基础研究 文章编号：0253-3626(2009)02-0161-03

DDR1a 在结肠癌细胞株中的表达及与基质金属蛋白酶 2,9 的关系

何 苗，傅仲学
（重庆医科大学附属第一医院胃肠外科，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨结肠癌细胞中盘状结构域受体酪氨酸激酶 1(Discoidin domain receptor tyrosine kinases1a，DDR1a)的表达和基质金属蛋白酶 2(Matrix metalloproteinase 2，MMP2)、基质金属蛋白酶 9(Matrix metalloproteinase9，MMP9)的活性及其相互的关系。方法：用 Western blot 检测结肠癌细胞株和人正常结肠平滑肌细胞株中 DDR1a 表达，明胶酶谱法检测各细胞株中的 MMP2，MMP9 的活性。结果：侵袭能力强的结肠癌细胞 LOVO 中，DDR1a 呈显著高表达($P<0.01$)及 MMP2、MMP9 呈显著高活性($P<0.01$)，此外在所测细胞中 DDR1a 表达与 MMP2 及 MMP9 活性呈显著正相关($P<0.05$)。结论：本研究提示 DDR1a 可作为反映结肠癌细胞侵袭力生物学指标之一。

【关键词】盘状结构域受体酪氨酸激酶 1a；结肠癌细胞；基质金属蛋白酶 2；基质金属蛋白酶 9
【中国图书分类法分类号】R735.3+4 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-04-23

Expression of DDR1a in colon carcinoma cells and its relationship with matrix metalloproteinase 2,9

HE Miao, et al
(*Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of DDR1a and the activities of MMP2, MMP9 in colon carcinoma cells and their mutual relations. *Methods*: The expression of DDR1a in colon carcinoma cell and human colon smooth muscle cell was detected by Western blot, the activities of MMP2, MMP9 were examined by gelatin zymography analysis. *Results*: The expression of DDR1a and the activities of MMP2, MMP9 in colon carcinoma cell (LOVO) which has stronger invasive behavior were significant higher ($P<0.01$). There was significant positive correlationship between the expression of DDR1a and the activities of MMP2, MMP9 in tested cells ($P<0.05$). *Conclusion*: DDR1a may act as one of biological indicators of the invasion in colon carcinoma cells.

【Key words】 Discoidin domain receptor tyrosine kinases1a; Colon carcinoma cells; Matrix metalloproteinase 2; Matrix metalloproteinase 9

结肠癌是消化系统常见的恶性肿瘤，死亡率较高，侵润和转移是结肠癌患者治疗效果不佳和死亡的重要原因。基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinase，MMP)能降解细胞外基质中的多种蛋白质成分，在肿瘤的侵润和转移中起重要作用，其中已 MMP2 及 MMP9 最为关键。

盘状结构域受体酪氨酸激酶 1(Discoidin domain receptor tyrosine kinases1，DDR1)是一类受体型蛋白酪氨酸激酶，目前发现 DDR1 在原发性乳腺癌、卵巢癌、食管癌等人类肿瘤中过度表达，其表达与肿瘤的恶性程度正相关[1]。DDR1 是一组蛋白，不同亚型具有不同的生物学活性，进一步研究亚型的表达状况，具有更重要的临床价值。其亚型 DDR1a 在结肠癌中是否表达未见报告，同时近来发现 DDR1a 可上调 MMP2 的活性[2]，但能否调节 MMP9 的活性亦未见报告。本研究检测了不同分化程度的结肠癌细胞株中 DDR1a 表达情况及 MMP2 和MMP9 的活性及相互的关系，从而探讨 DDR1a 在结肠癌侵袭转移的分子机制。

1 材料与方法

1.1 标本来源

结肠癌细胞株(HT-29,SW-480,LOVO,HCT-116)以及人

作者介绍：何 苗(1981-)，男，硕士，
研究方向：消化道肿瘤的基础与临床的研究。
通讯作者：傅仲学，男，教授，E-mail：fzx990521@sina.com。
基金项目：重庆市教委科研基金(基金号：KJ070307)。

正常结肠平滑肌细胞株 HCSMC 购自中科院上海细胞所，其中 HT-29、SW-480、HCT-116为低侵袭能力细胞株，LOVO 为高侵袭能力细胞株[3]。

1.2　Western blot 检测 DDR1a 表达

RIPA 裂解液提取细胞总蛋白，取样本上样进行电泳。湿转法将分离胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上。膜用 1XTBS 溶液配制的 5%脱脂奶粉（SIGMA 公司）封闭 2 h，再加入分别用兔抗人 ddr1 抗体（SANTACRUZE 公司原装）以及兔抗人 β-actin 抗体（SANTACRUZE，北京中杉生物技术有限公司分装）于 4℃ 孵育过夜，加入 1∶1000HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体（均为 SANTACRUZE 公司生产，北京中山生物技术有限公司分装）。用化学发光试剂盒（北京中山生物技术有限公司）检测显影。

1.3　明胶酶谱法检测 MMP 的活性

将细胞条件培养液上样于 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶（胶中含 1 mg/ml 的明胶，明胶是 IV 型胶原酶底物），20 mA 恒流电泳，电泳后，将凝胶于 2.5% Triton-X100 液内振摇 37℃，1 h；酶缓冲液（50 mmol/L Tris，pH 7.5、200 mmol/L NaCl、5 mmol/L $CaCl_2$、0.02% Brij-35）内孵育 37℃，16 h；0.5%考马斯亮蓝染色，30%甲醇、10%乙酸脱色，此时即显示出 MMP 位于蓝色背景上的透明带。

1.4　图像分析

运用 Quantity One-4.4.0 凝胶图像分析仪对图像进行吸光度值（A 值）测定。

1.5　统计学处理

各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS11.0 统计软件进行方差分析及相关性分析。

2　结　果

2.1　DDR1a 在 HCSMC、HT-29、SW-480、LOVO 和 HCT-116 各细胞株的表达情况

Western blot 检测的显示，DDR1a 在 LOVO 结肠癌细胞株中的表达显著高于在 HCSMC、HT-29、SW-480 和 HCT-116 细胞株中的表达，差异有统计学意义。

2.2　MMP2 及 MMP9 在 HCSMC、HT-29、SW-480、LOVO、HCT-116 各细胞株中活性情况

酶谱法结果显示，MMP2（酶原形式+活化形式）与 MMP9 在 LOVO 结肠癌细胞株中的活性显著高于在 HCSMC、HT-29、SW-480 和 HCT-116 细胞株中的活性，差异有统计学意义。

2.3　DDR1a 表达与 MMP2、MMP9 活性的关系

在各细胞株中，DDR1a 的表达与 MMP2 和 MMP9 的活性呈显著正相关（$P<0.05$）。

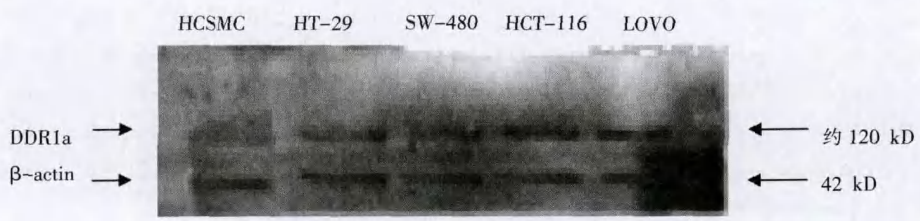


图 1　各细胞株中 DDR1a 的表达情况



图 2　各细胞株中 MMP 的酶谱分析结果

表 1　各细胞株中 DDR1a 的平均吸光度值结果（$n=10, \bar{x} \pm s$）

组别	DDR1a
HCSMC	322 ± 33
HT-29	742 ± 31
SW-480	678 ± 26
HCT-116	833 ± 35
LOVO	916 ± 40*

注：*与 HCSMC、HT-29、SW-480 和 HCT-116 组比较，$P<0.01$

表 2　各细胞株中 MMP 的平均吸光度值结果（$n=10, \bar{x} \pm s$）

组别	MMP2	MMP9
HCSMC	1548 ± 102	1256 ± 65
HT-29	3962 ± 138	1573 ± 79
SW-480	1863 ± 97	2023 ± 120
HCT-116	5021 ± 167	2538 ± 105
LOVO	12127 ± 406*	3874 ± 142*

注：*与 HCSMC、HT-29、SW-480 和 HCT-116 组比较，$P<0.01$

表 3 各细胞株中 DDR1a 的表达与 MMP2 的活性简单相关性分析(n=10)

组别	r	P
HCSMC	0.633	<0.05
HT-29	0.644	<0.05
SW-480	0.652	<0.05
HCT-116	0.713	<0.05
LOVO	0.684	<0.05

表 4 各细胞株中 DDR1a 的表达与 MMP9 的活性简单相关性分析(n=10)

组别	r	P
HCSMC	0.683	<0.05
HT-29	0.702	<0.05
SW-480	0.660	<0.05
HCT-116	0.655	<0.05
LOVO	0.689	<0.05

3 讨 论

盘状结构域受体酪氨酸激酶是一种受体型蛋白酪氨酸激酶(Protein tyrosine kinases,RTKs),分为 DDR1 和 DDR2。DDR1 基因定位于人的 6P21 和小鼠 17C[4]。Johnson 等在 1993 年最早发现 DDR1,其由胞外区、跨膜区、和胞内激酶区 3 部分组成,胞内激酶区可发生酪氨酸磷酸化。众多研究发现 DDR1 在原发性乳腺癌、卵巢癌、食管癌等人类肿瘤中可过度表达,在儿童脑肿瘤中甚至可达到正常值的 3 倍,其表达高低和肿瘤组织的恶性程度正相关[1]。DDR1 在肿瘤细胞中高表达,特别是上皮来源的肿瘤细胞,提示 DDR1 在这类肿瘤细胞的分化、增殖,特别是肿瘤转移和侵袭过程中占有重要地位[5]。近年来研究发现 DDR1a 是 DDR1 亚型,其在富含脯氨酸的跨膜区编码 37 个氨基酸的 exon11(11bp)缺失[6]。但未进一步全面研究其生物活性,其与肿瘤的关系亦未清晰阐述。

肿瘤细胞的侵袭和转移必需细胞外基质的蛋白水解,虽然许多蛋白酶参与这一过程,但其中最关键的是 MMP 家族。而在 MMP 家族中,认为MMP2 及 MMP9 对肿瘤细胞的恶性行为起到极其重要的作用。MMP2 及 MMP9 同属于明胶酶,主要以Ⅳ型胶原为底物起作用,常以非活性形式存在,而在恶性肿瘤中被激活(即在激活基的作用下,使非活性形式的 MMP 脱去前肽,被激活)且表达增高[7]。同时,MMP2 及 MMP9 还可促进肿瘤血管生成[8]。肿瘤灶的局部快速播散及远处转移能力与原发灶新生血管形成的程度相关。

Ram R 等通过转染和干扰等手段,发现在高表达 DDR1a 的细胞中,其细胞的侵袭能力增强,MMP2 的活性增强,在低表达 DDR1a 的细胞中,其细胞的侵袭能力减弱,MMP2 的活性减弱,其说明 DDR1a 可上调 MMP2 的活性,促进细胞的迁徙和侵润,从而细胞粘附侵袭力的增强[2]。所以 DDR1a 介导胶原-MMP2 之间的侵袭信号通路的调节作用。DDR1a 与 MMP9 是否有关联未见报道。

本研究发现:在侵袭转移能力强的结肠癌细胞株中,DDR1a 的表达及 MMP2 和 MMP9 的活性较高,同时在结肠癌细胞株中,DDR1a 的表达及 MMP2 和 MMP9 的活性呈正相关。提示 DDR1a 表达与结肠癌细胞侵袭力密切相关。DDR1a 是一种比较新的分子,目前对它的研究不多,所以尚无特异性的阻断剂。如果将来可以筛选亲和性高和阻断能力强的竞争性阻断剂,则可进一步研究其在肿瘤侵袭中细胞信号转导途径。

参 考 文 献

[1] Vogel W F, Abdulhussein R, Ford C E. Sensing extracellular matrix: An update on discoidin domain receptor function[J]. Cellular Signalling,2006,18(8):1108-1116.

[2] Ram R,Lorente G,Nokolich K, et al. Discoidin domain receptor-1a (DDR1a) promotes glioma cell invasion and adhesion in association with matrix metalloproteinase-2[J]. J Neurooncol,2006,76(3):239-248.

[3] 杨光之,丁彦青,魏荣干. Kai1/CD82 在不同转移潜能大肠癌细胞系的表达[J]. 世界华人消化杂志,2002,10(4):475-477.

[4] Hou G,Vogel W,Bendeck M P,et al. The discoidin domain receptor tyrosine kinase DDR1 in arterial wound repair[J]. The American Society for Clinical Investigation,2001,107(6):727-735.

[5] Vogel W F,Abdulhussein R,Ford C E.Sensing extracellular matrix: An update on discoidin domain receptor function[J]. Cellular Signalling, 2006,18(8):1108-1116.

[6] Alves F,Saupe S,Ledwon M,et al. Identification of two novel, kinase-deficient variants of discoidin domain receptor 1: differential expression in human colon cancer cell lines[J]. FASEB J,2001,15(1):1321-1323.

[7] 张雅青,顾克东. 基质金属蛋白酶与肿瘤关系研究进展[J]. 西北民族大学学报,2006,27(63):79-84.

[8] Fang J,Shing Y,Wiederschaim D,et al. Matrix metalloproteinases-2 Is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model[J]. ProcNatlA cad,2000,1997(8):3884-3889.

(责任编辑:冉明会)