次所得;† 与空白对照组比较,$P < 0.01$

3 讨论

HGF 通过结合并作用于特异性一氨酸跨膜受体 c-Met 从而在肿瘤侵袭、转移及血管生成中发挥着重要作用。Horiguchi[6] 等在转基因肝癌模型鼠的治疗中,发现 HGF 通过其受体 c-Met 自分泌活动调节肝癌的发生及血管形成,并与肿瘤的侵袭性呈正相关。但以此为靶点进行肿瘤干预治疗的有效性及其细胞内信号传导机制目前尚不明了。新近研究表明,NK-4 作为 c-Met 特异性磷酸化抑制剂,其基因转导为肿瘤治疗提供了一条潜在的有效途径。Hiscox[7] 在能够表达 HGF/SF 蛋白的乳腺癌细胞株中研究显示,通过人工基底膜 NK-4 抑制了由 HGF/SF 诱导的肿瘤的侵袭,其运动及播散也受到很大程度的抑制。但其具体作用机制尚不明确。作为肿瘤细胞内重要的信号通路 MEK/ERK——调节细胞增殖、分化、凋亡[8,9],是否参与了以 HGF/c-Met 为靶点治疗结肠癌的细胞内分子机制? 此问题尚需探讨。

本课题将结肠癌细胞株 LoVo 作为研究体系,分别观察了 c-Met 抑制剂 NK-4 及 HGF 对结肠癌细胞增殖和凋亡的影响;并从蛋白磷酸化水平检测了两者处理 LoVo 细胞后 c-Met 及 MEK2/ERK 信号通路的活性和上下游靶基因产物(MEK2,C-myc)的表达,明确了 NK-4 抗结肠癌及 HGF 促进其增殖的细胞内分子机制。本实验结果显示,选择性 c-Met 抑制剂 NK-4 呈剂量依赖性方式抑制 LoVo 细胞增殖,促进其凋亡;而 HGF 作用与之相反。表明以 HGF/c-Met 为靶点对结肠癌进行干预治疗具有可行性,为其分子靶向治疗提供理论依据。进一步研究表明,NK-4 使 LoVo 细胞中 c-Met 磷酸化活性随作用时间延长而逐步下降,印证了其直接作用的靶点;与之相反的是 HGF 使 c-Met 磷酸化活性增加。在此基础上,用 Western blot 检测显示 MEK2/ERK 信号传导通路与 NK-4 及 HGF 作用机制关系密切。由于 MEK2/ERK 通路下游靶基因 C-myc 为一原癌基因,同时作为核转录因子调控肿瘤细胞增殖与调亡。因此本研究结果,可以表明 NK-4 可能通过阻断 ERK 通路活性从而抑制结肠癌细胞生长和诱导凋亡。但对此通路的具体作用靶点尚需进一步研究。

本实验结果显示 HGF/c-Met 作为抗结肠癌的新靶点,其抗肿瘤机制存在 MEK2/ERK 信号途径,而其效应与下游靶基因 C-myc 表达密切相关,故认为本研究为进一步开展结肠癌信号阻断治疗提供实验基础和理论依据。

参考文献:

[1] Tanaka K, Miki C, Wakuda R, *et al*. Circulating level of hepatocyte growth factor as a useful tumor marker in patients with early-stage gastric carcinoma [J]. Scand J Gastroenterol, 2004, 39(8):754 -760.

[2] Rodney J, Fiddles, Peter W Janes , *et al*. Inhibition of the MAP kinase cascade blocks heregulin-induced cell cycle progression in T-47D human breast cancer [J]. Oncogene ,1998,16(7), 2803 -2813.

[3] Ueda K, Iwahashi M, Matsuura I, *et al*. Adenoviral-mediated gene transduction of the hepatocyte growth factor (HGF) antagonist, NK4, suppresses peritoneal metastases of gastric cancer in nude mice [J]. Eur J Cancer, 2004, 40(14):2135 - 2142.

[4] Grandis JR, Drenning SD, Zeng Q, *et al*. Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(8): 4227 -4232.

[5] Li M, Yuan X, Xu XC. Inhibition of apoptosis in colon cancer cells by cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 through a cytochrome c-dependent pathway. Clin [J]. Cancer Res, 2001, 7(4): 1010 -1016.

[6] Horiguchi N, Takayama H, Toyoda M, *et al*. Hepatocyte growth factor promotes hepatocarcinogenesis through c-Met autocrine activation and enhanced angiogenesis in transgenic mice treated with diethylnitrosamine [J]. Oncogene, 2002 ,21(12):1791 - 1799.

[7] Hiscox S, Parr C, Nakamura T, *et al*. Inhibition of HGF/SF-induced breast cancer cell motility and invasion by the HGF/SF variant, NK4 [J]. Breast Cancer Res Treat, 2000 ,59(3): 245 -254.

[8] Cassano A, Bagala C, Battelli C, *et al*. Expression of vascular endothelial growth factor, mitogen-activated protein kinase and p53 in human colorectal cancer [J]. Anticancer Res , 2002, 22(4):2179 -2184.

[9] 张辉,张有成,王杉,等. 结直肠癌中 MEK2/ERK 信号传导通路的研究[J]. 中国普通外科杂志,2004,13(4): 257 -260.