

吲哚美辛对骨肉瘤 143B 细胞增殖、迁移和凋亡的影响

郭良煜 陶春杰 陈敬腾 龚长天 施玉博 郭卫春

摘要 目的 观察吲哚美辛对骨肉瘤 143B 细胞增殖、凋亡的影响,并探讨其可能的机制。**方法** 体外培养人骨肉瘤细胞 143B,倒置显微镜观察骨肉瘤 143B 细胞的形态;CCK-8 检测骨肉瘤 143B 细胞增殖情况;流式细胞术分析骨肉瘤 143B 细胞的凋亡;Transwell 检测骨肉瘤 143B 细胞迁移情况;Western blot 法检测细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2 的表达。**结果** CCK-8 结果显示吲哚美辛能抑制骨肉瘤 143B 细胞的增殖,呈时间、浓度依赖性;流式细胞术结果显示吲哚美辛以浓度依赖的形式诱导骨肉瘤细胞凋亡;Transwell 结果显示吲哚美辛可以抑制骨肉瘤 143B 细胞迁移;Western blot 法检测结果表明,吲哚美辛下调抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达。**结论** 吲哚美辛抑制骨肉瘤 143B 细胞增殖和迁移能力并且促进其凋亡,并呈现时间和浓度依赖性。

关键词 吲哚美辛 骨肉瘤 细胞凋亡

中图分类号 R2 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.01.014

Effects of Indomethacin on Proliferation, Migration and Apoptosis of Osteosarcoma 143B Cells. Guo Liangyu, Tao Chunjie, Chen Jingting, et al. Renmin Hospital of Wuhan University, Department of Orthopedics, Hubei 430060, China

Abstract Objective To observe the effect of indomethacin on proliferation and apoptosis of osteosarcoma 143B cells and explore the possible mechanism. **Methods** Human osteosarcoma 143B cells were cultured in vitro. The morphology of human osteosarcoma 143B cells was observed by inverted microscope. CCK-8 was used to detect the proliferation of osteosarcoma 143B cells. Flow cytometry was used to analyze the apoptosis of osteosarcoma 143B cells. Transwell assay showed osteosarcoma 143B cell invasion. Expression of Bcl-2 was detected by Western blot. **Results** CCK-8 results showed that indomethacin could inhibit the proliferation of osteosarcoma 143B cells in a time-dependent and concentration-dependent manner. Flow cytometry showed that indomethacin induced apoptosis of osteosarcoma cells in a concentration-dependent manner. Transwell results showed that indomethacin inhibited the migration of osteosarcoma 143B cells. Western blot analysis showed that indomethacin down-regulated the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2. **Conclusion** Indomethacin inhibits proliferation and migration and promotes apoptosis of osteosarcoma 143B cells in a time-dependent and concentration-dependent manner.

Key words Indomethacin; Osteosarcoma; Apoptosis

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是最常见的原发性骨肿瘤,好发于儿童和青少年,主要发生于长骨远端并且容易产生远处转移和侵袭。目前针对骨肉瘤治疗的金标准是新辅助化疗加手术切除,这使得骨肉瘤的 5 年生存率从 20% 提高到了 60%^[1]。然而,化疗药物的毒性和骨肉瘤细胞对化疗药物表现出的耐药性对骨肉瘤的临床治疗和长期存活率构成了极大挑战。近几年的研究表明诱导靶细胞凋亡是消灭癌细胞的关键因素^[2-4]。

吲哚美辛是 NSAID 一类的抗炎药物,主要用于类风湿关节炎或骨关节炎等相关疼痛的对症治

疗^[5]。近年来已有相关文献报道吲哚美辛可以抑制结直肠癌细胞的增殖、分化和转移^[6,7]同时也可以抑制结直肠癌细胞的增殖并诱导其凋亡^[8-11]。然而,吲哚美辛对人类 OS 的作用仍有待于进一步研究。本研究通过细胞实验研究吲哚美辛对骨肉瘤 143B 细胞增殖、迁移、细胞形态和凋亡的影响,并初步探讨吲哚美辛抗骨肉瘤作用的相关分子机制,以期对吲哚美辛应用于临床骨肉瘤患者的治疗提供实验基础和理论依据。

材料与方法

1. 材料:人骨肉瘤 143B 细胞购自中国典型培养物保藏中心(China Center For Type Culture Collection, CCTCC);MEM 培养基和胎牛血清购自美国 Hyclone 公司;1% 双抗(青霉素 100U/ml,链霉素 100μg/ml)购自吉诺公司;含 EDTA 的胰酶购自武汉谷歌生物科技有限公司;吲哚美辛、DMSO 以及胰蛋白酶均购自

基金项目:国家自然科学基金资助项目(815025750);中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2042015kf0069)

作者单位:430060 武汉大学人民医院骨科

通讯作者:郭良煜,电子信箱:glystster@foxmail.com

美国 Sigma 公司; Cell Counting Kit - 8 (CCK - 8) 购自日本同仁化学研究所; Annexin V - FITC/PI (Propidium Iodide) 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; 一抗 caspase - 3、caspase - 9、GAPDH、Bcl - 2 以及 Bax 均购自美国 CST 公司; HRP 标记抗兔 IgG 二抗购自武汉博士德生物工程有限公司。

2. 细胞培养: 人骨肉瘤 143B 细胞用含 10% 的胎牛血清和 1% 双抗的 MEM 培养基, 于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中常规培养, 取对数生长期的细胞进行后续实验。

3. 细胞增殖能力检测: 将骨肉瘤 143B 细胞以 1×10^5 个/毫升浓度接种于 96 孔板上。每孔加入 100 μ l, 过夜孵育待细胞贴壁后加入不同浓度的吡哆美辛, 阴性对照组加入等体积的 MEM 培养基。分别培养 24、48、72h 后每孔加入 10 μ l 的 CCK - 8 试剂, 继续孵育 2h 后用酶标仪 (澳大利亚 Tecan Sunrise 公司) 测量 450nm 波长下的吸光度 (A) 值。A 值与细胞活力和数量呈正比, 所有试验均进行 3 次。

4. 形态学观察: 将骨肉瘤 143B 细胞以 1×10^5 个/毫升浓度接种于 6 孔板中。24h 后分别加入不同浓度的吡哆美辛 (0、400、600、800 μ mol/L) 随后置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24h 后, 在倒置显微镜下观察细胞贴壁情况和生长情况, 并拍照。

5. 细胞凋亡检测: 将骨肉瘤 143B 细胞以 1×10^5 个/毫升浓度接种于 6 孔板中。用不同浓度的吡哆美辛 (0、600、800 μ mol/L) 处理骨肉瘤 143B 细胞 24h 后, 用胰酶消化细胞, 离心 5min 后用预冷的 PBS 洗涤细胞 1 次后用 250 μ l binding buffer 重悬细胞, 取 100 μ l 细胞悬液于 5ml 流式管中, 加入 5 μ l 的 Annexin V/FITC 和 5 μ l 的 PI, 混匀后避光孵育 30min, 最后再加入 400 μ l binding buffer, 随即用流式细胞仪进行细胞凋亡检测。

6. Transwell 迁移实验: 将小室放入 24 孔板中, 随后将骨肉瘤 143B 细胞以每孔 1×10^5 个接种于小室的上室中。下室加入含 20% 血清的 MEM 培养基以建立血清浓度差。后用不同浓度的吡哆美辛 (0、600、800 μ mol/L) 处理骨肉瘤 143B 细胞。处理 24h 后用 PBS 清洗 15min, 用甲醇固定 15min, 吉姆萨染色 10min。随后用棉签擦去上室的细胞, 用倒置显微镜进行细胞计数。

7. Western blot 法: 将骨肉瘤 143B 细胞以每孔 1×10^5 个接种于 6 孔板中。用吡哆美辛 (800 μ mol/L) 处理骨肉瘤 143B 细胞 24h 后用 PBS 洗涤 2 次, 随后

加入 RIPA 裂解液提取总蛋白, 用 BCA 法测定蛋白浓度后用 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS - PAGE) 分离, 转膜后用 5% 的脱脂奶粉于室温封闭 1h, 后加入相应一抗随后在 4℃ 条件下过夜孵育。后用 HRP 标记抗兔 IgG 于室温孵育 2h。TBST 溶液洗 5×10 min, 随后用 ECL 发光液显色后分析结果以目的蛋白与 GAPDH 的灰度比值表示蛋白表达水平。

8. 统计学方法: 应用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行统计分析, 计量数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据之间的比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 吡哆美辛抑制骨肉瘤 143B 细胞增殖的影响: 用不同的浓度分别处理 143B 细胞 24 和 48h 后用 CCK8 检测增殖能力 (图 1)。随着吡哆美辛浓度的增加, 细胞活力在不断下降。同时相同浓度下的 48h 细胞活力均小于 24h 细胞活力, 证明吡哆美辛可以抑制 143B 细胞的增殖, 并且具有时间 - 剂量依赖性。

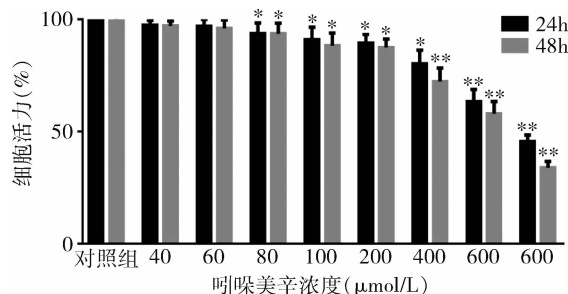


图 1 吡哆美辛对骨肉瘤 143B 细胞增殖的影响

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2. 吡哆美辛对骨肉瘤 143B 细胞形态的影响: 用不同浓度的吡哆美辛处理骨肉瘤 143B 细胞 24h 后, 用倒置显微镜观察细胞形态显示对照组细胞均贴壁同时生长良好, 形态正常, 排列规则且细胞密度高; 而实验组中, 细胞形态异常同时细胞皱缩且排列紊乱, 并且随着吡哆美辛浓度的增加, 细胞数量及密度明显减少 (图 2)。

3. 吡哆美辛对骨肉瘤 143B 细胞凋亡的影响: 用不同浓度的吡哆美辛处理 143B 细胞后, 用流式细胞仪检测细胞总凋亡率详见图 3。总凋亡率 (%) = 早期凋亡率 + 晚期凋亡率。随着吡哆美辛浓度的提高, 实验组细胞的凋亡率不断增高。

4. 吡哆美辛对骨肉瘤 143B 细胞迁移的影响: 用不同浓度的吡哆美辛处理 143B 细胞后, 倒置显微镜下观察细胞后发现, 实验组细胞总数小于对照组细胞

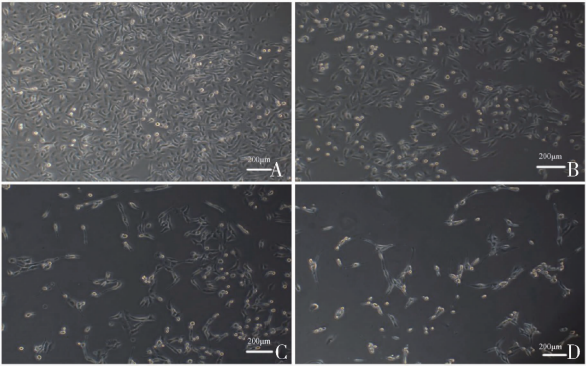


图 2 吲哚美辛对骨肉瘤 143B 细胞形态的影响 (×100)

A. 对照组; B. 400 μmol/L 吲哚美辛处理组; C. 600 μmol/L 吲哚美辛处理组; D. 800 μmol/L 吲哚美辛处理组

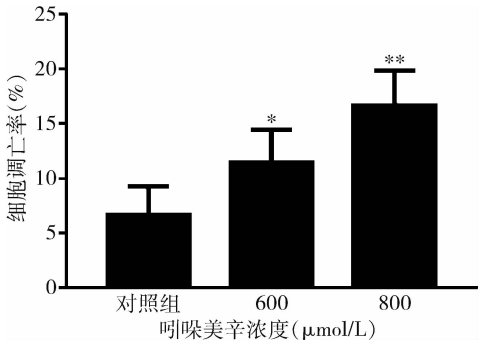


图 3 吲哚美辛对骨肉瘤 143B 细胞凋亡的影响
与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

总数(图 4),并且随着吲哚美辛浓度的提高,实验组的细胞总数不断减少。

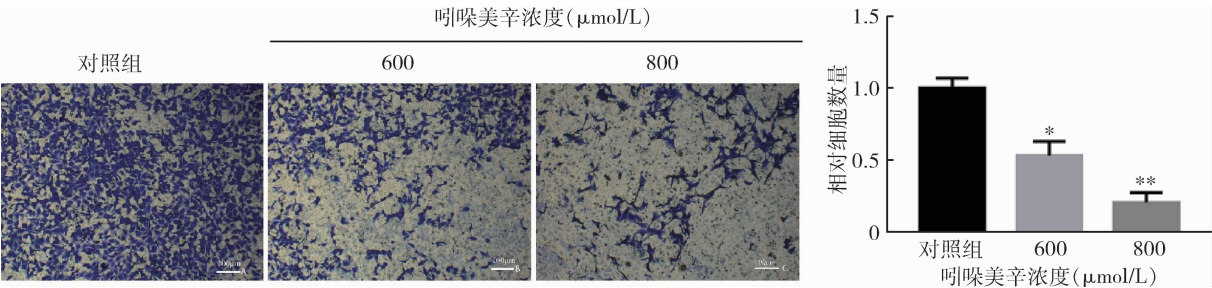


图 4 吲哚美辛对骨肉瘤 143B 细胞迁移的影响(结晶紫, ×100)

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

5. 吲哚美辛对凋亡蛋白的影响:为了探讨吲哚美辛诱导 143B 细胞的凋亡机制,检测 143B 处理后的 Bcl-2 的表达情况(图 5),与对照组比较,Bcl-2 表达下调,证明吲哚美辛通过下调 Bcl-2 凋亡蛋白来诱导 143B 细胞的凋亡。

讨 论

骨肉瘤是骨科中常见的原发性骨肿瘤,具有容易复发和侵袭性强的特点。而传统的化疗因其毒性不良反应并且骨肉瘤容易产生耐药性的原理使得骨肉瘤的临床治疗效果无明显提高。而之前的研究中显示抗炎药物,例如赛来西布,可以抑制肿瘤细胞和血管生成、促进肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤的侵袭和转移等^[12,13]。同时吲哚美辛对胃癌、乳腺癌等恶性肿瘤有显著作用^[14]。有研究证实了吲哚美辛可以抑制胃癌细胞的增殖和分化,同时通过调控细胞中的溶酶体从而导致细胞凋亡,并且吲哚美辛也可以抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭,并且与基于葡聚糖的化合物相混合后可以降低乳腺癌细胞的耐药性,其原理是减少了 MDR 相关蛋白所介导的化疗药物的排出^[15,16]。

本研究通过不同浓度的吲哚美辛处理骨肉瘤 143B 细胞,结果显示吲哚美辛可以抑制骨肉瘤 143B 细胞的增殖和侵袭,诱导细胞的凋亡,而无论是细胞增殖还是侵袭,都与凋亡是密不可分的。凋亡的经典途径有两种:线粒体途径和 Fas 配体途径,两者都具有共同的下游通路 caspase 家族^[17]。对于线粒体途

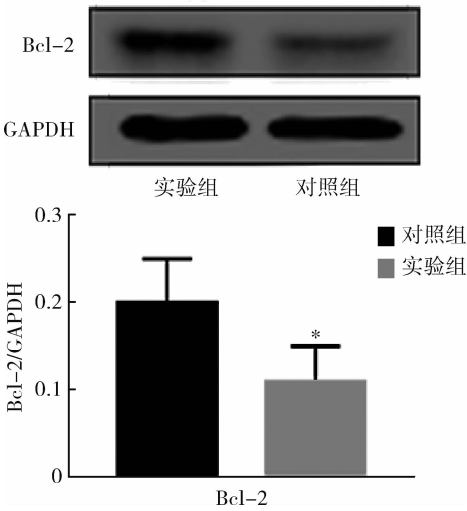


图 5 吲哚美辛对凋亡蛋白的影响

与对照组比较, * $P < 0.05$

径,在接受死亡信号转导后,Bcl - 2 影响电压依赖性阴离子通道 (VDAC) 从而导致细胞膜电位降低,通透性增加,诱导细胞凋亡^[18~20]。Western blot 法检测结果显示 Bcl - 2 表达下调,证实了吲哚美辛通过下调 Bcl - 2 来诱导骨肉瘤 143B 细胞凋亡。

综上所述,吲哚美辛可以通过剂量依赖性和时间依赖性来抑制其骨肉瘤的增殖和迁移,同时通过下调 Bcl - 2 来诱导骨肉瘤 143B 细胞凋亡。这为吲哚美辛治疗骨肉瘤患者提供了实验依据。但与骨肉瘤发生、发展有关的其他通路,例如 Notch 和 Wnt 通路等均未进行研究,后续实验将会研究吲哚美辛与以上两通路之间的联系。

参考文献

- 1 Chen Y, Li M, Li Z, *et al.* Bufalin induces apoptosis in the U2OS human osteosarcoma cell line via triggering the mitochondrial pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(1):817-822
- 2 Li J, Zhang F, Wang S. A polysaccharide from pomegranate peels induces the apoptosis of human osteosarcoma cells via the mitochondrial apoptotic pathway[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35:7475-7482
- 3 Hilovska L, Jendzelovsky R, Fedorocko P. Potency of non - steroidal anti - inflammatory drugs in chemotherapy[J]. *Mol Clin Oncol*, 2015, 3(1):3-12
- 4 Xu L, Croix BS. Improving VEGF - targeted therapies through inhibition of COX - 2/PGE2 signaling[J]. *Mol Cell Oncol*, 2014, 1(4):e969154
- 5 Xu L, Stevens J, Hilton MB, *et al.* COX - 2 inhibition potentiates antiangiogenic cancer therapy and prevents metastasis in preclinical models[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(242):242ra84
- 6 Leszczynska KB, Foskolou IP, Abraham AG, *et al.* Hypoxia - induced p53 modulates both apoptosis and radiosensitivity via AKT[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(6):2385-2398
- 7 Gao M, Yu FB, Lv CJ, *et al.* Fluorescent chemical probes for accurate tumor diagnosis and targeting therapy[J]. *Chem Soc Rev*, 2017, 46(8):2237-2271
- 8 Qiu M, Ren WX, Jeong T, *et al.* Omnipotent phosphorene: a next - generation, two - dimensional nanoplatfor for multidisciplinary biomedical applications[J]. *Chem Soc Rev*, 2018, 30(47):5580-5588

- 9 Ji W, Wang B, Fan Q, *et al.* Chemosensitizing indomethacinconjugated dextran - based micelles for effective delivery of paclitaxel in resistant breast cancer therapy[J]. *PLoS One*, 2017, 12(7):e0180037
- 10 Hu W, Fang L, Hua W, *et al.* Biotin - Pt (IV) - indomethacin hybrid: a targeting anticancer prodrug providing enhanced cancer cellular uptake and reversing cisplatin resistance[J]. *J Inorg Biochem*, 2017, 175:47-57
- 11 Neumann W, Crews BC, Sarosi MB, *et al.* Conjugation of cisplatin analogues and cyclooxygenase inhibitors to overcome cisplatin resistance[J]. *Chem Med Chem*, 2015, 10(1):183-192
- 12 Matsunaga S, Asano T, Tsutsuda - Asano A, *et al.* Indomethacin overcomes doxorubicin resistance with inhibiting multi - drug resistance protein 1 (MRP1) [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2006, 58(3):348-353
- 13 Zhang Y, Wang J, Lv ZM, *et al.* Cox - 2 promotes mesenchymal stem cells differentiation into cardiocytes by activating JNK and ERK pathway[J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 2016, 480:101-105
- 14 Geesala R, Dhoke NR, Das A. Cox - 2 inhibition potentiates mouse bone marrow stem cell engraftment and differentiation - mediated wound repair[J]. *Cytherapy*, 2017, 19:756-770
- 15 Zhou YF, Wang SH, Ying XH, *et al.* Doxorubicin - loaded redox - responsive micelles based on dextran and indomethacin for resistant breast cancer[J]. *Int J Nano Med*, 2017, 12:6153-6168
- 16 Vallecillo - Hernández J, Barrachina MD, Ortiz - Masiá D, *et al.* Indomethacin disrupts autophagic flux by inducing lysosomal dysfunction in gastric cancer cells and increases their sensitivity to cytotoxic drugs [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):3593
- 17 Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, *et al.* Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis [J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(7):8471-8486
- 18 Radogna F, Dicato M, Diederich M. Cancer - type - specific crosstalk between autophagy, necroptosis and apoptosis as a pharmacological target[J]. *Biochem Pharmacol*, 2015, 94(1):1-11
- 19 Radogna F, Cerella C, Gaigneaux A, *et al.* Cell type - dependent ROS and mitophagy response leads to apoptosis or necroptosis in neuroblastoma[J]. *Oncogene*, 2016, 35(29):3839-3853
- 20 Han Z, Li B, Wang J, *et al.* Norcantharidin inhibits SK - N - SH neuroblastoma cell growth by induction of autophagy and apoptosis [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2017, 16(1):33-34

(收稿日期:2019-02-26)

(修回日期:2019-04-23)

《医学研究杂志》专家论坛栏目约稿启事

《医学研究杂志》由中华人民共和国国家卫生健康委员会主管、中国医学科学院主办的国内外公开发行的国家级医学学术刊物。本杂志为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、世界卫生组织西太区医学索引(WPRIM)收录期刊。为进一步推广科学研究成果,扩大学术交流,《医学研究杂志》专家论坛栏目在此特向广大医学专家约稿。来稿要求如下:论文第一作者为博士生导师或者硕士生导师,正高职称。文章内容为所研究的某一领域的最新研究进展,来稿为综述形式,不必写中英文摘要。字数 5000 字左右,并附 200 字左右的个人简历,一并刊登。来稿请发送至编辑部电子信箱:xyjyzz@imicams.ac.cn,请注明“专家论坛栏目约稿”及第一作者联系方式。专家论坛栏目稿件采用后不收版面费,论文发表后付给作者稿费。