文章编号:1000-5404(2008)03-0237-04

论著

PARP抑制剂5-AIQ对CT26细胞侵袭及转移的影响

黎 明,蔡 莉,王娅兰 (重庆医科大学基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

摘 要:**目的** 探讨多聚(腺苷二磷酸核糖)聚合酶[Poly(ADP-ribose) polymerases, PARPs]抑制剂5-氨基异喹啉酮[5-Aminoisoquinolinone·HCl,5-AIQ]对小鼠结肠腺癌CT26细胞基质黏附、运动、侵袭能力的影响。**方法** 应用Western blot检测5-AIQ对PARP表达的影响,细胞-基质黏附实验、细胞运动及侵袭实验观察5-AIQ抑制CT26细胞PARP后,其基质黏附、运动及侵袭能力的变化。**结果** 5-AIQ处理组PARP表达明显弱于未处理组($P<0.05$)。黏附实验结果显示,与5-AIQ未处理组比较,5-AIQ 100、500 μmol/L处理组的吸光度值明显降低($P<0.01$),其黏附抑制率分别是14.54%、21.69%。运动及侵袭实验中,5-AIQ 500 μmol/L处理组与未处理组的细胞数差别显著($P<0.05$),其运动及侵袭抑制率分别是30.09%、37.47%。**结论** 5-AIQ可抑制CT26细胞PARP的表达,并可降低CT26细胞基质黏附、运动及侵袭能力,5-AIQ在抗肿瘤侵袭转移中可能发挥作用。

关键词:PARP;5-AIQ;大肠癌;肿瘤侵袭转移
中图法分类号:R73-362;R73-37;R735.35 **文献标识码**:A

Effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor 5-AIQ on invasion and metastasis of CT26 cells

LI Ming, CAI Li, WANG Ya-lan (Department of Pathology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor 5-AIQ on the adhesion, migration and invasion of mouse colon adenocarcinoma cell line (CT26). **Methods** The expression of PARP after 5-AIQ treatment was detected Western blot. The cell adhesion, migration and invasion of CT26 after 5-AIQ treatment were observed by cell-matrix adhesion assay, cell migration assay and matrigel invasion assay. **Results** The expression of PARP in 5-AIQ-treated CT26 was weaker than that in 5-AIQ-untreated cells ($P<0.05$). In the adhesion assay, the OD value of 5-AIQ-treated cells was reduced as compared with untreated cells ($P<0.05$) and the inhibition rate of 100 μmol/L 5-AIQ treated cells and 500 μmol/L 5-AIQ treated cells was 14.54% and 21.69% respectively. Moreover, migration and invasion potential of CT26 were also reduced by 500 μmol/L 5-AIQ treatment ($P<0.05$), and the inhibition rate was 30.09% and 37.47% for migration and invasion respectively. **Conclusion** PARP inhibitor 5-AIQ can reduce the expression of PARP, adhesion, migration and invasion of CT26 cells, suggesting 5-AIQ probably plays a role against tumor metastasis.

Key words: poly(ADP-ribose) polymerase; 5-AIQ; colorectal neoplasm; metastasis

PARP是一种核蛋白酶,由DNA的断链激活,参与DNA的修复、复制、基因调控、信号转导等。文献[1-3]报道,在大肠癌、前列腺癌等多种恶性肿瘤中PARP的表达增强,且PARP抑制剂有抗血管发生的作用,推测PARP可能在肿瘤转移中发挥重要作用。我们先前的研究表明[4],在大肠癌组织中,聚(腺苷二磷酸核糖)[poly(ADP-ribose), PAR](PARP活化的产物)在伴癌转移组织内的表达明显高于未伴癌转移的组织,且与P-选择素和ICAM-1的表达呈正相关,提示PARP活性增强与大肠癌侵袭转移有关。

5-氨基异喹啉酮[5-Aminoisoquinolinone·HCl, 5-AIQ]是近几年合成的一种PARP的强效水溶性抑制剂。有文献报道,5-AIQ能通过抑制PARP降低黏附分子如P-选择素、ICAM-1等的表达而影响白细胞与

基金项目:重庆市自然科学基金(2006BB52881)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2006BB52881)
作者简介:黎 明,女,重庆市人,硕士研究生,主要从事肿瘤病理方面的研究。电话:(023)68485789,E-mail:cqku1981@yahoo.com.cn
通信作者:王娅兰,电话:(023)68485789,E-mail:wangyalan074@gmail.com
收稿日期:2007-03-26 修回日期:2007-04-17

血管上皮细胞的黏附[5]。但5-AIQ在肿瘤中的作用尚少见相关文献报道。我们前期研究表明，PARP抑制剂5-AIQ可抑制小鼠结肠腺癌CT26细胞与人脐静脉血管内皮细胞的黏附。本研究则应用Western blot、基质黏附实验、Transwell小室模型，采用5-AIQ抑制PARP，在体外直接观察PARP改变对小鼠结肠腺癌CT26细胞的黏附、侵袭、运动能力的影响，初步探讨PARP抑制剂5-AIQ在肿瘤侵袭转移中可能的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

CT26为小鼠结肠腺癌细胞系由四川大学魏于全教授惠赠，5-AIQ由英国Bath大学Threadgill教授惠赠，纤维连接蛋白(fibronectin，FN)、抗PARP、β-actin抗体、ECL试剂盒均购自Santa Cruz公司，Matrigel购自BD公司，辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG抗体购自北京中杉生物技术公司，96孔培养板、24 Well Transwell® Permeable Supports购自Corning公司，核蛋白裂解液购自Pierce公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将小鼠结肠腺癌细胞CT26置入含10%小牛血清的RPMI1640培养液中，37 ℃、5% CO_2培养箱培养。

1.2.2 Western blot检测 参照Linfor等[6]的方法稍加修改，CT26细胞按100 μmol/L加入5-AIQ培养16 h，未加5-AIQ为对照组(未处理组)。收集细胞离心沉淀后，按NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents说明提取细胞核蛋白，并用BCA法测定蛋白浓度。8%变性聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳，将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上，5%脱脂奶粉封闭，加入PARP一抗、β-actin一抗，4 ℃过夜，加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG室温孵育1 h，采用ECL试剂盒进行化学发光显影。凝胶成像仪照相，目的条带用图像分析软件(Quantity One)进行光密度积分值分析，以PARP与β-actin光密度积分值的比值作为蛋白表达相对含量。

1.2.3 细胞-基质黏附试验 参照Wu等[7]的方法稍加修改，FN 30 μg/ml，包被于96孔板中，4 ℃过夜。BSA 10 mg/ml，封闭2 h。按100、500 μmol/L分别加入5-AIQ培养CT26细胞16 h处理组，未加5-AIQ为对照组。取细胞悬液，按细胞数2.5×10^5 ml^{-1}接种于96孔板，200 μl/孔，每组设5个复孔。37 ℃，5% CO_2孵育1 h，弃培养液，PBS洗去未黏附的细胞，加入MTT 2 mg/ml，50 μl/孔，37 ℃孵育4 h。弃MTT，加入二甲基亚砜150 μl/孔，振荡10 min显色。用酶标仪测630 nm吸光度值[$D(630)$]。实验重复3次。

细胞黏附抑制率 = [对照组平均$D(630)$ − 处理组平均$D(630)$]/对照组平均$D(630)\times100\%$

1.2.4 运动实验 参照Wu等[7]的方法稍加修改，在膜的下表面包被FN，5 μg/室，37 ℃孵育2 h，在下室中加入含10%小牛血清的培养基600 μl。CT26细胞按500 μmol/L加入5-AIQ培养16 h(处理组)，未加5-AIQ为对照组(未处理组)。取细胞悬液(10^6 ml^{-1})，100 μl/室，加入上室。每组设3个复室。37 ℃，5% CO_2孵育，24 h后，固定、染色。用棉签擦去上室的细胞，风干，倒置显微镜下观察。高倍镜下(×400)观察5个视野，计数细胞。细胞运动抑制率 = (对照组平均侵袭细胞数 − 处理组平均侵袭细胞数)/对照组平均侵袭细胞数 × 100%。

1.2.5 侵袭实验 基本步骤同运动实验，仅在上室包被时采用稀释的Matrigel(用无血清的RPMI1640培养液按1∶5稀释)，30 μl/室。

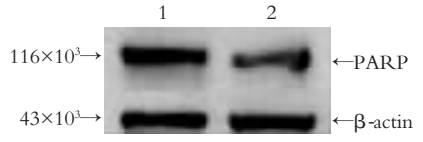
1.3 统计学处理

采用SAS 8.0统计软件对5-AIQ处理前后CT26细胞的PARP蛋白表达、细胞-基质黏附能力、运动侵袭能力进行t检验。

2 结果

2.1 Western blot检测结果

CT26细胞加入100 μmol/L的5-AIQ孵育后，其PARP的蛋白表达明显弱于未处理的CT26细胞(图1)。统计学结果表明，对照组的CT26细胞其PARP的表达较5-AIQ处理组的CT26细胞PARP的表达强[分别为(0.793 ± 0.154)、(0.501 ± 0.086)，$P<0.05$]。



1：5-AIQ未处理组；2：5-AIQ(100 μmol/L)处理组

图1 5-AIQ处理前后PARP的表达

2.2 细胞-基质黏附试验

CT26细胞用100、500 μmol/L的5-AIQ处理后，其与FN的黏附能力较5-AIQ对照组都有明显下降，且随剂量增加而下降更明显(表1)。

表1 5-AIQ处理前后CT26黏附的变化($n=5$，$\bar{x}\pm s$)

组别	$D(630)$	抑制率(%)
5-AIQ对照组	0.341 ± 0.015	–
5-AIQ 100 μmol/L处理组	0.292 ± 0.012[a]	14.54
5-AIQ 500 μmol/L处理组	0.267 ± 0.009[ab]	21.69

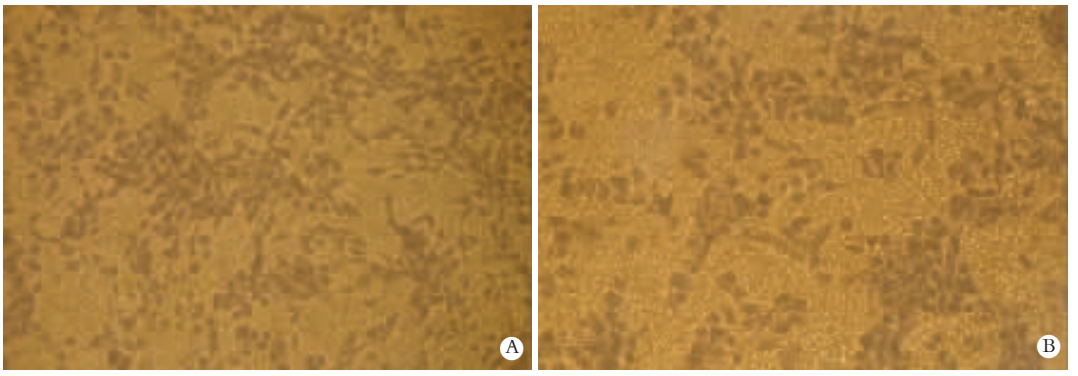
a：$P<0.05$，与5-AIQ对照组比较；b：$P<0.01$，与5-AIQ 100 μmol/L处理组比较

2.3 运动实验

运动实验的结果表明，CT26细胞用5-AIQ 500 μmol/L处理后，其运动穿过微孔膜的能力较对照组有明显下降(图2)。统计学结果表明，5-AIQ处理组的CT26细胞穿过微孔膜的细胞数(79 ± 8)较5-AIQ未处理组(对照组)的CT26细胞穿过微孔膜的细胞数(113 ± 8)明显减少($P<0.05$)，其迁移抑制率为30.09%。

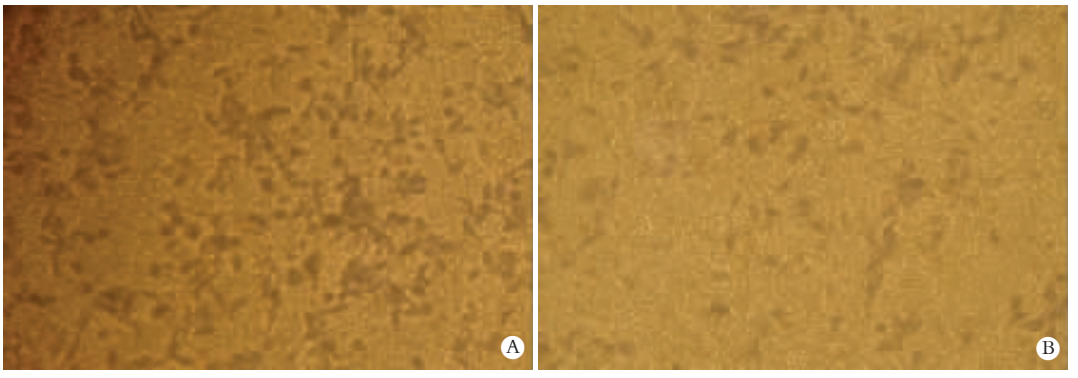
2.4 侵袭实验

侵袭实验的结果表明，CT26细胞用5-AIQ 500 μmol/L处理后，其侵袭基质胶的能力较对照组有明显下降(图3)。统计学结果表明，5-AIQ处理组的CT26细胞侵袭Matrigel胶穿过微孔膜的细胞数(54 ± 8)较5-AIQ未处理组(对照组)的CT26细胞数(86 ± 9)明显减少($P<0.05$)，其侵袭抑制率为37.47%。



A 5-AIQ 未处理组;B 5-AIQ 500 μmol/L 处理组

图 2　迁移到微孔膜下表面的 CT26 细胞　(倒置显微镜 ×400)



A 5-AIQ 未处理组;B 5-AIQ 500 μmol/L 处理组

图 3　侵袭 Matrigel 到微孔膜下表面的 CT26 细胞　(倒置显微镜 ×400)

3　讨论

PARP 普遍存在于真核细胞的细胞核内,其通过对细胞内众多蛋白质和酶类进行翻译后修饰,从而调节细胞内一系列的分子事件。目前的研究表明,PARP 抑制可以减少多种病理生理现象的危害,如内毒素性休克、糖尿病性神经病、糖尿病视网膜内皮细胞死亡、多种器官的缺血再灌注损伤、系统性红斑狼疮及多种炎症。在 PARP 与肿瘤的关系研究中,我们先前的实验表明[4],人大肠癌组织肿瘤细胞,PAR(PARP 活化的产物)的表达与淋巴结转移和远处转移具相关性,且肿瘤细胞 PAR 的表达与 P-选择素和 ICAM-1 的表达呈正相关。

5-AIQ 作为 PARP 的有效抑制剂,可通过对 PARP 的抑制,减少心肌梗死的面积,也有利于肝脏的缺血再灌注损伤和失血性休克。在脊髓损伤模型[8-11]和肺损伤模型[5]中 5-AIQ 能减少炎症和组织损伤及白细胞的浸润,并能下调血管内皮细胞 P-选择素和 ICAM-1 的表达,从而抑制白细胞与血管内皮细胞的黏附。Rajesh 等[3]研究也表明,5-AIQ 及其他的 PARP 抑制剂对血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)诱导的人脐静脉内皮细胞的增殖、迁移及血管形成等均有抑制作用。但抑制肿瘤细胞的 PARP 是否能减弱其侵袭转移能力,尚少见文献报道。

本研究以小鼠结肠腺癌 CT26 细胞为研究对象,观察了 5-AIQ 抑制 PARP 后,CT26 细胞黏附、运动、侵袭能力的改变。结果表明:5-AIQ 可抑制 CT26 细胞 PARP 的蛋白表达,并可抑制 CT26 细胞与 FN 的黏附率、迁移率和侵袭微孔膜的能力,提示 PARP 与 CT26 细胞的基质黏附、迁移和侵袭能力有关;5-AIQ 作为 PARP 的抑制剂可以通过抑制 PARP 降低肿瘤细胞与细胞外基质的黏附、肿瘤细胞的运动及侵袭能力。

有文献报道,PARP 一方面可通过调节白细胞 PI3-kinase/Akt 信号转导途径和促分裂原活化蛋白激酶[mitogen-activated protein kinase,MAPK]级联反应,调节其核转录因子 κB(nuclear transcription factor κB,NF-κB)的转录活性[12];另一方面,PARP 的自动修饰可促进 NF-κB · DNA 复合物的形成,增强 NF-κB 的转录活性[13]。PARP 抑制则可降低 NF-κB 的转录活性,从而下调 NF-κB 依赖性基因的表达。

在癌细胞与基底膜的黏着过程中,整合素(integrin)发挥着重要作用。文献[14]报道,CT26 与 FN 的黏附主要由整合素 α5、β1 亚基介导。在肿瘤细胞降解细胞外基质的过程中,基质金属蛋白酶(matrix met-

alloproteinases，MMPs）则发挥着关键作用，尤其是MMP-2和MMP-9。文献[15]也报道，NF-κB可以转录调节整合素β1亚基的表达，且NF-κB的激活、α5、β1亚基表达增加都会使MMP增加，而NF-κB活性的抑制则使MMP-9表达大幅度的下降。而MMP-2的表达与NF-κB的调节也有关系[16]。

而本研究中，我们应用Western blot方法，表明5-AIQ作为PARP的抑制剂，能够抑制小鼠结肠癌CT26细胞PARP的表达。而目前认为，在炎症过程中，PARP可以调节NF-κB依赖性基因的表达，NF-κB依赖性基因如整合素、MMP-2、MMP-9等在介导肿瘤细胞与细胞外基质黏附、降解细胞外基质蛋白中具有重要作用。因此我们推测，肿瘤CT26细胞PARP的抑制也与炎症时相似，可以下调NF-κB依赖性基因如整合素、MMP-2、MMP-9等的表达。

因此，本实验中5-AIQ可以抑制CT26细胞黏附、运动和侵袭Matrigel膜的能力，可能与5-AIQ对PARP的抑制，进而抑制了NF-κB的活化，下调了NF-κB调控的整合素、MMP-2、MMP-9等相关基因的表达有关。这一推论有待进一步实验的证实。

参考文献：

[1] Trofimova I, Dimtchev A, Jung M, *et al*. Gene therapy for prostate cancer by targeting poly(ADP-ribose) polymerase[J]. Cancer Res, 2002, 62(23): 6879-6883.

[2] Tentori L, Leonetti C, Scarsella M, *et al*. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase prevents irinotecan-induced intestinal damage and enhances irinotecan/temozolomide efficacy against colon carcinoma[J]. FASEB J, 2006, 20(10): 1709-1711.

[3] Rajesh M, Mukhopadhyay P, Godlewski G, *et al*. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition decreases angiogenesis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 350(4): 1056-1062.

[4] 郝兰香，王娅兰，李圆圆. 大肠癌PARP表达与P-selectin和ICAM-1表达的相关性[J]. 基础医学与临床，2006，26(8)：882-887.

[5] Cuzzocrea S, McDonald M C, Mazzon E, *et al*. Effects of 5-Aminoisoquinolinone, a water-soluble, potent inhibitor of the activity of poly(ADP-ribose) polymerase, in a rodent model of lung injury[J]. Biochem Pharmacol, 2002, 63(2): 293-304.

[6] Linfor J, Berger T. Potential role of alphav and beta1 integrins as oocyte adhesion molecules during fertilization in pigs[J]. J Reprod Fertil, 2000, 120(1): 65-72.

[7] Wu X, Zeng H, Zhang X, *et al*. Phosphatase of regenerating liver-3 promotes motility and metastasis of mouse melanoma cells[J]. Am J Pathol, 2004, 164(6): 2039-2045.

[8] Wayman N, McDonald M C, Thompson A S, *et al*. 5-Aminoisoquinolinone, a potent inhibitor of poly(adenosine 5'-diphosphate ribose) polymerase, reduces myocardial infarct size[J]. Eur J Pharmacol, 2001, 430(1): 93-100.

[9] Mota-Filipe H, Sepodes B, McDonald M C, *et al*. The novel PARP inhibitor 5-Aminoisoquinolinone reduces the liver injury caused by ischemia and reperfusion in the rat[J]. Med Sci Monit, 2002, 8(11): BR444-BR453.

[10] McDonald M C, Mota-Filipe H, Wright J A, *et al*. Effects of 5-Aminoisoquinolinone, a water-soluble, potent inhibitor of the activity of poly(ADP-ribose) polymerase on the organ injury and dysfunction caused by haemorrhagic shock[J]. Br J Pharmacol, 2000, 130(4): 843-850.

[11] Genovese T, Mazzon E, Muia C, *et al*. Inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase modulate signal transduction pathways and secondary damage in experimental spinal cord trauma[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 312(2): 449-457.

[12] Veres B, Radnai B, Gallyas F, Jr., *et al*. Regulation of kinase cascades and transcription factors by a poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, 4-hydroxyquinazoline, in lipopolysaccharide-induced inflammation in mice[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2004, 310(1): 247-255.

[13] Nakajima H, Nagaso H, Kakui N, *et al*. Critical role of the automodification of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in nuclear factor-kappaB-dependent gene expression in primary cultured mouse glial cells[J]. J Biol Chem, 2004, 279(41): 42774-42786.

[14] Geng L, Ali S A, Marshall J F, *et al*. Fibronectin is chemotactic for CT 26 colon carcinoma cells: sub-lines selected for increased chemotaxis to fibronectin display decreased tumorigenicity and lung colonization[J]. Clin Exp Metastasis, 1998, 16(8): 683-691.

[15] Wang J H, Manning B, Wu Q D, *et al*. Endotoxin/lipopolysaccharide activates NF-kappa B and enhances tumor cell adhesion and invasion through a beta 1 integrin-dependent mechanism[J]. J Immunol, 2003, 170(2): 795-804.

[16] Marin-Castano M E, Elliot S J, Potier M, *et al*. Regulation of estrogen receptors and MMP-2 expression by estrogens in human retinal pigment epithelium[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(1): 50-59.

（编辑 吴培红）

作者书写数字须知

根据《关于出版物上数字用法的规定》，本刊实行三位分节法（即从小数点算起，向左向右每3位分1节，节间留出一定空隙），废除千分撇分节法（如2,431改为2 431）。但年份、页数、部队编号、仪表型号、标准号不用三位分节法。中文出现的数字，凡属计数数值，一律用阿拉伯数字表示。

本刊编辑部