DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.23.024
第26卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 23
2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

文章编号:1000-5404(2004)23-2143-03

论著

美洛昔康联合奥曲肽增强对肝癌生长的抑制作用

谢 怡[1],唐承薇[2],周旭春[3] ([1]重庆医科大学生殖医学系生殖生理学教研室,重庆 400016;[2]四川大学华西医院消化内科,成都 610041;[3]重庆医科大学第一医院消化内科,重庆 400016)

提 要:目的 美洛昔康和奥曲肽以各自不同的作用机制均能抑制肝癌生长,两者联用其抗肿瘤作用将如何,并不清楚。从不增加不良反应但又能最大限度增加抗肿瘤作用的角度考虑,我们将探讨美洛昔康联合奥曲肽能否协同抑制肝癌细胞生长。方法 采用^{3}H-TdR掺入法探讨美洛昔康和奥曲肽单独或联合应用对人肝癌细胞株HepG2生长的影响,根据中效原理判断两者相互作用的关系;并观察它们对人肝癌裸鼠原位移植瘤生长的影响。结果 美洛昔康联合奥曲肽在体外能显著抑制HepG2肝癌细胞的生长,其浓度与^{3}H-TdR掺入值呈负相关($r=-0.980$, $P<0.01$)。美洛昔康联合奥曲肽能显著抑制人肝癌裸鼠原位移植瘤生长,抑瘤率为75.4%,较单药美洛昔康抑瘤率55.1%明显增高($P<0.05$)。各组裸鼠的体内实验中未见明显不良反应。结论 体外细胞培养及裸鼠原位移植瘤实验均表明:美洛昔康联合奥曲肽能显著增强抑制肝癌生长的作用,美洛昔康和奥曲肽呈协同作用。

关键词:美洛昔康;奥曲肽;肝细胞癌;生长
中图法分类号:R735.7;R971.1;R977.6 文献标识码:A

Combination of meloxicam and octreotide enhances the inhibitory effect on growth of human hepatocellular carcinoma

XIE Yi[1], TANG Cheng-wei[2], ZHOU Xu-chun[3] ([1]Department of Fertility Medical Science, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016; [2]Department of Gastroenterology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041; [3]Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To understand whether meloxicam combined with octreotide could enhance the inhibitory effect on proliferation of hepatic cell carcinoma (HCC). **Methods** The proliferation of HepG2 HCC cells was measured by ^{3}H-thymidine incorporation into DNA. The synergic effect of meloxicam combined with octreotide on the growth of HepG2 cells was evaluated according to the median-response principle. We also observed the infiuence of combination therapy on the growth of HepG2 xenografts in nude mice. **Results** The combination of meloxicam and octreotide significantly inhibited ^{3}H-TdR incorporation of HepG2 cells in a dose-dependent manner ($r=-0.980$, $P<0.01$). The combination indexes of meloxicam and octreotide in the range of majority responses were less than 1. The inhibition rate (75.4%) of xenografts in nude mice in the combined group was significantly enhanced as compared with that in the meloxicam group (55.1%). No servere side effect was observed in all the treatment groups. **Conclusion** The combination of meloxicam and octreotide can greatly improve the inhibitory effect on the proliferation of HCC cells in culture as well as the growth of implanted tumors in nude mice.

Key words: meloxicam; octreotide; hepatocellular carcinoma; growth

我国的肝癌发病率位居恶性肿瘤第二位。多数患者一经确诊多为晚期,丧失了手术机会。目前化疗的疗效仍很有限,且毒副作用大,影响了患者的生存质量,生存期却无明显延长。非细胞毒药物因能抑制肿瘤生长且毒副作用小,在抗肿瘤治疗中越来越受重视。

我们以往的研究表明,奥曲肽和阿司匹林都能抑制肝癌生长,奥曲肽联合阿司匹林能明显提高对肝癌生长的抑制作用[1],尽管它们的作用机制并不相同。目前肿瘤治疗多主张联合用药,目的是尽可能多途径多环节地发挥抗肿瘤作用,减少单个药物的用量,在既能提高疗效的前提下又不增加毒副反应。所以,本研究我们将采用^{3}H-TdR掺入、人肝癌裸鼠原位移植瘤模型,探讨奥曲肽和COX-2抑制剂美洛昔康联合应

作者简介:谢 怡(1965-),女,云南省昆明市人,博士研究生,主治医师,主要从事肿瘤临床和基础方面的研究。电话:(023)68485002

收稿日期:2004-04-09;修回日期:2004-06-08

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

用,是否能增强抑制肝癌生长的作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

人肝癌细胞株 HepG2 为华西医院人类疾病相关多肽研究实验室保存。BALB/c nu/nu 裸小鼠(京动许字 2003-017 号)18只,雄性,SPF 级,6~8 周,体质量 18~20 g,购自中国医学科学院实验动物研究所,在第三军医大学野战外科研究所医学实验动物中心无特殊病原菌条件下分笼饲养。^{3}H-TdR 购自中国科学院原子能研究所。POPOP 和 PPO 系上海试剂站提供。Triton X-100 为上海华舜生物公司产品。奥曲肽系瑞士诺华公司产品。美洛昔康 Boehringer Ingelheim 公司产品。

1.2 方法

^{3}H-TdR 掺入法观察美洛昔康、奥曲肽及联合用药对人肝癌细胞株 HepG2 生长的影响。实验分 4 组,对照组:HepG2 细胞组(不加药);美洛昔康组:给 HepG2 细胞不同终药浓度美洛昔康(1×10^{-4}~1×10^{-8} mol/L);奥曲肽组:给 HepG2 细胞不同终药浓度奥曲肽(1×10^{-5}~1×10^{-9} mol/L);美洛昔康+奥曲肽组:终药浓度依次为美洛昔康 1×10^{-5} mol/L+奥曲肽 1×10^{-6} mol/L,美洛昔康 1×10^{-6} mol/L+奥曲肽 1×10^{-7} mol/L,美洛昔康 1×10^{-7} mol/L+奥曲肽 1×10^{-8} mol/L,美洛昔康 1×10^{-8} mol/L+奥曲肽 1×10^{-9} mol/L,美洛昔康 1×10^{-9} mol/L+奥曲肽 1×10^{-10} mol/L。对照组加入等容量培养基,每一浓度设 3 个复孔。

5×10^4 个对数生长细胞 HepG2 接种至 24 孔板,待细胞长致约 80%时,改为无血清培养 24 h,药物作用 22 h 后,加入 37 kBq/ml 的 ^{3}H-TdR 1 ml,37 ℃孵育 2 h,收获细胞并用 PBS 洗 5 次,晾干,每孔加 1% Tritonx-100 200 μl,作用 4 h 后,每孔均吸出 100 μl,加入 10 ml 闪烁液中,暗适应 2 h 后在液体闪烁仪上检测 cpm 值。

根据中效原理分析美洛昔康和奥曲肽联用时的相互作用,合用指数 CI<1 则为协同作用,合用指数 CI>1 则为拮抗,合用指数 CI=1 则为相加[2]。

1.3 美洛昔康联合奥曲肽对人肝癌裸鼠移植瘤生长的影响

取对数生长期 HepG2 细胞按每只裸鼠 2×10^7 个接种于前腋皮下,约 5 周后肿瘤生长至直径 1.5~2.0 cm,完整取下瘤块,立即放入含青霉素、链霉素(浓度各为 100 U/ml)生理盐水中,切成 1~2 mm^3 小块备用。用戊巴比妥钠按 50 mg/kg 腹腔注射麻醉裸鼠,开腹暴露肝脏,将 1 块肿瘤组织植入裸鼠肝右叶深部实质内,全层关腹。裸鼠随机分 3 组:对照组、美洛昔康组、美洛昔康联合奥曲肽组,每组 6 只。对照组不给药,美洛昔康组 15 mg·kg^{-1}·d^{-1} 灌服;美洛昔康(15 mg·kg^{-1}·d^{-1} 灌服)联合奥曲肽(100 μg·kg^{-1}·d^{-1} 皮下注射)。原位移植肝癌术后次日给药,连续 8 周,注意观察裸鼠的活动、饮食、大便及有无出血等。末次用药 24 h 后处死裸鼠,测量 3 组肝癌原位瘤的长径、短径及称重。将部分瘤块置于 4%多聚甲醛中固定,石蜡包埋切片,HE 染色,光镜下观察各组组织形态。解剖整只裸鼠,观察是否有转移灶、消化道溃疡出血等,并记录心、脑、肝、肾、肺等重要脏器的重量。

1.4 统计学方法

所有数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用方差分析。

2 结果

2.1 美洛昔康联合奥曲肽对人肝癌细胞株 HepG2 生长的影响

美洛昔康与奥曲肽合用时,其浓度与 ^{3}H-TdR 掺入值呈显著负相关,相关系数 $r=-0.980$,$P<0.01$,有良好量效关系,即随着药物浓度增高,其抑制 HepG2 的 ^{3}H-TdR 掺入作用也逐渐增强。

2.2 美洛昔康、奥曲肽单药及联合用药时的效应

按中效方程计算出美洛昔康、奥曲肽及美洛昔康+奥曲肽的中效浓度,结果表明:美洛昔康联合奥曲肽时美洛昔康的中效浓度(9.42×10^{-6}) mol/L 仅为单药时中效浓度(5.89×10^{-5}) mol/L 的约 1/6,而美洛昔康联合奥曲肽时奥曲肽的中效浓度(9.42×10^{-7}) mol/L 仅为单药时中效浓度(2.79×10^{-5}) mol/L 的约 1/30,可见联合用药时,美洛昔康与奥曲肽的中效浓度都明显降低。联合用药时,在大多数效应范围尤其是高水平效应时 CI<1,呈协同作用。

2.3 美洛昔康联合奥曲肽对人肝癌裸鼠原位移植瘤生长的影响

各组裸鼠原位移植瘤生长情况见表 1,经组织学证实均为肝细胞癌。美洛昔康联合奥曲肽组肿瘤体积(0.34 ± 0.16) cm^3 较美洛昔康组(0.62 ± 0.17) cm^3 明显缩小($F=3.88$,$P<0.01$),抑瘤率(75.4%)较美洛昔康组(55.1%)明显提高。

表1 各组人 HCC 裸鼠原位移植瘤比较($n=6$)

Tab 1 Comparison of transplanted HCCs in nude mice ($n=6$)

Group	Transplanted tumor of HCCs ($\bar{x}\pm s$)		Inhibition rate (%)
	Volume (cm^3)	Weight (g)	
Control	1.38±0.55	1.38±0.54	/
Meloxicam	0.62±0.17^{a1}	0.62±0.16^{c1}	55.1
Meloxicam+Octreotide	0.34±0.16^{a2b}	0.35±0.19^{c2d}	75.4

a1: $F=10.66$, $P=0.008$, a2: $F=16.81$, $P=0.002$, *vs* control; b: $F=3.876$, $P=0.008$, *vs* meloxicam group; c1: $F=11.05$, $P=0.008$, c2: $F=19.83$, $P=0.001$, *vs* control; d: $F=7.37$, $P=0.022$, *vs* meloxicam group

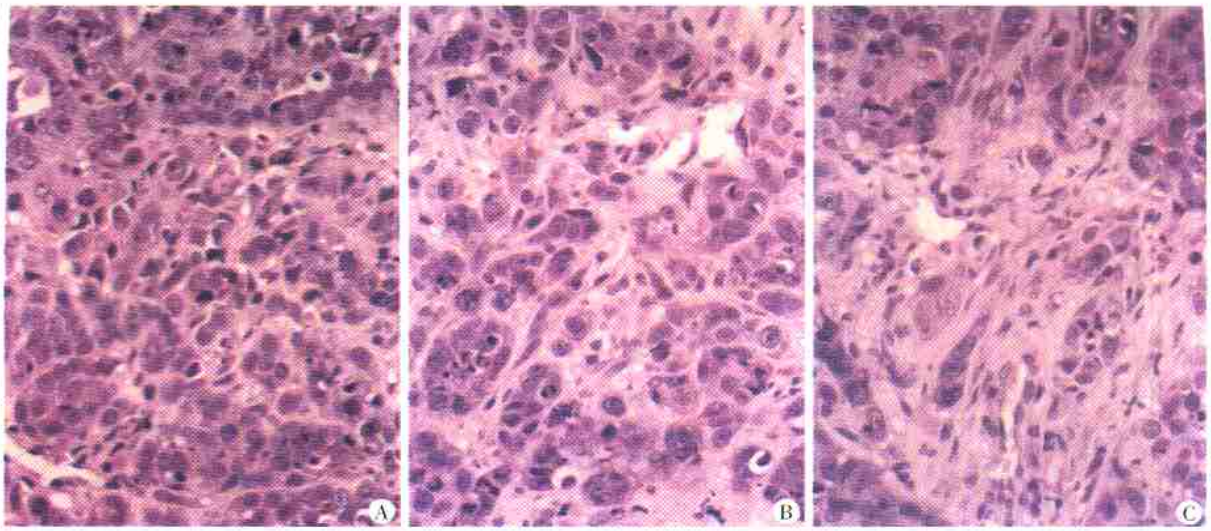
2.4 组织形态学观察

人肝癌裸鼠原位移植瘤病理切片光镜下观察发现:美洛昔康联合奥曲肽组细胞分化程度与单用美洛昔康组相似,联合用药组较单用美洛昔康组肿瘤组织纤维化程度增加(图 1)。

2.5 不良反应观察

3 组动物存活率 100%,饮食与活动均正常,每 2 周作大便隐血实验 1 次均阴性,也未发现其它出血征象。实验结束时,解剖各鼠未见有消化道出血、溃疡等异常,心、脑、肺、肝、肾等重要脏器的重量无明显差异。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



A: Control; B: Meloxicam; C: Meloxicam+ Octreotide

图 1　各组人 HCC 移植瘤组织学比较 (HE× 200)

Fig 1　Histological comparison of the transplanted HCCs in nude mice (HE× 200)

3　讨论

本研究结果表明, 美洛昔康可抑制体外培养人肝癌细胞 HepG2 的生长, 而美洛昔康联合奥曲肽对肝癌细胞生长的抑制作用明显增强了, ^{3}H-TdR 掺入值与其浓度有良好的量效关系。不仅如此, 根据中效原理定量分析还发现, 美洛昔康与奥曲肽合用在大多数效应范围内均为协同作用(CI< 1)。这一点还在肝癌裸鼠原位移植瘤模型中得到了证实, 美洛昔康联合奥曲肽组的抑瘤率为 75.4%, 较单用美洛昔康组的抑瘤率 55.1%明显提高了。这说明美洛昔康与奥曲肽联合应用时其抗肿瘤作用明显优于美洛昔康单独用药。

目前研究已证实 COX-2 可能参与了人类多种肿瘤(包括肝癌)的发生、发展[3]。研究表明 HepG-2 细胞表达 COX-2[4], 美洛昔康是选择性的 COX-2 抑制剂, 它通过作用于靶 COX-2 抑制花生四烯酸合成 PG, 而抑制肿瘤增殖等[5,6]。和美洛昔康不同的是生长抑素类似物奥曲肽主要是经生长抑素受体介导而抑制肝癌生长[7,8], 我们前面的研究发现 HepG2 人肝癌细胞有生长抑素受体(SSTR-2、SSTR-3、SSTR-5)表达, 而奥曲肽作用的生长抑素受体正是 SSTR-2、SSTR-3、SSTR-5[9]。本研究结果表明二者联用可能是充分利用了各自抗肿瘤的各个环节, 才最大限度地增加了对肝癌生长的抑制作用, 其协同作用机制有待进一步探讨。

由于美洛昔康与奥曲肽之间的协同作用, 联合用药时美洛昔康的中效浓度仅为单药的 1/6, 奥曲肽的中效浓度也大大下降为单药时的 1/30, 所以联合用药使达到同样药效的药物用量减少了, 结果是随着用药量的减少, 药物引起的副作用也会减轻, 这具有重要临床意义。另外从理论上考虑, 奥曲肽因能作用用于胃粘膜壁细胞上的生长抑素受体, 抑制胃泌素释放, 减少胃酸分泌, 可能会减少美洛昔康引起的胃肠道毒副反应。

目前肝癌治疗仍然非常棘手。美洛昔康联合奥曲肽能明显增加对肝癌生长的抑制作用, 这一结果对临床实践具有指导意义, 其临床疗效也有待进一步证实。

参考文献:

[1] 唐承薇, 汤丽平, 王春晖. 奥曲肽联合阿司匹林增强对肝癌细胞生长的抑制作用[J]. 癌症, 2002, 21(4): 383－387.

[2] 韩　锐. 肿瘤化学预防及药物治疗[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1991. 315－320.

[3] Fosslien E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia [J]. Ann Clin Lab Sci, 2000, 30(1): 3－21.

[4] 王　昆, 邢宝才, 张青云, 等. 环氧合酶-2 在肝癌细胞系中的表达研究[J]. 中华普通外科杂志, 2003, 18(2): 107－108.

[5] Hussey H J, Tisdale M J. Effect of the specific cyclooxygenase-2 inhibitor meloxicam on tumour growth and cachexia in a murine model[J]. Int J Cancer, 2000, 87(1): 95－100.

[6] Tsubouchi Y, Mukai S, Kawahito Y, *et al*. Meloxicam inhibits the growth of non-small cell lung cancer [J]. Anticancer Res, 2000, 20(5A): 2867－2872.

[7] Patel Y C. Smotostatin and its receptor family [J]. Front Neuroendocrinol, 1999, 20(3): 157－198.

[8] Reubi J C, Zimmermann A, Jonas S, *et al*. Regulatory peptidereceptors in human hepatocellular carcinomas[J]. Gut, 1999, 45(5): 766－774.

[9] Patel Y C, Srikant C B. Subtype selectivity of peptide analogs for all five cloned human somatostatin receptors (hsstr1-5)[J]. Endocrinology, 1994, 135(6): 2814－2817.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net