

# p27mt 基因对人大肠癌裸鼠移植瘤模型的影响

陈 2<sup>1</sup>, 丁武华<sup>2</sup>, 卢光新<sup>1</sup>, 徐少勇<sup>1</sup>

Effect of p27mt Gene on Growth of Transplanted Human Colorectal Carcinoma in Naked Mice

CHEN Jun<sup>1</sup>, DING Wu-hua<sup>2</sup>, LU Guang-xin<sup>1</sup>, XU Shao-yong<sup>1</sup>

1. Department of Gastroenterology, Renmin Hospital, Yunyang Medical College, Shiyan 44200, Chi-

na; 2. Department of Gynecology and Obstetrics, Taihe Hospital, Yunyang Medical College

Corresponding Author: DING Wu-hua, E-mail: Dingwh@medmail.com.cn

**Abstract:** **Objective** To study the effect and mechanism of p27mt gene for the growth inhibition and anti-metastasis of human colorectal carcinoma transplanted in naked mice. **Methods** The model of transplanted colorectal Lovo cell line of colorectal carcinoma in naked mice was set up. Ad-p27mt was directly injected into tumor. The transplanted tumor size, cell cycle, proliferation index (PI) and apoptosis rates were observed, MMP-9 expression levels were observed also. **Results** The mean volume of Ad-p27mt group, Ad-LacZ group and control group was  $(1.94 \pm 0.67) \text{cm}^3$ ,  $(2.75 \pm 0.83) \text{cm}^3$  and  $(3.01 \pm 0.76) \text{cm}^3$  ( $P < 0.05$ ); the growth rate was  $(37.34 \pm 1.45) \%$ ,  $(53.16 \pm 3.27) \%$  and  $(54.48 \pm 2.43) \%$  ( $P < 0.05$ ); the apoptosis rate was  $(19.79 \pm 3.32) \%$ ,  $(6.38 \pm 4.91) \%$  and  $(7.25 \pm 5.20) \%$  ( $P < 0.01$ ); The expression rate of MMP-9 was 20%, 75% and 66.7% ( $P < 0.01$ ), respectively. **Conclusion** p27mt gene can obviously suppress the growth of transplanted colorectal carcinoma. The mechanism dues to inhibit tumor proliferation and promote apoptosis. p27mt gene can suppress metastasis of colorectal cancer in naked mice, the mechanism partially dues to decrease the expression of MMP-9.

**Key words:** Colorectal carcinoma; p27mt gene; naked mice; MMP-9

**摘要:** **目的** 研究 p27mt 基因对大肠癌裸鼠移植瘤的生长抑制和抗转移作用及其机制。 **方法** 建立大肠癌裸鼠移植瘤模型, 采用瘤体内直接注射法, 测量瘤体体积, 观察 p27mt 对移植瘤的生长抑制作用。分离瘤体, 制作单细胞悬液, 流式细胞术检测细胞周期, 测定细胞凋亡。免疫组化检测瘤体组织中 MMP-9 的表达。 **结果** Ad-p27mt 组、Ad-LacZ 组和对照组移植瘤平均体积分别为  $(1.94 \pm 0.67) \text{cm}^3$ 、 $(2.75 \pm 0.83) \text{cm}^3$  和  $(3.01 \pm 0.76) \text{cm}^3$  ( $P < 0.05$ ); 增殖率分别为  $(37.34 \pm 1.45) \%$ 、 $(53.16 \pm 3.27) \%$  和  $(54.48 \pm 2.43) \%$  ( $P < 0.05$ ); 凋亡率分别为  $(19.79 \pm 3.32) \%$ 、 $(6.38 \pm 4.91) \%$  和  $(7.25 \pm 5.20) \%$  ( $P < 0.01$ ); MMP-9 的表达率为 20%、75% 和 66.7% ( $P < 0.01$ )。 **结论** 人突变 p27mt 基因通过阻滞移植瘤的增殖, 促进移植瘤细胞的凋亡来抑制移植瘤的生长, 通过降低移植瘤 MMP-9 的表达抑制移植瘤的转移。

**关键词:** 大肠癌; p27mt 基因; 裸鼠; MMP-9

中图分类号: R735.3<sup>+</sup>4 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2008)06-0399-03

## 0 引言

随着人们生活水平的提高, 饮食结构的改变, 结肠癌发病率在逐渐上升<sup>[1]</sup>。结肠癌的治疗包括手术、放疗、化疗, 但效果均不理想。随着后基因时代的到来, 基因的功能成为人们研究的重点, 为肿瘤的基因治疗带来了曙光。p27 基因是一种抑癌基因,

本研究旨在通过动物实验来探讨突变型 p27 基因对大肠癌的生长及转移方面的作用机制, 为 p27 治疗大肠癌提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株及腺病毒

Lovo 细胞购于武汉大学标准物保藏中心, 用 RPMI1640 培养基培养, 调整细胞浓度至  $1 \times 10^8 / \text{ml}$ , 台盼蓝染色活细胞计数  $> 99 \%$ 。Ad-LacZ 由王家宁博士等构建并惠赠<sup>[2]</sup>。Ad-p27mt 由本人构建<sup>[3]</sup>。

### 1.2 结肠癌裸鼠移植瘤模型的建立及分组

购买 BALB/C 裸鼠 36 只 (湖北省实验动物管

收稿日期: 2007-05-31; 修回日期: 2008-01-30

基金项目: 湖北省自然科学基金资助项目 (2003ABA193) 十堰市科技局资助项目 (2005ZD036)

作者单位: 1. 442000 湖北十堰, 郧阳医学院附属人民医院消化内科; 2. 附属太和医院妇产科

通讯作者: 丁武华, E-mail: Dingwh@medmail.com.cn

作者简介: 陈 2 (1966-), 男, 硕士, 副教授, 主要从事消化道肿瘤基础与临床研究

表 1 各组移植瘤细胞周期分布,PI 及凋亡率( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

Tab 1 cell cycle, proliferation index (PI) and apoptosis rates among groups in different stages ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

Group	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	PI	apoptosis rate
Control	45.52 ±4.15	24.43 ±2.15	30.05 ±3.21	54.48 ±2.43	7.25 ±5.20
Ad-pmt	46.84 ±3.95	23.89 ±4.51	29.27 ±2.87	53.16 ±3.27	6.38 ±4.91
Ad-p27mt	62.57 ±4.55*	16.67 ±1.75	20.67 ±1.25	37.34 ±1.45*	19.79 ±3.32*

\*:Ad-p27mt group comparisons with control group and Ad-p27mt group,  $P < 0.01$

理中心),鼠龄 4~6 周,体重 18~25 g。取 0.2 ml 结肠癌 Lovo 细胞悬液,分别在裸鼠右侧背部皮下接种,共 36 只。成瘤后选用肿瘤大小介于 0.5~1.5 cm 之间的裸鼠 27 只,随机分为对照组,Ad-LacZ 组和 Ad-p27mt 组。采用瘤体内直接注射法,每次分别注射 PBS 0.1 ml, Ad-LacZ 0.1 ml (病毒含量  $10^{10}$  pfu/ml) 和 Ad-p27mt 0.1 ml (病毒含量  $10^{10}$  pfu/ml)。3 日 1 次,连续 28 天。

1.3 移植瘤体积测定

测定移植瘤的长径(a)和短径(b),按公式  $V = a^2b/2$  计算体积。

1.4 流式细胞术

待裸鼠移植瘤模型治疗 28 d 后,处死裸鼠,分离瘤体、称重、照相。分别切取移植瘤组织 15 g,制成单细胞悬液,取 100  $\mu$ l,加入 DNA-PREP™ LPR 200  $\mu$ l 混匀,室温避光 3 min 后加入 DNA-PREP-stain 1 000  $\mu$ l 染色试剂混匀,15 min 后在 Coulter Epics XL 流式细胞仪上检测细胞周期及细胞凋亡。细胞增殖指数(PI)按以下公式计算:

$$PI = \frac{S + G_2/M}{G_0/G_1 + S + G_2/M} \times 100\%$$

1.5 免疫组化检测 MMP-9 的表达

SP 法染色鼠抗人 MMP-9 单克隆抗体,SP 试剂盒,DAB 显色剂购自北京中山公司,具体步骤按试剂盒说明书进行。结果判断标准:MMP-9 为胞质中的棕黄色颗粒。在癌巢周边基质区,计数 5 个视野,每个视野计数细胞总数及 MMP-9 表达阳性的癌细胞数,根据细胞着色的范围及程度,将免疫组织化学程度分为:-未见阳性染色细胞;+着色淡或着色细胞 < 10%;++着色适中或着色细胞占 10%~25%;+++着色深或着色细胞大于 50%。-为阴性表达;+/-++为弱阳性表达;+++为强阳性表达。

1.6 统计学方法

计量资料用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用独立样本 t 检验,计数资料用  $\chi^2$  检验。

2 结果

2.1 各组移植瘤末次体积比较

Ad-p27mt 组移植瘤平均体积 ( $1.94 \pm 0.67$ )  $\text{cm}^3$  显著小于对照组移植瘤平均体积 ( $3.01 \pm 0.76$ )  $\text{cm}^3$  ( $P < 0.05$ );对照组移植瘤平均体积 ( $3.01 \pm 0.76$ )  $\text{cm}^3$  与 Ad-LacZ 组移植瘤平均体积 ( $2.75 \pm 0.83$ )  $\text{cm}^3$  相比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),见图 1。

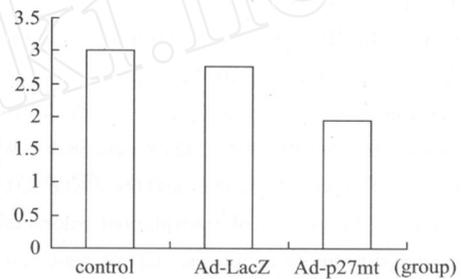


图 1 移植瘤体积的比较 ( $\text{cm}^3$ )

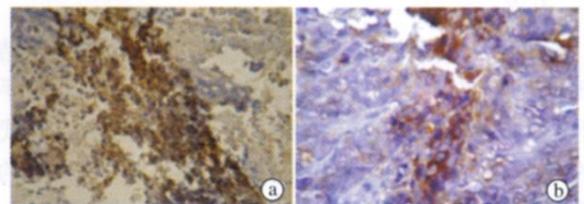
Fig 1 Comparison of volum among groups in transplanted colorectal carcinoma ( $\text{cm}^3$ )

2.2 各组移植瘤细胞周期分布、PI 及凋亡率比较

Ad-p27mt 组移植瘤 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞增多,S 期及 G<sub>2</sub>/M 期细胞减少,Ad-p27mt 组与其他组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),对照组与 Ad-LacZ 组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),见表 1。

2.3 MMP-9 在移植瘤中的表达

MMP-9 主要在癌巢周边基质区域,着色于癌细胞的胞浆中,呈棕黄色颗粒,见图 2。Ad-p27mt 组中 MMP-9 的表达比对照组明显降低,见表 2。



a:control group; b:Ad-p27mt group

图 2 MMP-9 在移植瘤中的表达

Fig 2 Expression of MMP-9 in transplanted colorectal carcinoma

3 讨论

p27 是一种细胞周期负调控因子,是一种抑癌基因<sup>[4]</sup>。其表达异常(缺失或减少)时,细胞周期的

表 2 MMP-9 组间阳性率比较 (n, %)

Tab 2 Comparison of positive rate of MMP-9 among groups (n, %)

Groups	-	+	++	+++	positive rate (%)
Control group	12	4	11	9	66.7
Ad+LacZ group	9	2	14	11	75 <sup>#</sup>
Ad+p27mt group	30	2	4	0	20 <sup>*</sup>

<sup>#</sup> P > 0.05: Ad+LacZ group vs control group; <sup>\*</sup> P < 0.05: Ad+p27mt group vs Ad+LacZ group and control group

抑制作用减弱,将导致细胞生长的失控,发生癌变<sup>[5]</sup>。Ganoth 等<sup>[6]</sup>和 Troncone 等<sup>[7]</sup>研究结果表明:p27 表达降低与泛素介导的蛋白酶体磷酸化 p27/187 位点的苏氨酸降解途径作用异常增强有关。因此,本课题通过瘤体内直接注射 187 位突变的 p27mt 基因重组腺病毒,研究其在体 (in vivo) 对移植瘤的抑制作用。

Park 等<sup>[8]</sup>发现 p27mt (mutant type p27) 对肿瘤细胞的抑制作用比 p27wt (wild type p27) 作用更强,使细胞阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,且有更强的促细胞凋亡作用。Jaen 等<sup>[9]</sup>进一步研究发现 p27mt 的半衰期超过 12 h,远超过野生型 p27wt 的 2 h。本课题通过测定移植瘤体积,发现 p27mt 基因对大肠癌的生长有明显的抑制作用,其机制可能是通过抑制细胞的增殖和促细胞凋亡作用。通过细胞增殖指数的测定和凋亡率的检测发现,p27mt 可明显抑制细胞的增殖,阻滞细胞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,与对照组比较有明显的促凋亡作用,凋亡率达 (37.9 ± 3.32) %。

本课题前期研究发现大肠癌组织中 p27 呈低表达,且分化程度越低,表达越低。p27 与肿瘤组织的分化程度及淋巴结转移密切相关<sup>[10]</sup>。本研究通过检测移植瘤组织中的金属蛋白酶 9 (MMP-9),发现 p27mt 能降低 MMP-9 的表达。MMP-9 以酶原形式存在于胞质中,生理情况下释放到细胞外,降解细胞外基质,参与机体的生长发育及组织修复等多种生理过程<sup>[11]</sup>。当 MMP-9 基因发生紊乱时,酶原生成增多,释放到胞外降解、胶原、层粘连蛋白等成分,破坏基底膜的完整性,在肿瘤的浸润转移过程中扮演着十分重要的角色<sup>[12]</sup>。本文观察到 p27mt

降低了 MMP-9 的表达。本文还观察到在移植瘤生长的 28 天内,未见到肿瘤的转移。p27mt 抑制肿瘤转移的机制是降低了 MMP-9 的表达还是有其他机制,我们将进一步探讨。

综上所述,p27mt 通过抑制细胞的增殖,促进细胞的凋亡而抑制大肠癌的生长,并对大肠癌的转移有一定的抑制作用。

参考文献:

- [1] Zheng S, Cai SR. Colorectal cancer epidemiology and prevention study in China[J]. Chinese-German Journal of Clinical Oncology, 2003, 2(2): 72-75.
- [2] 王家宁,黄永章,孔霞,等. 细菌内同源重组快速构建和制备表达 - 半乳糖苷酶的重组腺病毒[J]. 郧阳医学院学报, 2004, 23(1): 1-5.
- [3] 陈 2, 徐少勇, 邓长生, 等. 细菌内同源重组高效制备人突变 p27 基因重组腺病毒[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(5): 406-409.
- [4] Nan KJ, Jing Z, Gong L. Expression and altered subcellular localization of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 (kip1) in hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(10): 1425-1430.
- [5] Masaharu F. Immunohistochemical characterization of Cyclin E and p27kip1 expression in early hydatidiform moles[J]. Int J Gynecol Pathol, 2004, 23(1): 259-264.
- [6] Ganoth D, Bornstein G, Ko TK. The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF(Skp2)-mediated ubiquitinylation of p27[J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(5): 321-324.
- [7] Troncone G, Martinez JC, Iaccarino A. p27kip1 is expressed in proliferating cells in its form phosphorylated on threonine 187[J]. BMC Clin Pathol, 2005, 23(4): 3.
- [8] Park KH, Seol JY, Kim TY, et al. An adenovirus expressing mutant p27 showed more potent antitumor effects than adenovirus-p27 wild type[J]. Cancer Res, 2001, 61(1): 6163-6169.
- [9] Jean A, Hurteau MD, Ssusan A, et al. Over expression of a stabilized mutant form of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 inhibits cell growth[J]. Gynecol Oncol, 2002, 86(1): 19-23.
- [10] 孙泽群, 徐少勇, 邓长生, 等. p38 及 p27 在大肠癌中的表达及其临床意义[J]. 郧阳医学院学报, 2005, 24(3): 151-153.
- [11] 张云锋, 王作仁, 牛新捷, 等. 胆囊癌中基质金属蛋白酶-9, 黏附分子 CD44 变构体 6 表达极其临床意义[J]. 中华实验外科杂志, 2002, 19(5): 405-406.
- [12] 万运廉, 戎龙, 刘玉树, 等. 组织因子对大肠癌侵袭能力的影响及其与基质金属蛋白酶-9 的关系[J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21(9): 1087-1088.

[编辑校对: 安 凤]