

- 5 Mukoyama M, Nakao K, Saito Y, *et al.* Increased human brain natriuretic peptide in congestive heart failure. *N Engl J Med*, 1990, 323 (11): 757 - 758
- 6 中华神经科学会. 各类脑血管疾病诊断要点[J]. 中华神经内杂志, 1996, 29 (6): 379
- 7 Nishigaki K, Tomita M, Kagawa K, *et al.* Marked expression of plasma brain natriuretic peptide is a special feature of hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 1996, 28 (5): 1234 - 1242
- 8 Sutton TM, Stewart RAH, Gerber IL, *et al.* Plasma natriuretic peptide levels increase with symptoms and severity of mitral regurgitation. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 41 (12): 2280 - 2287
- 9 Kohno M, Horio T, Yokokawa K, *et al.* Brain natriuretic peptide as a cardiac hormone in essential hypertension. *Am J Med*, 1992, 92 (1): 29 - 34
- 10 Rossi A, Enriquez - Sarano M, Burnett Jr JC, *et al.* Natriuretic peptide levels in atrial fibrillation: a prospective hormonal and Doppler - echocardiographic study. *J Am Coll Cardiol*, 2000, 35 (5): 1256 - 1262
- 11 Silvet H, Young - Xu Y, Walleigh D, Ravid S. Brain natriuretic peptide is elevated in outpatients with atrial fibrillation. *Am J Cardiol*, 2003, 92 (9): 1124 - 1127
- 12 刘舟, 李敬诚. 脑梗死患者血清脑钠素的变化及临床意义. 安徽医药, 2006, 5 (3): 113 - 115
- 13 张春玲, 康金锁. 心血管病患者血浆 N 端 B 型脑钠肽水平变化及其临床意义. 中华检验医学杂志, 2006, 29 (1): 31 - 34
- 14 McClatchey FD. *Clinical Laboratory Medicine*. 2nd edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002
- 15 陈子, 陈怀红, 陈琳迪. 脑梗死患者血清 BNP 与 CRP 浓度的变化及临床意义. 心脑血管病防治, 2008, 8 (4): 225 - 226
- 16 Pedro J Modrego, Beatriz Boned, Juan J Berlanga, *et al.* Plasmatic B - Type Natriuretic Peptide and C - Reactive Protein in Hyperacute Stroke as Markers of Cerebral Evidence of Brain Edema. *International Journal of Medical Sciences*, 2008, 5 (1): 18 - 23
- (收稿: 2010 - 05 - 11)
- (修回: 2010 - 07 - 05)

1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 和塞来昔布协同对 5 - FU 化疗的增敏作用

孙根林 鲍扬漪

摘要 目的 研究塞来昔布(特异性环氧合酶-2抑制剂)联合 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 增强 5 - FU 对结肠癌化疗增敏作用及其机制。方法 3 种药物用单药、两药和 3 药联合干预结肠癌细胞株 HT29 48h, 用 ELISA 法观察干预后结肠癌细胞抑制率和基质金属蛋白酶-7(MMP-7)表达变化及联用 5 - FU 后溶解型 Fas 受体(s - FasL)表达的变化。结果 单药、两药和 3 药联合干预结肠癌细胞株 HT29 后抑制率增加, MMP-7 表达减少及 s - Fas 表达减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 塞来昔布和 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 协同对 5 - FU 的增敏作用, 其机制可能通过抑制 MMP-7 表达, 降低其对细胞表面 Fas 的酶解作用, 促进结肠癌细胞凋亡。

关键词 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 5 - FU 敏感性

Effect of 1,25 (OH)₂ VitD₃ Combined with Celecoxib on Sensitivity Increasing by 5 - FU Chemotherapy. Sun Genlin, Bao Yangyi. *The First People's Hospital of Hefei, Anhui 230061, China*

Abstract Objective To study the molecular mechanism of enhancing the sensitivity of 5 - FU chemotherapy by celecoxib (a specific COX-2 inhibitors) combined with 1,25 (OH)₂ VitD₃ in the colon cancer cells. **Methods** The colon cancer cell lines HT29 were intervened with one drug, two drugs and three drugs for 48h. Determination of MMP-7 and s - FasL titer was done through cell culture supernatant by means of ELISA. After the determination of OD values was done by means of MTT, inhibition rates were calculated. **Results** After HT29 cells were treated by one drug, two drugs and three drugs, the inhibition rate increased, and the concentration of MMP-7 and s - Fas decreasing was observed ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The molecular mechanism of enhancing the sensitivity of

基金项目: 合肥市科技局重点科研项目(合科 2007 第 15 号)

作者单位: 230061 安徽省合肥市第一人民医院肿瘤科

通讯作者: 鲍扬漪, 电子信箱: baoyyi@yahoo.com.cn

5-FU chemotherapy by celecoxib and 1,25 (OH)₂ VitD₃ in the colon cancer cells may be inhibiting the expression of MMP-7, reducing the shedding of Fas in cell surface by MMP-7, and promoting apoptosis of the colon cancer cells in 5-FU chemotherapy.

Key words 1,25 (OH)₂ VitD₃; 5-FU; Sensitivity

结肠癌目前治疗主要以手术治疗为主,加用化疗,其中以 5-FU 为主的化疗是主要辅助治疗方法,但由于部分患者对 5-FU 耐药,使临床上化疗被动提高剂量,加重了药物不良反应。近年来有研究认为塞莱昔布联用二甲胺四环素协同抑制乳腺癌骨转移和 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 对 5-FU 耐药结肠癌细胞增生起增敏作用,我们的研究发现环氧合酶-2(COX-2)抑制剂塞莱昔布和 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 协同在乳腺癌细胞株 Hs578T 中起抑制增生作用,进一步研究在结肠癌细胞株 HT29 中两药协同对 5-FU 化疗的增敏作用及其机制,可为临床化疗提供新思路^[1-3]。

材料与方 法

1. 材料:结肠癌细胞株 HT29(中科院上海细胞库),RP-MI1640 培养液(北京天竺生物公司),新生牛血清(杭州四季青生物公司),MMP-7 试剂盒(武汉博士德生物公司),s-FasL 单抗试剂盒(武汉博士德生物公司),塞莱昔布(辉瑞制药有限公司)及 1,25(OH)₂ 维生素 D₃(上海罗氏公司)。

2. 方法:(1)分组:前四组:对照组、1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 组、塞莱昔布组、1,25(OH)₂ 维生素 D₃ + 塞莱昔布组;后四组:5-FU 组、1,25(OH)₂ 维生素 D₃ + 5-FU 组、塞莱昔布 + 5-FU 组、3 药组。(2)操作步骤:①用 96 孔板将 HT29 细胞放置于 37℃、5% CO₂ 无菌孵箱中培养 24h 左右,倒置显微镜观察细胞数,细胞贴壁铺满孔底,PBS 冲洗 3 遍,加含 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ (10⁻⁹ μmol/L)、塞莱昔布(1 μmol/L)的无血清培养液 200 μl,培养 48h。48h 后,每孔取上清液 100 μl 放在 -70℃ 冰冻保存,进行 MMP-7 检测,每孔加 MTT(5mg/ml) 20 μl,在培养 4h 后吸去上清液,加二甲亚砷(2.5%) 150 μl 摇床低速振动 10min,细胞进行酶标仪测定 OD 值,计算抑制率;②基本步骤同上除加入上述药物外,同时加入 5-FU 使得培养液中 5-FU 浓度为 5 μmol/L,其余两药浓度与上相同,细胞进行酶标仪测定 OD 值计算抑制率,上清液进行 MMP-7 和 s-FasL 测定。MMP-7 和 s-FasL 测定严格按照试剂盒说明书进行。(3)共铺 96 孔板 5 块,指标测定的上清液为 5 孔上清液的混合液。抑制率计算的 OD 值为 5 孔平均值。

3. 统计学处理:(1)抑制率的计算:抑制率 = 1 - 实验组 OD 值/对照组 OD 值 × 100%,根据金氏公式 q = E(a + b)/Ea + Eb - Ea × Eb;Q > 1.15 且两者抑制率比较(P < 0.05)即有协同效应^[4]。(2)实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 软件使用单因素方差分析 t 检验并进行两两比较及相关性检验,P < 0.05 为有统计学意义。

结 果

在前 4 组中,塞莱昔布组和 1,25(OH)₂ 维生素

D₃ 联用和单用的抑制率比较,联用组和维生素 D₃ 组、塞莱昔布组相比分别 P < 0.01 和 0.05,Q > 1.15,提示两药联用协同抑制 HT29 细胞株增生。塞莱昔布组和 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 联用和单用的上清液中 MMP-7 浓度比较,单药和对照组相比均 P < 0.01,联用组和单药组相比均 P < 0.05,显示塞莱昔布和 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 单药抑制 HT29 细胞株 MMP-7 表达,两药联用抑制作用更显著。4 组中抑制率和上清液中 MMP-7 浓度值呈负相关关系,P < 0.05,推测 MMP-7 在抑制 HT29 细胞株增生中起作用(表 1)。

在后 4 组中,3 药组和 5-FU + 塞莱昔布组和 5-FU + 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 组抑制率比较,以 5-FU 组作为对照组,3 药组和 5-FU + 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 组、维生素 D₃ 组、5-FU + 塞莱昔布组相比分别 P < 0.01 和 0.05,Q > 1.15,提示在 5-FU 存在时,塞莱昔布和 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 联用协同抑制 HT29 细胞株增生。3 药组和 5-FU + 塞莱昔布组和 5-FU + 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 组的上清液中 MMP-7 浓度比较,5-FU + 塞莱昔布组和 5-FU + 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 组和 5-FU 组相比均 P < 0.01,3 药组和 5-FU + 塞莱昔布组和 5-FU + 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 组相比均 P < 0.05,显示在 5-FU 存在时,塞莱昔布和 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 单药抑制 HT29 细胞株 MMP-7 表达,两药联用抑制作用更显著,4 组中抑制率和上清液中 MMP-7 浓度值及 s-Fas 浓度值呈负相关关系,P < 0.05,可能在 5-FU 存在时 MMP-7 在抑制 HT29 细胞株增生中也起作用,并且推测 Fas/FasL 通路在促进 HT29 细胞株凋亡中起作用(表 2)。

表 1 前 4 组抑制率及 MMP-7 浓度值的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	抑制率(%)	Q	MMP-7 (ng/ml)
空白组(对照组)	-	-	2.03 ± 0.84
1,25(OH) ₂ 维生素 D ₃ 组	7.08 ± 2.87	-	1.20 ± 0.27 [#]
塞莱昔布组	11.37 ± 2.26	-	1.07 ± 0.27 [#]
1,25(OH) ₂ 维生素 D ₃ + 塞莱昔布组	25.18 ± 3.71 [*]	1.43	0.67 ± 0.14 ^{##}

与维生素 D₃ 组或塞莱昔布组相比,* P < 0.01 或 < 0.05;与对照组相比,[#]P < 0.01;与维生素 D₃ 组或塞莱昔布组相比,^{##}P < 0.05

表 2 后 4 组抑制率、MMP-7 及 s-Fas 浓度值的比较

组别	抑制率	Q	MMP-7 (ng/ml)	s-Fas (ng/ml)
5-FU 组 (对照组)	-	-	1.71 ± 0.62	3.13 ± 0.64
5-FU + 1,25(OH) ₂ 维生素 D ₃ 组	8.11 ± 2.50	-	1.13 ± 0.33 [#]	2.57 ± 0.46 [¥]
5-FU + 塞莱昔布组	18.84 ± 6.47	-	1.04 ± 0.22 [#]	2.53 ± 0.45 [¥]
3 药组	41.86 ± 7.46 [*]	1.64	0.65 ± 0.17 ^{##}	1.93 ± 0.44 ^{¥¥}

与维生素 D₃ 组或塞莱昔布组相比, * $P < 0.01$ 或 < 0.05 ; 与对照组相比, [#] $P < 0.01$; 与维生素 D₃ 组或塞莱昔布组相比, ^{##} $P < 0.05$; 与对照组相比, [¥] $P < 0.01$; 与维生素 D₃ 组或塞莱昔布组相比, ^{¥¥} $P < 0.05$

讨 论

近年来通过对乳腺癌、肺癌、肝癌、直肠癌细胞等的药物(如阿霉素、丝裂霉素、5-FU、干扰素、白细胞介素等)研究发现 Fas/FasL 途径凋亡起重要作用,其治疗敏感性与 MMPs 有关。

1. 塞莱昔布协同 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 抑制 HT29 细胞增生和促进其凋亡,其中 MMP-7 起重要作用:在 5-FU 存在或不存在时,塞莱昔布协同 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 抑制 HT29 细胞增生和促进其凋亡,可能 MMP-7 起重要作用。MMP-7 通过其酶解作用使得肝素结合表皮生长因子(HB-EGF)从细胞膜上脱落,导致胰岛素样生长因子(IGFs)从胰岛素样生长因子及其结合蛋白(IGFs-IGFBPs)形成复合物中释放;还可以激活 TGF- β ,从而促进细胞增生。MMP-7 能够使死亡蛋白 Fas 配体(FasL 或 CD95),从而促进凋亡抵抗,降低了凋亡的效能^[5]。

2. 塞莱昔布和 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 抑制 HT29 细胞 MMP-7 表达:在 5-FU 存在或不存在时,塞莱昔布和 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 抑制 HT29 细胞 MMP-7 表达,其机制可能是通过抑制 WNT 通路和 IGFs-IGF-1R axis 激活而降低 MMP-7 表达。Tian 等在研究 Smad4 在结肠癌转移机制中显示上调 Smad4 通过下调 B 连环蛋白(β -catenin)的表达,直接抑制 WNT/B-catenin 信号的激活,同时增加 E-钙黏蛋白(E-cad)表达,降低 β 连环蛋白/T 细胞因子(β -catenin/TCF)靶基因转录活性,如 claudin-1 和 MMP-7 的基因^[6],而 Xu 等通过 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 对结肠癌细胞 SW480 的 E-cad 表达影响研究认为 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 通过影响 B-catenin 核定位上调 E-cad 表达,并抑制 β -catenin/TCF 转录活性,TCF-1 蛋白的表达^[7];另外 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 能够增加 DDK-1 的转录,经翻译后成为 wnt 抑制因子,使得阻断 WNT/ β -catenin 信号受体复合物的形成^[8]。在前列腺癌细胞 LNCAP 研究中证实 1,

25(OH)₂ 维生素 D₃ 通过维生素 D 受体/维甲酸 X 受体(VDR/RXR)复合体作用于 BP3-维生素 D₃ 反应元件(BP3-VDRE),在转录水平直接激活 IGFBP-3 表达^[9];而 IGFBP-3 调节 IGFs 的循环和活性。用 IGF-1R 抑制剂和刺激剂对结肠癌细胞 HT29 和前列腺癌细胞 LACZ 研究证实 IGF-1R 信号系统的激活促进磷酸酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶-1(PI3-K/Akt-1)信号系统激活和 MMP-7 的表达^[10]。塞莱昔布也可通过这两通路的抑制 MMP-7 表达。Maier 等在塞莱昔布作用人 Caco-2 结肠癌细胞研究显示塞莱昔布降低 β -catenin 的表达水平,并下调 β -catenin/TCF/Lef DNA 结合活性,抑制其目的基因 MMP-7 基因转录^[11]。塞莱昔布干预 Colon 26 Cells 研究证实塞莱昔布减低 IGF-1R 的表达,降低 IGF-2 对细胞的增生和侵袭效应,从而抑制 IGFs/IGF-1R Axis^[12]。

3. 塞莱昔布和 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 协同抑制 HT29 细胞 MMP-7 表达:塞莱昔布协同 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 在体外协同抑制结肠癌细胞株 HT29 的 MMP-7 表达机制尚不完全清楚,可能与塞莱昔布上调 VDR 及 E-cad 表达,而 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 抑制 COX-2 表达有关。通过对肺非小细胞癌细胞 A549 和 H157 的研究显示,COX-2 上调 snail 表达,而 snail 蛋白下调 E-cad 表达水平,用塞莱昔布干预后 E-cad 表达增加,另外在用结肠癌细胞 SW480 和 HT29 研究显示 Snail1 和 Snail2 通过不同途径下调 VDR 的表达^[13,14]。Araki 等基因转染对结肠癌细胞研究发现 APC 诱导下调 COX-2 表达,而 β -catenin 的核内聚集则上调 COX-2 表达,两种效应均与 WNT 信号通路调节 COX-2 基因转录有关^[15]。MMP-7 还可酶解 IGFBPs,在结肠癌细胞 HT29 和 SW837 研究显示 MMP-7 酶解 IGF-1-IGFBP-2 和 IGF-2-IGFBP-3 复合体^[10,16]。

4. 塞莱昔布和 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 联用协同

对 5-FU 化疗增效机制:塞莱昔布和 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 联用增强 5-FU 对 HT29 细胞株化疗效应,其机制尚不完全清楚,Houghton 等研究认为 5-FU 对结肠癌细胞促凋亡作用之一是通过 Fas 通路发挥凋亡作用^[17]。塞莱昔布和 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 在 5-FU 存在或不存在下协同抑制结肠癌细胞株 HT29 的 MMP-7 表达。降低 MMPs(如 MMP-3,-7,)表达水平可导致细胞表面 FasL 的表达增加是因为降低 FasL 剪切体(即 s-Fas 由 MMPs 酶解作用从细胞表面脱落而成)水平^[18]。死亡蛋白 Fas Ligand(FasL 或 CD95),从细胞表面脱落促进凋亡抵抗,不管 FasL 的来源和活性,肿瘤细胞对它都是不敏感的,从而降低了凋亡的效能^[19]。两药联用协同对 5-FU 的增敏作用,其机制可能通过抑制 MMP-7 表达,降低其对细胞表面 Fas 的酶解作用,抑制结肠癌细胞增生和促进凋亡,从而对 5-FU 化疗起增敏作用。

总之研究显示塞莱昔布联合 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 对 5-FU 抑制结肠癌细胞株 HT29 体外增生有协同作用,从而降低单药使用的药物剂量,降低药物不良反应,提高单一药物化疗的敏感性,为临床化疗提供新手段。

参考文献

- Niu Guangfeng, Liao Zhichao, Cai Lin, *et al.* The Combined Effects of Celecoxib and Minocycline Hydrochloride on Inhibiting the Osseous Metastasis of Breast Cancer in Nude Mice[J]. Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 2008, 4(23): 469-476
- Taghizadeh F, Tang M J, Tai I T. Synergism between vitamin D and secreted protein acidic and rich in cysteine - induced apoptosis and growth inhibition results in increased susceptibility of therapy - resistant colorectal cancer cells to chemotherapy[J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(1): 309-317
- 何雪琦, 鲍扬漪, 孙昕, 等. 1,25-二羟维生素 D₃ 联合塞莱昔布对乳腺癌细胞株 Hs578T 生长及凋亡的影响[J]. 医学研究杂志, 2008, 27(8): 66-68
- 戴体俊. 合并用药的定量分析[J]. 中国药理学通报, 1998, 14(1): 479-480
- Masanori I, Hiroyuki Y, Yasusni A, *et al.* Role of matrix metalloproteinase - 7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth and angiogenesis[J]. Exp Biol Med, 2006, 231: 20-27
- Tian Xiaoxiao, Du Hao, Fu Xiangsheng, *et al.* Smad4 restoration leads to a suppression of Wnt/β - catenin signaling activity and migration capacity in human colon carcinoma cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, 380: 478-483
- Xu Haibo, Cann M M, Zhang Zhiyu, *et al.* Vitamin D Receptor

- Modulates the Neoplastic Phenotype Through Antagonistic Growth Regulatory Signals[J]. Molecular Carcinogenesis, 2009, 48: 758-772
- Aguilera O, Pena C, Garcia J M, *et al.* The WNT antagonist DICK-KOPF - 1 gene is induced by 1α,25 - dihydroxyvitamin D₃ associated to the differentiation of human colon cancer cells[J]. Carcinogenesis, 2007, 28(9): 1877-1884
- Peng Lihong, Malloy P J, Feldman D. Identification of a Functional Vitamin D Response Element in the Human Insulin - Like Growth Factor Binding Protein - 3 Promoter[J]. Molecular Endocrinology, 2004, 18(5): 1109-1119
- Shimizu M, Deguchi A, Hara Y, *et al.* EGCG inhibits activation of the insulin - like growth factor - 1 receptor in human colon cancer cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 334: 947-953
- Maier T J, Janssen A, Schmidt R, *et al.* Targeting the beta - catenin/APC pathway: a novel mechanism to explain the cyclooxygenase - 2 - independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells[J]. The FASEB Journal, 2005, 9: 1-25
- Yasumaru M, Tsuji S, Tsujii M, *et al.* Inhibition of Angiotensin II Activity Enhanced the Antitumor Effect of Cyclooxygenase - 2 Inhibitors via Insulin - Like Growth Factor I Receptor Pathway[J]. Cancer Research, 2003, 63: 6726-6734
- Dohadwala M, Yang S C, Luo J, *et al.* Cyclooxygenase - 2 - Dependent Regulation of E - Cadherin: Prostaglandin E2 Induces Transcriptional Repressors ZEB1 and Snail in Non - Small Cell Lung Cancer[J]. Cancer Res, 2006, 66(10): 5338-5345
- Mar? 'a Jesu' s Larriba, Ester Martl' n - Villar, Jose' Miguel Garcel' a, *et al.* Snail2 cooperates with Snail1 in the repression of vitamin D receptor in colon cancer[J]. Carcinogenesis, 2009, 30(8): 1459-1468
- Araki Y, Okamura S, Hussain S P, *et al.* Regulation of Cyclooxygenase - 2 Expression by the Wnt and Ras Pathways[J]. Cancer Research, 2003, 63: 728-734
- Miyamoto S, Nakamura M, Yano K, *et al.* Matrix metalloproteinase - 7 triggers the matricrine action of insulin - like growth factor - II via proteinase activity on insulin - like growth factor binding protein2 in the extracellular matrix[J]. Cancer Sci, 2007, 98(5): 685-691
- Houghton J A, Harwood F G, Tillman D M. Thymineless death in colon carcinoma cells is mediated via Fas signaling[J]. Proc. Natl. Acad Sci USA, 1997, 94: 8144-8149
- Gorelik E, Robert P. Edwards R P, Feng Xin, *et al.* IL - 12 receptor - mediated upregulation of FasL in human ovarian carcinoma cells[J]. Int J Cancer, 2004, 112: 620-627
- Cleavage of CD95 by matrix metalloproteinase - 7 induces apoptosis resistance in tumour cells[J]. Oncogene, 2004, 23: 3732-3736

(收稿: 2010-03-24)