

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.04.004

肝细胞生长因子对结肠癌细胞 SW620 增殖、侵袭的影响

贾漪涛¹, 刘敏², 王安峰³, 郭薇⁴, 张雷⁴, 李中信⁵

Effects of Hepatocyte Growth Factor on Proliferation and Migration of Human Colon Cancer Cells SW620

JIA Yi-tao¹, LIU Min², WANG An-feng³, GUO Wei⁴, ZHANG Lei⁴, LI Zhong-xin⁵

1. Department of Oncology, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China, 2. Laboratory of Elder Disease Research; 3. Department of Radiotherapy, The Third Hospital, Hebei Medical University; 4. Department of Histology and Embryology, Hebei Medical University; 5. The Second Department of Surgery, The Fourth Hospital, Hebei Medical University

Corresponding Author: LI Zhong-xin, E-mail: lizhongxin99@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To investigate the effects of Hepatocyte growth factor (HGF) on the proliferation and migration of SW620. **Methods** MTT was used to assess the effect of HGF on the proliferation of SW620. The effect of HGF on the migration of cells was calculated by restoration of basal membrane; the ultrastructure of SW620 after being treated with HGF was observed by TEM; the expression of MMP-2 was determined by PCR. **Results** HGF promoted both the proliferation and migration of SW620 in a dose-dependent manner. Microfilaments increased significantly after being treated with HGF. HGF up-regulated the expression level of MMP-2 mRNA of SW620 cells. **Conclusion** HGF can promote the proliferation and migration of colon cancer cell SW620.

Key words: HGF; Proliferation; Migration; Human colon cancer

摘要:目的 探讨肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor, HGF)对人结肠癌细胞株 SW620 的增殖和侵袭能力的影响。**方法** 应用 MTT 法分析 HGF 对 SW620 细胞增殖的影响,确定最佳促增殖浓度;应用基底膜重建实验和电镜观察 HGF 对细胞侵袭能力的影响;应用 PCR 技术检测 HGF 对 MMP-2 mRNA 表达的影响。**结果** 当 HGF 浓度 ≥ 10 ng/ml 时促进 SW620 增殖且呈质量浓度依赖性;HGF 明显促进 SW620 移行且呈质量浓度依赖关系;加入 HGF 后,SW620 细胞内的微丝明显增多,MMP-2 表达水平升高。**结论** HGF 可以在体外促进人结肠癌细胞 SW620 的增殖和移行。

关键词: 肝细胞生长因子;增殖;侵袭;结肠癌

中图分类号:R73-37;R735.3⁺5 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2011)04-0377-03

0 引言

结直肠癌是最常见的恶性肿瘤之一,由于癌细胞容易发生血行或淋巴转移而常导致治疗失败。研究显示,结直肠癌的转移与癌细胞的增殖和侵袭能力密切相关,而肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor, HGF)对多种肿瘤的增殖和移行具

有促进作用,极有可能成为肿瘤治疗的新靶点^[1-3]。本实验在结肠癌细胞株 SW620 中加入重组人肝细胞生长因子(rhHGF),应用 MTT 法、基底膜重建实验、透射电镜和 RT-PCR 方法,检测 HGF 对 SW620 的增殖、移行的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 SW620 人结肠癌细胞系,浙江大学郑树教授惠赠。

1.1.2 试剂 rhHGF (PEPROTECH), RPMI1640 培养液干粉(Gibco),胎牛血清(兰州民海生物公司), MTT, DMSO(SERVA), PCR 体系(promega), PCR 引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2 方法

收稿日期:2010-06-01;修回日期:2010-12-30

基金项目:河北省博士基金资助项目(05547008D-3)

作者单位:1. 050051 石家庄,河北省人民医院肿瘤三科, 2. 老年病实验室;3. 河北医科大学第三医院放疗科;4. 河北医科大学组织胚胎学研究室;5. 河北医科大学附属第四医院外二科

通信作者:李中信, E-mail: lizhongxin99@yahoo.com.cn

作者简介:贾漪涛(1970-),女,博士,副主任医师,主要从事肿瘤放化疗和相关基础研究

1.2.1 SW620 的培养 用含 10% 胎牛血清 RPMI1640 培养液培养, 加入 100 u/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱培养。

1.2.2 MTT 法分析 HGF 对 SW620 细胞增殖的影响 以 1.0 × 10⁴/ml 的密度将细胞接种于 96 孔培养板, 每孔 200 μl。对照组加入含 5% 胎牛血清的培养液; HGF 组分 5 个剂量, 依次加入含 5% 胎牛血清的培养液和 5、10、20、40、80 ng/ml 的 HGF, 每组设 6 个复孔。培养 48h 后, 每孔加入 MTT 20 μl, 继续孵育 4h, 每孔加入 100 μl 二甲基亚砜(DMSO), 在酶标仪上以 570 nm 波长测定各孔的吸光度(A)值, 计算增殖率。增殖率 = (A_{HGF组} - A_{对照组}) / A_{对照组} × 100%。

1.2.3 基底膜重建实验观察 HGF 对 SW620 移行的影响 在 6 孔培养板中每孔放入一个盖玻片, 将细胞按照 1.0 × 10⁵ 个/孔的密度接种于培养板中。48h 后夹出盖玻片, 显微镜下见每孔周边已被细胞贴满, 中间曾放有盖玻片之处呈现出边界清晰的一个正方形空白区。继续培养 48h 后在低倍镜下(×100)观察进入空白区的细胞的数量及其形态, 在高倍镜下(×400)每孔选 5 个视野, 计数进入空白区的细胞数。侵袭能力 = (HGF 组移行细胞数 - 对照组移行细胞数) / 对照组移行细胞数 × 100%。

1.2.4 透射电子显微镜观察加入 HGF 后 SW620 细胞超微结构的变化 对照组加入含 5% 胎牛血清的培养液, 实验组根据 MTT 的实验结果, 选择刺激细胞增殖作用最强的 HGF 浓度组, 培养 48h 后消化液消化, PBS 洗 2 次, 3500r/s, 离心半径 10cm 离心 5 min, 4℃ 预冷的 2.5% 戊二醛固定, 送电镜室进行后处理, 脱水, 包埋, 切片, 染色等步骤。

1.2.5 RT-PCR 检测基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP-2) mRNA 表达 用 trizol 提取细胞总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳和分光光度计测定 RNA 纯度和浓度。RT-PCR 按试剂盒说明书操作, 序列如下:

MMP2 上游 5'-CAACTTCTTCCCTCGCAAGC-3'

下游 5'-GCGTTCCATACTTCACACG-3'

GAPDH 上游 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

下游 5'-TCCACCACCTGTTGCTG-3'

反应参数: 94℃ 预变性 5 min, 然后 94℃ 45 s、58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环后于 72℃ 延伸 10 min。每个样本取 5 μl MMP-2 PCR 产物和 2 μl GAPDH PCR 产物混合至同一加样孔, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 用 UVP 凝胶图像成像系统拍摄打印实验结果, 用凝胶图像分析系统(Gel-Pro Analyzer Version 3.0)分析结果。

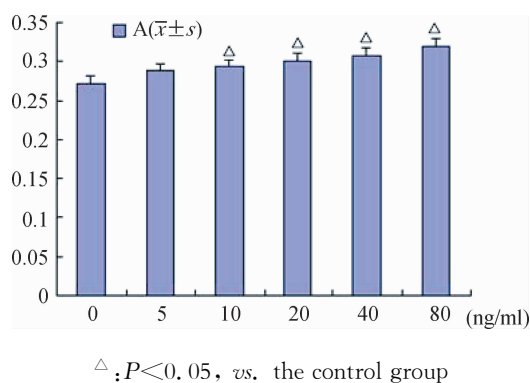
1.3 统计学方法

应用 SPSS11.5 统计软件处理所得数据, 各组数据以均数 ± 标准差表示, 定量资料的比较采用单因素方差分析(one way ANOVA), 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HGF 对 SW620 的促增殖作用

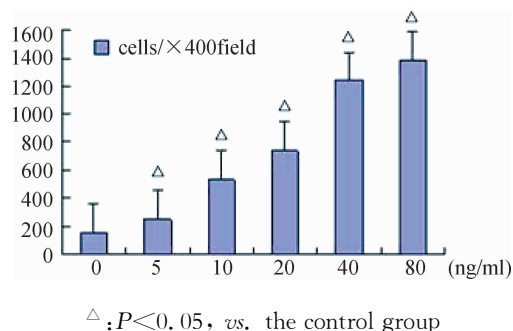
MTT 结果显示: HGF ≥ 10ng/ml 时能促进 SW620 增殖且呈质量浓度依赖性, 80ng/ml HGF 组促增殖能力最强, 见图 1。



△: P < 0.05, vs. the control group
图 1 不同浓度 HGF 对 SW620 细胞增殖的影响
Figure 1 The effect of HGF on the proliferation of SW620 cells at different concentration

2.2 HGF 对 SW620 的促移行作用

基底膜重建实验显示, 培养 48h 后, 低倍镜下可见 HGF 组进入空白区的细胞数较对照组明显增多, 形态变长且移行距离较远。HGF 的促移行作用呈质量浓度依赖性。高倍镜下计数 5 个视野的细胞数, 计算 HGF 80 ng/ml 组的移行能力为 801.3%, 见图 2。

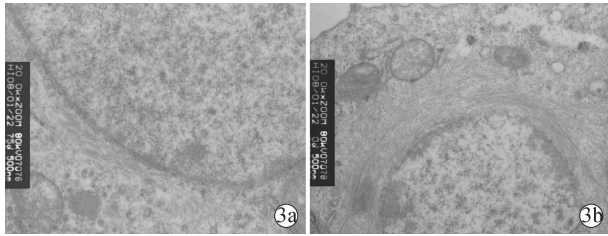


△: P < 0.05, vs. the control group
图 2 不同浓度 HGF 对 SW620 的促移行作用
Figure 2 The effect of HGF on the migration of SW620 cells at different concentration

2.3 透射电子显微镜观察 SW620 细胞的超微结构变化

正常状态下, 细胞圆形或椭圆形, 胞质丰富, 内有线粒体、粗面内质网、游离核糖体、溶酶体。细胞

核不规则,偶有双核,在核旁的胞质里可见微丝、微管。加入 HGF 后,可见核周微丝丰富,大量微丝沿核成束平行排列。游离核糖体增多,粗面内质网等细胞器变化不明显,见图 3。



3a; control group;3b; HGF group

图 3 SW620 细胞的超微结构(×20 000)

Figure 3 The ultrastructure of SW620 cells(×20 000)

2.4 HGF 对 SW620 细胞 MMP-2 mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示应用重组人 HGF 后,SW620 细胞 MMP-2 mRNA 表达水平明显升高($P < 0.05$),见图 4。

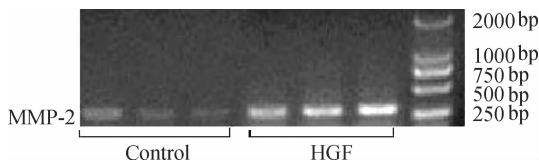


图 4 HGF 对 SW620 细胞 MMP-2 mRNA 表达水平的影响

Figure 4 The effect of HGF on the expression of MMP-2 mRNA in SW620 cells

3 讨论

HGF 和其受体 c-Met 信号转导通路广泛存在于各种组织细胞中,发挥有丝分裂原、运动因子等生理功能^[1,4]。但当细胞过表达 HGF/c-Met 时或该系统信号转导失调时,常导致肿瘤的发生和发展。大量研究表明,包括结直肠癌在内的许多肿瘤组织和肿瘤细胞中有 HGF/c-Met 的高表达^[5-6]。但 HGF/c-Met 在结直肠癌的发生、发展过程中的作用和确切机制尚不十分清楚。

本研究显示,HGF $\geq 10\text{ng/ml}$ 时开始促进 SW620 增殖,随着 HGF 浓度的增高,SW620 细胞增殖能力逐渐增强。HGF 达到 80ng/ml 时增殖能力达最高。我们还发现,HGF 能有效促进 SW620 的移行并呈质量浓度依赖性。而且,与 HGF 对结直肠癌细胞的促增殖作用相比,其促侵袭作用更为显著,提示 HGF 在结直肠癌的转移过程中具有重要作用。我们还发现,加入 HGF 后细胞内微丝数目显著增多,微丝数目增多可能是肿瘤细胞侵袭行为

的物质基础。

另外,肿瘤转移除了与肿瘤细胞的侵袭能力有关,还与细胞外基质及基底膜的降解有关^[7]。肿瘤细胞通过产生或诱导产生降解细胞外基质的一些蛋白酶而促进转移。基质金属蛋白酶家族就是引起细胞外基质降解最重要的酶类之一。MMP-2 是 MMP 家族中的重要成员,是一个重要的细胞外基质重塑酶,主要降解产物是 IV 型胶原,与包括结直肠癌在内的肿瘤细胞的侵袭转移密切相关^[8]。尽管有研究提示 HGF 可以通过促进 MMP-2 表达而促进脑胶质瘤、膀胱癌转移^[9-10],甚至 HGF 通过上调睾丸 Leydig 细胞的 MMP-2 表达而促进哺乳动物精子发生^[11],目前 HGF 与 MMP-2 之间的关系尚不完全清楚,其作用的确切分子机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Park MK, Kim DK, Lee HJ. Adenoviral mediated hepatocyte growth factor gene attenuates hyperglycemia and beta cell destruction in overt diabetic mice [J]. *Exp Mol Med*, 2003, 35 (6): 494-500.
- [2] Sattler M, Salgia R. c-Met and hepatocyte growth factor: potential as novel targets in cancer therapy[J]. *Curr Oncol Rep*, 2007, 9(2):102-108.
- [3] Cipriani NA, Abidoye OO, Vokes E, et al. MET as a target for treatment of chest tumors[J]. *Lung Cancer*, 2009, 63(2): 169-179.
- [4] Ma PC, Maulik G, Christensen J, et al. c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2003, 22 (4):309-325.
- [5] Kammula US, Kuntz EJ, Francone TD, et al. Molecular co-expression of the c-Met oncogene and hepatocyte growth factor in primary colon cancer predicts tumor stage and clinical outcome [J]. *Cancer Lett*, 2007, 248(2):219-228.
- [6] Stein U, Walther W, Arlt F, et al. MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metastasis[J]. *Nat Med*, 2009, 15(1):59-67.
- [7] Yilmaz M, Christofori G. Mechanisms of motility in metastasizing cells[J]. *Mol Cancer Res*, 2010, 8(5):629-642.
- [8] Murnane MJ, Cai J, Shuja S, et al. Active MMP-2 effectively identifies the presence of colorectal cancer[J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(12):2893-2902.
- [9] Hecht M, Papoutsis M, Tran HD, et al. Hepatocyte growth factor/c-Met signaling promotes the progression of experimental human neuroblastomas[J]. *Cancer Res*, 2004, 64 (17): 6109-6118.
- [10] Miyata Y, Sagara Y, Kanda S, et al. Phosphorylated hepatocyte growth factor receptor/c-Met is associated with tumor growth and prognosis in patients with bladder cancer: correlation with matrix metalloproteinase-2 and-7 and E-cadherin[J]. *Hum Pathol*, 2009, 40(4):496-504.
- [11] Catizone A, Ricci G, Tufano MA, et al. Hepatocyte growth factor (HGF) modulates Leydig cell extracellular matrix components[J]. *J Androl*, 2010, 31(3):306-313.