

蝎毒多肽提取物抑制 DU- 145 细胞 COX- 2 和 MMP- 9 表达的研究^{*}

张月英 张维东 贾 青 王兆朋 黄山英 宋守琴 王朝霞
(山东省医学科学院基础所病理室 济南 250062)

摘要 目的: 研究蝎毒多肽提取物 (peptide extract from scorpion venom, PESV) 对雄激素非依赖性人前列腺癌细胞株 DU-145 COX- 2 和 MMP- 9 表达的影响, 进一步探讨其抗血管生成的分子机制, 为抗前列腺癌骨转移提供有效的治疗手段。方法: 采用免疫组化化学方法检测 PESV 对 COX- 2、MMP- 9 蛋白表达的影响, 应用 RT- PCR 检测 PESV 对 MMP- 9 在 mRNA 水平表达的影响。结果: 蝎毒多肽提取物 (40μg/mL) 作用于前列腺癌细胞后, COX- 2、MMP- 9 蛋白表达水平明显下调 ($P < 0.05$), 进一步检测发现 MMP- 9 在 mRNA 水平亦明显下降 ($P < 0.05$)。结论: 蝎毒多肽提取物 (PESV) 通过抑制前列腺癌细胞血管生成因子 COX- 2 的表达而发挥其抗血管生成作用, 具有临床应用价值。

关键词: 蝎毒多肽提取物; 前列腺癌; COX- 2 ; MMP- 9

中图分类号: R737. 65; R285. 5 文献标识码: A

Polypeptide extract from scorpion venom (PESV) downregulates the expression of COX- 2 and MMP- 9 in DU- 145 cell lines

ZHANG Yue- ying, ZHANG Wei- dong, JIA Qin, et al

Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Science, Jinan, China, 250062

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of polypeptide extract from scorpion venom (PESV) on the expression of cyclooxygenase- 2 (COX- 2) and matrix metalloproteinase- 9 (MMP- 9) in androgen- independent human prostate cancer DU145 cell line, and to explore the antiangiogenic mechanisms induced by PESV, finally, hopefully to find out potential approach to targeting bone metastasis of prostate cancer. **Methods:** Immunohistochemistry was performed to determine the expression of COX- 2 and MMP- 9 in DU145 cells treated with PESV (40ug/ml) or vehicle. MMP- 9 mRNA was detected using RT- PCR. **Results:** The expression of COX- 2 and MMP- 9 was significantly downregulated in PESV- treated DU145 cells, compared with the control, and the amount of MMP- 9 mRNA reduced significantly in the treatment group. **Conclusions:** PESV is able to inhibit the expression of COX- 2 and MMP- 9, thus leading to inhibitory effect on PESV might be a promising angiogenesis inhibitor.

Key words: Polypeptide extract from scorpion venom (PESV); Prostate cancer; Cyclooxygenase- 2 (COX- 2), Matrix metalloproteinase- 9 (MMP- 9)

前言

前列腺癌 (prostate cancer, PCa) 是男性泌尿系统常见的恶性肿瘤, 在欧美国家其死亡率居男性恶性肿瘤第 2 位^[1]。近年来, 其发病率在全球呈上升趋势, 且易发生骨转移。我们从东亚钳蝎蝎毒中提取的一种多肽提取物 (Polypeptide extract from scorpion venom, PESV), 由 50~ 60 个氨基酸组成, 具有良好的体内和体外抗肿瘤血管生成活性^[2, 3, 4], 并藉此抑制肿瘤的生长与转移, 其作用机制是多方面的, 可能与抑制 COX- 2 表达有关。本实验旨在研究蝎毒多肽提取物 (PESV) 对前列腺癌

细胞 COX- 2 和 MMP- 9 表达的影响, 进一步阐明其抗肿瘤血管生成的作用机制。有关蝎毒多肽提取物 (PESV) 对前列腺癌细胞 COX- 2 表达影响研究尚属首次报道。

1 材料与方法

1.1 PESV 的药物提取和稀释方法

取蝎毒冻干粉溶解 (1g/40 mL, pH7. 4), 低温离心, 5000rpm, 30min; 0. 45μm 和 0. 22μm 微孔滤膜过滤, 将超滤物冻干。取蝎毒冻干粉 400mg 加磷酸缓冲液上样, 经葡萄糖凝胶, 收集蝎毒 III- IV 蛋白峰, 再进行阳离子交换层析, 紫外分光光

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号 30371841), 山东省自然科学基金资助 (编号 Y2003C02)

作者简介: 张月英, (1980-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 抗肿瘤血管生成。E- mail: qqhlxx99@163. com

通讯作者: 张维东, E- mail: zhangweidongkui@163. com. Tel: 053182919939

通讯地址: 山东省医学科学院实验病理学与生理学研究室, 250062

收稿日期: 2006- 04- 25 接受日期: 2006- 05- 10

度仪(吸收波长 280nm)检测,收集 PESV 蛋白峰。PESV 在 HPLC 色谱显示有四个峰,主峰占总面积的 41.4%。PESV 为含有 50~60 个氨基酸的多糖混合物,纯度 89.1%,分子量 6000~7000, pH 稳定。PESV 用 RPMI1640 完全培养基溶解稀释。

1.2 试剂和仪器

新生小牛血清:杭州四季青公司;RPMI1640:美国 GIBCO 公司;总 RNA 提取试剂盒:上海生物工程有限公司;COX-2、MMP-9 免疫组化试剂盒和 DAB 试剂盒:中山生物技术公司;Triton X-100:美国 Gibco 公司;TRIZOL 试剂:美国 Gibco 公司;德国 leica 倒置显微镜;德国 leicaDM4000B 光学显微镜;德国 leica Qwin V3 图像分析软件;CO₂ 孵箱:美国 Forma Scientific。

1.3 细胞培养与标本制作

DU-145 细胞(购自北京大学泌尿外科)用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养,37℃,饱和湿度 5% CO₂ 的培养箱中,常规培养,每日倒置显微镜观察生长情况,3 天换液,适时传代。细胞培养后,制作细胞爬片,经 95% 酒精固定后,以免疫组化法检测 COX-2、MMP-9 的表达情况。

1.4 免疫细胞化学染色

免疫组化步骤如下:取固定好的细胞爬片,PBS 振洗 3 次,每次 5min;然后,用 0.25% Triton X-100 处理 15min;再用 0.3% H₂O₂ 室温下孵育 10min,以消除内源性过氧化物酶;正常羊血清孵育 30min,甩去不洗;滴加一抗(1:50),4℃ 湿盒 24h,复温 1h;滴加生物素化二抗(1:100),37℃ 孵育 30min;滴加酶结合物(1:100),37℃ 孵育 30min;DAB 显微镜下控制显色 5~10min。上述各步骤后均用 0.01mol/L PBS 振洗 3 次,每次 5min。然后,苏木精复染,常规脱水,二甲苯透明,封片。高倍镜下随机选取 10 个高倍视野,读取表达细胞百分比,并做灰度值分析。

1.5 总 RNA 的提取

①6 孔板细胞汇合度为 90~100% 时,取出无菌室,去其上清,用 PBS 洗两次后,每孔加 TRIZOL 试 1mL,摇匀,无菌罩内消化 3~5min(观察:液体变粘稠,细胞脱壁);

②将各孔内消化好的细胞裂解液吸到一 DEPC 处理过的 1.5mL EP 管中,加新开的氯仿 0.2mL,轻摇 15 秒;

③室温静置 2~3 后,12000rpm,15min,4℃,离心。然后取上清无色水相(约 0.6mL)到 EP 管(DEPC 处理过),加 0.5mL 新打开的异丙醇,室温下静置 10 分钟;

④12000 rpm,10min,4℃,离心。观察总 RNA 在管底的白色沉淀,弃去上清,75% 乙醇 1.0mL 洗涤(用 DEPC 水新配制)后,7500rpm,5min,4℃,离心;

⑤去上清,点离,用小 Tip 吸干液体。气干沉淀 5~10 分钟,DEPC 处理水 20~30μL 加入,中枪打匀,55~60℃ 水浴 10 分钟溶解总 RNA,测 OD 值;

⑥电泳。

1.6 RT-PCR 检测 MMP-9 在 mRNA 水平的变化

总 RNA 在 70℃ 孵育 5min,取出后迅速置冰上冷却。逆转录体系如下:5μL 总 RNA、1.5μL Oligo(dT) 18、1mmol/L dNTP2.0μL、2.0μL 逆转录酶、20U RNase 抑制剂、逆转录 buffer4.0μL,用

DEPC 水补足 20μL 体积。70℃ 孵育 60min。逆转录产物于 -20℃ 保存。PCR 反应体系如下:1× PCR buffer、dNTP 200μmol/L、TaqplusDNA 聚合酶 215U、上、下游引物各 110μmol/L、cDNA 模板 500pg,加水至总体积 50μL。以(-actin 为内参照,其上、下游引物序列为:5'-GAGCTACGAGCTGCCTGACG-3' 和 5'-GCATTTCGGGTGGACGA-3',扩增片断长度为 389bp; mmp-9 引物由上海生物有限公司合成,上、下游引物序列为:5'-GAGATGCGTGGAGAGTCGAA-3'; 5'-CCGAGTTGGAGCAGCAGCG-3',扩增片断长度为 489bp。取不同批次培养细胞,重复 3 次。扩增产物电泳,进行吸光度扫描,与(-actin 条带的吸光度(A)值比较,得到相对吸光度值。进行单因素方差分析比较各组相对吸光度值间的差异。

1.7 统计学分析

采用 spss 10.0 软件包进行 t 检验、方差分析,计算数据结果以表示。

2 结果

2.1 免疫组化染色:

COX-2 和 MMP-9 阳性表达均定位于细胞质,呈淡棕黄色至棕黄色着色(见图 A、B、C、D)。COX-2 蛋白表达阳性率达率(%),分别为 85.5±3.32 和 40.6±2.56,差异有统计学意义(P<0.05)。对照组和实验组 MMP-9 蛋白表达阳性率(%),分别为 86.5±4.12 和 43.9±2.63,差异亦有显著性意义(P<0.05)。

2.2 RT-PCR:

对照组和 PESV 组均可检测到 MMP-9 mRNA 的存在,但 PESV 组与对照组比较前者表达明显减弱(P<0.05,见图 E)。

3 讨论

细胞外基质的降解、肿瘤血管形成是肿瘤细胞侵袭和转移的关键,因此,有效抑制细胞外基质的降解和抗肿瘤血管生成可有效抑制肿瘤转移。血管生成过程中,首先血管内皮细胞迁移并侵入细胞外基质,分裂形成新生血管,继而癌细胞脱落进入血管到达远处器官增殖形成转移灶。基质金属蛋白酶(MMPs)是一类重要的蛋白水解酶,他们具备降解细胞外基质所有成分的能力,MMP-9(明胶酶 B)是 MMPs 的一员,能降解结缔组织及细胞外基质成分,从而在肿瘤侵袭转移和血管生成中发挥重要作用^[5]。近年来的研究表明基底膜和细胞外基质的降解,对肿瘤血管生成所必需的内皮细胞的迁移极为重要,故 MMP-9 成为肿瘤新生血管形成的关键因素之一^[9]。

环氧化酶-2(cyclooxygenase2, COX-2)是花生四烯酸合成前列腺素(PGs)的限速酶,COX-2 的过度表达与肿瘤新生血管的形成密切相关^[7]。有资料证实,COX-2 的确可使肿瘤中的 VEGF 表达上调,抑制 COX-2 则可抑制 VEGF 的表达。单一的 PGE2 在体内就可刺激血管的生成,外源性的 PGE2 可逆转吗啡美辛引起的 VEGF 表达的下调,提示 COX-2 来源的 PGE2 可能在新生血管的生成中发挥着重要作用。在 PC-3

前列腺癌细胞株中, 外源性的 PGE2 可使 COX- 2 抑制剂 NS2398 引起的 VEGF 表达的下调发生逆转^[8]。COX- 2 的催化产物 PGE2 可以通过依赖 PGE2 的途径诱导 MMP- 2 和 MMP- 9 生成^[9]。Callejas NA 等^[10]也发现在肝细胞中 COX- 2 上调 MMP- 2, MMP- 9 表达, COX- 2 在诱导肝细胞分泌有活性的 MMPs 中发挥了重要作用。大量的 MMP- 9 的分解基底膜和细胞外基质, 有利于成纤维细胞及内皮细胞等迁移并在其中生长, 促进形成新生血管。因此, 可以推断 COX- 2 不仅通过促进 MMP- 9 合成增加以降解细胞外基质和基底膜, 促进肿瘤的侵袭和转移, 还可以直接促进肿瘤组织中新生血管的形成, 增强了肿瘤的侵袭能力和转移能力。本试验利用免疫组化法在蛋白水平检测 PESV 对 COX- 2 和 MMP- 9 在前列腺癌细胞中的表达影响, 结果发现, 与对照组相比, COX- 2、MMP- 9 表达均下调, 且差异有统计学意义(P < 0.05); 进一步用 Rt-PCR 法在 mRNA 水平检测 PESV 对 MMP- 9 在前列腺癌细胞中表达影响, 结果亦发现其表达下调, 与对照组比较, 其差异有统计学意义(P < 0.05)。本研究结果充分证实了 PESV 不仅可以直接抑制 COX- 2 的表达, 还可以间接抑制 MMP- 9 的表达, 具有抑制肿瘤侵袭、转移和抗血管生成的双重作用。因此, 可以预见具有 COX- 2 抑制剂样作用的蝎毒多肽提取物 (PESV) 在抗肿瘤转移的治疗中, 将具有良好的应用前景。

参考文献

[1] Jemal A, Tiwari RC, Murray T, et al. Cancer Statistics, 2004[J]. CA Cancer J Clin., 2004, 54(1): 8- 29

[2] 张维东, 崔亚洲, 姚成芳, 等. 蝎毒多肽提取物抗肿瘤血管生成作用

用的实验研究报, 2005, 21(6): 708- 711

[3] 张维东, 崔亚洲, 武利存, 等. 蝎毒多肽提取物的抗血管生成作用[J]. 细胞生物学杂志, 2005, 27(3): 343- 346

[4] 张维东, 崔亚洲, 贾青, 等. 蝎毒多肽提取物对小鼠 S180 肉瘤和 H22 肝癌血管生成抑制作用的实验研究[J]. 山东中医药大学学报, 2005, 29(2): 152- 155

[5] Basset P, Bellocq JP, Wolf C, et al. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. Nature[J], 1990, 348(6303): 699- 704

[6] Shekhar MP, WerdeJJ, Santner SJ, et al. Breast stroma plays a dominant regulatory role in breast epithelial growth and differentiation: implication for tumor development and progression[J]. Cancer Res. 2001, 61(4): 1320- 1326

[7] Prescott SM, Fitzpatrick FA. Cyclooxygenase- 2 and carcinogenesis[J]. Biochim. Biophys. Acta., 2000, 1470(2): M69- 78

[8] Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, et al. Up- regulation of vascular endothelial growth factor by cobalt chloride- simulated hypoxia is mediated by persistent induction of cyclooxygenase- 2 in a metastatic human prostate cancer cell lines[J]. Clin. Exp. Metastasis, 1999, 17(8): 687- 694

[9] Cipolone F, Prontera C, Pini B, et al. Overexpression of Functionally Coupled Cyclooxygenase- 2 and Prostaglandin E Synthase in Symptomatic Atherosclerotic Plaques as a Basis of Prostaglandin E2- Dependent Plaque Instability [J]. Circulation, 2001, 104(8): 921- 927

[10] Callejas NA, Casado M, Diaz- Guerra MJ, et al. Expression of cyclooxygenase- 2 promotes the release of matrix metalloproteinase- 2 and - 9 in fetal rat hepatocytes[J]. Hepatology, 2001, 33(4): 860- 867

(图 A- 图 F 请见封3)

(上接第 7 页)

[3] Nemati M, Harrison S T L, Hansford G S, et al. Biological oxidation of ferrous sulphate by Thiobacillus ferrooxidans: a review on the kinetic aspects[J]. Biochemical Engineering Journal, 1998(1): 171- 190

[4] 柳建设, 张艳华. 嗜酸氧化亚铁硫杆菌生长动力学方程的应用. 现代生物医学进展, 2006, 6(2): 5- 8

[5] 谢建平, 刘新星, 刘文斌, 等. Acidithiobacillus ferrooxidans 中磁小体的提取. 生物磁学, 2005, 5(3): 7- 10

[6] 施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种学[M]. 北京: 科学出版社, 2003

[7] 周吉奎, 邱冠周, 钮因健, 等. 干燥保存对氧化亚铁硫杆菌(Fe2+)氧化活性的影响[J]. 中南大学学报(自然科学版), 2004, 35(1): 39- 42

[8] Cleland David, Krader Paul, McCree Coral et al. Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 58: 31- 38

[9] 李华, 骆艳娥, 刘延琳. 真空冷冻干燥微生物的研究进展[J]. 微生物学通报, 2002, 29(3): 78- 82

[10] Nowshari MA, Brem G. Effect of cryoprotectants and their concentration on post- thaw survival and development of expanded mouse blastocysts frozen by a simple rapid- freezing procedure[J]. Theriogenology. 1998, 50(7): 1001- 13

[11] Simone, F. P., Brown, E. M. (Eds.), 1991. ATCC Preservation

Methods: Freezing and Freeze- Drying[J]. American Type Culture Collection, Rockville, MD, 7- 13

[12] 张在海. 铜硫化矿细菌浸出高效菌种选育及浸出机理[D]. 长沙: 中南大学, 2002

[13] Mills CK, Gherna RL. Cryopreservation studies of Campylobacter[J]. Cryobiology, 1988, 25: 148- 152

[14] 李钟庆. 微生物菌种保藏[M]. 北京: 科学技术出版社, 1989

[15] Hubalek, Z., 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms[J]. Cryobiology 46, 205- 229

[16] 何少华, 文竹青, 姜涛. 实验设计与数据处理[M]. 长沙: 国防科技大学出版社, 2002

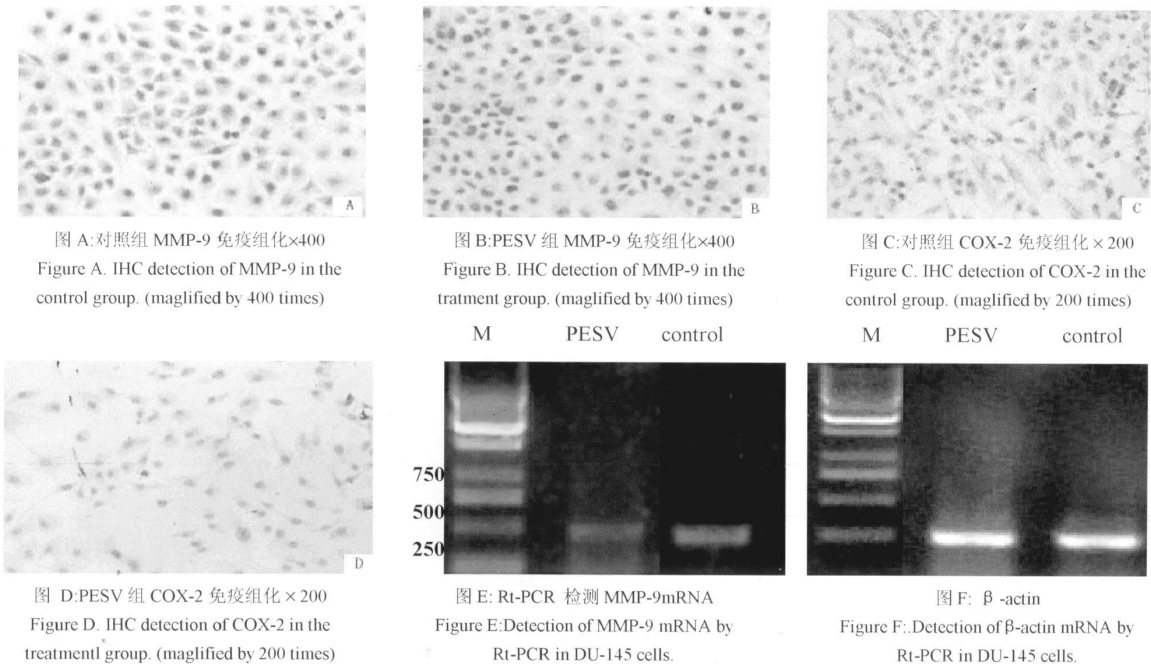
[17] Anchordoguy TJ, Rudolph AS, Carpenter JF, Crowe JH. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing[J]. Cryobiology. 1987 Aug, 24(4): 324- 31

[18] Charles L. Guy, Joan L. A. Huber, and Steven C. Huber. Sucrose Phosphate Synthase and Sucrose Accumulation at Low Temperature[J]. Plant Physiol. 1992 September, 100(1): 502- 508

[19] S. H. Loomis, J. F. Carpenter, T. J. Anchordoguy, John H. Crowe, B. R. Brandhini. Cryoprotective capacity of end products of anaerobic metabolism[J]. Journal of Experimental Zoology Volume, 1989, 252(1): 9- 15

蝎毒多肽提取物抑制 DU-145 细胞 COX-2 和 MMP-9 表达的研究

张月英 张维东 贾 青 王兆朋 黄山英 宋守琴 王朝霞
(山东省医学科学院基础所病理室 济南, 250062)



大鼠肠系膜淋巴结内高内皮微静脉周围网状支架的研究

郭文广 贺业春 贾立敏 谢遵江 朱保国
(哈尔滨医科大学大庆校区解剖教研室 黑龙江 大庆 163319)

