

· 论 著 ·

EGFR 信号通路调控人胶质瘤 U87 细胞侵袭转移的分子机制

邢细红^{1#}, 曾 晖¹, 王雄伟^{1△}, 郭东生³, 汪 雷¹, 万志先¹, 李 焘¹, 周红建¹

(三峡大学第一临床医学院: 1. 神经外科; 2 神经内科, 湖北宜昌 443003;

3. 华中科技大学同济医学院附属同济医院, 武汉 430030)

摘要:目的 探讨表皮生长因子受体(EGFR)信号通路与人胶质瘤细胞(U87 细胞)增殖和侵袭转移的关系及调控分子机制。方法 表皮生长因子(EGF, 100 ng/mL)、EGFR 抑制剂——AG1478(10 μmol/L)单独和联合处理 U87 细胞, 采用 MTT 法和 Transwell 小室体外侵袭实验检测 U87 细胞增殖和体外侵袭能力; 明胶酶谱法检测基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、MMP-9 的表达水平; Western blot 法检测磷酸化 EGFR (P-EGFR)、磷酸化 AKT(P-AKT)蛋白表达。结果 EGF(100 ng/mL)增加 P-EGFR 和 P-AKT 蛋白表达, 使加药后 24 h 和 48 h 的细胞生长率分别提高了 19.25%、22.32% ($P < 0.05$), 使 12 h 过膜细胞数由 (27±4) 个上升到 (126±3) 个 ($P < 0.05$), 促进 U87 细胞的 MMP-2、MMP-9 蛋白表达 ($P < 0.05$); AG1478(10 μmol/L) 可以阻断 EGF 增加 P-EGFR 和 P-AKT 蛋白表达的作用 ($P < 0.05$), 并具有时间依赖性 ($P < 0.05$), 减弱 U87 细胞体外侵袭能力 ($P < 0.05$), 抑制 MMP-2、MMP-9 蛋白的表达 ($P < 0.05$)。结论 EGFR-PI₃K/AKT 信号通路参与调节 U87 细胞增殖和侵袭转移过程, 其机制可能是 EGFR-PI₃K/AKT 信号通路活化后, 导致 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达增加, 对细胞外基质的破坏增强。

关键词:神经胶质瘤; 受体, 表皮生长因子; 基质金属蛋白酶类; 肿瘤转移; 肿瘤细胞, 培养的

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.18.011

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)18-1818-03

Molecular mechanism of EGFR signaling pathway mediating invasion and metastasis of U87 glioma cell line

Xing Xihong^{1#}, Zeng Hui¹, Wang Xiongwei^{1△}, Guo Dongsheng³, Wang Lei¹, Wan Zhixian¹, Li Tao¹, Zhou Hongjian¹

(1. Department of Neurology; 2. Department of Neurosurgery, the First College of Clinical Medical Science,

Three Gorges University, Yichang, Hubei 443003, China; 3. Tongji Hospital, Tongji Medical College,

Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China)

Abstract: Objective To study the relationship between EGFR signal pathway and invasion and metastasis of U87 glioma cells, and discuss the molecular mechanism. **Methods** U87 glioma cells were cultured in medium that contained epidermal growth factor (EGF 100 ng/mL) or epidermal growth factor inhibitor——AG1478(10 μmol/L) or combination, then the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay and transwell chamber were used to detect the proliferation and invasive ability of U87 glioma cells; Expression levels of matrix metalloproteinases-2 (MMP-2), matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) were determined by gelatinase zymography electrophoresis; Western blot was used to determine the expression levels of phosphorylation of the epidermal growth factor receptor (P-EGFR), and phosphorylation of protein kinase B (P-AKT). **Results** Exogenous EGF(100 ng/mL) increased the expression levels of P-EGFR, P-AKT, the growth ratio increased 19.25%, 22.32% ($P < 0.05$) at 24, 48 h respectively after treated, increased the number of invasion cell from (27±4) cells to (126±3) cells ($P < 0.05$), and increased the expression levels of MMP-2, MMP-9; AG1478 could block the effects of EGF increased the expressions of P-EGFR, P-AKT in time-independent ($P < 0.05$), decreased the invasive ability of U87 glioma ($P < 0.05$), inhibited the expression of MMP-2, MMP-9 ($P < 0.05$). **Conclusion** The EGFR-PI₃K/AKT signaling pathways involved in the regulation of U87 glioma cells proliferation and invasion and metastasis. Its mechanism is possible that after the EGFR-PI₃K/AKT signaling pathways activated, caused the high expression of MMP-2, MMP-9 and increased the damage to the extracellular matrix (ECM).

Key words: glioma; receptor, epidermal growth factor; matrix metalloproteinases; neoplasm metastasis; tumor cells, cultured

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)在很多恶性肿瘤中出现突变、重排和过表达, 并且与一些恶性肿瘤的预后密切相关, 成为了恶性肿瘤治疗靶点。研究发现 EGFR 在人胶质瘤中的过表达为 64%, EGFR 蛋白的表达与胶质瘤的恶性分化程度密切相关^[1], 而 60% 的多形性胶质母细胞瘤 (GBM) 中有 EGFR 基因的过表达^[2]。EGFR 过表达与相应的配体结合后, 通过不同的信号通路把细胞外信息传递到细胞内, 作用相应的靶基因调控肿瘤细胞增殖、侵袭转移等细胞生物学行为。胶质瘤的预后因素复杂, 已证实 EGFR 参与胶质瘤细胞增殖侵袭的调控^[3], 但 EGFR 信号通路如何调

控胶质瘤病情进展仍然不清楚, 阐明其具体机制是改善胶质瘤治疗和预后的关键。作者通过改变胶质瘤细胞 (U87 细胞) EGFR 信号通路状态, 研究 EGFR 信号通路与 U87 细胞增殖和侵袭转移的关系及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、Tyrphostin AG1478、ECM gel、MTT 和明胶均购于 Sigma 公司, 胎牛血清和 DMEM 培养基购于 Hyclone 公司, Transwell (装有聚碳酸酯微孔膜, 孔径 8 μm) 购于美国 Costar 公司, 磷酸化 EGFR (P-EGFR) 和磷酸化 AKT (P-AKT) 兔抗人的

现工作于荆州市第二人民医院。 △ 通讯作者, 宜昌市夷陵大道 183 号宜昌市中心人民医院神经外科。

单克隆抗体购于 Santa Cruz 公司;GAPDH 小鼠抗人多克隆抗体、带 HRP 的抗小鼠和兔二抗、ECL 显影液购于博士德公司, RIPA 裂解液购于碧云天公司, X 医用胶片购于 Kodak 公司。

1.2 U87 细胞的来源和培养 U87 细胞系购自中国科学院上海细胞生物学研究所,用含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养进行实验。

1.3 实验分组 实验分为对照组(不加任何药物)、实验 1 组(加 EGF 100 ng/mL)、实验 2 组(加 EGF 100 ng/mL 和 AG1478 10 μmol/L),实验 2 组在 AG1478 作用 1 h 后再加 EGF。

1.4 MTT 法检测细胞增殖 取对数生长期的细胞以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板,待细胞培养 24 h 后加药进行实验。每组设 4 个复孔,继续培养 24 和 48 h,检测前 4 h 每孔加 MTT (5 g/L)20 μL 和 DMEM 180 μL,4 h 后弃去上清液,加 DMSO 150 μL,避光震荡 15 min,用全自动酶标仪测 490 nm 处的吸光度值[OD(490)]。细胞生长率(%)=[OD(490)实验组 - OD(490)空白]/[OD(490)对照组 - OD(490)空白] × 100%。

1.5 Transwell 体外侵袭实验 取对数生长期 U87 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化,培养液洗涤终止消化,900 r/min 离心 5 min,再用 DMEM 培养基悬浮细胞计数待用;低温条件下将 100 μL 稀释后的 ECM gel 加入 Transwell 小室上室的 PET 膜上表面,37 °C 孵育 4 h 使胶凝固。每组设 2 个复孔,在 Transwell 小室下室加含 10% FBS 的 DMEM 培养基 600 μL,Transwell 小室分别加 DMEM 培养基悬浮的细胞 5×10^4 个/孔,在 37 °C、5% CO₂ 孵育箱中常规培养 12 h 后,取出小室,用棉签擦掉小室的 Matrigel 基质胶和没有侵过的细胞,再用 75% 的乙醇固定 20 min,取出小室放入结晶紫中染色 40 min,400 倍光镜下计 5 个视野细胞数,取均数。

1.6 明胶酶谱法检测基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)蛋白表达 取对数生长期细胞胰酶消化后接种于 6 孔板,待细胞汇合度达 90%,用 PBS 漂洗 2 次,用 1 mL PRIM 1640 培养基培养 24 h,取上清 2 000 r/min 离心 5 min,以去除细胞沉淀,取上清分装,冻于 -80 °C 冰箱。配置含 0.1% 明胶的 10% SDS-PAGE 凝胶,胶凝后配置 5% 上层胶。BCA 法测定收集的上清蛋白浓度。取等量的蛋白,计算好体积,与 2 × loading buffer 等比混合,室温放置 10 min,上样,冰水浴,100 V 恒压电泳 3 h,用含 2.5% Triton X-100 (V/V) 的超纯水室温震荡洗凝胶 2 次,每次 45 min,中间换液。将凝胶放入孵育液内 37 °C 孵育 42 h。凝胶置于含 0.1% 的考马斯亮蓝 R-250 染色液内(甲醇:乙酸:超纯水为 4.5:1.0:4.5, V/V/V)震荡染色 3 h。将凝胶置于脱色液(甲醇:乙酸:超纯水为 4.5:1.0:4.5, V/V/V)脱色,直至能辨别蓝色背景下的 MMP-2(72×10^3)和 MMP-9(92×10^3)透亮条带。用凝胶图像分析系统分析读取条带面积、宽度和灰度值。

1.7 Western blot 检测 P-EGFR 和 P-AKT 蛋白表达 RIPA 裂解液裂解细胞后,行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,转移至硝酸纤维素膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h,加一抗(P-EGFR、P-AKT 和 GAPDH 稀释倍数均为 1:1 000)4 °C 过夜。TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,分别加兔抗小鼠与羊抗兔二抗(辣根过氧化物酶标记)室温孵育 1 h。TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,ECL 显色,X 医用胶片摄影。

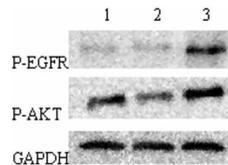
1.8 图像分析 KODA 凝胶成像系统照相,QUANTITY ONE 分析软件(版本 4.6)分析。

1.9 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组组间比较采用方差分析,生长率比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 EGF 和 AG1478 对 U87 细胞 P-EGFR 和 P-AKT 蛋白表达的影响 外源性 EGF(100 ng/mL)作用 U87 细胞 24 h 后 P-EGFR 和 P-AKT 蛋白表达同时明显增加,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);而 AG1478(10 μmol/L)能完全抑制外源性 EGF 的作用,使 P-EGFR 和 P-AKT 蛋白表达同时下降,与实验 1 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1、2。

2.2 EGF 和 AG1478 对 U87 细胞增殖的影响 EGF(100 ng/mL)作用 U87 细胞 24 h 和 48 h 后对细胞增殖具有促进作用,细胞生长率分别较对照组提高了 19.25%、22.32% ($P < 0.05$),但没有时间依赖性($P > 0.05$);AG1478(10 μmol/L)能阻止 EGF 的促进细胞增长作用,明显抑制细胞生长,与实验 1 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),而且有时间依赖性($P < 0.05$)。见图 3。



1:对照组;2:实验 2 组;3:实验 1 组。

图 1 Western blot 电泳图片

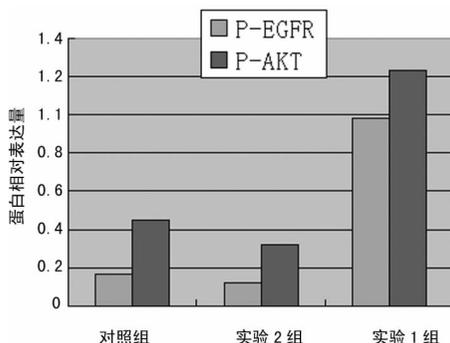


图 2 EGF 和 AG1478 对 U87 细胞 P-EGFR 和 P-AKT 蛋白表达的影响

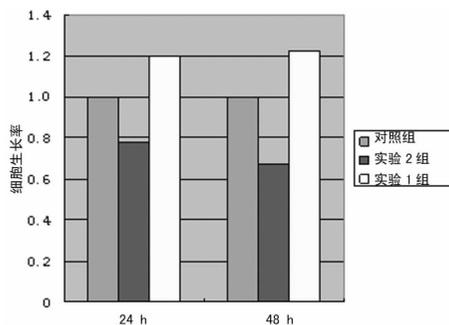
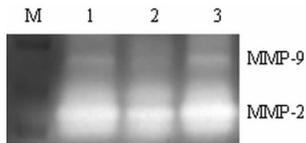


图 3 EGF 和 AG1478 对 U87 细胞增殖的影响

2.3 EGFR 活性改变对 U87 细胞体外侵袭力的影响 细胞体外侵袭实验结果显示,体外侵袭力以侵入 Transwell 小室 ECM 凝胶 PET 滤膜的细胞数来判定。对照组平均每个视野细胞数为(27 ± 4)个,实验 1 组平均每个视野细胞数为(126 ± 3)个,实验 2 组平均每个视野细胞数为(43 ± 6)个。实验 1 组与对照组相比侵袭力明显增加,差异有统计学意义($P <$

0.05);实验 2 组与实验 1 组比较侵袭力明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见插 I 图 4。

2.4 EGF 和 AG1478 对 U87 细胞 MMP-2 和 MMP-9 表达的影响 EGF(100 ng/mL)作用 24 h 后 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达均较对照组增强($P < 0.05$);而 AG1478(10 μ mol/L)可以抑制 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达,与实验 1 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 5。



M:Marker;1:对照组;2:实验 2 组;3:实验 1 组。

图 5 明胶酶谱法凝胶图像

3 讨 论

EGFR 是最早发现的受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK),其蛋白结构分成胞外域、跨膜区与胞内域 3 部分。EGFR 家族蛋白主要有 EGFR/ErbB-1、HER2/ErbB-2、HER3/ErbB-3 和 HER4/ErbB-4 4 类,分别由原癌基因 c-erbB(1~4)编码,并通过可变剪切形成许多特殊受体蛋白产物^[4]。EGFR 的扩增、过表达和突变在胶质瘤的发生和发展中起到重要作用,是恶性胶质瘤的责任基因之一。董伦等^[1]研究发现 EGFR 在人胶质瘤中的过表达为 64%,EGFR 蛋白的表达与胶质瘤的恶性分化程度密切相关,而 40%~60%GBM 中有 EGFR 基因的过表达^[5]。过度激活的 EGFR 可以通过 Ras-MAP 激酶途径、PI₃K/Akt 途径及 STAT-3 等 3 条信号转导途径把细胞外信号传到细胞内,并激活多种基因的异常表达而导致细胞增殖,抑制细胞凋亡,促进细胞迁移、侵袭和促进血管生成等改变。

研究发现 EGF 通过激活 EGFR-PI₃K/AKT 信号通路促进前列腺癌细胞生长与增殖,同时提高侵袭能力,封闭 EGFR 基因后,EGF 作用被抑制^[6]。国内有学者报道 EGF 激活结肠癌细胞的 EGFR 信号通路活化,促进 MMP-2 和 MMP-9 的过表达而增强结肠癌细胞的侵袭能力,这种作用可以被 EGFR 抑制剂阻断^[7-8]。席桂发等^[3]研究却发现低浓度 EGF(100 ng/mL)可以促进胶质瘤 GL-15 细胞增殖和侵袭能力增强,高浓度 EGF(200 ng/mL)的作用则相反,与 EGF 在头颈鳞癌细胞的作用一致^[9]。但目前关于 EGFR 信号通路调控胶质瘤细胞增殖和侵袭转移分子机制的报道很少。

本研究发现 EGF(100 ng/mL)可以促进人胶质瘤 U87 细胞增殖,但是细胞生长率在 24 h 和 48 h 之间没有时间依赖性,这种促进细胞增殖的作用可以被 EGFR 抑制剂——AG1478 阻断。同时研究发现 EGF 可以活化 EGFR 及下游信号通路,导致 P-EGFR 和 P-AKT 的表达上升,与众多研究结果一致^[7-8]。由此推测,EGFR-PI₃K/AKT 信号通路参与 U87 细胞生长和增殖的调控。

侵袭转移是恶性肿瘤的主要特征之一。细胞外基质(ECM)是肿瘤侵袭转移的天然屏障,ECM 的破坏是肿瘤细胞侵袭转移的前提。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases MMPs)是一组可降解 ECM 分子的锌依赖性酶,可降解基底膜的 ECM 成分^[9],在肿瘤侵袭转移过程中起到非常重要的作用,其中 MMP-2 和 MMP-9 最为重要。国内学者报道 EGF 促进结肠癌细胞对 ECM 黏附和体外侵袭力的同时,伴有 MMP-

2/组织型金属蛋白酶抑制因子-2(TIMP-2)和 MMP-9/组织型金属蛋白酶抑制因子-1(TIMP-1) mRNA 比值的升高;而阻断 EGFR 后具有抑制细胞异质黏附力和体外侵袭力作用,同时 MMP-2/TIMP-2 和 MMP-9/TIMP-1 mRNA 比值减少^[7-8]。Ellerbroek 等^[10]报道 EGF 诱导的卵巢癌细胞 MMP-9 蛋白表达涉及 EGFR 下游 PI₃K 和 MAPK 信号通路。本研究中 Transwell 小室体外侵袭实验表明 EGF 提高 U87 细胞的侵袭能力,同时研究也发现 EGF 促进 MMP-2 和 MMP-9 的表达,AG1478 可以降低 MMP-2 和 MMP-9 的表达,减弱 U87 细胞的侵袭能力。

总之,本研究结果表明,EGFR-PI₃K/AKT 信号通路参与调节 U87 细胞生长、增殖和侵袭转移过程,其机制可能是 EGFR-PI₃K/AKT 信号通路活化后,导致 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达增加,对 ECM 的破坏增强。

参考文献:

- [1] 董伦,浦佩玉,王虎,等.胶质瘤中 EGFR 扩增、过表达及其与肿瘤增殖关系的研究[J].中华神经医学杂志,2005,4(12):1204-1207.
- [2] Benjami RJ, Brown A. Classification of glioblastoms multiforme in adults by molecular genetics [J]. Cancer J, 2003,9(2):82-90.
- [3] 席桂发,王宝峰,王和平,等. EGF 和 AG1478 对 GL15 细胞增殖、侵袭和 GFAP 表达的影响[J].中华神经外科疾病研究杂志,2007,6(4):302-306.
- [4] Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signaling mechanisms and therapeutic opportunities[J]. Eur J Cancer Eur J Cancer, 37 Suppl 4: S3-8.
- [5] Fredrick L, Wang XY, Eley GEA, et al. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastoma[J]. Cancer Res, 2000,60(8):1383-1387.
- [6] Bonaccorsi L, Marchiani S, Muratori M, et al. Gefitinib ('IRES-SA', ZD1839) inhibits EGF-induced invasion in prostate Cancer cells by suppressing PI3 K/AKT activation[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2004,130(10):604-614.
- [7] 张晓晶,王甦,刘云鹏,等. EGFR 信号通路调控结肠癌 Caco-2 细胞侵袭转移的分子机制[J].第三军医大学学报,2006,28(14):1479-1482.
- [8] 张晓晶,徐惠绵,刘云鹏,等. EGFR 信号通路调节 A375 细胞侵袭转移分子机制探讨[J].中国肿瘤临床,2006,33(7):361-366.
- [9] O-charoenrat P, Rhys-Evans PH, Modjtahedi H, et al. The role of c-erbB receptors and ligands in head and neck squamous cell carcinoma [J]. Oral Oncol, 2002, 38(7): 627-640.
- [10] Ellerbroek SM, Hableib JM, Benavidez M, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase activity in epidermal growth factor-stimulated matrix metalloproteinase-9 production and cell surface association [J]. Cancer Res, 2001, 61(5): 1855-1861.