DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.08.010

论著

文章编号:1000-5404(2004)08-0682-04

塞来昔布对人肝癌SMMC-7721细胞的生长抑制作用

李军尧,欧武陵 (中国人民解放军广州军区武汉总医院急诊科,武汉 430070)

提 要:目的 研究环氧合酶-2(cyclooxygenase-2,COX-2)抑制剂塞来昔布对人肝癌SMMC-7721细胞的生长抑制作用。方法 用MTT比色法观察其对肝癌细胞生长的影响;荧光显微镜和透射电子显微镜检测细胞凋亡,TUNEL染色法记数细胞凋亡指数,流式细胞仪定量分析。结果 塞来昔布以剂量依赖的方式抑制SMMC-7721细胞的生长,2、10、20及40 mmol/L塞来昔布对肝癌细胞的生长抑制率分别为20.78%、33.37%、48.57%和64.96%($P<0.01$)。荧光显微镜和透射电镜观察到细胞皱缩、核质浓缩、核碎裂以及凋亡小体形成等凋亡形态学改变。流式细胞仪定量分析示2、10、20及40 mmol/L浓度下细胞凋亡率分别为(7.44±0.34)%、(19.59±1.73)%、(29.04±4.18)%和(42.14±2.40)%,与对照组(2.13±0.17)%比较均有显著性差异。结论 塞来昔布能抑制人肝癌SMMC-7721细胞增殖,亦能诱导其凋亡;诱导肿瘤细胞凋亡可能是塞来昔布抑制人肝癌细胞生长的机制。

关键词:塞来昔布;肝癌细胞;凋亡;环氧合酶-2

中图法分类号:R735.7;R977.3 文献标识码:A

Growth-inhibition effect of celecoxib on human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721

LI Jun-yao, OU Wu-ling (Emergency Department, Wuhan General Hospital, Guangzhou Military Area Command, Wuhan 430070, Hubei Province, China)

Abstract: **Objective** To study the inhibitory effect of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor celecoxib on the growth of hepatocellular carcinoma cell (HCC) line SMMC-7721 *in vitro*. **Methods** Growth suppression was evaluated by MTT method. Apoptosis-related changes in morphology were observed by fluorescence microscopy (FM) and transmission electron microscopy (TEM). Apoptotic index (AI) was counted by the TDT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) assay. The apoptotic rate was quantified by flow cytometry (FCM). **Results** Celecoxib inhibited the growth of HCC cells in a dose-dependent manner. The growth inhibitory rates of HCC cells treated with 2, 10, 20, and 40 mmol/L celecoxib were 20.78%, 33.37%, 48.57%, and 64.96%, respectively ($P<0.01$). Apoptosis with nuclear chromatin condensation, fragmentation, cell shrinkage, and the formation of apoptotic bodies was found by fluorescent staining and TEM. Apoptotic rates of HCC cells treated with 2, 10, 20, and 40 mmol/L celecoxib were (7.44±0.34)%, (19.59±1.73)%, (29.04±4.18)%, and (42.14±2.40)%, respectively, significantly higher than those of the control group (2.13±0.17)% ($P<0.05$). **Conclusion** Celecoxib can inhibit the growth of human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 as well as induce the cell apoptosis which may be related to the mechanism of inhibition of HCC cells.

Key words: celecoxib; hepatocellular carcinoma; apoptosis; cyclooxygenase-2

流行病学资料表明长期服用阿司匹林和其它非甾体类抗炎药(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)可以验和动物实验发现非甾体减少家族性腺瘤性息肉和结直肠癌发病率[1]。随后,体外细胞实类抗炎药如吲哚美辛、尼美舒利等可抑制多种肿瘤细胞的生长[2,3],明显减少胃癌、食管癌及结肠癌等消化道肿瘤的发生。目前,其研究范围亦过渡至消化道其它肿瘤如肝癌[4]。本实验研究环氧合酶-2(cyclooxygenase-2,COX-2)抑制剂塞来昔布对体外培养的肝癌SMMC-7721细胞的作用,并探讨其相关机制,为其应用于肝癌的化学预防和治疗提供实验和理论依据。

作者简介:李军尧(1963—),男,湖北省天门市人,主治医师。电话:(027)87879797-78111

收稿日期:2003-12-15;修回日期:2004-03-02

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

1　材料和方法

1.1　细胞和试剂

人肝癌细胞系 SMMC-7721, 购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。塞来昔布由武汉大学梅之南等[5] 提供, 二甲亚砜(DMSO)溶解, -20 ℃避光冷藏备用。碘化丙啶(PI)及 Hoechst 33258 荧光染色剂购于 Sigma 公司。RPMI1640 培养基、小牛血清、MTT 购自 Gibco 公司。末端转移酶介导的核苷酸末端标记(TUNEL)染色法原位凋亡检测试剂盒(POD 法)购自德国 Boehringer Mannheim 公司。

1.2　细胞培养

肝癌 SMMC-7721 细胞培养于含 10%小牛血清、1×10^5 U/L 青霉素、链霉素的 RPMI1640 培养液中, 37 ℃, 5%CO_2 培养箱内常规传代培养。细胞贴壁生长 24 h 至 70%~80%单层后更换含药培养基进行实验。

1.3　细胞毒性实验(MTT 比色法)

取对数生长期的细胞经胰酶消化后轻轻吹打成单细胞悬液, 调整细胞浓度为 1×10^5 个/ml, 接种于 96 孔培养板中每孔 100 μl, 培养 24 h 待细胞贴壁生长良好时, 弃原培养液, 加入药物终浓度分别为 0(对照)、2、10、20、40 mmol/L 的新培养液。每浓度设 8 个复孔, 培养 48 h 后, 加入新配制的 5 mg/ml MTT 液每孔 20 μl, 培养箱内继续作用 4 h, 吸去上清液, 加入二甲亚砜(DMSO)150 μl, 在振荡器上振荡 5 min 后, 立即用 318MC 型全自动酶标仪于 490 nm 处测吸光度值(A 值)。取 8 孔平均值。根据公式: 细胞抑制率=(1-实验组 A 值/对照组 A 值)×100%, 计算抑制率。

1.4　荧光显微镜观察

肝癌细胞经浓度为 0、2、10、20、40 mmol/L 的药物作用 48 h 后, 1 000 r/min 离心 10 min 去上清, 加 PBS 缓冲液洗涤(pH 7.4), 再离心, 去上清, 3∶1 甲醇/冰醋酸固定液固定 10 min, 留取少量固定液悬浮细胞; 取一滴细胞悬液于盖玻片上吹散, 加入 5 μg/ml 荧光染液 Hochest33258 避光染色 45 min 后用双蒸水洗 3 次, 自然晾干; 将盖玻片上有细胞的一面封盖在预滴封片液的载玻片上, 置 BH-2 荧光显微镜下观察并摄像。

1.5　透射电镜观察

收集处于对数生长期的细胞, 接种于 T-25 培养瓶内, 24 h 后换上含药(20 mmol/L)的培养液, 继续培养 48 h, 弃培养液, 用刮刀将细胞从瓶底刮下, 置于 EP 管中, 2 000 r/min 离心 10 min 弃上清, 加入 4 ℃预冷的 2%戊二醛固定 2 h, PBS 液清洗, 再用 1%锇酸固定 30 min PBS 液洗, 梯度乙醇脱水, 环氧树脂包埋, 超薄切片机切片, 醋酸铀和枸橼酸铅双重染色, 置 Hitachi-600 型透射电子显微镜下观察并摄影。

1.6　TUNEL 染色法检测

将单细胞悬液接种于预置小玻片的 12 孔培养板中, 待细胞贴壁生长良好时, 弃原培养液, 加入不同浓度的含药培养基, 置培养箱中培养 48 h, 制成细胞爬片, 4%多聚甲醛固定, PBS 液清洗及平衡缓冲液处理后按试剂盒说明操作。实验同时设 0 mmol/L 药物浓度为空白对照及 DNA 酶 I 处理组为阳性对照。反应完成后, 置载玻片上用显微镜下观察。结果判定: 光镜下观察结果, 计算凋亡指数 AI(apoptotic index), 细胞核染为棕黄色的细胞为凋亡细胞; 随机选取 5 个高倍镜视野(>1 000 细胞), 记数凋亡细胞和总细胞数。AI=凋亡细胞数/总细胞数×100%。

1.7　流式细胞仪检测

细胞接种于 T-25 培养瓶内, 待细胞贴壁良好, 处于对数生长期时, 弃原培养液, 加入不同浓度的含药培养基, 48 h 后, 用 0.25%的胰酶消化制成单细胞悬液, 1 000 r/min 离心弃上清, PBS 洗涤后重悬细胞, 调密度为 1×10^6 个/ml, 400 目筛网过滤 2 次, 沿管壁缓慢加入 1 ml 70%预冷(-20 ℃)乙醇固定, 4 ℃过夜后再经 PBS 洗 2 次, 100 μg/ml RNA 酶 100 μl 消化, 37 ℃ 30 min, 再加入 50 μg/ml PI 染色液 100 μl, 4 ℃下避光染色 30 min 后上机测试, 采用 FACScort 流式细胞仪对样品进行检测, 激发波长 488 nm, 分析软件 CellQuest 计算凋亡率。

1.8　统计学处理

所有实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用 SPSS 11.5 软件进行方差齐性检验、方差分析(LSD 法), 并行相关分析。

2　结果

2.1　塞来昔布对细胞生长的影响

不同浓度塞来昔布作用细胞后, 细胞生长受到不同程度的抑制, 这一抑制作用随塞来昔布浓度的升高而增强; 组间两两均有非常显著性差异($P<0.01$), 见表 1。并且浓度与抑制率间呈现明显的依赖效应, 经相关分析, 两者呈正相关($r=0.914$, $P<0.01$)。

表 1　塞来昔布对细胞的毒性作用

Tab 1　Toxic effect of celecoxib on SMMC-7721cells

Concentration(mmol/L)	A_{490}($\bar{x}\pm s$)	Inhibition rate(%)
0	0.842±0.052	
2	0.667±0.044*	20.78
10	0.561±0.094*	33.37
20	0.433±0.050*	48.57
40	0.295±0.033*	64.96

*: $P<0.01$, *vs* 0 mmol/L

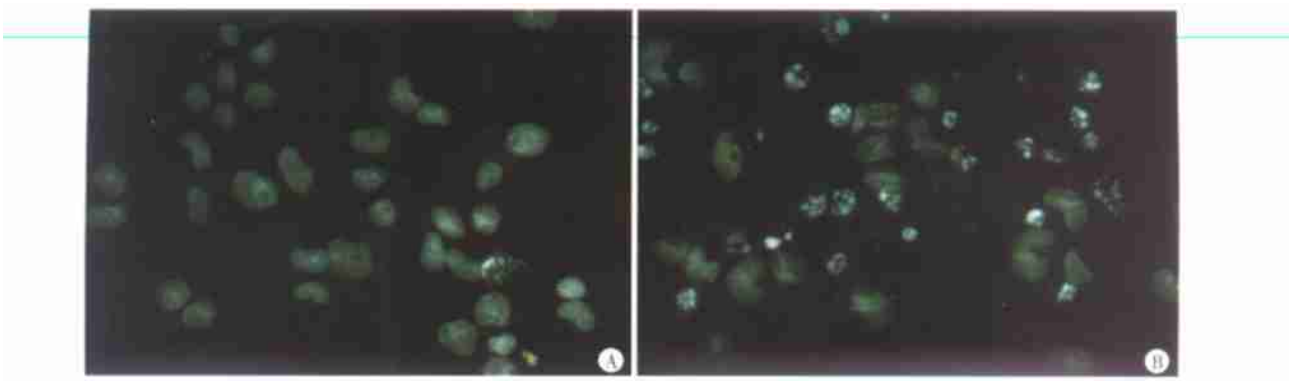
2.2　荧光显微镜观察

经 Hoechst 33258 荧光染色后, 荧光显微镜下见对照组 SMMC-7721 细胞膜完整, 核形态饱满, 核质着色深, 密度均匀一致, 见图 1 A; 而处理组可见部分细胞膜皱缩, 核变小, 染色质浓集, 荧光增强, 并发生浓聚并碎裂呈大小不等, 形似块状、圆形或花瓣状的细胞碎片, 形成凋亡小体, 呈现典型的凋亡形态特征, 见图 1 B。

2.3　透射电镜观察

对照组细胞胞体光滑, 胞质密度高, 细胞器亚微结构清晰, 染色质均匀分散、密度一致, 核仁大且完整; 而经 20 mmol/L 塞来昔布处理的细胞发生皱缩, 起泡, 细胞器尚正常, 核膜消失或突起呈小泡样, 核质浓缩, 发生碎裂, 形成凋亡小体。有的染色质固缩, 沿核膜形成数个团块或成新月形小体, 见图 2。

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



A: Control; B: 40 mmol/L

图 1 塞来昔布作用后 SMMC-7721 细胞凋亡的荧光显微镜结果 (FM × 200)

Fig 1 Apoptosis of SMMC-7721 cells induced by celecoxib (FM × 200)

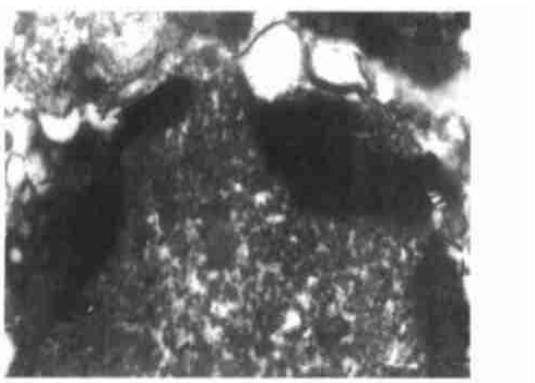


图 2 20 mmol/L 塞来昔布作用后肝癌细胞凋亡透射电镜结果 (× 15 000)

Fig 2 Ultrastructural changes of SMMC-7721 cells treated with 20 mmol/L celecoxib (× 15 000)



图 3 40 mmol/L 塞来昔布作用后 TUNEL 染色法观察肝癌细胞凋亡 (TUNEL× 200)

Fig 3 Apoptosis of SMMC-7721 cells treated with 40 mmol/L celecoxib (TUNEL × 200)

2.4 TUNEL 染色法

对照组少见染为棕黄色的凋亡细胞, 大多为蓝色或深蓝色浓染的正常细胞; 而 40 mmol/L 塞来昔布处理组见较多染为棕黄色的凋亡细胞, 见图 3。随着塞来昔布浓度的增大, 肝癌细胞的凋亡指数逐渐升高; 0 mmol/L(对照组)、2、10、20 及 40 mmol/L 浓度下 SMMC-7721 细胞凋亡指数分别为 2.06%、7.69%、23.72%、25.51%和 45.33%。

2.5 流式细胞仪检测

DNA 直方图上可见细胞凋亡峰。不同浓度塞来昔布作用 SMMC-7721 细胞后, 细胞凋亡率随塞来昔布浓度的增加而升高, 见表 2。两两比较除对照组与 2 mmol/L 组有显著性差异($P<0.05$)外, 其余各组间均有极显著性差异($P<0.01$)。相关分析得浓度与凋亡率两者间呈正相关($r=0.967$, $P<0.01$)。流式细胞仪定量检测的细胞凋亡率与 TUNEL 染色法记数的凋亡指数基本相一致。

表 2 不同浓度塞来昔布对 SMMC-7721 细胞的凋亡作用 ($n=3$)

Tab 2 Effects of different concentrations of celecoxib on the apoptotic rates of SMMC-7721cells ($n=3$)

Concentration(mmol/L)	Apoptotic rate(%, $\bar{x}\pm s$)
0	2.13±0.17
2	7.44±0.34 *
10	19.59±1.73 **
20	29.04±4.18 **
40	42.14±2.40 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* 0 mmol/L

3 讨论

近年来 COX-2 抑制剂对结肠癌、胃癌等肿瘤细胞的生长抑制和凋亡诱导作用国外报道较多[6], 而特异性 COX-2 抑制剂塞来昔布对肝癌细胞的研究还少见报道。本研究中, MTT 实验显示塞来昔布对人肝癌

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

SMMC-7721 细胞有较强的细胞毒性作用, 能抑制癌细胞的生长, 并且抑制率与浓度呈明显的依赖关系。荧光显微镜和透射电镜可见细胞体积缩小、核固缩、染色质边聚及凋亡小体形成等典型细胞凋亡形态学变化, 此结果表明塞来昔布可诱导人肝癌细胞凋亡。TUNEL 原位杂交和流式细胞定量分析进一步从分子水平检测细胞凋亡发生的程度, 其结果一致显示塞来昔布浓度越高, 诱导细胞凋亡作用越强; 与 MTT 法中细胞生长抑制率与浓度的依赖关系相同。此实验结果表明塞来昔布能抑制人肝癌 SMMC-7721 细胞生长和诱导其凋亡, 从药物浓度、细胞生长抑制率和细胞凋亡率看, 诱导肿瘤细胞凋亡可能是塞来昔布抑制人肝癌细胞生长的机制。

塞来昔布是非甾体抗炎药昔布类特异性 COX-2 抑制剂, 1999 年 FDA 批准作为骨关节炎和家族性息肉病的临床治疗用药, 用于结肠肿瘤的治疗亦已进入临床试验。塞来昔布可抑制 COX-2 活性, 从而减少前列腺素 E_2 的合成, 其抗肿瘤作用与前列腺素合成被抑制有关[7]。前列腺素 E_2 能诱导 *bcl*-2、*H-ras*、*K-ras* 等肿瘤基因表达, 并通过旁分泌效应作用于周围细胞[8]; 可提高细胞内 cAMP 的浓度, 抑制细胞凋亡。诱导细胞凋亡、抑制细胞增殖是 COX-2 抑制剂抗肿瘤作用的重要机制之一。Zhu 等[9] 研究发现 COX-2 抑制剂诱导胃癌细胞凋亡有时间和剂量依赖关系。不仅如此, Lim 等[10] 研究发现 COX-2 抑制剂可通过激活 NF-κB 途径而促进细胞凋亡, 抑制胃癌细胞增殖。COX-2 已被视为肿瘤治疗新的靶标。

由于 NSIDS 对 COX-1 的抑制作用, 导致胃肠道、肾脏等器官的副作用, 限制了作为抗肿瘤药物的广泛应用。而新型特异性 COX-2 抑制剂塞来昔布能显著降低不良反应的发生, 同时具有较好肿瘤抑制作用, 随着其作用机制的阐明, 可望成为肿瘤防治的手段之一。

参考文献:

[1] Greenee R T, Hill-Harmon M B, Murray T, *et al*. Cancer statistics, 2001 [J]. CA Cancer J Clin, 2001, 51(1): 15—36.

[2] 宋　军, 钱　伟, 侯晓华. Nimesulide 诱导胃癌细胞凋亡的作用机制研究[J]. 中华消化杂志, 2002, 22(12): 722—725.

[3] Tian G, Yu J P, Luo H S, *et al*. Effect of nimesulide on proliferation and apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells[J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(3): 483—487.

[4] Leng J, Han C, Demetris A J, *et al*. Cyclooxygenase-2 promotes hepatocellular carcinoma cell growth through Akt activation: evidence for Akt inhibition in celecoxib-induced apoptosis[J]. Hepatology, 2003, 38(3): 756—768.

[5] 梅之南, 施　震, 汪细和, 等. COX-2 抑制剂的合成[J]. 中国医药工业杂志, 2000, 31(10): 433—434.

[6] Ricchi P, Zarrilli R, Di Palma A, *et al*. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in colorectal cancer: from prevention to therapy[J]. Br J Cancer, 2003, 88(6): 803—807.

[7] Chen W S, Wei S J, Liu J M, *et al*. Tumor invasiveness and liver metastasis of colon cancer cells correlated with cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and inhibited by a COX-2-selective inhibitor, etodolac[J]. Int J Cancer, 2001, 91(6): 894—899.

[8] Prescott S M, Fitzpatrick F A. Cyclooxygen-2 and carcinogenesis[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1470(2): 69—78.

[9] Zhu G H, Wong B C, Eggo M X, *et al*. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis in gastric cancer cells is blocked by protein kinase activation through inhibition of c-myc[J]. Br J Cancer, 1999, 79(3-4): 390—400.

[10] Lim J W, Kim H, Kim K H. Nuclear factor-κB regulates cyclooxygenase-2 expression and cell proliferation in human gastric cancer cells[J]. Lab Invest, 1999, 81(3): 349—359.

（编辑　张大春）

第六届全国微生态调节剂学术研讨会会讯及征文通知

为了进一步推动和加强微生态调节剂在临床医疗、保健食品、农业、兽医与饲料添加剂及一般食品领域的应用和发展, 提高微生态调节剂科研人员的科研开发能力和其他人员对微生态调节剂的合理应用及相互间的学术交流, 我会决定 2004 年 10 月在重庆召开“全国微生态调节剂第六届学术研讨会”。本次会议由中华医学会微生态学分会主办, 由重庆市预防医学会微生态学专业委员会与第三军医大学实验动物中心共同承办。学术交流内容: 近年来国内外微生态调节剂基础理论研究的进展、文献综述、专题讲座; 微生态调节剂的研究、开发及生产、检验和质控等方面的论文; 微生态调节剂在医学、保健食品、农业、兽医与饲料添加剂及一般食品领域的应用。本次学术研讨会是 21 世纪初我国微生态学术领域的一次盛会, 届时邀请国内著名专家做专题讲座, 欢迎微生态制剂研发单位、广大科研、医务、开发、生产与相关人员踊跃参加。会议征文按《中国微生态学杂志》要求的格式投稿, 截稿日期为 2004 年 8 月 31 日。

地　址: 重庆市高滩岩第三军医大学实验动物中心　　邮　编: 400038

联系人: 袁　静　　电　话: (023)68753882　　E-mail: weihong@mail.tmmu.com.cn

中华预防医学会微生态学分会

2004 年 4 月

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