

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.33.010

AAV-HGFK1 抑制 EGFR 磷酸化拮抗大肠癌细胞生长

邓飞鸿, 聂 颺[△], 左俊华, 柳雪花, 陈金敏
(南方医科大学南方医院消化科, 广州 510515)

摘要:目的 研究腺相关病毒-肝细胞生长因子 K1(AAV-HGFK1)对 KRAS、BRAF 野生型和突变型大肠癌细胞株的生长影响。方法 选择人源的细胞株 KRAS 和 BRAF 野生的 SW48, KRAS 突变的 Lovo, KRAS 突变且不表达表皮生长因子受体(EGFR)的 SW620, BRAF 突变的 HT29, 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)测定 EGFR 基因转录水平, 分别用 5×10^4 vg/细胞的腺相关病毒(AAV)感染以上细胞株, 荧光显微镜和流式细胞仪测定 AAV-EGFP 感染率。加入或不加表皮生长因子(EGF)的情况下, 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 EGFR、磷酸化 EGFR(p-EGFR)和 β -actin, 四甲基偶氮唑盐比色(MTT)法测细胞增殖。结果 Lovo 和 HT29 高表达 EGFR, 而 SW48 表达 EGFR 较低, 加入 EGF 促进了以上 3 种细胞的 EGFR 磷酸化, AAV-HGFK1 抑制 EGFR 磷酸化, 从而显著降低其增殖。EGF 对 SW620 增殖无显著影响, 但 AAV-HGFK1 感染抑制了胎牛血清培养的 SW620 细胞。结论 AAV-HGFK1 可能直接作用于 EGFR, 抑制其磷酸化从而阻断 EGF 促进细胞增殖, 并可能通过其他通路对 KRAS 或 BRAF 基因野生或突变的大肠癌细胞都有抑制作用。

关键词:受体, 表皮生长因子; 大肠肿瘤; 肝细胞生长因子 K1; 腺相关病毒

中图分类号: R574.62 文献标识码: A 文章编号: 1671-8348(2014)33-4447-03

AAV-HGFK1 inhibits proliferation of colorectal cancer cells by down-regulating the phosphorylation of EGFR

Deng Feihong, Nie Biao[△], Zuo Junhua, Liu Xuehua, Chen Jinmin
(Department of Gastroenterology, the Affiliated Nanfang Hospital of
Nanfang Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

Abstract: Objective To study the effect of adeno associated virus hepatocyte growth factor K1(AAV-HGFK1) on the proliferation of 4 different colorectal cell lines with or without KRAS or BRAF mutation. **Methods** The levels of epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA were determined in SW48 without KRAS or BRAF mutation, Lovo with KRAS mutation, SW620 with KRAS mutation, HT29 with BRAF mutation by quantitative real time PCR, respectively. After the infection of AAV-HGFK1, the expressions of EGFR, p-EGFR and β -actin were detected by Western blot and the proliferation of the cells were assayed using MTT. **Results** Lovo, SW48 and HT29 expressed EGFR protein while SW620 did not. EGF promoted the proliferation of Lovo, SW48 and HT29 cells. AAV-HGFK1 down-regulated the phosphorylation of EGFR and significantly inhibited their proliferation. But EGF had no effect on proliferation of SW620 stimulated by EGF. **Conclusion** AAV-HGFK1 exhibited its antitumor effects through EGF/EGFR signaling irrespective of the KRAS or BRAF mutation and may also act through other signaling pathways.

Key words: receptor, epidermal growth factor receptor; colorectal neoplasms; hepatocyte growth factor K1; adeno associated virus

大肠癌发病率是肿瘤中的第 2 位, 而且逐年升高, 占新发病数的 9.4%^[1]。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)单克隆抗体包括西妥昔单抗和帕尼单抗。其中, 西妥昔单抗是一种人-鼠嵌合型 IgG 单克隆抗体, 而帕尼单抗是一种完全人源化的 IgG 单抗。最初认为 EGFR 单抗与 EGFR 的细胞外区结合, 从而阻断表皮细胞生长因子(EGF)等配体的结合, 抑制其下游信号的传导。所以, 仅被用于 EGFR 表达阳性的患者; 但随后研究发现, EGFR 表达阳性与 EGFR 单抗的疗效没有显著相关性, EGFR 表达水平并不能作为 EGFR 单抗疗效的预测指标^[2-3]。目前, 美国国立综合癌症网络(NCCN)推荐在使用抗 EGFR 单克隆抗体进行治疗之前, 先对患者进行 KRAS 和 BRAF 基因突变检测; 对于存在 KRAS 和 BRAF 突变的患者, 不推荐使用抗 EGFR 单克隆抗体进行治疗。笔者前期发现, 相关病毒-肝细胞生长因子 K1(AAV-HGFK1)主要通过抑制磷酸化 EGFR(p-EGFR)降低大肠癌细胞增殖, 选择人源的 KRAS 和 BRAF 野生的细胞株 SW48, KRAS 突变的细胞株 Lovo, BRAF 突变的细胞株 HT29, 用腺

相关病毒(adeno-associated virus, AAV)携带 HGFK1 构建的基因治疗药物实验对大肠癌细胞的作用^[4-5]。在大肠癌细胞中肝细胞生长因子受体(hepatocyte growth factor receptor, HGFR)高表达, HGFR 是原癌基因 *c-met* 编码的蛋白。HGF 是由链和链连接形成的, 链有一个 N 末端发卡结构和 4 个螺旋结构功能区^[6]。体内天然存在的突变体 NK1-4 与 HGFR 结合但不使 HGFR 磷酸化, 成为天然的 HGF 拮抗剂, 具有抑制肿瘤血管生成的潜在治疗作用, 因为 HGF 参与肿瘤新生血管生成^[7-9]。笔者前期发现, AAV-HGFK1 主要通过抑制 EGFR 磷酸化降低大肠癌细胞增殖^[5], 本研究选择人源的 KRAS 和 BRAF 野生的细胞株 SW48, KRAS 突变的细胞株 Lovo, BRAF 突变的细胞株 HT29, 用 AAV 携带 HGFK1 构建的基因治疗药物实验研究其对大肠癌细胞的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、G418、台盼蓝购自 Sigma 公司, 羊抗人 HGFK1 多克隆抗体由香港大学制备, 人结肠癌细胞 Lovo、SW48、HT29 和 SW620 购自 ATCC

公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI1640 培养基 (含 4.5 g/L 葡萄糖), 置于 37 ℃、5% CO₂ 恒温箱中培养。取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 RNA 提取和实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 六孔板中接种 5×10⁵ 个/孔, 培养 12 h。总 RNAs 用商品化试剂盒根据说明书提取 (Trizol, Gibco BRL, USA)。10 mg 总 RNA 用 SuperScript™ III (Synthesis Kit, Invitrogen, USA) 逆转录为 cDNA, cDNA 模板用人的 EGFR 特异性引物 PCR 扩增。EGFR 引物: 正向, 5'-AAT GTG AGC AGA GGC AGG GA-3'; 反向, 5'-GGC TTG GTT TGG AGC TTC TC-3'。

1.2.3 病毒制备 质粒 pAAV-CAG-sec-EGFP 和 pAAV-CAG-sec-HGFK1 是通过插入 EGFP 和人类 HGFK1 cDNA 到多克隆位点 AAV 血清型 2 载体获得, 重组 AAV 颗粒通过无辅助病毒的系统生产。

1.2.4 AAV-EGFP 对体外培养细胞的转染 常规培养细胞, 24 孔板 1×10⁵/孔种植细胞, 培养 12 h, 设阴性对照组, 弃去培养基, PBS 洗 2 次后, 病毒和无血清培养液混匀液加入 24 孔板的细胞中, 37 ℃ 孵育 2 h, 弃去培养基, 更换新鲜的培养基, 5% CO₂、37 ℃ 培养 4 d 和 7 d, 在荧光显微镜下观察 AAV 和 Adv 感染的细胞是否表达荧光蛋白。

1.2.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 杂交 六孔板中种植 2×10⁵ 个/孔, 培养过夜, 细胞黏附后用 AAV-EGFP 或 AAV-HGFK1 (MOI=5×10⁴ vg/细胞) 0.2% FBS 的培养基孵育 48 h 用不同浓度的 EGF 同时加入培养液中继续培养 24 h。然后, 刮取细胞, 提取总蛋白为 Western blot 检测备用。对于 Western blot, 标本先用 pH 7.9 含有 10.0 mmol/L HEPES、10.0 mmol/L KCl、1.5 mmol/L MgCl₂、0.5 mmol/L DTT、0.5 mmol/L PMSF、10.0 μg/mL 抑肽酶和 10.0 μg/mL 亮肽酶缓冲液处理。总蛋白用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 电泳, 转移到硝酸纤维素膜上, 经过封闭后, 膜分别用一抗和二抗室温孵育 1 h, 一抗为抗 EGFR、p-EGFR 和 β-actin (Santa Cruz Biotechnology, CA)。用 ECL 试剂盒检测发光信号 (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Buckinghamshire, UK)。

1.2.6 细胞增殖抑制实验 四甲基偶氮唑盐比色 (MTT) 法测定细胞增殖, 96 孔板中每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/mL) 20 μL 反应后用 Meter Tech 960 型酶标仪 570 nm 波长下测吸光度值)。同时, 用不同数量的以上种类细胞接种到 96 孔板中, 用于建立标准曲线, 用于计算细胞增殖率。同一个组设 6 个复孔, 设对照孔 (RPMI 1640 培养基) 和空白孔 (无细胞), 每个实验至少重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析。AAV-EGFP 或 AAV-HGFK1 各组间比较采用 *t* 检验, 不同浓度 EGF 加入细胞增殖实验采用双因素方差分析, 多组间比较采用 SNK 法, 以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 AAV-EGFP 感染后 EGFP 阳性率 5×10⁴ vg/细胞的 AAV-EGFP 感染 Lovo、HT29、SW48、SW620 后培养 4 d 和 7 d 后, 分别消化细胞制成细胞悬液, 用流式细胞检测 EGFP 绿色荧光阳性细胞数, 感染 7 d 后阳性率均大于 90%, 见图 1。

2.2 Lovo、HT29、SW48 细胞中 EGFR 的表达情况 采用

RT-PCR 检测 EGFR mRNA 在 Lovo 和 HT29 细胞中转录水平较高, 而 SW48 中的转录较低, SW620 未检测到 (图 2)。Western blot 显示 HT29 为 45.3 倍 Lovo 为 21.5 倍 SW48 为 1.0 倍, SW620 未检测到, 见图 3。

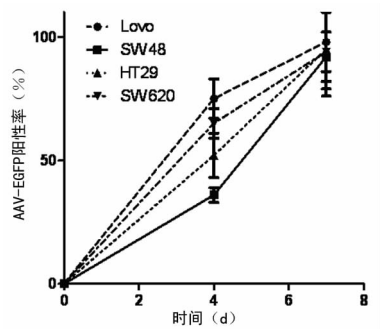


图 1 AAV-EGFP 感染 Lovo、HT29、SW48、SW620 后时间-EGFP 阳性率曲线

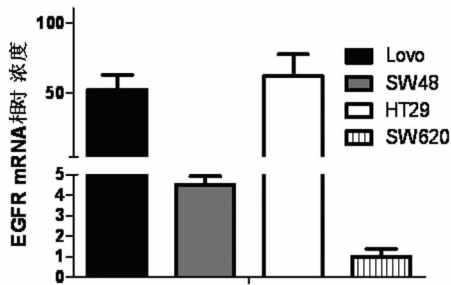


图 2 RT-PCR 检测 Lovo、HT29、SW48、SW620 中 EGFR mRNA 的表达

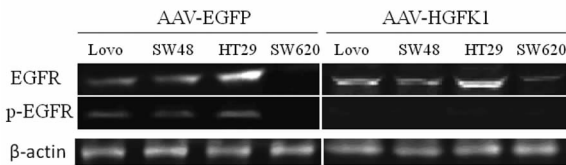
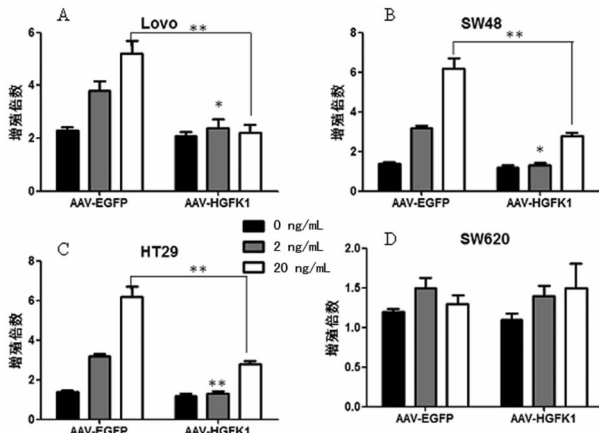


图 3 AAV-EGFP 和 AAV-HGFK1 感染 Lovo、HT29、SW48、SW620 后 Western blot 检测 EGFR、p-EGFR 蛋白的表达



A: Lovo; B: HT29; C: SW48; D: SW620。*: *P*<0.05, **: *P*<0.01。

图 4 感染后 MTT 检测 4 种细胞在含有 EGF 的无血清培养基中的生长情况

2.3 AAV-HGFK 抑制 EGFR 磷酸化 常规培养的细胞至

对数生长期进行病毒感染,7 d 后提取总蛋白,Western blot 检测 EGFR 和 p-EGFR,发现 AAV-HGFK1 感染的 Lovo、HT29、SW48 细胞 p-EGFR 显著低于 AAV-EGFP 感染的对照,提示 AAV-HGFK1 显著抑制了 EGFR 磷酸化,表明 HGFK1 是 EGFR 磷酸化的抑制剂,见图 3。

2.4 AAV-HGFK1 显著抑制了大肠癌细胞增殖 常规培养的细胞至对数生长期进行病毒感染 7 d 后,胰酶消化细胞,将细胞悬液 1×10^3 个/孔分别接种 96 孔板,培养过夜贴壁作为 0 小时的时间点,大肠癌细胞株分别用每孔 100 μ L 无 FBS 的 PRIM1640 加入或不加 EGF 培养 72 h。2、20 ng/mL 的 EGF 显著刺激了无血清培养液中 Lovo、HT29、SW48 细胞的增殖,SW620 的增殖无显著作用,AAV-HGFK1 感染显著抑制了 EGF 刺激细胞生长的作用,抑制率都超过 60%。为检测 HGFK1 是否可能通过抑制其他生长因子的作用抑制 SW620 的增殖,SW620 在 0.3%和 0.6%FBS 中培养,AAV-HGFK1 感染对增殖速度有显著抑制作用,抑制率为 22%和 26%,见图 4、5。

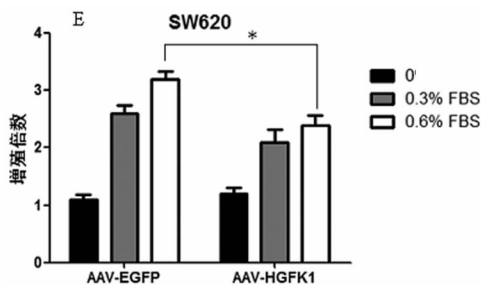


图 5 感染 SW620 后 MTT 检测基在含有 FBS 培养基中的生长情况

3 讨 论

HGFK1 是 HGF 第一个 Kringle 环状结构域的基因表达产物,是由 79 个氨基酸构成的球形结构,位于 HGF 的第 128~206 位氨基酸,相对分子质量 11×10^5 ^[10]。自 Xin 等^[11]发现 HGFK1 具有抑制成纤维细胞生长因子对牛动脉内皮细胞的增殖作用后,HGFK1 作为一个新的抗肿瘤因子开始成为研究的焦点。

本实验通过对 4 种结肠癌细胞系(Lovo、HT29、SW48、SW620)分别应用 RT-PCR、Western blot 方法进行检测,发现在 Lovo、HT29、SW48 3 种细胞中可以检测到 EGFR 表达,在 SW620 细胞中未检测到。AAV-HGFK1 感染 Lovo、HT29、SW48 细胞 p-EGFR 显著低于其对照组。MTT 实验证明,HGFK1 可以抑制 EGF 介导的促进 Lovo、HT29、SW48 肿瘤细胞生长作用,说明 HGFK1 可以通过 EGFR 信号通路抑制肿瘤细胞生长。SW620 中虽然未检测到 EGFR 的表达,但是在含 0.3%和 0.6%FBS 中培养,AAV-HGFK1 感染对其增殖速度有显著抑制作用,说明 HGFK1 可以通过其他通路抑制肿瘤细胞生长。

已有研究表明,EGFR 信号通路在肿瘤发生、发展中起重要作用,EGFR 主要有 Ras/Raf/MEK/ERK 和 P13K/PDK1/Akt 两条信号通路^[12]。以往研究发现,KRAS 基因突变的患者对 EGFR 单抗治疗无效。而近年来也有研究发现,约 40% KRAS 基因野生型患者有耐药现象。究其原因可能是与 EGFR 表达异常及 EGFR 通路中的其他基因如 BRAF 突变等因素相关,结果导致 EGFR 下游的分子信号通路异常活化^[13]。本研究通过体外实验表明,HGFK1 对表达 EGFR 同时伴或不

伴 KRAS 和 BRAF 突变的大肠癌细胞及不表达 EGFR 的大肠癌细胞有生长抑制作用,是一种肿瘤抑制因子,可能作为大肠癌治疗的新药物。这种关系的发现,为今后深入研究 HGFK1 治疗大肠癌提供实验依据。Shen 等^[14]研究发现,在肝癌细胞及微血管内皮细胞中,HGFK1 抗肿瘤细胞及抗血管形成效应主要是通过 EGF/EGFR 信号传导通路,部分通过 VEGF/VEGFR 和 bFGF/Flg 信号传导通路,而不是通过 HGF 诱导的细胞增殖效应。在大鼠肝癌模型中,AAV-HGFK1 治疗组显著抑制肿瘤生长,降低肿瘤微血管密度,并完全阻止肝、肺、腹膜转移。笔者前期研究已证明 rAAV-HGFK1 联合 Ad-p53 延长肝转移大肠癌小鼠生存^[4]。Lu 等^[15]研究发现,HGFK1 有效抑制人脐血管内皮细胞生长、迁移,并且在小鼠体内抑制脉络膜及视网膜新生血管形成。Zhou 等^[16]研究发现,表达 HGFK1 的非小细胞肺癌患者总生存期及无进展生存期显著长于不表达 HGFK1 的非小细胞肺癌患者。

综上所述,目前对 HGFK1 作用机制的研究正逐渐明朗,使 HGFK1 作为一种新型靶向治疗肿瘤药物进入临床成为可能。

参考文献:

- [1] Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000[J]. Lancet Oncol,2001,2(9):533-543.
- [2] Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer[J]. N Eng J Med,2004,351(4):337-345.
- [3] Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ, et al. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor[J]. J Clin Oncol,2004,22(7):1201-1208.
- [4] Nie B, Shen Z, Wen JB, et al. AAV-HGFK1 and Ad-p53 cocktail therapy prolongs survival of mice with colon cancer[J]. Mol Cancer Ther,2008,7(9):2855-2865.
- [5] Dunn EF, Iida M, Myers RA, et al. Dasatinib sensitizes KRAS mutant colorectal tumors to cetuximab[J]. Oncogene,2011,30(5):561-574.
- [6] Lalani A. Anti-tumor efficacy of human angiostatin using liver-mediated adeno-associated virus gene therapy[J]. Mol Ther,2004,9(1):56-66.
- [7] Csaky KG. Hepatocyte growth factor (HGF)/NK1 is a naturally occurring HGF/scatter factor variant with partial agonist/antagonist activity[J]. J Biol Chem,1996,271(22):13110-13115.
- [8] Hirao S, Yamada Y, Koyama F, et al. Tumor suppression effect using NK4, a molecule acting as an antagonist of HGF, on human gastric carcinomas[J]. Cancer Gene Ther,2002,9(8):700-707.
- [9] Van Belle E, Witzensbichler B, Chen D, et al. Potentiated angiogenic effect of scatter factor/hepatocyte growth factor via induction of vascular endothelial growth factor; the case for paracrine amplification of angiogenesis[J]. Circulation,1998,97(4):381-390.
- [10] 朱昱,吕尚东,方哲平. HGFK1 抗肿瘤血管生成研究进展[J]. 肿瘤学杂志,2011,17(6):463-465. (下转第 4453 页)

研究也发现,miRNA-181d、miRNA-27a 和 let-7f 在 HL-60/A 耐药细胞中的表达下调,而 HL-60 敏感细胞则在持续用药的第 7 天起表达下调,提示 miRNA-181d、let-7f 和 miRNA27a 的表达下调也可能与 HL-60 细胞对 DNR 的耐药性也具有一定的相关性。

综上所述,本研究对 5 种 miRNA 在 HL-60 细胞中的表达进行了探索,对这 5 种 miRNA 与 HL-60 细胞耐药性的相关性有了初步的认识。今后还需要通过转染 miRNA 特异的寡核苷酸模拟物及抑制物等手段,进一步了解这些 miRNA 的靶基因及其作用机制,为降低 APL 的耐药性,提高药物化疗效果打下理论基础。

参考文献:

[1] Su YC,Dunn P,Shih LY,et al. Retinoic acid syndrome in patients following the treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans retinoic acid[J]. *Chang Gung Med J*,2009,32(5):535-542.

[2] Sun YL,Patel A,Kumar P,et al. Role of ABC transporters in cancer chemotherapy[J]. *Chin J Cancer*,2012,31(2):51-57.

[3] Calin GA,Liu CG,Sevignani C,et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2004,101(32):11755-11760.

[4] Hong L,Piao Y,Han Y,et al. Zinc ribbon domain-containing 1 (ZNRD1) mediates multidrug resistance of leukemia cells through regulation of P-glycoprotein and Bcl-2 [J]. *Mol Cancer Ther*,2005,4(12):1936-1942.

[5] Zhao Y,Srivastava D. A developmental view of microRNA function[J]. *Trends Biochem Sci*,2007,32(4):189-197.

[6] Carleton M,Cleary MA,Linsley PS. MicroRNAs and cell cycle regulation[J]. *Cell Cycle*,2007,6(17):2127-132.

[7] Bartel DP. MicroRNAs;genomics,biogenesis,mechanism, and function[J]. *Cell*,2004,116(2):281-297.

(上接第 4449 页)

[11] Xin L,Xu R,Zhang Q,et al. Kringle 1 of human hepatocyte growth factor inhibits bovine aortic endothelial cell proliferation stimulated by basic fibroblast growth factor and causes cell apoptosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2000,277(1):186-190.

[12] Baselga J. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy [J]. *The Oncologist*, 2002,7 Suppl 4:2-8. .

[13] 秦玉璇,李东风,李良芳,等. 胰腺癌中 EGFR、KRAS、BRAF 基因突变状况分析及意义[J]. *实用医学杂志*, 2012,28(14):2339-2341.

[14] Shen Z,Yang ZF,Gao Y,et al. The kringle 1 domain of

[8] Wang ZX,Lu BB,Wang H,et al. MicroRNA-21 modulates chemosensitivity of breast cancer cells to doxorubicin by targeting PTEN[J]. *Arch Med Res*,2011,42(4):281-290.

[9] Li Y,Zhu X,Gu J,et al. Anti-miR-21 oligonucleotide enhances chemosensitivity of leukemic HL60 cells to arabinosylcytosine by inducing apoptosis [J]. *Hematology*, 2010,15(4):215-221.

[10] Bai H,Xu R,Cao Z,et al. Involvement of miR-21 in resistance to daunorubicin by regulating PTEN expression in the leukaemia K562 cell line[J]. *FEBS Lett*,2011,585(2):402-408.

[11] Zhu H,Wu H,Liu X,et al. Role of MicroRNA miR-27a and miR-451 in the regulation of MDR1/P-glycoprotein expression in human cancer cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2008,76(5):582-588.

[12] Zhang H,Luo XQ,Feng DD,et al. Upregulation of microRNA-125b contributes to leukemogenesis and increases drug resistance in pediatric acute promyelocytic leukemia[J]. *Mol Cancer*,2011,10:108.

[13] Zimmerman EI,Dollins CM,Crawford M,et al. Lyn kinase-dependent regulation of miR181 and myeloid cell leukemia-1 expression;implications for drug resistance in myelogenous leukemia[J]. *Mol Pharmacol*,2010,78(5):811-817.

[14] Feng DD,Zhang H,Zhang P,et al. Down-regulated miR-331-5p and miR-27a are associated with chemotherapy resistance and relapse in leukaemia78(5) [J]. *J Cell Mol Med*,2011,15(10):2164-2175.

[15] Yang N,Kaur S,Volinia S,et al. MicroRNA microarray identifies Let-7i as a novel biomarker and therapeutic target in human epithelial ovarian cancer [J]. *Cancer Res*, 2008,68(24):10307-10314.

(收稿日期:2014-06-01 修回日期:2014-08-12)

hepatocyte growth factor has antiangiogenic and antitumor cell effects on hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*,2008,68(2):404-414.

[15] Lu Q,Zhang L,Shen X,et al. A novel and effective human hepatocyte growth factor kringle 1 domain inhibits ocular neovascularization[J]. *Exp Eye Res*,2012,105:15-20.

[16] Zhou XH,Tang LN,Yue L,et al. HGFK1 is associated with a better prognostis and reverses inhibition by gefitinib in NSCLC cases [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012,13(4):1457-1461.

(收稿日期:2014-06-08 修回日期:2014-08-15)