文章编号:1000-5404(2007)10-0929-03

论著

罗非昔布对裸鼠人胃癌原位种植瘤组织中血管内皮生长因子和诱导型一氧化氮合酶表达的影响

孙永强[1],王 强[2],郑国静[2],孙 溪[2] ([1]南通大学第二附属医院普通外科,南通 226001;[2]第二军医大学附属长征医院普通外科,上海 200073)

提 要:目的 探讨罗非昔布对裸鼠人胃癌原位种植瘤组织中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)表达的影响。**方法** 建立裸鼠人胃癌原位种植转移模型,以罗非昔布给裸鼠灌胃,通过免疫组化 Envision 法检测罗非昔布对原位种植瘤胃癌组织中 VEGF、iNOS 蛋白的表达。**结果** VEGF 的表达:对照组 VEGF 阳性率为 81.25%,罗非昔布组为 61.25%,联合组为 35.00%,罗非昔布组与对照组相比,差异有显著性($P<0.05$),联合组与罗非昔布组相比,差异有显著性($P<0.05$)。iNOS 的表达显示:对照组 iNOS 阳性率为 73.75%,罗非昔布组为 52.50%,联合组为 26.67%,罗非昔布组与对照组相比,差异有显著性($P<0.05$)。**结论** 环氧合酶-2 抑制剂罗非昔布可能通过降低胃癌肿瘤组织中 VEGF、iNOS 的表达,使肿瘤血管生成受抑,从而抑制胃癌细胞的生长和转移。

关键词: 罗非昔布;胃癌;原位移植;血管内皮生长因子;诱导型一氧化氮合酶
中图法分类号: R73-361;R730.23;R735.2 **文献标识码:** A

Effect of rofecoxib on expressions of VEGF and inducible NOS in human gastric carcinoma tissues established in nude mice by orthotopic transplantation

SUN Yong-qiang[1], WANG Qiang[2], ZHENG Guo-jing[2], SUN Xi[2] ([1]Department of General Surgery, The Second Affiliated Hospital, Nantong University, Nantong 226001, [2]Department of General Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200073, China)

Abstract: Objective To evaluate the inhibitory effect of rofecoxib in human gastric carcinoma tissues established in nude mice by orthotopic transplantation through the expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and inducible nitric oxide synthase (iNOS). **Methods** After the models of human gastric carcinoma in nude mice by orthotopic transplantation were established, rofecoxib was administered intragastrically. The expressions of VEGF and iNOS were evaluated in the local tumors by Envision immunohistochemical method. **Results** The expression of VEGF protein in isotonic saline group, rofecoxib group and combination group were 81.25%, 61.25%, and 35.00% respectively. There was significant difference between rofecoxib group and isotonic saline group, and so was rofecoxib group and combination group ($P<0.05$). The expression of iNOS protein in isotonic saline group, rofecoxib group and combination group was 73.75%, 52.50%, and 26.67% respectively, being significantly different among groups ($P<0.05$). **Conclusion** Rofecoxib, by downregulating the protein expression of VEGF and iNOS, may suppress the angiogenesis and further the growth and metastasis of gastric carcinoma.

Key words: rofecoxib; gastric carcinoma; orthotopic transplantation; vascular endothelial growth factor; inducible nitric oxide synthase

作者简介: 孙永强(1970-),男,江苏省南通市人,博士,主治医师,主要从事胃肠肿瘤方面的研究。电话:(0513)85129166,E-mail:sunyq505@sina.com
收稿日期: 2006-10-08;**修回日期:** 2006-12-27

近年来，环氧化酶-2（Cycloxygenase，COX-2）与胃癌的关系越来越受到重视。资料表明，COX-2 的过度表达能促进肿瘤的新生血管生成，而 COX-2 抑制剂可明显抑制这些促血管生成因子的表达[1]。本实验旨在通过建立裸鼠人胃癌原位种植转移模型，检测肿瘤组织中的 VEGF 和 iNOS 表达情况，初步探讨 COX-2 抑制剂罗非昔布对肿瘤生成的影响及潜在的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

BALB/c nu/nu 裸鼠（由中国医学科学院国家啮齿类上海实验分中心提供，合格证号为 No:0001298），32 只，雌雄不拘，6 周龄，体质量 18～20 g，SPF 级条件下饲养。人胃腺癌 SGC-7901 细胞株，由中国医学科学院上海细胞生物研究所提供，2×10^6/ml 细胞悬液腋部皮下注射，成瘤后反复传代至形成实体瘤，本组瘤源为第 6 代。罗非昔布：25 mg/片，杭州默沙东制药有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 人胃癌裸鼠原位种植模型的建立[2] 取传代后 14 d 左右的荷瘤鼠，常规消毒，从腋部皮下剥取肿瘤组织，切成 1 mm × 1 mm × 1 mm 小块备用。动物术前禁食，氯胺酮 50 mg/kg腹腔麻醉，左侧旁正中切口进腹，在胃窦小弯近胃角处用无菌缝合针头划破胃壁浆肌层，植入 1 块瘤组织块于凹内，并在瘤块表面滴上 1 滴 QB 生物胶，凝固后回纳入腹腔，逐层关腹。模型建立 12 周左右，将裸鼠处死。

1.2.2 实验动物分组及给药 在种植术后 1 周，将裸鼠分 4 组，每组 8 只。分别为：对照组（生理盐水 0.2 ml）；化疗组（5-Fu 60 mg·kg^{-1}·周$^{-1}$）；罗非昔布组（罗非昔布 5 mg·kg^{-1}·d^{-1}）；罗非昔布联合 5-Fu 化疗组（罗非昔布 5 mg·kg^{-1}·d^{-1} +5-Fu 60 mg·kg^{-1}·周$^{-1}$）

用法：5-Fu 腹腔注射，每周 1 次，连续 8 周；罗非昔布每天 1 次，灌胃，连续 8 周；生理盐水灌胃，每天 1 次，连续 8 周。其中，联合组于用药后第 4 周和第 8 周各死亡 1 只。

1.3 主要试剂

兔抗人 VEGF 一抗：武汉博士德生物工程有限公司产品，稀释度：1∶50；兔抗人 iNOS 一抗：武汉博士德生物工程有限公司产品，稀释度：1∶80；即用型 Envision 试剂（二抗）：丹麦 Dako 生物制品有限公司产品，批号：K4001；10% 多聚赖氨酸：Sigma 生物制品有限公司产品。本部分采用 Evision 免疫组化方法检测。

以 PBS 为一抗设阴性对照，以丹麦 Dako 生物制品有限公司提供的阳性切片为阳性对照。

1.4 结果判定标准

1.4.1 VEGF 阳性结果判定 染色结果阳性细胞为细胞质着色，呈棕黄色颗粒。以任意 10 个高倍镜视野中阳性细胞所占比率作为评定依据。所占比率为 0～10% 为阴性（－），10%～30% 为弱阳性（＋），30%～50% 为中度阳性（＋＋），50% 以上为强阳性（＋＋＋）。

1.4.2 iNOS 阳性结果判定 光镜下阳性细胞细胞质有棕黄色或棕褐色颗粒表达且着色明显高于背景，根据阳性细胞染色强度及阳性细胞百分数分级：染色强度（未见染色为 0，轻度染色为 1，中度染色为 2，深度染色为 3），阳性细胞的百分率（未见染色为 0，染色细胞 <25% 为 1，染色细胞 25%～50% 为 2，>50% 为 3）进行评分，然后将两方面得分相加。以上实验由两名病理科医师在未知病理诊断的情况下，在高倍镜下观察 10 个视野平均而评定结果。得分 0～2 分判为阴性，3 分以上为阳性表达，其中，3～4 分为弱阳性，5～6 分为强阳性。

1.5 统计学方法

采用 SAS 6.0 统计软件进行 χ^2 检验。

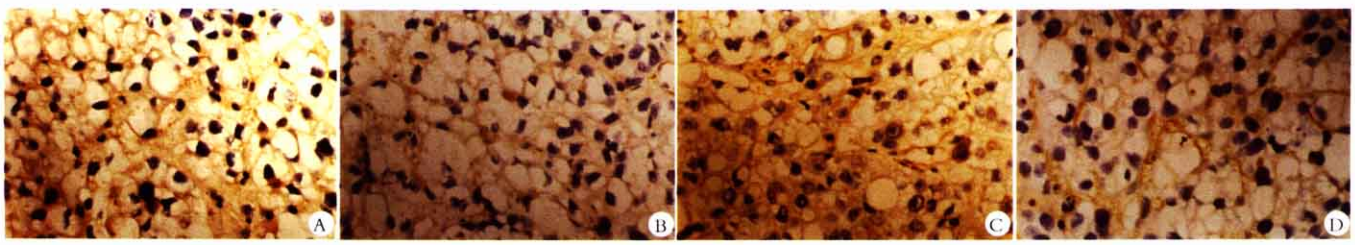
2 结果

2.1 罗非昔布对胃癌组织 VEGF 表达的影响

VEGF 阳性着色颗粒呈棕黄色颗粒，位于肿瘤细胞膜和细胞质内（图 1AB）。罗非昔布组细胞膜（质）上 VEGF 的阳性表达率为 61.25%，与对照组（阳性表达率为 81.25%）相比较，存在显著性差异（$P<0.05$）。罗非昔布组及化疗组中的 VEGF 阳性表达率（分别为 61.25%、58.75%）均明显高于联合组（35.00%）（$P<0.05$）。

2.2 罗非昔布对胃癌组织 iNOS 表达的影响

iNOS 阳性着色颗粒呈棕黄色颗粒，位于肿瘤细胞膜和细胞质内（图 1CD）。罗非昔布组 iNOS 的阳性表达率为 52.50%，与对照组（73.75%）相比较，存在显著性差异（$P<0.05$）。罗非昔布组（52.50%）及化疗组（50.00%）分别与联合组（26.67%）相比，差异有统计学意义（$P<0.05$）。



A：对照组 VEGF；B：罗非昔布组 VEGF；C：对照组 iNOS；D：罗非昔布组 iNOS

图 1 罗非昔布处理前后胃癌组织 VEGF、iNOS 免疫组化染色结果（Envision ×400）

3　讨论

胃癌的生长、转移与复发是血管生成依赖性的。多项研究显示,COX-2 过度表达在胃癌的形成中起重要作用。COX-2 的过度表达可促进肿瘤的新生血管生成,而抑制 COX-2 的表达有可能预防和逆转肿瘤的发生。因此,应用 COX-2 抑制剂可能成为治疗和预防肿瘤的里程碑[3]。

促血管生成因子是肿瘤生长所必需的,其中最重要的是血管内皮细胞生长因子(VEGF)。另外,肿瘤血管生成亦受肿瘤微环境中多种可溶性分子,如一氧化氮(NO)等的调节[4]。一氧化氮(NO)是一种气体性细胞信使物质,参与多种疾病,特别是与肿瘤的发生、发展过程密切相关,NO 可诱导内皮的分裂、增生,调节肿瘤血管新生,调控肿瘤血流量,因而可能是肿瘤生长必要的血管形成开关,没有 NO,肿瘤的生长将会因血供的缺乏而受到限制[5]。

最近研究表明,由 iNOS 诱导生成的 NO 可通过激活 COX-2 的活性来促进血管的生成[6]。另外,在内皮细胞和结肠癌细胞共同培养的实验模型中,结肠癌细胞 COX-2 高表达可刺激血管因子产生,促进血管内皮细胞的游走及血管形成[7]。NO 作为重要的血管扩张剂,可刺激 VEGF 产生并参与 VEGF 促血管生成过程中的每一步骤,NO 可增加 VEGF 的合成[8]。与此同时,肿瘤细胞生成的 VEGF 也可增加内皮细胞生成 NO,并且还可增加内皮细胞 NOS 的活性[9]。

本实验采用的是高选择性环氧化酶-2(COX-2)抑制剂罗非昔布,结果显示:对照组 VEGF 阳性率为 81.25%,罗非昔布组为 61.25%,联合组为 35.00%,罗非昔布组 VEGF 阳性表达率与对照组相比,差异有显著性,提示罗非昔布可以降低 VEGF 的阳性表达率;联合组 VEGF 阳性表达率与罗非昔布组相比,差异有显著性,提示罗非昔布与 5-Fu 联合使用可以增加其对 VEGF 的抑制作用。

iNOS 的表达显示:对照组 iNOS 阳性率为 73.75%,罗非昔布组为 52.50%,联合组为 26.67%,罗非昔布组与对照组相比,差异均有显著性;罗非昔布组与联合组相比,差异有显著性。结果提示罗非昔布可以降低 iNOS 的阳性表达率;罗非昔布与 5-Fu 联合使用可以增加其对 iNOS 的抑制作用。Dicker 等[10]也通过实验观察到常规剂量的罗非昔布可以抑制内皮细胞的增殖、移位和管道形成。

免疫组化分析结果提示:罗非昔布可通过降低 VEGF 和 iNOS 的阳性表达率而抑制胃肿瘤血管生成;罗非昔布与 5-Fu 联合使用可以增加对胃肿瘤 VEGF 和 iNOS 表达的抑制作用,抑制胃肿瘤的血管生成。实验表明,选择性 COX-2 抑制剂具有抑制肿瘤新生血管生成的作用。同时又不存在 NSIADs 的副作用。因此,高选择性 COX-2 抑制剂有可能为恶性肿瘤的治疗开辟新的治疗途径。

参考文献:

[1] Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, *et al*. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation [J]. Hepatology, 1999, 29(3): 688-696.

[2] 孙永强,臧　宏,王　强,等. 人胃癌裸鼠胃原位种植转移模型的建立和改进[J]. 南通大学学报:医学版, 2005, 25(3): 169-170,173.

[3] Yamamoto D S, Viale P H. Cyclooxygenase-2: from arthritis treatment to new indications for the prevention and treatment of cancer[J]. Clin J Oncol Nurs, 2003, 7(1): 21-29.

[4] Liu Y, Christou H, Morita T, *et al*. Carbon monoxide and nitric oxide suppress the hypoxic induction of vascular endothelial growth factor gene *via* the 5' enhancer [J]. J Biol Chem, 1998, 273(24): 15257-15262.

[5] Ambs S, Merriam W G, Bennett W P, *et al*. Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression [J]. Cancer Res, 1998, 58(2): 334-341.

[6] Lala P K, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression [J]. Lancet Oncol, 2001, 2(3): 149-156.

[7] Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, *et al*. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells[J]. Cell, 1998, 93(5): 705-716.

[8] Konopka T E, Barker J E, Bamford T L, *et al*. Nitric oxide synthase Ⅱ gene disruption: implications for tumor growth and vascular endothelial growth factor production [J]. Cancer Res, 2001, 61(7): 3182-3183.

[9] Michel J B. Role of endothelial nitric oxide in the regulation of the vasomotor system [J]. Pathol Biol (Paris), 1998, 46(3): 181-189.

[10] Dicker A P, Williams T L, Grant D S. Targeting angiogenic processes by combination rofecoxib and ionizing radiation[J]. Am J Clin Oncol, 2001, 24(5): 438-442.

(编辑　张大春)