



塞来昔布预防大鼠乳腺癌发生及其机制

环氧酶(COX)参与维持机体各种生理和病理过程。COX-1是一种结构酶,它催化产生的PG参与机体正常生理过程和保护功能。COX-2被认为是诱导型酶,只在病理情况下才表达,包括炎症、损伤、修复及肿瘤的生长和转移。许多癌前病变和恶性肿瘤均有COX-2基因扩增和蛋白的高表达[1],有效抑制COX-2的表达可能对肿瘤发生、发展具有重要意义[2]。本研究在用化学致癌剂7,12-二甲基苯蒽(DMBA)诱发大鼠乳腺癌的过程中,观察COX-2特异性抑制剂塞来昔布对DMBA化学诱发的乳腺癌形成及COX-2及VEGF蛋白表达的影响。

1 材料和方法

1.1 模型制造

实验用未交配雌性SD大鼠90只(动物合格证号:陕医动字第08-005号,西安交通大学医学院实验动物中心提供),鼠龄(45±5)d,体质量(110±10)g,以DMBA油剂20 mg/100 g灌胃复制大鼠乳腺癌模型。

1.2 动物分组

每组30只大鼠,分为单纯诱癌组(造模后正常饮食)作为阴性对照、三苯氧胺组(每kg饮用水加入4 mg三苯氧胺,正常饮用)作为阳性对照和塞来昔布组(每kg饲料加入1000 mg塞来昔布,用玉米油溶解后,拌于正常饲料内喂养)。观察各组大鼠进食、毛发、排泄情况,并每周两次检测大鼠乳腺。

1.3 标本检测

于实验第120天停药,经阴道涂片检查,证实为间情期。以5%乌拉坦液腹腔注射麻醉,将每个乳腺连同周围皮肤、皮下组织解剖,自乳头部对半切开乳腺进行大体观测,计数肿瘤数量及形态。标本固定于10%中性福尔马林溶液中,常规石蜡包埋,HE染色。乳腺癌诊断参考实验性大鼠乳腺癌分类诊断标准[3]。

1.4 免疫组化SP法检测COX-2和VEGF蛋白表达

4 μm石蜡切片,二甲苯常规脱蜡,梯度酒精水化,3% H_2O_2 -甲醇室温下封闭,微波炉修复抗原,非免疫性羊血清以阻断组织中非特异性吸附,滴加兔抗鼠COX-2、VEGF多克隆抗体(1:100);湿盒内4℃冰箱过夜,滴加生物素标记的二抗IgG,滴加辣根过氧化酶标记的链霉卵白素工作液;DAB显色,苏木素复染,脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。结果判断:以细胞胞质出现棕黄色颗粒为阳性,阳性判定标准:(-):无阳性染色;(+):弥散弱的胞质染色,染色细胞数<10%;(++):中等至强的胞质染色,阳性细胞数介于10%~50%;(+++):50%以上细胞强染色。

1.5 统计学处理

应用SPSS10.0软件进行,采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 三组乳腺癌发生率的比较

实验结束前死亡大鼠未纳入实验结果统计，实验结束时单纯诱癌组、三苯氧胺组、塞来昔布组数据完整的大鼠数目及各组乳腺癌发生率见表1。

表 1 各组乳腺癌发生率比较

Tab.1 Comparison of the incidence of breast cancer in different groups

Group	n	Breast cancer	Incidence of breast cancer (%)	χ^2	P*
Control	28	24	85.71		
Tamoxifen	27	13	48.15	8.811	0.003
Celecoxib	28	14	50.00	8.187	0.004

*Compared with the incidence of breast cancer in control group

2.2 组织学观察

单纯诱癌组：浸润性导管癌癌细胞密集，排列呈巢状，腺样结构，间质成分较少，癌细胞形状不规则，核异型性明显，核分裂相多见，组织象较杂乱(图1)；未发生肿瘤的乳腺，可见不同程度的乳腺小叶增生和腺上皮不典型增生，表现为腺泡细胞排列紊乱，多层排列，核质比增大及核异型性改变(图2)。塞来昔布组：癌细胞出现坏死，间质成分较多，核分裂相少见(图3)；未发生肿瘤的乳腺上皮无或仅轻度增生，小叶内和小叶间纤维组织增多，腺泡少见，仅见导管(图4)。

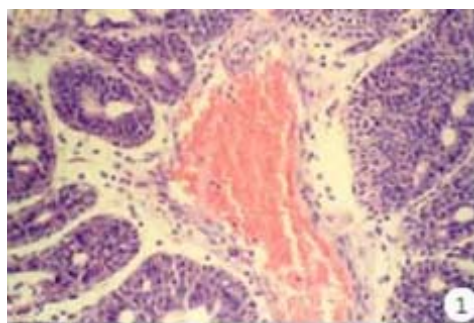


图1 单纯诱癌组大鼠乳腺浸润性导管癌组织

Fig.1 Infiltrating ductal cancer of rat mammary gland in control group (HE staining, original magnification: $\times 200$)

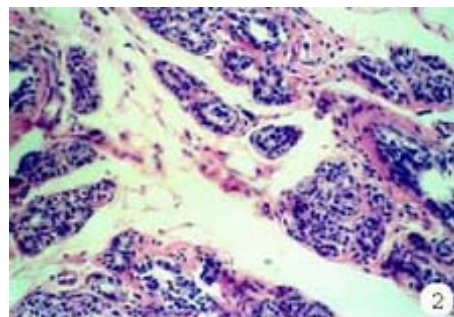


图2 单纯诱癌组大鼠乳腺不典型增生组织

Fig.2 Atypical hyperplasia of rat mammary gland in control group (HE staining, original magnification: $\times 200$)

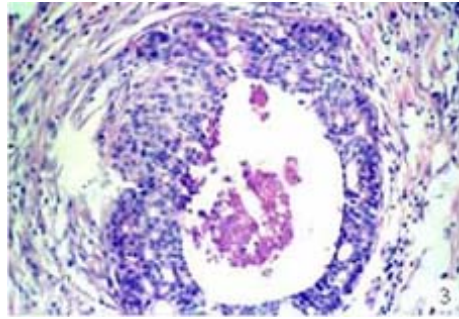


图3 塞来昔布组大鼠乳腺浸润性导管癌组织

Fig.3 Infiltrating ductal cancer of rat mammary gland in celecoxib group (HE staining, original magnification:×200)

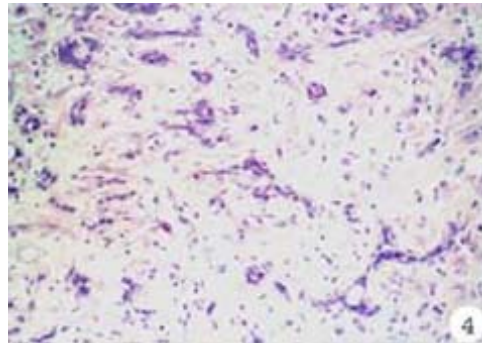


图4 塞来昔布组大鼠乳腺增生组织

Fig.4 Hyperplasia of rat mammary gland in celecoxib group (HE staining, original magnification: ×200)

2.3 COX-2蛋白在各组乳腺癌组织中的表达

COX-2蛋白的阳性染色颗粒位于乳腺癌细胞的胞质内，部分内皮细胞可见阳性着色。塞来昔布组(图5)与单纯诱癌组(图6)比较，COX-2蛋白的表达明显减弱。COX-2蛋白在各组肿瘤组织中的表达情况见表2。统计学检验表明：3组乳腺肿瘤之间COX-2蛋白表达阳性率差别显著($\chi^2=11.767$, $P=0.003$)。塞来昔布组COX-2蛋白表达低于单纯诱癌组($\chi^2=11.396$, $P=0.001$)；塞来昔布组COX-2蛋白表达低于三苯氧胺组($\chi^2=4.464$, $P=0.035$)；三苯氧胺组和单纯诱癌组COX-2蛋白表达无显著性差异($\chi^2=0.990$, $P=0.320$)。

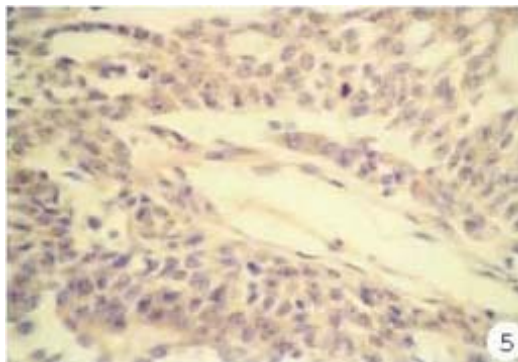


图5 塞来昔布组大鼠乳腺癌组织COX-2蛋白阳性染色

Fig.5 Positive expression of COX-2 in breast cancer tissue in celecoxib group (SP staining, original magnification: ×400)

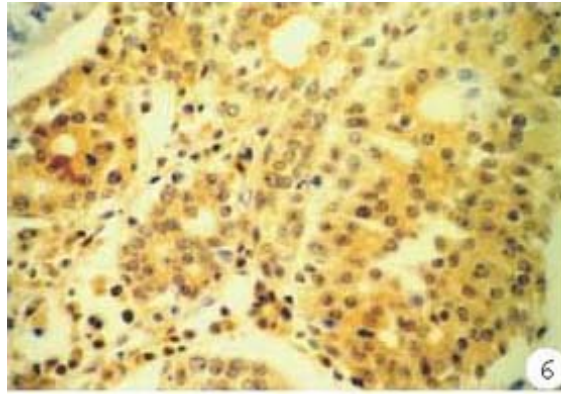


图6 单纯诱癌组大鼠乳腺癌组织COX-2蛋白强阳性染色

Fig.6 Positive expression of COX-2 in breast cancer tissue in control group (SP staining, original magnification: $\times 400$)

表 2 COX-2 蛋白在各组乳腺癌组织中的表达

Tab.2 Expression of COX-2 protein in different groups

Group	n	COX-2(-)	COX-2(+)	COX-2(++)	COX-2(+++)
Control	24	4	4	7	9
Tamoxifen	13	4	1	4	4
Celecoxib	14	10	1	2	1

2.4 VEGF蛋白在各组乳腺癌组织中的表达

VEGF蛋白的阳性染色颗粒位于乳腺癌细胞的胞质内，部分内皮细胞可见阳性着色。塞来昔布组(图7)与单纯诱癌组(图8)比较，VEGF蛋白的表达明显减弱。VEGF蛋白在各组肿瘤组织中的表达情况见表3。统计学检验表明：3组之间阳性表达率差异显著($\chi^2=6.457$, $P=0.040$)，塞来昔布组VEGF蛋白表达低于单纯诱癌组($\chi^2=5.179$, $P=0.023$)，塞来昔布组VEGF蛋白表达与三苯氧胺组无显著性差异($\chi^2=0.030$, $P=0.863$)，三苯氧胺组和单纯诱癌组VEGF蛋白表达有显著性差异($\chi^2=4.194$, $P=0.041$)。

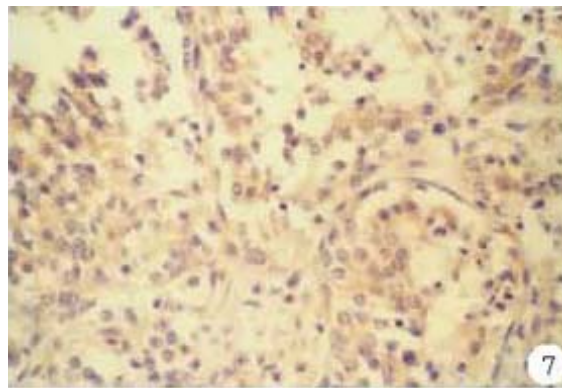


图7 塞来昔布组大鼠乳腺癌组织VEGF蛋白阳性染色

Fig.7 Positive expression of VEGF in breast cancer tissue in celecoxib group (SP staining, original magnification: $\times 400$)

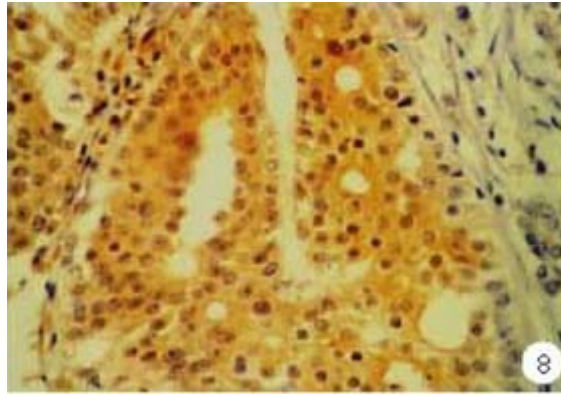


图8 单纯诱癌组大鼠乳腺癌组织VEGF蛋白强阳性染色

Fig.8 Positive expression of VEGF in breast cancer tissue in control group (SP staining, original magnification: $\times 400$)

表 3 VEGF 蛋白在各组乳腺癌组织中的表达

Tab.3 Expression of VEGF protein in different groups

Group	n	VEGF(-)	VEGF(+)	VEGF(++)	VEGF(+++)
Control	24	5	5	6	8
Tamoxifen	13	7	2	4	0
Celecoxib	14	8	2	3	1

3 讨论

本研究发现，塞来昔布组乳腺肿瘤发生率明显低于单纯诱癌组，表明塞来昔布能有效抑制DMBA诱发的大鼠化学性乳腺癌的发生、发展，对乳腺癌高危人群预防具有潜在的应用价值。其他学者也有类似报道。Nakatsugi等[4]研究发现尼美书利可降低肿瘤发生率，明显降低肿瘤的大小、多发率。Harris等[5]用塞来昔布处理DMBA诱导的乳腺癌模型，发现塞来昔布能明显延迟肿瘤的发生，与优布芬相比更加有效；饲料内混入塞来昔布乳腺癌的发生率、多发率及肿瘤体积较对照组分别降低68%、86%、81%。

COX-2参与肿瘤的发生发展的机制尚不完全清楚，可能包括：刺激肿瘤细胞的增殖[6]、抑制细胞凋亡[7]、增强细胞膜金属蛋白酶活性、抑制E-cadherin表达[8]、抑制机体免疫机能[9]、参与前致癌物的代谢、影响肿瘤细胞周期[10]等途径。本研究发现塞来昔布组乳腺组织的不典型增生、腺管上皮细胞的增生程度明显减轻，而单纯由DMBA诱发的大鼠乳腺癌COX-2表达显著增高，部分不典型增生细胞中也有COX-2表达，表明COX-2的高表达参与了肿瘤发生发展的病理生理过程。塞来昔布组大鼠肿瘤COX-2的表达在蛋白水平明显低于单纯诱癌组和三苯氧胺组，提示塞来昔布组可能是通过下调COX-2的蛋白表达水平，进而抑制了乳腺癌的发生和发展。其他作者也有类似报道[10]。

COX-2过度表达可刺激肿瘤新生血管的形成，但其机制尚未完全明确，其直接产物PGE2能直接刺激血管生成；同时，PGE2能诱导组织生成VEGF，产生的VEGF以旁分泌和自分泌的形式作用于内皮细胞，从而促进血管形成。本研究发现，在塞来昔布处理的肿瘤组织中，VEGF蛋白的表达水平明显低于单纯诱癌组，表明作为VEGF的上调因子，抑制COX-2的表达和活性可明显下调VEGF的表达，两者具有明显的相关性。其他研究也有类似报道。Masferrer等[2]实验证明COX-2与肿瘤血管形成密切相关，特异性抑制剂能明显抑制肿瘤发生和新血管生成。人结肠癌细胞株转染COX-2基因发现肿瘤细胞在过度表达COX-2的同时，促血管生成因子VEGF、bFGF、PDGF、内皮素等均明显上调，并促进人脐静脉内皮细胞株增殖并形成网状的內皮细胞条索[11]。

Chang等[12]的研究也认为COX-2诱导的乳腺癌发生、发展与PGE2依赖的的肿瘤新血管生成关系密切。这些均

说明COX-2能刺激肿瘤新血管生成，而下调VEGF表达是特异性COX-2抑制剂塞来昔布的抗肿瘤机制之一。

我们的研究证明：COX-2可能参与了DMBA诱发的化学性大鼠乳腺癌的发生、发展，选择性COX-2抑制剂塞来昔布可以有效预防大鼠乳腺癌的发生、发展，机制可能与下调COX-2和VEGF蛋白表达有关。

参考文献：

- [1]Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors[J]. *Cancer*, 2000, 89(12): 2637-45.
- [2]Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(5): 1306-11.
- [3]Russo J, Russo I. Atlas and histologic classification of tumors of the rat mammary gland[J]. *J Mamm Gland Biol Neoplas*, 2000, 5(2): 187-200.
- [4]Nakatsugi S, Ohta T, Kawamori T, et al. Chemoprevention by nimesulide, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-induced mammary gland carcinogenesis in rats[J]. *Jpn J Cancer Res*, 2000, 91(9): 886-92.
- [5]Harris RE, Alshafie GA, Abou-Issa H, et al. Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(8): 2101-3.
- [6]Michael MS, Badr MZ, Badawi AF. Inhibition of cyclooxygenase-2 and activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma synergistically induces apoptosis and inhibits growth of human breast cancer cells[J]. *Int J Mol Med*, 2003, 11(6): 733-6.
- [7]Souza RF, Shewmake K, Beer DG, et al. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses growth and induces apoptosis in human esophageal adenocarcinoma cells[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(20): 5767-72.
- [8]Noda M, Tatsumi Y, Tomizawa M, et al. Effects of etodolac, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on the expression of E-cadherin-catenin complexes in gastrointestinal cell lines[J]. *J Gastroenterol*, 2002, 37(11): 896-904.
- [9]Pockaj BA, Basu GD, Pathangey LB, et al. Reduced T-cell and dendritic cell function is related to cyclooxygenase-2 overexpression and prostaglandin E2 secretion in patients with breast cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2004, 11(3): 328-39.
- [10]Shishodia S, Aggarwal BB. Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib abrogates activation of cigarette smoke-induced nuclear factor (NF)-kappaB by suppressing activation of I kappa B kinase in human non-small cell lung carcinoma: correlation with suppression of cyclin D1, COX-2, and matrix metalloproteinase-9[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(14): 5004-12.
- [11]Tsuji M, Kawano S, Tsuji S, et al. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells[J]. *Cell*, 1998, 93(5): 705-16.
- [12]Chang SH, Liu CH, Conway R, et al. Role of prostaglandin E2-dependent angiogenic switch in cyclooxygenase 2-induced breast cancer progression[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 591-6.