

塞来昔布对前列腺癌细胞株 PC-3 中 VEGF-C 及 bcl-2 mRNA 表达的影响

胡乃刚¹, 周荣祥¹, 陈强²

Effects of Celecoxib on Expression of VEGF-C and bcl-2 mRNA in Prostate Cancer PC-3 Cell Lines

HU Nai-gang¹, ZHOU Rong-xiang¹, CHEN Qiang²

1. Department of Urology, The Affiliated Municipal Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266011, China; 2. Department of Urology, The Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University

Corresponding Author: ZHOU Rong-xiang, E-mail: zhourongxiang621@sohu.com

Abstract: **Objective** To investigate effects of cyclooxygenase-2 selective inhibitor on the expression of VEGF-C and bcl-2 mRNA in human prostate cancer PC-3 cell lines, and study the anticancer mechanism of COX-2 selective inhibitor. **Methods** The PC-3 cells were divided to four groups: Test groups (The cells were treated with celecoxib at different concentrations: 10 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$, 40 $\mu\text{mol/L}$) and control group (celecoxib was not used), detected the expression of VEGF-C and bcl-2 mRNA in the four groups by RT-PCR method. **Results** There were no statistical difference of the VEGF-C/ GAPDH and bcl-2/ GAPDH value between 10 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib group and control group ($P > 0.05$); VEGF-C/ GAPDH value in 20 $\mu\text{mol/L}$ and 40 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib groups were 0.370 ± 0.063 and 0.263 ± 0.062 respectively, bcl-2/ GAPDH value in both the groups above were 0.339 ± 0.047 and 0.272 ± 0.042 respectively, both the value above in the two groups decreased significantly compared with control group ($P < 0.01$). **Conclusion** Celecoxib maybe plays its antitumor effect by inhibiting the expression of VEGF-C and bcl-2 mRNA in prostate cancer PC-3 cell lines.

Key words: Prostate cancer; Celecoxib; VEGF; bcl-2

摘要:目的 探讨环氧化酶-2(COX-2)选择性抑制剂塞来昔布(celecoxib)对前列腺癌细胞株 PC-3 中 VEGF-C mRNA 及 bcl-2 mRNA 表达的影响,研究 COX-2 抑制剂抗肿瘤的作用机制。方法 将培养的 PC-3 细胞分为四组:试验组(分别以 10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$ 不同浓度塞来昔布处理)和对照组,采用 RT-PCR 的方法检测四组中 VEGF-C 及 bcl-2 mRNA 的表达。结果 10 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组 VEGF-C/ GAPDH 值及 bcl-2/ GAPDH 值与对照组相比差别均无统计学意义($P > 0.05$); 20 $\mu\text{mol/L}$ 及 40 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组 VEGF-C/ GAPDH 值分别为 0.370 ± 0.063 、 0.263 ± 0.062 , bcl-2/ GAPDH 值分别为 0.339 ± 0.047 、 0.272 ± 0.042 , 两组中上述两项指标均较对照组明显下降(P 均 < 0.01)。结论 塞来昔布可能通过对前列腺癌细胞株 PC-3 中 VEGF-C 及 bcl-2 mRNA 表达的抑制发挥其抗肿瘤作用。

关键词: 前列腺癌; 塞来昔布; 血管内皮生长因子; bcl-2

中图分类号: Q786; R737.25 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2008)04-0233-03

0 引言

研究表明,环氧化酶-2(COX-2)在前列腺癌组织中表达增强^[1,2]。体外实验证实 COX-2 抑制剂具有抑制前列腺癌细胞生长的作用^[3,4],但其抗肿瘤的机制尚不完全明确。本实验采用 RT-PCR 的方

法对前列腺癌细胞株 PC-3 中的 VEGF-C 及 bcl-2 mRNA 进行检测,进而探讨 COX-2 选择性抑制剂塞来昔布(celecoxib)的抗癌机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人雄激素非依赖性前列腺癌细胞株 PC-3,由青岛大学医学院病理生理教研室惠赠。

1.2 主要试剂

选择性 COX-2 抑制剂塞来昔布购自普强苏州制药有限公司。RPMI 1640 培养液、小牛血清均购

收稿日期:2007-07-04;修回日期:2007-09-10
作者单位:1. 266011 山东青岛大学医学院附属市立医院泌尿外科;2. 青岛大学医学院附属医院泌尿外科
通讯作者:周荣祥, E-mail: zhourongxiang621@sohu.com

作者简介:胡乃刚(1980-),男,硕士在读,主要从事泌尿外科研究

自青岛海泰生物技术有限公司;总 RNA 提取试剂盒 ,cDNA 合成试剂盒及 PCR 扩增试剂盒均购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.3 细胞培养及实验分组

将塞来昔布加入适量的 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 中配制成 5.6 mg/L 母液 ,高压灭菌于 4 保存 ,使用时用培养液稀释成所需浓度 ;在含 10 % 小牛血清的 RPMI1640 细胞培养基中加青霉素及链霉素各 100 U/ml ,将 PC-3 细胞接种于配好的培养基中 ,在 37 、5 % CO₂ 及 95 % 饱和湿度条件下培养 ,每 3 ~ 5 天传代。取对数生长期的前列腺癌细胞进行实验 ,用质量分数 0.25 % 的胰蛋白酶消化 ,加培养液制成 5 × 10⁵ / ml 细胞悬液 ,接种于 96 孔培养板 ,200 μl/ 孔 ,待细胞贴壁后去上清 ,试验组分别加入含 10、20、40 μmol/L 三种不同浓度的塞来昔布培养液 ,每一浓度设 10 个重复孔 ,对照组仅加入含 10 % 小牛血清的 RPMI 1640 培养液。继续培养 72 h 后收集细胞 ,进行总 RNA 提取及 RT-PCR 检测。

1.4 引物的设计与合成

采用 Primer 5.0 软件设计相关基因引物序列。bcl-2 的引物序列为 :上游引物 5 - GTG GTG GAG GAG CTC TTC AG-3 ,下游引物 5 - TCC ACA AAG GCA TCC CA G-3 ,产物片段长 203 bp ; VEGF-C 上下游的引物序列分别为 :5 - AAT GTG GGG CCA ACC GAG AA-3 ,5 - CCA ATA TGA AGG GAC ACA ACG-3 ,扩增长度为 259 bp ;内对照 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 上下游引物分别为 :5 - GGT GAA GGT CGG AGT CAA CGG-3 ,5 - GGT GAT GAG TCC TTC CAC GAT-3 ,扩增长度为 425 bp。以上引物均由上海生物工程技术有限公司合成。

1.5 总 RNA 提取及 RT-PCR

采用 Trizol 一步法提取总 RNA。紫外分光光度计测样品 A260 和 A280 值 ,琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 质量 ,其余 - 80 保存。按逆转录试剂盒说明书操作反转录合成 cDNA ,产物 - 20 保存。取反转录产物 5 μl 进行 PCR 扩增 ,反应体系为 50 μl ,包括 10 × Buffer 5 μl ,25mmol/L MgCl₂ 3 μl ,10 mmol/L dNTP 1 μl ,上下游引物各 2.5 μl ,cDNA 模板 5 μl ,Taq 酶 1 μl ,ddH₂O 30 μl。VEGF-C 的反应条件为 :94 预变性 1 min ;94 变性 1 min ,55 退火 1 min ,72 延伸 40 s ,共 35 个循环 ,最后 72 延伸 10 min ;bcl-2 的反应条件 :94 预变性 2 min 后 ,94 45 s ,50 退火 40 s ,72 60 s ,共进行 35 个循环 ,最后 72 延伸 10 min ;GAPDH 作为内参照基因与目的基因一一对应同时进行 PCR 反应 ,以达定

量目的。PCR 扩增产物经 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳 EB 染色观察结果。以平均吸光度 × 条带面积表示总的吸光度 ,以此代表 mRNA 的量。凝胶图像分析系统以 VEGF-C 和 bcl-2 基因与内参照基因 (GAPDH) 电泳带的吸光度比值作为 VEGF-C 和 bcl-2 mRNA 的表达量指标。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 12.0 统计软件进行单因素方差分析和两两比较 *q* 检验 ,数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

前列腺癌细胞 PC-3 中 VEGF-C 及 bcl-2 mRNA 表达的 PCR 产物凝胶电泳结果见图 1、2。在三个处理组中 ,20 μmol/L、40 μmol/L 塞来昔布组 VEGF-C 和 bcl-2 mRNA 表达量均降低 ,尤以 40 μmol/L 组降低明显。

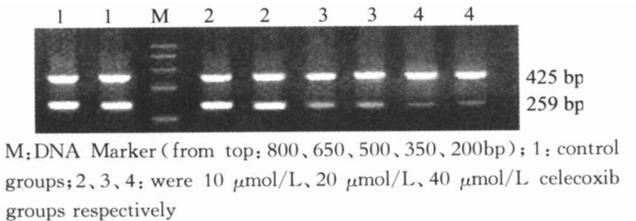


图 1 PC-3 中 VEGF-C mRNA 表达的 PCR 产物凝胶电泳分析 Fig 1 The electrophoretic analysis of VEGF-C mRNA in PC-3

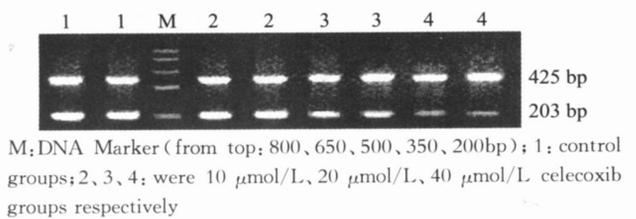


图 2 PC-3 中 bcl-2 mRNA 表达的 PCR 产物凝胶电泳分析 Fig 2 The electrophoretic analysis of bcl-2 mRNA in PC-3

凝胶图像分析系统分析结果经统计软件处理 ,对照组与各处理组中 VEGF-C/ GAPDH 及 bcl-2/ GAPDH 的值见表 1、2。表明在一定浓度范围内 ,塞来昔布对 PC-3 细胞株中 VEGF-C 及 bcl-2 mRNA 的表达有抑制作用。

表 1 VEGF-C mRNA 在 PC-3 中的表达

Tab 1 The expression of VEGF-C mRNA in PC-3 cell lines				
Groups	n	VEGF-C/ GAPDH ($\bar{x} \pm s$)	F	P
Celecoxib groups			98.61	
10μmol/L	10	0.509 ± 0.057		0.242
20μmol/L	10	0.370 ± 0.063		< 0.01
40μmol/L	10	0.263 ± 0.062		< 0.01
Control group	10	0.534 ± 0.036		

表 2 bcl-2 mRNA 在 PC-3 中的表达

Tab 2 The expression of bcl-2 mRNA in PC-3 cell lines

Groups	n	bcl-2/ GAPDH ($\bar{x} \pm s$)	F	P
Celecoxib groups			76.54	
10 μ mol/L	10	0.444 \pm 0.034		0.199
20 μ mol/L	10	0.339 \pm 0.047		<0.01
40 μ mol/L	10	0.272 \pm 0.042		<0.01
Control group	10	0.466 \pm 0.032		

3 讨论

环氧合酶是前列腺素合成过程中的限速酶,有 COX-1、COX-2 和 COX-3 三种。自上世纪 90 年代 COX-2 抑制剂的抗肿瘤作用日益受到人们重视,动物实验也已证明选择性 COX-2 抑制剂可对肿瘤产生显著治疗作用^[5]。COX-2 抑制剂防治肿瘤的机制可能是通过抑制 COX-2 进而抑制肿瘤细胞增殖和诱导凋亡。塞来昔布是近年来开发的新型非甾体类抗炎药,其抗肿瘤作用已有报道^[6],但其作用机制尚不完全清楚。据此,我们选择了 VEGF-C 和 bcl-2 作为研究对象探讨 COX-2 抑制剂抗肿瘤的作用机制。

肿瘤的生长、浸润和转移是血管生成依赖性的,当肿瘤 > 0.4 mm³ 时,为保证其快速增殖,必须有血管生成^[7]。提示血管内皮生成因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)与恶性肿瘤的发生及生长有一定关系。VEGF-C 是 VEGF 家族成员之一,有较强的促进新生血管和淋巴管形成作用,参与病理性、生理性淋巴管和血管新生。已有实验表明,前列腺癌组织 VEGF-C mRNA 的表达,促进了肿瘤诱导的淋巴管新生,在前列腺癌的淋巴转移中发挥了重要作用^[8]。Cheng 等^[9]对肝癌组织中 COX-2、VEGF、前列腺素(PG)以及肿瘤微血管密度(MVD)的状况进行了检测,发现 COX-2 和 VEGF 在肝细胞癌中的表达均有增高,且 COX-2 与 VEGF 及 MVD 有关($P = 0.003$ 和 $P = 0.004$)。在某些消化道肿瘤中 COX-2 表达与 VEGF 呈正相关,提示 COX-2 可能通过诱导 VEGF 表达上调促进肿瘤生长^[10]。

bcl-2 基因是从滤泡性淋巴细胞中分离出来的一种癌基因。在多种肿瘤中表达,具有抑制肿瘤细胞凋亡的作用^[11]。bcl-2 基因的过度表达并不影响细胞增殖和加速细胞分裂,而是阻止细胞凋亡的发

生,延长肿瘤细胞生存时间^[12]。在对某些皮肤肿瘤的研究中发现,bcl-2 的表达与 COX-2 的过表达有关,COX-2 可能是通过激活 bcl-2 发挥抗凋亡作用而促进皮肤肿瘤形成及发展。

本实验证实了一定浓度的塞来昔布对前列腺癌细胞株 PC-3 中 VEGF-C 及 bcl-2 mRNA 的表达有抑制作用,表明 COX-2 抑制剂可能通过对前列腺癌细胞中 VEGF-C 和 bcl-2 基因表达的抑制来发挥其抗肿瘤作用。这为临床上治疗前列腺癌,特别是非激素依赖型前列腺癌提供了新的方法。

参考文献:

- [1] Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, et al. Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma [J]. Prostate, 2000, 42(1): 73-78.
- [2] Hussain T, Gupta S, Mukhtar H. Cyclooxygenase-2 and prostate carcinogenesis [J]. Cancer Lett, 2003, 191(2): 125-135.
- [3] Wen B, Deutsch E, Eschwege P, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 enhances antitumor effect of irradiation on hormone refractory human prostate carcinoma cells [J]. J Urol, 2003, 170(5): 2036-2039.
- [4] Lin DW, Nelson PS. The role of cyclooxygenase-2 inhibition for the prevention and treatment of prostate carcinoma [J]. Clin Prostate Cancer, 2003, 2(2): 119-126.
- [5] Yamazaki R, Kusunoli 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.
- [6] 朱风尚, 陈锡美, 王毅军, 等. 特异性环氧合酶抑制剂和抗癌药联用对胃癌细胞增殖的影响 [J]. 中华肿瘤杂志, 2007, 29(3): 186-188.
- [7] Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases [J]. Nature, 2000, 407(6801): 249-257.
- [8] 丁国芳, 李继承, 徐银峰, 等. 中国人前列腺癌 VEGF-C mRNA、VEGFR-3 和 CD31 表达与肿瘤转移的关系 [J]. 实验生物学报, 2005, 38(3): 257-261.
- [9] Cheng AS, Chan HL, TO KF, et al. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in hepatitis B virus associated hepatocytes carcinoma [J]. Int J Oncol, 2004, 24(4): 853.
- [10] 蔡瑞霞, 盛霞, 袁至浩, 等. CD105、COX-2 和 VEGF 在结直肠癌中的表达及其与血管新生的关系 [J]. 肿瘤防治研究, 2007, 34(2): 125-127.
- [11] 魏红梅, 郭坤元, 梅家转, 等. 热疗联合足叶乙甙对 K562 体外抑制效应及 bcl-2 的表达 [J]. 肿瘤防治研究, 2007, 34(4): 293-296.
- [12] Haldar S, Negrini M, Monne M, et al. Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells [J]. Cancer Res, 1994, 54(8): 2095-2097.

[编辑:刘红武;校对:贺文]