

罗格列酮逆转人胃癌裸鼠移植瘤对丝裂霉素耐药的作用

廖文秋¹, 张 琍¹, 李国庆¹

(南华大学第二附属医院 消化内科, 湖南 衡阳 421001)

摘要: 目的 观察 PPAR γ 激动剂罗格列酮(ROS)能否逆转人胃癌 SGC7901/VCR 细胞裸鼠移植瘤对丝裂霉素(MMC)的耐药作用。方法 建立人胃癌 SGC7901/VCR 细胞裸鼠移植瘤模型,将 48 只裸鼠随机分为 6 组:空白对照组(生理盐水 0.2 mL 灌胃)、MMC 组(MMC 2.5 mg/kg 腹腔注射)、ROS 组(ROS 100 mg/kg 灌胃)、MMC + ROS 中剂量组(MMC 2.5 mg/kg 腹腔注射 + ROS 50 mg/kg 灌胃)、MMC + ROS 高剂量组(MMC 2.5 mg/kg 腹腔注射 + ROS 100 mg/kg 灌胃)、MMC + CSA 组(MMC 2.5 mg/kg 腹腔注射 + CSA 50 mg/kg 灌胃)。每组 8 只裸鼠;用药 40 天后,观察各组裸鼠体重和移植瘤体积变化,计算抑瘤率,绘制移植瘤的生长曲线;HE 染色观察移植瘤的组织形态。结果 处死前各组裸鼠体重差异无统计学意义($P > 0.05$);空白对照组、MMC 组移植瘤体积和抑瘤率差异无显著性($P > 0.05$),ROS 组、MMC + ROS 中剂量组、MMC + ROS 高剂量组、MMC + CSA 组与空白对照组、MMC 组比较移植瘤体积和抑瘤率差异均有显著性($P < 0.05$)。结论 罗格列酮可抑制人胃癌 SGC7901/VCR 细胞裸鼠移植瘤体生长,罗格列酮可部分逆转人胃癌 SGC7901/VCR 细胞裸鼠移植瘤对丝裂霉素的耐药性。

关键词: PPAR γ ; 罗格列酮; 多药耐药; SGC7901/VCR 细胞株

中图分类号:R735.2

文献标识码:A

文章编号:2095-1116(2011)01-0058-04

The Effect of Reversing the Resistance to Mitomycin in Nude Mice Xenografts of Human Gastric Carcinoma by Rosiglitazone

LIAO Wen-qiu, ZHANG Li, LI Guo-qing

(Department of Medicine Digest, the Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunnan, 421001, China)

Abstract: Objective To explore whether Rosiglitazone (ROS), a selective Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) ligand, can reverse the resistance to Mitomycin (MMC) of human gastric cancer SGC7901/VCR cell transplanted into mice which has multidrug resistant phenotype. **Methods** The model of xenografts tumor in nude mice were established by inoculating human gastric cancer cells line SGC7901/VCR into the back of nude mice subcutaneously. Forty-eight male nude mice were divided into six groups: Control group, MMC group, ROS group, MMC combined moderate dose ROS group, MMC combined high dose ROS group, MMC combined cyclosporineA (CSA) group. There were eight mice in each group. After treated for forty days, the volume changes of tumor and tumor inhibition rates were observed, the growth curve of xenograft tumor was drawn. Morphology of the xenograft tumor was observed by HE stain. **Results** The difference of the average transplantable tumor weight in the Control group and other groups were not statistically different before executed ($P > 0.05$). After medication the effect on the volume of transplantable tumor and tumor inhibition rates; there was no significant difference between Control group and MMC group ($P > 0.05$), the difference of tumor volume and tumor inhibition rates were significant between other groups compared with Control group and MMC group ($P < 0.05$). **Conclusions** Rosiglitazone inhibits the growth of tralantable tumor of SGC7901/VCR cell. Rosiglitazone can reserve the drug resistance of transplantable tumor of SGC7901/VCR cell to MMC partly in vivo.

收稿日期:2010-09-06

基金项目:湖南省卫生厅资助项目(2007110),湖南省自然科学基金资助项目(08JJ5002),湖南省科技厅资金资助项目(2009SK3138).

通讯作者:张琍,教授,硕士生导师, E-mail:hyzhangli@163.com.

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,在我国发病率和死亡率居消化道肿瘤首位。化学药物治疗是晚期患者和手术无法根治病人的主要治疗手段。肿瘤的多药耐药性(multidrugresistance,MDR)是指肿瘤细胞接触一种抗肿瘤药物并产生耐药后,同时对结构和作用机理不同的多种天然来源的抗肿瘤药物具有交叉耐药。MDR是肿瘤细胞耐药的常见方式,也是肿瘤化疗失败的主要原因。克服MDR现象已成为国内外的研究热点。然而,目前有关在体内能否逆转肿瘤多药耐药国内外尚未见类似报道。

本实验将人胃癌SGC7901/VCR细胞移植于裸小鼠皮下建立移植瘤模型,观察不同浓度的罗格列酮及罗格列酮与丝裂霉素联用,对裸鼠移植瘤瘤体的体积,组织形态学变化,观察罗格列酮是否逆转人胃癌裸鼠移植瘤对丝裂霉素耐药的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株和动物 人胃癌多药耐药细胞株SGC7901/VCR购自中南大学肿瘤研究所;6~8周龄雄性BABL/c小鼠,48只,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。

1.1.2 主要试剂: RPMI-1640培养基购于Gibco BRL公司;长春新碱为深圳万乐有限公司生产;罗格列酮购于武汉远城科技发展有限公司;丝裂霉素购于浙江海正药业股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 SGC7901/VCR细胞于终浓度含1 mg/L长春新碱(VCR)的10%小牛血清RPMI-1640培养基中培养维持耐药,置于37 $^{\circ}$ C,95%饱和湿度、含5%CO $_2$ 孵箱中培养,每1~2天换一次液,于细胞80%汇合时,用0.25%的胰酶细胞消化液消化,1:2或1:3传代一次。实验前2周撤除VCR。

1.2.2 动物实验 将人胃癌SGC7901/VCR细胞收集后接种于裸鼠背部皮下,观察移植后裸鼠的成瘤情况,术后两周将48只成瘤裸鼠随机分为6组:空白对照组(生理盐水0.2 mL灌胃)、MMC组(MMC 2.5 mg/kg腹腔注射)、ROS组(ROS 100 mg/kg灌胃)、MMC+ROS中剂量组(MMC 2.5 mg/kg腹腔注射+ROS 50 mg/kg灌胃)、MMC+ROS高剂量组(MMC 2.5 mg/kg腹腔注射+ROS 100 mg/kg灌胃)、MMC+CSA组(MMC 2.5

mg/kg腹腔注射+CSA50 mg/kg灌胃)。每组8只裸鼠;待移植瘤长至大小约100 mm 3 时开始分别给每组裸鼠灌胃给药(均为每两天一次),每5天分别测量每只裸鼠移植瘤的体积并给裸鼠称重,40天后处死动物,计算抑瘤率,并据此绘制移植瘤的生长曲线。肿瘤体积=(长径 \times 短径 2)/2;抑瘤率=(对照组肿瘤体积-实验组肿瘤体积)/对照组肿瘤体积 \times 100%。

1.2.3 组织形态学观察 将移植瘤在10%的中性福尔马林中固定24 h,石蜡包埋,切片,HE染色,光学显微镜下观察细胞形态变化。

1.3 统计学分析

采用SPSS13.0统计学软件进行结果处理,各组实验数据以均数 \pm 标准差表示,实验组与对照组的比较采用单基因方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 各组裸鼠体重及移植瘤体积变化

与空白对照组比较,MMC组移植瘤体积差异无显著性($P > 0.05$)。ROS组、MMC+ROS中剂量组、MMC+ROS高剂量组及MMC+CSA组与空白对照组及MMC组比较移植瘤体积均有明显缩小($P < 0.05$),其中以MMC+ROS高剂量组、MMC+CSA组的体积缩小最明显。各组移植瘤体积的变化见表1。

空白对照组有4只裸鼠瘤体表面有溃烂,MMC+ROS中剂量组有一只裸鼠瘤体表面有溃烂;如表2所示,各组动物肿瘤前体重差异无显著性($P > 0.05$),而各用药组之间及用药组与空白对照组之间的处死前体重无明显差异($P > 0.05$);从各用药组的抑瘤率(表1)及绘制移植瘤的生长曲线中

表1 各组移植瘤体积及抑瘤率的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	瘤体体积(mm 3)	抑瘤率(%)
空白对照组	437.39 \pm 5.74	0.00
MMC组	431.97 \pm 8.76	1.23
ROS组	120.76 \pm 2.51 ^{ab}	72.39
MMC+ROS中剂量组	114.74 \pm 3.77 ^{abc}	73.77
MMC+ROS高剂量组	103.35 \pm 3.30 ^{abcd}	76.37
MMC+CSA组	102.38 \pm 2.18 ^{abcd}	76.60

与空白对照组比较;a: $P < 0.05$;与MMC组比较;b: $P < 0.05$;与ROS组比较;c: $P < 0.05$;与MMC+ROS中剂量组比较;d: $P < 0.05$

(图1),可看出丝裂霉素对移植瘤生长无明显抑制作用($P > 0.05$),罗格列酮或丝裂霉素联合罗格列酮或环孢霉素A用药后对移植瘤生长有抑制作用($P < 0.05$),MMC + ROS高剂量组和MMC + CSA组的作用最强,罗格列酮抑制移植瘤的作用呈剂量依赖关系。

表2 各组裸鼠的体重变化(g)

组别	建模前裸鼠体重	处死前裸鼠体重
空白对照组	21.88 ± 0.44	25.13 ± 0.21
MMC组	22.26 ± 0.36	24.76 ± 0.44
ROS组	22.19 ± 0.22	24.81 ± 0.33
MMC + ROS中剂量组	22.29 ± 0.38	24.90 ± 0.23
MMC + ROS高剂量组	22.03 ± 0.14	24.80 ± 0.22
MMC + CSA组	22.18 ± 0.15	24.82 ± 0.36

2.2 各组移植瘤的组织学变化

如图2所示(HE染色),其中肿瘤细胞染成蓝色

色,间质呈红色。空白对照组和MMC组中肿瘤细胞及间质最为丰富,其他各用药组肿瘤细胞及间质相对较少,其中以MMC + ROS高剂量组和MMC + CSA组中肿瘤细胞及间质最少。

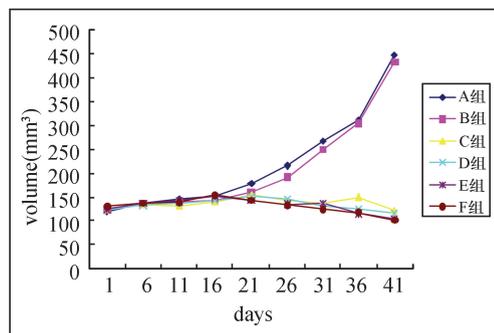


图1 各组移植瘤的生长曲线图

注:A组:空白对照组;B组:MMC组;C组:ROS组;D组:MMC + ROS中剂量组;E组:MMC + ROS高剂量组;F组:CSA + MMC组

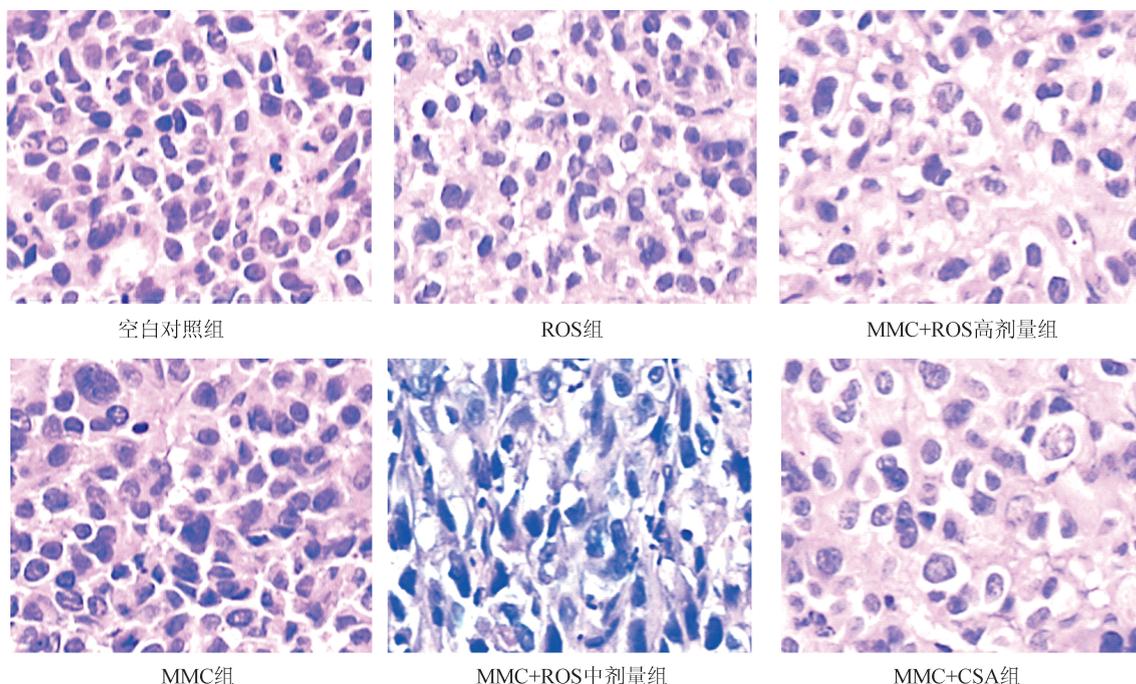


图2 各组移植瘤的组织学变化(HE × 400)

3 讨论

过氧化物酶体增殖因子活化受体(peroxisome proliferation-activated receptors, PPARs)是一组核激素受体,与其配体结合后可启动核内靶基因的转录,已发现有PPAR α 、PPAR β 及PPAR γ 三个亚型。

PPAR γ 配体参与脂肪细胞分化、调节糖代谢平衡、调控细胞周期、抑制炎症反应、诱导肿瘤细胞分化和凋亡等作用^[1]。Satotff等^[2,3]发现PPAR γ 在高、中、低分化胃腺癌及伴肠化生的胃黏膜中均有表达,当PPAR γ 被曲格列酮和15 d-PGJ2激活后可产生抗肿瘤效应,并呈剂量依赖关系,与消化道肿瘤的发

生、发展和预后呈负相关。25 mg/kg 的罗格列酮能缩小低分化胃腺癌 MGC803 细胞裸鼠移植瘤瘤体体积,并随着用药浓度的增加,抑瘤率也增加,呈剂量依赖关系^[4]。ROS 抑制低分化胃腺癌 MGC803 的裸鼠移植瘤的生长,显著降低新生血管密度(MVD),并抑制 VEGF mRNA 和 HIF mRNA 的表达^[5]。本实验结果显示 100 mg/kg ROS 组裸鼠移植瘤瘤体体积较生理盐水组明显减少,差异有显著性($P < 0.05$)。提示 ROS 能够抑制人胃癌 SGC7901/VCR 细胞裸鼠移植瘤瘤体的生长和增殖。

已有研究表明 PPAR γ 配体曲格列酮对肿瘤细胞的多药耐药性有明显的逆转作用,并通过不同的机制抑制肿瘤的生长^[6]。胡剑峰等^[7]发现 PPAR γ 配体罗格列酮在体外能部分逆转 SGC7901/VCR 细胞对丝裂霉素的耐药性。采用药物浓度梯度法由 SGC7901 细胞株诱导的 SGC7901/VCR 细胞株,对 VCR 具有明显的耐受性,能够在含有 1 mg/L VCR 的培养基中能持续增殖,对丝裂霉素 C (mitomycin, MMC)、顺铂 (cisplatin, DDP)、阿霉素 (adriamycin, ADM)、5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-Fu) 产生交叉耐药,具有明显的多药耐药特点^[8]。本实验示丝裂霉素组与生理盐水组比较,差异无显著性($P > 0.05$),说明人胃癌 SGC7901/VCR 细胞裸鼠移植瘤对 MMC 耐药;ROS 组对人胃癌 SGC7901/VCR 细胞裸鼠移植瘤瘤体生长有明显的抑制作用($P < 0.05$),说明人胃癌 SGC7901/VCR 细胞裸鼠移植瘤对 ROS 敏感。ROS 联合 MMC 组对人胃癌 SGC7901/VCR 细胞裸鼠移植瘤的抑制作用明显强于 ROS 组(50 mg/kg 罗格列酮与 2.5 mg/kg MMC 联用比 100 mg/kg 罗格列酮的抑瘤作用强)并呈量效正相关。Qadir M 等^[9]研究证明环孢霉素 A 是一种广谱多药耐药逆转剂。本实验示 100 mg/kg 罗格列酮与 50 mg/kg 环孢霉素 A 比较差异无显著性($P > 0.05$)。说明 ROS 可逆转人胃癌 SGC7901/VCR 细胞株裸鼠移植瘤对 MMC 耐药性并呈量效正相关。但其机制仍不十分清楚, Cao LQ 等^[10]发现 PPAR γ 配体 ROS 上调 PTEN 抑癌基因,并呈时间、剂量依赖形式,PTEN 作为 AKT 磷酸化作用的抑制因子,阻断了磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/AKT 这一信号途径,并且 PTEN 抑癌基因编码的蛋白表达降低可失去对 PI3K/AKT 途径的下调作用^[11]。抑制 PI3K/Akt 途径活性可逆转肝蛋白介导的胃癌细

胞耐药和降低 P-gp 和 Bcl-2 的表达^[12],但这仍需要进一步的实验加以证实。

参考文献:

- [1] Krishnan A, Nair SA, Pillai MR, et al. Biology of PPAR gamma in cancer: a critical review on existing lacunae [J]. *Curr Mol Med*, 2007, 7(6): 532-540.
- [2] Sato H, Ishihara S, Kawashima K, et al. Expression of Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) gamma in gastric cancer and inhibitory effects of PPARgamma agonists [J]. *Br J Cancer*, 2000, 83(10): 1394-1400.
- [3] Ma XM, Yu H, Huai N, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is essential in the pathogenesis of gastric carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(31): 3874-3883.
- [4] 朱理辉, 张 琍. PPAR γ 激活剂罗格列酮抑制人胃癌 MGC803 增殖机制的研究 [J]. *实用癌症杂志*, 2005, 20(6): 564-567.
- [5] 文 澜, 张 琍, 李国庆, 等. 罗格列酮联用维甲酸抗胃癌裸鼠移植瘤血管生成的研究 [J]. *中华消化杂志*, 2006, 26(10): 670-674.
- [6] Davies GF, Juurlink BH, Harkness TA, et al. Troglitazone reverses the multiple drug resistance phenotype in cancer cells [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2009, 3: 79-88.
- [7] 胡剑峰, 张 琍. 罗格列酮逆转人胃癌细胞多药耐药及机制的实验研究 [D]. 南华大学(学位论文) 2007, 5.
- [8] 蔡学君, 张学庸, 樊代明. 胃癌耐药细胞株耐药谱的体外实验 [J]. *第四军医大学学报*, 1994, 15(2): 78-79.
- [9] Qadir M, O'Loughlin KL, Fricke SM, et al. Cyclosporin A is a broad-spectrum multidrug resistance modulator [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(6): 2320-2326.
- [10] Cao LQ, Chen XL, Wang Q, et al. Upregulation of PTEN involved in rosiglitazone-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(6): 879-887.
- [11] DeGraffenried LA, Fulcher L, Friedrichs WE, et al. Reduced PTEN expression in breast cancer cells confers susceptibility to inhibitors of the PI3 kinase/Akt pathway [J]. *Ann Oncol*, 2004, 15(10): 1510-1516.
- [12] Liang J, Ge F, Guo C, et al. Inhibition of PI3K/Akt partially leads to the inhibition of PrP(C)-induced drug resistance in gastric cancer cells [J]. *FEBS J*, 2009, 276(3): 685-694.

(此文编辑 蒋湘莲)