

文章编号:1005-6947(2006)02-0102-04

· 实验研究 ·

L-NAME 对大肠癌细胞侵袭和转移的影响

于丽波, 孙文洲, 董新舒, 徐海涛

(哈尔滨医科大学附属肿瘤医院 外科, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:目的 探讨 N-硝基精氨酸甲酯(L-NAME)对人大肠癌细胞(LS-174T)侵袭、运动能力的影响及其可能的机制。方法 用不同浓度的 L-NAME 干预 LS-174T 细胞,用硝酸还原酶法测定 L-NAME 对细胞分泌 NO 的影响;用重组基底膜侵袭实验观察药物对癌细胞侵袭、运动能力的影响;用 RT-PCR 法检测 MMP2 和 TIMP2 的表达。结果 (1) L-NAME 降低了 SL-174T 细胞 NO 的分泌,呈浓度依赖性。(2) 0.2 mmol/L, 0.4 mmol/L, 0.8 mmol/L 和 1.0 mmol/L L-NAME 处理 SL-174T 细胞 72 h,对细胞侵袭重建基底膜的抑制率分别为 10.29%, 19.62%, 34.08% 和 42.23% ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);(3)对细胞趋化运动抑制率分别为 20.76%, 24.95%, 39.43% 和 46.85% ($P < 0.01$),同时可降低细胞 MMP2 mRNA 的表达,而提高 TIMP2 mRNA 的表达。(4) NO 浓度与 MMP2 mRNA 表达呈正相关($r = 0.8124, P < 0.01$),而与 TIMP2 mRNA 呈负相关($r = -0.7106, P < 0.01$)。结论 L-NAME 具有抑制 SL-174T 细胞侵袭和转移的作用;L-NAME 的抗侵袭活性与肿瘤细胞 MMP2 mRNA 和 TIMP2 mRNA 的表达有关。

关键词:结直肠肿瘤/病理学;肿瘤转移;L-硝基精氨酸甲酯/药理学

中图分类号: R735.35; R731.37

文献标识码: A

The effects of L-NAME on invasion and metastasis of human colorectal carcinoma cell line

YU Li-bo, SUN Wen-zhou, DONG Xin-shu, XU Hai-tao

(Department of General Surgery, The Tumor Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150040, China)

Abstract: Objective To study the effects of L-NAME on invasion and metastasis of human colorectal carcinoma cell line(LS-174T) and explore its possible mechanism. **Methods** The LS-174T cells were co-incubated with L-NAME at various concentrations. Griess technique was used to examine the effect of L-NAME on excretion of nitric oxide(NO) of the cells. The effects of L-NAME on invasion and migration of LS-174T were evaluated using Transwell chambers attached with polycarbonate filters and reconstituted basement membrane. Expression of MMP2 mRNA and TIMP2 mRNA in LS-174T cells was measured by RT-PCR. **Results** (1) L-NAME decreased the excretion of NO of the cells in a dose-dependent manner. (2) The ability of the L-NAME treated LS-174T cells to invade the reconstituted basement membrane increased significantly with the concentration and time, at the concentration of 0.2 mmol/L, 0.4 mmol/L, 0.8 mmol/L and 1.0 mmol/L, respectively, after 72 hour, the inhibition rates were 10.29%, 19.62%, 34.08% and 42.23%, respectively. ($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.01, P < 0.01$, respectively). (3) L-NAME can also inhibit LS-174T cells migration, and the inhibition rates were 20.76%, 24.95%, 39.43% and 46.85% in L-NAME at 0.2 mmol/L, 0.4 mmol/L, 0.8 mmol/L and 1.0 mmol/L, respectively ($P < 0.01$). (4) NO concentration was positive related to expression of MMP2 mRNA, and negative related to expression of TIMP2 mRNA. **Conclusions** L-NAME has anti-invasive and anti-metastatic effects on LS-174T cells, and the anti-invasive and anti-metastatic action of L-NAME might be associated with expression of MMP2 mRNA, TIMP2 mRNA in tumor cells.

Key words: Colorectal Neoplasms/pathol; Neoplasms Metastasis; L-NAME/pharm

CLC number: R735.35; R731.37

Document code: A

基金项目:黑龙江省青年科学技术专项资金资助项目(QC05C39)。

收稿日期:2005-05-30; **修订日期:**2005-10-27。

作者简介:于丽波,女,黑龙江哈尔滨人,哈尔滨医科大学附属肿瘤医院主治医师,主要从事恶性肿瘤的临床与基础研究。

通讯作者:于丽波 E-mail: YLBSWZ@yahoo.com.cn。

大肠癌发病率呈增高趋势,侵袭和转移是临床肿瘤患者治疗失败导致死亡的主要原因。抗肿瘤侵袭和转移是肿瘤治疗的研究热点之一。国外已有利用一氧化氮合酶抑制剂治疗肿瘤的相关研究的报道^[1],但其抑制肿瘤转移的机制尚不清楚。本实验探讨一氧化氮合酶抑制剂N-硝基精氨酸甲酯(L-NAME)对具有高转移能力的人大肠癌细胞LS-174T侵袭重建基底膜能力的影响,并探讨其可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人大肠癌细胞系LS-174T购自哈尔滨医科大学肿瘤研究所;L-NAME和二甲基亚砜(DMSO)购自Sigma公司;RPMI-1640培养基、Trizol试剂盒购自Gibco公司;新生牛血清、胰蛋白酶购自杭州四季青生物工程公司;逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)试剂盒为Invetrogen公司产品,引物由上海生物工程公司合成;一氧化氮(NO)测试盒购自南京建成生物工程公司;Transwell小室购自Costar公司;纤粘连蛋白购自Promega公司;matrigel购自Becton Dickinson公司。

1.2 细胞培养及药物处理

LS-174T细胞常规培养于用含10%灭活小牛血清,100U/mL链霉素,100U/mL青霉素的RPMI-1640培养液中,培养条件为37℃,5%CO₂温箱单层传代培养。取对数生长期细胞,胰酶消化后分组,每组有1×10⁶细胞,分别用含L-NAME浓度为0.2mmol/L,0.4mmol/L,0.8mmol/L,1.0mmol/L,和含DMSO的RPMI-1640培养液预处理细胞,对照组为未经L-NAME处理的空白对照,然后进行有关检测。

1.3 检测项目与方法

1.3.1 硝酸还原酶法检测NO的分泌 取药物处理过的72h细胞培养上清液100μL,严格按试剂盒说明书流程操作,测定细胞培养上清液中NO₂⁻的水平以反映NO的生成。

1.3.2 细胞侵袭实验 细胞侵袭重建基底膜实验在Transwell小室中进行。在小室的聚碳酸酯膜PVPF膜的外表面涂趋化剂5μg纤粘连蛋白,在膜的内表面涂5μgmatrigel。经上述处理后的72h各组大肠癌细胞悬液加入Transwell小室中,每室2×

10⁵细胞,37℃,5%CO₂温箱培养4h。用绵签擦尽膜的内表面未穿过膜的细胞。随机选择5个400倍显微视野,统计视野中侵袭至滤膜下表面的细胞数目,计算平均值。按下式计算药物对肿瘤细胞侵袭的抑制率:

抑制率 = 对照组平均侵袭细胞数 - 给药组平均侵袭细胞数 / 对照组平均侵袭细胞数 × 100%

1.3.3 细胞运动实验 聚碳酸酯膜内表面不铺matrigel,其余操作同细胞侵袭实验。按下式计算药物对肿瘤细胞运动能力的抑制率:抑制率 = 对照组平均细胞数 - 给药组平均细胞数 / 对照组平均细胞数 × 100%

1.3.4 L-NAME作用后LS-174T细胞基质金属蛋白酶-2(MMP2)和基质金属蛋白酶抑制剂2(TIMP2)的表达 大肠癌细胞与不同浓度的L-NAME培养72h后,收集细胞,按照Trizol说明书提取细胞总RNA。取5μg总RNA逆转录合成cDNA链,取4μLcDNA用于PCR扩增。MMP2引物序列:上游序列为5'-TCTTCAAGGACCGGTTTCATTTG-3',下游序列为5'-GATGCTTCCAACTTCACGCTC-3',扩增片段长度为500bp。TIMP2引物序列:上游序列为5'-ACCTGGATGCCGTCGTGGAC-3';下游序列为5'-TGTGGCAGCACCAGGGCAGC-3',扩增片段长度为376bp。β-actin上游引物序列为5'-TACATGGCTGGGGT-GTTGAA-3',下游引物序列为5'-AAGAGAGGCATC-CTCACCCT-3',扩增片段长度320bp。取扩增产物10μL,以2%琼脂糖凝胶电泳,紫外凝胶成像电泳分析系统下分析光密度值,计算目的产物和β-actin产物的比值。

1.4 统计学处理

应用SAS6.12统计软件分析实验结果,计量资料采用方差分析和t检验。NO的浓度与目的产物和β-actin产物的比值作直线相关分析。以P < 0.05为有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度L-NAME对LS-174T细胞分泌NO的影响

细胞培养上清液中测得LS-174T细胞分泌NO的浓度随L-NAME浓度的增加,NO浓度呈下降趋势;各浓度组与对照组比较差异均有显著性(P < 0.05)(表1)。

表 1 不同浓度 L-NAME 作用后 LS-174T 细胞 NO 的分泌

组别	L-NAME 浓度 (mmol/L)	n	NO($\mu\text{mol/L}$)
对照	0	3	147.80 + 0.78
L-NAME	0.2	3	135.66 + 0.45 [†]
	0.4	3	95.73 + 0.23 [†]
	0.8	3	59.80 + 0.65 [†]
	1.0	3	56.43 + 0.64 [†]

注: [†] 与对照组比较, $P < 0.05$

表 2 L-NAME 对 LS-174T 细胞体外侵袭力和运动能力的影响

组别	L-NAME 浓度(mmol/L)	侵袭细胞数	抑制率(%)	细胞数	抑制率(%)
		($\bar{x} + s$)		($\bar{x} + s$)	
对照	0	158.66 + 3.21	0	175.00 + 5.56	0
L-NAME	0.2	142.33 + 1.52	10.29 ^{1),3)}	148.66 + 1.52	20.76 ^{2),3)}
	0.4	127.00 + 5.29	19.62 ^{2),3)}	131.33 + 5.50	24.95 ^{2),3)}
	0.8	103.00 + 2.64	34.08 ^{2),3)}	106.00 + 8.00	39.43 ^{2),3)}
	1.0	91.66 + 7.57	42.23 ^{2),3)}	93.01 + 2.00	46.85 ^{2),3)}

注: 1)与对照组比较, $P < 0.05$; 2)与对照组比较, $P < 0.01$; 3)不同浓度组间比较, $P < 0.05$ 。

2.3 L-NAME 对 LS-174T 细胞 MMP2 和 TIMP2 mRNA 表达的影响

经不同浓度的 L-NAME 处理的 LS-174T 细胞在 72h 后, MMP2 与 β -actin 扩增带的吸光面积积分比值高于对照组, MMP2 mRNA 表达随 L-NAME 浓度的增加而逐渐减少 ($P < 0.01$) (图 1); 而细胞 TIMP2 mRNA 表达与对照组比较则呈逐渐增强趋势

2.2 L-NAME 对 LS-174T 细胞体外侵袭力和运动能力的影响

对照组 LS-174T 细胞穿过膜较多, 体外侵袭能力较强。实验组随着 L-NAME 浓度的增加, LS-174T 细胞过膜逐渐减少, 且呈剂量效应关系。与对照组比较, L-NAME 对 LS-174T 细胞体外侵袭力有明显的抑制作用; 不同浓度 L-NAME 对 LS-174T 细胞运动有抑制作用, 随浓度的增加抑制作用逐渐增强, 与对照组比较均有明显的抑制作用(表 2)。

($P < 0.01$) (图 2)。

2.4 NO 浓度与 MMP2 mRNA 和 TIMP2 mRNA 的相关性

经不同浓度 L-NAME 处理的 LS-174T 细胞在 72h 后, NO 浓度与 MMP2 mRNA 表达呈正相关 ($r = 0.8124$, $P < 0.01$); NO 浓度与 TIMP2 mRNA 比值呈负相关 ($r = -0.7106$, $P < 0.01$) (表 3)。

M; marker; 1: 对照组; 2: 0.2 mmol/L L-NAME 组; 3: 0.4 mmol/L L-NAME 组; 4: 0.8 mmol/L L-NAME 组; 5: 1.0 mmol/L L-NAME 组

图 1 不同浓度的 L-NAME 作用后, SL-174T 细胞 MMP2 mRNA 的表达

M; marker; 1: 对照组; 2: 0.2 mmol/L L-NAME 组; 3: 0.4 mmol/L L-NAME 组; 4: 0.8 mmol/L L-NAME 组; 5: 1.0 mmol/L L-NAME 组

图 2 不同浓度的 L-NAME 作用后, SL-174T 细胞 TIMP2 mRNA 的表达

表 3 不同浓度 L-NAME 处理后 NO 浓度与 MMP2 mRNA 和 TIMP2 mRNA 的相关性

NO($\mu\text{mol/L}$)	MMP2/ β -actin	TIMP2/ β -actin
	吸光度值	吸光度值
135.66	0.71	1.17
95.73	0.31	1.67
59.80	0.21	1.78
56.43	0.19	2.31

3 讨论

NO 是一种具有广泛生物活性的小分子化合物, 在肿瘤的发生发展中起着双向作用。高浓度的 NO 通过细胞毒作用和诱导肿瘤细胞凋亡起抗肿瘤作用; 而在肿瘤组织微环境中, 较低浓度 NO 通过促进血管生长和调节血流量促进肿瘤生长和

转移^[2]。一氧化氮合酶(NOS)是催化NO合成的关键酶,可分为结构型NOS(cNOS)和诱导型NOS(iNOS)两类。NOS在不同的肿瘤组织的表达和活性均与肿瘤的生物行为存在一定的联系^[3-9],Kojima等^[10]研究表明,人大肠癌组织标本有iNOS mRNA表达和iNOS蛋白表达。Lagares-Garcia等^[11]发现,iNOS活性高的人群其癌细胞更具有侵袭性,肿瘤转移率高,5年生存率低,认为iNOS活性可作为判断预后的指标。降低NOS的表达和活性使内源性NO生成减少,可能对肿瘤的生长有抑制作用。

本实验结果表明,L-NAME在浓度为0.2~1.0 mmol作用72h时,LS-174T细胞NO的分泌呈下降趋势,此外,L-NAME可明显抑制大肠癌LS-174T细胞侵袭和运动,并呈一定的剂量效应关系。本研究还发现在不同浓度的L-NAME作用于肿瘤细胞后,肿瘤细胞内MMP2 mRNA水平下降,而TIMP2 mRNA呈上升趋势。分析NO浓度与LS-174T细胞MMP2和TIMP2 mRNA的关系发现,NO浓度与MMP2 mRNA表达呈正相关,而与TIMP2 mRNA呈负相关。肿瘤细胞在侵袭和转移过程中,必须破坏由细胞间基质和基底膜组成的细胞外基质屏障,MMP2能特异降解细胞间基质和基底膜的IV型胶原,被认为是肿瘤侵袭转移过程中最重要和最直接基质金属蛋白酶。组织TIMP2是MMP2的特异抑制因子。体内外研究表明:TIMP2不但能结合活性的MMP2,抑制其活性,还能结合非活性状态的MMP2;TIMP2通过其抗血管生成作用或直接调节细胞生长的特性阻断肿瘤细胞的生长。据此推测,L-NAME通过抑制NO的分泌,降低了MMP2/TIMP2值,从而抑制了对基底膜的破坏和细胞外基质的降解,进而抑制大肠癌LS-174T细胞侵袭和转移能力。

综上所述,L-NAME可能通过NOS/NO-MMPs通路降低大肠癌LS-174T细胞侵袭和转移能力。深入研究一氧化氮合酶抑制剂的抗肿瘤转移作用

及其机制必将为肿瘤转移的治疗和预防带来广阔前景。

参考文献:

- [1] Jadeski LC, Lala PK. Nitric oxide synthase inhibition by NG-nitro-L-arginine methyl ester inhibits tumor-induced angiogenesis in mammary tumor [J]. *Am J Pathol*, 1999, 155(4): 1381-1390.
- [2] Fukumura D, Jain RK. Role of nitric oxide in angiogenesis and microcirculation in tumor [J]. *Cancer Met Rev*, 1998, 17(1): 77-89.
- [3] Thomsen LL, Lawton FG, Knowles RG, et al. Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer [J]. *Cancer Res*, 1994, 54(5): 1352-1354.
- [4] Thomsen LL, Miles DW, Happerfield L, et al. Nitric oxide synthase activity in human breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 1995, 72(1): 41-44.
- [5] Cobbs CS, Brenman JE, Aldape KD, et al. Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(4): 727-730.
- [6] Gallo O, Masini E, Morbidelli L, et al. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1998, 90(8): 587-596.
- [7] Klotz T, Bloch W, Volberg C, et al. Selective expression of inducible nitric oxide synthase in human prostate carcinoma [J]. *Cancer*, 1998, 82(10): 1897-1903.
- [8] Fujimoto H, Ando Y, Yamashita T, et al. Nitric oxide synthase activity in human lung cancer [J]. *Jpn J Cancer Res*, 1997, 88(12): 1190-1198.
- [9] 孟文,曹明智,曹洪明,等. 诱导型一氧化氮合酶与乳腺癌增殖和转移的关系的研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(5): 378-380.
- [10] Kojima M, Morisaki T, Tsukahara Y, et al. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in human colon carcinoma tissue [J]. *J Surg Oncol*, 1999, 70(4): 222-229.
- [11] Lagares-Garcia JA, Moore RA, Collier B, et al. 2001 nitric oxide synthase as a marker in colorectal carcinoma [J]. *Am Surg*, 2001, 67(7): 709-713.