Том 291, номер 2, 229-232 ФЕБС 10294
© 1991 Федерация Европейских биохимических сообществ 00145793/$3.50
ADONIS 001457939101003 W
Октябрь 1991

Фактор роста гепатоцитов проявляет мощную антипролиферативную активность при воздействии на различные линии клеток опухоли.

Хисао Таджима, Кунио Матсумото и Тошикацу Накамура

Отделение биологических исследований, Факультет научных изысканий,

Университет Киюши, Фукуока 812, Япония

Получено 7 августа 1991

Фактор роста гепатоцитов (ФРГ) оказывает мощное митогенное воздействие на зрелые гепатоциты и различные нормальные эпителиальные клетки. В настоящее время нами получены доказательства, что воздействие ФРГ в количестве 1-10 нг/мл, приводит к значительному ингибированию роста клеток карциномы печени линии HepG2, клеток меланомы B6/F1, а также карциномы сквамозных клеток KB. Эти опухолевые клетки имеют рецепторы с высокой степенью сродства к ФРГ с K_d 25-28 пМ, аналогично гепатоцитам. ФРГ в концентрации 1-100 нг/мл не оказывал какого-либо значительного цитолитического эффекта на опухолевые клетки. Следовательно, антипролиферативный эффект ФРГ на опухолевые клетки, по всей видимости, является цитостатическим, а не цитолитическим.

Поскольку очевидно, что ФРГ обладает разнонаправленным воздействием на рост клеток, заслуживает внимания возможность его использования в качестве противоопухолевого препарата.

Фактор роста гепатоцитов (ФРГ); Противоопухолевый препарат; Ингибирование роста; Рецептор ФРГ

1. ВВЕДЕНИЕ

Фактор роста гепатоцитов (ФРГ) представляет собой недавно обнаруженный фактор роста, состоящий из α-субъединицы весом 69 кДа и β-субъединицы весом 34 кДа [1-3]. Клонирование к-ДНК ФРГ показало, что ФРГ образуется путем протеолитического процессинга из изолированного белка-предшественника, состоящего из 728 аминокислот, при этом гомология с профибринолизином составляет 38% [4,5]. ФРГ в концентрации 58 нг/мл (60-90 пМ) способствует росту зрелых паренхиматозных гепатоцитов в первичной культуре. Активность ФРГ и экспрессия м-РНК ФРГ значительно возрастали в клетках печени или плазме крыс с различными повреждениями печени [6-9], кроме того, повышенные уровни ФРГ были обнаружены в асците пациентов с циррозом печени [10]. Было показано, что зрелые гепатоциты в первичной культуре проявляют высокое сродство к рецептору ФРГ, при этом были отмечены значения Kd=20-30 пМ при наличии 500-600 локусов связывания на гепатоцит [11]. Рецепторы ФРГ в большом количестве присутствуют на поверхности различных эпителиальных клеток, включая зрелые гепатоциты, но их, очевидно, нет на поверхности клеток мезенхимы, таких как фибробласты и гематопоэтические клетки. ФРГ способствует более быстрому росту различных эпителиальных клеток, таких как клетки почечных канальцев [12], кератиноциты [13] и меланоциты [14], однако отмечен явный эффект его воздействия на рост клеток мезенхимы. Фактор Скаттера, описанный впервые Stoker с соавторами, представляет собой фактор, являющийся производным фибробласта, который способствует увеличению подвижности клетки, и который, как было обнаружено, идентичен ФРГ [15,16]. В действительности, в физиологических концентрациях, рекомбинантный ФРГ человека значительно способствует более быстрой миграции различных видов эпителиальных клеток, включая MDCK клетки почечного эпителия собаки, [17]. Нами получены доказательства, что ФРГ обладает цитостатическим антипролиферативным эффектом на различные виды опухолевых клеток, следовательно, он может использоваться в качестве регулятора роста двунаправленного действия, и, возможно, он обладает противоопухолевой активностью.

Почтовый адрес: T.Nakamura, Department of Biology, Faculty of Science, Kyushu University, Fukuoka 812, Japan; Fax: (81)(92)632 2741

Опубликовано Elsevier Science Publishers B. V.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. *Культуры клеток*

Клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека линии HepG2, предоставленные безвозмездно компанией Genentech Co., и линии KB (клетки эпидермоидной карциномы человека ICRB 9027) культивировали на среде Игла в модификации Дюльбекко (среда DME дополненная 10% фетальной сывороткой теленка (ФСТ)). Культура B6/F1 (клетки меланомы мыши, предоставленные безвозмездно компанией Genentech Co.) выращивалась в среде, представляющей собой смесь DME и среды Ham F12 (1:1), с добавлением 10% ФСТ.

2.2. *Определение интенсивности синтеза ДНК и клеточного роста*

Клетки высевали с плотностью $1x10^4$ клеток/2 *на* пластиковую чашку с 24 лунками (Corning), и культивировали в среде, содержащей соответствующее количество ФРГ. После 4 дней культивирования клетки метили 03 μCi/мл [^{125}I] дезоксиуридина (2200 Ci/ммоль, New England Nuclear) в течение 4 часов, затем дважды промывали раствором фосфатного буфера, и однократно - 10%TCA (вес/объем), предварительно охлажденным на льду и солюбилизированным 1 M NaOH. Количество метки, связавшейся с клетками, определялось при помощи γ-счетчика.

Для определения роста клеток, клетки высевали на чашки с 6 лунками ($8 X 10^4$ клеток/лунку для клеток B6/F1 и KB), а также высевали на чашки с 6 лунками $4X 10^4$ клеток/лунку для HepG2 (Corning), и культивировали в присутствии различных концентраций ФРГ в течение 4 дней. Клетки отделяли при помощи обработки трипсином, после чего количество клеток определяли при помощи хемоцитометра.

2.3. *Оценка связывания с рецепторами ФРГ*

Для того чтобы охарактеризовать рецептор ФРГ, было проанализировано связывание [^{125}I] с клетками, причем процедура состояла в следующем: культуры были доведены до приблизительно равного состояния связывающим буфером (раствор Хэнкса, содержащий 20 мМ HEPES, 2мг/мл бычьего сывороточного альбумина, pH 7.0) в течение 30 минут при 10°C. Предварительно охлажденный на льду связывающий буфер, содержащий возрастающие концентрации [^{125}I] ФРГ, с добавлением или без добавления 100-кратного избыточного количества немеченого ФРГ, добавляли к клеткам и инкубировали в течение 1 часа при 10°C. После этого культуры клеток промывали трижды связывающим буфером, охлажденным на льду и

измеряли связывание [^{125}I]ФРГ с клетками при помощи γ-счетчика после растворения клеток при помощи 1M NaOH.

2.4. Определение цитолитической активности

Цитолитическая активность измерялась следующим образом: клетки культивировали при плотности $5X10^4$ клеток/лунку на плашке с 24-лунками (Corning). На следующий день среду заменяли на свежую, а видимые визуально клетки метили 70 μCi/мл Na^{51}/CrO_2 (250-500 мСі/мг, Amersham) при 37°C в течение 2.5 часов. Культуры клеток промывали три раза свежей средой, и культивировали в течение 24 часов в среде, содержащей соответствующие концентрации ФРГ. Радиоактивность среды для культивирования и лизатов клеток, растворенных в 2% SDS измеряли при помощи γ-счетчика, а процент цитолиза вычислялся по следующей формуле:

% цитолиза=100 x $(A-A_0)/(A+B)$,

где A представляет радиоактивность в среде для культивирования, или в клетках-мишенях, после культивирования с ФРГГ в течение 24 часов, В соответствует радиоактивности, остающейся в клетках-мишенях после культивирования, и A^0 - это радиоактивность в среде для культивирования клеток-мишеней без ФРГ, что соответствует спонтанному высвобождению ^{51}Cr.

Таблица 1

Значения K_d и B_{max} ФРГ рецептора нормальной и опухолевой клетки

Клетки	Тип клетки	ФРГ рецептор	
		K_d (nM)	B_{max} (сайт /кл.)
Нормальные клетки			
Гепатоцит[a]	клетка паренхимы печени (крысы)	24	565
Клетка почечного	эпителия (кролика)	28	720
Меланоцит[b]	эпидермиса (человека)	22	120
Кератиноцит[c]	эпидермиса (человека)	17-45	700-1100
Опухолевые клетки			
KB	эпидермоидная карцинома (человека)	25	750
B6/F1	меланома (мыши)	24	350
HepG2	гепатоцеллюлярная карцинома (человека)	25	1510

Значения K_d и B_{max} в опухолевых клетках были вычислены путем применения анализа Скэтчарда, как показано на Рис. 3В.

[a-c]Результаты были взяты из опубликованных нами ранее работ. См. ссылки [1], [14] и [13], соответственно.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Ингибирование синтеза ДНК под воздействием ФРГ

Была отмечена способность ФРГ ингибировать синтез ДНК опухолевых клеток в зависимости от дозы (Рис.1). При проведении исследований с применением фазово-контрастного микроскопа не было зафиксировано каких-либо значительных морфологических изменений при какой-либо из концентраций ФРГ (данные не приводятся). Максимальное ингибирование было отмечено при концентрации 5-10нг/мл ФРГ, и соответствовало 50-70% ингибирования. При более высоких концентрациях ФРГ (> 10 нг/мл), не отмечалось дальнейшего ингибирования синтеза ДНК. Для сравнения, было проведено исследование эффекта ФРГ на синтез ДНК зрелых паренхиматозных клеток гепатоцитов, причем ФРГ в концентрациях 5-8 нг/мл значительно стимулировал синтез ДНК гепатоцитов. Следовательно, ФРГ обладает разнонаправленным эффектом на синтез ДНК, и, по всей видимости, стимулирующий или ингибирующий эффект ФРГ зависит от типа клетки, то есть от того, является ли данная клетка нормальной или трансформированной: ФРГ стимулирует синтез ДНК гепатоцитов в первичной культуре, но ингибирует синтез ДНК в клетках гепатоцеллюлярной карциномы HepG2. Аналогичным образом, ФРГ стимулирует рост меланоцитов [14], но ингибирует рост клеток меланомы B6/F1.

Рис. 1 Влияние ФРГ на синтез ДНК HepG2, B6/F1, KB и гепатоцитов. Клетки культивировали в плашках с 24 лунками при плотности $1X10^4$ кл/см^2, в среде, содержащей соответствующее количество ФРГ. Клетки культивировали в течение 4 дней, после чего метили [^{125}I] дезоксиуридином в течение 4 часов. Показано среднее значение трех измерений. (●)B6/F1, (○)HepG2, (▲)KB и (Δ) гепатоциты.

Рис. 1 Влияние ФРГ на рост клеток HepG2, B6/F1 и KB. Клетки культивировали в плашках с 6 лунками при плотности $8X10^4$ кл./лунке для B6/F1 и KB, и при плотности $4X10^4$ кл./лунке для HepG2, культуру выращивали в присутствии различных концентраций ФРГ в течение 4 дней. Отделение клеток производили с применением трипсина, а количество клеток определяли, используя гемоцитометр. Показано среднее значение двух измерений. (●)B6/F1, (○)HepG2, (▲)KB и (Δ) гепатоциты.

Таблица II

Эффект ФРГ на цитолитическое высвобождение ^{51}Cr из опухолевых клеток

Клетки	ФРГ (нг/мл)	Высвобождение[3] Среда для выращивания клеток (A) (кл/мин)	Высвобождение[3] Клетки (B) (кл/мин)	% цитолиза $((A-A_0)/(A+B)X\ 100)$ (%)
HepG2	0	11 876 ± 0	35 722 ± 1050	0
	5	11 905 ± 29	39196 ± 367	0
	10	12 026 ± 91	36 785 ± 1163	0
	100	11471 ± 46	37215 ± 23	0
B6/F1	0	24340 ± 1411	54 108 ± 642	0
	5	25116 ± 722	55 603 ± 824	0.2
	10	25 482 ± 220	54 806 ± 729	0.4
	100	29 163 ± 521	53 288 ± 298	4.8
	0	21900 ± 59	60 297 ± 15	0
	5	22 139 ± 796	60391 ± 1199	0.2
	10	23 638 ± 509	57 672 ± 1866	2.5
	100	22 278 444	53 161 ± 997	2.9

Каждое значение представляет среднее от трех измерений. A_0 – это высвобождение ^{51}Cr из культур клеток мишеней (кл/мин) в отсутствие ФРГ

3.2 *Ингибирование роста клеток при воздействии ФРГ*

Ингибирующее влияние ФРГ на синтез ДНК опухолевых клеток проявилось полностью при проведении исследований процесса пролиферации в линиях опухолевых клеток (Рис.2). ФРГ подавлял рост опухолевых клеток, причем действие зависело от применяемой концентрации, а максимальное ингибирование на 50-70% было отмечено при 5-10 нг/мл ФРГ, что согласуется с данными о влиянии на синтез ДНК.

3.3 *Рецепторы ФРГ на опухолевых клетках*

Анализ рецепторов ФРГ показал, что [^{125}I]ФРГ связывается с этими клетками опухоли в зависимости от концентрации, и что связывание является насыщаемым (Рис.3А). Как показано на Рис.3В, графики Скэтчарда по связыванию показали существование высокоспецифичных сайтов связывания одного типа на этих опухолевых клетках. Значения K_d и Bmax опухолевых клеток и других нормальных клеток представлены в таблице I. Линии протестированных опухолевых клеток содержат приблизительно 300-1500 сайтов связывания на клетку при значении K_d =25-28пМ. Следовательно, не было выявлено значительных отличий по ФРГ рецепторам между нормальными и опухолевыми клетками.

3.4 *Цитостатическое воздействие ФРГ на опухолевые клетки*

Цитолиз, вызываемый ФРГ, был менее 2.5% при концентрациях 5-10 нг/мл, при которых ФРГ значительно подавляет как рост клетки, так и синтез ДНК (Таблица II). Более того, цитолиз был менее 5% при такой высокой концентрации как 100 нг/мл ФРГ.

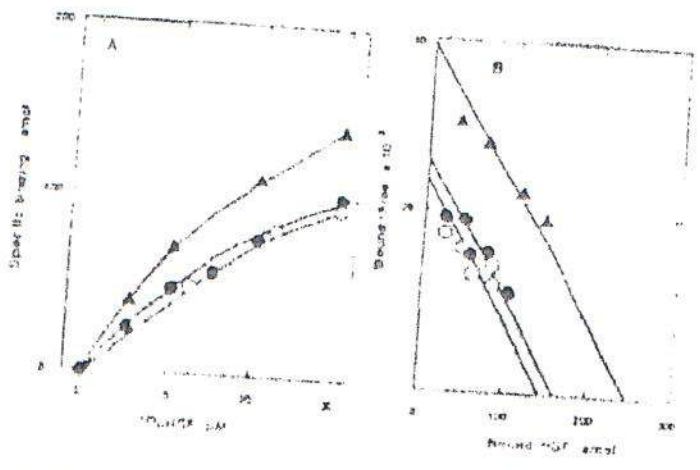

Рис. 3 Анализ связывания [^{125}I]ФРГ с рецепторами клеток линий B6/F1, HepG2 и KB. Клетки инкубировали в течение 1 часа при 10° С с предварительно охлажденным на льду связывающим буфером, содержащим возрастающие концентрации [^{125}I]ФРГ, с добавлением или без добавления 100-кратной избыточной концентрации немеченого ФРГ. (А) Показаны кривые насыщения специфичного связывания [^{125}I]ФРГ с клетками, после обработки этих клеток возрастающими концентрациями [^{125}I]ФРГ: (●)B6/F1, (○) HepG2, (▲)KB. (В) Показаны кривые Скэтчарда по связыванию [^{125}I]ФРГ с этими клетками. Использованы те же символы, что и на Рис. А.

Следовательно, антипролиферативный эффект ФРГ на клетку опухоли имеет цитостатическую, а не непосредственно цитолитическую природу при физиологических концентрациях.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

Был отмечен цитостатический эффект ФРГ на рост опухолевых клеток. Поскольку наблюдаемое при половине максимальной дозы ингибирование роста соответствует значениям K_D рецептора ФРГ (25-28 пМ) при взаимодействии с опухолевыми клетками, ингибирование роста клеток, индуцированное ФРГ, может иметь место при физиологических концентрациях ФРГ. В недавних работах Bottaro et al. сообщалось, что рецептор ФРГ идентичен продукту *c-met* прото-онкогена [18]. Поскольку *c-met* протоонкогена кодирует трансмембранный рецептор тирозин-киназы, первое событие, которое, по всей видимости, происходит после связывания ФРГ с рецептором, - это автофосфорилирование рецептора. Однако поскольку эти линии опухолевых клеток обладают рецепторами ФРГ, которые неотличимы по степени сродства или количеству от рецепторов нормальных клеток, разнонаправленное влияние ФРГ, по всей видимости, не зависит от различий между рецепторами ФРГ нормальных и опухолевых клеток. Вероятно, что движение по внутриклеточным проводящим путям от места тирозинового фосфорилирования рецептора ФРГ имеет различия у нормальных и опухолевых клеток. Позднее в работах Shiota et al. сообщалось, что рост клеток гепатоцеллюлярной карциномы FaO, подверженных стабильной трансфекции вектором, содержащим к-ДНК ФРГ, связанную с промотором альбумина, значительно замедлялся по сравнению с родительскими клетками; при этом как канцерогенность, так и размер опухолей при имплантировании голым мышам, значительно уменьшались [19]. При совместном рассмотрении, эти результаты показывают, что ФРГ может ингибировать рост опухолевых клеток как in vitro, так и in vivo.

В работах Higashio et al. утверждается, что цитотоксический фактор опухоли (ЦФО), выделенный из IMR90 (эмбриональные фибробласты легких человека) идентичен ФРГ, или обладает высокой степенью родства с ним [20], а Sone et al. обнаружили, что цитолитический фактор опухоли (ЦФО) производится альвеолярными макрофагами и моноцитами крови человека [21, 22]. Они исследовали цитотоксический эффект ФРГ/ЦФО при чрезвычайно высоких концентрациях ФРГ не проявляет значительной цитолитической активности, однако его цитостатическое влияние проявляется при физиологических концентрациях.

В предыдущем исследовании нами был отмечен ингибирующий эффект ФРГ на рост нормальных кератиноцитов человека, выращенных в условиях низких концентраций Ca^{2+} (0.1 мМ) [13]. При низкой концентрации Ca^{2+} (0.1 мМ), кератиноциты растут быстро, тогда как конечная дифференциация клеток подавляется на стадиях, когда дифференциация еще не началась, что отличается от клеток, культивируемых при физиологических условиях Ca^{2+} (1.8 мМ). Поскольку кератиноциты при низком содержании Ca^{2+}, по всей видимости, имеют свойства, сходные со свойствами опухолевых клеток, ингибирующее влияние ФРГ на рост может также проявляться при воздействии на нормальные клетки, когда рост значительно ускоряется, но нормальная дифференциация при этом отсутствует.

ФРГ представляет собой мощный митоген для первичной культуры зрелых гепатоцитов, и, по всей видимости, он играет важную роль в качестве гепатотрофного фактора при процессе регенерации печени после инсульта печени [6-10]. Кроме стимулирующего воздействия на рост клеток и восстановления клеточных повреждений, ФРГ оказывает антипролиферативный эффект на некоторые опухолевые клетки, а также на нормальные клетки, при условиях, отличных от нормальных. Следовательно, ФРГ может действовать как обратный регулятор, целью которого является подавление роста опухолевых или нормальных клеток при гиперплазии. ФРГ играет важную роль в поддержании гомеостаза структуры ткани за счет двустороннего влияния на клеточный рост. Антипролиферативный эффект ФРГ на опухолевые клетки позволяет предположить, что этот фактор может действовать как дополнительный противоопухолевый агент.

Благодарность. Мы выражаем благодарность М. Охара за полезные комментарии. Эта работа проводилась при поддержке Гранта, предоставленного для проведения научных исследований в области канцерогеза Министерством Образования, Науки и Культуры Японии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] Nakamura, T., Nawa, K. and Ichihara, A. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 122, 1450-1459.

[2] Nakamura, T., Teramoto, H. and Ichihara, A. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 6489-6493.

[3] Nakamura, T., Nawa, K., Ichihara, A., Kaise, N. and Nishino, T. (1987) FEBS Lett. 224, 311-316.

[4] Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sugiyama, A., Tashiro, Is. and Shimizu, S. (1989) Nature 342, 440443.

[5] Tashiro, K., Наглия, М., Nishizawa, T., Seki, T., Shimonishi, M., Shimizu, S. and Nakamura, T. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3200-3204.

[6] Kinoshita, T., Tashiro, K. and Nakamura, T. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 174, 831-838.

[7] Noji, S., Tashiro, K., Kayama, E., Nohno, T., Oyaina, K., Tamguchi, S. and Nakamura, T. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 173, 42-47.

[8] Asami, O., Ihara, I., Shimizu, N., Shimizu, S., Tomita, Y., Ichihara, A. and Nakamura, T. (1991) J. Biochem. 109, 8-13.

[9] Konishita, T., Hirao, S., Matsumoto, K. and Nakamura, T. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 330-335.

[10] Shimizu, I., Ichihara, A. and Nakamura, T. (1991) J. Biochem. 109, 14-18.

[11] Higuchi, O. and Nakamura, T. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 176, 599-607.

[12] Igawa, T., Kanda, S., Kanetake, H., Saitoh, Y., Ichihara, A., Tomita, Y. and Nakamura, T. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 174, 831-838.

[13] Matsumoto, K., Hashimoto, K., Yoshikawa, K. and Nakamura, T. (1991) Exp. Cell Res. 196 (in press).

[14] Matsumoto, K., Tajima, H. and Nakamura, T. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 176, 45-51.

[15] Gherardi, E. and Stoker, M. (1990) Nature 346, 228.

[16] Stoker, M. and Gherardi, E. (1991) Biochem. Biophys. Acta. 1072, 81-102.

[17] Furlong, R.A., Takehara, T., Taylor, W.G., Nakamura, T. and Rubin, J.S. (1991) J. Cell. Sci. (in press).

[18] Bottaro, D.P., Rubin, J.S., Faletto, D.L., Chan, A.M.L., Kmiecik, T.E., VandeWoude, G.F. and Aaronson, S.A. (1991) Science 251, 802-804.

[19] Shiota, G., Rhoads, D.B., Nakamura, T. and Schmidt, E.V. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA (in press).

[20] Higashio, K., Shima, N., FOTo, M., Itagaki, Y., Nagao, M., Yasuda, H. and Monnaga, T. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 170, 397-104.

[21] Sone, S., Tachibana, K., Ishii, K., Ogawara, M. and Tsubura, E. (1984) Cancer Res. 44, 646-651.

[22] Sone, S., Lopez-Berestein, G. and Fidler, I.J. (1986) Cancer Immunol. Immunother. 21, 93-99.

Volume 291, number 2, 229-232 FEBS 10294 October 1991
© 1991 Federation of European Biochemical Societies 0014-5793/91/$3.50
ADONIS 001457939101003W

Hepatocyte growth factor has potent anti-proliferative activity in various tumor cell lines

Hisao Tajima, Kunio Matsumoto and Toshikazu Nakamura

Department of Biology, Faculty of Science, Kyushu University, Fukuoka 812, Japan

Received 7 August 1991

Hepatocyte growth factor (HGF) has potent mitogenic activity for mature hepatocytes and various normal epithelial cells. We now have evidence that HGF at 1-10 ng/ml strongly inhibits the growth of HepG2 hepatocellular carcinoma cells, B6/F1 melanoma cells and KB squamous carcinoma cells. These tumor cells express high affinity receptors for HGF with a K_d of 25-28 pM, similar to findings with hepatocytes. HGF at 1-100 ng/ml had no significant cytolytic effect on tumor cells. Therefore, the anti-proliferative effect of HGF on tumor cells seems to be cytostatic, not cytolytic. As HGF apparently has bidirectional effects on cell growth, the possibility that it can serve as an anti-tumor agent merits attention.

Hepatocyte growth factor (HGF); Anti-tumor agent; Growth inhibition; HGF receptor

1. INTRODUCTION

Hepatocyte growth factor (HGF) is a novel growth factor composed of a 69 kDa α-subunit and a 34 kDa β-subunit [1-3]. HGF cDNA cloning revealed that HGF derives by proteolytic processing from a single precursor protein consisting of 728 amino acids, and the homology with plasminogen is 38% [4,5]. HGF at 5-8 ng/ml (60-90 pM) promotes the growth of mature parenchymal hepatocytes in primary culture. HGF activity and expression of HGF mRNA were markedly increased in livers or plasma of rats with various liver injuries [6-9] and elevatec levels of HGF were noted in ascites from patients with cirrhosis [10]. Mature hepatocytes in primary culture express a high affinity receptor for HGF, exhibiting K_d=20-30 pM and 500-600 sites/hepatocyte [11]. HGF receptor is widely distributed in various epithelial cells, including mature hepatocytes, but apparently not in mesenchymal cells such as fibroblasts and hematopoietic cells. HGF enhances the growth of various epithelial cells such as renal tubular cells [12], keratinocytes [13] and melanocytes [14], but it has no evident effect on growth of mesenchymal cells. Scatter factor first described by Stoker and his colleagues is a fibroblast-derived factor which enhances cell motility and was found to be identical to HGF [15,16]. Indeed, recombinant human HGF markedly enhances the migration of various species of epithelial cells, including MDCK canine renal epithelial cells, at physiological concentrations [17]. We have now obtained evidence that HGF has cytostatic anti-proliferative effects on various species of tumor cells, hence may be a bidirectional growth regulator, and possibly a putative anti-tumor agent.

Correspondence address: T. Nakamura, Department of Biology, Faculty of Science, Kyushu University, Fukuoka 812, Japan. Fax: (81) (92) 632 2741.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *Cell cultures*

HepG2 (human hepatocellular carcinoma, a gift from Genentech, Co.) and KB (human epidermoid carcinoma, JCRB 9027) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's (DME) medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). B6/F1 (mouse melanoma, a gift from Genentech Co.) cells were cultured in a mixture of DME and Ham's F12 medium (1:1) supplemented with 10% FCS.

2.2. *Measurement of DNA synthesis and cell growth*

Cells were seeded at a density of 1×10^4 cells/? on a 24-well plastic plate (Corning), and cultured in medium containing an appropriate amount of HGF. After 4 days of culture, the cells were pulse-labeled with 0.3 μ Ci/ml [^{125}I] deoxyuridine (2200 Ci/mmol, New England Nuclear) for 4h, then were washed twice with phosphate-buffered saline and once with 10% (w/v) ice-cold TCA and solubilized with 1 M NaOH. The radioactivily incorporaled to the cells was counted in a γ-counter.

To measure the cell growth, the cells were seeded ($8 \cdot 10^4$ cells/well for B6/F1 cells and KB cells, and $4 \cdot 10^4$ cells/well for HepG2 cells) on 6-well plates (Corning) and cultured in the presence of various concentrations of HGF for 4 days. The cells were dissociated by trypsin-treatment and the number of cells was determined using a hemocytometer.

2.3. *Binding assay for HGF receptors*

To characterize HGF receptors, binding of [^{125}I] HGF to cells was analyzed as follows: cultures were equilibrated in binding buffer (Hank's solution containing 20 mM HEPES, 2mg/ml bovine serum albumin, pH 7.0) for 30 min at 10°C. Ice-cold binding buffer containing increasing concentrations of [^{125}I] HGF, with or without a 100-fold excessive concentration of unlabeled HGF, was added and the preparation incubated for 1 h at 10°C. Subsequently cultures were rinsed three times with ice-cold binding buffer, and [^{125}I] HGF bound

Published by Elsevier Science Publishers B.V.

to cells was measured in a γ-counter after solubilization of the cells with 1 M NaOH.

2.4. *Measurement of cytolytic activity*

Cytolytic activity was measured as follows: cells were plated at a density of 5×10^4 cells/well on a 24-well plate (Corning). The next day, the medium was replaced with fresh medium and viable cells were labeled with 70 μCi/ml $Na^{51}CrO_4$ (250-500 mCi/mg Cr, Amersham) at 37°C for 2.5h. Cultures were washed three times with fresh medium and cultured for 24h in medium containing appropriate concentrations of HGF. The radioactivities in the culture media and cell lysates dissolved in 2% SDS were counted in a γ-counter, and the percent of cytolysis was calculated as follows:

$$\% \text{ of cytolysis} = 100 \times (A - A_0)/(A - B),$$

wherein A represents radioactivity in culture medium or target cells cultueed with HGFf for 24 h B represents radioactivity remaining in target cells after cultivation, and A_0 represents radioactivity in culture medium of target cells cultured without HGF, which means the spontaneous release of ^{51}Cr.

3. RESULTS

3.1. Inhibition of DNA synthesis by HGF

HGF dose-dependently inhibited DNA synthesis of tumor cells (Fig.1). There were no significant morphological changes seen with any concentration of HGF, as examined under a phase-contrast microscope (not shown). The maximal inhibition seen with 5-10ng/ml HGF corresponds to 50-70% of inhibition. At higher concentrations (>10 ng/ml), there was no further inhibition of DNA synthesis by HGF. For purpose or comparison, the effect of HGF on DNA synthesis of mature parenchymal hepatocytes was examined. HGF at 5-8 ng/ml markedly stimulated DNA synthesis of hepatocytes. Therefore, HGF has bidirectional effects on DNA synthesis and the stimulatory or inhibitory effect of HGF seems to depend on the cell type, that is nomal or transformed: HGF stimulates DNA synthesis of hepatocytes in primary culture, but inhibits that of HepG2 hepatocellular carcinoma cells. Similarly, HGF stimulates the growth of melanocytes [14], but inhibits that of B6/F1 melanoma cells.

Table I

K_d and B_{max} values of an HGF receptor on normal and tumor cells

Cells	Cell type	HGF receptor	
		K_d (pM)	B_{max} (sites/cell)
Normal cells			
Hepatocyte[a]	parenchymal liver cell (rat)	24	565
Renal tubular cell	epithelial(rabbit)	28	720
Melanocyte[b]	epidermal(human)	22	120
Kerationocyte[c]	epidermal(human)	17-45	700-1100
Tumor cells			
KB	epidermoid carcinoma (human)	25	750
B6/F1	melanoma(mouse)	24	350
HepG2	hepatocellular carcinoma (human)	25	1510

K_d and B_{max} values in tumor cells were calculated from Scatchard analysis as shown in Fig. 3B.

[a-c]The results were taken from our reported results. See references [11], [14] and [13], respectively.

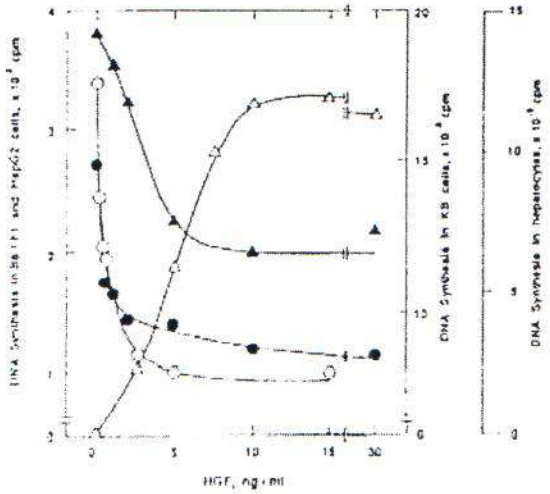

Fig. 1. Effect of HGF on the DNA synthesis of HepG2, B6/F1, KB cells and hepatocytes. Cells were plated in 24-well plates at a density of 1×10^4 cells/well and cultured in medium containing an appropriate amount of HGF. Cells were cultured for 4 days and pulse labeled with [^{3}H]thymidine for 4 h. The average of triplicate measurements is shown (●: B6/F1 cells, ○: HepG2 cells, ▲: KB cells and △: hepatocytes).

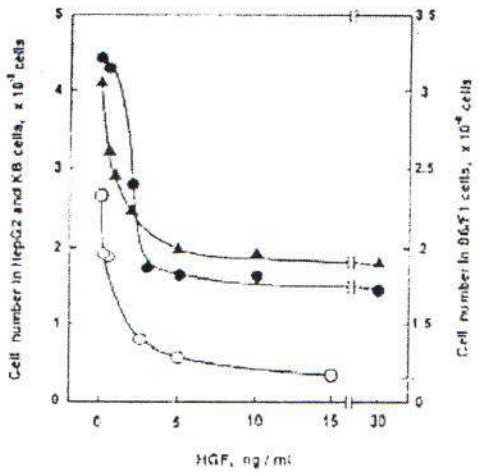

Fig. 2. Effect of HGF on growth of HepG2, B6/F1 and KB cells. Cells were plated in 6-well plates at a density of 3×10^4 cells/well for B6/F1 cells and KB cells, and 4×10^4 cells/well for HepG2 cells and cultured in the presence of various concentrations of HGF for 4 days. Cells were dissociated by trypsin-treatment and the number of cells was determined using a hemocytometer. The average of duplicate measurements is shown (●: B6/F1 cells, ○: HepG2 cells and ▲: KB cells).

Table II

Effect of HGF on cytolytic release of ^{51}Cr from tumor cells

Cells	HGF	^{51}Cr release in		% of cytolysis
		Cultured medium (*A*) (cpm)	Cells (*B*) (cpm)	$((A-A_0)/(A+B) \times 100)$
	ng/ml)			(%)
HepG2	0	11 876 ± 0	35 722 ± 1050	0
	5	11 905 ± 29	39 196 ± 367	0
	10	12 026 ± 91	36 785 ± 1163	0
	100	11 471 ± 46	37 215 ± 23	0
B6/F1	0	24 340 ± 1411	54 108 ± 642	0
	5	25 116 ± 722	55 603 ± 824	0.2
	10	25 482 ± 220	54 806 ± 729	0.4
	100	29 163 ± 521	53 288 ± 298	4.8
KB	0	21 900 ± 59	60 297 ± 15	0
	5	22 139 ± 796	60 391 ± 1199	0.2
	10	23 638 ± 509	57 672 ± 1866	2.5
	100	22 278 ± 444	53 161 ± 997	2.9

Each value is the mean SE of triplicate measurements. A_0 is ^{51}Cr release (cpm) in cultured of target cells in the absence of HGF.

3.2 *Inhibition of cell growth by HGF*

Inhibitory effects of HGF on DNA synthesis of tumor cells were evident when proliferation of the tumor cell lines was examined (Fig.2).HGF dose-dependently suppressed the growth of tumor cells. and the maximal inhibition by 50-70% was seen with 5-10 ng/ml HGF,findings consistent with the effects on DNA synthesis.

3.3 *HGF receptors on tumor cells*

Analysis of HGF receptors showed that [^{125}I]HGF binds to these tumor cells in a concentration-dependent manner and that the binding is saturable(Fig.3A).As shown in Fig.3B.Scatchard plots of the binding indicated a single class of high affinity binding sites expressed on these tumor cells. K_d and B_{max} values of tumor cells and other normal cells are summarized in table I. The tumor cell lines tested express approximately 300-1500 binding sites/cell with K_d of 25-28 pM.Therefore,there were no significant differences in HGF receptors between normal and tumor cell lines.

3.4 *Cytostatic effect of HGF on tumor cells*

The cytolysis caused by HGF was less than 2.5% at 5-10 ng/ml.concentrations at which HGF strongly suppressed both cell growth and DNA synthesis (Table II). Moreover,the cytolysis was still less than 5% at concentration as high as 100 ng/ml HGF.Therefore,the anti-

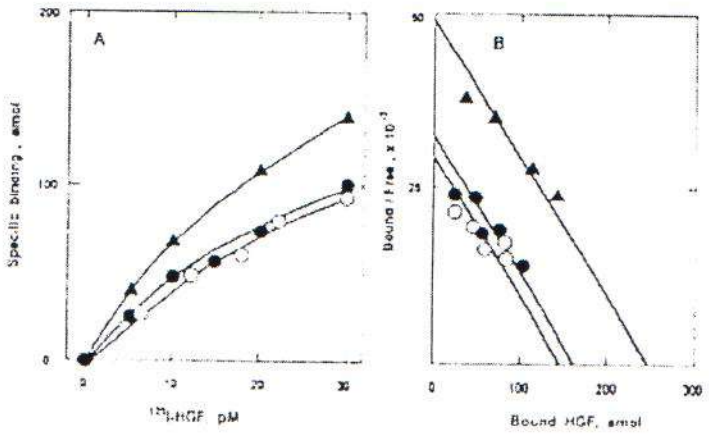

Fig. 3. Analysis of [^{125}I]HGF binding to the receptor on B6-F1, HepG2 and KB cells. Cells were incubated for 1 h at 10°C with second binding buffer containing increasing concentrations of [^{125}I]HGF with or without a 200-fold excessive concentration of unlabeled HGF. (A) Saturation curves of [^{125}I]-HGF specific binding on cells exposed to increasing concentrations of [^{125}I]HGF are shown. (●) B6-F1 cells, (○) HepG2 cells and (▲) KB cells. (B) Scatchard plots of [^{125}I]HGF binding on these cells are shown. Symbols are the same as in (A).

proliferative effect of HGF on tumor cell is a cytostatic but not direct cytolytic effect at physiological concentrations.

4. DISCUSSION

HGF was seen to have a cytostatic effect on the growth of tumor cells. Because the half-maximal dose exhibiting growth inhibition is consistent with the K_d values (25-28 pM) of HGF receptor on tumor cells, cell growth inhibition induced by HGF may be functioning at physiological concentrations of HGF.Recently, Bottaro et al. reported that HGF receptor is identical to *c-met* proto-oncogene product[18]. As the *c-met* proto-oncogene encodes transmembrane-associated receptor tyrosine kinase, the primary event following HGF binding to its receptor seems to be autophosphorylation of the receptor. However, because these tumor cell lines express HGF receptor which is indistinguishable in affinity or the number from that of the normal cells.the bidirectional effects of HGF do not seem to be due to differences in HGF receptors between normal and tumor cells. It is likely that intracellular signaling pathways downstream from tyrosine phosphorylation of HGF receptor differ between nomal and tumor cells.

More recently, Shiota et al. reported that the growth of FaO hepatocellular carcinoma cells stably transfected with an expression vector containing HGF cDNA linked to albumin promotor was markedly retarded compared to that of parental cells, and both tumorigenicity and size of tumors when implanted into nude mice were markedly decreased[19]. Taken together, these results indicate that HGF can inhibit growth of tumor cells both in vitro and in vivo.

Higashio et al. stated that tumor cytotoxic factor (TCF) purified from conditioned medium of IMR90 (human embryonic lung fibroblast) is identical or highly related to HGF[20], and Sone et al. found tumor cytolytic factor(TCF) is produced by human alveolar macrophages and blood monocytes[21, 22]. They examined the cytotoxic effector HGF/TCF at extremely higher concentrations. HGF has no significant cytolytic activeity, rather it has cytostatic effects at physiological concentrations.

In our previous study, we noted that HGF inhibited the growth of nomal human keratinocytes cultured under conditions of low Ca^{2+}(0.1mM) [13]. In the presence of low Ca^{2+}(0.1mM), keratinocytes prolifbrate rapidly, while the terminal differentiation of cells is suppressed in undifferentiated states, in contrast to cells cultured under physiological Ca^{2+}(1.8mM). Since keratinocytes in low Ca^{2+} seems to have properties similar to those of tumor cells, growth inhibitory effects of HGF may be also present in normal cells when the growth is extraordinarily promoted without undergoing a normal differentiation.

HGF is a potent mitogen for mature hepatocytes in primary culture and seems to have an important role as hepatotropic factor in liver regeneration after hepatic insult[6-10]. In addition to stimulating of cell growth and tissue repair. HGF has an antiproliferative effect on several tumor cells, and normal cells, under extraordinary conditions. Therefore. HGF may function as a negative regulator to suppress growth of tumor cells or normal cells during hyperplasia. HGF has an important role to sustain homeostasis of tissue organization by its bidirectional effects on cell growth. The antiproliferative effect of HGF on tumor cells suggests that this factor may be a putative anti-tumor agent.

Acknowledgements: We thank M. Ohara for helpful comments.This work was supported by Research Grants for Science and Cancer from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan.

REFERENCES

[1] Nakamura, T., Nawa, K. and Ichihara, A. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 122, 1450-1459.
[2] Nakamura, T., Teramoto, H. and Ichihara, A. (1986) Proc.Natl. Acad. Sci. USA 83, 6489-6493.
[3] Nakamura, T., Nawa,K., Ichihara, A., Kaise, N. and Nishino, T. (1987) FEBS Lett. 224, 311-316.
[4] Nakamura, T., Nishzawa,T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sugiyama, A., Tashiro, K. and Shimizu, S. (1989) Nature 342, 440-443.
[5] Tashiro, K., Hagiya, M., Nishizawa, T., Seki, T., Shimonishi, M., Shimizu, S. and Nakamura,T. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3200-3204.
[6] Kinoshita, T., Tashiro, K. and Nakamura, T. (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 174, 831-838.
[7] Noji, S., Tashiro, K., Kayama, E., Nohno, T., Oyama, K., Taniguchi, S. and Nakamura, T. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 173, 42-47.
[8] Asami, O., Ihara, I., Shimizu, N., Shimizu, S., Tomita, Y., Ichihara, A. and Nakamura, T. (1991) J. Biochem. 109, 8-13.
[9] Konishita, T., Hirao, S., Matsumoto, K. and Nakamura, T. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun.177, 330-335
[10] Shimizu, I., Ichihara, A. and Nakamura, T. (1991) J.Biochem. 109, 14-18.
[11] Higuchi, O. and Nakamura, T. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 176, 599-607.
[12] Igawa,T., Kanda,S., Kanetake, H., Saitoh, Y., Ichihara, A., Tomita, Y. and Nakamura, T. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 174, 831-838.
[13] Matsumoto, K., Hashimoto, K., Yoshikawa, K. and Nakamura, T. (1991) Exp. Cell. Res. 196 (in press).
[14] Matsumoto, K., Tajima, H. and Nakamura, T. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 176, 45-51.
[15] Gherardi, E. and Stoker, M. (1990) Nature 346, 228.
[16] Stoker, M. and Gherardi, E (1991) Biochem. Biophys. Acta. 1072, 81-102.
[17] Furlong, R.A., Takehara, T., Taylor, W.G., Nakamura, T. and Rubin, J.S. (1991) J. Cell. Sci. (in press).
[18] Bottaro, D.P., Rubin, J.S., Faletto, D.L., Chan, A.M.L., Kmiecik, T.E., VandeWoude, G.F. and Aaronson, S.A. (1991) Science 251, 802-804.
[19] Shiota, G., Rhoads, D.B., Nakamura, T. and Schmidt, E.V. (1991) Proc.Natl.Acad.Sci.USA(in press).
[20] Higashio, K., Shima, N., Goto, M., Itagaki, Y., Nagao, M., Yasuda, H. and Morinaga, T. (1990) Biochem. Biophys.Res. Commun. 170, 397-104.
[21] Sone, S., Tachibana, K., Ishii, K., Ogawara, M.and Tsubura, E. (1984) Cancer Res. 44,646-651.
[22] Sone, S., Lopez-Berestein, G. and Fidler, I.J. (1986) Cancer Immunol.Immunother. 21, 93-99.