

DOI:10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2011. 08. 003

鞘氨醇激酶-1 激活 ERK 通路介导人结肠癌细胞株 LoVo 侵袭与迁移的实验

钟月圆,刘诗权,黄杰安,覃蒙斌,金 卉

Sphingosine Kinase-1 Regulates LoVo Cell Invasion and Migration via Activation of ERK1/2 Pathway

ZHONG Yue-yuan, LIU Shi-quan, HUANG Jie-an, QIN Meng-bin, JIN Hui

Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Corresponding Author: HVANG Jie-an, E-mail: jh23229@gmail. com

Abstract: Objective To investigate the effect of Sphk1 on colon cancer cell invasion and migration. **Methods** Human colon cancer LoVo cells were divided into three group: LoVo cells were treated using 100 nM Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) as the Sphk1 activation group, 50 μ M N, N-dimethyl-D-erythro-sphingosine (DMS) as suppression group, and 0. 9% NaCl as control group. Cell invasiveness and migration were detected by Transwell boyden chamber model. Sphk1, ERK1/2, p-ERK1/2 protein expressions were detected by Western blot, MMP-2, MMP-9 and uPA protein levels in the culture medium were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and MMP-2, MMP-9 and uPA mRNA expressions in LoVo cells were detected by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. **Results** The Sphk1 activator induced the expression of Sphk1 and obviously enhanced LoVo cell invasion and migration capacity, accompanied with the up-regulating of ERK1/2, p-ERK1/2 protein expressions; moreover the protein in culture medium and the mRNA in cells levels of MMP-2, MMP-9 and uPA were elevated. On the contrary, the inhibitor obviously suppressed the protein expression of Sphk1 and cell invaseness and migration, associated with the suppressing of ERK1/2, p-ERK1/2 protein expressions; furthermore, the protein and the mRNA levels of MMP-2, MMP-9 and uPA were down-regulated. **Conclusion** Sphk1 was able to promote the invasion and migration of LoVo cells, through the activation of ERK1/2 signaling pathway, MMP-2, MMP-9 and uPA mRNA expression were up-regulated.

Key words: Sphingosine kinase 1; Human colon cancer cells; Invasion; Migration

摘要:目的 研究 Sphk1 对人结肠癌 LoVo 细胞侵袭与迁移能力的影响并探讨其作用机制。**方法** 将人结肠癌 LoVo 细胞分成 Sphk1 激活组, Sphk1 抑制组, 空白对照组。以 Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)为 Sphk1 激活剂(终浓度为 100 nM), N, N-dimethyl-D-eryt-hro-sphingosine(DMS)为 Sphk1 抑制剂(终浓度为 50 μ M), NaCl(终浓度为 0. 9%)为空白试剂处理 LoVo 细胞 24 h 后, 用 Transwell Boyden 小室模型测定 LoVo 细胞的相对侵袭率与迁移率; 用 Western blot 方法测定细胞 Sphk1、ERK1/2 与 p-ERK1/2 蛋白水平的变化; 用 ELISA 方法检测细胞培养上清中 MMP-2、MMP-9 及 uPA 的蛋白含量; 用半定量 RT-PCR 检测细胞中 MMP-2、MMP-9 和 uPA 的 mRNA 水平。**结果** Sphk1 激活剂可促进 LoVo 细胞侵袭与迁移, 同时明显增强 LoVo 细胞中 Sphk1、ERK1/2 及 p-ERK1/2 的蛋白表达, 并促进 MMP-2、MMP-9 及 uPA 的 mRNA 表达与蛋白分泌。Sphk1 抑制剂则抑制 LoVo 细胞侵袭与迁移, 同时抑制 Sphk1、ERK1/2 与 p-ERK1/2 的蛋白表达, 并抑制 MMP-2、MMP-9 及 uPA 的 mRNA 表达与蛋白分泌。**结论** Sphk1 可促进人结肠癌细胞株 LoVo 细胞的侵袭与迁移, 其机制可能与激活 ERK1/2 信号通路从而促进 MMP-2、MMP-9 及 uPA mRNA 表达与蛋白分泌有关。

收稿日期:2010-06-24;**修回日期:**2010-11-23
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30760275); 广西科学基金资助项目(0832008)
作者单位:530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院消化内科
通信作者:黄杰安, E-mail: jh23229@gmail. com
作者简介:钟月圆(1984-), 女, 硕士, 主要从事消化系疾病的研究

关键词: 鞘氨醇激酶-1; 人结肠癌细胞; 侵袭; 迁移
中图分类号: R730. 2; R735. 3⁺ 5
文献标识码: A
文章编号: 1000-8578(2011)08-0861-05

0 引言

鞘氨醇激酶(sphingosine kinase, Sphk)磷酸化鞘氨醇形成 1-磷酸鞘氨醇(sphingosine 1-phosphate, S1P), 鞘氨醇激酶-1(Sphk1)、S1P 是肿瘤发展过程中的重要调节因子^[1], 在调节细胞迁移、增殖、凋亡等过程中具有重要作用。但 Sphk1 对人结肠癌细胞 LoVo 侵袭及迁移的影响及其机制有待深入探讨。本研究通过化学方法调控 Sphk1 蛋白的表达, 观察 Sphk1 对结肠肿瘤 LoVo 细胞的侵袭和迁移、ERK1/2 与 p-ERK1/2 蛋白表达, 及 MMP-2、MMP-9 和 uPA 的 mRNA 表达及蛋白分泌的影响, 以期明确 Sphk1 对人结肠癌细胞的侵袭和迁移的影响并探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人结肠癌细胞株 LoVo 购自南京凯基生物科技发展有限公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司; DMEM(高糖型)购自 Gibco 公司; 磷酸盐缓冲液(PBS)购自福州迈新生物技术开发有限公司; 细胞培养瓶及 Transwell 均购自 Corning Costar 公司; Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)购自 Sigma-Aldrich 公司; erythro-sphingosine, N, N-Dimethyl-(DMS) 购自 Calbiochem 公司; 蛋白提取试剂盒购自碧云天生物技术研究; 鼠抗人 Sphk1 单克隆抗体购自 Sigma-Aldrich 公司, 兔抗人 ERK1/2、p-ERK1/2 多克隆抗体购自 Cell Signaling Technology; MMP-2、MMP-9 及 uPA ELISA 试剂盒购自 Life technology 公司; Trizol 购自 Invitrogen 公司; 反转录试剂盒购自 Fermentas 公司; Taq 酶购自 Promega 公司; 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成; 电泳仪购自北京沃德生物医学仪器公司。

1.2 细胞培养

人结肠癌 LoVo 细胞置于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中、37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。

1.3 侵袭与迁移试验

取对数生长期细胞制备细胞悬液, 接种至 6 孔板, 每孔 1 000 μ l, 实验分三组: 空白对照组、Sphk1 激活组、Sphk1 抑制组, 每组重复 3 孔。培养 12 h 细胞贴壁后, Sphk1 激活组加终浓度为 100 nM 的 PMA, Sphk1 抑制组加终浓度为 50 μ M 的 DMS。作用 24 h 后用 0.25% 的胰酶消化细胞并用 1% 的含血清培养液洗涤细胞 2 次, 制备细胞悬液, 调整细胞密度为 5×10^5 /ml, 侵袭实验取 200 μ l 细胞悬液

种于铺好了 Matrigel 的 Transwell 板的内室中, 迁移试验取 200 μ l 细胞悬液直接接种至 Transwell 板的内室中, 外室注入培养液。24 h 后倒置 Transwell 小室, 滤膜下表面朝上, 自然风干, 结晶紫染色, 再次倒置 Transwell 小室, 自然风干, 刀片取下滤膜置于载玻片上, 滴中性树脂, 盖盖玻片。显微镜计数 3 个随机视野取平均值, 以空白试剂为对照计算相对侵袭率与迁移率, 分析数据。重复试验 3 次。

1.4 Western blot 检测

将人结肠癌 LoVo 细胞接种于直径为 4 cm 的细胞培养皿中, 接种细胞密度为 3×10^6 /ml, 实验分组及细胞药物处理同上。作用 24 h 后收集细胞, 按照每 20 μ l 细胞沉淀加 200 μ l 已添加了 PMSF 的细胞总蛋白抽提试剂, 剧烈振荡 5 s, 把细胞沉淀完全悬浮并分散开, 冰浴 15 min, 4℃ 12 000r/min 离心 20 min, 收集上清即为抽提到的细胞总蛋白。Bradford 法测定蛋白浓度, 将 $5 \times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液加入蛋白中, 煮沸 5min 使蛋白变性。制备 5% 浓缩胶与 12% 分离胶, 取适量(60 μ g)蛋白电泳(75 V, 90 min), 根据蛋白 Marker 指示切胶, 转膜(100 mA, 75 min), 用 5% 的脱脂奶粉封闭 60 min, 洗膜三次, 根据抗体说明书稀释抗体(Sphk1 1 : 500, ERK1/2 1 : 1 000, p-ERK1/2 1 : 1 000), 敷一抗(4℃, 摇床, 过夜), 次日洗膜三次(同前), 根据抗体说明书稀释抗体(Sphk1、ERK1/2、p-ERK1/2 对应的二抗浓度分别是: 1 : 3 000, 1 : 4 000, 1 : 3 000), 敷二抗(60 min, 摇床), 洗膜三次(同前), ECL 显影。重复试验 3 次。显影结果采用 quanty-one 分析软件进行图像分析。

1.5 ELISA 试验

取对数生长期细胞制备细胞悬液, 调整细胞密度为 10^6 /ml, 接种至 96 孔板, 每孔 100 μ l(相当于 10^5 个细胞), 实验分组及细胞药物处理同上, 作用 24 h 后收集细胞上清液。在酶标板上设立空白孔、标准孔与待测孔; 按照倍比稀释方法将标准品稀释, 取 50 μ l 标准品加入标准孔; 取细胞上清 10 μ l 加入待测孔, 用待测品稀释液将待测孔液体补足至 50 μ l; 将酶标板置于 37℃ 温箱中培养 30 min; 弃液体, 每孔加 350 μ l 洗涤液, 静置 30 s 后弃去, 拍干, 重复洗涤 5 次; 每孔加酶标试剂 50 μ l(空白孔除外); 培养(同前); 洗涤(同前); 每孔分别加显色剂 A 与 B 各 50 μ l, 轻轻振荡混匀, 避光显色 10 min; 每孔加终止液 50 μ l 终止反应; 在酶标仪上以空白孔调零于 450 nm 波长处测定积分吸光度值(A); 根据标准品浓度及 A 值绘制标准曲线, 计算每孔待测品浓度, 分析数据。重复试验 3 次。

1.6 RT-PCR 法检测 MMP-2、MMP-9 及 uPA 的 mRNA 表达水平

取对数生长期细胞制备细胞悬液,调整细胞密度为 10^6 /ml,接种至 6 孔板,每孔 100 μ l 细胞悬液(相当于 10^5 个细胞),实验分组及细胞药物处理同上。作用 24 h 后采用 Trizol 法抽提细胞中总 RNA,用核酸蛋白测定仪测定 RNA 含量及纯度,保证 A260/A280 均为 1.8~2.0,取总 RNA 3 μ g,采用 M-MuLV 反转录酶将其反转录成 cDNA, PCR 扩增 cDNA,引物序列见表 1,条件为:95℃预变性 5 min,95℃变性 45 s,各自退火温度(MMP-2 为 51℃;MMP-9 为 53℃;uPA 为 60℃)45 s,72℃延伸 45 s,72℃延伸 7 min,总共 35 个循环。所有 PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶上电泳后,用凝胶成像系统拍照,Quantity One 软件测定灰度值,灰度值以各产物与 GAPDH 的积分吸光度值(A)的比值表示。

1.7 统计学方法

采用单因素方差分析方法,用 SPSS11.5 统计软件进行处理,各实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P<0.05$

表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Sphk1 对细胞侵袭与迁移作用的影响

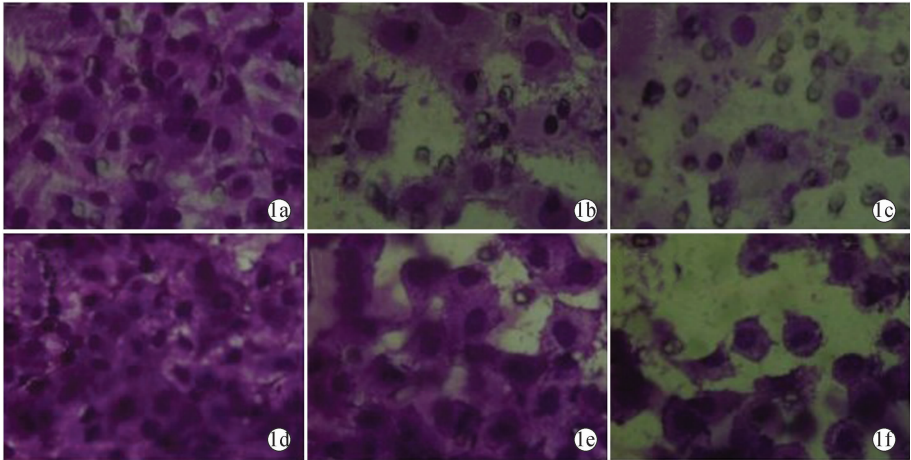
PMA 显著促进细胞侵袭与迁移,而 DMS 则明显抑制细胞侵袭与迁移,见图 1。Sphk1 激活组、抑制组的细胞相对侵袭率与迁移率分别是 197.65%与 165.56%、10.34%与 11.29%。Sphk1 激活剂组的侵袭率与迁移率均明显高于空白对照组,而 Sphk1 抑制剂组的侵袭率与迁移率显著低于对照组, $P<0.01$ 。

2.2 Sphk1 在 LoVo 细胞的表达及 Sphk1 的表达对 ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达的影响

PMA 可明显增加 Sphk1 的表达,而 DMS 可明显抑制 Sphk1 蛋白的表达。增强 Sphk1 的活性,ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达上调,相反,抑制 Sphk1 的活性,ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达下调,ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白的表达在 Sphk1 激活组、对照组、抑制组依次减弱,各组间差别均有统计学意义($P<0.01$),见图 2。

表 1 各引物序列
Table 1 The primer sequences

Names	Primer sequences	The length of products
MMP-2	Forward: 5'-CAA AAA CAA GAA GAC ATA CAT CTT-3'	232 bp
	Reverse: 5'-GCT TCC AAA CTT CAC GCT C- 3'	
MMP-9	Forward: 5'-CGC TAC CAC CTC GAA CTT TG -3'	198 bp
	Reverse: 5'-GCC ATT CAC GTC GTC CTT AT - 3'	
uPA	Forward: 5'-AAA ATG CTG TGT GCT GCT GAC C - 3'	87 bp
	Reverse: 5'-GCC TTG GAG GGA ACA GAC GA- 3'	
GAPDH	Forward: 5'-CAA GGT CAA TCC ATG ACA AGT TTG- 3'	498 bp
	Reverse: 5'-GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA G- 3'	



1a: the invasion cell in Sphk1 activator group; 1b: the invasion cell in control group; 1c: the invasion cell in Sphk1 inhibitor group; 1d: the migration cell in Sphk1 activator group; 1e: the migration cell in control group; 1f: the migration cell in Sphk1 inhibitor group

图 1 Sphk1 激活剂或抑制剂对 LoVo 细胞侵袭与迁移的影响 (HE×400)

Figure 1 The effects of Sphk1 activator or inhibitor on the LoVo cell invasiveness and migration (HE×400)

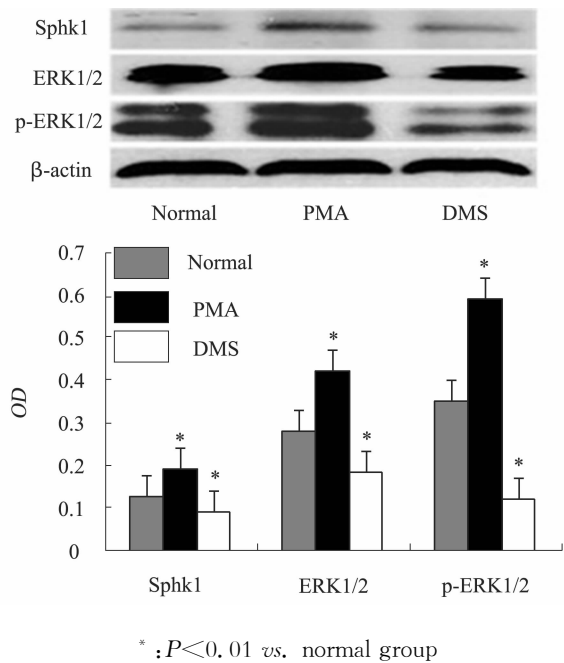


图2 Sphk1在LoVo细胞中的表达及Sphk1的表达对ERK1/2、p-ERK1/2蛋白表达的影响

Figure 2 The effect of Sphk1 on the expression of ERK1/2 and p-ERK1/2 protein

2.3 Sphk1 激活剂或抑制剂对细胞上清中 MMP-2、MMP-9 及 uPA 蛋白水平的影响

统计分析结果表明,与空白对照组比较,PMA可明显增高细胞培养上清中 MMP-2、MMP-9 及 uPA 的蛋白水平,而 DMA 则明显降低细胞培养上清中 MMP-2、MMP-9 及 uPA 的蛋白水平,见表 2。

2.4 Sphk1 激活剂或抑制剂对 MMP-2、MMP-9 及 uPA 的 mRNA 表达水平的影响

灰度分析结果表明,与空白对照组相比,PMA

表 2 细胞培养上清中 MMP-2、MMP-9 和 uPA 的蛋白水平

Table 2 The protein level of MMP-2, MMP-9 and uPA in the culture medium

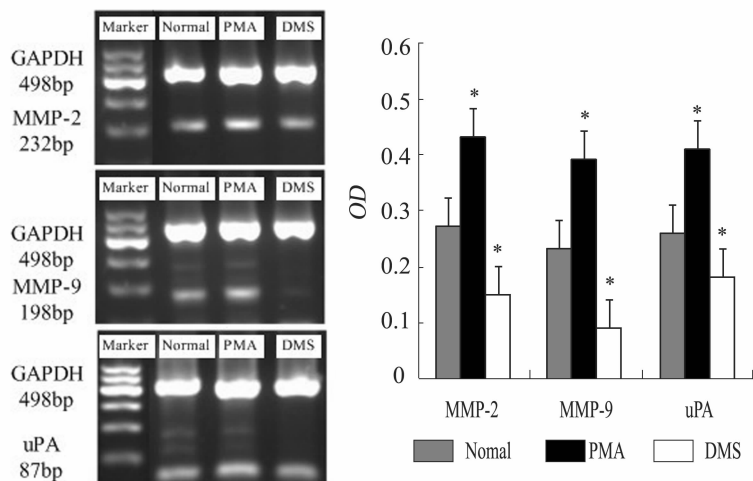
Groups	MMP-2	MMP-9	uPA
Control	4.62 ± 0.78	4.35 ± 0.24	2.71 ± 1.13
PMA	7.83 ± 0.78 ^a	8.53 ± 0.46 ^a	3.37 ± 0.57 ^a
DMS	1.58 ± 0.26 ^a	0.42 ± 0.25 ^a	2.31 ± 1.36 ^a

Note: ^a: $P < 0.01$ vs. control group

显著增强 LoVo 细胞中 MMP-2、MMP-9 及 uPA 的 mRNA 表达,DMS 则与之相反,见图 3。

3 讨论

Sphk1 在鞘脂类物质功能的发挥中起着重要的调节作用,目前已确认哺乳动物中 Sphk1 存在两种同工酶,即 Sphk1 与 Sphk2,Sphk1 能被诸多生长因子与细胞活素类因子激活从而发挥多种生物学作用。有学者^[2]报道 Sphk1 的表达与结肠肿瘤的发生发展及转移密切相关。本研究发现 Sphk1 激活剂能促进细胞侵袭与迁移,而 Sphk1 抑制剂则抑制细胞侵袭与迁移。初步证实 Sphk1 具有促进细胞侵袭与迁移的作用。在随后的研究当中,Sphk1 活性调节剂干预 LoVo 细胞后,Western blot 检测结果与对照组相比较发现,PMA 组的 Sphk1、ERK 与 p-ERK1/2 的蛋白表达量明显增多,DMS 组的 Sphk1、ERK 与 p-ERK1/2 的蛋白表达量则减少。p-ERK1/2 是由 ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinases) 的 Thr202 与 Tyr204 末端磷酸化而成的 ERK1/2 活化形式,促进细胞侵袭与运动是 p-ERK 1/2 的生物学作用之一^[3]。而且还有研究表



*: $P < 0.01$ vs. normal group

图3 MMP-2、MMP-9 及 uPA 的 mRNA 在不同 Sphk1 活性组的表达

Figure 3 The expressions of MMP2, MMP9 and uPA mRNA in different group

明^[4]在食管肿瘤细胞中 TGF- β 通过 Sphk1/S1P 通路激活 ERK1/2 从而促进细胞侵袭与迁移。所以, Sphk1 可能通过激活 ERK1/2 通路而促进 LoVo 细胞的侵袭与迁移。

肿瘤细胞侵袭与转移是影响肿瘤病患者死亡率的重要机制,在癌细胞侵袭与迁移的过程中,许多蛋白水解酶参与降解细胞外基质(extracellular matrix,ECM)、基膜等屏障^[5]。其中基质金属蛋白酶(matrix-metalloproteinase,MMPs)在细胞外基质的降解中起着重要的作用,而 ECM 的降解既是肿瘤侵袭早期的变化之一,也是肿瘤侵袭与细胞迁移中组织结构重建所必需的^[6]。MMPs 是一个能降解蛋白且高度同源性的锌依赖性肽链内切酶家族,能够降解Ⅳ型胶原蛋白以及其他细胞基质成分,现在已发现这个家族有 28 个成员,包括胶原酶、明胶酶、基质分解素与基质溶素等。MMPs 除了参与胚胎发育、血管形成以及伤口愈合等诸多正常生物过程,还参与一些病理过程,如降解 ECM、参与新血管形成^[7]从而有利于癌细胞的迁移。MMP-2(明胶酶-A)与 MMP-9(明胶酶-B)不仅能降解Ⅳ型胶原蛋白,而且二者在结构与催化方面具有相似性。MMP-2 与 MMP-9 蛋白在肿瘤中大量表达,并且在机体内肿瘤侵袭与转移中发挥着重要作用。本研究分别运用半定量 RT-PCR 及 ELISA 实验方法检测 LoVo 细胞中 MMP-2 与 MMP-9 的 mRNA 表达及蛋白分泌水平,结合侵袭与迁移实验结果发现 Sphk1 可通过诱导 MMP-2 与 MMP-9 表达促进 LoVo 细胞侵袭与迁移。同时,在本实验中我们还发现细胞侵袭力的增强伴随着尿型纤溶酶原激活物(Urokinase-Type Plasminogen Activator,uPA)表达的增高。这是因为 uPA 是一种能够将无活性的血浆酶原催化成有活性的血浆蛋白酶的丝氨酸蛋白酶,独立地或者通过活化的血浆酶降解 ECM、激活 MMPs、介导生长因子的释放以及刺激肿瘤细胞迁移^[6]。Miyake^[8]报道在动物模型实验中发现导致细胞缺氧的放射致敏剂 TX-1877 因抑制 MMP-9 与 uPA 表达导致肿瘤转移受到抑制。二次胆汁酸石胆酸可通过 ERK1/2 通路诱导 uPA 受体表达,增强人结肠癌细胞侵袭力^[9]。最近研究表明^[10]在结肠

癌 HT29 细胞中异硫氰酸苄酯通过 MAPK 信号通路抑制 MMP-2、MMP-9 及 uPA 表达,从而达到抑制肿瘤侵袭与迁移的目的。综上所述,Sphk1 通过调控 ERK1/2 信号通路促进人结肠癌 LoVo 细胞的侵袭与迁移,可能与促进 MMP-2、MMP-9 及 uPA 的 mRNA 表达与蛋白分泌有关。

参考文献:

- [1] Ogretmen B, Hannun Y A. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment[J]. Nat Rev Cancer,2004, 4(8):604-616.
- [2] Kawamori T, Kaneshiro T, Okumura M, et al. Role for sphingosine kinase 1 in colon carcinogenesis[J]. FASEB J, 2009,23 (2):405-414.
- [3] Joslin EJ, Opresko LK, Wells A, et al. EGF-receptor-mediated mammary epithelial cell migration is driven by sustained ERK signaling from autocrine stimulation [J]. J Cell Sci, 2007,120(Pt 20):3688-3699.
- [4] Miller AV, Alvarez SE, Spiegel S,et al. Sphingosine kinases and sphingosine-1-phosphate are critical for transforming growth factor beta-induced extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 activation and promotion of migration and invasion of esophageal cancer cells[J]. Mol Cell Biol, 2008,28 (12):4142-4151.
- [5] Pasco S, Brassart B, Ramont L, et al. Control of melanoma cell invasion by type IV collagen[J]. Cancer Detect Prev, 2005,29(3): 260-266.
- [6] Livant DL. Targeting invasion induction as a therapeutic strategy for the treatment of cancer[J]. Curr Cancer Drug Targets,2005,5(7):489-503.
- [7] Ali M A, Schulz R. Activation of MMP-2 as a key event in oxidative stress injury to the heart[J]. Front Biosci,2009,14: 699-716.
- [8] Miyake K , Shimada M , Nishioka M, et al. Downregulation of matrix metalloprotease-9 and urokinase plasminogen activator by TX-1877 results in decreased tumor growth and metastasis on xenograft model of rectal cancer[J]. Cancer Chemother Pharmacol,2009,64(5):885-892.
- [9] Baek MK, Park JS, Park JH, et al. Lithocholic acid upregulates uPAR and cell invasiveness via MAPK and AP-1 signaling in colon cancer cells[J]. Cancer Lett,2010,290(1):123-128.
- [10] Lai KC, Huang AC, Hsu SC, et al. Benzyl isothiocyanate (BITC) inhibits migration and invasion of human colon cancer HT29 cells by inhibiting matrix metalloproteinase-2/-9 and urokinase plasminogen (uPA) through PKC and MAPK signaling pathway[J]. J Agric Food Chem,2010,58(5):2935-2942.

[编辑:黄国玲;校对:安 凤]