

· 论 著 ·

1400W 对缺氧培养人舌鳞癌 CAL-27 细胞株 iNOS 和 MMP-9 表达变化的影响及意义

何海蕾¹, 王 羽¹, 唐维平²

(1. 江西省赣州市人民医院口腔颌面外科 341000; 2. 南昌大学第二附属医院口腔科 330006)

摘要:目的 探讨缺氧条件下培养诱导型一氧化氮合酶(iNOS)抑制剂 1400W 对人舌鳞癌 CAL-27 细胞株 iNOS 和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)mRNA 表达的影响。方法 常规培养人舌鳞癌 CAL-27 细胞株, 实验组分别加入 50、100、200、400 $\mu\text{mol/L}$ 的 1400W 培养液培养; 对照组不加 1400W 培养液, 缺氧条件下培养 24、48、72、96 h 后, 采用 RT-PCR 方法检测 iNOS、MMP-9 mRNA 表达的变化。结果 1400W 作用于人舌鳞癌 CAL-27 细胞后, 可呈时间、剂量性依赖抑制人舌鳞癌 iNOS、MMP-9 基因表达($P < 0.05$)。结论 1400W 可显著抑制缺氧条件下培养的人舌鳞癌 CAL-27 细胞株 iNOS 和 MMP-9 表达, 表明 1400W 对舌鳞癌新生血管的形成具有预防和潜在的治疗价值。

关键词:诱导型一氧化氮合酶; 基质金属蛋白酶-9; 缺氧; 人舌鳞癌细胞株

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.24.007

中图分类号: R739.86; R73-361

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)24-3320-02

Effects of 1400W on the expression of iNOS and MMP-9 in human tongue squamous carcinoma cell line CAL-27 after hypoxic culture

HE Hai-lei¹, WANG Yu¹, TANG Wei-ping²

(1. Department of Oral and maxillofacial Surgery, the People's Hospital of Ganzhou, Ganzhou 341000, China;

2. Department of Stomatology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of selective iNOS inhibitor 1400W in hypoxic on the expressions of iNOS and MMP-9 in Human tongue squamous carcinoma cell line CAL-27. **Methods** The Human tongue squamous cells(CAL-27) experimental groups were cultured regularly in medium with different concentration rations of 1400W(50、100、200、400 $\mu\text{mol/L}$), control group without 1400W. All groups were cultured in hypoxia condition for 24、48、72、96 h. Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) was employed to measure the expression of iNOS、MMP-9 mRNA of the Human tongue squamous cells(CAL-27). **Results** Compared to the control group the expressions of iNOS、MMP-9 mRNA in the treatment groups were down-regulated significantly($P < 0.05$); 1400W can inhibit the expression of iNOS、MMP-9 in a time and dose-depended manner. **Conclusion** 1400W could inhibit the expressions of iNOS and MMP-9 in Human tongue squamous carcinoma cell line CAL-27. It suggests that selective iNOS inhibitor in hypoxic might play a latent role in the prevention and treatment of Human tongue squamous carcinoma neovascularization.

Key words: Inducible nitric oxide synthase; Matrix metalloprotease-9; Hypoxic; Human tongue squamous cell line

舌鳞癌为常见的口腔癌, 易发生早期转移, 是严重危害人类生命健康的口腔恶性肿瘤^[1]。肿瘤转移是癌细胞与宿主细胞相互作用的复杂多步骤的连续过程, 目前发现与肿瘤转移关系密切的是基质金属蛋白酶-9(matrix metalloprotease-9, MMP-9)和一氧化氮合酶(iNOS)。MMPs 是通过破坏基底膜和其他细胞外基质的水解破坏、调节肿瘤血管生成、调节肿瘤细胞生长等促使肿瘤浸润转移^[2], 因此抑制基质蛋白水解酶活性已经成为希望极大的抗肿瘤转移方案之一^[3]。本实验用 1400W 作用人舌鳞癌 CAL-27 细胞株, 探讨其抑瘤作用及机制, 以达到治疗肿瘤的可能性。

1 材料与与方法

1.1 材料 人舌鳞癌 CAL-27 细胞株(美国 ATCC 细胞库)由上海九院肿瘤研究所提供。1400W(Cayman 公司, USA)、高糖 DMEM 培养基(SIGMA, USA)、DNA marker(北京特可美生物技术有限公司)、人 iNOS、GAPDH、MMP-9 引物(上海生工公司)、PCR 试剂盒(美国 Promega 公司)、RT 试剂盒(Fermentas 公司)、PCR-MIX(TIANGEN, 北京)、大型坐式离心机(LXJ-II 型, 上海)、PCR-100 型扩增仪(MJ Research Inc, USA)等。

1.2 细胞培养及实验分组 常规条件下培养, 人舌鳞癌

CAL-27 细胞株生长于含有 10% 胎牛血清、100 000 u/L 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 DMEM 培养基中, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、95% 空气湿度和 5% CO_2 缺氧条件下培养。选取对数生长期人舌鳞癌 CAL-27 细胞, 将细胞分成密度为 5×10^7 个/L 的单细胞悬液, 再将细胞接种于 5 个培养瓶中, 每瓶 6 mL; 常规条件下培养 24 h 后, 其中 4 个培养瓶(实验组)分别加入 50、100、200、400 $\mu\text{mol/L}$ 的 1400W 培养液培养; 另 1 个培养瓶不加 1400W (对照组)。通过预实验初步筛选出最佳浓度及时间(200 $\mu\text{mol/L}$ 、72 h)。实验组 1400W 调整终浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$, 对照组加等体积高糖 DMEM 培养基。将细胞置入缺氧条件下培养 72 h 后, 提取细胞总 RNA。所有实验重复 6 次。

1.3 RT-PCR 法检测 iNOS、MMP-9 基因 mRNA 表达水平 收集经 50、100、200、400 $\mu\text{mol/L}$ 1400W 作用 72 h 细胞, 及经 200 $\mu\text{mol/L}$ 1400W 作用 24、48、72、96 h 的细胞。调整细胞密度为 1×10^8 个/L, 采用 Trizol 总 RNA 提取试剂盒(invitrogen 公司)提取总 RNA, 电泳鉴定 RNA 完整性。PCR 引物序列如下: MMP-9 为 172 bp, Sense 5'-TGG GCT ACG TGA CCT ATG ACA T-3', Antisense 5'-GCC CAG CCC ACC TCC ACT CCT C-3'; iNOS 为 364 bp, Sense 5'-GGA AGC GGT AAC

AAA GGA-3', Antisense 5'-CAC AAG GTC AGG TGG-GAT T-3'; GAPDH 为 593 bp, Sense 5'-CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA-3', Antisense 5'-TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC-3'。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定拍照后,以 iNOS、MMP-9 与 GAPDH 的比值作为 iNOS、MMP-9 mRNA 表达的相对含量。

1.4 统计学处理 应用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

1400W 对 5 组人舌鳞癌细胞 iNOS、MMP-9 mRNA 表达水平的影响见表 1、2。

表 1 不同浓度 1400W 作用 72 h 后对细胞 iNOS、MMP-9 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	iNOS	MMP-9
对照组	0.248 ± 0.008	1.05 ± 0.02
50 μmol/L 组	0.210 ± 0.010**	1.36 ± 0.03**
100 μmol/L 组	0.171 ± 0.011*	0.91 ± 0.03*
200 μmol/L 组	0.135 ± 0.007*	0.40 ± 0.03*
400 μmol/L 组	0.140 ± 0.009*	0.62 ± 0.05*

*: $P < 0.05$, **: $P > 0.05$, 与对照组比较。

表 2 200 μmol/L 1400W 作用不同时间对细胞 iNOS、MMP-9 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	iNOS	MMP-9
对照组	0.269 ± 0.009	1.26 ± 0.04
200 μmol/L 组		
24 h	0.201 ± 0.010**	1.09 ± 0.08**
48 h	0.147 ± 0.008*	0.69 ± 0.03*
72 h	0.135 ± 0.007*	0.40 ± 0.03*
96 h	0.146 ± 0.008*	0.59 ± 0.02*

*: $P < 0.05$, **: $P > 0.05$, 与对照组比较。

各实验组、对照组经扩增后可见 593 bp GAPDH、364 bp iNOS、172 bp MMP-9 特异性扩增片段。72 h 时,经不同浓度 1400W 处理的实验组细胞中 iNOS、MMP-9 mRNA 表达水平均随 1400W 浓度增加而逐渐下降。但 24 h 50 μmol/L 组与对照组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),实验组以 72 h、200 μmol/L 抑制差异有统计学意义 ($P < 0.05$);浓度为 200 μmol/L 时,经不同时间作用后各实验组细胞中 iNOS、MMP-9 mRNA 表达水平均随 1400W 作用时间延长而逐渐下降。

3 讨 论

舌鳞癌为常见的口腔癌,随着发病率的不断上升,更引起国内外学者的重视^[4-5]。iNOS 和 MMP-9 是重要的促血管生长因子,而缺氧是诱导两者在肿瘤组织中高表达的主要因素^[6-7]。有研究发现一氧化氮(NO)及 iNOS 与肿瘤血管生成以及肿瘤生长、转移密切相关^[8];另有研究证明 MMP-9 可增加微血管通透性,加速血浆蛋白外渗,为肿瘤细胞的生长和新生毛细血管的建立提供了最佳的基质^[9]。因此 MMP-9 是肿瘤的生长侵袭过程中具有关键性作用的因素之一。缺氧状态下 MMP-9 在 mRNA 和蛋白水平上表达均有明显增加^[10],且 Kaur 等^[11]认为 MMP-9 蛋白的免疫组化表达还可作为早期口腔鳞癌预后的预测标准。对肿瘤组织行免疫组化分析表明 iNOS 与 MMP-9 表达显著相关,且发现 iNOS 表达与肿瘤的微

血管密度及复发显著相关^[12],提示 NO 可通过作用于 MMP-9 调节血管生成,从而影响肿瘤生长和转移^[13]。

1400W 对人 iNOS 的抑制能力比对人内皮型一氧化氮合酶(eNOS)和神经型一氧化氮合酶(nNOS)的抑制能力分别高 5 000 倍和 200 倍^[14],是迄今为止最有选择性的 iNOS 抑制剂。目前已有 1400W 在其他肿瘤组织中抑制 iNOS 活性和表达的研究^[15],但尚未见 1400W 对舌鳞癌细胞作用及影响的报道。本实验在缺氧培养条件下对不同浓度 1400W 作用不同时间干预舌鳞癌细胞后,检测其 MMP-9、iNOS 基因的表达,发现随着浓度的增加和时间的延长 MMP-9、iNOS mRNA 的表达逐渐降低,以 200 μmol/L、72 h 抑制差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示 1400W 对缺氧诱导的人舌鳞癌 CAL-27 细胞株 iNOS、MMP-9 mRNA 表达具有抑制作用。

本实验结果证实,1400W 能抑制缺氧条件下培养的人舌鳞癌 CAL-27 细胞株 iNOS 和 MMP-9 的表达,并且表现出量效关系,提示 1400W 对舌鳞癌的生长和浸润具有明显抑制作用,为 1400W 预防及治疗舌鳞癌提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Regelzi JA, Sciubba JJ. Ulcerative conditions. In: Oral pathology: clinical-pathologic correlations[M]. Philadelphia: WB Saunders, 1989: 70.
- [2] Zhao Y, Lyons CE Jr, Xiao A, et al. Urokinase directly activates matrix metalloproteinases-9: a potential role in glioblastoma invasion[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 369: 1215.
- [3] Lakka SS, Gondi CS, Dinh DH, et al. Specific interference of urokinase-type plasminogen activator receptor and matrix metalloproteinase-9 gene expression Induced by double-stranded RNA results in decreased invasion, Tumor growth, and angiogenesis in gliomas[J]. J Biol Chem, 2005, 280: 21882.
- [4] 刘凯, 伍明毅. ABCG2 在人舌癌的表达及意义[J]. 重庆医学, 2009, 38(23): 2922.
- [5] 季平, 叶尚敏, 李庆妹, 等. 人舌鳞癌 Tca8113 细胞株中 c-erbB-2、bcl-2 表达[J]. 重庆医学, 2005, 34(3): 332.
- [6] Kaur B, Khwaja FW, Severson EA, et al. Hypoxia and the Hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis[J]. Neuro Oncol, 2005, 7(2): 134.
- [7] Bentz BG, Haines GK 3rd, Hanson DG. Endothelial constitutive nitric oxide synthase (ecNOS) localization in normal and neoplastic salivary tissue[J]. Head Neck, 1998, 20(4): 304.
- [8] Dallas NA, Fan F, Gray MJ, et al. Functional significance of vascular endothelial growth factor receptors on gastrointestinal cancer cells[J]. Cancer Metastasis Rev, 2007, 26(3/4): 433.
- [9] Kelly BD, Hackett TSF, Hirota K, et al. Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and Induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1[J]. Circ Res, 2003, 93(11): 1074.
- [10] Ruokolainen H, Pako P, Turpeenniemi-Hujanen T. Expression of matrix metalloproteinase-9 (下转第 3324 页)

合的重要遗传因子。而多态性分布与腰椎后路横突间植骨融合之间无相关性($P=0.831$),因为影响腰椎后路横突间植骨融合的因素较多,脊柱后外侧横突间融合具有独特的局部微环境,横突细小,去皮质后对移植物的血液供应小,特别是移植物的中央部位,需要血管再生;横突间融合是在椎体旁肌肉间的大段异位成骨,其融合的机制和所受的力学环境比较复杂,影响因素较多。

骨融合是一个涉及多因子的复杂过程,包括骨生成、骨诱导和骨传导三个环节直至成骨和破骨间达到动态平衡,随着内固定器械的进步,骨融合率得到了巨大提高,但却依然不能避免融合失败的发生,据报道,脊柱植骨融合术后,无骨融合率为 5%~30%,非优良骨融合率高达 40%,因此对影响植骨融合的影响因子的研究变得尤为重要,本实验通过对 COL1A1 基因 -1997G/T 多态性的研究发现,该基因多态性与颈椎前路自体髂骨椎间植骨融合有相关性,可能是促进脊柱融合的关键因子。由于该实验仅限于山东半岛地区,病例数量相对不足,还需要继续加大样本量研究。

目前对于进行脊柱融合的患者而言,选择自体髂骨植骨融合仍然是临床的常规治疗方法,但基因治疗在国内外研究中日渐广泛,动物试验研究表明局部基因治疗可以促进脊柱融合^[1]。根据本实验研究结果,可尝试将 COL1A1 基因 GG 型种子细胞导入需行融合的脊柱节段的特定解剖部位,以期促进局部脊柱融合。由于该实验尚未成熟,需要进行大规模的临床研究,基因治疗技术有望成为促进脊柱融合的常规手段。

参考文献:

- [1] Tao J, Xu YW, Zheng X, et al. Relationship between the polymorphism of collagen 1 alpha 1 gene and primary osteoporosis[J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2004, 10(1):42.
- [2] Garcia-Giralt N, Nogue X, Enjuanes A, et al. 2002 Two new single nucleotide polymorphisms in the COL1A1 upstream regulatory region and their relationship with bone mineral density[J]. J Bone Miner Res, 2007, 17:384.
- [3] Hubacek JA, Weichetova M, Bohuslavova R, et al. No associations between genetic polymorphisms of TGF-beta, PAI-1, and COL1A1, and bone mineral density in Caucasian females[J]. Endocr Regul, 2006, 40:107.
- [4] 周传利,陈晓亮. 骨形态发生蛋白 2 基因表达异常与脊柱融合的相关性研究[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(3):45.
- [5] 袁百胜,陈晓亮. TGF-β1 基因单核苷酸多态性与脊柱融合[J]. 青岛大学医学院学报, 2007, 25:612.
- [6] Nguyen TV, Esteban LM, White CP, et al. Contribution of the collagen I alpha1 and vitamin D receptor genes to the risk of hip fracture in elderly women[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(12):6575.
- [7] Braga V, Mottes M, Mirandola S, et al. Association of CTR and COL1A1 alleles with BMD values in peri- and postmenopausal women[J]. Calcif Tissue Int, 2000, 67:361.
- [8] Harris SS, Patel MS, Cole DE, et al. Associations of the collagen type I alpha 1 Sp1 polymorphism with five-year rates of bone loss in older adults[J]. Calcif Tissue Int, 2000, 66:268.
- [9] Macdonald HM, Mcguigan FA, New SA, et al. COL1A1 Sp1 polymorphism predicts perimenopausal and early postmenopausal spinal bone loss[J]. J Bone Miner Res, 2001, 16:1634.
- [10] Zhang YY, Lei SF, Mo XY, et al. 2005 The -1997 G/T polymorphism in the COL1A1 upstream regulatory region is associated with hip bone mineral density (BMD) in Chinese nuclear families[J]. Calcif Tissue Int, 2002, 76:107.
- [11] Hall KO, Moon IG, Hwang CS, et al. Lack of an intronic Sp1 binding site polymorphism at the collagen type I alpha 1 gene in healthy Korean women[J]. Bone, 1999, 24:135.
- [12] Lambrinoudaki I, Kung AW. Absence of high-risk "s" allele associated with osteoporosis at the intronic sp1 binding-site of collagen I alpha gene in Southern Chinese[J]. J Endocrinol invest, 2001, 24:499.
- [13] Lind M, Deleuran B, Thestrup-Pedersen K, et al. Chemotaxis of human osterblasts effects of osteotropic growth factors[J]. APMS, 1995, 103(2):140.
- [14] Cook SD, Salkeld SL, Brinker MR, et al. Use of an osteoinductive biomaterial (rhOP-1) in heal large segmental long bone defects [J]. J Orauma, 1998, 12(6):407.

(收稿日期:2010-06-13 修回日期:2010-07-05)

(上接第 3321 页)

- in head and neck squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(9):3110.
- [11] Kaur B, Khwaja FW, Severson EA, et al. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis[J]. Neuro Oncol, 2005, 7(2):134.
 - [12] Sun MH, Han XC, Jia MK, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and matrix metalloproteinase-9 and their effects on angiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(38):

5931.

- [13] Morbidelli L, Donnini S, Ziche M. Role of nitric oxide in tumor angiogenesis[J]. Cancer Treat Res, 2004, 117:155.
- [14] Garvey EP, Oplinger JA, Furfine ES, et al. 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo[J]. J Biol Chem, 1997, 272(8):4959.
- [15] 叶君,孙红. 1400W 对宫颈癌 Hela 细胞株生长的抑制作用[J]. 复旦学报:医学版, 2009, 36(2):177.

(收稿日期:2010-06-28 修回日期:2010-07-11)