

蝎毒提取物对 Lewis 细胞及 DU-145 细胞转移的抑制作用

王兆朋, 贾青, 王朝霞, 张月英, 王晓慧, 张维东*

山东省医学科学院基础医学研究所, 山东 济南 250062

摘要: 目的 观察蝎毒提取物对 Lewis 肺癌细胞肺转移和前列腺癌细胞株 DU-145 骨转移的抑制作用。方法 C57BL/6 小鼠尾 iv Lewis 肺癌细胞 (实验分模型组和给药组), 裸鼠尾 iv CM-DiI 标记 DU-145 细胞 (实验分模型组、对照组和给药组), 给药组均每天 ig 给予蝎毒提取物 300 mg/kg 1 次, C57BL/6 小鼠给药 12 d, 裸鼠给药 24 d, 模型组和对照组给予等量生理盐水, 肉眼及镜检观察肺转移灶 Lewis 肺癌细胞肺转移情况, 活体成像系统观察 DU-145 细胞骨转移的情况。在体外实验, 免疫组化法检测 Lewis 细胞基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 的表达, 免疫组化法和 Western blotting 检测 DU-145 细胞 MMP-9、NF- κ B、基质金属蛋白酶抑制因子 1 (TIMP-1)、I κ B- α 蛋白表达。结果 接种 Lewis 肺癌细胞后, 蝎毒提取物组平均癌细胞肺转移灶数为 3.2 ± 1.2 , 而模型组为 13.5 ± 5.3 , 差异显著 ($P < 0.01$)。活体成像检测显示, 接种 DU-145 细胞 30 d 后, 对照组未见荧光团, 模型组 8 只裸鼠中有 6 只肩胛骨、骨盆、肋骨及胫骨显示有大量荧光团存在, 蝎毒提取物组仅有 3 只裸鼠出现明显荧光团。免疫组化法和 Western blotting 检测显示, 与对照组相比, 蝎毒提取物给药后 DU-145 细胞 MMP-9、NF- κ B 蛋白表达下调 ($P < 0.01$), TIMP-1 表达上调 ($P < 0.01$), 免疫组化检测亦显示 I κ B- α 蛋白表达上调 ($P < 0.05$)。结论 蝎毒提取物抑制 Lewis 肺癌细胞肺转移和 DU-145 细胞骨转移, 其作用是通过 NF- κ B 和 TIMP-1 途径抑制 MMP-9 表达实现的。**关键词:** 蝎毒提取物; DU-145 细胞; Lewis 细胞; 癌细胞转移; 基质金属蛋白酶-9; NF- κ B; 基质金属蛋白酶抑制因子 1
中图分类号: R285.5; R979.19 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)10-2008-05

Inhibition of extract from scorpion venom on experimental metastasis of Lewis and DU-145 tumor cells

WANG Zhao-peng, JIA Qing, WANG Zhao-xia, ZHANG Yue-ying, WANG Xiao-hui, ZHANG Wei-dong
Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Science, Ji'nan 250062, China

Key words: extract from scorpion venom; DU-145 cell; Lewis cell; metastasis; matrix metalloproteinase-9 (MMP-9); nuclear factor- κ B (NF- κ B); tissue-inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1)

癌细胞转移是恶性肿瘤的重要特征, 也是肿瘤患者预后的关键因素。近年来, 肿瘤转移机制研究虽取得了长足的进步, 但临床上仍缺乏有效的抗肿瘤转移药物。全蝎甘、辛、平, 有小毒, 具有熄风镇痉、攻毒散结、通络止痛等功效, 临床上常用来治疗风湿顽痹、瘰疬结核等症。全蝎的主要药用部位是蝎毒, 近年来发现其具有良好的抗肿瘤作用。前期研究表明, 蝎毒提取物可抑制肿瘤细胞增殖, 下调血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达水平^[1-3]。本实验通过观察蝎毒提取物对前列腺癌细胞株 DU-145 荷瘤裸鼠骨转移、Lewis 肺癌荷瘤小鼠肺转移的影响, 进一步确定其抗肿瘤转移的作用。

1 材料

1.1 药品与试剂

蝎毒提取自野生东亚钳蝎 *Buthus martensii* Karsch, 由笔者鉴定。兔抗人 MMP-9、TIMP-1、NF- κ B、I κ B- α 一抗体 (北京中杉公司); RPMI 1640 培养基 (Gibco 公司); 新生小牛血清 (杭州四季青公司); C-7000 CM-DiI 荧光染料 (美国 Molecular Probes 公司); SABC 试剂盒 (北京中山生物技术公司)。

1.2 细胞

人前列腺癌细胞 DU-145 由北京大学泌尿外科研究所提供, Lewis 肺癌细胞购自中国医学科学院药物研究所。2 种细胞株均用含 10% 小牛血清的

收稿日期: 2012-02-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30873408); 山东省自然科学基金资助项目 (Y2007C094); 山东省济南市科技项目 (201004011)

作者简介: 王兆朋, 男, 助理研究员, 研究方向为中西医结合抗肿瘤转移。Tel: (0531)82919939 E-mail: charle92003@163.com

*通讯作者 张维东 Tel: (0531)82919939 E-mail: zhangweidongkui@163.com

RPMI 1640 培养基在 37 °C、饱和湿度、5%CO₂ 培养箱中常规传代培养。

1.3 动物

C57BL/6 小鼠，体质量 18~20 g，饲养于清洁级环境，用于尾 iv Lewis 细胞；Balb/c 裸鼠，6~8 周龄，体质量 18~20 g，饲养于 SPF 环境中，用于尾 iv DU-145 细胞。2 种动物均购自北京维通利华实验动物技术有限公司，许可证号 SCXK（京）20070001。

1.4 仪器

DM4000B 光学显微镜、Qwin V3 图像分析软件、Leica DM400B 软件分析系统，德国 Leica 公司。Image station 2000 mm 活体成像系统，美国柯达公司。2102C 型紫外分光光度计，美国 Unico 公司。

2 方法

2.1 蝎毒提取物的制备

蝎毒冻干粉以蒸馏水溶解成质量浓度为 25 mg/mL 溶液(pH 7.4)，2 000 r/min 离心 30 min，0.45、0.22 μm 微孔滤膜滤过，超滤物冻干。取蝎毒冻干粉 400 mg 加磷酸缓冲液(PBS)上样，经葡聚糖凝胶，收集蝎毒 III~IV 蛋白峰，再进行阳离子交换色谱分离，紫外分光光度计(吸收波长 280 nm)检测，收集蝎毒提取物蛋白峰。蝎毒提取物在 HPLC 色谱中显示 4 个峰，主峰占总峰面积的 41.4%。蝎毒提取物为含有 50~60 个氨基酸的多肽混合物，质量分数为 89.1%，相对分子质量 6 000~7 000，pH 值稳定。蝎毒提取物以 RPMI 1640 完全培养基溶解稀释，给药时以蒸馏水稀释。

2.2 对 Lewis 肿瘤荷瘤小鼠肺转移的影响

Lewis 细胞种植于 C57BL/6 小鼠右腋皮下进行扩增传代，传 3 代后，无菌剥离肿瘤组织，研磨制成细胞悬液，调细胞浓度为 1×10⁶/mL，每只小鼠尾 iv Lewis 细胞悬液 0.1 mL 造模。将造模小鼠随机分成蝎毒提取物组和模型组 2 组，每组 10 只，蝎毒提取物组于接种肿瘤细胞第 6 天开始 ig 给予蝎毒提取物 300 mg/kg，每天给药 1 次，连续给药 12 d，模型组 ig 等量蒸馏水。接种肿瘤细胞第 30 天颈椎脱臼处死各组小鼠，取肺脏，肉眼及解剖镜观察肺转移灶数与大小，称小鼠体质量和肺质量，并计算肺指数，而后中性甲醛固定。

2.3 对 DU-145 荷瘤裸鼠骨转移的影响

2.3.1 荧光标记 DU-145 细胞 取生长良好的 DU-145 细胞，常规消化，离心，收集细胞并计数，

弃上清。取 CM-DiI 荧光染料 50 μg，加入 50 μL DMSO 溶解，以 Dulbecco PBS 稀释(终质量浓度为 4 μg/mL)后，迅速加入离心管孵育标记细胞：先于 37 °C 孵育 5 min，再于 4 °C 孵育 15 min，PBS 冲洗细胞 1 次，离心，用生理盐水悬浮细胞，使细胞浓度为 2×10⁷/mL。CM-DiI 荧光染料在发射波长 465 nm，激发波长 570 nm 下观察。

2.3.2 模型制备、分组与给药 每只裸鼠尾 iv 标记好的 DU-145 细胞悬液 0.1 mL。将接种 DU-145 细胞后的裸鼠随机分为 2 组：蝎毒提取物组(8 只)、模型组(8 只)，蝎毒提取物组裸鼠在 iv DU-145 细胞后第 6 天开始，每天 ig 给予蝎毒提取物 300 mg/kg 1 次，连续给药 24 d，模型组 ig 等量蒸馏水；另取 3 只正常小鼠作为对照组。

2.3.3 裸鼠活体观察 于接种 DU-145 细胞第 30 天，乙醚麻醉裸鼠，迅速进行活体荧光分析，发射波长 465 nm，激发波长 570 nm，曝光时间为 15 min。

2.4 对 Lewis 和 DU-145 细胞相关蛋白表达的影响

2.4.1 分组与给药 取处于对数生长期的 Lewis 和 DU-145 细胞，在 12 孔板中进行细胞爬片，于爬片 24 h 后将细胞分为蝎毒提取物组和对照组，前者给予蝎毒提取物 40 μg/mL，后者给予等体积的培养液。

2.4.2 免疫组织化学检测 细胞于 12 孔板爬片培养，染色过程严格按照 SABC 试剂盒说明书操作。高倍镜下随机选取 5 个高倍视野，读取阳性表达 MMP-9 的 Lewis 细胞以及表达 MMP-9、TIMP-1、NF-κB、IκB-α 的 DU-145 细胞的百分比，并进行灰度值分析(灰度值越低，表达水平越高)。

2.4.3 Western blotting 检测 细胞裂解液裂解 DU-145 细胞，BCA 法测定总蛋白的量。配制 SDS-PAGE 凝胶，电泳条件为 100 V、2 h，常规电转仪电转，5%脱脂奶粉封闭 3 h，将硝酸纤维素膜与 1:1 000 稀释的一抗在室温下反应 2 h，再与 1:1 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的兔抗人 IgG(二抗)室温下反应 1 h，加入 DAB 显色 10~15 min，自来水冲洗终止酶反应。Leica Qwin V3 图像分析软件对各显色条带进行灰度值分析。

2.5 统计学分析

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS10.0 软件包进行 *t* 检验和方差分析。

3 结果

3.1 对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肺转移的影响

蝎毒提取物组肺癌小鼠肺转移灶数为 3.2±

1.2, 明显少于模型组的 13.5 ± 5.3 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 蝎毒提取物组小鼠的体质量和肺质量均明显降低, 差异显著 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 蝎毒提取物对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肺转移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of extract from scorpion venom on pulmonary metastasis of Lewis cells in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	肺转移灶数	体质量 / g	肺指数
模型	—	13.5 ± 5.3	26.9 ± 4.2	1.36 ± 0.14
蝎毒提取物	300	3.2 ± 1.2**	20.7 ± 3.1*	1.47 ± 0.09*

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

3.2 对 DU-145 荷瘤裸鼠骨转移的影响

活体成像观察可见, 模型组有 6 只裸鼠骨骼存在荧光团, 其中 4 只荧光强度较高, 荧光团主要集中在裸鼠肩胛骨、骨盆、胫骨、肋骨, 而脊柱未发现明显荧光存在, 1 例荧光团不明显。蝎毒提取物组有 3 只裸鼠骨骼有荧光团存在, 仅 1 只荧光强度较高, 表明蝎毒提取物对 DU-145 荷瘤裸鼠骨转移具有抑制作用, 结果见图 1。

3.3 对 Lewis 细胞 MMP-9 表达的影响

免疫组化检测结果显示, 对照组 Lewis 细胞 MMP-9 高表达, 而蝎毒提取物组 MMP-9 表达显著下调 ($P < 0.01$)。免疫组化检测灰度值分析见图 2。

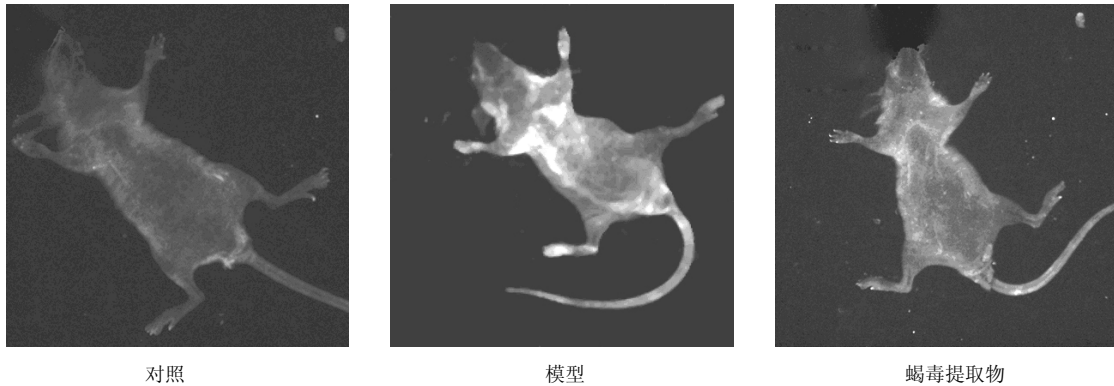


图 1 DU-145 荷瘤裸鼠的活体成像观察

Fig. 1 In vivo imaging observation of DU-145 tumor-bearing mice

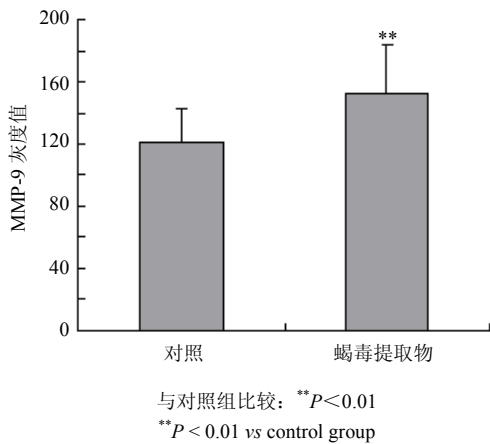


图 2 蝎毒提取物对 Lewis 细胞 MMP-9 表达的影响

Fig. 2 Effect of extract from scorpion venom on MMP-9 expression in Lewis cell

3.4 对 DU-145 细胞相关蛋白表达的影响

免疫组化检测结果显示, 与对照组相比, 蝎毒提取物组 DU-145 细胞中 MMP-9、NF- κ B 蛋白表达

水平皆下调, 以 MMP-9 下调更为明显 ($P < 0.05$), TIMP-1、I κ B- α 表达则上调 ($P < 0.01$)。蝎毒提取物组细胞碎片明显增多, 细胞贴壁差, 悬浮细胞增多。结果见图 3、4。

Western blotting 检测结果显示, 与对照组相比, 蝎毒提取物组 DU-145 细胞 MMP-9、NF- κ B 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), TIMP-1 蛋白表达明显升高。蝎毒提取物组和对照组 TIMP-1 蛋白表达灰度值分别为 68.2 ± 5.42 、 43.6 ± 6.45 , 差异显著 ($P < 0.01$)。Western blotting 检测结果见图 5, 灰度值分析见图 6。

4 讨论

肿瘤细胞发生转移过程中, 细胞外基质的降解是关键环节。基膜的主要成分是 IV 型胶原, 因此 IV 型胶原酶在肿瘤浸润和转移中起重要作用。IV 型胶原酶还可维持肿瘤细胞从细胞外基质获取生长因子和促进肿瘤血管生长以调节肿瘤生长^[4]。IV 胶原酶有 MMP-2 和 MMP-9, MMP-9 主要降解细胞外基质中 IV 型胶原和明胶, 其存在组织型抑制因

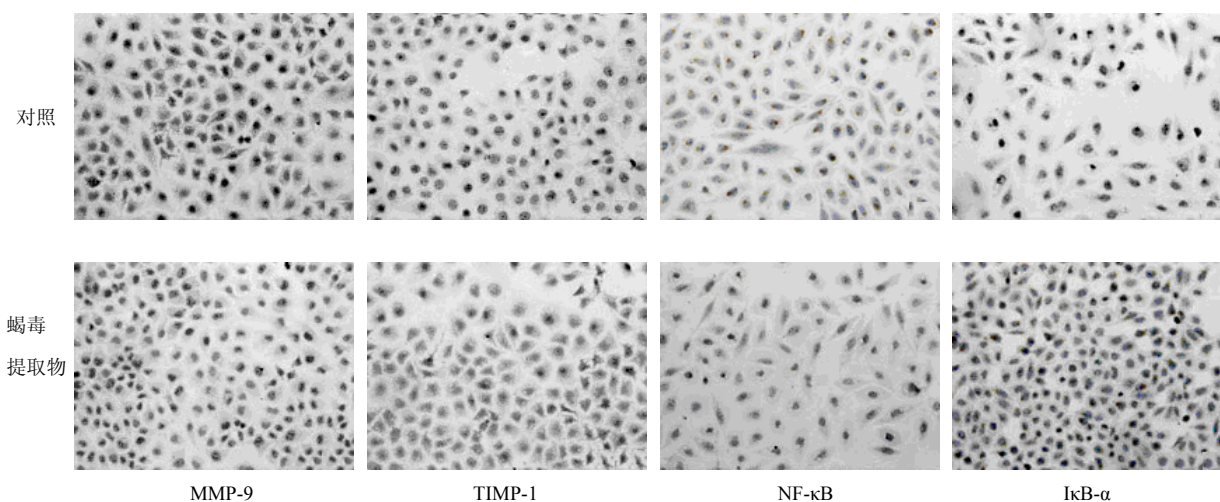


图3 蝎毒提取物对DU-145细胞转移相关蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of extract from scorpion venom on expression of metastasis-associated protein in DU-145 cell

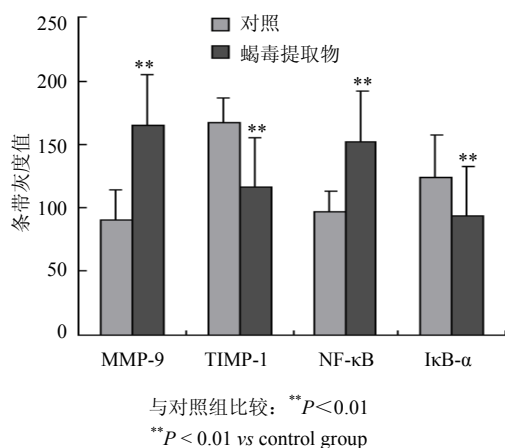


图4 DU-145细胞转移相关蛋白表达的灰度值分析
Fig. 4 Greyscale analysis of expression of metastasis-associated protein in DU-145 cell

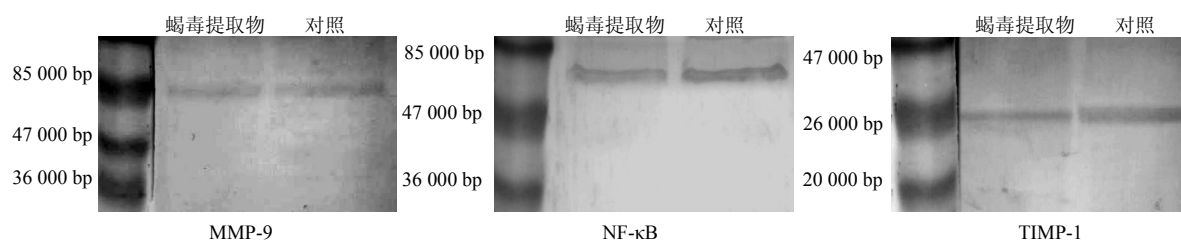


图5 蝎毒提取物对DU-145细胞转移相关蛋白表达的影响 (Western blotting)

Fig. 5 Effect of extract from scorpion venom on expression of metastasis-associated protein in DU-145 cell (Western blotting)

的表达上调,表明蝎毒提取物通过激活 IκB-α 途径抑制 NF-κB 表达。

恶性肿瘤发生转移时,首先是癌细胞局部浸润并渗入血管,然后随血液循环系统转移并在其中存

活,最后移出血管在新的部位定居并增殖,本实验采用将肿瘤细胞直接注入小(裸)鼠尾静脉中,导致肿瘤转移的方法,该模型体现了肿瘤细胞进入血液后发生转移的过程,与人体内瘤细胞进入血液

子TIMP-1, TIMP-1通过与MMP-9结合而使MMP-9失活^[5],已发现很多恶性肿瘤组织表达MMP-9与TIMP-1。本实验结果表明,蝎毒提取物干预DU-145细胞后, MMP-9表达下调, TIMP-1表达明显上调,表明MMP-9表达下调与TIMP-1表达上调有关。MMP-9启动子结构区域有两个AP-1结合位点,一个AP-2结合位点,一个NF-κB结合位点。NF-κB作为一个转录因子,在炎症、免疫反应及肿瘤发生和发展等生理、病理过程中有重要意义^[6-10]。NF-κB蛋白主要受其抑制因子IκB家族的调节。本实验免疫组化检测发现,蝎毒提取物组DU-145细胞NF-κB蛋白表达与MMP-9蛋白表达同时下调,表明MMP-9蛋白表达与NF-κB蛋白表达相关, NF-κB可促进MMP-9的表达;同时NF-κB抑制因子IκB-α

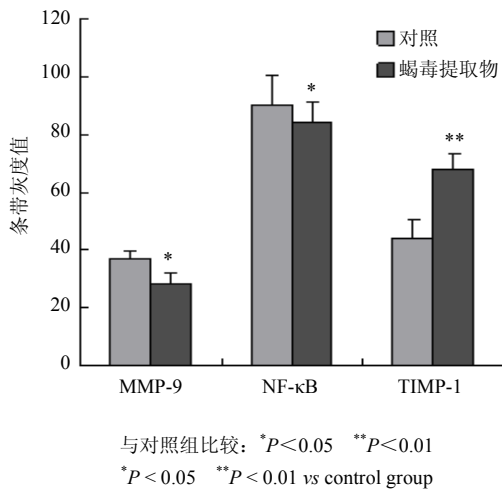


图 6 蝎毒提取物对 DU-145 细胞转移相关蛋白水平表达的影响 (Western blotting)

Fig. 6 Effect of extract from scorpion venom on expression of metastasis-associated protein in DU-145 cell (Western blotting)

循环的情况相似, 因此常用于抗肿瘤转移药物的筛选。因此本实验首先采用向 C57BL/6 小鼠尾静脉注射 Lewis 肺癌细胞, 以建立 Lewis 肺癌肺转移模型。结果显示, 此方法建立肺转移模型成功。模型组小鼠体质量及肺质量明显增加, 而肺指数降低, 提示肿瘤转移到肺中并在肺中生长时, 机体被迫提高体质量以维持高代谢状态; 应用蝎毒提取物后, 体质量及肺质量明显下降, 肺指数提高, 说明蝎毒可有效抑制转移和抑制肿瘤在肺中的生长。经免疫组织化学检测显示, 在对照组肿瘤转移灶组织中高表达 MMP-9, 表明 MMP9 参与了肿瘤细胞转移灶的形成。经蝎毒提取物干预后, 转移灶形成明显减少, 且转移灶肿瘤组织 MMP-9 表达明显降低, 提示蝎毒提取物可能通过抑制 MMP-9 的表达, 达到抑制肿瘤细胞转移和在肺中形成转移灶的目的。

裸鼠尾静脉注射 DU-145 细胞实验中, DU-145 细胞经 CM-DiI 标记 30 d 后, 经活体荧光观察可见模型组裸鼠肩胛骨、肋骨、胫骨及骨盆等处明显存在荧光团, 证明前列腺癌 DU-145 细胞具有较高的骨转移性, 为临床上前列腺癌患者高发骨转移现象提供了实验依据。

目前蝎毒在世界范围内得到广泛研究, 并且已经从蝎毒中分离出具有抗癌疗效的多肽分子。蝎毒提取物对多种肿瘤具有治疗作用, 但其机制至今尚未完全明确。本实验结果表明, 蝎毒提取物可下调人前列腺癌 DU-145 细胞 MMP-9 表达水平, 其作用机制可能与 TIMP-1 和 NF-κB 两种途径有关。

参考文献

- [1] 张维东, 崔亚洲, 贾青, 等. 蝎毒多肽提取物对小鼠 S180 肉瘤和 H22 肝癌血管生成抑制作用的实验研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2005, 29(2): 152-155.
- [2] 张维东, 崔亚洲, 姚成芳, 等. 蝎毒多肽提取物抗肿瘤血管生成作用的实验研究 [J]. 中国药理学通报, 2005, 21(6): 708-711.
- [3] 王兆朋, 张维东, 武利存, 等. 蝎毒提取物抑制 Lewis 肺癌化疗期间再增殖实验研究 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 103-107.
- [4] Trudel D, Fradet Y, Meyer F, *et al.* Significance of MMP22 expression in prostate cancer: An immunohistochemical study [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(23): 8511-8515.
- [5] Brew K, Dinakarpanian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1477(1/2): 267-283.
- [6] Sanjeev S, Sanjay G. Suppression of constitutive and tumor necrosis factor-induced nuclear factor (NF)-κB activation and induction of apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma PC-3 cells: correlation with down-regulation of NF-κB responsive genes [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(9): 3169-3178.
- [7] 向松涛, 郭辉. 核转录因子 κB 与前列腺癌 [J]. 中华男科学, 2003, 9(7): 536-538.
- [8] Barbara A, Pratibha B, Kevin W, *et al.* Chromatin-dependent E1A activity modulates NF-κB relA-mediated repression of glucocorticoid receptor-dependent transcription [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(8): 6349-6358.
- [9] Adam J F, Sarah E H, Talib Al-M, *et al.* Evidence for incorporation of free-floating cells as a mechanism of serosal healing [J]. *J Cell Sci*, 2002, 115(7): 1383-1388.
- [10] Ben-Yair R, Kahane N, Kalcheim C. Coherent development of dermomyotome and dermis from the entire mediolateral extent of the dorsal somite [J]. *Development*, 2003, 130(9): 4325-4336.