

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.04.004

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.04.004

非甾体抗炎药塞来昔布和吲哚美辛对胃癌细胞 MKN45 的抑制作用

祝喜萍, 任旭, 李锐, 于丹, 康永明

(黑龙江省医院消化病院消化内科, 哈尔滨 150001)

[摘要] 目的: 探讨非甾体抗炎药塞来昔布和吲哚美辛对胃癌细胞MKN45的增殖、凋亡的作用及相关作用机制。方法: MTT法检测不同浓度的塞来昔布和吲哚美辛对MKN45增殖的影响。非甾体抗炎药单独或联合应用P38MAPK信号通路抑制剂(SB203580)处理MKN45细胞, 采用流式细胞术检测体外细胞周期及细胞凋亡情况; Western印迹法检测COX2, p-P38MAPK及P38MAPK蛋白的表达情况。结果: MTT的检测结果显示非甾体抗炎药塞来昔布和吲哚美辛均可浓度依赖性的抑制胃癌细胞MKN45的体外增殖。流式细胞周期的检测结果显示非甾体抗炎药可抑制MKN45细胞周期的G₁/S转换, 而联合应用SB203580则可部分逆转非甾体抗炎药的抑制效应。细胞凋亡的检测结果显示非甾体抗炎药可上调细胞中P53和cleaved-caspase3/caspase3的表达, 促进MKN45细胞凋亡; 而联合使用SB203580可降低单加药组的细胞凋亡率, 部分抑制细胞中P53和cleaved-caspase3/caspase3的表达。此外, Western印迹法的检测结果显示非甾体抗炎药可抑制细胞中COX2的表达, 增加p-P38MAPK/P38MAPK的蛋白表达水平; 联合使用SB203580可部分逆转该作用。结论: 非甾体抗炎药可通过P38MAPK信号通路抑制胃癌细胞MKN45的增殖, 并促进其凋亡。

[关键词] 非甾体抗炎药; MKN45; 胃癌细胞; 增殖; 凋亡; P38MAPK信号通路

Inhibitory effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs celecoxib and indomethacin on gastric cancer cells MKN45

ZHU Xiping, REN Xu, LI Rui, YU Dan, KANG Yongming

(Department of Gastroenterology, Digestive Disease Hospital, Heilongjiang Provincial Hospital, Harbin 150001, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effect and related mechanism of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, such as celecoxib and indomethacin, on the proliferation and apoptosis of gastric cancer cells MKN45. **Methods:** The effect of celecoxib and indomethacin of various concentrations on the proliferation of MKN45 in gastric cancer cells was measured by MTT assay. After cells were treated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs alone or accompanied with P38MAPK pathway inhibitor SB203580, cell cycle distribution and cell apoptosis

收稿日期 (Date of reception): 2018-11-09

通信作者 (Corresponding author): 祝喜萍, Email: zhuxiping23@aliyun.com

基金项目 (Foundation item): 黑龙江省自然科学基金 (H2016043)。This work was supported by the Heilongjiang Provincial Natural Science Foundation, China (H2016043).

were detected by flow cytometry, respectively. Furthermore, the protein expression of COX2, p-P38MAPK and P38MAPK was measured by Western blot. **Results:** MTT assay showed that both celecoxib and indomethacin inhibited the proliferation of MKN45 in gastric cancer cells in vitro with a concentration dependent manner. flow cytometry showed that nonsteroidal anti-inflammatory drugs restrained the cell cycle G1/S transition and accompanied use of SB203580 could partly reverse the inhibitory effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Detection of cell apoptosis showed that nonsteroidal anti-inflammatory drugs up-regulated the protein expression of P53 and cleaved-caspase3/caspase3, promoted MKN45 cell apoptosis; while accompanied use of SB203580 down-regulated the protein expression of P53 and cleaved-caspase3/caspase3 and decreased cell apoptotic rate in celecoxib group or indomethacin group. Furthermore, cells treated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs exhibited higher COX2 protein expression and lower p-P38MAPK/P38MAPK protein expression; while accompanied used of SB203580 partly reverse its effect. **Conclusion:** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs could inhibit the proliferation of MKN45 in gastric cancer cells and promoted its apoptosis via P38MAPK pathway.

Keywords nonsteroidal anti-inflammatory drugs; MKN45; gastric cancer cells; proliferation; apoptosis; P38MAPK pathway

胃癌是消化系统的常见恶性肿瘤之一, 虽然其发病率一直居高不下, 但由于早期诊断及治疗技术的不断改进, 现在早期胃癌的5年生存率已达95%以上^[1]。然而, 针对进展期胃癌的治疗, 仍不尽人意。目前主要的治疗手段包括放疗、化疗、免疫治疗及分子靶向治疗^[1-2]。流行病学调查研究^[3-5]多次报道: 长期规律服用非甾体抗炎药对多种肿瘤具有抑制效果, 可降低肿瘤的发生率和病死率。且一项关于非甾体抗炎药阿司匹林与胃癌发病风险的Meta分析^[6]显示: 非甾体抗炎药可显著降低胃癌, 特别是胃体癌的患病风险。早期有研究^[7]显示非甾体抗炎药塞来昔布可通过促进凋亡的途径抑制1,2-二甲胍(DMH)所致的结肠癌。且非甾体抗炎药吲哚美辛可促进人胃癌细胞KATO III的凋亡^[8], 但非甾体抗炎药对低分化胃癌细胞的增殖及凋亡等生物学行为的影响并无确切系统的研究。Liu等^[9]研究显示: 第二代选择性COX2抑制剂伐地昔布可通过激活P38MAPK信号通路, 进而上调Fas及FasL的表达, 最终诱导人食管癌细胞系Eca109的凋亡。虽然P38MAPK信号通路的异常可介导多种肿瘤细胞生物学行为的改变, 但是关于其在非甾体抗炎药物介导的胃癌细胞生物学行为变化中的相关作用, 目前尚缺乏足够的研究资料。因此, 本研究应用非选择性COX抑制剂吲哚美辛及选择性COX2抑制剂塞来昔布作为干预因素, 初步探讨非甾体抗炎药对低分化胃腺癌细胞MKN45增殖及凋亡的影响; 借助P38MAPK特异性抑制剂(SB203580)进一步分析非甾体抗炎药除COX2之外的抑制胃癌发生、发展的作用机制, 旨在为胃癌的预防及合理用药提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

人胃腺癌低分化细胞系MKN45由黑龙江医院分子病理实验室冻存; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)及RPMI1640培养基均购于美国Gibco公司; P38MAPK特异性抑制剂SB203580购于美国Sigma公司; 抗P53(货号: sc-71819)、cleaved-caspase3(货号: sc-166589)、caspase3(货号: sc-271759)、COX2(货号: sc-514489)、p-P38MAPK(货号: sc-365487)、P38MAPK(货号: sc-166182)及 β -actin(货号: sc-81178)抗体购于美国Santa Cruz公司; MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒购于碧云天生物技术研究所; 细胞周期检测试剂盒及细胞凋亡检测试剂盒购于南京凯基科技发展有限公司; 其他试剂均为国产市售分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、分组及处理

实验用MKN45细胞常规传代培养于预先配置好并滤过除菌的RPMI1640完全培养基(含10%胎牛血清及双抗)中, 培养箱条件设置为37 °C、饱和湿度、5%CO₂, 隔天换液, 每3 d传代1次。

1.2.2 MTT法

将处于对数生长期的细胞接种于96孔板(密度为 2×10^5 个/mL), 按浓度梯度依次加入塞来昔布(0, 20, 40, 60, 80, 100 μ mol/L)或吲哚美辛(0, 100, 200, 400, 600, 800 μ mol/L)后继续于培养箱中孵育18 h。之后向每孔加入MTT试剂20 μ L, 置于细胞培养箱中继续反应4 h, 最后用酶

标仪测定490 nm波长处的吸光度(OD)值, 并计算增殖抑制率。每组设置3个复孔取平均值, 另设单孔只加入培养基作空白对照。增殖抑制率(IR)=[(OD_{对照}-OD_{加药})/OD_{对照}] \times 100%。

1.2.3 流式细胞术

各组细胞经相应的药物处理24 h后, 离心收集细胞, 经预冷的PBS漂洗后加冰乙醇(70%)于4 ℃条件下固定24 h; 离心洗去乙醇。依据试剂盒说明书, 先加入RNase于37 ℃温浴反应30 min, 然后加入碘化丙啶(PI)染色液于冰上避光孵育30 min, 最后经流式细胞仪检测Ex=488 nm处的红色荧光强度, 分析DNA周期及各期细胞比例。细胞分组如下: 对照组(Control, Ctrl)、塞来昔布组(Celecoxib, Cel)、吲哚美辛组(Indomethacin, Indo)、塞来昔布+P38MAPK抑制剂组(Cel+SB, 先加入20 μ mol/L的SB203580预孵2 h, 后加塞来昔布处理)、吲哚美辛+P38MAPK抑制剂组(Indo+SB, 先加入20 μ mol/L的SB203580预孵2 h, 后加吲哚美辛处理)。

1.2.4 Annexin V/PI 双染色法

各组细胞经相应的药物处理24 h后, 按照说明书要求, 加入不含EDTA的胰酶消化并收集各组细胞, 之后加入试剂盒中的结合缓冲液重悬细胞。然后依次加入Annexin V-FITC染液(室温条件下避光孵育10 min)和PI染液(室温条件下避光孵育5 min)。最后用流式细胞仪检测Ex=488 nm, Em=530 nm处的荧光强度, 分析细胞的凋亡情况。细胞分组设置同方法1.2.3。

1.2.5 Western 印迹

Western印迹测定蛋白水平加含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液提取各组细胞的总蛋白, 经BCA

蛋白定量试剂盒测定所提蛋白浓度后, 调整各组上样蛋白总量至80 μ g。并向每组蛋白液中加入4倍体积的上样缓冲液, 95 ℃条件下变性5 min, 然后上样进行SDS-PAGE凝胶电泳。电泳结束后将蛋白电转至PVDF膜上。取出含有蛋白的PVDF膜置于5%脱脂牛奶中室温封闭2 h, 依据说明书的要求加入相应比例的一抗置于4 ℃条件下孵育过夜, 次日将PVDF膜转移至TBST溶液中洗涤5 min \times 3次; 而后加入对应的二抗置于室温条件下孵育2 h, 将PVDF膜转移至TBST溶液中再次洗涤10 min \times 3次。然后于暗室中加ECL发光液显影, 曝光定影后冲洗胶片, 最后用Image J行蛋白半定量灰度分析。细胞分组设置同方法1.2.3。

1.3 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件进行数据分析。实验结果均以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组计量资料的组间差异采用 t 检验, 多组计量资料行单因素方差分析, 同时采用Bonferroni校正的 t 检验进行均数组间的两两比较, 计数资料的比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 非甾体抗炎药对胃癌细胞 MKN45 增殖活性的影响

MTT的检测结果显示(图1)显示: 塞来昔布和吲哚美辛均可浓度依赖性的抑制胃癌细胞MKN45的增殖活性; 相对于吲哚美辛, 塞来昔布的抑制作用较为显著。表明非甾体抗炎药可抑制胃癌细胞MKN45的增殖活性。

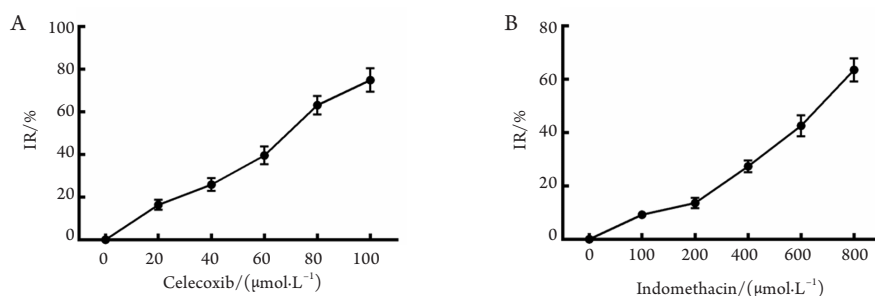


图1 非甾体抗炎药对胃癌细胞MKN45增殖活性的影响

Figure 1 Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the proliferation of gastric cancer cells MKN45

(A) 塞来昔布; (B) 吲哚美辛。

(A) Celecoxib; (B) Indomethacin.

2.2 非甾体抗炎药对胃癌细胞 MKN45 细胞周期的影响

在常规培养的胃癌细胞 MKN45 中加入 $60 \mu\text{mol/L}$ 塞来昔布或 $600 \mu\text{mol/L}$ 吲哚美辛单药处理, 或联用 P38MAPK 抑制剂 SB203580, 采用 MTT 法检测细胞增殖的变化, 结果显示(图 2A): 单加非甾体抗炎药处理可显著抑制细胞增殖, 而联用 P38MAPK 抑制剂 SB203580 后, MKN45 细胞增殖率部分回升 ($P < 0.05$)。进一步采用流式细胞术检测 MKN45 细胞的周期分布情况(图 2B, 2C), 对照组、塞来昔布组、塞来昔布+P38MAPK 抑制剂联用

组、吲哚美辛组、吲哚美辛+P38MAPK 抑制剂联用组细胞 G_0/G_1 期所占百分比分别为 $(60.48 \pm 4.13)\%$, $(77.57 \pm 3.74)\%$, $(69.49 \pm 3.41)\%$, $(75.56 \pm 3.12)\%$ 及 $(67.58 \pm 2.94)\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), S 期细胞所占百分比分别为 $(32.41 \pm 2.21)\%$, $(16.4 \pm 2.16)\%$, $(23.77 \pm 2.73)\%$, $(17.92 \pm 2.45)\%$ 及 $(25.37 \pm 2.08)\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明单用非甾体抗炎药处理可抑制 MKN45 细胞周期由 G_0/G_1 期向 S 期转化; 联用 P38MAPK 抑制剂 SB203580 可部分逆转非甾体抗炎药所致的 G_1/S 期阻滞。

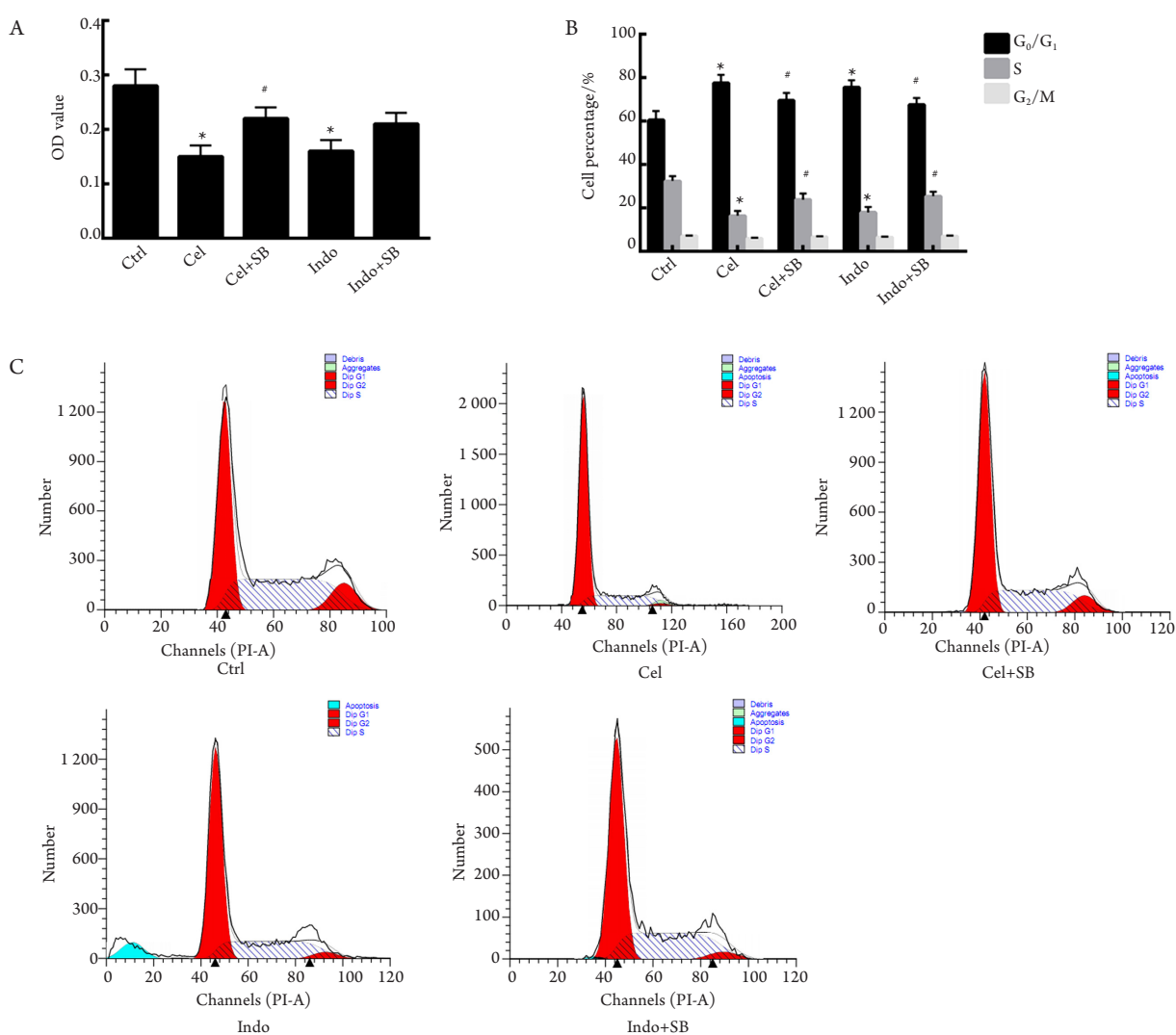


图2 非甾体抗炎药对胃癌细胞MKN45增殖的影响

Figure 2 Impact of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on cell proliferation of gastric cancer cells MKN45

(A) MTT法检测细胞的增殖; (B, C)流式细胞术检测细胞周期。

(A) Cell proliferation was detected with MTT assay. (B, C) Cell cycle was determined by flow cytometry.

* $P < 0.05$ vs Cel or Indo; # $P < 0.05$ vs Ctrl.

2.3 非甾体抗炎药对胃癌细胞 MKN45 细胞凋亡的影响

细胞凋亡检测(图3A)显示: 对照组、塞来昔布组、塞来昔布+P38MAPK抑制剂联用组、吲哚美辛组、吲哚美辛+P38MAPK抑制剂联用组细胞的早期凋亡率分别为(7.21±0.62)%、(27.96±1.52)%、(15.26±0.89)%、(25.28±1.15)%以及(13.67±0.74)%，说明单用非甾体抗炎药处理可促进MKN45细胞凋

亡，联用P38MAPK抑制剂SB203580可部分逆转非甾体抗炎药所致的细胞凋亡。

此外，Western印迹结果(图3B)示: 相较于对照组，塞来昔布和吲哚美辛处理后，MKN45细胞中P53，cleaved-caspase3/caspase3的蛋白水平均显著升高；联用P38MAPK抑制剂SB203580后两组的P53，cleaved-caspase3/caspase3蛋白表达水平有所回落。

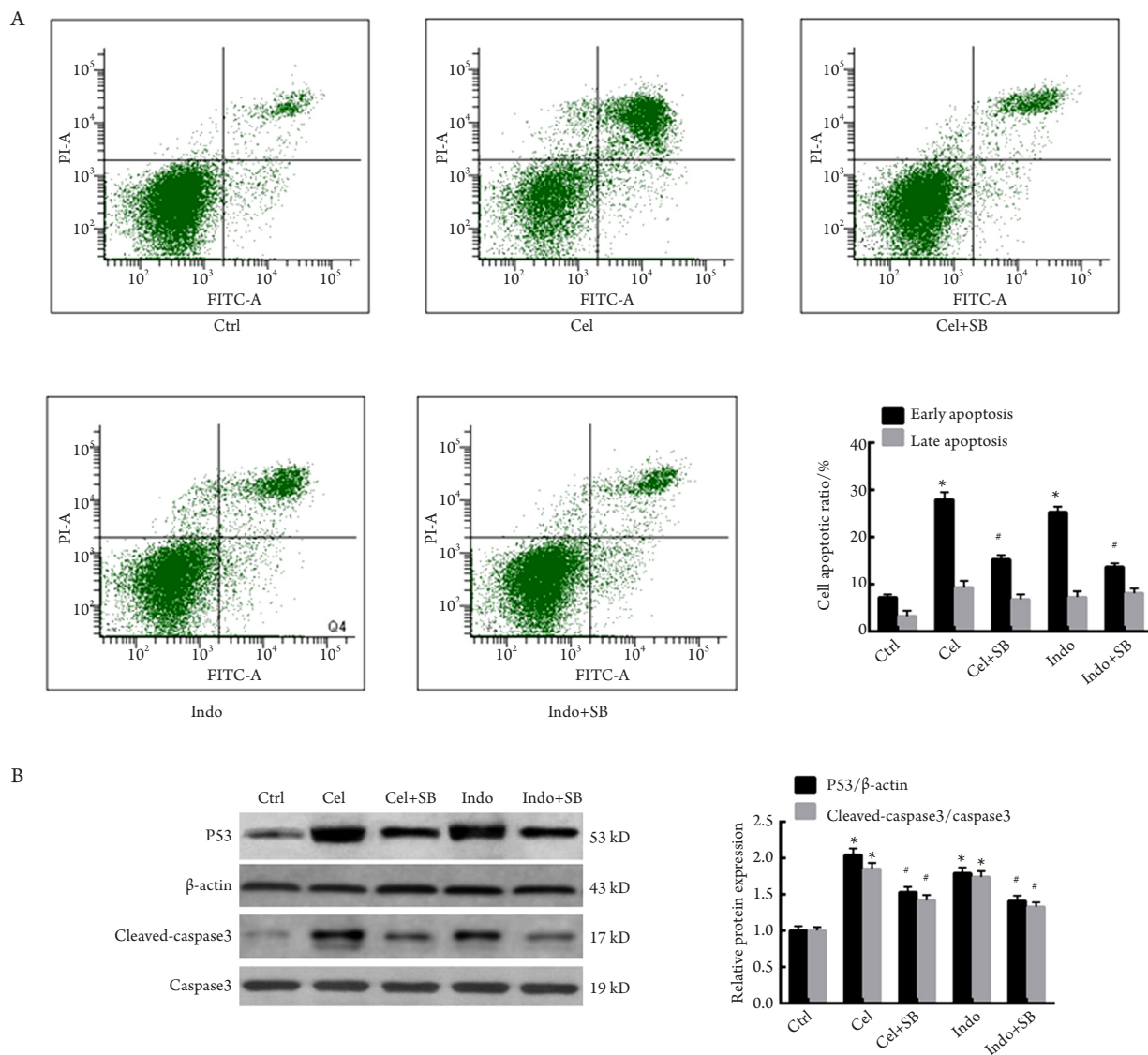


图3 非甾体抗炎药对胃癌细胞MKN45凋亡的影响

Figure 3 Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on cell apoptosis of gastric cancer cells MKN45

(A)流式细胞术检测细胞凋亡；(B)Western印迹法检测细胞凋亡相关蛋白的表达。

(A) Cell apoptosis was detected by flow cytometry; (B) Expression of cell apoptotic-related protein was determined by Western blot.

$P < 0.05$ vs Cel or Indo; * $P < 0.05$ vs Ctrl.

2.4 非甾体抗炎药对 P38MAPK 信号通路的影响

Western印迹的结果如图4所示, 相较于对照组, 塞来昔布和吲哚美辛处理后, MKN45细胞中COX2的蛋白水平均显著降低, 且塞来昔布组COX2的含量显著低于吲哚美辛组; 联用P38MAPK抑制剂SB203580后两组的COX2蛋白表

达水平进一步降低。此外, 塞来昔布和吲哚美辛均可促进MKN45细胞中p-P38MAPK/P38MAPK的表达, 联用P38MAPK抑制剂SB203580后p-P38MAPK/P38MAPK的表达显著低于单加药组。提示非甾体抗炎药可抑制COX2的表达, 并激活P38MAPK信号通路。

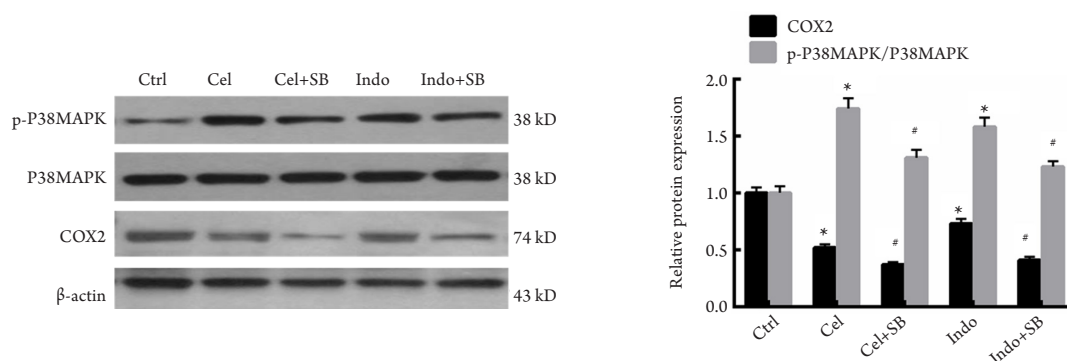


图4 非甾体抗炎药对P38MAPK信号通路活性的影响

Figure 4 Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the activation of P38MAPK pathway

* $P < 0.05$ vs Cel or Indo; * $P < 0.05$ vs Ctrl.

3 讨论

肿瘤的发生发展通常与肿瘤细胞生物学特性的改变密切相关, 肿瘤细胞的恶性增殖是肿瘤形成及发展的关键机制。本研究首先通过MTT法检测了非甾体抗炎药的两类代表塞来昔布和吲哚美辛对低分化高表达COX2的胃癌细胞MKN45增殖活性的影响, 结果显示: 塞来昔布和吲哚美辛均可浓度依赖性地抑制胃癌细胞MKN45的增殖活性; 相对于吲哚美辛, 塞来昔布的抑制作用较为显著。

目前有研究^[10]显示: 非甾体抗炎药可通过COX2途径和非COX2途径发挥抑癌作用。其中非COX2途径主要涉及NF- κ B, P38MAPK等多条信号通路以及癌基因的表达^[11-13]。本研究选取P38MAPK信号通路作为研究的着手点, 通过P38MAPK特异性抑制剂SB203580探讨非甾体抗炎药抑制胃癌细胞MKN45增殖的可能作用机制。MTT细胞增殖分析和流式细胞周期检测的结果显示: 单用非甾体抗炎药塞来昔布或吲哚美辛处理均可抑制MKN45细胞周期由G₀/G₁期向S期转化; 而联用P38MAPK抑制剂SB203580可部分逆转非甾体抗炎药所致的G₁/S周期阻滞。表明非甾体抗炎

药可抑制MKN45细胞增殖, 该作用与P38MAPK信号通路密切相关。增殖与凋亡的平衡失常被认为是癌细胞恶变主要特征。本研究发现单用非甾体抗炎药塞来昔布或吲哚美辛处理可促进MKN45细胞凋亡, 联用P38MAPK抑制剂SB203580可部分逆转非甾体抗炎药所致的细胞凋亡; 表明非甾体抗炎药可促进MKN45细胞凋亡, 该作用也与P38MAPK信号通路密切相关。众所周知, P38MAPK信号通路又被称为MAPK应激信号通路, 该通路的激活可有效调节其他信号通路并影响细胞中基因的表达、蛋白质的合成, 最终引起细胞的凋亡^[14-16]。为进一步验证P38MAPK信号通路在非甾体抗炎药抑制胃癌细胞增殖中的作用, 本研究通过Western印迹检测了COX2的表达以及P38MAPK信号通路的活性, 结果提示非甾体抗炎药可抑制COX2的表达并激活P38MAPK信号通路, 且联用P38MAPK抑制剂SB203580可进一步降低COX2的表达。这表明P38MAPK可能是COX2的上游激酶, 但其中具体的作用机制还需进一步深入的研究。

综上, 非甾体抗炎药可通过抑制胃癌细胞增殖并促进其凋亡发挥抑癌作用, 且该作用P38MAPK信号通路密切相关。

参考文献

- den Hoed CM, Kuipers EJ. Gastric Cancer: how can we reduce the incidence of this disease?[J]. *Curr Gastroenterol Rep*, 2016, 18(7): 34.
- Song Z, Wu Y, Yang J, et al. Progress in the treatment of advanced gastric cancer[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(7): 1010428317714626.
- Reinau D, Surber C, Jick SS, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of nonmelanoma skin cancer[J]. *Int J Cancer*, 2015, 137(1): 144-153.
- Yoshitake R, Saeki K, Watanabe M, et al. Molecular investigation of the direct anti-tumour effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in a panel of canine cancer cell lines[J]. *Vet J*, 2017, 221: 38-47.
- Kang M, Ku JH, Kwak C, et al. Effects of aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, statin, and COX2 inhibitor on the developments of urological malignancies: a population-based study with 10-year follow-up data in Korea[J]. *Cancer Res Treat*, 2018, 50(3): 984-991.
- Huang XZ, Chen Y, Wu J, et al. Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs use reduce gastric cancer risk: a dose-response meta-analysis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(3): 4781-4795.
- Ghanghas P, Jain S, Rana C, et al. Chemoprevention of colon cancer through inhibition of angiogenesis and induction of apoptosis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs[J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2016, 35(3): 273-289.
- Chiou SK, Hoa N, Hodges A, et al. Indomethacin promotes apoptosis in gastric cancer cells through concomitant degradation of Survivin and Aurora B kinase proteins[J]. *Apoptosis*, 2014, 19(9): 1378-1388.
- Liu SX, Zhang YJ, Guo HF, et al. The regulatory effect of the p38 signaling pathway on valdecoxib-induced apoptosis of the Eca109 cell line[J]. *Oncol Rep*, 2009, 22(2): 313-319.
- Umar A, Steele VE, Menter DG, et al. Mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention[J]. *Semin Oncol*, 2016, 43(1): 65-77.
- Chen J, Stark LA. Aspirin prevention of colorectal cancer: focus on NF- κ B signalling and the nucleolus[J]. *Biomedicines*, 2017, 5(3): E43.
- Ferrera P, Zepeda A, Arias C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs attenuate amyloid- β protein-induced actin cytoskeletal reorganization through Rho signaling modulation[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2017, 37(7): 1311-1318.
- Sareddy GR, Kesnakurti D, Kirti PB, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs diclofenac and celecoxib attenuates Wnt/ β -catenin/Tcf signaling pathway in human glioblastoma cells[J]. *Neurochem Res*, 2013, 38(11): 2313-2322.
- Sun Y, Liu WZ, Liu T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2015, 35(6): 600-604.
- Zhao HG, Zhou SL, Lin YY, et al. Toxicaricoid N induces apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cell by activating the p38MAPK pathway[J]. *Arch Pharm Res*, 2018, 41(1): 71-78.
- Liu J, Wen D, Fang X, et al. p38MAPK signaling enhances glycolysis through the up-regulation of the glucose transporter GLUT-4 in gastric cancer cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(1): 155-165.

本文引用: 祝喜萍, 任旭, 李锐, 于丹, 康永明. 非甾体抗炎药塞来昔布和吲哚美辛对胃癌细胞MKN45的抑制作用[J]. *临床与病理杂志*, 2019, 39(4): 714-720. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.04.004

Cite this article as: ZHU Xiping, REN Xu, LI Rui, YU Dan, KANG Yongming. Inhibitory effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs celecoxib and indomethacin on gastric cancer cells MKN45[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2019, 39(4): 714-720. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.04.004