

基质金属蛋白酶组织抑制剂-3对喉癌细胞 顺铂化疗敏感性提高的机制研究

郜元坤, 张志敏, 秦 静, 余滋中, 李国义[△]

(湖北省十堰市太和医院·湖北医药学院附属医院耳鼻喉科, 湖北 十堰 442000)

摘要:目的 探讨基质金属蛋白酶组织抑制剂-3(TIMP-3)提高喉癌 Hep-2 细胞顺铂化疗敏感性的作用机制。方法 试验分为空白对照组(A组)、顺铂组(B组)和顺铂+TIMP-3组(C组),A组和B组均为10 mL Hep-2 细胞液溶于10%胎牛血清中,分别加入0和5 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂5 mL,C组为10 mL 转染TIMP-3的Hep-2 细胞液加入顺铂(5 $\mu\text{mol/L}$)5 mL,置CO₂培养箱中,于37℃、5% CO₂、20% O₂条件下培养72 h。以噻唑蓝(MTT)比色法检测Hep-2 细胞活力及细胞单克隆形成数目,以流式细胞仪检测Hep-2 细胞凋亡情况,以荧光共聚焦显微镜检测线粒体膜电位(MMP)水平,以实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)法检测TIMP-3 mRNA表达水平,以酶联免疫吸附法检测细胞色素C、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、胱天蛋白酶-9(Caspase-9)蛋白表达水平。结果 与A组比较,B组和C组细胞活力、存活率水平、细胞单克隆形成数目、MMP均显著降低,细胞凋亡率、TIMP-3 mRNA和细胞色素C、Caspase-3、Caspase-9蛋白表达水平均显著升高($P < 0.01$);C组上述指标均优于B组($P < 0.01$);TIMP-3与细胞色素C、Caspase-3、Caspase-9呈显著正相关($P < 0.01$)。结论 TIMP-3能提高喉癌Hep-2 细胞顺铂化疗敏感性,其机制与上调TIMP-3,促进MMP去极化和线粒体细胞色素C释放,进而诱导Caspase-3和Caspase-9过表达引起细胞凋亡有关。

关键词:基质金属蛋白酶组织抑制剂-3;线粒体;细胞凋亡;喉癌;顺铂;化学治疗敏感性;作用机制

中图分类号:R965;R979.1

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)12-0028-04

Mechanism of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-3 in Improving the Chemotherapy Sensitivity of Cisplatin in Laryngeal Carcinoma Cells

GAO Yuankun, ZHANG Zhimin, QIN Jing, YU Zizhong, LI Guoyi

(Department of Otolaryngology, Shiyan Taihe Hospital, Affiliated Hospital of Hubei Medical College, Shiyan, Hubei, China 442000)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of tissue inhibitor of metalloproteinases-3(TIMP-3) in improving chemotherapy sensitivity of cisplatin in laryngeal carcinoma Hep-2 cells. **Methods** The experiment was divided into the blank control group(group A), cisplatin group(group B) and cisplatin+TIMP-3 group(group C). 10 mL Hep-2 cell solution was dissolved in 10% fetal bovine serum in group A and group B, 5 mL 0 and 5 $\mu\text{mol/L}$ cisplatin were added in group A and group B respectively. 10 mL Hep-2 cell solution transfected TIMP-3 was added to 5 mL cisplatin(5 $\mu\text{mol/L}$) in group C. All of them were placed in a CO₂ incubator, cultured at 37℃, 5% CO₂ and 20% O₂ for 72 h. MTT assay was used to detect the activity of Hep-2 cells and the number of monoclonal formation. Flow cytometry was used to detect the apoptosis of Hep-2 cells. Fluorescence confocal microscopy was used to detect the level of mitochondrial membrane potential(MMP) and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction(PCR) was used to detect the expression of TIMP-3 mRNA. The enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the expression levels of cytochrome C, Caspase-3 and Caspase-9 protein. **Results** Compared with group A, the cell viability, survival rate, number of monoclonal formation and MMP in group B and group C were significantly decreased, while the apoptosis rate, TIMP-3 mRNA and the expression levels of cytochrome C, Caspase-3 and Caspase-9 protein in group B and group C were significantly increased($P < 0.01$), the above indexes in group C were better than those in group B($P < 0.01$). TIMP-3 was positively correlated with cytochrome C, Caspase-3 and Caspase-9($P < 0.01$). **Conclusion** TIMP-3 can promote the chemotherapy sensitivity of cisplatin in laryngeal carcinoma Hep-2 cells. Its mechanism is related to the up-regulation of TIMP-3, promotion of MMP depolarization and release of mitochondrial cytochrome, and then inducing overexpression of Caspase-3 and Caspase-9 to induce apoptosis.

Key words: tissue inhibitor of metalloproteinases-3; mitochondria; apoptosis; laryngeal carcinoma; cisplatin; chemotherapy sensitivity; mechanism of action

对于喉癌早期,手术治疗是最有效的方法,但大多数患者初诊时已为晚期,癌细胞已广泛转移,手术效果差。晚期治疗手段通常包括化学治疗(简称化疗)、放射

治疗(简称放疗)及辅助治疗,但由于化疗耐药性的发展,喉癌总生存率无提高。故评估化疗药物的分子抗性对于提高喉癌的疗效极为重要^[1]。基质金属蛋白酶对喉

第一作者:郜元坤,男,硕士研究生,主治医师,研究方向为咽喉科学,(电子信箱)545675773@qq.com。

[△]通信作者:李国义,男,博士研究生,主任医师,研究方向为鼻科学及头颈外科学,(电话)0719-8801459。

癌的转移至关重要,且基质金属蛋白酶高表达与喉癌预后不良有关。基质金属蛋白酶组织抑制剂(TIMP)能明显抑制基质金属蛋白酶的活性^[2]。TIMP-3 不仅能抑制金属蛋白酶的活性,而且不受其他 TIMP 调节成员的影响。TIMP-3 可延缓癌症的进展,如肿瘤生长,血管生成和侵袭等,可在几种癌症(肝癌、肺癌、胰腺癌等)中观察到 TIMP-3 的异常表达^[3-5]。本研究中探讨了 TIMP-3 通过线粒体依赖性细胞凋亡途径对喉癌细胞顺铂化疗敏感性的影响,以便为喉癌的治疗提供理论及临床依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞、仪器与试剂

细胞:人喉癌细胞系 Hep-2 由美国菌种保藏中心(ATCC)提供。

仪器:T100 型实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪(美国 Bio-Rad 公司);NanoDrop2000c 型蛋白核酸检测仪、MK3 型酶标仪(美国 Thermo 公司);FV1000 型荧光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司);SIGMA 500 型高分辨率场发射扫描电镜(德国 Zeiss 公司)。

试剂:顺铂(批号为 AW48794,含量为 99.99%);5,5',6,6'-四氯-1,1',3,3'-四乙基-苯并-咪唑并噻唑碘化物(JC-1);噻唑蓝(MTT),均购自美国 Sigma 公司;DMEM 培养基(北京索莱宝科技有限公司);胰酶(德国 Merck 公司);TIMP-3 mimics(上海伯豪生物技术有限公司);Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司);逆转录试剂盒及实时荧光定量 PCR 试剂盒(日本 Takara 公司),细胞色素酶 C、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、胱天蛋白酶-9(Caspase-9)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(上海伯豪生物技术有限公司);二甲基亚砜(DMSO,北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 方法

Hep-2 细胞株 TIMP-3 mimics 转染:取 10 mL Hep-2 细胞液接种于 6 孔板上,取 TIMP-3 mimics 100 pmol,置 200 μ L DMEM 培养基中,取 4 μ L 脂质体 2000,置 200 μ L DMEM 培养基中,混匀脂质体 2000 和 miRNA 液,室温培育 30 min,无菌磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞,将混合液加入细胞孔内,6 h 后弃混合液,加入 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养,流式细胞仪检测转染情况。

分组与药物剂量设计:试验分为空白对照组(A组)、顺铂组(B组)和顺铂+TIMP-3 组(C组),A 组和 B 组均为 10 mL Hep-2 细胞液溶于 10% 胎牛血清中,分别加入 0 和 5 μ mol/L 顺铂 5 mL,置 CO₂ 培养箱中,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、20% O₂ 条件下培养 72 h;C 组为 10 mL 转染 TIMP-3 的 Hep-2 细胞液加入顺铂(5 μ mol/L)

5 mL,置 CO₂ 培养箱中,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、20% O₂ 条件下培养 72 h;各组每孔设 6 个平行样。

Hep-2 细胞活力及细胞单克隆形成数目:每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL)10 μ L,37 $^{\circ}$ C 恒温箱孵育 4 h,加入 150 μ L 的 DMSO,采用酶标仪于 490 nm 波长处测定吸光度(OD)值,以 OD 值代表细胞活力,并计算细胞存活率[(试验组 OD 值-空白对照组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白对照组 OD 值) $\times$ 100%];在含有 DMEM 的 10% 胎牛血清中的 12 孔板(每孔 1×10^3 个)中培养细胞。培养 5 d 后,用亚甲蓝染色细胞确定 5 个成像区域中的菌落形成数目。

Hep-2 细胞凋亡:Hep-2 细胞培养 72 h 后,通过胰蛋白酶消化,收集细胞。将细胞用膜联蛋白 V-FITC 和 PI 溶液在黑暗中染色 15 min,采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

线粒体凋亡:Hep-2 细胞与 JC-1 工作溶液在暗室中于 37 $^{\circ}$ C 条件下温育 15 min,PBS 洗涤 2 次后,使用荧光共聚焦显微镜测定红/绿荧光强度。JC-1 在活细胞中表现为线粒体潜在的依赖性积累,用红色荧光表示;在凋亡细胞中,染料流出到细胞质中作为单体并发出绿色荧光,其中线粒体膜电位(MMP)被打破,故红/绿荧光强度比可表示线粒体 MMP 的变化情况。

Hep-2 细胞液中 TIMP-3 mRNA 表达水平:取各组细胞液,Trizol 法提取 RNA,鉴定完 RNA 纯度和完整性后,反转录制备 cDNA。PCR 反应体系:正向引物 10 μ L、反向引物 10 μ L、RNA 模版 0.6 μ L、超级酶混合物 0.2 μ L、2 $\times$ μ Byr 一步法 RT-qPCR 缓冲液 5 μ L、去 RNA 水 3.4 μ L。PCR 条件:95 $^{\circ}$ C 变性 10 min,循环 40 次,60 $^{\circ}$ C 退火 15 s。通过 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 方法计算 miR-452 相对表达水平。使用内源性 U6 小核 RNA(U6)上游引物:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',下游引物:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3';TIMP-3 上游引物:5'-AGTCTATACAAGGGCAAGCTCTC-3',下游引物:5'-CCCAATACGACCAAATCCGTT-3'。

Hep-2 细胞液中细胞色素酶 C、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达水平:取各组细胞液,5 000 r/min 离心,收集细胞,加 PBS 制成细胞悬液后,ELISA 法测定细胞色素酶 C、Caspase-3、Caspase-9 表达水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行 t 检验;计数资料以率(%)表示,行 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hep-2 细胞活力和细胞单克隆形成数目

与 A 组比较,B 组和 C 组细胞活力、存活率水平、

细胞单克隆形成数目均显著降低($P < 0.01$);与B组比较,C组细胞活力、存活率水平、细胞单克隆形成数目均显著降低($P < 0.01$)。详见表1和图1。

表1 3组Hep-2细胞活力和单克隆形成数目比较($\bar{X} \pm s, n=6$)

组别	OD值	存活率(%)	单克隆形成数目
A组	0.82 ± 0.05	78.52 ± 8.25	175.32 ± 10.25
B组	0.54 ± 0.02^a	42.01 ± 8.24^a	88.25 ± 9.58^a
C组	0.22 ± 0.05^{ab}	24.36 ± 3.21^{ab}	34.12 ± 8.32^{ab}

注:与A组比较,^a $P < 0.01$;与B组比较,^b $P < 0.01$ 。表2和表3同。

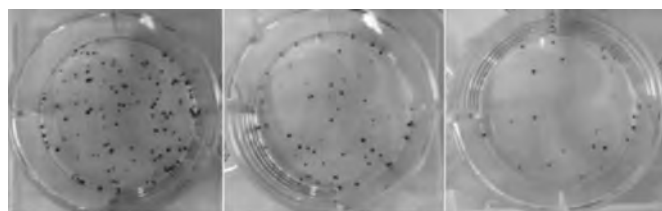
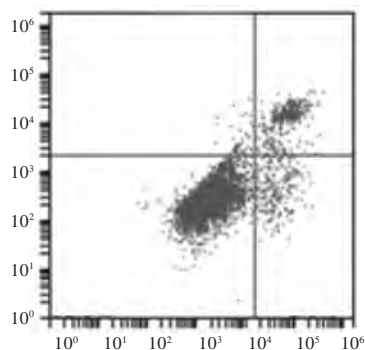
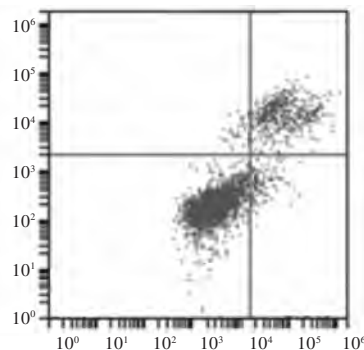


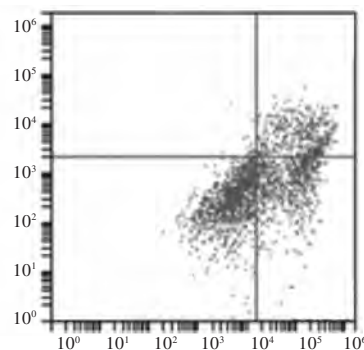
图1 3组Hep-2细胞单克隆形成数目



A组



B组

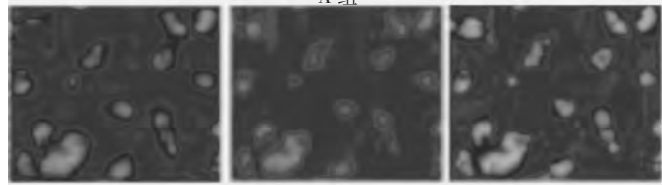


C组

图2 3组Hep-2细胞凋亡情况



A组



B组



C组

图3 3组Hep-2细胞MMP情况

2.2 Hep-2细胞凋亡率

与A组比较,B组和C组细胞凋亡率均显著升高($P < 0.01$);与B组比较,C组细胞凋亡率显著升高($P < 0.01$)。详见表2和图2。

表2 3组Hep-2细胞凋亡率、MMP及TIMP-3 mRNA表达水平比较($\bar{X} \pm s, n=6$)

组别	凋亡率(%)	红/绿荧光比值	TIMP-3 mRNA
A组	4.70 ± 2.54	1.23 ± 0.12	0.91 ± 0.17
B组	14.30 ± 2.87^a	0.74 ± 0.22^a	1.45 ± 0.29^a
C组	16.80 ± 2.12^{ab}	0.42 ± 0.15^{ab}	3.67 ± 0.23^{ab}

2.3 Hep-2细胞MMP

与A组比较,B组和C组细胞MMP均显著降低($P < 0.01$);与B组比较,C组细胞MMP显著降低($P < 0.01$)。详见表2和图3。

2.4 Hep-2细胞TIMP-3 mRNA表达

与A组比较,B组和C组细胞TIMP-3 mRNA表达水平均显著升高($P < 0.01$);与B组比较,C组细

胞TIMP-3 mRNA表达水平显著升高($P < 0.01$)。详见表2。

2.5 细胞色素酶C、Caspase-3、Caspase-9表达

与A组比较,B组和C组细胞色素酶C、Caspase-3、Caspase-9表达水平均显著升高($P < 0.01$);与B组比较,C组细胞色素酶C、Caspase-3、Caspase-9表达水平显著升高($P < 0.01$)。详见表3。

表3 3组细胞色素酶C、Caspase-3、Caspase-9表达水平比较($\bar{X} \pm s, n=6$)

组别	细胞色素酶C	Caspase-3	Caspase-9
A组	78.52 ± 16.32	89.63 ± 19.36	54.32 ± 26.32
B组	252.01 ± 29.32^a	265.32 ± 36.54^a	396.23 ± 49.32^a
C组	496.21 ± 33.21^{ab}	564.32 ± 26.36^{ab}	895.23 ± 46.39^{ab}

2.6 各变量的相关性分析

TIMP-3与细胞色素酶C、Caspase-3、Caspase-9呈显著正相关($P < 0.01$)。详见表4。

表4 各变量的相关性分析

变量1	变量2	R	P
TIMP-3 mRNA	细胞色素酶 C	0.569	<0.01
	Caspase-3	0.644	<0.01
	Caspase-9	0.543	<0.01

3 讨论

虽然喉癌的诊断和治疗水平已逐渐提高,但其死亡率仍然很高,其5年总体死亡率达40%^[6]。晚期化疗耐药和晚期转移是导致喉癌预后不良的原因。本研究结果显示,TIMP-3提高喉癌细胞顺铂化疗敏感性与线粒体膜电位稳定有关;TIMP-3的上调MMP去极化和线粒体细胞色素C释放,提高了顺铂化疗敏感性。

TIMP-3是TIMP基因家族成员^[7],可抑制肿瘤细胞繁殖,促进细胞凋亡,抑制淋巴管生成和血管生成,以及癌症对抗癌药物的干扰反应。TIMP-3低水平表达与不同癌症的进展相关^[8-9],在宫颈癌及软组织瘤中TIMP-3 mRNA表达水平降低,在喉鳞状细胞癌中TIMP-3表达降低与淋巴结转移密切相关^[10]。上述研究结果提示,TIMP-3在肿瘤进展中具有关键调控作用。

金属基质酶的失调导致细胞外基质周转增加,这是许多肿瘤局部侵袭和转移的关键^[11-12]。TIMP能降低MMP,表明其在癌症生物疗法中有独特作用。TIMP-1和TIMP-2可抑制癌细胞侵袭,TIMP-3可抑制癌细胞侵袭并促进细胞凋亡,具有用于癌症基因治疗的优势^[13]。此外,TIMP-3对未转染的细胞具有“旁观者效应”。过度表达的TIMP-3可诱导肺癌细胞凋亡,上调p53,Fas配体,TNFR₁和TNFR₂的表达。研究表明,TIMP-3通过Caspase诱导细胞凋亡,TIMP-3的过度表达诱导细胞色素C的释放并激活Caspase-8和Caspase-9,两者均可导致肿瘤细胞凋亡。TIMP-3还可通过Fas相关死亡域诱导细胞凋亡^[14]。研究结果显示,TIMP-3能在人小细胞肺癌细胞中缺乏Caspase-8活化时诱导细胞凋亡,表明TIMP-3可通过除死亡受体信号传导外的其他途径诱导细胞凋亡^[15]。

综上所述,TIMP-3能提高喉癌Hep-2细胞顺铂化疗敏感性,其机制与上调TIMP-3,促进MMP去极化和线粒体细胞色素C释放,进而诱导Caspase-3和Caspase-9过表达引起细胞凋亡有关。

参考文献:

- [1] GRABARSKA A, ŁUSZCZKI JJ, NOWOSADZKA E, et al. Histone Deacetylase Inhibitor SAHA as Potential Targeted Therapy Agent for Larynx Cancer Cells[J]. J Cancer, 2017, 8(1): 19-28.
- [2] HIRONO J, SANAKI H, KITADA K, et al. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases and matrix metalloproteinases in the ischemic brain of photothrombosis model mice[J]. Neuroreport, 2017, 29(3): 1-3.

- [3] DEKKER S, BANK J, SOONAWALA D, et al. Fp749 urinary tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (timp-2) and insulin-like growth factor-binding protein 7 (igfbp7) in acute and chronic kidney dysfunction[J]. Nephrology Dialysis Transplantation, 2018, 33(suppl_1): i298.
- [4] JIN R, XU S, LIN X, et al. MiR-136 controls neurocytes apoptosis by regulating tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in spinal cord ischemic injury[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 94(3): 47-54.
- [5] TIMMERMAN AJ, LANGE CA, DE BOIS JA, et al. Tumor volume as a prognostic factor for local control and overall survival in advanced larynx cancer[J]. Laryngoscope, 2016, 126(2): E60-E67.
- [6] 何亚, 刘晓颖, 邓庆华, 等. 丙泊酚与水合氯醛对亚低温大鼠海马神经元凋亡的影响比较[J]. 中国药业, 2017, 26(6): 12-15.
- [7] DUELLMAN T, DOLL A, CHEN X, et al. dCas9-mediated transcriptional activation of tissue inhibitor of metalloproteinases[J]. Metalloproteinases Med, 2017, 4(3): 63-73.
- [8] XUE W, ZHANG Z, ZENG S, et al. Expression and Clinical Significance of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 (TIMP-1) and a Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Type 1 Motif 1 (ADAMTS1) in Post-Kidney-Transplant Bladder Tumors[J]. Annals of Transplantation, 2017, 22(3): 622-623.
- [9] KIM HS, VARGAS A, EOM YS, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 enhances rod survival in the rd1 mouse retina[J]. PLoS One, 2018, 13(5): 322-323.
- [10] LAO G, REN M, WANG X, et al. Human tissue inhibitor of metalloproteinases-1 improved wound healing in diabetes through its anti-apoptotic effect[J]. Experimental Dermatology, 2017, 8(3): 45-47.
- [11] KORMI I, NIEMINEN MT, HAVULINNA AS, et al. Matrix metalloproteinase-8 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 predict incident cardiovascular disease events and all-cause mortality in a population-based cohort[J]. European Journal of Preventive Cardiology, 2017, 24(11): 585-586.
- [12] 黄好武, 黄欢文, 姜一平, 等. 芹菜素对肺癌细胞的抗增殖作用和抗肿瘤药物的增敏作用[J]. 中国药业, 2017, 26(12): 20-22.
- [13] MA XH. Department of Clinical Laboratory, Heze Multiple Hospital Changes of Intramyocardial Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase Protein Expression[J]. China & Foreign Medical Treatment, 2017, 9(2): 23-25.
- [14] LI X, FU X, GAO Y, et al. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and B-cell lymphoma-2 in the synovial membrane in patients with knee osteoarthritis[J]. Experimental & Therapeutic Medicine, 2018, 15(1): 885-889.
- [15] LAO G, REN M, WANG X, et al. Human Tissue Inhibitor of Metalloproteinases Improved Wound Healing in Diabetes through Its Anti-apoptotic Effect[J]. Experimental Dermatology, 2017, 26(Suppl_2): 89-91.

(收稿日期: 2018-09-26)