

基质金属蛋白酶-2 在脑胶质瘤细胞中的表达及其分子探针体外磁共振成像的检测

孙艳¹, 沈静², 单煜恒¹, 钟士江¹

(1. 中国人民武装警察部队后勤学院附属医院脑科中心, 天津 300162; 2. 中国人民武装警察部队安徽总队医院神经内科)

[摘要] **目的** 观察基质金属蛋白酶-2(MMP2)在脑胶质瘤细胞中的表达,并检测其分子探针体外磁共振成像能力。**方法** 利用免疫印迹法检测 MMP2 在多种脑胶质瘤细胞系的表达水平;利用碳二亚胺法合成 USPIO-PEG-MMP2Ab 分子探针,进行噻唑蓝比色法检测其细胞毒性,普鲁士蓝染色及体外磁共振成像检测 USPIO-PEG 及 USPIO-PEG-MMP2Ab 与 MMP2 高表达的脑胶质瘤细胞的特异性结合能力。**结果** 所有胶质瘤细胞均高表达 MMP2,与星形胶质细胞相比,差异有统计学意义;合成的分子探针 USPIO-PEG-MMP2Ab 应用浓度范围内无明显细胞毒性,具有同 C6 脑胶质瘤细胞特异性结合的能力,普鲁士蓝染色结果显示在相同浓度及时间的条件下,USPIO-PEG-MMP2Ab 组较 USPIO-PEG 组蓝染颗粒更多、更明显;磁共振成像结果显示 USPIO-PEG-MMP2Ab 组细胞在相同浓度条件下 SI 值下降水平明显较高,与 USPIO-PEG 组细胞相比,差异有统计学意义。**结论** MMP2 在胶质瘤细胞中高表达,且 USPIO-PEG-MMP2Ab 分子探针活性高,安全性好,对脑胶质瘤细胞系具有靶向性。

[关键词] 神经胶质瘤;基质金属蛋白酶 2;磁共振成像;分子探针

中图分类号:R730.264 **文献标识码:**A **DOI:**10.3969/J.issn.1672-6790.2018.01.025

Expression of MMP2 in brain glioma cells and detection of magnetic resonance imaging in vitro by molecular probes Sun Yan*, Shen Jing, Shan Yuheng, Zhong Shijiang(* Department of Neurology, Affiliated Hospital of Logistics University of PAP, 300162 Tianjin, China)

Corresponding author: Zhong Shijiang, Email: zhongshijiang1@163.com

[Abstract] **Objective** Observation of matrix metalloproteinase -2 (MMP2) expression in the glioma cells, and study its molecular probes magnetic resonance imaging ability in vitro. **Method** The expression level of MMP2 was detected by Western blotting in various brain glioma cell line; USPIO-PEG-MMP2Ab was synthesized by conjugating USPIO-PEG with MMP2Ab. MTT colorimetric assay was used to assess the cytotoxicity of USPIO-PEG-MMP2Ab. The specific binding ability of USPIO-PEG and USPIO-PEG-MMP2Ab with MMP2 highly expressed glioma cells was detected by Prussian blue staining and MR imaging in vitro. **Result** All the tumor cells were positive for MMP2, there were significant differences compared with astrocytes; The synthetic molecular probe USPIO-PEG-MMP2Ab has no cytotoxicity in the range of concentration, and has the ability to bind specifically to C6 glioma cells. Prussian blue staining showed that at the same time and concentration conditions, USPIO-PEG-MMP2Ab group showed much more intracellular blue particles than USPIO-PEG group. Magnetic resonance imaging showed that the SI value of the group USPIO-PEG-MMP2Ab cells under the same concentration condition decreased significantly, and compared with the USPIO-PEG group cells, the difference was statistically significant. **Conclusion** MMP2 is highly expressed in glioma cells, and the USPIO-PEG-MMP2Ab molecular probe has high activity and safety. It is targeted against glioma cell lines and lays the foundation in vivo experiments.

[Key words] Glioma; Matrix metalloproteinase 2; Magnetic resonance imaging; Molecular probes

基金项目:中国人民武装警察部队后勤学院附属医院种子基金(FYM201535);天津市卫生行业重点攻关项目(16KG136)

作者简介:孙艳,主治医师,Email:wjrgb1@126.com

通信作者:钟士江,主任医师,Email:zhongshijiang1@163.com

脑胶质瘤是原发性人脑肿瘤中的一类恶性疾病,罹患者大多不到 5 年的生存率,恶性程度高。胶质瘤的治疗是世界医学难题。虽然近年来从手术、化疗与放疗等手段治疗脑胶质瘤取得很大进展,但并未显著提高其治疗效果,很大一部分原因是由于其发病部位位于中枢神经系统,且其相当一部分会浸润迁移至外周组织^[1]。西医治疗(手术、放疗、化疗)很难达到治愈与控制复发的目的,因此需要了解胶质瘤侵袭的分子机制,特别是其在临床应用的重要价值。

基质金属蛋白酶(MMPs)是一种结构中含有锌离子和钙离子的蛋白水解酶类,主要分解细胞外基质蛋白酶类成分,包括发育、组织塑形、炎症、退行性疾病、肿瘤生长、侵袭与转移、血管生成等生理病理过程。MMP2 是基质金属蛋白酶家族中的重要亚型^[2]。当过表达 MMP2 时,能促进不同肿瘤的转移,特别是胶质瘤中的转移情况。因此有关 MMP2 的研究就显得相当重要。但是有关 MMP2 和胶质瘤的分子研究和影像学研究还需更进一步的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 人 U251、U373 及大鼠 C6 胶质瘤细胞系购自于中国医学科学院协和细胞库,星形胶质细胞系(RA)购自于上海中国科学研究院细胞所。

1.1.2 主要试剂与仪器 (1)试剂: BIO-r-C 磁性氧化铁纳米颗粒(USPIO)以 Fe_3O_4 为核心, pH 值呈中性,其 Fe 的浓度为 3.5 mg/mL, 购买自北京万德高科技发展有限公司。合成 USPIO-PEG-MMP2Ab 分子探针由广州锐博生物公司合成。1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCL)、N-羧基琥珀酰亚胺(NHS); DMEM 高糖培养基及 FBS 胎牛血清(FBS)购于美国 Gibco 公司;普鲁士蓝染色试剂盒(Perls stain,核固红法)购于康为世纪(北京)有限公司。(2)仪器:电子显微镜(JEM-100CX II, 日本);动态光散射纳米粒度仪(Malvern Mastersizer2000, 英国);酶标仪(Eppendorf, 德国);3.0T 磁共振扫描仪(Philip, 荷兰)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞的培养、传代和贮藏 人 U251、U373 及大鼠 C6 胶质瘤细胞系、星形胶质细胞系(RA)用 DMEM/HIGH GLUCOSE 培养基(10% FBS, 1% 双抗, 1% 谷氨酰胺)培养在 37℃、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中培养。待细胞铺满瓶底的 80% ~ 90% 时

用胰蛋白酶法消化传代。

1.2.2 免疫印迹 RIPA 细胞裂解液提取三种脑胶质瘤细胞及星形胶质细胞的总蛋白,采用 BCA 法进行蛋白定量,后与蛋白等比例加入 SDS Loading Buffer,煮沸 10 min,进行电泳并半干转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h,加入抗 MMP2 兔多克隆抗体(1:500)及兔抗人 β -actin 抗体(1:2000),4℃ 孵育过夜, TBST 洗 5 次, 8 分钟/次,加入含 5% 脱脂奶粉的封闭液稀释的二抗,室温孵育 1 h, TBST 洗 5 次, 8 分钟/次,滴入显影液,凝胶成像仪下曝光显影并采集图像,以 β -actin 为内参,实验重复 3 次,使用 Image Lab 软件进行数据定量分析。

1.2.3 合成 USPIO-PEG-MMP2Ab 探针 吸取 USPIO-PEG(1 mg, 3.5 mg Fe/mL)加入 2 mL EP 管中,称取 1 mg EDC 及 2.8 mg sulfo-NHS,加入 100 μL 去离子水溶解后,迅速转移至 USPIO-PEG 溶液中,在室温下反应 15 min,采用 PD-10 交换柱对活化后的 USPIO-PEG 进行缓冲液交换,洗脱液采用 NaHCO_3 (0.1 M),然后加入 1mg MMP2Ab 在室温下进行偶联反应,4 h 后, PBS 缓冲液进行透析并过夜,偶联完毕后,将偶联物置于 4℃ 冰箱储存备用,使用前用无菌 PBS 洗 2 次, 1 次 5 min。

1.2.4 噻唑蓝(MTT)比色法 取对数期生长的 RA 细胞,以每孔 2×10^4 细胞均匀接种至 96 孔板,完全培养基 37℃ 培养 24 h, PBS 清洗 2 遍。加入 DMEM 稀释的 USPIO-PEG-MMP2Ab(0、6.25、12.5、25、50、100 μg Fe/mL),每组设置 3 个复孔,37℃ 培养 24、48、72 h 后加入 20 μL MTT(5 mg/mL 用 PBS 配制 pH = 7.4),继续培养 4 h,水平离心机离心后小心弃去上清,每孔加入 100 μL 二甲基亚砷,避光置于微量振荡器震荡 15 min,在酶标仪下读取 490 nm 处吸光度值。

1.2.5 普鲁士蓝检测 取对数期生长的 C6 细胞,以每孔 5×10^4 细胞均匀接种至 24 孔板,完全培养基培养 24 h, PBS 清洗 2 遍。加入 200 μL USPIO-PEG-MMP2Ab、BSA、BSA-USPIO, 4℃ 孵育 2 h 后 PBS 清洗 2 遍,4% 多聚甲醛室温固定 30 min,每孔加入 Perls stain 200 μL ,室温静置 30 min 后 PBS 清洗 3 遍,核固红复染 5 min, PBS 清洗后显微镜下观察。

1.2.6 体外细胞磁共振成像 取对数期生长的 C6 细胞,以每孔 2.5×10^5 细胞均匀接种至 12 孔板,完全培养基培养 24 h, PBS 清洗 2 遍。加入 DMEM 稀释的 USPIO-PEG 及 Ab-MMP-2-USPIO(10、20、30、

40、50 μg Fe/mL) 500 μL, 另设置空白对照组。37 ℃ 培养 2 h 后, 胰酶消化离心, 200 μL 1% 的低熔点琼脂糖溶液重悬后加入 96 孔板中, 迅速置于 4 ℃ 得到细胞均匀分布的琼脂糖凝胶。采用 (Philip, Aachieva 3.0T) 及人头线圈行轴位及冠状位扫描, 扫描参数设置如下: T2WI; TR (repetition time) 3000 ms, TE (echo time) 15 ms, FOV (field of view) 180 mm, 层厚 1.5 mm, 层间距: 0.5 mm, 矩阵 180 × 142, 感兴趣区 (ROI) 11.5 mm²。每组取不同层面各测量 3 次, 信号强度 (SI) 下降计算公式如下: SI 下降水平 = SI 空白 - SI 测定。

1.3 统计学处理 运用 SPSS19.0 软件进行数据处理, 实验所获数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 方差齐时采用 *t* 检验, 方差不齐时采用秩和检验。 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Western-Blot 检测不同脑胶质瘤细胞系中 MMP2 表达水平 以 RA 细胞 (0.50 ± 0.21) 作为对照, 结果显示 MMP2 在 U251 (2.19 ± 0.56)、U373 (1.65 ± 0.42)、C6 (2.31 ± 0.76) 均高表达, 差异均有统计学意义 (均 *P* < 0.05)。

2.2 MTT 比色法检测 USPIO-PEG 及对细胞生存的影响 RA 细胞与不同浓度的 USPIO-PEG-MMP2Ab (0.6.25、12.5、25、50、100 μg Fe/mL) 孵育 24 h 后细胞存活率见表 1。在磁共振应用的有效浓度范围内 (≤ 50 μg Fe/mL), USPIO-PEG-MMP2Ab 对细胞存活率无显著影响, 提示其无明显细胞毒性 (*P* > 0.05); 当浓度升至 100 μg Fe/mL 时, 细胞存活率显著降低, 提示存在一定的细胞毒性 (*P* < 0.01)。

表 1 MTT 检测不同 Fe 浓度的分子探针
对 RA 细胞存活的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fe 浓度 (μg Fe/mL)	吸光度值	存活率 (%)
0	0.97 ± 0.04	100.00 ± 4.93
6.25	1.03 ± 0.03	109.43 ± 4.84
12.5	1.04 ± 0.03	109.95 ± 3.65
25	0.97 ± 0.10	100.71 ± 14.76
50	0.91 ± 0.09	92.24 ± 13.38
100	0.80 ± 0.02 ^a	75.67 ± 3.27 ^a

注: 与 Fe 浓度为 0 组比较, ^a*P* < 0.01

2.3 USPIO-PEG-MMP2Ab 与脑胶质瘤细胞的结合 C6 细胞与 USPIO-PEG 及 USPIO-PEG-MMP2Ab 孵育后的普鲁士蓝染色见图 1。细胞内蓝染颗粒较多, 主要分布于细胞膜及细胞质中。在相同浓度及孵育

时间的条件下, USPIO-PEG-MMP2Ab 组的蓝染颗粒较 USPIO-PEG 组更多、更明显。

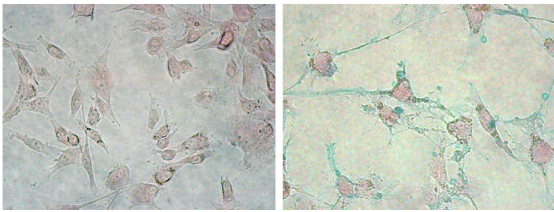


图 1 USPIO-PEG 及 USPIO-PEG-MMP2Ab 与 C6 细胞共孵育后的普鲁士蓝染色 (400 ×)

2.4 USPIO-PEG-MMP2Ab 的体外磁共振成像 C6 细胞与不同浓度的 USPIO-PEG 及 USPIO-PEG-MMP2Ab (0、10、20、30、40、50 μg Fe/mL) 孵育 2 h 后细胞的 SI 值均出现下降。在相同浓度下, USPIO-PEG-MMP2Ab 组细胞的 SI 值下降水平明显高于 USPIO-PEG 组细胞 (*P* < 0.01) (见表 2)。

表 2 C6 与 USPIO-PEG 及 USPIO-PEG-MMP2Ab 孵育后
磁共振成像 SI 下降值

Fe 浓度 (μg Fe/mL)	USPIO-PEG	USPIO-PEG-MMP2Ab
10	1778.12 ± 497.11	1471.13 ± 579.26
20	2897.56 ± 599.21	1589.22 ± 487.19 ^a
30	3980.47 ± 791.83	1781.20 ± 598.31 ^a
40	5010.92 ± 1071.60	1981.14 ± 612.33 ^a
50	6211.53 ± 1171.22	1821.45 ± 581.44 ^a

注: 在相同浓度下, USPIO-PEG-MMP2Ab 组细胞的 SI 值下降水平明显高于 USPIO-PEG 组细胞, ^a*P* < 0.01

3 讨论

脑胶质瘤约占颅内肿瘤的 20%, 其生长过快和浸润性较强的特点造成了其预后差^[3]。MMPs 在恶性肿瘤浸润和转移过程中, 参与了细胞外基质和新血管的重构, 这主要由于其对底物的亲和性, 即胶原 IV, 纤连蛋白, 蛋白聚糖, 他们被分泌出来时是处于未激活状态^[4-5], 这一激活过程是通过基质金属蛋白酶或者丝氨酸蛋白酶来完成。恶性肿瘤细胞侵袭性生长需穿过由基底膜和间质成分构成的细胞外基质, 基底膜主要由 IV 型胶原蛋白构成, 而间质则主要由 I 型胶原蛋白构成。绝大部分肿瘤细胞可产生降解 IV 型胶原蛋白的酶。近年来肿瘤基因学治疗的发展随着分子生物学技术的发展亦有较大进步。有研究报道 MMP9 和 MMP12 参与肿瘤的转移^[6-8]。胶质瘤的形成和转移与基质金属蛋白酶家族中的 MMP2 有关, 但是有关 MMP2 在胶质瘤中的分子机

制还未被研究^[9-10]。MMP2 参与肿瘤的分子机制可能是通过:(1)通过降解癌细胞或者癌巢周围细胞外基质,为癌细胞生长和转移停工良好的环境;(2)在降解细胞外基质的同时促进血管表皮生长因子,转录生长因子等的释放,通过释放这些血管生长和细胞转录的因子进而到促进癌细胞生长的目的^[11-12]。最近有文献报道 MMP2 和 MMP9 与脑出血有关系,该研究表示 MMP2/MMP9 可能促进了出血后血管源性脑水肿的形成^[13-14]。但是其模型是在诱导小鼠形成水肿基础上进行研究的,所以在临床上具有一定的参考价值,并没法说明其实用性。MMP2 在影像学中的研究多集中在其是否在临床患者中的表达情况,其具体研究机制还未清楚。

本实验首先证实了在多种胶质瘤细胞系(包括人源性和鼠源性胶质瘤细胞系)中,均高表达 MMP2,但是在对照组星形胶质细胞系中其表达明显低于其他肿瘤细胞,统计分析发现差异有统计学意义($P < 0.05$)。而后,本研究利用碳二亚胺法将 MMP2 的抗体与超顺磁性氧化铁纳米颗粒偶联合成新型磁共振分子探针 USPIO-PEG-MMP2Ab,且对其细胞活力进行检测,发现其细胞增殖未受影响,紧接着通过普鲁士蓝染色及体外磁共振成像验证了新型磁共振分子探针同 MMP2 高表达的 C6 细胞的靶向能力,在与单纯多肽对照组相比,MMP2 靶向性更好($P < 0.05$)。

本研究显示,MMP2 在胶质瘤中高表达,分子影像学研究表明 USPIO 探针对高表达 MMP2 的胶质瘤细胞具有靶向性,为今后在体实验进一步验证该磁共振分子探针的成像效果,为其应用于脑胶质瘤早期无创性诊断奠定基础。

参考文献

- [1] DAVID LS, SHIDENG B, JEREMY NR. Genomics informs glioblastoma biology[J]. *Nature Genetics*, 2013, 45(10): 1105-1107.
- [2] 吴文斌,胡长林,李国秧,等. 脑内血肿吸收机制中相关因素的分析[J]. *现代康复*, 2000, 4(4): 581-583.
- [3] DAVIDSON B, REICH R, RISBERG B, et al. The biological role and regulation of matrix metalloproteinases (MMP) in cancer[J]. *Arkh Patol*, 2002, 64(1): 47-53.
- [4] SONG H, LI Y, LEE J, et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 promotes cancer cell migration and invasion by inducing the expression of matrix metalloproteinases 2 and 9[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(3): 879-886.
- [5] 石建霞,顾健. 凝血酶与肿瘤的血管新生[J]. *中国实验血液学杂志*, 2006, 14(1): 197-200.
- [6] ROMERO S, MARTINEZ A, HEMANDEZ L, et al. Light scriteria revisited consistency and comparison with new proposed alternative criteria for separating pleural transudates from exudates[J]. *Respiration*, 2013, 67(1): 18-23.
- [7] LUO Y, LIANG F, ZHANG ZY. PRL1 promotes cell migration and invasion by increasing MMP2 and MMP9 expression through Src and ERK1/2 pathways[J]. *Biochemistry*, 2009, 48(8): 1838-1846.
- [8] YEUNG YT, MCDONALD KL, GREWAL T, et al. Interleukins in glioblastoma pathophysiology: implications for therapy[J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 168(3): 591.
- [9] 李京佳,林相国,许涛,等. VEGF 家族及其在肿瘤生长中作用的研究[J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(4): 777-779.
- [10] HUANG JL, WU SY, XIE XJ, et al. Inhibiting effects of leflunomide on overexpression of CD147, MMP-2 and MMP-9 in PMA differentiated THP-1 cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 67(1): 304-310.
- [11] LI R, LI G, DENG L, et al. IL-6 augments the invasiveness of U87MG human glioblastoma multiforme cells via up-regulation of MMP-2 and fascin-1[J]. *Oncol Rep*, 2010, 23(6): 1553-1559.
- [12] ZHU GE Y, XU J. Rac1 mediates type I collagen-dependent MMP-2 activation. role in cell invasion across collagen barrier[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(19): 16248-16256.
- [13] 印弘,李复,高元桂,等. 大鼠 C6 胶质瘤 VEGF 表达与 MRI 对照研究[J]. *中国医学影像学杂志*, 2001, 10(3): 200-202.
- [14] LI S, GAO Y, MA W, et al. EGFR signaling-dependent inhibition of glioblastoma growth by ginsenoside Rh2[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(1): 5593-5598.

(收稿日期:2017-05-10)