基础研究 文章编号:0253-3626(2010)10-1520-04

5- 氟脲嘧啶联合尼美舒利对人食管癌 EC109 细胞 VEGF 表达的研究

李民杰,向小勇,汪 斌,陈焕文
(重庆医科大学附属第一医院胸心外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:通过观察 5- 氟脲嘧啶(5-Fluorouracil,5-FU)、尼美舒利(Nimesulide,NIM)单独或联合作用对人食管癌 EC109 细胞血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)表达的影响,初步探讨 5-FU、NIM 抑制食管癌血管生成的机制。方法:培养食管癌 EC109 细胞,不同浓度 5-FU、NIM 单独或联合作用 24 h 后,MTT 法检测细胞增殖情况;流式细胞仪检测细胞凋亡;RT-PCR 检测 VEGF mRNA 表达情况;Western blot 法检测 VEGF 蛋白表达。结果:NIM 与 5-FU 联合作用于食管癌 EC109 细胞株时,其抑制率与凋亡率较两者单独作用时高,且 VEGF mRNA 及蛋白的表达水平低于两者单独作用时的表达水平。结论:NIM 联合 5-FU 能有效抑制食管癌 EC109 细胞增殖,其中抑制 VEGF 表达可能为其机制之一。

【关键词】5- 氟脲嘧啶;尼美舒利;食管癌;血管内皮生长因子
【中国图书分类法分类号】R735.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-04-27

Effects of 5-FU combined with nimesulide on the expression of VEGF in human esophageal carcinoma Eca-109 (EC109) cell line

LI Min-jie, et al
(*Department of Cardiothoracic Surgey, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of NIM (a cyclooxygenase 2 inhibitor), 5-FU, and their combination on the expression of VEGF, in order to explore the possible mechanism. *Methods*: Nimesulide (100, 200, 400 μ mol/ml) and 5-FU (100, 200, 400 μ mol/ml) were used. EC109 cell lines were divided into control group, Nimesulide treated group, 5-FU treated group, and Nimesulide combined with 5-FU group. The inhibition on the proliferation of EC109 cells respectively treated with Nimesulide, 5-FU, and their combination were detected by MTT and their apoptosis rates were detected by FCM. The expression of VEGFmRNA was detected by RT-PCR. The protein expression of VEGF was detected by Western blotting. *Results*: The inhibition rate and apoptosis rate of Nimesulide combined with 5-FU were significantly higher than the single Nimesulide or 5-FU single treated. Nimesulide combined with 5-FU significantly reduced VEGFmRNA and protein, as compared with the single Nimesulide and 5-Fu. *Conclusion*: Nimesulide combined with 5-FU can inhibit the EC109 esophageal cancer cell proliferation in vitro, inhibiting VEGF expression may be one of its mechanisms.

【Key words】5-fluorouracil; Nimesulide; Esophageal carcinoma; Vascular endothelial growth factor

环氧化酶(Cyclooxygenase,COX),也被称为环氧合酶,是将花生四烯酸合成前列腺素(Prostaglandin,PG)和血栓素的限速酶。该酶具有脂肪酸环氧化活性和氢过氧化物酶活性,目前已知有 2 种结构形式:COX-1 和 COX-2[1]。COX-1 是一种结构型表达蛋白,存在于许多正常组织和细胞中,对维持细胞的正常生理功能起着重要作用。COX-2 为诱导型蛋白,在炎症和促进有丝分裂因子(如细胞因子、白介素)刺激后便快速合成表达。近年来流行病学资料显示,COX-2 在多种肿瘤中呈现高表达现象;且环氧化酶抑制剂能抑制多种肿瘤细胞的增殖及诱导凋亡,这为肿瘤的防治提供了一个重要线索;但其具体机制目前尚未明确。

5- 氟脲嘧啶(5-Fluorouracil,5-FU)是临床常用化疗药物(Chemotherapeutic drugs),疗效确切,但是副反应较多,如骨髓抑制、肝功能损害等,降低了患者的耐受性。应用不同浓度的选择性 COX-2 抑制剂尼美舒利(Nimesulide,NIM)作用于人食管癌 EC109 细胞,观察其对食管癌细胞增殖的影响;并将其与临床常用化疗药物 5-FU 联用,探讨两者抑制食管癌细胞增殖、诱导凋亡的可能分子机制,以期为化疗药物联合选择性环氧化酶抑制剂治疗肿瘤新思路的实行提供一定实验依据。

作者介绍:李民杰(1983-),男,硕士,
研究方向:食管癌基础与临床研究。
通讯作者:汪 斌,男,副教授,E-mail:wangbin999666@yahoo.com.cn。

1 材料与方法

1.1 实验材料

食管癌 EC109 细胞株购于中科院上海细胞生物所;NIM 购于美国 Sigma 公司;5-FU 购于上海旭东海普药业有限公司;RPMI1640 培养基干粉、胰蛋白酶购于美国 Gibco 公司;优等胎牛血清购于北京元亨公司;MTT、二甲亚砜(Dimethyl sulfoxide,DMSO)购于美国 Amresco 公司。Trizol 购自美国 Gibco 公司;逆转录-多聚酶链反应(Reverse transcription polymerase chain reaction,RT-PCR)试剂盒购自北京天根生化科技公司。PCR 引物由重庆维斯腾公司合成。AnexinV/PI 试剂盒、兔抗人血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)多克隆抗体、辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase,HRP)二抗、预染蛋白 Marker、增强发光试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司;聚偏二氟乙烯膜(Polyvinylidene fluride,PVDF)购自英国 Whatman 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 食管癌 EC109 细胞株在含 10%胎牛血清及青霉素、链霉素的 RPMI1640 培养基中,于 37℃、5% CO_2 饱和湿度下培养、繁殖、传代,维持细胞处于对数生长期备用。

1.2.2 MTT 法检测 5-FU、NIM 单独或联合干预对食管癌 EC109 细胞增殖活性的影响 取对数生长期的 EC109 细胞,0.25%胰蛋白酶消化,用培养液制成单细胞悬液,血球计数板计数调整细胞密度为 5×10^4 个/ml,接种于 96 孔培养板中,每孔 200 μl,含 1×10^4 个细胞;同时取 1 孔加入不含细胞的培养液作为空白调零孔,置于 37℃、5% CO_2 培养箱中继续培养,待细胞贴壁后分组进行实验。实验分为 3 个 5-FU 浓度组(100、200、400 μmol/ml)、3 个 NIM 组(100、200、400 μmol/ml),3 个联合用药组(100 μmol/ml 5-FU+100 μmol/ml NIM、200 μmol/ml 5-FU+200 μmol/ml NIM、400 μmol/ml 5-FU+400 μmol/ml NIM),不同药物浓度根据 NIM 实验文献[2]及本实验预实验得出。对照组为仅含等量体积分数 0.2%有机溶剂 DMSO 的 RPMI1640 培养基。每组设置 8 个复孔,于 37℃、5% CO_2 培养箱中继续培养 24 h。加入处理药物 24 h 后每孔加 MTT20 μl,继续在培养箱中培养 4 h,彻底吸尽每孔中的培养液后加入 DMSO 200 μl,振荡 1 min 运用酶联免疫检测仪,测定波长570 nm 处的吸光度值(Absorbance,A 值),吸光度值取平均值。重复实验 3 次。按照公式细胞抑制率 =1-(药物组平均 A 值-试剂对照组 A 值)/(空白对照组 A 值-试剂对照组 A 值)×100%。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率 取对数生长期细胞,用无血清 RPMI1640 培养液 24 h 同步化后,分为对照组(为仅含等量体积分数 0.2%有机溶剂 DMSO 的 RPMI1640 培养基)、400 μmol/ml NIM组、400 μmol/ml 5-FU 组及以上两药联合组,培养 24 h 后,观察细胞形态变化,收集细胞,PBS 反复洗 2 次,加入 Annexin-V/PI 染料后充分混匀,避光反应 30 min 上机检测,计算细胞凋亡率。

1.2.4 RT-PCR 法分析 VEGF mRNA 表达水平 培养细胞与药物处理同前,培养 24 h。收集药物处理后的细胞,按 Trizol 试剂盒说明提取总 RNA。每个标本取总 RNA 5 μl,用逆转录酶进行逆转录,PCR 扩增 VEGF,同时扩增 GAPDH 作为内参,每例标本重复 3 次。VEGF 引物序列(产物长 417 bp):上游序列 5'-TTGCTGCTCTACCTCCAC-3',下游序列 5'-AATGCTTTCTCCGCTCTG-3'。GAPDH 引物(产物长 821 bp)上游序列 5'-GGGCTGCTTTTAACTCTGGTAA-3',下游序列5'-ATGAGCTTGACAAAGTGGTCGT-3'。94℃ 3 min 预变性后开始循环,GAPDH 与 VEGF 各行 30 个循环,最后于 72℃延伸 10 min。每个样品取 5 μl,在 0.1%琼脂糖上进行凝胶电泳。应用凝胶成像系统摄取各样品电泳图后,通过成像分析软件 Quantity One 进行半定量。目的条带用凝胶成像分析系统作光密度测定,并用 VEGF 与 GAPDH 光密度的比值表示VEGF mRNA 的相对含量。

1.2.5 Western blotting 法分析 VEGF 蛋白表达水平 培养细胞与处理细胞同前,培养 24 h 后,提取细胞蛋白,用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,以 GAPDH 的表达水平作为等量蛋白质上样对照。取 20 μl 蛋白质与 5×SDS 上样缓冲液按 4∶1 比例混合,混匀后沸水中煮 5 min 使蛋白变性。10%SDS-PAGE 电泳,将分离的蛋白转移至 PVDF 膜,并做好正反面标记,脱脂奶粉封闭液封闭 2 h;加入一抗工作液,4℃冰箱过夜。TBST 洗涤 3 次,每次 10 min 后,加入辣根素过氧化酶标记的二抗稀释液 37℃孵育 2 h,再用 TBST 清洗 4 次,每次 10 min。增强化学发光显色系统显色,暗室内 X 光底片感光成像;最后用 UVP 凝胶图像处理系统 Labworks4.6 软件分析目的条带的灰度值。并用 VEGF 与 GAPDH 灰度值的比值表示 VEGF 蛋白的相对含量。

1.3 统计学处理

所有实验重复 3 次,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。用 SPSS13.0 统计软件进行方差分析,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 5-FU、NIM 单独或联合干预对食管癌 EC109 细胞增殖活性的影响

结果发现,5-FU、NIM 单独作用时呈浓度依赖性抑制 EC109 细胞增殖,随着药物浓度增加其抑制效应逐渐增强($P<0.05$)。5-FU、NIM 联合作用于 EC109 细胞时,其抑制率较单独应用时增高($P<0.05$)(见表 1)。本实验中 5-FU、NIM 最大药物浓度(400 μmol/ml 5-FU、400 μmol/ml NIM)单独及联合作用后,对 EC109 细胞的抑制率明显增高。因此,选取 400 μmol/ml 5-FU、400 μmol/ml NIM 及 400 μmol/ml 浓度的 5-FU+NIM)继续下一步的实验。

2.2 流式细胞仪检测结果

5-FU 与 NIM 联合作用于 EC109 细胞株后,凋亡率较两者单独作用时明显提高。5-FU、NIM 及二者联合作用时的凋

亡率分别为:7.66%、10.76%、28.07%,与对照组相比(3.05%),差异具有统计学意义($P<0.05$)(见图 1～4)。

2.3 RT-PCR 检测结果

结果显示,用药物处理细胞 24 h 后,5-FU 及 NIM 均能抑制 EC109 细胞 VEGF mRNA 的表达;但 5-FU 与 NIM 联合作用时,较两者单独作用更能明显降低 VEGF mRNA 的表达,且差异具有统计学意义($P<0.05$)(见图 5)。

2.4 Western blot 检测结果

应用 Western blot 免疫印迹法测定不同处理组 VEGF 蛋白在 EC109 细胞中的表达。与对照组相比,单独用药组及联合用药组均可降低 VEGF 蛋白的表达;且联合用药组较单独用药组更能降低 VEGF 蛋白的表达,差异具有统计学意义(见图6)。

表 1 5-FU 单独、NIM 单独或联合应用对食管癌 EC109 细胞增殖的影响($n=8, \bar{x} \pm s$)

分组	OD570	IR/%
对照组	1.146 7 ± 0.010 1	-
100 μ mol/ml 5-FU	1.127 6 ± 0.025 7	1.68
200 μ mol/ml 5-FU	0.915 4 ± 0.000 9*	20.18
400 μ mol/ml 5-FU	0.727 7 ± 0.004 1*	36.55
100 μ mol/ml NIM	1.115 3 ± 0.030 4	2.75
200 μ mol/ml NIM	1.059 1 ± 0.013 1*	7.65
400 μ mol/ml NIM	0.916 6 ± 0.002 5*	20.07
100 μ mol/ml 5-FU+100 μ mol/ml NIM	1.061 9 ± 0.007 4*	7.4
200 μ mol/ml 5-FU+200 μ mol/ml NIM	*0.863 9 ± 0.013 6***	*24.22*
400 μ mol/ml 5-FU+400 μ mol/ml NIM	0.618 0 ± 0.008 9**	46.11

注:*$P<0.05$ 5-Fu 单独,NIM 单独与对照组;**$P<0.05$,联合组与单独用药组。IR:抑制率

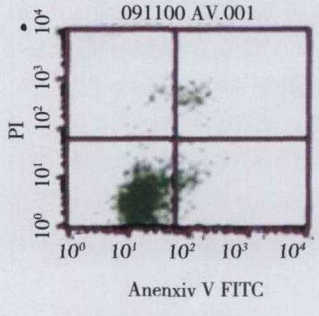


图 1 对照组

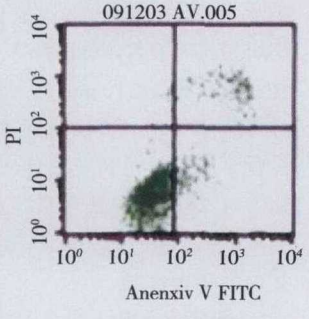


图 2 5-FU 组

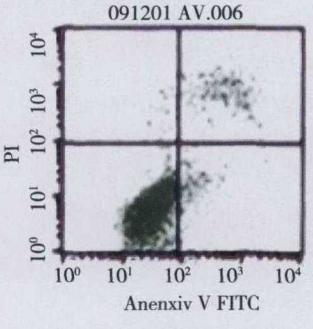


图 3 NIM 组

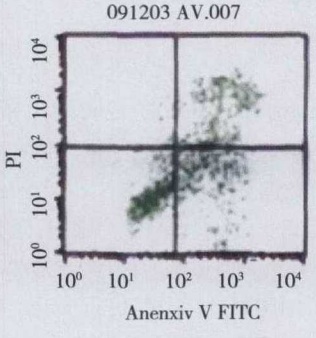


图 4 联合作用组

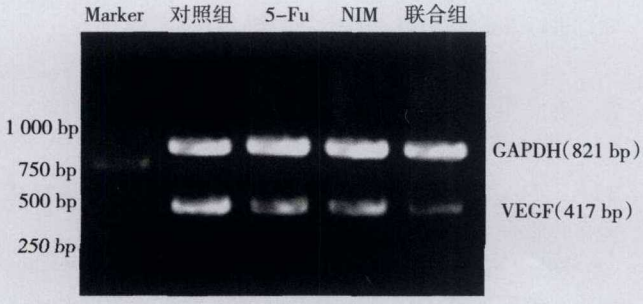


图 5 药物作用后 VEGF mRNA 表达水平

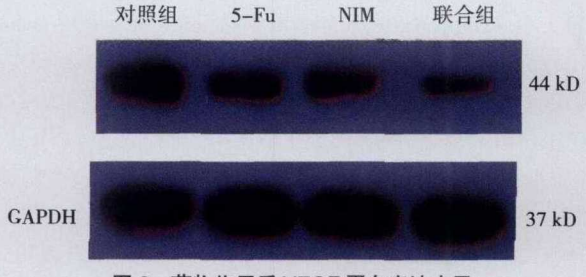


图 6 药物作用后 VEGF 蛋白表达水平

3 讨 论

流行病学资料显示,COX-2 在人类多种肿瘤中呈现高表达现象。Liu WK 等[3]通过链霉素抗生物素蛋白－过氧化物酶方法检测 82 例食管鳞状细胞癌和 30 例正常食管黏膜,发现 COX-2 在食管鳞癌中的表达率为 73.2%(60/80),而在食管正常粘膜中的表达率仅为 6.7%(2/30),且 COX-2 的高表达与年龄及性别无关,与肿瘤浸润及淋巴结转移密切相关。Felin IP 等[4]通过免疫组化法对 31 例食管肿瘤和正常组织标本检测发现,COX-2 的在肿瘤组织表达为 100%(根据肿瘤标本 COX-2 的表达及染色强度分为 1+、2+、3+),且肿瘤标本 COX-2 染色 3+ 的与食管癌的 TNM 分级密切相关。Liu JR 等[5]研究发现 COX-2 在食管鳞癌及食管发育不良中的表达率较正常食管粘膜高,且食管癌中 COX-2 的高表达与细胞分化及淋巴结转移相关。Liu YS 等[6]通过对 86 例食管癌标本和 40 例正常食管粘膜标本研究发现,COX-2 的在食管癌标本中的表达率较食管正常粘膜组织高,并且发现 COX-2 的高表达是食管癌发生的一个预测因子,组织表达高表达 COX-2 更容易癌变。

Hashimoto N 等[7]通过对 68 例食管鳞癌标本研究发现,COX-2 免疫反应弱者 27 例(40%),免疫反应强者 41 例(60%);肿瘤强表达 COX-2 者(34%,14/41)较表达弱者(19%,3/14)细胞分化更差;且肿瘤浸润深度、淋巴结转移及肿瘤分级在 COX-2 强表达中呈现进行性。于钟等[8]研究显示在食管癌中 COX-2 的表达与肿瘤浸润深度呈正相关,与鳞癌的分化程度呈负相关;食管癌肿瘤浸润越深、鳞癌分化程度越低,COX-2 的表达越强。COX-2 通过促进血管发生、促进细胞增殖、抑制细胞凋亡、免疫抑制和将前致癌物转化为致癌物等机制参与了肿瘤的发生发展[9]。因此,COX-2 可能是肿瘤治疗的一个新靶点。实验研究、流行病学及临床调查都显示了服用环氧化酶抑制剂与降低肿瘤发生率的密切相关性。但非选择性环氧化酶抑制剂存在一定的副作用,采用选择性环氧化酶抑制剂 NIM 实验。

局部浸润和远处转移是恶性肿瘤最重要的特点,并且是恶性肿瘤致人死亡的主要原因。研究表明,当肿瘤直径达到 1 ~ 2 mm 时,要继续发展或转移,就比必须依靠血管新生来提供足够的营养成分并带走代谢产物。血管新生是肿瘤生长和转移过程中一个关键限速步骤,VEGF 是目前已知的作用最强,特异性最高的促血管生长因子[10],具有促进内皮细胞增殖、提高血管通透性及改变细胞外基质诱导血管形成的生物学作用。

逄旭光等[11]通过免疫组化法检测 VEGF 在 45 例食管癌患者的手术切除癌组织中的表达,发现 VEGF 在食管癌组织中的表达阳性率为 62.2%,VEGF 表达与肿瘤临床分期、淋巴结转移有关 ($P<0.05$),提示 VEGF 与食管癌临床分期、淋巴结转移密切相关。Li Chen 等[12]通过 RT-PCR 法和 Western blot 法检测了 67 例食管癌组织标本,发现 VEGF 呈现高表达,且 VEGF 的高表达参与了食管癌的发生发展。林称意等[13]通过免疫组化 S-P 法检测 VEGF 在 48 例食管癌组织和癌旁正常组织中的表达情况,发现 48 例食管癌组织中 VEGF 的阳性表达率为 64.6%(31/48),显著高于癌旁正常食管组织中的表达(17.1%),VEGF 的表达与有无淋巴结转移、TNM 分期显著相关($P<0.05$),与患者年龄、性别、瘤体大小和肿瘤组织分化程度无相关性。崔玉霞等[14]采用免疫组化 SP 法检测 44 例原发性食管癌,20 例癌旁组织和 20 例正常组织,发现 VEGF 表达在食管癌组织中明显高于其他组织,且逾期病理分级、有无淋巴结转移及肿瘤浸润有相关性($P<0.05$)。Shih[15]认为,VEGF 也促进了淋巴结转移,其机制可能有以下 3 种:①癌细胞通过淋巴结的供应血管直达淋巴结;②通过丰富的血管淋巴管吻合到达淋巴结;③淋巴管和血管具有相似的结构,VEGF 同样可以促进淋巴管的发生,导致癌细胞直接进入淋巴循环。因此,抑制肿瘤细胞 VEGF 的表达是阻止肿瘤发生发展及远处转移的有效途径。

通过本次实验,探讨了 5-FU 与 NIM 单独和联合作用对食管癌 EC109 细胞株增殖、凋亡的影响。体外药物敏感实验结果提示,5-FU 及 NIM 对 EC109 细胞的杀伤率随剂量增加而增强,并且两者联合作用时具有协同杀伤和诱导凋亡作用,与单独作用时相比差异有统计学意义($P<0.05$)。与此同时观察到两者联合后,细胞内 VEGF mRNA 及蛋白的表达较对照组和单独作用组较更少。由此可见,NIM 联合 5-FU,可以在不增加 5-FU 的浓度下,增强了诱导 EC109 细胞凋亡的能力。

化疗药物的副作用如骨髓抑制、肝脏损害及耐药是临床上肿瘤治疗的主要问题。实验表明,5-FU 与选择性环氧化酶抑制剂尼美舒利联合作用能更好地抑制食管癌 EC109 细胞增殖和诱导凋亡,这为选择性环氧化酶抑制剂与临床化疗药物联合治疗肿瘤提供了一定的实验依据。

参 考 文 献

[1] Williams C S, Mann M, DuBois R N. The role of cyclooxygenase in inflammation, cancer and development[J]. Oncogene, 1999, 18(55): 7908-7916.

[2] 刘俊茹,齐凤英,左连富,等.尼美舒利对食管癌 Ec-109 细胞生长的影响及其可能机制[J].肿瘤,2006,26(3):244-248.

[3] Liu W K, Fu Q, Li Y M, et al. The relationship between cyclooxygenase-2, CD44v6, and nm23H1 in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Onkologie, 2009, 32(10): 574-578.

[4] Felin I P, Grivicich I, Felin C R, et al. P53, P16 E COX-2 expression in esophageal squamous cell carcinoma and histopathological association [J]. Arq Gastroenterol, 2008, 45(4): 308-312.

[5] Liu J R, Wang Y, Zuo L F, et al. Expression and clinical significance of COX-2, p-Stat3, and p-Stat5 in esophageal carcinoma[J]. Ai Zheng, 2007, 26(5): 458-462.

[6] Liu Y S, Yu C H, Li L, et al. Expression of p53, p16 and cyclooxygenase-2 in esophageal cancer with tissue microarray[J]. J Dig Dis, 2007, 8(3): 133-138.

[7] Hashimoto N, Inayama M, Fujishima M, et al. Clinicopathologic significance of expression of cyclooxygenase-2 in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. Hepatogastroenterology, 2007, 54(75): 758-760.

[8] 于 钟,詹 俊,钟 娃,等.环氧化酶 2 在反流性食管炎和食管癌中的表达[J].中华生物医学工程杂志,2008,14(4):301-305.

[9] Szumio J, Burdan F, Lewkowicz D, et al. Cyclooxygenase inhibitors in chemoprevention and treatment of esophageal squamous cell carcinoma [J]. Pol Merkur Lekarski, 2009, 27(161): 408-412.

[10] Ma E L, Li Y C, Tsuneki H, et al. Beta-eudesmol suppresses tumor growth through inhibition of tumour neovascularisation and tumor cell proliferation[J]. J Asian Nat Prod Res, 2008, 10(2): 159-167.

[11] 逄旭光,葛 棣,谢 冬,等.VEGF、CD44v6 和 MMP-9 在食管癌组织中的表达及临床意义[J].中国临床医学,2007,14(2):177-179.

[12] Li C, Guo S R, Fan L, et al. Expression of Livin and vascular endothelial growth factor in different clinical stages of human esophageal carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(37): 5749-5754.

[13] 林称意,郭家龙,左顺庆,等.PTTG 和 VEGF 在食管癌中的表达及其相关性研究[J].邵阳医学院学报,2008,27(6):499-501.

[14] 崔玉霞,李森晶.血管内皮生长因子(VEGF)在食管癌中的表达及临床意义[J].牡丹江医学院学报,2007,28(6):28-29.

[15] Shih C H, Ozawa S, Ando N, et al. Vascular endothelial growth factor statement predicts outcome and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(3): 1161-1168.

(责任编辑:张学颖)