

肺癌 A549 细胞 COX-2 与 MMP-2 表达的关系

邓洁¹, 周锐², 陈名久², 王建湘¹, 张颂平¹, 汤渝玲¹, 周志国¹

(1. 湖南长沙市第一医院呼吸科, 湖南长沙 410008; 2. 中南大学湘雅二医院, 湖南长沙 410011)

[摘要] 目的: 探讨肺癌 A549 细胞环氧化酶-2(COX-2)表达和基质金属蛋白酶-2(MMP-2)表达之间可能潜在的关系。方法: ①用 Western blot 法检测对照组和干预组(5、10、15 $\mu\text{g/mL}$ 脂多糖(LPS)干预 12 h, 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 干预 6、12、24 h) A549 细胞 MMP-2 蛋白质表达; ②用 ELISA 法检测对照组和干预组 A549 细胞培养上清液 COX-2 活性产物前列腺素 E_2 (PGE_2)及 MMP-2 的变化。结果: ①在 5、10、15 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 12 h 诱导下, 肺癌 A549 细胞 MMP-2 蛋白表达及 MMP-2 和 PGE_2 的分泌增加; ②10 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 干预肺癌 A549 细胞 6、12、24 h 后 MMP-2 蛋白表达及 MMP-2 和 PGE_2 的分泌增加; ③肺癌 A549 细胞 PGE_2 与 MMP-2 正相关($r_1=0.980, r_2=0.975$)。结论: ①肺癌 A549 细胞 PGE_2 与 MMP-2 密切相关; ②肺癌 A549 细胞可能通过激活肺癌 A549 细胞 MMP-2, 参与肺癌的侵袭与转移。

[关键词] 肺癌 A549 细胞; 细菌脂多糖(LPS); 环氧化酶-2(COX-2); 基质金属蛋白酶 2(MMP-2)

[中图分类号] R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)04-0425-04

Association between the expression of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 in human lung adenocarcinoma cell line A549

DENG Jie¹, ZHOU Rui², CHENG Ming-jiu², WANG Jian-xiang¹,
ZHANG Song-ping¹, TANG Yu-ling¹, ZHOU Zhi-guo

(1. Department of Respiratory, the First Hospital of Changsha, Hunan Changsha 410008, China;

2. Department of Respiratory, the 2nd Xiangya Hospital, Central South University, Hunan Changsha 410011, China)

[Abstract] **Aim:** To study the effect of the change of COX-2 on the expression of MMP-2 in human lung adenocarcinoma cell line A549 and the relationship between the expression of COX-2 and MMP-2. **Methods:** ①Human lung adenocarcinoma cell line A549 were stimulated in different concentration(5, 10, 15 $\mu\text{g/mL}$) of LPS for 12 h and in 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS for different time(6, 12, 24 h). After stimulation, human lung adenocarcinoma cell line A549 were collected to measure the expression of MMP-2 for western blot analysis. ②And the supernatants were collected to measure the stable metabolite of PGE_2 and MMP-2 using enzyme-linked immunosorbent assays(ELISA). **Results:** ①After Human Lung Adenocarcinoma Cell Line A549 were stimulated in different concentration(5, 10, 15 $\mu\text{g/mL}$) of LPS for 12 h, the MMP-2 protein of cells expression and the secretion of MMP-2 and PGE_2 increased in human Lung Adenocarcinoma Cell Line A549 in a concentration-dependent manner within 12 h; ②After Human Lung Adenocarcinoma Cell Line A549 were stimulated in 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS for different time(6, 12, 24 h), the

[收稿日期] 2009-04-29

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(08JJ3049)

[作者简介] 邓洁(1971-), 女, 主治医师, 研究方向: 肺癌转移与侵袭的基础与临床研究

secretion of PGE_2 increased, simultaneously, the MMP-2 protein of cells expression and the secretion of MMP-2 also increased in a time-dependent manner; ③MMP-2 has positive correlation with PGE_2 . The correlation coefficients was 0.980 and 0.975, respectively. **Conclusion:** ①MMP-2 has positive correlation with PGE_2 in human Lung Adenocarcinoma Cell Line A549; ②Stimulating MMPs, specially MMP-2 overexpression may be one of the pathways of COX-2 to promote to the invasion and metastasis of lung cancer.

[Key words] human lung adenocarcinoma cell line A549; lipopolysaccharide(LPS); cyclooxygenase-2(COX-2); matrixMetalloproteinase-2(MMP-2)

肺癌是我国发病率最高的恶性肿瘤之一,5年生存率低于15%,肺癌的浸润和转移是导致患者治疗失败和死亡的主要原因。环氧化酶-2(COX-2)是花生四烯酸转化为前列腺素(PGs)的重要的限速酶。COX-2有两种酶的活性,将花生四烯酸转化为具有多种生物活性的小分子物质,主要包括 PGE_2 、 PGF_2 、 PGD_2 、 PGI_2 及血栓素(TXs)等。它们可以通过多种途径参与机体的生理及病理生理过程。最近国内外大量研究表明,COX-2在许多肿瘤的发生发展中起着重要作用,COX-2不仅通过促进细胞增殖、血管生成,抑制凋亡参与多种肿瘤的发生过程,而且还可利用不同的途径来促进肿瘤的侵袭与转移,COX-2可能通过促进基质金属蛋白酶(MMPs)表达上调,尤其是基质金属蛋白酶2(MMP-2)的表达显著升高,成为其促进肿瘤细胞的浸润、转移的可能途径之一。本研究通过Western blot、ELISA法探讨肺癌A549细胞COX-2、MMP-2表达及其分子机制。旨在通过此研究探讨COX-2、MMP-2对患者的预后的影响,并在预防肺癌的浸润、转移中寻找新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

肺癌A549细胞(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所提供),DMEM、胎牛血清(Gibco-BRL Life Technologies, USA),脂多糖(LPS)(美国Sigma公司),兔抗人MMP-2抗体、驴抗兔二抗、ECL-Western blot试剂盒(Satan-Cruze公司), PGE_2 ELISA试剂盒(上海太阳生物技术公司),MMP-2 ELISA试剂盒(上海森雄生物技术公司)

1.2 方法

(1)细胞培养方法 肺癌A549细胞培养在含

有体积分数10%胎牛血清、青霉素、链霉素各100 U/mL的DMEM培养基中,置37℃饱和湿度含体积分数5% CO_2 和95%空气的恒温箱中无菌培养。体积分数0.25%胰蛋白酶消化传代。取指数生长期的A549细胞,以 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 细胞接种于10 cm培养皿中,细胞长至80%融合时,弃去含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养基,Hank's液洗2次,换以新鲜无血清培养基,然后分别加入LPS干预。

(2)脂多糖干预方法 以上细胞分实验组(含浓度组和时间组)和对照组,浓度组按LPS的质量浓度分3个亚组,每个亚组3瓶细胞加入终质量浓度为5、10、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的LPS处理细胞12 h;时间组加入10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ LPS后按刺激时间分3个亚组,分别处理6、12和24 h。对照组细胞培养基中不加入任何试剂。A549细胞培养至要求的时间时,吸取培养基入EP管,1 000 r/min离心10 min,收集上清液,-70℃冰箱保存待测。用ELISA法检测MMP-2、 PGE_2 。

(3)MMP-2蛋白表达测定(Western blot法) 将以上实验组和对照组细胞用细胞裂解液[(50 mmol/L三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-cl),质量分数为0.1%十二烷基磺酸钠(SDS),100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 苯甲基磺酰氟(PMSF),150 mmol/L氯化钠 pH 8.0]裂解,收集蛋白-70℃冰箱保存。根据《分子克隆实验指南》配制质量分数8%聚丙烯酰胺胶,取40 μg 上述蛋白加等体积的2×加样缓冲液(100 mmol/L Tris.cl,体积分数10% β -巯基乙醇,质量分数4% SDS,体积分数0.2%溴酚蓝,质量分数20%甘油),100℃变性5 min,质量分数8%的SDS-聚丙烯酰胺胶电泳100伏2 h,4℃50 mA电流12 h电转移胶上的蛋白质至硝酸纤维素膜上,体积分数为5%脱脂奶

粉封膜 2 h。用质量分数 0.05% TBS-T 溶液稀释山羊抗人 MMP-2 抗体(1:500),4 ℃ 过夜,质量分数为 0.05% TBS-T 洗膜 3 次,每次 15 min,抗山羊二抗用质量分数 0.05% TBS-T 溶液稀释浓度为 1:4 000,室温下作用 2 h,质量分数为 0.05% TBS-T 洗膜 3 次,每次 15 min,ECL 显影,在自动 X 片洗片机洗片。

(4) PGE₂、MMP-2 的浓度测定 采用 ELISA 夹心法检测 5、10、15 μmol/L 的 LPS 刺激 A549 细胞 12 h 后细胞培养上清液和 10 μmol/L 的 LPS 分别刺激 6、12、24 h 后细胞培养上清液 PGE₂ 浓度和 MMP-2 浓度,严格按试剂盒说明书操作。

1.3 统计分析

应用 SPSS 10.0 统计软件包进行统计学分析,数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两样本均数比较采用 *t* 检验,两变量之间的关系采用 pearson 相关分析,以 $P < 0.05$ 作为差异有显著性标准。

2 结果

2.1 ELISA 法检测 LPS 对 PGE₂ 释放水平的影响

5、10、15 μg/mL 的 LPS 刺激 A549 细胞 12 h 后,上清液 PGE₂ 质量浓度分别为 (29.56 ± 1.93)、(45.55 ± 2.58)、(56.66 ± 2.72) pg/mL,对照组为 (15.95 ± 1.55) pg/mL。与对照组比较 5 μg/mL 组 ($t = 9.52, P < 0.02$)、10 μg/mL 组 ($t = 17.03, P < 0.005$)、15 μg/mL 组 ($t = 22.52, P < 0.002$) 差异均有显著性差异。10 μg/mL 的 LPS 处理 A549 细胞 6、12 和 24 h 后上清液质量浓度分别为 (22.77 ± 2.57)、(41.49 ± 0.93)、(44.57 ± 2.14) pg/mL。对照组为 (15.95 ± 1.55) pg/mL。与对照组比较 6 h 组 ($t = 3.94, P < 0.01$)、12 h 组 ($t = 24.56, P < 0.001$) 和 24 h ($t = 18.75, P < 0.001$) 组差异均有显著性。

2.2 ELISA 法检测 LPS 对 MMP-2 释放水平的影响

5、10、15 μg/mL 的 LPS 刺激 A549 细胞 12 h 后,上清液 MMP-2 质量浓度分别为 (23.72 ± 2.50)、(30.48 ± 2.05)、(42.56 ± 1.82) pg/mL,对照组为 (16.10 ± 0.83) pg/mL,与对照组比较 5 μg/mL 组 ($t = 3.30, P < 0.025$)、10 μg/mL 组 ($t = 11.23, P < 0.001$)、15 μg/mL 组 ($t = 22.81, P < 0.001$),差异均有显著性。10 μg/mL 的 LPS 处理 A549 细胞 6、12

和 24 h 后上清液 MMP-2 质量浓度分别为 (14.57 ± 1.93)、(25.39 ± 1.02)、(30.48 ± 2.05) pg/mL,对照组为 (2.66 ± 0.14) pg/mL,与对照组比较 6 h 组 ($t = 10.63, P < 0.001$)、12 h 组 ($t = 38.53, P < 0.001$) 和 24 h 组 ($t = 23.37, P < 0.001$),差异均有显著性。

2.3 PGE₂、MMP-2 释放水平的相关性

将上述 PGE₂、MMP-2 释放水平进行相关性分析,在 LPS 不同质量浓度时 MMP-2 与 PGE₂ 呈正相关 ($r = 0.980, P < 0.01$);在 LPS 不同作用时间 MMP-2 与 PGE₂ 呈正相关 ($r = 0.975, P < 0.01$)。

2.4 Western blot 结果

如图 1A 为 3 种浓度 LPS 对 A549 细胞作用不同时间后 MMP-2 蛋白表达的量-效关系图;图 1B 为 10 μg/mL 的 LPS 刺激 A549 细胞 12 h 后 MMP-2 蛋白表达的时-效关系图。随着 LPS 作用时间的延长和剂量的增加,MMP-2 表达的条带逐渐增强。(图 1C 为 β-actin 参照)

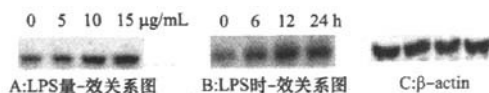


图1 LPS 量效和时效关系图

3 讨论

环氧合酶 (COX) 是花生四烯酸 (AA) 转化为前列腺素 (PGs) 的限速酶,COX-2 在细胞受到各种刺激后迅速合成,参与多种病理生理过程,包括炎症过程及肿瘤的发生、发展过程。在接受刺激后如 LPS、IL-1 等 COX-2 的表达在 24 h 内可以增加数 10 倍,活化的 COX-2 可以催化花生四烯酸产生多种 PGs,主要是 PGE₂。

MMP-2 为相对分子量 72 000 的基质金属蛋白酶 (MMPs) 的明胶酶类,是一种依赖锌离子的水解蛋白酶,以无活性酶原形式存在,由多种细胞分泌,如成纤维细胞、巨噬细胞、内皮细胞和恶性肿瘤细胞等。MMPs 几乎能降解细胞外基质 (ECM) 的所有成分,促进癌细胞对周围正常组织的侵袭,导致肿瘤的扩散和转移,ECM 和基底膜的主要结构蛋白是 IV 型胶原,而 MMP-2 和 MMP-9 是降解 IV 型胶原最主要的酶,在癌细胞的侵袭与转移过程中起着重要的作用。

本实验用 ELISA 法检测 LPS 在 5、10、15 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度和 10 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度在 6、12、24 h, 肺腺癌 A549 细胞 PGE_2 释放水平和 MMP-2 释放水平。实验结果表明, 随着 LPS 浓度的增加和时间的延长, 肺腺癌 A549 细胞 PGE_2 、MMP-2 逐渐增加。对两组数据进行相关分析发现 MMP-2 分泌程度与 PGE_2 分泌程度正相关, PGE_2 是 COX-2 的产物, 从而间接推断出 COX-2 与 MMP-2 正相关。COX-2 可能上调 MMP-2 促进肿瘤细胞的侵袭能力。

Tsujii 等^[1]对 COX-2 的研究表明在结肠癌细胞中 COX-2 高表达使 MMP-2 表达增强, 具有更强侵袭力。COX-2 抑制剂舒林酸可逆转 COX-2 过表达的 Caco-2 细胞的生化改变, 降低其侵袭性。在肺癌中 COX-2 可诱导 MMP-2 表达上调而增加癌组织的侵袭力^[2]。Masferrer 等^[3]报道, COX-2 影响 MMP-2 的水平, 使 MMP-2 激活。Byun 等^[4]也发现在非小细胞肺癌中 COX-2 与 MMP-2 有密切的关系, 二者与肺癌患者预后相关。国内翁晓丹等^[5]报道在非小细胞肺癌(NSCLC)中 COX-2 与 MMP-2 表达成正相关。左顺庆等发现 COX-2、MMP-2 在 NSCLC 组织中均呈高表达, 其在肺癌侵袭、转移中起重要作用^[6]。

本实验还用 Western blot 法测定 MMP-2 蛋白表达情况, 实验结果表明随着 LPS 浓度的增加和时间的延长, 肺腺癌 A549 细胞 PGE_2 释放水平逐渐增加, MMP-2 蛋白表达条带逐渐增强。 PGE_2 与 MMP-2 表达正相关, 进一步证实 COX-2 可能上调 MMP-2 表达而促进肿瘤的侵袭与转移。

通过研究 COX-2 和 MMP-2 在肺癌细胞的表达

及 COX-2 上调 MMP-2 表达这一现象有助于了解 COX-2 在肺癌发病机制中的作用, COX-2 促进肺癌浸润转移的途径之一可能是通过诱导 MMPs 尤其是 MMP-2 上调而促进肺癌的侵袭力, 从而为肺癌的防治寻找新的靶点。

[参考文献]

- [1] TSUJII M, KAMANO S, DUBOIS R N. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(7):3336-3340.
- [2] MEI-REN PAN, LEA-YEA CHUANG, WEN-CHUN HUNG. Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit matrix metalloproteinase-2 expression via repression of transcription in lung cancer cells[J]. *FEBS Letters*, 2001, 508(3):365-368.
- [3] MASFERRER J L, LEAHY K M, KOKI A T, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(5):1306-1311.
- [4] BYUN J H, LEE M A, ROH S Y. Association between cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 expression in non-small cell lung cancer[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2006, 36(5):263-268.
- [5] 翁晓丹, 尤庆生, 施公胜. COX-2、VEGF、MMP-2 在非小细胞肺癌中的表达及其意义[J]. *南通大学学报:医学版*, 2007, 27(6):491-493.
- [6] 左顺庆, 郭家龙, 季艳梅. COX-2 和 MMP-2 在非小细胞肺癌组织中的表达及意义[J]. *山东医药*, 2008, 48(17):34-35.

[责任编辑:陈咏梅]