维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2005)04 - 0564 - 03

环氧化酶抑制剂对人乳腺癌细胞株 MCF - 7 的抑制作用研究

刘方欣,张玉诺,李少林

(重庆医科大学基础医学院核医学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究环氧化酶抑制剂阿司匹林和选择性环氧化酶 2 抑制剂尼美舒利对人乳腺癌细胞株 MDA - MB - 231 的生长抑制作用,并初步探讨其作用机理。方法:用阿司匹林和尼美舒利分别作用人乳腺癌细胞株 MDA - MB - 231,MTT 法观察其生长抑制作用;免疫组化法检测阿司匹林和尼美舒利作用后 MDA - MB - 231 细胞中 COX - 2 和 c - erbB - 2 的表达情况。结果:阿司匹林和尼美舒利能够抑制 MDA - MB - 231 细胞的生长,并呈时间 - 剂量依赖型。COX - 2 在 MDA - MB - 231 细胞中表达呈阳性,免疫组化发现细胞内 c - erbB - 2 表达下降。结论:环氧化酶抑制剂能够有效的抑制肿瘤细胞的生长,其机制可能与下调 c - erbB - 2 基因的表达有关。

【关键词】环氧化酶抑制剂;选择性环氧化酶 2 抑制剂;人乳腺癌细胞株 MDA - MB - 231

【中国图书分类法分类号】R797.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2004 - 09 - 13

The inhibitory effect of cyclooxygenase inhibitor on human breast cancer line MDA - MB - 231 in vitro

LIU Fangxin, et al

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

【Abstract】*Objective*: To investigate the inhibitory effect of cyclooxygenase inhibitor acetylsalicylic acid(ASA), and a selective COX - 2 inhibitor(Nimesulide) on the growth of human breast cancer cell line MDA - MB - 231 in vitro. *Methods*: The inhibitory effect was detected by MTT assay. Immunohistochemical assay was performed to examine the expressions of COX - 2 and c - erbB - 2 in SKOV3 cell line treated by NSAIDs. *Results*: A decrease in cell number compared with controls was observed in all of the cell line treated with ASA and Nimesulide. It was a dose - dependent inhibition of cell proliferation. COX - 2 was expressed positive in MDA - MB - 231 and the expression of cerbB - 2 was found to decrease by immunohistochemical assay. *Conclusion*: NSAIDs can inhibit the growth of human breast cancer cell line MDA - MB - 231 in vitro.

【Key words】Cyclooxygenase inhibitor acetylsalicylic acid; Selective COX - 2 inhibitor; Human breast cancer cell line MDA - MB - 231

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有两种同工酶: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 在大多数正常组织的正常状态下不表达,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的时候其表达量迅速增加[1]。研究发现,COX - 2 不仅是启动炎症反应的关键酶,而且还可以通过多种致瘤机制参与肿瘤的发生与发展。研究表明,COX - 2 在上皮组织癌(如胃癌、直肠癌、肺癌、乳腺癌等)中普遍存在过度表达。

本研究选用了非选择性 COX 抑制剂阿司匹林和选择性 COX - 2 抑制剂尼美舒利分别作用体外培养的人乳腺癌细胞株 MDA - MB - 231,比较其对肿瘤生长的抑制作用,并对其抗肿瘤机制作初步的探讨。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及药品

RPMI - 1640 培养基由 GIBCO BRL 公司提供,小牛血清为 Hyclone 公司产品。MTT 四甲基偶氮唑盐(Sigma),以

作者介绍:刘方欣(1971 -),女,实验师,主要研究方向:肿瘤药物。

维普资讯 http://www.cqvip.com

生理盐水配成 5μg/ml 的工作液，－20℃保存。Ki－67，c－erbB－2 免疫组化试剂盒为博士德公司产品，COX－2 免疫组化试剂盒为 SantaCruz 公司产品。阿司匹林、尼美舒利为西南药业提供，以生理盐水溶解配制母液，使用时用 RPMI－1640 培养液配制成工作浓度。

1.2 细胞株

人乳腺癌细胞株 MDA－MB－231 细胞株由重庆医科大学病理生理教研室提供。于含 10% 灭活小牛血清 RPMI1640 培养液的完全培养体系中培养，倒置显微镜观察细胞生长情况，每 2～3d 传代，置 37℃、饱和湿度、5%CO_2 培养箱中培养。

1.3 实验方法

1.3.1 MTT 检测 COX 抑制剂对肿瘤细胞生长的影响实验

取对数生长期的 MDA－MB－231 细胞，苔盼蓝染色计数，配制成 4×10^7/L 起始浓度细胞悬液，按每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板中。

共分四组：①阿司匹林实验组：加入 5 种不同浓度的阿司匹林（1×10^{-2}，1×10^{-3}，1×10^{-4}，1×10^{-5}，1×10^{-6}mol/L），每浓度每时间（24、48、72h 组）组重复 5 孔（24、48、72h 组），每孔 100μl；②尼美舒利实验组：加入 5 种不同浓度的尼美舒利（25，50，100，200，400μmol/L），每浓度每时间组重复 5 孔，每孔 100μl；③空白对照组：不接种细胞，加入 RPMI1640 培养液 100μl 代替，分别加入不同浓度的阿司匹林和尼美舒利；④无药物对照组：接种细胞后，每孔每时间点加入生理盐水 100μl。加药后置 5%CO2 培养箱 37℃继续培养。

于培养的第 24、48、72h 每孔加入 MTT 液（5mg/ml）20μl，37℃孵育 4h 后弃去上清液。每孔加入 200μl DMSO，轻振荡 10min，使结晶物充分溶解，在 490/570nm 波长酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值（OD 值），求其平均值，对照组细胞存活率记为 100%，实验组按下列公式计算相对抑制率：相对抑制率＝[（对照孔平均 OD 值－加药孔平均 OD 值）/对照孔平均 OD 值]×100%。

1.3.2 免疫组化检测 COX2、c－erbB－2、Ki－67 的表达

将盖玻片（22mm×30mm）裁为 4 小块，灭菌后放入 24 孔培养板内。将细胞悬液以 2.5×10^3 个接种在玻片上，1ml/L 孔。待盖玻片长满细胞后，加入浓度为 1×10^{-2}mol/L 的阿司匹林、以及浓度为 200μmol/L 的尼美舒利。试验分为 2 组，每组分为加药组和不加药组并设置阳性对照，阴性对照（以 PBS 代替一抗）。加药完毕置 5%CO_2 培养箱 37℃培养 48h 后取出玻片，PBS 缓冲液冲洗 3 次，每次 3min。静置 2h 风干，缓冲甲醛丙酮固定，置于 4℃冰箱备用。

根据 SABC 免疫组化试剂盒说明书完成操作步骤，染色后各组细胞在高倍镜下随机观察 200 个细胞，COX2 结果判定以细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性。c－erbB－2 的表达以 HSCORE 计算判定。

1.4 统计学处理

实验结果采用 SPSS10.0 统计软件处理。MTT 检测 OD 值以 $\bar{x}\pm s$ 表示，进行方差分析，免疫组化结果采用 HSCORE 计算得分，均以 $P<0.05$ 为显著性差异。

2 结 果

2.1 阿司匹林对肿瘤细胞生长的影响实验

不同浓度的阿司匹林作用肿瘤细胞后，对细胞的生长具有抑制作用，且抑制作用呈时间－剂量依赖型，$IC_{50}=2.54\times10^{-3}$mol/L。结果见表 1，F、P 值为浓度组之间比较的方差分析结果，F'、P'值为时间组之间的方差分析结果。

2.2 尼美舒利对肿瘤细胞生长的影响实验

尼美舒利作用肿瘤细胞后，对肿瘤细胞的生长具有明显的抑制作用，呈时间－剂量依赖型。中效浓度 $IC_{50}=1.41\times10^{-4}$mol/L。结果见表 2，F、P 值为浓度组之间比较的方差分析结果，F'、P'值为时间组之间的方差分析结果。

2.3 COX2 和 c－erbB－2 在细胞中的表达

结果显示 COX2 在 MDA－MB－231 人乳腺癌细胞中存在阳性表达，表现为细胞浆中出现棕黄色颗粒，见图 1。阿司匹林组与对照组比较，c－erbB－2 在 MDA－MB－231 细胞中的表达明显下降，具有显著性差异，见图 2。尼美舒利组与对照组比较，c－erbB－2 的表达稍有下降，但无显著性差异。结果见表 3。

表 1 MTT 法测不同浓度阿司匹林对细胞的影响

组别	24h		48h		72h	
	吸光度 OD（$\bar{x}\pm s$）	抑制率（%）	吸光度 OD（$\bar{x}\pm s$）	抑制率（%）	吸光度 OD（$\bar{x}\pm s$）	抑制率（%）
对照组	1.4126±0.010		1.5156±0.004		1.8268±0.015	
10^{-6}mol/L	1.1428±0.050	12.77	1.2632±0.041	16.53	1.3468±0.009	24.80
10^{-5}mol/L	0.9428±0.002	18.43	1.0428±0.015	22.46	1.1856±0.051	31.41
10^{-4}mol/L	0.8826±0.070	26.41	0.9042±0.048	31.17	1.0616±0.003	38.57
10^{-3}mol/L	0.7254±0.052	31.24	0.8147±0.014	40.19	0.8532±0.008	50.62
10^{-2}mol/L	0.6478±0.050	35.09	0.7036±0.036	47.51	0.6785±0.003	56.25

$F=5.738$，$P<0.01$；$F'=37.10$，$P'<0.01$

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 MTT 法测不同浓度尼美舒利作用不同时间对细胞的影响

组别	24h		48h		72h	
	吸光度 OD($\bar{x}\pm s$)	抑制率(%)	吸光度 OD($\bar{x}\pm s$)	抑制率(%)	吸光度 OD($\bar{x}\pm s$)	抑制率(%)
对照组	1.1247±0.005		1.3756±0.033		1.8546±0.011	
25μmol/L	0.9713±0.002	13.79	1.2753±0.003	15.86	1.4302±0.008	23.81
50μmol/L	0.9369±0.004	16.89	1.1537±0.009	21.30	1.2374±0.005	34.62
100μmol/L	0.8736±0.005	22.03	1.0138±0.004	28.27	1.0712±0.009	41.29
200μmol/L	0.7126±0.012	33.25	0.8374±0.009*	40.97	0.8624±0.004	54.89
400μmol/L	0.5871±0.003	45.83	0.6370±0.007	52.37	0.6312±0.005	65.32

$F=7.243$ $P<0.01$, $F'=41.327$ $P'<0.01$

表 3 C-erbB-2 HSCORE 得分

组别	对照		阿司匹林		尼美舒利	
	阳性	HSCORE	阳性	HSCORE	阳性	HSCORE
C-erbB-2	99.6	2.174±0.01	81.4	1.614±0.02*	95.7	2.051±0.01

* 与对照组有显著差异, $F=9.677$ $P<0.05$



图 1 COX-2 免疫组化 1000×胞浆棕黄色着染

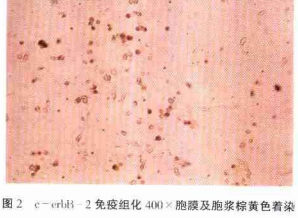


图 2 c-erbB-2 免疫组化 400×胞膜及胞浆棕黄色着染

3 讨 论

NSAIDs 是临床和生活中常用的解热镇痛药，大量流行病学资料和动物实验证明，长期服用 NSAIDs 能够降低消化道肿瘤的发病率，并且能够抑制消化道肿瘤的生长。近年的研究表明，NSAIDs 在其它的肿瘤中也有抑制和预防作用，如乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌等。NSAIDs 能够通过抑制 COX2 的表达、下调 bcl-2 蛋白的水平、上调 Par-4 基因的水平等途径抑制肿瘤的生长[3]。Harris 等[4]统计了 511 名乳腺癌患者与 1534 名正常女性，发现每周至少服用 3 次 NSAIDs、服用至少 1 年的妇女患乳腺癌的相对危险度降低了 34%。动物实验发现，传统 NSAIDs 布洛芬和选择性 COX_2 抑制剂 celecoxib 都可以抑制二甲基苯蒽诱发的小鼠乳腺癌，并从肿瘤的发生率、肿瘤数量和肿瘤体积三方面的结果可以看出 celecoxib 的抑制作用要强于布洛芬。Nakatsugi 等[5]发现另一种选择性 COX2 抑制剂尼美舒利对小鼠诱发的乳腺癌有很好的抑制作用。

本研究结果表明，阿司匹林和尼美舒利都能够抑制乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 在体外的生长，抑制程度与对照组相比均具有显著性差异($P<0.01$)，而尼美舒利的疗效要优于阿司匹林。阿司匹林(10^{-5}mol/L 组)72h 的抑制率为 56.25%，尼美舒利(500μmol/L)72h 抑制率为 65.32%。免疫组化结果显示，MDA-MB-231 细胞株中存在 COX2 的阳性表达，但使用药物后对 COX2 的表达没有明显的影响，提示 NSAIDs 对乳腺癌的抑制作用可能并不是通过抑制 COX2 的表达完成的。在使用阿司匹林处理的细胞中，肿瘤细胞内 c-erbB-2 基因的表达明显下降，尼美舒利作用的细胞 c-erbB-2 基因表达也有一定程度下降，提示 NSAIDs 的生长抑制作用可能与 c-erbB-2 基因的表达下调有关。

NSAIDs 抑制肿瘤生长是多因素、多机制联合作用的结果，其具体机制目前尚不明确。本研究结果证实，尼美舒利能够有效的抑制乳(下转第 580 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

疗,而抗病毒治疗疗效与肝组织炎症活动度和病毒载量等有直接的关系。诊断肝组织炎症活动度的金标准是肝组织病理学检查,同时判断肝病治疗疗效高低的金标准也是肝组织学的改善[2]。由于肝活检为有创性检查,并有一定的并发症和禁忌症,不便于反复进行,使其推广与应用受到限制,所以人们不断寻找无创性诊断方法来判断肝组织炎症活动度。

血清 HBV DNA 是乙肝病毒复制的最可靠指标,其存在表示血液的传染性较强,病毒复制活跃。HBV 复制也可以刺激机体产生免疫反应,使病变程度加重。但 HBV DNA 定量水平不能反应肝组织病理学炎症分级和纤维化分期,许多研究证实肝组织学炎症分级及纤维化分期均与 HBV DNA 定量无明显相关[3,4],Cho[5]等同样报道 HBV DNA 水平与肝纤维化程度没有相关性。我们对 285 例慢性乙肝患者 HBV DNA 定量与肝组织学检查进行对比分析,证实血清 HBV DNA 水平与肝组织炎症及纤维化无明显相关性,与前面的研究相一致。同时对 285 例中 230 例 HBeAg 阳性的慢性乙肝患者分析发现 HBV DNA 水平与肝组织炎症呈明显的负相关,与 Cho[5]等和 Heo[6]等均报道一致,即在 HBeAg 阳性的慢性乙肝患者随肝组织炎症级别的增高,HBV DNA 定量值逐渐下降。

ALT 是判断肝内炎症活动度的可靠指标,我们的研究与冯平[7]和 Cho[5]的报道表明,随着炎症活动度加重,ALT 升高明显,各级别之间两两比较差异有显著意义。

本研究证实 HBV DNA 定量与肝组织炎症及纤维化无明显关系,但在 HBeAg 阳性的患者中,HBV DNA 水平与肝组织炎症呈负相关,提示较低病毒载量的 HBeAg 阳性慢性乙肝患者可能有较高的炎症级别,用以指导临床治疗。ALT 仍是观察炎症变化的敏感指标,与肝脏炎症活动度有明显相关性。

参 考 文 献

[1] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会和肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志,2002;10(8):324-329.

[2] 杨 春,肖永红,管小琴. 拉米夫定治疗慢性乙型肝炎的肝组织病理学研究[J]. 重庆医科大学学报,2004;29(1):34-37.

[3] 姜湘宁,王功遂,尹建军. 慢性乙型肝炎患者血清 HBeAg 和 HBV DNA 水平与肝组织病理关系的探讨[J]. 实用肝脏病杂志,2004;7(2):86-88.

[4] 朱雄鹰,谌翠蓉,娄国强. 慢性乙型肝炎的临床、血清 HBV-DNA 与病理分度的关系[J]. 浙江实用医学,2004;9(2):88-89.

[5] Cho SC, Lee SH, Shinn JJ, et al. HBV DNA levels, aminotrasnferase and histological activity in young male patients with HBeAg positive chronic hepatitis B[J]. Taehan Kan Hakhoe Chi, 2002;8(1):44-51.

[6] Heo JH, Heo J, Kwon DS, et al. Relationship between serum HBV DNA levels and liver histology in chronic hepatitis B[J]. Korean J Gastroenterol, 2003;42(3):220-225.

[7] 冯 平,丁 琦. 慢性乙型肝炎的临床诊断、血清 HBV DNA 与病理分度的关系[J]. 实用医学杂志,2001;17(4):293-294.

(上接第 566 页)腺癌细胞在体外的生长,并且其副作用明显小于传统的 NSAIDs,有希望作为乳腺癌的预防和辅助治疗用药,为乳腺癌的治疗和预防开辟新的途径。

参 考 文 献

[1] Robert W, Mcmurray MD, Kenneth J, et al. Cox-2 inhibitors: today and tomorrow[J]. Am J Med Sci, 2002;323(4):181-189.

[2] Sharpe CR, Collet JP, McNutt M, et al. Nested case-control study of the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on breast cancer risk and stage[J]. Br J Cancer, 2000;83(1):112-120.

[3] 邱建波,龙启才. COX-2 选择性抑制剂防治肿瘤的研究进展[J]. 中国肿瘤,2003;12(2):92-96.

[4] Harris RE, Alshafie GA, Abou-Issa H, et al. Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxlib, a cyclooxygenase 2 inhibitor[J]. Cancer Res, 2000;60(8):2101-2103.

[5] Nakatsugi S, Ohta T, Kawamori T, et al. Chemoprevention by nimesulide, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, of 2-amino-lmethy-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine(PhIP)-induced mammary gland carcinogenesis in rats[J]. Jpn J Cancer Res, 2000;91(9):886-892.