

p38MAPK 在结肠癌细胞凋亡中的作用及与 COX-2 的关系

宋伟庆¹, 刘 玉², 韦金英², 周保军¹, 韩彩丽², 陈 怡²

Role of p38MAPK in Apoptosis of Colon Cancer Cells and Its Relationship with COX-2

SONG Wei-qing¹, LIU Yu², WEI Jin-ying², ZHOU Bao-jun¹, HAN Cai-li², CHEN Yi²

1. Department of Gastrointestinal Surgery, Secondary Affiliated Surgery, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 2. Department of Pathology, Hebei Medical University

Corresponding Author: HAN Cai-li

Abstract **Objective** To investigate the role of p38MAPK in mediating celecoxib (COX-2 selective inhibitor) inhibited the growth of tumor in colon cancer cells and its relationship COX-2. **Methods** The cell growth activity of HT-29 cells after the treatment by celecoxib was observed by MTT assay, flow cytometry was used to observed the effect of celecoxib and SB203580 (p38MAPK specific inhibitor) on apoptosis and the cell cycle distribution of HT-29 cells, the expression of Phospho-p38MAPK and COX-2 protein was detected by Western blot. **Results** Compared with the expression of p38MAPK(0.23 ±0.12) and COX-2(0.95 ±0.14) of control group, p38MAPK expression (0.62 ±0.11) was higher than control group, while the expression of COX-2(0.44 ±0.11) was lower than control group which was treated by celecoxib. SB203580 could decrease the expression of p38MAPK(0.12 ±0.05) and COX-2(0.23 ±0.13); the expression of p38MAPK(0.43 ±0.12) was lower than control group, which was between celecoxib and SB203580, the decrease of COX-2 was most significant(0.15 ±0.10). Compared with the apoptosis of control group(4.31%), celecoxib and celecoxib + SB203580 induced apoptosis significantly($P < 0.01$ and $P < 0.05$), the apoptosis rate of them was 40.95%, 26.24% respectively. **Conclusion** Celecoxib can induced the apoptosis of human colon cancer HT-29 cell lines, which may through the activation of p38MAPK. In signal transduction of HT-29 cell lines, the upstream kinase of COX-2 is p38MAPK, the expression of COX-2 was regulation by p38MAPK, which has the effect of degenerative feedback regulation by COX-2. Celecoxib induced the apoptosis of tumor cells and play the role of anti-neoplasia through COX-2 and p38MAPK.

Key words: Colon cancer cell lines; COX-2; p38MAPK; Signal transduction; Apoptosis

摘要:目的 探讨结肠癌细胞 p38MAPK 介导 celecoxib (COX-2 选择性抑制剂) 抗肿瘤的作用及与 COX-2 的关系。方法 用 MTT 法检测 celecoxib 对人结肠癌 HT-29 细胞生长的作用,用 Western blot 法测定各组细胞 COX-2 和 Phospho-p38MAPK 蛋白表达量,采用流式细胞术检测 celecoxib 和 SB203580 (p38MAPK 特异性抑制剂) 作用后 HT-29 细胞凋亡和细胞周期分布。结果 p38MAPK 和 COX-2 蛋白表达量与对照组(0.23 ±0.12)(0.95 ±0.14)相比,celecoxib 可使 p38MAPK 蛋白表达水平明显升高(0.62 ±0.11),而使 COX-2 蛋白表达水平降低(0.44 ±0.11);SB203580 使 p38MAPK(0.12 ±0.05)及 COX-2 蛋白(0.23 ±0.13)表达水平均降低;SB203580 和 celecoxib 共同作用后,p38MAPK 表达量介于 celecoxib 和 SB203580 作用之间(0.43 ±0.12),COX-2 表达量下降最为显著(0.15 ±0.10)。celecoxib 和 celecoxib + SB203580 均可显著诱导 HT-29 细胞凋亡($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),与对照组(4.31%)相比,其凋亡率分别为40.95%、26.24%。结论 在 HT-29 细胞中,celecoxib 可通过活化 p38MAPK 而诱导结肠癌细胞凋亡,p38MAPK 是 COX-2 的上游激酶,COX-2 的表达水平受 p38MAPK 调控,并且 COX-2 可能对 p38MAPK 有负反馈调节作用。celecoxib 是通过 COX-2 及其以外的 p38MAPK 通路诱导肿瘤细胞凋亡而发挥抗肿瘤作用的。

关键词: 结肠癌细胞株; COX-2; p38MAPK; 信号转导; 凋亡

中图分类号: R735.3⁺5 文献标识码: A

文章编号: 1000-8578(2007)05-0359-04

收稿日期: 2006-03-31; 修回日期: 2006-07-21

作者单位: 1. 050017 河北医科大学第二医院胃肠外科; 2. 河北医科大学病理教研室

通讯作者: 韩彩丽

作者简介: 宋伟庆(1956-),男,本科,主任医师,主要从事肿瘤的研究

0 引言

非甾体类抗炎药 (Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 是临床上常用的抗炎镇痛药, 近年来发现它还具有抗癌作用, 尤其是对结肠癌具有预防和治疗作用。但对于 NSAIDs 抗肿瘤作用的详细机制目前尚未完全明确, 有研究表明 NSAIDs 主要的抗癌机制是抑制 COX-2 途径, 通过抑制 COX 阻断花生四烯酸转化为前列腺素的生物合成, 从而发挥抗肿瘤的作用。但这并不是唯一的途径, 又有研究发现使用 NSAIDs 可能通过启动细胞信号转导通路中 p38MAPK 通路来诱导肿瘤细胞凋亡。Bhounik 等^[1] 研究显示, p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK) 信号转导通路是细胞信号传导的交汇点, 在凋亡途径中可被启动, 通过诱导肿瘤细胞的凋亡达到抗肿瘤的作用, 而同时 p38MAPK 又参与了 COX-2 的转录调控。故本研究采用 MTT 法、Western Blot 法及流式细胞分析技术, 探讨结肠癌 HT-29 细胞中 p38MAPK 在 celecoxib 抗肿瘤中的作用及其与 COX-2 关系的研究, 为进一步阐明非甾体类抗炎药的抑瘤机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

结肠癌细胞株 HT-29 (购自中国协和医科大学细胞中心) 在含有 5% 胎牛血清 (美国 HyClone 公司), 10^5 U/L 青霉素, 100mg/L 链霉素的 DMEM/F12 培养基 (美国 HyClone 公司) 37℃、5% CO₂ 条件下体外常规培养。

1.2 试剂

二甲基亚砷 (DMSO) (Sigma 公司)。COX-2 抗体、COX-2 特异性抑制剂 celecoxib、磷酸化 p38MAPK 抗体、p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 (Santa Cruz 公司)。免疫组化试剂盒 SABC (北京中山生物技术有限公司)。DAB 试剂盒 (北京中山生物技术有限公司)。

1.3 MTT 法检测 celecoxib 对人结肠癌 HT-29 细胞增殖的抑制作用

HT-29 细胞在含 5% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液中常规培养。取对数生长期细胞, 以 1×10^4 /孔接种于 96 孔板, 培养 4h 细胞贴壁后, 轻轻吸去上清, 加入 celecoxib 浓度梯度为 20、40、60、80、100 μmol/L。同时设不含药物的阴性对照组和溶剂对照组 (分别加入等体积的培养基和最大浓度的 DMSO, DMSO 的体积分数为 0.16%)。每浓度每时间点设 6 组, 继续培养。分别于 24、48、72h 后

各孔加入 MTT (5mg/ml) 20 μl, 继续培养 4h, 弃上清, 每孔加入 DMSO 150 μl, 微量振荡器振荡 10min, 以使甲胺产物充分溶解, 置酶标仪测 570nm 波长时各孔吸光度 (A 值)。肿瘤细胞生长抑制率的计算: 抑制率 (%) = (对照组 A 值 - 试验组 A 值) / 对照组 A 值 × 100%。

1.4 分组及处理

实验分为对照组 (Ctrl 组)、celecoxib 干预组 (C 组)、SB203580 干预组 (SB 组)、先用 SB203580 干预 30min 后再用 celecoxib 处理组 (SB + C 组)。CON 组: 加入等体积的培养基; celecoxib 组: 70 μmol/L 的 celecoxib (根据 MTT 实验结果) 作用 48h; SB 组: 5 μmol/L 的 SB203580 (根据参考文献^[2]) 作用 48h; SB + C 组: 先用 5 μmol/L 的 SB203580 作用于 HT-29 细胞 30min, 然后再用 70 μmol/L 的 celecoxib 作用 48h。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡并分析其细胞周期

各实验组处理细胞 48h 后, 收集细胞约 1×10^6 个, 用 2.5g/L 胰蛋白酶消化成单细胞悬液, PBS 洗涤 2 次, 70% 冷乙醇固定过夜, 用碘化丙啶染色行细胞 DNA (凋亡) 含量的测定, 并行细胞周期分析。采用美国 Beckman Coulter 公司 EpiCS-XL 型流式细胞仪, 15mW 氩离子激光器, 激发波长为 488nm。应用 DNA 细胞周期分析软件, 计算出 DNA 组方图各时相分布的百分比, 以增殖指数 (PI) 表示细胞的增殖活性, 公式: $PI = (S \text{ 期} + G_2M \text{ 期}) / (S \text{ 期} + G_2M \text{ 期} + G_0/G_1 \text{ 期}) \times 100\%$

1.6 Western blot 检测 p38MAPK 和 COX-2 表达

提取 HT-29 细胞总蛋白, 考马斯亮蓝法粗定量, 每次检测蛋白之前使用 β -actin 抗体对各样本的蛋白量进行剂量标准化检测。取等量总蛋白, 8% SDS-PAGE 电泳分离, 将分离区带电转移至 PVDF 膜, 加一抗 (p38MAPK 和 COX-2 工作液浓度分别为 1:50 和 1:100)、二抗、三抗, DAB 显色。结果扫描保存, Lab Works 4.5 凝胶成像软件 (美国) 行半定量分析, 以积分光密度 (IOD) 表示。结果用相对积分光密度 (IOD) 来表示 (β -actin 作为内参对照, 相对 IOD 值 = COX-2、Phospho p38MAPK 的 IOD 值 / β -actin 的 IOD 值), 并与对照组的相对 IOD 值作比较。

1.7 统计学处理

应用 SAS 6.12 软件对结果进行统计处理。数据结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单样本 Student's *t* 检验和方差分析对相关数据进行检验, 检验水准为 0.05。

2 结果

2.1 celecoxib 对 HT-29 细胞增殖的抑制作用

当 celecoxib 浓度达到 20 μ mol/L 时,就开始抑制 HT-29 细胞的增殖;随着其浓度增加,抑制率也增加;当其剂量为 80 μ mol/L 作用 72h 时,抑制率为 50.07%。相关性分析表明 celecoxib 对 HT-29 细胞生长抑制作用呈时间和浓度依赖性 ($r = 0.85 \sim 0.99$ 、 $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),见表 1。

2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡并分析其细胞周期在二倍体细胞 (G_0/G_1) 峰前出现一个亚二倍体

峰位判定为凋亡细胞峰。对亚二倍体峰进行定量分析,可计算出细胞凋亡率。celecoxib 作用于 HT-29 细胞后,与空白对照组相比,细胞增殖水平下降。celecoxib 和 SB203580 共同作用于 HT-29 细胞后, G_1 期比率由 66.20% 上升到 80.92%,而 S 期比率由 30.07% 下降到 16.43%,细胞增殖受到抑制。celecoxib 和 SB203580 共同作用于 HT-29 细胞后,凋亡细胞百分比分别由 3.31% 增加至 65.24%,见表 2。

表 1 celecoxib 对 HT-29 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Group	24h		48h		72h	
	OD ₅₇₀	IR (%)	OD ₅₇₀	IR (%)	OD ₅₇₀	IR (%)
Control	0.286 \pm 0.039	—	0.457 \pm 0.081	—	0.721 \pm 0.080	—
DMSO	0.276 \pm 0.057	0.72	0.411 \pm 0.063	1.01	0.690 \pm 0.010	1.97
celecoxib (μ mol/L)						
20	0.257 \pm 0.020	6.88	0.364 \pm 0.015 *	12.71	0.605 \pm 0.189 **	13.38
40	0.251 \pm 0.024	9.05	0.300 \pm 0.078 **	28.87	0.352 \pm 0.040 **	47.60
60	0.230 \pm 0.054 **	16.67	0.210 \pm 0.040 **	40.29	0.366 \pm 0.043 **	48.59
70	0.219 \pm 0.035 **	17.02	0.187 \pm 0.045 **	45.15	0.359 \pm 0.061 **	50.70
100	0.100 \pm 0.037 **	60.14	0.091 \pm 0.071 **	79.13	0.071 \pm 0.052 **	90.15

Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。IR: Inhibitory rate

表 2 HT-29 细胞在不同实验组的增殖和凋亡情况

Groups	Apoptosis rate (%)	Proliferation index (%)	Distribution of cell cycle		
			S phase	G_2/M phase	G_0/G_1 phase
Control	4.31 \pm 0.27	45.07 \pm 1.69	30.07 \pm 1.53	15.13 \pm 0.93	66.20 \pm 1.64
celecoxib	40.95 \pm 0.83 **	15.81 \pm 0.78 **	23.17 \pm 0.72 *	10.57 \pm 0.10	70.01 \pm 2.10
SB	5.36 \pm 0.77	41.15 \pm 0.10	25.43 \pm 0.55	11.71 \pm 0.49	69.86 \pm 2.60
SB + C	26.24 \pm 0.99 *	20.93 \pm 0.98 **	16.43 \pm 0.86 **	9.65 \pm 0.47	80.92 \pm 2.76 **

Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 Western blot 检测结果

2.3.1 P-p38MAPK 蛋白的表达 p38MAPK 蛋白分子量为 38kD, SDS-PAGE 电泳、Western 杂交后在 38kD 位置出现了浅棕色的阳性条带。采用凝胶成像分析系统 Lab Work 4.5 软件对杂交条带进行半定量分析,蛋白含量以积分光密度值 (IOD) 表示,以相对积分光密度 P-p38MAPK/ β -actin 比较蛋白表达高低。与对照组相比, celecoxib 组 P-p38MAPK 表达量增高; SB 组 P-p38MAPK 的表达减少, SB + C 组 P-p38MAPK 表达量介于 celecoxib 组和 SB 组之间,见图 1、表 2。

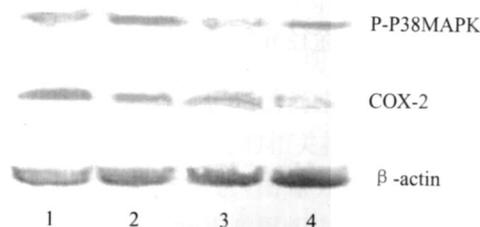
2.3.2 COX-2 蛋白的表达 COX-2 蛋白分子量为 72kD, SDS-PAGE 电泳、Western 杂交后在 72kD 位置出现了浅棕色的阳性条带。采用凝胶成像分析系统 Lab Work 4.5 软件对杂交条带进行半定量分析,蛋白含量以积分光密度值 (IOD) 表示,以相对积分光密度 COX-2/ β -actin 比较蛋白表达高低。与对照组相比, celecoxib 组 COX-2 表达量明显减少; SB 组 COX-2 的表达也减少, SB + C 组 COX-2 表达量最

少,见图 1、表 3。

表 3 Western blotting 检测 HT-29 细胞中 P-p38MAPK 和 COX-2 蛋白的表达

Group	P-p38MAPK	COX-2
CON	0.23 \pm 0.12	0.95 \pm 0.14
celecoxib	0.62 \pm 0.11 **	0.44 \pm 0.11 **
SB	0.12 \pm 0.05 *	0.23 \pm 0.13 **
SB + C	0.43 \pm 0.12 **	0.15 \pm 0.10 **

Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$



1: Control Group; 2: celecoxib Group;
3: SB Group; 4: SB + C Group

图 1 The protein expression of P-p38MAPK and COX-2 in the HT-29 cells by Western blotting

3 讨论

流行病学证据表明非甾体类抗炎药(NSAIDs)可抑制结直肠癌肿瘤细胞增殖并逆转其癌前病变,此种作用的细胞靶被认为是诱导型 COX-2,此酶在结直肠癌中呈过表达,并导致前列腺素水平增高。然而,有研究显示,对 COX-2 的抑制潜能并不是 NSAIDs 抗肿瘤的唯一或最重要的机制,其抗肿瘤机制还远未清楚。NSAIDs 可能通过细胞信号转导通路来诱导肿瘤细胞凋亡和抑制肿瘤细胞生长、增殖,这为临床肿瘤治疗又提供了一新的抗癌思路。NSAIDs 可能通过作用于 MAPKs 信号转导通路来诱导肿瘤细胞凋亡和抑制肿瘤细胞的增殖和生长。近年来研究发现,MAPKs 信号转导通路之一,即 p38MAPK 通路可导致蛋白合成、细胞表面受体表达、细胞骨架重构,最终导致细胞的凋亡^[3]。p38MAPK 通路中的 p38MAPK 表达和活性的变化,可以有效调节和阻断关键的信号通路,调控细胞凋亡。但该信号传导途径是否也介导了 NSAIDs 的抗肿瘤作用,迄今尚不清楚。

本研究首先应用 MTT 法测定了 celecoxib 对 HT-29 细胞增殖的抑制作用,随 celecoxib (20 μ mol/L)作用浓度增加抑制作用增强,两者存在着明显的量效关系。celecoxib 剂量为 70 μ mol/L 作用 48h,对 HT-29 细胞的抑制率为 45.15%;流式细胞仪检测 celecoxib 作用于 HT-29 细胞细胞凋亡率为 40.95%,celecoxib 可通过诱导 HT-29 细胞凋亡而抑制其增殖。

本实验结果显示,p38MAPK 特异性抑制剂使结肠癌细胞株 COX-2 和 P-p38MAPK 蛋白表达均下降;COX-2 选择性抑制剂 celecoxib 可使 COX-2 蛋白表达明显下降,而 P-p38MAPK 被激活表达增高;两种药物联合作用 COX-2 蛋白表达最低,而 P-p38MAPK 蛋白表达介于两种药物组之间,提示 p38MAPK 可能是 COX-2 的上游激酶,当 p38MAPK 活化时可上调 COX-2 蛋白的表达,并且 COX-2 对 p38MAPK 有负反馈调节作用。Fan 等^[4]研究认为 IL-1 诱导胃癌细胞 COX-2 表达是由 p38 和 P42/44 途径介导的,其分别单用 IL-1 和

先用 IL-1 然后再用 MEK 和 p38MAPK 信号通路抑制剂 PD98905、SB203580 处理胃癌细胞株 AGS 时,结果显示在人胃癌细胞中,IL-1 可通过 MEK 和 p38MAPK 通路调控 COX-2 基因的表达以及 PGE₂ 的合成。还有研究表明激活 MEKK1-SEK1/MKK4-p38MAPK 途径可以诱导 COX-2 生成。本实验结果与李艳波等^[5]研究一致。celecoxib 可抑制 COX-2 蛋白表达,使 COX-2 对 p38MAPK 的反馈抑制作用减弱,通过上调 p38MAPK 的表达,诱导肿瘤细胞凋亡而发挥抗肿瘤作用。

COX-2 抑制剂作为强有力的抗肿瘤因子,其抗肿瘤机制存在 COX-2 非依赖性途径,而其效应与 p38MAPK 信号转导通路密切相关,可能是 COX-2 抑制剂抗结肠癌的重要靶点。因此,人们提出信号转导干预治疗(interference therapy in signal transduction)这一新概念。即针对信号转导通路中发生异常环节来干预这种不正常的信号转导,以逆转肿瘤细胞恶性表型,从而达到抑制肿瘤生长的目的。本研究为选择 COX-2 抑制剂扩大其药物适应症及结肠癌的基因治疗提供依据。

参考文献:

- [1] Bhoumik A, Ivanov V, Ronai Z. Activating transcription factor 2-derived peptides alter resistance of human tumor cell lines to ultraviolet irradiation and chemical treatment [J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(2):331-342.
- [2] 李同丽,李源,张革化. 细菌脂多糖诱导离体鼻黏膜上皮细胞致炎后 p38MAPK 的活性变化及意义[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 2005, 19(13): 607-610.
- [3] Park KM, Chen A, Bonventre JV. Prevention of kidney ischemia/reperfusion-induced + functional injury and JNK, p38, and MAPK kinase activation by remote ischemic pretreatment [J]. J Bio Chem, 2001, 276(15):11870-11876.
- [4] Fan XM, Wong BCY, Lim MCM, et al. Interleukin-1B induce cyclooxygenase-2 expression in gastric cancer cells by the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinase signaling pathways [J]. Gastroenterol Hepatol, 2001, 16(5):1098-1104.
- [5] 李艳波,邓华聪,郑丹,等. 硒对人脐静脉内皮细胞 p38 信号通路和环氧酶-2 表达的影响[J]. 中华预防医学杂志,2004, 38(2):127-127.

[编辑:安 凤]