

研究报告

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*

张广森** 刘定胜***

(中南大学湘雅二医院血液科分子血液病研究室, 长沙 410011)

摘要 环氧酶 (cyclooxygenase, COX) 家系被显示与恶性肿瘤的增殖和凋亡耐受有关, COX-2 可作为恶性肿瘤治疗和预防的重要分子靶标. 应用 COX-2 特异抑制剂——celecoxib, 观察了药物对人慢性粒细胞白血病急变细胞株——K562 细胞的增殖抑制和凋亡诱导效应. 结果证明, celecoxib 能够有效地抑制 K562 细胞增殖 (台盼蓝染色, MTT 试验及集落形成抑制试验证实), 并呈一定的剂量依赖性. Celecoxib 抑制 K562 细胞增殖的 IC_{50} 为 $46 \mu\text{mol/L}$. 通过 DNA ladder 胶电泳和流式细胞仪检测, 凋亡细胞的 AO/EB 染色等方法证明 celecoxib 能够诱导 K562 细胞凋亡, 这一效应与 Caspase-3 蛋白表达上调和裂解激活有关, 当阻断 Caspase-3 的活性, celecoxib 诱导的 K562 细胞凋亡明显受抑. 利用 RT-PCR 分析技术及蛋白质印迹, 证明 K562 细胞存在 COX-2 mRNA 和 COX-2 蛋白表达; 而且, K562 细胞 COX-2 蛋白表达可被 IL-1 β 诱导性刺激, 从而确认 K562 细胞为 COX-2 表达阳性细胞; celecoxib 在较高浓度 ($80 \sim 160 \mu\text{mol/L}$) 既可抑制 K562 细胞 COX-2 mRNA 表达, 也可下调 COX-2 蛋白质表达, 提示 celecoxib 抗 K562 白血病细胞活性与 COX-2 的抑制相关, 其抗白血病的分子机制部分涉及到 COX-2 依赖性途径.

关键词 环氧酶-2, celecoxib, K562 细胞, 增殖, 凋亡, 机制

学科分类号 R733

环氧酶 (cyclooxygenase, COX) 的诱生性同工酶 COX-2 常常在实体肿瘤中过度表达, 提示该酶有助于恶性肿瘤的发生发展^[1]. 流行病学研究和临床前实验显示, 摄入 COX-1/COX-2 双重抑制剂或选择性的 COX-2 抑制剂可降低恶性肿瘤发生的风险^[2]. COX-2 的非特异性抑制剂, 如阿斯匹林和其他非甾体类抗炎药 (NSAIDs) 的体外或体内试验, 均显示能抑制恶性肿瘤细胞系, 如结肠癌和神经胶质瘤细胞株的增殖^[3,4]. 已证实 COX-2 选择性抑制剂如塞来昔布 (celecoxib) 对人结肠癌细胞株和人肿瘤细胞异种移植的免疫缺陷鼠, 具有明显的抗增殖效应^[5,6]. 新近 Kundu 等^[7]报道选择性的 COX-1 或 COX-2 抑制剂可抑制或阻遏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 COX-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? 恶性血液肿瘤细胞系是否存在 COX-2 表达? Waskewich 等^[8]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. 作者的资料也显示, 人慢性粒细胞白血病

K562 细胞系存在 COX-2 mRNA 微弱表达, 而 COX-2 蛋白表达阴性. 这一 COX-2 “基因”与“蛋白质”表达相分离的机制尚未知. 同时, 国外研究者对 COX-2 特异抑制剂的抗肿瘤作用更多地将注意力放在药物的抗肿瘤细胞增殖层面. 该药抗肿瘤作用机制是否涉及到细胞凋亡机制? 我们以 K562 细胞株作为药物作用靶, 以 COX-2 特异抑制剂——celecoxib 作为干预因素, 系统观察了 celecoxib 对 K562 细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用, 并从 mRNA 和蛋白质水平, 确认 K562 细胞存在 COX-2 mRNA 和 COX-2 蛋白质表达, celecoxib 抗 K562 细胞增殖和诱导凋亡作用至少部分呈 COX-2 依赖性.

1 材料和方法

1.1 材料

K562 细胞引自中南大学血液生理研究室; 细胞遗传学分析示 Ph 染色体阳性; 人非小细胞肺癌细胞株——A549 细胞系由中南大学湘雅二医院呼吸科实验室提供; 新生牛血清购自杭州四季青公

* 美国中华医学基金会 (CMB) 基金资助 (99-698).

** 通讯联系人. *** 江西医学院附三医院血液科, 南昌 330008.

Tel: 0731-5550283, E-mail: zgslzy@public.cs.hn.cn

收稿日期: 2004-06-30, 接受日期: 2004-08-30

司; celecoxib 由美国辉瑞公司提供; RPMI1640、吡啶橙、羟基脲、台盼蓝、MTT 均购自 Sigma 公司; 溴乙锭为 Fluka 公司产品; RNase A、蛋白酶 K 购自华美公司; 蛋白质分子质量标准为 Bio-Rad 公司产品; 兔抗人 Caspase-3 抗体为 StressGen 公司产品; 鼠抗人 COX-2 抗体购自 Cayman 公司; HRP 标记的羊抗兔 IgG 和羊抗鼠 IgG 为 Jackson ImmunoResearch 公司产品; 羊抗人 β -actin 和 HRP 标记的兔抗羊 IgG 为 Santa Cruz 公司产品; ECL-蛋白质印迹 (Western blot) 试剂盒购自 Amersham 公司; Trizol 购自 Gibco 公司; 逆转录试剂盒和 DNA 分子质量标准购自 Promega 公司; COX-2 和 β -actin 引物由上海生工公司合成; DEVD-fmk [Z-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-CH₂F] 系 ENZYME SYSTEMS 公司产品; IL-1 β 系 PEPROTECH EC LTD 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养和药物处理: K562 细胞接种于含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 置 5% CO₂、饱和湿度、37℃ 培养箱中传代培养, 1~2 天换液一次。取细胞浓度为 3.0×10^5 /ml 的指数生长期细胞进行 celecoxib 干预, celecoxib 以 DMSO 作溶剂。药物处理组 celecoxib 浓度依次为 10 μ mol/L、20 μ mol/L、40 μ mol/L、80 μ mol/L 和 160 μ mol/L, 对照组加等体积的 DMSO, 培养 36 h 后, 取细胞进行进一步实验。

1.2.2 台盼蓝拒染法: 收集各浓度组 celecoxib 作用 36 h 后的细胞, 常规台盼蓝染色并计数各组活细胞数, 重复 2 次实验取平均值。细胞活力 = (实验组活细胞数/对照组活细胞数) $\times 100\%$ 。

1.2.3 MTT 试验: 取指数生长期细胞, 接种于 96 孔板中, 每孔 200 μ l, 含 6×10^4 个细胞。培养 12 h 后, 各实验组加入不同浓度的 celecoxib, 使终浓度分别为 10 μ mol/L、20 μ mol/L、40 μ mol/L、80 μ mol/L、160 μ mol/L, 对照组加等体积 DMSO, 每组设 3 个平行孔。32 h 后, 每孔加入 5 g/L 的 MTT 20 μ l, 细胞培养 4 h, 加 DMSO 后, 用酶标仪在 490 nm 波长检测 A 值。细胞活力 = (实验组 A 值/对照组 A 值) $\times 100\%$, 取 3 孔平均数, 重复实验 2 次, 取平均值。

1.2.4 K562 细胞集落形成抑制实验: 取指数生长期细胞 1×10^3 /ml, 分别用不同终浓度的 celecoxib 干预 36 h 后, 接种于底层铺有 0.5% 琼脂-RPMI 1640, 含 0.3% 上层琼脂-RPMI 1640 的 6 孔板中,

置 37℃, 5% CO₂, 完全饱和湿度培养箱中 2 周, 计数集落 (大于 50 个细胞为一个集落) 并照相, 集落抑制率 = (1 - 实验组集落均数/空白组集落均数) $\times 100\%$ 。

1.2.5 Celecoxib 对 K562 细胞凋亡诱导和细胞周期影响的流式细胞仪分析: K562 细胞培养和 celecoxib 干预浓度及作用时间见 1.2.1, 分离沉淀各组细胞, 加入 PBS 制成细胞悬液, RNase A (终浓度为 20 mg/L) 于细胞悬液, 作用 30 min 后, 调整各组细胞数为 1×10^6 /ml, 加入 PI (50 mg/L) 避光作用 30 min, 进行流式细胞仪检测。

1.2.6 凋亡细胞的 AO/EB 染色鉴定: 按文献 [9] 介绍的方法进行。取不同浓度 celecoxib 干预的细胞, 用 PBS 配制成 2×10^6 /ml 细胞悬液, 然后进行 AO/EB 染色, 在荧光显微镜下观察结果并照相。

1.2.7 DNA 裂解片段分析: 按文献 [9] 介绍的方法, 收集各组细胞, 加细胞裂解缓冲液 (20 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris, pH 8.0, 0.8% SDS) 和 RNase A (10 g/L), 37℃ 孵育 2 h 后, 加 PK (25 g/L) 50℃ 过夜, 然后进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像系统观察并照相。

1.2.8 Caspase-3 裂解激活分析和 DEVD-fmk 阻断试验: 收集不同浓度 celecoxib 干预的细胞, 加适量细胞裂解缓冲液裂解, 高速离心分离细胞上清液, 用 Bradford 方法定量蛋白质浓度, 等量蛋白质状态下进行 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜封闭后, 加兔抗人 Caspase-3 抗体 (1:4 000), 室温孵育 4 h, 洗涤后加 HRP 标记的羊抗兔 IgG (1:5 000), 孵育洗涤后, ECL 检测系统检测 Caspase-3 蛋白的表达激活。为确定 Caspase-3 裂解激活与 celecoxib 诱导的 K562 细胞凋亡机制相关, 用 Caspase-3 特异阻断剂 DEVD-fmk, 以 100 μ mol/L 浓度预先作用于 K562 细胞 2 h 后, 再以不同浓度的 celecoxib 干预和培养 36 h, 分别作 MTT 分析、凋亡细胞鉴定、DNA ladder 分析和蛋白质印迹分析。

1.2.9 K562 细胞 COX-2 表达的证明: a. IL-1 β 对 K562 细胞 COX-2 蛋白表达的诱导作用。用一定数量 3×10^6 /ml 的 K562 细胞, 加入 IL-1 β (终浓度为 5 μ g/L), 37℃, 5% CO₂, 饱和湿度下培养 12 h, 抽提细胞总蛋白质, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 转膜, 加入鼠抗人 COX-2 单抗, 二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, ECL-蛋白质印迹检测试剂盒检测 COX-2 蛋白信号。作为阳性对照, A549 细胞同样用 IL-1 β 干预, 然后用蛋

白质印迹检测 COX-2 蛋白表达, 以 β -actin 为内参照. b. Celecoxib 对 K562 细胞 COX-2 蛋白表达的影响. 收集各浓度组 celecoxib 干预的 K562 细胞, 蛋白质印迹检测 COX-2 蛋白表达, 以 β -actin 为内参照. c. RT-PCR 检测 COX-2 mRNA 表达. 取 A549 细胞及各浓度组 celecoxib 干预的 K562 细胞 ($2 \times 10^6/\text{ml}$), 进行 COX-2 基因逆转录, 逆转录反应体系包括 2 μg 总 RNA, MgCl_2 (25 mmol/L) 4 μl , $10 \times$ 缓冲液 2 μl , dNTP (10 mmol/L) 2 μl , Oligo dT (500 mg/L) 1 μl , RNasin (40 U/ μl) 0.5 μl , AMV (20 U/ μl) 1 μl , 加去离子水至 20 μl . PCR 反应在 25 μl 体系中, 含转录模板 5 μl , dNTP (2 mmol/L) 2.5 μl 及 COX-2 基因引物 (25 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μl (引物序列为正义链 5' ATCCTTGCTGTCCCACCCA 3', 反义链 5' CTTTGACACCCAAGGGAGT C 3', 预期片段大小 402 bp). PCR 条件为 96 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min. 作为对照, β -actin PCR 被完成 (β -actin 向前引物 5' TGACGG-GGTCACCCACAC 3', 反向引物 5' CTAGAAGC-ATTTGCGGTGGA 3', 预期片段大小为 661 bp). PCR 产物经 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳银染后, 用凝胶成像系统观察并照相.

1.3 统计学处理

Celecoxib 处理组与空白对照组之间细胞活力比较用 One-way ANOVA 统计软件分析.

2 结 果

2.1 Celecoxib 对 K562 细胞的增殖抑制作用

研究结果从 3 个方面证明了 celecoxib 对 K562 细胞具有显著的增殖抑制效应. a. 台盼蓝拒染法结果显示, 当 celecoxib 处理浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$ 、80 $\mu\text{mol/L}$ 、160 $\mu\text{mol/L}$ 时, 相对应的 K562 细胞活力依次为 94.2%、76%、56.6%、20.8%、1.6%. b. MTT 分析显示, 各处理组细胞活力与台盼蓝拒染法所得结果基本吻合 (图 1), 药物抑制 K562 细胞的 IC_{50} 为

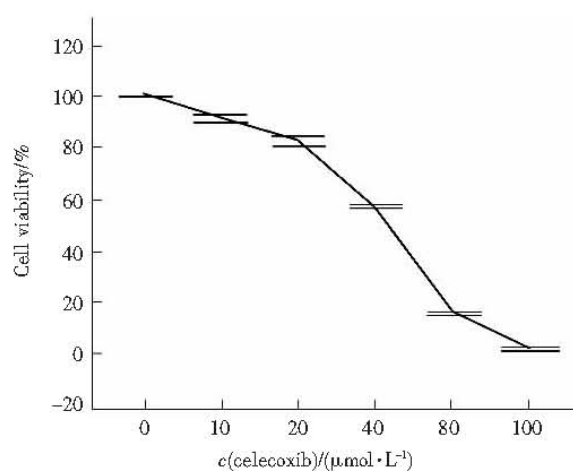


Fig. 1 Dose-response curve for proliferation inhibition as assessed by MTT assay for celecoxib
 $\bar{x} \pm s, n=3.$

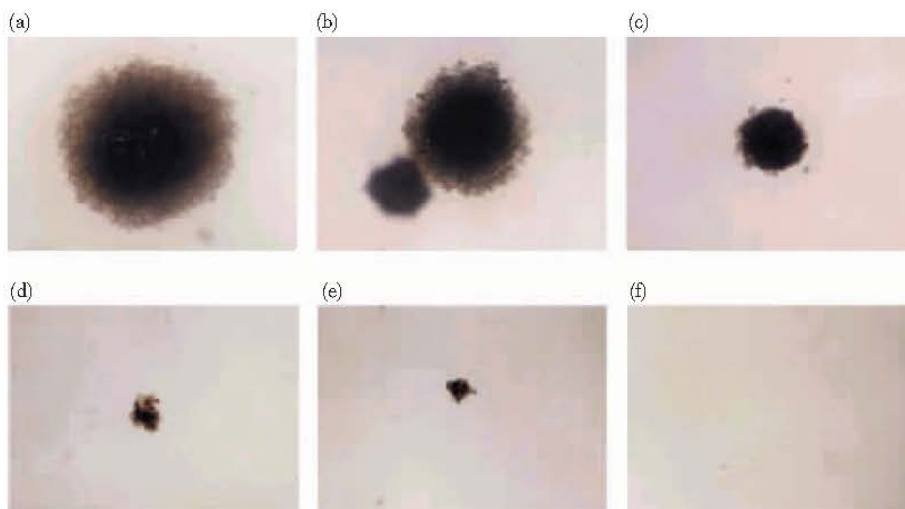


Fig. 2 An inhibitory effect of colonies-formation in celecoxib-treated K562 cells

(a) ~ (f) was corresponding to celecoxib dose 0 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$, 40 $\mu\text{mol/L}$, 80 $\mu\text{mol/L}$ and 160 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Along with the increase of celecoxib dose, the size of single colony exhibited a regular change (big $\rightarrow$ middle $\rightarrow$ small $\rightarrow$ disappeared) ($\times 40$).

46 $\mu\text{mol/L}$. 在 20 ~ 160 $\mu\text{mol/L}$ 的 celecoxib 浓度均可不同程度地抑制 K562 细胞的增殖 ($P < 0.05$). c. 集落抑制试验显示, 随着 celecoxib 浓度增加, 培养皿中集落平均数目显著性减少, 相应于 0 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$ 、80 $\mu\text{mol/L}$ 、160 $\mu\text{mol/L}$ 的 celecoxib 浓度, 其集落抑制率分别为 57.7%、82.7%、94.3%、98.3%、100%. 除了明显的集落抑制效应外, 集落大小也随药物浓度的变化而呈显著的变化 (图 2). d. 细胞周期分析结果显示, celecoxib 能以浓度依赖性方式提高 G1 期的细胞百分率, 下调 S 期的细胞百分率 (表 1).

Table 1 The effect of celecoxib on K562 cells cycle-flow cytometry analysis

c (celecoxib) / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	G1 phase/%	S phase/%	G2 phase/%
0	32.82	57.41	9.77
10	31.68	56.15	12.17
20	35.99	52.89	11.11
40	41.21	58.79	0
80	59.62	40.38	0
160	64.28	35.72	0

2.2 Celecoxib 诱导 K562 细胞凋亡与 Caspase-3 裂解激活相关

a. Celecoxib 诱导 K562 细胞凋亡的 AO/EB 染

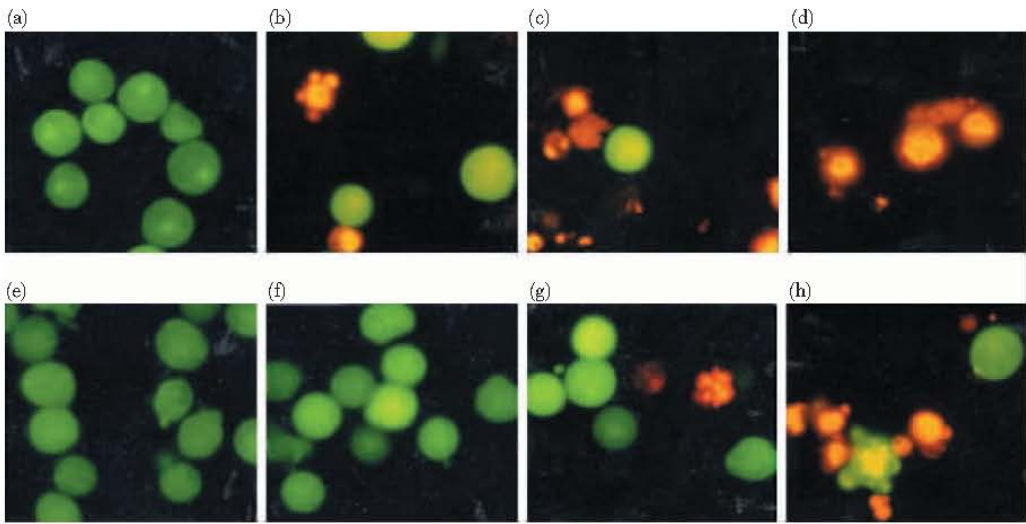


Fig. 3 Identification of apoptosis by double staining with AO/EB in celecoxib-treated K562 cells and DEVD-fmk blocking experiment

(a) ~ (d) represented celecoxib concentration 0 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$, 80 $\mu\text{mol/L}$ and 160 $\mu\text{mol/L}$, viable cells were green, typical apoptotic cells were orange-red with cell shrinkage, nuclear condensation and fragmentation. (e) ~ (h) showed a blocking effects in which Caspase-3 activity was blocked by DEVD-fmk and celecoxib-induced K562 cells apoptosis was partly reversed (g, h). (e) ~ (h) was corresponding to celecoxib concentration 0 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$, 80 $\mu\text{mol/L}$ and 160 $\mu\text{mol/L}$.

色结果显示, 20 $\mu\text{mol/L}$ 的药物即引起少量细胞凋亡. 随着药物浓度的增加, 凋亡细胞比例明显增多 (图 3a ~ d). b. DNA ladder 胶电泳结果显示, 随着 celecoxib 浓度的增加, DNA 从出现“涂抹”现象到 80 $\mu\text{mol/L}$ 和 160 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时较典型的 DNA 梯状条带形成 (图 4). c. 流式细胞仪分析结果显示, celecoxib 能以剂量依赖性方式诱导 K562 细胞凋亡, 凋亡细胞百分率在药物浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$, 40 $\mu\text{mol/L}$, 80 $\mu\text{mol/L}$ 和 160 $\mu\text{mol/L}$ 时, 相应于凋亡细胞百分率依次为 4.09%, 14.66%, 37.16%

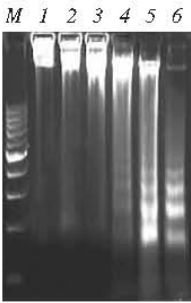


Fig. 4 Analysis of DNA fragmentation in celecoxib-induced K562 cells apoptosis
M: DNA ladder, lane 1, 2, 3, 4, 5, 6 represented celecoxib dose 0 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$, 40 $\mu\text{mol/L}$, 80 $\mu\text{mol/L}$ and 160 $\mu\text{mol/L}$, respectively. On lane 5 or 6, an evident DNA laddering pattern was shown.

和 53.33% (图 5)。d. Caspase-3 的蛋白质印迹结果显示, 随着 celecoxib 浓度增加, Caspase-3 表达呈 celecoxib 浓度依赖性上调, 在 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度, 开始出现分子质量约 20 ku 的裂解片段, 提示 Caspase-3 裂解激活介导了 celecoxib 诱导的 K562 细胞凋亡 (图 6a)。e. Caspase-3 活性阻断对 celecoxib

诱导 K562 细胞凋亡的影响: 为了进一步证明 celecoxib 诱导的 K562 细胞凋亡与 Caspase-3 调控相关, 我们用 Caspase-3 特异性抑制剂 DEVD-fmk 阻断 Caspase-3 的活性后, 再用 celecoxib 干预, 然后重复 DNA ladder、凋亡细胞的 AO/EB 染色分析和 Caspase-3 的蛋白质印迹。结果表明, 随着

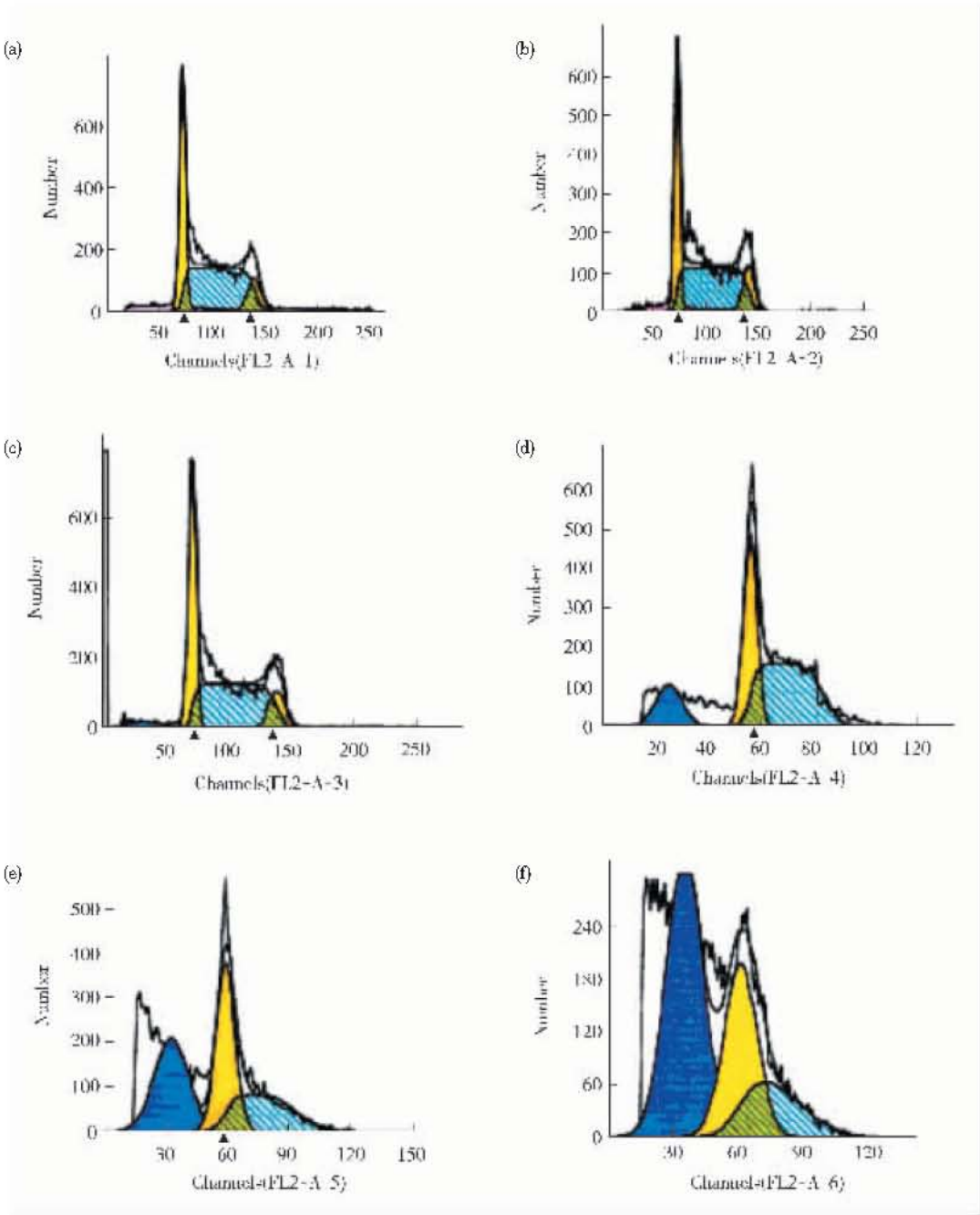


Fig. 5 Cell cycle distribution and the percentage of apoptotic cells by flow cytometry analysis in celecoxib-treated K562 cells

(a) ~ (f) indicated celecoxib concentration 0 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$, 40 $\mu\text{mol/L}$, 80 $\mu\text{mol/L}$ and 160 $\mu\text{mol/L}$, respectively.

■: Debris; ■: Aggregates; ■: Apoptosis; ■: DipG1; ■: DipG2; ■: DipS.

Caspase-3 活性的阻断, 同药物浓度作用条件下的 K562 细胞凋亡数明显减少 (图 3e ~ h), DNA ladder 形成不明显 (图片未显示). 蛋白质印迹结

果表明, 在 80 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib 浓度处理的 K562 细胞, 由于 Caspase-3 活性被抑制未能出现 Caspase-3 的裂解片段 (图 6b).

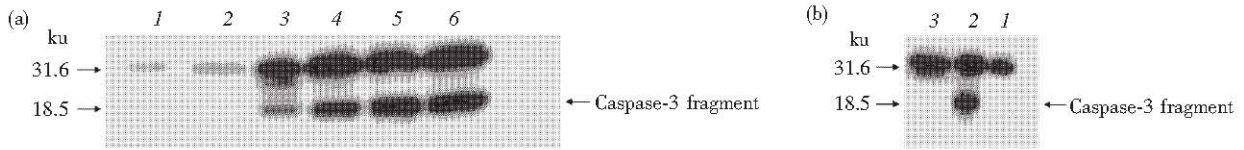


Fig. 6 Induction of apoptosis by celecoxib in K562 cells and an upregulated expression and activation for Caspase-3 (Western blot)

(a) 1~6 was corresponding to celecoxib dose 0 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$, 40 $\mu\text{mol/L}$, 80 $\mu\text{mol/L}$ and 160 $\mu\text{mol/L}$, respectively. While celecoxib dose increased, the expression of Caspase-3 was upregulated; a cleaved fragment with 20 ku size was detected on 20 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib intervention. (b) DEVD-fmk blocking test: lane 1 was 80 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib with 100 $\mu\text{mol/L}$ DEVD-fmk; lane 2 was 80 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib only; lane 3 was blank control (neither celecoxib nor DEVD-fmk), Western blot documented DEVD-fmk blocked effectively the activation or cleavage of celecoxib-induced Caspase-3.

2.3 K562 细胞存在 COX-2 蛋白和基因表达

a. K562 细胞存在 COX-2 蛋白表达. 用鼠抗人 COX-2 单克隆抗体结合蛋白质印迹技术, 我们发现, K562 细胞裂解上清液中存在 COX-2 蛋白表达, 其分子质量为 72 ku 左右. 作为阳性对照, A549 细胞裂解物同样存在 COX-2 蛋白表达. 用 IL-1 β 作为 COX-2 蛋白表达的诱导剂, 分别作用于 K562 细胞和 A549 细胞, 相对于未经 IL-1 β 诱导的 K562 细胞和 A549 细胞, COX-2 蛋白表达呈 IL-1 β 诱导性上调, 从而证明了 COX-2 蛋白的特异性 (图 7a). 作为内参照的 β -actin, 无论 IL-1 β 干预与否, 两组 K562 细胞之间以及两组 A549 细胞之间表达基本一致 (图 7c). b. Celecoxib 对 COX-2 蛋白表达的影响. 从蛋白质印迹结果可见, 10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib 处理的 K562 细胞, COX-2 蛋白表达量无明显抑制; 但在 80 $\mu\text{mol/L}$ 和 160 $\mu\text{mol/L}$ 浓度, 可观察到 COX-2 蛋白表达量显著降低 (图 7b), 而各组 β -actin 表达不受药物影响 (图 7d). c. K562 细胞存在 COX-2 mRNA 表达. 通过 RT-PCR 扩增 COX-2 mRNA 拷贝, 在期待的 402 bp 大小位置, A549 细胞出现显著的 COX-2 DNA 条带. K562 细胞也出现相应的 COX-2 DNA 条带, 但 K562 细胞 COX-2 mRNA 表达丰度低于 A549 细胞表达丰度 (图 8a). d. Celecoxib 可抑制 K562 细胞 COX-2 mRNA 表达. 从 K562 细胞 COX-2 mRNA 的 RT-PCR 结果可见, 低浓度的 celecoxib 对 K562 细胞 COX-2 mRNA 表达无影响, 高浓度的 celecoxib (80 ~ 160 $\mu\text{mol/L}$), 可显著抑制 COX-2 mRNA 表达 (图 8a), 而 β -actin 内对照

无明显差异 (图 8b).

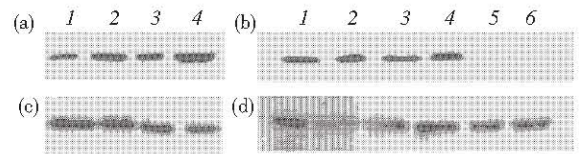


Fig. 7 COX-2 protein expression pattern on Celecoxib-treated K562 cells and an inducible COX-2 expression in IL-1 β stimulated K562 cells (Western blot)

(a) lane 1~4 indicated K562 cells, K562 cells plus IL-1 β (5 $\mu\text{g/L}$), A549 cells, A549 cells plus IL-1 β (5 $\mu\text{g/L}$), respectively. (b) 1~6 were corresponding to celecoxib dose: 0 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$, 40 $\mu\text{mol/L}$, 80 $\mu\text{mol/L}$ and 160 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Western blotting of COX-2 showed that celecoxib (80 ~ 160 $\mu\text{mol/L}$) could significantly suppress COX-2 expression; IL-1 β could induce an upregulated COX-2 expression both in K562 cells and A549 cell line. (c) and (d) represented β -actin internal control, the loaded protein concentration in each well was same.

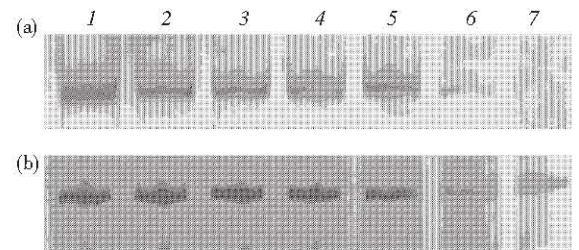


Fig. 8 Expression of COX-2 mRNA in K562 cells (RT-PCR results)

(a) lane 1~7 represent A549 cells (positive control), different dose of celecoxib (0 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$, 40 $\mu\text{mol/L}$, 80 $\mu\text{mol/L}$ and 160 $\mu\text{mol/L}$) treated K562 cells. Results showed there were COX-2 mRNA expression in K562 cells, and COX-2 mRNA expression was downregulated by higher dose celecoxib (80 ~ 160 $\mu\text{mol/L}$). (b) β -actin mRNA as internal control, the cDNA concentration in each well was same.

3 讨 论

环氧化酶-2 (COX-2) 在人和啮齿类动物肿瘤组织中均有高表达, 提示该同工酶是肿瘤发生发展的一个重要决定簇^[1,10]. 临床流行病学研究结果显示, 规则地摄入较高剂量的 COX 抑制剂, 可降低上皮细胞起源恶性肿瘤如结肠癌、肺癌、乳腺癌、食道癌等的发病率^[11,12]. 由于常规的非甾体类抗炎药 (NSAIDs) 具有 COX-1 和 COX-2 双重抑制作用, 而 COX-1 阻断与上消化道出血副作用相关. 因此, COX-2 特异抑制剂不仅克服了上消化道出血副作用, 而且保持了其抗炎抗肿瘤活性. 最近, COX-2 特异抑制剂已被美国食品和药品管理局 (FDA) 批准用于家族性结肠多发性腺瘤 (一种具有恶性肿瘤倾向的腺瘤) 的预防^[13], 说明 COX-2 抑制剂具有抗肿瘤增殖活性.

我们先前的研究显示, 高浓度的吲哚美辛 (400 $\mu\text{mol/L}$) ——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病人新鲜骨髓白血病细胞的增殖和诱导白血病细胞凋亡. 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. 吲哚美辛抑制 K562 细胞增殖的 IC_{50} 为 310.21 $\mu\text{mol/L}$ ^[14,15]. 本研究我们用 celecoxib——一种特异性的 COX-2 抑制剂作用于 K562 细胞株, 从以下几点有力证明了 celecoxib 能够显著地抑制 K562 细胞增殖: a. 台盼蓝拒染实验显示, celecoxib 能以浓度依赖性方式抑制 K562 细胞活力; b. MTT 试验结果客观地证明了 celecoxib 能够有效地抑制 K562 细胞增殖; c. 集落形成抑制试验证明, celecoxib 能以浓度依赖性方式抑制 K562 细胞集落形成的数量和大小; d. celecoxib 抑制 K562 细胞增殖的作用点主要位于细胞周期的 G1/S 期“稽查点”, 从而阻断了细胞周期由 G1 期向 S 期的“转换”或“行进”; e. celecoxib 抑制 K562 细胞增殖的 IC_{50} 值为 46 $\mu\text{mol/L}$. 在微摩尔级浓度, celecoxib 抑制 K562 细胞增殖所需的药物浓度较之吲哚美辛抑制 K562 细胞增殖所需的药物浓度降低了约 600%. 值得注意的是, 吲哚美辛抑制 K562 细胞增殖药物作用时间需要 72 h, 而 celecoxib 作用 K562 细胞并达到增殖抑制效应只需 36 h, 从而进一步说明, 在抑制 K562 细胞增殖能力上, celecoxib 较之 COX 非特异抑制剂吲哚美辛具有更强的白血病细胞抑制活性.

COX-2 特异抑制剂抗肿瘤活性也与药物诱导肿

瘤细胞凋亡相关. 我们的初步结果表明, celecoxib 能够以浓度依赖性方式诱导 K562 细胞凋亡. DNA ladder 胶电泳证明, 当 celecoxib 作用浓度达到 80 $\mu\text{mol/L}$ 时即出现明显的 DNA 断裂, 并形成特征性的“梯状条带”. 这一结果与凋亡细胞的 AO/EB 染色鉴定结果相一致, 在 80 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib 浓度, 半数以上的 K562 细胞出现细胞体积变小, 核固缩、碎裂甚至典型的“凋亡小体”. 为了从分子水平进一步确定凋亡过程的启动及机制, 我们应用蛋白质印迹技术, 分析凋亡调控的关键分子——Caspase-3 蛋白的表达及有无裂解激活. 结果表明, celecoxib 能以剂量依赖性方式使得 K562 细胞 Caspase-3 蛋白表达上调, 提示 Caspase-3 活化介导了 celecoxib 诱导的 K562 细胞凋亡. 为进一步强化上述结论的可靠性, 我们用 Caspase-3 活性的特异阻断剂——DEVD-fmk 预先作用于 K562 细胞, 再施以 celecoxib 干预, 结果显示, 当“封闭”Caspase-3 的裂解激活, 相同浓度 celecoxib 诱导的 K562 细胞凋亡明显受到抑制. 显然, celecoxib 诱导的 K562 细胞凋亡涉及到 Caspase-3 活化的信号转导途径.

COX-抑制剂的抗肿瘤活性机制仍不完全清楚, 目前认为涉及到“COX-依赖性”和“非 COX-依赖性”2 种途径^[5, 16, 17]. 由于这类研究靶标多来自于实体肿瘤或上皮细胞起源性肿瘤, 对于造血系统恶性肿瘤, 是否存在 COX-2 表达? COX-2 抑制剂抑制 K562 细胞增殖是依赖于还是独立于 COX-2 途径, 目前这方面的资料不多且结果矛盾. Waskewich 等^[8]的研究资料显示, 绝大部分造血细胞恶性肿瘤细胞株 COX-2 编码基因和 COX-2 蛋白表达阴性, 其中 K562 细胞株存在 COX-2 mRNA 微弱表达 (RT-PCR 结果), 而 COX-2 蛋白表达阴性 (多克隆抗 COX-2 抗体, 蛋白质印迹分析). 作者还观察到即使造血系统恶性细胞株 COX-2 表达阴性, celecoxib 仍能抑制这类细胞的增殖, 表现出明显的抗肿瘤活性, 因此认为 COX-2 抑制剂的抗肿瘤效应独立于 COX-2 途径. 新近, Giles 等^[18]报道慢性粒细胞性白血病慢性期病人骨髓白血病细胞 COX-2 水平增高, 具有增高的 COX-2 水平的 CML 患者有着较短的生存期. 为了进一步确认 celecoxib 抗 K562 细胞活力是否与 COX-2 抑制相关, 我们着力于 3 方面的“求证”: a. 分别从 COX-2 的 mRNA 和 COX-2 蛋白表达层面, 寻找 K562 细胞是否存在 COX-2 表达的证据. 令人感兴趣的是, 在 K562 细

胞既存在着 COX-2 mRNA 表达 (RT-PCR), 也存在 COX-2 蛋白表达. 较之 COX-2 阳性表达细胞株 A549 细胞, COX-2 蛋白表达水平量明显降低. 这一结果与 Waskewich 报道的截然不同. Waskewich 使用的抗 COX-2 抗体为多克隆抗体, 我们使用的是鼠抗人 COX-2 单克隆抗体. 在检测蛋白质丰度方面, 单克隆抗体显然敏感性更高. b. IL-1 β 可特异诱导 K562 细胞 COX-2 蛋白表达. 我们用一定浓度的 IL-1 β 分别作用于 A549 细胞株和 K562 细胞株, 蛋白质印迹检测 IL-1 β 刺激与否的 2 种细胞株的 COX-2 表达. 结果表明 K562 细胞 COX-2 表达可被 IL-1 β 特异性诱导, 从而有力地支持 K562 细胞存在 COX-2 蛋白表达. c. 在 80 ~ 160 μ mol/L celecoxib 干预剂量, K562 细胞 COX-2 mRNA 表达及 COX-2 蛋白表达明显受抑, 而该药物浓度可诱导 K562 细胞明显凋亡. 提示 COX-2 蛋白下调可能参与或增敏了 celecoxib 诱导的 K562 细胞凋亡.

选择性的 COX-2 抑制剂抗肿瘤活性机制不仅涉及到细胞凋亡的诱导, 也与抑制肿瘤血管新生相关. 新近, Dife 等^[19]用 celecoxib 体外作用于几株恶性肿瘤细胞株, 发现药物不仅能抑制肿瘤细胞上清液作用的人脐静脉血管内皮细胞 (一种体外的新生血管形成模型) 微管形成, 也可诱导肿瘤细胞凋亡 (DNA ladder 和 Caspases 分析). Ferrandina 等^[20]对 14 例患有头颈部癌的病人给予短时期的 celecoxib 处理 (400mg, 每天 2 次), 并分析药物处理前后病人 COX-2 表达、血清 Ki67 抗原水平 (一种鳞状细胞癌抗原)、细胞凋亡标志物及肿瘤组织微血管密度 (MVD) 值, 发现 celecoxib 处理后, 病人平均 COX-2 表达水平显著降低, Ki67 明显下降, MVD 值明显降低. 上述研究强烈提示 COX-2 抑制剂用于临床肿瘤治疗的潜力. 结合我们对 celecoxib 体外抗 K562 细胞增殖活力和诱导白血病细胞凋亡效应的观察, 可以认为 COX-2 特异抑制剂用于治疗慢性粒细胞白血病或急变病人, 是一种有前景的白血病治疗药物.

参 考 文 献

- 1 Taketo M M. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I). *J Natl Cancer Inst*, 1998, **90** (20): 1529 ~ 1536
- 2 Than M J, Namboodiri M M, Calle E E, *et al*. Aspirin use and risk of fatal cancer. *Cancer Res*, 1993, **53** (6): 1322 ~ 1327
- 3 Shiff S J, Qiao L, Tsai L L, *et al*. Sulindal sulfide, an aspirin-like compound, inhibits proliferation, causes cell cycle quiescence, and induces apoptosis in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *J Clin Invest*, 1995, **96** (1): 491 ~ 503
- 4 Aas A T, Tonnessen T I, Brun A, *et al*. Growth inhibition of rat glioma cells *in vitro* and *in vivo* by aspirin. *J Neurooncol*, 1995, **24** (2): 171 ~ 180
- 5 Sheng H, Shao J, Kirkland S C, *et al*. Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest*, 1997, **99** (9): 2254 ~ 2259
- 6 Williams C S, Watson A J, Sheng H, *et al*. Celecoxib prevents tumor growth *in vivo* without toxicity to normal gut: lack of correlation between *in vitro* and *in vivo* models. *Cancer Res*, 2000, **60** (21): 6045 ~ 6051
- 7 Kundu N, Fulton A M. Selective cyclooxygenase (COX) -1 or COX-2 inhibitors control metastatic disease in a murine model of breast cancer. *Cancer Res*, 2002, **62** (8): 2343 ~ 2346
- 8 Waskewich C, Blumenthal R D, Li H L, *et al*. Celecoxib exhibits the greatest potency amongst cyclooxygenase (COX) inhibitors for growth inhibition of COX-2-negative hematopoietic and epithelial cell lines. *Cancer Res*, 2002, **62** (7): 2029 ~ 2033
- 9 斯佩克特 D L, 戈德曼 R D, 莱因万德 L A, 等. 黄培堂等译. 细胞实验指南. 北京: 科学出版社, 2001. 105 ~ 108
- 10 Spector D L, Goldman R D, Leinwand L A, *et al*. Translated by Huang P T, *et al*. *Cells A Laboratory Manual*. Beijing: Science Press, 2001. 105 ~ 108
- 11 Taketo M M. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part II). *J Natl Cancer Inst*, 1998, **90** (21): 1609 ~ 1620
- 12 Schreinemachers D M, Everson R B. Aspirin use and lung, colon, and breast cancer incidence in a prospective study. *Epidemiology*, 1994, **5** (2): 138 ~ 146
- 13 Langman M J, Cheng K K, Gilman E A, *et al*. Effect of anti-inflammatory drugs on overall risk of common cancer: case-control study in general practice research database. *Br Med J*, 2000, **320** (7250): 1642 ~ 1646
- 14 Steinbad G, Lynch P M, Phillips R K, *et al*. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl Med J*, 2000, **342** (26): 1946 ~ 1952
- 15 Zhang G S, Tu C Q, Zhang G Y, *et al*. Indomethacin induces apoptosis and inhibits proliferation in chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia Res*, 2000, **24** (5): 385 ~ 392
- 16 Zhang G S, Zhou G B, Dai C W. Upregulation and activation of caspase-3 or caspase-8 and elevation of intracellular free calcium mediated apoptosis in Indomethacin-induced K562 cells. *Chin Med J*, 2004, **117** (7): 978 ~ 984
- 17 Sanchez-Alcazar J A, Bradbury D A, Pang L, *et al*. Cyclooxygenase (COX) inhibitors induce apoptosis in non-small cell lung cancer through cyclooxygenase independent pathways. *Lung Cancer*, 2003, **40** (1): 33 ~ 44
- 18 Leng J, Han C, Demetris A J, *et al*. Cyclooxygenase-2 promotes hepatocellular carcinoma cell growth through Akt activation: evidence for Akt inhibition in celecoxib-induced apoptosis. *Hepatology*, 2003, **38** (3): 756 ~ 768
- 19 Giles F J, Kanfarjian H M, Bekele B N, *et al*. Bone marrow cyclooxygenase-2 levels are elevated in chronic-phase chronic myeloid leukemia and are associated with reduced survival. *Br J Haematol*, 2002, **119** (1): 38 ~ 45
- 20 Dife R S, Stott B, Carr R E. Effect of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on cancer cells *in vitro*. *Cancer Biol Ther*, 2004, **3** (2): 228 ~ 232
- 21 Ferrandina G, Ranelletti F O, Legge F, *et al*. Celecoxib modulates the expression of cyclooxygenase-2, ki67, apoptosis-related marker, and microvessel density in human cervical cancer: a pilot study. *Clin Cancer Res*, 2003, **9** (12): 4324 ~ 4331

Growth Inhibiting and Apoptosis Inducing Effect of Celecoxib (a Selective COX-2 Inhibitor) on K562 Cells and Their Molecular Mechanism *

ZHANG Guang-Sen **, LIU Ding-Sheng

(Division of Hematology/Institute of Molecular Hematology, The Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract Accumulating evidence suggests that cyclooxygenase (COX) family members are associated with a proliferative potential and apoptosis resistance of many cancers. COX-2 is an important molecular target for both therapy and prevention of malignancies. *In vitro* studies have revealed that treatment of various human epithelial cancer cell lines with specific COX-2 inhibitors induce apoptotic cell death. However, little is known about tumor cell lines of hematopoietic origin. The effects of COX-2 specific inhibitor-celecoxib on proliferation and apoptosis on K562 cells are sought to be determined. K562 cells were exposed to increasing concentration of celecoxib (0, 10, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{mol/L}$). The growth inhibition was evaluated by trypan blue dye exclusion, MTT assay and colony-formation inhibiting test. Apoptosis was determined by DNA ladder in agarose gel. The morphology apoptotic cells was identified by AO/EB staining combined with fluorescence microscopy observation, and by caspase-3 assay. The percentage of apoptotic cells was determined by flow cytometry. A blocking experiment for caspase-3 was carried out by incubating K562 cells together with DEVD-fmk. In addition, whether there is an expression of COX-2 mRNA or protein in K562 cells were investigated by RT-PCR and Western blot. Celecoxib (40 ~ 160 $\mu\text{mol/L}$) can effectively inhibit the proliferation and induce apoptosis of K562 cells in a dose-dependent manner. IC_{50} of celecoxib for inhibiting cells proliferation was 46 $\mu\text{mol/L}$. The regulation of apoptosis induction was related to an upregulated caspase-3 expression and activation. When caspase-3 activity was blocked by DEVD-fmk, the effect of celecoxib on apoptosis induction was partly abolished. Importantly, It is first demonstrated that K562 cells indeed exists in COX-2 expression both mRNA and protein (IL-1 β inducement assay and RT-PCR/Western blot confirmation), celecoxib (80 ~ 160 $\mu\text{mol/L}$) could significantly down-regulate the expression of COX-2 mRNA and protein. In conclusion, these data indicated that a selective COX-2 inhibitor celecoxib inhibits cell proliferation, induces apoptosis in human K562 cells, thus suggesting that COX-2 inhibitors may be a promising strategy in treatment of CML.

Key words cyclooxygenase-2, celecoxib, K562 cell line, proliferation, apoptosis, mechanism

* This work was supported by a grant from Chinese Medical Board (CMB) (99-698).

** Corresponding author. Tel: 86-731-5550283, E-mail: zgsllyz@public.cs.hn.cn

Received: June 30, 2004 Accepted: August 30, 2004