文章编号:1000-5404(2010)21-2303-04

论著

顺铂联合 COX-2 选择性抑制剂 NS-398 对食管癌 Eca-109 细胞增殖和凋亡的影响

王琳冬[1],郭 颖[2],郝秀轻[3],罗 强[2],孙 黎[2],朱登祥[2],张林西[2] (075100 河北 宣化,河北北方学院附属第二医院病理科[1];075000 河北 张家口,河北北方学院实验中心[2];075000 河北 张家口,中国人民解放军第251医院病理科[3])

【摘要】 目的 体外观察顺铂(diamminedichloroplatinum,DDP)以及DDP联合环氧合酶-2(cyclooxygenase,COX-2)选择性抑制剂NS-398对人食管癌Eca-109细胞增殖和凋亡的影响,比较单独应用DDP与DDP联合NS-398应用于食管癌Eca-109细胞的抗肿瘤效应。方法 CCK-8法检测不同浓度的DDP(1.25、2.50、5.00、10.00、20.00 mg/L)单独作用及DDP联合NS-398(1.00、10.00 μmol/L)作用Eca-109细胞24 h的细胞增殖抑制率。琼脂糖凝胶电泳技术检测DDP(1.25、2.50、5.00 mg/L)单用及联合NS-398(1.00、10.00、80.00 μmol/L)作用Eca-109细胞24 h和48 h的DNA Ladder出现情况。透射电镜观察DDP单用以及联合NS-398作用于Eca-109细胞24 h超微结构的变化。药物未处理组作为对照组。结果 细胞增殖抑制实验表明顺铂、NS-398对Ec-109细胞有剂量依赖性抑制增殖作用($P<0.05$)。顺铂联合NS-398用药组细胞增殖抑制率明显高于同浓度顺铂单用组,且随添加的NS-398的剂量的增加而增加,DDP联合NS-398用药组对Ec-109细胞的增殖抑制效应和诱导凋亡效应明显高于DDP单药组,二者具有协同效应。结论 与DDP单用相比,添加低剂量NS-398能够增强DDP对Eca-109细胞的增殖抑制效应和诱导凋亡效应。

【关键词】 食管癌;Eca-109细胞;NS-398;顺铂;细胞凋亡
【中图法分类号】 R73-361;R730.23;R735.1 【文献标志码】 A

Effect of combined cisplatin and COX-2 selective inhibitor NS-398 on proliferation and apoptosis of human esophageal cancer Eca-109 cells

Wang Lindong[1], Guo Ying[2], Hao Xiuqing[3], Luo Qiang[2], Sun Li[2], Zhu Dengxiang[2], Zhang Linxi[2] ([1]Department of Pathology, Second Affiliated Hospital, Hebei North University, Xuanhua, Hebei Province, 075100, [2]Experimental Center, Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei Province, 075000; [3]Department of Pathology, No. 251 Hospital of PLA, Zhangjiakou, Hebei Province, 075000, China)

【Abstract】 Objective To observe the effect of diamminedichloroplatinum (DDP) and combined DDP and cyclooxygenase (COX-2) selective inhibitor NS-398 on proliferation and apoptosis of esophageal cancer Eca-109 cells *in vitro* and their anti-tumor effect. Methods CCK-8 assay was used to detect the inhibitory rate of DDP at the concentrations of 1.25, 2.5, 5, 10, and 20 mg/L and combined DDP and NS-398 at the concentrations of 1.0 and 10.0 μmol/L for human esophageal cancer Eca-109 cells 24 h after they were used. Agarose gel electrophoresis was performed to show the DNA ladder of human esophageal Eca-109cancer cells in 24 h and 48 h after they were treated with DDP at the concentration of 1.25, 2.5, and 5.0 mg/L, and combined DDP and NS-398 at the concentration of 1.0, 10.0, and 80.0 mg/L. Transmission electron microscopy was employed to observe the ultra-structure of Eca-109 cells 24 h after they were treated with DDP and combined DDP and NS-398, respectively. Non-drug treated esophageal cancer Eca-109 cells served as a control group. Results Cell growth inhibition test showed that DDP and NS-398 inhibited the proliferation of esophageal cancer Eca-109 cells in a dose-dependent manner ($P<0.05$). The growth inhibition rate and apoptosis rate of combined DDP and NS-398 were significantly higher than those of DDP for esophageal cancer Eca-109 cells, indicating that DDP and combined DDP and NS-398 exhibited a synergistic effect on the proliferation and apoptosis of esophageal cancer Eca-109 cells. Conclusion The effect of DDP in combination with a low dose of NS-398 is stronger than that of DDP on the proliferation and apoptosis of esophageal cancer Eca-109 cells.

【Key words】 esophageal carcinoma; Eca-109 cell line; NS-398; Ddiamminedichloroplatinum; apoptosis

Supported by the Foundation of Hebei Department of Education(2009305). Corresponding author: Zhang Linxi, E-mail: linxizhang@sohu.com

【基金项目】 河北省教育厅课题(2009305)
【通信作者】 张林西,E-mail:linxizhang@sohu.com

非甾体类抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)除了具有解热镇痛作用外,长期服用阿司匹林等NSAIDs类药物还可降低和预防食管癌等消化道肿瘤的发生或降低其患病危险性[1-3]。NS-398是NSAIDs中的一类——环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)选择性抑制剂[4]。近年研究发现,应用NS-398等COX-2选择性抑制剂可以抑制人食管癌细胞的生长并可诱导其发生凋亡,降低其增殖活性[5-7]。食管癌等恶性肿瘤患者在常规化疗的同时添加COX-2选择性抑制剂是否可以增强化疗药物对食管癌的抗癌疗效、增强杀伤癌细胞的作用,同时可减少化疗药物的治疗用量,这有待我们研究。本研究就是在应用常规化疗药物顺铂(diamminedichloroplatinum, DDP)作用于食管癌Eca-109细胞的同时添加低剂量NS-398,以观察NS-398对DDP抗癌效应的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

人食管癌细胞株Eca-109是从中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所购买,河北北方学院实验中心冻存保留。NS-398为Cayman公司产品,实验前先溶于二甲基亚砜中,以20 mmol/L浓度储存。DDP为齐鲁制药有限公司产品,配制成100 mg/L储存,使用时用培养基稀释;RPMI1640培养基为Gibico公司产品;细胞凋亡DNA抽提检测试剂盒为碧云天生物技术研究所产品;透射电子显微镜为日本电子公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将人食管癌细胞Eca-109用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基在含5% CO_2、37 ℃恒温培养箱中进行培养。观察细胞生长进入对数生长期后,用0.25%的胰蛋白酶消化细胞,细胞计数并传代,待细胞贴壁后,按不同的处理因素,将细胞分组实验。

1.2.2 实验分组 未处理组(阴性对照组)、DDP组(1.25、2.50、5.00、10.00、20.00 mg/L)、NS-398组(1.00、10.00、20.00、40.00、80.00 μmol/L)和NS-398和DDP联合应用组(终浓度为0、1.00、10.00 μmol/L NS-398分别和终浓度为1.25、2.50、5.00、10.00、20.00 mg/L DDP联合)。

1.2.3 CCK-8实验测细胞增殖抑制率 取对数生长期的人食管癌Eca-109细胞,用0.25%的胰蛋白酶消化后,细胞计数,调整细胞密度,取100 μl Eca-109细胞单细胞悬液加入96孔板,使每孔细胞 1×10^4个,待细胞贴壁后,轻轻吸去上清,加入终浓度为1.25、2.50、5.00、10.00、20.00 mg/L的DDP,以及终浓度为0、1.00、10.00 μmol/L NS-398分别和终浓度为1.25、2.50、5.00、10.00、20.00 mg/L DDP,同时设不含药物的阴性对照组及溶剂对照组,每个浓度设4个复孔,于作用24 h后,每孔加入20 μl CCK-8继续培养4 h,在酶联免疫检测仪上测定波长490 nm处光密度值[D(490)],计算对癌细胞的相对抑制率。以药物分组为横坐标,抑制率为纵坐标,绘制细胞生长曲线。细胞抑制率 = [1 − 实验组 D(490)/对照组 D(490)] × 100%。

1.2.4 琼脂糖凝胶电泳检测DNA Ladder 收集阴性对照组、NS-398组、DDP组及二者联合作用于Eca-109细胞24、48 h的细胞,按照试剂盒的操作步骤进行琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下观察并拍摄Eca-109细胞的DNA Ladder。

1.2.5 透射电镜检测细胞凋亡 于药物作用Eca-109细胞24 h时收集细胞,PBS洗涤,2.5%的戊二醛固定4 h,常规制作透射电镜样本,透射电镜下观察各类细胞器的超微结构变化,并照相。

1.3 统计学分析

CCK-8实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用SPSS 16.0统计软件进行数据处理,联合效应进行完全随机分组两因素析因分析,各组均数与对照组的比较行单因素方差分析。

2 结果

2.1 细胞生长抑制实验

采用CCK-8法,DDP和DDP联合NS-398孵育Eca-109细胞24 h均可剂量依赖性的抑制Eca-109细胞的增殖。对照组的增殖率被看作100%,用药组抑制率随着用药浓度的增高而增高,与对照组相比差异具有显著性($P<0.05$)。并且DDP和NS-398有协同作用($F=2.579$, $P=0.021$),联合作用抑制Eca-109细胞的效应与单用DDP差异有显著性($P<0.05$),1.00、10.00 μmol/L NS-398分别和梯度浓度的DDP联合作用Eca-109细胞24 h的抑制率较单用二者的抑制率高。DDP单用及与NS-398联合应用时的抑制率见表1。

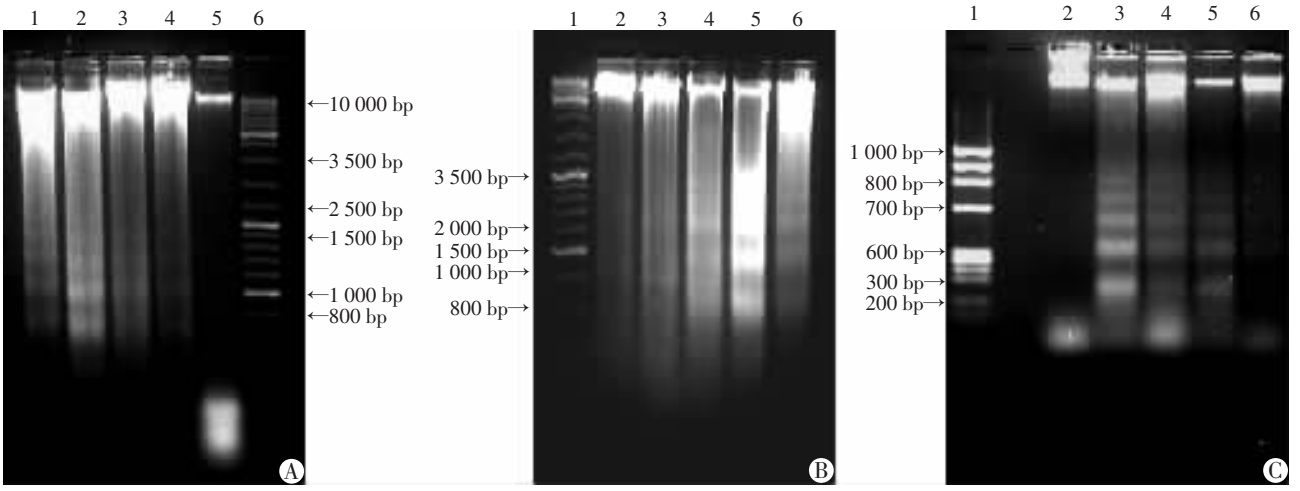
表1 不同浓度NS-398和DDP作用于Eca-109细胞24 h的抑制率变化(%)

DDP(mg/L)	NS-398(μmol/L)		
	0	1.00	10.00
1.25	18.56±1.39	21.95±2.27	25.74±0.45
2.50	27.98±0.39	30.42±0.13	32.19±0.64
5.00	33.22±2.61	35.75±1.53	38.51±1.92
10.00	46.03±0.37	49.19±0.67	50.65±0.33
20.00	57.05±0.41	60.59±0.33	62.92±2.06

DDP和NS-398之间相互作用 $F=2.579$, $P=0.021$, $P<0.05$。$F_{DDP}=366.402$, $F_{NS\text{-}398}=23.722$, $P<0.01$

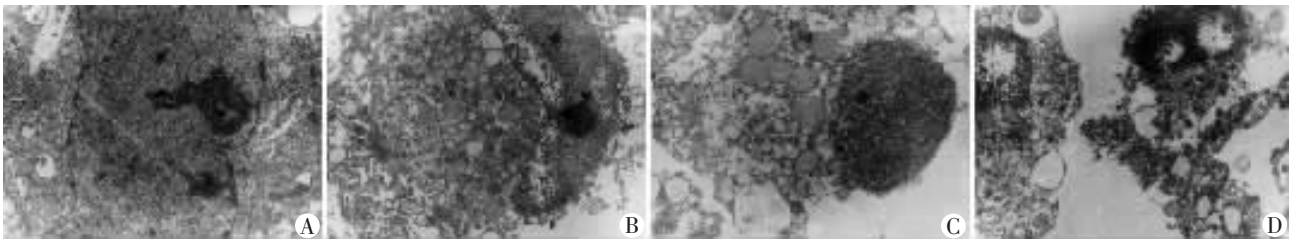
2.2 琼脂糖凝胶电泳检测结果

Eca-109细胞分别经10.00、20.00、40.00、80.00 μmol/L NS-398, 1.25、2.50、5.00 mg/L DDP及DDP联合NS-398作用24 h未检测到清晰的DNA梯形条带;当药物作用48 h时的DNA电泳中均观测到相差约180~200 bp的凋亡细胞所特有的DNA梯形条带。同一电泳中,80 μmol/L及40 μmol/L NS-398作用于Eca-109细胞的DNA条带的亮度比10 μmol/L NS-398作用于Eca-109细胞的条带亮;DDP作用于癌细胞后DNA条带也随着药物浓度的增加逐渐明显;而1.25 mg/L DDP联合10.00 μmol/L NS-398组出现的条带比NS-398或DDP单独作用时的条带都要明显(图1)。



A :NS-398 作用 48 h 1 :NS-398 80.00 μmol/L 2 :NS-398 40.00 μmol/L 3 :NS-398 20.00 μmol/L 4 :NS-398 10.00 μmol/L 5 :对照组; 6 :标准(1 kb) B :DDP 作用 48 h 1 :标准(1 kb) 2 :对照组 3 :DDP 1.25 mg/L 4 :DDP 2.50 mg/L 5 :DDP 5.00 mg/L 6 :DDP 10.00 mg/L; C :NS-398 和 DDP 作用 48 h 1 :标准(100bp) 2 :对照组 3 :DDP 1.25 mg/L + NS-398 10 .00 μmol/L 4 :DDP 1.25 mg/L 5 :NS-398 80.00 μmol/L 6 :NS-398 10.00 μmol/L

图 1 不同浓度药物对 Eca-109 细胞作用 48 h 后,琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 电泳结果



A :对照组;B :10 mg/L DDP 组 异染色质成团块,染色质紧邻核膜下呈半月形,核仁消失;C :10 mg/L DDP 和 10.00 μmol/L NS-398 组 细胞体积缩小,核固缩,细胞质内细胞器肿胀呈大量空泡结构;D :10 mg/L DDP 和 40.00 μmol/L NS-398 组 凋亡晚期,细胞核裂解呈多个团块

图 2 DDP 和 NS-398 对 Eca-109 细胞作用 24 h 后的超微结构改变 (TEM ×5 800)

2.3 Eca-109 细胞凋亡的形态学观察

透射电镜观察结果显示,对照组 Eca-109 细胞形态正常(图 2A),DDP 组(10 mg/L,作用 24 h)细胞核的形态改变明显,可见异染色质增多,染色质浓缩成团块,边集在核膜下,呈现半月形(图 2B);10 mg/L DDP 与不同浓度 NS-398 作用 24 h 后,胞质水肿,细胞器减少,内质网扩张,核膜结构不清,部分消失,可见核碎裂或凋亡小体形成(图 2C、D)。

3 讨论

食管癌是我国常见的恶性肿瘤之一,在某些地区居恶性肿瘤发病率和死亡率的第一位[8,9],食管癌的预后很差,5 年总生存率为 10% ~20%[10]。其中 50% 患者就诊时已有远处转移;而即使临床上认为局部晚期的食管癌,经尸检证实也有 50% 以上的病例伴有远处转移,70% 以上有淋巴结转移。虽然临床手术治疗仍是食管癌的首选治疗方法。但是,寻找有效的药物控制食管癌的全身播散或探索高效的综合治疗方案仍是食管癌临床治疗的关键。对于食管癌患者术后化疗方案选择与疗效,如何延长食管癌患者的生存时间、提高其生存质量,仍是摆在临床医师面前的一大难题。

近年来,许多新药包括紫杉醇、草酸铂、伊立替康等应用于食管癌的治疗。抗肿瘤药物不断推陈出新,食管癌的化疗方案也在不断更新。但是顺铂一直是一个常用基本药物。研究显示,顺铂可致发生链间交联及链内交联,通过凋亡机制而杀死细胞[11]。临床经常遇到的难题是因为剂量限制毒性带来的化疗延期甚至中断;而铂类药物存在明显的量效关系,体内一定水平的血药浓度是疗效保证的基石。为了解决减少毒副反应与疗效保证这一对矛盾,有的是减小剂量、有的是改换联合药物,严重时只能停止化疗。这样就严重影响了食管癌患者的化疗效果或预后。

而 NSAIDs 类药物的主要作用位点是环氧化酶(cyclooxygenase, COX)。此酶是花生四烯酸转变为前列腺素过程中的一个重要限速酶,含有两种异构体:COX-1 和 COX-2。COX-1 是结构型表达基因,被认为

是“看家基因”,在大多数细胞内均有稳定表达,参与维持细胞正常的生理功能;而COX-2为诱导型表达基因,正常组织中不表达,当细胞受到某些刺激时则迅速表达增高。COX-2的异常高表达与食管癌等消化系统恶性肿瘤的发生关系密切[12]。常用的NSAIDs可分为COX-2选择性抑制剂和非选择性抑制剂,NS-398是选择性抑制剂中的一种。

近年来,诱导细胞凋亡被视为抗癌药物研究的新靶点,对细胞凋亡的研究已成为当今生物学领域的热点之一。细胞凋亡最显著而突出的生化学特征是内源性Ca^{+}/Mg^{+}依赖性核酸内切酶的活化在和小体连接区切割DNA双链,使DNA有规律的广泛断裂,降解成180~200 bp或其整数倍的寡核苷酸片段,琼脂糖凝胶电泳可见特征性的DNA梯状带(DNA Ladder)。DDP是中心以二价铂同2个氯原子和2个氨分子结合的重金属络合物,类似于双功能烷化剂,可与DNA形成链内、链间交叉联结,破坏DNA功能,阻止DNA复制,通过凋亡机制而杀死细胞[11]。研究发现NS-398可以抑制人食管癌细胞的生长并可诱导其发生凋亡,其诱导癌细胞凋亡可能是通过不同的途径[13,14],尤其是通过选择性抑制COX-2的表达而诱导癌细胞凋亡。本研究是研究小剂量的NS-398与DDP合用,是否可以降低DDP的剂量但同时可以增强DDP杀伤癌细胞的作用。

本研究采用了CCK-8法、琼脂糖凝胶电泳与形态学相结合的实验方法,结果显示NS-398、DDP对Eca-109细胞具有生长抑制效应和诱导凋亡效应,且呈浓度依赖性关系。当两药联合应用时,小剂量NS-398增强了同浓度的DDP对Eca-109细胞的生长抑制及诱导凋亡的作用,其抑癌作用优于二者分别单用时的效应。两者联合应用具有协同效应,提示NS-398和DDP联合应用可提高抗癌疗效、降低DDP使用剂量并减少其毒副作用。透射电镜观察药物作用Eca-109细胞24 h后,出现明显的核固缩、染色质凝聚,细胞膜出泡及凋亡小体形成。结果显示NS-398与DDP对Eca-109细胞都具有生长抑制、诱导凋亡的作用,且呈浓度依赖性关系,DDP添加NS-398后,其诱导凋亡的效应增强。

DDP是细胞周期非特异性药物,抗瘤谱广、作用强,与多种抗肿瘤药物有协同作用,且无交叉耐药。应用NS-398等COX-2选择性抑制剂协同DDP联合作用于食管癌细胞,减轻了DDP的剂量依赖性毒副作用和耐药性,这为小剂量COX-2选择性抑制剂联合DDP等化疗用于指导临床化疗提供了实验基础。对于二者联合应用在体内对癌细胞的生物学效应及COX-2选择性抑制剂增强顺铂等抗癌药的抗癌机制还有待进一步研究。本研究为临床开展食管癌等恶性肿瘤的化学治疗开辟新途径提供了理论依据。这为临床在不降低疗效的前提下减少化疗药物用量带来了新曙光。

参考文献:

[1] Fujimura T, Ohta T, Oyama K, *et al*. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in carcinogenesis and selective COX-2 inhibitors for chemoprevention in gastrointestinal cancers[J]. J Gastrointest Cancer, 2007, 38(2/4): 78-82.

[2] Gupta M, Eisen G M. NSAIDs and the gastrointestinal tract[J]. Curr Gastroenterol Rep, 2009, 11(5): 345-353.

[3] Cuzick J, Otto F, Baron J A, *et al*. Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: an international consensus statement[J]. Lancet Oncol, 2009, 10(5): 501-507.

[4] Yu H P, Shi L Y, Lu W H, *et al*. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human esophageal cancer and *in vitro* inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2004, 19(6): 638-642.

[5] Liu J F, Zhu G J, Jamieson G G, *et al*. NS-398 induces apoptosis in human esophageal cancer cells through inhibition of NF-kappaB downstream regulation of cyclooxygenase-2[J]. Cancer Invest, 2009, 27(1): 17-23.

[6] Li S, Tong Q, Zhang W, *et al*. Mechanism of growth inhibitory effects of cyclooxygenase-2 inhibitor-NS398 on cancer cells[J]. Cancer Invest, 2008, 26(4): 333-337.

[7] 金春亭, 鲁蓓, 李海军, 等. 环氧化酶-2选择性抑制剂抑制人食管癌细胞的生长及其诱导凋亡[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(5): 440-446.

[8] 陈万青, 张思维, 孔灵芝, 等. 中国肿瘤登记处2004年恶性肿瘤死亡资料分析[J]. 中国肿瘤, 2008, 17(11): 913-916.

[9] 刘庆福, 肖宝荣, 李瑞卿. 泰安市2002~2005年恶性肿瘤流行病学调查[J]. 中国肿瘤, 2007, 16(9): 676-678.

[10] 林东昕. 中国食管癌分子流行病学研究[J]. 中华流行病学杂志, 2003, 24(10): 939-943.

[11] 蔡先彬, 荆绪斌, 胡辉, 等. 活性氧在顺铂诱导食管癌细胞EC-109凋亡中的作用[J]. 癌症, 2006, 25(4): 427-431.

[12] Barry E L, Sansbury L B, Grau M V, *et al*. Cyclooxygenase-2 polymorphisms, aspirin treatment, and risk for colorectal adenoma recurrence--data from a randomized clinical trial[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009, 18(10): 2726-2733.

[13] Chuang H C, Kardosh A, Gaffney K J, *et al*. COX-2 inhibition is neither necessary nor sufficient for celecoxib to suppress tumor cell proliferation and focus formation *in vitro*[J]. Mol Cancer, 2008, 7: 38.

[14] Zhang H, Ye Y, Bai Z, *et al*. The COX-2 selective inhibitor-independent COX-2 effect on colon carcinoma cells is associated with the Delta1/Notch1 pathway[J]. Dig Dis Sci, 2008, 53(8): 2195-2203.

(收稿:2010-06-11 修回:2010-08-07)
(编辑 汪勤俭)