

巨噬细胞移动抑制因子抑制剂对大肠癌细胞增殖的作用*

杨莉萍¹, 陈 萌², 彭侠彪², 全华斌³, 何兴祥^{4△} (1. 广东药学院附属门诊部检验科, 广州 510224; 2. 广州医学院第二附属医院消化科, 广州 510260; 3. 广东省中山市人民医院消化科 528403; 4. 广东药学院临床医学院内科学教研室, 广州 510310)

【摘要】 目的 研究选择性巨噬细胞移动抑制因子(MIF)互变异构酶活性抑制剂 ISO-1 对大肠癌细胞增殖的影响并探讨其可能机制。**方法** 不同浓度的 ISO-1(0.01~100 μmol/L)作用于人大肠癌细胞 Lovo、SW116 和鼠大肠癌细胞 CT26, 对照组以相应浓度的二甲基亚砷处理。采用 MTT 法观察 ISO-1 对大肠癌细胞增殖的影响。通过 L-多巴色素甲酯测定 MIF 互变异构酶活性, 酶联免疫吸附试验测定 ISO-1 作用后大肠癌细胞 MIF 蛋白水平, 逆转录聚合酶链反应检测 ISO-1 作用后大肠癌细胞 IL-8 mRNA 的表达。**结果** ISO-1 抑制了 Lovo 细胞的增殖, 且呈剂量和时间依赖性; ISO-1 同样抑制了 SW116($F=800.694, P<0.01$) 和 CT26($F=879.544, P<0.01$) 细胞的增殖。ISO-1 抑制了 Lovo 和 SW116 细胞内 MIF 互变异构酶活性, 并且与抑制大肠癌细胞增殖程度呈正相关性(Lovo: $r=0.54, P=0.005$; SW116: $r=0.683, P<0.01$); 降低了 Lovo 和 SW116 细胞 IL-8 mRNA 表达水平(Lovo: 0.1541 ± 0.0019 vs $0.2081 \pm 0.0300, P<0.05$; SW116: 0.1509 ± 0.0170 vs $0.2354 \pm 0.0100, P<0.05$)。**结论** MIF 抑制剂不仅抑制人大肠癌细胞 Lovo 和 SW116 的增殖, 而且也抑制鼠大肠癌细胞 CT26 的增殖, 其可能机制为 MIF 抑制剂抑制了 MIF 的互变异构酶活性并下调 IL-8 的表达。

【关键词】 肠肿瘤; 大肠; 巨噬细胞游走抑制因子; 异构酶类; 逆转录聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.01.001 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)01-0001-03

Effects of ISO-1 on proliferation of colorectal cancer cell lines* YANG Li-ping¹, CHEN Meng², PENG Xia-biao², QUAN Hua-bin³, HE Xing-xiang^{4△} (1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Clinic, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510224, China; 2. Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260, China; 3. Department of Gastroenterology, Zhongshan People's Hospital, Zhongshan, Guangdong 528403, China; 4. Department of Internal Medicine, Clinical Medicine College, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510310, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of ISO-1, a selective MIF tautomerase activity inhibitor, on the proliferation of the colorectal cancer cell lines and its probable mechanisms. **Methods** The human colorectal cancer cell lines Lovo, SW116 and the mice colorectal cancer cell lines CT26, were treated with series concentrations of ISO-1 (0.01 mol/L to 100 μmol/L), while those in the control group were treated with the corresponding concentration of dimethylsulfoxide(DMSO). MTT assay was used to evaluate the inhibition ratios. The tautomerase activity of MIF was measured using L-dopachrome methyl ester. MIF protein levels were determined using ELISA. And the expression of IL-8 mRNA was detected by reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR). **Results** ISO-1 inhibited the proliferation of Lovo cells in a time-and-concentration-dependent manner, and ISO-1 also inhibited the proliferation of SW116 cells and CT26 cells. The MIF tautomerase activities were significantly inhibited after ISO-1 treatment, and positively correlated with the proliferation of the colorectal cancer cell lines affected by ISO-1 (Lovo: $r=0.54, P=0.005$; SW116: $r=0.683, P<0.01$). The expression of IL-8 mRNA was obviously reduced after ISO-1 treatment (Lovo: 0.1541 ± 0.0019 vs. $0.2081 \pm 0.0300, P<0.05$; SW116: 0.1509 ± 0.0170 vs $0.2354 \pm 0.0100, P<0.05$). **Conclusion** ISO-1 can not only inhibit the proliferation of the human colorectal cancer cell lines Lovo, SW116 but also inhibit the proliferation of the mice colorectal cancer cell lines. The mechanism may be involved in the inhibition of the tautomerase activities of MIF and the down-regulation of IL-8 levels.

【Key words】 intestinal neoplasms; intestine, large; macrophage migration-inhibitory factors; isomerases; reverse transcriptase polymerase chain reaction

巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)为一种在多种炎症反应、肿瘤性疾病中广泛表达的细胞因子, 很多研究发现在这些疾病中 MIF 均有较高水平

的表达, 并被认为与多种肿瘤增殖相关^[1-3]。近年来有研究发现, ISO-1 特异性抑制 MIF 互变异构酶活性, 并改善重症败血症、前列腺癌和一些自身免疫性疾病的预后^[4-6]。本研究分析

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30470435); 广东省自然科学基金资助项目(06022450、7101731), 广东省科技计划项目(2008A030201001)。△ 通讯作者, E-mail: xingxianghe@medmail.com.cn。

MIF 互变异构酶活性抑制剂 ISO-1 对大肠癌细胞增殖的影响, 并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人大肠癌细胞 Lovo 和 SW116 为本实验室冻存, 鼠大肠癌细胞 CT26 从美国 ATCC 引进。ISO-1 由美国 NY 大学 Yousef Al-Abed 教授惠赠; RPMI 1640 培养基为 Gibco 公司产品; 二甲亚砜(DMSO)为 Amresco 公司产品, MTT 为 Sigma 公司产品; 高碘酸钠、L-3, 4-二羟基苯丙氨酸甲酯购于 Sigma-Aldrich 公司; AMV 逆转录酶为 Promega 公司产品, 人 IL-8 和 β -actin 引物由上海生工公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 大肠癌细胞培养于含 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI 1640 培养液中, 取对数生长期细胞, 消化、离心后调整细胞浓度为 0.5×10^5 、 1.0×10^6 /mL。分组: 实验组分别给予不同浓度 ISO-1(0.01~100 μ mol/L), ISO-1 预先用 DMSO 溶解, 配成 1 mmol/L 的储存液, 实验时再用培养液稀释成工作浓度; 对照组用与实验组储存液等体积的 DMSO 溶解, 实验时再用培养液以同样方式稀释。

1.2.2 MTT 法检测细胞增殖 取密度为 0.5×10^5 /mL 的细胞悬液, 每孔 100 μ L 接种于 96 孔细胞培养板。培养 24 h 待细胞贴壁后更换培养液。按上述方法分组, 并设空白调零孔。每组设 3 个复孔, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中分别培养 24、48、72 h, 检测时每孔加入 5 g/L MTT 20 μ L, 按试剂盒说明书进行, 测量 490 nm 处各孔吸光度(OD)值, 按以下公式计算抑制率[抑制率=(1-实验组 OD 平均值/对照组 OD 平均值)×100%]。

1.2.3 MIF 互变异构酶活性测定 取 100 μ L 细胞悬液(1.0×10^6 /mL)加入 1.5 mL 离心管中, 无菌 PBS 洗涤细胞 1 次。加入 100 μ L 预冷的 RIPA 细胞裂解液, 至细胞充分裂解后, 14 000 r/min 离心 5 min, 取上清液按下述方法测定 MIF 互变异构酶活性: 在 1 620 μ L EDTA 溶液(1 mmol/L, pH6.2)中混合 72 μ L 高碘酸钠(20 mmol/L)和 108 μ L L-3, 4-二羟基苯丙氨酸甲酯(4 mmol/L)。于 96 孔板中每孔加入 200 μ L 上述溶液和 60 μ L 待测上清液, 混匀后在紫外分光光度计上测 475 nm 处 OD 值。OD 值降低提示 MIF 互变异构酶活性降低。

1.2.4 ELISA 测定细胞培养液中 MIF 浓度 收集细胞培养液, 12 000 r/min 离心 5 min, 以除去培养液中的细胞碎片。按人 MIF ELISA 试剂盒说明书进行。

1.2.5 半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)测定 IL-8 mRNA 的表达 按 Trizol 试剂盒说明书一步法提取总 RNA, 紫

外分光光度仪测 RNA 纯度并定量。取 1 μ g 总 RNA, 采用 AMV 逆转录酶合成 cDNA。循环条件为: 70 $^{\circ}$ C、10 min, 42 $^{\circ}$ C、15 min, 95 $^{\circ}$ C、5 min, 5 $^{\circ}$ C、5 min, 共 1 个循环。PCR 反应体系 25 μ L: cDNA 5 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μ L, 10 \times buffer (含 MgCl₂) 2.5 μ L。上、下游引物(20 μ mol/L)各 0.5 μ L, Takara Taq 0.125 μ L。IL-8 PCR 扩增的循环条件为: 94 $^{\circ}$ C、2 min 后, 94 $^{\circ}$ C、45 s, 60 $^{\circ}$ C、45 s, 72 $^{\circ}$ C、2 min, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。 β -actin 扩增的循环条件为: 94 $^{\circ}$ C、1 min, 54 $^{\circ}$ C、1 min, 72 $^{\circ}$ C、2 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min, 共 28 个循环。在 1.2% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 用 Syngene 荧光成像系统(英国)及其软件分别计算 IL-8 与 β -actin 条带灰度, 以其比值表示 IL-8 的相对含量(表 1)。

1.3 统计学方法 所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异用方差分析和 *t* 检验, $\alpha=0.05$, 所有统计分析借助 SPSS 12.0 软件完成。

2 结果

2.1 ISO-1 抑制人大肠癌细胞 Lovo 增殖的时间、剂量依赖性 从 ISO-1 的浓度看, 不论是作用 24 h 还是作用 48、72 h, 其均表现出抑制率随浓度增加而增加, 差异有统计学意义(24 h: $F=15.327, P<0.01$; 48h: $F=187.963, P<0.01$; 72 h: $F=55.527, P<0.01$)。同样, 从作用时间看, 在 ISO-1 浓度从 1 μ mol/L 到 100 μ mol/L 的范围也表现出抑制率随着时间的增加而增加, 差异具有统计学意义(1 μ mol/L: $F=18.680, P=0.001$; 10 μ mol/L: $F=18.902, P=0.001$; 100 μ mol/L: $F=45.599, P<0.01$)(图 1)。

2.2 ISO-1 抑制人大肠癌细胞 SW116 和鼠大肠癌细胞 CT26 的增殖 根据 Lovo 细胞 MTT 实验结果, 以 ISO-1 100 μ mol/L 作用于 SW116 和 CT26 细胞, 结果显示, 24、48 和 72 h CT26 细胞生长抑制率分别为 49.14%、75.67% 和 89.31% ($F=879.544, P<0.01$), SW116 细胞生长抑制率分别为 28.41%、50.46% 和 61.97% ($F=800.694, P<0.01$)。抑制率均呈时间依赖性。

表 1 PCR 扩增使用的引物序列和片段长度

细胞因子	引物序列	扩增片段长度(bp)
hIL-8	5'-AGTGCTAAAGAACTTAGATG -3'	218
	5'-TATGAATTCCTCAGCCCTCTT -3'	
β -actin	5'-ATGTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG -3'	831
	5'-CGTCATACTCTGCTTGCTGATCCACATCTGC -3'	

表 2 ISO-1 对大肠癌细胞 MIF 互变异构酶活性抑制与增殖抑制的相关度

大肠癌细胞	ISO-1 浓度(μ mol/L)				
	0.01	0.10	1.00	10.00	100.00
Lovo					
增殖抑制率(%)	15.87 \pm 5.50	25.48 \pm 2.42	33.00 \pm 4.57	35.49 \pm 6.19	37.32 \pm 2.50
MIF 互变异构酶活性抑制率(%)	1.19 \pm 0.35	2.41 \pm 1.38	3.32 \pm 0.87	39.48 \pm 6.14	85.47 \pm 1.31
SW116					
增殖抑制率(%)	14.17 \pm 5.50	16.37 \pm 1.34	25.05 \pm 2.72	25.62 \pm 1.95	28.41 \pm 2.01
MIF 互变异构酶活性抑制率(%)	3.71 \pm 1.55	6.24 \pm 0.73	7.69 \pm 0.40	41.03 \pm 3.81	84.45 \pm 1.40

2.3 ISO-1 抑制 MIF 互变异构酶活性 不同浓度 ISO-1 作用于 Lovo 和 SW116 细胞 24 h 后, 细胞内 MIF 互变异构酶活性如图 2 所示。大肠癌细胞 Lovo MIF 互变异构酶活性随着 ISO-1 浓度增加而降低($F=1 543.286, P<0.01$); 大肠癌细胞

SW116 MIF 互变异构酶活性也随着 ISO-1 浓度增加而降低($F=16.366, P<0.01$)。

2.4 ISO-1 抑制大肠癌细胞增殖与抑制 MIF 互变异构酶活性的相关性 经 Spearman 相关性分析, 不同浓度 ISO-1 作用于

人大肠癌细胞 Lovo 和 SW116 后,对增殖与 MIF 互变异构酶活性的抑制呈正相关(Lovo; $r=0.767, P<0.01$;SW116; $r=0.648, P<0.01$),提示 ISO-1 抑制大肠癌细胞增殖与其抑制 MIF 互变异构酶活性有关(表 2)。

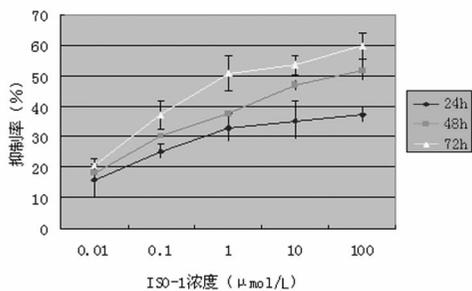


图 1 ISO-1 对 Lovo 细胞增殖的影响

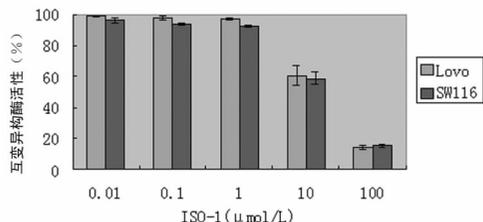
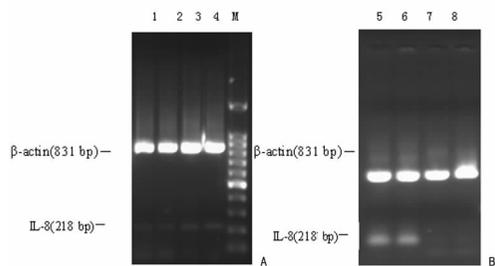


图 2 不同浓度 ISO-1 对 Lovo 和 SW116 细胞 MIF 互变异构酶活性的影响

2.5 ISO-1 对大肠癌细胞 MIF 蛋白表达的影响 100 μmol/L ISO-1 作用于大肠癌细胞 SW116 和 Lovo 24 h,细胞培养液中 MIF 浓度分别为(0.384 6±0.026 0)和(2.082 5±0.030 0) ng/mL,对照组为(0.397 4±0.032 0)和(2.100 1±0.030 0) ng/mL,两者相比差异均无统计学意义($P=0.238, P=0.127$)。

2.6 ISO-1 降低 Lovo 和 SW116 细胞 IL-8 mRNA 的表达 100 μmol/L ISO-1 作用于大肠癌细胞 SW116 和 Lovo 24 h,IL-8 mRNA 的表达与对照组相比较均有下降(图 3),Lovo: 0.154 1±0.001 9 vs 0.208 1±0.030 0, $P=0.029$;SW116: 0.150 9±0.017 0 vs 0.235 4±0.010 0, $P=0.001$ 。



注:A 表示 Lovo 细胞;1,2 泳道为 ISO-1 组;3,4 泳道为对照组。B 表示 SW116 细胞;5,6 泳道为对照组;7,8 泳道为 ISO-1 组。M 表示 Marker(100~1 500 bp)。

图 3 Lovo 和 SW116 细胞 IL-8 mRNA 表达的 RT-PCR 结果

3 讨 论

MIF 广泛表达于多种组织细胞中,具有多种生物学活性,可介导免疫和炎性反应。MIF 也在很多肿瘤如肺癌^[1]、卵巢癌^[2]、胃癌^[3]、前列腺癌^[7]组织中呈高度表达。近年来有研究发现,MIF 在一些肿瘤的发生、发展过程中起着非常重要的作用,它可能涉及肿瘤细胞的分化、增殖及促进肿瘤侵袭、转移等

诸多环节。本课题组之前的研究发现,在正常胃黏膜、胃炎、肠化生和胃癌组织中,MIF 蛋白与 mRNA 的表达随着组织学恶变程度加重而增加,提示 MIF 与胃黏膜恶变密切相关^[8]。

小鼠和人 MIF 蛋白均是较为保守的蛋白质(同源性大于 90%),保留有氧化还原、互变异构酶的活性。利用 X 线晶体学技术发现,MIF 与 D-多巴色素互变异构酶具有较高的同源性,二者在主要氨基酸序列上基本一致,而后者可以将 D-多巴色素转化为 5,6-二羟吲哚。随后又经实验证明,天然 MIF 和重组 MIF 同样具有互变异构酶的活性,可将 D-多巴色素转化为 5,6-二羟吲哚-羧酸^[9]。少数 MIF 互变异构酶活性的小分子抑制物,如 ISO-1^[10]、对乙酰氨基酚的代谢产物 N-乙酰对苯醌亚胺(NAPQI)等均可结合 MIF,并抑制 MIF 的功能。

ISO-1 为选择性 MIF D-多巴色素互变异构酶抑制剂 Isoxazoline 中的一种,能选择性地结合 MIF 的互变异构酶活性位点,抑制该酶活性,从而抑制 MIF 的一些生物学功能。Al-bed 和 Dabideen^[4]在重症败血症动物模型的实验研究中发现,ISO-1 特异性结合 MIF D-多巴色素互变异构酶活性位点,抑制该酶活性并阻止 MIF 结合其他细胞间信号转导分子,从而抑制 MIF,促进炎症反应活性。在实验性变态反应性神经炎小鼠模型中,化学性抑制物 ISO-1 可降低总严重性评分、缩短疾病持续时间,提示 MIF 可能会成为炎症脱髓鞘外周神经紊乱有希望的治疗靶点^[5]。在前列腺癌细胞 DU-145 移植瘤动物模型中,ISO-1 能明显抑制肿瘤细胞增殖,减小肿瘤体积和抑制肿瘤血管生成^[6]。

本研究结果显示,选择性 MIF 酶活性抑制剂 ISO-1 对不同种属大肠癌细胞增殖均有抑制作用。ISO-1 抑制了人大肠癌细胞 Lovo 和 SW116 的增殖,其抑制程度与 ISO-1 呈剂量依赖性。同时,ISO-1 也抑制了鼠大肠癌细胞 CT26 的增殖,其抑制率也随 ISO-1 浓度的增加而增加。更为重要的是,ISO-1 抑制大肠癌细胞 MIF 互变异构酶活性也呈剂量依赖关系,并且与 ISO-1 抑制大肠癌细胞增殖有正相关性。因此作者推测,ISO-1 有可能是通过抑制 MIF 酶活性而抑制大肠癌细胞的增殖。

近年来一些研究显示,IL-8 在 MIF 参与的肿瘤的发生和发展中起重要作用,Benedetti 等^[11]发现,IL-8 能够显著刺激 HDMEC 增生,说明 IL-8 在肿瘤细胞和内皮细胞的生长过程中起着重要作用,与血管内皮生长因子共同作用时可起协同效应,使凋亡细胞的数量减少 50%。本研究发现,ISO-1 能降低 Lovo 和 SW116 细胞 IL-8 mRNA 的表达,因此其也有可能通过降低大肠癌细胞 MIF 相关细胞因子 IL-8 的表达,进而抑制大肠癌细胞增殖,但其明确的机制有待进一步研究。

总之,本实验表明,ISO-1 不仅抑制人大肠癌细胞的增殖,而且也抑制鼠大肠癌细胞的增殖,其可能机制是 ISO-1 抑制了大肠癌细胞 MIF 互变异构酶,这为以 MIF 为靶点开发小分子化合物治疗大肠癌提供了一定的依据。

参考文献

[1] Kamimura A, Kamachi M, Nishihira J, et al. Intracellular distribution of macrophage migration inhibitory factor predicts the prognosis of patients with adenocarcinoma of the lung[J]. Cancer, 2000, 89: 334-341.
 [2] 王红英,孔北华,张友忠.巨噬细胞移动抑制因子在卵巢上皮性肿瘤组织中的表达及其临床意义[J].现代妇产科进展, 2005, 14(3): 190-192. (下转第 5 页)