

# 选择性环氧合酶-2 抑制剂 NS398 对人肺癌裸鼠移植瘤生长抑制作用研究

陈 健 毕艳丽 仇 容 徐麟皓 钱佳红 杨玉秀

**摘要** 目的 探讨选择性环氧合酶-2 抑制剂 NS398 对人肺癌裸鼠移植瘤的生长抑制作用及其机制。方法 建立人肺癌 A549 细胞的裸鼠皮下移植瘤模型,成瘤后 20 只裸鼠随机分为 4 组:对照组、NS398 低剂量(1.5mg/kg)组、NS398 中剂量(3.0mg/kg)组和 NS398 高剂量(4.5mg/kg)组。各组均采用腹腔注射给药,每周 3 次,共 4 周。给药期间每隔 7 日测量肿瘤体积。最后一次给药次日,处死裸鼠完整剥取肿瘤,测量肿瘤重量并计算抑瘤率。TUNEL 法检测各组移植瘤标本细胞凋亡情况,免疫印迹法检测 survivin、XIAP 和 cleaved caspase-3 蛋白表达情况。结果 NS398 各剂量组肺癌移植瘤生长速度均慢于对照组,各剂量组肿瘤重量显著低于对照组( $P < 0.01$ ,  $P = 0.000$ ),呈剂量依赖性。各剂量组的抑瘤率分别为 30.18%、46.50% 和 53.87%。TUNEL 法结果显示,与对照组比较,NS398 各剂量组凋亡指数均显著增加( $P < 0.01$ ,  $P = 0.000$ ),并呈剂量依赖性。免疫印迹法结果显示,与对照组比较,NS398 各剂量组 survivin 和 XIAP 蛋白表达量均显著减少,cleaved caspase-3 蛋白表达量均显著增加( $P = 0.000$ ),也呈明显剂量依赖性。结论 NS398 能明显抑制人肺癌裸鼠移植瘤的生长,并诱导肿瘤细胞凋亡,其机制可能与下调 survivin 和 XIAP 蛋白表达,上调 cleaved caspase-3 蛋白表达有关。

**关键词** NS398 肺癌 Survivin XIAP 裸鼠 细胞凋亡

**中图分类号** R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.07.015

**Study of a Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor NS398 in Suppressing the Growth of Human Lung Tumor Xenografts in Nude Mice.** Chen Jian, Bi Yanli, Qiu Rong, et al. Zhejiang Medical College, Zhejiang 310053, China

**Abstract Objective** To investigate the inhibitory effect and mechanism of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 in suppressing the growth of human lung tumor xenografts in nude mice. **Methods** A human lung tumor xenografts model was established by subcutaneously injecting human lung tumor A549 cell into nude mice. Twenty nude mice was randomly assigned into four groups: control, low-dose NS398 injection(1.5mg/kg), middle-dose NS398 injection(3.0mg/kg) and high-dose NS398 injection(4.5mg/kg). Mice in every groups were treated with corresponding dosage intraperitoneally for 3 times in each week and it lasted for 4 weeks. The volume of tumor was measured in every week, the nude mice were sacrificed for quantifying the rate of tumor inhibition and the tumor was removed for calculating tumor weight in the next day of last injection. The Apoptotic cells in tumor xenografts were detected by TUNEL method, and the expression levels of survivin, XIAP and cleaved caspase-3 were quantified by Western blot. **Results** The growth rate of tumor xenografts in NS398 injection groups with different dosages was slower than that in control group. The tumor weight in NS398 injection groups with different dosages all significantly decreased when compared with control group( $P < 0.01$ ,  $P = 0.000$ ). It showed a dose-dependent manner. The rates of tumor inhibition in NS398 injection groups were 30.18%, 46.50% and 53.87%, respectively. It showed that the apoptotic index of NS398 injection groups with different dosages was obviously increased in a dose-dependent manner when compared with control group by TUNEL detection( $P < 0.01$ ,  $P = 0.000$ ). Western blot showed that the expression levels of survivin and XIAP were significantly decreased when compared with control group, however, the expression level of cleaved caspase-3 was distinctly elevated when compared with control group. It also was a dose-dependent manner( $P = 0.000$ ). **Conclusion** The growth of human lung tumor xenografts was inhibited and apoptosis in tumor tissue was induced by NS398, which might be associated with decreased the expression of survivin and XIAP and increased the expression of cleaved caspase-3.

**Key words** NS398; Lung tumor; Survivin; XIAP; Nude mice; Apoptosis

基金项目:浙江省教育厅科研项目(Y201534309);浙江省高校国内访问工程师校企合作项目(FG2014009);浙江省大学生科技创新项目(2015R436009);浙江医学高等专科学校研究计划项目(2014XZA03)

作者单位:310053 杭州,浙江医学高等专科学校(陈健、仇容、徐麟皓、钱佳红、杨玉秀);310002 杭州,海勤疗养院(毕艳丽)

通讯作者:毕艳丽,电子邮箱:blywopu1998@163.com

肺癌是目前国内外病死率最高的恶性肿瘤,5年生存率仅为10%~15%,肺癌中80%~85%为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)。有研究表明,环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)高表达与NSCLC的发生、发展和预后密切相关<sup>[1]</sup>,以COX-2为靶向的治疗将是针对肺癌一种特异且有效的方法。氮-2,环己氧-4,硝基苯-甲基磺胺[N-(2-cyclohexyloxy-4-nitrophenyl)-methanesulfonamide, NS398]是Futaki等<sup>[2]</sup>发现的一种高选择性COX-2抑制剂。笔者前期研究证实NS398体外能够抑制肺癌A549细胞增殖,诱导其细胞凋亡<sup>[3]</sup>。然而,在体内环境中,NS398是否也有同样的效果国内外未见报道。本实验通过建立肺癌A549细胞裸鼠皮下移植瘤模型,采用不同剂量的NS398进行干预治疗,研究其对肺癌移植瘤生长以及生存素(survivin)、X连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)和cleaved caspase-3表达的影响。

### 材料与方法

1. 药物和试剂: NS398、BCA定量试剂盒和ECL化学发光试剂盒购自碧云天生物技术有限公司; RPMI1640培养基购自杭州吉诺生物医药技术有限公司; 标准小牛血清购自杭州四季青生物公司; TUNEL细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司; survivin和 $\beta$ -actin抗体购自美国Santa Cruz公司; XIAP和cleaved caspase-3抗体购自美国Cell Signaling Technology公司。

2. 细胞培养和实验动物: A549细胞购自南京凯基生物科技发展有限公司。细胞置于37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的细胞培养箱培养,培养基为含有10%小牛血清的RPMI1640,每2~3天传代1次。SPF级4~5周龄BALB/c雌性裸鼠,体重15~20g,购自上海斯莱克实验动物有限公司。裸鼠饲养于浙江医学高等专科学校比较医学中心SPF屏障系统的洁净层流架内,室温25~27℃,湿度40%~60%,用高压灭菌的标准饲料和水供裸鼠自由取用。

3. 动物造模和实验分组: A549细胞悬液(细胞密度为 $1 \times 10^7$ /ml)接种于裸鼠背部皮下,每只裸鼠注射0.2ml,观察成瘤情况,以皮下结节体积达50mm<sup>3</sup>为成瘤标准。将成瘤裸鼠按完全随机法分为4组(每组5只),对照组(生理盐水),低剂量组(NS398 1.5mg/kg),中剂量组(NS398 3.0mg/kg),高剂量组(NS398 4.5mg/kg),各组均腹腔注射给药,每周给药

3次,每次0.2ml,共4周,12次<sup>[4]</sup>。

4. 抗移植瘤生长效应检测: 每隔7日测量肿瘤结节的长径(a)、短径(b),计算肿瘤体积( $V = ab^2/2$ ),绘制肿瘤体积-时间生长曲线。治疗期间每天观察瘤鼠饮食、活动和排便等情况。最后一次给药次日,颈椎脱臼法处死裸鼠,完整剥取肿瘤,测量肿瘤重量,计算抑瘤率(%) = (对照组平均肿瘤重量 - 处理组平均肿瘤重量) / 对照组平均肿瘤重量 × 100%。剥取的肿瘤组织部分置于4%多聚甲醛中固定,部分置于液氮中保存。

5. TUNEL法检测细胞凋亡: 取多聚甲醛固定的各组肿瘤组织制成石蜡切片,石蜡切片经脱蜡后,按照TUNEL检测试剂盒说明书的步骤进行操作,以二氨基联苯胺显色,细胞核内出现棕黄色颗粒为凋亡细胞。每张切片随机选取5个高倍视野(×400),计数500个肿瘤细胞中的凋亡细胞数,计算凋亡指数(apoptotic index, AI) = (凋亡细胞数/肿瘤细胞总数) × 100%。

6. 免疫印迹法检测蛋白表达: 取液氮保存的各组肿瘤组织置入匀浆器中粉碎并研磨至粉末,再转入离心管中,加入裂解液完全裂解后离心取上清,以BCA法进行总蛋白定量测定。取每个样本60 $\mu$ g总蛋白进行上样行SDS-PAGE电泳。在冷却条件下以100V恒压1.5~2.0h转印于PVDF膜。室温封闭,加入相应的抗体孵育,再加入ECL发光试剂,暗室曝光,显影定影。进行光密度扫描,并以 $\beta$ -actin校正做相对量分析,数值以两者积分吸光度的比值表示。

7. 统计学方法: 计量数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,应用SPSS 17.0统计软件对数据进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 结 果

1. NS398对移植瘤生长的影响: NS398各剂量组肺癌移植瘤生长速度均慢于对照组,详见图1。完成给药后剥离肿瘤称重,各剂量组肿瘤重量均显著低于对照组( $P < 0.01$ ,  $P = 0.000$ ),高剂量组明显高于低剂量组( $P < 0.01$ );各剂量组抑瘤率分别为30.18%、46.50%和53.87%,详见表1。

2. NS398对移植瘤细胞凋亡的影响: NS398各剂量组凋亡指数均显著高于对照组( $P < 0.01$ ,  $P = 0.000$ ),中、高剂量组均明显高于低剂量组( $P = 0.000$ )。详见表2。

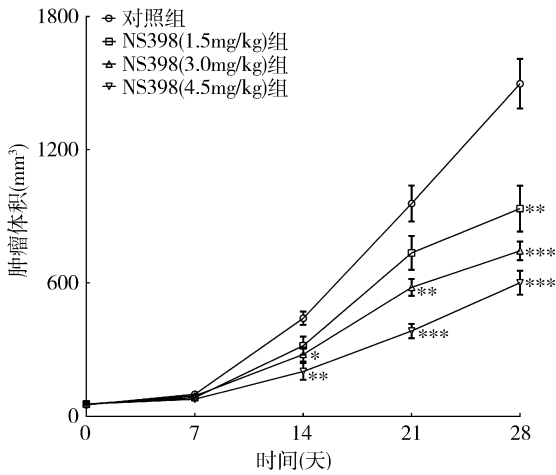


图 1 肺癌裸鼠移植瘤体积 - 时间生长曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ ) 与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P = 0.000$

表 1 肺癌裸鼠移植瘤用药结束后肿瘤称重情况 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	肿瘤重量 (mg)	抑瘤率 (%)
对照组	1121.75 ± 182.09	0
NS398 (1.5mg/kg) 组	783.25 ± 152.35 *	30.18
NS398 (3.0mg/kg) 组	600.18 ± 56.07 **	46.50
NS398 (4.5mg/kg) 组	517.43 ± 91.13 ***	53.87

与对照组比较, \*  $P < 0.01$ , \*\*  $P = 0.000$ ; 与 NS398 (1.5mg/kg) 组比较, #  $P < 0.01$

表 2 肺癌裸鼠移植瘤细胞凋亡情况 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	凋亡指数 (%)
对照组	3.31 ± 0.35
NS398 (1.5mg/kg) 组	7.44 ± 2.07 *
NS398 (3.0mg/kg) 组	12.60 ± 1.15 ***
NS398 (4.5mg/kg) 组	13.71 ± 2.13 ***

与对照组比较, \*  $P < 0.01$ , \*\*  $P = 0.000$ ; 与 NS398 (1.5mg/kg) 组比较, #  $P = 0.000$

3. NS398 对移植瘤蛋白表达的影响: survivin 和 XIAP 蛋白表达检测发现, 与对照组比较, NS398 中、高剂量组均显著减少 ( $P = 0.000$ ); 与低剂量组比较, 中、高剂量组明显减少 ( $P < 0.01, P = 0.000$ ); 与中剂量组比较, 高剂量组明显减少 ( $P = 0.000$ )。cleaved caspase - 3 蛋白表达检测发现, 与对照组比较, NS398 各剂量组均显著增加 ( $P = 0.000$ ); 与低剂量组比较, 中、高剂量组明显增加 ( $P = 0.000$ ), 详见图 2。

### 讨 论

NS398 是一种磺胺类制剂的衍生物, 属于选择性 COX - 2 抑制剂, 其显著的抗肿瘤作用已得到许多资

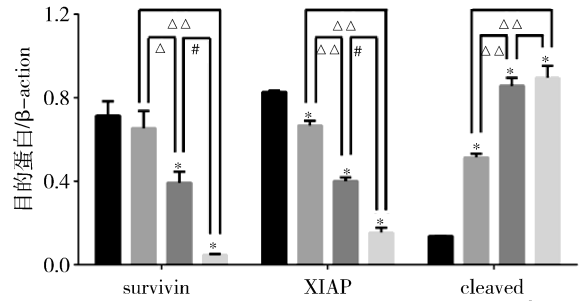
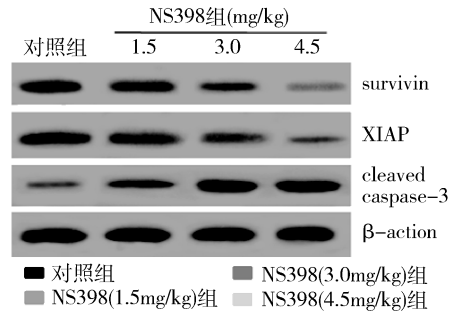


图 2 肺癌裸鼠移植瘤蛋白表达情况 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

与对照组比较, \*  $P = 0.000$ ; 与 NS398 (1.5mg/kg) 组比较,  $\Delta P < 0.01$ ,  $\Delta\Delta P = 0.000$ ; 与 NS398 (3.0mg/kg) 组比较, #  $P = 0.000$

料的证实<sup>[5-8]</sup>。笔者前期体外实验通过 MTT 法和细胞形态学检测证实 NS398 能抑制肺癌 A549 细胞增殖并诱导其凋亡<sup>[3]</sup>。本实验通过建立肺癌 A549 细胞的裸鼠皮下移植瘤模型, 采用不同剂量的 NS398 进行干预治疗, 观察其在体内对肺癌生长的影响。研究显示, NS398 各剂量组中移植瘤的生长明显慢于对照组, 治疗结束, 剥离肿瘤称重及取部分组织进 TUNEL 法检测发现, 与对照组比较, NS398 各剂量组肿瘤重量均显著减少, 呈剂量依赖性, 抑瘤率分别为 30.18%、46.50% 和 53.87%, 凋亡指数均显著增加, 也呈剂量依赖性, 因此从体内研究角度进一步证实了 NS398 具有确切的抗肿瘤效果。

目前的研究已证明肺癌的发生、发展与 IAP 家族和 caspase 家族关系密切。IAP 是一类具有结构同源性的蛋白家族, 具有抑制细胞凋亡的功能, survivin 和 XIAP 均属 IAP 家族成员。为进一步研究 NS398 抗肿瘤机制, 笔者用免疫印迹法对留取的各组移植瘤组织进行 survivin、XIAP 和 cleaved caspase - 3 蛋白水平检测发现, NS398 中、高剂量组 survivin 蛋白表达量均显著低于对照组, 低、中、高剂量组 XIAP 蛋白表达量均显著低于对照组, 并呈明显剂量依赖性, 而 NS398 处理后 cleaved caspase - 3 表达显著增加, 且随 NS398 剂量的增加而增加。survivin 基因定位于染色体 17q25, 全长约 14.7kp, XIAP 基因定位于 Xq25, 全长

约 8.7kb。研究表明, survivin 和 XIAP 在正常肺组织中无表达或低表达,而在 NSCLC 组织中高表达,并且两者的表达呈显著正相关<sup>[9]</sup>。survivin 和 XIAP 的高表达,可抑制 NSCLC 细胞凋亡,导致 NSCLC 化疗耐药<sup>[10,11]</sup>。因此,一些以 survivin 和 XIAP 为分子靶点的抗肿瘤研究取得了一定的进展,已有研究报道 NS398 可以下调肿瘤细胞 survivin 与 XIAP 的表达水平<sup>[12,13]</sup>。

本实验笔者从蛋白水平也证实了 NS398 具有降低肺癌组织 survivin 和 XIAP 表达的作用。caspase - 3 是 caspase 家族中最重要的凋亡执行分子,有活性的 caspase - 3 (cleaved caspase - 3) 表达水平是一种反映细胞凋亡严重程度的可靠指标<sup>[14]</sup>。本实验中随着 NS398 剂量的增加,cleaved caspase - 3 表达增加,与细胞凋亡指数呈正相关。另外研究证明,IAP 家族和 caspase 家族之间也存在很重要的关系,survivin 和 XIAP 均可以通过直接抑制凋亡起始因子 caspase - 9 以及效应分子 caspase - 3 与 caspase - 7 活性以实现对细胞凋亡的抑制<sup>[9,15]</sup>。因此笔者推测,NS398 诱导肺癌凋亡可能与通过降低 survivin、XIAP 表达、减少对 caspase 的抑制作用、增加 caspase - 3 活化有关。

总之,本实验研究证实 NS398 能明显抑制人肺癌裸鼠移植瘤的生长,并诱导肿瘤细胞凋亡,其机制可能与下调 survivin 和 XIAP 蛋白表达,上调 cleaved caspase - 3 蛋白表达有关,但具体作用机制有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Li F, Liu Y, Chen H, *et al.* EGFR and COX - 2 protein expression in non - small cell lung cancer and the correlation with clinical features [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011, 30: 27
- 2 Futaki N, Takahashi S. NS - 398, a new anti - inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX - 2) activity invitro [J]. *Prostaglandins*, 1994, 47(1): 55 - 59
- 3 Qiu R, Chen J, Sima J, *et al.* NS398 induces apoptosis in non - small cell lung cancer cells [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138(1): 119 - 124
- 4 Ding L, Xu Y, Zhang W, *et al.* MiR - 375 frequently downregulated in gastric cancer inhibits cell proliferation by targeting JAK2 [J]. *Cell Res*, 2010, 20(7): 784 - 793
- 5 Lv Z, Rao P, Li W. MiR - 592 represses FOXO3 expression and promotes the proliferation of prostate cancer cells [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(9): 15246 - 15253
- 6 Dong Y, Si JW, Li WT, *et al.* miR - 200a/miR - 141 and miR - 205 upregulation might be associated with hormone receptor status and prognosis in endometrial carcinomas [J]. *Int J Clin Exp Pathol*,

- 7 Liu X H, Kirscheubaum A, Yao S, *et al.* Inhibition of cyclooxygenase - 2 suppresses angiogenesis and the growth of prostate cancer in vivo [J]. *J Urol*, 2000, 164(3 Pt 1): 820 - 825
- 8 Duan DP, Dang XQ, Wang KZ, *et al.* The cyclooxygenase - 2 inhibitor NS - 398 inhibits proliferation and induces apoptosis in human osteosarcoma cells via downregulation of the survivin pathway [J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(5): 1693 - 1700
- 9 Que W, Li S, Chen J. NS - 398 enhances the efficacy of bortezomib against RPMI8226 human multiple myeloma cells [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(5): 1641 - 1645
- 10 Wang X, Liang Y, Wang J, *et al.* Effect of NS - 398, a cyclooxygenase - 2 selective inhibitor, on the cytotoxicity of cytotoxic T lymphocytes to ovarian carcinoma cells [J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(3): 1517 - 1522
- 11 Li H, Cheng J, Mao Y, *et al.* miR - 21 inhibits the effects of cyclooxygenase - 2 inhibitor NS398 on apoptosis and invasion in gastric cancer cells [J]. *Onco Targets Ther*, 2015, 4(8): 3245 - 3253
- 12 葛莉萍, 李坚, 陈萍. Survivin 与 XIAP mRNA 在非小细胞肺癌组织中的表达及相关性 [J]. *中国肿瘤*, 2009, 18(1): 68 - 71
- 13 张曙光, 刘晓凡, 杜江, 等. Survivin - siRNA 抑制肺癌 A549 细胞的增殖并增强其对顺铂的敏感性 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 6(6): 583 - 587
- 14 Zhou Y, Peng Y, Mao QQ, *et al.* Casticin induces caspase - mediated apoptosis via activation of mitochondrial pathway and upregulation of DR5 in human lung cancer cells [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2013, 6(5): 372 - 378
- 15 Duan DP, Dang XQ, Wang KZ, *et al.* The cyclooxygenase - 2 inhibitor NS - 398 inhibits proliferation and induces apoptosis in human osteosarcoma cells via downregulation of the survivin pathway [J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(5): 1693 - 1700
- 16 Yamanaka Y, Shiraki K, Inoue T, *et al.* COX - 2 inhibitors sensitize human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL - induced apoptosis [J]. *International journal of molecular medicine*, 2006, 18(1): 41 - 47
- 17 黎萍, 赵丽晶, 张捷, 等. 红景天对肺癌多药耐药细胞 A549/DDP 的促凋亡作用研究 [J]. *中国实验诊断学*, 2014, 18(9): 1406 - 1408
- 18 Suzuki A, Ito T, Kawano H, *et al.* Survivin initiates precaspase - 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas mediated cell death [J]. *Oncogene*, 2000, 19(10): 1346 - 1353
- 19 (收稿日期: 2015 - 10 - 23)
- 20 (修回日期: 2015 - 12 - 10)
- 21 Chung TK, Cheung TH, Huen NY, *et al.* Dysregulated microRNAs and their predicted targets associated with endometrioid endometrial adenocarcinoma in Hong Kong women [J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(6): 1358 - 1365
- 22 Wu W, Lin Z, Zhuang Z, *et al.* Expression profile of mammalian microRNAs in endometrioid adenocarcinoma [J]. *Eur J Cancer Prev*, 2009, 18(1): 50 - 55
- 23 (收稿日期: 2015 - 12 - 13)
- 24 (修回日期: 2015 - 12 - 28)

(上接第 51 页)