基础研究 文章编号:0253-3626(2010)12-1787-04

选择性环氧化酶 -2 抑制剂调节 Egr-1 作用机制的研究

江 兵[1],蒋幼凡[2],秦光梅[1],李良兰[1]

(1. 重庆医科大学附属永川医院呼吸内科,重庆 402360;2. 重庆医科大学附属第二医院呼吸内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:以肺腺癌细胞株 A549 为研究对象,观察不同浓度的塞来昔布对 A549 细胞的生长周期及凋亡率的影响,以及对早期反应基因 -1(Early growth response-1,Egr-1)表达的影响,探讨环氧化酶 -2(Cyclooxygenase-2,COX-2)抑制剂调节 Egr-1 的具体机制,从分子水平上寻找 COX-2 抑制剂抗肿瘤作用的具体机制,进一步指导临床治疗。方法:体外培养肺腺癌细胞A549,经 25.0、50.0、100.0 μmol/L 浓度的塞来昔布处理细胞,24 h 后采用流式细胞仪(Flow cytometer,FCM)测定细胞周期,TUNEL 法测定细胞凋亡,RT-PCR 法检测 Egr-1、Fas 基因的表达。结果:25.0、50.0、100.0 μmol/L 赛来昔布作用 24 h 后,A549 细胞不同程度的阻滞在 G_0/G_1 期,A549 细胞凋亡指数分别是 10.67% ± 1.46%、18.33% ± 2.54%、25.67% ± 2.10%,差异具有统计学意义($P<0.05$);随着塞来昔布药物浓度的增加,Egr-1 和 Fas 的 mRNA 表达量逐步增加,差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论:高度选择性 COX-2 抑制剂塞来昔布可通过调节细胞周期和细胞凋亡发挥抗肿瘤作用,其作用机制可能是通过上调细胞中 Egr-1 的表达,进而上调 Fas 的表达,使细胞周期阻滞于 G_0/G_1,最终促进细胞凋亡,这可能是环氧化酶抑制剂发挥抗癌作用的分子生物学基础。

【关键词】环氧化酶 -2 抑制剂;肺癌;早期反应基因 -1

【中国图书分类法分类号】R730.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-07-08

Study of mechanism of action of specific inhibitor of COX-2 on Egr-1

JIANG Bing, et al

(*Department of Respiratory Medicine, Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effects of specific inhibitor of COX-2 celecoxib in different concentration on cell apoptosis, cell cycle and expression of Egr-1 of A549 cells, and to investigate the molecular mechanism of anti-tumor effects. *Methods*: A549 cells were cultured in vitro and treated by 25.0, 50.0 μmol/L and 100.0 μmol/L celecoxib. Then the TUNEL assay was used to detect apoptosis; FCM assay was used to determine cell cycle, and RT-PCR assay was performed to evaluate the Egr-1 and Fas mRNA expression levels. *Results*: Treated by celecoxib in the concentration of 25.0, 50.0 μmol/L and 100.0 μmol/L, the cell cycle was arrested in c phase in A549 cells respectively; the apoptotic index of A549 cells were 10.67% ± 1.46%, 18.83% ± 2.54% and 25.67% ± 2.10% respectively, and the expression levels of Egr-1 and Fas mRNA were up-regulated synchronously. *Conclusion*: Celecoxib, a specific inhibitor of COX-2, can inhibit the proliferation of A549 cells by regulating the cell cycle and inducing the cell apoptosis. The molecular mechanism may be that COX-2 inhibitor up-regulates the expression of Fas by up-regulating the expression of Egr-1, and then induces the cell apoptosis by blocking the A549 cells in G_0/G_1 period.

【Key words】Cyclooxygenase-2; Lung cancer; Early growth response-1

原发性支气管肺癌是我国成年男性中最常见的恶性肿瘤之一。肺癌的发生发展是个逐渐演化的过程,该过程涉及到众多原癌基因的激活和抑癌基因的失活。早期反应基因 -1(Early growth response-1,Egr-1)是一种抑癌基因,它的异常与许多癌症的发生发展密切相关。抑制细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡是抑癌基因发挥其生物学效应的重要机制之一[1]。有研究报道选择性环氧化酶 -2(Cyclooxygenase-2,COX-2)抑制剂塞来昔布可通过 Egr-1 促进细胞凋亡,发挥抗肿瘤作用[2]。本实验以此为背景,探讨 COX-2 抑制剂塞来昔布调节 Egr-1 的具体机制,从分子水平上寻找 COX-2 抑制剂抗肿瘤作用的具体机制,为进一步临床治疗提供实验室依据。

作者介绍:江 兵(1965-),男,硕士,

研究方向:肺癌的早期诊断与治疗。

通讯作者:蒋幼凡,女,教授,E-mail:zengzuo1992@sina.com。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

肺腺癌细胞株 A549,购自中科院上海细胞库;RPMI1640 培养基、小牛血清购自美国 Hyclone 公司;PBS 缓冲液、0.25%

胰酶等由重庆医科大学基础医学研究所提供;MTT 购自上海华舜;细胞总 RNA 提取试剂盒购自华舜科技公司;核酸分子标准物、RT-PCR 两步法试剂盒购自 TaKaRa 生物公司;引物由上海英俊生物技术公司合成;Cell Death Dectection TUNEL 试剂盒购自 Roche 公司。塞来昔布由美国西尔大药厂波多黎各分厂提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 肺腺癌细胞株 A549 培养于含 10%的小牛血清,100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 RPMI1640 培养液中,37℃,5%CO_2 孵箱,传代培养。待细胞生长至指数生长期进行实验。

1.2.2 实验分组 根据预实验结果,选择塞来昔布作用 24 h 后细胞存活率 >70%的药物浓度用于实验,将实验分为处理组 1、处理组 2、处理组 3 和对照组,具体如下:处理组 1:低浓度组,细胞培养基中加入一定体积的药物,使塞来昔布的终浓度为 25.0 μmol/L;处理组 2:中浓度组,细胞培养基中加入一定体积的药物,使塞来昔布的终浓度为 50.0 μmol/L;处理组 3:高浓度组,细胞培养基中加入一定体积的药物,使塞来昔布的终浓度为 100.0 μmol/L;对照组:细胞培养基中不加药物,只加等体积的 RPMI1640 完全培养基。

1.2.3 采用流式细胞仪(Flow cytometer,FCM)测定细胞周期 不同浓度浓度的塞来昔布作用 24 h 后,收集培养细胞,PBS 洗涤细胞 2 次,PBS 重悬细胞,加 70%乙醇 2 ml 4℃固定过夜,再用 PBS 洗涤细胞 1 次,加碘化丙啶染液 0.5 ml 37℃孵育 30 min,上流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.4 TUNEL 法测定细胞凋亡 不同浓的塞来昔布作用 24 h 后,用 4%的多聚甲醛固定 1 h,PBS 缓冲液漂洗后按照 Roche 公司 TUNEL 检测试剂盒说明书进行操作,显微镜下观察 3 个视野(×200),每个视野至少 500 个细胞。计算凋亡指数(Apoptotic index,AI),AI= 凋亡细胞数/观察细胞总数×100%。

1.2.5 RT-PCR 法检测 Egr-1、Fas 基因的表达 不同浓度的塞来昔布作用 24 h 后,按总 RNA 抽提试剂盒说明书提取各组细胞总 RNA。经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定,根据 260 nm 的 A 值对样品的总 RNA 初步定量。取 0.5 μl RNA 作为逆转录模板行 RT 反应(引物序列见表 1)。随后进行 PCR 扩增,β-actin 为内参,于 94℃预变性 2 min 后紧随 30 个循环,循环参数:94℃变性 30 s,60℃(Egr-1)或 57℃(Fas)退火 30 s,72℃延伸 60 s,最后 72℃延伸 5 min 补齐末端。PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳鉴定,约 251 bp(Egr-1)、227 bp(Fas)处为目的基因片段。电泳结果经光密度面积积分分析,以与内参 β-actin mRNA 的比值作为目的基因 mRNA 的相对含量。

1.2.6 统计方法 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SAS8.2 统计软件进行完全随机设计方差分析和组间 SNK-q 检验,取 $P<0.05$ 差异统计学意义。

2 结 果

2.1 不同浓度的塞来昔布对 A549 细胞周期和凋亡的影响

不同浓度塞来昔布作用过后,A549 细胞 G_0/G_1 期细胞逐渐增多,而 S 期细胞则逐渐减少,随着塞来昔布浓度的增加,G_0/G_1 期细胞增多的越明显,各组间有统计学差异,而 S 期细胞则减少越明显;高浓度组与各组间有统计学差异。A549 细胞凋亡率随着药物浓度增加逐渐增加,差异有统计学意义(表 2)。

塞来昔布作用 A549 细胞 24 h 后,各组细胞的凋亡指数随着药物浓度的增加而逐渐增大,差异有统计学意义(表3)。

2.2 RT-PCR 法检测 Egr-1、Fas 基因的表达

RT-PCR 扩增后,2%凝胶琼脂糖电泳结果显示(图 2),分别在 251 bp 和 227 bp 左右有 Egr-1 和 Fas 的表达,在 483 bp 左右有 β-actin 的表达,无非特异性条带。分析各组细胞的目的基因水平,随着塞来昔布药物浓度的增加,Egr-1 和Fas的 mRNA 表达量逐步增加,差异有统计学意义(表 4)。

表 1 目的基因与内参引物情况

扩增产物	产物大小	产物序列(5'~3')	退火温度
Fas	227 bp	上游:CAG AAC TTG GAA GGC CTG CAT C 下游:TCT GTT CTG CTG TGT CTT GGA C	57℃
Egr-1	251 bp	上游:AACGCTGCCCCAACCACGAG 下游:GCCGGTTCATGCCCCCTA	60℃
β-actin	483 bp	上游:GACTACCTCATGAAGGTC 下游:GATCCACATCTGCTGGAA	55℃

表 2 不同剂量塞来昔布作用后 24 h A549 细胞周期及凋亡率的变化(n=3,$\bar{x} \pm s$)

分组	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期	凋亡率(%)
对照组	42.69 ± 3.31	43.98 ± 2.11	14.06 ± 1.57	0.78 ± 0.26
A 组 25 μmol/L	46.44 ± 3.33*	40.20 ± 2.57	12.37 ± 1.99	8.82 ± 0.34*
B 组 50 μmol/L	57.52 ± 6.36*#	30.72 ± 3.45	10.27 ± 2.01	16.53 ± 0.76*#
C 组 100 μmol/L	67.43 ± 3.62*#&	22.47 ± 3.71*#&	10.84 ± 2.10	23.31 ± 0.58*#&

注:*$P<0.05$,与对照组比较;#$P<0.05$,与 A 组比较;&$P<0.05$,与 B 组比较

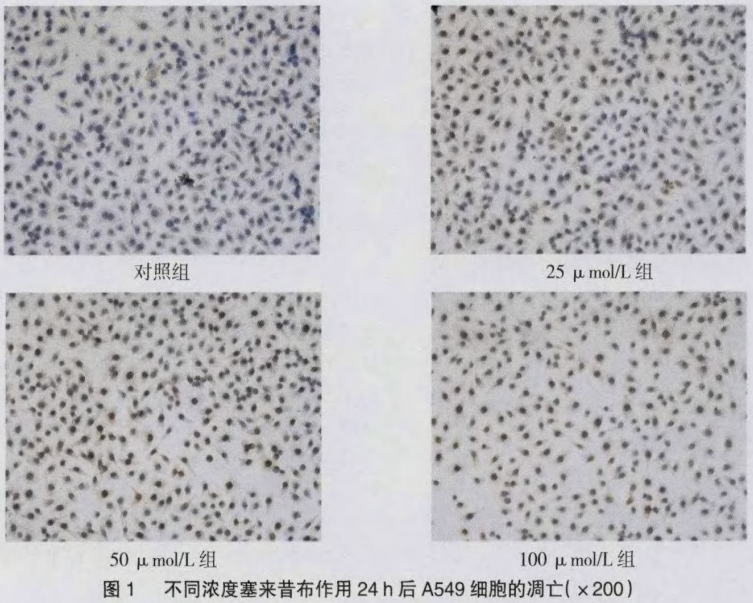
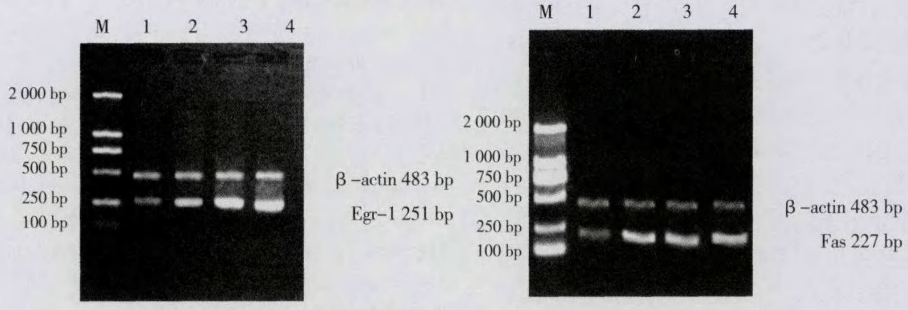


图 1 不同浓度塞来昔布作用 24 h 后 A549 细胞的凋亡(×200)



M. Marker PRI 2 000; 1. 对照组; 2. 25 μmol/L 组; 3. 50 μmol/L 组; 4.100 μmol/L 组

图 2 不同浓度塞来昔布作用 24 h 后 Egr-1 和 Fas mRNA 的表达

表 3 不同剂量塞来昔布作用 A549 细胞 24 h 后的凋亡指数(n=3, $\bar{x} \pm s$)

分 组	AI(%)
对照组	0
A 组(25.0 μmol/L)	10.67 ± 1.46*
B 组(50.0 μmol/L)	18.33 ± 2.54*#
C 组(100.0 μmol/L)	25.67 ± 2.10*&&

注: *P<0.05, 与对照组比较; #P<0.05, 与 A 组比较; &P<0.05, 与 B 组比较

表 4 不同浓度塞来昔布作用 24 h 后 Egr-1 和 Fas mRNA 的表达(n=3, $\bar{x} \pm s$)

分组	对照组	25 μmol/L	50 μmol/L	100 μmol/L
Egr-1	0.43 ± 0.02	1.06 ± 0.010*	1.86 ± 0.04*	1.96 ± 0.07*
Fas	0.64 ± 0.05	1.33 ± 0.08#	1.54 ± 0.091#	1.68 ± 0.03#

注: *P<0.05, 与 Egr-1 对照组比较; #P<0.05, 与 Fas 对照组比较

3 讨 论

原发性支气管肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,严重威胁着人类的健康,其发病率和死亡率在国际上占居恶性肿瘤第一位,如何控制肺癌细胞增殖,抑制肺癌的发生发展已成为抗癌焦点,目前 COX-2 抑制剂在肺癌的治疗作用日益受到广大学者的重视,研究已表明,COX-2 在肺癌中的表达与肿瘤的侵袭性生长、增加肿瘤的转移性、使肿瘤对标准治疗产生抵抗及不良预后密切相关,选择性环氧化酶抑制剂通过调节细胞周期和细胞凋亡来抑制肿瘤血管生成[3]、抑制肿瘤转移[4]、免疫调节等[5]机制来发挥抗肿瘤作用。Csiki 等[6]报道了赛来昔布可与化疗药物多烯紫杉醇联合应用以治疗复发性非小细胞肺癌, Hida 等[7]研究 COX-2 抑制剂(JTE2522)和传统肺癌化疗药物合用的效果发现:在体外,JTE2522 联合传

统化疗药物能使其半数抑制浓度 IC_{50} 最高减少至 70%；在人体，JTE2522 分别合用多烯紫杉醇和长春瑞滨，其 IC_{50} 分别最高减少至 65%及 55%。

塞来昔布抑制癌细胞机理目前认为促进细胞凋亡，抑制肿瘤新生血管的合成，国内外学者已在宫颈癌细胞[8]，乳腺癌细胞[9]的研究方面证实了它的促进细胞凋亡作用，有报导[10]认为它对非小细胞癌也有促进凋亡的作用，本研究通过检测细胞的凋亡 TUNEL 及 FCM 2 种方法，发现它对肺腺癌细胞的明显的促进凋亡作用，随着药物浓度的增加，凋亡率相应增加，两者呈剂量依赖性相关，证实了塞来昔布抑制肺腺细胞的是与促进细胞凋亡密不可分。本研究还发现，塞来昔布影响细胞的凋亡，使细胞分化停留在 G_0/G_1，这种效应呈剂量依赖性，说明塞来昔布确是对肺癌细胞有明显的抑制作用，这种作用主要是通过促进细胞凋亡使其停留 G_0/G_1 在产生的。

细胞凋亡是由基因调控的细胞主动死亡过程，是细胞程序化死亡的一种形式，与肿瘤的发生、消退密切相关[11]。随着近年来对肿瘤细胞凋亡机理的深入研究，已认识到该过程涉及到众多原癌基因的激活和抑癌基因的失活，Fas 基因是抑癌基因中最为重要基因之一[12]，Fas 基因又称作APO-1/CD95，属肿瘤坏死因子受体家族。Fas 基因编码产物为分子量 45 kD 的跨膜蛋白，分布于胸腺细胞、激活的 T 和 B 淋巴细胞、巨噬细胞、肝、脾、肺、心、脑、肠、睾丸和卵巢细胞等，Fas 蛋白与Fas 配体结合后，会激活半胱天冬酶，导致靶细胞走向凋亡。这个过程在细胞膜上进行，无须细胞核的参与。Egr-1 是近年来受到关注另一个抑癌基因，是“立即早期基因”家族中的一个[13]，人 Egr-1 基因定位于 5q23～31，编码 3.3 kb 的成熟 mRNA，Egr-1 是通过与下游细胞核内靶基因启动子上的 Egr-1 结合位点的结合，而实现对靶基因的转录调控，使靶细胞执行相应功能，其作用具有双重性。一方面，对有些基因具有转录激活作用。另一方面对另外一些基因的转录表达则具有抑制作用，与细胞增生、分化、凋亡以及炎性反应等密切相关，Fas 是已知的 Egr-1 基因的 30 多种靶基因之一[14]，国内有学者[15]在宫颈癌细胞凋亡的研究中用 ^{60}Co 射线对宫颈癌细胞进行不同剂量的照射，发现了 Egr-1 基因与 Fas 基因变化均上调，两者之间具差异有统计学意义的相关性，它们的表达上调同时宫颈癌细胞的凋亡率也上调，三者呈同一变化趋势；当照射剂量达到一定程度时，凋亡率不再上升，此时 Egr-1 基因与 Fas 基因表达也不再上调，表明 Egr-1 基因与 Fas 基因在参与癌细胞凋亡过程中具有关联性。本研究通过测定不同浓度 COX-2 抑制剂塞来昔布诱导肺腺癌细胞 A549 凋亡及有关基因表达的情况，得出塞来昔布可诱导A549 细胞凋亡，且呈剂量依赖性。同时也显示，塞来昔布可上调细胞内 Egr-1，Fas 的表达，诱导细胞凋亡，呈现出剂量依赖性。本实验中，随着药物浓度的增加，Egr-1 表达也逐步增加，这与凋亡指数、Fas 的表达的变化趋势相一致。可见 Egr-1 参与了塞来昔布诱导的细胞凋亡过程，且可能是通过上调了 Fas的表达来参与细胞凋亡过程的。

高度选择性 COX-2 抑制剂塞来昔布可通过调节细胞周期和细胞凋亡发挥抗肿瘤作用，其作用机制可能是通过上调细胞中 Egr-1 的表达，进而上调 Fas 的表达，使细胞周期阻滞于 G_0/G_1，最终促进细胞凋亡。这就为临床应用 COX-2 抑制剂提供了可靠的理论依据。

参 考 文 献

[1] 钟守军，姚运红.早期生长反应基因 -1 与肿瘤关系的研究进展[J].广东医学院学报，2004，22(3)：282-284.

[2] Yuseok M，Frank G，Bottone J R.Suppression of tumor cell invasion by cyclooxygenase inhibitors is mediated by thrombospondin-1 via the early growth response gene Egr-1[J].Mol Cancer Ther，2005，4(10)：1551-1555.

[3] Baek S J，Kim J S，Nixon J B，et al.Expression of NAG-1，a transforming growth facor-beta superfamily member，by troglitazone require the early growth response gene EGR-1[J].J Bio Chem，2004，279(8)：6883-6892.

[4] Revest J M，Di B F，Kitchener P，et al. The MAPK pathway and Egr-1 mediate stress related behavioral effects of glucocorticoids[J].Nat Neurosci，2005，8(5)：664-672.

[5] 李也鹏，胡成平，吴鄂生.NS-398 和顺铂联合作用对人肺腺癌增殖的影响及其机制初步探讨[J].中国肺癌杂志，2005，8(1)：8-13.

[6] Csiki，Jason D，Morrow，et al.Targeting Cyclooxygenase-2 in Recurrent Non Small Cell Lung Cancer：A Phase Ⅱ Trial of Celecoxib and Docetaxel [J]. Clin Cancer Res，2005，11(18)：6634-6640.

[7] Hida T，Kozaki K，Muramat S H，et al.Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis and enhances cytotoxicity of various anticancer agents in non-small cell lung cancer cell lines[J].Clin Cancer Res，2000，6(5)：2006-2011.

[8] 娄 阁，钱素娟，隋丽华，等.宫颈鳞状细胞癌组织细胞凋亡调控机制的研究[J].现代妇产科进展，2000，9(3)：173-174.

[9] 李媛媛，刘雨清，李文通.塞来昔布对乳腺癌细胞株 MCF-7 生长的影响[J].中国现代医学杂志，2008，18(20)：2959-2961.

[10] 佟 旭，张一梅.COX-2 在非小细胞肺癌中的表达及意义[J].齐齐哈尔医学院学报，2008，29(9)：1044-1045.

[11] Ferraro B，Bepler G，Sharma S，et al.EGR-1 predicts PTEN and survival in patients with non-small cell lung cancer[J].J Clin Oncol，2005，23(9)：1921-1926.

[12] Fruesen C，Herr I，Friesen C，et al.Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in drug induced apoptosis in leuke mia cells [J]. Nat med，1996，2(5)：574-577.

[13] Pold M，Zhu L X，Sharma S，et al.Cyclooxygenase-2-dependent expression of angiogenic CXC chemokines ENA-78/CXC Ligand(CXCL)5 and interleukin-8/CXCL8 in human non-small cell lung cancer[J].Cancer Res，2004，64(5)：1853-1860.

[14] Scott S D，Marples B，Hendry J H，et al.A radiation-controlled molecular Switch for use in gene therapy of cancer[J]. Gene Ther，2000，7(13)：1121-1125.

[15] 刘海涛，李敬巍，程丽坤，等.不同剂量 ^{60}Co 射线照射后 Fas、Egr-1 基因在宫颈癌 Hela 细胞中的表达及意义[J].哈尔滨医科大学学报，2006，40(6)：467-470.

（责任编辑：张学颖）