

COX-2 抑制剂联合顺铂或 X 射线对 A549 肺腺癌细胞株的体外实验

熊建萍,陶庆松,张凌,徐俊,项小军,李思明,张锡泉,卢珊

The Depressive Effect of Detected on the Proliferation of A549 Human Lung Adenocarcinoma Cell Lines and Celecoxib Combined with Cisplatin or X ray

XIONG Jian-ping, TAO Qing-song, ZHANG Ling, XU Jun, XIANG Xiao-jun, LI Si-ming, ZHANG Xi-quan, LU Shan

Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China

Abstract :Objective To observe the depressive effect of celecoxib combined with cisplatin or X ray on A549 human lung adenocarcinoma cells. **Methods** The depressive effect on the proliferation of A549 cells was detected by MTS technique when celecoxib was combined with cisplatin, the effect on SF of A549 cells was detected by MTS technique when celecoxib was combined with X ray, the apoptosis of A549 cells was detected by flow cytometry. **Results** Within a certain concentration, celecoxib and cisplatin was able to inhibit the proliferation of A549 cells respectively, and dose-effect relationship was detected in the process. The combination of celecoxib (0.35mg/L) and cisplatin could enhance the depressive effect, and synergistic effect or addition effect was detected in the combination when the concentration of cisplatin was more than 1mg/L. In addition, celecoxib/ X ray (4Gy) combination significantly decreased the SF of A549 cells and increased the apoptosis rate of A549 cells. **Conclusion** Celecoxib/ cisplatin combination could enhance the depressive effect on the proliferation of A549 human lung adenocarcinoma cells; Celecoxib/ X ray could increase the apoptosis rate of A549 human lung adenocarcinoma cells, enhance the cells' radio sensitivity.

Key words Lung Cancer; COX-2 inhibitor; In vivo experiment; Apoptosis; X-ray

摘要:目的 观察环氧化酶-2(COX-2)抑制剂塞来昔布(Celecoxib)联合化疗药物顺铂(DDP)或联合 X 射线对 A549 人肺腺癌细胞增殖的影响及可能机制。方法 应用 MTS 法分别检测 Celecoxib 与 DDP 联用对 A549 细胞增殖的影响及联合 X 射线对 A549 细胞存活分数(SF)的影响,流式细胞术检测细胞凋亡。结果 在一定浓度范围内,Celecoxib 和 DDP 均可抑制 A549 人肺腺癌细胞的生长,其抑制作用呈量-效关系。两者联用可增强对 A549 细胞生长的抑制作用,DDP 浓度 1mg/L 时两者具有协同或相加作用。Celecoxib 与 X 射线联用可显著降低细胞存活分数(SF),增加细胞凋亡率。结论 Celecoxib 与 DDP 联合可增强对 A549 人肺腺癌细胞的生长抑制效应;Celecoxib 与 X 射线联合时,可增加 A549 人肺腺癌细胞的凋亡率,增强其对放射的敏感性。

关键词:肺癌;环氧化酶 2;体外实验;凋亡;X 射线

中图分类号:R73-36+1;R734.2 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2007)01-0008-03

0 引言

目前,国外已经有预临床实验证实了选择性 COX-2 抑制剂可提高一些化疗药物的细胞毒活性^[1],还可增加肿瘤细胞对放疗的敏感性^[2]。本课题借鉴国内外有关研究,在观察 COX-2 抑制剂 Celecoxib 与 DDP 联合对 A549 细胞抑制作用的基础上,进一步观察其与 X 射线联合对 A549 细胞的

影响,从而为肺癌的临床治疗提供基础研究资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株与细胞培养 人肺腺癌细胞株 A549 购自中国科学院上海细胞生物学研究所,用含体积分数为 10%的胎牛血清、100U/ml 青霉素、100U/ml 链霉素的 DMEM 培养基,于 37℃、5%CO₂、95%湿度 CO₂ 培养箱进行培养。待细胞呈对数生长,即用 0.25%的胰蛋白酶溶液消化,分瓶并扩大培养。

1.1.2 主要试剂及仪器 Celecoxib(昆山化工医

收稿日期:2006-01-27;修回日期:2006-03-22
基金项目:江西省科技厅自然科学基金课题资助(0540059)
作者单位:330006 南昌大学第一附属医院肿瘤科
作者简介:熊建萍(1961-),女,本科,主任医师,主要从事肿瘤临床及临床基础的研究

药原料有限公司),化学结构式为 C₁₇ H₁₄ F₃ N₃ O₂ S₂, 25 溶于二甲亚砜(DMSO);DDP(云南个旧生物药业有限公司)。其他主要试剂仪器包括 MTS/ PMS (Promega)、酶联免疫检测仪、流式细胞仪和电子直线加速器(瑞典依科达公司)。

1.1.3 药物浓度参照其常用剂量在人体达到的血浆峰浓度,选择其血浆峰浓度的 1/4 ~ 1/10 倍范围,顺铂血浆峰浓度为 2mg/L, Celecoxib 血浆峰浓度为 0.7mg/L。

1.2 方法

1.2.1 Celecoxib 与 DDP 联合对 A549 细胞的影响 MTS 法检测细胞生长抑制。取 96 孔无菌培养板一个,每孔加入含有 2 × 10⁵/ml 肿瘤细胞的 DMEM 细胞悬液 100μl。设空白组(只含等量溶剂)、Celecoxib 组、顺铂组及联合组,每组 3 复孔,于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养 6h。肿瘤细胞完全贴壁后,实验组中分别加入不同浓度的干预药物,使 DDP 终浓度分别为 0.5、1.0、2.0、4.0 和 8.0mg/L; Celecoxib 终浓度分别为 0.175、0.35、0.7、1.4 和 2.8mg/L; 联合组 Celecoxib 浓度为 0.35mg/L。继续培养 48h 后,每孔加入 MTS/ PMS 混合液 20μl 培养 2h,应用酶标仪,于 492nm 波长处测光吸收(OD)值。根据公式计算细胞生长抑制率(E): E = 1 - 实验组平均 OD 值/ 对照组平均 OD 值 × 100%。按下式计算 Q 值并判断两药的联合效应^[3]: Q = E(A + B) / [EA + (1 - EA) × EB], 其中,E(A + B)为两药合用的抑制率,EA、EB 为两药单用的抑制率。Q 为 0.85 ~ 1.15 表示两药作用相加,Q > 1.15 表示两药作用协同,Q < 0.85 表示两药作用相互拮抗。上述实验重复 3 次。

1.2.2 Celecoxib 与 X 射线联合对 A549 细胞的影响

(1) X 线照射条件 细胞在室温下,直线加速器 6MV-X 线、SSD 照射,加 2cm 标准等效填充物(2cm 厚有机玻璃板),平均剂量率 200cGy/ min。

(2) MTS 法检测存活分数 取 24 孔培养板一个,设 4Gy 照射组及 4Gy + Celecoxib 联合组,每组 3 复孔,按上述接种方法,每孔加入含有 2 × 10⁵/ml 肿瘤细胞的 DMEM 细胞悬液 100μl 及 DMEM 完全培养基 400μl;另取 24 孔培养板一个,设空白对照组 3 复孔,每孔加入细胞悬液 100μl 及 DMEM 完全培养基 400μl,于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养 6h。空白对照组加入 DMEM 完全培养基 500μl,联合组经不同浓度 Celecoxib 500μl 处理,1h 后经 X 线照射,继续培养 5d, MTS 法检测 OD 值,按下式计算存活分数(SF): SF = 实验组平均 OD 值/ 对照组平均 OD 值 × 100%。

(3) 流式细胞术检测细胞凋亡 取对数生长期的 A549 细胞 1 × 10⁶/ ml 接种于培养瓶中,24h 后换液。分为单纯照射组和 Celecoxib 处理组,均重复 3 瓶。单纯照射组不加药物,Celecoxib 处理组终浓度为 0.35mg/L,于照射前 1h 加入,分别照射 0Gy、2Gy、4Gy、6Gy、8Gy,继续培养 24h。将样品制备成单细胞悬液,固定于 70% 乙醇,-20 °C 保存,上机测试前去除固定液,使样品细胞悬浮于缓冲液中,调整细胞浓度在 10⁵/ ml 左右。加入溴化乙啶染液 1.0ml(含溴化乙啶 10μg/ ml, RNA 酶 10μg/ ml, Triton-X-100 1.0%),4 °C 染色 30min 后,上机测试,分析计算凋亡率。

1.3 统计学方法

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间差异采用 SPSS11.5 统计软件行单因素方差分析,相关性采用 Pearson 相关分析,检验水准 $\alpha = 0.05, P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 Celecoxib、DDP 以及两者联用对 A549 细胞的生长抑制效应

不同浓度 Celecoxib 对 A549 细胞的生长抑制率分别为 4.13%、13.66%、22.73%、29.28% 及 41.56%,在一定浓度范围内呈量-效关系 ($r = 0.996, P < 0.01$)。Celecoxib 单用时,浓度为 0.35mg/L 可显著抑制 A549 细胞的增殖,因此,根据 Celecoxib 对 A549 细胞的抑制效应结果,选用 0.35mg/L 作为与 DDP 联合用药的干预浓度,见表 1。

表 1 DDP、DDP + Celecoxib 对 A549 细胞生长抑制效应($\bar{x} \pm s, n = 9$)

| 浓度 (mg/L) | DDP | | Cele + DDP | | Q 值 |
|--------------|---------------|---------|-----------------|---------|------|
| | OD 值 | 抑制率 (%) | OD 值 | 抑制率 (%) | |
| 0.5 | 0.855 ± 0.025 | 1.84 | 0.817 ± 0.041 | 6.20 | 0.41 |
| 1.0 | 0.832 ± 0.025 | 4.48 | 0.668 ± 0.019 * | 23.10 | 1.32 |
| 2.0 | 0.636 ± 0.009 | 22.73 | 0.514 ± 0.006 * | 40.96 | 1.23 |
| 4.0 | 0.521 ± 0.016 | 40.35 | 0.459 ± 0.031 * | 47.30 | 0.98 |
| 8.0 | 0.439 ± 0.041 | 49.60 | 0.326 ± 0.072 * | 60.96 | 1.08 |

* P < 0.01, 与 DDP 单用相比较

由表 1 可见,当 DDP 单用时,浓度为 2.0mg/L 可显著抑制 A549 细胞的增殖,随着 DDP 浓度的增加,抑制作用增大,呈量-效关系 ($r = 0.980, P = 0.003$)。而联合组 DDP 浓度为 1mg/L 时即可显著抑制 A549 细胞的增殖,随浓度增加对 A549 细胞增殖的抑制率也显著增加 ($P < 0.001$)。经计算 Q 值,当 DDP 浓度为 0.5mg/L 时,与 Celecoxib 联用无相加或协同作用 ($Q = 0.41$); DDP 浓度 1.0mg/L 时,与 Celecoxib 联用有相加/协同作用。

2.2 Celecoxib 联合 X 射线对 A549 细胞的生长抑



制效应

2.2.1 与 4Gy 单纯照射组相比较,除 4Gy + 0.175mg/L 组外,其余各组细胞的存活分数均有显著降低,且随着 Celecoxib 浓度加大,细胞存活分数降低 ($r = -0.988, P = 0.001$),见表 2。

表 2 Celecoxib 与 X 射线联合对 A549 细胞的存活分数影响的比较($\bar{x} \pm s, n = 9$)

| 浓度 (mg/L) | 吸光值 | 存活分数 (%) |
|-------------|-----------------|----------|
| 对照组 | 0.879 ± 0.026 | |
| 4Gy | 0.778 ± 0.017 | 88.51 |
| 4Gy + 0.175 | 0.766 ± 0.016 | 87.14 |
| 4Gy + 0.35 | 0.649 ± 0.016 * | 73.83 |
| 4Gy + 0.7 | 0.508 ± 0.017 * | 57.79 |
| 4Gy + 1.4 | 0.447 ± 0.020 * | 50.85 |
| 4Gy + 2.8 | 0.328 ± 0.037 * | 37.32 |

* $P < 0.01$, 与 4Gy 组相比

2.2.2 流式细胞术的结果显示,随着照射剂量的增加,A549 细胞的凋亡率增加,联合组的细胞凋亡率明显高于单纯 X 线照射组 (P 均 < 0.05),见表 3。

表 3 Celecoxib 与 X 射线联合对 A549 细胞的凋亡率影响的比较($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 0Gy | 2Gy | 4Gy | 6Gy | 8Gy |
|---------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| 对照组 (%) | 2.47 ± 0.39 | 8.71 ± 0.53 | 16.22 ± 2.14 | 21.66 ± 1.05 | 25.51 ± 1.23 |
| 联合组 (%) | 8.91 ± 0.49 ** | 16.88 ± 0.54 ** | 20.29 ± 0.70 * | 30.73 ± 0.85 ** | 34.32 ± 0.89 ** |

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, 与对照组比较

3 讨论

动物实验已经证实^[4,5],COX-2 抑制剂可以抑制肺癌的发生、发展,促进肺癌细胞的凋亡。

本研究发现,COX-2 抑制剂 Celecoxib 可抑制 A549 肺癌细胞的增殖,在一定浓度范围内随浓度增加其抑制作用增强,呈量-效关系;DDP 单用时其对细胞的抑制作用也同样呈现量-效关系,浓度为 2mg/L 可显著抑制 A549 细胞增殖,而当两者联合时,DDP 浓度为 1mg/L 即可显著抑制细胞增殖,这一结果表明两者联用时增加了对细胞的抑制作用,而对于低浓度 DDP,联合 Celecoxib 时虽然对细胞的抑制率有一定程度的增加,但是无显著差别,而且较 Celecoxib 0.35mg/L 单用时反而有所降低;进一步分析两药的联合效应发现:DDP 浓度为 1mg/L 时,两者联合具有协同/相加作用;而 DDP 浓度为 0.5mg/L 时,两药具有拮抗作用 ($Q = 0.41$),这一结果可能是引起上述抑制率较 Celecoxib 单用时有所降低的原因。DDP 是一种铂类化合物,可与 DNA 形成链内或链间交叉连接从而杀伤肿瘤细胞,还可诱导细胞凋亡^[6]。因此,推测 Celecoxib 与 DDP 的协同/相加作用可能是通过增强对细胞增殖的抑制和对凋亡的诱导来实现的,具体的机制尚需其他实验研究探讨。

放射治疗是恶性肿瘤综合治疗的重要方法之

一,肿瘤细胞的放射敏感性与放疗效果密切相关,研究指出^[7],凋亡可明显增加放疗效果。既往研究^[12]表明 COX-2 抑制剂可促进肿瘤细胞凋亡,因而理论上可增加肿瘤细胞对放射的敏感性。实验结果显示,与单纯照射组相比较,联合组 Celecoxib 浓度 0.35mg/L 时,随着浓度增大细胞 SF 显著下降,而浓度为 0.175mg/L 时,SF 并无明显改变,可能与浓度较低不足以对细胞造成明显影响所致;不同剂量的 X 线照射细胞后,细胞的凋亡率随照射剂量增加而增加,联合组显著高于单纯照射组,因此,提示 Celecoxib 对 A549 细胞有放射增敏作用,而这一作用似乎是通过促进细胞凋亡实现的。

关于 Celecoxib 能增加 A549 人肺腺癌细胞对放射的敏感性的研究在国内尚未见报导。但是,本实验并未进一步研究 Celecoxib 是通过何种途径来促进细胞凋亡的,另外,本实验采用的研究方法为体外细胞抑制实验,肿瘤细胞处于脱离了体内生长的内环境的情况下,因而必然会受到外界多种不确定因素的影响,故本实验结果并不能表明 Celecoxib 与 DDP 或 X 射线联合应用在体内实验或临床上是否也能获得同样的效果,同时,Celecoxib 的最佳剂量、毒副反应等也尚有待于动物实验以及临床实验进一步研究证实。

参考文献:

- [1] Trifan OC, Durham WF, Salazar VS, et al. Cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib enhances antitumor efficacy and reduces diarrhea side effect of CPT-11 [J]. Cancer Res, 2002, 62 (20): 5778-5784.
- [2] Milas L, Kishi K, Hunter N, et al. Enhancement of tumor response to gamma-radiation by an inhibitor of cyclooxygenase-2 enzyme [J]. J Natl Cancer Inst, 1999, 91 (17): 1501-1504.
- [3] Vimal AP, Michael JD, Andrey S. Regulation of MDR-1 (P-glycoprotein) by cyclooxygenase-2 [J]. J Biol Chem, 2002, 277 (41): 38915-38920.
- [4] Yao R, Rioux N, Castonguay A, et al. Inhibition of COX-2 and induction of apoptosis: two determinants of nonsteroidal anti-inflammatory drugs' chemopreventive efficacies in mouse lung tumorigenesis [J]. Exp Lung Res, 2000, 26 (8): 731-742.
- [5] Moody TW, Leyton J, Zakowicz H, et al. Indomethacin reduces lung adenoma number in A/J mice [J]. Anticancer Res, 2001, 21 (3B): 1749-1755.
- [6] 黄振华, 黄有国. A549 / DDP 细胞的抗凋亡特性与其 pH_i 和 [Ca²⁺]_i 变化相关 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28 (5): 722-727.
- [7] Rupnow BA, Murtha AD, Alarcon RM, et al. Direct evidence that apoptosis enhances tumor responses to fractionated radiotherapy [J]. Cancer Res, 1998, 58 (9): 1779-1784.
- [8] Hsu AL, Ching TT, Wang DS, et al. The cyclooxygenase-2 inhibitor Celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2 [J]. J Biol Chem, 2000, 275 (15): 11397-11403.

[编辑: 贺文]

