

莪术醇对结直肠癌细胞裸鼠移植瘤生长及其 VEGF 和 COX-2 表达的影响

池碧霞¹, 王娟¹, 白准², 胡雷蕾¹, 严威¹, 李旭梅¹, 武家才¹, 陈旭^{1*}

(1. 桂林医学院, 广西 桂林 541004; 2. 株洲市中心医院, 湖南 株洲 412007)

[摘要] 目的:观察莪术醇对人结直肠癌 LoVo 细胞裸鼠移植瘤的抑制作用,探讨其可能的机制。方法:建立人结直肠癌 LoVo 细胞裸鼠移植瘤模型,成瘤后将其随机分为莪术醇高、中、低剂量(80,40,20 mg·kg⁻¹)组,模型组,空白组,每天 ig 给药 1 次,给药 21 d。用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法和免疫组化方法(IHC)检测瘤组织中血管生成因子(VEGF)、环氧合酶-2(COX-2)的表达。结果:与模型组比较,莪术醇高、中、低剂量组能明显降低肿瘤的瘤体积、瘤重及 VEGF,COX-2 的表达,均呈剂量依赖性。莪术醇高、中、低剂量组抑瘤率分别为 66.88%,42.08%,25.73%;模型组 VEGF 表达量与莪术醇各组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);模型组 COX-2 表达量与莪术醇中、高剂量组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$),VEGF 和 COX-2 表达具有明显相关性($r = 0.874, P < 0.01$)。结论:莪术醇抑制结直肠癌 LoVo 细胞裸鼠移植瘤生长的机制可能与下调 VEGF 和 COX-2 表达有关,并且可能通过 COX-2/前列腺素 E₂(PGE₂)/VEGF 信号通路发挥抑制结直肠癌生长的作用。

[关键词] 莪术醇;结直肠癌 LoVo 细胞;裸鼠移植瘤;血管生成因子;环氧合酶-2

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)08-0121-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016080121

Effects of Curcumol on Growth of Xenograft Tumors and Expression of VEGF and COX-2 in Nude Mice with Colorectal Cancer

CHI Bi-xia¹, WANG Juan¹, BAI Zhun², HU Lei-lei¹, YAN Wei¹, LI Xu-mei¹, WU Jia-cai¹, CHEN Xu^{1*}

(1. Guilin Medical University, Guilin 541004, China;

2. Zhuzhou Central Hospital, Zhuzhou 412007, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the effects of curcumol on LoVo cells-planted xenograft tumors in nude mice with colorectal cancer (CRC) and to investigate the possible mechanism. **Method:** Human CRC LoVo cells were implanted in BALB/c nude mice, then, tumor-bearing mice were randomly divided into five groups: blank group, model group, curcumol low dose group, middle dose group and high dose group (20, 40, 80 mg·kg⁻¹, respectively). The drugs were administered by intragastric injection (21 days), then the expressions of vascular endothelial growth factors (VEGF) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in these tumor tissues were determined by reverse transcription-PCR (RT-PCR) and immunohistochemistry. **Result:** Compared with the model group, curcumol high dose group, middle dose group and low dose group significantly inhibited the tumor volume, tumor weight, and expressions of VEGF and COX-2 in a dose-dependent manner. The anti-tumor rate was 25.73%, 42.08%, 66.88% respectively in curcumol low dose group, middle dose group and high dose group. There was statistical difference in expression of VEGF between model group and all curcumol groups ($P < 0.05$). There was statistically significant difference in COX-2 expression between model group and curcumol middle and high dose

[收稿日期] 20150816(004)

[基金项目] 广西科学研究与技术开发项目(1355001-5-7);桂林市科学研究与技术开发项目(20140105-8);广西医药产业人才小高地项目(1415)

[第一作者] 池碧霞,在读硕士,从事天然药物抗消化道肿瘤的基础研究,Tel:18877328613,E-mail:winatlast@163.com

[通讯作者] *陈旭,博士,教授,硕士生导师,从事天然药物抗消化道肿瘤的基础研究,Tel:0773-5893619,E-mail:chenxu@glmc.edu.cn

groups ($P < 0.05$). Moreover, VEGF and COX-2 expressions were positively correlated with each other ($r = 0.874, P < 0.01$). **Conclusion:** Curcumol significantly inhibited tumor growth in CRC implanted mice, probably associated with down-regulating expressions of VEGF and COX-2, and may have a role in treating human colorectal cancer by the signal pathways of COX-2/PGE₂/VEGF.

[**Key words**] curcumol; colorectal cancer of LoVo cells; xenrafted tumors; vascular endothelial growth factors; cyclooxygenase-2

结直肠癌 (CRC) 是消化系统常见的恶性肿瘤之一, 是世界上第 3 大恶性肿瘤, 病死率在所有恶性肿瘤中排第 4 位^[1]。在我国, 结直肠癌已跃居常见恶性肿瘤中的第 5 位, 而且患者低龄化趋势也日趋显著^[2]。近年来虽然临床上常用的结直肠癌的治疗方法有手术、放疗和化疗等, 但是创伤大, 副反应大, 预后差, 因此, 寻找副作用较小的治疗方法成为临床研究的重要目标。莪术醇 (Curcumol) 又名姜黄素, 是莪术挥发油中提取的有效单体成分, 为中国传统中药莪术的一种活性成分, 具有抗肿瘤、抗病毒、抗菌和抗血栓等药理活性^[3]。近年来, 因其副作用小, 其抗肿瘤活性成了科研工作者研究的热点。虽然对于莪术醇抗肿瘤的作用及其机制已经有了一些研究, 但关于莪术醇抗结直肠癌 LoVo 裸鼠移植瘤生长的机制是否与血管生成因子 (VEGF), 环氧合酶-2 (COX-2) 有关却鲜有相关文献报道, 本研究拟观察莪术醇对人结直肠癌 LoVo 细胞裸鼠移植瘤的抑制作用, 观察 VEGF, COX-2 表达, 探讨其可能的机制。

1 材料

1.1 细胞及动物 人结直肠癌 LoVo 细胞为桂林医学院科学实验中心提供。SPF 级 Balb/c nu/nu 裸鼠, 体重 (20 ± 2) g, 雌雄各半, 购于上海斯莱克实验动物中心, 合格证号 SCXK (沪) 2012-0002。

1.2 药物与试剂 莪术醇 (上海艾汇生物科技有限公司, 批号 CC110520), 胎牛血清 (上海依科赛生物制品有限公司, 批号 130915), DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司, 批号 8114129), 逆转录试剂盒 (TaKaBa 公司, 批号 AK2802), 即用型 VEGF 一抗, 即用型二抗, DAB 显色剂 (北京中杉金桥生物技术公司, 批号分别为 14T1312, WP143020, 14164A05), COX-2 一抗 (沈阳万类生物科技有限公司, 批号 00669)。

1.3 主要仪器 MDF-U73V 型超低温冰箱 (日本松下公司), 311 型 Thermo CO₂ 培养箱 (美国 Thermo 公司), Axiovert-40 型倒置相差显微镜 (德国蔡司公司), T Personal 48 型基因扩增仪 (德国 Biometra

公司)。

2 方法

2.1 造模和分组 造模方法^[4]: 将对数期生长的结直肠癌 LoVo 细胞用胰蛋白酶消化, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤细胞, 离心后调整细胞浓度, 用 PBS 混匀制备细胞悬液 (2.5×10^7 个/mL)。将制备好的 LoVo 细胞悬液以 0.2 mL/只注射接种于裸鼠右侧腋窝中外侧皮下。待成瘤后, 将其随机分成模型 (溶剂) 组, 莪术醇高、中、低剂量 (80, 40, 20 mg · kg⁻¹) 组, 空白组, 每组 10 只。空白组不注射细胞。用剪耳法标记裸鼠, 于分组当天开始 ig 给药, 0.2 mL/只。

2.2 观察指标 计算肿瘤近似体积 (V), $V = (\text{肿瘤最长径} \times \text{肿瘤最短横径}^2) / 2$; 观察裸鼠生长情况, 绘制肿瘤生长曲线; 给药 21 d 后停药, 次日处死动物, 取出皮下移植瘤, 称瘤重, 计算, 即抑瘤率 = (平均瘤重_{空白组} - 平均瘤重_{给药组}) / 平均瘤重_{空白组} × 100%。解剖裸鼠, 取移植瘤部分制成切片, 剩余保存于液氮中。

2.3 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 VEGF 和 COX-2 基因表达 将液氮中保存组织研磨后, 按照 Trizol 说明书提取总 RNA, 然后按逆转录酶试剂盒说明书, 逆转录成 cDNA, 引物序列采用 Primer Premier 5.0 软件设计。VEGF 引物序列, 上游 5'-CACTGGACCCCTGGCTTTACT-3', 下游 3'-ATGTC CACCAGGTCTCAAT-5'。COX-2 引物序列, 上游 5'-TACAATGCTGACTATGGCTAC-3', 下游 3'-GTCGTGAAGTGCCTAGT-5'。按照 PCR 扩增的体系加入模板 cDNA, 引物, 2 × PCR 反应混合物和水, PCR 仪上以 95 °C 3 min, 94 °C 30 s, 60 °C 40 s, 72 °C 1 min, 30 个循环, 72 °C 7 min 终延伸, 进行扩增, 扩增后进行琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统拍照并分析。

2.4 免疫组化检测 VEGF, COX-2 蛋白表达 石蜡切片脱蜡水化后, 采用 SP 试剂盒说明书完成免疫组化染色各步骤, 用 PBS 代替一抗作为对照。VEGF 和 COX-2 均主要定位于细胞浆, 凡细胞浆出现棕黄

色或棕褐色颗粒为阳性细胞,于高倍镜下随机取 5 个不重复视野,根据染色强度以及阳性细胞数占总细胞数的百分比进行综合评分^[5],所有染色结果的判定均采用统一评分标准和双盲法,均重复 3 次以上。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 18.0 进行数据分析,所有数据描述用 $\bar{x} \pm s$ 表示,根据资料类型和统计目的不同分别选用 One-Way ANOVA 和 Pearson 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 裸鼠成瘤情况 所有裸鼠 9 d 后均成瘤,成瘤率 100%,14 d 后选取瘤体积为 50 ~ 100 mm³ 的裸

鼠进行分组^[6],用剪耳法对各裸鼠进行标记。

3.2 莪术醇对结直肠癌 LoVo 细胞裸鼠移植瘤生长的影响 随着莪术醇浓度的提高,裸鼠移植瘤体积增长速度逐渐降低,莪术醇的抑瘤作用随着浓度的增加而增大,呈剂量依赖性,与模型组比较,21 d 后,低、中、高剂量莪术醇组瘤体积显著减小($P < 0.01$)。见图 1。

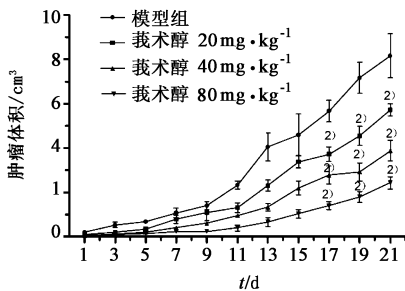
3.3 莪术醇对结直肠癌 LoVo 细胞移植瘤瘤重的影响 给药 21 d 后处死裸鼠,剥离移植瘤称重,与模型组比较,莪术醇低、中、高剂量组的平均瘤重显著降低($P < 0.05$),莪术醇低、中、高剂量组抑瘤率增加。呈剂量依赖性。见表 1。

表 1 各组裸鼠 VEGF 和 COX-2 的表达,瘤重,抑瘤率比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Curcumol on expressions of VEGF and COX-2, tumor weight and anti-tumor rate ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	浓度/mg·kg ⁻¹	VEGF 相对表达量	COX-2 相对表达量	瘤重/g	抑瘤率/%
空白	-	-	-	-	-
模型	-	6.00 ± 1.22	5.00 ± 1.41	6.32 ± 0.78	-
莪术醇	20	4.20 ± 1.30 ¹⁾	3.80 ± 0.84	4.69 ± 0.98 ¹⁾	25.73
	40	3.00 ± 1.41 ²⁾	2.40 ± 1.34 ²⁾	3.66 ± 1.06 ²⁾	42.08
	80	1.80 ± 0.84 ²⁾	1.80 ± 0.84 ²⁾	2.09 ± 0.74 ²⁾	66.88

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。



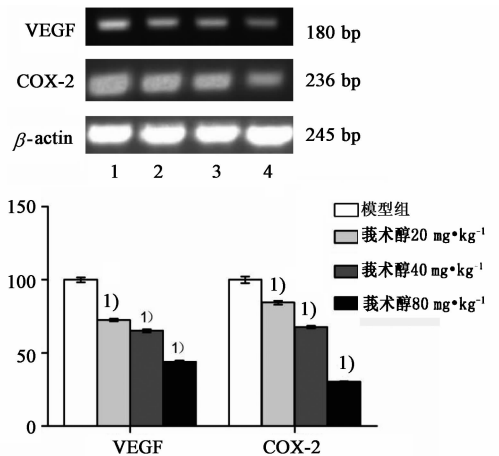
与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (图 2,3 同)

图 1 莪术醇对人结直肠癌 LoVo 细胞裸鼠移植瘤的抑瘤作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig.1 Effect of Curcumol on inhibiting growth of CRC xenograft tumors ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.4 莪术醇对结直肠癌 LoVo 细胞裸鼠 VEGF, COX-2 基因表达影响 莪术醇干预裸鼠后,随着莪术醇浓度的增加,VEGF,COX-2 基因的表达逐渐减少,低、中、高剂量莪术醇组与模型组相比较差异显著($P < 0.05$)。见图 2。

3.5 莪术醇对结直肠癌 LoVo 细胞裸鼠 VEGF 和 COX-2 蛋白表达影响及相关性分析 与模型组比较,莪术醇低、中、高剂量组瘤组织中 VEGF,COX-2 基因相对表达量逐渐减低($P < 0.05, P < 0.01$)。呈剂量依赖性。VEGF 与 COX-2 在结直肠癌 LoVo 细



1~4. 模型组,莪术醇 20,40,80 mg·kg⁻¹ 剂量组。与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$

图 2 各组移植瘤组织中 VEGF,COX-2 基因表达

Fig.2 Detection of VEGF and COX-2 mRNA expressions in CRC xenograft tumors

胞裸鼠移植瘤组织中表达存在明显相关性($r = 0.874, P < 0.01$)。见表 1,图 3。

4 讨论

本研究通过建立人结直肠癌 LoVo 细胞裸鼠移植瘤模型在体内水平来探讨莪术醇抑制结直肠癌生长的可能机制。VEGF 是迄今发现的最重要的血管

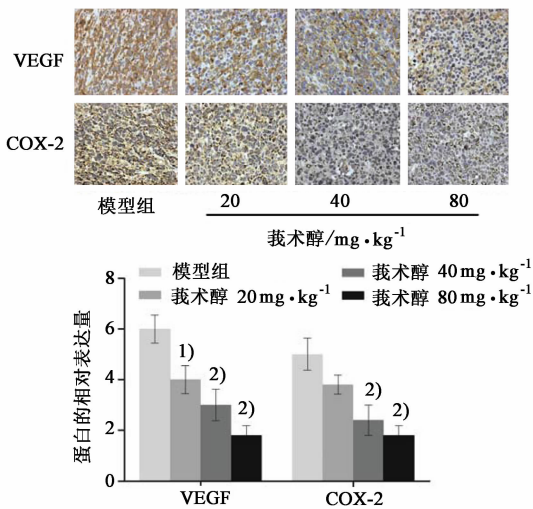


图 3 各组裸鼠移植瘤组织中 VEGF, COX-2 蛋白表达 (免疫组化, ×400)

Fig. 3 Detection of VEGF and COX-2 protein expressions in CRC xenograft tumors (IHC, ×400)

生成诱导因子,它能够通过刺激血管的生成,促进内皮细胞的增殖迁移,增加微小血管的通透性,促进基质的降解等机制促进肿瘤新生血管的形成,最终导致肿瘤的增殖,浸润和转移^[7]。有文献报道,VEGF 在结肠癌、乳腺癌、肝癌等诸多肿瘤组织的形成及发展中都发挥了重要作用^[8-10],在近 50% 的结肠癌患者 VEGF 表达升高^[11-12]。Araujo 等^[13]研究表明,VEGF 的高表达与结肠癌患者的 TNM 分期,细胞异型性呈正相关,与结肠癌患者的生存时间呈负相关,以上研究显示 VEGF 可能是促进结肠癌发生发展的一个最重要的因素之一,因此抑制或降低 VEGF 表达可以成为一种肿瘤治疗的方法,而相关 VEGF 的抑制剂已经成为临床上重要的抗结肠癌的化疗药物^[14]。本研究发现,随着莪术醇剂量的增大,瘤体体积增长趋势变缓,瘤体组织中的 VEGF 的表达量逐渐降低,体内实验表明莪术醇抑制肿瘤的生长可能与下调 VEGF 表达有关。

COX-2 是一种可诱导基因,在人体内大多数正常组织中检测不到其表达。越来越多的证据表明,COX-2 在包括结肠癌在内的多种不同类型恶性肿瘤中均有过度表达,在肿瘤的形成过程中扮演了重要的角色^[15-17]。目前研究认为,COX-2 主要是通过促进前列腺素(PGs)合成,抑制细胞凋亡,刺激肿瘤新生血管的生成,增加肿瘤细胞的浸润和转移,免疫抑制,诱导致癌物的活化等途径促进肿瘤的发生发展^[18]。Vinogradova 等^[19]研究表明,服用 COX-2 抑制剂可以减少结肠癌的发病率。本研究中,随着

莪术醇剂量的增加,中、高剂量组与模型组比较,COX-2 的相对表达量降低,表明莪术醇发挥体内抑制肿瘤的作用可能是与下调 COX-2 的表达有关。

以上结果提示,莪术醇体内抑制结肠癌 LoVo 细胞裸鼠移植瘤的生长作用可能与其下调 VEGF, COX-2 的表达有关。有研究表明,被 COX-2 转染的结肠癌细胞可使 VEGF 的表达增强^[20],而且 COX-2 的主要产物之一前列腺素 E₂(PGE₂)已经被发现有促血管生成的作用^[21],并在结肠癌中大量表达^[22]。本实验中进一步研究发现,莪术醇下调 VEGF, COX-2 的表达作用具有明显的相关性。提示莪术醇体内抑制肿瘤生长的作用可能与 COX-2/PGE₂/VEGF 信号通路有关,但其具体的作用机制还有待进一步证实。

[参考文献]

- [1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65 (2): 87-108.
- [2] Chen W, Zheng R, Zeng H, et al. Annual report on status of cancer in China, 2011 [J]. Chin J Cancer Res, 2015, 27(1): 2-12.
- [3] 陈旭,王娟,蒋晓山,等. 莪术醇对肺癌 A549 细胞凋亡诱导因子、聚 ADP 核糖聚合酶及 Caspase-3 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (19): 157-159.
- [4] 田庆镠,李玛琳. 人肿瘤细胞悬液裸鼠皮下接种及影响移植成功的因素 [J]. 实验动物科学与管理, 2004, 21(3): 47-50.
- [5] Yoosungnoen-Chintana P, Bhattarakosol P, Patumraj S. Antitumor and antiangiogenic activities of curcumin in cervical cancer xenografts in nude mice [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014(2): 817972.
- [6] Zhou L, Feng Y, Jin Y, et al. Verbascoside promotes apoptosis by regulating HIPK2-p53 signaling in human colorectal cancer [J]. BMC Cancer, 2014, 14: 747.
- [7] Kerbel R S. Tumor angiogenesis [J]. N Engl J Med, 2008, 358(19): 2039-2049.
- [8] Abdou A G, Aiad H, Asaad N, et al. Immunohistochemical evaluation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in colorectal carcinoma [J]. J Egypt Natl Canc Inst, 2006, 18(4): 311-322.
- [9] Saponaro, C, Malfettone A, Ranieri G, et al. VEGF, HIF-1alpha expression and MVD as an angiogenic network in familial breast cancer [J]. PLoS One, 2013, 8 (1): e53070.
- [10] Uematsu, S, Higashi T, Nouse K, et al. Altered expres-

- sion of vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor-2 and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2005, 20 (4):583-588.
- [11] Clasper S, Royston D, Baban D, et al. A novel gene expression profile in lymphatics associated with tumor growth and nodal metastasis [J]. Cancer Res, 2008, 68 (18):7293-7303.
- [12] Choi J H, Oh Y H, Park Y W, et al. Correlation of vascular endothelial growth factor-D expression and VEGFR-3-positive vessel density with lymph node metastasis in gastric carcinoma [J]. J Korean Med Sci, 2008, 23 (4):592-597.
- [13] Araujo R F, Lira G A, Vilaca J A, et al. Prognostic and diagnostic implications of MMP-2, MMP-9, and VEGF- α expressions in colorectal cancer [J]. Pathol Res Pract, 2015, 211 (1):71-77.
- [14] Carmeliet P, Jain R K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis [J]. Nature, 2011, 473 (7347):298-307.
- [15] Stasinopoulos I, O'Brien D R, Wildes F, et al. Silencing of cyclooxygenase-2 inhibits metastasis and delays tumor onset of poorly differentiated metastatic breast cancer cells [J]. Mol Cancer Res, 2007, 5 (5):435-442.
- [16] De Heer P, Sandel M H, Guertens G, et al. Celecoxib inhibits growth of tumors in a syngeneic rat liver metastases model for colorectal cancer [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2008, 62 (5):811-819.
- [17] Narayanan B A, Narayanan N K, Davis L, et al. RNA interference-mediated cyclooxygenase-2 inhibition prevents prostate cancer cell growth and induces differentiation: modulation of neuronal protein synaptophysin, cyclin D1, and androgen receptor [J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5 (5):1117-1125.
- [18] Wu Q B, Sun G P. Expression of COX-2 and HER-2 in colorectal cancer and their correlation [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21 (20):6206-6214.
- [19] Vinogradova Y, Hippisley-Cox J, Coupland C, et al. Risk of colorectal cancer in patients prescribed statins, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and cyclooxygenase-2 inhibitors: nested case-control study [J]. Gastroenterology, 2007, 133 (2):393-402.
- [20] Tsujii M, Kawano S, Du Bois R N. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94 (7):3336-3340.
- [21] Nie D, Honn K V. Cyclooxygenase, lipoxygenase and tumor angiogenesis [J]. Cell Mol Life Sci, 2002, 59 (5):799-807.
- [22] Hendrickse, C W, Kelly R W, Radley S, et al. Lipid peroxidation and prostaglandins in colorectal cancer [J]. Br J Surg, 1994, 81 (8):1219-1223.

[责任编辑 张丰丰]