

DOI:10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2010. 08. 007

# 结肠癌细胞中 GSK-3β 活性对 EGFR 和 IGFR-1 抑制剂反应性的作用

杨 黎<sup>1,2</sup>, 李建军<sup>1</sup>, 张艳玲<sup>1</sup>, 梁后杰<sup>1</sup>

## Role of GSK-3β Activation in Responses of Colorectal Cancer Cells to EGFR and IGFR-1 Inhibitor

YANG Li<sup>1,2</sup>, LI Jian-jun<sup>1</sup>, ZHANG Yan-ling<sup>1</sup>, LIANG Hou-jie<sup>1</sup>

1. Department of Oncology, Southwest Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 2. Department of Oncology, The Affiliated Hospital of Guiyang Medical College  
Corresponding Author: LIANG Hou-jie, E-mail: lianghoujie@sina.com

**Abstract: Objective** To investigate the role of glycogen synthetase kinase 3β (GSK-3β) activation in response of colorectal cancer cells to epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor gefitinib and insulin-like growth factor receptor-1 (IGFR-1) inhibitor AG1024. **Methods** Western blot analysis was used to detect the expression levels of activated GSK-3β. Cell proliferation rate of colorectal cancer cells treated with GSK-3β inhibitor lithium chloride (LiCl) was determined by MTT assay. Laser-scanning microscopy based on immunofluorescence staining for activated GSK-3β performed to observe its cellular expression and intranuclear accumulation. **Results** The expression level of activated GSK-3β significantly increased in Lovo cells after treated with gefitinib, in contrast, no obvious changes in the other cell lines. HT29 cells showed a marked increase in GSK-3β activation after treated with the combination of gefitinib and AG1024, and so did HCT116 cells after the AG1024 treatment ( $P < 0.05$ ). Cell growth suppression of gefitinib-treated Lovo cells was rescued by the addition of LiCl, and the similar effect that resulted from LiCl action was also conducted with combination-treated HT29 cells, as well as AG1024-treated HCT116 cells ( $P < 0.05$ ). As confocal analysis shown, the significantly increased activated GSK-3β expression was found in the Lovo cells treated with the gefitinib, HT29 treated with the combination, and HCT116 treated with the AG1024, compared with their untreated-treated control groups respectively. More noticeable, subcellular localization of the activated GSK-3β displayed intranuclear accumulation when the cells were treated with the corresponding agents. **Conclusion** Gefitinib and/or AG1024-induced cell growth suppression was mediated by GSK-3β activation, suggesting that the responses of colorectal cancer cells to EGFR/IGFR-1 blockade could be predicted early in the course of treatment by measuring the activation of GSK-3β.

**Key words:** Colorectal cancer cell lines; Glycogen synthetase kinase 3β; Gefitinib; AG1024; Cell growth suppression

**摘要:目的** 探讨糖原合成酶激酶 3β(glycogen synthetase kinase 3β,GSK-3β)在结肠癌细胞对表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)抑制剂吉非替尼和胰岛素样生长因子 1 型受体(insulin-like growth factor receptor-1, IGFR-1)抑制剂 AG1024 反应性中的作用。**方法** 以 Western blot 检测结肠癌细胞激活型 GSK-3β 的表达状况;以 GSK-3β 抑制剂氯化锂(lithium chloride,LiCl)阻断其活性,MTT 法观察 LiCl 对吉非替尼和(或)AG1024 诱导的生长抑制作用有无影响;以免疫荧光激光共聚焦显微镜观察激活型 GSK-3β 在细胞内的表达及其核转位。**结果** 吉非替

收稿日期:2009-03-19;修回日期:2010-02-02  
基金项目:吴阶平医学基金资助项目(EGFR07-07);第三军医大学科研基金资助项目  
作者单位:1. 400038 重庆,第三军医大学西南医院肿瘤科;2. 贵阳医学院附属医院肿瘤科  
通信作者:梁后杰, E-mail: lianghoujie@sina.com  
作者简介:杨黎(1975-),女,博士,主治医师,主要从事分子靶向治疗和肿瘤化疗耐药方面的研究

尼作用下 Lovo 细胞中激活型 GSK-3β 明显增加,而在其余细胞中无明显变化。在 LiCl 作用下,Lovo 细胞的增殖率较吉非替尼作用时有所增加( $P < 0.05$ );HT29 细胞增殖率较吉非替尼联合 AG1024 作用时升高( $P < 0.05$ );HCT116 细胞增殖率较 AG1024 作用时也有所增加( $P < 0.05$ )。在吉非替尼和

(或)AG1024 诱导生长抑制效应的结肠癌细胞中,激活型 GSK-3 $\beta$  不仅在细胞内的表达量增加,还出现明显的核转位。  
**结论** 吉非替尼和 AG1024 诱导的结肠癌细胞生长抑制依赖于激活 GSK-3 $\beta$ ,检测 GSK-3 $\beta$  活性可在早期阶段反映结肠癌细胞对治疗的反应性。

**关键词:** 结肠癌细胞系;糖原合成酶激酶 3 $\beta$ ;吉非替尼;AG1024;生长抑制作用

**中图分类号:**R735.3      **文献标识码:**A

**文章编号:**1000-8578(2010)08-0882-04

0 引言

糖原合成酶激酶 3 $\beta$ (glycogen synthase kinase3, GSK-3 $\beta$ )是一种多功能的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,不仅参与细胞内糖代谢过程,而且还参与细胞增殖、分化和凋亡等多种重要的生理过程<sup>[1]</sup>。它主要有 2 种亚型:GSK-3 $\alpha$  和 GSK-3 $\beta$ ,其中 GSK-3 $\beta$  是包括 EGFR、IGFR-1 等引导的细胞内多种信号转导通路的重要成分。我们以往的研究<sup>[2]</sup>表明 EGFR 抑制剂吉非替尼可通过降低其下游信号通路中 AKT、MAPK 的活性从而抑制结肠癌 Lovo 细胞生长,而给予 IGFR-1 抑制剂 AG1024 逆转结肠癌 HT29 和 HCT116 细胞耐受吉非替尼表型的研究也正是抑制了 AKT、MAPK 的活性,由此设想 AKT 和 MAPK 共同的下游信号蛋白激酶的活性状态应该可反映药物对肿瘤细胞产生的生长抑制效应,比如 GSK-3 $\beta$ 。本研究通过检测结肠癌细胞中 GSK-3 $\beta$  活性的表达状况,并以 GSK-3 $\beta$  抑制剂 LiCl 降低 GSK-3 $\beta$  活性,探讨 GSK-3 $\beta$  在结肠癌细胞对吉非替尼和 AG1024 反应性中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞系及其培养

人结肠癌细胞系 Lovo、HCT116、HT29 为本室传代保存,LS174T、SW480、SW620 购自中国科学院上海细胞生物研究所。SW620 用 Leibovitz's L-15 培养液,其余以 DMEM 高糖培养液培养,其中含 10% 胎牛血清,各 100u/ml 的青、链霉素,用 0.25%胰酶消化传代。取对数生长期的细胞用于各项实验。

1.2 药物和主要试剂

吉非替尼由阿斯利康制药有限公司提供,溶解于二甲亚砜(DMSO)中,储存浓度为 200mmol/L, -20℃ 保存,仅在每次实验前用新鲜培养液稀释至所需浓度,作用于细胞的 DMSO 浓度不超过 1%。AG1024 储存液为 1 mg AG1024 溶解于 100  $\mu$ l DM-SO,储存浓度为 10 mg/ml (33 mmol/L), -20℃ 保存,每次实验前用新鲜培养液稀释至所需浓度,其中

DMSO 浓度不超过 1%。LiCl 储存液为 84.8 mg LiCl 溶解于 10ml 灭菌水中,浓度 200 mmol/L,分装后 4℃ 保存。兔抗 p-GSK-3 $\beta$ <sup>Tyr216</sup> 和内参  $\beta$ -actin 抗体购于 Santa Cruz Biotechnology 公司,化学发光试剂盒购于 Pierce Biotechnology 公司。羊抗兔 IgG-TRITC 购于北京中杉生物公司。

1.3 Western blot 检测

以 RIPA 细胞裂解液提取各种细胞总蛋白。用 Bradford 法测定蛋白浓度。取各组 50 $\mu$ g 蛋白上样,经 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (10% SDS-PAGE)电泳分离,电转移至 PVDF 膜后,置于一抗(1:1000)稀释液中 4℃ 孵育过夜。HRP 标记的二抗(1:2000)室温孵育 1 h,避光显影检测杂交信号。以 Quantity One 软件(美国 Bio-Rad 公司)测量各个蛋白条带的灰度值。

1.4 体外药物敏感实验

调整细胞浓度后取 100 $\mu$ l,以每孔含细胞数 5000 个接种于 96 孔培养板中,37℃ 孵育 24h 后,每孔加入含不同药物浓度的完全培养液 100 $\mu$ l,对照组不含药物只加入等量的 DMSO,每组设 4 个复孔,继续孵育 72h。每孔加 20 $\mu$ l MTT 液(5mg/ml),培养 4 h 后小心吸弃培养液,每孔加入 200 $\mu$ l DMSO。用 Model 550 型酶标仪在 490 nm 下测吸光度值(OD 值),计算细胞增殖率:增殖率(%) = 实验组平均 OD 值/ 对照组平均 OD 值  $\times$  100 %,每个实验重复至少 3 次。

1.5 免疫荧光法

取对数期生长的结肠癌细胞传代接种作细胞爬片,但细胞生长融合至 50%时加入 10  $\mu$ mol/L 吉非替尼和(或)AG1024 作用细胞 3h,设不加药物的对照组,PBS 漂洗;4%多聚甲醛固定细胞 20 min,PBS 漂洗 5 min  $\times$  3 次,2.5% Triton 处理 3~5 min;血清封闭 30 min; p-GSK-3 $\beta$ <sup>Tyr216</sup> 一抗(1:100)稀释液 37℃ 孵育 40 min,再 4℃ 孵育过夜;PBS 漂洗 5 min  $\times$  3 次;羊抗兔 IgG 二抗 37℃ 孵育 40 min; Hoechst33258 在 37℃ 孵育 15 min;PBS 漂洗 5 min  $\times$  3 次;封片;激光共聚焦显微镜下观察 p-GSK-3 $\beta$ <sup>Tyr216</sup> 在细胞内的表达及其核转位。

1.6 统计学方法

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS13.0 软件进行 One-Way ANOVA 统计学分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 吉非替尼作用下激活型 GSK-3 $\beta$  在结肠癌细胞中的表达

激活型 GSK-3 $\beta$  第 216 位点酪氨酸被磷酸化(p-GSK-3 $\beta^{Tyr216}$ )。以 Western blot 检测在吉非替尼作用下 Lovo、HT29 和 HCT116 细胞中激活型 GSK-3 $\beta$  的表达状态,见图 1,Lovo 细胞在吉非替尼作用下激活型 GSK-3 $\beta$  明显增加,而 HT29、HCT116 细胞无明显变化。研究还发现 SW480、LS174T 和 SW620 细胞在吉非替尼剂量提高的情况下激活型 GSK-3 $\beta$  亦无增加,见图 2。

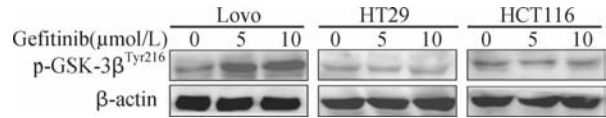


图 1 吉非替尼作用下 Lovo、HT29 和 HCT116 细胞激活型 GSK-3 $\beta$  的表达

Figure 1 The levels of GSK-3 $\beta$  phosphorylation on residue Y216 (activated site) in Lovo, HT29 and HCT116 cells treated with gefitinib

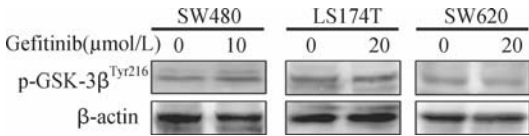


图 2 吉非替尼作用下 SW480、LS174T 和 SW620 细胞激活型 GSK-3 $\beta$  的表达

Figure 2 The levels of GSK-3 $\beta$  phosphorylation on residue Y216 (activated site) in SW480, LS174T and SW620 cells treated with gefitinib

2.2 AG1024 作用下激活型 GSK-3 $\beta$  在结肠癌细胞中的表达

Western blot 结果显示,HT29 细胞在吉非替尼联合 AG1024 作用下激活型 GSK-3 $\beta$  明显增加,HCT116 细胞在 AG1024 作用下激活型 GSK-3 $\beta$  也显著增加,见图 3。

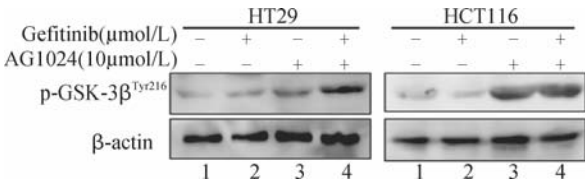


图 3 吉非替尼和 AG1024 单独或联合作用于 HT29、HCT116 细胞激活型 GSK-3 $\beta$  的表达

Figure 3 Effects of gefitinib, AG1024 or both on the expression of activated GSK-3 $\beta$  in HT29 and HCT116 cells

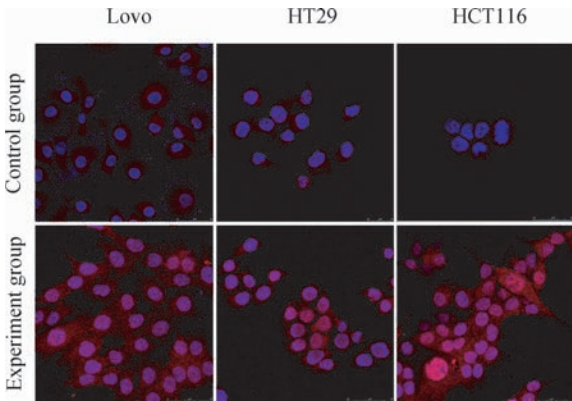
2.3 GSK-3 $\beta$  抑制剂 LiCl 对吉非替尼、AG1024 诱导结肠癌细胞生长抑制的影响

MTT 法检测细胞增殖率,吉非替尼作用可明显降低 Lovo 细胞增殖率,但同时给予 LiCl 组的细胞增

殖率[(79.30±6.75)%]较吉非替尼作用组[(44.03±5.81)%]有所上升( $P<0.05$ );吉非替尼联合 AG1024 可明显降低 HT29 细胞增殖率,但同时给予 LiCl 组的细胞增殖率[(75.77±8.64)%]较联合作用组[(42.97±5.52)%]有所上升( $P<0.05$ );AG1024 可降低 HCT116 细胞增殖率,但同时给予 LiCl 组的细胞增殖率[(85.47±3.09)%]较 AG1024 作用组[(43.53±8.25)%]也有所上升( $P<0.05$ )。

2.4 吉非替尼、AG1024 作用下结肠癌细胞激活型 GSK-3 $\beta$  在细胞内的表达及其核转位

以免疫荧光法标记 p-GSK-3 $\beta^{Tyr216}$ ,在激光共聚焦显微镜下观察吉非替尼和(或)AG1024 作用于结肠癌细胞激活型 GSK-3 $\beta$  的表达和亚细胞定位,见图 4。p-GSK-3 $\beta^{Tyr216}$  可在胞质/核表达,Lovo、HT29 和 HCT116 细胞对照组的表达量低,而且多在胞浆表达,胞核极少,而给予相应药物作用后表达量明显增多,更重要的是出现明显的核内聚集的现象。



Immunofluorescence staining for GSK-3 $\beta$  phosphorylation on residue Y216 (red) and nuclei (blue)

图 4 吉非替尼和(或)AG1024 作用于结肠癌细胞激活型 GSK-3 $\beta$  的表达和核转位

Figure 4 The expression of activated GSK-3 $\beta$  and intranuclear accumulation in colorectal cancer cells treated with gefitinib and(or) AG1024

3 讨论

我们以往的研究<sup>[2]</sup>已报道结肠癌细胞 Lovo 对 EGFR 抑制剂吉非替尼的敏感度最好,HCT116、LS174T 和 SW620 的敏感度最差,HT29 和 SW480 的敏感度居中,并且探讨了 IGFR-1 信号通路 与细胞对吉非替尼反应性的关系,即 EGFR 和 IGFR-1 形成异二聚体,组成性激活下游信号 AKT、MAPK 通路,通过调控细胞周期和凋亡,使结肠癌细胞对抗吉非替尼的生长抑制作用。联合 IGFR-1 抑制剂 AG1024 可逆转 HT29 细胞的耐受表型,而单独应用 AG1024 即可逆转 HCT116 细胞的耐受性。本文

延伸前期的研究结果,论证 AKT、MAPK 共同的下游信号激酶 GSK-3 $\beta$  的活性状态能否反映阻断 EGFR、IGFR-1 活性后结肠癌细胞的生长抑制效应。

GSK-3 $\beta$  活性受多种机制调节,磷酸化是研究最多的调节方式之一,已发现第 9 位点的丝氨酸(GSK-3 $\beta^{\text{Ser}9}$ )磷酸化后其蛋白酶活性降低,即失活型 GSK-3 $\beta$ 。多种激酶可参与 GSK-3 $\beta^{\text{Ser}9}$  磷酸化的修饰调节,如 PI3K/AKT 和 Ras/MAPK 信号通路的激活等;相反,GSK-3 $\beta^{\text{Tyr}216}$  磷酸化后活性增强<sup>[3]</sup>。关于 GSK-3 $\beta$  在结肠癌中的作用存在争议,有研究认为 GSK-3 $\beta$  反向调节 MAPK 活性,抑制 GSK-3 $\beta$  可诱导 COX-2 和 IL-8 产生<sup>[4]</sup>,PKC 抑制剂或 COX-2 抑制剂均可激活 GSK-3 $\beta$  引起促凋亡效应<sup>[5-7]</sup>;但亦有研究认为激活 GSK-3 $\beta$  后主要表现为抗凋亡效应<sup>[8-9]</sup>。造成结论不一致的原因可能是 GSK-3 $\beta$  还同时调节 Wnt/ $\beta$ -catenin 和 NF- $\kappa$ B 通路,可产生错综复杂的生物学效应。

本研究显示,在吉非替尼和 AG1024 诱导的结肠癌细胞生长抑制中 GSK-3 $\beta$  活性状态至关重要,阻断其活性将在一定程度上保护细胞免受药物作用。首先,在吉非替尼作用下,对其反应性最好的 Lovo 细胞 GSK-3 $\beta$  活性明显增高,反应性较差的其他细胞系则无明显变化;然而,在 AG1024 作用下 HCT116 细胞的 GSK-3 $\beta$  活性明显增高,同样的现象也发生在 AG1024 联合吉非替尼作用的 HT29 细胞中;其次,抑制 GSK-3 $\beta$  活性使吉非替尼、AG1024 诱导的结肠癌细胞生长抑制效应明显减弱;最后,吉非替尼、AG1024 诱导的生长抑制效应除了表现 GSK-3 $\beta$  活性增高外,还伴随着激活型 GSK-3 $\beta$  转位到细胞核内聚集,从而调控细胞核相关蛋白的活性以调节细胞生长,这进一步论证了我们的研究结果。Kassouf 等<sup>[10]</sup>研究发现膀胱癌细胞耐受吉非替尼作用是通过持续性激活 MAPK 通路使 GSK-3 $\beta$  失活,而敏感性细胞在吉非替尼诱导下激活 GSK-3 $\beta$ ,并转移到细胞核内,下调 cyclin D1 的表达,引起细胞周期阻滞。

综合分析 EGFR 和 IGFR-1 的活性在预测结肠癌对吉非替尼的敏感度方面可能存在一定价值,若

要有效地抑制肿瘤生长繁殖,则很有必要同时检测两者的表达及其活性状态,从而适时、合理地调整用药方案。然而,抑制 EGFR、IGFR 活性诱导结肠癌细胞产生的生长抑制效应依赖于激活 GSK-3 $\beta$ ,故本研究认为检测 GSK-3 $\beta$  活性可在早期阶段反映结肠癌细胞对吉非替尼和 AG1024 的反应性。

参考文献:

[1] Steinbrecher KA, Wilson W 3rd, Cogswell PC, et al. Glycogen synthase kinase 3 beta functions to specify gene-specific, NF-kappaB-dependent transcription[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(19): 8444-8455.

[2] 杨黎, 赵晓昕, 李建军, 等. EGFR 信号通路的活化状态与结肠癌细胞对吉非替尼敏感性的关系[J]. 解放军医学杂志, 2009, 34(9): 1046-1049.

[3] Wang QM, Fiol CJ, DePaoli-Roach AA, et al. Glycogen synthase kinase-3 beta is a dual specificity kinase differentially regulated by tyrosine and serine/threonine phosphorylation[J]. J Biol Chem, 1994, 269(20): 14566-14574.

[4] Wang Q, Zhou Y, Wang X, et al. Glycogen synthase kinase-3 is a negative regulator of extracellular signal-regulated kinase [J]. Oncogene, 2006, 25(1): 43-50.

[5] Wang Q, Zhou Y, Evers BM. Neurotensin phosphorylates GSK-3alpha/beta through the activation of PKC in human colon cancer cells[J]. Neoplasia, 2006, 8(9): 781-787.

[6] Graff JR, McNulty AM, Hanna KR, et al. The protein kinase C beta-selective inhibitor, Enzastaurin (LY317615. HCl), suppresses signaling through the AKT pathway, induces apoptosis, and suppresses growth of human colon cancer and glioblastoma xenografts[J]. Cancer Res, 2005, 65(16): 7462-7469.

[7] Tuynman JB, Vermeulen L, Boon EM, et al. Cyclooxygenase-2 inhibition inhibits c-Met kinase activity and Wnt activity in colon cancer[J]. Cancer Res, 2008, 68(4): 1213-1220.

[8] Shakoory A, Ougolkov A, Yu ZW, et al. Deregulated GSK 3beta activity in colorectal cancer: its association with tumor cell survival and proliferation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 334(4): 1365-1373.

[9] Ghosh JC, Altieri DC. Activation of p53-dependent apoptosis by acute ablation of glycogen synthase kinase-3beta in colorectal cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(12): 4580-4588.

[10] Kassouf W, Dinney CP, Brown G, et al. Uncoupling between epidermal growth factor receptor and downstream signals defines resistance to the antiproliferative effect of Gefitinib in bladder cancer cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(22): 10524-10535.

[编辑:安 风;校对:杨 卉]