

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.01.011

阿苯达唑抑制结肠癌 SW480 细胞的侵袭和迁移能力及其可能的机制

刘劲松, 李丽萍 (仙桃市第一人民医院 肿瘤科, 湖北 仙桃 433000)

[摘要] 目的: 探索阿苯达唑 (albendazole) 抑制结肠癌 SW480 细胞侵袭和迁移能力及其可能的机制。方法: 体外培养人结肠癌 SW480 细胞, 用不同质量浓度 (0、1.0 和 2.0 mg/ml) 的 albendazole 处理人结肠癌 SW480 细胞, CCK-8 法检测 albendazole 对结肠癌 SW480 细胞增殖能力的影响, 采用细胞划痕实验、Transwell 小室实验检测细胞的迁移侵袭能力, 免疫细胞化学及 Western blotting 检测 SW480 细胞中 E-cadherin、MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达水平。结果: 与空白对照组比较, albendazole 各质量浓度 (1.0 和 2.0 mg/ml) 组细胞的增殖能力明显降低, SW480 细胞侵袭细胞数显著下降 [(51.33 ± 3.96)、(23.42 ± 4.03) vs (80.76 ± 7.18) 个/视野, $F=3.975$, $P=0.026$]; 而且细胞迁移能力显著下降 [(9.6 ± 1.13)、(6.4 ± 0.81) vs (19.6 ± 1.41) mm; $F=5.012$, $P=0.023$]; E-cadherin 蛋白表达水平上调, MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平明显下调。结论: Albendazole 能显著抑制 SW480 细胞增殖, 并通过上调 E-cadherin 的表达水平和下调 MMP-2 和 MMP-9 的分泌水平抑制细胞的侵袭和迁移能力。

[关键词] 阿苯达唑; 结肠癌; SW480 细胞; 侵袭; 迁移

[中图分类号] R735.3; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)01-0062-05

Albendazole-mediated inhibition on invasion and migration of colon carcinoma SW480 cells and the underlying mechanisms

Liu Jinsong, Li Liping (Department of Oncology, The First People's Hospital of Xiantao, Xiantao 433000, Hubei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of albendazole on colon carcinoma cell invasion and migration as well as the mechanisms underlying the effect. **Methods:** Colon carcinoma SW480 cells were treated with albendazole at 0 mg/ml, 1.0 mg/ml and 2.0 mg/ml. Cell proliferation was assessed by a cell proliferation assay using a cell counting Kit-8 (CCK-8), cell migration and invasion by wound-healing assays and transwell chamber assays, respectively, and protein levels of E-cadherin, MMP-2 and MMP-9 by immunocytochemistry and Western blotting. **Results:** Compared with the control (0 mg/ml), 1.0 mg/ml and 2.0 mg/ml albendazole significantly inhibited SW480 cell proliferation ($P < 0.05$), and significantly decreased the invasion and migration in SW480 cells at both concentrations tested ($P < 0.05$). Albendazole treatments significantly reduced the protein level of MMP-2 and MMP-9 but increased the protein level of E-cadherin. **Conclusion:** Albendazole can inhibit the invasion and migration of SW480 cells, at least partially through up-regulating the expression of E-cadherin and down-regulating the expression of MMP-2 and MMP-9.

[Key words] albendazole; SW480 cells; invasion; migration

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(1): 62-66]

结肠癌是常见的消化道恶性肿瘤之一, 近年来我国结肠癌的发病率和病死率呈逐年上升的趋势。因结肠癌早期无明显症状, 临床确诊时大多数患者已经属晚期, 患者的 5 年生存率仅为 50% 左右^[1-2], 肿瘤的复发转移成为结肠癌治疗失败的主要原因。化疗是结肠癌重要的治疗手段之一, 但抗肿瘤药物的选择性差、毒性作用大, 因此, 探索高效低毒的抗肿瘤药已成为目前研究的热点。

阿苯达唑 (albendazole, ABZ) 是临床上最常使

用的抗寄生虫药之一, 有学者^[3]首先于 1985 年发现 ABZ 可在体外抑制小鼠白血病细胞 L1210 的生长, 其后 ABZ 抗肿瘤效应引起了广大学者的兴趣, 随着研究的深入, ABZ 抗肿瘤细胞增殖的作用在前列腺

[作者简介] 刘劲松 (1968 -), 男, 湖北省仙桃市人, 副主任医师, 主要从事肿瘤生物治疗的研究。E-mail: liujinsong010101@163.com

[通信作者] 李丽萍 (Li Liping, corresponding author), E-mail: liujun2013@163.com

癌、黑素瘤及卵巢癌中得到证实。

虽然目前众多研究已经证实 ABZ 确有抗肿瘤作用,但关于 ABZ 能否调控细胞黏附及运动能力,从而介导细胞侵袭和转移尚不明确。因此,本研究以结肠癌 SW480 细胞为研究对象,观察 ABZ 对结肠癌 SW480 细胞侵袭和迁移能力的影响,并探讨其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料及设备

人结肠癌 SW480 细胞购于中科院上海生物细胞库。RPMI-1640 培养基购于 Hyclone 公司,胎牛血清购自杭州四季清公司,ABZ 粉剂购自 Sigma 公司。兔抗人多克隆抗体 E-cadherin、MMP-2、MMP-9 购于美国 Santa Cruz 公司, β -actin 购于北京博奥森公司,辣根过氧化物酶标记的 IgG 二抗购于武汉博士德公司,Transwell 小室(Milipore PI8P01250 聚碳酸酯微孔膜,孔径 8 μm)购于美国 Costar 公司,Matrigel 重组人工基质胶购于美国 BD 公司,Giemsa 染液购于南京建成公司,免疫组化试剂盒和 DAB 显色试剂盒购于北京中杉生物技术有限公司。全蛋白提取试剂盒、ECL 检测试剂盒购于凯基生物公司, RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒购于大连宝生物,CCK-8 试剂盒购于上海碧云天公司。

1.2 细胞培养及药物配制

SW480 细胞置于含 100 U/ml 青霉素、100 mg/L 链霉素、10% 胎牛血清的 L-15 培养基中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度培养箱条件下常规培养,每 3 d 换培养液,细胞用 0.05% 胰蛋白酶消化传代,取对数生长期的细胞进行后续实验。将 10 mg ABZ 粉剂完全溶解于 5 ml 无菌 DMSO 中,按照实验分组分别配制成 1.0 和 2.0 mg/ml 的母液,密封,在避光、凉爽、干燥处保存。

1.3 CCK-8 法检测细胞增殖能力

取对数生长期的各组细胞,常规方法消化细胞制备单细胞悬液,调整细胞密度,以每孔 200 μl (含细胞数 5×10^3 个)接种于 96 孔板。实验分为空白对照组(加不含 ABZ 的完全培养液)、完全空白组(不含细胞且不含药物只加培养液)、1 mg/ml 实验组和 2 mg/ml 实验组。各组细胞常规条件下分别培养 0、24、48、72 h 后更换培养液(每孔加入 100 μl 无血清培养基),每孔加入 CCK-8 试剂 10 μl ,继续培养 2 h,在酶标仪上测定 490 nm 处的光密度(D)值,以各时间点的 D 值按公式计算抑制率。抑制率

(%) = $[1 - (\text{实验组 } D \text{ 值} - \text{完全空白组 } D \text{ 值}) / (\text{空白对照组 } D \text{ 值} - \text{完全空白组 } D \text{ 值})] \times 100\%$ 。

1.4 细胞划痕实验

取对数期各组细胞,分别用 0、1.0 和 2.0 mg/ml ABZ 处理 24 h,常规方法制备单细胞悬液,按照每孔 100 μl (细胞数 1×10^5 个)接种到 6 孔板内,每孔加入 500 μl 完全培养基常规条件下培养。待细胞长至 90% 融合形成单细胞层时,用消毒后的 100 μl 移液器枪头在单层细胞上垂直划过,形成一个划痕伤口。用 PBS 轻轻洗涤去除细胞碎片,剩余细胞继续置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下孵箱内继续培养。分别于 0、24 h 后在倒置显微镜下观察并拍下伤口愈合情况,用 Image Pro Plus 软件计算各组细胞迁移距离。实验重复 3 次。

1.5 细胞侵袭实验

用无血清预冷的 1640 培养液按照 1:8 的比例稀释制备 10 mg/ml 的 Matrigel 胶,将 100 μl 稀释后 Matrigel 胶均匀平铺于 Transwell 小室的聚碳酸酯微孔膜上制备成人工基底膜。将铺好胶的小室置于 24 孔培养板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h 使其成凝胶状。分别用 0、1.0 和 2.0 mg/ml ABZ 处理 24 h,常规方法消化细胞,用无血清培养基制备成 1×10^6 /ml 单细胞悬液,下室加入 500 μl 含 10% 胎牛血清的培养基,每组 3 个复孔,常规培养 24 h 后,取出小室,将上室细胞用棉签轻轻完全擦掉,多聚甲醛固定后 H-E 染色,取下小室微孔膜反转贴于载玻片上并封片。倒置显微镜下随机选择 10 个 400 倍视野,计数由小室迁移至微孔膜下的细胞数量,求得单个视野的平均穿膜细胞数。实验重复 3 次。

1.6 免疫细胞化学检测蛋白表达水平

在 24 孔板底放置预先处理过的无菌盖玻片,常规制备不同处理组(0、1.0 和 2.0 mg/ml)作用 24 h 后的细胞悬液爬片。按照 S-P9000 免疫组化试剂盒说明书进行操作,固定、过氧化氢封闭、山羊血清封闭,加一抗(稀释比例: E-cadherin 1:500, MMP-2 1:500, MMP-9 1:500) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,加二抗, DAB 显色,苏木精对比染色,脱水透明,中性树胶封片。用 PBS 作为阴性对照。以细胞质及周边有明显黄棕色颗粒沉积为阳性表达,在 200 倍显微镜下选定具有代表性的 24 个视野,照相并测定其光密度值进行计算。

1.7 Western blotting 检测蛋白表达水平

收集各组细胞,采用全蛋白提取试剂盒提取各组细胞蛋白,经 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。按照每孔 50 μg 总蛋白上样进行 SDS-PAGE。然后将蛋白转印到 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉

的 TBST 封闭 1 h 后加一抗 4 ℃ 过夜, (一抗稀释比例: E-cadherin 1: 500, MMP-2 1: 500, MMP-9 1: 500), TBST 洗 3 次, 每次 15 min, 然后加 HRP 标记的二抗 (1: 1 000) 温育 2 h, TBST 洗 3 次, 用化学发光法显影。Bio-Rad 凝胶成像系统采集图像, Quantity one 软件进行灰度值分析, 以 β -actin 为内参对照, 计算各个样本目的蛋白条带与 β -actin 条带的灰度比值, 作为目的蛋白的相对表达水平值。实验重复 3 次。

1.8 统计学处理

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS17.0 统计软件, 组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ABZ 对 SW480 细胞增殖的影响

CCK-8 法检测结果 (图 1) 显示, 与空白对照组及完全空白组相比, 1.0 及 2.0 mg/ml 质量浓度 ABZ 处理组的 *D* 值明显降低, 1.0 mg/ml ABZ 组 24、48 及 72 h 的增殖抑制率分别为 (9.77 ± 1.09)%、(14.33 ± 1.46)% 和 (23.04 ± 1.57)%、 $F = 4.563$, $P = 0.036$ 。2.0 mg/ml ABZ 组增殖抑制率分别为 (26.7 ± 2.18)%、(32.15 ± 2.49)% 和 (38.53 ± 3.12)% ($F = 2.952$, $P = 0.08$)。结果表明, ABZ 可抑制 SW480 细胞增殖, 而且随着 ABZ 浓度的增加和作用时间的延长, 其对 SW480 细胞增殖的抑制作用不断增强。

2.2 ABZ 对 SW480 细胞迁移能力的影响

细胞划痕实验结果 (图 2) 显示, 与空白对照组相比, 1.0 和 2.0 mg/ml ABZ 处理组的划痕愈合速度明显减慢。空白对照组 0 mg/ml ABZ 处理组 24 h 细胞迁移距离为 (19.6 ± 1.41) mm, 而 1.0 和 2.0 mg/ml 组细胞迁移距离分别为 (9.6 ± 1.13) mm 和 (6.4 ± 0.81) mm, 其差异具有统计学意义 ($F = 5.012$, $P = 0.023$)。结果表明, ABZ 能抑制 SW480 细胞体外迁移能力, 且随着 ABZ 浓度的增大, 抑制作用明显增强。

2.3 ABZ 抑制 SW480 细胞体外侵袭能力

Transwell 侵袭实验结果 (图 3) 显示, 与空白对照组相比, ABZ 各浓度处理组均能抑制 SW480 细胞体外侵袭能力, 0 mg/ml 组 24 h 细胞穿过 Matrigel 胶的细胞为 (80.76 ± 7.18) 个/视野, 而 1.0 和 2.0 mg/ml 组穿过 Matrigel 胶的细胞数分别为 (51.33 ± 3.96) 和 (23.42 ± 4.03) 个/视野, 其差异具有统计学意义 ($F = 3.975$, $P = 0.026$)。结果表明, ABZ 明显抑制 SW480 细胞体外侵袭能力, 且随着 ABZ 浓

度的增大, 抑制作用增大。

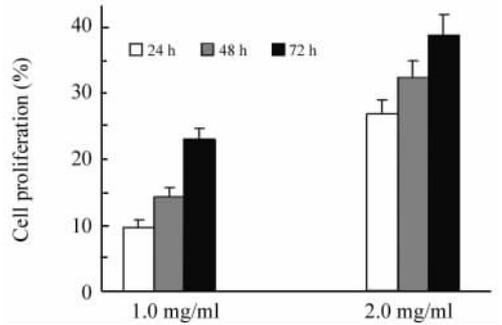


图 1 不同质量浓度 ABZ 对 SW480 细胞增殖的抑制 Fig. 1 Proliferation inhibition rate of SW480 cells induced by different mass concentrations ABZ

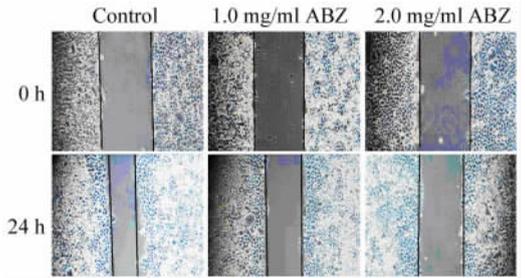


图 2 ABZ 对 SW480 细胞迁移能力的影响 (×100) Fig. 2 Effect of ABZ on migration ability of SW480 cells (×100)

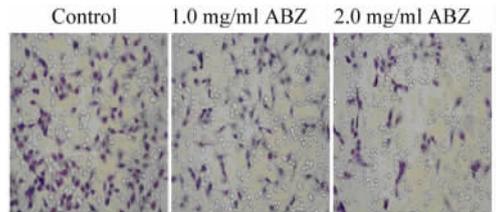


图 3 ABZ 对 SW480 细胞侵袭能力的影响 (×400) Fig. 3 Effect of ABZ on cell invasion in SW480 cells (×400)

2.4 ABZ 对 SW480 细胞 E-cadherin、MMP-2 及 MMP-9 蛋白表达影响的免疫细胞化学染色结果

免疫细胞化学结果 (图 4) 显示, E-cadherin、MMP-2 及 MMP-9 蛋白阳性染色部位均主要在细胞质, 为棕黄色颗粒 (图 4)。不同质量浓度 (0、1.0 和 2.0 mg/ml) ABZ 处理组 E-cadherin 平均 (*D*) 值分别为 (0.16 ± 0.07)、(0.44 ± 0.10) 和 (0.65 ± 0.13), 差异有统计学意义 ($F = 5.654$, $P = 0.003$)。3 组细胞 MMP-2 *D* 值分别为 (0.41 ± 0.10)、(0.21 ± 0.06) 和 (0.11 ± 0.02), 其差异具有统计学意义

($F=2.815$, $P=0.028$); MMP-9 的 D 值分别为 (0.39 ± 0.05)、(0.25 ± 0.03)和(0.14 ± 0.03), 差异具有统计学意义($F=3.872$, $P=0.018$)。

2.5 ABZ 对 SW480 细胞 E-cadherin、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达影响的 Western blotting 结果

Western blotting 结果(图 5)显示,与空白对照组相比较,1.0、2.0 mg/ml ABZ 处理组 E-Cadherin

表达明显上调,而 MMP-2 和 MMP-9 表达明显下调。与空白对照组比较,E-cadherin 蛋白表达增加率分别为 38.0%、60.7%,MMP-2 蛋白表达抑制率分别为 63.5%、70.8%,MMP-9 蛋白表达抑制率分别为 26.5%、52.9%,三者变化均具统计学意义($P < 0.05$)。

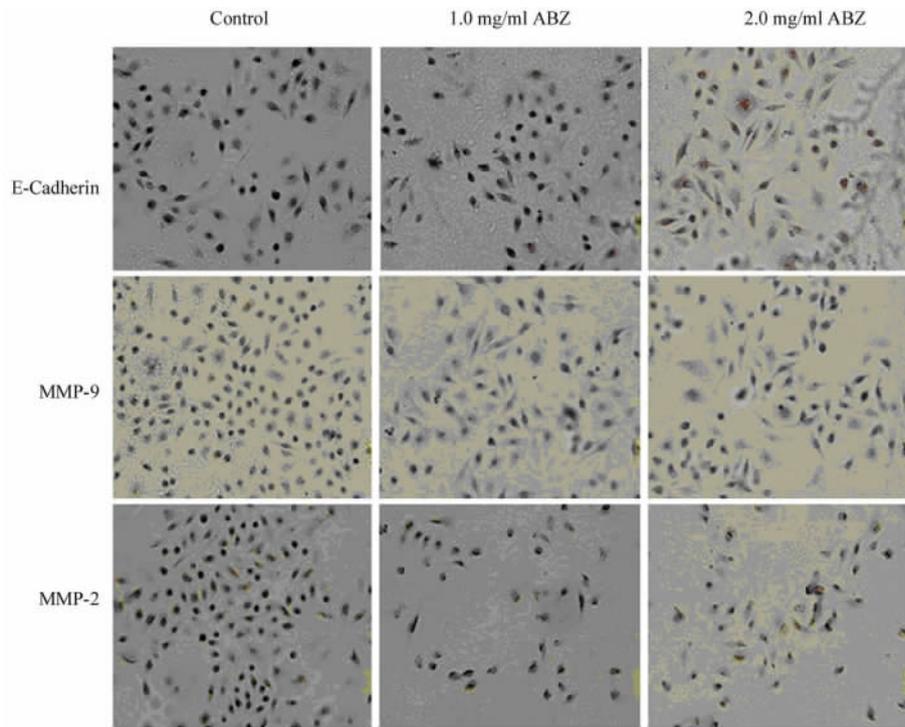


图 4 免疫细胞化学检测 SW480 细胞 E-cadherin、MMP-2、MMP-9 蛋白的表达(×200)

Fig. 4 Expressions of E-cadherin, MMP-2 and MMP-9 protein in SW480 cells detected by immunocytochemistry(×200)

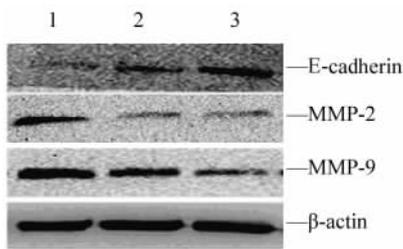


图 5 Western Blotting 检测 SW480 细胞 E-cadherin、MMP-2、MMP-9 蛋白的表达

Fig. 5 Expressions of E-cadherin, MMP-2 and MMP-9 protein in SW480 cells detected by Western blotting

1: Control; 2: 1.0 mg/ml ABZ; 3: 2.0 mg/ml ABZ

3 讨论

肿瘤浸润的三步学说(黏附、降解、转移)表明,

肿瘤由原位增殖到侵袭转移依靠肿瘤细胞降解细胞基质来实现。在这个过程中有一个重要因素就是基底膜破坏和细胞外基质的降解,E-cadherin 和基质金属蛋白酶家族(matrix metalloproteinases, MMPs)是这一过程中不可缺少的关键因子。E-cadherin 是钙依赖性钙黏素黏附分子家族的一个成员,参与了多种细胞功能,其与细胞骨架蛋白之间连结对维持细胞形态和调节细胞黏附及运动能力具有重要作用^[4-5],其在肿瘤侵袭和转移潜能中发挥着关键性的作用。MMPs 是一类活性依赖于锌离子和钙离子的蛋白水解酶,主要的生理作用是降解细胞外基质,其在肿瘤的浸润和转移研究中是一个重要指标。MMPs 家族中 MMP-2 和 MMP-9 主要降解基底膜的 IV 型胶原成分,肿瘤细胞中常常过度表达,通过对 IV 型胶原成分的降解,使这些屏障消失或减弱,促进了癌细胞的侵袭和转移。

研究^[6]表明,相对于正常组织,E-cadherin在肿瘤细胞中低表达或不均匀表达,使肿瘤细胞具有破坏和降解基底膜及细胞外基质的能力,从而导致肿瘤发生侵袭转移。E-cadherin与肿瘤侵袭转移关系在体外实验中得到证实,在体外培养的具有高侵袭力的乳腺癌细胞中,E-cadherin的表达呈不同程度的减弱或缺失^[7]。用小鼠 E-cadherin cDNA 质粒导入缺 E-cadherin 的高侵袭细胞系,该细胞系 E-cadherin 呈高水平表达,同时转染细胞的侵袭能力减弱^[8]。MMPs 主要通过对 IV 型胶原成分的降解,使细胞外基质和基底膜所形成的屏障消失或减弱,促进了肿瘤细胞的侵袭转移。MMP-2 和 MMP-9 在正常组织或良性肿瘤中无表达或低表达,而癌组织及转移灶中表达和活性显著增强。E-cadherin 与恶性肿瘤的分化程度、侵袭转移及预后密切相关,E-cadherin 低表达和不稳定表达可促进基质金属蛋白酶的分泌,促进肿瘤侵袭转移的发生^[9-10]。

ABZ 抗肿瘤作用主要为以下几个方面:(1)抑制肿瘤细胞的增殖和有丝分裂;(2)介导肿瘤细胞凋亡和分化;(3)参与细胞信号通路转导;(4)抑制肿瘤细胞血管形成。Belaz 等^[11]发现,ABZ 的衍生物能够抑制前列腺癌细胞的生长,它作用于细胞微管蛋白,从而表现出高效的抑制癌细胞增殖的能力。用 ABZ 处理经 RNA 干扰降低 Bcl-2 蛋白水平的黑素细胞,不仅微管解聚,还发生了凋亡^[12]。接种了卵巢癌 OVCAR-3 细胞的小鼠模型中,ABZ 能够通过抑制 HIF-1 α 而降低 VEGF 的表达,使其干扰肿瘤血管生成^[13]。

本实验对体外培养的结肠癌 SW480 细胞用不同浓度的 ABZ 进行干预,观察其对 SW480 细胞侵袭转移能力的影响,探讨其抑制肿瘤细胞侵袭转移的分子机制。研究表明,1.0 mg/ml 及 2.0 mg/ml 的 ABZ 对 SW480 细胞增殖均有明显抑制作用,且随着浓度的增加和作用时间的延长,其增殖抑制作用也逐渐增强。为进一步明确 ABZ 抑制结肠癌 SW480 细胞侵袭和迁移的机制,采用免疫细胞化学和 Western blotting 检测 E-cadherin、MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达情况,结果表明 ABZ 能够上调 E-cadherin 蛋白表达、下调 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达。

综上所述,ABZ 在体外可明显抑制 SW480 细胞增殖及侵袭转移能力,其机制可能与上调 E-cadherin 蛋白表达并抑制 MMP-2 和 MMP-9 的分泌有关,但其具体分子机制仍需进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Janakiram NB, Mohammed A, Bronze MS, et al. Prophylactic

vaccine approach for colon and pancreatic cancers: Present and future [J]. *Curr Med Chem*, 2012, 19(22): 3664-3678.

- [2] Zhao Y, Chen ZX, Rewuti A, et al. Quantitative assessment of the influence of cytochrome P450 1A2 gene polymorphism and colorectal cancer risk [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e171481.
- [3] Lacey E, Watson TR. Activity of benzimidazole carbamates against L1210 mouse leukaemia cells: Correlation with *in vitro* tubulin polymerization assay [J]. *Biochem Pharmacol*, 1985, 34(19): 3603-3605.
- [4] Wang LY, Liu YP, Chen LG, et al. Pyruvate kinase M2 plays a dual role on regulation of the EGF/EGFR signaling via E-cadherin-dependent manner in gastric cancer cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67542.
- [5] Lee DJ, Kang DH, Choi M, et al. Peroxiredoxin-2 represses melanoma metastasis by increasing E-cadherin/ β -catenin complexes in adherens junctions [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(15): 4744-4757.
- [6] Zuo JH, Zhu W, Li MY, et al. Activation of EGFR promotes squamous carcinoma SCC10A cell migration and invasion via inducing EMT-like phenotype change and MMP-9-mediated degradation of E-cadherin [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(9): 2508-2517.
- [7] Inaguma S, Kasai K, Ikeda H. GLI1 facilitates the migration and invasion of pancreatic cancer cells through MUC5AC-mediated attenuation of E-cadherin [J]. *Oncogene*, 2011, 30(6): 714-723.
- [8] Lin MC, Wang FY, Kuo YH, et al. Cancer chemopreventive effects of lycopene: Suppression of MMP-7 expression and cell invasion in human coloncancer cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(20): 11304-11318.
- [9] McConkey DJ, Choi W, Marquis L, et al. Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2009, 28(3/4): 335-344.
- [10] You TK, Kim KM, Noh SJ, et al. Expressions of E-cadherin, cor-tactin and MMP-9 in pseudoepitheliomatous hyperplasia and squamous cell carcinoma of the head and neck: Their relationships with clinicopathologic factors and prognostic implication [J]. *Korean J Pathol*, 2012, 46(4): 331-340.
- [11] Belaz KR, Denadai M, Almeida AP, et al. Enantiomeric resolution of albendazole sulfoxide by semipreparative HPLC and *in vitro* study of growth inhibitory effects on human cancer cell lines [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 66(1): 100-108
- [12] Doudican N, Rodriguez A, Osman I, et al. Menbendazole induces apoptosis via Bcl-2 inactivation in chemoresistant melanoma cells [J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6(8): 1308-1315.
- [13] Pourgholami MH, Cai ZY, Badar S, et al. Potent inhibition of tumoral hypoxia-inducible factor 1 alpha by albendazole [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10(1): 143-151.

[收稿日期] 2013-10-26

[修回日期] 2013-11-25

[本文编辑] 韩丹