

# 外源性碱性成纤维细胞生长因子 对人腺样囊性癌细胞株ACC-2增殖和细胞 外信号调节激酶、Cyclin D1及p21<sup>waf/cip1</sup>通路的影响

丁 蕾, 朱声荣, 谢三祥, 吴祥冰

(华中科技大学附属同济医院 口腔科, 湖北 武汉 430030)

**[摘要]** 目的 腺样囊性癌(ACC)是最常见的唾液腺恶性肿瘤之一。本研究拟观察碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)对人ACC-2细胞增殖及细胞外信号调节激酶(ERK)、Cyclin D1及p21<sup>waf/cip1</sup>信号通路的影响。方法 培养人ACC-2细胞, MTT比色法测定不同浓度的外源性bFGF对细胞增殖的影响; 采用ERK活性测定试剂盒测定ERK活性; 免疫印迹法测定p-ERK<sub>1/2</sub>和下游的Cyclin D1及p21<sup>waf/cip1</sup>表达。并观察丝裂原蛋白活化激酶激酶(MEK)抑制剂U0126对上述指标的干预作用。结果 MTT实验显示bFGF明显增强ACC-2细胞增殖, bFGF可上调ERK活性, 免疫印迹法显示bFGF明显增强p-ERK<sub>1/2</sub>、Cyclin D1表达及抑制p21<sup>waf/cip1</sup>表达。U0126可抑制bFGF的以上效应。结论 bFGF可促进人ACC-2细胞增殖, 其途径与上调p-ERK<sub>1/2</sub>活性、抑制p21<sup>waf/cip1</sup>表达进而增强Cyclin D1表达有关。本研究为ACC的发病机制及治疗提供新思路。

**[关键词]** 碱性成纤维细胞生长因子; 腺样囊性癌; 细胞外信号调节激酶

**[中图分类号]** R780.2 **[文献标识码]** A

Effects of basic fibroblast growth factor on the proliferation of human salivary adenoid cystic carcinoma cell line ACC-2 and extracellular signal-regulated kinase, Cyclin D1, p21<sup>waf/cip1</sup> signaling pathway DING Lei, ZHU Sheng-rong, XIE San-xiang, WU Xiang-bing. (Dept. of Stomatology, Tongji Hospital of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

**[Abstract]** Objective To investigate the effects of basic fibroblast growth factor(bFGF) on the proliferation of human salivary adenoid cystic carcinoma(ACC) cell line ACC-2 in vitro. Methods The effect of ectogenic bFGF on proliferation of ACC-2 was observed by MTT assay. Extracellular signal-regulated kinase(ERK) activity was measured by immuno-precipitation. p-ERK<sub>1/2</sub>, Cyclin D1 and p21<sup>waf/cip1</sup> expression were assessed by Western blot. Results bFGF could enhance the proliferation of ACC-2. Stimulated by bFGF, the proliferation ratio increased significantly. The intracellular ERK activity, p-ERK<sub>1/2</sub> and Cyclin D1 expression were increased, while p21<sup>waf/cip1</sup> expression was inhibited by different concentrations of bFGF. The above effects of bFGF could be attenuated by MEK inhibitor U0126. Conclusion bFGF stimulates the proliferation of ACC-2 in a dose dependent manner. The proliferation effect of bFGF may be due to up-regulating ERK, Cyclin D1 and p21<sup>waf/cip1</sup> signaling pathway. This research can help us to explore a new pathogenesis and therapy of the ACC.

**[Key words]** basic fibroblast growth factor; adenoid cystic carcinoma; extracellular signal-regulated kinase

碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)属于成纤维细胞生长因子家族成员。目前已有实验证明bFGF在腺样囊性癌(adenoid cystic carcinoma, ACC)中表达, 刺激肿瘤细胞异常生长, 与肿瘤发生及进展密切相关, 但其具体机制尚未完

全明了<sup>[1]</sup>。本研究拟探讨bFGF促人腺样囊性癌细胞株(ACC-2)的生长作用, 对细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)、Cyclin D1及p21<sup>waf/cip1</sup>信号通路的影响, 并且观察丝裂原蛋白活化激酶激酶(mitogen activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinase kinase, MEK)抑制剂U0126对上述指标的干预作用, 探索其促进ACC-2细胞生长的可能机制, 为从阻断信号通路角度治疗ACC提供实验依据。

[收稿日期] 2007-05-09; [修回日期] 2007-12-27

[作者简介] 丁 蕾(1980-), 女, 湖北人, 博士

[通讯作者] 朱声荣, Tel: 027-67167665

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞和试剂

ACC-2由武汉大学口腔医学中心提供。bFGF(武汉天源生物技术公司),胰蛋白酶、RPMI 1640培养基、胎牛血清(Sigma公司,美国),MTT(武汉众一生物公司),PVDF膜(Amersham公司,美国),小鼠抗大鼠p-ERK<sub>1/2</sub>、Cyclin D1及p21<sup>waf/cip1</sup>单克隆抗体、化学发光试剂ECL(Santa Cruz公司,美国),ERK活性测定试剂盒(Chemicon公司,美国),标准蛋白(New England Biolab公司,美国),垂直电泳仪及转膜系统(Biorad公司,美国)。其余试剂均为国产分析纯。以pH为7.4的磷酸盐缓冲液(PBS)配制成5 g/L的贮液,经0.22 μm滤膜过滤除菌后4℃保存。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞的培养和分组 ACC-2细胞在含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中贴壁生长,于37℃、体积分数为5%CO<sub>2</sub>、95%O<sub>2</sub>的培养箱中培养,用0.25%胰蛋白酶消化传代。根据所加试剂不同分为3组,分别为:1)对照组:所加试剂为培养液;2)实验组:根据bFGF不同质量浓度,分0.3×10<sup>-3</sup>、0.6×10<sup>-3</sup>、1.2×10<sup>-3</sup> g/L bFGF组,观察其对ACC-2的作用;3) bFGF和U0126组:观察质量浓度为0.6×10<sup>-3</sup> g/L bFGF和0.1 g/L U0126同时给药对ACC-2的作用。

1.2.2 MTT比色 收集对数生长期的ACC-2细胞,将浓度为每毫升5×10<sup>5</sup>个的细胞接种于培养瓶,24 h换液1次。细胞达到接近汇合状态后,无血清培养液培养12 h。消化处于指数增殖期的细胞,并将浓度为每孔5×10<sup>3</sup>个细胞接种于96孔板,在37℃、体积分数为5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度下培养。当细胞达到接近汇合状态时,每孔加入200 μL无血清培养液,12 h后弃培养液。加入不同质量浓度的bFGF及培养液,各孔终体积均为200 μL。2 d后,每孔加入质量浓度为5 g/L的MTT溶液20 μL。孵育4 h后弃培养液,每孔加入150 μL二甲亚砜,振荡10 min,用酶联免疫检测仪读取每孔光密度值(测量波长620 nm,参考波长490 nm)。绘制细胞生长曲线,根据公式:细胞增殖率=实验组的光密度值/对照组的光密度值×100%,计算细胞的增殖率。

1.2.3 蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测 将ACC-2细胞先经过PBS冲洗3遍,用加样缓冲液裂解细胞,100℃水浴10 min后,2 000 r/min离心10 min,收集上清,采用考马斯亮蓝法行蛋白定量,制备好的蛋白样品置-80℃冰箱保存备用。每泳道以20 μg蛋白上样,经12%的十二烷基硫酸钠/聚丙烯酰胺凝胶电泳后,电转至硝酸纤维素膜。室温封闭3 h,加

p-ERK<sub>1/2</sub>、Cyclin D1及p21<sup>waf/cip1</sup>一抗,在室温下孵育2 h,加辣根过氧化物酶标记二抗,室温下孵育1 h,采用DAB显色试剂盒进行2~5 min显色,待蛋白条带显色清晰时,中止反应,拍摄照片,记录结果。

1.2.4 ERK活性测定 取0.5 mL蛋白样品,加入抗ERK抗体10 μL,4℃孵育12 h。加入20 μL含50%蛋白A的琼脂糖,于4℃孵育2 h。然后4℃时1 800 r/min离心1 min,弃上清,加入1 mL裂解液,4℃孵育10 min后离心,重复2次,第3次用适量激酶活性测定缓冲液代替裂解液,其成分为:含10%小牛血清的RPMI 1640培养基1 g/L、20 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(pH7.2)、10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、1 mmol/L二巯基苏糖醇、0.1 mmol/L Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>、0.1 g/L牛血清白蛋白、0.05 mmol/L三磷酸腺苷(ATP)、20 mCi/L(-<sup>32</sup>P)ATP。弃去上清液,沉淀的蛋白进行激酶活性测定,在酶标仪450 nm处读取光密度值。计算活性比=实验组光密度值/对照组光密度值×100%,以此比值来衡量各组ERK活性。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS 10.0统计程序软件包进行方差分析,数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ACC-2细胞增殖率的检测结果

对照组、0.3×10<sup>-3</sup> g/L bFGF组、0.6×10<sup>-3</sup> g/L bFGF组、1.2×10<sup>-3</sup> g/L bFGF组、bFGF和U0126组的细胞增殖率分别为(100.00±0.00)%、(131.79±0.71)%、(151.39±8.39)%、(173.34±7.79)%和(142.80±8.36)%。与对照组相比,0.3×10<sup>-3</sup>、0.6×10<sup>-3</sup>、1.2×10<sup>-3</sup> g/L bFGF组增殖率均明显增高(P<0.05),而bFGF和U0126组增殖率明显低于0.6×10<sup>-3</sup> g/L bFGF组(P<0.05)。

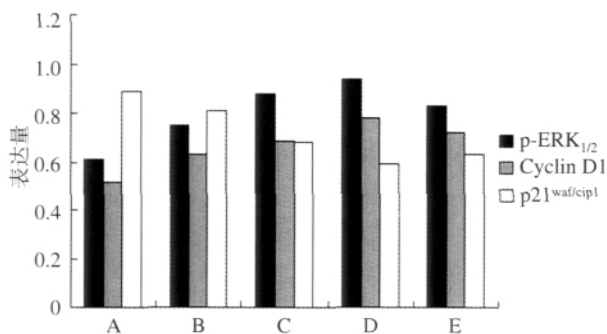
### 2.2 p-ERK<sub>1/2</sub>、Cyclin D1及p21<sup>waf/cip1</sup>的表达

采用免疫印迹法检测各组p-ERK<sub>1/2</sub>、Cyclin D1及p21<sup>waf/cip1</sup>的蛋白表达,结果显示bFGF显著增强p-ERK<sub>1/2</sub>、Cyclin D1表达及抑制p21<sup>waf/cip1</sup>表达。而U0126可抑制这种效应(图1)。0.3×10<sup>-3</sup>、0.6×10<sup>-3</sup>、1.2×10<sup>-3</sup> g/L bFGF组蛋白的表达与对照组相比有统计学差异(P<0.05),而bFGF和U0126组与0.6×10<sup>-3</sup> g/L bFGF组相比有统计学差异(P<0.05)。

### 2.3 ACC-2细胞ERK活性的检测结果

对照组、0.3×10<sup>-3</sup> g/L bFGF组、0.6×10<sup>-3</sup> g/L bFGF组、1.2×10<sup>-3</sup> g/L bFGF组、bFGF和U0126组的ERK活性分别为(100.00±0.00)%、(123.97±0.15)%、(143.71±9.77)%、(159.78±1.78)%、(134.27±8.66)%。与对照组比较,0.3×10<sup>-3</sup>、0.6×10<sup>-3</sup>、1.2×10<sup>-3</sup> g/L bFGF组ERK活性明显升高(P<0.05),而bFGF和U0126组

ERK活性明显低于 $0.6 \times 10^{-3}$  g/L bFGF组( $P < 0.05$ )。



A: 对照组; B~D分别为 $0.3 \times 10^{-3}$ 、 $0.6 \times 10^{-3}$ 、 $1.2 \times 10^{-3}$  g/L bFGF组; E: bFGF和U0126组

图1 bFGF和U0126对ACC-2细胞p-ERK<sub>1/2</sub>、Cyclin D1及p21<sup>waf/cip1</sup>表达的影响

Fig 1 Effects of bFGF and U0126 on the expression of p-ERK<sub>1/2</sub>, Cyclin D1 and p21<sup>waf/cip1</sup>

### 3 讨论

肿瘤的发生发展机制涉及多条信号传导通路,其中ERK通路是重要的一环<sup>[2-3]</sup>。ERK处于胞浆信号传导通路的终末位置,主要被各种生长因子、离子射线、过氧化氢等激活、磷酸化,从而被激活(p-ERK),进入细胞核作用于c-myc、激活蛋白-1(activator protein-1, AP-1)、核转录因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)等转录因子,促进某些基因的转录,提高某些蛋白如Cyclin D表达,在细胞生长、发育、分裂、死亡及恶性转化等过程中起重要作用<sup>[4-6]</sup>。而作为ERK上游的信号分子,MEK可磷酸化ERK使其激活<sup>[7]</sup>,U0126则是MEK特异性抑制剂,可阻断MEK<sub>1</sub>及MEK<sub>2</sub><sup>[8]</sup>。

细胞周期抑制因子(cyclin-dependent-kinase inhibitor, CKI)是调节细胞周期蛋白、周期蛋白依赖性激酶等的关键因素。其中Cyclin D1是G<sub>1</sub>/S期转化的重要细胞周期蛋白,表达于G<sub>1</sub>期和S期,通过激活CDK4或CDK6使细胞由G<sub>1</sub>期进入S期。研究发现Cyclin D1在肿瘤细胞中表达增高,并与肿瘤细胞异常增殖、侵袭和预后有关<sup>[9]</sup>。p21<sup>waf/cip1</sup>是最早发现和克隆的家族成员之一,其羧基端与增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)结合,使PCNA不能与DNA聚合酶形成复合物,影响DNA的复制,阻止细胞周期的进程;其氨基端与Cyclin D和Cyclin E结合,从而使视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, RB)蛋白不能磷酸化,使细胞周期停滞于G<sub>1</sub>期。有研究表明p21<sup>waf/cip1</sup>蛋白与细胞衰老、分化及肿瘤发生、发展有关<sup>[10]</sup>。

本研究利用ACC-2细胞,以MTT比色法测定不同质量浓度( $0.3 \times 10^{-3}$ 、 $0.6 \times 10^{-3}$ 、 $1.2 \times 10^{-3}$  g/L)bFGF对

细胞增殖的影响,以不同质量浓度bFGF刺激ACC-2细胞,细胞增殖率明显增加,证实了bFGF促进ACC-2细胞生长的作用。以ERK活性测定试剂盒测定ERK活性,随bFGF浓度增高,ERK活性明显升高。用Western blot测定p-ERK<sub>1/2</sub>、Cyclin D1及p21<sup>waf/cip1</sup>的表达,结果显示bFGF可以显著增强p-ERK<sub>1/2</sub>、Cyclin D1的表达及抑制p21<sup>waf/cip1</sup>的表达。而以上由bFGF引起的效应均可被U0126部分抑制,说明bFGF促癌细胞的生长作用可能与增强ERK活性、提高p-ERK表达及激活Cyclin D1有关,但也不能排除bFGF对其他通路的干预。

### [参考文献]

- [1] 农晓琳,王大章,蒙敏,等. 血管生成抑制剂与化疗联合对裸鼠腺样囊性癌移植瘤生长的影响[J]. 华西口腔医学杂志, 2004, 22(4): 267-269.  
NONG Xiao-lin, WANG Da-zhang, MENG Min, et al. Combining of TNP-470 and 5-Fluorouracil inhibition of adenoid cystic carcinoma nude mice model[J]. West China J Stomatol, 2004, 22(4): 267-269.
- [2] Yamamoto Y, Virmani AK, Wistuba SH, et al. Loss of heterozygosity and microsatellite alterations in p53 and RB genes in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands[J]. Hum Pathol, 1996, 27(11): 1204-1206.
- [3] Andresen BT, Rizzo MA, Shome K, et al. The role of phosphatidic acid in the regulation of the Ras/MEK/Erk signaling cascade[J]. FEBS Lett, 2002, 531(1): 65-68.
- [4] Webb CP, Van Aelst L, Wigler MH, et al. Signaling pathways in Ras-mediated tumorigenicity and metastasis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(15): 8773-8778.
- [5] Weinstein-Oppenheimer CR, Blalock WL, Steelman LS, et al. The Raf signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in growth factor-responsive tumors[J]. Pharmacol Ther, 2000, 88(3): 229-279.
- [6] Eguchi S, Inagami T. Signal transduction of angiotensin type 1 receptor through receptor tyrosine kinase[J]. Regul Pept, 2000, 91(1/3): 13-20.
- [7] Solit DB, Garraway LA, Pratilas CA, et al. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition[J]. Nature, 2006, 439(7074): 358-362.
- [8] Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, et al. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase[J]. J Biol Chem, 1998, 273(29): 18623-18632.
- [9] Angadi PV, Krishnapillai R. Cyclin D1 expression in oral squamous cell carcinoma and verrucous carcinoma: Correlation with histological differentiation[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2007, 103(3): e30-e35.
- [10] Harada K, Kurisu K, Sadatomo T, et al. Growth inhibition of human glioma cells by transfection-induced P21 and its effects on telomerase activity[J]. J Neurooncol, 2000, 47(1): 39-46.

(本文编辑 王 晴)