

·论 著·

隐丹参酮联合顺铂对非小细胞肺癌PC9细胞MMP-9、MMP-2、p-ERK1/2表达和迁移侵袭的影响

马蒙恩 雷俊华 许冠华

[摘要] 目的 研究隐丹参酮(CPT)联合顺铂(DDP)作用于肺癌细胞PC9细胞后,基质金属蛋白酶2(MMP-2)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)和磷酸化细胞外信号调节激酶1/2(p-ERK1/2)的表达及其对细胞生长迁移能力的影响。方法 体外培养PC9细胞细胞株,分为空白对照组、CPT组、DDP组及CPT联合DDP组,CCK-8法检测各组PC9细胞的增殖情况,免疫印迹技术检测MMP-2、MMP-9、p-ERK1/2蛋白的表达水平,RT-PCR检测MMP-9及MMP-2的mRNA转录水平,Trasswell技术检测用药后PC9细胞的穿透滤膜数。结果 与空白对照组、5 μg/ml DDP、10 μmol/L CPT相比,5 μg/ml DDP+10 μmol/L CPT组细胞存活率明显降低(t 分别=11.82、9.00、7.88, P 均 <0.05),MMP-9、MMP-2蛋白表达水平明显下调(t 分别=9.82、8.02、7.83;13.66、1.76、7.40, P 均 <0.05),p-ERK1/2蛋白表达水平明显下降(t 分别=11.50、17.75、10.72, P 均 <0.05),PC9细胞穿透滤膜数目明显减少,迁移能力降低。结论 CPT联合DDP可通过下调MMP-2、MMP-9、p-ERK1/2的表达,抑制非小细胞肺癌细胞的迁移和侵袭。**[关键词]** 隐丹参酮; 非小细胞肺癌; 基质金属蛋白酶2; 基质金属蛋白酶9; 磷酸化细胞外信号调节激酶1/2

Effect of cryptotanshinone combined with cisplatin on MMP-9, MMP-2, p-ERK1/2 expressions and migration and invasion in non-small cell lung cancer PC9 cell MA Meng'en, LEI Junhua, XU Guanhua. Department of Oncology, First People's Hospital of Hangzhou Xiaoshan District, Hangzhou 311200, China.

[Abstract] **Objective** To investigate the expressions of MMP-2, MMP-9 and p-ERK1/2, the effects on cell growth, migration and invasion after NSCLC PC9 cell stimulated by cryptotanshinone combined with cisplatin. **Methods** PC9 cells were divided into control group, cryptotanshinone group, cisplatin group and cryptotanshinone combined cisplatin group. The proliferation of PC9 cells was determined by CCK-8 assay, the levels of MMP-2, MMP-9, p-ERK1/2 were detected by Western blot, the mRNA level MMP-2 and MMP-9 were detected by RT-PCR, the number of penetrating filter membranes of PC9 was detected by Trasswell technology. **Results** Compared to the control group, 5 μg/ml cisplatin group, and 10 μmol/L cryptotanshinone group, the survival rate of cell proliferation of cryptotanshinone combined cisplatin group was significantly lower ($t=11.82, 9.00, 7.88, P<0.05$), the expressions of MMP-2, MMP-9, p-ERK1/2 were significantly lower ($t=9.82, 8.02, 7.83, 13.66, 1.76, 7.40, 11.50, 17.75, 10.72, P<0.05$), and the number of cells penetrating the membrane was significantly decreasing. **Conclusion** Cryptotanshinone combined with cisplatin can inhibit the migration and invasion of NSCLC cells by down-regulating the expressions of MMP-2, MMP-9, and p-ERK1/2.

[Key words] cryptotanshinone; non-small cell lung cancer; MMP-2; MMP-9; p-ERK1/2

DOI:10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2020.008.004

基金项目: 海南省卫生计生行业科研项目(1601320674A2001); 杭州市卫生科技计划一般项目(2016B14); 杭州市科技计划引导项目(20163501Y69)

作者单位: 311200 浙江杭州, 杭州市萧山区第一人民医院肿瘤内科(马蒙恩), 重症医学科(许冠华); 海南医学院第一附属医院肿瘤内科(雷俊华)

通讯作者: 许冠华, Email: guanxi5220@163.com

肺癌居于全球恶性肿瘤发病率和死亡率首位, 5年生存率仅为10%~15%^[1]。由于临床症状出现较晚, 患者就诊时已发生转移, 转移和侵袭是高死亡率的主要原因。细胞外调节蛋白激酶1/2(extracellular regulated protein kinases, ERK1/2)信号通路

是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路家族中的一员,其异常激活与细胞增殖和恶性肿瘤的侵袭、转移密切相关,其活化后可进一步激活其下游的基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase 2, MMP-2)及基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)表达^[2,3]。而MMP-2、MMP-9与肿瘤细胞的侵袭转移关系密切^[4]。隐丹参酮(cryptotanshinone, CPT)具有抑制细胞增殖、促进凋亡、影响细胞周期分布以及促进分化等抗肿瘤作用^[5]。本研究拟通过体外研究探索CPT联合顺铂(cisplatin, DDP)诱导人肺腺癌PC9细胞后,磷酸化ERK1/2(phospho ERK1/2, p-ERK1/2)、MMP-2、MMP-9表达情况,进一步探讨其与肺癌侵袭转移的关系,为CPT联合DDP抗肿瘤临床应用提供理论基础和数据支撑。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 主要试剂:CPT(由成都曼思特生物科技有限公司生产)、DDP(由德州德药有限公司生产),多克隆兔一抗MMP-2、MMP-9(由美国Santa cruz公司生产)、p-ERK1/2(由Santa Cruze公司生产)、多克隆兔二抗 β -Actin(由美国CST公司生产),RPMI-1640培养液(由美国Gibco化学试剂公司生产)。主要仪器:多功能全波长酶标仪(由Thermo公司生产),蛋白印记检测系统(由Bio-rad公司生产),超低温冰箱(由Bio-rad公司生产),凝胶成像系统(由Bio-rad公司生产),荧光定量PCR仪(由美国RD公司生产),OLYMPUS显微镜(由日本奥林巴斯有限公司生产),逆转录试剂盒/iTaq Universal SYBR Green Supermix(由Bio-rad公司生产)。

1.2 方法 本次研究时间为2018年1月至2018年9月。

1.2.1 细胞培养 人肺癌细胞株PC9培养于RPMI1640培养基(含10%胎牛血清、1%双抗)中,置于37℃、5%CO₂培养箱,隔天换液,待细胞生长至80%~90%时,用0.1%胰酶消化并传代,选取对数生长期的PC9细胞用于实验。

1.2.2 CCK-8法检测各组PC9细胞增殖抑制率 取人肺癌PC9细胞常规消化、离心、重悬,接种于96孔板(4×10³个/孔),24 h后给药。分为4组,CPT组共有3个浓度:分别为7.5 μmol/L、10 μmol/L、12.5 μmol/L,DDP组共有3个浓度:分别为2.5 μg/ml、5 μg/ml、7.5 μg/ml,联合用药组:5 μg/ml DDP+

10 μmol/L CPT,每组3个复孔,同时设定RPMI-1640培养基为空白对照组。给药后,每孔加入10 μl CCK-8,继续培养2 h,测定490 nm光密度(optical density, OD)值,计算细胞存活率,实验重复3次取平均值。联合用药组细胞存活率最接近50%的药物浓度后行后续实验。

细胞存活率(%)=实验组OD值/对照组OD值×100%。

1.2.3 免疫印迹技术检测各组MMP-9、MMP-2、p-ERK1/2蛋白表达水平 取对数生长期的PC9细胞,给予药物处理并分为4组:空白对照组、10 μmol/L CPT组、5 μg/ml DDP组、10 μmol/L CPT+5 μg/ml DDP组,加药24 h后收集细胞,加入细胞裂解液,冰浴30 min,12 000 r/min离心5 min,取上清液,BSA法蛋白定量,100℃水温箱变性5 min,置于-30℃冰箱备用,常规电泳,转膜,封闭1 h,一抗(1:1000),4℃孵育过夜,二抗(1:1000),室温孵育2 h,增强化学发光法(enhanced chemiluminescence, ECL)显色。Quantity one软件进行蛋白条带的灰度值分析。

1.2.4 Transwell技术检测各组PC9细胞迁移能力 每孔加入600 μl培养基至24孔板,Transwell内室加入100 μl培养基(含4×10⁴/孔),按照1.2.3方法给药处理,24 h后,棉签擦去聚碳酸脂微孔滤膜上室细胞,磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤3次,4%多聚甲醛室温固定30 min, PBS清洗凉干,加入0.2 ml结晶紫染液,室温放置20 min,双蒸水洗涤、晾干,切下聚碳酸脂微孔滤膜,中性树胶封片,随机选取5个视野计数。

1.3 统计学方法 应用SPSS 19.0软件进行统计学分析,定量数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组数据比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组PC9细胞存活率比较见表1

由表1可见,与空白对照组相比,7.5 μmol/L、10 μmol/L、12.5 μmol/L CPT浓度组细胞存活率依次降低(*t*分别=9.75、15.32、24.90, P 均 < 0.05);与空白对照组相比,2.5 μg/ml、5 μg/ml、7.5 μg/ml DDP浓度组细胞存活率依次降低(*t*分别=3.22、9.11、13.78, P 均 < 0.05);与空白对照组、5 μg/ml DDP、10 μmol/L CPT相比,5 μg/ml DDP+10 μmol/L CPT组细胞存活率明显降低,差异均有统计学意义(*t*分别=11.82、9.00、7.88, P 均 < 0.05)。

表1 各组PC9细胞存活率比较/%

组别	n	PC9细胞存活率
空白对照组	3	100
2.5 μg/ml DDP组	3	84.32 ± 2.34*
5 μg/ml DDP组	3	70.62 ± 2.01*
7.5 μg/ml DDP组	3	57.62 ± 2.21*
7.5 μmol/L CPT组	3	92.31 ± 2.67*
10 μmol/L CPT组	3	76.31 ± 3.04*
12.5 μmol/L CPT组	3	64.47 ± 3.22*
5 μg/ml DDP+10 μmol/L CPT组	3	50.13 ± 2.01** [△]

注: *: 与空白对照组比较, $P < 0.05$; #: 与 5 μg/ml DDP组比较, $P < 0.05$; [△]: 与 10 μmol/L CPT组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 CPT联合DDP作用于PC9细胞后MMP-9、MMP-2蛋白表达水平见图1

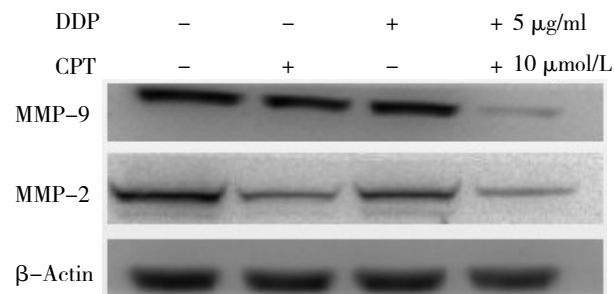


图1 药物作用于PC9细胞后MMP-9、MMP-2蛋白的表达水平

由图1可见,与空白对照组、5 μg/ml DDP组、10 μmol/L CPT组相比,5 μg/ml DDP+10 μmol/L CPT组细胞MMP-9、MMP-2蛋白表达水平明显下调,差异有统计学意义(t 分别=9.82、8.02、7.83; 13.66、1.76、7.40, P 均 < 0.05)。

2.3 CPT联合DDP下调PC9细胞MAPK信号通路中p-ERK1/2蛋白的表达见图2

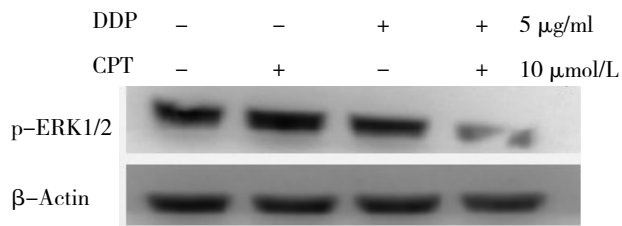


图2 不同药物作用于PC9细胞后p-ERK1/2蛋白表达水平

由图2可见,与空白对照组、5 μg/ml DDP组、10 μmol/L CPT组相比,5 μg/ml DDP+10 μmol/L CPT组p-ERK1/2蛋白表达水平明显下降(t 分别=11.50、17.75、10.72, P 均 < 0.05)。

2.4 CPT联合DDP作用于PC9细胞对生长迁移的

影响见图3

由图3可见,与空白对照组、5 μg/ml DDP组、10 μmol/L CPT组相比,5 μg/ml DDP+10 μmol/L CPT组PC9细胞穿透滤膜数目明显减少,迁移能力降低。

3 讨论

研究发现CPT通过抑制人胆管癌HCCC-9810细胞周期及抑制基因Survivin表达从而诱导细胞凋亡^[6]。此外,CPT可阻滞人纤维肉瘤HT-1080细胞于G0/G1期抑制细胞增殖并诱导其凋亡^[7]。本研究发现,CPT和DDP单用或联合应用,均可抑制肺腺癌PC9细胞的增殖活性,且呈负相关。尤其是CPT联合DDP作用于PC9细胞后,其增殖活性明显下降,提示CPT可增强肺腺癌PC9细胞对DDP的敏感性,其机制可能与促进肿瘤细胞凋亡有关。

导致肺癌患者死亡的主要原因是肿瘤细胞的侵袭和转移,侵袭转移与机体自身因素及肺癌的肿瘤生物学行为有关^[8,9]。肿瘤细胞侵袭能力与其诱导产生的蛋白酶降解细胞外基质和基底膜的能力密切相关。MMPs是一个多基因家族,其中MMP-2和MMP-9是肺癌中研究较多的基质金属蛋白酶^[10,11],可降解各种细胞外基质成分并破坏基膜,在肿瘤侵袭转移过程中起关键性作用。肿瘤细胞MMP-2、MMP-9的分泌增多,基底膜溶解破坏,细胞外基质减少或消失,使肿瘤细胞易于离开原发灶形成转移^[12-14]。有研究发现细胞侵袭转移能力受到抑制的同时MMP-2、MMP-9也出现同步下调^[15,16]。本研究发现10 μmol/L CPT联合5 μg/ml DDP作用于细胞24 h后,MMP-2、MMP-9蛋白及基因转录水平明显下降且穿膜细胞数量明显减少,提示联合用药可以明显抑制肺腺癌PC9细胞迁移能力。

ERK1/2是介导细胞增殖和肿瘤形成的一条重要通路,p-ERK1/2参与细胞增殖与分化^[17,18]。冯城婷等^[19]研究结果提示ERK通路异常活化与乳腺癌生长和浸润有关,ERK通路可能通过促进血管生成及降解基底膜发挥促进乳腺癌进展的作用。刘宏侠等^[20]研究表明p-ERK在非小细胞肺癌中高表达,且低分化、有淋巴结转移、Ⅲ~Ⅳ期表达更高,表明p-ERK在肺癌侵袭、转移进展中起着促进作用。本研究发现,10 μmol/L CPT联合5 μg/ml DDP作用于PC9细胞24 h,p-ERK1/2蛋白表达水平明显下降。提示CPT可协同DDP抑制肿瘤细胞的发生与发展。

综上所述,CPT联合DDP能够有效地抑制人肺

癌细胞PC9增殖、转移、侵袭,其机制可能与下调p-ERK1/2蛋白表达及MMP-2、MMP-9蛋白和基因转录水平有关。CPT作为中药提取的有效成分,其较小的毒副作用,良好的抗肿瘤作用,其协同抗肿瘤作用值得进一步研究。

参考文献

- Huang CY, Au KK, Chen SL, et al. Unfavorable mortality-to-incidence ratio of lung cancer is associated with health care disparity[J]. *Int J Environ Res Public Heal*, 2018, 15(12):2889.
- Beutel B, Song J, Konken CP, et al. New in vivo compatible matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 inhibitors[J]. *Bioconjugate Chem*, 2018, 29(11):3715-3725.
- 汤国辉, 谢远杰, 刘丽兵, 等. ERK1/2与MMP2在结肠癌中的表达及意义[J]. *诊断病理学杂志*, 2016, 23(10):784-788.
- Song CL, Zhu SC, Wu CY, et al. Histone deacetylase(HDAC) 10 suppresses cervical cancer metastasis through inhibition of matrix metalloproteinase(MMP) 2 and 9 expression[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(39):28021-28033.
- 陈春雷, 弓建华, 缪辉来, 等. CPT对人胆管癌HCCC-9810细胞中Survivin基因表达的影响[J]. *广东医学*, 2011, 32(23):3028-3031.
- 陈伟达, 罗成华, 苗成利. CPT对人纤维肉瘤HT-1080细胞增殖和凋亡影响[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2019, 154(7):457-462.
- Geng F, Jiang ZS, Song XG, et al. Mdig suppresses epithelial-mesenchymal transition and inhibits the invasion and metastasis of non-small cell lung cancer via regulating GSK-3 β / β -catenin signaling[J]. *Int J Oncol*, 2017, 51(6):1898-1908.
- 张峰, 张媛, 孙立新, 等. H226细胞和肺癌及其淋巴结转移组织CPA4表达以及生物学功能研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2019, 26(6):366-372.
- Chou CK, Wu CY, Chen JYF, et al. Bub R1 acts as a promoter in cellular motility of human oral squamous cancer cells through regulating MMP-2 and MMP-9[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(7):15104-15117.
- 李晓海, 穆维新, 王耀贤, 等. 2型糖尿病并发肺癌患者癌组织基质金属蛋白酶-2和9的表达[J]. *山西医药杂志*, 2018, 47(6):642-643.
- Desmeules P, Trudel D, Turcotte S, et al. Prognostic significance of TIMP-2, MMP-2, and MMP-9 on high-grade serous ovarian carcinoma using digital image analysis[J]. *Hum Pathol*, 2015, 46(5):739-745.
- 孙健, 张磊, 房丹, 等. RECK及MMP-2、MMP-9在神经母细胞瘤组织中的表达与肿瘤侵袭转移研究[J]. *中华小儿外科杂志*, 2019, 40(2):167-171.
- 张萌, 张向东, 夏永欣, 等. 钙周期素结合蛋白促进胃癌细胞迁移侵袭和MMP-2、MMP-9、p-ERK1/2、p-AKT水平上调[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2019(2):134-141.
- Yang L, Song XY, Zhu JB, et al. Tumor suppressor microRNA-34a inhibits cell migration and invasion by targeting MMP-2/MMP-9/FNDC3B in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2017, 51(1):378-388.
- 朱玲玲, 张洋, 窦勤玲, 等. 槲皮素对U937细胞迁移和侵袭能力及MMP-2、MMP-9表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(16):146-151.
- 扈玉华, 吴玉鹏, 王刘帅, 等. 胰岛素样生长因子结合蛋白-3通过细胞外信号调节激酶1/2信号通路调控多发性骨髓瘤增殖的机制[J]. *中华实验外科杂志*, 2019, 36(4):667-670.
- Li S, Ma YM, Zheng PS, et al. GDF15 promotes the proliferation of cervical cancer cells by phosphorylating AKT1 and Erk1/2 through the receptor ErbB2[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1):80.
- 冯城婷, 王莹, 史悦, 等. p-ERK1/2、CD34、层粘连蛋白在乳腺癌组织中的表达及其意义[J]. *实用癌症杂志*, 2016, 31(5):397-700.
- 刘宏侠, 孙玉满, 汪宏斌, 等. p-ERK和MMP-9在非小细胞癌中的表达及临床意义[J]. *中国肿瘤临床*, 2008, 35(14):819-823.

(收稿日期 2020-03-30)

(本文编辑 蔡华波)