

阿司匹林对人胃癌细胞SGC-7901、BGC-823生长和自噬的影响[△]

李 强*,徐倩楠,廖仲恺,邓慧鸣,许荣华[#](海南医学院第一附属医院胃肠肿瘤外科,海口 570102)

中图分类号 R735.2;R361⁺.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)05-0614-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.05.08

摘要 目的:研究阿司匹林对人胃癌细胞SGC-7901、BGC-823生长和自噬的影响。方法:以SGC-7901、BGC-823细胞为研究对象,磷酸盐缓冲液(PBS)为阴性对照组,作用时间为48 h,采用MTT法检测1、2、4、6、8、10 mmol/L阿司匹林以及5 mmol/L阿司匹林单用和分别与2.5 μmol/L氯喹、2.5 μmol/L 3-甲基腺嘌呤(3-MA)联用对胃癌细胞存活率的影响;采用流式细胞术检测2、5 mmol/L阿司匹林以及5 mmol/L阿司匹林单用和分别与2.5 μmol/L氯喹、2.5 μmol/L 3-MA联用对胃癌细胞凋亡率和细胞周期分布的影响;采用Hoechst33258染色观察5 mmol/L阿司匹林对胃癌细胞核形态学的影响;采用Transwell小室试验检测5 mmol/L阿司匹林对胃癌细胞迁移的影响;采用激光共聚焦扫描显微镜观察5 mmol/L阿司匹林对胃癌细胞内自噬体形成的影响;采用Western blot法检测2、5 mmol/L阿司匹林对胃癌细胞内自噬标志物LC3-II蛋白表达的影响。结果:与阴性对照组比较,阿司匹林能明显抑制SGC-7901、BGC-823细胞的存活率,且呈浓度依赖性,但对SGC-7901、BGC-823细胞的凋亡率没有明显影响,能够诱导细胞周期阻滞在G₁期。与阿司匹林单用组比较,阿司匹林+氯喹和阿司匹林+3-MA作用后SGC-7901、BGC-823细胞存活率明显升高,G₁期细胞分布率明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与阴性对照组比较,阿司匹林作用后SGC-7901、BGC-823细胞均未见明显的DNA裂解片段、凋亡小体以及碎块状的浓密亮蓝色,迁移数量明显减少($P<0.001$),自噬体明显增加,LC3-II蛋白表达明显增强($P<0.05$)。结论:阿司匹林能够显著抑制胃癌细胞SGC-7901、BGC-823的生长,使其细胞周期停滞在G₁期,其作用机制可能与激活细胞自噬有关。

关键词 胃癌细胞;阿司匹林;细胞自噬;细胞周期分布;存活率;凋亡率

Effects of Aspirin on the Growth and Autophagy of Human Gastric Cancer Cells SGC-7901 and BGC-823

LI Qiang, XU Qiannan, LIAO Zhongkai, DENG Huiming, XU Ronghua (Dept. of Gastrointestinal Tumor Surgery, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570102, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of aspirin on the growth and autophagy of human gastric cancer cells SGC-7901 and BGC-823. METHODS: SGC-7901 and BGC-823 cells were selected as research objects, with phosphate buffer (PBS) as negative control treated for 48 h, MTT assay was used to detect the effects of 1, 2, 4, 6, 8, 10 mmol/L aspirin, 5 mmol/L aspirin alone or combined with 2.5 μmol/L chloroquine, 2.5 μmol/L 3-methyladenine (3-MA) on survival rate of gastric cancer cells. Flow cytometry was used to detect the effects of 2 and 5 mmol/L aspirin, 5 mmol/L aspirin alone or combined with 2.5 μmol/L chloroquine and 2.5 μmol/L 3-MA on the apoptosis rate and cell cycle distribution of gastric cancer cells. Hoechst33258 staining was used to observe the effects of 5 mmol/L aspirin on morphology of gastric cancer cell nucleus; Transwell chamber test was adopted to detect the effects of 5 mmol/L aspirin on the migration of gastric cancer cell. Laser confocal scanning microscopy was used to observe the effects of 5 mmol/L aspirin on autophagy formation in gastric cancer cells. Western blot method was used to detect the effects of 2 and 5 mmol/L aspirin on the protein expression of autophagy markers LC3-II in gastric cancer cells. RESULTS: Compared with negative control group, aspirin could inhibit the survival rates of SGC-7901 and BGC-823 cells in dose-dependent manner, but had no significant effects on apoptosis rate of SGC-7901 and BGC-823 cells; SGC-7901 and BGC-823 cells were blocked in G₁ phase. Compared with aspirin alone group, the survival rates of SGC-7901 and BGC-823 were increased significantly after treated with aspirin+chloroquine and aspirin+3-MA, while the distribution rate of SGC-7901 and BGC-823 cells at G₁ phase were decreased significantly, with statistical significance ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with negative control group, there were no obvious DNA fragmentation fragments, apoptotic bodies and fragments of dense bright blue, while the number of migration cells were decreased significantly in SGC-7901 and BGC-823 cells after treated with aspirin ($P<0.001$); the number of autophagosome was increased significantly and the protein expression of LC3-II was enhanced significantly ($P<0.05$).

[△] 基金项目:海南省应用技术研发与示范推广专项项目(No. ZDXM2015080)

* 医师,硕士。研究方向:胃肠肿瘤治疗。电话:0898-66528114。E-mail:287994623@qq.com

[#] 通信作者:主任医师,博士。研究方向:胃肠肿瘤治疗。电话:0898-66528114。E-mail:hyfyweichang@163.com

CONCLUSIONS: Aspirin can significantly inhibit the growth of SGC-7901 and BGC-823 cells, and arrest cell cycle in G₁ phase, the mechanism of which may be associated with the activation of autophagy.

KEYWORDS Gastric cancer cell; Aspirin; Cell autophagy; Cell cycle distribution; Survival rate; Apoptosis rate

胃癌(Gastric cancer, GC)是全球最常见的消化道恶性肿瘤之一,据全球癌症数据统计显示,其在2012年就有约95万的新发病率,约72万患者死于胃癌^[1]。根据全国肿瘤登记中心最新发布的《2015中国肿瘤登记年报》数据显示,在我国,胃癌的发病率和病死率仅次于肺癌和肝癌,位于第三位,且发病率和病死率仍在继续迅速上升^[2]。另外,因胃癌的早期临床症状不明显,多数患者确诊为胃癌时已为中晚期,届时手术治疗和放化疗的疗效也不理想^[3-4]。由此可见,胃癌已经严重威胁人类健康,其防治工作已成为全社会亟待解决的重要课题。

阿司匹林(Aspirin),又名乙酰水杨酸,是常见的非甾体类抗炎药(NSAID),主要作用为解热、镇痛、抗炎,常用于治疗感冒、头痛、发热和风湿类疾病,还可用于预防心血管疾病^[5]。近年来有研究发现,阿司匹林除有上述经典药理作用之外,在抗肿瘤方面也具有重要作用,且其安全性高于部分抗肿瘤药物。据报道,规律服用阿司匹林可明显提高结肠癌、乳腺癌、前列腺癌患者的存活率^[6-9]。尽管多项研究表明,阿司匹林具有很强的抗肿瘤作用,但其抗肿瘤的机制目前还不十分明确。本课题以人胃癌细胞株SGC-7901和BGC-823为研究对象进行体外研究,探讨阿司匹林对胃癌细胞生长的影响及其可能的作用机制,以期阿司匹林的临床使用提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

3111型二氧化碳培养箱(美国Thermo公司);SpectraMax plus384型全波长酶标仪(美国MD公司);TGL-16M型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司);TDZ6B-WS型台式低速离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);IX73型倒置显微镜(日本Olympus公司);ACCURI C6型流式细胞仪(美国BD公司);ChemiDoc XRS+System型凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司);880型激光共聚焦显微镜(美国Zeiss公司)。

1.2 药品与试剂

阿司匹林对照品(上海麦克林生化科技有限公司,批号:A800349,纯度:99%);自噬双标腺病毒(mRFP-GFP-LC3,上海汉恒科技有限公司,滴度: 1.26×10^{10} PFU/ μ L);RPMI-1640培养基、0.25%胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(Trypsin-EDTA)、胎牛血清(FBS)均购于美国Gibco公司;4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI,批号:064M4108V)和兔抗人LC3-II(自噬标志物)、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体均购于美国Sigma公司;MTT试剂盒(批号:022817170423)、细胞周期检测试剂盒(批号:023017170612)、异硫氰酸荧光素标记膜联蛋白V(Annexin V-FITC)细胞凋亡检测试剂盒(批号:082917171212)、Hoechst33258细胞凋亡染色试剂盒(批号:021617170649)、增强化学发光(ECL)试剂盒(批号:

052417170622)均购于碧云天生物技术有限公司;氯喹(批号:S443002)、3-甲基腺嘌呤(3-MA,批号:S276709)均购于美国Selleck公司;Transwell小室(美国Corning公司);山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 细胞

人胃癌细胞SGC-7901和BGC-823均购自中国科学院上海细胞库。

2 方法

2.1 MTT法检测细胞存活率

选取处于对数生长期的SGC-7901、BGC-823细胞,0.25%胰酶消化后,用10% FBS的RPMI-1640完全培养基悬浮制成单细胞悬液,接种于96孔板,调整细胞密度为 5×10^3 个/100 μ L,待细胞贴壁后,先将阿司匹林、氯喹、3-MA分别溶于二甲亚砜(DMSO),再用磷酸盐缓冲液(PBS)调整浓度制成阿司匹林溶液(1、2、4、6、8、10 mmol/L)、氯喹溶液(2.5 μ mol/L)、3-MA溶液(2.5 μ mol/L),以加入1、2、4、6、8、10 mmol/L阿司匹林以及5 mmol/L阿司匹林(阿司匹林单用组)、2.5 μ mol/L氯喹(氯喹组)、2.5 μ mol/L 3-MA(3-MA组)、5 mmol/L阿司匹林+2.5 μ mol/L氯喹(阿司匹林+氯喹组)、5 mmol/L阿司匹林+2.5 μ mol/L 3-MA(阿司匹林+3-MA组)进行处理为试验组,同时设置以给药同体积的PBS进行处理为阴性对照组,每组设5个复孔,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养48 h,于终止培养前4 h加入10 μ L MTT(5 mg/mL),继续37 $^{\circ}$ C孵育4 h后弃去培养液,每孔加入150 μ L DMSO,用SpectraMax plus384型全波长酶标仪在570 nm波长下测定吸光度(A),计算细胞存活率(试验组 A_{570} /对照组 $A_{570} \times 100\%$)。

2.2 流式细胞术检测细胞凋亡率和细胞周期分布

2.2.1 细胞凋亡率 选取处于对数生长期的SGC-7901、BGC-823细胞,分别按 1×10^5 个/孔接种于6孔板,待细胞贴壁后分别加入2、5 mmol/L阿司匹林(阿司匹林低、高浓度组)以及PBS(阴性对照组),每组3个复孔,作用48 h后,用不含EDTA的0.25%胰酶消化并收集细胞,800 r/min离心3 min,弃上清,收集细胞,用PBS重悬细胞并计数。取 1×10^5 个重悬细胞,800 r/min离心3 min,弃上清,加入195 μ L Annexin V-FITC结合液重悬细胞,再加入Annexin V-FITC和碘化丙啶(PI),室温避光孵育10 min。用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.2.2 细胞周期分布 选取处于对数生长期的SGC-7901、BGC-823细胞,分别按 1×10^5 个/孔接种于6孔板,待细胞贴壁后分别加入2、5 mmol/L阿司匹林(阿司匹林低、高浓度组,其中5 mmol/L时为阿司匹林单用组)、PBS(阴性对照组)、2.5 μ mol/L氯喹(氯喹组)、2.5 μ mol/L 3-MA(3-MA组)、5 mmol/L阿司匹林+2.5 μ mol/L氯喹(阿司匹林+氯喹组)、5 mmol/L阿司匹林+2.5 μ mol/L

3-MA(阿司匹林+3-MA组),每组3个复孔,作用48 h后,收集细胞制成单细胞悬液,离心去上清后,逐滴加入70%的冰乙醇固定过夜,4℃保存,PBS洗去固定液,加入核糖核酸酶A(RNaseA)及PI染色,4℃避光孵育20 min,流式细胞仪检测细胞周期分布。

2.3 Hoechst33258染色检测细胞核形态学变化

取干净无菌的盖玻片置于6孔板内,分别按 1×10^5 个/孔接种对数期生长的SGC-7901、BGC-823细胞,在37℃、5% CO₂培养箱中培养至玻片表面细胞贴壁生长达50%~60%时,分别加入5 mmol/L阿司匹林(阿司匹林组)以及PBS(阴性对照组),每组3个复孔,作用48 h后,加入70%乙醇室温固定15 min,去除固定液,PBS洗3次,进行Hoechst33258染色,在荧光显微镜下观察细胞核形态学变化。

2.4 Transwell小室试验检测细胞的迁移

用0.25%胰蛋白酶消化并收集对数生长期的SGC-7901、BGC-823细胞,PBS洗2次,用无血清的RPMI-1640培养基重悬,调整细胞密度为 5×10^5 mL⁻¹。均匀加入200 μL细胞悬液至上室中,再分别加入浓度为5 mmol/L的阿司匹林(阿司匹林组)和PBS处理(阴性对照组);下室加入含10% FBS的RPMI-1640培养基600 μL,每组3个复孔,37℃、5% CO₂培养箱中培养48 h。取出上室,用棉签擦去上室细胞,PBS漂洗后用多聚甲醛固定15 min,弃固定液,0.1%结晶紫染液染色10 min,PBS洗3次,每次10 min,显微镜下摄片,每组随机挑选5个视野进行计数,取平均值。

2.5 激光共聚焦显微镜观察细胞内自噬体的形成

取干净无菌的盖玻片置于6孔板内,分别按 1×10^5 个/孔接种对数生长期的SGC-7901、BGC-823细胞,用mRGFP-GFP-LC3腺病毒感染(感染复数=300)胃癌细胞24 h后,加入5 mmol/L阿司匹林(阿司匹林组)和PBS(阴性对照组),作用48 h,4%多聚甲醛固定20 min,洗涤后加入含DAPI的封片剂封片,激光共聚焦显微镜观察胞内自噬体的形成情况。

2.6 Western blot法检测细胞内LC3-II蛋白的表达

选取处于对数生长期的SGC-7901、BGC-823细胞,分别按 5×10^5 个/孔接种于6孔板,待细胞贴壁后,分别加入2、5 mmol/L阿司匹林(阿司匹林低、高浓度组)以及PBS(阴性对照组),每组3个复孔,作用48 h后收集细胞,提取总蛋白,BCA蛋白定量试剂盒定量分析蛋白浓度,加入5×十二烷基硫酸钠(SDS)加样缓冲液混合,95%变性10 min,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),转膜,5%脱脂奶粉封闭2 h,按1:1 000加入兔抗人LC3-II、β-actin抗体,4℃孵育过夜,洗膜后,按1:2 000加入山羊抗兔IgG二抗,室温孵育2 h,洗膜,采用ECL试剂盒曝光,Quantity one图像分析软件分析目的条带与内参

(β-actin)条带吸光度的比值,评价LC3-II的相对表达量。

2.7 统计学方法

所有数据应用SPSS 19.0统计软件进行分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间分析采用单因素方差分析,两两比较用t检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞存活率

3.1.1 阿司匹林单用 与阴性对照组比较,阿司匹林对SGC-7901、BGC-823细胞存活率均有明显的抑制作用,且随阿司匹林浓度的增加细胞存活率逐渐降低,呈浓度依赖性。阿司匹林对胃癌细胞存活率的影响见表1。

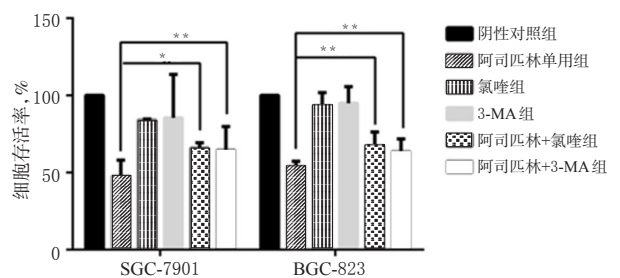
表1 阿司匹林对胃癌细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)
Tab 1 Effects of aspirin on survival rate of gastric cancer cells($\bar{x} \pm s, n=5$)

浓度,mmol/L	SGC-7901		BGC-823	
	A ₅₇₀	细胞存活率,%	A ₅₇₀	细胞存活率,%
0(阴性对照组)	0.92±0.021	100	1.09±0.051	100
1	0.91±0.016	99	0.89±0.011***	82
2	0.68±0.007***	74	0.61±0.009***	56
4	0.60±0.017***	66	0.64±0.012**	58
6	0.48±0.011***	52	0.56±0.011***	52
8	0.30±0.008***	32	0.30±0.006***	27
10	0.08±.0002***	8	0.08±0.003***	8

注:与阴性对照组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$

Note: vs. negative control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3.1.2 阿司匹林与氯喹、3-MA联用 与阿司匹林单用组比较,阿司匹林+氯喹组和阿司匹林+3-MA组SGC-7901、BGC-823细胞存活率明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明氯喹、3-MA能够逆转阿司匹林对SGC-7901、BGC-823细胞的抑制作用,进一步说明阿司匹林可能通过激活SGC-7901、BGC-823细胞自噬从而发挥抑制作用。阿司匹林联合氯喹、3-MA对胃癌细胞存活率的影响见图1。



注:与阿司匹林单用组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. aspirin alone group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图1 阿司匹林联合氯喹、3-MA对胃癌细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig 1 Effects of aspirin combined with chloroquine and 3-MA on survival rate of gastric cancer cells($\bar{x} \pm s, n=5$)

3.2 细胞凋亡率与细胞周期变化

3.2.1 细胞凋亡率 阿司匹林对胃癌细胞凋亡率的影

响见图2。

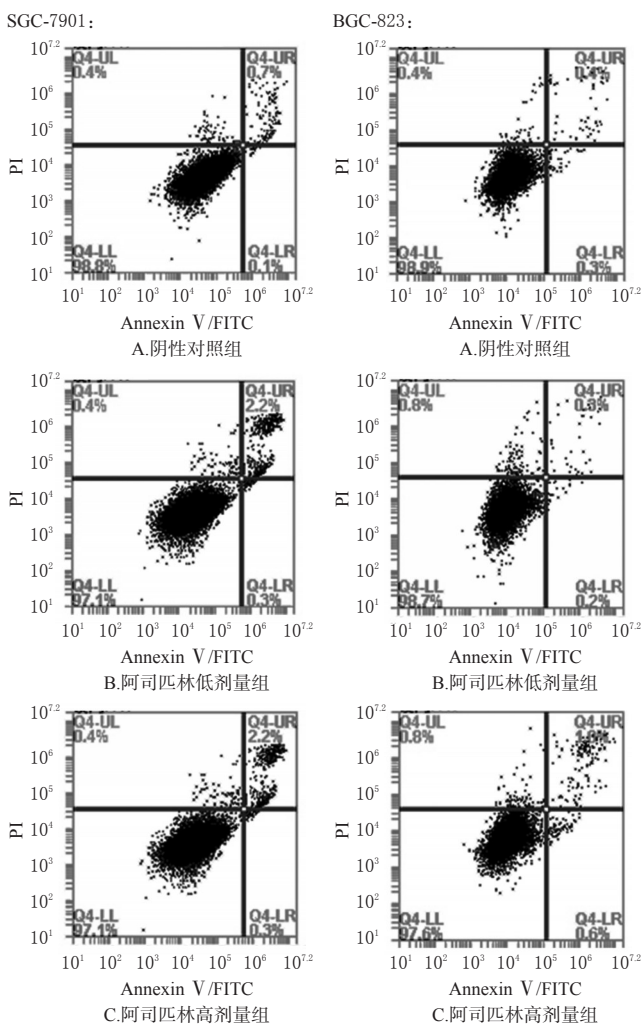


图2 阿司匹林对胃癌细胞凋亡率的影响

Fig 2 Effects of aspirin on apoptosis rate of gastric cancer cells

由图2显示,阿司匹林对SGC-7901、BGC-823细胞的凋亡率无明显影响。

3.2.2 细胞周期 与阴性对照组比较,2、5 mmol/L阿司匹林作用SGC-7901、BGC-823细胞48 h后,G₁期细胞比例均明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),说明阿司匹林能显著诱导SGC-7901、BGC-823细胞阻滞在G₁期。阿司匹林对胃癌细胞周期分布影响的流式图见图3,统计结果见图4。

与阿司匹林单用组比较,阿司匹林+氯喹组和阿司匹林+3-MA组SGC-7901、BGC-823细胞G₁期的细胞比例明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明氯喹、3-MA能够明显降低阿司匹林对SGC-7901、BGC-823细胞G₁期的阻滞作用,进一步表明阿司匹林可能通过激活自噬导致胃癌细胞阻滞在G₁期从而发挥抑制作用。阿司匹林联合氯喹、3-MA对胃癌细胞G₁期细胞分布的影响见图5。

3.3 细胞核形态学变化

镜下可见,阿司匹林组SGC-7901、BGC-823细胞核

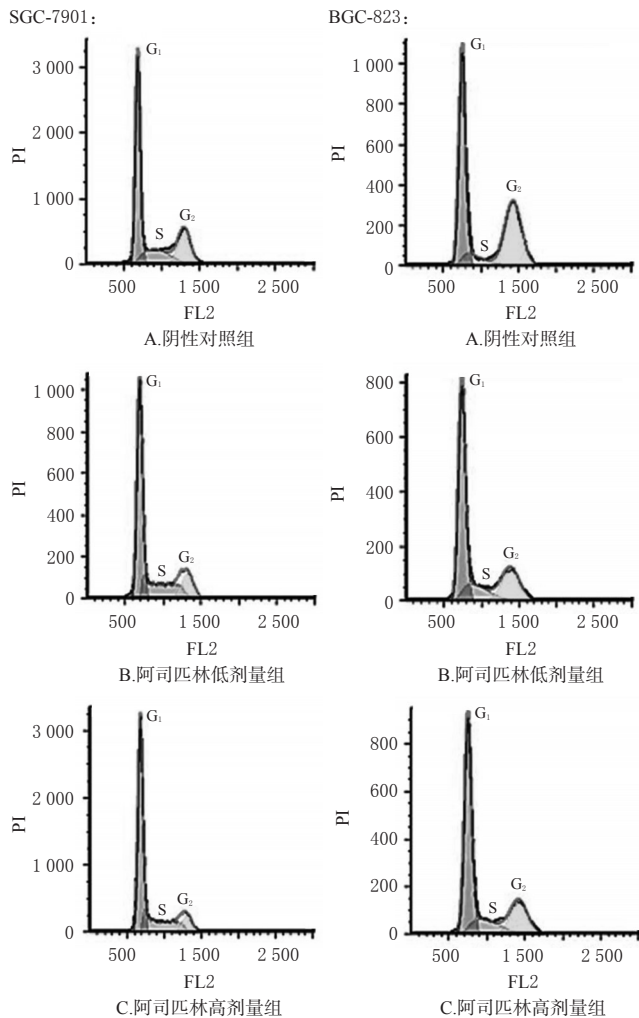


图3 阿司匹林对胃癌细胞周期分布影响的流式图

Fig 3 Flow cytometry of the effects of aspirin on cell cycle distribution of gastric cancer cells

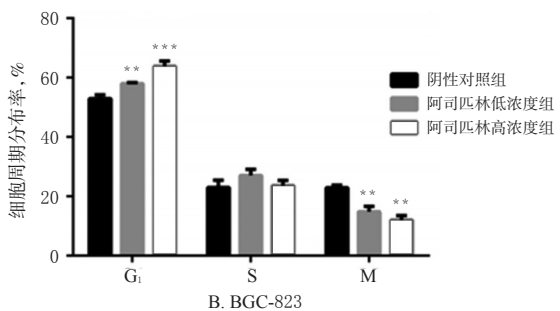
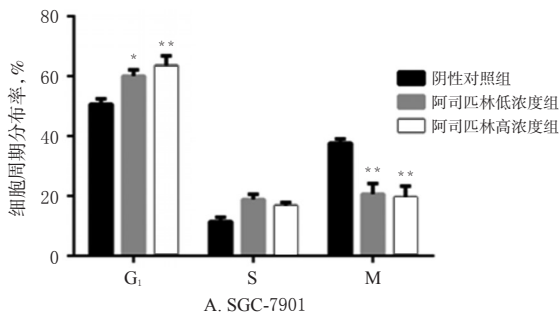
发出均匀的蓝光,细胞核完整,细胞核内的DNA未被酶裂解片段化,未见凋亡小体,未见碎块状的浓密亮蓝色,但可见染色细胞核少于阴性对照组。阿司匹林对胃癌细胞核形态的影响见图6。

3.4 细胞迁移

与阴性对照组比较,阿司匹林组SGC-7901、BGC-823细胞的迁移数量明显减少($P < 0.001$),表明阿司匹林能明显抑制SGC-7901、BGC-823细胞的迁移能力。阿司匹林对胃癌细胞迁移影响的显微镜图见图7,统计结果见图8。

3.5 细胞内自噬体变化

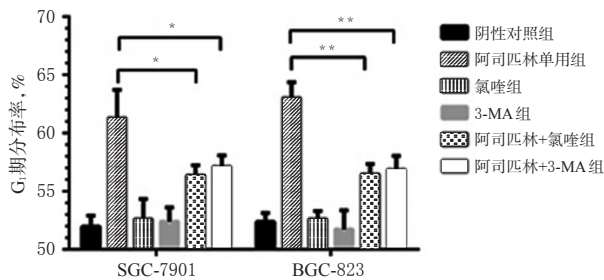
与阴性对照组比较,阿司匹林组SGC-7901、BGC-823细胞中自噬体明显增加,其中BGC-823细胞表现更为明显,提示阿司匹林能够促进SGC-7901、BGC-823细胞自噬体的形成。阿司匹林对胃癌细胞内自噬体的影响见图9(图中GFP-绿色荧光蛋白;GFP-红色荧光蛋白;Merge-绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白合并)。



注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$
 Note: vs. negative control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

图4 阿司匹林对胃癌细胞周期分布影响的统计结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 4 Statistical analysis of the effects of aspirin on the cell cycle distribution of gastric cancer ($\bar{x} \pm s, n=3$)



注:与阿司匹林单用组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$
 Note: vs. aspirin alone group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

图5 阿司匹林联合氯喹、3-MA对胃癌细胞G₁期分布率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 5 Effects of aspirin combined with chloroquine and 3-MA on G₁ phase distribution of gastric cancer cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.6 LC3-II 蛋白表达变化

阴性对照组和阿司匹林低、高浓度组 SGC-7901 细胞中 LC3-II 蛋白的相对表达量分别为 1.07 ± 0.10 、 1.27 ± 0.18 、 1.43 ± 0.10 ; BGC-823 细胞中 LC3-II 蛋白的相对表达量分别为 0.35 ± 0.08 、 0.46 ± 0.10 、 1.10 ± 0.16 。与阴性对照组比较,阿司匹林低、高浓度组 SGC-7901、BGC-823 细胞中 LC3-II 蛋白的相对表达量均明显增强 ($P < 0.05$)。阿司匹林对胃癌细胞内 LC3-II 蛋白表达影响的电泳图见图 10,统计结果见图 11。

4 讨论

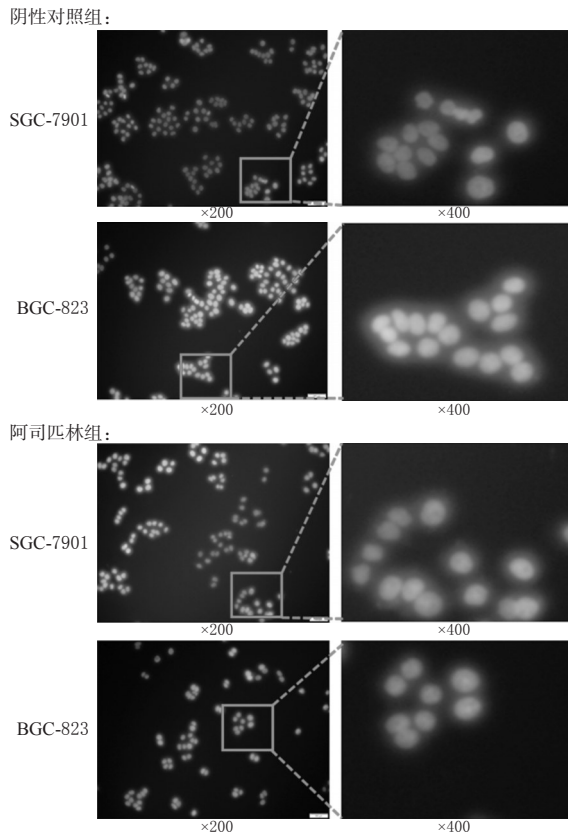


图6 阿司匹林对胃癌细胞核形态的影响
 Fig 6 Effects of aspirin on the morphology of gastric cancer nucleus

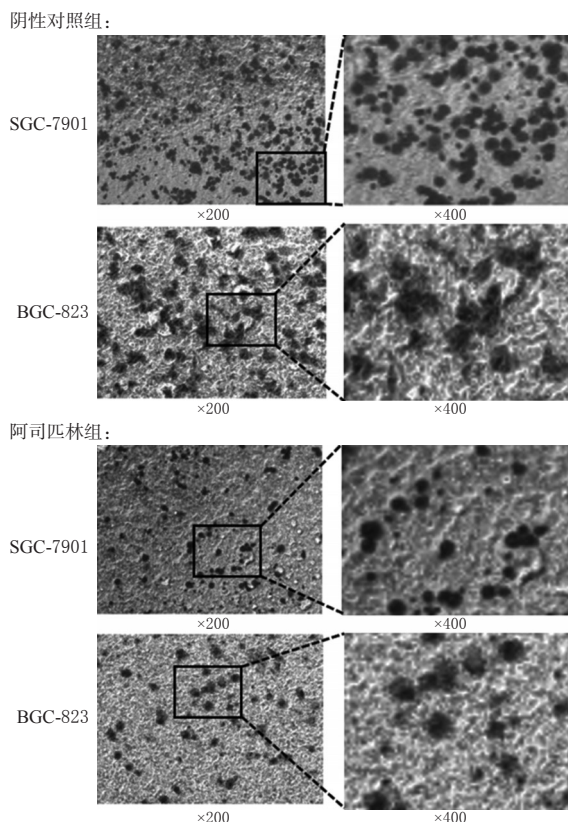
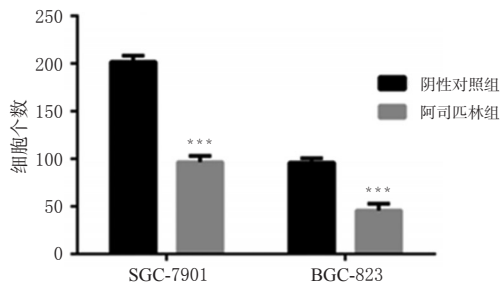


图7 阿司匹林对胃癌细胞迁移影响的显微镜图
 Fig 7 Microscopic observation of the effects of aspirin on the migration of gastric cancer cells



注:与阴性对照组比较,*** $P < 0.001$

Note: vs. negative control group, *** $P < 0.001$

图8 阿司匹林对胃癌细胞迁移影响的统计结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 8 Statistical analysis of the effects of aspirin on the migration of gastric cancer cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

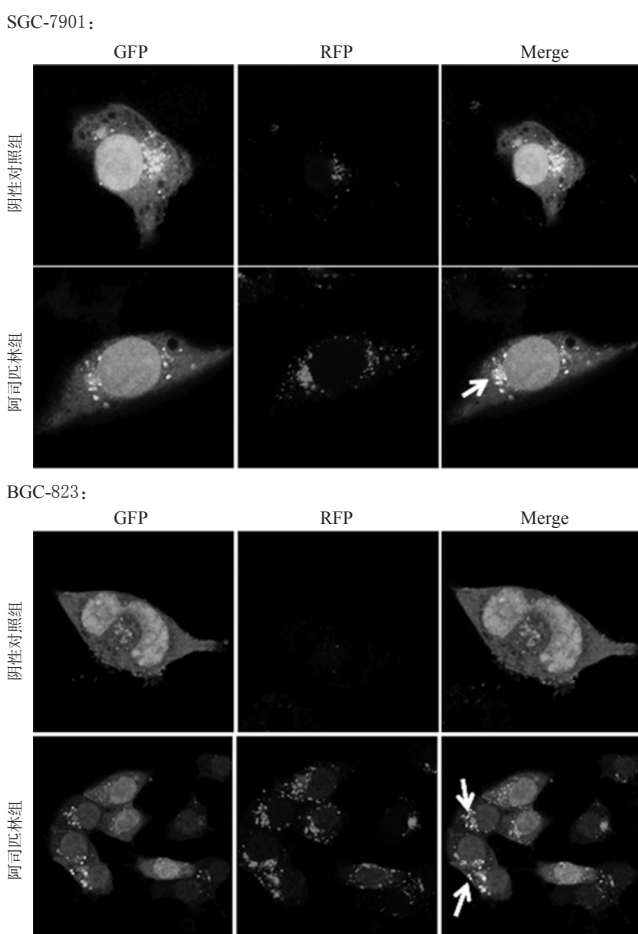


图9 阿司匹林对胃癌细胞内自噬体的影响($\times 690$)

Fig 9 Effects of aspirin on intracellular autophagy lysosome ($\times 690$)

化学药物治疗是肿瘤治疗的重要方法之一,目前临床常用的抗肿瘤药物普遍存在副作用大、毒性强、价格昂贵等短板,而新抗肿瘤药物的研发耗时长、投入大,因此老药新用的研究也是寻找抗肿瘤药物治疗的新途径。据Lancet杂志报道,每天服用75~300 mg阿司匹林能够在3年内将癌症的发病率减少1/4,在5年内将癌

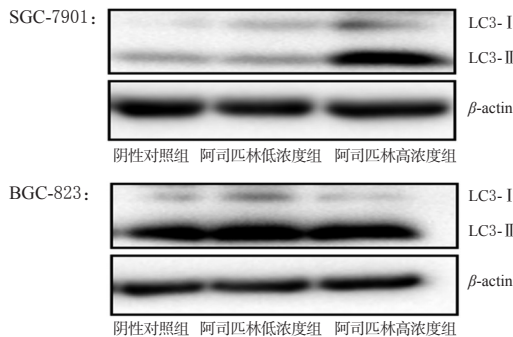
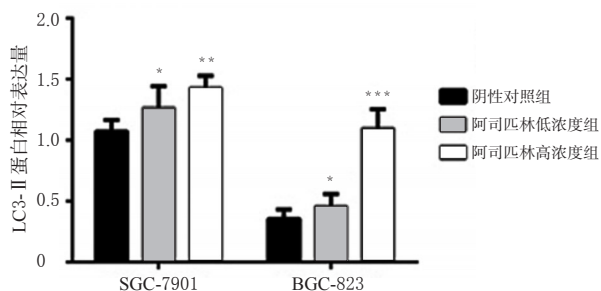


图10 阿司匹林对胃癌细胞内LC3-II蛋白表达影响的电泳图

Fig 10 Electrophoregram of the effects of aspirin on the protein expression of LC3-II in gastric cancer cells



注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$

Note: vs. negative control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图11 阿司匹林对胃癌细胞内LC3-II蛋白表达影响的统计结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 11 Statistical graph of the effects of aspirin on the protein expression of LC3-II in gastric cancer cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

症相关的病死率降低15%^[10]。在2017年NCCN结肠癌治疗指南中,也建议将阿司匹林作为一级预防用药^[11]。虽然如此,但很多地区仍然未提出将阿司匹林作为癌症预防用药,主要原因是阿司匹林的作用机制尚不明确,仍处于研究阶段;怎么减少其副作用的发生以及找出其安全有效的确切治疗剂量是目前面临的问题。本研究首先采用MTT法和Transwell小室试验证实了阿司匹林能够抑制胃癌细胞的生长和降低细胞的迁移能力。流式细胞术检测细胞周期结果表明,阿司匹林能够显著诱导细胞周期阻滞在G₁期。但流式细胞术检测细胞凋亡和Hoechst33258染色结果都表明阿司匹林在48 h内不能诱导细胞凋亡,其可能机制还需进一步研究。

已有研究表明,阿司匹林的抗肿瘤作用机制有以下几个:(1)选择性地抑制环氧酶2(COX-2)的表达,从而导致胃蛋白酶原(PG)的合成受阻,抑制肿瘤细胞的增殖、肿瘤血管的生成以及侵袭或转移^[12];(2)阿司匹林可上调B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)相关X蛋白Bax基因的表达并抑制Bcl-2基因的表达^[13]。本研究还发现,阿司匹林可

激活自噬抑制肿瘤的生长,诱导细胞周期抑制。氯喹可抑制自噬体与溶酶体融合,3-MA能抑制自噬小体的形成,因此自噬抑制剂氯喹和3-MA常用来探讨自噬流的发生^[14]。本研究中笔者利用阿司匹林联合氯喹和3-MA共同处理胃癌细胞后发现,氯喹和3-MA能明显逆转阿司匹林对胃癌细胞G₁期的阻滞作用。另外,LC3-I是LC3-II的前体,自噬形成时,胞浆型LC3-I会酶解掉一小段多肽转变为LC3-II,所以LC3-II蛋白定位于前自噬体和自噬体,随自噬体膜的增多而增加,故LC3-II常作为自噬的标志物^[15]。笔者利用mRFP-GFP-LC3标记及追踪LC3,发现当自噬激活时,溶酶体与自噬小体的融合形成自噬溶酶体,在激光共聚焦扫描显微镜可出现黄色斑点^[16]。本研究结果表明,与阴性对照组比较,胃癌细胞经阿司匹林处理后自噬明显增强。Western blot法也证实阿司匹林组LC3-II蛋白的表达水平比阴性对照组明显增加,这与前人报道的阿司匹林能够激活结肠癌细胞和肝癌细胞自噬从而抑制细胞生长的结果一致^[17-18]。

为进一步探讨阿司匹林诱导胃癌细胞周期阻滞是否与其激活自噬有关,笔者利用阿司匹林联合氯喹和3-MA共同处理胃癌细胞,结果显示,与阿司匹林单用比较,氯喹、3-MA能够减少阿司匹林对胃癌细胞G₁期的阻滞作用,提示阿司匹林通过激活自噬导致胃癌细胞G₁期阻滞从而发挥抑制胃癌细胞生长的作用。近年来有多项研究表明,肿瘤细胞自噬与Akt/mTOR信号通路有着密切关系^[19-20]。因此以后的研究工作将探讨阿司匹林激活自噬致使细胞周期阻滞在G₁期的作用机制是否与抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路活性有关,以进一步阐明其分子作用机制,为阿司匹林的临床应用提供依据。

参考文献

[1] TORRE LA, BRAY F, SIEGEL RL, et al. Global cancer statistic, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.

[2] CHEN W, ZHENG R, BAADA PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.

[3] MARINO V, RICCARDO V, THEODOROS R, et al. Gastric cancer: epidemiology, prevention, and therapy[J]. *Helicobacter*, 2018. DOI: 10.1111/hel.12518.

[4] ZENG XQ, WANG J, CHRN SY. Methylation modification in gastric cancer and approaches to targeted epigenetic therapy (Review)[J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(6): 1921-1933.

[5] DAVIDE C, ROANA M, MARCO V, et al. Aspirin-free strategies in cardiovascular disease and cardioembolic stroke prevention[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(8): 480-496.

[6] GONG L, ZHANG D, DONG Y, et al. Integrated bioinformatical analysis for identifying the therapeutic targets of aspirin in small cell lung cancer[J]. *J Biomed Inform*, 2018. DOI: 10.1016/j.jbi.2018.11.001.

[7] EDWAID G. Aspirin and delayed chemoprevention of colorectal cancer[J]. *Clin Chem*, 2018, 64(11): 1668-1669.

[8] CHEN WY, HOLMES MD. Role of aspirin in breast cancer survival[J]. *Current Oncology Reports*, 2017. DOI: 10.1007/s11912-017-0605-6.

[9] SAUER CM, MYRAN DT, COSTENTIN CE, et al. Effect of long term aspirin use on the incidence of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2018. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2018.09.013.

[10] BURN J, GERDES AM, MACRAE F, et al. Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomised controlled trial[J]. *Lancet*, 2011, 378(9809): 2081-2087.

[11] NCCN. *National comprehensive cancer network: version 2.2017* [EB/OL]. [2018-08-16]. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp.

[12] ALFONSO L, AI G, SPITALE RC, et al. Molecular targets of aspirin and cancer prevention[J]. *Br J Cancer*, 2014, 111(1): 61-67.

[13] 赵健, 曹泽毅, 廖秦平, 等. 阿司匹林对宫颈癌细胞系 Caski 的生长抑制作用[J]. *中国妇产科临床杂志*, 2003, 4(1): 37-39.

[14] HUANG YH, SUN Y, HUANG FY, et al. Toxicariocide O induces protective outophagy in a sirtuin-1-dependent manner in colorectal cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(32): 52783-52791.

[15] SCHAAF MB, KEULERS TG, VOOIJS MA, et al. LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions[J]. *FASEB J*, 2016. DOI: org/10.1096/fj.201600698R.

[16] WANG Y, JING L, QIU Y, et al. ZSTK474, a specific class I phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, induces G₁ arrest and autophagy in human breast cancer MCF-7 cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(15): 19897-19909.

[17] DIN FVN, VALANCIUTE A, HOUDE VP, et al. Aspirin inhibits mTOR signaling, activates AMP-activated protein kinase, and induces autophagy in colorectal cancer cells [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(7): 1504-1515.

[18] ZHAO Q, WANG Z, WANG Z, et al. Aspirin may inhibit angiogenesis and induce autophagy by inhibiting mTOR signaling pathway in murine hepatocarcinoma and sarcoma models[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(4): 2804-2810.

[19] 周运生, 王凤泽. 蛋白激酶 B 抑制剂 CCT128930 对人骨肉瘤 U2-OS 细胞凋亡与自噬的影响[J]. *中国药房*, 2016, 27(13): 1767-1770.

[20] KIMMELMAN AC, WHITE E. Autophagy and tumor metabolism[J]. *Cell Metabolism*, 2017, 25(5): 1037-1043.

(收稿日期: 2018-09-16 修回日期: 2019-01-17)

(编辑: 邹丽娟)