

文章编号:1005-6947(2006)02-0111-05

· 实验研究 ·

大肠癌细胞增殖中 HGF/SF 作用的观察

李宏武¹, 张趣², 梁健¹

(1. 中国医科大学第四临床学院 普通外科, 辽宁 沈阳 110032; 2. 辽宁省沈阳市第四人民医院 儿科, 辽宁 沈阳 110035)

摘要:目的 研究肝细胞生长因子/离散因子(HGF/SF)在诱导大肠癌细胞增殖中的作用。方法 采用 Western Blot 方法,检测 HGF 的受体 c-met 在受检大肠癌细胞株 Caco-2, Colo320 中的表达;观察 Caco-2, Colo320 中 HGF/SF 活化 p42/p44 MAPK 和 p38 MAPK 的动态变化;应用 [³H]-TdR, MTT 方法观察 p42/p44 MAPK 和 p38 MAPK 传导通路阻滞剂 PD98059 和 SB203580 对 HGF/SF 诱导的大肠癌细胞增殖的抑制作用。**结果** (1) c-met 在 Caco-2 和 Colo320 中有表达。(2) HGF/SF 激活 p42/p44 MAPK, p38 MAPK; 20 ng/mL 的 HGF/SF 处理细胞, p42/p44 MAPK 磷酸化在 10 min 达高峰(2.28 ± 0.01); p38 MAPK 变化与之相似(2.25 ± 0.01)。(3) HGF/SF 诱导大肠癌细胞的 DNA 合成增加依赖于 p42/p44 MAPK 的激活, 在 24 h 时点分别以 20 ng/mL HGF/SF, 不同浓度(1 μmol/L, 5 μmol/L, 10 μmol/L)的 PD98059 和 SB203580 处理细胞, HGF/SF 使胸腺嘧啶吸收增加(P < 0.01); PD98059 以浓度依赖性抑制胸腺嘧啶的吸收(P < 0.01)。(4) HGF 促进 Caco-2 细胞的增殖, 而 PD98059 对这种增殖有抑制作用。**结论** HGF 激活大肠癌细胞 Caco-2 和 Colo320 中 p42/p44 MAPK 和 p38 MAPK; p42/p44 MAPK 参与 HGF/SF 诱导的大肠癌细胞 Caco-2 有丝分裂; HGF 促进大肠癌细胞 Caco-2 增殖; HGF/SF 和 p42/p44 MAPK 在大肠癌细胞中发挥作用可能有细胞选择性。

关键词:结直肠肿瘤/病理学; 肝细胞生长因子/离散因子; 癌细胞增殖

中图分类号: R735.35; R392.11

文献标识码: A

The function of HGF/SF in the proliferation of colorectal cancer cells

LI Hong-wu¹, ZHANG Qu², LIANG Jian¹

(1. Department of General Surgery, the Fourth Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110032, China; 2. Department of Pediatrics, the Fourth Hospital of Shenyang, Shenyang 110035, China)

Abstract: **Objective** To study the function of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) in the proliferation of colorectal cancer cells. **Methods** The expression of c-met, the receptor of HGF, was detected in Caco-2 and Colo320 cell lines by Western blot. The activation of p42/p44 MAPK and p38 MAPK induced by HGF in these two cell lines was observed. Observation of the effect of the inhibitor of p42/p44 MAPK (PD98059), p38 MAPK (SB203580) on the inhibition of HGF-induced proliferation of Caco-2 and Colo320 cells were made by Using [³H]-TdR, MTT assay. **Results** (1) Both cell lines expressed the c-met. (2) HGF activated p42/p44 MAPK and p38 MAPK, and 20 ng/ml HGF treated cells showed maximum activity in both to be within 10 min. (p42/p44 MAPK, 2.28 ± 0.01; p38 MAPK, 2.25 ± 0.01). (3) HGF was found to significantly increase [³H] thymidine incorporation (P < 0.01), when cells were pretreated with inhibitors of p42/p44 MAPK (PD98059) in different doses (1 μmol/L, 5 μmol/L, 10 μmol/L), HGF-induced thymidine uptake was suppressed in a dose-dependent manner (P < 0.01). (4) MTT assay found HGF enhanced the proliferation of Caco-2, however, PD98059 inhibited this proliferation. **Conclusions** The results demonstrate that HGF activates MAPK in both colorectal carcinoma cell lines, and p42/p44 MAPK take part in the mitosis of the Caco-2 cells, while HGF promotes the proliferation of Caco-2 cells. The function of HGF/SF and p42/p44 MAPK in colorectal cancer cells may have cellular selection.

收稿日期: 2005-08-15; **修订日期:** 2006-01-09.

作者简介: 李宏武, 男, 辽宁沈阳人, 中国医科大学第四临床学院副主任医师, 主要从事胃肠恶性肿瘤基础和临床方面的研究。

通讯作者: 李宏武

Key words: Colorectal Neoplasms/pathol; HGF/SF; Tumor Cells Proliferation

CLC number: R735.35; R392.11

Document code: A

恶性肿瘤的分化、增殖是浸润、转移发生的基础。研究表明肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor/scatter factor, HGF/SF)及其受体 c-met 相互作用对很多上皮组织具有促有丝分裂、诱导形态发生的作用,提示它们与恶性肿瘤增殖、侵袭和转移有关。HGF/SF 是一个多功能细胞因子,具有广泛的生物活性,通过其受体 c-met 对许多种细胞发挥作用。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)与细胞生长关系最密切,其也是近年国际前沿研究最多的丝氨酸/苏氨酸激酶。虽然 HGF/SF 作用多样,但对大肠癌细胞增殖的作用及主要途径还不十分清楚。因此,本实验应用 HGF/SF 诱导大肠癌细胞株 Caco-2 和 Colo320,观察 HGF, p42/p44 MAPK 和 p38 MAPK 在大肠癌细胞增殖中的作用以及 p42/p44 MAPK 和 p38 MAPK 抑制因子对细胞增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 试剂

人大肠癌细胞株 Caco-2 及 Colo320 购自中科院上海生命科学研究所; Dulbecco 改良培养基(DMEM)购自 Gibco 公司;胎牛血清(FBS)购自武汉博士德公司;人 HGF/SF 为深圳晶美公司代理美国 Pepro-Tech 产品,用无血清 DMEM 配制成 20 ng/mL,置于 -20℃ 保存备用; p42/p44 MAPK 及 p38 MAPK 阻断剂 PD98059 和 SB203580 购自 Promega 公司,用二甲基亚砜(DMSO)溶解,配成 20 mmol/L 和 10 mmol/L,用 DMEM 稀释至使用浓度 1 μmol/L, 5 μmol/L, 10 μmol/L, -20℃ 保存备用;兔抗鼠 c-met 抗体购自武汉博士德公司;phospho-p38 及 phospho-p42/p44 MAPK 抗体购自中山公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体为 Santa Cruz 产品;胸腺嘧啶脱氧核苷掺入物([³H]-TdR)购自北京原子能公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自 Sigma 公司。

1.2 Caco-2 及 Colo320 大肠癌细胞培养

分别用 10% 和 20% FBS 加 DMEM 培养液培养人大肠癌细胞株 Caco-2 和 Colo320,置于 37℃, 5% CO₂ 孵育箱中培养,24h 换液 1 次,用 0.25% 胰酶

加 0.02% EDTA 消化,1:2 或 1:4 传代培养。

1.3 Western Blot 免疫印记检测

1.3.1 c-met 免疫印迹 3 × 10⁶ 细胞/瓶用冷 Tris 盐缓冲液(TBS)洗 2 次,加入裂解液(200 mg 加 1 mL 缓冲液;其成分有 20 mmol/L TRIS, pH:7.5, 0.1 mmol/L Na₃VO₄, 25 mmol/L NaF, 2 mmol/L EDTA, EGTA, 1 mmol/L DTT, 1 mg/mL 亮氨酸/抑肽酶),匀浆机匀浆,4℃, 12 000 r/min 离心 1 h,上清液为总的细胞蛋白成分。蛋白定量采用酚试剂法:取样本试剂 20 μL 加碱酮液 2.5 mL,放置 20 min,加酚试剂 0.25 mL,放置 30 min;650 nm 比色(光密度值 OD = 实测 OD 值/标准 OD 值)。取出 25 μL 已定量样本加到电泳槽内,进行 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),50 V 转印;TBS 浸泡 10 min 后封闭(5% 脱脂奶粉 + TBS)1 h;吐温-Tris 盐缓冲液(TTBS)洗 5 min 2 次,置于兔抗人 c-met 一抗(用封闭液 1:400 稀释)反应过夜,TTBS 洗 5 min,2 次,置于辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗(用封闭液 1:2 000 稀释)中 2 h,TTBS 洗 5 min,2 次,TBS 洗 5 min,2 次。用底物发光 ECL 系统进行检测,X 光片显影。

1.3.2 p42/p44 及 p38 MAPK 免疫印迹 为研究 p42/p44 和 p38 MAPK 在 HGF/SF 诱导的大肠癌细胞增殖中的作用,分别采用对应的抑制因子 PD98059 和 SB203580,观察 [³H]-TdR 掺入量的变化。将 Caco-2, Colo320 细胞培养至对数生长期,3 × 10⁶ 细胞/瓶,20 ng/mL HGF/SF 分不同时间(10 min, 30 min, 1 h, 3 h)处理细胞,每时点收集细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次,5 min/次,用 TBS 洗 2 次;加入裂解液(200 mg 加 1 mL 缓冲液;成分 20 mmol/L TRIS, pH:7.5, 0.1 mmol/L Na₃VO₄, 25 mmol/L NaF, 2 mmol/L EDTA, EGTA, 1 mmol/L DTT, 1 mg/mL 亮氨酸/抑肽酶);匀浆机匀浆,4℃, 12 000 r/min 离心 1 h,上清液为总的细胞蛋白成分;蛋白定量采用酚试剂法;取出 25 μL 加到电泳槽内,进行 10% SDS-PAGE,50 V 转印,TBS 浸泡 10 min,封闭(5% 脱脂奶粉 + TBS)1 h,TTBS 洗 5 min 2 次,置于兔抗人一抗(phospho-p42/p44, p-p38)抗体(1:400 稀释)中反应过夜,其余处理方法与 1.3.1 相同。

1.4 [³H]-TdR 掺入 DNA 检测细胞增殖

取对数生长期的 Caco-2 和 Colo320 细胞用 0.25% 胰酶 + 0.02% 乙二胺四乙酸 (EDTA) 消化后,制成 2×10^5 个细胞/mL,按每孔 1 mL 接种于 24 孔培养板生长至细胞接近融合,用 HGF/SF 20 ng/mL 在 24 h 时点作用前 1 h 分别用 1, 5, 10 μ mol/L 浓度的 PD98059 和 SB203580 干预细胞;每种细胞分 3 组 (阻断剂, HGF + 阻断剂及 HGF/SF), 干预结束前 1 h 加入 18 500 Bq/mL 的 [³H]-TdR, 收集细胞, 无血清培养 1 ~ 24 h, 使细胞进入生长停止期。干预结束后冷 PBS 洗 2 次, 加 2 mL 10% 三氯乙酸 (TCA), 放置 10 min。若细胞松散, 加甲醇固定 10 min; 10% TCA 洗 2 次, 5 min/次, 沉淀 DNA; 每孔加入 0.5 mL 浓度为 0.3 mmol/L 的 NaOH (1% SDS 配制)。在 60℃ 条件下处理细胞 30 min, 冷却至室温; 每个时点收集细胞至玻璃纤维滤纸上, 烤干, 将玻璃纤维滤纸置于闪烁计数管中; 每管加闪烁液 10 mL, 闪烁仪测定每分钟脉冲数 (cpm 值)。结果以 cpm 值的均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

1.5 MTT 检测 HGF/SF 和 PD98059 的作用

第 1 天接种细胞: 常规胰酶消化细胞, 制成细胞悬液, 96 孔培养板 1×10^5 个细胞/孔, 每孔 200 μ L 培养液 DMEM, 置于 5% CO₂, 37℃ 饱和湿度条件下的孵箱中培养。第 2 天弃原培养液加处理因素: 对照组加 DMEM; HGF 组加 HGF 20 ng/mL; PD98059 组加 PD98059 40 μ mol/L; 分别培养 24, 48, 72, 96 h。显色: 培养结束前 4 h, 每孔加 MTT 溶液 20 μ L, 到时间点则终止培养; 弃上清, 每孔加 DMSO

100 μ L, 振荡 10 min, 用酶联免疫检测仪 570 nm 波长读取每孔光密度值 (OD)。

1.6 统计分析

使用 SPSS12.0 统计软件。所有数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 *t* 检验进行分析。P < 0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 Caco-2, Colo320 细胞中 HGF/SF 受体 c-met 的表达

c-met 受体在受检测的两种细胞中均有表达, 145 kD 是 c-met β 链 (图 1)。

1: marker; 2: Colo320 细胞; 3: Caco-2 细胞

图 1 c-met 在 Caco-2 和 Colo320 细胞中的表达 145 kD

2.2 HGF/SF 对 Caco-2, Colo320 细胞中的 p42/p44 MAPK 和 p38 MAPK 激活

Caco-2 细胞中的 p42/p44 MAPK 在 10 min 时达高峰, 然后活性下降 (图 2 a, b); p38 MAPK 变化与 p42/p44 MAPK 相似 (图 3 a, b)。证明在大肠癌细胞 Caco-2 中 HGF/SF 激活了 p42/p44 MAPK 和 p38 MAPK。在 Colo320 细胞中未发现 p42/p44 MAPK 和 p38 MAPK 的活化过程。

图 2a Caco-2 细胞中 HGF 作用下 p42/44 MAPK 蛋白表达

图 2b Caco-2 细胞中 HGF 作用下 p42/44 MAPK 活化过程

图 3a Caco-2 细胞中 HGF 作用下 p38 MAPK 蛋白表达

图 3b Caco-2 细胞中 HGF 作用下 p38 MAPK 活化过程

2.3 p42/p44 和 p38MAPK 阻断剂对 HGF/SF 诱导 Caco-2 和 Colo320 细胞的增殖作用

HGF/SF 诱导的大肠癌细胞 DNA 掺入量变化以 24h 为作用时点。在 Caco-2 细胞中 HGF 引起胸腺嘧啶掺入量增加,而使用 PD98059 后明显减少胸腺嘧

掺入量,并呈浓度依赖性抑制即 PD98059 浓度越高,胸腺嘧啶掺入量越少。提示 p42/p44 MAPK 参与 HGF/SF 诱导的大肠癌细胞增殖;而对 Colo320 细胞无上述作用。SB203580 无干预作用(图 4a, b, 图 5a, b)。

图 4a PD98059 对 HGF 诱导的 Colo320 细胞增殖的影响

图 4b SB203580 对 HGF 诱导的 Colo320 细胞增殖的影响

图 5a PD98059 对 HGF 诱导的 Caco-2 细胞增殖的影响

图 5b SB203580 对 HGF 诱导的 Caco-2 细胞增殖的影响

2.4 大肠癌细胞中 HGF 和 PD98059 的作用

与对照组比较, HGF 对 Caco-2 细胞有促增殖作用, 24h 时有统计学意义 ($P < 0.01$); PD98059 明显抑制细胞增殖, 但并不随时间延长而抑制率下降或增加(抑制率 = $A/B \times 100\%$ 。A = 对照值 - 实际值, B = 对照值 - 调 0 值)。在 Colo320 细胞中无作用意义。SB203580 无干预作用(表 1)(图 6)。

表 1 Caco-2 细胞中 HGF 和 PD98059 的作用

分组	OD 均值($\bar{x} \pm s$)			
	24h	48h	72h	96h
对照	0.38 ± 0.13	0.67 ± 0.08	0.76 ± 0.12	0.88 ± 0.02
HGF/SF	0.52 ± 0.05 [†]	0.67 ± 0.09	0.82 ± 0.05	0.82 ± 0.03
PD98059	0.42 ± 0.06 [†]	0.39 ± 0.05	0.40 ± 0.08	0.56 ± 0.10
调 0	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.08 ± 0.00	0.11 ± 0.01

注: † 与对照组比较, $P < 0.01$

图 6 Caco-2 细胞中 HGF 和 PD98059 的作用

3 讨论

1984 年 HGF/SF 被两个不同研究领域小组独立发现。1986 年 Gohda 从重症肝炎患者血浆中纯化获得 HGF。由于它对肝细胞具有非常强的丝裂原作用, 故命名为肝细胞生长因子。与此同时, Stoker 和 Perryman 发现, 由成纤维细胞分泌的另一种细胞因子, 可促进上皮细胞集落的扩散, 故称之为离散因子(SF)。后来通过对两种细胞因子结构和功能的研究发现 HGF 和 SF 为同一物质, 并发现与细胞分化、迁移、形态发生相关的许多进化过程依靠细胞外信号传导^[1]。HGF/SF 是多功能生长因子, 可诱导多种上皮细胞, 是上皮细胞形态发生的间叶细胞效应因子^[2]。体外实验表明, HGF/SF 可诱导肿瘤细胞增生、扩散、浸润和形态发生; 体内分析, HGF/SF 负责成人胚胎发生并参与多种活性调节, 这些活性与肿瘤形成和转移有关^[3]。1991 年 Battaro 等^[4]首次报道 HGF/SF 和 c-met 的关系, 原癌基因 c-met 的蛋白产物是 HGF 的酪氨酸受

体, HGF 与它的受体结合, 使受体酪氨酸激酶磷酸化, 引起细胞有丝分裂、形态发生等生物学效应。许多细胞内信号途径的研究提示这些作用都和与 c-met 结合的酪氨酸激酶活化有关。由 c-met 调节的生物学反应多是受体尾部 C-末端的单个多功能位点酪氨酸磷酸化所激发, 直接或间接通过效应子如 Grb2, She 和 Gab1 等与细胞浆内信号传递子相互作用^[5]。体外实验中, HGF 能诱导表达 c-met 的靶细胞多种作用, 包括细胞增殖、侵袭、转移等^[6]。本课题的前期实验^[7]也表明, 在大肠癌组织中 c-met mRNA 高水平表达, 提示 HGF/SF-c-met 与大肠癌侵袭、转移关系密切。本实验证明在大肠癌细胞 Caco-2 和 Colo320 中表达 HGF 的受体 c-met, 且 HGF/SF 增强大肠癌细胞胸腺嘧啶的吸收, 提示 HGF 促进大肠癌细胞增殖。

有关大肠癌细胞中 HGF/SF 与受体结合后信号转导通路的报道不多; 与细胞生长最密切也是近年研究最多的是丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路。该通路是一个重要的核内激活转录因子反应通路, 是将细胞外刺激信号传导至细胞核、介导细胞信息传递的共同通路, 许多细胞外刺激因子 (如缺血、应激、细胞因子等) 都通过此通路进行精细的细胞内调控。PD98059 是 MAPK 的抑制因子, 能阻滞 p42/p44 MAPK 活化; SB203580 抑制 p38 MAPK 下游靶目标的磷酸化。本实验结果表明: 在 HGF/SF 诱导的大肠癌细胞 Caco-2 中, HGF 刺激的有丝分裂可能与癌细胞增殖有关, HGF 激活了 Caco-2 中的 p42/p44 MAPK 和 p38 MAPK, 加入 p42/p44 MAPK 的阻断剂 PD98059 后, HGF 刺激的增殖效应被抑制。这提示 HGF/SF 诱导的表达 c-met 的大肠癌细胞增殖中有 p42/p44 MAPK 参与。本实验还发现 HGF 发挥作用可能有细胞选择性, 因为在 Colo320 细胞中未发现上述作用。

虽然 p42/p44 MAPK 与几种激活机制有关, 但被生长因子激活的作用最强^[8]。有报道^[9] p38 MAPK 与细胞凋亡有关, 但通常不被生长因子激活。也有报道^[10] p42/p44 MAPK 和 p38 MAPK

是造血细胞增殖所必需的。但目前有关 p42/p44 MAPK 和 p38 MAPK 作用的靶目标尚不十分明了。本实验结果提示: p42/p44 MAPK 参与 HGF 诱导的大肠癌细胞 Caco-2 的增殖过程; 在 HGF 诱导的大肠癌细胞增殖过程中可能有细胞类型的区别; 在 Caco-2 细胞 HGF 的促增殖作用中有 p42/p44 MAPK 途径参与。这可能是大肠癌细胞进入有丝分裂的重要途径, 为今后大肠癌的治疗提供理论依据。

参考文献:

- [1] Otte JM, Schmitz F, Kiehne K, *et al.* Functional expression of HGF and its receptor in human colorectal cancer [J]. *Digestion*, 2000, 61(4): 237-246.
- [2] Brinkmann V, Forouta H, Sache M, *et al.* Hepatocyte growth factor/scatter factor induces a variety of tissue-specific morphogenic programs in epithelial cells [J]. *J Cell Biol*, 1995, 131(6 Pt 1): 1573-1586.
- [3] Zhang YW, VandeWoude GF. HGF/SF-c-met signaling in the control of branching morphogenesis and invasion [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 88(2): 408-417.
- [4] Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, *et al.* Identification of the hepatocyte growth factor as the c-met proto-oncogene product [J]. *Science*, 1991, 251(4995): 802-804.
- [5] Nakagami H, Morishita R, Yamamoto Y, *et al.* Mitogenic and anti-apoptotic actions of hepatocyte growth factor through ERK, STAT3, and AKT in endothelial cells [J]. *Hypertension*, 2001, 37(2): 581-586.
- [6] Webb CP, Taybor GA, Jeffers M, *et al.* Evidence for a role of met-HGF/SF during Ras-mediated tumorigenesis/metastasis [J]. *Oncogene*, 1998, 17(16): 2019-2025.
- [7] 李宏武, 单吉贤. 人大肠癌组织肝细胞生长因子及其受体 c-met 的表达 [J]. *世界华人消化杂志*, 2004, 12(9): 2199-2201.
- [8] Cohen P. The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells [J]. *Trends Cell Biol*, 1997, 7(7): 353-361.
- [9] Davis RJ. MAPKs; new JNK-expands the group [J]. *Trends Biochem Sci*, 1994, 19(11): 470-473.
- [10] Rausch O, Marshall CJ. Cooperation of p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways during granulocyte colony-stimulating factor-induced hemopoietic cell proliferation [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(7): 4096-4105.