

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2013)05-0458-04

塞来昔布联合替吉奥对胃癌裸鼠移植瘤生长的抑制作用

孟翠翠¹, 陈晓品^{1*}, 罗治彬²¹重庆医科大学附属第一医院肿瘤科, 重庆 400016; ²重庆市合川区人民医院肿瘤科, 重庆 合川 401520)

[摘要] 目的 研究选择性环氧合酶-2 抑制剂塞来昔布联合替吉奥对胃癌裸鼠皮下移植瘤生长的影响及可能机制。方法建立胃癌裸鼠皮下移植瘤模型, 成瘤后将裸鼠随机分为阴性对照组、塞来昔布组、替吉奥组、塞来昔布联合替吉奥组, 连续给药 21 d 后, 取材, 测量肿瘤体积、计算抑瘤率, TUNEL 检测肿瘤组织的凋亡率, 免疫组化检测各组 PCNA、Bcl-2、caspase-3 的表达情况。结果 塞来昔布组、替吉奥组、联合给药组的抑瘤率分别为 30.8%、50.1%、78.8%。各干预组较对照组凋亡率明显增加($P < 0.01$), 联合给药组较单药组凋亡率明显增加($P < 0.01$)。各干预组 PCNA、Bcl-2 的表达较对照组明显降低($P < 0.01$), 联合给药组较单药组明显降低($P < 0.05$)。各干预组 caspase-3 的表达较对照组明显升高($P < 0.05$), 联合给药组表达较单药组明显升高($P < 0.01$)。结论 塞来昔布、替吉奥均有明显的抗肿瘤作用, 二者联合表现为协同作用, 可能是抑制肿瘤细胞的增殖、促进凋亡所致。

[关键词] 胃癌; 塞来昔布; 替吉奥; Bcl-2; caspase-3

[中图分类号] R392-33, R735.2 **[文献标志码]** A

Inhibitive effect of celecoxib combined with tegafur gimeracil oteracil potassium on the growth of xenograft tumor of gastric cancer in nude mice

MENG Cuicui¹, CHEN Xiaopin^{1*}, LUO Zhibin²¹Department of Oncology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; ²Department of Oncology, Hechuan District People's Hospital, Hechuan 401520, China

[Abstract] **Objective** To investigate the anti-tumor effect of celecoxib combined with tegafur gimeracil oteracil potassium on subcutaneous xenograft tumor of gastric cancer in nude mice and analyze the possible mechanism. **Methods** A xenograft tumor model of gastric cancer was established subcutaneously in nude mice. After the largest diameter of tumor reached about 5 mm, the nude mice were randomly divided into 4 groups: the control group, the celecoxib group, the tegafur gimeracil oteracil potassium group, and the combination group; the drug was administered respectively for 21 days. Thereafter, tumor tissues were collected, tumor volume was measured, and tumor inhibition rate was calculated. Apoptosis was determined by TUNEL assay and the expression levels of PCNA, Bcl-2 and caspase-3 by immunohistochemistry. **Results** The tumor inhibition rates of the celecoxib group, the tegafur gimeracil oteracil potassium group, the combination group were 30.8%, 50.1%, 78.8%, respectively. The apoptosis index in treatment groups was higher than that in the control group ($P < 0.01$), and the combination group was higher than single drug group ($P < 0.01$). The expressions of PCNA, Bcl-2 in treatment groups were lower than those in the control group ($P < 0.01$), and the combination group was lower than single drug group ($P < 0.05$). The expression of caspase-3 in treatment groups was higher than that in the control group ($P < 0.05$), and the combination group was higher than single drug group ($P < 0.01$). **Conclusion** Both celecoxib and tegafur gimeracil oteracil potassium showed obvious anti-tumor effect, and the combination of the two acted synergistically. The possible mechanism was that they inhibited tumor growth through inhibiting proliferation and promoting apoptosis of the tumor cells.

[Key words] gastric cancer; celecoxib; tegafur gimeracil oteracil potassium; Bcl-2; caspase-3

环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 是催化花生四烯酸转化为前列腺素的限速酶, 研究表明, 它在

多种人类肿瘤, 包括胃癌中过表达, 与肿瘤发生、发展密切相关。流行病学资料表明, 规律服用非甾体

收稿日期: 2012-11-12; 接受日期: 2012-11-27

作者简介: 孟翠翠(1985-), 女, 山东枣庄人, 硕士

Tel: 15823998563; E-mail: mengcuicui-happy@163.com

* Corresponding author, 陈晓品, E-mail: cxp640910@163.com

类抗炎药物,可以减少包括胃癌^[1]在内的多种人类肿瘤的风险。塞来昔布作为一种选择性 COX-2 抑制剂,是新型高效低毒的非甾体类抗炎药物。研究表明,塞来昔布具有明显的抗肿瘤作用。塞来昔布联合新型抗肿瘤药物替吉奥在胃癌裸鼠皮下移植瘤模型中的抗肿瘤作用如何,国内外未见报道。本实验通过建立胃癌裸鼠皮下移植瘤模型,给予塞来昔布、替吉奥进行干预,观察联合治疗的抗肿瘤作用及可能的机制,为塞来昔布用于胃癌的综合治疗提供前期的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌 SGC-7901 细胞株由重庆医科大学附属第一医院实验研究中心保存。4~6 周龄雌性 BALB/c 裸鼠 31 只,体质量 13.5~14.5 g,购于中国协和医科大学实验动物研究所,动物合格证号 SCXK(京)2009-0004。动物饲养于重庆医科大学附属第一医院实验研究中心动物实验室 SPF 级环境中。塞来昔布购于美国辉瑞制药公司(批号 BK11CCEE042),替吉奥购于江苏恒瑞制药公司(批号 11122996 No. 223)。胎牛血清、RPMI1640 培养基购于 HyClone 公司。兔抗 PCNA、兔抗 Bcl-2 抗体购于 Epitomics 公司,兔抗 caspase-3 抗体购于碧云天公司。免疫组化 SP 试剂盒、DAB 显色剂购于北京中杉金桥生物公司。TUNEL 试剂盒购于 Roche 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 胃癌 SGC-7901 细胞培养于含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,于 37℃、50 mL/L CO₂ 的培养箱中培养,细胞生长至 80%~90% 汇合度时进行传代。

1.2.2 动物模型建立及分组干预 取对数生长期的细胞,以 2.5 g/L 的胰酶消化后离心,血细胞计数板计数,用 PBS 调整细胞的密度为 1×10^7 /mL,每只裸鼠于前肢靠近背部皮下注射 0.2 mL 细胞悬液,即每只接种 2×10^6 细胞,共接种 31 只。肿瘤最大径达到 5 mm 开始分组干预。成瘤的裸鼠随机分为阴性对照组、塞来昔布组、替吉奥组、塞来昔布联合替吉奥组。塞来昔布、替吉奥均采用灌胃给药,混悬于 5 g/L 的羧甲基纤维素钠中。塞来昔布给药剂量为 50 mg/(kg·d)^[2],每只裸鼠给予 0.2 mL,每周连续给药 7 d;替吉奥给药剂量为 10 mg/(kg·d)^[3],每只裸鼠给予 0.1 mL,每周连续给药 5 d;联合给药组为等剂量塞来昔布、替吉奥的联合;阴性对照组给予等体积的 5 g/L 的羧甲基纤维素钠。治疗过程中每 3 d 用游标卡尺测量肿瘤的长径(a)、短径(b),连续给药 3 周后脱颈椎处死裸鼠,取材。测量肿瘤体积 $V = ab^2/2$,计算抑瘤率 = (1 - 干预组肿瘤体积/对照组肿瘤体积) × 100%。

1.2.3 TUNEL 检测肿瘤组织的凋亡率 按照 TUNEL 试剂盒的说明书操作,石蜡切片常规脱蜡水化,蛋白酶 K 进行细胞通透、TUNEL 反应混合液进行标记反应、辣根酶标记的链霉亲和素进行酶标反应、DAB 显色、苏木素复染、梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树脂封片。凋亡细胞的胞核染成棕黄色。在 200 倍镜下,随机计数 5 个视野中阳性染色细胞比例^[4],计算凋亡率 = 阳性染色细胞数/总细胞数 × 100%。

1.2.4 免疫组化检测移植瘤组织 PCNA、Bcl-2、caspase-3 的

表达 采用免疫组化 SP 法,抗原修复。分别滴加兔抗 PCNA 抗体(1:150)、兔抗 Bcl-2 抗体(1:150)、兔抗 caspase-3 抗体(1:300)、生物素标记的山羊抗兔二抗工作液、辣根酶标记的链霉亲和素、DAB 显色,苏木素复染。盐酸酒精分化、碳酸锂返蓝、梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。光学显微镜下拍照。PCNA 阳性染色定位于肿瘤细胞的胞核,为棕黄色染色。在 200 倍镜下随机计数 5 个视野中阳性染色细胞数,计算增殖指数 = PCNA 阳性染色细胞数/总细胞数 × 100%。Bcl-2、caspase-3 阳性染色定位于肿瘤细胞的胞质和胞核。利用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件测量并分析胃癌组织中 Bcl-2、caspase-3 表达的平均光密度值。

1.2.5 统计学分析 应用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成瘤率及裸鼠的一般状况 26 只裸鼠在接种后第 18 天肿瘤最大径达到或者超过 5 mm,5 只裸鼠未成瘤,成瘤率 83.9%。给予药物干预后,各干预组裸鼠并未出现明显的不良反应,精神状况、活动、饮食、大小便未见异常,体重均较治疗前增加。

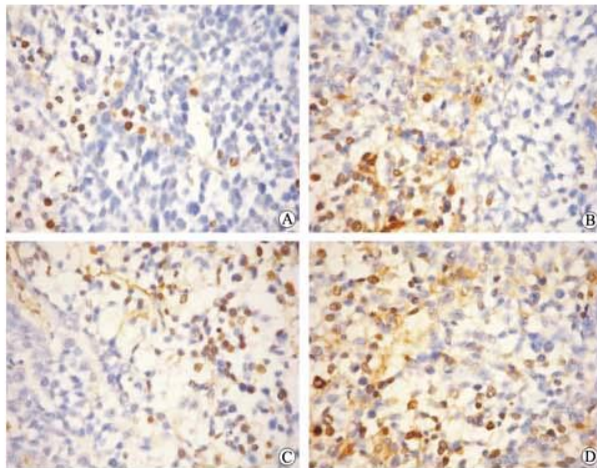
2.2 药物对裸鼠皮下移植瘤生长的影响 药物干预后,各组移植瘤体积分别为:阴性对照组(2288.67 ± 753.87)mm³、塞来昔布组(1583.75 ± 345.25)mm³、替吉奥组(1142.42 ± 229.17)mm³、联合给药组(485.00 ± 255.25)mm³。药物干预组与对照组相比,肿瘤生长缓慢,体积明显缩小($P < 0.05$),联合给药组肿瘤体积明显小于各单药组($P < 0.05$),替吉奥组肿瘤体积与塞来昔布组无显著差异($P > 0.05$)。塞来昔布组、替吉奥组、联合给药组的抑瘤率分别为 30.8%、50.1%、78.8%。由金正均法^[5]可知,两药合用后产生明显的协同作用, $q > 1.15$ 。 $(q = E_{A+B} / (E_A + E_B - E_A \cdot E_B))$, E_{A+B} 为 A、B 两药联用后的效应, E_A 、 E_B 分别为两药单用的效应)。

2.3 塞来昔布与替吉奥对移植瘤组织凋亡率的影响

TUNEL 检测结果表明,凋亡细胞的胞核呈现棕黄色染色,极少部分细胞的胞质呈现棕黄色染色。各干预组凋亡细胞数较对照组明显增多($P < 0.01$),对照组、塞来昔布组、替吉奥组、联合给药组的凋亡率分别为(11.19 ± 1.73)%、(30.98 ± 2.00)%、(39.16 ± 2.74)%、(58.93 ± 3.70)%。替吉奥组凋亡率高于塞来昔布组($P < 0.01$)。联合给药组较塞来昔布组、替吉奥组凋亡率进一步增高($P < 0.01$,图 1)。

2.4 塞来昔布与替吉奥对各组移植瘤 PCNA、Bcl-2、caspase-3 表达的影响 免疫组化分析结果为:阴性对照组、塞来昔布组、替吉奥组、联合给药组的增殖指数分别为(79.49 ± 3.47)%、(59.76 ± 3.86)%、(52.70 ± 2.37)%、(32.24 ± 2.11)%。各干预组增

殖指数较对照组明显降低($P < 0.01$), 联合给药组增殖指数低于单药组($P < 0.01$), 塞来昔布组的增殖指数高于替吉奥组($P < 0.01$)。各干预组 Bcl-2 的表达较对照组明显降低($P < 0.01$), 联合给药组低于单药组($P < 0.05$), 塞来昔布组与替吉奥组 Bcl-2 的表达无明显差异($P > 0.05$)。各干预组 caspase-3 的表达较对照组升高($P < 0.05$), 联合给药组明显高于单药组($P < 0.01$), 替吉奥组 caspase-3 的表达高于塞来昔布组(表 1, 图 2、3, $P < 0.05$)。

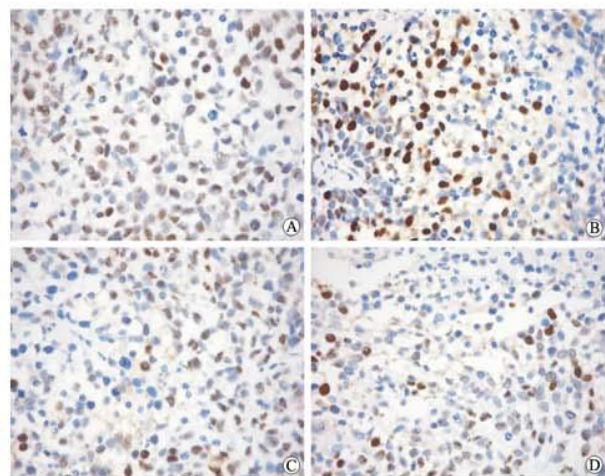


A: 阴性对照组; B: 塞来昔布组; C: 替吉奥组; D: 联合给药组。
图 1 胃癌裸鼠皮下移植瘤组织中凋亡检测(TUNEL 染色, $\times 200$)

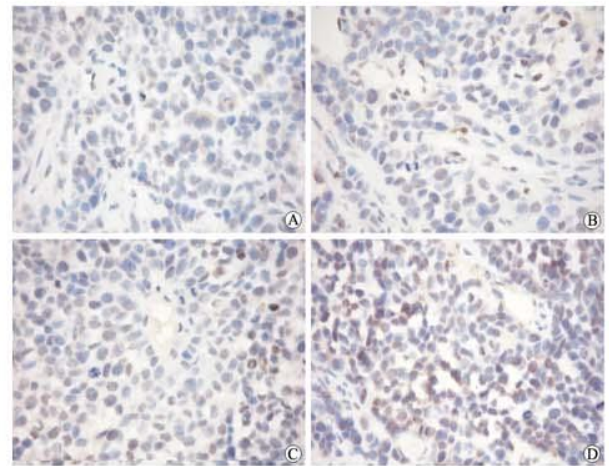
表 1 各组肿瘤组织中 Bcl-2、caspase-3 表达的平均光密度值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2	caspase-3
阴性对照组	0.0658 \pm 0.0061	0.0205 \pm 0.0022
塞来昔布组	0.0410 \pm 0.0060 ^b	0.0268 \pm 0.0035 ^{ac}
替吉奥组	0.0393 \pm 0.0063 ^b	0.0325 \pm 0.0008 ^a
联合给药组	0.0304 \pm 0.0014 ^{cb}	0.0454 \pm 0.0049 ^{ad}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 塞来昔布组、替吉奥组; ^e $P < 0.05$ vs 替吉奥组。



A: 阴性对照组; B: 塞来昔布组; C: 替吉奥组; D: 联合给药组。
图 2 胃癌裸鼠皮下移植瘤组织中 PCNA 的表达(免疫组化染色, $\times 200$)



A: 阴性对照组; B: 塞来昔布组; C: 替吉奥组; D: 联合给药组。
图 3 胃癌裸鼠皮下移植瘤组织中 caspase-3 的表达(免疫组化染色, $\times 200$)

3 讨论

COX-2 在约 60% 的胃癌组织中过表达^[6], 与肿瘤发生、发展密切相关, 是肿瘤预防和治疗的重要靶点。塞来昔布是高选择性的 COX-2 抑制剂, 具有抑制肿瘤细胞增殖、促进凋亡、抑制肿瘤新生血管生成、抵抗宿主的抗肿瘤免疫的作用。近年研究表明, 塞来昔布与一些化疗药物联用可以提高肿瘤治疗的疗效, 减少化疗药物的副作用。

替吉奥是用于胃肠道肿瘤治疗的口服抗癌新药, 是 5-FU 的衍生物, 由 3 种成分组成, 即替加氟(FT), 是 5-FU 的前体, 可进一步转变为 5-FU 发挥抗肿瘤作用; 吉美嘧啶(CDHP)通过抑制二氢嘧啶脱氢酶(DPD)的活性提高 5-FU 的血药浓度; 奥替拉西钾减少 5-FU 引起的胃肠道的副作用。替吉奥抗肿瘤作用的机制与 5-FU 相同, 两种调节成分并无抗肿瘤的作用, 抗肿瘤的效果优于 5-FU, 化疗的副作用明显减少^[7]。替吉奥抗肿瘤作用的机制为替加氟经肝脏微粒体细胞色素 P450 酶系作用转化为 5-FU, 5-FU 通过抑制胸苷酸合酶而抑制 DNA 的合成, 另外 5-FU 可以整合到 RNA 分子中, 进而抑制 RNA 合成。

塞来昔布联合替吉奥对胃癌裸鼠皮下移植瘤生长的影响尚未见报道。本研究通过建立胃癌裸鼠皮下移植瘤模型, 给予塞来昔布、替吉奥进行干预, 结果发现, 各干预组肿瘤生长明显受到抑制, 两药联合表现为协同作用。首先通过免疫组化方法检测了各组 PCNA 的表达情况。PCNA 是 DNA 聚合酶 δ 的辅助因子, 与 DNA 合成密切相关, 是衡量肿瘤细胞增殖能力和恶性程度的重要指标。本研究发现塞来昔布、替吉奥均明显抑制肿瘤细胞的增殖, 联合给药组 PCNA 的表达, 明显低于各单药组($P < 0.01$)。可能

的机制为替吉奥通过抑制肿瘤细胞 DNA 的合成,抑制了肿瘤细胞的增殖,而塞来昔布通过抑制 COX-2 的活性,进而抑制了肿瘤细胞的增殖,二者通过不同的途径发挥抗增殖的作用。在紫外线诱导的皮肤肿瘤的动物模型中,塞来昔布与 5-FU 显示了协同的抗肿瘤作用,其机制为塞来昔布、5-FU 对肿瘤细胞增殖的抑制作用及塞来昔布减少 5-FU 引起的 PGE2 表达的上调,增强 5-FU 的抗肿瘤作用^[8]。Ponthan 等^[9]在神经母细胞瘤细胞系及动物模型的研究中发现,塞来昔布与阿霉素联合起到了协同的抗肿瘤作用,塞来昔布通过使细胞周期阻滞在亚 G1 期、抑制肿瘤细胞的增殖、抑制肿瘤新生血管生成,增强了化疗药物的抗肿瘤作用。

TUNEL 实验表明各干预组凋亡率明显高于阴性对照组($P < 0.01$),联合给药组的凋亡率高于各单药组($P < 0.01$)。本研究中发现,凋亡细胞的胞核呈棕黄色染色,极少部分细胞的胞质出现了棕黄色染色,可能的原因是细胞坏死所致,或者是线粒体中 DNA 链的断裂引起的。

进一步从凋亡通路研究了塞来昔布联合替吉奥抗肿瘤作用的机制。本研究发现,塞来昔布、替吉奥均下调 Bcl-2 的表达,上调 caspase-3 的表达,促进凋亡,二者联合作用进一步增强。Bcl-2 是 Bcl-2 家族的成员,是目前研究比较多的一种凋亡抑制蛋白,通过抑制线粒体通透性转换孔开放,抑制细胞色素 C、凋亡诱导因子释放,抑制凋亡的发生。Caspase 家族是细胞凋亡过程中的关键元件,其激活与超常表达均引起细胞凋亡,因此又称为死亡蛋白酶,可通过与众多蛋白因子的相互作用调控细胞凋亡^[10]。Caspase-3 处于凋亡级联反应的下游,是细胞凋亡的关键执行者,它的活化是凋亡进入不可逆阶段的标志。诱导凋亡是化疗药物抗肿瘤作用的重要机制,本研究中发现,替吉奥通过下调 Bcl-2 的表达,上调 caspase-3 的表达促进了凋亡。在胃癌 SGC-7901 细胞^[11]、宫颈癌 Hela 细胞^[12]的研究中,塞来昔布可以下调 Bcl-2 的表达,促进凋亡,并且与顺铂联用有协同的抗肿瘤作用。Dandekar 等^[13]发现在前列腺癌细胞中,塞来昔布联合多烯紫杉醇有协同的抗肿瘤作用,二者均可以促进前列腺癌细胞的凋亡,显著上调 caspase-9、caspase-3 的表达。苏方等^[14]研究发现,塞来昔布和多柔比星对乳腺癌 MCF-7 细胞和 Sk-Br-3 细胞有增殖抑制和促凋亡作用,两药联合表现为协同或相加作用。二者均可以下调 Bcl-2 的表达,提高 caspase-3 的活性,联合用药组作用强于单药组。

目前研究发现,塞来昔布与一些化疗药物联合

可以起到协同的抗肿瘤作用,或者是增强化疗药物的抗肿瘤作用,具体机制尚未完全明确。本研究中,塞来昔布联合替吉奥对胃癌裸鼠皮下移植瘤的生长起协同的抑制作用,可能的机制为二者通过抑制肿瘤细胞的增殖、下调 Bcl-2 的表达、上调 caspase-3 的表达,促进凋亡,发挥抗肿瘤作用。

参考文献:

- [1] Akre K, Ekstrom AM, Signorello LB, et al. Aspirin and risk for gastric cancer: a population-based case-control study in Sweden[J]. Br J Cancer, 2001, 84(7): 965-968.
- [2] Zhang X, Chen ZG, Choe MS, et al. Tumor growth inhibition by simultaneously blocking epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 in a xenograft model[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(17): 6261-6269.
- [3] Tachimori A, Yamada N, Amano R, et al. Combination therapy of S-1 with selective cyclooxygenase-2 inhibitor for liver metastasis of colorectal carcinoma[J]. Anticancer Res, 2008, 28(2A): 629-638.
- [4] Choi S, Sano D, Cheung M, et al. Vandetanib inhibits growth of adenoid cystic carcinoma in an orthotopic nude mouse model[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(16): 5081-5089.
- [5] 金正均. 合并用药中的相加[J]. 中国药理学报, 1980, 1(2): 70-76.
- [6] Joo YE, Chung IJ, Park YK, et al. Expression of cyclooxygenase-2, p53 and Ki-67 in gastric cancer[J]. J Korean Med Sci, 2006, 21(5): 871-876.
- [7] Kobayakawa M, Kojima Y. Tegafur/gimeracil/oteracil (S-1) approved for the treatment of advanced gastric cancer in adults when given in combination with cisplatin: a review comparing it with other fluoropyrimidine-based therapies[J]. Onco Targets Ther, 2011, 4: 193-201.
- [8] Wilgus TA, Breza TS Jr, Tober KL, et al. Treatment with 5-fluorouracil and celecoxib displays synergistic regression of ultraviolet light B-induced skin tumors[J]. J Invest Dermatol, 2004, 122(6): 1488-1494.
- [9] Ponthan F, Wickstrom M, Gleissman H, et al. Celecoxib prevents neuroblastoma tumor development and potentiates the effect of chemotherapeutic drugs *in vitro* and *in vivo*[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(3): 1036-1044.
- [10] Zhang Y, Goodyer C, LeBlanc A, et al. Selective and protracted apoptosis in human primary neurons microinjection with active caspase-3, -6, -7 and -8[J]. J Neurosci, 2000, 20(22): 8384-8389.
- [11] 崔京远, 马红, 李梅, 等. 塞来昔布联合顺铂对 SGC-7901 人胃癌细胞凋亡及 Bcl-2 表达的影响[J]. 中国现代普通外科进展, 2009, 12(6): 466-468.
- [12] 周自华, 徐宁红, 陈尚忠, 等. 塞来昔布对宫颈癌细胞的化疗增敏作用[J]. 实用癌症杂志, 2011, 26(5): 452-455.
- [13] Dandekar DS, Lopez M, Carey RI, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib augments chemotherapeutic drug-induced apoptosis by enhancing activation of caspase-3 and -9 in prostate cancer cells[J]. Int J Cancer, 2005, 115(3): 484-492.
- [14] 苏方, 刘浩, 程秀, 等. 塞来昔布联合多柔比星对乳腺癌细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(5): 632-638.