

塞来昔布联合卡培他滨对 H₂₂ 肝癌移植瘤小鼠的抑制作用及机制

姚志华¹, 苑亚东², 刘艳艳¹, 郭宏强¹, 赵 燕¹, 姚书娜¹, 杨树军¹

¹郑州大学附属肿瘤医院内科, 郑州 450008

²武警河南总队医院神经外科, 郑州 450052

通信作者: 杨树军 电话: 0371-65587232, 电子邮件: yangshujun@cscsco.org.cn

摘要: **目的** 探讨塞来昔布联合卡培他滨对 H₂₂肝癌移植瘤小鼠的抑瘤作用及作用机制。**方法** BALB/c 裸鼠皮下接种 H₂₂肝癌细胞, 建立移植瘤模型。40 只模型小鼠随机分为对照组、塞来昔布组 (100 mg/kg)、卡培他滨组 (755 mg/kg) 和联合干预组 (100 mg/kg 塞来昔布 + 755 mg/kg 卡培他滨) 4 组, 每组 10 只。接种后第 3 天起, 每天灌胃给药 1 次, 对照组给予等量生理盐水, 连续 15 d。处死动物, 剥离完整瘤组织, 称重并计算抑瘤率。采用荧光定量 PCR 和 Western blotting 检测瘤组织中核转录因子 kappa B (NF-κB) p65 和环氧合酶 (COX)-2 的 mRNA 及蛋白表达。**结果** 塞来昔布和卡培他滨组抑瘤率分别为 30.2% 和 49.9%, 而联合干预组抑瘤率为 75.4%, 显著高于单药组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。荧光定量 PCR 结果显示, 塞来昔布和联合干预组 COX-2 的 mRNA 表达显著低于对照组 ($P < 0.001$), 但对 NF-κB p65 的 mRNA 表达无明显影响。卡培他滨对 NF-κB p65 和 COX-2 的 mRNA 均无明显影响。Western blotting 结果显示, 塞来昔布和联合干预组小鼠瘤组织中 NF-κB p65 和 COX-2 的蛋白表达水平均显著低于对照组 ($P < 0.05$), 卡培他滨组与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 塞来昔布可通过抑制 H₂₂肝癌移植瘤小鼠瘤组织中 NF-κB p65 和 COX-2 的表达发挥抗肿瘤作用, 且与卡培他滨联合应用具有协同增效作用。

关键词: 塞来昔布; 卡培他滨; H₂₂肝癌; 核转录因子 kappa B p65; 环氧合酶-2

中图分类号: R730.5 文献标志码: A 文章编号: 1000-503X(2013)04-0447-04

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2013.04.017

Inhibitory Effects of Celecoxib Combined with Capecitabine on H₂₂ Hepatoma Mice and Its Mechanism

YAO Zhi-hua¹, YUAN Ya-dong², LIU Yan-yan¹, GUO Hong-qiang¹,
ZHAO Yan¹, YAO Shu-na¹, YANG Shu-jun¹

¹Department of Medical Oncology, Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, China

²Department of Neurosurgery, Henan Peoples Armed Police Corps Hospital, Zhengzhou 450052, China

Corresponding author: YANG Shu-jun Tel: 0371-65587232, E-mail: yangshujun@cscsco.org.cn

ABSTRACT: Objective To evaluate the inhibitory effect and its mechanism of celecoxib combined with capecitabine on the growth of implanted H₂₂ hepatoma in mice. **Methods** Tumor model was established by hypodermic injection of H₂₂ cells in BALB/c nude mice. Forty mice were equally randomly divided into 4 groups: control group, celecoxib group (receiving 100 mg/kg celecoxib), capecitabine group (receiving 755 mg/kg capecitabine), and combined treatment group (receiving 100 mg/kg of celecoxib and 755 mg/kg of capecitabine). From the third post-implantation day, each mouse was given relevant drug (or normal saline) by oral gavage. Fifteen days later, all mice were sacrificed and the tumor tissues were measured. The mRNA and protein levels of nuclear factor kappa-B (NF-κB) p65 and cyclooxygenase (COX)-2 in tumor tissues were detected by

the quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and Western blotting, respectively. **Results** The tumor inhibition rate was 30.2% in celecoxib group and 49.9% in capecitabine group, which was significantly lower than that (75.4%) in the combined treatment group ($P < 0.01$, $P < 0.05$, respectively). qPCR showed a significant decrease of the mRNA expression of COX-2 in celecoxib group and combined treatment group when compared with control group ($P < 0.001$), but no significant change in NF- κ B p65. Capecitabine had no significant effects on the mRNA expression of COX-2 and NF- κ B p65. Western blotting showed that celecoxib and combined treatment significantly inhibited the protein expression of COX-2 and NF- κ B p65 ($P < 0.05$), but not capecitabine. **Conclusion** Celecoxib can enhance the antitumor effect of capecitabine by inhibiting the expressions of COX-2 and NF- κ B p65 in mice bearing H₂₂ implanted tumor.

Key words: celecoxib; capecitabine; H₂₂ hepatoma; nuclear factor kappa-B p65; cyclooxygenase-2

Acta Acad Med Sin, 2013, 35(4):447-450

肝癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一, 在全球恶性肿瘤中居第5位, 严重危害人类生命健康。研究表明, 环氧合酶2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 的过表达与肿瘤的发生、发展密切相关, 而 COX-2 抑制剂对多种肿瘤均有较强的抑制作用, 且与其他常规化疗药物联用具有协同作用^[1]。本研究采用选择性 COX-2 抑制剂塞来昔布与氟嘧啶类抗肿瘤药物卡培他滨联合用于 H₂₂ 肝癌细胞移植瘤小鼠, 观察肿瘤抑制作用并探讨其作用机制, 以期为临床应用提供理论依据。

材料和方法

材料 人肝癌 H₂₂ 细胞株购自中国科学院上海细胞库, 常规培养于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中 (37 °C、5% CO₂), 采用 0.25% 的胰蛋白酶消化传代。BALB/c 裸鼠, 清洁级, 体重 (20 ± 2) g, 雌雄各半, 购自河南省实验动物中心, 许可证号: SYXK (豫) 2005-0012。塞来昔布胶囊 (西乐葆) 购自美国辉瑞公司, 卡培他滨 (希罗达) 购自上海罗氏公司, 小牛血清购自杭州四季青公司, DMEM 培养基购自美国 Sigma 公司, 兔抗小鼠 COX-2、核转录因子 kappa B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) p65 和 β -actin 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司, HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自上海康成生物科技有限公司, Trizol 试剂购自美国 Introvigen 公司, PCR 试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司。

小鼠皮下移植瘤模型 无菌环境下, 吸取处于对数生长期的 H₂₂ 细胞制备单细胞悬液, 无菌生理盐水调整至细胞浓度为 1×10^7 /ml, 接种于 BALB/c 小鼠右前肢腋窝皮下, 每只小鼠的接种量为 0.2 ml, 制备小鼠 H₂₂ 移植瘤模型。

动物分组及给药 40 只模型小鼠随机分为对照组、塞来昔布组、卡培他滨组和联合干预组 4 组, 每组 10 只。塞来昔布以 100 mg/kg 灌胃^[2], 卡培他滨以 755 mg/kg (相当于最大耐受量 2.1 mmol/kg) 灌胃^[3], 联合干预组同时给予塞来昔布和卡培他滨, 给药剂量及途径与单独用药组相同。对照组灌胃等量生理盐水。从接种后第 3 天起, 每天给药 1 次, 连续 15 d。

指标检测 末次给药 24 h 后, 脱颈处死小鼠, 剥离完整肿瘤组织, 生理盐水漂洗干净, 吸水纸吸干水分后于电子天平称重, 记录肿瘤重量 (瘤重) 并计算抑瘤率。抑瘤率 = (对照组瘤重 - 给药组瘤重) / 对照组瘤重 × 100%。采用荧光定量 PCR 和 Western blotting 分别检测瘤组织中 NF- κ B p65 和 COX-2 的 mRNA 及蛋白表达水平。

荧光定量 PCR 取新鲜瘤组织, 采用 Trizol 试剂提取总 RNA, 反转录合成 cDNA。采用荧光定量 PCR 方法检测 NF- κ B p65 和 COX-2 的 mRNA 表达水平。NF- κ B p65 上游引物: 5'-ACCCCTTCAAGTCCCATAGA-3', 下游引物: 5'-ACCTCAATGTCTTCTTCTGCAC-3'; COX-2 上游引物: 5'-GTCTGATGATGATGCCACAATCTG-3', 下游引物: 5'-GATGCCAGTGATAGAGGTGTGTTAAA-3'; 内参 β -actin 上游引物: 5'-TGTC-CCATCTACGAGGGTATGC-3', 下游引物: 5'-GGTACATGCTGCTGCCCGCCAGACA-3'。引物由生兴生物技术 (南京) 有限公司合成。采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法分析结果^[4]。

Western blotting 取瘤组织约 100 mg, 加入 10 倍体积的 RIPA 组织蛋白裂解液, 匀浆机匀浆后, 于 12 000 × g 离心 20 min, 吸取上清液, 弃沉淀。采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白含量。总蛋白 (约 50 μ g) 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离目的蛋白, 并转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉于室温下封闭 2 h,

分别加入兔抗小鼠 NF- κ B p65 和 COX-2 的一抗,按照体积比 1:1000 稀释,4 °C 孵育过夜, TBST 漂洗 3 次,每次 5 min,加入 HRP 标记的二抗,室温下孵育 4 h, TBST 漂洗 3 次,每次 5 min。采用 ECL 法显影并压片。采用 Quantity One v4.62 软件分析条带灰度值,结果以目的条带与内参 β -actin 的相对灰度值表示。

统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

对抑瘤率的影响 塞来昔布和卡培他滨组的平均瘤重均较对照组显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.001$),两组抑瘤率分别为 30.2% 和 49.9%。联合干预组的抑瘤率高达 75.4%,平均瘤重明显低于塞来昔布组和卡培他滨组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$) (表 1)。

对 NF- κ B 和 COX-2 的 mRNA 表达的影响 NF- κ B p65 的 mRNA 表达水平在各组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。塞来昔布和联合干预组显著抑制了 COX-2 的 mRNA 表达,与对照组相比差异有统计学意义 (P 均 < 0.001),卡培他滨对 COX-2 的 mRNA 表达无明显影响 (图 1)。

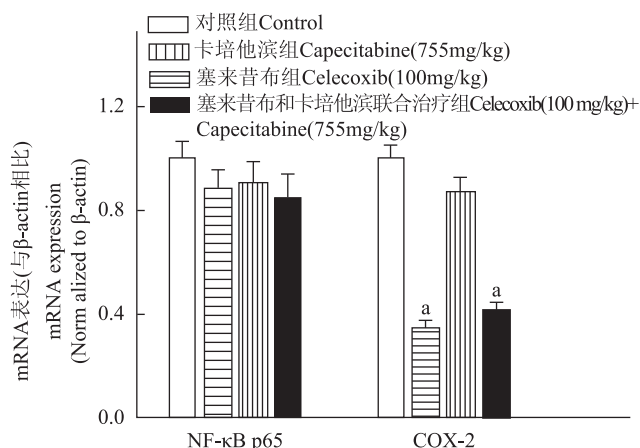
对 NF- κ B p65 和 COX-2 蛋白表达的影响 塞来昔布组和联合干预组 NF- κ B 和 COX-2 的蛋白表达水平较对照组均显著下降 ($P < 0.05$);卡培他滨亦可减少 NF- κ B 和 COX-2 的表达,但与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 2)。

表 1 塞来昔布和卡培他滨对抑瘤率的影响 ($n = 10$)

Table 1 Effects of celecoxib and capecitabine on tumor inhibition rate ($n = 10$)

分组 Group	剂量 Dose (mg/kg)	瘤重 Tumor weight (g, $\bar{x} \pm s$)	抑瘤率 Inhibition rate (%)
对照组 Control group	-	5.77 \pm 1.36	-
塞来昔布组 Celecoxib group	100	4.03 \pm 1.08 ^{ad}	30.2
卡培他滨组 Capecitabine group	755	2.89 \pm 0.63 ^{bc}	49.9
塞来昔布和卡培他滨联合组 Celecoxib + Capecitabine group	100 + 755	1.42 \pm 0.34 ^b	75.4

与对照组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.001$;与联合治疗组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$
^a $P < 0.01$,^b $P < 0.001$ compared with control group;^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$ compared with Celecoxib + Capecitabine group

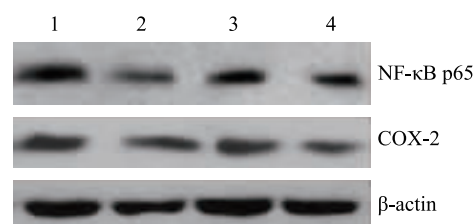


NF- κ B p65: 核转录因子 kappa B p65; COX-2: 环氧合酶 2; 与对照组比较,^a $P < 0.001$

NF- κ B p65: nuclear factor kappa B p65; COX-2: cyclooxygenase-2;
^a $P < 0.001$ compared with control group

图 1 塞来昔布和卡培他滨对 NF- κ B p65 和 COX-2 的 mRNA 表达的影响

Fig 1 Effects of celecoxib and capecitabine on mRNA expression of NF- κ B p65 and COX-2



1: 对照组; 2: 塞来昔布组; 3: 卡培他滨组; 4: 塞来昔布和卡培他滨联合治疗组

1: control group; 2: celecoxib group; 3: capecitabine group; 4: celecoxib combined with capecitabine group

图 2 塞来昔布和卡培他滨对 NF- κ B p65 和 COX-2 蛋白表达的影响

Fig 2 Effects of celecoxib and capecitabine on protein expression of NF- κ B p65 and COX-2

讨 论

COX-2 是催化花生四烯酸合成前列腺素的关键限速酶,众多研究表明,COX-2 在多种癌组织中高度表达^[5],与肿瘤的发生、发展过程密切相关。COX-2 抑制剂塞来昔布具有广泛的抗肿瘤效应^[6-7],临床研究显示,塞来昔布与 5-氟尿嘧啶联合用于治疗多耐药性肝细胞癌可显著增强抑瘤效果^[8],提示塞来昔布用于联合化疗具有巨大的应用前景。卡培他滨是一种新型的抗肿瘤药物,在体内可转化为 5-氟尿嘧啶后发挥抗肿瘤效应,临床常用于治疗乳腺癌、结肠癌、直肠癌

癌、胃癌、食管癌等,近来发现卡培他滨对肝癌亦有良好的治疗作用^[9]。既往研究表明,卡培他滨与塞来昔布联合化疗晚期结直肠癌可有效控制疾病进展并减轻不良反应^[10],但两药联合用于肝癌则鲜有报道。本研究结果显示,塞来昔布和卡培他滨两药单用均可抑制肝癌 H₂₂小鼠瘤组织的生长,抑瘤率分别为 30.2% 和 49.9%,而联合干预组抑瘤率高达 75.4%,疗效显著优于单药治疗,提示塞来昔布和卡培他滨两药联用治疗肝癌 H₂₂小鼠具有协同效应。

NF- κ B 是 COX-2 的重要上游调节因子,在炎症、肿瘤等过程中发挥关键作用。多种致癌因子均可通过上调 NF- κ B 的表达,刺激细胞增殖,抑制细胞凋亡,促进肿瘤的浸润转移。生理状况下,NF- κ B 是由 p65 和 p50 两个亚基以及抑制性蛋白 I κ B 结合为三聚体形式存在,当被白细胞介素-1、内毒素等激活后,I κ B 脱离下来,活化的二聚体进入细胞核内,与 DNA 特定识别序列结合,调节靶基因转录,刺激肿瘤细胞大量增殖,其中 p65 是起关键作用的催化亚基。抑制 NF- κ B 可促进肿瘤细胞凋亡,增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。研究发现,塞来昔布作为 COX-2 选择性抑制剂,可抑制人肝癌细胞 HeG2 中 NF- κ B 和 COX-2 表达^[11]。本研究结果表明,塞来昔布和联合干预组 NF- κ B p65 和 COX-2 的蛋白表达水平均较对照组显著下降,而卡培他滨组 NF- κ B p65 和 COX-2 的表达则无明显变化,提示塞来昔布与卡培他滨具有不同的抗肿瘤机制,两药联用可通过不同的途径在抑制肿瘤生长方面发挥协同作用。

综上,本研究结果提示,塞来昔布可通过抑制 NF- κ B p65 和 COX-2 的表达,增强卡培他滨的抗肿瘤效应,两药联用具有良好的协同增效作用,为临床治疗肝癌提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] 刘智豪,刘叔文,余乐. COX-2 抑制剂联合抗肿瘤的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(12):1651-1654.
- [2] 徐志刚,陈立,吕晓艳,等. 塞来昔布对 H22 肝癌组织环氧合酶 2 及磷脂酶 A2 抑制作用 [J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(2):174-176.
- [3] 潘焯,郑起,艾开兴,等. α 干扰素和卡培他滨对肝癌根治性切除术后转移复发抑制作用的实验研究 [J]. 肿瘤, 2005, 25(5):439-441.
- [4] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($-\Delta\Delta C_T$) Method [J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
- [5] Hida T, Yatabe Y, Achiwa H, et al. Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas [J]. Cancer Res, 1998, 58(17):3761-3764.
- [6] Tanaka T, DeLong PA, Amin K, et al. Treatment of lung cancer using clinically relevant oral doses of the cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib potential value as adjuvant therapy after surgery [J]. Ann Surg, 2005, 241(1):168-178.
- [7] Wick M, Hurteau G, Dessev C, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs mediating cyclooxygenase-independent inhibition of lung cancer cell growth [J]. Mol Pharmacol, 2002, 62(5):1207-1214.
- [8] Bassiouny AR, Zaky A, Neena HM. Synergistic effect of celecoxib on 5-fluorouracil-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma patients [J]. Ann Hepatol, 2010, 9(4):410-418.
- [9] 隋忠国,薛宏伟,荆凡波,等. 索拉非尼联合卡培他滨治疗肝细胞癌患者的临床研究 [J]. 中国药房, 2008, 19(11):848-849.
- [10] 邓立春,沈伟生,张瑶,等. 卡培他滨节拍化疗联合塞来昔布治疗晚期结直肠癌的临床疗效观察 [J]. 现代医学, 2011, 39(4):434-436.
- [11] 卢栋,李永华,纪龙,等. 塞来昔布对人肝癌细胞株 HepG2 细胞核转录因子- κ B 活性及蛋白表达的抑制 [J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(16):1793-1796.

(收稿日期: 2013-02-25)

[1] 刘智豪,刘叔文,余乐. COX-2 抑制剂联合抗肿瘤的研究