

• 基础论著 •

雌激素对结肠癌肝转移细胞增殖与凋亡及 MMP-9 表达的影响

张涛 张诗琳 杨鹤鸣 杨建武 赵燕 李晓鸥 王平 张宏文 李成林 崔彦

【摘要】 目的 研究雌二醇(E2)对结肠癌肝转移肿瘤细胞增殖与凋亡及 MMP-9 表达的影响。**方法** 实验动物选用裸鼠,随机分为四组($n=6$):雄性组、雌性组、卵巢切除组、卵巢切除并雌激素注射组。培养 MCA-38 细胞至对数生长期,制成单细胞悬液,采用门静脉注射法构建裸鼠结肠癌肝转移模型。应用免疫组化 SP 法检测转移灶中 PCNA 和 Caspase-3 表达,计算肿瘤细胞增殖率(CPI)和凋亡率(CAI),Western blot 法检测转移灶中 MMP-9 表达量。**结果** (1)雄性组细胞的 CPI 最高(0.912 ± 0.023),其次为卵巢切除组(0.876 ± 0.031)。雄性组与雌性组之间的 CPI 差异($t=7.30, P<0.05$)以及卵巢切除组与卵巢切除注射雌激素组之间的 CPI 差异($t=2.74, P<0.05$)有统计学意义。(2)雌性组肿瘤细胞的 CAI 最高(0.064 ± 0.010),其他各组依次为卵巢切除注射雌激素组(0.049 ± 0.007)、雄性组(0.038 ± 0.003)和卵巢切除组(0.023 ± 0.011)。雄性组与雌性组之间的 CAI 差异($t=4.72, P<0.05$)以及卵巢切除组与卵巢切除注射雌激素组之间的 CAI 差异($t=5.872, P<0.05$)有统计学意义。(3)雄性组肝转移灶 MMP-9 表达量最高(0.62 ± 0.05),其他各组依次为卵巢切除组(0.49 ± 0.03)、雌性组(0.36 ± 0.03)和卵巢切除注射雌激素组(0.28 ± 0.04)。雄性组与雌性组之间的 MMP-9 表达量差异($t=8.462, P<0.05$)、卵巢切除组与卵巢切除注射 E2 组之间的 MMP-9 表达量差异($t=7.620, P<0.05$)以及雌性组与卵巢切除组之间的 MMP-9 表达量差异($t=5.324, P<0.05$)有统计学意义。**结论** 结肠癌肝转移灶细胞凋亡与体内雌激素水平增加有关,转移灶细胞增殖与体内雌激素水平减低有关,MMP-9 可能参与其调控机制。

【关键词】 雌激素类; 细胞增殖; 细胞凋亡; 基质金属蛋白酶9; 肝转移模型; MCA-38 细胞

Effects of 17 β -estradiol on proliferation, apoptosis and MMP-9 expression of colorectal liver metastasis

ZHANG Tao, ZHANG Shi-lin, YANG He-ming, YANG Jian-wu, ZHAO Yan, LI Xiao-ou, WANG Ping, ZHANG Hong-wen, LI Cheng-lin, CUI Yan. Department of General Surgery, 306 Hospital of PLA, Beijing 100101, China

Corresponding author: CUI Yan, Email: dryancui@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effects of 17 β -estradiol (E2) on proliferation, apoptosis and expression of MMP-9 of colorectal liver metastasis. **Methods** MCA-38 cells were trained to logarithmic growth period, and collected to make suspension. Animal models of colorectal liver metastasis were established through portal vein injection of MCA-38 cells. Four groups of animal models were setup ($n=6$), including male group, female group, ovariectomy group, ovariectomy plus E2 injection group. PCNA and Caspase-3 were detected by immunohistochemistry, and the tumor cell proliferation index (CPI) and cell apoptosis index (CAI) were calculated. The expression of MMP-9 were analysed by Western blot assay. **Results** The immunohistochemistry showed that the highest of CPI was in the male group (0.912 ± 0.023), and next by that of in the ovariectomy group (0.876 ± 0.031). The differences of CPI between male group and female group, ovariectomy group and ovariectomy plus E2 injection group were statistically significant ($P<0.05$). The highest of CAI was in the female group (0.064 ± 0.010), followed by that of in the ovariectomy plus E2 injection group (0.049 ± 0.007), the male group (0.038 ± 0.003) and the ovariectomy group (0.023 ± 0.011). The differences of CAI between male group and female group, ovariectomy group and ovariectomy plus E2 injection group were statistically significant ($P<0.05$). Western blot assay showed that MMP-9 expression behaved the same features as that of CPI in each of the experimental group. **Conclusions** E2 affect the CPI and CAI of MCA-38 liver metastases, and the expression of MMP-9 is correlated with the E2 concentration and may play roles in the progress of hepatic metastasis of colon cancer.

【Key words】 Estrogens; Cell proliferation; Cell apoptosis; Matrix metalloproteinase 9; Liver metastasis model; MCA-38 cell line

结直肠癌的发病率呈持续上升趋势,肝脏是其最常见的转移器官,约25%的结直肠癌患者确诊时即伴有肝转移,另有25%患者在根治术后出现肝转移。肝转移已成为影响结直肠癌患者预后的最大问题^[1-2]。研究发现,雌激素有助于维护正常结直肠黏膜形态,在结直肠癌发生发展过程中可能发挥一定保护作用,而雌激素对结直肠癌肝转移灶的影响作用尚不明确^[3-5]。基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase, MMP-9)作为一种降解细胞外基质的蛋白裂解酶,在肿瘤侵袭转移中亦起关键性作用^[6-7]。本研究使用小鼠结肠腺癌细胞 MCA-38 构建肝转移模型,研究雌激素(雌二醇, E2)对转移灶肿瘤细胞增殖、凋亡及 MMP-9 表达的影响并探讨其机制。

材料与方 法

1. 材料: MCA-38 细胞为 1975 年由 Corbett 等使用化学诱导法构建的 C57BL/6 品系小鼠结肠腺癌细胞,购自山东省肿瘤医学科学研究院。构建结肠癌肝转移肿瘤模型使用 BALB/C-nu 品系 8 周龄裸鼠,体重 25 ~ 30 g,购自军事医学科学院(动物合格证号: SCXK 京 2009-0004),饲养条件为无菌层流,人工控温 22 ~ 26 °C, 14L: 10D 光照,自由饮水采食。PCNA、Caspase-3、MMP-9 抗体购自 Sigma 公司。SP 染色试剂盒和 DAB 显色试剂盒购自北京中衫金桥生物技术有限公司。凝胶成像系统为 AlphaImager™ 2200 (AlphaEase FCTM software package, version 3.2.1, Alpha Innotech Corporation, USA)。

2. MCA-38 细胞培养: 从液氮中取出冻存细胞,立即放入 37 °C 水浴中快速解冻。将 1 ml 细胞冻存液加入到 4 ml 含 10% 胎牛血清的 1640 培养液中混匀,离心 1000 r/min × 5 min,弃上清液。用完全培养液悬浮细胞并计数,接种到 60 mm 培养皿中,浓度为 1×10^5 /ml。置于 37 °C、5% 二氧化碳条件下培养。待细胞悬浮生长至 80% 融合(悬浮生长的细胞抱团融合、融合的百分比通过视野面积判断)时,吸出细胞悬液,离心 1000 r/min × 5 min,弃上清液。用完全培养液悬浮细胞并计数,继续以浓度 1×10^5 /ml 接种至新培养皿中。构建肿瘤模型时收集细胞离心,使用无菌生理盐水悬浮细胞制成单细胞悬液,细胞浓度为 1×10^7 /ml。

3. 结肠癌肝转移动物模型的建立: 门静脉注射法建立^[8] MCA-38 肝转移动物模型。实验动物选用裸鼠,随机分为四组($n = 6$): 雄性组、雌性组、卵巢切除组(卵

巢切除术 2 周后)、卵巢切除并 E2 注射组(卵巢切除术后 2 周给予裸鼠 E2 皮下注射 100 ng/100 μl)。经腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 0.15 ~ 0.20 ml (40 mg/kg),麻醉后固定小鼠呈仰卧位,上腹右侧旁正中线取 1.0 cm 切口进腹,显露门静脉,用 5 号针头将浓度为 1×10^7 /ml 的 MCA-38 细胞悬液 200 μl 注入门静脉,注射毕轻按压注射部位数分钟以防止出血及肿瘤细胞外溢,关腹。接种后的小鼠自由进食、饮水,每日观察变化,术后动物全部存活至实验取材时间,4 周后处死动物,剖腹观察肝脏转移情况,肿瘤转移灶取材。

4. 免疫组化检测肝转移灶中 PCNA 和 Caspase-3 表达: 将石蜡包埋组织 4 μm 厚切片,二甲苯脱蜡 10 min × 2 次,梯度酒精水化(100% 酒精、95%、70%、50%),每级 5 min,抗原修复时将切片置于 0.01 mol/L 枸橼酸钠缓冲液(pH 6.0)中,微波炉处理 4 min × 4 次,静置至室温,PBS 清洗,以含 10% 正常羊血清的封闭液室温下封闭 1 h,将鼠源 PCNA 抗体和兔源 Caspase-3 抗体分别按 1:100 稀释,滴加在切片上,4 °C 过夜,PBS 洗 5 min × 3 次,将 GAM-B 和 GAR-B 分别用 PBS 作 1:200 倍稀释,滴加在切片上,常温孵育 2 h,再次 PBS 洗涤 5 min × 3 次,加辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(SP-HRP, 1:200),湿盒内室温孵育 2 h,PBS 洗涤 5 min × 3 次,DAB 显色,苏木素复染,脱水透明,中性树脂封片。用已知的 PCNA、Caspase-3 阳性组织作为阳性对照,阴性对照使用 PBS 缓冲液代替一抗进行实验。显微镜观察,随机选取 50 个 200 倍视野观察计数,计算肿瘤细胞 CPI(阳性细胞数/总细胞数 × 100%) 和 CAI(阳性细胞数/总细胞数 × 100%)。

5. Western blot 法检测转移灶 MMP-9 表达: (1) 蛋白质提取: 取肿瘤转移灶组织 3 mm × 3 mm × 3 mm 剪碎,加入 200 μl TEDGM 细胞裂解液(含 1 mmol/L PMSF 和 DTT)置于冰上混匀。裂解 30 min 后,在液氮中反复冻融 3 ~ 5 次,然后在 4 °C 下离心 12 000 r/min × 30 min,取上清分装于 0.5 ml 离心管中并置于 -20 °C 保存。(2) 电泳: 按 100 μg 总蛋白/泳道上样,使用 12% 聚丙烯酰胺(PAGE)凝胶电泳 160 V × 50 min,至溴酚蓝跑出即终止电泳。(3) 转膜: 按预染蛋白 Marker 所示范围切取凝胶,将胶上已分离的蛋白按电转印的标准方法转移到 PVDF 膜上,100 V × 100 min,用 1 × 丽春红染液染色,按预染蛋白 Marker 所示范围裁剪 PVDF 膜,用 TBST 配制的 5% 脱脂奶封闭液室温孵育 3 ~ 4 h。(4) 免疫反应: 将兔源 β-actin 一

抗和鼠源 MMP-9 一抗分别用 TBS 作 1:10 000 和 1:2000 稀释后与膜在 4 ℃ 条件下孵育 24 h,用 TBST 洗膜 30 min × 3 次,然后进行二抗孵育(GAR-AP/GAM-AP),用 TBS 作 1:5000 稀释碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 和羊抗鼠 IgG 分别在常温下孵育 2 h 后用 TBST 洗膜 30 min × 3 次。(5)显色:用 5 ml 碱性磷酸酶的底物 NBT/BCIP 进行显色约 10 min,用自来水冲洗终止反应。(6)分析 Western blot 免疫标记条带的光密度值。MMP-9 表达的相对灰度值用其与内参 β -actin 的比值来表示。

6. 统计学分析:使用 CHISS 软件进行统计学分析,所有数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多个样本的比较采用单因素方差分析,两样本均数比较采用 t 检验,多个均数之间两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 结肠癌肝转移动物模型:小鼠接种初期活跃如常,体型无改变,2~3 周后小鼠明显消瘦,腹部渐膨隆,行动渐迟缓,精神差,摄食量减少。4 周时可见实验各组裸鼠右上腹部肝脏部位均形成局部隆起。取材解剖时发现各实验组裸鼠肝脏均可见转移灶,呈弥漫性分布,部分转移结节融合成块,难以计数,肝组织遭严重破坏,多数小鼠腹腔内有血性腹水,量不等。部分小鼠肝脏转移灶呈外生性生长,侵及腹膜,与周围形成广泛黏连。

2. 肿瘤转移灶中 PCNA 表达:免疫组化检测结果显示,PCNA 阳性细胞的细胞核呈棕黄色(图 1)。雄性组细胞的 CPI 最高(0.912 ± 0.023),其次为卵巢切除组(0.876 ± 0.031),而雌性组和卵巢切除注射雌激素组细胞的 CPI 维持在较低水平,分别为 0.776 ± 0.029 和 0.837 ± 0.027 。雄性组与雌性组之间的 CPI 差异($t = 7.30, P < 0.05$)、卵巢切除组与卵巢切除注射雌激素组之间的 CPI 差异($t = 2.74, P < 0.05$)以及雌性组与卵巢切除组之间的 CPI 差异($t = 4.85, P < 0.05$)有统计学意义,而雄性组与卵巢切除组、雌性组与卵巢切除注射雌激素组之间的 CPI 无明显差异(图 2)。

3. 肿瘤转移灶中 Caspase-3 表达:免疫组化检测结果显示,Caspase-3 阳性细胞的细胞核呈棕黄色(图 3)。雌性组肿瘤细胞的 CAI 最高(0.064 ± 0.010),其他各组依次为卵巢切除注射 E2 组(0.049 ± 0.007)、雄性组(0.038 ± 0.003)和卵巢切除组(0.023 ± 0.011)。雄性组与雌性组之间的 CAI 差异($t = 5.95, P < 0.05$)、卵巢切除组与卵巢切除注射 E2 组之间的 CAI 差异($t = 4.72, P < 0.05$)以及雌性组与卵巢切除组之间的 CAI

差异($t = 5.872, P < 0.05$)有统计学意义(图 4)。

4. 肿瘤转移灶组织中 MMP-9 表达:Western blot 检测结果显示,雄性组肝转移灶 MMP-9 表达量最高(0.62 ± 0.05),其他各组依次为卵巢切除组(0.49 ± 0.03)、雌性组(0.36 ± 0.03)和卵巢切除注射 E2 组(0.28 ± 0.04)。雄性组与雌性组之间的 MMP-9 表达量差异($t = 8.462, P < 0.05$)、卵巢切除组与卵巢切除注射 E2 组之间的 MMP-9 表达量差异($t = 7.620, P < 0.05$)以及雌性组与卵巢切除组之间的 MMP-9 表达量差异($t = 5.324, P < 0.05$)有统计学意义,而雄性组与卵巢切除组、雌性组与卵巢切除注射 E2 组之间的 MMP-9 表达量无明显差异(图 5,6)。

讨 论

在肿瘤转移过程中,肿瘤细胞需要完成诸多连续受限的步骤,包括脱离原发部位、侵入基质、进入淋巴管或血管、播散并滞留于靶器官的毛细血管床、适应新微环境进而恣意生长。肿瘤转移是一个多步骤、多阶段并由多种细胞及多种分子参与的复杂过程^[9]。研究发现,MMPs 在细胞外基质有效成分降解过程中起关键作用^[6-7]。MMPs 是一个大家族,一般由 5 个功能不同的结构域组成:(1)疏水信号肽序列。(2)前肽区,主要作用是保持酶原的稳定。当该区域被外源性酶切断后,MMPs 酶原被激活。(3)催化活性区,有锌离子结合位点,对酶催化作用的发挥至关重要。(4)富含脯氨酸的铰链区。(5)羧基末端区,与酶的底物特异性有关。其中酶催化活性区和前肽区具有高度保守性。研究证实,在结直肠癌肝转移起始阶段,MMP-9 是最重要的蛋白水解酶。恶性表型和侵袭转移表型的细胞均高表达 MMP-9,结直肠癌细胞 MMP-9 表达的水平可以反映其侵袭转移能力^[6-7,10]。

我们在前期研究中发现,E2 对 MCA-38 细胞的雌激素受体(ER α 、ER β)表达、细胞增殖及凋亡均产生影响,MCA-38 细胞增殖和凋亡分别与 ER α 和 ER β 表达变化密切相关^[11]。本实验研究发现,高 E2 水平能在基因转录翻译水平下调 MMP-9 表达,阻碍游离肿瘤细胞在宿主器官的定居,并诱导转移灶肿瘤细胞凋亡,低 E2 水平有利于肿瘤细胞的增殖,而雌激素水平对以上实验结果影响不大。结合文献^[12-14]分析认为,E2 所起的作用主要为促发细胞凋亡,抑制异型增生,维护细胞正常的形态、结构和功能,从而起保护作用;在结直肠癌肝转移过程中,E2 可能通过影响 MMP-9 表达量,对肿瘤转移事件产生重要影响;同时,体内较高水平的 E2 具有抑制结直肠癌肝转移的作用,可能亦与 E2 影响转移癌细胞的增殖和凋亡有一定关系。尽管如此,E2 发

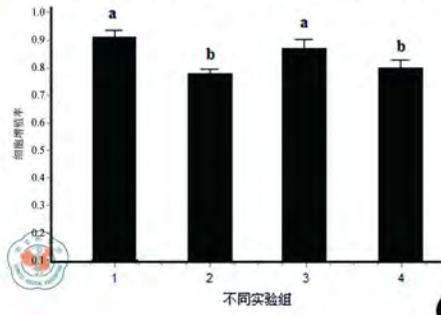
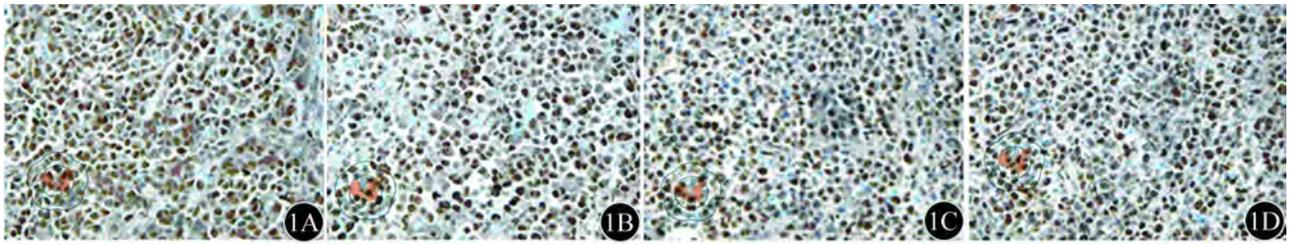


图1 实验各组肝转移肿瘤细胞的PCNA表达(SP×200); 1A: 雄性组; 1B: 雌性组; 1C: 卵巢切除组; 1D: 卵巢切除雌激素注射组 图2 实验各组肝脏转移肿瘤细胞的CPI; 1: 雄性组; 2: 雌性组; 3: 卵巢切除组; 4: 卵巢切除雌激素注射组; 字母不同表示差异有统计学意义(P<0.05)

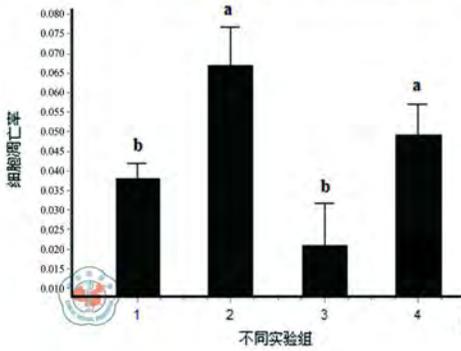
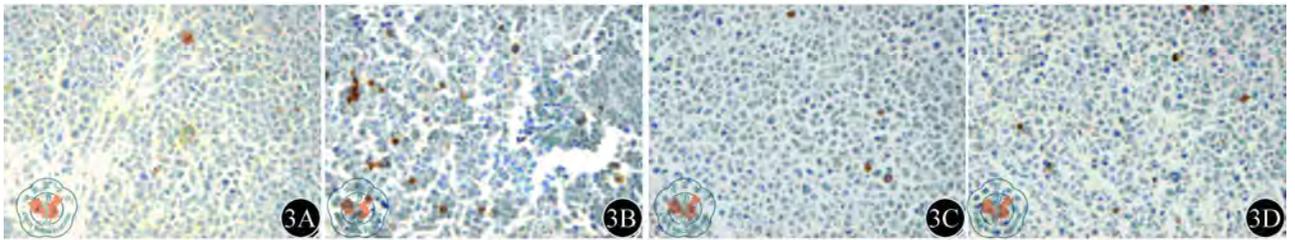


图3 实验各组肝脏转移肿瘤细胞的Caspase-3表达(SP×200); 3A: 雄性组; 3B: 雌性组; 3C: 卵巢切除组; 3D: 卵巢切除雌激素注射组 图4 实验各组肝脏转移肿瘤细胞的CAI; 1: 雄性组; 2: 雌性组; 3: 卵巢切除组; 4: 卵巢切除雌激素注射组; 字母不同表示差异有统计学意义(P<0.05)

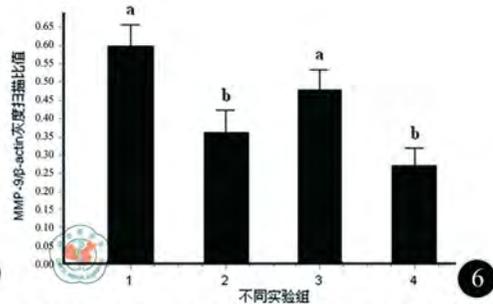
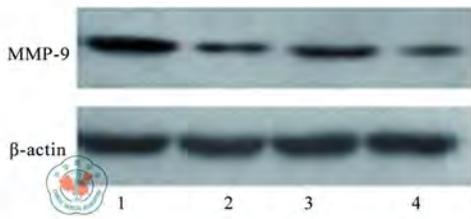


图5 实验各组肝脏转移灶中MMP-9表达; 1: 雄性组; 2: 雌性组; 3: 卵巢切除组; 4: 卵巢切除雌激素注射组

图6 实验各组肝转移灶中MMP-9表达量灰度扫描结果; 1: 雄性组; 2: 雌性组; 3: 卵巢切除组; 4: 卵巢切除雌激素注射组; 字母不同表示差异有统计学意义(P<0.05)

挥上述功能的具体机制和信号通路以及对MMP-9酶活性的调节位点仍不明确,均有待进一步研究,基于本研究可望为探索结直肠癌肝转移发生发展的阻断靶点提供线索。

参 考 文 献

[1] Aloia TA, Vauthey JN. Management of colorectal liver metastases: past, present, and future. Updates Surg, 2011, 2: 547-551.
 [2] 王平, 崔彦. 结直肠癌肝转移的早期诊断和防治研究. 中国普通外科杂志, 2004, 13: 688-690.
 [3] Rory K, Dara O, Aisling M, et al. Oestrogen and the colon: potential

- mechanisms for cancer prevention. *Lancet Oncol*, 2008, 9:385-391.
- [4] Johan H, Jan-Ake G. Estrogen receptors in colorectal cancer: Goalkeepers, Strikers, or Bystanders? *Cancer Prev Res*, 2010, 3:897-899.
- [5] 张涛, 崔彦. 雌激素受体 β 及其与肿瘤关系的研究进展. *中国实验诊断学*, 2010, 14:1646-1649.
- [6] Kyung SP, Seon JK, Kyung HK, et al. Clinical characteristics of TIMP2, MMP2, and MMP9 gene polymorphisms in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26:391-397.
- [7] Draquinovic W, Radonjic NV, Petronijevic ND, et al. Matrix metalloproteinase-2(MMP-2) and-9(MMP-9) in preoperative serum as independent prognostic markers in patients with colorectal cancer. *Mol Cell Biochem*, 2011, 9:173-178.
- [8] Thalheimer A, Otto C, Bueter M, et al. The intraportal injection model: a practical animal model for hepatic metastases and tumor cell dissemination in human colon cancer. *BMC Cancer*, 2009, 9:29.
- [9] Gupta GP, Massagué J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 2006, 11:679-695.
- [10] Wilhelm J, Lubbel ZY, Zhou WF. Tumor epithelial cell matrix metalloproteinase 9 is a target for antimetastatic therapy in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 2006, 3:186-192.
- [11] 张涛, 周金莲, 崔彦, 等. 雌二醇影响MCA-38细胞增殖及雌激素受体表达的实验研究. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2011, 20:181-184.
- [12] Emily MF, Josefa A, Magaret AS, et al. Novel action of estrogen to promote proliferation: integration of cytoplasmic and nuclear pathways. *Steroids*, 2009, 74:622-627.
- [13] Wilkins HR, Doucet K, Duke V, et al. Estrogen prevents sustained COLO-205 human colon cancer cell growth by inducing apoptosis, decreasing c-myc protein, and decreasing transcription of the anti-apoptotic protein bcl-2. *Tumour Biol*, 2010, 31:16-22.
- [14] Polly A, Yingye Z, Victoria M, et al. Estrogen plus progestin use, microsatellite instability, and the risk of colorectal cancer in women. *Cancer Res*, 2007, 67:7534-7541.

(收稿日期:2012-08-17)

(本文编辑:戚红丹)

张涛, 张诗琳, 杨鹤鸣, 等. 雌激素对结肠癌肝转移细胞增殖与凋亡及MMP-9表达的影响[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2013, 7(1):177-181.

