

选择性COX-2抑制剂联合顺铂对肺癌新生血管的影响

魏 慧¹, 张 卿²

(1. 内蒙古自治区人民医院 呼吸与危重症医学科, 内蒙古 呼和浩特 010017; 2. 内蒙古医科大学附属医院 呼吸内科)

摘要: **目的:** 选择性环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)抑制剂尼美舒利(nimesulide, NIM)联合顺铂(cisplatin, CDDP)对于肺癌A549裸鼠动物模型中肿瘤新生血管的影响。**方法:** (1)培养肺癌A549细胞, 构建肺癌A549裸鼠移植瘤模型; (2)药物干预, 对照组, 尼美舒利组, 顺铂组, 尼美舒利与顺铂联合组, 依据随机数字表法将研究对象分为4组每组8只, 观察一般状态; (3)用免疫组化检测肺癌A549裸鼠移植瘤内新生血管因子, 血管转换生长因子TGF- β 、环氧合酶COX-2、碱性成纤维细胞生长因子bFGF, 以明确尼美舒利单独或者联合顺铂对肺癌A549裸鼠移植瘤新生血管的影响及其机制。**结果:** (1)成功构建肺癌A549裸鼠移植瘤模型, 裸鼠背部皮下形成圆形、椭圆形、不规则形结节, 无裸鼠建模死亡; (2)NIM+DDP组对肿瘤的抑制最强, 抑瘤率最大($P < 0.001$), 有明显差异, 有统计学意义; (3)NIM+DDP组的bFGF、TGF- β 1的阳性表达最弱, NIM+DDP组和DDP组的阳性表达比较, ($P < 0.001$), 有统计学意义; (4)COX-2阳性表达呈对照组 > NIM组 > DDP组 > NIM+DDP组。**结论:** (1)选择性COX-2抑制剂联合顺铂对肺肿瘤的生长有抑制作用, 抑瘤率明显高于顺铂单药组; (2)选择性COX-2抑制剂联合顺铂对新生血管因子bFGF、TGF- β 1、COX-2表达的抑制效果更显著, 对肺癌A549细胞裸鼠移植瘤的生长的抑制更显著。

关键词: 肺肿瘤; 血管内皮生长因子; 新生血管

中图分类号: R734.1

文献标识码: A

文章编号: 2095-512X(2020)06-0565-05

COX-2 INHIBITORS IN COMBINATION WITH CISPLATIN FOR LUNG CANCER RESEARCH PROGRESS OF ANGIOGENESIS

WEI Hui, ZHANG Qing

(Critical Care Medicine and Respiratory Medicine, People's Hospital of Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010017 China)

Abstract: Objective: Effect of selective cyclooxygenase-2 (cox-2) inhibitor Nimesulide (NIM) combined with Cisplatin (CDDP) on tumor neovascularization in A549 nude mouse model of lung cancer. **Methods:** (1) cultured A549 cells and established A549 lung xenografts in nude mice model; (2) intervention, control group, nimesulide group, cisplatin group, nimesulide + cisplatin group, n = 8, to observe the clinical signs; (3) To specify the effect and mechanism of nimesulide alone or in combination with cisplatin on A549 lung cancer xenograft tumor angiogenesis, we detected A549 lung cancer xenograft tumor angiogenesis factor, vascular transforming growth factor (TGF- β 1), cyclooxygenase(COX-2), and basic fibroblast growth factor (bFGF) in immunohistochemistry. **Results:** (1) We constructed A549 lung cancer xenografts in nude mice successfully, formed a round, oval, irregular-shaped nodules subcutaneously; (2) NIM could inhibit the growth of A549 lung cancer cells in nude mice; (3) NIM + DDP group and the positive expression of DDP group have significant differences ($P < 0.001$); (4) Cox-2 positive expression in the control group > NIM group > DDP group > NIM + DDP group. **Conclusion:** (1) Selective cox-2 inhibitors combined with cisplatin can inhibit the growth of lung tumors, and the inhibitory rate is significantly higher than that of single drug; (2) The selective COX-2 inhibitors in combination with cisplatin showed more significant inhibitory effect on the angiogenesis and A549 cell xenografts tumor in nude mice.

Key words: lung neoplasms; vascular endothelial growth factors; angiogenesis

收稿日期: 2020-06-09; 修回日期: 2020-10-13

作者简介: 魏慧(1984-), 女, 内蒙古自治区人民医院呼吸与危重症医学科主治医师。

通讯作者: 张卿, 主任医师, E-mail: fczhangqing@126.com 内蒙古医科大学附属医院呼吸内科, 010050

任何肿瘤的生长和转移都依赖于血液供应^[1], 肿瘤血供丰富, 营养充分, 导致肿瘤快速生长、恶化、转移。血管新生依赖于促血管生长因子, 目前促进血管新生的生长因子主要有 bFGF、COX-2、TGF-β1 等, 它们能促进血管内皮细胞分裂增殖^[2], 诱导肿瘤血管生成。肺癌是我国患病率最高的恶性肿瘤^[3], 其中非小细胞肺癌最多见^[4], 约 75%~80%。

本研究前期实验表明: COX-2 在肺腺癌中高表达, 并可促进肺癌细胞生长与增殖^[5]。目前, 国内外研究表明^[6,7], 非甾体抗炎药(NSAID)有抗肿瘤的作用, 而且有协同传统化疗药物发挥抗肿瘤作用。尤其选择性 COX-2 抑制剂因其副作用小, 已被应用于结肠癌、直肠癌的临床实验中^[8]。

本研究旨在探讨选择性 COX-2 抑制剂联合顺铂的抗肿瘤作用, 为肺癌提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人肺癌细胞株 A549, 购买于中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所。试验动物: 4 周龄雌性 BALB/C 裸鼠 32 只, 体重 16~18g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司【试验裸鼠许可证号 SCXK(京 2012-0001)】。

1.2 测量瘤重、对肺癌 A549 裸鼠移植瘤组织内血管生长因子测定

瘤重抑制率=(对照组移植瘤重-用药组瘤重)/对照组瘤重 × 100%; 免疫组化检测肿瘤组织内 bFGF、COX-2、TGF-β1 血管生长因子。

1.3 结果判定

应用免疫组织化学和形态计量方法, 用 CD31

标记微血管, 置于显微镜下, 计数采用微血管金标准法, COX-2 阳性染色定位于胞质和胞膜染色, 呈棕黄色着色, b-FGF、TGF-β 阳性染色定位于胞浆/胞质染色, 呈棕黄色弥漫着色。每个标本切 4 张片子进行染色, 利用阳性细胞数评定。阳性细胞数评定法^[9]: 采用 9 分评分制, 按照阳性细胞率和染色强度分别计分。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。正态性检验采用单样本 K-S 拟合优度法。计量资料以表示, 两样本间比较采用 t 检验。多个样本间不同时间点的比较采用重复测量资料的方差分析, 计数资料以 (n, %) 表示, 数据间比较采用 χ² 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建肺癌 A549 裸鼠移植瘤模型

裸鼠荷瘤过程顺利, 生长状态较好。移植瘤生长过程中, 开始裸鼠背部皮下形成圆形、椭圆形、不规则形结节, 触摸偏硬, 早期肿瘤呈灰白色, 表面光滑, 之后肿瘤逐渐增大。荷瘤后第 8 天开始用药, 裸鼠生长状态良好。

2.2 NIM 单独以及联合 DDP 对肺癌 A549 裸鼠移植瘤生长的影响

用药治疗后测量肺癌 A549 裸鼠移植瘤的瘤重变化, 第 22 天处死裸鼠剥离移植瘤, 计算肿瘤瘤重抑制率。NIM+DDP 组分别与 NIM 组、DDP 组比较, NIM+DDP 组瘤重抑制率最强 (P<0.001), 总体之间比较 F 值 32.264 (见表 1)。

表 1 用药结束后各组裸鼠移植瘤瘤重和瘤重抑制率(̄x±s)

Tab.1 Tumor weight and tumor weight inhibition rate of transplanted nude mice in each group after treatment (̄x±s)

Group	Tumor weight(g)	inhibit rate of tumor weigh(%)
Normal control	1.11 ± 0.18	
NIM	1.01 ± 0.12	9.91
DDP	0.73 ± 0.07	34.23
NIM+DDP	0.58 ± 0.06	47.75
F	32.264	
P	<0.001	

注: NIM 组与 DDP 组比较, P<0.001; NIM 组与 NIM+DDP 组比较, P<0.001; DDP 组与 NIM+DDP 组比较, P<0.001。

2.3 NIM 单独以及联合 DDP 对肺癌 A549 裸鼠移植瘤细胞 COX-2、bFGF、TGF-β1 蛋白表达的影响

2.3.1 免疫组化测定 COX-2 在各组肺癌 A549 移植

瘤中的表达 COX-2 阳性染色定位于胞质和胞膜染色, 呈棕黄色着色, 每个标本切 4 张片子进行染色, 利用阳性细胞数评定。NIM+DDP 组分别与对照组、

NIM组、DDP组比较($P < 0.001$), COX-2阳性表达呈 间比较 χ^2 值为45.486(见表2,图1)。
对照组 > NIM组 > DDP组 > NIM+DDP组。总体之

表2 COX-2在各组肺癌A549移植瘤中的表达
Tab.2 Expression of COX-2 in lung cancer A549 transplanted tumor in each group

Group	COX-2			
	-	+	++	+++
Normal control	6	5	6	15
NIM	7	7	13	5
DDP	10	15	2	5
NIM+DDP	20	6	5	1
χ^2	45.486			
P	<0.001			

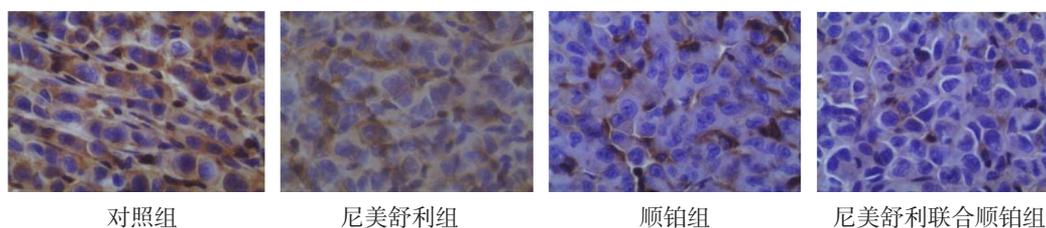


图1 COX-2在肺癌A549裸鼠移植瘤细胞中的蛋白表达情况(免疫组化40×)

Fig.1 Protein expression of COX-2 in xenograft cells of lung cancer A549 nude mice (Immunohistochemistry 40×)

2.3.2 免疫组化测定b-FGF在各组肺癌移植瘤中的表达 每个标本切4张片子进行染色,利用阳性细胞数评定。b-FGF在各组肺癌A549移植瘤中的阳性表达呈对照组 > NIM > DDP > NIM+DDP;而对照组与NIM组的阳性表达, ($P > 0.05$),无统计学意

义。NIM+DDP与DDP组、对照组、NIM组的阳性表达($P < 0.001$)。四组之间总体比较 χ^2 值为44.238(见表3、图2)。b-FGF阳性染色定位于胞浆/胞质染色,呈棕黄色弥漫着色。NIM+DDP组的阳性表达最弱(见图2)。

表3 b-FGF在各组肺癌A549移植瘤中的表达
Tab.3 Expression of b-FGF in lung cancer A549 transplanted tumor in each group

Group	b-FGF			
	-	+	++	+++
Normal control	3	5	10	14
NIM	5	6	8	13
DDP	12	10	5	5
NIM+DDP	23	5	3	1
χ^2	44.238			
P	<0.001			

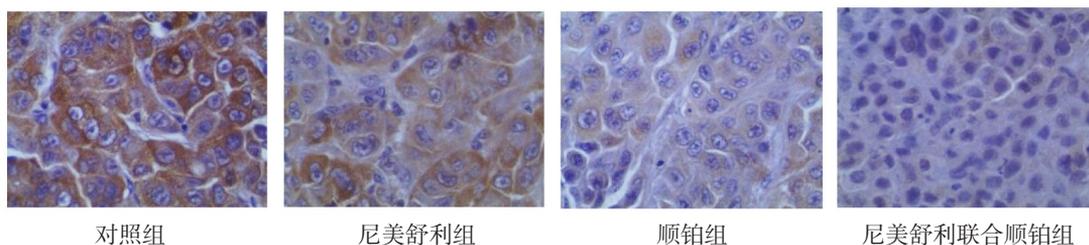


图2 b-FGF在肺癌A549裸鼠移植瘤细胞中的蛋白表达情况(免疫组化40×)

Fig.2 b-FGF-expression in lung cancer A549 xenografts in each group (Immunohistochemistry 40×)

2.3.3 TGF-β 免疫组化测定在各组肺癌移植瘤中的表达 每个标本切4张片子进行染色,利用阳性细胞数评定。TGF-β在各组肺癌 A549 移植瘤中的阳性表达呈对照组 > NIM > DDP > NIM+DDP;而对照组与 NIM 组的阳性表达, (P>0.05),无统计学意

义。NIM+DDP 与 DDP 组、对照组、NIM 组的阳性表达 (P<0.001)。四组之间总体比较 χ² 值为 42.715 (见表4,图3)。TGF-β 阳性染色定位于胞浆/胞质染色,呈棕黄色弥漫着色。NIM+DDP 组的阳性表达最弱(见图3)。

表4 TGF-β在各组肺癌A549移植瘤中的表达
Tab.4 TGF- expression in lung cancer A549 xenografts in each group

Group	TGF-β1			
	-	+	++	+++
Normal control	3	5	9	15
NIM	5	5	6	16
DDP	10	9	8	5
NIM+DDP	22	5	3	2
χ ²	42.715			
P	<0.001			

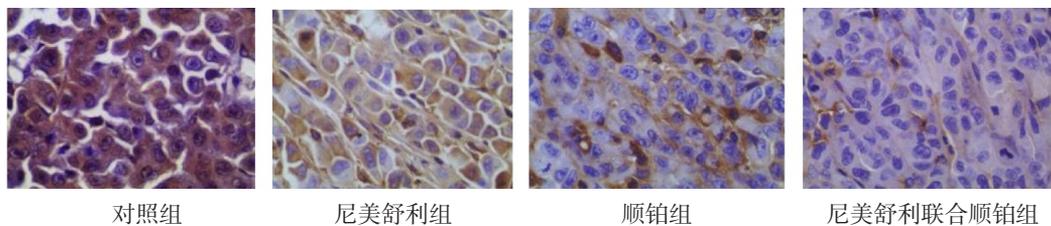


图3 TGF-β1 在肺癌A549裸鼠移植瘤细胞中的蛋白表达情况(免疫组化40×)

Fig.3 TGF-β1-Expression of in lung cancer A549 xenografts in each group (Immunohistochemistry 40)

3 讨论

肿瘤新生血管形成的一系列过程是在新生血管调节因子的严密调控下,使得肿瘤细胞自体分泌的生长因子然后作用于它自身的生长受体,从而形成自分泌循环,刺激新生血管的不断增殖,促使肿瘤细胞无休止的生长与浸润^[10]。

本研究前期实验表明:COX-2在肺腺癌中高表达,并可促进肺癌细胞生长与增殖^[11]。另有研究表明,bFGF^[12],能直接诱导血管生成,肿瘤细胞产生的bFGF还可以引起TGF-β1表达上调,导致缺氧诱导因子减弱,且三者表达时微血管密度(microvessel density, MVD)显著增加。COX-2是前列腺素合成过程中的限速酶^[13],正常生理状态未见其表达,在血管生长因子分泌过多、癌基因刺激下,机体COX-2表达增强,并通过前列腺素、血栓素途径,刺激血管生成增强,抑制内皮细胞凋亡。本实验结果表明:尼美舒利对肺癌 A549 裸鼠移植瘤有抑制作用,尼美舒利与顺铂联合对肿瘤生长的抑制作用更强,推测,尼美舒利有协同顺铂起到抑制肺肿瘤的生长的

作用。

本实验免疫组化结果显示,COX-2在尼美舒利组与对照组的阳性表达有明显差异(P<0.05),肺癌中COX-2的表达可被选择性COX-2抑制剂尼美舒利所抑制。我们免疫组化结果还表明,尼美舒利顺铂联合组COX-2的表达分别与尼美舒利组、顺铂组、对照组比较,有显著差异(P<0.05),有统计学意义。我们前期体外实验研究也得出相同的结果。国外研究表明:在卵巢癌研究中^[14],发现选择性COX-2抑制剂可显著增强肿瘤细胞对顺铂诱导凋亡的敏感性,二者联合时明显降低卵巢癌细胞株的增殖,降低顺铂的用量。

bFGF^[15]能直接诱导血管生成。TGF家族是一类结构、功能相关的多肽生长因子,TGF-β1是其家族成员之一,它的作用是促进VEGF以及bFGF的形成,从而影响肿瘤细胞的增殖、分化^[16]。

本研究免疫组化结果显示:肺癌 A549 裸鼠移植瘤细胞均有b-FGF、TGF-β1阳性表达,两个因子阳性染色均位于胞浆,呈棕黄色弥漫着色,表明尼美舒利单独使用对b-FGF、TGF-β1的下调作用不

明显,当与顺铂联合作用于肺癌 A549 裸鼠移植瘤时,明显抑制 b-FGF、TGF- β 1 的表达,且抑制效果好于尼美舒利组以及顺铂单药组。有研究表明^[17]:选择性 COX-2 抑制剂通过下调胆道肿瘤细胞 VEGF、b-FGF 的蛋白表达起到抑制胆道肿瘤生长的作用。在非小细胞肺癌及其周围基质细胞中,COX-2、TGF- β 1 蛋白表达均增加,且瘤内微血管密度增加,选择性 COX-2 抑制剂通过抑制 COX-2 的表达下调 TGF- β 1 的蛋白表达,减少微血管的产生,进而抑制肺癌细胞的增殖与生长^[18]。

综上所述,选择性 COX-2 抑制剂有抑制肿瘤生长作用,联合化疗药物可增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,即增强顺铂对肺癌的细胞毒作用,从而更好地发挥抗肿瘤效应,在肺癌的治疗中有重要意义,为肺癌的综合治疗提供了新的方案。

4 结论

选择性 COX-2 抑制剂联合顺铂对肺癌的生长有抑制作用,抑瘤率明显高于顺铂单药组;选择性 COX-2 抑制剂增强顺铂对肺癌的抑瘤作用,可能通过下调肺癌新生血管因子 COX-2、bFGF、TGF- β 1 的蛋白表达,进而抑制肺癌血管新生,达到协同抗肿瘤的作用。选择性 COX-2 抑制剂联合顺铂将有可能为肺癌综合治疗提供新思路。

参考文献

- [1] Shackelford DB, Abt E, Gerken L, et al. LKB1 inactivation dictates therapeutic response of non-small cell lung cancer to the metabolism drug phenformin[J]. *Cancer cell*, 2013; **23**(2): 143-158
- [2] Luo H, Chen Z, Jin H, et al. Cyclooxygenase-2 up-regulates vascular endothelial growth factor via a protein kinase C pathway in non-small cell lung cancer[J]. *Exp Clin Cancer Res*, 2011; **30**(1): 6
- [3] Siegl RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016; **66**(1): 7-30
- [4] Besse B, Adjei A, Baas P, et al. 2nd ESMO consensus conference on lung cancer: Non-small cell lung cancer first-line/second and further lines of treatment in advanced disease [J]. *Ann Oncol*, 2014; **25**(8): 1475-1484
- [5] 贺利平, 张卿. 尼美舒利联合顺铂对肺癌增殖与凋亡的影响及机制研究[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2012; **39**(1): 76-79
- [6] Fonsatti E, Nicolay HJ, Altomonte M, et al. Targeting cancer vasculature via endoglin/CD105: a novel antibody-based diagnostic and therapeutic strategy in solid tumours[J]. *Cardiovascular research*, 2010; **86**(1): 12-19
- [7] Yuan A, Lin CY, Chou CH, et al. Functional and structural characteristics of tumor angiogenesis in lung cancers overexpressing different VEGF isoforms assessed by DCE- and SSCE-MRI[J]. *PLoS One*, 2011; **6**(1): e16062
- [8] Slattery ML, Lundgreen A, Herrick JS, et al. Genetic variation in bone morphogenetic protein and colon and rectal cancer risk[J]. *Int J Cancer*, 2012; **130**(3): 653-664
- [9] Jadus MR, Natividad J, Mai A, et al. Lung cancer: a classic example of tumor escape and progression while providing opportunities for immunological intervention[J]. *Clin Dev Immunol*, 2012: 160724
- [10] Rangel-Corona R, Corona-Ortega T, Soto-Cruz I, et al. Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor, 2010; **50**(3): 273-277
- [11] Jadus MR, Natividad J, Mai A, et al. Lung cancer: a classic example of tumor escape and progression while providing opportunities for immunological intervention[J]. *Clin Dev Immunol*, 2012: 160724
- [12] Rolfo C, Giovannetti E, Hong DS, et al. Novel therapeutic strategies for patients with NSCLC that do not respond to treatment with EGFR inhibitors[J]. *Cancer Treat Rev*, 2014; **40**(8): 990-1004
- [13] Santoro A, Bufo P, Russo G, et al. Expression and clinical implication of cyclooxygenase-2 and e-cadherin in oral squamous cell carcinomas[J]. *Cancer Biol Ther*, 2015: 1071741
- [14] Kaur J, Sanyal SN. Diclofenac, a selective COX-2 inhibitor, inhibits DMH-induced colon tumorigenesis through suppression of MCP-1, MIP-1 α and VEGF[J]. *Mol Carcinog*, 2011; **50**(9): 707-718
- [15] Chatterjee S, Wiczorek C, Schittle J, et al. Transient antiangiogenic treatment improves delivery of cytotoxic compounds and therapeutic outcome in lung cancer. 2014; **74**(10): 2816-2824
- [16] Shaw J, Chen B, Huang WH, et al. The small-molecule TNF modulator, UTL-5g, reduces side effects induced by cisplatin and enhances the therapeutic effect of cisplatin in vivo[J]. *J Exp Ther Oncol*. 2011; **9**(2): 129-37
- [17] Shen J1, He J, Tang X. Role of autophagy on cobrotoxin induced cell death of A549[J]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2013; **16**(7): 339-344
- [18] Arjaans M, Schroder CP, Oosting SF, et al. VEGF pathway targeting agents, vessel normalization and tumor drug uptake: from bench to bedside[J]. *Oncotarget*, 2016; **7**(16): 21247-21258