肿瘤分子学相关研究 文章编号:0253-3626(2009)07-0845-04

环氧化酶－2 抑制剂 NS398 对肾癌细胞增殖和凋亡的影响

付云锐[1,2],刘 川[3],吴小候[1],罗春丽[4],林 杰[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016;2. 重庆医科大学基础医学研究所,重庆 400016;3. 重庆医科大学附属第二医院泌尿外科,重庆 400010;4. 重庆医科大学检验系实验诊断教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨环氧化酶-2(Cyclooxygenase-2,COX-2)抑制剂 NS398 对肾癌细胞 786-O 增殖和凋亡的影响。方法:不同浓度 NS398 作用体外培养的 786-O 细胞后,采用噻唑蓝(MTT)法检测 24、48、72、96 h 后肾癌细胞 786-O 的增殖活性。终浓度为 30、180 μmol/L 的 NS398 作用 786-O 细胞 72 h 后,免疫细胞化学检测 COX-2 蛋白表达;RT-PCR 法检测 COX-2mRNA 表达;流式细胞仪检测细胞凋亡情况。结果:NS398 可以抑制 786-O 细胞的增殖,呈时间和剂量依赖型。RT-PCR 法检测显示 NS398 作用后能降低 COX-2mRNA 表达。免疫细胞化学结果显示 NS398 作用后能降低 COX-2 蛋白表达。流式细胞仪检测表明,30、180 μmol/L NS398 处理组凋亡率分别为 14.3%±1.4%、31.5%±2.1%,与对照组凋亡率 2.1%±0.4%比较,凋亡率显著上升($P<0.05$)。结论:NS398 可能通过降低 COX-2 表达,抑制肾癌细胞增殖和诱导其凋亡。

【关键词】肾细胞癌;环氧化酶-2;NS398;增殖;凋亡

【中国图书分类法分类号】R737.11 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-03

Effects of cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 on proliferation and apoptosis of renal cell carcinoma cells

FU Yun-rui, et al

(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the proliferative and apoptotic effects of NS398, a selective COX-2 inhibitor, on renal carcinoma cell line 786-O in vitro. *Methods*: 786-O cells were treated with different concentrations of NS398 for24, 48, 72 and 96 h. The proliferation of 786-O cells was studied by MTT assay. Immuno cytochemistry was used to detect the expressions of COX-2. The expression of COX-2 mRNA was analyzed by reverse transcription-polymerase chain raction (RT-PCR). Flow cytometric analysis was used to detect the apoptosis status of 786-O cells. *Results*: NS398 resulted in significant antiproliferative effects on 786-O cells in dose and time dependent manner. Immunocytochemistry showed the expressions of COX-2 were significantly inhibited by NS398. RT-PCR showed the expressions of COX-2 were significantly inhibited by NS398. Apoptosis rate were 31.5%±2.1% and 14.3%±1.4%, respectively in the 786-O cells treated with NS398 in different concentrations of 180 μmol/L and 30 μmol/L, which was significantly higher than in the control group 2.1%±0.4%. *Conclusion*: NS398 could effectively suppress the growth of 786-O cells and induce apoptosis, the mechanism of which probably relates to its inhabited expression of COX-2.

【Key words】Renal cell carcinoma; Cyclooxygenase-2(COX-2); NS398; Proliferation; Apoptosis

流行病学资料显示:在很多肾癌组织中还氧化酶-2(Cyclooxygenase-2,COX-2)呈高表达状态,与肾癌的发生发展有密切的关系。近年来,选择性 COX-2 抑制剂的抗肿瘤作用日益引起重视。大量的流行病学资料、体外实验、动物实验及临床研究发现 COX-2 抑制剂具有抗肿瘤作用,并且证实这种作用主要通过抑制 COX-2 来实现。本研究采用 MTT、RT-PCR、免疫细胞化学和流式细胞仪观察 COX-2 抑制剂 NS398 对肾癌细胞增殖和凋亡的影响,为临床肿瘤治疗奠定基础。

1 材料及方法

1.1 材料

肾癌细胞株 786-O 细胞由重庆医科大学附属第二医院

作者介绍:付云锐(1976-),男,主治医师,硕士,研究方向:泌尿系统肿瘤。

通讯作者:吴小候,男,教授,E-mail:chinacqrui@yahoo.com.cn。

泌尿外科刘川博士惠赠。NS398、DMSO 购自 Sigma 公司。MTT 为美国 Amresco 产品，COX-2 抗体购自博士德公司。Trizol、RT-PCR 转录试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司。膜联蛋白 V(Annexin V)- 异硫氰酸荧光素(FITC)/PI 试剂盒为晶美公司产品。RPMI1640、胰酶均为重庆医科大学基础医学研究所配置。胎牛血清购自 TBD 公司。

1.2 方法

786-O 细胞置于 37℃，饱和湿度，含 5%CO_2 的孵箱中培养，培养液 RPMI1640 含 10%胎牛血清，100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素。根据细胞生长状态每 2、3 d 传代 1 次。当细胞生长状态稳定，呈对数生长期，用于实验。

1.2.1 MTT 实验 将 1×10^4 个细胞/孔接种于 96 孔板培养，24 h 后吸出原培养液，实验组分别加入 NS398 浓度为 30、60、120、180、360 μmol/L 的 RPMI1640 培养液 200 μl，设培养液中不加药物为对照组，另设空白对照。每组设 4 个复孔继续培养 24、48、72、96 h 后，进行 MTT 实验，每孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml)20 μl，继续培养 4 h，终止培养，小心吸弃孔内培养上清液，每孔加 DMSO 150 μl，振荡 10 min，使结晶充分溶解，用酶标仪在 570 nm 处测定各孔的吸光度 A 值。按下列公式计算细胞生长抑制率：细胞生长抑制率 $R=(1-A_{实验组}/A_{对照组})\times100\%$。

1.2.2 RT-PCR 检测 786-O 细胞中 COX-2 mRNA 表达量 786-O 细胞经 30、180 μmol/L 的 NS398 处理 72 h 后，用 Trizol 提取总 RNA，按照试剂盒说明书逆转录合成 cDNA 后，COX-2 和 β-actin 同管进行 PCR 扩增。50 μl 反应体系含 5 μl 2 μmol/L 的上游及下游引物，4 μl 25 mmol/L Mg^{2+}，3 μl 10 mmol/L dNTP，1.25 U Taq DNA 聚合酶。PCR 反应条件为 94℃，预变性 5 min 后，94℃变性 40 s，60℃退火 40 s，72℃延伸 1 min，共 30 个循环。PCR 产物在含 0.5 g/L EB 的 1.5%琼脂糖凝胶电泳。应用凝胶成像分析系统(Bio-rad)对 PCR 产物进行半定量分析，基因的表达量通过扩增的 β-actin 表达进行校正，即以 COX-2/β-actin 比值作为 COX-2 基因表达相对水平。引物序列见表 1。

1.2.3 免疫细胞化学检测 COX-2 蛋白表达 将盖玻片灭菌后放入 24 孔培养板内。将细胞悬液以 1×10^4 个接种在玻片上，每孔 1 ml。细胞贴壁后弃去培养液分组加药物。实验组 NS398 浓度分别为 30、180 μmol/L，对照组不加药物。培养 72 h 后取出玻片，PBS 缓冲液冲洗 3 次，每次 3 min。4%多聚甲醛固定，一抗(COX-2，1:100 稀释)4℃孵育过夜，根据 SABC 免疫组化试剂盒说明书完成操作步骤。检测结果的判定：在 100 倍视野下随机选取细胞爬片上不同部位的 5 个视野，用 Simple PCI 图像分析软件对各组免疫细胞化学结果进行分析，计算阳性反应细胞平均吸光度值(A)。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率 选对数生长期细胞，0.25%胰蛋白酶消化成单细胞悬液后，用培养液调整细胞浓度为 1×10^5 个/ml，接种于 6 孔培养板，每孔 2 ml。细胞贴壁后弃去培养液分组加药物。实验组 NS398 的浓度分别为 30、180 μmol/L，对照组不加药物。培养 72 h 后分别收集每孔细胞，用冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次，重混悬于 100 μl 结合缓冲液，加入 10 μl Annexin V-FITC 和 5 μl 碘化丙啶(PI)，轻轻混匀后避光室温反应 15 min，再加入 400 μl 结合缓冲液，流式细胞仪检测并读取细胞凋亡率。检测结果的判定：左下象限代表正常细胞($FITC^-/PI^-$)，左上象限代表坏死细胞($FITC^+/PI^+$)，右下象限代表凋亡细胞($FITC^+/PI^-$)，右上象限代表晚期凋亡(继发坏死)细胞($FITC^-/PI^+$)。凋亡率为右下象限细胞占全部细胞的百分率。

1.2.5 统计学处理计量 资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS11.0 统计软件包的单因素方差分析，以 $P<0.05$ 为有显著意义。

2 结 果

2.1 NS398 对 786-O 细胞增殖的作用

表 2 所示 NS398 对 786-O 细胞的生长增殖有较强抑制作用，第 2、3 d 随药物浓度的增大、作用时间的延长抑制作用明显，呈时间和剂量依赖关系。第 4 d 抑制作用下降，其中第 3 d 抑制作用最明显，由此推测出第 3 d 中效浓度 IC_{50} 值约为 206 μmol/L。不同浓度 NS398 作用不同时间对 786-O 细胞的增殖的影响见表 2。

2.2 NS398 对 786-O 细胞 COX-2mRNA 表达量的影响

对照组和 30、180 μmol/L NS398 处理组均可检测到 COX-2mRNA 的条带(图 1)。与对照组比较，30、180 μmol/L NS398 处理组 COX-2 mRNA 表达水平明显减弱($P<0.05$，表 3)。

2.3 NS398 对 786-O 细胞 COX-2 蛋白表达的影响

COX-2 免疫阳性染色表现为胞浆内出现棕黄色颗粒(图 2)。与对照组(吸光度为 431±23)比较，30、180 μmol/L NS398 作用 72 h 后的 786-O 细胞 COX-2 蛋白表达(吸光度分别为 308±52、176±39)明显减弱，差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 NS398 对 786-O 细胞凋亡的影响

用 Annexin V-FITC/PI 双染检测 NS398 作用 72h 后的 786-O 细胞，30、180 μmol/L NS398 处理组凋亡率分别为 14.3%±1.4%、31.5 %±2.1%，与对照组凋亡率 2.1%±0.4%比较，凋亡率显著上升($P<0.05$，图 3)。

表 1 COX-2、β-actin 引物序列

基因	引物	片段长度
COX-2	上游 5'-CGCTGAGTTCAACACGCTCTATC 3' 下游 5'-GAACATTCCTACCACCAGCCAC 3'	188 bp
β-actin	上游 5'-GTGACGTGGACATCCGCAAAGAC 3' 下游 5'-GATGCTCGCTCCAACCGACTGCT 3'	463 bp

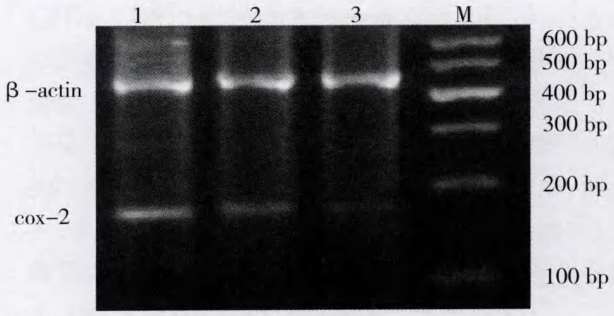
表 2 NS398 对 786-O 细胞增殖抑制的（剂量、时间）/效应关系（$\bar{x} \pm s$）

NS398(μmol/L)	24 h 抑制率(%)	48 h 抑制率(%)	72 h 抑制率(%)	96 h 抑制率(%)
30	4.3 ± 1.17	10.1 ± 0.51	16.3 ± 6.24*	17.2 ± 5.29
60	9.2 ± 3.7	18.3 ± 3.2	25.8 ± 5.29#	25.6 ± 6.3
120	15.6 ± 3.91	29.1 ± 5.83	39.4 ± 2.67#	41.5 ± 3.75
180	21.3 ± 1.75	35.6 ± 3.42	45.7 ± 3.42#	44.8 ± 3.9
360	33.2 ± 5.34	53.4 ± 5.87	79.5 ± 1.83#	78.7 ± 0.92

*P<0.05,#P<0.01,与对照组比较

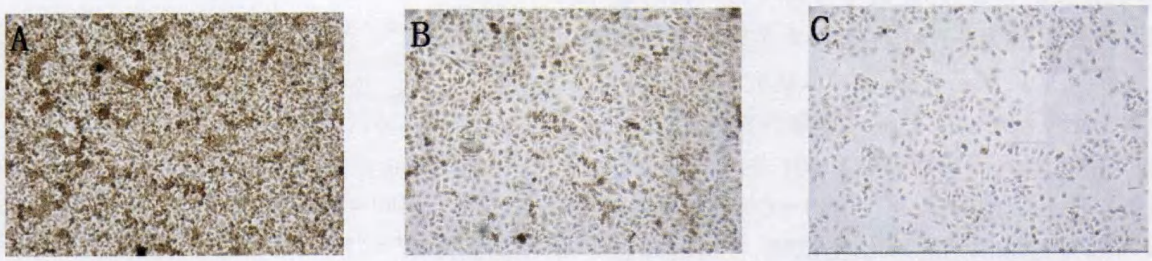
表 3 786-O 细胞 COX-2mRNA 表达量分析

NS398 (μmol/L)	COX-2mRNA 表达量	P (与对照组比较)
对照组	0.776 ± 0.035	
30	0.482 ± 0.12	P<0.05
180	0.266 ± 0.39	P<0.01



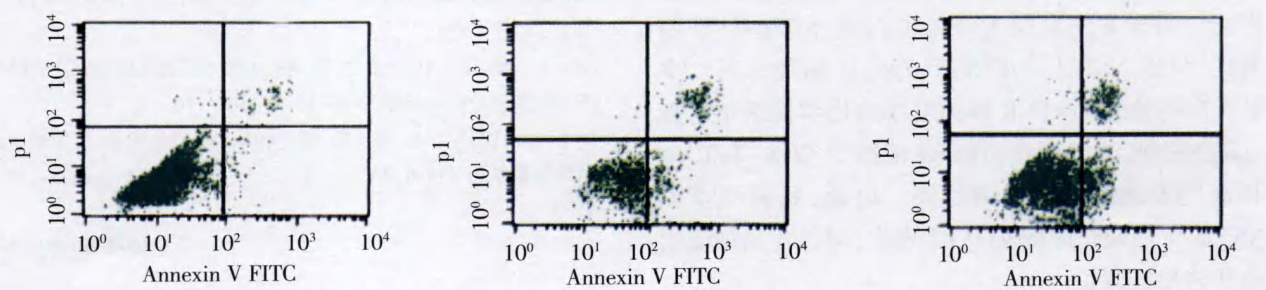
M. Maker; 1. 对照组; 2. 30 μmol/L NS398; 3. 180 μmol/L NS398

图 1 NS398 对 786-O 细胞 COX-2mRNA 表达量的影响



A. 对照组　B. NS398(30 μmol/L)　C. NS398(180 μmol/L)

图 2 不同浓度 NS398 对 786—O 细胞 COX—2 蛋白表达的影响



A. 对照组(凋亡率 2.35%)　B. 30 μmol/L NS398(凋亡率 14.48%)　C. 180 μmol/L NS398(凋亡率 31.83%)

图 3 786—O 细胞凋亡流式散点图

3 讨 论

环氧化酶(Cyclooxygenase, COX)是催化花生四烯酸转化为前列腺素的关键酶。COX 由两种不同的基因型 COX-1 和 COX-2 组成。研究证明,COX-2 在许多人类恶性肿瘤组织中表达显著上调,在肿瘤的发生发展中起到重要作用。目前认为 COX-2 的致癌机制包括:诱导肿瘤血管生成;抑制凋亡;增加肿瘤发生和侵袭的能力;免疫抑制等[1-4]。在正常状态下 COX-2 的活性很低,在多数组织中检测不到,如果在细胞因子、生长因子、癌基因等刺激下,COX-2 可诱导性表达,并参与炎症、细胞增殖与分化过程。Yoshimura R 等[5]采用 RT-PCR 和免疫组化检测了 108 例肾癌和 20 例正常肾组织中 COX-2 的表达,结果在所有肾癌标本检测到 COX-2 mRNA 特异性条带,正常肾组织中未检测到,和免疫组织化学检测蛋白表达结果相同。因此以 COX-2 为靶向的肿瘤治疗可能是一种较有效的治疗方法。研究表明,COX-2 抑制剂(罗非昔布、塞来昔布、NS398 等)除抗炎镇痛的作用外,还具有抗肿瘤的作用,可以抑制多种肿瘤细胞生长,如结肠癌、食管癌、胃癌等[6,7]。COX-2 抑制剂能够通过抑制 COX-2 表达下调 bcl-2 蛋白的水平上调 Par-4 基因的水平等途径抑制肿瘤的生长[8]。

本研究采用中效原理,取中效浓度以下进行实验,即可防止因细胞非凋亡性死亡太多影响观察结果,又可很好地反映药物效应。本研究采用 MTT、RT-PCR、免疫细胞化学和流式细胞仪观察 COX-2 抑制剂 NS398 对肾癌细胞增殖和凋亡的影响,并初步探讨其可能存在的机制。MTT 试验证实体外 NS398 可较好的抑制 786-O 细胞增殖,且呈时间和剂量依赖关系。应用流式细胞术检测细胞凋亡具有很高的灵敏性,并能进行凋亡细胞的定量分析[9]。本研究应用该方法发现 NS398 可以诱导 786-O 细胞凋亡,且随 NS398 浓度增高,786-O 细胞的凋亡率呈升高趋势。RT-PCR 和免疫细胞化学检测结果显示随 NS398 浓度增高,786-O 细胞的 COX-2mRNA 和蛋白表达水平呈下调趋势。由此,我们可推测 NS398 可能通过降低 COX-2 表达,抑制肾癌细胞增殖和诱导其凋亡。

临床上肾细胞癌各种治疗方法中,手术切除在未出现肿瘤转移前效果良好,免疫治疗对肾细胞癌治疗有效,但实际应用效果不佳,并且肾细胞癌确诊时一半以上患者有局部浸润或远处的转移[10],因此,进一步探索肾细胞癌的发病机制和新的治疗手段是非常必要的。本研究显示 NS398 可能通过降低 COX-2 表达,抑制肾癌细胞增殖和诱导其凋亡。这为临床上使用 COX-2 抑制剂作为抗癌药物提供了实验室的依据,但还有待于深入研究其作用机理和利用裸鼠进行体内实验证实其抗肿瘤作用。

参 考 文 献

[1] Legan M, Luzar B, Ferlan-Marolt V, et al. Cyclooxygenase-2 expression determines neo-angiogenesis in gallbladder carcinomas[J]. Bosn J Basic Med Sci, 2006, 6(4): 58-63.

[2] Fodera D, Dalessandro N, Cusimano A, et al. Induction of apoptosis and inhibition of cell growth in human hepatocular carcinoma cells by COX-2 inhibitors[J]. Ann N Y A-cad Sci, 2004, 18(5): 440-449.

[3] Nystrom M L, McCulloch D, Weinreb P H, et al. Cyclooxygenase-2 inhibition supp- resses alphavbeta6 integrin-dependent oral squamous carcinoma invasion[J]. Cancer Res, 2006, 66(22): 10833-10842.

[4] Lang S, Picu A, Hofmann T, et al. COX-inhibitors relieve the immunosuppressive effect of tumor cells and improve functions of immune effectors[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2006, 19(2): 409-419.

[5] Yoshimura R, Matsuyama M, Kawahito Y, et al. Study of cyclcoxygenase-2 in renal cell carcinoma[J]. Int J M0l Med, 2004, 13(2): 229-233.

[6] Banu N, Buda A, Chell S, et al. Inhibition of COX-2 with NS-398 decreases colon cancer cell motility through blocking epidermal growth factor receptor transactivation: possibilities for combination therapy [J]. Cell Prolif, 2007, 40(5): 768-779.

[7] Honjo S, Osaki M, Ardyanto T D, et al. COX-2 inhibitor, NS398, enhances Fas-mediated apoptosis via modulation of the PTEN-Akt pathway in human gastric carcinoma cell lines[J]. DNA Cell Biol, 2005, 24(3): 141-147.

[8] Courtney E D, Melville D M, Leicester R J. Review article: chemoprevention of colorectal cancer[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2004, 19(1): 1-24.

[9] 王 珊, 李 宁, 于力方, 等. 流式细胞术检测细胞凋亡比较研究[J]. 标记免疫分析与临床, 2005, 12(3): 168-170.

[10] 付云锐, 林 杰, 吴小候, 等. NS398 通过环氧化酶-2 依赖途径诱导肾癌细胞 786-0 凋亡[J]. 重庆医学, 2008, 37(14): 1525-1527, 1530.

(责任编辑: 冉明会)