

## 罗格列酮联用维甲酸在体内对直肠癌 HCT-15 细胞 COX-2、MMP-7、TIMP-1 表达的影响

王猛 苗瑞政 徐涛 郭仁乐 姜言明

山东大学附属省立医院 胃肠外科 (山东 济南 250021)

**【摘要】目的:** 研究罗格列酮(ROS)联用全反式维甲酸(ATRA)对直肠癌裸鼠移植瘤 HCT-15 细胞 COX-2、MMP-7、TIMP-1 表达的影响,并初步探讨其抗肿瘤的机制。**方法:** 建立直肠癌裸鼠移植瘤模型,荷瘤裸鼠随机分为未用药组、ROS 组(ROS 25 mg·kg<sup>-1</sup>·2d<sup>-1</sup>)、ATRA 组(ATRA 11mg·kg<sup>-1</sup>·2d<sup>-1</sup>)、ATRA 联用 ROS 组(ROS 25 mg+ ATRA 11 mg)·kg<sup>-1</sup>·2d<sup>-1</sup>。灌胃 40 d 后,观察各组裸鼠移植瘤体积变化;利用免疫组化 SP 法观察移植瘤细胞中 COX-2、MMP-7、TIMP-1 的表达。**结果:** 1)用药 3 组瘤体体积与未用药组比较均缩小,差别有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),ATRA 联用 ROS 组的荷瘤体积缩小更明显 ( $P < 0.05$ );ROS 组与 ATRA 组瘤体体积相当 ( $P > 0.05$ );2)用药 3 组移植瘤细胞内 COX-2、MMP-7、TIMP-1 的表达与未用药组比较均降低 ( $P < 0.05$ ),且 ROS 组与 ATRA 组移植瘤细胞内 COX-2、MMP-7、TIMP-1 下降更明显 ( $P < 0.01$ ),ROS 组与 ATRA 组移植瘤细胞内三者的表达相当 ( $P > 0.05$ )。**结论:** ROS 与 ATRA 均有一定的抑瘤作用,ROS 与 ATRA 联用可发挥协同抗肿瘤的作用,可能是通过抑制移植瘤细胞内 COX-2、MMP-7、TIMP-1 的表达而实现。

**【关键词】** 罗格列酮·维甲酸·环氧合酶-2·基质金属蛋白酶·组织型基质金属蛋白酶抑制物

**【中图分类号】** R735.3\*7

**【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1009-9905.2011.07.001

**【文章编号】** 1009-9905(2011)07-0505-04

### In vivo effect of rosiglitazone combined with all-trans retinoic acid on the expression of COX-2、MMP-7、TIMP-1 Of rectal cancer HCT-15 cells

WANG Meng, MIAO Rui-zheng, XU Tao, GUO Ren-le, JIANG Yan-ming

Department of Gastrointestinal Surgery, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University(Jinan 250021, China)

**【ABSTRACT】Objective:** To investigate the effect of rosiglitazone(ROS) combined with all-trans retinoic acid (ATRA) on the expression of COX-2、MMP-7、TIMP-1 of transplanted rectal cancer in nude mice, and to explore the mechanism of anti-carcinoma preliminarily. **Methods:** Established

**【作者简介】** 王猛(1983-01-),男,山东淄博人,硕士研究生,研究方向:胃肠外科。

Tel:15288864091 E-mail:wangmeng.1983.2008@163.com

**【通讯作者】** 苗瑞政(1965-06-),男,山东莱芜人,博士,副主任医师,研究方向:胃肠道肿瘤的诊断及治疗。

Tel:15168886538 E-mail:miaoruizheng123@sina.com

the model of transplanted tumor in nude mice by inoculating human rectal cancer cell line HCT-15 into the right back of nude mice subcutaneously. The cancer-bearing nude mice were divided randomly into 4 groups: group 1 with no drugs, group 2 with ROS (ROS 25 mg)·kg<sup>-1</sup>·2d<sup>-1</sup>, group 3 with ATRA (ATRA 11 mg·kg<sup>-1</sup>·2d<sup>-1</sup>), group 4 ROS combined with ATRA [(ROS 25 mg+ ATRA 11 mg)·kg<sup>-1</sup>·2d<sup>-1</sup>]. After treated for 40 days, the volume change of tumor were observed. The expression of COX-2, MMP-7, TIMP-1 in transplanted tumor cells were detected by immunohistochemical. **Results:** 1) The volumes of tumor were significantly decreased in group 2, 3, 4 compared with group 1 (P<0.05). The volume of tumor in group 4 was significantly decreased compared with group 2, 3 (P<0.05). The volume of tumor in group 2 was similar to group 3 (P>0.05). 2) The expression of COX-2, MMP-7, TIMP-1 in transplanted tumor were significantly decreased in group 2, 3, 4 compared with group 1 (P<0.05). The expression of COX-2, MMP-7, TIMP-1 in group 4 were significantly decreased compared with group 2, 3 (P<0.01). The expression of these three in group 2 and group 3 were quite (P>0.05). **Conclusion:** ROS and ATRA can inhibit the growth of tumor and ROS combined with ATRA can further inhibit the growth of tumor. The mechanism maybe that ROS and ATRA can inhibit expression of COX-2, MMP-7, TIMP-1.

**[KEY WORDS]** Rosiglitazone·All trans retinoic acid·Cyclooxygenase·Matrix metalloproteinase·Tissue inhibitor of metalloproteinase

直肠癌是消化系统中常见的恶性肿瘤之一,其发病率有明显增长的趋势。目前其主要治疗方式为手术切除病灶,化疗也是重要的治疗方法。罗格列酮(rosiglitazone, ROS)为过氧化物酶体增殖物活化受体 $\gamma$ (peroxisome proliferators-activated receptors $\gamma$ , PPAR $\gamma$ )合成配体,当 ROS 与 PPAR $\gamma$  结合后可激活 PPAR $\gamma$ ,从而发挥其抑制增殖、诱导细胞凋亡及分化、抑制血管形成的作用。全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)对多种肿瘤细胞有诱导分化和促进凋亡的作用,ATRA 的生物学活性是通过细胞核内的维甲酸受体起作用的。维甲酸对肿瘤细胞有抑制生长、促进凋亡及诱导分化的作用<sup>[1]</sup>。ROS 与 ATRA 联合应用后,可使 ROS 对肿瘤细胞集落生成的抑制作用明显加强,增强对肿瘤细胞的生长抑制作用<sup>[2]</sup>。目前,针对恶性肿瘤的靶向药物联合应用,是治疗及预防肿瘤的研究热点。本研究通过探讨 ROS 与 ATRA 联合应用对直肠癌裸鼠移植瘤细胞 COX-2、MMP-7、TIMP-1 表达的影响,观察单独用药与联合用药之间的差距,并初步探讨其可能机制。

## 1 材料和方法

1.1 材料与试剂 人结直肠癌细胞株 HCT-15 购自中科院上海细胞库。ROS 与 ATRA 购自北京高盟燕山科技有限公司(纯度>99%),分别用 DMSO 配制成 1 mmol/L 母液,-20℃冰箱保存,临用时用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液稀释至所需浓度。COX-2、MMP-7、TIMP-1 兔抗人多克隆抗体购

自北京博奥森生物技术有限公司,SP 染色试剂盒、DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 细胞培养与收集 HCT-15 细胞为贴壁生长细胞,培养于含 10%胎牛血清、100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 培养基中,100 U/mL 青霉素,置于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养传代。取对数生长期的细胞用于实验,收集细胞,制成单细胞悬液,锥虫蓝染色计数,并确认活细胞在 95%以上,按每只裸鼠接种 0.2 mL 单细胞悬液计算,平均每只裸鼠可接种  $1 \times 10^7$  个细胞以上。

1.3 直肠癌移植瘤模型的建立 雄性裸小鼠 60 只,3~4 周龄,在相同条件下饲养 1 周。接种前体质量为 12.5~15.5 g。用 1 mL 无菌注射器在无菌条件下注射 0.2 mL 单细胞悬液于小鼠右侧背部皮下。

1.4 分组及治疗 接种 10 d 后观察裸鼠的成瘤情况(移植瘤长至大小约 100 mm<sup>3</sup> 时看做接种成功),共有 55 只裸鼠成瘤,灌胃前将成瘤裸鼠随机分为 4 组,分别为未用药组(生理盐水 0.2 mL·2 d<sup>-1</sup>灌胃);ROS 组 (ROS 25 mg·kg<sup>-1</sup>·2 d<sup>-1</sup>灌胃);ATRA 组 (ATRA 11 mg·kg<sup>-1</sup>·2 d<sup>-1</sup>灌胃);ATRA 联合 ROS 组 [(ROS 25 mg+ ATRA 11 mg)·kg<sup>-1</sup>·2 d<sup>-1</sup>灌胃]。

1.5 测量肿瘤大小与计算肿瘤生长抑制率 灌胃 40 d 后处死各组裸鼠,完整取出肿瘤,测量肿瘤的长径(a)与短径(b),按公式  $V = ab^2/2$  计算肿瘤体积。抑瘤率=(对照组 V-实验组 V)/对照组 V×100%。

1.6 免疫组织化学 SP 法检测移植瘤中 COX-2、MMP-7、TIMP-1 的表达 将取出的移植瘤在 4%甲醛中固定 24 h;石蜡包埋;切片;常规脱蜡至水;高温抗原修复;3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 去离子水解育 5~10 min,PBS 冲洗,3 min×3 次;滴加试剂 A 室温孵育 10~15 min,倾去;滴加适当比例稀释的一抗 4 °C 过夜,PBS 冲洗,3 min×3 次;滴加试剂 B,37 °C 孵育 10~15 min,PBS 冲洗,3 min×3 次;滴加试剂 C,37 °C 孵育 10~15 min,PBS 冲洗,3 min×3 次;DAB 显色;自来水冲洗;苏木精复染,脱水,透明;中性树脂胶封片。细胞质呈黄色或棕黄色颗粒为阳性染色。高倍(×400)显微镜下观察 COX-2、MMP-7、TIMP-1 表达水平,结果应用高清晰度彩色病理图象分析系统分析(Nikon TE2000-U)。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件包对实验数据进行分析,数据应用  $\bar{x} \pm s$  表示,2 组间比较用 *t* 检验,多组间比较用单因素方差分析, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 移植瘤体积变化 本实验共有 60 只裸鼠,其中 55 只裸鼠成瘤,9 只在灌胃时死亡,46 只裸鼠完成实验,未用药组有 10 只、ROS 组有 12 只、ATRA 组有 11 只、ATRA 联用 ROS 组有 13 只。荷瘤未用药组瘤体体积最大,其次是 ROS 组与 ATRA 组,ATRA 联用 ROS 组瘤体体积较未用药组明显缩小( $P < 0.05$ ,图 1,表 1)。

2.2 免疫组织化学法检测各组移植瘤中 COX-2、MMP-7、TIMP-1 蛋白量的表达变化 各组移植瘤



图 1 移植瘤体积的变化

a: 未用药组; b: ROS 组; c: ATRA 组; d: ROS + ATRA 组

表 1 罗格列酮联用维甲酸对裸鼠移植瘤体积及抑瘤率的影响

组别	瘤体体积(mm <sup>3</sup> )	抑瘤率(%)
荷瘤未用药组	3 637.41±1 145.36	0
ROS 组	2 632.60±522.70	27.62
ATRA 组	2 646.38±372.27	27.25
ROS+ATRA 组	475.21±524.01 <sup>a</sup>	86.94

注:<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,与其他各组之间比较;<sup>b</sup> $P < 0.05$ ,与 ROS 组和 ATRA 组比较

中 3 种蛋白均有表达,主要为细胞质染色,其中以未用药组表达最强(图 2A、B,表 2),ATRA 联用 ROS 组表达最弱(图 2D、F,见表 2),ROS 组与 ATRA 组表达介于二者之间(图 2C、E)。

表 2 COX-2、MMP-7、TIMP-1 3 种蛋白

在各组裸鼠中的阳性表达( $\bar{x} \pm s, \%$ )

观察指标	ROS 组	ATRA 组	ROS 联用 ATRA 组	未用药组
COX-2	50.02±3.58 <sup>a</sup>	49.88±3.27 <sup>a</sup>	20.35±2.21 <sup>b</sup>	70.59±6.89
MMP-7	54.58±3.10 <sup>a</sup>	49.65±2.18 <sup>a</sup>	22.66±1.38 <sup>b</sup>	76.67±7.10
TIMP-1	46.37±2.67 <sup>a</sup>	51.67±3.89 <sup>a</sup>	17.23±1.56 <sup>b</sup>	69.37±4.75

注:<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ,与对照组比较

## 3 讨论

PPAR $\gamma$  属于核激素受体,是由配体激活的转录因子的一个亚型,在脂肪代谢和糖代谢中起重要的

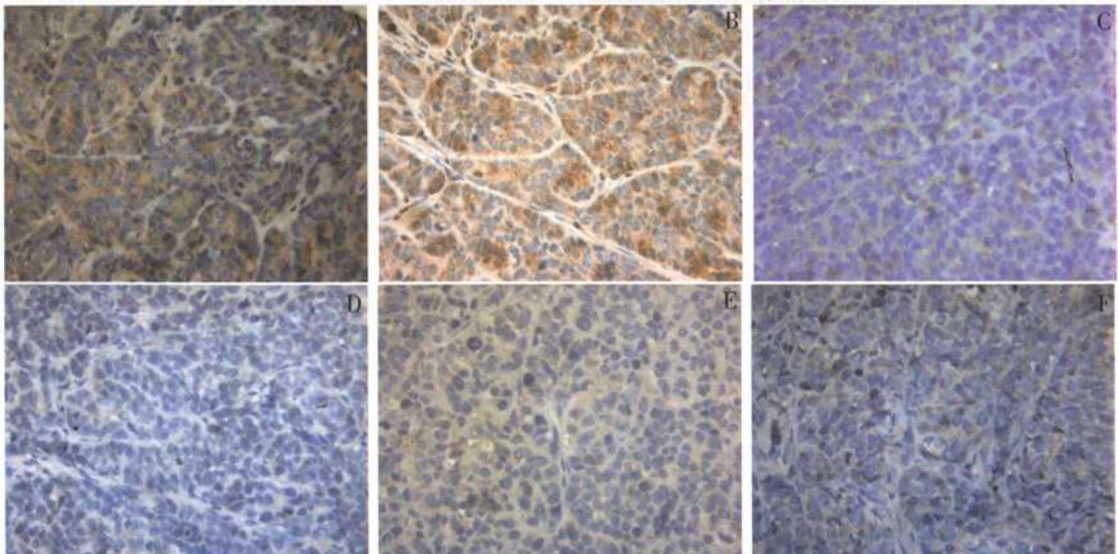


图 2 各组裸鼠移植瘤内 COX-2、MMP-7、TIMP-1 蛋白量的表达(SP,×400)

A: 未用药组 TIMP-1 蛋白表达; B: 未用药组 MMP-7 蛋白表达; C: ROS 组 COX-2 蛋白表达; D: ATRA 联用 ROS 组 TIMP-1 蛋白表达; E: ATRA 组 COX-2 蛋白表达; F: ATRA 联用 ROS 组 MMP-7 蛋白表达

调节作用<sup>[3]</sup>。研究证实, PPAR $\gamma$ 在大肠癌组织及癌细胞株中呈现高表达<sup>[4]</sup>。PPAR $\gamma$ 在抑制增殖、抑制肿瘤血管形成、诱导细胞分化及肿瘤细胞的分化和凋亡中起到非常重要的作用。PPAR可与核激素受体超家族的另一成员维甲酸X受体结合形成异二聚体,再结合于特定的DNA序列(过氧化物酶体增值反应元件),从而调控靶基因的转录<sup>[5]</sup>。

COX-2在肿瘤的发展和演进过程中发挥重要作用,COX-2过度表达可促进细胞增殖及肿瘤生长,抑制细胞凋亡。Kasper等<sup>[6]</sup>应用COX-2抑制剂美洛昔康后,结直肠癌与其肝转移灶中COX-2的表达减少,并且促进了细胞的凋亡。MMP-7是基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)家族中分子最小的一员,也是唯一的有上皮肿瘤特异性表达的酶,与肿瘤的侵袭转移有关,可通过各种机制促进肿瘤的侵袭、生长和转移,比如降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM),诱导和促进肿瘤血管生成等<sup>[7]</sup>。Horndler等<sup>[8]</sup>研究发现, MMP-7与pIGF-1R是应用EGFR抑制剂后,预测不良预后的一个新指标。除了其蛋白酶抑制作用, TIMPs在控制细胞生长、细胞凋亡、血管形成和基因不稳定性等细胞信号传导方面也起作用,血清中TIMP-1的高表达与Dukes分期、淋巴结转移及不良预后有明显的联系,并且低分化肿瘤患者血清中TIMP-1的水平明显高于高、中分化肿瘤患者<sup>[9-10]</sup>。

已有体外研究表明, ROS与ATRA联用后,可抑制HCT-15细胞内COX-2、MMP-7、TIMP-1的表达,从而发挥联合抗肿瘤的作用<sup>[11]</sup>。本研究通过体内细胞试验发现:1)未用药组瘤体的体积最大。单独应用ROS或ATRA后,移植瘤的体积均有缩小且ROS与ATRA作用相当,但联合用药后移植瘤体积缩小更明显。2)COX-2、MMP-7、TIMP-1三者在未用药组中高表达,阳性率分别为70.59%、76.67%、69.37%;用药后移植瘤细胞内COX-2、MMP-7、TIMP-1的表达均有降低,并且ROS联用ATRA降低COX-2、MMP-7、TIMP-1表达的作用更明显,但单独用药作用相当。这表明在体内环境下ROS或ATRA可以抑制肿瘤细胞的生长和增殖,降低肿瘤细胞内与生长、增殖有关的基因COX-2、MMP-7、TIMP-1的表达;二者联合应用后COX-2、MMP-7、TIMP-1的表达明显降低,明显抑制了肿瘤的生长、增殖和转移,比单独用药效果更显著;ROS与ATRA抑制肿瘤细胞的生长、转移的机制是通过下调肿瘤细胞内与生长、增殖、浸润相关蛋白(COX-2、MMP-7、TIMP-1)的基因表达来实现的。

通过体内细胞试验,本研究证实ROS与ATRA对人结直肠癌细胞株HCT-15的抑制作用,以及联合用药的优越性,推测其可能机制是通过抑制细胞内COX-2、MMP-7、TIMP-1表达而发挥作用。本研究结果表明在体内环境下,联合应用ROS与ATRA更合理,但其使用的有效浓度仍值得进一步的研究。

## 参 考 文 献

- [1] Coelho SM, Vaisman M, Carvalho DP. Tumour re-differentiation effect of retinoic acid: a novel therapeutic approach for advanced thyroid cancer[J]. *Curr Pharm Des*, 2005, 11(19):2525-2531.
- [2] 季宇彬, 蔡林, 陈晓光. ROZ与ATRA联合应用对MCF27细胞诱导作用[J]. *哈尔滨商业大学学报(自然科学版)*, 2008, 24(1):1-6.
- [3] Berthiaume M, Sell H, Lalonde J, et al. Actions of PPAR gamma agonism on adipose tissue remodeling, insulin sensitivity, and ipemia in absence of glucocorticoids [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004, 287(5):1116-1123.
- [4] Osawa E, Nakajima A, Wada K, et al. Peroxisome proliferator activated receptor gamma ligands suppress colon carcinogenesis induced by azoxymethane in mice[J]. *Gastroenterology*, 2003, 124:361-367.
- [5] Fauconnet S, Lascombel I, Chabannes E, et al. Differential regulation of vascular endothelial growth factor expression by peroxisome proliferator-activated receptors in bladder cancer cells [J]. *J Boil Chem*, 2002, 277:23534-23543.
- [6] Kasper HV, Konze E, Dienes HP, et al. COX-2 Expression and Effects of COX-2 Inhibition in Colorectal Carcinomas and their Liver Metastases[J]. *Anticancer Research*, 2010, 30(6):2017-2024.
- [7] 饶雪峰, 刘伟中, 廖传文, 等. MMP-7在肝细胞癌组织中的表达及临床意义[J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(28):2903-2907.
- [8] Horndler C, Gallego R, Garcia-Albeniz X, et al. Co-expression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) and phosphorylated insulin growth factor receptor1 (pIGF-1R) correlates with poor prognosis in patients with wild-type KRAS treated with cetuximab or panitumumab[J]. *Cancer Bio Ther*, 2011, 11(2):177-183.
- [9] Sorensen NM, Sorensen IV, Wiirtz SO, et al. Biology and potential clinical implications of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in colorectal cancer treatment [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2008, 43(7):774-786.
- [10] Giaginis C, Nikiteas N, Margeli A, et al. Serum tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 (TIMP-1 and TIMP-2) levels in colorectal cancer patients: associations with clinicopathological variables and patients survival[J]. *Int J Biol Markers*, 2009, 24(4):245-252.
- [11] 郭仁乐, 苗瑞政, 徐涛, 等. 联合应用罗格列酮与维甲酸对HCT-15细胞增殖和凋亡的影响[J]. *中国现代普通外科进展*, 2010, 13(6):421-429.

(收稿日期:2011-04-13)

(本文编辑:陈敏)