

[文章编号] 1000-1182(2010)06-0591-04

环氧化酶-2抑制剂对舌癌细胞侵袭及基质金属蛋白酶-2表达的影响

李伟忠¹ 霍秋菊¹ 王晓燕²

(1.南方医科大学南方医院 口腔科; 2.病理科, 广东 广州 510515)

[摘要] 目的 探讨环氧化酶-2(Cox-2)抑制剂塞来昔布对人舌鳞癌细胞系Tca8113侵袭、黏附及基质金属蛋白酶-2(MMP-2)分泌的影响。方法 Tca8113细胞经塞来昔布作用24 h后, 免疫组织化学方法检测细胞Cox-2蛋白表达, 细胞外基质黏附实验检测细胞黏附力, Boyden侵袭小室测定细胞的侵袭力, 酶联免疫吸附法检测培养液中MMP-2的水平。结果 Tca8113细胞经塞来昔布作用24 h后, Cox-2蛋白表达明显受到抑制, Boyden侵袭小室细胞穿膜数和细胞外基质黏附率明显降低, 同时, 培养液中MMP-2水平也明显降低。结论 Cox-2抑制剂塞来昔布可抑制Tca8113细胞Cox-2蛋白表达, 其抑制细胞侵袭力和黏附率作用可能与抑制MMP-2分泌有关。

[关键词] 环氧化酶-2; 鳞状细胞癌; 侵袭; 基质金属蛋白酶-2

[中图分类号] R 739.98 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2010.06.005

Effect of cyclooxygenase-2 inhibitor on expression of matrix metalloproteinase-2 and invasion of tongue squamous cell carcinoma cell line Tca8113 LI Wei-zhong¹, HUO Qiu-ju¹, WANG Xiao-yan². (1. Dept. of Stomatology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Dept. of Pathology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of celecoxib on adhesion, invasion, migration and matrix metalloproteinase-2(MMP-2) expression of tongue squamous cell carcinoma cell line Tca8113 cells. **Methods** Following 24 h incubation with celecoxib, the Tca8113 cells were detected for cell adhesion and migration using cell adhesion assay and Boyden chamber invasion assay. The expression of cyclooxygenase-2(Cox-2) protein in Tca8113 cells was detected with SP immunohistochemistry staining. The MMP-2 level in supernatant was detected with enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** The adhesion and Boyden chamber invasion assays showed that, after treatment with celecoxib, the ability of adhesion and migration of Tca8113 cells was significantly inhibited. Celecoxib could decrease the expression of Cox-2 protein in Tca8113 cell and decrease the MMP-2 level in supernatant. **Conclusion** Cox-2 inhibitor celecoxib can significantly inhibit the adhesion and migration of Tca8113 cells. The inhibitory effect on adhesion and migration may be correlative with its effect on decrease of Cox-2 protein expression and secretion of MMP-2 in Tca8113 cells.

[Key words] cyclooxygenase-2; squamous cell carcinoma; invasion; matrix metalloproteinase-2

环氧化酶(cyclooxygenase, Cox)是花生四烯酸生物合成前列腺素的限速酶, 目前发现有Cox-1和Cox-2亚型, 其中Cox-2是诱导型酶, 在正常组织中不表达或极低量表达, 但在炎症、组织损伤、肿瘤发生发展等过程中表达增加, Cox-2的过度表达与肿瘤的发生、生长、侵袭和转移有关^[1-4], 而肿瘤转移的机制较为复杂, 其中基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase-2, MMP)具有十分重要的作用,

因此, 研究Cox及其抑制剂在防治肿瘤发生及转移中的作用成为近年来研究的重点。本实验应用Cox-2抑制剂塞来昔布(celecoxib)作用于人舌鳞癌Tca8113细胞, 研究细胞黏附、侵袭和迁移能力的变化, 并检测细胞MMP-2的分泌情况, 探讨Cox-2选择性抑制剂塞来昔布对Tca8113细胞侵袭转移能力的影响及可能机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

新生牛血清(杭州四季青公司), RPMI 1640培

[收稿日期] 2009-10-20; [修回日期] 2010-03-10

[基金项目] 广东省自然科学基金资助项目(06024396)

[作者简介] 李伟忠(1962—), 男, 湖南人, 副教授, 博士

[通讯作者] 李伟忠, Tel: 020-61642025

培养基(Gibco公司,美国),纤维粘连蛋白(fibronectin, FN)(BD Labware公司,美国), Boyden趋化小室(Costar公司,美国),二甲基亚砷、磷酸盐缓冲液(Sigma公司,美国),PVDF膜(Millipore公司,美国),塞来昔布(辉瑞大连公司),用低糖DMEM培养液稀释备用。鼠单抗MMP-2和Cox-2(北京中杉金桥公司),Soniprep 150型超声粉碎仪(MSE公司,英国),SDS-PAGE电泳及转移系统(BIO-RAD公司,美国),Odyssey红外荧光扫描成像系统(LI-COR Bio-science公司,美国)。

1.2 细胞系及细胞培养

人舌鳞癌Tca8113细胞,上海交通大学第九人民医院·口腔医学院建株,南方医科大学南方医院口腔科实验室保存。将细胞培养于含10%灭活胎牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素、100 U·mL⁻¹链霉素的低糖DMEM培养液中,置于37℃、5%CO₂孵箱内培养。待细胞铺满瓶底后,用0.25%的胰蛋白酶和0.02% EDTA消化成单个细胞,传代后分瓶并扩大培养。取对数生长期的细胞用于实验。

1.3 Boyden小室法检测细胞体外侵袭力

用Boyden趋化小室(孔径8.0 μm,直径65 mm,厚度10 μm的膜)将Transwell分成上、下层。FN溶解于无血清DMEM低糖培养基,稀释成适当浓度,滴加600 μL上述FN溶液于下层,包被过夜。2 mmol·L⁻¹ EDTA消化细胞,离心,用无血清DMEM低糖培养基冲洗2次,最后用无血清DMEM低糖培养液重悬,调节细胞密度为每毫升1×10⁴个,取100 μL细胞悬液加入Transwell的上室,分别加入10、20 μmol·L⁻¹塞来昔布,对照区加入等量的0.2% DMEM培养液。将各组趋化小室置于37℃、5%CO₂孵箱内孵育24 h,取出趋化小室,用棉签擦去上层未迁移的细胞,洗膜,结晶紫染色,70%乙醇脱水,100%乙醇脱水,显微镜下随机计数4个不同视野的穿膜细胞数,计数膜下的细胞数,以膜下细胞的数量表示细胞迁移的快慢。

1.4 细胞基质黏附实验

用无血清培养基DMEM将FN基质配制成0.04 μg·μL⁻¹备用,96孔板每孔中铺FN基质2 μg,放于超净台中风干过夜;96孔板每孔加入适量无血清低糖DMEM细胞培养液,放置60~90 min,洗去多余的胶,取培养的肿瘤细胞以每孔4×10⁴个(接种前在含10、20 μmol·L⁻¹塞来昔布的培养基中孵育24 h)接种在铺胶的96孔板中,设4个重复孔,放入37℃、5%CO₂培养箱中培养2 h,然后每孔加入MTT 10 μL(5 g·L⁻¹),继续培养4 h,每孔加入二甲基亚砷200 μL,在振荡器上振荡10 min,然后在酶标仪

490 nm处读取吸光度值A,计算细胞黏附率。黏附率=(实验组A_{490 nm}值/对照组A_{490 nm}值)×100%。

1.5 免疫组织化学法观察Tca8113细胞Cox-2蛋白的表达

SP免疫组织化学法:将细胞接种于多聚赖氨酸(1:10)处理过的玻片上,加塞来昔布(20 μmol·L⁻¹),对照组加等量PBS,培养24 h,待其长成单层后取出细胞爬片,用95%的乙醇固定37℃,15 min;用10%正常山羊血清封闭,滴加1:100稀释的Cox-2抗体,4℃过夜。PBS冲洗。滴加生物素标记的二抗,37℃孵育10~30 min。PBS冲洗。每张切片加50 μL链酶亲和素-过氧化酶溶液,37℃或室温孵育10 min。PBS冲洗。DAB显色,室温下染色时间3~5 min。复染,脱水透明,封片。

1.6 酶联免疫吸附法

以每孔1×10⁵个细胞接种于6孔板,贴壁后分别加入塞来昔布,其浓度分别为0、10、20 μmol·L⁻¹,对照组加入0.2% DMEM,培育24 h,收集上清。取0.5 mL上清加入0.1 mL HCl,离心10 min收集上清,再加入0.1 mL NaOH以中和酸性化的样品。将200 μL标准品或样品分别加入相应孔中,然后按MMP-2酶联免疫吸附法试剂盒要求进行。在酶联免疫检测分析仪上测定吸光度值A_{450 nm},每一标准品及样品均设置4个复孔。

1.7 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件进行分析。

2 结果

2.1 塞来昔布对Tca8113细胞迁移、黏附能力影响

塞来昔布10、20 μmol·L⁻¹作用Tca8113细胞24 h后穿过滤膜的细胞数明显少于空白对照组,同时,其细胞黏附能力也明显下降,与对照组相比,差异有统计学意义(P<0.01),见表1及图1。

表1 塞来昔布对Tca8113细胞迁移、黏附率及MMP-2分泌的影响

Tab 1 Effect of celecoxib on migration, adhesion and MMP-2 level of Tca8113 cells

n=4, $\bar{x} \pm s$			
项目	迁移数/个	黏附率/%	MMP-2/(ng·mL ⁻¹)
对照组	313.00±18.67	75.25±5.14	8.68±0.51
10 μmol·L ⁻¹	172.50±7.85 ^a	34.20±5.26 ^a	7.44±0.87 ^b
20 μmol·L ⁻¹	99.25±6.80 ^{ac}	24.28±4.17 ^{ac}	4.96±0.48 ^{ac}
F值	310.107	122.634	34.422
P值	0.000	0.000	0.000

注:与对照组相比,^aP<0.01; ^bP<0.05;与10 μmol·L⁻¹浓度组相比,^cP<0.01。

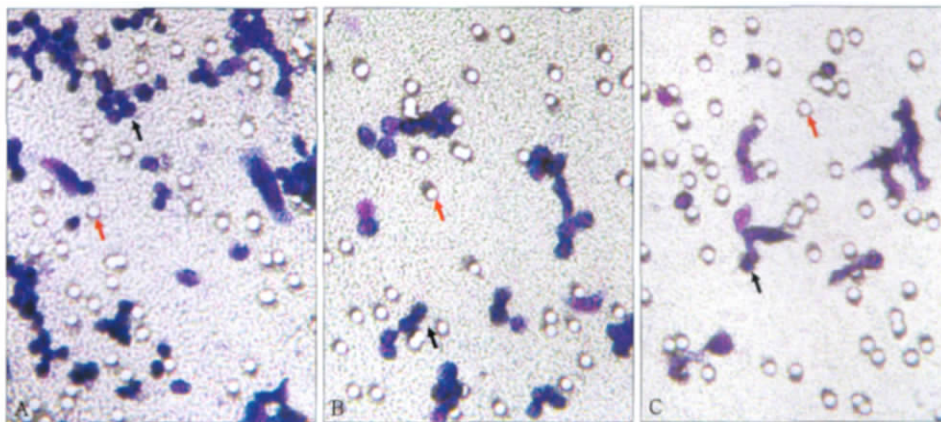


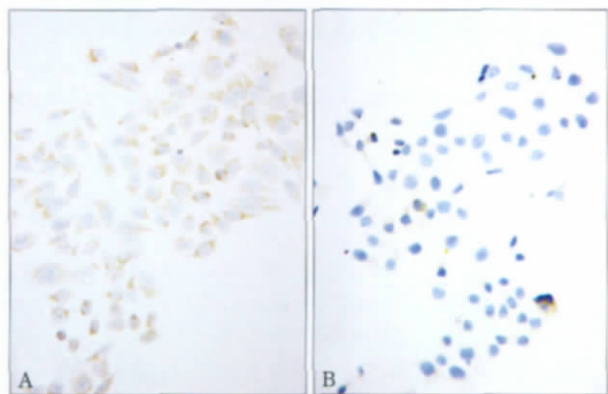
图1 塞来昔布作用24 h后对Tca8113细胞侵袭力的影响 倒置相差显微镜 ×200
A: 对照组; B: 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; C: 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组。红箭头: Transwell小室聚碳酸酯膜上的微孔; 黑箭头: Transwell小室聚碳酸酯膜背面的结晶紫染色的细胞。

图1 塞来昔布作用24 h后对Tca8113细胞侵袭力的影响 倒置相差显微镜 ×200

Fig 1 Effect of celecoxib on invasion of Tca8113 cells after 24 h inverted phase contrast microscope ×200

2.2 Cox-2蛋白在Tca8113细胞的表达

Cox-2蛋白在Tca8113细胞呈阳性表达, 主要在细胞浆中表达, 阳性染色为粗细均匀的棕黄色颗粒, 胞核一般不着色。但采用塞来昔布20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理细胞后, 在其抑制迁移、黏附的同时, 也抑制了Cox-2蛋白的表达(图2)。



A: 对照组; B: 塞来昔布(20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理48 h。

图2 Cox-2蛋白在Tca8113细胞的表达 SP ×400

Fig 2 Expression of Cox-2 protein in Tca8113 cells SP ×400

2.3 塞来昔布对细胞MMP-2分泌的影响

如表1所示, 塞来昔布作用Tca8113细胞24 h后培养液中MMP-2水平显著低于对照组, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组与对照组相比, MMP-2降低有统计学意义($P=0.023$), 且20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组与对照组及10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组相比, 均有显著性差异($P<0.001$), 提示: 塞来昔布具有抑制Tca8113细胞分泌MMP-2的作用。

3 讨论

环氧化酶又称前列腺素内过氧化物合酶(prostaglandin endoperoxide synthase, PGES), 是前列腺素从其前体花生四烯酸合成过程中的重要限速酶。环氧化酶有2个亚型: Cox-1和Cox-2。Cox-1在体内分布广泛, 是一种持续表达于许多组织细胞内

的结构酶, 能促进生理性前列腺素的合成, 维持和调节组织细胞正常的生理活动, 保持自身稳定, 具有重要的生理功能。Cox-2在氨基酸序列上与Cox-1同源性达60%, 除了中枢神经系统、肾脏和精囊外, 在大多数正常组织中检测不到Cox-2, 但当机体受到不同的炎症反应和促有丝分裂刺激后, 便可产生Cox-2。各种生长因子、致炎细胞因子、致癌剂、胆汁酸和紫外线光谱照射均为Cox-2表达的刺激因素, 因此, Cox-2又被称为诱导型酶^[5-6]。

近年来的研究发现: Cox-2的过表达除与恶性肿瘤的发生、发展有关外, 还具有促进肿瘤浸润和转移的作用。其除了通过促进肿瘤细胞增殖和血管形成等间接促进肿瘤转移外, 还可能通过以下途径促进细胞的侵袭和转移: 1)诱导基质金属蛋白酶的表达促进肿瘤的转移; 2)抑制E-钙黏附素的表达, 钙黏附素表达降低后, 肿瘤细胞的黏附能力下降, 有利于肿瘤细胞的浸润和转移; 3)通过PGE2经由PGE受体4受体信号转导途径上调CD44的表达; 4)诱导尿激酶型凝血酶原激活物受体mRNA的表达进而促进肿瘤的侵袭和转移^[7-8]。Larkins等^[9]通过体外实验显示: 低浓度Cox-2抑制剂NS-398明显抑制乳腺癌细胞系Hs578T和MDA-MB-231的增殖、浸润和转移, 提示Cox-2在癌浸润和转移中发挥作用, 其中, 对基质金属蛋白酶的作用是非常重要的。

MMP是一类含有锌钙的蛋白水解酶类, 根据其作用底物的不同可分为4类: 1)间质胶原酶(MMP-1和MMP-5), 降解底物为 、 、 胶原; 2)明胶酶(型胶原酶), 包括明胶酶A(MMP-2)、明胶酶B(MMP-9), 降解底物为 、 、 型胶原, 纤维蛋白, 弹力蛋白等; 3)基质溶解素(MMP-3、MMP-7、MMP-10), 降解底物为 型胶原、纤维连接蛋白、层黏蛋白; 4)膜型基质金属蛋白酶,

在体内分布很广。它们在中性条件下可降解绝大多数细胞外基质(extracellularmatrix, ECM)成分,特别是MMP-2。MMP在正常稳态组织中表达极少,而在炎症细胞因子、激素、生长因子刺激下其表达量上升,使其在许多生理及病理过程中扮演重要的角色,如炎症、胚胎发生、血管形成、肿瘤侵袭及转移等。MMP的生成调节分成3方面:1)转录调节:ECM成分的改变、生长因子及细胞因子等可使碱性基因的表达水平及mRNA的稳定性迅速出现改变;2)酶原活化:所有MMP都是以无活性的酶原形式分泌,大多数可被组织或血浆中的丝氨酸蛋白酶(如纤维蛋白溶酶)活化,出现肽链裂解及自身催化;3)MMP的抑制:人体内主要存在的MMP内源性抑制剂是金属蛋白酶组织抑制剂及 $\alpha 2$ 巨球蛋白。金属蛋白酶组织抑制剂抑制MMP的作用不仅表现在抑制肿瘤生长及抑制新生血管生成方面,而且还能诱导肿瘤细胞凋亡^[10-12]。实验研究表明:Cox-2的高表达可以引起MMP-2的活性的增强,因此,采用Cox-2抑制剂抑制Cox-2的表达是否能抑制MMP-2的表达,从而降低癌细胞的侵袭和转移,对于恶性肿瘤的防治具有重要意义。本研究前一阶段实验证实,小剂量的Cox-2抑制剂可以抑制Tca8113的生长及诱导细胞凋亡,并且可以增强抗癌药物对肿瘤细胞的杀伤作用,提示Cox-2抑制剂在肿瘤防治方面的作用^[13-14]。本实验仍采用小剂量选择性Cox-2抑制剂塞来昔布作用Tca8113细胞24 h后发现,与对照组相比,塞来昔布可以显著抑制Cox-2蛋白的表达,并降低Tca8113细胞的侵袭及黏附,同时,抑制MMP-2的分泌,其MMP-2分泌量的降低与侵袭力及黏附力的降低呈正相关,从而说明塞来昔布可以通过影响Tca8113细胞MMP的分泌来降低其侵袭能力。

总之,本实验初步证实了选择性Cox-2抑制剂可以通过MMP途径,降低人舌鳞癌细胞的侵袭能力,为选择性Cox-2抑制剂预防头颈癌提供了一定的理论依据,其机制有待进一步探索。

[参考文献]

- [1] Botting RM. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane(1927-2004)[J]. J Therm Biol, 2006, 31(1/2): 208-219.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Kwak YE, Jeon NK, Kim J, et al. The cyclooxygenase-2 selective inhibitor celecoxib suppresses proliferation and invasiveness in the human oral squamous carcinoma[J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1095: 99-112.
- [5] de Groot DJ, de Vries EG, Groen HJ, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs to potentiate chemotherapy effects: From lab to clinic[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2007, 61(1): 52-69.
- [6] Dempke W, Rie C, Grothey A, et al. Cyclooxygenase-2: A novel target for cancer chemotherapy[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2001, 127(7): 411-417.
- [7] Méric JB, Rottey S, Olaussen K, et al. Cyclooxygenase-2 as a target for anticancer drug development[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2006, 59(1): 51-64.
- [8] Sinicrope FA. Targeting cyclooxygenase-2 for prevention and therapy of colorectal cancer[J]. Mol Carcinog, 2006, 45(6): 447-454.
- [9] Larkins TL, Nowell M, Singh S, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 decreases breast cancer cell motility, invasion and matrix metalloproteinase expression[J]. BMC Cancer, 2006, 6: 181.
- [10] Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(3): 161-174.
- [11] Mannello F, Tonti G, Papa S. Matrix metalloproteinase inhibitors as anticancer therapeutics[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2005, 5(4): 285-298.
- [12] Vihinen P, Ala-aho R, Kähäri VM. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in cancer[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2005, 5(3): 203-220.
- [13] 李伟忠, 王晓燕, 丁彦青. 塞来昔布对Tca8113细胞环氧化酶-2表达及诱导凋亡的作用[J]. 华西口腔医学杂志, 2009, 27(4): 374-377, 385.
- [14] LI Wei-zhong, WANG Xiao-yan, DING Yan-qing. Effect of Celecoxib on cyclooxygenase-2 expression and inducing apoptosis in Tca8113 cell lines[J]. West China J Stomatol, 2009, 27(4): 374-377, 385.
- [14] 李伟忠, 王晓燕, 李祖国, 等. 塞来昔布增强博来霉素对人舌鳞状细胞癌Tca8113杀伤作用的研究[J]. 中华口腔医学杂志, 2009, 44(3): 140-143.
- LI Wei-zhong, WANG Xiao-yan, LI Zu-guo, et al. Celecoxib enhances the lethal effects of bleomycin in human tongue squamous carcinoma cell line Tca8113[J]. Chin J Stomatol, 2009, 44(3): 140-143.

(本文编辑 汤亚玲)