维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)02－0213－03

两种酪氨酸激酶抑制剂对结肠癌细胞增殖的影响

朱玉娟[1], 王春晖[2]

(1.三六三医院消化科,成都 610041;2.四川大学华西医院消化科,成都 610041)

【摘 要】目的:研究两种酪氨酸激酶抑制剂对体外培养的 HT－29 结肠癌细胞生长的影响及可能机制。方法:用 MTT 比色法观察不同浓度的 Genistein 及 Tyrphostin AG1478 对体外培养的结肠癌细胞生长的影响;免疫细胞化学法检测两种酪氨酸激酶抑制剂(Tyrosine kinase inhibitors, TKIs)对肿瘤细胞 PCNA 表达的影响;Western blot 技术分析 Genistein 及 Tyrphostin AG1478 对结肠癌细胞 ERK－1 及 pERK 表达的影响。结果:不同浓度的 Genistein 及 Tyrphostin AG1478 对 HT－29 结肠癌细胞的增殖均具有抑制作用,并具有良好的量－效关系。免疫细胞化学检测表明,Genistein 及 Tyrphostin AG1478 明显下调 HT－29 细胞 PCNA 表达。蛋白质印迹检测发现,两种酪氨酸激酶抑制剂不抑制 ERK 表达,但能够抑制 ERK 磷酸化。结论:酪氨酸激酶抑制剂 Genistein 及 Tyrphostin AG1478 能有效抑制 HT－29 结肠癌细胞生长,其作用机制与抑制肿瘤细胞 ERK 表达及磷酸化有关。

【关键词】结肠癌;细胞外信号调节激酶;酪氨酸激酶抑制剂

【中国图书分类法分类号】R329.2+8 【文献标识码】A 【收稿日期】2004－08－26

The tffects of two tyrosine kinase inhibitors on the proliferation of colon cancer cell

ZHU Yujuan, et al

(*Department of Gastroenterology, Chengdu 363 Hospital, Chengdu*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of Genistein and Tyrphostin AG1478 on the proliferation of colon cancer cell HT－29 and its possible mechanism. *Methods*: The effect of two tyrosine kinase inhibitors (TKIs) on HT－29 cell lines was studied by using MTT assay. Immunocytochemical staining was performed with PCNA polyclonal antibody in HT－29 cells. Western blot assay was used to detect the expression of ERK－1 and pERK. *Results*: Both Genistein and Tyrphostin AG1478 significantly inhibit the growth of HT－29 cells and showed concentration dependence. Two tyrosine kinase inhibitors suppressed PCNA expression. Western blot revealed that Genistein and Tyrphostin not inhibit ERK－1 expression but inhibit phosphorylation of ERK. *Conclusion*: Tyrosine kinase inhibitors Genistein and Tyrphostin AG1478 can inhibit the growth of HT－29 colon cancer cells, the anti－proliferation mechanism may be related to down－regulate the expression of pERK.

【Key words】Colon cancer; Extralcellular－signal regulated kinase; Tyrosine kinase inhibitors

结肠癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一,受体酪氨酸磷酸化与结肠肿瘤的发生、发展密切相关。有研究表明,选择性及非选择性酪氨酸激酶抑制剂能抑制某些肿瘤生长[1,2]。本研究探讨两种酪氨酸激酶抑制剂 Genistein 及 tyrphostinAG1478 对 HT－29 结肠癌细胞增殖的影响及可能的机制。

作者介绍:朱玉娟(1970－),女,主治医师,
主要研究方向:消化系统疾病。

1 材料与方法

1.1 材料

HT－29 人结肠癌细胞株引自 ATCC,人类疾病相关多肽研究室保种。Genistein(Sigma 公司)、Tyrphostin(Calbiochem 公司),新生小牛血清(杭州四季青公司产品),RPMI－1640 培养基干粉(1nvitrogen, Ltd),MTT 粉剂(Sigma 公司),小鼠 PCNA 多克隆抗体(北京中山公司),兔 ERK－1 多克隆抗体、小鼠 pERK 单克隆抗体、Western blotting Luminal Reagent(Santa Cruz 公司)。HRP 标记的羊抗兔 IgG、羊抗小鼠 IgG (Jackson 公司)。蛋白酶抑制剂复合物(Roche 公司)。

1.2 方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2.1 MTT 实验 取对数生长期细胞，按 5×10^4/ml 接种于 96 孔培养板，每孔接种 200μl，用含 10% 小牛血清的 RPMI－1640 培养液培养 24h 后，改用无血清的 RPMI－1640 培养液培养 24h。分别加入不同浓度的 Genistein 及 Tyrphpstin AG1478 作用于 HT－29 细胞，每一浓度设 3 个复孔，对照组不加入药物，继续培养 20h。每孔加入 20μl 浓度为 5mg/ml 的 MTT，37℃继续培养 4h；小心吸去培养基，每孔加入 150μl 二甲基亚砜，振荡混匀。在酶标仪上，选取 490nm 波长测定每孔吸光值。

1.2.2 结肠癌细胞 PCNA 的检测 5×10^4 细胞接种于预置小玻璃片的 24 孔板，培养 24h 后，改用无血清的 RPMI－1640 液培养 24h→加入终浓度为 10mM 的 aspirin 及 10μM 的 celecoxib 作用 24h，按免疫细胞化学法常规操作。

1.2.3 蛋白质印迹检测结肠癌细胞 ERK－1、pERK 表达 按 RIPA 方案提取细胞总蛋白，定量及调节蛋白质浓度。经 8% 的 SDS－PAGE 电泳后，采用半干电转方法将蛋白质转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉封闭 1h，加入 1:200 的 COX－2 羊单克隆抗体，4℃过夜→TTBS 漂洗 3 次→加入 HRP 标记的 1:2000 浓度的二抗，37℃作用 1h→TTBS 漂洗 3 次，TBS 漂洗 1 次→将 Western blotting reagent 均匀地涂在 NC 膜上，作用 1～2min→在暗室内将 X 光片曝光 1～2min→冲片，拍照及进行计算机图像分析。

1.3 统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS(10.0 版)统计软件分析。

2 结 果

2.1 TKIs 对 HT－29 细胞增殖的影响

由表 1 可见，Genistein 及 TyrphostinAG1478 对 HT－29 结肠癌细胞作用的增殖具有明显的抑制作用。药物对 HT－29 细胞增殖的抑制作用随浓度增高而逐渐增强，具有良好的量效关系（$r=-0.96$，$P<0.01$）。其中 1×10^{-4} mol/L 的 TyrphostinAG1478 作用最强，抑制率达 72.4%。

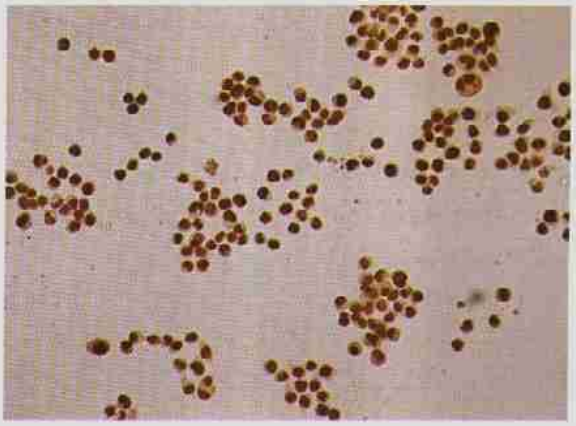
表 1 两种 TKIs 对 HT－29 结肠癌细胞增殖的影响

	OD 值(X±SD)	
对照组	0.533±0.02	
	Genistein(mmol/L)	Tyrphostin AG1478(mol/L)
1.0×10^{-4}	0.262±0.015**	0.147±0.010**
0.5×10^{-4}	0.429±0.005*	0.301±0.016**
1.0×10^{-5}	0.512±0.030	0.441±0.027*
0.5×10^{-5}	0.518±0.024	0.501±0.010
1.0×10^{-6}	0.553±0.007	0.518±0.021

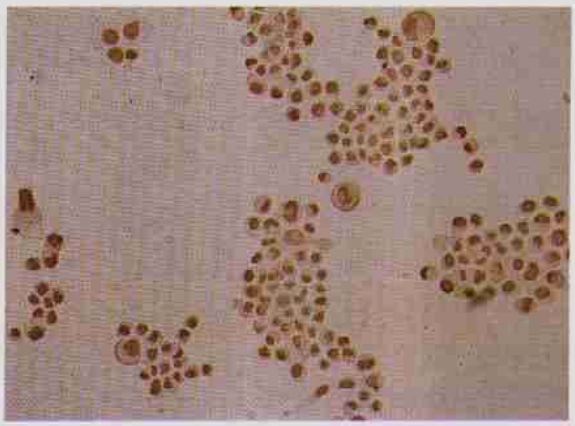
** $P<0.01$，* $P<0.05$ 与对照组比较。

2.2 TKIs 对结肠癌细胞 PCNA 蛋白表达的影响

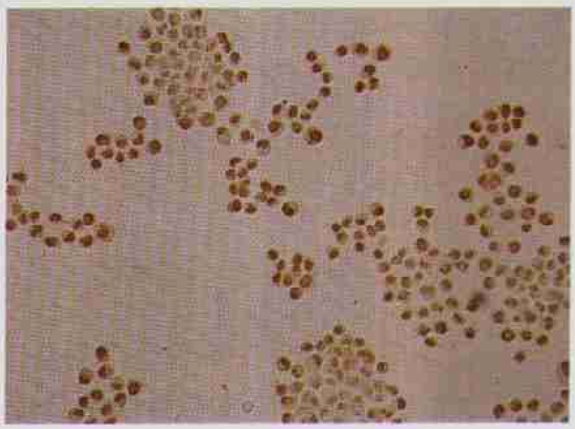
结肠癌细胞经免疫细胞化学染色后，细胞核呈棕黄色，为 PCNA 表达阳性。经两种 TKIs 作用后，结肠癌细胞核棕黄色较对照组变浅，强阳性细胞数较对照组减少，即结肠癌细胞 PCNA 表达降低（图 1）。



Control



Genistein(1×10^{-4}mol/L)



Tyrphpstin AG1478(1×10^{-4}mol/L)

图 1 两种 TKIs 对 HT－29 细胞 PCNA 表达的影响(SABC，400×)

2.3 TKIs 对结肠癌细胞 ERK、pERK 蛋白表达的影响

图 2 显示 Genistein 及 Tyrphpstin AG1478 对 HT－29 结肠癌细胞 ERK 表达的影响，可见各组细

维普资讯 http://www.cqvip.com

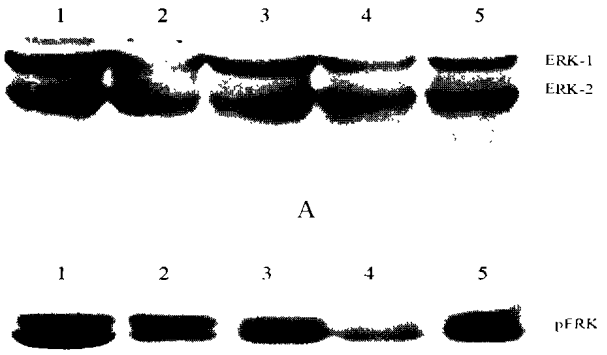


图 2 两种 TKIs 对 HT－29 细胞 ERK 和 pERK 表达的影响

Lane 1:control, Lane 2:1×10^{-4}mol/L genistein, Lane 3:0.5 $\times10^{-4}$mol/L genistein, Lane 4:1×10^{-4}mol/L tyrphpstin－AG1478, Lane 5:0.5×10^{-4}mol/L tyrphpstin－AG1478, HT－29 cell's cytoplasmic(A) and nuclear(B) were detected by Western blot with either a rabbit polyclonal antibody to ERK (A) or a mouse monoclonal antibody to pERK(B)

胞均有两条条带，分别为 42Kd 及 44Kd。由于 ERK－1 多抗与 ERK－2 有交叉反应，44Kd 处为 ERK－1，42Kd 处为 ERK－2。Genistein 及 TyrphpstinAG1478 对总 ERK 表达的影响不明显，主要抑制 ERK 磷酸化，即下调 pERK 的表达。计算机图像分析，发现不同浓度的 Genistein 组及 TylybpstinAG1478 组其面积积分光密度均明显低于对照组，以 1×10^{-4}mol/L 浓度的 Tyrphpstin AG1478 作用最强($P<0.01$)。

3 讨 论

细胞过度增殖及凋亡减少是肿瘤的特征之一，多种生长因子能通过正性或负性调节，参与结直肠肿瘤的发生、发展。促进结肠肿瘤生长有 EGF、TGF－α、IGF 等；起负性调节作用的有 TGF－β 等。TGF－α 与 EGF 的同源性为 40%，它们均能与分子量为 10Kd 的 EGF 受体结合，使受体同源或异源二聚化或寡聚化，激活其酪氨酸激酶，使自身的酪氨酸残基磷酸化，通过 Raf－MEK1/2－ERK 信号通路促进基因转录、蛋白质表达、细胞增殖与分裂。

酪氨酸激酶抑制剂(TKIs)是一组小分子化合物，其基本结构为 quinazoline，可以进入细胞内与受体酪氨酸残疾上的 ATP 位点竞争性结合，抑制受体酪氨酸激酶活性。Genistein 为大豆中提取的 4',5,7－三羟基异黄酮，是一种非选择性 TKIs，而 TyrphostinAG1478、ZD1839(Iressa)、OSI－774 等则为选择性 TKIs。有研究表明，这些 TKIs 能不同程序抑制肺癌、乳腺癌、前列腺癌等生长[3~5]，Genistein 还能抑制 DMH 诱导的大鼠结肠肿瘤的发生[6]。本研究表明，两种酪氨酸激酶抑制剂 Genistein 及 TyrphostinAG1478 均有效抑制 HT－29 结肠癌细胞增殖，并具有浓度依赖性。就相同剂量而言，选择性 TKIs TyrphostinAG1478 的作用强于非选择性 TKIs Genistein。采用免疫细胞化学检测发现，Genistein 及 Tyrphpstin AG1478 明显下调结肠癌细胞 PCNA 的表达。PCNA 是一种酸性细胞周期蛋白，主要反映细胞的增殖能力[7]，被认为是一种衡量肿瘤增殖能力和恶性程度的可靠指标。进一步说明 TKIs 能减慢结肠癌细胞增殖、抑制其生长。

ERK 是 MAPK 家族四个成员之一，磷酸化的 ERK 即 pERK 能通过核转位传递有丝分裂信号，活化转录因子。有研究表明，食物中摄入 Genistein 能抑制转基因小鼠前列腺癌增殖，并下调肿瘤细胞 EGFR、IGF－1R 及 ERK－1/2 表达[8]。为明确 TKIs 是否对结肠癌细胞 EGF/EGFR 信号传导通路中 ERK 产生作用，进一步研究了 TKIs 对 ERK－1 及 pERK 表达的影响。Western blot 检测证明，Genistein 及 Tyrphpstin AG1478 不抑制 ERK－1/2 的表达，但能有效抑制 pERK 的表达。说明 TKIs 抑制结肠癌细胞增殖的机制与其抑制肿瘤细胞 ERK－1/2 磷酸化有关。

参 考 文 献

[1] Ciardiello F. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents[J]. Drugs, 2000; 60(s): 25－32.

[2] Yang Z, Bagheri－Yarmand R, Wang RA, et al. The epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) suppresses c－Src and Pak1 pathways and invasiveness of human cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2004; 10: 658－667.

[3] Kozuki T, Kiura K, Ueoka H, et al. Long－term effect of gefitinib (ZD1839) on squamous cell carcinoma of the lung[J]. Anticancer Res, 2004; 24: 393－396.

(下转第 265 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

度以上表达,两组比较有显著性差异($P<0.05$)。

3 讨 论

长期以来,恶性肿瘤严重威胁人类健康,早有研究表明恶性肿瘤发生浸润转移是影响其治疗效果及预后的重要原因之一。肿瘤浸润转移受多种因素调控,既往研究发现,肿瘤转移往往伴有 MMPs 表达上调[3,4],MMPs 在影响肿瘤生长,促进肿瘤转移等方面所起的作用受到更多的关注。

肿瘤浸润转移过程涉及肿瘤细胞穿过细胞外基质屏障、血管壁以及穿出血管壁进入宿主微环境的过程。MMPs 作用于以上各阶段促进肿瘤转移。同时,其作用也受到 TIMPs 的制约[5],二者的平衡影响着肿瘤的进展。研究 MMPs 与肿瘤转移的相关性对于进一步探索肿瘤转移机制、早期预测肿瘤转归,制订有效的治疗方案有着重要的临床意义。

MMP-3 属于 MMPs 家族中的间质溶素亚群,它通过降解 ECM、促进肿瘤新生血管形成等途径促进肿瘤浸润转移。尤其在鳞形细胞癌中高度表达,显示其对肿瘤的进展起重要作用[6]。本研究发现 MMP-3 在绝大多数儿童恶性肿瘤细胞胞浆内不同程度表达,而在良性肿瘤组中表达阳性率及表达程度都大大降低,两者间存在统计学差异。表明 MMP-3 表达与肿瘤性质有关,恶性肿瘤往往有程度较高的表达。同时,恶性肿瘤组中转移组 MMP-3 表达程度明显高于未转移组,表明 MMP-3 的表达程度与肿瘤浸润转移有关,MMP-3 表达越强,肿瘤恶性程度越高,浸润转移可能性越大。提示,检测 MMP-3 表达强度能帮助判断肿瘤恶性程度,预测肿瘤浸润转移。MMP-3 表达可作为儿童肿瘤预后及转归判断的临床检测指标,对临床制定治疗方案有一定指导意义。

参 考 文 献

[1] Sternlicht MD, Bergers G. Matrix metalloproteinases as emerging targets in anti-cancer therapy: status and prospects [J]. Emerging Therapeutics Targets, 2000; 4: 609-633.

[2] Shimiizu M, saitoh Y, Itoh H. Immumnohistochemical staining of Ha-ras oncogene product in normal, benign, and malignant human pancreatic tissues[J]. Hum pathol, 1990; 21: 607.

[3] Bemardo MM, Fridman R. TIMP-2 regulates MMP-2 activity in the extracellular environment after Pro-MMP-2 activation by MT1-MMP[J]. Biochem J. 2003; 374(3): 739-745.

[4] Hyland PL, Traynor PS, Myrillas TT. The effects of cyclosporin on the collagenolytic activity of gingival fibroblasts[J]. J Periodontol, 2003; 74(4): 437-445.

[5] 陶雅军,张英杰,任 新,等. 基质金属蛋白酶-2 及其抑制物与大肠癌恶性生物学行为的关系[J]. 实用肿瘤杂志, 2004; 19(1): 28-31.

[6] McCawley LJ, Crawford HC, King LE Jr, et al. A protective role for matrix metalloproteinase-3 in squamous cell carcinoma[J]. Cancer Res, 2004; 64(19): 6965-6972.

(上接第 215 页)

[4] Chan KC, Knox WF, Gee JM, et al. Effect of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition on epithelial proliferation in normal and premalignant breast[J]. Cancer Res, 2002; 62: 122-128.

[5] Bemis DL, Capodice JL, Desai M, et al. A concentrated aglycone isoflavone preparation(GCP) that demonstrates potent anti-prostate cancer activity in vitro and in vivo[J]. Clin Cancer Res, 2004; 10: 5282-5292.

[6] Gee JM, Noteborn HP, Polley AC, et al. Increased induction of aberrant crypt foci by 1, 2-dimethylhydrazine in rats fed diets containning purified genistein or genistein-rich soya protein[J]. Carcinogenesis, 2000; 21: 2255-2259.

[7] Tsurimoto T. PCNA, a multifunction ring on DNA[J]. Biochim Biophys Acta, 1998; 26: 1443: 110-116.

[8] Wang J, Eltoum IE, Lamartiniere CA. Genistein alters growth factor signaling in transgenic prostate model(TRAMP) [J]. Mol Cell Endocrinol, 2004; 219: 171-180.