基础研究 文章编号:0253-3626(2010)02-0209-04

NS398 逆转溶血磷脂酸拮抗顺铂抑制卵巢癌细胞增殖作用的研究

熊学华,彭真年
(重庆医科大学基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察环氧化酶-2(Cyclooxygenase-2,COX-2)抑制剂 NS398 对溶血磷脂酸(Lysophosphatidic acid,LPA)拮抗顺铂抑制卵巢癌细胞细胞增殖作用的影响,并探讨其可能机制。方法:体外培养人卵巢癌细胞 3AO,MTT 法检测 NS398 对 LPA 拮抗顺铂抑制 3AO 细胞增殖的影响;流式细胞仪检测细胞周期变化;RT-PCR 检测 LPA 单独或合用 NS398 对 3AO 细胞表达 COX-2 的影响。结果:LPA 对顺铂抑制卵巢癌细胞增殖有拮抗作用,并降低 G_0/G_1 期的细胞比率;联合用 NS398 后,卵巢癌细胞的生长显著受抑制,同时 G_0/G_1 期细胞比率上升;RT-PCR 结果显示 40 μmol/L LPA 能促进 COX-2 的表达,而合用 NS398 后 COX-2 表达降低。结论:NS398 可能通过抑制 COX-2 表达,实现逆转 LPA 拮抗顺铂抑制卵巢癌细胞细胞增殖的作用。

【关键词】溶血磷脂酸;环氧化酶-2;顺铂;NS398;3AO 细胞;卵巢癌
【中国图书分类法分类号】R737.31 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-10-08

Study of NS398 reversing the antergy of lysophosphatidic acid for the inhibiting effect of cisplatin in the proliferation of huanman ovarian cancer

XIONG Xue-hua, et al
(*Department of Pathology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of NS398, cyclooxygenase-2(COX-2)-inhibitor, on the antergy of lysophosphatidic acid (LPA) for the inhibiting effect of cisplatin(DDP) in the proliferation of huanman ovarian cancer, and to analyze its possible mechanism. *Methods*: Human ovarian cancer cell line(3AO) were cultured in vitro. The effect of NS398 on the antergy of LPA for the inhibiting effect of DDP in the proliferation of 3AO cells were measured by MTT. Cell cycle of 3AO were analysed by flow cytometry (FCM). The effect of LPA alone or in combination with NS398 on the expression of COX-2 of 3AO cells were measured with RT-PCR. *Results*: LPA showed antergy on the inhibiting effect of DDP in the proliferation of 3AO cells, and decrease the proportion of cells in the G_0/G_1 phase of the cell cycle. Whereas, combined with NS398 in culture, the proliferation of were significantly inhibited, and the the proportion of cells in the G_0/G_1 phase of the cell cycle was raised. RT-PCR results revealed that 40 μmol/L LPA could promote the expression of COX-2 in 3AO cells, and in combination with NS398, the expression of

作者介绍:熊学华(1981-),男,硕士,
研究方向:妇产科肿瘤。
通讯作者:彭真年,男,副教授,E-mail:pznpeng@Hotmail.com。

cells[J].Biochem Biophys Res Commun,2007,356(2):438-443.
[5] Samuel J. Reich,Joshua Fosnot,et al.Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model[J].Molecular Vision,2003,9:210-216.
[6] Cashman SM,Bowman L,Christofferson J,et al.Inhibition of choroidal neovascularization by adenovirus-mediated delivery of short hairpin RNAs targeting VEGF as a potential therapy for AMD[J].Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006,47(8):3496-3504.
[7] Seta F,Patil K,Bellner L,et al.Inhibition of VEGF expression and corneal neovascularization by siRNA targeting cytochrome P450 4B1[J] Prostaglandins Other Lipid Mediat,2007,84(3-4):116-127.
[8] Zamore PD,Tuschl T,Sharp PA,et al.RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals[J].Cell,2000,101(1):25-33.
[9] Elbashir SM,Lendeckel W,Tuschl T.RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs[J].Genes Dev,2001,15(2):188-200.
[10] Lipardi C,Wei Q,Paterson BM.RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs[J].Cell,2001,107(3):297-307.
[11] Hohjoh H.RNA interference (RNA (i)) induction with various types of synthetic oligonucleotide duplexes in cultured human cells[J]. FEBS Lett,2002,521(1-3):195-199.
[12] Miyagishi M,Taira K.U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells[J].Nat Biotechnol,2002,20(5):497-500.
[13] Sijen T,Fleenor J,Simmer F,et al.On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing[J].Cell, 2001,107(4):465-476.

(责任编辑:关蕴良)

COX-2 was decreased. *Conclusion*: The reverse effect of NS398 for the antergy of LPA on the inhibiting effect of DDP in the proliferation of 3AO cells may be completed by inhibiting the expression of COX-2 in these cells.

【Key words】Lysophosphatidic acid; Cyclooxygenase-2; Cisplatin; NS398; 3AO cells; Ovarian cancer

溶血磷脂酸(Lysophosphatidic acid,LPA)是一类具有广泛生物学效应的细胞间磷脂类信号分子,在多数卵巢癌患者的腹水和血浆中 LPA 均升高[1,2]。已有研究表明,LPA 能引起卵巢癌细胞增殖,抑制凋亡,促进细胞迁移和侵润。此外,LPA 还能增加卵巢癌细胞对化疗药物的耐药性[3,4]。而选择性 COX-2 抑制剂与多种化疗药物合用能提高疗效,故本文应用 NS398(一种高选择性 COX-2 抑制剂,对 COX-2 有较强的抑制作用),观察其对 LPA 拮抗顺铂(Cisplatin,DDP)抑制卵巢癌细胞增殖作用的影响,并探讨其可能机制,为临床治疗卵巢癌提供一定的理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

卵巢癌 3AO 细胞由重庆医科大学病理教研室提供。RPMI1640 培养基干粉(Hyclone 公司),标准新生牛血清(杭州四季青生物工程技术公司);LPA 及 NS398(BIOMOL 公司),注射用顺铂(德州德药制药有限公司);四甲基偶氮唑盐(MTT)粉剂(北京天来生物有限公司);RT-PCR 试剂盒(Promeg 公司),DNA 引物由 invitrogen 公司设计并合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 3AO 细胞常规复苏接种于 100 ml 培养瓶中,用含 10%小牛血清 RPMI-1640 培养液在 37℃、5%CO_2 条件下孵箱内培养。细胞长满瓶底的 80%后,用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化传代,取指数生长期细胞用于实验。

1.2.2 MTT 检测 细胞计数后,用培养液调整细胞浓度为 5×10^3 个 /ml,以每孔 200 μl 接种于 2 块 96 孔板,置于 37℃,5%CO_2 的培养箱中培养。24 h 贴壁后(细胞融合度约 70%,4%的台盼蓝染色,细胞活性大于 95%),弃去培养液,PBS 洗 3 次后,更换无血清培养液,根据分组进行实验干预,每组设 4 个平行孔,每孔的总液量为 200 μl。分组如下:①DDP 组:DDP 终浓度为 2.5、5 μg/ml。②LPA 组:LPA 终浓度为 20、40 μmol/L。③NS398 组:NS398 终浓度为 50、100 μmol/L。④LPA+DDP 组:LPA 及 DDP 终浓度分别同单药处理组。⑤NS398+LPA+DDP 组:NS398、LPA 及 DDP 终浓度分别同单药处理组。⑥对照组。各药物处理顺序为:先加入 NS398,2 h 后加入 LPA,待 LPA 处理 4 h 后加入 DDP。在加入 DDP 后继续培养 24 h,取出 96 孔板,弃上清,每孔加 200 μl 无血清的 RPMI1640 和 20 μl MTT(5 mg/ml),继续培养 4 h;弃上清,每孔加 200 μl DMSO 震荡 10 min 后以 490 nm 波长比色分析。实验重复 3 次。计算细胞增殖抑制率:细胞增殖抑制率 =1-(加药组平均 A 值/未加药组平均 A 值)×100%。

1.2.3 流式细胞仪检测 常规培养 3AO 细胞并传代,分组同 MTT 法。其中 DDP 选用 2.5 μg/ml(DDP 的血浆浓度峰值 ppc=2.5 μg/ml),LPA 选用 40 μmol/L,NS398 选用 100 μmol/L。用 0.1%胰酶消化细胞,调整细胞浓度为 1×10^6 个 /ml,取 1 ml 细胞悬液移入 EP 管后离心,用 PBS 洗 3 次,然后加入 1 ml 70%的冷乙醇固定细胞 24 h,4℃保存,用流式细胞仪检测。

1.2.4 RT-PCR 检测 常规培养 3AO 细胞并传代,24 h 贴壁后更换无血清培养液,PBS 洗 3 次后,更换无血清培养液,根据分组进行实验干预。分组如下:①LPA 组:LPA 终浓度为 10、20、40 μmol/L。②NS398 组:NS398 终浓度为 100 μmol/L。③NS398+LPA 组:先加入 NS398 100 μmol/L,2 h 后加入 LPA 40 μmol/L。④对照组。继续培养 12 h 后提取总 RNA,并用紫外分光光度仪检测纯度和浓度。COX-2 的序列:上游 5'-TTCAAATGAGATTGTGGGAAAAT-3',下游 5'-AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT-3'(扩增产物长度 305 bp);β-actin 序列:上游为:5'-CTCGTCATACTCCTGCTTGCTG- 3',下游引物:5'-CGGGACCTGACTGACTACCTC-3'(扩增产物长度 546 bp,作为内参照),PCR 反应条件:94℃ 30 s,56.5℃ 30 s,72℃ 30 s,共 30 个循环。RT-PCR 步骤依据 Promega 产品说明书。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳分离(电压 100 V,20 min),Gel Doc1000 凝胶成像分析系统进行半定量分析,以扩增的目的片段与内参的吸光度比值代表各目的基因 mRNA 的相对含量值,实验重复 3 次。

1.3 统计学处理

MTT 检测结果及样本的平均光密度均以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS13.0 for windows 统计软件包分析处理,多个样本均数间的比较用方差分析。检验水准 α 为 0.05,$P\leq0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTT 检测

不同浓度的 DDP 和 NS398 对 3AO 细胞的增殖都有受到不同程度的抑制,而不同浓度的 LPA 对 3AO 细胞的增殖无抑制作用。LPA+DDP 组与 DDP 相比较,其细胞增殖抑制率均有所下降,表明 LPA 对 DDP 诱导的细胞增殖抑制有拮抗作用,并且有浓度依赖效应。NS398+LPA+DDP 组与相同浓度的 LPA+DDP 组相比较,由于联合用了 NS398,其卵巢癌细胞的增殖抑制率增加,并且随 NS398 浓度增加,其增殖抑制率也增加(表 1)。

2.2 流式细胞仪检测

DDP 组和 NS398 组均使 3AO 细胞 G_0/G_1 期比率上升,而

LPA 组与对照组相比较，其 3AO 细胞 G_0/G_1 期比率下降；LPA+DPP 组与 DDP 组相比较，其 3AO 细胞 G_0/G_1 期比率下降，表明 LPA 降低了 DDP 引起的 3AO 细胞 G_0/G_1 期阻滞。NS398+LPA+DDP 组，由于联合用了 NS398 和 DDP，其 3AO 细胞 G_0/G_1 期比率明显高于 DDP 组、NS398 组和 LPA+DPP 组。表明 NS398 和 DDP 具有协同作用，能拮抗 LPA 引起的 3AO 细胞 G_0/G_1 期比率下降（表 2）。

2.3 RT-PCR 检测

琼脂糖凝胶电泳结果显示，随 LPA 浓度的增加，其电泳条带在 LPA 浓度为 40 μmol/L 较明显，表明 LPA 在体外能促进 3AO 细胞表达 COX-2。而 NS398 单独作用或与 LPA 合用均能降低 COX-2 的表达（图 1）。各组泳道 COX-2/β-actin 的光密度比值结果见表 3。

3 讨 论

LPA 是一种多功能磷脂信使，通过 G 蛋白偶联受体介导多种信号传导通路发挥其生物学效应。LPA 与卵巢癌的发生、发展密切相关。DDP 是卵巢癌患者常用的化疗药物，可与 DNA 形成链内和链间交叉连接，抑制 DNA 复制或者 DNA 转录而引起细胞死亡。有研究表明，LPA 能增加卵巢癌细胞对 DDP 的耐药性。Frankel 等[3]报道，在卵巢癌 HEY 细胞系中 LPA 可明显抑制 DDP 所致的卵巢癌细胞凋亡，从而降低 DDP 对癌细胞的凋亡；房朝辉[4]等采用无血清培养基在 SKOV3 细胞系也得出了相似的结果。本实验以卵巢癌细胞株 3AO 为研究对象，结果也证实 LPA 对 DPP 诱导的细胞增

表 1 不同处理组对细胞抑制率的影响

组别	浓度	细胞抑制率
对照组		0
DDP 组	2.5	23.3 ± 1.3*
	5	33.2 ± 2.4*
LPA 组	20	0
	40	0
NS398 组	50	8.0 ± 0.8*
	100	12.9 ± 0.7*
LPA+DDP 组	20 +2.5	4.6 ± 0.8**
	20+5	7.9 ± 0.7**
	40+2	2.9 ± 0.2**
	40+5	4.5 ± 0.8**
NS398+LPA+DDP 组	50+20+2.5	21.8 ± 0.9***
	100+20+2.5	25.1 ± 1.5***
	50+20+5	31.4 ± 1.5***
	100+20+5	37.4 ± 3.3***
	50+40+2.5	17.2 ± 1.1***
	100+40+2.5	22.8 ± 1.0***
	50+40+5	29.2 ± 1.3***
	100+40+5	32.6 ± 2.5***

注：LPA 浓度单位为 μmol/L，DDP 为 μg/ml，NS398 为 μmol/L，* $P<0.05$，与对照组相比较；** $P<0.05$，与相同浓度 DDP 组相比较；*** $P<0.05$，与相同浓度 LPA+DDP 组相比较

表 2 不同处理组对细胞周期的影响

组别	细胞周期（%）		
	G_0/G_1	S	G_2/M
对照组	60.9	25.4	13.7
DDP 组	74.5	18.6	6.9
LPA 组	50.4	29.8	19.8
NS398 组	67.2	22.7	10.1
LPA+DDP 组	58.8	30.9	10.3
NS398+LPA+DDP 组	82.3	12.8	4.9

表 3 LPA 和 NS398 单独或合用对 3AO 细胞 COX-2 表达变化的光密度比值的统计分析

分组	光密度比值
对照组	0.12 ± 0.06
LPA10 μmol/L	0.14 ± 0.08
LPA20 μmol/L	0.19 ± 0.09
LPA40 μmol/L	0.56 ± 0.12*
NS398 组	0.08 ± 0.03
NS398+LPA 组	0.12 ± 0.07**

* $P<0.05$，与对照组比较；** $P<0.05$，与 LPA40 μmol/L 组比较



M. DNA Marker；1. 对照组；2. LPA 10 μmol/L 组；3. LPA 20 μmol/L 组；4. LPA 40 μmol/L 组；5. NS398 100 μmol/L 组；6. NS398 100 μmol/L + LPA 40 μmol/L 组

图 1 RT-PCR 检测 LPA 和 NS398 单独或合用对 3AO 细胞 COX-2 表达的变化

殖抑制有拮抗作用，并且降低了 DDP 引起的 G_0/G_1 期阻滞。这可能是因为 LPA 提高 Cyclin D1 的水平[5]，从而缩短细胞 G_1 期，更快进入 S 期，而准备细胞分裂。因而对抗了 DDP 在 G_0/G_1 期对细胞的作用，促进细胞的增殖与存活。

已有研究表明，COX-2 抑制剂具有抑制肿瘤细胞生长、促进凋亡的作用，并且与化疗药物合用具有协同作用，但也有与之相矛盾的结果。如 NS398 和 DDP 可协同抑制卵巢癌的增殖[6]，然而 Munkarah 等[7]报道 NS398 抑制了紫杉醇所诱导的卵巢癌细胞凋亡，这可能是不同化疗药物作用机制不同，使用 NS398 后，其结果也不同。本研究结果表明，COX-2 抑制剂 NS398 可以逆转 LPA 对 DDP 诱导卵巢癌细胞增殖抑制的拮抗作用，并且随着 NS398 浓度增加，其抑制率也增加。流式细胞仪检测也表明，在 NS398+LPA+DDP 组中，由于联合用了 NS398 后，能使细胞 G_0/G_1 期比率上升。NS398 抑制肿瘤细胞增殖，Chen 等[8]认为可能机制是 NS398 能上调P21cip1/waf1 和 P27kip1 表达，干扰 CDK 功能而阻止细胞进入 S 期，从而阻断了肿瘤细胞的异常增殖。对于 NS398 抑制肿瘤细胞增殖的机制有待深入研究。

近来研究表明，LPA 的促进肿瘤细胞产生及发展中的作用至少部分是通过其下游媒介 COX-2 实现的，如 LPA 可通过 COX-2 介导 MMP-2 蛋白前体的表达和活化[9]；上调细胞表面 FasL 的表达，诱导激活的淋巴细胞凋亡，有利于癌细胞的免疫逃逸[10]；上调 VEGF-C 的表达[11]。我们采用 RT-PCR 检测，结果显示在 LPA 的浓度为 40 μmol/L 时，可明显促进 3AO 细胞 COX-2 的表达；而 NS398 单独作用或与 LPA 合用均能降低 COX-2 的表达。有研究表明，高表达 COX-2 的肿瘤细胞对化疗药物有不同程度的抵抗[12,13]。因此，我们认为 NS398 可能通过抑制肿瘤细胞 COX-2 的表达，实现逆转 LPA 拮抗 DDP 诱导卵巢癌细胞增殖抑制的作用，其原因可能是由于 COX-2 作为下游媒介在 LPA 发挥上述拮抗效应中起了重要作用。

综合上述，我们认为 LPA 可能通过上调 COX-2 的表达拮抗 DDP 诱导卵巢癌细胞细胞增殖抑制的作用，而 COX-2 抑制剂 NS398 可对抗这种拮抗作用。本研究为 COX-2 抑制剂在卵巢癌患者中的临床应用提供了一定的理论和实验依据。

参 考 文 献

[1] Xu Y, Gaudette D C, Boynton J D, et al. Characterization of an ovarian cancer activating factor in ascites from ovarian cancer patients[J]. Clin Cancer Res, 1995, 1(10): 1223-1232.

[2] Xu Y, Shen Z, Wiper D W, et al. Lysophosphatidic acid as a potential biomarker for ovarian and other gynecologic cancers[J]. JAMA, 1998, 280(8): 719-723.

[3] Frankel A, Mills G B. Peptide and lipid growth factors decrease cis-diamminedichloroplatinum-induced cell death in human ovarian cancer[J]. Ciin Cancer Res, 1996, 2(8): 1307-1313.

[4] 房朝辉，吴小华，刘 红，等. 溶血磷脂酸对顺铂诱导卵巢癌细胞凋亡的影响[J]. 中国老年学杂志，2006，26(12)：1697-1699.

[5] Hu Y L, Albanese C, Pestell G, et al. Dual mechanisms for lysophosphatidic acid stimulation of human ovarian carcinoma cells[J]. J Natl Cancer Inst, 2003, 95(10): 733-740.

[6] Barnes A P, Miller B E, Kucera G L. Cyclooxygenase inhibition and hyperthermia for the potentiation of the cytotoxic response in ovarian cancer cells [J]. Gynecol Oncol, 2007, 104(2): 443-450.

[7] Munkarah A R, Genhai Z, Morris R, et al. Inhibition of paclitaxel-induced apoptosis by the specific COX-2 inhibitor, NS398, in epithelial ovarian cancer cells[J]. Gynecol Oncol, 2003, 88(3): 429-433.

[8] Chen X J, Xiao W, Qu X, et al. NS-398 enhances the efficacy of gemcitabine against lung adenocarcinoma through up-regulation of p21 WAF1 and p27KIP1 protein[J]. Neoplasma, 2008, 55(3): 200-204.

[9] Symowicz J, Adley B P, Woo M M. et al. Cyclooxygenase-2 functions as a downstream mediator of lysophosphatidic acid to promote aggressive behavior in ovarian carcinoma cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(6): 2234-2242.

[10] Kang S, Luo R, Smicun Y, et al. Selective induction of cyclooxygenase-2 plays a role in lysophosphatidic acid regulated Fas ligand cell surface presentation[J]. FEBS Lett, 2006, 580(2): 443-449.

[11] Lin C I, Chen C N, Huang M T, et al. Lysophosphatidic acid upregulates vascular endothelial growth factor-C and tube formation in human endothelial cells through LPA (1/3), COX-2, and NF-kappaB activation and EGFR transactivation-dependent mechanisms[J]. Cell Signal, 2008, 20(10): 1804-1814.

[12] Raspollni M R, Amunni G, Villanucci A, et al. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) and P-glycoprotcin-170 (MDR1) expression is associatedwith chemotherapy resistance and poor prognosis. Analysis in ovariancarcinoma patients with low and high survival[J]. Int J Gynecol Cancer, 2005, 15(2): 255-260.

[13] Ferrandina, Lauriola L, Zannoni G, et al. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) expression is associated with chemotherapy resistance and outcome in ovarian cancer patients[J]. Ann Oncol, 2002, 13(8): 1205-1211.

（责任编辑：冉明会）