

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.06.023

阿司匹林通过调节血管生成相关因子抑制非小细胞肺癌增殖及凋亡的机制

顾宪文,谷兰海,邢加强,李殿波,于海防
(山东省临沂市肿瘤医院胸外科 276000)

摘要:目的 探讨阿司匹林通过调节血管生成相关因子抑制非小细胞肺癌 A549 增殖及凋亡的机制。方法 将非小细胞肺癌 A549 细胞行体外培养至对数期,分别加入不同水平梯度(0.0、2.5、5.0、10.0、20.0 mmol/L)的阿司匹林进行干预,应用噻唑蓝法(MTT)检测不同水平梯度的阿司匹林对细胞增殖率的影响,用流式细胞仪测定不同细胞周期 A549 细胞凋亡率,Western blotting 试验检测血管内皮生长因子(VEGF)、表皮生长因子受体(EGFR)、成纤维细胞生长因子(FGF)转录水平。**结果** 阿司匹林作用 A549 细胞后在倒置显微镜下观察,细胞形态不规则,呈通透性增加,细胞脱落、破碎等改变。MTT 结果显示,阿司匹林作用 A549 细胞可抑制细胞增殖,且呈剂量及时间依赖性。阿司匹林可在 S 期诱导 A549 细胞凋亡,阻断 A549 细胞在 G₀/G₁ 期及 G₂/M 期增殖。阿司匹林作用 A549 细胞后 VEGF、EGFR、FGF 表达水平显著下降,且呈剂量依赖性。**结论** 阿司匹林可抑制非小细胞肺癌 A549 细胞体外增殖,诱导细胞在 S 期凋亡,其凋亡机制可能与阿司匹林可抑制肿瘤血管生成相关因子表达有关。

关键词:血管内皮生长因子; 表皮生长因子受体; 成纤维细胞生长因子; 阿司匹林; 非小细胞肺癌
中图分类号:R734.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2018)06-0813-04

Mechanisms of aspirin for inhibiting proliferation and apoptosis of non-small cell carcinoma by regulating angiogenesis-related factors

GU Xianwen, GU Lanhai, XING Jiaqiang, LI Dianbo, YU Haifang

(Department of Thoracic Surgery, Linyi Municipal Tumor Hospital, Linyi, Shandong 276000, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of aspirin for inhibiting the proliferation and apoptosis of non-small cell carcinoma(A549) by regulating angiogenesis-related factors. **Methods** The A549 cells were cultured in vitro to the logarithmic phase and intervened with aspirin at different level gradients(0.0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 mmol/L). The effect of different aspirin concentration gradients on the cell proliferation rate was detected by using the thiazolyl blue(MTT) method. The A549 cell apoptosis rates at different cellular cycles were detected by using the flow cytometry. The transcriptional level of vascular endothelial growth factor(VEGF), epidermal growth factor receptor(EGFR) and fibroblast growth factor(FGF) were detected by Western blotting. **Results** After aspirin acting on A549 cells, the inverted microscope observed the changes of irregular cellular morphology, increased permeability and cellular disintegration and broken. The MTT results showed that the aspirin action on A549 cells could inhibit cell proliferation in a time and dose dependent manner. Aspirin could induce apoptosis of A549 cells in S phase and block the proliferation of A549 cells in G₀/G₁ phase and G₂/M phase. The expression levels of VEGF, EGFR and FGF after aspirin acting on A549 cells were significantly decreased in a dose-dependent manner. **Conclusion** Aspirin can inhibit the in vitro proliferation of non-small cell carcinoma A549 cells and induces the cellular apoptosis in S phase. The apoptosis mechanism may be related to the inhibition of angiogenesis-related factors by aspirin.

Key words: angiogenesis-related factor; non-small cell carcinoma; proliferation; aspirin; apoptosis

非小细胞肺癌是临床常见的恶性肿瘤,病死率居各类恶性肿瘤的首位,近年发病率呈上升趋势,患者预后差,5 年存活率仅为 13%^[1]。目前临床上对非小细胞肺癌主要采用铂类化疗药物进行治疗,长期大剂量应用铂类化疗药物可增加患者耐药性,降低化疗敏感性^[2]。因此,寻找有效的治疗方案对改善非小细胞肺癌患者预后,提高患者存活率有重要的意义。阿司

匹林属于非甾体抗炎药物,可通过抑制环氧化酶活性而影响机体多种生理病理性活动^[3]。文献[4]指出,阿司匹林可抑制多种肿瘤细胞增殖及生长,如肺癌、胃癌、食管癌、肝癌、乳腺癌及子宫内膜癌等。关云哲等^[5]研究指出,长期服用阿司匹林等非甾体类抗炎药物能有效降低恶性肿瘤发生率。相关流行病学证实,非甾体类抗炎药物能有效降低结直肠癌发生率,可恢

复机体抗肿瘤免疫功能^[6]。本研究通过体外细胞培养探讨阿司匹林抑制非小细胞肺癌 A549 增殖及凋亡的作用机制,旨在为非小细胞肺癌临床预防及治疗提供指导。现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 非小细胞肺癌 A549 细胞(湖南丰晖生物科技有限公司);新生胎牛血清(上海恒远生物有限公司);RPMI1640 培养基(上海博升生物有限公司);四甲基偶氮唑蓝(MTT,上海沪峰化工有限公司);二甲基亚砜(DMSO,上海伊卡生物技术有限公司)。

1.2 仪器与试剂 光学显微镜(型号 DMLP-MP30;上海光学仪器厂);微量移液器(20、200、1000 μL ;DragonMed 公司);台式微量离心机(型号 H1650-W;北京大龙兴创实验仪器有限公司);高速冷冻离心机(型号 A1330103;太仓市华美生化仪器厂);台式低温高速离心机(型号 TD-35M/TD35;上海珂淮仪器有限公司);CO₂ 培养箱(型号 MCO-20AIC;上海旦鼎国际贸易有限公司);电子天平(BP211D 型;Sartorius 公司);酶联免疫检测仪(型号 DNM-9602G 型;北京普朗新技术有限公司);流式细胞仪(型号 1401-X-20R;贝克曼库尔特有限公司)。血管内皮生长因子(VEGF)试剂盒(上海吉泰依科赛生物科技有限公司);表皮生长因子受体(EGFR)试剂盒(北京雅康博生物科技有限公司);成纤维细胞生长因子(FGF)试剂盒(上海纪宁实业有限公司);细胞凋亡检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)。兔抗人 VEGF 克隆抗体、兔抗人 EGFR 克隆抗体、兔抗人 FGF 抗体均购于美国 Santa Cruz 生物公司,阿司匹林购于河南福森药业有限公司。

1.3 方 法

1.3.1 非小细胞肺癌 A549 的培养 取非小细胞肺癌 A549 细胞,在无菌操作条件下置于含 10% 胎牛血清(100 U/mL 青霉素 + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素) RPMI1640 培养基中,恒温培养于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO₂ 培养箱中,传代时依次加入 0.01% II 型胶原酶、0.08% 胰蛋白酶消化 10 min,反复消化直至组织块消失。收集悬浮液,离心过滤后留取沉淀物,继续传代培养于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO₂ 培养箱中,每次传代 2~4 d,收集对数生长期细胞,每种实验重复 3 次。

1.3.2 倒置显微镜下观察细胞形态 在 6 孔培养板中接种非小细胞肺癌 A549 细胞 1×10^5 个/孔,分别加入阿司匹林 2.5、5.0、10.0、20.0 mmol/L,每组设 3 个复孔,将等体积生理盐水加入对照组,加入培养基,培养 24 h,后应用倒置显微镜下细胞形态。

1.3.3 噻唑蓝(MTT)法测定细胞生长抑制率 在 96 孔板中接种对数期非小细胞肺癌 A549 细胞 1×10^4 个/孔,将新生胎牛血清 100 μL 分别加入孔中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO₂ 培养箱中培养,24 h 后加药,分别加入阿司匹林 2.5、5.0、10.0、20.0 mmol/L,每组设 3 个复孔,将等体积生理盐水加入对照组,加入培养基,继

续恒温培养于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO₂ 培养箱中,分别加入 5 g/L MTT 溶液 20 μL ,待培养 24、48、72 h 后,继续恒温孵育 4 h,将培养液去掉,依次加入经生物素标记山羊抗小鼠免疫球蛋白及辣根酶标记链霉卵白素工作液于室温孵育。应用酶标仪测量样品在 570 nm 处吸光度,并计算生长抑制率。细胞生长抑制率(%) = (1 - 药物组 A 值/对照组 A 值) $\times 100\%$ 。

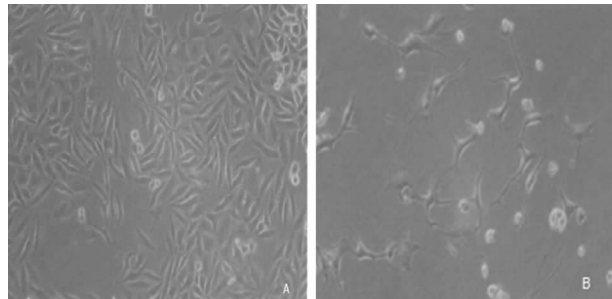
1.3.4 非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡率测定 应用 0.25% 胰酶消化细胞制备悬液,在 6 孔培养板中培养对数生长期非小细胞肺癌 A549 细胞 1×10^5 个/孔。分别加入阿司匹林 2.5、5.0、10.0、20.0 mmol/L,每组设 3 个复孔,将等体积生理盐水加入对照组,加入培养基,收集细胞于作用 24 h 后。采用 70% 乙醇固定细胞,行 Annexin V/PI 双染色,具体操作:取 10 万个细胞,离心 5 min,弃去上清液,加入 200 μL Annexin V-FITC 结合液,轻轻重悬细胞,室温下避光孵育 10 min,离心处理 5 min 后加入 190 μL Annexin V-FITC 结合液,轻轻重悬细胞,加入 10 μL 碘化丙啶染色液,轻轻混匀,冰浴下避光放置 10 min 后上机使用流式细胞仪测定细胞凋亡率,重复操作 3 次。

1.3.5 Western blot 法测定相关蛋白 分别在 10 mmol/L 阿司匹林作用 A549 细胞 24、48 h 后加入细胞裂解液,并于低温下高速离心 30 min,收集上清液,加入考马斯亮蓝染色,酶标仪测定蛋白水平,并置于沸水中加热 5 min 破坏蛋白结构,加入 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳分离蛋白,并转移至 PVDF 膜上,加入 5% 脱脂奶粉封闭过夜,分别加入兔抗人 VEGF 克隆抗体、兔抗人 EGFR 隆抗体、兔抗人 FGF 抗体, TBST 洗涤 2 次, ECL 显影压片。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析,对数据先行正态分布检验,对于符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 F 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 阿司匹林作用非小细胞肺癌 A549 细胞形态学观察 在倒置显微镜下观察 10.0 mmol/L 阿司匹林作用非小细胞肺癌 A549 48 h 后,细胞呈通透性增加,形态不规则,细胞脱落、破碎等改变。见图 1。



注:A 为对照组非小细胞肺癌 A549 细胞形态学表现;B 为 10.0 mmol/L 阿司匹林作用非小细胞肺癌 A549 48 h 后细胞形态学表现

图 1 阿司匹林作用非小细胞肺癌 A549 细胞形态学观察

2.2 阿司匹林对非小细胞肺癌 A549 细胞增殖抑制

作用 MTT 结果显示,阿司匹林可抑制非小细胞肺癌 A549 细胞增殖,且呈剂量及时间依赖性。见表 1。

表 1 阿司匹林对非小细胞肺癌 A549 细胞的生长抑制率($\bar{x} \pm s, \%$)

时间	0.0 mmol/L	2.5 mmol/L	5.0 mmol/L	10.0 mmol/L	20.0 mmol/L
24 h	—	0.84±0.03	9.79±1.56	21.37±0.99	57.21±9.23
48 h	—	5.87±0.20*	12.84±2.67*	36.48±6.72*	72.12±10.78*
72 h	—	10.57±0.26*#	20.44±5.29*#	47.50±7.33*#	91.82±11.75*#
F		288.40	6.832	17.054	7.286
P		0.000	0.028	0.003	0.025

注:与 24 h 相比,* $P < 0.05$;与 48 h 相比,# $P < 0.05$;—表示无数据

2.3 阿司匹林诱导非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡
 未经处理的非小细胞肺癌 A549 细胞处于 G_0/G_1 期的高达 60%,较少处于凋亡期。经阿司匹林处理后,A549 细胞处于 G_0/G_1 期数量明显减少,而处于 S 期的细胞数明显增加。随着药物水平增加,细胞周期改变,大部分细胞在 S 期发生凋亡,凋亡率呈时间及剂量依赖性。见表 2。

表 2 阿司匹林作用非小细胞肺癌 A549 细胞 48 h 后各周期细胞凋亡率($\bar{x} \pm s, \%$)

阿司匹林水平	细胞周期			
	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期	凋亡期
0.0 mmol/L	60.8±1.5	10.2±1.2	25.2±2.2	0.5±0.1
2.5 mmol/L	54.5±1.8*	18.9±2.2*	23.2±3.2*	2.8±0.5*
5.0 mmol/L	52.5±2.2*	30.2±2.5*	22.5±2.8*	19.2±1.5*
10.0 mmol/L	45.5±2.4*	38.2±1.6*	15.5±3.8*	32.2±2.2*
20.0 mmol/L	40.2±2.6*	52.9±3.5*	8.9±2.3*	52.8±3.8*
F	52.332	48.950	42.363	40.110
P	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 0.0 mmol/L 阿司匹林比较,* $P < 0.05$

2.4 阿司匹林抑制肿瘤 VEGF、EGFR、FGF 蛋白表达
 阿司匹林作用 A549 细胞后 VEGF、EGFR、FGF 蛋白表达水平明显下降,且呈剂量依赖性,提示阿司匹林抑制 A549 细胞凋亡的机制可能与其抑制血管相关生成因子表达,影响肿瘤新生血管生成有关。见图 2。

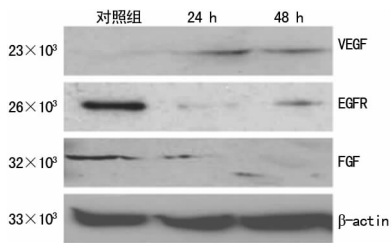


图 2 阿司匹林抑制肿瘤 VEGF、EGFR、FGF 蛋白表达

3 讨论

化疗是目前治疗非小细胞肺癌的重要手段,但大部分化疗药物会产生不良反应,影响患者化疗依从性^[7]。此外,长期应用同一种化疗药物治疗容易导致机体产生耐药性,影响化疗效果。因此,寻找安全有效的抗肿瘤治疗方案对改善非小细胞肺癌患者预后,提高患者存活率具有积极的作用。阿司匹林属于非甾类药物,近年研究表明,阿司匹林在抗肿瘤治疗方面具有广阔的应用前景^[8]。刘宇等^[9]通过大样本对

照研究发现,慢性胃溃疡患者中服用过阿司匹林的患者其胃癌发生率明显低于未服用过阿司匹林者,经年龄、性别及社会因素校正后,提示服用阿司匹林可将胃癌风险明显降低,且随着用药频率的增加,风险进一步降低。LICHTENBERGER 等^[10]研究指出,阿司匹林不仅能降低多种恶性肿瘤的发生率,而且还可通过抑制糖原合成酶激酶-3 β 及其下游基因产物活性,达到吉西他滨促进胰腺癌细胞凋亡的作用。本研究发现,阿司匹林能够对非小细胞肺癌 A549 细胞增殖产生明显的抑制作用,使细胞活性降低,将细胞阻滞在 DNA 合成的 S 期,从而有效诱导细胞凋亡,并呈时间及剂量依赖性。

肿瘤的生成、增殖及转移过程伴随着血管的生成,肿瘤血管生成过程包括内皮细胞迁移、增殖、管状结构形成及血流贯通等步骤,而在这个过程中血管生成相关因子起到重要的作用^[11]。目前研究指出,VEGF、EGFR、FGF 等多种因子在肿瘤血管生成中起到重要的调节作用^[12]。VEGF 是最强的促血管生成因子,可与血管内皮细胞表面受体结合,并增加血管通透性,介导血管内皮细胞迁移。同时 VEGF 可激活 PI3K/Akt 信号通路,促进血管内皮细胞增殖,并诱导血管生成,促进肿瘤形成。阿司匹林能够抑制原癌基因 ErbB2 的表达,进而抑制其下游细胞 VEGF 信号通路表达,抑制此信号通路在阿司匹林诱导的血管新生中起重要作用。EGFR 属于酪氨酸激酶型受体,可参与细胞增殖及血管生成^[13]。HENRY 等^[14]研究指出,EGFR 可介导多种信号转导并参与肿瘤进展,促进肿瘤细胞增殖、侵袭及转移。研究指出,阿司匹林的抗肿瘤作用机制主要与抑制 EGFR 的表达有关,阿司匹林对胃癌的抑制作用主要与其抑制 EGFR 的表达有关^[15]。FGF 由内皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞分泌。它的作用是促进内皮细胞的游走和平滑肌细胞的增殖,能够修复损伤的内皮细胞及促进新血管形成。因此,通过下调非小细胞肺癌患者肿瘤细胞中 VEGF、EGFR、FGF 表达将有助于抑制肿瘤的生成。本研究结果显示,阿司匹林作用 A549 细胞后 VEGF、EGFR、FGF 表达水平显著下降,且呈剂量依赖性,提示阿司匹林抑制 A549 细胞凋亡的机制可能与其抑制血管相关生成因子表达,影响肿瘤新生血管生成有关。

综上所述,阿司匹林可抑制非小细胞肺癌 A549

细胞体外增殖,诱导细胞在S期凋亡,其凋亡机制可能与阿司匹林可抑制肿瘤血管生成相关因子表达有关。

参考文献

[1] 程光.不同化疗方案治疗老年Ⅲ期非小细胞肺癌的效果及预后[J].中国老年学杂志,2015,34(13):3636-3637.

[2] 刘飞,贾鑑慧,孙丽萍,等.奥利沙铂、多西紫杉醇化疗方案联合同步三维适形放疗治疗晚期非小细胞肺癌的近期临床疗效观察[J].现代生物医学进展,2014,14(7):1315-1319.

[3] 张根豪,刘俊文,苏利沙,等.阿司匹林对人卵巢癌组织和SKOV3细胞SOX7表达和Wnt/ β -catenin信号通路的影响[J].郑州大学学报(医学版),2015,58(2):240-243.

[4] 李涛,乔筱玲,王敏,等.阿司匹林促进干扰素- α 诱导肝癌凋亡的作用机制[J].中华肝胆外科杂志,2014,20(9):670-674.

[5] 关云哲,王振中.小剂量阿司匹林对前列腺癌细胞的增殖抑制作用研究[J].中国实验诊断学,2014,17(5):821-822.

[6] ZELL J A, MCLAREN C E, ALBERS C G, et al. A phase IIa clinical biomarker trial of aspirin and dietary arginine restriction in colorectal cancer patients[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(15):132-135.

[7] 田伟,豆亚伟,戴云,等.不同化疗方案治疗晚期非小细胞肺癌的临床疗效及肿瘤标志物与疗效的相关性研究[J].河北医学,2016,22(8):1305-1307.

[8] 王南雄,吕军,胡卫列,等.阿司匹林预防前列腺癌内分泌治疗后心血管疾病的疗效及安全性[J].广东医学,2014,51(7):1105-1107.

[9] 刘宇,高东,钟静静,等.阿司匹林与氟尿嘧啶协同抑制结

肠癌细胞生长增殖的机制研究[J].中国病理生理杂志,2014,2(6):988-993.

[10] LICHTENBERGER L M, PHAN T, FANG D, et al. Bioavailability of aspirin in rats comparing the drug's uptake into gastrointestinal tissue and vascular and lymphatic systems: implications on aspirin's chemopreventive action [J]. J Physiol Pharmacol, 2016, 67(5): 635-642.

[11] SHIAO J, THOMAS K M, RAHIMI A S, et al. Aspirin/antiplatelet agent use improves disease-free survival and reduces the risk of distant metastases in Stage II and III triple-negative breast cancer patients [J]. Breast Cancer Res Treat, 2017, 161(3): 463-471.

[12] ITALIAN A I. Aspirin use for the primary prevention of cardiovascular disease and cancer; reflections on the 2016 U. S. Preventive Services Task Force recommendation statement [J]. G Ital Cardiol(Rome), 2016, 17(11): 881-883.

[13] YANG L U, CHEN Y J, TANG Z, et al. Aspirin and levofloxacin for the prevention of the occurrence of prostate cancer or transformation to castration-resistant prostate cancer; a two-part, open-label, randomised, controlled study [J]. Lancet, 2016, 388(1): 85-90.

[14] HENRY W S, LASZEWSKI T, TSANG T, et al. Aspirin suppresses growth in PI3K-Mutant breast cancer by activating AMPK and inhibiting mTORC1 signaling [J]. Cancer Res, 2017, 77(3): 790-801.

[15] HUANG X Z, CHEN Y, WU J, et al. Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs use reduce gastric cancer risk; a dose-response meta-analysis [J]. Oncotarget, 2017, 8(3): 4781-4795.

(收稿日期:2017-09-18 修回日期:2017-11-22)

(上接第812页)

参考文献

[1] 柯莉芹,王凤美,李银洁,等.儿童肺炎支原体肺炎流行病学特征[J].中国当代儿科杂志,2013,15(1):33-36.

[2] MA X, DING M J, ZHAO X X, et al. Features of lung dysfunction in children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia with different chest imaging findings[J]. Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(10): 997-1000.

[3] 吴跃进,孙节,张建华,等.糖皮质激素辅助治疗儿童肺炎支原体大叶性肺炎的疗效[J].中国当代儿科杂志,2014,16(4):401-405.

[4] 万其芳.阿奇霉素联合小剂量激素治疗肺炎支原体大叶性肺炎的疗效[J].实用临床医学,2015,16(5):11-12.

[5] YOU S Y, JWA H J, YANG E A, et al. Effects of methylprednisolone pulse therapy on refractory mycoplasma pneumoniae pneumonia in children [J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2014, 6(1): 22-26.

[6] 付晓燕,辛德莉,秦选光,等.儿童肺炎支原体感染流行病学、临床特点、发病机制及治疗研究进展[J].山东医药,2015,55(4):96-99.

[7] 孟珊珊.儿童肺炎支原体感染的肺外表现及发病机制[J].国际儿科学杂志,2013,40(1):14-18.

[8] 徐翠萍,张波.大叶性肺炎支原体肺炎的临床特点分析

[J].空军医学杂志,2015,31(1):31-34.

[9] 阳爱梅,宋建辉,黄榕,等.1 026例儿童肺炎支原体感染及耐药情况分析[J].中国当代儿科杂志,2013,15(7):522-525.

[10] WU Y J, SUN J, ZHANG J H, et al. Clinical efficacy of adjuvant therapy with glucocorticoids in children with lobar pneumonia caused by Mycoplasma pneumoniae [J]. Chi J Contemp Pediatr, 2014, 16(4): 401-405.

[11] 李凯.儿童重症肺炎支原体肺炎30例临床分析[J].中国综合临床,2013,29(11):1222-1223.

[12] 王利玲,杜琳麟,程申,等.阿奇霉素联合热毒宁治疗肺炎支原体感染患儿血清炎性因子的影响分析[J].中华医院感染学杂志,2014,24(4):863-865.

[13] 饶鸣皋.血清炎性因子在难治性肺炎支原体肺炎患儿中变化的临床意义[J].安徽医药,2014,18(9):1710-1711.

[14] 甄波,胡国斌,曾艳等.难治性肺炎支原体肺炎患儿血清炎性细胞因子水平变化及意义[J].山东医药,2015,59(44):73-75.

[15] 贺金娥,高春燕,李红日,等.小剂量甲泼尼龙对肺炎支原体肺炎患儿血清肿瘤坏死因子- α 水平的影响[J].中国当代儿科杂志,2013,15(10):850-853.

(收稿日期:2017-08-25 修回日期:2017-11-12)