

[文章编号] 1000- 4718(2005)09- 1775- 04

COX- 2 抑制剂对肺癌裸鼠移植瘤血管生成素基因表达的影响

邢丽华^{1,2△}, 张珍祥¹, 徐永健¹, 张惠兰¹, 刘剑波¹⁽¹华中科技大学同济医学院附属同济医院卫生部呼吸疾病重点研究室, 湖北 武汉 430030;²郑州大学第一附属医院呼吸内科, 河南 郑州 450052)

[摘要] 目的: 探讨环氧酶- 2(COX- 2)抑制剂尼米舒利(NIM)对肺癌裸鼠移植瘤的血管生成素基因表达的影响及意义。方法: 人肺癌 A549 细胞接种于裸鼠皮下, 建立肺癌裸鼠移植瘤模型并予 NIM 治疗, 计算 NIM 的抑瘤率, RT- PCR 检测裸鼠移植瘤组织血管生成素- 1 2(Ang- 1, Ang- 2) mRNA 表达, 免疫组织化学法测定裸鼠移植瘤组织微血管密度(MVD)。结果: NIM 可有效抑制裸鼠移植瘤的生长, 其抑瘤率为 43.02%。NIM 治疗组裸鼠移植瘤组织 Ang- 2 mRNA 水平显著低于对照组($P < 0.01$), Ang- 1 mRNA 水平无显著改变($P > 0.05$), Ang- 2/Ang- 1 mRNA 比值下降($P < 0.01$); 同时 MVD 明显低于对照组($P < 0.01$)。结论: COX- 2 抑制剂 NIM 可下调 Ang- 2 基因表达, 改变 Ang- 2/Ang- 1 mRNA 比值, 该作用可能是 COX- 2 抑制剂抑制肿瘤血管生成从而抑制肿瘤生长的机制之一。

[关键词] 环氧酶- 2; 肺癌; 血管生成; 血管生成素

[中图分类号] R734.2; R979.1

[文献标识码] A

Influence of COX- 2 inhibitor on angiotensin expression of human lung cancer xenografts in nude mice

XING Li- hua^{1,2△}, ZHANG Zhen- xiang¹, XU Yong- jian¹, ZHANG Hui- lan¹, LIU Jian- bo¹⁽¹Research Laboratory of Respiratory Disease, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; ²Department of Respiratory Disease, the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University Zhengzhou 450052, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the influence and significance of nimesulide (NIM), a selective cyclooxygenase 2 (COX- 2) inhibitor, on angiotensin expression of human lung cancer xenografts in nude mice. **METHODS:** Human A549 lung cancer cells were inoculated subcutaneously in athymic nude mice to establish xenograft models. The mice were divided into NIM group and control group randomly. Mice in NIM group and control group were administered with NIM (6 mg/kg) and saline into stomachs respectively once a day for 35 days. The inhibitory rate was calculated and expressions of angiotensin- 1, - 2 (Ang- 1, Ang- 2) mRNA in xenografts were measured by semiquantitative reverse transcription- polymerase chain reaction (RT- PCR) analysis. Microvessel density (MVD) in xenografts was assessed immunohistochemically using antibody against F VIII. **RESULTS:** NIM inhibited the xenografts growth significantly and the inhibitory rate was 43.02%. Expression of Ang- 2 mRNA but not Ang- 1 mRNA was significantly reduced ($P < 0.01$), thus Ang- 2/Ang- 1 mRNA ratio was also reduced ($P < 0.01$) in xenografts of NIM group compared with control group. MVD in xenografts of NIM group was significantly lowered down ($P < 0.01$). **CONCLUSION:** NIM down- regulates the expression of Ang- 2 gene and Ang- 2/Ang- 1 mRNA ratio, which may be one of the mechanisms involved in angiogenesis inhibition of COX- 2 inhibitor.

[KEY WORDS] Cyclooxygenase 2; Lung cancer; Angiogenesis; Angiotensin

肿瘤进展依赖于新生血管形成, 肿瘤细胞可产生多种因子影响血管生成和肿瘤生长。Cao 等^[1]发现环氧酶(cyclooxygenase, COX)的诱导型 COX- 2

在多种肿瘤细胞中表达上调, 且与肿瘤新生血管的生成密切相关; COX- 2 抑制剂可抑制血管生成及肿瘤生长, 但其机制尚不完全清楚。一些研究^[2, 3]认为

[收稿日期] 2003- 12- 28

[修回日期] 2004- 03- 25

△通讯作者 Tel: 13838095088, 0371- 6849045; E- mail: lhxingwh@sina.com.cn

COX-2 抑制剂对肿瘤及血管生成的作用,部分可能是通过抑制一些促血管生成因子的表达。血管生成素(angiotensin, Ang)是近年才发现的一族分泌性蛋白分子,可作用于内皮细胞特异性酪氨酸受体 Tie-2,在维持血管生成的平衡中发挥重要作用。本实验旨在研究 COX-2 抑制剂尼米舒利(nimesulide, NIM)对肺癌裸鼠移植瘤组织 Ang-1、Ang-2 基因表达及肿瘤生长的影响,以期进一步探讨 COX-2 抑制剂的作用机制。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 人肺癌细胞株 A549 购自武汉大学典型生物冷藏中心,由本实验室传代培养。培养液为含 10% 新生牛血清、 1×10^5 U/L 青霉素及 1×10^5 U/L 链霉素的 RPMI-1640, 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.2 SPF 级 BALB/C 裸鼠 16 只,雌性,3-4 周龄,体重 16-19 g,华中科技大学同济医学院实验动物中心提供并饲养。

1.3 药物及试剂 NIM (Sigma 公司), RPMI-1640 培养基及胰蛋白酶 (Gibco 公司), 新生牛血清 (武汉三利生物制品厂), Trizol™ 试剂、逆转录及 PCR 扩增试剂 (Promega 公司), 兔抗人 F VIII 抗体、链霉卵白素过氧化酶 (streptavidin peroxidase, SP) 试剂盒及二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色试剂盒 (Zymed 公司)。

2 方法

2.1 移植瘤模型建立及分组 16 只裸鼠随机分为对照组和 NIM 治疗组,每组 8 只,于裸鼠右下背部皮下接种处于对数生长期的 A549 细胞 1×10^7 cells/0.2 mL。NIM 治疗组于接种前 1 d 开始 NIM $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, ig; 对照组灌注等量生理盐水,实验共 35 d。实验中注意观察裸鼠进食及排便情况,实验终末取出移植瘤并称量瘤结节重量,以瘤结节重量计算抑瘤率: 抑瘤率 (%) = (对照组重量 - 实验组重量) / 对照组重量 $\times 100\%$ 。

2.2 RT-PCR 检测 Ang-1、Ang-2 基因表达 移植瘤组织 50-100 mg,按 Trizol™ 试剂盒 (Gibco 公司) 说明一步法提取总 RNA,用 DNA/RNA 测定仪 (英国 PHARMACIA 产品) 测定 RNA 纯度并定量。逆转录反应后,特异性 PCR 扩增 Ang-1、Ang-2 和内参照 β -actin。引物序列为 Ang-1: 上游 5' - GATGGA-CACAGTCCACAACC-3', 下游 5' - ATTCCTTCCAGC-CTCCTTTGG-3', 扩增片段长度 269 bp; Ang-2: 上游

5' - GTCCACCTGAGGAACTGTCT-3', 下游 5' - TTGTGACAGCAGCGTCTGTA-3', 扩增片段长度 289 bp; β -actin: 上游 5' - GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3', 下游 5' - CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC-3', 扩增片段长度 540 bp。6 μ L PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶中电泳,溴化乙锭 (ethidium bromide, EB) 显色,目的条带用图像分析系统作光密度测定,Ang-1、Ang-2 与 β -actin 光密度的比值作为 mRNA 的相对含量。

2.3 免疫组化法检测微血管密度 取移植瘤组织 10% 甲醛液固定,石蜡切片,免疫组化染色按 SP 试剂盒说明书进行操作, F VIII 因子工作液浓度为 1:100。采用 Weidner 等^[4] 法评价微血管密度 (microvessel density, MVD)。每一切片在低倍镜 ($\times 40$) 下选 3 个微血管最多的区域即“热点”,然后在高倍镜 ($\times 400$) 下计数。任何被染成棕黄色孤立的内皮细胞或内皮细胞簇团,只要与临近微血管分开,就把它们作为一个微血管。结果用 3 个视野下微血管数目的平均数来表示。

3 统计学处理

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, *t* 检验采用 SPSS 11.0 软件完成。

结 果

1 裸鼠移植瘤实验结果

裸鼠皮下接种 A549 细胞后约 1 周左右,接种部位可触及圆形或椭圆形结节,在实验过程中裸鼠均未出现明显的进食及排便异常。实验终末移植瘤结节称重,对照组瘤结节平均重量为 (822.7 ± 101.2) mg, NIM 治疗组为 (468.8 ± 58.1) mg,二者有显著差异 ($P < 0.01$); NIM 的抑瘤率为 43.02%。见图 1。

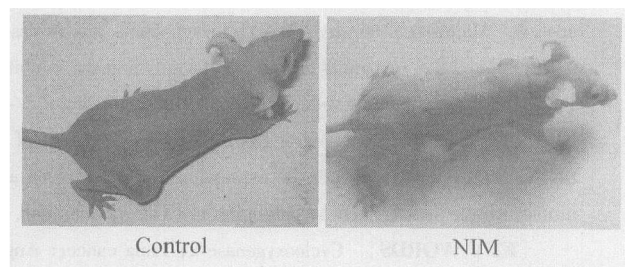


Fig 1 Human lung cancer xenografts in nude mice (control: control group; NIM: NIM group).

图 1 裸鼠移植瘤结果

2 NIM 对裸鼠移植瘤 Ang-1、Ang-2 基因表达的影响

对照组及 NIM 治疗组裸鼠移植瘤组织均可检测

到 Ang-1、Ang-2 mRNA 表达, NIM 治疗组 Ang-2 mRNA 显著低于对照组 ($P < 0.01$); Ang-1 mRNA 表达则无明显下降 ($P > 0.05$); NIM 治疗组 Ang-2/Ang-1 mRNA 比值显著下降 ($P < 0.01$)。见图 2、表 1。

表 1 裸鼠移植瘤组织 Ang-1、Ang-2 基因表达定量分析
Tab 1 Quantitative analysis of Ang-1, Ang-2 mRNA expression in nude mice xenograft tissues ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Group	Ang-1 mRNA	Ang-2 mRNA	Ang-2/Ang-1 ratio
Control	0.3839 ± 0.0501	0.6024 ± 0.0289	1.5847 ± 0.1948
NIM	0.3502 ± 0.0317*	0.2032 ± 0.0185**	0.5825 ± 0.0621**

* $P > 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

3 裸鼠移植瘤组织 MVD

显微镜下观察, 对照组肿瘤组织新生血管丰富, MVD 计数为 (30.59 ± 9.21); NIM 治疗组血管减少, MVD 计数 (9.43 ± 2.45) 低于对照组 ($P < 0.01$)。见图 3。

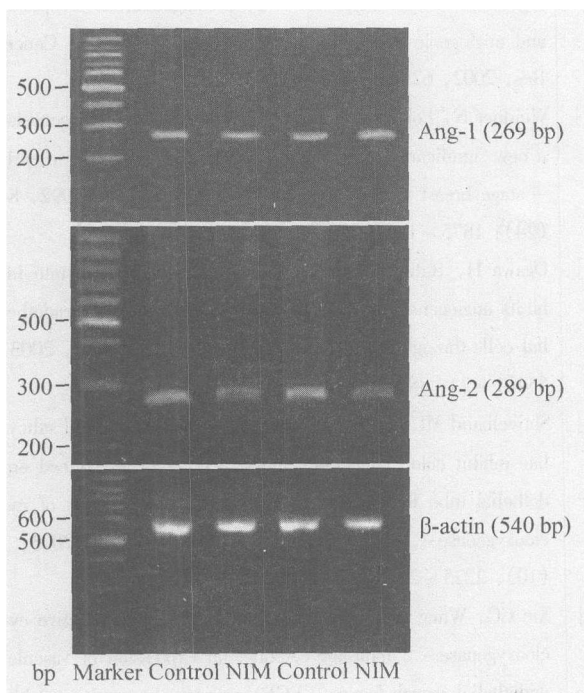


Fig 2 Ang-1 and Ang-2 mRNA expression in nude mice xenograft tissues (marker: 100 bp DNA ladder; control: control group; NIM: NIM group).

图 2 裸鼠移植瘤组织 Ang-1、Ang-2 mRNA 表达的 RT-PCR 结果

讨 论

COX 是花生四烯酸生物合成前列腺素和血栓素途径的关键酶。COX 有两种异构体, COX-1 和 COX-2。COX-1 被认为是“看家基因”, 它在多数组织

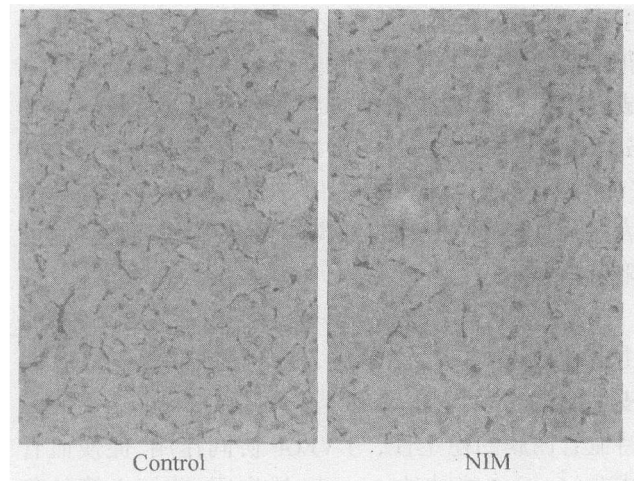


Fig 3 MVD count in nude mice xenograft tissues (paraffin section, DAB staining, × 200) (control: control group; NIM: NIM group).

图 3 裸鼠移植瘤组织 MVD 结果 (石蜡切片, DAB 显色, × 200)

中组成性表达; COX-2 可由多种刺激如白介素-4 (interleukin-4, IL-4)、IL-13、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等细胞因子、激素和丝裂素所诱导产生。Cao 等^[1] 研究认为, COX-2 在多种人类恶性肿瘤如结肠癌、胃癌、肺癌、乳腺癌及头颈部肿瘤等中表达增高, 并认为肿瘤组织中 COX-2 的高表达与血管生成增加、肿瘤侵袭及肿瘤细胞抗凋亡有关。新生血管生成是肿瘤生长和转移的前提, 抑制肿瘤血管生成是抑制肿瘤进展和播散的引人注目的方法, 因此近年来 COX-2 与肿瘤血管生成成为研究关注的焦点。Ogawa 等^[5] 观察到丁酸钠可抑制原代培养的人肠微血管内皮细胞 (human intestinal microvascular endothelial cells, HIMEC) COX-2 的表达及前列腺素 PGE₂ 及 PGI₂ 的生成, 从而抑制血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 诱导的 HIMEC 细胞增殖、迁移和管腔形成; 加入 PGI₂ 类似物后对血管生成的抑制作用可部分逆转, 提示下调 COX-2 表达和 PG 生成可抑制血管生成。Shtivelband 等^[6] 发现用来自结肠癌 DLD-1, HT-29 或 HCT-116 细胞株的条件培养基培养人内皮细胞, 可诱导内皮细胞 COX-2 蛋白表达; 非甾体抗炎药 (nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 阿司匹林 (aspirin) 和水杨酸钠 (sodium salicylate) 在药理浓度下可抑制肿瘤或 VEGF 刺激诱导的 COX-2 表达, 同时有效地阻断内皮细胞管腔形成。在体实验^[7] 也发现 COX-2 抑制剂 celebrex 可抑制胰腺癌裸鼠移植瘤的生长、下调 VEGF 的表达及血管生成。虽然体外及体内研究均证实下调 COX-2 可抑制血管

生成,但其机制尚不清楚,有学者认为^[4] COX-2 将花生四烯酸转化为前列腺素,后者可诱导促血管生成因子包括 VEGF、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, b-FGF)、转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)及 IL-6 等的表达,促进新生血管生成;抑制 COX-2 的活性,则可阻滞该作用。

Ang 是近年才发现的一族分泌性蛋白分子,主要由 Ang-1 和 Ang-2 组成,是特异性作用于血管内皮细胞的生长因子,Tie2 是共同受体。Ang-1 能保持血管内膜的稳定性,与 VEGF 协同作用,促使血管成熟;Ang-2 能拮抗 Ang-1 的作用,破坏血管的稳态。Ang-1 和 Ang-2 是新血管形成重要的调节因子。我们的前期研究发现 COX-2 在肺癌尤其是腺癌中表达增高,COX-2 在肺癌组织中的表达量高于相对应的癌旁正常组织及良性病变组织^[8],体外实验显示 COX-2 抑制剂 NIM 可抑制肺癌 A549 细胞的生长及 VEGF 的表达(待发表),提示 COX-2 参与肺癌的发病,COX-2 抑制剂 NIM 抑制肿瘤细胞生长的机制之一可能与抑制血管生成有关。我们的前期研究^[9]还发现 Ang-2 在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)组织中的表达率及表达量均高于相对应的癌旁正常组织,提示 Ang-2 基因在肺癌的发生中也起了重要作用。在肺癌的发病中是否存在 Ang-1 和 Ang-2 的失衡,COX-2 抑制剂 NIM 抑制血管生成的机制中是否也包含了对 Ang 基因进行重新调整,目前尚未见到相关报道。

本研究结果显示,COX-2 抑制剂 NIM 对肺癌裸鼠移植瘤生长有明显的抑制作用,且在实验过程中裸鼠均未出现 NSAIDs 常见的胃肠道副作用,这可能与 NIM 选择性抑制 COX-2 而对 COX-1 作用小有关。本研究发现肺癌裸鼠移植瘤均可表达 Ang-1 和 Ang-2 基因,但 NIM 对二者的抑制作用则有选择性,NIM 对 Ang-2 基因表达有明显的抑制作用,而对 Ang-1 基因表达则无明显作用,对 Ang-2 基因表达的抑制改变了 Ang-2/Ang-1 的比值,推测由此血管稳态得以加强,不利于肿瘤新生血管的生成。对移植瘤组织 MVD 的研究再次从形态学上证实了上述推测,在镜下观察到 NIM 治疗组微血管显著减少;而与之相反,对照组则微血管丰富。本研究提示 COX-2 抑制剂可抑制在体肺癌移植瘤新生血管的

形成从而抑制肿瘤的生长,Ang-2 基因表达下调及 Ang-2/Ang-1 比值降低可能是其重要的作用机制之一。

总之,COX-2 抑制剂可抑制动物模型肺癌的生长,其抗癌机制与抑制肿瘤新生血管形成有关。但 COX-2 抑制剂能否安全、有效地用于人类肺癌的治疗,有待临床研究进一步证实。

[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): 279-286.
- [2] Yoshida S, Amano H, Hayashi I, et al. COX-2/VEGF-dependent facilitation of tumor-associated angiogenesis and tumor growth *in vivo*[J]. Lab Invest, 2003, 83(10): 1385-1394.
- [3] Sales KJ, Katz AA, Howard B, et al. Cyclooxygenase-1 is up-regulated in cervical carcinomas: autocrine/paracrine regulation of cyclooxygenase-2, prostaglandin E receptors, and angiogenic factors by cyclooxygenase-1[J]. Cancer Res, 2002, 62(2): 424-432.
- [4] Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma[J]. J Natl Cancer Inst, 1992, 84(24): 1875-1887.
- [5] Ogawa H, Rafiee P, Fisher PJ, et al. Sodium butyrate inhibits angiogenesis of human intestinal microvascular endothelial cells through COX-2 inhibition[J]. FEBS Lett, 2003, 554(1-2): 88-94.
- [6] Shtivelband MI, Juneja HS, Lee S, et al. Aspirin and salicylate inhibit colon cancer medium- and VEGF-induced endothelial tube formation: correlation with suppression of cyclooxygenase-2 expression[J]. J Thromb Haemost, 2003, 1(10): 2225-2233.
- [7] Xie CG, Wang XP, Dong YW, et al. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor celebrex on expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in pancreatic carcinoma[J]. Ai Zheng, 2003, 22(10): 1042-1046.
- [8] 邢丽华,张珍祥,徐永健. 环氧酶-2 基因在肺癌组织中的表达及意义[J]. 中国肿瘤临床, 2003, 30(10): 728-730.
- [9] 邢丽华,张珍祥,徐永健. 血管生成素-2 基因在非小细胞肺癌组织中的表达及意义[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2003, 26(11): 730-731.