

## ERK 信号转导通路在 CXCL12 促进子宫内膜癌细胞增殖和侵袭中的作用

马营营, 黄煜, 颜莉莉, 叶元英, 刘萍萍( 青岛大学附属医院 妇科, 山东 青岛 266010 )

[ 摘要 ] **目的:** 探讨趋化因子 CXCL12 及其受体 CXCR4( CXCL12/CXCR4 )生物学轴通过细胞外信号调节激酶( extracellular signal-regulated kinase, ERK )信号转导通路发挥促子宫内膜癌细胞增殖和侵袭的作用。**方法:** 应用外源性 CXCL12 处理子宫内膜癌 Ishikawa 细胞株, 通过 Western blotting 检测不同时间位点 ERK1/2 的磷酸化水平和 Survivin 蛋白的表达; 通过 ELISA 检测细胞培养上清液中 MMP-2 的分泌水平。同时分析 AMD3100 和 PD98059 对细胞 ERK1/2 磷酸化水平、Survivin 蛋白水平和 MMP-2 分泌水平的影响。**结果:** 外源性 CXCL12 刺激后, 可迅速上调 ERK1/2 的磷酸化水平(  $t = 0.887, P < 0.01$  ), 促进 Survivin 蛋白和 MMP-2 蛋白的表达(  $t = 0.861, P < 0.01$ ;  $t = 0.297, P < 0.01$  ), 且三者均呈时间依赖性。PD98059 和 AMD3100 均能明显抑制外源性 CXCL12 诱导后 ERK1/2 的磷酸化水平, 而且在两者共同作用下, 能完全抑制 ERK1/2 的磷酸化水平, 阻断 ERK 通路的激活, 下调 Survivin 蛋白和 MMP-2 蛋白的表达。**结论:** CXCL12/CXCR4 生物学轴通过激活 ERK 通路上调 Survivin 蛋白和 MMP-2 蛋白表达, 从而引发 Ishikawa 细胞一系列增殖和侵袭的生物学效应。

[ 关键词 ] 趋化因子 CXCL12; 子宫内膜癌; 细胞外信号调节激酶 1/2; Survivin 蛋白; MMP-2 蛋白

[ 中图分类号 ] R739.41; R730.54; R939 [ 文献标识码 ] A [ 文章编号 ] 1007-385X(2016)02-0250-05

## Role of ERK transduction signaling pathway in proliferation and invasion of endometrial carcinoma cells promoted by CXCL12

MA Yingying, HUANG Yu, YAN Lili, YE Yuanying, LIU Pingping ( Department of Gynecology, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266010, Shandong, China )

[ Abstract ] **Objective:** To explore the role of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 ( biologic axis CXCL12/CXCR4 ) in promoting proliferation and invasion of endometrial carcinoma cells through transduction signaling pathway of extracellular signal-regulated kinase ( ERK ). **Methods:** Ishikawa endometrial carcinoma cell line was treated with exogenous CXCL12. The phosphorylation of ERK1/2 and the expression of survivin protein at different time points were detected by Western blotting; and secretion level of MMP-2 in supernatant of cell culture was measured by ELISA. At the same time, effects of AMD3100 and PD98059 on phosphorylation level of ERK1/2, level of Survivin protein and secretion level of MMP-2 were analyzed. **Results:** After treatment with exogenous CXCL12, phosphorylation level of ERK1/2 was rapidly risen (  $t = 0.887, P < 0.01$  ) as well as expressions of Survivin and MMP-2 proteins were boosted (  $t = 0.861, P < 0.01$ ;  $t = 0.297, P < 0.01$  ) in a time dependent manner. Both of PD98059 and AMD3100 could significantly inhibit the phosphorylation level of p-ERK after induction with exogenous CXCL12. Combined action of PD98059 and AMD3100 could completely inhibit phosphorylation of ERK, block the activation of ERK pathway, and down-regulate the expressions of Survivin and MMP-2 proteins. **Conclusion:** Biologic axis of CXCL12/CXCR4 could up-regulate the expressions of Survivin and MMP-2 proteins through activation of ERK pathway, thus inspire a series of biological effects in proliferation and invasion of the Ishikawa cell.

[ Key words ] chemokine CXCL12; endometrial carcinoma; extracellular signal-regulated kinase 1/2; Survivin protein; MMP-2 protein

[ Chin J Cancer Biother, 2016, 23( 2 ): 250-254. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.02.016 ]

[ 基金项目 ] 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金资助项目( No. BS2009SW002 ); 山东省自然科学基金资助项目( No. ZR2013HM012 )。Project supported by the Scientific Research Foundation of Shandong Province for Outstanding Young Scientist Award( No. BS2009SW002 ), and the Natural Science Foundation of Shandong Province ( No. ZR2013HM012 )

[ 作者简介 ] 马营营( 1987 - ), 女, 山东省济宁市人, 硕士生, 主要从事妇科肿瘤基础和临床研究, E-mail: linchuangmy@163.com

[ 通信作者 ] 黄煜( HUANG Yu, corresponding author ), E-mail: huangyuqd@126.com

子宫内膜癌是常见的妇科恶性肿瘤之一,以内膜样腺癌最常见。随着人类生活水平的提高和人类寿命的延长,子宫内膜癌的发病率有逐年上升趋势且趋于年轻化,但其发病原因仍不十分清楚。笔者以往的实验已经证实 CXCL12/CXCR4 生物学轴可促进子宫内膜癌 Ishikawa 细胞的侵袭、转移及增殖,并可能在子宫内膜癌的发生发展和转移中发挥调控作用<sup>[1]</sup>,但其作用的细胞内信号转导通路尚不明确。研究表明<sup>[2]</sup>,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)信号转导通路与肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移密切相关,目前已鉴定出 3 条,其中细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)1/2 通路是最重要的通路。Survivin 在肿瘤组织中特异性的高表达<sup>[3]</sup>,而且在细胞增殖和凋亡失衡中起到了决定性的作用,进而参与肿瘤的发生与发展。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)降解大部分的细胞外基质,进而促进肿瘤细胞的生长、侵袭和转移<sup>[4]</sup>。为此,本文拟探讨 CXCL12/CXCR4 生物轴促进子宫内膜癌细胞增殖和侵袭的细胞内信号转导机制与 ERK 通路的关系,揭示该途径在子宫内膜癌细胞增殖和侵袭中的调节作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与细胞株

DMEM 高糖培养基购自 Gibco 公司;人基质细胞衍生因子 1a(SDF-1a/CXCL12)购自中国武汉博士德生物公司;PD98059 和 AMD3100 购自 Sigma 公司;抗磷酸化和非磷酸化 ERK1/2 抗体购自美国 CST 公司;抗 Survivin 抗体购自 Abcam 公司;MMP-2 检测试剂盒购自 USCNK 公司;抗 GAPDH 抗体购自康成公司;人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞株由青岛大学附属医院中心实验室保存。

### 1.2 Ishikawa 细胞培养

在含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液中常规培养 Ishikawa 细胞,每天更换培养液。置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中。当细胞融合达到 90% ~ 95% 时用 0.25% 胰酶(含 0.02% EDTA)消化、传代。以每孔 3 × 10<sup>5</sup> 个细胞等量接种于六孔板中,加入 100 ng/ml 的外源性 CXCL12 作用 0 ~ 30 min,分别于 0、5、15、30 min 提取蛋白,用于 ERK1/2 的磷酸化检测,或作用 0 ~ 24 h,分别于 0、3、6、12、24 h 提取蛋白和细胞上清液,分别用于 Survivin 蛋白和 MMP-2 蛋白的检测。当进行药物抑制实验时,先用 100 ng/ml 的 AMD3100(CXCR4 的拮抗剂)或 30

umol/L 的 PD98059(ERK 通路的阻断剂)预处理细胞 30 min,再分别加入 100 ng/ml 的外源性 CXCL12 作用细胞 5 min、12 h 或 6 h。将不同处理的细胞分别提取蛋白和细胞上清液,以备 Western blotting 和 ELISA 检测。

### 1.3 Western blotting 检测 ERK1/2 的磷酸化、Survivin 蛋白的表达

15 μl/孔上样,然后行 SDS-PAGE,转膜、洗膜、封闭。TBST 洗涤,加兔抗人 GAPDH 单抗(1:5 000),兔抗人 p-ERK 单抗(1:2 000),小鼠抗人 ERK 单抗(1:1 000),兔抗人 Survivin 单抗(1:2 000),4 °C 摇床孵育过夜。TBST 洗涤,加 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体(1:5 000),HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体(1:5 000),室温孵育后,加化学发光试剂。发光成像仪曝光成像,采用 Quantity One 软件对条带进行灰度分析。实验重复 3 次。

### 1.4 ELISA 检测 MMP-2 蛋白的表达

Ishikawa 细胞用胰酶消化后制成单细胞悬液,以每孔 3 × 10<sup>5</sup> 接种于 6 孔板中,分别于 0、3、6、12、24 h 后收集细胞上清,1 000 × g 离心 20 min。实验中分别设置标准孔、待测样品孔、空白孔。每组各设 5 个复孔。加样、孵育、洗板等实验流程均按照说明书操作。实验结束后,立即用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的光密度(D 值)。

### 1.5 统计学处理

采用 SPASS20.0 统计软件对结果进行分析。实验结果采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 外源性 CXCL12 诱导 ERK 通路的激活

Western blotting 检测结果显示,空白组 Ishikawa 细胞具有一定水平的磷酸化 ERK1/2 的表达。当外源性 CXCL12(100 ng/ml)刺激后,Ishikawa 细胞中磷酸化 ERK1/2 的表达迅速上调,5 min 即出现并达到高峰( $t = 0.887$ ,  $P < 0.01$ ),持续一段时间后逐渐减弱;非磷酸化的 ERK1/2 则无明显变化(图 1)。用 PD98059 或 AMD3100 预处理细胞 30 min,均可明显抑制外源性 CXCL12 诱导下的 Ishikawa 细胞中 ERK1/2 的磷酸化水平,阻滞 ERK 通路的激活,两者联合添加几乎完全阻滞 ERK 通路的激活( $t = 0.107$ ,  $P < 0.01$ ) (图 2)。

### 2.2 外源性 CXCL12 对 Survivin 蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果显示,空白组 Ishikawa 细胞具有一定水平的 Survivin 蛋白表达。当外源性

CXCL12( 100 ng/ml )刺激后, Ishikawa 细胞中 Survivin 蛋白的表达量迅速增加, 作用 3 h 后即出现, 于 12 h 达到峰值(  $t = 0.861, P < 0.01$  ), 24 h 降至基础水平( 图 3 )。

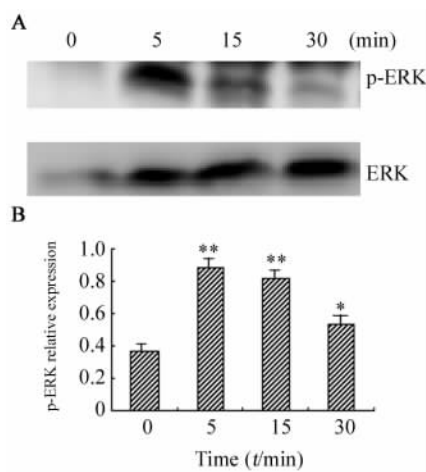


图 1 rhCXCL12 对 Ishikawa 细胞 ERK1/2 磷酸化水平的影响

Fig. 1 Effect of rhCXCL12 on phosphorylation level of ERK1/2 in Ishikawa cells

A: Western blotting; B: Relative expression level  
\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs 0 h

当用 AMD3100 或 PD98059 预处理细胞时, Survivin 蛋白的表达量均明显下降, 两者同时处理时, Survivin 蛋白的表达量几乎为零(  $t = 0.237, P < 0.01$  )。由此表明, Survivin 蛋白的表达依赖于 ERK 通路的激活, 而且 AMD3100 和 PD98059 之间有协同抑制作用( 图 4 )。

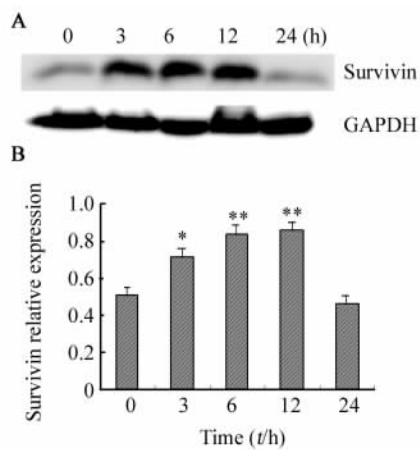


图 3 rhCXCL12 对 Ishikawa 细胞 Survivin 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effects of rhCXCL12 on protein expression of survivin in Ishikawa cells

A: Results of Western blotting; B: Relative expression level  
\*\*  $P < 0.05$ , \*  $P < 0.01$  vs 0 h

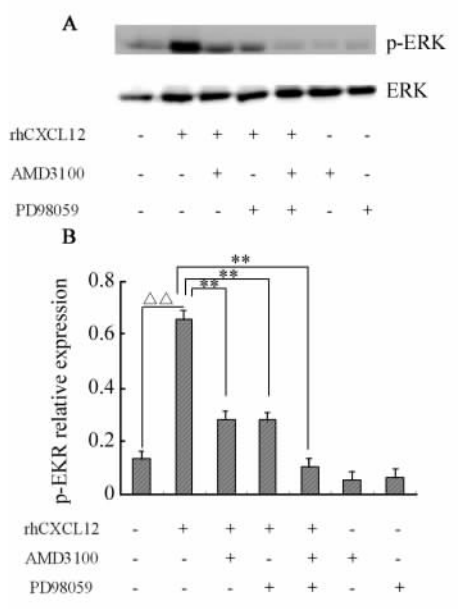


图 2 AMD3100 和 PD98059 对 Ishikawa 细胞 ERK1/2 磷酸化水平的影响

Fig. 2 Effects of AMD3100 and PD98059 on phosphorylation level of ERK1/2 in Ishikawa cells

A: Result of Western blotting; B: Relative expression level  
\*\*  $P < 0.01$  vs rhCXCL12( + ) and AMD3100( - ) and PD98059( - );  
 $\Delta\Delta P < 0.01$  vs rhCXCL12( - ) and AMD3100( - ) and PD98059( - )

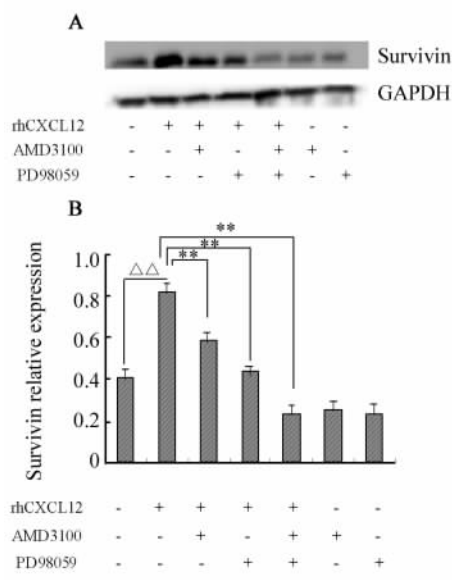


图 4 AMD3100 和 PD98059 对 Ishikawa 细胞 Survivin 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effects of AMD3100 and PD98059 on protein expression of Survivin in Ishikawa cells

A: Result of Western blotting; B: Relative expression level  
\*\*  $P < 0.01$  vs rhCXCL12( + ) and AMD3100( - ) and PD98059( - );  
 $\Delta\Delta P < 0.01$  vs rhCXCL12( - ) and AMD3100( - ) and PD98059( - )

2.3 外源性 CXCL12 促 Ishikawa 细胞 MMP-2 的分泌

ELISA 检测结果显示, 空白组 Ishikawa 细胞具有一定水平的 MMP-2 蛋白表达, 应用外源性 CXCL12 可促进 Ishikawa 细胞 MMP-2 的分泌, 且该作用呈时间依赖性, 随着 CXCL12 作用于 Ishikawa 细胞的时间延长, MMP-2 蛋白的分泌量逐渐增加, 于 6 h 达到最高值 ( $t = 0.297, P < 0.01$ ) (图 5)。当用 AMD3100 或 PD98059 预处理细胞时, MMP-2 蛋白的分泌量均明显下降 ( $t = 0.127, t = 0.130, P < 0.01$ ), 两者同时处理时, MMP-2 蛋白的分泌量未见明显下降。由此表明, 外源性 CXCL12 促进子宫内膜癌 Ishikawa 细胞的侵袭依赖于 ERK 通路的激活 (图 6)。

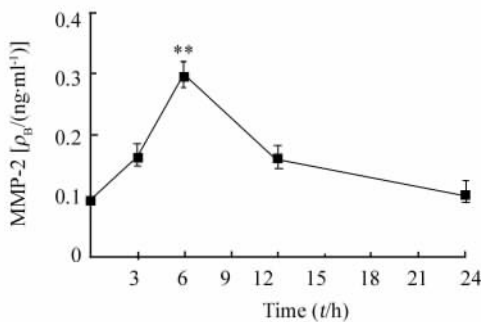


图 5 rhCXCL12 对 Ishikawa 细胞分泌 MMP-2 的影响

Fig. 5 Effect of rhCXCL12 on secretion of MMP-2 in Ishikawa cells

\*\*  $P < 0.01$  vs 0 h

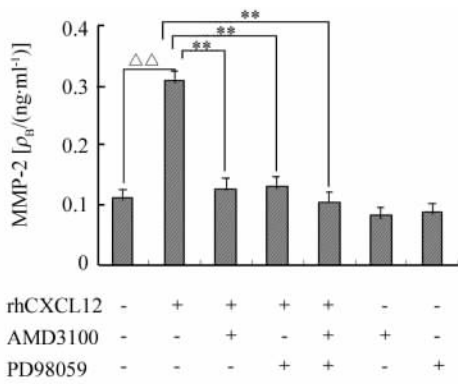


图 6 AMD3100 和 PD98059 对 Ishikawa 细胞 MMP-2 蛋白分泌的影响

Fig. 6 Effects of AMD3100 and PD98059 on secretion of MMP-2 in Ishikawa cells

\*\*  $P < 0.01$  vs rhCXCL12 (+) and AMD3100(-) and PD98059(-);

$\Delta\Delta P < 0.01$  vs rhCXCL12(-) and AMD3100(-) and PD98059(-)

3 讨论

趋化因子(chemokines)是一组在结构和功能上相似的小分子量(8~14 kD)蛋白质。对趋化因子的认识最初起源于炎症, 认为其在调控细胞向炎症定向迁移的过程中起到了至关重要的作用<sup>[5]</sup>。越来越多的研究表明, 趋化因子及其受体与肿瘤的增殖、侵袭和转移密切相关<sup>[6-7]</sup>。趋化因子与其受体结合后形成耦联分子对, 激活受体耦联的 G 蛋白, 改变 G 蛋白的化学结构, 进一步激活细胞内的多种信号通路促进肿瘤细胞的生长、增殖、侵袭、转移和血管生成, 从而促进恶性肿瘤的发生和发展<sup>[8]</sup>。作者前期的实验已证实, 子宫内膜癌细胞系可高表达 CXCL12 及其受体 CXCR4, 并且通过 CXCL12/CXCR4 生物学轴参与子宫内膜癌细胞的增殖、侵袭和转移等一系列生物学行为<sup>[1]</sup>。因此, 研究 CXCL12/CXCR4 生物学轴促进子宫内膜癌增殖和侵袭的细胞内信号转导通路, 有助于进一步了解子宫内膜癌增殖、侵袭、转移的机制和发病原因, 从而为子宫内膜癌的预防、治疗和预后判断提供新的思路。

近来研究表明<sup>[9-10]</sup>, MAPK 通路在恶性肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移的生物学行为中起着至关重要的作用。MAPK 通路是将细胞外的刺激作为信号转导至细胞核内, 通过影响细胞核内基因的表达, 从而影响恶性肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移及凋亡的一系列生物学行为。已知 MAPK 通路有 3 条途径, 其中, Ras/Raf/MEK/ERK1/2 途径, 是 MAPK 家族的重要组成部分, 而且是 MAPK 系统的经典通路, 该通路是一系列的级联反应, 即 Raf、MEK、ERK1/2 激酶依次被激活<sup>[11]</sup>。本文用 100 ng/ml 的外源性 CXCL12 作用于 Ishikawa 细胞可诱导 ERK1/2 的磷酸化水平, 应用 AMD3100 或 PD98059 均能抑制其作用, 而且两者同时作用时效果更加显著, 说明 rhCXCL12 可能通过激活 ERK 通路, 进而活化下游分子促进子宫内膜癌细胞的增殖和侵袭作用。

Survivin 是最近发现的凋亡抑制家族新成员, 具有促进细胞增殖和抗细胞凋亡的双重作用。Survivin 在肿瘤组织中的表达具有高度特异性, 在正常成熟组织中的表达几乎为零, 而在大多数肿瘤组织中高表达, 且与肿瘤的恶性程度密切相关<sup>[12-13]</sup>。本文结果表明, CXCL12 与其受体 CXCR4 结合后激活 ERK 通路, 上调 Survivin 蛋白的表达, 进而参与子宫内膜癌细胞的增殖作用。

MMPs 家族主要通过降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)、破坏基底膜介导的肿瘤细胞侵

袭和转移<sup>[14]</sup>。研究<sup>[15-16]</sup>表明 MMP-2 和 MMP-9 是破坏基底膜IV型胶原蛋白和参与肿瘤血管形成最主要的酶。本文结果表明,CXCL12 与其受体 CXCR4 的相互作用促进子宫内膜癌细胞分泌 MMP-2,使肿瘤细胞穿越基底膜,侵入细胞外基质,向远处转移。

总之,CXCL12 可促进子宫内膜癌细胞的增殖、侵袭和转移能力,该作用的机制与 ERK 信号转导通路有关,充分提示通过阻断 ERK 信号转导通路治疗子宫内膜癌是临床治疗的新思路。

[ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] 刘萍萍. 趋化因子 CXCL12 及其受体 CXCR4 对子宫内膜癌细胞株生物学行为的调控 [ D ]. 青岛大学, 2013.

[ 2 ] ZHANG Y, DONG C. Regulatory mechanisms of mitogen-activated kinase signaling [ J ]. Cell Mol Life Sci, 2007, 64( 21 ): 2771-2789. DOI:10.1007/s00018-007-7012-3.

[ 3 ] 余章斌,郭锡熔. 肥胖相关新基因 NYGGF4 的系列研究 [ J ]. 实用儿科临床杂志,2012, 27( 1 ):53-56. DOI: 10.3969/j.issn.1003-515X.2012.01.020.

[ 4 ] FAN X H, LI H X, CHEN D, et al. Changes in the expression of MMP2, MMP9, and Coliv in stromal cells in oral squamous tonguecell carcinoma: relationships and prognostic implications [ J ]. Exp Clin Cancer Res, 2012, 31: 90. DOI: 10.1186/1756-9966-31-90.

[ 5 ] BENDALL L. Chemokines and their receptors in disease [ J ]. Histol Histopathol, 2005, 20( 3 ): 907-926. PMID:15944942.

[ 6 ] BALKWILL F. Chemokine biology in cancer [ J ]. Semin Immunol, 2003, 15( 1 ): 49-55. DOI:10.1016/s1044-5323(02)00127-6.

[ 7 ] BALKWILL F. Cancer and the chemokine network [ J ]. Nat Rev Cancer, 2004,4( 7 ):540-550. DOI: 10.1038/nrc1388.

[ 8 ] GANJU R K, BRUBAKER S A, MEYER J, et al. The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multi-

ple signal transduction pathways [ J ]. J Biol Chem, 1998, 273 ( 36 ): 23169-23175. DOI: 10.1074/jbc.273.36.23169.

[ 9 ] ORTEGA E, MARTI R M, YERAMIAN A, et al. Targeted therapies in gynecologic cancers and melanoma [ J ]. Semin Diagn Pathol, 2008, 25: 262-273. DOI: 10.1053/j.semmp.2008.07.008.

[ 10 ] ERALP Y, DERIN D, OZLUK Y, et al. MAPK overexpression is associated with anthracycline resistance and increased risk for recurrence in patients with tripl-negative breast cancer [ J ]. Ann Oncol, 2008, ( 914 ): 669-674. DOI:10.1093/annonc/mdm522.

[ 11 ] KONDOH K, TORII S, NISHIDA E. Control of MAP kinase signaling to the nucleus [ J ]. Chromosoma, 2005, 114( 2 ): 86-91. DOI:10.1007/s00412-005-0341-9.

[ 12 ] ROHAYCM J, DIESTELKOETTER P, WEIGLE B. Antibody response to the tumor-associated inhibitor of apoptosis protein Survivin in cancer patients [ J ]. Cancer Res, 2000, 60( 7 ): 1815-1817. DOI:10.1111/j.1365-2842.2009.01975.x.

[ 13 ] 陶红芳,徐之良,江毅,等. 小分子干扰技术缄默 Survivin 基因表达对 Jurkat 细胞凋亡和化疗敏感性的影响 [ J ]. 实用儿科临床杂志,2012, 27( 15 ):1147-1150. DOI: 10.3969/j.issn.1003-515X.2012.15.004.

[ 14 ] BAUVOIS B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression [ J ]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1825( 1 ): 29-36. DOI: 10.1016/j.bbcan.2011.10.001.

[ 15 ] 高敏娜. E-cadherin 和 MMP-2 在大肠癌中的表达及其意义 [ J ]. 世界科技研究与发展,2013, 35( 4 ):514-517. DOI:10.3969/j.issn.1006-6055.2013.04.021.

[ 16 ] JEDRYKA M, CHROBAK A, CHELMONSKA SOYTA A, et al. Matrix metalloproteinase ( MMP )-2 and MMP-9 expression in tumor infiltrating CD3 lymphocytes from women with endometrial cancer [ J ]. Int J Gynecol Canner, 2012, 22( 8 ): 1303-1309. DOI:10.1097/IGC.0b013e318269e27b.

[ 收稿日期 ] 2015 - 12 - 06 [ 修回日期 ] 2016 - 03 - 01  
 [ 本文编辑 ] 党瑞山

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对论文中实验动物描述的要求

根据国家科学技术部 1988 年颁布的《实验动物管理条例》和卫生部 1998 年颁布的《医学实验动物管理实施细则》,本刊对论文中有关实验动物的描述,要求写清楚以下事项:(1)品种、品系及亚系的确切名称;(2)遗传背景或其来源;(3)微生物检测状况;(4)性别、年龄、体重;(5)质量等级及合格证书编号;(6)饲养环境和实验环境;(7)健康状况;(8)对动物实验的处理方式。

医学实验动物分为四级:一级为普通级;二级为清洁级;三级为无特定病原体(SPF)级;四级为无菌级(包括悉生动物)。省部级课题及研究生毕业论文等科研实验必须应用二级以上的实验动物。

( 本刊编辑部 )