论著

文章编号:1000-5404(2006)20-2044-03

基质溶解素及其反义寡核苷酸对肺腺癌A549细胞增殖的作用

王志新,徐 飞,谢启超,陈正堂 (第三军医大学新桥医院肿瘤科,全军肿瘤诊治中心,重庆市肿瘤生物技术研究所,重庆 400037)

提 要:目的 探讨重组基质溶解素(recombinant matrilysin, rMMP-7)和脂质体-MMP-7反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide of matrilysin by liposome transfection, LIPO- MAON)对肺腺癌A549细胞和人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)增殖的影响。**方法** ①构建MMP-7的反义寡核苷酸。②MTT法检测rMMP-7和LIPO-MOAN作用下A549和HUVEC的增殖状况。③RT-PCR法检测rMMP-7和LIPO-MAON作用下腺癌A549细胞和HUVEC MMP-7 mRNA的表达。**结果** 0.75、1.0 μg/ml rMMP-7对HUVEC增殖有促进作用,各种浓度的LIPO-MAON无作用;对A549细胞的增殖,0.5、0.75、1.0 μg/ml的rMMP-7均有促进作用;而高浓度(7.5、10 nmol/ml)的LIPO-MAON对A549细胞增殖有明显抑制作用。RT-PCR检测结果表明,HUVEC不表达MMP-7 mRNA;rMMP-7能增加A549细胞MMP-7 mRNA的表达,LIPO-MAON可降低其MMP-7 mRNA的表达($P<0.05$)。**结论** 在本试验浓度范围内高浓度的MMP-7能促进正常血管内皮细胞和肺腺癌细胞的增殖,其反义寡核苷酸不能抑制正常血管内皮细胞增殖,但高浓度的反义寡核苷酸能抑制肺腺癌细胞的增殖。

关键词:基质溶解;MMP-7反义寡核苷酸;肺腺癌细胞A549;人脐静脉血管内皮细胞

中图法分类号:R329.28;R730.23;R734.2 **文献标识码**:A

Effect of matrilysin and its antisense oligonucleotide on proliferation of lung adenocarcinoma cell line A549

WANG Zhi-xin, XU Fei, XIE Qi-chao, CHEN Zheng- tang (Cancer Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University. Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the effect of the recombinant matrilysin (rMMP-7) and its antisense oligonucleotide transfected by liposome (LIPO-MAON) on the proliferation of lung adenocarcinoma cell line A549 and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Methods** Antisense oligonucleotide of matrilysin was constructed by liposome transfection. The proliferation of HUVEC and A549 was detected by MTT assay in case of rMMP-7 or LIPO-MAON existence. The expression of MMP-7 mRNA in both HUVEC and A549 was examined by semi-quantitative RT-PCR assay. **Results** The proliferation of both HUVEC and A549 cell line was accelerated by high level of rMMP-7 (0.75, 1.0 μg/ml), and the inhibited proliferation was only found in A549 cell line treated with high concentration of LIPO-MAON (7.5, 10 nmol/ml), but not in HUVEC. By RT-PCR assay, no expression of MMP-7 mRNA was found in HUVEC; however, enhanced or decreased expression of mRNA were found when A549 cell line was treated respectively with rMMP-7 or LIPO-MAON ($P<0.05$). **Conclusion** The proliferation of both HUVEC and A549 cell line can be accelerated by high level of rMMP-7. No effect of matrilysin antisense oligonucleotide on the proliferation of HUVEC is found, while at high concentration it can inhibit the proliferation of A549 cell line.

Key words: matrilysin, MMP-7-antisense oligonucleotide, human umbilical vein endothelial cell, lung adenocarcinoma cell line A549

基质溶解素(matrilysin, MMP-7)是基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase)的一种,其主要作用是降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和基底膜(basement membrane, BM),可促进肿瘤细胞浸润、转移。本实验旨在探讨rMMP-7和脂质体-MMP-7反义寡核苷酸(LIPO-MAON)对肺腺癌A549细胞和人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)增殖的影响,为寻找抗癌治疗的新靶点奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

重组基质溶解素(rMMP-7)购自美国Sigma公司,阳离子

作者简介:王志新(1953-),女,河北省徐水市人,硕士,主任医师,教授,主要从事肿瘤转移及生物靶向治疗方面的研究。电话:(023)65209855

收稿日期:2005-11-09;修回日期:2006-06-20

脂质体(DOTAP)购自 Roche 公司，阳离子脂质体(Lipofectin)购自，Invitrogen 公司，RT-PCR 试剂盒购自北京鼎国生物试剂公司。

1.2　MMP-7 反义寡核苷酸和 PCR 引物的设计与合成

MMP-7 反义寡核苷酸构建：在基因库获得 MMP-7 的 DNA 序列，使用 Primer Premier 5.0 软件设计反义寡核苷酸，设计序列为：GTATATGATACGATC，该 DNA 序列通过与 MMP-7 互补链杂交，从而影响其转录，为了兼顾反应特异性与效率，设计时采用 15 个碱基的 DNA 片段，合成后通过在 NCBI 上比对，未发现有其他同源片段，由上海申友生物技术有限责任公司合成。RT-PCR 扩增引物的构建方法同上。引物序列 上游：TATGAGGCTCACCCTGTTCC；下游：AACTTCTGGATGCCTGCAAT，产物片段长度为 745 bp，由上海博亚生物技术有限公司合成。β-actin 作为内参，其产物长度为 540 bp。

1.3　HUVEC 和 A549 细胞培养[1]

rMMP-7 和 LIPO-MAON 作用下 HUVEC 与 A549 细胞的培养，0.03% Ⅳ型胶原蛋白包被 96 孔培养板，取对数生长期细胞，调整细胞数为 10^5/(ml·孔)。每个培养板分为 4 组：LIPO-MAON 组，rMMP-7 组，细胞对照组，空白对照组。每组同一剂量一式三孔，取均值；LIPO-MAON 的终末浓度分别为：2.5、5.0、7.5、10 nmol/ml；rMMP-7 的终末浓度分别为：0.25、0.5、0.75、1.0 μg/ml。检测 24、48、72、96 h 4 个时相点的细胞增殖状况。

1.4　MTT 法检测 rMMP-7 和 MMP-7 反义寡核苷酸对 HUVEC 和肺腺癌 A549 细胞增殖的影响

上述细胞培养终止前 4 h，每孔加入 MTT 20 μl，培养终止后弃上清，加入 DMSO 150 μl，在酶联仪上 570 nm 波长处读取吸光度值[D(570)]。

1.5　RT-PCR 法检测 HUVEC 和 A549 细胞 MMP-7 mRNA 的表达

取培养 72 h 的 HUVEC(或 A549)细胞(10 nmol/ml LIPO-MAON 组，1.0 μg/ml rMMP-7 组)，用 RT-PCR 试剂盒提取 RNA，RT-PCR 法检测 MMP-7 mRNA 表达。扩增参数如下：94 ℃预变性 2 min，94 ℃变性 45 s，55 ℃复性 40 s，72 ℃延伸 40 s，扩增 32 轮，72 ℃延伸加时 5 min。PCR 产物凝胶电泳，凝胶成像仪成像，用图像分析仪分析。

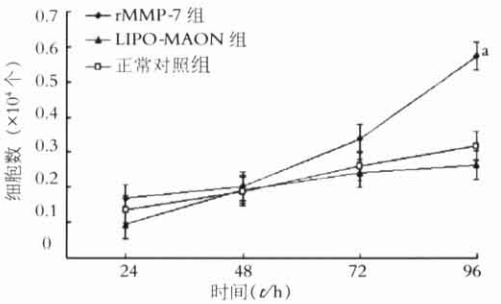
1.6　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验和 χ^2 检验。

2　结果

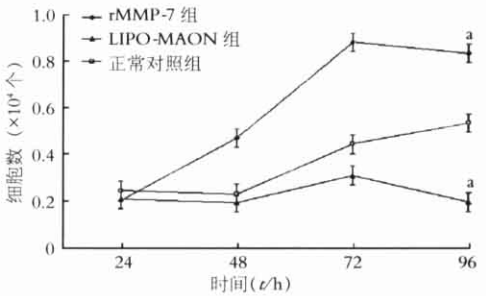
2.1　rMMP-7 和 LIPO-MAON 对 HUVEC 和肺腺癌 A549 细胞增殖的影响

0.25、0.5 μg/ml rMMP-7 各时相点对 HUVEC 的增殖没有促进作用，在 0.75、1.0 μg/ml rMMP-7 作用下，HUVEC 则出现了明显的增殖现象($P<0.05$)。但各种浓度的 LIPO - MAON 对 HUVEC 的生长均没有抑制作用。0.5 μg/ml rMMP-7 对肺腺癌 A549 细胞有明显的促增殖作用，增加浓度促增殖作用并没有增加而是趋于稳定。LIPO-MAON 浓度达到 7.5、10.0 nmol/ml 能明显地抑制 A549 细胞的增殖($P<0.05$)(图 1、2)。



a：$P<0.05$，与正常对照组比较

图 1　0.75 μg/ml rMMP-7 和 7.5 nmol/ml LIPO-MAON 作用下 HUVEC 的增殖状况



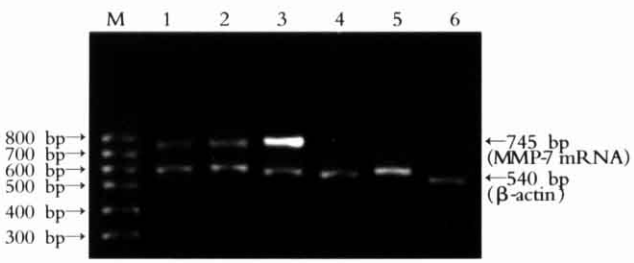
a：$P<0.05$，与正常对照组比较

图 2　0.75 μg/ml rMMP-7 和 7.5 nmol/ml LIPO-MAON 作用下 A549 的增殖状况

2.2　RT-PCR 检测干预因素下 HUVEC 和 A549 细胞 MMP-7 mRNA 表达

MMP-7 mRNA 条带出现在电泳凝胶上的位置为 730 ~ 760 bp之间(通用引物 β-actin 的扩增片段为 540 bp)，原设计引物的片段为 745 bp。HUVEC 样品在正常条件、rMMP-7 以及 LIPO- MAON 作用下，电泳凝胶 745 bp 位置附近未见明显的条带出现。

而 A549 样品在上述 3 种条件下，在电泳凝胶 745 bp 位置附近出现明显条带。该条带出现的位置和引物的条件相符，因此为待检测的目的片段 MMP-7 mRNA(图 3)。对凝胶成像进行半定量分析，结果表明：在 1.0 μg/ml rMMP-7 作用下，A549 细胞 MMP-7 mRNA 表达较正常对照组明显增加($P<0.05$)，而在 10.0 nmol/ml LIPO-MAON 作用下，A549 细胞 MMP-7 mRNA 表达较正常对照组明显降低($P<0.05$)。



M：标准；1－3：A549 细胞 MMP-7 mRNA 的表达(1：加 LIPO-MAON，2：对照，3：加 rMMP-7)；4－6：HUVEC 细胞 MMP-7 mRNA 的表达阴性(4：加 LIPO-MAON，5：对照，6：加 rMMP-7)

图 3　A549 和 HUVEC MMP-7 mRNA 的表达

3 讨论

基质溶解素是基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP_S)家族成员之一。MMP-7 和其他 MMPs 的理化性质基本相似,是一种锌离子依赖性的蛋白水解酶,具有降解细胞外基质(ECM)和基底膜(BM)的作用,主要由肿瘤细胞和巨噬细胞分泌。MMP-7 的作用底物为 ECM 和 BM 的弹性蛋白、明胶、Ⅳ型胶原纤维等。纤溶酶/纤溶酶原能降解前酶-基质溶解素(pro-MMP-7),使之成为活化基质溶解素(MMP-7)。主要表达于某些恶性肿瘤细胞或肿瘤浸润的边缘间质中[2-4]。MMP-7 表达量的增高,不仅有助于肿瘤细胞的扩散和转移,还有助于肿瘤血管的形成[5]。Wilson 等[6]的研究证明了 MMP-7 对 ECM 和 BM 的降解和肿瘤的浸润与转移密切相关,且 MMP-7 高表达的肿瘤,浸润性和转移性强,转染 MMP-7 cDNA 的结直肠癌细胞可增加其浸润和转移的能力。

Wilson 等[6]的实验结果显示:MMP-7 基因敲出的多发性结直肠腺瘤小鼠和没有 MMP-7 基因敲出的多发性结直肠腺瘤小鼠同时喂养一定时间,前者很少有恶变,而后者恶变率很高。Fingleton 等[7]的实验证明 MMP-7 能降解细胞表面的 FasL (Fas ligand, the ligand of the TNF receptor family member Fas),使 Fas 不能与 FasL 相结合,从而降低了肿瘤细胞凋亡的敏感性,使其肿瘤的恶性程度增加,另有研究也显示 MMP-7 的表达可以保护肿瘤细胞不被凋亡机制杀死[8]。我们用重组 MMP-7(rMMP-7)和脂质体转染 MMP-7 的反义寡核苷酸(LIPO-MAON)分别作用于人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)和肺腺癌细胞(A549),检测结果显示:MMP-7 可促进肺癌细胞株 A549 的增殖,但对正常血管内皮,仅在大剂量情况下才有促进增殖的作用。其反义寡核苷酸不能抑制血管内皮细胞增殖,但能有效抑制肺癌细胞的增殖。经 RT-PCR 检测,未发现正常血管内皮细胞(HUVEC)表达 MMP-7 的 mRNA,因此考虑 MMP-7 对正常血管内皮细胞的作用可能是非特异的,与浓度有关。MMP-7 促进细胞增殖的机制可能与 MMP-7 和细胞表面相应受体结合;或是 MMP-7 溶解 ECM(包括Ⅳ型胶原蛋白)后产生的一些细胞因子和细胞表面相应的受体结合,通过相关的信号传导激活启动子,导致细胞的增殖。Hashimoto 等[9]的实验证明:MMP-7 可以割断 $VEGF_{165}$-CTGF(结缔组织生长因子)形成 $VEGF_{165}$ 片段,该片段与血管内皮细胞的 VEGF2R 结合,将信息传递给钙-粘附素,后者的细胞质尾段与细胞内的 β-连环素发生作用,通过 Ras 路径激活和血管内皮细胞分裂和增生相关的基因,从而引起血管内皮细胞增生,rMMP-7 对 A549 细胞的促进作用可能和此相类似。LIPO-MAON 对 A549 细胞的抑制能力较强,提示肺腺癌细胞 A549 细胞能过度表达 MMP-7,因此其反义的寡核苷酸能有效抑制该细胞的增殖[10]。鉴于 MMP-7 与肺癌细胞的增殖关系密切,且非小细胞肺癌(NSCLC)组织中 MMP-7 有较高表达(82.5%)[11],MMP-7 可能有望成为抗肺癌治疗的新靶点。

我们用 RT-PCR 检测 rMMP-7、LIPO-MAON 和正常对照条件下 HUVEC 细胞和 A549 细胞 MMP-7 mRNA 的表达,结果显示:HUVEC MMP-7 mRNA 表达阴性;A549 细胞 MMP-7 mRNA 表达阳性,rMMP-7 可促进其 mRNA 表达,LIPO-MAONA 则能抑制其表达。肿瘤细胞所分泌的 MMP-7 不仅可溶解细胞外基质,还能被肿瘤细胞自身和血管内皮细胞所利用,一方面促进肿瘤细胞增殖,另一方面在高浓度情况下还可促进血管内皮细胞的增殖,而生长的血管内皮形成微血管后,又给肿瘤细胞提供充分的营养物质。从多方面扩大肿瘤细胞无限增殖的能力。因此以 MMP-7 作为治疗靶点,抑制能分泌 MMP-7 的肿瘤生长和浸润,不失为一种颇有前景的抗癌途径。

参考文献:

[1] 李向东,鲁开化,郭树忠,等. 血管内皮细胞培养与观察[J]. 中国美容医学, 2001, 10(3): 189-191.

[2] ISHII Y, NAKASATO Y, KOBAYASHI S, *et al*. A study on angiogenesis-related matrix metalloproteinase networks in primary hepatocellular carcinoma[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2003, 22(3): 461-470.

[3] IMPOLA U, UITTO V J, HIETANEN J, *et al*. Differential expression of matrilysin-1 (MMP-7), 92 kD gelatinase (MMP-9), and metalloelastase (MMP-12) in oral verrucous and squamous cell cancer [J]. J Pathol, 2004, 202(1): 14-22.

[4] WATANABE H, IWASE M, OHASHI M, *et al*. Role of interleukin-8 secreted from human oral squamous cell carcinoma cell lines[J]. Oral Oncol, 2002, 38(7): 670-679.

[5] LIU X P, KAWAUCHI S, OGA A, *et al*. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) expression at the invasive front in gastric carcinoma[J]. Jpn J Cancer Res, 2002, 93(3): 291-295.

[6] WILSON C L, HEPPNER K J, LABOSKY P A, *et al*. Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(4): 1402-1407.

[7] FINGLETON B, VARGO-GOGOLA T, CRAWFORD H C, *et al*. Matrilysin [MMP-7] expression selects for cells with reduced sensitivity to apoptosis[J]. Neoplasia, 2001, 3(6): 459-468.

[8] MITSIADES N, YU W H, POULAKI V, *et al*. Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity[J]. Cancer Res, 2001, 61 (2): 577-581.

[9] HASHIMOTO G, INOKI I, FUJII Y, *et al*. Matrix metalloproteinases cleave connective tissue growth factor and reactivate angiogenic activity of vascular endothelial growth factor 165[J]. J Biol Chem, 2002, 277 (39): 36288-36295.

[10] YONEMURA Y, ENDO Y, FUJITA H, *et al*. Inhibition of peritoneal dissemination in human gastric cancer by MMP-7-specific antisense oligonucleotide[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2001, 20(2): 205-212.

[11] 徐 飞,王志新,陈正堂. 非小细胞肺癌组织基质溶解素的表达与微血管密度的关系[J]. 重庆医学, 2004, 33(7): 994-996.

(编辑 王 红)