

## 多西紫杉醇在肝癌细胞裸鼠肝脏移植瘤中对 P53、VEGF 作用的研究

何 迷, 王家平, 张 磊, 孙 寅, 马 悦

(昆明医科大学第二附属医院放射科, 云南 昆明 650101)

**[摘要]** **目的** 探讨多西紫杉醇在肝癌细胞株 SMMC-7721 裸鼠皮下移植瘤中与血管内皮生长因子 (VEGF)、肿瘤抑制蛋白 (p53) 表达的研究. **方法** 建立肝癌细胞株 SMMC-7721 裸鼠皮下移植瘤模型, 建模成功后, 将 20 只裸鼠分成两组, 多西紫杉醇组及肿瘤对照组. 3 周后处理裸鼠, 应用免疫组化 Envision 法检测实验组与对照组肝癌组织中 p53、VEGF 表达情况. **结果** 实验组肝癌组织中 p53 表达阳性率 41.26%, 显著低于对照组肝癌组织的 p53 表达阳性率 87.16%, 两者间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ). 实验组肝癌组织中 VEGF 表达阳性率为 36.79%, 显著低于对照组肝癌组织的 VEGF 表达阳性率 68.27%, 两者间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ). **结论** p53 在诱导肝癌细胞凋亡中起到重要作用, VEGF 过度表达在肝癌微血管生成过程中起重要作用, 多西紫杉醇可降低 p53、VEGF 的表达, 从而起到移植肿瘤生长及转移的作用.

**[关键词]** 多西紫杉醇; 肝癌细胞株 SMMC-7721; 裸鼠移植瘤; 血管内皮生长因子; 肿瘤抑制蛋白

**[中图分类号]** R815.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 01-0043-05

## Effect of Docetaxel on the Expression of p53 and VEGF in Hepatoma Cells SMMC-7721 Transplanted Tumors in Nude Mice

HE Mi, WANG Jia - ping, ZHANG Lei, SUN Yin, MA Yue

(Dept. of Radiology, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the effect of docetaxel on the expression of p53 and VEGF in hepatoma cells SMMC-7721 transplanted tumor model in nude mice. **Methods** Twenty nude mice with transplant subcutaneous were randomly divided into 2 groups ( $n = 10$ ), docetaxel group and control group. The expression of p53 and VEGF were compared between two groups using envision immunohistochemistry. **Results** After 3 weeks with treatment, p53 in control group was 87.16%, while in docetaxel group was 41.26%. Obviously, the expression of p53 in docetaxel group was lower than that in control group ( $P < 0.05$ ). VEGF in docetaxel group was 36.79%, which was lower than that in control group (68.27%), and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Docetaxel can inhibit the growth, invasion and metastasis of hepatoma cells SMMC-7721 by lowering the expression of p53 and VEGF.

**[Key words]** Docetaxel; Hepatoma cells SMMC-7721; Nude mice; P53; VEGF

原发性肝癌 (primary hepatic carcinoma, PHC) 是我国常见的恶性肿瘤, 其死亡率在消化系统恶性肿瘤中居第三位, 仅次于胃癌和食管癌. 目前有大量动物实验研究为肝癌的临床治疗提供基础

依据<sup>[1]</sup>. 多西紫杉醇作为一种抗肿瘤新药, 已经引起了人们极大兴趣, 并在多种肿瘤中进行了基础和临床应用研究. 本研究通过建立肝癌细胞株 SMMC-7721 裸鼠皮下转移瘤模型, 从 P53、VEGF

**[基金项目]** 云南省社会发展科技计划资助项目 (2009ZC111M)

**[作者简介]** 何迷 (1989~), 女, 云南昆明市人, 在读硕士研究生, 主要从事肝癌的介入临床工作.

**[通讯作者]** 王家平. E-mail:wangjiaping@yahoo.com

基因的角度, 通过免疫组化检测裸鼠肝细胞癌中 p53 与 VEGF 的阳性表达率, 探讨多西紫杉醇在肝癌生长及转移中对上述靶点的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株

人肝癌细胞株 SMMC-7721 由云南省肿瘤医院肿瘤研究所提供。

### 1.2 主要试剂

多西紫杉醇注射液(齐鲁制药有限公司)、胎牛血清(Gibco, Sigma 公司); DMEM 培养液(Hyclony 公司); 0.25%胰蛋白酶(昆明医科大学实验部配制); GeneJET™RNAPurificationKit(Fermentas 公司); DAB 显色剂(福州迈新生物技术开发有限公司); Envision 试剂盒(达科为生物技术有限公司); 多聚甲醛; 兔抗人 P53 多克隆抗体(Neomarkers, US); 兔抗人 VEGF 多克隆抗体(Neomarkers, US)。

### 1.3 实验仪器

超净工作台、细胞培养箱、普通光学显微镜、细胞计数板、4℃冰箱、恒温水浴箱、液氮罐、高速离心机、注射器、CO<sub>2</sub>恒温培养箱、倒置显微镜。

### 1.4 实验动物

BALB/c-nude 裸鼠, 数量不限, 雌性, 4~6 周龄, 体重约 21~23 g, 于北京维通利华实验动物有限公司购买, 昆明医科大学实验动物中心内予 SPF 级层流柜内分笼饲养。

### 1.5 动物模型建立

将适量培养液置于培养瓶中, 细胞从液氮中取出后快速置于 37℃ 恒温水浴箱内快速震荡, 尽快融解, 再将细胞悬液转移到培养瓶中, 混匀后置 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养; 复苏后 24 h 换液, 之后每 3 d 换液 1 次, 当培养细胞生长达培养瓶 80% 左右, 吸出旧培养液后, 置入胰酶, 于培养箱中消化 7~8 min, 轻吹混匀, 转移到离心管中, 1 000 r/min, 5 min 离心, 离心后弃上清, 适量培养液重悬细胞, 按 1:3 传代, 继续培养。按传代方法收集细胞, 加入适量细胞冻存液重悬细胞, 混匀后置冻存管, 放入梯度冻存盒内, 然后直接放到 -80℃ 冰箱中, 24 h 后可冻存到液氮中。取指数生长期 SMMC-7721 肝癌细胞, 制成浓度为  $5.0 \times 10^6/0.2$  mL 的单细胞悬液, 每只动物背部皮下接种 200  $\mu$ L。4 周左右, 待瘤体直径达 0.7~1.1 cm, 将裸鼠随机分为 2 组, 每组 10 只, 按以下方法进行分组处理。

肿瘤对照组: 注射生理盐水 50  $\mu$ g/(0.3 mL·只), 每 3 d 注射 1 次, 连续注射 7 次, 作为阴性对照。

多西紫杉醇组: 注射多西紫杉醇 50  $\mu$ g/(0.3 mL·只), 每 3 d 注射 1 次, 连续注射 7 次。于 3 周后处理动物, 开腹切除整个肝脏, 浸泡在 4% 多聚甲醛中, 进行免疫组化检测。

### 1.6 研究方法

**1.6.1 免疫组化法 (Envision 二步法) 检测 p53 的表达** 石蜡切片, 厚约 4  $\mu$ m, 常规脱蜡、水化, 再将切片浸于 pH6.5 的柠檬酸缓冲液中, 微波加热至沸腾, 作用 10 min 以修复抗原, 然后冷却至室温, 充分水洗、PBS 浸洗, 再将切片浸于 0.6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 甲醇中, 室温下孵育 30 min, 阻断内源性过氧化物酶, 充分水洗, PBS 浸洗, 滴加 1:20 正常兔或羊血清, 室温下孵育 20 min, 滴加特异性单克隆或多克隆抗体 (1:500), 室温下孵育 1 h, PBS 浸洗, 滴加 EnViSion 复合物, 室温下孵育 1 h, PBS 浸洗, DAB 显色, 苏木素衬染, 常规脱水、透明、封固。阴性对照以 PBS 替代一抗, 用已知阳性标本作阳性对照。

免疫组化法 (Envision 二步法) 检测 VEGF 的表达, 方法同上。

**1.6.2 评价标准** p53、VEGF 抗原分别定位于细胞核及细胞浆, 染色均呈棕黄色视为阳性; 选择 4 个高倍 (400 $\times$ ) 光镜视野下进行细胞计数, 至少计数 1 000 个细胞, 记数细胞总数和阳性细胞数, 计算百分率, 取其均数。

### 1.7 统计学处理

所有资料采用 SPSS 统计分析软件包进行处理, 所得数值均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间均数比较用单因素方差分析和 SNK 检验 (Student Newman Keuls, SNK),  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 P53 在肝癌细胞株 SMMC-7721 裸鼠皮下移植瘤中的表达

P53 定位于细胞核, 表达阳性的染色显示为棕黄色或棕褐色, 阳性细胞散在或局灶性分布。光镜下显示 (见图 1), 在同一肿瘤细胞的组织切片中, 阳性细胞的染色呈不均一性分布。对照组 P53 表达最高 (见表 1), 阳性百分率达 87.16%, 而实验组 p53 表达水平明显降低, 只有 41.26%, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

2.2 VEGF 在肝癌细胞株 SMMC-7721 裸鼠皮下移植瘤中的表达

VEGF 位于细胞浆, 表达阳性细胞的染色显示为棕黄色或棕褐色 (图 2), 阳性细胞染色无明显

规律, 染色强度及分布尚均匀. 对照组阳性表达率 (表 2) 约 68.26%, 实验组表达水平较对照组低, 约 36.79%.  $P < 0.05$ , 有统计学差异.

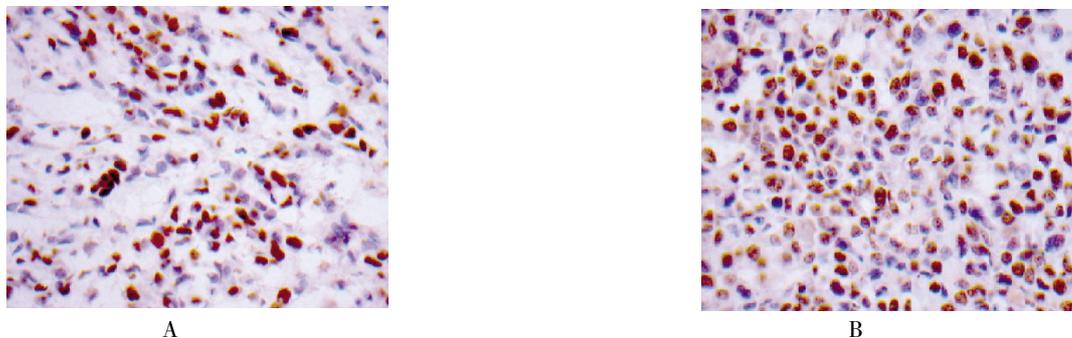


图 1 p53 在瘤细胞中的阳性表达

Fig. 1 The positive expression of p53 in tumor cells in two groups

A:对照组; B:多西紫杉醇组.

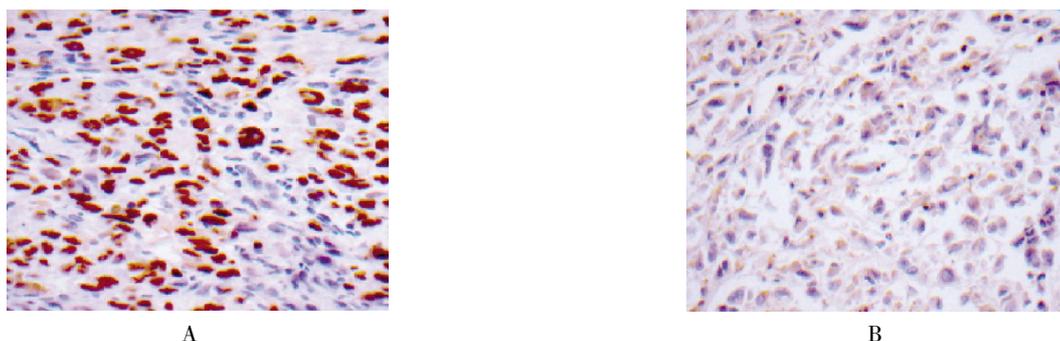


图 2 VEGF 在瘤细胞中的阳性表达

Fig. 2 The positive expression of VEGF in tumor cells in two groups

A:对照组, B:多西紫杉醇组.

表 1 p53 在肝癌细胞株 SMMC-7721 裸鼠皮下移植瘤的表达情况 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 The expression of p53 in hepatocarcinoma SMMC-7721 transplanted tumor ( $\bar{x} \pm s$ )

组 别	n	p53 蛋白的表达 (%)
肿瘤对照组	10	87.16 ± 6.11
多西紫杉醇组	10	41.26 ± 4.28*

与对照组比较, \* $P < 0.05$ .

表 2 VEGF 在肝癌细胞株 SMMC-7721 裸鼠皮下移植瘤的表达情况 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 The expression of VEGF in hepatocarcinoma SMMC-7721 transplanted tumor ( $\bar{x} \pm s$ )

组 别	n	VEGF 蛋白的表达 (%)
肿瘤对照组	10	68.27 ± 6.43
多西紫杉醇组	10	36.79 ± 3.54*

与对照组比较, \* $P < 0.05$ .

3 讨论

多西紫杉醇是一种新型半合成紫杉醇类衍生物, 使微管蛋白及组成微管的微管蛋白二聚体失去动态平衡, 从而能促进微管蛋白聚合, 抑制微管蛋白的解聚及肿瘤细胞纺锤体的形成, 使得肿瘤细胞停止在 G<sub>2</sub> 期和 M 期<sup>[2,3]</sup>, 从而导致细胞死亡. 大多数抗肿瘤药物都是通过诱导细胞凋亡达到抑制细胞增殖, 细胞凋亡又是众多基因调控的复杂的细胞程序性死亡过程<sup>[4]</sup>.

目前的肿瘤基因治疗大致可以从很多方面着手, 其中包括: (1) 抑制癌基因活性. p53 基因是最重要的抗癌基因, 大约 50% 以上的肿瘤中存在 p53 基因的突变, 是最为常见的基因突变<sup>[5]</sup>. 作为转录因子, p53 可结合到靶基因 (如 p21、puma

等) 启动子区的保守结合位点, 调节其转录, 进而参与细胞周期或细胞凋亡等生物学过程的调控<sup>[6]</sup>; 其编码产物 p53 蛋白分野生型和突变型两种. 目前一致认为野生型 p53 (wide-type53, wtp53) 蛋白是基因组卫士, DNA 因为体内外各种因素受损, wtp53 蛋白开始活化, 转录激活一系列下游靶基因, 诱导受损细胞生长停滞、对于发生 DNA 损伤的细胞能阻止其增殖直至损伤修复, 或者使受损细胞发生老化, 或者启动损伤细胞发生凋亡, 阻止具有癌变倾向细胞持续增殖, 从而维持遗传稳定性<sup>[7]</sup>, 但是其半衰期短, 难以通过免疫组化的方法检测出. p53 基因突变后可表达过量的突变型 p53 蛋白, 刺激机体发生免疫应答反应, 产生抗突变型 p53 (mutation-type 53, mtp53) 蛋白的自身抗体, 突变 p53 蛋白由于半衰期延长易积聚于核内并被检出, 因此免疫组化检测到的 p53 蛋白被认为是 p53 基因突变产物. 而 mtP53 与 wtp53 作用相反, 对细胞凋亡有抑制作用, 可以推测, 正常情况下, 体细胞增殖过程中的端粒序列丢失、端粒损伤被 p53 识别, 从而触发 p53 依赖性凋亡或老化途径. 异常情况时, 当 mtp53 大量表达时, 细胞获得增殖优势, 肿瘤细胞增殖不受限制, 利于肿瘤的发生和发展. Ventura<sup>[8]</sup> (等实验所示, 在带有缺陷 p53 的小鼠肿瘤细胞中使 wtp53 表达增多, 肿瘤明显消除. 因此细胞内 p53 野生型和突变型的比例可能是调节细胞增殖、分裂的关键<sup>[9]</sup>. 本研究显示, 对照组裸鼠肝癌组织中 mtp53 的表达高, 多西紫杉醇组 mtp53 的基因表达下降, 两者之间差异显著, 说明多西紫杉醇对 p53 的表达产生了影响, 通过检测结果可知实验组 wtp53 的蛋白明显降低, 从而使其对肿瘤细胞凋亡抑制作用降低, 从而抑制了肿瘤的生长. (2) 抑制肿瘤血管生成: 即通过阻断促血管生长因子作用或强化血管生长抑制因子的表达达到治疗的目的. 恶性肿瘤的生长, 侵袭及转移过程受多种因素的影响, 其中肿瘤诱导的血管生成反应与其生物学行为关系密切. VEGF 是 PDGF (血小板衍生长因子) 家族中的一个重要成员, 目前是最强的促进血管生成的生长因子<sup>[10]</sup>. VEGF 作为肿瘤组织中最主要的血管生成因子, 不仅与 HCC 的肿瘤血管发生、增殖有关, 实验已证实<sup>[11]</sup> VEGF 蛋白及 mRNA 表达主要在 HCC 细胞, 肿瘤组织 VEGF 的表达水平明显高于邻近正常组织的表达, 强阳性染色的肿瘤细胞多位于肿瘤浸润边缘或肿瘤包膜附近, 其表达水平与肿瘤血管化程度呈正相关. 同时对肿瘤浸润和转移起重要作用, 有研究表明<sup>[12]</sup>,

HCC 中发生复发转移, VEGF 的表达均明显高于未复发转移的患者 ( $P < 0.05$ ). 肿瘤易转移和复发; 其浸润和转移的原理大体分为以下几方面: (1) VEGF 能促进血管新生, 增强血管通透性<sup>[13]</sup>. 由于新生肿瘤血管的结构不完善, 通透性强, 肿瘤细胞可以穿过血管壁进入血管向远处转移, 利于肿瘤浸润和转移; (2) VEGF 通过自分泌或者旁分泌的方式结合分布于肝癌细胞膜上的特异性受体 VEGFR<sup>[13]</sup>, 促进其自身生长, 并使肝癌细胞移动能力加强, 增强了癌细胞的浸润和转移能力; (3) VEGF 作用于肝癌细胞后能使之更易发生分离脱落, 利于其运动和转移.

本实验对照组及实验组 VEGF 阳性表达率相差显著, 对照组明显在无多西紫杉醇的情况下, VEGF 蛋白阳性表达率高, 与许多文献证实的 VEGF 在肝癌中高表达一致, 由此可知肿瘤血管生长快速, 血供丰富, 有利于肿瘤的生长和转移. 而实验组由于紫杉醇的作用 VEGF 阳性表达率显著降低, 说明多西紫杉醇对 VEGF 有影响, 抑制了肝癌中 VEGF 的高表达, VEGF 表达下降, VEGF 促血管生成因子分泌减少, 使肿瘤新生血管生成减少, 血供匮乏, 破坏了肿瘤的营养基础而使其生长受限, 同时新生血管减少, 癌细胞向其他器官侵袭和转移的能力明显降低.

综上所述, 肿瘤的凋亡是一个多基因控制的复杂的过程, 本实验着重研究了 P53、VEGF 两个靶点, 结果表明多西紫杉醇可降低人肝癌细胞株 SMMC-7721 裸鼠皮下转移瘤内的 P53、VEGF 的表达水平, 从而降低了肝癌细胞的凋亡的抑制作用, 抑制了肝细胞癌内的微血管生长, 而达到抑制肿瘤生长及转移的作用. 最终可以确定多西紫杉醇对 p53、VEGF 有影响, 但是其进一步的具体机制还有待研究.

#### [参考文献]

- [1] SPERLING J, SCHAFFER T, ZIEMANN C, et al. Hepatic arterial infusion of bevacizumab in combination with oxaliplatin reduces tumor growth in a rat model of colorectal liver metastases [J]. Clin Exp Metastasis, 2012, 29(2): 91 - 99.
- [2] SONG M J, PARK C H, KIM J D, et al. Drug-eluting bead loaded with doxorubicin versus conventional Lipiodol based transarterial chemoembolization in the treatment of hepatocellular carcinoma: a case-control study of Asian patients [J]. Gastroenterol Hepatol, 2011, 23 (6): 521 -

- 527.
- [3] BURREL M, REIG M, FORNER A, et al. Survival of patients with hepatocellular carcinoma treated by transarterial chemoembolization (TACE) using Drug Eluting Beads Implications for clinical practice and trial design [J]. *Hepatology*, 2012, 56(6): 1330 – 1335.
- [4] LIU J J, YANG C L, JIANG J H, et al. Mechanism of SGC-7901. apoptosis induced by Houttuynia cordata rhizome subterranean stem extraction [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2014, 30(2): 257 – 261.
- [5] KEEGAN P E, LUNEC J, NEAL D E. p53 And p53 – regulated genes in bladder cancer [J]. *Br J Urol*, 1998, 82(5): 710 – 720.
- [6] MULLER P A, VOUSDEN K H. P53 mutations in cancer [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 5(1): 2.
- [7] 戴大英. 肿瘤抑制基因 P53 和 P21/WAF1/Cip1/Sd1 的相关性 [J]. *生理、病理科学与临床分册*, 2000, 20(6): 440 – 442.
- [8] VENTURA A, KIRSCH D G, MCLAUGHLIN M E, et al. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo [J]. *Nature*, 2007, 445(7128): 661 – 665.
- [9] DEY A, VERMA C S, LANE D P. Updates on P53: modulation of P53 degradation as a therapeutic approach [J]. *Br J Cancer*, 2008, 98(1): 4 – 8.
- [10] ALITALO K, TAMMELA T, PETROVA T V. Lymphangiogenesis in development and human disease [J]. *Nature*, 2005, 438(7070): 946 – 953.
- [11] CHEN Z Y, WEI W, GUO Z X. Using multiple cytokines to predict hepatocellular carcinoma recurrence in two patient cohorts [J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(3): 733 – 740.
- [12] 高建芝, 杜经丽, 李佳. VEGF 相关信号通路在肝癌组织中的表达及临床意义 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2014, 30(1): 75 – 78.
- [13] BACHELDER, ROBIN E/RE, WENDT, et al. Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4 [J]. *Cancer Research*, 2002, 62(24): 7203 – 7206.
- [14] KIM B K, KIM B R, LEE H J. Tumor-suppressive effect of a telomerase-derived peptide by inhibiting hypoxia-induced HIF-1 $\alpha$ -VEGF signaling axis [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(9): 2924 – 2933.
- (2014 – 11 – 17 收稿)

(上接第 42 页)

- 18482 – 18488.
- [6] COHEN S, CIECHANOVER A, KRAVTSOVA-IVANTSIV Y, et al. ABIN-1 negatively regulates NF- $\kappa$ B by inhibiting processing of the p105 precursor [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 389(2): 205 – 210.
- [7] VALLABHAPURAPU S, KARIN M. Regulation and function of NF- $\kappa$ B transcription factors in the immune system [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27(3): 693 – 733.
- [8] OSHIMA S, TURER E E, CALLAHAN J A, et al. ABIN-1 is a ubiquitin sensor that restricts cell death and sustains embryonic development [J]. *Nature*, 2009, 457(722): 906 – 909.
- [9] GUREVICH I, ZHANG C, FRANCIS N, et al. TNIP1, a retinoic acid receptor corepressor and A20-binding inhibitor of NF- $\kappa$ B, distributes to both nuclear and cytoplasmic locations [J]. *Histochem Cytochem*, 2011, 59(12): 1101 – 1112.
- [10] GUREVICH I, ZHANG C, FRANCIS N, et al. Human TNF $\alpha$ -induced protein 3-interacting protein 1 (TNIP1) promoter activation is regulated by retinoic acid receptors [J]. *Gene*, 2013, 515(1): 42 – 48.
- [11] ENCARNACAO P C, RAMIREZ V P, ZHANG C, et al. Sp sites contribute to basal and inducible expression of the human TNIP1 (TNF $\alpha$ -inducible protein 3-interacting protein 1) promoter [J]. *Biochem J*, 2013, 452(3): 519 – 529.
- (2014 – 09 – 08 收稿)