

· 论 著 ·

## 塞来昔布对急性白血病原代细胞增殖及血管新生的影响\*

葛晓华, 赵小强, 阮林海<sup>△</sup>

(河南科技大学第一附属医院血液科, 河南洛阳 471003)

**摘要:**目的 探讨塞来昔布对急性白血病原代细胞增殖的影响。方法 采用 MTT 法检测塞来昔布对急性白血病原代细胞的增殖抑制作用, 采用免疫组化法检测塞来昔布作用急性白血病原代细胞后血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )的表达情况。结果 塞来昔布能显著抑制急性白血病原代细胞的增殖, 免疫组化结果可见实验组 VEGF、bFGF 的阳性率较对照组均显著降低; 但 TGF- $\beta$  阳性率与对照组比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 塞来昔布能有效抑制急性白血病原代细胞分泌 VEGF、bFGF, 抑制白血病原代细胞的生长和增殖, 其机制可能与抑制白血病血管新生有关。

**关键词:**白血病; 血管内皮生长因子类; 成纤维细胞生长因子; 转化生长因子; 塞来昔布

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.26.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)26-2689-03

Influence of celecoxib on proliferation and regulatory networks of angiogenesis in primary acute leukemia cells<sup>†</sup>Ge Xiaohua, Zhao Xiaoqiang, Ruan Linhai<sup>△</sup>

(Department of Hematology, First Affiliated Hospital, Henan University of Science and Technology,

Luoyang, Henan 471003, China)

**Abstract:** **Objective** To evaluate the influence of celecoxib on proliferation of primary acute leukemia cells and vascular new network control system in the development of leukemia. **Methods** The inhibiting effect of celecoxib on the proliferation of primary acute leukemia cells was detected by MTT assay. The immunocytochemistry method was used to detect the expression of VEGF, bFGF and TGF- $\beta$  after celecoxib acting on primary acute leukemia cells. **Results** Celecoxib could significantly inhibit the proliferation of primary acute leukemia cells. The immunocytochemistry analysis demonstrated that celecoxib significantly reduced the expression of VEGF, bFGF and TGF- $\beta$  protein in the experimental group compared with the control group. However, compared with the control group, the positive rate of TGF- $\beta$  had no statistical difference ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Celecoxib can effectively inhibit primary acute leukemia cells secreting VEGF and bFGF, and inhibit the growth and proliferation of primary leukemia cells, the mechanism may be related to inhibit leukemic angiogenesis.

**Key words:** leukemia; vascular endothelial growth factors; fibroblast growth factors; transforming growth factors; celecoxib

越来越多的证据表明, 环氧化酶-2(COX-2)的表达不仅与炎症有关, 且与多种恶性肿瘤有关。COX-2 抑制剂可以抑制肿瘤细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 抑制肿瘤细胞的侵袭和转移<sup>[1]</sup>。目前, 特异性 COX-2 抑制剂塞来昔布用于白血病治疗的研究较少, 且仅限于细胞株。因此, 本研究以塞来昔布作用于急性白血病原代细胞, 观察其对白血病细胞增殖的影响, 并探讨其作用机制, 为其临床应用提供理论依据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2010 年 2 月至 2011 年 7 月本院血液科初诊未治的急性白血病患者 16 例, 其中, 急性髓系白血病患者 12 例( $M_2$  6 例,  $M_3$  3 例,  $M_5$  3 例), 急性淋巴细胞白血病患者 4 例( $L_1$  2 例,  $L_2$  2 例), 所有患者均符合国内诊断及疗效标准<sup>[2]</sup>, 排除合并心、肝、肾功能异常, 感染, 合并其他恶性肿瘤及自身免疫性疾病者。其中, 男 10 例, 女 6 例; 年龄 5~68 岁, 中位 36 岁。

## 1.2 方法

**1.2.1 主要仪器与试剂** CO<sub>2</sub> 细胞培养箱、普通及倒置显微镜、COX-2 抑制剂塞来昔布胶囊购自辉瑞公司; RPMI1640 培养基、胎牛血清、MTT、通用型 SP-9000 试剂盒、鼠抗人血管内皮生长因子(VEGF)单克隆抗体、兔抗人碱性成纤维细胞生长

因子(bFGF)单克隆抗体均购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 兔抗人多克隆转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )抗体(1:60)购自武汉博士德生物技术公司。

**1.2.2 MTT 法测定塞来昔布对急性白血病原代细胞增殖的抑制作用** Ficoll 密度梯度离心法取患者骨髓单个核细胞分离, 接种于含体积分数为 10% 灭活胎牛血清的 RPMI1640 培养基中常规培养。取指数生长期的细胞, 调整细胞密度为  $1 \times 10^5$  个/mL, 接种于 3 个 96 孔板中, 每孔细胞悬液 100  $\mu$ L, 加入用 RPMI1640 培养液稀释的塞来昔布, 使其终浓度分别为 20、40、60、80、100  $\mu$ mol/L, 并各设 5 个复孔, 同时设对照组(不加塞来昔布), 每组细胞培养不同时间(24、48、72 h), 实验结束前 4 h, 每孔加入 MTT 10  $\mu$ L(5 mg/mL), 再继续培养 4 h 后从培养箱中取出, 每孔各加入 100  $\mu$ L 10% 十二烷基磺酸钠(SDS)终止反应, 37  $^{\circ}$ C 存放过夜, 用酶标仪于 570 nm 波长处检测吸光度 A 值。根据如下公式计算细胞抑制率: 细胞生长抑制率 = [对照组 A 值 - 实验组 A 值] / 对照组 A 值  $\times 100\%$ 。

**1.2.3 免疫组化法检测 VEGF、bFGF、TGF- $\beta$  的表达** 收集经 80  $\mu$ mol/L 塞来昔布处理培养 48 h 的单个核细胞和未经处理的单个核细胞, 制备细胞滴片, 晾干后置于 4  $^{\circ}$ C 丙酮固定

表 1 VEGF、bFGF、TGF- $\beta$  在急性白血病原代细胞培养 48 h 后的表达

项目	n	对照组		实验组	
		表达率	积分	表达率	积分
VEGF	16	46.69 $\pm$ 7.12	102.63 $\pm$ 12.97	36.19 $\pm$ 5.99 $\star$	73.38 $\pm$ 11.02 $\star$
bFGF	16	27.19 $\pm$ 8.19	56.81 $\pm$ 14.91	16.38 $\pm$ 5.07 $\star$	36.31 $\pm$ 9.62 $\star$
TGF- $\beta$	16	79.19 $\pm$ 16.23	161.56 $\pm$ 36.20	81.05 $\pm$ 15.76	165.44 $\pm$ 33.77

$\star$ :  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

液中固定 10 min, PBS 液洗涤 5 min $\times$ 3 次, 自然晾干。细胞滴片置于即用型过氧化物酶阻断剂中, 室温孵育 15 min, PBS 洗涤 4 min $\times$ 3 次。滴加 5% 正常山羊血清, 室温孵育 20 min, 实验组滴加一抗工作液 50 mL, 对照组用 PBS 代替一抗, 置于底部有体积分数 20% 甘油保湿盒中, 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。PBS 洗涤 5 min $\times$ 3 次, 滴加生物素标记的二抗 50 mL, 室温下孵育 30 min, PBS 洗涤 5 min $\times$ 3 次。DAB 显色, 苏木素复染, 中性树脂封片。

**1.2.4 结果判定** 细胞核或细胞质染色为棕黄色或深棕黄色者为阳性细胞, 根据阳性细胞所占比例及显色程度, 参照 1997 年全国免疫组化技术诊断标准化专题研讨会意见, 对阳性细胞进行积分: 阳性颗粒所占细胞面积比例小于 50%, 见浅黄色颗粒, 明显高于背景底色, 记 1 分; 阳性颗粒所占细胞面积比例为 50%~70%, 见较深黄色颗粒, 记 2 分; 阳性颗粒所占细胞面积比例大于 70%, 见大量深黄色颗粒, 记 3 分; 每片计数并计算 200 个细胞中阳性细胞率及阳性积分。

**1.3 统计学处理** 所有数据采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 计量资料的均数比较采用  $t$  检验、方差分析、直线相关分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 塞来昔布对急性白血病原代细胞生长抑制率的测定** 塞来昔布对急性白血病原代细胞的生长增殖有较强抑制作用, 且随着药物浓度的增大、作用时间的延长, 抑制作用越明显, 细胞生长的抑制率逐渐升高, 塞来昔布终浓度在 0~100  $\mu\text{mol/L}$  能显著抑制急性白血病原代细胞的生长和增殖, 抑制率从 3.48% 增加到 70.24%, 且呈时间和剂量依赖性, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 1。

**2.2 VEGF、bFGF、TGF- $\beta$  在急性白血病原代细胞培养 48 h 后的表达** 见表 1。

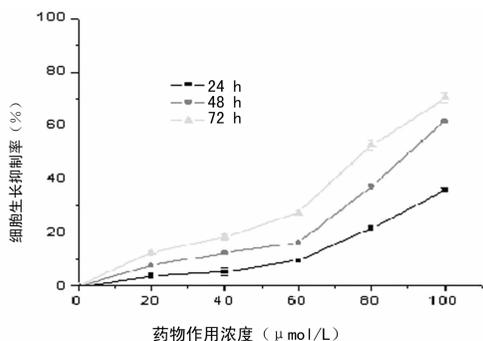


图 1 塞来昔布对急性白血病原代细胞的抑制率

**2.3 急性白血病初发未治患者(对照组)单个核细胞 VEGF 与 bFGF、TGF- $\beta$  水平的相关性** 采用直线相关分析显示,

VEGF 表达与 bFGF、TGF- $\beta$  表达均呈正相关( $r$  分别为 0.534、0.408,  $P < 0.01$ )。

## 3 讨 论

塞来昔布是一种选择性 COX-2 的抑制剂, 是目前惟一被美国食品药品监督管理局(FDA)批准治疗家族性腺瘤性息肉患者的辅助治疗的非甾体抗炎药。但塞来昔布的抗癌效果及分子机制尚不完全清楚。研究表明 COX-2 参与实体瘤中多种血管生长因子调控的血管生成包括 VEGF、白细胞介素-6(IL-6)、bFGF 等, 影响肿瘤细胞与基质黏附, 促进肿瘤细胞生存和耐药, 阻断上述通路可抑制肿瘤细胞增殖、促进凋亡<sup>[3]</sup>。Lang 等<sup>[4]</sup>用大鼠角膜模型观察到塞来昔布能抑制血管形成, 并认为塞来昔布强有力的抗血管形成活性可能是其抑制肿瘤生长和转移的主要机制。国外有学者研究塞来昔布对人类慢性粒系白血病细胞株的影响, 其结果表明塞来昔布在体外能诱导人慢性粒性白血病细胞系 K562 细胞凋亡<sup>[5]</sup>。这些结果表明, 塞来昔布在治疗慢性粒细胞白血病方面有广泛的前景。但塞来昔布对急性白血病原代细胞的影响在国内外少见报道。

本实验将 COX-2 抑制剂塞来昔布作用于原代培养的急性白血病细胞, 观察其对促血管新生因子的作用。实验结果发现塞来昔布终浓度在 0~100  $\mu\text{mol/L}$  能显著抑制急性白血病原代细胞的生长和增殖, 抑制率从 3.48% 增加到 70.24%, 且呈时间和剂量依赖性, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。免疫组化结果显示实验组 VEGF、bFGF 的阳性率均明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 但 TGF- $\beta$  阳性率与对照组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。这表明 COX-2 抑制剂塞来昔布在体外能显著下调白血病细胞 VEGF bFGF 表达, 但对 TGF- $\beta$  表达基本无改变, 这充分说明了血管新生是一个复杂的过程, 它受众多正性与负性调节因子的控制, 两者的平衡才使血管增生维持在生理范围内。急性白血病的发病过程中涉及多种细胞因子共同作用的调控, 其中, 血管新生因子如 COX-2、VEGF、bFGF、白细胞介素-8(IL-8) 在血管新生过程中的作用最为重要, 而 TGF- $\beta$  是最主要的负调控因子之一, TGF- $\beta$ /Smads 作为一种肿瘤抑制信号, 在乳腺癌<sup>[6]</sup>、胃癌<sup>[7]</sup> 等实体瘤中有信号降低或异常的表达, 同时它能下调造血刺激因子及肿瘤蛋白的表达。相反, 另有学者 Jung 等<sup>[8]</sup>发现 TGF- $\beta$  在白血病及淋巴瘤细胞中可通过阻断肿瘤细胞 Fas 途径抑制肿瘤细胞的凋亡, 同时还可通过上调肿瘤细胞中白介素-1 $\beta$  转换酶抑制蛋白(c-FLIPL) 的表达使肿瘤细胞重新获得抗凋亡能力, 这些因素导致了肿瘤细胞的生长及迁移。而本实验结果表明 TGF- $\beta$  在对照组和实验组的阳性率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 这可能与 TGF- $\beta$  在白血病发展中的负调控因子的作用减弱有关, 同时进一步表明了急性白血病细胞生长的过程中促血管生长因子起重要的作用, 因此, 通过抑制白血病血管的新生可以达到抑制白血病细胞生长的目的。而本实验的结果也证实了这一点, 其机制可能与塞

来昔布减弱了刺激血管新生反应调控的信号有关,进而通过抑制血管新生而发挥抗白血病的效应。这说明塞来昔布可能是治疗急性白血病的潜在药物,同时认为 VEGF、bFGF、TGF- $\beta$  等血管新生因子是血液肿瘤治疗的靶点。

有研究表明 COX-2 能促进 VEGF、bFGF 及血小板趋化因子(PDGF)等的表达,使肿瘤组织内新生血管形成<sup>[9]</sup>。VEGF 是一种作用最强和特异性最高的血管内皮细胞有丝分裂素,它通过与其受体特异性的结合,具有促进内皮细胞的增殖和迁移、促进血管再生、增加血管的通透性以及维持血管的功能,与肿瘤血管新生密切相关。bFGF 是成纤维细胞生长因子(FGF)超家族成员之一,它主要通过刺激内皮细胞的增生和迁移来促进肿瘤血管的生成。Uefuji 等<sup>[10]</sup>发现在肿瘤患者中,COX-2 表达高的患者微血管密度(MVD)比 COX-2 表达低者增加明显,这说明 COX-2 与骨髓的微血管密度有关,同时它能够诱导 VEGF 和 bFGF 等多种促血管生成因子的表达,进而促进肿瘤的生成。可见 COX-2 与 VEGF、bFGF 在肿瘤的发生、发展过程中存在一定的相关性。同时有研究表明,COX-2 还可提高 VEGF、bFGF、TGF- $\beta$  以及 PDGF 的表达,促进肿瘤血管的生成<sup>[11]</sup>。Ishjko 等<sup>[12]</sup>在对宫颈腺样囊性癌(ACCs)的研究中,发现 COX-2 与 VEGF 的表达水平明显高于宫颈原位癌,且发现在 ACCs 中有明显的血管新生现象,这提示 COX-2 的高表达很可能会引起 VEGF 的过度合成,最终促使肿瘤新生血管的生成。Dias 等<sup>[13]</sup>证实白血病细胞分泌的 bFGF 可引起内皮细胞释放 VEGF,这说明 VEGF 与 bFGF 有协同作用,这与本实验的结果一致,即 VEGF 与 bFGF 的表达在对照组呈正相关( $r=0.534, P<0.01$ )。本实验还发现 VEGF 与 TGF- $\beta$  的表达在对照组也呈正相关( $r=0.408, P<0.01$ ),这充分说明了 VEGF、bFGF、TGF- $\beta$  共同参与了白血病血管新生的过程。而另外在一些药物实验中发现,COX-2 选择性抑制剂 NS398、吲哚美辛等可通过抑制 VEGF、bFGF、PDGF 等抑制白血病细胞的生长,同时在体外实验中也发现 COX-2 特异性抑制剂 NS2398 可通过增加自身的凋亡速度而明显降低白血病细胞的生存期,这与大量资料证明的结果一致<sup>[14-15]</sup>,即 COX-2 抑制剂有极为广泛的抗白血病作用,能直接抑制白血病细胞的生长,其机制比较复杂,除了与抑制白血病血管新生有关外,还通过调控癌基因和抑癌基因,下调凋亡拮抗基因的表达,抑制 COX-2 的活性,影响表皮生长因子受体(EGFR),蛋白激酶 C(PKC)信号转导通路,诱导细胞周期停滞和细胞凋亡,抑制血管生成,抑制尿激酶的活性和基质金属蛋白酶-2/9(MMP2/9)的分泌,诱导特异的细胞周期蛋白表达,以及通过线粒体途径等诱导白血病细胞凋亡。可见,白血病血管新生调控网络系统极其复杂,其调节机制有待进一步研究。

#### 参考文献:

[1] Chen Q, Shinohara N, Abe T, et al. Significance of COX-2 expression in human renal cell carcinoma cell lines[J]. *Int J Cancer*, 2004, 108, (6): 825-832.

[2] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京: 北京科学出版社, 2007: 131-134.

[3] Giles FJ, Kantarjian HM, Bekele BN, et al. Bone marrow

cyclooxygenase-2 levels are elevated in, chronic-phase chronic myeloid leukemia and are associated with reduced survival[J]. *Br J Haematol*, 2002, 119(1): 38-45.

- [4] Lang S, Lauffer L, Clausen C, et al. Impaired monocyte function in cancer patients restoration with a cyclooxygenase-2 inhibitor[J]. *FASEB J*, 2003, 17(2): 286-288.
- [5] Subhashini J, Mahipal SV, Reddanna P. Anti-proliferative and apoptotic effects of celecoxib on human chronic myeloid leukemia in vitro[J]. *Cancer Lett*, 2005, 224(1): 31-43.
- [6] Sterling JA, Wu L, Banerji SS. PARP regulates TGF-beta receptor type II expression in estrogen receptor-positive breast cancer cell lines[J]. *Anticancer Res*, 2006, 26(3A): 1893-1901.
- [7] Kim SS, Shetty K, Katuri V, et al. TGF-beta signaling pathway inactivation and cell cycle deregulation in the development of gastric cancer: role of the beta spectrin, ELF[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 344(4): 1216-1223.
- [8] Jung YJ, Kim JY, Park JH. TGF-beta1 inhibits Fas-mediated apoptosis by regulating surface Fas and cFLIPL expression in human leukaemia/lymphoma cell[J]. *Int J Mol Med*, 2004(13): 99-104.
- [9] Turini ME, Dubois RN. Cyclooxygenase-2: A therapeutic target[J]. *Annu Rev Med*, 2002(53): 35-57.
- [10] Uefuji K, Iehikura T, Moehizuki H. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(1): 135-138.
- [11] Cianchi F, Cortesini C, Bech P. Up-regulation of cyclooxygenase-2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer [J]. *Gastroenterology*, 2001, 121(6): 1339-1347.
- [12] Ishjko O, Sumi T, Yoshidal H. Cyclooxygenase-2 expression in an adenoid cystic carcinoma of the uterine cervix [J]. *Oncol Rep*, 2001, 8(5): 1023-1025.
- [13] Dias S, Choy M, Alitalo K, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C signaling through FLT-4 (VEGFR-3) mediates leukemic cell proliferation, survival, and resistance to chemotherapy[J]. *Blood*, 2002, 99(6): 2179-2184.
- [14] Mustafa C, Suleyman B, Muzaffer D, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 in multiple myeloma: association with reduced survival[J]. *Am J of Hematology*, 2005, 80(3): 169-173.
- [15] Cui W, Yu CH, Hu KQ. In vitro and in vivo effects and mechanisms of celecoxib-induced growth inhibition of human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(22): 8213-8221.