

· 实验研究 ·

尼美舒利联合吉西他滨对人非小细胞肺癌 NCI-H1975 细胞增殖和凋亡的影响

李雅静¹, 张富康², 张洁^{1*}

1. 天津医科大学肿瘤医院 国家肿瘤临床医学研究中心 天津市“肿瘤防治”重点实验室 天津市恶性肿瘤临床医学研究中心, 天津 300060
2. 天津市环湖医院, 天津 300350

摘要: **目的** 研究尼美舒利联合吉西他滨对人非小细胞肺癌 NCI-H1975 细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 采用 MTT 法测定尼美舒利联合吉西他滨对 NCI-H1975 细胞生长的抑制作用。流式细胞仪检测尼美舒利(100 $\mu\text{mol/L}$)组、吉西他滨(20 nmol/L)组和联合用药(尼美舒利 100 $\mu\text{mol/L}$ +吉西他滨 20 nmol/L)组对 NCI-H1975 细胞周期和凋亡的影响。Western blotting 检测各组对 Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3 蛋白表达的影响。**结果** 尼美舒利对 NCI-H1975 细胞的生长具有抑制作用,且呈剂量相关性, IC_{50} 为 $(298.76 \pm 2.79) \mu\text{mol/L}$; 吉西他滨的 IC_{50} 为 $(78.64 \pm 3.14) \text{nmol/L}$, 尼美舒利与吉西他滨联合作用后,能明显增加后者对 NCI-H1975 细胞增殖的抑制作用,二者有明显的协同作用。尼美舒利联合吉西他滨将细胞阻滞在 G_0/G_1 期,而 S 和 G_2/M 期均有所减少。与单药组相比,联合用药组能显著升高细胞的凋亡率 ($P < 0.05$)。与单药组相比,联合用药组明显下调 Bcl-2 蛋白的表达 ($P < 0.05$),上调 Bax 和 Cleaved caspase-3 蛋白的表达 ($P < 0.05$)。**结论** 尼美舒利联合吉西他滨能明显抑制肿瘤细胞的增殖,诱导细胞凋亡,其效果优于单用吉西他滨组,其机制与影响细胞周期调控,下调 Bcl-2 蛋白表达、上调 Bax 和 Cleaved caspase-3 蛋白表达水平有关。

关键词: 尼美舒利; 吉西他滨; 人非小细胞肺癌; 细胞周期; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2020)08 - 1505 - 07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.08.001

Effects of nimesulide combined with gemcitabine on proliferation and apoptosis of human non-small cell lung cancer NCI-H1975 cells

LI Ya-jing¹, ZHANG Fu-geng², ZHANG Jie¹

1. Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center for Cancer, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Tianjin 300060, China
2. Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin 300350, China

Abstract: Objective To study the effects of nimesulide combined with gemcitabine on proliferation and apoptosis of human non-small cell lung cancer NCI-H1975 cells. **Methods** MTT assay was used to determine the inhibitory effect of nimesulide combined with gemcitabine on the growth of NCI-H1975 cells. Flow cytometry was used to detect the cell cycle and apoptosis of NCI-H1975 in the nimesulide (100 $\mu\text{mol/L}$) group, the gemcitabine (20 nmol/L) group, and the combination (nimesulide 100 $\mu\text{mol/L}$ + gemcitabine 20 nmol/L) group. The expression of Bcl-2, Bax, and Cleaved caspase-3 protein was detected by Western blotting. **Results** Nimesulide inhibited the growth of NCI-H1975 cells in a dose-dependent manner with an IC_{50} of $(298.76 \pm 2.79) \mu\text{mol/L}$. The IC_{50} of gemcitabine was $(78.64 \pm 3.14) \text{nmol/L}$. The combination of nimesulide and gemcitabine significantly increased the inhibitory effect of the latter on the proliferation of NCI-H1975 cells. The ratio of nimesulide plus gemcitabine to cells in the gemcitabine group was

收稿日期: 2020-06-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81472474); 天津市卫生局科技基金资助项目(201242034)

作者简介: 李雅静, 硕士, 主管药师, 主要从事医院药学工作。E-mail: liyajing919@163.com

*通信作者 张洁, 硕士, 副主任药师, 主要从事医院药学工作。E-mail: jiezhang1224@163.com

significantly increased in the G₀/G₁ phase, while the S and G₂/M phases were reduced. Compared with the single-agent group, the apoptosis rate in the combined group was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the single-agent group, the combination group could significantly down-regulate Bcl-2 protein expression ($P < 0.05$), but up-regulate Bax and Cleaved caspase-3 protein expression ($P < 0.05$). **Conclusion** Nimesulide combined with gemcitabine can significantly inhibit the proliferation of tumor cells and induce apoptosis. The effect is better than that of gemcitabine alone. The mechanism and effect of cell cycle regulation, down-regulation of Bcl-2 protein expression, up-regulation of Bax and Caspase-3 protein expression levels are related.

Key words: nimesulide; gemcitabine; human non-small cell lung cancer; cell cycle; cell proliferation; cell apoptosis

肺癌是全球发病率最高的恶性肿瘤,发病率和死亡率均居恶性肿瘤之首,严重威胁人类健康。非小细胞肺癌(NSCLC)是肺癌中最主要的类型,占肺癌总数约85%^[1]。近年来大量实验研究表明环氧化酶-2(COX-2)在炎症组织和肿瘤组织中高表达,而在正常组织中低表达^[2],COX-2在肿瘤细胞的生长、增殖过程中起重要作用,它可促进肿瘤细胞增殖,促进肿瘤的侵袭、转移,抑制肿瘤细胞凋亡等,这些作用特点使得COX-2成为研究肿瘤的新靶点。尼美舒利正是选择性COX-2抑制剂,研究发现其对体外多种肿瘤细胞有明显的抑制作用。有报道尼美舒利具有明确的抑制宫颈癌细胞的作用^[3];还可通过降低 β -catenin蛋白表达有效促使结肠癌细胞凋亡^[4];可通过抑制HSP70表达来诱导人肝癌SMMC7721细胞凋亡^[5]。研究还发现尼美舒利可促进肿瘤细胞对传统化疗药的敏感性,有报道尼美舒利与奥沙利铂联用,能增强奥沙利铂对食管癌的抑瘤作用,降低奥沙利铂对大鼠免疫功能的抑制程度^[6]。尼美舒利是否对肺癌细胞也有抑制作用。吉西他滨临床常用于非小细胞肺癌的治疗,本研究主要探讨尼美舒利与吉西他滨联用是否具有协同的抗肿瘤增殖的作用,并初步探讨其作用机制。

1 材料

1.1 试药

尼美舒利(天津药物研究院有限公司,质量分数为99.0%,批号1808082);注射用盐酸吉西他滨(江苏豪森药业集团有限公司,规格0.2g/支,批号180204);RPMI-1640培养液(Gibco公司,批号8117203);无支原体新生牛血清(浙江天杭生物科技有限公司,批号180709);四甲基偶氮唑蓝(MTT,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,批号JT343);二甲基亚砜(DMSO,天津市化学试剂批发公司,批号20180408);碘化丙啶(索莱宝科技有限公司,1mg/mL,批号20170518);实验用Bcl-2、Bax和Cleaved caspase-3抗体(上海碧云天生物技术有限公司,批号201712013、201808010、201707009);RNase

A(索莱宝科技有限公司,10mg/mL,批号20170504);Annexin V-FITC凋亡试剂盒(天津优抗生物技术有限公司,批号UAFP050)。

1.2 仪器

J810R离心机(德国Eppendorf公司);HEPAClass100恒温培养箱(美国Thermo公司);IM倒置显微镜(日本Olympus公司);S3e流式细胞分选仪(Bio-Rad Laboratories公司);BD FACSCanto II流式细胞仪(BD公司)。

1.3 细胞株

人非小细胞肺癌细胞株NCI-H1975由天津医科大学肿瘤医院提供,常规培养于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中,37℃、5%CO₂培养箱及饱和湿度条件下培养,2~3d传代1次。

2 方法

2.1 尼美舒利联合吉西他滨对NCI-H1975细胞增殖的影响

取对数生长期的NCI-H1975细胞,接种于96孔培养板中,调整细胞浓度为 1×10^5 /mL,每孔100 μ L,设对照组(培养基中加入NCI-H1975细胞,不加药物)、尼美舒利组(100、200、300、400、500 μ mol/L)、吉西他滨组(20、40、80、160、320nmol/L)、尼美舒利联合吉西他滨用药组(100+20、300+20、300+40、300+80、300+160)均设置8个复孔。继续培养24h,每组终止培养前加30 μ L MTT(5g/L),继续培养3~4h后弃上清液,加100 μ L DMSO溶解,避光震荡15min,使用酶标仪测定490nm波长处各孔的吸光度(A)值,重复3次,计算细胞的抑制率。以样品浓度对数值与抑制率(IR)做回归方程,求出尼美舒利对NCI-H1975细胞作用不同时间的半抑制浓度(IC₅₀)值。

$$IR = 1 - A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.2 流式细胞术检测尼美舒利联合吉西他滨对NCI-H1975细胞周期的影响

取对数生长期的NCI-H1975细胞,调整密度为 1×10^5 /mL的细胞悬液,接种于25cm²培养瓶中,

贴壁 24 h 后, 分别加入尼美舒利 100 $\mu\text{mol/L}$ 、吉西他滨 20 nmol/L 和尼美舒利 100 $\mu\text{mol/L}$ +吉西他滨 20 nmol/L , 另设不加药物的对照组。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养, 孵育 48 h 后, 用胰酶消化, 1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞。用冷 PBS 洗涤 2 次, 离心, 用 70% 冰乙醇溶液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定细胞 24 h。1 000 r/min 离心 5 min , 弃掉乙醇固定液。再用 PBS 洗涤 2 次后将细胞重悬于 PBS 中。加入终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ RNase A, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min , 加入终浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 碘化丙啶, 避光, 室温孵育 15 min , 流式细胞仪检测各组细胞生长周期。

2.3 流式细胞术检测尼美舒利联合吉西他滨对 NCI-H1975 细胞凋亡的影响

取对数生长期 NCI-H1975 细胞调整密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞悬液, 接种于 25 cm^2 培养瓶中, 贴壁 24 h 后, 分别加入尼美舒利 100 $\mu\text{mol/L}$ 、吉西他滨 20 nmol/L 和尼美舒利 100 $\mu\text{mol/L}$ +吉西他滨 20 nmol/L , 另设不加药物的对照组。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养, 于药物作用 48 h 后, 收集细胞, 用胰酶消化后, 1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞。用冷 PBS 洗涤 2 次, 1 000 r/min 离心 5 min , 将细胞重悬于试剂盒配套的 $1 \times \text{binding buffer}$ 缓冲液中, 加入 5 μL Annexin V-FITC 和 1 μL 100 $\mu\text{g/mL}$ 的碘化丙啶溶液, 轻轻混匀。避光、室温反应 15 min 。上机测定细胞凋亡情况。

2.4 Western blotting 法检测尼美舒利联合吉西他滨对 NCI-H1975 细胞 Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3 表达的影响

NCI-H1975 细胞接种于 6 孔板中, 分组同上, 培养 48 h 后提取总蛋白, 在聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳后, 将蛋白转膜至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉溶液封闭后, 加入一抗 Bcl-2 (1:500)、Bax (1:500)、Cleaved caspase-3 (1:500)。4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; TBST 缓冲液洗膜 3 次后与相应的二抗 (1:2 000) 室温孵育 30 min ; 再用 TBST 漂洗膜 3 次, 加入发光液后显影、定影、拍照, 实验重复 3 次。以目标条带与内参 GAPDH 的比值评价蛋白表达水平。

2.5 统计学方法

用 SPSS 21.0 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间差异用单因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD 法 (方差齐) 或 Dunnett's T3 法 (方差不齐), 另外增殖抑制率判断两药联用的拮抗、相加

或协同效应, 按金氏公式求 q 值, $q > 1.15$ 表示两药联用有协同作用, q 值为 0.85~1.15 表示两药联用具有相加作用, $q < 0.85$ 表示两药联用具有拮抗作用。 $q = (Ea + b) / Ea + Eb - Ea \times Eb$, $Ea + b$ 为两药合用的抑制率; Ea 和 Eb 为各药单用时的抑制率。

3 结果

3.1 尼美舒利联合吉西他滨对 NCI-H1975 细胞增殖的抑制作用

尼美舒利的 IC_{50} 为 $(298.76 \pm 2.79) \mu\text{mol/L}$ 和吉西他滨的 IC_{50} 为 $(78.64 \pm 3.14) \text{nmol/L}$, 二者单独用药时对 NCI-H1975 细胞均有明显的抑制作用, 且药物剂量与细胞抑制率呈正相关。尼美舒利和吉西他滨联用时对 NCI-H1975 细胞就呈现出了更强的抑制作用, 与单独用药相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 且 $q > 1.15$), 表明两种药物联合应用对抑制 NCI-H1975 细胞增殖具有协同作用。当用尼美舒利为 300 $\mu\text{mol/L}$ 与不同浓度吉西他滨联用时, 其抑制率与两倍浓度的吉西他滨接近或更高, 说明尼美舒利联合吉西他滨可降低吉西他滨的用量。见表 1。

3.2 尼美舒利联合吉西他滨对 NCI-H1975 细胞周期的影响

根据细胞增殖的结果, 选择低于 IC_{50} 剂量的药物浓度即尼美舒利 100 $\mu\text{mol/L}$ 和吉西他滨 20 nmol/L , 单独用药或联用作用于 NCI-H1975 细胞。流式细胞术检测结果表明, 与对照组相比, 尼美舒利+吉西他滨组和单药组细胞 G_0/G_1 比例均明显升高 ($P < 0.05$), S 和 G_2/M 比例降低 ($P < 0.05$), NCI-H1975 细胞的生长周期被阻滞在 G_0/G_1 期, 且联用组比单用药组作用更明显 ($P < 0.05$)。见图 1、表 2。

3.3 尼美舒利联合吉西他滨对 NCI-H1975 细胞凋亡的影响

根据细胞增殖的实验结果, 选择低于 IC_{50} 剂量的药物浓度即尼美舒利 100 $\mu\text{mol/L}$ 和吉西他滨 20 nmol/L , 单独用药或联用作用于 NCI-H1975 细胞。流式细胞术检测结果表明, 与对照组比较, 尼美舒利+吉西他滨组和单药组均可显著诱导 NCI-H1975 细胞凋亡 ($P < 0.05$), 且与单药组相比, 联合用药组诱导 NCI-H1975 细胞凋亡的作用更明显, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2、表 3。

3.4 尼美舒利联合吉西他滨对 NCI-H1975 细胞 Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3 表达的影响

根据细胞增殖的实验结果, 选择低于 IC_{50} 剂量的药物浓度即尼美舒利 100 $\mu\text{mol/L}$ 和吉西他滨 20

表1 尼美舒利联合吉西他滨对 NCI-H1975 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Inhibition of nimesulide combined with gemcitabine on proliferation of NCI-H1975 cell ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	抑制率/%	<i>q</i>	IC ₅₀
尼美舒利	100 μmol L ⁻¹	16.36 ± 0.98		(298.76 ± 2.79) μmol L ⁻¹
	200 μmol L ⁻¹	28.35 ± 2.95		
	300 μmol L ⁻¹	49.32 ± 3.88		
	400 μmol L ⁻¹	56.79 ± 2.74		
	500 μmol L ⁻¹	69.73 ± 1.98		
吉西他滨	20 nmol L ⁻¹	38.74 ± 3.56		(78.64 ± 3.14) nmol L ⁻¹
	40 nmol L ⁻¹	46.53 ± 2.75		
	80 nmol L ⁻¹	55.65 ± 3.69		
	160 nmol L ⁻¹	73.98 ± 2.78		
	320 nmol L ⁻¹	88.12 ± 3.16		
尼美舒利+吉西他滨	100 μmol L ⁻¹ +20 nmol L ⁻¹	45.76 ± 1.29*▲	1.28	
	200 μmol L ⁻¹ +40 nmol L ⁻¹	54.38 ± 3.05#△	1.32	
	300 μmol L ⁻¹ +20 nmol L ⁻¹	48.74 ± 2.38&▲	1.56	
	300 μmol L ⁻¹ +40 nmol L ⁻¹	56.69 ± 2.94&△	1.48	
	300 μmol L ⁻¹ +80 nmol L ⁻¹	68.64 ± 3.97&◇	1.45	
	300 μmol L ⁻¹ +160 nmol L ⁻¹	90.80 ± 1.86&□	1.35	

与尼美舒利 100 μmol L⁻¹组比较: **P*<0.05; 与尼美舒利 200 μmol L⁻¹组比较: #*P*<0.05; 与尼美舒利 300 μmol L⁻¹组比较: &*P*<0.05; 与吉西他滨 20 nmol L⁻¹组比较: ▲*P*<0.05; 与吉西他滨 40 nmol L⁻¹组比较: △*P*<0.05; 与吉西他滨 80 nmol L⁻¹组比较: ◇*P*<0.05; 与吉西他滨 160 nmol L⁻¹组比较: □*P*<0.05

**P* < 0.05 vs nimesulide 100 μmol L⁻¹ group; #*P* < 0.05 vs nimesulide 200 μmol L⁻¹ group; &*P* < 0.05 vs nimesulide 300 μmol L⁻¹ group; ▲*P* < 0.05 vs gemcitabine 20 nmol L⁻¹ group; △*P* < 0.05 vs gemcitabine 40 nmol L⁻¹ group; ◇*P* < 0.05 vs gemcitabine 80 nmol L⁻¹ group; □*P* < 0.05 vs gemcitabine 160 nmol L⁻¹ group

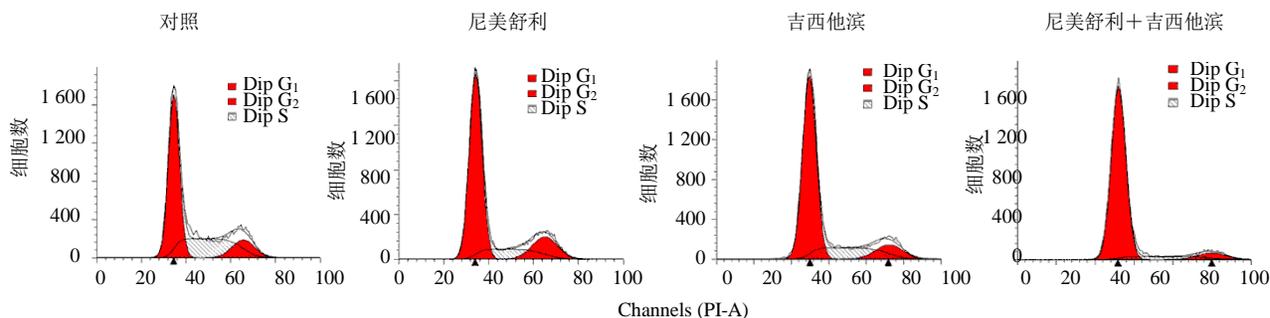


图1 细胞周期分布图

Fig. 1 Cell cycle distribution diagram

表2 尼美舒利联合吉西他滨对 NCI-H1975 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of nimesulide combined with gemcitabine on cell cycle distribution of NCI-H1975 cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量	G ₀ /G ₁ 期/%	S期/%	G ₂ /M期/%
对照	—	50.35 ± 0.76	27.74 ± 0.65	21.91 ± 0.67
尼美舒利	100 μmol L ⁻¹	57.58 ± 2.12*	26.21 ± 1.99	16.21 ± 2.13*
吉西他滨	20 nmol L ⁻¹	68.94 ± 2.64*	20.15 ± 1.53*	10.91 ± 1.76*
尼美舒利+吉西他滨	100 μmol L ⁻¹ +20 nmol L ⁻¹	85.93 ± 1.37*#▲	10.96 ± 0.78*#▲	3.11 ± 1.52*#▲

与对照组比较: **P*<0.05; 与尼美舒利 100 μmol L⁻¹组比较: #*P*<0.05; 与吉西他滨 20 nmol L⁻¹组比较: ▲*P*<0.05

**P* < 0.05 vs control group; #*P* < 0.05 vs nimesulide 100 μmol L⁻¹ group; ▲*P* < 0.05 vs gemcitabine 20 nmol L⁻¹ group

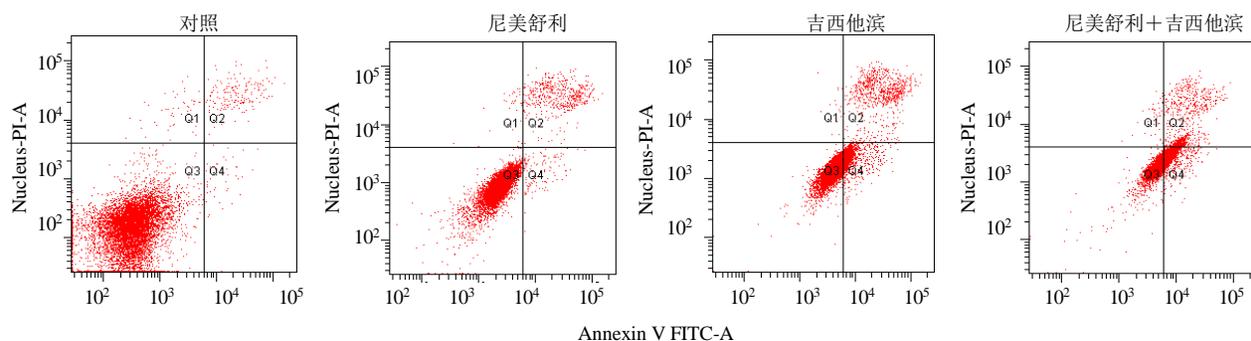


图2 尼美舒利联合吉西他滨对 NCI-H1975 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effect of nimesulide combined with gemcitabine on cell apoptosis of NCI-H1975 cell

表3 尼美舒利联合吉西他滨对 NCI-H1975 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Effect of nimesulide combined with gemcitabine on cell apoptosis of NCI-H1975 cell ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量	凋亡率/%		
		早期凋亡	晚期凋亡	总凋亡率
对照	—	0.8±0.2	2.4±0.4	3.2±0.5
尼美舒利	100 μmol L ⁻¹	1.5±0.6*	6.9±0.9*	8.4±0.4*
吉西他滨	20 nmol L ⁻¹	24.7±4.8*	11.0±1.1*	35.7±2.2*
尼美舒利+吉西他滨	100 μmol L ⁻¹ +20 nmol L ⁻¹	49.7±5.7*#▲	8.6±1.2*#▲	58.3±4.1*#▲

与对照组比较: *P<0.05; 与尼美舒利 100 μmol L⁻¹ 组比较: #P<0.05; 与吉西他滨 20 nmol L⁻¹ 组比较: ▲P<0.05

*P < 0.05 vs control group; #P < 0.05 vs nimesulide 100 μmol L⁻¹ group; ▲P < 0.05 vs gemcitabine 20 nmol L⁻¹ group

nmol/L, 单独用药或联用作用于 NCI-H1975 细胞。Western blotting 法检测结果表明, 与对照组比较, 尼美舒利+吉西他滨组和单药组均可显著升高 Bax、Cleaved caspase-3 的表达量 (P<0.05), 显著降低 Bcl-2 的表达量 (P<0.05); 且与单药组相比, 联合用药组能明显下调 Bcl-2 蛋白表达 (P<0.05), 上调 Bax 和 Cleaved caspase-3 蛋白表达, 差异具有统计学意义 (P<0.05)。见图 3、表 4。

4 讨论

非甾体抗炎药 (NSAIDs) 是一类不含有甾体结构, 具有抗炎、解热、镇痛作用的药物。近年来, 各种临床及实验研究显示长期有效地服用 NSAIDs 能够降低肿瘤的发生率。大量的实验研究还证实选

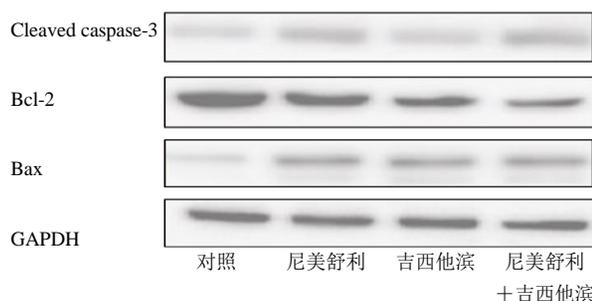


图3 尼美舒利联合吉西他滨对 NCI-H1975 细胞 Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3 表达的影响

Fig. 3 Effect of nimesulide combined with gemcitabine on expression of Bcl-2, Bax, and Cleaved caspase-3

表4 尼美舒利联合吉西他滨对 NCI-H1975 细胞 Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of nimesulide combined with gemcitabine on expression of Bcl-2, Bax, and Cleaved caspase-3 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量	Bax/GAPDH	Bcl-2/GAPDH	Cleaved caspase-3/GAPDH
对照	—	0.186±0.018	0.796±0.052	0.204±0.057
尼美舒利	100 μmol L ⁻¹	0.397±0.026*	0.436±0.041*	0.469±0.021*
吉西他滨	20 nmol L ⁻¹	0.429±0.037*	0.406±0.032*	0.500±0.009*
尼美舒利+吉西他滨	100 μmol L ⁻¹ +20 nmol L ⁻¹	0.630±0.015*#▲	0.194±0.019*#▲	0.736±0.098*#▲

与对照组比较: *P<0.05; 与尼美舒利 100 μmol L⁻¹ 组比较: #P<0.05; 与吉西他滨 20 nmol L⁻¹ 组比较: ▲P<0.05

*P < 0.05 vs control group; #P < 0.05 vs nimesulide 100 μmol L⁻¹ group; ▲P < 0.05 vs gemcitabine 20 nmol L⁻¹ group

择性 COX-2 抑制剂的抗肿瘤作用尤为突出。COX-2 在肿瘤中的作用机制主要有：COX-2 可促进肿瘤细胞的增殖，抑制细胞的凋亡；促进肿瘤细胞的侵袭，提高肿瘤细胞转移的可能性，还可诱导肿瘤新生血管形成。因此 COX-2 抑制剂的抗肿瘤作用成为研究热点^[7-10]。吉西他滨是目前治疗中晚期肺癌的常用药物之一，但由于其半衰期短、靶向性不强、毒副作用大在体内容易代谢失活等问题限制了其临床应用^[11-14]。同时大剂量药物的使用也容易造成肿瘤细胞对化疗的抵抗^[15]，因此联合应用一些辅助治疗药物降低吉西他滨的使用剂量，提高肺癌细胞对吉西他滨的敏感性是提高化疗效果并改善患者顺应性的有效方法。

本研究选择 NCI-H1975 细胞为研究对象，研究了尼美舒利联用吉西他滨对 NCI-H1975 细胞的抗肿瘤增敏作用。尼美舒利抑制肿瘤的作用与剂量有关，而无论是高浓度吉西他滨还是高浓度的尼美舒利都会使抑制率升高，不利于观察两药的协同作用，因此本研究选用了低浓度的尼美舒利 100 $\mu\text{mol/L}$ 联合低浓度的吉西他滨 20 nmol/L 作用于细胞，采用 MTT 法对两药单独使用和联合使用抑制 NCI-H1975 细胞增殖作用进行了检测。结果显示尼美舒利与吉西他滨联用时，对 NCI-H1975 细胞的生长抑制明显高于单药组，且两药具有协同作用，与浓度呈正相关。当固定尼美舒利用量时达到相同的抑制率，所需吉西他滨的量是单用吉西他滨剂量的 1/3 左右，说明尼美舒利联合吉西他滨不仅可以提高其杀伤细胞的作用，还可降低吉西他滨的用量，进一步降低了吉西他滨的毒性。

本研究还观察了用药前后细胞周期分布和细胞凋亡的变化情况，100 $\mu\text{mol/L}$ 尼美舒利与 20 nmol/L 吉西他滨联用 G_0/G_1 期细胞比例明显升高 ($P < 0.05$)，S 期和 G_2/M 期细胞比例降低 ($P < 0.05$)，差异具有统计学意义。说明两药联用将 NCI-H1975 细胞的生长周期阻滞在了 G_0/G_1 期。同时两种药物均可诱导细胞凋亡，吉西他滨单独用药细胞凋亡率为 35.7%，两种药物联用细胞凋亡率为 58.3%，升高了近 1 倍。Bax 是 Bcl-2 家族中的促凋亡因子，而 Bcl-2 是抗凋亡因子，它们都与肿瘤细胞凋亡密切相关，有研究表明，激活 Bcl-2/Bax 信号通路，可加速肺癌细胞的凋亡^[16]。Caspase 家族是凋亡过程的核心调控因子，而 caspase-3 是凋亡的效应因子。尼美舒利和吉西他滨联用通过抑制 Bcl-2 蛋白的表达，激

活 Bax 和 Cleaved caspase-3 蛋白的表达，来促进细胞凋亡，联用组与单药组相比，降低 Bcl-2 蛋白的表达有显著性差异，Bax 和 Cleaved caspase-3 蛋白的表达水平升高同样有显著性差异。其作用机制可能是激活 Bcl-2/Bax 信号通路，活化 Cleaved caspase-3，最终诱导了肺癌细胞的凋亡。同时尼美舒利可用于慢性关节炎症、手术和急性创伤后的疼痛、发热等症状，这样两药联用既可对吉西他滨具有增敏作用，又可降低吉西他滨用药剂量，减少毒性，同时又能缓解肿瘤患者的一些其他症状，增加患者顺应性。因此提示临床当一些肿瘤患者在化疗的同时使用尼美舒利时，应注意化疗药物的用量。

综上所述，尼美舒利联用吉西他滨体外抑制 NCI-H1975 细胞的增殖，将细胞周期阻滞在了 G_0/G_1 期，并促进了细胞的凋亡，其作用机制可能与下调 Bcl-2 蛋白，上调 Bax 和 Cleaved caspase-3 蛋白的表达有关。因此尼美舒利可能成为一种潜在的治疗肺癌的药物，它通过与吉西他滨的协同抗肿瘤作用，来降低吉西他滨的使用剂量，进一步限制其毒性及延缓其耐药性的产生。

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. *CA Cancer*, 2018, 68(1): 7-30.
- [2] 高峰, 冯一中. Cox-2、MMP-9 和 CD31 在非小细胞肺癌的表达及其意义 [J]. *江苏医药*, 2014, 40(9): 1067-1070.
- [3] 杨凤玉, 孙海清, 张玉荣. 尼美舒利对人宫颈癌 Hela 细胞株的抑制作用及其机制研究 [J]. *中国医药导报*, 2013, 10(4): 4-6.
- [4] 吴小娟, 万云, 黄家明, 等. 尼美舒利对结肠癌细胞凋亡及 β -catenin 蛋白表达的影响 [J]. *临床医药实践* 2019, 28(8): 563-566.
- [5] 殷国志, 涂康生, 韩少山, 等. 尼美舒利诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡并下调 HSP70 基因表达 [J]. *细胞与分子免疫杂志*, 2012, 28(9): 933-936.
- [6] 李萌, 何勇, 肖飞, 等. 尼美舒利联合奥沙利铂对食管癌大鼠移植瘤生长及免疫功能的影响 [J]. *中国药房*, 2017, 28(16): 2208-2211.
- [7] Pomianowska E, Sandnes D, Grzyb K, et al. Inhibitory effects of prostaglandin E2 on collagen synthesis and cell proliferation in human stellate cells from pancreatic head adenocarcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14(1): 413.
- [8] Boyce J A, Peebles R S. Regulation of Th9-type pulmonary immune responses [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 187(8): 785-786.

- [9] Testa U, Castelli G, Pelosi E. Lung cancers: molecular characterization, clonal heterogeneity and evolution, and cancer stem cells [J]. *Cancers* (Basel), 2018, 10(8): 248.
- [10] Didkowska J, Wojciechowska U, Manczuk M, *et al.* Lung cancer epidemiology: contemporary and future challenge worldwide [J]. *Ann Transl Med*, 2016, 4(8): 150.
- [11] Pham K, Delitto D, Knowlton A E, *et al.* Isolation of pancreatic cancer cells from a patient-derived xenograft model allows for practical expansion and preserved heterogeneity in culture [J]. *Am J Pathol*, 2016, 186(6): 1537-1546.
- [12] Dyawanapelly S, Kumar A, Chourasia M K. Lessons learned from gemcitabine: impact of therapeutic carrier systems and gemcitabine's drug conjugates on cancer therapy [J]. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2017, 34(1): 63-96.
- [13] 饶奇硕. 生长抑素联合吉西他滨对人胰腺癌 PANC-1 细胞的影响 [D]. 衡阳: 南华大学, 2017.
- [14] 易栋谦. Cox-2 抑制剂尼美舒利通过 mTOR 途径上调脂变肝细胞自噬基因 Atg5 的表达 [D]. 衡阳: 南华大学, 2016.
- [15] HEIST R S. First-line systemic therapy for non-small cell lung cancer [J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2017, 31(1): 59-70.
- [16] Yu S, Gong L S, Li N F, *et al.* Galangin (GG) combined with cisplatin (DDP) to suppress human lung cancer by inhibition of STAT3-regulated NF- κ B and Bcl-2/Bax signaling pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 213-224.