

· 论著 ·

槲皮素对人结肠癌细胞 SW480 基质金属蛋白酶及组织蛋白酶-D 的作用

孟勇 李华 林增海 吴华涛 马涛

【摘要】 目的 观察槲皮素对人结肠癌 SW480 细胞分泌的基质金属蛋白酶(MMPs)的影响;观察槲皮素对人结肠癌 SW480 细胞组织蛋白酶-D 表达的影响。方法 酶谱分析技术观察槲皮素对人结肠癌 SW480 细胞 MMPs 分泌的影响;运用免疫组织化学方法观察槲皮素对人结肠癌 SW480 细胞组织蛋白酶-D 表达的影响。结果 酶谱分析法检测显示不同浓度的槲皮素能够抑制人结肠癌 SW480 细胞分泌 MMP-2 及 MMP-9,随浓度的升高,MMP-2 及 MMP-9 的分泌量减少;免疫组织化学法显示不同浓度的槲皮素处理人结肠癌 SW480 细胞后,组织蛋白酶-D 的表达随药物浓度的升高和作用时间的延长而降低。结论 不同浓度的槲皮素能够抑制人结肠癌 SW480 细胞 MMP-2 和 MMP-9 的分泌及组织蛋白酶-D 的表达,这些都可能是槲皮素抑制结肠癌细胞侵袭和转移的原因。

【关键词】 结肠肿瘤; 槲皮素; 基质金属蛋白酶类; 组织蛋白酶类; SW480 细胞

Effect of quercetin on matrix metalloproteinases and Cathepsin-D of the SW480 human colon cancer cell in vitro MENG Yong, LI Hua, LIN Zeng-hai, WU Hua-tao, MA Tao. Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou 515041, China

Corresponding author: MENG Yong, Email: my176@sohu.com

【Abstract】 Objective To observe the secretion of matrix metalloproteinases in human colon carcinoma cell line SW480 treated by quercetin and to detect the expression of Cathepsin -D in SW480 cell treated by quercetin. **Methods** Zymogram analysis assay was used to analyze the effect on the secretion of matrix metalloproteinases in human colon carcinoma cell line SW 480. The expression of Cathepsin-D in SW480 cell treated by quercetin was measured by immunohistochemistry method. **Results** Zymogram analysis assay showed the secretion of matrix metalloproteinases in human colon carcinoma cell line SW 480 treated by quercetin decreased. With increasing concentration of quercetin, the secretion of MMP-2 and MMP-9 decreased. Immunohistochemistry method demonstrated the positive expression of Cathepsin -D in SW480 cell was suppressed by quercetin in a time- and dose-dependent manner. **Conclusions** Quercetin can suppress the secretion of matrix metalloproteinases and the expression of Cathepsin -D in human colon carcinoma cell line SW480. These are probably the reason that quercetin inhibits invasion and metastasis of colon cancer cells.

【Key words】 Colonic neoplasms; Quercetin; Matrix metalloproteinases; Cathepsins; SW480 cell

大肠癌是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一,近年来,随着社会经济的发展和人民生活水平的不断提高,生活方式和饮食习惯的变化,致使我国大肠癌的发病人数呈逐年上升的趋势。约半数患者根治术后死于转移和(或)复发^[1-2]。由于大肠癌对多种化疗药天然不敏感,且化疗药毒副作用大,因此寻求低毒高效的天然植物成分成为近几年来抗肿瘤药物开发的热点^[3],乃当务之急。

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2011.12.008

基金项目:2009年广东省中医药局科研课题(2009232);2009年广东省科技攻关项目(2009B030801321)

作者单位:515041 广东省,汕头大学医学院第一附属医院普外科(孟勇、林增海、吴华涛、马涛);西安交通大学医学院第二附属医院普外科(李华)

通讯作者:孟勇,Email:my176@sohu.com

槲皮素是一种天然的五肽羟基生物黄酮,在自然界含量丰富,广泛存在于多种中草药、花卉、干果、蔬菜及水果中,对肿瘤具有预防和治疗作用。有研究表明槲皮素有抑制肿瘤细胞生长的作用^[4]。研究表明结肠癌的侵袭和转移的过程中基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)及组织蛋白酶-D(Cathepsin-D)均有重要作用^[5-7]。有鉴于此,本研究就槲皮素与大肠癌侵袭和转移相关的两个方面 MMPs 及组织蛋白酶-D 进行研究,试图发现防治结直肠癌细胞侵袭和转移的可能机制。

材料与方法

一、材料

1. 实验细胞:人结肠癌细胞株 SW480,由第四军医大学细胞工程中心提供。SW480 细胞株来源于白种男性原发性的结肠癌组织,为贴壁生长的腺癌细胞。培养采用含 10% 灭活小牛血清、100 U/L 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 链霉素的 RPMI1640 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱内传代培养。每 2~3 d 用 2.5 g/L 胰酶消化,以 1:5~1:3 传代。当细胞生长状态稳定,呈对数生长期时用于实验,台盼蓝拒染率在 95% 以上。

2. 实验材料:RPMI1640 (Gibco 公司),二甲基亚砜(DMSO),分析纯产品(Sigma 公司),小牛血清(杭州四季青生物工程研究所),槲皮素(Sigma 公司),UltrasensitiveTM S-P 超敏试剂盒(福建迈新公司),明胶(Sigma 公司),考马斯亮蓝(Fluka 公司)。

二、方法

(一) 酶谱分析

1. 标本制备:正常传代的癌细胞长满 80% 的瓶底面积时传代,10 h 后按照分组(培养液中槲皮素浓度分别为 0、30、60、90 $\mu\text{mol}/\text{L}$)加入含槲皮素的培养液,培养 48 h。去除含血清培养液,PBS 液冲洗 3 遍后,加入等量的不含血清的 RPMI1640 培养液,经 1200 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,0.22 μm 滤膜过滤,以细胞数为依据调整体积。分装后立刻进行酶谱分析或冻存于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 。正常传代的癌细胞长至 80% 瓶底面积时,收集培养液并进行活细胞计数,培养液处理同上。根据细胞计数调整上清液体积,分装后立刻进行下一步实验或冻存于 -70 $^{\circ}\text{C}$ ^[8]。

2. 酶谱分析步骤:将细胞条件培养液与等体积的 2 \times SDS 非还原加样缓冲液在室温下混匀后直接点样。4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下恒压(120 V)电泳,待溴酚蓝泳至凝胶底部(约 135 min),电泳结束后,凝胶置于 2.5% Triton-X-100 中漂洗 2 h,再浸入反应缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8, 50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L CaCl_2) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 9 h(过夜)。取出凝胶,用 0.5% 考马斯亮蓝 R250 染色 0.5 h,再用脱色液(30% 甲醇,10% 乙酸)脱色至蓝色背景下显示出清晰的白色条带(明胶降解所形成的透明区带)为止。运用德国产 Dolphin-Doc 图像分析系统对图像进行吸光度测定,计算各条带的积分 A 值(积分 A 值 = 平均 A 值 \times 面积)。

(二) 免疫组织化学检测组织蛋白酶-D

1. 细胞爬片制备:将无菌的盖玻片置于 6 孔板中,每孔一片。取对数生长期细胞以 2.5 g/L 胰蛋白酶消化细胞,用含 10% 灭活小牛血清的 RPMI1640 培养液配成单个细胞悬液,稀释成 $5 \times 10^8/\text{L}$,取 0.5 ml 滴于盖玻片上,37 $^{\circ}\text{C}$ 、50 ml/L CO_2 、饱和湿度下孵育 2 h 后;每孔加培养液 2 ml,培养 1 d 后;每孔加入不同药物浓度(槲皮素 30、60、90 $\mu\text{mol}/\text{L}$),共同培养 24 h、48 h、72 h。

细胞爬片固定:(1)用 0.01 mol/L PBS 冲洗 2 次,每次 5 min;(2)4% 多聚甲醛固定 30 min;(3)烤干,置入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用(时间不超过 2 周)。

2. 免疫组织化学检查:采用链霉卵白素-过氧化物酶(streptavidin-horseradish peroxidase, SP)免疫组织化学法,一抗为组织蛋白酶-D 单克隆抗体,为即用型。实验步骤按 SP 法试剂盒说明书进行。从冰箱中取出细胞爬片,解冻,三蒸水清洗,浸泡 5 min;浸入 3% H_2O_2 中 15 min(去除内源性过氧化物酶活性);三蒸水浸泡 3 min,共 3 次;正常山羊血清封闭,室温下 30 min,用滤纸吸干;滴加一抗;山羊抗兔 IgG,室温下 50 min, PBS 浸泡 5 min,共 3 次;滴加试剂 SP,室温下 30 min, PBS 浸泡 5 min,共 4 次;DBA 显色,苏木素复染,中性树脂胶封固。PBS 代替一抗作空白对照。

3. 阳性结果判断标准:组织蛋白酶-D 阳性细胞细胞质内出现棕色颗粒,每张切片随机选择 5 个视野,每

个视野计数 200 个细胞中的阳性细胞数,计算组织蛋白酶-D 指数。(1)根据阳性细胞的百分比判断结果,阴性(-);无表达;弱阳性(+):阳性细胞数 < 25%;阳性(++):阳性细胞数为 25% ~ 75%;强阳性(+++):阳性细胞数 > 75%。(2)按照染片中大多数阳性细胞的染色反应强度分为三级:(+):细胞质内少量浅棕色颗粒;(++):细胞质内较多明显棕色颗粒;(+++):细胞质内大量致密棕褐色致密颗粒。

三、统计学分析

数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析。采用单因素方差分析和 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 槲皮素对人结肠癌 SW480 细胞 MMPs 分泌的影响(表 1):明胶酶谱实验结果表明,高转移人结肠癌 SW480 细胞能够分泌 MMP-2 及 MMP-9,同时发现不同浓度的槲皮素能够抑制 MMP-2 及 MMP-9 的分泌,30 $\mu\text{mol/L}$ 处理组与对照组之间的 MMP-9 的分泌量存在统计学差异($P < 0.05$),其余各组之间差异也均有统计学意义($P < 0.01$),提示槲皮素能够通过抑制 MMP-2 及 MMP-9 的分泌来抑制结肠癌 SW480 细胞的体外侵袭能力。

2. 槲皮素对人结肠癌 SW480 细胞组织蛋白酶-D 的影响(表 2):组织蛋白酶-D 免疫组织化学显示,组织蛋白酶-D 主要表达于细胞质内,阳性细胞细胞质内出现棕色颗粒。人结肠癌 SW480 细胞经 3 种浓度的槲皮素处理后,组织蛋白酶-D 的表达 24 h 后即开始减少,持续到 72 h,并呈剂量依赖性,以 90 $\mu\text{mol/L}$ 时抑制最明显。槲皮素处理组各浓度之间差异有统计学意义($P < 0.01$)。同一浓度不同时间差异有统计学意义($P < 0.01$)。提示槲皮素有下调组织蛋白酶-D 的作用。

表 1 槲皮素对人结肠癌 SW480 细胞 MMP-2 及 MMP-9 分泌的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	MMP-2 积分 A 值	MMP-9 积分 A 值
对照组	60.8 ± 0.45	15.3 ± 0.43
30 $\mu\text{mol/L}$ 组	49.7 ± 0.30 ^a	13.1 ± 8.94 ^b
60 $\mu\text{mol/L}$ 组	27.3 ± 0.33 ^a	8.9 ± 0.39 ^a
90 $\mu\text{mol/L}$ 组	20.5 ± 0.48 ^a	4.2 ± 0.45 ^a

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$

表 2 槲皮素对人结肠癌 SW480 细胞组织蛋白酶-D 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h
对照组	70.6 ± 0.14	69.1 ± 0.12	71.2 ± 0.33
30 $\mu\text{mol/L}$ 组	62.2 ± 0.11 ^a	55.1 ± 0.23 ^{ab}	47.4 ± 0.28 ^{abc}
60 $\mu\text{mol/L}$ 组	54.3 ± 0.18 ^a	46.9 ± 0.33 ^{ab}	39.9 ± 0.27 ^{abc}
90 $\mu\text{mol/L}$ 组	46.1 ± 0.20 ^a	37.6 ± 0.27 ^{ab}	30.3 ± 0.46 ^{abc}

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与 24 h 比较,^b $P < 0.01$;与 48 h 比较,^c $P < 0.01$

讨 论

大肠癌是严重危害人类健康的主要恶性肿瘤之一,近年来,随着社会经济的发展和人民生活水平的不断提高,生活方式和饮食习惯也发生了很大的变化,精细食物和高蛋白高脂肪食物的摄入不断增多,致使我国大肠癌的发病人数呈逐年上升的趋势,从 20 世纪 70 年代至今平均发生率以 4.2% 的年增长率增加^[2,9],据 20 世纪 90 年代的统计,大肠癌的发病率为(25 ~ 35)/万^[2]。在经济发达的地区和城市,大肠癌发病率的增高更为明显。目前,有报道其发病率在恶性肿瘤中已由原来的第四位上升为第三位,在世界肿瘤病死率中居第三位,在西方癌症相关死亡中居第二位^[10]。同大部分恶性肿瘤一样,大肠癌的发病涉及多个因素和环节,其发生发展是一个多基因、多阶段的变化过程,而其侵袭、转移及术后复发是影响疗效和预后的重要

因素。

槲皮素的生理和药理作用广泛,可抗肿瘤、降血压、降血脂、扩张冠状动脉、抗血小板聚集、抗炎、清除自由基和抗心律失常等,所以对人类肿瘤、衰老、感染、心血管疾病的治疗和预防具有重要意义^[11-15]。国内外对槲皮素及其衍生物在白血病、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌和胶质瘤等肿瘤中研究较多,它是已知最强抗癌剂之一,只要毫摩尔浓度即可直接阻滞癌细胞增殖^[16-21]。因此,槲皮素对肿瘤的化学预防和治疗作用日益受到人们关注^[4]。由于槲皮素毒副作用小,越来越显示出重要的临床应用价值。被认为是颇具应用前景的抗癌药物或抗癌辅助药物,深入研究其机制很有必要。

肿瘤细胞的侵袭和转移能力与其诱导产生的细胞外 MMPs 密切相关。MMPs 是一类在肿瘤转移过程中发挥降解基底膜和细胞外基质作用的 Zn^{2+} 依赖的内源性蛋白水解酶,是自然界进化中高度保守的一类酶,几乎能降解除多糖外细胞外基质的所有成分,因而成为近年来肿瘤侵袭和转移研究的热点。MMPs 中的明胶酶(包括 MMP-2、MMP-9 等)能够破坏基质的代谢平衡,促进肿瘤细胞穿过基底膜和细胞外基质所构成的组织学屏障,进而侵袭周围组织并向远端转移^[22-23]。

组织蛋白酶-D 是四种门冬氨酸类的蛋白水解酶之一,于 1979 年由 Westleg 和 Rochefort 等发现,是一种相对分子量为 3.4×10^4 的酸性溶组织蛋白酶,以多种形式存在于细胞溶酶体中,分为前体(52 000),中间体(48 000)及成熟型体(34 000)。组织蛋白酶-D 广泛存在于不同的组织细胞和癌细胞中,主要以成熟的溶酶体酶存在,其正常功能是在溶酶体酸性环境下分解蛋白质,部分可变蛋白以酶前体形式被癌细胞系所分泌^[24-25]。

国内外许多学者进行了大量的基础实验研究和临床观察,一致认为组织蛋白酶-D 是肿瘤侵袭性指标,与癌细胞的转移和侵袭密切相关^[26-27]。已知结肠癌组织内组织蛋白酶-D 过度表达,其活性显著高于正常细胞,国内外多数研究表明组织蛋白酶-D 的活性增加与癌细胞的生长和转移预后密切相关,是结肠癌预后的重要指标之一。因此,使用组织蛋白酶-D 抑制剂可预防其他蛋白水解酶的激活及基底膜、细胞外基质的降解。

本实验采用免疫组织化学方法研究槲皮素对结肠癌 SW480 细胞组织蛋白酶-D 表达的影响,具有精确的抗原组织定位优点,特异性高。研究结果显示,组织蛋白酶-D 的阳性表达主要位于结肠癌 SW480 细胞的细胞质中。经方差分析发现组织蛋白酶-D 的表达随槲皮素作用浓度的增加和时间的延长而降低,提示槲皮素可抑制结肠癌 SW480 细胞组织蛋白酶-D 的表达。在未来抗转移治疗中通过抑制组织蛋白酶-D 及其他蛋白水解酶的活性,有可能获得显著的进展^[28]。

综上所述,不同浓度的槲皮素能够抑制人结肠癌 SW480 细胞分泌 MMP-2 及 MMP-9;槲皮素能够抑制人结肠癌 SW480 细胞组织蛋白酶-D 的表达,这可能是槲皮素抑制肿瘤侵袭和转移的机制之一。因而推测它将是很有应用前景和开发价值的治疗大肠癌的天然药物。

参 考 文 献

- [1] 王新颖,姜泊. 大肠癌发病机制基础研究进展与展望. 胃肠病学和肝病杂志,2011,20:197-200.
- [2] 金贤英,全贞玉,韩春姬. 1999~2008年恶性肿瘤住院患者的疾病构成分析. 中国卫生统计,2011,28:107-108.
- [3] 毛海波,刘国龙,朱国栋,等. 三氧化二砷对小鼠 C26 结肠癌细胞生长的影响[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2010,4:748-751.
- [4] 林增海,孟勇,马涛. 槲皮素对肿瘤作用的研究现状. 实用医学杂志,2010,26:3446-3447.
- [5] Byun HO, Han NK, Lee HJ, et al. Cathepsin D and eukaryotic translation elongation factor 1 as promising markers of cellular senescence. Cancer Res, 2009, 69:4638-4647.
- [6] Park KS, Kim SJ, Kim KH, et al. Clinical characteristics of TIMP2, MMP2, and MMP9 gene polymorphisms in colorectal cancer. J Gastroenterol Hepatol, 2011, 26:391-397.
- [7] 徐燕平,金世禄. 大肠癌淋巴结转移相关分子的研究进展[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2011,5:786-788.
- [8] 孟勇,马清涌,马涛,等. 芹菜素对人结肠癌细胞 SW480 增殖抑制作用的实验研究. 现代肿瘤医学,2008,16:701-703.
- [9] 张晓慧,许岸高. 大肠癌危险因素病例对照研究. 临床消化病杂志,2010,22:289-293.
- [10] 杜灵彬. 发挥肿瘤登记处深层次作用. 中国肿瘤,2011,20:184.
- [11] Kim HJ, Kim SK, Kim BS, et al. Apoptotic effect of quercetin on HT-29 colon cancer cells via the AMPK signaling pathway. J Agric Food Chem, 2010, 58:8643-8650.

- [12] Baran I, Ganea C, Scordino A, et al. Effects of menadione, hydrogen peroxide, and quercetin on apoptosis and delayed luminescence of human leukemia Jurkat T-cells. *Cell Biochem Biophys*, 2010, 58:169-179.
- [13] Lee WJ, Chen YR, Tseng TH. Quercetin induces FasL-related apoptosis, in part, through promotion of histone H3 acetylation in human leukemia HL-60 cells. *Oncol Rep*, 2011, 25:583-591.
- [14] Xavier CP, Lima CF, Rohde M, et al. Quercetin enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in MSI colorectal cancer cells through p53 modulation. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011. [Epub ahead of print]
- [15] Zhang M, Swarts SG, Yin L, et al. Antioxidant properties of quercetin. *Adv Exp Med Biol*, 2011, 915:283-289.
- [16] Soria EA, Eynard AR, Bongiovanni GA. Modulation of early stress-related biomarkers in cytoplasm by the antioxidants silymarin and quercetin using a cellular model of acute arsenic poisoning. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2010, 107:982-987.
- [17] Oh SJ, Kim O, Lee JS, et al. Inhibition of angiogenesis by quercetin in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48:3227-3234.
- [18] Yeh SL, Yeh CL, Chan ST, et al. Plasma Rich in Quercetin Metabolites Induces G2/M Arrest by Upregulating PPAR-gamma Expression in Human A549 Lung Cancer Cells. *Planta Med*, 2011, 77:992-998.
- [19] Senthilkumar K, Arunkumar R, Elumalai P, et al. Quercetin inhibits invasion, migration and signalling molecules involved in cell survival and proliferation of prostate cancer cell line (PC-3). *Cell Biochem Funct*, 2011, 29:87-95.
- [20] Fonseca-Silva F, Inacio JD, Canto-Cavalheiro MM, et al. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. *PLOS ONE*, 2011, 6:e14666.
- [21] Camargo CA, da Silva ME, da Silva RA, et al. Inhibition of tumor growth by quercetin with increase of survival and prevention of cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 406:638-642.
- [22] Jobim FC, Xavier NL, Uchoa DM, et al. Prevalence of vascular-endothelial growth factor, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in primary breast cancer. *Braz J Med Biol Res*, 2009, 42:979-987.
- [23] Roomi MW, Monterrey JC, Kalinovsky T, et al. Modulation of MMP-2 and MMP-9 by cytokines, mitogens and inhibitors in lung cancer and malignant mesothelioma cell lines. *Oncol Rep*, 2009, 22:1283-1291.
- [24] Shubin AV, Demidyuk IV, Kurinov AM, et al. Cathepsin D messenger RNA is downregulated in human lung cancer. *Biomarkers*, 2010, 15:608-613.
- [25] Vetvicka V, Vetvickova J. Procathepsin D and cytokines influence the proliferation of lung cancer cells. *Anticancer Res*, 2011, 31:47-51.
- [26] Abbott DE, Margaryan NV, Jeruss JS, et al. Reevaluating cathepsin D as a biomarker for breast cancer: serum activity levels versus histopathology. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9:23-30.
- [27] Nicotra G, Castino R, Follo C, et al. The dilemma: does tissue expression of cathepsin D reflect tumor malignancy? The question: does the assay truly mirror cathepsin D mis-function in the tumor. *Cancer Biomark*, 2010, 7:47-64.
- [28] Staedler D, Idrizi E, Kenzaoui BH, et al. Drug combinations with quercetin: doxorubicin plus quercetin in human breast cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011.

(收稿日期:2011-05-11)

(本文编辑:马超)

孟勇,李华,林增海,等.槲皮素对人结肠癌细胞 SW480 基质金属蛋白酶及组织蛋白酶-D 的作用[J/CD].中华临床医师杂志:电子版, 2011,5(12):3427-3431.