基础研究 文章编号:0253-3626(2010)08-1160-03

MMP7 反义寡核苷酸对肺腺癌 A549 细胞粘附和侵袭能力的影响

杨 波[1],唐伏秋[2],高建飞[1],饶智国[1],王志新[3]

(1.广州军区武汉总医院肿瘤科,武汉 430070;2.广州军区武汉总医院干部病房二科,武汉 430070;3.第三军医大学新桥医院全军肿瘤研究所,重庆 400037)

【摘 要】目的:观察基质溶解素(Matrilysin,MMP7)反义寡核苷酸(Antisense oligodeoxynucleotide)对肺腺癌 A549 细胞体外粘附和侵袭能力的影响。方法:采用硫代磷酸修饰的 MMP7 ASODN,通过脂质体导入 A549 细胞,RT-PCR 检测 MMP7 mRNA 表达;平板粘附模型和 Boyden chamber 模型比较 A549 细胞的粘附和侵袭能力。结果:MMP7 ASODN 转染 A549 细胞后,与未转染组和脂质体组比较,RT-PCR 电泳条带相对光密度值显著降低($P<0.01$)。粘附于平板和穿过 Boyden chamber 的细胞数有明显下降($P<0.01$)。结论:MMP7 ASODN 可以有效抑制肺腺癌 A549 细胞株 MMP7 基因的表达,降低细胞粘附和侵袭能力。

【关键词】基质溶解素;反义寡核苷酸;肺腺癌 A549 细胞;粘附;侵袭

【中国图书分类法分类号】R342.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-12-17

Effects of MMP7 antisense oligodeoxynucleotide on adhesion and invasion of human lung adenocarcinoma cell A549

YANG Bo, et al

(*Department of Oncology, Wuhan General Hospital of Guangzhou Command*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the influence of MMP7 antisense oligodeoxynucleotide (ASODN) on adhesion and invasion of human lung adenocarcinoma cell line A549. *Methods*: Phosphorothioate MMP7 ASODN was transfected to A549 cells mediated by liposome. The expression of MMP7 was examined by RT-PCR. The adhesive and invasive ability were examined by plate adhesion model and Boyden Chamber transwell assay. *Results*: After MMP7 ASODN was transfected, the relative optical density (ROD) of electrophoresis strip was decreased obviously ($P<0.01$). Compared with A549 group and liposome group, the cells adhering to plate and permeating septum of Boyden chamber were decreased markedly ($P<0.01$). *Conclusion*: The MMP7 ASODN could effectively inhibit the expression of MMP7 and reduce the adhesive and invasive ability of A549.

【Key words】Matrilysin; Antisense oligodeoxynucleotide; Lung adenocarcinoma cell line A549; Adhesion; Invasion

基质溶解素(Matrilysin,MMP7)是一种锌离子依赖性的蛋白水解酶,广泛表达于包括肺腺癌在内的多种肿瘤组织中[1]。研究发现,MMP7 可以降解细胞外基质(Extracellular matrix,ECM)和基底膜(Basement membrane,BM),在肿瘤细胞侵润、迁移和转移中起重要作用[2,3]。在发现 MMP7 高表达于肺腺癌 A549 细胞的前期工作基础上,本研究通过反义基因技术体外抑制 A549 细胞 MMP7 的表达,检测对 A549 细胞体外粘附和侵袭能力的影响,为以 MMP7 为靶点治疗非小细胞肺癌(Non-small cell lung carcinoma,NSCLC)提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞培养 肺腺癌 A549 细胞株由第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所提供。于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中培养,37℃、5%CO_2 孵箱内贴壁生长,用 0.25%胰酶消化传代。取指数生长期细胞,在转染反义寡核苷酸前 1 d 将细胞以 5×10^4 个/ml 的浓度接种 3 ml 于 50 ml 细胞培养瓶中,到转染时细胞长至板底的 50%~70%。DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自美国 Hyclone 公司,阳离子脂质体(DOTAP)购自瑞士 Roche 公司,RT-PCR 试剂盒购自美国 MBI 公司,Matrigel 和 Boyden chamber 购自美国 Sigma 公司。其余试剂均为国产分析纯。

1.1.2 反义寡核苷酸的合成 参照文献[4]设计反义寡核苷酸(ASODN),作用在 MMP7 的翻译起始密码子(AUG)后的 18 个碱基序列,其序列为 5'-ACACAGCACGGTGAGTCG-3'。经微机检索与 MMP7 基因以外的人类基因无同源性。由上海生工生物工程公司合成,寡核苷酸的碱基均进行硫化修饰,即寡核苷酸磷酸二酯键内非连接氧被硫替代。先用无血清不含抗生素的 DMEM 培养基把 ASODN 配成 20 μmol/L 贮存

作者简介:杨 波(1978-),男,主治医师,硕士,研究方向:肿瘤转移和靶向治疗。

液，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌贮存，使用前稀释成相应浓度与脂质体在室温下混匀 30min，形成脂质体－寡核苷酸混合液。其中寡核苷酸(μg)：脂质体(μg)=1:5。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR检测 依ASODN浓度不同，分为5组：7.5 μmol/L的ASODN组、5 μmol/L的ASODN组、2.5 μmol/L的ASODN组、A549组、20 mg/L的脂质体组。其中，A549组和20 mg/L的脂质体组为对照组。取对数生长期的A549细胞，按实验分组分别加入4 ml含10%血清、相应浓度寡核苷酸和脂质体的DMEM培养基。37℃、5%CO_2孵箱培养48 h。采用Tripure一步法进行总RNA提取。取总RNA 2 μg，采用MBI公司RT试剂盒，按说明书进行。将其中的mRNA反转录为cDNA。取cDNA进行半定量PCR。94℃ 4 min→92℃ 30 s →59℃ 30 s → 72℃ 60 s 。后3步进行33个循环。以磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参照，根据Genbank提供的GAPDH mRNA序列，用DNAstar软件设计引物如下，上游引物：5'－GGAGTCC ACTGGCGTCTT-3'，下游引物：5'－GAGT CCTTCCACGATA CCAA-3'。其扩增片段为235 bp。同方法设计MMP7上游引物：5'－AAAATGCCAACAGTTTAGAAGC－3'，下游引物：5'－CGTCCAGCGTTCATCCTC－3'。其扩增片段为449 bp。上下游引物各1.5 μl在第6循环72℃时再加入，循环完成后72℃ 5 min终止。取样品电泳后进行图像分析，用相对光密度值表示MMP7 mRNA相对含量。

1.2.2 细胞超微结构观察 实验分为A549对照组和5 μmol/L的ASODN组。常规培养48 h后取出培养瓶，使用0.25%胰酶消化后，制成细胞悬液；2 000 r离心10 min弃上清；0.01 mol/L PBS(pH 7.2~7.6)漂洗；离心后弃上清；上述细胞置于电镜专用固定液中固定2 h，送电镜室制片，电镜(德国Leica)下观察。

1.2.3 平板粘附实验 依ASODN浓度不同，分为3组，每组细胞设5个平行复孔实验(n=5)：A549对照组、2.5 μmol/L的ASODN组和5 μmol/L的ASODN组。96孔培养板分别均匀包被Matrigel 10 μl，4℃过夜，超净工作台风干。紫外线照射消毒。取对数生长期(60%~70%融合状态)的A549细胞，0.25%胰酶消化成细胞悬液，以 5×10^4 个/ml接种于96孔细胞培养板，每孔0.1 ml，60 min后，37℃ PBS洗去未粘附的细胞，MTT法测各孔490 nm波长光吸收值。用光吸收值大小代表粘附活细胞的相对数量。

1.2.4 Boyden chamber实验 依ASODN浓度不同，分为3组，每组细胞设5个平行复孔实验(n=5)：A549对照组，2.5 μmol/L的ASODN组，5 μmol/L的ASODN组。将Transwell杯放置入24孔培养板内；Transwell杯底部加入100 μl的Matrigel均匀铺制底层，4℃过夜。取对数生长期的A549细胞，以 5×10^4 个/ml接种于Transwell杯内，每孔800 μl。24孔培养板内加入A549细胞的培养液上清500 μl。继续37 ℃、5%CO_2孵箱培养24 h。24 h后自孵箱中取出Transwell杯，用棉签蘸无血清的DMEM培养基擦拭除去杯内侧的Matrigel及其表面的细胞。多聚甲醛中固定10 min，PBS漂洗3 min×3次后行HE染色。染色后将Transwell杯置于光镜下，每个滤膜随机选取5个200倍视野，计数穿膜细胞数(Numbers of cell permeating septum，NCS)。以穿膜细胞的数目表示A549细胞的相对侵袭能力。

1.3 统计学分析

结果以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，用统计学软件SPSS 13.0进行两正态总体间均值比较(t检验)，以 $P\leq0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MMP7 mRNA的表达

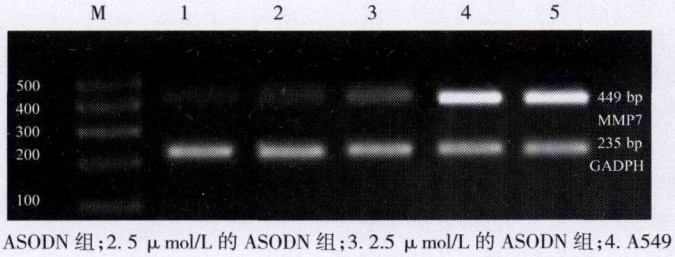
MMP7 ASODN送上海Invitrogen公司测序，结果表明序列正确。RT-PCR产物电泳如图1照片所示：5组在235 bp处皆显现明亮的GAPDH内参照条带且无明显差别；A549对照组、脂质体组在449 bp处皆可见特异性的MMP7基因条带，2.5 μmol/L的ASODN组、5 μmol/L的ASODN组、7.5 μmol/L的ASODN组在449 bp处条带明显变暗，7.5 μmol/L的ASODN组基本未见明显条带。图像分析结果如表1所示，A549对照组、脂质体组ROD值没有显著性差异($P>0.05$)。2.5 μmol/L的ASODN组、5 μmol/L的ASODN组、7.5 μmol/L的ASODN组和A549对照组比较，ROD值显著降低($P<0.01$)。5 μmol/L的ASODN组、7.5 μmol/L的ASODN组与2.5 μmol/L的ASODN组比较，相对光密度值值显著降低($P<0.01$)。提示MMP7 ASODN转染能显著抑制A549细胞MMP7 mRNA表达，其抑制能力呈浓度依赖性。

2.2 细胞超微结构变化

电镜下A549细胞核异形性明显，染色质丰富，胞浆内线粒体、内质网、核糖体数目较多，细胞膜表面微绒毛丰富(左侧照片)；ASODN处理组细胞肿胀，透亮度增加，细胞核内染色质不如未转染细胞丰富，可见空泡样变，线粒体水肿，内质网水肿。细胞膜表面微绒毛明显减少(右侧照片)。

2.3 细胞粘附能力的变化

如表2所示，平板粘附实验中，MMP7 ASODN转染A549



M. Marker；1. 7.5 μmol/L ASODN组；2. 5 μmol/L的ASODN组；3. 2.5 μmol/L的ASODN组；4. A549对照组；5. 脂质体组

图1 RT-PCR检测A549细胞MMP7基因表达

细胞后测定实验各组 490 nm 波长光吸收值，2.5 μmol/L A-SODN 组和 5 μmol/L ASODN 组与 A549 对照组比较，光吸收值显著下降($P<0.05$)，表明 MMP7 ASODN 能够显著抑制 A549 细胞粘附能力。而 5 μmol/L ASODN 组与 2.5 μmol/L ASODN 比较，光吸收值显著下降($P<0.05$)；表明 5 μmol/L ASODN 比 2.5 μmol/L ASODN 更能有效地抑制 A549 细胞粘附能力。

表 1 MMP7 ASODN 对 A549 细胞 MMP7 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组 别	相对光密度值
7.5 μmol/L ASODN 组	0.124 ± 0.038^{ab}
5 μmol/L ASODN 组	0.242 ± 0.059^{ab}
2.5 μmol/L 的 ASODN 组	0.617 ± 0.097^{a}
A549 对照组	1.485 ± 0.134
脂质体组	1.456 ± 0.125

[a]: $P<0.01$，与 A549 对照组比较；[b]: $P<0.01$，与 2.5 μmol/L 的 ASODN 组比较

表 2 MMP7 ASODN 转染对 A549 细胞粘附能力的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	490 nm 波长光吸收值
Control 组	0.264 ± 0.038
2.5 μmol/L ASODN 组	0.179 ± 0.024^{a}
5 μmol/L ASODN 组	0.105 ± 0.011^{ab}

[a]: $P<0.05$，与 A549 对照组比较；[b]: $P<0.05$，与 2.5 μmol/L ASODN 组比较

3 讨 论

反义技术是根据核酸互补杂交原理特异性抑制特定基因(mRNA)表达的一种生物技术。反义核酸可以与细胞内特定的序列结合，从而抑制该 RNA 与蛋白、其他核酸或其他因子的相互作用，最终影响 RNA 的代谢与功能。还可以影响 RNA 的稳定性、RNA 加工、亚细胞定位和转运等[5]。由于反义核酸易为体内的核酸内切酶所降解，而采用硫代磷酸修饰的反义核酸抗核酸内切酶降解能力较强，在生物体内的半衰期比未修饰者长 10 倍，因此本实验采用硫代磷酸修饰的MMP7 反义核酸来抑制 MMP7 基因表达。由于寡核苷酸是带大量负电荷的大分子物质，难以进入细胞内。脂质体表面带有正电荷，无毒性，无免疫原性，它能与寡核苷酸通过静电引力结合，通过与细胞的融合和内吞作用，将寡核苷酸导入细胞中，可增加细胞的吸收[6]。另外，脂质体的包裹避免了寡核苷酸与血清中核酸酶的直接接触，可使寡核苷酸的稳定性提高，减少反义寡核苷酸的用量。因此，本实验采用脂质体 DOTAP 将 MMP7 ASODN 导入体外培养的 A549 细胞。

MMP7 基因定位于 11q21~q22，DNA 长 1.6 kb，编码 267 个氨基酸[7]。MMP7 是 1 种锌离子依赖性的蛋白水解酶，以前酶的形式分泌，含有 1 个信号肽、1 个前肽，其前肽含有 1 个半胱氨酸开关和 1 个高度保守区，高度保守区位于 Zn^{2+} 结合

2.4 细胞侵袭能力的变化

如表 3 所示，Boyden chamber 模型中，各组皆有一定的穿 Matrigel 膜细胞数，MMP7 ASODN 转染 A549 细胞后，2.5 μmol/L ASODN 组和 5 μmol/L ASODN 组与 A549 对照组比较，跨膜细胞数显著下降($P<0.01$)，表明 MMP7 ASODN 能显著抑制 A549 细胞侵袭能力。5 μmol/L ASODN 组与 2.5 μmol/L ASODN 组比较，跨膜细胞数显著下降($P<0.01$)；表明 5 μmol/L ASODN 比 2.5 μmol/L ASODN 更能有效地抑制 A549 细胞侵袭能力。

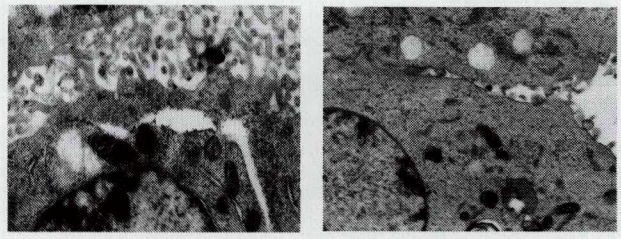


图 2 A549 细胞表面微绒毛

表 3 MMP7 ASODN 转染对 A549 细胞侵袭能力的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	跨膜细胞数
Control 组	17.00 ± 3.12
2.5 μmol/L ASODN 组	11.00 ± 1.54^{a}
5 μmol/L ASODN 组	7.00 ± 0.78^{ab}

[a]: $P<0.01$，与 A549 对照组比较；[b]: $P<0.01$，与 2.5 μmol/L ASODN 组比较

的活化中心；和其他 MMP 家族成员不一样的是 MMP7 不含类血红素结合区。MMP7 主要由成纤维细胞、巨噬细胞、肿瘤细胞所分泌，作用底物为 ECM 的弹性蛋白、明胶、Ⅳ型胶原纤维、层粘素(LM)、纤维蛋白(FN)等。纤溶酶、纤溶酶原是激活基质溶解素的主要活化因子。Gershtein ES 等[8]的研究证明了在结直肠癌中，MMP7 对 ECM 和 BM 的降解和肿瘤的浸润与转移密切相关，且 MMP7 高表达的肿瘤，浸润性和转移性强。本课题组在前期的研究也发现，MMP7 在 NSCLC 有较高表达，并随肺癌分化程度的降低而增加[9]。

微绒毛(Microvilli)是细胞表面伸出的细长指状突起，广泛存在于动物细胞表面。微绒毛直径约为 0.1 μm。长度则因细胞种类和生理状况不同而有所不同。小肠上皮细胞刷状缘中的微绒毛，长度约为 0.6~0.8 μm。微绒毛的内芯由肌动蛋白丝束组成，肌动蛋白丝之间由许多微绒毛蛋白(Villin)和丝束蛋白(Fimbrin)组成的横桥相连。研究发现，肿瘤细胞表面有大量微绒毛存在，其数量显著多于正常细胞。细胞表面的微绒毛不只是一种简单的突起而是具有一定的功能，其数量与分布是与细胞的生理状态密切相关的。微绒毛数量的增加，呈千百倍地增加了恶性瘤细胞的表面积，有利于细胞物质交换，有利于细胞旺盛增殖所需要的 DNA、RNA、蛋白质的合成。微绒毛刺入周围基质，利于细胞的停泊定位、钻透、侵袭。微绒毛的收缩可牵引细胞移动、游走、运动。因此，微绒毛的活动有利于恶性瘤细胞的侵袭和转移[10]。本试验结果表明：MMP7 ASODN 转染 A549 细胞后，不仅可以抑制 MMP7

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)08-1163-04

胰岛素后处理对离体大鼠心肌的保护作用及其机制

王为新,杨双强,辛 东,欧 袁
(重庆医科大学附属第一医院胸心外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨胰岛素(Insulin)后处理对离体大鼠心肌的保护作用及其可能机制。方法:将 32 只 Wistar 大鼠随机分成 4 组,对照组(Control 组),缺血再灌注组(I/R 组),低剂量胰岛素后处理组(L-POST 组),高剂量胰岛素后处理组(H-POST 组),每组 8 只。Control 组开胸取左心室肌作为缺血前对照;I/R 组、L-POST 组、H-POST 组建立离体心脏 Langendorff-Neely 灌注模型,预灌注 K-H 缓冲液 30 min 后,灌注 4℃ STH-2 心脏停搏液,停搏心脏并低温维持 30 min,复灌 K-H 缓冲液 60 min 后,取左心室肌备用;L-POST 组和 H-POST 组于复灌期给予含胰岛素的 K-H 液灌注。采用免疫组化和 Western blot 分别检测大鼠心肌内皮型一氧化氮合酶(Endothelial nitric oxide synthase,eNOS)、蛋白激酶 C(Protein kinase C,PKC)的分布和量的变化;TUNEL 法检测心肌细胞凋亡指数(Apoptotic index,AI)。结果:与 Control 组相比,I/R 组、L-POST 组、H-POST 组内皮型一氧化氮合酶(Endothelial nitric oxide synthase,eNOS)、蛋白激酶 C(Protein kinase C,PKC)表达量明显增多($P<0.05$),AI 明显增高($P<0.05$);与 I/R 组相比,L-POST 组和 H-POST 组 eNOS、PKC 表达量明显增加($P<0.05$),AI 明显减少($P<0.05$);与 L-POST 组相比,H-POST 组 eNOS、PKC 表达量增加($P<0.05$),AI 明显减少($P<0.05$)。结论:胰岛素后处理具有减轻心肌缺血/再灌注损伤的作用,其机制可能与增加 eNOS、PKC 表达,抑制细胞凋亡有关,高剂量胰岛素对缺血/再灌注心肌细胞较低剂量胰岛素具有更显著的保护作用。

【关键词】胰岛素后处理;缺血/再灌注损伤;内皮型一氧化氮合酶;蛋白激酶 C;凋亡
【中国图书分类法分类号】R654.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-12-26

Effects and mechanisms of insulin postconditioning on myocardial protection in isolated rat hearts

WANG Wei-xin, et al
(*Department of Cardiaothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

作者介绍:王为新(1981-),男,硕士,
研究方向:心肌保护。
通讯作者:杨双强,男,教授,E-mail:yysqiang@163.com。

【Abstract】*Objective*: To explore the effects and mechanisms of insulin postconditioning on myocardial protection in isolated rat hearts. *Methods*: 32 Wistar rats were randomly divided into

表达,降低细胞降解 ECM 和 BM 的能力,影响 A549 细胞的侵袭能力;而且可以减少细胞表面微绒毛的数量,大大减弱 A549 细胞的粘附和侵袭能力。

本组实验以肺腺癌 A549 细胞株为研究对象,采用硫代磷酸修饰的 MMP7 反义核酸,通过脂质体导入培养的 A549 细胞,其转染后细胞粘附、侵袭能力明显下降。由于 MMP7 与肺癌细胞侵袭能力密切相关,可能成为今后 NSCLC 治疗的一个非常有希望的靶点。

参 考 文 献

[1] Liu D, Nakano J, Ishikawa S, et al. Overexpression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) correlates with tumor proliferation, and a poor prognosis in non-small cell lung cancer [J].Lung Cancer, 2007, 58(3): 384-391.

[2] Lynch C C, Vargo-Gogola T, McDonnell S, et al. Matrix metalloproteinase 7 mediates mammary epithelial cell tumorigenesis through the ErbB4 receptor[J]. Cancer Res, 2007, 67(14): 6760-6767.

[3] Miyamoto S, Yano S, Sugimoto S, et al. Matrix metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor bioavailability through its proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein[J].Cancer Res, 2004, 64(2): 165-171.

[4] 郑晓飞.RNA 实验技术手册[M].第 1 版,北京:科学技术出版社,2004, 188-189.

[5] Klisovic R B, Stock W, Cataland S, et al. A phase Ⅰ biological study of MG98, an oligodeoxynucleotide antisense to DNA methyltransferase 1, in patients with high-risk myelodysplasia and acute myeloid leukemia[J].Clin Cancer Res, 2008, 14(8): 2444-2449.

[6] Liu H F, Teng X C, Zheng J C, et al. Effect of NHE1 antisense gene transfection on the biological behavior of SGC-7901 human gastric carcinoma cells[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(14): 2162-2167.

[7] Swee M, Wilson C L, Wang Y, et al. Matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) controls neutrophil egress by generating chemokine gradients[J]. J Leukoc Biol, 2008, 83(6): 1404-1412.

[8] Gershtein E S, Korotkova E A, Shcherbakov A M, et al. Matrix metalloproteinases 7 and 9 and their types 1 and 4 tissue inhibitors in tumors and plasma of patients with colorectal cancer[J]. Bull Exp Biol Med, 2007, 143(4): 459-462.

[9] 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.

[10] Felner K J, Wieczorek R, Kline M, et al. Malignant mesothelioma masquerading as a multinodular bronchioloalveolar cell adenocarcinoma with widespread pulmonary nodules[J]. Int J Surg Pathol, 2006, 14(3): 229-233.

(责任编辑:冉明会)