文章编号:1000-5404(2006)05-0451-03

论著

塞来昔布对人结肠癌细胞裸鼠移植瘤肝转移和血管生成的影响

张 超,郝迎学,刘 伟,刘占奎,吕 伟 (第三军医大学西南医院普通外科,重庆 400038)

提 要:目的 研究COX-2选择性抑制剂塞来昔布对结肠癌肝转移瘤微血管生成以及血管生成因子VEGF、bFGF表达的影响,从而探讨COX-2对结肠癌肝转移瘤血管形成的作用机制。**方法** 细胞培养建立稳定的结肠癌细胞株HT-29和HCT-116,利用脾切除法建立结肠癌肝转移动物模型,免疫组化检测结肠癌肝转移瘤MVD、VEGF、bFGF蛋白表达。**结果** 结肠癌肝脏转移率,HT-29组、HCT-116组和塞来昔布组分别为83.33%、16.67%和33.33%。肝脏转移瘤MVD、VEGF、bFGF的表达,HT-29组与HCT-116组、塞来昔布组比较治疗组表达减弱,有显著统计学差异($P<0.01$,$P<0.05$);塞来昔布组与HCT-116组比较无显著性差异($P>0.05$)。**结论** 塞来昔布可能通过抑制促血管生成因子VEGF、BFGF的表达,进而抑制了结肠癌肝转移瘤新生血管生成。

关键词:COX-2;血管生成;血管内皮生长因子;成纤维细胞生长因子
中图法分类号:R73-37;R735.35;R977.15 **文献标识码**:A

Effects of COX-2 and celecoxib on angiogenesis in liver metastasis of colon cancer in mice

ZHANG Chao, HAO Ying-xue, LIU Wei, LIU Zhan-kui, LU Wei (Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effect of COX-2 on liver metastasis of colon cancer in mice by studying the correlation between COX-2 and angiogenesis factor, VEGF, bFGF. **Methods** Colon cancer cell strains, HT-29 and HCT-116 were cultured in Dulbecco modified Eagle medium. The liver metastasis of colon cancer models were established in 36 BALB/c-nu/nu mice by intrasplenic injection of 0.1 ml solution containing 1×10^6 colon cancer cells of HT-29 ($n=24$) or HCT-116 ($n=12$). The mice in HT-29 group were then assigned to receive celecoxib or be used as control with 12 in each subgroup. The expression of MVD, VEGF, bFGF of liver metastasis of colon cancer were studied by immunohistochemical methods (SABC). **Results** The incidence of liver metastasis in HT-29 control group, HCT-116 group, HT-29 celecoxib group were 83.33%, 16.67% and 33.33%, respectively. The expressions of MVD, VEGF and bFGF in HT-29 control group were higher than that in HCT-116 group and HT-29 celecoxib group, while no statistical difference between HCT-116 group and HT-29 celecoxib group. **Conclusion** The expression of COX-2 contributes to angiogenesis in liver metastasis of human colon cancer in nude mice, which is probably related to the production of angiogenic factors, VEGF and bFGF.

Key words: cyclooxygenase-2; angiogenesis; VEGF; FGF

结肠癌是最常见的恶性肿瘤之一,在我国其发病率在各种消化道肿瘤中已升至第2位,且呈逐年增长的趋势。结直肠癌原发瘤发现时已有15%~35%患者发生肝脏转移,尸检资料为60%~70%,因此,研究结肠癌肝转移的原因及机制已成为当前研究的热点之一。有流行病学资料表明长期坚持服用非甾体类抗炎药(nonsteriodal anti-inflammatory drugs, NSAID)类药物如阿司匹林等可使患大肠癌的危险性降低40%~50%,使家族性腺瘤性息肉病息肉的数量和体积减小,使其癌变率和病死率降低。非甾体类抗炎药可以通过抑制环氧化酶(COX)减少前列腺素的产生,并抑制肿瘤的生成,其具体的机制尚未明确,我们利用脾切除法建立结肠癌肝转移动物模型,免疫组化检测结肠癌肝转移瘤MVD、VEGF、BFGF蛋白表达,进而探讨COX-2对结肠癌肝转移瘤新生血管形成的影响。

基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(2005BB5291)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2005BB5291)
作者简介:张 超(1956-),男,重庆市人,博士,主任医师,教授,主要从事胃肠道肿瘤发病机制方面的研究,电话:(023)68773171
收稿日期:2005-07-04;修回日期:2005-08-26

1 材料与方法

1.1 结肠癌细胞株

COX-2 高表达的人结肠癌株 HT-29 购自中南大学湘雅医学院肿瘤研究所，COX-2 低表达的结肠癌细胞株 HCT-116 由第三军医大学医学检验系临床检验教研室惠赠。

1.2 实验动物

BALB/c-nu/ nu 裸小鼠 36 只，鼠龄 4～6 周，体质量 15～20 g，雌性，购自华中科技大学同济医学院动物研究所。

1.3 主要试剂

兔抗鼠 VEGF（血管内皮生长因子）多克隆抗体、兔抗鼠 BFGF（碱性成纤维细胞生长因子）多克隆抗体、SABC 免疫组化试剂盒（即用型）、浓缩型 DAB 显色试剂盒，均购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 模型建立及分组 利用脾切除法建立结肠癌肝转移动物模型可以很好地模拟临床上大肠癌根治术后肝转移征象，而不会在肝转移瘤形成的同时合并脾脏肿瘤[1,2]，36 只裸鼠用随机数字表法分为 HT-29 组（24 只）和 HCT-116 组（12 只），两组裸小鼠脾内分别注入 HT-29 和 HCT-116 细胞悬液 0.1 ml，细胞含量为 1×10^6 个，注射时间为 1 min。HT-29 组 24 只裸鼠再按照随机数字表法分为两组，每组 12 只，其中一组用灌胃法于次日给予塞来昔布（celecoxib）10 mg·kg^{-1}·d^{-1}溶液（即塞来昔布组），另一组作为对照组，不施加干预。

1.4.2 腹腔内肿瘤生长情况 接种后的小鼠自由进食、饮水，活跃如常，体形无改变，每日观察小鼠体重、精神、摄食等情况，40 d 所有裸鼠椎脱臼处死，死亡小鼠均剖腹观察腹腔内肿瘤生长情况，分别取肝脏置于 10 % 甲醛溶液中固定作病理组织学观察和置液氮冻存。

1.5 免疫组化结果判定

1.5.1 微血管判定标准及定量 微血管为毛细血管和仅有 1～2 层薄肌层的小血管。100 倍光镜下选取高密度区，在 200 倍视野下计数 3 个视野的被 FⅧAg 染成棕色的血管数，取其平均值作为该例肿瘤的 MVD 值。与邻近微血管明显分开的阳性染色的血管内皮细胞或细胞簇均视为独立的微血管。

1.5.2 VEGF 和 bFGF 表达结果判定 VEGF 和 bFGF 表达主要在肿瘤细胞的细胞质内，内皮细胞也可，含有棕黄色或棕褐色颗粒的细胞被计为阳性细胞。

1.5.3 免疫组化结果定量分析 应用 Image-pro plus 4.5 免疫组化彩色图像分析系统对免疫组化结果进行定量分析，以图片中的一个阳性点（单个细胞或小腺腔、细胞团）为基础，分析、测定整幅图片阳性点的个数、面积、积分光密度值（D）的参数。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件包行 t 检验。

2 结果

2.1 肉眼观察肝、胃、大肠、小肠、肠系膜、胰、肺等脏器癌转移情况

解剖后肉眼可见发现 HT-29 组有 10 只裸鼠肝脏上有转移瘤形成，转移率为 83.33 %，与 HCT-116 组相比差异非常显著（$P<0.01$）。腹水 3 例（25.0 %），其他脏器未见转移病灶；塞来昔布组 4 只裸鼠发现有肝脏转移瘤形成，转移率为 33.33 %，与 HT-29 组相比有显著性差异（$P<0.05$）。无腹水；HCT-116 组 2 只裸鼠发现有肝脏转移瘤形成，转移率为 16.67 %。

2.2 各组肝脏转移瘤 MVD 比较

HT-29 组明显大于 HCT-116（35.83±4.86）组、塞来昔布组（$P>0.05$），而塞来昔布组与 HCT-116 组比较差别不显著（$P>0.05$）。

2.3 免疫组化（SABC）检测肝转移瘤 VEGF、bFGF 蛋白表达情况

应用 Image-pro plus 4.5 免疫组化彩色图像分析系统对免疫组化结果进行定量分析，HT-29 组与 HCT-116 组、塞来昔布组比较 VEGF、BFGF 蛋白表达有明显差异，塞来昔布组与 HCT-116 组比较差异不显著（表 1、2）。

表 1 肝脏转移瘤 VEGF 免疫组化表达情况

组别	面积	光密度值
HT-29	288 399.7±5 058.673 5	11 159.14±14 748.631 4
塞来昔布	123 376.9±39 786.918 8[a]	59 817.79±12 305.140 2[a]
HCT-116	140 129.0±35 796.866 2[a]	24 776.03±2 458.565[a]

a：$P<0.01$，与 HT-29 组比较

表 2 肝脏转移瘤 bFGF 蛋白表达情况比较

组别	面积	光密度值
HT-29	254 003 16±265 611 446 2	777 091 09±691 414 197
塞来昔布	167 800 12±175 421 002 4[a]	710 111 21±138 215 692[b]
HCT-116	147 353 13±434 315 071[a]	683 981 48±381 015 687

a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与 HT-29 组比较

3 讨论

肿瘤血管生成（tumor angiogenesis，TA）是指肿瘤细胞诱导的毛细血管生长及肿瘤血液循环建立的过程，它受多种促血管生成因子及抑制因子的作用，并有多种酶、细胞粘附分子的参与，主要包括 VEGF、bFGF、转化生长因子 β1（TGFβ1）和肿瘤源性粘附因子（TAF）等。其中 VEGF 是目前已知最强烈的血管发生蛋白，VEGF 选择性地作用于血管内皮细胞膜上的两种Ⅲ型酪氨酸激酶受体 flt21 和 KDR，通过磷酸肌醇特异性磷脂酶 C，使胞内 IP_3 浓度升高而发挥作用。bFGF 是一个促有丝分裂的碱性多肽类物质，bFGF 和其他细胞因子一样，是哺乳动物和人体中一种正常的微量物质，是一种广谱的有丝分裂原，具有广泛的细胞增殖效应，其对血管内皮细胞具有强烈的促增殖、促分裂效应，从而介导组织中新生血管的形成。既然 COX-2 主要在新生血管内皮细胞、巨噬细胞、成纤维细胞和肿瘤细胞自身表达，在肿瘤新生血管生成过程中 VEGF 和 bFGF 又起到了重要作用，那么 COX-2 与 VEGF 和 bFGF 的关系如何呢？有资料证实，

COX-2 可使肿瘤中的 VEGF 表达上调，抑制 COX-2 则可抑制 VEGF 的表达。同时 VEGF 可上调 COX-2 的表达，从而形成一个正反馈网络，协同刺激肿瘤血管生成[3]。COX-2 与 bFGF 的关系密切，COX-2 诱导包括 VEGF、bFGF、内皮素 21 等多种促血管生成因子的表达，选择性 COX-2 抑制剂 NS2398 明显抑制这些因子的表达，使肿瘤血管生成减少[4]。

我们的研究发现：结肠癌肝脏转移率，HT-29 组、HCT-116 组、塞来昔布组分别为 83.33%、16.67%、33.33%。HT-29 组与 HCT-116 组(16.67 %)比较转移率明显升高，有非常显著差异($P<0.01$)；与塞来昔布组比较有显著差异($P<0.05$)；塞来昔布组与 HCT-116 组比较无显著性差异($P>0.05$)。测肝脏转移瘤 MVD、VEGF、bFGF 蛋白表达，HT-29 组比 HCT-116 组明显增强，而应用塞来昔布处理后，即塞来昔布组肝脏转移瘤 MVD、VEGF、bFGF 蛋白表达减弱，有显著统计学意义($P<0.01$ 和 $P<0.05$)；塞来昔布组与 HCT-116 组比较无显著性差异($P>0.05$)。那么 COX-2 促进 VEGF、bFGF 表达上调的途径是什么呢？就现有的资料表明[5]，COX-2 通过前列腺素途径促进 VEGF 的表达上调；COX-2 促进 bFGF 的表达，其机制不清楚，可能是通过血栓素 A2 途径介导的，同时，bFGF 也可以诱导 COX-2 的表达形成新生血管。

综上所述，本研究表明环氧合酶-2 与结肠癌肝转移瘤新生血管生成密切相关，其高表达促进了结肠癌肝转移瘤新生血管生成，其机制可能是上调促血管生成因子 VEGF、bFGF 的表达；环氧合酶-2 的选择性抑制剂塞来昔布对结肠癌肝转移瘤的血管生成有一定的抑制作用；提示环氧合酶-2 在结肠癌肝转移过程中起重要作用，使用环氧合酶-2 选择性抑制剂可能是防治结肠癌肝转移的可行性途径之一。

参考文献：

[1] 许　勤，吴文溪，马利民，等. 小鼠结肠腺癌肝转移模型的建立[J]. 实用癌症杂志，2000，15(5)：456-457.

[2] 陆　飞，沈洪薰，陈瑞新，等. 人结肠癌细胞裸鼠肝转移模型及其血中 CK20 mRNA 表达的研究[J]. 南通医学院学报，2002，22(1)：22-23，26.

[3] TSUJII M，KAWANO S，TSUJI S，*et al*. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells[J]. Cell，1998，93(5)：705-716.

[4] MASFERRER J L，LEAHY K M，KOKI A T，*et al*. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors[J]. Cancer Res，2000，60(5)：1306-1311.

[5] LEAHY K M，ORNBERG R L，WANG Y，*et al*. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells *in vivo*[J]. Cancer，2002，62(3)：625-631.

(编辑　陈聪连)

(上接 450 页)

以排除甲～戊型肝炎病毒感染所致的病毒性肝炎；患者无低热，皮疹，血管炎，内分泌失调，闭经等肝外症状，多次查自身抗体阴性，两次肝穿病检均为急性肝炎的病理表现，无界面肝炎(碎屑状坏死)及淋巴细胞浸润，根据其评分标准可除外自身免疫性肝炎；患者多次发病均为急性表现，无慢性化趋势，且每次发病均无明确的病毒感染，因此未明肝炎病毒所致的病毒性肝炎的可能性也较小；本例患者反复出现黄疸、肝功能异常，在临床上常易误诊为未明病毒所致慢性病毒性肝炎与自身免疫性肝病，但是两次肝穿病检均为急性肝炎，反复询问病史证实患者每次发病前均服用解热镇痛药，因此我们认为本患者是由解热镇痛药反复所致的急性药物性肝炎。

目前常用的感冒药大多含有解热镇痛药，主要成分多为对乙酰氨基酚，对乙酰氨基酚所致的药物性肝炎是通过毒性代谢产物的作用致病；其在肝内大部分转化成葡萄糖醛酸和硫酸盐的结合物，只有 5%～10% 经细胞色素 P450 等的作用，转化为有毒的亚胺醌代谢产物，这些毒性产物进一步被细胞中的谷胱甘肽灭活或者解毒。当药物过量超过谷胱甘肽结合能力时或者在敏感的病人(某些基因异常)，这些有毒的代谢产物可能以共价键的形式与肝毒细胞和肝内大分子共价结合导致肝细胞坏死；给药后很快发病，再一次应用同一药物时，临床表现相似，出现的时间不缩短，症状也不加重。所以该例患者每次在服用常用量的对乙酰氨基酚后出现急性肝损害，考虑与其敏感的体质有关。

因此，在临床工作中有相当一部分的药物性肝炎被误诊或者漏诊，上述病例很容易被误诊为未明病毒的慢性病毒性肝炎或自身免疫性肝病，而不去深究其用药史，使病人继续服药，反复发病。所以作为临床医生要提高对药物性肝炎的认识，做好鉴别诊断，避免已有的和具有潜在肝毒性药物反复导致肝损害的发生，尽量减少、减轻药物带来的不良反应。

关键词：反复发作；对乙酰氨基酚；药物性肝炎
中图法分类号：R575.1　　文献标识码：B

参考文献：

[1] KRAHENBUHL S. Toxic liver injuries[J]. Ther Umsch，2004，61(8)：529-534.

[2] ATHAL G P. Diclofenac-induced liver injury：a paradigm of idiosyncratic drug toxicity[J]. Expert Opin Drug Saf，2004，3(6)：519-523.

[3] WATKINS P B. Idiosyncratic liver injury：challenges and approaches[J]. Toxicol Pathol，2005，33(1)：1-5.

[4] 梁扩寰，李绍白. 肝脏病学[M]. 第 2 版. 北京：人民卫生出版社，2003：776-793.

[5] 赵治国，李　健，李振锋，等. 53 例药源性肝病诊治分析[J]. 中国综合临床，2003，19(11)：1017-1018.

[6] 温朝辉，张丽君，徐惠新. 药源性肝损害[J]. 航空航天医药，2000，11(4)：227-231.

(编辑　张大春)