

肝细胞生长因子对肝细胞癌细胞系SMMC-7721黏着斑激酶的影响

苏荣健, 李贞, 李宏丹, 宋慧娟, 程留芳

■背景资料

肝癌是一种恶性肿瘤, 他的发病率逐年增高。肝细胞生长因子是间充质细胞分泌的多效应因子, 其与c-Met结合, 激活下游的信号通路。已经明确HGF可以促进肝细胞癌的侵袭和转移, 并且发现其对肝细胞癌侵袭和转移的作用与PI3K有关。

苏荣健, 李宏丹, 宋慧娟, 辽宁医学院科学实验中心 辽宁省高校分子细胞生物学和新药开发重点实验室 辽宁省锦州市121001

李贞, 程留芳, 中国人民解放军总医院临床部消化科 北京市100853

辽宁省博士启动基金资助项目, No. 20061074

辽宁省教育厅重点实验室基金资助项目, No. 2008S142

作者贡献分布: 本研究由程留芳提出, 苏荣健设计并分析结果; 李贞、李宏丹及宋慧娟负责具体的实验操作; 论文撰写由李贞完成。

通讯作者: 苏荣健, 副教授, 121001, 辽宁省锦州市, 辽宁医学院科学实验中心, 辽宁省高校分子细胞生物学和新药开发重点实验室。rongjiansu@hotmail.com

电话: 0416-4673183

收稿日期: 2009-04-14 修回日期: 2009-06-15

接受日期: 2009-06-23 在线出版日期: 2009-07-18

Effects of hepatocyte growth factor on the expression and phosphorylation of focal adhesion kinase in SMMC-7721 cells

Rong-Jian Su, Zhen Li, Hong-Dan Li, Hui-Juan Song, Liu-Fang Cheng

Rong-Jian Su, Hong-Dan Li, Hui-Juan Song, Key Laboratory of Molecular Cell Biology and New Drug Development of the Education Department of Liaoning Province, Scientific Experimental Center, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China
Zhen Li, Liu-Fang Cheng, Department of Gastroenterology, General Hospital of the Chinese PLA, Beijing 100583, China

Supported by: the Doctor Scientific Startup Foundation of Liaoning Province, No. 20061074; and the Key Laboratory Foundation of the Department of Education of Liaoning Province, No. 2008S142

Correspondence to: Professor Rong-Jian Su, Key Lab of Molecular Cell Biology and New Drug Development of the Education Department of Liaoning Province, Scientific Research Center, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. rongjiansu@hotmail.com

Received: 2009-04-14 Revised: 2009-06-15

Accepted: 2009-06-23 Published online: 2009-07-18

Abstract

AIM: To investigate the effects of hepatocyte growth factor (HGF) on the expression and phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) and Src kinase, and explore the role of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) in this

process.

METHODS: After hepatocellular carcinoma cells (SMMC-7721) were pretreated with LY294002 and stimulated with HGF, the phosphorylation status of FAK at Y397 and Src at Y416 were analyzed by Western blot, and the distribution of FAK was observed by immunofluorescence.

RESULTS: HGF (50 µg/L) was able to promote the phosphorylation of FAK at Y397, but had no effect on the expression of FAK. Pretreatment of cells with LY294002 (an inhibitor of PI3K) significantly decreased the phosphorylation of FAK at Y397. After HGF treatment, FAK was mainly clustered in the periphery of hepatocellular carcinoma cells. In contrast, FAK was diffused throughout the cells after pretreatment with PI3K inhibitor. HGF treatment could significantly raise the phosphorylation levels of Src kinase and Src-Y416 while pretreatment with LY294002 could significantly decrease the phosphorylation levels of Src kinase and Src-Y416.

CONCLUSION: HGF is able to promote the activation of FAK and Src in a PI3K-dependent manner.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Hepatocyte growth factor; Focal adhesion kinase; PI3K

Su RJ, Li Z, Li HD, Song HJ, Cheng LF. Effects of hepatocyte growth factor on the expression and phosphorylation of focal adhesion kinase in SMMC-7721 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(20): 2070-2073

摘要

目的: 探讨肝细胞生长因子(HGF)对黏着斑激酶(FAK)、Src表达及活性的影响以及PI3K在该过程中的作用。

方法: LY294002预处理阻断PI3K的活性、HGF处理SMMC-7721后检测FAK和Src的表达、磷酸化及在细胞内的分布。应用免疫印迹技术检测FAK、Src的表达及磷酸化, 免疫荧

■同行评议者

潘兴华, 副主任医师, 中国人民解放军成都军区昆明总医院病理实验科

光技术检测FAK在SMMC-7721细胞中的分布.

结果: HGF(50 $\mu\text{g/L}$)可以促进FAK Y397位点的磷酸化, 对FAK的表达没有影响. 应用PI3K抑制物LY294002处理后, FAK Y397的磷酸化水平显著降低. HGF处理后, FAK主要位于细胞边缘, 呈簇状分布, 应用PI3K抑制物, FAK在细胞内弥散分布. HGF处理后, Src激酶和Src Y416的磷酸化水平明显增加, 而经LY294002处理后, Src激酶与Src Y416的磷酸化水平明显降低.

结论: 肝细胞癌中, HGF以PI3K依赖性的方式促进FAK和Src的活化.

关键词: 肝细胞癌; 肝细胞生长因子; 黏着斑激酶; PI3K

苏荣健, 李贞, 李宏丹, 宋慧娟, 程留芳. 肝细胞生长因子对肝细胞癌细胞系SMMC-7721黏着斑激酶的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(20): 2070-2073
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2070.asp>

0 引言

肝细胞癌是一种常见的恶性肿瘤, 其发病率呈逐年上升的趋势, 居于全球第5位, 死亡率居第3位仅次于肺癌和胃癌^[1]. 肝细胞生长因子(hepatocellular growth factor, HGF)是间质细胞(如成纤维细胞、巨噬细胞等)分泌的一种多效应生长因子, 对细胞增殖、细胞迁移、细胞黏附等多种生物学行为具有调节作用^[2]. 目前已经明确HGF可以与细胞膜表面的c-Met结合, 导致c-Met的自身磷酸化^[3], 激活下游的信号传导过程. 我们以前的研究表明HGF可以促进肝细胞癌的侵袭和转移, 并且明确HGF对肝细胞癌侵袭和转移作用与PI3K有关^[4]. 本文进一步对肝细胞癌细胞系SMMC-7721中HGF对黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)的分布及磷酸化水平进行研究, 并进一步探讨PI3K在该过程中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 肝细胞癌细胞系SMMC-7721为中国医科大学发育生物学教研室惠赠. HGF、LY294002购于Sigma公司. FAK和磷酸化FAK抗体(pY397)购于Biosource公司, Src及SrcY416抗体购于Cellsignal公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及HGF处理: 人肝细胞癌细胞系

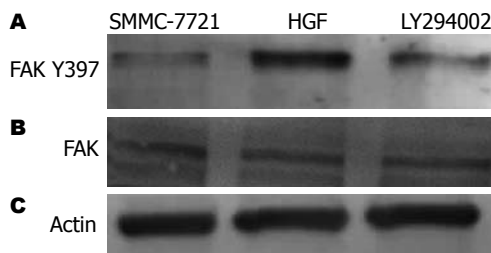


图 1 PI3K对FAK Y397磷酸化的影响. A: HGF能够促进FAK Y397的磷酸化, PI3K抑制物LY294002可以阻断HGF对FAK Y397磷酸化的促进作用; B: HGF不能增加FAK的表达, LY294002对FAK的表达也没有影响; C: Actin的表达一致, 蛋白含量一致.

SMMC-7721培养于含100 mL/L胎牛血清、100 g/L青霉素、100 g/L链霉素的DMEM培养液中; 当细胞生长至培养瓶底面的70%-80%, 血清饥饿3 h, 加入HGF(终浓度50 $\mu\text{g/L}$)处理12 h^[4].

1.2.2 LY294002处理: 细胞培养方法同上, 当细胞生长至培养瓶底面的70%-80%, 血清饥饿3 h, 加入LY294002(终浓度10 $\mu\text{mol/L}$)预处理1 h, PBS漂洗3次, 加入HGF(终浓度50 $\mu\text{g/L}$)处理12 h.

1.2.3 免疫荧光实验: 胰蛋白酶消化细胞, PBS漂洗3次, 用无血清培养液稀释至 2×10^8 个/L, 接种于用10 mg/L的纤粘连蛋白包被的盖玻片上, 继续培养12 h, 取出盖玻片, PBS漂洗, 37 mL/L甲醛固定30 min, 2 mL/L Triton-X-100通透5 min, 100 mL/L BSA封闭30 min, 一抗室温温育1 h, PBS漂洗, 二抗室温温育1 h, PBS漂洗, 甘油封片, 荧光显微镜下观察.

1.2.4 免疫印迹: 用细胞刮刀收集收集细胞, PBS漂洗, RIPA缓冲液冰上裂解30 min, BCA法测定蛋白含量. SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 1 g/L BSA封闭, 一抗(FAK, FAK Y397, SRC, SRC Y416)室温温育3 h, 二抗室温温育1 h, BCIP/NBT显色.

2 结果

2.1 PI3K对FAK Y397磷酸化的影响 HGF(50 $\mu\text{g/L}$)可以促进FAK Y397位点的磷酸化, 对FAK的表达没有影响. 应用PI3K抑制物LY294002处理后, FAK Y397的磷酸化水平显著降低(图1). 这些说明在肝细胞癌细胞中PI3K参与FAK活化过程的调节, 抑制PI3K能够抑制FAK的活化.

2.2 PI3K对FAK细胞内分布的影响 HGF处理后, FAK主要位于细胞边缘, 呈簇状分布, 应用PI3K抑制物, FAK在细胞内弥散分布(图2). 这些说明PI3K对FAK在肝细胞癌细胞中的定位具有调节作用.

■ 研发前沿

HGF能够促进很多肿瘤细胞的侵袭和转移, 对于其机制的研究一直受到众多研究者的重视, 其中信号通路的研究更成为本领域研究热点. 然而, 其具体机制的研究一直未果. 故而, 明确HGF促进肝细胞癌侵袭和转移的机制, 抑制肝细胞癌侵袭和转移成为亟待解决的问题.

■ 相关报道

目前研究认为, HGF对于肝细胞癌侵袭和转移的机制是通过多信号通路实现的, PI3K和MAPK信号通路在肿瘤的侵袭和转移过程中发挥着重要的作用, FAK和Src能够调节肿瘤的侵袭和转移.

创新盘点

本文以肝细胞癌 SMMC-7721 为研究对象, 用 HGF 和 PI3K 抑制剂 LY294002 处理, 观察其对于 FAK 和 Src 的影响, 并且探讨 HGF 发挥作用的机制。结果发现 HGF 通过 PI3K 信号通路发挥其影响 FAK 和 Src 的作用, 促进 SMMC-7721 的侵袭和转移作用。

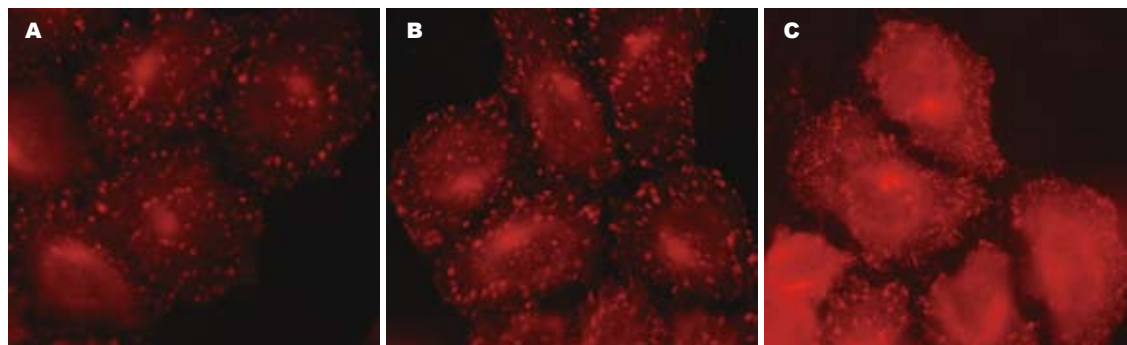


图 2 PI3K 对 FAK 细胞内分布的影响. A: 未做处理的 SMMC-7721; B: HGF 处理后的 SMMC-7721; C: 经 LY294002 预处理后加入 HGF 的 SMMC-7721. 可见 HGF 能够导致 FAK 在细胞内的重新分布, 主要位于细胞边缘, 呈簇状分布; PI3K 抑制物处理后 FAK 弥散分布于细胞内, 簇状结构消失。

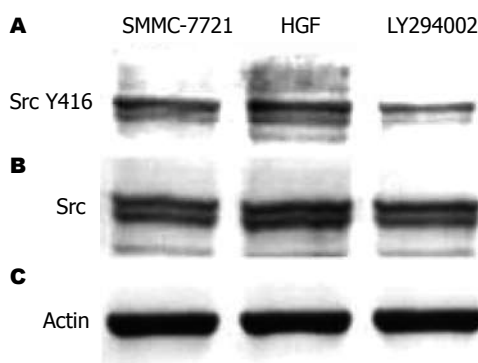


图 3 PI3K 对 Src 激酶活化的影响. A-B: 分别显示了 Src 和 Src Y416 的表达情况, 可见 HGF 能够促进 Src 激酶和 Src Y416 的活化; 但经 PI3K 预处理后, HGF 所致的 Src 激酶和 Src Y416 的活化明显受到抑制. C: 显示 3 组细胞的 Actin 表达相同, 表示蛋白含量上样相同。

2.3 PI3K 对 Src 激酶活化的影响 HGF 处理后, Src 激酶和 Src Y416 的磷酸化水平明显增加, 而经 LY294002 处理后, Src 激酶与 Src Y416 的磷酸化水平明显降低。这些结果说明 HGF 可以促进 Src 激酶的活化(图3)。

3 讨论

FAK 是整合素信号传导途径中的关键酪氨酸激酶, 对于肿瘤细胞的侵袭和转移具有重要的调节作用^[5-6]。大量研究表明 FAK 分别通过磷酸化 Y397 和 Y576/577 位点激活 FAK^[7-8]。FAK 激活后, 其磷酸化的 Y397 与 Src 激酶结合, 形成 FAK/SRC 复合物而引起 Paxillin 和 cas 磷酸化^[9-10], 后二者通过接头蛋白 Crk 和 Grb2 激活 Ras 途径的下游激酶 MAPK^[11], 进而改变细胞行为。HGF 通过与 c-Met 结合后能够激活 PI3K^[12], 继而引起一系列的细胞内信号传导。本实验基于前文 HGF 促进细胞的侵袭和转移^[4], 进一步研究 HGF 对 FAK, Src 激酶的影响及 PI3K 在其中的作用。

由免疫印迹结果可见, HGF (50 μ g/L) 处理后

的 SMMC-7721 细胞 FAK 的表达不变, 而磷酸化 FAK Y397 的表达增加, 说明 HGF 能够促进 FAK 活化, 但却不增加 FAK 的表达。应用 PI3K 抑制物 LY294002 处理后, FAK Y397 的磷酸化水平显著降低。由此, 说明 HGF 引起的 FAK Y397 磷酸化增加, 是通过 PI3K 激酶起作用的, PI3K 激酶对于 HGF 刺激 FAK 的磷酸化具有调节作用。免疫荧光结果可见, HGF 处理后的 SMMC-7721, FAK 的表达主要位于细胞边缘, 呈簇状分布, 细胞内分布很少, 而经 PI3K 抑制物 LY294002 处理后, FAK 主要是在细胞内弥散分布, 边缘很少, 与对照组的细胞 FAK 的分布相似。说明在肝细胞癌细胞中 PI3K 参与 FAK 活化过程的调节, 影响其在细胞内的分布, PI3K 对 HGF 引起的 FAK 的活化具有抑制作用。

HGF 处理后, Src 激酶和 Src Y416 的磷酸化水平均明显增加, 而经 LY294002 处理后, Src 激酶与 Src Y416 的磷酸化水平也均明显降低。这说明 HGF 可以促进 Src 激酶的活化, PI3K 激酶对于 HGF 引起的 Src 磷酸化具有调节作用。由此可见, HGF 与细胞膜表面的 c-Met 结合, 导致 c-Met 的自身磷酸化, 激活 PI3K, 进而导致磷酸化的 FAK Y397 与 Src 激酶结合, 激活下游的信号通路, 导致肝癌细胞的整合素, E-cad, N-cad 的表达改变, 进而改变细胞的侵袭、转移、黏附等行为。

总之, HGF 引起的肝癌细胞侵袭和转移能力增强是一个复杂生物的过程^[12-14]。其通过活化 PI3K 激酶促进 FAK Y397 的磷酸化, 引起肝癌细胞内 FAK 分布改变。HGF 所引起的肝癌细胞的侵袭和转移能力增强, 黏附能力降低的机制与 PI3K 有关。

4 参考文献

- 1 Yau T, Chan P, Epstein R, Poon RT. Evolution

- of systemic therapy of advanced hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6437-6441
- 2 You WK, McDonald DM. The hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway as a therapeutic target to inhibit angiogenesis. *BMB Rep* 2008; 41: 833-839
- 3 Puri N, Salgia R. Synergism of EGFR and c-Met pathways, cross-talk and inhibition, in non-small cell lung cancer. *J Carcinog* 2008; 7: 9
- 4 王庆军, 孙抒, 李宏丹, 魏嘉, 苏荣健. 肝细胞生长因子对肝细胞癌侵袭和转移的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3152-3156
- 5 Su JM, Wang LY, Liang YL, Zha XL. Role of cell adhesion signal molecules in hepatocellular carcinoma cell apoptosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4667-4673
- 6 von Sengbusch A, Gassmann P, Fisch KM, Enns A, Nicolson GL, Haier J. Focal adhesion kinase regulates metastatic adhesion of carcinoma cells within liver sinusoids. *Am J Pathol* 2005; 166: 585-596
- 7 Shepard HM, Brdlik CM, Schreiber H. Signal integration: a framework for understanding the efficacy of therapeutics targeting the human EGFR family. *J Clin Invest* 2008; 118: 3574-3581
- 8 Halder J, Lin YG, Merritt WM, Spannuth WA, Nick AM, Honda T, Kamat AA, Han LY, Kim TJ, Lu C, Tari AM, Bornmann W, Fernandez A, Lopez-Berestein G, Sood AK. Therapeutic efficacy of a novel focal adhesion kinase inhibitor TAE226 in ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2007; 67: 10976-10983
- 9 Armulik A, Velling T, Johansson S. The integrin beta1 subunit transmembrane domain regulates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrate. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 2558-2567
- 10 Sundberg LJ, Galante LM, Bill HM, Mack CP, Taylor JM. An endogenous inhibitor of focal adhesion kinase blocks Rac1/JNK but not Ras/ERK-dependent signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 29783-29791
- 11 Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF. Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene* 2000; 19: 5582-5589
- 12 Watanabe T, Tsuda M, Makino Y, Ichihara S, Sawa H, Minami A, Mochizuki N, Nagashima K, Tanaka S. Adaptor molecule Crk is required for sustained phosphorylation of Grb2-associated binder 1 and hepatocyte growth factor-induced cell motility of human synovial sarcoma cell lines. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 499-510
- 13 Luo YQ, Wu MC, Cong WM. Gene expression of hepatocyte growth factor and its receptor in HCC and nontumorous liver tissues. *World J Gastroenterol* 1999; 5: 119-121
- 14 Lee KH, Kim SW, Kim JR. Reactive oxygen species regulate urokinase plasminogen activator expression and cell invasion via mitogen-activated protein kinase pathways after treatment with hepatocyte growth factor in stomach cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2009; 28: 73

■同行评价

本研究选题新颖, 设计合理, 结果可靠, 具有一定的参考价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang *et al*”的右上角注角码; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注角码. 如马连生^[1]报告……, 潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……; PCR方法敏感性高^[6-7]. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献, 包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和*World Journal of Gastroenterology*(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>). 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页. (常务副总编辑: 张海宁 2009-07-18)