

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.33.007

Celecoxib 抑制 Lewis 肺癌移植瘤淋巴管生成的作用机制及量效关系 *

陆相前 肖文静 沈方臻[△] 孙同琳 李 晓 姚如永

(青岛大学附属医院肿瘤中心肿瘤科 山东 青岛 266003)

摘要 目的: COX-2 过度表达及淋巴管的生成与肺癌早期转移、不良预后密切相关。观察不同剂量 COX-2 特异性抑制剂 Celecoxib 对 Lewis 肺癌移植瘤生长、COX-2、VEGF-C 表达和微淋巴管生成影响,探讨 Celecoxib 对 Lewis 肺癌移植瘤淋巴管生成可能作用机制及量效关系。**方法:** 将 Lewis 肺癌细胞株接种于 C57BL/6 小鼠左侧腹股沟皮下建立移植瘤模型,随机分为 4 组:对照组、塞来昔布低剂量(30 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、中剂量(90 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、高剂量(180 mg·kg⁻¹·d⁻¹)组。观察荷瘤小鼠生存状态,瘤体体积变化,计算抑瘤率,种瘤 42 天后牺牲小鼠,切取移植瘤组织,免疫组化染色检测 COX-2、VEGF-C 表达及微淋巴管密度(Lymphatic microvessel density, LMVD)。**结果:** 塞来昔布低、中、高剂量组的抑瘤率分别为 13.3%、46.8% 和 56.3%。塞来昔布高、中剂量组较对照组抑瘤作用明显,差异有统计学意义(P<0.05),但低剂量组差异无统计学意义(P>0.05)。免疫组织化学染色结果分析显示:塞来昔布高、中剂量组 COX-2、VEGF-C 的表达水平及微淋巴管密度均明显减低,差异有统计学意义(P<0.05),低剂量组略有减低但差异无统计学意义(P>0.05)。抑制程度呈明显的剂量依赖性。**结论:** 塞来昔布抑制 Lewis 肺癌移植瘤的生长及淋巴转移,可能与下调 COX-2 的表达,减少 VEGF-C 的产生,抑制微淋巴管生成有关,该抑制作用呈一定的剂量相关性,为抗肺癌早期淋巴转移,改善患者预后的药物研发提供了一定的实验基础。

关键词: Lewis 肺癌; 塞来昔布; 环氧合酶-2; 微淋巴管密度; 免疫组织化学

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)33-6425-07

The Inhibitory Effect of Celecoxib on Lewis Lung Tumor Lymphangiogenesis and Dose-response Relationship*

LU Xiang-qian, XIAO Wen-jing, SHEN Fang-zhen[△], SUN Tong-lin, LI Xiao, YAO Ru-yong

(Department of Oncology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266003, China)

ABSTRACT Objective: COX-2 overexpression and lymphangiogenesis have been related to early-metastasis and poor prognosis in lung cancer. To observe the effect of different doses of Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, on tumor growth, COX-2, VEGF-C expression and lymphangiogenesis in Lewis Lung Carcinoma homograft in C57BL/6 mice and explore the possible role of Celecoxib on Lewis lung tumor lymphangiogenesis mechanism and the dose-response relationship. **Methods:** Lewis Lung Carcinoma cell lines were seeded in C57BL/6 left groin subcutaneous to establish homograft models. These models were randomly divided into four groups: control group, low-dose(30 mg·kg⁻¹·d⁻¹) group, medium-dose(90 mg·kg⁻¹·d⁻¹) group, and high dose(180 mg·kg⁻¹·d⁻¹) group. Then we observed the tumor-bearing survival statuses and tumor volume changes of the mice. Transplanted tumor tissues were collected after 42 days and we made a detection of COX-2, VEGF-C expression and lymphatic microvessel density by immunohistochemical staining method. **Results:** Low-dose group, medium-dose group and high-dose group of Celecoxib inhibition rates were 13.3%, 46.8% and 56.3%, respectively. Compared with the control group. There were significant statistically differences in the inhibitory effect on tumors of high and medium-dose groups (P<0.05), however no difference could be seen in low-dose group (P>0.05). Immunohistochemical staining showed that celecoxib with medium and high-dose lowered the expressions of COX-2, VEGF-C and lymphatic microvessel density (LMVD). And compared with the control group, there were significant differences (P<0.05). Though expressive levels decreased slightly, there were no significant differences between Low-dose group and control group (P>0.05). The degree of inhibition was dose-related. **Conclusion:** Celecoxib inhibits the growth of Lewis lung tumor and lymph node metastasis by reducing expressions of COX-2 and VEGF-C and inhibiting lymphangiogenesis which is related to dosage. That provides certain experimental basis for drug development of anti-cancer lymph node metastasis in early stage and the patients prognosis improvement.

Key words: Lewis Lung Carcinoma; Celecoxib; Cyclooxygenase-2; LMVD; Immunohistochemical

Chinese Library Classification(CLC): R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)33-6425-07

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(30872169)

作者简介: 陆相前(1986-), 男, 硕士研究生, 主要从事肿瘤的化疗及生物治疗, E-mail: luxiangqian1986@163.com

△ 通讯作者: 沈方臻, 女, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事各种肿瘤的化疗及靶向治疗, E-mail: shenfazhen@163.com

(收稿日期: 2014-03-07 接受日期: 2014-03-30)

前言

目前肺癌发病率已高居全球男性恶性肿瘤的首位,女性恶性肿瘤的第二位^[1],严重威胁着人类的生命健康。早期淋巴转移已成为肺癌不良预后的重要危险因素。

环氧合酶-2 (Cyclooxygenase-2, COX-2) 是环氧合酶的一种诱导酶,近年来研究发现 COX-2 可诱导肿瘤血管生成,促进肿瘤细胞增殖并抑制其凋亡,提高肿瘤发生及转移的潜能,增加肿瘤细胞的侵袭力。在肿瘤的发生和发展、转移中起重要的促进作用。Celecoxib 作为新一代高选择性 COX-2 抑制剂,最近已通过 FDA 批准用于家族性肠癌息肉的辅助治疗。研究发现 Celecoxib 对肝癌、乳腺癌、头颈部癌、结肠癌、胰腺癌、肺癌等多种肿瘤的增殖有抑制作用^[2-7],是目前抗肿瘤的研究热点。但是关于 Celecoxib 抑制肿瘤生长的作用机制和合适的临床用量仍未明确,限制了其临床应用^[8],有研究表明 Celecoxib 对肺癌新生血管具有明显的抑制作用^[9],但对淋巴管生成的作用的研究相对较少,而 Celecoxib 对肺癌淋巴转移的影响及量效关系更鲜有报道。

本实验通过建立高恶性度、高转移率的 Lewis 肺癌移植瘤模型,应用不同剂量的 Celecoxib 对 Lewis 肺癌小鼠分组进行干预,研究 Celecoxib 对肿瘤生长、COX-2、VEGF-C 表达及微淋巴管生成的影响,并探讨 Celecoxib 对淋巴管的生成作用的量效关系及可能机制,为探讨肺癌治疗的新途径提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 DMEM 高糖培养基、胎牛血清、胰蛋白酶及必需氨基酸购自美国 Hyclone 公司;兔抗鼠 COX-2 单克隆抗体、兔抗鼠血管内皮生长因子-C (vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C) 单克隆抗体均购自北京博奥森生物技术有限公司、兔抗鼠肾小球足突细胞膜蛋白 (Podoplanin) 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 试剂公司,SP 二抗试剂盒 (SP-0023)、DAB 显色试剂盒均购自北京博奥森生物技术有限公司;塞来昔布购自辉瑞制药有限公司。

1.1.2 细胞株 Lewis 肺癌细胞株 (Lewis Lung Carcinoma cell, LLC) 由青岛大学医学院附属医院中心实验室惠赠。

1.1.3 实验动物 无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级,雄性, C57BL/6 小鼠 (4~5 周龄) 60 只,体质量 14~16 g,于肿瘤前 3 周购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物生产许可证号: HNASLKJ20102739,实验动物合格证编号: SCXK (湘) 2009-0004。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 LLC 细胞使用含 10% 新生胎牛血清、100 μ / mL 青霉素和 100 μ / mL 链霉素的 DMEM 高糖培养基,在 37℃ 含体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中培养,每 2~3 天传代 1 次。

1.2.2 构建 C57BL/6 小鼠皮下移植瘤 取处于对数生长期的 LLC 细胞分别在 C57BL/6 小鼠左腹股沟皮下种植,细胞数量约为 2×10^7 / 只。观察并记录肿瘤后小鼠精神、饮食、体质量及活动状态等情况。将小鼠随机分为生理盐水对照组、塞来昔布低、

中、高剂量组 (30、90、180 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 每组 15 只。待皮下瘤结节“米粒”大小时即肿瘤后第 10 天,采用灌胃方式给药。用游标卡尺测量肿瘤长径(a)和短径(b),按公式 $V(\text{mm}^3) = ab^2\pi/6$ 计算瘤体积,绘制肿瘤体积增长曲线。肿瘤 42 天摘眼球法处死小鼠,取血检测血生理、生化指标。剥离肿瘤组织,称取瘤质量,计算抑瘤率,抑瘤率(%)=(对照组平均瘤重-给药组平均瘤重)/对照组平均瘤重×100%。并称取去瘤后小鼠体质量。肿瘤组织取部分置于中性甲醛溶液中固定,常规石蜡包埋、切片。

1.2.3 免疫组织化学法 (immunohistochemistry, IHC) 染色检测肿瘤组织中 COX-2、VEGF-C 表达以及微淋巴管密度 (Lymphatic microvessel density, LMVD) 肿瘤组织组织切片用二甲苯脱腊,梯度酒精水化,3% H₂O₂ (80% 甲醇) 室温封闭 10 min, 98℃ 微波热修复抗原 10 min。按 SP 三步法行免疫组织化学检测:滴加山羊血清封闭 30 min, 甩去不洗;随后分别滴加兔抗小鼠 COX-2 (1:150)、VEGF-C (1:200) 及 Podoplanin (1:200), 4℃ 过夜;PBS 洗涤,滴加生物素化的羊抗兔 IgG, 37℃ 孵育 30 min, PBS 洗涤, 37℃ 孵育 30 min, DAB 显色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,苏木素衬染,中性树胶封片。

1.2.4 结果判定 参考 Beasley 等^[10]的方法光镜下观察 LMVD 并计数,即先在低倍镜下 (×100) 观察切片,寻找肿瘤内染成棕褐色单个内皮细胞或内皮细胞簇,作为一个微淋巴管,含有肌层的细胞不以计数,每个标本在高倍镜下 (×400) 随机计数 10 个视野,取平均数作为该 LMVD 值。VEGF-C 和 COX-2 蛋白均主要表达于胞浆,结合免疫组化图像分析系统,据染色强度及阳性细胞率评判:无染色计为 0 分,弱染色 (浅黄色) 计为 1 分,中等染色 (棕黄色) 计为 2 分,强染色 (黄褐色) 计为 3 分;阳性细胞率 ≤5% 计 0 分, 5%~25% 计 1 分, 25%~50% 计 2 分, >50% 计 3 分;上述两项得分相加并取均数。

1.3 统计学方法

实验结果数据采用均数 ($\bar{x} \pm s$) ± 标准差 (S) 描述。数据处理用 SPSS17.0 软件,首先进行单因素方差分析 (ANOVA),组间两两比较用 LSD-t 检验分析,等级资料比较采用秩和检验, $P < 0.05$ 时,认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成瘤及 LLC 荷瘤小鼠的一般情况

60 只小鼠均种瘤成功,成瘤率 100%,成瘤时间为细胞种植后第 7~9 天。肿瘤细胞种植后第 13 天,肿瘤直径平均达 5 mm。成瘤后早期小鼠的体质量和活动情况没有明显变化,随着肿瘤逐渐增大,小鼠出现消瘦,活动减少,摄食量明显下降。对照组移植瘤生长迅速,其中 5 只小鼠皮下移植瘤出现皮肤破溃,表面溃疡形成。Celecoxib 干预后,高剂量、中剂量给药组与对照组相比瘤体生长明显缓慢,瘤体变小,且瘤体较规则,与周围少见粘连。低剂量给药组瘤体生长略显缓慢,较对照组变化不明显 (图 1)。

2.2 LLC 荷瘤小鼠血生理、生化参数及去瘤后体质量

不同剂量的 Celecoxib 对荷瘤小鼠毒性作用,血生理、生化参数检测未有明显差异,无统计学意义 ($P > 0.05$)。去瘤后小鼠的体质量高剂量、中等剂量组较对照组、低剂量组差异有统计学 ($P < 0.05$) 可能与随着移植瘤生长小鼠出现消瘦,活动减少,

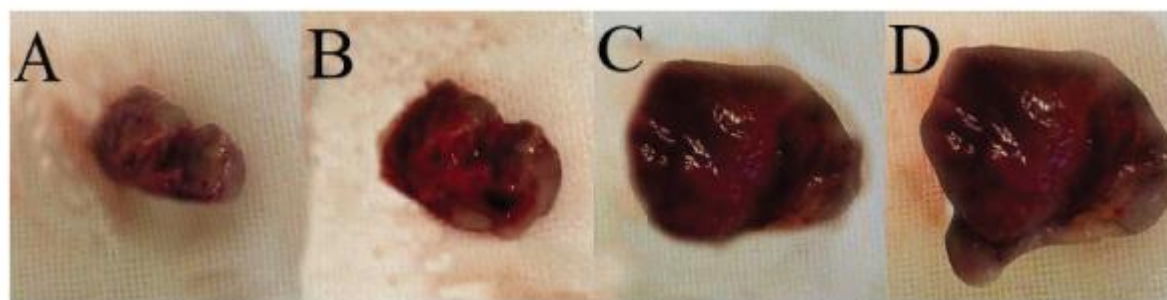


图1 四组 LLC 荷瘤小鼠移植瘤大小、形态的比较,高剂量、中剂量给药组与对照组相比瘤体生长明显缓慢,瘤体变小,且瘤体较规则

A:高剂量组(180 mg·kg⁻¹·d⁻¹);B:中剂量组(90 mg·kg⁻¹·d⁻¹);

C:低剂量组(30 mg·kg⁻¹·d⁻¹);D:对照组

Fig. 1 The comparison of the size and shape of tumor homographs in LLC tumor-bearing mice among four groups. In the high-dose group and middle-dose group, the tumor showed a small and regular figure and a slow-growing behavior compared to the control group

A:High dose group(180 mg·kg⁻¹·d⁻¹);B:Middle dose group(90 mg·kg⁻¹·d⁻¹);C: Low-dose group(30 mg·kg⁻¹·d⁻¹);D:Control group

摄食量明显下降有关(表 1)。

2.3 LLC 荷瘤小鼠皮下移植瘤生长曲线

测量四组 LLC 荷瘤小鼠不同时间肿瘤体积,求其平均值。并于种瘤 42 天后处死小鼠,绘制肿瘤生长曲线,结果发现在种瘤后 20 天时肿瘤体积高、中剂量组比对照组小,但无统计学差

异($P>0.05$)。30 天后高、中剂量组较低剂量、对照组生长明显减缓,有统计学差异($P<0.05$)。对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组小鼠的最终肿瘤体积分别为 $6488.59 \pm 1606.14 \text{ mm}^3$, $3879.37 \pm 1085.04 \text{ mm}^3$, $1149.94 \pm 670.45 \text{ mm}^3$, $839.53 \pm 272.77 \text{ mm}^3$ (图 2)。

表 1 LLC 荷瘤小鼠血生理、生化参数及去瘤后体质量($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Quality of life of each group and blood physiological and biochemical parameters ($\bar{x} \pm s$)

Group	WBC($10^3/\mu\text{L}$)	ALT(U/L)	PLT($10^3/\mu\text{L}$)	the body weight after tumor-removed(g)
Control group	6.43 ± 1.23	25 ± 13	656 ± 123	18.2 ± 1.2
Low-dose	6.68 ± 1.56	36 ± 15	628 ± 189	19.2 ± 1.8
Middle dose	4.83 ± 1.79	33 ± 20	458 ± 232	$23.2 \pm 2.3^*$
High dose	5.56 ± 2.13	30 ± 18	568 ± 187	$22.8 \pm 1.7^*$

注:低剂量组、中剂量组、高剂量组、对照组:WBC、ALT、PLT 组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。去瘤后体质量: * $P<0.05$, vs 对照组。低剂量组 vs 对照组: $P>0.05$ 。

Note: Low-dose; Middle dose; High dose, Control group: WBC、ALT、PLT Pairwise comparisons among groups ($P>0.05$). body mass after tumor: * $P<0.05$, vs Control group. Low-dose group vs Control group: $P>0.05$.

2.4 瘤质量及抑瘤率

Celecoxib 各给药组瘤质量均较对照组减小,高、中剂量给药组较对照组差异明显,有统计学意义($P<0.05$),但高、中剂量组间比较差异不明显,无统计学意义($P>0.05$)。Celecoxib 高剂量组抑瘤率较塞来昔布低剂量组差异明显($P<0.05$)。Celecoxib 中剂量组抑瘤率高于低剂量组,而低于高剂量组,与低剂量组相比差异有统计学意义($P<0.05$),但与高剂量组相比差异无统计学意义($P>0.05$)(表 2)。

2.5 免疫组化

2.5.1 不同剂量的 Celecoxib 对 LLC 移植瘤组织 COX-2、VEGF-C 表达的影响 对照组瘤组织中,COX-2、VEGF-C 蛋白表达阳性肿瘤细胞分布广泛,染色较强。Celecoxib 高剂量、中剂量组 COX-2、VEGF-C 染色强度比对照组减弱,(图 3,图 4)。四组 COX-2、VEGF-C 表达积分测定进行秩和检验。Celecoxib 高剂量、中剂量组较低剂量组、对照组表达量明显降低,有统计学差异($P<0.05$)。然而低剂量组较对照组及高、中剂量组间比较无统计学差异($P>0.05$)(表 3)。

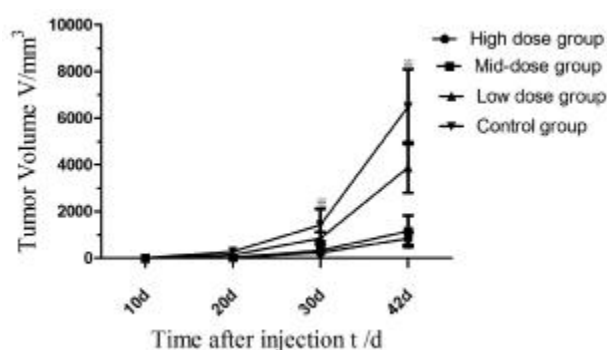


图2 四组 LLC 荷瘤小鼠移植瘤体积生长曲线:高剂量和中等剂量组的移植瘤生长显著降低。高剂量组和中剂量组 * $P<0.05$ 与低剂量组与对照组相比

Fig. 2 The growth curves of tumor homographs in LLC tumor-bearing mice of four groups (high dose, mid-dose, low dose, control group). The capacity of tumorigenicity in high dose and mid-dose group was significantly reduced. High dose group and Mid-dose group * $P<0.05$ compared with Low dose group and Control group

表 2 四组 LLC 荷瘤小鼠移植瘤质量和抑瘤率($\bar{x} \pm s$)Table 2 Homograft tumor weight of four group and the inhibition rate, ($\bar{x} \pm s$)

Group	N	Tumor mass(g)	Tumor Inhibition rate(%)
Control	15	3.47± 0.42	
Celecoxib($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)			
30	15	2.92± 0.43	13.3
90	15	1.88± 0.32**	46.8
180	15	1.56± 0.38**	56.3

注:低剂量组;中剂量组;高剂量组;对照组:瘤质量:** $P=0.0000 < 0.01$, vs 对照组。低剂量组 vs 对照组: $P=0.9799 > 0.05$ 。

Note: Low-dose; Middle dose; High dose, Control group: tumor mass: ** $P=0.0000 < 0.01$, vs Control group.

Low-dose group vs Control group: $P=0.9799 > 0.05$.

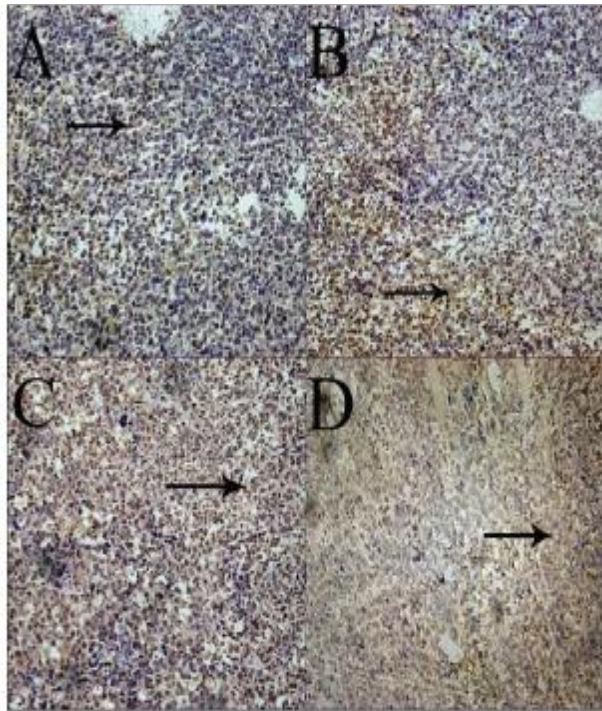


图 3 免疫组化染色测定 COX-2 在 LLC 荷瘤小鼠移植瘤组织中的表达($\times 200$)

A: 高剂量组($180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$); B: 中剂量组($90 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$);
C: 低剂量组($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$); D: 对照组

Fig. 3 COX-2 protein expression (DAB staining, $\times 200$) in Lewis Lung Carcinoma homografts among four groups were detected by immunohistochemistry. The arrows represent the particles positively expressed in tumor homografts.

A: High dose group($180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$); B: Middle dose group($90 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$);
C: Low-dose group($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$); D: Control group

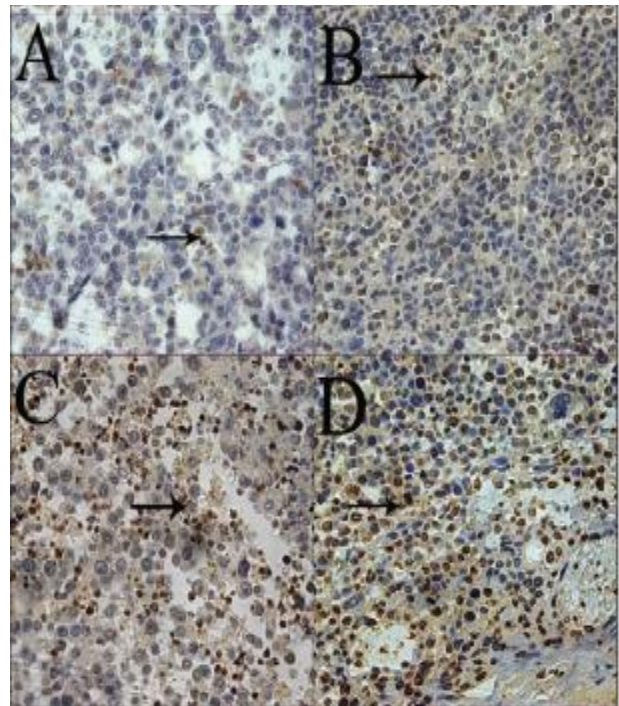


图 4 免疫组化染色测定 VEGF-C 在 LLC 荷瘤小鼠移植瘤组织中的表达($\times 400$)

A: 高剂量组($180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$); B: 中剂量组($90 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$);
C: 低剂量组($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$); D: 对照组

Fig. 4 VEGF-C protein expression (DAB staining, $\times 400$) in Lewis Lung Carcinoma homografts among four groups were detected by immunohistochemistry. The arrows represent the particles positively expressed in tumor homografts.

A: High dose group($180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$); B: Middle dose group($90 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$);
C: Low-dose group($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$); D: Control group

2.5.2 不同剂量的 Celecoxib 对 LLC 移植瘤组织 LMVD 的影响 应用淋巴管标记物 Podoplanin 标记淋巴管内皮细胞, 可见 Podoplanin 特异性地表达于淋巴管。Podoplanin 阳性表达的管状结构, 呈棕色, 不规则, 管腔大, 符合微淋巴管的形态学特征。对照组 Podoplanin 阳性淋巴管密度高, 管腔扩张, 在较大的淋巴管腔内常可见到癌细胞及其碎片。Celecoxib 高剂量、中剂量组 Podoplanin 阳性淋巴管密度较对照组明显减少, 阳性淋巴管分布稀疏, 呈散在, 点状分布, 染色较浅。统计分析显示: 400 倍

视野中高剂量组、中剂量组、低剂量组和对照组的微淋巴管平均个数分别为 8.503 ± 3.216 、 7.360 ± 2.238 、 4.177 ± 2.344 、 3.445 ± 1.355 。高、中剂量组较低剂量组、对照组 LMVD 明显减少, 有统计学差异($P < 0.05$)。低剂量组较对照组及高、中剂量组间比较无统计学差异($P > 0.05$)。Celecoxib 对 LLC 荷瘤小鼠移植瘤微淋巴管的生成有明显抑制作用且有一定的量效关系(图 5)。

表 3 四组 LLC 荷瘤小鼠移植瘤 COX-2、VEGF-C 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 3 The expression of COX-2、VEGF-C in four groups of homografts in LLC mice ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	COX-2				VEGF-C			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
Control	15	0	2	3	10	0	3	3	9
Low-dose	15	1	2	5	7	1	3	4	7
Middle dose*	15	6	4	4	1	5	5	3	2
High dose*	15	8	5	2	0	8	5	1	1

注:低剂量组;中剂量组;高剂量组;对照组:* $P < 0.05$, vs 对照组;低剂量组 vs 对照组;高剂量组 vs 中剂量组: $P > 0.05$ 。

Note: study group: Low-dose; Middle dose; High dose, Control group: * $P < 0.05$, vs Control group; Low-dose vs Control group;

Middle dose vs High dose: $P > 0.05$.

3 讨论

最新的流行病学调查显示肺腺癌已成为非小细胞肺癌 (Non-small cell lung cancer, NSCLC) 最常见的病理类型^[11]。随着近些年分子靶向药物治疗的兴起,使部分肺腺癌患者的生存期明显延长,生活质量得到改善。临床研究^[12]表明,虽然表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 突变阳性的肺腺癌患者对 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitors, TKIs) 的有效率可达 70%–80%,但是野生型的患者有效率仍仅约 10%–20%,治疗上尚存诸多局限性。即便 EGFR-TKI 初始治疗有效的患者,随着治疗时间的延长,几乎所有患者都最终会出现获得性耐药。探讨适用人群的靶向药物成为目前肺癌研究的趋势之一。

环氧合酶是花生四烯酸转化为前列腺素的关键酶,包括 COX-1 和 COX-2 两种形式。近年来大量研究证实 COX-2 作

为一种诱导酶过度表达对肿瘤的发生、发展及不良预后都起到至关重要的作用^[13,14], COX-2 在头颈部肿瘤、食管癌、结肠癌、乳腺癌、胰腺癌和前列腺癌中皆过表达。1998 年, Hida 等^[15]首先报道约 70% 的肺癌组织中可见 COX-2 高表达,在淋巴结转移灶中, COX-2 染色阳性的癌细胞数较原发肿瘤高。COX-2 高表达可见于从癌前病变到癌的全过程,其他多项研究也证实了 COX-2 在肺癌中表达的重要性^[16,17]。近来研究发现,在肺癌中的腺癌、鳞状上皮细胞癌、大细胞癌和小细胞癌这 4 种类型中,以腺癌 COX-2 表达增强最为明显,约 70% 过度表达,以进展期病例占多数,而小细胞肺癌几乎不表达 COX-2,鳞癌的 COX-2 表达相对较弱。肺原位癌、浸润性腺癌 COX-2 表达阳性率均超过 80%^[18],说明在肺癌早期就有 COX-2 表达的增高,且主要见于 NSCLC,特别是肺腺癌中。

Celecoxib 作为新一代选择性 COX-2 抑制剂,由于能特异性作用于 COX-2,对正常组织中 COX-1 的表达无明显影响,所以消化道、肾脏和血液的不良反应低,已成为抗肿瘤研究的热点。本实验结果统计学分析发现不同剂量 Celecoxib 各给药组对移植瘤的生长均有抑制作用,尤以高、中剂量组抑瘤作用较显著,与对照组比较,有统计学差异 ($P < 0.05$),低剂量组抑瘤作用较弱与对照组比较,无统计学差异 ($P > 0.05$),这与 Masferrer 等^[19]关于塞来昔布不仅可抑制 LLC 移植瘤的生长,也可抑制裸鼠结肠癌皮下移植瘤的肺转移,且呈现一定剂量依赖性研究一致。本实验结果显示 Celecoxib 对肺癌移植瘤的生长有一定抑制作用,且对肿瘤抑制呈现明显的量效关系,不同剂量的 Celecoxib 对荷瘤小鼠毒性作用未见明显差异,说明 Celecoxib 应用安全剂量范围可能较大,对临床应用抗肿瘤适宜剂量研究提供了一定实验基础。关于 Celecoxib 抑制肿瘤生长的作用机制目前存在不同的观点。有学者认为选择性 COX-2 抑制剂通过抑制 COX-2、减少前列腺素 (PG) 的生成以及抑制多种细胞生长控制基因及其表达产物如 ERK2 的活性,从而抑制肿瘤的生长;而另有研究认为, Celecoxib 通过非 COX-2 依赖途径发挥抑瘤作用^[20,21]。

近年来, Celecoxib 抗肺癌作用研究多集中在其对肺癌细胞本身及血管生成的影响上,而对淋巴管生成作用研究较少,特别 Celecoxib 抗肺癌淋巴管生成是否存在剂量依赖性更是鲜有报道。早在 2001 年 Jackson^[22]提出了肿瘤微淋巴管生成的理论,发现有诸多因素参与微淋巴管生成,目前多数学者认为微淋巴管的生成是肿瘤生长和转移中最关键的步骤。微淋巴管的

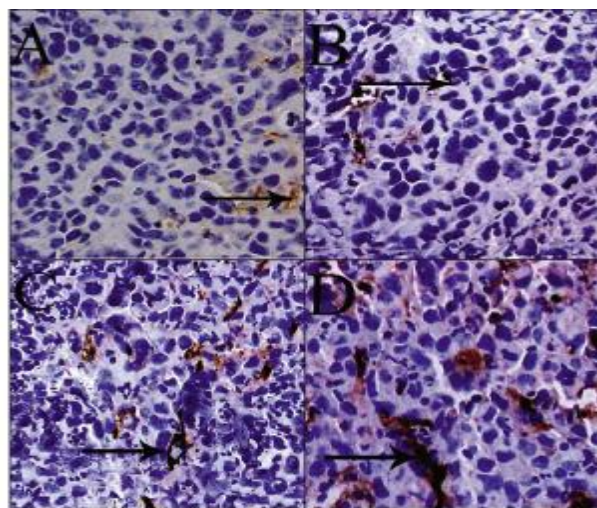


图 5 免疫组化染色 Podoplanin 测定微淋巴管密度在四组移植瘤组织中的表达 ($\times 400$)

A: 高剂量组 ($180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$); B: 中剂量组 ($90 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$); C: 低剂量组 ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$); D: 对照组

Fig. 5 LMVD (Lymphatic microvessel density) (DAB staining, $\times 400$) in tumor homografts in C57BL/6 mice among four groups were detected by immunohistochemistry. The arrows represent the particles positively expressed in tumor homografts and the micro-lymphatic vessel.

A: High dose group ($180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$); B: Middle dose group ($90 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$);

C: Low-dose group ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$); D: Control group

生成对肺癌早期淋巴转移有重要促进作用,已成为 NSCLC 独立的不良预后因素之一^[23-25]。研究发现 VEGF-C 过表达促进了淋巴管的生成,VEGF-C 通过旁分泌的形式激活毛细淋巴管内皮的特异性受体 VEGFR-3,使其受体自身磷酸化,从而促进毛细淋巴管生成,促进肿瘤的转移。对包括甲状腺癌、前列腺癌、胃癌、结肠癌、食管癌、头颈部鳞癌和宫颈癌等多种肿瘤的研究结果,支持 VEGF-C / VEGFR-3 信号通路参与肿瘤淋巴管生成或扩张,为肿瘤细胞与淋巴管内皮间的接触和对淋巴管的侵袭及向淋巴结转移提供了更多的机会。本实验通过免疫组化染色证实了应用不同剂量的 Celecoxib 作用的 LLC 移植瘤组织中 COX-2 表达都减少,相应的 VEGF-C 表达及淋巴管生成也减少,经统计分析发现,高、中剂量给药组 COX-2、VEGF-C 的表达较对照组明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),但低剂量组较对照组及高、中剂量组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。说明 Celecoxib 对 COX-2、VEGF-C 表达抑制作用呈现一定的剂量依赖性。具体机制尚不十分明了。有学者认为 COX-2 对 VEGF-C 表达及淋巴管的生成可能存在协同或促进作用,该影响作用涉及到多条信号通路。COX-2 可能通过催化前列腺素 2(PGE2)的合成,而 PGE2 与前列腺素受体结合后可使之激活,该受体的激活促进了人表皮生长因子受体 HER / Neu-2 酪氨酸磷酸化,该信号通过有丝分裂原激活蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MARK)p38 介导并刺激转录因子 NF-KB。而包括 MAPK、NF-KB 等在内的信号通路在部分肿瘤细胞中已证明都与 VEGF-C 的表达调节有关^[26]。COX-2 也可能通过 EP4 和 EP1 受体途径上调 VEGF-C 表达促进淋巴管的生成,进而促使淋巴转移^[26,27]。本实验发现 Celecoxib 可使 LLC 移植瘤 COX-2 和 VEGF-C 表达同时下降,且表达下降程度随给药剂量的增加而增加,呈明显剂量依赖性,但这种下降程度并非随着剂量增加无限增加,提示 Celecoxib 可能存在最适剂量既能达到良好的抗肺癌移植瘤微淋巴管生成的疗效,又对正常组织器官不良反应最小。其抑制淋巴管生成的机制可能通过抑制 COX-2 的表达进而抑制 VEGF-C 表达的信号通路实现的。

Podoplanin 是类似粘蛋白的跨膜糖蛋白,表达于淋巴管内皮。因为它的表达是存在血管系统中的淋巴管内皮细胞,因此可以通过免疫组织化学方法区分淋巴管和血管。Schmid 等^[28]研究发现通过 CD34 和 Podoplanin 双重染色可以区分淋巴管和毛细血管。Cursiefen 等^[29]采用免疫金标记技术及免疫电镜技术研究角膜的淋巴管生成,发现表达 Podoplanin 的内皮细胞具有淋巴管内皮细胞的超微结构特点,因而 Podoplanin 可以作为淋巴管内皮细胞的特异性标志物。本实验通过免疫组化染色检测不同剂量 Celecoxib 给药组 LLC 移植瘤组织中 Podoplanin 表达,计数 LMVD,结果表明高、中剂量组较对照组 LMVD 明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),而低剂量组较对照组及高、中剂量组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

综上,本实验研究发现不同剂量 Celecoxib 对 LLC 荷瘤小鼠的一般生存状态,COX-2、VEGF-C 的表达及微淋巴管的生成均有抑制作用,高、中剂量组较低剂量组抑制作用明显,说明 Celecoxib 可能通过抑制肺癌组织中 COX-2 的表达,下调 VEGF-C 的产生,抑制肺癌微淋巴管生成,这种抑制作用呈现一定的剂量依赖性。本研究结果不仅有助于 Celecoxib 作为化

疗药物推广于临床,从而改善化疗方案,减少化疗药物的毒副作用,而且对研究一种能够抗肺癌早期微淋巴管转移,改善肺癌患者预后的药物提供了一定的实验基础。Celecoxib 抑制肺癌微淋巴管生成的作用是否存在其他机制,对其机制更深入的研究能否发现治疗肺癌的新靶点都尚有待于大量的实验室和临床的探索,Celecoxib 应用到临床抗肺癌早期淋巴转移最适宜安全剂量也有待进一步探讨。

参考文献(References)

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2011, 61(2): 69-90
- [2] Gao J, Jia W D, Li J S, et al. Combined inhibitory effects of celecoxib and fluvastatin on the growth of human hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice[J]. J Int Med Res, 2010, 4(38): 1413-1427
- [3] Dai Z J, Ma X B, Kang H F, et al. Antitumor activity of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, on breast cancer in Vitro and in Vivo[J]. Cancer Cell Int, 2012, 12(1): 53-61
- [4] Shin D M, Zhang H, Saba N F, et al. Chemoprevention of head and neck cancer by simultaneous blocking of epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 signaling pathways: preclinical and clinical studies[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(5): 1244-1256
- [5] Wang L, Chen W, Xie X, et al. Celecoxib inhibits tumor growth and angiogenesis in an orthotopic implantation tumor model of human colon cancer[J]. Exp Oncol, 2008, 1(30): 42-51
- [6] 宋金霞, 于晓昀, 宋华丽, 等. 塞来昔布联合氟尿嘧啶对胰腺癌细胞株 SW1990 生长抑制作用及其机制研究 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(16): 3048-3051
- [7] Song Jin-xia, Yu Xiao-yun, Song Hua-li, et al. The Inhibitory Effect of Celecoxib Combined with Fluorouracil on SW1990 Pancreatic Cancer Cells Line[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13(16): 3048-3051
- [8] Ko J C, Wang L H, Jhan J Y, et al. The role of celecoxib in Rad51 expression and cell survival affected by gefitinib in human non-small cell lung cancer cells[J]. Lung Cancer, 2009, 65(3): 290-298
- [9] Ramer R, Walther U, Borchert P, et al. Induction but not inhibition of COX-2 confers human lung cancer cell apoptosis by celecoxib [J]. J Lipid Res, 2013, 54(11):3116-3129
- [10] 董雪丽, 牟晓燕, 刘庆亮, 等. 塞来昔布联合厄罗替尼对人肺癌裸鼠移植瘤生长及血管生成的影响[J]. 山东大学学报(医学版), 2013, 51(2): 49-52
- [11] Dong Xue-li, Mou Xiao-yan, Liu Qing-liang, et al. Effects of erlotinib combined with celecoxib on growth and angiogenesis of human lung cancer xenograft model [J]. Journal of Shandong University (Health Science), 2013, 51(2): 49-52
- [12] Beasley N J, Prevo R, Banerji S, et al. Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer [J]. Cancer Res, 2002, 62(5): 1315-1320
- [13] 钱桂生. 肺癌不同病理类型发病率的变化情况及其原因 [J]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2011, 04(1): 1-6
- [14] Qian Gui-sheng. The incidence and reasons for the changes of different pathological types of lung cancer [J]. Chinese Journal Of Lung Disease(Electronic Edition), 2011, 04(1): 1-6
- [15] Mitsudomi T, Yatabe Y. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth

- factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer[J]. Cancer Sci, 2007, 98(12): 1817-1824
- [13] Gupta G P, Nguyen D X, Chiang A C, et al. Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis [J]. Nature, 2007, 446(7137): 765-770
- [14] 宋纪宁, 徐卫国. 环氧合酶-2 和肿瘤的关系[J]. 中国医药, 2007, 2(5): 318-320
- Ning Ji-ning, Xu Wei-guo. Cyclooxygenase-2 and tumor relations[J]. China Medicine, 2007. 2(5): 318-320
- [15] 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
- [16] Van Hattem W A, Brosens L A, Marks S Y, et al. Increased cyclooxygenase-2 expression in juvenile polyposis syndrome[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2009, 7(1): 93-97
- [17] Hosomi Y, Yokose T, Hirose Y, et al. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) expression occurs frequently in precursor lesions of human adenocarcinoma of the lung[J]. Lung Cancer, 2000, 30(2):73-81
- [18] Kilic A, Schuchert M J, Luketich J D, et al. Efficacy of signal pathway inhibitors alone and in combination with Cisplatin varies between human non-small cell lung cancer lines[J]. J Surg Res, 2009, 154(1): 9-12
- [19] Masferrer J L, Leahy K M, Koki A T, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors [J]. Cancer Res, 2000, 60(5): 1306-1311
- [20] Chung L Y, Tang S J, Sun G H, et al. Galectin-1 promotes lung cancer progression and chemoresistance by upregulating p38 MAPK, ERK, and cyclooxygenase-2[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(15):4037-4047
- [21] Su J L, Shih J Y, Yen M L, et al. Cyclooxygenase-2 induces EP1- and HER-2/Neu-dependent vascular endothelial growth factor-C up-regulation: a novel mechanism of lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma[J]. Cancer Res, 2004, 64(2): 554-564
- [22] Jackson DG. New molecular markers for the study of tumor lymphangiogenesis[J]. Anticancer Res, 2001, 21(6B): 4279-4283
- [23] Nwogu C E, Endamuri S, Tan W, et al. Lung cancer lymph node micrometastasis detection using real-time polymerase chain reaction: correlation with vascular endothelial growth factor expression [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2013, 145(3): 702-708
- [24] Matsumoto M, atsugoe S, Okumura H, et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor-C correlates with lymph node micrometastasis in submucosal esophageal cancer [J]. J Gastrointest Surg, 2006, 10(7): 1016-1022
- [25] Arigami T, Natsugoe S, Uenosono Y, et al. Vascular endothelial growth factor-C and -D expression correlates with lymph node micrometastasis in pN0 early gastric cancer [J]. J Surg Oncol, 2009, 99(3): 148-153
- [26] Liu H, Yang Y, Xiao J, et al. COX-2-mediated regulation of VEGF-C in association with lymphangiogenesis and lymph node metastasis in lung cancer[J]. Anat Rec (Hoboken), 2010, 293(11): 1838-1846
- [27] Xin X, Majumder M, Girish G V, et al. Targeting COX-2 and EP4 to control tumor growth, angiogenesis, lymphangiogenesis and metastasis to the lungs and lymph nodes in a breast cancer model[J]. Lab Invest, 2012, 92(8): 1115-1128
- [28] Schmid K, Birner P, Gravenhorst V, et al. Prognostic value of lymphatic and blood vessel invasion in neuroendocrine tumors of the lung[J]. Am J Surg Pathol, 2005, 29(3): 324-328
- [29] Cursiefen C, Schlotzer-Schrehardt U, Kuchle M, et al. Lymphatic vessels in vascularized human corneas: immunohistochemical investigation using LYVE-1 and podoplanin [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(7): 2127-2135

(上接第 6569 页)

- [12] Mittal S, Ahern L, Flaster E, et al. Selfassessed physical and mental function of haemodialysis patients [J]. Nephrology Dialysis Transplantation, 2001, 16(7): 1387-1394
- [13] 周晓娟, 赵庆华, 刘丽萍. 维持性血液透析患者症状负担与生活质量的相关性研究[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(5): 464-467
- Zhou Xiao-juan, Zhao Qing-hua, Liu Li-ping. Correlation between symptom burden and quality of life in hemodialysis patients [J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2013, 35(5): 464-467
- [14] 热娜, 赵新, 张豫, 等. 血液透析和腹膜透析患者的生命质量对比及影响因素研究[J]. 中国全科医学, 2013, 16(2): 157-160
- Re Na, Zhao Xin, Zhang Yu, et al. QOL Comparison between Hemodialysis and Peritoneal Dialysis Patients and Its Influencing Factors[J]. Chinese General Practice, 2013, 16(2): 157-160
- [15] McCann K, Boore J. Fatigue in persons with renal failure who require maintenance haemodialysis [J]. Journal of Advanced Nursing, 2000, 32: 1132-1142
- [16] Painter P, Ward K, Nelson RD. Self-reported physical activity in patients with end stage renal disease [J]. Nephrology Nursing J, 2011, 38(2): 139-148
- [17] De Moura Reboredo M, Henrique DMN, De Souza Faria R, et al. Exercise training during hemodialysis reduces blood pressure and increases physical functioning and quality of life [J]. Artif Organs, 2010, 34(7): 586-593
- [18] Malagoni AM, Catizone L, Mandini S, et al. Acute and long-term effects of an exercise program for dialysis patients prescribed in hospital and performed at home[J]. J Nephrol, 2008, 21(6): 871-878
- [19] Jhamb M, Weisbord SD, Steel JL, et al. Fatigue in patients receiving maintenance dialysis: a review of definitions, measures, and contributing factors[J]. Am J Kidney Dis, 2008, 52(2): 353