

[文章编号] 1007-385X(2005)01-0061-02

选择性环氧合酶-2 抑制剂对胶质瘤细胞增殖的抑制作用

杨武双¹, 刘金凤², 杨德林³, 岳武¹(1. 哈尔滨医科大学附属第一临床医院神经外科, 哈尔滨 150001; 2. 哈尔滨市第八医院, 哈尔滨 150020; 3. 上海市浦东新区人民医院, 上海 201200)

近年来,很多研究显示环氧合酶-2(COX-2)与胶质瘤密切相关。Celecoxib 属非甾体类抗炎药(NSAIDs),是 COX-2 选择抑制剂,对于胶质瘤作用方面的研究未见报道。为观察 Celecoxib 对胶质瘤的抑瘤效果,本实验应用 MTT 法、细胞生长曲线和流式细胞仪等方法,检测 Celecoxib 对 C6 胶质瘤增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞

C6 胶质瘤细胞系购于中国科学院上海细胞库。

1.2 主要试剂及仪器

MTT 购自原平皓生物工程公司,PI 购自 Sigma 公司,倒置相差显微镜 IX-70(Olympus),Celecoxib 为美国西尔制药公司分装,流式细胞仪(FCM)为美国 BD 公司生产的 FACSCalibur 型号,采用 ModFit 分析软件,Bio-Rad550 酶标仪(日本)。

1.3 细胞培养

C6 胶质瘤细胞常规培养于含 10% 灭活小牛血清的 RPMI-1640 培养液中,置 37℃,5% CO₂ 孵箱内培养。

1.4 MTT 法检测 Celecoxib 抑瘤作用

取对数生长细胞,以 10⁴/孔接种 C6 胶质瘤细胞于 96 孔培养板,培养 24 h 与 Celecoxib 共孵育,其浓度分别为 12.5 μmol/L, 25 μmol/L 和 50 μmol/L,对照组加 DMSO 溶液,每组 8 孔,加药后培养 24 h,每孔加 MTT 20 μl(5 mg/ml),继续培养 4 h,弃上清,加二甲基亚砜(DMSO)150 μl,使 MTT 结晶完全溶解,酶联免疫检测分析仪 490 nm 处吸光值(A_{490nm}),以 A_{490 nm} 间接反映存活细胞的数量。

$$\text{细胞抑制率}(\%) = \frac{\text{对照组 OD 值} - \text{实验组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \times 100\%$$

1.5 绘制细胞生长曲线

取 24 孔板,加入对数生长期细胞 2 × 10⁴/孔,细胞完全贴壁后,加入 Celecoxib,浓度分别为 0 μmol/L, 12.5 μmol/L 和 50 μmol/L,每组 3 孔,每天取一组,用台盼兰进行活细胞计数,共 5 d,绘制细

胞生长曲线。

1.6 Celecoxib 诱导调亡作用检测

取对数生长期细胞,接种于 75 mm² 培养瓶,3 × 10⁶/瓶,培养 2 h 后,与 Celecoxib 共孵育,其浓度分别为: 0 μmol/L, 12.5 μmol/L 和 50 μmol/L,加药后培养 24 h,收集细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃去培养液,加入预冷的 70% 乙醇固定,保存于 4℃ 冰箱,待检。

1.7 统计学处理

所有数据取均数 ± 标准差,行方差分析,以 P < 0.01 为显著性差异,以 SASS6.12 软件处理。

2 结果与讨论

近年来,研究者发现人类的多种肿瘤 COX-2 呈阳性表达,并且与分期、转移及预后关系密切,COX 有两种同型异构体,环氧合酶 I(COX-1)为结构酶或看家酶;环氧酶 II(COX-2)为诱导酶,COX-1 在包括胃肠道黏膜细胞和血小板在内的细胞中表达的水平相当稳定,而 COX-2 在正常细胞内是低表达的,但可以在炎性细胞介质、细菌毒素和生长因子等刺激下表达上调,提示 COX-2 在炎症、感染和细胞增殖中起到一定作用,随着流行病学、动物实验及人的研究,发现 NSAIDs 对结肠癌具有防治作用^[1]。

Celecoxib 是选择性 COX-2 抑制剂,属三环类化合物,于 1999 年在美国上市,用于治疗风湿和类风湿关节炎。Harris 等^[2]首次发现 Celecoxib 对乳腺癌发生具有强的化学预防作用。在 C6 胶质瘤方面未见报道,通过倒置相差显微镜下观察,给药前,C6 细胞贴壁良好,伸展性好(如图 1A);给药后,随着 Celecoxib 浓度增高,细胞贴壁能力逐渐减弱,飘浮的细胞增多,当浓度达 100 μmol/L 时,细胞全部飘浮及破坏成为碎片(如图 1B)。Celecoxib 能够杀伤培养的胶质瘤细胞,并呈浓度依赖的关系,当浓度达 100 μmol/L 时,培养中的细胞全部死亡及成为碎片;MTT 检测 Celecoxib 抑瘤作用中当 Celecoxib 浓度为 12.5 μmol/L, 25 μmol/L 和 50 μmol/L 时,其

抑制率分别为 $(43.86 \pm 0.91)\%$, $(63.48 \pm 1.09)\%$, $(78.54 \pm 5.44)\%$, 经方差检验具有显著的统计学意义 ($P < 0.01$), 从细胞生长曲线看出, 随着 Celecoxib 浓度增加, 细胞增殖明显受到抑制 (如图 2); 流式细胞仪检测, 对照组细胞凋亡为 1.43%, 治疗组浓度为 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 凋亡分别为 5.83% 和 15.32%。Celecoxib 对 C6 胶质瘤细胞的增殖具有抑制作用, 并且随着其浓度的增高而增加。

达, 其阳性表达与胶质瘤分级相关, 并且与预后关系密切。

NSAIDs 诱导肿瘤细胞凋亡机理还不清楚, 首先 COX-2 的活性被抑制很重要, 另外 Celecoxib 具有直接肿瘤细胞抑制增殖和诱导凋亡的作用, 其具体途径还需进一步研究。

图 1 C6 胶质瘤细胞给药前后对比
A: 给药前; B: 给药后

国内学者首次报道 Celecoxib 对 SGC7901 和 AGS 胃癌细胞增殖具有抑制作用, 发现 Celecoxib 可使胃癌细胞凋亡明显增加, 较其它几种 NSAIDs 效果好, 而且无副作用发生^[3]。而胶质瘤的 COX-2 呈阳性表达, Joki 等^[4]用免疫组织化学方法研究了 50 例神经胶质瘤和 3 例正常标本中 COX-2 蛋白表达, 高度恶性的神经胶质瘤 COX-2 阳性分数明显增加, COX-2 呈高表达。Shonn 等分析了 66 例胶质瘤发现均有 COX-2 蛋白表

图 2 不同浓度 celecoxib 抑制 C6 胶质瘤细胞的生长曲线

[关键词] Celecoxib; 胶质瘤; 凋亡
[中图分类号] R739.4 [文献标识码] A

[参考文献]

[1] 王中华, 徐兵河. 环氧化酶-2 与肿瘤关系的研究进展[J]. 国外医学肿瘤学分册, 2003, 30(8): 252-255.
[2] Harris RE, Alshafic GA, Seibert K, et al. Chemoprevention of beast cancer in rats by celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor[J]. Cancer Res, 2000, 60(8): 2101-2103.
[3] 徐美虹, 吴开春, 吴汉平, 等. 非甾体类抗炎药对胃癌细胞增殖的抑制作用[J]. 中华消化杂志, 2002, 22(4): 99-201.
[4] Joki T, Heese O, Black PM, et al. Expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) in human glioma and *in vitro* inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398[J]. Cancer Res, 2000, 60(17): 4926-4931.

[收稿日期] 2004-10-21 [修回日期] 2005-02-10
[本文编辑] 王莹, 韩丹

欢迎订阅《中国肿瘤生物治疗杂志》