



狄文,教授,主任医师,医学博士,博士研究生导师。1984年毕业于复旦大学医学院(原上海第一医学院)。现任上海交通大学医学院附属仁济医院妇产科主任,上海医学会妇产科学会主任委员,中华医学会妇产科学会委员、中华医学会妇科肿瘤学会委员,上海市产科质量控制专家委员会委员。《中华妇产科杂志》审稿、《现代妇产科进展》、《实用妇产科杂志》、《中华妇幼临床医学杂志》、《国外医学 妇幼保健分册》编委,《中国实用妇科与产科杂志》、《国外医学-计划生育/生殖健康分册》常务编委。卫生部七年制、八年制教材《妇产科学》编委。狄教授曾在美国作为期三年的博士后研究,专攻肿瘤分子生物学研究,其“维甲酸感应基因启动子”的研究获得1998年世界议会基金奖。狄文教授目前承担国家自然科学基金项目及多项市级以上科研课题,内容涉及妇科肿瘤的发病机理,肿瘤化疗的耐药机制及肿瘤治疗的新方法等。在国外杂志、国家核心杂志发表论文40余篇,主编、参编专著十余部。2005年荣获“宝钢优秀教师奖”。

TGF- β /EGFR 自分泌环调控卵巢癌 细胞增殖转移的分子机制

洪祖蓓 狄文 丁传伟

上海交通大学医学院附属仁济医院妇产科,上海 200001

[摘要] 背景与目的: TGF- β /EGFR自分泌环在许多恶性肿瘤中异常激活,与肿瘤发生、发展密切相关。本研究观察 TGF- β 诱导的卵巢腺癌细胞 Caov-3生物学行为及相关信号分子的变化,探讨 TGF- β /EGFR自分泌环在卵巢癌发生、发展中的作用机制。方法:采用 MTT和 BOYDEN小室体外侵袭实验检测 Caov-3细胞增殖和侵袭能力;采用 Western blot方法检测 EGFR、ERK1/2、PBK、AKT、P70S6K蛋白表达情况。结果: TGF- β 促进 Caov-3细胞增殖和转移,0.5-25ng/ml浓度范围内,细胞增殖率与 TGF- β 浓度成剂量效应关系;TGF- β 在短时间内可使 Caov-3细胞 EGFR表达量骤增,并伴随 PBK、AKT、P70S6K等信号传导分子表达量的上调;但 ERK1/2表达量无明显变化。结论: TGF- β /EGFR自分泌环可能通过激活 PBK/AKT信号传导通路,上调 P70s6k来增强卵巢癌细胞的增殖和转移能力。

[关键词] TGF- β /EGFR自分泌环; PBK; AKT; P70S6K; 转移; 增殖

中图分类号: R737.31 文献标识码: A 文章编号: 1007-3639(2006)11-0899-04

Molecular mechanism of TGF- β /EGFR autocrine loop in the regulation of proliferation and metastasis of ovarian cancer cell line HONG ZU-bei, DI Wen, DING Chuan-wei (Dept of Obstetrics and Gynecology; Renji Hospital; School of Medicine Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200001, China)
Correspondence to: DI Wen Email: diwen163@163.com

[Abstract] Background and purpose: TGF- β /EGFR autocrine loop is markedly activated in wide malignant tumor. It is closely correlated with the tumorigenesis and development of different cancers. Our study is to investigate the biological behavior and signaling molecule changes in TGF- β induced ovarian cancer cell line Caov-3, and to study the effect and molecular mechanism of the activation of TGF- β /EGFR autocrine loop in ovarian cancer. **Methods:** The tetrazolium-based colorimetry assay was used to evaluate the cell growth treated by TGF- β . The vitro invasion assay was used to examine the invasiveness of Caov-3 treated by TGF- β . Expression of EGFR, ERK1/2, PBK, AKT, P70S6K were determined by western blotting. **Results:** Exogenous TGF- β enhanced significantly the proliferation and invasiveness of Caov-3 cells. The proliferation rate of Caov-3 was in a dose-dependent manner to TGF- β within the concentration of 0.5~25ng/ml. Exogenous TGF- β up-regulated the expression of EGFR, PBK, AKT, P70S6K but not ERK1/2. **Conclusions:** The activation of TGF- β /EGFR

基金项目:上海市卫生系统百人计划资助项目(No: 03-77-2)

通讯作者:狄文 E-mail: diwen163@163.com

autocrine loop could promote the growth, invasion and metastasis of ovarian cancer through PBK/AKT/P70S6K signaling survival pathway.

[Key words] TGF- β /EGFR autocrine loop; PBK; AKT; P70S6K; metastasis; proliferation

肿瘤的发生、发展是由细胞网络调控的、多基因参与的、极其复杂的过程。细胞增殖和细胞外基质降解是实现肿瘤侵袭、转移的关键步骤。肿瘤细胞本身可以生成某些生长因子,干预细胞周期或信号传导通路,促进细胞异常增殖和转移。多种卵巢癌细胞有EGFR过表达,且其中大部分细胞系能分泌TGF- β ;外源性TGF- β 刺激卵巢癌细胞系可促进肿瘤细胞增殖^[1]。TGF- β 、EGFR在多种人类恶性肿瘤(如乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、肺癌和骨癌等)中表达增加,且TGF- β 表达增高,EGFR表达也相应上调,由此推测肿瘤细胞自分泌TGF- β ,作用于自身膜受体,形成刺激其自身增殖的环路可能在肿瘤的形成和发展中起重要作用^[2]。但目前TGF- β /EGFR自分泌环对卵巢癌细胞作用机制的基础研究较少,我们利用重组人转化生长因子- β 刺激卵巢腺癌细胞Caov-3,观察该肿瘤细胞生物行为及相应信号传导机制的变化,旨在探讨上述分子及其受体在卵巢癌细胞增殖和侵袭中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 人乳突状卵巢腺癌细胞(Caov-3)购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。MEM培养液、青链双抗、非必需氨基酸、胎牛血清均购自Hycorne公司。TGF- β 购自Promega公司。四甲基偶氮唑蓝(MTT)和二甲基亚砷(DMSO)购自Sigma公司。EGFR、ERK1/2、PBK、AKT、P70S6K多克隆抗体均购自Santa cruz公司。Millicell chamber(8 μ m孔径)购自Millipore公司,Matrigel胶购自BD公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Caov-3细胞于含10%胎牛血清、1%非必需氨基酸、青霉素、链霉素各100U/ml的MEM培养液中贴壁生长,在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、饱和湿度的培养箱内培养。3~4天传代一次,取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 MTT检测细胞增殖力 取对数生长期细胞消化制成1 \times 10⁴个/ml细胞悬液,每孔100 μ l接种到96孔板,各孔中分别加入不同浓度(0.5, 2.5, 12.5, 25, 50, 100, 200ng/ml)的TGF- β ,每个浓度设6个复孔,对照组单加Caov-3细胞,空白对照组单加培养液。CO₂培养箱内培养24、48、72、96h;实验结

束前4h加入MTT(5mg/ml, PBS配制)20 μ l,继续培养4h;实验结束时吸弃上清液,每孔加入二甲基亚砷(DMSO)150 μ l,震荡混匀,10min后在酶标仪(波长492nm)测定光密度(A)值,按公式计算增殖率。

$$\text{细胞增殖率} = \frac{(\text{实验组 } A \text{ 值} - \text{空白对照组 } A \text{ 值})}{(\text{对照组 } A \text{ 值} - \text{空白对照组 } A \text{ 值})} \times 100\%$$

1.2.3 Western blot 收集经TGF- β 处理1h、6h、12h、24h及未处理细胞,预冷PBS洗2次,提取蛋白并定量,100 $^{\circ}$ C热变性3min,进行SDS-PAGE电泳转移到PVDF膜上,封闭(5%脱脂奶粉, TBST)2h;1:150 TBST稀释一抗(兔抗人),4 $^{\circ}$ C温育过夜;TBST洗膜3次;1:2000 TBST稀释二抗(羊抗兔),室温孵育2h;TBST洗膜3次;ECL显影,X光胶片记录。Smartview凝胶成像系统分析条带灰度值。

1.2.4 体外侵袭力检测 配制ECM胶,用无血清的DMEM液1:3稀释(2~4 $^{\circ}$ C中进行),稀释后每个小室底加入100 μ l稀释后的ECM胶;用无血清DMEM培养液稀释成1 \times 10⁵/ml细胞悬液,每个小室上室加入细胞悬液300 μ l,不设复孔;24孔板中每孔加入含15%血清的DMEM 500 μ l,放入小室;37 $^{\circ}$ C,5%CO₂,培养20h后,取出小室,弃去上室液体,用棉签仔细刮去上室的ECM胶,HE染色,割下小室膜。制成切片,明胶加盖玻片封片;倒置显微镜(100 \times)观察穿过膜的细胞数(每张膜周围部分和中央部分各随机取三个视野),由两人分别计数细胞数,最终取平均值,每张片取最佳视野摄像,实验重复三次。

1.3 统计分析 数据以均数 \pm 标准差表示,应用SPSS 11.0统计软件进行方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异具有极显著性。

2 结果

2.1 TGF- β 对卵巢腺癌细胞Caov-3生长的影响

TGF- β 对Caov-3有明显的促进增殖作用,不同作用浓度的TGF- β 随作用时间的延长,对细胞生长的促进作用逐渐增加($P < 0.01$) (见图1)。相同的作用时间下,0.5-25ng/ml TGF- β 对Caov-3的增殖作用随浓度升高而升高;TGF- β 浓度 > 50 ng/ml时,该细胞因子对Caov-3的增殖作用与25ng/ml在统计学上无显著性差异。因此取TGF- β 25ng/ml作为进一步实验的工作浓度。

2.2 TGF- 影响 Caov-3细胞 EGFR、PBK、AKT 等信号传导分子的表达 Caov-3细胞为 EGFR 阳性表达的卵巢腺癌细胞,在外源性 TGF- 刺激下,EGFR、PBK、AKT、P70S6K的表达量分别在不同的作用时间点上升,而 ERK1/2在 TGF- 作用后没有明显改变。这说明 TGF-、EGFR 自分泌环调控卵巢癌细胞可能是通过 EGFR、PBK、AKT 通路来实现的。

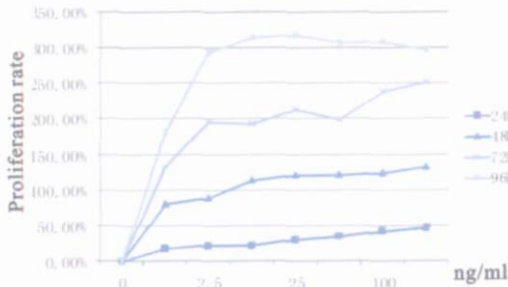


图 1 TGF- 对卵巢腺癌细胞 Caov-3 生长增殖的促进作用

Fig 1 The effect of TGF- to promote the proliferation of Caov-3 cell strain

表 1 TGF- 对 Caov-3细胞 EGFR、PBK、AKT 等信号蛋白表达的影响

Tab 1 Effect of TGF- (25ng/ml) on EGFR, PBK, AKT, P70S6K, ERK1/2 in Caov-3 cell

	1h	6h	12h	24h
EGFR	1.5305 ± 0.053 ^a	1.368 ± 0.004 ^a	1.334 ± 0.031 ^a	0.8585 ± 0.023
AKT	0.968 ± 0.027	1.889 ± 0.074 ^a	1.154 ± 0.016 ^a	1.002 ± 0.097
PBK	2.290 ± 0.036 ^a	3.610 ± 0.084 ^a	1.752 ± 0.114 ^a	1.107 ± 0.029
ERK	0.981 ± 0.004	0.960 ± 0.003	0.955 ± 0.013	0.999 ± 0.006
P70S6K	1.221 ± 0.016 ^a	1.835 ± 0.064 ^a	2.575 ± 0.037 ^a	1.932 ± 0.024 ^a

a: $P < 0.05$ (Different time groups contrast control groups. All gray scale of control group was equal to 1)

2.3 TGF- 对 Caov-3 细胞侵袭力的影响 在 Millicell 微孔膜表面所铺的重构基底膜 Matrigel 与机体内的基底膜组分相似,癌细胞通过分泌基质降解酶分解人工基底膜,才能够穿过微孔膜。25ng/ml TGF- 作用于 Caov-3 细胞能显著提高其侵袭力,作用 24h、48h 与对照组相比,有显著的统计学差异 ($P < 0.01$),24h 与 48h 无统计学差异 ($P > 0.05$)。

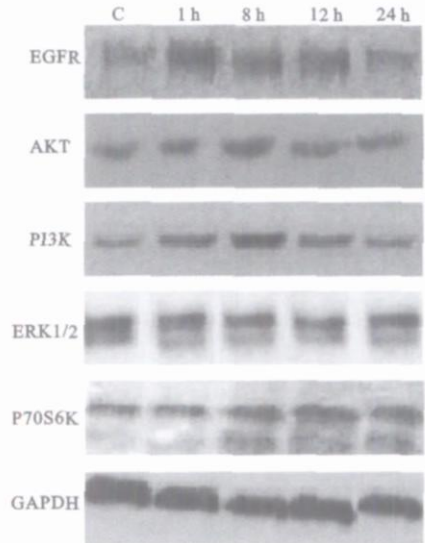


图 2 TGF- 对 Caov-3细胞 EGFR、ERK1/2、PBK、AKT、P70S6K 表达的影响的免疫印迹图

Fig 2 Expression of EGFR, ERK1/2, PBK, AKT, P70S6K in Caov-3 treated by TGF-

表 2 TGF- 对 Caov-3 细胞侵袭力的影响

Tab 2 Effect of TGF- on invasiveness of Caov-3 cell	Permeate cell population	Elevating invasiveness
Control group	38 ± 12	-
TGF- 24h	73 ± 12 ^a	92%
TGF- 48h	74 ± 9 ^a	94%

a: $P < 0.01$ (Different time groups vs control group).

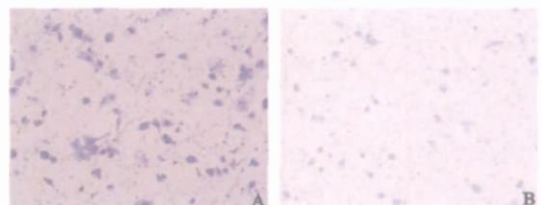


图 3 TGF- 对 Caov-3 细胞侵袭力的影响

Fig 3 Effect of TGF- on invasiveness of Caov-3 cell

A: Migration of Caov-3 treated with TGF- for 24 hours; B: Migration of Caov-3 growing in absence of TGF-.

3 讨论

转化生长因子 (TGF-) 是参与细胞生长与转化的一类细胞因子,通过与细胞膜上的表皮生长因子受体 (EGFR) 结合,引起相关的酪氨酸激酶活化,最终促使细胞增殖和分化。正常卵巢上皮组织中 EGFR 表达量很低或缺如,但 70% 卵巢癌组织有 EGFR 表达,且表达量越高,预后越差,是判断卵巢癌预后的独立指标^[3]。在胰腺癌、卵巢癌、肾母细胞瘤等肿瘤组织中发现 EGFR 表达量随 TGF- 表达的升高而上调,两者呈正相关^[4],因此认为肿瘤细胞自分泌 TGF-,作用于自身膜受体,形成刺激其自身增殖的环路可能在肿瘤的形成和发展过程中起

重要作用。本实验中我们用不同浓度的外源性 TGF- β 刺激卵巢腺癌细胞 Caov-3 诱导产生 TGF- β / EGFR 自分泌环,在此条件下肿瘤细胞与对照组相比显著增殖,且增殖效应随作用时间的延长而增强;在 0.5~25ng/ml 浓度范围内,细胞增殖率与 TGF- β 浓度成剂量效应关系。

EGFR 是具有酪氨酸蛋白激酶活性的膜受体,能被生长因子或转化生长因子激活,并将信息沿多条下游信号通路传递到核内,作用靶基因,参与调节多种肿瘤的发生、发展过程。Jiang 等^[5]报道生长因子激活 EGFR 后,通过 PBK/AKT 或 MAPK 下游信号通路调节细胞增殖、黏附、运动、蛋白水解酶的分泌等过程。但不同来源肿瘤细胞 EGFR 信号所通过的下游传导途径并不完全相同。在前列腺癌细胞中,活化的 EGFR 通过 PBK/AKT 信号通路改善细胞的增殖和侵袭转移能力^[6]。胰腺癌细胞 EGFR 信号则通过 MAPK 通路调节细胞的增殖和转移^[7]。那么,TGF- β / EGFR 自分泌环在卵巢癌细胞中是通过什么途径来发挥作用的呢?我们的研究结果提示:一定量的 TGF 在短时间内可使 Caov-3 细胞 EGFR 表达量骤增,并伴随 PBK、AKT、P70S6K 等信号传导分子表达量的上调;但 ERK1/2 表达量无明显变化。因此推断 TGF- β / EGFR 自分泌环可能通过 PBK/AKT/p70S6K 信号传导通路调节 Caov-3 细胞的生长与增殖。

PBK/AKT 信号通路不仅导致细胞恶性转化,而且与肿瘤细胞的迁移、黏附和细胞外基质的降解密切相关。PBK 能传递整合素所介导的侵袭信号;AKT2 过表达能通过 IV 型胶原蛋白上调整合素 B1 从而增强细胞的侵袭和转移;在鳞癌细胞系中 AKT 过表达可诱导上皮间质转变,赋予组织侵袭和转移所需的运动性^[8]。P70S6k 是位于 PBK/AKT 信号通路下游的一个激酶,PBK 传递有丝分裂信号经 AKT、mTOR 到 p70S6k,加快 cyclin D1、CDK4、CDC25A、Rb 的磷酸化,促进细胞周期的进展。Thomas 等^[9]人在对果蝇的研究中发现敲除 P70S6k 的细胞的周期可明显延长,为正常的 2 倍。体外研究发现卵巢癌细胞中活化的 P70S6k 可刺激蛋白水

解酶、MMP-9 表达,促进肿瘤细胞侵袭转移^[12]。我们用 TGF- β 诱导 Caov-3 细胞大量表达 EGFR,继而激活 PBK/AKT/P70S6k 信号通路,此时肿瘤细胞的体外侵袭力显著增强 ($P < 0.01$)。由此看出,卵巢癌中 TGF- β / EGFR 自分泌系统可能通过激活 PBK/AKT 信号传导通路,上调 P70S6k 活化来提高肿瘤细胞的转移能力;这一通路可作为控制卵巢肿瘤病情进展的治疗靶点,为进一步基因治疗提供理论基础。

[参考文献]

- [1] Ueda M, et al Biological implications of growth factors on the mechanism of invasion in gynecological tumor Cells[J]. Gynecol Obstet Invest 1999; 48 (3): 221-228
- [2] Doraiswamy V, et al Expression and action of transforming growth factor alpha in normal ovarian surface epithelium and ovarian cancer[J]. Biol Reprod 2000 Sep; 63 (3): 789-796
- [3] Bauknecht T, et al Expression analysis of EGF-R and TGF α in human ovarian carcinomas[J]. Anticancer Res 1991 Jul-Aug; 11 (4): 1523-1528
- [4] 王家祥等. TGF- β 、EGFR 及 Ki67 在肾母细胞瘤组织中的表达及意义 [J]. 中华泌尿外科杂志, 2006; 27: 83-86
- [5] Jiang Q, et al EGF-induced cell migration is mediated by ERK and PBK/AKT pathways in cultured human lens epithelial cells [J]. J Ocul Pharmacol Ther 2006 Apr; 22 (2): 93-102
- [6] Shukla S, et al Constitutive activation of PBK/Akt and NF-kappaB during prostate cancer progression in autochthonous transgenic mouse model[J]. Prostate 2005; 1; 64 (3): 224-239.
- [7] Tan X, Eqami H, et al Involvement of MMP-7 in invasion of pancreatic cancer cells through activation of the EGFR mediated MEK-ERK signal transduction pathway[J]. J Clin Pathol 2005; 58 (12): 1242-1248
- [8] Grille SJ, Bellacosa A, et al The protein kinase Akt produces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines[J]. Cancer Res 2003; 63: 2172-2178
- [9] Thomas G, et al The S6 kinase signaling pathway in the control of development and growth [J] Biol Res 2002; 35 (3): 3-5.
- [10] Zhou HY, Wong AS Activation of p70S6K induces expression of matrix metalloproteinase 9 associated with hepatocyte growth factor-mediated invasion in human ovarian cancer cells[J]. Endocrinology 2006 May; 147 (5): 2557-2566

(收稿日期: 2006-09-22 修回日期: 2006-10-10)