

· 基础研究 ·

美洛昔康对人喉癌 Hep-2 细胞株作用的研究

沈宝茗, 周芝芳, 刘 璐

(湖南南华大学第一附属医院 耳鼻咽喉科, 湖南 衡阳 421001)

摘要: **目的** 探讨美洛昔康对喉癌细胞株 Hep-2 凋亡作用和对体外培养喉癌 Hep-2 细胞周期的影响及作用机制。**方法** 应用肿瘤细胞培养技术, 随机分实验组和空白对照组, 培养不同时间后, 用流式细胞仪检测美洛昔康对 Hep-2 细胞凋亡发生率及对细胞周期的影响, 同时检测美洛昔康作用 Hep-2 细胞后细胞线粒体跨膜电位的变化。**结果** 流式细胞仪分析显示美洛昔康呈浓度依赖性诱导 Hep-2 细胞凋亡, 且实验组 G1 期细胞数明显增加, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 实验组 Hep-2 细胞线粒体跨膜电位明显下降, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 美洛昔康具有诱导 Hep-2 细胞凋亡及抑制细胞分化的作用, 其机制可能与触发了线粒体凋亡途径有关。

关键词: 美洛昔康; 喉癌 Hep-2 细胞株; 线粒体跨膜电位; 细胞凋亡

中图分类号: R739.65

文献标识码: A

文章编号: 1007-1520(2011)04-0255-04

Effect of Meloxicam on laryngeal carcinoma cell line Hep-2

SHEN Bao-min, ZHOU Zhi-fang, LIU Jun

(Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421001, China)

Abstract: **Objective** To study the apoptosis induction and cell cycle effect of Meloxicam on laryngeal carcinoma cell line Hep-2 and the possible mechanism. **Methods** Hep-2 cell was cultured and randomly divided into experimental group and control group. At different time points after culturation, the apoptosis induced by Meloxicam and the influence on cell cycle in Hep-2 were observed by flow cytometry. At the same time, the changes of mitochondrial membrane potential in Hep-2 were detected. **Results** Flow cytometry analysis showed that Meloxicam induced apoptosis of Hep-2 in a concentration-dependent manner. The cell number of G1 phase in the experimental group was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). The mitochondrial membrane potential of the experimental group decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Meloxicam can significantly induce apoptosis and inhibit differentiation of Hep-2 cell via a possible mechanism to initiate mitochondrial apoptosis.

Key words: Meloxicam; Hep-2 cell line; Laryngeal neoplasm; Mitochondrial membrane potential; Apoptosis

喉癌是头颈部常见的恶性肿瘤之一, 且具有上升趋势^[1,2]。有研究发现环氧合酶-2 (Cyclooxygenase-2, COX-2) 在头颈鳞癌血管形成中起重要作用^[3]。Chen 等^[4]用环氧合酶-2 抑制剂赛来昔布中发现赛来昔布能抑制头颈部鳞状细胞癌细胞的生长, 诱导

癌细胞的凋亡。美洛昔康 (Meloxicam) 是一种新型的选择性环氧合酶-2 抑制剂, 具有较强抗炎、镇痛和解热作用, 且不良反应较少, 同时美洛昔康也具有抗肿瘤的特征^[5,6]。有实验表明美洛昔康能抑制结肠癌细胞^[7]、肝癌细胞^[8]等肿瘤细胞的生长增殖。但国内还没有将美洛昔康作用于喉癌细胞的报道。笔者以喉癌 Hep-2 细胞株为材料, 研究美洛昔康对 Hep-2 细胞生长抑制和对其凋

基金项目: 衡阳市科学技术局科研计划项目(编号: 2009KJ35)。
作者简介: 沈宝茗, 女, 主任医师。
通讯作者: 沈宝茗, Email: shenbaoming77@163.com.

亡的诱导作用,同时探讨美洛昔康诱导 Hep-2 细胞凋亡的机制,为美洛昔康用于临床治疗喉癌提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞及体外培养

人喉癌 Hep-2 细胞株引自中南大学湘雅医院耳鼻咽喉头颈外科实验室,接种于含 15% 小牛血清 RPMI-1640 培养基液中,常规培养,在 37℃、95% 湿度、5% CO₂ 孵箱中培养,每 1.5~2 d 换液传代,取对数生长期细胞,加入相应浓度的美洛昔康,并设立对照组。

1.2 药物和试剂

美洛昔康 (Boehringer Ingelheim France 公司产品,分子量是 351.4,纯度 > 96%),细胞培养 4 h 内不加药物,然后随即分成 4 个实验组,分别加入 0、0.4、0.8、1.2、1.6 mmol/L 不同浓度的美洛昔康;对照组不加药物继续培养。

1.3 FITC 荧光标记、FCM 法测美洛昔康对 Hep-2 细胞凋亡的影响

取不同浓度美洛昔康 (0、0.4、0.8、1.2、1.6 mmol/L) 处理细胞,每组 3 瓶标本,细胞经不同浓度美洛昔康处理 0、12、24 和 48 h 后,用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞,PBS 洗涤细胞 3 次 (2000 rpm, 5 min),收集 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞,加入 500 μl 的 binding Buffer 悬浮细胞,再加入 5 μl Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μl Propidium Iodide 混匀,室温避光,反应 5~15 min 后用流式细胞仪检测,选用 488 nm 激发波长测定样本。

1.4 美洛昔康对 Hep-2 细胞周期的检测

取 0、0.4、0.8、1.2、1.6 mmol/L 不同浓度美洛昔康处理细胞,每组 3 瓶标本,细胞经不同浓度美洛昔康处理 24 h,用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞。PBS 洗涤细胞 3 次 (2000 rpm, 5 min),收集 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞,加入 500 μl 的 binding Buffer 悬浮细胞,再加入 5 μl Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μl Propidium Iodide 混匀,室温避光,反应 5~15 min 后用流式细胞仪检测,选用 488 nm 激发波长测定样本,流式细胞

仪上检测处于 G1 期细胞数量。

1.5 流式细胞仪检测 Hep-2 细胞线粒体跨膜电位

取 1.2 mmol/L 美洛昔康处理细胞 0、12、24 和 48 h,每组设 3 瓶细胞,并设空白对照组。用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞。PBS 洗涤细胞 3 次 (2000 rpm, 5 min),收集 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞,加入 500 μl 终浓度为 5 mg/ml 的 JC-1,37℃ 恒温箱避光温孵 10 min,用 PBS 重悬沉淀,上流式细胞仪检测,激发波长为 488 nm,通过荧光通道 FL1 (绿) 和 FL2 (红) 检测荧光强度,每份 Hep-2 细胞悬液标本获取 10×10^3 个细胞,应用 Cell Quest 软件获取和分析数据,发红色荧光即为线粒体结构未受损,统计 Hep-2 细胞线粒体跨膜电位的变化。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件,数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 美洛昔康促进 Hep-2 细胞凋亡的作用

美洛昔康对 Hep-2 细胞周期的检测。经 0、0.4、0.8、1.2、1.6 mmol/L 不同浓度美洛昔康分别处理 0、12、24 和 48 h,流式细胞仪 (见表 1) 分析,随浓度增加凋亡率也随之增加,方差分析各浓度组凋亡率差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 不同浓度美洛昔康对 Hep-2 细胞凋亡的影响

浓度 (mmol/L)	时间			
	0 h	12 h	24 h	48 h
0	0.9±0.1	0.9±0.1	1.1±0.2	1.2±0.3
0.4	-	4.0±0.2	6.9±0.2	7.3±0.3
0.8	-	4.9±0.3	8.4±0.3	7.6±0.4
1.2	-	6.4±0.3	10.1±0.4	14.5±0.4
1.6	-	11.8±0.5	15.8±0.5	16.9±0.5

2.2 美洛昔康对 Hep-2 细胞周期的检测

经 0、0.4、0.8、1.2、1.6 mmol/L 不同浓度美洛昔康处理 24 h,流式细胞仪检测,

其凋亡率分别(图 1),随溶度增加处于 G1 期细胞明显增加,溶度到 1.2 mmol/l 时 G1 期细胞达到高峰。方差分析各溶度组 G1 期细胞数差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

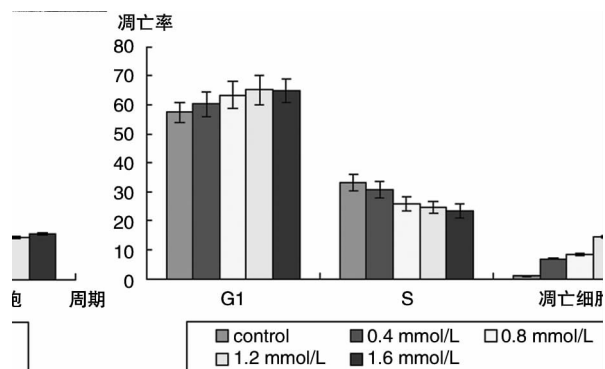


图 1 美洛昔康处理 Hep-2 细胞 24 h 对其周期的影响 ($P < 0.05$)

2.3 美洛昔康对 Hep-2 细胞跨膜电位的影响

喉癌细胞株 Hep-2 经美洛昔康处理后的细胞跨膜电位情况见表 2。对照组在 0、12、24、48 h 后均无明显细胞跨膜电位的下降,而用药 24 h 组细胞在不同浓度美洛昔康(0、0.4、0.8、1.2、1.6 mmol/L)作用后,随着美洛昔康浓度的增加,细胞跨膜电位明显下降,细胞跨膜势能呈递减趋势,方差分析各浓度组之间差异有统计学意义,有明显剂量依赖性($P < 0.05$,图 2)。而 1.2 mmol/L 用药组作用 0、12、24 和 48 h 后,随着药物作用时间延长,细胞跨膜电位明显下降,细胞跨膜势能呈递减趋势,方差分析各浓度组之间差异有统计学意义,有明显剂量依赖性($P < 0.05$,图 3)。

表 2 美洛昔康对 Hep-2 细胞跨膜电位的影响 ($P < 0.05$)

浓度	时间			
	0	12 h	24 h	48 h
0	231.5 ± 6.2	224.9 ± 6.6	212.8 ± 6.1	204.1 ± 7.3
0.4	-	210.7 ± 6.4	202.9 ± 5.6	192.3 ± 6.2
0.8	-	199.3 ± 6.1	194.8 ± 4.3	186.7 ± 5.4
1.2	-	182.8 ± 5.0	175.1 ± 3.9	160.3 ± 5.9
1.6	-	175.6 ± 5.3	161.5 ± 4.2	152.5 ± 3.8

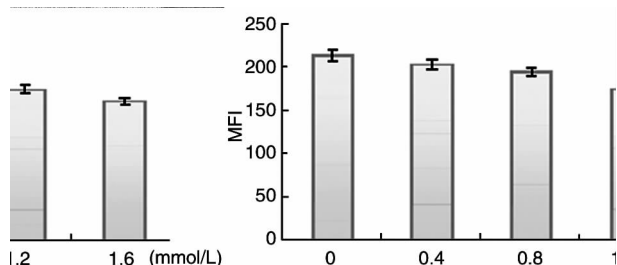


图 2 不同浓度的美洛昔康处理 Hep-2 细胞 24 h 对其线粒体跨膜势能的影响 ($P < 0.05$)

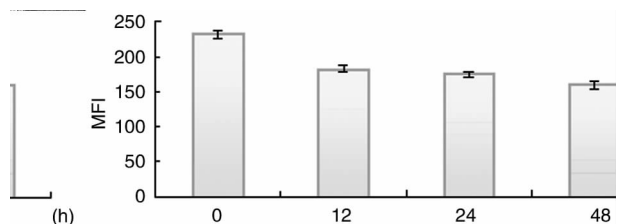


图 3 1.2 mmol/L 美洛昔康处理 Hep-2 细胞不同时间对其线粒体跨膜势能的影响 ($P < 0.05$)

3 讨论

肿瘤的生长速度主要决定于生长分数及与肿瘤细胞的生成和丢失之比,与倍增时间关系不大。生长分数是指处于增殖阶段的细胞所占的比例,生长分数越大,肿瘤增长越迅速,反之,增长越慢。因此通过抑制肿瘤细胞的生长,诱导肿瘤细胞的凋亡来消除肿瘤已经成为一种有效的肿瘤治疗途径。近年来,细胞凋亡的研究重点从细胞核转向线粒体,各种死亡信号诱导线粒体膜通透性改变,引起线粒体膜电位下降,导致促凋亡物质释放,继而激活 caspase,最终使细胞凋亡。Caspase 是一类对天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶,在细胞凋亡执行过程中直接参与早期凋亡启动、信号传递及晚期凋亡效应。本文应用细胞跨膜电位检测方法检测美洛昔康对 Hep-2 细胞的细胞跨膜电位作用,结果显示随着浓度增加和时间的延长,细胞线粒体跨膜势能逐渐降低,呈一定的时间和剂量依赖性特点,在高溶度 1.6 mmol/L 时,48 h 时细胞线粒体跨膜势能下降最多;不同浓度美洛昔康作用 Hep-2 细胞 24 h,细胞线粒体跨膜势能逐渐下降;1.2 mmol/L 美洛昔康作用 Hep-2 细胞不同时间后,其跨膜电位逐渐下降。因此本实验充分证实美洛昔康的

浓度和用药时间对喉癌 Hep-2 细胞的促凋亡的有效性,这一结果和国内相关研究一致^[9,10]。COX-2 催化花生四烯酸是产生前列腺素的限速酶,其中 PGE2 为主要催化产物,PGE2 有促进肿瘤生长的作用,有研究显示 PGE2 可使 HCA-7 结肠癌细胞克隆数增多,选择性 COX-2 抑制剂 SC-58125 减少其克隆数,但 PGE2 可逆转其抑制作用。美洛昔康是否对 Hep-2 细胞有诱导凋亡的作用,本实验用流式细胞仪检测细胞凋亡率和细胞周期,结果显示 1.6 mmol/L 浓度组干预 24 h 后相对于其他浓度组和对照组,处于 G1 期细胞含量明显增加,凋亡细胞明显增加,细胞凋亡率结果显示,1.6 mmol/L 组干预 48 h 后,细胞凋亡率与对照组差异有统计学意义。

参考文献:

- [1] Yang L, Parkin DM, Ferlay J, et al. Estimates of cancer incidence in China for 2000 and projections for 2005 [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005, 14(1): 243 - 250.
- [2] 董志伟,谷锐之. 临床肿瘤学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002: 443 - 447.
- [3] Gallo O, Massini E, Bianchi B, et al. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 pathway and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Hum Pathol*,

2000, 33(7): 708 - 714.

- [4] Chen Z, Zhang X, Li M, et al. Simultaneously targeting epidermal growth factor receptor tyrosine Kinase and cyclooxygenase-2, an efficient approach to inhibition of squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(17): 5930 - 5939.
- [5] Zhang N, Tao K, Huang T. Effects of Meloxicam on Vascular Endothelial Growth Factor and Angiotensin-2 Expression in Colon Carcinoma Cell Line HT-29 [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2007, 27(4): 399 - 402.
- [6] Yoshino S, Okabe T. Tadashi Okabe Advanced renal cell carcinoma in which a combination of IFN- α and meloxicam was thought to be effective [J]. *Int J Urol*, 2003, 10(1): 52 - 55.
- [7] 陶凯雄,张宁,王国斌,等. 美洛昔康对结肠癌细胞 VEGF 和 angiotensin-2 表达的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2006, 14(13): 1277 - 1282.
- [8] Pelzmann M, Thurnher D, Gedlicka C, et al. Nimesulide and indomethacin induce apoptosis in head and neck cancer cells [J]. *J Oral Pathol Med*, 2004, 33(10): 607 - 613.
- [9] Chen WS, Wei SJ, Liu JM, et al. Tumor invasiveness and liver metastasis of colon cancer cells correlated with cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and inhibited by a COX-2-selective inhibitor, etodolac [J]. *Int J Cancer*, 2001, 91(6): 894 - 899.
- [10] Alitalo K, Mohla S, Ruoslahti. Lymphangiogenesis and cancer: meeting report [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(24): 9225 - 9229.

(修回日期:2011-03-26)

(上接第 254 页)

上述实验结果表明:FXVD6 蛋白在鼻咽癌组织中存在高表达 4.3% (108/128),而在鼻咽慢性炎症对照组中阳性表达率仅为 5%。FXVD6 蛋白在有颈淋巴结转移组(N₁组)中的阳性率明显高于无颈淋巴结转移组(N₀组)($P < 0.01$),但在年龄、性别、病理类型、临床分期的分组中差异均无统计学意义($P > 0.05$)。FXVD6 蛋白在鼻咽癌中存在过度表达,且和颈淋巴结转移明显相关,说明 FXVD6 蛋白在鼻咽癌的发生和转移中可能起着重要的作用。

参考文献:

- [1] Delprat B, Bibert S, Geering K. FXVD proteins: novel regulators of Na⁺, K⁺-ATPase [J]. *Med Sci*, 2006, 22(6-7): 633 - 638.
- [2] Geering K. FXVD proteins: new regulators of Na⁺-K⁺-ATPase [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006, 290(2):

241 - 250.

- [3] Geering K, Beguin P, Garty H, et al. FXVD proteins: new tissue- and isoform-specific regulators of Na⁺, K⁺-ATPase [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 986(3): 388 - 394.
- [4] Hildsheim A, Levine PH. Etiology of nasopharyngeal carcinoma: a review [J]. *Epidemiology Rev*, 1993, 15(2): 466 - 485.
- [5] Chen DL, Huang TB. A case-control study of risk factor of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 1997, 117(1): 17 - 22.
- [6] 申良方,李建瓚. 鼻咽癌延误诊断的因素分析 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2003, 9(3): 165 - 167.
- [7] 谢振宇,程金妹,张鹏飞,等. 鼻咽癌中 VEGF-C、COX-2、VEGFR-3 的表达及其意义 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2008, 14(4): 259 - 264.
- [8] Yamaguchi F, Yamaguchi K, Tai Y, et al. Molecular cloning and characterization of a novel phospholemman-like protein from rat hippocampus [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001, 86(22): 189 - 192.

(修回日期:2011-06-30)

