

EGFR 激活对头颈部鳞癌细胞 SCC10A 抗失巢凋亡的影响

左建宏^{1,2}, 吕 冬³, 李金成³

(1. 南华大学医学院 微生物学与免疫学教研室, 湖南 衡阳 421001; 2. 中南大学湘雅医院
卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室; 3. 邵阳医学高等专科学校)

摘 要: **目的** 探讨表皮生长因子(EGF)对头颈部鳞癌细胞 SCC10A 失巢凋亡的影响及其机理。**方法** 运用悬浮诱导凋亡试验检测 EGF 受体(EGFR)激活后对头颈部鳞癌细胞 SCC10A 抗失巢凋亡能力的影响; Real-time PCR 和 West blotting 检测 Bcl-2 和 Bcl-xl 表达情况。**结果** EGFR 激活后提高了头颈部鳞癌细胞 SCC10A 抗失巢凋亡的能力; 诱导了 Bcl-2 和 Bcl-xl 的表达。**结论** EGF 能提高头颈部鳞癌细胞 SCC10A 抗失巢凋亡能力。
关键词: 表皮生长因子受体; 肿瘤微环境; 头颈部鳞癌细胞; 失巢凋亡
中图分类号: R730.261 **文献标识码:** A **文章编号:** 2095-1116(2011)04-0376-04

The Effect of EGFR Activation on Anoikis of HNSCC-SCC10A

ZUO Jian-hong, LV Dong, LI Jin-cheng

(Medical School, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To detect whether EGF has some contribution to anoikis of head and neck squamous carcinoma cell (HNSCC)-SCC10A. **Methods** Suspend-inducing cell apoptosis test was applied to detect whether the activation of EGFR affected anoikis of HNSCC-SCC10A. The expression of Bcl-2 and Bcl-xl were analyzed by Real-time PCR and West blotting. **Results** It was showed that the activation of EGFR promoted the ability of anti-anoikis of HNSCC-SCC10A, induced the expression of Bcl-2 and Bcl-xl. **Conclusions** The activation of EGFR promoted the ability of anti-anoikis of HNSCC-SCC10A.
Key words: EGFR; tumor microenvironment; head and neck squamous carcinoma cell; anoikis

头颈部鳞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)是一种严重威胁人类生命的恶性上皮肿瘤,已经成为全世界第六大常见的肿瘤^[1,2]。由于头颈部特殊的解剖部位和复杂的功能,给恶性肿瘤的诊断与治疗提出了挑战。尽管早期 HNSCC 经手术或放疗后,均能获得良好的效果,但遗憾的是 60% 的 HNSCC 就诊时已属晚期(Ⅲ、Ⅳ期),5 年生存率仍然很低^[3]。因此,采用分子生物学等方法研究 HNSCC 的发病机理,对提高其治疗效果具有重要意义。

表皮细胞生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是属于 ErbB 受体家族中的一种跨膜糖蛋白,其主要由胞膜外的配体结合域、跨膜部分以及胞膜内的蛋白(质)酪氨酸激酶域等三部分构成。表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和转化生长因子 α (transforming growth factor- α , TGF- α)能与胞膜外的配体结合域结合,激活受体和下游的信号通路,例如:ERK-1/2、PI3K 和 Stat3 等,最终调节或激活细胞的多个生命活动^[4,5]。

已有研究表明:EGFR 在 HNSCC 中表达上调^[6~8],且该受体的表达上调通常与 HNSCC 微环境中的细胞因子 EGF 和 TGF- α 大量产生密切相关,这样在 HNSCC 中形成了一个自分泌的刺激信号通路^[7,9]。EGF 及其受体在调节细胞的生长、增殖、分

收稿日期:2011-01-07
基金项目:湖南科技厅项目(2008SK3030)和湖南省外国专家局项目(06 外 023)。
通讯作者:左建宏,电话:0734-8282907, E-mail: jhzuoch@sina.com.

化、恶变及血管生长等方面发挥着重要的作用,并且 EGFR 过度表达与肿瘤的进展、侵袭、转移、复发和化疗的耐药有关^[10~12]。因而,近年来 EGFR 已作为治疗 HNSCC 的一个重要的靶标^[13~15],本研究试图探讨 EGF 对 HNSCC-SCC10A 细胞抗失巢凋亡的影响,报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

EGF (human recombinant epidermal growth factor) (Invitrogen 公司产品), Bcl-2 Ab (santa cruz biotechnology 公司产品), Bcl-xl Ab (BD Biosciences 公司产品), HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (Santa cruz biotechnology 公司), 试验所用细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基, 于 37℃ 5% CO₂ 恒温细胞培养箱中培养。

1.2 单个悬浮细胞诱导失巢凋亡试验

为了产生单个悬浮的细胞, 用 0、10、20 ng/mL EGF 处理细胞 8 h, 应用胰酶消化, 离心, 用计数板计数, 取 6 × 10⁵ 个 SCC-10A 细胞于终体积为 5 mL DMEM 培养基中, 另加入 5 mL 半固体 DMEM (其主要组成 0.5% FBS/DMEM 培养基, 1.5% 纤维甲醚 (Sigma)) 并混匀, 悬浮在 poly-HEMA 预处理的 10 cm 培养皿, 培养 48 h 后, 培养物用 2 倍量的 PBS 收集, 以 900 g 速度离心 10 min。然后, 将细胞沉淀物用含 10% FBS 的 DMEM 培养基继续培养 7 天。

1.3 实时定量 PCR

实时定量 PCR 应用 7000 序列检测系统 (Applied Biosystems) 来检测 Bcl-2 和 Bcl-xl 的表达。将细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养 24 h 后, 换上不含 FBS 的 DMEM 培养基过夜培养, 然后用 10 ng/mL EGF 处理 8 h, 以不加 EGF 处理的细胞作为对照。采用 RNA 抽提试剂盒 (Qiagen RNeasy MiniKit) 抽提 RNA, 每个样本取 5 μg RNA, 运用

A3500 逆转录系统 (Promega) 逆转录成 cDNA, PCR 引物: GAPDH 5'-TGG CAG AGA TGC GTG GAG A-3', 5'-GGC AAG TCT TCC GAG TAG TTT T-3'; Bcl-2 5'-GGA GGA TTG TGG CCT TCT TT-3', 5'-GCC GTA CAG TTC CAC AAA GG-3'; Bcl-xl 5'-GGA CTG AAT CGG AGA TGG AG-3', 5'-TGG GAT TCA GGT CAC TGA A-3'。PCR 条件: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 40 个循环, 于 55℃、20 s 退火阶段采集荧光信号。熔解曲线的分析条件: 在荧光实时 PCR 检测仪的系统上, 将 SYBR Green I 荧光实时 PCR 的产物, 设定为从 50℃ 以 0.2℃/s 的速度缓慢上升至 95℃, 连续收集荧光信号, 系统自动绘制熔解曲线。通过样品在荧光实时 PCR 检测仪上生成扩增曲线的 Ct 值 (循环阈值), 然后, 比较基因表达差异。

1.4 免疫印迹技术

收集细胞, 用 PBS 洗涤 3 次, 加入裂解液 (50 mmol/L Tris (pH 7.5), 500 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% 脱氧胆酸盐, 0.1% SDS, 10 mmol/L MgCl₂, 完全蛋白酶抑制剂), BCA (Pierce) 法测蛋白的浓度, SDS-PAGE 电泳, 转膜 (Millipore Corp.), 依次孵育 1 抗和 2 抗, ECL (Amersham Biosciences) 显影。

2 结 果

2.1 EGFR 激活提高了头颈部鳞癌细胞抗失巢凋亡能力

研究发现, 对照组有小量的细胞克隆形成, 而经过 EGF 处理的细胞所形成的细胞克隆明显增多 (图 1A)。在显微镜下计数形成的细胞克隆数目 EGF 处理组明显多于对照组, 并呈剂量依赖关系, 差异有显著性 (图 1B), 提示 EGFR 激活提高了 HNSCC-SCC10A 细胞抗失巢凋亡能力。

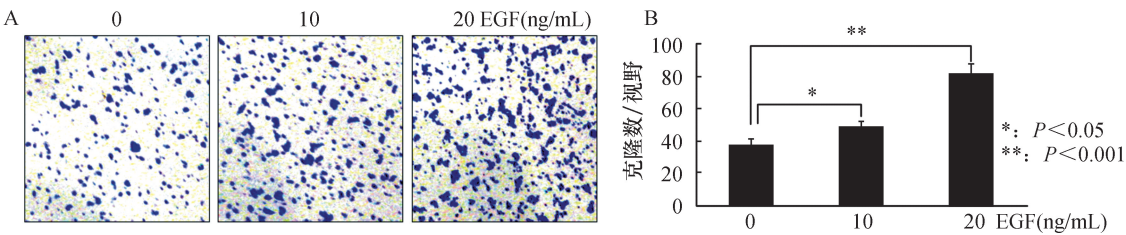


图1 EGFR 激活抑制了悬浮细胞诱导的凋亡

A: 相差图片显示 SCC10A 细胞或 EGF 处理的 SCC10A 细胞经过 48 h 的单细胞悬浮培养后, 收集细胞置于完全培养基中所形成的细胞克隆。 B: 细胞克隆固定, 用结晶紫染色, 然后记述每个视野细胞克隆

2.2 EGFR 激活诱导了 Bcl-2 和 Bcl-xl 的表达

细胞经过 EGF 处理或未处理后,收集细胞 RNA,采用实时 PCR 技术检测 Bcl-2 和 Bcl-xl 的 RNA 表达水平。EGF 处理组 Bcl-2 和 Bcl-xl 的 RNA 表达水平明显高于对照组(图 2A 和 C);进一步采用 West blotting 检测蛋白表达水平,也得到类似的结果,并呈剂量依赖关系(图 2B 和 D)。以上试验结果提示:激活的 EGFR 能上调抗凋亡基因 Bcl-2 和 Bcl-xl 的表达(图 3)。

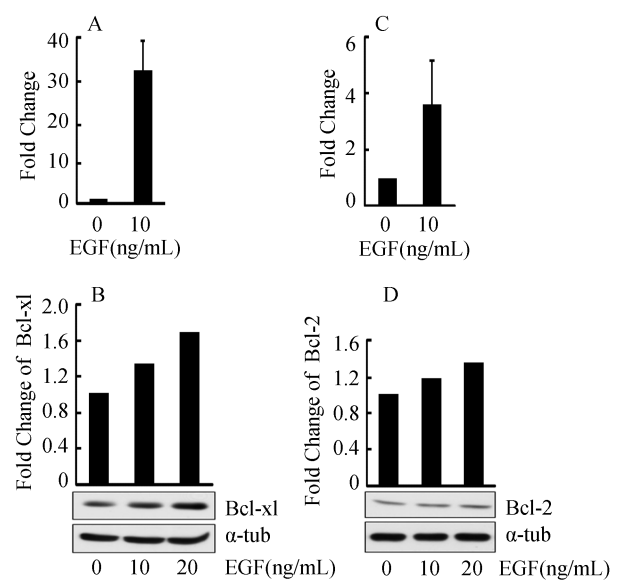


图 2 EGFR 激活上调 Bcl-xl 和 Bcl-2 的表达
A:实时 PCR 检测 Bcl-xl 的表达;B:Western blot 分析 EGFR 激活对 Bcl-xl 的表达的影响;C:实时 PCR 检测 Bcl-2 的表达;D:Western blot 分析 EGFR 激活对 Bcl-2 的表达的影响,α-tubulin 作为上样对照

3 讨 论

转移是恶性肿瘤的一个重要的生物学特征,也是 HNSCC 患者死亡的主要原因之一^[16,17]。转移是一个涉及多基因、多阶段、多步骤的复杂过程,而癌细胞的抗失巢凋亡并能生存于其它组织的能力是癌细胞侵袭与转移的重要条件之一^[18,19]。

肿瘤微环境的研究是当今肿瘤研究的热点话题之一,已有许多证据表明,肿瘤的转移与肿瘤微环境紧密相关^[20~22],表皮生长因子(EGF)是 HNSCC 肿瘤微环境中的重要细胞因子,并且在 HNSCC 肿瘤微环境中明显上调^[7,9],因而,肿瘤微环境中的 EGF 与 HNSCC 之间关系的探讨、EGF 活化 EGFR 后对失巢凋亡的影响以及具体机制的深入研究,对 HNSCC 的进一步研究有着十分重要的理论和现实意义。

细胞失巢凋亡(Anoikis)是细胞的一种特定的凋亡形式,是由于细胞与细胞外基质或相邻细胞脱离接触而诱发^[18,19]。失巢凋亡作为一种特殊的程序化细胞死亡形式,在机体发育、组织自身平衡、疾病发生和肿瘤转移中起重要作用^[18,19,23]。通常癌细胞抗失巢凋亡的能力主要与 3 种因素有关:癌基因的失活持续刺激生存信号通路;癌细胞相互形成团块,依赖细胞间的粘附存活;细胞因子作用^[19]。在本研究中,应用细胞因子 EGF 活化 EGFR,结果表明:EGFR 激活后细胞的抗失巢凋亡的能力明显增强。

为了进一步探讨 EGFR 激活后能提高细胞的抗失巢凋亡的能力的具体机制,本文检测了 2 个与抗凋亡相关的基因:Bcl-2 和 Bcl-xl 的表达情况。研究结果显示:Bcl-2 和 Bcl-xl 在 EGFR 激活后,其 RNA 水平和蛋白水平均有提高。而 Bcl-2 和 Bcl-xl 是抗凋亡基因^[24,25],因此,本研究所提供的实验结果提示:EGFR 激活后细胞的抗失巢凋亡能力的增强可能与 Bcl-2 和 Bcl-xl 的诱导表达紧密相关。

至于 EGFR 激活后上调 Bcl-2 和 Bcl-xl 的表达,是否可能与 ERK-1/2、PI3K-AKT 和 Stat3 等信号通路相关,具体的机制将在后续的研究中继续深入探讨。

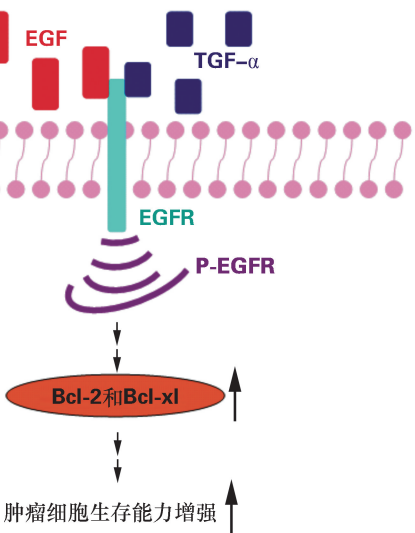


图 3 EGFR 激活抗凋亡调控示意图

参考文献:
[1] Schaaij-Visser TB, Brakenhoff RH, Leemans CR, et al. Protein biomarker discovery for head and neck cancer [J]. J Proteomics, 2010, 73:1790-1803.
[2] Yu YH, Kuo HK, Chang KW. The evolving transcriptome of head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review [J]. PLOS One, 2008, 3:e3215.

- [3] Thomas SM, Grandis JR. The current state of head and neck cancer gene therapy[J]. *Hum Gene Ther*,2009,20: 1565-1575.
- [4] Wheeler DL, Dunn EF, Harari PM. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies[J]. *Nat Rev Clin Oncol*,2010,7:493-507.
- [5] Lurje G, Lenz HJ. EGFR signaling and drug discovery [J]. *Oncology*,77:400-410.
- [6] Sheikh Ali MA, Gunduz M, Nagatsuka H, et al. Expression and mutation analysis of epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Sci*,2008,99:1589-1594.
- [7] Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer[J]. *J Clin Oncol*,2006,24:2666-2672.
- [8] Thomas SM, Coppelli FM, Wells A. Epidermal growth factor receptor-stimulated activation of phospholipase Cgamma-1 promotes invasion of head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Res*,2003,63:5629-5635.
- [9] Pornchai O-charoenrat, Helmut Modjtahedi, Peter Rhys-Evans, et al. Eccles. Epidermal growth factor-like ligands differentially up-regulate matrix metalloproteinase 9 in head and neck squamous carcinoma cells [J]. *Cancer Res*,2000,60:1121-1128.
- [10] Reuter CW, Morgan MA, Eckardt A. Targeting EGF-receptor-signalling in squamous cell carcinomas of the head and neck[J]. *Br J Cancer*,2007,96:408-416.
- [11] Valkova C, Mertens C, Weisheit S, et al. Activation by tyrosine phosphorylation as a prerequisite for protein kinase C to mediate epidermal growth factor receptor signalling to ERK[J]. *Mol Cancer Res*,2010,8(5):783-97.
- [12] Mantha AJ, McFee KE, Niknejad N, et al. Epidermal growth factor receptor-targeted therapy potentiates Iovastatin-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cells [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*,2003, 129:631-641.
- [13] Fung C, Grandis JR. Emerging drugs to treat squamous cell carcinomas of the head and neck[J]. *Expert Opin Emerg Drugs*,2010,15:355-373.
- [14] Chen LF, Cohen EE, Grandis JR. New strategies in head and neck cancer; understanding resistance to epidermal growth factor receptor inhibitors [J]. *Clin Cancer Res*, 2010,16:2489-2495.
- [15] Le Tourneau C, Faivre S, Siu LL. Molecular targeted therapy of head and neck cancer; review and clinical development challenges[J]. *Eur J Cancer*,2007,43:2457-2466.
- [16] Kupferman ME, Jiffar T, El-Naggar A, et al. TrkB induces EMT and has a key role in invasion of head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Oncogene*,2010,29: 2047-2059.
- [17] Pan Q, Gorin MA, Teknos TN. Pharmacotherapy of head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Expert Opin Pharmacother*,2009,10:2291-2302.
- [18] Rennebeck G, Martelli M, Kyprianou N. Anoikis and survival connections in the tumor microenvironment: is there a role in prostate cancer metastasis [J]? *Cancer Res*,2005,65:11230-11235.
- [19] Simpson CD, Anyiwe K, Schimmer AD. Anoikis resistance and tumor metastasis [J]. *Cancer Lett*,2008,272: 177-185.
- [20] Casimiro S, Guise TA, Chirgwin J. The critical role of the bone microenvironment in cancer metastases [J]. *Mol Cell Endocrinol*,2009,310:71-81.
- [21] Finger EC, Giaccia AJ. Hypoxia, inflammation, and the tumor microenvironment in metastatic disease[J]. *Cancer Metastasis Rev*,2010,29:285-293.
- [22] Mbeunkui F, Johann DJ Jr. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*,2009,63:571-582.
- [23] Sakamoto S, Kyprianou N. Targeting anoikis resistance in prostate cancer metastasis[J]. *Mol Aspects Med*,2010, 31:205-214.
- [24] Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, et al. The BCL-2 family reunion[J]. *Mol Cell*,2010,37:299-310.
- [25] Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family[J]. *J Cell Sci*,2009,122:437-441.

(此文编辑 朱雯霞)