

Mmp-2 重组真核表达载体的构建及 MMP-2 蛋白对肝癌细胞的作用机制探讨

夏 庆¹, 彭明兵¹, 郑志菊², 王 伟¹, 孙达权¹, 曹煜珊¹, 徐国强¹

(1. 贵州医科大学基础医学院, 贵阳 550025; 2. 贵阳市第二人民医院手术室, 贵阳 550023)

【摘要】目的:构建人基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase 2, MMP-2)基因重组真核表达载体,探讨 MMP-2 蛋白对肝癌细胞迁移和侵袭的影响及其作用机制。**方法:**以肝癌 SMMC-7721 细胞为研究模型,以基因重组技术构建 pEYFP-Mmp-2 重组真核表达载体,pEYFP-Mmp-2 一过性转染模型细胞过表达 MMP-2-YFP,siRNA 转染沉默模型细胞内源性 MMP-2 表达,设立空白对照、MMP-2 沉默对照组、MMP-2 沉默组、过表达 MMP-2 融合蛋白对照组、过表达 MMP-2 融合蛋白组,划痕实验检测细胞迁移能力,侵袭小室实验检测细胞侵袭能力,钙蛋白酶(calpain)特异性抑制剂 Calpeptin 抑制 Calpain 活性,蛋白印记实验检测 MMP-2、MMP-2-YFP、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)表达变化。**结果:**成功构建人 Mmp-2 重组真核表达载体 pEYFP-Mmp-2。pEYFP-Mmp-2 转染过表达 MMP-2 融合蛋白组细胞高表达 MMP-2-YFP。与 MMP-2 沉默对照组相比,MMP-2 沉默组内源性 MMP-2 表达明显下调($P=0.000$),细胞 12 h、24 h 及 48 h 迁移率明显降低($P=0.000$ 或 $P=0.001$),48 h 侵袭率明显降低($P=0.004$),E-cadherin 表达明显上调,N-cadherin 及 Vimentin 表达明显下调($P=0.000$)。与过表达 MMP-2 融合蛋白对照组相比,过表达 MMP-2 融合蛋白组 12 h、24 h 及 48 h 迁移率明显增强($P=0.015$ 或 $P=0.001$),48 h 侵袭率明显升高($P=0.011$),细胞 E-cadherin 表达明显下调,N-cadherin 及 Vimentin 表达明显上调($P=0.003$ 或 $P=0.001$)。Calpeptin 预处理明显降低过表达 MMP-2 融合蛋白组细胞迁移率和侵袭率($P=0.000$),上调 E-cadherin,下调 N-cadherin 及 Vimentin 蛋白表达水平($P=0.000$)。**结论:**本实验通过基因重组技术成功构建人 Mmp-2 重组真核表达载体 pEYFP-Mmp-2,成功表达 MMP-2-YFP 融合蛋白;并发现 MMP-2 通过调节 Calpain 介导肝癌 SMMC-7721 细胞迁移、侵袭及 EMT。

【关键词】肝细胞癌;基质金属蛋白酶 2;迁移;侵袭;上皮-间质转化

【中图分类号】R329.2*5

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-01-02

Construction of *Mmp-2* recombinant eukaryotic expression vector and study of the mechanism of action of MMP-2 on hepatocellular carcinoma cells

Xia Qing¹, Peng Mingbing¹, Zheng Zhijue², Wang Wei¹, Sun Daquan¹, Cao Yushan¹, Xu Guoqiang¹

(1. College of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University;

2. Department of Operation Room, The Second People's Hospital of Guiyang)

【Abstract】Objective: To construct a recombinant eukaryotic expression vector of human matrix metalloproteinase 2 (*Mmp-2*) and investigate the effect and mechanism of action of MMP-2 on the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. **Methods:** The human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells were used as the research model, and the recombinant eukaryotic expression vector pEYFP-Mmp-2 was constructed by gene recombination technology. The cells of pEYFP-Mmp-2 transient transfection model overexpressed MMP-2-YFP, while the cells of siRNA transfection silencing model expressed endogenous MMP-2. Then the above cells were divided into five groups, namely control group, MMP-2 silencing control group (siCON), MMP-2 silencing group (siMMP-2),

作者介绍: 夏 庆, Email: 1024280366@qq.com,

研究方向: 肿瘤生物学。

通信作者: 徐国强, Email: 1737049021@qq.com。

基金项目: 贵阳市科技计划资助项目(编号: 筑科合同[20161001]012);

贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究资助项目(编号: 黔中医药发[2015] 8 号)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190507.1737.013.html>

(2019-05-08)

overexpressed MMP-2 fusion protein control group (ovNC), and overexpressed MMP-2 fusion protein group (ovMMP-2). Wound healing assay was used to determine cell migration, and Transwell chamber assay was used to evaluate cell invasion. Calpeptin, a specific inhibitor of calcium-activated neutral protease (calpain), inhibited the activity of calpain. The expression levels of MMP-2, MMP-2-YFP, E-cadherin, N-cadherin, and

vimentin were measured by Western blotting. **Results:** The human *Mmp-2* recombinant eukaryotic expression vector pEYFP-*Mmp-2* was successfully constructed. High expression of MMP-2-YFP was observed in the ovMMP-2 group transfected with the pEYFP-*Mmp-2*. Compared with the siCON group, the siMMP-2 group showed a significant reduction in the expression level of endogenous MMP-2 ($P=0.000$). Meanwhile, the cell migration in the siMMP-2 group decreased significantly at 12 h, 24 h, and 48 h ($P=0.000$ or $P=0.001$), and the cell invasion also decreased significantly at 48 h ($P=0.004$). Furthermore, a significant up-regulation of E-cadherin and significant down-regulations of both N-cadherin and vimentin were manifested in siMMP-2 cells ($P=0.000$). Compared with those in the ovNC group, the cell migration in the ovMMP-2 group increased significantly at 12 h, 24 h, and 48 h ($P=0.015$ or $P=0.001$), and the cell invasion increased significantly at 48 h as well ($P=0.011$). In addition to those, the ovMMP-2 group also had a significant down-regulation of E-cadherin along with significant up-regulations of N-cadherin and vimentin ($P=0.003$ or $P=0.001$). Results also demonstrated that calpeptin pretreatment significantly reduced the cell migration and invasion, up-regulated the expression level of E-cadherin, and down-regulated the expression levels of N-cadherin and vimentin in the ovMMP-2 group ($P=0.000$). **Conclusion:** In this study, the recombinant eukaryotic expression vector pEYFP-*Mmp-2* is successfully constructed by gene recombination technology, which successfully expresses the MMP-2-YFP fusion protein. It finds that MMP-2 mediates the migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells by regulating calpain.

【Key words】hepatocellular carcinoma; matrix metalloproteinase-2; migration; invasion; epithelial-mesenchymal transition

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的恶性肿瘤, 死亡率位居全球第二位^[1-3]。HCC 患者死亡的主要原因是癌细胞转移, 因此, 如何控制癌细胞转移是 HCC 临床治疗的关键。上皮-间质转化 (endothelial to mesenchymal transition, EMT) 是上皮细胞通过特定程序转化为间质细胞表型的生物学行为, 肿瘤细胞 EMT 往往伴随迁移和侵袭能力的增强, 而迁移和侵袭是恶性肿瘤转移的必要过程^[4-5]。因此, 遏制 EMT 可能是控制 HCC 细胞转移的新方法。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 是 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 依赖的内源性蛋白酶家族, 其与肿瘤 ECM 降解、转移、侵袭等有关^[6-10]。MMP-2 是 MMPs 中的重要成员之一, 研究表明 HCC 细胞发生 EMT 伴随 MMP-2 表达上调, 并且影响肝癌细胞的迁移与侵袭能力^[6]。最新研究显示, CXC 趋化因子配体 10 能通过 MMP-2 介导肝癌细胞 EMT 和转移^[11]。提示 MMP-2 可调控 EMT 进程。但 MMP-2 对 EMT 的调控机制还未明了, 有待进一步实验研究。本研究以肝癌 SMMC-7721 细胞为研究模型, 以基因重组技术构建 pEYFP-*Mmp-2* 重组真核表达载体, pEYFP-*Mmp-2* 一过性转染模型细胞过表达 MMP-2 融合蛋白, siRNA 转染沉默模型细胞内源性 MMP-2 表达, 观察 MMP-2 对模型细胞迁移、侵袭及 EMT 的影响, 并对其作用机制进行探索, 为 HCC 临床治疗提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 SMMC-7721 肝癌细胞株购自中科院上海细胞库。

1.1.2 试剂 GXL DNA Polymerase 高保真酶、RNA 反转录试剂盒、限制性内切酶 *EcoR* I、*Xho* I、T4 DNA Ligase 连接酶、5 kb DNA Marker 和 10 000 bp DNA Marker 均购自大连 Takara 公司; 质粒微量抽提试剂盒、无内毒素质粒中量小提试剂盒、DNA 回收试剂、分子克隆宿主 *E. coli* DH5 α 均购自北京天根生化有限公司; SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒购自北京索莱宝生物公司; BCA 蛋白浓度定量试剂盒购自上海碧云天生物技术公司; Transwell 小室购自美国 Millipore 公司; Matrigel 胶购自美国 Corning 公司; Lipofectamine™ 2000 购自美国 Invitrogen 公司; MMP-2 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司; E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 多克隆抗体购自美国 Affinity 公司; calpain 抑制剂 calpeptin 购自美国 Sigma 公司; 胎牛血清 (FBS) 购自美国 Gibco 公司; 高糖 DMEM 培养基购自美国 HyClone 公司; 引物合成及测序均由北京博迈德基因技术有限公司完成; MMP-2 siRNA 转染沉默试剂盒购自上海吉玛基因公司。克隆载体 pMD18-T vector 购自大连 Takara 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 SMMC-7721 肝癌细胞株用 DMEM 高糖培养基 (10% FBS、1% 青-链霉素), 在 37 °C、5% CO₂ 孵箱内进行常规培养。待细胞培养至融合 70% 左右, 即可进行后续的实验。

1.2.2 获取 *Mmp-2* 目的基因 根据 GenBank 中人 *Mmp-2* 的基因序列(NM_004530)和 pEYFP-N1 真核表达载体的多克隆位点设计合成一对引物。上游引物 5'端插入 *Xho* I 酶切位点,下游引物 5'端插入 *EcoR* I 酶切位点。引物序列如下。*Mmp-2* 上游:5'-TTCTCGAGACCATGCAATACCTGAACACC TTCTATGGC-3'(下划线为 *Xho* I 限制酶切位点,前两位为保护序列);*Mmp-2* 下游:5'-AAGAATTCCGCAGCCTAG-CCAGTCGGATTT-3'(下划线为 *EcoR* I 限制酶切位点,前两位为保护序列)。提取人 SMMC-7721 总 RNA,经 RT-PCR 合成入源性第一条链 cDNA,以 cDNA 为模板,以上述核苷酸序列为引物,PCR 扩增 *Mmp-2* 基因片段,经 1%琼脂糖电泳检测,用 DNA 回收试剂盒获得目的片段。

1.2.3 获取 T-A 克隆 将获得的 *Mmp-2* 基因片段,与 pMD18-T 载体 4 °C 连接 24 h,后转化分子克隆的宿主 *E.coli* DH5 α 并涂布于含氨苄青霉素的 Luria-Bertani 固体培养基中。将得到的阳性菌落在 Luria-Bertani 液体培养基(含氨苄)中 37 °C 振荡扩增。抽提质粒后用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切电泳鉴定。由北京博迈德基因技术有限公司帮助进行检测菌液序列,序列正确的命名为 pMD18-*Mmp-2*。

1.2.4 构建重组真核表达载体 用 DNA 回收试剂盒获得 pMD18-*Mmp-2* 双酶切的 *Mmp-2* 基因片段与用 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切后的表达载体 pEYFP-N1 4 °C 连接 24 h。后转化进 *E.coli* DH5 α 感受态细胞,涂于含 Kana 的 Luria-Bertani 固体培养基平板上,37 °C 过夜培养。挑取阳性菌株在含 Kana 的 Luria-Bertani 液体培养基中扩增阳性菌落。用质粒小抽提试剂盒获得质粒,用 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切后电泳检测,并测定菌落序列,序列正确的命名为 pEYFP-*Mmp-2*。

1.2.5 pEYFP-*Mmp-2* 质粒转染过表达外源性融合蛋白 将细胞按 2×10^5 个/孔,铺于 24 孔板待长到 50%~70%时对细胞进行瞬时转染,转染前 2 h 将 24 孔换成新鲜无血清 DMEM,取 2 个 1.5 mL 离心管,一管加入 1 μ L Lipo2000 与 25 μ L DMEM 培养基后混匀;另一管加入 500 ng pEYFP-*Mmp-2*/pEYFP-N1 与 25 μ L DMEM 培养基后混匀,室温静置 5 min,混匀上述 2 个离心管中的液体,室温静置 20 min,实验组中每孔各加入 50 μ L。继续培养 6 h 后换成含 10% FBS 的新鲜 DMEM 培养基。

1.2.6 MMP-2 siRNA 转染沉默 MMP-2 蛋白表达 将细胞按 2×10^5 个/孔,铺于 24 孔板待长到 50%~70%时对细胞进行瞬时转染,转染前 2 h 将 24 孔换成新鲜无血清 DMEM,取 siRNA(0.5 OD),瞬时离心后加入 62.5 μ L DEPC 处理水配成工作溶液。取 2 个 1.5 mL 离心管,一管加入 1 μ L Lipo6000 与 25 μ L DMEM 培养基后混匀;另一管加入 1 μ L siRNA 与 25 μ L DMEM 培养基后混匀,室温静置 5 min,混匀上述两个离心管中的液体,室温静置 20 min,实验组中每孔各加入 50 μ L。继续培养 6 h 后换成含 10% FBS 的新鲜 DMEM 培养基。

1.2.7 实验分组 空白对照组(Control):正常 SMMC-7721 肝癌细胞;MMP-2 沉默对照组(siCON):MMP-2 siRNA 转染对照细胞;MMP-2 沉默组(siMMP-2):MMP-2 siRNA 转染沉默细胞;过表达 MMP-2 融合蛋白对照组(ovNC):转染 pEYFP-N1 空载质粒组细胞;过表达 MMP-2 融合蛋白组(ovMMP-2):转染 pEYFP-*Mmp-2* 重组质粒组细胞。

1.2.8 划痕实验检测细胞迁移能力 将各组细胞按每孔 2×10^5 个细胞铺于 24 孔板中,待细胞生长至 100 %密度时在孔中央使用 10 μ L 的无菌枪头做“十字”划痕,PBS 清洗 3 次以去掉悬浮的细胞,加入 1 mL 不含血清的 DMEM 培养基继续培养,分别在 0、12、24、48 h 时于显微镜下观察细胞的状态并拍照记录。以各组 0 h 迁移率归一化处理,各组迁移率=1+各组迁移距离/0 h 划痕距离。

1.2.9 侵袭小室实验检测细胞侵袭能力 收集各组细胞,按每室 4×10^5 个细胞制成 200 μ L 无血清 DMEM 悬液(必要时以 Calpeptin 预处理各组细胞后制备细胞悬液),铺于事先铺好基质胶的 8 μ m 孔径 Transwell 小室,后将小室移至加有 600 μ L 含 10%血清培养基的下室中,继续培养细胞。48 h 时取出,用 4%的多聚甲醛固定细胞 10 min,苏木素染细胞核 15 min,伊红染胞浆 5 min,70%的乙醇清洗 2 次,轻柔去除上层的细胞和胶。每组随机在 3~5 个视野内于 200 倍镜下拍照记录,计数侵袭率。

1.2.10 Western blot 检测各蛋白表达变化 各组细胞抽提蛋白后 BCA 法定量并制样,蛋白样品以 12%的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,后将蛋白转印至 PVDF 膜,37 °C、5%脱脂奶粉封闭 1 h,一抗 4 °C 孵育过夜,洗膜(1 $\times$ TBST,3 次,5 min/次),二抗 37 °C 孵育 2 h,洗膜,在膜上均匀铺上曝光液 ECL,在凝胶成像系统内测定结果。用 Quantity One 系统分析目的条带并获取目的条带的灰度值。本实验中使用 GAPDH 作为蛋白质标准化的内参。蛋白的相对表达量用目的蛋白的灰度值与内参蛋白的灰度值比值表达。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 和 Graphpad prism6.0 软件进行统计,所有数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多样本比较采用单因素方差分析,两组样本以 *t* 检验分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 成功构建人 *Mmp-2* 基因重组真核表达载体 pEYFP-*Mmp-2*

琼脂糖凝胶检测,如图 1 所示,在约 2 000 bp 处有明显条带,与 *Mmp-2* 基因蛋白编码区片段大小一致。pMD18-*Mmp-2* 重组质粒用 *EcoR* I、*Xho* I 酶切鉴定结果见下图,目的条带与预计结果一致。pEYFP-*Mmp-2* 重组真核表达质粒的双酶切结果下图所示,图中有 2 条带,在约 5 000 bp 处的表达载体 pEYFP-N1 骨架及 2 000 bp 处的目的基因 *Mmp-2*。

2.2 外源性过表达融合蛋白 MMP-2-YFP 和转染沉默内源性 MMP-2

构建成功的重组真核表达载体带有黄色荧光蛋白基因, 荧光显微镜下显示过表达 MMP-2 融合蛋白对照组和过表达 MMP-2 融合蛋白组细胞发黄荧光, 如图 2Ab 和图 2Ad 所示。Western blot 结果显示, 空白对照组与过表达 MMP-2 融合蛋白对照组不表达外源融合蛋白 MMP-2-YFP; 而 ovMMP-2 组细胞高表达 MMP-2-YFP。空白对照组与 MMP-2 沉默对照组内源性 MMP-2 表达无统计学差异; 与 MMP-2 沉默对照组相比, MMP-2 沉默组内源性 MMP-2 表达明显下调 ($t=34.46, P=0.000$) (表 1)。

表 1 Control、siCON 和 siMMP-2 组 MMP-2 相对蛋白表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	MMP-2 蛋白表达量
空白对照组	1.000 $\pm$ 0.000
MMP-2 沉默对照组	1.037 $\pm$ 0.037
MMP-2 沉默组	0.269 $\pm$ 0.011 ^a

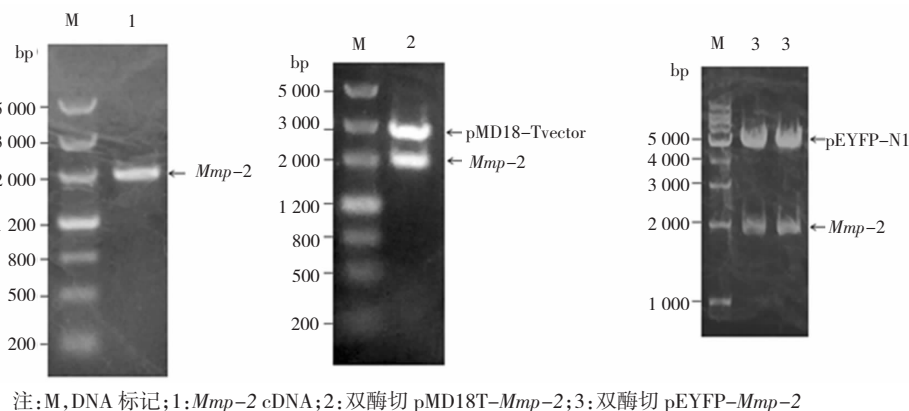
注: a, 与 MMP-2 沉默对照组相比, $P=0.000$

2.3 MMP-2 对 SMMC-7721 细胞迁移能力的影响

划痕实验结果显示, 12 h 时, 与 MMP-2 沉默对照组相比, MMP-2 沉默组迁移率明显降低 ($t=9.921, P=0.000$), 与过表达 MMP-2 融合蛋白对照组相比, 过表达 MMP-2 融合蛋白组迁移率明显增强 ($t=4.082, P=0.015$)。24 h 时, 与 MMP-2 沉默对照组相比, MMP-2 沉默组迁移率明显降低 ($t=7.868, P=0.001$), 与过表达 MMP-2 融合蛋白对照组相比, 过表达 MMP-2 融合蛋白组迁移率明显增强 ($t=15.280, P=0.000$)。48 h 时, 与 MMP-2 沉默对照组相比, MMP-2 沉默组迁移率明显降低 ($t=15.610, P=0.000$), 与过表达 MMP-2 融合蛋白对照组相比, 过表达 MMP-2 融合蛋白组迁移率明显增强 ($t=4.082, P=0.015$) (表 2)。

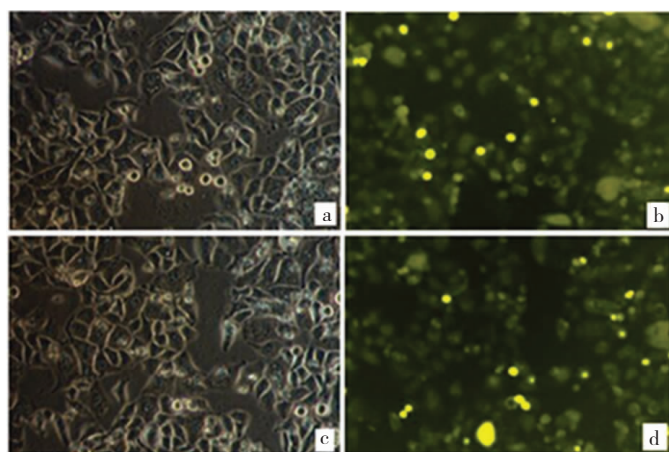
2.4 MMP-2 对 SMMC-7721 细胞侵袭能力的影响

侵袭小室结果显示 (图 4, 表 3), 空白对照组、MMP-2 沉默对照组和过表达 MMP-2 融合蛋白对照组细胞侵袭率无明显差异。与 MMP-2 沉默对照组相比, MMP-2 沉默组细胞侵袭率明显降低 ($t=6.119, P=0.004$)。与过表达 MMP-2 融合蛋白对照组相比, 过表达 MMP-2 融合蛋白组细胞侵袭率明显升高 ($t=4.479, P=0.011$)。



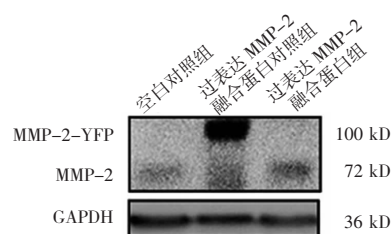
注: M, DNA 标记; 1: *Mmp-2* cDNA; 2: 双酶切 pMD18T-*Mmp-2*; 3: 双酶切 pEYFP-*Mmp-2*

图 1 人 *Mmp-2* 基因重组真核表达载体 pEYFP-*Mmp-2* 的构建

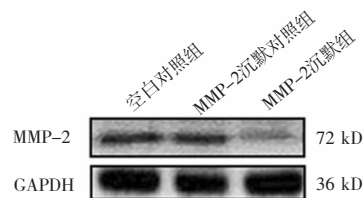


a 和 b: 转染 pEYFP-N1 空载体后 SMMC-7721 细胞白光图和荧光图 ($\times 100$);
c 和 d: 转染 pEYFP-*Mmp-2* 空载体后 SMMC-7721 细胞白光和荧光图 ($\times 100$)

A. 转染后细胞中蛋白表达情况



B. 各组细胞外源融合蛋白 MMP-2-YFP 表达变化



C. 各组细胞内源性 MMP-2 表达变化

图 2 外源性过表达融合蛋白 MMP-2-YFP 和转染沉默内源性 MMP-2

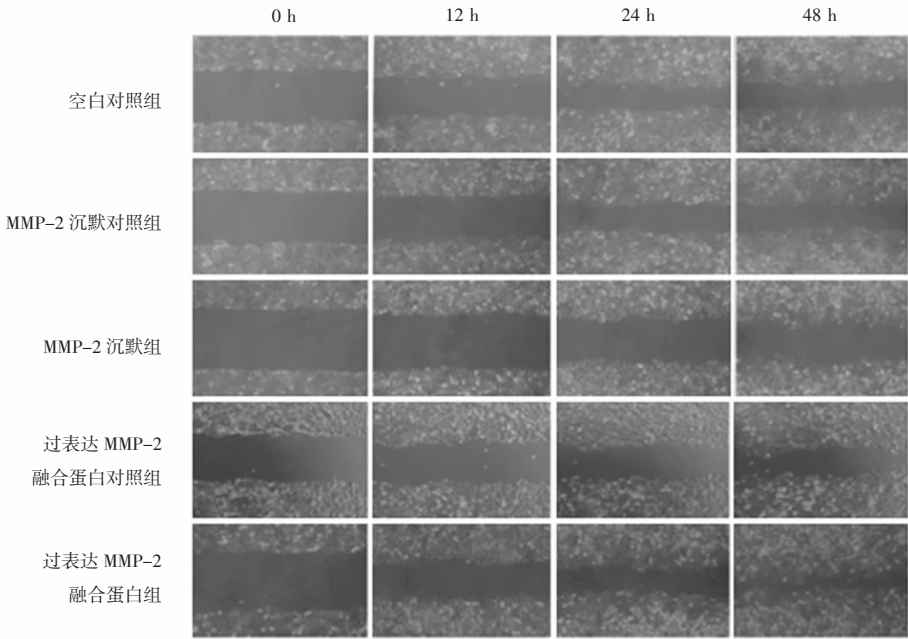


图 3 MMP-2 对 SMMC-7721 细胞迁移的影响

表 2 各组细胞迁移率比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	12 h 迁移率	24 h 迁移率	48 h 迁移率
空白对照组	1.250 ± 0.013	1.438 ± 0.014	1.669 ± 0.033
MMP-2 沉默对照组	1.252 ± 0.038	1.458 ± 0.029	1.633 ± 0.007
MMP-2 沉默组	1.018 ± 0.015^a	1.255 ± 0.034^b	1.399 ± 0.025^a
过表达 MMP-2 融合蛋白对照组	1.253 ± 0.016	1.454 ± 0.015	1.655 ± 0.038
过表达 MMP-2 融合蛋白组	1.329 ± 0.028^c	1.613 ± 0.010^d	1.843 ± 0.015^c

注:a,与 MMP-2 沉默对照组相比, $P=0.000$;b:与 MMP-2 沉默对照组相比, $P=0.001$;c:与过表达 MMP-2 融合蛋白对照组相比, $P=0.015$;d:与过表达 MMP-2 融合蛋白对照组相比, $P=0.000$

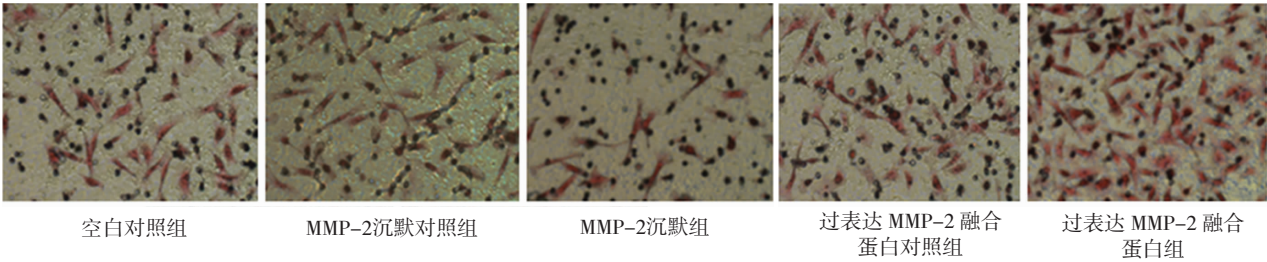


图 4 MMP-2 对 SMMC-7721 细胞侵袭能力的影响

表 3 各组细胞侵袭率比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	48 h 侵袭率
空白对照组	1.000 ± 0.000
MMP-2 沉默对照组	1.011 ± 0.109
MMP-2 沉默组	0.332 ± 0.021^a
过表达 MMP-2 融合蛋白对照组	0.984 ± 0.022
过表达 MMP-2 融合蛋白组	1.448 ± 0.101^b

注:a,与 MMP-2 沉默对照组相比, $P=0.004$;b:与过表达 MMP-2 融合蛋白对照组相比, $P=0.011$

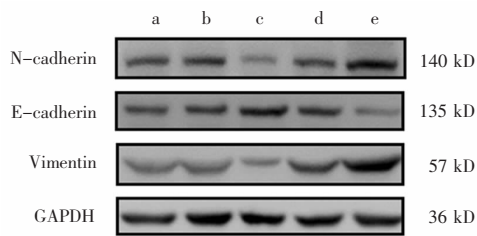
2.5 MMP-2 对 E-cadherin、N-cadherin 及 Vimentin 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示,在空白对照组、MMP-2 沉默对照组和过表达 MMP-2 融合蛋白对照组细胞中 E-cadherin、N-cadherin 及 Vimentin 蛋白表达无明显差异。与 MMP-2 沉默对照组相比,MMP-2 沉默组细胞 E-cadherin 表达明显上调($t=5.233, P=0.006$),N-cadherin ($t=16.910, P=0.000$)及 Vimentin ($t=8.912, P=0.000$)表达明显下调。与过表达 MMP-2 融合蛋白对照组相比,过表达 MMP-2 融合蛋白组细胞 E-cadherin 表达明显下调($t=6.787, P=0.003$),N-cadherin ($t=17.590, P=0.000$)及 Vimentin($t=11.250, P=0.000$)表达明显上调(表 4)。

表 4 MMP-2 对 E-cadherin、N-cadherin 及 Vimentin 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	E-cadherin 蛋白表达量	N-cadherin 蛋白表达量	Vimentin 蛋白表达量
空白对照组	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
MMP-2 沉默对照组	1.041 ± 0.054	1.030 ± 0.030	1.010 ± 0.038
MMP-2 沉默组	1.635 ± 0.100 ^a	0.433 ± 0.019 ^a	0.412 ± 0.055 ^a
过表达 MMP-2 融合蛋白对照组	1.020 ± 0.056	0.970 ± 0.012	0.984 ± 0.033
过表达 MMP-2 融合蛋白组	0.552 ± 0.040 ^b	2.032 ± 0.059 ^b	1.921 ± 0.076 ^b

注:a,与 MMP-2 沉默对照组相比, $P=0.000$;b:与过表达 MMP-2 融合蛋白对照组相比, $P=0.000$

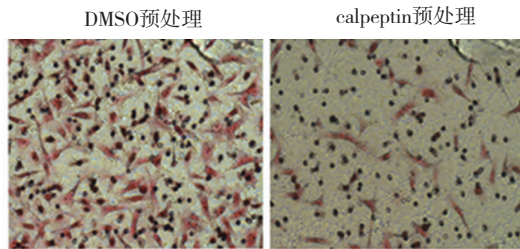


注:a,空白对照组;b:MMP-2 沉默对照组;c:MMP-2 沉默组;d:过表达 MMP-2 融合蛋白对照组;e:过表达 MMP-2 融合蛋白组

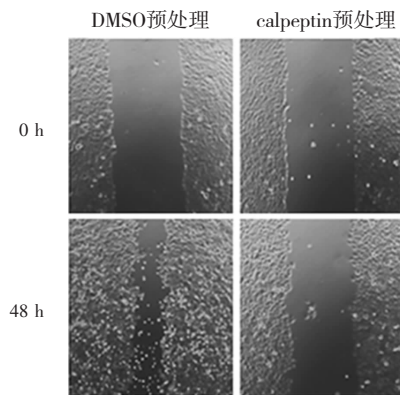
图 5 MMP-2 对 E-cadherin、N-cadherin 及 Vimentin 蛋白表达的影响

2.6 Calpeptin 预处理在 MMP-2 影响过表达 MMP-2 融合蛋白细胞迁移与侵袭能力中的作用

在过表达 MMP-2 融合蛋白组细胞中,与 DMSO 预处理相比,Calpeptin 预处理组细胞迁移率明显降低($t=28.590, P=0.000$),侵袭率也明显降低($t=19.830, P=0.000$)。



A. 侵袭小室实验结果



B. 划痕实验结果

图 6 Calpeptin 预处理在 MMP-2 影响过表达 MMP-2 融合蛋白细胞迁移与侵袭能力中的作用

2.7 Calpeptin 预处理在 MMP-2 影响过表达 MMP-2 融合蛋白细胞 E-cadherin、N-cadherin 及 Vimentin 蛋白表达中的作用

Western blot 结果显示,在过表达 MMP-2 融合蛋白组细胞中,与 DMSO 预处理相比,Calpeptin 预处理能明显上调 E-cadherin 蛋白表达水平($t=21.300, P=0.000$),下调 N-cadherin ($t=11.210, P=0.000$)及 Vimentin($t=10.390, P=0.000$)蛋白表达水平(表 5)。

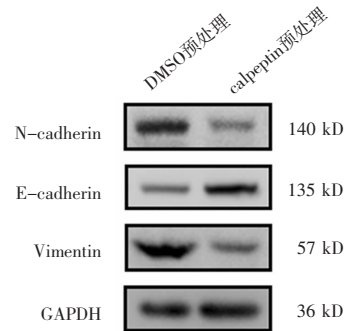


图 7 Calpeptin 预处理在 MMP-2 影响过表达 MMP-2 融合蛋白细胞 E-cadherin、N-cadherin 及 Vimentin 蛋白表达中的作用

表 5 Calpeptin 预处理在 MMP-2 影响过表达 MMP-2 融合蛋白细胞 E-cadherin、N-cadherin 及 Vimentin 蛋白表达中的作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

处理方式	E-cadherin 蛋白表达量	N-cadherin 蛋白表达量	Vimentin 蛋白表达量
DMSO 预处理	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
Calpeptin 预处理	1.788 ± 0.053 ^a	0.408 ± 0.053 ^a	0.440 ± 0.054 ^a
t 值	21.300	11.210	10.390
P 值	0.000	0.000	0.000

注:a,与 DMSO 预处理组相比, $P=0.000$

3 讨论

MMP-2 作为 MMPs 的重要成员之一,参与了包括肝癌、乳腺癌及结肠癌在内多种肿瘤细胞的恶性生物学行为^[6,12]。研究显示,MMP-2 能降解基底膜成分 IV 型胶原,破坏基底膜的完整性,从而促进癌细

胞迁移、侵袭或转移^[12-13]。提示控制癌细胞 MMP-2 表达是抑制转移的可能途径。

本研究首次用 pEYFP-N1 载体构建了 pEYFP-Mmp-2 成功转染过表达了 MMP-2-YFP 融合蛋白。同时,本研究还采用 siRNA 转染干扰 SMMC-7721 细胞内源性 MMP-2,建立了 MMP-2 沉默细胞模型。通过划痕实验和侵袭小室实验发现,MMP-2 过表达模型细胞迁移和侵袭能力显著增强,而 MMP-2 沉默模型细胞迁移和侵袭能力明显降低。提示 MMP-2 可调节肝癌细胞迁移和侵袭,这与文献报道相一致。最近的研究显示,CXC 趋化因子配体 10 可通过 MMP-2 介导肝癌细胞 EMT^[11]。提示 MMP-2 可调控 EMT 进程。为此,本研究观察了上皮表型标志物 E-钙黏蛋白(E-cadherin)和间质表型标志物 N-钙黏蛋白(N-cadherin)与波形蛋白(Vimentin)的表达变化。结果显示,MMP-2 过表达模型细胞 E-cadherin 表达下调,N-cadherin 和 Vimentin 表达上调。而在 MMP-2 沉默模型细胞中观察到了相反结果。提示 MMP-2 过表达能诱导 SMMC-7721 细胞 EMT;而沉默 MMP-2 能抑制 EMT,使细胞保持更强的上皮表型。提示 MMP-2 可调控肝癌 SMMC-7721 细胞迁移、侵袭和 EMT。但 MMP-2 的上述调控机制还不明了。钙激活中性蛋白酶(calcium-activated neutral protease,Calpain)是一种钙离子依赖性的半胱氨酸蛋白酶,其激活状态需要钙离子。Calpain 参与多种肿瘤细胞的恶性生物学行为,并已证实与 EMT 有关。研究报道,纤连蛋白通过激活 Calpain 促进乳腺癌 MCF-7 细胞的迁移、侵袭和 EMT 进程^[14]。还有研究显示,MALAT1/miR-124 信号通路通过 Calpain 小亚基 Calpain4 调节鼻咽癌细胞侵袭和 EMT^[15]。为观察 Calpain 是否参与介导 MMP-2 诱导的 SMMC-7721 细胞 EMT,本研究采用 Calpain 广谱抑制剂 Calpeptin 预处理 MMP-2 过表达模型细胞,发现 Calpeptin 预处理明显抑制了 MMP-2 过表达模型细胞迁移和侵袭活动,同时细胞 E-cadherin 表达上调,N-cadherin 和 Vimentin 表达下调。提示 Calpeptin 预处理可抑制 MMP-2 过表达模型细胞迁移、侵袭和 EMT。

综上所述,MMP-2 通过调节 Calpain 介导肝癌 SMMC-7721 细胞迁移、侵袭及 EMT。本研究首次发现 MMP-2/Calpain 信号通路参与调节肝癌细胞迁移、侵袭及 EMT,为临床治疗 HCC 提供了理论依据,

但哪一 Calpain 家族成员参与上述作用还需进一步实验验证。

参 考 文 献

- [1] Allaire M, Nault JC. Advances in management of hepatocellular carcinoma[J]. Curr Opin Oncol, 2017, 29(4): 288-295.
- [2] Tang A, Hallouch O, Chernyak V, et al. Epidemiology of hepatocellular carcinoma; target population for surveillance and diagnosis[J]. Abdom Radiol (NY), 2018, 43(1): 13-25.
- [3] Au JS, Frenette CT. Management of hepatocellular carcinoma; current status and future directions[J]. Gut Liver, 2015, 9(4): 437-448.
- [4] Brooks SA, Lomax-Browne HJ, Carter TM, et al. Molecular interactions in cancer cell metastasis[J]. Acta Histochem, 2010, 112(1): 3-25.
- [5] Schmidmaier R, Baumann P. ANTI-ADHESION evolves to a promising therapeutic concept in oncology[J]. Curr Med Chem, 2008, 15(10): 978-990.
- [6] Naim A, Pan Q, Baig MS. Matrix metalloproteinases (MMPs) in liver diseases[J]. J Clin Exp Hepatol, 2017, 7(4): 367-372.
- [7] Shi F, Xiao F, Ding P, et al. Long noncoding RNA highly up-regulated in liver cancer predicts unfavorable outcome and regulates metastasis by MMPs in triple-negative breast cancer[J]. Arch Med Res, 2016, 47(6): 446-453.
- [8] Shan Y, You B, Shi S, et al. Hypoxia-induced matrix metalloproteinase-13 expression in exosomes from nasopharyngeal carcinoma enhances metastases[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(3): 382.
- [9] Shen Z, Wang X, Yu X, et al. MMP16 promotes tumor metastasis and indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Oncotarget, 2017, 8(42): 72197-72204.
- [10] Huang SF, Chu SC, Hsieh YH, et al. Viola yedoensis suppresses cell invasion by targeting the protease and NF- κ B activities in A549 and lewis lung carcinoma cells[J]. Int J Med Sci, 2018, 15(4): 280-290.
- [11] Ren T, Zhu L, Cheng M. CXCL10 accelerates EMT and metastasis by MMP-2 in hepatocellular carcinoma[J]. Am J Transl Res, 2017, 9(6): 2824-2837.
- [12] 焦娟, 宋艳艳, 刘霞, 等. CXCL12/CXCR4/MMP-2 信号通路对三阴性乳腺癌生物学行为的影响[J]. 临床与实验病理学杂志, 2017, 33(11): 1203-1208.
- [13] 王城, 吴斌, 严舒, 等. 沉默 FOXQ1 基因抑制肝细胞癌 SMMC-7721 细胞迁移侵袭能力[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(1): 48-52.
- [14] Li CL, Yang D, Cao X, et al. Fibronectin induces epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer MCF-7 cells via activation of calpain[J]. Oncol Lett, 2017, 13(5): 3889-3895.
- [15] Shi B, Wang Y, Yin F. MALAT1/miR-124/Capn4 axis regulates proliferation, invasion and EMT in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Cancer Biol Ther, 2017, 18(10): 792-800.

(责任编辑:张辉洁)