

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.03.005

· 基础研究 ·

MPPa-PDT 抑制骨肉瘤 MG-63 细胞侵袭和迁移

尹航, 陶勇, 欧云生, 黄秋, 陈艳阳 (重庆医科大学附属第一医院 骨科, 重庆 400016)

[摘要] **目的:** 探讨焦脱镁叶绿酸-a 甲酯介导的光动力疗法(methyl ester pyropheophorbide-a mediated photodynamic therapy, MPPa-PDT) 对人骨肉瘤 MG-63 细胞迁移及侵袭的影响及其可能机制。**方法:** 采用 CCK-8 检测经 MPPa-PDT 处理后不同时间点的人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖活性; 划痕实验及 Transwell 实验检测细胞迁移、侵袭能力; Western blotting 检测 E-钙黏蛋白(E-cad)和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-2、-9 蛋白的表达水平。**结果:** MPPa-PDT 处理 MG-63 细胞 12、24 及 48 h 后 MPPa-PDT 组细胞增殖能力明显较对照组、MPPa 组和 LED 组细胞降低(均 $P < 0.05$), 且 MPPa-PDT 组细胞的划痕愈合能力、迁移活力及侵袭能力也较这 3 组细胞显著下降(均 $P < 0.05$); MPPa-PDT 组细胞 E-cad 的表达显著高于其他 3 组, MMP-2、MMP-9 的表达则明显低于其他 3 组(均 $P < 0.05$)。**结论:** MPPa-PDT 抑制人骨肉瘤 MG-63 细胞的侵袭和迁移能力; 上调 E-cad 的表达, 下调 MMP-2、-9 的表达可能是其作用机制之一。

[关键词] 焦脱镁叶绿酸-a 甲酯; 光动力疗法; 骨肉瘤; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R738.1; R730.58

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2017)03-0242-05

MPPa-PDT inhibits invasion and migration of osteosarcoma MG-63 line cell

YIN Hang, TAO Yong, OU Yunsheng, HUANG Qiu, CHEN Yanyang (Department of Orthopedics, The 1st Hospital affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective:** To explore effect of methyl ester pyropheophorbide-a mediated photodynamic therapy (MPPa-PDT) on invasion and migration of human osteosarcoma MG-63 line cell and its possible mechanism. **Methods:** Using CCK8 assay, cytoactive of the MG-63 cell was detected at various time points of post-treatment with MPPa-PDT. Migration and invasion abilities of the MG-63 cell were respectively examined by Scratch and Transwell tests. Western blotting assay was used to check expression levels of E-cadherin (E-cad), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) proteins in the MG-63 cell. **Results:** After treatment with MPPa-PDT, proliferation ability of the MG-63 cell at 12, 24 and 48 h in MPPa-PDT group was significantly lower than those in control, MPPa and LED groups (all $P < 0.05$), and scratch healing ability, migration activity and invasion ability of the MG-63 cell in the MPPa-PDT group were also obviously more decline than those in the other three groups (all $P < 0.05$). Expression of E-cad protein in the MG-63 cell of the MPPa-PDT group was evidently higher than those in the MG-63 cell of the other three groups, while expressions of MMP-2 and MMP-9 proteins in the MG-63 cell of the MPPa-PDT group were lower than those in the MG-63 cell of the other three groups (all $P < 0.05$). **Conclusion:** MPPa-PDT could inhibit invasion and migration abilities of the human osteosarcoma MG-63 line cell, and could up-regulate expression of E-cad and down-regulate expressions of MMP-2 and MMP-9, which could be one of the mechanisms responsible for the above inhibition action.

[Key words] methyl ester pyropheophorbide-a (MPPa); photodynamic therapy (PDT); osteosarcoma; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(3): 242-246. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.03.005]

[基金项目] 国家自然科学基金项目(No. 81572634), 重庆市教育委员会研究生科研创新项目(No. CYS15141)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81572634), and the Innovational Research Foundation for Postgraduate of the Chongqing Education Commission(No. CYS15141)

[作者简介] 尹航(1990-), 男, 硕士, 主要从事骨肿瘤研究, E-mail: lovespain@126.com

[通信作者] 欧云生(OU Yunsheng, corresponding author), 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事骨肿瘤其他物理治疗研究, E-mail: ouyunsheng2001@163.com

骨肉瘤是最常见的原发性骨恶性肿瘤,好发于儿童及青少年,年发病率约为 3/100 万。骨肉瘤具有恶性程度高、侵袭性强、远处转移早、易发生肺部转移的特点,预后较差^[1]。骨肉瘤的侵袭性生长和早期转移是导致患者死亡的重要原因之一,并且骨肉瘤迁移侵袭的发生常受多因素、多步骤及多阶段综合作用的影响^[2]。因而抑制骨肉瘤的侵袭和迁移能力可能是治疗骨肉瘤、改善患者预后的重要策略。

光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)是临床治疗恶性肿瘤的新方法,具有选择性好、创伤小、毒副反应少、可重复治疗、可协同手术提高疗效等优点^[3]。目前研究^[4-6]表明, PDT 对喉癌、乳腺癌、神经胶质瘤等多种肿瘤细胞的迁移及侵袭能力具有明显的抑制作用,故手术切除肿瘤组织后,采用 PDT 处理肿瘤切缘可能具有抑制骨肉瘤复发、转移的作用。然而 PDT 对骨肉瘤迁移和侵袭能力的影响目前未见相关报道。本研究探讨焦脱镁叶绿酸-a 甲酯(methyl ester pyropheophorbide-a, MPPa)介导的光动力疗法(MPPa-PDT)抑制人骨肉瘤 MG-63 细胞的迁移和侵袭能力及其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

人骨肉瘤 MG-63 细胞购于中国生命科学院上海细胞库, MPPa 购于美国 Sigma 公司,二甲亚砜(dimethyl sulphoxide, DMSO)购于美国 MP Biomedicals 生物医学公司, E-cad 抗体、基质金属蛋白酶(MMP)-2 及-9 抗体购于美国 CST(Cell Signaling Technology)公司, Matrigel 基质胶购于 BD 公司, DMEM 细胞培养基购于美国 HyClone 公司, 胎牛血清购于美国 Gibco 公司, 胰蛋白酶、羊抗兔辣根过氧化物酶 IgG 购于上海碧云天生物技术有限公司, 光动力治疗仪购于重庆京渝激光生物研究所。

1.2 细胞培养

人骨肉瘤 MG-63 株细胞在含青霉素(50 μg/ml)、链霉素(50 μg/ml)及 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 37 °C、5% CO₂ 常规细胞培养传代。

1.3 实验分组及处理

将对数生长期 MG-63 细胞分为对照组、MPPa 组、LED 组和 MPPa-PDT 组。换液后, MPPa-PDT 组及 MPPa 组在避光条件下加 MPPa(0.2 μmol/L), 对照组和 LED 组加等体积 DMEM 培养基和相等质量浓度的 DMSO。各组于 37 °C、5% CO₂ 条件下避光孵育 20 h 后, 用完全培养基替换含 MPPa 或 DM-

SO 的培养液; LED 组和 MPPa-PDT 组使用波长 630 nm 连续输出方式, 光功率密度为 40 mW/cm² 的集成 LED 特种光源照射 120 s, 使细胞接受的光能量密度达到 4.8 J/cm², 避光条件下培养至检测。

1.4 CCK-8 法检测 MPPa-PDT 对 MG-63 细胞增殖活性的影响

将加入 MPPa 药物处理 20 h 后与未做处理的骨肉瘤 MG-63 细胞消化, 重悬, 并进行细胞计数, 接种于试剂盒 CCK-8 96 孔板(2 000 个/孔), 加入 10% 胎牛血清 DMEM 培养基 200 μl, 每组设 5 个复孔, 待细胞贴壁后对 LED 组及 MPPa-PDT 组行 LED 光照处理, 分别于 12、24 和 48 h 进行检测, 检测时每孔加入 CCK-8 20 μl, 培养箱孵育 4 h 后, 酶标仪检测 490 nm 处光密度(D)值, 并绘制生长曲线。

1.5 划痕实验检测 MPPa-PDT 对 MG-63 细胞迁移能力的影响

取对数生长期骨肉瘤 MG-63 细胞, 接种于六孔板(2 × 10⁴ 个/孔)中, 待各细胞汇合率达到 70% 后, 在 MPPa 组及 MPPa-PDT 组加入 MPPa(0.2 μmol/L), 待 MPPa 处理 20 h 后用 10 μl 移液枪头在 6 孔板培养皿上做“一”字划痕。PBS(0.01 mol/L)洗涤 3 次去除漂浮细胞, 4 组细胞培养皿每组加入 2 ml 无血清培养基后在倒置显微镜下拍照, 记录初始划痕宽度值。使用 LED 光照处理 LED 组及 MPPa-PDT 组, 随后将 6 孔板置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养, 24 h 后倒置显微镜下观察细胞迁移情况, 并拍照, 测量对应时间点划痕宽度值。细胞迁移率(%)=(初始划痕宽度值-对应时间点划痕宽度值)/初始划痕宽度值 × 100%。

1.6 Transwell 小室实验检测 MPPa-PDT 对 MG-63 细胞迁移能力的影响

使用无血清培养基将骨肉瘤 MG-63 细胞密度调整为 1 × 10⁵ 个/ml, 24 孔培养板中放入 4 个 transwell 小室, 上室分别加入不含或含有 MPPa(0.2 μmol/L)的 MG-63 细胞悬液 100 μl, 各组行饥饿与 MPPa 处理后 20 h 对 LED 组及 MPPa-PDT 组行光照处理, 再向下室加入含 10% 胎牛血清培养基各 1 ml。置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 取出 transwell 小室, 用棉签小心将上层小室内的细胞抹去, PBS(0.01 mol/L)清洗后风干, 用甲醛固定已经迁移过膜的细胞, 结晶紫染色并计数。

1.7 Transwell 小室实验检测 MPPa-PDT 对 MG-63 细胞侵袭能力的影响

将 Transwell 小室放置于 24 孔板中, 将使用无血清培养基稀释后的 Matrigel 基质胶(1:8)加入上

室中,每室 100 μ l,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中,2 h 后其凝固为胶冻状。向上室加入不含或含有 MPPa(0.2 μ mol/L)的 MG-63 细胞悬液 100 μ l(3×10^5 个/ml),各组行饥饿与 MPPa 处理 20 h 后对 LED 组及 MPPa-PDT 组行光照处理,再向下室加入含 10% 胎牛血清培养基各 1 ml。置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中孵育 48 h 后取出小室,用棉签小心地将上层小室内未侵袭的细胞及 Matrigel 基质胶稀释液抹去,用甲醇固定已穿过膜底端的侵袭细胞,结晶紫染色并计数。

1.8 Western blotting 检测 MPPa-PDT 对 MG-63 细胞中迁移和侵袭相关蛋白表达的影响

取对数生长期 MG-63 细胞分组后给予相应处理,收集各组细胞,常规方法提取细胞总蛋白,BCA 测定蛋白浓度(5 g/L),煮沸变性后取等量上述蛋白样品行 SDS-PAGE,经转膜室温 5% 牛奶封闭后分别加入 E-cad、MMP-2、MMP-9 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,复温 30 min 后 TBST 漂洗 4 次(10 min/次),再加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温下孵育 1.5 h,经 TBST 洗膜后,采用 ECL 化学发光法显影采用 Quantity One 4.6.2 软件进行图像分析。

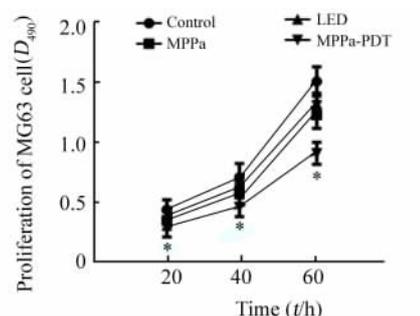
1.9 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件进行数据统计,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据资料对比采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MPPa-PDT 处理降低骨肉瘤 MG-63 细胞增殖活性

CCK-8 法检测对照组、MPPa 组、LED 组和 MPPa-PDT 组在 12、24 及 48 h 不同时间点的细胞活性,结果(图 1)发现,MPPa-PDT 组较其他 3 组的细胞增殖活性显著降低(均 $P < 0.05$)。



* $P < 0.05$ vs Control, MPPa and LED groups

图 1 CCK-8 法检测各处理组 MG-63 细胞的增殖

Fig.1 Proliferation of the MG-63 cells in the various treatment groups detected by CCK-8 assay

2.2 MPPa-PDT 处理降低 MG-63 细胞的迁移能力

细胞划痕实验结果(图 2)显示,MPPa-PDT 组划痕愈合率为(21 \pm 3.10)%,低于对照组(52.13 \pm 1.43)%、MPPa 组(49.12 \pm 2.30)%以及 LED 组(51.25 \pm 3.37)% ($P < 0.05$)。Transwell 小室迁移实验结果(图 3)显示,对照组、MPPa 组、LED 组和 MPPa-PDT 组穿膜细胞数分别为(65 \pm 15.09)、(59 \pm 5.29)、(62 \pm 9.03)和(17 \pm 3.05)个,MPPa-PDT 处理组 MG-63 细胞迁移能力显著低于其他 3 组(均 $P < 0.01$)。

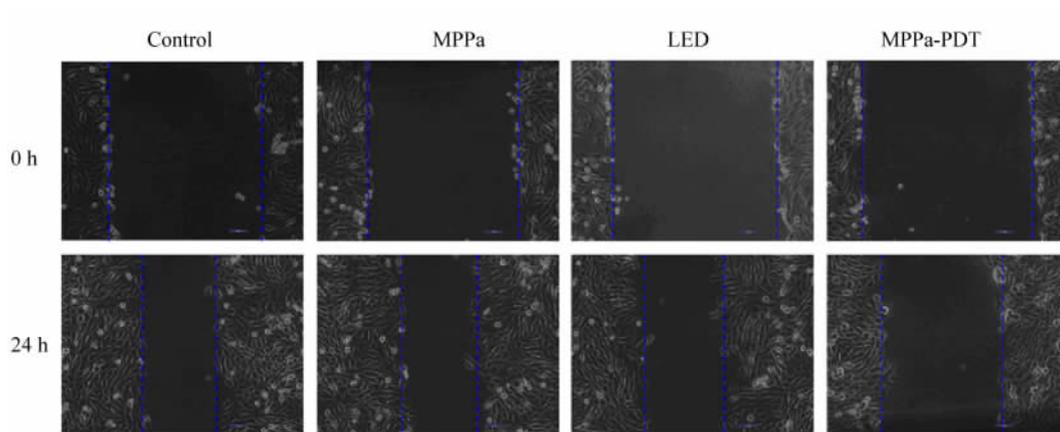
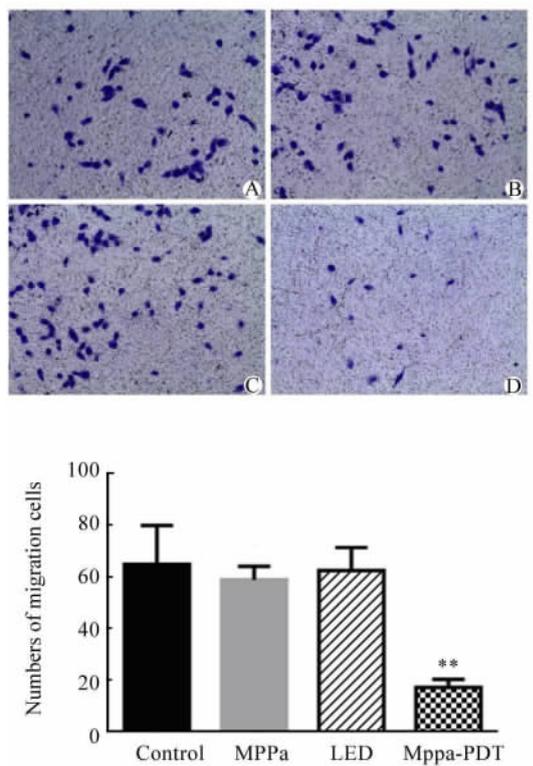


图 2 划痕实验检测各处理组 MG-63 细胞的迁移能力

Fig.2 Migration abilities of the MG-63 cell in the various treatment groups detected by a scratch assay



A:Control group; B:MPPa group;
C:LED group; D:MPPa-PDT group(×100)
** $P < 0.01$ vs Control, MPPa and LED groups

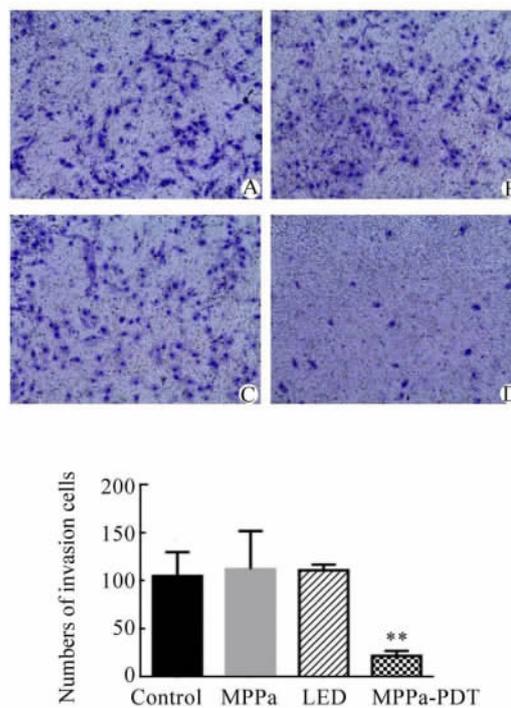
图3 Transwell 法检测各处理组 MG-63 细胞的迁移能力
Fig. 3 Migration abilities of the MG-63 cells in the various treatment groups detected by Transwell assay

2.3 MPPa-PDT 处理降低 MG-63 细胞的侵袭能力

Transwell 小室侵袭实验结果(图4)显示,对照组、MPPa 组、LED 组和 MPPa-PDT 组穿膜细胞数分别为(105 ± 25.01)、(112 ± 40.00)、(111 ± 5.86)和(21 ± 5.69)个。MPPa-PDT 处理组 MG-63 细胞的侵袭能力明显低于其他 3 组($P < 0.01$)。

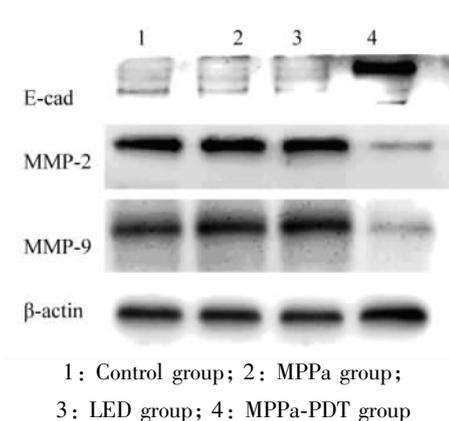
2.4 MPPa-PDT 处理增加 MG-63 细胞迁移相关 E-cad 蛋白表达,减少 MG-63 细胞侵袭相关 MMP-2、MMP-9 蛋白表达

Western blotting 检测结果(图5)显示对照组、MPPa 组和 LED 组之间 MG-63 细胞迁移相关 E-cad 蛋白表达无显著差异(均 $P > 0.05$),而 MPPa-PDT 组 MG-63 细胞 E-cad 蛋白表达较其他 3 组显著升高(均 $P < 0.05$)。对照组、MPPa 组、LED 组之间 MG-63 细胞迁移相关 MMP-2 与 MMP-9 蛋白表达无显著差异(均 $P > 0.05$),而 MPPa-PDT 组 MG-63 细胞的 MMP-2 与 MMP-9 蛋白表达,均比其他 3 组显著减少($P < 0.05$)。



A:Control group; B:MPPa group;
C:LED group; D:MPPa-PDT group(×100)
** $P < 0.01$ vs Control, MPPa and LED groups

图4 Transwell 法检测各处理组 MG-63 细胞的侵袭能力
Fig. 4 Invasion abilities of the MG-63 cells in the various treatment groups detected by Transwell assay



1: Control group; 2: MPPa group;
3: LED group; 4: MPPa-PDT group
图5 Western blotting 检测各处理组 MG-63 细胞的 E-cad、MMP-2 及 MMP-9 蛋白表达
Fig. 5 Expressions of E-cad, MMP-2 and MMP-9 proteins in the MG-63 cells of the various treatment groups tested by Western blotting assay

3 讨论

PDT 治疗肿瘤的原理是用特定波长的光激发富集于肿瘤细胞中的光敏剂,激发后的光敏剂和氧分子

发生光化学反应,产生大量的活性氧(reactive oxygen species, ROS),损伤细胞内的脂质、蛋白以及核酸等细胞成分,达到对肿瘤细胞的杀伤作用^[7-9]。MPPa属于第二代光敏剂,具有较强的光敏性,并且其成分单一,性质稳定,体内代谢快,对于正常人体组织的毒副作用较小,具有良好的临床应用前景^[10]。同时,大量研究表明,PDT对鼻咽癌、前列腺癌、乳腺癌和卵巢细胞癌等多种肿瘤的迁移和侵袭有明显的抑制作用。

迁移和侵袭是恶性肿瘤最为显著的特征,是区别于正常细胞和良性肿瘤的生物特征之一。人骨肉瘤MG-63细胞具有较强的迁移侵袭能力,本研究结果表明,MPPa-PDT处理MG-63细胞的划痕愈合能力明显降低,穿膜细胞数明显减少,说明MPPa-PDT能够显著降低骨肉瘤MG-63的体外迁移和侵袭能力。

E-cad蛋白在恶性肿瘤转移中扮演重要角色,肿瘤组织的E-cad蛋白降低会导致细胞间黏附力减弱,细胞外基质降解和基底膜缺损,从而促进肿瘤细胞从原来的位置游离出来,进入血液,向远处转移^[11-12]。Zhang等^[13]研究发现,特异性抑制E-cad蛋白的表达有助于骨肉瘤MG-63的远处转移。本研究发现MPPa-PDT处理后骨肉瘤MG-63细胞的E-cad蛋白表达明显升高。恶性肿瘤可分泌基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs),降解细胞外基质胶^[14]。在体内MPPs与其抑制剂组织金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMPs)相互作用维持着细胞外基质的合成与降解平衡,恶性肿瘤细胞的MMPs表达大于TIMPs,使得细胞外基质的合成与降解平衡打破,导致细胞外基质降解,肿瘤细胞更加容易发生侵袭与转移^[15]。Guo等^[16]发现,鸢尾黄酮通过下调基质金属蛋白酶MMP-1、MMP-2和MMP-9的表达可以对骨肉瘤的侵袭产生明显的抑制作用。本研究发现,MPPa-PDT处理后骨肉瘤MG-63细胞的MMP-2和MMP-9表达明显降低。这些结果提示:MPPa-PDT处理后MG-63细胞迁移和侵袭能力的降低可能与E-cad蛋白和MMP-2、MMP-9表达变化有关。

综上所述,本研究发现,MPPa-PDT可上调人骨肉瘤MG-63细胞E-cad蛋白的表达,下调MMP-2和MMP-9的表达,且具有抑制MG-63细胞的迁移和侵袭作用。但其更深层次的分子机制及信号调节通路则有待进一步研究加以阐明。

[参 考 文 献]

[1] OSBORNE T S, KHANNA C. A review of the association between osteosarcoma metastasis and protein translation [J]. *J Comp Pathol*, 2012, 146(2/3): 132-142. DOI: 10.1016/j.jcpa.2011.12.007.

[2] MORTUS J R, ZHANG Y, HUGHES D P. Developmental path-

ways hijacked by osteosarcoma [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 804: 93-118. DOI: 10.1007/978-3-319-04843-7_5.

[3] 李黎波,李文敏,项蕾红,等. 光动力疗法在中国的应用与临床研究 [J]. *中国激光医学杂志*, 2012, 21(5): 278-307. DOI: 10.13480/j.issn1003-9430.2012.05.010.

[4] MATHEWS M S, ANGELL-PETERSEN E, SANCHEZ R, et al. Effects of ultra low fluence rate single and repetitive photodynamic therapy on glioma spheroids [J]. *Lasers Surg Med*, 2009, 41(8): 578-584. DOI: 10.1002/lsm.20808.

[5] WU L, WANG X, LIU Q, et al. Sinoporphyrin sodium mediated photodynamic therapy inhibits the migration associated with collapse of F-actin filaments cytoskeleton in MDA-MB-231 cells [J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2016, 13: 58-65. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2015.12.008.

[6] 许川山, LEUNG A W N, 杨青. MPPa光动力作用对鼻咽癌细胞生长抑制的初步研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2006, 28(14): 1457-1460. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2006.14.003.

[7] WANG H, LIU Q, ZHANG K, et al. Comparison between sonodynamic and photodynamic effect on MDA-MB-231 cells [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2013, 127: 182-191. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2013.08.015.

[8] HUANG Q, OU Y S, TAO Y, et al. Apoptosis and autophagy induced by pyropheophorbide- α methyl ester-mediated photodynamic therapy in human osteosarcoma MG-63 cells [J]. *Apoptosis*, 2016, 21(6): 749-760. DOI: 10.1007/s10495-016-1243-4.

[9] TU P, HUANG Q, OU Y, et al. Aloe-emodin-mediated photodynamic therapy induces autophagy and apoptosis in human osteosarcoma cell line MG-63 through the ROS/JNK signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(6): 3209-3215. DOI: 10.3892/or.2016.4703.

[10] 黄秋,涂平华,欧云生,等. MPPa-PDT诱导人骨巨细胞瘤细胞自噬 [J]. *第三军医大学学报*, 2015, 37(17): 1755-1760. DOI: 10.16016/j.1000-5405.201412133.

[11] SLEEMAN J P, THIERY J P. SnapShot: the epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cell*, 2011, 145(1): 162. DOI: 10.1016/j.cell.2011.03.029.

[12] CAMPBELL K, CASANOVA J. A role for E-cadherin in ensuring cohesive migration of a heterogeneous population of non-epithelial cells [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7998. DOI: 10.1038/ncomms8998.

[13] ZHANG L Z, MEI J, QIAN Z K, et al. The role of VE-cadherin in osteosarcoma cells [J]. *Pathol Oncol Res*, 2010, 16(1): 111-117. DOI: 10.1007/s12253-009-9198-1.

[14] LIOTTA L A, TRYGGVASON K, GARBISA S, et al. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen [J]. *Nature*, 1980, 284(5751): 67-68.

[15] Shimoda M, Jackson H W, Khokha R. Tumor suppression by stromal TIMPs [J/OL]. *Mol Cell Oncol*, 2016, 3(3): e975082 [2016-12-06]. <http://dx.doi.org/10.4161/23723556.2014.975082>. DOI: 10.4161/23723556.2014.975082.

[16] GUO Y, CHEN Y H, CHENG Z H, et al. Tectorigenin inhibits osteosarcoma cell migration through downregulation of matrix metalloproteinases in vitro [J]. *Anticancer Drugs*, 2016, 27(6): 540-546. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000362.

[收稿日期] 2016-10-19

[修回日期] 2017-01-29

[本文编辑] 宋关鸿