

毛玉宁,柳森森,巩淼淼,等. MMP2 在胃癌侵袭和转移中的作用 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 23-30.

Mao YN, Liu SS, Gong MM, et al. Role of matrix metalloproteinase-2 in the invasion and metastasis of gastric cancer [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 23-30.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.003

MMP2 在胃癌侵袭和转移中的作用

毛玉宁^{1,2}, 柳森森², 巩淼淼^{1,2}, 赵菊梅^{1*}, 师长宏^{2*}

(1. 延安大学医学院, 陕西 延安 716000; 2. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710032)

【摘要】 目的 探索 MMP2 在胃癌侵袭和转移中的作用, 以为胃癌转移提供新的预测指标及治疗靶点。**方法** 选择胃癌细胞系 MKN-1 转染慢病毒, 使 MMP2 低表达, 获得细胞系 sh-MMP2, 并通过 RT-PCR 及 Western Blot 检测转染后 MKN-1 细胞中 MMP2 表达情况。进一步通过细胞划痕实验、Transwell、CCK8 实验分别检测 MMP2 低表达后细胞迁移能力、侵袭能力、增殖能力变化。利用裸鼠建立 sh-MMP2 细胞系异种移植模型及转移模型, 观察 MMP2 低表达后体内肿瘤生长变化及体内转移能力变化。通过 RT-PCR 及 Western Blot 检测 MMP2 对 EMT 及细胞凋亡的影响。**结果** MMP2 低表达后胃癌细胞迁移能力 ($P < 0.05$)、侵袭能力 ($P < 0.01$)、增殖能力 ($P < 0.05$) 均下降。体内实验结果显示 MMP2 低表达可显著减缓肿瘤生长及体内转移 ($P < 0.01$)。进一步实验表明降低 MMP2 的表达, 可抑制细胞 EMT 过程并增加细胞凋亡。**结论** MMP2 低表达可通过抑制 EMT 过程及增加细胞凋亡, 减弱胃癌细胞迁移能力、侵袭能力和增殖能力, 抑制胃癌的发展。

【关键词】 胃癌; MMP2; 转移; 侵袭

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 01-0023-08

Role of matrix metalloproteinase-2 in the invasion and metastasis of gastric cancer

MAO Yuning^{1,2}, LIU Sensen², GONG Miaomiao^{1,2}, ZHAO Jumei^{1*}, SHI Changhong^{2*}

(1. Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000, China. 2. Laboratory Animal Center, the Air Force Medical University, Xi'an 710032)

Corresponding author: SHI Changhong. E-mail: changhong@fmmu.edu.cn; ZHAO Jumei. E-mail: jmz2003.stu@163.com

【Abstract】 Objective To explore the role of matrix metalloproteinase-2 (MMP2) in gastric cancer invasion and metastasis, so as to provide a new predictive index and therapeutic target for gastric cancer metastasis. **Methods** Gastric cancer cell line MKN-1 was transfected with lentivirus to make a cell line with low expression of MMP2, denoted sh-MMP2. Real-time PCR and Western Blot were used to detect MMP2 expression in MKN-1 cells after transfection. Cell scratch, Transwell and CCK8 assays were used to detect changes in migration, invasion and proliferation, respectively, of MKN-1 cells. Xenotransplantation and metastasis models of MKN-1 NC and MKN-1 sh-MMP2 cell lines were established in nude mice, and changes in tumor growth and metastasis were observed *in vivo*. The effects of MMP2 on apoptosis and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) were detected by Real-time PCR and Western Blot. **Results** The migration ($P < 0.05$), invasion ($P < 0.01$) and proliferation ($P < 0.05$) of gastric cancer MKN-1 cells were decreased with the reduction of MMP2 expression. *In vivo* result showed that low expression of MMP2 significantly slowed down tumor growth and metastasis ($P < 0.01$). Further experiments demonstrated that decreasing MMP2 expression in gastric cancer cells

【基金项目】 国家自然科学基金(31772546)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(31772546).

【作者简介】 毛玉宁(1998—), 女, 硕士生, 研究方向: 肿瘤分子病理与药物研究。Email: yuningmao98@163.com

【通信作者】 师长宏(1973—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 人类疾病动物模型。Email: changhong@fmmu.edu.cn;

赵菊梅, 女, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 肿瘤分子病理与药物研究。Email: jmz2003.stu@163.com。

* 共同通信作者

increased apoptosis and inhibited the EMT process. **Conclusions** Low expression of MMP2 can retard the development of gastric cancer by increasing cell apoptosis and inhibiting the EMT process, as well as reducing the migration, invasion and proliferation of gastric cancer cells.

【Keywords】 gastric cancer; MMP2; metastasis; invasion

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

胃癌是全球第五大恶性肿瘤,其发病率为 5.7%,死亡率为 8.2%,为全球癌症相关死亡第三位^[1]。我国胃癌的发生率为 10.26%,仅次于肺癌位于第二位,死亡率为 12.45%,位于癌症相关死亡第三位^[1]。目前临床胃癌的治疗方式主要为手术治疗并辅以放疗及化疗,胃癌早起症状不明显但早期胃癌患者的 5 年生存率高达 95%^[2],大部分患者发现时已经是晚期而晚期患者的五年生存率却低于 30%^[3]。生存率低的主要原因为术后复发及远处转移^[4],因此筛选出胃癌转移相关基因可以通过提高诊断准确性及针对性治疗从而提高患者生存率。目前已筛选出一些分子,如 RelA、环氧合酶-2、NF- κ B 信号通路的分子等,这些分子均在胃腺癌组织中表达增加,并参与肿瘤的生长、侵袭和转移^[5-9]。目前基质金属蛋白酶被报道在多种癌症中与肿瘤的复发转移相关,但其要作为转移预测指标及治疗靶点还需要探究及明确其作用机制。

MMPs(matrix metalloproteinase,MMP)又称基质金属蛋白酶,是锌依赖性内切蛋白酶家族,现已报道的 MMPs 有 20 多种^[10],在炎症调节、器官发育、癌症发展中均发挥作用^[11-13]。

因 MMP2 可水解胶原蛋白导致细胞外基质降解,故与肿瘤的转移密切相关^[14-15]。已有文献报道,MMP2 参与甲状腺癌、肺癌、肝癌、口腔癌的发生发展,并与转移密切相关^[16-19]。然而 MMP2 在胃癌中的作用尚不清楚。本研究旨在研究 MMP2 在胃癌侵袭和转移中的作用,探索其调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

18 只 SPF 级雄性 BALB/c 裸鼠,6 ~ 7 周龄,体重 22 ~ 25 g,购自常州卡文斯实验动物有限公司【SCXK(苏)2016-0010】,饲养在空军军医大学实验动物中心 SPF 级屏障设施内【SYXK(陕)2018-001】。环境温度 23 ~ 25℃,相对湿度 40% ~ 60%,12 h 昼夜交替,饲料经辐照处理,饮用水经高温高

压灭菌处理,动物自由摄食和饮水。动物实验通过了空军军医大学实验动物福利及伦理委员会批准(审批号:20180512)。细胞异种移植模型分为 MKN-1 sh-MMP2 组和 MKN-1 NC 组,每组 5 只裸鼠。体内转移实验分为 MKN-1 sh-MMP2 组和 MKN-1 NC 组,每组 4 只裸鼠。

1.1.2 细胞

人胃癌细胞 SGC-7901、MKN45、MKN-1、BGC-823 及人正常胃黏膜细胞 GES-1 购买于国家实验细胞资源共享平台。C61262 为本实验室培养的人胃癌原代细胞。细胞培养条件为 RPMI-1640 培养基(10%胎牛血清 + 1%青链霉素),37℃、5% CO₂ 孵箱中培养。

1.1.3 主要试剂与仪器

RPMI-1640 培养基和 0.05%胰酶购自美国 HyClone 公司;胎牛血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司;荧光定量 PCR 及 RNA 提取试剂盒等分子生物相关试剂均购自大连宝生物工程有限公司。基质胶购自美国 Becton Dickinson 公司,transwell 小室购自美国 Corning Incorporated 公司,酶标仪(Biotek Take,美国),荧光定量 PCR 仪(StepOne Plus,Thermo Fisher,美国)等。

1.2 方法

1.2.1 构建 MMP2 低表达胃癌细胞株

检测胃正常细胞系 GES-1 及五株胃癌细胞 MKN-1、MKN-45、BGC-823、SGC-7901、C61262 本底 MMP2 表达,并选择 MMP2 高表达胃癌细胞株构建 sh-MMP2 细胞株。之后设计 3 个小干扰 RNA 并转染所选 MMP2 高表达胃癌细胞株,通过 qRT-PCR 和 Western Blot 实验检测其敲低效果,选取敲低效果最佳小干扰 RNA 序列包装合成慢病毒,之后将慢病毒转染所选细胞,嘌呤霉素(5 μ g/mL)持续筛选,待细胞稳定后,观察荧光信号并通过 qRT-PCR 和 Western Blot 检测转染效率,确认稳转株构建成功并记作 sh-MMP2。

1.2.2 实时 RT-PCR 分析

按照商品化 RNA 提取试剂盒(总 RNA 提取试剂盒,TIANGEN,DP419)说明书提取总 RNA。用微

量酶标仪测定 RNA 浓度,根据测定结果,将其浓度调整至 500 ng/ μL 。根据 TaKaRa 试剂盒说明书 (PrimeScriptRT Master Mix, TaKaRa, RR036A) 将 RNA 逆转录为 cDNA,反转录条件设置为 37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。荧光定量 PCR 反应按照 TaKaRa 试剂盒 (SYBR Premix Ex Taq II, TaKaRa, RR820A) 进行荧光定量 PCR 反应。PCR 反应体系 (20 μL): SYBR Premix Ex Taq II 10 μL , 上下游引物各 0.5 μL , ROX Reference Dye (50 $\times$) 0.4 μL , cDNA 模板 1 μL , ddH₂O 7.6 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, PCR 反应 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s (荧光测量) 40 个循环。PCR 反应结束后直接进行熔解曲线分析 (95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s)。测定待测样本中各基因的 Ct 值, 每组样本检测 3 次, 每次检测均做 3 个复孔, 最终 Ct 值以平均数表示。扩增的基因包括 MMP2、E-Cadherin、Vimentin、Bax、Bcl-2, 内参为 β -actin, 相关信息见表 1。

表 1 引物序列信息

Table 1 Primer sequences of genes	
引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
MMP2	F: 5'-ATGACAGCTGCACCACTGAG-3'
	R: 5'-ATTGTGTGCCAGGAAAGTG-3'
E-Cadherin	F: 5'-CTGGCTGACATGTACGGAGG-3'
	R: 5'-TCTCAAGGGAAGGGAGTGA-3'
Vimentin	F: 5'-AGCACTGAGAACTAGCAGCG-3'
	R: 5'-TGAGGGCTCCTAGCGGTTTA-3'
Bax	F: 5'-GCCCTTTTGCTTCAGGGTTTC-3'
	R: 5'-GGAAAAAGACCTCTCGGGG-3'
Bcl-2	F: 5'-CAGGATAACGGAGGCTGGGATG-3'
	R: 5'-ACTTGTGGCCAGATAGGCA-3'
β -actin	F: 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3'
	R: 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'

1.2.3 免疫印迹分析

在 RIPA 裂解缓冲液中裂解细胞。使用 BCA 试剂 (中国 Beyotime) 测量蛋白质浓度。通过 SDS-PAGE 分离等量的蛋白质, 并用相应抗体 MMP2 (Abcam, ab92536)、E-Cadherin (Proteintech, 20874-1-AP)、Vimentin (Proteintech, 10366-1-AP)、Bax (Cell Signaling, 5023)、Bcl-2 (Cell Signaling, 15071) 进行免疫印迹。

1.2.4 Transwell 实验

将包被基质胶的小室放入 24 孔板中, 在上室加入 300 μL 预热的无血清培养基, 使基质胶水化, 室温下静置 30 min 后, 吸去剩余培养基。对数期生长的低表达 MMP2 胃癌细胞及阴性对照 (NC) 细胞用 0.25% 的胰酶消化并计数, 用含无血清的 1640 培养

基重悬, 调整细胞密度为 1×10^5 , 取 100 μL 细胞悬液培养在 24 孔板 transwell 小室的上室, 下室加入 500 μL 含 10% 血清的 1640 培养基。37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养箱培养 48 h 后, 取出小室弃掉培养基, 轻轻擦掉上室的细胞, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 0.2% 结晶紫染色 10 min 后, 用 PBS 清洗 3 次, 置于显微镜下拍照观察。

1.2.5 伤口愈合实验

将低表达 MMP2 的胃癌细胞及阴性对照 (NC) 细胞接种于六孔板, 显微镜下观察汇合度达到 90%, 取 200 μL 的枪头制造划痕, 尽量保证每个孔的划痕宽度一致。吸掉细胞培养液, PBS 清洗孔板 3 次, 去掉划痕产生的细胞碎片。加入新鲜无血清培养基 RPMI-1640, 显微镜下拍照, 记为 0 h 细胞划痕状态。将 6 孔板放回培养箱继续培养, 按 0、24、48 h 拍照, 倒置显微镜观察。通过比较图像数据确定细胞迁移情况。

1.2.6 细胞增殖

通过 CCK8 测定法测量细胞增殖。将细胞铺在 96 孔板 (2000 个细胞/孔) 中, 并在培养 0、6、12、18、24、30 h, 加入 100 μL 培养基/CCK8 混合物 (培养基: CCK8, 9:1) 孵育 3 h 后, 测量 450 nm 处吸光度值。

1.2.7 肿瘤细胞异种移植

将 MKN-1 sh-MMP2 细胞及 MKN-1 NC 细胞用 0.25% 的胰酶消化后制备成细胞悬液, 用 PBS 把细胞稀释成 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 接种到 6 ~ 7 周龄的免疫缺陷裸鼠皮下, 每组 5 只用游标卡尺测量皮下肿瘤的长度 (l) 和宽度 (w), 肿瘤体积 (V) 计算公式为: $V = 1/2 \times l \times w^2$ 。连续测定肿瘤体积, 绘制肿瘤生长曲线。

1.2.8 体内转移模型

将 MKN-1 sh-MMP2 细胞及 MKN-1 NC 细胞用 0.25% 的胰酶消化后制备成细胞悬液, 用 PBS 把细胞稀释成 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 打入 6 ~ 7 周龄的免疫缺陷裸鼠尾静脉, 每组 4 只, 通过小动物成像观察体内转移情况, 待出现转移后取小鼠肺组织切片进行 HE 染色。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 8.4.0 软件进行数据统计学分析, 所有实验均重复 3 次, 计量资料以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性, $P < 0.01$ 为差异极具显著性。

2 结果

2.1 构建 MMP2 低表达胃癌细胞株

为了探索 MMP2 与胃癌侵袭和转移的关系,构建 MMP2 低表达稳转细胞株。通过 RT-PCR 及 Western Blot 检测胃正常细胞系 GES-1 及五株胃癌细胞本底 MMP2 表达后发现 MKN-1 及 C61262 细胞 MMP2 本底表达高(图 1A、1B),因 C61262 细胞为本研究室原代培养细胞,细胞状态不稳定,因此,选用 MKN-1 进行下一步实验。之后将设计的 3 个小干扰 RNA 转染 MMP2 高表达胃癌细胞株 MKN-1,通过 qRT-PCR 和 Western Blot 实验检测发现 si-MMP2 628 敲低效果最佳(图 1C、1D)。因此选取 si-MMP2 628 序列包装合成慢病毒,将慢病毒转染 MKN-1 细胞并检测 MMP2 表达情况,确认 MKN-1 sh-MMP2 构建成功(图 1E、1F)。

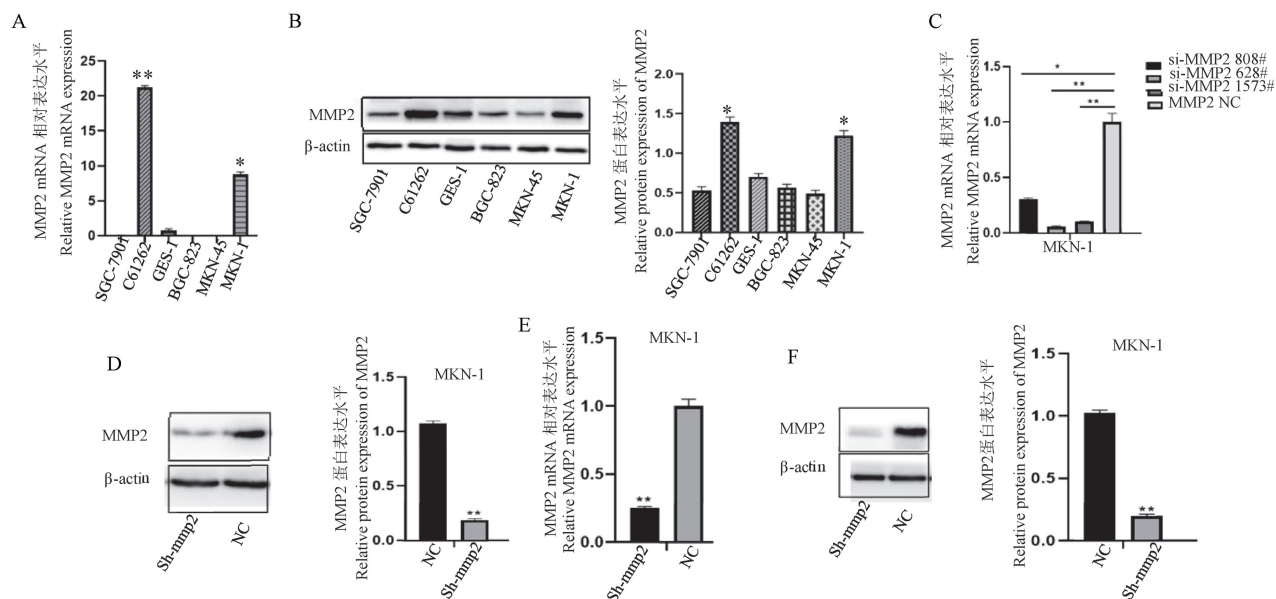
2.2 降低 MMP2 表达可抑制胃癌细胞侵袭、迁移和增殖能力

MMP2 低表达稳转细胞株构建成功后,检测敲

低后细胞侵袭、迁移、增殖能力变化。Transwell 结果显示,MMP2 低表达后 MKN-1 细胞侵袭能力显著降低(图 2A)。进一步检测细胞迁移能力变化,细胞划痕实验显示与对照组相比,MMP2 低表达后细胞迁移能力显著下降(图 2B)。细胞增殖实验显示与对照组相比,MMP2 低表达后 MKN-1 细胞增殖能力降低(图 2C)。以上数据表明,MMP2 与肿瘤细胞侵袭、迁移、增殖能力均显著相关。

2.3 降低 MMP2 表达可延缓肿瘤生长及体内转移

体外实验表明 MMP2 与肿瘤细胞侵袭、迁移、增殖能力显著相关。于是进一步进行体内实验验证 MMP2 在体内的功能,将 MMP2 低表达 MKN-1 细胞及对照组细胞以 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 接种到裸鼠皮下,密切监测肿瘤生长情况。待肿瘤长至 100 mm^3 左右时每 4 d 测量肿瘤最长直径(l),肿瘤最短直径(w),以计算公式 $V = 1/2 \times l \times w^2$ 计算肿瘤体积,20 d 后 MMP2 低表达组肿瘤体积平均为 495 mm^3 ,对照组肿瘤平均体积为 992 mm^3 。综上所述,MMP2 低表达组肿瘤体积明显小于对照组肿瘤,肿瘤重量

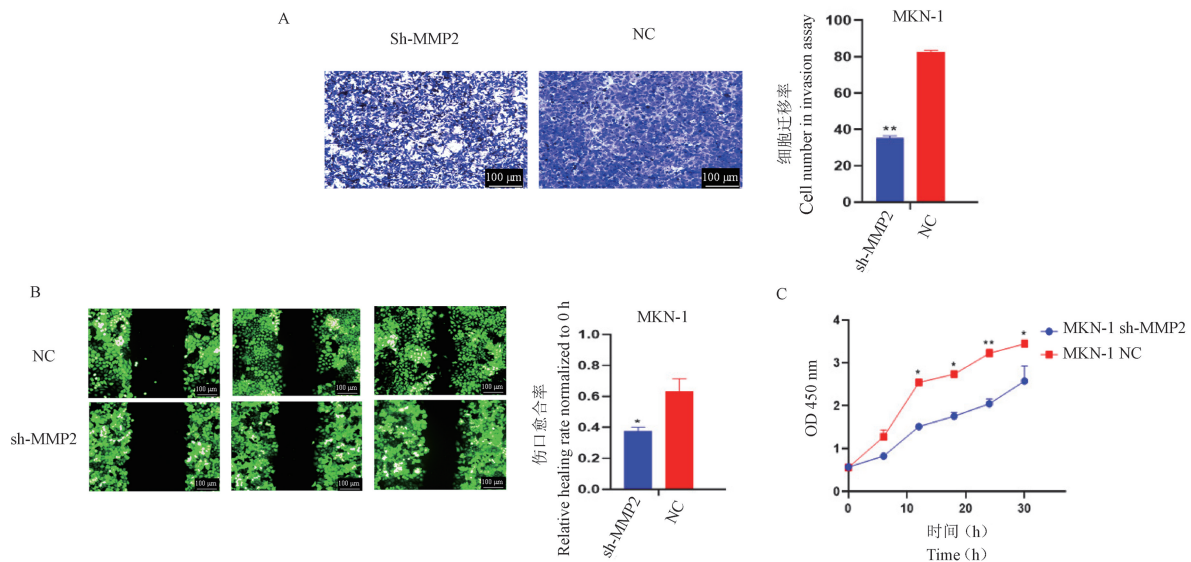


注:A;qRT-PCR 分析胃正常细胞系 GES-1 及五株胃癌细胞 MKN-1、MKN-45、BGC-823、SGC-7901、C61262 本底 MMP2 表达情况;B;Western Blot 分析胃正常细胞系 GES-1 及五株胃癌细胞 MKN-1、MKN-45、BGC-823、SGC-7901、C61262 本底 MMP2 表达情况;C;qRT-PCR 分析 3 个小干扰 RNA 转染 MKN-1 后 MMP2 表达情况;D;Western Blot 分析转染 si-MMP2 628 后 MMP2 蛋白表达水平;E;qRT-PCR 分析转染慢病毒后 MMP2 表达情况;F;Western Blot 分析转染慢病毒后 MMP2 表达情况;与 MKN-1 NC 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。(下同)

图 1 构建 MMP2 低表达稳转细胞株

Note. A. The expression of background MMP2 in normal gastric cell line GES-1 and five gastric cancer cell lines MKN-1, MKN-45, BGC-823, SGC-7901 and C61262 were analyzed by qRT-PCR. B. The expression of background MMP2 in normal gastric cell line GES-1 and five gastric cancer cell lines MKN-1, MKN-45, BGC-823, SGC-7901 and C61262 were analyzed by Western Blot. C. Expression of MMP2 after transfection of MKN-1 with three small interfering RNAs was analyzed by qRT-PCR. D. Western Blot analysis of MMP2 protein expression level after si-MMP2 628 transfection. E. Expression of MMP2 after lentivirus transfection was analyzed by qRT-PCR. F. Western Blot analysis of the expression of MMP2 after lentivirus transfection. Compared with MKN-1 NC, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 1 Construction of stable cell line with low expression of MMP2



注:A;Transwell 分析 MMP2 低表达后细胞侵袭能力变化;B;细胞划痕实验分析 MMP2 低表达后细胞迁移能力变化;C;CCK8 实验分析 MMP2 低表达后细胞增殖能力变化。

图 2 降低 MMP2 表达可抑制胃癌细胞侵袭、迁移和增殖能力

Note. A. Transwell analysis of changes in cell invasion ability after low expression of MMP2. B. Cell scratch assay was used to analyze the changes of cell migration ability after low expression of MMP2. C. CCK8 assay was used to analyze the changes of cell proliferation ability after low expression of MMP2.

Figure 2 Reducing the expression of MMP2 inhibit the invasion, migration and proliferation of gastric cancer cells

明显小于对照组(图 3A),且与对照组相比肿瘤生长缓慢(图 3B),提示 MMP2 表达变化可影响体内肿瘤生长。将 MKN-1 sh-MMP2 细胞及 MKN-1 NC 细胞通过尾静脉打入裸鼠体内,小动物成像结果显示 MMP2 低表达后细胞在体内转移能力下降(图 3C),肺组织切片显示对照组 3 只出现明显肺转移,而 MMP2 低表达组 4 只裸鼠肺部未出现转移(图 3D)。

2.4 降低 MMP2 表达可减少胃癌细胞 EMT 过程

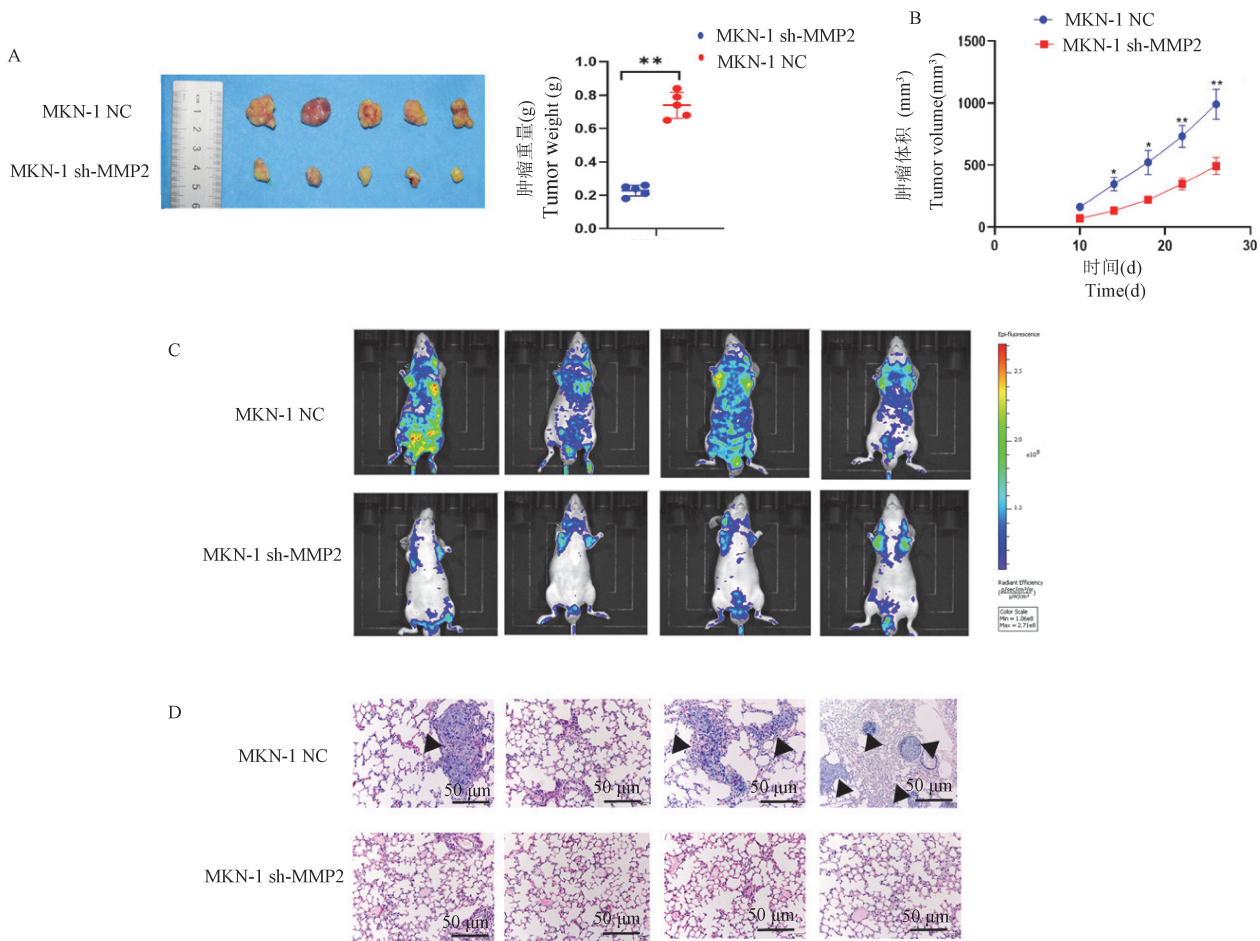
为了探讨 MMP2 影响胃癌细胞侵袭、迁移、增殖的具体作用机制,我们进一步检测了上皮间质转化相关分子 E-cadherin 及 Vimentin 表达情况,结果显示,MMP2 低表达后 MKN-1 细胞上皮标志物 E-cadherin mRNA 表达量升高,间质标志物 Vimentin mRNA 表达量降低(图 4A),提示降低 MMP2 表达,可抑制上皮间质转化。同样在蛋白水平也发现 MMP2 低表达后 MKN-1 细胞上皮标志物 E-cadherin 蛋白表达量升高,间质标志物 Vimentin 蛋白表达量降低(图 4B),说明 MMP2 低表达可抑制上皮间质转化。以上数据表明,MMP2 可通过影响上皮间质转化过程进而影响肿瘤侵袭及转移。

2.5 降低 MMP2 表达可增加细胞凋亡

为了探索 MMP2 影响细胞增殖的相关机制,我们研究了 MMP2 的表达与凋亡相关分子的关系。实验发现 MMP2 低表达后 MKN-1 细胞 Bax mRNA 表达量升高,Bcl-2 mRNA 表达量降低(图 5A),提示 MMP2 低表达可通过增加细胞凋亡从而延缓肿瘤细胞生长。在蛋白水平发现 MMP2 低表达后 MKN-1 细胞 Bax 蛋白表达量升高,Bcl-2 蛋白表达量降低(图 5B),说明 MMP2 低表达可通过增加细胞凋亡进而延缓肿瘤生长。进一步将细胞异种移植模型的肿瘤组织进行 TUNEL 染色,结果显示与对照组相比 MMP2 低表达后 MKN-1 细胞凋亡增加(图 5C)。以上数据表明,MMP2 低表达可通过增加细胞凋亡抑制肿瘤生长。

3 讨论

基质金属蛋白酶通过影响细胞外基质从而在肿瘤生长和转移过程中发挥重要作用。虽然有文章报道 MMP2 参与胃癌的发生与进展,但 MMP2 在胃癌中的具体作用仍然不清楚^[21]。本研究揭示了 MMP2 对于胃癌细胞侵袭、迁移、增殖的影响。首先通过慢病毒转染的方式获得了低表达 MMP2 的胃

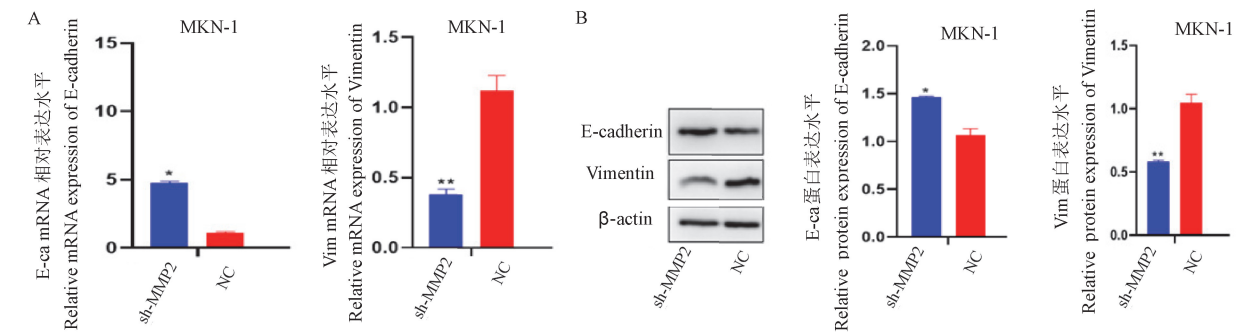


注:A:MMP2 低表达后体内肿瘤生长情况;B:MMP2 低表达后体内肿瘤生长曲线;C:MMP2 低表达后体内转移情况;D:MMP2 低表达后小鼠肺部组织 HE 结果。

图 3 降低 MMP2 表达可显著延缓体内肿瘤生长及体内转移

Note. A. Changes in tumor growth *in vivo* after low expression of MMP2. B. Tumor growth curve *in vivo* after low expression of MMP2. C. *In vivo* metastasis after low expression of MMP2. D. HE results in lung tissues of mice after low expression of MMP2.

Figure 3 Decreased MMP2 expression can significantly delay tumor growth and metastasis *in vivo*

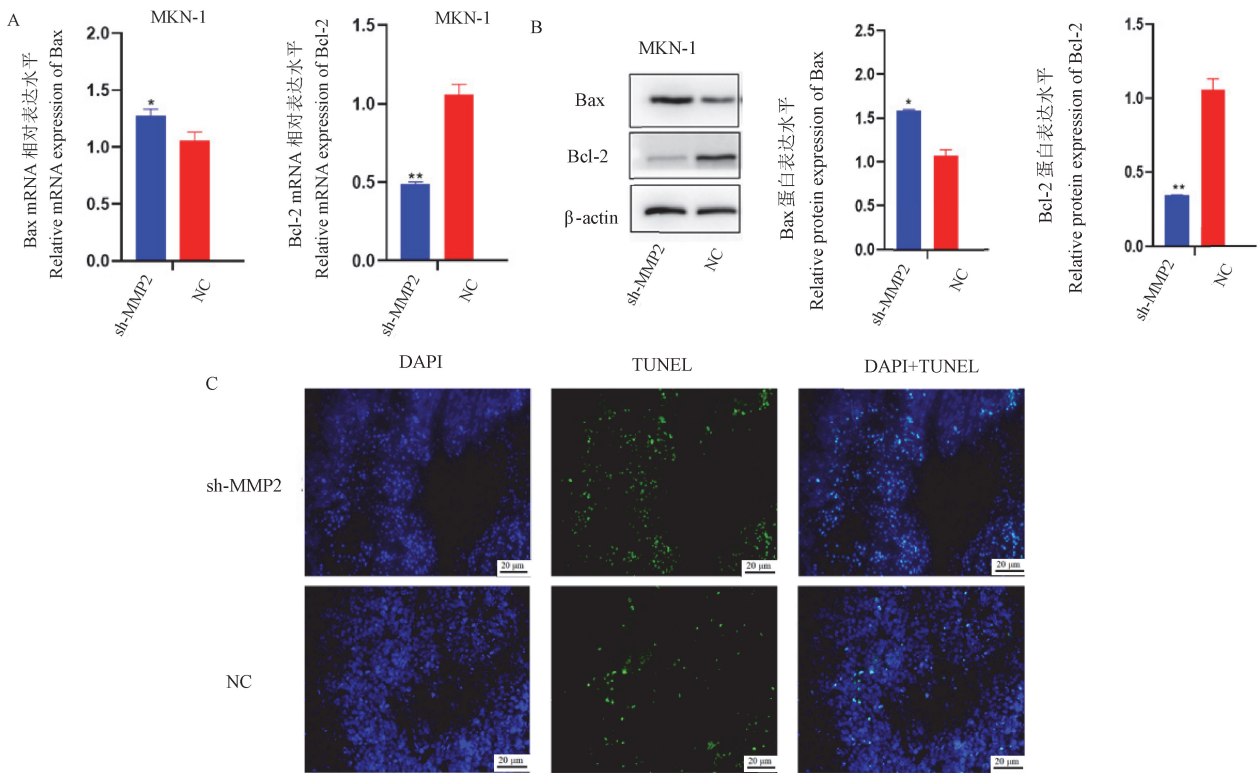


注:A:qRT-PCR 分析 MMP2 低表达后 E 钙黏蛋白及波形蛋白表达情况;B:Western Blot 分析 MMP2 低表达后 E 钙黏蛋白及波形蛋白表达情况。

图 4 降低 MMP2 表达可抑制胃癌细胞 EMT 过程

Note. A. Expression of E cadherin and vimentin after low expression of MMP2 was analyzed by qRT-PCR. B. The expression of E cadherin and vimentin after the low expression of MMP2 was analyzed by Western Blot.

Figure 4 Reducing the expression of MMP2 can inhibit the EMT process of gastric cancer cells



注:A;qRT-PCR 分析 MMP2 低表达后 Bax 及 Bcl-2 表达情况;B;Western Blot 分析 MMP2 低表达后 E 钙黏蛋白及波形蛋白表达情况;C: CDX 组织 TUNEL 染色结果。

图 5 降低 MMP2 表达可增加细胞凋亡

Note. A. The expression of Bcl-2 and Bax after low expression of MMP2 was analyzed by qRT-PCR. B. The expression of E cadherin and vimentin after the low expression of MMP2 was analyzed by Western Blot. C. TUNEL staining results of CDX tissue.

Figure 5 Decrease of MMP2 expression increased apoptosis

癌细胞株 MKN-1,相关实验显示 MMP2 低表达后胃癌细胞的侵袭、迁移、增殖能力均下降,提示 MMP2 可能参与了胃癌发展。这与肺癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌的相关研究报道结果相一致^[22-26]。上皮间质转化过程的特征是上皮表型的丧失和间充质表型的获得^[27]。大量文献表明 MMP2 是调节细胞外基质重要的细胞外蛋白水解酶,并且可通过 PI3K/Akt-NF- κ B 通路影响上皮间质转化从而促进喉部肿瘤生长和迁移^[20]。已有文献报道 MMP2 可通过促进上皮间质转化过程加快三阴乳腺癌的发展^[28]。为了探究 MMP2 调控胃癌转移的机制,进一步探究了 MMP2 与上皮间质转化标志物之间的关系。上皮标记物(E 钙黏蛋白)和间充质标志物(波形蛋白)常用来评估上皮间质转化过程,在低表达 MMP2 的胃癌细胞中发现上皮标志物表达上升,间质标志物表达下降,这表明 MMP2 通过影响上皮间质转化从而影响胃癌发展。

细胞异种移植模型及 CCK8 实验表明,MMP2 低表达后细胞增殖能力显著降低。于是进一步研

究 MMP2 低表达引起细胞增殖能力降低的具体作用机制。细胞凋亡是影响细胞增殖的重要因素之一,其中 Bcl-2 家族是细胞凋亡研究中最受关注的家族之一,其分子成员 Bcl-2 和 Bax 最具代表性,Bax 为细胞凋亡促进因子,Bcl-2 为细胞凋亡的抑制因子^[29]。检测胃癌细胞 MMP2 低表达后 Bax 及 Bcl-2 的变化用于评估细胞凋亡情况,结果显示降低 MMP2 的表达后,Bax 在 mRNA 水平及蛋白水平均高于对照组,而 Bcl-2 在 mRNA 水平及蛋白水平均低于对照组,提示 MMP2 低表达可增加细胞凋亡从而抑制细胞增殖。进一步将细胞异种移植模型组织进行 TUNEL 染色,结果证实 MMP2 低表达可通过增加细胞凋亡抑制肿瘤生长。

总之,本研究证实,MMP2 低表达使上皮标志物 E-cadherin 表达上升,间质标志物 Vimentin 表达下降,提示 MMP2 低表达可通过抑制上皮间质转化过程降低胃癌细胞的侵袭、迁移能力。并且 MMP2 低表达使细胞凋亡促进因子 Bax 表达量增加,抑制凋亡因子 Bcl-2 表达降低,TUNEL 染色同样提示用

MKN-1 sh-MMP2 细胞建立细胞异种移植模型后肿瘤组织细胞凋亡增加,提示 MMP2 低表达可通多增加细胞凋亡从而抑制细胞增殖以及延缓体内肿瘤生长。综上所述,MMP2 低表达可通过抑制上皮间质转化过程降低肿瘤细胞侵袭和迁移能力,通过增加细胞凋亡抑制肿瘤细胞增殖。以上数据提示 MMP2 在胃癌的发生及转移中至关重要,并且可能是胃癌转移标志物及潜在治疗靶点。

参 考 文 献 (References)

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Schernberg A, Rivin Del Campo E, Rousseau B, et al. Adjuvant chemoradiation for gastric carcinoma; State of the art and perspectives [J]. Clin Transl Radiat Oncol, 2018, 10: 13-22.
- [3] Kim YJ, Hwang KC, Kim SW, et al. Potential miRNA-target interactions for the screening of gastric carcinoma development in gastric adenoma/dysplasia [J]. Int J Med Sci, 2018, 15(6): 610-616.
- [4] Lee BL, Lee HS, Jung J, et al. Nuclear factor- κ B activation correlates with better prognosis and Akt activation in human gastric cancer [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11: 2518-2525.
- [5] Yamanaka N, Sasaki N, Tasaki A, et al. Nuclear factor- κ B p65 is a prognostic indicator in gastric carcinoma [J]. Anticancer Res, 2004, 24(2): 1071-1075.
- [6] Chen Z, Liu M, Liu X, et al. COX-2 regulates E-cadherin expression through the NF- κ B/Snail signaling pathway in gastric cancer [J]. Int J Mol Med, 2013, 32(1): 93-100.
- [7] Smale ST. Hierarchies of NF- κ B target-gene regulation [J]. Nat Immunol, 2011, 12(8): 689-694.
- [8] Zhang HD, Jiang LH, Sun DW, et al. The role of mir-130a in cancer [J]. Breast Cancer, 2017, 24(4): 521-527.
- [9] Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer [J]. Mol Cancer, 2013, 12(1): 86.
- [10] Chakraborti T, Das S, Mandal M, et al. Role of Ca^{2+} -dependent metalloprotease-2 in stimulating Ca^{2+} ATPase activity under peroxynitrite treatment in bovine pulmonary artery smooth muscle membrane [J]. IUBMB Life, 2010, 53(3): 167-173.
- [11] Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity [J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(8): 617-629.
- [12] Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(3): 221-233.
- [13] Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(3): 161-174.
- [14] Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteinases [J]. Amino Acids, 2011, 41(2): 271-290.
- [15] Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, et al. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen [J]. Nature, 1980, 284(5751): 67-68.
- [16] Murugan AK, Al-Amr A, Al-Ansari MM, et al. Single nucleotide polymorphisms in matrix metalloproteinase 2 (MMP2) enhance BRAFV600E mutation-mediated oncogenicity and invasiveness of papillary thyroid cancer cells [J]. Endocr Relat Cancer, 2021, 28(4): 273-289.
- [17] Han LP, Sheng BW, Zeng QD, et al. Correlation between MMP2 expression in lung cancer tissues and clinical parameters: a retrospective clinical analysis [J]. BMC Pulm Med, 2020, 20(1): 283.
- [18] Liu DR, Kang HX, Gao MT, et al. Exosome-transmitted circ_ MMP2 promotes hepatocellular carcinoma metastasis by upregulating MMP2 [J]. Mol Oncol, 2020, 14(6): 1365-1380.
- [19] Tsai CW, Hsu HM, Wang YC, et al. Contribution of MMP2 promoter genotypes to oral cancer susceptibility, recurrence and metastasis in Taiwan [J]. Anticancer Res, 2018, 38(12): 6821-6826.
- [20] Zhu Y, Yan L, Zhu WJ, et al. MMP2/3 promote the growth and migration of laryngeal squamous cell carcinoma via PI3K/Akt-NF- κ B-mediated epithelial-mesenchymal transformation [EB/OL]. (2018-11-4) [2019-01-18], <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jcp.28242>.
- [21] Wang XF, Chang XY, He CY, et al. ATP5B promotes the metastasis and growth of gastric cancer by activating the FAK/AKT/MMP2 pathway [J]. FASEB J, 2021, 35(4): e20649.
- [22] Zeng FY, Yu N, Han YY, et al. The long non-coding RNA MIAT/mir-139-5p/MMP2 axis regulates cell migration and invasion in non-small-cell lung cancer [J]. J Biosci, 2020, 45: 51.
- [23] Wu DM, Deng SH, Liu T, et al. TGF- β -mediated exosomal lnc-MMP2-2 regulates migration and invasion of lung cancer cells to the vasculature by promoting MMP2 expression [J]. Cancer Med, 2018, 7(10): 5118-5129.
- [24] Wang XQ, Yang B, She YP, et al. The lncRNA TP73-AS1 promotes ovarian cancer cell proliferation and metastasis via modulation of MMP2 and MMP9 [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(9): 7790-7799.
- [25] Liu G, Ren F, Song YS, et al. Upregulation of SPOCK2 inhibits the invasion and migration of prostate cancer cells by regulating the MT1-MMP/MMP2 pathway [J]. Peer J, 2019, 7: e7163.
- [26] Zhang XB, Shi G, Gao F, et al. TSPAN1 upregulates MMP2 to promote pancreatic cancer cell migration and invasion via PLC γ [J]. Oncol Rep, 2019, 41(4): 2117-2125.
- [27] Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, et al. EMT in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2018, 18(2): 128-134.
- [28] Qin H, Liu XQ, Li FJ, et al. PAD1 promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis in triple-negative breast cancer cells by regulating MEK1-ERK1/2-MMP2 signaling [J]. Cancer Lett, 2017, 409: 30-41.
- [29] DA Silva Machado F, Munari FM, Scariot FJ, et al. Piperlongumine induces apoptosis in colorectal cancer HCT 116 cells independent of Bax, p21 and p53 status [J]. Anticancer Res, 2018, 38(11): 6231-6236.

[收稿日期] 2021-06-28