DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.18.023
第26卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 18
1670 2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)18-1670-03

# 尼美舒利对人结肠癌细胞生长的抑制作用及对E-钙粘蛋白表达的影响

刘 伟,张 超,刘占奎 (第三军医大学西南医院普通外科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨尼美舒利对体外培养的结肠癌细胞生长及E-cad表达的作用。方法 以人结肠癌细胞株HT-29,HCT-116为研究对象,体外药物敏感实验(MTT)法检测尼美舒利对肿瘤细胞的增殖抑制效应;应用免疫组化S-P方法检测尼美舒利作用前后细胞E-cad表达的变化。结果 尼美舒利对人结肠癌细胞HT-29、HCT-116生长的抑制作用呈时间、剂量依赖性方式,对HT-29细胞抑制效果强于HCT-116细胞。尼美舒利上调HT-29细胞E-cad表达,而对HCT-116细胞E-cad的表达无显著差异。结论 尼美舒利可明显抑制COX-2表达阳性的结肠癌细胞HT-29生长,同时提示尼美舒利可能通过抑制COX-2酶活性而上调肿瘤细胞E-cad的表达,从而降低增癌细胞播散及转移机率。

关键词:环氧合酶-2 结肠肿瘤 E-钙粘蛋白
中图法分类号:R73-361;R735.35;R979.12 文献标识码:A

## Effects of nimesulide on the proliferation and the expression of E-cadherin of human colonic carcinoma cell lines

LIU Wei, ZHANG Chao, LIU Zhan-kui (Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: Objective To evaluate the potential roles of nimesulide, a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID), on the proliferation and the expression of E-cadherin of human colon adenocarcinoma cell lines. Methods The human colon cancer cell lines HT-29 and HCT-116 were employed in the study. After treatment with nimesulide, the inhibitory effect of nimesulide on the proliferation of cancer cells was quantified by MTT assay, and the expression of E-cadherin in the cells was detected by immunohistochemical streptavidin/peroxidase method. Results Nimesulide inhibited the proliferation of HT-29 and HCT-116 cells in time and dose-dependent manners. The inhibitory effect on HT-29 cells was stronger than that on HCT-116 cells. Nimesulide up-regulated the E-cadherin expression of HT-29 cells, whereas the expression level of HCT-116 cells remained unchanged. Conclusion Nimesulide can obviously inhibit the growth of colon cancer cells HT-29 overexpressing cyclooxygense-2 protein, suggesting that nimesulide may up-regulate the expression of E-cadherin through the inhibition of COX-2 activity, resulting in decrease of the invasion and metastatic ability of tumor cells.

**Key words**: cyclooxygenase-2; colonic neoplasm; E-cadherin

结肠癌是我国人群中最常见的恶性肿瘤之一,其发病率在消化道恶性肿瘤中已升至第2位,而且结肠癌患者肿瘤易发生转移决定了其较高的死亡率。有研究表明结肠癌的血行转移、淋巴转移及肿瘤复发与COX-2的高表达有关。流行病学研究支持非甾体类抗炎药(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)可通过抑制花生四烯酸代谢中的关键酶-环氧合酶(cyclooxygenase, COX)活性,减少前列腺素(prostaglandins, PGs)的产生,从而拮抗肿瘤形成的生物学过程的观点。尼美舒利属于甲磺酰苯胺类药物,是一种选择性COX-2抑制剂,临床应用有较好的镇痛和消炎作用。上皮钙粘蛋白(E-cadherin, E-cad)为一种钙依赖性的跨膜糖蛋白,是维护上皮细胞形态和结构的完整性和极性的重要分子[1]。E-cad的表达及功能变化可能与肿瘤的侵袭转移密切相关。我们通过体外培养结肠腺癌细胞,应用尼美舒利作用于细胞,检测肿瘤细胞的生长活性及细胞中E-cad的表达情况,并初步探讨COX-2选择性抑制剂对结肠癌侵袭转移活动抑制作用的机制。

作者简介:刘 伟(1975-),男,河北省沙河市人,满族,博士研究生,医师,主要从事胃肠道肿瘤发病机制等方面的研究。电话:(023)65399065,E-mail:liuweil.student@sina.com

收稿日期:2004-02-07;修回日期:2004-08-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

## 1　材料和方法

### 1.1　材料

DMED 培养液(Hyclony 公司), 小牛血清, 胰蛋白酶(Gibco 公司), MTT, DMSO, 尼美舒利(Sigma 公司), 小鼠抗人 E-cad 单克隆抗体、S-P 试剂盒和浓缩 DAB 试剂盒(北京中山生物技术有限公司)、$CO_2$ 培养箱(Thermo Forma 公司), 倒置显微镜(重庆光学仪器厂), 酶联免疫检测仪(HTS-7000 生物分析仪), 人结肠癌细胞株 HT-29(COX-2 高表达)购自中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 人结肠癌细胞株 HCT-116(COX-2 低表达)由第三军医大学大坪医院野战外科研究所病理科向德兵硕士惠赠。

### 1.2　方法

1.2.1　体外药物敏感实验　　按照噻唑蓝(MTT)法: 结肠癌细胞 HT-29 和 HCT-116 培养于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中, 置于 37 ℃, 5% $CO_2$ 培养箱中孵育, 细胞为贴壁生长的上皮细胞, 取对数生长细胞以备实验之用。取对数生长期的 HT-29 和 HCT-116 细胞按每孔 $5\times10^3$ 的密度接种于 96 孔板中, 24 h 换液, 加入不同浓度的尼美舒利使其终浓度分别为 25、50、100、200 μmol/L, 同时设只加等体积溶剂 DMSO 的对照组和不接种细胞的空白对照组, 继续培养 24、48、72 h。每个浓度每个时间点重复设 8 孔, 每孔加入 MTT 液(5 g/L) 20 μl, 37 ℃孵育 4 h 后弃去上清, 每孔加入 DMSO 150 μl, 轻轻振荡 10 s, 充分溶解结晶物, 在 570 nm 波长酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值(*A* 值)。计算各种不同浓度药物对两种细胞株的细胞生长抑制率, 生长抑制率=(对照组 *A* 值−实验组 *A* 值)/对照组 *A* 值×100%, 以时间为横轴, 光吸收值为纵轴绘制细胞生长曲线。

1.2.2　免疫组化(S-P)法测定 E-cad 表达变化　　将结肠癌细胞 HT-29 和 HCT-116 消化后分别制成单细胞悬液, 接种到预先放置灭菌盖玻片的培养皿中, 24 h 待细胞贴壁后更换培养基, 并加入不同浓度的尼美舒利使其终浓度分别为 50、100、200 μmol/L, 并设加等体积溶剂 DMSO 的对照组, 继续培养 72 h, 取出盖玻片, 95% 乙醇固定 30 min, 采用免疫组化 S-P 染色法, 细胞爬片滴加 $H_2O_2$-PBS 和正常二抗血清, 以消除内源性过氧化物酶和非特异性染色; 滴加一抗, 在湿盒中 4 ℃过夜; 滴加生物素化二抗 37 ℃ 30 min; 滴加 S-P 复合物 37 ℃ 30 min; DAB 显色, 苏木精复染, 盐酸乙醇分化、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。实验中设置阳性对照, 空白对照(以 PBS 代替一抗)。

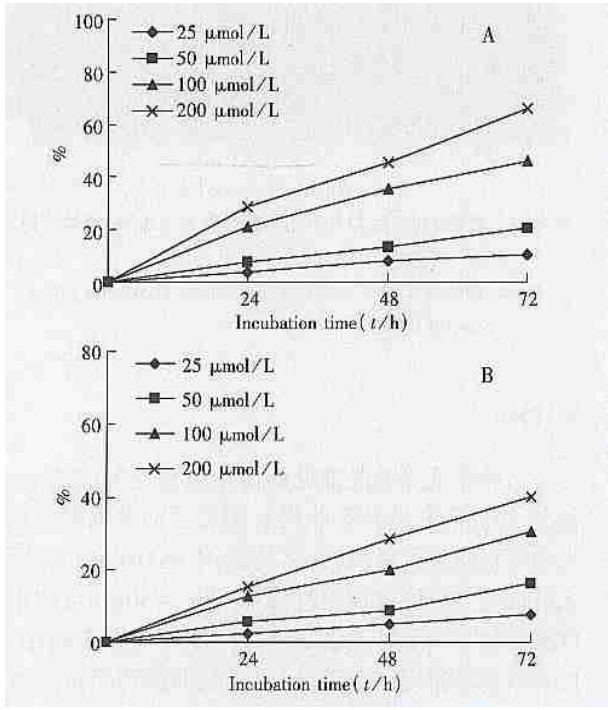
### 1.3　统计学处理

所得到的数值均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件包进行方差分析及均数间多重比较。

## 2　结果

### 2.1　尼美舒利对HT-29 和HCT-116 细胞增值的影响

见图 1, 随着尼美舒利浓度的增加, 作用时间的延长, 药物对 HT-29 和 HCT-116 细胞的抑制率明显增高, 呈时间, 剂量依赖方式。尼美舒利对 HT-29 细胞的抑制作用较 HCT-116 敏感。




A: HT-29 inhibitory; B: HCT-116 inhibitory

图 1　尼美舒利对 **HT-29、HCT-116** 细胞增殖的影响

**Fig 1　Effects of NIM on the proliferation of HT-29 and HCT-116 cells**

### 2.2　不同浓度尼美舒利对结肠癌细胞 E-cadherin 表达的影响

免疫组化结果显示: HT-29 细胞和 HCT-116 细胞均表达 E-cadherin, 其阳性表达位于肿瘤细胞的胞膜, 为连续线性棕黄色, 呈弱阳性表达; HCT-116 细胞的表达稍强。随着尼美舒利浓度的增加, HT-29 细胞 E-cadherin 表达的阳性水平逐渐增加, 药物浓度 200 μmol/L 组表达为最高, 各浓度组与对照组相比有显著性差异; 而 HCT-116 细胞各浓度组表达水平与对照组相比无显著性差异, 见表 1, 图 2。

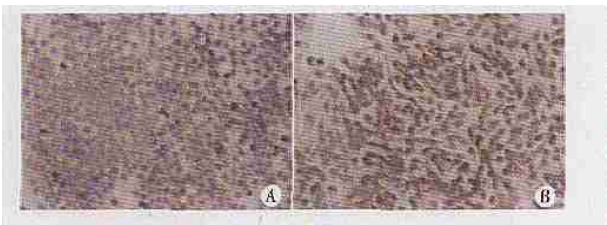
表 1　尼美舒利作用 **72 h** 对肿瘤细胞 **E-cadherin** 表达的影响($\bar{x}\pm s$)

**Tab 1　Effects of NIM treatment for 72 h on E-cadherin expression in cancer cells** ($\bar{x}\pm s$)

| Concentration(μmol/L) | Mean optical density | |
|---|---|---|
| | HT-29 | HCT-116 |
| 0 | 0.147 8±0.019 | 0.210 8±0.028 |
| 50 | 0.165 6±0.022 3 * | 0.189 5±0.021 |
| 100 | 0.207 0±0.017 ** | 0.180 7±0.023 |
| 200 | 0.210 8±0.011 ** | 0.196 1±0.030 |

*: $P<0.05$,　**: $P<0.01$, *vs* 0

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net




A: Control; B: 200 μmol/L NIM

图2 尼美舒利作用72 h对HT-29细胞E-cadherin表达的影响 (S-P×200)

**Fig 2 Effects of NIM treatment for 72 h on E-cadherin expression in HT-29 cells** (S-P×200)

## 3 讨论

结肠癌是我国最常见的消化道恶性肿瘤之一,其侵袭、转移和复发是影响疾病预后的关键因素。近年来的流行病学资料表明:坚持服用NSAID类药物可使人群罹患大肠癌的危险性降低40%~50%,可使家族性腺瘤型息肉病患者的息肉数量减少、体积减小,使FAP癌变率和死亡率降低;但是长期服药后患者有可能出现胃肠、肾脏和心脑血管系统等并发症。传统观点认为这些毒副作用的发生与COX-1受到抑制有关,因此COX-2选择性抑制剂的研究成为了新的热点。

上皮钙粘蛋白存在于上皮细胞膜表面,是钙粘蛋白家族经典成员之一[2]。其胞质端与连接素蛋白(catenins, cat)相结合,形成E-cad/cat复合体,由α-cat锚着于细胞骨架的肌动蛋白微丝系统[3,4]。E-cad/cat复合体对上皮细胞的极性与组织结构的形成和维持、细胞识别、迁移、归类等行为发挥重要作用。细胞间粘附下降是导致肿瘤发生、发展的重要原因之一。近年来的临床研究表明:E-cad表达下调或功能异常可能和包括乳腺癌、胃癌、结肠癌等众多恶性肿瘤的发生、发展密切相关。E-cad的表达水平不仅与肿瘤的分化程度、而且与肿瘤分期、侵袭转移能力密切相关[5]。导致E-cad表达障碍或缺失的主要机制包括:染色体16q的等位基因缺失或失活、E-cad基因启动子CpG岛的高甲基化[6]、α-、β-连接素蛋白的表达与功能障碍等。肿瘤细胞产生E-cad减少,但E-cad胞外区从膜上降解脱落的量增加,从而使血液中可溶性E-cad(sE-cad)水平增高,因此有研究者认为可以将血清sE-cad作为上皮性肿瘤的特异性标志物[7]。有些研究表明:E-cad在某些肿瘤浸润转移的不同阶段表达程度明显不同[8]:转移的早期,E-cad表达下调,有利于癌细胞的脱落和间质浸润;而癌细胞到达转移部位后,恢复正常表达,利于肿瘤细胞的粘附和植入。

许多研究表明NSAIDs对结肠肿瘤的生长产生抑制作用,我们采用MTT法证实尼美舒利可呈时间、剂量依赖方式抑制结肠癌细胞的增殖。尼美舒利对人结肠癌细胞生长抑制的作用机制,并不能完全归因于选择性COX-2抑制作用,因为尼美舒利对COX-2低表达的HCT-116细胞同样产生了抑制作用。其可能的机制为:药物作用后降低肿瘤细胞的分裂生长能力,促进细胞$G_0/G_1$期停滞、诱导性细胞凋亡等。本研究采用S-P法检测不同浓度尼美舒利对结肠癌细胞E-cad表达的影响,结果显示:尼美舒利对结肠癌细胞E-cad表达影响的敏感程度与肿瘤细胞COX-2的表达水平呈正相关。实验显示两种结肠癌细胞的E-cad表达水平均较低,其作用可能在于诱导肿瘤细胞出现高侵袭转移表型,并使同质细胞间的粘附减弱或丧失,癌细胞容易向其它部位扩散转移。尼美舒利可上调HT-29结肠癌细胞的E-cad表达水平,说明其可能通过选择性抑制COX-2酶活性的途径,经由某种特定机制恢复肿瘤细胞E-cad的表达,加强肿瘤细胞间的粘附性,降低了细胞脱离原发瘤细胞团,进而与基质成分接触的机会,削弱了肿瘤浸润和转移的能力。尼美舒利能否应用于临床上结肠癌术后患者,以改善其预后,预防肿瘤的复发和转移,值得进一步加以研究探讨。

参考文献:

[1] Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role of the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness[J]. Biochim Biophys Acta, 1994, 1198(1): 11-26.

[2] Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator [J]. Science, 1991, 251(5000): 1451-1455.

[3] Nigam A K, Savage F J, Boulos P B, *et al*. Loss of cell-cell and cell-matrix adhesion molecules in colorectal cancer[J]. Br J Cancer, 1993, 68(3): 507-514.

[4] Kintner C. Regulation of embryonic cell adhesion by the cadherin cytoplasmic domain[J]. Cell, 1992, 69(2): 225-236.

[5] 赵 军, 黄士勇, 于恩达, 等. E-钙黏蛋白在结直肠癌组织中的表达及意义[J]. 外科理论与实践, 2002, 7(1): 54-55.

[6] Tamura G, Yin J, Wang S, *et al*. E-Cadherin gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas[J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92(7): 569-573.

[7] Chan A O, Lam S K, Chu K M, *et al*. Soluble E-cadherin is a valid prognostic marker in gastric carcinoma[J]. Gut, 2001, 48(6): 808-811.

[8] Shiozaki H, Oka H, Inoue M, *et al*. E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells[J]. Cancer, 1996, 77(8 Suppl): 1605-1613.

(编辑 张 宁)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net