

· 基础论著 ·

帕瑞昔布对非小细胞肺癌细胞株 A549 增殖和迁移的影响

刘晨辉 鲍红光 葛亚力 王书奎 王晓亮 沈妍

【摘要】目的 研究帕瑞昔布对非小细胞肺癌 A549 细胞增殖和迁移的影响,并探讨其可能机制。**方法** 采用随机数字表法将 A549 细胞随机分为四组:对照组(C组),10 $\mu\text{mol/L}$ 帕瑞昔布(P₁组)、40 $\mu\text{mol/L}$ 帕瑞昔布组(P₂组)和 160 $\mu\text{mol/L}$ 帕瑞昔布组(P₃组)。C组细胞常规培养,P₁、P₂和P₃组细胞分别用终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$ 和 160 $\mu\text{mol/L}$ 的帕瑞昔布处理 A549 细胞 24 h。MTT 法检测各组细胞的增殖情况,划痕试验检测各组细胞的迁移能力,Western blot 法检测各组细胞 p-AKT、survivin 的表达情况。**结果** 与C组比较,P₁、P₂和P₃组细胞的增殖抑制率依次增高($P < 0.05$),P₁、P₂和P₃组细胞的迁移距离依次降低($P < 0.05$),P₁、P₂和P₃组细胞 p-AKT 和 survivin 的表达水平依次降低($P < 0.05$),且呈剂量依赖性。**结论** 帕瑞昔布可以抑制 A549 细胞的增殖和迁移,其机制可能是抑制 p-AKT 和 survivin 的表达。

【关键词】 癌,非小细胞肺; 细胞增殖; 细胞运动; 帕瑞昔布

Effect of parecoxib on proliferation and movement in non-small cell lung cancer cell line A549 LIU Chen-hui, BAO Hong-guang, GE Ya-li, WANG Shu-kui, WANG Xiao-liang, SHEN Yan. Department of Anesthesiology, Affiliated Nanjing Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China
Corresponding author: BAO Hong-guang, Email: hongguang_bao@hotmail.com

【Abstract】Objective To study the effect of parecoxib on proliferation and movement in non-small cell lung cancer cell line A549. **Methods** The A549 cells were randomly divided into 4 groups: control group and different concentrations of parecoxib groups (P1-3 groups). The cells in parecoxib groups were exposed to 10, 40 and 160 $\mu\text{mol/L}$ parecoxib for 24 h respectively. The rates of proliferation inhibition were analyzed via a MTT assay, the distances of movement were detected by wound-healing experiment, and the expression of p-AKT and survivin protein were detected via Western blot analysis. **Results** Compared with C group, the rates of proliferation inhibition were significantly increased ($P < 0.05$), the distances of movement were significantly decreased, and the expression of p-AKT and survivin proteins were significantly down-regulated ($P < 0.05$) in P1, P2 and P3 groups. All results showed a dose-dependent manner. **Conclusions** The parecoxib inhibits the proliferation and movement of A549 cells. This function of parecoxib may be related to the inhibition of AKT phosphorylation and down-regulation of survivin protein.

【Key words】 Carcinoma, non-small-cell lung; Cell proliferation; Cell movement; Parecoxib

我国肺癌的发生率和死亡率居各种恶性肿瘤之首,肺癌主要分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),其中 NSCLC 约占 80%,治疗以外科手术为主,但是其术后转移率高,五年生存率低^[1]。肿瘤切除的围术期是肿瘤细胞增殖、扩散和转移的高危时期。在 NSCLC 等恶性肿瘤中,环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)高表达,与肿瘤细胞的增殖、扩散和转移密切相关^[2]。新近的研究表明,围术期

应用 COX-2 抑制剂可以减少肿瘤细胞的增殖、扩散和转移,帕瑞昔布是新型的高选择性 COX-2 抑制剂,是麻醉医师在围术期常用的镇痛药物,其对 NSCLC 细胞增殖和迁移的影响尚不清楚。本研究拟采用不同浓度的帕瑞昔布处理 NSCLC 细胞株 A549,观察其对 A549 细胞增殖和迁移的影响,并探讨可能机制。

材料与方 法

1. 主要药品和试剂: RPMI-1640 培养基,胎牛血清(Fetal Calf Serum, FCS)为美国 Gibco 公司产品;胰蛋白酶,二甲亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)为美国 Sigma 公司产品;四氮嘧啶盐(MTT)、牛血清蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;帕瑞昔布为美国 Pfizer 公司产品(批号:A24R8);兔抗人

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.04.049

基金项目:南京市医学科技发展重点项目(201108028)

作者单位:210006 南京医科大学附属南京医院(南京市第一医院)麻醉科

通讯作者:鲍红光,Email:hongguang_bao@hotmail.com

p-AKT 多克隆抗体,兔抗人 survivin 多克隆抗体,Western blot 用二抗,兔抗人多克隆 anti- β -actin 抗体为美国 Cell Signaling 公司产品。

2. 细胞培养及分组:A549 细胞购自中科院上海细胞保藏中心。细胞培养于含 10% FCS、青霉素(100 U/ml),链霉素(100 μ g/ml),谷氨酸盐(2 mmol/L)的 RPMI-1640 培养基中。于 37 $^{\circ}$ C、饱和湿度下 5% CO_2 的培养箱中培养,细胞呈单层贴壁生长,每 2 d 更换 1 次培养基。实验均取处于对数生长期的细胞,制备成单细胞悬液。每项实验均采用随机数字表法,将细胞随机分为四组:对照组(C组)、10 μ mol/L 帕瑞昔布组(P_1 组)、40 μ mol/L 帕瑞昔布组(P_2 组)和 160 μ mol/L 帕瑞昔布组(P_3 组)。C 组细胞正常培养, P_1 、 P_2 和 P_3 组细胞分别采用终浓度为 10 μ mol/L、40 μ mol/L 和 160 μ mol/L 帕瑞昔布处理 24 h。

3. MTT 法检测细胞的增殖情况:调整细胞浓度为 1×10^4 个/ml,将细胞接种于 96 孔板,每孔加入细胞悬液 200 μ l。将培养板置于 37 $^{\circ}$ C、饱和湿度下 5% CO_2 的培养箱中培养 24 h 后, P_1 、 P_2 和 P_3 组分别加入用 RPMI-1640 培养基配制的帕瑞昔布溶液,使帕瑞昔布的终浓度分别为 10 μ mol/L、40 μ mol/L 和 160 μ mol/L,终体积为 200 μ l。C 组各孔中只加入 RPMI-1640 培养基。每组设 6 个复孔。再将各组细胞孵育 24 h 后,立即弃去上清,每孔加入 5 g/L 的 MTT 20 μ l,混匀后于 37 $^{\circ}$ C、饱和湿度下 5% CO_2 的培养箱中培养 4 h。弃上清后每孔加入 150 μ l 的 DMSO,10 min 后以全自动酶标仪检测波长 570 nm 的每孔吸光度值(A 值)。采用以下公式计算各孔细胞的生长抑制率:肿瘤细胞生长抑制率 = (1 - 处理组平均 A 值/对照组平均 A 值) \times 100%。

4. 划痕试验检测 A549 细胞的迁移情况:取对数生长期的 A549 细胞,胰酶消化,制备单细胞悬液。将细胞稀释至 5×10^6 /L,接种至 96 孔板中,置于 37 $^{\circ}$ C、饱和湿度下 5% CO_2 的培养箱中培养。待细胞生长至单层后弃去培养基,用 200 μ l 的灭菌枪头在单层细胞上划痕。用 PBS 洗去死细胞后, P_1 、 P_2 和 P_3 组分别加入用 1% DMSO 配制的帕瑞昔布溶液,使帕瑞昔布的终浓度分别为 10 μ mol/L、40 μ mol/L 和 160 μ mol/L,终体积为 200 μ l。C 组各孔中只加入 1% DMSO 溶液。每组设 6 个复孔。再将各组细胞孵育 24 h 后,倒置显微镜下观察细胞的生长情况。用 Image-pro plus 软件分别测量各组细胞划痕边界的距离,迁移距离 = 处理前的距离 - 处理后的距离。

5. Western blot 法检测 p-AKT、survivin 的表达:取对数生长期的细胞,经胰酶消化后以 5×10^4 个/L 浓度

接种于细胞培养瓶内。24 h 贴壁后, P_1 、 P_2 和 P_3 组分别加入用 RPMI-1640 培养基配制的帕瑞昔布溶液,使帕瑞昔布的终浓度分别为 10 μ mol/L、40 μ mol/L 和 160 μ mol/L,C 组培养瓶中只加入 RPMI-1640 培养基。继续孵育各组细胞 24 h 后,取各组细胞,加入 RIPA 裂解液,冰浴 30 min 后 12 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,提取各处理组及对照组蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。将蛋白样品作 SDS-PAGE 电泳后转膜,5% 脱脂奶粉封闭,4 $^{\circ}$ C 下加入相应一抗,孵育过夜。常温下加入相应二抗孵育 1 h,然后转入暗室加 ECL 发光液,胶片曝光。内参照采用 β -actin,并用 Smartview 软件进行分析。

6. 统计学处理:采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK 法(q 检验), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 不同浓度帕瑞昔布对 A549 细胞增殖和迁移的影响(表 1):与 C 组比较, P_1 、 P_2 和 P_3 组细胞的增殖抑制率依次增高($P < 0.05$),迁移距离依次降低($P < 0.05$)。

表 1 不同浓度帕瑞昔布对 A549 细胞增殖和迁移的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	增殖抑制率(%)	迁移距离(μ m)
C 组	6	9.07 \pm 2.09	292.33 \pm 27.20
P_1 组	6	14.81 \pm 3.14 ^a	262.67 \pm 22.46 ^a
P_2 组	6	22.37 \pm 4.27 ^{ab}	225.33 \pm 16.13 ^{ab}
P_3 组	6	30.15 \pm 4.89 ^{abc}	196.67 \pm 17.41 ^{abc}

注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 P_1 组比较,^b $P < 0.05$;与 P_2 组比较,^c $P < 0.05$

2. 不同浓度帕瑞昔布对 A549 细胞 p-AKT 和 survivin 蛋白表达的影响(图 1):与 C 组比较, P_1 、 P_2 和 P_3 组细胞 p-AKT 和 survivin 蛋白的表达依次下调($P < 0.05$)。

讨 论

COX-2 是催化花生四烯酸合成前列腺素的限速酶,在不同组织学类型的肺癌中检出率有差异,其高表达主要见于 NSCLC^[3],发挥强烈的抗细胞凋亡、促细胞增殖和转移的作用,因此 COX-2 已经成为治疗 NSCLC 的新靶点。许多实验表明,COX-2 抑制剂能够抑制 A549 细胞的增殖和转移,诱导细胞凋亡^[4-5]。COX-2 抑制剂还能增加 NSCLC 患者对放疗的敏感性^[6]。本实验所用的帕瑞昔布是一种新型的高度选择性 COX-2 抑制剂,是麻醉医师在围术期常用的镇痛药物。根据

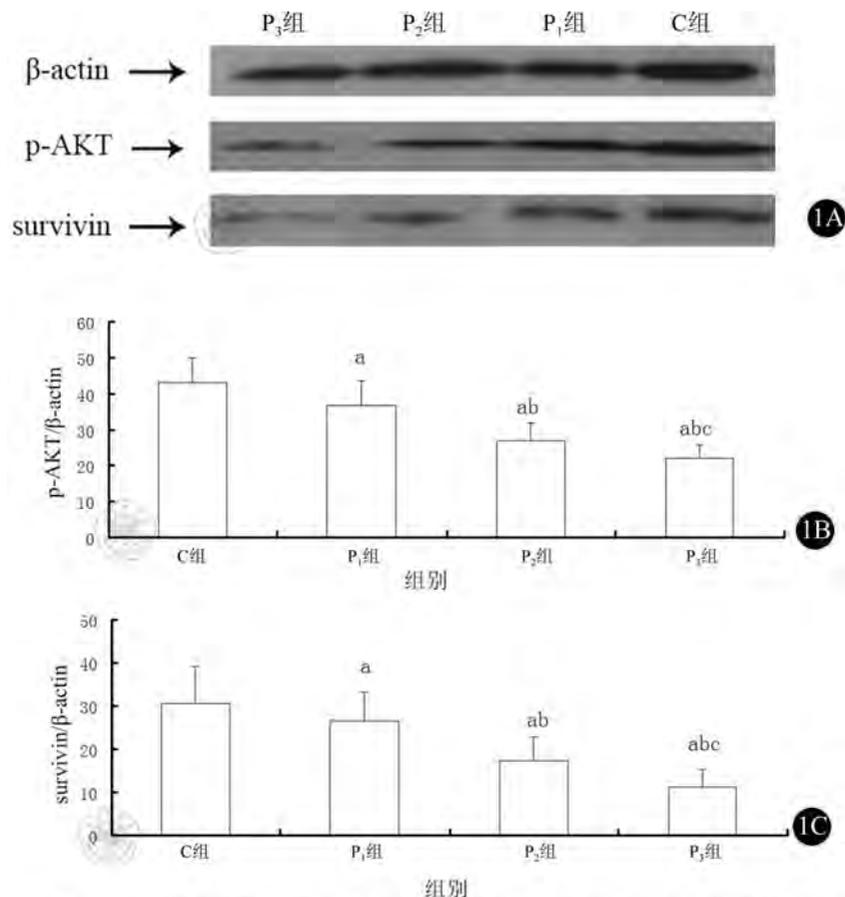


图1 不同浓度帕瑞昔布对A549细胞p-AKT和survivin蛋白表达的影响。与C组比较, ^a $P < 0.05$; 与P₁组比较, ^b $P < 0.05$; 与P₂组比较, ^c $P < 0.05$

文献^[7],结合我们前期的预实验结果,本研究选择帕瑞昔布作用于A549细胞的终浓度分别为10 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$ 和160 $\mu\text{mol/L}$ 。帕瑞昔布的半衰期为8 h^[8],围术期主要用于术后24 h内镇痛,因此本研究选择帕瑞昔布作用于A549细胞的时间为24 h。

目前,NSCLC的治疗以手术为主,手术中接触和分离瘤体可以促使更多的肿瘤细胞种植^[9]。切除瘤体会抑制患者体内自然杀伤细胞的活性,降低机体的免疫力,促进肿瘤的种植与转移^[10]。手术创伤增加机体的应激性反应,使免疫系统的功能受到抑制,尤其对细胞免疫有显著的影响,与机体术后感染、伤口愈合和肿瘤转移扩散密切相关^[11]。因此,围术期是肿瘤扩散和转移的高危时期。近期的研究发现,肿瘤切除之前使用COX-2抑制剂可以减弱播散入血的肿瘤细胞的迁移性和黏附性,从而减少肿瘤细胞的播散和转移^[12]。Glasner等^[13]的一项动物实验表明,在Lewis肺癌的小鼠模型中,围术期使用COX-2抑制剂可以明显减少肿瘤切除术中肿瘤细胞的转移,提高小鼠的术后生存率。Benish等^[14]的另一项动物实验提示,围术期应用COX-2抑制剂可以明显减少肿瘤细胞转移的风险。

AKT是AKT信号通路中的关键酶,它是一种丝氨

酸/苏氨酸蛋白激酶,在细胞存活和凋亡中起重要作用。AKT在PI3K、PDK1、ILK的作用下,发生2个位点的磷酸化(催化结构域的Thr308位点和调节结构域的Ser473位点),只有2个位点的磷酸化才能使AKT充分活化^[15]。活化的AKT在介导细胞的增殖、抗细胞凋亡及促进细胞的迁移和侵袭中有重要作用。许多因素都可以促进AKT的活化。NSCLC中高表达的COX-2可以促进花生四烯酸合成前列腺素(PG),前列腺素E₂(PGE₂)通过与细胞膜表面的4型前列腺素EP(EP₄)受体结合,活化AKT信号通路,进而磷酸化下游的糖原合成激酶-3(GSK-3)等与抑制细胞生长、促进细胞凋亡有关的调控蛋白而使其失去活性,发挥强烈的促细胞增殖,抗细胞凋亡,促进肿瘤细胞迁移及血管生成,抑制宿主免疫反应等作用^[16-17]。本研究中MTT法的结果显示,帕瑞昔布可以抑制A549细胞的增殖;划痕试验的结果表明,帕瑞昔布可以抑制A549细胞的迁移,且都呈剂量依赖性,与文献报道一致。Western blot的结果表明,帕瑞昔布可以抑制p-AKT的表达,表明帕瑞昔布抑制A549细胞的增殖和迁移可能是因为它抑制了AKT的磷酸化。

survivin属于凋亡抑制蛋白家族(inhibitor of apop-

tosis proteins, IAPs) 的一员,是迄今为止发现的最强的凋亡抑制因子之一。survivin 的表达有明显特异性,在成人正常分化成熟的组织中不表达或者低表达,而在 NSCLC 中表达率高达 90% 以上,能抑制多种因素诱导的细胞凋亡^[18]。survivin 还可以通过调控细胞周期的 G2/M, 促进细胞的有丝分裂过程,从而促进细胞的增殖^[7]。survivin 的表达受到多种因素的影响,AKT 是影响因子之一。在许多肿瘤细胞中,高表达的 p-AKT 可以上调 survivin 的表达,而 AKT 信号通路受到抑制会下调 survivin 的表达^[19]。Asanuma 等^[20]的研究证实,在乳腺癌细胞中,特异性的 PI3K/AKT 抑制剂可以通过抑制 PI3K/AKT 途径下调 survivin 的表达。本实验中,Western blot 的结果显示,帕瑞昔布处理 A549 细胞 24 h 后,可以明显降低 p-AKT 的表达,同时 survivin 的表达也降低,表明帕瑞昔布抑制 A549 细胞的增殖可能与其抑制 AKT 的磷酸化,从而抑制 survivin 的表达有关。

综上所述,帕瑞昔布能够抑制 NSCLC 细胞 A549 的增殖和迁移,其机制可能与抑制 A549 细胞 AKT 的磷酸化,进一步抑制 survivin 的表达有关。

参 考 文 献

- [1] 黄天乐,马洁韬,邹华伟,等. 尼妥珠单抗提高肺腺癌放射敏感性的体外实验研究[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2012,6:8038-8041.
- [2] Edelman MJ, Hodgson L, Wang X, et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) as a predictive marker for the use of COX-2 inhibitors in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 2012, 30:2019-2020.
- [3] 谭明旗,张秀娟,周卓. Survivin, COX-2 蛋白在肺腺癌中的表达及意义. *中国现代医学杂志*, 2007, 17:2924-2927.
- [4] Qiu R, Chen J, Sima J, et al. NS398 induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138:119-124.
- [5] Setia S, Vaish V, Sanyal N. Chemopreventive effects of NSAIDs as inhibitors of cyclooxygenase-2 and inducers of apoptosis in experimental lung carcinogenesis. *Mol Cell Biochem*, 2012, 366:89-99.
- [6] 何慧娟,胡伟. 塞来昔布联合化疗治疗晚期肺癌近期疗效观察. *中国药师杂志*, 2012, 14:531-532.
- [7] Hullett B, Salman S, O'Halloran SJ, et al. Development of a population pharmacokinetic model for parecoxib and its active metabolite valdecoxib after parenteral parecoxib administration in children. *Anesthesiology*, 2012, 116:1124-1133.
- [8] 梁桦,杨承祥,王汉兵,等. 不同浓度帕瑞昔布对结肠癌 LoVo 细胞增殖及凋亡的影响. *中华麻醉学杂志*, 2012, 32:947-949.
- [9] Snyder GL, Greenberg S. Effect of anaesthetic technique and other perioperative factors on cancer recurrence. *Br J Anaesth*, 2010, 105:106-115.
- [10] Ben-Eliyahu S, Page GG, Yirmiya R, et al. Evidence that stress and surgical interventions promote tumor development by suppressing natural killer cell activity. *Int J Cancer*, 1999, 80:880-888.
- [11] 孙慧珍,李慧娟,崔虹,等. 不同麻醉方法对胃癌患者围术期 T 淋巴亚群的影响. *中华麻醉学杂志*, 2001, 21:220-222.
- [12] Harris RE, Beebe-Donk J, Alshafie GA. Reduced risk of human lung cancer by selective cyclooxygenase 2 (COX-2) blockade; results of a case control study. *Int J Biol Sci*, 2007, 3:328-333.
- [13] Glasner A, Avraham R, Rosenne E, et al. Improving survival rates in two models of spontaneous postoperative metastasis in mice by combined administration of a beta-adrenergic antagonist and a cyclooxygenase-2 inhibitor. *J Immunol*, 2010, 184:2449-2457.
- [14] Benish M, Bartal I, Goldfarb Y, et al. Perioperative use of beta-blockers and COX-2 inhibitors may improve immune competence and reduce the risk of tumor metastasis. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15:2042-2052.
- [15] Pöld M, Krysan K, Pöld A, et al. Cyclooxygenase-2 modulates the insulin-like growth factor axis in non-small lung cancer. *Cancer Res*, 2004, 64:6549-6555.
- [16] Vergara D, Simeone P, Toraldo D, et al. Resveratrol downregulates Akt/GSK and ERK signalling pathways in OVCAR-3 ovarian cancer cells. *Mol Biosyst*, 2012, 8:1078-1087.
- [17] Gyftopoulos K, Vourda K, Sakellariopoulos G, et al. The angiogenic switch for vascular endothelial growth factor-A and cyclooxygenase-2 in prostate carcinoma; correlation with microvessel density, androgen receptor content and Gleason grade. *Urol Int*, 2011, 87:464-469.
- [18] Singhal S, Vachani A, Antin-Ozerkis D, et al. Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small lung cancer; a review. *Clin Cancer Res*, 2005, 11:3974-3986.
- [19] Peng X, Karna P, Cao Z, et al. Cross talk between epidermal growth factor receptor and hypoxia-inducible factor-1 alpha signal pathways increases resistance to apoptosis by up-regulating survivin gene expression. *J Biol Chem*, 2006, 281:25903-25914.
- [20] Asanuma H, Torige T, Kamiguchi K, et al. Survivin expression is regulated by coexpression of human epidermal growth factor receptor 2 and epidermal growth factor receptor via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer cells. *Cancer Res*, 2005, 65:11018-11025.

(收稿日期:2012-10-22)

(本文编辑:吴莹)

刘晨辉,鲍红光,葛亚力,等. 帕瑞昔布对非小细胞肺癌细胞株 A549 增殖和迁移的影响[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2013,7(4):1605-1608.