

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

熱休克對胃腸道癌細胞catenin及上皮生長因子
接受體的影響

The effects of heat shock to catenins and epidermal
growth factor receptor in gastrointestinal cancers

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC89 - 2314 - B - 038 - 054 -

執行期間： 89年 8月 1日至90年 7月 31日

計畫主持人：謝茂志

共同主持人：吳秋文，余家利

本成果報告包括以下應繳交之附件：
赴國外出差或研習心得報告一份
赴大陸地區出差或研習心得報告一份
出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：台北醫學大學醫學系

中華民國 90 年 10 月 31 日

熱休克對胃腸道癌細胞catenin及上皮生長因子 接受體的影響

The effects of heat shock to catenins and epidermal growth factor receptor in gastrointestinal cancers

計畫編號：NSC89-2314-B038-054

執行期限：89年8月1日 至 90年7月31日

主持人：謝茂志，台北醫學大學醫學系

共同主持人：吳秋文，台北榮民總醫院

共同主持人：余家利，台灣大學醫學院

一、中文摘要

利用胃癌細胞株對於受到熱休克及上皮生長因子接受體的影響，其catenin，E-cadherin 表現的改變做研究，發現熱休克對於catenin的影響並不顯著，但是上皮生長因子接受體對於E-cadherin的影響卻呈現有意義的差別。

二、英文摘要

Using three gastric cancer cell lines (SC-M1, NU-GC-3, AGS), the E-cadherin and catenin expression was detected under the treatments of heat shock and epidermal growth factor receptor. The catenin expressions were not significantly affected by heat shock treatment, but the concentration of soluble E-cadherin was significantly changed after the treatment of epidermal growth factor receptor.

三、緣由

Catenin 是在細胞內與 E-cadherin 相連接的一種蛋白質 [1,2,3]。E-cadherin 廣泛存在於上胚層來源的細胞中。E-cadherin 與細胞的形態分化皆有關係，其表現與癌症轉移息息相關，更與癌症病患的預後有關。E-cadherin 的功能與 catenin 的功能息息相關。愈來愈多的實驗證據顯示，上皮生長因子接受體 (EGFR) 的磷酸化，透過與 beta-或 gamma-catenin 的交互作用，與引起 E-cadherin/catenin 複合體的不活化有關。

我們先前的實驗已測知胃癌細胞會表現E-cadherin。我們先前已測知胃癌細胞表現 E-cadherin會受到熱休克的影響而改變，最近更發現胃癌細胞上catenin的表現也都不盡相同。腹腔內高溫療法(熱休克的應用)已被用來治療胃腸道癌合併腹腔內轉移的病例。此種治療結果，可能有部分原因是熱休克會改變胃腸道癌細胞表面對於E-cadherin表現程度的改變。我們假設熱休克也將改變胃腸道癌細胞EGFR及catenin的表現程度。在本研究中，我們去偵測胃腸道

癌細胞中的 E-cadherin, catenin, EGFR, phosphorylated tyrosine residues, EGFR-tyrosine kinase 在熱休克前後不同的表現程度。

四、材料及方法

我們同樣利用一個日本的人類胃癌細胞株 NU-GC-3 [4]，一個中國的人類胃癌細胞株 SC-M1 [5]，以及一個美國的人類胃癌細胞株 AGS [6] 來作此研究。其中 NU-GC-3 是從肌肉分離培養出來分化不良的轉移性胃腺癌細胞，為多角形，培養於 1 : 1 的 RPMI-1640 與 Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco®) 混合液內含 10% 的胎牛血清。SC-M1 則是從胃癌組織中所培養出來的胃腺癌。SC-M1 培養於 RPMI-1640 (Gibco®, Grand Island, NY)。AGS 則是培養於 Ham's F-10。以上的培養基皆含有 10% 的胎牛血清。這些細胞都是培養在 37 °C, 5% CO₂-95% air。

細胞的熱休克處理是將培養中的細胞，連同培養皿一起加熱到 42.5 ± 0.1 °C [7] 並持續 30 分鐘，60 分鐘及 120 分鐘不等，另有一組不經加熱處理以作為對照組。加熱以後的細胞以 2mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 溶液處理使其剝落，並以 Trypan Blue 染色，並在顯微鏡下觀察其存活率及計數。結果顯示經加熱 30 分鐘，60 分鐘及 120 分鐘後的細胞存活率分別為 96%，89% 及 47%。因此對於熱休克處理後的細胞觀察，我們認為 60 分鐘為最適當的時間。

對於 EGF 之處理，則先以無血

清之培養液培養 36 小時後，再加入 200 ng/ml 之 EGF 於 37 °C, 5% CO₂-95% air 中處理 10 分鐘，再將細胞以 2mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 溶液處理使其剝落取下。

上述各種條件處理後的細胞溶液以 1.5 毫升, 0.125M Tris buffer, pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) 2-mercaptoethanol, 10% (w/v) glycerol, 0.001% (w/v) bromophenol blue 的 Laemmli sample solution [8] 溶解，加熱 100 °C, 三分鐘，再經過超高速離心 100,000 g, 4 °C 之一小時，收集上清液。先將上清液定量後取 10 μg 的濃度以作為 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 電泳分析 [9]。並將電泳分析後之蛋白轉移至 nitrocellulose membrane。此 nitrocellulose membrane 先以 5% 脫脂牛奶加上 Tris buffer saline 一小時來阻斷 (blocking) 非專一性的結合，之後以 PBS 沖洗三次，再以 primary antibody (如上所述的各種抗體) 作用一小時。以 PBS 沖洗三次後，再以經 horseradish peroxidase 結合 (HRP-conjugated) 的 goat anti-mouse 或 anti-rat IgG 作用一小時。以 PBS 沖洗三次後，以 enhanced chemiluminescence (ECL; Amersham, Aylesbury, UK) 方法曝光於 X 光片上顯示出來。

另外，於熱休克及 EGF 處理結束後，收集細胞培養的上清液來測定可溶性 E-cadherin。可溶性 E-cadherin 之測量乃依據市面上所購得的三層式酵素連結免疫分析套件 (Zymed Laboratories Inc., San Francisco,

USA)，其中含有兩種老鼠 (mouse) 抗人體 E-cadherin 不同表位 (epitope) 的單株抗體。利用山葵過氧化酶 (horseradish peroxidase, HRP) 標誌在次級抗體上，可決定人體可溶性 E-cadherin 之濃度。在波長 450nm 時，利用 ELISA 讀取器，可讀取其透光度，並利用波長 630nm 作為矯正。每一個樣本至少都做雙重以上的檢驗，並取其平均值為測量濃度。

所有的胃癌病患都依照日本胃癌研究學會 [10] 所推薦的胃切除手術 (全胃切除或次全胃切除) 以及淋巴結廓清術來進行手術。將癌組織及非癌之胃粘膜成對取下。所有的標本都在收集後便保存於 -80℃，一直到取出使用。

五、結果

胃癌細胞株經熱休克處理後之 E-cadherin，在西方墨點法之下，有明顯之增強表現之現象 (圖一)，而 alpha-catenin (圖二)、beta-catenin (圖三)、gamma-catenin (圖四) 則無明顯之變化。

然而，經過上皮生長激素接受體的影響之下，對此三種胃癌細胞株來測定可溶性 E-cadherin 之表現，卻可發現 E-cadherin 的濃度可受到影響而降低 (表一)。

六、討論

Catenin 是 E-cadherin 所連結的功能性蛋白質，因此推測 catenin 可以影響 E-cadherin 的表現。然而從我們的初步結果顯示，在熱休克的影響下似乎 catenin 並沒有對 E-cadherin 有直

接的關係 (圖二、圖三、圖四)。但是當我們進一步測定可溶性 E-cadherin 與上皮生長激素接受體之間的關係時，卻可發現可溶性 E-cadherin 的濃度確實會受到影響而減少 (表一)。El-Bahrawy [11] 提到第一行的生長因素接受體與其他的分子作用，經由 tyrosine phosphorylation 而影響 catenin 的功能。任何生化學上的改變或基因突變上的改變，都有可能間接影響 catenin 的功能而導致細胞的不正常生長及分化 [12, 13, 14]。Shiozaki 更指出，一旦上皮生長因素接受體受到刺激，將抑制 E-cadherin 的表現而導致癌細胞的轉移及侵襲性 [12]。而在我們的實驗結果顯示，受到生長因素接受體的處理後，胃癌細胞培養上清液中的可溶性 E-cadherin 濃度，在 SC-M1 及 AGS 兩種細胞接呈現有意義的降低。在胃癌病患的血清中，較高的可溶性 E-cadherin 濃度表示預後不佳，亦即容易有癌轉移的現象 [15]。NU-GC-3 細胞的培養上清液中的可溶性 E-cadherin 亦有減少的趨向，只是為達到有意義的差別。這結果顯示上皮生長激素接受體是會影響到癌細胞 E-cadherin 的表現，只是程度的大小而已。

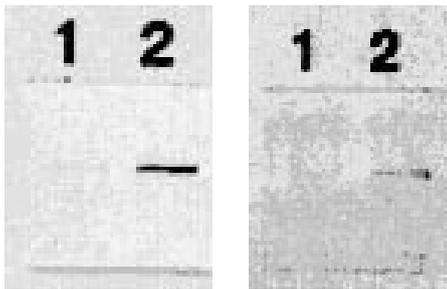
我們首度發現在胃癌細胞中，E-cadherin 的表現會受到上皮生長因素接受體的影響，而且以可溶性 E-cadherin 的影響最顯著。進一步的澄清，需要對於 catenin，上皮生長因素接受體，tyrosine phosphorylation 以及可溶性 E-cadherin 之間的複雜關係做進一步的探討。

七、參考資料

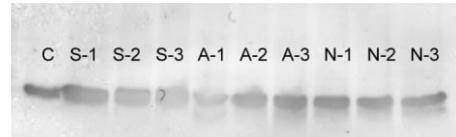
1. Reynolds AB, Daniel J, McCreia PD, Wheelock MJ, Wu J, Zhang Z. Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complex. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 8333-8342.
2. Shibamoto S, Hayakawa M, Taceuchi K et al. Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin / catenin complexes. *J Cell Biol* 1995; 128: 949-957.
3. Aghib DF, McCreia PD. The E-cadherin complex contains the src substrate p120. *Exp Cell Res* 1995; 218: 359-369.
4. Akiyama S, Amo H, Watanabe T, Matsuyama M, Sakamoto J, Imaizumi M, Icgihashi H, Kondo T, Takagi H. Characteristics of three human gastric cancer cell lines, NU-GC-2, NU-GC-3 and NU-GC-4. *Jpn J Surg* 1988; 4: 438-446.
5. King LD, Meng CL, Han SH, Ding MJ, Chang JM, Chen JK, Shen KL. Study of monoclonal antibody by Chinese gastric cancer cell lines (In Chinese). *J Med Sci* 1987; 8: 17-25.
6. Barranco SC, Townsend CM, Casartelli C JR, Macik BG, Burger NL, Boerwinkle WR and Gourley WK. Establishment and characterization of an in vitro model system for human adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1983; 43: 1703-1709.
7. Teicher BA, Kowal CD, Kennedy KA and Sartorelli AC. Enhancement by hyperthermia of the in vitro cytotoxicity of mitomycin C toward hypoxic tumor cells. *Cancer Res* 1981; 41: 1096-1099.
8. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(Lond.)*, 227: 680-685, 1970.
9. Dunn MJ. *Gel Electrophoresis: proteins*. Bios Scientific Publishers Limited, Oxford, UK. 1993.
10. Japanese Research Society of Gastric Cancer (JRSGC). *Japanese classification of gastric carcinoma*. Kanehara & Co., Ltd., Tokyo, 1995.
11. El-Bahrawy MA, Pignatelli M. E-cadherin and catenins: molecules with versatile roles in normal and neoplastic epithelial cell biology. *Microscopy Research & Technique*. 1998; 43(3): 224-232, Nov 1.
12. Shiozaki H, Kadowaki T, Dokey Y, et al. Effect of epidermal growth factor on cadherin-mediated adhesion in a human oesophageal cancer cell line. *Br J Cancer* 1995; 71: 250-258.
13. Takayama T, Shiozaki H, Doki Y, et al. Aberrant expression and phosphorylation of β -catenin in human colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998; 77: 605-613.
14. Ilyas M, Tomlinson IPM, Rowan A, Pignatelli M, Bodmer WF. β -Catenin mutations in cell lines established from colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:10330-10334.
15. Katayama M, Hirai S, Kamihagi K, Nakagawa K, Tasumoto M, Kato I. Soluble E-cadherin fragments increased in circulation of cancer patients. *Br J Cancer* 1994; 69: 580-555.

圖一、E-cadherin在胃癌細胞株的表現。1：正常培養下。2：熱休克以後。

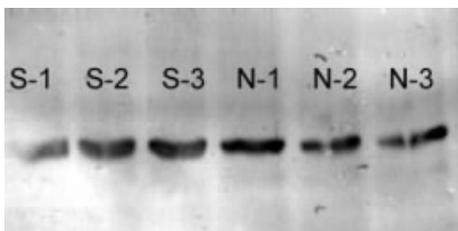
左：SC-M1；右：NU-GC-3。



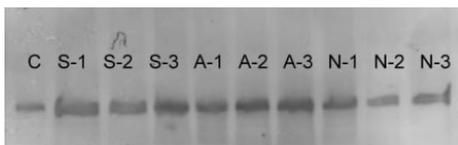
圖四 Gamma-catenin在胃癌細胞株的表現。C：control, S:SC-M1, A：AGS, N:NU-GC-3。1：正常培養下。2：熱休克30分鐘以後。3：熱休克60分鐘以後。



圖二、Alpha-catenin在胃癌細胞株的表現。S:SC-M1, N:NU-GC-3。1：正常培養下。2：熱休克30分鐘以後。3：熱休克60分鐘以後。



圖三、Beta-catenin在胃癌細胞株的表現。C：control, S:SC-M1, A：AGS, N:NU-GC-3。1：正常培養下。2：熱休克30分鐘以後。3：熱休克60分鐘以後。



表一、胃癌細胞株經過熱休克處理（42.5℃，30分鐘，60分鐘，120分鐘）前、後以及EGFR處理後的培養上清液中，可溶性E-cadherin濃度（ng/ml）的比較。

Treatment	SC-M1	NU-GC-3	AGS
37°C	215.4 ±	151.6 ±	94.2 ±
	3.43	3.49	1.41
42.5°C, 30 min.	234.8 ±	164.4 ±	94.5 ±
	2.94	2.56	0.92
<i>p</i>	0.014	0.106	0.824
42.5°C, 60 min.	396.5 ±	197.2 ±	93.8 ±
	4.21	1.26	2.57
<i>p</i>	<0.001	0.001	0.902
42.5°C, 120 min.	329.4 ±	180.9 ±	92.3 ±
	6.25	1.92	2.06
<i>p</i>	0.001	0.019	0.407
EGFR	168.0 ±	162.8 ±	65.1 ±
	13.57	2.16	3.21
<i>p</i>	0.0315	0.0794	0.0139

p: 與 37℃ 之下比較。