

[文章编号] 1000-1182(2007)05-0490-03

口腔癌相关成纤维细胞对舌癌细胞株细胞外信号调节激酶通路的影响

林靖雯¹, 陈谦明², 李胜富³, 付春华¹, 林梅², 龙丹³, 周红梅²

(1.口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川大学; 2.四川大学华西口腔医院 黏膜科;
3.四川大学华西医院 卫生部移植工程和移植免疫重点实验室, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 研究口腔癌相关成纤维细胞(CAFs)对舌癌细胞株细胞外信号调节激酶(ERK)通路的影响。方法以口腔CAF条件培养基刺激舌癌细胞株Tca8113和将Tca8113细胞与口腔CAF共同培养, 采用Western杂交检测特定时间Tca8113细胞总ERK和总pERK的表达。结果 Tca8113细胞经口腔CAF条件培养基刺激或与口腔CAF共同培养后, 总pERK的表达迅速增加, 总pERK与总ERK的比值增加。结论 口腔CAF对癌细胞ERK通路有活化作用。

[关键词] 癌相关成纤维细胞; 舌癌; 细胞外信号调节激酶传导通路

[中图分类号] R781.5 [文献标识码] A

Effect of oral carcinoma-associated fibroblasts on extracellular signal-regulated kinases pathway in the lingual carcinoma cell line LIN Jing-wen¹, CHEN Qian-ming², LI Sheng-fu³, FU Chun-hua¹, LIN Mei², LONG Dan³, ZHOU Hong-mei². (1. Key. Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Oral Medicine, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Key. Laboratory of Transplantation Engineering and Transplantation Immunity of Ministry of Health, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Objective To investigate the effects of oral carcinoma-associated fibroblasts(CAFs) on extracellular signal-regulated kinases(ERK) pathway in a lingual carcinoma cell line. Methods The lingual carcinoma cell line, Tca8113 was stimulated by conditioned medium from oral CAFs, or cocultured with oral CAFs for definite time. Total ERK and pERK in Tca8113 lysate were detected by Western blotting, and the ratio between pERK and ERK were calculated. Results Both stimulation by conditioned medium and coculture induced prompt phosphorylation of ERK, and increased the ratio between pERK and ERK. Conclusion Oral CAFs can activate ERK pathway of carcinoma cells.

[Key words] carcinoma-associated fibroblasts; tongue carcinoma; extracellular signal-regulated kinases pathway

癌相关成纤维细胞(carcinoma-associated fibroblasts, CAFs)是肿瘤-宿主界面微环境中具有独特表型成纤维细胞^[1], 它通过分泌肝细胞生长因子、胰岛素样生长因子等促进癌细胞的增殖^[2-3], 但CAF如何影响癌细胞内信号传导通路目前尚未见报道。学者^[4]发现, 口腔鳞状细胞癌旁也存在表型转化的CAF; 本课题组^[5]前期实验发现, 口腔CAF在体外可促进舌癌细胞株Tca8113增殖和侵袭, 但其作用机制不清楚。细胞外信号调节激酶(extracellular signal-

regulated kinases, ERK)通路主要由生长因子激活, 其异常活化与口腔癌的发生发展密切相关^[6]。本研究研究CAF对口腔癌细胞信号传导通路的影响。

1 材料和方法

1.1 主要实验试剂

胎牛血清、质量浓度为2.5 μg/mL胰蛋白酶(Gibco公司, 美国); 细胞及组织总蛋白抽提试剂盒、蛋白酶磷酸酶混合抑制剂(上海康成生物有限公司); BCA蛋白定量试剂盒(Pierce公司, 美国); 兔抗人ERK1/2多抗、兔抗人pERK1/2单抗(Cell Signaling公司, 美国); 羊抗人actin多抗(Santa Cruz公司, 美国); 辣根酶标记山羊抗兔IgG(北京中杉生物有限公司); PVDF膜(Roche公司, 瑞士); 化学

[收稿日期] 2006-10-08; [修回日期] 2007-01-15

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30572035); 四川省科技攻关资助项目(05SG022-018-1)

[作者简介] 林靖雯(1978-), 女, 云南人, 住院医师, 博士

[通讯作者] 周红梅, Tel: 028-85503480

发光试剂盒(Pierce公司,美国);预染蛋白质marker (Fermentas公司,加拿大)。

1.2 实验细胞

经患者知情同意,无菌条件下切取中分化舌鳞癌组织,标本包括上皮及邻近结缔组织。参照前期实验方法^[7],分离纯化并鉴定口腔CAFs,以第3代细胞作为研究对象。舌癌细胞株Tca8113购自中国科学院细胞研究所。

1.3 建立CAFs与Tca8113细胞作用模型

模型1(以CAFs条件培养基作用于Tca8113细胞):细胞浓度为 3×10^5 个/mL CAFs无血清培养基培养24 h后,1 300 r/min 10 min离心细胞培养液,收集上清液,即CAFs条件培养基。细胞浓度 3×10^5 个/mL Tca8113无血清培养基培养24 h后,换用CAFs条件培养基刺激,于0、15、30、60、120 min时按蛋白抽提试剂盒说明裂解细胞,抽提蛋白,冻存于 -70°C 。模型2(Tca8113细胞与CAFs共同培养):细胞浓度为 3×10^5 个/mL Tca8113细胞无血清培养基培养24 h后,装配上接种有细胞浓度为 3×10^5 个/mL CAFs的Transwell小室,与细胞共同培养0、2、12、24 h时裂解Tca8113细胞,步骤同前。

1.4 Western杂交检测ERK1/2及磷酸化细胞外信号调节激酶(phosphorylated ERK1/2, pERK1/2)的表达

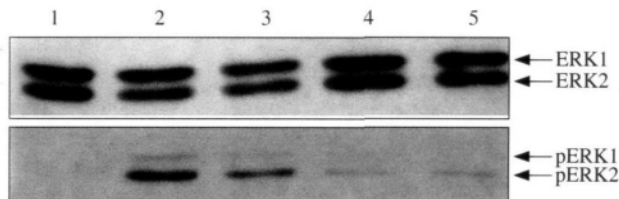
按照蛋白定量试剂盒说明测定上述两种模型所得样本的蛋白浓度。样本与5倍还原上样缓冲液混匀,95 $^\circ\text{C}$ 水浴10 min。按每泳道25 μg 蛋白上样,4行SDS-PAGE电泳(质量浓度为80 g/L分离胶,质量浓度为50 g/L浓缩胶)。凝胶与PVDF膜于电转缓冲液中平衡30 min后,半干电转仪中10 V电转40 min。质量浓度为50 g/L BSA封闭1 h。加兔抗人pERK1/2(稀释度1 1000),37 $^\circ\text{C}$ 孵育30 min,4过夜。TTBS洗脱一抗后,加辣根酶标记山羊抗兔IgG(稀释度1 5000),室温反应1 h。TTBS和TBS洗脱二抗。按化学发光试剂盒说明配制发光底物,均匀滴加于PVDF膜,5 min后吸去多余底物,塑料袋封膜,暗盒中曝光3 min,冲洗胶片。PVDF膜于50 $^\circ\text{C}$ 洗脱1 h。TBS漂洗后,重新封闭,加入兔抗人ERK1/2(稀释度1 1000),余下步骤同前。采用凝胶图像分析系统对结果进行灰度扫描,条带灰度与条带面积的乘积反映所测抗原量。实验以 β -actin作为内参。

2 结果

2.1 CAFs条件培养基刺激后Tca8113细胞内ERK1/2及pERK1/2的变化

CAFs条件培养基刺激后,ERK1/2表达无显著变

化,仅60 min时略增强。但pERK2表达明显增强,15 min时约为刺激前45.5倍,30 min时为刺激前的20.6倍,60 min后逐渐减弱(图1)。pERK1与ERK1的比值、pERK2与ERK2的比值刺激后迅速升高,15 min达到峰值,此后随时间延长逐渐降低(图2)。



1: 0 min; 2: 15 min; 3: 30 min; 4: 60 min; 5: 120 min

图1 CAFs条件培养基刺激后Tca8113细胞内ERK1/2及pERK1/2的表达

Fig 1 ERK1/2 and pERK1/2 expression in Tca8113 stimulated by CAFs conditioned medium

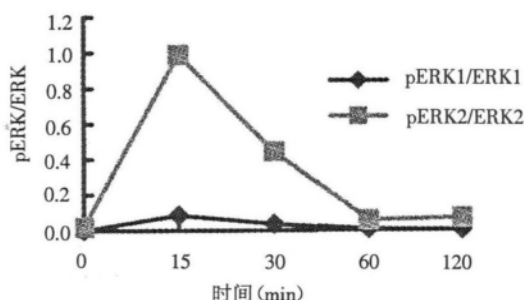
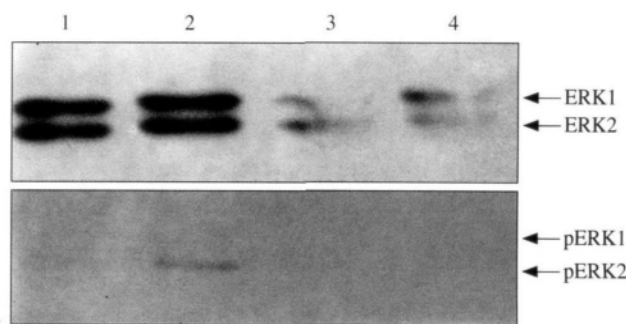


图2 CAFs条件培养基刺激后Tca8113细胞内pERK1与ERK1比值、pERK2与ERK2比值的变化

Fig 2 The ratio of pERK1 to ERK1 and the ratio of pERK2 to ERK2 in Tca8113 stimulated by CAFs conditioned medium

2.2 与CAFs共同培养后Tca8113细胞内ERK1/2及pERK1/2的变化

与CAFs共同培养后,Tca8113细胞内ERK1/2表达在前2 h保持稳定,但pERK1/2,尤其pERK2,比共同培养前明显增强,2 h时达到峰值,为共同培养前的5.1倍。共同培养12 h后Tca8113细胞内ERK1/2和pERK1/2的表达则明显减少(图3)。pERK1与ERK1的比值、pERK2与ERK2的比值在2 h时达到峰值,12 h后恢复到基础水平(图4)。



1: 0 h; 2: 2 h; 3: 12 h; 4: 24 h

图3 CAFs共同培养后Tca8113细胞内ERK1/2及pERK1/2的表达

Fig 3 ERK1/2 and pERK1/2 expression in Tca8113 cocultured with CAFs

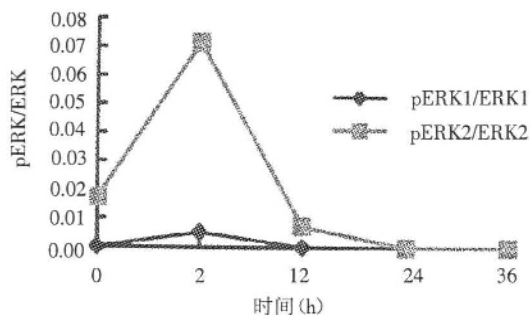


图4 CAFs共同培养后Tca8113细胞内pERK1与ERK1比值、pERK2与ERK2比值的变化

Fig 4 The ratio of pERK1 to ERK1 and the ratio of pERK2 to ERK2 in Tca8113 cocultured with CAFs

3 讨论

在前期研究^[9]中,本课题组已发现口腔CAFs可通过其强大的分泌功能促进舌癌细胞株Tca8113增殖和侵袭。由于ERK通路主要受生长因子激活,其异常活化与包括口腔鳞状细胞癌在内的多种肿瘤的发生发展密切相关,因此本实验选择研究口腔CAFs对Tca8113细胞ERK通路的影响,以期揭示CAFs促进舌癌细胞增殖和侵袭作用的可能机制。本研究分别建立了两种CAFs与Tca8113的作用模型。一种是以CAFs条件培养基作用于Tca8113细胞。由于条件培养基中含有CAFs分泌的多种可溶性生长因子、细胞因子,通过该模型可观察CAFs通过旁分泌途径对肿瘤细胞ERK通路的影响。因为其产生影响需时较短,故选择2 h以内的5个时间点进行观测,但此模型仅能反映CAFs对肿瘤细胞单方面的作用。另一种模型是采用Transwell小室建立细胞共同培养模型,可更好地模拟体内细胞的交互作用、观察CAFs对Tca8113细胞内ERK通路的影响。由于CAFs需一定时间产生足量的可溶性因子作用于Tca8113,故选择2 h及2 h以后的时间点观测。

研究结果表明,CAFs条件培养基对Tca8113细胞内ERK1/2影响不大,但可使pERK1/2的表达显著增高,使pERK与ERK比值提高,峰值出现于15 min时,随后活化水平逐渐降低。这可能是由于条件培养基中生长因子的消耗所致。细胞共同培养时,ERK1/2在2 h内同样无明显变化,但在2 h时pERK2、pERK2与ERK2的比值明显增加。因此,两种模型的研究均显示口腔CAFs可激活Tca8113细胞内的ERK通路。本实验中,在细胞共同培养12 h后,Tca8113细胞内ERK和pERK的含量均明显降低,这是由于Tca8113细胞长时间缺乏血清支持而出现了生长抑制,还是由于ERK通路的活化状态受到了其他复杂因素的影响,尚有待进一步研究。

由于有关CAFs分泌功能的研究少且分散,因此

尚无法明确判断哪一个或哪一些因子参与了ERK通路的活化。有研究^[8]证实,CAFs可分泌大量肝细胞生长因子作用于肿瘤细胞;另有研究^[9]揭示肝细胞生长因子与其受体C-Met结合可直接激活口腔鳞状细胞癌细胞株内的ERK信号传导通路,由此推测CAFs可通过分泌大量肝细胞生长因子激活ERK通路,从而促进肿瘤细胞的增殖。鉴于ERK通路上游分子及CAFs分泌因子的多样性,因此,认为Tca8113细胞内ERK通路的激活可能是多种因子的综合作用的结果。同时,由于在CAFs与肿瘤细胞的交互作用中存在着复杂的信号传导网络^[10],所以CAFs对Tca8113细胞信号传导通路的影响也不仅限于ERK通路。

[参考文献]

- [1] Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression[J]. Nature, 2004, 432(7015): 332-337.
- [2] Kankuri E, Chlujova D, Comajova M, et al. Induction of hepatocyte growth factor/scatter factor by fibroblast clustering directly promotes tumor cell invasiveness[J]. Cancer Res, 2005, 65(21): 9914-9922.
- [3] Rosenthal E, McCrory A, Talbert M, et al. Elevated expression of TGF-beta1 in head and neck cancer-associated fibroblasts[J]. Mol Carcinog, 2004, 40(2): 116-121.
- [4] Lewis MP, Lygoe KA, Nystrom ML, et al. Tumour-derived TGF-beta1 modulates myofibroblast differentiation and promotes HGF/SF-dependent invasion of squamous carcinoma cells[J]. Br J Cancer, 2004, 90(4): 822-832.
- [5] 林靖雯, 周红梅, 李胜富, 等. 口腔癌相关成纤维细胞对舌癌细胞株侵袭特性的影响[J]. 华西口腔医学杂志, 2006, 24(2): 101-103.
LIN Jing-wen, ZHOU Hong-mei, LI Sheng-fu, et al. The effect of oral carcinoma-associated fibroblasts on the invasion of carcinoma cell line[J]. West China J Stomatol, 2006, 24(2): 101-103.
- [6] Mishima K, Inoue K, Hayashi Y. Overexpression of extracellular-signal regulated kinases on oral squamous cell carcinoma[J]. Oral Oncol, 2002, 38(5): 468-474.
- [7] Liu Y, Hu T, Shen J, et al. Separation, cultivation and biological characteristics of oral carcinoma-associated fibroblasts[J]. Oral Dis, 2006, 12(4): 375-380.
- [8] Jiang WG, Grimshaw D, Martin TA, et al. Reduction of stromal fibroblast-induced mammary tumor growth, by retroviral ribozyme transgenes to hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, c-MET[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(11): 4274-4281.
- [9] Fleigel J, Sedwick J, Kornberg LJ. Hepatocyte growth factor/scatter factor stimulates mitogenesis and migration of a head and neck squamous cell carcinoma cell line[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2002, 127(4): 271-278.
- [10] Micke P, Ostman A. Tumour-stroma interaction: Cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy[J]. Lung Cancer, 2004, 45(Suppl 2): 163-175.

(本文编辑 汤亚玲)