维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)03-0294-03

尼美舒利对人胃癌 SGC7901 细胞增殖、凋亡及 STAT3 通路相关蛋白表达的影响研究

陈 敏[1],高 青[2],李林海[2]

(1.重庆市肿瘤研究所内科,重庆 400030; 2.重庆医科大学附属第一医院消化内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨选择性环氧化酶 2(COX-2)抑制剂尼美舒利抑制胃癌细胞株 SGC7901 增殖的作用和可能的细胞内信号转导机制。方法:将选择性 COX-2 抑制剂尼美舒利作用于胃癌细胞株 SGC7901,MTT 法检测细胞增殖状态;流式细胞仪检测细胞周期及凋亡;Western blot 法检测 STAT3 通路相关蛋白的表达。结果:尼美舒利作用胃癌细胞株 SGC7901 后细胞增殖受到显著抑制且呈时间、剂量依赖性方式;细胞凋亡百分数增高($P<0.05$);G_0/G_1 期细胞比例升高($P<0.05$);Western Blot 结果显示 SGC7901 细胞中磷酸化 STAT3(P-STAT3)、CyclinD1、Bcl-2 蛋白的表达明显降低($P<0.05$)。结论:尼美舒利可抑制胃癌细胞株 SGC7901 的增殖,阻滞细胞周期的进展,促进细胞凋亡,其机制可能与抑制 STAT3 信号通路相关蛋白 P-STAT3、CyclinD1、Bcl-2 表达有关。

【关键词】信号转导和转录激活因子 3;胃癌;尼美舒利

【中国国书分类法分类号】R735.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-24

Effect of nimesulide on proliferation, apoptosis and protein expression related to STAT3 signaling pathway in SGC-7901 cells

CHEN Min, et al

(*Department of Internal Medicine, Chongqing Cancer Insitute*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the inhibition effect of proliferation of gastric cancer cell line SGC7901 treated with selective cyclooxgenase 2(COX-2) inhibitor, nimesulide, and the probable mechanism of cell signal transduction. *Methods*: SGC7901 cells were treated with nimesulide. MTT assay was used to measure the cell proliferation; Flow cytometry was used to detect cell cycle and apoptosis. The protein expression related to STAT3 signaling pathway in SGC7901 cells was examined by Western blot. *Results*: The growth of gastric cancer cells was obviously inhibited in a time-and dose-dependent manner after nimesulide treatment; the percentage of apoptosis was increased significantly($P<0.05$); the proportion of SGC7901 in G_0/G_1 phase was hoisted significantly($P<0.05$); Western blot analysis showed that: the protein expression of phosphorylated STAT3 (P-STAT3), CyclinD1, Bcl-2 in SGC-7901 cells was decreased significantly($P<0.05$). *Conclusions*: The proliferation of gastric cancer cell line SGC7901 could be inhibited; the course of cell cycle could be prevented; cell apoptosis could be induced by nimesulide through down-regulating the protein expression of P-STAT3, CyclinD1, Bcl-2, which was probably one of its molecular mechanisms.

【Key words】Signal transducer and activator of transcription 3; Gastric cancer; Nimesulide

越来越多的新证据提示选择性环氧化酶 2 抑制剂(Selective cyclooxgenase 2 inhibitor)通过抑制 COX-2 的活性以降低前列腺素 E2(Prostaglandin E2)合成而起到抗癌作用并非唯一或最重要的抗肿瘤机制。选择性 COX-2 抑制剂还可以通过作用于细胞内信号通路来诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞增殖和生长[1],但其抗肿瘤确切的细胞信号转导机制尚不十分清楚。新近发现的信号转导和转录激活因子 3(STAT3)信号传导通路与细胞的增殖、分化及凋亡密切相关,该通路持续激活可导致细胞异常增殖和恶性转化。本研究探讨 STAT3 信号传导通路在选择性环氧化酶 2(COX-2)抑制剂尼美舒利抗胃癌中的作用及其机制。

作者介绍:陈 敏(1977-),女,硕士,
研究方向:消化道肿瘤基础及临床研究。

基金项目:重庆市教委科研基金资助项目(2003)。

1 材料与方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 材料

人胃癌细胞系 SGC7901，由重庆医科大学病理生理教研室汤为学教授惠赠。尼美舒利购自 Sigma 公司，兔抗 P-STAT3 多克隆抗体购自 Cell Signaling 公司，兔抗 Bcl-2 多克隆抗体，鼠抗 CyclinD1 多克隆抗体，HRP 标记的二抗，ECL 化学发光试剂盒均购自 Santa Cruz 公司。Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒、RIPA 细胞裂解液均购自晶美生物公司。

1.2 细胞培养

人胃癌细胞系 SGC7901 培养于含 10%胎牛血清的 RPMI1640 液中，培养条件为 37℃饱和湿度，体积分数为 5% CO_2 孵箱中传代培养。

1.3 MTT 法检测细胞增殖

收集对数生长期细胞制成细胞悬液，以 5×10^4 个 /ml 细胞浓度接种于 96 孔板中(200μl/孔)，待细胞贴壁后，加入处理因素使尼美舒利的终浓度为 50、100、200、400μmol/L，与实验孔平行设空白、细胞对照组，每组设 3 个复孔。继续培养 24、48、72h 后分别于每孔加入 MTT 溶液(5mg/ml)20μl，37℃培养 4h 后终止反应，用酶标仪测定 540nm 波长处各孔 OD 值。细胞增殖抑制率=(1-实验组平均 OD 值 / 对照组平均 OD 值)×100%。

1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡

将终浓度为 100μmol/L、200μmol/L 的尼美舒利作用 SGC7901 细胞 48h 后消化细胞制成单细胞悬液，调整待测细胞密度为 5×10^5 个 /ml。按 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒说明完成标记操作，即行流式细胞仪检测。

1.5 流式细胞仪检测细胞周期

将终浓度为 100、200μmol/L 的尼美舒利作用 SGC7901 细胞 48h 后制成 1×10^5 个 /ml 细胞悬液，PBS 洗 2 次加入 70% 冰乙醇于 4℃固定 24h，加入 PI 染液避光染色 30min 后上机检测。

1.6 Western blot 检测 STAT3 信号通路相关蛋白表达

终浓度为 100μmol/L 的尼美舒利处理细胞 0、24、48h 后提取细胞蛋白。分别将相同含量的蛋白样品 SDS-PAGE 后电转移至硝酸纤维素膜上。5%脱脂奶粉 4℃封闭过夜，加入按 1:100 比例稀释的第一抗体后室温孵育 3h，PBST 洗膜后，加入 1:500 稀释的第二抗体，室温孵育 2h，PBST 洗膜后，ECL 化学发光试剂盒检测杂交信号，用 Image Master VDS Software 软件分析蛋白区带，以各指标的光密度值与内参 β-actin 的光密度值的比值代表其蛋白的相对表达量。

1.7 统计学分析

实验结果以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。应用 SPSS13.0 统计软件分析，根据资料性质采用方差分析，以 $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结 果

2.1 尼美舒利对 SGC7901 细胞增殖的影响

经 50、100、200、400μmol/L 的尼美舒利处理 24、48、72h 后，SGC7901 细胞生长受到不同程度的抑制，随作用时间的延长、药物浓度的增大，抑制率逐渐增高，呈现出时间—剂量依赖性关系(图 1)。

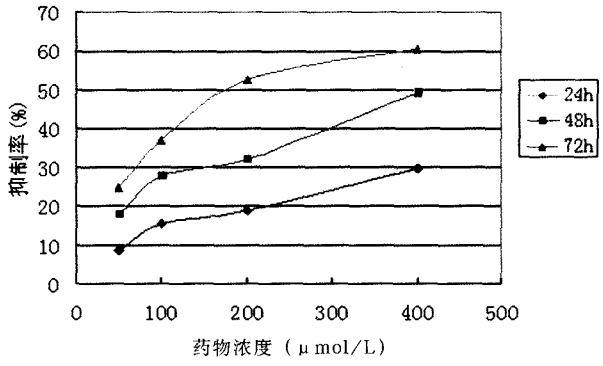


图 1 尼美舒利对 SGC7901 细胞增殖的影响

2.2 尼美舒利对 SGC7901 细胞凋亡的影响

100μmol/L、200μmol/L 尼美舒利作用 48h 后的凋亡率分别为 10.98 ± 0.27、38.40 ± 0.55，与对照组的 8.09 ± 0.12 相比，差异有显著性($P<0.05$)。200μmol/L 处理组与 100μmol/L 处理组相比较，以前者凋亡率为高($P<0.05$)，可见尼美舒利作用后，凋亡率随药物浓度的增高而明显升高，有明显的量效关系。见表 1。

表 1 尼美舒利作用 48h 后胃癌细胞株 SGC7901 的凋亡率

实验分组	凋亡率(%)
细胞对照组	8.09 ± 0.12
100μmol/L	10.98 ± 0.27*
200μmol/L	38.40 ± 0.55*#

注：* 与细胞对照组比较，$P<0.05$；# 与 100μmol/L 组比较，$P<0.05$

2.3 尼美舒利对 SGC7901 细胞周期的影响

100μmol/L、200μmol/L 尼美舒利作用 48h 后 SGC7901 处于 G_0/G_1 期细胞比例升高，与对照组相比尼美舒利处理组出现明显的细胞周期阻滞，大量细胞被阻滞于 G_0/G_1 期，且阻滞程度表现为浓度依赖性。见表 2。

2.4 尼美舒利对 SGC7901 细胞中 STAT3 信号通路相关蛋白表达的影响

Western Blot 结果显示 100μmol/L 尼美舒利作用 24、48h 后 Bcl-2、P-STAT3、CyclinD1 蛋白的表达量显著低于对照组($P<0.05$)，并随作用时间的延长逐渐降低。见表 3、图 2。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 尼美舒利作用 48h 后 SGC7901 细胞周期分布(%)

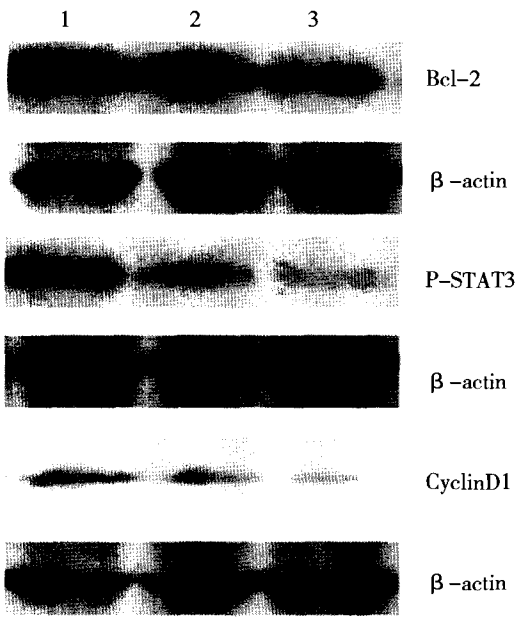
组别	G_0/G_1	S	G_2/M
对照组	56.68 ± 1.58	19.47 ± 1.33	25.49 ± 0.70
100 μ mol/l	60.42 ± 1.82*	17.60 ± 0.81#	16.34 ± 1.40*
200 μ mol/l	69.63 ± 0.82*	18.65 ± 1.12#	11.64 ± 0.76*

注:* 与细胞对照组比较,$P<0.05$;# 与细胞对照组比较,$P>0.05$

表 3 100μmol/L 尼美舒利作用 24、48h 后蛋白的相对表达量

蛋白分组	对照(0h)	24h	48h
Bcl-2	0.68 ± 0.04	0.56 ± 0.06*	0.37 ± 0.05*
P-STAT3	0.38 ± 0.07	0.27 ± 0.04*	0.19 ± 0.03*
CycinD1	0.29 ± 0.03	0.20 ± 0.08*	0.12 ± 0.09*

注:* 与对照组比较,$P<0.05$



1.对照; 2.作用 24h; 3.作用 48h

图 2 100μmol/L 尼美舒利作用 24、48h 后Bcl-2、P-STAT3、CyclinD1 蛋白的表达

3 讨 论

俞丽芬等[2]研究表明中分化和低分化胃腺癌中有较高程度的 STAT3 信号的激活,提示这一通路的调控异常与胃癌有密切关系。STAT3 是 JAK/STAT3 信号转导途径中的关键信号分子,是一种存在于细胞浆与酪氨酸磷酸化信号通道相耦联的具有关键作用的双功能蛋白,介导了多种细胞因子和生长因子的细胞内信号转导过程并激活相应的靶基因,从而调控细胞增殖、分化和凋亡[3,4]。在肿瘤细胞中 STAT3 被持续性激活,活化的 STAT3 分子恒定地存在于细胞核中,持续地调控目标基因的表达[5]。目前已经明确抗凋亡蛋白 Bcl-xL、Mcl1、Bcl-2,细胞增殖相关蛋白 CyclinD1 和 c Myc 均为 STAT3 的靶基因产物[6]。

但该途径是否介导选择性 COX-2 抑制剂的抗胃癌作用? Muthian G 等[7]研究表明 COX-2 抑制剂可通过阻断 JAK/STAT 通路而抑制 COX-2 表达发挥抗肿瘤作用。本研究应用 STAT3 磷酸酪氨酸抗体能与磷酸化的 STAT3 酪氨酸 705 位点反应,从而识别胃癌细胞中 STAT3 的活化形式,Western blot 结果显示:尼美舒利作用 SGC7901 胃癌细胞后磷酸化的 STAT3(P-STAT3)、CyclinD1、Bcl-2 的表达明显下降并随作用时间的延长逐渐降低,而 CyclinD1 是参与细胞周期 G_1/S 转换的重要正性调节因子,作用于细胞周期的 G1→S 期调控点,由于尼美舒利抑制 CyclinD1 的表达,从而降低了 CyclinD-CDK4 复合物的形成,最终 DNA 合成受阻,细胞阻滞在 G_1 期。而本研究细胞周期分析结果显示,在尼美舒利作用 48h 后 G_0/G_1 期细胞比例增高,说明尼美舒利将胃癌 SGC7901 细胞阻滞在 G_0/G_1 期,可见 CyclinD1 表达的降低与细胞周期的阻滞相一致。MTT 结果显示经不同浓度的尼美舒利处理 24、48、72h 后,SGC7901 细胞生长受到不同程度的抑制,随作用时间的延长、药物浓度的增大,抑制率逐渐增高,呈现出时间—剂量依赖性关系。表明尼美舒利抑制 P-STAT3 及下游靶基因蛋白 CyclinD1 的表达使细胞周期的进程受阻从而细胞增殖受到抑制。Bcl-2 是目前研

(下转第 333 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

肾小球滤过功能的常用指标，具有简便易行的优点，但 Cr 是肌肉中磷酸肌酸的代谢产物，它受病人性别、年龄、肌肉量及外源性 Cr 摄入等多种因素的影响，并且随着肾小管排泌或重吸收 Cr 的程度不同，肾脏处理 Cr 的速度也不同，尤其是在肾病状态下。因此，Cr 作为 GFR 测定物，影响因素多，特异性不高，灵敏度也较差。近年来对“早期肾病变”(Incipient nephropathy)的报道越来越多，这就要求相应的肾脏疾病的实验室检测方法更为敏感和特异，以有利于临床的早期诊断和治疗。Cys C 是新近发展起来的 1 个评价肾功能早期损害的灵敏指标[3-6]，2002 年，FDA 网上公布了 26 个在检验医学有重大突破的全新检测项目，Cys C 便是其中之一。欲建立定量检测 Cys C 的乳胶颗粒增强免疫浊度法，此法具有快速、准确、自动化、检测通量高、适宜临床常规操作的特点，试剂盒国产化将大大降低成本，从而促进 Cys C 测定的普及率，提高肾脏疾病的临床检验诊断水平。

免疫浊度法测定 Cys C 的首要条件是 Cys C 蛋白抗原的制备纯化。在本文中我们选用了经济、高效、来源方便稳定的基因重组策略来制备 Cys C 的蛋白抗原，成功构建了人 Cys C 原核表达载体并转化大肠杆菌，制备了纯化的目的蛋白，由于制得的蛋白仅用于免疫动物制备抗血清，对表达的蛋白活性要求不高，所以我们未进一步对表达蛋白的生物活性作鉴定。

参 考 文 献

[1] Gokkusu CA,Ozden TA,Gul H,et al. Relationship between plasma cystatin C and creatinine in chronic renal diseases and Tx-transplant parients[J]. Clin Biochem,2004;37(2):94-97.

[2] Laterza OF,Price CP,Scott MG. Cystatin C:an improved estimator of glomerular filtration rate[J]. Clin Chem,2002;48(5):699-707.

[3] Fliser D, Ritz E. Serum cystatin C concentration as a marker of renal dysfunction in the elderly[J]. Am J Kidney Dis,2001;37(1):79-83.

[4] Christensson A,Ekberg J,Grubb A,et al. Serum cystatin C is a more sensitive and more accurate marker of glomerular filtration rate than enzymatic measurements of creatinine in renal transplantation[J]. Nephron Physiol,2004;94(2):19-27.

[5] Gerbes AL,Gulberg V,Bilzer M,et al. Evaluation of serum cystatin C concentration as a marker of renal function in patients with cirrhosis of the liver[J]. Gut,2002;50(1):106-110.

[6] Xia LH,Bing XG,An XT.Serum cystatin C assay for the detection of early renal impairment in diabetic patients[J]. J Clin Lab Anal,2004;18(1):31-35.

(责任编辑：关蕴良)

(上接第 296 页)

究最多的与细胞凋亡关系密切的基因，它的作用主要是抑制凋亡的发生，是目前公认的细胞凋亡拮抗基因。流式细胞仪证实尼美舒利作用于胃癌 SGC7901 后能诱导细胞凋亡，可见 Bcl-2 蛋白表达下调与其引起凋亡的情况相符合。表明尼美舒利抑制 P-STAT3 及下游靶基因蛋白 Bcl-2 的表达从而诱导细胞凋亡。

本研究结果提示尼美舒利抑制胃癌 SGC7901 细胞增殖和诱导胃癌细胞凋亡的机制可能是通过 STAT3 信号途径，抑制了癌基因 STAT3 的表达，使其不能激活它的靶基因所诱导某些关键性基因产物的表达(如 CyclinD1 蛋白、Bcl-2 蛋白)，从而影响肿瘤的发生所致，表明该信号通路能介导选择性 COX-2 抑制剂的抗胃癌作用，以 STAT3 为靶点对胃癌进行干预治疗具有可行性。

参 考 文 献

1] Hussain SS, zabo IL,pai R,et al. MAPK(ERK2) kinase-a key target for NSAIDS -induced inhibition of gastric cancer cell proliferation and growth[J]. Life Sci,2001;69(3):3045-3054.

[2] 俞丽芬，朱延波，乔敏敏，等. Stat3 在人胃癌细胞株和组织中的组成性激活及其临床意义[J]. 中华医学杂志，2004;84(24):2064-2069.

[3] Schindler CW. JAK-STAT signaling in human disease[J]. J Clin Invest,2002;109(9):1133-1137.

[4] O'Shea JJ,Gadina M,Schreiber RD. Cytokine signaling in 2002:New surprises in the Jak/Stat pathway[J]. Cell,2002;109(suppl 1):121-131.

[5] Buettner R,Mora LB,Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention[J]. Clin Cancer Res,2002;8(4):945-954.

[6] BrombergJ.STAT proteins and oncogenesis[J]. J clin Invest,2002;109(6):1139-1142.

[7] Muthian G,Raikwar HP,Johnson C,et al. COX-2 inhibitors modulate IL-12 signaling through JAK-STAT pathway leading to Th1 response in experimental allergic encephalomyelitis[J]. J Clin Immunol,2006;26(1):73-85.

(责任编辑：冉明会)