

甘草查尔酮 A 对小鼠黑色素瘤 B16F10 细胞体外迁移能力的影响

马晓懿¹, 杨新惠¹, 郑秋生^{1,2*}

(1. 新疆特种植物药资源教育部重点实验室, 石河子大学药学院, 新疆石河子 832002;
2. 烟台大学生命科学学院, 山东烟台 264005)

[摘要] **目的:**探讨甘草中黄酮类化合物甘草查尔酮 A(licochalcone A, LCA)对小鼠黑色素瘤 B16F10 细胞株体外迁移能力的影响。**方法:**取对数生长期 B16F10 细胞按 8 000 个/孔接种于 96 孔板中, 磺酰罗丹明 B(SRB)法测定 LCA(0, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)作用 24 h 对细胞活力影响;取对数生长期 B16F10 细胞按 1×10^5 个/孔接种于 24 孔板中, 划痕实验检测 LCA(0, 5, 10, 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)作用 24 h 细胞体外迁移能力;取对数生长期 B16F10 细胞按 5×10^5 个/瓶接种于细胞培养瓶中, LCA(0, 5, 10, 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)作用 24 h 后, 明胶酶谱法检测细胞培养上清基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)活性;ELISA 检测 MMP-2 和 MMP-9 蛋白含量;实时荧光定量 PCR(Q-PCR)和半定量 PCR(RT-PCR)法检测 MMP-2 和 MMP-9 基因表达水平。**结果:**5 ~ 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 LCA 对小鼠黑色素瘤 B16F10 细胞作用 24 h, 对细胞活力没有显著的影响;划痕试验结果说明, LCA 可剂量依赖性降低 B16F10 细胞的体外迁移能力;明胶酶谱结果显示, LCA 可明显抑制 B16F10 细胞分泌 MMP-2 和 MMP-9 的活性;ELISA 试验表明, LCA 可明显降低 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达;Q-PCR 和 RT-PCR 结果显示, LCA 可明显降低 MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 基因表达量。**结论:**甘草查尔酮 A 能抑制 B16F10 小鼠黑色素瘤细胞体外转移侵袭作用, 其机制可能与抑制 MMP-2 和 MMP-9 表达有关。

[关键词] 甘草查尔酮 A; 抗转移; 基质金属蛋白酶; 小鼠黑色素瘤 B16F10 细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)18-0111-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015180111

Effects of Licochalcone A on Invasion and Metastasis in Mouse Melanoma B16F10 Cells MA Xiao-yi¹, YANG Xin-hui¹, ZHENG Qiu-sheng^{1,2*} (1. Key Laboratory of Xinjiang Endemic Phytomedicine Resources, Ministry of Education, School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832002, China; 2. College of Life Science Yantai University, Yantai 264005, China)

[Abstract] **Objective:** The purpose of this study is to investigate the effects of licochalcone A (LCA) on the invasion and metastasis in mouse melanoma B16F10 cells. **Method:** The cell proliferation rate was evaluated using sulforhodamine B (SRB) method. And the anti-metastasis ability was observed using scratch wound assay. The activated of matrix metal proteinase-2 (MMP-2) and matrix metal proteinase-9 (MMP-9) were evaluated using gelatin zymography. The expression in protein level of MMP-2 and MMP-9 were detected using enzyme-elinked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA expression of MMP-2 and MMP-9 were assessed using quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) and reverse transcription-PCR. **Result:** There was no significant effect on proliferation rate after treated with LCA 5-15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in B16F10 cells. LCA attenuated B16F10 cells migration in a concentration-dependent manner. LCA was able to reduce the activities of MMP-2 and MMP-9, down-regulated the expression of MMP-2 and MMP-9 both in mRNA and protein levels. **Conclusion:** LCA attenuated mouse melanoma B16F10 cells migration by inhibition of MMP-2 and MMP-9 expression.

[Key words] licochalcone A; anti-metastasis; matrix metal proteinase; mouse melanoma B16F10 cells

[收稿日期] 20150212(018)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31471338)

[第一作者] 马晓懿, 硕士, 从事肿瘤及细胞药理研究, Tel:18799752882, E-mail:mxysz@163.com

[通讯作者] * 郑秋生, 博士, 教授, 从事肿瘤及细胞药理研究, Tel:13999328286, E-mail:zqsyt@sohu.com

基质金属蛋白酶 (matrix metallo proteinases, MMPs) 在肿瘤转移中发挥极其重要的作用^[1], 与肿瘤的浸润转移高度相关^[2]。MMPs 几乎能降解细胞外基质 (ECM) 中的各种蛋白成分, 破坏肿瘤细胞侵袭组织学屏障, 在肿瘤侵袭转移中起到非常关键的作用^[3]。在所有的 MMPs 中, 降解 ECM 主要是基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 和基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 2 种^[4], 抑制 MMP-2 和 MMP-9 活性对抑制肿瘤转移有重要的意义^[5]。甘草中的黄酮成分是广谱抗肿瘤活性成分^[6], 甘草查耳酮 A (licochalcone A, LCA) 主要通过诱导肿瘤细胞凋亡发挥抗肿瘤活性。笔者实验室前期的研究表明, LCA 能够诱导肿瘤细胞线粒体功能障碍, 激活天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3), 促进 PARP 聚合酶的解离; 诱导 T24 凋亡^[7]。但对甘草查耳酮 A 抗侵袭转移报道较少, 本研究将探讨甘草查耳酮 A 对小鼠黑色素瘤 B16F10 侵袭转移的影响。

1 材料

1.1 细胞与药物 小鼠黑色素瘤细胞 B16F10, 中国科学院上海生命科学院细胞资源中心提供。甘草查耳酮 A (LCA, 批号 14022606, 纯度 98%, 成都普瑞法生物科技有限公司)。

1.2 试剂 二甲基亚砜 (DMSO, 批号 51596BPV), 磺酰罗丹明 B (SRB, 批号 3520421) 和胰蛋白酶 (批号 1030E048), 均购自 Sigma 公司, DMEM 细胞培养基 (批号 1342967, Gibco 公司), 新生牛血清 (批号 140207, 杭州四季青生物工程有限公司), 明胶 (北京拜尔迪生物技术有限公司), MMP-2 (批号 1411031), MMP-9 (批号 1411032) ELISA 试剂盒 (上海西塘生物工程有限公司), 总 RNA 快速抽提试剂盒 (批号 13112605Y, 上海生工生物技术有限公司), cDNA 逆转录试剂盒 (批号 00170212, Thermo 公司), 实时荧光定量 SYBR Green 扩增试剂盒 (批号 148041276, 凯杰公司), $2 \times Taq$ PCR MasterMix [批号 N2122, 科技 (北京) 有限公司]。

1.3 仪器 Thermo 3131 型 CO₂ 细胞培养箱 (美国 Thermo 公司), MIC00266 型倒置荧光显微镜 (德国 ZEISS 公司), BDS200-PH 型倒置生物显微镜 (重庆奥特光学仪器有限公司), Thermo 3001 型多功能酶标仪 (美国 Thermo 公司), H H S 型精密恒温水浴锅 (江苏金坛市医疗仪器厂), AR-2140 型电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司), 5424R 型离心机 (德国 Eppendorf 公司), C1000 型 PCR 扩增仪和 Powerpac 型恒流恒压电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 甘草查耳酮 A 对 B16F10 细胞活力的影响^[8]

收集对数生长期细胞, 计数并调整细胞悬液密度为 8×10^4 个/mL, 按每孔 100 μ L 加于 96 孔培养板中, 置于 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养。细胞接种 24 h 后, 吸出旧培养液, 分别加入 200 μ L 含甘草查耳酮 A 的培养基, 至终浓度为 0, 5, 10, 15, 20 μ mol \cdot L⁻¹, 于 37 $^{\circ}$ C 继续培养 24 h。细胞培养结束后, 取出培养板, 每孔液面上加入 50% (质量/体积) 的三氯乙酸 (TCA) 50 μ L 固定细胞, TCA 的终浓度为 10%, 然后在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中放置 1 h。培养板各孔用去离子水洗涤 5 遍, 去除 TCA。在空气中干燥后, 每孔加 0.4% 的 SRB 100 μ L, 室温下放置 20 min, 弃去各孔内液体 (回收) 后用 1% 乙酸洗涤 5 遍, 去除未结合的染料, 空气中干燥后用 pH 为 10.5 的 10 mmol \cdot L⁻¹ Tris base (三羟甲基胺基甲烷) 或者 DMSO 150 μ L 溶解, 在平板振荡器上振荡 10 min, 酶标仪测量 A_{515 nm} 各孔的吸光度 A。计算药物对细胞增殖的抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组 } A - \text{给药组 } A}{\text{对照组 } A} \times 100\%$$

2.2 检测细胞迁移能力 划痕实验检测 LCA 对肿瘤细胞迁移运动能力的影响^[9]。收集对数生长期细胞, 调整单细胞悬液密度至 1.0×10^5 个/mL, 传于 24 孔培养板, 至细胞长到 90% 融合度, 以 200 μ L 无菌的塑料液枪头均匀划痕, 用无血清的 DMEM 培养基轻轻洗去脱落细胞, 再于各组分别加入含不同浓度 LCA 的无血清培养基, 其终浓度分别为 0, 5, 10, 15 μ mol \cdot L⁻¹, 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 24 h 至对照组划痕基本愈合。用倒置显微镜拍照并分析。采用 Image-Pro plus 软件分别测定各组划痕前后面积, 计算划痕愈合率。

$$\text{划痕愈合率} = \frac{\text{划痕宽度}_{\text{零时间点}} - \text{划痕宽度}_{\text{测试点}}}{\text{划痕宽度}_{\text{零时间点}}} \times 100\%$$

2.3 测定 MMP-2, MMP-9 活性^[10] 首先, 预制含有 0.05% 明胶的 10% 聚丙烯酰胺凝胶。收集的药物预处理 B16F10 细胞培养上清 (1 500 $\times g$, 5 min) 离心, 将相同数量的细胞所对应的不同处理组培养液, 分别加同体积的 $2 \times$ 上样缓冲液, 不煮沸, 直接上样, 电泳 (浓缩胶: 60 ~ 80 V, 40 min; 分离胶: 100 V, 150 min)。电泳结束取出胶条, 将胶条室温下复性 (50 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl, pH 7.5, 2.5% Triton X-100) 3 次, 每次 20 min。目的是除去 SDS, 然后在 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床上孵育 18 h (50 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl,

150 mmol·L⁻¹ NaCl, 5 mmol·L⁻¹ CaCl₂, 2 μmol·L⁻¹ ZnCl₂, pH 7.5)。用质量分数 0.2% 的考马斯亮蓝 (R-250) 进行染色,用 35% 甲醇-10% 乙酸配制的脱色液,将胶条脱色至蓝色的均一背景,出现亮白色的条带。用凝胶成像仪白光下拍照,并用 Image-Pro plus 软件对条带进行分析。

2.4 测定 MMP-2, MMP-9 蛋白表达 用 ELISA 试剂盒测定 MMP-2, MMP-9 蛋白表达。取对数生长期 B16F10 细胞,计数后以相同细胞数接种于培养瓶中,在培养箱中培养 24 h,加入预先配制 LCA,培养 24 h 后,收集上清液,按照试剂盒说明操作,每样品设 6 个复孔,酶标仪 450 nm 测定 A。

2.5 检测 MMP-2, MMP-9 mRNA 表达 分别提取总 RNA,定量后进行逆转录聚合酶链反应,以 GAPDH 为内参,上游引物序列为 5'-AATCTCCACTTTGCCACTG-3',下游引物序列为 5'-CCTCGTCCCGTAGACAAAA-3',扩增长度为 103 bp,PCR 条件:94 ℃ 预变性 5 min,然后 94 ℃ 变性 30 s,59 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 40 s,30 个循环后再 72 ℃ 终末延伸 5 min;MMP-2 引物:上游序列 5'-CGTGGATCCTATGGGGCCTCTCCTG-3',下游序列 5'-GCGGAATTCACCTCGCTGGACATCAGGG-3',扩增片段大小为 386 bp,PCR 条件:94 ℃ 预变性 3 min,94 ℃ 变性 30 s,68 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环后再 72 ℃ 延伸 5 min;MMP-9 引物:上游序列 5'-CCTTTTGAGGGCGACCTCCAAG-3'下游序列 5'-CTGGATGACGATGTCTGCCT-3'扩增片段大小为 188 bp;PCR 条件:94 ℃ 预变性 3 min,94 ℃ 变性 30 s,61 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环后再 72 ℃ 延伸 5 min。RT-PCR 产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,拍照并对结果进行分析。

2.6 统计学分析 采用 Origin 8.0 软件进行统计分析,所有试验设 3 个平行组或重复 3 次,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 *t* 检验进行组间统计学差异比较,以

$P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对 B16F10 细胞活力的影响 与对照组相比,低浓度 LCA (5 ~ 15 μmol·L⁻¹) 对 B16F10 细胞活力没有显著的影响,而 LCA 浓度达到 20 μmol·L⁻¹ 时, B16F10 细胞活力被抑制。见表 1。

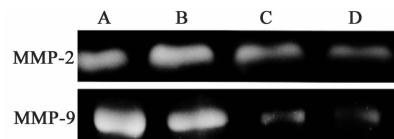
表 1 甘草查尔酮 A 对 B16F10 细胞活力和迁移能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/μmol·L ⁻¹	细胞存活率/%	划痕愈合率/%
对照	-	100	89.77 ± 3.03
LCA	5	95.25 ± 3.50	58.29 ± 4.37 ¹⁾
	10	93.75 ± 2.91	46.09 ± 3.68 ²⁾
	15	91.80 ± 3.42	14.20 ± 2.36 ²⁾
	20	84.19 ± 2.79 ¹⁾	-

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对 B16F10 细胞迁移能力的影响 在含 LCA 不同药物浓度 (5, 10, 15 μmol·L⁻¹) 无血清的 DMEM 培养基中孵育 24 h 的 B16F10 细胞与对照组相比,愈合率明显降低且呈浓度依赖性。见表 1。

3.3 对 MMP-2, MMP-9 活性的影响 与对照组比较,5, 10, 15 μmol·L⁻¹ 甘草查尔酮 A 处理 24 h 后 MMP-2 和 MMP-9 条带的面积和亮度都有所降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 1, 表 2。



A. 对照组; B. 甘草查尔酮 A 5 μmol·L⁻¹ 处理组; C. 甘草查尔酮 A 10 μmol·L⁻¹ 处理组; D. 甘草查尔酮 A 15 μmol·L⁻¹ 处理组 (图 2 同)

图 1 甘草查尔酮 A 对 B16F10 细胞分泌 MMP-9 和 MMP-2 蛋白活性的影响

Fig. 1 Effect of LCA on activity of MMP-9 and MMP-2 in B16F10 cells

表 2 甘草查尔酮 A 对 MMP-2 和 MMP-9 活性,蛋白含量,mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/μmol·L ⁻¹	蛋白活性/%		蛋白含量/%		mRNA 表达/%	
		MMP-2	MMP-9	MMP-2	MMP-9	MMP-2	MMP-9
对照	-	100	100	100	100	100	100
LCA	5	91.53 ± 3.05 ¹⁾	74.69 ± 6.13 ¹⁾	79.56 ± 4.99 ¹⁾	65.66 ± 0.73 ²⁾	71.86 ± 0.29 ¹⁾	80.43 ± 5.79 ¹⁾
	10	82.45 ± 4.27 ¹⁾	40.94 ± 4.15 ²⁾	67.02 ± 4.44 ²⁾	56.58 ± 3.73 ²⁾	58.89 ± 8.00 ¹⁾	56.03 ± 12.73 ²⁾
	15	63.70 ± 5.71 ²⁾	34.80 ± 3.49 ²⁾	34.42 ± 5.08 ²⁾	42.90 ± 5.38 ²⁾	29.23 ± 16.43 ²⁾	55.74 ± 26.76 ²⁾

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.4 对 MMP-2, MMP-9 蛋白含量的影响 与对照组相比甘草查尔酮 A (5 ~ 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 B16F10 细胞,可浓度依赖性减少 MMP-2 和 MMP-9 蛋白水平 ($P < 0.01$)。见表 2。

3.5 对 MMP-2, MMP-9 mRNA 表达的影响 与对照组相比, LCA (5, 10, 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理组 MMP-2, MMP-9 mRNA 表达显著下降 ($P < 0.05, P < 0.01$), 见表 2, 图 2。

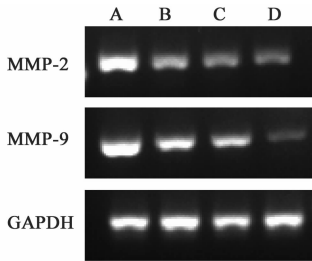


图 2 甘草查尔酮 A 抑制 B16F10 细胞 MMP-2, MMP-9 mRNA 表达
Fig. 2 LCA inhibited the mRNA expression of MMP-2 and MMP-9 in B16F10 cells

4 讨论

MMP-2 和 MMP-9 是 MMPs 家族中 2 种重要的酶类,在多种恶性肿瘤的侵袭转移过程中发挥至关重要的作用^[11]。MMP-2 在所有 MMPs 中的分布是最广的,在肿瘤细胞的恶变中, MMP-2 常升高^[12]。MMP-9 是 MMPs 中相对分子质量最大的酶,它以酶原形式分泌,被激活后形成 IV 型胶原酶,降解、破坏靠近肿瘤表面的细胞外基质和基膜,使瘤细胞可沿着缺失的基膜向周围组织浸润,促进肿瘤侵袭和转移^[13]。在本研究中,笔者观察到甘草查尔酮 A 在体外能够浓度依赖性地抑制小鼠黑色素瘤 B16F10 细胞迁移和侵袭,结果显示甘草查耳酮 A 能够浓度依赖的降低 B16F10 细胞分泌 MMP-2 和 MMP-9 蛋白水平,抑制 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 表达。提示甘草查尔酮 A 能通过下调 MMP-2 和 MMP-9 表达,从而抑制黑色素瘤 B16F10 细胞的侵袭转移。虽然其上下游的受体和其他通路的影响还有待进一步研究,但是本研究结果充分表明,更深入地探讨其抑制肿瘤细胞侵袭转移的机制是十分有价值的。

[参考文献]

[1] Okada A. Roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) in cancer invasion and metastasis [J]. Gan To Kagaku Ryoho, 1999, 26 (14): 2247-2252.
[2] Katayama A, Bandoh N, Kishibe K, et al. Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous

cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10 (2): 634-640.

[3] Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis [J]. Trends Cell Biol, 2001, 11 (11): S37-S43.
[4] Gialeli C, Theocharis A D, Karamanos N K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting [J]. FEBS J, 2011, 278 (1): 16-27.
[5] Lubbe W J, Zuzga D S, Zhou Z, et al. Guanylyl cyclase C prevents colon cancer metastasis by regulating tumor epithelial cell matrix metalloproteinase-9 [J]. Cancer Res, 2009, 69 (8): 3529-3536.
[6] Furusawa J, Funakoshi-Tago M, Mashino T, et al. Glycyrrhiza inflata-derived chalcones, licochalcone A, licochalcone B and licochalcone D, inhibit phosphorylation of NF-kappaB p65 in LPS signaling pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2009, 9 (4): 499-507.
[7] Jiang J, Yuan X, Zhao H, et al. Licochalcone A inhibiting proliferation of bladder cancer T24 cells by inducing reactive oxygen species production [J]. Biomed Mater Eng, 2014, 24 (1): 1019-1025.
[8] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening [J]. J Natl Cancer Inst, 1990, 82 (13): 1107-1112.
[9] Fishman D A, Kearns A, Chilukuri K, et al. Metastatic dissemination of human ovarian epithelial carcinoma is promoted by $\alpha 2\beta 1$ -integrin-mediated interaction with type I collagen [J]. Invasion Metastasis, 1998, 18 (1): 15-26.
[10] Huang Q, Shen H M, Ong C N. Inhibitory effect of emodin on tumor invasion through suppression of activator protein-1 and nuclear factor-kappaB [J]. Biochem Pharmacol, 2004, 68 (2): 361-371.
[11] Roy R, Yang J, Moses M A. Matrix metalloprotemases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer [J]. J Clin Oncol, 2009, 27 (31): 5287-5297.
[12] Thomas P, Khokha R, Shepherd FA, et al. Differential expression of MMPs and their inhibitors in non-small cell lung cancer [J]. J Pathol, 2000, 190 (2): 150-156.
[13] Nutt J E, Durkan G C, Mellon J K, et al. Matrix metalloproteinases (MMPs) in bladder cancer: the induction of MMP9 by epidermal growth factor and its detection in urine [J]. BJU Int, 2003, 91 (1): 99-104.

[责任编辑 聂淑琴]