

吲哚美辛对宫颈癌Hela细胞增殖和凋亡作用的影响

徐 晖^{1,2*}, 俞 佳¹, 吕良忠^{1,2#} (1.浙江省人民医院药学部, 杭州 310014; 2.浙江中医药大学药学院, 杭州 310053)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)31-4375-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.31.18

摘要 目的:研究吲哚美辛对宫颈癌Hela细胞增殖、凋亡的影响。方法:以体外培养的Hela细胞为试验对象,分别用0(空白对照)、200、400、600、800、1 000 $\mu\text{mol/L}$ 吲哚美辛作用24、48、72 h后,采用MTT法检测吲哚美辛对Hela细胞的增殖抑制率;用0(空白对照)、400、600、800 $\mu\text{mol/L}$ 吲哚美辛作用24 h后,采用倒置显微镜观察细胞形态的改变,并用流式细胞仪检测细胞周期分布和细胞凋亡情况。结果:600、800、1 000 $\mu\text{mol/L}$ 吲哚美辛可抑制Hela细胞的增殖,增殖抑制率与药物浓度和作用时间呈正相关。与空白对照比较,吲哚美辛可使Hela细胞形态由多角形逐渐向圆形转变且细胞呈现凋亡和坏死状态;其中细胞 G_0/G_1 期比例增加、S期比例减少,细胞凋亡率增加。结论:吲哚美辛可抑制Hela细胞增殖,诱导其凋亡,主要阻滞细胞于 G_0/G_1 期。

关键词 吲哚美辛;宫颈癌Hela细胞;细胞增殖;细胞凋亡

Effects of Indometacin on Apoptosis and Proliferation of Cervical Cancer Hela Cell

XU Hui^{1,2}, YU Jia¹, LYU Liang-zhong^{1,2} (1.Dept. of Pharmacy, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, China; 2.College of Pharmacy, Zhejiang University of TCM, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of indometacin on apoptosis and proliferation of cervical cancer Hela cell. METHODS: Hela cell was cultured *in vitro* as study object, and cultured with 0 (blank control), 200, 400, 600, 800 and 1 000 $\mu\text{mol/L}$ indometacin for 24, 48 and 72 h. The inhibitory rate of indometacin to the proliferation of Hela cells was detected by MTT assay. After treated with 0 (blank control), 400, 600 and 800 $\mu\text{mol/L}$ indometacin for 24 h, the change of cellular morphology was observed by invert microscope; cell cycle phase and apoptosis were analyzed by flow cytometry. RESULTS: Indometacin of 600, 800, 1 000 $\mu\text{mol/L}$ could inhibit the proliferation of Hela cell, which was positively correlated to drug concentration and time. Compared with blank control, indometacin could induce that Hela cell transformed from polygonous to round in appearance, and resulted in cell apoptosis and necrosis; the proportion of cells at G_0/G_1 phase increased, while the proportion of cells at S phase reduced; the apoptotic rate of cells raised. CONCLUSIONS: Indometacin could inhibit the proliferation of Hela cell, block cell cycle at G_0/G_1 phase and induce apoptosis.

KEYWORDS Indometacin; Cervical cancer Hela cell; Proliferation; Apoptosis

吲哚美辛属于非甾体抗炎药(Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs),临床上主要用于抗炎、抗风湿及解热镇痛。大量流行病学调查表明,规律服用NSAIDs可显著降低多种肿瘤的发病率和死亡率。近年来研究发现,吲哚美辛对肺癌、胃癌、结肠癌、胰腺癌等有一定的抗肿瘤作用^[1-4]。但吲哚美辛在宫颈癌方面研究较少,其作用机制也不清楚。为此,笔者以体外培养的宫颈癌Hela细胞为试验对象,研究吲哚美辛对宫颈癌Hela细胞增殖、凋亡的影响,为吲哚美辛用于宫颈癌的临床治疗提供试验依据。

1 材料

1.1 仪器

倒置相差显微镜(日本Olympus公司);酶标仪(瑞士Tecan公司);流式细胞仪(美国Beckman-Coulter公司);R430型低温高速离心机(德国Eppendorf公司,离心半径:8 cm);细胞培养箱(美国Thermo公司)。

1.2 药品与试剂

* 硕士研究生。研究方向:肿瘤药理学。电话:0571-85893117。E-mail: xuhui19890926@126.com

通信作者:主任药师,博士。研究方向:肿瘤药理学。电话:0571-85893122。E-mail: lvliangzhong@126.com

吲哚美辛原料药(浙江省食品药品检验所,批号:2175130424,纯度:98%);RPMI1640培养基(杭州吉诺生物医药技术有限公司);胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司);胰酶(美国Genview公司);二甲基亚砜(DMSO)、MTT(美国Sigma公司);细胞周期检测试剂盒(南京建成生物科技有限公司)。

1.3 细胞株

Hela细胞株购自上海鼎国生物技术有限公司。

2 方法

2.1 含药培养基的制备

吲哚美辛用DMSO制成1 mol/L的溶液,分装后置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 贮存。加药前用含10%胎牛血清的RPMI1640细胞培养基稀释至所需浓度。

2.2 细胞培养

取Hela细胞培养于含10%胎牛血清、100 u/ml青霉素和100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的RPMI1640培养基中,在37 $^{\circ}\text{C}$ 、饱和湿度、5% CO_2 的培养箱中培养,待细胞长至80%时,用0.25%的胰酶进行消化、传代。

2.3 细胞增殖抑制率的测定

取对数生长期的Hela细胞以 $6 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ 加入96孔板内,每孔200 μl ,待细胞贴壁后,更换含药培养基,使吲哚美辛的终浓

度为200、400、600、800、1 000 $\mu\text{mol/L}$ ，每个浓度设6个复孔；另设空白对照。采用MTT法，待作用24、48、72 h后，各孔加20 μl MTT，继续培养4 h，弃培养液后加150 μl DMSO，轻微振荡10 min后，在酶标仪540 nm波长处检测光密度(OD)，试验重复3次。计算细胞增殖抑制率，细胞增殖抑制率=(1-加药孔OD值/空白对照孔OD值) \times 100%。

2.4 细胞形态观察

取对数生长期的Hela细胞以 $6\times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ 加入96孔板内，每孔200 μl ，待细胞贴壁后，更换含药培养基，使吲哚美辛的终浓度为400、600、800 $\mu\text{mol/L}$ ；另设空白对照。作用24 h后，在倒置相差显微镜下观察各孔细胞的形态学变化。

2.5 细胞周期分布检测

收集“2.4”项下作用24 h的Hela细胞，用磷酸盐缓冲液(PBS)制成单细胞悬液，转移至 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的无水乙醇中， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温度下中过夜；离心，弃上清后，用PBS重新悬浮细胞，室温放置15 min；再次离心，弃上清后加100 μl 核糖核酸酶A(RNaseA)， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min，再加400 μl 碘化丙啶(PI)， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下避光30 min。采用流式细胞仪检测各孔Hela细胞的周期分布。

2.6 细胞凋亡检测

收集“2.4”项下作用24 h的Hela细胞，用PBS重悬细胞并计数。取 $2\times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ 的重悬细胞，离心，弃上清，加500 μl 结合液重悬细胞；加5 μl Annexin V-FITC，混匀；加5 μl PI，混匀，室温避光孵育10 min。采用流式细胞仪检测各孔Hela细胞的凋亡情况，其中Annexin V-FITC为绿色荧光，即早期凋亡细胞；PI为红色荧光，即晚期凋亡细胞。

2.7 统计学方法

采用SPSS 11.5软件进行统计分析。数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示，两组资料间的比较采用 t 检验，多组资料间的比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞增殖抑制率

与空白对照比较，200(除作用24 h外)、400、600、800、1 000 $\mu\text{mol/L}$ 吲哚美辛作用后各孔细胞的OD值均减小，差异有统计学意义($P<0.05$)，增殖抑制率均增加；且600、800、1 000 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下效果与浓度和作用时间呈正相关。这表明吲哚美辛可抑制Hela细胞增殖。其中，吲哚美辛作用于Hela细胞24、48、72 h的半数抑制浓度(IC_{50})分别为640、540、490 $\mu\text{mol/L}$ 。吲哚美辛对Hela细胞的增殖抑制率测定结果见表1。

表1 吲哚美辛对Hela细胞的增殖抑制率的测定结果($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab 1 Results of inhibitory rates of indometacin to the proliferation of Hela cell ($\bar{x}\pm s, n=3$)

浓度, $\mu\text{mol/L}$	24 h		48 h		72 h	
	OD	抑制率, %	OD	抑制率, %	OD	抑制率, %
0(空白对照)	1.492 9 \pm 0.025 3	0	1.651 8 \pm 0.018 2	0	1.891 0 \pm 0.022 7	0
200	1.460 3 \pm 0.022 7	2.17	1.336 0 \pm 0.035 9*	18.29	1.693 2 \pm 0.016 3*	10.46
400	1.377 8 \pm 0.026 7*	7.71	1.189 5 \pm 0.038 0*	27.25	1.405 7 \pm 0.004 6*	25.66
600	0.920 6 \pm 0.005 6*	38.82	0.608 0 \pm 0.007 5*	62.81	0.560 5 \pm 0.003 5*	70.36
800	0.615 1 \pm 0.042 0*	57.44	0.694 0 \pm 0.019 6*	77.42	0.376 3 \pm 0.013 2*	80.10
1 000	0.387 8 \pm 0.002 2*	74.02	0.239 7 \pm 0.001 7*	85.34	0.199 7 \pm 0.003 3*	89.44

注:与空白对照比较, * $P<0.05$

Note: vs. blank control, * $P<0.05$

3.2 细胞形态学变化

空白对照孔的Hela细胞状态良好，呈不规则多角形，胞质饱满，相邻细胞生长融合成片。400、600、800 $\mu\text{mol/L}$ 吲哚美辛作用24 h后Hela细胞数量明显减少，细胞形态由多边形逐渐向圆形转变，体积缩小，细胞间隙增大，空泡颜色加深，呈深褐色，并出现片状无细胞生长区，见较多的凋亡和坏死细胞，且随给药浓度的增加效果越明显。吲哚美辛对细胞形态的影响见图1。

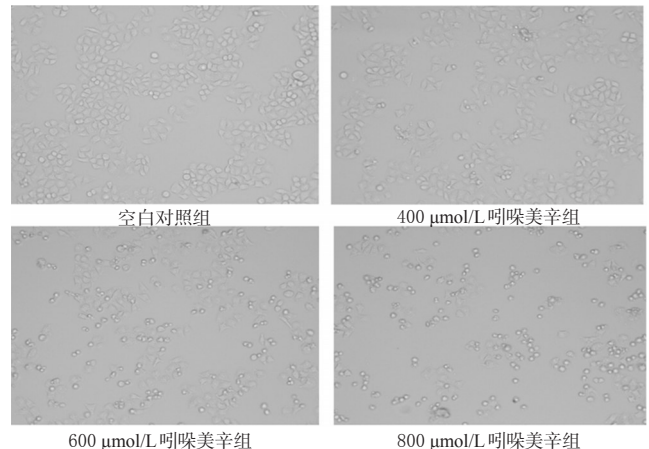


图1 吲哚美辛对细胞形态的影响($\times 200$)

Fig 1 Effect of indometacin on cell morphology ($\times 200$)

3.3 细胞周期分布

与空白对照比较，400、600、800 $\mu\text{mol/L}$ 吲哚美辛作用24 h后 G_0/G_1 期细胞比例增加，S期细胞比例减少，差异有统计学意义($P<0.05$)，且与给药浓度呈正相关。这表明吲哚美辛可使Hela细胞周期停滞于 G_0/G_1 期。Hela细胞周期分布的测定结果见表2，分布图见图2。

表2 Hela细胞周期分布的测定结果($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab 2 Results of the cell cycle phase of Hela cell ($\bar{x}\pm s, n=3$)

浓度, $\mu\text{mol/L}$	细胞周期, %		
	G_0/G_1	S	G_2/M
0(空白对照)	46.12 \pm 1.31	38.25 \pm 1.53	15.63 \pm 1.73
400	59.34 \pm 1.08*	24.12 \pm 1.42*	16.54 \pm 1.26
600	62.41 \pm 1.25*	23.88 \pm 1.27*	13.71 \pm 1.03
800	64.53 \pm 0.97*	23.20 \pm 1.13*	12.27 \pm 1.17

注:与空白对照比较, * $P<0.05$

Note: vs. blank control, * $P<0.05$

3.4 细胞凋亡情况

空白对照孔Hela细胞的早期凋亡率为(1.56 \pm 0.05)%，400、600、800 $\mu\text{mol/L}$ 吲哚美辛作用后Hela细胞的早期凋亡率分别为(4.73 \pm 0.06)%、(10.53 \pm 0.15)%、(30.07 \pm 0.11)%。与空白对照比较，400、600、800 $\mu\text{mol/L}$ 吲哚美辛作用后Hela细胞早期凋亡率增加，差异有统计学意义($P<0.05$)，且与给药浓度呈正相关。这表明吲哚美辛能诱导Hela细胞凋亡。

4 讨论

宫颈癌是我国常见的妇科恶性肿瘤，严重威胁着妇女的生命和健康。近年来，随着宫颈癌发病率的增加，患者呈现年轻化趋势^[5]。目前，宫颈癌的治疗采用以手术、化疗、放疗为主的综合治疗方法^[6]，但对于复发转移的晚期宫颈癌患者并未取

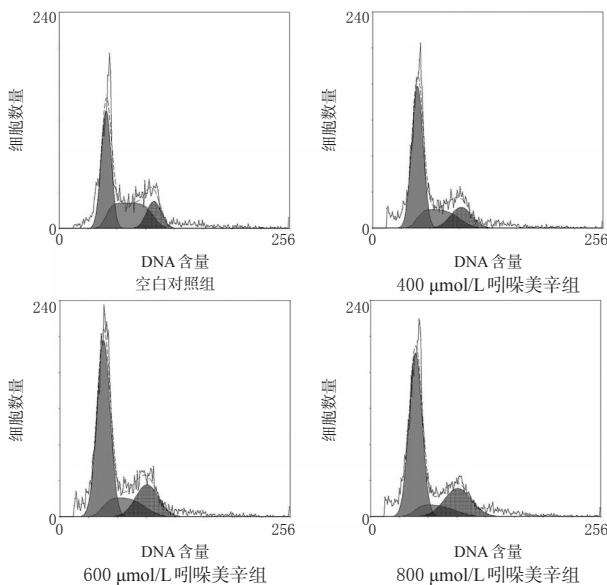


图2 HeLa细胞周期分布图

Fig 2 Distribution chart of the cell cycle of HeLa cell

得满意的疗效。晚期宫颈癌患者一般以化疗为主的姑息性治疗。顺铂已经广泛用于宫颈癌的治疗,但由于其耐药性和肾毒性影响了临床疗效。因此,发掘新的有效的抗宫颈癌药物具有重要的临床意义。

本研究通过MTT法检测吲哚美辛对宫颈癌Hela细胞增殖的影响,结果表明,吲哚美辛具有抑制宫颈癌Hela细胞生长的作用,且随着作用时间和给药浓度的增加,抑制作用增强。倒置相差显微镜下观察发现药物作用后Hela细胞失去正常的多角形,变小、变圆,并逐渐悬浮起来,呈现凋亡和坏死的状态。

关于吲哚美辛体外抑癌作用的确切机制尚不清楚。陆颖影等^[7]研究发现,吲哚美辛可使胰腺癌细胞停滞在G₀/G₁期,减少进入G₁期以后进行有丝分裂的细胞数量,减缓细胞周期进程,从而使胰腺癌细胞生长受到抑制。体内外研究表明,吲哚美辛可抑制胰腺癌细胞株BxPC-3的生长,促进细胞凋亡,诱导细胞周期阻滞于G₀/G₁期^[7]。王国强等^[8]发现,吲哚美辛能抑制结肠癌细胞株HCT116的增殖,下调细胞周期调控蛋白Cyclin D1的表达。苏江浩等^[9]报道了吲哚美辛可明显抑制前列腺癌DU145细胞增殖,改变细胞的周期分布,使S期细胞比例增加、G₂/M期细胞比例减少。Bernardi A等^[10]也报道了吲哚美辛可以诱导脑胶质瘤细胞凋亡,增加G₀/G₁期细胞比例,减少S期细胞比例。本研究结果显示,吲哚美辛可以使Hela细胞G₀/G₁期细胞比例增加、S期细胞比例减少,且随着药物浓度的增加,Hela细胞的凋亡率呈递增趋势。这表明吲哚美辛可能导致

Hela细胞的G₀/G₁期阻滞,诱导其凋亡,从而发挥抗肿瘤作用。

本研究结果提示,NSAIDs可能成为一类具有广阔应用前景的宫颈癌治疗药物,进一步研究其抗宫颈癌作用的机制将为NSAIDs抗宫颈癌的临床应用提供试验依据。

参考文献

- [1] 王颢,魏莎莉,杨戎,等.吲哚美辛体外干预研究胃癌 Wnt/ β -Catenin 信号途径与 Caspase-3 及 Bcl-2 关系[J].重庆医科大学学报,2008,33(3):304.
- [2] Brunelli C, Amici C, Angelini M, *et al.* The non-steroidal anti-inflammatory drug indomethacin activates the eIF2 α kinase PKR, causing a translational block in human colorectal cancer cells[J]. *Biochem J*, 2012,443(2):379.
- [3] 王存德,张利娟,龚泉,等.吲哚美辛对荷 Lewis 肺癌小鼠抗肿瘤作用的相关研究[J].中国药物经济学,2014,9(2):37.
- [4] Han L, Peng B, Ma Q, *et al.* Indometacin ameliorates high glucose-induced proliferation and invasion via modulation of e-cadherin in pancreatic cancer cells[J]. *Curr Med Chem*, 2013,20(33):4 142.
- [5] 范开慧.宫颈癌与 HPV 感染的关系及发病年龄趋势的调查研究[J].中国卫生产业,2011,8(8):63.
- [6] 彭茸,赵纯全.化疗药物在宫颈癌治疗中的应用及研究进展[J].中国药房,2013,24(12):1 143.
- [7] 陆颖影,靖大道,王兴鹏,等.吲哚美辛与埃罗替尼对胰腺癌细胞生长的协同抑制作用[J].胃肠病学,2007,12(4):209.
- [8] 王国强,方清清,卢震海,等.吲哚美辛对结肠癌细胞 HCT116 的影响及机制探讨[J].实用医学杂志,2012,28(11):1 756.
- [9] 苏江浩,刘军,朱加庚,等.吲哚美辛对前列腺癌 DU145 细胞增殖与凋亡的影响及机制探讨[J].山东医药,2008,48(30):9.
- [10] Bernardi A, Frozza RL, Hoppe JB, *et al.* The antiproliferative effect of indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules in glioma cells is mediated by cell cycle regulation, differentiation, and the inhibition of survival pathways[J]. *Int J Nanomedicine*, 2013,doi:10.2147/IJN.S40284.

(收稿日期:2014-12-24 修回日期:2015-03-15)

(编辑:邹丽娟)

《中国药房》杂志——《化学文摘》(CA)收录期刊,欢迎投稿、订阅