

TGF-β1 可通过 ERK 信号通路调节胃癌细胞 MMP-2 和 MMP-9 的表达

万珍玲,胡忠良,刘保安

TGFβ1 Upregulates Expression of MMP-2 and MMP-9 through ERK Signaling Pathway in Gastric Carcinoma Cells

WAN Zhen-ling, HU Zhong-liang, LIU Bao-an

Department of Pathology , College of Basic Medicine , Central South University , Changsha 410013 , China

Corresponding Author :LIU Bao-an ,Email:lba118@yahoo. com. cn

Abstract: Objective To investigate the role of TGFβ1/ MAPK signaling pathways in the regulation of MMP-2 and MMP-9 in gastric carcinoma cells. **Methods** MKN45 and BGC823 gastric carcinoma cell lines were used in this study. The expression of MMP-2 and MMP-9 in the two gastric carcinoma cell lines stimulated by TGFβ1 was tested by Gelatin Zymography. The activity of MAPK signaling pathway in TGFβ1-stimulated cells was measured by Western blotting. The effects of the MAPK pathway specific inhibitors on TGFβ1-activated MMP-2 and MMP-9 expression in two cell lines were examined. **Results** TGF-β1 induced expression of MMP-2 and MMP-9 in MKN45 and BGC823 cells. P38 was activated in BGC823 cells by TGF-β, whereas NK and ERK was activated in both MKN45 and BGC823 cells. PD98059, a ERK specific inhibitor, significantly inhibited the production of MMP-2 and MMP-9 by TGF-β1 in both MKN45 and BGC823 cells, however, SB203580 and SP600125, specific blocker for P38 and JNK, showed no effect on the MMP-2 and MMP-9 expression in both two cells. **Conclusion** TGF-β1 induced enhanced MMP-2 and MMP-9 expression mediated by ERK signaling pathway in MKN45 and BGC823 gastric carcinoma cell lines.

Key words:Gastric Neoplasm; TGF-β1; MMP-2; MMP-9; ERK

摘要:目的 探讨转化生长因子-β1(TGF-β1)/丝裂原活化的蛋白激酶(MAPK)通路在调节胃癌细胞 MMP-2 和 MMP-9 表达中的作用。**方法** 以 MKN45 和 BGC823 胃癌细胞系为研究对象。明胶酶谱法检测 TGF-β1 对各细胞 MMP-2 和 MMP-9 表达的影响,Western 蛋白印迹检测在 TGF-β1 作用下各细胞中 MAPK(P38、JNK、ERK)的活化情况。用相应 MAPK 通路的特异抑制剂对 TGF-β1 调节各细胞 MMP-2 和 MMP-9 的表达进行阻断研究。**结果** TGF-β1 可上调 MKN45 和 BGC823 细胞 MMP-2 和 MMP-9 的表达;TGF-β1 可诱导 BGC823 细胞 P38、MKN45 和 BGC823 细胞 ERK 及 JNK 的活化;ERK 特异抑制剂 PD98059 可明显抑制 TGF-β1 诱导 MKN45 和 BGC823 细胞 MMP-2 和 MMP-9 的表达,但 P38 特异抑制剂 SB203580 和 JNK 特异抑制剂 SP600125 对 TGF-β1 诱导这两种细胞 MMP-2 和 MMP-9 的表达无明显影响。**结论** TGF-β1 可通过活化 ERK 信号通路上调 MKN45 和 BGC823 胃癌细胞 MMP-2 和 MMP-9 的表达。

关键词:胃癌;TGF-β1;MMP-2;MMP-9;ERK

中图分类号:R735. 2 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8578(2009)02-0091-04

0 引言

胃癌是一种严重危害人类生命健康的常见恶性肿瘤,导致胃癌患者死亡的主要原因在于肿瘤的浸

润和转移。研究表明转化生长因子-β1(TGF-β1)能诱导肿瘤细胞中 MMP-2 和 MMP-9 的表达,引起细胞外基质和基底膜降解,从而促进肿瘤细胞的迁徙和转移^[1]。近年有研究发现 TGF-β1 与胃癌的浸润和转移密切相关^[2-3],MMP-2 和 MMP-9 在胃癌的进展中亦发挥重要作用^[4-5]。但对于胃癌中 TGF-β1 与 MMP-2 和 MMP-9 之间的关系研究甚少。因此,我们拟研究 TGF-β1 对胃癌细胞 MMP-2 和 MMP-9

收稿日期:2008-01-23;修回日期:2008-04-16
作者单位:410013 长沙,中南大学基础医学院病理学系
通信作者:刘保安,E-mail:lba118@yahoo. com. cn
作者简介:万珍玲(1980-),女,硕士,主要从事肿瘤病理研究

表达的影响,并初步探讨其相关的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

BGC823 细胞购自中国科学院上海细胞库, MKN45 细胞为上海交通大学消化外科研究所朱正纲教授惠赠。人源重组 TGF- β 1 购自美国 R&D 公司,明胶购自美国 sigma 公司, p-P38、p-ERK、p-JNK 小鼠单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司, PD98059 购自美国 Promega 公司, SB203580 和 SP600125 购自美国 Alexis 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及初步处理 MKN45、BGC823 细胞用含 10%新生牛血清的 RPMI1640 培养基,在 37℃、含 5%CO₂ 饱和湿度条件下传代培养。然后分别以相同数量(5×10^5)的细胞转种于 50 ml 培养瓶中,待细胞长至 80%融合时换含 1%血清培养基同步化处理细胞 24 h。

1.2.2 细胞分组及实验处理 经初步处理的细胞于实验组中加入等体积分含 10 ng/ml TGF- β 1 的 1%血清培养基继续培养 48 h 后收集上清液(同时以无 TGF- β 1 刺激作对照)。MAPKs(ERK、P38、JNK)活化的检测:各细胞用 10 ng/ml TGF- β 1 分别刺激 0、15、30、60、120 min,分别收集细胞裂解蛋白。阻断实验分四组,即未加 TGF- β 1 刺激组、TGF- β 1 刺激组、抑制剂干预 + TGF- β 1 刺激组、抑制剂干预组。经初步处理的细胞各组分别以 SB203580 (20 μ mol/L)、SP600125 (20 μ mol/L)、PD98059 (30 μ mol/L)预孵育 1 h 后,再于实验组中加入等体积分含 10 ng/ml TGF- β 1 的 1%血清培养基继续培养 48 h 后收集上清液。

1.2.3 明胶酶谱分析 分别取相等体积的各处理组细胞培养上清液与不含 DTT 的蛋白上样缓冲液混匀后直接上样(不加热),进行 10%聚丙烯酰胺凝胶(含 1 mg/ml 明胶)垂直电泳。电泳结束后将凝胶置于培养皿中,加入 100 ml 2.5% Triton-X100,振荡,重复洗 6 次,每次 5 min,再用 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L Tris, pH 7.4)漂洗 3 次,每次 5 min,之后将凝胶放入反应液(50 mmol/L Tris, pH 7.4, 200 mmol/L NaCl, 10 mmol/L CaCl₂)中 37℃孵育 36~42 h,然后将凝胶置于 0.25%考马斯亮蓝 R250 染色液中染色 4 h,最后放入脱色液(30%甲醇,10%冰醋酸)中进行脱色以显示条带。

1.2.4 Western 蛋白印迹分析 将步骤 2 中收集的细胞裂解蛋白用 BCA 法测定浓度。分别取等量蛋白加上样缓冲液于沸水中煮 5 min,以 12%SDS

聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离。电泳完毕后将凝胶上的蛋白经半干转膜仪以恒压 15 V 转至 PVDF 膜上,用含 3%小牛血清白蛋白(或 5%脱脂奶粉)的 TBST 溶液(137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 25 mmol/L Tris, 0.1%Tween-20, pH 7.4)封闭 1~2 h,分别加入抗 p-P38、p-JNK 和 p-ERK 抗体, 37℃孵育 2~3 h 或 4℃孵育过夜,洗膜后再用 HRP 标记的二抗 37℃孵育 2 h,洗膜后 DAB 显色。扫描。以 β -actin 蛋白水平作为内对照。

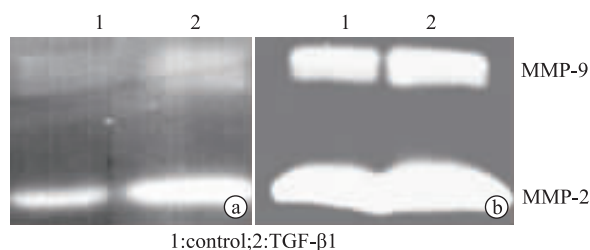
1.3 统计学方法

采用 SPSS12.0 统计软件分析结果。对多组实验数据采用方差分析;对两组实验数据采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TGF- β 1 对 MKN45 和 BGC823 细胞 MMP-2 和 MMP-9 表达的影响

明胶酶谱结果显示,各组细胞上清液分别在 72KD(MMP-2)和 92KD(MMP-9)处均出现透明酶解条带。在 MKN45 细胞中对照组 MMP-2 已有较明显表达,而 MMP-9 仅有微弱的表达,在 TGF- β 1 刺激细胞后,它们分别升高为对照组的 3.27 倍($P < 0.01$)和 24.22 倍($P < 0.01$)。在 BGC823 细胞中对照组 MMP-2 和 MMP-9 均已有较明显表达,在 TGF- β 1 刺激细胞后,它们分别升高为对照组的 1.66 倍($P < 0.05$)和 1.44 倍($P < 0.05$),见图 1。



1:control;2:TGF- β 1
图 1 TGF- β 1 对 MKN45(a)和 BGC823(b)细胞 MMP-2 和 MMP-9 表达的影响

Fig 1 Effects of TGF- β 1 on the expression of MMP-2 and MMP-9 in MKN45(a) and BGC823(b) cells

2.2 TGF- β 1 对 MKN45 和 BGC823 细胞 MAPK 激酶磷酸化的影响

Western blot 结果显示,TGF- β 1 刺激 MKN45 细胞后各时间点均未见 p-P38 有明显变化,见图 2Aa。但作用于 BGC823 细胞 15 min 后 p-P38 表达量即增加,随后减少,见图 2Ba。TGF- β 1 刺激 MKN45 细胞 30 min 后 p-JNK 的表达达高峰,见图 2Ab。而作用于 BGC823 细胞 15 min 后 p-JNK 表达量即升高,随后减少,见图 2Bb。TGF- β 1 分别作用 15 min 和 60 min 后,MKN45 和 BGC823 细胞中

p-ERK 表达达高峰,见图 2Ac、Bc。

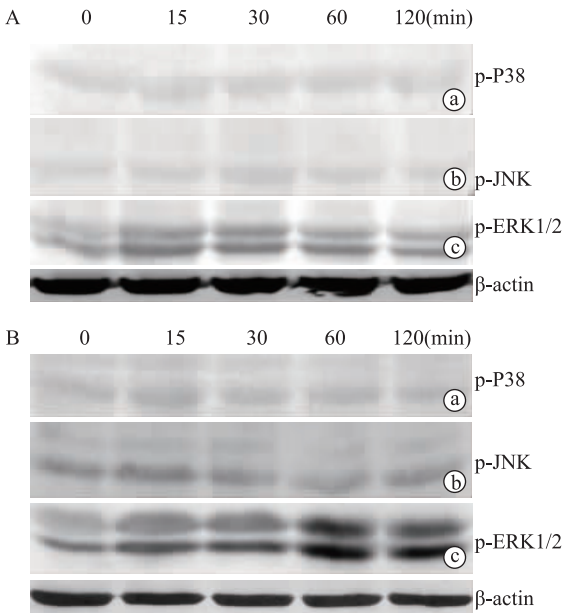


图 2 TGF-β1 对 MKN45(A)和 BGC823(B) 细胞 MAPKs 激酶磷酸化的影响

Fig 2 Effects of TGF-β1 on the phosphorylation of MAPKs in MKN45(A) and BGC823(B) cells

2.3 阻断 ERK、JNK 和 P38 通路对 TGF-β1 诱导 MKN45 和 BGC823 细胞 MMP-2 和 MMP-9 表达的影响

明胶酶谱结果显示,ERK 激酶抑制剂 PD98059 可明显抑制 TGF-β1 诱导 MKN45 和 BGC823 细胞 MMP-2 和 MMP-9 的表达,见图 3。对 MMP-2 和 MMP-9 表达的抑制率在 MKN45 细胞中分别为 53.13% 和 95.84%, 在 BGC823 细胞中分别为 39.35%和37.66%。而 JNK 激酶抑制剂 SP600125 和 P38 激酶抑制剂 SB203580 对 TGF-β1 诱导 MKN45 和 BGC823 细胞 MMP-2 和 MMP-9 的表达均无明显抑制作用。

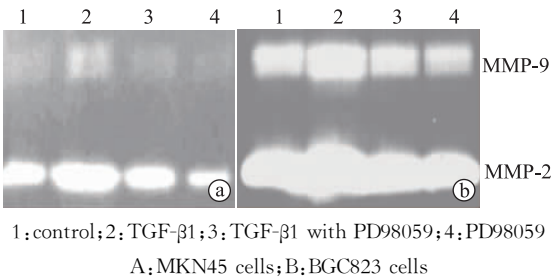


图 3 PD98059 对 TGF-β1 诱导 MKN45 和 BGC823 细胞 MMP-2 和 MMP-9 表达的影响

Fig 3 PD98059 inhibited the expression of MMP-2 and MMP-9 in cells treated with TGF-β1

3 讨论

众多研究表明 TGF-β1 在多种肿瘤中存在高表

达,它可通过调节细胞外基质的状态、血管生成以及促进肿瘤细胞免疫逃逸等机制参与肿瘤的浸润和转移过程。TGF-β1 在胃癌的进展中发挥重要作用,与患者的预后密切相关^[2-3]。我们的体外实验表明外源性 TGF-β1 能诱导胃癌细胞系 MKN45 及 BGC823 细胞 MMP-2 和 MMP-9 的表达。基质金属蛋白酶 MMP-2 和 MMP-9 可分解基底膜的主要成分-Ⅳ型胶原等,引起细胞外基质和基底膜降解,从而促进肿瘤细胞的迁徙和转移^[1]。临床研究表明 MMP-2 和 MMP-9 与胃癌的进展相关^[4-5]。因此,本实验结果提示 TGF-β1 可能通过上调 MMP-2 和 MMP-9 的表达来促进胃癌的浸润和转移。

细胞外基质和基底膜的降解是肿瘤浸润和转移过程中的一个关键步骤,在这个过程中 MMP-2 和 MMP-9 发挥重要作用。它们的表达受到多种细胞因子及生长因子的调节,而这些因子常常可以通过激活细胞内的 MAPK 信号通路来发挥其作用^[6]。MAPK 信号通路是 TGF-β 发挥其生物学效应的一个重要通路^[7-8]。TGF-β1 可快速激活 MAPK 通路,但对不同的细胞系诱导活化的激酶种类及达高峰的时间不同,且可能分别介导不同的生物学效应^[9-11]。该实验发现 TGF-β1 可活化 BGC823 细胞中的 P38 激酶、MKN45 及 BGC823 细胞中的 ERK 激酶和 JNK 激酶。进一步在分别应用三种激酶的特异性抑制剂后,发现仅干预 ERK 通路对 TGF-β1 诱导 MKN45 及 BGC823 细胞 MMP-2 和 MMP-9 表达才有明显的抑制作用。综合结果表明,TGF-β1 可通过 ERK 信号通路诱导 MKN45 及 BGC823 胃癌细胞 MMP-2 和 MMP-9 的表达。研究表明 ERK 可通过活化核转录因子 AP-1^[12]或 Ets^[11]而参与调节 MMP-9 的表达,通过刺激核转录因子 AP-2 蛋白的表达^[13]或活化核转录因子 Sp1^[14]从而调节 MMP-2 的表达。因此推测在胃癌细胞中 ERK 可能也通过类似的途径参与调节 TGF-β1 诱导 MMP-2 和 MMP-9 的表达。目前对 TGF-β1 调节 MMP-2 和 MMP-9 表达机制的研究不多,在不同类型的细胞中研究的结果不太一致^[15],可能是 TGF-β1 对不同的细胞系诱导活化的 MAPK 激酶种类及其后介导何种生物学效应与细胞的类型相关。

本研究表明 TGF-β1 可通过 ERK 信号通路诱导胃癌细胞 MMP-2 和 MMP-9 的表达。但 TGF-β 信号传导通路是一个复杂的信号网络,由于体外细胞实验本身的局限性,我们也不能排除可能存在其他信号传导通路的参与。其他可能参与的信号传导通路以及这些通路间是否相互影响有待探讨。

参考文献:

[1] Hagedorn HG, Bachmeier BE, Nerlich AG. Synthesis and degradation of basement membranes and extracellular matrix and their regulation by TGF-beta in invasive carcinomas[J]. Int J Oncol, 2001, 18(4):669-681.

[2] Saito H, Tsujitani S, Oka S, et al. An elevated serum level of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) significantly correlated with lymph node metastasis and poor prognosis in patients with gastric carcinoma[J]. Anticancer Res, 2000, 20(6B):4489-4493.

[3] Lin Y, Kikuchi S, Obata Y, et al. Serum levels of transforming growth factor beta1 are significantly correlated with venous invasion in patients with gastric cancer[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2006, 21(2):432-437.

[4] Kubben FJ, Sier CF, van Duijn W, et al. Matrix metalloproteinase-2 is a consistent prognostic factor in gastric cancer[J]. Br J Cancer, 2006, 94(7):1035-1040.

[5] Dragutinovic VV, Radovanovic NS, Izrael-Zivkovic LT, et al. Detection of gelatinase B activity in serum of gastric cancer patients[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(1):105-109.

[6] Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion[J]. FASEB J, 1999, 13(8):781-792.

[7] Imamichi Y, Waidmann O, Hein R, et al. TGF beta-induced focal complex formation in epithelial cells is mediated by activated ERK and JNK MAP kinases and is independent of Smad4[J]. Biol Chem, 2005, 386(3):225-236.

[8] Dumont N, Bakin AV, Arteaga CL. Autocrine transforming growth factor-beta signaling mediates Smad-independent motility in human cancer cells[J]. J Biol Chem, 2003, 278(5):3275-3285.

[9] Hyman KM, Seghezzi G, Pintucci G, et al. Transforming growth factor-beta1 induces apoptosis in vascular endothelial cells by activation of mitogen-activated protein kinase[J]. Surgery, 2002, 132(2):173-179.

[10] Khalil N, Xu YD, O'Connor R D, et al. Proliferation of pulmonary interstitial fibroblasts is mediated by transforming growth factor-beta1-induced release of extracellular fibroblast growth factor-2 and phosphorylation of p38 MAPK and JNK[J]. J Biol Chem, 2005, 280(52):43000-43009.

[11] Liu S, Liang Y, Huang H, et al. ERK-dependent signaling pathway and transcriptional factor Ets-1 regulate matrix metalloproteinase-9 production in transforming growth factor-beta1 stimulated glomerular podocytes[J]. Cell Physiol Biochem, 2005, 16(4-6):207-216.

[12] Hong S, Park KK, Magae J, et al. Ascochlorin inhibits matrix metalloproteinase-9 expression by suppressing activator protein-1-mediated gene expression through the ERK1/2 signaling pathway; inhibitory effects of ascochlorin on the invasion of renal carcinoma cells[J]. J Biol Chem, 2005, 280(26):25202-25209.

[13] Guccione M, Silbiger S, Lei J, et al. Estradiol upregulates mesangial cell MMP-2 activity via the transcription factor AP-2[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2002, 282(1):F164-169.

[14] Kuo L, Chang HC, Leu TH, et al. Src oncogene activates MMP-2 expression via the ERK/Sp1 pathway[J]. J Cell Physiol, 2006, 207(3):729-734.

[15] Kim ES, Kim MS, Moon A. TGF-beta-induced upregulation of MMP-2 and MMP-9 depends on p38 MAPK, but not ERK signaling in MCF10A human breast epithelial cells[J]. Int J Oncol, 2004, 25(5):1375-1382.

[编辑:刘红武;校对:贺文]