

帕瑞昔布对非小细胞肺癌细胞株 A549 黏附能力和 CD44v6 表达的影响

刘晨辉¹, 苗文静², 张宗泽¹

1. 武汉大学中南医院麻醉科, 湖北 武汉 430000; 2. 武汉市第三医院麻醉科, 湖北 武汉 430000

摘要: **目的** 研究帕瑞昔布对非小细胞肺癌细胞株 A549 细胞黏附能力和 CD44v6 表达的影响,探讨其对肿瘤细胞转移行为的可能影响及机制。**方法** 体外培养 A549 细胞,取对数生长期的 A549 细胞,采用随机数字表法将其分为 4 组:对照组(C 组),10 $\mu\text{mol/L}$ 帕瑞昔布组(P_1 组)、40 $\mu\text{mol/L}$ 帕瑞昔布组(P_2 组)和 160 $\mu\text{mol/L}$ 帕瑞昔布组(P_3 组)。C 组细胞正常培养, P_1 、 P_2 和 P_3 组细胞分别加入 10、40 和 160 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的帕瑞昔布处理 A549 细胞 24 h。纤维连接蛋白包被法检测各组细胞的黏附率,Western blot 法检测各组细胞 CD44v6 的表达情况,其水平以条带灰度值/内参灰度值表示。**结果** 与 C 组 A549 细胞的黏附率 $[(90.52 \pm 6.62)\%]$ 比较, P_1 组 $[(77.38 \pm 4.93)\%]$ 、 P_2 组 $[(68.22 \pm 5.71)\%]$ 和 P_3 组 $[(55.01 \pm 6.24)\%]$ 依次降低,呈剂量依赖关系($P < 0.05$);与 C 组 A549 细胞 CD44v6 蛋白的表达水平 (0.81 ± 0.15) 比较, P_1 组 (0.54 ± 0.13) 、 P_2 组 (0.39 ± 0.09) 和 P_3 组 (0.15 ± 0.04) 水平依次下调,呈剂量依赖关系($P < 0.05$)。**结论** 帕瑞昔布可以降低非小细胞肺癌细胞株 A549 的黏附率,其机制可能与下调 CD44v6 的表达有关。

关键词: 帕瑞昔布; 非小细胞肺癌; 细胞黏附; CD44v6; 肿瘤转移

中图分类号: R 734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2016)02-0182-04

Effects of parecoxib on adhesion ability of non-small cell lung cancer cell line A549 and expression of CD44v6

LIU Chen-hui*, MIAO Wen-jing, ZHANG Zong-ze

* Department of Anesthesiology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430000, China

Corresponding author: ZHANG Zong-ze, Email: zhangzz_0301@126.com

Abstract: Objective To study the effect of parecoxib on adhesion ability of non-small cell lung cancer cell line A549 and CD44v6 expression in A549 cells and explore its potential influence on metastatic behavior of tumor cells and the mechanism. **Methods** After being cultured in vitro, A549 cells in logarithmic growth phase were divided into 4 groups by random number table method: control group (C group), 10 $\mu\text{mol/L}$ parecoxib group (P_1 group), 40 $\mu\text{mol/L}$ parecoxib group (P_2 group) and 160 $\mu\text{mol/L}$ parecoxib group (P_3 group). The cells in C group were normally cultured. The cells in P_1 , P_2 and P_3 groups were cultured in the culture medium containing 10, 40 and 160 $\mu\text{mol/L}$ parecoxib, respectively. After being cultured for 24 hours, cell adhesion rate was detected by fibronectin coated method, and CD44v6 relative expression level (ratio of band gray-scale value to internal reference gray-scale value) was detected by Western blot method. **Results**

Compared with C group $[(90.52 \pm 6.62)\%]$, the adhesion rate of A549 cells in P_1 group $[(77.38 \pm 4.93)\%]$, P_2 group $[(68.22 \pm 5.71)\%]$ and P_3 group $[(55.01 \pm 6.24)\%]$ decreased in turn with dose-dependent manner ($P < 0.05$). Compared with C group (0.81 ± 0.15) , the CD44v6 protein expression levels in P_1 group (0.54 ± 0.13) , P_2 group (0.39 ± 0.09) and P_3 group (0.15 ± 0.04) were down-regulated in turn with dose-dependent manner ($P < 0.05$). **Conclusion** Parecoxib can decrease the adhesion rate of A549 cells, and the mechanism may be associated with down-regulating the expression of CD44v6.

Key words: Parecoxib; Non-small cell lung cancer; Cell adhesion; CD44v6; Tumor metastasis

肺癌是目前世界范围内发病率和病死率最高的恶性肿瘤,治疗以外科手术为主,但约有 50% ~ 90%

的患者于术后 1 年内复发或者转移,90% ~ 95% 的患者于术后 5 年内复发或者转移。肿瘤切除术的围术期是肿瘤细胞转移的高危时期^[1]。影响肿瘤细胞转移行为的因素有很多,其中细胞黏附参与整个过程并

起关键作用^[2],介导细胞黏附的是一大类细胞黏附分子,CD44 是其中一种。CD44 尤其是其变异体 CD44v6 在非小细胞肺癌等肿瘤细胞表面高表达,在肿瘤细胞的黏附和转移过程中发挥重要作用^[3]。近年来的研究表明,围术期应用 COX-2 抑制剂可以减少肿瘤细胞的增殖、扩散和转移^[4-5]。帕瑞昔布为新型的高选择性 COX-2 抑制剂,是麻醉医师在围术期常用的镇痛药物,其对非小细胞肺癌 A549 细胞黏附的影响尚不清楚。本研究拟观察不同浓度的帕瑞昔布对 A549 细胞黏附的影响,并探讨其对肿瘤细胞转移行为的可能影响及机制。

1 材料与方法

1.1 材料 RPMI-1640 培养基,胎牛血清(Fetal Calf Serum, FCS)购自美国 Gibco 公司;帕瑞昔布为美国 Pfizer 公司产品(批号:A24R8)。胰蛋白酶、二甲基亚砜(Dimethyl Sulfoxide, DMSO)、牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)为美国 Sigma 公司产品;纤维连接蛋白购自美国 BD Biocoat 公司;鼠抗人 CD44v6 单克隆抗体及相应二抗购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞系及培养 A549 细胞购自中科院上海细胞库。细胞培养于含 10% FCS、青霉素(100 U/ml)、链霉素(100 μ g/ml)、谷氨酸盐(2 mmol/L)的 RPMI-1640 培养基中。于 37℃、饱和湿度下 5% CO₂ 的培养箱中培养,每隔 2~3 d 用 0.25% 胰酶消化,以 1:3 传代 1 次。实验均取处于对数生长期的细胞。

1.2.2 实验分组与处理 取对数生长期的 A549 细胞,采用随机数字表法,将其分为 4 组:对照组(C 组)、10 μ mol/L 帕瑞昔布组(P₁ 组)、40 μ mol/L 帕瑞昔布组(P₂ 组)和 160 μ mol/L 帕瑞昔布组(P₃ 组)。将 A549 细胞培养于 24 孔板,其中 C 组细胞培养基中加入 1% 的 DMSO, P₁ 组、P₂ 组和 P₃ 组细胞培养基中分别加入用 1% DMSO 配制的终浓度为 10 μ mol/L、40 μ mol/L 和 160 μ mol/L 的帕瑞昔布溶液。四组细胞均于 37℃、饱和湿度下 5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h。

1.2.3 细胞黏附实验 于培养后 24 h,每组分别收集 6 个复孔的 A549 细胞,采用纤维连接蛋白包被法对各组细胞的黏附率进行检测。用不含 FCS 的 RPMI-1640 培养基将纤维连接蛋白稀释至 20 mg/L,按照 100 μ l/孔分别加入 96 孔板。将 96 孔板放置于超净工作台过夜风干,第 2 天放置于 4℃ 冰箱内。使用前吸出培养板中残余液体,每孔加入 1% BSA 培

养液 100 μ l, 37℃ 下封闭水化 30 min,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次。收集各组细胞,用含 0.1% BSA 的 RPMI-1640 洗涤细胞并制备成浓度为 1×10^6 /ml 的细胞悬液。分别将 100 μ l 细胞悬液加入上述已包被好的 96 孔板中,于 37℃、饱和湿度下、5% CO₂ 的培养箱中继续孵育 1 h。弃去各孔培养基, PBS 轻轻冲洗掉未黏附的细胞, 10 min $\times$ 3 次。弃去 PBS 后每孔加入噻唑蓝(MTT) 20 μ l,继续孵育 4 h。弃去 MTT,每孔加入 150 μ l DMSO,孵育 30 min。用酶标仪在 490 nm 处测定各孔吸光度(OD)值。采用以下公式计算每孔细胞黏附率:黏附率 = [(各处理孔黏附细胞 OD 值 $\div$ 对照孔黏附细胞 OD 值) - 1] $\times$ 100%。

1.2.4 Western blot 法检测 CD44v6 蛋白的表达 于培养后 24 h,每组分别收集 6 个复孔的 A549 细胞,采用 Western blot 法检测 CD44v6 蛋白的表达。取处理后的 A549 细胞,加入 RIPA 裂解液,冰浴 30 min。12 000 r/min, 4℃,离心 5 min,取上清液,分光光度计测定蛋白含量, -80℃ 冰箱内保存备用。灌制浓缩胶和分离胶,将蛋白样品于 125 V 电压下电泳 90 min 后转膜, 5% 脱脂奶粉 37℃ 封闭 2 h,加入鼠抗人 CD44v6 单克隆抗体(1:1 000 稀释), 4℃ 过夜。TTBS 冲洗 10 min $\times$ 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:500 稀释),室温下孵育 2 h, TTBS 冲洗 10 min $\times$ 3 次,转入暗室加 ECL 发光液后贴附于 X 线胶片曝光显影。Image-pro plus 5.02 图像分析软件扫描并分析条带灰度,结果以样品条带灰度值/内参灰度值表示。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 法(q 检验)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

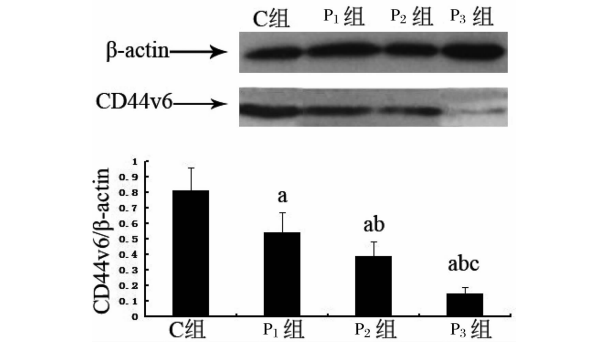
2.1 不同浓度帕瑞昔布对 A549 细胞黏附的影响 纤维连接蛋白包被法结果显示,与 C 组 A549 细胞的黏附率 [(90.52 $\pm$ 6.62)%] 比较, P₁ 组 [(77.38 $\pm$ 4.93)%]、P₂ 组 [(68.22 $\pm$ 5.71)%] 和 P₃ 组 [(55.01 $\pm$ 6.24)%] 依次降低,呈剂量依赖关系 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 不同浓度帕瑞昔布对 A549 细胞 CD44v6 表达的影响 Western blot 条带行灰度扫描分析细胞上清液中 CD44v6 蛋白的表达水平(图 1):与 C 组 A549 细胞 CD44v6 蛋白(0.81 $\pm$ 0.15)比较, P₁ 组(0.54 $\pm$ 0.13)、P₂ 组(0.39 $\pm$ 0.09)和 P₃ 组(0.15 $\pm$ 0.04)的表达依次降低,呈剂量依赖关系 ($P < 0.05$)。

表 1 不同浓度帕瑞昔布对 A549 细胞黏附能力的影响 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞黏附率(%)
C 组	90.52 ± 6.62
P ₁ 组	77.38 ± 4.93 ^a
P ₂ 组	68.22 ± 5.71 ^{ab}
P ₃ 组	55.01 ± 6.24 ^{abc}

注:与 C 组比较,^a*P* < 0.05;与 P₁ 组比较,^b*P* < 0.05;与 P₂ 组比较,^c*P* < 0.05。



注:β-actin 为内参;与 C 组比较,^a*P* < 0.05;与 P₁ 组比较,^b*P* < 0.05;与 P₂ 组比较,^c*P* < 0.05。

图 1 不同浓度帕瑞昔布对 A549 细胞 CD44v6 表达水平的影响 (n=6)

3 讨论

肺癌在我国的发生率高居各种恶性肿瘤之首,其中非小细胞肺癌约占 80%。非小细胞肺癌的治疗以手术为主,但是术后转移率高,5 年生存率低^[6]。围术期是肿瘤细胞转移的高危时期。新近的研究发现,围术期应用 COX-2 抑制剂可以减少肿瘤的增殖、扩散和转移^[4-5]。Glasner 等^[7]的一项动物实验表明,在 Lewis 肺癌的小鼠模型中,围术期使用 COX-2 抑制剂可以明显减少肿瘤切除术中肿瘤细胞的转移,提高小鼠的术后生存率。Benish 等^[5]的另一项动物实验提示,围术期应用 COX-2 抑制剂可以明显减少肿瘤细胞转移的风险。这些研究都提示围术期合理地应用 COX-2 抑制剂,可以减少手术因素引起的肿瘤细胞的转移。帕瑞昔布是一种新型的 COX-2 抑制剂,是麻醉医师在围术期经常使用的镇痛药物。根据 Hullett 等^[8]的报道,并结合预实验的结果,本研究选取帕瑞昔布作用于 A549 细胞的终浓度为 10、40 和 160 μmol/L。帕瑞昔布的半衰期为 8 h,围术期主要用于术后 24 h 内镇痛,因此本研究采用帕瑞昔布作用于 A549 细胞 24 h。

肿瘤细胞的转移是一个多步骤且极其复杂的过程,而细胞黏附参与肿瘤细胞转移的全过程,并起关键作用。细胞黏附不仅包括肿瘤细胞与肿瘤细胞的黏附,还包括肿瘤细胞与胞外基质,肿瘤细胞与血管

内皮细胞,肿瘤细胞与白细胞以及肿瘤细胞与宿主细胞的黏附^[9]。介导细胞黏附过程的是一大类黏附分子,其中 CD44 在介导细胞黏附过程中起重要作用。CD44 是存在于细胞表面的一种跨膜受体糖蛋白,其生物学特性主要表现为:(1)与细胞外基质中含量丰富的透明质酸、硫酸软骨素、纤维连接蛋白等多种配体相结合,介导细胞与细胞之间、细胞与胞外基质之间特异性的黏附过程;(2)参与淋巴细胞的黏附和迁移,对淋巴细胞的归巢起“向导”作用;(3)参与形成细胞的伪足,与细胞运动密切相关^[10]。含有变异拼接外显子的 CD44 统称为 CD44v (variance from CD44),目前通过 PCR 等技术已经发现了十多种 CD44v。大量的研究表明,许多恶性肿瘤细胞的表面存在异常表达的 CD44,尤其是 CD44v6,且与肿瘤的发生和发展密切相关。Joo 等^[11]发现 CD44 的表达在胃癌的发展中起重要作用,特别是 CD44v6,对于胃癌的淋巴结转移有预测作用。Koyama 等^[12]的研究提示,在原发性和转移性结肠癌或结肠腺瘤组织中,CD44v6 基因高表达,而正常的结肠黏膜组织中,CD44v6 的基因表达微弱或者测不到。Ko 等^[13]研究了 82 例非小细胞肺癌患者,结果表明 91.7% 的患者 CD44 表达量增高,且高表达的 CD44 与淋巴结转移密切相关。

本研究结果表明, A549 细胞经 10、40 和 160 μmol/L 的帕瑞昔布处理 24 h 后,黏附率依次降低,提示帕瑞昔布可以抑制 A549 细胞的黏附; CD44v6 蛋白的表达水平依次降低,提示帕瑞昔布抑制 A549 细胞黏附的机制可能与帕瑞昔布下调 CD44v6 蛋白的表达有关。

参考文献

[1] Kaneko M, Sasaki S, Ishimaru K, et al. The impact of perioperative allogeneic blood transfusion on survival in elderly patients with colorectal cancer[J]. Anticancer Res, 2015, 35(6): 3553-3558.

[2] Oliveira-Ferrer L, Kürschner M, Labitzky V, et al. Prognostic impact of transcription factor Fra-1 in ER-positive breast cancer: contribution to a metastatic phenotype through modulation of tumor cell adhesive properties[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2015, 141(10): 1715-1726.

[3] Wang W, Dong LP, Zhang N, et al. Role of cancer stem cell marker CD44 in gastric cancer: a meta-analysis[J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(12): 5059-5066.

[4] Neeman E, Zmora O, Ben-Eliyahu S. A new approach to reducing postsurgical cancer recurrence: perioperative targeting of catecholamines and prostaglandins[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(18): 4895-4902.

性耐药。另外,抗菌药物都有副作用,多种抗菌药物联用可以造成副作用的叠加,使患者身体受损虚弱,从而更易感染产耐药酶的肺炎克雷伯菌。

本研究单因素结果显示第一代头孢和第三代头孢可增加产耐药酶肺炎克雷伯菌感染的几率,考虑为患者入院后的经验性用药所致肺炎克雷伯菌的选择压力增大,从而产生耐药酶。另外,感染前使用大量抗菌药物,可导致大量敏感细菌被杀灭,造成耐药菌大量增殖而成优势菌,如本次调查的第一代头孢和第三代头孢是产耐药酶肺炎克雷伯菌的诱导剂^[13]。故临床上需合理使用抗菌药物,减少抗菌药物的经验性用药,而根据药敏及培养结果针对性用药,以降低细菌产生耐药酶的几率。

综上所述,年龄大、住院时间长为呼吸科患者感染产耐药酶肺炎克雷伯菌的主要高危人群,应列为呼吸科防治感染产耐药酶肺炎克雷伯菌的重点对象,早期识别产酶菌的危险因素,有利于院内耐药菌感染的预防和控制。

参考文献

[1] 王玉红,邓敏,曾吉.肺炎克雷伯菌耐药机制研究进展[J]. 中华医院感染学杂志,2007,17(4):478-480.

[2] 中华人民共和国卫生部.医院感染诊断标准(试行)[J]. 中华医学杂志,2001,81(5):314-320.

[3] 陆婷,王宝涵,庞来祥.医院感染重点科室现患率调查与分析[J]. 中华医院感染学杂志,2013,23(13):3077-3079.

[4] Borer A, Saidel-Odes L, Riesenber K, et al. Attributable mortality

rate for carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae bacteremia[J]. Infect Control Hosp Epidemiol,2009,30(10):972-976.

[5] 肖书念,卓超,苏丹虹,等.2011 年中国 CHINET 克雷伯菌属细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2013,13(5):331-336.

[6] 赵德军,付维婵,胡昭宇,等.分离自下呼吸道感染患者的肺炎克雷伯菌耐药性调查[J]. 中国医药,2013,8(3):327-329.

[7] 陈刚,陈荣,邓子德,等.肺炎克雷伯菌感染部位分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2013,23(22):5562-5563,5566.

[8] Wu D, Cai J, Liu J. Risk factors for the acquisition of nosocomial infection with carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae[J]. South Med J,2011,104(2):106-110.

[9] 吴世木,谢光云,钱耀先,等.产超广谱 β -内酰胺酶肺炎克雷伯菌的耐药性及产酶因素分析[J]. 中华医院感染学杂志,2013,23(18):4527-4528,4524.

[10] Hussein K, Sprecher H, Mashiach T, et al. Carbapenem resistance among Klebsiella pneumoniae isolates; risk factors, molecular characteristics, and susceptibility patterns[J]. Infect Control Hosp Epidemiol,2009,30(7):666-671.

[11] 俞锡灿,朱美英,张筱蓉. ICU 产超广谱 β -内酰胺酶细菌医院感染危险因素及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2010,20(8):1177-1179.

[12] 邹存丽.滥用抗生素容易导致耐药性[J]. 中国实用医药,2012,7(19):182-183.

[13] 陈弘群,余荣环,程玉,等.产 ESBLs 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌医院感染危险因素及耐药性分析[J]. 临床肺科杂志,2005,10(4):506-507.

收稿日期:2015-09-06 修回日期:2015-10-16 编辑:石嘉莹

(上接第 184 页)

[5] Benish M, Bartal I, Goldfarb Y, et al. Perioperative use of β -blockers and COX-2 inhibitors may improve immune competence and reduce the risk of tumor metastasis[J]. Ann Surg Oncol,2008,15(7):2042-2052.

[6] VanderMeer R, Chambers S, Van Dam A, et al. Diagnosing lung cancer in the 21st century; are we ready to meet the challenge of individualized care? [J]. Curr Oncol,2015,22(4):272-278.

[7] Glasner A, Avraham R, Rosenne E, et al. Improving survival rates in two models of spontaneous postoperative metastasis in mice by combined administration of a beta-adrenergic antagonist and a cyclooxygenase-2 inhibitor[J]. J Immunol,2010,184(5):2449-2457.

[8] Hullett B, Salman S, O, Halloran SJ, et al. Development of a population pharmacokinetic model for parecoxib and its active metabolite valdecoxib after parenteral parecoxib administration in children[J]. Anesthesiology,2012,116(5):1124-1133.

[9] Negi LM, Talegaonkar S, Jaggi M, et al. Role of CD44 in tumour pro-

gression and strategies for targeting[J]. J Drug Target,2012,20(7):561-573.

[10] 彭挺生,丘钜世,李智,等. CD44 对骨肉瘤细胞增殖、黏附和侵袭性的影响[J]. 中华病理学杂志,2005,34(6):362-366.

[11] Joo M, Lee HK, Kang YK, et al. Expression of E-cadherin, beta-catenin, CD44s and CD44v6 in gastric adenocarcinoma; relationship with lymph node metastasis[J]. Anticancer Res,2003,22(2B):1581-1588.

[12] Koyama S, Maruyana T, Adachi S. Expression of epidermal growth factor receptor and CD44 splicing variants sharing exons 6 and 9 on gastric and esophageal carcinomas; a two-color flow-cytometric analysis[J]. J Cancer Res Clin Oncol,1999,125(1):47-54.

[13] Ko YH, Won HS, Jeon EK, et al. Prognostic significance of CD44s expression in resected non-small cell lung cancer[J]. BMC Cancer,2011,11:340.

收稿日期:2015-09-01 编辑:周永彬