文章编号:1000-5404(2006)14-1479-04

论著

EGFR 信号通路调控结肠癌 Caco-2 细胞侵袭转移的分子机制

张晓晶,王　甦,刘云鹏,候科佐,王舒宝　(中国医科大学第一附属医院肿瘤科,沈阳 110001)

提　要:目的　探讨 EGFR 信号通路与人结肠癌 Caco-2 细胞增殖和侵袭转移的关系及其调控分子机制。**方法**　采用 MTT 法和 Boyden 小室体外侵袭实验检测 Caco-2 细胞增殖和体外侵袭能力;采用 RT-PCR 方法检测 MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2 基因转录水平;采用 Western blot 法检测 P-EGFR 和 P-ERK 蛋白表达。**结果**　外源性 EGF(10 μg/L)增加 P-EGFR 和 P-ERK 蛋白表达同时使 24 h 细胞生长率提高了 23.35%($P<0.01$),使过膜细胞数由(208 ± 3)上升到(241 ± 5)($P<0.01$)。当用 AG1478 (20 μmol/L)和 PD98059 (40 μmol/L)分别阻断 EGFR 和 ERK/MAPK 后,EGF 作用消失,Caco-2 细胞生长明显抑制($P<0.01$),但无时间效应关系;Caco-2 细胞体外侵袭力明显减弱($P<0.01$)。RT-PCR 测定显示,EGF 能增加 Caco-2 细胞 MMP-2、MMP-9 mRNA 的表达和减少 TIMP-1 和 TIMP-2 mRNA 的表达;而 AG1478 能逆转 EGF 的作用,使 MMP-2、MMP-9 mRNA 的表达下降,TIMP-1 和 TIMP-2 mRNA 的表达上升,结果 MMP-2/TIMP-2 比值和 MMP-9/TIMP-1 比值均下降($P<0.01$)。**结论**　EGFR-ERK/MAPK 信号通路通过改变基质金属蛋白酶和其抑制剂 mRNA 比值调控人结肠癌细胞侵袭转移能力。

关键词:表皮生长因子受体;侵袭;转移;基质金属蛋白酶
中图法分类号:R73-37;R730.23;R735.35　　**文献标识码**:A

Molecular mechanism of EGFR signaling pathway mediating invasion and metastasis of Caco-2 cell line

ZHANG Xiao-jing, WANG Su, LIU Yun-peng, HOU Ke-zuo, WANG Shu-bao (Department of Oncology, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: Objective　To study the effect and molecular mechanism of EGFR pathway mediating proliferation and invasion of Caco-2 cell line. Methods　The tetrazolium-based colorimetric assay was used to evaluate the cell growth treated by EGF, AG1478 or PD98059. The *in vitro* invasion assay was used to examine the invasiveness of Caco-2 cells treated by EGF, AG1478 or PD98059. MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 mRNA of Caco-2 cells were measured by RT-PCR. Expressions of P-EGFR and P-ERK protein of Caco-2 cells were determined by Western blotting. Results　Exogenous EGF enhanced significantly the growth and proliferation of Caco-2 cells. The growth ratio increased 23.35% ($P<0.01$) at 24 h. AG1478 (20 μmol/L) as EGFR inhibitor and PD98059 (40 μmol/L) as ERK inhibitor inhibited the growth and proliferation of Caco-2 cells in a time-independent manner ($P<0.01$). *In vitro* invasion assay showed that 10 μg/L EGF increased the invasion ($P<0.01$) of Caco-2 cells, while both AG1478 and PD9805 inhibited EGF-induced invasion of Caco-2 cells ($P<0.01$). RT-PCR assays revealed that exogenous EGF up-regulated mRNA levels of MMP-2 and MMP-9 and down-regulated mRNA levels of TIMP-1 and TIMP-2, and AG1478 and PD98059 decreased the levels of MMP-2, MMP-9 mRNA and increased the levels of TIMP-1 and TIMP-2 mRNA. The MMP-2 to TIMP-2 ratio and the MMP-9 to TIMP-1 ratio were decreased significantly by AG1478 or PD98059 ($P<0.01$). Conclusion　EGFR signal pathway adjusts the growth, invasion and metastasis of human colon carcinoma cells. The mechanisms may be that EGFR changes matrix metalloproteinases and its inhibitors by ERK/MAPK signal pathway.

Key words: EGFR; invasion; metastasis; MMPs

基金项目:辽宁省科技攻关课题(2003225007-3)
Supported by the Foundation for Sci & Tech Research Project of Liaoning Province(2003225007-3)

作者简介:张晓晶(1963 -),女,辽宁省沈阳市人,博士,副主任医师,主要从事软组织肿瘤方面的研究。现在辽宁省肿瘤医院。电话:(024)24315516-250, E-mail: zhangxiaojingwu@163.com

收稿日期:2005-04-05;**修回日期**:2006-04-13

肿瘤的发生、发展是由细胞信号网络调控的多基因参与的极其复杂的过程，其中细胞增殖和水解细胞外基质(ECM)是实现肿瘤侵袭转移的关键步骤。近年来研究表明，表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor，EGFR)信号通路在正常组织中多呈关闭状态，而在肿瘤组织中被激活开放，而且其活跃程度与肿瘤病情进展呈正相关，说明EGFR信号通路参与调节肿瘤的发展过程。结肠癌预后因素复杂，已证实EGFR表达水平与结肠癌转移潜能相关[1]，但EGFR信号如何调控结肠癌病情发展的仍不十分清楚，阐明结肠癌转移机制是改善其治疗和预后的关键。本研究探讨EGFR信号传导通路调控结肠癌Caco-2细胞增殖和侵袭转移相关分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

表皮生长因子(epidermal growth factor，EGF)购于北京科宇联合干细胞库；AG1478由美国BIOMOL研究实验室提供；PD98059购于Promega公司；Matrigel基质胶和8 μm聚碳酸酯膜分别购于BD和Milipore公司；Boyden Chamber由北大医学部病理系提供；McCoy's 5A无血清培养基和逆转录试剂均为GIBCO公司产品；胰岛素购于上海第一生化制药有限公司；转铁蛋白为Sigma公司产品；磷酸化EGFR(P-EGFR)和磷酸化细胞外调节蛋白激酶(phosphorylation extracellular regulated protein kinase，P-ERK)小鼠mAb购于Santa Cruz公司；逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒Ver1.1购于TaKaRa公司；引物由大连博瑞得生物技术有限公司合成。

1.2 结肠癌细胞来源与培养

低浸润Caco-2细胞株构建于人结肠黏液腺癌，购于中国科学院上海细胞库，用含10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养液，在37 ℃、5% CO_2孵育箱中常规培养，0.25%胰酶+0.02% EDTA消化传代，取对数生长期细胞进行实验。

1.3 MTT法检测细胞活力

将生长活力良好的细胞以4×10^3/孔接种于96孔板，待细胞在37 ℃ 5% CO_2培养24 h贴壁生长后更换配好的McCoy's 5A无血清培养基(含4 mg/L转铁蛋白和20 mg/L胰岛素)；饥饿培养24 h后分组，即：对照组不加药，实验组(1)加EGF 10 μg/L，实验组(2)加AG1478 20 μmol/L和EGF 10 μg/L，实验组(3)加PD98059 40 μmol/L和EGF 10 μg/L，其中(2)、(3)组EGF在抑制剂作用1 h后加药，每组设9复孔；继续培养24、48、72、96 h，检测前4 h加MTT(5 g/L)20 μl，4 h后弃上清，加DMSO 100 μl，避光振荡15 min，用全自动酶标仪测570 nm处的吸光度OD值[$D(570)$]。细胞生长率(%)=[$D(270)_{实验}-D(570)_{空白}$]/[$D(570)_{对照}-D(570)_{空白}$]×100%。

1.4 Boyden体外侵袭实验

取对数生长期Caco-2细胞用0.25%胰酶+0.02% EDTA消化、培养液洗涤终止消化，再用含10% FBS的DMEM培养液配成3×10^8/L细胞悬液待用；取Boyden小室，上下室间用8 μm微孔滤膜隔开，下室加200 μl McCoy's 5A无血清培养液，对照组不加药，实验组(1)、(2)、(3)下室分别加EGF 10 μg/L，EGF 10 μg/L+AG1478 20 μmol/L和EGF 10 μg/L+PD98059 40 μmol/L，上室各加200 μl细胞悬液，在37 ℃ 5% CO_2孵育箱内作用24 h后取膜，甲醇固定并行HE染色，400倍镜下记数9个视野细胞数，取均值。

1.5 Western blot检测P-EGFR和P-ERK蛋白表达

由于EGF 10 μg/L，AG1478 20 μmol/L和PD98059 40 μmol/L在24 h时对Caco-2细胞生长及体外侵袭能力都有影响，故将EGF 10 μg/L和EGF 10 μg/L+AG1478 20 μmol/L处理24 h和未处理的细胞(2×10^{10}/L)用RIPA缓冲液裂解，并用超声粉碎，10×10^3 r/min离心20 min后收取上清液，取100 μg蛋白上样行SDS-PAGE电泳，常规方法转膜，经脱脂奶封闭，分别用一抗(P-EGFR和P-ERK)和二抗孵育，NBT/BCIP显色，GDS8000成像分析仪分析图像。

1.6 RT-PCR法检测MMP-2、MMP-9、TIMP-1和TIMP-2 mRNA表达

收集经EGF 10 μg/L、EGF 10 μg/L+AG1478 20 μmol/L和EGF 10 μg/L+PD98059 40 μmol/L处理24 h及未处理的细胞5×10^6个，用Trizol LS试剂提取总RNA，按说明进行操作。引物设计：GenBank检索基因cDNA序列，各基因引物序列见(表1)。扩增条件：98 ℃预变性5 min，94 ℃变性1 min，最后延伸10 min。各基因复性温度和扩增循环数分别为56～60 ℃，30次循环。取PCR产物10 μl，经1.2%琼脂糖凝胶电泳，以各指标和β-action扩增条带的吸光面积积分值的比值来评定各指标mRNA的表达水平，进行半定量分析。

表1 待扩增片段的引物序列和扩增条件

基因	引物序列	扩增片段长度(bp)	循环次数
β-actin	5′-GATTGCCTCAGGACATTTCTG-3′	690	30
	5′-GATTGCTCAGGACATTTCTG-3′		
MMP-2	5′-TCAACGGTCGGGAATACA-3′	307	35
	5′-CCCACAGTGGACATAGCG-3′		
MMP-9	5′-TCGAACTTTGACAGCGACAAGAA-3′	215	35
	5′-TCAGGGCGAGGACCATAGAGG-3′		
TIMP-1	5′-CTTCCACAGGTCCCACAACC-3′	285	30
	5′-CAGCCCTGGCTCCCGAGGC-3′		
TIMP-2	5′-AAACGACATTTATGGCAACCCTATC-3′	265	35
	5′-ACAGGAGCCGTCACTTCTCTTGATG-3′		

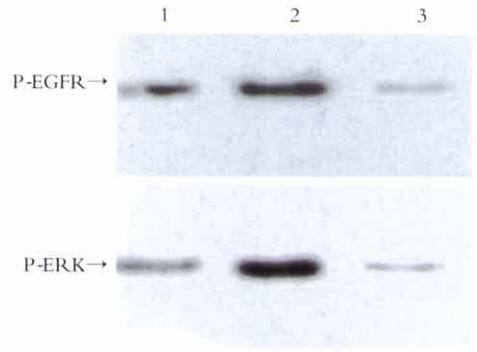
1.7 统计学方法

采用SPSS 10.0统计软件，计量资料用$\bar{x}\pm s$表示，各组组间比较采用t检验，生长率比较采用χ^2检验。

2 结果

2.1 EGF和AG1478影响Caco-2细胞P-EGFR和P-ERK蛋白表达

Caco-2细胞为P-EGFR蛋白表达细胞，经外源性EGF(10 μg/L)作用24 h后P-EGFR和P-ERK蛋白表达同时明显增加，而AG1478(20 μmol/L)能完全抑制外源性EGF的作用，使P-EGFR和P-ERK蛋白表达同时下降(图1)。说明Caco-2细胞EGFR信号通过ERK/MAPK下游信号传导通路传递信息。



1：对照组；2：10 μg/L EGF 组；3：EGF（10 μg/L）+ AG1478（20 μmol/L）组

图 1　EGF 和 AG1478 对 Caco-2 细胞 P-EGFR 和 P-ERK 蛋白表达的影响

2.2　EGFR 活性改变对 Caco-2 细胞生长增殖的影响

外源性 EGF 10 μg/L 具有促进 Caco-2 细胞生长作用，24 h 细胞生长率提高了 23.4%（$P<0.01$），随作用时间延长至 48 h 时其促进作用略有下降，但与对照组相比仍维持在一个相对高的生长状态（$P<0.01$），说明其促进作用没有时间效应关系。AG1478（20 μmol/L）和 PD98059（40 μmol/L）分别作用 Caco-2 细胞 1 h 后均能阻断 EGF 的促细胞生长作用，24 h 时细胞生长受到抑制，48 h 时 AG1478 的抑制作用达到最强，细胞生长率下降了 45.7%（$P<0.01$），72 h 时 PD98059 的抑制作用达到最强，细胞生长率下降了 54.6%（$P<0.01$），但 AG1478 和 PD98059 的抑制作用不随作用时间的延长而增强（图 2）。

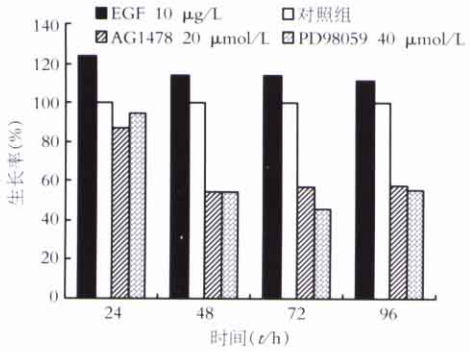
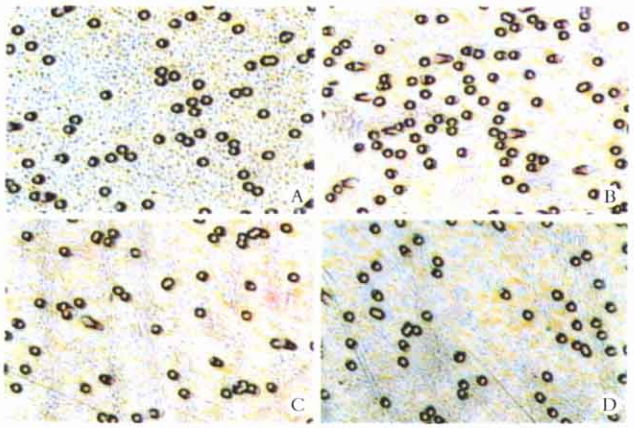


图 2　EGF、AG1478 和 PD98059 对 Caco-2 细胞生长的影响

2.3　EGFR 活性改变对 Caco-2 细胞体外侵袭力的影响

EGF 10 μg/L、AG1478 20 μmol/L 和 PD98059 40 μmol/L 分别作用 Caco-2 细胞 24 h 时检测细胞穿透 Matrigel 人工基底膜能力时发现，EGF 能明显地增加 Caco-2 细胞的过膜细胞数［过膜细胞数由对照组的（208 ± 3）个增至（241 ± 5）个，$P<0.01$］；而 AG1478 不仅能减少 Caco-2 细胞本身的过膜能力［过膜细胞数由对照组的（208 ± 3）个减为（170 ± 4）个，$P<0.01$］，也能阻止 EGF 对 Caco-2 细胞侵袭力的调节［过膜细胞数由 EGF 作用的（241 ± 5）个减为（171 ± 2）个，$P<0.01$］；同样 PD98059 也能阻止 EGF 对 Caco-2 细胞侵袭力的调节［过膜细胞数由 EGF 作用的（241 ± 5）个减为（164 ± 6）个，$P<0.01$］（图 3）。结果表明，EGFR 信号通过 ERK/MAPK 通路调节 Caco-2 细胞侵袭转移能力。

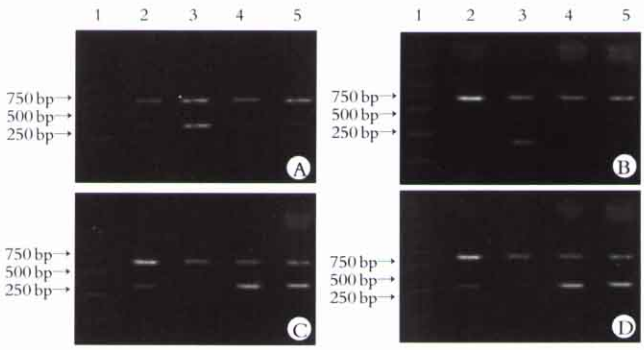


A：对照组；B：EGF 组；C：EGF + AG1478 组；D：EGF + PD98059 组

图 3　EGF、AG1478 和 PD98059 对 Caco-2 细胞侵袭力的影响　（光镜 ×100）

2.4　EGFR 活性改变对 MMP-2、MMP-9、TIMP-1 和 TIMP-2 mRNA 表达的影响

EGF 10 μg/L、EGF 10 μg/L + AG1478 20 μmol/L 和 EGF 10 μg/L + PD98059 40 μmol/L 分别作用 Caco-2 细胞 24 h 后检测显示，EGF 使 MMP-2 307 bp 和 MMP-9 215 bp 分别与 β-actin 690 bp 扩增带的吸光面积积分比值均高于对照组，分别是对照组的 2.2 倍和 3.3 倍（$P<0.01$），使 TIMP-1 285 bp 和 TIMP-2 265 bp 分别与 β-actin 690 bp 扩增带的吸光面积积分比值均低于对照组，分别减少了 36.7% 和 25.4% 且有显著性差异（$P<0.01$）；而 AG1478 和 PD98059 均可抑制 EGF 对 Caco-2 细胞的影响，使 MMP-2 mRNA 表达分别减少了 63.9% 和 61.5%（$P<0.01$），MMP-9 mRNA 表达分别减少了 63.5% 和 70.8%（$P<0.01$），使 TIMP-1 mRNA 表达分别是 EGF 组的 2.3 倍和 2.7 倍（$P<0.001$），TIMP-2 mRNA 表达分别是 EGF 组的 1.9 倍和 2.4 倍（$P<0.01$），MMP-2/TIMP-2 和 MMP-9/TIMP-1 的比值明显下降，差异均有显著性（$P<0.01$）（图 4）。



A：MMP-2 mRNA；B：MMP-9 mRNA；C：TIMP-1 mRNA；D：TIMP-2 mRNA；1：标准；2：对照组；3：EGF；4：EGF + AG1478；5：EGF + PD98059

图 4　EGF、AG1478 和 PD98059 对 Caco-2 细胞 MMPs 和 TIMPs mRNA 表达的影响

3 讨论

EGFR 为具有酪氨酸蛋白激酶(TK)活性的膜受体,能被表皮样生长因子激活,并将信息沿多条下游信号通路传递到核内,作用靶基因,参与调节多种肿瘤的发生、发展过程。Ciardiello 等[2]报道生长因子激活 EGFR 后,通过 PI3K/AKT 或 MAPK 下游信号通路调节细胞增殖、黏附、运动、蛋白水解酶的分泌等过程。研究表明不同来源肿瘤细胞 EGFR 信号所通过的下游传导途径并不完全相同。在前列腺癌细胞中,EGF 激活 EGFR 后通过 PI3K/AKT 信号通路改善细胞的增殖和侵袭转移能力;而阻断 EGFR 信号通路后能够抑制 EGF 对细胞的影响,使细胞生长和侵袭能力均下降[3,4]。胰腺癌细胞 EGFR 信号则通过 MAPK 通路调节细胞的增殖和转移[5]。我们研究发现 EGF 激活 EGFR 信号通路后具有刺激结肠癌细胞生长与增殖的作用,阻断 EGFR 信号后能同时阻断 ERK 基因,并抑制结肠癌细胞生长,因此推断 EGFR-ERK 信号通路参与调节结肠癌细胞生长增殖过程。

一般认为细胞增殖活性是肿瘤侵袭、转移的基础和前提,但侵袭与转移的实现还取决于肿瘤细胞对正常组织的破坏能力。细胞外基质(ECM)是肿瘤侵袭和转移的天然屏障,主要成份是胶原、糖蛋白、蛋白多糖和氨基葡聚糖,以基底膜(BM)和细胞间结缔组织的形式存在。ECM 的降解和 BM 的破坏是侵袭过程中的关键步骤,基质金属蛋白酶(MMPs)及其组织抑制因子(TIMPs)家族是其中关键因素之一。MMPs 与 ECM、BM 成分的破坏、降解相关,TIMPs 是 MMPs 的特异性抑制因子,两者的动态平衡维持了 ECM、BM 的完整[6]。MMP-2 和 MMP-9 主要降解Ⅳ型胶原及明胶[7]。已研究证实 EGF 具有增加皮肤鳞状细胞癌 MMP-2 和 MMP-9 基因活性使鳞癌细胞侵袭和转移能力增加[8]。O-charoenrat 等[9]报道头颈鳞癌细胞 EGFR 信号通过 MAPK 和 PI3K/AKT 2 条下游信号通路增加 MMP-9 蛋白表达,进而提高对 Matrigel 的侵袭力,但不改变 MMP-2 的基因活性。我们应用低浸润 Caco-2 细胞进行体外侵袭实验和 RT-PCR 检测显示,EGFR 信号通路具有调控结肠癌 Caco-2 细胞侵袭转移能力的作用。当 EGF 激活 EGFR 信号通路使其异常活跃时,Caco-2 细胞穿透基底膜胶原纤维的能力明显提高;进一步研究证实侵袭能力的改善是由于 EGFR 信号通过 ERK/MAPK 下游信号通路提高 Caco-2 细胞 MMP-2 和 MMP-9 转移基因功能和抑制转移抑制基因 TIMP-1 和 TIMP-2 功能的结果;当我们预先使用 EGFR 抑制剂 AG1478 和 ERK 抑制剂 PD98059 作用 Caco-2 细胞后,EGF 的促结肠癌细胞侵袭转移作用消失,同时 MMP-2/TIMP-2 和 MMP-9/TIMP-1 的比值均明显下降,说明 EGFR-ERK/MAPK 信号通路参与调节结肠癌病情进展,阻断该信号通路具有改善结肠癌预后的功能,EGFR-ERK/MAPK 信号通路可作为控制结肠癌病情发展的治疗靶点。

参考文献:

[1] 沈 岩, VOGEL I, KALTHOFF H, 等. 不同转移能力肿瘤细胞间转移相关特征的比较研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2000, 22(3): 201-204.

[2] CIARDIELLO F, TORTORA G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(10): 2958-2970.

[3] BONACCORSI L, MARCHIANI S, MURATORI M, *et al*. Gefitinib ('IRESSA', ZD1839) inhibits EGF-induced invasion in prostate cancer cells by suppressing PI3K/AKT activation[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2004, 130(10): 604-614.

[4] 白 莉,祝 蓉,陈智鸿,等. 靶向 EGFR 基因的 siRNA 表达载全构建及其生物学效应的研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(13): 2307-2310

[5] LI J, KLEEFF J, GIESE N, *et al*. Gefitinib ('Iressa', ZD1839), a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, inhibits pancreatic cancer cell growth, invasion, and colony formation[J]. Int J Oncol, 2004, 25(1): 203-210.

[6] 范跃祖,傅锦业,赵泽明, 等. 去甲斑蝥素对人胆囊癌 GBC-SD 细胞系增殖及侵袭的影响[J]. 中华肿瘤杂志, 2004, 26(5): 271-274.

[7] 郑伟达,王小众. 基质金属蛋白酶及其抑制物与实验性肝纤维化[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(2): 428-431.

[8] HUANG Y T, HWANG J J, LEE L T, *et al*. Inhibitory effects of a luteinizing hormone-releasing hormone agonist on basal and epidermal growth factor-induced cell proliferation and metastasis-associated properties in human epidermoid carcinoma A431 cells[J]. Int J Cancer, 2002, 99(4): 505-513.

[9] O-CHAROENRAT P, WONGKAJORNSILP A, RHYS-EVANS P H, *et al*. Signaling pathways required for matrix metalloproteinase-9 induction by betacellulin in head-and-neck squamous carcinoma cells[J]. Int J Cancer, 2004, 111(2): 174-183.

(编辑 薛国文)