

福安泰-03 对高转移人卵巢癌细胞 HO-8910PM 侵袭能力的影响

廖铭能 徐海瑛 马润娣* 于立坚* 苏伟明 黄来珍 张霄瑜 于廷曦*
(广东海洋大学海洋药物研究与开发重点实验室, 湛江 524025)

摘要 应用噻唑蓝法检测从赤魮中分离到的福安泰-03 (Fuantai-03, FAT-03)对高转移人卵巢癌细胞 HO-8910PM 生长的影响; 人工重组基底膜检测 FAT-03 对细胞侵袭能力的影响; SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 FAT-03 对 HO-8910PM 细胞分泌 MMP-9 能力的影响。结果显示, FAT-03 (20.0、40.0、60.0 $\mu\text{g/ml}$)作用 HO-8910PM 细胞 24 h, 对细胞生长的抑制率小于 10%, 对细胞与纤维粘连蛋白(fibronectin, FN)和 Matrigel 粘附的抑制率分别为 15.1%、28.0% ($P<0.05$)、54.1% ($P<0.01$)和 14.7%、34.3% ($P<0.05$)、40.5% ($P<0.01$), 对细胞迁移的抑制率分别为 16.4%、33.8% ($P<0.05$)和 42.6% ($P<0.01$)。此外, FAT-03 显著减少 HO8910-PM 细胞分泌 MMP-9 的量, 并降低其活性。这些实验事实提示 FAT-03 能明显抑制 HO-8910PM 细胞的侵袭能力。

关键词 赤魮; 福安泰-03; 侵袭; MMP-9; 高转移人卵巢癌细胞株(HO-8910PM 细胞)

侵袭和转移是恶性肿瘤的基本生物学特征, 是肿瘤细胞与宿主细胞、细胞外基质之间一系列复杂的、多步骤的动态过程, 是多因素参与、多步骤完成的分子生物学变化, 也是临床上绝大多数肿瘤患者的致死因素^[1,2]。因此, 抑制肿瘤的侵袭和转移是治疗恶性肿瘤的有效策略。

此前我们已经报导赤魮(*Dasyatis akajei*)尾刺提取物具有抗肿瘤作用^[3], 赤魮组织粗提物和从赤魮组织中分离得到的福安肽(Fuantai)具有抗肿瘤活性^[4,5]和抗血管生成作用^[6]。然而, 福安肽的电泳图谱显示, 由分子量范围很宽的多种蛋白质肽类物质组成, 其成分比较复杂。本实验室以抑制血管生成作为同步追踪指标, 从福安肽中分离纯化得到具有强抗肿瘤血管生成活性的单一成分, 并测定其分子量和 N 末端氨基酸序列, 因其分子量较大, 是一种蛋白质, 姑且将其命名为福安泰-03 (Fuantai-03, FAT-03)。我们已经证实 FAT-03 对小鼠移植性肿瘤的生长和转移有显著的抑制效果^[7], 对血管生成也有强抑制作用^[8]。本文主要研究 FAT-03 对高转移人卵巢癌细胞株 HO-8910PM 侵袭能力的影响。

1 材料与方 法

1.1 试剂

新生牛血清购自杭州四季青生物材料有限公司; RPMI-1640 购自美国 Hyclone 公司; MTT、纤维粘

连蛋白(fibronectin, FN)、Matrigel、牛血清白蛋白(bovine serum albumen, BSA)、四甲基乙二胺(TEMED)、Triton-100、十二烷基磺酸钠(SDS)购自 Sigma 公司; 胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司; Transwell 小室(直径 6.5 cm、孔径 8 μm)购自美国 Costar 公司。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞株

高转移人卵巢癌细胞 HO-8910PM^[9], 购自广东医学院生物化学与分子生物学研究室。

1.3 细胞培养

HO-8910PM 细胞培养于含 10% 新生牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的 RPMI-1640 培养液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养。取对数生长期细胞用于实验。

1.4 MTT 试验

取对数生长期细胞接种于 96 孔板, 每孔 90 μl 细胞悬液(含 1.0×10^4 个细胞)。培养过夜后, 加入 10 μl 不同浓度的 FAT-03 溶液, 使终浓度分别为 20.0、40.0、60.0 $\mu\text{g/ml}$, 对照组则加入相同体积的培养液, 每一浓度设 3 个平行孔, 充分混匀, 培养 24 h。每孔加入 20 μl MTT (5 mg/ml), 继续培养 4~6 h。每孔

收稿日期: 2008-12-10 接受日期: 2009-05-13

国家自然科学基金(No.30271493)和广东省自然科学基金重点项目(No.021386)资助

* 通讯作者。Tel: 0759-2362480, Fax: 0759-2382424, E-mail: ywyj9578@sohu.com, mard@gdou.edu.cn, yutingxi@yahoo.com

加入 100 μl 三联液(1% SDS、5% 异丁醇、0.012 mol/L HCl, W/V/V)。37 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜后,用 DG-5031 型酶标仪在 570 nm 波长处测各孔 A 值^[10,11]。实验重复 3 次。以 Bliss 法计算半数抑制浓度,并按下列公式计算细胞生长抑制率。细胞生长抑制率(%)=(1- 实验组平均 A 值 / 对照组 A 值) \times 100%

1.5 细胞粘附能力检测

分别将 FN 和 Matrigel 铺于 96 孔板(每孔 5.0 μg),置超净台上风干。用 50 μl 含 2% BSA 的培养液封闭 1 h, PBS 洗 2 次。将 20.0、40.0 和 60.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FAT-03 处理 24 h 的 HO-8910PM 细胞重悬于含 0.1% BSA 的无血清培养液中,调整其浓度至 8×10^5 个/ml。每孔加 100 μl 细胞悬液,对照组为未经 FAT-03 处理的 HO-8910PM 细胞。每一浓度设 3 个平行孔。温育 1 h,吸去培养液。加入 200 μl 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 PBS 轻轻吹打 10 次,重复 3 次,以洗去未粘附的细胞。加入 100 μl 以无血清培养液溶解的 MTT (0.1 mg),继续培养 4 h。加入 100 μl 三联液,37 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜。然后用 DG-5031 型酶标仪在 570 nm 波长处测量 A 值^[12]。按下式计算细胞粘附抑制率。粘附抑制率(%)=(1- 实验组 A 值 / 对照组 A 值) \times 100%

1.6 细胞迁移能力检测

采用 24 孔带有聚碳酸酯膜小室的培养板,下室加入 600 μl 含 50 ng/ml 血管内皮细胞生长因子(VEGF)的 RPMI-1640 培养液,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h 备用。将经 20.0、40.0 和 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FAT-03 处理 24 h 的细胞悬液 200 μl (含 2.0×10^4 个细胞)加入上室,对照组为未经 FAT-03 处理的细胞,设 3 个平行孔。细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下迁移 4 h。取出小室,迁移到下表面的细胞以 3% 的福尔马林固定,用 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 碘化丙锭染色。在 100 倍荧光显微镜下随机选择 5 个视野,计数每个视野穿过膜的细胞数^[13]。实验重复 3 次。按下式计算迁移抑制率。迁移抑制率(%)=(1- 实验组迁移细胞数 / 对照组迁移细胞数) \times 100%

1.7 明胶酶谱分析

1.7.1 胶原酶分泌 将对数生长期 HO-8910PM 细胞接种于 24 孔板,每孔 400 μl 细胞悬液(含 8×10^4 个细胞),培养过夜。弃去培养液, PBS 洗 2 次,换无血清培养液培养 1 h。弃去培养液, PBS 洗 2 次,加入 360 μl 无血清培养液,同时分别加入 40 μl 不同浓度的 FAT-03 液,使其终浓度为 20.0、40.0 和 60.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$,继续培养 24 h。收集上清液离心去除细胞碎片。计活细胞数,按照活细胞数取相应体积的上清液与等

体积的上样缓冲液混合,分离胶中加入终浓度为 1 g/L 的明胶,常规聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-poly-acrylamide gelelectrophoresis, SDS-PAGE) 3~4 h,当溴酚蓝刚好逸出时停止电泳,剥胶。蒸馏水漂洗数次,转移到 100 ml 2.5% Triton-100 溶液中,在摇床上低速摇动以洗脱 SDS。30 min 后,换新 Triton-100 溶液,继续洗脱 1 h。蒸馏水漂洗,加 100 ml 明胶酶缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl、10 mmol/L CaCl_2 、200 mmol/L NaCl、1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ZnCl_2 , pH 7.5),在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中温育 12~16 h。取出凝胶,蒸馏水漂洗,放入染色液(0.1% 考马斯亮蓝 R-250,以甲醇:水:冰醋酸=45:45:10 溶解)中染色 4 h,漂洗后在脱色液(甲醇:水:冰醋酸=45:45:10)中脱色 1~2 h 至对照出现清晰的负染酶带^[14,15]。采用上海复日科技 Smart view 生物电泳图象分析系统对电泳条带进行密度扫描,结果以条图表示。

1.7.2 胶原酶活性 将 HO-8910PM 细胞悬液接种于培养瓶内(4 ml,含 8×10^5 个细胞)培养 24 h。无血清培养液洗 3 次,加入 4 ml 无血清培养液继续培养 24 h。收集上清液,200 r/min 低速离心去除细胞碎片。取 50 μl 上清液与 10 μl 的 6 倍上样缓冲液混合,按 1.7.1 条件电泳。剥离胶前先把胶切成一定宽度的条状,按 1.7.1 条件洗脱。放入已加入明胶酶缓冲液的杂交袋中,同时分别加入 200 μl 不同浓度的 FAT-03 液,使其终浓度分别为 20.0、40.0 和 60.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。密封杂交袋,做好标记,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中温育 96 h。其余步骤同 1.7.1。

2 结果

2.1 FAT-03 抑制 HO-8910PM 细胞与 FN 和 Matrigel 的粘附

20.0、40.0、60.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FAT-03 作用 HO-8910PM 细胞 24 h,对其生长的抑制率小于 10%,对其与 FN 粘附的抑制率分别为 15.1%、28.0%、54.1%,对其与 Matrigel 粘附的抑制率分别为 14.7%、34.3%、40.5%。差异有统计学意义,并呈一定的量效依赖关系(图 1)。

2.2 FAT-03 抑制 HO-8910PM 细胞的迁移

60.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FAT-03 作用 HO-8910PM 细胞 24 h,细胞的迁移能力受到显著抑制(图 2)。20.0、40.0 和 60.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FAT-03 对 HO-8910PM 细胞迁移的抑制率分别为 16.4% ($P<0.05$)、33.8% 和 42.6% ($P<0.01$),呈一定的量效依赖关系。

2.3 FAT-03 抑制 HO-8910PM 细胞 IV 型胶原酶 MMP-9 的分泌及其活力

实验结果表明, FAT-03 作用 HO-8910PM 细胞 24 h, 显著抑制细胞分泌 MMP-9 (图 3 和图 5A); FAT-03

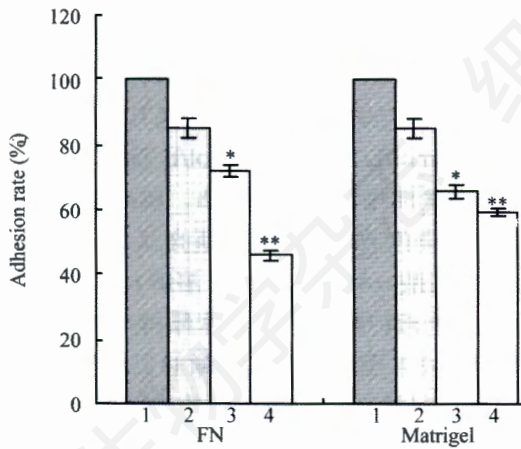


Fig.1 Inhibitory effects of FAT-03 on adhesion of HO-8910PM cells to FN and Matrigel

1: control; 2: 20 µg/ml FAT-03; 3: 40 µg/ml FAT-03; 4: 60 µg/ml FAT-03. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control.

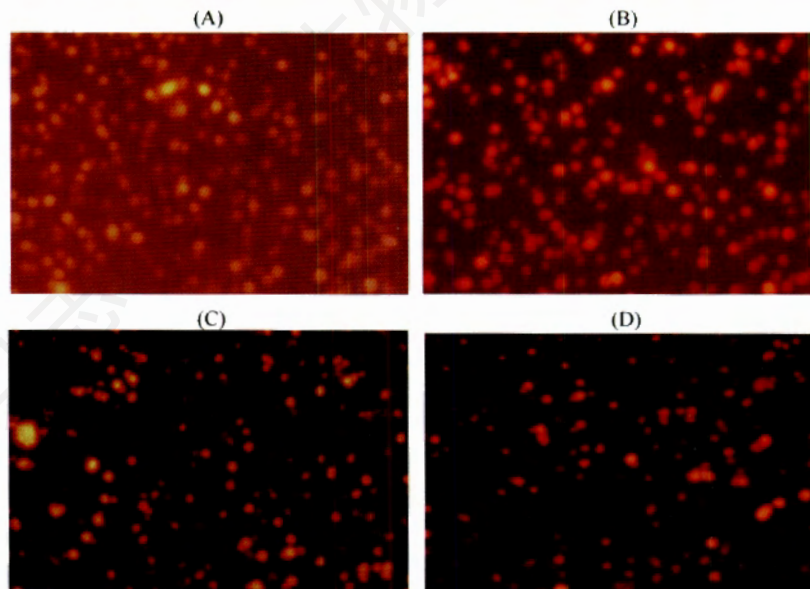


Fig.2 Inhibitory effect of FAT-03 on the migration ability of HO-8910PM cells (100×).

A: control; B: 20.0 µg/ml FAT-03; C: 40.0 µg/ml FAT-03; D: 60.0 µg/ml FAT-03.



Fig.3 Inhibitory effect of FAT-03 on the secretion of MMP-9 by HO-8910PM cells

M: marker; 1: control; 2: 20 µg/ml FAT-03; 3: 40 µg/ml FAT-03; 4: 60 µg/ml FAT-03.

作用 MMP-9 96 h, 激活形式的 MMP-9 (86 kDa) 显著降低, 并呈一定的量效依赖关系(图 4 和图 5B)。

3 讨论

肿瘤的侵袭转移过程大体上可分为三步: 原发灶侵袭、转移细胞通过与基底膜表面整合素、非整合素受体等结合而粘附其上; 释放多种基质蛋白酶, 降解由细胞间质与基底膜组成的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分, 打破 ECM 的动态平衡; 穿越 ECM 破损处, 侵入局部血管、淋巴管, 在远端位突破毛细血管形成“种子”, 长出新生血管, 供给瘤体营养, 最终形成新转移灶。此三个基本步骤可循环反复、不断演进。因此, 抑制细胞粘附和迁移, 抑制基质蛋白酶分泌和活力, 抗肿瘤血管生成的物质均可抑制恶性肿瘤细胞的侵袭和转移。

IV型胶原酶(type IV collagenase), 也称基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)或明胶酶(gelatinase), 其中 Zn^{2+} 依赖性 72000 IV型胶原酶 A (MMP-2)和 92000 IV型胶原酶 B (MMP-9)与肿瘤侵袭



Fig.4 Inhibitory effect of FAT-03 on the activity of MMP-9 by HO-8910PM cells

M: marker; 1: control; 2: 20 µg/ml FAT-03; 3: 40 µg/ml FAT-03; 4: 60 µg/ml FAT-03.

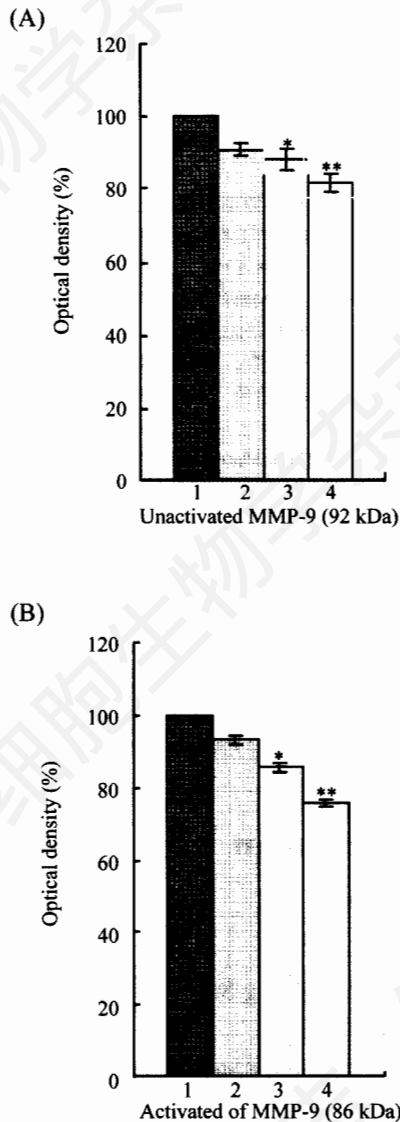


Fig.5 Inhibitory effects of FAT-03 on the secretion of MMP-9 by HO-8910PM cells and its activity

A: unactivated MMP-9 (92 kDa); B: activated MMP-9 (86 kDa). 1: control; 2: 20 µg/ml FAT-03; 3: 40 µg/ml FAT-03; 4: 60 µg/ml FAT-03. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control.

和转移的关系是基质金属蛋白酶研究中的热点。IV型胶原酶能降解组成基质膜的IV型胶原,其在肿瘤组织中的过度表达和活力增强与肿瘤的侵袭转移和恶性进展密切相关^[16,17]。

高转移人卵巢癌细胞HO-8910PM体外生物学性状稳定,裸鼠皮下移植自发转移,皮下移植瘤和转移瘤保持原始人卵巢低分化浆液性囊腺癌的形态学特性,且有分泌孕酮的功能。已有多位作者采用这一细胞株进行细胞侵袭的实验研究^[18,19]。HO-8910PM细胞主要分泌MMP-9。

MMP-9 mRNA的高表达及MMP-9和它的组织

抑制物(TMP-1)平衡调节失衡导致卵巢上皮性肿瘤的发生发展^[20];上皮性卵巢癌组织中,MMP-9表达上调,其在上皮性卵巢癌的生长和转移过程中发挥着重要作用^[21];血清MMP-9含量在卵巢恶性肿瘤病例中异常升高,可作为卵巢恶性肿瘤有价值的诊断、评价手术效果以及判断复发的指标^[22]。

基质金属蛋白酶属于锌依赖蛋白酶大家族,其主要功能是消化细胞外基质成分^[23],也涉及多种生长因子和细胞因子的释放和激活^[24]。金属蛋白酶降解基质膜是肿瘤血管生成的一个关键步骤,而金属蛋白酶抑制剂能够抑制肿瘤血管生成,进而抑制肿瘤的生长和转移^[25]。

我们以前的实验已经证明FAT-03对小鼠移植性肿瘤的生长和转移有显著的抑制效果^[7],对肿瘤血管生成也有强抑制作用^[8]。本文的研究结果提示,FAT-03能显著抑制HO-8910PM细胞的粘附和迁移,有效抑制HO-8910PM细胞分泌MMP-9及其活性。正是由于MMP既能消化细胞外基质成分,又有促肿瘤血管生成的作用,所以作为强血管生成抑制剂FAE-03能够有强抗肿瘤生长和转移的效果。

参考文献(References)

- [1] 苏剑敏, 桂律, 周逸平, 等。粘着斑激酶在肿瘤中的表达及其临床意义, *中国肿瘤*, 2002, 11(11): 670-672
- [2] 高进, 章静波, 林建银, 等。肿瘤侵袭与转移的分子生物学机制。见: 高进, 章静波, 主编。《癌的侵袭和转移基础与临床》, 北京: 科学出版社, 2003, 84-118
- [3] 苏伟明, 马润娣, 于立坚。赤缸尾刺提取物的抗肿瘤作用, *广东海洋大学学报*, 2007, 27(6): 84-85
- [4] 廖铭能, 于立坚, 马润娣, 等。赤缸组织粗提物的抗肿瘤作用, *广东海洋大学学报*, 2008, 28(1): 53-56
- [5] 苏伟明, 于立坚, 马润娣, 等。从赤缸组织中分离到的福安肽的抗肿瘤活性的初步研究, *中国生化药物杂志*, 2008, 29(1): 9-11
- [6] 廖铭能, 于立坚, 马润娣, 等。从赤缸组织中分离到的福安肽的抗血管生成作用, *中国生化药物杂志*, 2008, 29(4): 217-220
- [7] 马润娣, 于立坚, 徐海英, 等。福安泰-03灌胃对小鼠Lewis肺癌和B16黑色素瘤生长和转移及其血管生成的影响, *中国药理学通报*, 2009, 待发表
- [8] 于立坚, 马润娣, 廖铭能, 等。福安泰-03对肿瘤血管生成的抑制作用, *中国药理学通报*, 2008, 24(11): 1445-1449
- [9] 许沈华, 钱丽娟, 牟瀚舟, 等。高转移人卵巢癌细胞系HO-28910PM的建立及其生物学特性, *中华病理学杂志*, 1998, 27(6): 154
- [10] Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill, *J Immunol Methods*, 1989, 119(2): 203-210
- [11] Ma R, Song G, You W, et al. Anti-microtubule activity of

- tubeimoside I and its colchicine binding site of tubulin, *Cancer Chemother Pharmacol*, 2008, 62(4): 559-568
- [12] Sato Y, Fujiwara H, Zeng BX, *et al.* Platelet-derived soluble factors induce human extravillous trophoblast migration and differentiation: platelets are a possible regulator of trophoblast infiltration into maternal spiral arteries, *Blood*, 2005, 106(2): 428-435
- [13] Li L, Liu RY, Huang JL, *et al.* Adenovirus-mediated intratumoral delivery of the endostatin gene inhibits tumor growth in nasopharyngeal carcinoma, *Int J Cancer*, 2006, 118(8): 2064-2071
- [14] 于立坚, 马润娣, 王长秀, 等. 土贝母苷甲对人高转移巨细胞肺癌 PGCL3 细胞粘附、侵袭和迁移能力的影响, *中国天然药物*, 2008, 6(2): 135-140
- [15] Hendrx MJ, Wood WR, Seftor EA, *et al.* Retinoic acid inhibition of human melanoma cell invasion through a reconstituted basement membrane and its relation to decreases in the expression of proteolytic enzymes and motility factor receptor, *Cancer Res*, 1990, 50(13): 4121-4130
- [16] Parsons SL, Watson SA, Brown PD, *et al.* Matrix metalloproteinases, *Br J Surg*, 1997, 84(2): 160-166
- [17] Reich R, Thompson EW, Iwamoto Y, *et al.* Effects of inhibitors of plasminogen activator, serine proteinases, and collagenase IV on the invasion of basement membranes by metastatic cells, *Cancer Res*, 1988, 48(12): 3307-3312
- [18] 朱峰, 刘新光, 梁念慈. 大黄素、芹菜素抑制人卵巢癌细胞侵袭的体外实验研究, *癌症*, 2003, 22(4): 358-362
- [19] 何太平, 莫丽儿, 梁念慈. 斑蝥素抑制人高转移卵巢癌细胞 HO-8910PM 侵袭转移的体外实验研究, *癌症*, 2005, 24(4): 443-447
- [20] 刘霞, 张淑兰, 高红. 卵巢上皮性肿瘤中基质金属蛋白酶 MMP-9 及其组织抑制剂 TIMP-1mRNA 的表达及意义, *妇科肿瘤*, 2008, 16(10): 1748-1751
- [21] 李道成, 梁立治, 邓高丕. MMP-9 在上皮性卵巢癌组织中的表达及临床意义, *实用癌症杂志*, 2008, 23(1): 1-2
- [22] 周杰, 李力, 王素梅, 等. 测定卵巢恶性肿瘤患者血清基质金属蛋白酶-9 的临床价值, *实用妇科杂志*, 2008, 24(6): 643-646
- [23] Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases, *J Biol Chem*, 1999, 274(31): 21491-21494
- [24] Fowlkes JL, Winkler MK. Exploring the interface between metallo-proteinase activity and growth factor and cytokine bioavailability, *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002, 13(3): 277-287
- [25] Yoshida D, Noha M, Watanabe K, *et al.* Novel approach to analysis of in vitro tumor angiogenesis with a variable-pressure scanning electron microscope: suppression by matrix metalloproteinase inhibitor SI-27, *Brain Tumor Pathol*, 2001, 18(2): 89-100

Effect of Fuantai-03 on Invasion of Human Ovarian Cancer HO-8910PM Cells

Ming-Neng Liao, Hai-Ying Xu, Run-Di Ma*, Li-Jian Yu*, Wei-Ming Su,
Lai-Zhen Huang, Xiao-Yu Zhang, Ting-Xi Yu*

(Key Laboratory of Marine Materia Medica, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract MTT assay was adapted to measure the effect of Fuantai-03 (FAT-03) isolated from *Dasyatis akajei* on the growth of human ovarian cancer HO-8910PM cells; artificial reconstituted basement membrane was utilized to evaluate the invasive activity; SDS-PAGE was employed to analyze the effects of FAT-03 on the activity and secretion of MMP-9 by HO-8910PM cells. The results showed that cell growth inhibition rates were <10% after the treatment of HO-8910PM with FAT-03 (20.0, 40.0, 60.0 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h, and that FAT-03 (20.0, 40.0, 60.0 $\mu\text{g/ml}$) inhibited HO-8910PM cells to adhere to the basement membrane components FN and Matrigel by 15.1%, 28.0% ($P<0.05$), 54.1% ($P<0.01$), and 14.7%, 34.3% ($P<0.05$), 40.5% ($P<0.01$), respectively, and decreased the percentages of locomoting and migrating HO-8910PM cells by 16.4%, 33.8% ($P<0.05$), 42.6% ($P<0.01$), respectively. In addition, FAT-03 significantly inhibited the activity of MMP-9 and its secretion by HO-8910PM cells in a dose-dependant manner. These experimental facts suggest that FAT-03 can significantly inhibit the invasion of HO-8910PM cells.

Key words *Dasyatis akajei*; FAT-03; invasion; MMP-9; HO-8910PM cells

Received: December 10, 2008 Accepted: May 13, 2009

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30271493) and the Key Program of the Natural Science Foundation of Guangdong Province (No.021386)

*Corresponding authors. Tel: 86-759-2362480, Fax: 86-759-2382424, E-mail: ywyj9578@sohu.com, mard@gdou.edu.cn, yutingxi@yahoo.com