双氯芬酸抑制肝癌细胞增殖和促进环氧合酶-2 mRNA作用的表达

环氧合酶-2(COX-2)是催化前列腺素合成的限速酶，在大多数的细胞和组织为诱生性表达。正常情况下，此酶低表达或不表达，而在生长因子、细胞因子和肿瘤启动子的刺激下大量表达，参与炎症和恶性组织中前列腺素的合成[1]。近年来大量研究证实COX-2参与多种肿瘤，如肺癌、胃癌、膀胱癌、食道癌，尤其是结肠癌等的发生、发展以及转移和扩散[2]，但目前对COX-2在肝癌发生中的作用仍存在争议。有研究表明，在由慢性肝炎发展成肝硬化的非肝癌组织和肝癌组织都存在COX-2的高表达[3][4]，COX-2抑制剂可诱导肝癌细胞的凋亡[5]。但同时有学者指出，环氧合酶抑制剂仅在超出抑制环氧合酶活性的生理剂量时才对肿瘤细胞具有抗增殖作用，并且此作用不依赖于COX-2的表达，即通过非COX-2途径起作用[6][7]。本研究观察非选择性的环氧合酶抑制剂双氯芬酸钠对体外培养的肝癌细胞HepG2、Hep3B和正常肝细胞系QSG -7701增殖的作用以及药物对COX-2 mRNA表达的影响，以探讨COX-2与肝癌细胞增殖的关系。

1 材料和方法

1.1 细胞来源

人肝细胞癌HepG2、Hep3B细胞和人结肠癌HT-29细胞均购自美国典型培养物中心(ATCC)，人正常肝细胞QSG-7701购自上海细胞所。

1.2 试剂

DMEM细胞培养基购自Gibco公司，特级无支原体新生牛血清购自杭州四季青生物材料有限公司，胰蛋白酶由Amresco生产，细胞计数试剂CCK-8 Kit购自日本同仁化学研究所。人COX-2引物5'-TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT-3'、5'-AGATCAT CTCTGCCTGAGTATCTT-3'；人GAPDH引物5'-A C CACAGTCCATGCCATCAC-3'、5'-TCCACCACCCT GTTGCTGTA-3'由北京赛百盛生物有限公司合成，PAGE纯化，RNA提取试剂Trizol购自Invitrogen公司，逆转录和PCR试剂购自宝生物公司(TaKaRa Ex TaqTM)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养和CCK-8法测定细胞增殖活性 采用一种新的细胞活性测定方法—CCK-8法代替经典的MTT法进行细胞增殖的测定，此法原理与MTT法类似，使用时可直接在细胞培养液中加入试剂进行测定，操作更为简单，灵敏度和重现性强于MTT法，目前已在国际上广为使用[8]。人肝细胞癌HepG2、Hep3B细胞和人正常肝细胞QSG-7701均用添加10%新生牛血清的DMEM培养，按2000个细胞/孔的密度接种96孔组织培养板，培养24 h；细胞生长融合度约为30%，每孔加双氯芬酸使终浓度分别为0、10、25、50、100、200 μmol/L，每种浓度6孔，同时设立PBS阴性对照组和5 μg/ml 5-Fu阳性对照组；分别于加药24、48和72 h 加入体积比为1∶10的CCK-8试剂，孵育2.5 h；酶标仪上测定450 nm吸光度，参比波长为630 nm。

1.3.2 RT-PCR检测COX-2 mRNA水平 HepG2、Hep3B细胞按2×105个/孔密度接种6孔板，培养24 h，分别加入双氯芬酸和5-Fu，孵育相应时间后用Trizol试剂提取细胞总RNA，在紫外分光光度计上进行定量。逆转录合成cDNA第一链，取1.5 μl进行PCR。扩增条件为95 ℃ 2 min，94 ℃ 30 s、55 ℃ 30 s、72 ℃ 1

min，35个循环，72 ℃延伸5 min。PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳，用凝胶成像系统作半定量分析。以COX-2的PCR产物和内参看家基因GAPDH的PCR产物灰度积分值的比值(relative volume，RV)反映COX-2 mRNA的表达水平。实验重复3次。

1.4 统计学处理

采用SPSS 10.0统计软件行单向方差分析(One-way ANOVA)，两两比较用SNK检验。用Bliss法计算药物的半数抑制浓度(IC50)。

2 结果

2.1 双氯芬酸对HepG2和Hep3B细胞增殖的抑制作用

双氯芬酸10～200 μmol/L作用24、48和72 h后，浓度依赖性抑制人肝癌细胞HepG2和Hep3B的增殖(图1、2)，作用48 h后，在10 μmol/L时即显现明显的抗增殖作用，抑制率分别为22.8%和24.1%，50 μmol/L时抑制率为40.47%和54.49%，其半数抑制浓度分别为70.54和48.39 μmol/L。阳性对照药5-Fu 5 μg/mL作用48 h对HepG2和Hep3B细胞增殖的抑制率分别为50.97%和62.98%。人正常肝细胞QSG-7701对双氯芬酸的敏感性远低于HepG2和Hep3B，在浓度大于50 μmol/L时才表现出较为明显的抑制作用(图3)，作用48 h的半数抑制浓度为189.91 μmol/L。

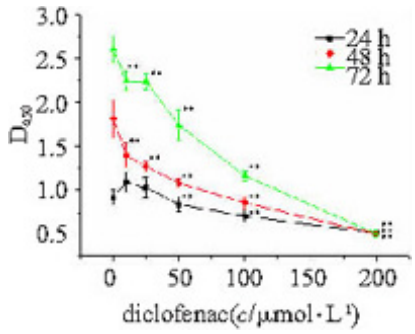

图1 双氯芬酸处理24、48和72 h后对HepG2细胞增殖的影响

Fig.1 HepG2 cell proliferation after diclofenac exposure for 24, 48 and 72 h

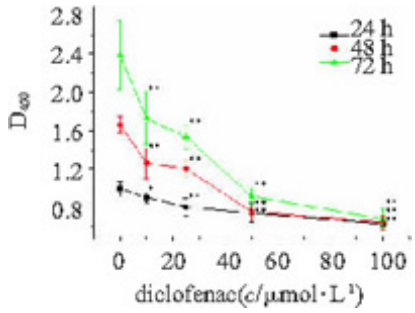

图2 双氯芬酸处理24、48和72 h后对Hep3B细胞增殖的影响

Fig.2 Hep3B cell proliferation after diclofenac exposure for 24, 48 and 72 h

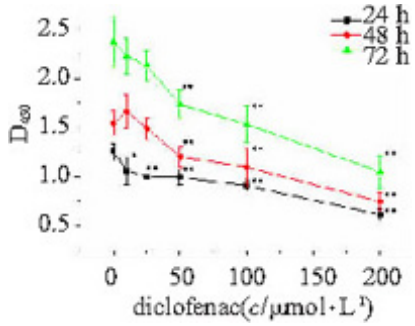

图3　双氯芬酸处理24、48和72 h后对QSG-7701细胞
Fig.3　QSG-7701 cell proliferation after diclofenac

2.2 细胞COX-2 mRNA表达水平

RT-PCR检测结果显示，人肝癌细胞HepG2、Hep3B均表达COX-2 mRNA，而正常肝细胞QSG-7701 COX-2 mRNA表达水平远远弱于前二者(图4)。人结肠癌HT-29细胞为表达COX-2的阳性对照细胞。

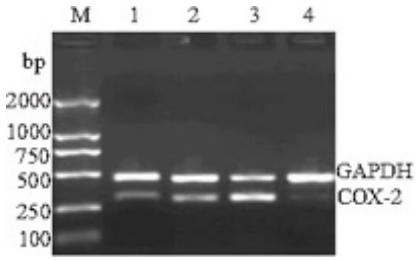

图4　COX-2 mRNA在肝癌细胞和正常肝细胞系中的表达
Fig.4　Expression of COX-2mRNA detected with RT-PCR
M: DNA marker; Lane 1: Human colon cancer cell line HT-29 as the positive control; Lane 2: Hep3B; Lane 3: HepG2; Lane 4: QSG-7701

2.3　双氯芬酸和5-Fu对HepG2和Hep3B细胞COX-2 mRNA表达的影响

50 μmol/L双氯芬酸处理HepG2细胞72 h后，COX-2 mRNA表达明显上升，与对照相比上调了36.80%(P<0.01)，5 μg/ml的5-Fu作用72 h后COX-2 mRNA表达上调了27.12%(P<0.05，图5)。双氯芬酸50 μmol/L和5-Fu 5 μg/ml作用Hep3B细胞72 h后，分别使COX-2 mRNA表达上调了83.56和79.09%(P<0.01，图6)

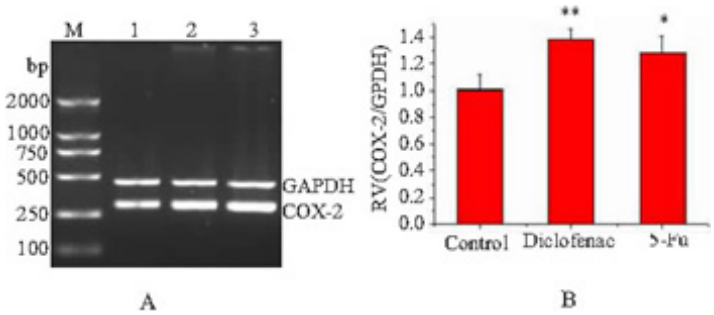

图5　双氯芬酸和5-Fu对HepG2细胞COX-2mRNA表达的影响
Fig.5　Effects of diclofenac and 5-Fu on the expression of COX-2 mRNA in HepG2 cells
A: Electrophoretic patterns; M: DNA marker; Lane 1: Control group;Lane 2: 50 μmol/L diclofenac; Lane 3: 5 μg/ml 5-Fu; B:Semi-quantification of COX-2 mRNA expression. Data are expressed as the ratio of VCOX-2/VGAPDH.

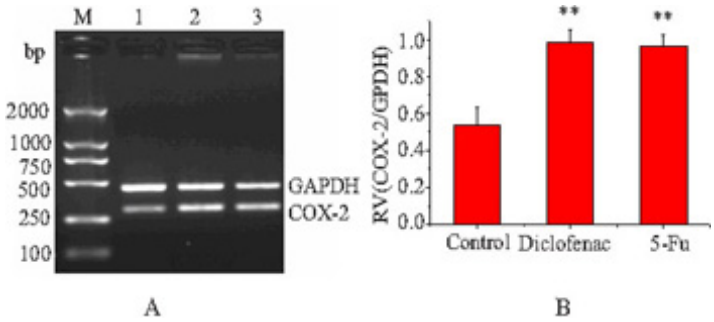

图6　双氯芬酸和5-Fu对Hep3B细胞COX-2mRNA表达的影响
Fig.6　Effects of diclofenac and 5-Fu on the expression of COX-2 mRNA in Hep3B cell

A: Electrophoretic patterns; M: DNA marker; Lane 1: Control group; Lane 2: 50 μmol/L diclofenac; Lane 3: 5 μg/ml 5-Fu;B: Semi-quantification of COX-2 mRNA expression. Data are expressed as the ratio of VCOX-2/VGAPDH.

3 讨论

COX-2被认为是一种肿瘤抗凋亡分子，通过抑制肿瘤细胞凋亡、促进肿瘤组织血管生成以及提高肿瘤细胞的扩散能力等机制，参与结肠癌等多种肿瘤的发生与发展[1]。然而，COX-2在肝癌中所起的作用尚不明确[9]。本研究首次发现环氧合酶抑制剂双氯芬酸对表达COX-2的肝癌细胞的增殖具有选择性抑制作用。以往的研究显示，环氧合酶抑制剂仅在超出生理剂量的较高浓度(>50 μmol/L)时对肝癌细胞具有抗增殖作用[6]，并且对不表达COX-2的细胞也有相似作用，此作用可能依赖于非COX-2途径[7]。而本实验发现对于高表达COX-2的肝癌细胞HepG2和Hep3B，双氯芬酸在10 μmol/L的低浓度时就能明显地抑制细胞增殖，半数抑制浓度分别为70.54和48.39 μmol/L，而对几乎不表达COX-2的正常肝细胞QSG-7701作用弱，半数抑制浓度为189.91 μmol/L。上述结果表明双氯芬酸特异性地抑制表达COX-2的肝癌细胞的增殖，提示COX-2在肝癌细胞的增殖中发挥重要作用。

实验还发现，双氯芬酸在抑制肝癌细胞增殖的同时，明显升高COX-2 mRNA的表达。这与一些学者在对结肠癌的研究中得到的结论有所不同。Boolbol等[10]发现环氧合酶抑制剂苏林酸具有抑制结肠癌小鼠肿瘤组织COX-2表达的作用，Yao等[11]的研究也显示，COX-2选择性抑制剂Rofecoxib可抑制结肠癌组织COX-2的表达，从而起到促进肿瘤凋亡的作用。上述结果提示，COX-2在肝癌细胞中可能起着与在结肠癌细胞中不同的调节作用。我们在实验中同时发现，治疗肝癌常用的化疗药5-Fu亦可明显升高COX-2 mRNA的表达。最近有研究报道，5-Fu通过AMP活化的蛋白激酶上调COX-2的表达[12]。还有研究显示，化疗药如丝裂霉素或阿霉素引起的细胞DNA损伤可诱导抑癌基因p53的表达，p53通过Ras/Raf/MAPK途径促进COX-2的表达[13]。那么，在肝癌细胞中，双氯芬酸是否通过上述途径上调COX-2的表达值得进一步研究。本研究发现的COX-2在肝癌细胞中与在其他肿瘤细胞中的不同调节作用有助于进一步了解COX-2在肝癌细胞增殖过程中的意义。

参考文献：

[1]Cao Y, Prescott SM. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer[J]. J Cell Physiol, 2002, 190(3): 279-86.

[2]Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JK, et al. Cyclo-oxygenase 2: A pharmacological target for prevention of cancer[J]. Lancet Oncol, 2001, 2(9): 544-51.

[3]Shiota G, Okubo M, Noumi T, et al. Cyclooxygenase-2 expression in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatogastroenterology, 1999, 46(25): 407-12.

[4]Morinaga S, Yamamoto Y, Noguchi Y, et al. Cyclooxygenase-2 mRNA is up-regulated in cirrhotic or chronic hepatitis liver adjacent to hepatocellular carcinoma[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2002, 17(10): 1110-6.

[5]Bae SH, Jung ES, Park YM, et al. Expression of cyclooxygenase-2(COX-2) in hepatocellular carcinoma and growth inhibition of hepatoma cell lines by a COX-2 inhibitor, NS-398[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(5): 1410-8.

[6]Cheng J, Imanishi H, Amuro Y, et al. NS-398, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, inhibited cell growth and induced cell cycle arrest in human hepatocellular carcinoma cell lines[J]. Int J Cancer, 2002, 99(5): 755-61.

[7]Park MK, Hwang SY, Kim JO, et al. NS398 inhibits the growth of Hep3B human hepatocellular cells via caspase-independent apoptosis[J]. Mol Cells, 2004, 17(1): 45-50.

[8]Tan AS, Berridge MV. Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: a simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents[J]. J Immunol Methods, 2000, 238(1-2): 59-68.

[9]Hironori K. Hepatocellular carcinoma: is there a potential for chemoprevention using cyclooxygenase-2 inhibitors[J]. Cancer, 2003, 98(4): 661-7.

[10]Boolbol SK, Dannenberg AJ, Chadburn A, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression and tumor formation are blocked by sulindac in a murine model of familial adenomatous polyposis[J]. Cancer Res, 1996, 56(11): 2556-60.

[11]Yao M, Kargman S, Lam EC, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 by rofecoxib attenuates the growth and metastatic potential of colorectal carcinoma in mice[J]. Cancer Res, 2003, 63(3): 586-92.

[12]Hwang JT, Ha J, Park OJ. Combination of 5-fluorouracil and genistein induces apoptosis synergistically in chemo-resistant cancer cells through the modulation of AMPK and COX-2 signaling pathways[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 332(2): 433-40.

[13]Han JA, Kim JI, Ongusaha PP, et al. p53-mediated induction of Cox-2 counteracts p53- or genotoxic stress-induced apoptosis[J]. EMBO J, 2002, 21(21): 5635-44.

回结果列表