

COX-2/PGE₂ 激活 Wnt/ β -catenin 信号通路调控人肠癌细胞 VEGF 表达

刘 宣¹, 李丹光², 周利红¹, 王 炎¹, 殷佩浩¹, 季 青¹, 范忠泽¹, 李 琦^{1*}

1. 上海中医药大学附属普陀医院肿瘤科, 上海中医药大学中西医结合肿瘤介入研究所, 上海 200062

2. 吉林省肿瘤医院放射科, 长春 130012

[摘要] **目的** 探讨环氧化酶 2(COX-2)/前列腺素 E₂(PGE₂)是否通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调控人肠癌细胞血管内皮生长因子(VEGF)的表达。**方法** 将 PGE₂ 或 COX-2 选择性抑制剂 NS-398 作用 LoVo 细胞 24 h, 采用蛋白质印迹法检测 COX-2 和 β -catenin 蛋白表达; 将 PGE₂ 和(或) β -catenin/tcf 抑制剂 FH-535 作用 LoVo 细胞 24 h, 采用 ELISA 法检测 VEGF 表达。以常规培养的 LoVo 细胞为对照。**结果** 与对照组比较, PGE₂ 能够上调 LoVo 细胞中 COX-2 蛋白表达, 同时上调 β -catenin 在细胞总蛋白、细胞浆蛋白和核蛋白中的表达水平(分别是对照组的 3.8 倍、2.7 倍和 3.0 倍, P 均 <0.01); COX-2 抑制剂能够下调 COX-2 蛋白表达, 同时下调 β -catenin 在细胞总蛋白、细胞浆蛋白和核蛋白中的表达水平(分别是对照组的 0.3 倍、0.3 倍和 0.2 倍, P 均 <0.01)。与对照组比较, PGE₂ 能够上调 LoVo 细胞 VEGF 表达水平(是对照组的 1.6 倍, $P<0.01$); β -catenin/tcf 抑制剂能够下调 VEGF 表达(是对照组的 0.68 倍, $P<0.01$); 将 PGE₂ 和 β -catenin/tcf 抑制剂同时作用 LoVo 细胞后 VEGF 表达水平与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** COX-2/PGE₂ 通过上调 β -catenin 蛋白表达, 从而激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, 上调 VEGF 表达, 这可能是 COX-2/PGE₂ 促进大肠癌血管新生的机制之一。

[关键词] 结直肠肿瘤; 环氧化酶 2; Wnt/ β -catenin 信号通路; 血管内皮生长因子

[中图分类号] R 735.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)11-1178-04

COX-2/PGE₂ regulates VEGF expression by activating Wnt/ β -catenin signal pathway in human colorectal cancer cells

LIU Xuan¹, LI Dan-guang², ZHOU Li-hong¹, WANG Yan¹, YIN Pei-hao¹, JI Qing¹, FAN Zhong-ze¹, LI Qi^{1*}

1. Department of Oncology, Interventional Cancer Institute of Chinese Integrative Medicine, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China

2. Department of Radiology, Jilin Provincial Cancer Hospital, Changchun 130012, Jilin, China

[Abstract] **Objective** To investigate whether COX-2/PGE₂ can regulate vascular endothelial growth factor (VEGF) expression through activating Wnt/ β -catenin signal pathway in human colorectal cancer cells. **Methods** PGE₂ and (or) COX-2 selective inhibitor NS-398 was used to treat LoVo cells for 24 h, and then COX-2 and β -catenin protein expression was detected by Western blotting analysis. PGE₂ and (or) β -catenin/tcf selective inhibitor FH-535 were used to treat LoVo cells for 24 h, and then the levels of VEGF was determined by ELISA. Routinely cultured LoVo cells were taken as control. **Results** Compared with the control group, PGE₂ not only increased COX-2 protein expression, but also increased the levels of β -catenin in the total cell, cytosolic and nuclear proteins (being 3.8 folds, 2.7 folds, and 3.0 folds of the control, respectively, $P<0.01$). COX-2 selective inhibitor not only decreased COX-2 protein expression, but also decreased the levels of β -catenin in the total cell, cytosolic and nuclear proteins (being 0.3 folds, 0.3 folds, and 0.2 folds of the control, $P<0.01$). Compared with the control group, PGE₂ increased VEGF expression in LoVo cells (being 1.6 folds of the control, $P<0.01$), and β -catenin/tcf selective inhibitor decreased VEGF expression in LoVo cells (being 0.68 folds of the control, $P<0.01$). Co-treatment of LoVo cells with β -catenin/tcf selective inhibitor and PGE₂ showed no great effect on VEGF expression. **Conclusion** COX-2/PGE₂ can increase β -catenin protein level, subsequently activate Wnt/ β -catenin signal pathway and promote VEGF expression, which

[收稿日期] 2012-07-27

[接受日期] 2012-09-24

[基金项目] 上海市自然科学基金(09ZR1428500); 上海市六院医疗集团项目(20114001); 上海市教委科研创新项目(12YZ058); 上海市普陀区科委重点项目(2010PTKW005). Supported by Natural Science Foundation of Shanghai (09ZR1428500), Shanghai 6th People's Hospital Medical Group Project(20114001), Innovation Program of Shanghai Municipal Education Commission (12YZ058), and Key Project of Science and Technology Commission of Putuo District, Shanghai(2010PTKW005).

[作者简介] 刘 宣, 博士生. E-mail: lxtw@hotmail.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-52669731, E-mail: Lzwf@hotmail.com

might be one of the mechanisms for COX-2/PGE₂-induced angiogenesis in colon cancer.

[Key words] colorectal neoplasms; cyclooxygenase 2; Wnt/ β -catenin signal pathway; vascular endothelial growth factor [Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(11): 1178-1181]

大肠癌是临床上常见的恶性肿瘤之一,其发病率和病死率呈逐年上升趋势^[1]。目前大肠癌的治疗主要采用以手术为主的综合治疗,但复发率高,主要原因是由于肿瘤血管新生导致的肿瘤向其他脏器组织侵袭、转移^[2]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种有效的血管形成和血管通透性诱导因子,研究^[3]发现大肠癌中 VEGF 表达升高,并与环氧酶 2(cyclooxygenase 2, COX-2)过表达密切相关,但其机制尚不明确。前列腺素 E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)是 COX-2 催化花生四烯酸生成的主要产物,也是 COX-2 发挥生物学作用的主要信使。在体外,COX-2 选择性非甾类抗炎药能够抑制 COX-2 诱导的内皮细胞增殖、迁移和血管管腔形成,而非甾类抗炎药抑制血管形成的作用可以被 PGE₂ 逆转^[4]。近年来研究^[5]发现,在肠道肿瘤形成过程中 COX-2/PGE₂ 与 Wnt/ β -catenin 通路密切相关,并且 Wnt/ β -catenin 信号通路下游的转录因子 T 细胞因子/淋巴增强因子(TCF/LEF)可以上调 VEGF 表达^[6-7]。为了探讨 COX-2/PGE₂ 调控 VEGF 表达的信号转导机制,本研究采用 PGE₂ 和 COX-2 选择性抑制剂 NS-398、 β -catenin/tcf 抑制剂 FH-535 作用人肠癌细胞,研究 Wnt/ β -catenin 信号通路在 COX-2/PGE₂ 调控 VEGF 表达中的作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 PGE₂、NS-398 购自美国 Sigma 公司; FH-535 购自德国 Calbiochem 公司;细胞裂解液、SDS-PAGE 试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒均购自碧云天科技有限公司;细胞核蛋白与浆蛋白抽提试剂盒购自美国 Fermentas 公司;兔抗人 COX-2、 β -catenin 和 β -actin 单克隆抗体、鼠抗人增殖细胞核抗原(PCNA)单克隆抗体、HRP 标记的羊抗兔 IgG、HRP 标记的羊抗鼠 IgG 均购自美国 CST 公司;人 VEGF ELISA 试剂盒购自美国 Bio Sources 公司。

1.2 人肠癌细胞培养 人肠癌 LoVo 细胞购自中国科学院上海细胞生物学研究所,用含 10% 胎牛血清、1.5 g/L 碳酸氢钠、2 mmol/L L-谷氨酰胺的 F12K 培养液,置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。

1.3 蛋白质印迹法检测 PGE₂、NS-398 作用后细胞中 COX-2、 β -catenin 蛋白表达 取常规培养的处于对数生长期的人肠癌 LoVo 细胞,分为 3 组:对照

组、PGE₂(5 μ mol/L)组、NS-398(20 μ mol/L)组,作用 24 h 后提取蛋白。细胞总蛋白抽提步骤:预冷的 PBS 清洗细胞 2 次,加入预冷的含蛋白酶抑制剂的裂解液,用预冷的细胞刮将培养瓶壁上的贴壁细胞刮下来,将细胞悬浮液转移到离心管中,冰浴下摇动 30 min 进行裂解,之后 4℃、15 000 $\times g$ 离心 5 min,取上清于-80℃保存待用;细胞浆蛋白与核蛋白抽提步骤:用预冷的 PBS 清洗细胞 2 次,用含蛋白酶抑制剂的预冷 PBS 刮下细胞,4℃、250 $\times g$ 离心 5 min 收集细胞,加入预冷的细胞裂解液(使用前每毫升细胞裂解液中加入 10 μ l 0.1 mol/L DTT, 15 μ l 蛋白酶抑制剂),旋涡剧烈振荡 15 s,放置冰上 10~15 min,再漩涡震荡;分离细胞浆蛋白和核蛋白,4℃、500 $\times g$ 离心 7 min,之后再分别纯化细胞浆蛋白和核蛋白。BCA 分析试剂测定蛋白浓度。取 50 μ g 蛋白在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,电转移至 PVDF 膜,将膜用 5% BSA 溶液封闭,然后加入一抗,4℃过夜;TBS/T 洗膜 3 次,每次 5 min,再加入 HRP 标记的二抗,室温孵育膜 1 h, TBS/T 洗膜 3 次,每次 5 min;之后按 1:1 加入 AB 荧光底物,显影,定影,并分析其灰度值。

1.4 ELISA 检测 PGE₂、NS-398、FH-535 作用后细胞培养上清中 VEGF 表达 取常规培养的对数生长期人肠癌 LoVo 细胞,调整细胞密度至 1 $\times 10^5$ /ml,以每孔 500 μ l 的量接种于 24 孔细胞培养板中,置于 5% CO₂、饱和湿度、37℃培养箱中培养。待细胞贴壁后,用无血清培养液处理细胞 12 h,之后分别更换为完全培养液,分为 5 组:对照组、PGE₂(5 μ mol/L)组、NS-398(20 μ mol/L)组、FH-535(15 μ mol/L)组、FH-535(15 μ mol/L)+PGE₂(5 μ mol/L)组。分别在作用 24 h 后收集培养上清,1 000 $\times g$ 离心 10 min,分装到无菌管中。按人 VEGF ELISA 试剂盒说明书检测细胞培养液中 VEGF 的表达情况。

1.5 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。方差齐性检验后,多组样本均数比较用单因素方差分析,均数间两两比较采用 Newman-Keuls 检验。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 COX-2/PGE₂ 对人肠癌细胞 COX-2、 β -catenin 蛋白表达的影响 蛋白质印迹结果(图 1)显示,与正常培养的对照组细胞比较,PGE₂(5 μ mol/L)能够上

调 COX-2 在细胞总蛋白中的表达水平(是对照组的 3.7 倍, $P<0.01$),同时上调 β -catenin 在细胞总蛋白、细胞浆蛋白和核蛋白中的表达水平(分别是对照组的 3.8 倍、2.7 倍和 3.0 倍, P 均 <0.01);而相反 COX-2 选择性抑制剂 NS-398($20\text{ }\mu\text{mol/L}$)能够下调 COX-2 蛋白表达水平(是对照组的 0.4 倍, $P<0.01$),同时下调 β -catenin 在细胞总蛋白、细胞

浆蛋白和核蛋白中的表达水平(分别是对照组的 0.3 倍、0.3 倍和 0.2 倍, P 均 <0.01)。提示 PGE_2 能够上调人结肠癌 LoVo 细胞中 COX-2 表达,进而上调 β -catenin 的蛋白表达水平,促使 β -catenin 在细胞浆累积并向细胞核移位,从而激活 Wnt/ β -catenin 信号通路。

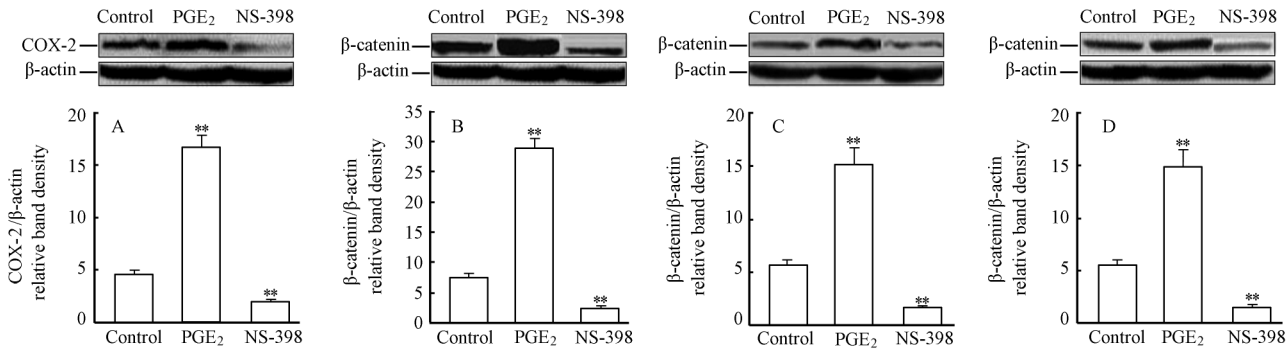


图 1 COX-2 和 β -catenin 在 LoVo 细胞中的表达

Fig 1 COX-2 and β -catenin expression in LoVo cells

A: COX-2 expression in total protein of LoVo cells; B: β -catenin expression in total protein of LoVo cells; C: β -catenin expression in cytosolic protein of LoVo cells; D: β -catenin expression in nuclear protein of LoVo cells. * $P<0.01$ vs control. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

2.2 COX-2/ PGE_2 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调节 VEGF 表达 ELISA 检测结果(图 2)显示,与对照组比较, PGE_2 (作用浓度 $5\text{ }\mu\text{mol/L}$)能够上调 VEGF 表达水平(是对照组的 1.6 倍, $P<0.01$);与之相反 COX-2 选择性抑制剂 NS-398(作用浓度 $20\text{ }\mu\text{mol/L}$)能够下调 VEGF 水平(是对照组的 0.7 倍, $P<0.01$); β -catenin/tcf 抑制剂 FH-535(作用浓度 $15\text{ }\mu\text{mol/L}$)能够下调 VEGF 表达(是对照组的 0.68 倍, $P<0.01$);将 β -catenin/tcf 抑制剂 FH-535 和 PGE_2 同时作用 LoVo 细胞后, VEGF 表达水平与对照组相比无明显变化($P>0.05$)。提示 COX-2/ PGE_2 可能通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路上调人结肠癌 LoVo 细胞 VEGF 表达水平。

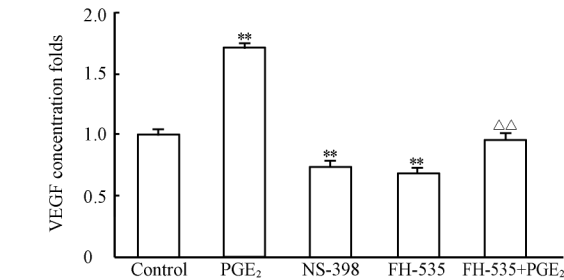


图 2 PGE_2 、NS-398、FH-535 作用后 LoVo 细胞中 VEGF 的表达

Fig 2 VEGF expression in LoVo cells treated with PGE_2 , NS-398, and FH-535

* $P<0.01$ vs control; $\triangle\triangle P<0.01$ vs PGE_2 . $n=3$, $\bar{x}\pm s$

3 讨论

COX-2 是催化花生四烯酸产生前列腺素(prostaglandins, PGs)的关键限速酶之一,当细胞受到各种刺激因素包括生长因子、细胞因子、炎性介质等作用时, COX-2 的表达迅速上调, PGE_2 是 COX-2 催化花生四烯酸生成的主要产物。Tsuji 等^[8]发现转染 COX-2 基因的 CaCo-2 结肠癌细胞株,在体外培养时产生的 VEGF、Ang-2 等血管生成因子量比未转染的细胞株增加 4~8 倍,而 COX-2 抑制剂可使其恢复基础水平。Fukuda 等^[9]发现 PGE_2 能够上调人结肠癌细胞 VEGF 表达水平。说明 COX-2 的过度表达与结直肠癌的发生发展密切相关,其可能通过促进肿瘤血管新生促进肿瘤的发生发展。本实验研究也发现, PGE_2 能够上调 LoVo 细胞的 COX-2 和 VEGF 蛋白表达,而 COX-2 抑制剂 NS-398 能够下调 VEGF 表达。但 COX-2 的过表达是否与 VEGF 等促血管生成因子的升高直接相关,是通过什么信号途径实现的,其机制尚不清楚。

Wnt/ β -catenin 信号通路与大肠癌等多种肿瘤发生、发展密切相关。Wnt/ β -catenin 信号通路的关键分子是 β -catenin,当 Wnt 信号通路激活时, β -catenin 从其结合蛋白 Axin 中释放,在胞浆中堆积,并转入细胞核,与 TCF/LEF 结合,激活靶基因

VEGF、cyclin D1、c-myc 和 matrilysin 等的转录^[10-11]。Kawasaki 等^[12]研究发现 Wnt/ β -catenin 信号通路中的 β -catenin 基因的激活伴随 COX-2 的过表达;并且细胞质中 β -catenin 能使 COX-2 基因 mRNA 稳定表达^[13]。研究^[6]发现在大肠癌细胞中 PGE₂能够激活 G 蛋白偶联受体 EP2,它含有与 Axin 结合位点,使 GSK-3 和 Axin 从破坏复合体中释放,导致 β -catenin 积聚。APC 基因突变能够上调 TCF 转录活性,增加 COX-2 和 PGE₂表达水平^[14],而 COX-2/PGE₂又能通过 cAMP/PK 通路进一步上调 β -catenin/TCF 转录活性^[15]。说明在肠道肿瘤形成过程中 COX-2/ PGE₂ 通路 与 APC/ β -catenin/TCF 通路密切相关。本研究发现,PGE₂能够上调人肠癌人肠癌细胞 β -catenin 蛋白在细胞核中的表达水平,从而激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,抑制 COX-2 表达可以抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路。同时,PGE₂能够上调 LoVo 细胞的 VEGF 表达水平;而抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路后,PGE₂对 VEGF 表达水平无明显影响,说明 PGE₂/COX-2 可能通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路调控 VEGF 表达。

综上所述,本研究结果表明 COX-2/PGE₂ 通过上调 β -catenin 蛋白表达,从而激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,上调 VEGF 表达,这可能是 COX-2/PGE₂ 促进大肠癌血管新生的机制之一。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参 考 文 献]

[1] Jemal A, Bray F, Center M M, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61: 69-90.
[2] 李 玉 明 , 詹 文 华 , 韩 方 海 , 何 裕 隆 , 彭 俊 生 , 董 文 广 , 等 . 大 肠 癌 同 时 性 肝 转 移 外 科 治 疗 的 预 后 因 素 分 析 [J]. 中 华 普 通 外 科 杂 志 , 2005, 20: 625-628.
[3] Han Y D, Hong Y K, Kang J G, Choi Y J, Park C H. Relation of the expression of cyclooxygenase-2 in colorectal adenomas and adenocarcinomas to angiogenesis and prognosis[J]. J Korean Soc Coloproctol, 2010, 26: 339-346.

[4] Jones M K, Wang H, Peskar B M, Levin E, Itani R M, Sarfeh I J, et al. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing[J]. Nat Med, 1999, 5: 1418-1423.
[5] Castellone M D, Teramoto H, Williams B O, Druey K M, Gut-kind J S. Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis [J]. Science, 2005, 310: 1504-1510.
[6] Easwaran V, Lee S H, Inge L, Guo L, Goldbeck C, Garrett E, et al. beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer [J]. Cancer Res, 2003, 63: 3145-3153.
[7] Hwang I, Kim J, Jeong S. β -Catenin and peroxisome proliferator activated receptor- δ coordinate dynamic chromatin loops for the transcription of VEGFA gene in colon cancer cells[J]. J Biol Chem, 2012 Oct 18. [Epub ahead of print]
[8] 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.
[9] Fukuda R, Kelly B, Semenza G L. Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E2 is mediated by hypoxia-inducible factor 1[J]. Cancer Res, 2003, 63: 2330-2334.
[10] Dale T C. Signal transduction by the Wnt family of ligands[J]. Biochem J, 1998, 329(Pt 2): 209-223.
[11] Orsolic S, Peifer M. Cell-cell signaling: wingless lands at last [J]. Curr Biol, 1996, 6: 1363-1367.
[12] Kawasaki T, Noshio K, Ohnishi M, Suemoto Y, Kirkner G J, Dehari R, et al. Correlation of beta-catenin localization with cyclooxygenase-2 expression and CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer[J]. Neoplasia, 2007, 9: 569-577.
[13] Lee H K, Jeong S. Beta-Catenin stabilizes cyclooxygenase-2 mRNA by interacting with AU-rich elements of 3'-UTR[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34: 5705-5714.
[14] Williams C S, Luongo C, Radhika A, Zhang T, Lamps L W, Nanney L B, et al. Elevated cyclooxygenase-2 levels in Min mouse adenomas[J]. Gastroenterology, 1996, 111: 1134-1140.
[15] Shao J, Jung C, Liu C, Sheng H. Prostaglandin E2 stimulates the beta-catenin/T cell factor-dependent transcription in colon cancer[J]. J Biol Chem, 2005, 280: 26565-26572.

[本文编辑] 孙 岩