

肝细胞生长因子及受体促进人大肠癌细胞血管内皮生长因子表达

张玉华, 吴文溪*, 魏 尉, 王国柱

(南京医科大学第一附属医院普外科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 观察不同浓度肝细胞生长因子对体外培养的大肠癌细胞血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。方法: 体外培养人大肠癌细胞, 分别加入不同浓度的人重组肝细胞生长因子和或其受体抑制剂 Herbimycin A(HA), 用 Western blot、RT-PCR、ELISA 等方法检测肝细胞生长因子对其受体磷酸化表达及大肠癌细胞 VEGF 表达的影响。结果: 肝细胞生长因子在 10~100 ng/ml 浓度范围内较对照组相比显著促进大肠癌细胞 VEGF mRNA(增加了 4~5 倍)、蛋白质表达(增加了 3~10 倍); Western blot 检测肝细胞生长因子引起其受体磷酸化, 并与其诱导的 VEGF 表达相关。结论: 体外培养条件下, 肝细胞生长因子呈剂量依赖性促进大肠癌细胞 VEGF 表达, 其表达与其受体磷酸化水平相关; 其受体磷酸化抑制剂可以抑制大肠癌细胞 VEGF 表达。

[关键词] 肝细胞生长因子; 血管内皮生长因子; 受体酪氨酸激酶; 大肠癌

[中图分类号] R730.21; Q74

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2007)03-0216-04

Up-regulation of vascular endothelial growth factor by hepatocyte growth factor in human colorectal carcinoma cells

ZHANG Yu-hua, WU Wen-xi*, WEI Wei, WANG Guo-zhu

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] Objective: To observe the effect of human recombinant hepatocyte growth factor (HGF) on the expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) in colorectal carcinoma(CRC) cells in vitro. Methods: Human CRC cell lines SW480, LOVO were cultured with different concentrations of HGF. The culture supernatants were collected to detect the production of VEGF by ELISA assay. The effect of HGF on phosphorylation of its receptor c-Met was detected by Western blot assay. The expression of VEGF mRNA stimulated by HGF was investigated by reverse transcription PCR(RT-PCR). Results: HGF increased the expression of VEGF (mRNA 4-5-fold and protein 3-10-fold) in CRC cell lines; HGF induced the phosphorylation of its receptor c-Met in a dose-dependent manner. Conclusion: In vitro, HGF can up-regulate the expression of VEGF in CRC cells, which correlates with the phosphorylation of its c-Met induced by HGF. Inhibitor of phosphorylation-c-Met, HA, can inhibit the expression of VEGF in CRC cells induced by HGF.

[Key words] hepatocyte growth factor; vascular endothelial growth factor; receptor tyrosine kinase; colorectal carcinoma

[Acta Univ Med Nanjing, 2007, 27(03): 216-219]

肿瘤血管生成一直是人们关注的热点。研究表明肿瘤血管生成是一复杂过程, 许多生长因子、细胞因子参与了这一过程。其中血管内皮生长因子(VEGF)是最重要的一种因子^[1-2]。但对于 VEGF 的生成及调控仍需进一步的研究。最近研究表明, 受体酪氨酸激酶(RTK)介导信号转导途径参与了

VEGF 的表达^[3-4]。本实验研究肝细胞生长因子(HGF)及其受体 c-Met 对大肠癌(CRC)细胞株 VEGF 表达的影响。旨在为大肠癌 VEGF 表达提供可能的途径, 并为抑制肿瘤血管生成提供新的靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠癌细胞株 SW480, LOVO 本室保存。RPMI1640 培养基购自美国 Gibco 公司; VEGF ELISA KIT 购自美国 R&D 公司; HGF 购自以色列

[基金项目] 江苏省卫生厅 135 重点人才基金资助项目(苏卫科教[2001]31 号)

* 通信作者, E-mail: wuwenxi@yahoo.com

Pepotech 公司; c-Met 抗体购自美国 USB 公司; 磷酸化 c-Met 抗体购自美国 ABR 公司; 磷酸化 c-Met 抑制剂 Herbimycin A (HA) 购自美国 Sigma 公司; 胎牛血清 (FBS) 购自杭州四季青生物工程有限公司; MMLV 逆转录酶、TRIzol Reagent 购自美国 Promega 公司; Tarara Taq 酶购自深圳宝生物有限公司; 引物由上海申能博彩公司合成; 其余试剂均为分析纯, 购自南京博全试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及传代

细胞株于液氮罐中取出, 迅速投入到 37 °C 水中复温, 待完全解冻后将细胞转入离心管中, 以 1 000 r/min 离心 5 min, 加入含有 10% FBS、100 U/ml 青霉素、100 µg/ml 链霉素的 1640 培养基中制成细胞悬液, 接种培养瓶内, 于 37 °C, 5%CO₂ 饱和湿度培养箱内常规培养, 3 天左右更换培养基, 待接近长满瓶底时, 0.25%胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 ELISA

细胞以 5 × 10⁴/ml 接种至 24 孔培养板, 待长至 80%~90%时弃原培养基, 加入含有 1%牛血清白蛋白 (BSA) 的条件培养基培养 24 h。第二天实验组分别加入 10~100 ng/ml 不同浓度的 HGF, 对照组只加等量的 PBS (HGF 用 PBS 作溶剂) 作用 24 h, 收集细胞上清, 13 000 r/min 离心 10 min, 分装上清, -70 °C 保存用于 ELISA 定量检测 VEGF 表达。按试剂盒的步骤检测 VEGF 表达, 制作标准曲线, 于 450 nm 测定各组吸光度 (A) 值, 与标准曲线相比得到对应的 VEGF 量, 每种浓度作复孔, 重复 3 次。检测 HA 对 HGF 诱导的细胞 VEGF 表达影响, 试验组细胞先加入不同浓度的 HA 37 °C 作用 1 h, 对照组加入等量二甲基亚砜 (DMSO, HA 用 DMSO 作溶剂), 再加入 40 ng/ml 的 HGF 作用 24 h, 余步骤同上。

1.2.3 RNA 提取及 RT-PCR

细胞处理同 1.2.2, 不同的是 HGF (40 ng/ml) 作用 4 h 或预先不同浓度抑制剂 HA 作用 1 h 后加 HGF (40 ng/ml) 作用 4 h, 细胞总 RNA 提取按 TRIzol RNA 提取试剂盒说明书进行; RNA 逆转录按试剂盒说明书操作; PCR 过程: VEGF 引物, 上游: 5'-TTGGGTGCATTGGAGCCTTG-3', 下游 5'-GCTGGCCT-TGGTGAGGTTTG-3'。反应体系 20 µl: DEPC 水 12.9 µl, MgCl₂ 1.6 µl, 10 × Buffer 2 µl, dNTP 0.4 µl, Taq 聚合酶 0.1 µl, 引物 1.0 µl, 模板 2 µl。反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 循环数 35。产物长度 309 bp。

取 5 µl 300 bp 产物加 1 µl 6 × loading buffer 上样, 置于 1.5%琼脂糖凝胶 (含 0.5 µl/ml 溴化乙锭) 中电泳。条带经凝胶成像系统扫描。内参 -actin, 引物: 上游 5'-TGACGGGGTACCCACACTGTGCCCATCTA-3', 下游 5'-CTAGAAGCATTTGCGGACGATGGAGGG-3'。产物长度 983 bp。图像以 Gel-Pro 4.0 凝胶定量分析软件计算各组条带的灰度值, 以 -actin 相应值相比, 所得比值为各组 VEGF 相对量。

1.2.4 Western blot

细胞处理同 1.2.2, 不同的是 HGF 作用时间为 30 min 或预先加不同浓度抑制剂 HA 作用 1 h 再加 40 ng/ml HGF 作用 30 min。Western blot 过程: 冷 PBS 洗涤细胞, 以裂解液裂解细胞, 同时加蛋白酶及磷酸酶抑制剂, Bradford 法测蛋白浓度, 与 1 × SDS 凝胶加样缓冲液混合, 100 °C 5 min 变性蛋白, 每条 10%SDS-PAGE 凝胶泳道上样 30 µg 蛋白, 电泳 100 V 3 h, 转 PVDF 膜 0.1 mA 2 h, 以含 5%脱脂奶粉的 TBS-T 室温封闭 1 h, 一抗磷酸化 c-Met (兔多抗 1 1 000), 4 °C 过夜, 二抗 (羊抗兔 1 5 000) 室温 1 h, ECL 显影, 凝胶成像系统扫描。将膜 Strip 液清洗, 加 c-Met 一抗 (兔多抗 1 1 000), 余同上。

1.3 统计学方法

数据计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS11.0 软件包对实验数据进行单因素方差分析, P < 0.05 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 ELISA 结果

HGF 促进两种大肠癌细胞株 VEGF 表达, 随 HGF 浓度增加 VEGF 表达增加 (3~10 倍), 各试验组均明显高于对照组 P < 0.05。HGF 40 ng/ml 时 SW480 VEGF 表达达到峰值。而对于 LOVO 细胞, HGF 100 ng/ml VEGF 分泌达到高峰 (表 1, 2)。c-Met 磷酸化抑制剂 HA 抑制了 HGF 诱导的细胞 VEGF 表达, 1.0 µg/ml 时完全抑制 VEGF 表达, 而对照组未见明显变化 (图 1)。

2.2 RT-PCR 结果

内参 -actin 其 PCR 产物在各组表达差异无显著性 (P > 0.05)。各试验组与对照组均有 VEGF mRNA 表达, SW480 试验组与对照组相比表达升高了 (3.20 ± 0.74) 倍, LOVO 试验组与对照组相比表达升高了 (4.10 ± 0.96) 倍, 各组之间差异有显著性 (P < 0.01)。HA 抑制 HGF 引起 VEGF mRNA 表达, 1.0 µg/ml 时完全抑制 VEGF mRNA 表达 (图 2)。

表 1 HGF 对 SW480 VEGF 表达的影响

Tab 1 Effect of HGF on expression of VEGF in SW480 cells

组 别	HGF 浓度 (ng/ml)			
	10	20	40	100
试验组	205.00 ± 5.66	310.00 ± 14.14	600.00 ± 3.54	612.00 ± 16.97
对照组	55.00 ± 4.24*	62.00 ± 2.83*	53.00 ± 4.24*	60.00 ± 14.14*

* 与对照组相比较, P < 0.01.

表 2 HGF 对 LOVO VEGF 表达的影响

Tab 2 Effect of HGF on expression of VEGF in LOVO cells

组 别	HGF 浓度 (ng/ml)			
	10	20	40	100
试验组	398.00 ± 4.24	598.00 ± 11.31	794.00 ± 5.66	816.00 ± 5.49
对照组	106.00 ± 7.78*	88.00 ± 14.14*	108.00 ± 17.68*	93.00 ± 10.61*

* 与对照组相比较, P < 0.01.

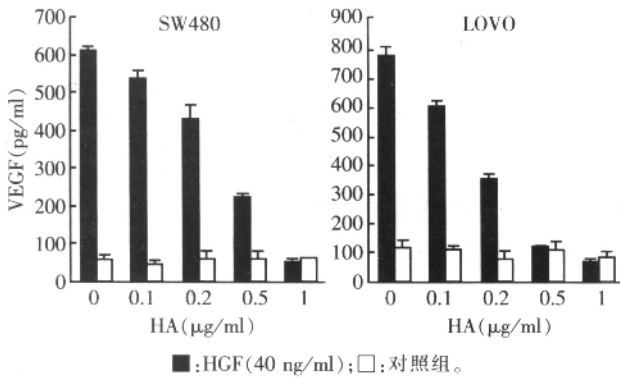


图 1 HA 对 HGF 诱导大肠癌细胞 VEGF 表达的影响

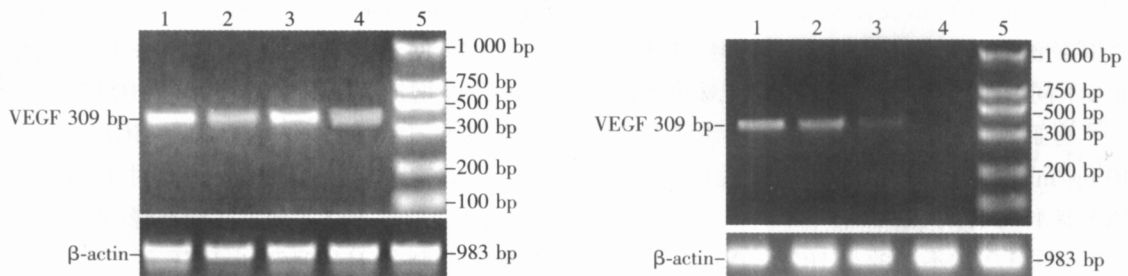
Fig 1 Effect of HA on the HGF-induced VEGF production in CRC cells

2.3 Western blot 结果

HGF 引起其受体 c-Met 磷酸化, 随着 HGF 浓度增加 c-Met 磷酸化水平也提高. HA 抑制 HGF 引起的 c-Met 磷酸化, 1.0 μg/ml 时完全抑制 c-Met 磷酸化表达 (图 3).

3 讨 论

肿瘤血管生成不仅是肿瘤生长、增殖必需, 而且与肿瘤侵袭、转移密切相关^[5-6]. 研究表明, 肿瘤血管生成受多种血管生成因子和血管生成抑制物的调控. 其中血管内皮生长因子是最重要的. VEGF 不仅



1, 3 为试验组, 2, 4 为对照组, M: Marker.

图 2 HGF 及 HA 对大肠癌细胞 VEGF mRNA 表达影响

Fig 2 Effect of HGF and HA on mRNA expression of VEGF in CRC cells

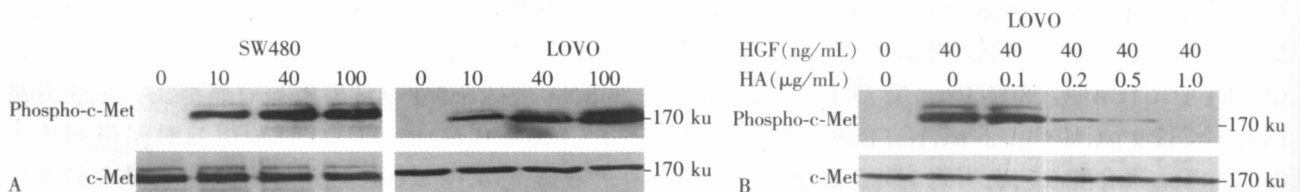


图 3 HGF 及 HA 对大肠癌细胞 c-Met 磷酸化表达影响

Fig 3 Effect of HGF and HA on phosphorylation of c-Met in CRC cells

是内皮细胞特异的强效有丝分裂原,而且能促进内皮细胞产生并调节纤溶酶原激活物及其抑制因子;增加血管通透性等作用^[7]。许多肿瘤患者血清、肿瘤组织及细胞高表达 VEGF,而且其表达与预后相关^[8]。VEGF 表达与诸多因素有关,如缺氧^[9]。最近研究显示,某些生长因子、细胞因子及其酪氨酸蛋白激酶受体参与肿瘤 VEGF 表达^[3-4]。

HGF 是一种具有多种生物活性的生长因子,可以促进其靶细胞、增殖、迁移、转移、抑制凋亡,并在某些组织、器官发生时起一定作用^[10]。HGF 的受体 c-Met 是具有蛋白酪氨酸激酶活性的细胞膜受体,是由原癌基因 c-Met 编码的蛋白质^[11]。是含有、亚基的分子质量为 170 ku。其中亚基(145 ku)跨细胞膜,胞外有受体配体结合位点,胞内羧基残端含有具有酪氨酸激酶活性的位点^[12]。胞外、亚基形成二聚体时,HGF 与亚基胞外位点结合,引起胞内激酶位点磷酸化,进而引发下游分子事件^[13]。研究表明,许多肿瘤组织、细胞过表达 HGF/c-Met,其中包括大肠癌^[14]。

本实验以大肠癌细胞株为研究对象,体外检测 HGF 及其受体能否促进大肠癌细胞 VEGF 表达。本研究表明,HGF 能够促进大肠癌细胞株 SW480、LOVO 的 VEGF 表达,呈剂量依赖性,而且能够促进 VEGF mRNA 表达,这与其他人的报道相符^[15]。作者初步研究了其机制,发现 HGF 引起其受体磷酸化,磷酸化受体抑制剂 HA 能够抑制受体磷酸化,并能抑制 HGF 上调的大肠癌细胞 VEGF(蛋白质和基因水平)表达。但 HGF/c-Me 调控大肠癌细胞 VEGF 表达的具体机制需要进一步研究。也是下一步研究的课题。本实验结果提示,HGF 可以以旁分泌形式促进肿瘤细胞血管生成。对大肠癌血管生成的深入研究有助于对大肠癌发生、发展等理论的理解,并为抑制肿瘤血管生成寻找合适的靶点。

[参考文献]

[1] Plate KH, Breier G, Welch HA, et al. Vascular endothelial growth factor is a potential tumor angiogenesis factor in human gliomas in vivo[J]. Nature,1992,359: 843- 848
[2] Takahashi Y, Tucker SL, Kitadai Y, et al. Vessel counts and expression of vascular endothelial growth factor as prognostic factors in node-negative colon cancer[J]. Arch Surg, 1997, 132: 541- 546

[3] Cheng N, Brantley DM, Liu H, et al. Blockade of EphA receptor tyrosine kinase activation inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced angiogenesis[J]. Mol Cancer Res, 2002, 1(1): 2- 11
[4] Calza L, Giardino L, Giuliani A, et al. Nerve growth factor control of neuronal expression of angiogenic and vasoactive factors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 4160-4165
[5] Maruyama Y, Ono M, Kawahara A, et al. Tumor growth suppression in pancreatic cancer by a putative metastasis suppressor gene Cap43/NDRG1/Drg-1 through modulation of angiogenesis [J]. Cancer Res, 2006, 66 (12): 6233- 6242
[6] Albig AR, Neil JR, Schiemann WP. Fibulins 3 and 5 antagonize tumor angiogenesis in vivo [J]. Cancer Res, 2006,66(5): 2621- 2629
[7] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors[J]. Nat Med, 2003,9(6): 669- 676
[8] 张丽华,孙荣超,陈瑛. 胃癌组织中 CD44v6 和 VEGF 表达的相互关系及其临床意义[J]. 南京医科大学学报, 2006, 26(2): 118- 120
[9] 穆四清,张峰. 缺氧诱导因子-1 的表达与肝癌血管生成的关系[J]. 南京医科大学学报, 2006, 26(3): 172- 175
[10] Boros P, Miller CM. Hepatocyte growth factor: a multifunctional cytokine[J]. Lancet, 1995, 345(8945): 293- 295
[11] Trusolino L, Comoglio PM. Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(4): 289- 300
[12] Segarra J, Balenci L, Drenth T, et al. Combined signaling through ERK, PI3K/AKT, and RAC1/p38 is required for met-triggered cortical neuron migration [J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281: 4771- 4778
[13] Seeger K, Adams HP, Buchwald D, et al. TEL-AML1 fusion transcript in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. Blood, 1998, 91: 1716- 1722
[14] 李宏武,单吉贤. 人大肠癌组织肝细胞生长因子及其受体 c-met 的表达[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(9): 2199- 2201
[15] Yi Ren, Brian Cao, Simon Law, et al. Hepatocyte growth factor promotes cancer cell migration and angiogenic factors expression: a prognostic marker of human esophageal squamous cell carcinomas [J]. Clinical Cancer Research, 2005, 11: 6190- 6197

[收稿日期] 2006-08-11