

## 环氧合酶-2 基因沉默对食管鳞癌花生四烯酸代谢通路的影响

庄则豪<sup>①</sup> 王凤霞<sup>①</sup> 魏晶晶<sup>①</sup> 孙静文<sup>①</sup> 邹方明<sup>①</sup> 杨立勇<sup>②</sup>

**摘要 目的:**探讨 siRNA 沉默环氧合酶-2(COX-2)对食管鳞癌(ESCC)细胞增殖的影响,观察花生四烯酸(AA)代谢酶 COX-2 和 5-脂氧合酶(5-LOX)、其下游产物 PGE<sub>2</sub> 和 LTB<sub>4</sub> 及细胞凋亡相关基因表达的变化,寻找低浓度 COX-2 酶抑制剂引起 AA 代谢转向 5-LOX 途径并促进 ESCC 细胞增殖的解决方案。**方法:**设空白对照、脂质体对照、随机序列 siRNA 和 COX-2 siRNA 组,筛选高效 COX-2 siRNA 序列作用于 ESCC 细胞株 TE-1 及 Eca109,四唑单钠法检测细胞增殖、RT-PCR 和 Western blot 检测 mRNA 及蛋白、ELISA 法检测 PGE<sub>2</sub> 和 LTB<sub>4</sub>,流式细胞技术检测细胞周期。**结果:**与空白对照组相比,COX-2 siRNA 转染后,TE-1 及 Eca109 细胞出现增殖抑制(抑制率分别为 45.86% 和 48.99%,均  $P < 0.05$ );COX-2 mRNA、蛋白表达及 PGE<sub>2</sub> 下降( $P < 0.05$ ),5-LOX 表达及 LTB<sub>4</sub> 无明显变化( $P > 0.05$ );G<sub>1</sub> 期细胞比例分别为 63.16% 和 68.15% (空白对照组分别为 58.93% 和 33.02%, $P < 0.05$ );Bcl-2 mRNA 及蛋白表达下降而 Caspase-9、Bax 表达上调( $P < 0.05$ )。**结论:**高效 COX-2 抑制可以避免 COX-2 低水平抑制引起的 AA 向 5-LOX 途径代谢分流,从而有效实现 ESCC 细胞增殖抑制。

**关键词** RNAi 干扰 环氧合酶-2 5-脂氧合酶 食管鳞癌 细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.23.002

## Effects of Cyclooxygenase-2 Gene Silencing on the Arachidonic Acid Metabolism Pathway of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cells

Zehao ZHUANG<sup>1</sup>, Fengxia WANG<sup>1</sup>, Jingjing WEI<sup>1</sup>, Jingwen SUN<sup>1</sup>, Fangming ZOU<sup>1</sup>, Liyong YANG<sup>2</sup>

Correspondence to: Zehao ZHUANG; E-mail: zhuang203@gmail.com

<sup>1</sup>Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China. <sup>2</sup>Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China

**Abstract Objective:** In a previous study, we found that low doses of cyclooxygenase-2 (COX-2) selective inhibitors could induce the proliferation of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells, which can be attributed to the activation of a 5-lipoxygenase (5-LOX) shunt by slight COX-2 inhibition. The objective of the present study was to determine whether highly effective COX-2 siRNA inhibition can avoid this shunt. **Methods:** TE-1 and Eca109 (ESCC) cells were divided into blank control, liposome transfection, random sequence siRNA, and COX-2 siRNA groups. Cell proliferation was assessed using Cell Counting Kit-8 assay. Protein and mRNA expressions were determined using Western blot analysis and RT-PCR, respectively. Prostaglandin E<sub>2</sub> and leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. A flow cytometer was used for cell cycle measurement. **Results:** Compared with the blank controls, COX-2 siRNA-transfected TE-1 and Eca109 cells showed 79% and 73% inhibition of COX-2 expression, respectively, as well as 45.86% and 48.99% inhibition of cell proliferation, respectively ( $P < 0.05$ ). The expression of 5-LOX remained unchanged ( $P > 0.05$ ), and prostaglandin E<sub>2</sub> and LTB<sub>4</sub> levels were highly in accordance with alterations in COX-2 and 5-LOX expressions, respectively. The percentages of cells in G<sub>1</sub> stage increased significantly. Bcl-2 expression decreased, whereas the expressions of caspase-9 and Bax increased in the two ESCC cells after COX-2 siRNA transfection ( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** Highly effective inhibition of COX-2 expression may prevent the activation of 5-LOX and the following up-regulation of LTB<sub>4</sub>, which is a cell proliferation factor. These suggest that only high-dose COX-2 selective inhibitors with significant COX-2 inhibitory effects can achieve anti-cancer effects in ESCCs.

**Keywords** RNA interference; Cyclooxygenase-2; 5-Lipoxygenase; Esophageal squamous cell carcinoma; Apoptosis

花生四烯酸(arachidonic acid, AA)复杂代谢通路失衡、代谢产物表达异常与多种肿瘤的发生发展有关,其与食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)的关系也受到重视<sup>[1-3]</sup>。由于环氧合酶(cyclooxygenase, COX)与脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)存在共同作用底物 AA,对单独抑制 COX 或

LOX 的抑癌策略而言,其竞争性代谢分流的作用不可忽视。Tavolari 等<sup>[4]</sup>发现,单用 COX-2 或 5-LOX 抑制剂均不能诱导结肠癌细胞凋亡而 COX-2、5-LOX 双重抑制剂却可实现,提示存在 AA 代谢分流的可能性。庄则豪等<sup>[5]</sup>发现,COX/LOX 双重抑制可稳定抑制 ESCC 细胞增殖,而单一选择性 COX-2 酶抑制剂

作者单位:①福建医科大学附属第一医院消化内科(福州市 350004);②内分泌科

通信作者:庄则豪 zhuang203@gmail.com

NS-398在较低浓度下却促使细胞增殖,这一现象可能与较低浓度NS-398对AA代谢另一关键酶5-LOX有显著的激活作用有关<sup>[6-8]</sup>,5-LOX激活抵消了对ES-CC细胞增殖的负性作用。高效抑制COX-2 mRNA表达能否避免COX-2酶水平化学抑制中出现的LOX代谢分流,其对细胞增殖有何种影响,本研究对此进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

人ESCC细胞株TE-1及Eca109购自中国科学院上海生物所;COX-2 siRNA由广州锐博生物公司设计合成,蛋白抗体(兔抗人多克隆抗体)购自Santa Cruz公司;前列腺素E2(prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>)及白三烯B4(leukotriene B<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>)-ELISA试剂盒购自上海碧云天生物技术研究所。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 细胞培养于37℃、5% CO<sub>2</sub>恒湿培养箱,采用含10% FBS的RPMI 1640培养基。设COX-2 siRNA、空白对照、转染载体(脂质体)和随机序列siRNA组。COX-2 siRNA组采用转染效率最高的siRNA序列(5'-GCUGGGAAGCCUUCUCUAAAdTdT-3';3'-dTdTTCGACCCUUCGGAAGAGAUU-5')。

1.2.2 四唑单钠法检测细胞增殖 细胞常规消化,调整细胞浓度为1×10<sup>4</sup>~5×10<sup>4</sup>/mL,每组设3复孔,450 nm波长测定吸光度。细胞增殖抑制率(%)=(1-处理组OD值/对照组OD值)×100%。

1.2.3 RT-PCR 按试剂盒说明书操作。扩增条件:94℃ 5 min,94℃ 30s,72℃ 45s,30~40个循环,72℃延伸7 min。引物序列及退火条件见表1。

表1 引物序列及退火温度

Table 1 Sequences of the selected primer pair and annealing temperature in reactive polymerase chain reaction

基因	退火温度(℃)	引物序列
COX-2	60	5'-GGTGCCTGGTCTGATGATGT-3'
		5'-CTGCCTGCTCTGGTCAATGG-3'
5-LOX	60	5'-CCCAGGGCATGCAGAGCA-3'
		5'-GCGGTCGGGCAGCCTGTC-3'
Bcl-2	55	5'-CCGGGAGATCCTGATGAAGT-3'
		5'-ATCCCAGCCTCCGTTATCCT-3'
Caspase-9	60	5'-CAGTTCCCA GGG GCT GTC TA-3'
		5'-CAAACCTTCTCGAACGGGG-3'
Bax	55	5'-CCAAGAAGCTGAGCGAGTGT-3'
		5'-TGAGGACTCCAGCCACAAAGA-3'
β-actin	60	5'-AAAGACCTGTACGCCAACACAG-3'
		5'-TTTTAGGATGGCAAGGGACTTC-3'

1.2.4 Western blot分析 -20°冰盒中裂解细胞,4℃、12 000 r/min离心15 min;BCA法测定浓度;每孔蛋白上样量50 μg,12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。抗体工作浓度:COX-2为1:100,5-LOX为1:800,β-actin为1:300,Bcl-2为1:200,Caspase-9为1:500,Bax为1:300;辣根过氧化物酶标记的二抗为1:1 000。以化学发光法显影。

1.2.5 细胞周期分析 收集siRNA干预24 h后行流式细胞分析,按试剂盒说明书操作。

1.2.6 ELISA检测 双抗体夹心ABC-ELISA法检测PGE<sub>2</sub>及LTB<sub>4</sub>含量。按试剂盒说明书操作,450 nm波长测定吸光度。

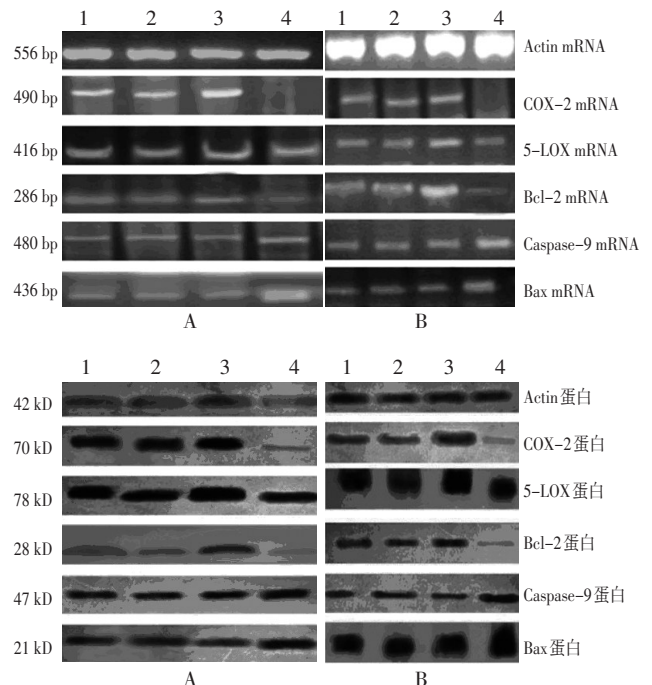
1.3 统计学方法

结果重复3次,以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。采用SPSS 17.0软件,方差齐性资料选用单因素方差分析,组间多重比较检验采用最小显著差异法,α=0.05。

2 结果

2.1 COX-2、5-LOX mRNA及蛋白表达水平

COX-2 siRNA序列的沉默效率在TE-1及Eca109细胞分别为79%和76%,与空白对照组比较差异有统计学意义(P<0.05),与此同时,5-LOX的mRNA及蛋白表达无明显增高(P<0.05,图1,表2)。



1:空白对照;2:脂质体对照;3:随机序列siRNA;4:COX-2 siRNA

图1 siRNA干预与COX-2、5-LOX、Bcl-2、Caspase-9及Bax mRNA及蛋白在TE-1(A)及Eca109(B)细胞的表达

Figure 1 mRNA and protein expressions of COX-2, 5-LOX, Bcl-2, caspase-9, and Bax in TE-1 (A) and Eca109 (B) cells treated with siRNA

表2 COX-2 siRNA转染后TE-1与Eca109细胞COX-2、5-LOX、Bcl-2、Caspase-9和Bax mRNA及蛋白的表达

Table 2 mRNA and protein expressions of COX-2, 5-LOX, Bcl-2, caspase-9, and Bax in TE-1 and Eca109 cells treated with COX-2 siRNA

细胞分组	与 $\beta$ -actin灰度比值( $\bar{x}\pm s$ )									
	COX-2		5-LOX		Bcl-2		Caspase-9		Bax	
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
TE-1										
空白对照	2.1 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.0	1.8 $\pm$ 0.0	1.9 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.1
脂质体	2.1 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.0	1.8 $\pm$ 0.1
随机序列	2.4 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.0
siRNA	0.7 $\pm$ 0.1*	0.2 $\pm$ 0.0*	2.0 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.0*	0.3 $\pm$ 0.1*	2.9 $\pm$ 0.1*	2.5 $\pm$ 0.1*	2.9 $\pm$ 0.1*	2.3 $\pm$ 0.1*
Eca109										
空白对照	1.6 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.0	1.8 $\pm$ 0.1
脂质体	1.3 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.0	1.7 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.1
随机序列	1.4 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.0	1.9 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.0
siRNA	0.5 $\pm$ 0.0*	0.2 $\pm$ 0.0*	2.0 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1*	0.4 $\pm$ 0.1*	2.8 $\pm$ 0.0*	2.5 $\pm$ 0.1*	2.9 $\pm$ 0.1*	2.3 $\pm$ 0.1*

注:\*与空白对照组相比 $P<0.05$ 

## 2.2 细胞增殖

与空白对照组比较,COX-2 siRNA处理后TE-1细胞增殖的抑制率为45.86%,Eca109细胞为48.99% ( $P<0.05$ )。

## 2.3 PGE<sub>2</sub>和LTB<sub>4</sub>含量

与空白对照组比较,COX-2 siRNA处理后的TE-1和Eca109细胞中PGE<sub>2</sub>浓度均下降( $P<0.05$ ),而LTB<sub>4</sub>浓度则无明显变化( $P>0.05$ ,表3)。

表3 COX-2 siRNA转染后TE-1及Eca109细胞PGE<sub>2</sub>和LTB<sub>4</sub>水平的变化( $\bar{x}\pm s, n=3$ )Table 3 PGE<sub>2</sub> and LTB<sub>4</sub> levels in TE-1 and Eca109 cells treated with COX-2 siRNA

细胞分组	PGE <sub>2</sub>	LTB <sub>4</sub>
TE-1		
空白对照	77.7 $\pm$ 8.3	76.3 $\pm$ 8.5
脂质体	72.4 $\pm$ 7.4	73.3 $\pm$ 7.4
随机序列	80.1 $\pm$ 9.2	80.1 $\pm$ 9.2
siRNA	45.7 $\pm$ 4.7*	77.8 $\pm$ 8.8
Eca109		
空白对照	75.4 $\pm$ 8.6	74.5 $\pm$ 8.4
脂质体	70.3 $\pm$ 7.2	79.3 $\pm$ 9.2
随机序列	79.4 $\pm$ 9.1	76.7 $\pm$ 8.5
siRNA	42.5 $\pm$ 4.8*	76.7 $\pm$ 8.5

注:\*与空白对照组相比 $P<0.05$ 

## 2.4 细胞周期

TE-1及Eca109细胞在COX-2 siRNA处理后G<sub>1</sub>期细胞比例较空白对照组明显上升,分别为63.16%和68.15%,空白对照组分别为58.93%和33.02% ( $P<0.05$ );而S期细胞比例分别为27.12%和29.52%,低于空白对照、转染载体和随机序列siRNA组( $P<0.05$ )。

## 2.5 Bcl-2、Caspase-9及Bax mRNA及蛋白表达水平变化

两种ESCC细胞Bcl-2 mRNA及蛋白表达均较空白对照组明显下降,而Caspase-9、Bax的mRNA及蛋白水平的表达均显著上调( $P<0.05$ ,图1,表2)。

## 3 讨论

庄则豪等<sup>[5]</sup>报道低浓度选择性COX-2酶抑制剂(NS-398)在抑制ESCC细胞COX-2表达的同时上调了5-LOX的表达,进而增加了具有促细胞增殖作用的5-LOX途径下游代谢产物,可能抵消了选择性COX-2酶抑制剂抑制细胞增殖的作用。NS-398是COX-2的酶活性化学抑制剂,通过特异性结合COX-2的活性结构而发挥作用,鉴于该过程中COX-2已合成且仅是活性受抑制,推断调节其抑制作用的关键物质应存在于COX-2下游,研究酶蛋白水平的合成抑制可能有助于阐明其机制。

本研究利用高效抑制COX-2基因表达的siRNA进行干预,结果发现,COX-2和5-LOX高水平表达的两种ESCC细胞增殖均明显受抑。低浓度COX-2酶活性抑制后抗ESCC效应减弱,与LOX代谢分流有关,而从基因水平完全沉默COX-2表达能够有效发挥抗细胞增殖效应,且5-LOX mRNA及蛋白质的表达均未上调,亦未检测到其下游代谢产物LTB<sub>4</sub>增加,提示迅速诱导COX-2表达抑制可避免5-LOX途径的异常激活,为通过抑制COX-2抗ESCC的防治应用提供了有益思路。

PGE<sub>2</sub>可促进血管新生、上调凋亡抑制蛋白表达<sup>[9]</sup>,其表达下降不利于细胞增殖,是COX-2抑制抗ESCC细胞增殖的重要原因。由于在选择性COX-2酶活性抑制作用的过程中出现PGE<sub>2</sub>浓度下降而5-LOX代谢



产物上升,曾推测PGE<sub>2</sub>表达水平改变可能反馈激活5-LOX代谢途径。然而本研究中,两种ESCC细胞的PGE<sub>2</sub>浓度在COX-2 siRNA处理后均迅速下降,而5-LOX途径并未相应激活,因此,PGE<sub>2</sub>本身不太可能是反馈调节5-LOX途径的关键物质,其机制有待进一步研究。鉴于COX-2 siRNA引起的PGE<sub>2</sub>浓度可迅速下降,与低浓度选择性COX-2酶活性抑制过程中出现的轻度PGE<sub>2</sub>浓度下降不同,因此,不排除PGE<sub>2</sub>浓度改变程度影响LOX途径激活的可能。本研究的结果证实高效抑制COX-2表达不会激活LOX途径进而增加LTB<sub>4</sub>表达,亦不会因此抵消COX-2抑制的抗ESCC细胞增殖作用。Cianchi等<sup>[10]</sup>结果亦支持这一观点。因此,高效抑制COX-2可成为稳定而有效的抗ESCC途径。

COX-2 siRNA对ESCC细胞的增殖阻滞可能涉及多种机制。在食管癌体外模型中,无论是食管腺癌或ESCC细胞,COX-2 siRNA均可成功抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡<sup>[11-12]</sup>。本研究结果显示,COX-2 siRNA干预可上调G<sub>1</sub>期ESCC细胞比例、降低S期细胞比例,提示其诱导了G<sub>1</sub>期阻滞。另一方面,肿瘤细胞凋亡受Bax等凋亡抑制基因和Bcl-2等凋亡促进因子的共同调节,这些因子的失衡是启动凋亡的关键。本研究亦发现,转染COX-2 siRNA后TE-1和Eca109细胞的Bcl-2 mRNA及蛋白的表达下降而Caspase-9和Bax mRNA及蛋白表达上调,表现为凋亡占优势地位。尽管本研究未观察ESCC细胞的凋亡情况,但凋亡基因表达上调仍一定程度上提示了凋亡的启动可能参与了COX-2 siRNA对ESCC细胞增殖的负性作用。

综上所述,高效抑制COX-2可以避免AA代谢通路另一关键酶5-LOX的激活,避免其下游促细胞增殖代谢产物的影响,进而获得稳定的抗ESCC细胞效果,这一过程可能伴随了凋亡途径的激活。

#### 参考文献

- 1 王凤霞,庄则豪.花生四烯酸代谢通路与食管癌的发生发展[J].医学综述,2010,16(22):3396-3398.
- 2 Cui PH, Rawling T, Bourget K, et al. Antiproliferative and Antimigratory Actions of Synthetic Long Chain n-3 Monounsaturated Fatty Acids in Breast Cancer Cells That Overexpress Cyclooxygenase-2[J]. J Med Chem, 2012, 55(16):7163-7172.
- 3 Orlando UD, Garona J, Ripoll GV, et al. The functional interaction between Acyl-CoA synthetase 4, 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 controls tumor growth: a novel therapeutic target[J]. PLoS One, 2012, 7(7):e40794.
- 4 Tavolari S, Bonafe M, Marini M, et al. Licofelone, a dual COX/5-LOX inhibitor, induces apoptosis in HCA-7 colon cancer cells through the mitochondrial pathway independently from its ability to affect the arachidonic acid cascade[J]. Carcinogenesis, 2008, 29(2):371-380.
- 5 庄则豪,魏晶晶,王凤霞,等.选择性环氧合酶-2抑制剂与COX-2/5-脂氧合酶双酶抑制剂对食管鳞状细胞癌细胞增殖的影响[J].胃肠病学和肝病杂志,2011,20(7):628-632.
- 6 Hyde CA, Missailidis S. Inhibition of arachidonic acid metabolism and its implication on cell proliferation and tumour-angiogenesis[J]. Int Immunopharmacol, 2009, 9(6):701-715.
- 7 Ye YN, Wu WK, Shin VY, et al. Dual inhibition of 5-LOX and COX-2 suppresses colon cancer formation promoted by cigarette smoke[J]. Carcinogenesis, 2005, 26(4):827-834.
- 8 Ganesh R, Marks DJ, Sales K, et al. Cyclooxygenase/lipoxygenase shunting lowers the anti-cancer effect of cyclooxygenase-2 inhibition in colorectal cancer cells[J]. World J Surg Oncol, 2012, 10(1):200.
- 9 Bai XM, Jiang H, Ding JX, et al. Prostaglandin E2 upregulates survivin expression via the EP1 receptor in hepatocellular carcinoma cells[J]. Life Sciences, 2010, 86(5-6):214-223.
- 10 Cianchi F, Cortesini C, Magnelli L, et al. Inhibition of 5-lipoxygenase by MK886 augments the antitumor activity of celecoxib in human colon cancer cells[J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(11):2716-2726.
- 11 Zhong Y, Xia Z, Liu J, et al. The effects of cyclooxygenase-2 gene silencing by siRNA on cell proliferation, cell apoptosis, cell cycle and tumorigenicity of Capan-2 human pancreatic cancer cells[J]. Oncol Rep, 2012, 27(4):1003-1010.
- 12 Zhang L, Tu J, Yu ZL, et al. Effects of the inhibition of cyclooxygenase-2 on human esophageal cancer cells: inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis[J]. Pathol Oncol Res, 2010, 16(1):39-45.

(2012-03-26收稿)

(2012-11-01修回)

(本文编辑:张佷)