

[文章编号] 1671-587X(2012)01-0089-04

## 胡桃醌对人结肠癌 HCT-8 细胞黏附及基质金属蛋白酶活性的影响

卢 阳, 李 薇, 崔久崑, 徐效义, 王冠军  
(吉林大学第一医院肿瘤中心, 吉林 长春 130021)

**[摘 要]** 目的: 观察胡桃醌对人结肠癌 HCT-8 细胞黏附作用、基质金属蛋白酶 (MMP2、MMP9) 活性及表达的影响, 阐明其抑制肿瘤侵袭转移的可能作用机制。方法: 取体外培养处于对数生长期人结肠癌 HCT-8 细胞, 分为胡桃醌 1.25、2.50、5.00、10.00 和 20.00 mg · L<sup>-1</sup> 组, 并设空白对照组, 处理 72 h 后通过细胞黏附实验观察 HCT-8 细胞黏附率的变化, 明胶酶谱法检测 MMP2 和 MMP9 活性, Western blotting 法检测细胞 MMP2 和 MMP9 蛋白表达水平。结果: 与空白对照组比较, 1.25、2.50、5.00、10.00 和 20.00 mg · L<sup>-1</sup> 胡桃醌组 HCT-8 细胞黏附率逐渐降低 ( $P < 0.05$ ); 2.50、5.00、10.00 和 20.00 mg · L<sup>-1</sup> 胡桃醌组 MMP2 活性降低 ( $P < 0.05$ ), 各浓度胡桃醌处理组 MMP9 活性均降低 ( $P < 0.05$ ); 各浓度胡桃醌处理组 MMP2、MMP9 蛋白表达水平均降低 ( $P < 0.01$ )。结论: 胡桃醌明显抑制 HCT-8 细胞黏附, 降低 MMP2、MMP9 活性及蛋白表达水平, 提示 MMP2 和 MMP9 活性及蛋白表达水平下降可能是胡桃醌在体外抑制 HCT-8 细胞黏附的作用机制。

**[关键词]** 胡桃醌; 细胞黏附; 基质金属蛋白酶; 结肠肿瘤

**[中图分类号]** R735.4 **[文献标志码]** A

## Influence of juglone on adhesion and activities of matrix metalloproteinases in human colon carcinoma HCT-8 cells

LU Yang, LI Wei, CUI Jiu-wei, XU Xiao-yi, WANG Guan-jun  
(Tumor Center, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the influence of juglone on adhesion, activities and expressions of matrix metalloproteinases (MMP2 and MMP9) in human colon carcinoma HCT-8 cells, and clarify the possible mechanism that juglone can inhibit the invasion and migration of tumor. **Methods** The human colon carcinoma HCT-8 cells cultivated *in vitro* at logarithmic growth phase were divided into 1.25, 2.50, 5.00, 10.00 and 20.00 mg · L<sup>-1</sup> juglone groups, while the control group was set up. The ability of cell adhesion was detected by fibronectin adhesion assay after treated for 72 h, the activities of MMP2 and MMP9 of the cells were detected by gelatin zymography analysis, the expressions of MMP2 and MMP9 proteins were examined by Western blotting method. **Results** Compared with control group, the adhesion rates of HCT-8 in 1.25, 2.50, 5.00, 10.00 and 20.00 mg · L<sup>-1</sup> juglone groups were decreased ( $P < 0.05$ ); the activities of MMP2 in 2.50, 5.00, 10.00 and 20.00 mg · L<sup>-1</sup> juglone groups was decreased; the activities of MMP9 in all juglone groups with different concentrations were decreased ( $P < 0.05$ ); the expressions of MMP2 and MMP9 proteins in juglone groups with different concentrations were decreased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Juglone could significantly inhibit the adhesion ability of HCT-8 cells and decrease the activities and protein expressions of MMP2 and MMP9. It is suggested that the decreasing of the activities and protein expressions of MMP2 and MMP9 might be the possible mechanism that juglone can inhibit the adhesion of HCT-8 cells *in vitro*.

**Key words:** juglone; cell adhesion; matrix metalloproteinases; colon neoplasms

[收稿日期] 2011-10-10

[基金项目] 吉林省中医药管理局中医药科技项目资助课题 (2010-pt056)

[作者简介] 卢 阳 (1985-), 女, 辽宁省沈阳市人, 在读医学硕士, 主要从事肿瘤的基础与临床研究。

[通信作者] 王冠军 (Tel: 0431-88782102, E-mail: guanjunwang2006@163.com)

胡桃醌(juglone)化学名为5-羟基-1,4-萘醌,属于萘醌类化合物,存在于胡桃属植物中,如核桃树叶、树皮、青果皮等<sup>[1-2]</sup>。中国民间广为流传饮用核桃树皮水煎剂治疗恶性肿瘤的验方,现已开展大量实验对胡桃属植物成分进行分离鉴定,国内外研究证明胡桃醌对血液系统及实体肿瘤细胞具有抑制增殖的作用<sup>[3-5]</sup>。目前对胡桃醌抗肿瘤作用的研究多为观察细胞凋亡的影响,关于其对肿瘤侵袭作用影响的报道较少见。黏附能力改变为肿瘤细胞发生侵袭、转移的始动步骤,本实验主要以基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase-2, MMP2)和基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase-9, MMP9)为观察指标,探讨胡桃醌对人结肠癌HCT-8侵袭、转移作用的影响。

## 1 材料与方法

1.1 细胞、药物及主要试剂 人结肠癌HCT-8细胞株为本实验室保存株,属贴壁生长型细胞。胡桃醌购自Sigma公司,质量分数98%。纤维黏连蛋白(fibronectin, Fn)为美国Sigma公司产品;鼠抗人MMP-2单克隆抗体、兔抗人MMP-9多克隆抗体购自Abcam公司;鼠抗人GAPDH抗体购自ProMab公司;HRP标记的羊抗兔IgG购自北京中杉金桥公司;HRP标记的羊抗鼠IgG购自美国Zymed公司;RPMI 1640为Gibco公司产品;胎牛血清为杭州四季青公司产品;甲叉双丙烯酰胺为美国Sigma公司产品;丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠购自北京鼎国公司。

1.2 主要仪器 生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司);二氧化碳培养箱(美国Thermo公司);酶标仪(model 550)、电泳仪(BIO-RAD公司);倒置显微镜(日本Olympus公司);洗片机(美国Kodak公司)。

1.3 细胞培养 人结肠癌HCT-8细胞培养在含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液中,置于5%CO<sub>2</sub>、37℃培养箱内,0.25%胰蛋白酶消化传代,每2~3d传代1次。

1.4 细胞黏附实验 将FN用PBS液稀释成100 mg·L<sup>-1</sup>,以每孔100 μL分别包被96孔板,每组包被3复孔。37℃包被2h,用PBS洗涤2次,1%BSA封闭2h。收集胡桃醌终浓度分别为0.00、1.25、2.50、5.00、10.00和20.00 mg·L<sup>-1</sup>处理72h的HCT-8细胞,以无血

清培养基制成单细胞悬液,调节细胞浓度为3×10<sup>5</sup> L<sup>-1</sup>,以每孔200 μL加入包被的培养板中,置37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育2h。取出96孔板,轻轻洗去未黏附的细胞,用10%中性甲醛100 μL固定,30 min后洗去。每孔加0.5%结晶紫100 μL,室温染色2h,蒸馏水洗涤1次,阴干后每孔加入2%SDS溶液100 μL,于酶标仪570 nm波长测定各孔吸光度(A)值。细胞黏附率=(处理组平均A值/对照组平均A值)×100%。

1.5 明胶酶谱法检测MMP2和MMP9活性 取对数生长期HCT-8细胞,以无血清RPMI 1640培养液洗涤2次,接种于6孔培养板,加入含胡桃醌浓度分别为0.00、1.25、2.50、5.00、10.00和20.00 mg·L<sup>-1</sup>的无血清培养基,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>孵箱内培养72h。收集上清,将上清液移入离心管中2000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min。调整上样蛋白浓度一致,将样品与5×上样缓冲液混合。配制含1%明胶的分离胶和浓缩胶,待胶凝固后每孔15 μL上样,4℃、100 V进行SDS-PAGE电泳约1.5 h。电泳结束后,将凝胶移入2.5% TritonX-100溶液中洗脱2次,每次40 min,蒸馏水漂洗。将凝胶置于孵育液中37℃孵育42h,孵育结束后经考马斯亮蓝染色3h后脱色3~4h直至显示出MMP-2(相对分子质量为72000)和MMP-9(相对分子质量为92000)位于蓝色背景上的透亮带。将凝胶成像并以Gel pro 4.0版凝胶光密度分析软件分析累积光密度(IOD)参考值,以IOD值表示酶活性大小,IOD值越低,MMP2和MMP9活性越小。

1.6 Western-blotting检测MMP2、MMP9蛋白表达水平 实验分组同明胶酶谱法,细胞加药处理72h后分别裂解细胞,离心后取裂解液上清,测定蛋白浓度,30 μg蛋白加上样缓冲液于沸水中煮5 min,以10%SDS聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,电泳完毕半干式转膜,5%无脂奶粉封闭,与待测目的蛋白的特异性抗体孵育杂交,最后以化学发光法显示结果,以Gel pro 4.0版凝胶光密度分析软件分析累积光密度(IOD)参考值,结果以IOD<sub>MMP</sub>/IOD<sub>GAPDH</sub>表示,比值越小,MMP2和MMP9蛋白表达水平越低。

1.7 统计学分析 采用SPSS 17.0统计软件,A值、明胶酶谱IOD值及Western-blotting IOD<sub>MMP</sub>/IOD<sub>GAPDH</sub>值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。

## 2 结 果

2.1 细胞黏附实验 各浓度胡桃醌处理组随胡桃醌浓度增加细胞黏附率逐渐降低, 与对照组比较各浓度组差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

2.2 各组 MMP2 和 MMP9 活性 各浓度胡桃醌处理组随着胡桃醌浓度增加, MMP2、MMP9 活性逐渐降低, 仅 1.25 mg · L<sup>-1</sup> 组 MMP2 的活性变化与对照组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 其余各组 MMP2 和 MMP9 活性变化与对照组比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2 和图 1。

2.3 各组 MMP2 和 MMP9 蛋白表达变化 随着胡桃醌浓度增加, MMP2、MMP9 表达逐渐减少, 与对照组比较, 各组 MMP2、MMP9 表达变化差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 3 和图 2。

表 1 各组人结肠癌 HCT-8 细胞黏附率

Tab. 1 The adhesion rates of HCT-8 cells in various groups

Group	A	Adhesion rate(η/%)
Control	0.69±0.15	100.0
Juglone(mg · L <sup>-1</sup> )		
1.25	0.61±0.13*	88.4
2.50	0.53±0.12*	76.8
5.00	0.50±0.19*	72.5
10.00	0.42±0.12*	60.9
20.00	0.30±0.12*	43.5

\*  $P < 0.05$  compared with control group.

表 2 明胶酶谱检测各组 IOD 值

Tab. 2 The IOD values in various groups detected with gelatin zymography analysis ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	MMP2	MMP9
Control	5 520.00±836.93	12 003.33±132.51
Juglone( mg · L <sup>-1</sup> )		
1.25	5 609.33±113.29	9 942.00±127.74*
2.50	4 563.00±148.31*	8 604.67±153.81*
5.00	3 316.67±250.03*	7 775.67±109.25*
10.00	2 405.33±96.55*	5 051.33±75.58*
20.00	877.67±155.65*	2 590.33±177.64*

\*  $P < 0.05$  compared with control group.

## 3 讨 论

侵袭、转移是恶性肿瘤的重要特征, 也是肿瘤复发、治疗失败最终患者死亡的主要原因。肿瘤侵袭、转移过程复杂, 多种机制参与其中, Liotta<sup>[6]</sup> 将这一过程清晰的概括为 3 步: ①细胞与细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 黏附; ②肿瘤细

表 3 Western blotting 检测各组 IOD 值

Tab. 3 The IOD values in various groups detected with Western blotting ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	MMP2/GAPDH	MMP9/GAPDH
Control	0.83±0.13	2.79±0.13
Juglone( mg · L <sup>-1</sup> )		
1.25	0.67±0.02*	1.98±0.13*
2.50	0.38±0.04*	1.45±0.07*
5.00	0.32±0.02*	1.13±0.03*
10.00	0.19±0.03*	0.65±0.05*
20.00	0.11±0.01*	0.19±0.02*

\*  $P < 0.01$  compared with control group.

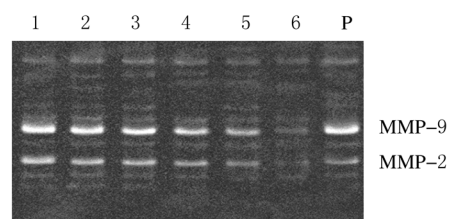


图 1 各组 MMP2 和 MMP9 活性检测电泳图

Fig. 1 Electrophoregram of the activities of MMP2 and MMP9 in various groups

Lane 1: Control group; Lane 2-6: 1.25, 2.50, 5.00, 10.00 and 20.00 mg · L<sup>-1</sup> juglone groups; P: Positive mixture.

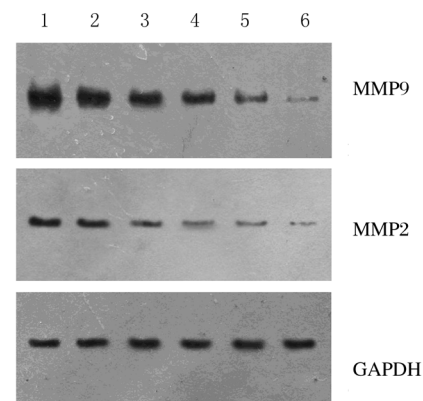


图 2 各组 MMP2 和 MMP9 蛋白表达水平检测电泳图

Fig. 2 Electrophoregram of the expression levels of MMP2 and MMP9 proteins in various groups

Lane 1: Control group; Lane 2-6: 1.25, 2.50, 5.00, 10.00 and 20.00 mg · L<sup>-1</sup> juglone groups.

胞本身或诱导宿主细胞分泌蛋白水解酶降解基质; ③由趋化介导的细胞运动和迁移。

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 因其几乎能降解细胞外基质中的各种蛋白成分和胞外蛋白, 从而破坏肿瘤细胞侵袭的组织学

屏障,被认为是侵袭过程中主要的蛋白水解酶<sup>[7-8]</sup>。而明胶酶作为 MMPs 家族中的成员,因其能够降解 IV 型胶原酶,在多种恶性肿瘤组织中表达升高<sup>[9-12]</sup>,受到广泛关注,其研究较为深入。

本研究中细胞黏附实验结果表明:不同浓度胡桃醌处理 72 h 后的人结肠癌 HCT-8 细胞黏附率下降,提示胡桃醌在一定浓度可以抑制 HCT-8 细胞黏附;明胶酶谱法检测胡桃醌作用后 HCT-8 细胞分泌 MMP2、MMP9 活性结果显示:2.50~20.00 mg·L<sup>-1</sup>组细胞分泌 MMP2 活性明显下降,1.25~20.00 mg·L<sup>-1</sup>组细胞 MMP9 活性明显下降;Western-blotting 检测结果显示:随着胡桃醌浓度的增加,MMP2、MMP9 蛋白表达水平明显降低,MMP2、MMP9 活性和蛋白表达水平下降均呈剂量依赖性,提示 MMP2、MMP9 活性下降可能因其在胞内表达减少所致,这可能是胡桃醌在体外抑制 HCT-8 细胞黏附的作用机制。

综上所述,胡桃醌对人结肠癌 HCT-8 细胞侵袭有一定抑制作用,且呈剂量依赖性,其机制可能是通过下调 MMP2、MMP9 活性及表达水平,降低 HCT-8 细胞降解细胞外基质的能力而发挥作用。但胡桃醌在体内能否发挥同样作用有待进一步研究,如能证明其疗效及作用机制,将会对抗肿瘤药物的研究和开发发挥重要作用。

#### [参考文献]

[1] 许绍惠,唐婉屏,韩忠环. 核桃楸毒性成分研究 [J]. 沈阳农业大学学报,1986,17(2):34-39.

- [2] 孙墨珑,宋湛谦,方桂珍. 核桃楸树皮乙醇提取物的成分分析 [J]. 应用化学,2008,5(10):1205-1207.
- [3] 陈丽,那顺巴雅尔,张建,等. 胡桃醌对人肝癌 BEL-7402 细胞增殖和膜流动性的影响 [J]. 数理医药学杂志,2009,22(2):144-148.
- [4] Sugies S, Okamoto K, Rahman KM, et al. Inhibitory effects of plumbagin and juglone on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats [J]. *Cancer Lett*, 1998, 127(1/2):177-183.
- [5] 季宇彬,曲中原,奏响,等. 青龙衣中胡桃醌对 S180 肉瘤小鼠的抑瘤作用研究 [J]. 中国药理学杂志,2009,44(3):195-199.
- [6] Liotta LA. Tumor invasion and metastases-role of the extracellular matrix; roboards memorial award lecture [J]. *Cancer Res*, 1986, 46(1):1-7.
- [7] Katayama A, Bando N, Kishibe K, et al. Expressions of matrix metalloproteinase in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(2):634-640.
- [8] 丁岩,陈晓光. 基质金属蛋白酶与肿瘤侵袭和转移 [J]. 哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2002,18(4):373-378.
- [9] 王晓燕,张燕开,任国春. MMP2 和 MMP9 表达与卵巢上皮性癌侵袭转移的关系 [J]. 中国肿瘤临床与康复,2004,11(5):406-408.
- [10] 黄仲夏,季清风,陈世伦,等. 多发性骨髓瘤患者 MMP-9、MMP-2 表达的研究 [J]. 中国癌症杂志,2006,11(7):578-580.
- [11] 金立鹏,王广义,谢淑丽,等. 雷帕霉素联合阿霉素对肝癌细胞 BEL-7402 增殖及迁移的影响及其作用机制 [J]. 吉林大学学报:医学版,2011,37(1):30-34.
- [12] 王葆春,孙杨柳,宫晓光,等. RNA 干扰沉默 STAT3 基因表达对人胰腺癌细胞 SW1990 侵袭能力的影响 [J]. 吉林大学学报:医学版,2011,37(4):636-640.

## 《吉林大学学报(医学版)》征订启事

《吉林大学学报(医学版)》(原名为《白求恩医科大学学报》)是中华人民共和国教育部主管、吉林大学主办的综合性医药卫生类学术期刊。《吉林大学学报(医学版)》创刊于 1959 年,经过半个多世纪的发展,现已成为《中文综合性医药卫生类核心期刊》、《中国科技核心期刊》和《RCCSE 中国权威学术期刊》收录期刊,并被荷兰《医学文摘》等十余种国内外著名数据库收录,在国内外具有一定的学术地位和影响。

《吉林大学学报(医学版)》设有基础研究、临床研究、临床医学、影像学、调查研究、方法学和综述等栏目,主要报道医学科学研究的新理论、新方法和新技术,促进医学科学的发展和国内外的学术交流。

《吉林大学学报(医学版)》现为双月刊,国内外公开发行。国内总发行:吉林省报刊发行局;国内订购处:全国各地邮局(所);国外总发行:中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱,邮编 100044)。

中国标准连续出版物号:ISSN 1671-567X 发行代号:12-23(国内) 国内订价:20.00 元/期

CN 22-1342/R

BM4177(国外)

120.00 元/年

通讯地址:吉林省长春市新民大街 828 号(邮编 130021)

吉林大学学报(医学版)编辑部

联系电话:0431-85619278;0431-85619279

网 址: <http://xuebao.jlu.edu.cn>