

COX-2 抑制剂对人红白血病 HEL 细胞增殖、凋亡及迁移的影响

赵亚玲^{1,2}, 刘贵敏^{1,2}, 梁文同^{2*}, 成志勇^{2*}, 谢旭磊², 谷 蕾², 李 琳², 颜晓燕²

(¹承德医学院研究生院, 河北 承德 067000; ²保定市第一医院血液内科, 河北 保定 071000)

[摘要] 目的:探讨环氧化酶(cyclooxygenase-2, COX-2)抑制剂塞来昔布对人红白血病 HEL 细胞增殖、凋亡及迁移的影响及其作用机制。方法:不同浓度的塞来昔布处理 HEL 细胞, CCK-8 法检测细胞增殖抑制率; Hoechst33342 荧光染色检测细胞凋亡; Transwell 小室检测细胞迁移率; RT-PCR 检测 COX-2 及 JAK2 mRNA 水平; Western blot 检测 COX-2 及 p-JAK2 蛋白表达。结果:塞来昔布能够时间和剂量依赖性抑制 HEL 细胞增殖, 不同浓度(25、75、125 $\mu\text{mol/L}$)的塞来昔布在 48 h 时对细胞生长抑制率分别为(9.96 \pm 0.82)%、(18.46 \pm 2.01)%、(21.36 \pm 2.48)% ($P < 0.05$); Hoechst33342 凋亡细胞染色显示 125 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布处理 HEL 细胞后, 凋亡细胞明显增多; 细胞迁移实验结果显示 75 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布处理细胞 24 h 后漏出细胞为(22.13 \pm 7.51)个, 明显低于对照组(77.89 \pm 6.94)个, $P < 0.05$; RT-PCR 结果显示不同浓度塞来昔布处理 HEL 细胞 48 h 后 COX-2 mRNA 呈剂量依赖性减低, 而对 JAK2 mRNA 无明显影响; Western blot 结果显示塞来昔布处理 HEL 细胞 COX-2 蛋白表达明显减低($P < 0.05$), 而对 p-JAK2 无明显影响。结论:塞来昔布能够抑制 HEL 细胞增殖, 可能与抑制 COX-2 表达有关, 而对 JAK2 信号通路无明显影响。

[关键词] 塞来昔布; HEL 细胞系; COX-2; JAK2

[中图分类号] R733.43

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)04-435-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20160411

Effects of COX-2 inhibitor on proliferation, apoptosis and migration of human erythroleukemia HEL cells

Zhao Yaling^{1,2}, Liu Guimin^{1,2}, Liang Wentong^{2*}, Cheng Zhiyong^{2*}, Xie Xulei², Gu Lei², Li Lin², Yan Xiaoyan²
(¹Graduate School of Chengde Medical College, Chengde 067000; ²Department of Hematology, the First Hospital of Baoding, Baoding 071000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate COX-2 inhibitor effect of celecoxib on proliferation, apoptosis and migration of human erythroleukemia HEL cells and its mechanism. **Methods:** The human erythroleukemia HEL cells were treated with different concentrations of celecoxib. The cell proliferation inhibition rate was calculated by CCK-8 test; the apoptosis rate was detected by Hoechst33342 fluorescent staining; cell migration ability was tested by transwell chambers. The expression levels of COX-2 and JAK2 mRNA were detected by Real-time PCR; the protein expression levels of COX2 and p-JAK2 were detected by Western blotting assay. **Results:** Celecoxib time and dose dependently inhibited the proliferation of HEL cells, the cell growth inhibition rates were (9.96 \pm 0.82)%, (18.46 \pm 2.01)% and (21.36 \pm 2.48)%, respectively ($P < 0.05$), after treated with different concentrations (25, 75, and 125 $\mu\text{mol/L}$, respectively) of celecoxib in HEL cells after 48 h. Hoechst33342 fluorescent staining showed that apoptosis increased significantly after treatment of 125 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib in HEL cells after 48 h; cell migration ability showed that the leakage after treated with 75 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib in HEL cells after 24 h was 22.13 \pm 7.51, which was significantly lower than that of the control group (77.89 \pm 6.94, $P < 0.05$); RT-PCR results showed that COX-2 mRNA was dependently decreased, while no significant effect on the JAK2 mRNA after treated with different concentrations of celecoxib; Western blotting assay showed that the expression of COX-2 protein in the experimental group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$), but no obvious effect was found on p-JAK2 expression. **Conclusion:** Proliferation of HEL cells can be inhibited by celecoxib. It may be related to the inhibition of the expression of COX-2, but had no obvious effect on JAK2 signaling pathway.

[Key words] celecoxib; human erythroleukemia cell line; COX-2; JAK2

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(04):435-439]

[基金项目] 河北省重点研发科技项目(162777120D); 保定市科学技术研究与发展指导计划(12ZF105)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: liangwentong1967@sina.com; dzczy@sohu.com

血管新生是指在多种促血管新生因子如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)等作用下, 内皮细胞增殖、迁移, 在原有血管基础上形成新的毛细血管网^[1]。研究表明部分血液系统恶性肿瘤的发生发展及预后与骨髓血管新生程度及其调控因子密切相关^[2]。COX-2 在包括恶性血液病在内的多种肿瘤中表达增加, JAK/STAT 信号通路的激活能使 COX-2 过表达, 诱发肿瘤增殖及血管新生^[3]。

环氧化酶是花生四烯酸代谢过程中前列腺素合成的限速酶^[3], 有 COX-1 和 COX-2 两种同工酶。塞来昔布(celecoxib)是第一个高效的 COX-2 特异性抑制剂, 对肿瘤的发生、发展和转移均有抑制作用。已证实塞来昔布对人多种实体肿瘤及造血肿瘤细胞具有明显的抗增殖效应^[4], 而 COX-2 及 JAK2 信号通路相互作用尚无相关报道。

HEL 细胞为人红白血病细胞, 具有 JAK2-STAT5 信号通路活化, 同时存在骨髓增殖性肿瘤常见的 JAK2V617F 点突变, 是白血病及骨髓增殖性肿瘤常用细胞系。本实验以 COX-2 特异抑制剂——塞来昔布作用于 HEL 细胞, 观察其对该细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用, 以及对 JAK2 信号通路的影响, 为应用 COX-2 抑制剂治疗恶性血液病提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人红白血病细胞系(HEL 细胞)是 JAK2V617F 突变阳性细胞, 购自上海科学院细胞库。用含 10% 新生牛血清(FBS), 加入 RPMI1640 培养基培养; 均在 37℃、5%CO₂ 饱和湿度环境培养。根据细胞生长状况, 2~3 d 换液 1 次, 取对数生长期细胞进行实验。

RPMI1640(Gibico 公司, 美国), 新生牛血清(杭州四季青公司), 荧光染料 Hoechst33342(Sigma 公司, 美国), 塞来昔布、CCK-8(同仁化学研究所, 日本), 引物(北京赛百胜公司), COX-2 和 p-JAK2 兔抗人多克隆抗体、HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体(Santa Cruz 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

将对数期细胞分为实验组和对照组, 实验组加入不同浓度的塞来昔布(25、75、125 μmol/L), 对照组不加塞来昔布。每次实验均重复 3 次。

1.2.2 细胞增殖抑制曲线

将不同浓度处理组 HEL 细胞培养不同时间, 同

时设阴性对照组及空白对照组; 在 96 孔板中接种处理好的细胞悬液(100 μL/孔), 每孔约 5 000 个细胞, 每个浓度设 3 个复孔; 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液。在细胞培养箱内继续孵育 2 h 后分别用酶标仪测 450 nm 处的吸光度。根据公式: 抑制率=[(对照组吸光度-实验组吸光度)/(对照组吸光度-空白组吸光度)]×100%, 计算不同组 HEL 细胞增殖抑制率, 绘制增殖抑制曲线。

1.2.3 Hoechst33342 染色观察细胞凋亡

分别取 48 h 后对照组及 125 μmol/L 塞来昔布处理组的 HEL 细胞, 取 100 μL 细胞悬液, 加入终浓度为 10 μg/mL 的 Hoechst33342, 避光染色 15~20 min, 取 40 μL 细胞悬液滴于载玻片, 荧光显微镜下观察凋亡细胞形态。Hoechst 33342 染色后未凋亡细胞着色为淡蓝色, 细胞核内 DNA 分布均匀, 核呈圆形或卵圆形, 无固缩、变形; 而凋亡细胞核呈亮蓝色, 细胞出现凋亡, 核固缩、变形。

1.2.4 Transwell 小室迁移实验

调整细胞密度至 5×10⁵ 个/mL; 取无血清细胞悬液 100 μL 加入 Transwell 小室上室, 加入终浓度为 75 μmol/L 塞来昔布作为实验组, 不加塞来昔布组为对照组, 下室加入含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基, 24 h 后显微镜下观察迁移至下室细胞并计数。

1.2.5 流式细胞检测细胞凋亡

收集不同处理组 1×10⁶ 个细胞, PBS 洗涤 2 次, 离心 5 min, 弃上清, 加入 1 mL 预冷 70% 乙醇, 4℃ 过夜; 离心, 弃上清, PBS 洗涤 2 次; 加入 1 mL DNA 抽提缓冲液, 室温静置 30 min; 离心弃上清, 50 μg/mL 的 RNaseA 1 mL, 混匀后 37℃ 水浴 30 min; 离心弃上清, 加入 0.1 g/mL 的碘化丙啶(propidium iodide, PI) 染液, 混匀避光 30 min, 上机检测。

1.2.6 半定量 PCR(RT-PCR)

收集不同处理组 HEL 细胞, PBS 清洗 3 次, 离心弃上清, TRIzol 提取总 RNA。电泳鉴定 RNA 并定量, 根据 Vazyme Hiscript 合成试剂盒反转录合成 cDNA。PCR 反应体系 20 μL, 包括 20×SYBR Green1 染料 10 μL, 上游引物 0.5 μL, 下游引物 0.5 μL, 去离子水 32.5 μL, cDNA 5 μL, dNTP 0.5 μL, Taq 酶 1 μL。JAK2、COX-2 及 β-actin 引物如表 1。反应条件: 94℃ 变性 5 min, 94℃ 变性 45 s, 60℃ 退火 1 min, 68℃ 延伸 45 s, 40 个循环。扩增后的产物进行琼脂糖凝胶电泳, 全自动凝胶成像仪下分析。以与 β-actin 的比值代表各基因的相对表达量。

表 1 JAK2、COX-2 及 β -actin 引物序列

基因	引物序列(5'→3')	产物大小(bp)
JAK-2	F:CAGCAAGTATGATGAGCAAGCTTT R:TGAACCAGAATATTCTCGTCTCCAC	101
COX-2	F:TCACAGGCTTCCATTGACCAG R:CCGAGGCTTTTCTACCAGA	198
β -actin	F:CTGGCACCACCTTCTACAAT R:AATGTCACGCACGATTTCCTCCGC	382

1.2.7 Western blot 检测 p-JAK2、COX-2 蛋白水平

提取不同处理组细胞总蛋白,将等量的蛋白样品和上样缓冲液按适当比例混合,在沸水中煮沸 5 min 使蛋白变性,SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳使蛋白分离。将凝胶、PVDF 膜和滤纸浸入转膜缓冲液中。4℃ 100 V 恒压,转膜约 2 h。转膜完毕,取出 PVDF 膜经 5%脱脂奶粉 37℃封闭 2 h,加入一抗(COX-2 或 p-JAK2 兔抗人多克隆抗体),4℃孵育过夜。Tris-HCl 缓冲盐溶液(TBS)漂洗 5 min 3 次,加入二抗(HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体),37℃孵育 2 h,TBS 漂洗 5 min 3 次。将膜置于培养皿中,加入发光剂,显色后进行显影、定影及灰度扫描分析。

1.3 统计学方法

所有数据均用 SPSS19.00 统计软件分析处理。两样本均数比较采用 *t* 检验,多组均数比较采用方差分析,组间两两比较选用 *q* 检验。 $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 塞来昔布对 HEL 细胞增殖抑制率的影响

随着浓度增加、作用时间延长,塞来昔布对 HEL 细胞的增殖抑制效应增强,与对照组比较有显著性差异($P < 0.01$),并呈现时间和浓度依赖性。25、75、125 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布在 48 h 时对细胞生长抑制率分别为 $(9.96 \pm 0.82)\%$ 、 $(18.46 \pm 2.01)\%$ 、 $(21.36 \pm 2.48)\%$ 。各浓度间差别有统计学意义($P < 0.05$,图 1)。

2.2 Hoechst33342 荧光染色检测细胞凋亡

与对照组相比,塞来昔布处理 HEL24 及 48 h 时细胞均出现明显凋亡,并呈剂量依赖性 ($P < 0.05$,表 2 及图 2)。

2.3 塞来昔布对 HEL 细胞迁移的影响

75 $\mu\text{mol/L}$ 浓度塞来昔布处理 HEL 细胞 24 h 后在显微镜下观察漏出至下室细胞数为 (22.13 ± 7.51) 个,明显低于对照组 $[(77.89 \pm 6.94)$ 个] $(P < 0.05)$ 。

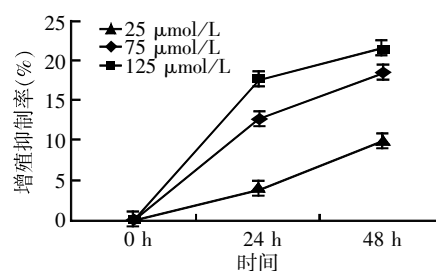


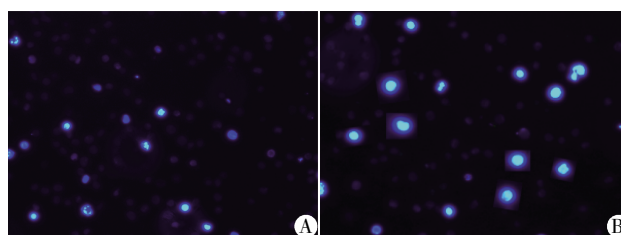
图 1 塞来昔布对 HEL 细胞抑制率的影响

Figure 1 HEL cell inhibition rate was detected by CCK-8 assay after treated with celecoxib in different concentrations for different times

表 2 Hoechst 33342 染色后不同处理组不同时间的 HEL 细胞凋亡情况

Table 2	HEL cell apoptosis was detected by Hoechst 33342 staining after treated with celecoxib in different concentrations for different times	(%, $\bar{x} \pm s$)
分组	24 h	48 h
对照组	1.57 ± 0.16	1.91 ± 0.28
25 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布处理组	$3.33 \pm 0.29^*$	$5.29 \pm 0.61^*$
75 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布处理组	$6.87 \pm 0.56^*$	$12.27 \pm 0.95^*$
125 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布处理组	$10.02 \pm 0.93^*$	$15.35 \pm 1.37^*$

与对照组比较, * $P < 0.01$ 。



A: 对照组; B: 125 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布处理组。

图 2 Hoechst33342 荧光染色检测细胞凋亡形态

Figure 2 Morphology of apoptotic cells by Hoechst33342 fluorescence staining

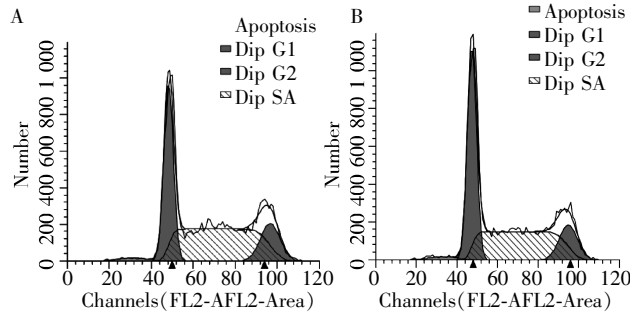
2.4 塞来昔布对 HEL 细胞晚期凋亡的影响

流式细胞检测结果显示,对照组细胞凋亡率 $(1.762 \pm 0.168)\%$ 与 125 $\mu\text{mol/L}$ 浓度塞来昔布作用于 HEL 细胞 48 h 细胞凋亡率 $(2.247 \pm 0.209)\%$ 无显著差异($P > 0.05$),未出现明显亚二倍体凋亡峰。表明该浓度塞来昔布作用 HEL 细胞 48 h,对该细胞晚期凋亡无明显影响,同时细胞周期检测结果显示,125 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布对 HEL 细胞周期亦无明显细胞周期阻滞作用(图 3)。

2.5 COX-2 抑制剂塞来昔布对 HEL 细胞 JAK2、COX-2 mRNA 及 p-JAK2、COX-2 蛋白的表达的影响

半定量 PCR 及 Western blot 检测结果显示应用塞来昔布处理后与对照组比较,COX-2 mRNA 及蛋白表达量均明显减少 ($P < 0.05$),而 JAK2 mRNA 及

p-JAK2 蛋白表达量未见明显减少,与对照组相比差异无显著性($P > 0.05$,图 4、5)。



A: 对照组; B: 125 μmol/L 塞来昔布处理组。

图 3 塞来昔布对 HEL 细胞晚期凋亡及细胞周期影响

Figure 3 Effects of celecoxib on late stage apoptosis and cells cycle of HEL cells

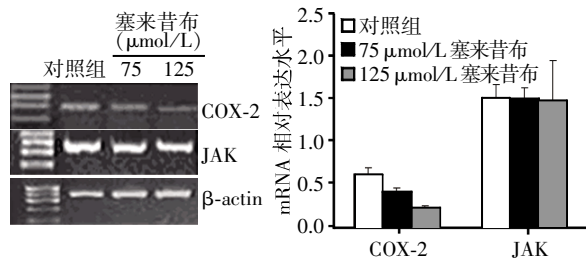


图 4 半定量 PCR 方法检测塞来昔布处理 HEL 细胞 48 h 后 JAK2、COX-2 mRNA 表达的影响

Figure 4 Expression levels of JAK2, COX-2 mRNA in HEL cells treated with celecoxib after 48 h by semi-quantitative PCR

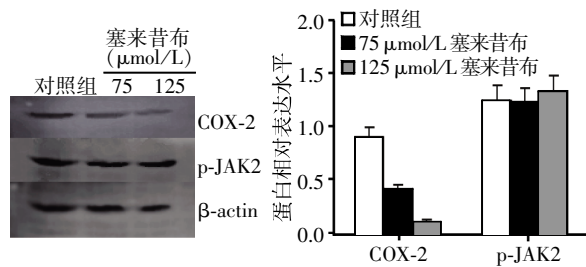


图 5 Western blot 检测塞来昔布处理 HEL 细胞 48 h 后 p-JAK2、COX-2 蛋白表达的影响

Figure 5 Expression levels of JAK2, COX-2 protein in HEL cells treated with celecoxib after 48 h by Western blot

3 讨论

COX-2 作为一种诱导型酶,在多种恶性血液系统疾病中高表达^[3],能够促进肿瘤细胞增殖、黏附、转移及血管新生^[5]。近年有研究发现 COX-2 抑制剂对多种实体肿瘤细胞具有抑制作用^[4,6]。COX-2 抑制剂发挥抗癌作用的机制有:①能够抑制肿瘤细胞生长,而对正常细胞的影响较小;②抑制肿瘤血管生

成,降低肿瘤细胞转移能力,COX-2 抑制剂同时抑制 COX-2 及 VEGF 的合成,降低肿瘤微血管密度,并抑制肿瘤的侵袭和转移^[5];③增强肿瘤细胞对放疗和化疗的反应性^[7];④增强肿瘤免疫治疗的效果^[7];⑤逆转肿瘤引起的消瘦和高钙血症^[8]。

有研究显示塞来昔布能够通过抑制 Survivin 基因的表达明显抑制急性早幼粒细胞白血病细胞株 MR2 细胞的增殖^[9]。Waskewih 等^[10]研究 COX-2 抑制剂作用于 COX-2 表达阴性的造血和上皮细胞系恶性肿瘤细胞株后对该类肿瘤仍具有显著的增殖抑制作用,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。另有研究显示应用塞来昔布处理慢性粒细胞白血病 K562 细胞株后可明显促进细胞凋亡^[11]。本实验结果提示塞来昔布能够抑制 HEL 细胞增殖及迁移,具有时间及剂量依赖性,并且其作用明显大于促细胞凋亡作用。同时分子生物学检测结果显示,塞来昔布能够明显降低 COX-2 mRNA 及蛋白水平。

HEL 细胞具有 JAK2V617F 点突变,为白血病及骨髓增殖性肿瘤常用细胞系。该突变导致 JAK2-STAT5 信号通路的持续活化,诱导细胞过度增殖。研究显示在 JAK2/STAT3 通路激活的食管癌细胞 Eca-109 细胞和结肠癌细胞系 HT-29 中,应用 JAK2 抑制剂 AG490 后伴随着 p-JAK2、p-Stat3 的表达下降,COX-2 mRNA 和蛋白的表达水平也降低,并出现了肿瘤细胞的增殖抑制和凋亡增加。因此 COX-2 可能是 JAK/STAT 信号通路的靶基因之一^[12]。而应用 COX-2 抑制剂能否影响 JAK2 尚未有定论。有研究认为 COX-2 抑制剂亦能够参与调控 JAK-STAT 信号通路^[13]。本研究显示,应用 COX-2 抑制剂后,对 JAK2 mRNA 及 p-JAK2 无明显抑制作用。

通过本研究,结果表明塞来昔布能够通过抑制 COX-2 表达水平,从而抑制 HEL 细胞增殖、迁移,而对 JAK2 信号通路无明显抑制作用,为 COX-2 抑制剂治疗恶性血液病提供了理论依据。

[参考文献]

[1] Song G, Li Y, Jiang G. Role of VEGF/VEGFR in the pathogenesis of leukemias and as treatment targets (Review)[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(6): 1935-1944

[2] 付建珠, 徐倩, 赵亚玲, 等. 干扰素抑制 JAK2V617F 阳性骨髓增殖性肿瘤血管新生的机制[J]. *中华医学杂志*, 2015, 95(46): 3727-3732

[3] Vural F, Soyer N, Hekimgil M, et al. The association between COX-2 expression and survival in myeloma patients

- [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2014,18 (15):2132-2136
- [4] Sobolewski C,Muller F,Cerella C,et al. Celecoxib prevents curcumin-induced apoptosis in a hematopoietic cancer cell model[J]. Mol Carcinog,2015,54(10):999-1013
- [5] 成志勇, Li SH, 杨琳, 等. 干扰素 α 对 JAK2V617 阳性的骨髓增殖性疾病的影响 [J]. 实用肿瘤杂志, 2008, 23(4): 318-321
- [6] Valverde A, Peñarando J, Cañas A, et al. Simultaneous inhibition of EGFR/VEGFR and cyclooxygenase-2 targets stemness-related pathways in colorectal cancer cells [J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0131363
- [7] Cahlin C, Lönnroth C, Arvidsson A, et al. Growth associated proteins in tumor cells and stroma related to disease progression of colon cancer accounting for tumor tissue PGE2 content [J]. Int J Oncol, 2008, 32(4): 909-918
- [8] Altorki NK, Keresztes RS, Port JL, et al. Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, enhances the response to preoperative paclitaxel and carboplatin in early-stage non-small-cell lung cancer [J]. J Clin Oncol, 2003, 21(14): 2645-2650
- [9] 胥 昀, 赵妍敏, 黄河, 等. 塞来昔布诱导急性早幼粒细胞白血病细胞株 MR2 凋亡及机制的研究 [J]. 浙江大学学报(医学版), 2007, 36(4): 319-324
- [10] Waskewih C, Blumenthal RD, Li HL, et al. Celecoxib exhibits the greatest potency amongst cyclooxygenase and epithelial cell lines [J]. Cancer Res, 2002, 62(7): 2029-2033
- [11] 张广森, 刘定胜. 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 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2004, 31(12): 1058-1066
- [12] Fang J, Chu L, Li C, et al. JAK2 inhibitor blocks the inflammation and growth of esophageal squamous cell carcinoma in vitro through the JAK/STAT3 pathway [J]. Oncol Rep, 2015, 33(1): 494-502
- [13] Muthian G, Raikwar HP, Johnson C, et al. COX-2 inhibitors modulate IL-12 signaling through JAK-STAT pathway leading to Th1 response in experimental allergic encephalomyelitis [J]. J Clin Immunol, 2006, 26(1): 73-85
- [收稿日期] 2015-07-26

连接号的使用

国标将连接号的形式规范为短横线“-”、一字线“—”和浪纹线“~”3种,并对三者的功能做了归并与划分:

浪纹线(数值范围号,~)用于连接计量和计数数值的起止,如:200~250 g、110~120 km/h、50~60人、1 000~3 000辆。

一字线(-),用于以下场合:标示公历世纪,年代,年份,年、月、日和时刻的起止;连接地名或方位名词,表示起止、相关或走向;标示工艺流程,也可用“→”;在表格的表身中,表示“未发现”;在图注中,为节省版面和讲求美观,可代替破折号(——)。

短横线(-),用于以下场合:连接相关的词语,构成复合结构;连接相关的字母、阿拉伯数字之类,组成化合物名称、产品型号及各种代号;连接号码,包括书号、连续出版物号、电话号码,等;用全数字式日期表示法时,间隔年月日;连接图表序号中的章节号与图表号;连接姓名中的复姓或姓与名(需要时)。