

塞来昔布联合氟尿嘧啶对 MFC 细胞 615 小鼠原位移植瘤 COX-2、Fas 表达的影响及意义

范立侨,李 勇,李巧霞,李 涛,赵 群,檀碧波

(河北医科大学第四医院,河北 石家庄 050011)

摘 要: [目的] 通过测定在塞来昔布及氟尿嘧啶干预下的小鼠前胃癌细胞 (MFC) 615 小鼠原位移植瘤中环氧化酶(COX-2)、Fas 的表达,对 COX-2 抑制剂联合氟尿嘧啶对胃癌的影响及意义进行探讨。[方法] 制备 MFC 细胞 615 小鼠原位移植胃癌模型。造模成功后分为塞来昔布组、联合用药组及对照组,其中塞来昔布 25mg/kg 灌胃,氟尿嘧啶 50mg/kg 腹腔注射。观察各组小鼠一般情况。干预 3 周后处死小鼠,计算抑瘤率。SP 免疫组织化学法检测各组肿瘤 COX-2、Fas 表达。[结果] 造模成功率 100.00% (30/30)。联合用药组、塞来昔布组的小鼠一般情况优于对照组。实验结束后 3 组比较,塞来昔布组、联合用药组比对照组肿瘤体积和瘤重的抑制率均明显升高 ($P < 0.05$)。与塞来昔布组相比,联合用药组肿瘤体积更小、瘤重减轻 ($P < 0.05$)。COX-2 蛋白在塞来昔布组、联合用药组表达阳性率明显低于对照组,而 Fas 蛋白的表达则明显高于对照组 ($P < 0.05$)。[结论] 塞来昔布及氟尿嘧啶对胃癌有抑制作用,其机制与调节 COX-2、Fas 蛋白表达有关。

关键词: 胃肿瘤;环氧化酶-2;氟尿嘧啶;Fas 蛋白

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2015)05-0355-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.05.B001

Effect of Celecoxib Combined with Fluorouracil on Expressions of COX-2, Fas Proteins in 615 Mice Orthotopic Transplantation Tumors of MFC Cells and Their Significance

FAN Li-qiao, LI Yong, LI Qiao-xia, et al.

(The Fourth Affiliated Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of celecoxib combined with fluorouracil on the expressions of COX-2, Fas proteins in 615 mice orthotopic transplantation tumors of MFC cells and to investigate the influence of COX-2 inhibitor or combined with fluorouracil on gastric cancer. [Methods] 615 mice MFC orthotopic transplantation models were established. The mice were divided into celecoxib group (celecoxib 25mg/kg orally), combination group (celecoxib 25mg/kg orally and fluorouracil 50mg/kg intraperitoneal injection), and control group. General data of mice were recorded. Models were sacrificed after 3 weeks with intervention, and inhibition rate of tumor was analyzed. Expressions of COX-2, Fas proteins were determined with SP immunohistochemical method. [Results] All models were established (100.00%, 30/30). General situation of celecoxib group and combination group was better than that of control group. After intervention, the inhibition of tumor volume and weight were higher in celecoxib group and combination group than those in control group ($P < 0.05$). Compared with celecoxib group, tumor volume and weight were lower in combination group ($P < 0.05$). Positive rate of COX-2 protein expression was lower in celecoxib group and combination group than that in control group, whereas positive rate of Fas protein expression was higher in celecoxib group and combination group than that in control group ($P < 0.05$). [Conclusion] Celecoxib combined with fluorouracil could inhibit gastric cancer by regulating COX-2, Fas proteins.

Subject words: gastric neoplasms; cyclooxygenase-2; fluorouracil; Fas protein

胃癌是我国恶性肿瘤中发病率和死亡率较高的

肿瘤之一,胃癌治疗目前仍以根治性手术切除为主,辅以化疗和放疗^[1,2]。但手术后 2 年内大约有 50%~60% 患者可出现转移,且因胃癌起病隐袭、早诊率低,大约 40% 的患者确诊时已属晚期,故手术切除率低、长期生存率低为胃癌的特点。全身化疗是进展期胃癌的主要治疗措施,但目前尚无公认的标准

基金项目: 国家自然科学基金 (81372580); 河北省自然科学基金 (C2011206086); 河北省卫生厅医学科学研究重点课题 (20110456)

通讯作者: 李勇,主任医师,教授,博士生导师,博士;河北医科大学第四医院外三科,河北省石家庄市健康路 12 号 (050011); E-mail: li_yong_hbth@126.com

收稿日期: 2015-03-10; **修回日期:** 2015-03-28

化疗方案,化疗药物疗效不高。研究表明环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 与胃癌的发生、发展密切相关^[3], 特异性 COX-2 抑制剂如塞来昔布 (celecoxib) 等有望成为胃癌防治的一类新药。为探讨 COX-2 抑制剂对胃癌的作用及机制, 本研究制备了 615 小鼠原位移植瘤胃癌模型, 应用塞来昔布与氟尿嘧啶 (5-Fu) 进行了干预, 对塞来昔布提高化疗的效果及机制进行了分析。

1 材料与方法

1.1 动物

选用健康、SPF 级别 (specific-pathogen free, SPF) 615 小鼠共 44 只, 均 6~8 周龄, 18~22g, 雌雄兼用, 购自北京华阜康公司。小鼠在河北医科大学第四医院实验动物中心饲养。

1.2 细胞株

MFC 小鼠前胃癌细胞购自中国科学院上海细胞生物学研究所, 由河北医科大学第四医院科研中心传代培养。

1.3 主要试剂及仪器

塞来昔布 (美国 SIGMA 公司), 氟尿嘧啶注射液 (江苏恒瑞医药股份有限公司), COX-2、Fas 蛋白多克隆抗体 (武汉博士德生物公司), 免疫组化试剂盒、DAB 显色剂试剂盒 (北京中杉金桥公司); CO₂ 培养箱 (TC2323 型, 美国 SHELDON 公司), RM2135 型切片机 (德国 LEICA 公司), Qcapture 图像采集系统 (加拿大 QIMAGING 公司)。

1.4 细胞培养

MFC 细胞复苏后在 5%CO₂、37℃ 恒温培养箱中常规培养并传代。取对数生长期细胞调整细胞悬液密度为 10⁶ 个/ml 用于模型制备。

1.5 615 小鼠原位移植胃癌模型的建立

首先建立小鼠皮下移植瘤模型: MFC 细胞调节浓度为 3.5×10⁵ 个/ml 的细胞悬液, 0.2ml 注射于 615 小鼠消毒后的背部。接种后待瘤体生长至直径约 10mm 时剥取瘤体, 制成 1mm×1mm×1mm 小组织块, 将小组织块植入第二代皮下移植鼠背部后缝合皮肤, 每次重复 2 只。如此反复鼠间传代 6 次后取肿瘤组织进行原位移植。

原位移植胃癌模型的建立: 取鼠间传代 6 次后

的小鼠皮下瘤组织, 剪成 1mm×1mm×1mm 大小备用。手术前腹腔注射 1% 戊巴比妥麻醉 (50mg/kg), 常规消毒皮肤后铺巾, 取腹正中切口, 于剑突下切开约 1.5cm 皮肤, 自白线处切开腹膜进腹, 将小鼠胃稍拉出腹腔, 在鼠胃大弯侧血管丰富区划开胃浆膜层成一“十”字, 观察到出血后将稳定传代 6 次后的胃肿瘤组织块接种于此, 组织块大小为 1mm×1mm×1mm。在此“十”字处滴少量医用 OB 胶, 将网膜组织覆盖在胶上, 待粘合牢固后将鼠胃还纳入腹, 逐层关腹。同期原位移植 30 只 615 小鼠。原位移植动物随机分为 3 组, 每组 10 只。联合用药组: 5-Fu 50mg/kg, 腹腔注射, 每周 1 次, 塞来昔布 25mg/kg, 灌胃, 每日 1 次。塞来昔布组: 塞来昔布 25mg/(kg·d), 灌胃, 每日 1 次; 腹腔注射等量生理盐水。荷瘤对照组给予等量的灭菌蒸馏水溶液灌胃, 腹腔注射等量生理盐水。3 周后处死动物, 进行检测。

1.6 常规检测指标

1.6.1 动物行为观察

观察 3 组小鼠精神状态、进食饮水、活动、体重等情况。

1.6.2 瘤重抑制率及肿瘤体积抑制率检测

实验结束后完整剥取瘤块, 称重并游标卡尺测量肿瘤最长径 a (mm) 及最短径 b (mm), 各重复 2 次。瘤重抑制率的计算按公式: 抑瘤率 (%) = (对照组平均瘤重量 - 实验组平均瘤重量) / 对照组平均瘤重量 × 100%。肿瘤的近似体积 (V) = b² × a × 0.5。肿瘤体积抑制率 = (对照组平均体积 - 治疗组平均体积) / 对照组平均体积 × 100%。

1.7 免疫组化技术检测 COX-2、Fas 蛋白的表达

制备肿瘤组织石蜡标本, 4μm 连续切片、烤片。组织常规脱蜡、脱水, PBS 工作液浸泡 5min×2 次后进行抗原修复。按试剂盒说明严格操作。封片后进行结果判读。以 PBS 代替一抗为阴性对照; 阳性显色为棕黄色颗粒, 标准光镜下以细胞浆、膜中出现粗细一致的棕黄色颗粒或细胞核着色为阳性染色; 光镜 (×400) 随机观察 5 个视野, 采取二次计分法: 首先将染色强度计分: 0 分为无色, 1 分为淡黄色, 2 分为棕黄色, 3 分为棕褐色。再将阳性细胞百分比计分, 0 分为阴性, 1 分为阳性细胞为 <10%, 2 分为 11%~50%, 3 分为 51%~75%, 4 分为 >75%。用染色强度得分和细胞数得分的乘积来判断表达结果, 若积分 ≤ 2 为

阴性,>2 为阳性。

1.8 统计学处理

使用 SPSS13.0 统计软件对结果进行分析。计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较先进行方差齐性检验后采用单因素方差分析,用 SNK 法进行两两比较。免疫组织化学阳性率比较应用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠前胃癌细胞 MFC615 小鼠原位移植模型的建立情况

30 只 615 小鼠原位移植全部成功,建模成功率 100%。随机分为塞来昔布组、塞来昔布联合 5-Fu 组和荷瘤对照组,每组 10 只。

2.2 塞来昔布、5-Fu 对原位移植 615 小鼠行为的影响

用药过程中联合用药组小鼠有轻度呕吐,精神状态较好,反应较灵敏,正常进食饮水。塞来昔布组进食饮水稍减少,未发现呕吐,活动较前迟钝,体重减轻不明显。对照组小鼠随着移植瘤结节的逐渐长大,进食饮水减少,活动减少,明显消瘦,精神差,反应迟钝。

2.3 塞来昔布及 5-Fu 对 MFC615 小鼠原位移植瘤体积的影响

实验结束对照组、塞来昔布组、联合用药组肿瘤体积分别为(982.76 ± 79.06)mm³、(325.96 ± 67.22)mm³、(92.57 ± 43.68)mm³;塞来昔布组、联合用药组肿瘤体积抑制率分别为 66.83%、90.58%;与对照组相比,塞来昔布组、联合用药组肿瘤体积抑制明显,差异显著($t=20.01, P < 0.001$; $t=31.17, P < 0.001$)。与塞来昔布组相比,联合用药组肿瘤体积抑制率显著升高且有显著差异($t=9.21, P < 0.001$)(Table 1)。

2.4 塞来昔布及 5-Fu 对 MFC615 小鼠原位移植瘤重量的影响

对照组、塞来昔布组、联合用药组的瘤重分别为(1.64 ± 0.11)g、(0.74 ± 0.13)g、(0.38 ± 0.08)g;塞来昔布组、联合用药组瘤重抑瘤率分别为 54.57%、76.55%,与对照组相比,塞来昔布组、联合用药组瘤重抑制明显,差异显著($t=16.71, P < 0.001$; $t=29.29, P < 0.001$)。与塞来昔布组相比,联合用药组抑瘤率明显升高($t=7.46, P < 0.001$)(Table 2)。

Table1 The tumor volume and inhibition rate in the different groups($\bar{x} \pm s$)

Groups	N	Tumor volume (mm ³)	Inhibition rate (%)
Control	10	982.76 $\pm$ 79.06	0
Celecoxib	10	325.96 $\pm$ 67.22*	66.83
Celecoxib+ 5-Fu	10	92.57 $\pm$ 43.68* [△]	90.58

Note:*, Compared with control group, $P < 0.05$; [△]: compared with celecoxib group, $P < 0.05$.

Table 2 The tumor weight and inhibition rate at the 21th day in the different groups(g)($\bar{x} \pm s$)

Groups	N	Tumor weight (g)	Inhibition rate (%)
Control	10	1.64 $\pm$ 0.11	0
Celecoxib	10	0.74 $\pm$ 0.13*	54.57
Celecoxib+ 5-Fu	10	0.38 $\pm$ 0.08* [△]	76.55

Note:*, Compared with the control group $P < 0.05$; [△]: compared with the celecoxib group, $P < 0.05$.

2.5 塞来昔布、5-Fu 对 MFC615 小鼠原位移植瘤细胞 COX-2 及 Fas 蛋白表达的影响

塞来昔布组、联合用药组、对照组 Cox-2 阳性表达率分别为 20.00%、10.00%、70.00%,3 组阳性表达率的差异具有统计学意义($\chi^2=9.30, P=0.01$)。与对照组相比,塞来昔布组和联合用药组 COX-2 阳性表达率降低($\chi^2=5.05, P=0.025$; $\chi^2=7.50, P=0.006$)。与塞来昔布组相比,联合用药组 COX-2 阳性表达率无显著性差异($\chi^2=0.39, P=0.53$)(Table 3, Figure 1)。

Table 3 The expression of COX-2 in 3 groups

Groups	N	COX-2		Fas	
		Positive case	Positive rate(%)	Positive case	Positive rate(%)
Control	10	7	70.00	1	10.00
Celecoxib	10	2	20.00*	6	60.00*
Celecoxib+5-Fu	10	1	10.00* [△]	9	90.00* [△]

Note:*, Compared with control group, $P < 0.05$; [△]: compared with celecoxib group, $P > 0.05$.

MFC615 小鼠原位移植瘤细胞 Fas 蛋白阳性率在塞来昔布组、联合用药组、对照组中分别为 60.00%、90.00%、10.00%,3 组差异具有统计学意义($\chi^2=13.13, P=0.001$)。与对照组相比,塞来昔布组和联合用药组 Fas 阳性表达率明显升高($\chi^2=5.49, P=0.02$; $\chi^2=12.80, P < 0.001$)。与塞来昔布组相比,联合用药组 Fas 阳性表达率无明显差异($\chi^2=2.53, P=0.11$)(Table 3, Figure 2)。

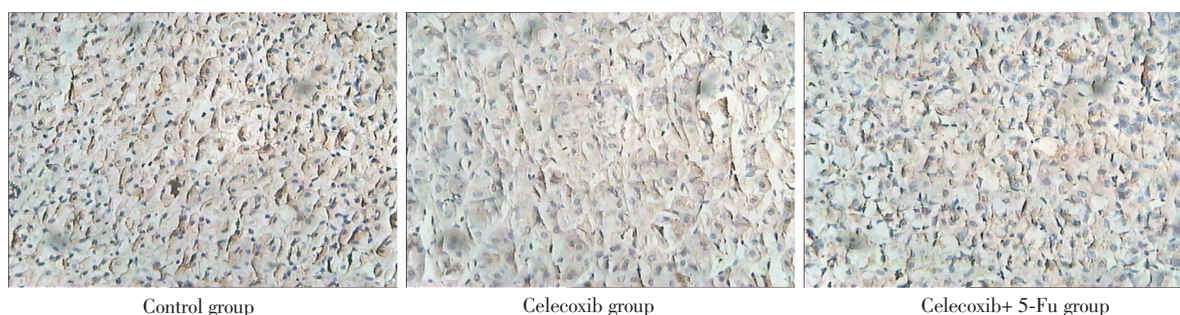


Figure 1 Expression of COX-2 in 615 mice MFC orthotopic transplantation tumor tissues in each group(IHC ×400)

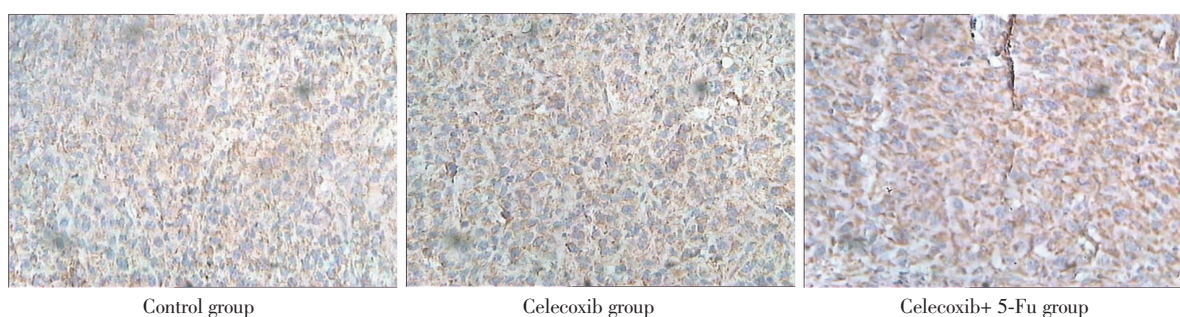


Figure 2 Expression of Fas in 615 mice MFC orthotopic transplantation tumor tissues in each group(IHC×400)

3 讨 论

胃癌是严重威胁人类健康的消化道恶性肿瘤,在全世界是最常见恶性肿瘤之一^[4,5]。该病发病率高、预后差,多于进展期发现,但手术后以化疗为主的综合治疗措施疗效仍不高,尤其是局部进展、转移的胃癌化疗仍然是目前临床肿瘤学界研究的热点和难点。5-Fu 是胃癌中应用最广泛的化疗药物,该药通过抗代谢物而发挥作用,在细胞内转化为有效的氟尿嘧啶脱氧核苷酸后,通过阻断脱氧核糖尿苷酸受细胞内胸苷酸合成酶转化为胸苷酸,而干扰 DNA 的合成。多年来 5-Fu 一直是胃癌化疗的一线药物,目前已开发出了多种氟尿嘧啶类药物如替加氟、卡培他滨等,并已在临床广泛应用。但此类药物对胃癌的治疗效果一直不能令人满意,其重要原因在于胃癌细胞具有较强的耐药性。因而有效逆转胃癌细胞的耐药性对于提高胃癌综合治疗效果有重要意义。在胃癌耐药的形成中,COX-2 发挥了重要作用,因而干扰 COX-2 表达可能增强 5-Fu 的作用效果。

COX 是前列腺素(PGs)合成过程中的一个重要的限速酶,分为 COX-1 和 COX-2 两个亚型^[6]。研究发现 COX-2 与恶性肿瘤关系密切,COX-2 抑制剂对胃癌、乳腺癌、结直肠癌^[7-9]均有抑制作用。为了解 COX-2 抑制剂对胃癌作用的效果及机制,本研究进行了体内研究,制备了 615 小鼠胃癌原位移植模型,并应用 COX-2 抑制剂塞来昔布及化疗药物 5-Fu 进行了干预。结果发现,塞来昔布对肿瘤形成有明显的抑制作用,与 5-Fu 联合作用后这种效果更为明显。提示 COX-2 抑制剂可能可有效提高胃癌化疗药物的疗效,值得进一步研究。

为了解 COX-2 抑制剂塞来昔布的作用机制,本研究还检测了促凋亡的 Fas 蛋白表达。Fas 蛋白是一种参与凋亡信号转导的胞质蛋白,其 C 末端含死亡结构域,可自身相互结合或其他含死亡结构域的分子(如 RIP、TRADD)结合。其与 Fas 分子胞质区死亡结构域结合,可介导细胞凋亡。Fas 与 FasL 结合是引起细胞凋亡的主要途径之一,Fas 系统功能的减弱可以导致组织细胞破坏的减少。细胞上表达的

Fas 与 FasL 或 Fas 抗体相互结合后, 可以使 Fas 所在的细胞凋亡, 因而激活 Fas 高表达可以诱导胃癌细胞的凋亡增加^[10]。肿瘤的发生过程中, Fas 蛋白表达下调, 则肿瘤细胞凋亡减少, 肿瘤进一步生长。本研究发现塞来昔布有明显促进 Fas 蛋白表达的作用, 这种作用导致凋亡的胃癌细胞增多, 抑制胃癌的生长。这可能是 COX-2 抑制剂塞来昔布抑制胃癌细胞的机制之一。

本研究发现应用 COX-2 抑制剂塞来昔布可有效抑制裸鼠的胃癌肿瘤形成, 其机制与调控 COX-2、Fas 蛋白有关。但本研究仅进行了动物研究, 且作用机制研究不够深入。今后研究中应对其调控进行深入研究, 并在条件成熟时进行临床效果观察, 以得到准确的结果。

参考文献:

- [1] Li FQ, Xu B, Wu YJ, et al. Differential microRNA expression in signet-ring cell carcinoma compared with tubular adenocarcinoma of human gastric cancer [J]. Genet Mol Res, 2015, 14(1): 739-747.
- [2] Chung HW, Kong HY, Lim JB. Clinical significance and usefulness of soluble heparin binding-epidermal growth factor in gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(7): 2080-2088.
- [3] Li Y, Tan BB, Fan LQ, et al. Expression of COX-2, survivin in regional lymph node metastases of gastric carcinoma and the correlation with prognosis [J]. Hepatogastroenterology, 2010, 57(104): 1435-1441.
- [4] Lin F, Li Y, Yan S, et al. MicroRNA-181a inhibits tumor proliferation, invasiveness, and metastasis and is downregulated in gastric cancer[J]. Oncol Res, 2015, 22(2): 75-84.
- [5] Xu ZY, Tang JN, Xie HX, et al. 5-fluorouracil chemotherapy of gastric cancer generates residual cells with properties of cancer stem cells[J]. Int J Biol Sci, 2015, 11(3): 284-294.
- [6] Li Y, Tan BB, Fan LQ, et al. Heterogeneity of COX-2 and multidrug resistance between primary tumors and regional lymph node metastases of gastric cancer [J]. Tumori, 2012, 98(4): 516-522.
- [7] Meng C, Lu Z, Fang M, et al. Effect of celecoxib combined with chemotherapy drug on malignant biological behaviors of gastric cancer [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(11): 7622-7632.
- [8] Thill M, Reichert K, Woeste A, et al. Combined treatment of breast cancer cell lines with vitamin D and COX-2 inhibitors[J]. Anticancer Res, 2015, 35(2): 1189-1195.
- [9] Kim NK, Park JK, Shin E, et al. The combination of nuclear factor kappa B, cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor expression predicts poor prognosis in stage II and III colorectal cancer [J]. Anticancer Res, 2014, 34(11): 6451-6457.
- [10] Gryko M, Guzińska-Ustymowicz K, Kiśluk J, et al. High Fas expression in gastric carcinoma cells as a factor correlating with the occurrence of metastases to regional lymph nodes[J]. Adv Med Sci, 2014, 59(1): 47-51.