

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.22.003

文章编号: 1005-8982 (2018) 22-0013-06

MMP-9 过表达对骨肉瘤 143B 细胞 侵袭与迁移能力的影响

齐巍¹, 李勇², 琚绍静¹, 孙娜³, 张瑞杰¹

(1. 河北省唐山市第二医院 创伤一科, 河北 唐山 063000; 2. 河北省唐山市第二医院
骨病科, 河北 唐山 063000; 3. 华北理工大学基础医学院, 河北 唐山 063000)

摘要: 目的 研究 MMP-9 过表达对成骨肉瘤 143B 细胞侵袭与迁移能力的影响。**方法** 通过慢病毒介导 MMP-9 过表达载体转染骨肉瘤 143B 细胞, 实验分为 3 组: 实验组 (转染 pLV-Puro MMP-9 过表达序列)、对照组 (转染 pLV-Puro MMP-9-NC 序列)、空白组 (PBS); 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 MMP-9 和 VEGF mRNA 的表达; Western blot 法检测 MMP-9 和 VEGF 蛋白的表达; Transwell 小室侵袭实验检测细胞侵袭能力; 细胞划痕实验检测细胞迁移能力。**结果** 实验组 MMP-9 和 VEGF 的 mRNA 和蛋白表达量较对照组和空白组上调 ($P < 0.05$); 实验组穿过人工基底膜细胞数高于对照组和空白组 ($P < 0.05$); 实验组划痕愈合率高于对照组和空白组 ($P < 0.05$)。**结论** 慢病毒介导 MMP-9 过表达通过作用于 VEGF 靶基因, 抑制成骨肉瘤 143B 细胞侵袭及迁移能力。

关键词: 基质金属蛋白酶 9; 血管内皮生长因子; 骨肉瘤细胞; 侵袭; 迁移

中图分类号: R 738.1

文献标识码: A

Effect of MMP-9 over-expression on invasion and migration of osteosarcoma 143B cells

Wei Qi¹, Yong Li², Shao-jing Ju¹, Na Sun³, Rui-jie Zhang¹

(1. Department of Trauma, 2. Department of Orthopedics, the Second Hospital of Tangshan, Tangshan, Hebei 063000, China; 3. School of Basic Medical Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To study the effect of MMP-9 over-expression on invasion and migration of osteosarcoma 143B cells. **Methods** Lentivirus-mediated MMP-9 over-expression vector was transfected into osteosarcoma 143B cells. The experiment was divided into an experimental group (transfected with pLV-Puro MMP-9 over-expression sequence), a control group (transfected with pLV-Puro MMP-9-NC sequence) and a blank group (PBS). qRT-PCR was used to detect the expressions of MMP-9 and VEGF mRNAs. The expressions of MMP-9 and VEGF proteins were detected by Western blot. Transwell invasion assay was used to detect the invasion ability. Cell migration was measured by cell scratch test. **Results** The mRNA and protein expressions of MMP-9 and VEGF in the experimental group were significantly higher than those in the control and blank groups ($P < 0.05$). The number of cells passing through the artificial basement membrane in the experimental group was significantly larger than that in the control group and the blank group ($P < 0.05$). The healing rate of scratches in the experimental group was significantly higher than that in the control group and the blank group ($P < 0.05$). **Conclusions** Lentivirus-mediated MMP-9 over-expression inhibits the invasion and migration of osteosarcoma 143B cells by acting on VEGF target gene.

Keywords: MMP-9; VEGF; osteosarcoma cell; invasion; migration

收稿日期: 2017-12-22

骨肉瘤是多发于青少年的恶性肿瘤,具有恶性程度高、转移早、转移率高、侵袭力强等特点,是导致治愈率低的主要原因。细胞外基质和基底膜是恶性肿瘤局部浸润和远处转移的重要天然组织学屏障^[1]。肿瘤细胞可以产生多种蛋白水解酶,降解细胞外基质和基底膜,在癌细胞浸润和转移的过程中发挥作用,其中尤以基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase, MMP-9) 发挥作用最为重要^[2]。因此,探讨其与肿瘤侵袭、转移的机制及其关系具有重要的理论和临床意义。本研究以骨肉瘤 143B 细胞为研究对象,研究 MMP-9 过表达对成骨肉瘤 143B 细胞侵袭与迁移能力的影响,以及探讨 MMP-9 及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 等与骨肉瘤的复发与转移的关系。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人成骨肉瘤 143B 细胞株由华北理工大学基础医学实验室馈赠,10% FBS、DMEM 培养基和 qRT-PCR 反应试剂盒均购置于美国 Invitrogen 公司,慢病毒过表达及阴性对照载体购置于上海吉凯基因化学技术有限公司,pLV-Puro MMP-9 阳性序列:5'-UCCAGGGCGAGGACCAUAGAG-3'、pLV-Puro MMP-9 阴性对照序列:5'-ACGUGACACGUUCGGA GAAGTCT-3'、Transwell 小室购置于以色列 BI 公司,MMP-9 和 VEGF 一抗和二抗均购置于北京中杉金桥生物技术有限公司,JSM-6030LV 激光共聚焦显微镜购置日本电子株式会社。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组转染 骨肉瘤 143B 细胞用含 10%FBS、1% (100 μg/ml 青霉素和 10 μg/ml 链霉素) 的 DMEM 完全培养基,并置于 37℃、5% 二氧化碳饱和湿度培养箱培养,当细胞生长汇合至 80% 时可进行消化传代。取对数生长期细胞,常规消化 143B 细胞,调整细胞浓度为 2×10^5 个/ml,接种于 6 孔板中,实验分为 3 组:转染组 (转染 pLV-Puro MMP-9 过表达序列)、对照组 (转染 pLV-Puro MMP-9-NC 序列)、空白组 (PBS)。参照吉凯慢病毒转染说明书进行操作,48 h 后激光共聚焦显微镜下观察转染率。

1.2.2 qRT-PCR 检测 mRNA 表达 收集各组细胞,制成单细胞悬液,参照 Trizol 说明书一步法提取细胞 MMP-9 和 VEGF 的总 RNA,检测 RNA 浓度

复合实验要求后,取 2 μl 总 RNA 样品逆转录合成 cDNA,再取 1 μl cDNA 为模板进行 PCR 扩增反应,MMP-9 引物序列正向引物:5'-CTGTTGG ACTGCTGCTTTGCTG-3';反向引物:5'-GTCTCCTGA AAGGTTTGAAT-3'。β-actin 引物序列正向引物:5'-GTTGGGACCTGAGAGACTA-3';反向引物:5'-TGGCC ATGTCCAG TCACACT-3'。PCR 扩增反应条件:95℃ 预变性 20 min,95℃ 变性 30 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,40 个循环后再 72℃ 延伸 10 min。采用比较 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对实验结果进行分析。

1.2.3 Western blot 检测 MMP-9 和 VEGF 蛋白表达 转染后 48 h 收集对数生长期各组细胞,提取各组细胞总蛋白,每组样品取 35 μg 蛋白质/泳道,进行 SDS-PAGE 电泳,分别配制 5% 的浓缩胶和 10% 的分离胶,设置电压和电流进行电转,设置 250 mA 90 min 将凝胶中蛋白转移至 PVDF 膜;分别滴加 150 μl 一抗 MMP-9 和 VEGF (1 : 2 000) 以及一抗 β-actin (1 : 1 000),4℃ 过夜;TBST 洗膜,每次 10 min × 3 次;加相应 100 μl 二抗 MMP-9 和 VEGF (1 : 1 000),37℃ 培养 1.5 h;TBST 洗膜,每次 10 min × 3 次。进行 ECL 显色,扫描仪扫描条带分析光密度值。

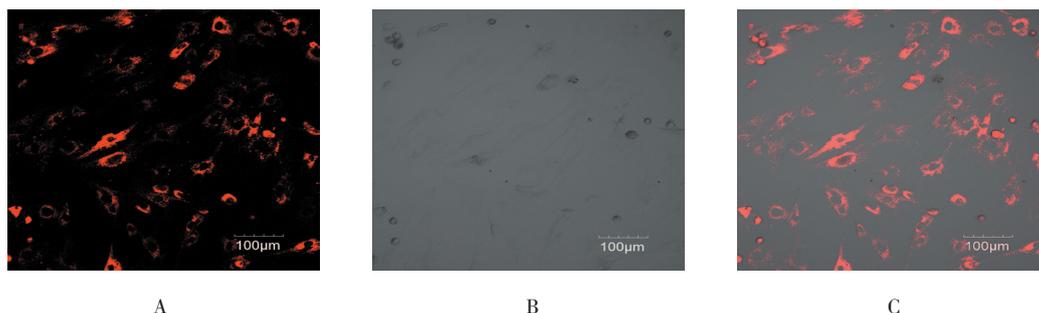
1.2.4 Transwell 侵袭实验检测细胞侵袭能力 以预冷空白培养基 DMEM 按 1 : 8 的比例稀释胶体,取 100 μl 稀释液滴加于 Transwell 小室的上室,置于 37℃ 细胞培养培养基箱 1 h 即可制成 Matrigel 胶,常规消化单细胞悬液,调整细胞浓度为 2×10^5 个/ml;以 100 μl 孔滴加至 Transwell 小室上层,滴加 500 μl (20% FBS) 的 DMEM 至下室,常规培养 24 h。吸去小室内液体,使用湿润棉签轻拭擦去小室上层的 Matrigel 胶和未穿透过的细胞,将小室底部的聚碳酸酯膜用刀片切割下来,置于 4% 多聚甲醛液中,固定 30 min 以上;PBS 冲洗 3 遍,对酯膜进行苏木素染色,封片。倒置显微镜下随机选取 5 个视野计数细胞并拍照,观察每个视野内穿过脂膜的细胞数量,以穿过脂膜的细胞总数为指标评价细胞的侵袭能力。

1.2.5 细胞划痕实验检测细胞迁移能力 采用记号笔在 6 孔板背面画出均匀间隔 0.8 cm 左右的横线,横穿过孔,每孔至少穿过 5 条线。各组细胞常规消化制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 5×10^6 个/ml。细胞生长良好融合率达到 80% 时用 10 μl 的枪头作划痕,划痕完毕后,PBS 轻轻冲洗 3 遍,漂洗去除划下的细胞,继续培养。按 0 和 24 h 时间点取样,拍照,并测量多

个点划痕宽度, 计算平均划痕愈合率。用 Image J 软件分析培养 0 和 24 h 时的各组划痕情况。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用单因素方差分析, 组间比较采用 LSD-*t* 检验方法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



A: 荧光图; B: 透视图; C: A 和 B 组合图

图 1 细胞转染率 (激光共聚焦显微镜 $\times 400$)

高于对照组和空白组。经统计学分析, 实验组 MMP-9 和 VEGF 的 mRNA 表达量相对于对照组和空白组均增高 ($P < 0.05$), 而空白组和对照组之间 MMP-9 和 VEGF 的 mRNA 表达量差异无统计学意义 ($t = 20.625$ 和 16.472, $P = 0.165$ 和 0.072)。见表 1 和图 2。

表 1 各组 MMP-9 mRNA 和 VEGF mRNA 的表达量
($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	MMP-9 mRNA	VEGF mRNA
实验组	$2.98 \pm 0.22^\dagger$	$3.40 \pm 0.25^\dagger$
对照组	1.25 ± 0.13	1.36 ± 0.30
空白组	1.19 ± 0.10	1.28 ± 0.36
F 值	7.380	10.260
P 值	0.028	0.001

注: \dagger 与对照组、空白组比较, $P < 0.05$

2.3 MMP-9 和 VEGF 的蛋白表达情况

实验组 MMP-9 和 VEGF 的蛋白相对光密度值均高于空白组和对照组。经统计学分析, 实验组 MMP-9 和 VEGF 的蛋白表达量均高于空白组和对照组 ($P < 0.05$), 而空白组和对照组 MMP-9 和 VEGF 的蛋白表达量差异无统计学意义 ($t = 16.206$ 和 12.572, $P = 0.106$ 和 0.060)。见表 2 和图 3。

2 结果

2.1 慢病毒介导细胞转染率

根据最强红色荧光判断转染率, 激光共聚焦显微镜观察转染效率证实慢病毒介导的转染方法转染率高, 可达 90% 以上。见图 1。

2.2 MMP-9 和 VEGF 的 mRNA 表达情况

实验组 MMP-9 和 VEGF 的 mRNA 相对表达量均

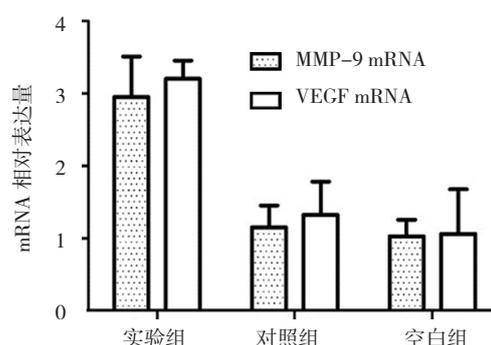


图 2 各组 MMP-9 mRNA 和 VEGF mRNA 的表达量

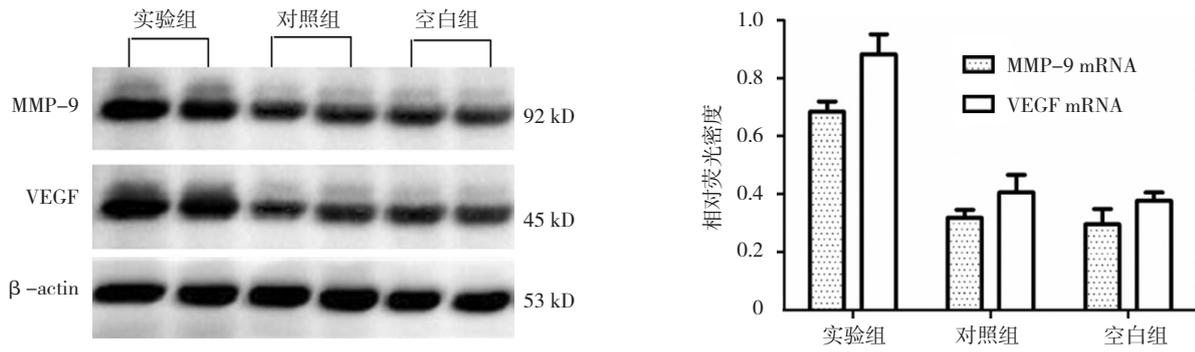
表 2 各组细胞 MMP-9、VEGF 蛋白的表达
($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	MMP-9	VEGF
实验组	$0.69 \pm 0.13^\dagger$	$0.91 \pm 0.16^\dagger$
对照组	0.36 ± 0.11	0.45 ± 0.13
空白组	0.35 ± 0.08	0.40 ± 0.10
F 值	8.821	5.350
P 值	0.021	0.015

注: \dagger 与空白组和对照组比较, $P < 0.05$

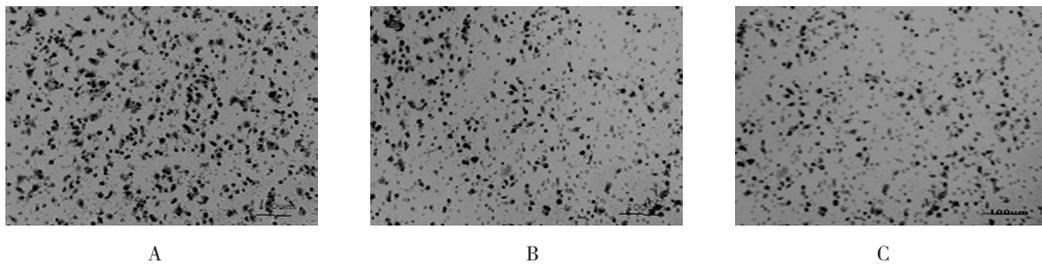
2.4 Transwell 体外侵袭实验

实验组穿过人工基底膜细胞数为 (92.80 ± 2.65) 个 / 视野, 对照组为 (56.80 ± 5.37) 个 / 视野, 空白组为 (54.80 ± 2.90) 个 / 视野 (见图 4)。经统计学分析,



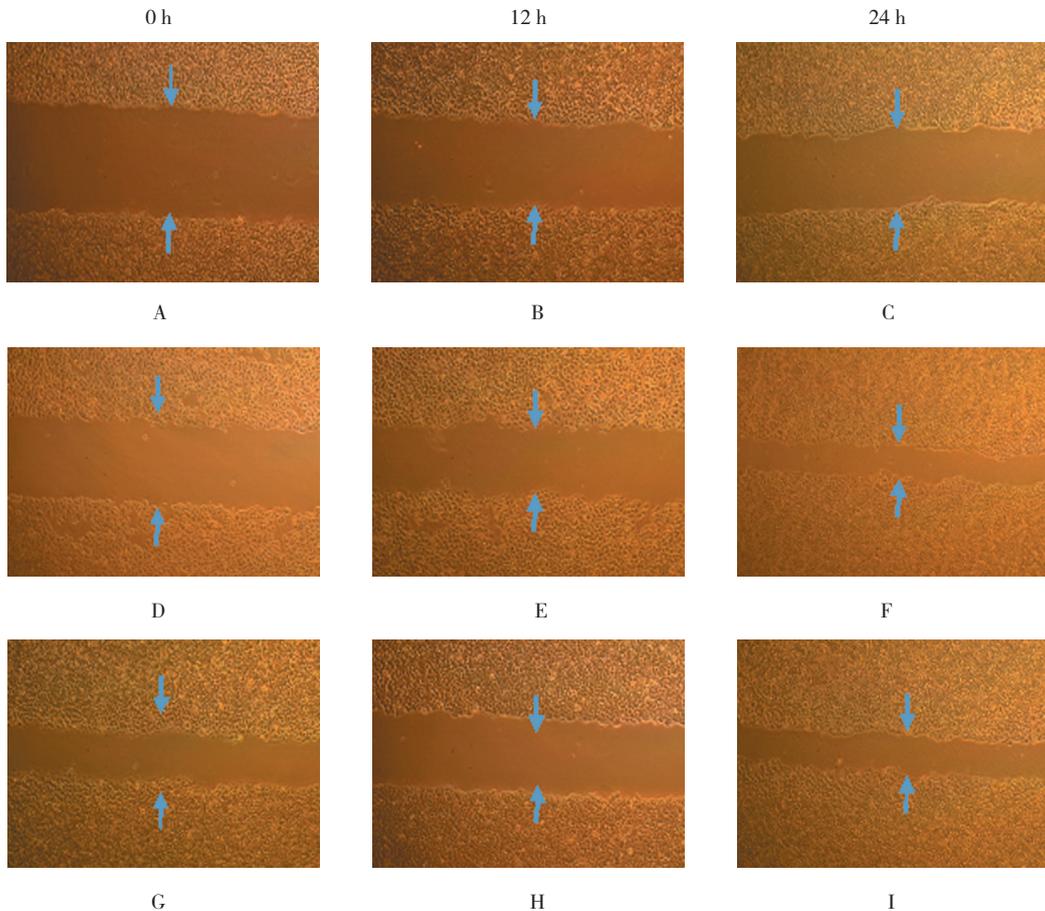
MMP-9: 实验组与空白组和对照组比较, $P < 0.05$; VEGF: 实验组与空白组和对照组比较, $P < 0.05$

图 3 各组蛋白表达水平



A: 实验组; B: 对照组; C: 空白组

图 4 各组细胞的侵袭能力 (苏木素染色 $\times 200$)



A、B、C: 实验组; D、E、F: 对照组; G、H、I: 空白组

图 5 各组细胞的迁移情况 ($\times 40$)

个 / 视野, 对照组为 (56.80 ± 5.37) 个 / 视野, 空白组为 (54.80 ± 2.90) 个 / 视野 (见图 4)。经统计学分析, 实验组穿膜细胞数高于对照组和空白组, 差异有统计学意义 ($F=34.214, P=0.012$), 而对照组与空白组比较差异无统计学意义 ($t=28.057, P=0.086$)。说明实验组细胞的侵袭能力增高。

2.5 细胞的迁移运动能力

实验组、对照组和空白组划痕愈合率分别为 $(68.58 \pm 3.48)\%$ 、 $(32.17 \pm 3.25)\%$ 、 $(29.13 \pm 4.18)\%$ (见图 5)。经统计学分析, 各组细胞划痕愈合率比较, 空白组和对照组比较差异无统计学意义 ($F=9.207, P=0.155$), 而实验组细胞划痕愈合率高于对照组和空白组 ($F=13.355, P=0.030$)。表明实验组细胞的迁移速度快于对照组及空白组。

3 讨论

骨肉瘤为青少年最常见恶性肿瘤, 恶性程度高, 具有很高的致残率和致死率, 侵袭性强, 转移率高, 预后较差^[5]。调查资料显示, 骨肉瘤易于肺部转移^[6]。临床治疗骨肉瘤以手术截肢和辅助放疗为主, 患者的生存率无提高^[5]。肿瘤转移早和术后易复发是影响骨肉瘤治疗和生存率的重要因素^[6]。在监控骨肉瘤转移复发方面至今为止尚缺乏针对性的预测靶基因和肿瘤标志物, 寻找针对骨肉瘤转移复发的肿瘤标志物对于骨肉瘤的早期诊断、早期治疗及预后检测具有重要的意义, 因此, 研究骨肉瘤侵袭、转移及复发相关的作用机制具有重要临床意义。本研究以骨肉瘤 143B 为研究对象, 试图探索 MMP-9 过表达对成骨肉瘤 143B 细胞侵袭与迁移能力的影响。以及探讨 MMP-9 及 VEGF 与骨肉瘤的复发与转移的关系。

基质金属蛋白酶 (MMPs) 是锌离子依赖性蛋白水解酶, 能降解细胞外基质的成分, 与肿瘤浸润、转移、血管形成关系十分密切, 细胞外基质间的黏附及细胞外基膜的降解被认为是恶性肿瘤侵袭转移的首要条件^[7]。MMP-9 是 (MMPs) 家族中重要的一员, 属于 IV 型胶原酶, MMP-9 蛋白酶是降解 IV 型胶原最重要的酶, 与肿瘤的浸润、转移及血管形成能力有关^[8-9], 并参与细胞外基质降解和再塑。MMP-9 具有降解细胞外基质, 破坏细胞的天然屏障的作用, 同时具有调控细胞之间、细胞与基质间的黏附作用, 促使癌细胞发生浸润和转移^[10]; 并且 MMP-9 还可以协同纤维蛋白溶解酶和组织蛋白酶等酶类, 降解血管周围基质和

血管基底膜^[11]。这一过程强化癌细胞的局部侵袭和远处转移。李昕等^[12]探讨 MMP 在骨肉瘤中的表达及与侵袭转移的关系, 应用免疫组织化学法检测骨肉瘤 MMP-9 的表达, 并分析其与无瘤生存率和侵袭转移的关系, 发现 MMP-9 与骨肉瘤细胞的高侵袭转移能力相关。陈雷等^[13]研究骨肉瘤组织中基 MMP-9 的表达情况, 发现 MMP-9 可作为骨肿瘤恶性表型的标志, 可作为骨肉瘤诊断的辅助指标, MMP-9 是骨肉瘤细胞侵袭的标志。同样, LV 等^[14]在骨肉瘤患者发现, 5 年内发生肺转移患者中 MMP-9 阳性率明显高于 5 年内未发生肺转移患者, 表明 MMP-9 高表达与骨肉瘤的侵袭转移能力密切相关, MMP-9 有可能成为骨肉瘤肺转移的预测指标。本研究通过慢病毒介导 MMP-9 过表达转染人骨肉瘤 143B 细胞, Transwell 体外侵袭实验结果显示, 实验组细胞的侵袭能力高于对照组和空白组, MMP-9 过表达可促进增加骨肉瘤细胞的侵袭能力。细胞划痕实验结果显示, 实验组细胞划痕愈合率高于对照组和空白组, 实验组细胞的迁移速度快于对照组及空白组。说明 MMP-9 过表达促进骨肉瘤 143B 细胞的侵袭和迁移能力。

VEGF 是目前作用最强的一种促进肿瘤血管生长因子, 通过与内皮细胞特异性受体结合促进内皮细胞增殖, 增加微血管通透性, 促进血管形成。同时它可以旁分泌的方式作用于内皮细胞, 刺激内皮细胞分泌 MMP-9。VEGF 与肿瘤生长、浸润及转移密切相关。研究发现 MMP-9 在降解细胞外基质的过程中, 能够释放出生长因子如 b-FGF、TGF- β 等, 它们能够上调 VEGF 的表达^[15]。黄自锋等^[16]研究 MMP-9、VEGF 的表达与骨肉瘤血管新生及临床复发转移的关系, 结果发现 MMP-9、VEGF 共同参与骨肉瘤的血管生成并协同表达。李昱等^[17]发现分化程度较低、浸润程度较深、伴淋巴结转移、临床分期较高的非小细胞肺癌患者, 同时伴有 MMP-9 与 VEGF 的高表达, 提示 MMP-9 与 VEGF 有着内在联系, MMP-9 作用于 VEGF 因子。本研究以慢病毒介导 MMP-9 过表达转染人骨肉瘤 143B 细胞, qRT-PCR 结果发现, 实验组 MMP-9 和 VEGF mRNA 的表达量增高, 免疫细胞化学染色结果发现, 实验组 MMP-9 和 VEGF 蛋白表达量增高, 并促进骨肉瘤 143B 细胞侵袭和转移。同样, 有研究发现 VEGF 可通过 ETS-1 调节 MMP-9 启动子从而上调 MMP-9 mRNA 的表达^[18]。POYER 等^[19]发现 MMP-9 与 VEGF 之间相互调节促进对方的分泌, 两者

之间存在着正反馈调节作用。

在肿瘤细胞从增殖到局部浸润和远处转移这一过程,蛋白水解酶介导的细胞外基质降解、基底膜降解和肿瘤微血管的形成起到关键作用。MMP-9 和 VEGF 在骨肉瘤的的浸润和转移过程中起着重要作用,骨肉瘤中 MMP-9 和 VEGF 可作为评价骨肉瘤预后指标,目前从临床研究已初步揭示了 MMP-9 和 VEGF 表达水平与骨肉瘤患者预后之间的关系。同时,通过对其调控机制的进一步深入研究,将有助于找到治疗骨肉瘤转移的有效生物靶点,给广大骨肉瘤患者带来福音。

参 考 文 献:

- [1] MIYAG S P, HIRAKI K R, MARTINS M D, et al. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in odontogenic myxoma in vivo and in vitro[J]. *J Oral Sci*, 2008, 50(2): 187-192.
- [2] KERKEL E, SAARIALHO-KERE U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer[J]. *Exp Dermatol*, 2003, 12(2): 109-125.
- [3] 李秋萍, 盖亚男. 五味子乙素对 MDR1 介导的人骨肉瘤细胞 U-2 OS/ADR 所致多药耐药性的逆转研究 [J]. *安徽医药*, 2014, 18(9): 1642-1645.
- [4] FERRARI S, MEAZZA C, PALMERINI E, et al. Nonmetastatic osteosarcoma of the extremity. neoadjuvant chemotherapy with methotrexate, cisplatin, doxorubicin and ifosfamide, An Italian Sarcoma Group study[J]. *Tumori*, 2014, 100(6): 612-619.
- [5] 黄承夸, 韦文, 陆吉利, 等. 骨肉瘤治疗研究进展 [J]. *海南医学*, 2014, 25(21): 3198-3200.
- [6] XU L, DING X, TAN H, et al. B7-H3 expression and matrix metalloproteinases 2 expression in pancreatic cancer[J]. *Cancer Cell Int*, 2013, 13(1): 81.
- [7] LI H, ZHANG K, LIU L H, et al. A systematic review of matrix metalloproteinase 9 as a biomarker of survival in patients with osteosarcoma[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(6): 5487-5491.
- [8] MCCAWLEY L J, MATRISAN L M. Matrix metallo proteinases: they are not just for matrix anymore[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13: 534-540.
- [9] 邓必勇, 邱冰. MMP-9、Ki-67 的表达与骨肉瘤侵袭、转移、复发的相关性研究 [J]. *海南医学*, 2016, 27(6): 895-897.
- [10] VANDOOREN J, VAN DEN STEEN P E, OPDENAKKER G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2013, 48(3): 222-272.
- [11] LI H, ZHANG K, LIU L H, et al. A systematic review of matrix metalloproteinase 9 as a biomarker of survival in patients with osteosarcoma[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(6): 5487-5491.
- [12] 李昕, 李建民, 杨志平, 等. MMP-7, MMP-9 和 MMP-10 与骨肉瘤侵袭转移的关系及临床意义 [J]. *山东大学学报 (医学版)*, 2004, 42(5): 593-595.
- [13] 陈雷, 林建, 张声. MMP-9 在骨肉瘤中的表达及其临床意义 [J]. *中国肿瘤临床*, 2001, 28(6): 431-433.
- [14] LV H W, CHEN M, LI S F, et al. The expression of MMP-9 in osteosarcoma and its significance[J]. *Medical Laboratory Science and Clinics*, 2007, 18(3): 57-58.
- [15] SHOU Y, HIRANO T, GONG Y, et al. Influence of angiogenic factors and matrix metalloproteinases upon tumour progression in non-small cell lung cancer[J]. *Br J Cancer*, 2001, 85(11): 1706-1712.
- [16] 黄自锋, 杨述华, 刘勇. 骨肉瘤中基质金属蛋白酶-9、血管内皮生长因子表达的意义 [J]. *华中医学杂志*, 2008, 32(4): 247-248.
- [17] 李昱, 王艳. E-cadherin、VEGF、MMP-9 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2009, 19(3): 705-708.
- [18] 张建东, 张育. 恶性血液病血管新生过程中 VEGF/R、内皮抑素和基质金属蛋白酶的相互调控探讨 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2005, 13(6): 1145-1150.
- [19] POYER F, COQUEREL B, PEGAHI R, et al. Secretion of MMP-2 and MMP-9 induced by VEGF autocrine loop correlates with clinical features in childhood acutelymphoblastic leukemia[J]. *Leuk Res*, 2009, 33(3): 407-417.

(张西倩 编辑)