

榄香烯抑制视网膜母细胞瘤 HXO-RB44 细胞 COX-2 和 VEGF 的表达

聂跃华,尹文君,贺秋冬,杨 立

(南华大学第一附属医院 肿瘤内科,湖南 衡阳 421001)

摘要: **目的** 探讨榄香烯对视网膜母细胞瘤 HXO-RB44 细胞环氧合酶 2(COX-2)和血管内皮细胞生长因子(VEGF)表达的影响。**方法** 体外培养 HXO-RB44 细胞,用 20~100 $\mu\text{g/mL}$ 榄香烯作用细胞 48 h,Western blot 检测 COX-2 和 VEGF 的表达情况。**结果** 阴性对照组中, HXO-RB44 细胞内 COX-2 和 VEGF 呈高表达, 当用 20~100 $\mu\text{g/mL}$ 榄香烯处理后,其表达量明显降低,呈剂量依赖性。**结论** 榄香烯可降低视网膜母细胞瘤细胞内 COX-2 和 VEGF 水平。

关键词: 榄香烯; 视网膜母细胞瘤; 环氧合酶 2; 血管内皮细胞生长因子

中图分类号:R739.7

文献标识码:A

文章编号:2095-1116(2011)04-0395-02

Elemene Inhibits COX-2 and VEGF Expression in Retinoblastoma HXO-RB44 Cell Line

NIE Yue-hua, YIN Wen-jun, HE Qiu-dong, et al

(The First Hospital Affiliated to University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of elemene on expression of Cyclooxygenase-2 and Vascular Endothelial Growth Factor in HXO-RB33 cells. **Methods** Retinoblastoma cell line HXO-RB44 was cultured in vitro, and then incubated with 20~100 $\mu\text{g/mL}$ elemene for 48 h. The expression level of COX-2 and VEGF was detected by Western blot. **Results** COX-2 and VEGF were high expressed in quiescent condition, after 20~100 $\mu\text{g/mL}$ elemene treatment, the expression levels of COX-2 and VEGF were decreased. **Conclusion** Elemene could decrease the expression levels of COX-2 and VEGF, and it may be one of the antineoplastic mechanism.

Key words: elemene; retinoblastoma; cyclooxygenase-2; vascular endothelial growth factor

视网膜母细胞瘤是最常见的原发性恶性肿瘤,以婴幼儿多见。肿瘤细胞的无限制生长和转移是导致治疗失败和患者死亡的主要原因^[1]。在肿瘤的生长与侵袭过程当中,血管生成是重要的环节,其中以环氧合酶 2(cyclooxygenase-2, COX-2)和血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)最为重要^[2,3]。榄香烯是目前疗效比较明确的肿瘤治疗药物,能诱导多种肿瘤细胞凋亡^[4]。本研究探讨榄香烯抑制视网膜母细胞瘤 COX-2 以及 VEGF 的表达,为视网膜母细胞瘤的临床治疗提供

实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

鼠抗人 COX-2 和 VEGF 多克隆抗体购自 Santa Cruz(北京中杉金桥生物有限公司),辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 二抗和鼠抗人 β -actin 多克隆抗体购自武汉博士德生物有限公司。胎牛血清、RP-MI-1640 培养基分别购自杭州四季青和 Invitrogen

公司。榄香烯注射液购自大连金港制药公司,ECL 发光试剂购自 Pierce,链霉素和青霉素为上海生物工程有 限公司产 品。

1.2 细胞培养

人视网膜母细胞瘤 HXO-RB44 细胞系购自中科院上海细胞库,培养于含有 100 U 青霉素、100 U 链霉素以及 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,于 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养,每 2 ~ 3 天传代 1 次。

1.3 分组及处理

取生长至对数期的细胞,按 10⁶/mL 接种于 24 孔板,分为对照组和处理组。处理组加入终浓度为 20、40、80 和 100 μg/mL 榄香烯溶液后,培养 48 h 后进入下一步研究。对照组仅加入等量的 RPMI-1640 培养基。

1.4 Western blot

细胞处理结束后,用 4℃ PBS 洗涤细胞 2 次。离心收集细胞,并加入 SDS-上样缓冲液 100 μL 裂解细胞。经超声处理 5 s 后,置于 100℃煮沸 5 min。离心后取 20 μL 上清蛋白用于 SDS-PAGE。电泳结束后卸下凝胶,用转膜液洗涤 2 次,随后按三明治法装载转膜仪,4℃转膜过夜。用含 5% 脱脂奶粉的封闭液室温封闭 2 h 后,与 1:1 000 一抗稀释液 4℃孵育 12 h,洗涤,孵育二抗,ECL 显影、拍照。

1.5 统计学处理

所有实验重复 3 次,用 SPSS 13.0 统计软件行 Dunnett's 分析,以 $P < 0.05$ 判定为差异有显著性。

2 结 果

2.1 榄香烯对 HXO-RB44 细胞 COX-2 表达的影响

Western blot 结果显示,20 μg/mL 榄香烯处理 HXO-RB44 细胞 24 h 后,能轻微下调 COX-2 蛋白水平的表达,当浓度逐渐从 20 μg/mL 增加到 100 μg/mL 时,能进一步抑制 COX-2 的表达,呈明显的剂量依赖性($P < 0.05$),内参 β-actin 在所有处理组中表达无明显影响(图 1)。

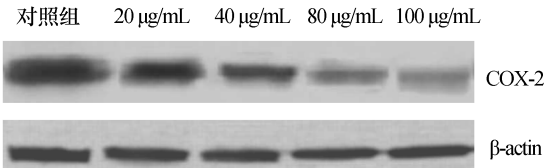


图 1 不同浓度榄香烯对 HXO-RB44 细胞 COX-2 蛋白表达的影响

2.2 榄香烯对 HXO-RB44 细胞 VEGF 表达的影响

榄香烯对 VEGF 表达的影响情况如图 2 所示。未经榄香烯处理时(对照组),HXO-RB44 细胞 VEGF 呈高表达。当经不同浓度的榄香烯处理后,VEGF 表达水平随着剂量的递增而降低($P < 0.05$)。β-actin 在所有组中无明显改变。

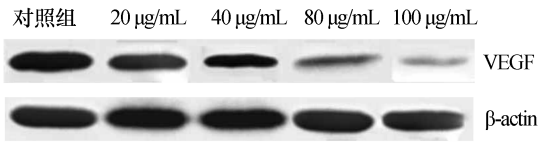


图 2 不同浓度榄香烯对 HXO-RB44 细胞 VEGF 表达的影响

3 讨 论

迄今为止,视网膜母细胞瘤的治疗方法依然是以是手术为主的综合性治疗。虽然目前本病的生存率有了较大的提高,但依然有部分患者死于复发或转移^[5]。随着对肿瘤机制研究的不断深入,目前已认识到肿瘤的发生是一个多阶段、多因素的过程,是一种细胞增殖、血管生成失控性的疾病^[6,7],其中以 COX-2 和 VEGF 最为重要^[8,9]。生理条件下,COX-2 和 VEGF 参与机体的炎症反应和血管生成,但其过度表达可以促进细胞增殖、抑制凋亡、促进血管生成等机制参与肿瘤的发生和转移^[10,11]。因此以上述分子为治疗靶点,对肿瘤的治疗具有极其重要的意义。

榄香烯是一类从姜科植物中提出的一种萜类物质,国内把它列为二类抗肿瘤药物。研究表明,榄香烯抗肿瘤谱广泛,由于来源于天然植物,副作用小,减轻了化疗药物造成的毒副作用^[12]。另外,榄香烯可以通过血—脑屏障,这对于迫切寻求安全有效的药物来治疗视网膜母细胞瘤来说,具有重要意义。

本研究显示,HXO-RB44 细胞未经榄香烯处理时,胞内 COX-2 和 VEGF 表达水平高,当给予 20 ~ 100 μg/mL 榄香烯处理后,随着榄香烯浓度的增加,能明显下调 COX-2 和 VEGF 蛋白的表达,与榄香烯呈明显的剂量依赖性。由于肿瘤细胞的失控性增长与 COX-2 以及 VEGF 的过度表达密切相关,因此初步认为榄香烯下调 COX-2 和 VEGF 的表达有可能是其抗肿瘤的重要方式。在接下来的研究中将进一步探讨榄香烯通过何种机制影响 COX-2 和 VEGF 的表达,并探讨榄香烯是否还具有其他的作用靶点。总之,以上问题的阐明将丰富榄香烯药理机制,并能为其临床应用提供理论和实验依据。(下转第 428 页)

参考文献:

- [1] Houston SK, Murray TG, Wolfe SQ, et al. Current update on retinoblastoma[J]. Int Ophthalmol Clin, 2011, 51(1): 77-91.
- [2] Souza FJP, Martins MC, Correa ZM, et al. The expression of cyclooxygenase 2 in retinoblastoma: primary enucleated eyes and enucleation after conservative treatment[J]. Am J Ophthalmol, 2006, 142(4): 625-631.
- [3] Areal C, Orellana ME, Abourbih D, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in retinoblastoma[J]. Arch Ophthalmol, 2010, 128(2): 223-229.
- [4] Rui D, Xiaoyan C, Taixiang W, et al. Elemene for the treatment of lung cancer[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2007, (4): CD006054.
- [5] Parulekar MV. Retinoblastoma-current treatment and future direction[J]. Early Hum Dev, 2010, 86(10): 619-625.
- [6] Gupta SC, Kim JH, Prasad S, et al. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals[J]. Cancer Metastasis Rev, 2010, 29(3): 405-434.
- [7] Davis CD, Emenaker NJ, Milner JA. Cellular proliferation, apoptosis and angiogenesis: molecular targets for nutrition-al preemption of cancer[J]. Semin Oncol, 2010, 37(3): 243-257.
- [8] De Souza Filho JP, Correa ZM, Marshall JC, et al. The effect of a selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor on the proliferation rate of retinoblastoma cell lines[J]. Eye (Lond), 2006, 20(5): 598-601.
- [9] Jia RB, Zhang P, Zhou YX, et al. VEGF-targeted RNA interference suppresses angiogenesis and tumor growth of retinoblastoma[J]. Ophthalmic Res, 2007, 39(2): 108-115.
- [10] Erdem H, Gundogdu C, Sipal S. Correlation of E-cadherin, VEGF, COX-2 expression to prognostic parameters in papillary thyroid carcinoma[J]. Exp Mol Pathol, 2011, 90(3): 312-317.
- [11] Liu H, Yang Y, Xiao J, et al. COX-2-mediated regulation of VEGF-C in association with lymphangiogenesis and lymph node metastasis in lung cancer[J]. Anat Rec (Hoboken), 2010, 293(11): 1838-1846.
- [12] Edris AE. Anti-cancer properties of Nigella spp. essential oils and their major constituents, thymoquinone and betaelemene[J]. Curr Clin Pharmacol, 2009, 4(1): 43-46.

(此文编辑 朱雯霞)