

# 环氧化酶-2 抑制剂联合依托泊苷对肺癌细胞增殖凋亡的影响

邢丽华<sup>1,2</sup>, 刘剑波<sup>2,3</sup>, 张惠兰<sup>2</sup>, 张珍祥<sup>2</sup>

## The Effects of Nimesulide Combined with Etoposide on Lung Cancer Cell Proliferation and Apoptosis

XING Li-hua<sup>1,2</sup>, LIU Jian-bo<sup>2,3</sup>, ZHANG Hui-lan<sup>2</sup>, ZHANG Zhen-xiang<sup>2</sup>

1. Department of Respiratory Disease, The First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Research Laboratory of Respiratory Disease, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology; 3. Department of Respiratory Disease, the Second Affiliated Hospital, Zhengzhou University

**Abstract:** **Objective** To investigate the effects of cyclooxygenase-2 selective inhibitor nimesulide (NIM) combined with etoposide (VP-16) on cell proliferation and apoptosis in human lung cancer. **Methods** Human lung cancer A549 cells were incubated and the studies were done as follows: NIM (25 $\mu$ mol/L) combined with VP-16 (2 ~ 32 $\mu$ g/mL) coincubated with A549 cells for 48h, the cell proliferation status and proliferation inhibition rate were detected by MTT reduction assay. The cells were divided into control group, NIM (25 $\mu$ mol/L) group, VP-16 (8 $\mu$ g/mL) group and NIM + VP-16 group. The cells growth activity was observed by growth curve as cells coincubated for 12h, 24h, 48h, and the cell apoptosis rate was analyzed by flow cytometry. **Results** VP-16 could inhibit A549 cells proliferation in a concentration dependent pattern, which was enhanced as combined with NIM. NIM and VP-16 acted in a synergistic or additive pattern. NIM and VP-16 could induce A549 cells apoptosis effectively and the antitumor effects were augmented as they combined. **Conclusion** NIM combined with VP-16 can enhance the effects of growth inhibition and apoptosis induction and they play a synergistic anti-tumor effect in lung cancer cell.

**Key words:** Lung neoplasm; Apoptosis; Proliferation; Cyclooxygenase 2; Etoposide

**摘要:**目的 探讨环氧化酶-2(COX-2)抑制剂尼米舒利(NIM)与化疗药依托泊苷(VP-16)联用对肺癌细胞增殖和凋亡的影响。方法 培养人肺癌细胞 A549: NIM(25 $\mu$ mol/L)与 VP-16(2~32 $\mu$ g/mL)联合, MTT 试验观察干预 48h 后细胞增殖变化及增殖抑制率; 分为对照组、NIM 组(25 $\mu$ mol/L)、VP-16 组(8 $\mu$ g/mL)和 NIM + VP-16 组, 观察 12h、24h 及 48h 后 A549 细胞生长情况, 描记生长曲线; 流式细胞术检测干预 48h 后细胞凋亡率。结果 VP-16 能抑制肺癌 A549 细胞的增殖, 且呈量-效关系( $r = -0.908, P < 0.01$ ), NIM 与 VP-16 联用后, 抑增殖作用增强, 二者有相加或协同作用; NIM 及 VP-16 均可抑制 A549 细胞的生长, 诱导凋亡, 二者联用后作用增强。结论 NIM 与 VP-16 联用可增强对肺癌细胞增殖的抑制和凋亡的诱导, 二者具有协同抗肿瘤作用。

**关键词:** 肺癌; 凋亡; 增殖; 环氧化酶-2; 依托泊苷

**中图分类号:** R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2005)11-0689-03

## 0 引言

近 20 年来, 肺癌已成为世界范围内发病率及病死率最高的恶性肿瘤, 严重威胁着人类的健康和生命。目前由于早期诊断技术的局限, 约 75% ~ 80% 患者就诊时已属晚期, 有效的综合治疗尤其是提高

全身化疗疗效十分必要。环氧化酶-2(cyclooxygenase 2, COX-2)是前列腺素(prostaglandins, PGs)生物合成过程中一个重要的限速酶, 与肿瘤发生发展关系密切, 而 COX-2 抑制剂可增强一些肿瘤细胞对化疗药物的敏感性<sup>[1]</sup>。本研究拟探讨 COX-2 抑制剂尼米舒利(nimesulide, NIM)与肺癌常用化疗药依托泊苷(etoposide, VP-16)联用对肺癌细胞增殖与凋亡的作用, 以期对肺癌的临床治疗提供基础理论依据。

收稿日期: 2004-11-25; 修回日期: 2005-02-23

作者单位: 1. 450052 郑州大学第一附属医院呼吸内科; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院卫生部呼吸疾病重点实验室; 3. 郑州大学第二附属医院呼吸内科

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

人肺癌细胞株 A549(购自武汉大学典型生物冷藏中心),用含 10%新生牛血清(武汉三利生物制品厂)、100u/mL 青霉素及 100u/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基(Gibco 公司),于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱内培养,细胞为贴壁生长,0.25%胰蛋白酶(Gibco 公司)消化传代。

### 1.2 MTT 比色法检测 A549 细胞增殖及增殖抑制率

取对数生长期 A549 细胞按  $1 \times 10^4$ /孔接种于 96 孔培养板,每孔加液量 200 $\mu$ L。24h 后换液,设空白调零组:不接种细胞;对照组:只含等量溶剂;实验组:NIM(Sigma 公司)25 $\mu$ mol/L 与 VP-16(山东齐鲁制药厂)2~32 $\mu$ g/mL 联用,每组设 6 个复孔。培养 48h 后加入 MTT(5mg/mL)20 $\mu$ L,继续培养 4h 后吸出培养液,每孔加 DMSO 150 $\mu$ L,振荡溶解 10min,待结晶完全溶解后,在 ELX800 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)上选择波长 490nm,空白组调零,测定各孔吸光度 A,计算细胞生长抑制率。抑制率 = (1 - 实验组 A 平均值/对照组 A 平均值) × 100%。按以下公式计算 Q 值并判断两药的联合效应<sup>[2]</sup>:  $Q = E(A+B) / [EA + (1-EA)EB]$ ,其中 E(A+B)为两药合用的抑制率,EA、EB 为两药单用的抑制率。 $Q = 0.85 \sim 1.15$  表示两药作用相加; $Q > 1.15$  表示两药作用协同; $Q < 0.85$  表示两药作用相互拮抗。

### 1.3 描绘细胞生长曲线

取对数生长期 A549 细胞按  $2 \times 10^5$ /mL 接种于六孔板,24h 后换液,分为 4 组,即对照组:未加药物;NIM 组:NIM 25 $\mu$ mol/L;VP-16 组:VP-16 8 $\mu$ g/mL;NIM + VP-16 组:NIM 25 $\mu$ mol/L + VP-16 8 $\mu$ g/mL。分别于干预后 12h、24h、48h 各取 4 孔,每孔 4 次记数,取其平均值,描绘生长曲线。

### 1.4 流式细胞术检测细胞凋亡率

取对数生长期 A549 细胞  $2 \times 10^5$ /mL 接种于培养瓶中,24h 后换液,分组同 1.3,各组均重复 3 瓶。培养 48h 后常规收集细胞,70%冷乙醇固定,-20 保存。检测前 PBS 洗两次,RNA 酶消化,PI 避光染色 30min,上流式细胞仪检测凋亡率。

### 1.5 统计学处理

计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,SPSS 11.0 统计软件行单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 细胞增殖抑制率

MTT 比色法检测 A 值结果显示,见表 1。VP-

16 单用时,即可抑制 A549 细胞的增殖( $P$  均  $< 0.01$ ),随着浓度 VP-16 的增加,抑制作用增大,呈量-效关系( $r = -0.908, P < 0.01$ );NIM 与 VP-16 联用后,抑制作用增大,抑制率增加。我们的前期研究结果已证实,NIM 浓度为 25 $\mu$ mol/L 时,其对 A549 细胞增殖的抑制率为 10.85%<sup>[3]</sup>,根据公式计算 Q 值,结果显示 NIM 与 VP-16 联用有相加或协同作用( $Q = 1.10 \sim 1.25$ )。

表 1 VP-16、NIM+VP-16 对肺癌 A549 细胞增殖的影响

组别	VP-16 组		NIM+VP-16 组	
	A 值 ( $\bar{x} \pm s$ )	抑制率 (%)	A 值 ( $\bar{x} \pm s$ )	抑制率 (%)
对照组	1.084 $\pm$ 0.047		1.089 $\pm$ 0.108	
VP-16 (2 $\mu$ g/mL)	0.946 $\pm$ 0.010 *	12.70	0.817 $\pm$ 0.008 *	24.98
VP-16 (4 $\mu$ g/mL)	0.782 $\pm$ 0.017 *	27.86	0.603 $\pm$ 0.024 *	44.63
VP-16 (8 $\mu$ g/mL)	0.571 $\pm$ 0.017 *	47.32	0.381 $\pm$ 0.015 *	65.01
VP-16 (16 $\mu$ g/mL)	0.452 $\pm$ 0.025 *	58.30	0.274 $\pm$ 0.022 *	74.83
VP-16 (32 $\mu$ g/mL)	0.277 $\pm$ 0.017 *	74.45	0.158 $\pm$ 0.024 *	85.49

注:与对照组相比:\*  $P < 0.01$

### 2.2 细胞生长曲线

根据 2.1 实验结果,选用抑制率接近 50% 的 VP-16 浓度即 8 $\mu$ g/mL 作为 VP-16 组及 NIM + VP-16 组的干预浓度。由 A549 细胞生长曲线观察到 NIM 和 VP-16 可使生长曲线下移,二者联用后下移更为明显,见图 1。提示 NIM 和 VP-16 对 A549 细胞生长有抑制作用,二者联用后,对细胞生长的抑制作用进一步加强。

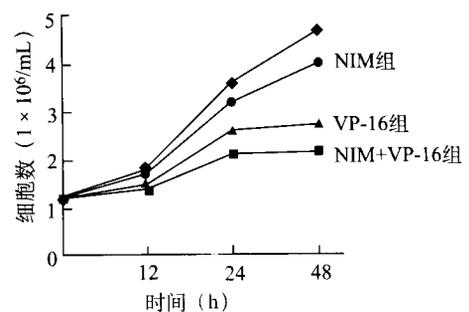


图 1 A549 细胞生长曲线

### 2.3 细胞凋亡率

流式细胞术结果显示,NIM、VP-16 及 NIM + VP-16 组 A549 细胞凋亡率分别为 (8.61  $\pm$  0.55)%、(14.90  $\pm$  1.90)% 及 (18.51  $\pm$  1.74)%,均高于对照组(4.13  $\pm$  0.31)% ( $P$  均  $< 0.01$ );且 NIM + VP-16 组又高于 NIM 组及 VP-16 组( $P < 0.01, P < 0.05$ )。提示 NIM 和 VP-16 均可有效地诱导 A549 细胞凋亡,二者联用后诱导凋亡作用增强。

### 3 讨论

化疗是治疗中晚期恶性肿瘤的主要方法,由于肿瘤细胞的异质性、敏感性及耐药性等问题,疗效尚不令人满意,如何提高现有化疗药的疗效是近年来肿瘤治疗学的研究热点。研究发现,在一些恶性肿瘤化疗中加用 COX-2 抑制剂可起到增效作用。在表达或不表达 COX-2 的结肠癌细胞株,COX-2 抑制剂 NS-398 和 5-Fu 联用可使生长抑制作用增强,提示 NS-398 可作为结肠癌的辅助治疗<sup>[4]</sup>;而 COX-2 抑制剂依托度酸(etodolac)在体外虽不能提高 5-Fu 对结肠癌细胞 LM-H3 增殖的抑制效应,但体内实验则显示它与 5-Fu 联用可显著降低裸鼠结肠癌的肝转移<sup>[5]</sup>。还有实验结果表明,COX-2 抑制剂 JTE-522 (JT)与化疗药顺铂(CDDP)合用具有协同抗胃癌作用<sup>[6]</sup>,在乳腺癌、头颈部癌也有相似的研究报道<sup>[7,8]</sup>。提示 COX-2 抑制剂与常规化疗药联用是一个有希望的方法,值得进行更多的研究。

化疗是中晚期非小细胞肺癌(NSCLC)的主要治疗方法,VP-16 是临床常用的化疗药。VP-16 是一种细胞分裂抑制剂,通过抑制 DNA 拓扑异构酶,对细胞内 DNA 起作用,间接诱导 DNA 断裂,发挥细胞毒效应。NIM 属甲磺酰胺类化合物,是选择性 COX-2 抑制剂。我们前期研究发现,NIM 可抑制体内外肺癌细胞的生长<sup>[3]</sup>,本研究发现,VP-16 单用时,对肺癌细胞增殖的抑制呈剂量依赖性;与 NIM 联用后,具有相加或协同作用;NIM 和 VP-16 都可抑制肺癌细胞的生长并诱导凋亡,联用后肺癌细胞生长抑制更加明显。提示 NIM 与 VP-16 联用能增强对肺癌的细胞毒作用。

目前,基础研究取得了令人鼓舞的结果,COX-2 抑制剂作为肿瘤的辅助用药,已进入结肠癌、乳腺癌、肺癌等的 期临床实验阶段<sup>[9-11]</sup>,并被认为是具有增效作用。值得关注的是研究结果并不完全一致,Becerra 等<sup>[12]</sup>用 COX-2 抑制剂 Rofecoxib 联合 5-Fu 治疗过表达 COX-2 的结肠癌时,患者上消化道出血、血小板减少、腹泻、恶心呕吐等副作用增多而抗癌疗效并未增强。说明,COX-2 抑制剂与化疗药合用可能还存在着肿瘤细胞学和化疗药的差异性问题,有待进一步探讨。

总之,本研究发现 COX-2 抑制剂 NIM 与 VP-

16 联用后,可增强对肺癌细胞的增殖抑制及凋亡诱导作用,提示二者联用可能是提高肺癌疗效的一种有效方法。

### 参考文献:

- [1] Nakata E, Mason KA, Hunter N, et al. Potentiation of tumor response to radiation or chemoradiation by selective cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004, 58(2):369-375.
- [2] Wang W, Qin SK, Chen BA, et al. Experimental study on antitumor effect of arsenic trioxide in combination with cisplatin or doxorubicin on hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2001, 7(5):702-705.
- [3] 邢丽华, 张珍祥, 徐永健, 等. 环氧酶-2 抑制剂联合顺铂治疗肺癌的实验研究[J]. *中国肺癌杂志*, 2004, 7(3):191-195.
- [4] 张有成, 王杉, 张辉, 等. 选择性环氧酶-2 抑制剂 NS-398 抗结肠癌机制及对 5-氟尿嘧啶化疗的辅助作用[J]. *中华医学杂志*, 2004, 84(7):583-586.
- [5] Matsunaga N, Yamada N, Ohira M, et al. Combined treatment with selective cyclooxygenase-2 inhibitor and fluorinated pyrimidines for liver metastasis of colon cancer[J]. *Oncol Rep*, 2004, 11(1):167-171.
- [6] Sugiura T, Saikawa Y, Kubota T, et al. Combination chemotherapy with JTE-522, a novel selective cyclooxygenase-2 inhibitor, and cisplatin against gastric cancer cell lines in vitro and in vivo[J]. *In Vivo*, 2003, 17(3):229-233.
- [7] Witters LM, Crispino J, Fraterrigo T, et al. Effect of the combination of docetaxel, zoledronic acid, and a COX-2 inhibitor on the growth of human breast cancer cell lines[J]. *Am J Clin Oncol*, 2003, 26(4):S92-97.
- [8] Hashitani S, Urade M, Nishimura N, et al. Apoptosis induction and enhancement of cytotoxicity of anticancer drugs by celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in human head and neck carcinoma cell lines[J]. *Int J Oncol*, 2003, 23(3):665-672.
- [9] Fenwick SW, Toogood GJ, Lodge JP, et al. The effect of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib on human colorectal cancer liver metastases[J]. *Gastroenterology*, 2003, 125(3):716-729.
- [10] Arun B, Goss P. The role of COX-2 inhibition in breast cancer treatment and prevention[J]. *Semin Oncol*, 2004, 31(2 Suppl 7):22-29.
- [11] Altorki NK, Keresztes RS, Port JL, et al. Celecoxib, a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor, enhances the response to preoperative paclitaxel and carboplatin in early-stage non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(14):2645-2650.
- [12] Becerra CR, Frenkel EP, Ashfaq R, et al. Increased toxicity and lack of efficacy of Rofecoxib in combination with chemotherapy for treatment of metastatic colorectal cancer: A phase II study[J]. *Int J Cancer*, 2003, 105(6):868-872.

[编辑:周永红]