

文章编号:1000-5404(2014)17-1805-04

论著

基质金属蛋白酶26能促进人低转移肺癌95-C细胞浸润能力

黎联^{1,2}, 孙贵银^{2,3}, 向德兵^{2,3}, 李敏^{2,4}, 黎晓强^{1,2}, 曹国强⁵ (402260 重庆, 重庆市江津区中心医院:呼吸内科¹, 江津区呼吸疾病研究所², 肿瘤科³, 病理科⁴; 400042 重庆, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所呼吸内科⁵)

[摘要] **目的** 探讨基质金属蛋白酶26(matrix metalloproteinase 26, MMP-26)对低转移肺癌95-C细胞浸润能力的影响及机制。**方法** 构建含MMP-26 cDNA的表达质粒PUC57-MMP-26, 转染到MMP-26低表达的95-C细胞, 并筛选稳定表达的含MMP-26 cDNA的细胞, RT-PCR检测MMP-26、MMP-9 mRNA表达, 明胶酶谱分析检测过表达MMP-26对95-C细胞分泌MMP-9的影响, 侵袭试验检测细胞体外侵袭力, 双荧光免疫细胞化学染色检测MMP-26、MMP-9蛋白在细胞内的定位。**结果** 转染含MMP-26 cDNA表达质粒的95-C细胞MMP-26、MMP-9 mRNA表达上调($P < 0.05$)。明胶酶谱分析显示过表达MMP-26的95-C细胞分泌MMP-9能力、体外侵袭力明显增强($P < 0.05$)。双荧光免疫细胞化学染色发现MMP-26、MMP-9在细胞内共定位。**结论** MMP-26可以促进肺癌95-C细胞的侵袭力, MMP-26促进侵袭的作用至少部分是通过调节MMP-9表达实现的。

[关键词] 基质金属蛋白酶类; 95-C细胞; 细胞浸润

[中图分类号] R345; R73-37; R734.2

[文献标志码] A

Matrix metalloproteinase-26 promotes cell invasion in non-invasive (95-C) lung cancer cells with low metastatic ability

Li Lian^{1,2}, Sun Guiyin^{2,3}, Xiang Debing^{2,3}, Li Min^{2,4}, Li Xiaoliang^{1,2}, Cao Guoqiang⁵ (¹Department of Respiratory Medicine, ²Jiangjin Institute of Respiratory Diseases, ³Department of Oncology, ⁴Department of Pathology, Jiangjin Central Hospital, Chongqing, 402260; ⁵Department of Respiratory Disease, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[Abstract] **Objective** To determine the effect of matrix metalloproteinase-26 (MMP-26) on cell invasiveness in lung cancer 95-C cells and its possible underlying mechanism. **Methods** A full-length cDNA encoding human MMP-26 was cloned into the eukaryotic expression vector PUC57, and this vector was designated as PUC57-MMP-26. After the vector was transfected into 95-C cells, the stable cells expressing MMP-26 were screened out, then RT-PCR was used to detect the mRNA expression of MMP-26 and MMP-9. The secretion of MMP-9 in the transfected cells was detected by gelatin zymography. *In vitro* invasion was detected by transwell assay and localization of MMP-26 and MMP-9 proteins were determined by double immunofluorescent staining. **Results** Transfection of MMP-26 expressing plasmid PUC57-MMP-26 in 95-C cells led to over-expression of MMP-26 mRNA and MMP-9 mRNA ($P < 0.05$), and cell invasiveness in these cells were significantly promoted ($P < 0.05$). The results of gelatin zymogram revealed that MMP-26 over-expression enhanced the secretion of MMP-9 ($P < 0.05$). Double immunofluorescence staining revealed that MMP-26 and MMP-9 were co-localized in MMP-26-transfected 95-C cells. **Conclusion** MMP-26 is involved in invasion-promoting regulating of lung cancer cells, and it functions, at least in partial, through interaction with MMP-9.

[Key words] matrix metalloproteinases; 95-C cells; cell invasion

Supported by the General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011jjA0961) and the Construction Project of Medical Specialty of Chongqing (2010). Corresponding author: Li Lian, E-mail: lilian19700925@163.com

[基金项目] 重庆市自然科学基金面上项目(CSTC2011jjA0961);重庆市医疗特色专科建设项目(2010)

[通信作者] 黎联, E-mail: lilian19700925@163.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140704.1052.003.html>(2014-07-04)

目前研究证实基质金属蛋白酶 26 (matrix metalloproteinase 26, MMP-26) 在卵巢癌、食道癌、子宫内膜癌、前列腺癌等^[1-6] 发生和转移中起着重要作用, MMP-26 可促进肿瘤的侵袭转移。我们前期研究发现 MMP-26 在非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 表达远高于正常肺组织和非典型增生, 与淋巴转移相关^[7]。本研究以低转移肺癌 95-C 细胞为模型, 通过基因转染方法, 研究 MMP-26 对细胞浸润行为的影响及其作用的途径, 以期探讨 MMP-26 在 NSCLC 浸润中的作用及其调控机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

兔抗人 MMP-26 多克隆抗体购自 Sigma 公司, 鼠抗人 MMP-9 多克隆抗体、Actin 抗体购自 Santa Cruz 公司, LipofectmineTM 2000 和 RNA 提取试剂 TRIzol 购于美国 Invitrogen 公司, G418 购于 Gibco 公司, 质粒 PUC57 购自 Promega 公司, TaKaRa On step RNA PCR kit (AMV) 购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 95-C 肺癌细胞株购自北京肿瘤医院, 大肠杆菌 DH5a 由重庆医科大学基础医学研究所提供, 限制性内切酶及细胞培养试剂均购自福建迈新公司。

1.2 人低转移肺癌 95-C 细胞的培养

95-C 购于北京肿瘤医院细胞库。冻存于液氮的 95-C 细胞经复苏后, 于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 经过 3 次传代稳定后, 进行基因转染。

1.3 构建 MMP-26 表达质粒并转染细胞

根据 GenBank 的人 MMP-26 cDNA 序列, 设计上游引物 5'-ACATATGACCTCCATCTCGCCAG-3' 和下游引物 5'-TGAATPCT-TATCCATACAAATGCTGG-3' 由上海生工合成。参照 TRIzol 法从 A549 细胞提取总 RNA, 取 3 μL 总 RNA, 按照 TaKaRa 试剂盒步骤做 RT-PCR, 反应体系 50 μL, 然后取 RT-PCR 产物 5 μL, 按照 PUC57 Easy Vector Systems 说明书构建重组载体, 转化 DH5a 感受态大肠杆菌, 挑选转化子, 提取质粒, 经酶切和测序鉴定 PUC57-MMP-26 构建成功。采用 LipofectmineTM 2000 系统将 PUC57-MMP-26 质粒转染到 95-C 细胞 24 h 后, 加入 250 μg/mL G418 筛选 1 周, 将存活细胞克隆并逐代扩增, 获得稳定转染的细胞株。同时用 PUC57 空质粒转染 95-C 细胞, 并筛选稳定细胞株作为阴性对照。

1.4 Transwell 细胞浸润实验

将有 8 μm 小孔聚碳酸酯滤膜的培养小室上铺 0.05 g/L I 型胶原后, 接种 100 μL 95-C 细胞 (1 × 10⁵/mL), 培养小室及其下层培养皿中均加入含 10% 血清的 DMEM 培养液。24 h 后, 取出培养小室, 用 2.5% 戊二醛固定 15 min, 并以 0.5% Triton X-100 处理 3 min, 苏木精染核 15 min, 将培养小室倒置, 在光学显微镜下观察、照相, 并计数滤膜底面的细胞数, 以转染 PUC57-MMP-26 的 95-C 浸润细胞数为 100%, 计算其他细胞浸润的百分率。

1.5 细胞总 RNA 的提取和半定量 RT-PCR

根据 TRIzol 试剂的说明提取培养细胞的总 RNA, 紫外分光

光度法定量后, 冻存于 -80 °C。取 1 μg 总 RNA, 在 20 μL 体系中用 oligo(d)T 引物和 SuperScript II 逆转录酶进行逆转录反应, 随后取出 1 μL 产物进行 PCR 反应。根据 NCBI 数据库提供的人 MMP-26、MMP-9 cDNA 序列设计特异 PCR 引物 (引物序列等信息见表 1)。经预实验确定 PCR 反应的“指数期”, 选取在“指数期”内, 且经凝胶电泳能检测到反应产物的最小扩增循环数, 进行半定量 PCR 反应。结果以相同起始模板量的管家基因 GAPDH 扩增产物进行校正。反应产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外光下凝胶成像, 经 Gel-ProAnalyzer 软件进行灰度定量分析。

表 1 RT-PCR 所用引物序列和反应条件

基因	引物序列	片段大小 (bp)	温度 (°C)	循环次数
MMP-26	正义链: 5'-ACATGATATGAAGCCATCCGC-3'	310	54	30
	反义链: 5'-GCCCAAAGAATGCCCAATCTC-3'			
MMP-9	正义链: 5'-GTGCTGGGCTGCTGTTTCT-3'	303	68	30
	反义链: 5'-GTCGCCCTCAAAGGTTTGGAA-3'			
GAPDH	正义链: 5'-TCCACCACCTGTTGCTGTA-3'	452	55	22
	反义链: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'			

1.6 双荧光免疫细胞化学

细胞爬片在 4% 多聚甲醛固定 30 min 后, 以 0.5% Triton X-100 处理 10 min, 1% BSA 室温封闭 30 min, 吸去封闭液; 加入 1:100 稀释的兔抗人 MMP-26 抗体和 1:50 稀释的鼠抗人 MMP-9 抗体混合液, 在湿盒内 4 °C 过夜; PBS 清洗 3 次, 加入 1:100 稀释的 FITC 标记的羊抗兔 IgG 抗体和 TRIAT 标记的兔抗鼠 IgG 抗体, 湿盒内 37 °C 避光孵育 30 min。IgG 和 BSA 作为阴性对照, 于激光共聚焦扫描显微镜下观察分析照相。

1.7 明胶酶谱分析

取适量细胞培养液, 以 1:1 与样品缓冲液混合, 37 °C 放置 30 min, 样品于含 1 g/L 明胶的 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 2 h, 将凝胶在含 2.5% Triton X-100 的 Tris 缓冲液中室温洗 1 h, 于孵育液中 37 °C 孵育过夜。0.1% 考马斯亮蓝 R-250 染色 60 min, 用脱色液脱色。凝胶扫描后, Gel-ProAnalyzer 软件进行灰度定量分析。

1.8 统计学分析

每组实验均用不同批次的细胞重复至少 3 次, 半定量 RT-PCR 结果以 GAPDH 作为内参照, 计算出相对灰度值, 将至少 3 次的实验结果进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异分析采用单因素方差分析。

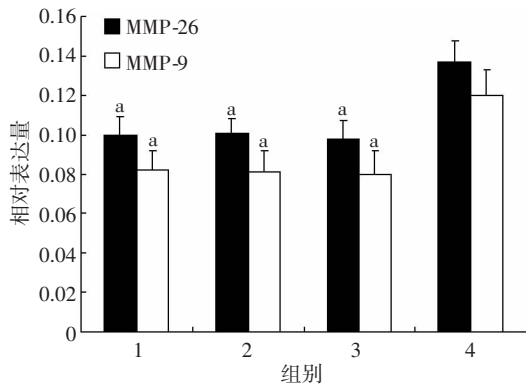
2 结果

2.1 过表达 MMP-26 的 95-C 细胞中 MMP-26、MMP-9 mRNA 表达的变化

RT-PCR 结果显示, 转染 MMP-26 的质粒的 95-C 细胞 MMP-26、MMP-9 mRNA 水平明显增高 (图 1)。

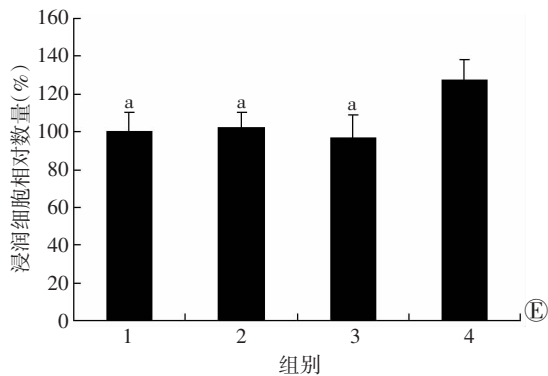
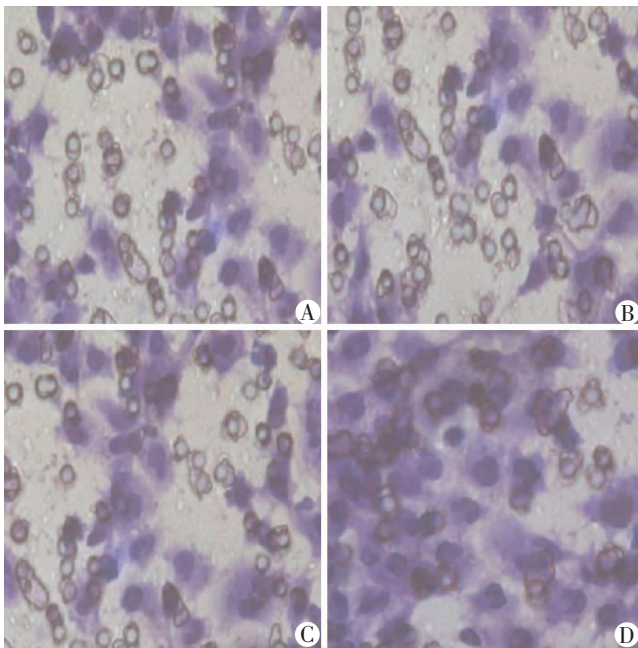
2.2 过表达 MMP-26 的 95-C 细胞浸润能力明显增强

细胞浸润实验显示, 95-C、加脂体 95-C 和转染空质粒的 95-C 细胞 PUC57 细胞浸润能力均较弱, 而 PUC57 转染 95-C 细胞浸润能力明显增强 ($P < 0.05$, 图 2)。



1:95-C 细胞;2:脂质体对照 95-C 细胞;3:转染空质粒的 95-C 细胞;4:转染 MMP-26 质粒的 95-C 细胞;a: $P < 0.05$,与转染 MMP-26 质粒的 95-C 细胞比较

图1 各组 95-C 细胞中 MMP-26、MMP-9 的 mRNA 表达

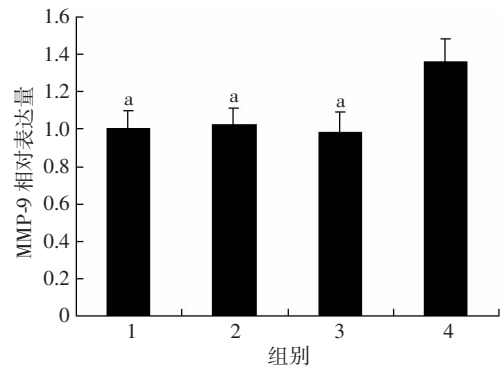


A:95-C 细胞;B:脂质体对照 95-C 细胞;C:转染空质粒的 95-C 细胞;D:转染 MMP-26 质粒的 95-C 细胞;A ~ D: $\times 200$;E: 浸润到 insert 膜下层细胞计数 1:95-C 细胞;2:脂质体对照 95-C 细胞;3:转染空质粒的 95-C 细胞;4:转染 MMP-26 质粒的 95-C 细胞;a: $P < 0.05$,与转染 MMP-26 质粒的 95-C 细胞比较

图2 Transwell 细胞浸润实验检测各组 95-C 细胞的浸润能力

2.3 过表达 MMP-26 对 95-C 细胞分泌 MMP-9 的影响

明胶酶谱分析结果表明正常 95-C 细胞分泌 MMP-9 的水平低,而转染 MMP-26 质粒 24 h 后的 95-C 细胞分泌 MMP-9 的能力明显增强 ($P < 0.05$,图 3)。

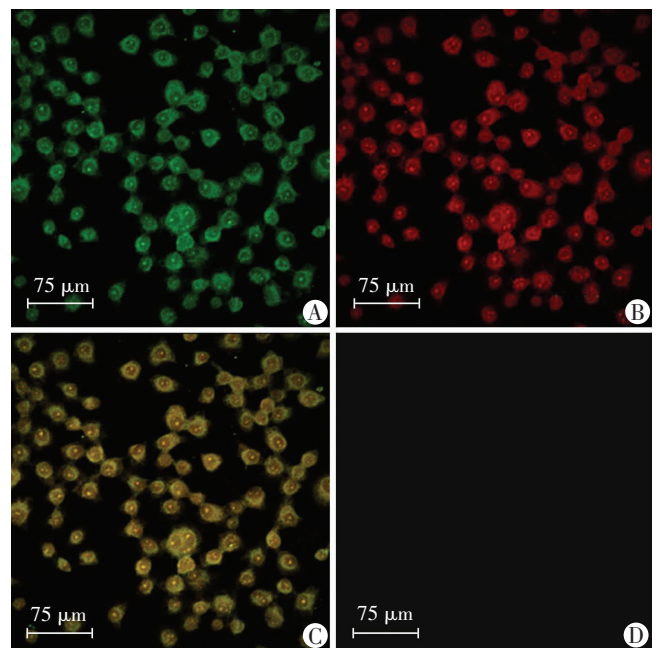


1:95-C 细胞;2:脂质体对照 95-C 细胞;3:转染空质粒的 95-C 细胞;4:转染 MMP-26 质粒的 95-C 细胞;a: $P < 0.05$,与转染 MMP-26 质粒的 95-C 细胞比较

图3 明胶酶谱分析检测过表达 MMP-26 对 95-C 细胞分泌 MMP-9 的影响

2.4 MMP-26 和 MMP-9 在细胞内共定位

双荧光免疫细胞化学结果显示,转染 MMP-26 质粒的 95-C 中,MMP-26 和 MMP-9 主要定位于细胞质,激光共聚焦扫描显微图像分析显示,MMP-26 和 MMP-9 的大部分信号重叠,表明这两种分子在细胞内表达存在共定位现象(图 4)。



A:MMP-26 在 95-C 细胞中的表达;B:MMP-9 在 95-C 细胞中的表达;C:MMP-26、MMP-9 在 95-C 细胞中共定位;D:阴性对照

图4 双荧光免疫细胞化学观察 MMP-26、MMP-9 在 95-C 细胞中的表达 ($\times 100$)

3 讨论

MMP-26 高表达增强肿瘤转移与侵袭能力的机制

目前尚不清楚。Zhao等^[8]研究发现 ARCaP 同时表达 MMP-26 和 MMP-9, 特异性抗 MMP-26 和 MMP-9 的抗体能减弱 ARCaP 细胞通过纤维连接蛋白或 IV 型胶原的侵袭能力。而且转染 MMP-26 反义 cDNA 的 ARCaP 细胞 MMP-26 的表达水平明显减少, ARCaP 细胞的侵袭力急剧下降, MMP-9 活性也下降。双荧光免疫细胞化学染色和共聚焦激光扫描显微镜成像显示 MMP-26 和 MMP-9 共存于亲代和转染了 MMP-26 的 ARCaP 细胞质中, 存在共定位现象。吴晓秋等^[9]将含有 MMP-26 全长 cDNA 的质粒转染到人绒毛膜上皮癌细胞系(JEG-3)中, 细胞浸润分析表明 JEG/MMP-26 细胞的浸润能力较母本细胞明显增强; RT-PCR 和明胶酶谱分析显示 JEG-3/MMP-26 细胞中 MMP-9 的表达和分泌水平提高; 双荧光免疫细胞化学显示 MMP-26 和 MMP-9 蛋白在细胞中有共定位现象。Yang 等^[4]对乳腺癌细胞的研究亦有类似发现。上述结果表明 MMP-26 能有效促进癌细胞浸润, 其作用可能是通过与其他 MMP 分子(如 MMP-9)的协调来实现的。

我们通过蛋白免疫印迹实验, 发现低转移性肺癌细胞株 95-C MMP-26 蛋白表达很弱, 构建含 MMP-26 基因的表达质粒 PUC57-MMP-26, 转染 95-C 细胞后发现, 内源性 MMP-26 蛋白和 mRNA 表达明显升高, MMP-9 蛋白和 mRNA 表达明显升高, 明胶酶谱分析发现, 过表达 MMP-26 的 95-C 细胞分泌 MMP-9 蛋白明显升高, 体外侵袭实验表明, 过表达 MMP-26 的 95-C 细胞侵袭能力明显增强。以往大量的研究发现, 肺癌的浸润需要多种 MMPs 分子的参与, MMP-2 和 MMP-9 是其中非常重要的两个分子^[10], 有研究者在体外培养的肺癌细胞中证实 MMP-9 参与降解细胞外基质以促进肺癌细胞的浸润。上述这些结果提示, 在肺癌细胞中, MMP-26 能有效促进细胞浸润, 除了 MMP-26 的直接作用外, 也可能是通过与 MMP-9 等分子的协调而发挥。

有关 MMP-26 激活 MMP-9 表达的机制是值得探讨的问题。其他肿瘤细胞的研究中发现, MMP-26 可以激活酶原型 MMP-9, 产生活性 MMP-9, 我们发现过表达 MMP-26 的 95-C 分泌活性 MMP-9 量明显增加。已有的研究表明, 多种 MMP 分子可以通过降解 ECM 成分产生 ECM 生物活性片段或释放结合在 ECM 上的生长因子和细胞因子, 从而调节细胞行为^[11-12]。MMP-26 也可以有效降解纤维蛋白原和纤粘连蛋白等多种 ECM, 推测 95-C 细胞中过量表达的 MMP-26 有可能通过上述方式改变细胞所处的微环境, 从而使

MMP-9 的表达上调, 这一推测还需要更多的实验证据加以支持。

本研究利用 95-C 细胞研究了 MMP-26 对细胞浸润的影响及其可能的作用途径, 结果表明, MMP-26 能够显著提高 95-C 细胞的浸润能力, 其作用可能通过上调 MMP-9 的表达实现, 有助于深入理解 MMP-26 在肺癌侵袭转移作用的机制。但由于本试验采用的 95-C 细胞只是肺癌细胞中的一种, 今后尚需更多种细胞的试验来深入研究。

参考文献:

- [1] Deng Y, Li W, Li Y, *et al.* Expression of Matrix Metalloproteinase-26 promotes human glioma U251 cell invasion *in vitro* and *in vivo*[J]. *Oncol Rep*, 2010, 23(1): 69-78.
- [2] Khamis Z I, Zorio D A, Chung L W, *et al.* The Anti-inflammatory Role of Endometase/Matrilysin-2 in Human Prostate Cancer Cells[J]. *J Cancer*, 2013, 4(4): 296-303.
- [3] Bister V, Skoog T, Virolainen S, *et al.* Increased expression of matrix metalloproteinases-21 and -26 and TIMP-4 in pancreatic adenocarcinoma[J]. *Mod Pathol*, 2007, 20(11): 1128-1140.
- [4] Yang H, Wang Y, Li Y, *et al.* Roles of matrix metalloproteinase-26 in the growth, invasion and angiogenesis of breast cancer[J]. *Oncol Lett*, 2012, 4(4): 832-836.
- [5] Lee S, Desai K K, Iczkowski K A, *et al.* Coordinated peak expression of MMP-26 and TIMP-4 in preinvasive human prostate tumor[J]. *Cell Res*, 2006, 16(9): 750-758.
- [6] Yamamoto H, Vinitketkumnuen A, Adachi Y, *et al.* Association of matrilysin-2 (MMP-26) expression with tumor progression and activation of MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25(12): 2353-2360.
- [7] Li L, Mei T H, Zhou X D, *et al.* Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase (MMP)-26 protein in non-small cell lung cancer[J]. *Ai Zheng*, 2009, 28(1): 60-63.
- [8] Zhao Y G, Xiao A Z, Newcomer R G, *et al.* Activation of pro-gelatinase B by endometase/matrilysin-2 promotes invasion of human prostate cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(17): 15056-15064.
- [9] 吴晓秋, 李玉侠, 付雅媛, 等. 基质金属蛋白酶 MMP-26 能有效促进人绒毛膜上皮癌细胞 JEG-3 浸润能力[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2006, 33(6): 524-530.
- [10] 秦蓁, 罗彬, 王旭东. 肺癌 MMP-9 表达与血管生成的关系及其意义[J]. *第三军医大学学报*, 2009, 31(7): 595-597.
- [11] Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteinases[J]. *Amino Acids*, 2011, 41(2): 271-290.
- [12] Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs[J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 69(3): 562-573.

(收稿:2014-03-02;修回:2014-05-15)

(编辑 邓强庭)