

COX-2 抑制剂尼美舒利对 HSC-T6 细胞增殖及凋亡的影响

陆丽娟¹, 彭芳¹, 阳学风²

1. 南华大学衡阳医学院附属第二医院, 湖南衡阳 421001; 2. 南华大学衡阳医学院附属南华医院, 湖南衡阳 421002

[摘要] **目的** 探讨环氧合酶-2(COX-2)抑制剂尼美舒利对肝星状细胞(HSC)-T6 细胞增殖、凋亡的影响。**方法** 将 HSC-T6 细胞实验分为对照组(RPMI-1640 培养液)、低剂量组(尼美舒利 200 $\mu\text{mol/L}$ 培养液)和高剂量组(尼美舒利 400 $\mu\text{mol/L}$ 培养液)。采用免疫细胞化学法检测各组 COX-2 蛋白表达水平, MTT 法检测各组细胞增殖能力, 流式细胞术检测各组细胞凋亡情况。**结果** 低剂量组、高剂量组 COX-2 表达水平均低于对照组($P<0.05$)。在 48、72 h 时, HSC-T6 细胞增殖能力为高剂量组<低剂量组<对照组($P<0.05$)。高剂量组、低剂量组 HSC-T6 细胞凋亡率均高于对照组($P<0.05$)。**结论** 尼美舒利对大鼠 HSC-T6 细胞具有抑制增殖、诱导凋亡的作用。

[关键词] 环氧合酶-2; 尼美舒利; 细胞增殖; 细胞凋亡; HSC-T6 细胞

[中图分类号] R332

[文献标识码] A

Effects of COX-2 inhibitor nimesulide on the proliferation and apoptosis of HSC-T6 cells

LU Lijuan¹, PENG Fang², YANG Xuefeng³

1. The Second Affiliated Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China; 2. Affiliated Nanhua Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421002, Hunan, China

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor nimesulide on the proliferation and apoptosis of hepatic stellate cell(HSC)-T6. **Methods** The HSC-T6 cells experiment were divided into a control group (RPMI-1640 medium), a low-dose group (nimesulide 200 $\mu\text{mol/L}$ medium), and a high-dose group (nimesulide 400 $\mu\text{mol/L}$ medium). Immunocytochemistry was used to detect the expression level of COX-2 protein in each group, MTT assay was used to detect the cell proliferation ability of each group, and flow cytometry was used to detect cell apoptosis. **Results** The expression levels of COX-2 in both low-dose and high-dose groups was lower than that in the control group ($P<0.05$). At 48 and 72 hours, the proliferation ability of HSC-T6 cells was in an order of the high-dose group<the low-dose group<the control group ($P<0.05$). The apoptosis rate of HSC-T6 cells in the high-dose and low-dose groups was higher than that in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** Nimesulide has inhibitory effects on proliferation and induces apoptosis in rat HSC-T6 cells.

[KEY WORDS] COX-2; nimesulide; cell proliferation; cell apoptosis; HSC-T6

肝纤维化是慢性肝病进展的关键病理过程,与肝细胞癌的发生发展密切相关,目前尚缺乏有效的治疗手段^[1-4]。肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)作为肝纤维化的核心效应细胞,在肝脏受损时由静止态转化为活化态,通过过度分泌细胞外基质驱动纤维化进程^[5],因此调控 HSC 的增殖与凋亡成为干预肝纤维化的重要策略。环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)作为诱导型炎症介质,在正常肝脏组织中表达微弱,但在慢性肝炎和肝硬化组织中

呈现进行性高表达特征,其表达水平与肝纤维化程度呈正相关^[6-7]。虽然本课题组前期研究发现 COX-2 抑制剂可显著改善大鼠肝纤维化^[8-9],但其具体作用机制尚未阐明。本研究选用选择性 COX-2 抑制剂尼美舒利,通过观察其对 HSC-T6 细胞增殖和凋亡的影响,旨在揭示 COX-2 促进肝纤维化细胞分子机制,为临床防治肝纤维化提供新的理论依据和治疗靶点。

[收稿日期] 2024-10-18

[修回日期] 2025-08-28

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(08JJ3031)

[作者简介] 陆丽娟,护师,研究方向为慢性肝病的诊治,E-mail 为 272958873@qq.com。通信作者阳学风,博士,主任医师,教授,博士研究生导师,研究方向为慢性肝病的诊治,E-mail 为 yxf9988@126.com。

1 材料和方法

1.1 主要材料

HSC-T6 细胞株(南华大学药理实验室传代保存);尼美舒利(美国 Sigma 公司);RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司);二甲基亚砷(上海艾锐化工有限公司);10% 小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);Annexin V-APC/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司)。

1.2 细胞培养及分组

HSC-T6 细胞接种于 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基中,于 37 °C 饱和湿度、含 5% CO₂ 的孵箱中培养。

根据不同的培养液,将 HSC-T6 细胞实验分为对照组(RPMI-1640 培养液)、低剂量组(尼美舒利 200 μmol/L 培养液)和高剂量组(尼美舒利 400 μmol/L 培养液)。

1.3 免疫细胞化学法检测 COX-2 表达水平

将处于对数生长期的 HSC-6 细胞以 4×10^4 个/mL 的密度接种于 6 孔板内的玻片上,培养 48 h。细胞爬片经 PBS 洗涤 3 次后,30 °C 甲醇固定 15 min;0.1% Triton X-100 透化 10 min;10% 山羊血清于 30 °C 封闭 30 min。随后,实验组加入兔抗 COX-2 一抗(1:200),阴性对照组则以 PBS 代替一抗,4 °C 孵育过夜。次日,加入生物素标记的二抗(1:500,30 °C,1 h)和链霉亲和素-过氧化物酶复合物(30 °C,30 min),DAB 显色 1 min 终止。样本经脱水、透明后封片。COX-2 阳性信号定位于胞质,呈棕黄色^[10]。随机计数 10 个高倍视野(约 1 000 个细胞/视野),计算阳性细胞百分比并取均值。

1.4 MTT 法检测细胞增殖能力

将 HSC-T6 细胞以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,每孔加入 200 μL 含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640

培养液,37 °C、5% CO₂ 条件下培养 2~3 h。低剂量组、高剂量组分别加入 100 μL 含 200 μmol/L 和 400 μmol/L 尼美舒利的培养液,对照组加入等量培养液,每组设 3 个复孔。各组培养 24、48、72 h 后,弃上清,PBS 洗涤,每孔加入 100 μL PBS 和 120 μL 5 g/L MTT 溶液,继续培养 4~6 h。终止培养后加入 150 μL 二甲基亚砷,振荡 10 min,用酶标仪于 490 nm 波长处测定光密度(optical density, OD)值。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡情况

将 HSC-T6 细胞置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中,采用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养 48 h。经 0.2% 胰酶消化后离心收集细胞,用 4 °C 预冷 PBS 洗涤 2 次。加入 250 μL 结合缓冲液重悬细胞,调整密度至 1×10^6 个/mL。取 100 μL 细胞悬液加入流式管,依次加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL 20 μg/mL PI 染液,30 °C 避光孵育 15 min。最后用 400 μL PBS 重悬细胞,经 400 目筛网过滤后,采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率,数据通过 ModFit LT 软件进行分析。

1.6 统计学处理

采用 SPSS16.0 统计软件分析数据。计量资料比较采用方差分析,计数资料比较采用卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 COX-2 表达水平比较

对照组 HSC-T6 细胞胞质内存在大量棕黄色颗粒,而其他两组棕黄色颗粒减少(图 1)。COX-2 阳性表达率,低剂量组(40.13% ± 4.40%)和高剂量组(30.36% ± 5.81%)均低于对照组(70.13% ± 2.40%)($P < 0.05$;图 1)。

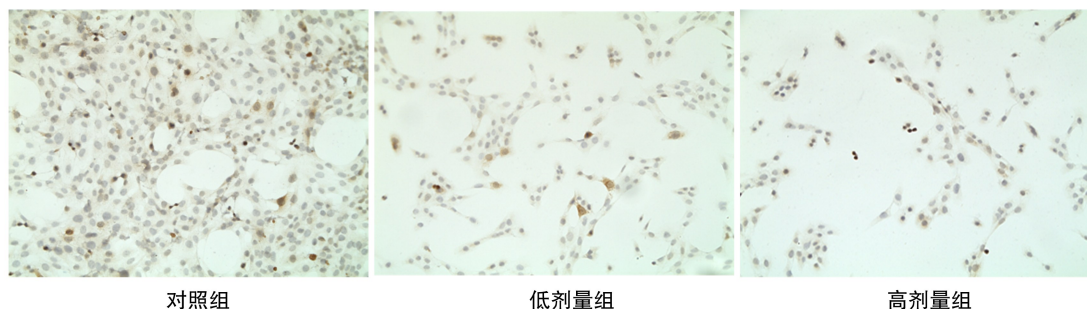


图 1 各组 HSC-T6 细胞 COX-2 表达情况比较(SP, 200×)

2.2 各组 HSC-T6 细胞增殖能力比较

对照组 HSC-T6 细胞增殖能力随着时间的延长呈持续增强趋势 ($P < 0.05$)。在 48、72 h 时, HSC-T6 细胞的增殖能力为高剂量组 < 低剂量组 < 对照组 ($P < 0.05$; 表 1)。

2.3 各组 HSC-T6 细胞凋亡率比较

HSC-T6 细胞凋亡率, 低剂量组 ($25.2\% \pm 7.7\%$) 和高剂量组 ($65.9\% \pm 2.9\%$) 均高于对照组 ($10.2\% \pm 1.3\%$) ($P < 0.05$; 图 2)。

表 1 各组 HSC-T6 细胞不同时间增殖 OD_{490} 值比较

时间	对照组	低剂量组	高剂量组
0 h	0.369±0.015	0.400±0.025	0.389±0.022
24 h	0.602±0.051 ^a	0.526±0.003 ^a	0.725±0.045 ^a
48 h	1.201±0.103 ^{ab}	1.109±0.218 ^{abd}	0.475±0.087 ^{abde}
72 h	1.928±0.142 ^{abc}	0.969±0.055 ^{abcd}	0.227±0.051 ^{abcde}

注: a 为 $P < 0.05$, 与同组 0 h 比较; b 为 $P < 0.05$, 与同组 24 h 比较; c 为 $P < 0.05$, 与同组 48 h 比较; d 为 $P < 0.05$, 与对照组同时时间比较; e 为 $P < 0.05$, 与低剂量组同时时间比较。

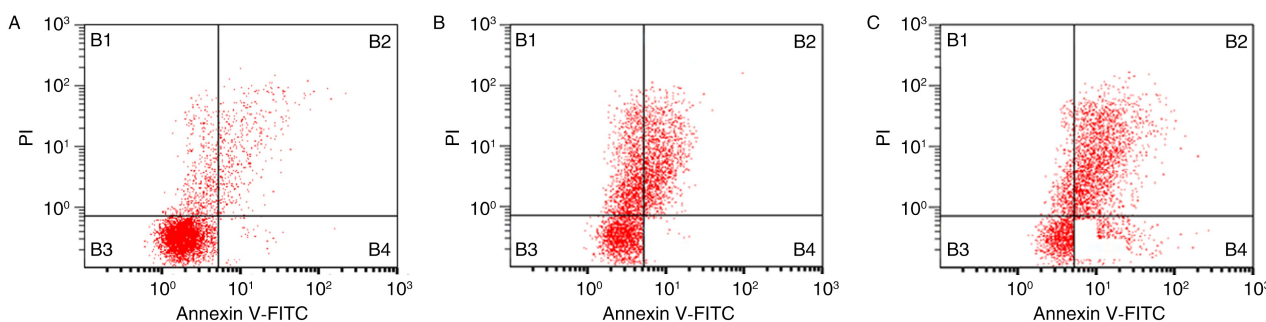


图 2 流式细胞术检测各组 HSC-T6 细胞凋亡情况

A、B、C 分别为对照组、低剂量组、高剂量组双变量流式细胞仪的散点图; 其中, 左上象限 (B1) 为细胞收集过程中产生的损伤细胞; 右上象限 (B2) 是晚期凋亡细胞和坏死细胞; 左下象限 (B3) 展示的是活细胞; 右下象限 (B4) 则代表早期凋亡细胞。

3 讨论

尼美舒利作为一种选择性 COX-2 抑制剂和非甾体抗炎药, 已被证实具有抗肿瘤和抗增殖活性, 可诱导多种肿瘤细胞凋亡^[11-12]。本研究发现, 尼美舒利能显著降低 HSC-T6 细胞中 COX-2 的阳性表达率 ($P < 0.05$), 同时抑制细胞增殖并促进细胞凋亡 ($P < 0.05$), 这一结果为阐明其抗肝纤维化作用机制提供了新的实验依据。本课题组前期研究曾报道尼美舒利具有抗肝纤维化作用^[8], 但其具体机制尚未明确。本研究从细胞水平证实, 尼美舒利可通过调控 HSC-T6 细胞的增殖与凋亡发挥抗肝纤维化作用。

COX-2 作为前列腺素合成的关键酶, 其代谢产物在 HSC 功能调控中具有重要作用。研究表明, 肝脏 M2 巨噬细胞分泌的前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 可通过与 HSC 表面的 E 型前列腺素受体 4 (prostaglandin E Receptor 4, EP4) 结合, 促进 HSC 自噬, 进而增强其活化及细胞外基质沉积^[13]。本实验中尼美舒利显著抑制 COX-2 表达, 提示其可能通过干扰 COX-2/PGE2/EP4 信号轴抑制 HSC 活化。此外, 张丽君等^[14]发现, 沉默 COX-2 可抑制 HSC-T6 细胞增殖, 且该作用可被 P53 信号通路抑制剂

Pifithrin- α 逆转, 表明 COX-2 可能通过 P53 通路调控 HSC 增殖。虽然本研究未直接探讨 P53 通路的作用, 但为后续研究提供了重要方向。

在细胞凋亡调控方面, 本实验发现尼美舒利可显著提高 HSC-T6 细胞凋亡率 ($P < 0.05$)。研究表明, COX-2 代谢产物 2-花生四烯酰甘油 (2-arachidonoylglycerol, 2-AG) 能选择性诱导 HSC 凋亡^[15], 而尼美舒利作为 COX-2 抑制剂, 可能通过减少 2-AG 的分解促进 HSC 凋亡。这一假设需通过检测 2-AG 水平变化进一步验证。COX-2 在正常组织中表达水平极低, 但在肝纤维化过程中被显著诱导^[5-6]。本研究证实, 抑制 COX-2 可通过双重机制——即抑制 HSC-T6 细胞增殖和促进其凋亡——发挥抗纤维化作用, 这为肝纤维化的治疗提供了新的靶点。

综上所述, 本研究揭示了尼美舒利通过抑制 COX-2 表达调控 HSC-T6 细胞增殖与凋亡的作用, 为阐明 COX-2 促进肝纤维化的分子机制提供了实验依据。未来研究可进一步探索: ①尼美舒利是否通过 P53 信号通路抑制 HSC 增殖; ②其对 COX-2 下游代谢产物 (如 PGE2、2-AG) 的具体调控机制。这些研究将有助于开发以 COX-2 为靶点的抗肝纤维化新策略。

(下转第 1100 页)

疗。相较于认知水平低的父母,认知水平较高的父母更易主动发现 CH 患儿的智力障碍情况并及时就诊,整体治疗依从性高,使用正确的训练方法改善 CH 患儿的智力水平^[15]。

综上所述,CH 患儿神经精神发育情况与 FT₃、FT₄、TSH 水平呈一定相关性,早产、母亲甲状腺功能减退、父母学历情况、FT₃、FT₄、FSH 对 CH 患儿神经精神发育均有显著影响,临床可针对性采取措施预防 CH 患儿神经精神发育不良。

[参考文献]

- [1] 李红,刘成山,拉珍. 先天性甲状腺功能减退症患儿 TSHR 基因突变及其与血清 FT₄ 水平的关系[J]. 中南医学科学杂志, 2024, 52(6): 976-979.
- [2] 孙俊杰,高莹,侯新琳,等. 胎儿及新生儿甲状腺功能异常的产前诊断及处理[J]. 中华围产医学杂志, 2021, 24(5): 321-325.
- [3] FELDT-RASMUSSEN U, EFFRAIMIDIS G, BLIDDAL S, et al. Consequences of undertreatment of hypothyroidism [J]. *Endocrine*, 2024, 84(2): 301-308.
- [4] 王双. 济宁地区 2013—2022 年新生儿疾病筛查回顾性分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2023, 31(11): 2334-2337.
- [5] 中华医学会,中华医学杂志社,中华医学会全科医学分会,等. 甲状腺功能减退症基层诊疗指南(2019 年)[J]. 中华全科医师杂志, 2019, 18(11): 1022-1028.
- [6] 毛正欢,杜瑜,王慧,等. Griffiths 发育评估量表-中文版在注意缺陷多动障碍儿童中的发展水平结构模式分析[J]. 中国实用儿科杂志, 2020, 35(11): 896-900.
- [7] STEPIEN B K, HUTTNER W B. Transport, metabolism, and function of thyroid hormones in the developing mammalian brain[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019, 10: 209.
- [8] LÉGER J, DELCOUR C, CAREL J C. Fetal and neonatal thyroid dysfunction[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2022, 107(3): 836-846.
- [9] MORAG I, ROTEM I, FRISCH M, et al. Cumulative pain-related stress and developmental outcomes among low-risk preterm infants at one year corrected age[J]. *Early Hum Dev*, 2017, 109: 1-5.
- [10] YAMAMOTO A, IWANAGA K, MATSUKURA T, et al. Response of preterm infants with transient hypothyroxinaemia of prematurity to the thyrotropin-releasing hormone stimulation test is characterized by a delayed decrease in thyroid-stimulating hormone after the peak[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2020, 93(5): 605-612.
- [11] 张冰,陈鹏,张成云,等. 早产儿甲状腺功能变化及其临床检测价值分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2022, 32(23): 2817-2821.
- [12] 司珊珊,钱明,陈祖培,等. 妊娠早中期孕妇甲状腺功能与子女脑神经发育关系的研究[J]. 中国地方病学杂志, 2012, 31(3): 259-262.
- [13] GUTVIRTZ G, WALFISCH A, WAINSTOCK T, et al. Maternal hypothyroidism and future pediatric neurological morbidity of the offspring[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2019, 299(4): 975-981.
- [14] DA CUNHA MENEZES E, DE ABREU F F, DAVIS J B, et al. Effects of gestational hypothyroidism on mouse brain development: GABAergic systems and oxidative stress[J]. *Dev Biol*, 2024, 515: 112-120.
- [15] 鲍毓,王慧,赵正言. 早期康复干预对先天性甲状腺功能减低症患儿发育状况的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2016, 38(10): 786-788.

(此文编辑 朱雯霞)

(上接第 979 页)

[参考文献]

- [1] GAN L, JIANG Q, HUANG D, et al. A natural small molecule alleviates liver fibrosis by targeting apolipoprotein L2[J]. *Nat Chem Biol*, 2025, 21(1): 80-90.
- [2] 张鹏,郑世豪,苟思媛,等. 中药复方逆转肝纤维化及早期肝硬化的作用机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2024, 40(9): 1873-1879.
- [3] 徐少华,黄江华,朱琳,等. 无创肝纤维化诊断指标在乙型肝炎伴肝硬化及肝癌进展程度中的意义[J]. 四川医学, 2024, 45(8): 827-832.
- [4] 巫协宁. 肝纤维化和其他器官纤维化的药物治疗[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2025, 34(3): 418-419.
- [5] KAMM D R, MCCOMMIS K S. Hepatic stellate cells in physiology and pathology[J]. *J Physiol*, 2022, 600(8): 1825-1837.
- [6] KULESZA A, PACZEK L, BURDZINSKA A. The role of COX-2 and PGE2 in the regulation of immunomodulation and other functions of mesenchymal stromal cells[J]. *Biomedicine*, 2023, 11(2): 445.
- [7] YANG H, XUEFENG Y, SHANDONG W, et al. COX-2 in liver fibrosis[J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 506: 196-203.
- [8] 周筱艳,阳学风. 环氧合酶-2 抑制剂尼美舒利对大鼠肝纤维化的影响[J]. 中华消化杂志, 2004, 24(7): 441-442.
- [9] 阳学风. RNAi 沉默 COX-2 对 HSC 细胞动力学及脂质代谢的影响[D]. 衡阳: 南华大学, 2012.
- [10] 沈洁,张洁. GNPAT1 与 HDAC11 在非小细胞肺癌组织中的表达及其临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2024, 32(21): 4089-4095.
- [11] FERREIRA R G, NARVAEZ L E M, ESPÍNDOLA K M M, et al. Can nimesulide nanoparticles be a therapeutic strategy for the inhibition of the KRAS/PTEN signaling pathway in pancreatic cancer? [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 594917.
- [12] VUNNAM N, YOUNG M C, LIAO E E, et al. Nimesulide, a COX-2 inhibitor, sensitizes pancreatic cancer cells to TRAIL-induced apoptosis by promoting DR5 clustering[J]. *Cancer Biol Ther*, 2023, 24(1): 2176692.
- [13] CAO Y, MAI W, LI R, et al. Macrophages evoke autophagy of hepatic stellate cells to promote liver fibrosis in NAFLD mice via the PGE2/EP4 pathway[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(6): 303.
- [14] 张丽君. P53 在沉默 COX-2 抑制肝星状细胞增殖中的作用[D]. 衡阳: 南华大学, 2017.
- [15] SIEGMUND S V, WOJTALLA A, SCHLOSSER M, et al. Cyclooxygenase-2 contributes to the selective induction of cell death by the endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol in hepatic stellate cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 470(3): 678-684.

(此文编辑 蒋湘莲)