

分泌型磷脂酶 A₂ 在人皮肤黑素瘤细胞和组织中的表达和分布

张立超,张永佳,顾伟鹰,王慧菁,时扣荣(上海市第七人民医院药剂科,上海 200137)

摘要 目的:比较分泌型磷脂酶 A₂ (sPLA₂)在人恶性黑素瘤 A375细胞、黑素瘤组织与健康人皮肤细胞、组织中的表达和分布。方法:分别采用 ELISA法和 Western Blot法检测细胞上清液和细胞内 sPLA₂ 的表达,免疫组化法考察人皮肤组织中 sPLA₂ 的表达和分布。结果:恶性黑素瘤 A375细胞上清液的 sPLA₂ 浓度为 (177.27 ±13.57) pg/mL,明显高于人表皮 HaCaT细胞的 (21.42 ±5.05) pg/mL ($P < 0.05$)和真皮成纤维细胞的 (2.75 ±1.23) pg/mL ($P < 0.05$);其细胞内 sPLA₂/GAPDH的灰度比值为 7.03 ±1.31,亦明显高于 HaCaT细胞的 1.45 ±0.37 ($P < 0.05$)和成纤维细胞的 0.31 ±0.11 ($P < 0.05$);黑素瘤组织中呈现大量 sPLA₂ 阳性细胞和颗粒,而健康人表皮和真皮组织中则未见该阳性细胞和颗粒。结论:sPLA₂ 在人恶性黑素瘤 A375细胞和黑素瘤组织中较健康皮肤细胞和组织均有较高表达和分布,提示 sPLA₂ 有可能成为皮肤黑素瘤靶向给药的新靶点。

关键词 分泌型磷脂酶 A₂;黑素瘤;表达;分布

中图分类号:R965.1

文献标识码:A

文章编号:1006-0111(2009)06-0417-04

Expression and distribution of secretory phospholipase A₂ in human skin melanoma cells and tissues

ZHANG Li-chao, ZHANG Yong-jia, GU Wei-ying, WANG Hui-jing, SHI Kou-rong (Department of Pharmacy, Shanghai Seventh People's Hospital, Shanghai 200137, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression and distribution of secretory phospholipase A₂ (sPLA₂) in A375 human malignant melanoma cells and melanoma tissues compared with normal human skin cells and tissues. **Methods:** The expression of sPLA₂ in the clear supernatant and intra-cellular of cells was detected by ELISA method and Western Blot method, respectively. Immunohistochemical method was used to investigate the expression and distribution of sPLA₂ in the human skin tissues. **Results:** The levels of sPLA₂ in the clear supernatant of A375 malignant melanoma cells was (177.27 ±13.57) pg/mL, which was significantly higher ($P < 0.05$) than the group of human epidermal HaCaT cells (21.42 ±5.05) pg/mL and the group of dermal fibroblast cells (2.75 ±1.23) pg/mL, respectively. The ratio of sPLA₂/GAPDH in the A375 cells was (7.03 ±1.31), which was also significantly higher ($P < 0.05$) than the group of human epidermal HaCaT cells (1.45 ±0.37) and the group of dermal fibroblast cells (0.31 ±0.11), respectively. Many sPLA₂ positive cells and granules were presented in the tumor tissues. In contrast, positive cells and granules above were unobserved in the normal human epidermal and dermal tissues. **Conclusion:** sPLA₂ is expressed and distributed at higher levels in A375 human malignant melanoma cells and melanoma tissues compared with the normal skin cells and tissues, indicating the sPLA₂ maybe a novel trigger for targeted drug delivery to skin melanoma.

KEY WORDS secretory phospholipase A₂; melanoma; expression; distribution

磷脂酶 A₂ (PLA₂)是花生四烯酸、溶血磷脂等炎性介质生成的限速酶,参与多种急、慢性炎症反应,在炎性病灶区具有高表达和分布^[1]。基于这一原理,国外研究者合成了药物 -sn₂ 磷脂酰胆碱共聚物,设计出了解热镇痛^[2]、抗癫痫^[3]等药物的靶向制剂。比如,水溶性的抗癫痫药物丙戊酸静脉注射

后,很难通过血脑屏障,从而无法进入大脑病变部位。但合成了丙戊酸 -sn₂ 磷脂酰胆碱共聚物后,脂溶性大增,能有效通过血脑屏障;同时,大脑病灶部位高度表达的 PLA₂,能快速将母体药物丙戊酸代谢出来,从而实现大脑靶向治疗^[3]。

5-氟尿嘧啶凝胶是目前抗黑素瘤等皮肤肿瘤的临床主要药物,但是,其实际治疗效果并不佳。这主要是因为 5-氟尿嘧啶水溶性大,无法透过皮肤到达病灶区。国外研究表明,采用 Franz池扩散 36 h,仅有 5%的 5-氟尿嘧啶透过大鼠皮肤^[4]。本课题组针对很

基金项目:国家自然科学基金项目(30472103),浦东新区卫生系统学科带头人项目(PWRd2008-07),浦东新区科委科研项目(PKJ2009Y23)。

作者简介:张立超(1972-),男,副主任药师。Tel: (021) 68660665。

多肿瘤病灶具有 sPLA₂ 的高表达这一最新研究报道^[5],创新设计并合成了一种新型肿瘤靶向前体药物——5-氟尿嘧啶-*sn*₂ 磷脂酰胆碱共聚物,其不仅能利用磷脂特有的纳米脂质囊结构,有效携带药物融合进入黑素瘤病灶区,而且该共聚物有可能被黑素瘤病灶区高表达的 sPLA₂ 代谢,释放出 5-氟尿嘧啶。但查找文献,国内外至今尚未见 sPLA₂ 在黑素瘤细胞和组织中表达的相关报道。为此,本文拟采用 ELISA、Western Blot、免疫组化等方法,以健康皮肤细胞和组织为对照,系统考察了分泌型磷脂酶 A₂ (sPLA₂) 在黑素瘤细胞和组织中的表达与分布。

1 材料与方法

1.1 材料 人恶性黑素瘤细胞株 A375 购自中科院上海细胞生物研究所;人角质形成细胞株 HaCaT 细胞由第二军医大学免疫学教研室提供;人成纤维细胞株由长海医院药学部提供;黑素瘤组织和健康人皮肤组织由长征医院病理科提供;人 sPLA₂ 酶联免疫测定试剂盒购自 USCN LIFE 公司;ECL 发光底物试剂盒和抗小鼠 HRP-IgG 购自上海普飞生物技术有限公司;小鼠来源的抗 sPLA₂ 抗体购自 Cayman 公司;HRP-GAPDH 购自上海康成生物有限公司;DAB 显色试剂盒购自轩昊科技公司;小牛血清购自杭州四季清有限公司;胰蛋白酶购自 AMERSCO 公司;DMEM 购自 HyCone 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与收集 HaCaT 细胞、成纤维细胞和 A375 细胞分别于 30 mm 的培养瓶中,采用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液,37℃、5% CO₂ 培养。待细胞生长至 80%~90% 融合时,用 0.25% 胰蛋白酶消化后接种于六孔板 (HaCaT 细胞和 A375 细胞 1×10⁶ 个细胞/孔,成纤维细胞 1×10⁵ 个细胞/孔),培养体积 2 mL,37℃、5% CO₂ 继续孵育。24 h 后换成含 10% 血清、无酚红的 DMEM 培养液继续培养 24 h,收集细胞上清液和细胞裂解液,-20℃ 保存备用。

1.2.2 酶联免疫法检测细胞上清液中 sPLA₂ 的表达 分别取“1.2.1 所述 HaCaT 细胞、成纤维细胞及 A375 细胞的上清液,严格按照酶联免疫法 (ELISA 法) 试剂盒说明书操作进行。在 96 孔板中依次加入待测样品及标准品,37℃ 孵育 2 h,弃去液体,甩干,加检测液 A 孵育 1 h 后洗净,再加检测液 B 孵育 1 h,洗净拍干,加底物,避光显色 30 min 后加入终止液,在酶联仪 450 nm 波长处,测量各孔的光密度 A 值 (OD 值)。用人 sPLA₂ 溶液作标准曲线,以浓度 C (pg/mL) 对光密度 A 值进行线性回归 (n=8),得回

归方程和相关系数为: $C = 7.047.64A - 1.100.2$ (r = 0.993),线性范围为 0~2 000.00 pg/mL。

1.2.3 Western Blotting 法检测细胞中 sPLA₂ 的表达 配制 8% SDS 聚丙烯酰胺凝胶,分别取“1.2.1”所述 HaCaT 细胞、成纤维细胞及 A375 细胞裂解液,调节蛋白浓度一致,上样体积 10 μL,100V 电泳 60 min 后,转移至 PVDF 膜上,丽春红检验电泳效果。以 10% 脱脂奶粉 TBST 缓冲液室温封闭过夜,加入小鼠来源的抗 sPLA₂ 抗体 (1:1000) 室温孵育 3~4 h, TBST 洗膜 4 次,20 min/次,然后与抗小鼠 HRP-IgG (1:1000) 及 HRP-GAPDH (1:8000) 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 5 次,5 min/次,最后加入化学发光试剂 (ECL) 显色 5 min, X 胶片曝光显影。于 FluorChem TM IS-8900 成像系统进行成像分析,计算 sPLA₂ 和对照 GAPDH 的灰度比值。

1.2.4 免疫组化法检测组织中 sPLA₂ 的表达和分布 将固定好的黑素瘤组织和健康人皮肤组织样品,分别按常规方法制备石蜡切片、脱蜡置水。将切片在 PBS (pH = 7.4) 中冲洗 3 次,5 min/次,于蛋白酶缓冲液中,37℃ 消化 15 min。121℃、20 min 进行抗原修复,自然冷却。将切片在 0.01 mol/L PBS 中洗 3 次,5 min/次,然后将切片放入 3% 的甲醇-双氧水中,室温作用 10 min,阻断内源性过氧化物酶的活性。经 PBS 5 min/次洗涤 3 次后,用 10% 血清室温封闭 30 min。滴加小鼠来源的抗 sPLA₂ 抗体 (1:400) 37℃ 孵育 4 h,经 PBS (5 min, 3 次) 洗涤,再加入抗小鼠 IgG 抗体 (1:1000),室温静置 30~40 min, PBS (5 min, 3 次) 洗涤,滴加 2 滴 DAB 显色 5 min,冲洗 10 min,用苏木精复染 2 min,常规脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,在光学显微镜下观察。

1.2.5 数据统计分析 采用组间 t 检验,进行统计学数据处理。

2 结果

2.1 细胞的形态特征 培养获得的人 HaCaT 细胞、成纤维细胞、恶性黑素瘤 A375 细胞的倒置相差显微镜下形态见图 1。其中,表皮 HaCaT 细胞呈椭圆形或多角形,折光性强,边界清楚,细胞形成多个细胞岛,胞核位于细胞近中央,呈椭圆形或圆形;真皮成纤维细胞可见呈长梭形或不规则三角形,胞质向外伸出 2~3 个长短不齐的突起,细胞在生长时呈放射状火焰状或旋涡状走行;而人恶性黑素瘤 A375 细胞则呈多样性,从多角形、梭形到圆形,巢状或旋涡状排列,细胞形态大小不一。

2.2 sPLA₂ 在细胞上清液中的表达 HaCaT 细胞、

成纤维细胞、恶性黑色素瘤 A375 细胞上清液中 sPLA₂ 的浓度见图 2。结果显示,经过 24 h 的细胞培养,恶性黑色素瘤 A375 细胞上清液的 sPLA₂ 浓度为

(177.27 ± 13.57) pg/mL,明显高于人表皮 HaCaT 细胞的 (21.42 ± 5.05) pg/mL ($P < 0.05$)和真皮成纤维细胞的 (2.75 ± 1.23) pg/mL ($P < 0.05$)。

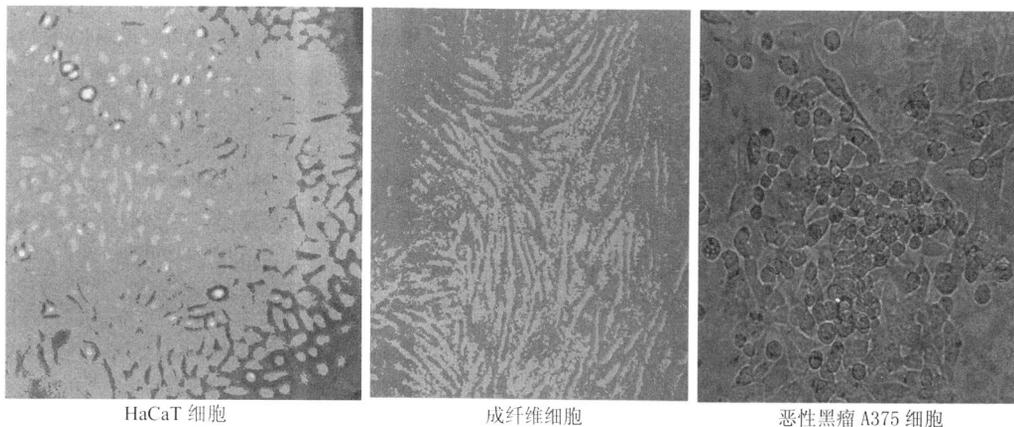


图 1 HaCaT 细胞、成纤维细胞、恶性黑色素瘤 A375 细胞形态图 (×40 倍)

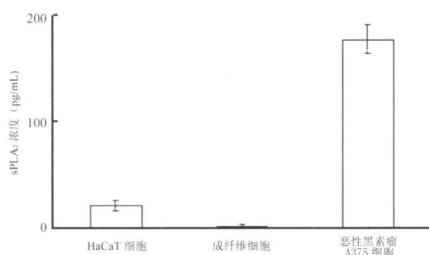


图 2 HaCaT 细胞、成纤维细胞、恶性黑色素瘤 A375 细胞上清液中 sPLA₂ 浓度 (n = 6)

2.3 sPLA₂ 在细胞内的表达 HaCaT 细胞、成纤维细胞、恶性黑色素瘤 A375 细胞内 sPLA₂ 蛋白含量见图 3。图 3A 可见, sPLA₂ 和 GAPDH 条带,分子量分别为 14 KD 和 37 KD; HaCaT 细胞和 A375 细胞均呈现特异性条带,但是 A375 细胞的条带远较 HaCaT 明显;成纤维细胞未见细胞条带。

图 3B 可见,恶性黑色素瘤 A375 细胞内 sPLA₂ / GAPDH 的灰度比值为 (7.03 ± 1.31),亦明显高于 HaCaT 细胞的 (1.45 ± 0.37) ($P < 0.05$)和成纤维细胞的 (0.31 ± 0.11) ($P < 0.05$)。

2.4 sPLA₂ 在人组织中的表达和分布 sPLA₂ 在健康人表皮、真皮和黑素瘤组织中的表达和分布见图 4。结果显示,健康人皮肤的表皮和真皮组织中均未见 sPLA₂ 阳性细胞和阳性颗粒;而黑色素瘤组织中则可见大量的典型 sPLA₂ 阳性信号,为棕红色颗粒,主要位于细胞间质和细胞胞浆内,胞核不着色。

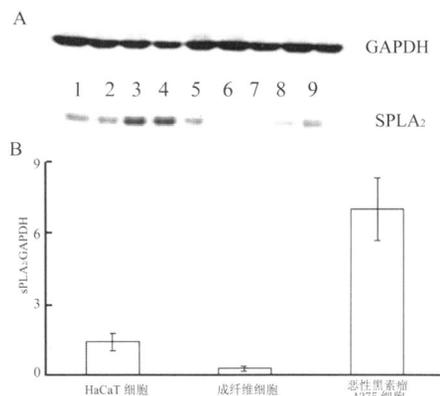


图 3 HaCaT 细胞、成纤维细胞、恶性黑色素瘤 A375 细胞内 sPLA₂ / GAPDH 的灰度比值 (n = 2)

1-HaCaT 细胞; 2-HaCaT 细胞; 3-A375 细胞; 4-A375 细胞; 5-A375 细胞; 6 成纤维细胞; 7 成纤维细胞; 8 成纤维细胞; 9-HaCaT 细胞

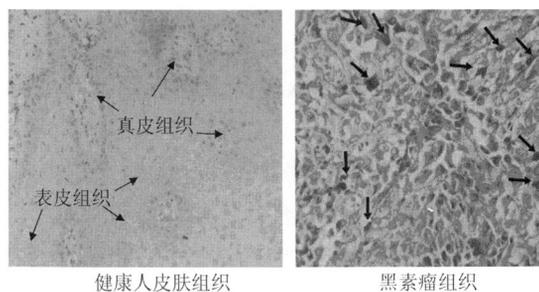


图 4 健康人表皮、真皮及黑素瘤组织中 sPLA₂ 表达和分布

3 讨论

本研究培养获得的人 HaCaT 细胞^[6]、成纤维细胞^[7]、恶性黑色素瘤 A375 细胞^[8]的形态,与国外文献描述相类似,符合进一步开展细胞实验的要求。

ELISA 结果显示,恶性黑色素瘤 A375 细胞上清液中的 sPLA₂ 浓度分别较人表皮 HaCaT 细胞和真皮成纤维细胞高 8.28 和 64.46 倍。这提示,与表皮

HaCaT细胞和真皮成纤维细胞相比,恶性黑色素瘤 A375细胞具有 sPLA₂ 的高分泌。Western Blotting 结果显示,恶性黑色素瘤 A375细胞裂解液中 sPLA₂ / GAPDH的灰度比值,分别是人表皮 HaCaT细胞和成纤维细胞的 4.85和 22.68倍。这提示,与表皮 HaCaT细胞和真皮成纤维细胞相比,恶性黑色素瘤 A375细胞内具有 sPLA₂ 的高表达。

免疫组化结果显示,人黑色素瘤组织的细胞间质和细胞胞浆内,呈现大量的典型 sPLA₂ 阳性信号,而在健康人的表皮和真皮组织中并未见到上述 sPLA₂ 阳性信号。这提示,与健康人表皮和真皮相比,黑色素瘤组织的细胞内外具有 sPLA₂ 的高表达和高分布。

综上所述,从细胞学和组织学水平,证实了黑色素瘤组织的细胞内外,较健康人皮肤细胞和组织,均具有 sPLA₂ 的高表达和高分布。

本课题组前期利用药物 磷脂酰胆碱共聚物的 sn₂ 构型能特异性地被 sPLA₂ 酶解代谢出活性药物的原理,以及基于疗效确切的 5-氟尿嘧啶无法有效到达皮肤黑色素瘤病灶区的临床用药现状,创新地设计并合成出了治疗皮肤黑色素瘤的双重靶向前体药物——5-氟尿嘧啶-sn₂ 磷脂酰胆碱共聚物。而本研究证实了黑色素瘤组织的细胞内外,均较健康人皮肤细胞和组织,具有 sPLA₂ 的高表达和高分布,为研究该前体药物的酶解动力学提供了理论基础。同时,这也进一步提示, sPLA₂ 有可能成为皮肤黑色素瘤靶

向给药的新靶点。

参考文献:

- [1] 杨银治,夏时海. 磷脂酶 A₂ 在炎症反应中的作用 [J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14 (8): 795.
- [2] Michael K, Gerhard KES. Drug-phospholipid conjugates as potential prodrugs: synthesis, characterization, and degradation by pancreatic phospholipase A₂ [J]. Chem Phys Lipid, 2000, 107: 143.
- [3] Dahan A, Duvdevani R, Shapiro I, et al. The oral absorption of phospholipid prodrugs: *in vivo* and *in vitro* mechanistic investigation of trafficking of a lecithin-valproic acid conjugate following oral administration [J]. J Control Rel, 2008, 126: 1.
- [4] El Maghraby GM. Skin delivery of 5-fluorouracil from lutradeformable and standard liposomes *in vitro* [J]. J Pharm Pharmacol, 2001, 53: 1069.
- [5] Jensen SS, Thomas LA, Davidsen J, et al. Secretory phospholipase A₂ as a tumor-specific trigger for targeted delivery of a novel class of liposomal prodrug anticancer etherlipids [J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3 (11): 1451.
- [6] Kim S, Kim Y, Lee Y, et al. Cholesterol inhibits MMP-9 expression in human epidermal keratinocytes and HaCaT cells [J]. FEBS Lett, 2007, 581 (20): 3869.
- [7] Cario-Andrie M, Pain C, Gauthier Y, et al. *In vivo* and *in vitro* evidence of dermal fibroblasts influence on human epidermal pigmentation [J]. Pigment Cell Res, 2006, 19 (5): 434.
- [8] Papoutsis M, Othman-Hassan K, Christ B, et al. Development of an arterial tree in C6 gliomas but not in A375 melanomas [J]. Histochem Cell Biol, 2002, 118 (3): 241.

收稿日期: 2009-10-25

(上接第 416页)

Bcl-2基因表达,下调 Bax基因表达起到抑制细胞凋亡作用的。

参考文献:

- [1] Merfort I, Heilmann J, Weiss M, et al. Radical scavenger activity of three flavonoid metabolites studied by inhibition of chemiluminescence in human PMNs [J]. Planta Med, 1996, 62 (4): 289.
- [2] 曾繁典,谢笔钩,张晓辉,等. 原花青素的药理研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2002, 18 (1): 9.
- [3] Mewer LD, Kelly BL, Home MK, et al. Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures [J]. Biochem Pharmacol, 2005, 69 (2): 339.
- [4] Tang XQ, Feng JQ, Chen J, et al. Protection of oxidative preconditioning against apoptosis induced by H₂O₂ in PC12 cells: mechanisms via MMP, ROS, and Bcl-2 [J]. Brain Res, 2005, 1057 (1-2): 57.

- [5] 王春菊,许沛然. 血管性痴呆的基础性研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2008, 4 (10): 142.
- [6] Mak II, Boehme P, Weglicki WB. antioxidant effect Antioxidant effects of calcium channel blockers against free radical injury in endothelial cells [J]. Circ Res, 1992, 70: 1099.
- [7] Hirose M, Takatori M, Kuroda Y, et al. Effect of synthetic cell penetrating peptides on TrkA activity in PC12 cells [J]. J Pharmacol Sci, 2008, 106 (1): 107.
- [8] Xu W, Zha RP, Wang WY, et al. Effects of scutellarin on PKC in PC12 cell injury induced by oxygen and glucose deprivation [J]. Acta Pharmacol Sin (中国药理学报), 2007, 28 (10): 1573.
- [9] Won SI, Kim DY, Gwag BJ. Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal deaths [J]. J Biochem Mol Biol. 2002; 35 (1): 67.
- [10] 李桂兰,于哩哩,白丽亚. 调控基因 Bcl-2, Bax在脑缺血再灌注损伤细胞凋亡的表达的实验研究 [J]. 基础研究, 2007, 4 (21): 118.

收稿日期: 2009-07-08