

# 环氧化酶-2 表达在 NK/T 细胞淋巴瘤 化疗耐药中的作用及其机制研究

王亚民, 顾康生

**摘要** 目的 探讨环氧化酶-2 (COX-2) 的表达导致 NK/T 细胞淋巴瘤细胞株化疗耐药的可能机制。方法 MTS 法检测表阿霉素、COX-2 抑制剂塞来昔布及 Akt 信号通路抑制剂 LY294002 对 NK/T 淋巴瘤细胞株 YTS 的生长影响。Western blot 检测表阿霉素作用后 COX-2 的表达情况, 高表达 COX-2 YTS 细胞分成表阿霉素组、表阿霉素联合塞来昔布 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 组及表阿霉素、塞来昔布 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 联合 LY294002 (25  $\mu\text{mol/L}$ ) 组进行比较, Western blot 检测 Akt、p-Akt、Bax、Bcl-2、Mcl-1 表达情况, MTS 检测细胞存活率, 流式细胞仪检测细胞的凋亡变化。结果 表阿霉素、塞来昔布、LY294002 对 YTS 的生长均具有细胞毒作用, 并呈剂量依赖性。表阿霉素可以诱导 YTS COX-2 的高表达, 且呈剂量依赖性。与未被诱导细胞相比, COX-2 高表达的细胞株对表阿霉素的耐受性提高, Western blot 结果显示 Bcl-2、Mcl-1 和 p-Akt 蛋白表达升高, Bax 蛋白表达降低。COX-2 高表达 YTS 细胞分成表阿霉素组、表阿霉素联合塞来昔布 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 组及表阿霉素、塞来昔布 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 联合 LY294002 (25  $\mu\text{mol/L}$ ) 组进行比较, 细胞存活率依次降低; 凋亡率依次升高; Bax 表达依次升高; p-Akt、Bcl-2、Mcl-1 表达依次降低。结论 表阿霉素可诱导 NK/T 淋巴瘤细胞株 YTS COX-2 表达, 高表达 COX-2 细胞株可能通过 p-Akt 信号通路介导细胞凋亡途径提高对表阿霉素的耐受性。

**关键词** 环氧化酶-2; 凋亡; Akt; 表阿霉素; NK/T 淋巴瘤细胞株 YTS

中图分类号 R 733.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)08-1039-06

环氧化酶-2 (Cyclooxygenase-2, COX-2) 是前列腺素合成过程中的一个重要限速酶, 研究<sup>[1]</sup>表明在鼻型 NK/T 细胞淋巴瘤患者中, COX-2 表达可以作为治疗反应不佳的预后因子, 提示 COX-2 在该类型淋巴瘤肿瘤对化疗的耐受性方面发挥重要作用; 而化疗耐药的一个重要原因是肿瘤对凋亡诱导的耐受, 其中磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3-kinase/Akt, PI3K/Akt) 信号通路的激活

被认为是肿瘤细胞抗凋亡的主要机制之一, 影响肿瘤细胞对化疗的敏感性。为探讨 NK/T 细胞淋巴瘤耐药的机制, 该研究拟采用化疗药物表阿霉素诱导 NK/T 淋巴瘤细胞株 YTS, 获得高表达 COX-2 细胞株并进行分组研究, 检测 p-Akt、Bax、Bcl-2、Mcl-1 表达和细胞存活率; 探讨 p-Akt 信号通路和细胞凋亡途径在 COX-2 高表达的 NK/T 细胞淋巴瘤化疗耐药中的作用及可能机制。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 人 NK/T 淋巴瘤细胞株 YTS 由郑州大学第一附属医院张明智教授馈赠; 1640 培养基购自赛默飞世尔生物化学制品 (北京) 有限公司; 表阿霉素、塞来昔布购自美国辉瑞公司; LY294002 购自美国 Sigma 公司; COX-2 单抗和 Bax、Bcl-2、Mcl-1、Akt、p-Akt 单抗购自美国 Bioworld Technology 公司;  $\beta$ -actin、鼠/兔二抗均购自北京中杉金桥公司; Marker 和发光剂购自美国 Thermo Scientific 公司; BCA 蛋白定量试剂盒购自原平皓生物技术有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 人 NK/T 淋巴瘤细胞株 YTS 接种于含 10% 胎牛血清, 1% 非必须氨基酸的 1640 培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度培养箱中常规培养, 3~4 d 传代。

## 1.2.2 不同剂量表阿霉素对 YTS 细胞生长的影响

取对数生长期的细胞 (细胞数为  $10 \times 10^4/\text{ml}$ ), 每孔 90  $\mu\text{l}$  接种 96 孔板, 分别加入含表阿霉素 (0、3.33、6.66、9.99、1.32、1.67 mg/L) 培养液, 终液量 100  $\mu\text{l}/\text{孔}$ , 并设等量 PBS 孔调零。培养 24 h 加入 MTS 20  $\mu\text{l}$ , 继续培养 4 h, 酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光值 (A)。

## 1.2.3 不同剂量塞来昔布对 YTS 细胞生长的影响

取对数生长期的细胞 (细胞数为  $10 \times 10^4/\text{ml}$ ), 每孔 90  $\mu\text{l}$  接种于 96 孔板。将含塞来昔布 (0、20、40、60、80、100  $\mu\text{mol/L}$ ) 的培养液加入接种于 96 孔板的 YTS 细胞。终液量 100  $\mu\text{l}/\text{孔}$ , 并设等量 PBS 孔调零。培养 24 h 加入 MTS 20  $\mu\text{l}$ , 继续培养 4 h, 酶标仪检测 A 值。

2014-02-25 接收

基金项目: 安徽省高校省级自然科学基金项目 (编号: KJ2011Z164)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院肿瘤科, 合肥 230022

作者简介: 王亚民, 男, 硕士研究生;

顾康生, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: ks63@tom.com.

**1.2.4 不同剂量 LY294002 对 YTS 细胞生长的影响** 取对数生长期的细胞(细胞数为  $10 \times 10^4$ /ml), 每孔 90  $\mu$ l 接种于 96 孔板。将含 LY294002 (0、25、50、75、100、150  $\mu$ mol/L) 的培养液加入接种于 96 孔板的 YTS 细胞。终液量 100  $\mu$ l/孔, 并设等量 PBS 孔调零。培养 24 h 加入 MTS 20  $\mu$ l, 继续培养 4 h, 酶标仪检测 A 值。每组设定 5 个复孔, 取其平均值, 实验重复 3 次。细胞存活率 = (实验组 A 值/对照组 A 值)  $\times$  100%, 细胞死亡率 = 1 - 细胞存活率。

**1.2.5 表阿霉素对 COX-2 表达不同的 YTS 细胞存活率的影响** 取对数生长期的细胞(细胞数为  $10 \times 10^4$ /ml), 每孔 90  $\mu$ l 接种于 96 孔板。A 组为未处理对照组, B 组直接加入表阿霉素 3.3 mg/L 10  $\mu$ l 作用 24 h。C 组每孔加入表阿霉素 0.33 mg/L 10  $\mu$ l 预作用 3 h 后再加入表阿霉素 3.3 mg/L 10  $\mu$ l 作用 24 h。设等量 PBS 孔调零培养 24 h 加入 MTS 20  $\mu$ l, 继续培养 4 h, 酶标仪检测 A 值。

**1.2.6 不同干预组作用于高表达 COX-2 YTS 细胞后细胞存活率变化** 取对数生长期的细胞(细胞数为  $10 \times 10^4$ /ml), 每孔 90  $\mu$ l 接种于 96 孔板, 每孔均加入表阿霉素 0.33 mg/L 10  $\mu$ l 预作用 3 h 后分组, C 组每孔加入表阿霉素 3.3 mg/L 10  $\mu$ l 作用 24 h, D 组每孔加入表阿霉素 3.3 mg/L 10  $\mu$ l 和塞来昔布 20  $\mu$ mol/L 10  $\mu$ l 作用 24 h, E 组加入表阿霉素 3.3 mg/ml 10  $\mu$ l 和塞来昔布 20  $\mu$ mol/L 10  $\mu$ l 及 LY294002 25  $\mu$ mol/L 10  $\mu$ l 作用 24 h, 设等量 PBS 孔调零培养 24 h, 加入 MTS 20  $\mu$ l, 继续培养 4 h, 酶标仪检测 A 值。

**1.2.7 流式细胞术检测凋亡率** 细胞分组和处理同上, A 组为对照组。作用 24 h 后收集细胞。先将每孔上清液吸取到对应的 10 ml 离心管中, 每孔加 1 ml 预冷 PBS 洗涤后同样收集到对应的离心管中, 1 500 r/min 离心 10 min 后弃上清液后同样用预冷 PBS 离心洗涤 1 次。每孔加 750  $\mu$ l PI 溶液, 37  $^{\circ}$ C 避光作用 20 min 以充分消化细胞, 吹打后确保将所有细胞收集到离心管中, 混匀。4  $^{\circ}$ C 避光染色过夜。重悬收集细胞, 混匀后转移到流式管中, 流式细胞仪在 FL3 参数即第三荧光激发波长处对每管细胞进行 DNA 细胞周期分析, 并将结果予以保存。WinMDI 2.9 软件分析亚二倍体峰 DNA 含量所占细胞周期的百分率即细胞凋亡率, 绘制量效曲线图。每组实验重复 3 次。

**1.2.8 表阿霉素对 YTS 细胞 COX-2 蛋白表达的影响** 分别收集表阿霉素 (0、0.033、0.165、0.33 mg/

L) 作用 3 h 的细胞, 冰上裂解 30 min, 4  $^{\circ}$ C 离心, 提取蛋白。以 BCA 方法进行蛋白定量, 120  $^{\circ}$ C、5 min 变性处理, 上样后分别行电泳 100 V 30 min 后转 150 V, 电泳至溴酚蓝刚出现即可, 终止电泳进行转膜。按预染 Marker 切取相应分子量凝胶, 半干转膜, 电压 100 V, 转膜 1 h, 含 5% 脱脂牛奶 TBST 液封闭 2 h, 孵育 COX-2 单抗 4  $^{\circ}$ C 过夜, TBST 清洗 3 次, 每次 15 min。加入辣根酶标记的鼠或兔二抗孵育 1 h, TBST 清洗后, 于曝光仪中涂上发光剂曝光, 并保存图像。目的条带用捷达 801 专业数码凝胶成像与分析系统 3.3.2 进行分析, 以目的条带与  $\beta$ -actin A 值的比值作为蛋白表达相对含量。

**1.2.9 Western blot 检测不同处理组的 p-Akt、Bax、Bcl-2、Mcl-1 蛋白表达** 分别提取 A、B、C、D、E 组细胞的蛋白, 按照 1.2.8 中方法检测 Bax、Bcl-2、Mcl-1 及 p-Akt 蛋白表达。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 19.0 统计软件分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 单变量两组资料间的比较采用 *t* 检验, 多组资料间的比较用单因素方差分析。

## 2 结果

**2.1 表阿霉素对 YTS 细胞生长的影响** 不同浓度的表阿霉素对细胞生长均有抑制作用, 这种作用呈剂量依赖性。见图 1。

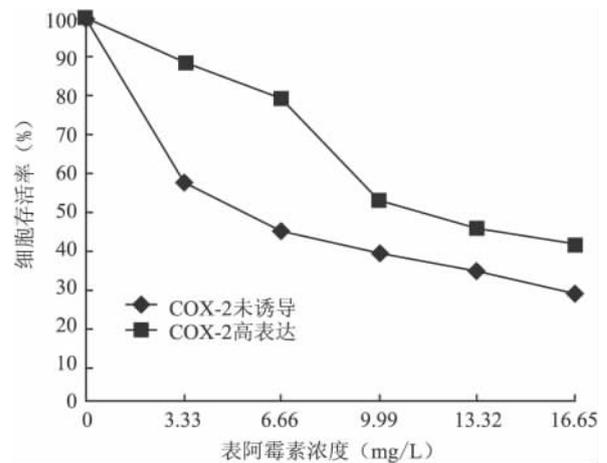


图1 表阿霉素对 COX-2 表达不同的 YTS 细胞存活率的影响

**2.2 塞来昔布对 YTS 细胞生长的影响** 不同浓度的塞来昔布对细胞生长均有抑制作用, 呈剂量依赖性。见表 1。

**2.3 LY294002 对 YTS 细胞生长的影响** 不同浓度的 LY294002 对细胞生长均有抑制作用, 呈剂量依赖性。见表 1。

表 1 不同浓度塞来昔布和 LY294002 对 YTS 细胞生长的影响 (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

浓度(μmol/L)	A <sub>450</sub>	YTS 存活率(%)	P <sub>1</sub> 值	P <sub>2</sub> 值
塞来昔布				
0	0.89 ± 0.01	100		
20	0.82 ± 0.07	92.28 ± 1.77	0.003 000	
40	0.72 ± 0.09	80.20 ± 1.89	0.000 200	0.008 80
60	0.61 ± 0.19	68.21 ± 1.39	0.000 100	0.000 59
80	0.54 ± 0.14	60.73 ± 1.22	0.000 008	0.008 79
100	0.45 ± 0.09	50.38 ± 1.06	0.000 001	0.002 77
LY294002				
0	0.89 ± 0.01	100		
25	0.81 ± 0.02	90.49 ± 1.65	0.001 39	
50	0.70 ± 0.03	78.94 ± 3.24	0.000 90	0.008 8
75	0.62 ± 0.01	69.04 ± 1.54	0.000 03	0.003 4
100	0.54 ± 0.01	60.65 ± 1.15	0.000 01	0.002 1
150	0.43 ± 0.01	48.97 ± 0.07	0.000 01	0.000 4

P<sub>1</sub>:与未加药组比较;P<sub>2</sub>:与前一浓度组比较

2.4 表阿霉素对 COX-2 表达不同的 YTS 细胞存活率的影响 检测结果显示:高表达 COX-2 细胞株与未诱导细胞株相比,在接受相同剂量的表阿霉素作用后,细胞存活率明显增加,差异具有统计学意义 (P=0.000 32, P<0.05)。见图 1。

2.5 不同干预组作用于高表达 COX-2 YTS 细胞后细胞存活率变化 检测结果显示:COX-2 高表达 YTS 细胞分别加入单药表阿霉素,表阿霉素联合塞来昔布,及表阿霉素、塞来昔布联合 LY294002,3 组进行比较,细胞株存活率逐渐降低,差异具有统计学意义 (P=0.000 23, P<0.05)。见图 2。

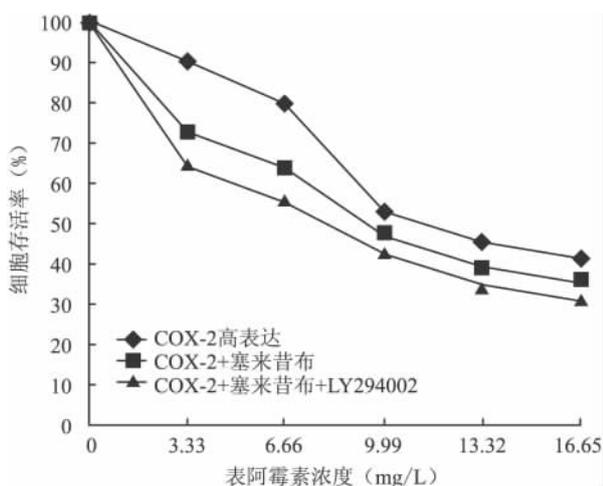


图 2 不同干预组作用于高表达 COX-2 YTS 细胞后细胞存活率变化

2.6 不同处理组的细胞凋亡率变化 检测结果显示:与 B 组未诱导细胞株相比,在接受相同剂量的表阿霉素作用后,C 组 COX-2 高表达细胞株的凋亡

率明显降低。C 组与表阿霉素联合塞来昔布(D 组)及表阿霉素、塞来昔布联合 LY294002 (E 组)相比较,细胞凋亡率依次增高,差异具有统计学意义 (P<0.05)。见表 2、图 3。

表 2 不同处理组接受表阿霉素作用 24 h 后 YTS 细胞凋亡的变化 (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	YTS 细胞凋亡率(%)	P <sub>1</sub> 值
A	0.48 ± 0.02	
B	64.8 ± 1.12 **	0.000 000 1
C	28.32 ± 0.69 **	0.000 000 1
D	38.22 ± 0.92 **	0.000 190 0
E	49.50 ± 1.29 **	0.000 540 0

P<sub>1</sub>:与前一浓度组比较

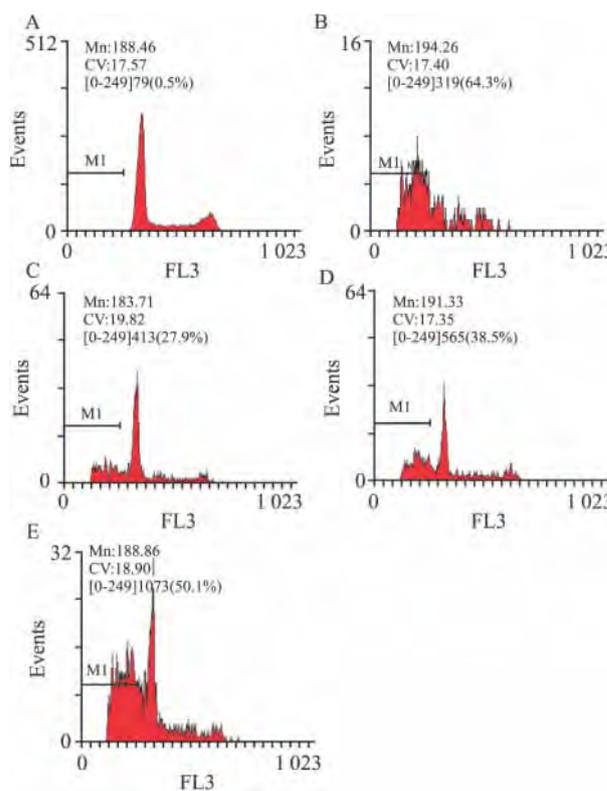


图 3 不同处理组细胞凋亡率变化

A:空白对照组; B:YTS 细胞直接加入表阿霉素作用 24 h 组; C:高表达 COX-2 YTS 细胞加入表阿霉素作用 24 h 组; D:高表达 COX-2 YTS 细胞加入表阿霉素和塞来昔布作用 24 h 组; E:高表达 COX-2 YTS 细胞加入表阿霉素和塞来昔布及 LY294002 作用 24 h 组

2.7 表阿霉素对 YTS 细胞 COX-2 表达的影响

Western blot 结果显示:YTS 细胞 COX-2 有一定表达,随着表阿霉素 (0、0.033、0.165、0.33 mg/L) 作用剂量的增加,COX-2 的表达呈增高趋势。见图 4。

2.8 不同处理组的 p-Akt、Bax、Bcl-2、Mcl-1 蛋白表达

Western blot 结果显示:与 B 组未诱导细胞

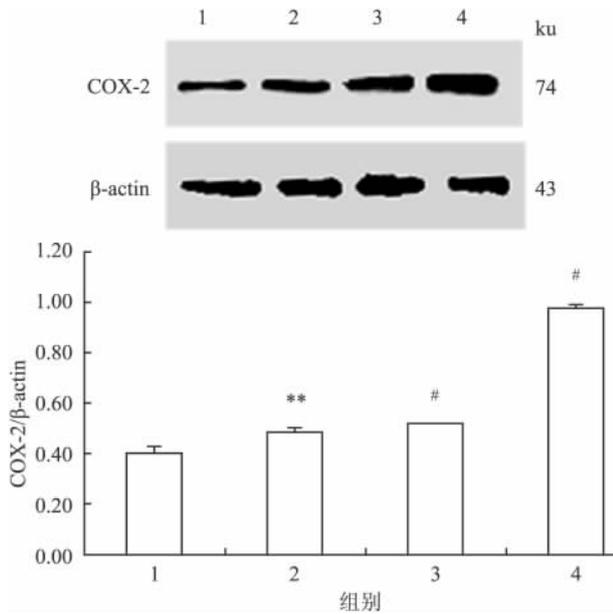


图4 不同剂量表阿霉素对 YTS 细胞作用 3 h 后 COX-2 蛋白表达的影响

1: 空白对照组;2:表阿霉素 0.033 mg/L 组;3:表阿霉素 0.165 mg/L 组;4:表阿霉素 0.33 mg/L 组;与空白对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ;与前一浓度组比较: #  $P < 0.05$

株相比 ,C 组 COX-2 高表达 YTS 细胞株在接受表阿霉素作用 24 h 后 ,Bcl-2、Mcl-1 和 p-Akt 蛋白表达增强 ,Bax 蛋白表达减弱。C、D、E 3 组干预组相比较 ,Bax 蛋白表达依次增强;p-Akt、Bcl-2、Mcl-1 蛋白表达依次减弱。见图 5。

### 3 讨论

正常情况下 ,COX-2 在绝大部分组织细胞中不表达 ,细胞因子、某些药物等多种刺激因子可以诱导其高表达。研究<sup>[2]</sup>显示抗肿瘤药物可诱导肿瘤细胞表达 COX-2。Gu et al<sup>[3]</sup>研究结果表明 ,紫杉醇可诱导胃癌细胞株 SGC-7901 的 COX-2 高表达。研究<sup>[1]</sup>表明 ,在鼻型 NK/T 细胞淋巴瘤患者中 ,COX-2 表达可以作为治疗反应不佳的预后因子 ,提示 COX-2 在该类型淋巴瘤肿瘤对化疗的耐受性方面发挥重要作用。

对凋亡诱导的耐受是肿瘤化疗耐药的一个重要原因;引起细胞信号凋亡通路和凋亡相关分子的变化均会导致细胞凋亡耐受 ,多种对细胞凋亡起促进或抑制作用的基因参与其中 ,其中 Bcl-2 家族较受关注。Bcl-2 和 Bax、Mcl-1 都属于 Bcl-2 家族 ,Bcl-2、Mcl-1 编码蛋白抑制凋亡 ,Bax 编码蛋白促进凋亡。Chen et al<sup>[4]</sup>在肺癌细胞中发现 ,COX-2 可能通过 Akt、Mcl-1 从而介导细胞对凋亡的耐受。

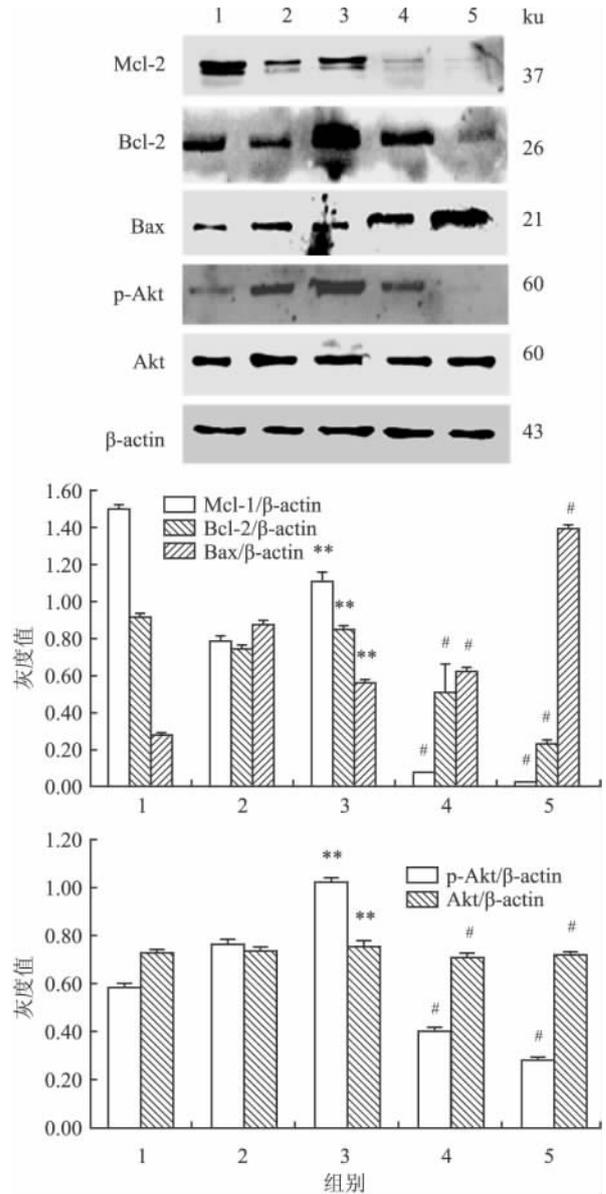


图5 不同处理组 Bax、Bcl-2、Mcl-1、p-Akt 表达变化

1:A 组;2:B 组;3:C 组;4:D 组;5:E 组;与 B 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ;与前一浓度组比较: #  $P < 0.05$

PI3K/Akt 信号通路的激活被认为是肿瘤细胞抗凋亡的主要机制之一 ,影响肿瘤细胞对化疗的敏感性。在胃癌细胞与化疗药物依托泊苷和阿霉素化疗耐药研究中显示:PI3K/Akt 信号通路发挥重要作用 ,用 PI3K 抑制剂阻断 PI3K/Akt 信号通路后 ,可减弱胃癌细胞对两种化疗药物的抵抗<sup>[5]</sup>。研究<sup>[6-7]</sup>显示许多肿瘤细胞的凋亡可能是通过 p-Akt 信号通路介导发生。Hill et al<sup>[8]</sup>发现 ,在胰腺癌细胞中 ,COX-2 高表达可以使 p-Akt 活化增强。也有文献<sup>[9]</sup>报道 COX-2 的抑制剂塞来昔布可以抑制 Akt 的磷酸化。

本研究中 ,用表阿霉素刺激 YTS 细胞诱导

COX-2 高表达, 获得高表达 COX-2 细胞株。预实验中发现, 表阿霉素浓度为 0.33 mg/L 作用 3 h 后, COX-2 表达最高, 故每次选取这一浓度来诱导 COX-2 高表达。塞来昔布和 LY294002 对细胞生长呈剂量毒性, 本研究中选取作用细胞 24 h 后无明显细胞毒性的浓度。塞来昔布选取浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$ , LY294002 选取浓度为 25  $\mu\text{mol/L}$ 。

在本研究中, COX-2 高表达细胞与未诱导细胞相比, 在接受相同浓度表阿霉素作用后, 对表阿霉素的耐受性提高。Western blot 检测显示, COX-2 高表达细胞 p-Akt 活化表达升高, Bcl-2、Mcl-1 抗凋亡蛋白表达升高, Bax 促凋亡蛋白表达降低, 提示高表达 COX-2 细胞可能通过 p-Akt 信号通路介导细胞凋亡途径提高对表阿霉素的耐受性。

为进一步研究高表达 COX-2 细胞可能通过 p-Akt 信号通路介导细胞凋亡途径提高对表阿霉素的耐受性的假设, 本研究将 COX-2 高表达细胞分成 3 组, 分别加入表阿霉素单药、表阿霉素联合塞来昔布 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 两药及表阿霉素、塞来昔布 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 联合 LY294002 (25  $\mu\text{mol/L}$ ) 3 组结果比较显示, COX-2 的抑制剂塞来昔布可以抑制 p-Akt 的表达, 这与有关文献<sup>[9]</sup>提出 COX-2 的抑制剂塞来昔布可以抑制 Akt 的磷酸化说法一致。随着 p-Akt 表达的逐渐降低, 细胞存活率不断降低, 凋亡率逐渐增加。Bax 表达逐渐增高; Bcl-2、Mcl-1 表达逐渐降低。这与 Lin et al.<sup>[10]</sup>在其他肿瘤细胞中发现 COX-2 可能通过 p-Akt 信号通路上调 Mcl-1 的表达而提高肿瘤细胞存活率的结果是相似的。

综上所述, NK/T 淋巴瘤细胞株 YTS 可被表阿霉素诱导获得 COX-2 高表达。高表达 COX-2 细胞可能通过 p-Akt 信号通路介导细胞凋亡途径提高对表阿霉素的耐受性。p-Akt 可作为新的提高化疗效果靶点进行进一步探索和研究。

## 参考文献

- [1] Shim S J, Yang W I, Shin E, et al. Clinical significance of cyclooxygenase-2 expression in extranodal natural killer (NK)/T-cell lymphoma, nasal type [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007 67 (1): 31-8.
- [2] Eichele K, Ramer R, Hinz B. Decisive role of cyclooxygenase-2 and lipocalin-type prostaglandin D synthase in chemotherapeutics-induced apoptosis of human cervical carcinoma cells [J]. *Oncogene* 2008 27(21): 3032-44.
- [3] Gu K S, Chen Y. Mechanism of P-glycoprotein expression in the SGC7901 human gastric adenocarcinoma cell line induced by cyclooxygenase-2 [J]. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012 13 (5): 2379-83.
- [4] Chen W, Bai L, Wang X, et al. Acquired activation of the Akt/cyclooxygenase-2/Mcl-1 pathway renders lung cancer cells resistant to apoptosis [J]. *Mol Pharmacol* 2010 77(3): 416-23.
- [5] Rodriguez D, Rojas-Rivera D, Hetz C. Integrating stress signals at the endoplasmic reticulum: the BCL-2 protein family rheostat [J]. *Biochim Biophys Acta* 2011 1813 (4): 564-74.
- [6] Jia S S, Xi G P, Zhang M, et al. Induction of apoptosis by D-limonene is mediated by inactivation of Akt in LS174T human colon cancer cells [J]. *Oncol Rep* 2013 29(1): 349-54.
- [7] Liu Q, Dong H W, Sun W G, et al. Apoptosis initiation of bionone in SGC-7901 gastric carcinoma cancer cells via a PI3K-AKT pathway [J]. *Arch Toxicol* 2013 87(3): 481-90.
- [8] Hill R, Li Y, Tran L M, et al. Cell intrinsic role of COX-2 in pancreatic cancer development [J]. *Mol Cancer Ther* 2012 11 (10): 2127-37.
- [9] Agarwal S, Achari C, Praveen D, et al. Inhibition of 12-LOX and COX-2 reduces the proliferation of human epidermoid carcinoma cells (A431) by modulating the ERK and PI3K-Akt signalling pathways [J]. *Exp Dermatol* 2009 18(11): 939-46.
- [10] Lin M T, Lee R C, Yang P C, et al. Cyclooxygenase-2 inducing Mcl-1-dependent survival mechanism in human lung adenocarcinoma CL1.0 cells. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway [J]. *J Biol Chem* 2001 276 (52): 48997-900.

## Experimental study of cyclooxygenase-2 expression in NK/T cell lymphoma in the role of chemotherapy drug resistance and its mechanism

Wang Yamin, Gu Kangsheng

(Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the potential mechanism of chemotherapy drug resistance induced by cyclooxygenase-2 (COX-2) in NK/T cell lymphoma. **Methods** The effects of epirubicin and celecoxib, a COX-2 selective inhibitor and LY294002, the Akt pathway inhibitor on the viability of NK/T cell was assessed by MTS assay. The effect of epirubicin on regulating the COX-2 expression was detected by Western blot. The significance of

# 褪黑素对 ICSI 周期中人未成熟卵母细胞体外成熟结果的影响

高明<sup>1</sup> 郝燕<sup>1</sup> 陈大蔚<sup>1,2</sup> 纪冬梅<sup>1</sup> 陈蓓丽<sup>1</sup> 邹薇薇<sup>1</sup> 章志国<sup>1,2</sup> 曹云霞<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 探讨褪黑素的应用对卵泡浆内单精子注射 (ICSI) 周期中人未成熟卵母细胞体外成熟 (IVM)、受精和胚胎发育的影响。方法 收集的人未成熟卵母细胞随机置于含褪黑素和不含褪黑素的 IVM 培养液中进行 IVM 培养, 记录和分析未成熟卵 IVM 以及所获胚胎的发育情况。结果 用含褪黑素 IVM 培养液培养的未成熟卵母细胞为褪黑素组 ( $n=94$ ) IVM 培养成熟 78 枚, ICSI 后受精 60 枚, 培养后卵裂 59 枚, 发育至囊胚 26 枚, 其 14 枚为优质囊胚, 而非褪黑素组 ( $n=73$ ) IVM 培养成熟 60 枚, ICSI 后受精 44 枚, 培养后卵裂 42 枚, 随后 11 枚发育至囊胚, 仅 1 枚优质囊胚。两组间成熟率、受精率、卵裂率及囊胚率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 但褪黑素组的优质囊胚率明显高于非褪黑素组 (53.8% vs 9.1%), 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $\chi^2 = 6.42$ )。结论 褪黑素的应用改善了 IVM 效果, 使人未成熟

卵母细胞在 IVM、ICSI 及胚胎培养后发育更多的优质囊胚。  
**关键词** 褪黑素; 未成熟卵母细胞; 体外成熟; 发育  
 中图分类号 R 321; R 329  
 文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)08-1044-04

1983 年, Veeck et al<sup>[1]</sup> 首次报道了利用体外成熟 (*in vitro* maturation, IVM) 培养获得成熟卵母细胞并生育一正常婴儿。目前 IVM 已成为辅助生殖领域的一项重要技术, 但大量研究<sup>[2-3]</sup> 结果显示, 未成熟卵母细胞经 IVM、体外受精和胚胎体外培养很少能发育至囊胚阶段。为了改善 IVM 结果, 研究人员不断对 IVM 过程各个环节进行改进。2013 年, Kim et al<sup>[4]</sup> 将褪黑素引入人未成熟卵母细胞 IVM 培养体系, 在 IVM 培养液中添加 10  $\mu\text{mol/L}$  褪黑素获得了 60% 的临床妊娠率, 显著高于其他报道的 IVM 妊娠率。研究<sup>[4]</sup> 表明卵泡液中含有一定浓度的褪黑素, 在卵母细胞的生长和成熟过程中有重要的作用。该研究中添加 5~10  $\mu\text{mol/L}$  褪黑素的 IVM 培养液培养卵泡浆内单精子注射 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 周期中获得的未成熟卵母细胞, 探讨褪黑素的应用能否改善 ICSI 周期未成熟卵母细胞及所获胚胎的发育, 为 IVM 方案的优化和临床应用提供依据。

2014-03-20 接收

基金项目: 国家重大研究计划 (编号: 2012CB944704); 国家自然科学基金青年科学基金培育计划 (编号: 2012KJ06)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学第一附属医院生殖医学中心, 合肥 230022

<sup>2</sup>安徽省生命资源保存与人工器官工程技术研究中心, 合肥 230022

作者简介: 高明, 男, 硕士研究生;

曹云霞, 女, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: caoyunxia6@126.com

章志国, 男, 副研究员, 责任作者, E-mail: zzg\_100@gmail.com

chemotherapy drug resistance in cell lines YTS that over express COX-2 was analyzed among different groups treated with epirubicin alone and with celecoxib (20  $\mu\text{mol/L}$ ) or combined with LY294002 (25  $\mu\text{mol/L}$ ). Further, we detected the activation of Akt, p-Akt, Bax, Bcl-2, Mcl-1 by means of Western blot, meanwhile, flow cytometry was used to evaluate cell apoptosis rate. **Results** It was shown that epirubicin, celecoxib and LY294002 were in possession of cytotoxic effect on YTS cell line activity in a dose-dependent manner. When the dose of epirubicin increased, the expression of COX-2 showed a rising trend in YTS cell line. Compared with control cell, COX-2-over-expressing cells were more tolerant to epirubicin, and expressed higher expression of p-Akt, Bcl-2, Mcl-1 and less Bax. Over-express COX-2 was analyzed among different groups treated with epirubicin alone, and with celecoxib (20  $\mu\text{mol/L}$ ) or combined with LY294002 (25  $\mu\text{mol/L}$ ). Cell survival rate decreased and cell apoptosis rate increased successively. At the same time, expression of Bax up-regulated and expression of Bcl-2, Mcl-1, p-Akt reduced successively. **Conclusion** Epirubicin has a cumulative effect on COX-2 expression induction in NK/T lymphoma cell lines YTS. Over-express COX-2 cell lines may increase tolerance of epirubicin through the apoptosis pathway mediated by p-Akt signaling.

**Key words** COX-2; apoptosis; Akt; epirubicin; NK/T lymphoma cell line YTS