

选择性 COX-2 抑制剂对胃癌细胞株 BGC-823 增殖和凋亡的影响

李乾, 彭杰, 张桂英

(中南大学湘雅医院消化内科, 长沙 410008)

[摘要] 目的:观察塞来昔布对胃癌细胞株 BGC-823 细胞增殖和凋亡的影响,寻找安全有效的治疗胃癌的化疗药物。方法:常规培养胃癌细胞株 BGC-823 至 80% 融合,加入不同浓度塞来昔布继续培养,采用噻唑蓝(MTT)比色法观察其对胃癌 BGC-823 细胞生长的影响。流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡情况。RT-PCR 技术检测 p21 和 Fas 的表达。结果:MTT 比色法显示体外不同浓度塞来昔布均能抑制胃癌 BGC-823 细胞生长,呈浓度和时间依赖性,各浓度组间比较有显著差异($P < 0.05$)。流式细胞仪检测发现在 0~100 $\mu\text{mol/L}$ 内,随浓度增加 G_1 期细胞数增加,S 期细胞数减少;RT-PCR 显示塞来昔布干预后胃癌 BGC-823 细胞 p21 和 Fas 的表达增强且呈浓度依赖性,各浓度组间比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:体外塞来昔布抑制胃癌 BGC-823 细胞增殖和促进其凋亡,可能与 p21 上调阻止细胞周期进展和促进 Fas 表达诱导细胞凋亡有关。

[关键词] 选择性环氧化酶-2; 塞来昔布; 细胞增殖; 细胞凋亡; BGC-823 细胞系

[中图分类号] R735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2008)12-1123-06

Effect of a selective COX-2 inhibitor on cell proliferation and apoptosis in human gastric cancer cell line BGC-823

LI Qian, PENG Jie, ZHANG Gui-ying

(Department of Gastroenterology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To determine the effect of a selective COX-2 inhibitor celecoxib on cell proliferation and apoptosis of gastric cancer cell line BGC-823 to seek an effective and safe drug for gastric cancer chemoprevention. **Methods** Gastric cancer cell line BGC-823 was cultured to 80% fusion. MTT assay and flow cytometry were used to quantify the influence of celecoxib in the proliferation, cell period, and apoptosis of gastric cancer cell line BGC-823. The expression of p21 and Fas by RT-PCR were investigated on gastric cancer cell line BGC-823 by the effect of different celecoxib concentrations. **Results** Growth of BGC-823 cells was inhibited by celecoxib in a dose- and time-dependent manner ($P < 0.05$). Flow cytometry showed that celecoxib increased the proportion of cells in G_1 phase, whereas decreased the proportion of cells in S phase and increased the apoptotic rates of cells in a concentration-dependent manner from 0 to 100 $\mu\text{mol/L}$ in gastric cancer cell line BGC-823 ($P < 0.05$). RT-PCR detection showed that the treated BGC-823 cells had increased the expression of p21 and Fas, which was also in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). **Conclusion**

收稿日期 (Date of reception) 2008-04-15

作者简介 (Biography) 李乾(1971—),男,湖南祁阳人,博士,主治医师,主要从事肝病和消化道肿瘤研究。

通讯作者 (Corresponding author) 李乾, E-mail: liqian0816@sina.com

基金项目 (Foundation item) 湖南省科委基金(06SK3019)。 This work was supported by Science Committee Foundation of Hunan Province, P. R. China(06SK3019).

Celecoxib inhibited cell proliferation and apoptosis of human gastric cancer cell line BGC-823, which may be related to blocking the cell cycle progress by increasing the expression of p21 and inducing the apoptosis of gastric cancer cells by increasing the expression of Fas.

Key words: selective cyclooxygenase-2 inhibitor; celecoxib; proliferation; apoptosis; BGC-823 cell line

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2008, 33(12):1123-06]

目前流行病学和实验室资料表明非甾体类抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)可预防和治疗人类肿瘤,尤其对消化道肿瘤的发生发展起一定作用^[1]。体外研究表明非甾体类抗炎药对胃癌细胞生长有一定抑制作用^[2]。李建英等^[3]研究发现,NSAIDs可抑制环氧酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)活性,减少前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)释放,进而抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡;但对细胞增殖、细胞凋亡的途径及相关调控因子的研究不多。笔者在体外用选择性环氧酶-2抑制剂塞来昔布(celecoxib)干预人胃癌细胞BGC-823,初步探讨其可能的抗肿瘤机制,为选择性环氧酶-2抑制剂用于胃癌化疗寻求理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人胃癌细胞株BGC-823购自中南大学肿瘤研究所。

1.1.2 主要药物和试剂 塞来昔布由中南大学湘雅二医院张广森教授惠赠,为辉瑞公司产品,用二甲基亚砷(DMSO,美国Sigma公司)配成30 mmol/L储存液,4℃保存备用。MTT购自Fluk公司,RPMI-1640,吡啶橙(AO),溴化乙啶(EB)及GAPDH,p21和Fas引物均购自北京天为时代公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 均胃癌细胞株BGC-823置于含10%小牛血清,100 U/mL青霉素及100 U/mL链霉素的RPMI-1640细胞培养基常规传代培养。

1.2.2 MTT比色法检测塞来昔布对BGC-823细胞增殖的抑制 将 2×10^5 /mL细胞接种于96孔培养板上,培养至80%融合时,加入用DMSO溶解的不同浓度(20, 40, 60, 80, 100, 120 μmol/L)塞来昔布为测定组,设空白对照组和

DMSO溶媒对照组,常规培养24, 48, 72 h后,分别在每孔中加入0.5% MTT液20 μL,培养4h后吸弃上清液,每孔加入DMSO溶液100 μL,震荡15 min,使结晶颗粒充分溶解。酶联免疫检测分析测定570 nm波长处的OD值。试验重复3次。计算公式是:抑制率 = $1 - (\text{测定组吸光平均值} - \text{空白对照组吸光平均值}) / (\text{溶媒对照组吸光平均值} - \text{空白对照组吸光平均值})$ 。

1.2.3 流式细胞仪分析细胞周期和凋亡 常规培养BGC-823胃癌细胞至80%融合。按实验分组设计,分别加入塞来昔布工作液,使塞来昔布终浓度分别为20, 40, 60, 80, 100 μmol/L,同时设溶媒对照组。继续常规培养72 h。处理后获单细胞悬液离心(要求每份样本细胞数量 $\geq 10^6$)。上机检测,行细胞周期和细胞凋亡分析。以上实验重复3次。

1.2.4 RT-PCR测定p21和Fas mRNA表达 按Trizol试剂盒操作说明抽取各组培养72 h后的细胞总RNA。逆转录cDNA合成:取RNA样品1 μg,95℃温育5 min,在逆转录体系中反应,总体积20 μL,42℃反应60 min。PCR扩增条件:逆转录产物5 μL, Taq酶2 U, 4 × dNTP 2.5 mmol/L,引物40 pmol/L,总体积50 μL。循环条件:94℃预变性5 min,94℃变性30 s, GAPDH, Fas和p21分别在58℃, 53℃和60℃复性1 min。7℃延伸90 s。循环30次,72℃保温10 min,产物置冰箱4℃保存。扩增引物:GAPDH上游引物5'-GCCCAACG-CACCGAATAGT-3',下游引物5'-CGATGGC-CCAGTCTCCTCAG-3'; Fas上游引物5'-CACTATT-GCTGGAGTCATG-3',下游引物5'-CTGAGTCAC-TAGTAATGTCC-3'; p21上游引物5'-GCGCTAATG-GCGGGGGTGCAT-3',下游引物5'-GCCGGCGTTT-GAGTGGTAG-3', GAPDH作内参照。扩增产物检测:取5 μL PCR产物加样至1%琼脂糖凝胶点样孔,以30 V稳压电泳25 min。图像分析仪检测并计算样品胶片的Fas和p21区带与GAPDH区带的密度百

分比,进行半定量分析。Fas 或 p21 相对丰度 = Fas 或 p21 (面积 × 强度) / GAPDH (面积 × 强度)。

1.3 统计学处理 所有资料经 SPSS10.0 统计软件处理。数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,各组间比较采用方差分析,两两比较采用 *q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 塞来昔布对胃癌细胞 BGC-823 生长的影响

塞来昔布各浓度组均可抑制胃癌细胞 BGC-823 的增殖,并呈时间和浓度依赖性。塞来昔布 20 ~ 120 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内,各浓度组抑制率呈时间依赖性 ($P < 0.05$)。在塞来昔布 120 $\mu\text{mol/L}$ 作用 72 h 后抑制率达 98% (图 1)。

2.2 流式细胞仪分析细胞周期和细胞凋亡

2.2.1 塞来昔布对细胞周期的影响

塞来昔布浓度为 0, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, G_1 期细胞数比例分别为 0.603 ± 0.016 , 0.643 ± 0.006 , 0.671 ± 0.005 , 0.708 ± 0.008 , 0.750 ± 0.007 , 0.787 ± 0.006 , G_1 期各浓度组细胞数

比例两两比较,差别有统计学意义 ($P < 0.05$); S 期细胞数比例分别为 0.307 ± 0.006 , 0.223 ± 0.003 , 0.209 ± 0.005 , 0.193 ± 0.015 , 0.157 ± 0.005 , 0.122 ± 0.006 , S 期各浓度组细胞数比例进行两两比较,差别有统计学意义 ($P < 0.05$); G_2 期细胞数所占百分比在各浓度组比较无显著差异 (图 2)。

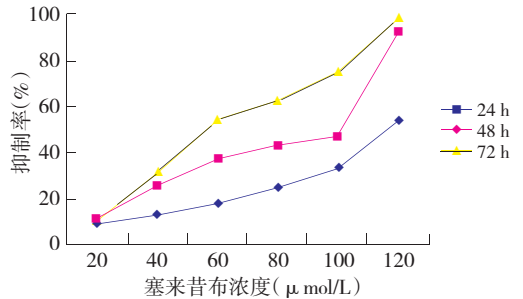


图 1 不同浓度塞来昔布对胃癌细胞 BGC-823 细胞抑制率。

Fig. 1 Cell restraint rate of BGC-823 gastric cancer cells treated with various concentrations of celecoxib for 24, 48, 72 h by means of MTT assay.

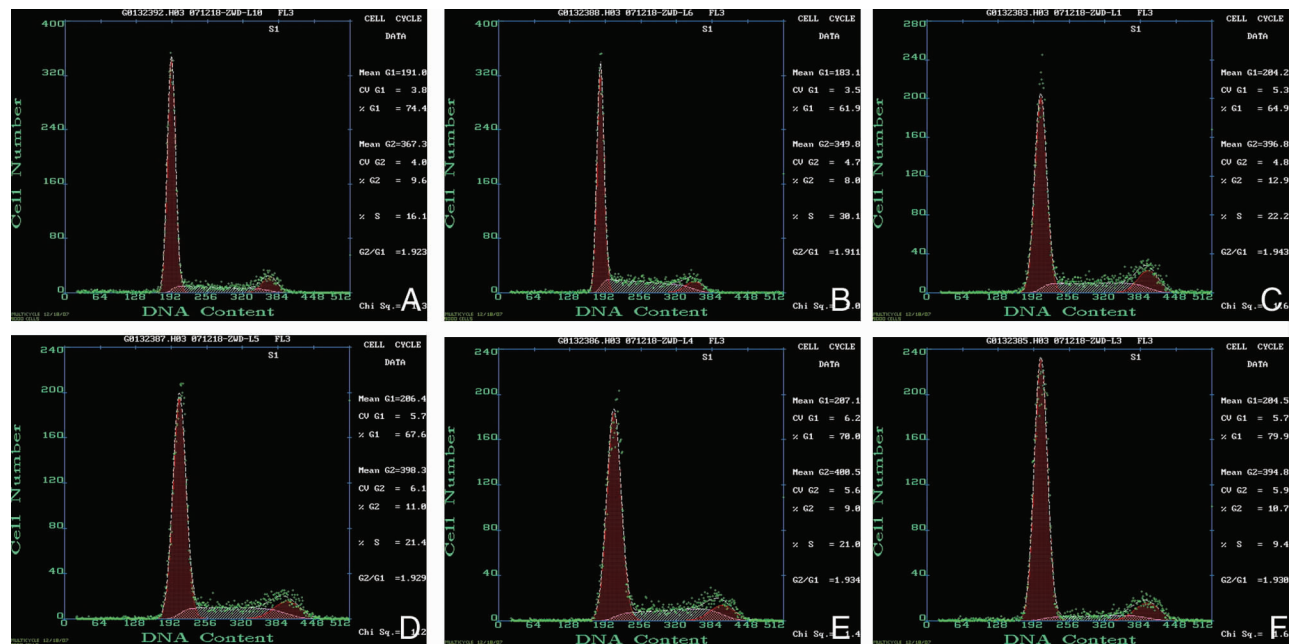


图 2 不同浓度塞来昔布处理组细胞周期各期细胞计数流式图。A: 0 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组; B: 20 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组; C: 40 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组; D: 60 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组; E: 80 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组; F: 100 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组。

Fig. 2 FCM histogram of cell periodic of BGC-823 gastric cancer cells treated with various concentrations of celecoxib. A: Celecoxib group of 0 $\mu\text{mol/L}$; B: Celecoxib group of 20 $\mu\text{mol/L}$; C: Celecoxib group of 40 $\mu\text{mol/L}$; D: Celecoxib group of 60 $\mu\text{mol/L}$; E: Celecoxib group of 80 $\mu\text{mol/L}$; F: Celecoxib group of 100 $\mu\text{mol/L}$.

2.2.2 塞来昔布对细胞凋亡的影响 塞来昔布浓度为0,20,40,60,80,100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 凋亡细胞比率分别为 0.503 ± 0.018 , 5.870 ± 0.325 ,

11.396 ± 0.267 , 17.567 ± 0.376 , 24.439 ± 0.326 , 52.933 ± 2.575 , 各浓度组凋亡细胞比率两两比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图3)。

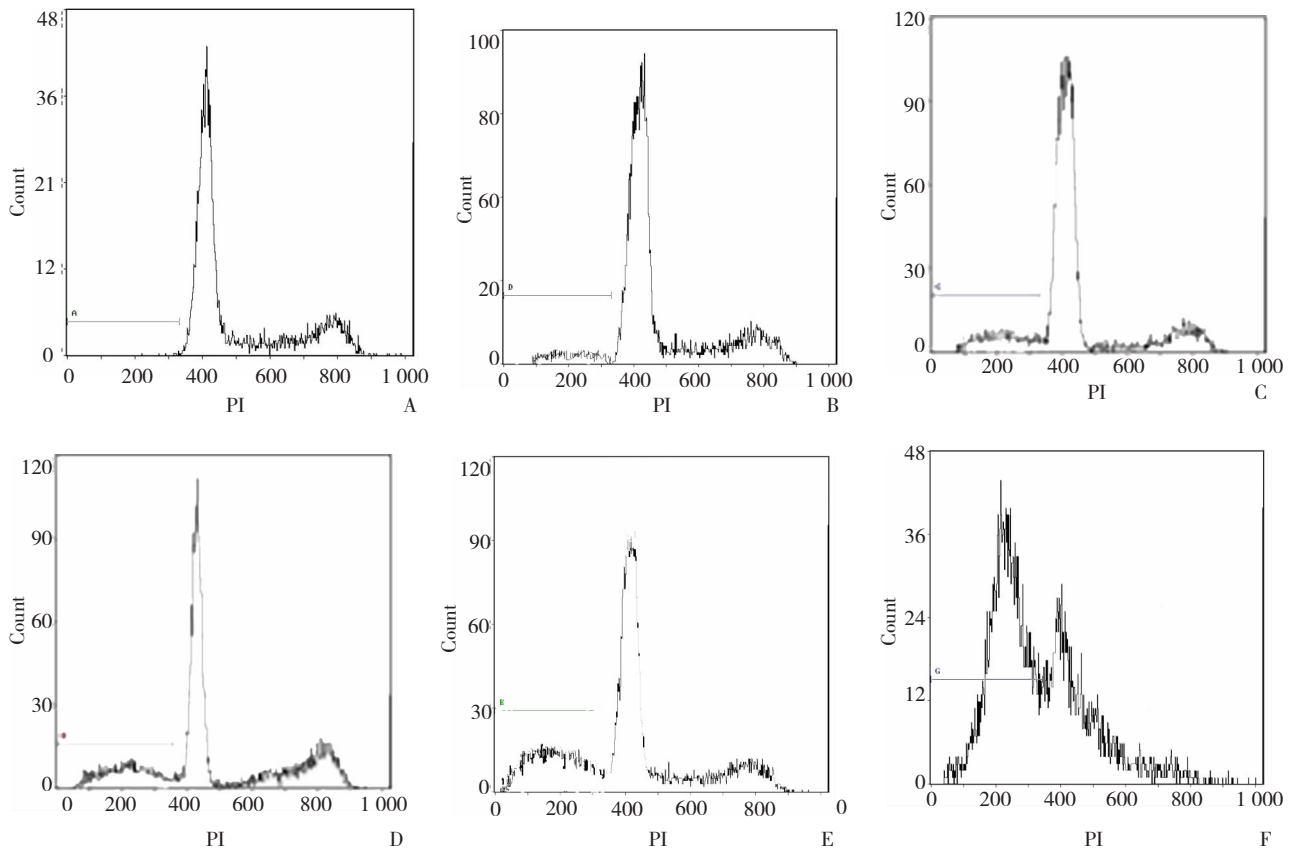


图3 不同浓度塞来昔布处理组细胞凋亡比率流式图。A:0 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组;B:20 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组;C:40 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组;D:60 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组;E:80 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组;F:100 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布组。

Fig. 3 FCM histogram of cell apoptosis of BGC-823 gastric cancer cells treated with various concentrations of celecoxib. A: Celecoxib group of 0 $\mu\text{mol/L}$; B: Celecoxib group of 20 $\mu\text{mol/L}$; C: Celecoxib group of 40 $\mu\text{mol/L}$; D: Celecoxib group of 60 $\mu\text{mol/L}$; E: Celecoxib group of 80 $\mu\text{mol/L}$; F: Celecoxib group of 100 $\mu\text{mol/L}$.

2.3 *Fas* 和 *p21*mRNA 的表达

2.3.1 *Fas* mRNA 的表达 *Fas* 扩增产物的凝胶电泳显示内参照 GAPDH 扩增产物电泳区带在 580 bp。*Fas* 扩增产物电泳区带在 266 bp 位置, 与设计引物的理论值一致。塞来昔布各浓度组 *Fas* 扩增产物均有表达, 塞来昔布浓度为 0, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 相对丰度分别为 0.191 ± 0.005 , 0.254 ± 0.010 , 0.326 ± 0.007 , 0.375 ± 0.015 , 0.423 ± 0.001 , 0.568 ± 0.059 ; 各浓度组 *Fas* 扩增产物表达的相对丰度两两比较, 差别有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 4A)。

2.3.2 *p21*mRNA 的表达 *p21* 扩增产物的凝胶电泳显示内参照 GAPDH 扩增产物电泳区带在 580 bp。*p21* 扩增产物电泳区带在 364 bp 位置, 与设计引物的理论值一致。塞来昔布各浓度组 *p21* 扩增产物均有表达, 塞来昔布浓度为 0, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 相对丰度分别为: 0.435 ± 0.045 , 0.642 ± 0.098 , 0.730 ± 0.014 , 0.813 ± 0.069 , 0.907 ± 0.058 , 1.030 ± 0.051 ; 各浓度组 *p21* 扩增产物表达的相对丰度两两比较, 差别有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 4B)。

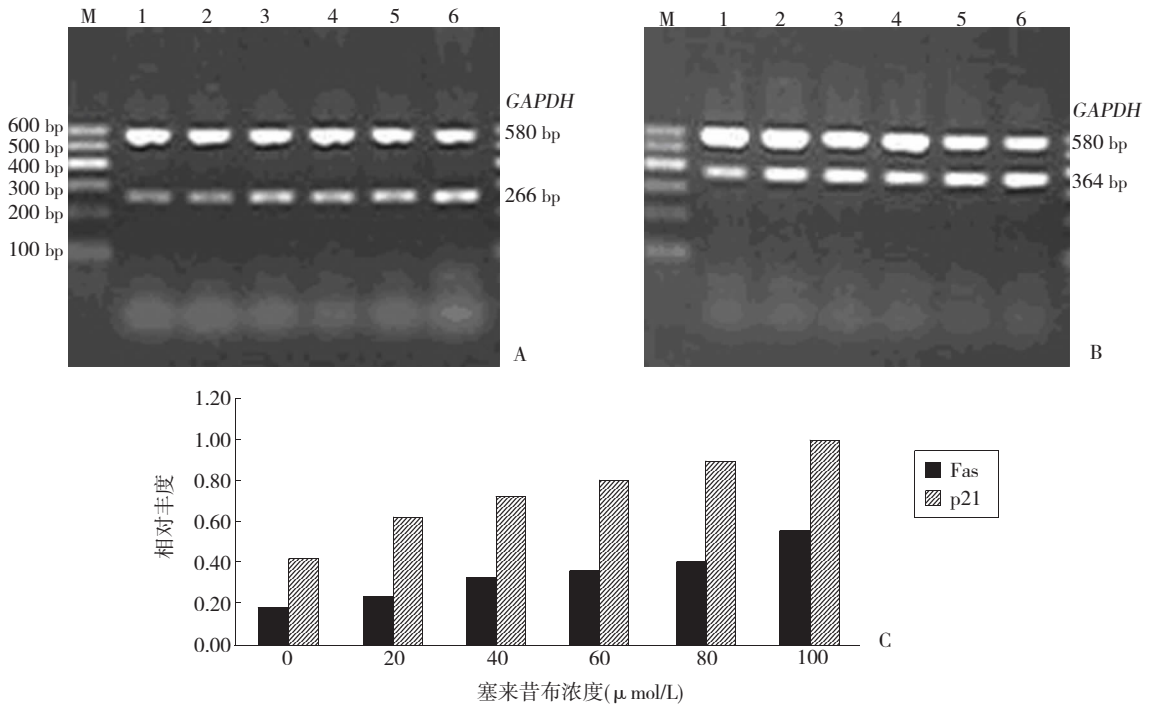


图4 RT-PCR检测胃癌BGC-823细胞各浓度组的Fas和p21 mRNA表达。A: Fas mRNA; B: p21 mRNA; C: Fas mRNA和p21 mRNA表达水平直方图。

Fig. 4 Expressions of Fas mRNA and p21 mRNA of BGC-823 gastric cancer cells treated with various concentrations of celecoxib by means of RT-PCR. A: Fas mRNA; B: p21 mRNA; C: Histogram charts of expression level of Fas mRNA and p21 mRNA; M: Marker; 1: Celecoxib group of 0 μmol/L; 2: Celecoxib group of 20 μmol/L; 3: Celecoxib group of 40 μmol/L; 4: Celecoxib group of 60 μmol/L; 5: Celecoxib group of 80 μmol/L; 6: Celecoxib group of 100 μmol/L.

3 讨 论

研究表明^[4], NSAIDs有抗肿瘤作用。然而,长期服用非选择性的NSAIDs可因持续抑制环氧化酶-1而导致胃肠道等方面的副作用,近来发现环氧化酶-2抑制剂塞来昔布可抑制体外培养的某些肿瘤细胞的生长^[2]。本研究用不同浓度塞来昔布干预抑制BGC-823胃癌细胞,发现随浓度增加和时间延长,其抑制作用逐渐增强,与徐美虹等^[2]结果一致。

p21是细胞周期负性调控基因,可通过编码蛋白的表达量来调节细胞周期,使细胞周期停滞于G₁期^[5],其调控机制与p21抑制CDK2, CDK4的活性有关,p21上调后,CDK2, CDK4不能磷酸化pRb,处于低磷酸化的pRb结合到E2Fs上,使E2Fs不能与其靶基因结合,这些调控细胞周期的靶基因表达受抑,导致细胞不能进入S期^[6-7]。而在胃癌患者中,细胞p21表达降低,导致细胞

周期增殖失控,最终导致肿瘤发生。本实验流式细胞检测发现,在0~100 μmol/L塞来昔布浓度组中,随塞来昔布浓度增加,G₁细胞数逐渐增加,S期细胞数逐渐降低,且具有统计学差异;同时PCR检测p21发现随塞来昔布浓度增加,胃癌BGC-823细胞p21表达逐渐增强,推测塞来昔布抑制胃癌细胞生长并使细胞周期停滞于G₁期,是通过上调p21的表达来实现的。

肿瘤的发生和发展与细胞凋亡的异常也密切相关。Fas是细胞表面重要的死亡受体,其与配体FasL结合活化并转导凋亡信号是诱导细胞凋亡的重要途径^[8]。然而大多数肿瘤细胞存在着Fas分子的低表达或缺失。已知某些细胞因子、化疗药物和放射治疗均能上调肿瘤细胞表面的Fas表达,诱导肿瘤细胞凋亡。本实验结果表明塞来昔布可以诱导凋亡且凋亡率随浓度增加而增加;同时塞来昔布可以上调Fas的表达。推测塞来昔布可能通过上调Fas表达诱导胃癌细胞BGC-823凋亡。目前如何提高肿瘤细胞的Fas表

达水平,用 FasL 或 Fas 抗体攻击表达 Fas 的恶性肿瘤细胞,已成为肿瘤治疗研究的新热点^[9]。

一些研究也提示胃癌表达 FasL,下调 Fas 表达,以逃离宿主免疫攻击^[10]。在胃癌组织中发现表达 FasL 的癌细胞区域内有大量的淋巴细胞凋亡,提示胃癌组织 Fas/FasL 系统的异常表达削弱了机体的免疫监视作用,可能是胃癌免疫逃逸形成的重要机制之一。尽管塞来昔布可以上调 Fas 表达,促进胃癌细胞凋亡,但塞来昔布是否能通过纠正对 Fas/FasL 系统的异常表达来防止胃癌的免疫逃避,尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Smalley W E, DuBois R N. Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs [J]. *Adv Pharmacol*, 1997, 39:1-20.
- [2] 徐美虹,吴开春,吴汉平,等. 非甾体类抗炎药对胃癌细胞增殖的抑制作用[J]. *中华消化杂志*, 2002, 22(4):199-201.
- XU Mei-hong, WU Kai-chun, WU Han-ping, et al. The inhibitory effect of nonsteroid anti-inflammatory drugs on gastric [J]. *Chin J Dig*, 2002, 22(4):199-201.
- [3] 李建英,于皆平,罗和生,等. 选择性 COX-2 抑制剂对胃癌细胞增殖的影响[J]. *癌症*, 2002, 21(6):625-629.
- LI Jian-ying, YU Jie-ping, LUO He-sheng, et al. Influence of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on proliferation of human gastric cancer cell [J]. *Chin J Cancer*, 2002, 21(6):625-629.
- [4] Taketo M M. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part 1) [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1998, 90(20):1529-1536.
- [5] Beauséjour C M, Krtolica A, Galimi F, et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways [J]. *EMBO J*, 2003, 22(16):4212-4222.
- [6] Alexander K, Yang H S, Hinds P W. pRb inactivation in senescent cells leads to an E2F-dependent apoptosis requiring p73 [J]. *Mol Cancer Res*, 2003, 1(10):716-728.
- [7] Herbig U, Jobling W A, Chen B P, et al. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21 (CIP1), but not p16 (INK4a) [J]. *Mol Cell*, 2004, 14(4):501-513.
- [8] 朱强,邓长生. Fas/Fas 配体在大肠癌发生和免疫逃逸及反击中的作用[J]. *中华内科杂志*, 2002, 41(6):378-380.
- ZHU Qiang, DENG Chang-sheng. The role of Fas/Fas ligand in tumorigenesis, immune escape, and counterattack in colonic cancer [J]. *Chin J Int Med*, 2002, 41(6):378-380.
- [9] Ohno S, Tachibana M, Shibakita M, et al. Prognostic significance of Fas and FasL ligand system-associated apoptosis in gastric cancer [J]. *Ann Surg Oncol*, 2000, 7(10):750-757.
- [10] Lee T B, Min Y D, Lim C, et al. Fas (Apo-1/CD95) and Fas ligand interaction between gastric cancer cells and immune cells [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2002, 17(1):32-38.

(本文编辑 彭敏宁)