

选择性 COX-2 抑制剂 Celecoxib 对胃癌 细胞增殖影响的探讨

孙现军 侯文红 马 恒 王兴武 王永胜 徐忠法 姜希宏^①
山东省肿瘤防治研究院普外科 (济南市 250117)

摘要 目的:探讨选择性 COX-2 抑制剂 Celecoxib 对胃癌 SGC-7901 细胞增殖和凋亡的影响。方法:应用 MTT 法和 FCM 检测 Celecoxib 对胃癌 SGC-7901 细胞增殖、细胞凋亡、细胞周期和 COX-2 蛋白和 bcl-2 蛋白表达的影响。结果:Celecoxib 呈时间、剂量依赖性抑制胃癌 SGC-7901 细胞生长,72h 细胞最高存活率为 48.7%,最低为 20.5%;COX-2 蛋白含量由 26.73 ± 0.06 降至 5.79 ± 1.44 , bcl-2 蛋白含量由 2.76 ± 0.14 降至 0.78 ± 0.05 , COX-2 蛋白和 bcl-2 蛋白表达的降低呈浓度依赖性;随着药物浓度的增高,细胞凋亡率由 3.0% 增加到 33.0%;G₀/G₁ 期细胞比例增加到 $(87.29 \pm 1.34)\%$, S 期和 G₂/M 期细胞比例分别降低到 $(8.91 \pm 0.78)\%$ 、 $(3.80 \pm 0.55)\%$ 。结论:Celecoxib 能够诱导胃癌 SGC-7901 细胞的凋亡,影响细胞周期的分布,从而有效地抑制胃癌 SGC-7901 细胞的增殖;Celecoxib 诱导胃癌 SGC-7901 细胞的凋亡可能主要通过抑制 COX-2 的生物活性来实现,并与 bcl-2 蛋白表达的下调有关。

关键词 Celecoxib 胃肿瘤 细胞增殖 COX-2

中图分类号:R735.2 文献标识码:A 文章编号:1000-8179(2004)20-1171-04

Effect of Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor Celecoxib on Proliferation of Gastric Cancer Cell

Sun Xianjun Hou Wenhong Ma Heng et al

Department of General Surgery, Shandong Tumor Hospital, Jinan

Abstract Objective: To study the the effect of selective COX-2 inhibitor Celecoxib on proliferation and apoptosis of gastric cancer cell. **Methods:** Investigate the effect of Celecoxib on proliferation of gastric cancer cell line SGC-7901 by MTT assay. Detect the change of apoptosis, cell cycle and the expression of COX-2, bcl-2 protein using flow cytometry analysis. **Results:** Celecoxib could inhibit the proliferation of SGC-7901 cell and showed a time-and dose-dependent manner. The highest survival rate of SGC-7901 cell is 48.7% and the lowest is 20.5% after 72 hour of Celecoxib action. The content of COX-2 and bcl-2 protein was decreased from 26.73 ± 0.06 to 5.79 ± 1.44 , from 2.76 ± 0.14 to 0.78 ± 0.05 respectively. The decrease of them showed a dose-dependent manner. The apoptosis rate of the cell increased from 3% to 33% with the raise of Celecoxib concentration. The percentage of cell in G₀/G₁ phase increased to $87.29 \pm 1.34\%$ and the percentage of cell in S and G₂/M phase reduced to $8.91 \pm 0.78\%$, $3.80 \pm 0.55\%$, respectively. **Conclusions:** Celecoxib could inhibit the proliferation of SGC-7901 cell effectively through inducing apoptosis and influencing the distribution of cell cycle of SGC-7901 cell. The mechanism of Celecoxib induced apoptosis of SGC-7901 cell mainly through inhibit the biological activity of COX-2 and may associated with the down-regulation of bcl-2 protein.

Key words Celecoxib Gastric neoplasm Cell proliferation Cyclooxygenase-2

研究表明,环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)在胃肠道肿瘤的发生、发展起着重要的作

用^[1]。选择性 COX-2 抑制剂 Celecoxib 能够有效的抑制结肠癌、乳腺癌等肿瘤的发生^[2]。本文探讨

① 山东大学齐鲁医院普外科

Celecoxib 对胃癌 SGC-7901 细胞增殖和凋亡的影响,为胃癌防治提供新的理论依据和有效的靶药物。

1 材料与方法

1.1 细胞系

胃癌 SGC-7901 细胞,由山东省医学科学院基础中心提供。

1.2 主要试剂及仪器

Celecoxib 由 Pharmacia 公司惠赠, FITC 标记鼠抗人 COX-2 单抗及 FITC 标记鼠抗鼠 IgG₁ 单抗阴性对照 (Cayman, 美国, 流式专用), FITC 标记鼠抗人 bcl-2 单抗及 FITC 标记鼠抗鼠 IgG₁ 单抗阴性对照 (Becton Dickinson, 美国, 流式专用), 流式细胞检测仪 (Becton Dickinson, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 胃癌 SGC-7901 细胞系, RPMI-1640 培养基, 5% CO₂ 培养箱内 37℃ 培养。

1.3.2 Celecoxib 对胃癌 SGC-7901 细胞生长抑制作用的检测 分为 Celecoxib 实验组和对照组。对照组为生理盐水, Celecoxib 用生理盐水代替, 其余各成分与实验组相同。应用 MTT 法, 每孔 2×10^4 个细胞接种, Celecoxib 终浓度梯度为 50 μmol/L、100 μmol/L、200 μmol/L、400 μmol/L, 细胞总体积为 100 μl。培养 24、48、72h 后加入 MTT 液 (0.5mg/ml) 20 μl, 37℃ 培养 4h 终止反应, 置酶标仪上 570nm 波长测定各孔的吸光度 (optical density value, OD 值)。每个时间、每个浓度点重复 6 孔, 实验重复 4 次。

1.3.3 Celecoxib 对胃癌 SGC-7901 细胞内 COX-2 蛋白和 bcl-2 蛋白表达的影响 按每孔 1×10^6 个接种于 6 孔培养板, Celecoxib 浓度梯度为 50 μmol/L、100 μmol/L、200 μmol/L、400 μmol/L, 细胞总体积为 100 μl, 继续培养 72h。收集细胞, 1 500rpm 离心 5min, 70% 冷乙醇固定, 分别加入 COX-2 单抗、bcl-2 单抗及其阴性对照 1 μg, 避光室温反应 30min, 每个试管中加入碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 50 μg/ml (含 RNA 酶 0.2mg/ml), 避光 4℃ 反应 30min, 充分混匀过滤后, 进行 FCM (FACS Calibur) 检测, 每个样本分析 10 000 个细胞。每个浓度点重复 6 孔, 实验重复 3 次。

1.3.4 Celecoxib 对胃癌 SGC-7901 细胞凋亡和细胞周期的影响 细胞培养及收集同 1.3.3, FCM (FACS Calibur) 检测细胞凋亡和细胞周期分布, 每个样本分析 10 000 个细胞。对照组为生理盐水。细胞凋亡率应用软件系统对亚 G₁ 峰进行分析。每个浓度点重复 3 孔, 实验重复 3 次。

1.4 统计学分析

所得数值均以平均数加减标准差表示, 应用美

国苹果公司 Power Macintosh G₃ 计算机系统 Celquest 软件分析。应用 SAS 软件进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有显著性。

2 结果

2.1 Celecoxib 对胃癌 SGC-7901 细胞增殖的影响

Celecoxib 可明显抑制胃癌 SGC-7901 细胞增殖, 随着浓度的增高和时间的延长, 抑制作用逐渐增强, 呈时间、剂量依赖性抑制胃癌 SGC-7901 细胞生长。24h 细胞最高存活率为 97.9%, 最低为 37.5%; 48h 细胞最高存活率为 89.7%, 最低为 33.8%; 72h 细胞最高存活率为 48.7%, 最低为 20.5%, 见图 1。

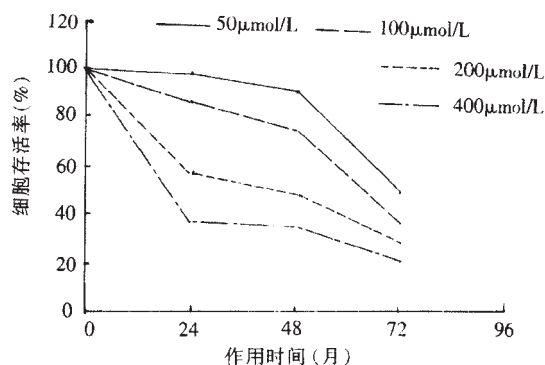


图1 Celecoxib 对 SGC-7901 细胞的生长抑制作用

2.2 Celecoxib 对胃癌 SGC-7901 细胞内 COX-2 蛋白和 bcl-2 蛋白表达的影响

不同浓度 Celecoxib 作用于胃癌 SGC-7901 细胞, 培养 72h 后细胞内 COX-2 蛋白和 bcl-2 蛋白表达随着浓度的增高而降低, COX-2 蛋白和 bcl-2 蛋白表达的降低呈浓度依赖性, 见表 1。

表1 Celecoxib 对 SGC-7901 细胞内 COX-2 和 bcl-2 蛋白表达的影响 $\bar{x} \pm s$

浓度 (μmol/L)	COX-2	bcl-2
(对照组) 0	29.03±0.08	3.11±0.70
50	26.73±0.06	2.76±0.14
100	21.37±2.45 [△]	2.19±0.19 [△]
200	14.61±1.12*	1.24±0.09*
400	5.79±1.44*	0.78±0.05*

与对照组比较, [△] $P < 0.05$ * $P < 0.01$

2.3 Celecoxib 对胃癌 SGC-7901 细胞凋亡和细胞周期的影响

Celecoxib 能够诱导 SGC-7901 细胞发生凋亡, 在 DNA 图谱上表现为 G₀/G₁ 期前出现一个代表凋亡细胞的亚 G₁ 峰。对亚 G₁ 峰进行定量分析, 可了解细胞凋亡比例, SGC-7901 细胞凋亡率随着药物浓度的增高而增加, 培养 72h 后细胞凋亡比例由 3.0% 增加到 33.0%, 见图 2。随着药物浓度的增高, G₀/G₁ 期细胞比例逐渐增加, S 期和 G₂/M 期细胞比例逐渐

降低,而且呈剂量依赖性,见表 2。

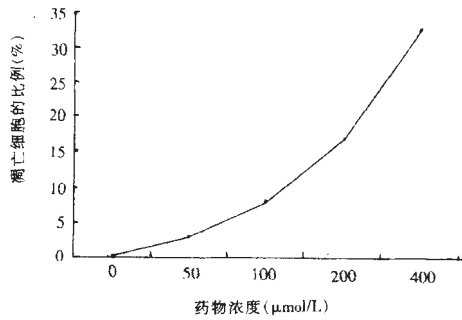


图 2 Celecoxib 诱导 SGC-7901 细胞凋亡的比例

表 2 Celecoxib 对胃癌 SGC-7901 细胞周期的影响 $\bar{x} \pm s$

浓度(μmol/L)	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
(对照组) 0	52.06±1.04	24.09±1.62	23.85±2.65
50	58.15±1.94	22.77±2.01	19.08±0.06
100	65.25±1.39 ^Δ	19.99±0.32	13.79±0.32 ^Δ
200	74.29±1.25*	14.78±0.76 ^Δ	10.92±0.49 ^Δ
400	87.29±1.34*	8.91±0.78 ^Δ	3.80±0.55*

与对照组比较, ^Δ*P*<0.05 **P*<0.01

3 讨论

Penning 等^[3]经过对非甾体类抗炎药的修饰,合成了第一个只对 COX-2 有抑制作用的选择性 COX-2 抑制剂, Celecoxib。

本文应用 MTT 方法检测了 Celecoxib 对胃癌 SGC-7901 细胞的生长抑制作用。结果表明,随着药物浓度的增加和时间的延长,细胞存活率逐渐降低, Leahy 等^[4]应用结肠腺癌 HT-29 细胞裸鼠移植模型研究了 Celecoxib 对活体内肿瘤细胞的生长抑制作用, Celecoxib 组肿瘤细胞的增殖指数明显降低, 凋亡指数增加了 2.2~3.0 倍, 我们的研究表明, Celecoxib 作用 SGC-7901 细胞 72h 后, 其细胞存活率仅为 20.5%, 对胃癌 SGC-7901 细胞有明显的抑制作用, 且抑制作用呈时间、剂量依赖性。COX-2 过表达能够诱导肿瘤细胞对抗凋亡的能力, 进而促进肿瘤发生和发展, 而且和 COX-2 蛋白表达强度有一定的关系^[5]。本文表明, 流式细胞仪检测可见凋亡细胞形成的亚 G₁ 峰, bcl-2 蛋白的含量随着药物浓度的增高而逐渐降低, 同时, COX-2 蛋白的含量也随着药物浓度的增高而逐渐降低。Celecoxib 呈剂量依赖性诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡, 细胞凋亡比例可达到 33.0%。Willams 等^[6]也证实 Celecoxib 能够诱导大肠癌肿瘤细胞凋亡, 而且, 正常的肠道上皮细胞没有发生凋亡。

本文研究表明, 应用 Celecoxib 72h 后, 药物浓度为 50μmol/L 时, bcl-2 蛋白含量为 2.76±0.14, 药物浓度为 400μmol/L 时, bcl-2 蛋白含量为 0.78±0.05, 与对照组比较差异显著 (*P*<0.001), 提示 Celecoxib

诱导细胞凋亡的机制之一是通过 bcl-2 表达下调来完成, 这与 Tang 等^[7]研究结果一致。

有关 Celecoxib 诱导肿瘤细胞凋亡是否依赖于 COX-2 也有不同观点。从理论上讲, Celecoxib 诱导肿瘤细胞凋亡应该是 COX-2 依赖性的。因为, COX-2 促进肿瘤发生和发展的重要原因之一就是催化机体内前列腺素的合成, 抑制 COX-2 表达能够诱导胃肠道上皮细胞的凋亡^[8]。Waskewich 等^[9]研究了 Celecoxib 对结肠癌细胞的杀伤作用、细胞周期分布和凋亡的影响, 显示作用途径是非 COX-2 依赖性的。本文结果显示, 作用途径呈 COX-2 依赖性。两种结果的差异说明, 1) 可能确实存在着其他非 COX-2 依赖性途径; 2) COX-2 存在着另外的变异形式; 3) 肿瘤细胞的异质性和检测细胞种类的不同。

本文检测了 Celecoxib 对细胞周期的影响。结果表明, Celecoxib 具有明显的 G₀/G₁ 期阻滞作用, 使进入 S 期细胞减少, 从而抑制细胞 DNA 的合成, 与 Kundu 等^[10]研究结果一致。Celecoxib 能够通过抑制 COX-2 的生物活性, 合理的调控细胞周期的进程, 有效的诱导凋亡的产生, 发挥其抑制胃癌 SGC-7901 细胞增殖的作用。因此, Celecoxib 是一种较为理想的胃癌治疗和预防的药物。

参考文献

- 1 Son HJ, Kim YH, Park D, et al. Interaction between cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in gastric cancer [J]. J Clin Gastroenterol, 2001, 33 (5):383~388
- 2 Fosslien E. Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia [J]. Crit Review Clin Lab Sci, 2000, 37(5):431~502
- 3 Penning TD, Talley JJ, Bertenshaw SR, et al. Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-Methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, celecoxib) [J]. J Med Chem, 1997, 40(9):1347~1365
- 4 Leahy KM, Ornberg RL, Wang Y, et al. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in Vivo [J]. Cancer Res, 2002, 62(3):625~631
- 5 Nzeako UC, Guicciardi ME, Yoon JH, et al. COX-2 inhibits fas-mediated apoptosis in cholangiocarcinoma cells [J]. Hepatology, 2002, 35(3):552~559
- 6 Willams CS, Waston AJM, Sheng H, et al. Celecoxib prevents tumor growth in Vivo without toxicity to normal gut: lack of correlation between in Vitro and in Vivo models [J]. Cancer Res, 2000, 60(21):6045~6051
- 7 Tang X, Sun YJ, Half E, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression inhibits death receptor 5 expression and confers resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human colon cancer cells [J]. Cancer Res, 2002, 62 (17):4903~4908

- 8 Sawaoka H, Kawano S, Tsuji S, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitors suppress the growth of gastric cancer xenografts via induction of apoptosis in nude mice [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 1998, 274:G1061~G1067
- 9 Waskewich C, Blumenthal RD, Li H, et al. Celecoxib exhibits the greatest potency amongst cyclooxygenase (COX) inhibitors for growth inhibition of COX-2 negative hematopoietic and epithe-

lial cell lines. *Cancer Res*, 2002,62(7):2029~2033

- 10 Kundu N, Smith MJ, Samsel L, et al. Cyclooxygenase inhibitors block cell growth, increase ceramide and inhibit cell cycle [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2002, 76(1):57~64

(2004-02-01 收稿)

(2004-06-25 修回)

(韩豫生校对)

·短篇及病例报告·

胰腺实性假乳头状瘤 1 例

丁 伟 邵永孚^① 吴健雄^① 张 峰^① 荣维淇^①

新疆医科大学附属肿瘤医院外一科 (乌鲁木齐市 830011)

关键词 胰腺肿瘤 实性假乳头状瘤 临床病理学

中图分类号:R735.9 文献标识码:D 文章编号:1000-8179(2004)20-1174-01

1 临床资料

患者,女性,50岁。因间断上腹部隐痛1年入院。查体:腹部未触及肿物。血清CA242、CA199、CEA在正常范围,肝肾功能检查正常。B超示胰腺钩突部约3.2cm大小囊实性肿物,与周围血管关系密切,倾向良性病变。CT显示胰头可见约2.0cm×2.0cm结节,密度不均与十二指肠关系密切,包绕肠系膜上静脉1/2周,提示胰头癌,行胰十二指肠切除术,术后患者顺利恢复出院。

术后病理检查,巨检:肿瘤位于胰头部,直径3.2cm,切面呈囊实性结构混合。镜检:瘤细胞呈弥漫片状、巢状排列,形态、大小较一致,圆形或椭圆形,围绕血管呈假乳头状。肿瘤呈侵袭性生长累及十二指肠壁深肌层,淋巴结转移0/8。病理诊断:胰头实性假乳头状瘤,低度恶性。

免疫组织化学检查:AE1/AE3(+)、CK18(+++)、Vimentin(++)、Synaptophysin(++)、chromogranin A(+),NF(-)、gastrin(-)、NSE(+),PR(-)、p53蛋白(-)、Ki-67 20%。

2 小结

胰腺实性假乳头状瘤(Solid pseudopapillary tumor, SPT)是发生于胰腺罕见的一类肿瘤。1959年由Frantz首先报告,为胰腺交界性或恶性潜能未能确定的肿瘤。

临床特征 因缺乏典型临床表现,极易误诊。SPT好发于年轻女性,中位发病年龄23.9岁^[1]。临床可有逐渐增大的腹部肿块,伴腹痛和上腹不适。肿瘤可发生于胰腺任何部位,目前实验室检查均不能提供诊断依据,B超及CT等影像学检查常提示囊实性占位性病变^[1,2]。

病理组织学 特征由形态比较一致的瘤细胞排列呈片状和假乳头状,假乳头状结构是诊断SPT的重要标志^[3]。其假乳头的纤维血管轴心常有透明变性或粘液变性及出血坏死。

肿瘤细胞核圆形或卵圆形,细胞质微嗜酸或透明。如出现血管和神经鞘的浸润或淋巴结和肝脏转移,即属恶性^[4]。

SPT免疫组织化学可表达多种组织来源的分化抗原,既可表达上皮来源的分化抗原如AE1/AE3、CK18,也可表达神经内分泌来源的分化抗原如NSE、Syn、CgA和腺泡细胞来源的分化抗原如Vimentin、AAT、ACT等,多数学者推测SPT可能源于胰胚胎多能干细胞,具有多项分化的潜能。有部分病例检测到孕激素受体,提示可能是一种性激素依赖性肿瘤^[5]。

治疗及预后 手术治疗是目前唯一有效的治疗方法。根据肿瘤部位的不同选择胰十二指肠切除术、胰体尾切除术或全胰切除术。由于SPT多属良性或低度恶性,有较好的生物学行为,手术治疗有良好的效果,多数报道患者术后长期生存^[1,5]。

参考文献

- 1 Mao C, Guvendi M, Domenico DR, et al. Papillary cystic and solid tumors of the pancreas: A pancreatic embryonic tumor? Studies of three cases and cumulative review of the world's literature[J]. *Surgery*, 1995, 118(5):821~828
- 2 邓元,张学斌. 胰腺囊性实性肿瘤8例临床病理分析[J]. *诊断病理学杂志*, 2003, 10(2):85~87
- 3 丁敏,蝗国铮,王晓秋,等. 胰腺实性-假乳头状瘤8例临床病理分析[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2003, 19(5):474~477
- 4 刘复生,主编. 中国肿瘤病理学分类(下卷)[M]. 北京:科学技术文献出版社, 2001. 271~273
- 5 Zinner MJ. Solid and papillary neoplasms of the pancreas[J]. *Surg Clin Nor Am*, 1995, 75(5):1017~1024

(2004-08-13 收稿)

(2004-09-13 修回)

(韩豫生校对)

① 中国医学科学院肿瘤医院腹部外科