维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)01-0049-04

COX-2 抑制剂对乳腺癌放射增敏作用的实验研究

刘方欣,李晓愚,任庆兰,李少林

(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:探讨环氧化酶 2 抑制剂尼美舒利对乳腺癌细胞株 MCF-7 的放射增敏作用并初步探讨其机制。方法:克隆形成实验检测尼美舒利对 MCF-7 的放射增敏作用;电镜观察肿瘤细胞形态学改变;流式细胞仪(FCM)检测肿瘤细胞调亡率及 Bcl-2、Bax 蛋白的表达。结果:不同浓度的尼美舒利对乳腺癌细胞 MCF-7 均有放射增敏作用,且呈剂量依赖性关系;尼美舒利与射线照射联用能够上调 Bax 的蛋白表达,同时抑制 Bcl-2 蛋白表达,明显增加细胞凋亡率。结论:COX-2 抑制剂尼美舒利对人乳腺癌 MCF-7 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;乳腺癌; 凋亡

【中国图书分类法分类号】R734.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-03

Experimental study on radiosensitivity enhancement effect of COX-2 inhibitor on breast cancer

LIU Fang-xin, et al

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

【Abstract】 *Objective*: To investigate the radiosensitivity enhancement effect of COX-2 inhibitor -Nimesulide on breast cancer cell line(MCF-7) in vitro and to initially disclosure its mechanism. *Methods*: The clonogenic assay was performed to determine the radiosensitizing effect of Nimesulide on MCF-7 cell line. The morphological changes of MCF-7 were observed by electron microscopy. The apoptosis and expressions of Bcl-2 and Bax were measured by flow cytometry (FCM). *Results*: Nimesulide at different concentration significantly enhanced the radiosensitivity of MCF-7 cells. in a dose-dependent manner, under the combined treatment of Nimesulide and radial the protein expression of Bax was up-regulated, while that of Bcl-2 was inhibited and the apoptpsis increased significantly. *Conclusion*: Cox-2 inhibitor could obviously enhance the radiosentivity of human breast cancer cell line MCF-7.

【Key words】 Selective cyclooxygene-2 inhibitor; Radiosensitivity; Breast cancer; Apoptosis

乳腺癌是最常见的恶性肿瘤之一,在乳腺癌的综合治疗中,放疗占有十分重要的地位。多种因素影响放疗的效果,如肿瘤组织的低氧状态、谷胱甘肽含量、肿瘤细胞本身的放射敏感性以及对放射线的抵抗等。作为增加肿瘤放射敏感性、逆转放射抵抗、提高放疗疗效的重要手段,放射增敏剂已逐渐成为研究热点。最近研究发现,诱导型环氧化酶 2 (Cyclooxygenase 2,COX-2)抑制剂具有放射增敏作用,其确切机制尚不明确[1]。本研究探讨 COX-2抑制剂尼美舒利(Nimesulide)对乳腺癌细胞株 MCF-7 放射敏感性的影响,并初步研究其机制。

作者介绍:刘方欣(1971-),女,高级实验师,主要研究方向:放射肿瘤学。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

人乳腺癌细胞株 MCF-7 由重庆医科大学病理生理学教研室提供;PRMI 1 640 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。

主要仪器: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),^{60}Co 放疗机(GWGP-80,中国)。

1.2 细胞培养

人乳腺癌细胞株 MCF-7 置于含 10%小牛血清、青-链霉素各 100U/ml 的 RPMI 1 640 培养液,37℃、饱和湿度、5% CO_2 孵箱中培养,取对数生长期细胞进行实验。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.3 克隆形成实验

取对数生长期的 MCF-7 细胞，用 0.25% 胰蛋白酶 (0.02%EDTA)消化，制备成细胞悬液；取适量细胞接种于 6 孔板中，培养 24h 细胞贴壁。分 4 组进行实验：(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：γ 射线照射；(4)实验组：不同剂量尼美舒利作用 24h+ γ 射线照射。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。照射组根据照射剂量分为不同亚组；实验组于细胞贴壁后更换含不同浓度尼美舒利溶液 (0、25、50、100、150 μmol/L) 的培养液培养 24h。照射组与实验组分布接受 0、2、4、6、8Gy ^{60}Co γ 射线照射(平均剂量率为 62.89cGy/min)。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 500、1 000、2 000、10 000、100 000 个细胞于 60mm 培养皿中，每个剂量点设 3 个平行样品。培养皿细胞于 37℃、饱和湿度、5%CO_2 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 电镜观察细胞形态学改变

分对照组和实验组 (25 μmol/L 尼美舒利+8Gy ^{60}Co γ 射线照射)。细胞接种于培养瓶中，对照组用普通培养液培养 24h。实验组更换含 25 μmol/L 尼美舒利溶液的培养液培养 24h 后，给予 8Gy ^{60}Co γ 射线照射。2 组均更换无药物的培养液继续培养 24h，离心收集细胞，4℃ 2% 戊二醛固定 24h，PBS 溶液清洗 2 遍，4℃ 1% 锇酸固定 1h，酒精脱水，离子镀膜，扫描电镜观察。

1.5 流式细胞仪(FCM)检测细胞凋亡

分为对照组、药物组(25 μmol/L 尼美舒利)、照射组(8 Gy ^{60}Co γ 射线照射) 和实验组 (25 μmol/L 尼美舒利+8Gy ^{60}Co γ 射线照射)。对照组与照射组采用无药培养液培养，药物组和实验组采用含 25 μmol/L 尼美舒利溶液的培养液培养 24h，照射组与实验组给予 8Gy ^{60}Co γ 射线照射。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，Modifit 软件分析。以上实验重复 3 次。

1.6 FCM 检测 Bcl-2 与 Bax 蛋白的表达

MCF-7 细胞加入含不同浓度尼美舒利溶液(0、25、50、100、150 μmol/L)的培养液培养 24h 后，更换无药培养液继续培养 24h，收集各组细胞。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。

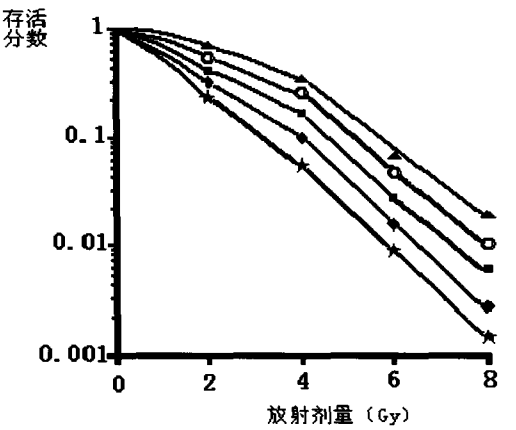
1.7 统计方法

实验结果采用 SPSS1.0 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 $P<0.05$ 表示显著性差异。

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，各剂量尼美舒利处理后的 SF_2、D_0、D_q、放射增敏比见表 1，单靶多击模型拟合曲线如图 1。结果显示，不同浓度的尼美舒利作用后 SF_2、D_0、D_q 均低于对照组，并呈现剂量依赖性。实验组曲线低剂量区“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。



▲ 照射+0μmol/L 尼美舒利；◎ 照射+25μmol/L 尼美舒利；■ 照射+50μmol/L 尼美舒利；◆ 照射+100μmol/L 尼美舒利；★ 照射+150μmol/L 尼美舒利

图 1 不同浓度尼美舒利对 MCF-7 细胞放射敏感性的拟合曲线

2.2 电镜观察结果

MCF-7 乳腺癌细胞电镜下呈大片分布，癌巢分布现象明显，有的细胞间有大间隙，腺管腔面微绒毛丰富，细胞内线粒体及粗面内质网丰富，核分裂相明显(图 2a)。经尼美舒利 + 射线照射后肿瘤实质和细胞数目明显减少，代之以大量胶原纤维，细胞间距增大，染色质浓缩，边集于核膜下呈团块状，并

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 尼美舒利对 MCF-7 放射敏感性的影响

组别	尼美舒利浓度 (μmol/L)	SF_2	D_0	D_q	SER_{SF2}	SER_{Dq}
A	0	0.672	1.94	1.44		
B	25	0.532	1.52	1.21	1.04	1.16
C	50	0.401	1.34	1.17	1.11	1.24
D	100	0.374	1.18	0.82	1.19	1.31
E	150	0.312	0.91	0.64	1.27	1.57

形成典型的凋亡小体等形态学改变。各种膜性结构出现裂隙,内质网结构松散、脱颗粒,线粒体膜碎裂和空泡化(图 2b)。



图 2a 正常 MCF-7 细胞 EM×5 000

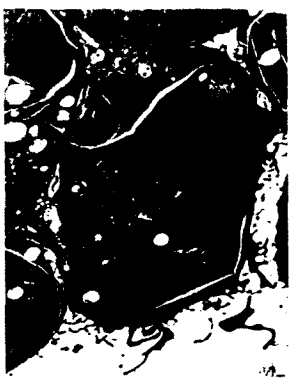


图 2b 照射后的 MCF-7 细胞 EM×6 000

2.3 FCM 检测细胞凋亡

各组细胞凋亡率如表 2.25 μmol/L 尼美舒利与 8Gy ^{60}Co γ 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 2)。

表 2 FCM 检测 MCF-7 细胞凋亡率

组别	凋亡率
对照组	1.52 ± 0.36
药物组(25 μmol/L 尼美舒利)	3.24 ± 1.21
照射组(8Gy ^{60}Co γ 射线照射)	10.23 ± 3.27
实验组(25 μmol/L 尼美舒利+8 Gy ^{60}Co γ 射线照射)	15.25 ± 3.45

2.4 FCM 检测 Bcl-2 与 Bax 的蛋白表达

尼美舒利作用后 MCF-7 细胞 Bcl-2 蛋白表达降低,而 Bax 蛋白表达明显增高(表 3)。

表 3 FCM 检测 MCF-7 细胞 Bcl-2、Bax 蛋白表达情况(%)

组别	尼美舒利浓度 (μmol/L)	Bcl-2	Bax
A	0	34.17 ± 2.58	25.31 ± 2.56
B	25	27.65 ± 2.10	34.24 ± 4.08
C	50	14.05 ± 3.01	52.14 ± 5.15
D	100	9.04 ± 2.54	72.85 ± 4.29
E	150	7.25 ± 1.89	78.35 ± 3.39
	F	56.21	74.13
	P	0	0

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,目前发现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 在机体中常有表达,维持机体正常的生理功能;而 COX-2 在大多数正常组织不表达,而在多种细胞外次级因素包括生长因子、细胞因子、炎性介质等作用于细胞时其表达量迅速增加[2]。有研究发现,放射治疗同样是 COX-2 表达的刺激因素,COX-2 随照射剂量增加而增加[3],而 COX-2 的主要产物前列腺素 2(PGE2)很早即被证实是对抗放射损伤的细胞保护剂[4]。利用消化道副作用较小的 COX-2 抑制剂选择性抑制 COX-2 的表达,提高细胞放射敏感性受到了研究者的极大关注。目前 COX-2 抑制剂放射增敏机制尚不明确,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[5];(2)诱导治疗细胞凋亡;(3)抑制肿瘤血管生成[6];(4)促使肿瘤细胞周期再分布[7,8]。

单击多靶模型被人们广泛用于衡量细胞的放射敏感性,参数 D_0 为平均致死剂量,反映细胞在相对高剂量照射下对射线的敏感性;D_q 为准域剂量(Qu-

维普资讯 http://www.cqvip.com

asithreshould dose),反映细胞亚致死放射损伤的修复能力;SF_2 则是衡量细胞内在放射敏感性的最重要的指标。这些参数数值越高,反映细胞对放射线抵抗性越高。本研究结果表明,COX-2 抑制剂尼美舒利在不同浓度下对人乳腺癌细胞株 MCF-7 均有明显的放射增敏作用,作用后细胞的 SF_2、D_0、D_q 均明显降低。在肿瘤细胞存活曲线上,反映亚致死性放射损伤修复能力的"肩"区缩小,提示细胞亚致死性放射损伤修复能力受到抑制。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[9]。

FCM 检测表明 COX-2 抑制剂与放射治疗单独应用均可诱导肿瘤细胞的凋亡,但二者联用肿瘤细胞的凋亡率明显增加,电镜观察可见到凋亡细胞和明显的凋亡小体,提示尼美舒利能够增强 MCF-7细胞对放射诱导凋亡的敏感性。本研究发现,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,与国外学者的研究结果一致;Basu 等[10]研究发现 COX-2 抑制剂 Celecoxib 通过 PKB/Akt 途径增加 Bax 的表达并下调 Bcl-2 的表达;Gee 等[11]研究发现 COX-2 抑制剂可以降低 Bcl-2 的表达,对 Bax 的表达没有明显影响,但同样使 Bax/Bcl-2 比值增大。Bax 与 Bcl-2 同属于 Bcl-2 家族成员,前凋亡蛋白 Bax 属促凋亡蛋白,与 Bax或 Bcl-2 形成二聚体则促进细胞凋亡。凋亡抑制蛋白 Bcl-2 处于凋亡调控信号转导途径的终末部分,在细胞接受凋亡刺激后可受到蛋白激酶 MAPK 家族成员 JNK 的磷酸化或经 caspase 的催化裂解,通过抑制线粒体网膜上的渗透性转运孔的形成而发挥其抑制凋亡的作用。Rudin CJM [12] 等研究发现,Bax/Bcl-2 比值增大,细胞膜对细胞色素 C 的通透性增加,利于细胞色素 C 的释放;细胞色素 C 释放后与其他因子一起激活凋亡相关的信号转导分子,促进细胞的凋亡。

本研究证实 COX-2 抑制剂尼美舒利对人乳腺癌细胞株 MCF-7 具有明显的放疗增敏作用,细胞对射线诱导凋亡的敏感性提高和对射线所致亚致死损伤修复能力的抑制在其作用机制中发挥了重要的作用。

参 考 文 献

[1] Crokart N,Radermacher K,Jordan BF,et al. Tumor Radopsensitization by antiinflammatory drugs:evidence for a new mechanism involvong the oxygen effect[J]. Cancer Res,2005;65(17):7 911-7 916.

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

[3] Tang C,Liu C,Zhou X,et al. Enhanced inhibitive effects of combination of rofecoxib and octreotide on the growth of human gastric cancer[J]. Int J Cancer,2004;112(3):470-474.

[4] Furuta Y,Hall ER,Sanduja S,et al. Prostaglandin production by murine tumors as a predictor for therapeutic response to indomethacin[J]. Cancer Res,1988;48(11):3 002-3 007.

[5] Petersen C,Petersen S,Milas L,et al. Enhancement of intrinsic tumor cell radiosensitivity induced by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor[J]. Clin Cancer Res,2000;6(6):2 513-2 520.

[6] Kishi K,Petersen S,Petersen C, et al. Preferential enhancement of tumor radioresponse by a cyclooxygenase-2 inhibitor[J]. Cancer Res,2000;60(5):1 326-1 331.

[7] 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.

[8] Pyo H,Choy H, Amorino GP,et al. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor,SN-398,enhances the effect of radiation in vitro and in vivo preferentially on the cells that express cyclooxygenase-2 [J]. Clin Cancer Res,2001;7(10):2 998-3 005.

[9] Raju U,Ariga H,Dittmann K,et al. Inhibition of DNA repair as a mechanism of inhanced 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.

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

[11] Gee J,Lee IL,Jendiroba D,et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors inhibit growth and induce apoptosis of bladder cancer[J]. Oncol Rep,2006;15(2):471-477.

[12] Rudin CJM. Cytochrome C induces caspase-dependent apoptosis in intact hematopoietic cells and overrides apoptosis surpressin mediated by bcl-2,growth factor signaling, MAP-kinase,and malignant change[J]. Blood, 1998;92(4):1 235-1 246.

(责任编辑:谭乐勤)