

• 论 著 •

非甾体类抗炎药阿司匹林、吲哚美辛对胃癌 MGC803 细胞的抑制作用研究

唐 菁¹, 曲丽梅¹, 曹维斌², 李笃军^{1△}

(山东省烟台业达医院: 1. 检验科; 2. 血液肿瘤科, 山东烟台 264006)

摘要:目的 探讨非甾体类抗炎药阿司匹林(ASP)、吲哚美辛(Indo)促进胃癌 MGC803 细胞凋亡、抑制增殖的作用和机制。方法 细胞增殖检测(MTT)法检测 ASP、Indo 对 MGC803 细胞增殖的影响; 流式细胞技术检测 ASP、Indo 对 MGC803 细胞凋亡的影响; 细胞免疫化学方法检测 ASP、Indo 对 MGC803 细胞表达 C 反应蛋白(CRP)、白细胞介素-6(IL-6)的影响。结果 与对照组相比, ASP、Indo 对 MGC803 细胞具有明显的增殖抑制作用及促进 MGC803 细胞凋亡的作用; MGC803 细胞高表达 CRP、IL-6, ASP、Indo 能下调 MGC803 细胞 CRP、IL-6 的表达水平。结论 非甾体类抗炎药 ASP、Indo 对胃癌 MGC803 细胞具有抑制增殖、诱导凋亡的作用, 并能下调 MGC803 细胞中 CRP、IL-6 的表达。

关键词:阿司匹林; 吲哚美辛; 肿瘤细胞增殖; CRP; IL-6

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.10.016

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)10-1341-03

Experimental study of the inhibition mechanism of ASP and Indo on human gastric carcinoma cell line MGC803

Tang Jing¹, Qu Limei¹, Cao Weibin², Li Dujun^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Hematology, Yantai Yeda Hospital, Yantai, Shandong 264006, China)

Abstract: Objective To explore the effect of ASP and Indo inducing the apoptosis and inhibiting the proliferation of human gastric carcinoma MGC803 cell in vitro and its mechanism. **Methods** Inhibition rate was tested by MTT method; apoptosis induced by ASP and Indo in MGC803 cells was investigated by applying flow cytometry analysis techniques; the expression of CRP and IL-6 was analyzed by immunocytochemistry(ICC) analysis. **Results** Compared with the control, ASP and Indo significantly inhibited the proliferation and induced apoptosis of MGC803 cells; CRP and IL-6 were strongly expressed on MGC803 cells, and ASP and Indo down-regulated the expression levels of CRP and IL-6. **Conclusion** NSAIDs ASP and Indo can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of MGC803 cells, and can down-regulating the expression of CRP and IL-6.

Key words: ASP; Indo; tumor cell proliferation; CRP; IL-6

多年来,在应用手术、放化疗及生物治疗等方法治疗肿瘤的同时,科学研究也在不断地开发新的抗肿瘤药物。阿司匹林(ASP)、吲哚美辛(Indo)是常用的非甾体类抗炎药(NSAIDs),流行病学研究发现,长期规律的服用 NSAIDs 可以明显降低肿瘤的发生及延缓肿瘤的发展^[1-2]。并且,研究发现,NSAIDs 的抑癌机制可以分为环氧化酶-2(COX-2)依赖型和非环氧化酶-2 依赖型^[3]。C 反应蛋白(CRP)、白介素-6(IL-6)作为炎症细胞因子,可通过自分泌、旁分泌或相关联动效应来促进肿瘤生长及转移^[4-5]。本研究通过观察 ASP、Indo 对胃癌细胞株 MGC803 增殖、凋亡的影响,同时检测 CRP、IL-6 的表达变化,为临床应用 NSAIDs 在胃癌方面的治疗提供理论和实验依据。

1 资料与方法

1.1 细胞株与主要试剂 人胃癌细胞株 MGC803 由滨州医学院中心实验室提供。ASP、Indo 购自上海如吉科技发展有限公司产品。细胞培养基(DMEM)、胰蛋白酶为 Gibco 公司产品,青霉素、链霉素购自山东鲁抗制药公司。MTT 系 Pro-mega 公司产品。PI 试剂盒购自美国 Sigma 公司产品, Rabbit Anti-CRP 单克隆抗体及 Rabbit Anti-IL-6 单克隆抗体,均购自北京博奥森生物技术有限公司。DAB 显色试剂盒系北京中杉金桥生物技术有限公司产品。

1.2 MTT 法检测 ASP、Indo 对 MGC803 细胞增殖的影响^[6] 取对数生长期的 MGC803 细胞(5×10^4 /mL),接种于 96 孔板,37℃、5%CO₂ 孵箱孵育过夜后,实验组细胞分别加

入不同浓度的 ASP、Indo,作用终质量浓度分别为 ASP 2、4、8、10 mmol/L; Indo 200、400、800、1 000 μmol/L; 对照组加 10% 小牛血清 DMEM 培养液,继续培养 48 h,终止培养前 4 h 加入 MTT(5 mg/mL),4 h 后置酶标仪下测定光密度(OD)值,以 570 nm 为检测波长,630 nm 为参考波长,以 570~630 nm 计算 OD 值。

1.3 PI 染色流式细胞术检测 MGC803 细胞凋亡^[7] 取对数生长期的 MGC803 细胞(5×10^4 /mL),实验设空白对照组、8 mmol/L ASP 组、800 μmol/L Indo 组共 3 个组别,每组各 6 瓶细胞,孵箱内细胞培育 48 h 后终止培养,以 0.25% 的胰酶消化后,每组分别制成单细胞悬液,各收集细胞数目约($1 \sim 5$) $\times 10^6$ 个,500~1 000 r/min 离心 5 min,弃去培养液;3 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 1 次,离心去 PBS;加入冰预冷的 70% 乙醇固定,4℃,过夜;离心弃去固定液,3 mL PBS 重悬 5 min;400 目的筛网过滤 1 次,500~1 000 r/min 离心 5 min,弃去 PBS;用 1 mL PI 染液染色,4℃避光 30 min;流式细胞仪检测:PI 用氩离子激发荧光,激光光波波长为 488 nm,发射光波波长大于 630 nm,产生红色荧光分析 PI 荧光强度的直方图,也可分析前散射光对侧散射光的散点图。

1.4 免疫细胞化学检测 MGC803 细胞中 CRP、IL-6 表达变化^[8] 取对数生长期的 MGC803 细胞(1×10^5 /mL),接种于有盖玻片的 24 孔培养板,2 mL/孔,实验设空白对照组、8 mmol/L ASP 组、800 μmol/L Indo 组共 3 个组别,每组设 3 个

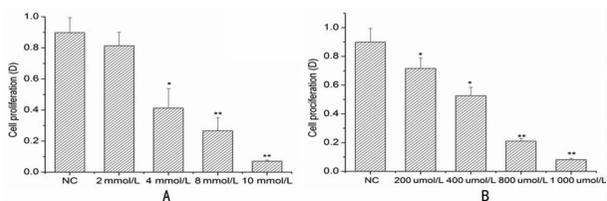
复孔,孵箱内细胞培育 48 h 后终止培养。取出细胞玻片,PBS 洗 5 min,洗 3 次,4%多聚甲醛固定,4℃,过夜,蒸馏水洗 5 min,洗 3 次,按文献[9]灭活内源性过氧化物酶和免疫细胞化学染色,用 Leica DM 4000B 显微镜拍照,并通过 Leica QwinV3 分析软件进行染色结果的灰度值扫描分析,蛋白表达强弱与灰度值成反比。

1.5 统计学处理 采用 SPSS12.0 统计软件包进行数据分析,分析方法包括 *t* 检验、 χ^2 检验和 Pearson 线性相关分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ASP、Indo 对 MGC803 细胞增殖的影响 结果显示,不同浓度的 ASP、Indo 作用于 MGC803 细胞 48 h 后,对 MGC803 细胞具有增殖抑制作用,其中 ASP 4、8、10 mmol/L,Indo 400、800、1 000 $\mu\text{mol/L}$ 组与未用药对照组相比增殖抑制作用明显,且差异具有统计学意义($P < 0.01$)。见图 1。

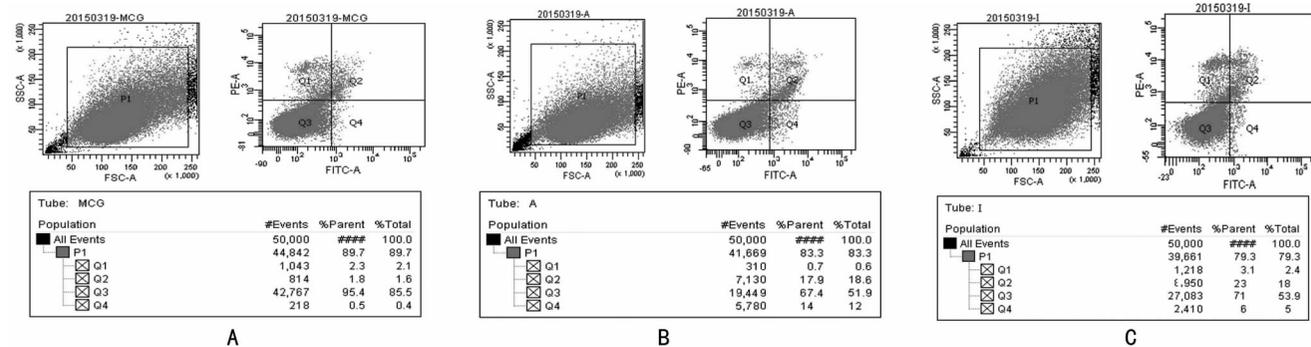
2.2 ASP、Indo 对 MGC803 细胞凋亡的影响 流式细胞仪分析结果显示,MGC803 细胞经 8 mmol/L ASP、800 $\mu\text{mol/L}$ Indo 用药 48 h 后均出现了明显的凋亡,各实验组的凋亡率分别为 $(31.9 \pm 3.21)\%$ 和 $(29.0 \pm 3.01)\%$,与对照组的 $(9.3 \pm 0.45)\%$ 比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。



A: ASP 对 MGC803 细胞增殖的影响;B:Indo 对 MGC803 细胞增殖的影响。

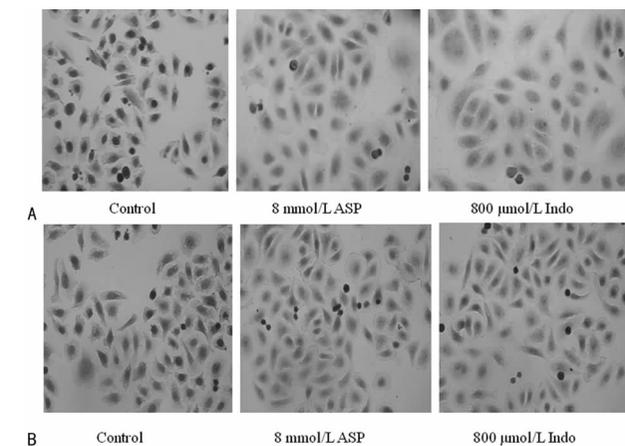
图 1 ASP、Indo 对 MGC803 细胞增殖的影响

2.3 ASP、Indo 处理后 MGC803 细胞中 CRP、IL-6 的表达变化 免疫细胞化学染色结果显示,在两组图的对照组细胞胞质中可见大量的棕黄色颗粒,提示 CRP、IL-6 蛋白在 MGC803 细胞中表达为强阳性。MGC803 细胞经 8 mmol/L ASP、800 $\mu\text{mol/L}$ Indo 用药 48 h 后,与未用药对照组相比,细胞质褐色的 CRP、IL-6 蛋白的表达明显下降,并且病理图像分析结果显示,8 mmol/L ASP、800 $\mu\text{mol/L}$ Indo 药物处理后 CRP 表达灰度值分别为 179 ± 8.5 、 190 ± 7.6 ;IL-6 表达灰度值分别为 165 ± 2.4 、 184 ± 3.4 ,均高于各自对照组的 86 ± 4.3 和 95 ± 5.0 ,且差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。



A:流式细胞术分析对照组 MGC803 细胞凋亡;B:流式细胞术分析 8 mmol/L ASP 诱导的 MGC803 细胞凋亡 C:流式细胞术分析 800 $\mu\text{mol/L}$ Indo 诱导的 MGC803 细胞凋亡。

图 2 ASP、Indo 对 MGC803 细胞凋亡的影响



A:免疫细胞化学分析 8 mmol/L ASP、800 $\mu\text{mol/L}$ Indo 作用后的 CRP 的表达 B:免疫细胞化学分析 8 mmol/L ASP、800 $\mu\text{mol/L}$ Indo 作用后的 IL-6 的表达。

图 3 ASP、Indo 处理后 MGC803 细胞中 CRP、IL-6 的表达变化

3 讨论

癌症尽管在早期诊断和防治方面取得很大成绩,但目前仍是人类亟待解决的难题之一。近年的流行病学、临床和实验研究证实,长期服用临床常用于解热、镇痛、抗炎的 NSAIDs 如 ASP、Indo 等,与多种肿瘤的发生呈负相关,可以显著降低乳腺、肺、前列腺、膀胱、卵巢、食道和胃及部位肿瘤发病率^[3]。Waddell 等^[9]于 1983 年最早报道了 NSAIDs 与肿瘤的发生具有量效关系,长期服用 NSAIDs 可以明显减少家族性腺瘤样息肉(FAP)患者的息肉数量。并且后来的随机临床试验也证实了每天服用剂量 300~400 mg 的苏灵大(苏灵大属于 NSAIDs,结构同吡罗昔美)4~6 个月,可以降低 FAP 患者腺瘤数量的 70%^[10]。

除临床研究以外,还有大量的实验动物模型和体外的试验研究证明 NSAIDs 具有明显抑癌作用。Pollard 等^[11]报道,Indo 在致癌物质诱导的结肠癌动物模型中具有一定的抑癌活性。随后的试验研究也证实了不同种类的 NSAIDs 对结肠癌的不同程度的抑癌作用^[12]。孙振华^[13]在体外试验中发现,ASP 能够抑制原癌基因 ErbB2 的表达,进而抑制其下游细胞

生存相关的信号通路,从而诱导了宫颈癌细胞系 HeLa 细胞凋亡。Li 等^[14]研究发现,ASP 能够通过抑制 Mcl-1 的表达来增强细胞凋亡调节蛋白 Bcl-2 高亲和力和靶向抑制剂 ABT-263 介导的抗肿瘤作用,从而对肝癌细胞起到诱导凋亡的作用。孙振海^[7]研究结果显示,NSAIDs 塞来布昔可以通过抑制结肠癌细胞 SW480 中 BiP 蛋白的表达,从而起到促进肿瘤细胞凋亡的作用。董兆如^[15]的研究显示,低浓度 ASP(1 mmol/L)联合干扰素 α (IFN- α)较单独作用于肝癌细胞时,凋亡数量明显增加,提示低浓度 ASP 协同 IFN- α 诱导肝癌细胞凋亡有较好的效果。本课题以胃癌细胞株 MGC803 细胞为靶细胞,将 4、8、10 mmol/L ASP 与 400、800、1 000 μ mol/L Indo 作用于 MGC803 细胞 48 h 后,发现其对 MGC803 细胞具有明显的增殖抑制作用。并且研究还发现,8 mmol/L ASP、800 μ mol/L Indo 用药 48 h 后,细胞凋亡明显增加。

IL-6 原称 B 细胞刺激因子 2、B 细胞分化因子、IFN- β 2、杂交瘤/浆细胞瘤生长因子、 26×10^3 蛋白、肝细胞刺激因子等。产生 IL-6 的细胞主要有单核/巨噬细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞、角质细胞及 T 细胞(主要是 Th2)等,此外还包括骨髓瘤细胞株、宫颈癌细胞株等。IL-6 的生物学活性,除了在细胞因子网络中可发挥多种效应,如免疫调节、刺激造血、防御作用、急性期反应等外,还具有促进肿瘤生长的作用。如 IL-6 合成增加与多发性骨髓瘤的发生有关,IL-6 在体外可促进浆细胞瘤和骨髓瘤细胞的生长。某些肿瘤可高表达 IL-6,使细胞增殖失控,对肿瘤的发生和发展起重要作用^[16]。研究证明,部分肺癌细胞系可以产生 IL-6,作为自分泌、旁分泌的生长因子,促进肿瘤生长及向周围组织侵袭。并且白血病、肾癌、骨髓瘤等多种肿瘤细胞生长也均依赖于 IL-6 的自分泌能力^[5,17]。CRP 是一种急性时相反应蛋白,作为炎症和急性组织损伤的非特异标志物广泛应用于临床。近几年临床研究显示,许多胃肠、肝胆、胰腺癌患者的血清 CRP 水平会升高^[18]。并有研究显示,CRP 联合 CEA、CA724 对胃癌的早期诊断和病情判断也有一定的临床应用价值,但 CRP 在胃癌细胞中的表达水平及作用机制还有待进一步研究^[19]。因此,本实验将 CRP、IL-6 作为研究的靶因子,免疫细胞化学发现 CRP、IL-6 在胃癌 MGC803 细胞中呈高表达状态,并且与空白对照组相比,8 mmol/L ASP、800 μ mol/L Indo 用药 48 h 后, MGC803 细胞中 CRP、IL-6 的表达明显下降,说明 ASP、Indo 对胃癌 MGC803 细胞的增殖抑制、诱导凋亡的作用机制可能与其抑制细胞中 CRP、IL-6 的产生有关。

先前针对 NSAIDs 的抑癌机制大都集中于其能抑制具有诱导炎症反应和致癌变作用的 COX-2 的表达有关,本课题将具有促进肿瘤细胞生长的 CRP、IL-6 作为研究靶分子,发现 NSAIDs ASP、Indo 抑制胃癌细胞增殖、诱导凋亡的可能作用机制与其抑制细胞中 CRP、IL-6 的产生有关,从而为临床应用 NSAIDs 的抗癌治疗提供了一定试验基础。

参考文献

[1] Thun MJ, Henley SJ, Patrono C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: Mechanistic, pharmacologic, and clinical

cal issues[J]. J Natl Cancer Inst, 2002, 94(4): 252-266.

[2] Ruder EH, Laiyemo AO, Graubard BI, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and colorectal cancer risk in a large, prospective cohort[J]. Am J Gastroenterol, 2011, 106(7): 1340-1350.

[3] Gurbinar E, Grizzle WE, Piazza GA. NSAIDs inhibit tumorigenesis, but how? [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(5): 1104-1113.

[4] Mckeown DJ, Brown DJF, Kelly A, et al. The relationship between circulating concentrations of C-reactive protein, inflammatory cytokines and cytokine receptors in patients with non-small-cell lung cancer[J]. Br J Cancer, 2004, 91(12): 1993-1995.

[5] Takenawa J, Kaneko Y, Fukumoto M, et al. Enhanced expression of interleukin-6 in primary human renal cell carcinomas[J]. J Natl Cancer Inst, 1991, 83(2): 1668-1672.

[6] Kan SH, Jing T, Li DJ, et al. Inhibition of the expression of a proliferation-induced ligand APRIL in HepG2 cell line and the reversal on tumor immune evasion by Chinese medicine[J]. Bangladesh J Pharmacol, 2012, 7: 236-242.

[7] 孙振海, 杜寒松, 龙跃平, 等. 奥曲肽联合 NSAIDs 对结肠癌细胞生长的影响及作用机制[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2012, 41(3): 306-309.

[8] 周任, 张龙洲, 王睿智. 塞来昔布对胶质瘤 U251 细胞增殖、凋亡和 Survivin 表达的影响[J]. 癌症, 2010, 29(3): 316-322.

[9] Waddell WR, Loughry RW. Sulindac for polyposis of the colon[J]. J Surg Oncol, 1983, 24(1): 83-87.

[10] Keller JJ, Giardiello FM. Chemoprevention strategies using NSAIDs and COX-2 inhibitors[J]. Cancer Biol Ther, 2003, 2(4 Suppl 1): S140-149.

[11] Pollard M, Luckert PH. Indomethacin treatment of rats with dimethylhydrazine-induced intestinal tumors[J]. Cancer Treat Rep, 1980, 64(12): 1323-1327.

[12] Kawamori T, Rao CV, Seibert K, et al. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis[J]. Cancer Res, 1998, 58(3): 409-412.

[13] 孙振华. 阿司匹林抑制 ErbB2 诱导宫颈癌细胞凋亡[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2009.

[14] Li GQ, Zhang SJ, Fang HB, et al. Aspirin overcomes Navitoclax-resistance in hepatocellular carcinoma cells through suppression of Mcl-1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 434(4): 809-814.

[15] 董兆如. 小剂量阿司匹林协同干扰素- α 诱导肝癌 BEL-7402 细胞凋亡的实验研究[D]. 济南: 山东大学, 2012.

[16] 龚非力. 基础免疫学[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998.

[17] 姜正华. 白介素-6 与肺癌[J]. 国际呼吸杂志, 1997, 17(3): 148-150.

[18] Miyake K, Imura S, Nishioka M, et al. Serum evaluation of soluble interferon-alpha/beta receptor and high-sensitivity C-reactive protein for diagnosis of the patients with gastrointestinal and hepatobiliary-pancreatic cancer[J]. Cytokine, 2010, 49(3): 251-255.

[19] 唐普, 陈海霞, 李笃军. CRP 联合 CEA、CA724 检测对胃癌早期诊断及病情判断的临床应用价值[J]. 重庆医学, 2013, 42(1): 63-65.

(收稿日期: 2015-12-01)