

文章编号:1005-6947(2006)02-0106-05

· 实验研究 ·

非甾体类消炎药抑制结肠癌细胞株细胞生长的实验研究

劳学军, 曹明溶, 姜海平, 汤汉林, 梁忠平, 庞钊

(暨南大学附属第一医院 肝胆外科, 广东 广州 510630)

摘要:目的 研究非甾体类消炎药(NASIDs)通过产生一氧化氮的亚硝基谷胱甘肽(GSNO)对结肠癌细胞生长的影响及其机制。方法 采用细胞生长曲线和流式细胞仪方法研究细胞凋亡,竞争酶联免疫分析测定细胞培养上清PGE₂的环氧合酶2(PGE₂)表达水平,Western Blot法检测COX-1/COX-2蛋白表达。结果 在不同时间和浓度梯度中,GSNO处理可增加PGE₂的产量。用500 μmol/L处理48h后,COX-1和COX-2的蛋白表达水平增加。NASIDs可以阻断PGE₂的产生,但对于GSNO诱导的细胞生长抑制无影响。结论 GSNO可促进细胞产生PGE₂增加,并诱导COX-1和COX-2蛋白呈时间依赖和剂量依赖性表达;高浓度的GSNO可抑制细胞生长,并诱导3种细胞株凋亡,而不受COX-2表达及其活性的影响。NASIDs能阻断PEG₂产生,但对于GSNO诱导的结肠癌细胞株生长抑制并无协同作用。

关键词:结肠肿瘤/药物治疗;消炎药,非甾体类/治疗应用;肿瘤细胞,培养的/药物作用;消炎药,非甾体类/药理学

中图分类号:R735.35;R73-351

文献标识码:A

Experimental study on inhibition of cell growth in colon cancer cell lines by non-steroidal anti-inflammatory drugs

LAO Xue-jun, CAO Min-rong, JIANG Hai-ping, TANG Han-lin, LIANG Zhong-ping, PANG Zhao

(Department of Hepato-Biliary Surgery, the First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: Objective To evaluate the effect and mechanism of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on the colon cancer cell growth by using S-nitrosoglutathione (GSNO) which can produce nitric oxide. **Methods** Apoptosis of 3 colon cell lines were evaluated by cell growth curve and flow cytometry, the PGE₂ levels in cell culture supernatants were determined by competitive enzyme immunoassay method, and the protein expression of COX-1 and COX-2 were analyzed by Western blot. **Results** The production level of PGE₂ was increased with GSNO treated concentration and time. Using 500 μmol/L GSNO treatment for 48 h, the expression level of COX-1 and COX-2 protein increased. NSAIDs can block the production of PGE₂ but had no effect on the inhibition of cell growth induced by GSNO. **Conclusions** GSNO can increase PGE₂ production and induce COX-1 and COX-2 protein expression in a dose- and time-dependent manner. Higher concentrations of GSNO also can inhibit cell growth and induced apoptosis in all 3 cell lines. NSAIDs can block production of PEG₂ but NSAIDs are no effect on cell growth.

Key words: Colon Neoplasms/durg ther; Anti-Inflammatory Agents, Non-Steroidal/theruse; Tumor Cells, Cultured/drug eff; Anti-Inflammatory Agents, Non-Steroidal/theruse/pham

CLC number: R735.35; R73-351

Document code: A

收稿日期:2005-08-24; 修订日期:2006-01-09。

作者简介:劳学军,男,江西瑞昌人,暨南大学附属第一医院副主任医师,主要从事消化道肿瘤方面的研究。

通讯作者:劳学军 电话:13697424345(手机); E-mail:foxlxjZK@yahoo.com.cn。

环氧化酶(COX-2)是使花生四烯酸转变为前列腺素的催化剂。当结肠直肠癌发生或使用具有抑制COX活性的非甾体类消炎药物(NASIDs)时,COX-2的表达水平升高从而抑制结肠直肠癌的发展^[1],可见COX-2和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)在炎症和肿瘤的发病机制中发挥着重要作用。已有大量关于COX-2和iNOS之间相互作用的研究,显示一氧化氮(NO)具有刺激和/或抑制COX-2表达及其活性的作用^[2]。本研究通过NASIDs抑制不同浓度的S-亚硝基谷胱甘肽(GSNO)作用的3株结肠癌细胞株进行体外观察,探讨其对结肠癌细胞的作用,并检测NO对COX表达及其活性的影响。

1 材料和方法

1.1 试剂

GSNO(Sigma公司)于加入培养液前,迅速溶解于磷酸盐缓冲液(PBS)新鲜配制。将NS398(20 mmol/L)(Sigma公司)和阿司匹林(1 mol/L)溶解于二甲基亚砷(DMSO)(Sigma公司)中,-20℃保存备用。

1.2 细胞培养

3种人结肠腺癌细胞株,HCA7由英国Royal医学院Susan C. Kirkland惠赠;HT29和HCT116均来源于美国模式菌种保藏中心(ATCC),置于37℃,5%CO₂的潮湿环境下培养。培养基为McCoy 5A培养液(Sigma公司),内含10%胎牛血清,50 U/mL青霉素和50 mg/mL的链霉素。细胞经0.5%胰蛋白酶和0.2% EDTA消化后常规传代。

将细胞按 5×10^4 (HT29和HCT116)或 1×10^5 (HCA7)个/孔的浓度接种于6孔板中。培养24h后更换培养液,用新鲜配制的含GSNO(10~500 μmol/L)或GSNO(50,500 μmmol/L)加NSAIDs(10 μmol/L NS398或500 μmol/L阿司匹林)的培养基共孵育72h。GSNO组,对照组与GSNO+NSAIDs组分别于24,48,72h后,将培养液于12 000 r/min,离心10 min,上清于-80℃冻存,用以检测PGE₂和硝酸盐/硝基水平。贴壁细胞经胰蛋白酶消化后,用血细胞计数板计数。实验操作2次,至少重复3次。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

1.3 细胞周期分析

收集对照组与药物处理组的悬浮细胞和贴壁细胞,加70%的冷乙醇4℃固定过夜,细胞经离心

沉淀后,重悬于碘化丙啶(PI)溶液(50 μg/mL PI,100 kU/mL RNA酶A和1 mg/mL糖在PBS中)孵育30 min后,应用流式细胞仪检测细胞DNA含量。每个样品进行至少10 000次的计算。所得数据在WINMDI上分析,含亚倍数染色体DNA的细胞代表凋亡细胞。实验操作2次,至少重复2次。结果以含亚倍数染色体DNA细胞所占百分率的 $\bar{x} \pm s$ 。

1.4 PGE₂测定

用竞争酶联免疫分析试剂盒检测细胞培养上清PGE₂的表达水平。免疫检测按操作步骤进行,其灵敏度可达10 pg/mL。PGE₂的产量经相应培养孔内的贴壁细胞数量校正,结果以ng/10⁶(个细胞)表示。

1.5 硝酸盐/硝基浓度检测

培养上清加0.1 U/mL硝酸钾还原酶,5 μmol/L黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)和30 μmol/L烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAPDH),37℃作用60 min,使所有硝酸盐转变为硝基。再加入0.1 kU/mL乳酸脱氢酶(LDH)和0.3 mmol/L丙酮酸钠,作用5 min以氧化剩余的NADPH,减少干扰,随即加入Greiss试剂(1%磺胺和0.1%萘基乙二胺,在2.5%磷酸溶液中)孵育10 min。在波长540 nm处测吸光度值。用硝酸盐的标准溶液(0~50 μmol/L)制出标准曲线,再计算硝酸盐/硝基的浓度。

1.6 Western Blot法检测蛋白水平

细胞经GSNO(500 μmol/L)孵育48 h后,用4℃的PBS清洗2次。将细胞刮下,6 000 r/min离心5 min,收集细胞小斑块,再重悬于预热的裂解液(10 mmol/L Tris-HCl,pH7.4,1 mmol/L钒酸钠,1% SDS),95℃加热5 min,并通过27号的针孔3次。获得的裂解产物12 000 r/min,离心15 min,获上清保存备用。用BCA蛋白检测试剂盒测蛋白浓度。50 mg蛋白加入等体积的上样缓冲液,煮沸5 min,上样于7.5% SDS-PAGE胶电泳。将蛋白转移到硝酸纤维(NC)膜上。5%脱脂牛奶封闭后,NC膜与抗COX-1获抗COX-2单克隆一抗共孵育,再与山葵过氧化物酶标记的单抗鼠二抗孵育,最后经化学荧光试剂显色,X线胶片曝光。常规洗膜,重新与抗肌动蛋白(actin)单克隆抗体共孵育,作为对照。X线胶片上的条带经Deskscan扫描,获得的信号密度用图像分析系统定量,结果以COX-1或COX-2与内参照actin的比值表示。

1.7 统计学分析

采用统计软件 Prism3.0 版本行统计分析,均数用平均值 \pm 标准误 ($\bar{x} \pm s$) 表示,数据采用方差检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 GSNO 抑制结肠癌细胞株的生长

无论结肠癌细胞株的 COX-2 表达水平及其活性的如何,GSNO 对 3 个细胞株生长产生浓度依赖性抑制。在低浓度 (10, 20 $\mu\text{mol/L}$) GSNO 对细胞株无作用,在高浓度 50 $\mu\text{mol/L}$ 时,抑制 HT29 和 HCT116 的生长;在 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度能抑制 HCA7 的细胞生长。在最高浓度 500 $\mu\text{mol/L}$ 时,能完全阻断 3 个细胞株的生长(图 1)。

2.2 GSNO 诱导结肠癌细胞株凋亡

在较高浓度 300 $\mu\text{mol/L}$ 和 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 GSNO 作用 72h 后,3 个细胞株表现为时间依赖性和浓度依赖性的细胞凋亡。凋亡细胞百分比增加伴随着

G_1 期细胞的减少,而其他细胞周期参数并无显著性差异(表 1)。

图 1 不同浓度 GSNO 对 3 个细胞株生长产生的抑制

表 1 基因突变阳、阴性组判别良恶性指标的对照

组别	HCA7			HT29			HCT116		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
对照组	4.6 \pm 0.9	6.5 \pm 1.0	8.5 \pm 0.6	1.9 \pm 0.6	3.8 \pm 0.8	5.0 \pm 1.9	2.2 \pm 0.5	3.0 \pm 0.8	4.9 \pm 0.3
GSNO 使用对照组	4.2 \pm 0.8	6.5 \pm 0.6	8.1 \pm 0.4	2.1 \pm 0.7	4.2 \pm 1.3	4.0 \pm 1.1	1.5 \pm 0.1	4.1 \pm 1.5	3.8 \pm 0.4
GSNO 10 μM	3.3 \pm 0.2	6.2 \pm 0.3	8.2 \pm 0.4	1.6 \pm 0.5	2.9 \pm 0.8	4.7 \pm 1.2	1.4 \pm 0.3	2.0 \pm 0.4	6.1 \pm 1.1
GSNO 20 μM	3.6 \pm 0.8	6.9 \pm 0.8	9.4 \pm 0.7	3.8 \pm 1.8	2.8 \pm 0.3	6.1 \pm 1.9	1.8 \pm 0.4	2.7 \pm 0.7	4.8 \pm 0.5
GSNO 50 μM	4.4 \pm 0.7	6.2 \pm 0.6	9.2 \pm 0.7	2.7 \pm 1.1	3.6 \pm 0.9	9.1 \pm 3.3	2.4 \pm 1.0	2.1 \pm 0.3	5.7 \pm 1.1
GSNO 100 μM	3.3 \pm 0.3	7.1 \pm 0.7	10.3 \pm 1.4	4.1 \pm 0.8	4.8 \pm 0.5	9.9 \pm 1.4	2.3 \pm 0.6	5.9 \pm 0.4	8.5 \pm 0.3 [†]
GSNO 300 μM	13.0 \pm 0.9 [†]	16.0 \pm 1.5 [†]	22.7 \pm 1.7 [†]	6.7 \pm 0.6 [†]	12.5 \pm 0.5 [†]	17.1 \pm 1.0 [†]	7.0 \pm 0.4 [†]	12.3 \pm 1.0 [†]	27.8 \pm 1.4 [†]
GSNO 500 μM	16.8 \pm 0.8 [†]	24.6 \pm 1.4 [†]	34.5 \pm 4.0 [†]	11.6 \pm 0.9 [†]	16.2 \pm 1.1 [†]	24.2 \pm 1.0 [†]	11.6 \pm 1.3 [†]	20.7 \pm 0.6 [†]	38.3 \pm 1.1 [†]

注: [†] 与 GSNO10 ~ 100 μM 比较, $P < 0.05$

2.3 GSNO 对加 PGE₂ 和 COX-1 和 COX-2 蛋白表达的影响

HCA6 细胞株的 PGE₂ 的分泌比未处理的 HT29 和 HCT116 高几百倍。在不同时间和浓度梯度中,GSNO 处理可增加 PGE₂ 的产生和 COX-1、COX-2 的表达。用 500 $\mu\text{mol/L}$ 处理 48h 后,COX-1 和 COX-2 的蛋白表达水平也有增加。3 种细胞株均可以被 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 NS398 所抑制而导致 PGE₂ 产生和 COX-2 表达下降,而 COX-1 变化不明显(图 2)。

图 2 3 种结肠癌细胞株经 GSNO 处理 COX-1 和 COX-2 蛋白的表达量

2.4 NASIDs 对结肠癌细胞株生长的作用

0.5 mmol/L 阿司匹林和 10 μ mol/L NS398 可以明显减少 HCA7, HT29 和 HCT116 细胞株的 PGE₂ 的产量,达到减少 100 倍或更低。相对于对照组, HCA7 细胞株中 PGE₂ 的产量低 100 倍或以上。在此浓度范围内,它们不能抑制细胞的生长(表 2)。NASIDs 完全阻断 PGE₂ 的产生,但不增加 GSNO 对结肠癌细胞株的生长抑制作用(图 3)。

表 2 阿司匹林和 NS398 在 HCA7 细胞株中对 PGE₂ 产率的影响

组别	HCA7	
	24h	72h
对照组	7342.0 \pm 1088.0	32150.0 \pm 1717.0
DMSO 组	6889.0 \pm 1275.0	35220.0 \pm 2902.0
阿司匹林 0.5 mmol/L	378.8 \pm 97.4 ^(1),2)	434.7 \pm 112.0 ^(1),2)
NS398 10 μ mmol/L	207.3 \pm 37.2 ^(1),2)	241.5 \pm 12.7 ^(1),2)

注:1)与对照组比较, $P < 0.05$; 2)与 DMSO 组比较, $P < 0.05$

进多种细胞免于凋亡,而高浓度的 NO 则可抑制细胞生长并诱导凋亡发生^[3]。

关于结直肠癌的研究亦显示了不同的结果。有的临床研究显示,结肠腺癌和腺瘤较正常结肠组织的 iNOS 含量显著升高^[4];而另一些研究却报道结肠癌组织的 iNOS 表达水平较正常结肠组织下降^[5]。在动物实验中,有报道 iNOS 的诱导水平与结直肠癌的消减成正比(包括原位癌和转移癌)^[6];另有报道显示, NOS 的抑制剂可抑制异型结肠组织的形成^[7];但也有 NO 促进或抑制结直肠癌细胞生长的报道,其作用可能与浓度有关^[8]。

本研究评价了 3 种结肠癌细胞株在体外受不同 GSNO 浓度影响而导致 COX-2 蛋白表达和活性的差异。结果表明高浓度 GSNO 能抑制结肠癌细胞株的生长,而低浓度则否。尽管 HC47 在 3 种细胞株中 COX-2 活性最高,更高浓度的 NO 也能抑制细胞的生长。

本实验中,细胞在低浓度的 GSNO 中培养 72h 后,未表现出任何细胞生长受抑制的现象。这可能是由于在实验中细胞在 GSNO 中培养时间过短,或由于在培养基还有血清使 GSNO 在 10h 内发生了降解^[9]。本研究的结论也提示细胞凋亡可能是 GSNO 抑制细胞生长的一个重要机制。尽管 Clancy 等报道在巨噬细胞中, NO 可以激活 COX-1 而抑制 COX-2^[10],但本实验却发现在这 3 种结肠癌细胞株中 GSNO 不仅可以诱导 COX-1 和 COX-2 的蛋白表达,而且 PGE₂ 的产生量有时间和浓度依赖性。在 NS398 浓度为 10 μ mol/L 时, PGE₂ 的产生量几乎没有增加,表明 COX-2 是导致 PGE₂ 增加的主要因素。在正常的结肠细胞株中,已发现 NO 可以增加 COX-2 基因 mRNA 转录和蛋白合成水平^[11]。这些结果均表明在癌症细胞株中, iNOS 表达水平与 COX-2 表达增加有关,这种现象在炎症时也被观察到^[12]。

虽然 NSAIDs 治疗结肠癌是非常有效的化学制剂,但它们又有明显的副作用而使其的临床使用受到限制。一些新合成的此类药物可以有效地达

图 3 NSAIDs 对 3 种结肠癌细胞株的生长抑制作用

3 讨论

一氧化氮(NO)是许多生理和病理过程的一种重要信号分子。它是在一氧化氮合酶(NOS)催化作用下由精氨酸转变为瓜氨酸的产物。NOS 存在 3 种不同的类型,其中 2 种分别为内皮型 NOS 和神经型 NOS,为钙离子依赖性,在数分钟内可催化产生低水平(pmol ~ nmol)的 NO。第 3 种为诱导型 NOS(iNOS),属非钙离子依赖性。大部分组织在正常情况下并不表达 iNOS,但脂多糖和各种细胞因子可诱导其表达。iNOS 可长期(数天至数周)诱导产生大量(μ mol)的 NO。据报道 NO 既有抑瘤性又有促瘤性,这可能取决于 NO 的作用时间、浓度和组织类型;低浓度的 NO 可刺激细胞生长并促

到抑制结肠癌细胞的生长而又不产生 NSAIDs 副作用已经在体外实验和动物模型中得到证实^[13], 表明 NSAIDs 可能与 NO 有协同抑制结肠癌细胞株的作用。尽管本实验表明, 虽然阿司匹林和 NS398 可以通过 COX 抑制而导致 PEG₂ 产率减少, 但它们并不能协同增加 NO 对于结肠癌细胞株的抑制作用, 是否其他新一代 NSAIDs 可以通过另外途径抑制结肠癌细胞生长, 尚需要进一步研究。

总之, GSNO 可增加 PGE₂ 的产量诱导 COX-1 和 COX-2 的蛋白表达, 抑制 HCA7, HT29 和 HCT116 的细胞生长, 并呈时间和浓度依赖性。凋亡可能是其中导致细胞死亡的主要原因。NSAIDs 可抑制 PEG2 的产生, 但不能协同增加 NO 的抑制结肠癌细胞生长的作用。

参考文献:

- [1] Chan TA. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, apoptosis and colon-cancer chemoprevention [J]. *Lancet Oncol*, 2002, 3(3):166-174.
- [2] Weinberg JB. Nitric oxide synthase 2 and cyclooxygenase 2 interactions in inflammation [J]. *Immunol Res*, 2000, 22(2):319-341.
- [3] Kim PK, Zamora R, Petrosko P, et al. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2001, 1(8):1421-1441.
- [4] Yagihashi N, Kasajima H, Sugai S, et al. Increased in situ expression of nitric oxide synthase in human colorectal cancer [J]. *Virch Arch*, 2000, 436(2):109-114.
- [5] Hao XP, Pretlow TG, Rao JS, et al. Inducible nitric oxide synthase is expressed similarly in multiple aberrant crypt foci and colorectal tumors from the same patients [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(2):419-422.
- [6] Onier N, Hilpert S, Reveneau S, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in tumors in relation with their regression induced by lipid S in rats [J]. *Int J Cancer*, 1999, 81(5):755-760.
- [7] Rao CV, Indranie C, Simi B, et al. Chemopreventive properties of a selective inducible nitric oxide synthase inhibitor in colon carcinogenesis, administered alone or in combination with celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(1):165-170.
- [8] Xu W, Liu L, Charles IG. Microencapsulated iNOS expressing cells cause tumor suppression in mice [J]. *FASEB J*, 2002, 16(2):213-215.
- [9] Zeng H, Spencer NY, Hogg N. Metabolism of S-nitrosoglutathione by endothelial cells [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 281(1):H432-H439.
- [10] Clancy R, Varenika B, Huang W, et al. Nitric oxide synthase/COX cross-talk: nitric oxide activates COX-1 but inhibits COX-2-derived prostaglandin production [J]. *J Immunol*, 2000, 165(3):1582-1587.
- [11] Mei JM, Hord NG, Winterstein DF, et al. Expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 induced by nitric oxide in conditionally immortalized murine colonic epithelial cells [J]. *FASEB J*, 2000, 14(9):1188-1201.
- [12] 孙英刚, 范西红, 徐良, 等. 选择性、非选择性 NOS 抑制剂及 L-精氨酸对创伤性休克大鼠的影响 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(2):107-110.
- [13] Williams JL, Borgo S, Hasan I, et al. Nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) alter the kinetics of humoral colon cancer cell lines more effectively than traditional NSAIDs: implications for colon cancer chemoprevention [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(8):3285-3289.

本刊 2006 年下半年各期重点内容安排

本刊 2006 年下半年各期重点内容安排如下, 欢迎赐稿。

第 7 期 肝脏外科
第 8 期 腔镜外科
第 9 期 胃肠外科

第 10 期 乳腺、甲状腺外科
第 11 期 胰腺外科
第 12 期 血管外科及其他