

PPAR- γ 通路在尼美舒利抑制胃癌小鼠癌细胞生长中的作用

唐涛¹, 费素娟², 刘军权³, 陈复兴³, 李伟平¹

(1. 湖州市中心医院, 浙江 湖州 313000; 2. 徐州医学院附属医院, 江苏 徐州 221000;

3. 中国人民解放军第九七医院, 江苏 徐州 221000)

摘要: [目的] 研究尼美舒利(NIM)是否通过过氧化物酶增殖物激活受体 γ (PPAR- γ)途径影响胃癌细胞体内生长。[方法] 通过培养人胃癌 SGC-7901 细胞, 建立裸鼠胃癌移植瘤模型。设立 GW9662+NIM 组、生理盐水组、GW9662 组、NIM 组共 4 组。3 周后测量各组裸鼠移植瘤体积, 并采用免疫组化法检测裸鼠移植瘤组织 PPAR- γ 表达。[结果] NIM 组裸鼠移植瘤体积较生理盐水组明显小, 而 GW9662+NIM 组较 NIM 组移植瘤体积大, 各组之间差异有显著性($P<0.05$)。GW9662+NIM 组与 NIM 组相比, 移植瘤组织的 PPAR- γ 蛋白表达降低。[结论] 尼美舒利在体内能抑制胃癌细胞的生长, PPAR- γ 通路可能在此过程中发挥重要作用。

关键词: 胃肿瘤; 移植瘤; PPAR- γ ; 尼美舒利; 肿瘤生长

中图分类号: R73-75.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)05-0327-05

Role of PPAR- γ Pathway in Tumor Growth Inhibition Induced by Nimesulide in Mice with Gastric Cancer

TANG Tao¹, FEI Su-juan², LIU Jun-quan³, et al.

(1. Huzhou Central Hospital, Huzhou 313000, China; 2. The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000, China; 3. The 97th Hospital of PLA, Xuzhou 221000, China)

Abstract: [Purpose] To study the role of PPAR- γ pathway in tumor growth inhibition induced by nimesulide (NIM) in stomach cancer cells in vivo. [Methods] Nude BABL/c mice were implanted with SGC-7901 as human gastric cancer xenograft model, which were randomly divided into 4 groups: control group, GW9662 group, NIM group and GW9662+NIM group. The volume of transplantation tumors was measured and the expression of PPAR- γ protein was detected by immunohistochemistry after three weeks. [Results] The volume of transplantation tumors in nude mice in NIM group was smaller than that in the control group, but the volume of transplanted tumor in GW9662+NIM group was bigger than that in the NIM group. There was significantly different among the 4 groups ($P<0.05$). Compared with NIM group, the expression of PPAR- γ protein in transplanted tumor decreased obviously in GW9662+NIM group. [Conclusion] Nimesulide is capable of inhibiting tumor growth in nude mice. PPAR- γ pathway may play an important role in this process.

Subjects words: stomach neoplasms; transplantation tumor; PPAR- γ ; nimesulide; tumor growth

尼美舒利(nimesulide, NIM)属于磺酰苯胺类非甾体抗炎药(NSAIDs), 具有良好的抗炎、镇痛和解热作用。有研究报道 NIM 对消化道肿瘤具有防治作用, 可促进消化道肿瘤细胞凋亡, 抑制肿瘤细胞生长^[1,2], 并可增加肿瘤细胞对放疗的敏感性^[3]。但有关 NSAIDs 的抗癌机制目前尚不十分明确, 多数学

者认为 NSAIDs 主要通过抑制 COX 途径发挥抗肿瘤作用, 但随着研究的深入, 越来越多的证据提示这并非唯一的或最重要的抗肿瘤机制^[4], 非 COX 途径在 NSAIDs 的抗肿瘤机制中也具有重要作用, 对这些途径的深入研究将有利于从机制上阐明 NSAIDs 的抗癌作用。

过氧化物酶增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs) 是一类由配体激活的核转录因子。PPAR- γ 在影响肿瘤生长^[5]等方面也发挥着重要作用, PPAR- γ 在脂肪肉瘤、乳腺癌、结

基金项目: 江苏省徐州市科技局社会发展项目(X20052321)

通讯作者: 费素娟, 科主任, 主任医师, 硕士生导师, 教授, 硕士; 徐州医学院附属医院消化内科, 江苏省徐州市淮海西路 99 号(221000); E-mail: feisuj1031@yahoo.com.cn.

收稿日期: 2012-12-24; **修回日期:** 2013-02-12

肠癌、肺癌等肿瘤组织和细胞系中均有较高水平的表达,在胃癌细胞上亦有表达,PPAR- γ 激活剂能诱导胃癌细胞分化,抑制其增殖,促进其凋亡。PPAR- γ 配体应用于肿瘤治疗的研究具有重要意义。有研究提示,一些 NSAIDs 也是 PPAR- γ 的激活剂,两者在肿瘤发生和演进中的相互作用关系尚不明确,有鉴于此,我们将 PPAR- γ 引入对 NSAIDs 影响胃癌细胞凋亡及增殖机制中的研究,探讨 PPAR- γ 在 NSAIDs 影响胃癌细胞凋亡及增殖机制中发挥的作用及其机制,以期为临床提供胃癌防治的新策略。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人胃癌细胞系 SGC-7901 购自上海细胞生物研究所。实验动物:健康雄性的 BALB/c 裸小鼠 20 只,SPF 级,3~4 周龄,体重 18~22g,购自上海实验动物中心(合格证号:2081594)。胰蛋白酶、小牛血清、RPMI 1640 细胞培养液购自美国 GIBCO 公司,尼美舒利购自美国 Sigma 公司,GW9662 购自 Cayman 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

20 只裸鼠随机分成 4 组:生理盐水组、GW9662 组、NIM 组和 GW9662+NIM 组。每组 5 只。

1.2.2 细胞培养

胃腺癌细胞株 SGC-7901 常规培养于含 10% 小牛血清,含有双抗(青霉素 100U/ml 及链霉素 100U/ml)的 RPMI 1640 培养液中,置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱内培养,常规消化传代。

1.2.3 裸鼠 SGC-7901 胃腺癌细胞移植瘤模型的建立及药物干预

收集对数生长期 SGC-7901 细胞,接种于裸鼠背部皮下组织内 (0.2ml, 2×10^6 /L)。实验和饲养均在 SPF 条件下的超净工作台中进行,成瘤率为 100%。待肿瘤生长至 1.2cm³ 大小,约需 2 周时间,先处死皮下荷瘤裸鼠,皮肤消毒,取出皮下肿瘤,立即浸入含青霉素、链霉素各 100U/ml 的生理盐水中。剔除周围结缔组织,取肿瘤生长旺盛的组织,剪碎成约 1.5mm³ 大小碎块,再次种植于其他裸鼠背部皮下组织内。GW9662+NIM 组于接种次日开始腹腔注射

GW9662 1mg/kg, 半小时后灌胃服用 NIM 3mg/kg, NIM 组于接种次日开始灌胃服用 NIM 3mg/kg, GW9662 组于接种次日开始腹腔注射 GW9662 1mg/kg, 生理盐水组腹腔注射生理盐水。

1.2.4 观察肿瘤生长情况并测量移植瘤体积

第 21d 处死裸鼠,取出肿瘤结节。用游标卡尺测量 4 组胃癌种植瘤的长径、短径,比较 4 组胃癌组织学改变。按下式计算肿瘤体积:肿瘤体积=1/2 长径 \times 短径^[7]。裸鼠移植肿瘤取出后,立即置于冰冻切片连续切片(8 μ m),制成冰冻切片,进行 HE 染色。

1.2.5 免疫组化染色检测各组小鼠 PPAR- γ 蛋白的表达

免疫组化染色检测各组小鼠 PPAR- γ 蛋白, PPAR- γ 蛋白以细胞核染色为棕黄色或深棕黄色为阳性细胞。单纯细胞质着色而胞核无着色,或细胞核、细胞浆均无着色为阴性。同时计算每例切片 10 个高倍视野中阳性细胞率(阳性细胞占计数细胞的比例)。

1.2.6 统计学处理

所有数值均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS18.0 统计分析软件进行分析,组间采用析因设计的分析,组内采用 *t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裸鼠移植瘤模型建立

20 只裸鼠均建模成功,服用药物过程顺利,无明显不适反应(Figure 1)。

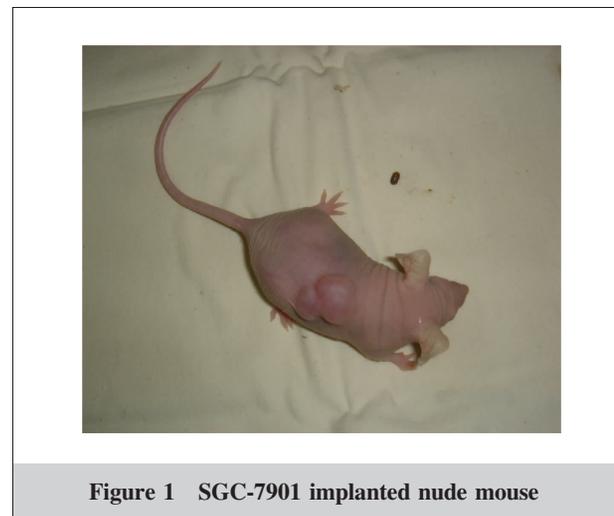


Figure 1 SGC-7901 implanted nude mouse

2.2 用药3周后各组裸鼠移植瘤的体积变化

肿瘤形态多数为半球形,偶尔表现为分叶状。生理盐水组及 GW9662 组肿瘤生长速度基本一致,生长较迅速,平均体积分别为 $(63.83 \pm 17.08) \text{mm}^3$ 和 $(67.42 \pm 17.17) \text{mm}^3$ 。GW9662+NIM 组相对于生理盐

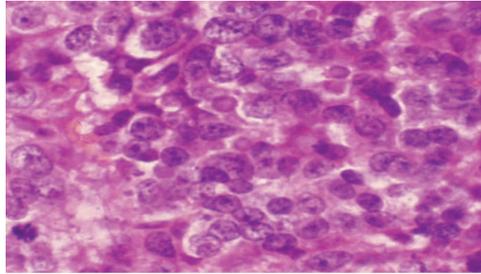


Figure 2 HE staining,transplantation tumor tissue in physiological saline group ($\times 400$)

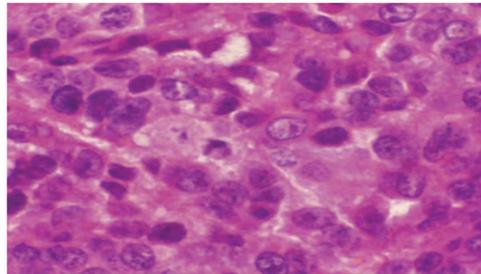


Figure 3 HE staining,transplantation tumor tissue in GW9662 group ($\times 400$)

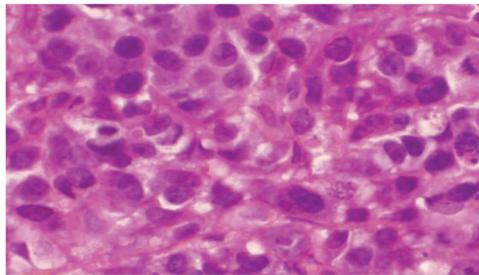


Figure 4 HE staining,transplantation tumor tissue in NIM group ($\times 400$)

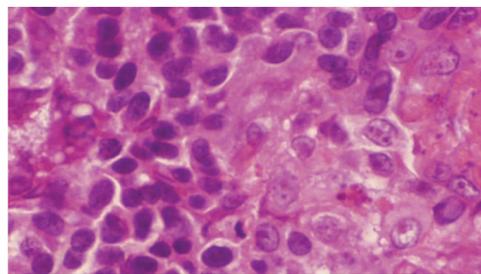


Figure 5 HE staining,transplantation tumor tissue in GW9662+NIM group ($\times 400$)

水组肿瘤生长速度变缓,肿瘤体积较小,为 $(44.17 \pm 10.98) \text{mm}^3$ 。NIM 组则肿瘤增长明显变缓,平均体积为 $(2.50 \pm 1.08) \text{mm}^3$ 。除生理盐水组与 GW9662 组之间差异无显著性($P > 0.05$)外,其余各组之间均有显著差异($P < 0.05$)。上述结果显示 NIM 对皮下瘤生长的抑制作用明显优于 GW9662+NIM 组。

2.3 移植瘤组织 HE 染色

生理盐水组、GW9662 组细胞核内染色质松散,可见核仁,显示细胞增殖活跃,而 NIM 组细胞核深染,很少见核仁,切片内还可见到坏死的组织, GW9662+NIM 组可见部分细胞核染色质松散,部分细胞核深染,提示 NIM 抑制肿瘤的作用被 GW9662 部分减弱 (Figure 2~5)。

2.4 免疫组化法检测裸鼠移植瘤组织 PPAR- γ 蛋白的表达

GW9662 组较生理盐水组无明显变化;NIM 组较生理盐水组移植瘤组织的 PPAR- γ 蛋白表达明显增强, GW9662+NIM 组小鼠与 NIM 组相比,移植瘤组织的 PPAR- γ 蛋白表达减低。析因设计的统计分析显示 NIM 和 GW9662 对裸鼠移植瘤组织存在交互作用($P = 0.047$) (Table 1, Figure 6~9)。

3 讨论

本实验选用 NIM 对胃癌移植瘤进行干预,因其

Table 1 Comparison of PPAR- γ protein expression in transplantation tumor tissues in 4 groups ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Groups	PPAR- γ expression
Physiological saline group	42.13 \pm 4.09
GW9662 group	39.16 \pm 3.97
NIM group	72.36 \pm 11.69 ^{Δ}
GW9662+NIM group	51.97 \pm 12.57*

Note: Compared with physiological saline group, ^{Δ} $P < 0.05$; Compared with NIM group, * $P < 0.05$.

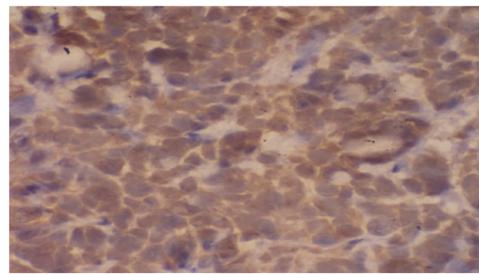


Figure 6 Immunohistochemical staining, PPAR- γ protein expression in physiological saline group ($\times 400$)

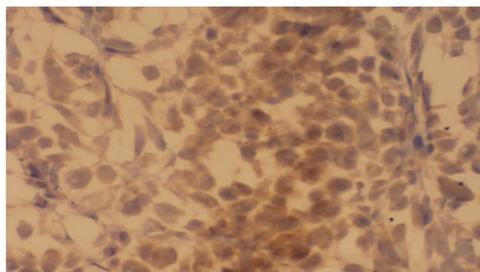


Figure 7 Immunohistochemical staining, PPAR- γ protein expression in GW9662 group ($\times 400$)

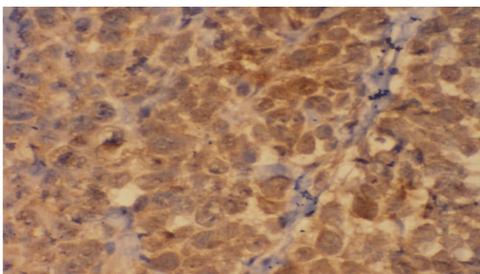


Figure 8 Immunohistochemical staining, PPAR- γ protein expression in NIM group ($\times 400$)

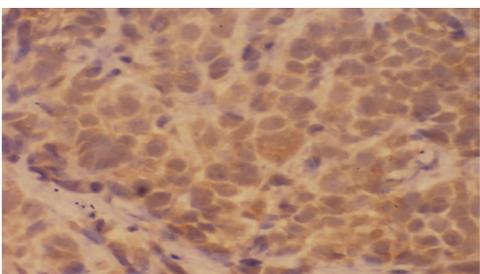


Figure 9 Immunohistochemical staining, PPAR- γ protein expression in GW9662+NIM group ($\times 400$)

为特异性作用于 COX-2 的 NSAIDs 药物, 胃肠道不良反应较小。HE 及免疫组化证实其在成功建立的裸鼠胃癌移植瘤模型体内作用后, 移植瘤肿瘤细胞体积及病理组织学均明显受到抑制。

最新研究发现 II 型核受体超级家族成员 PPAR- γ 可能为一肿瘤抑制因子, 在体内、体外的实验中, PPAR- γ 在多种肿瘤中均有所表达, 其配体能诱导异常分化的上皮细胞生长停滞并使这些细胞具有一些分化成熟的生长特征, 在调控肿瘤细胞的生长、分化及凋亡等方面起重要的转录调节作用。PPAR- γ 的强表达能抑制胃肠道肿瘤的生长。PPAR- γ 的配

体据来源分为天然配体和合成配体两大类。NSAIDs (吲哚美辛、布洛芬等) 为重要的合成配体之一, NSAIDs 及其代谢产物可以和 PPAR- γ 结合, 是一种 PPAR- γ 激动剂^[6]。目前很多研究都证实 PPAR- γ 被激活后而发挥潜在的抗肿瘤增殖, 促进肿瘤细胞凋亡, 诱导肿瘤细胞分化, 抑制肿瘤新生血管形成和抑制肿瘤浸润与转移, 从而达到治疗肿瘤的作用^[7,8]。基于以上研究, 我们推测 PPAR- γ 转录调节通路是 NSAIDs 抑制胃癌细胞生长的重要机制。

GW9662 为特异性 PPAR- γ 抑制剂, 能够与 PPAR- γ 285 位的半胱氨酸结合, 从而抑制 PPAR- γ 的作用^[9]。Mehta 等^[10]报道 GW9662 可成功阻断 PPAR- γ 与雌激素受体间的相互作用, 抑制率高达 90%。Leesnitzer 等^[9]证实 GW9662 可阻断 PPAR- γ 所诱导的脂细胞分化。本实验在使用 NIM 的基础上应用 GW9662 干预, 发现 PPAR- γ 被抑制后, NIM 抗裸鼠胃癌移植瘤生长的作用被减弱。说明 NSAIDs 通过 PPAR- γ 途径发挥抗肿瘤作用。体内实验亦证明 GW9662 可以部分阻碍 NIM 抑制胃癌细胞增殖的作用, 抑制其凋亡。然而 PPAR- γ 通路抗肿瘤的机制很复杂, 我们根据既往研究推测可能通过下列途径: ①诱导细胞凋亡; ②调节细胞周期; ③抑制肿瘤新生血管生成; ④影响 NF- κ B 等其他信号通路进而影响肿瘤的生长、分化, 尚需进一步实验证实。

综上所述, GW9662 是特异性 PPAR- γ 抑制剂, 从而证明了 NSAIDs 抗肿瘤机制中的 COX-2 非依赖途径包含 PPAR- γ 通路, 对 NSAIDs 类药物和 PPAR- γ 通路的进一步研究将有助于为临床防治胃癌提供新的思路, 为 NSAIDs 用于胃癌的防治提供新的线索和理论依据。

参考文献:

- [1] Shi HY, Lv FJ, Zhu ST, et al. Dual inhibition of 5-LOX and COX-2 suppresses esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2011, 309(1):19-26.
- [2] Li P, Zhang ST, Yu ZL, et al. Effects of cyclooxygenase-2 non-selective and selective inhibitors on proliferation inhibition and apoptosis induction of esophageal squamous carcinoma cells[J]. *Dis Esophagus*, 2009, 22(1):21-31.
- [3] Niu GL, Wang H, Xie RJ, et al. Radiosensitization of selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib in breast cancer and its mechanism[J]. *Journal of Chinese Oncology*,

- 2011, 17(3):172-176. [牛国梁, 王辉, 谢荣俊, 等. 选择性 COX-2 抑制剂塞来昔布对乳腺癌的放疗增敏作用及其机制研究[J]. 肿瘤学杂志, 2011, 17(3):172-176.]
- [4] Zhang YJ, Bao YJ, Dai Q, et al. mTOR signaling is involved in indomethacin and nimesulide suppression of colorectal cancer cell growth via a COX-2 independent pathway[J]. *Ann Surg Oncol*, 2011, 18(2):580-588.
- [5] Paulitschke V, Gruber S, Hofstätter E, et al. Proteome analysis identified the PPAR γ ligand 15d-PGJ2 as a novel drug inhibiting melanoma progression and interfering with tumor-stroma interaction[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9):e46103.
- [6] Nakahigashi K, Doi H, Otsuka A, et al. PGD2 induces eosinophilic pustular folliculitis via PPAR γ from sebocytes: a possible pathogenesis of eosinophilic pustular folliculitis[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 129(2):536-543.
- [7] Bojkova B, Kajo K, Garajova M, et al. Rosiglitazone shows partial oncostatic effect in rat mammary carcinogenesis[J]. *Neoplasma*, 2013, 60(1):46-55.
- [8] Vitale G, Zappavigna S, Marra M, et al. The PPAR- γ agonist troglitazone antagonizes survival pathways induced by STAT-3 in recombinant interferon- β treated pancreatic cancer cells[J]. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(1):169-184.
- [9] Leesnitzer LM, Parks DJ, Bledsoe RK, et al. Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662[J]. *Biochemistry*, 2002, 41(21):6640-6650.
- [10] Mehta RG, Peng X, Roy S, et al. PPAR γ antagonist GW9662 induces functional estrogen receptor in mouse mammary organ culture: potential translational significance[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 372(1-2):249-256.

第六届浙江省抗癌协会抗癌药物专业委员会 2013 年继续教育项目预告

1. 项目名称:抗肿瘤药物研究新趋向与肿瘤个性化药物治疗论坛

2. 会议时间与地点:11 月 8 日~10 日 杭州

3. 主办单位:浙江省抗癌协会

承办单位:浙江省肿瘤医院 肿瘤学杂志社

4. 继续教育内容:本次研讨会主题为“抗肿瘤新药研发与个体化治疗最新进展”。届时,将邀请国内外著名的专家作前沿性的大会报告,从基础研究、转化医学研究、临床研究三个层面探讨肿瘤药物研发、肿瘤标志物和个体化治疗的新进展、新技术以及新成果,探索肿瘤个体化药物治疗的新模式。

5. 征文内容与要求

征文内容:抗肿瘤药物新通路与新靶点;抗肿瘤新药的研发;肿瘤标志物与肿瘤个性化药物治疗;基因向导与肿瘤个性化治疗;肿瘤个性化药物治疗的临床实践等相关内容。

征文要求:相关学术论文提交全文的同时请附 500~800 字中文摘要。首页请注明第一作者姓名、单位、科室、地址、邮编、联系电话等,邮件主题请标注“抗肿瘤药物研究新趋向与肿瘤个性化药物治疗论坛”投稿,所有投稿论文均将编入大会论文集,并将评选优秀论文给予一定的奖励,并刊登于《中国肿瘤》、《肿瘤学杂志》。

征文方式:征文截止日期:2013 年 9 月 30 日,投稿请通过电子邮件提交,文稿请以附件形式发送至 leofang6000@gmail.com;联系人:方罗,童莹慧;联系电话:0571-88122114。

6. 学分授予:对全程参会者经考试合格,将授予省级 I 类继续教育学分 5 分。