DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.11.006

论著

文章编号:1000-5404(2003)11-0948-04

环氧合酶-2及其特异性抑制剂NS-398对膀胱癌细胞体外生长与侵袭能力的影响

李国平[1],杨 恬[1],李晋涛[2],余 瑾[1],严 军[1] (第三军医大学基础医学部:[1]细胞生物学教研室,[2]全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究环氧合酶-2(Cyclooxygenase-2, COX-2)及其特异性抑制剂NS-398在膀胱癌细胞生长和侵袭转移中的作用。方法 利用转基因技术将COX-2 cDNA基因导入低表达COX-2的膀胱癌细胞株EJ,获得高表达COX-2的永久转染细胞EJ-COX_2。观察转染前后细胞生长速度的变化;在NS-398作用下,Boyden小室检测细胞的侵袭能力的改变,用RT-PCR和Western blotting检测uPA的表达变化。结果 转染COX-2的EJ-COX_2细胞体外增殖能力增强;穿过人工基底膜的体外侵袭能力增强;尿激酶型纤溶酶原激活因子(Urokinase plasminogen activator, uPA)的表达上升;NS-398能呈剂量依赖地抑制COX-2、uPA的表达和EJ-COX_2细胞的侵袭能力。结论 COX-2能促进膀胱癌细胞生长,并通过促进uPA的表达从而促进其侵袭转移的能力,NS-398能呈剂量依赖地抑制COX-2、uPA的表达和EJ-COX_2细胞的侵袭能力。

关键词:环氧合酶-2;膀胱癌细胞株EJ;侵袭;uPA;NS-398
中图法分类号:Q554.1;R730.23;R737.14 文献标识码:A

Effects of cyclooxygenase-2 and its specific inhibitor NS-398 on the growth and invasion ability of urothelial carcinoma cell line EJ

LI Guo-ping, YANG Tian, LI Jin-Tao, YU Jin, YAN Jun (Department of Cell Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the function of cyclooxygenase-2(COX-2) and its specific inhibitor NS-398 on the cell growth and invasion ability of urothelial carcinoma cell line EJ. Methods The cox-2 cDNA was transfected into the urothelial carcinoma cell line EJ and a cell line EJ-COX_2 which highly expressed cox-2 gene permanently was gained. The cell growth rate before and after transfection was observed. Then at various concentrations of NS-398, the invasion ability was detected by Boyden Chamber and expression levels of uPA by RT-PCR and Western blot. Results The EJ-COX_2 cell line grew more rapidly and had a stronger invasion ability than EJ and its uPA expression increased significantly. NS-398 could dose-dependently inhibit the expressions of COX-2 and uPA and the invasiveness of EJ-COX-2 cell. Conclusion COX-2 can stimulate the growth of urothelial cell line EJ and promote its invasion ability by stimulating the expression of uPA.

Key words: cyclooxygenase-2; urothelial carcinoma cell line EJ; carcinoma; invasion; uPA; NS-398

环氧合酶(Cyclooxygenase, COX)是花生四烯酸转化成前列腺素(Prostaglandins, PGs)的限速酶,它有两种同工酶,环氧合酶-1(COX-1)和环氧合酶-2(COX-2)。COX-1呈组成性表达,由管家基因编码,它与正常细胞的PGs合成有关,主要功能是保护胃肠道和调节肾血流量。COX-2为诱导酶,多数正常细胞中不存在COX-2,但可被一些炎症细胞因子、肿瘤促进因子、生长因子和癌基因迅速诱导,形成的过量PGs导致疼痛、发热和红肿等[1]。已经发现COX-2基因在一些增殖性疾病如风湿性关节炎和结肠癌中过表达[1,2]。

近年来在肿瘤学上的一大进展是发现许多环氧合酶抑制剂(主要是非甾体抗炎药NSAIDs)能抑制一些癌症发生。报道最多的是结肠癌,另外陆续有COX-2表达于乳腺癌、头颈癌、胰腺癌、胃癌、前列腺癌和膀胱移行细胞癌等的报道。但对COX-2促进肿瘤发生的确切机制目前仍不清楚。为进一步理解COX-2对肿瘤发生发展的作用,本研究将COX-2 cDNA转染膀胱癌细胞株EJ后,观察转染前后及COX-2特异性抑制剂NS-398作用下细胞COX-2的表达、uPA的表达及生长能力和侵袭能力等的改变,以进一步阐明COX-2促进肿瘤发生的机制。

作者简介:李国平(1970-),女,四川省泸州市人,博士研究生,讲师,主要从事膀胱上皮生物学方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68752259

收稿日期:2002-06-28;修回日期:2003-01-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　材料和方法

1.1　材料和主要试剂

膀胱癌细胞株 EJ 由北京大学泌尿外科研究所提供, pBOSNeo 空质粒和 pBOSNeoCOX-2 质粒由日本 Kanazawa 大学药理系 Tanihiro Yoshimoto 教授馈赠, 质粒结构见图 1, 质粒抽提试剂盒(Roche 公司), Lipofectamine 2000 转染试剂(Gibco 公司), Trizol(Sangon 公司), 一步法 RT-PCR 试剂盒(TakaRa 公司), MTT(Sigma 公司), Matrigel 体外基质膜凝胶(北京大学), Transwell 细胞培养滤膜(Corning Costar 公司), COX-2 和 uPA 特异引物由上海 Sangon 公司合成, M-PER™蛋白裂解液为 Pierce Chemico. Co. 公司产品, COX-2 抗体购自 Santa Cruz, uPA 抗体购自 Boster 公司。

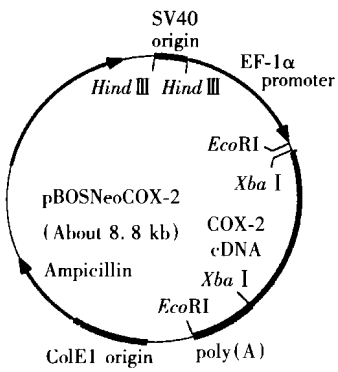
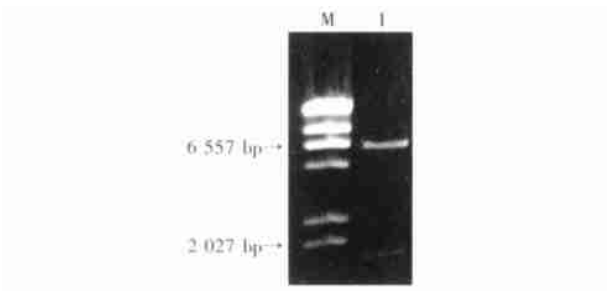


图 1　COX-2 质粒结构图

Fig 1　Construction of expression plasmid pBOSNeoCOX-2

1.2　质粒的提取、纯化与鉴定及细胞转化

参照文献[3]方法进行, 酶切鉴定结果见图 2。



M: λDNA/*Hind* Ⅲ marker; 1: Plasmid segments digested by *Eco* RI

图 2　质粒酶切鉴定

Fig 2　Enzyme digestive segments by *Eco*R Ⅰ

1.3　细胞培养

膀胱癌细胞株 EJ 在含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基中, 37 ℃, 5%CO_2 培养, 隔日传代, 绘制生长曲线, 细胞处于对数生长期时进行实验。

1.4　COX-2 基因转染及筛选

按 Lipofectamine 2000 说明书进行转染。pBOSNeo 空质粒和 pBOSNeoCOX-2 质粒 DNA 及与 Lipofectamine 2000 混匀后, 加入对数生长期的 EJ 细胞(96 孔板中), 常规培养 48 h 后, 换为含 G418 800 μg/ml 的培养基, 筛选 14 d 后, RT-PCR 和 Western blot 进行转染鉴定, 选其中 COX-2 表达量最高的一株转染细胞命名为 EJ-COX_2, 并与空质粒转染的细胞及 EJ 细胞一起进行后面的实验。

1.5　细胞生长情况观察

将细胞分别以 1×10^4 个/ml 接种于 24 孔板中, 每孔 800 μl, 每组 3 个重复, 每天用台盼蓝染色后于显微镜下计数活细胞数, 做出生长曲线。另外也用 MTT 法检测细胞增殖情况, 即在 96 孔板中以 5×10^3 个/孔接种细胞, 分别于接种后 2、4、6 d 吸出培养液, 加入 5 mg/ml 的氮蓝四唑盐(MTT)20 μl/孔, 继续培养 4 h, 吸出 MTT, 加入二甲亚砜 150 μl/孔, 振荡 10 min, 用酶联免疫检测仪在 490 nm 测定光吸收值 A_{490}。

1.6　侵袭实验

用 1 mg/ml 基质胶铺于 8 μm 孔径的 Transwell 微孔滤膜上, 下室加入 200 μl 趋化剂(无血清培养 24 h 的 NIH3T3 细胞条件培养基), 将 1×10^5 个/ml 的肿瘤细胞悬液以 1 ml/室加入上室, 培养 4 h, 取出滤膜, 甲醛固定 5 min, HE 染色, 200 倍光镜下计数膜背面侵袭的细胞数, 计数中间和四周 5 个视野, 计算平均值, 每组 3 次重复。

1.7　COX-2 和 uPA mRNA 表达的检测

Trizol 提取细胞总 RNA, 一步法 RT-PCR 检测 COX-2 和 uPA mRNA 的表达。50 μl 反应体系中含: 5 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L dNTP, 0.1 U/μl AMV RTase XL, 0.1 U/μl AMV-Taq, 1 μg 上游引物, 1 μg 下游引物, 1 μg 总 RNA 50 ℃下逆转录 30 min, 94 ℃变性 2 min, 随后进行 30 次 PCR, 程序为 94 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min。COX-2 引物为上游: 5′- TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA AT- 3′; 下游: 5′-AGA TCA TCT GCC TGA GAT ATC TT-3′; 产物大小为 305 bp。uPA 引物为上游: 5′-TTCTCTGCGTCCTG-GTCGTGA-3′; 下游: 5′-CTCCGGTTGTCTGGGTTCCTG-3′, 产物大小为 425 bp。

1.8　COX-2 和 uPA 蛋白表达的检测

用 M-PER™蛋白裂解液(临用前加入 0.5 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L PMSF 和 10 μg/ml Aprotinin)裂解细胞。对将进行 uPA 检测的裂解液裂解液于 4 ℃, 12 000× *g* 离心 15 min, 而进行 COX-2 蛋白检测的裂解液于 4 ℃, 1 500× *g* 离心 15 min。转移上清至一新的 EP 管, 蛋白定量后按常规方法进行 SDS-PAGE 电泳, 进而将分离开的蛋白质转印至硝酸纤维素膜上, 封闭液封闭过夜。分别用 COX-2 和 uPA 的一抗孵育过夜, TBS 充分漂洗后加入对应二抗, 37 ℃孵育 1 h。SP 法显色。

1.9　统计学方法

采用 *t* 检验。

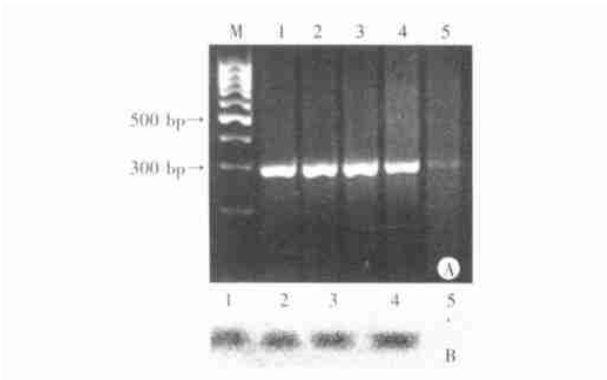
2　结果

2.1　转染鉴定

G418 筛选 1 周, EJ 细胞死亡, 转染细胞呈集落存活, 其中 COX-2 转染组共得到 4 个单克隆集落。RT-PCR 及 Western blotting 结果, 4 个单克隆转染细胞均扩增出 305 bp 的 COX-2 基因片段, 说明转染成功, 见图 3。选择其中 COX-2 表达最高的一

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

株，命名为 EJ-COX_2，继续后面的实验。PBOSNeo 空质粒转染的对照组得到的细胞集落未扩增出 COX-2 基因片段。



M: 100 bp DNA ladder of λDNA/*Hind* Ⅲ; 1～4: COX-2 Transfected cell lines 1～4; 5: Mock-transfected EJ

图 3 转染 COX-2 质粒的细胞鉴定

Fig 3 Identification of cells expressing COX-2 by RT-PCR(A) and Western blotting(B)

2.2 细胞生长能力

转染 COX-2 的细胞 EJ-COX_2 比 EJ 细胞和空质粒对照组细胞的增殖率明显上升，见图 4。对照组(空质粒转染)细胞与 EJ 细胞相比生长速度没有什么变化，表明转染事件本身对细胞的生长速度没有影响。COX-2 特异性抑制剂 NS-398 呈剂量依依赖地抑制转染细胞株 EJ-COX_2 的生长。

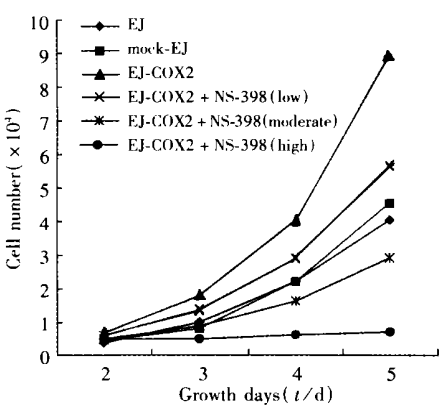


图 4 COX-2 及 NS-398 对肿瘤细胞生长的影响

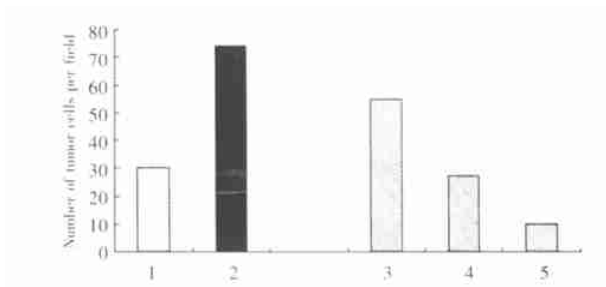
Fig 4 Effect of COX-2 and various concentrations of NS-398 on the tumor cell growth

2.3 细胞侵袭能力

肿瘤细胞粘附于基底膜后，消化降解基底膜并在驱化剂的诱导下穿过基底膜，最后附着在滤膜另一面，EJ-COX_2 细胞穿过滤膜数为(43.6±3.1)，EJ 细胞穿过滤膜数为(29.4±2.1)，两者比较 $P<0.01$。空质粒转染细胞穿过滤膜数为(27.8±2.6)，与 EJ 细胞比较，差异不显著($P>0.05$)。NS-398 能呈剂量依赖地抑制 EJ-COX_2 细胞的侵袭能力，见图 5，这些结果表明 COX-2 能促进细胞的运动和细胞对基底膜的降解，抑制 COX-2 酶的活性能抑制肿瘤细胞的侵袭能力。转染事件本身对细胞运动性和侵袭能力无明显影响。

2.4 uPA 的表达与 COX-2 的表达及侵袭能力的关系

uPA 在 EJ 细胞中有少量表达，在超表达 COX-2 的 EJ-COX2 细胞中表达增加了 4 倍(光密度对比)，选择性 COX-2 抑制剂 NS-398 能呈剂量依赖地抑制 COX-2、uPA 的表达和 EJ-COX_2 细胞的侵袭能力，见图 5。



1: Mock-EJ; 2: EJ-COX_2; 3: 2μmol/L NS-398; 4: 5μmol/L NS-398; 5: 10μmol/L NS-398; Influence of selective COX-2 inhibitor NS-398 on the tumor cell number migrated through the Matrigel layer to the lower surface of the filter

图 5 EJ-COX_2 细胞 uPA 的表达和侵袭能力与 COX-2 表达的

Fig 5 The correlation between uPA expression, invasive ability and COX-2 expression in EJ-COX_2

3 讨论

大量证据显示 COX-2 与肿瘤发生有关。这些证据主要集中在 3 个方面：①流行病学调查；②整体动物药理实验；③体外药理学实验。大量流行病学资料显示长期服用非甾体抗炎药的病人其结直肠癌及腺性息肉发生率明显降低。另外，无论是选择性 COX-2 抑制剂还是非选择性 COX 抑制剂，都能抑制体外肿瘤细胞生长和裸鼠体内肿瘤形成[4～6]。

对 COX-2 的促肿瘤作用机制研究，在抑制肿瘤细胞凋亡促进肿瘤细胞增殖方面研究较多[4,7]。文献[8～10]曾报道 COX-2 在临床病理标本中的表达与肿瘤侵袭和转移呈正相关，在我们以前的研究中也发现 COX-2 主要表达于侵袭性膀胱移行细胞癌[11]。但对于 COX-2 在肿瘤侵袭中的确切作用及机制知之甚少。

肿瘤侵袭和转移是恶性肿瘤形成的一个重要环节。在肿瘤侵袭过程中，肿瘤细胞需迁移通过局部组织的限制，扩散到其他组织和器官，这就需要对细胞外基质进行降解。细胞外基质的降解需要多种胞外蛋白水解酶的参与，其中重要的包括纤溶酶原激活因子 uPA[12]。uPA 能促进细胞外基质的降解，从而促进肿

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

瘤细胞迁移和侵袭转移。

本研究的目的，正是为了阐明人侵袭性膀胱移行细胞癌细胞株 EJ 过表达 COX-2 时其体外生长能力和侵袭能力的改变。过表达 COX-2 的 EJ-COX_2 细胞株与空质粒转染组对比，其生长能力显著增强，侵袭能力明显增加。与侵袭能力增强相关的生化改变是 uPA 表达显著上升。侵袭能力的增强及 uPA 表达的增加可被选择性 COX-2 抑制剂 NS-398 呈剂量依赖地逆转，与 COX-2 表达的变化一致。这表明 COX-2 通过促进 uPA 的表达，后者加速对细胞外基质的降解，从而增加肿瘤细胞的侵袭潜能。

参考文献：

[1] Ohno R, Yoshinaga K, Fujita T, *et al*. Depth of invasion parallels increased cycloxygenase-2 levels in patients with gastric carcinoma[J]. Cancer, 2001, 91(10): 1876—1881.

[2] Takahiro M, Yoshitaka T, Toshiki S, *et al*. Growth stimulation and induction of epidermal growth factor receptor by overexpression of cyclooxygenases 1 and 2 in human colon carcinoma cells[J]. Biochim Biophy Acta, 1999, 1438(1): 120—130.

[3] 吴乃虎. 基因工程原理[M]. 北京：科学出版社，2000. 156—189.

[4] Barnes C J, Cameron I L, Hardman W E, *et al*. Non-steroidal anti-inflammatory drug effect on crypt cell proliferation and apoptosis during initiation of rat colon carcinogenesis[J]. Br J Cancer, 1998, 77(3): 573—580.

[5] Reddy B S, Rao C U, Seibert K. Evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitors for potential chemopreventive properties in colon carcinogenesis[J]. Cancer Res, 1996, 56(20): 4566—4569.

[6] Giardiello F M, Offerhans G J, DuBois R N. The role of non-steroidal anti-inflammatory drugs in colorectal cancer prevention[J]. Eur J Cancer, 1995, 31A(6): 1071—1076.

[7] Sawaoka H, Kawano S, Tsuji S, *et al*. Cyclooxygenase-2 inhibitors suppress the growth of gastric cancer xenografts *via* induction of apoptosis in nude mice[J]. Am J Physiol, 1998, 274(6): G1061—1067.

[8] Ryo O, Keigo Y, Takeshi F, *et al*. Depth of invasion parallels increased cyclooxygenase-2 levels in patients with gastric carcinoma[J]. Cancer, 2001, 91(4): 1876—1881.

[9] Namita K, Qingyuan Y, Russell D, *et al*. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and activity in a murine model of metastatic breast cancer[J]. Int J Cancer, 2001, 93(3): 681—686.

[10] Kozaki K, Koshikawa K, Tatematsu Y, *et al*. Multi-faceted analyses of a highly metastatic human lung cancer cell line NCI-H460-LNM35 suggest mimicry of inflammatory cells in metastasis[J]. Oncogene, 2001, 20(5): 4228—4234.

[11] 李国平，杨 恬. 环氧合酶-2 蛋白在人膀胱移行细胞癌中的表达[J]. 第三军医大学学报，2002, 24(8): 904—906

[12] Andreasen P A, Egelund R, Petersen H H. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion and metastasis[J]. Cell Mol Life Sci, 2000, 57(1): 25—40.

（编辑 郭建秀）

文章编号：1000-5404(2003)11-0951-02

个案与短篇

无血液转流下巨大胸腺瘤切除并上腔静脉移植的麻醉处理

The anesthesia of enormous thymoma resection and superior vena cava transplantation without blood passby

文欣荣，陶国才 （第三军医大学附属西南医院麻醉科，重庆 400038）

我院成功开展了 3 例巨大胸腺瘤切除手术，均在非体外循环情况下阻断上腔静脉完成肿瘤切除及上腔静脉移植术。现将其麻醉处理及体会总结如下。

1 病例资料

3 例患者，其中男性 2 例，女性 1 例；年龄分别为 29、31、37 岁，主要症状为颜面水肿、胸痛、咳嗽、胸闷等；主要体征是颈静脉怒张。CT 检查报告为巨大胸腺瘤，侵及上腔静脉。其他实验室检查无明显异常。

入室后监测 ECG、BP、SPO_2，麻醉诱导：芬太尼 0.1 mg、氟哌啶 5 mg、硫喷妥钠 5 mg/kg、维库溴铵 6 mg、佩尔地平 1 mg，气管内插管，接呼吸机行机械通气。麻醉维持以 N_2O～O_2 持续吸入、异丙酚 2～5 $mg\cdot kg^{-1}\cdot h^{-1}$ 持续静脉泵注，术中间断静注芬太尼、维库溴铵维持麻醉。行右桡动脉穿刺监测动态血压（Artery blood pressure, ABP）、右颈内静脉穿刺监测上腔静脉压力、右股静脉穿刺监测下腔静脉压力。手术为胸腺瘤及部分上腔静脉切除及人造血管移植，阻断上腔静脉分别为 26、28、31 min，开胸时腔静脉阻断和开放时血压下降明显，见表 1，经股静脉快速输血后好转，术中予冰帽给大脑降温，静注甲基强的松龙，上腔静脉开放后静滴甘露醇减轻脑水肿，并静滴 $NaHCO_3$ 纠正酸中毒。患者上、下腔静脉压力变化见表 2。手术历时 4～6 h，术毕生命征平稳，控制呼吸送入病房继续行机械通气，予以安定镇静及维库溴铵维持肌松至次日晨，待患者清醒及肌力恢复后拔

作者简介：文欣荣(1973—)，男，四川省广安市人，硕士研究生，医师，主要从事临床麻醉方面的研究。电话：(023)68754000-73097

收稿日期：2003-03-01；修回日期：2003-04-27

（下转 955 页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net