

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.17.006

二甲双胍联合塞来昔布对胰腺癌细胞增殖及 Caspase-3 活性的影响*

蒲凤萍¹ 赵丽萍² 刘江伟^{1Δ} 李鹏³ 董翔¹

(1 新疆军区总医院急诊科 新疆 乌鲁木齐 830000; 2 西藏阿里军分区狮泉河医疗站 西藏 噶尔县 859400;
3 新疆维吾尔自治区人民医院胃肠外科 新疆 乌鲁木齐 830001)

摘要 目的:探讨二甲双胍和塞来昔布单独或联合应用对胰腺癌细胞增殖和 Caspase-3 活性的影响。**方法:**体外培养人胰腺癌 BxPC-3 和 AsPC-1 细胞,用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测不同浓度二甲双胍和塞来昔布对胰腺癌细胞存活率的影响。联合实验分 4 组:对照组、二甲双胍组(MET, 15 mmol/L)、塞来昔布组(CEL, 100 μmmol/L),二甲双胍和塞来昔布联合组(MET 15 mmol/L+CEL100 μmmol/L),孵育 48 h,用 MTT 检测细胞存活率,用 Caspase-3 比色测定试剂盒测定 Caspase-3 活性。**结果:**二甲双胍和塞来昔布单药均可以时间和剂量依赖性方式降低胰腺癌 BxPC-3 和 AsPC-1 细胞的生存率。两种细胞系的各加药组细胞存活率与对照组比较差异均存在统计学意义(P<0.01),联合实验组的细胞存活率明显低于单独用药物组(P<0.01)。二甲双胍和塞来昔布单药处理的胰腺癌 BxPC-3 和 AsPC-1 细胞 Caspase-3 活性均显著高于对照组(P<0.01),二甲双胍和塞来昔布联合实验组 Caspase-3 活性均明显高于单药处理组和对照组(P<0.01),但二甲双胍组和塞来昔布组之间的 Caspase-3 活性比较差异无统计学意义(P>0.05)。**结论:**二甲双胍和塞来昔布联合作用可协同抑制胰腺癌细胞的增殖,并通过激活 Caspase-3 活性促进胰腺癌细胞的凋亡,其联合应用可能成为胰腺癌药物治疗的有效策略。

关键词:胰腺癌;二甲双胍;塞来昔布;半胱天冬氨酸蛋白酶-3

中图分类号:R735.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)17-3225-05

The Effects of Metformin Combined with Celecoxib on the Proliferation and Caspase-3 Activity in Pancreatic Cancer Cells*

PU Feng-ping¹, ZHAO Li-ping², LIU Jiang-wei^{1Δ}, LI Peng³, DONG Xiang¹

(1 Department of Emergency, The General Hospital of Xinjiang Military region, Urumuqi, Xinjiang, 830000, China;

2 The Shiquanhe Medical Station of Ali Military Sub-command of Tibet Military Region, Gar County, Tibet, 859400, China;

3 Department of Gastrointestinal Surgery, The People's Hospital of Xinjiang Autonomous Region, Urumuqi, Xinjiang, 830001, China)

ABSTRACT Objective: To study the effects of metformin and celecoxib alone or in combination on the cell viability and Caspase-3 activity in the pancreatic cancer BxPC3 and AsPC-1 cells. **Methods:** Pancreatic cancer cell line BxPC-3 and AsPC-1 were cultured and treated with different concentrations of metformin or celecoxib for 24, 48 and 72 h, the cell viability was then measured and calculated by the MTT assay. In the combination experiments, each cell line was divided into 4 groups: the untreated control group, metformin group alone (treated with 15 mmol/L metformin), celecoxib group alone (treated with 100 μmmol/L celecoxib), the combination group (metformin 15 mmol/L+ celecoxib 100 μmmol/L). After treated for 48 h, MTT assay was used for the detection of viability and Caspase-3 activity. **Results:** The viability of BxPC-3 and AsPC-1 cell were inhibited by metformin or celecoxib in a time- and dose-dependent manner. Compared with the untreated control group, the cell viability of all the drug treated groups were significantly decreased, while the Caspase-3 enzyme activity were increased in both BxPC-3 and AsPC-1 cells (P<0.01). Compared to the untreated control or individual drug, the combination of metformin and celecoxib significantly decreased cell viability and increased caspase-3 enzyme activity of both cells (P<0.01). There were no significant different in caspase-3 enzyme activity between metformin group and celecoxib group(P>0.05). **Conclusion:** Combination of metformin and celecoxib could synergistically inhibit the cell proliferation and increased caspase-3 enzyme activity, thus induced apoptosis in the pancreatic cancer cell, which indicated that combination of metformin and celecoxib might be a promising remedy in treatment of pancreatic cancer.

Key words: Pancreatic cancer; Metformin; Celecoxib; Caspase-3

Chinese Library Classification(CLC): R735.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)17-3225-05

前言

胰腺癌是极具侵袭和转移潜能的恶性肿瘤,在在西方国家肿瘤引起的死亡中居第 4 位,5 年生存率不足 5%。手术是目前

* 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2013211A073)

作者简介:蒲凤萍(1964-),主任技师,主要从事高压氧与临床药物研究, E-mail: pufengping@126.com

Δ 通讯作者:刘江伟(1970-),男,博士后,主任医师,教授,博士生导师,研究方向:肝胆外科基础与临床研究, E-mail: ljw273273@163.com

(收稿日期:2016-12-03 接受日期:2016-12-27)

治疗胰腺癌的有效途径,然而 80%的患者在就诊时已经失去手术机会,即使早期行根治性切除其 5 年生存率不足 24%。对于局部侵袭和转移的非手术患者,放疗和化疗是常用的治疗方法,由于胰腺癌对放、化疗的不敏感性及其毒副作用而限制其临床效果,目前胰腺癌患者中位生存时间 <6 个月^[1-3]。因此,寻找有效、毒副作用小的辅助药物是目前亟待解决的问题。

二甲双胍是一种胰岛素增敏剂,被广泛用于 2 型糖尿病的一线治疗。近年来研究显示二甲双胍可明显降低乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、肝细胞癌等的发生率,并可抑制肿瘤的增殖、侵袭、转移和促进肿瘤细胞凋亡^[3-7]。环氧合酶-2(COX-2)是前列腺类物质合成的限速酶,研究表明其高表达与胰腺癌和其他肿瘤的侵袭和转移密切相关^[8,9]。选择性 COX-2 抑制剂塞来昔布(Celecoxib)是临床上常用的非甾体类抗炎药(NSAIDs),近年来,其对多种肿瘤细胞的抗肿瘤效应引起学者的广泛关注,其抗肿瘤机制主要包括诱导细胞凋亡、调节细胞周期和抗血管生成^[10,11]。本研究旨在探讨二甲双胍和塞来昔布单独或联合应用对胰腺癌细胞增殖和凋亡效应因子半胱天冬氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)活性的影响,以期对胰腺癌的有效治疗策略提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

人胰腺癌细胞株 BxPC-3、AsPC-1 由新疆军区总医院动物实验科保存。二甲双胍购自 Sigma 公司;塞来昔布购自美国辉瑞公司,胎牛血清和高糖 DMEM 培养基购自 Gibco 公司;二甲亚砷(DMSO)和四甲基偶氮唑盐(MTT)购自美国 Sigma 公司;Caspase-3 比色测定试剂盒购自 Biovision 公司。

1.2 方 法

1.2.1 细胞系和细胞培养 BxPC-3、AsPC-1 在含有 5% CO₂ 37℃,95%湿度培养箱中培养。培养液为含 10%胎牛血清和双抗(100 U/mL 链霉素和 100 U/mL 青霉素)的 DMEM 高糖培养基。当细胞融合 90%时,用 0.25%胰酶消化传代,取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 细胞用二甲双胍和塞来昔布药液配置 二甲双胍用高糖 DMEM 稀释为(5、10、15、20、25)mmol/L 浓度,塞来昔布稀释为(20、40、80、100、120)μmol/L 浓度,针式过滤后,4℃保存。

1.2.3 分别用 MTT 法检测二甲双胍和塞来昔布对 BxPC-3、AsPC-1 细胞的存活率 两种细胞接种于 96 孔板中(5×10³/孔)。贴壁 24 h 后,分别加入含有不同浓度二甲双胍(5、10、15、20、25 mmol/L)和不同浓度塞来昔布(20、40、80、100、120 μmol/L),孵育 24 h、48 h、72 h,分别加入 MTT,再孵育 4 h,以空白孔调零,弃去孔内液体,每孔加入二甲基亚砷 150 μL,震荡摇匀,在酶标仪 490 nm 波长处检测各孔吸光度值(absorbance, A 值),细胞相对存活率=(A 实验孔-A 调零孔)/(A 对照孔-A 调零孔)×100%。重复 3 次实验。

1.2.4 二甲双胍和塞来昔布联合作用对胰腺癌细胞的存活率的影响 BxPC-3、AsPC-1 细胞细胞接种于 96 孔板中(5×10³/孔)。贴壁 24 h 后,实验分 4 组并加入不同的药物:对照组(未加药物)、二甲双胍组(MET, 15 mmol/L)、塞来昔布组(CEL,100 μmol/L),联合组(MET 15 mmol/L+ CEL100 μmol/L),孵育 48 h,分别加入 MTT,在酶标仪 490 nm 波长处检测各孔吸光度值(A 值),计算细胞相对存活率,方法同上,重复 3 次实验。

1.2.5 二甲双胍和塞来昔布联合作用对胰腺癌细胞 Caspase-3 活性的影响 BxPC-3、AsPC-1 细胞细胞接种于 6 孔板中(1×10⁶/孔),培养 24 小时,实验分同上 4 组,加入不同浓度药物:对照组(0)、二甲双胍组(MET, 15 mmol/L)、塞来昔布组(CEL,100 μmol/L),联合组(MET 15 mmol/L+ CEL100 μmol/L),加药后作用 48 h,收集细胞,用 PBS 冲洗,离心 2 次。参照说明书方法应用 Caspase-3 比色测定试剂盒测定,用酶标免疫测定仪(Bio Rad, USA)测定波长 405 nm 下的吸光度值来反映 Caspase-3 活性,实验重复 3 次。

1.3 统计学分析

使用 SPSS23.0 统计软件处理数据,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析和 t 检验分析组间和组内差异,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同浓度二甲双胍和塞来昔布对胰腺癌 BxPC-3 和 AsPC-1 细胞增殖的影响

二甲双胍和塞来昔布对胰腺癌 BxPC-3 和 AsPC-1 细胞增殖的影响均呈时间和剂量依赖性(图 1-4)。在二甲双胍实验中,15 mmol/L 浓度的二甲双胍分别作用于 BxPC-3 细胞 24、48、72 h,其细胞相对存活率分别为(82.76±3.79)%、(51.48±3.76)%、(39.58±4.86)%,呈现时间依赖性,各个时间点之间的细胞相对存活率差异具有显著性(其中 24 h 小时与 48 h、72h 比较 P<0.01,48 h 和 72h 比较 P<0.05),见图 1。不同浓度的二甲双胍(5、10、15、20、25 mmol/L)分别作用于 AsPC-1 细胞 48 h,细胞存活率分别为(81.43±3.96)%、(72.38±4.76)%、(56.41±3.19)%、(44.79±3.14)%、(38.44±5.12)%,呈现明显的浓度依赖性,其中相邻浓度间的 10 mmol/L 与 15 mmol/L,15 mmol/L 与 20 mmol/L 之间的细胞相对存活率差异具有显著性(P<0.05),见图 2。在本组实验中,15 mmol/L 浓度的二甲双胍作用于 BxPC-3 细胞和 AsPC-1 细胞 48h 的细胞存活率均接近 IC₅₀ 值,因而选 15 mmol/L 浓度的二甲双胍作用 48 h 用于以下的联合实验。

在塞来昔布实验中,100 μmol/L 浓度的塞来昔布分别作用于 BxPC-3 细胞 24、48 和 72 h,其细胞相对存活率分别为(60.43±4.18)%、(50.36±4.23)%、(43.18±4.26)%,呈现时间依赖性,其中 24 h 小时与 48 h、72 h 差异具有显著性(P<0.05, P<0.01),48 h 和 72h 之间差异无显著性(P>0.05),见图 3。不同浓度的二甲双胍(5、10、15、20、25 mmol/L)作用于 AsPC-1 细胞 48 h,细胞相对存活率分别为(95.86±3.78)%、(85.44±3.17)%、(73.46±5.18)%、(60.48±3.22)%、(45.77±4.89)%,呈现明显的浓度依赖性,各个相邻浓度组之间的细胞相对存活率差异均具有显著性(P<0.05),见图 4。在此实验中,100 μmol/L 浓度的塞来昔布作用于 BxPC-3 和 AsPC-1 细胞 48h 的细胞存活率较接近 IC₅₀ 值,因而选 100 μmol/L 浓度的塞来昔布作用 48h 用于以下的联合实验。

2.2 二甲双胍和塞来昔布单独或联合作用对胰腺癌细胞增殖的影响

BxPC-3、AsPC-1 细胞在对照组的细胞相对存活率为 100%;二甲双胍组分别为(51.48±3.76)%和(56.41±3.19)%;塞来昔布组分别为(50.36±4.23)%和(60.48±3.22)%;联合组分别为(31.23±4.75)%和(36.42±3.96)%。塞来昔布组、二甲双胍组 BxPC-3、AsPC-1 细胞的存活率较对照组均显著降低(P<0.05),

但二甲双胍组和塞来昔布组之间的细胞存活率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。联合实验组细胞存活率显著低于二甲双胍

和塞来昔布单药处理组($P<0.01$),见图 5。

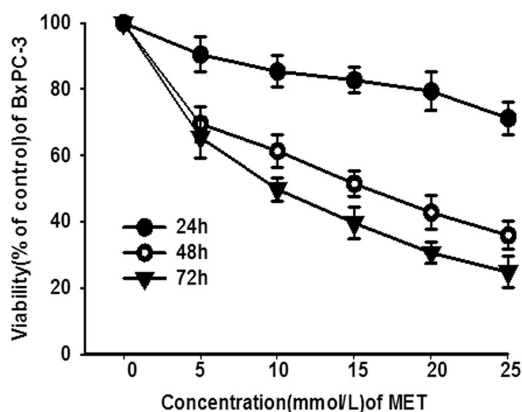


图 1 BxPC-3 在不同浓度二甲双胍作用下的细胞存活曲线

Fig.1 The survival curve of BxPC-3 cell treated with different concentrations of metformin

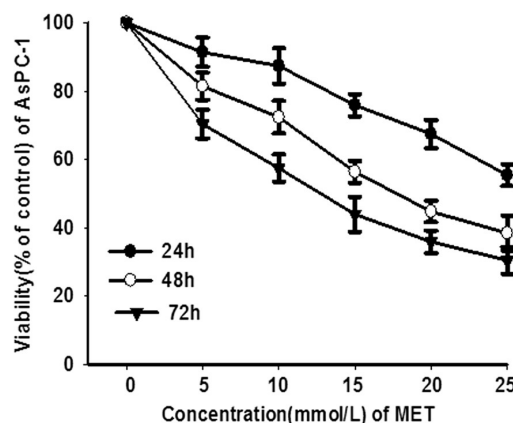


图 2 AsPC-1 在不同浓度二甲双胍作用下的细胞存活曲线

Fig.2 The survival curve of AsPC-1 cell treated with different concentrations of metformin

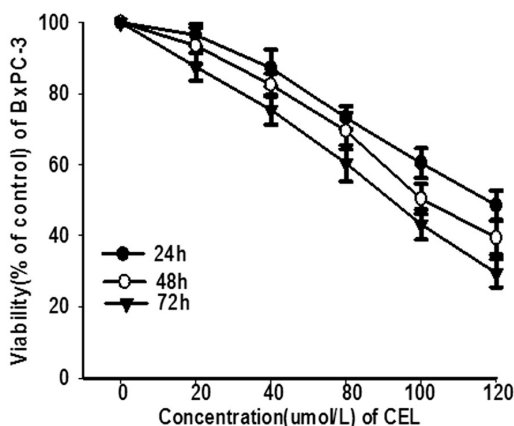


图 3 BxPC-3 在不同浓度塞来昔布作用下的细胞存活曲线

Fig.3 The survival curve of BxPC-3 cell treated with different concentrations of Celecoxib

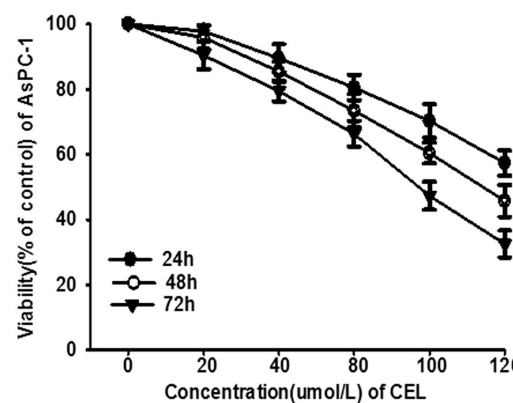


图 4 AsPC-1 在不同浓度塞来昔布作用下的细胞存活曲线

Fig.4 The survival curve of AsPC-1 cell treated with different concentrations of Celecoxib

2.3 二甲双胍和塞来昔布单独或联合作用对胰腺癌细胞 Caspase-3 活性的影响

BxPC-3、AsPC-1 细胞在对照组 Caspase-3 活性分别为 0.0091 ± 0.0003 和 0.0084 ± 0.0005 ; 二甲双胍组分别为 0.0437 ± 0.0035 和 0.0401 ± 0.0047 ; 塞来昔布组分别为 0.0498 ± 0.0056 和 0.0456 ± 0.0041 ; 联合组分别为 $0.0754 \pm$

0.0049 和 0.0719 ± 0.0058 。塞来昔布组、二甲双胍组 BxPC-3、AsPC-1 细胞的 Caspase-3 活性较对照组均显著升高($P<0.05$), 但二甲双胍组和塞来昔布组之间的 Caspase-3 活性比较差异无统计学意义($P>0.05$)。联合实验组细胞 Caspase-3 活性显著高于二甲双胍和塞来昔布单药处理组($P<0.01$), 见图 6。

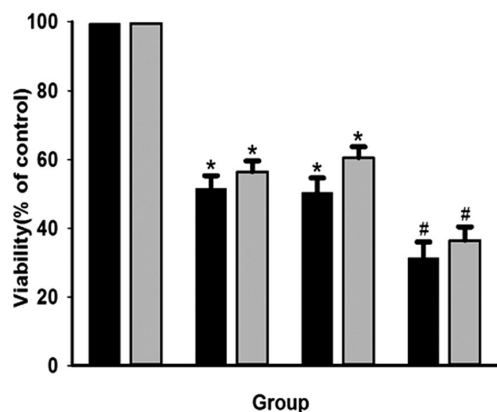


图 5 两种药物单独或联合作用下的细胞存活率

Fig.5 The viability

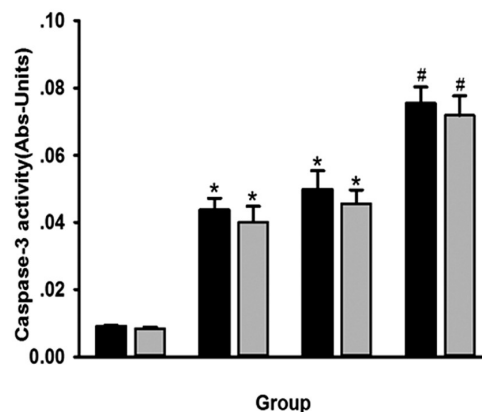


图 6 两种药物单独或联合作用下的细胞 Caspase-3 活性

Fig.6 The Caspase-3 activity of pancreatic cancer cell with MET and CEL alone or combination

*: Significantly different compared to control groups ($P<0.05$), #: Significantly different compared to MET or CEL alone groups ($P<0.01$)

3 讨论

二甲双胍和塞来昔布均为临床常用药物,近年来因二者的抗肿瘤效应而成为研究的热点。较常规化疗药物相比,二者的毒副作用小,因而在临床上作为抗肿瘤药物或放、化疗药物的辅助用药均具有潜在的应用价值,二者联合应用是否更具优势尚未见文献报道。本研究结果显示二甲双胍和塞来昔布分别作用于胰腺癌 BxPC-3 细胞和 AsPC-1 细胞后,均可呈时间和剂量依赖性抑制胰腺癌细胞的增殖。将接近 IC₅₀ 值浓度的 15 mmol/L 浓度的二甲双胍和 100 μmol/L 塞来昔布单独或联合作用于胰腺癌细胞 48 h,结果显示联合作用组细胞的存活率均明显低于对照组和单独组,Caspase-3 活性明显高于对照组和单独组,因而提示二甲双胍和塞来昔布联合应用较二者单独应用可明显抑制胰腺癌细胞增殖,促进胰腺癌细胞凋亡。

二甲双胍抑制肿瘤细胞增殖、诱导细胞凋亡的机制尚未阐明。Shi Y 等^[1]研究发现二甲双胍作用于胰腺癌 CFPAC 1 细胞和裸鼠移植瘤后可抑制细胞和瘤体生长,凋亡相关基因 Bcl-xL、Survivin 和 Cyclin D1 的表达下调,Bax 和 Caspase 3 的表达上调,由此认为二甲双胍的抗肿瘤效应的机制在于诱导细胞凋亡和抑制细胞增殖。Yue W 等^[2]将二甲双胍和阿司匹林联合作用于胰腺癌 PANC-1 和 BxPC-3 细胞,发现二者可明显抑制 mTOR 和 STAT3 磷酸化,Caspase-3 活性增加和 PARP 裂解提示可诱导细胞凋亡,并明显下调抗凋亡蛋白 Mcl-1 和 Bcl-2,上调促凋亡蛋白 Bim 和 Puma,其下调 Mcl-1 和 Bcl-2 不依赖于 AMPK 或 STAT3 通路,但部分通过 mTOR 信号通路,因而认为二甲双胍和阿司匹林联合作用诱导胰腺癌细胞凋亡主要通过抑制抗凋亡蛋白 Mcl-1 和 Bcl-2 来实现。Zhu HQ 等^[3]研究显示二甲双胍可通过抑制细胞增殖和通过影响 AMPK、Cyclin D1 和 Caspase-3 来诱导细胞凋亡,从而增加吉西他滨和顺铂对胆管癌细胞生长抑制的功效。李鹏等^[7]研究发现二甲双胍抑制胰腺癌细胞的增殖和凋亡主要通过抑制 COX-2、Bcl-2 和 Survivin 的 mRNA 来实现的。

塞来昔布可诱导多种肿瘤细胞凋亡。Lu Y 等^[4]研究发现塞来昔布在低浓度时诱导急性白血病 HL-60 细胞凋亡,在高浓度时可致细胞坏死,塞来昔布通过上调凋亡相关蛋白裂解 Caspase-3 和 PARP 来诱导细胞凋亡,并通过抑制溶酶体功能来抑制肿瘤细胞的自体吞噬。Zhao YQ 等^[5]研究提示塞来昔布对人喉鳞状细胞癌细胞系(Hep-2 细胞)具有抗增殖和促凋亡作用,细胞凋亡伴随着与人类端粒酶逆转录酶(hTERT)mRNA 直接相关的端粒酶活性下降,并上调 Bax/Bcl-2 比值。Liu M 等^[6]研究发现塞来昔布作用于胃癌细胞后,p-Akt 蛋白表达下降,Caspase-8 和 Caspase-9 mRNA 表达上升,认为塞来昔布在体外通过 16PI3K/Akt 通路诱导胃癌细胞凋亡和自体吞噬,而且通过线粒体和死亡受体通路诱导胃癌细胞凋亡。Gallouet AS 等^[7]研究表明,塞来昔布抑制非何杰金淋巴瘤(NHL)细胞增殖并通过非 COX-2 依赖方式减慢细胞周期和减少存活蛋白如 Mcl-1 的表达来促进非何杰金淋巴瘤 B 细胞的凋亡。刘江伟等^[8]研究发现联合应用 COX-2 抑制剂塞来昔布和 Survivin 反义寡核苷酸可明显抑制胰腺癌 BxPC-3 细胞增殖,诱导细胞凋亡,并提高 Caspase-3 活性,塞来昔布诱导胰腺癌 BxPC-3 细胞凋亡主要通

过 Survivin 和 Mcl-1 途径,而非 Bcl-2 途径。本课题组前期研究表明二甲双胍也可通过抑制 COX-2 来发挥抗肿瘤效应^[9],因塞来昔布本身可抑制 COX-2 表达,在本研究中二甲双胍和塞来昔布联合作用发挥更明显的抗肿瘤效应,可能部分通过共同抑制 COX-2 的表达来实现。

Caspase-3 是 Caspase 家族中关键的凋亡执行者,其表达异常在多种肿瘤的发生、发展中发挥重要作用,目前已知的细胞凋亡的发生主要通过三个途径:外在或死亡受体通路(I 型)、内在的或线粒体通路(II 型)和内质网通路,在 I 型通路,肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)的表面死亡受体被其固有死亡配体(TNFSF)激活后启动凋亡,产生死亡信号,pro-caspase-8 裂解,激活 Caspase-8,然后激活 Caspase-3。在 II 型通路,细胞因子如 IL-1、IL-6 和氧自由基可启动凋亡,线粒体释放细胞色素 c,从而激活 Caspase-3。无论内在和外在的两种凋亡通路都激活 Caspase-3,并导致细胞死亡。Caspase-3 裂解 DNA 断裂因子 α 亚基(DFFA),又名 Caspase 激活 DNA 酶抑制因子(ICAD),导致凋亡过程中 DNA 的裂解^[19,20]。因而认为检测 Caspase-3 活性是判定细胞凋亡的一种独特、直接和敏感的方法^[21]。本研究中,二甲双胍和塞来昔布均能增加胰腺癌细胞的 Caspase-3 活性,二者联合应用后 Caspase-3 活性升高更加明显,表明二者联合应用可发挥协同促进凋亡作用。

总之,二甲双胍和塞来昔布联合作用可协同抑制胰腺癌细胞增殖,并可能通过激活 Caspase-3 活性促进胰腺癌细胞凋亡,因二者为临床常用药物,且毒副作用小,其联合应用可能成为治疗胰腺癌药物的有效策略。

参考文献(References)

- [1] Shi Y, He Z, Jia Z, Xu C, et al. Inhibitory effect of metformin combined with gemcitabine on pancreatic cancer cells in vitro and in vivo[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(4): 2921-2928
- [2] Hidalgo M. Pancreatic cancer[J]. N Engl J Med, 2010, 363(3): 298
- [3] Ambe CM, Mahipal A, Fulp J, et al. Effect of Metformin Use on Survival in Resectable Pancreatic Cancer: A Single-Institution Experience and Review of the Literature [J]. PLOS One, 2016, 11 (3): e0151632
- [4] Bodmer M, Meier C, Krahenbuhl S, et al. Long-term metformin use is associated with decreased risk of breast cancer [J]. Diabetes Care, 2010, 33(6): 1304-1308
- [5] McAuliffe JC, Christein JD. Type 2 diabetes mellitus and pancreatic cancer[J]. Surg Clin North Am, 2013, 93(3): 619-627
- [6] Wright JL, Stanford JL. Metformin use and prostate cancer in Caucasian men: results from a population-based case-control study [J]. Cancer Causes Control, 2009, 20(9): 1617-1622
- [7] 李鹏, 刘江伟, 韩振魁, 等. 二甲双胍对胰腺癌细胞增殖与凋亡的影响及其分子机制研究[J]. 中华肝胆外科杂志, 2012, 18(12): 933-937
- [8] Li Peng, Liu Jiang-wei, Han Zheng-kun, et al. Modulating effect of metformin on proliferation, apoptosis and the molecular mechanism in BxPC-3 and AsPC-1 pancreatic cancer cell lines[J]. Chin J Hepatobiliary Surg, 2012, 18(12): 933-937
- [9] Li S, Gu Z, Xiao Z, et al. Anti-tumor effect and mechanism of cyclooxygenase-2 inhibitor through matrix metalloproteinase 14 pathway in PANC-1 cells[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(2): 1737-1742

- [9] Hill R, Li Y, Tran LM, et al. Cell intrinsic role of COX-2 in pancreatic cancer development[J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11: 2127-2137
- [10] Sadeghi-Aliabadi H, Aliasgharluo M, Fattahi A, et al. In vitro cytotoxic evaluation of some synthesized COX-2 inhibitor derivatives against a panel of human cancer cell lines[J]. *Res Pharm Sci*, 2013, 8: 298-303
- [11] Wang ZL, Fan ZQ, Jiang HD, et al. Selective Cox-2 inhibitor celecoxib induces epithelial-mesenchymal transition in human lung cancer cells via activating MEK-ERK signaling[J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34: 638-646
- [12] Yue W, Zheng X, Lin Y, et al. Metformin combined with aspirin significantly inhibit pancreatic cancer cell growth in vitro and in vivo by suppressing anti-apoptotic proteins Mcl-1 and Bcl-2[J]. *Oncotarget*, 6 (25): 21208-21224
- [13] Zhu HQ, Ma JB, Song X, et al. Metformin potentiates the anticancer activities of gemcitabine and cisplatin against cholangiocarcinoma cells in vitro and in vivo[J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(6): 3488-3496
- [14] Lu Y, Liu XF, Liu TR, et al. Celecoxib exerts antitumor effects in HL-60 acute leukemia cells and inhibits autophagy by affecting lysosome function[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 1551-1557
- [15] Zhao YQ, Feng HW, Jia T, et al. Antiproliferative effects of celecoxib in Hep-2 cells through telomerase inhibition and induction of apoptosis[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(12): 4919-4923
- [16] Liu M, Li CM, Chen ZF, et al. Celecoxib regulates apoptosis and autophagy via the PI3K/Akt signaling pathway in SGC-7901 gastric-cancer cells[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(6): 1451-1458
- [17] Gallouet AS, Travert M, Bresson-Bepoldin L, et al. COX-2-independent effects of celecoxib sensitize lymphoma B cells to TRAIL-mediated apoptosis[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(10): 2663-2673
- [18] 刘江伟, 张永久, 李开宗, 等. COX-2 抑制剂联合 Survivin 反义寡核苷酸抗胰腺癌 BxPC-3 细胞效应 [J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(30): 3178-3183
- Liu Jiang-wei, Zhang Yong-jui, Li Kai-zong, et al. Antitumor effects of COX-2 inhibitor in combination with Survivin antisense oligonucleotides on pancreatic cancer BxPC-3 cells [J]. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi*, 2007, 15(30): 3178-3183
- [19] Liu X, Zou H, Slaughter C, et al. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis[J]. *Cell*, 1997, 89: 175-184
- [20] Lorente L, Martín MM, Argueso M, et al. Serum caspase-3 levels and mortality are associated in patients with severe traumatic brain injury [J]. *BMC Neurol*, 2015, 15: 228
- [21] Behzad S, Ebrahim K, Mosaddegh M, et al. Primula auriculata Extracts Exert Cytotoxic and Apoptotic Effects against HT-29 Human Colon Adenocarcinoma Cells[J]. *Iran J Pharm*, 2016, 15(1): 311-322

(上接第 3269 页)

- [7] Roberts DJ, Bobrovitz N, Zygun DA, et al. Indications for Use of Damage Control Surgery in Civilian Trauma Patients: A Content Analysis and Expert Appropriateness Rating Study [J]. *Ann Surg*, 2016, 263(5): 1018-1027
- [8] Rotondo MF, Zonies DH. The damage control sequence and underlying logic[J]. *Surg Clin North Am*, 1997, 77(4): 761-777
- [9] 祝建勇, 邱宝安, 郭晓东, 等. 损伤控制性手术在肝胆外科治疗中的临床应用价值[J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(13): 2454-2456
- Zhu Jian-yong, Qiu Bao-an, Guo Xiao-dong, et al. Clinical Value of the Damage Control Operation Applied to the Hepatobiliary Surgery [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2015, 15(13): 2454-2456
- [10] Gaskin D, Kroll NA, Ochs AA, et al. Far Forward Anesthesia and Massive Blood Transfusion: Two Cases Revealing the Challenge of Damage Control Resuscitation in an Austere Environment[J]. *AANA J*, 2015, 83(5): 337-343
- [11] Ball CG. Damage control surgery [J]. *Curr Opin Crit Care*, 2015, 21(6): 538-543
- [12] Freeman JL, Winston KR, Byers JT, et al. Damage-control neurosurgery: Packing to halt relentless intracranial bleeding [J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2015, 79(5): 865-869
- [13] Hornez E, Boddaert G, Ngabou UD, et al. Temporary vascular shunt for damage control of extremity vascular injury: A toolbox for trauma surgeons[J]. *J Visc Surg*, 2015, 152(6): 363-368
- [14] Undurraga Perl VJ, Leroux B, Cook MR, et al. Damage-control resuscitation and emergency laparotomy: Findings from the PROPPR study[J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2016, 80(4): 568-574
- [15] Mehrotra AK, Feroz A, Dawar S, et al. Diaphragmatic rupture precipitated by intercostal chest tube drainage in a patient of blunt thoraco-abdominal trauma[J]. *Lung India*, 2016, 33(1): 85-87
- [16] Xiaojuan Y, Xiaojia W, Xiaohong W, et al. Analysis of risk factor of hyperlactacidemia after gastrointestinal surgery: a clinical data analysis of 216 patients [J]. *Chine critical care medicine*, 2015, 27(11): 875-879
- [17] T Noghani M, Rezaeizadeh H, Fazljoo SM, et al. Gastrointestinal Headache; a Narrative Review [J]. *Emerg (Tehran)*, 2016, 4(4): 171-183
- [18] Wang J, Feng MJ, Zhang R, et al. C-reactive protein/oxidized low density lipoprotein/ β 2-glycoprotein I complexes induce lipid accumulation and inflammatory reaction in macrophages via p38/mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ B signaling pathways[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(4): 3490-3498
- [19] Zielinski MD, Kuntz M, Zhang X, et al. Botulinum toxin A-induced paralysis of the lateral abdominal wall after damage-control laparotomy: A multi-institutional, prospective, randomized, placebo-controlled pilot study[J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2016, 80(2): 237-242
- [20] DiNorcia J, Lee MK, Harlander-Locke MP, et al. Damage Control as a Strategy to Manage Postreperfusion Hemodynamic Instability and Coagulopathy in Liver Transplant [J]. *JAMA Surg*, 2015, 150(11): 1066-1072