

启膈散及其拆方抑制原代培养食管癌细胞PDGFR-PLC- γ 1酪氨酸的磷酸化

司富春

司富春, 河南中医学院中医药分子生物学实验室 河南省郑州市 450008
国家自然科学基金资助项目, No. 30171160, No. 30371716
通讯作者: 司富春, 450008, 河南省郑州市金水路1号, 河南中医学院中医药分子生物学实验室. sifc2000@hotmail.com
电话: 0371-65680049
收稿日期: 2007-01-18 修回日期: 2007-09-03

Inhibitory effects of *Qigesan* and its individual components on tyrosine phosphorylation of PDGFR-PLC- γ 1 in primary cultured esophageal carcinoma cells

Fu-Chun Si

Fu-Chun Si, Laboratory of Molecular Biology for Traditional Chinese Medicine, He'nan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, He'nan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30171160 and No. 30371716

Correspondence to: Fu-Chun Si, Laboratory of Molecular Biology for Chinese Traditional Medicine, He'nan College of Traditional Chinese Medicine, 1 Jinshui Road, Zhengzhou 450008, He'nan Province, China. sifc2000@hotmail.com

Received: 2007-01-18 Revised: 2007-09-03

Abstract

AIM: To investigate the signaling pathways involved in the action of *Qigesan* in treating esophageal cancer, the effects of *Qigesan* and its different individual components on tyrosine phosphorylation of PDGFR-PLC- γ 1 were studied in primary cultured esophageal carcinoma cells.

METHODS: Cells from surgically resected human esophageal carcinoma specimens were primary cultured and treated with PDGF and the water extracts from *Qigesan* and its individual components. Total protein and tyrosine phosphorylated levels of PDGFR and PLC- γ 1 were assessed by Western blotting.

RESULTS: There was no difference in the levels of PDGFR β and PLC- γ 1 proteins before and

after treatment of primary cultured esophageal carcinoma cells with water extracts from *Qigesan* and its separated components for 15 minutes and PDGF-BB for 4 minutes. The tyrosine phosphorylation levels of PDGFR β and PLC- γ 1 were markedly increased by stimulation with PDGF-BB, and markedly decreased in cells treated with *Qigesan* and its separated components, which showed the best effects for promoting blood circulation group, while the second best was a whole prescription of *Qigesan*.

CONCLUSION: Inhibiting growth signaling via inhibition of tyrosine phosphorylation of PDGFR and PLC- γ 1 is an important mechanism in the treatment of esophageal cancer with *Qigesan* and its separated components.

Key Words: *Qigesan* prescription; Esophageal carcinoma; Phospholipase C- γ 1; Platelet-derived growth factor receptor; Tyrosine phosphorylation; Western blotting

Si FC. Inhibitory effects of *Qigesan* and its individual components on tyrosine phosphorylation of PDGFR-PLC- γ 1 in primary cultured esophageal carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(26): 2821-2824

摘要

目的: 观察启膈散及其活血和化痰2个拆方对原代培养的食管癌细胞血小板衍生生长因子受体(PDGFR)和磷脂酶C- γ 1(PLC- γ 1)酪氨酸磷酸化的影响, 以探讨启膈散治疗食管癌的作用机制。

方法: 从外科切除的原发性食管癌组织中采集食管上皮细胞进行原代培养, 加入PDGF和启膈散及其活血和化痰2个拆方的水提物, 免疫印迹法(Western blotting)测定PDGFR-PLC- γ 1蛋白表达和酪氨酸磷酸化水平。

结果: 用PDGF-BB刺激4 min和启膈散及其拆方处理15 min前后, 原代培养食管癌细胞PDGFR β 和PLC- γ 1蛋白表达没有变化; 但PDGF-BB刺激后PDGFR β 和PLC- γ 1蛋白酪氨酸

■背景资料

自1989年报道 PLC- γ 1是PDGF受体酪氨酸激酶的底物以来, 已发现PDGFR-PLC- γ 1信号转导在多种生理和病理过程中起关键作用, 已成为肿瘤病理和药物研究重要的信号转导通路, 但有关在食管癌病变中的作用尚未报道。

■相关报道

PDGFR-PLC- γ 1 信号转导在对肝细胞、成骨肉瘤细胞、肾小球膜细胞和星状细胞等研究中已有报道, PDGFR-PLC- γ 1 信号转导机制除已知的PDGFR受体酪氨酸激酶使PLC- γ 1酪氨酸磷酸化外, 近年还发现PDGFR与PLC- γ 1直接结合的相互作用途径。

酸磷酸化明显增强, 启膈散及其拆方能不同程度地降低其蛋白磷酸化水平, 其中以活血组作用最好, 全方组次之。

结论: 食管癌病变与PDGFR-PLC- γ 1蛋白酪氨酸磷酸化增强有关, 启膈散及其拆方通过抑制PDGFR-PLC- γ 1酪氨酸磷酸化从而抑制生长信号转导是其治疗食管癌重要机制。

关键词: 启膈散; 食管癌; 磷脂酶C- γ 1; 血小板衍生生长因子受体; 蛋白酪氨酸磷酸化; 免疫印迹法

司富春. 启膈散及其拆方抑制原代培养食管癌细胞PDGFR-PLC- γ 1酪氨酸的磷酸化. 世界华人消化杂志 2007;15(26):2821-2824

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2821.asp>

0 引言

血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGFs)包括PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PDGF-CC和PDGF-DD, 分别通过与相对应的受体(platelet-derived growth factor receptor α/β , PDGFR)结合而对细胞发生作用^[1-4]。PDGFR有1个细胞外配体结合区、1个跨膜区和1个细胞内区, 细胞内区为酪氨酸蛋白激酶^[5]。PDGF与细胞表面受体结合引起受体聚合成二聚体和PDGF受体多肽链上特异酪氨酸残基磷酸化^[6]。受体自磷酸化激活其酪氨酸激酶活性, 向细胞内底物传导促细胞有丝分裂的信号^[7]。这些磷酸化的酪氨酸残基是细胞蛋白质结合的位点, 这种结合是通过与效应蛋白质的SH2区相互作用而实现^[8]。PDGF受体的底物包括磷脂酶C- γ 1(PLC- γ 1)、ras GTPase激活蛋白、PI3K调节单位P85、蛋白酪氨酸激酶P60src家族成员、Nck、Grb-2等^[9-10]。

PDGF及其受体参与各种各样生理活动, 例如胚胎发育和伤口愈合。PDGF异常高的活性在某些病理生理发生中起关键作用^[11]。PDGF B链对急性转染猿猴肉瘤病毒的sis癌基因是必需的, PDGF类生长因子在猿肉瘤感染细胞或转染sis癌基因的细胞中表达, 由于对PDGF受体持续的自分泌刺激, 导致这些细胞转型^[12]。PDGF和其受体在多种肿瘤如肺癌、前列腺癌、视网膜神经细胞瘤中起重要作用, 参与了肿瘤的自分泌刺激生长、刺激血管生成和转移^[13]。

PLC- γ 1作为PDGF受体细胞内底物, 被PDGF受体酪氨酸磷酸化激活, 是PDGF产生促细胞有丝分裂信号的重要通路^[14-15]。我们研究发

现食管癌组织中PLC- γ 1和PDGFR受体超量表达, PLC- γ 1介导的信号转导增强, 中医复方启膈散及其拆方可以抑制人食管癌肿瘤细胞Eca109细胞和原代培养的人食管癌细胞PLC- γ 1介导的信号作用, 并能降低PDGFR受体表达。为了深入研究PDGF-PLC- γ 1信号转导在食管癌病变中的作用和启膈散的作用机制, 我们观察了启膈散及其拆方对原代培养食管癌细胞PDGFR-PLC- γ 1酪氨酸磷酸化的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 丹参、郁金、砂仁壳、沙参、贝母、茯苓购于河南中医学院第三附属医院, 经鉴定皆为正品。分为全方组(W)、活血组(P)(丹参、郁金、砂仁壳)、化痰组(R)(沙参、贝母、茯苓), 每味药10 g, 煎煮、浓缩、5000 g离心、0.22 μ m滤膜过滤, 取部分干燥称重, 换算出浓度, 用时调至所需浓度。人食管癌组织来源于河南省肿瘤医院, 经病理确诊的患者, 病理类型为鳞癌。RPMI 1640培养基(Gibco公司); 胎牛血清(Hyclone公司); PMSF和Leupeptin (Amresco公司); 丙烯酰胺(Biomol公司); 胰蛋白酶、山羊抗小鼠IgG-HRP和山羊抗兔IgG-HRP(华美公司); ECL试剂盒(Santa Cruz公司); PLC- γ 1 mAb(韩国浦项科技大学国家信号传导网络实验室惠赠); rhPDGF-BB(R&D公司); PDGFR β 多克隆抗体(Santa Cruz公司); 抗phosphotyrosine mAb 4G10(UBI公司); 考马斯亮蓝G250(Amresco公司)。Heraeus细胞培养箱(德国 Kendro公司); 倒置显微镜(Zeiss公司); 紫外分光光度计(Thermo公司); SG-603生物安全柜(Bake公司); ELx800型酶标仪(Bio-Tek公司); 蛋白电泳系统(Bio-Rad公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 外科切除的原发性食管癌组织, 从肉眼可见的肿瘤组织和标本末端2个部位采集食管上皮组织, 用不含血清的RPMI 1640培养液10 mL冲洗3次, 去除其表面的凝血块及坏死组织, 一部分组织直接用于检测, 一部分用于体外培养。将体外培养的组织剪成泥状, 加入5 mL trypsin消化液, 37℃消化15 min, 用60目不锈钢网筛过滤, 1000 g离心10 min, 用10 mL不含血清的RPMI培养液洗3次, 台盘兰染色检测活细胞数在90%以上, 用含100 mL/L胎牛血清的RPMI培养液悬浮细胞, 按实验分组要求分配于96孔培养板中和 Φ 60培养皿中, 37℃、50 mL/L CO₂培

■创新盘点

本文首次发现食管癌病变与PDGFR-PLC γ 1蛋白酪氨酸磷酸化增强有关, 启膈散及其拆方通过抑制PDGFR-PLC γ 1酪氨酸磷酸化从而抑制生长信号转导是其治疗食管癌的重要机制。

养箱培养。

1.2.2 PDGFR-PLC- γ 1蛋白表达及酪氨酸磷酸化水平检测 Western blot^[16]检测蛋白表达。用启膈散及其拆方水提物处理15 min后, 然后用PDGF-BB(30 μ g/L)处理4 min, 再用裂解液裂解细胞(裂解液组成: 20 mmol/L HEPES, pH7.2, 100 mL/L 甘油, 150 mmol/L NaCl, 10 mL/L TritonX-100, 1 mmol/L Na_3VO_4 , 10 mg/L Leupeptin和1 mmol/L PMSF), 提取蛋白, 用Bradford法测定蛋白浓度。用80 g/L SDS-PAGE电泳, 同一个凝胶左右上两套同样样品。分离的蛋白质转移到硝酸纤维素膜, 丽春红染色后, 将硝酸纤维素膜剪成左右两部分。50 g/L脱脂奶粉TTBS溶液封闭滤膜30 min(TTBS: 10 mmol/L, Tris, pH7.6, 150 mmol/L NaCl, 0.5 mL/L Tween 20), 一部分用PLC- γ 1 mAb或PDGFR β 多抗反应, 另一部分用抗磷酸酪氨酸mAb(4G10)反应, 再用辣根过氧化物酶偶联的抗鼠IgG抗体或抗兔IgG抗体检测ECL底物显影。

2 结果

启膈散及其拆方抑制PDGFR-PLC- γ 1酪氨酸磷酸化Western blot分析显示用PDGF-BB刺激4 min和用启膈散及其拆方处理15 min前后, 原代培养食管癌细胞PDGFR β 和PLC- γ 1蛋白表达没有变化; 但PDGF-BB刺激后PDGFR-PLC- γ 1蛋白酪氨酸磷酸化明显增强, 应用启膈散及其拆方处理的原代培养食管癌细胞磷酸化水平与对照组相比显著降低。说明启膈散及其拆方对PDGFR-PLC- γ 1蛋白酪氨酸磷酸化具有不同程度的抑制作用, 其中以P组作用最好, W组次之(图1)。

3 讨论

PDGFR是自磷酸化的酪氨酸蛋白激酶, 与其配体结合后, 受体发生空间构象改变, 酪氨酸残基相互作用发生磷酸化而激活, 并磷酸化多种下游分子, 启动级联信号传导^[17]。PLC- γ 1在肿瘤发生和发展中起关键作用, 其超量表达和激活引起肿瘤发生、浸润和转移^[18]。PLC- γ 1通过SH2区与PDGFR相互作用, 是以PDGFR为中心的多级蛋白质复合物的一个重要组成成分, 直接被PDGFR酪氨酸残基磷酸化而活化。PLC- γ 1酶活化后, 催化PIP2分解成产物IP3和DAG作为第2信使物质在细胞内发生作用, IP3能引起细胞内钙库的释放, DAG能激活PKC^[19-20]。通过这两条通路和其他未知通路从而激活多种细胞反应。PDGFR-PLC- γ 1酪氨酸磷酸化是PDGFR介导的

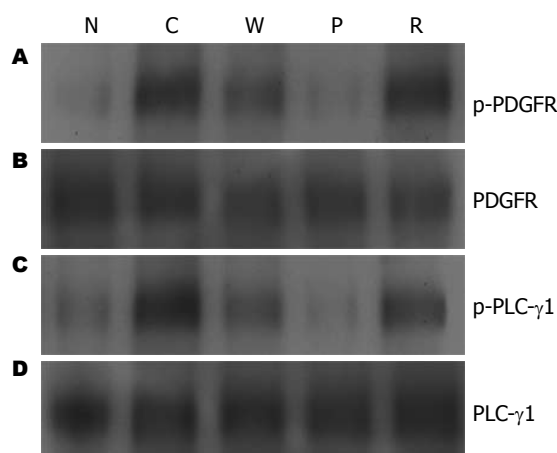


图1 启膈散及其拆方抑制原代培养食管癌细胞PDGFR-PLC- γ 1酪氨酸磷酸化的Western blot。A: α pTyr; B: α PDGFR; C: α pTyr; D: PLC- γ 1。N: 不用PDGF刺激组; C: 对照组; W: 全方组; P: 活血组; R: 化痰组。

PDGFR-PLC- γ 1信号传导的前提条件。

食管癌细胞以自分泌PDGF的形式促进生存和增殖^[21]。我们研究发现, 食管癌组织中PDGFR超量表达、PDGFR-PLC- γ 1磷酸化水平升高、PLC- γ 1介导的信号转导增强, 中医复方启膈散及其拆方可以抑制PDGFR-PLC- γ 1的表达, 减弱PLC- γ 1介导的信号转导。为了进一步研究该方对PDGF受体介导的生长信号转导的影响, 我们用rhPDGF-BB刺激原代培养的食管癌细胞, 观察启膈散及其拆方对其PDGFR-PLC- γ 1酪氨酸磷酸化的作用, 发现启膈散及其拆方可以不同程度地抑制PDGFR-PLC- γ 1的酪氨酸磷酸化, 用中药短时间处理食管癌细胞, 并不影响PDGFR-PLC- γ 1蛋白表达。上述结果表明启膈散及其拆方可以通过抑制酪氨酸蛋白激酶受体的酪氨酸磷酸化而抑制PLC- γ 1介导的信号转导, 这也是启膈散治疗食管癌的部分重要机制。

4 参考文献

- Alvarez RH, Kantarjian HM, Cortes JE. Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease. *Mayo Clin Proc* 2006; 81: 1241-1257
- Ostman A. PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15: 275-286
- Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 1999; 79: 1283-1316
- Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15: 197-204
- Srinivasan DM, Kapoor M, Kojima F, Crofford LJ. Growth factor receptors: implications in tumor biology. *Curr Opin Investig Drugs* 2005; 6: 1246-1249
- Hubbard SR, Miller WT. Receptor tyrosine kinases:

■应用要点

本文对食管癌细胞PDGFR-PLC- γ 1信号转导异常的发现可以为食管癌病变提供新的认识, 为研制药物提供新的靶点。

■名词解释

蛋白酪氨酸激酶是一类催化ATP上 γ -磷酸转移到蛋白酪氨酸残基上的激酶, 能催化多种底物蛋白质酪氨酸残基磷酸化, 在细胞生长、增殖、分化中具有重要作用。根据PTK是否存在于细胞膜受体可将其分成非受体型和膜受体型。

■同行评价

本文研究了启膈散及其拆方抑制原代培养食管癌细胞PDGFR-PLC γ 1酪氨酸磷酸化,设计合理,分析有据,对基础研究有一定的参考价值。

- mechanisms of activation and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19: 117-123
- 7 Tallquist M, Kazlauskas A. PDGF signaling in cells and mice. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15: 205-213
- 8 Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, Pawson T. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 1991; 252: 668-674
- 9 Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, Soltoff S. Oncogenes and signal transduction. *Cell* 1991; 64: 281-302
- 10 Schlesinger TK, Demali KA, Johnson GL, Kazlauskas A. Platelet-derived growth factor-dependent association of the GTPase-activating protein of Ras and Src. *Biochem J* 1999; 344 Pt 2: 519-526
- 11 Betsholtz C. Biology of platelet-derived growth factors in development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2003; 69: 272-285
- 12 Doolittle RF, Hunkapiller MW, Hood LE, Devare SG, Robbins KC, Aaronson SA, Antoniades HN. Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science* 1983; 221: 275-277
- 13 Jones AV, Cross NC. Oncogenic derivatives of platelet-derived growth factor receptors. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 2912-2923
- 14 Valius M, Kazlauskas A. Phospholipase C-gamma 1 and phosphatidylinositol 3 kinase are the downstream mediators of the PDGF receptor's mitogenic signal. *Cell* 1993; 73: 321-334
- 15 Kim HK, Kim JW, Zilberstein A, Margolis B, Kim JG, Schlessinger J, Rhee SG. PDGF stimulation of inositol phospholipid hydrolysis requires PLC-gamma 1 phosphorylation on tyrosine residues 783 and 1254. *Cell* 1991; 65: 435-441
- 16 Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning*. third edition. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001; 16: 25-26
- 17 Funa K, Uramoto H. Regulatory mechanisms for the expression and activity of platelet-derived growth factor receptor. *Acta Biochim Pol* 2003; 50: 647-658
- 18 Wells A, Grandis JR. Phospholipase C-gamma1 in tumor progression. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20: 285-290
- 19 Kim MJ, Si F, Kim SJ, Hong SB, Hwang JI, Lee HJ, Lee SJ, Chang JS, Lee YH, Ryu SH, Suh PG. The SH2-SH2-SH3 domain of phospholipase C-gamma1 directly binds to translational elongation factor-1alpha. *Mol Cells* 1999; 9: 631-637
- 20 Piccolo E, Innominato PF, Mariggio MA, Maffucci T, Iacobelli S, Falasca M. The mechanism involved in the regulation of phospholipase Cgamma1 activity in cell migration. *Oncogene* 2002; 21: 6520-6529
- 21 Liu YC, Chen SC, Chang C, Leu CM, Hu CP. Platelet-derived growth factor is an autocrine stimulator for the growth and survival of human esophageal carcinoma cell lines. *Exp Cell Res* 1996; 228: 206-211

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

中国学术期刊综合引证报告(2006)

本刊讯 根据《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》2005年6182种统计刊源析出的214万条中国期刊引文数据库及CNKI“中国期刊网”中心网站2005-01/12全文下载记录(1.5亿篇次)的大样本数据统计分析得到:世界华人消化杂志[标准刊号: ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R; 类目名称: 医药科学\临床科学\呼吸及消化系统疾病(YK5.2.3)]总被引频次为2471, 影响因子为0.661, 5年影响因子为0.644, 即年指标为0.079, 他引总引比为0.73, 被引期刊数为491, 被引半衰期为4.6, 2005载文量为768, 基金论文比为0.44, Web即年下载率为0.6. [中国学术期刊(光盘版)电子杂志社; 中国科学文献计量评价研究中心].