

NS-398 抑制 SKOV3 细胞恶性生物学特性的机制

赵婷婷¹, 凌 斌¹, 冯定庆², 申 震¹, 周 颖¹

摘要 目的 探讨环氧合酶 2 (COX2) 抑制剂 NS-398 对卵巢癌细胞恶性生物学特性的影响。方法 以卵巢癌细胞株 SKOV3 为研究对象, 根据 NS-398 的处理分为对照组、实验组。利用 MTS 法和免疫组化法检测 Ki-67 蛋白表达, 从而监测 NS-398 对 SKOV3 细胞增殖的影响; 采用划痕实验和侵袭实验分别观察细胞迁移和侵袭能力的变化, 采用 RT-PCR 法检测基质金属蛋白酶 (MMP) mRNA 的表达情况; 采用实时荧光定量 PCR 及 Western blot 检测上皮间质转化 (EMT) 相关分子表达情况。结果 ① MTS 增殖实验表明 NS-398 对 SKOV3 细胞增殖作用无影响, 免疫组化结果与之一致; ② 划痕实验和侵袭实验分别显示, NS-398 显著下调 SKOV3 细胞的迁移和侵袭能力, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。RT-PCR 检测结果表明 NS-398 抑制 MMP 的 mRNA 表达; ③ Western blot 结果表明 NS-398 上调 SKOV3 细胞 E-cadherin 的表达, 下调 Vimentin、Slug、Snail 的表达。结论 COX2 抑制剂通过阻止 MMP 的表达和 EMT 的发生, 从而下调 SKOV3 细胞的迁移、侵袭能力。

关键词 卵巢上皮癌; NS-398; 迁移; 侵袭

中图分类号 R 737.33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)09-1210-04

肿瘤的恶性生物学行为主要包括三方面: 增殖、迁移、侵袭。迁移和侵袭是卵巢癌相关进展过程中最致命的事件, 其分子机制是癌细胞从原位向远处转移时, 首先过度表达基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP), 通过基质的水解, 使细胞外基质和基底膜所形成的屏障消失或减弱, 使癌细胞发生侵袭, 进一步发生上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 使癌细胞具有了运动迁移能力。研究^[1-3]显示, 在多种肿瘤细胞中 EMT 发生与环氧合酶 2 (cyclooxygenase 2, COX2) 表达上调有关, 如乳腺癌、皮肤鳞癌、肝癌等。NS-398 是一种

选择性的 COX2 抑制剂, 可以穿透细胞膜, 特异性地抑制细胞内 COX2 的活性。该研究探讨 COX2 抑制剂对 SKOV3 细胞恶性生物学特性的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株及细胞培养 人卵巢癌 SKOV3 细胞株购自中国科学院上海细胞所。在含 10% FBS 的 McCoy's 5A 培养基中, 37 °C、5% CO₂ 相对湿度为 95% 的培养箱中培养。待细胞融合达 90% 时传代。

1.2 实验试剂 NS-398 购自中国碧云天生物技术公司; FBS 和 McCoy's 5A 培养基购自美国 GIBCO 公司; 胰蛋白酶 (1:250) 购自美国 AMRESCO 公司; COX2 抗体购自中国北京 Bioss 公司; E-cadherin 抗体和 Vimentin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; GAPDH 抗体和 Snail (L70G2) 抗体购自美国 Cell signaling 公司; Slug 抗体购自英国 Abcam 公司。

1.3 细胞增殖实验 采用 MTS 法, 取对数生长期细胞以 1 000 个/孔的密度接种至 96 孔培养板, 待细胞贴壁, 分别加入 NS-398 (10 μmol/L)、DMSO 处理, 分为: 对照组、NS-398 组、DMSO 组。对照组用溶媒处理, 每组设 3 个复孔。于处理后 24、48、72、96 h 加 MTS 工作液, 1 h 后 490 nm 波长处检测各组吸光度 (OD 值)。

1.4 细胞划痕实验 将细胞 (5×10^4 个/孔) 接种于 12 孔板中培养至细胞单层铺满, 用无菌的 20 μl 枪头在单层细胞上划痕, 用 PBS 洗去划下的细胞, 各孔加入无血清的培养基, 实验组用 10 μmol/L 的 NS-398 处理, 定时观察细胞生长情况并拍照, 迁移率 (%) = (0 h 划痕宽度 - 24 h 划痕宽度) / 0 h 划痕宽度 × 100%。

1.5 Transwell 侵袭实验 在 Transwell 小室孔径 8 μm 的聚碳酸酯微孔滤膜上均匀铺 1:5 稀释的 Matrigel (人工基质胶), 37 °C 放置 2 h, 将单细胞悬液 (5×10^4 个/ml) 接种于 Transwell 小室, 实验组在小室内加入浓度为 10 μmol/L 的 NS-398 无血清培养液, 小室外加入完全培养基, 而对照组小室内加入无血清培养液, 其他一致, 培养 20 h 后取出 Transwell 小室, PBS 漂洗 2 遍。用棉签擦去滤膜上未穿透的细胞, 4% 多聚甲醛固定, 伊红染色镜检, 随机选

2014-05-26 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81072127、81372779、81372777); 安徽省自然科学基金 (编号: 11040606M176、11040606M178)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院¹ 妇产科、² 分子医学重点实验室, 合肥 230001

作者简介: 赵婷婷, 女, 硕士研究生;

凌 斌, 男, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: lingbin.ling@gmail.com

取 5 个 200 倍高倍镜视野计数。

1.6 免疫组化 6 孔板每孔各放 1 个盖玻片,将细胞接种到 6 孔板板中,完全培养基培养过夜后,实验组用 10 μmol/L 的 NS-398 处理,对照组不做任何处理 24 h 后 PBS 洗 3 次,取出玻片用 4% 多聚甲醛固定, PBS 洗 3 次,滴加正常山羊血清封闭 10 min,弃去血清后不洗,滴加一抗 4 °C 孵育过夜后, PBS 洗 3 次,滴加通用型二抗室温下孵育 30 min, PBS 洗 3 次,滴加新鲜配制的 DAB 溶液显色,中性树胶封片。

1.7 RT-PCR 法 收取细胞,预冷 PBS 洗 3 次后,用 TRIzol 试剂提取总 RNA,紫外分光光度计测定其纯度及浓度,按照 PrimeScript[®] RT 试剂盒操作说明书配制逆转录反应体系及操作。靶 cDNA 按照 Premix Taq[®] Version 2.0 试剂盒操作说明书配制 RT-PCR 反应体系,RT-PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后用图像处理系统采集图像。使用 GAPDH 作为本实验的内对照。引物序列见表 1。

表 1 各基因的引物序列及扩增片段长度

引物	序列	扩增片段长度(bp)
GAPDH	F:5'-TAGCCCAGGATGCCCTTGAG-3'	99
	R:5'-GGACCTGACCTGCCGTCTAG-3'	
MMP-2	F:5'-TGATGGTGTCTGCTGGAAAG-3'	240
	R:5'-GACACGTGAAAAGTGCCTTG-3'	
MMP-9	F:5'-AACAGGGCTTGGCTTTGG-3'	146
	R:5'-CGTACTGCTGAGCGATTGG-3'	

1.8 Western blot 法检测相关蛋白表达 收取细胞,冷 PBS 洗 3 次后,加入 60 μl RIPA 冰上裂解 30 min,4 °C、12 000 r/min 离心 30 min,收集上清液并蛋白定量,后 SDS-PAGE 电泳,再电转到 PVDF 膜上,5% 的脱脂牛奶室温封闭 2 h 后,4 °C 一抗孵育过夜,TBS-T 洗后加入相应的二抗孵育 1.5 h,膜经 TBS-T 洗后与 ECL 发光检测剂结合,经 X 线片压片曝光,显示结果。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料的比较采用 *t* 检验。实验作图采用 origin 7.5、GraphPad Prism 5 软件完成。

2 结果

2.1 NS-398 对卵巢癌 SKOV3 细胞株增殖的影响

MTS 实验分为 3 组:对照组、NS-398 组、DMSO 组,由于 NS-398 使用 DMSO 溶剂稀释,因此 DMSO 组作为溶剂对照组。结果显示 3 组细胞增殖生长差

异无统计学意义 ($P > 0.05$) 表明 NS-398 对 SKOV3 细胞株增殖无影响,见图 1。免疫组化法检测 3 组细胞中的增殖细胞相关核抗原 Ki-67 的表达,结果表明 3 组细胞 Ki-67 都呈阳性表达,且表达水平一致,符合 MTS 实验结果,见图 2。

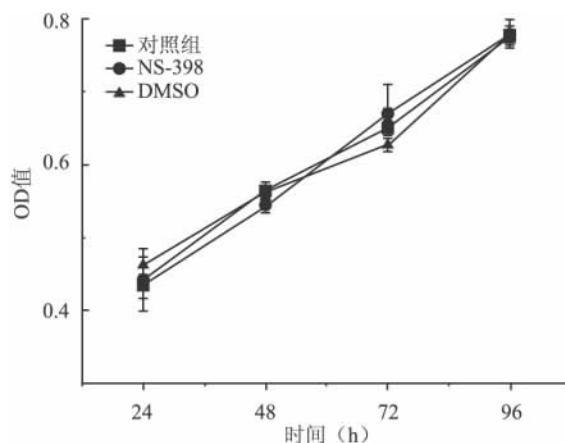


图 1 NS-398 处理后 SKOV3 细胞的生长曲线

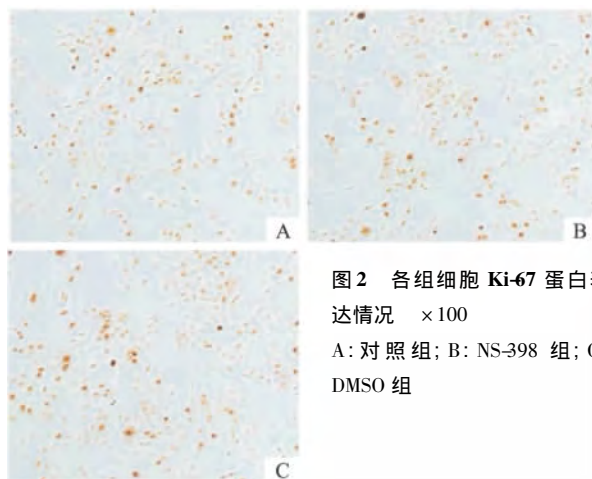


图 2 各组细胞 Ki-67 蛋白表达情况 ×100
A: 对照组; B: NS-398 组; C: DMSO 组

2.2 NS-398 对卵巢癌 SKOV3 细胞株迁移和侵袭能力的影响 细胞划痕实验可以观察到 NS-398 组 24 h 的划痕愈合速度慢于对照组,NS-398 抑制了细胞的迁移能力,两组细胞迁移率的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3。Transwell 侵袭实验表明 NS-398 处理可以增强 SKOV3 细胞株的侵袭能力,实验组与其对照组相比较穿膜细胞数差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4。RT-PCR 检测结果显示,NS-398 抑制 SKOV3 细胞株 MMP-2、MMP-9 mRNA 的表达,见图 5。

2.3 NS-398 对 EMT 相关标记分子的影响 目前认为肿瘤细胞迁移和侵袭能力的提高与 EMT 的发生有关,E-cadherin、Vimentin、Snail、和 Slug 都是与

EMT 发生相关的分子。Western blot 结果显示,NS-398 抑制了卵巢癌 SKOV3 细胞的 Vimentin、Slug、Snail 表达,上调 E-cadherin 表达,见图 6。

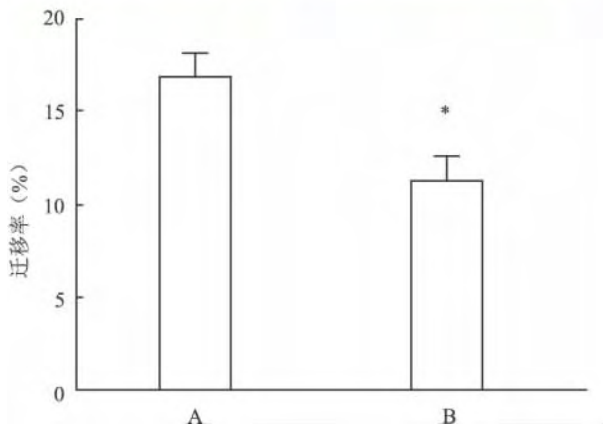
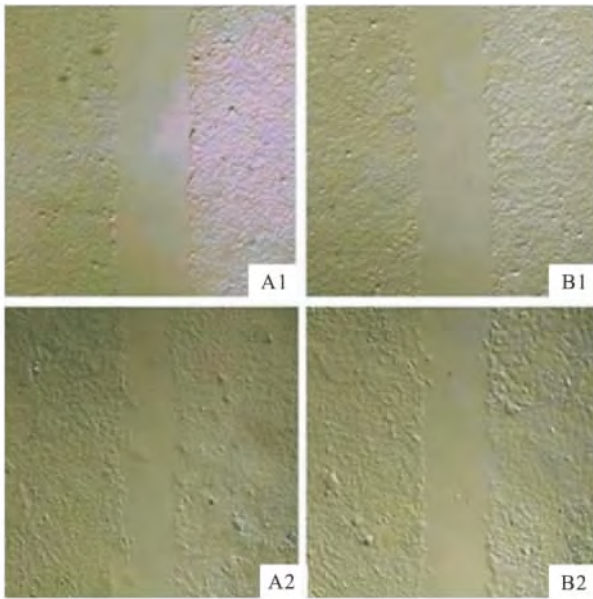


图3 NS-398 处理对 SKOV3 细胞迁移能力的影响 ×40
A:对照组;B:NS-398 组;1:0 h;2:24 h;与对照组比较:* $P < 0.05$

3 讨论

环氧合酶-2 (COX-2) 在正常组织中几乎不表达,与实质肿瘤关系密切,可以促进肿瘤的增殖、迁移、侵袭^[4]。研究^[5]报道 COX2 抑制剂塞来昔布、NS-398 可以抑制膀胱癌细胞株的增殖,而依托度酸只能抑制 3 个中 2 个细胞株的增殖。NS-398 是一种选择性的 COX2 抑制剂。Ki67 作为标记细胞增殖状态的抗原,其功能与有丝分裂密切相关,在细胞增殖中是不可缺少。本研究通过 MTS 方法和免疫组化检测 Ki-67 表达,结果都表明 NS-398 对 SKOV3 细胞增殖无影响。卵巢癌的浸润和转移是复杂的多

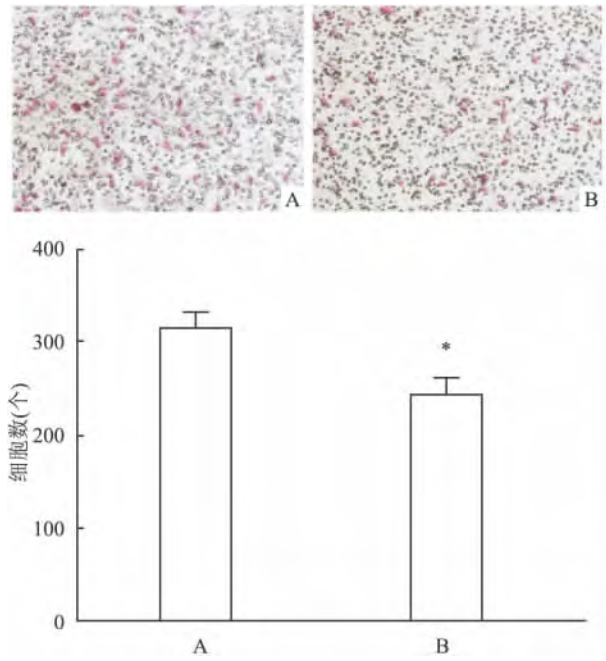


图4 Transwell 侵袭实验 ×200
A:对照组;B:NS-398 组;与对照组比较:* $P < 0.05$

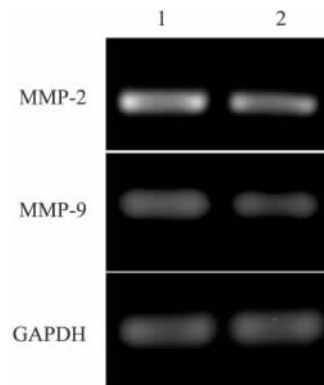


图5 RT-PCR 检测 MMP-2、MMP-9 mRNA 变化情况
1:对照组;2:NS-398 组

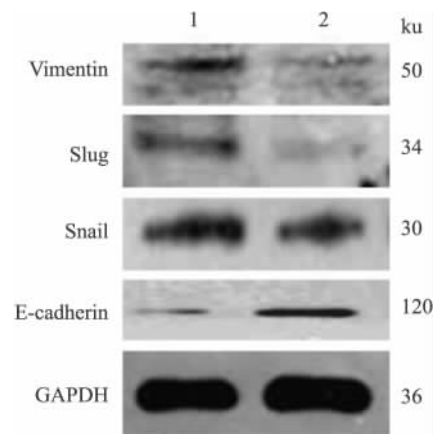


图6 Western blot 检测 EMT 相关蛋白变化情况
1:对照组;2:NS-398 组

步骤序贯过程,是众多因子相互协调以及共同作用的结果,促进其侵袭的重要机制之一是 MMP 的表达。MMP 为一锌离子依赖的中性蛋白酶家族,共同作用几乎可以降解所有的细胞外基质和基底膜成分。在本实验中 NS-398 抑制 COX2 从而下调 MMP-2、MMP-9 的 mRNA 表达,抑制了卵巢癌细胞的侵袭性。EMT 是介导迁移发生的关键因素,E-cadherin 表达降低导致细胞与细胞间黏附性减弱,Vimentin 表达上调使细胞获得间充质细胞表型从而具有运动能力。在肿瘤中 COX2 本身可以参与调节肿瘤细胞的生物学功能,也可以通过其产物 PGE2 发挥作用,PGE2 在致癌、诱导免疫抑制、抑制细胞凋亡、促进血管生成等方面都扮演重要角色。Hu et al^[6] 发现 PGE2 可以下调 E-cadherin 的表达从而促进肿瘤细胞的迁移和侵袭。最近研究^[7] 显示 COX2 是通过 NF- κ B/Snail 信号通路调节 E-cadherin 表达,从而导致胃癌细胞发生 EMT。课题组前期研究显示促性腺激素通过促进 EMT 发生显著上调卵巢癌细胞的迁移侵袭能力并且诱导 COX2 的表达。本研究表明 NS-398 通过抑制 COX2 从而可能导致 Snail 下调,进一步抑制卵巢癌细胞发生 EMT,运动迁移能力减弱,划痕愈合速度慢于对照组。

参考文献

- [1] Bocca C, Ievolella M, Autelli R, et al. Expression of Cox-2 in human breast cancer cells as a critical determinant of epithelial-to-mesenchymal transition and invasiveness [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2014, 18(2):121-35.
- [2] Jang T J. Epithelial to mesenchymal transition in cutaneous squamous cell carcinoma is correlated with COX-2 expression but not with the presence of stromal macrophages or CD10-expressing cells [J]. *Virchows Arch*, 2012, 460(5):481-7.
- [3] Ogunwobi O O, Liu C. Hepatocyte growth factor upregulation promotes carcinogenesis and epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma via Akt and COX-2 pathways [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2011, 28(8):721-31.
- [4] Khan Z, Khan N, Tiwari R P, et al. Biology of Cox-2: an application in cancer therapeutics [J]. *Curr Drug Targets*, 2011, 12(7):1082-93.
- [5] Adhim Z, Matsuoka T, Bito T, et al. *In vitro* and *in vivo* inhibitory effect of three Cox-2 inhibitors and epithelial-to-mesenchymal transition in human bladder cancer cell lines [J]. *Br J Cancer*, 2011, 105(3):393-402.
- [6] Hu Z, Liu X, Tang Z, et al. Possible regulatory role of Snail in NF- κ B-mediated changes in E-cadherin in gastric cancer [J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(3):993-1000.
- [7] Liu X J, Chen Z F, Li H L, et al. Interaction between cyclooxygenase-2, Snail, and E-cadherin in gastric cancer cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(37):6265-71.

The mechanism of inhibition of NS - 398 on malignant biological characteristics of ovarian cancer

Zhao Tingting¹, Ling Bin¹, Feng Dingqing², et al

(¹Dept of Obstetrics and Gynecology, ²Key Laboratory of Molecular Medicine, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate effects of cyclooxygenase-2 (COX2) inhibitor NS-398 on the biological characteristics of malignant ovarian cancer. **Methods** This study had ovarian cancer cell line SKOV3 as the research object. According to NS-398 treatment, this study was divided into control group, the experimental group. The use of MTS method and immunohistochemical expression of Ki-67 predicted the effect of NS-398 on proliferation and growth of SKOV3 cell, and scratch experiments and invasion assay to respectively detect the changes of migration and invasiveness capability and analysis of RT-PCR in matrix metalloproteinase (MMP) mRNA, and Western blot to detect the expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) related molecule. **Results** ① MTS proliferation assay suggested that NS-398 had no influence on proliferation of SKOV3 cell ($P > 0.05$), and consistent with the results of immunohistochemistry. ② Scratch experiments and invasion assay respectively showed NS-398 significantly down-regulate invasiveness and migration of SKOV3 cells, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). RT-PCR test results showed that NS-398 inhibited the mRNA expression of MMP. ③ In Western blot, it was found that NS-398 could increase E-cadherin expression and reduce Vimentin, slug, snail expression in ovarian cancer cells. **Conclusion** NS-398 inhibits migration and invasion of SKOV3 cell by down-regulating expression of MMP and preventing the occurrence of EMT.

Key words epithelial ovarian carcinoma; NS-398; migration; invasion