

Celecoxib 抑制人卵巢癌耐顺铂细胞株 SKOV-3/DDP 增殖及其机制的研究

The Effect of Celecoxib Inhibiting Cell Proliferation in Cisplatin-resistant Human Ovarian Cancer Cell Line SKOV-3/DDP and Its Mechanism

GUO Xiang-mei, LIU Feng-ling, YANG Xu, et al.

郭向梅, 刘凤玲, 杨旭, 刘霞

(河北医科大学第四医院, 河北省肿瘤医院, 河北 石家庄 050000)

摘要: [目的] 探讨选择性环氧酶-2(COX-2)抑制剂 celecoxib 对人卵巢癌耐药细胞株 SKOV-3/DDP 的增殖抑制作用并初步探讨其机制。[方法] 用不同浓度 celecoxib 作用 SKOV-3/DDP 细胞不同时间后, MTT 法检测细胞增殖抑制情况, RT-PCR 法检测细胞中 *survivin* 及 *GST- π* mRNA 的表达情况, FCM 法检测细胞 *survivin* 及 *GST- π* 蛋白表达情况。[结果] celecoxib 可以抑制 SKOV-3/DDP 细胞的增殖, 呈药物浓度及时间依赖性。RT-PCR 法检测发现与未处理组相比, celecoxib 可下调 SKOV-3/DDP 细胞中 *survivin* 及 *GST- π* mRNA 的表达 ($P < 0.01$), FCM 法检测显示 celecoxib 可下调细胞中 *survivin* 及 *GST- π* 蛋白表达 ($P < 0.01$)。[结论] celecoxib 能抑制 SKOV-3/DDP 细胞增殖, 并呈浓度及时间依赖性, 其机制可能与下调 *survivin* 及 *GST- π* 表达相关。

关键词: celecoxib; SKOV-3/DDP; 细胞凋亡; *survivin*; *GST- π*

中图分类号: R737.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)06-0419-05

卵巢癌是我国常见的妇科恶性肿瘤。大多患者发现时已属晚期, 虽然经过手术、辅助化疗等治疗, 但效果较差, 其中与化疗过程中细胞耐药密切相关。有研究发现环氧酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)在卵巢癌组织中高表达^[1]。潘珊等^[2]也发现在上皮性卵巢癌组织中 COX-2 高表达, 且与化疗耐药及预后相关。目前, COX-2 抑制剂初步显示出一定的抗肿瘤作用, 其中 celecoxib 已被美国 FDA 批准治疗家族性腺瘤息肉(familial adenomatous polyposis, FAP)。为了进一步探讨 COX-2 抑制剂对耐顺铂的卵巢癌的作用, 我们选用耐顺铂的卵巢癌细胞株 SKOV-3/DDP 进行体外试验, 并探讨其相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株

人卵巢癌耐药细胞株 SKOV-3/DDP 购自北京肿瘤研究所。

第一作者郭向梅现工作于浙江萧山医院肿瘤综合科。

通讯作者: 刘凤玲, 主任医师, 硕士研究生导师; 河北医科大学第四医院肿瘤内科, 河北省石家庄市健康路 12 号(050000);

E-mail: wodelaogongyue@126.com。

收稿日期: 2012-02-21; **修回日期:** 2012-04-29

1.1.2 药品及试剂

celecoxib 为武汉施瑞科技有限公司产品。顺铂为山东齐鲁制药有限公司产品。RPMI 1640 培养基购自美国 GIBCO/BRL 公司, 兔抗人 *survivin* 多克隆抗体购自河北博海生物工程开发有限公司, 羊抗兔 IgG 二抗、羊抗鼠 IgG 二抗和鼠抗人 *GST- π* 多克隆抗体均购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司。Trizol Reagent 购自上海 Gene Ray 生物工程公司。

1.1.3 主要仪器和设备

CO₂ 恒温培养箱(TC2323)为美国 SHELDON 公司产品, 超净工作台(SW-CJ-IF)为苏州净化设备集团产品, PCR 扩增仪(PE9700)为美国 ABI 公司产品, 流式细胞仪(Epics-XL II 型)为美国 BC 公司产品, 倒置相差显微镜(LH50A)为日本 OLYMPUS 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

将 SKOV-3/DDP 细胞置于 pH7.2~7.4 的含 10% 胎牛血清 (FCS) 的 1640 完全培养液 (其中青霉素 100U/ml, 链霉素 100U/ml) 中, 在 SKOV-3/DDP 细胞培养体系中加入浓度为 1 μ g/ml 的顺铂以维持耐药性, 在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 和饱和湿度条件下培养, 3d 换液传代一次。取对数期细胞用于实验。

1.2.2 MTT 法检测细胞体外增殖抑制情况

取对数生长期 SKOV-3/DDP 细胞,以 8.0×10^4 个/孔接种于 96 孔培养板,设 6 个复孔。在 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度下培养 24h 后小心吸出各孔内培养液,实验组加含不同浓度 celecoxib 的培养基 100μl,终浓度为 2.5μmol/L、5μmol/L、10μmol/L、20μmol/L、40μmol/L、80μmol/L。继续培养 24h、48h、72h 后各培养孔加入 MTT(5mg/ml)20μl。避光培养 4h 后,弃去上清,分别加入 10%DMSO 150μl/孔。振荡器振荡 15min,溶解 MTT 后,用全自动酶标仪检测各孔光密度值(OD₄₉₂),重复 3 次。按下列公式计算 celecoxib 对 SKOV-3/DDP 细胞的抑制率(inhibitory rate,IR): $IR=[1-(\text{实验组 OD 值}-\text{空白对照组 OD 值})/(\text{对照组 OD 值}-\text{空白对照组 OD 值})]\times 100\%$ 。以药物处理时间为横轴,抑制率为纵轴,绘制增殖抑制曲线。

1.2.3 半定量 RT-PCR 检测

收集各实验组细胞,TRIZOL 法提取细胞总 RNA,琼脂糖电泳法鉴定 RNA 的质量,并采用核算定量仪定量;采用反转录试剂盒合成 cDNA,随后进一步扩增获得目的片段。具体反应条件:GAPDH:(94℃ 5min,94℃ 1min,64℃ 40s,72℃ 30s,循环 30 次)。survivin:(94℃ 2min,94℃ 45s,58℃ 45s,72℃ 1min,循环 30 次);GST-π:(94℃ 2min,94℃ 45s,57℃ 45s,72℃ 1min,循环 30 次)。扩增产物在 2%琼脂糖凝胶上行电泳鉴定,凝胶成像分析系统拍照记录。每组重复 3 次,取平均值。PCR 引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

基因	引物序列	引物长度
GAPDH	5'-ACCACAGTCCATGCCATCACT-3'	452bp
	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	
GST-π	5'-CCGTGGTCTATTTCCCAGTTCG-3'	466bp
	5'-CAGCAAGTCCAGCAGGTTGTAG-3'	
survivin	5'-GGACCACCGCATCTCTACAT-3'	350bp
	5'-GCACTTTCTTCGCAGTTTCC-3'	

1.2.4 FCM 检测 survivin 和 GST-π 蛋白的表达

分别收集各实验组细胞,70%乙醇溶液(4℃预冷)固定细胞,RNase 酶消化后,加入 survivin 及 GST-π 单克隆抗体,荧光标记二抗,检测两种蛋白的表达。以荧光指数(florence index,FI)表示蛋白表达的相对含量。 $FI=\text{实验样品均道值}/\text{对照样品均道值}$ (均道值=lg(X-mode 值)×340)。每组重复 3 次,取平均值。

1.3 统计学处理

用 SPSS13.0 统计学软件进行数据处理,各组数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两个独立样本组间均数比较用 *t* 检验,多组间均数差异比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),以 *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 celecoxib 对 SKOV-3/DDP 细胞体外增殖的影响

MTT 法检测结果显示同一时间各浓度组与对照组比较,2.5μmol/L 组(24h)无明显差异,其余各组与对照比较差异显著(*P*<0.01),并且随着药物浓度增高,抑制率相应增高。同一浓度不同时间点间抑制率比较同样具有显著性差异(*P*<0.01),且随着时间延长,抑制率增高,但 48h 后抑制趋势减缓。见表 2、图 1。

表 2 不同浓度 celecoxib 对 SKOV-3/DDP 细胞体外生长的抑制作用(n=6)

药物浓度 (μmol/L)	抑制率(%)		
	24h	48h	72h
2.5	0.564±0.063	5.611±0.451*	11.685±0.605*
5	4.992±1.885*	15.66±0.706*	18.384±0.473*
10	9.089±0.397*	25.448±1.139*	30.635±0.929*
20	24.074±1.478*	40.862±1.169*	42.886±0.792*
40	44.104±1.225*	64.988±0.633*	71.065±0.941*
80	59.323±1.788*	89.320±0.583*	94.829±0.909*

注:*与对照组比较,*P*<0.01。

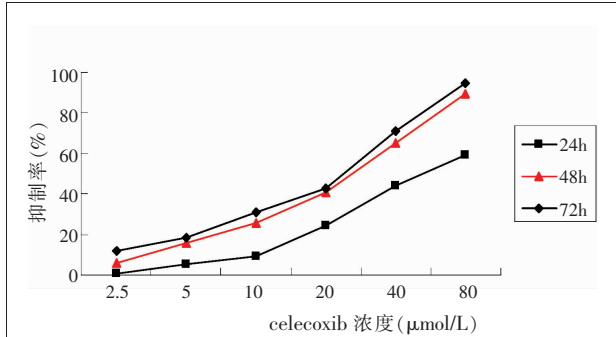


图 1 celecoxib 对 SKOV-3/DDP 细胞体外生长的抑制作用

2.2 celecoxib 对 SKOV-3/DDP 细胞中 survivin、GST-π mRNA 表达的影响

半定量 RT-PCR 检测发现,经 10μmol/L celecoxib 分别作用 SKOV-3/DDP 细胞 24h、48h、72h 后,应用凝胶成像系统对 mRNA 相对表达量分析:随着 celecoxib 作用时间延长,survivin mRNA 表达量也持

续下降,与对照组相比,差异显著($P<0.01$)。GST- π /GAPDH与对照组相比,作用24h与48h持续下降,而作用72h后比值反而升高,但与48h组比较无明显差异。与对照组比较有明显差异($P<0.01$)。见表3、图2。

2.3 celecoxib 作用不同时间对 SKOV-3/DDP 细胞 survivin、GST- π 蛋白表达的影响

流式细胞仪检测后,按公式计算 survivin、GST- π 蛋白的 FI 值。经 celecoxib 处理 24h、48h、72h 后, survivin 及 GST- π 蛋白的 FI 值较对照组减少($P<0.01$),且随着作用时间延长, survivin 蛋白的 FI 值持续减少,与对照组相比差异显著($P<0.01$),48h 后减缓,其中用药48h与用药72h相比, FI 值无统计学意义。但是 GST- π 蛋白的 FI 值经 celecoxib 作用 24h、48h、72h 后分别为:0.973、0.941 和 0.963,作用72h后较作用48h反而有所升高,但实验组与对照组比较,统计学差异明显($P<0.01$)。见表4、图3。

表3 RT-PCR 法检测 survivin 和 GST- π 在 SKOV-3/DDP 细胞中的表达 (n=3)

组别	survivin 表达量	GST- π 表达量
对照组	0.711 $\pm$ 0.016	0.877 $\pm$ 0.071
实验组 24h	0.701 $\pm$ 0.092	0.624 $\pm$ 0.038
48h	0.518 $\pm$ 0.037	0.463 $\pm$ 0.015
72h	0.475 $\pm$ 0.082	0.545 $\pm$ 0.042

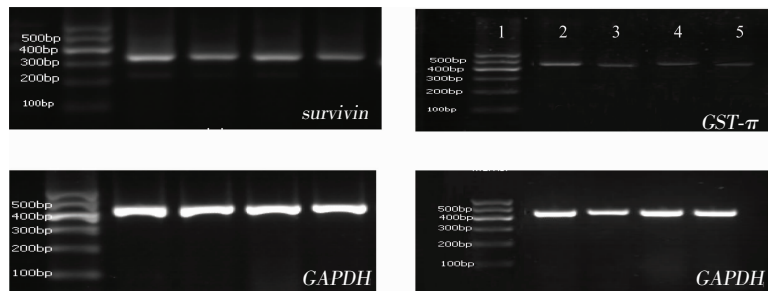


图2 RT-PCR 法检测 survivin 和 GST- π 在 SKOV-3/DDP 细胞中的表达

表4 celecoxib 处理 SKOV-3/DDP 细胞对 survivin、GST- π 蛋白表达的影响

组别	survivin 表达量	GST- π 表达量
对照组	1	1
实验组 24h	0.994 $\pm$ 0.011	0.973 $\pm$ 0.004
48h	0.951 $\pm$ 0.002	0.941 $\pm$ 0.003
72h	0.945 $\pm$ 0.002	0.963 $\pm$ 0.041

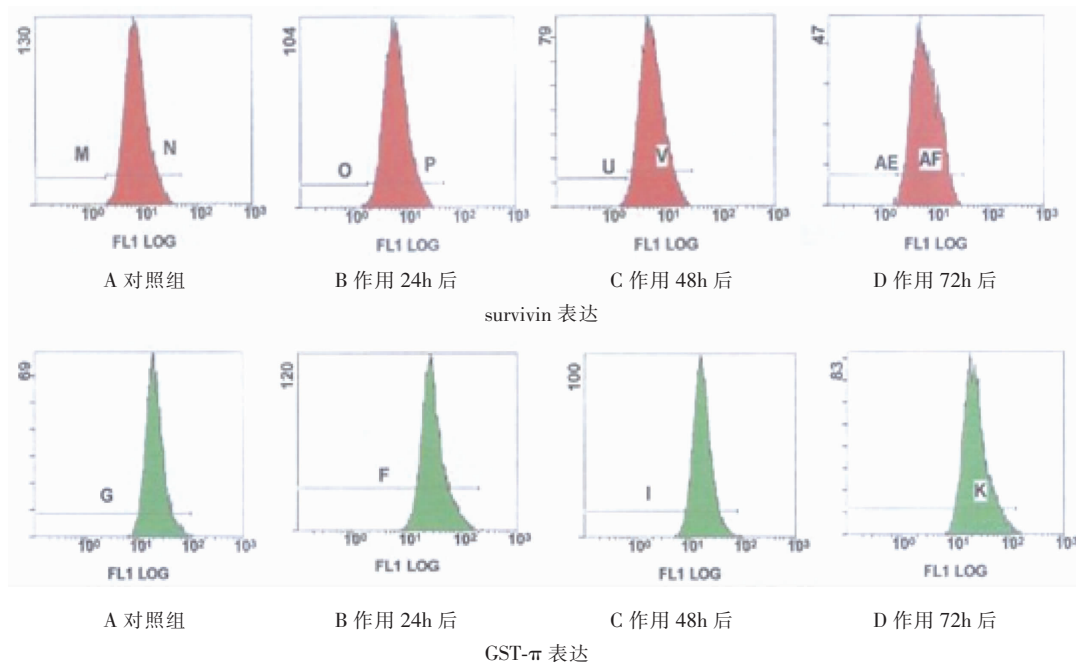


图3 celecoxib 10 μ mol/L 处理 SKOV-3/DDP 细胞对 survivin、GST- π 蛋白表达的影响

3 讨 论

卵巢癌是妇科三大肿瘤之一,我国卵巢癌发病率居妇科肿瘤第3位。近几十年对于卵巢癌的认识和诊断治疗方法取得了较大进展,但是总生存率仍徘徊不前。化疗是卵巢癌重要治疗方法之一,虽然顺铂联合化疗提高了晚期卵巢癌的疗效,但即使初始晚期卵巢癌手术联合化疗后临床已达完全缓解的患者,仍有50%~75%的复发可能。因为上皮癌既对化疗敏感又易产生耐药。近年来新药不断涌现,但这些新药对耐药卵巢癌均属中度有效(有效率约20%),因此耐药卵巢癌的治疗仍是当今棘手的问题。寻找逆转肿瘤细胞多药耐药的有效药物成为提高化疗疗效的关键方法之一。

COX-2与肿瘤的关系首先来源于流行病学资料,长期服用非甾体类抗炎药物人群的结肠癌发病率明显降低^[3]。研究发现COX-2在正常组织中不表达或表达量很少,但细胞在受到各种致癌物质刺激后表达量上调。COX-2与卵巢癌的发生发展及对药物反应近年亦有报道。Lee等^[4]发现COX-2在卵巢癌中高表达。苏亚娟等^[5]构建了重组表达质粒pGenesil-1-siRNA-COX-2,发现其能明显抑制卵巢癌细胞株中COX-2表达,并抑制肿瘤细胞生长和迁移。但对于卵巢癌耐药细胞的研究较少。

近年来发现凋亡蛋白抑制因子(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)在许多物种的抑制细胞凋亡过程中起重要作用,是最重要的细胞凋亡调节因子之一。人类发现的IAPs家族有8个成员。其中survivin基因直接抑制Caspase蛋白酶,通过抑制凋亡通路下游的汇集点Caspase-3和Caspase-7而发挥抗凋亡作用^[6],其表达产物survivin蛋白是1997年Ambrosini等发现的IAP家族的新成员,其主要功能是抑制肿瘤细胞的凋亡,同时具有调节细胞周期的作用^[7]。survivin是迄今为止发现的最强效的凋亡抑制因子,能够抑制细胞凋亡,同时调节有丝分裂。目前发现在结肠癌^[8]、宫颈癌^[9]细胞中应用celecoxib可以明显抑制survivin蛋白的表达,乳腺癌中celecoxib能够增敏癌细胞对于放疗的敏感性,与抑制survivin的表达亦有关^[10],因此推测在celecoxib抑制肿瘤细胞增殖过程中,抑制survivin蛋白表达可能起一定作用。本实验研究单独应用celecoxib血

药浓度剂量作用于细胞,能够明显抑制survivin蛋白表达,与Sakoguchi-Okada等^[8]、Fukada等^[9]研究结果相似。进一步分析发现survivin蛋白表达量下降呈现时间依赖性,48h组与24h组比较下降明显,随后下降趋势渐缓,与MTT结果中增殖抑制趋势相吻合。然而RT-PCR研究发现48h组与72h组比较结果相似,无统计学差异,提示48h后药物的抑制作用可能逐渐减弱甚至消失。本研究通过流式细胞术检测SKOV-3/DDP细胞中survivin蛋白在接受不同处理后的变化,发现celecoxib作用不同时间均可降低survivin蛋白的表达量,呈时间依赖性,进一步验证celecoxib诱导凋亡发生与下调凋亡抑制基因及其蛋白survivin相关。

谷胱甘肽(glutathione, GSH)依赖性解毒酶系统是存在于动、植物内的重要解毒酶系统,其中最重要的是谷胱甘肽-S-转移酶(GST),它是一组具有多种生理功能的蛋白质,能通过催化毒性物质与GSH相结合或通过非酶结合方式将体内有毒物质排出体外。其过度表达不仅可以催化亲电性烷化剂与谷胱甘肽结合,使其更有极性而加强外排,还可直接与亲电性物质结合,消除自由基或过氧化物,保护肿瘤细胞;在人体内,许多抗肿瘤药物,如CTX、MEL、CLB、BCUN、DDP、ADM和MMC等可通过该系统失活,对这些药物耐药与该系统活性增高部分有关^[11]。有研究发现前列腺素-Ⅱ(PG-Ⅱ)的类似物吡前列素和吲哚美辛是GST抑制剂。McIlwain等^[12]研究发现GST- π 能够催化各种内外源性亲电子物质如白三烯,及某些抗癌药物与GSH结合形成药物GSH结合物(GSHX),这些结合物由跨膜存在的GSHX泵类(如MRP)泵出细胞外或改变其胞内分布,从而降低药物在细胞内的有效蓄积,使肿瘤细胞对这些抗癌药物敏感性降低,最终导致多药耐药的发生。Beeghly等^[13]发现,通过抑制GST的功能可以提高卵巢癌患者术后化疗的敏感性及生存率。卵巢癌对化疗药物特别是铂类药物可能有获得性耐药,与肿瘤组织在接受化疗后出现基因激活有关^[14]。实验发现应用celecoxib后可下调SKOV-3/DDP细胞中GST- π 蛋白,存在时间依赖性,且应用48h后下降最明显,72h组与48h组相比反而增高,RT-PCR结果与流式细胞术检测结果趋势一致,但具体原因不明,需进一步研究是否48h后药物在细胞内浓度有重新分布,以致

药物对 GST- π 蛋白的合成抑制作用减弱。分析 celecoxib 诱导耐顺铂细胞株死亡可能与应用 celecoxib 后下调细胞耐药相关基因 GST- π mRNA 及蛋白表达水平相关。

综上所述,本实验证实了选择性 COX-2 抑制剂 celecoxib 可以抑制卵巢癌耐药细胞 SKOV-3/DDP 细胞增殖,其机制可能与下调凋亡抑制蛋白 survivin 和下调耐药蛋白 GST- π 表达相关。

参考文献:

- [1] Denkert C, Köbel M, Pest S, et al. Expression of cyclooxygenase-2 is an independent prognostic factor in human ovarian carcinoma[J]. *Am J Pathol*, 2002, 160(3):893-903.
- [2] 潘珊, 吴绪峰, 陈惠祯, 等. 上皮性卵巢癌组织中环氧合酶-2 的表达与化疗耐药及预后的相关性研究[J]. *肿瘤*, 2007, 27(1):46-50.
- [3] Bresalier RS. Prevention of colorectal cancer: tumor progression, chemoprevention, and cox-2 inhibition [J]. *Gastroenterology*, 2000, 119(1): 267-268.
- [4] Lee JS, Choi YD, Lee JH, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in epithelial ovarian tumors and its relation to vascular endothelial growth factor and p53 expression[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16(1):247-253.
- [5] 苏亚娟, 王前, 高玲娟, 等. siRNA 沉默 COX-2 基因对人卵巢癌细胞的增殖及迁移能力的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2009, 29(10): 1990-1993.
- [6] Rudnick DA, Perlmutter DH, Muglia LJ, et al. Prostaglandins are required for CREB activation and cellular proliferation during liver regeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(15):8885-8890.
- [7] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. *Nat Med*, 1997, 3(8):917-921.
- [8] Sakoguchi-Okada N, Takahashi-Yanaga F, Fukada K, et al. Celecoxib inhibits the expression of survivin via the suppression of promoter activity in human colon cancer cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 73(9):1318-1329.
- [9] Fukada K, Takahashi-Yanaga F, Sakoguchi-Okada N, et al. Celecoxib induces apoptosis by inhibiting the expression of survivin in HeLa cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 357(4):1166-1171.
- [10] 牛国梁, 王辉, 谢荣俊, 等. 选择性 COX-2 抑制剂塞来昔布对乳腺癌的放疗增敏作用及其机制研究[J]. *肿瘤学杂志*, 2011, 3(17): 172-176.
- [11] 徐冰河. 耐药问题和对策[A]. 孙燕, 石远凯. 临床肿瘤内科手册[M]. 第 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008. 194-208.
- [12] McIlwain CC, Townsend DM, Tew KD. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy [J]. *Oncogene*, 2006, 25(11):1639-1648.
- [13] Beeghly A, Katsaros D, Chen H, et al. Glutathione S-transferase polymorphisms and ovarian cancer treatment and survival[J]. *Gynecol Oncol*, 2006, 100(2):330-337.
- [14] 李家梅, 盖晓东, 王邵娟, 等. 卵巢癌组织中 MDR1(P-gp)、GST- π 基因的表达及其临床意义 [J]. *临床辅助检查*, 2006, 8(14):6-8.