

[文章编号] 1007-385X(2006)04-0257-04

## 低氧环境下罗勒多糖对乳腺癌细胞 TIMPs mRNA 表达的影响

郭文菁<sup>1,2</sup>, 曲 迅<sup>2</sup>, 张彬彬<sup>2</sup>, 邵倩倩<sup>2</sup>, 高文娟<sup>2</sup>, 郑广娟<sup>3</sup>, 孔北华<sup>2</sup>(1. 山东大学第二医院妇产科, 济南 250033; 2. 山东大学齐鲁医院临床基础研究所, 济南 250012; 3. 山东中医药大学, 济南 250014)

**[摘要]** **目的:** 探讨低氧对人乳腺癌细胞株 MDA-231 金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPs)mRNA 表达的影响, 以及罗勒多糖(basil polysaccharide, BP)对 TIMPs 的作用。**方法:** 分别置 MDA-231 细胞株于常氧(21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>)、低氧(1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>和 94% N<sub>2</sub>)环境中中和罗勒多糖(200 μg/ml)培养 6 h, RT-PCR 技术检测不同处理组细胞 TIMP1、2、3 mRNA 水平。**结果:** MDA-231 细胞株表达 TIMP1、2 mRNA, 未检测到 TIMP3 mRNA; 低氧环境下 MDA-231 细胞株 TIMP1、2 mRNA 水平显著上升( $P < 0.05$ ); 罗勒多糖处理后 TIMPs mRNA 的含量, 无论常氧组还是低氧组都有显著改变: 常氧环境下罗勒多糖可明显下调 MDA-231 细胞株中 TIMP1、2 mRNA 的表达( $P < 0.05$ ), 而低氧环境下则显著上调其表达( $P < 0.05$ )。**结论:** 罗勒多糖在常氧及低氧环境下对 MDA-231 细胞 TIMP1、2 基因表达的影响效应截然相反, 提示抗肿瘤药物及生物疗法的体外机制研究设计应充分考虑氧环境的影响。

**[关键词]** 低氧; 金属蛋白酶组织抑制剂; 乳腺癌细胞; 罗勒多糖

[中图分类号] R73 [文献标识码] A

## Effect of basil polysaccharide on mRNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in human breast cancer cell line cultured under hypoxia

GUO Wen-jing<sup>1,2</sup>, QU Xun<sup>2</sup>, ZHANG Bin-bin<sup>2</sup>, SHAO Qian-qian<sup>2</sup>, GAO Wen-juan<sup>2</sup>, ZHENG Guang-juan<sup>3</sup>, KONG Bei-hua<sup>2</sup>(1. Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Hospital of Shangdong University, Ji'nan 250033, China; 2. Basic Medical Science Institute, Qi Lu Hospital of Shangdong University, Ji'nan 250012; 3. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250013)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of hypoxia on the mRNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in breast carcinoma cell line (MDA-231) and the effect of basil polysaccharide (BP) on the expression of TIMPs. **Methods:** MDA-231 cells were cultured under normoxia(21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>), hypoxia(1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 94% N<sub>2</sub>) or were treated with BP for 6 h separately. The expression of TIMP1, 2, 3 mRNA was detected by RT-PCR. **Results:** Expression of TIMP1, 2 mRNA, but not TIMP3 mRNA, was detected in MDA-231 cells. After cultured in hypoxia condition for 6 h, the expression of TIMP1 and TIMP2 mRNA increased significantly ( $P < 0.05$ ). The expression of TIMPs mRNA changed significantly in both hypoxia and normoxia group after BP treatment: the expression of TIMP1, 2 mRNA in normoxia group decreased significantly ( $P < 0.05$ ) and that in hypoxia increased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** BP has opposite influence on expression of TIMP1, 2 in human breast cancer cell line MDA-231 under hypoxia and normoxia conditions, indicating that *in vitro* study on anti-tumor drugs and bio-therapy should take the oxygen environment into consideration.

**[Key words]** hypoxia; tissue inhibitor of metalloproteinases; breast cancer cell; basil polysaccharide

[Chin J Cancer Biother, 2006, 13(4): 257-260]

低氧微环境是人体许多病理生理过程中普遍存在的状态, 如炎症组织及实体肿瘤等。实体肿瘤的特征之一是存在局部低氧微环境和大量的乏氧细胞。近年的研究资料<sup>[1-2]</sup>表明, 肿瘤细胞可通过基因表达的改变产生低氧适应并导致生物学特性的变化, 如转移倾向

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30472261)

**[作者简介]** 郭文菁(1972-), 女, 主治医师, 博士研究生, 主要从事妇科肿瘤方面的研究

**[通讯作者]** 曲迅, E-mail: quxun@sdu.edu.cn;

孔北华, E-mail: kongbeihua@sdu.edu.cn

升高等。然而,我们以往对肿瘤转移及抗肿瘤制剂的体外效应研究通常采用常氧条件,因此对诠释其体内效应可能产生影响。本研究利用乳腺癌细胞株 MDA-231,分析低氧环境下金属蛋白酶组织抑制剂( tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs )表达的改变及本课题组研制的中药罗勒多糖( basil polysaccharide, BP )<sup>[3,4]</sup>在不同氧环境下对其表达的影响,探讨肿瘤细胞低氧适应中 TIMPs 基因表达的变化及药物体外效应的影响,旨在为体外抗肿瘤药物分子机制研究提供更为符合机体内环境的设计思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

罗勒多糖系本课题组从香草族植物罗勒中,经分离、提取及初步精制得到的药物有效成分<sup>[3,4]</sup>,浓度为 10 g/ml。Trizol 试剂购自 Gibco 公司。

### 1.2 细胞株和细胞培养

将人乳腺癌细胞株 MDA-231( 购自上海华舜生物工程 )在含 10% 小牛血清、100 U/ml 青、链霉素的 RPMI 1640 培养液内,于 5% CO<sub>2</sub>、21% O<sub>2</sub>、37℃ 条件下培养。细胞常规传代培养 12 h,收集细胞,调密度至 2 × 10<sup>6</sup>/ml,分成 4 组:常氧( 21% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> )组、罗勒多糖( 200 μg/ml )于常氧环境下处理组、低氧( 1% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>和 94% N<sub>2</sub> )组和罗勒多糖于低氧环境下处理组。4 组细胞分别培养 6 h,收集细胞,提取细胞总 RNA。

### 1.3 各组细胞 mRNA 的 RT-PCR 检测

Trizol 试剂一步法提取总 RNA,紫外分光光度计测纯度和浓度。取 2 μg 总 RNA,经反转录 PCR 扩增 TIMP1、2、3,同时扩增 β-actin 作内对照。引物由上海生工公司合成:TIMP1 引物序列为 5'-ACAGACGGCCT-TCTGCAATTC-3'( 正义 ), 5'-GGTGTAGACGAACCG-GAT GTCA-3'( 反义 );TIMP2 引物序列为 5'-GT-TCAAAGGGCCTGAGAAGGA-3'( 正义 ), 5'-CCAGGG CACGATGAAGTCA-3'( 反义 );TIMP3 引物序列为 5'-GCCTTCTGCAACTCC GACAT-3'( 正义 ), 5'-TCTCG-GAAGCTTCCGTATGG-3'( 反义 )。PCR 反应条件为:94℃ 变性 5 min,35 个循环:94℃ 45 s,59℃ 1 min,72℃ 90 s,72℃ 延伸 5 min,扩增片段大小皆为 166 bp。β-actin 引物序列为 5'-TTGCCGACAGGATGCAGAA-3'( 正义 ), 5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3'( 反义 ), 扩增片段为 101 bp。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,应用柯达 Image station MM2000 自动成像分析仪对 DNA 电泳条带进行分析,测定各条带的灰度值,计算积分灰度值。本实验重复 3 次。

### 1.4 统计学处理

利用 SPSS10.0 统计软件对所得的数据进行两两分析,两组之间的比较采用 One-Sample *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 低氧对 MDA-231 细胞 TIMPs mRNA 表达的影响

结果如图 1 所示,常氧条件下 MDA-231 细胞株中检测到 TIMP1、2 mRNA 的表达,但未检测到 TIMP3 mRNA;低氧环境下 MDA-231 细胞内 TIMP1、2 mRNA 的水平显著上调( *P* < 0.05 )。

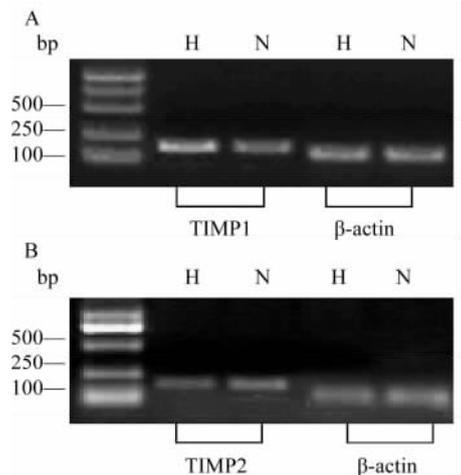


图 1 常氧和低氧环境下 MDA-231 细胞株 TIMPs mRNA 的表达

Fig. 1 Effect of hypoxia on expression of TIMPs mRNA in MDA-231 cells

A: TIMP1 mRNA; B: TIMP2 mRNA; H: Hypoxia; N: Normoxia

### 2.2 常氧环境中罗勒多糖对 MDA-231 细胞株 TIMPs mRNA 表达的影响

结果如图 2 和表 1 所示,与空白对照组比较,常氧环境中,罗勒多糖处理组 MDA-231 细胞内 TIMP1、2 mRNA 的水平显著下调( *P* < 0.05 )。

### 2.3 低氧环境中罗勒多糖对 MDA-231 细胞株 TIMPs mRNA 表达的影响

结果如图 2 和表 1 所示,在低氧环境中,罗勒多糖处理的 MDA-231 细胞株与空白对照组比较,细胞内 TIMP1、2 mRNA 水平上调( *P* < 0.05 )。

## 3 讨论

低氧是人类和动物肿瘤组织微环境的共同特征。肿瘤尤其是实体瘤在生长的过程中,由于新生血管功能紊乱导致局部出现低氧区域<sup>[5]</sup>。近年的研究资料表

明,肿瘤细胞可通过基因表达的改变并导致生物学特性的变化以适应低氧微环境,如低氧可导致肿瘤细胞缺氧诱导因子-1( HIF-1 $\alpha$ )水平升高<sup>[6]</sup>,其调控的下游许多基因如 VEGF 等促血管形成的基因表达升高<sup>[7]</sup>,从而导致其转移、耐药性等特性的改变。肿瘤转移是肿瘤恶性行为最本质的表现,也是导致手术、化疗、放

疗失败并最终引起患者死亡的主要因素。因此,防止肿瘤的侵袭与转移是降低肿瘤病死率的重要途径之一。然而目前临床尚无有效的抗转移药物,因此,深入研究肿瘤转移的分子机制,筛选高效、低毒的抗转移药物一直是抗肿瘤研究的热点之一。

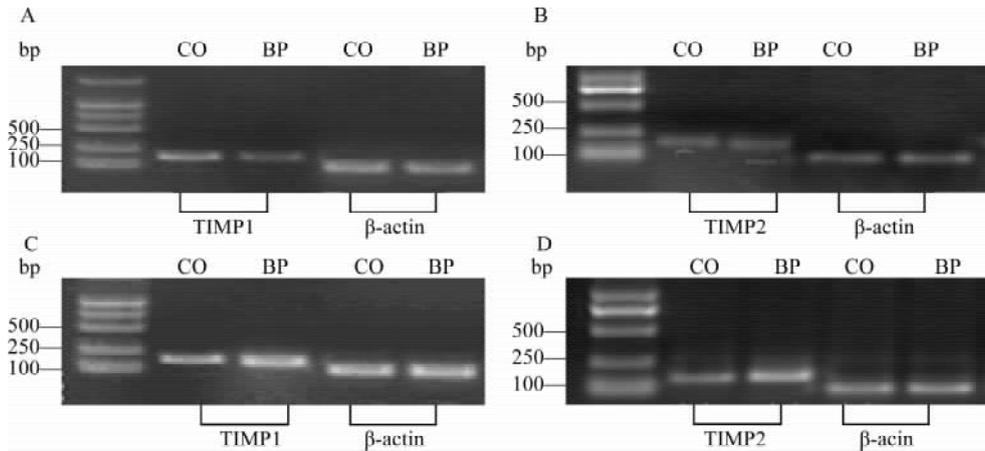


图2 常氧和低氧环境中罗勒多糖对 MDA-231 细胞株 TIMPs mRNA 表达的影响

Fig. 2 Effect of BP on expression of TIMPs mRNA in MDA-231 cell line cultured under normoxia or hypoxia

A, B: Normoxia; C, D: Hypoxia; CO: Control; BP: Basil polysaccharide

表1 常氧和低氧条件下罗勒多糖对 MDA-231 细胞 TIMPs 作用的比较( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Comparison of BP effect on TIMPs mRNA expression in MDA-231 cultured under normoxia and hypoxia

Index	Normoxia		Hypoxia	
	Control	Basil polysaccharide	Control	Basil polysaccharide
TIMP1 mRNA	0.63 $\pm$ 0.18	0.15 $\pm$ 0.02 *	0.95 $\pm$ 0.12	1.40 $\pm$ 0.96 *
TIMP2 mRNA	0.80 $\pm$ 0.38	0.68 $\pm$ 0.17 *	1.90 $\pm$ 0.26	2.33 $\pm$ 0.34 *

\*  $P < 0.05$  vs control;  $n = 3$

TIMP/MMP 是目前较为公认的调控肿瘤细胞侵袭与转移特性的重要酶类系统,因此成为抗转移药物设计的重要靶点<sup>[8]</sup>。许多的基质金属蛋白酶抑制剂包括从天然药物中筛选出来的制剂,如茶多酚、姜黄素等,在体外显示了良好的抗转移效应,然而其体内效应与分子机制有时与体外不符。其原因之一可能与目前体外进行肿瘤转移分子机制及药物效应靶点的研究,通常忽略了肿瘤体内低氧微环境的特性有关。我们在对树突状细胞低氧感受特性的研究中发现,TIMPs 的表达显著受微环境氧分压的影响。基于此,我们利用乳腺癌 MDA-231 细胞系,观察了低氧以及低氧微环境中中药罗勒多糖对肿瘤细胞 TIMPs 表达的影响。研究结果发现,MDA-231 细胞株从转录水平可检测到 TIMP1、

2 mRNA,且显著受氧环境的影响,低氧(1%  $O_2$ )微环境可上调 TIMP1、2 基因的表达。

本研究发现罗勒多糖在常氧与低氧微环境下对 MDA-231 细胞 TIMP1、2 基因表达的影响不同:常氧条件下罗勒多糖可显著下调 TIMP1、2 基因表达,而低氧条件下则显示明显上调其表达。结果表明,氧环境不同能影响体外药物效应分子机制的研究结果,提示在进行体外抗肿瘤药物分子机制研究中应充分考虑微环境氧分压的影响,从而筛选出更为有效的抗转移药物。

#### [参考文献]

[1] Vaupel P, Mayer A. Hypoxia and anemia: effects on tumor biology and treatment resistance[J]. Transfus Clin Biol, 2005, 12(1):

- 5-10.
- [ 2 ] Vaupel P, Hockel M. Hypoxia in cervical cancer: pathogenesis, characterization, and biological/clinical consequences[ J ]. Zentralbl Gynakol, 2001, 123( 4 ): 192-197.
- [ 3 ] Qu X, Zheng GJ, Yang MX, *et al.* Experiment studies of antitumor proliferation and metastasis of a new Chinese herb AT-1[ J ]. Chin J Cancer Res, 2003, 15( 3 ): 223-226.
- [ 4 ] 曲 迅, 郑广娟, 刘福利, 等. 罗勒多糖抗肿瘤转移效应的体内试验研究[ J ]. 中西医结合杂志, 2004, 10( 2 ): 138-140.
- [ 5 ] Baronzio G, Freitas I, Kwaan HC. Tumor microenvironment and hemorheological abnormalities[ J ]. Semin Thromb Hemost, 2003, 29( 5 ): 489-497 .
- [ 6 ] Lauzier MC, Michaud MD, Dery MA, *et al.* HIF-1 activation during tumor progression: implications and consequences[ J ]. Bull Cancer, 2006, 93( 4 ): 349-356.
- [ 7 ] Tong Q, Zheng L, Lin L, *et al.* VEGF is upregulated by hypoxia-induced mitogenic factor via the PI-3K/Akt-NF-kappaB signaling pathway[ J ]. Respir Res, 2006, 7: 37.
- [ 8 ] Moche M, Hui DS, Huse K, *et al.* Matrix metalloproteinases and their inhibitors in lung cancer with malignant pleural effusion[ J ]. Pneumologie. 2005, 59( 8 ): 523-528.
- [ 收稿日期 ] 2005 - 11 - 24 [ 修回日期 ] 2006 - 05 - 19
- [ 本文编辑 ] 王 莹

## · 科技动态 ·

## 树突状细胞凋亡在维持免疫耐受中的作用

细胞凋亡缺陷可以引起自身免疫疾病,但先前的研究发现,只抑制 T 细胞或 B 细胞的凋亡并不能诱发自身免疫疾病,这提示其他类型细胞的凋亡缺陷在自身免疫中起重要作用。树突状细胞(DC)是目前已知的体内功能最强的抗原提呈细胞,有研究发现自身免疫疾病的动物模型中存在 DC 的凋亡缺陷。因此,推测 DC 的凋亡缺陷可能引起自身免疫。

病毒来源的 p35 基因抑制细胞的凋亡。借助于此,该研究课题建立了 p35 的转基因小鼠,使 p35 的表达受控于 CD11c 启动子,因此该模型带有 DC 凋亡缺陷特征。同时,作为对照,也建立了表达受控于 CD2 或 CD19 启动子的 p35 转基因小鼠,分别带有 T 细胞和 B 细胞凋亡缺陷特征。DC-p35 小鼠的外周和中枢淋巴器官中的 DC 均出现了增生,而 T、B、NK 和巨噬细胞却无明显变化,表明 DC-p35 体内确实出现了 DC 的蓄积。在 DC-p35 小鼠脾脏中发现 T 细胞和 B 细胞表达了活化标志 CD69,而对照组的小鼠的却无明显活化。DC-p35 小鼠的 Treg 的功能和数量均显示正常,且其发育和 T 细胞的阴性选择也正常,说明 DC-p35 小鼠体内的淋巴细胞的慢性活化由 DC 凋亡缺陷引起。在 1~3 个月龄 DC-p35 小鼠的 CD11<sup>+</sup> DC 并未因 Caspase-8 的抑制而发育失常,Brdu 标记发现 DC 可被新生的 Brdu<sup>+</sup> DC 以正常速率取代,说明 p35 的表达并不能影响 DC 的发育。

注射 Brdu 于小鼠,再用 OVA 免疫,发现 DC-p35 小鼠引流淋巴结中的 Brdu<sup>+</sup> mDC 的减少较野生小鼠慢,而 Brdu<sup>+</sup> pDC 数量急剧增大,第 2 天后又急剧下降,到第 4 天始下降速度减慢,其增殖速度与对照组相似,而减少速度却要慢得多。由此说明在 DC-p35 小鼠体内,DC 在活化的免疫应答过程中存活时间大大延长。将 CFSE 标记的 OVA<sup>+</sup> TCR 转基因鼠的 CD8<sup>+</sup> T 细胞移植给受体小鼠,再移植经 OVA 抗原免疫的 DC-p35 或对照组小鼠 DC,发现 DC-p35 小鼠来源的 DC 能诱导更强的 T 细胞增殖。类似地,它还能诱导体内 OVA 特异的 CD4<sup>+</sup> 的 OT<sub>2</sub><sup>+</sup> T 细胞的显著增生。OVA 抗原免疫的 DC-p35 小鼠体内还检测到过度的免疫应答,以上研究从体内和体外实验证明 DC-p35 小鼠体内分离的 DC 较对照小鼠明显地诱导更强和持久的抗原特异性免疫应答。

DC-P35 或 FAS 缺陷的 MRL/lpr 小鼠体内的 DC 比 Bcl-2 转染的 DC 更容易诱导抗核抗体 ANA 的生成,说明 p35-DC 也有诱导自身抗体生成的潜力。在比较了年幼的和年长的 DC-p35 小鼠自身抗体产生情况并与对照组比较后发现,随着年龄的增长,ANA 抗体的产生也会相应增多。当把 DC-p35 和 T 或 B-p35 对照组小鼠杂交后,ANA 滴度并未明显变化,说明 p35 介导的 T 或 B 细胞凋亡缺陷在促进 DC-p35 小鼠的自身抗体产生过程中并不是重要因素。在能检测到 ANA 的 12 个月大的 DC-p35 小鼠肺里都有 DC 聚集和淋巴细胞浸润,说明在 C57BL/6 背景下 DC-p35 小鼠能在较大年龄产生自身免疫。将 DC-p35 小鼠和 MRL/lpr 小鼠进行 4 代回交,发现 6 个月大时有显著 DC 聚集和增生,以及 T 细胞的活化现象。该小鼠未表现在 MRL/lpr 小鼠体内存在的 TCRαβ<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> cCD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> T 细胞的增生,说明该种 T 细胞的增生并非由 DC 凋亡缺陷引起。DC-p35/MRL 小鼠大部分在 6 个月大时都产生 ANA,且血清 Hep2 细胞的胞核有斑点状染色。支气管、肝、肾周围血管有淋巴细胞聚集,肾小球内也有 IgG 的沉积,说明带有 MRL 背景的 DC-p35 小鼠能更早产生自身免疫。

以上研究表明 DC 缺陷是体内自身免疫应答的重要因素,因此,DC 可能成为控制自身免疫性疾病的有效靶点。

[ 倪琦琦 摘译,刘书逊 审阅,Chen M, Wang YH, Wang Y, *et al.* Science. 2006, 311( 5764 ): 1160-1164 ]