

[文章编号] 1000- 4718(2005)11- 2197- 04

# COX- 2 抑制剂(NS- 398)对结肠癌 HT- 29 细胞体外侵袭力的作用及 CD44v6 nm23- H1 基因的调节

贾晓青, 阎明, 孟繁立, 钟宁, 夏光涛, 李延青, 张尚忠<sup>△</sup>  
(山东大学齐鲁医院消化科, 山东 济南 250012)

[摘要] 目的: 研究 NS- 398 对结肠癌 HT- 29 细胞体外侵袭力的作用及 CD44v6 nm23- H1 基因的调节。方法: 通过流式细胞仪检测 COX- 2 和 CD44v6 的表达, MTT 检测细胞活性, 改良的 Boyden 小室法观察 HT- 29 细胞侵袭重组基底膜的能力, RT- PCR 观察 nm23- H1 mRNA 的表达。结果: HT- 29 细胞 COX- 2 表达阳性, 0.1、1.0、10 μmol/L NS- 398 可显著抑制 HT- 29 细胞侵袭重组基底膜的能力, 且上述作用与 NS- 398 的毒性作用无关。NS- 398 可下调 CD44v6 的表达, 上调 nm23- H1 mRNA 的表达。结论: NS- 398 具有抑制结肠癌细胞 HT- 29 体外侵袭力的作用, 下调 CD44v6 的表达和上调 nm23- H1 mRNA 的表达可能是其作用机制。

[关键词] HT- 29 细胞; NS- 398, 结肠肿瘤; 侵袭, 肿瘤; CD44v6; nm23- H1; 前列腺内过氧化物合酶

[中图分类号] R735.35

[文献标识码] A

## Effect of NS- 398 on invasion of colon cancer HT- 29 cells *in vitro* and its regulation by CD44v6 and nm23- H1 genes

JIA Xiao- qing, YAN Ming, MENG Fan- li, ZHONG Ning, XIA Guang- tao, LI Yan- qing, ZHANG Shang- zhong

(Department of Gastroenterology, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To study the anti- invasive effect of NS- 398 on colon cancer cell line HT- 29 *in vitro* and its regulation by CD44v6 and nm23- H1 genes. **METHODS:** Flow cytometry was used to detect the expression of COX- 2 and CD44v6 in HT- 29 cells. MTT was used for cell survival rate tests. The modified Boyden chamber model was used for quantitative invasion assay. RT- PCR was used to detect the expression of nm23- H1 mRNA. **RESULTS:** Flow cytometry analysis showed that COX- 2 was positive in HT- 29 cells. NS- 398 had significant inhibitory effects on invasion of HT- 29 cells, which had no relation with its cytotoxicity. NS- 398 down- regulated the expression of CD44v6 and up- regulated the expression of nm23- H1 mRNA. **CONCLUSION:** NS- 398 has an anti- invasive effect on HT- 29 cells *in vitro*. Down- regulation of CD44v6 and up- regulation of nm23- H1 may be its underlying mechanisms.

[KEY WORDS] HT- 29 cells; NS- 398; Colonic neoplasms; Invasiveness, neoplasm; CD44v6; nm23- H1; Prostaglandin- endoperoxide synthase

环氧合酶- 2(cyclooxygenase- 2, COX- 2) 是花生四烯酸代谢的关键酶, 与肿瘤的发生发展密切相关, 可促进肿瘤的侵袭和转移潜能<sup>[1,2]</sup>。NS- 398 是一种选择性的 COX- 2 抑制剂<sup>[3]</sup>, 因不抑制 COX- 1 的活性而胃肠道不良反应较小, 是一种理想的抗肿瘤药物。本试验拟观察选择性 COX- 2 抑制剂 NS- 398 对结肠癌细胞系 HT- 29 体外侵袭力的作用, 并初步探讨其对肿瘤侵袭、转移相关基因 CD44v6 和 nm23- H1 的调节。

## 材 料 和 方 法

### 1 细胞系

结肠癌细胞系 HT- 29 购自山东省医学科学院肿瘤生物治疗中心, 小鼠成纤维细胞 NIH 3T3 购自山东省医学科学院免疫室。

### 2 试剂和仪器

NS- 398 购自 Sigma 公司, FITC 标记的小鼠抗人 COX- 2 单克隆抗体、小鼠抗人 CD44v6 单克隆抗体及用于免疫阴性对照的 IgG<sub>1</sub>- FITC 为美国 Cayman

[收稿日期] 2004- 03- 09

[修回日期] 2004- 06- 18

△通讯作者 Tel: 0531- 8127005; E- mail: xiaqingjia@126.com

Chemical 公司产品,人工基底膜胶(matrigel)为美国 BD 公司产品,牛血清白蛋白(BSA)与四氮唑盐(MTT)为 Sigma 公司产品。Trizol 及 Taq 酶购自上海生工生物公司,逆转录酶 M-MLV 为美国 MBI 公司产品。24 孔 Transwell 细胞培养小室为 Costar 公司产品;酶联免疫检测仪(日本产, BIO-RAD 450 型);流式细胞仪为 FACScan 型,美国 BD 公司生产。

### 3 方法

**3.1 流式细胞仪检测 COX-2 的表达** 收集 HT-29 细胞悬液离心,以 PBS 漂洗后再离心调节细胞悬液的浓度为  $10^9 \cdot L^{-1}$ 。取两支试管各加细胞悬液 500  $\mu L$ ,其中一支加 FITC 标记的小鼠抗人 COX-2 单克隆抗体 20  $\mu L$ ,另一支加阴性对照单抗 IgG<sub>1</sub>-FITC,避光反应 20 min,待测。上机前调整仪器的变异系数并稳定在 2% 以内,上机后收集 20 000 个细胞,以荧光强度表示 COX-2 的表达水平。

**3.2 改良的 Boyden 小室法检测 HT-29 细胞体外侵袭力** 运用改良的 Boyden 小室法<sup>[4]</sup>,在聚碳酸酯微孔滤膜上包被人工基底膜胶(matrigel, 50  $\mu L$ /well)置于培养箱中聚合 1 h。实验时在下室加入 600  $\mu L$  NIH 3T3 细胞无血清培养 24 h 的上清作趋化因子,在上室接种对照及 0.1  $\mu mol/L$ 、1.0  $\mu mol/L$ 、10  $\mu mol/L$  NS-398 处理 72 h 的肿瘤细胞( $4 \times 10^8 \cdot L^{-1}$ ) 100  $\mu L$ ,置培养箱中 20 h 后取出,用湿棉签仔仔细擦掉位于膜内表面未穿过膜的细胞,10% 多聚甲醛固定 30 min,于 200 倍倒置显微镜下每膜计数上、下、左、右、中 5 个视野的侵袭细胞数,计算平均值。每组设 3 个滤膜。凡抑制率(inhibition rate, IR)达 30% 以上,经统计学处理  $P < 0.05$  者认为有抗侵袭活性。

$$\text{抑制率} = (\text{对照组侵袭细胞数} - \text{实验组侵袭细胞数}) / \text{对照组侵袭细胞数} \times 100\%$$

**3.3 MTT 法检测细胞活力** 取对数生长期的 HT-29 细胞用胰蛋白酶消化,将  $2 \times 10^3$  个细胞接种于 96 孔培养板中,待 24 h 细胞贴壁后进行实验。实验组加入 NS-398 使其终浓度分别为 0.1  $\mu mol/L$ 、1  $\mu mol/L$ 、10  $\mu mol/L$ ,对照组加相同剂量的生理盐水,各组设 6 个平行孔,培养 72 h 后加入 5 g/L MTT 液(PBS 稀释) 20  $\mu L$ ,放入细胞培养箱中继续培养 4 h,小心弃去各孔培养液,加入 150  $\mu L$  DMSO,振荡 10 min 至结晶全部溶解,用酶标仪在 570 nm 处测定吸光度值(A),计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = \text{实验组 A 值} / \text{对照组 A 值} \times 100\%$$

**3.4 流式细胞仪检测 CD44v6 的表达** 除以 CD44v6 单克隆抗体代替 COX-2 单克隆抗体以外,实验方法与 COX-2 的检测相同。

**3.5 RT-PCR 分析 nm23-H1 mRNA 的表达** 收集

0.1  $\mu mol/L$ 、1  $\mu mol/L$ 、10  $\mu mol/L$  NS-398 处理 72 h 的 HT-29 细胞及对照组细胞, -20  $^{\circ}C$  保存备用。按 Trizol 试剂盒说明书提取细胞总 RNA,以 1  $\mu g$  RNA 为模板,按照 M-MLV 逆转录试剂盒说明书合成 cDNA,并进行聚合酶链反应(PCR)。PCR 条件为 94  $^{\circ}C$  1 min, 58  $^{\circ}C$  1 min, 72  $^{\circ}C$  1 min, 循环 35 次,末次延长 7 min,经 2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外光下观察、照相。RT-PCR 所用的 nm23-H1 及  $\beta$ -actin 引物由上海生工生物工程公司合成, nm23-H1: 上游引物为 5' - GTGAAGGTCGGAGTCAAC - 3', 下游引物为 5' - GAGATGATGACCCITTTTGGC - 3',  $\beta$ -actin 上游引物为 5' - GTGGGGCGCCCCAGGCACCA - 3', 下游引物为 5' - CTCCTTAATGTCACGCACGATTT - 3', 扩增片段长度分别为 533 bp 和 500 bp,  $\beta$ -actin 为内参照。凝胶电泳图输入美国 Kodak 凝胶分析系统,应用 ID Image Analysis Software 进行表达强度分析,以 nm23-H1/ $\beta$ -actin 平均 A 值之比表示 nm23-H1 的相对表达强度。

### 4 统计学处理

计量资料数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间参数比较采用独立样本的  $t$  检验,统计计算由 SPSS 10.0 统计软件完成。

## 结 果

### 1 COX-2 在 HT-29 细胞的表达

流式细胞术检测显示阴性对照 COX-2 表达的荧光强度为  $10.915 \pm 1.549$ ,而 HT-29 细胞为  $66.070 \pm 7.665$ ,显著高于阴性对照。

### 2 体外侵袭能力

0.1、1.0、10  $\mu mol/L$  NS-398 处理 72 h 可显著抑制 HT-29 细胞的侵袭能力,抑制率分别为 22.74%、42.35% 和 58.61%,与对照组均差异显著( $P < 0.01$ ),因 0.1  $\mu mol/L$  NS-398 对细胞侵袭的抑制率  $\leq 30\%$  而认为这一剂量没有抗侵袭作用,而 1.0  $\mu mol/L$ 、10  $\mu mol/L$  NS-398 可显著抑制 HT-29 细胞的体外侵袭力(表 1)。

### 3 NS-398 对细胞生物活性的检测

0.1  $\mu mol/L$ 、1.0  $\mu mol/L$ 、10  $\mu mol/L$  NS-398 处理 72 h 后 HT-29 细胞存活率分别为 94.8%、92.57% 和 91.56%,与对照组差异无显著( $P > 0.05$ )。

### 4 NS-398 对 CD44v6 表达的影响

阴性对照 CD44v6 表达的荧光强度为  $1.090 \pm 0.180$ ,而未处理组细胞为  $11.370 \pm 1.047$ ,显著高于阴性对照( $P < 0.01$ )。经 0.1  $\mu mol/L$  NS-398 处理后 CD44v6 表达的荧光强度为  $9.710 \pm 1.448$ ,与未处

理组细胞相比无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 而  $1 \mu\text{mol/L}$ 、 $10 \mu\text{mol/L}$  NS-398 处理后 CD44v6 表达的荧光强度分别为  $8.083 \pm 1.207$  和  $4.367 \pm 0.683$ , 与对照组比差异显著 ( $P < 0.01$ , 图 1)。

**5 NS-398 对 HT-29 细胞 nm23-H1 mRNA 表达的影响**

应用 RT-PCR 检测  $0.1 \mu\text{mol/L}$ 、 $1 \mu\text{mol/L}$ 、 $10 \mu\text{mol/L}$  NS-398 作用 72 h 后 HT-29 细胞 nm23-H1 的表达, 图 2 反应产物电泳图显示 nm23-H1 表达逐渐增加, 呈现剂量依赖性。

表 1 NS-398 对结肠癌细胞 HT-29 体外侵袭力的影响  
Tab 1 Effect of NS-398 on invasion of HT-29 cells *in vitro* ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

	Invasion of HT-29 cells	
	Cell number	IR(%)
Control	$48.76 \pm 2.52$	—
$0.1 \mu\text{mol/L}$ NS-398	$37.67 \pm 2.36^{**}$	22.74
$1.0 \mu\text{mol/L}$ NS-398	$28.11 \pm 3.00^{**}$	42.35
$10 \mu\text{mol/L}$ NS-398	$20.18 \pm 3.00^{**}$	58.61

\*\*  $P < 0.01$  vs control group.

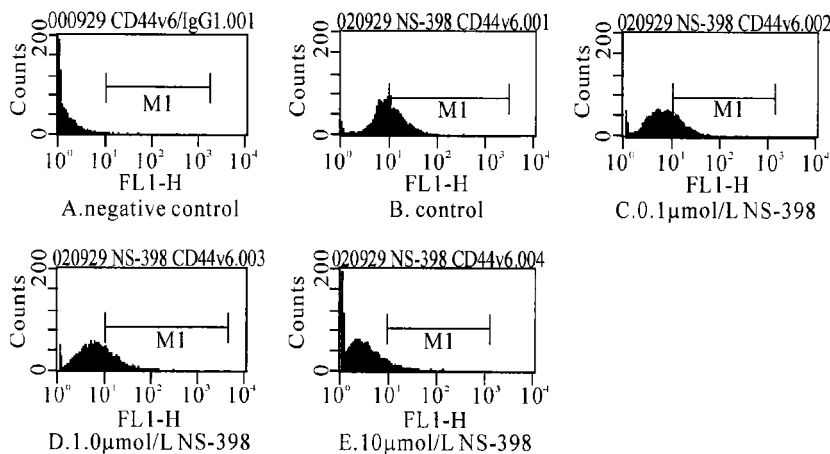


Fig 1 Effect of NS-398 on expression of CD44v6 in HT-29 cells.

图 1 NS-398 对 HT-29 细胞 CD44v6 表达的影响

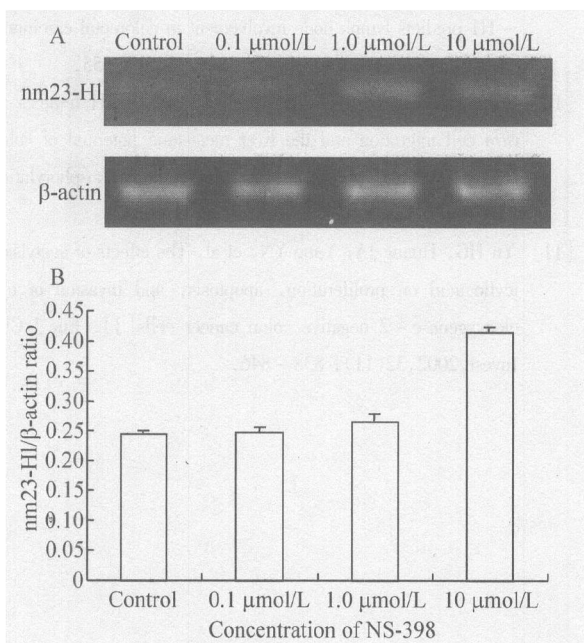


Fig 2 The effect of NS-398 on the expression of nm23-H1 mRNA. A: analysis of RT-PCR products of nm23-H1 and  $\beta$ -actin; B: the expression of nm23-H1 treated with NS-398 by semi-quantitative RT-PCR.

图 2 RT-PCR 法检测 NS-398 对 nm23-H1 mRNA 表达的影响

讨 论

侵袭与转移是恶性肿瘤最本质的特征之一, 也是导致肿瘤患者死亡的主要原因。侵袭是转移的前奏, 转移是侵袭的结果, 肿瘤细胞的侵袭是以细胞的粘附、运动和变形为基础的复杂病理生理过程。环氧合酶是花生四烯酸代谢的关键酶, 有 COX-1 和 COX-2 两种同工酶<sup>[5]</sup>, 近年研究表明 COX-2 的表达与结肠癌的临床病理分期和预后有关, 转染反义 COX-2 cDNA 至结肠癌细胞可使其侵袭、转移能力降低<sup>[1]</sup>。细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 是肿瘤侵袭和转移的天然屏障, ECM 的破坏被认为是肿瘤转移所必需的。Scrapers 等<sup>[6]</sup>发现 ECM 中断或缺失病人的 5 年生存率显著低于基底膜完整者, 肿瘤的临床分期与基底膜的染色情况显著相关。我们在实验中发现固定表达 COX-2 的 HT-29 细胞具有侵袭基底膜的能力, 经不同浓度的 NS-398 处理后, 其体外侵袭能力显著下降, 呈剂量依赖性, 表明 NS-398 可显著抑制 HT-29 细胞的体外侵袭力。我们通过 MTT 法检测 NS-398 对 HT-29 细胞活性的影响, 发现经  $0.1 \mu\text{mol/L}$ 、 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 、 $10 \mu\text{mol/L}$  NS-398

处理 72 h 后, HT- 29 细胞存活率与对照组相比无显著差异, 表明 NS- 398 的上述作用与其细胞毒性无关。

CD44 是分布极为广泛的细胞表面跨膜糖蛋白, 与结肠癌的侵袭和转移密切相关<sup>[7]</sup>。Mulder 等<sup>[8]</sup>对结肠癌病人进行生存分析发现, 肿瘤组织 CD44v6 的表达与肿瘤引起的死亡相关, 在原发肿瘤根治性切除的病人, VD44v6 对预后的意义独立于 Ducks' 分期, 认为“CD44v6 的表达是大肠癌转移的标志”。nm23 是一种转移抑制基因, 在人类有 nm23- H1 和 nm23- H2 两种, 其中 nm23- H1 与结肠癌的转移能力呈负相关, 可降低结肠癌细胞的运动能力和肝转移能力<sup>[9, 10]</sup>。我们的研究发现, CD44v6 在 HT- 29 细胞表达过度, NS- 398 处理后表达降低。与 CD44v6 的表达相反, nm23- H1 在 HT- 29 细胞表达微量, NS- 398 处理后的表达增加, 容易被检测到。我们认为 CD44v6 表达的下调和 nm23- H1 表达的上调可能是 NS- 398 抑制结肠癌细胞侵袭的机制。

Yu 等<sup>[11]</sup>在阿司匹林抑制 COX- 2 表达阴性的结肠癌细胞株 SW480 体外侵袭力的研究中发现, 阿司匹林作用后 SW480 细胞 CD44v6 的表达降低, nm23 的表达增加。综合我们的实验结果与 Yu 等的实验结果, 提示 NSAIDs 抑制结肠癌体外侵袭力的作用具有多样性, 既有依赖 COX- 2 的途径, 也有不依赖 COX- 2 的途径, 可能通过不同的机制影响 nm23 和 CD44v6 的表达, 也可能对 nm23 和 CD44v6 的影响与对 COX- 2 活性的抑制无关, 其具体机制尚需进一步研究。

[参 考 文 献]

[ 1 ] Tsujii M, Kuwano S, DuBois RN. Cyclooxygenase- 2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(7): 3336- 3340.

[ 2 ] Wu GS, Zou SQ, Liu ZR, et al. Celecoxib inhibits proliferation and induces apoptosis via prostaglandin E2 pathway in human cholangiocarcinoma cell lines [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(6): 1302- 1306.

[ 3 ] Barnett J, Chow J, Ives D, et al. Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system [J]. Biochim Biophys Acta, 1994, 1209(1): 130- 139.

[ 4 ] Attiga FA, Fernandez PM, Weeraratna AT, et al. Inhibitors of prostaglandin synthesis inhibit human prostate tumor cell invasiveness and reduce the release of matrix metalloproteinases [J]. Cancer Res, 2000, 60(12): 4629- 4637.

[ 5 ] 吴伟江, 李晓红, 任先达, 等. 非甾体类抗炎药对荷瘤小鼠肝癌的促凋亡作用(英文) [J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(8): 1074- 1078.

[ 6 ] Scrapers RF, Pauwels RP, Havenith MG, et al. Laminin immunoreactivity in urothelial carcinomas of the bladder [J]. Cancer, 1990, 66(12): 2583- 2588.

[ 7 ] Wielenga VJM, Heider KH, Offerhaus GJA, et al. Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression [J]. Cancer Res, 1993, 53(20): 4754 - 4759.

[ 8 ] Mulder JW, Kruij PM, Sewnath M, et al. Colorectal cancer prognosis and expression of exon- V6- containing CD44 proteins [J]. Lancet, 1994, 344(8935): 1470- 1472.

[ 9 ] Tannapful A, Kocherling F, Katalinic A. Expression of nm23 - H1 predicts lymph node involvement in colorectal carcinoma [J]. Dis Colon Rectum, 1995, 38(6): 651- 655.

[ 10 ] Suzuki E, Ota T, Tsukuda K, et al. nm23- H1 reduces *in vitro* cell migration and the liver metastatic potential of colon cancer cells by regulating myosin light chain phosphorylation [J]. Int J Cancer, 2004, 108(2): 207- 211.

[ 11 ] Yu HG, Huang JA, Yang YN, et al. The effects of acetylsalicylic acid on proliferation, apoptosis, and invasion of cyclooxygenase- 2 negative colon cancer cells [J]. Eur J Clin Invest, 2002, 32(11): 838- 846.