

PYK-2 在 PGE₂ 诱导大肠癌细胞侵袭转移中的作用

兰小琴, 王莹, 李美宁, 张悦红, 解军, 程牛亮

Role of PYK2 in Invasion and Migration of Human Colorectal Cancer Cells Induced by PGE₂

LAN Xiao-qin, WANG Ying, LI Mei-ning, ZHANG Yue-hong, XIE Jun, CHENG Niuliang

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding Author: Cheng Niuliang, E-mail: chengniuliangty@yahoo.com

Abstract: Objective To study the role of proline-rich tyrosine kinase 2 (PYK2) in the invasion and migration of Human Colorectal Cancer SW480 Cells induced by PGE₂. **Methods** The cells were divided into A, B, C and D group, including control group, PGE₂ group, PGE₂ + SC19220 (the antagonist of EP1) group and PGE₂ + BAPTA-AM (Ca²⁺ chelator) group. The mRNA levels of the four types of EP receptors (EP1, EP2, EP3, EP4) of PGE₂ in SW480 were analyzed by RT-PCR. Western blotting was used to detect the protein level of PYK2, the invasive and migrative ability of SW480 cells was examined by transwell assay. **Results** EP1, EP2 and EP4 expressed in SW480 cells, and the mRNA level of EP1 elevated after being treated with PGE₂. The phosphorylation level of PYK2 increased gradually within ten minutes after the treatment of PGE₂, and the statistically significant differences were observed among the PYK2 phosphorylation at different time points including 0 min, 5 min and 10 min ($P < 0.05$), and there was no difference between the level at 30 and 0 min ($P > 0.05$); the PYK2 phosphorylation of C group and D group degraded, compared with that of B group ($P < 0.05$), the ability of invasion and migration of SW480 cells degraded accordingly ($P < 0.05$). **Conclusion** PGE₂ may promote the phosphorylation of PYK2 via Ca²⁺ and EP1, then induce the invasion and migration of human colorectal cancer cells.

Key words: Colorectal cancer; PGE₂; PYK2; EP1; Invasion; Migration

摘要:目的 研究富含脯氨酸的酪氨酸激酶 2 (proline-rich tyrosine kinase 2, PYK-2) 在前列腺素 E₂ (PGE₂) 诱导大肠癌 SW480 细胞侵袭转移中的作用。方法 实验分为 A、B、C、D 四组, 分别为未处理组, PGE₂ 组, PGE₂ + SC19220 (EP1 抑制剂) 组, PGE₂ + BAPTA-AM (胞内 Ca²⁺ 螯合剂) 组。通过 RT-PCR 检测 SW480 中 PGE₂ 四种 EP (EP1, EP2, EP3, EP4) 受体的表达, 应用 Western blotting 检测 SW480 细胞中 PYK-2 蛋白的表达, 应用 Transwell 实验观察各组 SW480 细胞侵袭转移能力的改变。结果 SW480 表达 PGE₂ 的三种 EP 受体, EP1, EP2 和 EP4, PGE₂ 可促进 EP1 的表达; 经 PGE₂ 作用后, 10 分钟内 PYK-2 磷酸化水平逐渐增加, 0 分钟、5 分钟、10 分钟检测结果相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 30 分钟与 0 分钟检测结果相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$); C 组、D 组与 B 组相比 PYK-2 磷酸化水平明显下降 ($P < 0.05$), 大肠癌细胞侵袭转移能力显著降低 ($P < 0.05$)。结论 PGE₂ 可能通过 Ca²⁺, EP1 促进 PYK-2 的磷酸化, 从而进一步诱导大肠癌细胞的侵袭转移过程。

关键词: 大肠癌; PGE₂; PYK-2; EP1; 侵袭; 转移

中图分类号: R735.3⁺4 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2008)10-0697-04

0 引言

蛋白酪氨酸激酶是一类能催化 ATP 上的磷酸

基转移到酪氨酸残基上, 使其发生磷酸化的蛋白质, 在细胞信号转导中占据重要地位。资料显示, 超过 50% 的原癌基因和癌基因产物都具有蛋白酪氨酸激酶活性, 它们的异常表达与活化导致细胞增殖调节发生紊乱, 进而影响肿瘤的发生发展。富含脯氨酸的酪氨酸激酶 2 (proline-rich tyrosine kinase 2, PYK-2), 也称为 Ca²⁺ 依赖性酪氨酸激酶, 是粘着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 家族的成员之

收稿日期: 2007-11-05; 修回日期: 2008-02-27
基金项目: 山西省科技攻关项目 (2006031087-02)
作者单位: 030001 太原, 山西医科大学生物化学与分子生物学教研室
通信作者: 程牛亮, E-mail: chengniuliangty@yahoo.com
作者简介: 兰小琴 (1981-), 女, 硕士, 主要从事肿瘤分子学研究

一。研究表明,它与很多肿瘤如前列腺癌^[1]、肝癌^[2]、乳腺癌^[3]、结肠癌^[4]等的发生发展密切相关。PGE₂在诱导大肠癌细胞增殖侵袭转移中发挥重要作用,对其具体作用机制的探讨引起了很多学者的关注。PYK-2 是否参与了 PGE₂ 诱导大肠癌细胞恶性变的信号通路,目前不是很清楚。本研究以大肠癌细胞 SW480 为观察对象,研究 PYK-2 在 PGE₂ 诱导大肠癌细胞迁移侵袭信号通路中的作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

大肠癌细胞株 SW480 购自上海细胞库; RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司; anti-PYK-2 多克隆抗体, anti-phospho-PYK-2 (Try⁸⁸¹) 多克隆抗体, HRP 标记的二抗购自 Santa Cruz 公司; SC19220 购自 Cayman 公司; BAPTA-AM 购自 Alexis 公司; 硝酸纤维素膜购自 Millipore 公司; ECL 发光试剂购自 Amersham 公司; 复合磷酸酶抑制剂购自普利莱基因技术有限公司; 反转录 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司; transwell 购自 Costa 公司; ECM gel 购自 Sigma 公司; 其他均为国产分析纯试剂。

1.2 实验分组

实验分四组,分别为 A 组: 未处理组、PGE₂ 组、PGE₂ + SC19220 组、PGE₂ + BAPTA-AM 组。B 组: PGE₂ 组,即将 PGE₂ 加入到无血清培养 48 h 后的 SW480 中。C 组、D 组分别为将无血清培养 48 h 的细胞分别用 SC19220 (PGE₂ + SC19220 组)、BAPTA-AM 处理 1 h 后加入 PGE₂ (PGE₂ + BAPTA-AM 组)。其中 PGE₂ 终浓度为 1 μmol/L, SC19220 终浓度为 10 μmol/L, BAPTA-AM 终浓度为 10 μmol/L。

1.3 细胞培养

SW480 细胞用含 10% 胎牛血清、100 u/ml 青霉素和 100 u/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱内培养。

1.4 RT-PCR 检测

取 A 组和加入 PGE₂ 6 h 的 B 组细胞 (约 1 × 10⁶ 个),用 TRIZOL 试剂提取总 RNA。反转录体系为 2 μl MgCl₂, 1 μl 10 × RT buffer, 2.25 μl RNase free H₂O, 1 μl dNTP, 0.25 μl RNA 酶抑制剂, 0.5 μl AMV, 0.5 μl Oligo dT, 2 μl RNA。反转录条件为 30 ℃, 10 min; 42 ℃, 1 h; 99 ℃, 5 min; 5 ℃, 5 min。PCR 反应体系为 5 μl 5 × PCR buffer, 14.375 μl 灭菌蒸馏水, 0.125 μl Taq 酶, 上下游引物各 0.25 μl, PCR 反应条件为 95 ℃ 30 s; 55 ℃ 30 s; 72 ℃ 30 s; 循环 30 次; 72 ℃ 10 min; 4 ℃ 5 min。引物

序列如下: EP1 (124 bp): 5' cgctgccatcttctccat 3' (上游), 5' gccacgaacagcaggaagg 3' (下游); EP2 (500 bp): 5' ctgctccttgcccttcac 3' (上游), 5' cagccgattgttcctcc 3' (下游); EP3 (112 bp) 5' CACCCGCCTCAACCACT 3' (上游), 5' GGACACCGATCCGCAAT 3' (下游); EP4 (446bp): 5' aagtgaaagcaggttg 3' (上游), 5' ggacagctgaagaagag 3' (下游)。Kodak 成像系统成像,扫描各条带灰度值,以其与相应管家基因 GAPDH 的比值代表其相对含量。

1.5 Western blot 检测

分别收集各组细胞,用 PBS 洗涤,并加入细胞裂解液 (含复合蛋白磷酸化酶抑制剂) 于冰上裂解 30 min, 4 ℃ 12 000 g 离心 10 min, 收集上清。用 Bradford 法测定蛋白浓度。取 50 μg 样品进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,半干式电转移至硝酸纤维素膜。5% 脱脂奶粉封闭 3 h, 分别加入用封闭液 1:500 稀释的 anti-phospho-PYK-2, anti-PYK-2 多克隆抗体, 4 ℃ 过夜, TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 加入 HRP 标记的二抗, 4 ℃ 1.5 h, TBST 洗 3 次, 每次 10 min, ECL 发光, X 线胶片曝光, 显影, 定影。应用 Bio-rad 凝胶成像仪将 X 线胶片上的 Western blotting 阳性条带进行灰度扫描, 以其积分吸光度反应其信号的强度。以 P-PYK-2 与 PYK-2 的吸光度值的比值反应 P-PYK-2 的相对水平。

1.6 Transwell 迁移实验

分别收集各组细胞,用无血清培养基洗涤 3 次,计数,配成细胞悬液。每孔上室加入含 (3~4) × 10⁴ 个细胞的细胞悬液 100 μl, 下室中加入 1 ml 含 20% 胎牛血清的 1640 培养基。每组设 3 个复孔, 37 ℃ 培养箱中, 孵育 24 h。取出 Transwell 小室, 用 PBS 洗 2 次, 4 ℃ 甲醇固定 10 min, 0.1% 结晶紫染色 0.5 h, 用 PBS 洗 2 次, 用棉球擦去上表面细胞, 显微镜下观察, 计算穿过膜细胞的平均值。

1.7 Transwell 侵袭实验

将 ECM gel 与无血清培养基以 1:1 混合, 按 80 μl/孔加入到 Transwell 上室, 余步骤同迁移实验。

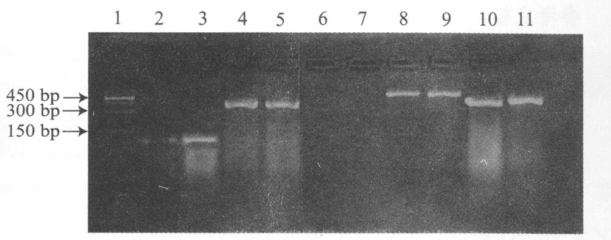
1.8 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计软件, 多组比较采用方差分析, 组间两两比较选用 SNK 法, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PGE₂ 促进 SW480 细胞 EP1 的表达

SW480 细胞中, EP1、EP2、EP4 都有表达, EP3 表达缺失。加入 PGE₂ 后, EP1 表达增加 (P < 0.05), 其他受体的表达均无显著变化, 见图 1。



1:150 bp DNA marker ,2,4,6,8,10 :A group ,3,5,7,9,11 :B group ;
2,3:EP1 ,4,5:EP2 ,6,7:EP3 ,8,9:EP4 ,10,11 :GAPDH

图 1 PGE₂对 EP 受体表达的影响

Fig 1 Effect of PGE₂ on the expression of PGE₂receptor EP

2.2 PGE₂促进 PYK-2 磷酸化

大肠癌 SW480 细胞中,可检测到较弱的磷酸化 PYK-2 的表达,经 PGE₂ 作用后,10 min 内 PYK-2 磷酸化水平随时间逐渐增加,30 min 检测基本降至基础水平,见图 2。半定量分析各时间点磷酸化 PYK-2 相对水平,0、5、10 min 的 PYK-2 磷酸化水平之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$),30 min 与 0 min 的检测结果之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 EP1 和 Ca²⁺ 介导了 PYK-2 的磷酸化

加入 PGE₂ 10 min, PYK-2 磷酸化水平明显增加,EP1 抑制剂 SC19220 和胞内 Ca²⁺ 螯合剂 BAPTA-AM 可明显降低 PYK-2 的磷酸化,见图 3a。半定量分析各组磷酸化 PYK-2 相对水平,见图 3b。经统计学分析,C、D 组与 B 组相比, PYK-2 磷酸化水平明显下降,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 EP1 和 Ca²⁺ 在 PGE₂ 诱导大肠癌细胞侵袭

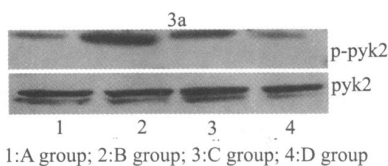
转移中发挥重要作用

Transwell 实验结果显示 B 组与 A 组相比,侵袭迁移能力增强,C、D 组与 B 组相比,侵袭迁移能力显著下降,见图 4、5。经统计学分析,B 与 A 之间,C、D 组与 B 组之间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示 PGE₂ 可明显增加 SW480 细胞的侵袭转移能力,EP1 和 Ca²⁺ 在 PGE₂ 诱导大肠癌细胞侵袭转移的过程中可能发挥重要作用。

3 讨论

PYK-2 基因是一种编码蛋白质酪氨酸激酶的基因,C 端有两个富含脯氨酸的结构,各种能使细胞内钙离子浓度升高的细胞外刺激信号均能激活 PYK-2,其他如 TNF- α 、紫外线照射,渗透压增高也能激活 PYK-2。常见的与 PYK-2 相互作用的蛋白有 Hic-5、paxillin、P130Cas 和 src 等^[5-6]。PYK-2 与 src 的相互作用,参与了很多细胞信号转导通路^[7]。接受细胞外信号刺激后,PYK-2 首先发生自磷酸化,磷酸化的 Try402 是 SH2 结构域的结合位点,可募集另一种胞质酪氨酸蛋白激酶 src 的 SH2 结构域并与其结合,使 src 被磷酸化激活,活化的 src 反过来磷酸化 PYK-2 的其他的酪氨酸磷酸化位点,使 PYK-2 进一步激活,产生多个与信号分子结合的位点,从而激活下游通路。Keely 等^[4]发现在人结肠癌 T84 细胞中,PYK-2/ src 复合体可以激活下游的 EGFR 进一步促进结肠癌的增殖侵袭。

PGE₂ 的受体有 EP1、EP2、EP3、EP4 四种;这些



1:A group; 2:B group; 3:C group; 4:D group

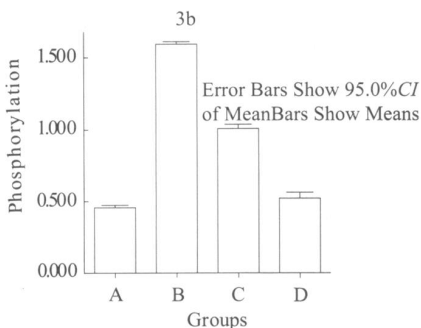


图 3 SC19220 和 BAPTA-AM 对 PYK-2 蛋白磷酸化水平的影响
Fig 3 Effect of SC19220 and BAPTA-AM on the Pyk-2 phosphorylation

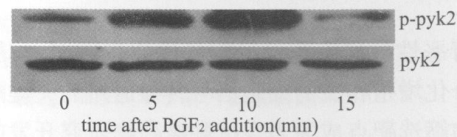


图 2 PGE₂对 SW480 细胞 PYK-2 蛋白磷酸化水平的影响

Fig 2 Effect of PGE₂ on the Pyk-2 phosphorylation

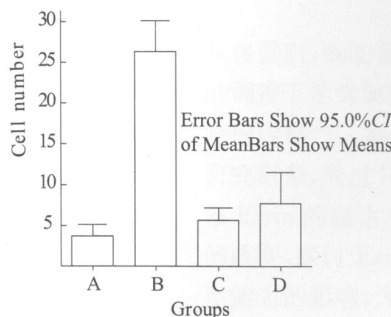


图 4 各组细胞侵袭能力检测
Fig 4 Detection of the ability of invasion in different groups

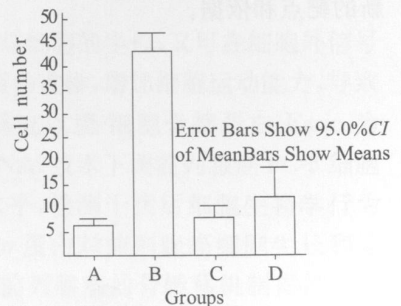


图 5 各组细胞迁移能力检测
Fig 5 Detection of the ability of migration in different groups

受体属于 G 蛋白耦连受体。实验中我们发现 PGE₂ 可以促进 SW480 细胞 EP1 的表达,这与 Tang 等^[8] 在成骨细胞中的研究相一致。PGE₂ 与 EP1 结合后通过 PLC 引起细胞内 Ca²⁺ 浓度增加^[9]。因此,钙离子浓度升高可能是 PGE₂ 和 PYK-2 的连接点, PGE₂ 与受体结合引起钙离子浓度升高,而钙离子浓度升高又成为 PYK-2 活化的刺激信号。在本实验中,我们通过测定 PGE₂ 作用后不同时间点 PYK-2 磷酸化水平,结果显示 PGE₂ 可促进 PYK-2 的磷酸化。进一步实验我们发现 EP1 抑制剂和胞内 Ca²⁺ 螯合剂可减弱 PGE₂ 的这种作用,表明 EP1 和 Ca²⁺ 在 PGE₂ 促进 PYK-2 磷酸化过程中可能发挥作用。

研究发现, PGE₂ 通过 c-src 介导激活 EGFR, 进而通过 PI3K/AKT 途径促进大肠癌细胞的增殖, 侵袭, 转移^[10]。但 PGE₂ 如何激活 C-src 机制尚不清楚。因 PGE₂ 通过与受体 EP1 结合引起钙离子浓度升高并激活 PYK-2, 而 PYK-2 与 src 之间可以相互磷酸化形成复合体激活下游的 EGFR。因此, 我们推测: PGE₂ EP1 Ca²⁺ 浓度增加 PYK-2 磷酸化 src 磷酸化 EGFR PI3K/AKT 大肠癌细胞增殖、侵袭、转移能力增强。

Transwell 迁移侵袭实验是目前测定肿瘤细胞迁移侵袭能力最理想的模型。结果表明: C 组与 B 组相比, 大肠癌细胞侵袭迁移能力明显减弱, 说明 EP1 在 PGE₂ 诱导大肠癌细胞恶性变中发挥重要作用, 这与 Han 等^[11] 在胆管癌中的研究相一致。同时实验结果提示 Ca²⁺, 作为 PYK-2 活化的必须信号, 对 SW480 细胞的侵袭转移能力也有很大影响。

随着恶性肿瘤细胞信号转导的逐步阐明, 与肿瘤细胞分化增殖相关的细胞信号转导通路的关键酶作为药物筛选靶点成为当今抗肿瘤药物研究开发的重要方向。对 PYK-2 介导的 PGE₂ 诱导大肠癌细胞迁移侵袭信号通路的研究, 有望为肿瘤的治疗提供新的靶点和依据。

参考文献:

- [1] Sahu SN, Nunez S, Bai G, et al. Interaction of Pyk2 and PTP-PEST with leupaxin in prostate cancer cells[J]. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007, 292(6): C2288-2296.
- [2] Sun CK, Ng KT, Sun KS, et al. The significance of proline-rich tyrosine kinase2 (Pyk2) on hepatocellular carcinoma progression and recurrence[J]. *Br J Cancer*, 2007, 97(1): 50-57.
- [3] Zrihan LS, Avraham S, Jiang S, et al. Coupling of RAFTK/Pyk2 kinase with c-Abl and their role in the migration of breast cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2004, 24(1): 153-159.
- [4] Keely SJ, Calandrella SQ, Barrett KE, et al. Carbachol-stimulated transactivation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase in T(84) cells is mediated by intracellular Ca²⁺, PYK-2, and p60(src) [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(17): 12619-12625.
- [5] Guignandon A, Boutahar N, Rattner A, et al. Cyclic strain promotes shuttling of PYK2/ Hic-5 complex from focal contacts in osteoblast-like cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006, 343(2): 407-414.
- [6] Choi JH, Yang YH, Lee SK, et al. Phospholipase C-gamma potentiates integrin-dependent cell spreading and migration through Pyk2/paxillin activation[J]. *Cell Signal*, 2007, 19(8): 1784-1796.
- [7] Cao Z, George J, Baden DG, et al. Brevetoxin-induced phosphorylation of Pyk2 and Src in murine neocortical neurons involves distinct signaling pathways[J]. *Brain Res*, 2007, 1184(1): 17-27.
- [8] Tang CH, Yang RS, Fu WN. Prostaglandin E2 stimulates fibronectin expression through EP1 receptor, phospholipase C, protein kinase C-alpha, and c-Src pathway in primary cultured rat osteoblasts[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(24): 22907-22916.
- [9] Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, et al. Prostanoid receptors: subtypes and signaling[J]. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 2001, 41(1): 661-690.
- [10] Buchanan FG, Wang DZ, Bargiacchi F, et al. Prostaglandin E Regulates Cell Migration via the Intracellular Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(37): 35451-35457.
- [11] Han C, Wu T. Cyclooxygenase-2-derived Prostaglandin E2 Promotes Human Cholangiocarcinoma Cell Growth and Invasion through EP1 Receptor-mediated Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor and Akt[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(25): 24053.

[编辑:周永红;校对:马福元]