基础研究 文章编号:0253-3626(2009)11-1524-03

环氧合酶-2抑制剂美洛昔康对人膀胱癌T24细胞体内外生长的影响

张荣贵,张唯力,徐光勇
（重庆医科大学附属第二医院泌尿外科,重庆 400010）

【摘 要】目的:探讨选择性环氧合酶-2(Cyclooxygenase-2,COX-2)抑制剂美洛昔康对膀胱癌T24细胞生长的体内外抑制作用。方法:RT-PCR检测人膀胱癌T24细胞株COX-2 mRNA表达,应用四唑氮蓝还原法研究选择性COX-2抑制剂美洛昔康对膀胱癌细胞T24生长的体外抑制作用。观察美洛昔康对裸鼠T24细胞移植瘤生长的体内抑制作用。结果:膀胱癌细胞株T24中检测出了COX-2的表达,美洛昔康体外抑制膀胱癌细胞株T24的增殖呈剂量依赖性,体内抑瘤率达61.2%。各组裸鼠的体内实验中未见明显不良反应。结论:选择性COX-2抑制剂在体内外对膀胱癌T24细胞生长均具有显著的抑制作用,提示其可用于膀胱癌的防治。

【关键词】美洛昔康;膀胱癌;体内;体外
【中图图书分类法分类号】R730.53 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-04-22

Influence of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on growth of human bladder carcinoma

ZHANG Rong-gui, et al
(*Department of Urology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of selective COX-2 inhibitor on proliferation of bladder carcinoma in vivo and in vitro. *Methods*: RT-PCR studied the expression of COX-2 in T24 cell. The inhibitory effects of Meloxicam on the growth of T24 cells were studied in vitro by MTT method. Meanwhile, the inhibitory rate of tumor growth in xenografted bladder carcinoma of T24 cells in nude mice treated by Meloxicam was determined. *Results*: RT-PCR showed that the expression of COX-2 mRNA was strong in T24 bladder carcinoma cell. MTT study showed that Meloxicam produced a dose-dependent inhibition of T24 proliferation. The rate of tumor growth inhibition by Meloxicam in T24 cell burden mice was 61.2%. No side effect was observed in all the treatment groups. *Conclusion*: Selective COX-2 inhibitor can significantly inhibit bladder carcinoma of T24 cells in vivo and in vitro and may be useful for prevention and therapy of bladder carcinoma.

【Key words】Meloxicam; Bladder carcinoma; In vivo; In vitro

越来越多的证据表明环氧合酶-2的表达除与已知的炎症反应有关外,它在肿瘤发生中可能起重要作用，抑制肿瘤中COX-2的表达则具有抗肿瘤效应。本实验的目的在于观察选择性COX-2抑制剂美洛昔康对人膀胱癌T24细胞株及体内实体瘤的治疗作用,以探讨其是否对膀胱癌也具有防治作用。

1 材料与方法

1.1 材料

RT-PCR试剂盒、TrizoI试剂、RPMI1640培养基和小牛血清均为Gibco公司产品。选择性COX-2抑制剂美洛昔康为Boehringer Ingelheim公司产品。人膀胱癌T24细胞株来自新桥医院泌尿外科。

1.2 细胞培养

T24细胞株采用RPMI1640细胞培养基常规培养于温箱中。待其贴壁生长至70%~80%融合时,用0.05%胰酶消化传代培养。

1.3 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)研究COX-2 mRNA表达

提取细胞株总RNA。取5μg RNA逆转录合成cDNA链。

作者介绍:张荣贵(1976-),男,副教授,博士后,研究方向:泌尿系统肿瘤基因治疗。
通讯作者:徐光勇,男,副教授,E-mail:xgy1128@163.com。
基金项目:重庆医科大学校办课题(编号200519)。

取 2μl cDNA 作为模板，加入 COX-2 引物：5'-TGAAACCC ACTCCAAACACAG-3'，5'-TCACAGGCACAGGAGGAA-3'，经过变性后进入循环。扩增片段为 232 bp。取 10 μl 扩增产物用 1.7%的琼脂糖凝胶电泳。

1.4 四唑氮蓝还原法(MTT)检测膀胱癌细胞增殖

将消化好的 T24 细胞按 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板，孵育 24 h 待细胞贴壁后加药。选择性 COX-2 抑制剂美洛昔康设 0 mol/L(对照组)、1×10^{-4} mol/L、1×10^{-5} mol/L、1×10^{-6} mol/L、1×10^{-7} mol/L；每组重复 6 孔，设空白对照用于调零。继续培养72 h。于 24、48、72 h 各孔加 MTT100 μg，孵育 4 h 后弃上清，加 120 μl 二甲亚砜，振荡后用酶标仪测 A492 值，求其平均值，对照组细胞存活率记为 100%。实验组细胞存活率 = (实验组 OD 值/对照组 OD 值) × 100%。

1.5 裸鼠移植瘤建立及药物干预实验

质量 18～22g，4～6 周龄 BALB/C-nu/nu 裸鼠12 只，均为雌性，实验前观察 1 周，若裸鼠生长正常(死亡率不超过10%)，于裸鼠背部皮下注射 T24 人膀胱癌细胞 1×10^7 个，1 周后，待移植瘤肉眼可见，接种部位肿瘤结节约 5 mm。随机分为 2 组：对照组和美洛昔康处理组(治疗组)。治疗组予以蒸馏水配制的 15 mg/(kg·d)的美洛昔康液饮用，对照组则只给予正常蒸馏水。定期观察小鼠精神、饮食及排便情况。1 月后结束实验，取下肿瘤组织，测量其长度、宽度和高度，求出肿瘤体积，并计算抑瘤率：[1-(治疗组开始平均体积 - 治疗组结束平均体积) ÷ (对照组开始平均体积 - 对照组结束平均体积)] × 100%。解剖动物观察各脏器变化。

1.6 统计学检验

采用四格表精确 χ^2 检验和 t 检验，$P\leq0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 RT-PCR 检测人膀胱癌 T24 细胞株 COX-2 mRNA 表达

RT-PCR 结果显示人膀胱癌 T24 细胞株可检测出 COX-2 mRNA 的表达，长度为 232 bp(见图 1)。



M. DNA Marker; 1.COX-2 mRNA

图 1 RT-PCR 检测 T24 细胞 COX-2 mRNA 表达

2.2 MTT 检测人膀胱癌 T24 细胞生长的影响

不同浓度美洛昔康加入培养基后的第 24、48、72 h，用 MTT 法测定细胞生长，如图所示：美洛昔康呈时间、剂量依赖性抑制人膀胱癌 T24 细胞株生长。72 h 其细胞存活率最高为 75.4%，最低为 21.3%(见图 2)。

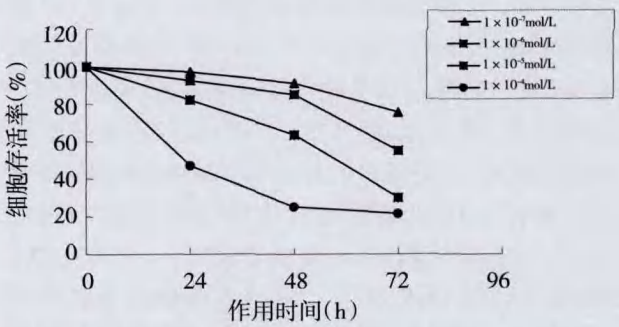


图 2 不同浓度美洛昔康在不同作用时间时对细胞生长的影响

2.3 美洛昔康对裸鼠人膀胱癌 T24 细胞株移植瘤生长的影响

2 组裸鼠均有膀胱癌移植瘤生长，瘤体呈椭圆形或圆形，表面有结节，经组织学检查证实均为膀胱癌(见图 3)。至实验观察结束，两组鼠均存活，无死亡。实验组肿瘤的体积明显小于对照组，两组肿瘤在开始一段时间内，生长比较迅速，随着用药时间的增加，美洛昔康对肿瘤生长的抑制作用增加，此后，生长速度逐渐减慢。实验结束时抑瘤率为 61.2%。与对照组比较，美洛昔康对膀胱癌移植瘤细胞分化无明显影响，在大小接近的瘤结节内，美洛昔康增加了鼠移植瘤中央区坏死面积。肿瘤组织取出后，无论是体积(0.417 相对 0.205 cm^3，$P<0.05$)还是肿瘤质量(0.501 相对 0.212 g，$P<0.05$)，两组间均存在显著差异。

2.4 不良反应观察

两组动物存活率 100%，饮食与活动均正常，未发现出血征象，实验结束时，解剖各鼠均未见有消



图 3 裸鼠膀胱癌 T24 细胞移植瘤组织切片(HE×400)

化道出血及溃疡.肝、肾、心、脑、肺等未见明显异常及差异。未发现有肿瘤转移。

3 讨 论

膀胱癌是泌尿系统中最常见的肿瘤,其发生率逐年增加。膀胱癌的发病难以预测,且易复发。目前尽管有放疗、化疗、免疫治疗和手术治疗等各种措施,但没有那种办法从根本上治疗膀胱癌。近来,Komhof 等[1]研究发现 38%(17/47)的病理高分级移行细胞癌 COX-2 蛋白表达阳性,Shbahama 等[2]研究发现 31%(34/108)癌组织中 COX-2 高表达,COX-2 表达与局部浸润相关,与浸润方式无关。El-Sheikh 等[3]研究发现 COX-2 表达与膀胱癌病理分级密切相关。Kim 等[4]通过对 37 例 TlG3 膀胱移行细胞癌患者进行 27 个月随访发现,COX-2 表达与肿瘤复发和进展相关,可为膀胱癌预后和治疗提供参考。

环氧合酶是前列腺素合成的一种重要限速酶,花生四烯酸是其合成前列腺素 E 的前体。COX 是膜结合蛋白,存在于核膜和微粒体膜,已知 COX 至少有两种亚型:COX-1 和 COX-2,前者是一种持家基因,在正常组织中常表达,有维持机体正常功能的作用;COX-2 则是一种重要的癌基因,它是一种细胞因子诱导的酶,在正常组织中无表达,在诱导条件,如炎症、肿瘤等病理条件下高表达,并与前列腺素的上调有关,可通过刺激细胞生长、抑制细胞凋亡、刺激新生血管形成、促进肿瘤侵袭和转移以及免疫抑制等机制参与肿瘤的发生发展。实验表明用非选择性 COX 抑制剂 NSAIDs 或选择性 COX-2 抑制剂均可降低啮齿动物化学致癌模型中 TCC 的发生率,表明 COX-2 可促进 TCC 的发生[5-7]。体外研究显示 COX-2 过表达会促进上皮性癌细胞株的生长,其机制主要是抑制细胞凋亡,促进细胞粘附和促进血管生成,而表达 COX-2 的裸鼠移植瘤的生长可被 COX-2 抑制剂明显抑制[6]。Hattori 等[8]的研究发现 Meloxicam 可抑制膀胱癌的生长,且高剂量组作用明显优于低剂量组。在我们的研究中,通过 RT-PCR 检测出了 COX-2 在 T24 细胞中的表达,采用 MTT 法显示选择性 COX-2 抑制剂 Meloxicam 可抑制 T24 细胞增殖,抑制作用呈时间、剂量依赖性方式,作用 72 h 后其细胞存活率最低仅为 21.3%。体内实验证明,实验组肿瘤的体积明显小于对照组,两组肿瘤在开始一段时间内,生长比较迅速,随着用药时间的增加,生长速度逐渐减慢,实验结束时抑瘤率为 61.2%。通过实验证实了 COX-2 抑制剂对膀胱癌 T24 细胞的治疗作用,从而为进一步研究 COX-2 抑制剂在膀胱癌治疗中的作用及其发生机制奠定了基础,并为提高治疗效果和改善预后创造了条件。

参 考 文 献

[1] Komhoff M,Guan Y, Shappell H W,et al. Enhanced expression of cyclooxygenase-2 in high grade human transitional cell bladder carcinoma [J]. Am J Pathol,2000,157(1):29-35.

[2] Shirahama T, Arima J, Akiba S, et al. Relation between cyclooxygenase-2 expression and tumor invasiveness and patient survival in transition cell carcinoma of the urinary bladder cancer[J]. Cancer,2001,92(2):188-193.

[3] El-Sheikh S S,Madaan S,Alhasso A,et al. Cyclooxygenase-2:a possible target in schistosoma associated bladder cancer[J]. BJU Int,2001,88(9):921-927.

[4] Kim S I,Kwon S M,Kim Y S,et al. Association of cyclooxygenase-2 expression with prognosis of stage TI grade 3 bladder cancer[J].Urology,2002,60(90):816-821.

[5] Pruthi R S,Derksen E,Gaston K, et al. Rationale for use of cyclooxygenase-2 inhibitors in prevention and treatment of bladder cancer [J].Urology,2004,64(4):637-642.

[6] Mizutani Y,Nakanishi H,Li Y N,et al. Enhanced sensitivity of bladder cancer cells to cisplatin mediated cytotoxicity and apoptosis in vitro and in vivo by the selective cyclooxygenase-2 inhibitor JTE-522[J]. J Urol,2004,172(4 Pt 1):1474-1479.

[7] Pruthi R S,Derksen E,Gaston K.Cyclooxygenase-2 as a potential target in the prevention and treatment of genitourinary tumors:a review[J].J Urol,2003,169(6):2352-2359.

[8] Hattori K,Iida K,Joraku A,et al. Chemopreventive effects of cyclooxygenase-2 inhibitor and epidermal growth factor-receptor kinase inhibitor on rat urinary bladder carcinogenesis[J]. BJU Int,2006,97(3):640-643.

(责任编辑:冉明会)