

# MK886对人结肠癌细胞SW480、Caco-2增殖和凋亡的影响

周娟燕, 唐采白, 陈复兴, 刘军权, 吕小婷, 费素娟

## ■背景资料

随着饮食结构及生活习惯的变化, 国内大肠癌发病率呈明显上升趋势, 其逐年递增率超过国际平均水平。调查显示, 男性大肠癌死亡率居全部恶性肿瘤第五位, 而肠癌的发病率年均增幅已达4.71%。由于大肠癌早期症状通常不明显, 多数患者确诊时已进入晚期, 故大肠癌的早发现、早诊治是国际公认的肿瘤防治手段。近年来, 感染、炎症、炎症因子和大肠癌发生及恶化的关系逐渐引起人们的重视, 其中白三烯和前列腺素的作用受到特别的注意。已有研究表明在结肠癌组织中, 白三烯类物质的表达与正常组织相比有统计学差异。而5-脂氧合酶是白三烯生成的主要限速酶, MK886是5-脂氧合酶激活蛋白抑制剂, 本课题就其与结肠癌细胞之间的关系进行初步研究。

## ■同行评议者

卢宁, 副主任医师, 兰州军区乌鲁木齐总医院肿瘤科

周娟燕, 费素娟, 徐州医学院附属医院消化内科 江苏省徐州市 221002

唐采白, 徐州医学院第三附属医院消化内科 江苏省徐州市 221003

陈复兴, 刘军权, 吕小婷, 中国人民解放军第九七医院实验科 江苏省徐州市 221004

周娟燕, 2011级徐州医学院硕士, 主要从事消化系肿瘤的基础及临床研究。

徐州市科技基金资助项目, No. XM12B044

作者贡献分布: 周娟燕主要从事课题的研究过程、数据分析及论文写作部分; 费素娟与唐采白主要从事课题的设计、指导、试剂的提供及论文的修改; 陈复兴、刘军权及吕小婷对研究过程给予很大帮助, 给予技术指导。

通讯作者: 费素娟, 教授, 221002, 江苏省徐州市淮海西路84号, 徐州医学院附属医院消化内科。feisj99@163.com

电话: 0516-85806239

收稿日期: 2013-11-04 修回日期: 2013-12-26

接受日期: 2014-01-08 在线出版日期: 2014-03-08

## MK886 inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in human colon cancer cell lines SW480 and Caco-2

Juan-Yan Zhou, Cai-Bai Tang, Fu-Xing Chen, Jun-Qun Liu, Xiao-Ting Lv, Su-Juan Fei

Juan-Yan Zhou, Su-Juan Fei, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China

Cai-Bai Tang, Department of Gastroenterology, Third affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221003, Jiangsu Province, China

Fu-Xing Chen, Jun-Qun Liu, Xiao-Ting Lv, Department of Central Laboratory, 97th Hospital of PLA, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Su-Juan Fei, Professor, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, 99 West Huaihai Road, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China. feisj99@163.com

Received: 2013-11-04 Revised: 2013-12-26

Accepted: 2014-01-08 Published online: 2014-03-08

## Abstract

**AIM:** To observe the effects of 5-lipoxygenase activating protein (FLAP) MK886 on cell proliferation and apoptosis in human colon cancer cell lines SW480 and Caco-2.

**METHODS:** MTT assay was used to detect the effects of treatment with MK886 at different concentrations (6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{mol/L}$ )

for different durations (24, 48, 72 h) on the proliferation of SW480 and Caco-2 cells. The apoptosis of cells treated with MK886 at concentrations of 12.5, 25, 50, and 100  $\mu\text{mol/L}$  for 72 h was assessed by flow cytometry with annexin V-FITC/PI. The cell cycle of cells treated with MK886 at concentrations of 12.5, 25, and 50  $\mu\text{mol/L}$  for 72 h was assessed by flow cytometry.

**RESULTS:** MK886 at concentrations between 50 and 200  $\mu\text{mol/L}$  inhibited the proliferation of SW480 cells in a dose- and time-dependent manner. Treatment with MK886 at concentrations from 12.5 to 25  $\mu\text{mol/L}$  for 24 h did not significantly inhibit the proliferation of SW480 cells, but treatment for 48 h or 72 h significantly inhibit cell proliferation in a dose- and time-dependent manner. MK886 at a concentration of 6.25  $\mu\text{mol/L}$  had no significant effects on the proliferation of SW480 cells. In Caco-2 cells, MK886 at concentrations from 25 to 200  $\mu\text{mol/L}$  inhibited cell proliferation in a dose- and time-dependent manner, but MK886 at concentrations between 6.25 and 12.5  $\mu\text{mol/L}$  MK886 had no significant inhibitory effect on the proliferation of Caco-2 cells. Treatment with MK886 at a concentration of 200  $\mu\text{mol/L}$  for 24 h significantly inhibited the growth of SW480 and Caco-2 cells, and the reduced rate of cell growth was 90%. MK886 at concentrations from 12.5 to 100  $\mu\text{mol/L}$  increased the apoptosis rate of the two cell lines in a dose- and time-dependent manner. Treatment with MK886 at concentrations from 12.5 to 50  $\mu\text{mol/L}$  for 72 h increased the percentage of cells in  $G_0/G_1$  phase but decreased that in S phase.

**CONCLUSION:** MK886 significantly inhibits the growth of SW480 and Caco-2 cells possibly by blocking cells in  $G_0/G_1$  phase and inducing cell apoptosis.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

**Key Words:** MK886; SW480; Caco-2; Apoptosis; Cell cycle

Zhou JY, Tang CB, Chen FX, Liu JQ, Lv XT, Fei SJ. MK886

inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in human colon cancer cell lines SW480 and Caco-2. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(7): 982-987 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/982.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i7.982>

## 摘要

**目的:** 观察5-脂氧合酶活化蛋白(5-lipoxygenase activating protein, FLAP)抑制剂MK886对人结肠癌细胞株SW480、Caco-2增殖和凋亡的影响。

**方法:** 噻唑蓝(MTT)比色法检测6.25、12.5、25、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$  MK886作用24、48、72 h对SW480和Caco-2细胞的抑制率; Annexin V-FITC/PI双染流式细胞术检测12.5、25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  MK886作用72 h的结肠癌细胞凋亡率; 流式细胞仪检测12.5、25、50  $\mu\text{mol/L}$  MK886作用72 h的结肠癌细胞周期。

**结果:** 50  $\mu\text{mol/L}$ 到200  $\mu\text{mol/L}$ 的MK886对结肠癌SW480细胞有抑制作用, 且存在时效和量效依赖性; 而12.5  $\mu\text{mol/L}$ 到25  $\mu\text{mol/L}$ 浓度的MK886处理24 h后, 对SW480细胞无明显作用, 延长时间至48、72 h后, 作用有统计学意义, 且同样存在时效和量效依赖性; 6.25  $\mu\text{mol/L}$ 的MK886对SW480细胞无抑制作用。25  $\mu\text{mol/L}$ 到200  $\mu\text{mol/L}$ 的MK886对结肠癌Caco-2细胞有抑制作用, 且存在时效和量效依赖性; 而6.25  $\mu\text{mol/L}$ 到12.5  $\mu\text{mol/L}$ 浓度的MK886对Caco-2细胞无抑制作用。200  $\mu\text{mol/L}$  MK886作用24 h即可明显抑制SW480、Caco-2两种结肠癌细胞株的增殖, 抑制率接近90%。12.5  $\mu\text{mol/L}$ 到100  $\mu\text{mol/L}$ 浓度的MK886对两种结肠癌SW480和Caco-2细胞有凋亡作用, 且存在时效和量效依赖性; 12.5  $\mu\text{mol/L}$ 到50  $\mu\text{mol/L}$ 浓度的MK886可以增加两种结肠癌SW480和Caco-2细胞G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期比例, 降低S期比例。

**结论:** MK886具有显著的抑制人结肠癌SW480、Caco-2细胞株增殖的作用, 该作用可能是通过阻滞细胞于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期, 并诱导肿瘤细胞凋亡所致。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

**关键词:** MK886; SW480细胞; Caco-2细胞; 凋亡; 细胞周期

**核心提示:** MK886具有显著的抗肿瘤细胞的效应, MK886对结肠癌细胞抑制率在一定范

围内具有时间、浓度依赖性。主要通过诱导细胞凋亡、阻滞细胞周期而抑制肿瘤细胞增殖。本工作为临床应用MK886治疗结肠癌提供了体外实验的依据, 很可能为结肠癌治疗提供一种全新的思路, 但其抗肿瘤机制及其临床观察, 有待进一步更深入的研究。

周娟燕, 唐采白, 陈复兴, 刘军权, 吕小婷, 费素娟. MK886对人结肠癌细胞SW480、Caco-2增殖和凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2014; 22(7): 982-987 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/982.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i7.982>

## 0 引言

结直肠癌(colitis associated carcinoma, CRC)是一种常见的恶性肿瘤, 在西欧国家, 发病率居第3位。在我国, 随着饮食结构和生活习惯的变化, 结直肠癌的发病率和病死率也逐年升高, 其逐年递增率超过国际平均水平, 且呈现出年轻化趋势。近年来, 感染、炎症、炎症因子和结直肠癌发生及恶化的关系逐渐引起人们的重视。统计研究表明, 慢性炎症和肿瘤发生相关程度最高的就是患有炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的结肠癌患者, 与正常组相比, IBD患者结肠癌发生的风险要高30倍<sup>[1]</sup>。此外, 在没有IBD发病基础的原发性结直肠癌患者中, Ning等<sup>[2]</sup>研究发现, 肿瘤组织中也伴有大量炎性细胞的浸润, 以及炎性因子表达的上升。目前, 炎性因子半胱氨酰白三烯(cysteinylleukotrienes, CysLTs)在结直肠癌发生中的作用研究在国外尚处于开始阶段, 但国内鲜有报道。5-脂氧合酶在催化花生四烯酸代谢生成半胱氨酰白三烯的过程中需5-脂氧合酶活化蛋白(5-lipoxygenase activating protein, FLAP)传送底物来协助, MK886是FLAP抑制剂, 能特异性与FLAP结合而抑制5-脂氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)的活性, 从而阻止花生四烯酸的5-LOX代谢途径, 减少半胱氨酰白三烯的生成。本文研究MK886对结肠癌SW480和Caco-2细胞的增殖抑制作用, 为进一步明确结肠癌的具体发病机制提供理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人结肠癌SW480细胞由徐州九七医院实验室保存; 人结肠腺癌Caco-2细胞购自中科院上海细胞库; 细胞培养液RPMI 1640、DMEM高糖培养基购自碧云天生物技术研究所; MK886购自美国Enzo公司; MTT购自美国Sigma公司;

## ■ 研发前沿

在多年的临床实践和科研过程中, 我们观察和注意到慢性炎症与结肠癌的发生有一定的相关性。本研究以结肠癌上皮细胞系为模型, 以MTT和流式细胞术为主要手段, 研究5-脂氧合酶激活蛋白抑制剂MK886对结肠癌细胞的增殖和凋亡的变化情况, 以期发现5-LOX通路在结肠癌发生发展过程中的作用。

## ■相关报道

Tong等在胰腺癌的研究中发现5-LOX的代谢产物LTB4可以通过诱导EPK1/2磷酸化,从而促进胰腺癌细胞增殖。Ding等进一步报道,5-LOX抑制剂可引起胰腺癌细胞的凋亡和形态学变化。Zhi等运用DNA芯片技术发现,5-LOX在人食管鳞状细胞癌中过度表达。Hoque等研究发现在79%食管癌患者的组织中表达5-LOX,应用5-LOX抑制剂AA861和REV5901能够诱导食管癌细胞发生凋亡,抑制细胞活力,并且这种作用具有剂量依赖性。不仅是消化系肿瘤,在肺癌、前列腺癌、肾细胞癌等其他肿瘤中也出现类似结果。这些研究结果表明5-LOX与消化系统肿瘤,甚至其他系统的相关肿瘤均有着密切关系。

Annexin V-FITC检测试剂盒购自美国BD公司;细胞周期试剂盒购自碧云天生物技术研究;CO<sub>2</sub>恒温细胞培养箱购自美国Thermo公司;IX71型倒置相差显微镜购自日本Olympus公司。

## 1.2 方法

1.2.1 细胞培养及药物准备:人结肠癌SW480及Caco-2细胞分别培养于含10%胎牛血清的RPMI 1640及DMEM培养基中,所有培养基分别加有55 μg/mL链霉素及55 IU/mL青霉素。细胞单层贴壁生长在37 °C, 5%CO<sub>2</sub>培养箱中,平均2-3 d换液,待细胞长至80%-90%融合,用0.25%的胰蛋白酶消化后按 $2 \times 10^5$ - $3 \times 10^5$ /mL细胞的密度传代,开始实验。5 mg MK886用DMSO配成20 mmol/L的母液,4 °C储存备用。实验浓度MK886用培养液稀释。所有实验均重复3次以上。

1.2.2 MTT法检测MK886对SW480和Caco-2细胞的增殖抑制率:取对数生长期的SW480和Caco-2结肠癌细胞按 $1 \times 10^3$ /孔的密度分别接种于96孔培养板,设实验组和空白对照组, MK886浓度设200、100、50、25、12.5、6.25 μmol/L共6个浓度组,每个浓度组设5个复孔,两种细胞分别在含不同浓度的相应培养基中培养24、48和72 h。酶标仪490 nm处测各孔吸光度(A)值。计算不同MK886浓度组作用不同时间对结肠癌细胞的抑制率,细胞抑制率(%) = (1-实验组平均A值/空白对照平均A值) × 100%。实验重复3次。根据对肿瘤细胞的增殖抑制效果选择进一步实验的MK886浓度。

1.2.3 流式细胞仪检测实验浓度MK886对SW480和Caco-2细胞凋亡率的影响:将SW480和Caco-2细胞按 $2 \times 10^5$ /mL的密度接种于6孔板,常规培养。设空白对照组及100、50、25、12.5 μmol/L MK886作用72 h实验组。各组细胞用0.25%胰蛋白酶消化,制成单细胞悬液, PBS漂洗,重悬在 $1 \times$  annexin V结合缓冲液中,调细胞密度为 $10^6$ 个/mL。用5 μL Annexin V-FITC和 $1 \times$  annexin-binding buffer室温孵育15 min,然后加入300 μL  $1 \times$  annexin V结合缓冲液和5 μL PI工作液,置于冰上,尽快对染色细胞于流式细胞仪检测分析。

1.2.4 流式细胞仪检测实验浓度MK886对SW480和Caco-2细胞周期的影响:将SW480和Caco-2细胞按 $2 \times 10^5$ 个/mL的密度接种于6孔板,常规培养。设空白对照组及50、25、12.5 μmol/L MK886作用72 h实验组。各组细胞用0.25%胰蛋白酶消化,制成单细胞悬液,1000 g离心3-5 min,去上清,1 mL PBS重悬,再次离心,残留50

μL PBS重悬,1 mL预冷700 mL/L乙醇,4 °C固定2 h,1000 g离心3-5 min,弃上清,1 mL PBS重悬,再次离心弃上清,加入0.5 mL碘化丙啶染色液,37 °C避光温浴30 min,用流式细胞仪在激发波长488 nm处检测红色荧光,同时检测光散射情况。相应分析软件进行细胞DNA含量分析和光散射分析。

**统计学处理** 实验数据以mean ± SD表示。应用SPSS13.0统计软件分析,进行样本正态分布和方差齐性检验。两独立样本均数比较用t检验。多组均数间比较用单因素方差分析(SNK检验,均数两两比较用Bonferroni法);方差差不齐用近似F检验,均数两两比较用Dunnett T3, 2-sided检验。

## 2 结果

2.1 不同浓度(时间)MK886对SW480和Caco-2细胞增殖抑制作用 对SW480细胞增殖抑制作用(表1):单因素方差分析显示:200、100、50 μmol/L MK886处理24 h后,SW480细胞的增殖受到明显抑制( $P < 0.05$ );200、100、50、25、12.5 μmol/L MK886处理48、72 h后,SW480细胞的增殖受到明显抑制( $P < 0.05$ ),且随药物浓度增加,细胞的增殖抑制更明显。200 μmol/L MK886处理72 h对SW480细胞抑制率与24、48 h比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );100、50、25、12.5、6.25 μmol/L处理72 h对SW480细胞抑制率与24 h比较,对细胞的抑制作用随时间延长而升高( $P < 0.05$ )。提示:在一定浓度范围内,随浓度增加和时间延长, MK886对SW480细胞增殖抑制率逐渐增高。200 μmol/L作用24、48、72 h,细胞增殖抑制率达90%以上,抑制率已不再随时间延长而增高。

对Caco-2细胞增殖抑制作用(表2):200、100、50、25 μmol/L MK886处理24、48、72 h后,Caco-2细胞的增殖受到明显抑制( $P < 0.05$ ),且随药物浓度增加,细胞的增殖抑制更明显。200 μmol/L MK886处理72 h对Caco-2细胞抑制率与24、48 h比较,对细胞的增殖抑制作用无明显差别( $P > 0.05$ );100、50、25、12.5、6.25 μmol/L处理72 h对Caco-2细胞抑制率与24 h比较,对细胞的抑制作用随时间延长而升高( $P < 0.05$ )。提示:在一定浓度范围内,随浓度增加和时间延长, MK886对Caco-2细胞增殖抑制率逐渐增高。200 μmol/L作用24、48、72 h,细胞增殖抑制率达90%左右,抑制率已不再随时间延长而增高。

2.2 MK886诱导肿瘤细胞SW480、Caco-2凋亡的



表 1 MK886不同浓度(时间)对SW480细胞的增殖抑制率 (% , mean  $\pm$  SD)

MK886( $\mu$ mol/L)	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0	0	0
6.25	3.40 $\pm$ 0.89	5.00 $\pm$ 1.19	9.00 $\pm$ 2.10 <sup>de</sup>
12.5	6.00 $\pm$ 1.64	8.51 $\pm$ 1.30 <sup>a</sup>	10.99 $\pm$ 1.81 <sup>ad</sup>
25	9.99 $\pm$ 1.99	24.00 $\pm$ 3.07 <sup>ad</sup>	32.97 $\pm$ 3.03 <sup>adf</sup>
50	38.00 $\pm$ 3.26 <sup>a</sup>	43.01 $\pm$ 3.30 <sup>b</sup>	67.01 $\pm$ 3.97 <sup>bdf</sup>
100	77.00 $\pm$ 4.38 <sup>b</sup>	92.69 $\pm$ 6.39 <sup>bc</sup>	92.79 $\pm$ 6.08 <sup>bc</sup>
200	93.45 $\pm$ 6.96 <sup>b</sup>	92.40 $\pm$ 6.23 <sup>b</sup>	91.04 $\pm$ 5.62 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P$ <0.05, <sup>b</sup> $P$ <0.01 vs 空白对照组; <sup>c</sup> $P$ <0.05, <sup>d</sup> $P$ <0.01 vs 24 h; <sup>e</sup> $P$ <0.05, <sup>f</sup> $P$ <0.01 vs 48 h.

表 2 MK886不同浓度(时间)对Caco-2细胞的增殖抑制率 (% , mean  $\pm$  SD)

MK886( $\mu$ mol/L)	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0	0	0
6.25	2.05 $\pm$ 0.68	3.01 $\pm$ 0.86	5.15 $\pm$ 0.94 <sup>de</sup>
12.5	6.99 $\pm$ 1.28	12.01 $\pm$ 2.49 <sup>c</sup>	14.06 $\pm$ 2.55 <sup>d</sup>
25	9.03 $\pm$ 1.26 <sup>a</sup>	29.23 $\pm$ 2.80 <sup>ad</sup>	47.00 $\pm$ 3.09 <sup>bdf</sup>
50	15.01 $\pm$ 2.61 <sup>a</sup>	43.51 $\pm$ 3.33 <sup>ad</sup>	64.01 $\pm$ 3.89 <sup>bdf</sup>
100	34.98 $\pm$ 2.90 <sup>a</sup>	81.99 $\pm$ 4.02 <sup>bd</sup>	88.02 $\pm$ 4.48 <sup>bd</sup>
200	84.99 $\pm$ 4.22 <sup>b</sup>	89.94 $\pm$ 4.59 <sup>b</sup>	90.72 $\pm$ 5.79 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P$ <0.05, <sup>b</sup> $P$ <0.01 vs 空白对照组; <sup>c</sup> $P$ <0.05, <sup>d</sup> $P$ <0.01 vs 24 h; <sup>e</sup> $P$ <0.05, <sup>f</sup> $P$ <0.01 vs 48 h.

表 3 MK886对SW480、Caco-2细胞凋亡的影响 (% , mean  $\pm$  SD)

MK886( $\mu$ mol/L)	SW480细胞凋亡率	Caco-2细胞凋亡率
空白对照组	4.61 $\pm$ 1.27	4.21 $\pm$ 1.19
12.5	9.21 $\pm$ 2.47 <sup>b</sup>	10.37 $\pm$ 1.70 <sup>b</sup>
25	8.12 $\pm$ 2.39 <sup>a</sup>	17.15 $\pm$ 2.30 <sup>b</sup>
50	18.29 $\pm$ 2.97 <sup>b</sup>	22.38 $\pm$ 3.13 <sup>b</sup>
100	24.36 $\pm$ 3.09 <sup>b</sup>	26.20 $\pm$ 3.28 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P$ <0.05, <sup>b</sup> $P$ <0.01 vs 空白对照组.

作用 与空白对照组相比, 12.5  $\mu$ mol/L到50  $\mu$ mol/L浓度的MK886对两种结肠癌SW480和Caco-2细胞的凋亡率升高( $P$ <0.05), 在12.5  $\mu$ mol/L到50  $\mu$ mol/L范围内随着浓度的增加其诱导细胞凋亡的作用也逐渐增强(表3).

2.3 不同浓度MK886对结肠癌细胞细胞周期的影响 与空白对照组相比, 处理72 h后, 12.5  $\mu$ mol/L到50  $\mu$ mol/L浓度的MK886增加两种结肠癌SW480和Caco-2细胞G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期的比例( $P$ <0.05), 降低S期比例( $P$ <0.05), 降低G<sub>2</sub>/M期比例( $P$ <0.05), 且随着药物浓度增高, 这种变化趋势更加明显.

提示MK886可将细胞阻滞于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期, 并在一定范围内呈浓度依赖性(表4).

### 3 讨论

5-LOX是脂氧合酶(LOX)的一个重要亚型, 花生四烯酸代谢酶是刺激上皮细胞生长的重要介质, Hong等<sup>[3]</sup>研究表明大多数肿瘤细胞中均表达花生四烯酸代谢酶, 其中5-LOX在所有上皮肿瘤中表达均明显增加. 研究认为, 5-LOX的主要作用机制是在Ca<sup>2+</sup>的刺激下由细胞质转移到核膜上, 细胞膜磷脂在磷脂酶A2的作用下释放的花生四烯酸(arachidonic acid, AA), 与FLAP特异性结合, 后者将AA呈递给5-LOX并激活5-LOX, 5-LOX通过加氧酶作用, 催化促使氧分子与AA合并, 从而生成5-过氧化氢二十碳四烯酸(5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid, 5-HPETE), 继而形成不稳定的环氧物白三烯(leukotriene A<sub>4</sub>, LTA<sub>4</sub>), LTA<sub>4</sub>在LTA<sub>4</sub>水解酶的作用下生成二羟酸白三烯(leukotriene B<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>), 在LTC<sub>4</sub>合成酶的作用下生成白细胞三烯C<sub>4</sub>(leukotrienes C<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>), 并进一步生成白细胞三烯D<sub>4</sub>(leukotrienes D<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>)及白细胞三烯E<sub>4</sub>(leukotrienes E<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>),

### ■创新盘点

国内外研究已就消化系统肿瘤与5-LOX的关系有了很多报道, 但对于结肠癌的研究, 国内主要侧重于临床组织标本, 尚未开展关于结肠癌细胞系与MK886关系的研究. 而且国外也只有少量零星报道. 由于国内外人种基因的差异和饮食环境的不同, 因此在国内进行该项研究具有重要的意义, 属国内领先水平并填补国内这方面的空白.

## ■应用要点

众所周知,目前肿瘤患者的治疗仍是困扰医学界的一大难题,结肠癌由于其早期症状不明显,难以早期发现、诊断,部分患者发现时已属于晚期,丧失了手术机会。本研究表明确实5-脂氧合酶激活蛋白抑制剂可以明显抑制结肠癌细胞的增殖、促进其凋亡,为临床应用MK886治疗结肠癌提供了体外实验的依据,很可能为结肠癌治疗提供一种全新的思路。

表 4 MK886对SW480、Caco-2细胞周期的影响 (% , mean  $\pm$  SD)

MK886( $\mu$ mol/L)	SW480			Caco-2		
	G <sub>1</sub> 期	G <sub>2</sub> 期	S期	G <sub>1</sub> 期	G <sub>2</sub> 期	S期
空白对照组	42.55 $\pm$ 2.20	12.78 $\pm$ 1.43	44.68 $\pm$ 3.54	39.64 $\pm$ 2.29	13.03 $\pm$ 1.90	47.32 $\pm$ 4.11
12.5	54.99 $\pm$ 2.41 <sup>b</sup>	10.17 $\pm$ 1.31 <sup>a</sup>	34.84 $\pm$ 2.21 <sup>b</sup>	50.84 $\pm$ 2.81 <sup>b</sup>	11.57 $\pm$ 1.60	37.60 $\pm$ 3.93 <sup>b</sup>
25	60.05 $\pm$ 2.88 <sup>b</sup>	9.77 $\pm$ 1.24 <sup>b</sup>	30.17 $\pm$ 4.07 <sup>b</sup>	55.77 $\pm$ 3.34 <sup>b</sup>	9.14 $\pm$ 1.99 <sup>b</sup>	35.09 $\pm$ 5.30 <sup>b</sup>
50	70.57 $\pm$ 3.24 <sup>b</sup>	8.64 $\pm$ 1.70 <sup>b</sup>	20.78 $\pm$ 4.90 <sup>b</sup>	61.60 $\pm$ 3.59 <sup>b</sup>	8.63 $\pm$ 1.60 <sup>b</sup>	29.78 $\pm$ 5.17 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 空白对照组。

其中LTC<sub>4</sub>、LTD<sub>4</sub>、LTE<sub>4</sub>统称半胱氨酰白三烯。5-LOX是此过程的关键酶。Tong等<sup>[4,5]</sup>在胰腺癌的研究中发现5-LOX的代谢产物LTB<sub>4</sub>可以通过诱导EPK1/2磷酸化,从而促进胰腺癌细胞增殖。Ding等<sup>[6]</sup>进一步报道,5-LOX抑制剂可引起胰腺癌细胞的凋亡和形态学变化。Zhi等<sup>[7]</sup>运用DNA芯片技术发现,5-LOX在人食管鳞状细胞癌中过度表达。Hoque等<sup>[8]</sup>研究发现在79%食管癌患者的组织中表达5-LOX,应用5-LOX抑制剂AA861和REV5901能够诱导食管癌细胞发生凋亡,抑制细胞活力,并且这种作用具有剂量依赖性。不仅是消化系肿瘤,在肺癌、前列腺癌、肾细胞癌等其他肿瘤中也出现类似结果<sup>[9]</sup>。

结肠癌是常见的消化系肿瘤。近年来,随着生活水平的提高,饮食中脂肪含量增高等原因,使结肠癌在我国有上升趋势,而且结肠癌发病年龄逐渐年轻化,早期容易发生转移。对于结肠癌的治疗,除手术切除外,化疗和放疗也是重要的治疗方法。传统的化疗药物效果差,不良反应较多,患者的耐受性较差。因此,积极寻找一种新的治疗结肠癌的有效途径,已经受到越来越多学者的普遍重视。

近年来,感染、炎症、炎症因子和结肠癌发生及恶化的关系逐渐引起人们的重视。统计学研究表明,慢性炎症和肿瘤发生相关程度最高的就是患有IBD的结肠癌患者。Jupp等<sup>[10]</sup>发现IBD炎症组织中5-LOX表达明显高于正常,差异有统计学意义。研究表明,IBD相关CRC约占1%-2%<sup>[11]</sup>。尽管IBD相关CRC在CRC中所占比率不高,但却占IBD死因的10%-15%<sup>[12]</sup>,因此,控制IBD的发生有利于减少结肠癌的发病率及死亡率。

MK886是FLAP抑制剂,可以直接抑制花生四烯酸代谢的5-LOX途径,减少5-LOX的表达。大量的体内外实验证明他对胰腺癌<sup>[13]</sup>、乳腺癌<sup>[14]</sup>、胃癌<sup>[15]</sup>、前列腺癌<sup>[16]</sup>等肿瘤细胞有生长抑制作用。本实验通过研究MK886对结肠癌细胞SW480和

Caco-2的增殖结果显示,随着MK886作用时间的延长,作用浓度的增加,均使肿瘤细胞的抑制率增高。MK886对SW480和Caco-2细胞的增殖抑制作用呈一定的量效和时效依赖性。在低浓度时,MK886对肿瘤细胞的增殖无明显作用,当浓度增加至200  $\mu$ mol/L时,MK886作用24 h即可达到很高的抑制率,但此时的抑制率不再随时间延长而增高。

细胞凋亡是由基因控制的细胞自主的有序的死亡,肿瘤无限制增生的恶性生物学特征与肿瘤细胞凋亡减少有关,随着对凋亡分子研究的深入,我们认识到诱导肿瘤细胞凋亡是一种有效治疗肿瘤的途径。通过流式细胞术,我们发现MK886可诱导结肠癌SW480、Caco-2细胞凋亡,且随着MK886浓度的增加,结肠癌细胞的凋亡率明显增加,说明5-LOX抑制剂可诱导结肠癌细胞凋亡。

目前认为结肠癌是一种细胞周期失调疾病,细胞周期靶向治疗是结肠癌化疗药物应用的一个重要策略<sup>[17,18]</sup>。本实验研究发现:MK886对SW480和Caco-2两种结肠癌细胞有周期阻滞作用,可将细胞阻滞于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期,且随着药物浓度的增加,趋势更明显。

本研究表明,MK886具有显著的抗肿瘤细胞的效应,MK886对结肠癌细胞抑制率在一定范围内具有时间、浓度依赖性。主要通过诱导细胞凋亡、阻滞细胞周期而抑制肿瘤细胞增殖。本工作为临床应用MK886治疗结肠癌提供了体外实验的依据,很可能为结肠癌治疗提供一种全新的思路,但其抗肿瘤机制及其临床观察,有待进一步更深入的研究。

## 4 参考文献

- 1 Terzić J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 2010; 138: 2101-2114. e5 [PMID: 20420949 DOI: 10.1053/j.gastro.2010.01.058]

- 2 Ning Y, Manegold PC, Hong YK, Zhang W, Pohl A, Lurje G, Winder T, Yang D, LaBonte MJ, Wilson PM, Ladner RD, Lenz HJ. Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models. *Int J Cancer* 2011; 128: 2038-2049 [PMID: 20648559 DOI: 10.1002/ijc.25562]
- 3 Hong SH, Avis I, Vos MD, Martínez A, Treston AM, Mulshine JL. Relationship of arachidonic acid metabolizing enzyme expression in epithelial cancer cell lines to the growth effect of selective biochemical inhibitors. *Cancer Res* 1999; 59: 2223-2228 [PMID: 10232612]
- 4 Tong WG, Ding XZ, Hennig R, Witt RC, Standop J, Pour PM, Adrian TE. Leukotriene B4 receptor antagonist LY293111 inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3232-3242 [PMID: 12374694]
- 5 Tong WG, Ding XZ, Talamonti MS, Bell RH, Adrian TE. Leukotriene B4 receptor antagonist LY293111 induces S-phase cell cycle arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Anticancer Drugs* 2007; 18: 535-541 [PMID: 17414622 DOI: 10.1097/01.cad.0000231477.22901.8a]
- 6 Ding XZ, Kuszynski CA, El-Metwally TH, Adrian TE. Lipoyxygenase inhibition induced apoptosis, morphological changes, and carbonic anhydrase expression in human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 266: 392-399 [PMID: 10600514 DOI: 10.1006/bbrc.1999.1824]
- 7 Zhi H, Zhang J, Hu G, Lu J, Wang X, Zhou C, Wu M, Liu Z. The deregulation of arachidonic acid metabolism-related genes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 106: 327-333 [PMID: 12845669 DOI: 10.1002/ijc.11225]
- 8 Hoque A, Lippman SM, Wu TT, Xu Y, Liang ZD, Swisher S, Zhang H, Cao L, Ajani JA, Xu XC. Increased 5-lipoxygenase expression and induction of apoptosis by its inhibitors in esophageal cancer: a potential target for prevention. *Carcinogenesis* 2005; 26: 785-791 [PMID: 15661803 DOI: 10.1093/carcin/bgi026]
- 9 Steele VE, Holmes CA, Hawk ET, Kopelovich L, Lubet RA, Crowell JA, Sigman CC, Kelloff GJ. Lipoxygenase inhibitors as potential cancer chemopreventives. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8: 467-483 [PMID: 10350444]
- 10 Jupp J, Hillier K, Elliott DH, Fine DR, Bateman AC, Johnson PA, Cazaly AM, Penrose JF, Sampson AP. Colonic expression of leukotriene-pathway enzymes in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 537-546 [PMID: 17230539 DOI: 10.1002/ibd.20094]
- 11 Ouaiissi M, Maggiori L, Alves A, Giger U, Sielezneff I, Valleur P, Sastre B, Panis Y. Colorectal cancer complicating inflammatory bowel disease: a comparative study of Crohn's disease vs ulcerative colitis in 34 patients. *Colorectal Dis* 2011; 13: 684-688 [PMID: 20184639 DOI: 0.1111/j.1463-1318.2010.02241]
- 12 Herszenyi L, Miheller P, Tulassay Z. Carcinogenesis in inflammatory bowel disease. *Dig Dis* 2007; 25: 267-269 [PMID: 17827953 DOI: 10.1159/000103898]
- 13 Schuller HM, Zhang L, Weddle DL, Castonguay A, Walker K, Miller MS. The cyclooxygenase inhibitor ibuprofen and the FLAP inhibitor MK886 inhibit pancreatic carcinogenesis induced in hamsters by transplacental exposure to ethanol and the tobacco carcinogen NNK. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002; 128: 525-532 [PMID: 12384795 DOI: 10.1007/s00432-002-0365-y]
- 14 Avis I, Hong SH, Martinez A, Moody T, Choi YH, Trepel J, Das R, Jett M, Mulshine JL. Five-lipoxygenase inhibitors can mediate apoptosis in human breast cancer cell lines through complex eicosanoid interactions. *FASEB J* 2001; 15: 2007-2009 [PMID: 11511519]
- 15 Fan XM, Tu SP, Lam SK, Wang WP, Wu J, Wong WM, Yuen MF, Lin MC, Kung HF, Wong BC. Five-lipoxygenase-activating protein inhibitor MK-886 induces apoptosis in gastric cancer through upregulation of p27kip1 and bax. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 31-37 [PMID: 14675240 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2004.03194.x]
- 16 Gugliucci A, Ranzato L, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Cusan C, Prato M, Mancini M, Pagano F, Bernardi P. Mitochondria are direct targets of the lipoxygenase inhibitor MK886. A strategy for cell killing by combined treatment with MK886 and cyclooxygenase inhibitors. *J Biol Chem* 2002; 277: 31789-31795 [PMID: 12080072 DOI: 10.1074/jbc.M204450200]
- 17 Freemantle SJ, Liu X, Feng Q, Galimberti F, Blumen S, Sekula D, Kitareewan S, Dragnev KH, Dmitrovsky E. Cyclin degradation for cancer therapy and chemoprevention. *J Cell Biochem* 2007; 102: 869-877 [PMID: 17868090 DOI: 10.1002/jcb.21519]
- 18 Dragnev KH, Pitha-Rowe I, Ma Y, Petty WJ, Sekula D, Murphy B, Rendi M, Suh N, Desai NB, Sporn MB, Freemantle SJ, Dmitrovsky E. Specific chemopreventive agents trigger proteasomal degradation of G1 cyclins: implications for combination therapy. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2570-2577 [PMID: 15073138 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0271]

#### 同行评价

本文观察FLAP抑制剂MK886对人结肠癌细胞株SW480、Caco-2增殖和凋亡的影响。结果表明MK886具有显著的抑制人结肠癌SW480、Caco-2细胞株增殖的作用,其作用可能是通过阻滞细胞于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期,并诱导肿瘤细胞凋亡所致。内容客观,实验方法成熟,观点新颖,具有一定的科学意义。

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静

