

尼美舒利对人舌鳞状细胞癌 Tca8113 细胞 ang-2 基因表达的影响

王晓彦¹ 武云霞²

(1. 深圳市龙岗中心医院·耳鼻咽喉科分院口腔科 深圳 518172;

2. 山西医科大学附属第一医院口腔科 太原 030001)

[摘要] 目的 探讨环加氧酶(COX)-2抑制剂尼美舒利(NIM)对人舌鳞状细胞癌 Tca8113 细胞中 ang-2 基因表达的影响及其意义。方法 以 25、50、100 和 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 NIM 处理 Tca8113 细胞 48 h, 半定量 RT-PCR 检测其 ang-2 mRNA 的表达。结果 Tca8113 细胞中 ang-2 mRNA 水平下降, 且下降呈浓度依赖性。结论 NIM 下调 ang-2 基因表达以抑制肿瘤血管发生, 可能是 COX-2 抑制剂抑瘤的作用机制之一。

[关键词] 舌鳞状细胞癌; 环加氧酶; 血管发生; 血管生成素

[中图分类号] Q 786 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1673-5749.2011.06.007

Influence of Nimesulide on expression of ang-2 gene in human tongue squamous cell carcinoma Tca8113

Wang Xiaoyan¹, Wu Yunxia². (1. Dept. of Stomatology, Otolaryngology Branch, Longgang District Central Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518172, China; 2. Dept. of Stomatology, The Affiliated First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the influence of Nimesulide(NIM), a selective cyclo-oxygenase(COX)-2 inhibitor, on angiogenins(ang) gene expressions in human tongue squamous cell carcinoma Tca8113. **Methods** Tca8113 cells were treated with NIM(25, 50, 100, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 48 h to measure the expression of ang-2 mRNA in Tca8113 cells by the semiquantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis. **Results** The expression of ang-2 mRNA reduced in a concentration dependent manner. **Conclusion** NIM can down-regulate ang-2 gene expression, which may be involved in cancer angiogenesis inhibition mechanisms of COX-2 inhibitor.

[Key words] tongue squamous cell carcinoma; cyclo-oxygenase; angiogenesis; angiogenin

舌鳞状细胞癌(tongue squamous cell carcinoma, TSCC)是常见的口腔恶性肿瘤,其发病率呈增加趋势;因此,预防 TSCC,探索其发病机制是目前研究的热点^[1]。血管发生参与了恶性肿瘤的转移、侵袭和复发过程,而环加氧酶(cyclo-oxygenase, COX)-2的前列腺类产物是重要的促进血管发生因素,有助于新生血管发生^[2],即 COX-2 与肿瘤的发生、血管形成有着密切的关系^[3-4]。由于 COX-2 抑制剂对结肠癌和直肠癌有防治作用,其机制尚不清楚,可能与其抗血管发生密切相关^[5];因此推测,COX-2 抑制剂对肿瘤的防治,可能是通过抑制血管发生因子介导的。

肿瘤性的血管发生受众多区域性血管发生促进因子和抑制因子的调节。血管生成素(angio-genin, Ang)家族在众多调节因子中有着重要的地位,其中尤其以 ang-2 的作用最为明显^[6]。本研究在细胞水平检测选择性 COX-2 抑制剂尼美舒利(Nimesulide, NIM)对 ang-2 基因表达的影响,以期对口腔 TSCC 的临床防治提供试验依据。

1 材料和方法

1.1 人舌鳞状细胞癌细胞株 Tca8113

人 TSCC 细胞株 Tca8113 购自中国科学院上海细胞生物研究所,培养于含体积分数 10% 的胎牛血清(杭州四季清公司)、100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素和 100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素的 RPMI-1640 培养液(Gibco 公司,美国),质量分数 0.25% 的胰蛋白酶(上海生工生物技术有限公司)消化传代。

[收稿日期] 2010-08-28; [修回日期] 2011-08-31

[基金项目] 山西省科技攻关计划基金资助项目(200703109-5)

[作者简介] 王晓彦(1980—),女,山西人,硕士

[通讯作者] 武云霞, Tel: 0351-8262067

1.2 RT-PCR 检测 ang-2 基因的表达

将对数生长期的 Tca8113 细胞 1×10^6 个接种于培养瓶中, 24 h 后换液。NIM 处理组, NIM 终浓度为 25、50、100 和 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 对照组含体积分数 0.4% 的等量二甲基亚砷。培养 48 h 后常规收集细胞, 各组均重复 3 瓶。按微量快速组织/细胞总 RNA 抽提试剂盒 W6221(上海华舜生物工程技术有限公司)说明提取细胞总 RNA, 用 DNA/RNA 测定仪(Eppendorf 公司, 德国)测定 RNA 纯度并定量。取总 RNA 行反转录, 反转录体系及过程为: 总 RNA 2 μL 、随机引物(Fermentas 公司, 立陶宛)1 μL , 焦碳酸二乙酯水补至终体积 12 μL , 混匀, 离心 3~5 s, 70 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 冰上冷却 3~5 min, 离心 3~5 s, 冰上冷却 3~5 min, 依次加入 5 倍的缓冲液 4 μL 、RNase 抑制剂 1 μL 、10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱氧核糖核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)混合液 2 μL (均为 Fermentas 公司, 立陶宛), 混匀, 25 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 5 min, 再加入鸟骨髓母细胞瘤病毒(avian myeloblastosis virus, AMV)反转录酶(Fermentas 公司, 立陶宛)1 μL , 25 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 60 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 扩增 ang-2 并以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参照。特异性引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 引物序列为 ang-2: 上游 5'-GTCCACCTGAGGAACTGTCT-3', 下游 5'-TTGTGACAGCAGCGTCTGTA-3', 扩增片段长度为 289 bp; GAPDH: 上游 5'-ACCACAGTCC-ATGCCATCAC-3', 下游 5'-TCCACCACCCTGTT-GCTGTA-3', 扩增片段长度为 450 bp。PCR 扩增体系为 10 倍缓冲液 2.5 μL 、25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化镁 4 μL 、10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP 混合液 1 μL 、50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上下游引物各 0.5 μL 、cDNA 模板 10 μL 、Taq DNA 酶(Fermentas 公司, 立陶宛)2 μL 、去离子水补至终体积 50 μL , PCR 扩增条件为变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min、94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 退火 54 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 延伸 70 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。10 μL 的 PCR 产物在质量分数 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳, 溴化乙锭显色, 目的条带用图像分析系统作光密度测定, 以 ang-2 与 GAPDH 光密度的比值作为 mRNA 相对质量。

1.3 统计学方法

所得结果为计量资料, 结果数据为 $\bar{x} \pm s$, 采用 SPSS 11.5 统计软件进行方差分析和个性相关

性分析, 以 $\alpha=0.05$ 作为检验标准, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

NIM 各处理组与对照组间进行比较, 均数间差异有统计学意义($F=175.492$, $P=0.000<0.01$)。NIM 处理 48 h 后可在 Tca8113 细胞中检测到 ang-2 mRNA 的表达明显下降。个性相关性分析显示 $r=-0.954$, $P<0.01$ 。这说明, NIM 的抑制作用在一定浓度范围内呈浓度依赖性(图 1、表 1)。

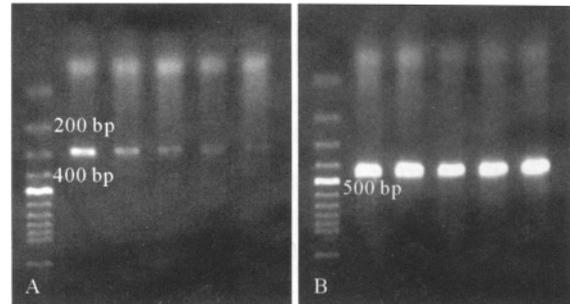


图 1 Tca8113 细胞 ang-2 mRNA 表达的 RT-PCR 结果
A: ang-2 基因, B: GAPDH; M 为 100 bp DNA 序列, 1 为对照组, 2~5 为 25、50、100、200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NIM 处理组。

Fig 1 RT-PCR analysis electrophoregrams of ang-2 mRNA

表 1 Tca8113 细胞 ang-2 mRNA 表达半定量分析

Tab 1 Expression quantity analysis of ang-2

mRNA in Tca8113 cells		$\bar{x} \pm s$
组别	ang-2 mRNA	
对照组		0.845 2 \pm 0.054 3
NIM/25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		0.579 6 \pm 0.045 7 ^D
NIM/50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		0.377 3 \pm 0.015 0 ^D
NIM/100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		0.297 0 \pm 0.006 3 ^D
NIM/200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		0.226 1 \pm 0.007 2 ^D

注: 相对于对照组, 1) 为 $P<0.01$ 。

3 讨论

COX 是催化前列腺素生物合成的限速酶, 有两种异构体: COX-1 和 2。前者为结构型, 表达于多数组织中, 维持组织内环境的稳定; 后者为诱生型, 参与肿瘤的发生发展, 具有促进肿瘤细胞增殖、血管发生、抑制肿瘤程序性细胞死亡、加强肿瘤细胞的侵袭和转移的作用^[7-9]。COX-2 表达是口腔肿瘤发生的早期事件^[10]。肿瘤血管发生通常由血管生长因子启动, 肿瘤细胞表达的多种前血管发生因子弥散至已存血管, 激活正常静止的血管细胞。其中包括降解基膜蛋白、内皮细胞向血管刺激方向迁移、内皮细胞增殖、管腔形成、

周细胞覆盖和产生新的基膜。常见的与肿瘤血管发生有关的血管发生因子有 Ang、成纤维细胞生长因子、血小板衍生生长因子、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、肝细胞生长因子、转化生长因子- α 及 β 等。

Ang 家族是唯一含受体激动剂和抑制剂的促血管发生因子。ang 基因编码的 4 种结构相似的蛋白质 Ang-1~4, 是血管内皮细胞上的特异性酪氨酸激酶受体 Tie-2 的天然配体^[11-12]。ang-2 对血管发生具有双向调节的作用。在 VEGF 缺乏时, ang-2 促进血管的退化; 在 VEGF 存在时, ang-2 导致的不稳定性可诱导血管发生反应^[13]。ang-2 本身并不刺激血管的发生, 但其破坏内皮细胞与外周基质之间的平衡, 使不稳定状态的血管内皮和基质对生长因子的敏感性增强; 同时可加强 VEGF 的促血管发生作用, 从而诱导血管重建。

NIM 属于非甾体类抗炎镇痛(non-steroidal anti-inflammatory drug, NSAID)类药物, 对COX-2 具有选择性抑制作用, 可预防胰腺癌和舌癌, 抑制结肠癌和胰腺癌细胞的生长^[14-17]。NIM 抑制肿瘤的主要途径之一是抑制其血管发生, 但其确切机制尚不完全明确。

在本研究中, Tca8113 细胞经 NIM 干预之后, ang-2 基因在 Tca8113 细胞中的表达明显下降, 且表达呈浓度依赖性。这提示 NIM 可能是通过下调 ang-2 基因表达来降低血管发生因子的作用的, 且该作用途径是 COX-2 依赖性的; 同时 ang-2 基因表达降低, 可能是 COX-2 抑制剂抑制肿瘤血管发生的重要机制。

4 参考文献

[1] 李伟忠, 丁彦青, 李祖国, 等. 舌癌组织中COX-2的表达及与肿瘤血管发生的关系[J]. 口腔医学研究, 2008, 24(3) 298-301.

[2] Iñiguez MA, Rodríguez A, Volpert OV, et al. Cyclooxygenase-2 :A therapeutic target in angiogenesis[J]. Trends Mol Med, 2003, 9(2) :73-78.

[3] Kyzas PA, Stefanou D, Agnantis NJ. COX-2 expression correlates with VEGF-C and lymph node metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma[J]. Mod Pathol, 2005, 18(1) :153-160.

[4] Soumaoro LT, Uetake H, Takagi Y, et al. Coexpression of VEGF-C and Cox-2 in human colorectal cancer and its association with lymph node metastasis[J]. Dis Colon

Rectum, 2006, 49(3) 392-398.

[5] Keller JJ, Giardiello FM. Chemoprevention strategies using NSAIDs and COX-2 inhibitors[J]. Cancer Biol Ther, 2003, 2(4 Suppl 1) S140-S149.

[6] Hu B, Cheng SY. Angiopoietin-2 :Development of inhibitors for cancer therapy[J]. Curr Oncol Rep, 2009, 11(2) :111-116.

[7] Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JO, et al. Cyclooxygenase 2 :A pharmacological target for the prevention of cancer[J]. Lancet Oncol, 2001, 2(9) 544-551.

[8] Milas L, Mason KA, Liao Z, et al. Chemoradiotherapy : Emerging treatment improvement strategies[J]. Head Neck, 2003, 25(2) :152-167.

[9] Lin DT, Subbaramaiah K, Shah JP, et al. Cyclooxygenase-2 :A novel molecular target for the prevention and treatment of head and neck cancer[J]. Head Neck, 2002, 24(8) :792-799.

[10] Sudbø J, Ristimäki A, Sondresen JE, et al. Cyclooxygenase-2(COX-2) expression in high-risk premalignant oral lesions[J]. Oral Oncol, 2003, 39(5) :497-505.

[11] Davis S, Aldrich TH, Jones PF, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning[J]. Cell, 1996, 87(7) :1161-1169.

[12] Valenzuela DM, Griffiths JA, Rojas J, et al. Angiopoietins 3 and 4 :Diverging gene counterparts in mice and humans[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(5) :1904-1909.

[13] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis[J]. Cell, 1996, 86(3) 353-364.

[14] Furukawa F, Nishikawa A, Lee IS, et al. A cyclooxygenase-2 inhibitor, nimesulide, inhibits postinitiation phase of N-nitrosobis(2-oxopropyl) amine-induced pancreatic carcinogenesis in hamsters[J]. Int J Cancer, 2003, 104(3) 269-273.

[15] Kubatka P, Kalická K, Chamilová M, et al. Nimesulide and melatonin in mammary carcinogenesis prevention in female Sprague-Dawley rats[J]. Neoplasma, 2002, 49(4) :255-259.

[16] Yamazaki R, Kusunoki N, Matsuzaki T, et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors show a differential ability to inhibit proliferation and induce apoptosis of colon adenocarcinoma cells[J]. FEBS Lett, 2002, 531(2) 278-284.

[17] Eibl G, Reber HA, Wente MN, et al. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide induces apoptosis in pancreatic cancer cells independent of COX-2[J]. Pancreas, 2003, 26(1) 33-41.

(本文编辑 汤亚玲)