论著

文章编号:1000-5404(2008)14-1338-04

塞来昔布对人结肠癌裸鼠移植瘤的抑制作用及其机制

赵士彭[1],赵 发[1],许明月[1],张啸尘[1],蔡建辉[2] (河北医科大学:[1]第三医院肛肠外科,河北省大肠肛门病研究中心,石家庄 050051,[2]第二医院胃肠外科,石家庄 050000)

摘 要:目的 研究不同剂量环氧化酶-2(COX-2)抑制剂塞来昔布对人结肠癌裸鼠移植瘤生长的影响及机制。**方法** 将人结肠癌HT-29细胞注射于裸鼠背部皮下建立移植瘤模型,16 d后,将裸鼠以随机数字表法分为5组:对照组、塞来昔布1组(25 mg·kg^{-1}·d^{-1})、塞来昔布2组(50 mg·kg^{-1}·d^{-1})、塞来昔布3组(75 mg·kg^{-1}·d^{-1})、塞来昔布4组(100 mg·kg^{-1}·d^{-1}),并给予相应剂量的塞来昔布。每周测量肿瘤体积,给药35 d后,处死裸鼠,切取移植瘤组织检测COX-2,survivin表达,VEGF mRNA表达和微血管密度(MVD)。**结果** 塞来昔布1、2、3、4组的抑瘤率分别为34.94%、39.20%、53.50%、59.20%,与对照组比较移植瘤体积明显缩小($P<0.05$)。与对照组比较,塞来昔布各组COX-2、survivin的表达水平均明显降低($P<0.05$),并且抑制程度呈药物剂量依赖性。低剂量(25 mg·kg^{-1}·d^{-1})塞来昔布可明显抑制VEGF mRNA表达和结肠癌移植瘤微血管生成($P<0.05$,*vs* 对照组),其抑制作用并未随用药剂量的增加而增强。**结论** 不同剂量的塞来昔布均能明显抑制结肠癌移植瘤的生长,其抑制作用呈用药剂量依赖性,这种作用可能是通过抑制survivin的表达实现的。低剂量塞来昔布可抑制人结肠癌裸鼠移植瘤微血管生成,可能对防止肿瘤转移起到重要作用。

关键词: 结肠癌;微血管生成;环氧化酶-2抑制剂;survivin

中图法分类号: R73-361;R735.35;R979.11 **文献标识码:** A

Celecoxib suppresses xenograft tumor of colon cancer in nude mice

ZHAO Shi-peng[1], ZHAO Fa[1], XU Ming-yue[1], ZHANG Xiao-chen[1], CAI Jian-hui[2] ([1]Department of Anorectal Surgery, The Third Hospital, Shijiazhuang 050051; [2]Department of Gastroenterology, The Second Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: Objective To evaluate the effects of celecoxib on tumor growth, COX-2 and survivin expressions and angiogenesis in nude mice. **Methods** Xenograft animal model was established by injecting human colon cancer HT-29 cells into the BALB/c nude mice subcutaneously. Fifty mice were randomly divided into 4 groups 16 d after injection: control group, celecoxib group (receiving 25, 50, 75, 100 mg·kg^{-1}·d^{-1} for 35 d). Tumor volumes were measured every week. The expression level of COX-2, survivin and the microvessel density (MVD) of the xenograft tumor tissues were measured by immunohistochemistry, and mRNA level of VEGF by RT-PCR. **Results** Celecoxib at dose of 25, 50, 75 and 100 mg·kg^{-1}·d^{-1} inhibited the tumor volume by 34.94%, 39.20%, 53.50%, 59.20% respectively, and showed more effective in suppressing the tumor growth than the control group ($P<0.05$). All celecoxib groups showed a significantly decreased expression of COX-2 and survivin compared with those in the control group ($P<0.05$) and their expression was in a dose-dependent manner. 25 mg·kg^{-1}·d^{-1} celecoxib inhibited VEGF mRNA expression and angiogenesis as compared with the control group ($P<0.05$), but not in a dose-dependent manner. **Conclusion** Celecoxib can suppress tumor growth partly by inhibiting survivin expression. Low dose of celecoxib can decrease the angiogenesis of xenograft colon cancer, and furthur more prevent the metastasis of colorectal cancer.

Key words: colon cancer angiogenesis COX-2 inhibitor survivin

基金项目: 河北省科技厅科学技术研究与发展计划(072761314)

Supported by the Funds of Scientific Research & Development Plan of Department of Science & Technology of Hebei Province (072761314)

作者简介: 赵士彭,男,河北省石家庄市人,硕士,副主任医师,副教授,主要从事结直肠癌微血管和便秘方面的研究,发表论文12篇。电话:(0311)87871225,E-mail:shipengzcn@yahoo.com.cn

通信作者: 蔡建辉,E-mail:jianhuicai2001@163.com

收稿日期: 2007-07-05;**修回日期:** 2007-11-10

近年结直肠癌的发病率在各种消化道肿瘤中已升至第 2 位,非甾体抗炎药(NSAIDs)和选择性环氧化酶-2(COX-2)抑制剂可抑制 COX-2 的活性,使人类患结直肠癌的危险性下降。探索 COX-2 及其抑制剂在结直肠癌发生、发展中的作用机制有重要的临床意义。本实验通过建立人结肠癌裸鼠皮下移植瘤模型,以不同剂量选择性 COX-2 抑制剂塞来昔布(celecoxib)对裸鼠结肠癌模型分组进行干预治疗,研究塞来昔布对人结肠癌裸鼠移植瘤生长、凋亡抑制蛋白生存素(survivin)表达和微血管生成的影响。

1　材料与方法

1.1　细胞培养及裸鼠移植瘤模型的建立

1.1.1　实验动物　　4 ~ 5 周龄 BALB/c 雌性裸鼠 50 只,体质量 20 ~ 24 g(中国医学科学院北京动物研究所),实验动物合格证编号:SCXK-2005-0013。于无特定病原体(SPF)环境饲养。

1.1.2　细胞培养　　小牛血清(杭州四季青公司),胰蛋白酶和一次性培养瓶(美国 HyClone 公司),人结肠癌细胞株 HT-29 和 D/F12 培养基(中国协和医科大学基础医学院基础医学细胞中心)。使用含 10% 新生牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素的 D/F12 培养基,培养于 37 ℃ 含 5% CO_2 培养箱中,细胞贴壁生长,至 70% ~ 80% 融合时 0.25% 胰蛋白酶、0.02% EDTA 液消化传代。

1.1.3　模型建立及分组干预治疗　　处于对数生长期的 HT29 细胞,以 0.25% 的胰酶、0.02% EDTA 液进行消化,以血细胞计数板进行计数后用不含血清的 D/F12 培养基稀释,细胞数为 $1.25 \times 10^7\ ml^{-1}$,每只裸鼠皮肤消毒后以 1 ml 注射器分别于颈背部皮下注射 0.2 ml 细胞悬液,接种细胞 2×10^6/只,共 50 只。定期观察小鼠精神、饮食及排便等情况,游标卡尺测量肿瘤结节的长径(a)、短径(b),按公式 $V = ab^2/2$,估算肿瘤近似体积。待移植瘤平均直径约 5 mm 后(细胞种植后第 16 天),裸鼠以随机数字表法分为对照组、塞来昔布 1 组(25 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$)、塞来昔布 2 组(50 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$)、塞来昔布 3 组(75 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$)、塞来昔布 4 组(100 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$),每组 10 只。塞来昔布(辉瑞制药有限公司)采用灌胃给药,对照组灌胃给予灭菌蒸馏水。给药 35 d 后,测量肿瘤体积,计算抑瘤率,取肿瘤组织备用。

1.2　免疫组化检测 COX-2、survivin 表达和微血管生成

1.2.1　试剂　　血管内皮标志物鼠抗人 CD34 单克隆抗体、鼠抗人 COX-2 单克隆抗体和 survivin 兔抗人多克隆抗体(北京中杉公司),工作浓度均为 1∶100。

1.2.2　免疫组织化学染色　　免疫组织化学染色采用 S-P 法,石蜡切片常规脱蜡至水;抗原热修复,分别滴加一抗和二抗,DAB 显色,苏木精复染。光学显微镜下观察并拍照。

1.2.3　COX-2、survivin 表达和微血管染色阳性结果判断　　COX-2 阳性产物为棕黄色颗粒,位于细胞质中,细胞质及细胞核周围呈黄色者判为阳性。survivin 阳性产物位于细胞质和细胞核,细胞质及细胞核染成棕黄色至棕褐色为阳性。先在低倍镜下对组织切片全面观察,随后于 200 倍光镜下,随机观察 10 个高倍视野,以北航真彩色病理图像分析系统计算平均积分光密度值。

血管内皮细胞的细胞膜或细胞质染色后呈现棕黄色颗粒,微血管计数由有经验的病理医师计数。先在低倍镜下寻找新生血管最密集区即“热点”,然后在高倍镜下于“热点”处观察染成棕色的单个细胞和细胞丛,并以此作为 1 个血管。每张染色切片选择 5 个血管最多的癌区,以 5 个高倍视野(400 倍)血管的均数表示平均微血管密度(MVD)。

1.3　RT-PCR 法检测组织血管内皮细胞生长因子(VEGF)mRNA

1.3.1　提取 RNA　　取 100 mg 组织加入 1 ml Trizol[GeneRay Biotech(Shanghai) Co., Ltd.],于匀浆管中匀浆,提取总 RNA。紫外分光光度计测定 $D(260)$ 及 $D(280)$ 值,分析 RNA 纯度并调整浓度。

1.3.2　逆转录反应(cDNA 的制备)反应体系　　RNasin 32 U,随机引物 0.2 μg,10 mmol/L dNTP 2 μl,5 × Buffer 8 μl,RNA 10 μg,AMV-RT(Promega Corporation),加无 RNA 酶焦碳酸二乙酯(DEPC)水至总体积 40 μl。25 ℃ 10 min,42 ℃ 1 h,95 ℃ 5 min,4 ℃ 5 min,置于 -20 ℃冰箱保存备用。

1.3.3　PCR 反应　　①PCR 引物:VEGF 上游引物:5′-CCCACTGAGGAGTCCAACAT-3′,下游引物:5′-AAATGCTTTCTCCGCTCTGA-3′,扩增片段为 173 bp;GAPDH 引物:上游引物:5′-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3′ 下游引物:5′-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3′,扩增片段为 238 bp。②VEGF、GAPDH 反应体系均为 20 μl。反应条件:VEGF:94 ℃变性5 min,进行 33 个循环(94 ℃变性 30 s,65 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 30 s);GAPDH:94 ℃变性 5 min,进行 30 个循环(94 ℃变性 30 s,65 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 45 s),循环结束后均在 72 ℃延伸 5 min。③电泳分析:每例 PCR 产物取 6 μl,置于 8% 丙烯酰胺凝胶中电泳,结果经凝胶图像分析系统处理和计算。

1.4　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SAS 6.12 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　成瘤及裸鼠一般情况

50 只裸鼠均成瘤,成瘤率 100%,成瘤时间为细胞种植后第 5 ~ 11 天。肿瘤细胞种植后第 16 天,肿瘤直径平均达 5 mm。随着肿瘤形成并逐渐增大,裸鼠逐渐出现消瘦,活动减少。在实验后期,塞来昔布 3 组和 4 组裸鼠活动较其他 3 组明显减少,精神状态差,3 组和 4 组各有 2 只裸鼠死亡。实验结束切取瘤组织后,对裸鼠解剖各组均未发现移植瘤肝转移。

2.2　药物对裸鼠生长的影响

治疗结束后,各组移植瘤体积分别为:对照组(1 326 ± 238)mm^3;塞来昔布 1 组(923 ± 171)mm^3;塞来昔布 2 组(863 ± 177)mm^3;塞来昔布 3 组(729 ± 179)mm^3;塞来昔布 4 组(647 ±

205)mm^3。不同剂量塞来昔布均能明显抑制人结肠癌裸鼠移植瘤的生长。塞来昔布 1、2、3、4 组抑瘤率分别为 34.94%、39.20%、53.50%、59.20%。方差分析显示,与对照组比较,塞来昔布 1、2、3、4 组移植瘤生长缓慢($P<0.05$)。4 组移植瘤较 1 组生长缓慢($P<0.05$),其余各组之间比较抑瘤率无明显差异(图 1,$P>0.05$)。

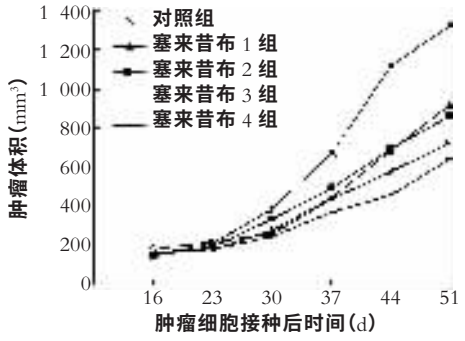


图 1 结肠癌裸鼠移植瘤生长曲线

2.3 不同剂量塞来昔布对裸鼠人结肠癌移植瘤 COX-2、survivin 表达的影响

对 COX-2 免疫组织化学染色切片进行积分光密度测定(表 1),方差分析显示,与对照组比较,塞来昔布各组 COX-2 表达水平均明显降低($P<0.05$);与塞来昔布 1 组比较,3、4 组 COX-2 表达水平明显降低($P<0.05$),塞来昔布 1 组和 2 组比较、塞来昔布 2、3、4 组之间比较,COX-2 表达水平无差别(表 1,$P>0.05$)。

表 1 人结肠裸鼠移植瘤各组 COX-2、survivin、VEGF mRNA 的表达和微血管密度($\bar{x}\pm s$)

组别	n	COX-2	survivin	VEGF mRNA	MVD
对照组	10	12 632 ± 2 434	16 803 ± 6 958	0.80 ± 0.28	19.72 ± 5.19
1 组	10	5 995 ± 3 175[a]	11 966 ± 4 449[a]	0.50 ± 0.24[a]	12.22 ± 3.81[a]
2 组	10	4 130 ± 2 195[a]	10 210 ± 2 270[a]	0.45 ± 0.25[a]	9.33 ± 3.42[a]
3 组	8	2 856 ± 1 546[ab]	7 800 ± 2 874[a]	0.39 ± 0.18[a]	10.90 ± 4.18[a]
4 组	8	2 368 ± 1 410[ab]	6 507 ± 1 922[ab]	0.51 ± 0.27[a]	9.80 ± 3.72[a]

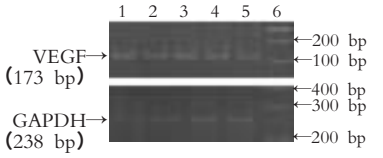
a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与塞来昔布 1 组比较

对 survivin 的免疫组织化学染色切片进行光密度值测定,方差分析显示(表 1),与对照组相比,塞来昔布各组 survivin 表达水平均明显降低($P<0.05$);与塞来昔布 1 组比较,4 组 survivin 表达明显降低($P<0.05$);其余各组之间 survivin 表达差别无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 不同剂量塞来昔布对裸鼠人结肠癌移植瘤 VEGF mRNA 和 MVD 的影响

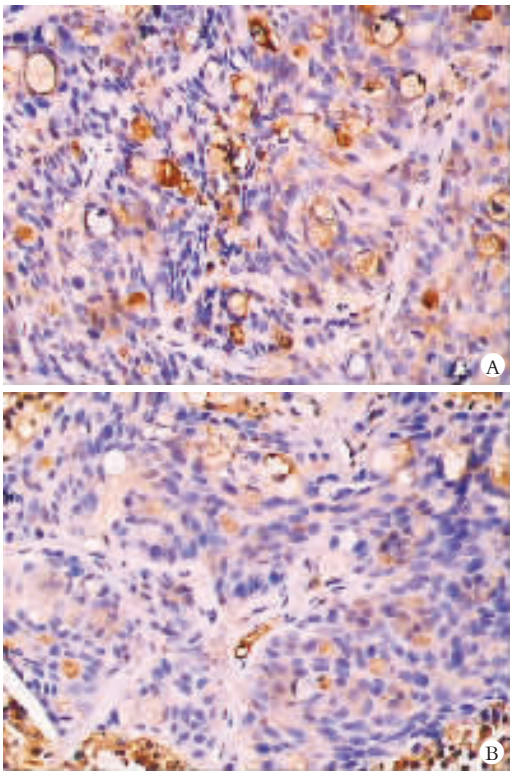
将 RT-PCR 产物经电泳分析,加入 VEGF mRNA 引物的各组均可见 173 bp 的扩增带(图 2A),加入 GAPDH 引物的各组均可见 238 bp 的扩增带(图 2B),对各条带进行灰度分析显示,塞来昔布各组 VEGF mRNA 表达低于对照组,差别有统计学意义($P<0.05$),塞来昔布各用药组之间 VEGF mRNA 表达差别无统计学意义($P>0.05$,表 1)。

免疫组织化学染色后对微血管热区进行计数(图 3),方差分析显示,塞来昔布用药各组 MVD 值均较对照组降低,差别有统计学意义($P<0.05$,表 1)。塞来昔布 1、2、3、4 组之间比较,MVD 差别无统计学意义($P>0.05$)。



1:塞来昔布 4 组;2:塞来昔布 3 组;3:塞来昔布 2 组;4:塞来昔布 1 组;5:对照组;6:标准(100 bp DNA ladder)

图 2 结肠癌裸鼠移植瘤各组血管内皮细胞生长因子表达



A:对照组;B:塞来昔布 1 组

图 3 人结肠癌裸鼠移植瘤微血管 CD_{34} 免疫组化染色 (S-P×400)

3 讨论

环氧化酶(COX)是前列腺素合成的限速酶,COX-2 在结直肠癌组织中表达升高,非甾体抗炎药和昔布类选择性 COX-2 抑制剂可抑制 COX-2 的活性,减少结直肠癌的发生[1],将 COX-2 作为结直肠癌治疗的一个新靶点展示了良好的前景,但其临床应用最佳剂量、与其他药物联合应用的安全性和有效性等因素限制了其临床应用,本实验对塞来昔布的作用机制及最

佳用药剂量等进行研究。

3.1　不同剂量塞来昔布对人结肠癌裸鼠移植瘤生长的影响

任亮等[2]研究塞来昔布对裸鼠膀胱癌(T24 细胞系)皮下移植瘤的生长,抑瘤率达 83.7%。越来越多的证据显示 COX-2 抑制剂可抑制体外肿瘤细胞和移植瘤的生长并呈剂量依赖性。在本实验中,与对照组比较,塞来昔布 1 组裸鼠移植瘤生长明显减慢。随塞来昔布给药剂量的增加,抑瘤率增加,但在实验后期,塞来昔布 3 组和 4 组裸鼠的活动减少和精神萎靡并各有 2 只裸鼠死亡,提示高剂量的塞来昔布产生了明显的副作用。塞来昔布的主要不良反应为胃肠道反应,另外大剂量时对心血管和免疫系统等多个系统有损害。塞来昔布 4 组较 1 组抑瘤率高,但 4 组用药量是 1 组的 4 倍,药物毒性反应明显增加。因此,在低剂量塞来昔布可产生明显抑瘤作用且无明显副作用的情况下,低剂量塞来昔布的应用可让临床患者更多受益。

3.2　塞来昔布对人结肠癌裸鼠移植瘤微血管生成和 survivin 表达的影响

越来越多的证据明确了 COX-2 在结直肠癌血管生成中的作用[3]。COX-2 高表达可能是结直肠癌细胞前列腺素 E_2(PGE_2)水平升高的主要因素,而 PGE_2 在体内外实验中均可通过诱导 VEGF 和成纤维细胞生长因子(FGF)刺激血管的生成[4,5]。左朝晖等[6]对人肝癌 HepG2 裸鼠移植瘤的研究显示,COX-2 抑制剂可降低移植瘤内 COX-2、VEGF、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和促血管生成素(Ang-2)的表达,抑制微血管生长,降低微血管密度。对不同剂量塞来昔布对移植瘤微血管形成的影响少见报道,本研究结果提示,塞来昔布可抑制人结肠癌 HT-29 裸鼠皮下移植瘤中 COX-2 和 VEGF 的表达,减少微血管生成,塞来昔布可能通过抑制微血管生成途径抑制了肿瘤的生长,并降低癌细胞血行转移的机会。

研究显示 COX-2 蛋白表达随塞来昔布用量的增加而下降,呈现剂量依赖性,而 VEGF mRNA 水平和 MVD 的下降则未呈现剂量依赖性,在每天 25 mg/kg 的低剂量(胃肠道及心血管副作用轻微)即可产生的抗血管生成作用增加了临床应用的可行性,进一步降低塞来昔布的用量能否产生相同的抗血管生成效应有待进一步研究。

survivin 是凋亡抑制蛋白家族成员之一,COX-2 作为 APC 的一个修饰基因位点可能通过 APC/β-catenin(边接素)/TCF4(T 细胞因子 4)信号转导通路影响 survivin 表达[6-9]。以上均是体外实验的研究结果,体内实验少见报道。在本实验中,给予塞来昔布可使裸鼠移植瘤 COX-2 和 survivin 表达同时下降,且表达下降程度随给药剂量的增加而增加,均呈明显剂量依赖性,提示 COX-2 抑制剂塞来昔布的抗结肠癌移植瘤生长作用可能是通过抑制 survivin 的表达从而促进细胞凋亡过程实现的。

总之,塞来昔布在低剂量时即可通过抑制 survivin 表达和肿瘤血管生成抑制结肠癌移植瘤生长。塞来昔布的抗肿瘤生长作用呈剂量依赖性,但高剂量时的副作用限制了高剂量塞来昔布的临床应用。其在低剂量时良好抗结肠癌微血管生成作用为其与化疗药物的联合应用提供了可能,通过降低临床化疗药物剂量来降低副反应的发生,同时可通过抗血管生成作用增加化疗的效果。进行临床试验评价塞来昔布参与结直肠癌的化疗方案的有效性具有重要的临床意义。

参考文献:

[1] Hawk E T, Levin B. Colorectal cancer prevention[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(2): 379-391.

[2] 任　亮, 侯树坤, 王晓峰, 等. 塞来昔布对膀胱癌裸鼠皮下移植瘤及移植瘤细胞凋亡的影响[J]. 中华泌尿外科杂志, 2006, 27(增刊): 30-32.

[3] 张　超, 郝迎学, 刘　伟, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(5): 451-453.

[4] Amano H, Hayashi I, Endo H, *et al*. Host prostaglandin E(2)-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth [J]. J Exp Med, 2003, 197(2): 221-232.

[5] Wang D, Dubois R N. Prostaglandins and cancer[J]. Gut, 2006, 55(1): 115-122.

[6] 左朝晖, 黎祖荣, 周　晓, 等. 环氧合酶-2 抑制剂塞来昔布对人肝癌 HepG2 裸小鼠移植瘤生长和肿瘤血管生成的抑制作用[J]. 癌症, 2006, 25(4): 414-420.

[7] Zhang T, Fields J Z, Ehrlich S M, *et al*. The chemopreventive agent sulindac attenuates expression of the antiapoptotic protein survivin in colorectal carcinoma cells[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2004, 308(2): 434-437.

[8] 张志宏, 韩盛玺. RNA 干扰 survivin 基因治疗大肠癌作用机制的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(33): 3215-3218.

[9] 郭文治, 张水军, 王冬雨, 等. 结肠癌组织中乙酰肝素酶2 蛋白的表达[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2007, 42(4): 706-708.

(编辑　栾　嘉)