

抑制 MMP9 表达对黑色素瘤细胞生物学的影响^{*}

张国安¹ 韩莎² 周健³ 侯森^{1,4} 王学春^{5△} 崔文^{1△}

(¹ 济宁医学院基础学院, ² 济宁医学院中心实验室, ³ 济宁医学院司法鉴定中心; 山东 济宁 272067;

⁴ 山东省医学科学院基础所, 山东 济南 250062; ⁵ 泰山医学院基础学院, 山东 泰安 271000)

摘要 目的 探讨抑制基质金属蛋白酶 9(MMP9)对高转移黑色素瘤细胞系 WM451 生物学的影响。**方法** 利用小干扰 RNA(siRNA)沉默 MMP9 的表达,western blot 检测 MMP9 表达降低情况,利用 CCK-8、黏附实验、划痕实验对细胞生物学改变进行观测。**结果** siRNA 降低了 MMP9 的表达,伴随 MMP9 表达的降低,WM451 增殖减缓,黏附能力和运动能力下降。**结论** 黑色素瘤细胞系的侵袭潜能与其产生 MMP9 的能力密切相关。

关键词 黑色素瘤; MMP9; 肿瘤转移

中图分类号: R739.5 **文献标志码**: A **文章编号**: 1000-9760(2013)02-018-04

The influence of MMP9 expression suppression on the biological behavior of melanoma cells

ZHANG Guo-an, HAN Sha, ZHOU Jian, et al

(Academy of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of MMP9 expression suppression on the biological behavior of melanoma cells. **Methods** We used siRNA to suppress the expression of MMP9, and then western blot was used to confirm the expression of MMP9. After that, CCK-8 assay, adhesion assay, and wound healing assay were used to measure the biological behavior of WM451. **Results** MMP9 expression was decreased by siRNA. The ability of growth, adhesion and invasion were also suppressed with the down-regulation of MMP9. **Conclusion** The growth and invasive potential of this melanoma cell line are correlated with their expression of MMP9.

Key words: Melanoma; MMP9; metastasis

金属蛋白酶(MMPs)是一个由多个成员组成的蛋白水解酶家族,许多研究提示肿瘤细胞侵袭转移的能力与其产生或诱导产生 MMPs 的能力密切相关。基质金属蛋白酶 9(Matrix Metalloproteinase 9, MMP9)是基质金属蛋白酶家族中的重要成员,在许多肿瘤的转移及其他生物学行为中起重要作用^[1]。大多数恶性肿瘤迟早会发生侵袭和转移,转移是肿瘤患者死亡的主要原因^[2]。本研究利用 siRNA 技术检测了降低 MMP9 的表达对高转移黑色素瘤生物学行为的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

高转移黑色素瘤细胞系 WM451,由北京大学

医学部病理学系馈赠。血清为 Hyclone; DMEM 培养基, Opti-mem, transfectamine2000 为 invitrogen 产品。兔抗 beta-actin 一抗,羊抗 MMP9 一抗,相应的二抗购自北京中杉公司。RIPA 裂液为北京普利莱基因技术公司产品。BCA 蛋白定量试剂盒购自武汉博士德。Matrigel 购自 BD 公司。MMP9-siRNA 及阴性对照,序列如下:阴性对照 5'-GTTCTCCGAACGTGTCACGT-3', MMP9-siRNA 5'-CATCACCTATTGGATGGATC-CAAACTAC-3'。序列被连接入 pGUPU6/GFP/Neo siRNA Expression Vector 中,由上海吉玛生物技术有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 WM451 细胞系于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液在中 37℃、5% CO₂、相对湿度为 90% 的培养箱中培养。

* [基金项目] 山东省教育厅计划项目(J06L06)

△ [通信作者] 王学春, E-mail: zga2007@126.com

崔文, E-mail: cuiwenmd@163.com

1.2.2 siRNA 转染 对数生长期的 WM451 7.0×10^5 /孔铺于 6 孔板上培养箱中培养 24h,待细胞约 90% 满。将细胞培养基换成 1ml Opti-mem。用 200 μ l Opti-mem 稀释 4 μ g 质粒,轻柔混匀。用 200 μ l Opti-mem 稀释 10 μ l lipofectamine 2000,混匀后加入到稀释的质粒中。然后将 400 μ l 液体加入到 6 孔板中,前后晃动混匀。将培养板放入培养箱内培养。24h 后观察荧光,估计转染效率。

1.2.3 Western blot RIPA 裂解液裂解细胞后,收集蛋白。行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳;转移至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 2h,加一抗(beta-actin:1:500,MMP9:1:100)4 $^{\circ}$ C 过夜;TBST 洗 3 次,每次 10min,分别加羊抗兔与兔抗羊二抗(beta-actin:1:5000,MMP9:1:3000),室温摇床孵育 2h;TBST 洗涤同前,最后经 ECL 曝光显影。

1.2.4 CCK-8 实验 用 MMP9-siRNA 载体和阴性对照载体分别转染细胞,24h 后胰酶消化,细胞计数,用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液制成 1.0×10^5 /ml 单细胞悬液。将细胞接种于 96 孔培养板,100 μ l/孔,置于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中培养。铺板后 24h、48h、72h 后分别取出一块板,加 CCK-8 溶液 10 μ l/孔,轻轻混匀。放入培养箱中继续培养。2h 后取出细胞培养板,在酶标仪上检测 450nm OD 值。用下列公式计算 MMP9-siRNA 实验组细胞生长抑制率:细胞生长抑制率 = $\frac{450\text{nm 吸光度}_{\text{阴性对照组}} - 450\text{nm 吸光度}_{\text{MMP9-siRNA组}}}{450\text{nm 吸光度}_{\text{阴性对照组}}} \times 100\%$

1.2.5 细胞黏附试验 Matrigel 稀释至 1mg/ml,以 100 微升/孔加入 24 孔板中,超净台过夜风干。取对数生长期细胞,消化后计数将细胞调整为 1.0×10^5 /ml,每孔加细胞悬液 1ml。37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 分别孵育 10min、30min、1h、2h。在每个时间点取出一块 24 孔板,每孔用 PBS 轻柔洗 3 次,以去掉没有黏附的细胞。胰酶消化,收集细胞进行细胞计数。试验重复 3 次,取均值,计算黏附率。黏附率(%) = $\frac{\text{黏附细胞数量}}{1 \times 10^5} \times 100\%$ 。

1.2.6 细胞划痕试验 对数生长期的 WM451 细胞 7.0×10^5 /孔铺于 6 孔板上,培养箱中培养 24h,待细胞约 90% 满。用 200 μ l 无菌枪尖小心在孔底划痕,PBS 轻柔洗 3 遍去掉细胞碎片,加入培养基后。取 3 个视野倒置显微镜照相测量划痕宽度。培养箱内继续培养 24h,再次倒置显微镜下照相测量划痕宽度(mm)。计算细胞爬行距离。比较各组间划痕愈合的差异。细胞爬行距离 = 0h 划痕宽

度 - 24h 划痕宽度。

1.3 统计学方法

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 统计软件 13.0 分析,组间均数比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 siRNA 降低了 MMP9 的表达

阴性对照组和 MMP9-siRNA 组转染后 48h,提取蛋白 western blot 检测 MMP9 的表达情况(图 1)。可见 MMP9-siRNA 降低了 MMP9 的表达。

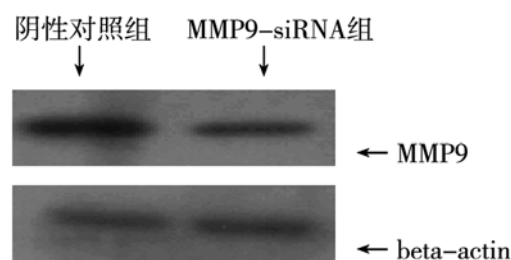


图 1 MMP9-siRNA 组与阴性对照组的 MMP9 的表达

2.2 WM451 细胞增殖能力检测

与阴性对照组比较,转染 MMP9-siRNA 组细胞生长较为迟缓,细胞在 24h、48h、72h 各时点生长抑制率分别为 $(1.73 \pm 1.5)\%$ 、 $(12.18 \pm 4.1)\%$ 、 $(13.79 \pm 3.3)\%$,其中 48h、72h 细胞生长水平具有显著性差异($P_{48h} = 0.004$, $P_{72h} = 0.001 < 0.01$),在 24h 时间点 2 组细胞增殖水平无显著性差异($P_{24h} = 0.086 > 0.05$)(图 2)。

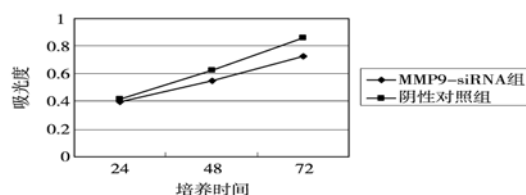


图 2 MMP9-siRNA 组与阴性对照组的生长曲线

2.3 黏附能力检测

细胞孵育 10min、30min 后,MMP9-siRNA 组黏附于 Matrigel 的细胞数明显少于阴性对照组(图 3),其黏附率分别为 $(25.33 \pm 1.57)\%$ ($P = 0.006 < 0.01$)和 $(51.56 \pm 2.2)\%$ ($P = 0.003 < 0.01$)。细胞孵育 60min、120min 后,MMP9-siRNA 组和阴性对照组在 Matrigel 基底膜上黏附率没有显著差异,分别为 $(75.3 \pm 0.95)\%$ 、 $(78.5 \pm 3.75)\%$ 和 $(84.3 \pm 1.4)\%$ 、 $(85.6 \pm 2.3)\%$ 。

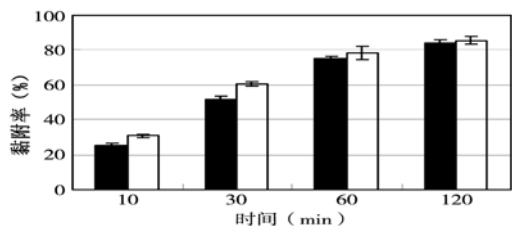


图3 2组细胞在各时间点的黏附率

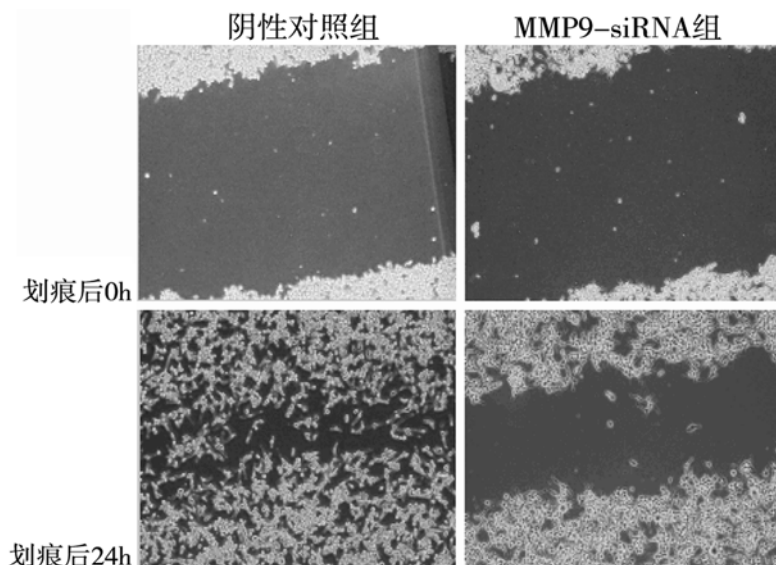


图4 MMP9-siRNA组与阴性对照组24h时的迁移

表1 2组细胞的划痕实验(mm)

分组	0h划痕宽度	24h划痕宽度	细胞迁移距离
MMP9-siRNA组	3.30±0.056	2.39±0.185	0.84±0.06*
阴性对照组	2.85±0.858	1.35±0.231	1.50±0.386*

* $P=0.043<0.05$, MMP9-siRNA组的迁移距离与阴性对照组比较有统计学意义。

3 讨论

研究表明,侵袭转移是肿瘤进化的最终产物。肿瘤细胞和周围微环境之间多种关系的相互作用使肿瘤细胞不断获得新的生物学行为,最终导致机体功能衰竭和死亡。从分子层面理解侵袭的过程和参与者是靶向高效预防和治疗转移的关键。肿瘤的侵袭及转移是一个多阶段、多因子调控的复杂过程,大致地分为以下几个步骤:1)早期原发癌生长增殖;2)肿瘤血管生成以支持持续生长并促进血道转移;3)肿瘤细胞同质性黏附降低与周围同种细胞脱离并侵入基质;4)进入脉管系统;5)黏附于远处的血管内皮细胞;6)穿越血管壁至继发组织器官;7)转移的肿瘤细胞在新的宿主环境中生长并继续扩散^[3-4]。以上的每一个步骤都有新的分子机制的参与^[5-6]。侵袭是指癌细胞侵犯和破坏周围正常组织,进入循环系统的过程;转移是指侵袭中癌细胞迁移到特定组织器官并发展成为继发性癌灶的

2.4 划痕实验结果

细胞划痕后24h,阴性对照组划痕愈合明显,而MMP9-siRNA组划痕愈合缓慢。2组间细胞的迁移距离有差别($P=0.043<0.05$)。结果见图4和表1。

过程。侵袭和转移是同一过程中的两个不同阶段,侵袭是转移的前奏,转移是侵袭的结果,他们是类似的过程^[2]。因此,侵袭能力在一定程度上也能反映肿瘤的转移能力。

无限性增殖是肿瘤细胞的基本特征。随着细胞的增殖导致肿瘤组织内部生存压力增高,有利于清除不能适应环境的细胞并利于转移性细胞的进化。这种扩张性的压力有利于癌细胞向压力低的方向侵袭和转移。转染正义MMP9载体导致的MMP9的高表达能促进黑色素瘤的生长^[7],降低MMP9的表达则能够抑制某些细胞的增殖,如恶性脑膜瘤^[8]、尤文肉瘤^[9]、非小细胞肺癌^[10]、胶质瘤细胞^[11]和平滑肌细胞^[12]等。

本研究利用siRNA转染的方法降低了高转移WM451细胞系MMP9的表达,同时CCK-8实验的结果显示细胞的增殖受到了明显的抑制,在24h和48h siRNA转染组比转染无关序列组增殖降低12.18%和13.79%(图2),说明MMP9在恶性肿瘤细胞的增殖中起促进作用,显示了MMP9在肿瘤发展中多方面的作用。

细胞的黏附可分为同质性黏附(homotypic adhesion)和异质性黏附(heterotypic adhesion)。同质性黏附是指同种细胞之间的黏附;异质性黏附

是指与宿主细胞或细胞外基质成分(ECM)黏附。相对于正常细胞,肿瘤细胞黏附能力的改变表现为同质性黏附的降低和异质性黏附的升高。这对于原发肿瘤的侵袭、穿入和穿出血管,以及在靶器官的侵袭中均有重要意义。黏附对于肿瘤细胞的侵袭转移具有双重作用:一方面肿瘤细胞从原发灶脱离是个去黏附的过程(同质性黏附降低),另一方面,肿瘤细胞又必须借助黏附才能获得移动的牵引力(异质性黏附升高)。因此,肿瘤的侵袭首先是黏附和去黏附的交替过程。肿瘤细胞同质性黏附的降低和异质性黏附的增强,均可促进转移的发生。

此外,某些特异性黏附分子在肿瘤细胞的表达是肿瘤器官特异性转移的原因之一。本实验利用 siRNA 降低 MMP9 的表达后测定 WM451 的黏附,发现在 10min 和 30min 时与阴性对照组比较(黏附率为 31.10% 和 60.63%),转染 siRNA 的 WM451 细胞的在 Matrigel 上黏附率(图 3)明显降低(黏附率为 25.33% 和 51.56%)。这反映了 MMP9 在调整肿瘤的黏附行为中的重要作用。

同时,其他文献也得到类似结论,如非小细胞肺癌 A549 细胞降低 MMP9 的表达能降低细胞的异质黏附率^[10],在尤文肉瘤细胞中利用 siRNA 降低 MMP9 的表达使尤文肉瘤细胞发生了迁移表型到黏附表型的转化(migratory-adhesive switch)^[9]。MMP9 降低肿瘤细胞异质性黏附的作用可能与它调节细胞整合素活性或表达水平相关。

细胞划痕实验是一种经典而且常用的研究体外细胞迁移能力的方法。体外培养细胞的这种迁移行为在一定程度上反应细胞在体内的多种生物学特性,包括细胞分化过程中的定向迁移和恶性肿瘤细胞的侵袭浸润能力。当单层细胞生长至近融合时,采用机械方法进行划痕,细胞则会对这种损伤产生反应,通过增殖和迁移来愈合划痕损伤。在使用不含血清或少量血清的培养液条件下,细胞的增殖在很大程度上被抑制,则实验结果实际上主要反映了细胞迁移能力的情况。

本课题划痕实验的结果显示用 siRNA 抑制 MMP9 的表达可以抑制细胞的迁移,转染 siRNA 的实验组迁移距离由 1.50mm 减少为 0.84mm(表 1,图 4),证明 MMP9 在细胞体外迁移过程中起重要作用。

总之,本实验首先将载体介导的 siRNA 转染入 WM451 细胞中,利用 western blot 确认 siRNA 干扰的效果,结果证实本实验所用 siRNA 序列确

能降低 MMP9 的表达。在此基础上我们探讨了降低 MMP9 的表达对 WM451 增殖,黏附和侵袭的影响,发现 MMP9 的低表达显著抑制了细胞的增殖,降低了肿瘤细胞的异质性黏附和侵袭,进一步证明 MMP9 在肿瘤发展特别是侵袭中的作用,为以 MMP9 为靶点的特异性肿瘤诊断和治疗提供理论和实验基础。

参考文献:

- [1] Turpeenniemi-Hujanen T. Gelatinases (MMP-2 and-9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers[J]. *Biochimie*, 2005, 87(3/4): 287.
- [2] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer[J]. *Cell*, 2000, 100(1): 57.
- [3] Lester BR, McCarthy JB. Tumor cell adhesion to the extracellular matrix and signal transduction mechanisms implicated in tumor cell motility, invasion and metastasis[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 1992, 11(1): 31-44.
- [4] Hwang ES, Lee HJ. Inhibitory effects of lycopene on the adhesion, invasion, and migration of SK-Hep 1 human hepatoma cells[J]. *Exp Biol Med*, 2006, 231(3): 22-32.
- [5] Liu XH, Bai CG, Yuan Y, et al. Angiopoietin-1 targeted RNA interference suppresses angiogenesis and tumor growth of esophageal cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(10): 1575-1581.
- [6] Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(10): 795-803.
- [7] 孔灵玲, 方伟岗, 由江锋, 等. 可调控性反义基质金属蛋白酶 9 表达抑制人黑色素瘤细胞侵袭转移表型的研究[J]. *中华病理学杂志*, 2003, 32(2): 137-141.
- [8] Tummalapalli P, Spomar D, Gondi CS, et al. RNAi-mediated abrogation of cathepsin B and MMP-9 gene expression in a malignant meningioma cell line leads to decreased tumor growth, invasion and angiogenesis[J]. *Int J Oncol*, 2007, 31(5): 1039-1050.
- [9] Sancéau J, Truchet S, Bauvois B. Matrix metalloproteinase-9 silencing by RNA interference triggers the migratory-adhesive switch in Ewing's sarcoma cells[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(38): 36537-36546.
- [10] Yang L, Zeng W, Li D, et al. Inhibition of cell proliferation, migration and invasion by DNase targeting MMP-9 in A549 cells[J]. *Oncol Rep*, 2009, 22(1): 121-126.
- [11] Lakka SS, Rajan M, Gondi C, et al. Adenovirus-mediated expression of antisense MMP-9 in glioma cells inhibits tumor growth and invasion[J]. *Oncogene*, 2002, 21(52): 8011-8019.
- [12] Dwivedi A, Slater SC, George SJ. MMP-9 and-12 cause N-cadherin shedding and thereby beta-catenin signalling and vascular smooth muscle cell proliferation[J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 81(1): 178-186.

(收稿日期 2012-12-09)