

艾瑞昔布抑制肺腺癌A549细胞裸鼠 移植瘤侵袭和转移及其机制

王玲婵, 崔立静, 王东昌, 赵云霞, 赵志芳, 陈刚

河北医科大学第三医院呼吸科, 河北 石家庄 050051

[摘要] **背景与目的:** 环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)与肺癌血管生成、淋巴转移相关, COX-2抑制剂能够抑制肺癌侵袭和转移。本研究探讨COX-2抑制剂艾瑞昔布能否抑制肺腺癌A549细胞裸鼠移植瘤侵袭和转移及其机制, 以及与洛铂联合应用的疗效。**方法:** 将肺腺癌A549细胞接种于30只BALB/c雄性裸鼠右侧腋部皮下, 建立移植瘤模型。将造模成功裸鼠($n=29$)随机分为4组: 对照组($n=7$)、艾瑞昔布组($n=8$)、洛铂组($n=7$)和艾瑞昔布联合洛铂组($n=7$)。对照组灌胃等量灭菌蒸馏水及尾静脉注射等量0.9%NaCl溶液, 治疗组分别给予灌胃艾瑞昔布片每日40 mg/kg及尾静脉注射洛铂每周7.5 mg/kg相应处理。每日观察裸鼠饮食、活动等一般情况。给药6周后处死裸鼠, 剥取移植瘤组织。应用免疫组织化学法和real-time PCR分别检测各组肿瘤PTEN、cortactin蛋白及相应mRNA表达水平。采用单因素方差分析及非参数检验进行统计学分析。**结果:** 最后1周发现所有裸鼠饮食、活动较之前减少, 逐渐消瘦, 洛铂组及联合组变化较明显。与对照组相比, 艾瑞昔布组及联合组PTEN蛋白及其mRNA表达明显升高, 差异有统计学意义(P 均 <0.001); 与对照组相比, 艾瑞昔布组及联合组cortactin蛋白及其mRNA表达明显降低, 差异有统计学意义(P 均 <0.001)。PTEN与cortactin蛋白、PTEN mRNA与cortactin mRNA均呈显著负相关($r=-0.660$ 、 -0.983 , P 均 <0.001)。**结论:** 艾瑞昔布能够抑制非小细胞肺癌侵袭和转移, 其作用机制可能与上调PTEN蛋白及下调cortactin蛋白表达有关。艾瑞昔布对洛铂化疗可能具有增敏作用。

[关键词] 非小细胞肺癌; 侵袭转移; 艾瑞昔布; PTEN; 皮层肌动蛋白

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2017.01.001

中图分类号: R734.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2017)01-0001-06

Inhibition of invasion and metastasis by imrecoxib and its mechanisms in lung adenocarcinoma A549 cell xenograft in nude mice WANG Lingchan, CUI Lijing, WANG Dongchang, ZHAO Yunxia, ZHAO Zhifang, CHEN Gang (Department of Respiratory Medicine, the Third Affiliated Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China)

Correspondence to: CHEN Gang E-mail: chengang.8@hotmail.com

[Abstract] **Background and purpose:** Cyclooxygenase-2 (COX-2) participates in angiogenesis and lymph node metastasis of lung cancer. COX-2 inhibitors could inhibit invasion and metastasis of lung cancer. This study aimed to investigate the inhibition of invasion and metastasis by COX-2 inhibitor imrecoxib in xenograft tumor of lung adenocarcinoma A549 cell in nude mice and to explore its possible mechanisms, in addition, to observe the efficacy of imrecoxib combined with lobaplatin. **Methods:** Thirty male BALB/c nude mice were injected subcutaneously with A549 cells into the right axillary region to establish xenograft models. Twenty-nine successfully modeled mice were randomly divided into four groups: control group ($n=7$), imrecoxib group ($n=8$), lobaplatin group ($n=7$), imrecoxib combined with lobaplatin group ($n=7$). The control group was treated with the same amount of sterile distilled water and injected with the same amount of 0.9% sodium chloride solution via caudal vein. The treatment group was treated with imrecoxib tablets 40 mg/kg per day through gavage and injected with lobaplatin 7.5 mg/kg per week via caudal vein respectively. The diet, physical activity and other normal conditions of nude mice were observed everyday. After 6 weeks, 29 mice were sacrificed and transplanted tumor tissues were cut off. The expression of PTEN, cortactin protein and mRNA were detected by immunohistochemistry and real-time PCR. The data were analyzed with one-way anova and non-parametric test. **Results:** In the last week, the diet

and physical activity of all nude mice were less than before, and they became thinner, which were more obvious among the mice in lobaplatin group and imrecoxib combined with lobaplatin group. Compared with the control group, the expression of PTEN protein and mRNA were significantly increased in imrecoxib group and imrecoxib combined with lobaplatin group ($P < 0.001$, respectively). Compared with the control group, the expression of cortactin protein and mRNA were significantly decreased in imrecoxib group and imrecoxib combined with lobaplatin group ($P < 0.001$, respectively). PTEN and cortactin protein, PTEN and cortactin mRNA had significantly negative correlation ($r = -0.660, -0.983, P < 0.001$, respectively).

Conclusion: Imrecoxib can inhibit non-small cell lung cancer invasion and metastasis which may be involved in upregulating PTEN protein and reducing cortactin protein. Imrecoxib could enhance the effect of lobaplatin chemotherapy.

[**Key words**] Non-small cell lung cancer; Invasion and metastasis; Imrecoxib; PTEN; Cortactin

肺癌的发病率、死亡率均居全球恶性肿瘤首位, 5年生存率仅10%~15%。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占85%, 约70%的NSCLC确诊时处于晚期, 对放化疗不敏感及耐药性的出现使肺癌疗效不理想^[1]。干预肺癌侵袭和转移是肺癌治疗的突破点。有研究表明, 环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)与NSCLC血管生成、淋巴转移相关^[2], COX-2抑制剂塞来昔布、尼美舒利等能够抑制肺癌侵袭和转移^[3-4]。PTEN是目前发现的第一个具有蛋白磷酸酶活性和脂质磷酸酶活性的新型抑癌基因, 其N端序列与张力蛋白同源且参与细胞之间黏附, 其脂质磷酸酶能够影响细胞与细胞外基质的相互作用, 参与NSCLC侵袭和转移^[5]。皮层肌动蛋白(cortactin)是一种聚集在皮质亚细胞且能与丝状肌动蛋白(F-actin)结合的蛋白质, 通过影响细胞外基质降解、细胞黏附等多种机制参与NSCLC侵袭和转移^[6]。

新型适度选择性COX-2抑制剂艾瑞昔布目前主要用于治疗骨性关节炎。关于艾瑞昔布与肺癌的研究较少, 本研究应用艾瑞昔布对肺腺癌A549细胞裸鼠移植瘤模型进行干预, 观察PTEN、cortactin及相应mRNA表达的变化, 从而探讨其能否抑制肺癌侵袭和转移及机制, 并观察其与化疗药物洛铂联合应用的疗效。

1 材料和方法

1.1 细胞株和实验动物

肺腺癌A549细胞株购自北京大学医学部。健康清洁级BALB/c雄性裸鼠30只, 4~5周龄, 体重20~24g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司(合格证编号: SCXY-京-2009-0004)。在IVC环境中应用无菌饲料及灭菌纯净水饲养裸鼠, 环境温度、湿度适宜。

1.2 主要试剂

艾瑞昔布片购自江苏恒瑞医药股份有限公司(批准文号: 国药准字H20110041, 产品批号: N0083)。注射用洛铂购自海南长安国际制药有限公司(批准文号: 国药准字H20080358, 产品批号: 20140101)。PTEN兔抗人多克隆抗体购自美国Bioworld公司(产品编号BS1305, 浓度1:100)。Cortactin兔抗人单克隆抗体购自英国Abcam公司(产品编号: ab81208, 浓度1:200)。兔SP检测试剂盒等购自北京中杉金桥生物技术有限公司。超纯RNA提取试剂盒、cDNA第一链合成试剂盒、UltraSYBR Mix(With ROX)等购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 建立肺腺癌A549细胞裸鼠移植瘤模型

使用F12k培养基在37℃、CO₂体积分数为5%的培养箱中培养A549细胞。将对数生长期A549细胞制成单细胞悬液, 调整细胞密度为 1×10^7 个/mL, 取0.2 mL接种于裸鼠右腋下皮下。

1.4 裸鼠分组与处理

肿瘤平均直径约4 mm为成瘤标准, 将29只造模成功裸鼠随机分为4组。对照组($n=7$): 灌胃等量灭菌蒸馏水和尾静脉注射等量0.9%NaCl溶液; 艾瑞昔布组($n=8$): 灌胃艾瑞昔布片每日40 mg/kg, 尾静脉注射等量0.9%NaCl溶液; 洛铂组($n=7$): 尾静脉注射洛铂每周7.5 mg/kg, 灌胃等量灭菌蒸馏水; 艾瑞昔布联合洛铂组($n=7$): 灌胃艾瑞昔布片每日40 mg/kg, 尾静脉注射洛铂每周7.5 mg/kg。每日观察裸鼠精神、饮食、活

动、皮肤黏膜有无出血及排便等情况。给药6周后处死裸鼠，将剥取的肿瘤组织保存于4%多聚甲醛溶液中。

1.5 免疫组织化学法检测肿瘤组织PTEN、cortactin蛋白表达

采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接(SP)法。常规石蜡切片脱蜡水化，EDTA抗原热修复10 min，3% H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶15 min，正常山羊血清封闭30 min，滴加一抗，4℃过夜，滴加二抗，在37℃烘箱培育30 min，滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素，二氨基联苯胺(DAB)显色，以0.01 mmol/L磷酸盐缓冲溶液作为阴性对照。于400倍显微镜下随机选取5个视野，对PTEN、cortactin蛋白进行染色评分。标准为染色强度“-”着色同空白对照，“+”为浅染黄色，“++”为棕黄色，“+++”为黄褐色，依次记为0、1、2、3分；阳性细胞比率为阴性、1%~25%、26%~50%、51%~75%、76%~100%、依次记为0、1、2、3、4分；积分为二者之积。

1.6 Real-time PCR检测肿瘤组织PTEN、cortactin mRNA表达

取50 mg肿瘤组织加入1 mL TRIzol提取总RNA，逆转录反应制备cDNA。*GAPDH*基因上游引物：5'-TGGAGTCTACTGGCGTCTT-3'，下游引物：5'-TGTCATATTTCTCGTGGTTCA-3'；*PTEN*基因上游引物：5'-ATGACAGCCATCATCAAAGA-3'，下游引物：5'-CACCTTCAAGTCTT

TCTGCA-3'；*cortactin*基因上游引物：5'-GGAGTACTATTTATATTAGC-3'，下游引物：5'-TGCTAATGAACGGATCATTC-3'。PCR热循环首先为95℃ 10 min，随后为95℃ 15 s，60℃ 60 s，68℃ 40 s，进行45个循环。按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量计算公式即 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{实验组目的基因平均值}} - Ct_{\text{实验组管家基因平均值}}) - (Ct_{\text{对照组目的基因平均值}} - Ct_{\text{对照组管家基因平均值}})$ 计算出各样品目的基因mRNA相对含量。

1.7 统计学处理

采用SPSS 21.0软件进行统计学分析，正态分布数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，非正态分布数据以中位数(最小值，最大值)表示。正态分布且方差齐资料采用单因素方差分析，组间两两比较用LSD检验。非正态分布资料采用非参数检验，采用Pearson或Spearman相关分析， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裸鼠成瘤及一般情况

接种30只裸鼠，29只成瘤，成瘤时间集中在第7~12天。随着肿瘤体积不断增大，最后1周发现各组裸鼠饮食、活动较前减少，逐渐消瘦，洛铂组及艾瑞昔布联合洛铂组变化较明显。实验期间所有裸鼠皮肤黏膜均未出血，排便未见异常(图1)。

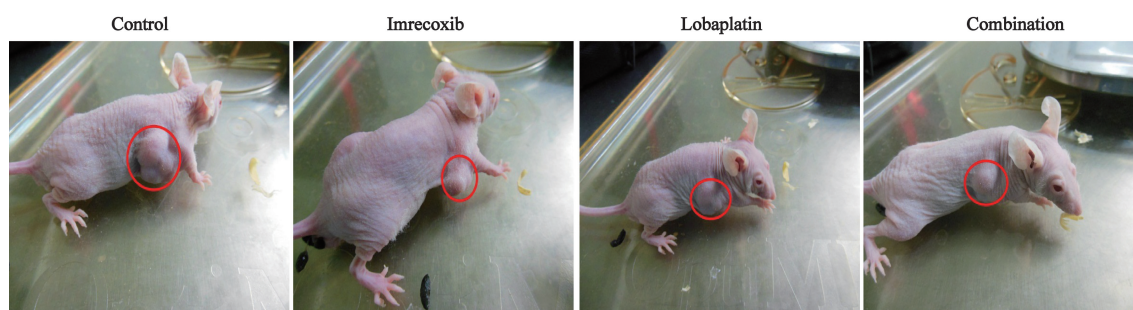


图1 6周后各组肺腺癌A549细胞裸鼠移植瘤生长比较

Fig. 1 Comparison of the growth of lung adenocarcinoma A549 cell xenografts in nude mice of different groups after 6 weeks

2.2 艾瑞昔布对肿瘤PTEN、cortactin蛋白达的影响

PTEN蛋白阳性表达产物主要为细胞核出现棕黄色颗粒(图2)。PTEN蛋白表达在艾瑞昔布组、洛铂组及联合组均明显高于对照组, 差异有统计学意义 [2(1,3)、2(2,3)、4(2,4)和1(0,1), $Z=-2.773$ 、 -1.275 、 -3.220 , $P=0.006$ 、 0.001 、 0.001] ; 联合组表达高于艾瑞昔布组、洛铂组, 差异有统计学意义 [4(2,4)、2(1,3)和2(2,3), $Z=-2.726$ 、 -2.453 , $P=0.006$ 、 0.014] ; 艾瑞昔布组表达较洛铂组降低, 差异无统计学意义 [2(1,3)和2(2,3), $Z=-1.275$, $P=0.202$, 表1]。Cortactin蛋白阳性

表达产物为细胞质或细胞核(少量)出现棕黄色颗粒(图2)。Cortactin蛋白表达在艾瑞昔布组、联合组均低于对照组, 差异有统计学意义 [4(3,4)、1(0,2)和6(4,6), $Z=-2.442$ 、 -3.202 , $P=0.015$ 和 $P=0.001$] ; 洛铂组低于对照组, 差异无统计学意义 [4(2,6)和6(4,6), $Z=-1.214$, $P=0.225$] ; 联合组表达低于艾瑞昔布组、洛铂组, 差异有统计学意义 [1(0,2)、4(3,4)和4(2,6), $Z=-3.228$ 、 -3.071 , $P=0.001$ 、 0.002] ; 艾瑞昔布组表达较洛铂组轻度升高, 差异无统计学意义 [4(3,4)和4(2,6), $Z=-1.120$, $P=0.263$, 表1]。

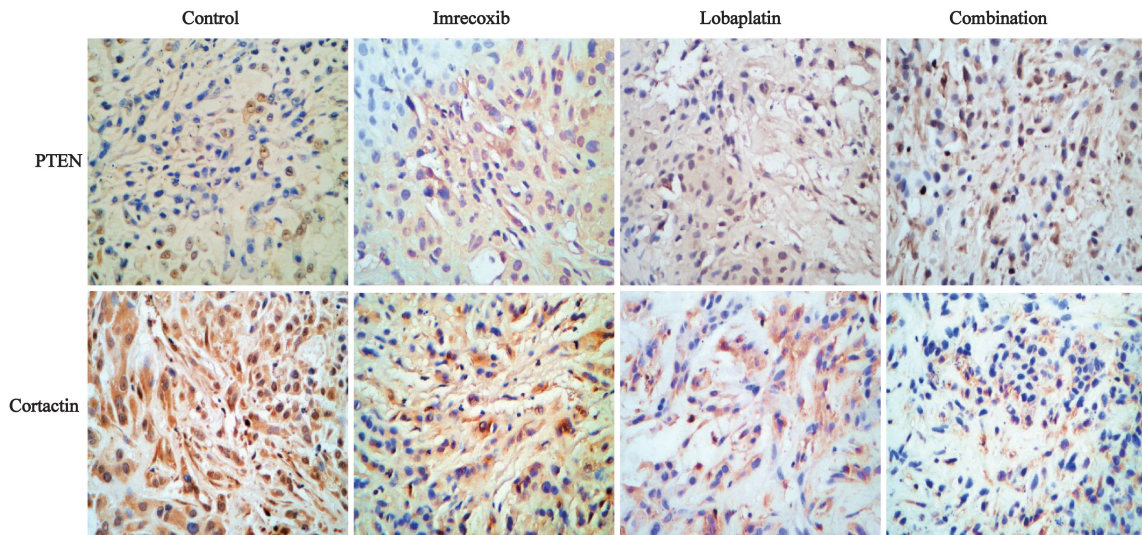
(SP, $\times 400$)

图2 PTEN和cortactin蛋白在各组肿瘤组织阳性表达

Fig. 2 Positive expression of PTEN and cortactin protein in tumor tissues of different groups

表1 各组肿瘤组织PTEN和cortactin蛋白表达 [中位数 (最小值, 最大值)]

Tab. 1 Expression of PTEN and cortactin protein in tumor tissues of different groups [Medium (Min, Max)]			
Group	N	PTEN	Cortactin
Control	7	1(0,1)	6(4,6)
Imrecoxib	8	2(1,3) ^{*△}	4(3,4) ^{*△}
Lobaplatin	7	2(2,3) ^{*△}	4(2,6) [△]
Combination	7	4(2,4) [*]	1(0,2) [*]

*: $P<0.05$, as compared with control group; Δ : $P<0.05$, as compared with imrecoxib combined with lobaplatin group

2.3 艾瑞昔布对肿瘤PTEN mRNA、cortactin mRNA表达的影响

PTEN mRNA的表达在艾瑞昔布组、洛铂组及联合组均高于对照组, 差异有统计学意义(2.340 ± 0.043 、 2.371 ± 0.021 、 3.105 ± 0.071 和 1.080 ± 0.046 , P 均 <0.001); 联合组高于艾瑞昔布组、洛铂组, 差异有统计学意义(3.105 ± 0.071 、 2.340 ± 0.043 和 2.371 ± 0.021 , P 均 <0.001); 艾瑞昔布组低于洛铂组, 差异无统计学意义(2.340 ± 0.043 和 2.371 ± 0.021 ,

$P=0.242$, 表2)。Cortactin mRNA的表达在艾瑞昔布组、洛铂组及联合组均低于对照组, 差异有统计学意义(0.549 ± 0.011 、 0.556 ± 0.014 、 0.388 ± 0.014 和 1.039 ± 0.026 , P 均 <0.001); 联合组低于艾瑞昔布组、洛铂组, 差异有统计学意义(0.388 ± 0.014 、 0.549 ± 0.011 和 0.556 ± 0.014 , P 均 <0.001); 艾瑞昔布组含量较洛铂组轻度降低, 差异无统计学意义(0.549 ± 0.011 和 0.556 ± 0.014 , $P=0.418$, 表2)。

表2 各组肿瘤组织PTEN和cortactin mRNA表达

Tab. 2 Expression of PTEN and cortactin mRNA in tumor tissues of different groups

Group	Number	PTEN	Cortactin
Control	7	1.080 ± 0.046	1.039 ± 0.026
Imrecoxib	8	$2.340 \pm 0.043^{*\Delta}$	$0.549 \pm 0.011^{*\Delta}$
Lobaplatin	7	$2.371 \pm 0.021^{*\Delta}$	$0.556 \pm 0.014^{*\Delta}$
Combination	7	$3.105 \pm 0.071^*$	$0.388 \pm 0.014^*$

*: $P<0.05$, as compared with control group; Δ : $P<0.05$, as compared with imrecoxib combined with lobaplatin group

2.4 PTEN与cortactin相关性分析

各组肿瘤组织中PTEN与cortactin蛋白呈显著负相关($r=-0.660$, $P<0.001$); PTEN mRNA与cortactin mRNA呈显著负相关($r=-0.983$, $P<0.001$)。

3 讨论

新型适度选择性COX-2抑制剂艾瑞昔布能够保持COX-1和COX-2动态平衡, 在抗炎镇痛基础上维持前列环素和血栓烷A2之间功能平衡, 减少胃肠道出血及严重心血管血栓性不良事件、心肌梗死和中风的风险^[7]。洛铂作为第3代铂类抗肿瘤药物, 不与顺铂和卡铂产生交叉耐药, 具有减少顺铂肾脏毒性、奥沙利铂神经毒性等优势^[8]。目前关于艾瑞昔布及其联合洛铂与肺癌的研究少见, 本课题对艾瑞昔布及其联合洛铂能否抑制肺癌侵袭和转移及作用机制进行了研究。

目前手术、放化疗治疗肺癌的疗效仍不理

想, 分子靶向治疗抑制肺癌侵袭和转移是肺癌治疗的新途径。肺癌的侵袭和转移是由多个因子、多种信号传导通路共同参与的复杂过程, 包括肺癌细胞从原发部位脱落、细胞外基质降解、失巢凋亡和肺癌细胞黏附等多种生理功能的失调。PTEN和cortactin蛋白异常表达均可导致肺癌细胞之间黏附性降低, 从而从原发灶脱落, 更易发生淋巴转移。

本研究结果表明, 与对照组相比, 艾瑞昔布组裸鼠饮食、活动、重量无明显变化, 说明艾瑞昔布的胃肠道反应等不良反应较少, 洛铂组及联合组裸鼠一般情况较差, 可能与洛铂较强的不良反应有关。

有研究表明, 在NSCLC中, PTEN与COX-2表达呈负相关, PTEN蛋白低表达或不表达者更易发生淋巴结转移, 且生存期短于高表达或阳性表达者^[9-10]。Cortactin阳性表达与NSCLC分化程度呈负相关, 与TNM分期、淋巴转移呈正相关^[11]。本研究结果表明, 与对照组相比, 艾瑞昔布组PTEN蛋白及其mRNA表达上调同时cortactin及其mRNA表达下调($P<0.05$), 艾瑞昔布组与洛铂组差异无统计学意义($P>0.05$), 提示艾瑞昔布可能促进PTEN蛋白的表达同时抑制cortactin蛋白的表达, 从而抑制NSCLC侵袭和转移。

本研究结果同时表明, 与艾瑞昔布及洛铂单药组相比, 艾瑞昔布联合洛铂组PTEN蛋白及其mRNA表达明显增加($P<0.05$), cortactin蛋白及其mRNA表达明显减少($P<0.05$), 提示艾瑞昔布可能增加洛铂抗肿瘤疗效, 艾瑞昔布对洛铂化疗具有增敏作用。该结果与COX-2抑制剂塞来昔布联合多西他赛和顺铂可增加肺癌化疗的敏感性报道相一致^[12]。

根据本研究推测艾瑞昔布能够抑制NSCLC侵袭和转移的可能机制: 通过抑制PTEN蛋白的失活, 干扰PI3K/Akt信号转导, 使细胞周期阻滞在G₁期或促使细胞凋亡^[13]; 调节FAK和Shc的磷酸化, 使细胞与细胞外基质黏附性增加肿瘤细胞不易从原发灶脱离^[5]; 通过下调cortactin目的基因CTTN3'端的miRNA-182, 同

时细胞程序性死亡因子4表达增加使肿瘤细胞停留在G₀/G₁期, 抑制细胞侵袭和转移^[14]。艾瑞昔布对洛铂化疗可能具有协同作用, 其具体分子生物学机制尚不明确。艾瑞昔布能否联合化疗药物应用于临床治疗肺癌还需进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] BOOTH C M, SHEPHERD F A, PENG Y, et al. Time to adjuvant chemotherapy and survival in non-small cell lung cancer: a population-based study [J]. *Cancer*, 2013, 119(6): 1243-1250.
- [2] LIU H, YANG Y, XIAO J, et al. COX-2-mediated regulation of VEGF-C in association with lymph angiogenesis and lymph node metastasis in lung cancer [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2010, 293(11): 1838-1846.
- [3] REN F Q, FAN M Y, MEI J D, et al. Interferon- γ and celecoxib inhibit lung-tumor growth through modulating M2/M1 macrophage ratio in the tumor microenvironment [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2014, 8: 1527-1538.
- [4] KIM B M, WON J, MAENQ K A, 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, 34(5): 1467-1473.
- [5] WANG C, YANG R, YUE D, et al. Expression of FAK and PTEN in bronchioloalveolar carcinoma and lung adenocarcinoma [J]. *Lung*, 2009, 187(2): 104-109.
- [6] WEAVER A M. Cortactin in tumor invasiveness [J]. *Cancer*, 2008, 265(2): 156-166.
- [7] 郭宗儒. 国家1类新药艾瑞昔布的研制 [J]. *中国新药杂志*, 2012, 21(3): 223-230.
- [8] WHEATE N J, WALKER S, CRAIQ G E, et al. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and clinical trials [J]. *Dalton Trans*, 2010, 39(35): 8113-8127.
- [9] YANAGAWA N, LEDUC C, KOHLER D, et al. Loss of phosphatase and tensin homolog protein expression is an independent poor prognostic marker in lung adenocarcinoma [J]. *J Thorac Oncol*, 2012, 7(10): 1513-1521.
- [10] PANAGIOTOU I, GEORGINANOS S N, TSIAMBAS E, et al. Impact of HER-2 and PTEN simultaneous deregulation in non-small cell lung carcinoma: correlation with biological behavior [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(12): 6311-6318.
- [11] 于涓瀚, 王恩华. Cortactin在非小细胞肺癌中的表达及意义 [J]. *现代肿瘤医学*, 2013, 21(1): 62-65.
- [12] 刘国华, 黄建安. 非小细胞肺癌塞来昔布联合化疗的临床观察 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2011, 6(34): 469-471.
- [13] YUN F, JIA Y F, LI X X, et al. Clinicopathological significance of PTEN and PI3K/AKT signal transduction pathway in non-small cell lung cancer [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(10): 2112-2120.
- [14] MIN W, YUAN Y W, WEN Q Z, et al. Downregulation of microRNA-182 inhibits cell growth and invasion by targeting programmed cell death 4 in human lung adenocarcinoma cells [J]. *Tumor Biol*, 2014, 35(1): 39-46.

(收稿日期: 2016-07-02 修回日期: 2016-08-20)