

# 细胞因子 HGF 体外增强骨肉瘤细胞株的增殖和黏附性

彭挺生<sup>1</sup>, 李 智<sup>1</sup>, 丘钜世<sup>1</sup>, 张 萌<sup>1</sup>, 王 燕<sup>2</sup>

( 1. 中山大学附属第一医院病理科//基础医学院病理学教研室, 广东 广州 510080;

2. 昆明医学院附属第二医院病理科, 云南 昆明 650224 )

**摘 要:**【目的】研究肝细胞生长因子/离散因子(HGF/SF)及其受体蛋白 c- Met 在骨肉瘤细胞株 MG- 63 和 HOS 中的表达及对瘤细胞生物学行为的影响, 探讨 HGF/c- Met 系统在骨肉瘤细胞生长侵袭过程中的作用。【方法】用流式细胞术检测 HGF-  $\alpha$ 、HGF-  $\beta$ 、c- Met 在 2 株骨肉瘤细胞株中的表达; 外源性 HGF 刺激此 2 株细胞株后, 用 MTT 法、黏附性检测方法研究细胞增殖速率和黏附性的变化。【结果】HGF-  $\alpha$ 、HGF-  $\beta$ 、c- Met 在 2 株骨肉瘤细胞株中的阳性表达率均低于 3%。HGF 浓度达 50 ng/mL 以上时, MG- 63 和 HOS 的增殖速率显著增高,  $P < 0.01$ 。当外源性 HGF 的浓度分别达 5 ng/mL 和 10 ng/mL 时, MG- 63 和 HOS 的黏附性指标即显著升高,  $P < 0.01$ 。外源性 HGF 刺激后 HGF-  $\alpha$ 、HGF-  $\beta$ 、c- Met 在 2 株骨肉瘤细胞株中的表达略有变化, 但差异无统计学意义,  $P > 0.05$ 。【结论】HGF 可以促进骨肉瘤细胞株 MG- 63 和 HOS 的体外增殖和黏附能力。

**关键词:** HGF; c- Met; 骨肉瘤细胞株; 细胞增殖; 细胞黏附

中图分类号: R738

文献标识码: A

文章编号: 1672- 3554(2006)05- 0529- 04

## Increased Proliferation Rate and Adhesiveness of Osteosarcoma Cell Lines by HGF Cytokine in Vitro

PENG Ting- sheng, LI Zhi, QIU Ju- shi, ZHANG Meng, WANG Yan

(1.Department of Pathology, The First Affiliated Hospital/ Basic Medical College, SUN Yat- Sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Pathological Section, The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650224, China)

**Abstract:** 【Objective】To investigate the expression of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) and its receptor protein c- Met in osteosarcoma cell line MG- 63 and HOS, and the influence of HGF on the proliferative and adhesive abilities of the two osteosarcoma cell lines, so as to investigate the possible role of this cytokine during the process of osteosarcoma proliferation and invasion. 【Methods】Two osteosarcoma cell lines MG- 63 and HOS were traditional cultured. Flow cytometry analysis was used to detect the positive rates of HGF-  $\alpha$ , HGF-  $\beta$ , c- Met in the two cell lines. Then, MTT method and cell adhesion detection were used to detect the change of the cells' proliferation rate and adhesive abilities after being stimulated by external pure HGF. 【Results】The positive rates of HGF-  $\alpha$ , HGF-  $\beta$ , c- Met in the two cell lines were all lower than 3%. The proliferation rates of MG- 63 and HOS increased dramatically when the concentration of external HGF reached 50 ng/mL. Only 5 ng/mL external HGF could make the index of MG- 63 adhesion increase markedly ( $P < 0.01$ ). Similarly, 10 ng/mL external HGF could make the index of HOS adhesion increase significantly ( $P < 0.01$ ). That the percentage of HGF-  $\alpha$ , HGF-  $\beta$ , c- Met positive cells almost had no variation after stimulated by external HGF. 【Conclusions】HGF cytokine could enhance the proliferative and adhesive abilities of osteosarcoma cell lines MG- 63 and HOS in vitro.

**Key words:** HGF/c- Met; osteosarcoma cell lines; cell proliferation; cell adhesion

[J SUN Yat- sen Univ(Med Sci), 2006, 27(5):529- 532]

肝细胞生长因子/离散因子 (hepatocyte growth factor/scatter factor, HGF/SF) 是一种多肽生长因子,

收稿日期: 2006-03-15

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(5300592)

作者简介: 彭挺生(1973-), 女, 广东化州人, 博士, 讲师. E- mail: tshpeng@yahoo.com

具有强的促进细胞分裂、组织成形、诱导上皮细胞迁移、侵袭及血管形成的作用;原癌基因 c-Met 编码 HGF 的受体,具有酪氨酸激酶的活性,被 HGF 激活的 c-Met 受体对多种细胞的增殖、分化、运动和侵袭有调节作用<sup>[1]</sup>;本研究拟探讨骨肉瘤细胞中 HGF 和 c-Met 的表达情况以及 HGF 对骨肉瘤细胞增殖、黏附和侵袭力等生物学特性的影响,以期从新的角度认识骨肉瘤侵袭转移的调控机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞 人骨肉瘤细胞株 MG-63 和 HOS 为本教研室冻存细胞株。

1.1.2 试剂 HGF- $\alpha$ 、HGF- $\beta$ 、c-Met 单克隆抗体均来自美国 Santa Cruz 公司;纯化的人重组 HGF 来自 Calbiochem 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 HGF- $\alpha$ 、HGF- $\beta$ 、c-Met 的测定 常规培养骨肉瘤细胞株 MG-63 和 HOS,当细胞生长至 80% 满时,制备细胞悬液,冷 PBS 洗 2 次。每种细胞设 2 支试管,每管加入细胞悬液 100  $\mu$ L (1  $\times 10^6$  个细胞),细胞固定及破膜后加入用破膜剂按 1 100 稀释的 HGF- $\alpha$ 、HGF- $\beta$ 、c-Met 单克隆抗体,室温孵育 30 min,空白对照管加不含一抗的破膜剂;二抗为羊抗鼠 IgG,用 PBS 按 1 200 稀释,室温孵育 30 min;PBS 洗 2 次,制成细胞悬液。采用流式细胞术,以对照管作为空白定标,计算 10 000 个肿瘤细胞,记录标本的阳性细胞百分率,重复 3 次。并检测外源性 HGF (10 ng/mL) 刺激 2 h 和 24 h 后 3 株骨肉瘤细胞中 HGF- $\alpha$ 、HGF- $\beta$ 、c-Met 阳性细胞百分率的变化。

1.2.2 细胞增殖速率的检测 生长至 80% 的培养骨肉瘤细胞分成 2 组,一组移入无血清 DMEM,另一组移入 HGF 浓度分别为 10、50、100 ng/mL 的无血清 DMEM,细胞浓度为 3  $\times 10^4$ /mL。接种细胞悬液 100  $\mu$ L 到 96 孔板,则每孔细胞数为 3  $\times 10^3$ ,每列分别设 7 个重复孔,第 8 排为不加细胞只加培养液的空白对照。孵育 48 h 后每孔加入 20  $\mu$ L MTT 溶液,37  $^{\circ}$ C 体积分数 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 4 h,甩去多余的培液。每孔滴加 200  $\mu$ L 二甲基亚砷,溶液变为紫蓝色,微型混合振荡器 37  $^{\circ}$ C 振荡 15 min;酶标仪读取 A<sub>570</sub>。

1.2.3 细胞黏附性检测 96 孔板涂布浓度为 200  $\mu$ g/mL 的 Matrigel 30  $\mu$ L,超净台上风干,用含有 1 g/L 加热变性 BSA 的 PBS 洗涤、封闭 40 min。生长至 80% 的细胞分成 2 组,一组移入无血清 DMEM,另一组移入 HGF 浓度分别为 5、10、20 ng/mL 的无血清 DMEM,预处理 24 h。胰酶消化后将细胞重悬于无血清 DMEM,每孔加入 5  $\times 10^4$  个细胞;37  $^{\circ}$ C 孵育 40 min;PBS 轻洗 2 次,已吸附于 96 孔板中的细胞用 1 g/L 美蓝溶液染色 30 min;用三蒸水轻洗去多余的染料,每孔加入乙醇和 0.1 mol/L HCL(1 1)混合的裂解液,测定 A<sub>630</sub>。

### 1.3 统计学分析

采用 t 检验,显著性水平为  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 HGF- $\alpha$ 、HGF- $\beta$ 、c-Met 的表达

2 株骨肉瘤细胞株中 3 种蛋白的表达率均不足 3%,10 ng/mL 外源性 HGF 刺激 2 h 后 3 种蛋白在 MG-63 中的表达略升高,在 HOS 中的表达略降低,但差异均无显著性意义 (P 值均 >0.05)。

### 2.2 外源性 HGF 对骨肉瘤细胞增殖速率的影响

当 HGF 达 50 ng/mL 时,MG-63 的增殖速率显著增高,HGF 达 100 ng/mL 时,HOS 增殖速率的增高才具有显著性意义(表 1)。

表 1 HGF 对骨肉瘤细胞 MG-63、HOS 增殖速率的影响

Table 1 Influence (A<sub>570</sub>) on the proliferation rates of osteosarcoma cell line MG-63 and HOS by various concentration of HGF

HGF	MG-63	t	P <sup>1)</sup>	HOS	t	P <sup>1)</sup>
0 ng/mL	0.69 $\pm$ 0.06			0.66 $\pm$ 0.06		
10 ng/mL	0.80 $\pm$ 0.18	1.83	>0.05	0.72 $\pm$ 0.13	1.32	>0.05
50 ng/mL	0.90 $\pm$ 0.17	3.68	<0.01	0.71 $\pm$ 0.13	1.10	>0.05
100 ng/mL	0.78 $\pm$ 0.15	1.76	>0.05	0.83 $\pm$ 0.11	4.41	<0.01

1) Compared with the control cell line (0 ng/mL, HGF)

### 2.3 外源性 HGF 对骨肉瘤细胞黏附性的影响

当 HGF 的浓度为 5 ng/mL 和 10 ng/mL 时,MG-63 的黏附性显著性升高,当 HGF 的浓度进一步升高为 20 ng/mL 时,其黏附性反而降低至未处理时的水平;而 HGF 的浓度达到 10 ng/mL 时 HOS 的黏附性才会显著性升高,见表 2、图 1、2。

表 2 HGF 对骨肉瘤细胞 MG-63 和 HOS 黏附性的影响

Table 2 The influence ( $A_{630}$ ) on the adhesive abilities of osteosarcoma cell line MG-63 and HOS by various concentration of HGF

HGF	MG-63	t	P <sup>1)</sup>	HOS	t	P <sup>1)</sup>
0 ng/mL	0.26 ± 0.05			0.25 ± 0.02		
5 ng/mL	0.35 ± 0.05	4.09	<0.01	0.28 ± 0.04	2.14	>0.05
10 ng/mL	0.35 ± 0.05	4.09	<0.01	0.35 ± 0.05	5.88	<0.01
20 ng/mL	0.28 ± 0.08	0.67	>0.05	0.41 ± 0.04	11.43	<0.01

1) Compared with the control cell line (0 ng/mL HGF)

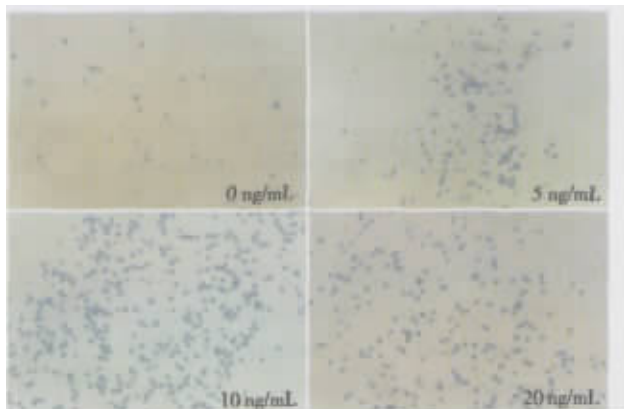


图 1 HGF 对骨肉瘤细胞系 MG-63 黏附性的影响

Fig.1 Influence on the adhesive ability of osteosarcoma cell line MG-63 by various concentration of hepatocyte growth factor

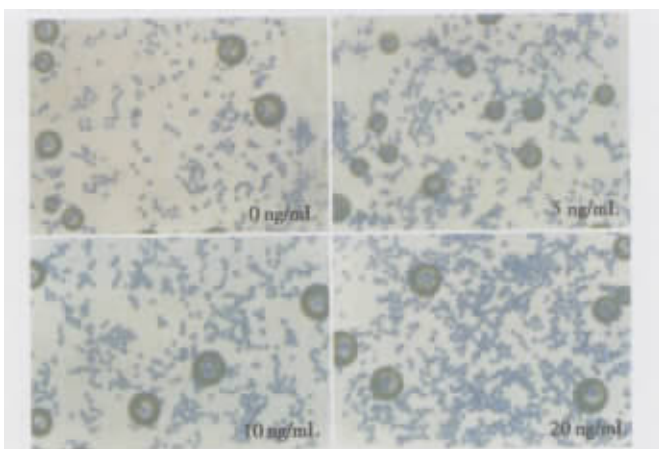


图 2 HGF 对骨肉瘤细胞系 HOS 黏附性的影响

Fig.2 Influence on the adhesive ability of osteosarcoma cell line HOS by various concentration of hepatocyte growth factor

### 3 讨论

HGF 是 1986 年从重症肝炎病人的血浆中纯化获得的细胞因子, 对肝细胞具有强的丝裂原作用并因此而得名, 后证实该因子对细胞具有趋散作用, 亦可称之为离散因子(SF)。原癌基因 c-Met

编码 HGF 的受体, 具有酪氨酸蛋白激酶(PTK)活性, HGF 与 c-Met 受体蛋白特异性结合后, 可导致多种底物蛋白的酪氨酸磷酸化, 最终将信号转入细胞核内的转录机构, 导致细胞的增殖和分化<sup>[1]</sup>。

多种研究证明患者血清中 HGF 升高与肝癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、前列腺癌等多种恶性上皮性肿瘤的进展和转移密切相关<sup>[2-4]</sup>; c-Met 高表达与甲状腺癌、乳腺癌、鼻咽癌等的淋巴结转移密切相关<sup>[5]</sup>; 体外研究也发现, HGF 诱导或增强有 c-Met 表达的肝癌、恶性纤维组织细胞瘤等肿瘤细胞株的体外增殖和侵袭能力<sup>[6]</sup>。

本研究结果表明, 外源性 HGF 确实能促进 2 株骨肉瘤细胞的增殖, 这一现象也在肝癌等其它肿瘤细胞的体外实验中得到了证实<sup>[6]</sup>, 说明 HGF 在骨肉瘤细胞发生发展过程中的作用不容忽视。同时, 外源性 HGF 对 2 株骨肉瘤细胞的黏附性也有一定的影响作用, 即 HGF 达到一定浓度后可使 MG-63 的黏附性显著升高, 并且 HOS 的黏附性与外源性 HGF 浓度呈剂量依赖性; 肿瘤细胞与周围组织黏附是其侵袭转移行为的起始步骤, 细胞-基质的黏附性增强能促进肿瘤细胞进一步转移<sup>[7]</sup>, 本结果提示 HGF 可能与骨肉瘤细胞的侵袭转移有一定的相关性。2 株骨肉瘤细胞株对 HGF 刺激的反应有所不同, 可能是由肿瘤细胞之间的异质性所致。

值得注意的是, 本研究中不论骨肉瘤细胞是否经外源性 HGF 因子刺激, 2 株骨肉瘤细胞本身表达内源性 HGF 的量始终很低, 因而作者认为骨肉瘤细胞本身并不能直接合成及分泌 HGF, HGF 可能是由肿瘤间质细胞产生, 并通过旁分泌途径促进骨肉瘤细胞增殖和黏附。目前研究认为 c-Met 是 HGF 的唯一受体, 而作为信号转导蛋白, 其蛋白水平的改变往往是瞬时的, 有时仅在几分钟内完成。本研究中外源性 HGF 刺激前后 2 株骨肉瘤细胞中 c-Met 的变化不大, 可能是由于刺激的时间较长(2 h 以上), 且未能应用检测磷酸化 c-Met 的特异性抗体检测该分子的表达, 因此未能检测出 c-Met 的明显变化。

已有研究表明 HGF/c-Met 系统参与了骨肉瘤细胞 Saos-2 的生长和肿瘤进展<sup>[8]</sup>, 并且能通过旁分泌途径促进人肺腺癌的增殖和转移<sup>[9]</sup>, 其结论支持本研究结果。这就给我们一个提示, 肿瘤间质成份在骨肉瘤的增殖乃至侵袭转移等生物学行为中的作用应是十分重要的。由间质淋巴类细胞或纤

维母细胞分泌的 HGF 因子与其受体 c-Met 结合后,可能通过与其他肿瘤中相类似的旁分泌通路激活其下游的信号分子,如 Stat3、MEK1/2 和 ERK1/2 等<sup>[10,11]</sup>促进骨肉瘤的增殖和转移。

综上所述,外源性 HGF 因子可以促进骨肉瘤细胞株 MG-63 和 HOS 的增殖和体外黏附能力,可能在骨肉瘤进展过程中起到十分重要的作用。

参考文献:

- [1] GOHDA E, TSUBOUCHI H, NAKAYAMA H, et al. Purification and partial characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with fulminant hepatic failure[J]. *J Clin Invest*, 1988,81(2):414-419.
- [2] JUNBO H, LI Q, ZAIDE W, et al. Increased level of serum hepatocyte growth factor/ scatter factor in liver cancer is associated with tumor metastasis[J]. *In Vivo*, 1999,13(2):177-180.
- [3] LENGYEL E, PRECHTEL D, RESAU J H, et al. C-Met overexpression in node-positive breast cancer identifies patients with poor clinical outcome independent of Her2/neu[J]. *Int J Cancer*, 2005,113(4):678-682.
- [4] KNUDSEN B S, EDLUND M. Prostate cancer and the met hepatocyte growth factor receptor [J]. *Adv Cancer Res*, 2004,91(1):31-67.
- [5] 李智,林素暇,梁惠珍,等. 肝细胞生长因子/c-Met 系统在鼻咽癌中的表达及意义[J]. *中华病理学杂志*,

2005,34(2):75-79.

- [6] EFIMOVA E A, GLANEMANN M, LIU L, et al. Effects of human hepatocyte growth factor on the proliferation of human hepatocytes and hepatocellular carcinoma cell lines [J]. *Eur Surg Res*,2004, 36(5): 300-307.
- [7] KURSCHAT P, MAUCH C. Mechanisms of metastasis [J]. *Clin Exp Dermatol*, 2000 , 25(6):482-489.
- [8] MACEWEN E G, KYTZKE J, CAREW J, et al. C-Met tyrosine receptor expression and function in human and canine osteosarcoma cells [J]. *Clin Exp Metastasis*,2003,20(5):421-430.
- [9] TOKUNOU M, NIKI T, EGUCHI K, et al. c-MET expression in myofibroblasts: role in autocrine activation and prognostic significance in lung adenocarcinoma[J]. *Am J Pathol*, 2001,158(4):1451-1463.
- [10] CRAMER A, KLEINER S, WESTERMANN M, et al. Activation of the c-Met receptor complex in fibroblasts drives invasive cell behavior by signaling through transcription factor STAT3[J]. *J Cell Biochem*, 2005, 95(4):805-816.
- [11] TANIGUCHI F, HARADA T, DEURA I, et al. Hepatocyte growth factor promotes cell proliferation and inhibits progesterone secretion via PKA and MAPK pathways in a human granulosa cell line[J]. *Mol Reprod Dev*,2004,68(3):335-344.

(编辑 黄小延)

(上接第 528 页 from page 528)

参考文献:

- [1] CAMPOCCIAA D, MONTANAROE L, ARCIOLA C R. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(11):2331-2339.
- [2] EIFF C V, JANSEN B, KOHNEN W, et al. Associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis[J]. *Drugs*, 2005, 65(2):179-214.
- [3] FRAENKEL D, RICKARD C, THOMAS P, et al. A prospective, randomized trial of rifampicin-minocycline-coated and silver-platinum-carbon-impregnated central venous catheters[J]. *Crit Care Med*, 2006,34(3):668-675.
- [4] WANG C C, CHEN C C. Anti-bacterial and swelling properties of acrylic acid grafted and collagen/chitosan immobilized polypropylene non-woven fabrics[J]. *J Appl Polymer Sci*, 2005, 98(1):391-400.
- [5] 林思聪. 高分子生物材料分子工程研究进展 [J]. *高*

分子通报, 1997, 1: 1-14.

- [6] 潘仕荣,黄宁芳,施锋,等. 聚 L-谷氨酸-苯酯合成的改进[J]. *生物医学工程学杂志*, 1990, 7(3): 321-324.
- [7] 王琴梅,潘仕荣,张静夏. 双端氨基聚乙二醇的合成和表征[J]. *中国医药工业杂志*, 2003, 34(10): 490-492.
- [8] HIGASHI N, KAWAHARA J, NIWA M. Preparation of helical peptide monolayer-coated gold nanoparticles[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005, 288(1): 83-87.
- [9] 杨隽,汪建华,童身毅. 低温等离子体改性铝片降低细菌黏附的研究[J]. *功能材料*, 2004, 35(5): 646-649.
- [10] KIM J H, KIM S C. PEO-grafting on PU/PS IPNs for enhanced blood compatibility-effect of pendant length and grafting density[J]. *Biomaterials*, 2002, 23(9): 2015-2025.
- [11] Mai-ngam K. Comblike poly(ethylene oxide)/hydrophobic C6 branched chitosan surfactant polymers as anti-infection surface modifying agents [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2006, 49(2): 117-125.

(编辑 黄小延)