

# COX-2 反义寡核苷酸抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的研究

刘霞<sup>1</sup>, 刘文楼<sup>2</sup>, 吴迪<sup>1</sup>, 卓士超<sup>1</sup>

1. 徐州市中心医院病理科, 江苏 徐州 221009; 2. 武汉大学中南医院肿瘤科, 湖北 武汉 430071

**摘要:** **目的** 通过研究环氧合酶(COX)-2 反义寡核苷酸对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖抑制作用并分析其抑制原理,探讨 COX-2 反义寡核苷酸对乳腺癌的作用意义。**方法** MDA-MB-231 细胞分为 3 组培养:对照组、正义寡核苷酸组及反义寡核苷酸组。MTT 实验检测细胞的增殖情况;转染 48 h 后,Western blot 检测 COX-2 蛋白的表达;流式细胞仪检测细胞周期的变化。**结果** 与对照组、正义寡核苷酸组比较,COX-2 反义寡核苷酸转染的细胞增殖受到明显抑制;蛋白表达明显下调;G0/G1 期细胞比例明显增多,S 期细胞所占比例显著降低( $P$  均  $< 0.05$ )。**结论** COX-2 反义寡核苷酸可以抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 细胞的增殖;下调 COX-2 蛋白的表达;并调节细胞周期的分布。

**关键词:** 环氧合酶-2; 正义寡核苷酸; 反义寡核苷酸; 乳腺癌; MDA-MB-231 细胞; 细胞增殖

**中图分类号:** R 737.9 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2016)09-1257-03

环氧合酶(cyclooxygenase, COX)又称前列腺素过氧化物合成酶,是花生四稀酸合成前列腺素(PG)过程中重要的限速酶,可以将花生四稀酸代谢成各种前列腺素产物,从而在机体的生理和病理过程中发挥作用。近年研究表明,COX-2 在多种肿瘤组织中过表达,通过多种机制参与肿瘤的发生、发展过程<sup>[1]</sup>。本文以人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株为实验对象,将 COX-2 反义寡核苷酸转染入此细胞,抑制 COX-2 的表达,来观察 COX-2 反义寡核苷酸对 MDA-MB-231 细胞的增殖抑制作用,探讨其在人乳腺癌细胞中的作用及其作用机制,为乳腺癌的基因治疗开辟新的途径。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 由江苏凯基生物技术股份有限公司提供;RPMI-1640 及 L15 培养基购自 GIBCO 公司;FBS 购自 ExCell Biology 公司;COX-2 反义寡核苷酸(序列为 5'-ATT CAG AGA GGT AAC CCC-3')<sup>[2]</sup>、正义寡核苷酸(序列为 5'-GGG GTT ACC TCT CTG AAT-3')<sup>[3]</sup>均购自上海捷瑞生物工程有限公司;Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;MTT 购自 Amresco 公司;细胞周期检测试剂盒、内参一抗(GAPDH)、二抗(羊抗小鼠/兔 IgG-HRP)购自江苏凯基生物技术股份有限公司。

## 1.2 方 法

**1.2.1 细胞培养** 人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞于 90% L15 + 10% FBS 完全培养基,37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养。细胞贴壁生长,0.25% 胰酶消化传代,每 2 天更换培养液,实验取对数生长期细胞。

**1.2.2 细胞转染** 转染前 1 d,接种适当数量的细胞至细胞培养板中,每孔中加入不含抗生素的培养基,使转染时的细胞密度能够达到 30% ~ 50%;稀释 siRNA:用 250 μl 不含血清培养基 Opti-MEM 稀释 5 μl 20 μmol/L 的 siRNA 贮存液,轻轻混匀,室温孵育 5 min;稀释 Lipo2000:用 250 μl 不含血清培养基 Opti-MEM 稀释 5 μl Lipo2000,轻轻混匀并室温孵育 5 min;将 siRNA 与 Lipo2000 轻轻混匀,室温孵育 20 min;将 siRNA-Lipo2000 混合液加入含有细胞的 400 μl 培养基的培养孔中,轻轻混匀;培养 6 h 后,将孔中含 siRNA-Lipo2000 混合液的培养基移去,更换新鲜培养基;将培养板置于 37 °C 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h。

**1.2.3 MTT 实验** 配制浓度为  $5 \times 10^4$  个/ml 的细胞悬液,种于 96 孔细胞培养板中,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h;加入正义寡核苷酸至终浓度 10 μmol/L,转染反义寡核苷酸至终浓度 10 μmol/L,同时设立对照组(仅用常规培养液培养);继续培养 48 h 后测定 OD 值( $\lambda = 490$  nm)。

**1.2.4 流式细胞仪测定细胞周期** 将对数生长期细胞消化接种到六孔板中( $1 \times 10^4$  个/ml),每孔培养液 2 ml;待细胞贴壁后,分别转染正义反义寡核苷酸(同

上),设立对照组;转染 48 h 后,用 0.25% 胰酶(不含 EDTA)消化收集细胞;用 PBS 洗涤细胞 1 次(离心 2 000 rpm, 5 min)收集细胞;制备的单细胞悬液用体积分数为 70% 乙醇固定 2 h(或过夜),4 ℃ 保存,染色前用 PBS 洗去固定液(如需要,细胞悬液用 200 目筛网过滤 1 次);加 100 μl RNase A 37 ℃ 水浴 30 min;再加入 400 μl PI 染色混匀,4 ℃ 避光 30 min;上机检测,记录激发波长 488 nm 处红色荧光。

**1.2.5 Western blot 方法** 将细胞用胰酶消化后,各加入 200 μl 冰预冷细胞裂解液,充分裂解。离心取上清,BCA 法测定蛋白浓度。配制 12% 的分离胶及 5% 成层胶,调整蛋白质标准品终浓度为 0.5 mg/ml, SDS-PAGE 电泳;电压开始设置为 60 V,当蛋白样品进入分离胶后,电压可提高至 90 V。参照预染 Marker 的位置,待目的条带进入凝胶最佳分离区(大约凝胶的 2/3)时,停止电泳。再电转移至 NC 膜(300 mA, 90 min)。封闭 1.5 ~ 2 h 洗膜后加入一抗孵育过夜,洗膜后加入二抗 1 ~ 2 h,洗膜显色。

**1.3 统计学方法** 采用 GraphPad Prism 5 软件进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差

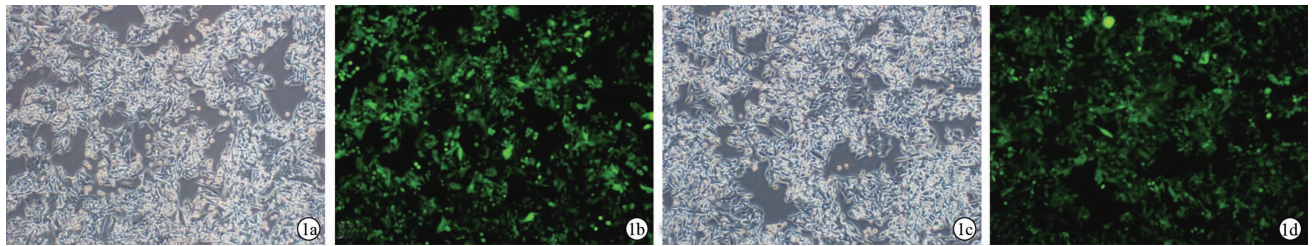
分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 转染反义及正义寡核苷酸后 6 h 后显微镜观察** 结果显示 MDA-MB-231 细胞浆及胞核内见到较多的寡核苷酸。见图 1。

**2.2 MTT 实验转染后 48 h 各组对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的作用** MDA-MB-231 转染后 48 h 对照组 OD 值为  $0.836 \pm 0.010$ , 正义组为  $0.827 \pm 0.017$ , 反义组为  $0.599 \pm 0.025$ 。反义组与对照组及正义组比较差异均有统计学意义( $P$  均  $< 0.05$ )。与对照组相比,MDA-MB-231 细胞株正义组转染后 48 h 生长抑制率为 1.08%;反义组为 28.35%。与正义组相比,反义组转染后生长抑制率为 27.57%,反义组肿瘤细胞的生长受到明显抑制。

**2.3 流式细胞技术检测细胞周期** 与对照组及正义组相比,反义组 G0/G1 期细胞比例增加,S 期细胞比例减少,差异有统计学意义( $P$  均  $< 0.05$ );各组细胞处于 G2/M 期的比例比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 1。



注:1a:反义组倒置显微镜下;1b:反义组荧光显微镜下;1c:正义组倒置显微镜下;1d:正义组荧光显微镜下。

图 1 转染反义及正义寡核苷酸后 6 h 后显微镜观察(10 × 10)

表 1 各组细胞周期分布 ( $n=3, \%, \bar{x} \pm s$ )

组别	G0/G1	S	G2/M
对照组	$69.89 \pm 3.41^*$	$25.56 \pm 2.76^*$	$5.05 \pm 2.00$
正义组	$68.67 \pm 3.39^*$	$27.94 \pm 2.17^*$	$4.57 \pm 2.48$
反义组	$80.92 \pm 6.47$	$16.22 \pm 3.45$	$3.61 \pm 2.96$

注:与反义组比较,\* $P < 0.05$ 。

**2.4 Western blot 检测 COX-2 蛋白相对表达量** 以 GAPDH 为内参,对每组转染前后 COX-2 蛋白进行检测,正义组 COX-2 蛋白表达与对照组比较无统计学差异( $P > 0.05$ ),反义组与对照组相比蛋白表达下降。电泳条带及电泳结果灰度分析见图 2、表 2。

## 3 讨论

近年文献报道显示,COX-2 在正常乳腺组织中不表达或低表达,在乳腺良性肿瘤中表达不一致,在乳腺癌中高表达<sup>[4-7]</sup>,抑制 COX-2 的表达可抑制肿瘤细胞的生长、促进细胞的凋亡<sup>[8]</sup>,因此 COX-2 被认为是抗肿瘤基因治疗的一个新靶点。反义寡核苷酸转染是近年来常用的抑制目的基因表达的方法。通过合成目的癌基因表达的特异的 mRNA 中的一段互补序列,转染入目的细胞与特异的 mRNA 结合,可以促进该 mRNA 降解或阻断其翻译为蛋白以达到抑制癌基因表达的作用<sup>[9]</sup>。我们通过反义寡核苷酸转染入

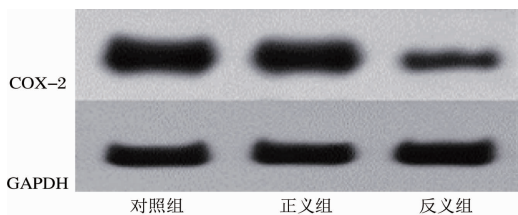


图 2 各组 Western blot 电泳条带显示

表 2 Western blot 电泳结果灰度分析

组别	COX-2	GAPDH	COX-2/GAPDH
对照组	887.14	1249.2	0.71
正义组	834.29	1285.3	0.65
反义组	359.52	1473.5	0.24

MDA-MB-231 乳腺癌细胞株,观察肿瘤细胞增殖情况的变化,COX-2 蛋白的合成及表达,以及对细胞周期的影响。

Takahashi 等<sup>[10]</sup>研究证明 COX-2 可以增强肿瘤细胞的增殖与生长、浸润与转移能力;Sivula 等<sup>[11]</sup>研究显示 COX-2 通过调节肿瘤细胞的迁移能力,增强细胞外基质的降解和促进其他活化因子的失活等来增强肿瘤细胞的侵袭能力,促进血管淋巴管的侵犯与远隔器官的转移;Yang 等<sup>[12]</sup>研究显示对乳腺癌 MCF-7 细胞中的 COX-2 进行 RNA 干扰后,细胞的增殖受到抑制,24、48、72 h 的抑制率分别为 24.47%、22.19%、25.34%。

赵波等<sup>[13]</sup>研究 COX-2 反义寡核苷酸转染宫颈癌 Hela 细胞后,细胞的增殖受到抑制,COX-2 蛋白表达水平下降,细胞周期 S 期细胞比例明显减少,G0/G1 期与 G2/M 期细胞比例增多。Liou 等<sup>[14]</sup>认为 COX-2 可能通过影响细胞周期调控机制,促进细胞有丝分裂,延长细胞周期 G1 期等途径,最终使肿瘤细胞获得以增殖过度为主的失控性生长特征。

COX-2 是前列腺素合成过程中的一个关键限速酶,其过度表达可导致前列腺素产物增加,而前列腺素是许多肿瘤形成的早期共同特点。COX-2 的高表达,通过催化花生四烯酸使其产物 PGE2 增加,而 PGE2 可抑制 T、B 淋巴细胞介导的抗肿瘤免疫应答,同时 COX-2 抑制 NK 细胞的活性,从而在肿瘤局部形成免疫抑制;同时 PGE2 还可抑制肿瘤坏死因子(TNF)的形成,并诱导有免疫抑制功能的白介素-10(IL-10)的产生,最终使机体免疫监视功能下降,细胞杀伤能力降低,肿瘤细胞逃避免疫监视<sup>[15]</sup>。

Yoon 等<sup>[16]</sup>认为乳腺癌细胞株 COX-2 的表达与其转移能力密切相关;Stasinopoulos 等<sup>[17]</sup>进行的体内实验证实,COX-2 的缺失显著延缓了肿瘤的发生及抑制了肺外转移,下一步我们也将采用动物模型进行体内实验研究。

## 参考文献

[1] Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JO, et al. Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer[J]. *Lancet Oncol*, 2001, 2(9): 544 - 551.

[2] Windhövel U, Haasper C, Duchrow M, et al. Effect of cyclooxygenase-2 antisense oligodeoxyribonucleotides in A-549 lung cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2004, 24(6): 3789 - 3794.

[3] 李昌秀,曹友德,黄源. VEGF-C 与 COX-2 反义寡核苷酸联合抑制乳腺癌细胞 VEGF-C 的表达[J]. *肿瘤*, 2008, 28(2): 117

- 120.

[4] Watanabe O, Shimizu T, Imamura H, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in malignant and benign breast tumors[J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(4): 3215 - 3221.

[5] Stasinopoulos I, O'Brien DR, Wildes F, et al. Silencing of cyclooxygenase-2 inhibits metastasis and delays tumor onset of poorly differentiated metastatic breast cancer cells[J]. *Mol Cancer Res*, 2007, 5(5): 435 - 442.

[6] Shah T, Stasinopoulos I, Wildes F, et al. Noninvasive imaging identifies new roles for cyclooxygenase-2 in choline and lipid metabolism of human breast cancer cells[J]. *NMR Biomed*, 2012, 25(5): 746 - 754.

[7] Alikanoglu AS, Yildirim M, Suren D, et al. Expression of Cox-2 and Bcl-2 in Paget's disease of the breast[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(3): 1041 - 1045.

[8] Dhakal HP, Naume B, Synnestvedt M, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in invasive breast carcinomas and its prognostic impact [J]. *Histol Histopathol*, 2012, 27(10): 1315 - 1325.

[9] Sivula A, Talvensaaari-Mattila A, Lundin J, et al. Association of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 expression in human breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2005, 89(3): 215 - 220.

[10] Takahashi Y, Kawahara F, Noguchi M, et al. Activation of matrix metalloproteinase-2 in human breast cancer cells overexpressing cyclooxygenase-1 or -2[J]. *FEBS Lett*, 1999, 460(1): 145 - 148.

[11] Sivula A, Talvensaaari-Mattila A, Lundin J, et al. Association of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 expression in human breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2005, 89(3): 215 - 220.

[12] Yang S, Han H. Effect of cyclooxygenase-2 silencing on the malignant biological behavior of MCF-7 breast cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(4): 1628 - 1634.

[13] 赵波,李淞漪,郑秀娟,等. COX-2 反义寡核苷酸抑制宫颈癌 Hela 细胞的研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2007, 14(4): 273 - 276.

[14] Liou JY, Ellent DP, Lee S, et al. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin e2 protects mouse embryonic stem cells from apoptosis[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(5): 1096 - 1103.

[15] Kinugasa Y, Hatori M, Ito H, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses invasiveness of oral squamous cell carcinoma cell lines via down-regulation of matrix metalloproteinase-2 and CD44 [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2004, 21(8): 737 - 745.

[16] Yoon AR, Stasinopoulos I, Kim JH, et al. COX-2 dependent regulation of mechanotransduction in human breast cancer cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(3): 430 - 437.

[17] Stasinopoulos I, O'Brien DR, Wildes F, et al. Silencing of cyclooxygenase-2 inhibits metastasis and delays tumor onset of poorly differentiated metastatic breast cancer cells[J]. *Mol Cancer Res*, 2007, 5(5): 435 - 442.