



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.09.010
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.09.010
Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(9):1282-1290.

· 基础研究 ·

COX-2 特异性抑制剂 NS-398 对胰腺癌生长及肿瘤血管生成影响

张旭, 葛春林

(中国医科大学附属第一医院 胰腺外科, 辽宁 沈阳 110001)

摘要

目的: 探讨 COX-2 特异性抑制剂 NS-398 对胰腺癌生长的影响及其机制。

方法: 分别用 qRT-PCR 与 Western blot 检测不同人胰腺癌细胞株 (BxPC-3、SW1990、Capan-2、Aspc-1、PANC-1) 中 COX-2 及 VEGF 表达, 并用 MTT 法检测 NS-398 在体外对人胰腺癌细胞增殖抑制作用; 用体外实验最敏感细胞株建立裸鼠胰腺癌原位移植瘤模型, 并随机将荷瘤鼠分为实验组和对照组, 分别用 NS-398 与生理盐水处理, 比较两组移植瘤的生长情况, 并检测肿瘤组织中 COX-2、VEGF 蛋白表达及肿瘤微血管密度 (MVD)。

结果: 各胰腺癌细胞中均有 COX-2 及 VEGF 表达, NS-398 呈时间与浓度依赖性抑制各胰腺癌细胞的体外增殖, 其中 Bxpc-3 细胞 COX-2 与 VEGF 表达量最高, 且对 NS-398 最敏感。用 Bxpc-3 细胞建立原位移植瘤的实验组与对照组裸鼠比较, 平均肿瘤体积明显减小 ($20.215 \pm 2 \text{ mm}^3$ vs. $204.444 \pm 4 \text{ mm}^3$), 瘤组织中 COX-2 与 VEGF 表达及 MVD 均明显降低 (均 $P < 0.05$)。

结论: NS-398 对胰腺癌的生长有抑制作用, 其机制可能是通过 COX-2 途径降低 VEGF 基因表达从而抑制肿瘤血管生成有关。

关键词

胰腺肿瘤; 环氧合酶 2; 血管内皮生长因子类; 异种移植模型抗肿瘤试验
中图分类号: R735.9

Influence of COX-2 specific inhibitor NS-398 on growth and tumor angiogenesis of pancreatic cancer

ZHANG Xu, GE Chunlin

(Department of Pancreatic Surgery, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract

Objective: To investigate the influence of COX-2 specific inhibitor NS-398 on growth of pancreatic cancer and its mechanism.

Methods: The expressions of COX-2 and VEGF in different human pancreatic cancer cell lines (BxPC-3, SW1990, Capan-2, Aspc-1, PANC-1) were determined by qRT-PCR and Western blot respectively, and the inhibitory effects of NS-398 on proliferation of each pancreatic cancer cell line in vitro were measured by MTT assay. Orthotopic transplantation models of pancreatic cancer using the most sensitive cell line identified by in vitro

基金项目: 辽宁省高等学校科学研究一般项目立项基金资助项目 (L2014294)。

收稿日期: 2016-03-11; **修订日期:** 2016-08-08。

作者简介: 张旭, 中国医科大学附属第一医院硕士研究生, 主要从事肝胆胰疾病方面的研究。

通信作者: 葛春林, Email: gechunlin@139.com

tests were established in nude mice, and then the tumor-bearing mice were randomly divided into experimental group and control group, which underwent treatment with NS-398 or normal saline respectively. The growths of the tumor xenografts in the two groups were compared and the expressions of COX-2 and VEGF protein as well as microvessel density (MVD) in the tumor tissues were detected.

Results: All the pancreatic cancer cell lines presented COX-2 and VEGF expressions with varying degrees; NS-398 inhibited the in vitro proliferation of all the pancreatic cancer cells in time- and concentration-dependent manner, and among them, Bxpc-3 cells had the highest expression levels of COX-2 and VEGF, and were also most sensitive to NS-398. After establishment of orthotopic pancreatic cancer model with Bxpc-3 cells, in mice in experimental group compared with those in control group, the average tumor volume was significantly reduced ($20.215 \pm 2 \text{ mm}^3$ vs. $204.444 \pm 4 \text{ mm}^3$), and the expression levels of COX-2 and VEGF as well as MVD were all significantly reduced (all $P < 0.05$).

Conclusion: NS-398 has inhibitory effect on growth of pancreatic cancer, and the mechanism may be related to its decreasing VEGF gene expression via COX-2 pathway and thereby reducing tumor angiogenesis.

Key words

Pancreatic Neoplasms; Cyclooxygenase 2; Vascular Endothelial Growth Factors; Xenograft Model Antitumor Assays

CLC number: R735.9

胰腺癌恶性度高,预后差,对于该肿瘤晚期的治疗目前仍没有好的治疗方法^[1],因此探索胰腺癌全新治疗方法具有重要的临床意义。环氧合酶二(cyclooxygenase-2, COX-2)^[2],可能在肿瘤发生发展等病理状态下诱导性表达^[3]。已有研究^[4]表明,COX-2的表达高低与肿瘤微血管生成有关。血管内皮生长因子(VEGF)是肿瘤血管生成的关键生长因子^[5]。而肿瘤的生长依赖于足够的血液供应,大量研究^[6-8]表明,COX-2、VEGF与恶性肿瘤的发生有密切关系。NS-398是一种选择性COX-2抑制剂,且已被发现能够抑制多种肿瘤细胞活性^[9],但在胰腺癌体内动物实验中的研究较少^[10]。本研究旨在检测出多种胰腺癌细胞均有COX-2及VEGF表达基础上,观察NS-398在体外对细胞生长活力影响,选出合适细胞株构建出人胰腺癌裸鼠原位移植瘤模型,在体内进一步研究NS-398对人胰腺癌生长和血管生成影响,初步探讨其抗肿瘤机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

细胞系:人胰腺癌细胞株Bxpc-3、SW1990、Capan-2、Aspc-1、PANC-1购自ATCC。胎牛血清购于克拉克;DMEM高糖培养基、1640培养基购自Gibco公司。选择性COX-2抑制剂NS-398购

自Sigma公司;兔鼠抗人COX-2、VEGF、MVD多克隆抗体购自美国Abcam公司。实验动物:BALB/C(nu/nu)裸小鼠30只购自北京维通利华实验动物技术有限公司。4周龄,雌性,13~16 g,分笼饲养于我校实验动物部屏障系统的洁净层流架内(SPF级)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人胰腺癌细胞株Bxpc-3、PANC-1培养于10%FBS的DMEM高糖培养液中,SW1990、Capan-1、Aspc-1培养于10%FBS的1640培养液中,置37℃、5%CO₂培养箱,3~4 d传代1次,取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 胰腺癌细胞株中COX-2与VEGF mRNA的检测 采用qRT-PCR法。TRIzol法提取各组细胞总RNA,用PrimeScript™RT Master Mix逆转录试剂盒将mRNA逆转录为cDNA。COX-2上、下游引物序列分别为5'-CCT GAG CAT CTA CGG TTT G-3'、5'-CAG TAT TAG CCT GCT TGT CT-3'产物为171 bp;VEGF上、下游引物序列分别为5'-CCC ACT GAG GAG TCC AAC A-3'、5'-CAA ATG CTT TCT CCG CTC T-3'产物为174 bp;以GAPDH作为内参照,其上、下游引物序列分别为5'-AGA AGG CTG GGG CTC ATT G-3'、5'-AGG GGC CAT CCA CAG TCT TC-3'产物为265 bp。PCR反应体系25 μL,其中SYBR®Premix Ex Taq™II 12.5 μL,上下游引物各1 μL,cDNA

2 μL , 灭菌蒸馏水 8.5 μL ; 循环参数: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 然后每个循环 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 退火延伸 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 40 个循环^[11]。反应结束后制作熔解曲线, 验证 PCR 产物的特异性。琼脂糖电泳验证产物片段大小。用目的基因 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值表示目的基因相对表达量。

1.2.3 胰腺癌细胞株中 COX-2 与 VEGF 蛋白的检测 提取总蛋白与上样缓冲液混合加热后上样, 电泳后转移到 PVDF 膜上, 1:400 兔鼠抗人 COX-2 抗体、1:500 兔鼠抗人 VEGF 抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 然后 1:5 000 羊抗兔 IgG/HRP 二抗室温 2 h, 充分洗涤后加入 ECL 工作液^[12], 用 Typhoon 多功能激光扫描成像系统扫描。Gel-pro 软件测量积分光密度 (IOD), 以目的基因条带与 GAPDH 条带积分光密度的比值为改基因相对表达量。

1.2.4 NS-398 对人胰腺癌细胞增殖的影响 采用 MTT 检测 NS-398 对人胰腺癌细胞株生长的影响。实验组加入 100 μL 不同浓度 NS-398, 终浓度分别为 12.5、25、50、75、100 $\mu\text{mol/L}$, 每浓度设 5 个复孔^[9], 分别培养 24、48、72 h 后于每孔中加入新鲜配制的 MTT 液 20 μL , 继续培养 4 h, 吸去孔内上清液, 每孔加入二甲亚砜 (DMSO) 150 μL , 振荡至结晶物充分溶解后, 在全自动酶标仪上 570 nm 波长处检测记录各孔吸光度 (OD) 值。计算细胞生长抑制率 (IR): $\text{IR}(\%) = (1 - \text{实验组 OD 值} / \text{对照组 OD 值}) \times 100\%$ ^[10]。

1.2.5 荷瘤裸鼠人胰腺原位移植瘤模型建立 收集对数生长期人胰腺癌 Bxpc-3 细胞, 计数将 1.5×10^8 个胰腺癌细胞悬液悬浮于 3 mL 完全培养基中带入 SPF 级手术室, 10% 水合氯醛 0.004 mL/g 腹腔注射麻醉裸鼠; 75% 酒精消毒皮肤, 沿左上腹切开约 1 cm 纵行切口, 进入腹腔后仔细分开胃脾之间薄膜, 带出脾脏, 暴露胰腺, 小心展平, 切勿损伤胰腺背膜, 用微量注射器浆悬浮胰腺癌细胞 100 μL (5×10^6 个细胞) 植入胰腺体尾部^[13], 以包膜向上鼓起, 脱离腺体表面无外漏为造模成功标准, 将胰腺及脾脏送回腹腔, 6-0 不可吸收外科缝线分层缝合腹膜及皮肤。以上所有操作均在佩戴外科手术放大镜下完成。术后自由进食饮水, 术后每日记录裸鼠的一般状况、手术并发症、死亡数、体质量, 肉眼观察并触诊腹部肿瘤的生长状况^[14]。

1.2.6 动物实验分组及处理方法 裸鼠 30 只造模后随机分为 2 组, 每组 15 只, 对照组 (术后 15 d 每隔 3 日腹腔注射生理盐水 0.2 mL), 实验组 (术

后 15 d 每隔 3 d 腹腔注射 NS-398 6 mg/kg)^[15]。连续给药 10 次, 每天检查和每 3 d 称体质量, 给药结束后自由活动 1 周处死动物解剖取出肿瘤观察大体形态, 收集肿瘤病灶以及所有可能发生侵袭、转移的脏器, 取出的肿瘤及其他脏器置于 4% 多聚甲醛中 4 度固定 24 h, 然后石蜡包埋。行 HE 染色观察各组裸鼠肿瘤的组织病理学改变。测量肿瘤长径 (A) 及短径 (B), 肿瘤体积按如下公式计算: 体积 (mm^3) = $A \times B^2 / 2$ 。计算抑瘤率: 抑瘤率 (%) = (对照组平均瘤体积 - 实验组平均瘤体积) / 对照组平均瘤体积 $\times 100\%$ 。记录治疗前及治疗后裸鼠体质量, 计算裸鼠体质量变化, 同时绘制动物体质量变化曲线^[16]。

1.2.7 免疫组化检测 COX-2 及 VEGF 蛋白表达及肿瘤微血管密度 (MVD) 按照武汉博士德生物技术有限公司 SABC 免疫组化试剂盒实验步骤说明进行免疫组化染色。阴性对照用 PBS 代替一抗。图片结果用 Image-Pro Plus 6.0 图像处理软件来进行分析积分光密度 (IOD)。MVD 测定: 根据 CD34 阳性情况判断 MVD^[17]。

1.3 统计学处理

用 SPSS 22.0 软件进行分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 单样本和组间行 *t* 检验, 组间比较采用双因素方差分析, COX-2、VEGF、MVD 之间采用 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 COX-2 与 VEGF mRNA 在人胰腺癌细胞株的表达

qRT-PCR 检测结果显示, BxPC-3、SW1990、Capan-2、Aspc-1、PANC-1 中 COX-2 mRNA 相对表达水平分别为 $1.000\ 0 \pm 0.032\ 2$ 、 $0.141\ 7 \pm 0.042\ 2$ 、 $0.561\ 7 \pm 0.093\ 1$ 、 $0.002\ 2 \pm 0.041\ 4$ 、 $0.003\ 7 \pm 0.031\ 2$, 差异有统计学意义 ($t = -3.396$, $P = 0.027$); BxPC-3、SW1990、Capan-2、Aspc-1、PANC-1 中 VEGF mRNA 相对表达水平分别为 $1.000\ 0 \pm 0.021\ 1$ 、 $0.319\ 7 \pm 0.035\ 6$ 、 $0.544\ 3 \pm 0.050\ 8$ 、 $0.405\ 4 \pm 0.065\ 1$ 、 $0.244\ 4 \pm 0.048\ 9$, 差异有统计学意义 ($t = -3.693$, $P = 0.021$) (图 1)。产物特异性经过溶解曲线验证, 经琼脂糖电泳鉴定产物片段长度符合引物扩增结果。

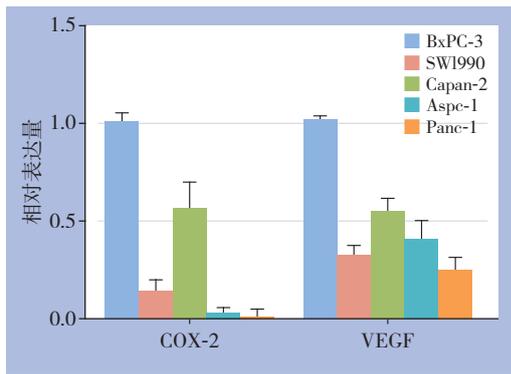


图1 不同胰腺癌细胞 COX-2 及 VEGF mRNA 相对表达量
Figure 1 Relative expression levels of COX-2 and VEGF mRNA in different pancreatic cancer cells

2.2 COX-2 与 VEGF 蛋白在人胰腺癌细胞株的表达

COX-2和VEGF蛋白的表达在和mRNA在人胰腺癌细胞株的表达趋势基本是一致的(图2)。人胰腺癌细胞BxPC-3、SW1990、Capan-2、Aspc-1、PANC-1中COX-2蛋白相对表达水平分别为1.591 0 ± 0.068 9、0.957 7 ± 0.070 1、0.897 2 ± 0.082 1、0.363 8 ± 0.022 4、0.392 3 ± 0.040 7, 差异有统计学意义 ($t=-3.343, P=0.029$)。VEGF蛋白相对表达水平分别为1.003 8 ± 0.029 1、0.636 5 ± 0.059 9、0.678 4 ± 0.043 4、0.465 7 ± 0.061 6、0.406 3 ± 0.058 8, 差异有统计学意义 ($t=-3.496, P=0.025$)。

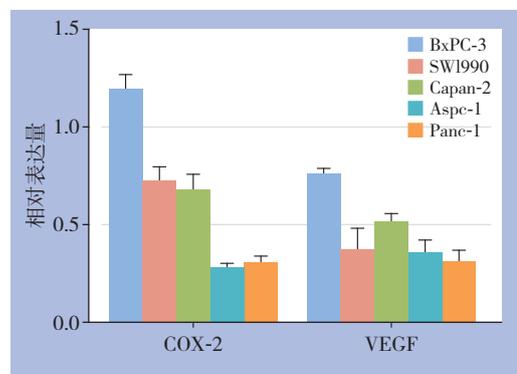
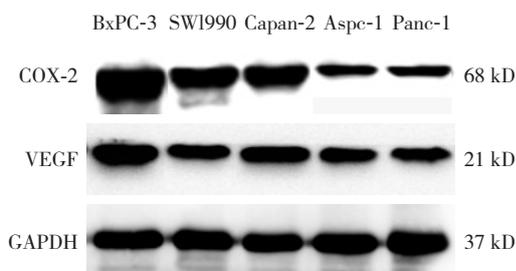


图2 不同胰腺癌细胞 COX-2 和 VEGF 蛋白相对表达量
Figure 2 Relative expression levels of COX-2 and VEGF protein in different pancreatic cancer cells

2.3 不同浓度 NS-398 对人胰腺癌细胞增殖的影响

NS-398分别处理人胰腺癌细胞 Bxpc-3、SW1990、Capan-2、Aspc-1、PANC-1 24、48、72 h后用MTT法测定其570 nm吸光度值(A),

发现NS-398对人胰腺癌细胞的增殖抑制作用呈时间、浓度依赖性,浓度在12.5~100 μmol/L时,随着浓度的增大和培养时间的延长吸光度值明显变小,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$) (图3)。

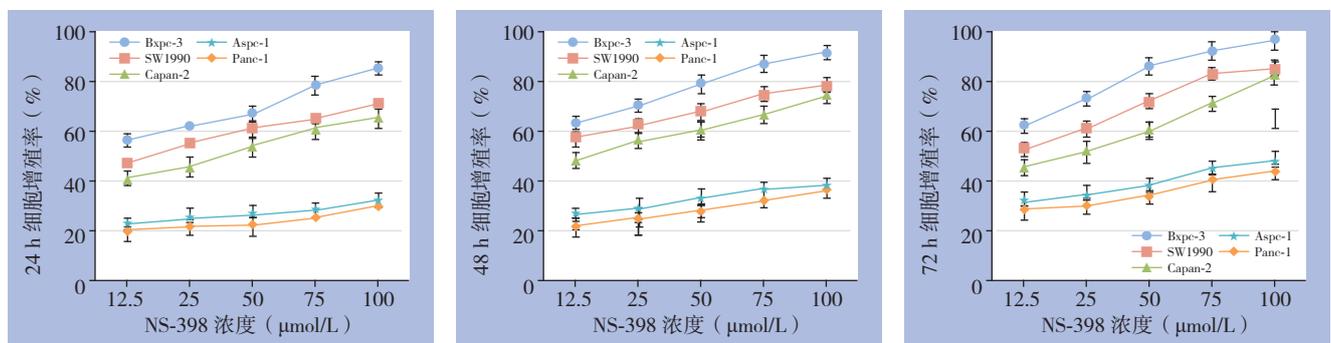


图3 NS-398 对不同胰腺癌细胞体外细胞增的影响
Figure 3 Effect of NS-398 on proliferation rate in different pancreatic cancer cells

2.4 造模后裸鼠及原位肿瘤生长情况

基于以上体外实验结果人胰腺癌细胞株 Bxpc-3高表达COX-2及VEGF, 且对NS-398相对最

敏感, 因此本研究选择该种细胞建立荷瘤裸鼠人胰腺原位移植瘤模型。造模后30只裸鼠术后第1天死亡1只可能为麻醉意外, 第2天死亡1只, 解剖可

见扩大的胃，疑为术后急性胃扩张死亡，其他裸鼠1周内进食饮水正常；对照组4周后出现活动力减弱，实验组状态良好；5周后对照组逐渐出现消瘦、体质量下降、皮下脂肪明显减少等恶病质生物学特性，实验组状态尚可。对照组14只原位接种6周后触及明显质硬包块，左上腹轻度隆起，实验组可能为打药干预后未触及明显包块。接种第52、54天对照组2只荷瘤鼠死亡，皆因肿瘤广泛转移至周围脏器及腹膜所致。接种后裸鼠体质量变化曲线如图4所示，对照组与实验组有统计学差异 ($P < 0.05$)。接种后第57天，对照组体质量持续下降，恶性肿瘤晚期症状较典型，实验组状态一般，处死荷瘤鼠解剖观察原位移植瘤的生长。在饲养期间实验组未发现裸鼠出现药物毒件反应。

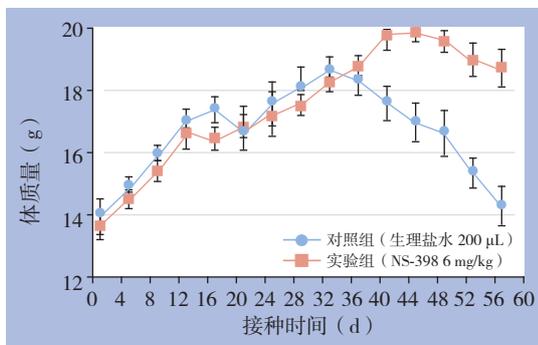


图4 两组裸鼠平均体质量变化

Figure 4 Changes in average body weight of the two groups of nude mice

2.5 肿瘤组织病理学观察

28只裸鼠25只胰腺均移植瘤生长，接种成功率89.28%，其中实验组肿瘤的平均体积 ($20.215 2 \pm 4.857 6$) mm^3 ，对照组为 ($204.444 4 \pm 14.140 8$) mm^3 ，平均抑瘤率达90.11%，差异有统

计学意义 ($t=57.539$, $P=0.000$)。病理学大体观察：原位移植瘤呈类圆形，表面凹凸不平，质较硬，表面可见滋养血管，无完整包膜，于周围组织分界不清，切面中心为灰白色，可见广泛浸润至腹膜和其他组织器官。肿瘤组织固定后行石蜡切片，HE染色后光镜下观察肿瘤组织的病理学变化：肿瘤细胞呈多边形，边界清楚，胞核大而圆，染色深异型性明显，可见病理性核分裂相；肿瘤细胞结节状生长，排列成实性巢片状结节，内有小的血窦，可见腺腔样结构，符合胰腺高分化腺癌 (图5)。

2.6 免疫组化分析 NS-398 对肿瘤组织 COX-2、VEGF 表达影响及 MVD 测定

COX-2和VEGF阳性染色为棕黄色，主要是胞浆着色，少数为核膜着色，呈弥漫性分布。图片经过Image-Pro Plus 6.0图像处理软件分析后，阳性细胞比例用IOD表示，COX-2及VEGF在对照组肿瘤组织中呈高表达，而实验组中COX-2 ($t=5.196$, $P=0.035$)、VEGF ($t=4.427$, $P=0.021$) 的表达水平均较对照组明显降低 (图6A-E)。VEGF与COX-2存在相关性 ($r=0.828$, $P=0.03$)。

肿瘤MVD测定：CD34抗体染色阳性的肿瘤组织新生血管内皮细胞被染成棕黄色，癌组织微血管形态不规则，部分血管无明显管腔，表现为内皮细胞簇，新生血管可分布在肿瘤任何位置 (图6E-F)。结果显示对照组MVD计数平均值为 27.4 ± 7.7 ，实验组MVD计数为 9.2 ± 1.4 ，实验组裸鼠肿瘤组织中MVD明显低于对照组 ($t=4.674$, $P=0.010$)。MVD与COX-2及VEGF均呈正相关 ($r=0.751$, $P=0.012$; $r=0.642$, $P=0.046$)。

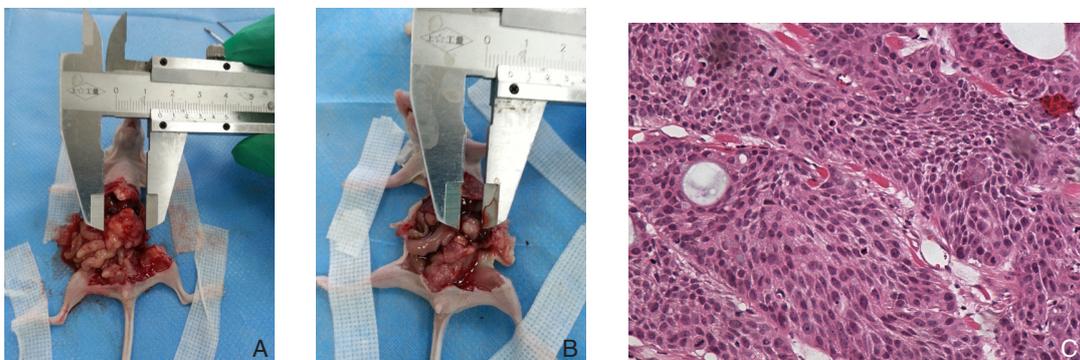


图5 裸鼠原位移植瘤的病理学观察 A: 对照组肿瘤大体形态; B: 实验组肿瘤大体形态; C: 移植瘤组织病理检测 (HE × 200)

Figure 5 Observation of orthotopic transplantation tumor of pancreatic cancer in nude mice A: Gross tumor shape in control group; B: Gross tumor shape in experimental group; C: Histopathological examination of xenograft tissue (HE × 200)

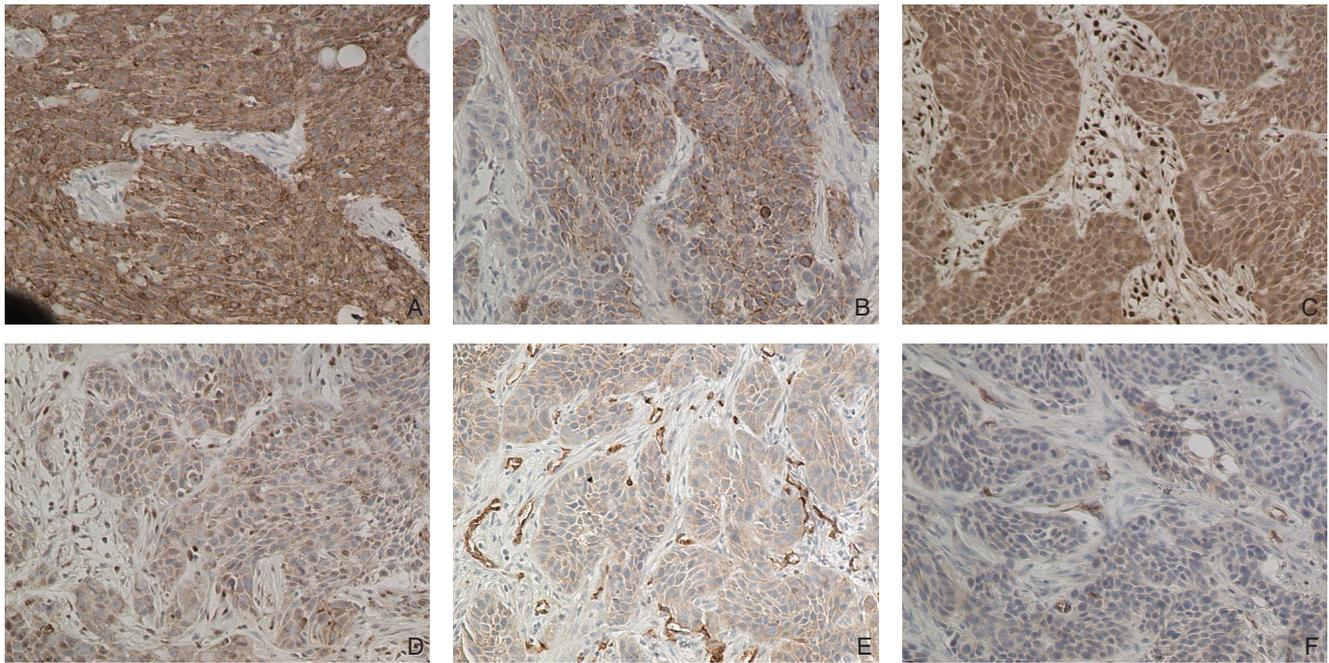


图6 免疫组化检测瘤组织中COX-2与VEGF表达及MVD($\times 200$) A: 对照组COX-2; B: 实验组COX-2; C: 对照组VEGF; D: 实验组VEGF; E: 对照组CD34; F: 实验组CD34

Figure 6 Immunohistochemical staining for COX-2 and VEGF expressions and MVD in xenograft tissues ($\times 200$) A: COX-2 expression in control group; B: COX-2 expression in experimental group; C: VEGF expression in control group; D: VEGF expression in experimental group; E: CD34 expression in control group; F: CD34 expression in experimental group

3 讨论

由于胰腺癌的早期临床表现隐匿,相当部分患者就诊时已属晚期,手术可切除率不高,所以化疗仍然是当今治疗胰腺癌的重要手段^[18]。但不论是单药化疗还是联合化疗,其治疗效果仍不能达到满意的程度^[19]。因此,胰腺癌的治疗根本改观有赖于新药的发现和治疗方案的改进^[20]。

近年来多项研究^[21]表明,人体在发生肿瘤后COX-2在肿瘤发生部位普遍高表达,而周边部位不表达或低表达。表明该基因的表达上调可能与肿瘤的发生可能有关。而肿瘤的生长需要一定的血供,新生的血管的长入是肿瘤生长、发展的基础和先决条件。相关研究^[22]已证实,COX-2的催化产物可参与肿瘤血管的新生,促进血管依赖实体瘤的不断生长和转移。VEGF是公认的直接作用于血管内皮细胞的生长因子,具有促进静脉血管通透性增加、血管内皮细胞不断分裂、增殖以及诱导新生血管形成等作用。肿瘤细胞中分泌的VEGF以自分泌及旁分泌方式刺激其血管生长。该基因已在多种肿瘤患者的血液检测到,且与患者预

后及分期有关。Ninomiya等^[23]研究证实结直肠癌COX-2表达的高低与VEGF及肿瘤微血管密度MVD表达密切相关。且这种现象已多种肿瘤动物模型中得到证实^[24]。

自抗血管生成疗法用于治疗癌症以来,已有十余种血管生成抑制剂不断的从实验室走向临床实验^[25],传统的NSAID的毒副作用主要由抑制COX-1所致。COX-2选择性抑制与传统NSAID比较,有效地降低胃肠道副作用,是一类新型、高效、低毒的抗血管生成药物。NS-398化学结构上属于甲磺酰苯胺类,为选择性COX-2抑制剂,对COX-1抑制很少,安全性可明显提高。相关研究^[26]表明,NS-398可以通过抑制COX-2及其mRNA的表达从而抑制多种肿瘤细胞的增殖。以上研究为肿瘤的预防和治疗提供了重要线索。一般认为COX-2抑制剂的抗肿瘤作用与其抑制COX-2的环氧合酶活性,减少前列腺素生成有关,而在人类胰腺癌中是否能够通过抑制COX-2的表达来发挥抗肿瘤效应目前尚有待大量研究证实。但已有研究^[27]表明,人胰腺癌中COX-2、VEGF的过度表达可能与胰腺癌的发生发展有关,于是本研究用实

时荧光定量PCR及Western blot观察了不同胰腺癌细胞中COX-2与VEGF mRNA相对表达量及蛋白表达水平。结果显示,在不同人胰腺癌细胞中均有COX-2及VEGF阳性表达,部分细胞,如Bxpc-3细胞系存在过度表达。

肿瘤对药物敏感的实验分为体内实验和体外实验两个阶段,体外实验是体内实验的基础^[28]。基于此,本研究通过MTT法体外观察了选择性COX-2抑制剂NS-398单独对胰腺癌细胞株的增殖抑制作用,发现在12.5~100 μM浓度范围内NS-398对人胰腺癌细胞的均有增殖抑制作用,且抑制程度随培养基中的NS-398浓度增加和时间延长而增强,COX-2表达强度越高,药物对细胞生长活力的抑制作用越强,其中以Bxpc-3该细胞株作用明显,因此可以认为COX-2可能是胰腺癌治疗的重要靶标之一^[29-30]。但到目前为止,选择性COX-2抑制剂抗胰腺肿瘤作用的分子机制仍不十分明确。由于VEGF是与肿瘤血管新生关系密切的生长因子,故笔者推断选择性COX-2抑制剂可能通过抑制胰腺癌细胞VEGF的产生从而影响肿瘤血管的生成,但有待于在体内做进一步研究以明确。Bxpc-3细胞是体外研究胰腺癌的代表性细胞系之一^[31],与胰腺癌组织类似。PCR及免疫印迹证实其存在COX-2及VEGF高表达,且NS-398对其作用最敏感。因此本研究选择此细胞系建立裸鼠胰腺癌原位移植瘤模型^[32],进一步在体内验证单独应用NS-398对裸鼠胰腺癌原位移植瘤的增殖抑制作用及初步探索其抗肿瘤机制。

成伟等^[33]用免疫组织化学方法检测64位喉癌患者COX-2和VEGF的表达情况,同时以CD34免疫组化测定肿瘤微血管密度,发现COX-2和VEGF的表达率分别达65.63%和68.75%。COX-2的表达与VEGF表达显著正相关。VEGF高表达者微血管密度显著高于低表达者,COX-2和VEGF均阳性者微血管密度值显著高于均阴性者,这些结果表明COX-2和VEGF在刺激肿瘤血管形成、促进肿瘤发生方面起重要作用。这种现象在软组织肿瘤、骨肉瘤、食管癌等多种肿瘤中也得到证实^[34-36],本动物实验结果也表明,NS-398可显著抑制裸鼠胰腺癌细胞Bxpc-3原位移植瘤的生长。裸鼠胰腺癌原位移植瘤经NS-398干预后,NS-398治疗组肿瘤体积明显小于对照组,而重要脏器包括胃肠道无

明显形态学的差异,表明该药有较高的胃肠道安全性。用免疫组织化学的方法检测了肿瘤组织COX-2、VEGF的表达以及血管生成的情况^[37]。结果提示NS-398可显著抑制COX-2的表达,同时使肿瘤组织中VEGF表达下调,MVD明显降低,经统计分析结果显示COX-2与VEGF及MVD之间存在显著相关性。提示NS-398可能通过抑制COX-2的表达而减少VEGF的产生、抑制肿瘤组织中新生血管的生成。初步表明COX-2特异性抑制剂NS-398其治疗人类胰腺癌的潜在机制之一可能是通过抑制COX-2来降低VEGF表达从而降低VEGF对肿瘤血管生成的刺激左右^[38]。

综上所述,通过本实验研究结果初步表明NS-398对人类胰腺癌细胞具有抑制其增殖抑制作用和抗血管生成作用,其作用机制可能与抑制COX-2表达下调VEGF和降低MVD有关,但肿瘤的生长和肿瘤血管的生成的是多通路进行的,COX-2相关通路中是否存在其他途径抑制肿瘤血管新生仍有待于进一步探索,只作用于其一还不能完全抑制肿瘤的生长,因此需要后续更多的实验研究,本试验为今后的研究打下了良好的基础。相信不久的将来定能发现疗效更高、安全性更好的抗肿瘤血管生成药物,通过调控COX-2基因表达来防治肿瘤将会更为普遍,可为胰腺癌的治疗开辟广阔的前景。

参考文献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013[J]. *CA Cancer J Clin*, 2013, 63(1):11-30.
- [2] Pham H, Chen M, Li A, et al. Loss of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase increases prostaglandin E2 in pancreatic tumors[J]. *Pancreas*, 2010, 39(3):332-339.
- [3] Omura N, Griffith M, Vincent A, et al. Cyclooxygenase-deficient pancreatic cancer cells use exogenous sources of prostaglandins[J]. *Mol Cancer Res*, 2010, 8(6):821-832.
- [4] Pham H, Rodriguez CE, Donald GW, et al. miR-143 decreases COX-2 mRNA stability and expression in pancreatic cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 439(1):6-11.
- [5] Gao Y, Jia Z, Kong X, et al. Combining betulinic acid and mithramycin effectively suppresses pancreatic cancer by inhibiting proliferation, invasion, and angiogenesis[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(15):5182-5193.
- [6] Pomianowska E, Schjølberg AR, Clausen OP, et al. COX-2 overexpression in resected pancreatic head adenocarcinomas

- correlates with favourable prognosis[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14:458. doi: 10.1186/1471-2407-14-458.
- [7] Zorgetto VA, Silveira GG, Oliveira-Costa JP, et al. The relationship between lymphatic vascular density and vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) expression with clinical-pathological features and survival in pancreatic adenocarcinomas[J]. *Diagn Pathol*, 2013, 8:170. doi: 10.1186/1746-1596-8-170.
- [8] Fendrich V, Chen NM, Neef M, et al. The angiotensin-I-converting enzyme inhibitor enalapril and aspirin delay progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and cancer formation in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer[J]. *Gut*, 2010, 59(5):630-637.
- [9] Ou YQ, Zhu Wb, Li Y, et al. Aspirin inhibits proliferation of gemcitabine-resistant human pancreatic cancer cells and augments gemcitabine-induced cytotoxicity[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(1):73-80.
- [10] Nambiar D, Prajapati V, Agarwal R, et al. In vitro and in vivo anticancer efficacy of silibinin against human pancreatic cancer BxPC-3 and PANC-1 cells[J]. *Cancer Lett*, 2013, 334(1):109-117.
- [11] Peng YP, Zhang JJ, Liang WB, et al. Elevation of MMP-9 and IDO induced by pancreatic cancer cells mediates natural killer cell dysfunction[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14:738. doi: 10.1186/1471-2407-14-738.
- [12] Nath S, Roy LD, Grover P, et al. Mucin 1 Regulates COX-2 Gene in Pancreatic Cancer[J]. *Pancreas*, 2015, 44(6):909-917.
- [13] Shankar S, Marsh L, Srivastava RK. EGCG inhibits growth of human pancreatic tumors orthotopically implanted in Balb C nude mice through modulation of FKHL1/FOXO3a and neuropilin[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 372(1/2):83-94.
- [14] Zhu L, Qin H, Li PY, et al. Response gene to complement-32 enhances metastatic phenotype by mediating transforming growth factor beta-induced epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cell line BxPC-3[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012, 31:29. doi: 10.1186/1756-9966-31-29.
- [15] Mach CM, Mathew L, Mosley SA, et al. Determination of minimum effective dose and optimal dosing schedule for liposomal curcumin in a xenograft human pancreatic cancer model[J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(6):1895-1899.
- [16] Metildi CA, Kaushal S, Hoffman RM, et al. In vivo serial selection of human pancreatic cancer cells in orthotopic mouse models produces high metastatic variants irrespective of Kras status[J]. *J Surg Res*, 2013, 184(1):290-298.
- [17] Wang WQ, Liu L, Xu HX, et al. Intratumoral α -SMA enhances the prognostic potency of CD34 associated with maintenance of microvessel integrity in hepatocellular carcinoma and pancreatic cancer[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8):e71189. doi: 10.1371/journal.pone.0071189.
- [18] Hagmann W, Jesnowski R, Löhr JM. Interdependence of gemcitabine treatment, transporter expression, and resistance in human pancreatic carcinoma cells[J]. *Neoplasia*, 2010, 12(9):740-747.
- [19] Thakkar A, Sutaria D, Grandhi BK, et al. The molecular mechanism of action of aspirin, curcumin and sulforaphane combinations in the chemoprevention of pancreatic cancer[J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(4):1671-1677.
- [20] Mohammed A, Janakiram NB, Pant S, et al. Molecular Targeted Intervention for Pancreatic Cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2015, 7(3):1499-1542.
- [21] Sokołowski G, Bałdys-Waligórska A, Trofimiuk M, et al. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in pituitary tumours[J]. *Med Sci Monit*, 2012, 18(4):CR252-259.
- [22] Lin SZ, Wei WT, Chen H, et al. Antitumor activity of emodin against pancreatic cancer depends on its dual role: promotion of apoptosis and suppression of angiogenesis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8):e42146. doi: 10.1371/journal.pone.0042146.
- [23] Ninomiya I, Nagai N, Oyama K et al. Antitumor and anti-metastatic effects of cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib on human colorectal carcinoma xenografts in nude mouse rectum[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(3):777-784.
- [24] Jiao J, Mikulec C, Ishikawa TO, et al. Cell-type-specific roles for COX-2 in UVB-induced skin cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(6):1310-1319.
- [25] El-Kenawi AE, El-Remessy AB. Angiogenesis inhibitors in cancer therapy: mechanistic perspective on classification and treatment rationales[J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 170(4):712-729.
- [26] Fornetti J, Jindal S, Middleton KA, et al. Physiological COX-2 expression in breast epithelium associates with COX-2 levels in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer in young women[J]. *Am J Pathol*, 2014, 184(4):1219-1229.
- [27] Yan C, Wang C, Dong M, et al. RNA interference-mediated silencing of VEGF and bFGF suppresses endostatin secretion in pancreatic carcinoma cells[J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(3):1031-1035.
- [28] Al-Wadei HA, Al-Wadei MH, Ullah MF, et al. Celecoxib and GABA cooperatively prevent the progression of pancreatic cancer in vitro and in xenograft models of stress-free and stress-exposed mice[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8):e43376. doi: 10.1371/journal.pone.0043376
- [29] Bu X, Zhao C, Dai X. Involvement of COX-2/PGE(2) Pathway in the Upregulation of MMP-9 Expression in Pancreatic Cancer[J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2011:214269. doi: 10.1155/2011/214269.
- [30] Hillion J, Smail SS, Di Cello F, et al. The HMGA1-COX-2 axis: a key molecular pathway and potential target in pancreatic adenocarcinoma[J]. *Pancreatol*, 2012, 12(4):372-379.
- [31] Metildi CA, Kaushal S, Lee C, et al. An LED light source and novel fluorophore combinations improve fluorescence laparoscopic

- detection of metastatic pancreatic cancer in orthotopic mouse models[J]. J Am Coll Surg, 2012, 214(6):997-1007.
- [32] Qiu W, Su GH. Challenges and advances in mouse modeling for human pancreatic tumorigenesis and metastasis[J]. Cancer Metastasis Rev, 2013, 32(1/2):83-107.
- [33] 成伟, 周维国. 喉癌组织中HIF-1 α 和COX-2及VEGF与微血管密度的关系及临床意义[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2010, 24(18):820-822.
- Cheng W, Zhou WG. Clinical significance and relationship between HIF-1 α , COX-2, VEGF and microvessel density expression in laryngeal carcinoma[J]. Journal of Clinical Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, 2010, 24(18):820-822.
- [34] Jung I, Gurzu S, Turdean S, et al. Relationship of endothelial area with VEGF-A, COX-2, maspin, c-KIT, and DOG-1 immunoreactivity in liposarcomas versus non-lipomatous soft tissue tumors[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(2):1776-1782.
- [35] Pang LY, Gatenby EL, Kamida A, et al. Global gene expression analysis of canine osteosarcoma stem cells reveals a novel role for COX-2 in tumour initiation[J]. PLoS One, 2014, 9(1):e83144. doi: 10.1371/journal.pone.0083144.
- [36] Yoon MS, Nam TK, Lee JS, et al. VEGF as a predictor for response to definitive chemoradiotherapy and COX-2 as a prognosticator for survival in esophageal squamous cell carcinoma[J]. J Korean Med Sci, 2011, 26(4):513-520.
- [37] Szepeshazi K, Schally AV, Block NL, et al. Powerful inhibition of experimental human pancreatic cancers by receptor targeted cytotoxic LH-RH analog AEZS-108[J]. Oncotarget, 2013, 4(5):751-760.
- [38] Vizio B, Biasi F, Scirelli T, et al. Pancreatic-carcinoma-cell-derived pro-angiogenic factors can induce endothelial-cell differentiation of a subset of circulating CD34+ progenitors[J]. J Transl Med, 2013, 11:314. doi: 10.1186/1479-5876-11-314.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 张旭, 葛春林. COX-2特异性抑制剂NS-398对胰腺癌生长及肿瘤血管生成影响[J]. 中国普通外科杂志, 2016, 25(9):1282-1290. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.09.010

Cite this article as: Zhang X, Ge CL. Influence of COX-2 specific inhibitor NS-398 on growth and tumor angiogenesis of pancreatic cancer[J]. Chin J Gen Surg, 2016, 25(9):1282-1290. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.09.010

本刊对来稿中统计学处理的有关要求

1. 统计研究设计: 应交代统计研究设计的名称和主要做法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性或横断面调查研究); 实验设计(应交代具体的设计类型, 如自身配对设计、成组设计、交叉设计、正交设计等); 临床试验设计(应交代属于第几期临床试验, 采用了何种盲法措施等)。主要做法应围绕4个基本原则(随机、对照、重复、均衡)概要说明, 尤其要交代如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

2. 资料的表达与描述: 用 $\bar{x} \pm s$ 表达近似服从正态分布的定量资料, 用 $M(QR)$ 表达呈偏态分布的定量资料; 用统计表时, 要合理安排纵横标目, 并将数据的含义表达清楚; 用统计图时, 所用统计图的类型应与资料性质相匹配, 并使数轴上刻度值的标法符合数学原则; 用相对数时, 分母不宜小于20, 要注意区分百分率与百分比。

3. 统计分析方法的选择: 对于定量资料, 应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的, 选用合适的统计分析方法, 不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析; 对于定性资料, 应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备条件以分析目的, 选用合适的统计分析方法, 不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析, 应结合专业知识和散布图, 选用合适的回归类型, 不应盲目套用简单直线回归分析, 对具有重复实验数据的回归分析资料, 不应简单化处理; 对于多因素、多指标资料, 要在一元分析的基础上, 尽可能运用多元统计分析方法, 以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系进行全面、合理的解释和评价。

4. 统计结果的解释和表达: 当 $P < 0.05$ (或 $P < 0.01$) 时, 应说明对比组之间的差异有统计学意义, 而不应说对比组之间具有显著性(或非常显著性)的差别; 应写明所用统计分析方法的具体名称(如: 成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等), 统计量的具体值(如 $t=3.45$, $\chi^2=4.68$, $F=6.79$ 等)应可能给出具体的 P 值(如 $P=0.0238$); 当涉及到总体参数(如总体均数、总体率等)时, 在给出显著性检验结果的同时, 再给出95%置信区间。

中国普通外科杂志编辑部