

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.10.007

p27mt 对裸鼠肝癌移植瘤侵袭性生长的影响

何志军¹,陈先祥¹,蔡庆和¹,于洋¹,张林菲¹,唐俊明²,杨建业²,王家宁²

Effects of Mutant p27 Gene on Invasive Growth of Hepatocellular Carcinoma in Nude Mice

HE Zhi-jun¹, CHEN Xian-xiang¹, CAI Qing-he¹, YU Yang¹, ZHANG Lin-fei¹, TANG Jun-ming², YANG Jian-ye², WANG Jia-ning²

1. Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Renmin Hospital, Hubei Medical University, Shiyian 442000, China; 2. Institute of Clinical Medicine, Hubei Medical University

Corresponding Author: CHEN Xian-xiang, E-mail: chenxian881@hotmail.com

Abstract: Objective To study the effects of mutant p27 (p27 mt) gene on invasive growth of SMMC-7721 (HCC) in nude mice. **Methods** A mouse model of human hepatocellular carcinoma (SMMC-7721) was established by subcutaneous transplantation in BALB/c mice. The PBS(100μl), adenovirus-mediated mutant p27 (Ad-p27mt, 5.0 × 10⁹ pfu, 100μl) and Lac-Z (Ad-Lac-Z, 5.0 × 10⁹ pfu, 100μl) were injected into the transplanted tumors. Subsequently, the tumor size was tested in every 3 days. The expression of p27 protein, CD44v6 and Ⅷ factor in the transplanted tumors were detected through immunofluorescence method and Semi-quantitative analysis of the expression of P27 protein, CD44v6 and Ⅷ factor were evaluated by integral optical density (IOD) and average optical density (AOD) through Image-Pro Plus software. **Results** Compared with the Ad-Lac-Z and blank control group, P27 protein expression in Ad-p27 group was obviously increased ($P<0.01$), and the expression of CD44v6 and Ⅷ factor were significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Over-expressing p27 mt could significantly inhibit the growth of SMMC-7721 in nude mice through angiogenesis inhibition, and obviously decreased the invasive ability of SMMC-7721 through CD44v6 expression down-regulation.

Key words: p27mt; Hepatocellular carcinoma; Nude mice; Growth; Invasion

摘要:目的 研究外源性突变型 p27 基因(p27mt)对裸鼠皮下肝癌移植瘤侵袭性生长的影响。**方法** 应用细胞移植法把人原发性肝癌细胞株 SMMC-7721 种于 BALB/c 裸鼠皮下,构建人肝癌裸鼠皮下移植瘤动物模型,将 PBS 液(100μl)、腺病毒介导的突变型 p27(Ad-p27mt, 5.0 × 10⁹ pfu, 100μl)及 Lac-Z(Ad-Lac-Z, 5.0 × 10⁹ pfu, 100μl)分别注射到瘤体后,每隔 3 天测量肿瘤体积,计算肿瘤生长抑制率。于处理后 21 天取材行冰冻切片,免疫组织荧光化学法观察各组移植瘤的 P27 蛋白、CD44v6 及 Ⅷ 因子的表达,数码成像后,用 Image-Pro Plus 软件计算荧光亮度和细胞总数,测量积分吸光度(integrated optical density, IOD),计算平均吸光度(Average optical density, AOD),以平均吸光度来反映细胞因子表达水平。**结果** 与 Ad-Lac-Z、空白对照组比较,Ad-p27 组移植瘤 P27mt 蛋白表达明显增高($P<0.01$),并且过表达的 P27mt 蛋白明显减小了移植瘤体积,抑制了肿瘤的生长速度;血管大体观发现 Ad-p27 组血管不仅细而且分支少,Ⅷ因子免疫组织荧光化学观察发现瘤体内血管密度明显降低;同时 Ad-p27 组也明显降低了肿瘤细胞 CD44v6 ($P<0.05$)。**结论** Ad-p27mt 能在裸鼠 SMMC-7721 肝癌皮下移植瘤过表达 P27mt 蛋白,不仅通过抑制血管的生成而抑制肿瘤的生长,而且通过降低肿瘤细胞 CD44v6 的表达而显著抑制移植瘤的侵袭性。

关键词:p27mt;肝癌;裸鼠;生长;侵袭

中图分类号:R735.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8578(2010)10-1123-05

收稿日期:2009-07-14;修回日期:2010-02-22
基金项目:湖北省自然科学基金项目(2005ABA082)
作者单位:1. 442000 湖北十堰,湖北医药学院附属人民医院肝胆胰脾外科;2. 湖北医药学院临床医学研究所
通信作者:陈先祥, E-mail: chenxian881@hotmail.com
作者简介:何志军(1975-),男,硕士,讲师,主要从事肝脏肿瘤的基础及临床研究

0 引言
原发性肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)是世界上最常见的恶性肿瘤之一,病死率高,复发转移是影响预后的最主要因素。据报道^[1], HCC 根治性切除后 5 年复发率为 54.1%~61.5%,

小肝癌 ≤5cm 为 43.5%，而局部治疗的转移复发率则更高。因此抗 HCC 侵袭转移，减少术后复发成为目前研究的热点和难点。本研究拟观察 p27mt 在体内对 SMMC-7721 细胞裸小鼠移植瘤生长的抑制作用及其对肿瘤细胞黏附及肿瘤血管生成的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 CD44V6、Ⅷ因子鼠抗人单克隆抗体购自为福建迈新生物技术开发公司，人源性鼠抗 p27 单克隆抗体、FITC 标记抗鼠免疫荧光二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.1.2 主要材料 BALB/C 裸小鼠 21 只(购于湖北省实验动物中心，合格证编号：SCXK(鄂)2003-205)，雌 11 只，雄 10 只，4~5 周龄，体重 18~20g。人原发性肝癌细胞系 SMMC-7721 购于中国科学院上海细胞生物研究所。Ad-Lacz、Ad-p27mt 由鄱阳医学院临床研究所运用细菌内同源重组方法完成，并成功地进行扩增、鉴定和纯化。

1.1.3 主要仪器 二氧化碳培养箱(Binder，德国)，独立送回风动物饲养笼具(IVC 笼具，苏杭动物实验器材公司)，生物净化工作台(中国苏州净化仪器公司)，低温恒冷冰冻切片(Leica CM1900，德国)，倒置相差显微镜(Olympus，日本)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人原发性肝癌细胞系 SMMC-7721 用含有 10%FCS 小牛血清的 1640 培养基在 37℃、5%CO₂ 条件下培养。细胞生长至对数生长期，用 0.25%胰蛋白酶消化，用 PBS 制成细胞悬液，调整细胞密度至(2×10⁷)/0.2ml，用于建立动物模型。

1.2.2 动物模型的建立及分组 在无菌条件下于每只裸鼠背部取一点皮下种植细胞悬液 0.2ml，注射时采用单点多方位注射。待裸鼠肿瘤生长至 0.5 cm³ 时，荷瘤裸鼠随机分为三组，分别为 PBS 空白对照组、Ad-Lacz 对照组、Ad-p27mt 治疗组，每组 7 只裸鼠。PBS 液(100μl)、腺病毒介导的突变型 p27(Ad-p27mt，5.0×10⁹ pfu，100μl)及 Lac-Z(Ad-Lac-Z，5.0×10⁹ pfu，100μl)分别注射到瘤体内。

1.2.3 实验观察指标 实验过程中隔天测量移植瘤长径(a)、宽径(b)及高(c)，计算肿瘤体积(V)= $\pi abc/6$ ，绘制肿瘤体积生长曲线。于实验结束时间点(3 周)分别处死各组裸鼠。测量、计算各组移植瘤体积，计算体积抑瘤率(%)=(对照组体积-实验组体积)/对照组体积×100%。取材后肿瘤组织固定用于免疫荧光。

1.2.4 免疫组织化学 应用免疫荧光染色方法检测 P27mt 蛋白、CD44v6 及Ⅷ因子表达。具体步骤如下：(1)标本取材，4%多聚甲醛固定、流水漂洗、梯度蔗糖脱水，Leica 冰冻切片机连续切片。(2)修复抗原：置 0.01 枸聚磷酸液 1 000 ml 中 100℃沸水煮 15min。(3)Tris 破膜液 20~30μl/片破膜 1~2 min。(4)PBS 液洗三次(5~10 min/次)。(5)吸干 PBS 液，敷一抗(1:100)，每片 20~30 μl。(6)置 4℃冰箱保存过夜。(7)PBS 液洗 3 遍(5~10 min/次)。(8)敷 FITC 标记二抗：每片 20~30 μl，室温标记二抗 2h。(9)PBS 液洗 1 遍(5~10 min)。(10)敷 DAPI 液 15 min，每片 20~30 μl。(11)50%甘油 PBS 封片。(12)荧光显微镜照相：200×荧光显微镜下(绿色荧光染料，使用绿色截止滤光片与蓝色激发滤光片；蓝色荧光染料，使用蓝色截止滤光片与紫色激发滤光片)。观察阳性染色细胞并照相，肿瘤细胞核呈蓝色，免疫荧光标记细胞因子呈绿色。

1.2.5 Image-Pro Plus 6.0 软件分析照片 使用 Invert contrast 反相应用照片，使用 gray-scale-8 转化为黑白灰阶，使用 calibratio、intensity calibration、std optical density 校正吸光度，以消除照片亮度及对比度不一致之间误差。测量积分吸光度(IOD)，计算平均吸光度(Average optical density，AOD)，平均吸光度=积分吸光度/(总面积-空白面积)，空白面积指照片中非癌组织的空白区域面积，以 AOD 来反映细胞因子表达水平。

1.3 统计学方法

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS13.0 软件进行分析处理，组间差异采用 t 检验，P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验结束后剥离各组肿瘤的标本及滋养血管外观

从血管大体观，发现对照组移植瘤血管不仅粗大而且分支多；Ad-p27 组移植瘤血管明显变细且分支少，见图 1。从移植瘤大体观，发现对照组和 Ad-Lac-Z 组移植瘤体积明显较大，而 Ad-p27 组移植瘤体积明显减小(图略)。

2.2 Ad-p27mt 对肿瘤生长抑制情况

测量移植瘤体积定量分析发现：对照组和 Ad-Lac-Z 组移植瘤体积没有差异，而 Ad-p27 组与对照组和 Ad-Lac-Z 组相比，移植瘤体积差异显著，见图 2。可见移植瘤自干预 10 天后 Ad-p27mt 组肿瘤生长体积逐渐减慢，Ad-LacZ 组、空白对照组移植瘤体

积继续增大。实验结束后 Ad-p27mt 组、Ad-LacZ 组、空白对照组移植瘤体积(cm^3)分别为:(1.30 ± 0.29) cm^3 、(4.19 ± 1.01 cm^3)、(4.20 ± 0.58) cm^3 , Ad-p27mt 组与对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$),而 Ad-LacZ 组和对照组比较则差异无统计学意义($P>0.05$)。Ad-p27mt 组与 Ad-LacZ 组、空白对照组比体积抑制率达 68.97%和70.18%。

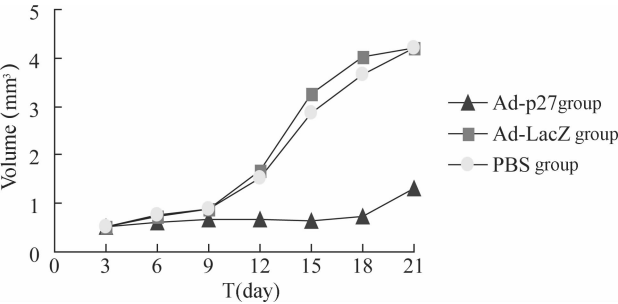


图 2 肿瘤生长曲线
Figure 2 Tumor growth curve

2.3 三组肝癌 SMMC-7721 细胞裸鼠皮下移植瘤 P27mt 蛋白表达的情况 见图 3、表 1。

2.4 各组对人肝癌 SMMC-7721 细胞裸鼠皮下移植瘤 CD44v6 表达的影响 见图 4、表 2。

2.5 各组对人肝癌 SMMC-7721 细胞裸鼠皮下移植瘤Ⅷ因子表达的影响 见图 5、表 3。

3 讨论

原发性肝癌是一种临床常见、恶性和死亡率较高的消化道肿瘤。目前主要以手术治疗为主,然而极大多数肝癌就诊时已失去治愈机会,能手术治疗的病人不足 1/3,即使手术治疗仍有较高复发率,肝癌切除术后 5 年复发率高达 70%^[2],复发转移是影响预后的最主要因素。p27 基因是近年新发现的一种抑癌基因,突变型 p27 基因(mutant-type p27 gene;p27mt)编码产生的蛋白抗降解、更稳定,具有比野生型 p27 基因(wild-type p27gene; p27wt)更强的抑制肿瘤细胞生长和诱导凋亡活性。p27 蛋白是一种新发现的非特异性的周期素依赖酶抑制剂,主要通过对细胞周期 G₁~S 节点的抑来调控细胞增殖,p27 在肿瘤发生中的作用主要决定于其蛋

表 1 三组 P27 蛋白平均吸光度值和积分吸光度值($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Three groups of P27 protein in the AOD value and the IOD value($\bar{x} \pm s$)							
Groups	n	IOD	t	P	AOD	t	P
PBS	7	12564.71 ± 1485.13	—	—	0.4875 ± 0.0555	—	—
Ad-Lacz	7	12244.52 ± 1270.73	0.433■	0.673■	0.4291 ± 0.0760	1.642■	0.129■
Ad-p27mt	7	28989.93 ± 1772.44	- 18.793★	0.000★	0.9930 ± 0.1035	- 11.384★	0.000★
			- 20.315▲	0.000▲		- 11.618▲	0.000▲

Note:■:Ad-Lacz group vs. PBS group $P>0.05$; ★:Ad-p27mt group vs. PBS group $P<0.01$; ▲:Ad-p27mt group vs. Ad-Lacz comparison $P<0.01$

表 2 三组 CD44v6 平均吸光度值和积分吸光度值($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Three groups AOD value and IOD value of CD44v6($\bar{x} \pm s$)							
Groups	n	IOD	t	P	AOD	t	P
PBS	7	124759.32 ± 6079.94	—	—	0.2137 ± 0.0116	—	—
Ad-Lacz	7	116291.14 ± 6923.19	0.919■	0.562■	0.2201 ± 0.0153	- 0.874■	0.518■
Ad-p27mt	7	19259.60 ± 569.62	17.276★	0.003★	0.0641 ± 0.0053	30.848★	0.015★★
			13.968▲	0.000▲		25.365▲	0.025▲▲

Note:■: Ad-Lacz group vs. PBS group, $P>0.05$; ★:Ad-p27mt group vs. PBS group, $P<0.01$; ▲:Ad-p27mt group vs. Ad-Lacz, $P<0.01$; ★★:Ad-p27mt group vs. PBS group, $P<0.05$; ▲▲:Ad-p27mt group vs. Ad-Lacz, $P<0.05$

表 3 三组Ⅷ因子平均吸光度值和积分吸光度值($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Three groups AOD value and the IOD value of Ⅷ factor ($\bar{x} \pm s$)							
Groups	n	(IOD)	t	P	(AOD)	t	P
PBS	7	56526.39 ± 9350.88	—	—	0.3395 ± 0.0803	—	—
Ad-Lacz	7	56112.54 ± 8388.84	0.087■	0.482■	0.3324 ± 0.0498	0.271■	0.081■
Ad-p27mt	7	13855.10 ± 997.31	12.005★	0.001★	0.1982 ± 0.0089	4.531★	0.000★
			13.243▲	0.000▲		7.002▲	0.000▲

Note:■:Ad-Lacz group vs. PBS group, $P>0.05$; ★:Ad-p27mt group vs. PBS group, $P<0.01$; ▲:Ad-p27mt group vs. Ad-Lacz comparison $P<0.01$

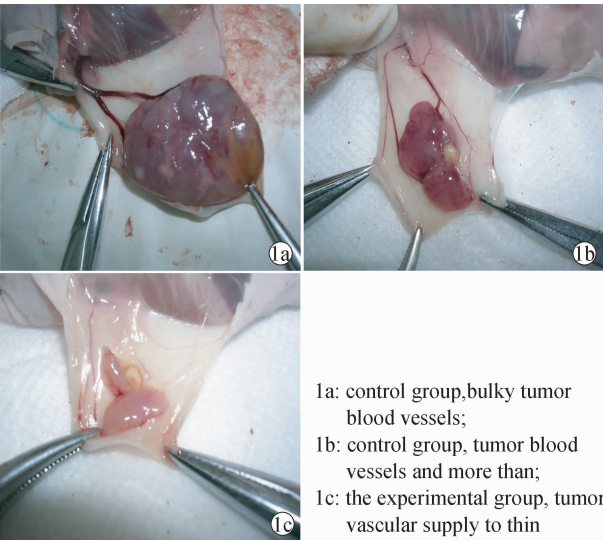
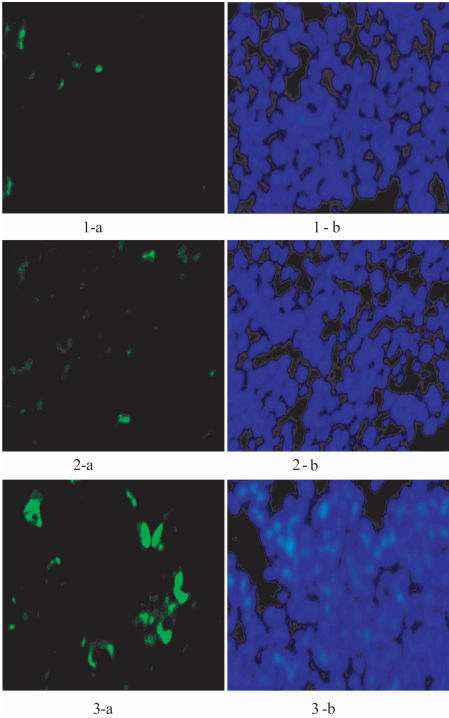
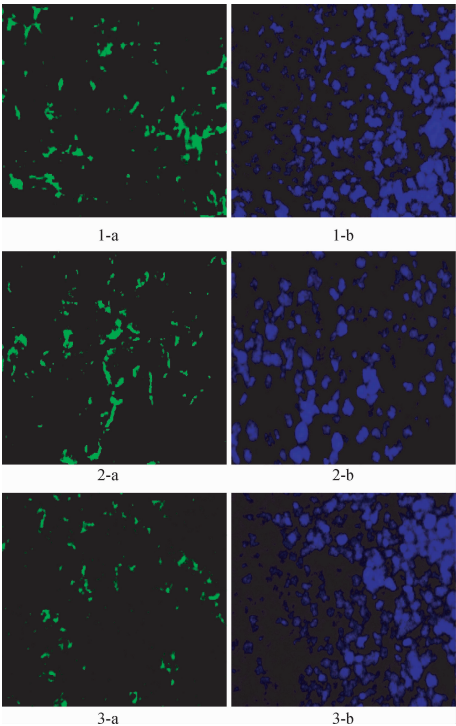


图 1 三组肝癌裸鼠移植瘤标本滋养层血管外观
Figure 1 Trophoblastic blood vessels appearance of hepatocellular carcinoma in nude mice transplanted tumor from three groups

白表达水平的改变。腺病毒介导的 p27 过表达在多种肿瘤细胞系与体外移植肿瘤中都可诱发生长抑制与凋亡^[3]。Park 等^[4]构建了 187 位氨基酸突变的突变型 p27,转染肺癌细胞系发现其较野生型更为稳定,并能诱发更强的 G₁~S 期阻滞和凋亡效应,

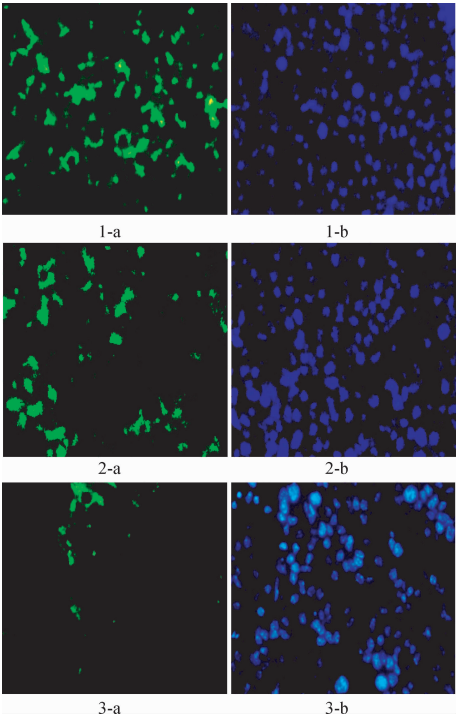


1: blank control group (PBS solution);
2: control group (Ad-Lacz);
3: experimental group (Ad-p27);
a: FITC staining P27 protein;
b: DAPI staining showed nuclear
图 3 三组移植瘤 p27mt 蛋白免疫荧光表达
Figure 3 Immunofluorescence expression of p27mt protein in transplanted tumors of three groups



1: blank control group (PBS solution); 2: control group (Ad-Lacz); 3: experimental group (Ad-p27)
a: FITC staining cd44v6 positioned in the cell membrane; b: DAPI staining showed nuclear

图 4 三组裸鼠皮下移植瘤 CD44v6 表达
Figure 4 Immunofluorescence expression of CD44v6 in transplanted tumors of three groups



1: blank control group (PBS solution); 2: control group (Ad-Lacz); 3: experimental group (Ad-p27)
a: FITC staining VIII factor-binding vascular endothelial cells; b: DAPI staining showed nuclear

图 5 三组裸鼠皮下移植瘤 VIII 因子表达
Figure 5 Immunofluorescenc expression of VIII factor in transplanted tumors of three groups

直接瘤内注射对肿瘤生长抑制也较野生型强。已有研究表明 Ad-p27mt 可明显抑制结肠癌、食管癌裸鼠移植瘤的生长和转移^[5-6],本课题组前期研究表明 Ad-p27mt 能在细胞水平抑制人原发性肝癌细胞系 SMMC-7721 生长^[7]。p27 蛋白定位于细胞核,本实验显示 p27mt 蛋白在空白对照组及 Ad-LacZ 对照组表达没有差异,提示腺病毒本身没有诱导 p27mt 蛋白表达的作用;而 Ad-p27mt 治疗组中表达明显高于空白对照组及 Ad-LacZ 对照组,与两对照组比较差异具有统计学意义($P<0.01$),这种差别提示:在原发性肝癌裸鼠移植瘤中高表达的 p27mt 蛋白主要是由于 Ad-p27mt 在移植瘤中过表达所致。

肿瘤侵袭和转移,涉及瘤细胞穿过细胞外基质(extra-cellular matrix,ECM)屏障、血管壁的基底膜(basement membrane,BM)及穿出血管壁进入宿主微环境等环节。Liotta 的三步假说,即黏附、降解和移动^[8]。在 HCC 的侵袭转移过程中存在多种细胞黏附分子异常表达,其中以钙黏素(cadherin,Cad)、连接素(catenin,Cat)和 CD44 最为重要。CD44 为一组细胞表面跨膜糖蛋白,广泛分布在粒细胞、上皮细胞和内皮细胞上,参与细胞与细胞、细胞与基质之间的特异性黏连,其作为淋巴细胞的归巢受体和透明质酸酶的主要受体,能与细胞基质中的纤维连接蛋白、层黏蛋白、I 型胶原和透明质酸分子以及骨架蛋白相结合,参与细胞的伪足形成,引起细胞形态和游动性改变,能够直接参与肿瘤细胞的侵袭和转移。Liu 等^[9]的研究显示 CD44s 和 CD44v6 的高表达与淋巴结转移和浸润有关,而且 CD44v6 的高表达与肿瘤的分化程度密切相关,故检测 CD44v6 的表达水平可以评价肿瘤的浸润和转移。本实验发现空白对照组及 Ad-LacZ 对照组可见粗大、双只肿瘤供应血管,见图 1a、b,Ad-p27mt 治疗组移植瘤供应血管纤细,见图 1c。实验显示 Ad-p27mt 治疗组中移植瘤生长缓慢,实验终止后 Ad-p27mt 组移植瘤体积与 Ad-LacZ 组、空白对照组比较差异具有统计学意义($P<0.01$)。提示 Ad-p27mt 可以明显抑制原发性肝癌裸鼠移植瘤的侵袭性生长。本实验显示 CD44v6 在 Ad-p27mt 治疗组中表达明显低于空白对照组及 Ad-LacZ 对照组,提示 Ad-p27mt 可抑制原发性肝癌裸鼠移植瘤的 CD44v6 蛋白表达,从而从黏附方面抑制肿瘤细胞黏附能力,进而抑制原发性肝癌的侵袭和转移能力。

微血管密度(Micro-vessel density,MVD)是肿瘤血管生成的一个代表性指标,它不仅与肿瘤细胞的营养和供氧有关,而且也反映了肿瘤的浸润和转移能力。肿瘤组织中血管的数量和密度是另一个与肿瘤侵袭转移潜能密切相关的因素。研究表明诱导血管生成的能力是肿瘤本身的一种固有的生物特性,当正常细胞发生遗传学改变导致恶性转化时,必需打开从血管抑制到血管生成的开关。新生血管形成是肿瘤迅速增殖和侵袭转移的重要条件和病理基础,同时发育不完善的微血管也为肿瘤细胞扩散进入循环提供了便利。本实验显示在 Ad-p27mt 治疗组中标记新生肿瘤血管的Ⅷ因子表达明显低于空白对照组及 Ad-LacZ 对照组,提示 Ad-p27mt 能够抑制肿瘤血管的形成,达到抑制肿瘤细胞侵袭性生长的目的。

我们的研究表明 Ad-p27mt 基因通过在移植瘤内高表达 P27mt 蛋白,从而有效地抑制肝癌细胞的侵袭性生长,同时也降低了肿瘤细胞黏附能力,并抑制肿瘤新生血管生成。在抗肝癌基因治疗方面及抑制肿瘤侵袭和转移提供了一定的理论依据。

参考文献:

- [1] 孙惠川,汤钊猷,马曾辰.影响肝癌根治性切除后复发率的因素[J].中华肝胆外科杂志,2000,1(6):7-9.
- [2] Imamura H, Matsuyama Y, Tanaka E, et al. Risk factors contributing to early and late phase intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy[J]. J Hepatol, 2003, 38(2): 200-207.
- [3] Koh T-Y, Park S-W, Park K-H, et al. Inhibitory effect of p27^{kip1} gene transfer on head and neck squamous cell carcinoma cell lines[J]. Head Neck, 2003, 25: 44-49.
- [4] 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(16): 6163-6169.
- [5] 陈珺,丁武华,卢光新,等. p27mt 基因对人大肠癌裸鼠移植瘤模型的影响[J]. 肿瘤防治研究, 2008, 35 (6): 399-401.
- [6] 吴清明,张卫国,童强,等. 腺病毒介导的 p27^{kip1} 基因转移对食管癌细胞及裸鼠移植瘤生长的抑制作用[J]. 邵阳医学院学报, 2004, 23(5): 257-261.
- [7] 陈先祥,徐兵,余锋,等. 重组腺病毒介导突变型 p27 基因转移对肝癌细胞 SMMC-7721 生长的影响[J]. 肿瘤研究与临床, 2006, 18(8): 538-540.
- [8] 王杰军,高勇,许青. 肿瘤转移机制及诊疗进展[M]. 2 版. 上海:第二军医大学出版社, 2005: 217-218.
- [9] Liu YJ, Yan PS, Li J, et al. Expression and significance of CD44s, CD44v6, and nm23 mRNA in human cancer [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(42): 6601-6606.

[编辑校对:周永红]