

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.05.006

人巨噬细胞金属弹性蛋白酶对人胃癌细胞 COX-2 和 VEGF 体内表达的影响

刘 衡¹, 石 海¹, 胡乃中¹, 鲍德明², 王黎明², 许建明¹**Effects of Human Macrophage Metalloelastase on Expression of COX-2 and VEGF *in vivo***LIU Heng¹, SHI Hai¹, HU Nai-zhong¹, BAO De-ming², WANG Li-ming², XU Jian-ming¹

1. Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China; 2. Department of Gastroenterology, The Second People's Hospital of Hefei

Corresponding Author: HU Nai-zhong, E-mail: hnz1956@msn.com

Abstract: Objective To study the effects of human macrophage metalloelastase (HME) on the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) *in vivo*. **Methods** 24 nude mice receiving subcutaneous injections of human gastric cancer SCG-7901 cells were randomly divided into four groups, which were treated with HME doses of 0.2 mg/kg, 0.4 mg/kg and 0.8 mg/kg, meanwhile control group was treated by equivalent normal saline. The tumors were removed after six weeks treatment, the weights and volume of which were evaluated as well as the weight of the mice. The expression of COX-2 and VEGF was detected by immunohistochemical SP method and Western Blot assay. Microvessel density (MVD) was analyzed in CD34-stained vascular endothelial cell. **Results** The growth of xenografts were significantly inhibited by each dose groups of HME ($P < 0.05$). The depressant effect was most powerful in HME 0.8 mg/kg dose group among intervention groups. HME depressed the expression of COX-2, VEGF and MVD obviously in xenografts ($P < 0.05$). **Conclusion** The antitumor effect of HME in nude mice may attribute to the anti-angiogenesis in dose dependent manner.

Key words: Human macrophage metalloelastase; Gastric cancer; Nude mice; Cyclooxygenase-2; Vascular endothelial growth factor

摘要:目的 探讨体内人巨噬细胞金属弹性蛋白酶(HME)对人胃癌细胞环氧合酶-2和血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。**方法** 选取BALB/c nu/nu裸鼠24只构建人胃癌细胞SCG-7901裸鼠皮下移植模型,随机分为对照组和HME干预组,其中HME干预剂量分别为0.2 mg/kg、0.4 mg/kg、0.8 mg/kg,对照组给予等体积0.9%氯化钠。干预6周后处死动物,测量鼠重、瘤重、肿瘤大小,计算抑瘤率;采用Western blot和免疫组织化学方法检测移植瘤组织中COX-2和VEGF的表达;CD34标记血管内皮细胞计数肿瘤微血管密度(MVD)。**结果** 与对照组相比各剂量组HME均能明显抑制皮下移植瘤生长($P < 0.05$);且在HME各剂量组中0.8 mg/kg组抑瘤作用最明显。HME能明显抑制移植瘤组织中COX-2和VEGF的表达,并明显降低肿瘤MVD值($P < 0.05$)。**结论** HME通过抑制肿瘤微血管形成来抑制肿瘤的生长;HME抑瘤作用具有剂量依赖性。

关键词:人巨噬细胞金属弹性蛋白酶;胃癌;裸鼠;环氧合酶-2;血管内皮生长因子

中图分类号:R735.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8578(2010)05-0511-04

0 引言

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一,转移和复发是胃癌死亡的主要原因^[1]。人巨噬细胞金属弹性蛋

白酶(human macrophage metalloelastase, HME)是基质金属蛋白酶家族(MMPs)的一员,它主要由人巨噬细胞分泌产生。HME一方面可以降解细胞外基质,渗透基底膜、侵袭正常和疾病组织;同时也可分解纤维蛋白原产生血管抑素和其他产物,从而抑制肿瘤生长和侵袭,因此关于HME在肿瘤中的生物学作用一直存在争议^[2-3]。我们在体外实验的基础上^[4]通过HME蛋白对SCG-7901胃癌细胞进行体内干预,进一步研究HME对胃癌的生物学作用以及可能的作用途径。

收稿日期:2008-11-26;修回日期:2009-02-06

基金项目:安徽省科技厅重点科研资助项目(05021016)

作者单位:1. 230022 合肥,安徽医科大学第一附属医院
消化内科;2. 合肥市第二人民医院消化内科

通信作者:胡乃中, E-mail: hnz1956@msn.com

作者简介:刘衡(1982-),男,硕士,主要从事胃肠道肿瘤基础与临床研究

1 材料和方法

1.1 材料

24 只 BALB/c nu/nu 裸鼠由中国科学院上海实验动物中心提供(许可证号:SCXK 沪 2007-0005),雌性,4~6 周龄,体重 18~20 g,SPF 级动物实验室条件下饲养。人胃腺癌 SCG-7901 细胞株由中国科学院上海细胞所提供。HME 蛋白由本课题组前期实验提供^[5]。RPMI-1640 培养液(Gibco 公司);小牛血清(杭州四季青公司);兔抗人 COX-2 多克隆抗体(Abzoom 公司);兔抗人 VEGF 多克隆抗体(Santa Cruz 公司);兔抗人 CD34 抗体(福州迈新公司);辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(北京中杉金桥公司);SP 法免疫组化试剂盒(北京中杉金桥公司)。

1.2 方法

1.2.1 造模分组及干预方案 SCG-7901 细胞于 37℃、饱和湿度、5% CO₂ 培养,培养液为 RPMI-1640 含 100 ml/L 小牛血清、100 ku/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素。2~3 d 换液 1 次。于对数生长期,0.25%胰酶消化,调整细胞悬液浓度为 2×10^7 /ml,经锥虫蓝测定细胞活力在 95%;分别取 0.2 ml 细胞悬液接种于每只裸鼠右侧前腋下皮内。皮下肿瘤结节直径达到 5~10 mm 为成瘤标准。裸鼠成瘤后随机分为 4 组:对照组、HME 干预组(干预浓度分别为 0.2、0.4 和 0.8 mg/kg),每组 6 只,干预组每 2 天瘤体内注射 1 次,对照组注射相同体积 0.9%氯化钠溶液。造模 6 周末处死动物,结束实验。

1.2.2 观察指标及测量方法 (1)每天观察裸鼠体重饮食、行为、状态、大小便及死亡等情况。(2)每 2 天用游标卡尺测量肿瘤长短径,并按如下公式计算肿瘤体积: $V(\text{mm}^3) = a \times b^2/2$ 。用药 6 周后称体重,颈椎脱臼法处死裸鼠,小心剥离肿瘤组织,测量大小并称重,10%中性福尔马林固定 24 h,石蜡包埋行连续切片。抑瘤率(%) = (对照组平均瘤重 - 实验组平均瘤重)/对照组平均瘤重 $\times 100\%$ 。

1.2.3 Western blot 检测 COX-2 和 VEGF 的表达 取 100 mg 移植瘤组织 PBS 洗涤后,于匀浆器中加入 0.4 ml RIPA 裂解液冰上匀浆 30 min,4℃,12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液。样品经 SDS-PAGE 电泳后,电转移至 PDVF 膜,用含 5%脱脂奶粉 TBS 封闭液室温封闭 1 h,分别以稀释度为 1:500 兔抗人 COX-2 多克隆抗体和 1:200 兔抗人 VEGF 多克隆抗体 4℃过夜。次日 TBS 洗膜后,加入稀释度为 1:5 000 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG,室温轻摇 1 h 后再次洗膜,用化学发光法显色 3~5 min,暗室压片曝光、显影。

1.2.4 免疫组织化学方法检测 COX-2 和 VEGF

的表达

石蜡切片脱蜡至水,3% H₂O₂ 室温孵育 10 min,0.01 mol/L 枸橼酸钠缓冲溶液(pH 6.0)抗原修复 20 min,5%羊血清 37℃ 15 min,分别滴加稀释度为 1:200 兔抗人 COX-2 多克隆抗体和 1:150 兔抗人 VEGF 多克隆抗体 4℃过夜。次日滴加生物素标记的山羊抗兔 IgG 37℃ 15 min,0.1 mol/L PBS 冲洗,滴加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素 37℃ 20 min,再用 0.1 mol/L PBS 冲洗,DAB 显色 3~5 min,蒸馏水冲洗,苏木精复染,脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。

COX-2 以胞质内和(或)胞核周围出现棕黄色颗粒者为阳性,VEGF 以胞质内出现棕黄色或褐色颗粒者为阳性。应用 Image-pro plus 6.0 免疫组化彩色图像分析系统对免疫组化结果进行定量分析,以图片中的一个阳性点(单个细胞或小腺腔、细胞团)为基础,分析、测量整幅照片的阳性点的个数、面积、积分吸光度值(IOD)等参数。

1.2.5 肿瘤微血管密度(MVD)的检测

微血管密度(MVD)计数参照 Weidner 方法进行,先在低倍镜下($\times 40$)扫描整张切片挑选微血管分布最高密度区域,即“热区”,再在高倍镜下($\times 200$)计数 5 个视野中被染成棕黄色的血管数目,取平均值作为微血管密度。每个与临近微血管明显分离的阳性染色血管内皮细胞或细胞簇(无论有无官腔形成)都被视为微血管。

1.3 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 15.0 软件进行统计学分析,多样本均数比较采用方差分析进行检验,两组间比较采用 SNK 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

实验过程中观察到各干预组动物对 HME 蛋白耐受性良好,一般生活状态未受明显影响,可以自由活动及进食,但对照组动物在实验后期出现活动状态差、进食欠佳、消瘦等症状。

2.2 移植瘤生长情况

接种后 10 天左右成瘤率 100%。对照组和 HME 干预组肿瘤体积分别为 $(110.7 \pm 17.58) \text{mm}^3$ 和 $(111.55 \pm 23.09) \text{mm}^3$,差异无统计学意义($P > 0.05$)。用药后第 10 天,HME 0.8 mg/kg 组裸鼠皮下移植瘤生长开始受抑制 $(402.18 \pm 118.33) \text{mm}^3$ vs. $(147.07 \pm 28.67) \text{mm}^3$ ($P < 0.05$),而 0.4 mg/kg 和 0.2 mg/kg 组裸鼠皮下移植瘤生长也分别在第

12 天和第 16 天开始受抑制。图 1 可见, 对照组肿瘤呈递增性生长, 而各 HME 干预组生长曲线较为低平, 肿瘤生长受抑制, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), HME 对肿瘤的抑制作用随着剂量的增加而增强。HME 各干预组鼠重与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

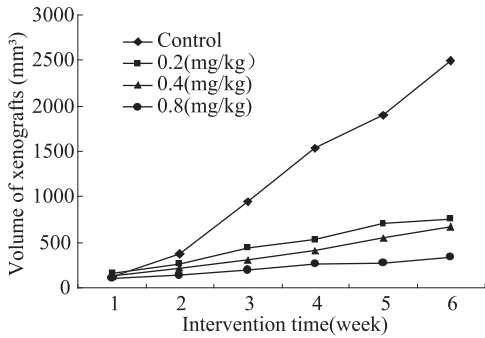


图 1 HME 各干预组及对照组移植瘤生长曲线

Figure 1 The growth curves of xenograft in each groups

2.3 Western blot 检测 COX-2、VEGF 的表达

COX-2 和 VEGF 在移植瘤组织中分别出现 72 kD 和 42 kD 的条带, 特异性较好, 见图 2。各 HME 干预组中 COX-2、VEGF 表达水平与对照组相比均明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3。0.8 mg/kg 组 COX-2、VEGF 表达水平较 0.4 和 0.2 mg/kg 组 (P 均 < 0.05) 也明显降低。

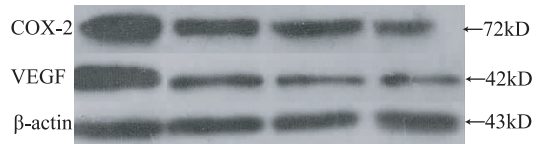


图 2 Western blot 检测移植瘤组织中 COX-2 和 VEGF 的表达

Figure 2 Western blot method detected expression of COX-2 and VEGF in xenografts

2.4 免疫组织化学方法检测 COX-2、VEGF 的表达结果

对照组和 HME 干预组的移植瘤中 COX-2、VEGF 均有表达, 见图 3。与对照组相比, 各 HME 干预组中 COX-2、VEGF 的表达均明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。HME 各干预剂量组间比较发现, 0.8 mg/kg 组 COX-2、VEGF 表达量均明显低于 0.4 mg/kg 组 ($P < 0.05$) 和 0.2 mg/kg 组 ($P < 0.05$), 但 0.4 和 0.2 mg/kg 组间 COX-2 表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.5 免疫组化检测肿瘤微血管密度(MVD)

CD34 相关抗原主要表达于血管内皮及单个血管内皮细胞。对照组 MVD 值与 HME 各干扰组比, 两者差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。0.8 mg/kg 组 MVD 值最低, 与 0.4 和 0.2 mg/kg 组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 而后两组之

表 1 HME 对人胃癌裸鼠皮下移植瘤生长的影响

Table 1 The influence of HME on growth of subcutaneously transplanted tumor of human gastric carcinoma in nude mice

Groups	Weight of mice(g)	Volume of xenografts(mm ³)	Weight of xenografts(g)	Tumor inhibition rate(%)
Control	17.22 ± 0.69	2494.12 ± 351.45	1.96 ± 0.14	-
HME 0.2 mg/kg	18.43 ± 3.05*	760.49 ± 72.03 [△]	0.72 ± 0.04 ^{△▲}	53.61
HME 0.4 mg/kg	19.55 ± 3.54*	668.84 ± 97.32 [△]	0.46 ± 0.04 ^{△▲}	59.09
HME 0.8 mg/kg	19.47 ± 2.33*	338.99 ± 102.56 [△]	0.34 ± 0.02 [△]	80.73

Note: * : Compared with the control group, $P > 0.05$; [△] : Compared with the control group, $P < 0.05$; [▲] : Compared with the HME 0.8 mg/kg group, $P < 0.05$

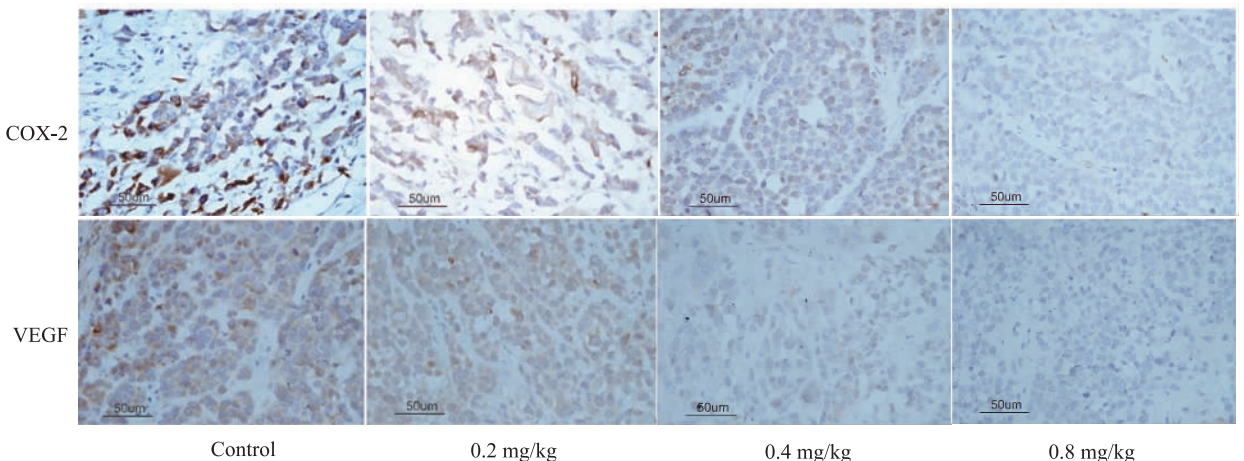


图 3 HME 对移植瘤组织中 COX-2、VEGF 表达的影响(SP × 400)

Figure 3 The influence of HME on expression of COX-2 and VEGF in xenografts(SP × 400)

间 MVD 值差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 HME 对肿瘤 COX-2、VEGF 表达及 MVD 的影响

Table 2 The effects of HME on microvessel density(MVD) value and expression of COX-2 and VEGF in xenografts

Groups	The IOD value of COX-2($\times 10^3$)	The IOD value of VEGF($\times 10^3$)	MVD
Control	880.28 ± 408.39	923.84 ± 431.03	8.14 ± 1.95
HME 0.2 mg/kg	197.07 ± 76.06* \blacktriangle	345.80 ± 55.64* \triangle	3.86 ± 0.38* \triangle \blacktriangle
HME 0.4 mg/kg	144.09 ± 71.64* \triangle	258.99 ± 57.47* \triangle	3.29 ± 0.49* \triangle
HME 0.8 mg/kg	47.95 ± 25.36*	85.65 ± 34.09*	1.86 ± 0.38*

Note: *: Compared with the control group, $P < 0.05$; \triangle : Compared with the HME 0.8 mg/kg group, $P < 0.05$; \blacktriangle : Compared with the HME 0.4 mg/kg group, $P > 0.05$

3 讨论

有研究表明, HME 虽然作为基质金属蛋白酶家族 (MMPs) 的一员, 但其生物学作用与其他 MMPs 家族成员不完全相同, 它能抑制某些肿瘤的浸润和转移。在胃癌的临床研究中发现, HME 阳性表达与肿瘤组织低血管密度密切相关, 并与 VEGF 表达呈负相关^[6]; 同时 HME 阳性表达患者的淋巴结转移率明显降低, 术后生存率也明显增加^[7]。本研究发现, HME 蛋白对胃癌皮下移植瘤的生长具有明显的抑制作用, 且对肿瘤的抑制作用具有剂量依赖性。

在肝癌的研究中发现, HME 阳性表达者大多数为低血供肿瘤, 相反阴性表达者绝大多数为血管丰富的肿瘤, 提示 HME 表达与肝癌组织血供情况密切相关^[8]。因此, HME 可能是通过抑制肿瘤血管生成从而抑制肿瘤浸润和转移。本实验发现 HME 能够明显抑制 COX-2 和 VEGF 在移植瘤组织中的表达 ($P < 0.05$), 其中 HME 0.8 mg/kg 组表达量最低。肿瘤微血管计数也证实 HME 干预组肿瘤微血管形成较对照组明显降低 ($P < 0.05$)。COX-2 在多种肿瘤细胞中大量表达, 催化花生四烯酸生成前列腺素 E_2 与 G 蛋白偶联受体结合, 促进肿瘤细胞增殖^[9]; 而 VEGF 是作用最强、特异性最高的血管生成调控因子, 在许多肿瘤新生血管形成过程中起关键作用。这些都提示 HME 一方面可能通过抑制肿瘤组织中 COX-2 表达来抑制肿瘤细胞增殖; 另一方面 HME 通过抑制肿瘤组织 VEGF 表达, 从而抑制肿瘤微血管形成, 进而抑制肿瘤浸润和转移。在对鼠巨噬细胞金属弹力酶 (MME) 的研究中发现, MME 能明显抑制结肠癌组织中 VEGF mRNA 以及 VEGF 蛋白的表达, 并能抑制肿瘤微血管形成^[10], 而 HME 与 MME 同均为巨噬细胞金

属弹性蛋白酶, 两者具有高度的同源性, 并且有许多相似的生物学功能^[11], 从而支持本实验结果。除此之外也有研究表明 MME 可以降解纤溶酶原产生血管抑素从而抑制血管生成; 体内实验表明 MME 可以在结肠癌细胞周围降解纤溶酶原产生生物活性片段, 并抑制结肠癌组织中 VEGF 表达, 进而抑制肿瘤微血管形成^[12], 因此 HME 也可能通过此途径来抑制肿瘤血管形成。本研究发现 HME 可以通过抑制肿瘤血管生成发挥抑瘤作用, 但各组实验动物中均未发生肿瘤转移, 未能证实 HME 对肿瘤转移的影响, 考虑可能与本实验所选模型类型以及肿瘤细胞侵袭性等有关。

参考文献:

- [1] 叶任高, 陆再英. 内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 393-399.
- [2] Sang QX. Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis[J]. Cell Res, 1998, 8(3): 171-177.
- [3] Fan J, Wang X, Wu L, et al. Macrophage-specific overexpression of human matrix metalloproteinase-12 in transgenic rabbits[J]. Transgenic Res, 2004, 13(3): 261-269.
- [4] 王黎明, 胡乃中, 石海, 等. 人巨噬细胞金属弹力酶对人胃癌细胞 VEGF 体外表达的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2008, 43(3): 280-282.
- [5] 鲍德明, 胡乃中, 沈际佳, 等. 人巨噬细胞金属弹力酶催化区域基因的克隆和表达[J]. 安徽医科大学学报, 2007, 42(3): 269-271.
- [6] 程芑, 许建明, 石海, 等. 胃癌 HME 表达的临床病理学意义[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(14): 1519-1524.
- [7] H Zhang, Y Li, G Xu. Human Macrophage Metalloelastase Expression in Gastric Cancer and Its Relationship with Gastric Cancer Prognosis[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2007, 26(3): 361-366.
- [8] Gorrin Rivas MJ, Arii S, Furutani M, et al. Expression of human macrophage metalloelastase gene in hepatocellular carcinoma: correlation with angiostatin generation and its clinical significance[J]. Hepatology, 1998, 28(4): 986-993.
- [9] 朱祖安, 刘莹, 费素娟. 舒林酸、尼美舒利对人胃癌 SGC-7901 细胞增殖及 COX-2、NF- κ B 表达的抑制作用[J]. 肿瘤防治研究, 2005, 32(10): 623-625, 672.
- [10] Shi H, Xu JM, Hu NZ, et al. Transfection of mouse macrophage metalloelastase gene into murine CT-26 colon cancer cells suppresses orthotopic tumor growth, angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression[J]. Cancer Lett, 2006, 233(1): 139-150.
- [11] Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ. Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages[J]. J Biol Chem, 1993, 268(32): 23824-23829.
- [12] Xu Z, Shi H, Li Q, et al. Mouse macrophage metalloelastase generates angiostatin from plasminogen and suppresses tumor angiogenesis in murine colon cancer[J]. Oncol Rep, 2008, 20(1): 81-88.

[编辑: 贺文; 校对: 杨卉]