

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.28.009

新城疫病毒(NDV)D90 抑制口腔鳞癌细胞系迁移和侵袭的研究*

张春晓¹ 袁 杰^{1△} 叶琰伟¹ 李天侠² 宋 纯³

(1 哈尔滨医科大学附属口腔医学院口腔预防保健科 黑龙江 哈尔滨 150001;

2 哈尔滨医科大学附属口腔医学院口腔修复科 黑龙江 哈尔滨 150001;

3 哈尔滨医科大学附属第一临床医学院卫生部细胞移植重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:证明 NDV D90 是否具有抑制口腔鳞癌细胞系迁移和侵袭的能力。**方法:**免疫荧光染色法检测 D90 对细胞微管和微丝形态的改变;Transwell 法检测 D90 对 HN-6 细胞迁移和侵袭率的抑制作用;蛋白印迹法检测 D90 对于 SP1、RECK、MMP-2 和 MMP-9 表达的影响;明胶酶谱法用于检测 MMP-2 和 MMP-9 活性的改变。**结果:**实验结果表明,D90 通过改变细胞的微管和微丝形态来抑制细胞的能动性;D90 具有抑制 HN-6 细胞的迁移和侵袭的功能。同时,D90 通过下调 SP1 和上调 RECK 的表达来抑制 MMP-2 和 MMP-9 的表达和活性。**结论:**NDV D90 能够有效地抑制口腔鳞癌细胞系 HN-6 的迁移和侵袭,为一种新的抗肿瘤制剂提供了临床试验基础。

关键词:新城疫病毒 D90;口腔鳞状细胞癌细胞;能动性;迁移和侵袭

中图分类号:R739.86 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)28-5436-04

Study on Newcastle Disease Virus(NDV) D90 Inhibited the Migration and Invasion of Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Lines*

ZHANG Chun-xiao¹, YUAN Jie^{1△}, YE Long-wei¹, LI Tian-xia², SONG Chun³

(1 Department of Oral Health Sciences, Affiliated Stomatological Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

2 Department of Prosthodontics, Affiliated Stomatological Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

3 The Key Laboratory of Cell Transplantation of the Ministry of Health and Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To detect that whether NDV D90 has the ability to inhibit the migration and invasion of oralsquamous cell carcinoma cell line. **Methods:** Immunocytochemistry was used to detect the changes of microtubules and microfilaments induced by D90; the effect of D90 migration and invasion rate was assayed by Transwell assay; the change of SP1, RECK, MMP-2 and -9 expression induced by D90 was detected by western blot and the change of MMP-2 and -9 activity was detected by gelatin zymography. **Results:** The results demonstrated that D90 changed the morphology of microtubules and microfilaments to inhibit the cell motility; D90 possessed the ability of inhibiting the migration and invasion rate of HN-6 cells. Meanwhile, D90 significantly decreased the expression of sp1 and increased the expression of RECK to suppress the expression and activity of MMP-2 and MMP-9. **Conclusions:** NDV D90 possessed the ability to inhibit obviously the migration and invasion of HN-6 cell. The finding provided a basis for clinical trials of NDV D90 to be a new antitumor agents.

Key words: NDV D90; OSCC cells; Motility; Migration and invasion

Chinese Library Classification(CLC): R739.86 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)28-5436-04

前言

目前,口腔癌在内的头颈部恶性肿瘤的发病率增长十分迅速,在世界多发性肿瘤中占据了第六位,90%以上的口腔恶性肿瘤为鳞状细胞癌^[1]。口腔恶性肿瘤常规的治疗方法包括外科

手术治疗,放射疗法和化学疗法,或者这些方法的联合使用。但是这些治疗方法可能会损害患者的外貌,存活率并没有明显地改变^[2]。导致口腔癌低存活率的主要原因是淋巴结的转移^[3],因此,抑制口腔癌转移是十分重要的。细胞外基质的降解对肿瘤细胞的侵袭和转移至关重要。MMPs 在降解细胞外基质的过程

* 基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(D200972)

作者简介:张春晓(1985-),女,硕士研究生,主要研究方向:NDV D90 对口腔鳞癌的抑制作用,

电话:13895759674, E-mail: zhangchunxiao910@163.com

△ 通讯作者:袁杰, E-mail: yj3982@sina.com

(收稿日期:2014-03-11 接受日期:2014-04-10)

中起到了重要的作用,其中 MMP-2 和 MMP-9 是降解Ⅳ型胶原最主要的酶。RECK(reversion-inducing cysteine rich protein with Kazal motifs)一种基质金属蛋白酶类抑制剂,能够负向调节 MMP-2 和 MMP-9^[4],并且抑制肿瘤的迁移,侵袭和血管生成^[5]。转录因子 SP1 可以通过 RECK 的 SP1 结合位点与 RECK 结合来下调 RECK 的表达^[6]。

多篇文献报道,新城疫病毒(NDV)对于乳腺癌、肺癌等多种肿瘤有一定的辅助治疗作用,成为一种有前景的抗肿瘤制剂^[7-10]。NDV 属于副粘病毒科中禽副粘病毒属,是一种不分节段的单股负链 RNA 病毒^[11,12]。作为一种溶瘤性病毒,NDV 在肿瘤细胞中能够特异地复制,在正常细胞中却没有这种能力,这主要是因为 NDV 在正常细胞中能够引起细胞内的干扰素应答^[3],重要的是,NDV 几乎不产生任何副作用。许多实验已经证明了 NDV 在人体中作为一种溶瘤性病毒,具有安全性,只引起流感样症状和结膜炎^[14]。许多实验对 NDV 的抗肿瘤机制进行了研究,但至今没有统一的结论。相关研究证明了野生型天然毒株和基因工程改造后的毒株能够引起强烈的细胞内免疫应答,起到抗肿瘤细胞的效果^[15-17]。许多研究发现 NDV 在肿瘤细胞中诱导凋亡是通过内源性途径,外源性途径或者两种途径的联合作用^[13,18]。

本实验对由我国自主分离出的毒株 D90^[19]抑制口腔鳞癌细胞(OSCC)迁移和侵袭能力进行了研究,关于此方面的研究甚少。

1 材料与方法

1.1 细胞株和病毒

OSCC 细胞株 HN-6 由哈尔滨医科大学附属第一临床医学院细胞移植办公室赠予。细胞采用含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养液,在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中进行培养。NDV D90 由哈尔滨兽医研究所李曦教授赠予,病毒保存在鸡胚尿囊液中。将病毒按 1:103 进行稀释后待用。

1.2 免疫细胞化学法检测

用适量稀释好的病毒与 HN-6 细胞共同孵育,并同时用等

量 PBS 设置对照组。12h 之后,4%多聚甲醛室温固定细胞 5-10 min,之后用 0.1% Triton X-100 室温破膜 5 min。5 μL FITC-Phalloidin 贮存液加入 150 μL PBS 中配成工作液 (5 μg/mL)并用以染细胞,室温染色 40 min。随后进行 β-tubulin 和 DAPI 染色,并在荧光显微镜下观察染色结果。

1.3 Transwell 法检测

用适量的病毒与细胞分别作用 12 h 和 24 h,同时设置对照组。对于细胞迁移试验,将待测细胞培养至对数生长期,消化细胞,用 PBS 和无血清培养基先后洗涤一次,用无血清培养基悬浮细胞,计数,调整浓度为 2×10^5 /mL,在下室加入 750 μL 含 10% 血清的培养基,上室加入 200 μL 细胞悬液,继续在孵箱培养 24 小时。取出小室之后用 PBS 进行清洗,4%多聚甲醛固定之后用 Giemsa 进行染色。染色后显微镜下取 5 个随机视野计数,统计结果。对于细胞侵袭试验,事先将 Matrigel 铺在小室底部,后续实验步骤同迁移实验。

1.4 蛋白印记法检测蛋白表达

用病毒与细胞分别共同孵育 12 h、24 h,并设置对照组。收集对照组与实验组的细胞,用 RIPA 裂解液于冰上进行裂解。之后在 12500 r/min 下离心 40 min,取上清液进行分装。采用 BCA 法进行蛋白浓度测定。取 50 μg 蛋白样品上样到 15% 的 SDS-聚丙烯酰胺胶中进行电泳,之后转印到硝酸纤维素膜上,用脱脂奶粉进行封闭。分别加入 sp1,RECK,MMP-2 和 MMP-9(稀释浓度均为 1:1000)抗体以及 GAPDH(1:3000)过夜。TBST 洗 3 次后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1000)作用 1h,ECL 法显色后 GIS 凝胶图像分析系统拍照并分析处理。

1.5 明胶酶谱法检测 MMP-2 和 MMP-9 活性

将病毒与细胞共同孵育 12 h、24 h,并设置对照组。吸出含有病毒的培养液之后,用不含血清的培养液继续培养 48 小时。取上清液进行离心,将蛋白样品与 5× 上样缓冲液混合,在含有 1%明胶的聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳。电泳结束后,用 2.5 % Triton X-100 溶液进行清洗后放入反应缓冲液,在 37℃ 下孵育 24 小时。用含有考马斯亮蓝的染液进行染色,随后用不含有考马斯亮蓝的溶液进行脱色。用凝胶图像分析系统分析读取条带

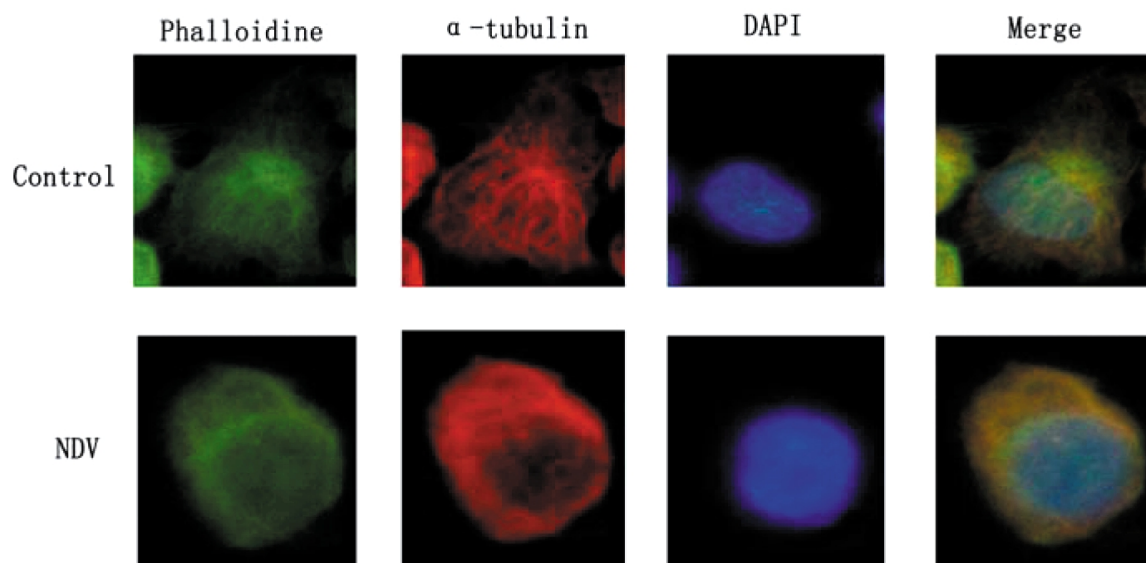


图 1 D90 改变微管和微丝的形态(400×)

Fig.1 The change of microtubules and microfilaments induced by D90(400×)

面积,宽度和灰度值,做统计分析。

1.6 统计学分析

本试验采用 SPSS20.0 软件进行 t 检验,所有数据均为 3 次独立试验所得的结果,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 D90 对微管和微丝形态的影响

对病毒处理过的细胞的微管和微丝进行了荧光染色结果

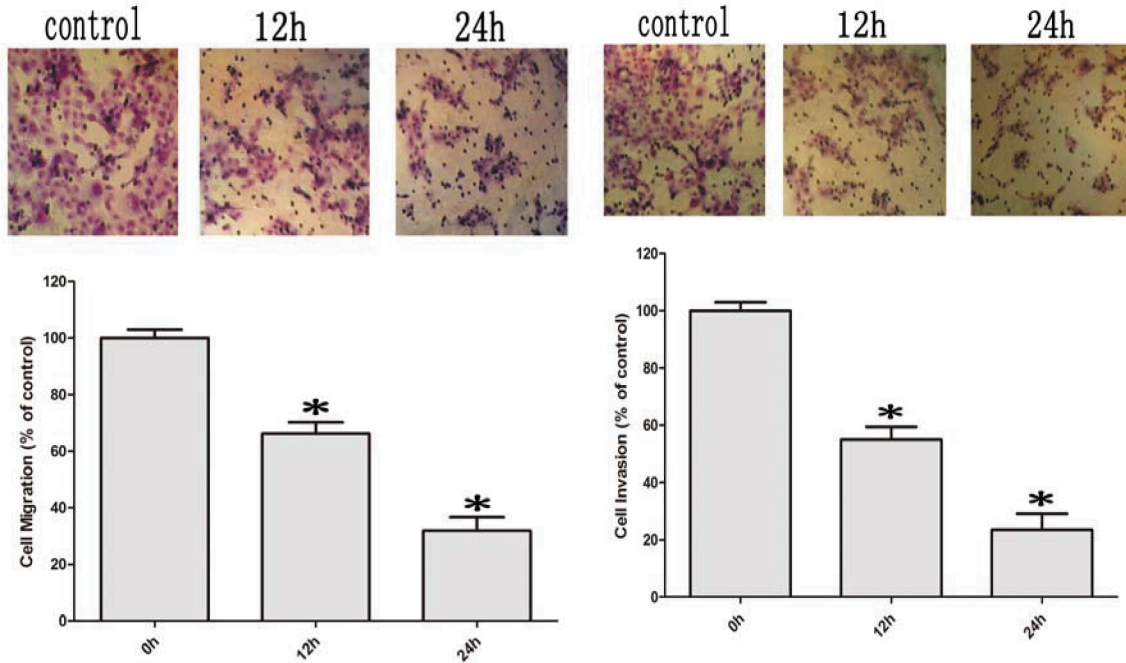


图 2 D90 能够抑制 HN-6 的迁移和侵袭(“*”表示 $P < 0.05$)(200×)

Fig.2 D90 inhibited the migration and invasion of HN-6 cell(“*”at $P < 0.05$)(200×)

2.3 D90 对 MMP-2 和 MMP-9 的表达和活性的影响

本试验采用蛋白印迹法来检测 D90 对于 SP1, RECK, MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的影响,并采用明胶酶谱法检测 MMP-2 和 MMP-9 活性的变化。如图 3A 所示,D90 可以下调 SP1, MMP-2 和 MMP-9 的表达和上调 RECK 的表达;如图 3B 所示,D90 能够抑制 MMP-2 和 MMP-9 的活性。

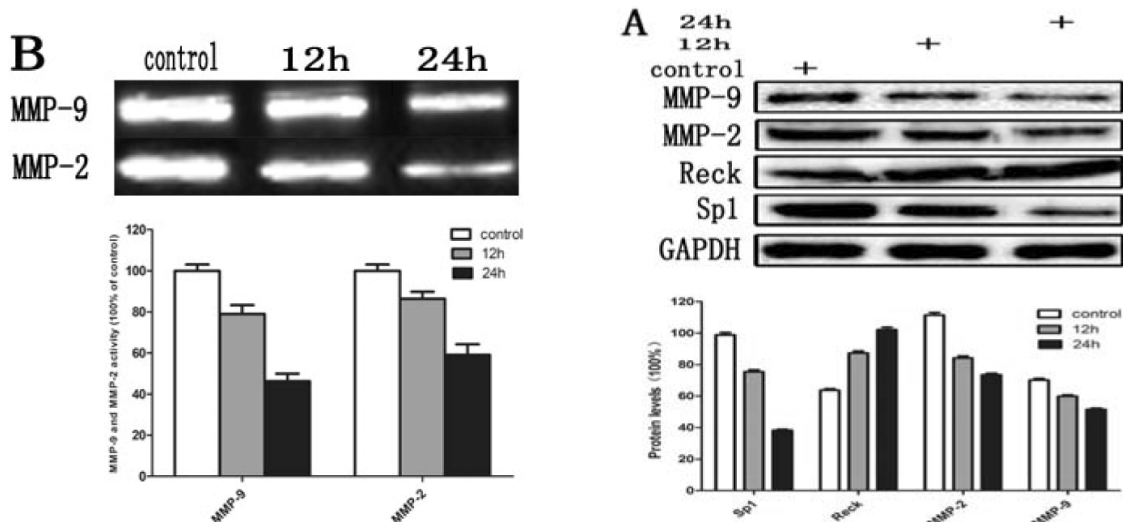


图 3 D90 通过下调 SP1 的表达和上调 RECK 的表达来抑制 MMP-2 和 MMP-9 的表达和活性

Fig.3 D90 decreased the expression of sp1 and increased the expression of RECK to suppress the expression and activity of MMP-2 and MMP-9

如图 1 所示,与对照组细胞相比较,微管的排列不连续和不规则,微丝模糊,细胞伪足数量也有所减少,DAPI 染色显示出细胞核没有明显的变化。

2.2 D90 对 HN-6 的迁移和侵袭的影响

D90 对 HN-6 细胞迁移和侵袭能力的影响如图 2 所示,与对照组相比较 D90 能够明显抑制 HN-6 细胞的迁移和侵袭 ($P < 0.05$)。

3 讨论

关于 NDV 抗肿瘤的机制至今还没有一个明确的结论。本试验主要针对 D90 能否抑制口腔鳞癌细胞迁移和侵袭来达到抗肿瘤效果进行了试验。本试验分别对细胞微管和微丝进行了荧光染色,结果(图 1)表明 D90 在引起细胞凋亡之前就改变了

微管微丝的形态,使其排列变得间断,模糊。与此同时,细胞伪足数量也减少了。这些结果证明了 D90 通过改变微管微丝形态降低了细胞的能动性。随后,我们采用了 Transwell 法证明了 D90 能够明显抑制 NH-6 细胞的迁移和侵袭能力(图 2)。

Christina Pu 等已经证明了属于副粘液病毒属的犬瘟热病(CDV)能够上调肿瘤细胞中 RECK 基因的表达并且抑制 MMP-2 的表达,进而抑制了肿瘤细胞的迁移和侵袭^[20]。SP1 能够通过捆绑到 RECK 上的 SP1 区域来减少 RECK 的表达,进而增加 MMP-2 和 MMP-9 的表达^[21]。为了进一步研究 D90 抑制 HN-6 细胞迁移和侵袭的机制,我们分别采用了蛋白印迹法和明胶酶谱法对相应的蛋白进行了研究。如图 3A 所示,与对照相比,D90 下调了 SP1, MMP-2 和 MMP-9 的表达而上调了 RECK 的表达;于此同时, MMP-2 和 MMP-9 的活性也有所减少(图 3B)。因此,我们可以推断出 D90 通过下调 SP1 的表达和上调 RECK 的表达来抑制 MMP-2 和 MMP-9 的表达和活性实现对于 HN-6 细胞迁移和侵袭的抑制。

综上所述,D90 具有抑制口腔鳞癌细胞迁移和侵袭的能力。本研究为进一步探讨 NDV D90 成为一种新的抗肿瘤制剂提供了初步的研究依据。

鸣谢:感谢李曦教授为本试验提供 NDV D90,并为本试验的设计以及论文撰写提出了宝贵的指导意见。

参考文献(References)

- [1] Saman Warnakulasuriya. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer[J]. Oral Oncol, 2009, 45(4-5):309-316
- [2] Forastiere A, Koch W, Trotti A, et al. Head and neck cancer [J]. N Engl J Med, 2001, 345(26):1890-900
- [3] Woolgar JA, Scott J, Vaughan ED, et al. Survival,metastasis and recurrence of oral cancer in relation to pathological features[J]. Ann R Coll Surg Engl, 1995,77(5):325-331
- [4] Takahashi N, Takeda K, Imai M. Inhibitory effects of p-dodecylaminophenol on the invasiveness of human fibrosarcoma cell line HT1080 [J]. Bioorg Med Chem, 2013, 21(19):6015-6021
- [5] Kato K, Long NK, Makita H, et al. Effects of green tea polyphenol on methylation status of RECK gene and cancer cell invasion in oral squamous cell carcinoma cells[J]. Br J Cancer, 2008, 99(4):647-654
- [6] Hsu MC, Chang HC, Hung WC. HER-2/neu represses the metastasis suppressor RECK via ERK and Sp transcription factors to promote cell invasion[J]. J Biol Chem, 2006, 281(8):4718-4725
- [7] Zhao L, Liu H. Newcastle disease virus: a promising agent for tumour immunotherapy[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2012, 39(8):725-730
- [8] Alabsi AM, Ali R, Ideris A et al. Anti-leukemic activity of Newcastle disease virus strains AF2240 and V4-UPM in murine myelomonocytic leukemia in vivo[J]. Leuk Res, 2012, 36(5):634-645
- [9] Jamal MH, Ch'ng WC, Yusoff K et al. Reduced Newcastle disease virus-induced oncolysis in a subpopulation of cisplatin-resistant MCF7 cells is associated with survivin stabilization [J]. Cancer Cell Int, 12(1): 35
- [10] Fu F, Zhao M, Yang YJ et al. Antiproliferative effect of newcastle disease virus strain D90 on human lung cancer cell line A549 [J]. Oncol Res, 2011, 19(7):323-333
- [11] Zamarin, Palese P. Oncolytic Newcastle disease virus for cancer therapy: old challenges and new directions [J]. Future Microbiol, 2012, 7(3): 347-367
- [12] Ravindra PV, Tiwari AK, Sharma B et al. Newcastle disease virus as an oncolytic agent[J]. Indian J Med Res, 2009, 130(5): 507-513
- [13] Elankumaran S, Rockemann D, Samal SK. Newcastle disease virus exerts oncolysis by both intrinsic and extrinsic caspase-dependent pathways of cell death[J]. J Virol, 2006, 80(15):7522-7534
- [14] Laurie SA, Bell JC, Atkins HL et al. A phase 1 clinical study of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, using two-step desensitization[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(8):2555-2562
- [15] Molouli A, Yusoff K. NDV-induced apoptosis in absence of Bax; evidence of involvement of apoptotic proteins upstream of mitochondria[J]. Virol J, 2012, 9:179
- [16] Kumar R, Tiwari AK, Chaturvedi U et al. Velogenic newcastle disease virus as an oncolytic virotherapeutics: in vitro characterization[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2012, 167(7):2005-2022
- [17] Biswas M, Kumar SR, Allen A et al. Cell-type-specific innate immune response to oncolytic Newcastle disease virus [J]. Viral Immunol, 2012, 25(4):268-276
- [18] Bian J, Wang K, Kong X et al. Caspase-and p38-MAPK-dependent induction of apoptosis in A549 lung cancer cells by Newcastle disease virus[J]. Arch Virol, 2011, 156(8):1335-1344
- [19] Sui H, Bai Y, Wang K, et al. The anti-tumor effect of Newcastle disease virus HN protein is influenced by differential subcellular targeting [J]. Cancer Immunol Immunother, 2010, 59(7):989-999
- [20] Puff C, Krudewig C, Imbschweiler I et al. Influence of persistent canine distemper virus infection on expression of RECK, matrix metalloproteinases and their inhibitors in a canine macrophage/monocytic tumor cell line(DH82)[J]. Vet J, 2009, 182(1):100-107
- [21] Wei Z, Jiang X, Qiao H, et al. STAT3 interacts with Skp2/p27/p21 pathway to regulate the motility and invasion of gastric cancer cells [J]. Cell Signal, 2013, 25(4):931-93