维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)07-0773-04

尼美舒利对 A549 细胞株放疗增敏作用的观察

宋 琳,李少林,刘芳欣,王树斌,柏 玮,彭志平

(重庆医科大学基础医学院放射医学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察尼美舒利(Nimesulide)作为环氧化酶 2(Cyclooxygenase-2,COX-2)抑制剂对肺腺癌细胞株 A549 的放射增敏作用并探讨其作用机制。方法:对数期生长的 A549 细胞株,按照实验要求分为对照组、药物组、照射组及实验组,流式细胞仪检测各组肿瘤细胞凋亡率及对 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响;克隆形成实验检测放射增敏作用。结果:小剂量(75mmol/L)尼美舒利与射线照射联合应用能够上调 Bax 的蛋白表达,同时抑制 Bcl-2 蛋白表达,明显增加肿瘤细胞的凋亡,具有统计学差别。结论:COX-2 抑制剂尼美舒利对人肺腺癌 A549 细胞株具有明显的放疗增敏作用。

【关键词】环氧化酶 2 选择性抑制剂;放射敏感性;肺腺癌;凋亡;X 线

【中国图书分类法分类号】R730.55 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-14

The investigation to the effect of radiosensitive enhancement of nimesulide in lung cancer cell line

SONG Lin, et al

(*Department of Radiation, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the enhancement of radiosensition of COX-2 inhibitor Nimesulide on lung cancer cell line (A549) in vitro and try to reaserch the possible radiosensitizing mechanisms. *Methods*: A549 cell line which is in logarithmic phase was devided into four group: control group, drug group, radiation group and case group. The apoptosis and the expression in protein of Bcl-2 and Bax were measured by flow cytometry(FCM). The enhancement of radiosensitising effect was detect by clone formation experiment. *Results*: Low dose of Nimesulide combined with X-ray can induce the up-regulation of the protein of Bax and inhibit the expression of the protein of Bcl-2, that increased the apoptosis of tumour cell. The difference is significant. *Conclusion*: It is suggested that Cox-2 inhibitor- Nimesulide enhance the radiosensitivity to the cell line A549 of adenocarcinoma of lung.

【Key words】 Selective cyclooxygene-2 inhibitor; Radiosensitivity; Lung cancer; Apoptosis; X-ray

肺腺癌的综合治疗中,放射治疗因疗效好而广泛应用。资料表明,肿瘤组织的低氧状态、谷胱甘肽含量、细胞本身的放射敏感性以及对放射线的抵抗等多种因素,可以影响放疗的效果。作为增加肿瘤放射敏感性、逆转放射抵抗、提高疗效的重要手段,放射增敏剂已逐渐成为研究热点。最近研究显示,诱导型 COX-2 抑制剂在放射增敏方面具有重要的作用[1]。本研究探讨 COX-2 抑制剂尼美舒利对肺腺癌细胞株 A549 放射敏感性的影响,并初步讨论其作用机制。

作者介绍:宋 琳(1980-),女,硕士,
研究方向:肿瘤的放射治疗及肿瘤学基础。
通讯作者:李少林,男,教授,E-mail:lishaolin@cqums.edu.cn。
基金项目:国家自然科学基金(30070230)。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂及仪器

人肺腺癌细胞株 A549 由重庆医科大学病理生理学教研室提供;PRMI1640 培养基、胰蛋白酶为 GIBCO BRL 公司产品;小牛血清为 Hyclone 公司产品;分析纯尼美舒利购自西南药业公司;二甲亚砜(DMSO)、鼠抗人 Bax、Bcl-2 单抗及羊抗鼠 FITC-IgG 为 Sigma 公司产品;二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司),超净工作台(苏州净化设备公司),直线加速器(Varian,23ex)。

1.2 细胞培养

人肺腺癌细胞株 A549 用含 10%小牛血清,青-链霉素各 100μ/ml 的 RPMI1640 培养液,置于 37℃、饱和湿度 5% CO_2 孵箱中培养,传代后取对数生长期细胞进行实验。0.25%胰蛋白酶(0.02% EDTA)消化 A549 细胞后,制备成细胞悬

维普资讯 http://www.cqvip.com

液,取适量接种于 6 孔板中,培养 24h 待细胞贴壁,实验分 4 组进行:①对照组:不做任何处理;②药物组:DMSO 溶解尼美舒利粉剂,配成 75mmol/L 溶液,置于 -20℃冰箱保存,使用时用培养液稀释配置为不同浓度,作用 24h;③照射组:X 射线照射;④实验组:尼美舒利作用 24h+X 射线照射。

1.3 克隆形成实验

对照组与药物组于细胞贴壁后分别更换不含 / 含尼美舒利溶液的培养液继续培养 24h,更换无药培养液培养 10d。实验组(25μmol/L 尼美舒利 24h)。照射组与实验组接受 0、2、4、6、8Gy X 射线照射,照射后立即用 PBS 清洗 2 遍,0.25% 胰蛋白酶(0.02%EDTA)消化,制成单细胞悬液。根据照射剂量大小分别接种 10^4 个细胞于 60mm 培养皿中,设 3 个平行样品。培养皿细胞于孵箱中采用无药培养液培养 10d。甲醇固定,0.1% 结晶紫染色,低倍镜下计数 >50 个细胞的克隆。以上实验重复 3 次,实验结果为 3 次平均值。计算细胞克隆形成率(Plating efficiency,PE)=(克隆数 / 接种细胞数)× 100%,以对照组 PE 作为 100% 计算细胞存活分数(Survival fraction,SF),SF=某一剂量照射组的克隆数 /(该组细胞接种数 × 未照射组克隆形成率)。按照多靶单击模型 $SF=1-(1-e^{-D/D_0})^N$ 拟合细胞存活曲线,计算放射敏感性参数 SF_2、D_0、D_q、N 以及放射性增敏比(Sensitizing enhancement ratio,SER)。SER_{SF2}=对照组 D_{SF2}/ 实验组 D_{SF2};SER_{Dq}=对照组 D_q/ 实验组 D_q。

1.4 细胞周期测定

用 95% 的冷乙醇固定细胞,过夜。每管加入 PI 染料(33μg/mlPI,0.13mg/mlRNaseA,10mmol/LEDTA,0.5%TritonX-100)置于避光处,室温孵育 30min 后,流式细胞仪测 DNA-PI 的荧光强度,结果用 MultiCycle 软件系统进行分析。

1.5 流式细胞仪检测 Bcl-2 与 Bax 蛋白的表达

收集对照组、药物组(25μmol/L 尼美舒利)、照射组(8Gy X 线)和实验组(25μmol/L 尼美舒利 +8Gy X 线照射)。各组细胞。调定细胞浓度至 1×10^6,加入鼠抗人 Bcl-2、Bax 单抗 37℃水浴温育 30min,PBS 洗涤 2 次,加入羊抗鼠 FITC-IgG,温育洗涤后流式细胞仪检测 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平。

1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡

收集对照组、药物组(25μmol/L 尼美舒利)、照射组(8Gy X 线)和实验组(25μmol/L 尼美舒利 +8Gy X 线)。4 组细胞皆更换无药培养液继续培养 24h,用 0.25% 胰蛋白酶(0.02% EDTA)消化、制备成细胞悬液,70% 乙醇 4℃固定 12h,溴化丙啶染色,于流式细胞仪上检测,以上实验重复 3 次,Modifit 软件分析。

1.7 统计方法

实验结果采用 SPSS13.0 和 GeaphPad Prism 4.0 统计软件处理。细胞存活分数采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,均数比较采用两独立样本的 t 检验,各组调亡率、蛋白表达率采用方差分析,以 $P<0.05$ 表示差异有显著性。

2 结 果

2.1 克隆形成实验结果

根据克隆形成实验所得的平均存活分数,得出尼美舒利处理后的 SF_2、D_0、D_q、N 值(表 1),单靶多击模型拟合曲线如图 1。从中发现,实验组 SF_2、D_0、D_q 均低于其它各组;实验组曲线"肩区"明显缩小变窄,且各剂量点的存活分数均低于对照组,提示细胞亚致死性放射损伤修复能力降低,说明尼美舒利在一定程度上提高了放射敏感性。

2.2 流式细胞仪检测细胞周期分布

表 2、图 2 显示,药物组的 G_0/G_1 期细胞较对照组明显增加,S 期和 G_2/M 期减少。

2.3 FCM 检测 Bcl-2 与 Bax 的蛋白表达

尼美舒利作用后 A549 细胞 Bcl-2 蛋白表达降

表 1 尼美舒利对 A549 细胞放射敏感性的影响

组别	SF_2	D_0(Gy)	D_q(Gy)	N
照射组	0.81	3.28	2.09	2.12
实验组	0.51	2.38	0.43	1.28

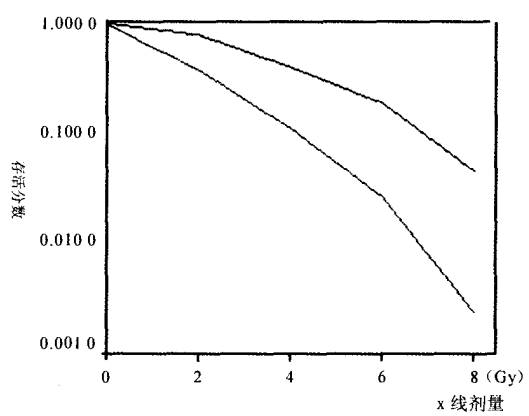


图 1 各组细胞存活曲线

表 2 流式细胞仪观察细胞周期时相

组别	G_0/G_1	S(%)	G_2/M 期(%)
对照组	60.01 ± 1.86	24.33 ± 1.30	15.88 ± 2.05
药物组	78.24 ± 2.05	14.25 ± 1.47	7.62 ± 1.72

维普资讯 http://www.cqvip.com

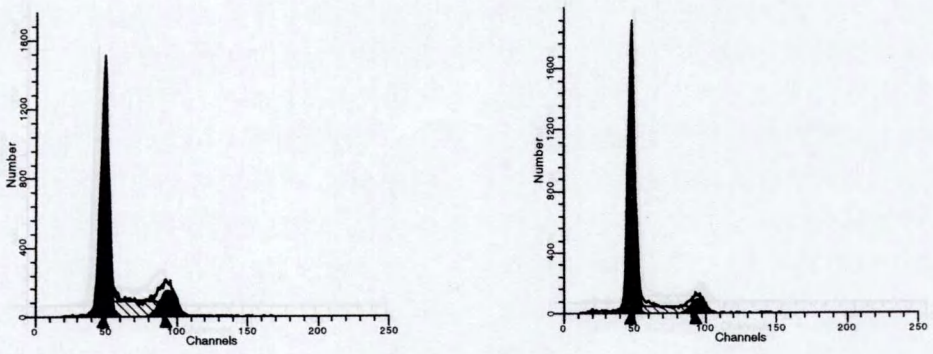


图 2 流式细胞仪观察细胞周期

表 3 各组 Bcl-2 与 Bax 的蛋白表达

组别	Bcl-2	Bax
对照组	33.19 ± 2.26	26.23 ± 2.09
药物组（25 μ mol/L 尼美舒利）	26.34 ± 1.98	35.31 ± 2.28
照射组(8Gy X 线照射)	19.25 ± 1.82	40.28 ± 2.74
实验组（25 μ mol/L 尼美舒利＋8GyX 线照射）	8.27 ± 1.41	75.86 ± 2.18

表 4 FCM 检测 A549 细胞凋亡率

组别	凋亡率%
对照组	2.01 ± 0.53
药物组(25 μ mol/L 尼美舒利)	4.67 ± 1.02
照射组(8Gy X 线照射)	15.38 ± 2.46
实验组（25 μ mol/L 尼美舒利＋8GyX 线照射）	28.87 ± 2.74

低，而 Bax 蛋白表达明显增高(表 3)。

2.4 FCM 检测细胞凋亡率

25 μ mol/L 尼美舒利与 8Gy X 射线照射均可诱导细胞凋亡，而两者联用细胞凋亡率明显增高(表 4、图 3)。

3 讨 论

环氧化酶(Cyclooxygenase，COX)是花生四烯酸合成前列腺素的限速酶，在哺乳动物中至少存在 2 种同工酶：结构型 COX-1 和诱导型 COX-2。COX-1

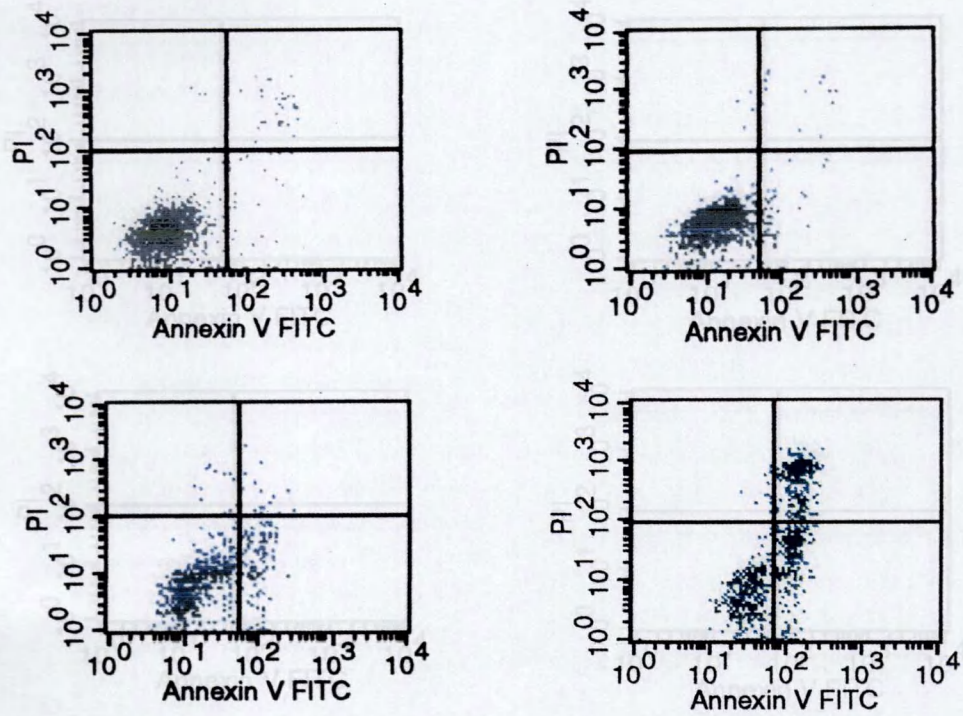


图 3 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率

维普资讯 http://www.cqvip.com

在机体中常有表达,主要维持机体正常的生理功能;而 COX-2 在大多数组织的正常状态下不表达[1]。近年来的研究发现,COX-2 的过度表达与肿瘤的发生密切相关,主要参与诱导肿瘤血管生成,促进增殖,抑制凋亡,促进肿瘤侵润和转移以及免疫抑制等[2],COX-2 的主要产物前列腺素 2(PGE_2)被证实是对抗放射损伤的细胞保护剂[3],所以,利用消化道副作用较小的选择性 COX-2 抑制剂来抑制 COX-2 的表达,提高细胞放射敏感性等研究,受到了科研人员的极大关注。

本实验中,流式细胞仪检测结果表明,尼美舒利抑制剂与放疗联合应用凋亡率较单纯药物组和单纯放疗组明显增加,提示尼美舒利能够增强A549细胞对放射诱导凋亡的敏感性,我们推测这可能与尼美舒利改变了细胞周期的分布有关,因为在实验中发现尼美舒利能够使 G_0/G_1 期细胞增加,S 期和 G_2/M 期细胞减少,这样便相应抑制了肿瘤细胞进入 DNA 合成期和有丝分裂期,促进了细胞的凋亡,增加了放疗的敏感性,Raju 等[4,5]的研究也证明了这一点。

众所周知,Bcl-2 的表达可抑制细胞凋亡,使细胞的增殖和凋亡失衡,对肿瘤的发生、发展与转移有一定的促进作用[6]。Bax 在体内广泛表达,在凋亡旺盛的细胞中表达更强,其生物学作用是拮抗 Bcl-2,与 Bcl-2 可各自形成自二聚体,也可相互作用形成异二聚体,Bax 水平高低与凋亡调控直接相关[7]。尼美舒利可以诱导 Bax 蛋白的表达并抑制Bcl-2 基因的表达,Bax/Bcl-2 比值明显增大,Basu 等[8]研究发现 COX-2 抑制剂通过 PKB/Akt 途径增加 Bax 的表达并下调 Bcl-2 的表达,与本实验的发现一致。此外,我们还观察到单纯放疗组也出现了 Bax 的表达升高和 Bcl-2 的表达下调,而尼美舒利联合放疗组 Bax 表达较其他各组明显升高,而 Bcl-2 的表达明显下调,这就能更好的抑制肿瘤细胞的增长,促进肿瘤细胞的凋亡,从而也就提高了放疗的敏感性。

本研究的以上结果,包括细胞周期的再分布,调亡率的增加,Bax 表达增高和 Bcl-2 表达下调,都间接或直接反映了尼美舒利的放疗增敏作用。而单击多靶模型是应用最广泛的衡量细胞放射敏感性的手段,本研究结果表明实验组的 D_0、D_q、SF_2 均低于对照组,提示尼美舒利联合放疗,使细胞亚致死性放射损伤修复能力受到抑制,这与 Petersen C 等[9]的报道相一致。有研究发现 COX-2 抑制剂可以通过抑制 DNA 修复相关蛋白的表达和 DNA 链的结合活性,抑制 DNA 的修复能力,发挥放射增敏作用,不过其具体机制尚不明确[10]。

本研究证实 COX-2 抑制剂尼美舒利对人肺腺癌细胞株 A549 具有明显的放疗增敏作用。目前 COX-2 抑制剂放射增敏机制尚不明确,目前一般认为是多种因素的综合作用,可能机制主要有:①抑制肿瘤细胞亚致死性放射损伤的修复;②诱导治疗细胞凋亡;③抑制肿瘤血管生成;④促使肿瘤细胞周期再分布。随着大量的实验研究,尼美舒利的放疗增敏作用会不断得到证实,它将是一种很有前景的放疗增敏剂。

参 考 文 献

[1] Spanp JP,Chouahnia K,Morere JF. Cyclooxygenase-2 inhibitors and lung carcinoma[J]. Bull Cancer,2004;91(s 2):S109-112.

[2] Saukkonen K,Rintahaka J,Sirula A,et al. Cyclooxygenase-2 and gastric carcinogenesis[J]. APMIS,2003;111(10):915-925.

[3] Madermr JL,Leahy KM,Koki AT,et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygermae-2 inhibitor[J]. Cancer Res,2000;60(3):1306-1311.

[4] Raju U,Nakata F,Yang P,et al. In vitro enhancement of cyclooxygenase-2 enzyme:Mechanistic considerations[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys,2002;54(3):886-894.

[5] Pyo H,Choy H,Amorino GP,et al. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor,NS-398,enhances the effect of radiation in vitro and in vivo preferentially on the cells that express cyclooxygenase-2[J]. Clin Cancer Res,2001;10(7):2998-3005.

[6] 许学亮,王鸿程,孙绍娟,等.STAT5 和 Bcl-xL 在非小细胞肺癌组织中的表达及相关性分析[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2006;22(6):818-820.

[7] Huantg J,Nakamura K,Ito Y,et al.Bcl-2 gene transfer inhibits Bax translocation and prolongs cardiac cold preservation time in rats [J]. Circulation,2005;112(1):76-83.

[8] Basu GD,Pathangey LB,Tinder TL,et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis in breast cancer cells in vivo model of spontaneous metastatic breast cancer[J]. Mol Cancer Res,2004;2(11):632-642.

[9] Petersen C,Petersen S,Milas L,et al. Enhancement of intrinsic tumor cell radiosensitivity induced hy a selective cyclooxygenase-2 inhibitor[J]. Clin Cancer Res,2000;6(6):2513-2520.

[10] Raju U,Ariga H,Dittmann K,et al. Inhibition of DNA repair as a mechanism of enhanced radioresponse of head and neck carcinoma cells by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor,celecoxib[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys,2005;63(2):520-528.

(责任编辑:冉明会)