

塞来昔布预防大鼠乳腺癌发生及其机制

康华峰,王西京,刘小旭,代志军,薛锋杰,薛兴欢(西安交通大学医学院第二附属医院肿瘤外科,陕西西安 710004)

摘要:目的 观察环氧酶-2(COX-2)选择性抑制剂塞来昔布对化学致癌剂 7,12-二甲基苯蒽(DMBA)化学诱发的大鼠乳腺癌形成的影响。方法 DMBA 油剂灌胃复制大鼠乳腺癌模型,90 只大鼠分为 3 组:单纯诱癌组作为阴性对照、三苯氧胺组作为阳性对照和塞来昔布组,观察塞来昔布对大鼠乳腺癌发生率和 COX-2、VEGF 蛋白表达的影响。结果 三苯氧胺组(48.15%)和塞来昔布组(50.00%)肿瘤发生率明显低于单纯诱癌组(85.71%),差异具有显著性($P=0.003$; $P=0.004$)。塞来昔布组 COX-2 蛋白表达率(28.57%)低于单纯诱癌组(83.33%)和三苯氧胺组(69.23%),差异具有显著性($P=0.001$; $P=0.035$)。塞来昔布组 VEGF 蛋白表达率(42.86%)低于单纯诱癌组(79.17%)($P=0.023$);和三苯氧胺组(46.15%)无显著性差异($P=0.863$)。结论 塞来昔布能抑制 DMBA 诱发的大鼠乳腺癌的发生、发展,下调 COX-2 和 VEGF 蛋白表达可能是其机制之一。

关键词:乳腺肿瘤;塞来昔布;三苯氧胺;环氧酶-2;血管内皮生长因子

中图分类号:R739.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4254(2006)11-1599-04

Chemopreventive effect of celecoxib against DMBA-induced breast cancer and its mechanism

KANG Hua-feng, WANG Xi-jing, LIU Xiao-xu, DAIZhi-jun, XUE Feng-jie, XUE Xing-huan

Department of Oncological Surgery, Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China

Abstract: Objective To evaluate the chemopreventive effect of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor, on chemically induced breast cancer of rats and its effect on COX-2 expression. **Methods** 7, 12-dimethylbenzanthracene (DMBA) was administered intragastrically in SD female rats to establish breast cancer models, which were divided subsequently into control group, tamoxifen group and celecoxib group to receive different treatments accordingly. The occurrence rate of breast cancer was observed and the effect of celecoxib on COX-2 and vascular endothelial growth factor (VEGF) expressions assayed by immunohistochemical SP method. **Results** The incidence of breast cancer in tamoxifen group (48.15%) and celecoxib group (50.00%) were both significantly lower than that in the control group (85.71%; $P=0.003$ and $P=0.004$, respectively). The positivity rate of COX-2 expression in celecoxib group (28.57%) was significantly lower than those of tamoxifen group (48.15%) and control group (83.33%; $P=0.001$ and $P=0.035$, respectively). The positivity rate of VEGF expression in celecoxib group (42.86%) was significantly lower than that of control group (79.17%, $P=0.023$), but comparable with that in tamoxifen group (46.15%, $P=0.863$). **Conclusion** Celecoxib can significantly suppress DMBA-induced breast cancer in female rats possibly through down-regulation of COX-2 and VEGF expressions.

Key words: breast neoplasms; celecoxib; tamoxifen; cyclooxygenase-2; vascular endothelial growth factor

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、

收稿日期:2006-04-12

基金项目:陕西省科技计划项目(2003K10-G40)

Supported by Sci-tech Development Program of Shaanxi Province (2003K10-G40)

作者简介:康华峰(1973-),男,博士,主治医师,电话:029-87679526,

E-mail:kanghf73@yahoo.com.cn

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% H₂O₂-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,滴加免抗鼠 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 χ² 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)。

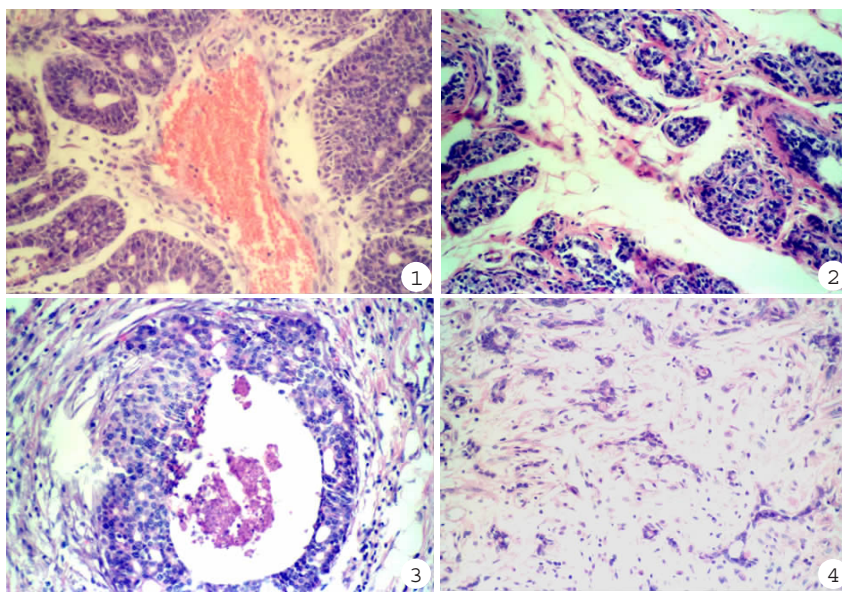


图 1 单纯诱癌组大鼠乳腺浸润性导管癌组织

Fig.1 Infiltrating ductal cancer of rat mammary gland in control group (HE staining, original magnification × 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 × 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($\chi^2=0.990, P=0.320$)。

2.4 VEGF 蛋白在各组乳腺癌组织中的表达

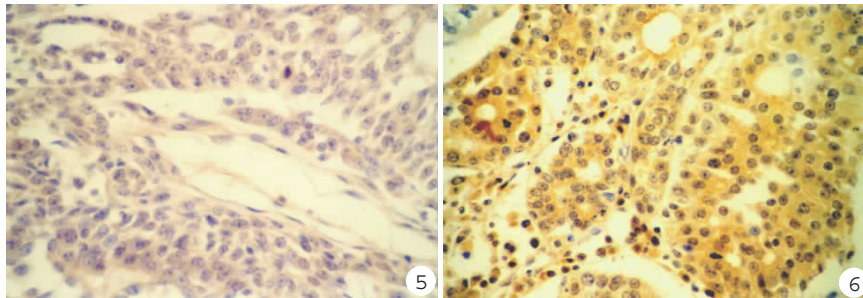


图 5 塞来昔布组大鼠乳腺癌组织 COX-2 蛋白阳性染色

Fig.5 Positive expression of COX-2 in breast cancer tissue in celecoxib group

(SP staining, original magnification: $\times 400$)

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

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($\chi^2=0.990, P=0.320$)。

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($\chi^2=4.194, P=0.041$)。

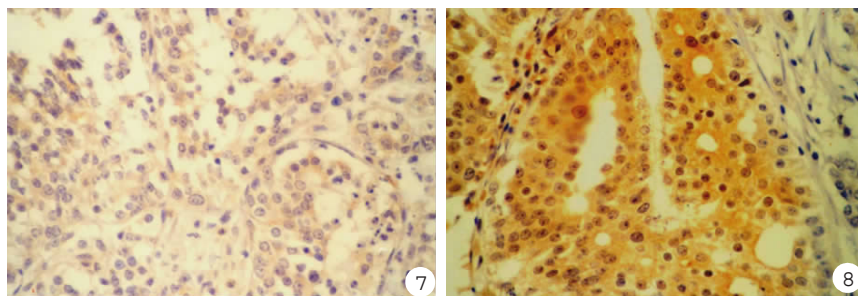


图 7 塞来昔布组大鼠乳腺癌组织 VEGF 蛋白阳性染色

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: $\times 400$)

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 DM BA 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

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

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内皮细胞条索^[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 Mammary 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] Michalek 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, Shewmoke 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] Tsujii 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.