

◆本文引用:李红涛.尼美舒利对三阴性乳腺癌干细胞体外增殖和凋亡的影响[J].新乡医学院学报,2014,31(9):701-704.

【基础研究】

尼美舒利对三阴性乳腺癌干细胞体外增殖和凋亡的影响

李红涛

(焦作市人民医院乳甲外科,河南 焦作 454002)

摘要: 目的 体外研究选择性环氧酶-2(COX-2)抑制剂尼美舒利对三阴性乳腺癌(TNBC)干细胞体外增殖和凋亡的影响及可能的作用机制。方法 在人乳腺癌细胞株MDA-MB-231中分别加入不同浓度的尼美舒利,作用24、48、72 h后,应用噻唑蓝比色法检测细胞增殖抑制作用,流式细胞仪检测细胞周期和凋亡,电镜观察细胞形态,Western blot法检测Cox/Bax/Bcl-2蛋白表达。结果 尼美舒利能显著抑制TNBC干细胞增殖,呈时间和浓度依赖性;并使G₀/G₁期细胞增多,S期和G₂/M期细胞减少,引起明显的细胞凋亡。电镜可见典型的细胞凋亡形态学特征:细胞体积缩小、细胞核固缩、凋亡小体形成等。凋亡比例呈剂量依赖。Western blot分析显示,尼美舒利作用细胞后,随着浓度的增加细胞COX-2和Bcl-2表达水平降低,但Bax表达水平增高。结论 尼美舒利体外能够显著抑制TNBC干细胞增殖,诱导其凋亡,COX-2、Bcl-2及Bax等凋亡相关基因可能参与了尼美舒利诱导的TNBC干细胞凋亡过程。

关键词: 尼美舒利;环氧酶-2;三阴性乳腺癌干细胞

中图分类号:R737.9 文献标志码:A 文章编号:1004-7239(2014)09-0701-04

Effect of nimesulide on proliferation and apoptosis of triple-negative breast cancer stem cells *in vitro*
LI Hong-tao

(Department of Breast and Thyroid Surgery, the People's Hospital of Jiaozuo, Jiaozuo 454002, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To determine the effect of selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor nimesulide on the proliferation and apoptosis of triple-negative breast cancer (TNBC) stem cells and the probable mechanism. **Methods** Human breast cancer cell line MDA-MB-231 was exposed to nimesulide in different concentrations. Each concentration group was exposed for 24, 48 and 72 h. Methyl thiazolyl tetrazolium assay was performed to detect proliferation inhibition efficiency. The cell apoptosis and cell cycles were analyzed by flow cytometry. Morphological changes of the cells were observed under electron microscopy. Western blot analysis was used to test Cox/Bax/Bcl-2 protein expression. **Results** The growth of TNBC stem cells was inhibited apparently by nimesulide in time and dose dependent manners. Nimesulide treatment arrested the triple-negative breast cancer stem cells at G₀/G₁ phase, reduced the proportion of S and G₂/M phase significantly, and induced apparent apoptosis. Cells exhibited some morphological features of apoptosis, including cell shrinkage, nuclear condensation, DNA fragmentation, and the formation of apoptosis bodies. The result of Western blot assay revealed Cox-2 protein and Bcl-2 protein level decreased by nimesulide in a concentration-dependent manner, but Bax protein level increased. **Conclusion** Nimesulide can inhibit proliferation of TNBC stem cells and induce apoptosis of TNBC stem cells, in which Bcl-2, Bax and COX-2 may play roles.

Key words: nimesulide;cyclooxygenase-2;triple-negative breast cancer stem cells

三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)是指雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)和人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER-2)均阴性的一种特殊类型乳腺癌^[1]。TNBC约占所有乳腺癌的15%,是乳腺癌预后最差的临床分型。TNBC因缺乏内分泌及抗HER-2治疗的靶

点,至今仍无有效的治疗方案^[2]。环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)在肿瘤的发生、发展中起重要作用。尼美舒利是一种新型COX-2选择性抑制剂,已被美国食品药品监督管理局(food and drug administration, FDA)批准用于预防家族型肠息肉的恶变。本实验研究尼美舒利对TNBC干细胞的体外抑制作用,探讨其诱导凋亡作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人乳腺癌细胞株MDA-MB-231

DOI:10.7683/xxxyxb.2014.09.008

收稿日期:2014-05-03

作者简介:李红涛(1975-),男,河南焦作人,硕士,主治医师,主要从事乳腺癌的基础与临床研究。

(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 Bel-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, 加入二甲基亚砜, 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,

CELLQues 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/相对对照组蛋白的 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。

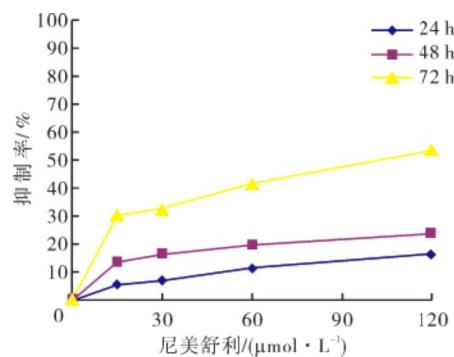


图 1 尼美舒利对 MDA-MB-231 细胞的增殖抑制作用

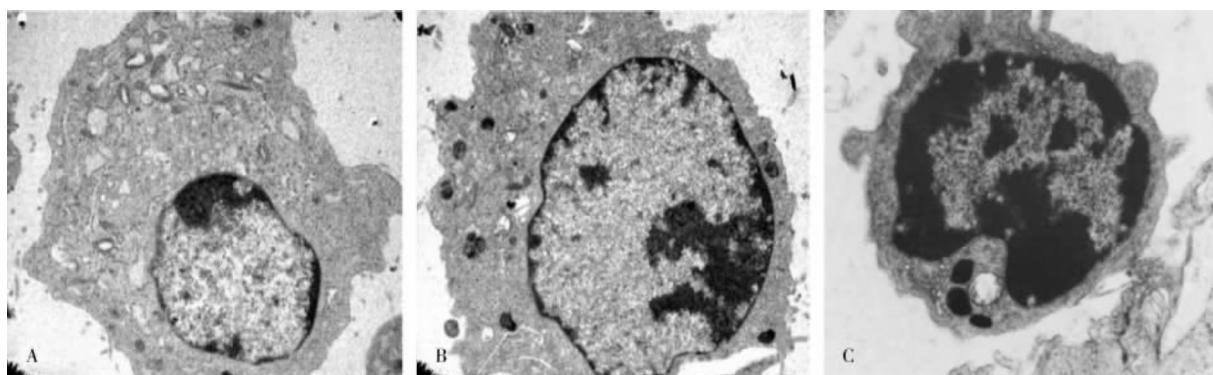
Fig. 1 Growth inhibition effect of nimesulide on MDA-MB-231 cells

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

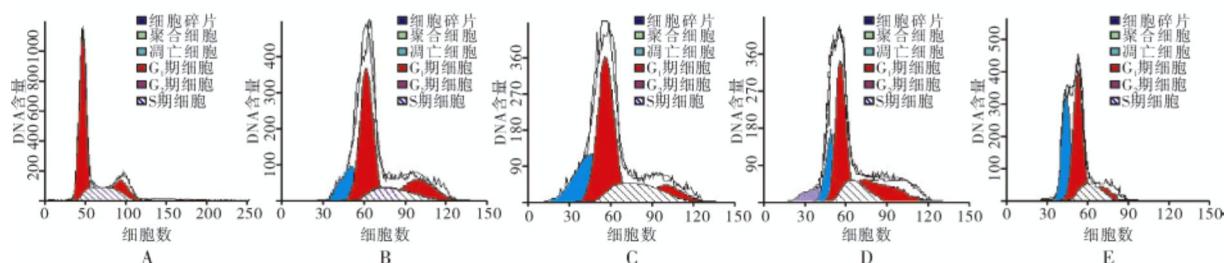
倍体凋亡峰,对照组未检测到凋亡峰。随着浓度的增大,细胞凋亡率亦明显增加。尼美舒利以浓度依赖性方式阻滞细胞于G₀/G₁期,并促进细胞凋亡,各组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$) (图3、表1)。



A:30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;B:60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;C:120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 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 ($\times 6 200$)



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细胞周期图的改变

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 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	58.02 ± 1.14 ^a	24.80 ± 1.01 ^a	17.86 ± 0.15 ^a	17.22 ± 0.56 ^a
30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	67.71 ± 0.48 ^{ac}	17.34 ± 0.46 ^{ac}	14.01 ± 0.71 ^{ac}	23.30 ± 1.27 ^{ac}
60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	74.80 ± 1.41 ^{bc}	14.63 ± 1.97 ^{bc}	10.05 ± 0.21 ^{bc}	31.78 ± 1.17 ^{bc}
120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 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 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较^c $P < 0.05$;与30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较^d $P < 0.05$;与60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较^e $P < 0.05$ 。

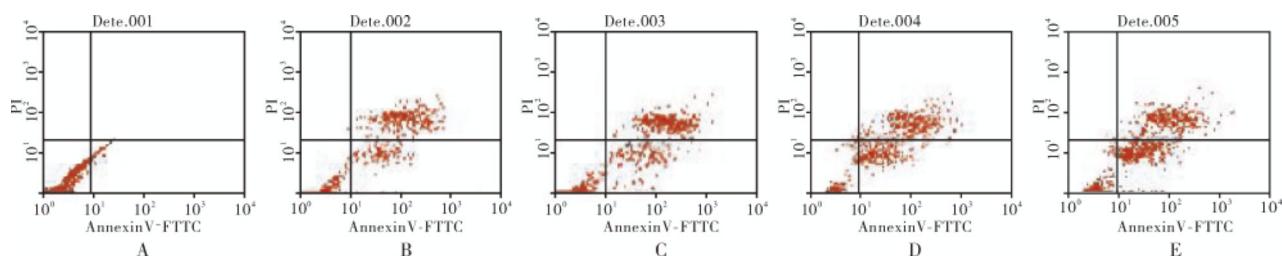
2.4 尼美舒利对MDA-MB-231细胞COX-2、Bcl-2及Bax蛋白表达影响 结果见表2。Western blot结果显示:对照组细胞COX-2表达呈阳性,加尼美舒利后COX-2表达减弱,并随着浓度的增加,对COX-2蛋白的抑制作用逐渐增强。Bcl-2的表达与COX-2一致,但Bax的表达却随着尼美舒利浓度的增加而逐渐增加,各浓度组与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

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 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	0.729 ± 0.053	0.491 ± 0.056 ^a	0.242 ± 0.021 ^a
30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	0.636 ± 0.018 ^a	0.397 ± 0.012 ^a	0.374 ± 0.098 ^a
60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	0.318 ± 0.045 ^a	0.200 ± 0.029	0.505 ± 0.101 ^a
120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 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角色^[10]。目前国内尼美舒利对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G₀/G₁期细胞数增多,S期和G₂/M期细胞相应减少,阻滞细胞周期在G₀/G₁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的比较[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, Ringner M, et al. The CD₄₄⁺/CD₂₄⁻ 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)