

[文章编号] 1000- 4718(2006)02- 0368- 04

阿司匹林对胰腺癌细胞周期的影响及其机制*

韩际奥[#], 陈其奎[△], 黄志清, 黄开红, 陈锦武, 朱兆华
(中山大学附属第二医院消化内科, 广东 广州 510120)

[摘要] 目的: 观察阿司匹林及其催化产物前列腺素 E₂(PGE₂) 对胰腺肿瘤细胞周期及细胞周期相关蛋白 p21^{Waf1/cip1}、p27^{Kip1/pic2} 表达的影响, 探讨阿司匹林抗胰腺癌的作用机制。方法: 以阿司匹林和 PGE₂ 处理胰腺癌细胞后, 分别采用 MTT 检测细胞活力、ELISA 检测细胞内 PGE₂ 浓度、流式细胞仪检测细胞周期变化、Western blotting 检测细胞周期相关蛋白 p21^{Waf1/cip1} 和 p27^{Kip1/pic2} 的表达水平。结果: 阿司匹林可抑制胰腺癌细胞生长并呈剂量依赖性减少细胞内 PGE₂ 的生成; 阿司匹林可诱导细胞周期相关蛋白 p21^{Waf1/cip1} 和 p27^{Kip1/pic2} 表达升高并引起细胞阻滞在 G₀/G₁ 期。但外源性 PGE₂ 并不能拮抗阿司匹林对细胞活力、细胞周期及细胞周期相关蛋白的影响。结论: 阿司匹林抑制胰腺癌细胞的生长可能并非完全通过环氧合酶途径; 诱导 p21^{Waf1/cip1} 和 p27^{Kip1/pic2} 表达的升高, 进而诱导细胞周期的阻滞可能是其作用机制之一。

[关键词] 胰腺肿瘤; 阿司匹林; 前列腺素 E 类; 细胞周期
[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Effects of aspirin on cell cycle in pancreatic carcinoma cells

HAN Ji-ao, CHEN Qi-kui, HUANG Zhi-qing, HUANG Kai-hong, CHEN Jing-wu, ZHU Zhao-hua

(Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To observe the effects of aspirin and prostaglandin E₂(PGE₂) on the cell viability and cell cycle in SW1990 human pancreatic carcinoma cell lines, and to investigate the mechanisms of aspirin-induced growth inhibition and cell cycle arrest. **METHODS:** After incubated with aspirin or PGE₂ and their combination, the viability of SW1990 cells was measured by MTT assay. The levels of intracellular PGE₂ were determined by ELISA. The effects of aspirin or PGE₂ on cell cycle were investigated by flow cytometry (FCM). The expression of p21^{Waf1/cip1} and p27^{Kip1/pic2} (the cyclin-dependent kinase inhibitors) were analyzed by Western blotting. **RESULTS:** Aspirin could inhibit the growth of cells and level of intracellular PGE₂ in a dose-dependent manner. Aspirin enhanced the expression of p21^{Waf1/cip1} and p27^{Kip1/pic2} and induced cell cycle arrest at G₀/G₁ phase. PGE₂ increased the cell viability of SW1990 cells. However, it couldn't antagonize the changes of cell viability and cell cycle that induced by aspirin. **CONCLUSIONS:** The inhibitory effects of aspirin on growth and cell cycle of pancreatic carcinoma cells might not be mediated by a COX-dependent pathway completely. Cell cycle arrest induced by aspirin might be associated with up-regulation of p21^{Waf1/cip1} and p27^{Kip1/pic2}.

[KEY WORDS] Pancreatic neoplasms cells; Aspirin; Prostaglandins E; Cell cycle

阿司匹林是一类具有消炎、解热、镇痛及抗风湿病作用的药物^[1], 同时广泛应用于心脑血管疾病的预防和治疗。在长期的临床应用中发现它们可以预防或降低肿瘤(尤其是消化系肿瘤)的发病率, 动物实验也证实它们可以抑制肿瘤的发生、发展^[2-4]。研究发现, 其发挥药理作用的基础是抑制前列腺素(PGs)合成过程中的重要限速酶——环氧合酶(COX), 从而

抑制 PGs 的合成^[5]。但近年的研究发现^[6,7], 阿司匹林抑制 COX 的活性并不能完全解释其抑制肿瘤发生、发展的整个过程, 可能还存在其他非 COX 机制。本研究在观察阿司匹林及其催化产物 PGE₂ 对胰腺肿瘤细胞作用基础之上, 检测它们对细胞周期及细胞周期相关蛋白 p21^{Waf1/cip1}、p27^{Kip1/pic2} 表达的影响, 从新的角度探讨阿司匹林抗胰腺癌的作用机制。

[收稿日期] 2005- 03- 28 [修回日期] 2005- 07- 05

* [基金项目] 广东省自然科学基金资助项目(No. 984211)

现在河南省郑州市第五人民医院消化科工作

△ 通讯作者 Tel: 020- 81332598; E-mail: qkchen@21cn.com

材 料 和 方 法

1 材料与试剂

SW1990 细胞株从美国 California 大学引进, 中山大学附属二院消化实验室提供, RPMI-1640 (Gibco-BRL 公司) 培养基体外培养传代。阿司匹林和 PGE₂ (Cayman 公司) 以二甲基亚砜 (DMSO) 配成 200 倍浓度的储存液, 使用前以新鲜培养基配制成所需的浓度。ELISA 试剂盒购自 Amersham 公司。小鼠抗人 p21^{Waf1/cip1}、p27^{Kip1/pic2} 和 actin 单克隆抗体均购自 Neomark 公司。Western blotting 试剂盒购自武汉博士德公司。酶标仪 (美国 Labsystem Dragon, Wellscan MK3 型), 低温高速离心机 (德国 Heraeus), 流式细胞仪 (美国 Becton Dickinson), 垂直电泳槽 (美国 BIO-RAD), 半干转印机 (美国 BIO-RAD), 彩色图像摄录输入仪 (日本 JVCKY-F308-3-CCD), 全自动图像分析系统 (德国 Kontron IBAS2.0)。

2 实验分组

实验分为: 空白对照组, 对照组 (DMSO 组), 阿司匹林组 (ASA 100 μmol/L), PGE₂ 组 (10 nmol/L), 阿司匹林与 PGE₂ 联用组 (A+P) 5 组 (下同, 另有分组说明的除外)。

3 检测胰腺癌细胞的活力采用 MTT 法

SW1990 胰腺癌细胞以 5×10^3 cells/well 接种细胞至 96 孔板上 (每组设 8 个复孔), 24 h 之后换含不同浓度或不同种类药物的新培养基, 作用 72 h 之后再加 MTT 孵育 4 h, 酶标仪 A₅₉₅ 检测吸光度值。

4 细胞内 PGE₂ 水平的检测采用 ELISA 法

以 1×10^4 cells/well 接种细胞至 96 孔板上 (每组设 3 个复孔, 实验重复两次), 培养 24 h 之后换含不同浓度阿司匹林 (浓度分别为 0、125、250、500、1 000 和 2 000 μmol/L) 的新培养基中作用 72 h 后采用酶联免疫分析 (ELISA) 试剂盒 (最低检测浓度 50 ng/L) 进行测定细胞内 PGE₂ 浓度, 按操作说明进行检测。

5 细胞周期检测采用流式细胞仪进行检测

各处理组 (每组 4 个复孔) 细胞培养 24 h 后, 以 70% 冰乙醇 4 °C 固定过夜, 然后经 RNA 酶处理和碘化丙啶 (PI) 染色, 流式细胞仪进行检测。

6 p21^{Waf1/cip1} 和 p27^{Kip1/pic2} 蛋白质的表达采用 Western blotting 法

将对照组及各处理组细胞裂解提取细胞蛋白, 进行 SDS-PAGE 电泳, 然后以半干转印机转移至 PVDF 膜上, 之后以鼠抗人 p21^{Waf1/cip1}、p27^{Kip1/pic2}、β-actin 单克隆抗体为 I 抗进行 Western blotting。DAB

显色后进行图像分析。即显色的 PVDF 膜经 JVC Ky-F308-3-CCD 彩色图像摄录输入仪扫描进计算机后, 采用 Kontron IBAS 2.0 全自动图像分析系统进行显色条带的平均吸光度 (A) 和发光面积 (Area) 的测定。每一条带蛋白的含量用此条带的累积吸光度 (Ac) 的数值表示 ($Ac = A \times Area$)。p21^{Waf1/cip1} 和 p27^{Kip1/pic2} 蛋白的相对含量以与同一标本的 actin 蛋白含量的比值来表示, 即 Ac_{p21}/Ac_{actin} 和 Ac_{p27}/Ac_{actin} 。

7 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。单药处理组的组间比较采用单因素方差分析; 两种药物处理组间相互作用的比较采用两因素析因设计方差分析 (the factorial experiment)。全部统计分析用 SPSS for Windows 10.0 统计软件包完成。

结 果

1 阿司匹林和 PGE₂ 联合应用对胰腺癌细胞活力的影响

实验结果显示, 阿司匹林对 SW1990 细胞具有明显的生长抑制作用 ($P < 0.01$)。单用 PGE₂ 具有促进 SW1990 细胞增殖的作用 ($P < 0.05$)。但析因设计方差分析并没有发现 PGE₂ 和阿司匹林之间有相互影响 ($P > 0.05$)。即 PGE₂ 并不能阻断阿司匹林的肿瘤细胞生长抑制作用 (图 1)。

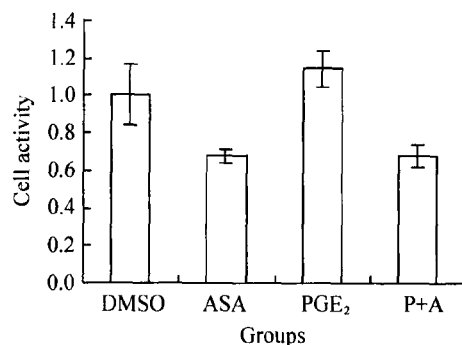


Fig 1 PGE₂ could not inhibit the effects of ASA on cell activity in SW1990 cells analyzed with the factorial experiment. $\bar{x} \pm s$, $n = 8$. $P > 0.05$.

图 1 阿司匹林和 PGE₂ 对 SW1990 细胞活力的影响

2 阿司匹林对细胞内 PGE₂ 水平的影响

以不同浓度的阿司匹林作用 SW1990 细胞 24 h 之后, 即可观察到细胞内 PGE₂ 水平有明显的下降, 而且具有浓度依赖作用。即使是较低浓度的阿司匹林 (125 μmol/L) 也使 PGE₂ 的水平下降了约 30%, 在较高浓度组 (2 000 μmol/L), 其 PGE₂ 水平已下降到可测水平以下 (图 2)。

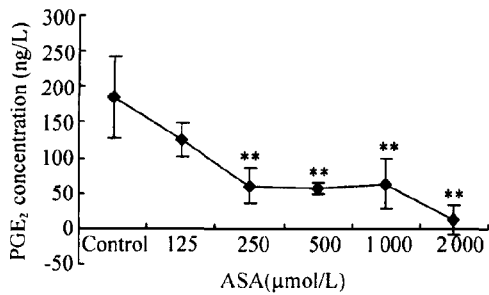


Fig 2 Effects of ASA on intracellular PGE₂ in SW1990 cells for 24 h. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. ** $P < 0.01$ vs control.

图2 阿司匹林对 SW1990 细胞内 PGE₂ 水平的影响

3 阿司匹林和 PGE₂ 对细胞周期的影响

在以阿司匹林或(和)PGE₂ 作用于 SW1990 细胞 24 h 后, 收集细胞固定染色做流式细胞仪检测(图 3)。结果显示阿司匹林组的 G₀/G₁ 期细胞比例比对照组高约 13.1%, 而 PGE₂ 对 G₀/G₁ 期细胞比例几乎没有影响($P < 0.05$)。阿司匹林与 PGE₂ 联用组的 G₀/G₁ 期细胞比例高于对照组(13.9%), 析因分析发现阿司匹林的效应具有统计学意义($P < 0.05$), 但未发现阿司匹林和 PGE₂ 之间有相互作用($P > 0.05$)。

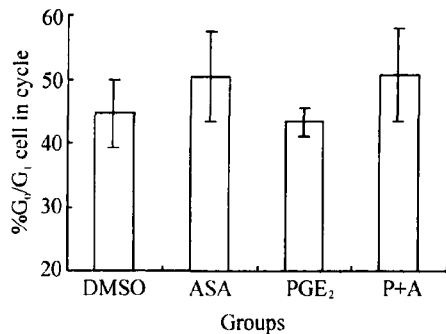


Fig 3 PGE₂ could not inhibit the effects of ASA on G₀/G₁ phase in SW1990 cells analyzed with the factorial experiment. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$. $P > 0.05$.

图3 阿司匹林和 PGE₂ 对 SW1990 细胞 G₀/G₁ 期的影响

4 阿司匹林和 PGE₂ 对胰腺癌细胞 p21^{Waf1/cip1} 蛋白表达的影响

图像分析结果显示阿司匹林作用于 SW1990 细胞 24 h 之后, 其 p21^{Waf1/cip1} 蛋白水平有明显的增高($P < 0.01$)。但 PGE₂ 组 p21^{Waf1/cip1} 蛋白水平无明显变化($P > 0.05$)。析因设计方差分析未发现此两种药物之间具有相互作用($P > 0.05$), 即 PGE₂ 并不能拮抗阿司匹林诱导的 p21^{Waf1/cip1} 蛋白表达的升高(图 4)。

5 阿司匹林和 PGE₂ 对胰腺癌细胞 p27^{Kip1/pic2} 蛋白表达的影响

与 p21^{Waf1/cip1} 类似, 阿司匹林组的 p27^{Kip1/pic2} 蛋白

水平明显高于对照组($P < 0.05$)。而 PGE₂ 组的 p27^{Kip1/pic2} 蛋白水平有不明显下降($P > 0.05$)。阿司匹林与 PGE₂ 联用组的 p27^{Kip1/pic2} 蛋白水平与阿司匹林组相似, 亦有明显上升。析因设计分析未发现阿司匹林与 PGE₂ 之间有相互作用($P > 0.05$) (图 4)。

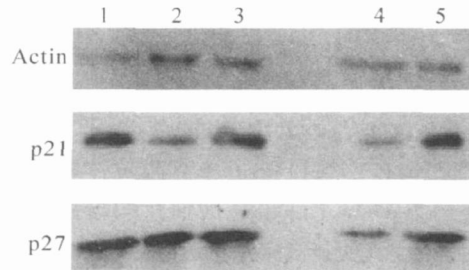


Fig 4 Western blotting of p21 and p27 treated with ASA and PGE₂. Lane 1: control; Lane 2: DMSO; Lane 3: ASA; Lane 4: PGE₂; Lane 5: ASA and PEG₂.

图4 阿司匹林和 PGE₂ 处理 24 h 之后的 Western blotting

讨 论

近年来的临床流行病学研究表明, 阿司匹林可降低多种消化系肿瘤的发病率^[2,4]。在本研究中也发现, 阿司匹林可抑制体外培养的胰腺癌细胞的生长。这与我们以前的报道是一致的^[8]。Anderson 等^[9]报道阿司匹林可呈剂量依赖性地减少胰腺癌的发生率, 其相对风险因子为 0.57。而其它非甾体类抗炎药(NSAIDs)并没有预防胰腺癌的作用。但另一个关于胰腺癌的大规模的前瞻性研究却发现长期(> 20 年)使用阿司匹林不仅不能减少妇女胰腺癌的发生率, 还会增加妇女胰腺癌的发生率, 其相对风险为 1.58, 而且发生胰腺癌的风险与阿司匹林的使用剂量成正相关^[10]。

本研究在检测阿司匹林对细胞周期的分布的影响时发现: 阿司匹林组的 G₀/G₁ 期的细胞比例明显高于对照组, 表明阿司匹林改变了 SW1990 细胞的周期分布, 引起肿瘤细胞阻滞在 G₀/G₁ 期。与此同时, 阿司匹林处理组的 p21^{Waf1/cip1} 和 p27^{Kip1/pic2} 的蛋白水平也明显高于对照组。p21^{Waf1/cip1} 和 p27^{Kip1/pic2} 是细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂, 它们可通过抑制 CDK2/CDK4 的活性而诱导细胞周期的阻滞。故推测在阿司匹林诱导的细胞周期阻滞中, p21^{Waf1/cip1} 和 p27^{Kip1/pic2} 可能发挥了重要的中介作用。

在肿瘤组织(如结肠癌、胃癌)中往往伴随着 PGs 水平的升高^[11]。有报道在用 NSAIDs 处理肿瘤细胞(恶性黑色素瘤或胃癌)时, 在其发挥抑制肿瘤作用

的同时,可以观察到 PGs 水平的下降^[12,13]。应用外源 PGE₂ 不仅有促生长作用,还可促进肿瘤浸润和血管生成等作用^[14]。故推测 PGs 在 NSAIDs 的抑制肿瘤机制中发挥了重要的作用。但 Denkert 等在对恶性黑色素瘤、结肠癌的研究中发现 PGE₂ 并不能拮抗 NSAIDs 的抑制肿瘤浸润或增生作用^[13]。在本研究中也发现类似现象。本研究中,阿司匹林呈剂量依赖性的降低细胞内 PGE₂ 水平,提示阿司匹林在作用于 SW1990 细胞之后,确实抑制了 COX 的活性,从而减少了 PGs 的产生。但在随后的干预试验中,虽然 PGE₂ 可增强胰腺肿瘤细胞的活力并降低 p21^{Waf1/cip1} 和 p27^{Kip1/pic2} 的蛋白表达,但添加外源 PGE₂ 既不能拮抗阿司匹林的肿瘤生长抑制作用,也不能拮抗阿司匹林的诱导细胞周期阻滞作用,又不能拮抗阿司匹林诱导的 p21^{Waf1/cip1} 和 p27^{Kip1/pic2} 基因转录和表达的改变。上述结果表明 PGE₂ 在阿司匹林诱导的胰腺癌细胞周期阻滞中未能发挥主导作用。可能还存在着另外的一个非 PGE₂(COX) 途径。对于非 PGE₂ 途径,阿司匹林可以通过抑制 COX 的活性减少 PGE₂ 产生,但这种 COX 活性和 PGE₂ 的变化只是阿司匹林对抗肿瘤细胞作用的一个副产品,其在 NSAIDs 的抗癌机制中并不太重要,至少说不是唯一的作用途径。

胰腺癌的防治是一项艰巨的任务,阿司匹林等 NSAIDs 具有抑制胰腺肿瘤细胞生长的作用,有可能在未来胰腺癌防治中发挥一定的作用,但其确切的抗肿瘤机制还有待进一步的研究。

[参 考 文 献]

- [1] 褚志强,尤承忠,秦永林,等. 炎症和凝血活化亢进在仓鼠胆囊胆固醇结石形成中作用的实验研究[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(9): 1817- 1820.
- [2] Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, et al. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase- 2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis[J]. N Engl J Med, 2000, 342(26): 1946 - 1952.
- [3] Souza RF, Shewmake K, Beer DG, et al. Selective inhibition of cyclooxygenase- 2 suppresses growth and induces apoptosis in human esophageal adenocarcinoma cells[J]. Cancer Res, 2000, 60(20): 5767- 5772.
- [4] Gonzalez- Perez A, Garcia Rodriguez LA, Lopez- Ridaura R. Effects of non- steroidal anti- inflammatory drugs on cancer sites other than the colon and rectum: a meta- analysis [J]. BMC Cancer, 2003, 3(1): 28.
- [5] 张德昌 主编. 医学药理学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997. 520- 574.
- [6] Slattery ML, Samowitz W, Hoffman M, et al. Aspirin, NSAIDs, and colorectal cancer: possible involvement in an insulin - related pathway [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2004, 13(4): 538- 545.
- [7] Yoo CG, Lee S, Lee CT, et al. Effect of acetylsalicylic acid on endogenous I kappa B kinase activity in lung epithelial cells [J]. Am J Physiol, 2001, 280(1): L3- L9.
- [8] 王海霞,陈其奎. 环氧合酶- 2 在胰腺癌中的表达及其抑制剂对细胞生长活力和凋亡的影响[J]. 中华消化杂志, 2003, 23(2): 114- 115.
- [9] Anderson KE, Johnson TW, Lazovich D, et al. Association between nonsteroidal anti- inflammatory drug use and the incidence of pancreatic cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2002, 94(15): 1168- 1171.
- [10] Schernhammer ES, Kang JH, Chan AT, et al. A prospective study of aspirin use and the risk of pancreatic cancer in women [J]. J Natl Cancer Inst, 2004, 96(1): 22- 28.
- [11] Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Cyclooxygenase- 2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(1): 135- 138.
- [12] 李 玲,吴开春,吴汉平,等. 人胃癌细胞中 COX- 2 基因的表达及其生物学活性[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2000, 16(3): 255- 259.
- [13] Denkert C, Kobel M, Berger S, et al. Expression of cyclooxygenase 2 in human malignant melanoma [J]. Cancer Res, 2001, 61(1): 303- 308.
- [14] Sheng H, Shao J, Washington MK, et al. Prostaglandin E₂ increases growth and motility of colorectal carcinoma cells[J]. J Biol Chem, 2001, 276(21): 18075- 18081.