

布洛芬抑制人肝癌细胞BEL-7402生长及机制的初步研究

张婷, 吴惠毅, 张欢欢, 杨晋

连云港市第一人民医院中心实验室, 江苏 连云港 222002

[摘要] **背景与目的:** 近来发现, 临床上常用的非甾体类抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)可以降低多种癌症的发病率。布洛芬(ibuprofen)作为一种常用的NSAIDs, 对肝癌是否具有抑制作用, 国内外鲜有报道。本研究初步探讨布洛芬抑制肝癌细胞BEL-7402的作用, 并研究其相关机制。**方法:** 肝癌细胞BEL-7402分为对照组和不同浓度布洛芬处理组, 药物处理0、24、48和72 h后用MTT法检测各组细胞增殖抑制率; 流式细胞术检测各组细胞的周期分布; 细胞分析仪检测各组细胞活力及细胞凋亡; 蛋白[质]印迹(Western blot)检测各组细胞增殖性核抗原(PCNA)、细胞周期蛋白(Cyclin D1)、B细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)和环氧合酶-2(COX-2)蛋白的表达; ELISA法检测细胞培养上清液中前列腺素E₂(PGE₂)蛋白表达水平。**结果:** 布洛芬组中BEL-7402细胞增殖受到抑制, 且抑制作用呈时间和剂量依赖性($P < 0.05$)。2.0 mmol/L布洛芬组48 h细胞活力明显低于对照组 [(47.87 ± 5.23)% vs (88.93 ± 5.49)%], G₀/G₁期细胞比例明显高于对照组 [(80.04 ± 3.61)% vs (62.36 ± 8.33)%], 细胞早期凋亡率明显高于对照组 [(36.65 ± 10.07)% vs (9.81 ± 6.80)%], 差异有统计学意义($P < 0.05$)。布洛芬作用于细胞48 h后, PCNA、Cyclin D1、Bcl-2以及COX-2蛋白表达与对照组相比显著减少($P < 0.05$); 细胞培养上清液中PGE₂蛋白表达量与对照组 [(23.98 ± 4.89) ng/L vs (68.70 ± 9.43) ng/L]相比, 显著降低($P < 0.01$)。**结论:** 布洛芬能够抑制肝癌细胞BEL-7402增殖与活力, 阻滞细胞周期, 促进细胞凋亡, 其作用机制可能与抑制COX-2及PGE₂表达有关。

[关键词] 布洛芬; BEL-7402细胞; 增殖; 凋亡; 前列腺素E₂

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2015.04.009

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2015)04-0294-06

The inhibition of ibuprofen on the growth of hepatoma carcinoma cell BEL-7402 and the preliminary mechanisms ZHANG Ting, WU Huiyi, ZHANG Huanhuan, YANG Jin (Department of Central Laboratory, the First People's Hospital of Lianyungang, Lianyungang Jiangsu 222002, China)

Correspondence to: YANG Jin E-mail: 18961322355@189.cn

[Abstract] **Background and purpose:** Recently, studies showed that non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) could reduce the incidence of cancer. Whether ibuprofen could inhibit the growth of hepatocellular carcinoma cells had not been reported yet. In the current study, we investigated the effects of ibuprofen on hepatoma carcinoma BEL-7402 cells and the relevant mechanisms. **Methods:** Hepatocellular carcinoma BEL-7402 cells were randomly divided into 7 groups: the control group and the ibuprofen groups (0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 and 4.0 mmol/L). The effect of ibuprofen on BEL-7402 HCC cells was measured by MTT method, the cell cycles were analyzed by flow cytometry (FCM), cell vitality and apoptosis were determined by cell analyzer. PCNA, Cyclin D1, Bcl-2 and COX-2 protein levels were examined by Western blot, and the expressions of prostaglandin E₂ (PGE₂) were measured by ELISA. **Results:** After the exposure to ibuprofen, the suppression ratio of BEL-7402 cells was increased ($P < 0.05$). BEL-7402 cell vitality was decreased by degrees significantly ($P < 0.05$), early apoptosis of BEL-7402 cells was increased ($P < 0.05$), and the G₀/G₁ phase ratio was increased significantly compared with control group ($P < 0.05$). Ibuprofen effectively decreased PCNA, Cyclin D1, Bcl-2 and COX-2 expressions in BEL-7402 cells ($P < 0.05$), and decreased PGE₂ protein expression in cell culture supernatants significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Ibuprofen is effective for inhibiting the proliferations, increasing apoptosis and blocking cell cycles of BEL-7402 HCC cells. The anti-tumor mechanisms of ibuprofen may be related with the inhibition of COX-2

and PGE₂ expressions.

[**Key words**] Ibuprofen; BEL-7402 HCC cell; Proliferation; Apoptosis; PGE₂

布洛芬作为非甾体类抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs), 是临床上常用的抗炎镇痛药, 通过抑制环氧合酶(cyclooxygenase, COX)进而抑制前列腺素(prostaglandin, PG)的生成来发挥其传统的解热、镇痛及抗炎作用。近年有研究证实, NSAIDs可以降低多种癌症的发病率, 包括结肠癌、食管癌、乳腺癌和膀胱癌等, 有研究者认为其主要机制为减少前列腺素E₂(PGE₂)的产生, 从而抑制肿瘤的发生、发展^[1-4]。布洛芬作为一种常用的NSAIDs, 对肝癌是否具有相关作用, 国内、外鲜有报道。本研究旨在观察布洛芬对人肝癌细胞BEL-7402细胞生长的影响, 初步探讨其相关机制, 为肝癌的药物应用提供新观点。

1 材料和方法

1.1 仪器与材料

FACS Canto II 流式细胞仪购自美国BD公司, FCQ型凝胶成像分析仪购自美国Protein Simple公司, Muse™细胞分析仪购自美国Millipore公司。人肝癌细胞BEL-7402(BEL-7402)细胞株于1974年从临床肝癌手术标本中建立, 电子显微镜下亦显示上皮细胞所具有的桥粒和张力原纤维, 与临床肝癌细胞相似, LDH同工酶谱显示与人胚肝及临床肝癌相近, 购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所细胞库。RPMI-1640培养基, 胎牛血清购自美国Gibco公司。布洛芬(规格: 1 g, 纯度≥98%), 购自美国Sigma公司。甲基噻唑蓝(MTT), 胰蛋白酶购自南京凯基生物科技有限公司。细胞周期检测试剂盒购自美国BD公司。Muse™细胞活力检测试剂盒、Muse™早期凋亡检测试剂盒、小鼠抗人(β-actin、PCNA、Bcl-2和COX-2)单克隆抗体、兔抗人Cyclin D1单克隆抗体及山羊抗小鼠/抗兔辣根过氧化物酶标记二抗购自美国Millipore公司。人PGE₂ ELISA试剂

盒, 购自北京艾然生物科技有限公司。

1.2 细胞培养

BEL-7402细胞在含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中, 置于37℃、CO₂体积分数为5%、饱和湿度的培养箱中培养, 隔天换液, 融合度达80%时传代。

1.3 MTT法测定细胞增殖抑制率

细胞按 1×10^4 个/孔的密度接种于96孔板中, 培养24 h后分别加入不同浓度的布洛芬(0.1、0.5、1.0、2.0、3.0和4.0 mmol/L), 同时设置无布洛芬对照组, 每组均设5个复孔。分别在0、24、48及72 h时, 每孔加MTT (5 mg/mL)20 μL, 37℃继续培养4 h后, 小心吸弃培养基, 每孔加入150 μL DMSO, 置摇床上低速振荡10 min, 酶标仪490 nm波长处测定各孔的吸光度值(D), 计算增殖抑制率(%)=(1-D_{Ibuprofen组}/D_{对照组})×100%。实验重复3次。

1.4 细胞分析仪检测细胞活力

细胞按 1×10^6 个/孔的密度接种于6孔板中, 细胞贴壁后分别加入不同浓度的布洛芬(0.1、0.5、1.0、2.0、3.0和4.0 mmol/L), 设置对照组, 48 h后检测各孔细胞活力。实验重复3次。

1.5 流式细胞术分析细胞生长周期

细胞按 1×10^6 个/孔的密度接种于6孔板中, 贴壁后分别加入不同浓度的布洛芬(0.1、0.5、1.0、2.0、3.0和4.0 mmol/L), 设置对照组, 48 h后收集细胞, 细胞周期检测试剂处理细胞, 观察各组细胞时相比比例的变化。实验重复3次。

1.6 细胞分析仪检测细胞凋亡

1×10^6 个/孔细胞接种于6孔板中, 24 h待细胞贴壁后分别加入不同浓度的布洛芬(0.1、0.5、1.0、2.0、3.0和4.0 mmol/L), 设置对照组, 48 h后收集细胞, Muse™早期凋亡检测试剂处理细胞, 检测细胞早期凋亡比例。实验重复3次。

1.7 蛋白[质]印迹法(Western blot)检测蛋白表达

在25 cm²细胞培养瓶中接种 5×10^6 个

细胞, 细胞贴壁后每瓶加入浓度为0.5和2.0 mmol/L的布洛芬, 设置对照组。培养48 h后提取蛋白, 测定蛋白浓度, 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离、电转后, 加入小鼠抗人 β -actin抗体(1:1 000)、PCNA抗体(1:500)、Bcl-2抗体(1:500)、COX-2抗体(1:100)和兔抗人Cyclin D1抗体(1:500), 4 °C温育过夜, 加入山羊抗小鼠或山羊抗兔辣根过氧化物酶标记二抗于37 °C温育1 h, 采用凝胶成像分析仪进行成像分析。

1.8 ELISA检测细胞上清液PGE₂含量

1 × 10⁶个/孔细胞接种于6孔板中, 24 h待细胞贴壁后加入浓度为0.5和2.0 mmol/L的布洛芬, 设置对照组, 培养48 h后, 收集细胞上清液, 操作步骤按ELISA试剂盒要求进行。酶标仪测定450 nm波长处各孔的吸光度值(D), 每一标准品及样品均设置2个复孔, 实验重复3次。

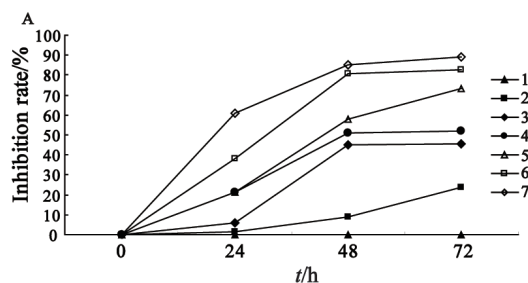
1.9 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件对数据进行处理。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析, 两样本均数比较采用成组 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 布洛芬对BEL-7402细胞生长的抑制作用

如图1A所示, 随着布洛芬作用时间的延



长, BEL-7402细胞的增殖受到抑制, 且抑制作用呈时间依赖性。对照组BEL-7402细胞生长活跃, 经0.1~4 mmol/L布洛芬处理48 h后, BEL-7402细胞生长逐渐减慢, 增殖抑制率从(9.14 ± 4.06)%升高至(85.30 ± 1.33)%。布洛芬能有效抑制BEL-7402细胞的增殖, 且抑制作用呈剂量依赖性, 与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$, 图1B)。

2.2 布洛芬对BEL-7402细胞活力的影响

不同浓度(0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0和4.0 mmol/L)布洛芬作用于细胞48 h后, 细胞活力分别为(68.83 ± 2.46)%、(61.87 ± 9.25)%、(52.05 ± 2.64)%、(47.87 ± 5.23)%、(21.30 ± 9.68)%和(6.89 ± 2.62)%, 与对照组的(88.93 ± 5.49)%相比明显减弱。由此可见, 布洛芬能抑制BEL-7402细胞的活力, 且抑制作用有剂量依赖性。不同剂量布洛芬的抑制力差异有统计学意义($P < 0.05$, 表1)。

2.3 布洛芬对BEL-7402细胞生长周期的影响

0.5、1.0、2.0、3.0和4.0 mmol/L布洛芬组细胞G₀/G₁期比率分别为(66.47 ± 5.70)%、(74.90 ± 3.91)%、(80.04 ± 3.61)%、(80.13 ± 2.82)%和(81.49 ± 2.21)%, 与对照组的(62.36 ± 8.33)%相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 表1)。

2.4 布洛芬诱导BEL-7402细胞凋亡

不同浓度(1.0、2.0、3.0和4.0 mmol/L)布洛芬作用于BEL-7402细胞48 h后, 细

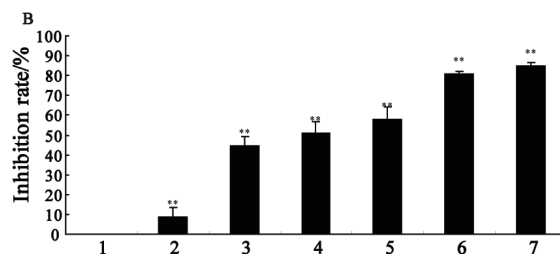


图1 布洛芬抑制BEL-7402细胞的增殖

Fig. 1 Cell growth-inhibition rate of ibuprofen on BEL-7402 cells

A: Cell growth-inhibition rate within 72 h; B: Cell growth-inhibition rate of 48 h. 1: Control group; 2-7: 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 and 4.0 mmol/L ibuprofen. **: $P < 0.01$, compared with control group.

表 1 布洛芬对BEL-7402细胞活力、周期、凋亡的影响

Tab. 1 Effects of ibuprofen treatment on vitality, cycle and apoptosis of BEL-7402 cells

Group	Cell vitality	G ₀ /G ₁ phase ratio	Apoptosis ratio
Control	88.93±5.49	62.36±8.33	9.81±6.80
0.1 mmol/L ibuprofen	68.83±2.46*	63.67±7.41	17.28±9.64
0.5 mmol/L ibuprofen	61.87±9.25*	66.47±5.70*	22.06±12.00
1.0 mmol/L ibuprofen	52.05±2.64**	74.90±3.91*	29.17±10.43*
2.0 mmol/L ibuprofen	47.87±5.23**	80.04±3.61**	36.65±10.07*
3.0 mmol/L ibuprofen	21.30±9.68**	80.13±2.82**	56.59±20.29*
4.0 mmol/L ibuprofen	6.88±2.62**	81.49±2.21**	66.10±15.40*

*: $P < 0.05$, compared with control group; **: $P < 0.01$, compared with control group.

胞早期凋亡率分别为(29.17 ± 10.43)%, (36.65 ± 10.07)%, (56.59 ± 20.29)%和(66.10 ± 15.40)%, 与对照组的(9.81 ± 6.80)%比较明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 表1)。

2.5 布洛芬对BEL-7402细胞中PCNA、Cyclin D1、Bcl-2、COX-2蛋白表达的影响

与对照组相比, 0.5、2.0 mmol/L布洛芬作用于BEL-7402细胞48 h后, 细胞PCNA、Cyclin D1、Bcl-2及COX-2蛋白表达均减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图2)。

2.6 布洛芬抑制BEL-7402细胞分泌PGE₂

2.0 mmol/L布洛芬可抑制BEL-7402细胞分泌PGE₂, PGE₂水平由(68.70 ± 9.43) ng/L降至(23.98 ± 4.89) ng/L($P < 0.01$, 图3)。

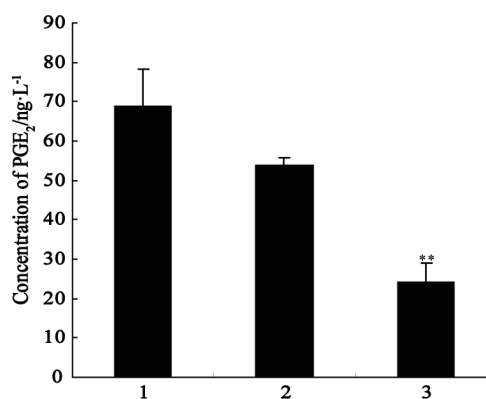


图 3 布洛芬对BEL-7402细胞分泌PGE₂的影响

Fig. 3 Effects of ibuprofen on PGE₂ expression in the cell culture supernatants of BEL-7402 cells

1: Control group; 2, 3: 0.5, 2.0 mmol/L ibuprofen. **: $P < 0.01$, compared with control group.

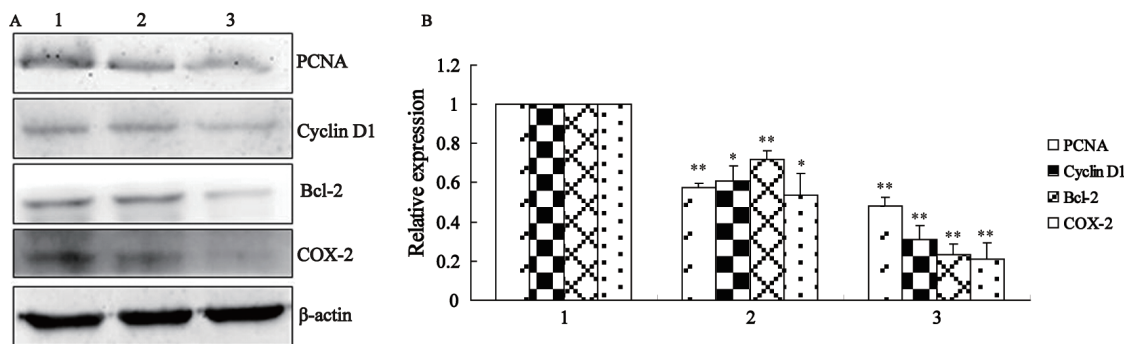


图 2 布洛芬对BEL-7402细胞中PCNA, Cyclin D1, Bcl-2和COX-2蛋白表达的影响

Fig. 2 The expressions of PCNA, Cyclin D1, Bcl-2 and COX-2 protein were tested by Western blot in BEL-7402 cells after ibuprofen treatment

1: Control group; 2, 3: 0.5, 2.0 mmol/L ibuprofen. *: $P < 0.05$, compared with control group; **: $P < 0.01$, compared with control group.

3 讨 论

近来大量研究表明, NSAIDs家族中的多种药物可以抑制多种不同恶性肿瘤的生长, 其作用机制复杂且不尽相同: 吡罗昔康可以抑制HT-29结肠腺癌细胞PGE₂蛋白的产生, 促进细胞凋亡^[5], Zhang等^[6]发现塞来昔布可以通过PGE₂调节 β -catenin通路抑制A549肺癌细胞的转移。陆维祺等^[7]发现, 阿司匹林可诱导细胞表达Fas, 下调Fas L, 促进结肠癌Caco-2细胞的凋亡。另外吡罗昔康可以通过调控*Bcl-2*、*Bax*基因及其蛋白水平诱导胃癌细胞的凋亡^[8]。

布洛芬作为一种常用的NSAIDs, 同样可以抑制多种恶性肿瘤生长。Greenspan等^[9]研究发现, SW480结肠癌细胞经布洛芬处理后, β -catenin蛋白水平降低, 其磷酸化水平增加, 活化受到抑制。John-Aryankalayil等^[10]认为, 布洛芬通过抑制前列腺癌细胞COX-2蛋白的表达, 进而影响细胞周期, 抑制肿瘤细胞的生长。此外, 布洛芬还可以抑制血管生成, 抑制SKOV-3卵巢癌小鼠肿瘤组织的生长^[11]。

本研究以肝癌细胞BEL-7402为对象, 通过体外实验证实, 布洛芬能有效抑制BEL-7402细胞的增殖, 且增殖抑制率呈时间和剂量依赖性。布洛芬处理的肝癌细胞, 其细胞活力显著下降。本研究分析细胞周期发现, G₀/G₁期细胞所占比例增加, 细胞周期发生G₀/G₁期阻滞; 同时, 不同浓度布洛芬处理的肝癌细胞, 细胞早期凋亡率显著增加。上述结果表明布洛芬能够抑制肝癌细胞增殖, 并且可诱导该细胞的凋亡。这一现象提示布洛芬对肿瘤细胞生长抑制及促凋亡现象具有普遍性。

为了初步探讨布洛芬抑制肝癌细胞生长的机制, 采用Western blot和ELISA实验对相关调控蛋白表达进行分析, 发现2.0 mmol/L布洛芬处理48 h后, 肝癌细胞PCNA、Cyclin D1、Bcl-2以及COX-2蛋白表达量都显著降低; 细胞培养上清液中PGE₂蛋白表达量减少。PGE₂作为一种重要细胞生长和调节因子与其受体在肿瘤发生、发

展过程中有着相当重要的作用, 可促进细胞的增殖和分化、肿瘤血管的形成, 抑制肿瘤细胞的凋亡^[12-15]。研究结果提示, 布洛芬抑制肝癌细胞生长可能通过调控PGE₂途径实现。

本研究结果表明, 布洛芬能有效抑制BEL-7402肝癌细胞的增殖、降低细胞活力、阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡, 其作用机制可能与抑制COX-2和PGE₂蛋白表达有关, 其确切的分子机制仍需进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] SCHRÖR K. Pharmacology and cellular/molecular mechanisms of action of aspirin and non-aspirin NSAIDs in colorectal cancer [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2011, 25(4): 473-484.
- [2] BEALES I L, VARDI I, DEARMAN L. Regular statin and aspirin use in patients with Barrett's oesophagus is associated with a reduced incidence of oesophageal adenocarcinoma [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2012, 24(8): 917-923.
- [3] BRASKY T M, BONNER M R, MOYSICH K B, et al. Genetic variants in COX-2, non-steroidal anti-inflammatory drugs, and breast cancer risk: the Western New York Exposures and Breast Cancer Study [J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 126(1): 157-165.
- [4] BARIS D, KARAGAS M R, KOUTROS S, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and other analgesic use and bladder cancer in northern New England [J]. Int J Cancer, 2013, 132(1): 162-173.
- [5] CHIEN C C, KO C H, SHEN S C, et al. The role of COX-2/PGE2 in gossypol-induced apoptosis of colorectal carcinoma cells [J]. J Cell Physiol, 2012, 227(8): 3128-3137.
- [6] ZHANG S, DA L, YANG X, et al. Celecoxib potentially inhibits metastasis of lung cancer promoted by surgery in mice, via suppression of the PGE2-modulated β -catenin pathway [J]. Toxicol Lett, 2014, 225(2): 201-207.
- [7] 陆维祺, 艾志龙, 沈兆忠. 阿司匹林对结肠癌细胞凋亡及Fas/Fas L表达的影响 [J]. 中国癌症杂志, 2003, 13(4): 350-352.
- [8] 张燕捷, 吴叔明, 李恩灵. 非甾体消炎药诱导胃癌细胞凋亡及其机制的研究 [J]. 中国癌症杂志, 2004, 14(5): 432-436.
- [9] GREENSPAN E J, MADIGAN J P, BOARDMAN L A, et al. Ibuprofen inhibits activation of nuclear β -catenin in human colon adenomas and induces the phosphorylation of GSK-3 β [J]. Cancer Prev Res (Phila), 2011, 4(1): 161-171.
- [10] JOHN-ARYANKALAYIL M, PALAYOOR S T, CERNA D, et al. NS-398, ibuprofen, and cyclooxygenase-2 RNA interference produce significantly different gene expression

- profiles in prostate cancer cells [J] . Mol Cancer Ther, 2009, 8(1): 261-273.
- [11] LI W, XU R J, LIN Z Y, et al. Effects of a cyclooxygenase-1-selective inhibitor in a mouse model of ovarian cancer, administered alone or in combination with ibuprofen, a nonselective cyclooxygenase inhibitor [J] . Med Oncol, 2009, 26(2): 170-177.
- [12] MA J, CHEN M, XIA S K, et al. Prostaglandin E2 promotes liver cancer cell growth by the upregulation of FUSE-binding protein 1 expression [J] . Int J Oncol, 2013, 42(3): 1093-1104.
- [13] 艾志龙, 童赛雄, 陆维祺. 大肠癌患者外周血前列腺素E2水平的临床意义 [J] . 中国癌症杂志, 2000, 10(4): 316-318.
- [14] ZHANG H, CHENG S, ZHANG M, et al. Prostaglandin E2 promotes hepatocellular carcinoma cell invasion through upregulation of YB-1 protein expression [J] . Int J Oncol, 2014, 44(3): 769-780.
- [15] ZHANG Y, DAAKA Y. PGE2 promotes angiogenesis through EP4 and PKA C γ pathway [J] . Blood, 2011, 118(19): 5355-5364.
- (收稿日期: 2014-12-20 修回日期: 2015-04-07)