

## • 基础研究论著 •

## 环氧化酶 2 抑制剂塞来昔布诱导 NB4 细胞凋亡的研究

梅序桥<sup>1</sup>, 吴阿阳<sup>1</sup>, 郑源海<sup>1</sup>, 柯靖兰<sup>2</sup>, 郑意<sup>2</sup>, 赵志坚<sup>2</sup>

(1. 福建医科大学附属漳州市医院检验科, 福建漳州 363000; 2. 福建省漳州市血液中心, 福建漳州 363000)

**摘要:**目的 研究环氧化酶 2(COX-2)选择性抑制剂塞来昔布对髓性白血病细胞株 NB4 凋亡的影响, 探讨塞来昔布诱导细胞凋亡的机制。方法 RT-PCR 检测不同细胞系中 COX-2 mRNA 表达, MTT 法检测 NB4 细胞增殖抑制, DNA Ladder 试验分析 NB4 细胞 DNA 片段化, 流式细胞术检测 NB4 细胞 Bcl-2 蛋白的表达。结果 与未加药处理组相比, 不同浓度塞来昔布作用后 DNA Ladder 片段随浓度的增加而更为明显。不同用药组 25  $\mu\text{mol/L}$ 、50  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$  塞来昔布组 Bcl-2 蛋白表达率分别为 (71.69 $\pm$ 1.65)%、(34.51 $\pm$ 2.53)% 和 (29.28 $\pm$ 2.38)%, 与空白对照组 Bcl-2 蛋白表达率为 85.34 $\pm$ 2.89% 相比, 50  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$  塞来昔布组 Bcl-2 蛋白明显下降 ( $P < 0.05$ )。结论 COX-2 选择性抑制剂塞来昔布通过下调 NB4 细胞 Bcl-2 蛋白表达致诱导其凋亡。

关键词: 环氧水解酶类; 细胞凋亡; 逆转录聚合酶链反应

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.13.005

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)13-1676-03

## Study on effect of COX-2 selective inhibitor celecoxib on inducing apoptosis of NB4

Mei Xuqiao<sup>1</sup>, Wu Ayang<sup>1</sup>, Zheng Yuanhai<sup>1</sup>, Ke Jinglan<sup>2</sup>, Zheng Yi<sup>2</sup>, Zhao Zhijian<sup>2</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Zhangzhou Municipal Hospital, Fujian Medical University, Zhangzhou, Fujian 363000, China; 2. Zhangzhou Blood Center, Zhangzhou, Fujian province 363000, China)

**Abstract:** Objective To study the effects of COX-2 selective inhibitor celecoxib on the apoptosis of acute promyelocytic leukemia NB4 cell line, and to investigate its apoptosis mechanisms. Methods The expression of COX-2 mRNA in different cell lines was detected by reverse transcript polymerase chain reaction (RT-PCR). After treatment of NB4 with different doses of celecoxib, the inhibition of NB4 growth was assayed by MTT, and the DNA fragmentation was examined by the DNA ladder test. The level of Bcl-2 protein expression was assayed by the flow cytometry. Results As compared with the no-medication treatment group, the DNA ladder fragments became more and more obvious after the treatment by different doses of celecoxib. The expression rates of Bcl-2 protein in the different doses of celecoxib groups (25, 50, 100  $\mu\text{mol/L}$ ) were (71.69 $\pm$ 1.65)%, (34.51 $\pm$ 2.53)% and (29.28 $\pm$ 2.38)% respectively, compared with the Bcl-2 protein expression rate (85.34 $\pm$ 2.89%) in the blank control group, the expression rate of Bcl-2 protein in different doses of celecoxib groups (50, 100  $\mu\text{mol/L}$ ) was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Conclusion Celecoxib as COX-2 selective inhibitor could evidently induce the apoptosis of NB4 cells by down-regulating the expression of Bcl-2 protein in NB4 cells.

Key words: epoxide hydrolases; apoptosis; reverse transcriptase polymerase chain reaction

环氧化酶(COX)是前列腺素合成过程中的限速酶, 它将花生四烯酸转化成各种前列腺素产物, 后者参与维持机体的各种生理病理过程<sup>[1]</sup>。目前发现这种酶主要有两种形式: COX-1 和 COX-2。人类 COX-1 基因序列 25 kb, 转录生 2.8 kb 的 mRNA, 蛋白质相对分子质量约为  $68 \times 10^3$ , COX-1 基因在多种组织和细胞中表达, 其基因的启动区有“看家”基因的特点, 表达为结构性蛋白, 参与维持细胞正常的生理功能。COX-2 基因位于染色体 1q25.2~25.3 上, 由 5' 端 0.8 kb 的转录起始点上游区、6 kb 的蛋白质区、以及 2.5 kb 的非编码区(UTR)组成。其 3' 端的 22 个拷贝 AUUUA 基序是迅速降解 mRNA 的信息, 是 COX-2 基因即时表达与否的关键<sup>[2-3]</sup>。COX-2 mRNA 全长为  $(4.1 \sim 4.5) \times 10^3$ , 蛋白质相对分子质量为  $72 \times 10^3$ , 为诱导性表达蛋白, 在各种刺激因素作用下 COX-2 迅速合成, 参与多种病理生理过程, 包括多种炎症过程及肿瘤的发生、发展<sup>[4]</sup>。故 Bernard 等<sup>[5]</sup>认为 COX-2 在细胞中扮演原癌基因作用。很多研究表明 COX-2 抑制剂抗肿瘤的活性机制与细胞凋亡有关系。本文以白血病细胞株 NB4 为研究对象, 探讨 COX-2 抑制剂塞来昔布诱导 NB4 凋亡作用。

## 1 材料与方

## 1.1 材料

**1.1.1 药物制备** 塞来昔布购自苏州普强公司, 先以少量二甲亚砜溶解(二甲亚砜在试验体系中的终浓度小于 0.1%, 经过对比实验证明对细胞增殖及凋亡没有影响), 再用二甲亚砜调成终浓度为 10.0 mmol/L 的贮存液, 过滤除菌, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存, 药物临用前用细胞培养液稀释后加入培养体系。

**1.1.2 细胞及其培养** NB4 细胞系急性早幼粒细胞白血病细胞株, 由上海生命科学细胞研究所引进, 单核白血病细胞 U937 作为本实验的阳性对照细胞株, 由福建血液病研究所引进。细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640(Gibco 公司)培养, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  及饱和湿度温箱中培养。

## 1.2 方法

**1.2.1 RT-PCR 检测** U937、NB4 细胞系 COX-2 mRNA 的表达 取对数生长期的细胞经 PBS 洗涤后加入 1.0 mL Trizol (Gibco 公司)混匀, 按试剂说明书提取总 RNA, 按逆转录试剂盒(promega 公司)说明书进行逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)。其中 COX-2 产物 498 bp, 正义链 5'-GAT CTA CCC TCC TCA AGT CC-3' 1  $\mu\text{L}$ ; COX-2 反义链 5'-TTC CTA CCA GCA ACC-3' 1  $\mu\text{L}$ , 内参  $\beta$ -Actin 产物 234 bp, 正义链 5'-CGA GAA GAT GAC CCA GAT CA-3' 1  $\mu\text{L}$ , 反义链 5'-GAT CTT CAT GAG GTA GTC AG-3' 1  $\mu\text{L}$ 。配制含 0.5  $\mu\text{g/mL}$  EB 的 2%

琼脂糖凝胶,取 8.0 μL PCR 产物加 2.0 μL 缓冲液上样,电泳后,经凝胶图像分析仪(Gel Doc 1000 型, Bio-Rad 公司)分析。

**1.2.2 MTT 比色法检测塞来昔布对 NB4 细胞增殖的影响** 取对数生长期细胞,将细胞浓度调整为  $2.0 \times 10^5$  /mL 接种于 96 孔板,每孔 200 μL,试验组为不同浓度的塞来昔布,对照组不加药,空白组只加培养液(无细胞),每组设 4 个平行孔,44 h 后加 MTT(5 mg/mL)20 μL,继续培养 4 h 后离心弃上清液,加二甲基亚砜 100 μL,振荡 10 min,在酶标仪(Stat, Fax-2100)上用双波长 492 nm 和 630 nm 测吸光度(A)值,计算抑制率。抑制率(%) =  $(A_{\text{对照}} - A_{\text{试验}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ ,试验均重复 3 次。

**1.2.3 RT-PCR 检测不同药物浓度对 NB4 细胞系 COX-1 mRNA 表达的影响** COX-1 mRNA 的提取过程和 RT-PCR 的反应体系与 1.2.1 相似,其中 COX-1 产物 311 bp,正义链 5'-CTT GAC CGC TAC CAG TGT GA-3',反义链 5'-AGA GGG CAG AAT ACG AGT GT-3',内参 β-Actin 产物 234 bp,正义链 5'-CGA GAA GAT GAC CCA GAT CA-3',反义链 5'-GAT CTT CAT GAG GTA GTC AG-3'。

**1.2.4 DNA Ladder 试验** 将  $5 \times 10^5$  细胞转入无菌 Eppendorf 管中,加入 20 μL 溶解缓冲液[20 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris, pH8.0, 0.8% (w/v) SDS]。混匀细胞沉淀后加 10 μL RNA 酶 A/T1 混合液(分别为 500 U/mL, 20 000 U/mL, Ambion Inc.),再次混匀。37 °C 孵育 90~120 min。加 5 μL 6×DNA 上样缓冲液,电泳后经凝胶图像分析仪分析。

**1.2.5 流式细胞术检测 Bcl-2 蛋白表达** 将各试验组细胞培养 48 h,用 PBS 洗涤 3 次,以未加药处理的细胞为对照,加入鼠抗人 Bcl-2 蛋白单克隆抗体,暗室孵育 30 min,再加入等量 FITC 标记的兔抗鼠二抗,继续作用 30 min,经流式细胞仪(FACScan, BD)检测 Bcl-2 蛋白表达率。试验均重复 3 次。

**1.3 统计学处理** 试验数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,并用 SPSS 16.0 统计软件处理,组间比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 两种不同细胞系 U937 以及 NB4 细胞系的 COX-2mRNA 表达** 其中 U937 细胞系表达 COX-2mRNA,而 NB4 细胞系未见 COX-2mRNA 表达。见图 1(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

**2.2 MTT 法检测塞来昔布对 NB4 增殖影响的结果** 各试验组塞来昔布对 NB4 细胞均有抑制杀伤作用,其作用呈时间、剂量依赖性,见表 1。

**表 1 不同浓度塞来昔布作用 48 h 后对 NB4 细胞增殖抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n=12$ )**

塞来昔布浓度 (mmol/L)	A 值	抑制率 (%)
0	0.589 2 ± 0.023 5	—
25.0	0.413 8 ± 0.031 7*	40.32 ± 5.89
50.0	0.329 7 ± 0.101 8*	54.60 ± 2.27
100.0	0.143 8 ± 0.015 9*	87.45 ± 7.84

\*:  $P < 0.05$ , 与未加药处理组比较; —: 无数据。

**2.3 RT-PCR 检测显示不同塞来昔布浓度对 NB4 细胞系 COX-1 mRNA 表达没有明显影响。** 见图 2(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

**2.4 塞来昔布作用后 NB4 细胞凋亡的 DNA 片段** 随着用药浓度的加大,凋亡片段明显,其中 100 μmol/L 塞来昔布组凋亡程度最大。见图 3(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

**2.5 塞来昔布对 NB4 细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响** 经 48 h

的培养后,与未加药处理组相比,25 μmol/L 塞来昔布组 Bcl-2 蛋白表达率的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),而 50 μmol/L 和 100 μmol/L 塞来昔布组 Bcl-2 蛋白表达率,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见表 2。

**表 2 不同浓度塞来昔布作用 48 h 后对 NB4 细胞增殖抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )**

塞来昔布浓度 (mmol/L)	Bcl-2 表达率 (%)
0	85.34 ± 2.89
25.0	71.69 ± 1.65
50.0	34.51 ± 2.53*
100.0	29.28 ± 2.38*

\*:  $P < 0.05$ , 与未加药处理组比较。

**3 讨 论**

COX-2 在很多实体瘤中高表达,同时在某些血液肿瘤中也处于持续高表达状态<sup>[6-7]</sup>。这些研究均表明 COX-2 与凋亡密切相关, Elder 等<sup>[8]</sup>的研究表明 NS-398 能诱导肿瘤细胞凋亡,而不管是否表达 COX-2 蛋白。Kunda 等<sup>[9]</sup>报道选择性的 COX-1 或 COX-2 抑制剂可抑制人乳腺癌鼠模型的癌细胞转移,作用机制涉及到 COX 依赖性和非依赖性途径。上述 COX 抑制剂的抗肿瘤作用多在实体肿瘤被观察到,在造血系统肿瘤 COX 抑制剂是否具有抗肿瘤活性以及恶性血液肿瘤细胞系是否存在 COX-2 表达, Waskewich 等<sup>[10]</sup>给予了一些初步结果: 尽管造血和上皮细胞系恶性肿瘤细胞株中 COX-2 表达阴性,但 COX-2 抑制剂对该类肿瘤具有显著的增殖抑制作用。因此认为, COX-2 抑制剂抗血液系恶性细胞株增殖效应为 COX-2 非依赖性。与 Rocca 等<sup>[11]</sup>的实验相似,本研究在细胞系 U937 中发现有 COX-2mRNA 的表达,但在 NB4 细胞系中却未见明显的 COX-2mRNA 表达(图 1)。通过 MTT 试验发现,塞来昔布对 NB4 细胞的增殖抑制作用明显(表 1)。通过 DNA Ladder 实验(图 3)发现,塞来昔布对 NB4 细胞的促凋亡作用明显,当塞来昔布浓度达到 50 μmol/L 时即出现明显的 DNA 断裂,并形成特征性的“梯状条带”。这与 Elder 等<sup>[8]</sup>和 Waskewich 等<sup>[11]</sup>的报道相一致。本实验表明塞来昔布对 NB4 细胞抑制杀伤作用,并不是通过抑制 COX-1mRNA 表达实现的(图 2),这一结论与 Rocca 等并不一致。由此可见,塞来昔布对 NB4 细胞的增殖抑制作用和促凋亡作用可能是通过 COX 非依赖性途径实现的。

Bcl-2 蛋白属于 Bcl-2 家族,它不仅能够抑制凋亡,还可以降低肿瘤细胞对化疗药物的敏感性<sup>[12]</sup>。研究表明上皮细胞中过度表达 COX-2 能导致凋亡抑制基因 Bcl-2 水平的升高,并可抑制丁盐酸诱导的凋亡<sup>[13]</sup>。有研究报道 NS-398(一种 COX-2 的选择性抑制剂)处理人前列腺癌细胞株,能引起 Bcl-2 蛋白表达的下调,故认为 NS-398 诱导的凋亡与下调 Bcl-2 蛋白的水平有关<sup>[14]</sup>。张广森等<sup>[15]</sup>的研究显示:高浓度的叫噪美辛是一种 COX-1 和 COX-2 双重抑制剂,可抑制 K562 细胞及来自慢性粒细胞白血病患者新鲜骨髓白血细胞细胞的增殖和诱导白血细胞凋亡。凋亡调控机制涉及到 Bcl-2/Bax 蛋白比率的变化和 Caspase 3、Caspase 8 的裂解激活。在本试验对不同浓度塞来昔布用药组 NB4 细胞抗凋亡蛋白 Bcl-2 的检测中发现, 50 μmol/L 和 100 μmol/L 塞来昔布组 Bcl-2 蛋白表达率与空白组相比,下降明显,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与以往实验结论一致,塞来昔布对 NB4 细胞的促凋亡作用是与诱导 Bcl-2 蛋白表达下降相关的。

综上所述,可以认为塞来昔布对 NB4 细胞的作用途径是 COX 非依赖性的,塞来昔布的细胞毒作用呈(下转第 1680 页)

抗生素以及炎症调节因子的评价是未来研究的重要工作。

本文结果显示,融合了糖类结合域的抗菌肽 hBD3-CBD 的抗菌活性优于 hBD3,且对表皮葡萄球菌生物膜的形成有一定的抑制作用。在未来新抗菌材料的研发中,抗菌肽有理由占居一席之地。同时,也应该注意抗菌肽可能的不良反应,以及避免重蹈抗菌药物滥用的覆辙。

参考文献

[1] Casey AL, Lambert PA, Elliott TS. Staphylococci[J]. Int J Antimicrob Agents, 2007, 29(1): 23-32.  
 [2] Otto M, Echner H, Voelter W, et al. Pheromone cross-inhibition between Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis [J]. Infect Immun, 2001, 69(17): 1957-1960.  
 [3] Sawamura D, Goto M, Shibaki A, et al. Beta defensin-3 engineered epidermis shows highly protective effect for bacterial infection [J]. Gene Ther, 2005, 12(8): 857-861.  
 [4] Li Q, Huang J, Guo H, et al. Bactericidal activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus of a novel eukaryotic therapeutic recombinant antimicrobial peptide[J]. Int J Antimicrob Agents, 2012, 39(4): 496-499.  
 [5] Kajiyama S, Tsurumoto T, Osaki M, et al. Quantitative analysis of Staphylococcus epidermidis biofilm on the surface of biomaterial [J]. J Orthop Sci, 2009, 14(6): 769-775.  
 [6] Appelbaum PC. Microbiology of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus[J]. Clin Infect Dis, 2007, 45(Suppl 3): S165-170.  
 [7] Izadpanah A, Gallo RL. Antimicrobial peptides[J]. J Am Acad Dermatol, 2005, 52(3 Pt 1): 381-390.

[8] Toke O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections[J]. Biopolymers, 2005, 80(6): 717-735.  
 [9] Ostberg N, Kaznessis Y. Protegrin structure-activity relationships: using homology models of synthetic sequences to determine structural characteristics important for activity [J]. Peptides, 2005, 26(2): 197-206.  
 [10] Li Q, Zhou Y, Dong K, et al. Potential therapeutic efficacy of a bactericidal-immunomodulatory fusion peptide against methicillin-resistant Staphylococcus aureus skin infection[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 86(2): 305-309.  
 [11] Brissette CA, Lukehart SA. Mechanisms of decreased susceptibility to beta-defensins by Treponema denticola[J]. Infect Immun, 2007, 75(20): 2307-2315.  
 [12] Gordon YJ, Romanowski EG, McDermott AM. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs[J]. Curr Eye Res, 2005, 30(7): 505-515.  
 [13] He J, Eckert R, Pharm T, et al. Novel synthetic antimicrobial peptides against Streptococcus mutans[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(13): 1351-1358.  
 [14] Guo C, Diao H, Lian Y, et al. Recombinant expression and characterization of an epididymis-specific antimicrobial peptide BIN1b/SPAG11E[J]. J Biotechnol, 2009, 139(1): 33-37.  
 [15] Tam JP, Lu YA, Yang JL. Antimicrobial dendrimeric peptides[J]. Eur J Biochem, 2002, 269(8): 923-932.

(收稿日期: 2014-01-23)

(上接第 1677 页)

剂量依赖性,对肿瘤细胞 NB4 的凋亡作用与下调 Bcl-2 的表达有关系。COX-2 有望成为治疗白血病新的基因靶点,而 COX-2 选择性抑制剂将会成为一种有前景的白血病治疗药物。

参考文献

[1] Rouzer CA, Marnett LJ. Cyclooxygenases: structural and functional insights[J]. J Lipid Res, 2009, 50(1): 29-34.  
 [2] Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology[J]. Annu Rev Biochem, 2000, 69(1): 145-182.  
 [3] Rouzer CA, Marnett LJ. Mechanism of free radical oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cyclooxygenases[J]. Chem Rev, 2003, 103(21): 2239-2304.  
 [4] Zha S, Yegnasubramanian V, Nelson WG, et al. Cyclooxygenase in cancer: progress and perspective[J]. Cancer Lett, 2004, 215(1): 18-20.  
 [5] Bernard MP, Bbancos S, Sime PJ, et al. Targeting Cyclooxygenase-2 in Hematological Malignancies: Rationale and Promise[J]. Curr Pharm Des, 2008, 14(21): 2051-2060.  
 [6] Ryan EP, Pollock SJ, Kaur K, et al. Constitutive and activation-inducible cyclooxygenase-2 expression enhances survival of chronic lymphocytic leukemia B cells[J]. Clin Immunol, 2006, 20(1): 76-90.  
 [7] Ohsawa M, Fukushima H, Ikura Y, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in Hodgkin's lymphoma; its role in cell proliferation and angiogenesis[J]. Leuk Lymphoma, 2006, 7(9): 1863-1871.  
 [8] Elder DJ, Halton DE, Crew TE, et al. Apoptosis induction and cyclooxygenase-2 regulation in human colorectal adenoma and carcinoma cell lines by the cyclooxygenase-2-selective non steroidal anti-inflammatory drug NS-398[J]. Int J Cancer, 2000, 86(4): 553-560.

[9] Kunda N, Fulton AM. Selective cyclooxygenase COX-1 or COX-2 inhibitors control metastatic disease in a murine model of breast cancer[J]. Cancer Res, 2002, 62(8): 2343-2346.  
 [10] Waskewich C, Blumenthal RD, Li HL, et al. Celecoxib exhibits the greatest potency amongst cyclooxygenase (COX) inhibitors for growth inhibition of COX-2-negative hematopoietic and epithelial cell lines[J]. Cancer Res, 2002, 62(7): 2029-2033.  
 [11] Rocca B, Morosetti R, Habib A, et al. Cyclooxygenase-1, but not 2, is upregulated in NB4 leukemic cells and human primary promyelocytic blasts during differentiation [J]. Leukemia, 2004, 18(8): 1373-1379.  
 [12] Kagawa S, Gu J, Swisher SG, et al. Antitumor effect of adenovirus-mediated BAX gene transfer on p53-sensitive and p53-resistant cancer lines[J]. Cancer Res, 2000, 60(5): 1157-1161.  
 [13] Tsujii M, Dubois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2[J]. Cell, 1995, 83(3): 493-501.  
 [14] Lliu XH, Yao S, Kirschenbaum A, et al. NS-398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and downregulates bcl-2 expression in LNCaP cell[J]. Cancer Res, 1998, 58(19): 4245-4249.  
 [15] 张广森, 刘定胜. 选择性 COX-2 抑制剂 celecoxib 对 K562 细胞的增殖抑制、凋亡诱导作用和分子机制[J]. 生物化学与生物物理进展, 2004, 31(12): 1058-1060.

(收稿日期: 2014-01-23)