

# 氧合酶-2 抑制剂 celecoxib 与喜树碱类衍生物联合用药的实验研究

付剑江, 李燕, 李洪燕, 刘悦, 陈晓光

付剑江, 李燕, 李洪燕, 刘悦, 陈晓光, 中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所药理室 北京市 100050

付剑江, 1975-09-06 生, 江西省丰城市人, 汉族, 博士研究生, 从事肿瘤药理学研究。

通讯作者: 陈晓光, 100050, 北京市宣武区先农坛街 1 号, 中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所药理室。chxg@imm.ac.cn

电话: 010-63165207 传真: 010-63017757

收稿日期: 2005-07-11 接受日期: 2005-07-20

## Effects of the combination of topoisomerase I inhibitors and celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on colorectal cancer

Jian-Jiang Fu, Yan Li, Hong-Yan Li, Yue Liu, Xiao-Guang Chen

Jian-Jiang Fu, Yan Li, Hong-Yan Li, Yue Liu, Xiao-Guang Chen, Department of Pharmacology, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Correspondence to: Xiao-Guang Chen, Department of Pharmacology, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, 1 Xiannongtan Street, Beijing 100050, China. chxg@imm.ac.cn

Received: 2005-07-11 Accepted: 2005-07-20

### Abstract

**AIM:** To investigate the antitumor properties of camptothecins (CPTs) combined with celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor, *in vitro* and *in vivo*, and the effects of celecoxib on irinotecan (CPT-11)-induced diarrhea in mice.

**METHODS:** Four human colon cancer cell lines, HT-29, HCT-8, HCT-116 and Caco-2, were exposed to the increasing concentrations ( $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$ , 1, 10, 100  $\mu\text{mol/L}$ ) of three topoisomerase I (Topo I) inhibitors, CPT-11, CPT and topotecan (TPT), and celecoxib (1 and 5  $\mu\text{mol/L}$ ) as well as a combination of each Topo I inhibitor. Then MTT assay was performed to evaluate the effects of adjunct use of celecoxib on the chemosensitivity of colon cancer cells to CPTs. HT-29 cells were divided into control group, celecoxib treatment group, CPT treatment group and combined CPT with celecoxib treatment group. Flow cytometry was used to evaluate the apoptotic rates and cell cycle distribution. The expression of COX-2 and apoptosis-related proteins (Bcl-2, Caspase-3 and P53) were determined

by immunocytochemical method. HT-29 cell line-xenografts model was established. The nude mice bearing tumor were divided into five groups, namely control group, CPT-11 (25 mg/kg per day) treatment group, celecoxib (60 mg/kg) treatment group and combined celecoxib (30 mg/kg and 60 mg/kg, respectively) with CPT-11 treatment group. The effects of the drugs on tumor growth and the severity of late diarrhea induced by CPT-11 were assessed.

**RESULTS:** Celecoxib significantly decreased the  $\text{IC}_{50}$  of the CPTs in the four colon cancer cell lines *in vitro*, but the reduction degrees of  $\text{IC}_{50}$  depended on the level of COX-2 expression. In HT-29 cells, the apoptotic rates were 51.4% in co-treated groups (24.4% in CPT treated groups,  $P < 0.01$ ), and the proportion in the G0/G1 phase were 49.1% in co-treated group (5.5% in CPT treated groups,  $P < 0.01$ ). The expression of COX-2 and Bcl-2 were down-regulated, but the expression of P53 and Caspase-3 were up-regulated after co-treatment with CPT and celecoxib in HT-29 cells. *In vivo*, treatment with celecoxib at 60 mg/kg in conjunction with CPT-11 (25 mg/kg per day for three consecutive days) significantly reduced tumor growth by 78.77% ( $P < 0.01$  vs control group;  $P < 0.05$  vs CPT-11 group), and decreased the score and rate of diarrhea induced by CPT-11 ( $0.33 \pm 0.52$  vs  $2.33 \pm 0.82$ ,  $P < 0.01$ ; 16.67% vs 83.33%,  $P < 0.05$ ). Besides, celecoxib at 60 mg/kg improved the body weight of the mice ( $17.54 \pm 1.13$  g vs  $14.56 \pm 2.16$  g,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Celecoxib enhances antitumor properties of CPTs in colon cancer *in vitro* and *in vivo*, and this enhancement may be associated with the apoptosis increase and cell cycle arrest. Additionally, celecoxib reduces the severity of diarrhea and body weight loss induced by CPT-11.

**Key Words:** Cyclooxygenase-2; Topoisomerase I inhibitor; Colon cancer; Diarrhea; Apoptosis; Cell cycle

Fu JJ, Li Y, Li HY, Liu Y, Chen XG. Effects of the combination of topoisomerase I inhibitors and celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005; 13(16):1985-1991

## 摘要

**目的:** 探讨喜树碱类衍生物与 celecoxib 联合用药的体外和体内的抗肿瘤作用及机制, 同时观察 celecoxib 对 CPT-11 引起裸鼠腹泻的影响。

**方法:** 以 MTT 法检测结肠癌细胞系在联合应用 celecoxib 后对喜树碱及其衍生物的化学敏感性的改变; 流式细胞术检测 celecoxib 与喜树碱联合用药后 HT-29 细胞的凋亡比率和细胞周期的变化; Western Blot 法检测环氧合酶-2(COX-2)以及凋亡相关蛋白(Bcl-2、Caspase-3、P53)的表达。以 HT-29 细胞裸鼠移植瘤模型观察 celecoxib 与 CPT-11 联合应用的体内抗肿瘤作用, 并且观察 celecoxib 对 CPT-11 引起腹泻及体重减轻的影响。

**结果:** celecoxib 可以显著降低三种喜树碱类衍生物对四种人结肠癌细胞系的 IC<sub>50</sub> 值, 并且这种降低的程度与 COX-2 的表达密切相关。在 HT-29 细胞, celecoxib 和 CPT 的联合应用使其凋亡率达到 51.4%, 而 CPT 单独使用的凋亡率为 24.4%( $P < 0.01$ )。同时, celecoxib 可以使 CPT 处理组的 G0/G1 期细胞增加并降低 S 期和 G2/M 期的细胞比例( $P < 0.01$ )。celecoxib 和 CPT 的联合应用可以降低 COX-2 和 Bcl-2 的表达, 增加 Caspase-3 和 P53 的表达。HT-29 细胞裸鼠移植瘤实验中, celecoxib(60 mg/kg)与 CPT-11(25 mg/kg)的联合应用使肿瘤生长明显抑制, 其抑制率为 78.77%(与对照组相比  $P < 0.01$ ), 与 CPT-11(25 mg/kg)组相比也有显著差异( $P < 0.05$ )。同时 celecoxib(60 mg/kg)可以明显减轻 CPT-11 引起腹泻症状, 降低其腹泻评分( $0.33 \pm 0.52$  vs  $2.33 \pm 0.82$ ,  $P < 0.01$ ), 并降低腹泻的发生率( $16.67\%$  vs  $83.33\%$ ,  $P < 0.05$ ); 另外, celecoxib(60 mg/kg)可以明显缓解 CPT-11 引起的裸鼠体重减轻( $17.54 \pm 1.13$  g vs  $14.56 \pm 2.16$  g,  $P < 0.05$ )。

**结论:** celecoxib 可以增强 CPTs 的体外、内的抗肿瘤活性, 这种作用可能与增加细胞凋亡和细胞周期阻滞作用有关。另外 celecoxib 可以减轻 CPT-11 引起的腹泻, 并缓解 CPT-11 引起的体重下降。

**关键词:** 细胞凋亡; 细胞周期; 环氧合酶-2; 拓扑异构酶 I 抑制剂; 结肠癌; 腹泻

付剑江, 李燕, 李洪燕, 刘悦, 陈晓光. 环氧合酶-2 抑制剂 celecoxib 与喜树碱类衍生物联合用药的实验研究. 世界华人消化杂志 2005;13(16):1985-1991 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1985.asp>

## 0 引言

环氧合酶(COX)是花生四烯酸代谢过程中的限速酶, 他存在两种亚型: COX-1 和 COX-2。近年来的大量研究表明, COX-2 不仅参与炎症的发生, 同时与肿瘤的发生发展密切相关。因此, 非甾体类抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)的抗肿瘤活性也成为人们关注的焦点。研究表明: 一方面,

NSAIDs 促进肿瘤细胞凋亡, 增加细胞凋亡的比率; 另一方面, 影响肿瘤细胞的细胞周期, 使肿瘤细胞阻滞在 G0/G1 期。因此 NSAIDs 是一类有潜力用于肿瘤化疗的药物<sup>[1-4]</sup>。化疗药物的联合应用是目前临床上非常重要的肿瘤治疗手段之一<sup>[5-8]</sup>, NSAIDs 与其他抗肿瘤药的联合应用也日益受到人们的关注。

喜树碱及其衍生物是一类以 Topo I 为靶点的抗肿瘤药, 当这类药物与 Topo I 结合后, 产生 Topo I 毒性, 从而影响 DNA 的复制、转录和修复过程<sup>[9-11]</sup>。其中 topotecan 和 irinotecan 是目前临床上广泛应用的两种喜树碱类衍生物, 前者主要用于晚期卵巢癌, 后者则用于转移性结肠癌。这两种喜树碱类药物在产生显著疗效的同时也引起非常严重的毒副反应, 比如 CPT-11 可以引起严重地腹泻, 这往往成为限制 CPT-11 使用的重要原因<sup>[12-14]</sup>。有许多研究认为这种腹泻的产生可能与肠黏膜中 COX-2 表达增加、PGE<sub>2</sub> 和 TXA<sub>2</sub> 的含量增加有关<sup>[15-16]</sup>。我们基于上述理论基础, 探讨喜树碱类衍生物与 celecoxib 联合用药的体外、内的抗肿瘤作用及机制, 同时观察 celecoxib 对 irinotecan(CPT-11)引起裸鼠腹泻的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人结肠癌细胞系 HT-29、Caco-2、HCT-8 和 HCT-116 由本实验室保存。培养基和胎牛血清购于 Gibco 公司。CPT、TPT、CPT-11、MTT 和碘化丙啶(propidium iodide, PI)均为 Sigma 的产品。COX-2(sc-1746), P53(sc-126), Bcl-2(sc-7382), Caspase-3(sc-7272)以及 actin(sc-1616)单抗购于 Santa Cruz 公司。

**1.2 方法** 四种结肠癌细胞系在含有 100 mL/L FBS 和 100 IU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的培养基中生长, 并于 37℃ 50 mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。4-6 wk, Balb/c 裸鼠用于 HT-29 裸鼠移植瘤模型和 CPT-11 引起腹泻模型的建立。所有动物实验均遵照中国医学科学院中国协和医科大学药物研究所动物伦理委员会所制定实验方法进行。

**1.2.1 MTT 法检测细胞生长** 将生长良好的细胞接种于 96 孔板, 待细胞在 37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 培养 24 h 贴壁后换成含不同浓度药物的培养基, 其中 CPT、CPT-11、TPT 各设 8 个浓度, 分别为 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-1</sup>, 1, 10, 100 μmol/L; celecoxib 设两个浓度, 1 μmol/L 和 5 μmol/L, 每个浓度设 3 个复孔, 继续培养 96 h, 检测前 4 h, 弃去上清, 每孔加入 100 μL MTT(5 g/L), 4 h 后弃上清, 加 DMSO 200 μL, 用全自动酶标仪测定 570 nm 和 450 nm 处的吸光度(A<sub>570</sub>, A<sub>450</sub>)值, 以溶剂孔为对照计算各药物对

细胞生长抑制的  $IC_{50}$ .

**1.2.2 流式细胞仪测定** 对数生长期的 HT-29 细胞接种于培养瓶中, 待细胞在  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $50\text{ mL/L CO}_2$  培养 24 h 贴壁后换成含不同浓度药物的培养基, 其中 CPT 设 40、80 nmol/L; celecoxib 设 1、5  $\mu\text{mol/L}$ . 收集药物处理后的 PBS 洗涤后, 用  $4^{\circ}\text{C}$  乙醇固定 12 h, 离心除去乙醇, 加入 10 g/L RNA 酶溶液 200  $\mu\text{L}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  水浴 15 min, 加入 PI, 上流式细胞仪 (Becton & Dickinson, Mountain View, CA, USA) 检测凋亡百分率和各细胞周期所占百分比<sup>[17]</sup>.

**1.2.3 Western blot 检测凋亡相关蛋白表达** 将各处理组细胞加 1 mL 含 0.1 mmol/L PMSF 细胞裂解液 (10 mmol/L Tris, pH 7.6, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, pH 8.0, 10 mL/L Triton X-100, 1 mmol/L DTT), 冰上裂解 30 min, 离心 ( $15\ 000\ g \times 10\text{ min}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ), 去除细胞碎片, 测细胞裂解产物的蛋白含量, 取等量蛋白在 100 g/L 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 将蛋白转印至硝酸纤维素膜上, 经封闭阻断后, 加抗体,  $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 碱性磷酸酶标记的 IgG 抗体室温孵育 2 h, NBT/BCIP 显色, GelPro3.1 成像分析软件分析图像.

**1.2.4 裸鼠移植瘤模型检测体内肿瘤生长及 CPT-11 引起的腹泻模型检测 celecoxib 对腹泻的影响** 雄性 4-6 周龄 BALB/C 裸鼠, 于背部皮内注射 HT-29 人结肠癌细胞  $1 \times 10^7$ /只, 当肿瘤长至  $1\text{ cm} \times 1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$  左右时, 无菌条件下取下部分瘤块, 切成  $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$  瘤块, 用套管针接种到实验裸鼠背部皮下, 形成皮下移植瘤. 接种 48 h 后随机分为五组, 每组 6 只: A、对照组, 只给予灭菌蒸馏水; B、celecoxib 组, celecoxib 每天

60 mg/kg, 每周连续给药 6 d; C、CPT-11 组, CPT-11 每天 25 mg/kg, 接种后第 7 d 开始给药, 连续 3 d, 每天一次; D、celecoxib 与 CPT-11 联合用药 I 组, celecoxib 的剂量为 30 mg/kg, 给药方法则与 B 组相同, CPT-11 剂量与给药方法均与 C 组一致; E、celecoxib 与 CPT-11 联合用药 II 组, 其中 celecoxib 的剂量为 60 mg/kg, 给药方法与 B 组相同, CPT-11 的剂量及给药方法则均与 C 组相同. 上述各组动物每周两次测量肿瘤体积, 绘制生长曲线, 5 wk 后结束实验, 取下肿瘤组织称重并计算肿瘤抑制率. 为了观察 CPT-11 引起的腹泻以及 celecoxib 对腹泻的作用, 上述荷瘤裸鼠在末次给予 CPT-11 后观察大便情况, 每天一次, 连续 10 d, 并按以下标准打分<sup>[18]</sup>: 0 分, 大便正常或没有; 1 分, 轻度腹泻, 大便可见轻微湿软; 2 分, 中度腹泻, 大便较湿且不成型并且有轻度的肛周着色; 3 分, 重度腹泻, 水样便并伴有重度肛周着色. 以平均腹泻评分, 2 分及 3 分腹泻发生率, 体重恢复等指标评价腹泻严重程度.

**统计学处理** 应用 SPSS10.0 统计软件包统计, 结果以平均值  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SD) 表示, 除腹泻发生率采用  $\chi^2$  检验外, 其余指标均采用单因素方差分析.

## 2 结果

**2.1 CPT、TPT、CPT-11 与 celecoxib 联合应用对结肠癌细胞系生长的影响** 图 1 显示 4 种人结肠癌细胞的 COX-2 表达情况, 其中 Caco-2、HT-29 和 HCT-8 均可检测到 COX-2 的表达, 而 HCT-116 则没有检测到 COX-2 的表达. 表 1 所示为三种喜树碱类药物与不同浓度的 celecoxib 联合应用对四株人结肠癌细胞系生长的

表 1 celecoxib 与 CPT-11、CPT、TPT 联合应用对人结肠癌细胞系化学敏感性的影响 ( $n = 3$ )

细胞系	CPT-11		CPT		TPT	
	$IC_{50}(\mu\text{mol/L})$	RR <sup>1</sup>	$IC_{50}(\text{nmol/L})$	RR	$IC_{50}(\text{nmol/L})$	RR
HT-29	$7.12 \pm 3.15$	1.00	$64.60 \pm 30.92$	1.00	$87.93 \pm 13.33$	1.00
HT-29/Cele 1 <sup>2</sup>	$3.77 \pm 1.94$	1.89	$37.00 \pm 20.61$	1.75	$19.23 \pm 5.97$	4.57
HT-29/Cele 5	$0.21 \pm 0.06$	34.03	$1.89 \pm 0.57$	34.24	$2.38 \pm 1.81$	37.00
HCT-8	$53.43 \pm 37.10$	1.00	$542.67 \pm 348.50$	1.00	$512.33 \pm 162.53$	1.00
HCT-8/Cele 1	$68.00 \pm 32.82$	0.79	$47.60 \pm 40.20$	11.40	$163.00 \pm 36.04$	3.14
HCT-8/Cele 5	$1.04 \pm 0.19$	51.60	$7.16 \pm 10.69$	75.83	$7.75 \pm 5.85$	66.11
HCT-116	$66.57 \pm 23.78$	1.00	$358.67 \pm 203.82$	1.00	$59.70 \pm 35.20$	1.00
HCT-116/Cele 1	$25.93 \pm 12.87$	2.57	$216.67 \pm 87.56$	1.66	$27.30 \pm 4.48$	2.19
HCT-116/Cele 5	$8.98 \pm 5.12$	7.41	$38.57 \pm 16.68$	9.30	$15.07 \pm 3.84$	3.96
Caco-2	$16.00 \pm 5.37$	1.00	$337.00 \pm 199.97$	1.00	$642.00 \pm 75.97$	1.00
Caco-2/Cele 1	$8.22 \pm 5.71$	1.95	$233.00 \pm 19.00$	1.44	$56.83 \pm 51.25$	11.30
Caco-2/Cele 5	$1.05 \pm 0.31$	15.24	$44.07 \pm 14.16$	7.65	$6.88 \pm 3.07$	93.35

<sup>1</sup>RR: 相对敏感指数, 联合用药组与相应不加 celecoxib 组  $IC_{50}$  的比值. <sup>2</sup>Cele 1、Cele 5, celecoxib 的终浓度分别为 1  $\mu\text{mol/L}$  和 5  $\mu\text{mol/L}$ .

影响. 结果显示, celecoxib可以不同程度的降低受试药物的  $IC_{50}$ , 而且这种降低的程度与 COX-2 表达有关.

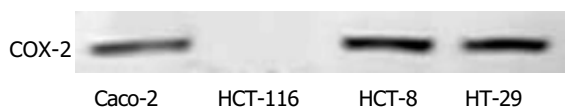


图1 四种人结肠癌细胞系的COX-2表达.

2.2 celecoxib 对 CPT 诱导的凋亡的影响 图2所示为 HT-29 细胞与 celecoxib 和/或 CPT 孵育 48 h 后流式细胞仪检测细胞凋亡的结果. celecoxib 可剂量依赖性的增加 CPT 诱导的细胞凋亡比率 ( $P < 0.01$ ).

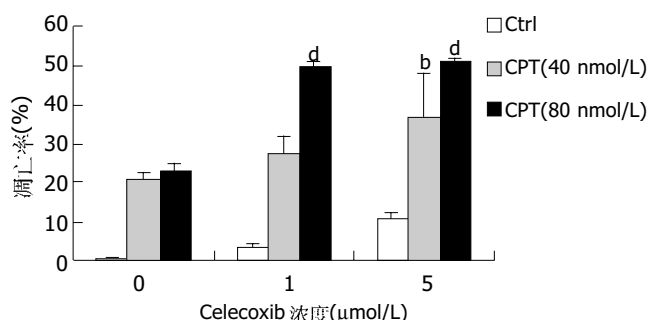


图2 celecoxib 与 CPT 联合用药 48 h 对 HT-29 细胞凋亡的影响 ( $n = 3$ ).  $^b P < 0.01$  VS CPT (40 nmol/L) 组,  $^d P < 0.01$  VS CPT (80 nmol/L).

2.3 细胞周期分析 celecoxib 可以显著增加 HT-29 细胞 G0/G1 期的细胞比例, 而 CPT 则将细胞阻滞于 S 期. celecoxib 与 CPT 联合应用后, G0/G1 期较 CPT 处理组明显增加, S 期和 G2/M 期则显著减少 ( $P < 0.01$ ) (表2).

2.4 对裸鼠移植瘤生长的影响 celecoxib 和 CPT-11 均可显著抑制 HT-29 移植瘤的生长 (图3), 二者联合应用则可以显著提高其抑制率 ( $P < 0.01$ ), 与 CPT-11 组相比, 瘤重也显著降低 ( $P < 0.05$ ).

2.5 celecoxib 对 CPT-11 引起的腹泻及体重的影响 如图4所示, CPT-11 可以引起小鼠产生严重的早期和晚期腹泻. 早期腹泻在给药后第2 d最严重, 而晚期腹泻在第6 d达到高峰, 在第8-10 d逐渐恢复. celecoxib

可以显著降低 CPT-11 引起的腹泻的发生, 并降低其腹泻评分, 同时增加小鼠体重 (表3).

表2 CPT 和 celecoxib 联合用药 48 h 对 HT-29 细胞周期的影响 ( $n = 3$ )

组别	G0-G1(%)	S(%)	G2-M(%)
对照组	58.9 ± 2.8	32.7 ± 1.1	10.3 ± 0.6
celecoxib 1 <sup>1</sup>	68.2 ± 3.9	25.4 ± 2.5	8.9 ± 0.4
celecoxib 5	84.5 ± 3.2	11.7 ± 3.1	3.5 ± 0.5
CPT (30 nmol/L)	22.3 ± 1.5	59.9 ± 3.5	16.2 ± 1.8
CPT/Cele 1	45.7 ± 2.2 <sup>b</sup>	48.3 ± 2.7 <sup>b</sup>	9.0 ± 1.1 <sup>b</sup>
CPT/Cele 5	47.7 ± 2.3 <sup>b</sup>	44.4 ± 2.9 <sup>b</sup>	7.9 ± 1.7 <sup>b</sup>
CPT (60 nmol/L)	5.5 ± 0.9	81.9 ± 4.4	17.6 ± 1.9
CPT 60/cele 1	46.7 ± 3.4 <sup>d</sup>	44.0 ± 1.6 <sup>d</sup>	10.5 ± 1.5 <sup>d</sup>
CPT 60/cele 5	52.1 ± 2.8 <sup>d</sup>	43.3 ± 2.4 <sup>d</sup>	7.6 ± 1.2 <sup>d</sup>

<sup>1</sup>Cele 1 和 Cele 5, celecoxib 终浓度为 1 μmol/L 和 5 μmol/L. <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs CPT (30 nmol/L); <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs CPT (60 nmol/L).

表3 celecoxib 对 CPT-11 诱导的腹泻的影响 ( $n = 6$ )

组别	腹泻评分	腹泻发生率(%)	体重(g)
对照组	0	0(0/6)	18.42 ± 1.86
CPT-11	2.33 ± 0.82 <sup>b</sup>	83.33(5/6) <sup>b</sup>	14.56 ± 2.16 <sup>a</sup>
CPT-11/Cele 30 <sup>1</sup>	0.50 ± 0.55 <sup>d</sup>	33.33(2/6)	16.28 ± 1.06
CPT-11/Cele 60	0.33 ± 0.52 <sup>d</sup>	16.67(1/6) <sup>c</sup>	17.54 ± 1.13 <sup>c</sup>

<sup>1</sup>Cele 30 和 Cele 60, celecoxib 的给药剂量分别为 30 mg/kg 和 60 mg/kg. <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs CPT-11.

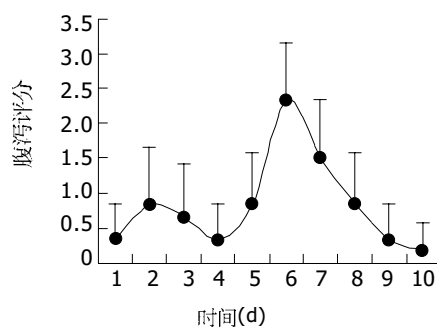


图4 CPT-11 诱导的早期和晚期腹泻 ( $n = 6$ ).

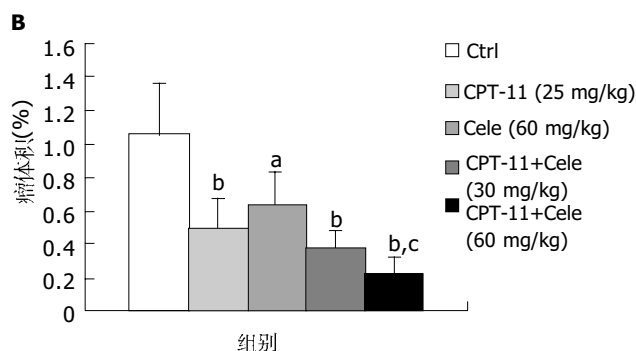
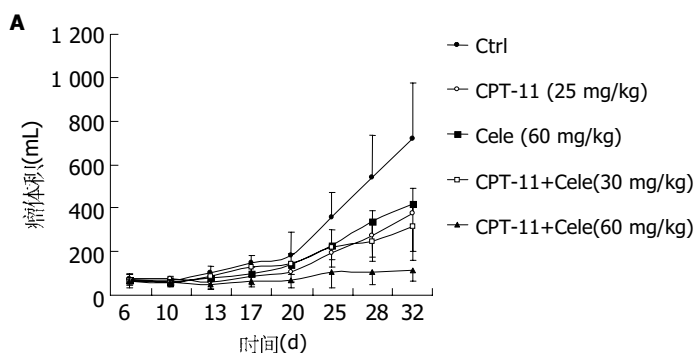


图3 celecoxib 与 CPT-11 联合用药对 HT-29 细胞裸鼠移植瘤的抑制作用 ( $n = 6$ ). A: 瘤体积; B: 瘤重. <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs CPT-11 组.

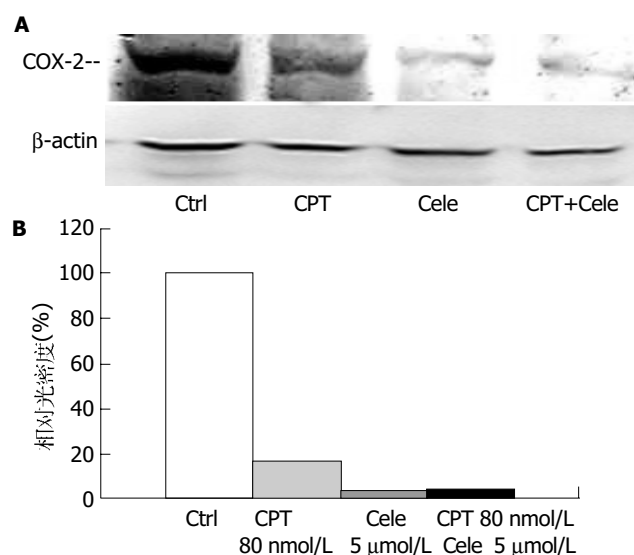


图5 HT-29在药物处理72 h后COX-2表达。A: Western blot分析结果; B: 光密度扫描结果。

2.6 对凋亡相关蛋白的影响 celecoxib可以显著降低COX-2的表达(图5)。celecoxib和CPT联合应用明显抑制Bcl-2(图6A-B)的表达,同时可以显著增加Caspase-3(图6C-D)和P53(图6E-F)的表达。

### 3 讨论

大量研究表明NSAIDs具有潜在的抗肿瘤活性,对于多种肿瘤,特别是结肠癌具有一定的疗效<sup>[19-20]</sup>。众所周知,NSAIDs的作用靶点是COXs-花生四烯酸代谢过程中的限速酶。目前已知其至少存在两种亚型,COX-1和COX-2。COX-1属结构型(constitutive)酶,

在多种组织中呈微量表达,其催化产物只参与维持细胞结构的完整性;COX-2属诱导型(inducible)酶,正常组织中很少表达,在各种刺激因素如细胞因子、炎症递质以及促癌剂作用下,其表达则迅速上调<sup>[21]</sup>。目前研究表明,COX-2参与肿瘤的发生、发展可能与以下机制有关:抑制凋亡;增加肿瘤的血管生成;对炎症的调节和抑制机体的免疫功能;参与致癌物的活化<sup>[22]</sup>等。近年来有研究报道COX-2的选择性抑制剂可以增加化疗药的抗肿瘤疗效<sup>[7, 23]</sup>。我们探讨了COX-2选择性抑制剂celecoxib与细胞毒型化疗药物喜树碱及其衍生物对结肠癌的影响,结果表明celecoxib可以显著增加四株人结肠癌细胞系对CPTs的化学敏感性,其IC<sub>50</sub>均有不同程度的下降。这种降低的程度可能与COX-2的表达密切相关,对于COX-2相对高表达的HT-29、HCT-8和Caco-2细胞,其敏感性较高,而对于COX-2不表达的HCT-116细胞,其IC<sub>50</sub>的下降则相对较低。进一步的研究显示,上述化学敏感性的增加可能与celecoxib增加化疗药物诱导的细胞凋亡有关。一方面,celecoxib剂量依赖性地增加CPT诱导的细胞凋亡比率;另一方面,celecoxib使CPT处理组细胞G0/G1期细胞比例显著增加,而S期、G2/M期细胞明显减少。

细胞凋亡是一种由细胞内基因所调控的程序性细胞自杀过程,P53、Bcl-2、c-Myc等都是细胞凋亡的重要调控因子。Bcl-2蛋白超家族在线粒体介导的凋亡途径中起着十分关键的作用,他包括抗凋亡蛋白(Bcl-2、Bcl-x1、Bcl-w等)和促凋亡蛋白(Bad、Bak、Bax等)两大类<sup>[23]</sup>。促凋亡蛋白减少或抗凋亡蛋

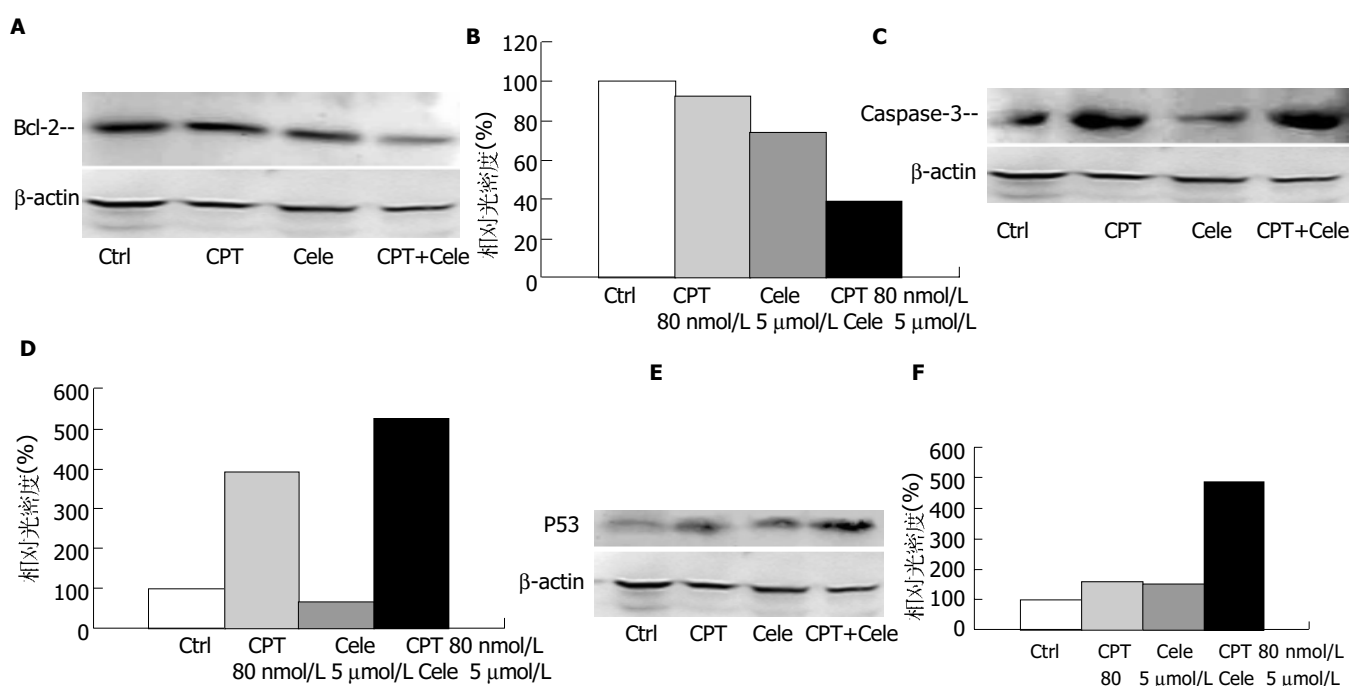


图6 HT-29在药物处理48 h后凋亡相关蛋白的表达。A、C、E分别为Bcl-2、Caspase-3、P53蛋白Western blot分析结果; B、D、F为相应蛋白的光密度扫描结果。

白过渡表达与细胞癌变或降低对化疗药物的敏感性密切相关<sup>[24]</sup>. 本研究结果显示, celecoxib与CPT联合应用明显降低Bcl-2表达, 同时增加Caspase-3的表达, 表明celecoxib增加结肠癌细胞系对CPTs的化学敏感性可能通过降低Bcl-2表达, 促进细胞凋亡有关.

p53是一种抑癌基因, 他通过对细胞应激信号的整合而产生一系列的抗增殖效应<sup>[25]</sup>, 其中最重要的效应之一为活化凋亡. P53蛋白活化凋亡的重要方式之一是作为转录因子与凋亡相关蛋白启动了区的特异序列结合, 调控下游效应基因的表达. 许多研究表明, P53可以通过这种方式调控Bcl-2家族成员表达, 尽管其确切机制目前尚未完全阐明, 但最终结果是增加促凋亡蛋白与抗凋亡蛋白之间的比例, 导致凋亡蛋白从线粒体释放, Caspase活化, 启动细胞凋亡. 因此p53表达的改变可以影响化疗药物诱导的细胞凋亡. 此外, 在细胞应激或DNA损伤引起的细胞周期阻滞中, P53是一个关键的调控因子<sup>[26, 28]</sup>. Choi与Heo *et al*<sup>[27]</sup>的研究表明, COX-2是p53下游的靶基因, 其表达受p53调控, 但是COX-2也可以抑制P53诱导的凋亡, 这种抑制作用可以被COX-2选择性抑制剂NS-398阻断. 我们的结果显示, celecoxib与CPT联合使用显著降低Bcl-2表达, 促进Caspase-3表达, 从而增加细胞凋亡比率. 这种变化可能与celecoxib显著增加CPT诱导的P53的表达有关.

为了证实上述体外研究结果, 我们利用HT-29细胞裸鼠移植瘤模型观察celecoxib与CPT-11体内联合应用的抗肿瘤作用. 结果显示二者联合用药显著增强CPT-11的体内抗肿瘤作用. 联合用药组的肿瘤重量及瘤体积显著降低, 不仅与对照组相比具有显著差异, 而且与CPT-11组比较也具有显著差别. 同时, celecoxib还显著降低CPT-11引起的腹泻发生率以及减轻腹泻的严重程度, 并缓解CPT-11引起的体重下降. Trifan与Durham *et al*<sup>[29]</sup>的研究表明, 在CPT-11诱导的大鼠腹泻模型中, 可以检测到COX-2的高表达以及PGE<sub>2</sub>的含量增加, 提示COX-2可能参与CPT-11诱导的晚期腹泻过程, 其选择性抑制剂可以阻断这一过程, 减轻腹泻的程度并降低腹泻的发生率. 我们对COX-2抑制剂与喜树碱类衍生物的联合用药进行实验, 可以初步的得出以下结论: 一方面, celecoxib可以显著增加CPTs的体外、内抗肿瘤效应, 这种作用可能与促进凋亡和细胞周期阻滞密切相关, 而P53是其中关键的调控因子; 另一方面, COX-2选择性抑制剂celecoxib可以显著降低COX-2表达, 同时降低CPT-11引起的腹泻的发生, 显著减轻腹泻程度, 并缓解CPT-11引起的体重降低, 提示COX-2可能参与CPT-11引起的晚期腹泻过程.

#### 4 参考文献

- 1 Arber N, Han EK, Sgambato A, Piazza GA, Delohery TM, Begemann M, Weghorst CM, Kim NH, Pamukcu R, Ahnen DJ, Reed JC, Weinstein IB, Holt PR. A K-ras oncogene increases resistance to sulindac-induced apoptosis in rat enterocytes. *Gastroenterology* 1997;113:1892-1900
- 2 Lu X, Xie W, Reed D, Bradshaw WS, Simmons DL. Nonsteroidal antiinflammatory drugs cause apoptosis and induce cyclooxygenases in chicken embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7961-7965
- 3 Piazza GA, Rahm AL, Krutzsch M, Sperl G, Paranka NS, Gross PH, Brendel K, Burt RW, Alberts DS, Pamukcu R. Antineoplastic drugs sulindac sulfide and sulfone inhibit cell growth by inducing apoptosis. *Cancer Res* 1995;55:3110-3116
- 4 Shiff SJ, Qiao L, Tsai LL, Rigas B. Sulindac sulfide, an aspirin-like compound, inhibits proliferation, causes cell cycle quiescence, and induces apoptosis in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *J Clin Invest* 1995;96:491-503
- 5 Hida T, Kozaki K, Ito H, Miyaishi O, Tatematsu Y, Suzuki T, Matsuo K, Sugiura T, Ogawa M, Takahashi T, Takahashi T. Significant growth inhibition of human lung cancer cells both in vitro and in vivo by the combined use of a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, JTE-522, and conventional anticancer agents. *Clin Cancer Res* 2002;8:2443-2447
- 6 Ricchi P, Di Matola T, Ruggiero G, Zanzi D, Apicella A, di Palma A, Pensabene M, Pignata S, Zarrilli R, Acquaviva AM. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on colon carcinoma Caco-2 cell responsiveness to topoisomerase inhibitor drugs. *Br J Cancer* 2002;86:1501-1509
- 7 Hida T, Kozaki K, Muramatsu H, Masuda A, Shimizu S, Mitsudomi T, Sugiura T, Ogawa M, Takahashi T. Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis and enhances cytotoxicity of various anticancer agents in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2000;6:2006-2011
- 8 Torrance CJ, Jackson PE, Montgomery E, Kinzler KW, Vogelstein B, Wissner A, Nunes M, Frost P, Discafani CM. Combinatorial chemoprevention of intestinal neoplasia. *Nat Med* 2000;6:1024-1028
- 9 Andoh T, Ishii K, Suzuki Y, Ikegami Y, Kusunoki Y, Takemoto Y, Okada K. Characterization of a mammalian mutant with a camptothecin-resistant DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:5565-5569
- 10 Thomas CJ, Rahier NJ, Hecht SM. Camptothecin: current perspectives. *Bioorg Med Chem* 2004;12:1585-1604
- 11 Rothenberg ML. Topoisomerase I inhibitors: review and update. *Ann Oncol* 1997;8:837-855
- 12 Hecht JR. Gastrointestinal toxicity of irinotecan. *Oncology (Williston Park)* 1998;12(8 Suppl 6):72-78
- 13 Bleiberg H, Cvitkovic E. Characterisation and clinical management of CPT-11 (irinotecan)-induced adverse events: the European perspective. *Eur J Cancer* 1996;32A(Suppl 3):S18-23
- 14 Kawato Y, Sekiguchi M, Akahane K, Tsutomi Y, Hirota Y, Kuga H, Suzuki W, Hokusui H, Sato K. Inhibitory activity of camptothecin derivatives against acetylcholinesterase in dogs and their binding activity to acetylcholine receptors in rats. *J Pharm Pharmacol* 1993;45:444-448
- 15 Kase Y, Hayakawa T, Togashi Y, Kamataki T. Relevance of irinotecan hydrochloride-induced diarrhea to the level of prostaglandin E2 and water absorption of large intestine in rats. *Jpn J Pharmacol* 1997;75:399-405
- 16 Sakai H, Sato T, Hamada N, Yasue M, Ikari A, Kakinoki B, Takeguchi N. Thromboxane A2, released by the anti-tumor drug irinotecan, is a novel stimulator of Cl-secretion in isolated rat colon. *J Physiol* 1997;505(Pt 1):133-144
- 17 Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 1991;139:271-279
- 18 Kurita A, Kado S, Kaneda N, Onoue M, Hashimoto S, Yokokura T. Modified irinotecan hydrochloride (CPT-11) administration

- schedule improves induction of delayed-onset diarrhea in rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000;46:211-220
- 19 Taketo MM. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (Part II). *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1609-1620
- 20 Ziegler J. Cancer and arthritis share underlying processes. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:802-803
- 21 Leahy KM, Ornberg RL, Wang Y, Zweifel BS, Koki AT, Masferrer JL. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. *Cancer Res* 2002;62:625-631
- 22 Dempke W, Rie C, Grothey A, Schmoll HJ. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:411-417
- 23 Soriano AF, Helfrich B, Chan DC, Heasley LE, Bunn PA Jr, Chou TC. Synergistic effects of new chemopreventive agents and conventional cytotoxic agents against human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1999;59:6178-6184
- 24 Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002;2:647-656
- 25 Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004;116:205-219
- 26 Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 2003;22:9030-9040
- 27 Sharpless NE, DePinho RA. p53: good cop/bad cop. *Cell* 2002;110:9-12
- 28 Choi EM, Heo JI, Oh JY, Kim YM, Ha KS, Kim JI, Han JA. COX-2 regulates p53 activity and inhibits DNA damage-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328:1107-1112
- 29 Trifan OC, Durham WF, Salazar VS, Horton J, Levine BD, Zweifel BS, Davis TW, Masferrer JL. Cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib enhances antitumor efficacy and reduces diarrhea side effect of CPT-11. *Cancer Res* 2002;62:5778-5784

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 中国生物医学基金论文摘要网站开通

本刊讯 中国生物医学基金论文摘要是由世界胃肠病学杂志社研制的大型生物医学基金论文摘要数据库. 该库收录自 1995-2004 年, 国内生物医学期刊 1191 种发表各类基金资助论文摘要 155115 条, 其中国家基金资助的论文为 70167 条(45.23%), 其他基金资助的论文为 84948 条(54.76%).

### 1 本系统的功能

电子杂志: 关键词搜索, 高级搜索(期刊全名、ISSN、年度、单位、题名、摘要、作者、资助), 期刊搜索(A-Z 排序). 论文排序: 期刊论文数, 点击论文数.

### 2 网址

中国生物医学基金论文摘要(<http://www.wjgnet.com/cmfa/index.jsp>)

### 3 论文摘要格式

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉. 鼻咽癌中染色体 3p21 区域一个表达下调的 EST 的鉴定. *癌症* 2003 年;22(1): 1-5

鼻咽癌中染色体 3p21 区域一个表达下调的 EST 的鉴定

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉.

湖南 长沙中南大学肿瘤研究所 410078

国家自然科学基金项目 (39970287, 30000188)

背景与目的: 研究显示鼻咽癌细胞 3p14-25 存在高频率杂合性丢失位点. 本研究拟寻找与筛选染色体 3p21 区域与鼻咽癌相关的表达序列标签(expressed sequence tag, EST), 为定位候选克隆鼻咽癌相关新基因奠定基础. 方法: 充分利用网上的生物信息资源, 采用定位查找 ESTs, 对 ESTs 进行同源性比较分析、筛选;运用逆转录 PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR)方法, 检测 ESTs 在鼻咽癌和正常鼻咽组织中的表达;并用 Northern blot 杂交方法, 检测 EST 在人其他正常组织及肿瘤细胞系的表达状况. 结果: 在 3p21 区域筛选到一个在鼻咽癌中表达下调的 EST(N31985), 在 60.00%(3/5)的鼻咽癌细胞株及 47.06% (16/34)的鼻咽癌活检组织检测到有 EST (N31985)表达下调, 与正常鼻咽上皮组织相比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ). 结论: 染色体 3p21 区域 EST(N31985)在鼻咽癌中表达下调, 提示其可能参与鼻咽癌癌变过程. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)