

EGFR 信号通路影响 Caco-2 细胞黏附和侵袭的分子机制

张晓晶, 张亮, 刘云鹏, 侯科佐, 王舒宝

张晓晶, 张亮, 刘云鹏, 侯科佐, 王舒宝, 中国医科大学第一附属医院肿瘤外科 辽宁省沈阳市 110001

张晓晶, 女, 1963-02-13 生, 辽宁省沈阳市人, 汉族. 医学博士, 副主任医师. 肿瘤外科医生. 主要从事软组织肿瘤研究.

辽宁省科技攻关课题资助项目, No. 2003225007-3

项目负责人: 张晓晶, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街 155 号, 中国医科大学第一附属医院肿瘤外科. zhangxiaojingwu@163.com

电话: 024-24315516-384

收稿日期: 2004-11-12 接受日期: 2004-11-29

Molecular mechanism of epidermal growth factor receptor pathway mediated adhesion and invasion of Caco-2 cell line

Xiao-Jing Zhang, Liang Zhang, Yun-Peng Liu, Ke-Zuo Hou, Shu-Bao Wang

Xiao-Jing Zhang, Liang Zhang, Yun-Peng Liu, Ke-Zuo Hou, Shu-Bao Wang, Department of Oncology, First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Supported by the Science and Technology Project of Liaoning Province, No. 2003225007-3

Correspondence to: Dr. Xiao-Jing Zhang, Department of Oncology, First Affiliated Hospital, China Medical University, 155 Nanjing North Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. zhangxiaojingwu@163.com

Received: 2004-11-12 Accepted: 2004-11-29

Abstract

AIM: To investigate the effect of epidermal growth factor receptor (EGFR) pathway on proliferation, adhesion and invasion of Caco-2 cell line and its molecular mechanism.

METHODS: Tetrazolium-based colorimetric assay was used to evaluate the effect of EGF, AG1478 or PD98059 on proliferation and growth of cultured human colon carcinoma Caco-2 cells. Matrigel experiment and cell adhesion assay were used to examine the invasiveness of Caco-2 cells. The transcription of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 of Caco-2 cells was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression of P-EGFR protein in Caco-2 cells was determined by Western-blot.

RESULTS: Exogenous EGF significantly enhanced the growth and proliferation of Caco-2 cells. The growth ratio was increased by 23.4% at 24 h ($P < 0.01$). AG1478 (20 $\mu\text{mol/L}$, 48 h) and PD98059 (40 $\mu\text{mol/L}$, 72 h) inhibited the growth and proliferation of Caco-2 cells in a time-independent

manner, and the growth rates were decreased by 45.7% and 54.6%, respectively ($P < 0.01$). Matrigel experiment showed that EGF increased the adhesion ($P < 0.05$) and invasion ($P = 0.001$) ability of Caco-2 cells *in vitro* at the concentration of 10 $\mu\text{g/L}$. AG1478 or PD98059 inhibited EGF-induced adhesion and invasion of Caco-2 cells ($P < 0.01$) by blocking the activity of EGFR and ERK1/2. After treatment with EGF the protein of P-EGFR was increased, which was abolished by AG1478. 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. Meanwhile AG1478 and PD98059 reversed the effect of EGF by decreasing the levels of MMP-2, MMP-9 mRNA and increasing 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 ($P < 0.001$).

CONCLUSION: In human colon carcinoma, EGFR changes MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 transcription via MAPK signal pathway, which may contribute to the invasiveness and metastasis of Caco-2 cells.

Key Words: Epidermal growth factor receptor; Caco-2 cell line; Adhesion; Invasion; Colon carcinoma

Zhang XJ, Zhang L, Liu YP, Hou KZ, Wang SB. Molecular mechanism of epidermal growth factor receptor pathway mediated adhesion and invasion of Caco-2 cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(4):483-488

摘要

目的: 探讨 EGFR 信号通路对人结肠癌 Caco-2 细胞增生、黏附和侵袭的影响及其分子机制。

方法: 应用细胞培养技术培养 Caco-2 细胞;以 MTT 法检测 EGF, AG1478 和 PD98059 对 Caco-2 细胞增生和生长的影响;Matrigel 黏附实验、侵袭实验和 RT-PCR 技术检测 EGF, AG1478 和 PD98059 对 Caco-2 细胞黏附力、侵袭力和 MMP-2, MMP-9, TIMP-1 和 TIMP-2 基因转录的影响;Western blot 蛋白免疫印迹法检测 EGF 和 AG1478 对 Caco-2 细胞 P-EGFR 蛋白表达的影响。

结果: 外源性 EGF (10 $\mu\text{g/L}$) 可明显地促进 Caco-2 细胞的增生和生长, 24 h 细胞生长率提高了 23.4% ($P < 0.01$); 而 AG1478 (20 $\mu\text{mol/L}$) 和 PD98059 (40 $\mu\text{mol/L}$) 则明显地

抑制细胞的增生和生长,其抑制作用没有时间效应关系,AG1478最强抑制时间为第48 h,细胞生长率下降了45.7% ($P < 0.01$),PD98059最强抑制时间为第72 h,细胞生长率下降了54.6% ($P < 0.01$)。Matrigel黏附实验、侵袭实验揭示了,EGF (10 $\mu\text{g/L}$) 提高EGFR活性后能明显地增加Caco-2细胞的体外黏附力 ($P < 0.05$) 和侵袭力 ($P = 0.001$);而且AG1478和PD98059分别阻断EGFR和ERK1/2后能使EGF的促细胞黏附力和侵袭力的作用消失 ($P < 0.01$)。RT-PCR测定显示,EGF能增加Caco-2细胞MMP-2, MMP-9 mRNA的表达,同时也能减少TIMP-1和TIMP-2 mRNA的表达;而AG1478和PD98059均能逆转EGF对Caco-2细胞基因的影响,使MMP-2和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 ($P < 0.001$)。

结论: EGFR信号可能通过下游MAPK通路传递信息,改变MMP-2, MMP-9, TIMP-1和TIMP-2基因功能,从而有助于结肠癌Caco-2细胞的侵袭与转移。

关键词: EGFR; Caco-2细胞; 黏附; 侵袭; 结肠癌

张锐晶, 张亮, 刘云鹏, 候科佐, 王舒宝. EGFR信号通路影响Caco-2细胞黏附和侵袭的分子机制. 世界华人消化杂志 2005;13(4):483-488
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/483.asp>

0 引言

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是 M_r 170 000具有酪氨酸蛋白激酶(TK)活性的膜受体,与生长因子(配体)结合后可使其磷酸化激活并将信号传入细胞内,再经胞内多条信号传导通路传至核内调节靶基因的功能。EGFR信号传导通路参与调节绝大多数肿瘤的发生、发展过程^[1]。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^[2],但EGFR信号如何影响结肠癌生物学行为仍不确切,弄清结肠癌转移机制是改善治疗和提高生存率的关键。我们探讨EGFR信号传导通路影响结肠癌Caco-2细胞增生、黏附和侵袭转移的分子机制如下。

1 材料和方法

1.1 材料 Caco-2细胞株来源于人结肠黏液腺癌,购于中国科学院上海细胞库;EGF购于北京科宇联合干细胞库;EGFR阻断剂AG1478由美国BIOMOL研究实验室提供;p42/p44MAPK阻断剂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;P-EGFR小鼠mAb购于

Santa Cruz公司;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 方法 Caco-2细胞生长在含100 mL/L FBS, 100 ku/L青霉素和100 mg/L链霉素的高糖DMEM培养液中,37℃,50 mL/L CO₂培养箱中培养,隔日换液,长满瓶时用含0.2 g/L EDTA + 2.5 g/L胰酶消化细胞,按1:2或1:4传代;取对数生长期细胞进行实验。

1.2.1 MTT法检测细胞增生 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℃,50 mL/L CO₂培养24 h贴壁后换成含4 mg/L转铁蛋白和20 mg/L胰岛素的McCoy's 5A无血清培养基;无血清培养24 h后实验组(1),(2),(3)分别加入EGF 10 $\mu\text{g/L}$, AG1478 20 $\mu\text{mol/L}$ 和PD98059 40 $\mu\text{mol/L}$; (2),(3)组作用1 h后各加EGF 10 $\mu\text{g/L}$,对照组加等体积的PBS液,另有培养基无细胞组,每组设9复孔。继续培养24-96 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(A_{570})值,细胞生长率(%) = $(A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

1.2.2 Caco-2细胞黏附实验 将Caco-2细胞悬液调整为 1×10^8 /L,每孔3 mL分别接种于无菌6孔板中;培养24 h细胞均贴壁,培养液改为含4 mg/L转铁蛋白和20 mg/L胰岛素的McCoy's 5A无血清培养基;饥饿48 h后更换McCoy's 5A培养基并加药。实验组(1)EGF 10 $\mu\text{g/L}$,实验组(2)EGF 10 $\mu\text{g/L}$ + AG1478 20 $\mu\text{mol/L}$,实验组(3)EGF 10 $\mu\text{g/L}$ + PD98059 40 $\mu\text{mol/L}$,其中AG1478与PD98059均在EGF用药前1 h加药,对照组加等体积PBS,在37℃,50 mL/L CO₂培养24 h后分别收集各孔细胞,离心去上清,每组均用无血清培养液调成 6×10^8 /L细胞悬液。取96孔培养板覆以Matrigel胶26 μg /孔,4℃过夜,实验前于37℃烤箱中孵育1 h, PBS洗后加入100 μL 预处理癌细胞悬液(6×10^4 个/孔),37℃作用90 min;弃上清, PBS及无血清DMEM培养液冲洗,然后按MTT法检测490 nm单波长下各组吸光度(A_{490})值,计算细胞相对黏附率,相对黏附率(%) = $(A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}) \times 100\%$ ^[4]。

1.2.3 Matrigel体外细胞侵袭实验 取对数生长期Caco-2细胞用0.2 g/L EDTA + 2.5 g/L胰酶消化、培养液洗涤终止消化,再用含100 mL/L FBS培养液配成 3×10^8 /L的细胞悬液待用;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,实验组(1),(2),(3)下室分别加EGF 10 $\mu\text{g/L}$, EGF 10 $\mu\text{g/L}$ + AG1478 20 $\mu\text{mol/L}$ 和EGF 10 $\mu\text{g/L}$ + PD98059 40 $\mu\text{mol/L}$,对照组为加入等体积PBS,上室各加200 μL 细胞悬液,37℃,50 mL/L CO₂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。

1.2.4 Western blot 检测 P-EGFR 蛋白表达 将经 EGF10 $\mu\text{g/L}$ 和 EGF10 $\mu\text{g/L}$ +AG1478 20 $\mu\text{mol/L}$ 处理和未处理的细胞 ($2 \times 10^{10}/\text{L}$) 加细胞裂解液, 冰浴下超声粉碎后裂解 40 min, 离心去除细胞碎片, 测细胞裂解产物的蛋白含量, 取等量蛋白在 120 g/L 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 将蛋白转印至硝酸纤维素膜上, 经封闭阻断后, 加小鼠抗人 P-EGFR (1:200) mAb, 4℃ 过夜, 碱性磷酸酶标记的马抗小鼠 IgG 抗体 (1:500) 室温孵育 2 h, NBT/BCIP 显色, GDS8000 成像分析仪分析图像。

1.2.5 RT-PCR 方法检测 MMP-2, MMP-9, TIMP-1 和 TIMP-2 mRNA 表达 收集经 EGF10 $\mu\text{g/L}$, EGF10 $\mu\text{g/L}$ +AG1478 20 $\mu\text{mol/L}$ 和 EGF10 $\mu\text{g/L}$ +PD98059 40 $\mu\text{mol/L}$ 处理及未处理的细胞, 采用异硫氰酸胍一步法提取总 RNA, RNA 引物序列 (表 1)。逆转录 (RT) 反应体系 20 μL , 含 $2 \times$ 缓冲液 10 μL , dNTP (10 mmol/L) 1 μL , RNasin (40 MU/L) 0.5 μL , Oligo (dT) 15 引物 (1 g/L) 1 μL , AMV 逆转录酶 (22 MU/L) 1 μL , RNA 样品 2 μg 。反应条件: 65℃ 1 min, 30℃ 5 min, 迅速升温至 65℃ 再作用 30 min 后, 98℃ 预变性 5 min 灭活 AMV Rtase, 5℃ 5 min。PCR 反应: 在 20 μL RT 反应产物中, 加入 15 mmol/L MgCl_2 8 μL , $4 \times$ dNTP 2 μL , 上游引物 1 μL , 95℃ 5 min, 加入 2 μL Taq DNA 聚合酶 (1 MU/L)。循环条件: 94℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共 30 个循环, 最后 72℃ 延长 7 min。取 PCR 产物 10 μL , 经 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 紫外灯下观察结果。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。

统计学处理 全部数据用 SPSS10.0 软件包进行统计学处理。计量资料用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示; 各组组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

表 1 待扩增片段的引物序列和扩增条件

名称	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' -TCAACGGTCGGAATACA-3'	307	35
	5' -CCCACAGTGGACATAGCG-3'		
MMP-9	5' -TCGAACCTTTGACAGCGACAAGAA-3'	215	35
	5' -TCAGGGCGAGGACCATAGAGG-3'		
TIMP-1	5' -CTTCCACAGGTCCCAAC-3'	285	30
	5' -CAGCCCTGGCTCCCGAGGC-3'		
TIMP-2	5' -AAACGACATTTATGGCAACCCTATC-3'	265	35
	5' -ACAGGAGCCGCTCACTTCTTGATG-3'		

2 结果

2.1 EGF 和 AG1478 对 Caco-2 细胞 EGFR 蛋白表达的影响 Caco-2 细胞为 P-EGFR 蛋白表达细胞, 经外源性 EGF (10 $\mu\text{g/L}$) 作用 24 h 后 P-EGFR 蛋白表达明显增加, 而 AG1478 (20 $\mu\text{mol/L}$) 能完全阻断外源性 EGF 对 Caco-2 细胞 EGFR 的激活作用, 使 P-EGFR 蛋白表达明显下降 (图 1)。

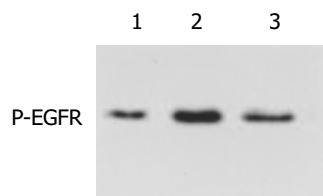


图 1 EGF 和 AG1478 对 Caco-2 细胞 P-EGFR 蛋白表达的影响。1: 对照组; 2: 10 $\mu\text{g/L}$ EGF; 3: 20 $\mu\text{mol/L}$ AG1478。

2.2 EGFR 活性改变对 Caco-2 细胞增生的影响 外源性 EGF 10 $\mu\text{g/L}$ 促进 Caco-2 细胞生长作用在 24 h 时最强, 细胞生长率提高了 23.4% ($P < 0.01$), 随着作用时间延长至 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 ($P < 0.01$)。AG1478 (20 $\mu\text{mol/L}$) 和 PD98059 (40 $\mu\text{mol/L}$) 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)。

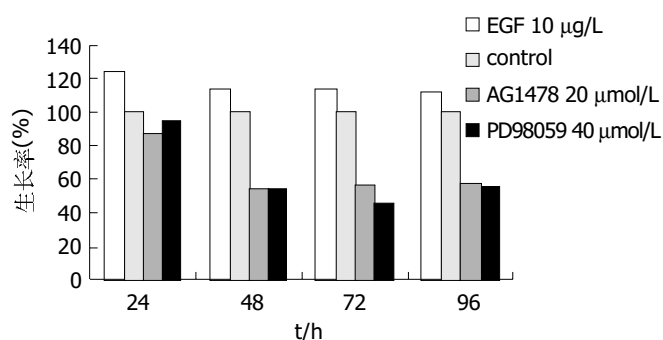


图 2 EGF, AG1478 和 PD98059 对 Caco-2 细胞生长的影响。

2.3 EGFR 活性改变对 Caco-2 细胞黏附力的影响 EGF10 $\mu\text{g/L}$ 作用 Caco-2 细胞 24 h 后可明显地增强 Caco-2 细胞对 ECM 的黏附性, 相对黏附性是对照组细胞的 1.49 ± 0.13 倍 ($P < 0.05$); 而 AG1478 20 $\mu\text{mol/L}$ 和 PD98059 20 $\mu\text{mol/L}$ 分别作用 Caco-2 细胞 1 h 封闭 EGFR 和 MAPK 信号传导通路后, EGF 则不能行使促使 Caco-2 细胞黏附于 ECM 的作用, 相对黏附性分别由 1.49 ± 0.13 降为 0.98 ± 0.03 和 0.51 ± 0.01 , 二组

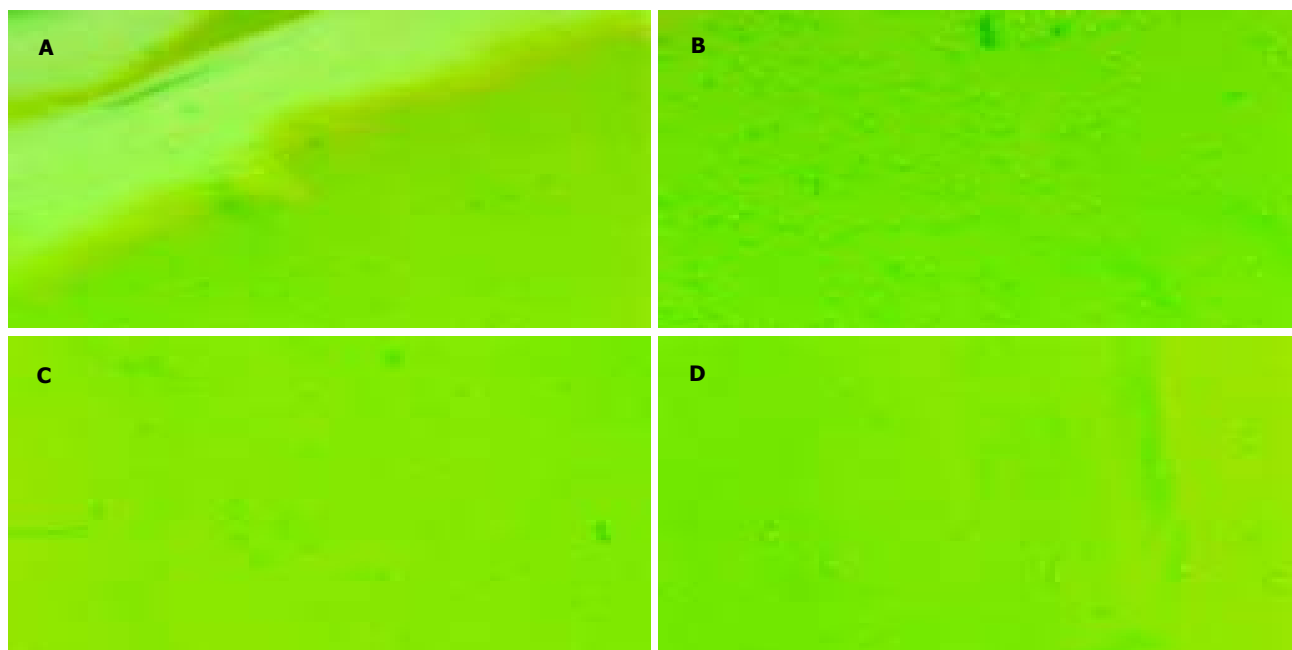


图3 EGF, AG1478 和 PD98059 对 Caco-2 细胞黏附性的影响($\times 100$). A: 对照; B: EGF; C: EGF+AG1478; D: EGF+PD98059.

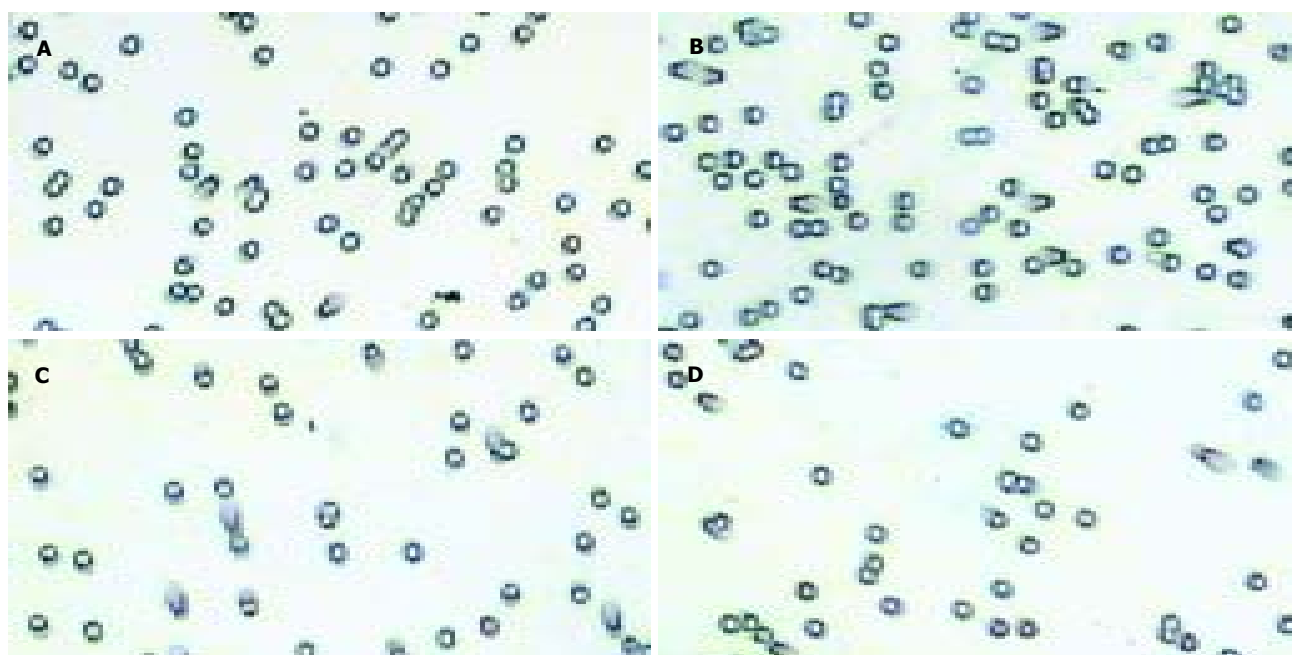


图4 EGF, AG1478 和 PD98059 对 Caco-2 细胞侵袭力的影响($\times 100$). A: 对照; B: EGF; C: EGF+AG1478; D: EGF+PD98059.

比较差异均有统计学意义($P < 0.01$). EGF处理组的黏附细胞数明显多于未处理组; EGF+AG1478 和 EGF+PD98059 处理组的黏附细胞数均显著低于EGF处理组的细胞数(图3).

2.4 EGFR 活性改变对 Caco-2 细胞体外侵袭力的影响
EGF10 $\mu\text{g/L}$, AG1478 20 $\mu\text{mol/L}$ 和 PD98059 40 $\mu\text{mol/L}$ 分别作用Caco-2细胞24 h 后, 检测细胞对Matrigel 体外侵袭力发现, EGF 明显增加Caco-2细胞的过膜细胞数(过膜细胞数由正常的 208 ± 3 个增至 241 ± 5 个) ($P = 0.001$); 而 AG1478 不仅能减少Caco-2细胞本身的过膜能力(过膜细胞数由正常的 208 ± 3 个减为 170 ± 4

个) ($P < 0.01$), 而且也能阻止 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) ($P = 0.001$); 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) ($P = 0.001$). EGF 处理组 Caco-2 细胞侵袭人工基底膜后, 不仅数目多, 而且表现出形态各异的伪足; 而 AG1478 和 PD98059 处理组的细胞形态较圆, 伪足数目相对较少(图4). 结果表明, EGFR 信号通过 MAPK 通路调节 Caco-2 细胞的侵袭力.

2.5 EGFR 活性改变对 MMP-2, MMP-9, TIMP-1 和 TIMP-2 mRNA 表达的影响 EGF10 $\mu\text{g/L}$, EGF10 $\mu\text{g/L}$ +

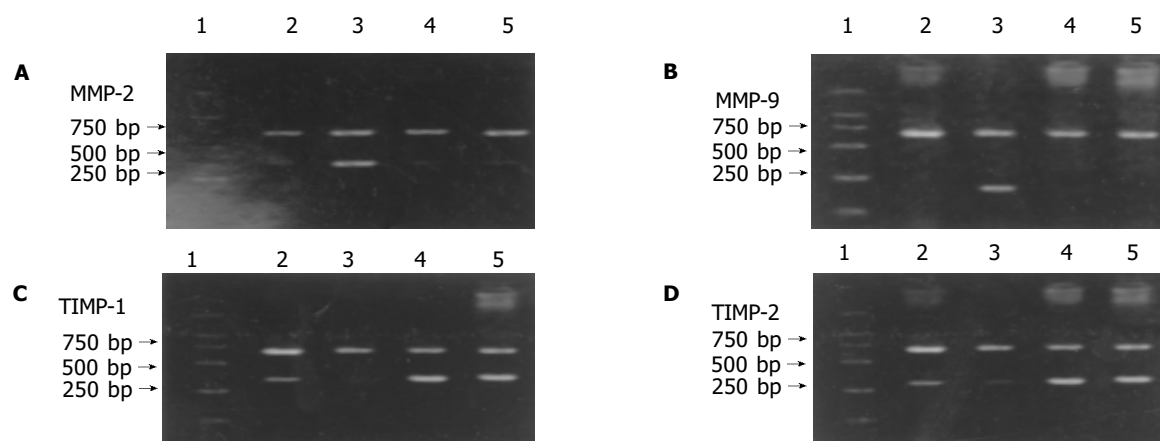


图5 EGF, AG1478 和 PD98059 对 Caco-2 细胞 MMPs 和 TIMPs mRNA 表达的影响. A: MMP-2 mRNA; B: MMP-9 mRNA; C: TIMP-1 mRNA; D: TIMP-2 mRNA. 1: Marker; 2: 对照组; 3: EGF 组; 4: EGF+AG1478 组; 5: EGF+PD98059 组.

AG1478 20 $\mu\text{mol/L}$ 和 EGF10 $\mu\text{g/L}$ + PD98059 40 $\mu\text{mol/L}$ 分别作用 Caco-2 细胞 24 h 后检测 MMP-2, MMP-9, TIMP-1 和 TIMP-2 mRNA 表达发现, EGF 使 MMP-2 307 bp 和 MMP-9 215 bp 分别与 β -action 690 bp 扩增带的吸光面积积分比值均高于对照组, 灰度值分别是对照组的 2.2 倍和 3.3 倍 ($P < 0.01$), 使 TIMP-1 285 bp 和 TIMP-2 265 bp 分别与 β -action 690 bp 扩增带的吸光面积积分比值均低于对照组, 灰度值分别减少了 36.7% 和 25.4% 且差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 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% ($P < 0.001$), MMP-9 mRNA 表达分别减少了 63.5% 和 70.8% ($P < 0.001$), 使 TIMP-1 mRNA 表达灰度值分别是 EGF 组的 2.3 倍和 2.7 倍 ($P < 0.001$), TIMP-2 mRNA 表达灰度值分别是 EGF 组的 1.9 倍和 2.4 倍 ($P < 0.001$), 结果 MMP-2/TIMP-2 和 MMP-9/TIMP-1 的比值明显下降, 差异均有统计学意义 ($P < 0.001$) (图 5)。

3 讨论

肿瘤的侵袭、转移是一个多步骤、多基因参与的极其复杂的过程. EGFR 在正常组织中几乎不表达, 呈关闭状态; 而在肿瘤组织中呈活跃的开放状态, 而且其表达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病理发展. 表皮样生长因子 (如 EGF, TGF- α 等) 能与胞膜上 EGFR 结合, 使其磷酸化激活, 再经 PI3K/AKT 或 MAPK 信号通路将信号传递至核内, 促进或抑制特定靶基因的表达, 调节细胞的增生、黏附、运动、蛋白水解酶的分泌等^[1]. EGF 和 EGFR 信号通路对肿瘤细胞生物学行为的影响是目前的研究热点, 而且对不同来源肿瘤的作用机制并不相同. Pouliot *et al*^[3] 报道 EGF 和 TGF- α 通过 EGFR 信号通路能改变结肠癌细胞的增生和生存能力, 而且 EGFR 促细胞增生作用的发挥与细胞外基质层蛋白作用的发挥具有协同性; 同时 EGF 作用 EGFR 后能诱导整合素的表

达, 从而提高结肠癌细胞的黏附、扩散和转移能力. 但 EGF 对不同结肠癌细胞株的作用结果有所不同. Sawhney *et al*^[4] 研究证实 EGF 并不影响结肠癌 HCT116 细胞 DNA 的合成, 但能通过上调细胞表面整合素的表达而影响细胞的黏附和运动能力. 由于结肠癌肿瘤组织中 EGFR 的表达量与结肠癌病情进展和肝转移事件的发生相一致, 所以 EGFR 可作为结肠癌治疗新的靶点. 尽管结肠癌对常规化疗并不敏感, 但通过 EGFR 阻断治疗具有抑制 EGF 和 TGF- 对结肠癌进展的影响, 同时具有诱导细胞凋亡和化疗增敏作用^[1, 5]. 我们发现 EGFR 信号通路的激活与失活能改变结肠癌细胞的生长, 当 EGF 激活 EGFR 使 P-EGFR 蛋白表达增加时 Caco-2 细胞的增生能力和生存能力均提高; 当 AG1478 阻断 EGFR 和 PD98059 阻断 MAPK 通路后, Caco-2 细胞的生长受到抑制, 从而推测 EGF 对高分化结肠癌细胞具有促进生长和提高增生能力的作用, 可能是 EGFR 信号通过 MAPK 通路传递作用靶基因的结果。

一般认为细胞增生活性是肿瘤侵袭、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, 主要成分是胶原、糖蛋白、蛋白多糖和氨基葡聚糖, 以基底膜 (BM) 和细胞间结缔组织形式存在. ECM 的降解和 BM 的破坏是一个关键步骤, 而基质金属蛋白酶 [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, 二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]. EGF 具有使乳腺癌和皮肤鳞状细胞癌 MMP-2 和 MMP-9 基因活性增高, 提高肿瘤细胞侵袭和转移能力的作用^[8-9]. O-charoenrat *et al*^[10] 发现 EGFR 信号通过 MAPK 和 PI3K/AKT 二条通路增加 MMP-9 蛋白表达, 进而提高头颈鳞癌细胞对 Matrigel 的侵袭力, 但不改变 MMP-2 的基因活性。

我们对低浸润 Caco-2 细胞的 Matrigel 黏附、侵袭、Western blot 和 RT-PCR 测定表明, EGF10 $\mu\text{g/L}$ 作用 24 h 激活 EGFR 信号通路后能明显提高 Caco-2 细胞对 Matrigel 的黏附力和穿透基底膜胶原纤维移向下室的体外侵袭力, 使 Caco-2 细胞 P-EGFR 蛋白表达和 MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 表达均升高, 使 TIMP-1 和 TIMP-2 的 mRNA 表达均下降, 说明基质金属蛋白酶具有增加结肠癌细胞异质黏附性和促进转移的作用; 而 EGFR 抑制剂 AG1478 和 MAPK 抑制剂 PD98059 则能阻断 EGF 对细胞黏附力和侵袭力的影响。AG1478 使 Caco-2 细胞 P-EGFR 蛋白表达和 MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 表达均明显下降, 使 TIMP-1 和 TIMP-2 的 mRNA 表达升高, 进而 MMP-2/TIMP-2 和 MMP-9/TIMP-1 的比值均明显下降 ($P < 0.001$)。结果表明 EGFR 被 EGF 激活后通过 MAPK 信号通路将信号传递至核内, 改变 Caco-2 细胞的基质溶解相关基因 MMP-2, MMP-9, TIMP-1 和 TIMP-2 的转录水平, 进而提高大肠癌细胞的转移能力。可见 EGFR 信号通路的激活是结肠癌病情进展的关键机制, 可作为理想的治疗靶点。

4 参考文献

- 1 Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2001;7:2958-2970
- 2 Shen Y, Vogel I, Kalthoff H. Comparative study of metastasis-associated characteristics of tumor cells with different metastatic capacities. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2000;22:201-204
- 3 Pouliot N, Connolly LM, Moritz RL, Simpson RJ, Burgess AW. Colon cancer cells adhesion and spreading on autocrine laminin-10 is mediated by multiple integrin receptors and modulated by EGF receptor stimulation. *Exp Cell Res* 2000;261:360-371
- 4 Sawhney RS, Zhou GH, Humphrey LE, Ghosh P, Kreisberg JJ, Brattain MG. Differences in sensitivity of biological functions mediated by epidermal growth factor receptor activation with respect to endogenous and exogenous ligands. *J Biol Chem* 2002;277:75-86
- 5 Liu B, Fang M, Schmidt M, Lu Y, Mendelsohn J, Fan Z. Induction of apoptosis and activation of the caspase cascade by anti-EGF receptor monoclonal antibodies in DiFi human colon cancer cells do not involve the c-jun N-terminal kinase activity. *Br J Cancer* 2000;82:1991-1999
- 6 范跃祖, 傅锦业, 赵泽明, 陈春球. 去甲斑蝥素对人胆囊癌 GBC-SD 细胞系增生及侵袭的影响. *中华肿瘤杂志* 2004;26:271-274
- 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. *世界华人消化杂志* 2004;12:428-431
- 8 Menashi S, Serova M, Ma L, Vignot S, Mourah S, Calro F. Regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinase expression by amphiregulin in transformed human breast epithelial cells. *Cancer Res* 2003;63:7575-7580
- 9 Huang YT, Hwang JJ, Lee LT, Liebow C, Lee PP, Ke FC, Lo TB, Schally AV, Lee MT. 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. *Int J Cancer* 2002;99:505-513
- 10 O-charoenrat P, Wongkajornsilp A, Rhys-Evans PH, Eccles SA. Signaling pathways required for matrix metalloproteinase-9 induction by betacellulin in head-and-neck squamous carcinoma cells. *Int J Cancer* 2004;111:174-183

编辑 潘伯荣 审读 张海宁