

布洛芬抑制人 NSCLC 细胞株 NCI-H460 和乳腺癌细胞株 SKBR3 增殖和转移的机制探讨

祝丽双¹, 王浩², 陈佳¹, 刘畅¹, 陆慧琪¹, 韩焕兴^{1*}

1. 第二军医大学长征医院转化医学中心, 上海 200433
2. 第二军医大学长征医院眼科, 上海 200003

[摘要] **目的** 阐述布洛芬在人非小细胞肺癌(non-small cell lung caner, NSCLC)细胞株 NCI-H460 和乳腺癌细胞株 SKBR3 中的抗增殖和抑制迁移作用,并对其机制进行探讨。**方法** 运用 MTT 法检测布洛芬作用下两种不同肿瘤细胞株的细胞增殖抑制情况;运用 Transwell 方法检测布洛芬作用下两种不同肿瘤细胞株的迁移抑制情况;运用 real-time 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)和蛋白质印迹方法分析肿瘤细胞 survivin 和 E-cadherin 的 mRNA 和蛋白表达情况。**结果** MTT 法检测结果显示,布洛芬降低了两种肿瘤细胞株的增殖,并且随着布洛芬药物浓度增高抑制增殖作用增强;Transwell 显示,2 mmol/L布洛芬作用于两种肿瘤细胞株 12 h,能够抑制肿瘤细胞株的转移;RT-PCR 和蛋白质印迹分析显示,布洛芬能够导致肿瘤细胞 survivin 的表达降低,使 E-cadherin 表达增高。**结论** 布洛芬体外能够显著抑制人非小细胞肺癌细胞株 NCI-H460 和乳腺癌细胞株 SKBR3 增殖和迁移,这一抑制作用与 survivin 表达降低和 E-cadherin 表达增高有关。

[关键词] 布洛芬;survivin;E-cadherin;肺肿瘤;乳腺肿瘤

[中图分类号] R 73-361 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)12-1327-06

Ibuprofen suppresses proliferation and metastasis of human non-small cell lung cancer cell line NCI-H460 and breast cancer cell line SKBR3

ZHU Li-shuang¹, WANG Hao², CHEN Jia¹, LIU Chang¹, LU Hui-qi¹, HAN Huan-xing^{1*}

1. Translational Medicine Center, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Ophthalmology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To investigate the inhibitory effect of ibuprofen on proliferation and migration of non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line NCI-H460 and breast cancer cell line SKBR3, and to discuss the possible mechanism. **Methods** MTT method was used to detect the proliferation inhibition of the two cancer cell lines after ibuprofen treatment for 24, 48, and 72 h; and Transwell assay was used to study the cell migration in vitro. Real-time PCR and Western blotting analysis were used to detect the mRNA and protein expression of survivin and E-cadherin after ibuprofen treatment. **Results** MTT assay showed that ibuprofen treatment decreased cell growth in the two cell lines in a dose-dependent manner. Ibuprofen treatment (2 mmol/L, 12 h) significantly inhibited the cell metastasis in the two cell lines. Moreover, real-time PCR and Western blotting analysis showed that ibuprofen treatment caused a reduction in survivin expression and elevation in E-cadherin expression at both mRNA and protein levels. **Conclusion** Ibuprofen can significantly inhibit human NSCLC proliferation and metastasis in vitro, which might be related to degreased expression of survivin and increased expression of E-cadherin.

[Key words] ibuprofen; survivin; E-cadherin; breast cancer; lung neoplasms; breast

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(12):1327-1332]

近年来,癌症的发病率和死亡率逐年增加,危害人类生命健康。非甾体类抗炎药(non-steroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs)用于抗肿瘤的研究

已经被大家所关注。研究发现,肿瘤组织中的环氧合酶-2(COX-2)的表达往往高于正常组织^[1]。但在 COX-2 低表达的肿瘤中非甾体类抗炎药仍然能够起

到抗肿瘤作用,表明非甾体类抗炎药还可以通过非依赖 COX-2 途径抑制肿瘤的发生和发展。临床研究证明,长期服用布洛芬的患者患前列腺癌、结直肠癌和其他癌症的风险大大降低^[2]。体外研究显示,布洛芬能够显著抑制人类结直肠癌细胞核 β -catenin 的定位,并且诱导 GSK-3 β 的磷酸化^[3]。布洛芬还能够抑制结肠炎诱导的肿瘤相关 Rac-1b 的过表达,从而对肿瘤的产生起到一定的抑制作用^[4]。此外,结直肠癌动物模型证实,低剂量布洛芬能够抑制肿瘤的生长、血管生成、肿瘤转移和存活^[5]。虽然布洛芬用于抗肿瘤方面的研究取得了一定进展,但是布洛芬用于非小细胞肺癌(NSCLC)和乳腺癌方面的研究甚少。本文旨在研究布洛芬在人非小细胞肺癌细胞株和乳腺癌细胞株中的抗肿瘤作用,及其与 survivin 和 E-cadherin 有关的机制。

1 材料和方法

1.1 材料及仪器 人非小细胞肺癌细胞株 NCI-H460 由上海长征医院呼吸科惠赠,人乳腺癌细胞株 SKBR3 购自上海中国科学院细胞库。无菌 PBS、DMEM 高糖培养液和胎牛血清购自美国 Hyclon 公司,胰酶和双抗购自上海吉诺生物医药技术有限公司。99%纯度的布洛芬购自美国 Sigma-Aldrich 公司,实验中用 DMSO 溶解。结晶紫染色液、RIPA 缓冲液、100 mmol/L 苯甲基磺酰氟(phenyl-methanesulfonyl fluoride, PMSF)、蛋白酶抑制剂和磷酸化蛋白酶抑制剂购自上海碧云天生物技术有限公司。BCA 蛋白定量试剂盒和 ECL 显影液购自美国 Therom 公司,10%SDS、过硫酸铵 AP、TEMED 和丙烯酰胺胶浓缩液 29:1 购自上海博光生物科技有限公司,5 $\times$ 蛋白 loading、蛋白 Marker、10 $\times$ 电泳缓冲液、10 $\times$ 转印液、1 mol/L Tris-HCl(pH 7.5)、10 $\times$ TBS 缓冲液、TBST 缓冲液购自上海生工生物工程有限公司,兔抗 GAPDH 单克隆抗体一抗、兔抗人 survivin 单克隆抗体一抗、兔抗人 E-cadherin 单克隆抗体一抗和羊抗兔二抗购自美国 Epitomics 公司,封闭液(5%脱脂奶粉)购自内蒙古伊利实业集团有限公司。DEPC 水购自上海生工生物工程有限公司,TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司,反转录试剂盒和 RT-PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司。Survivin 上游引物:5'-AAG AAC TGG CCC TTC

TTG GA-3',下游引物:5'-CAA CCG GAC GAA TGC TTT T-3';E-cadherin 上游引物:5'-GCT CAT CAA TAG GCG GTA-3',下游引物:5'-GTT TAT GGC CGA TCT TAT-3';内参基因 GAPDH 上游引物:5'-GTG AAG GTC GGA GTC AAC G-3',下游引物:5'-GAG ATG ATG ACC CTT TTG GC-3'。

1.2 细胞培养 人非小细胞肺癌细胞株 NCI-H460 和乳腺癌细胞株 SKBR3 在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件下培养于 DMEM 培养液中(10%胎牛血清,2 mmol/L 的 L-谷氨酰胺,100 U/mL 青霉素,100 mg/L 链霉素)。

1.3 MTT 法检测布洛芬作用后细胞增殖率 细胞传 3~4 代后,以 1 $\times$ 10⁴/mL 接种于 96 孔板,置 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养。24 h 后待细胞贴壁加入不同浓度(0、0.5、1 和 2 mmol/L)的布洛芬,分别处理 24 h、48 h 和 72 h 后测细胞增殖率。将 5 $\times$ MTT 用培养基稀释成 1 $\times$ MTT,每孔加入 20 μ L,在 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h;吸出上清液,每孔加入 150 μ L DM-SO,用平板摇床摇匀;570 nm 波长处检测每孔的光密度(D 值);结果分析:细胞存活率=(加药细胞 D/对照细胞 D) $\times$ 100;实验重复 3 次。

1.4 Transwell 法检测布洛芬作用后细胞的迁移抑制 用无血清培养基调整细胞密度为 0.5 $\times$ 10⁵,每个 Transwell 小室中加入 200 μ L。在 24 孔板的相应孔中加入用完全培养基稀释的不同浓度(0 和 2 mmol/L)的布洛芬 750 μ L。将 Transwell 小室移至下室,置 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中孵育 12~16 h。将小室中的液体去掉,用 PBS 洗 2 遍,然后固定、染色。用棉签将上室面的细胞轻轻擦掉,置于载玻片上,放到显微镜下观察,计数 20 倍目镜下、5 个视野中下室面的细胞数量;实验重复 3 次。

1.5 Real-time PCR 检测 survivin 和 E-cadherin mRNA 表达 按照实验设计确定每个 PCR 板 96 个孔的分配情况。计算所需 Premix 和 dH₂O 的量,需多配两个孔的量;将 Premix 和 dH₂O 混匀后分配到 24 个 200 μ L 的 Ep 管中,每管 54 μ L;每管中分别加入对应目的基因的上下游引物各 1.5 μ L 和 3 μ L 模板,混合均匀后分配到 PCR 板的 3 个复孔中,每孔 18 μ L;加样完毕后贴膜,上机检测;实验重复 3 次。采用相对定量法,以 GAPDH 为内参,计算各样本 Δc_i 值(目的基因 c_i 值-内参 c_i 值),目的基因的相对

定量则以 $2^{-\Delta c}$ 表示。

1.6 蛋白质印迹法检测 survivin 和 E-cadherin 蛋白表达 按照蛋白质印迹步骤进行配胶、电泳、转膜和 ECL 检测,检测条带颜色的深浅与蛋白表达量成正比,实验重复 3 次。

1.7 统计学处理 应用 SPSS19.0 软件进行统计学分析,两组数据资料之间的差异分析应用 t 检验,多组之间的差异分析采用方差分析。检验水准(α)为 0.05。

2 结 果

2.1 布洛芬作用下肿瘤细胞株细胞增殖抑制情况 0.5、1 和 2 mmol/L 布洛芬作用于人非小细胞

肺癌细胞株 NCI-H460 和乳腺癌细胞株 SKBR3 24、48 和 72 h 后,与 0 mmol/L 浓度布洛芬比较两种肿瘤细胞株的细胞增殖率显著降低,并且 2 mmol/L 浓度下作用 48、72 h 较 24 h 时差异有统计学意义($P<0.05$)。此外,布洛芬抑制两种肿瘤细胞株增殖呈浓度和时间依赖性。结果见图 1。

2.2 2 mmol/L 布洛芬作用下肿瘤细胞株细胞迁移抑制情况 2 mmol/L 布洛芬作用于人非小细胞肺癌细胞株 NCI-H460 和乳腺癌细胞 SKBR3,12 h 后,细胞迁移能力明显下降,与 0 mmol/L 浓度布洛芬相比差异具有统计学意义($P<0.05$)。结果见图 2。

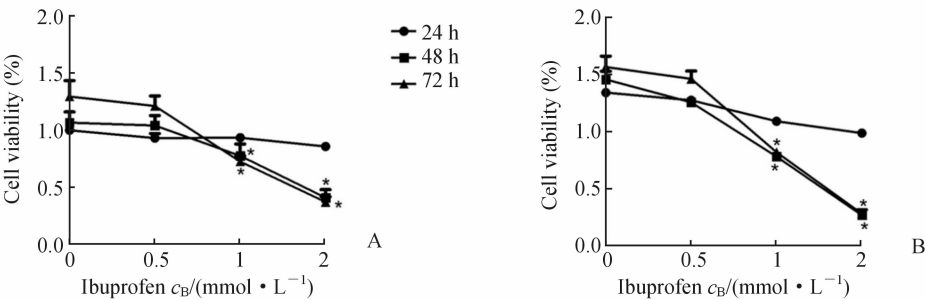


图 1 布洛芬对人非小细胞肺癌细胞株 NCI-H460(A)和乳腺癌细胞株 SKBR3(B)增殖抑制作用

Fig 1 Anti-proliferation effect of ibuprofen on human non-small cell lung cancer cell line NCI-H460 (A) and breast cancer cell line SKBR3(B)

After treatment with ibuprofen for 48 and 72 h, the viability of two cancer cell lines was significantly inhibited at 1 mmol/L compared with at 2 mmol/L. * $P<0.05$ vs 24 h of the same concentration; $n=3$, $\bar{x}\pm s$

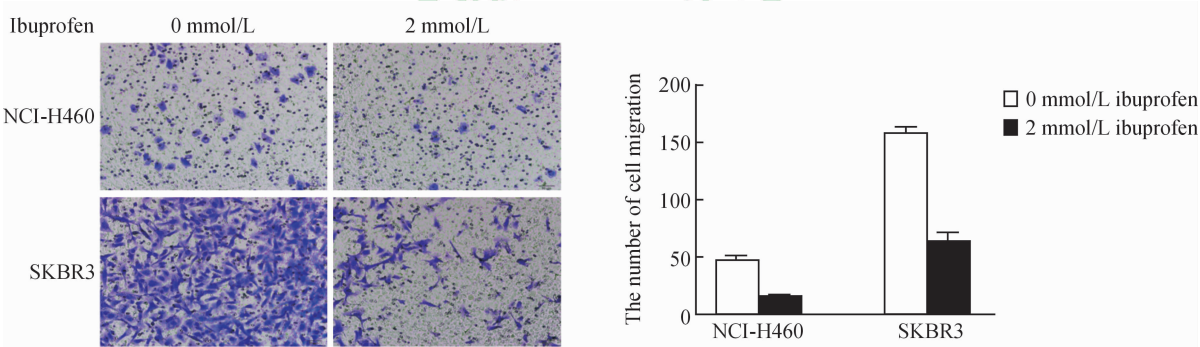


图 2 2 mmol/L 布洛芬作用 12 h 人非小细胞肺癌细胞株 NCI-H460 和乳腺癌细胞株 SKBR3 迁移抑制情况

Fig 2 Anti-migration effect of 2 mmol/L ibuprofen on human NSCLC cell line NCI-H460 and breast cancer cell line SKBR3 after treatment for 12 h

After treatment with 2 mmol/L ibuprofen for 12 h, the migration rates of two cancer cell lines were significantly inhibited. * $P<0.05$ vs 0 mmol/L ibuprofen group; $n=3$, $\bar{x}\pm s$

2.3 布洛芬作用下肿瘤细胞株 survivin、E-cadherin mRNA 表达变化 不同浓度(0、0.5、1 和 2 mmol/L)布洛芬作用于人非小细胞肺癌细胞株 NCI-H460 和乳腺癌细胞株 SKBR3 48 h, survivin

和 E-cadherin mRNA 表达变化如图 3A、图 3B 所示;2 mmol/L布洛芬作用于两种肿瘤细胞株 24、48 和72 h,survivin 和 E-cadherin mRNA 表达变化如图 3C、图 3D 所示。随着布洛芬药物浓度升高和作

用时间延长,survivin mRNA表达量降低,E-cadherin mRNA 表达量增加;2 mmol/L 布洛芬作用 48 和 72 h 较 0 h 时差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 布洛芬作用下肿瘤细胞株 survivin、E-cadherin 蛋白表达变化 不同浓度(0、0.5、1 和 2 mmol/L)布洛芬作用于人非小细胞肺癌细胞株 NCI-H460 和乳腺癌细胞株 SKBR3 48 h ,survivin 和 E-cad-

herin 蛋白水平变化如图 4A、图 4B 所示;2 mmol/L 布洛芬作用于两种肿瘤细胞株 24、48 和 72 h,survivin 和 E-cadherin 蛋白水平变化如图 4C、图 4D 所示。随着布洛芬药物浓度和作用时间的延长,人非小细胞肺癌细胞株 NCI-H460 和乳腺癌细胞株 SKBR3 survivin 表达降低,E-cadherin 表达增高。

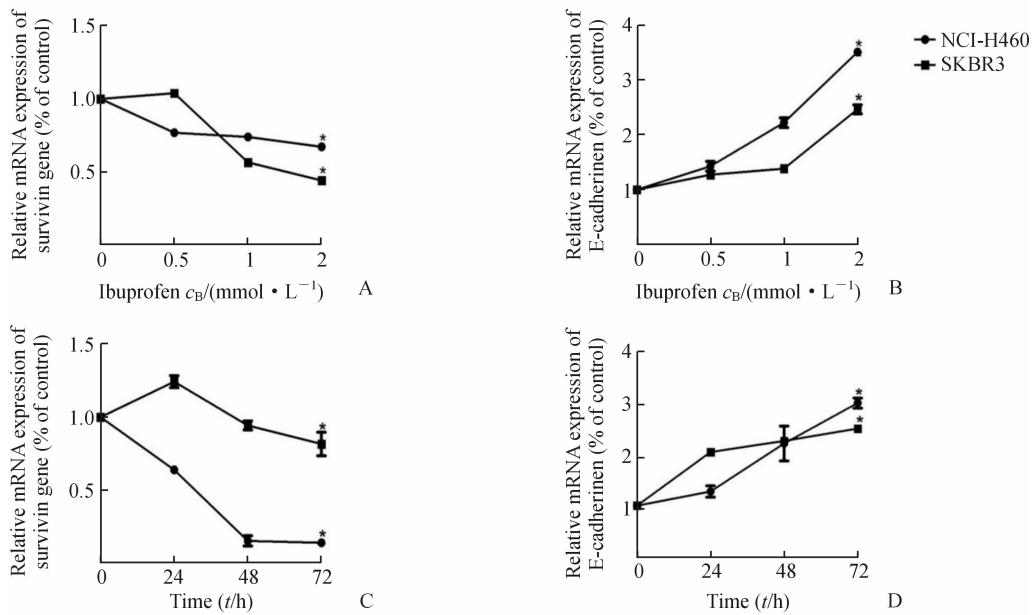


图 3 不同浓度布洛芬(A、B)和同浓度布洛芬 24、48、72 h(C、D)作用于细胞株后 survivin 和 E-cadherin mRNA 表达的变化

Fig 3 Expression of survivin and E-cadherin mRNA after treatment with ibuprofen of different regimens

A, B: Expression of survivin and E-cadherin mRNA after treatment with various concentrations of ibuprofen for 48 h. * $P<0.05$ vs 0 mmol/L ibuprofen; C, D: Expression of survivin and E-cadherin mRNA after 2 mmol/L ibuprofen treatment for 24, 48, and 72 h. * $P<0.05$ vs 0 h after 2 mmol/L ibuprofen treatment. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

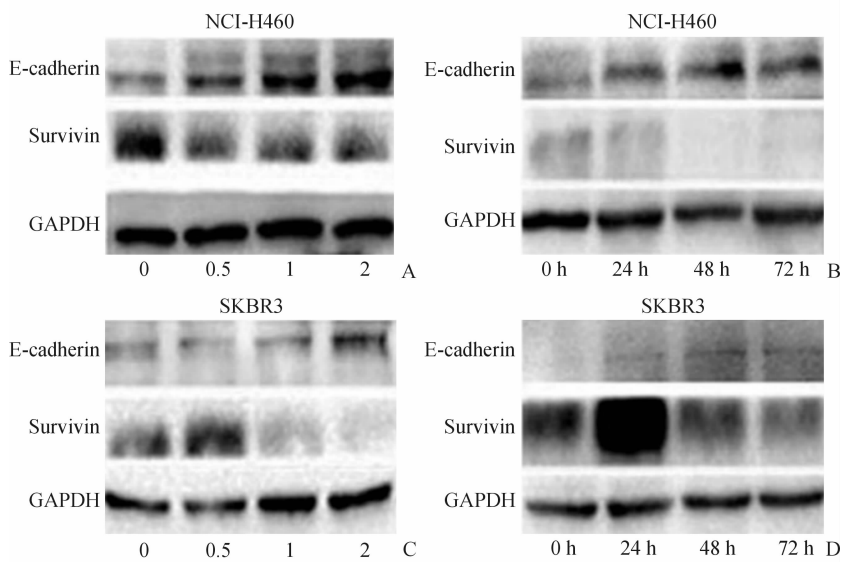


图 4 不同浓度布洛芬(A、C)和同浓度布洛芬 24、48、72 h 作用于细胞株后 survivin 和 E-cadherin 蛋白的水平变化

Fig 4 Expression of survivin and E-cadherin protein after treatment with ibuprofen of different regimens

A, B: Expression of survivin and E-cadherin after treatment with ibuprofen at various concentrations for 48 h. C, D: Expression of survivin and E-cadherin after 2 mmol/L ibuprofen treatments for 24, 48, and 72 h.

3 讨论

肿瘤的发生是内因和外因联合作用的结果, 近年来炎症学说在肿瘤的发生发展中的作用倍受关注。许多研究表明, COX-2 在正常组织中表达不高, 但在肿瘤组织中往往高表达^[5]。针对 COX-2 的非甾体类抗炎药在对抗肿瘤方面也取得了一定成果, 但是炎症诱发肿瘤并非这一条通路, 因此能够发现 COX-2 以外的其他抗肿瘤靶标将给肿瘤治疗带来新的曙光。

表皮黏附分子 E-cadherin 是一种细胞与细胞间的黏附蛋白, 广泛表达于表皮细胞和肿瘤细胞的表面, E-cadherin 的丢失能够促进肿瘤细胞的转移扩散, 而肿瘤转移扩散的第一步就是肿瘤细胞间黏附能力下降或丢失。许多体内和体外的模型充分证实了 E-cadherin 在肿瘤转移中的重要性^[4,6-8]。本研究发现, 2 mmol/L 布洛芬能够有效抑制人非小细胞肺癌细胞株 NCIH-460 和乳腺癌细胞株 SKBR3 的迁移 ($P<0.05$)。同时我们还发现, 布洛芬能够显著增加 E-cadherin 的表达, 这表明布洛芬体外可通过增加 E-cadherin 的表达抑制人非小细胞肺癌细胞株 NCIH-460 和乳腺癌细胞株 SKBR3 的迁移。

Survivin 是一个重要的凋亡抑制因子, 是许多抗肿瘤药物的作用靶点, 也是肿瘤预测的一个指标。Survivin 在正常组织和初发的肿瘤组织中表达很低^[9-13], 在大多数肿瘤组织中表达却很高^[14-18]。许多非甾体类抗炎药的抗肿瘤作用机制都与 survivin 的表达抑制有关。一些临床研究显示, 抑制 survivin 的表达或功能可以抑制肿瘤的生长, 增加肿瘤细胞的凋亡, 使肿瘤细胞对抗癌药物敏感^[19]。本研究亦发现, 布洛芬能够有效抑制人非小细胞肺癌细胞株 NCI-H460 和乳腺癌细胞株 SKBR3 的增殖, 以 2 mmol/L 布洛芬分别作用于 2 种肿瘤细胞株 48 h 和 72 h, 肿瘤细胞的增殖率下降明显, 与作用 24 h 时相比差异有统计学意义 ($P<0.05$), 探讨其机制发现与布洛芬作用下 survivin 的表达下降有关。

此外, 有研究显示虽然布洛芬可以诱导 $I\kappa B\alpha$ 的降解和 NF- κB 的细胞核定位, 但是 NF- κB 靶基因 survivin 的激活仍然被抑制, 原因可能是由于布洛芬作用下 GSK-3 β 的磷酸化增加^[3]。有研究证实, 只有 GSK-3 β 被激活才能正向调节 NF- κB 的基因表

达^[20]。而 Akt 可以磷酸化 GSK-3 β 的丝氨酸-9 残基, 这能够导致 GSK-3 β 信号通路活性受到抑制^[21]。因此, 在人非小细胞肺癌细胞株 NCI-H460 和乳腺癌细胞株 SKBR3 中布洛芬抑制 survivin 的表达是否与 GSK-3 β 以及 Akt 有关有待于进一步研究。

综上所述, 我们初步阐述了布洛芬可以通过影响 E-cadherin 的表达抑制肿瘤细胞的迁移。此外, 我们在人非小细胞肺癌细胞株 NCI-H460 和乳腺癌细胞株 SKBR3 中证实了布洛芬能够通过抑制 survivin 的表达来抑制肿瘤细胞的增殖。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Cha Y I, DuBois R N. NSAIDs and cancer prevention: targets downstream of COX-2 [J]. Annu Rev Med, 2007, 58: 239-252.

[2] Dauletbaev N, Lam J, Eklove D, Iskandar M, Lands L C. Ibuprofen modulates NF- κB activity but not IL-8 production in cystic fibrosis respiratory epithelial cells [J]. Respiration, 2010, 79: 234-242.

[3] Emily J. Greenspan, Madigan J P, Lisa A, Boardman, Daniel W. 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: 161-171.

[4] Matos P, Kotelevets L, Goncalves V, Henriques A, Zerbib P, Moyer M P, et al. Ibuprofen inhibits colitis-induced overexpression of tumor-related Rac1b [J]. Neoplasia, 2013, 15: 102-111.

[5] Yao M, Zhou W, Sangha S, Albert A, Chang A J, Liu T C, et al. Effects of nonselective cyclooxygenase inhibition with low-dose ibuprofen on tumor growth, angiogenesis, metastasis, and survival in a mouse model of colorectal cancer [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11: 1618-1628.

[6] Derksen P W, Liu X, Saridin F, van der Gulden H, Zevenhoven J, Evers B, et al. Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis [J]. Cancer Cell, 2006, 10: 437-449.

- [7] Frixen U H, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, et al. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells[J]. *J Cell Biol*, 1991, 113:173-185.
- [8] Vleminckx K, Vakaet L Jr, Mareel M, Fiers W, van Roy F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role[J]. *Cell*, 1991, 66:107-119.
- [9] Fukuda S, Pelus L M. Elevation of Survivin levels by hematopoietic growth factors occurs in quiescent CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells before cell cycle entry [J]. *Cell Cycle*, 2002, 1:322-326.
- [10] Yang D, Welm A, Bishop J M. Cell division and cell survival in the absence of survivin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101:15100-15105.
- [11] Okada H, Bakal C, Shahinian A, Elia A, Wakeham A, Suh W K, et al. Survivin loss in thymocytes triggers p53-mediated growth arrest and p53-independent cell death[J]. *J Exp Med*, 2004, 199:399-410.
- [12] Song J, So T, Cheng M, Tang X, Croft M. Sustained survivin expression from OX40 costimulatory signals drives T cell clonal expansion[J]. *Immunity*, 2005, 22: 621-631.
- [13] Uchide T, Takatsu N, Fujimori Y, Fukushima U, Itoh H. Expression of survivin mRNA in dog tumors [J]. *DNA Seq*, 2005, 16:329-334.
- [14] Ambrosini G, Adida C, Altieri D C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma [J]. *Nat Med*, 1997, 3:917-921.
- [15] Wang L, Zhang G M, Feng Z H. Down-regulation of survivin expression reversed multidrug resistance in adriamycin-resistant HL-60/ADR cell line[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24:1235-1240.
- [16] Endoh T, Tsuji N, Asanuma K, Yagihashi A, Watanabe N. Survivin enhances telomerase activity via up-regulation of specificity protein 1- and c-Myc-mediated human telomerase reverse transcriptase gene transcription[J]. *Exp Cell Res*, 2005, 305:300-311.
- [17] Waligórska-Stachura J, Jankowska A, Wako R, Liebert W, Biczysko M, Czarnywojtek A, Et al. Survivin—prognostic tumor biomarker in human neoplasms—review[J]. *Ginek Pol*, 2012, 83:537-540.
- [18] Shoeneman J K, Ehrhart E J, Eickhoff J C, Charles J B, Powers B E, Thamm D H. Expression and function of survivin in canine osteosarcoma [J]. *Cancer Res*, 2012, 72:249-259.
- [19] Yu D D, Wang C T, Shi H S, Li Z Y, Pan L, Yuan Q Z, et al. Enhancement of cisplatin sensitivity in Lewis Lung carcinoma by liposome-mediated delivery of a survivin mutant[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29:46.
- [20] Ougolkov A V, Bone N D, Fernandez-Zapico M E, Kay N E, Billadeau D D. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 activity leads to epigenetic silencing of nuclear factor kappaB target genes and induction of apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells[J]. *Blood*, 2007, 110:735-742.
- [21] Cross D A, Alessi D R, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings B A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B[J]. *Nature*, 1995, 378:785-789.

[本文编辑] 周燕娟