

· 论 著 ·

抑制 Raf-MEK-ERK 信号传导途径上调食管癌细胞株 EC9706 柯萨奇-腺病毒受体的表达

刘霞,冯婷,赵继敏,李沛,黄幼田,杨洪艳,赵明耀,董子明[△]

(郑州大学基础医学院病理生理教研室,河南郑州 450052)

摘要:目的 研究 Raf-MEK-ERK 信号传导途径对食管癌 EC9706 细胞柯萨奇-腺病毒受体(CAR)表达的影响。方法 用 ERK 抑制剂 PD98059 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 作用 EC9706 细胞 24 h,利用免疫荧光和 RT-PCR、Western-blot 检测各种浓度处理前、后 CAR 表达水平的变化。结果 与对照组比较,10 $\mu\text{mol/L}$ PD98059 组 CAR 表达水平差异无统计学意义;20、40 $\mu\text{mol/L}$ PD98059 处理组 CAR 表达水平显著提高($P < 0.05$),且呈浓度依赖性。结论 用一定浓度的抑制剂抑制 Raf-MEK-ERK 信号传导途径可上调食管癌 EC9706 细胞膜表面 CAR 的表达。

关键词:食管癌细胞;柯萨奇-腺病毒受体;Raf-MEK-ERK;信号传导途径

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.19.009

中图分类号:R735.1;R730.54

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)19-2567-03

Inhibition of Raf-MEK-ERK pathways up-regulated expression of coxsackievirus-adenovirus receptor in human EC9706 esophageal cancer cells

LIU Xia, FENG Ting, ZHAO Ji-min, et al.

(Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China)

Abstract: Objective To study Raf-MEK-ERK signal transduction pathway of esophageal carcinoma cell EC9706 Coxsackie-adenovirus receptor (CAR) in rats. **Methods** ERK inhibitor PD98059 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$ role in EC9706 cells, 24 hours, using immunofluorescence and RT-PCR, Western-blot detection of each group before and after the treatment group the changes in expression level of CAR. **Results** Compared with control group, 10 $\mu\text{mol/L}$ inhibitor PD98059 group had no significant difference in the level of CAR expression; 20, 40 $\mu\text{mol/L}$ PD98059 group, CAR expression significantly increased ($P < 0.05$), and the dose-dependent manner. **Conclusion** Inhibition of a certain concentration of Raf-MEK-ERK signal transduction pathway may increase esophageal cancer EC9706 cell surface CAR expression.

Key words: esophageal cancer cells; Coxsackie-adenovirus receptor; Raf-MEK-ERK; signal transduction pathway

众多生物分子能引起正常细胞恶变,参与肿瘤细胞的浸润、转移、抗凋亡等重要的生物学过程。理解这些分子的作用及相互影响有助于提高肿瘤的诊断率和治疗率。柯萨奇-腺病毒受体(coxsackie and adenovirus receptor, CAR)因为腺病毒载体基因治疗的兴起而备受重视。研究表明,CAR 不仅具有同种抗原黏附、白细胞游出、蛋白转运、细胞的生长调节等生理功能,而且在肿瘤发生和侵袭转移过程中也扮演着很重要的角色^[1]。近年来研究表明,腺病毒作为溶瘤病毒或基因治疗的载体用于恶性肿瘤的治疗,其临床疗效在很大程度上受 CAR 的影响,上调 CAR 可以增强治疗效果。然而,肿瘤细胞中的 CAR 常常呈现低表达或者缺失,因此,人们尝试用各种方法提高肿瘤细胞表面 CAR 表达。Rauen 等^[2]研究表明细胞 E-cadherin 的表达情况与 RAS 激活细胞外信号调节激酶(ERK1/2) MAPK 通路激活状态有关,而在临床肿瘤组织中 CAR 的表达模式又与 E-cadherin 的表达相似。在本研究中,作者用一定浓度的抑制剂抑制 Raf-MEK-ERK 信号传导途径,观察食管癌 EC9706 细胞膜表面 CAR 的表达。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂 人食管癌细胞 EC9706 由郑州大学病理生理教研室提供,RPMI-1640 培养基购自美国 HyClone 公司,胎

牛血清购于杭州赛乐生物科技有限公司,胰蛋白酶购于美国 Hykelone 公司,RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司,总 RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司,琼脂糖购自 BIO BASIC 公司,兔抗人 CAR 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,p44/42(137F5) ERK(1/2)兔抗人单抗购自美国,Cell Signaling Technology 公司,FITC 标记的羊抗兔 IgG(H+L)购自北京鼎国生物公司。

1.2 细胞培养及分组 将食管癌 EC9706 细胞置于 RPMI-1640 培养液(含 10% 胎牛血清,青霉素 100 u/mL,链霉素 100 u/mL)中 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱内贴壁培养,2~3 d 传代一次,取对数生长期的细胞进行实验。待细胞汇合至 80% 时,更换新鲜培养基并分组。实验组分为 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 单纯 ERK 抑制剂 PD98059 处理组,对照组为等体积的 RPMI-1640 培养基,作用 24 h 收集细胞。

1.3 免疫荧光检测 EC9706 细胞 CAR 表达 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered sodium,PBS)清洗长有细胞的盖玻片 3 次,轻轻吸去残余液体;室温用 40 g/L 多聚甲醛(溶于 0.01 mol/L PBS,pH 为 7.2~7.4)固定细胞 30 min,PBS 冲洗细胞 3 次,每次 5 min;用含 50 g/L 牛血清清蛋白(bovine serum albumin,BSA)的封闭液封闭非特异性结合位点,室温静置 30

[△] 通讯作者, Email: Dongzm@zzu.edu.cn.

min;用含 50 g/L BSA 的 PBS 稀释一抗,吸净盖玻片的液体,勿洗,将稀释后的一抗滴加至盖玻片上,湿盒中静置,4 ℃ 过夜,PBS 代替一抗作阴性对照。PBS 冲洗细胞 3 次,每次 5 min;用含 50 g/L BSA 的 PBS 稀释 FITC 标记的二抗,滴加二抗稀释液至玻片上,室温避光孵育 1 h,荧光下显微镜观察。以胞膜上出现绿色荧光颗粒为阳性细胞,应用 Biosens Digital Imaging System 灰度扫描分析其阳性面积百分比及阳性区平均灰度,检测 CAR 的表达水平。

1.4 RT-PCR 检测 EC9706 细胞 CAR mRNA 的表达 严格参照 Trizol 试剂盒说明书从分组并处理好的 EC9706 细胞中提取总 RNA。以随机六合引物 1 μL 做逆转录引物,2 μL RNA 在 AMV 的作用下合成 cDNA 第一链,以逆转录产物 3 μL 做 PCR 模板进行检测。检测 PCR 表达的上游引物为 TTC AGG TGC GAG ATG TTA,下游引物为 GAA TGA TTA CTG CCG ATG。PCR 反应条件:95 ℃、30 s,54 ℃、30 s,74 ℃、1 min,30 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物各 2 μL 在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳。凝胶成像仪扫描分析电泳结果,检测 CAR mRNA 的表达水平。

1.5 Western blot 检测 EC9706 细胞 CAR、ERK、p-ERK(1/2) 的表达 参照《分子克隆实验指南》提取 EC9706 细胞总蛋白,测定浓度后,在标准蛋白曲线下算出 50 μg 蛋白上样量,以 β-actin 为内参照,Western blot 检测 EC9706 细胞表面 CAR、ERK、p-ERK(1/2) 的表达。50 μg 上样量蛋白分别用 8%、12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行垂直电泳分离后,“三明治法”转移至 PVDF 膜上,用含 50 g/L BSA 摇床封闭 3 h,加入 1:1 000 p44/42(137F5) MAP Kinase 兔抗人一抗,4 ℃ 过夜。用 TBST 洗涤 3 次后加入 1:5 000 稀释的二抗孵育 1 h 后,再用化学发光法进行 X 线胶片曝光显影,在完成对 ERK 的化学发光检测后将该膜在蒸馏水中漂洗 5 min,加入适量的 Western 一抗、二抗去除液,漂洗 5 min 后加入 1:1 000 稀释的 p44/42(137F5) ERK(1/2) 兔抗人单抗,4 ℃ 孵育过夜,用 TBST 洗涤 3 次后加入 1:5 000 稀释的二抗孵育 1 h 后,再用化学发光法进行 X 线胶片曝光显影进行 p-ERK(1/2) 检测,用同样方法将一抗换成兔抗人 CAR 单克隆抗体进行 CAR 检测,用 Gel-Doc 图像分析软件检测各条带的灰度值,将不同浓度处理组的灰度值与对照组灰度值进行比较分析。每组至少重复 3 次。

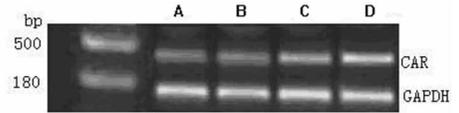
1.6 统计学方法 多样本均数采用单因素方差分析,SPSS10.0 统计软件处理。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫荧光检测不同浓度处理组 EC9706 细胞 CAR 的表达 封 2 图 1 显示,与对照组比较,10 μmol/L PD98059 组与对照组绿色荧光颗粒 CAR 蛋白的表达差异无统计学意义;而 20、40 μmol/L PD98059 组绿色荧光颗粒 CAR 蛋白的表达明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),随着抑制剂浓度的增加,绿色荧光颗粒 CAR 蛋白的表达明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),并且随着抑制剂浓度的增加 CAR 蛋白的表达明显上调。

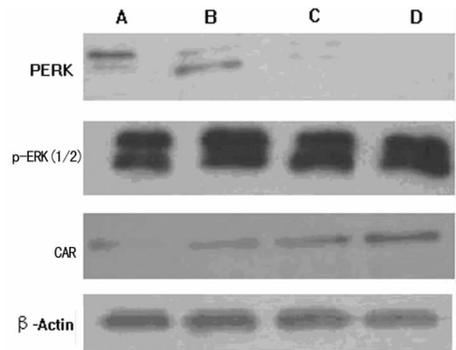
2.2 RT-PCR 检测不同浓度处理组 EC9706 细胞 CAR mRNA 的表达 图 2 显示,与对照组比较,10 μmol/L PD98059 组 CAR mRNA 的表达差异无统计学意义,而 20、40 μmol/L PD98059 组表达明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),且随着抑制剂浓度的增加 CAR mRNA 的表达明显上调。

2.3 抑制 ERK(1/2) 的磷酸化引起 EC9706 细胞 CAR 蛋白表达上调 图 3 显示,与对照组比较,Western-blot 检测 10 μmol/L PD98059 组 EC9706 细胞 p-ERK(1/2) 和 CAR 蛋白的表达差异无统计学意义,但 20、40 μmol/L PD98059 组 EC9706 细胞 p-ERK(1/2) 表达明显下降,而 CAR 蛋白的表达显著提高,且随着抑制剂浓度的增加 EC9706 细胞 p-ERK(1/2) 的表达越发下降,而 CAR 蛋白的表达提高更加显著($P < 0.05$)。



A:对照组; B:10 μmol/L PD98059 组; C:20 μmol/L PD98059 组; D:40 μmol/L PD98059 组。

图 2 RT-PCR 检测 PD98059 作用于 EC9706 细胞后 CAR 的表达



A:对照组; B:10 μmol/L PD98059 组; C:20 μmol/L PD98059 组; D:40 μmol/L PD98059 组。

图 3 Western-blot 检测 PD98059 作用于 EC9706 细胞后 p-ERK(1/2) 和 CAR 的表达

3 讨论

随着基因治疗理论和技术的发展,腺病毒作为溶瘤病毒或基因治疗的载体已被广泛用于恶性肿瘤的治疗。复制选择性腺病毒(replication-selective adenoviruses) 以其独特的优势成为肿瘤病毒治疗研究最为广泛的病毒之一。它是通过遗传工程改造使其能通过特异性在肿瘤细胞中复制、裂解肿瘤细胞,而对正常的细胞无杀伤力的溶瘤病毒。作为基因导入载体最常用的是 Ad2 和 Ad5,而 CAR 是 Ad5 和 Ad2 的受体^[3],它在不同组织来源肿瘤细胞中的表达水平很不相同,甚至在同一组织来源的肿瘤细胞中的表达也差异极大。尽管 CAR 真正的生物学功能还不十分清楚,但有关 CAR 表达的调节在以 Ad 载体为基础的基因治疗应用却非常广泛。基因治疗是通过替代有功能缺陷的关键基因或矫正缺陷基因,从而改变细胞的恶性表型以达到治疗疾病的目的,重组 Ad 载体具有转染效率高,携带外源基因容量大等优点,但许多研究表明腺病毒载体的感染效率受到靶细胞表面 CAR 蛋白表达水平的限制^[4-8]。若细胞 CAR 的表达水平低于一定阈值时,腺病毒的转染能力就会受到影响,导致腺病毒基因治疗效果下降甚至无效。为解决这些缺陷,通过各种方法增强肿瘤细胞表面 CAR 的表达成为增加腺病毒感染效率的重要手段^[9-12],找到有效调节 CAR 的方法,就可解决基因治疗过程中某些肿瘤组织 Ad 转导效率低下的难题。近年研究表明 CAR 表达的缺失至少部分是通过癌基

因信号传导途径^[13-15], 蛋白 E-cadherin 和 ZO-1 的表达缺失可以通过抑制 Ras 激活 ERK 信号转导通路引起表达上调, 而同样作为细胞黏附分子的 CAR 是否也能通过该通路的改变引起表达的上调呢? 已报道 Raf-MEK-ERK 信号传导途径与许多病毒感染有关, 病毒感染靶细胞可激活该信号传导途径; Raf-MEK-ERK 信号传导途径活化后又可进一步促进病毒的复制增殖, 调节细胞的增殖、分化和存活。作为多种生长因子(EGF、NGF、PDGF 等)的下游蛋白, ERK 信号途径在肿瘤侵袭和转移过程中起中介和放大信号的作用, 一方面接受大量来自生长因子、丝裂原、环境刺激等的信号, 另一方面通过 ERK 信号级联反应作用于核转录因子如 AP-1、NF- κ B 等, 调控基因表达。许多受体 Tyr 蛋白激酶及与 G 蛋白耦联的细胞因子受体都可激活胞内 Ser-Thr 蛋白激酶, 即 MAPKs(mitogen-activated Protein kinases), 而 CAR 胞内域也存在 Tyr 磷酸化位点。因此, 本文尝试通过抑制 Raf-MEK-ERK 信号传导途径来上调食管癌 EC9706 细胞 CAR 表达。总之, 食管癌 EC9706 细胞表面 CAR 的表达可通过抑制 Raf-MEK-ERK 信号传导途径而上调, 但具体抑制剂的浓度和抑制效果与细胞类型有关

参考文献:

- [1] Bruning A, Runnebaum IB. The coxsackie adenovirus receptor inhibits cancer cell migration[J]. *Exp cell Res*, 2004, 298(2):624.
- [2] Rauen KA, Sudilovsky D, Le JL, et al. Expression of the coxsackie adenovirus receptor in normal prostate and in primary and metastatic prostate carcinoma; potential relevance to genetherapy[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(13):133812.
- [3] Douglas JJ, Kim, Sumerel LA, et al. Efficient oncolysis by a replicating adenovirus(ad) in vivo is critically dependent on tumor expression of primary adreceptors[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(3):813.
- [4] 范良生, 陈刚, 马丁. 柯萨奇-腺病毒受体在肿瘤发生发展机制中的研究进展[J]. *癌症*, 2009, 28(3):333.
- [5] Manabu Y, Asami I, Kenji K, et al. Expression of coxsackie and adenovirus receptor reduces the lung metastatic potential of murine tumor cells[J]. *Int J Cancer*, 2007, 121:1690.

- [6] Glasgow JN, Bauerschmitz GJ, Curiel DT, et al. Transductional and transcriptional targeting of adenovirus for clinical applications[J]. *Curr Gene Ther*, 2004, 4(1):1.
- [7] Okegawa T, Nutahara K, Pong RC, et al. Enhanced transgene expression in urothelial cancer gene therapy with histone deacetylase inhibitor[J]. *J Urol*, 2005, 174(2):747.
- [8] Watanabe T, Hioki M, Fujiwara T, et al. Histone deacetylase inhibitor FR901228 enhances the antitumor effect of telomerase specific replication selective adenoviral agent OBP2301 in human lung cancer cells[J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(3):256.
- [9] Krom YD, Gras JC, Frants RR, et al. Efficient targeting of adenoviral vectors to integrin positive vascular cells utilizing a CAR cyclicRGD linker protein[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 338(2):847.
- [10] 吴赞, 郑辉, 陈宏新, 等. CAR 的表达调节对肝癌基因治疗中腺病毒载体感染效率的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 24(3):205.
- [11] 王仕忠, 王勇, 关乃富, 等. 肺癌细胞表面 CAR 表达水平与腺病毒转基因治疗的可能性研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2008, 17(6):947.
- [12] Krasnykh V, Dmitriev I, Navarro JG, et al. Advanced generation adenoviral vectors possess augmented gene transfer efficiency based upon coxsackie adenovirus receptor independent cellular entry capacity[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(4):578.
- [13] Hemminki A, Kanerva A, Liu B, et al. Modulation of Cox-sackie-Adenovirus receptor expression for increased adenoviral transgene expression[J]. *Cancer Res*, 2003, 63:847.
- [14] Anders M, Christian C, McMahon M, et al. Inhibition of the Raf/MEK/ERK pathway up-regulates expression of the coxsackievirus and Adenovirus receptor in cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2003, 63:2088.
- [15] Wilcox ME, Yang WQ, Senger D, et al. Reovirus as an oncolytic agent against experimental human malignant gliomas[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93(12):903.

(收稿日期:2010-02-29 修回日期:2010-03-05)

(上接第 2566 页)

- [11] Millett PJ, Huffard BH, Horan MP, et al. Outcomes of full-thickness articular cartilage injuries of the shoulder treated with microfracture[J]. *Arthroscopy*, 2009, 25(8):856.
- [12] Frank RM, Van Thiel GS, Slabaugh MA, et al. Clinical outcomes after microfracture of the glenohumeral joint

[J]. *Am J Sports Med*, 2010, 21:126.

- [13] Asik M, Ciftci F, Sen C, et al. The microfracture technique for the treatment of full-thickness articular cartilage lesions of the knee; midterm results[J]. *Arthroscopy*, 2008, 24(11):1214.

(收稿日期:2010-03-18 修回日期:2010-05-09)