

塞来西布体外对人类肝胃癌细胞生长的抑制作用

樊菁, 窦科峰, 李开宗

樊菁, 窦科峰, 李开宗, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科, 陕西省西安市 710032
樊菁, 男, 1978-05-23 生, 青海省西宁市人, 汉族, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科硕士生
项目负责人: 樊菁, 710032, 陕西省西安市长乐西路 127 号, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科. fanjing@fmmu.edu.cn
电话: 029-83375260 传真: 029-83375255
收稿日期: 2004-01-02 接受日期: 2004-01-12

Inhibitory effects of celecoxib on proliferation of human liver and gastric carcinoma cells *in vitro*

Jing Fan, Ke-Feng Dou, Kai-Zong Li

Jing Fan, Ke-Feng Dou, Kai-Zong Li, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China
Correspondence to: Jing Fan, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, 127 Changle West Road, Xi'an 710032, China. fanjing@fmmu.edu.cn
Received: 2004-01-02 Accepted: 2004-01-12

Abstract

AIM: To study the inhibitory effects of celecoxib on proliferation of human hepatoma SMMC-7721 cells and gastric cancer SGC-7901 cells *in vitro*.

METHODS: The two carcinoma cells were cultured with celecoxib at various concentrations (0, 20, 40, 80, 160 and 320 $\mu\text{mol/L}$). Growth suppression was detected with MTT colorimetric assay, cell apoptotic alterations were evaluated by transmission electron microscopy (TEM), and quantity of Cox-2 was evaluated by cytochemical staining.

RESULTS: The inhibition of proliferation on two carcinoma cells was observed by MTT (49.1% and 42.9% by 320 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib). The inhibitory effect was dose-dependent. Apoptotic cells were observed under transmission electron microscope. The different quantities of Cox-2 protein in cells were observed by cytochemical staining.

CONCLUSION: Celecoxib inhibits proliferation, induces apoptosis of human two carcinoma cells *in vitro*, and the effects have close relation to the quantities of Cox-2 protein in cells.

Fan J, Dou KF, Li KZ. Inhibitory effects of celecoxib on proliferation of human liver and gastric carcinoma cells *in vitro*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(3):523-526

摘要

目的: 研究塞来西布在体外对人类肝癌7721细胞以及胃癌7901细胞的生长抑制作用。

方法: 两种肿瘤细胞用含不同浓度(0, 20, 40, 80, 160 和 320 $\mu\text{mol/L}$)的塞来西布的培养液培养. 应用MTT测定法来测定生长抑制率, 电镜技术来观察细胞凋亡情况, 免疫组化技术来检测细胞内Cox-2蛋白含量。

结果: 塞来西布对两种肿瘤细胞均具有生长抑制作用(塞来西布 320 $\mu\text{mol/L}$ 时两种肿瘤细胞抑制率分别为 49.1% 和 42.9%), 并呈量-效关系. 电镜下可观察到凋亡细胞. 免疫组化发现细胞内环氧化酶的含量在处理前后有明显变化。

结论: 在体外, 塞来西布抑制人类肝癌及胃癌细胞生长, 诱导他们产生凋亡, 并且该作用与细胞内环氧化酶含量有密切关系。

樊菁, 窦科峰, 李开宗. 塞来西布体外对人类肝胃癌细胞生长的抑制作用. 世界华人消化杂志 2004;12(3):523-526
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/523.asp>

0 引言

早在 1870 年代, 阿斯匹林以及其衍生物就被用于解热、镇痛以及抗血栓的治疗^[1]. 他们被称作非甾体类抗炎药(NSAID), 其主要的的作用在于抑制了环氧化酶(cyclooxygenase)的活性, 减少了前列腺素的合成, 从而降低了炎症反应. 最近, 通过流行病学、基础实验和临床研究发现, 长期服用 NSAID 可以降低食管癌、胃癌、结肠癌及直肠癌等肿瘤的发病率. 其中, 针对环氧化酶两种亚型之一的环氧化酶-2 (Cox-2)的特异性抑制剂塞来西布(celecoxib)具有明显的抑制多种肿瘤细胞如前列腺癌^[2]、脑瘤^[3]等的生长, 并有促进肿瘤细胞凋亡的作用. 因此, 我们选择人类肝癌细胞(SMMC-7721)和胃癌细胞(SGC-7901)来观察塞来西布对他们的生长抑制及促凋亡作用, 为塞来西布抗肿瘤机制的进一步研究和肿瘤的化学治疗或是化学辅助治疗的临床应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 Celecoxib 购自 Cearal 公司, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存. 胰酶购自华美生物公司. MTT 购自 Gibco 公司. Cox-2 免疫组化试剂盒购自博士德生物公司. 小牛血清、RPMI1640 和 DMSO 购自鼎国公司. 肝癌细胞(SMMC-7721)由本实验室提供, 细胞置于含 50 mL/L CO_2 37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中培养, 以含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 作为其培养基, $10^4/\text{L}$ 细胞接种 100 mL 培养瓶进行培养, 3 d 传代。

1.2 方法 将对数生长期的 SMMC-7721 及 SGC-7901 细胞计数后, 调整细胞密度为 $1 \times 10^4/L$, 接种到 96 孔培养板, 每孔 200 μL , 每组 8 孔, 细胞贴壁后每孔分别加入 20, 40, 80, 160 和 320 $\mu mol/L$ 不同浓度的塞莱西布继续培养 24 h, 以培养液为对照组. 分别加入新配置的 5 g/L MTT 60 μL , 37 $^{\circ}C$ 继续孵育 4h, 弃上清, 加入 DMSO 150 μL 以及甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 10.2) 20 μL , 振荡 10 min 后, 用酶标仪, 在 570 nm 波长测定吸光度, 记录数据. 肿瘤细胞的抑制率(%) = (1 - 实验组 A 值 / 阴性对照组 A 值) \times 100%. 细胞培养同上, 对照组换正常培养液, 实验组换含 320 $\mu mol/L$ 的塞莱西布的培养液, 培养 24h 后, 消化后 D-Hanks 液洗涤离心 (1 000 r/min, 5min/ 次) 2 次后, 用 25 g/L 戊二醛 4 $^{\circ}C$

固定 30 min, 常规制作电镜标本, 双铅染色后, 置于 1200EX 型透射电镜观察摄片. 细胞以 $10^4/L$ 分别接种 4 个预置 4 块 1cm \times 1cm 盖玻片的 6 cm 培养皿, 37 $^{\circ}C$ 培养箱培养, 设立对照组和实验组, 对照组换正常培养液, 实验组换含 320 $\mu mol/L$ 的塞莱西布的培养液, 培养 24 h 后, 按试剂盒说明固定染色, 显微镜(Olympus)观察摄片.

统计学处理 对 MTT 测定所获得的数据进行 mean \pm SD 检验分析, $P < 0.05$ 被认为是显著差异.

2 结果

2.1 MTT 法检测 随着药物浓度的升高, 两种细胞的存活率呈明显下降, 存在量效关系(表 1).

表 1 塞西布对肿瘤细胞增生活性的影响(MTT 法 mean \pm SD)

塞莱西布($\mu mol/L$)	A 值		抑制率(%)		t	
	SGC-7901	SMMC-7721	SGC-7901	SMMC-7721	SGC-7901	SMMC-7721
0 (对照)	0.0743 \pm 0.0024	0.0653 \pm 0.0021				
20	0.0703 \pm 0.0012	0.0607 \pm 0.0006	5.4 \pm 1.2	7.7 \pm 0.7	6.000	13.999
40	0.0697 \pm 0.0012	0.0593 \pm 0.0021	6.3 \pm 1.2	9.2 \pm 2.4	7.000	4.992
80	0.0680 \pm 0.0020	0.0587 \pm 0.0015	8.5 \pm 1.8	10.2 \pm 1.7	5.485	7.559
160	0.0557 \pm 0.0042	0.0503 \pm 0.0015	25.0 \pm 4.0	23.0 \pm 1.7	7.766	17.008
320	0.0393 \pm 0.0050	0.0373 \pm 0.0012	47.1 \pm 4.8	42.9 \pm 1.4	12.044	41.999

$P < 0.05$.

2.2 凋亡细胞的超微结构 在电镜下可以看出, 两种实验组的细胞, 有典型的凋亡结构出现. 其特征是细胞皱缩, 微绒毛消失, 体积缩小, 且染色质浓缩, 形成沿核膜分布的不同形状和大小的块状结构(图 1).

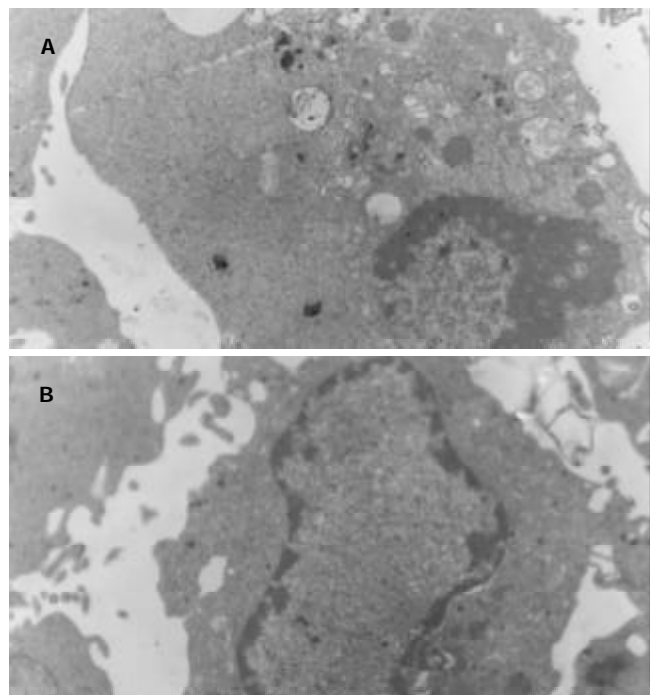


图 1 癌细胞凋亡的超微结构电镜 $\times 12\ 000$. A: 7901 细胞; B: 7721 细胞.

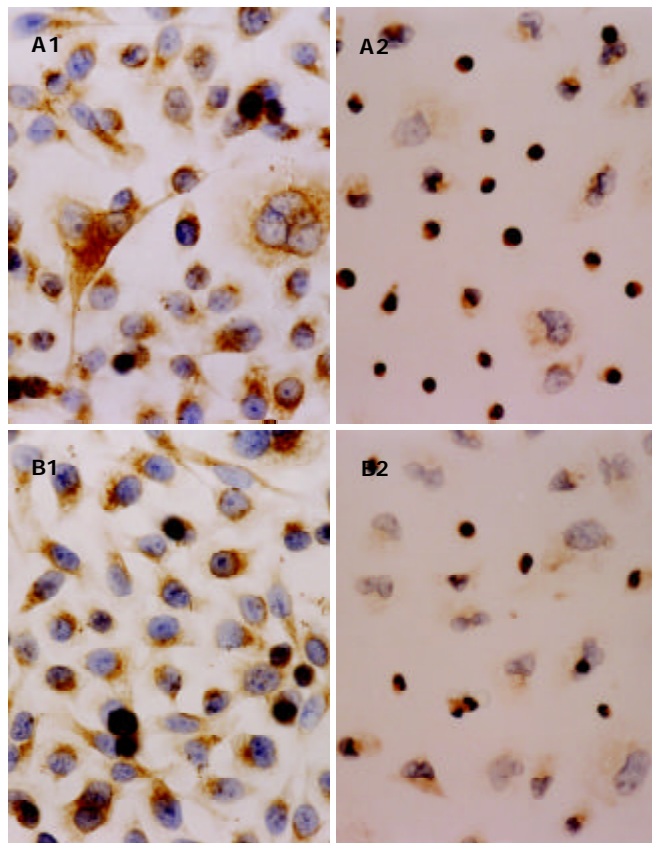


图 2 塞莱西布作用 24 h 的 COX-2 表达 SABC $\times 400$. A1: 7901 对照组; A2: 7901 实验组; B1: 7721 对照组; B2: 7721 实验组.

2.3 细胞化学染色观察 COX-2 阳性的细胞主要为细胞质和核膜着色, 呈棕黄色细颗粒状, 少部分细胞有细胞核和细胞质同时着色. 处理前的两种肿瘤细胞, COX-2 的表达水平较高, 而处理后, 可以发现, COX-2 表达水平明显下降, 并出现细胞形态的改变(图 2).

3 讨论

Kerr et al 学者最先提出了细胞凋亡这个概念. 随后的一系列研究显示肿瘤细胞的增生与其丧失凋亡能力有关^[4-17], 并且存在多种因素导致了肿瘤细胞凋亡能力的丧失^[18-23]. 因此, 探索能够诱导肿瘤细胞凋亡的新药就成为了众多学者努力的方向^[24-25]. 作为一种新近合成的抗风湿的非甾体类抗炎药, 塞莱西布最初的目的主要是抗炎镇痛治疗. 然而, 随着一些临床流行病学的调查的展开, 有学者发现, 患有家族性腺瘤息肉病的患者, 在持续 6 mo 服用一定剂量的塞莱西布后, 其息肉数量和大小都小于对照组患者^[26]. 流行病学研究的发现, 引起了科研人员的注意. 随后展开的一些实验中, 人们发现, 塞莱西布能够抑制部分肿瘤细胞的生长并且诱导他们的凋亡, 比如: 前列腺癌^[2]、脑癌^[3]等.

目前肿瘤仍是严重威胁人类生命的主要疾病之一, 其发病机制复杂, 影响因素多^[27-30]. 临床上, 许多患者在确诊时已丧失了手术机会, 而化疗和放疗的效果不佳、毒副作用较大. 因此, 寻找一种高效低毒的药物作为化疗治疗或是辅助治疗晚期肿瘤就是许多学者研究的方向. 本实验中, 我们通过 MTT 法, 发现塞莱西布具有明显的抑制两种肿瘤细胞生长的作用, 并且存在量-效关系. 通过电镜等, 我们又观察到塞莱西布对他们存在明显的促凋亡作用. 通过细胞化学染色, 我们发现, 塞莱西布对两种肿瘤细胞内的环氧化酶-2 (Cox-2) 具有明显的抑制作用, 此酶的含量可能与塞莱西布的作用密切相关.

目前, 塞莱西布抑制肿瘤细胞生长和促进其凋亡的作用机制还不是很清楚, 存在几种不同的观点. 有的观点认为, 环氧化酶-2 (Cox-2) 在肿瘤组织过表达所产生的前列腺素 E₂, 是大部分肿瘤细胞形成和存活的基础, 塞莱西布抑制了他的表达, 也同时抑制了前列腺素 E₂ 的合成, 因此抑制了肿瘤细胞的存活, 诱导了凋亡^[3]; 有的观点认为, 塞莱西布抑制了肿瘤细胞内内质网表面的 Ca²⁺ 依赖的 ATP 酶的功能, 导致了细胞内 Ca²⁺ 调控机制的紊乱, 从而促进了肿瘤细胞的凋亡^[31]; 还有观点认为, 塞莱西布通过抑制了蛋白激酶 C 依赖的激酶 1 (PKC1) 的磷酸化, 抑制了该激酶的功能, 也抑制了其下游分子蛋白激酶 B (PKB) 的功能, 从而导致了有功能的促凋亡分子 bad 在细胞内的表达量上升, 促进了细胞凋亡等^[32].

最近, 塞莱西布已经被美国食品和药品管理委员会(FDA)批准, 作为患家族性息肉病(FAP)的患者预防结肠癌的预防药物. 相信随着科研实验的进一步深入,

对环氧化酶-2 的特异性抑制剂塞莱西布抗肿瘤的作用机制的研究必将有所突破. 塞莱西布所具有的明显的抑制肿瘤细胞生长并且诱导其凋亡的特性, 相信将在多种晚期肿瘤的化疗治疗或辅助治疗中具有广阔的应用前景.

4 参考文献

- 1 Vane JR, Botting RM. The mechanism of action of aspirin. *Thromb Res* 2003;110:255-258
- 2 Kirschenbaum A, Liu X, Yao S, Levine AC. The role of cyclooxygenase-2 in prostate cancer. *Urology* 2001;58(2 Suppl 1): 127-131
- 3 Patti R, Gumired K, Reddanna P, Sutton LN, Phillips PC, Reddy CD. Overexpression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human primitive neuroectodermal tumors: effect of celecoxib and rofecoxib. *Cancer Lett* 2002;180:13-21
- 4 Tian G, Yu JP, Luo HS, Yu BP, Yue H, Li JY, Mei Q. Effect of nimesulide on proliferation and apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:483-487
- 5 Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:385-392
- 6 Tao HQ, Zou SC. Effect of preoperative regional artery chemotherapy on proliferation and apoptosis of gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:451-454
- 7 Liu S, Wu Q, Ye XF, Cai JH, Huang ZW, Su WJ. Induction of apoptosis by TPA and VP-16 is through translocation of TR3. *World J Gastroenterol* 2002;8:446-450
- 8 Shigeno M, Nakao K, Ichikawa T, Suzuki K, Kawakami A, Abiru S, Miyazoe S, Nakagawa Y, Ishikawa H, Hamasaki K, Nakata K, Ishii N, Eguchi K. Interferon-alpha sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation and NF-kappaB inactivation. *Oncogene* 2003;22:1653-1662
- 9 Shen ZY, Shen J, Li QS, Chen CY, Chen JY, Yi Z. Morphological and functional changes of mitochondria in apoptotic esophageal carcinoma cells induced by arsenic trioxide. *World J Gastroenterol* 2002;8:31-35
- 10 Shen ZY, Shen WY, Chen MH, Shen J, Cai WJ, Yi Z. Nitric oxide and calcium ions in apoptotic esophageal carcinoma cells induced by arsenite. *World J Gastroenterol* 2002;8:40-43
- 11 Wu YL, Sun B, Zhang XJ, Wang SN, He HY, Qiao MM, Zhong J, Xu JY. Growth inhibition and apoptosis induction of Sulindac on Human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:796-800
- 12 Sun BH, Zhao XP, Wang BJ, Yang DL, Hao LJ. FADD and TRADD expression and apoptosis in primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2000;6:223-227
- 13 Shan CM, Li J. Study of apoptosis in human liver cancers. *World J Gastroenterol* 2002;8:247-252
- 14 Liu LX, Jiang HC, Piao DX. Radiofrequency ablation of liver cancers. *World J Gastroenterol* 2002;8:393-399
- 15 Wang FS, Liu MX, Zhang B, Shi M, Lei ZY, Sun WB, Du QY, Chen JM. Antitumor activities of human autologous cytokine-induced killer (CIK) cells against hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol* 2002;8:464-468
- 16 Yang JY, Luo HY, Lin QY, Liu ZM, Yan LN, Lin P, Zhang J, Lei S. Subcellular daunorubicin distribution and its relation to multidrug resistance phenotype in drug-resistant cell line SMMC-7721/R. *World J Gastroenterol* 2002;8:644-649
- 17 Huang J, Cai MY, Wei DP. HLA class I expression in primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:654-657
- 18 Zheng JY, Li KZ, Wang WZ. Impact of the expression of p27KIP1 on apoptosis and progression of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:883-886
- 19 Hu PZ, Zhang CS, Ma FC, Wang SJ, Wang WL. Expressions of cyclin-dependent kinase inhibitor P21WAF1/CIP1 and PCNA

- in human hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:145-148
- 20 Guo XZ, Shao XD, Xu JH, Zhao JJ, Li HY, Wang D. The expression of bcl-xL mRNA in the tissues of hepatocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:530-532
- 21 Liang Y, Lu B, Cui ZF, Li XD, Guo YJ, Lu YJ. The expression of Fas/FasL in hepatocellular carcinomas. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1364-1368
- 22 Zhang CS, Wang WL, Peng WD, Hu PZ, Chai YB, Ma FC. Bcl-2 ribozyme's promotion of apoptosis of SMMC7721 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:417-419
- 23 Lu SY, Pan XZ, Peng XW, Shi ZL, Lin L, Chen MH. Effect of Hp infection on gastric epithelial cell kinetics in stomach diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:386-388
- 24 Shoieb AM, Elgayyar M, Dudrick PS, Bell JL, Tithof PK. In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. *Int J Oncol* 2003;22:107-113
- 25 Tu SP, Zhong J, Tan JH, Jiang XH, Qiao MM, Wu YX, Jiang SH. Induction of apoptosis by arsenic trioxide and hydroxyl camptothecin in gastric cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol* 2000;6:532-539
- 26 Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, Wakabayashi N, Saunders B, Shen Y, Fujimura T, Su LK, Levin B. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 2000;342:1946-1952
- 27 Zhou XD, Yu JP, Ran ZX, Luo HS, Yu BP. Expression of cFLIP and p53 mutation in adenocarcinoma of colon. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:536-539
- 28 Cui J, Yang DH, Qin HR. Mutation and clinical significance of c-fms oncogene in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:392-395
- 29 Yang YL, Dou KF, Li KZ. Correlation of UPAR and VEGF expression with invasion and metastasis in human hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:381-383
- 30 Guo J, Shen ZX, Tan SY, Luo HS, Li HX, Feng ZQ, Yang J. Expression of MDM2, P53 and P14ARF in human colon cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:540-543
- 31 Johnson AJ, Hsu AL, Lin HP, Song X, Chen CS. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib perturbs intracellular calcium by inhibiting endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases: a plausible link with its anti-tumour effect and cardiovascular risks. *Biochem J* 2002;366(Pt 3):831-837
- 32 Arico S, Pattingre S, Bauvy C, Gane P, Barbat A, Codogno P, Ogier-Denis E. Celecoxib induces apoptosis by inhibiting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activity in the human colon cancer HT-29 cell line. *J Biol Chem* 2002;277:27613-27621

World Journal of Gastroenterology 审稿要点

《World Journal of Gastroenterology, WJG》根据编委的审稿意见, 来稿分为优先发表、可以发表、修改后发表、修改后再审等项处理. WJG 为了确保其出版的每篇论文的学术质量, 特制定了以下评审要点. (1)题名: 是否准确反映了研究工作的科学问题, 内容是否简明而有特色. 若不符, 请提出具体修改意见. (2)摘要: 是否明确指出了研究的背景与目的、材料和方法、结果(包括重要数据)和结论, 创新点和重点科学问题是否与目的、材料和方法、结果(包括重要数据)和结论相符. (3)引言: 是否包括该研究的目的和与其他相关研究的关系. (4)材料和方法: 有无特色, 如大样本、安全性和有效性的随机、双盲双模拟、多中心平行对照临床试验、特殊病例、细胞或组织样品; 研究方法和技术的有无创新性、系统性或特色. 改进和创新方法的描述是否达到了他人可以重复或验证的要求, 实验对照的设计是否合理可靠, 统计学处理方法的使用是否恰当. (5)结果: 是否能得出较明确的科学结论, 实验证据是否充足. 临床研究重点应看其样本大小和统计学分析结果. (6)讨论: 是否条理分明, 有无系统的理论分析和有价值的科学结论. (7)参考文献: 文献引用是否恰当和充分, 特别是最新文献的引用情况. (8)综合评价: 论文的科学性、创新性和可读性是否能较好地反映我国或国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平.