

【基础研究】

(ER、PR、HER-2 表达均为阴性)购于中国科学院上海细胞生物研究所。

1.1.2 主要试剂 RPMI1640 培养基、噻唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 试剂均购于北京爱普华美生物科技有限公司。选择性 COX-2 抑制剂尼美舒利系美国辉瑞公司产品 (生产批号: 0907063)。细胞凋亡检测 (Annexin V-FITC apoptosis detection kit, Annexin V-FITC) 试剂盒购于北京宝赛生物工程公司, 鼠抗人 Bcl-2、COX-2 及 Bax 单克隆抗体购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 培养于含体积分数 10% 胎牛血清 RPMI1640 培养基中, 置于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱内培养, 培养至 70% ~ 80% 融合时, 2.5 g · L⁻¹ 胰蛋白酶消化、传代, 维持适当的细胞浓度。

1.2.2 细胞增殖抑制的检测 将处于对数生长期的 MDA-MB-231 细胞接种于细胞培养板中。分别加入不同浓度 (15、30、60 及 120 μmol · L⁻¹) 尼美舒利, 并设空白对照 (对照组)。培养 24、48 和 72 h 后, 每孔加入 5 g · L⁻¹ MTT, 作用 4 h 后, 吸弃上清液, 加入二甲亚砜, 振荡, 溶解, 以空白孔调零。在酶联免疫检测仪 570 nm 波长处测定各孔光密度 (optical density, OD) 值, 求其平均值。按下列公式计算: 实验组细胞抑制率 = (1 - 实验组 OD 值 / 对照组 OD 值) × 100%。以药物浓度、时间为横坐标, 抑制率为纵坐标, 绘制细胞生长抑制曲线。

1.2.3 形态学观察 用透射电镜观察尼美舒利是否引起 MDA-MB-231 细胞凋亡。

1.2.4 细胞周期分布及凋亡检测 收集不同浓度尼美舒利处理 48 h 的 MDA-MB-231 细胞, 常规胰蛋白酶消化后, 调整待测细胞浓度为 (0.5 ~ 1.0) × 10⁹ L⁻¹, 取 1 mL 细胞悬液, 800 r · min⁻¹ 离心 8 min, 弃上清, 加入磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS) 洗涤 3 次后, 吹打成细胞悬液, 一部分用体积分数 70% 的乙醇 4 ℃ 固定 12 h, 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染液染色 30 min, 上流式细胞仪检测细胞周期, 应用 Multicycle 软件对检测数据分析结果^[3]; 另一部分按 Annexin/异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 及 PI 试剂盒提供方法依次加入结合缓冲液。Annexin/FITC 及 PI 4 ℃ 避光 30 min 后, 即可上流式细胞仪检测,

CELLQuest 软件计算细胞凋亡率, 重复 3 次, 取其平均值。

1.2.5 Cox-2、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达检测 收集经不同浓度尼美舒利作用 48 h 的 MDA-MB-231 细胞, 用预冷的 PBS 洗 2 次, 弃上清, 加入细胞裂解液裂解细胞, 冰浴 30 min, 4 ℃ 1 200 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清, 荧光酶标仪检测蛋白浓度。以体积分数 10% SDS-PAGE 电泳, 电转印后至聚丙二氟乙烯 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜上, PBS 漂洗后与鼠抗人 COX-2、Bcl-2 及 Bax 单抗分别孵育 2 h, 漂洗后, 加入试剂盒化学发光试剂, 在 X 线胶片曝光、显影、定影; Western blot 图片应用凝胶成像系统 (UVP, 美国) LabWorks 4.5 软件对蛋白表达进行半定量分析, 以积分光密度 (integrated optical density, IOD) 值表示。相对 IOD 值 = COX-2、Bcl-2 或 Bax 蛋白的 IOD 值 / 相应对照组蛋白的 IOD 值。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 11.0 软件进行数据分析, 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用方差分析和配对 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 尼美舒利对 MDA-MB-231 细胞增殖的抑制作用 结果见图 1。随着尼美舒利浓度的增加、作用时间的延长, 其对 MDA-MB-231 细胞的抑制率明显增高, 呈时间-浓度依赖性。

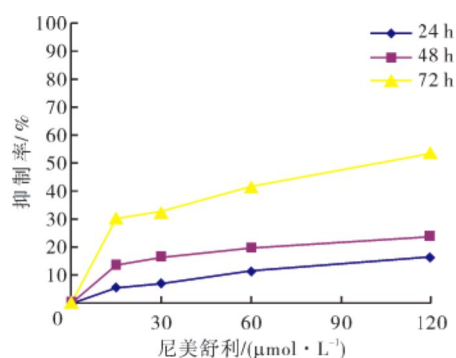


图 1 尼美舒利对 MDA-MB-231 细胞的增殖抑制作用

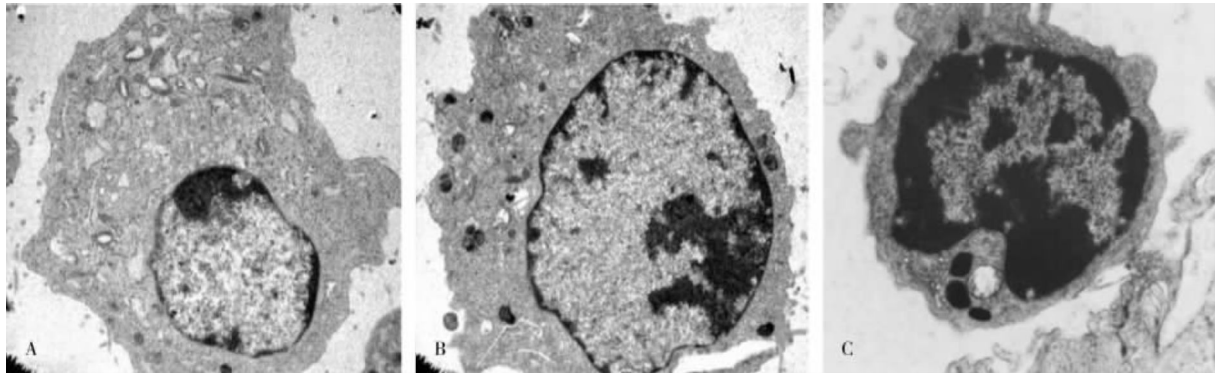
Fig. 1 Growth inhibition effect of nimesulide on MDA-MB-231 cells

2.2 形态学观察结果 结果见图 2。电镜下观察到尼美舒利作用后的细胞呈典型的凋亡形态学变化: 染色质凝集于细胞核和细胞膜周边, 细胞核固缩, 线粒体肿胀, 见囊泡状扩张的内质网、新月形小体形成等。

2.3 流式细胞仪分析结果

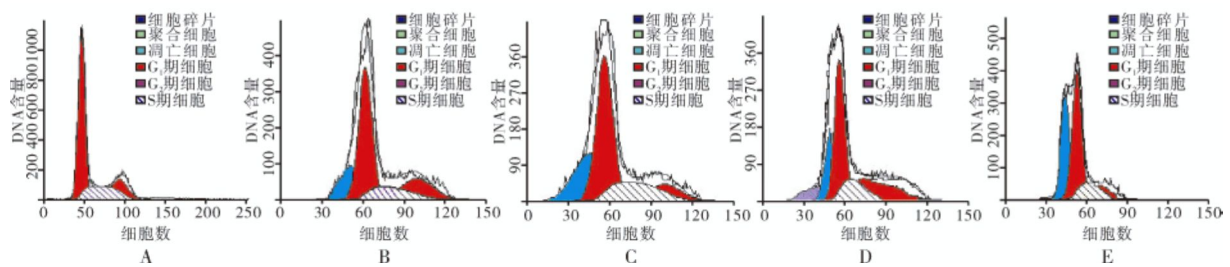
2.3.1 周期分布结果 结果见图 3、表 1。尼美舒利作用 MDA-MB-231 细胞 48 h 后,细胞周期呈浓度依赖性改变分布,G₀/G₁ 期细胞比例增高,S 期和 G₂/M 期细胞比例降低,可见在 G₁ 峰左侧出现亚二

倍体凋亡峰,对照组未检测到凋亡峰。随着浓度的增大,细胞凋亡率亦明显增加。尼美舒利以浓度依赖性方式阻滞细胞于 G₀/G₁ 期,并促进细胞凋亡,各组间比较差异有统计学意义 (*P* < 0.05) (图 3、表 1)。



A:30 μmol · L⁻¹组;B:60 μmol · L⁻¹组;C:120 μmol · L⁻¹组。
图 2 透射电镜观察不同浓度尼美舒利作用 48 h 后 MDA-MB-231 细胞的凋亡 (×6 200)

Fig.2 Apoptosis of MDA-MB-231 cells treated with different concentrations of nimesulide for 48 h observed under electron microscopy (×6 200)



A:对照组;B:15 μmol · L⁻¹组;C:30 μmol · L⁻¹组;D:60 μmol · L⁻¹组;E:120 μmol · L⁻¹组。
图 3 流式细胞仪检测不同浓度尼美舒利作用 48 h 后 MDA-MB-231 细胞周期图的变化

Fig.3 Cell cycle distribution of MDA-MB-231 cells treated with different concentrations of nimesulide for 48 h detected by flow cytometry

2.3.2 细胞凋亡检测 结果见表 1、图 4。尼美舒利能诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡,随着其浓度的提高,凋亡率明显增加,呈剂量依赖关系,不同浓度尼美舒利组间比较差异有统计学意义 (*P* < 0.05) (表 1、图 4)。不同浓度组与对照组比较,差异均有统计学意义 (*P* < 0.05, 0.01)。

表 1 不同浓度尼美舒利作用 48 h 对 MDA-MB-231 细胞凋亡率和细胞周期的影响

Tab.1 Apoptosis and cell cycle distribution of MDA-MB-231 cells treated with nimesulide for 48 h ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	细胞周期比例/%			凋亡率/%
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
对照组	47.04 ± 0.63	31.02 ± 1.43	21.20 ± 0.76	0.89 ± 0.13
15 μmol · L ⁻¹ 组	58.02 ± 1.14 ^a	24.80 ± 1.01 ^a	17.86 ± 0.15 ^a	17.22 ± 0.56 ^a
30 μmol · L ⁻¹ 组	67.71 ± 0.48 ^{ac}	17.34 ± 0.46 ^{ac}	14.01 ± 0.71 ^{ac}	23.30 ± 1.27 ^{ac}
60 μmol · L ⁻¹ 组	74.80 ± 1.41 ^{bc}	14.63 ± 1.97 ^{bc}	10.05 ± 0.21 ^{bc}	31.78 ± 1.17 ^{bc}
120 μmol · L ⁻¹ 组	84.35 ± 1.98 ^{bcd}	10.25 ± 0.57 ^{bcd}	5.31 ± 0.47 ^{bcd}	52.99 ± 0.51 ^{bcd}

注:与对照组比较^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01; 与 15 μmol · L⁻¹ 组比较^c*P* < 0.05; 与 30 μmol · L⁻¹ 组比较^d*P* < 0.05; 与 60 μmol · L⁻¹ 组比较^e*P* < 0.05。

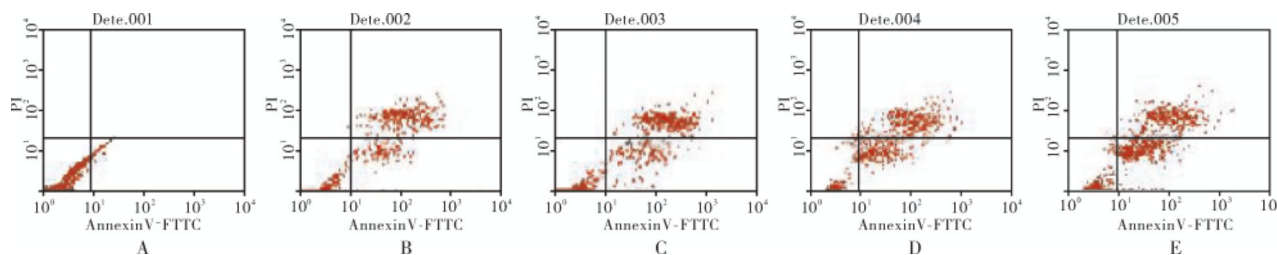
2.4 尼美舒利对 MDA-MB-231 细胞 COX-2、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达影响 结果见表 2。Western blot 结果显示:对照组细胞 COX-2 表达呈阳性,加尼美舒利后 COX-2 表达减弱,并随着浓度的增加,对 COX-2 蛋白的抑制作用逐渐增强。Bcl-2 的表达与 COX-2 一致,但 Bax 的表达却随着尼美舒利浓度的增加而逐渐增加,各浓度组与对照组比较,差异均有统计学意义 (*P* < 0.05)。

表 2 不同浓度尼美舒利作用 48 h 对 MDA-MB-231 细胞 COX-2、Bcl-2 和 Bax 相对表达量的影响

Tab.2 COX-2, Bcl-2 and Bax expression of MDA-MB-231 cells treated with nimesulide for 48 h

组别	相对表达量		
	COX-2	Bcl-2	Bax
对照组	0.872 ± 0.023	0.586 ± 0.024	0.100 ± 0.076
15 μmol · L ⁻¹ 组	0.729 ± 0.053	0.491 ± 0.056 ^a	0.242 ± 0.021 ^a
30 μmol · L ⁻¹ 组	0.636 ± 0.018 ^a	0.397 ± 0.012 ^a	0.374 ± 0.098 ^a
60 μmol · L ⁻¹ 组	0.318 ± 0.045 ^a	0.200 ± 0.029	0.505 ± 0.101 ^a
120 μmol · L ⁻¹ 组	0.112 ± 0.014 ^a	0.098 ± 0.037 ^a	0.618 ± 0.069

注:与对照组比较^a*P* < 0.05。



A:对照组;B:15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;C:30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;D:60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;E:120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组。

图4 流式细胞仪检测不同浓度尼美舒利作用48 h后MDA-MB-231细胞的凋亡率

Fig.4 Apoptosis of MDA-MB-231 cells treated with different concentrations of nimesulide for 48 h detected by flow cytometry

3 讨论

乳腺癌是一种异质性肿瘤,包含有多种生物学行为、临床病理特点和分子特征各不相同的类型,TNBC是一种具有特殊的生物学行为及临床病理特征的乳腺癌亚型,目前无针对性的治疗指南。TNBC具有高度侵袭性,多数患者在术后2~3 a内出现转移,多为肺部转移,5 a无病生存率均低于其他类型乳腺癌^[4],因此,寻找新的治疗方法引起了国内外学者的广泛关注。

尼美舒利是一种出现于20世纪90年代的非甾体类抗炎药,在体内外可抑制多种肿瘤细胞增生,诱导肿瘤细胞凋亡^[5]。近年来,COX-2在各种肿瘤中的表达及其抑制剂治疗肿瘤成为中外学者研究的热点^[6],尼美舒利作为特异性COX-2抑制剂,在肿瘤发生、发展的细胞凋亡过程中扮演着重要的角色,而且是放射治疗、化学治疗和生物治疗等方法治疗肿瘤的主要途径^[7-8]。研究表明,尼美舒利对结肠癌存在诱导凋亡的作用^[9]。尼美舒利在乳腺癌发生、发展和治疗中起着重要的作用^[10]。目前国内外尼美舒利对TNBC干细胞方面的报道很少,且具体的抗肿瘤机制尚不清楚。

本实验发现尼美舒利能够以时间-浓度依赖方式抑制MDA-MB-231细胞增殖;并能阻滞细胞周期,使 G_0/G_1 期细胞数增多,S期和 G_2/M 期细胞相应减少,阻滞细胞周期在 G_0/G_1 期,呈浓度依赖性。本研究结果还显示,尼美舒利可诱导MDA-MB-231细胞凋亡,并且也呈浓度依赖性。细胞凋亡过程伴随着COX-2、Bcl-2蛋白表达水平的降低和Bax蛋白表达水平的增高,提示尼美舒利除了作用于COX-2外,可能还通过调节Bcl-2和Bax的表达影响TNBC干细胞的增殖和凋亡,蛋白凋亡基因Bcl-2、Bax参

与了尼美舒利诱导的细胞凋亡过程。

选择性Bcl-2抑制剂尼美舒利在体外能够显著抑制TNBC干细胞的增殖,改变其细胞周期分布和诱导其凋亡。其机制可能与诱导凋亡和阻止细胞周期进展及蛋白凋亡基因Bcl-2、Bax参与了尼美舒利诱导的细胞凋亡过程有关。尼美舒利有可能成为TNBC化学治疗中新的、有效的药物。

参考文献:

- [1] Gierach G L, Burke A, Anderson W F. Epidemiology of triple negative breast cancers [J]. *Breast Dis*, 2010, 32 (1/2): 5-24.
- [2] Gelmon K, Dent R, Mackey J R, et al. Targeting triple-negative breast cancer: optimising therapeutic outcomes [J]. *Ann Oncol*, 2012, 23 (9): 2223-2234.
- [3] 刘飒,崔巍,王晓波,等.流式细胞术检测细胞周期分析软件比较[J].新乡医学院学报,2012,29(11):870-873.
- [4] 关印,徐兵河.三阴性乳腺癌的临床病理特征及预后分析[J].中华肿瘤杂志,2008,30(3):196-199.
- [5] Honeth G, Bendahl P O, Ringnér M, et al. The CD_{44}^+/CD_{24}^- phenotype is enriched in basal-like breast tumors [J]. *Breast Cancer Res*, 2008, 10 (3): R53.
- [6] 陈锦,孙彭利.塞来昔布诱导人肝癌细胞株QGY-770凋亡的研究[J].新乡医学院学报,2011,28(2):161-164.
- [7] Joshi P A, Khokha R. The mammary stem cell conundrum: is it unipotent or multipotent [J]. *Breast Cancer Res*, 2012, 14 (2): 305.
- [8] Zaha D C, Lazar E. Molecular characterization of apoptosis by the immunohistochemical evaluation of Bcl-2 in breast cancer [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2012, 53 (1): 155-160.
- [9] Maier T J, Schilling K, Schmidt R, et al. cyclooxygenase-2 (COX-2)-dependent and independent anticarcinogenic effects of nimesulide in human colon carcinoma cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 67 (8): 1469-1478.
- [10] Jana D, Sarkar D K, Maji A, et al. Can cyclooxygenase-2 be a useful prognostic and risk stratification marker in breast cancer [J]. *J Indian Med Assoc*, 2012, 110 (7): 429-433.

(本文编辑:王燕 英文编辑:王燕)