

NS-398 对肝细胞癌 VEGF、MMP-9 表达的调节

彭利¹, 徐卓¹, 张萌¹, 王顺祥¹, 唐瑞峰¹, 何宏涛¹, 左连富²

Regulation of NS-398 on Expressions of VEGF and MMP-9 in Hepatocellular Carcinoma SMMC-7721 Cell Lines

PENGLI¹, XU Zhuo¹, ZHANG Meng¹, WANG Shun-xiang¹, TANG Rui-feng¹, HE Hong-tao¹, ZUO Lian-fu²

1. Department of Hepatobiliary Surgery, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011; 2. Hebei Cancer Institute

Abstract: **Objective** To explore the role of NS-398 in angiogenesis and invasion in hepatocellular carcinoma. **Methods** For dose-dependent experiments, media containing various concentrations of NS-398 (0, 25, 50, 75 and 100 μmol/L) were used. For time course experiments, media containing various concentrations of NS-398 were used, and the cells were harvested daily for 3 days. The expression of VEGF and MMP-9 in SMMC-7721 cells were determined by RT-PCR and flow cytometry method by the treatment with NS-398. **Results** NS-398 significantly inhibited cell proliferation in both time-dependent and dose-dependent manner. Compared with control group, NS-398 can inhibit COX-2, VEGF and MMP-9 expression in SMMC-7721 cells in a dose and time-dependent. **Conclusion** This study suggested that NS-398 inhibited the expression of VEGF and MMP-9 mRNA and protein in SMMC-7721 cells.

Key words: Hepatocellular Carcinoma; NS-398; VEGF; MMP-9

摘要: **目的** 探讨 NS-398 对肝细胞癌血管生成和侵袭的调节作用。 **方法** NS-398 取 0、25、50、75、100 μmol/L 5 个浓度组, 每个浓度组选取 24h、48h、72h 三个作用时间点进行检测。采用 RT-PCR 和流式细胞技术, 观察 NS-398 对人肝癌 SMMC-7721 细胞株 VEGF、MMP-9 表达的影响。 **结果** NS-398 对 SMMC-7721 细胞有明显的生长抑制作用。与对照组相比, NS-398 能显著抑制 SMMC-7721 细胞 COX-2、VEGF、MMP-9 基因和蛋白表达, 并呈显著的剂量和时间依赖性关系 ($P < 0.001$)。 **结论** NS-398 能显著抑制 SMMC-7721 肝细胞癌中 VEGF、MMP-9 mRNA 和蛋白的表达。

关键词: 肝细胞癌; NS-398; 血管内皮生长因子; MMP-9

中图分类号: R73-76; R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2006)12-0859-03

0 引言

环氧合酶-2 (Cyclooxygenase-2, COX-2) 不但与肿瘤血管生成有关^[1], 还可通过改变肿瘤细胞的侵袭性和粘附性来抑制肿瘤生长^[2]。我们以前实验表明肝细胞癌组织中 COX-2 与 VEGF、MMP-9 蛋白表达和肿瘤微血管密度 (Microvessel density, MVD) 之间呈正相关^[3], 本实验研究 COX-2 特异性抑制剂——NS-398 对肝癌 SMMC-7721 细胞株 VEGF、MMP-9 表达的影响, 初步探讨 NS-398 对肝细胞癌血管生成和侵袭的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养和药物干预方案

收稿日期: 2005-10-19; 修回日期: 2006-01-05
基金项目: 河北省科技攻关计划项目 (04276198)
作者单位: 1. 050011 石家庄, 河北医科大学第四医院肝胆外科; 2. 河北省肿瘤研究所
作者简介: 彭利 (1972-), 男, 博士, 副主任医师, 主要从事肝胆胰肿瘤基础及临床研究

SMMC-7721 细胞分别用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液在含 5% CO₂ 37℃ 培养箱中培养。培养液中分别含有青霉素、链霉素 100 U/ml。将对数生长期的细胞接种于 96 孔培养板, 待细胞贴壁后加入 NS-398。NS-398 取 0、25、50、75、100 μmol/L 5 个浓度组, 每个浓度组选取 24h、48h、72h 三个时间点。每个实验组重复 6 孔。

1.2 主要试剂

NS-398 购自 sigma 公司。一抗山羊抗人 COX-2 多克隆抗体, 鼠抗人 VEGF 单克隆抗体, 兔抗人 MMP-9 单克隆抗体均为 Santa Cruz 产品, Trizol 试剂 (美国 Gibco BRL 公司)。PCR 仪 (美国 PE 公司 PE-9600 型), 流式细胞仪 (美国 B-C 公司 Epics-XL 型)。

1.3 RT-PCR 检测 COX-2、VEGF、MMP-9 mRNA 的表达

按照 Trizol 试剂说明书逐步提取细胞总 mRNA。COX-2 反应条件为: 94℃ 变性 30s; 63℃ 复性

30s;72 延伸 30s。VEGF 反应条件为: 94 变性 30s;63 复性 30s;72 延伸 30s。MMP-9 反应条件为: 94 变性 30s; 63 复性 30s; 72 延伸 30s。进行 35 个循环后进一步延伸 72 5min。COX-2 引物序列: 上游为 5'-AAT GAG TAC CGA AAA TTC-3', 下游为 5'-CAT CTA GTC CGG AGC GGG AAG-3', 扩增片段大小为 420bp。VEGF 引物序列: 上游为 5'-TTG CCT TGC TGC TCT ACC TC-3', 下游为 5'-AAA TGC TTT CTC CGC TCT GA-3', 扩增片段大小为 418 bp。MMP-9 引物序列: 上游: 5'-TTG CCT TGC TGC TCT ACC TC-3', 下游: 5'-AAA TGC TTT CTC CGC TCT GA-3', 扩增片段大小为 120bp。所有引物均由上海生工公司合成, 选取 β -actin 为内参照, 取 10 μ l PCR 产物用 1.2% 的普通琼脂糖凝胶电泳后, 凝胶电泳成像系统观测成像情况。

1.4 流式细胞仪定量检测 COX-2、VEGF、MMP-9 的表达

采用间接免疫荧光标记方法。每份样品加入第一和第二抗体工作液各 100 μ l。设有 PBS 代替一抗和二抗的阴性对照, 只加一抗和二抗的阳性对照。以荧光指数 (FI) 表示相对含量, $FI = (\text{样品蛋白表达荧光强度} - \text{正常样品的荧光强度}) / \text{正常样品的荧光强度}$ 。

1.5 MTT 法检测细胞增殖抑制情况

在 96 孔培养板中分别加入 25、50、75、100 μ mol/L NS-398, 继续孵育 24、48、72h 后每孔加入 MTT 溶液 (5mg/ml) 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 继续孵育 4~5h, 吸弃孔内培养上清液。每孔加入 150 μ l DMSO, 振荡 10min。用酶联免疫检测仪测定 490nm 处吸光度 (A)。每组取 3 次实验平均值, 计算细胞抑瘤率: 抑瘤率 = (对照组 A - 实验组 A) / (对照组 A - 空白组 A) \times 100%。

1.6 统计学检验

应用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学分析, 组间显著性检验采用析因设计方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 NS-398 对 SMMC-7721 细胞生长的影响

MTT 法测定结果显示, NS-398 对 SMMC-7721 细胞有明显的抑制生长作用, 并呈剂量依赖性和时间依赖性 ($P < 0.001$), 见图 1。

2.2 NS-398 对 SMMC-7721 细胞 COX-2 表达的影响

RT-PCR 和 FCM 结果表明, NS-398 能显著抑

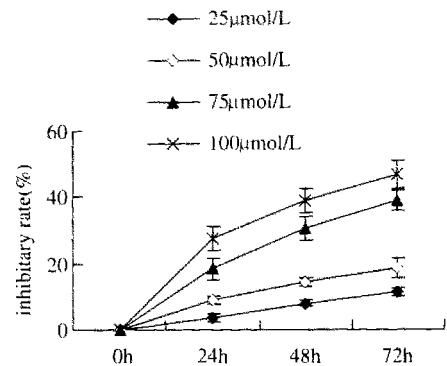


图 1 NS-398 对 SMMC-7721 细胞生长的抑制作用

制 SMMC-7721 细胞 COX-2 基因和蛋白表达, 并呈显著的剂量和时间依赖性关系 ($P < 0.001$)。

2.3 NS-398 对 SMMC-7721 细胞 VEGF、MMP-9 表达的影响

NS-398 能显著抑制 SMMC-7721 细胞 VEGF、MMP-9 基因和蛋白表达, 并呈显著的剂量和时间依赖性关系 ($P < 0.001$), 见表 1、2。

表 1 NS-398 对 SMMC-7721 细胞 COX-2、VEGF、MMP-9 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

| Time (h) | Concentration (μ mol/L) | FI value | | |
|----------|------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | COX-2 | MMP-9 | VEGF |
| 24 | 0 | 1.0012 \pm 0.0155 | 1.0005 \pm 0.0028 | 1.0012 \pm 0.0125 |
| | 25 | 0.9063 \pm 0.0257 | 0.9559 \pm 0.0041 | 0.8805 \pm 0.0149 |
| | 50 | 0.8257 \pm 0.0096 | 0.9059 \pm 0.0058 | 0.7773 \pm 0.0212 |
| | 75 | 0.7442 \pm 0.0202 | 0.8452 \pm 0.0035 | 0.6661 \pm 0.0202 |
| | 100 | 0.4024 \pm 0.0226 | 0.7192 \pm 0.0070 | 0.4282 \pm 0.0030 |
| 48 | 0 | 0.9969 \pm 0.0228 | 0.9986 \pm 0.0036 | 1.0024 \pm 0.0196 |
| | 25 | 0.6339 \pm 0.0245 | 0.8918 \pm 0.0050 | 0.6972 \pm 0.0122 |
| | 50 | 0.4731 \pm 0.0143 | 0.8089 \pm 0.0104 | 0.5835 \pm 0.0132 |
| | 75 | 0.3656 \pm 0.0401 | 0.6719 \pm 0.0081 | 0.4067 \pm 0.0227 |
| | 100 | 0.1981 \pm 0.0593 | 0.5888 \pm 0.0102 | 0.2893 \pm 0.0176 |
| 72 | 0 | 1.0018 \pm 0.0223 | 1.0009 \pm 0.0045 | 0.9964 \pm 0.0261 |
| | 25 | 0.3675 \pm 0.0180 | 0.8190 \pm 0.0038 | 0.5587 \pm 0.0112 |
| | 50 | 0.2879 \pm 0.0125 | 0.7512 \pm 0.0128 | 0.3323 \pm 0.0232 |
| | 75 | 0.1964 \pm 0.0188 | 0.6758 \pm 0.0098 | 0.2615 \pm 0.0266 |
| | 100 | 0.0525 \pm 0.0200 | 0.4298 \pm 0.0127 | 0.0683 \pm 0.0203 |

3 讨论

COX-2 新近被证实具有促进肿瘤生长作用, 可影响肿瘤细胞增殖、分化和凋亡, 最近还发现 COX-2 可通过刺激肿瘤血管生成、促进细胞侵袭和转移能力来促进肿瘤发生和发展。血管生成是肿瘤发生、发展过程中的重要步骤, 与肿瘤的生物行为及预后有关。VEGF 是肿瘤血管生成和侵袭转移过程中的关键因素, 其通过特异性受体 Flk-1、Flt-1 和 Flt-4 选择性作用于内皮细胞发挥作用。MMP-9 是

表 2 NS-398 对 SMMC-7721 细胞 COX-2、VEGF、MMP-9 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

| Time (h) | Concentration ($\mu\text{mol/L}$) | OD value | | |
|----------|-------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | COX-2 | MMP-9 | VEGF |
| 24 | 0 | 1.0623 \pm 0.0613 | 1.0074 \pm 0.0099 | 1.0820 \pm 0.0784 |
| | 25 | 0.8111 \pm 0.0167 | 0.9461 \pm 0.0082 | 0.8007 \pm 0.0557 |
| | 50 | 0.7033 \pm 0.0276 | 0.8794 \pm 0.0082 | 0.6900 \pm 0.0347 |
| | 75 | 0.5259 \pm 0.0124 | 0.8104 \pm 0.0232 | 0.5009 \pm 0.0487 |
| | 100 | 0.3522 \pm 0.0593 | 0.7444 \pm 0.0105 | 0.6852 \pm 0.0593 |
| 48 | 0 | 1.0777 \pm 0.0675 | 1.0006 \pm 0.0093 | 1.0591 \pm 0.1026 |
| | 25 | 0.7149 \pm 0.0271 | 0.8647 \pm 0.0127 | 0.7364 \pm 0.0459 |
| | 50 | 0.5942 \pm 0.0942 | 0.8022 \pm 0.0148 | 0.5942 \pm 0.0942 |
| | 75 | 0.4577 \pm 0.0366 | 0.7310 \pm 0.0179 | 0.4577 \pm 0.0366 |
| | 100 | 0.2928 \pm 0.0466 | 0.6606 \pm 0.0314 | 0.2928 \pm 0.0466 |
| 72 | 0 | 1.0686 \pm 0.0614 | 1.0086 \pm 0.0090 | 1.0686 \pm 0.0614 |
| | 25 | 0.5777 \pm 0.0432 | 0.6208 \pm 0.0022 | 0.5777 \pm 0.0432 |
| | 50 | 0.4706 \pm 0.0251 | 0.5845 \pm 0.0038 | 0.4706 \pm 0.0251 |
| | 75 | 0.3395 \pm 0.0123 | 0.5699 \pm 0.0080 | 0.3529 \pm 0.0286 |
| | 100 | 0.1866 \pm 0.0442 | 0.4369 \pm 0.0551 | 0.2253 \pm 0.0632 |

基质金属蛋白酶家族中的重要成员,其过度表达与肝细胞癌血管生成和侵袭转移密切相关。

已有研究表明 COX-2 在肝细胞癌中高表达,但对 COX-2 与肿瘤血管生成的研究较少。Tsuji 等^[1]研究发现,转染 COX-2 基因可以使培养的结肠癌细胞株在过度表达 COX-2 的同时,促使 VEGF、TGF- β 和 bFGF 等肿瘤血管生成因子的分泌,并促进联合培养的人脐静脉内皮细胞株在 I 型胶原凝胶中增殖、变形、向肿瘤细胞迁移和形成网状的内皮细胞索。Liu 等^[4]进一步进行体内研究,结果显示选择性 COX-2 抑制剂能显著抑制前列腺癌血管生成。Tsuji 等^[5]将 COX-2 基因转染入人结肠癌细胞株,发现该转染细胞具有更强的侵袭能力,同时可以被 COX-2 选择性抑制剂阻断。进一步研究发现,这种侵袭能力的增强与 MMP-2 的活化及 MMP-1 的表达增加有关。以前实验已证实肝细胞癌组织中 COX-2 与 VEGF、MMP-9 和 MVD 表达之间存在着

正相关,本研究结果显示 COX-2 特异性抑制剂 NS-398 可以显著降低肝癌 SMMC-7721 细胞株 VEGF 基因和蛋白的表达水平,进一步表明在肝细胞癌 COX-2 可通过上调 VEGF 与 MMP-9 表达水平来促进肿瘤血管生成和侵袭。

肿瘤细胞、巨噬细胞及血管内皮细胞在细胞因子诱导下,可上调 COX-2 表达^[6],增加的 PGEs 与 PGE 受体结合,通过 EP/cAMP 等途径激活各种胞内激酶,与核内受体 PPAR 等结合后作用于或直接作用于 VEGF、MMP-9 基因^[7],诱导 VEGF、MMP-9 表达水平上调,但具体机制尚有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, et al. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells[J]. Cell, 1998, 93(5):705-716.
- [2] Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2[J]. Cell, 1995, 83(3):493-501.
- [3] 彭利,左连富,王顺祥,等. 肝癌组织中 COX-2、VEGF、MMP-2、MMP-9 的表达及相互关系的免疫组织化学研究[J]. 实用肿瘤杂志, 2005, 20(2):134-136.
- [4] Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses angiogenesis and the growth of prostate cancer in vivo[J]. J Urol, 2000, 164(3 pt 1):820-825.
- [5] Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential[J]. Proc Natl Acad Sci, 1997, 94(7):3336-3340.
- [6] Mestre JR, Mackrell PJ, Rivadeneira DE, et al. Redundancy in the signaling pathways and promoter elements regulating cyclooxygenase-2 gene expression in endotoxin-treated macrophage/monocytic cells[J]. J Biol Chem, 2001, 276(6):3977-3982.
- [7] Bamba H, Ota S, Kato A, et al. Prostaglandins up-regulate vascular endothelial growth factor production through distinct pathways in differentiated U937 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 273(2):485-491.

[编辑:贺文]