

• 论 著 •

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00925

## 选择性环氧合酶-2 抑制剂 NS-398 体外抑制结肠癌细胞增殖和侵袭

邱彦,刘静,刘梅,司梁宏,茆玉国,陆瑜

解放军第454医院药剂科,南京210002

**[摘要]** 目的:观察环氧合酶-2(COX-2)抑制剂 NS-398 对结肠癌细胞增殖、侵袭的影响,探讨 COX-2 作为结肠癌治疗靶标的可行性。方法:用 RT-PCR 和 Western 印迹法检测结肠癌细胞 CW-2、COLO-320 中 COX-2 基因及蛋白的表达。MTT 法观察 NS-398 对 COLO-320 细胞增殖的抑制作用;体外细胞侵袭试验检测 NS-398 对细胞侵袭能力的影响;Western 印迹检测 NS-398 对基质金属蛋白酶 2(MMP-2)表达的影响。结果:结肠癌细胞株 CW-2、COLO-320 中 COX-2 均有阳性表达。NS-398 能抑制结肠癌细胞株 COLO-320 的生长,抑制作用具有时间、浓度依赖性。细胞侵袭试验表明,NS-398 体外能抑制结肠癌细胞株 COLO-320 的侵袭。Western 印迹结果表明 NS-398 可以抑制 COLO-320 中 MMP-2 的表达。结论:COX-2 抑制剂 NS-398 体外可显著抑制结肠癌细胞的生长、侵袭,COX-2 可作为结肠癌治疗的靶点。

**[关键词]** 环氧合酶-2 抑制剂;结肠肿瘤;肿瘤侵袭;基质金属蛋白酶 2

**[中图分类号]** R 735.35 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)08-0925-04

### Inhibitory effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 on proliferation and invasion of human colorectal cancer cells

QIU Yan, LIU Jing, LIU Mei, SI Liang-hong, MAO Yu-guo, LU Yu

Department of Pharmacy, No. 454 Hospital of PLA, Nanjing 210002, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the effect of NS-398, a selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor, on the proliferation and invasion of human colon carcinoma cells *in vitro*, so as to determine the possibility of COX-2 as a new target for treatment of colon carcinoma. **Methods:** The expression of COX-2 in colorectal cancer cells (CW-2, COLO-320) was detected by RT-PCR and Western blotting. COLO-320 cell proliferation was measured by MTT after treatment with NS-398. Cell invasion ability was measured using migration and invasion chamber systems. Western blotting assay was used to examine the influence of NS-398 on MMP-2 expression. **Results:** Our results showed that CW-2, COLO-320 cells expressed COX-2 mRNA and protein. NS-398 inhibited the proliferation of COLO-320 cells in a time- and concentration-dependent manner. Invasion test showed that NS-398 inhibited the migration and invasion of COLO-320 cells. Western blotting revealed that NS-398 inhibited the expression of MMP-2 in COLO-320 cells. **Conclusion:** The selective COX-2 inhibitor NS-398 can inhibit COLO-320 cell proliferation and invasion, indicating COX-2 may serve as a new target for colon carcinoma treatment.

**[KEY WORDS]** specific cyclooxygenase-2 inhibitor; colonic neoplasms; neoplasm invasiveness; matrix metalloproteinase-2

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(8):925-928]

人类环氧合酶-2(COX-2)基因位于一号染色体1q25.2-q25.3, mRNA 全长由 4 465 个碱基组成, CDS 区位于 135~1 949 位, 共编码 604 个氨基酸<sup>[1]</sup>。COX-2 是一种多功能诱导表达的蛋白, 在正常生理状态下并不表达, 是催化花生四烯酸合成前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 中的重要限速酶, 其启动子上含有 2 个核因子 κB(NF-κB) 位点, 可调控 COX-2 的转录激活<sup>[2]</sup>。COX-2 主要定位于核膜, 其催化产生的前列腺素(PGs)可以进入核内, 调节靶细胞基因的

转录。COX-2 作为环氧合酶的可诱导形式, 其表达可参与多种病理生理过程, 其高表达与炎症、疼痛、肿瘤发生等存在密切关系。

COX-2 与多种恶性肿瘤的生长密切相关, 且参与了肿瘤血管生成, 与肿瘤浸润和转移密切相关<sup>[3-6]</sup>; 应用 COX-2 抑制剂可干预肿瘤的生长及浸润转移<sup>[7]</sup>。因此, 本研究选择结肠癌细胞株作为研究对象, 观察 COX-2 抑制剂 NS-398 对结肠癌细胞株生长及浸润转移的影响, 探讨将 COX-2 作为结肠

**[收稿日期]** 2008-02-27 **[接受日期]** 2008-04-10

**[作者简介]** 邱彦, 博士, 主管药师。E-mail: qiuyan2189@163.com

癌治疗靶点的可行性,为进一步研究奠定基础。

## 1 材料和方法

**1.1 主要材料及试剂** 结肠癌细胞株 CW-2、COLO-320 购自中国科学院细胞库。RPMI 1640 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶购自 Gibco 公司; TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司。兔抗人 COX-2 多克隆抗体、鼠抗人 MMP-2 单克隆抗体, GAPDH 抗体为 Santa Cruz 公司产品。逆转录酶 M-MLV 购自 Promega 公司, RNA 酶抑制剂购自 Ambion 公司; MTT 试剂、NS-398 购自 Sigma 公司。Matrigel™ 细胞侵袭检测试剂盒购自 BD 公司。

**1.2 细胞培养** 人结肠癌细胞系 CW-2、COLO-320 用含有 10% 胎牛血清的 1640 培养基(含青霉素 100 IU/ml 和链霉素 100 IU/ml)在 37℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中传代培养,取生长状态良好的对数生长期细胞进行实验。

**1.3 COX-2 mRNA 的表达** COX-2 PCR 引物由上海英骏生物技术有限公司合成,上游引物序列为 5'-AGC ACT TCA CGC ATC AG-3',下游引物序列为 5'-CCA GAC CAA AGA CCT CC-3',产物长度 276 bp。TRIzol 试剂裂解细胞,提取细胞总 RNA,异丙醇沉淀,溶于 DEPC 水,紫外分光光度计测定  $D_{260}/D_{280}$ ,均在 1.8~2.0 范围内,电泳检测完整性。各总 RNA 样品,取 2 μg 以 oligo dT(15)为引物,用 M-MLV 逆转录为 cDNA,PCR 反应条件如下,94℃变性 30 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,循环 35 次,最后 72℃延伸 10 min。取 10 μl PCR 产物用 1.5% 琼脂糖电泳,用溴化乙啶(EB)染色,凝胶成像分析。

**1.4 COX-2 蛋白的表达** 收集培养的细胞,用冰冷的 PBS 洗 2 次,加细胞裂解液 0.5 ml(0.1 mol/L NaCl,0.01 mol/L Tris-HCl (pH 7.6),1 mmol/L EDTA (pH 8.0),1 mg/L Leupatin,100 mg/L PMSF),冰上裂解 30 min,刮下细胞,收集到离心管中,4℃、14 600×g 离心 15 min,取上清,BCA 法蛋白定量。取 25 μg 总蛋白变性 10 min 后,进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,蛋白电泳分离后,电转移至 PVDF 膜。膜用含 5% 脱脂奶粉的 TBS 室温封闭 1 h,然后在 1:400 稀释的一抗稀释液中,4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,再置于 1:2 000 稀释的二抗(HRP-羊抗兔 IgG)稀释液中,37℃ 孵育 1 h, TBST 洗膜 4 次,每次 10 min 后,加入 ECL 发光剂显影曝光。

**1.5 细胞增殖实验** 取对数生长期细胞,调节细胞

密度为  $1 \times 10^6$ /ml,接种于 96 孔板中,每孔 200 μl,24 h 后换液。空白细胞加无血清培养基,COX-2 抑制剂组加无血清培养基及 NS-398,NS-398 浓度为 0、25、50、100 μmol/L,各组设 3 复孔。分别培养 24、48、72 h 后,每孔分别加入 MTT(5 g/L)20 μl,继续培养 4 h,吸出培养基,每孔加入 DMSO 200 μl,振荡溶解 10 min 左右,酶标仪测定 570 nm 处光密度(D)值,减去背景  $D_{630}$ ,计算细胞生长抑制率,抑制率=(对照组平均 D 值-实验组平均 D 值)/对照组平均 D 值×100%。

**1.6 细胞体外侵袭能力检测** 肿瘤细胞体外侵袭能力检测使用目前体外研究侵袭行为常用的 Matrigel 胶质基底膜系统(Transwell 小室)。实验分组:对照组,25、50、100 μmol/L NS-398,各组设 3 个复孔。将对数生长期的细胞用胰酶消化后,用无血清培养基洗 2 次,然后用含有上述浓度 NS-398 无血清培养基稀释,所得的细胞悬液以  $1 \times 10^5$  每孔的密度接种于上室,下室中加入 0.75 ml 含 5% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,作为诱引物,置于 37℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 24 h 后,取出上室,用棉签小心拭去底部胶,取下 PET 膜,甲醛固定,H-E 染色,显微镜下计数,取四周和中间 5 个视野,计算平均值并计算侵袭率。侵袭率(%)=侵袭细胞数/迁移细胞数×100%。

**1.7 Western 印迹检测细胞基质金属蛋白酶 2 (MMP-2)表达** COLO-320 细胞接种后,培养 24 h,贴壁后,加入含有不同浓度 NS-398 的无血清培养基培养 24 h,然后收集细胞,用冰冷的 PBS 洗 2 次,加细胞裂解液 0.5 ml(配方同上),裂解 30 min,离心取上清,并进行蛋白定量。取 30 μg 蛋白煮沸变性后,进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后电转移至 PVDF 膜。膜经过含 5% 脱脂奶粉的 TBS 室温封闭后,置于 1:500 稀释的一抗稀释液中,4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次,再置于 1:5 000 稀释的二抗(HRP-羊抗鼠 IgG)稀释液中,37℃ 孵育 1 h, TBST 洗膜后使用 ECL 发光剂显影曝光。

**1.8 统计学处理** 采用 SPSS 11.0 统计软件, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 人结肠癌细胞系 CW-2、COLO-320 中 COX-2 表达** RT-PCR 结果(图 1)证实:人结肠癌细胞系 CW-2、COLO-320 存在 COX-2 mRNA 表达;Western 印迹结果(图 2)证实 COX-2 蛋白在上述细胞系中均阳性表达。

异具有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ , 图 4)。

图 1 RT-PCR 检测结果

Fig 1 RT-PCR analysis of COX-2 mRNA expression in CW-2 and COLO-320 cells

M: 100 bp DNA ladder; 1: CW-2 cell; 2: COLO-320 cell

图 2 Western 印迹检测结果

Fig 2 Detection of COX-2 protein expression in CW-2 and COLO-320 cells by Western blotting

2.2 NS-398 对 COLO-320 细胞生长的影响 25  $\mu\text{mol/L}$  NS-398 作用 24 h 后, 细胞生长抑制率为 7.6% ( $P > 0.05$ ); 而浓度 50、100  $\mu\text{mol/L}$  的 NS-398 对细胞的生长抑制作用与对照组比较均具有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。如图 3 所示, 随着作用时间的延长, 药物对癌细胞的抑制率逐渐上升, 呈时间依赖性。细胞与药物共孵育 24 h, 25  $\mu\text{mol/L}$  NS-398 作用细胞的生长抑制率仅为 7.6%, 而作用 72 h, 相同药物浓度的抑制率达到 28.9%。其他浓度的药物作用效果类似。在相同作用时间下, 25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  浓度梯度范围内, 随着浓度的升高, 其抑制作用加强, 如作用 48 h 后, 25  $\mu\text{mol/L}$  的抑制效率为 17.6%, 而 50  $\mu\text{mol/L}$  达到了 58.9%, 100  $\mu\text{mol/L}$  更是高达 76.2%。

2.3 NS-398 抑制 COLO-320 细胞的侵袭作用 与对照组(25.6%)相比, 25  $\mu\text{mol/L}$  NS-398 作用 COLO-320 细胞 24 h 后, 侵袭率(20.3%)下降, 但差异无统计学意义; 50、100  $\mu\text{mol/L}$  NS-398 作用 24 h 后, 侵袭率降低至 10.8% 和 6.4%, 与对照组相比差

图 3 NS-398 对 COLO-320 细胞增殖的影响

Fig 3 Inhibition of COLO-320 cell proliferation by NS-398

\*  $P < 0.05$  vs 0 h;  $n = 3, \bar{x} \pm s$

图 4 NS-398 对 COLO-320 细胞侵袭的影响

Fig 4 NS-398 affects invasion of COLO-320 cells

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group;  $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.4 NS-398 对 COLO-320 细胞 MMP-2 表达的影响 Western 印迹检测结果(图 5)显示: 50  $\mu\text{mol/L}$  NS-398 处理后, COLO-320 细胞 MMP-2 含量明显下降, 100  $\mu\text{mol/L}$  NS-398 对 MMP-2 表达的抑制作用更为明显, 其抑制作用具有剂量效应关系。

图 5 NS-398 对 COLO-320 细胞 MMP-2 蛋白表达的影响

Fig 5 Effect of NS-398 on expression of MMP-2 in COLO-320 cells

### 3 讨论

COX-2 是前列腺素合成过程中重要的限速酶, COX-2 的表达可以促进肿瘤细胞的增殖、抵抗细胞

凋亡,并参与诱导血管形成。人的很多癌前病变和恶性肿瘤如 Barrett 食管、胃癌、食管癌、肝癌、膀胱癌、口腔癌、前列腺癌、鼻咽癌、乳腺癌和非小细胞癌等中都有 COX-2 的高表达。本研究应用 RT-PCR 和 Western 印迹检测了结肠癌细胞 CW-2、COLO-320 中 COX-2 的表达水平,结果证实 CW-2、COLO-320 中 COX-2 的 mRNA 水平和蛋白水平均高表达。

肿瘤细胞过度表达 COX-2 可以导致促血管生成因子释放<sup>[8]</sup>、抑制内皮细胞凋亡<sup>[9]</sup>、激活 MMPs 等<sup>[10]</sup>,从而引起内皮细胞增殖,诱导肿瘤血管形成。应用非类固醇类抗炎药物(NSAIDs)可以通过抑制 COX-1 和 COX-2 发挥其抗血管生成作用。Tsujii 等<sup>[11]</sup>的研究认为结肠癌细胞中 COX-2 激活可促使血管生成因子增多,后者可作用于内皮细胞诱导血管生成。COX-2 抑制剂可以在不同类型肿瘤中以不同的作用机制抑制肿瘤细胞生长。COX-2 特异抑制剂 SC-236 可通过上调凋亡蛋白 Bak 的表达,促进细胞色素 C 的释放,并最终激活 caspase-3,诱导胃癌细胞凋亡<sup>[12]</sup>。在某些非侵袭性肿瘤细胞中 COX-2 抑制剂不引起细胞凋亡,但可以引起细胞滞留在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期<sup>[13]</sup>。本研究发现选择性 COX-2 抑制剂 NS-398 可以剂量依赖和时间依赖性地抑制 COLO-320 的增殖。

MMPs 的表达也受到 COX-2 的调控,其中, MMP-2 可以特异性降解细胞外基质和基底膜的主要成分 IV 型胶原,还可分解多种重要的生物活性分子,与肿瘤侵袭能力密切相关<sup>[14]</sup>。本研究利用体外侵袭模型证实,NS-398 可以抑制 COLO-320 的侵袭,而这一效应可能与 MMP-2 的表达下调有关。

本研究结果表明选择性 COX-2 抑制剂 NS-398 可以抑制结肠癌细胞株 COLO-320 增殖和侵袭,提示 COX-2 可作为结肠癌治疗的靶点,为深入研究 COX-2 在结肠癌中的功能以及 COX-2 选择性抑制剂的抗肿瘤作用奠定了基础。

(志谢 本研究得到上海倍尼菲生物科技有限公司王军、肖强老师的支持和帮助,在此表示感谢!)

## [参考文献]

- [1] O'Banion M K, Winn V D, Young D A. cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 4888-4892.
- [2] Tsatsanis C, Androulidaki A, Venihaki M, Margioris A N. Signalling networks regulating cyclooxygenase-2[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38: 1654-1661.
- [3] Robertson F M, Mallery S R, Bergdall-Costell V K, Cheng M, Pei P, Prosperi J R, et al. Cyclooxygenase-2 directly induces MCF-7 breast tumor cells to develop into exponentially growing, highly angiogenic and regionally invasive human ductal carcinoma xenografts[J]. Anticancer Res, 2007, 27: 719-727.
- [4] Takaoka K, Kishimoto H, Segawa E, Hashitani S, Zushi Y, Noguchi K, et al. Elevated cell migration, invasion and tumorigenicity in human KB carcinoma cells transfected with COX-2 cDNA[J]. Int J Oncol, 2006, 29: 1095-1101.
- [5] Su C C, Chen G W, Lin J G, Wu L T, Chung J G. Curcumin inhibits cell migration of human colon cancer colo 205 cells through the inhibition of nuclear factor kappa B/p65 and down-regulates cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 expressions[J]. Anticancer Res, 2006, 26 (2A): 1281-1288.
- [6] Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, Bostwick D G, Mukhtar H. Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma[J]. Prostate, 2000, 42: 73-78.
- [7] Kohno H, Suzuki R, Sugie S, Tanaka T. Suppression of colitis-related mouse colon carcinogenesis by a COX-2 inhibitor and PPAR ligands[J]. BMC Cancer, 2005, 5: 46.
- [8] Kase S, Osaki M, Honjo S, Adachi H, Tsujitani S, Kaibara N, et al. Expression of cyclo-oxygenase-2 is correlated with high intratumoral microvessel density and low apoptotic index in human esophageal squamous cell carcinomas[J]. Virchows Arch, 2003, 442: 129-135.
- [9] Ma L, del Soldato P, Wallace J L. Divergent effects of new cyclooxygenase inhibitors on gastric ulcer healing; Shifting the angiogenic balance [ J ]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 13243-13247.
- [10] Yao M, Kargman S, Lam E C, Kelly C R, Zheng Y, Luk P, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 by rofecoxib attenuates the growth and metastatic potential of colorectal carcinoma in mice [ J ]. Cancer Res, 2003, 63: 586-592.
- [11] Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois R N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells[J]. Cell, 1998, 93: 705-716.
- [12] 樊晓明, 郑发寿, 刘红燕, 马元华, 王振宇. 环氧合酶-2 特异抑制剂诱导胃癌细胞凋亡的机制研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2005, 27: 145-147.
- [13] Basu G D, Pathangey L B, Tinder T L, Gendler S J, Mukherjee P. Mechanisms underlying the growth inhibitory effects of the cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib in human breast cancer cells[J]. Breast Cancer Res, 2005, 7: R422-R435.
- [14] Karahan N, Güneş M, Baspınar S, Oral B, Kapucuoglu N, Mungan T. Expression of gelatinase (MMP-2 and MMP-9) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in endometrial carcinoma[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2007, 28: 184-188.

[本文编辑] 贾泽军