

· 实验研究 ·

塞来昔布对直肠癌 HCA-7 细胞放射敏感性的实验研究

宫文静 孙 萍 姚连昌 刘爱娜 由 栋

(青岛大学医学院附属烟台毓璜顶医院肿瘤内二科 山东 烟台 264000)

摘要 目的 观察环氧合酶-2(COX-2)抑制剂塞来昔布对直肠癌 HCA-7 细胞株的放射敏感性及其机制。方法 :采用 MTT 法检测塞来昔布作用不同时间对直肠癌 HCA-7 细胞株增殖的影响 ,计算出塞来昔布的半数抑制浓度 IC₅₀ ;HCA-7 细胞克隆形成实验用于检测塞来昔布对 HCA-7 细胞的放射敏感性,并绘制存活曲线 ;流式细胞仪(FCM)测定塞来昔布对 HCA-7 的细胞周期的影响。结果 :塞来昔布对 HCA-7 细胞株的抑制率随着时间的延长而升高 ,48h 的 IC₅₀ 是 40.19 μ mol/L ,照射组 + 药物组的 SF₂、D₀、D_q、SER 较单纯照射组均有所下降。塞来昔布使 HCA-7 细胞发生 G₂ 和 M 期阻滞 ,并抑制 S 期的比例。结论 塞来昔布能增加直肠癌 HCA-7 细胞的放射敏感性。

关键词 塞来昔布 ;直肠癌 ;放射增敏

中图分类号 R735.37 文献标识码 A 文章编号 :1673-6273(2012)05-868-04

Radiosensitization Of Celecoxib For Rectal HCA-7 Cells

GONG Wen-jing, SUN Ping, YAO Lian-chang, LIU Ai-na, OU Dong

(Department of Oncology, The Affiliated Yuhuangding Hospital of Medical College Qingdao University, Yantai 264000, P.R.China)

ABSTRACT Objective: To study the radiosensitization of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor celecoxib on rectal HCA-7 cells in vitro and try to venture into possible radiosensitizing mechanisms. **Methods:** MTT assay was used to measure the proliferation inhibition of celecoxib on HCA-7 cells and determine the concentration IC₅₀. Rectal HCA-7 exposed to different dose of radiation with or without the 20% of IC₅₀ concentration of celecoxib. Celecoxib's radiosensitization was measured by clonogenic assay, and survival curve was described. The cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry (FCM). **Results:** Inhibition of cell proliferation seemed more dependent on the time. The value of SF₂、D₀、D_q of the group of radiation combined with celecoxib was significantly lower than that of radiation alone group. Cell cycle analysis showed that the cell population with celecoxib in G₂/M phase increased and in S phase decreased. **Conclusion:** Celecoxib could enhance the radiotherapy on HCA-7 cells by promotion of apoptosis, inhibition of sublethal damage repair and facilitation of redistribution of tumor cell cycle.

Key words: Celecoxib; Rectal neoplasms; Radiosensitivity

Chinese Library Classification(CLC): R735.37 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)05-868-04

前言

直肠癌是常见的十大恶性肿瘤之一,随着我国人口老龄化以及饮食结构与生活习惯的改变,我国直肠癌的发病率、死亡率也逐渐上升,在消化系统肿瘤中位置仅次于胃癌。既往研究显示术前放射治疗可以降低进展期直肠癌的分期,延长生存期,降低局部复发率。近年来,化疗药物的联合使用使直肠癌患者更加获益,已成为局部进展期直肠癌术前治疗的标准^[1-3]。大量的临床研究及动物实验已证实 COX-2 与直肠癌的关系十分密切,不仅在肿瘤的发生、发展、转移中发挥作用,而且可能是直肠癌预防和治疗的靶点。本实验以 COX-2 抑制剂塞来昔布作用于直肠癌细胞,探讨其放射敏感性及其可能存在的机制^[4-5]。

1 材料和方法

作者简介 :宫文静 (1984-),女,住院医师,硕士研究生,研究方向 :肿瘤的综合治疗, Tel :0535-6691999
E-mail:gongwenjing19832001@yahoo.com.cn
(收稿日期 :2011-08-15 接受日期 :2011-09-11)

1.1 材料

1.1.1 主要材料和试剂 人直肠癌细胞株 HCA-7 细胞由青岛大学医学院微生物教研室提供,选择性环氧合酶 2 抑制剂塞来昔布(纯度为 99%)购自南京德宝生化器材有限公司 ;PRMI-1640、EDTA 和胰蛋白酶由 GIBCO BRL 公司提供 ;胎牛血清由杭州四季青生物公司提供。

1.1.2 主要仪器 AIRTECH 超净工作台,紫外可见分光光度计,瓦里安电子直线加速器,olympus 倒置显微镜,流式细胞仪。

1.1.3 细胞培养 人直肠癌细胞株 HCA-7 细胞置于含有体积分数 0.10 胎牛血清的 PRMI-1640 培养液中,置于 37℃、饱和湿度、体积分数 0.05 的 CO₂ 培养箱中培养,取对数生长期细胞进行实验。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法测定塞来昔布对直肠癌 HCA-7 细胞的毒性实验 取对数生长期 HCA-7 细胞,更换含有不同浓度的塞来昔布 (10、20、40、80 μ mol/L)培养液,设置对照组和空白组,对照组接种细胞并加入等量的培养液,空白组仅加入等量的培养液,不接种细胞。48h 后,弃去培养液,加入 150 μ L DMSO,避光振荡

10min,酶标检测仪测定各孔于 490nm 波长处的吸光度(A)值。实验重复 3 次。计算细胞增殖抑制率。公式如下 细胞增殖抑制率=1-(实验组 A 值 / 对照组 A 值)× 100%。塞来昔布浓度为横轴 细胞生长抑制率为纵轴 绘制细胞生长抑制曲线。根据半数抑制浓度(IC50)软件计算塞来昔布作用 HCA-7 细胞后 50%的细胞生长受抑制的浓度,即半数抑制浓度 IC50。

1.2.2 克隆形成实验检测塞来昔布对直肠癌 HCA-7 细胞的放射敏感性 塞来昔布用 DMSO 溶解,配置成 10mmol/L 母液。实验分 4 组(1)对照组:不做任何处理 (2)单纯照射组:分别设不同照射剂量亚组 (2、4、6、8Gy) (3) 单纯药物组:因为 20% IC50 是无毒浓度,常使用该浓度进行放射增敏实验,故单纯药物组浓度取 20%IC50(8 μ mol/l) (4)照射加药组:经过 8 μ mol/l 的塞来昔布处理后的细胞分别给予 2、4、6、8Gy 的剂量照射。取对数生长期的 HCA-7 细胞培养 24h,更换新鲜培养液(其中单纯药物组和照射加药组更换含有 8 μ mol/L 塞来昔布的培养液),继续培养 48h,单纯照射组和照射加药组分别给予不同剂量照射。继续培养 4h。然后根据所受照射剂量不同 (0Gy 到 8Gy),接种适当数量的细胞到六孔板培养 12 天,低倍镜下计数大于 50 个细胞的克隆数。计算克隆形成率(plating efficiency, PE)= 克隆数 / 接种细胞数× 100%;根据多靶单击模型 SF=1- (1-e-D/D0)N 拟合细胞存活曲线,计算放射敏感性参数:

平均致死剂量(D0)、准域剂量(Dq)、2Gy 剂量照射时的细胞存活分数(SF2)、外推数(N)以及放射增敏比(sensitizing enhancement ratio, SER),SER=D0 (单纯放射组)/D0 (放射 + 药物组)。实验重复 3 次。

1.2.3 流式细胞术(FCM)检测细胞周期分布 实验分两组:对照组和药物组,对照组不做任何处理,药物组加 8 μ mol/l 塞来昔布。将细胞接种于六孔板中,待细胞贴壁后,药物组更换含有 8 μ mol/L 塞来昔布的培养液,对照组更换无药培养液。处理后培养 48h,固定、染色后上流式细胞仪检测,采用 Modifit 软件分析数据。实验重复 3 次。

1.2.4 统计学处理 用 sigmaplot 和 PPMS 1.5[®]统计软件处理数据,实验数据用均数± 标准差($\bar{x}$ ± s)形式表示,组间比较采用假设检验。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 塞来昔布对 HCA-7 细胞生长抑制的影响

塞来昔布对细胞的生长抑制率随药物浓度的升高而逐渐升高,结果见图 1,呈现剂量依赖性。根据细胞生长抑制率公式计算出塞来昔布作用 48h 的 IC50 为 40.19 μ mol/L。20%IC50 (8 μ mol/L)的塞来昔布作用 HCA-7 细胞 48h 毒性较小,可作为放射增敏浓度进行研究。

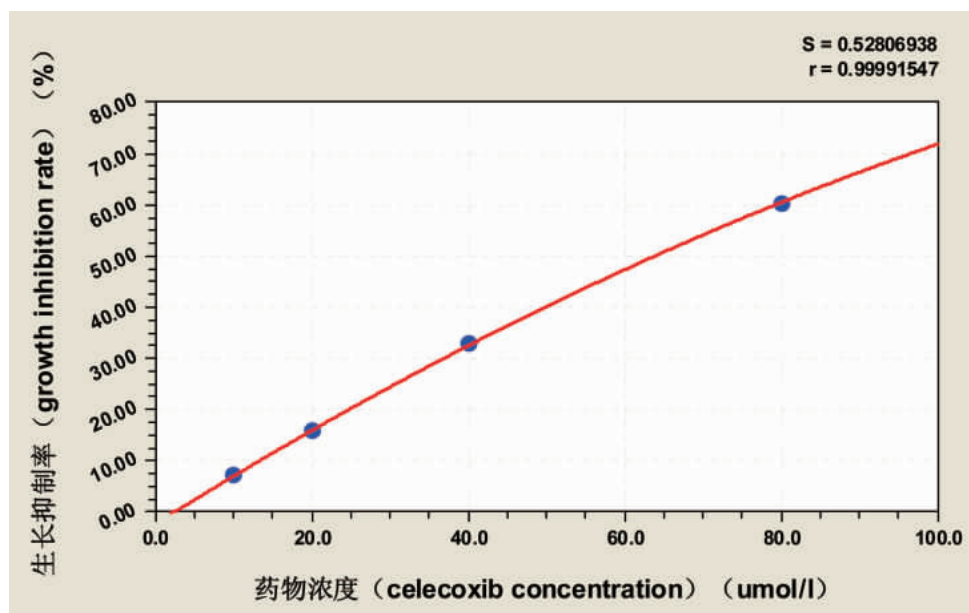


图 1 不同浓度的塞来昔布对直肠癌细胞生长抑制率的影响

Fig.1 Growth inhibition rate of HCA-7 cells after treatment of celecoxib

2.2 塞来昔布的放射增敏实验结果

实验结果经多靶单击模型拟合细胞存活曲线见图 2 所示。单纯照射组和照射加药物组的 SF2、D0、Dq、SER 结果见表 1。照射加药物组曲线肩区较单纯照射组缩小变窄,存活曲线放射加药组较单纯照射组左移,且各剂量点存活分数均小于单纯照射组。说明照射加药组的细胞亚致死性损伤修复能力降低。

2.3 塞来昔布对 HCA-7 细胞周期的影响

流式细胞术结果显示塞来昔布使 HCA-7 细胞周期发生改变,G2 和 M 期细胞比例增高,而 S 期细胞比例减少,差异有显著性(配对检验,t=12.02,6.93 P<0.05),G0-G1 期细胞比例无明显变化,见表 2。

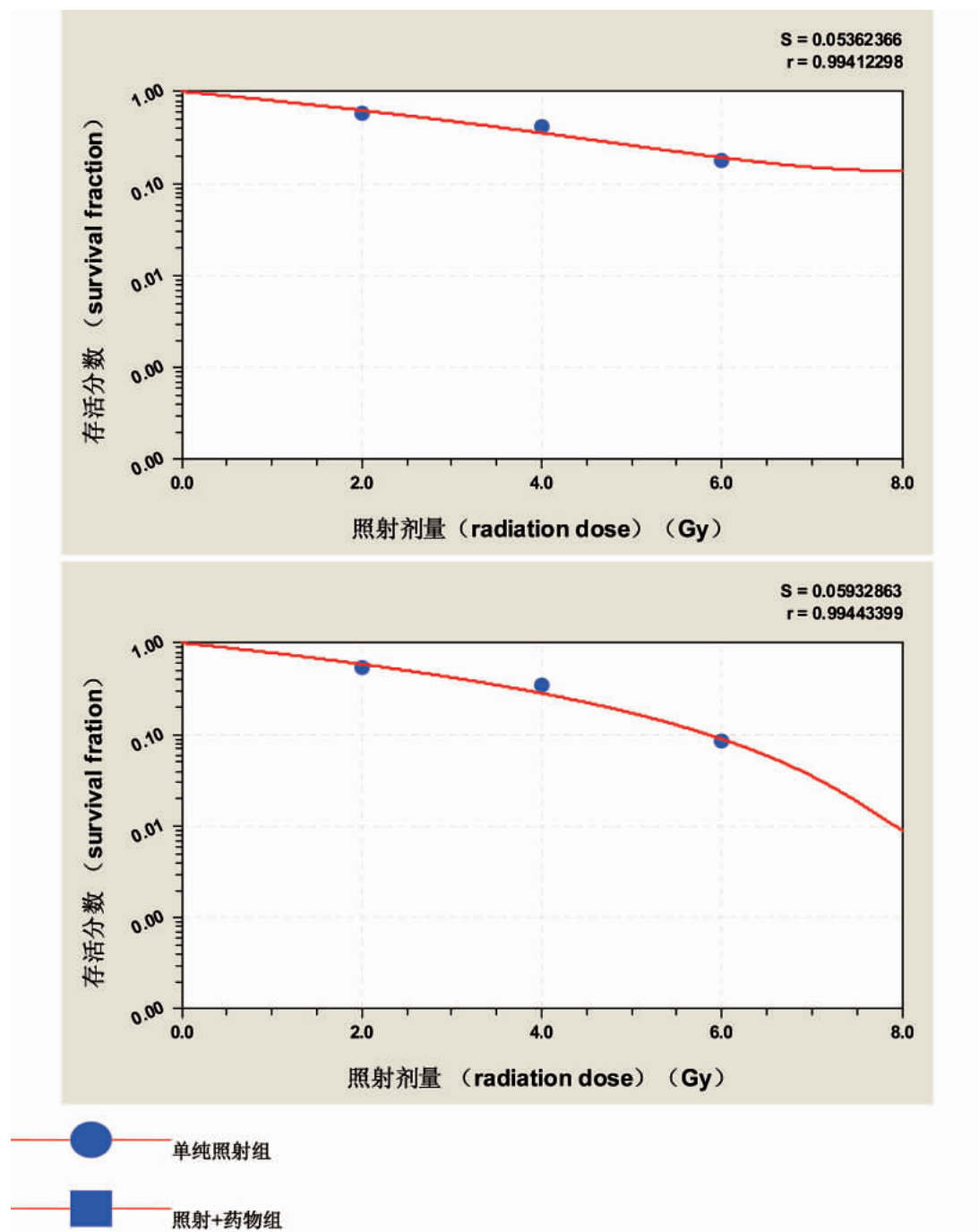


图2 塞来昔布对直肠癌细胞的放射敏感性结果
Fig.2 Survival fraction of HCA-7 cells after treatment of celecoxib

表1 塞来昔布对直肠癌细胞的放射敏感性的影响
Table 1 Radiosensitization of HCA-7 cells when treated with celecoxib

Group	SF2	D0	Dq	SER
Irradiation group	0.63	3.87	0.012	1.16
Irradiation plus celecoxib group	0.59	3.34	0.011	

3 讨论

放射治疗在直肠癌的综合治疗中发挥着重要的作用。由于

肿瘤本身存在的敏感性、乏氧程度等不同,且直肠癌的放疗可以引起出血、疼痛、穿孔等消化道副反应,因此研制良好的放射增敏剂是提高直肠癌放疗效果及提高患者生活质量的重要途

表 2 塞来昔布对直肠癌 HCA-7 细胞周期的影响(%)($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Cell cycle of HCA-7 when treated with celecoxib

Group	Cell cycle		
	G ₀ ~G ₁	S	G ₂ ~M
Control group	44.98± 1.57	37.12± 1.15	17.99± 2.14
Celecoxib group	45.85± 1.29	26.97± 1.72*	27.18± 1.95*

Celecoxib compared with control group * $t=12.02, 6.93$ $P<0.05$

径,也成为肿瘤放疗研究的热门。环氧合酶(COX)是花生四烯酸合成前列腺素的关键限速酶,COX-2是诱导型酶,只有在受到炎症、缺氧、损伤、修复过程中以及肿瘤生长中才有COX-2高表达^[7]。这使得COX-2抑制剂成为预防和治疗肿瘤的一个新靶点^[8]。

近几年,人们对COX-2抑制剂的放射增敏作用进行了大量的研究^[9-10],范志刚^[11]研究显示直肠癌5-Fu联合放疗组中22例可行手术治疗,其中12例行保肛手术,保肛率为52.2%(12/23);而5-Fu联合塞来昔布加放疗组31例手术25例行保肛手术,保肛率80.6%(25/31),联合塞来昔布治疗组可以改善患者放化疗期间的疼痛症状、进食及睡眠等,提高了手术后病理消退分级,两组治疗期间不良反应无显著性差异。Xia等^[12]证明活化PI3K/Akt/COX-2传导途径是抑制剂宫颈癌hela细胞的放射敏感性的主要原因,塞来昔布可以通过多处靶点抑制PI3K/Akt/COX-2轴的激活。Che SM等^[13-14]发现COX-2抑制剂NS398通过抑制AKT激活和诱导凋亡,下调 β -catenin的表达促进放射抗拒食管癌细胞Eca109R50Gy的放射敏感性,而不是通过前列腺素E₂。然而Rivera^[15]等研究发现,在直肠癌的放化疗联合治疗中,联合5-Fu或者卡培他滨组的无明显的总生存期和无病生存期的提高,塞来昔布组的结果也是令人失望的。

本实验采用MTT方法研究塞来昔布对肿瘤细胞的生长抑制情况,随着浓度梯度的升高,塞来昔布对肿瘤细胞的抑制率逐渐升高。本实验采用集落形成实验来检测塞来昔布对肿瘤细胞的生长抑制的影响。本实验发现,照射加药组的D₀、D_q、SF2均比单纯照射组的参数低,可见HCA-7细胞经药物处理后对射线的抵抗力降低,更容易凋亡;在肿瘤细胞的存活曲线上,照射加药组中的肩区减小,提示该组细胞受照射后亚致死性损伤修复能力减弱。本实验还进行了流式细胞术检测细胞周期的分布情况,进一步探讨塞来昔布对直肠癌细胞的放射增敏作用机制。结果显示塞来昔布可以使直肠癌细胞的G₂和M期比例升高,S期比例降低,而G₂和M期细胞对射线敏感,S期细胞对射线不敏感,表明塞来昔布使细胞周期再分布,使对放射敏感的G₂和M期细胞比例增加,受照射后更容易凋亡。

本实验研究显示,塞来昔布对体外直肠癌细胞有较好的细胞毒性和放射增敏作用,为临床上直肠癌的治疗提供了新途径。但塞来昔布对直肠癌放射增敏的具体运用方法和确切作用机制还有赖于进一步研究。

参考文献(References)

[1] Sauer R, Becker H, Hohenberger W, et al. Preoperative versus postop-

erative chemoradiotherapy for rectal cancer [J]. N Engl J Med, 2004, 351(17):1731-1740

[2] Bosset JF, Collette L, Calais G, et al. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer [J]. N Engl J Med, 2006, 355(11):1114-1123

[3] Ortholan C, Francois E, Thomas O, et al. Role of radiotherapy with surgery for T3 and resectable T4 rectal cancer: evidence from randomized trials [J]. Dis Colon Rectum, 2006, 49(3):302-310

[4] Zhang B, Liu JY, Pan JS, et al. Combined treatment of ionizing radiation with genistein on cervical cancer HeLa cells [J]. J Pharmacol Sci, 2006, 102(1): 129-135

[5] Crockart N, Radermacher K, Jordan BF, et al. Tumor radiosensitization by anti-inflammatory drugs: evidence for a new mechanism involving the oxygen effect [J]. Cancer Res, 2005, 65: 7911-7916

[6] 周晓彬, 纪新强, 徐莉. 医用统计学软件PPMS 1.5的组成和应用特点 [J]. 齐鲁医学杂志, 2009, 24(1):29-32

Zhou Xiao-bin, Ji Xin-qiang, Xu Li. The composition and application of PPMS1.5 medical statistical software [J]. Med J Qilu, 2009, 24(1): 29-32

[7] Huisman AM, Polak AA, Niehoff AG, van Rinsum AC, Saris D, Bijlsma JW, Lafeber FJ, Mastbergen SC. The chondroprotective effect of selective COX-2 inhibition in osteoarthritis: ex vivo evaluation of human cartilage tissue after in treatment [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2009, 17: 482-488

[8] Zh Liao, Komaki R, Milas L, et al. A phase I clinical trial of thoracic radiotherapy and concurrent celecoxib for patients with unfavorable performance status inoperable/unresectable non-small cell lung cancer [J]. Cancer Res, 2005, 11:3342-3348

[9] Kim BM, Won J, Maeng KA, et al. Nimesulide, a selective COX-2 inhibitor, acts synergistically with ionizing radiation against A549 human lung cancer cells through the activation of caspase-8 and caspase-3. [J]. Int J Oncol, 2009, May, 34(5):1467-1473

[10] Czembirek C, Eder-Czembirek C, Erovic BM, et al. The cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide, a nonsteroidal analgesic, decreases the effect of radiation therapy in head-and-neck cancer cells [J]. Strahlenther Onkol, 2009, 185(5):310-317

[11] 范志刚, 林焕新, 贺启华等. 塞来昔布术前通气放化疗治疗直肠癌的近期疗效观察 [J]. 实用癌症杂志, 2011, 26(1):49-55

Fan Zhi-gang, Lin Huan-xin, He Qi-hua, et al. Celecoxib combined preoperative concurrent chemotherapy for rectal cancer short-term efficacy. [J]. The practical journal of cancer, 2011, 26(1):49-55

(下转第864页)

- [12] Krafft AE, Lichy JH. Time-motion analysis of 6 cystic fibrosis mutation detection systems [J]. Clin Chem, 2005, 51(7): 1116-1122
- [13] Kramvis A, Kew MC. Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy. [J]. J Viral Hepat, 2005, 12(5): 456-464
- [14] Repp R, Rhiel S, Heermann KH, et al. Genotyping by multiplex polymerase chain reaction for detection of endemic hepatitis B virus transmission [J]. J Clin Microbiol, 1993; 31(5): 1095-1102
- [15] 闰丽, 侯金林, 郭亚兵, 等. HBV 基因型 S 基因 PCR-RFLP 分型方法的建立 [J]. 中华传染病杂志, 2001, 19(4): 39-43
Yun Li, Hou Jing-lin, Guo Ya-bing, et al. Establish a new method of genotyping hepatitis B Virus by restriction pattern analysis of S amplicon [J]. Chinese Journal of Infectious Diseases, 2001, 19(4): 39-43 (In Chinese)
- [16] Usuda S, Okamoto H, Iwanari H, et al. Serological detection of hepatitis B virus genotypes by ELISA with monoclonal antibodies to type-specific epitomes in the preS2-region product [J]. J Virol Methods 1999, 80(1): 97-112
- [17] Song Y, Dai E, Wang J, Liu H, Zhai J, Chen C, Du Z, Guo Z, Yang R. Genotyping of hepatitis B virus (HBV) by oligonucleotides microarray [J]. Mol Cell Probes, 2006, 20(2): 121-127
- [18] 林峰, 曾爱平. 寡核苷酸芯片技术检测乙肝病毒拉米夫定耐药株的应用研究 [J]. 医学研究杂志, 2007, 36(1): 35-37
Lin Feng, Zeng Ai-ping. Application Study of oligonucleotides Detecting HBV and Lamivudine Drug Resistance [J]. Journal of Medical Research, 2007, 36(1): 35-37 (In Chinese)
- [19] Tran N, Berne R, Chann R, et al. European multicenter evaluation of high-density DNA probe arrays for detection of hepatitis B virus resistance mutations and identification of genotypes [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(8): 2792-2800
- [20] Zeng G, Wang Z, Wen S, et al. Geographic distribution, virologic and clinical characteristics of hepatitis B virus genotypes in China [J]. J Viral Hepat, 2005, 12(6): 609-617

(上接第 871 页)

- [12] Xia S, Zhao Y, Yu S, et al. Activated PI3K/Akt/COX-2 pathway induces resistance to radiation in human cervical cancer HeLa cells [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2010, 25(3): 317-323
- [13] Che SM, Zhang XZ, Hou L, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 enhances radiosensitivity of radioresistant esophageal cancer cells by inhibiting AKT activation and inducing apoptosis [J]. Cancer Invest, 2010, 28(7): 679-688
- [14] Che SM, Zhang XZ, Liu XL, et al. The radiosensitization effect of NS398 on esophageal cancer stem cell-like radioresistant cells [J]. Dis Esophagus, 2010, 12(18): 1442-2050
- [15] Rivera S, Villa J, Quero L, et al. Adjuvant radiotherapy for rectal cancer: Recent results, new questions [J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2010, Dec 23