

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.15.006

文章编号: 1005-8982 (2018) 15-0027-05

塞来昔布联合 FOLFOX4 方案治疗 晚期胃癌的疗效及机制研究*

任晓晓¹, 张小茜², 张红梅², 冯玉光², 董秀红², 史立宏³, 邵翠¹

(1. 潍坊医学院研究生院, 山东 潍坊 261053; 2. 潍坊医学院附属医院 消化内科, 山东 潍坊 261031; 3. 潍坊医学院 药理学教研室, 山东 潍坊 261053)

摘要: 目的 探讨塞来昔布联合 FOLFOX4 方案治疗人晚期胃癌的效果及可能的作用机制。**方法** 选取 2015 年 9 月-2017 年 5 月潍坊医学院附属医院消化科就诊的符合条件的经电子胃镜和病理证实为晚期胃癌的患者, 共 80 例。随机分成两组, 其中实验组 40 例, 应用塞来昔布联合 FOLFOX4 化疗方案, 对照组 40 例, 应用 FOLFOX4 化疗方案。根据治疗效果的不同分为完全缓解 (CR)、部分缓解 (PR)、稳定 (SD) 和进展 (PD)。参考 WHO 实体瘤疗效评价标准评价治疗效果。分别采用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR)、免疫组织化学、Western blot 检测治疗后胃癌组织中 ABCG2、OCT-4、HIF-2 α 的 mRNA 及其蛋白表达。**结果** 80 例患者经过 4 周期治疗后, 实验组有效率为 77.5%, 对照组有效率为 42.5%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 实验组与对照组 HIF-2 α 、ABCG2、OCT-4 的 mRNA 和蛋白相对表达量差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。实验组表达减弱。**结论** 塞来昔布联合 FOLFOX4 治疗晚期胃癌有效率高于 FOLFOX4 方案, 胃癌组织中 ABCG2、OCT-4、HIF-2 α 的 mRNA 和蛋白表达量降低, 其机制可能通过降低 HIF-2 α -ABCG2 和 HIF-2 α -OCT-4 通路的表达影响胃癌的发展和转移, 进而影响肿瘤的化疗抵抗、多药耐药。

关键词: 胃癌; 塞来昔布; 多药耐药

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

Therapeutic effect of Celecoxib combined with FOLFOX4 on advanced gastric cancer*

Xiao-xiao Ren¹, Xiao-qian Zhang², Hong-mei Zhang², Yu-guang Feng²,
Xiu-hong Dong², Li-hong Shi³, Cui Shao¹

(1. Graduate school of Weifang Medical College, Weifang, Shandong 261053, China; 2. Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang, Shandong 261031, China; 3. Department of Pharmacology, Weifang Medical College, Weifang, Shandong 261053, China)

Abstract: Objective To assess the therapeutic effects of celecoxib combined with FOLFOX4 chemotherapy on human advanced gastric cancer and the possible mechanisms. **Methods** A total of 80 patients diagnosed with advanced gastric cancer were admitted to our hospital from September 2015 to May 2017. Patients in control group received standard treatment of FOLFOX4, and 40 cases in observation group were treated with additional Celecoxib. Efficacy of treatments were recorded as complete remission (CR), partial remission (PR), stable disease (SD) and progressive disease (PD). The expressions of ABCG2, OCT-4, HIF-2 α in gastric cancer tissues were detected by RT-PCR, immunohistochemical or Western blot. **Results** Effective rate in observation group was significantly higher

收稿日期: 2017-09-19

* 基金项目: 山东省自然科学基金 (No.: ZR2015HL016), 本成果得到潍坊医学院公派教师出国访学项目经费资助
[通信作者] 张小茜, E-mail: 13853697396@163.com

when compared with that in control group (77.5% vs 42.5%, $P < 0.05$). Expression of HIF-2 α , ABCG2, OCT-4 in observation group was dramatically decreased compared with control group ($P < 0.05$). **Conclusions** Celecoxib combined with FOLFOX4 is a promising treatment for the treatment of advanced gastric cancer, which exerts therapeutic effect through inhibiting HIF-2 α -ABCG2 and HIF-2 α -OCT-4 signaling pathway.

Keywords: gastric cancer; Celecoxib; multi-drug resistance

胃癌是全球常见的消化道恶性肿瘤之一, 发病率和死亡率均位居前列^[1], 临床诊断时多已进入晚期, 发生多脏器转移, 为延缓患者生存时间, 大多以放疗替代手术治疗。塞来昔布是新型环氧合酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 选择性抑制剂, 是非甾体抗炎药 (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 一种, 可抑制肿瘤的生长及新生血管生成, 诱导细胞凋亡, 逆转多药耐药 (multi-drug resistance, MDR), 并加强化疗药的放射敏感性和细胞毒性作用, 与化、放疗产生协同作用, 进而影响肿瘤的发生、发展^[2-4]。笔者之前的动物实验发现, 在裸鼠体内塞来昔布能联合氟尿嘧啶 (5-Fu) 协同抗肿瘤, 并可降低肿瘤干细胞标记物低氧诱导因子 2 α (hypoxia inducible factor-2 α , HIF-2 α)、ATP 结合盒基因 2 (ATP-binding cassette gene 2, ABCG2)、八聚体转录因子 4 (Octamer-binding Transcription Factor 4, OCT-4) 的表达, 从而改善和逆转 5-Fu 的化疗抵抗^[5]。本研究的目的是探讨塞来昔布与 FOLFOX4 方案联合在治疗晚期胃癌中的疗效, 进一步研究 ABCG2、OCT-4、HIF-2 α 与胃癌化疗抵抗、多药耐药的关系, 为晚期胃癌的治疗提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2015 年 9 月-2017 年 5 月于潍坊医学院附属医院消化内科就诊经病理和电子胃镜证实的 80 例晚期胃癌患者。纳入标准: ①晚期胃癌患者 TNM 分期为 III_B 期、III_C 期或 IV 期; ②因年龄大、心肺功能差或其他原因不能手术或拒绝手术的晚期胃癌患者。随机分成实验组和对照组各 40 例。其中, 男性 49 例, 女性 31 例; 年龄 48 ~ 90 岁, 平均 64.3 岁。

1.2 实验试剂

兔抗人 HIF-2 α 多克隆抗体、鼠抗人 ABCG2 单克隆抗体及 OCT-4 单克隆抗体 (购于 Abcam 公司), PV-9000 试剂盒、DAB 试剂 (购于北京中杉金桥有限公司), DNA Marker (购于 Thermo 公司), 二抗 (抗兔) (购于 Proteintech 公司), 二抗 (抗鼠) (购于 Biosharp 公

司), β -actin (购于 Santa 公司), RIPA 裂解液 (购于 Solarbio 公司), Trizol、HiFi Script Gdna Removal cDNA Synthesis Kit、DNA marker、Taq Master Mix (购于康为世纪生物科技有限公司), 上海生工生物工程股份有限公司合成 PCR 所需引物。

1.3 化疗方案

在征得患者家属知情同意的基础上, 实验组应用塞来昔布联合 FOLFOX4 化疗方案: 奥沙利铂 (OXA) 85 mg/m², 静脉滴注 2 h, 第 1 天; 塞来昔布 0.2 g, 1 次/d, 口服, 第 1 ~ 5 天; 亚叶酸钙 (CF) 200 mg/m², 静脉滴注 2 h, 第 1 ~ 2 天; 5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 400 mg/m², 快速静脉滴注 0.5 h, 5-Fu 600 mg/m², 持续静脉滴注 22 h, 第 1 ~ 2 天。对照组用 FOLFOX4 方案, 化疗剂量及时间同治疗组。每 3 周重复, 21 d 为 1 个周期, 共用 4 个周期。

1.4 疗效评价

每 2 个周期评价疗效 1 次, 若出现可能为病情进展的临床表现可提前评价疗效。所有患者进行随访。疗程结束 4 周后再行电子胃镜和上腹 CT 检查。参考 WHO 实体瘤疗效评价标准^[6]: 完全缓解 (complete remission, CR): 病灶完全消失, 维持 4 周以上。部分缓解 (partial remission, PR): 病灶减少 50% 以上并维持 4 周以上。稳定 (stable disease, SD): 病灶缩小 <25%, 或增大 <25%, 无新病灶出现。进展 (progressive disease, PD): 肿瘤增大超过 25%, 或出现新病灶。按照治疗效果分为有效 (包括 CR 和 PR) 与无效 (包括 SD 和 PD), 疾病有效率 (RR) = (CR+PR) / 总例数 \times 100%。分别检测实验组和对照组治疗后 ABCG2、OCT-4、HIF-2 α 的 mRNA 和蛋白表达。

1.5 ABCG2、OCT-4 及 HIF-2 α mRNA 表达的检测

采用逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测 mRNA 的表达。用 Trizol 法提取胃癌中的 RNA, 以 35 μ l DEPC 水溶解, 测得各组中 mRNA 的浓度和纯度, 并将各组稀释成相同浓度。引物序列如下: GAPDH 正向

5'-GCACCACCAACTGCTTAGCAC-3', 反向: 5'-GCAGC GCCAGTAGAGGCAGG-3', 产物片段 143 bp; OCT-4 正向: 5'-CCCAGAAAGAGAAAGCGAACC-3', 反向: 5'-CA GAACCACACTCGGACCAC-3', 产物片段 151 bp; ABCG2 正向: 5'-CCCTTATGATGGTGGCTTATTC-3', 反向: 5'-GTGAGATTGACCAACAGACCAT-3', 产物片段 132 bp; HIF-2 α 正向: 5'-CTTGGAGGGTTTCATTGCTG TGGT-3', 反向: 5'-GTGAAGTCAAAGATGCTGTGTCCT -3', 产物片段 123 bp。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 2 min 终延伸。2% 琼脂糖凝胶电泳。应用 Image J 图像分析软件计算条带灰度值, 以 ABCG2、OCT-4 及 HIF-2 α mRNA 灰度值与 GAPDH 灰度值的比值表示 mRNA 的相对表达量。

1.6 胃癌组织中 ABCG2、OCT-4 及 HIF-2 α 蛋白表达的检测

采用免疫组织化学(简称免疫组化)法。将收集到的部分胃癌组织标本用 4% 多聚甲醛固定, 包埋切片, 脱蜡入水, 按照 PV-9000 试剂盒说明书进行操作。阴性对照用 PBS 代替一抗。结果判定: ABCG2 和 OCT-4 阳性结果为细胞质内出现棕黄色颗粒, HIF-2 α 阳性结果为胞质内出现棕黄色颗粒, 部分胞核也有少量表达。

1.7 Western blot 检测胃癌组织中 HIF-2 α 、ABCG2 及 OCT-4 蛋白的表达

用 RIPA 裂解液提取组织中的蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 并将其调节成统一浓度。取 6 μ l 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜, 封闭, 孵育(4 $^{\circ}$ C 过夜), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, TBST 洗涤, X 射线曝光、显影、定影后观察结果。应用 Image J 图像分析软件, 分析 HIF-2 α 、ABCG2、OCT-4 的表达, 以 HIF-2 α 、ABCG2、OCT-4 灰度值与 β -actin 灰度值的比值表示蛋白的相对表达量。

1.8 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 t 检验, 计数资料以率 (%) 表示, 采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗效果

实验组中有效率为 77.5% (31/40), 对照组有效

率为 42.5% (17/40), 两组比较差异有统计学意义 ($\chi^2=10.208, P=0.001$)。

2.2 ABCG2、OCT-4 及 HIF-2 α mRNA 的表达

两组间 ABCG2、OCT-4 及 HIF-2 α mRNA 表达差异有统计学意义 (HIF-2 α : $t=21.517, P=0.000$; ABCG2: $t=27.348, P=0.000$; OCT-4: $t=62.470, P=0.000$)。实验组低于对照组。见图 1 和表 1。

2.3 ABCG2、OCT-4、HIF-2 α 蛋白的表达

实验组 ABCG2、OCT-4 及 HIF-2 α 蛋白的较对照组降低, ABCG2 和 OCT-4 胞质内出现棕黄色颗粒, HIF-2 α 胞质内出现棕黄色颗粒, 部分胞核也有少量表达。见图 2 ~ 4。

2.4 胃癌组织中 HIF-2 α 、ABCG2、OCT-4 蛋白的表达

两组间 HIF-2 α 、ABCG2 及 OCT-4 蛋白的表达比较, 差异有统计学意义 (HIF-2 α : $t=41.306, P=$

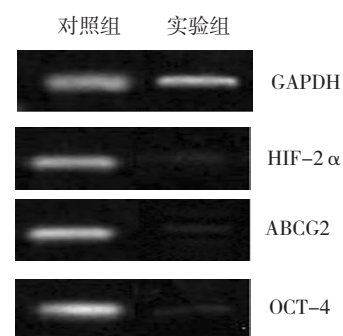


图 1 HIF-2 α 、ABCG2 及 OCT-4 mRNA 在胃癌组织中的表达 (RT-PCR)

表 1 两组 HIF-2 α 、ABCG2 及 OCT-4 mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	HIF-2 α	ABCG2	OCT-4
实验组	0.471 \pm 0.025	0.500 \pm 0.018	0.456 \pm 0.007
对照组	0.752 \pm 0.007	0.793 \pm 0.011	0.873 \pm 0.011
t 值	21.517	27.348	62.470
P 值	0.000	0.000	0.000

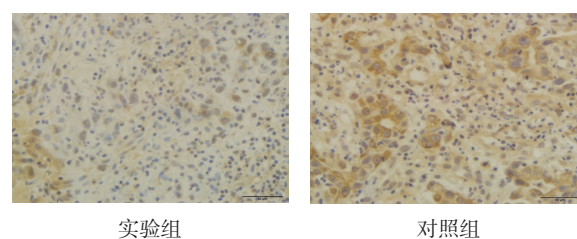


图 2 ABCG2 蛋白在胃癌组织中的表达 (免疫组化 $\times 400$)

0.000 ; ABCG2 : $t = 56.607$, $P = 0.000$; OCT-4 : $t = 31.048$, $P = 0.000$)。实验组低于对照组。见图 5 和表 2。

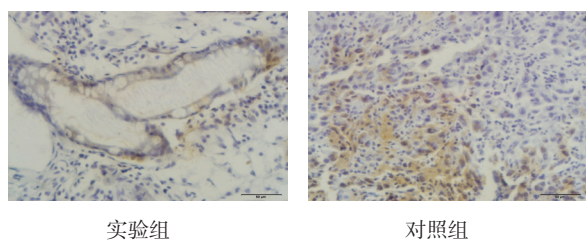


图 3 OCT-4 蛋白在胃癌组织中的表达 (免疫组化 × 400)

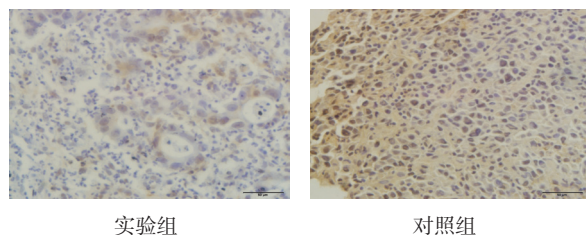


图 4 HIF-2α 蛋白在胃癌组织中的表达 (免疫组化 × 400)

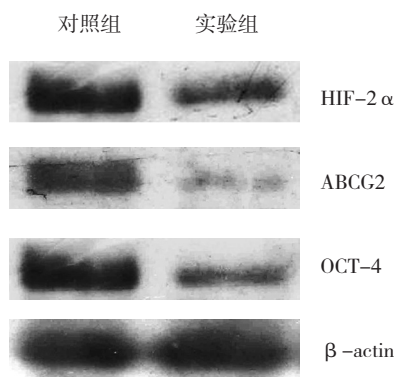


图 5 胃癌组织中 HIF-2α、ABCG2 及 OCT-4 蛋白的表达 (Western blot)

表 2 两组 HIF-2α、ABCG2 及 OCT-4 蛋白相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	HIF-2α	ABCG2	OCT-4
实验组	0.273 ± 0.014	0.320 ± 0.013	0.388 ± 0.006
对照组	0.678 ± 0.009	0.818 ± 0.008	0.538 ± 0.006
t 值	41.306	56.607	31.048
P 值	0.000	0.000	0.000

3 讨论

FOLFOX 方案治疗晚期胃癌的总体有效率不超过 50%，中位生存期仅 8.0 ~ 11.9 个月^[7-8]，转移、复发率

高达 80% 以上。许多研究表明，低氧微环境和肿瘤干细胞的存在是影响肿瘤化疗敏感性及发生、发展、转移的重要原因^[9-10]。因此研究胃癌患者的化疗是目前消化道肿瘤领域研究的一大重点。有研究证明，塞来昔布能抑制 COX-2 通路的表达，逆转多药耐药，改善肿瘤微环境，抑制细胞增殖，诱导细胞凋亡^[11-13]。塞来昔布与化疗药物的联合应用具有协同抗肿瘤作用，可能通过抑制肿瘤细胞的增殖促进细胞凋亡^[14]。本研究显示，治疗晚期胃癌时实验组有效率高于对照组。塞来昔布联合 FOLFOX4 化疗影响胃癌的发展和转移，提高患者的化疗敏感性，其疗效优于单独的 FOLFOX4 化疗方案。

慢性缺氧通常又是实体瘤广泛生长的原因^[15]。微环境变化与缺氧诱导因子 (hypoxia-inducible factors, HIF) 有关^[16]。HIF-1α、HIF-2α、HIF-3α 是 HIF 的 3 个亚型，其中 HIF-2α 与 CSCs 的关系最密切，研究表明，HIF-2α 通过减少 OCT-4、Notch 等多种干细胞通路的表达适应微环境的变化^[17]。ABCG2 是一种在肿瘤组织中高表达与化疗耐药相关的膜转运蛋白超家族成员。OCT-4 是一种与肿瘤耐药相关的 POU 转录因子，其表达水平直接影响干细胞的分化方向^[18-19]。多种 CSCs 高表达 ABCG2、OCT-4 和 HIF-2α，CSCs 的化疗耐药与 HIF-2α-ABCG2 和 HIF-2α-OCT-4 通路高表达有关^[20-21]。此外研究显示，HIF-2α 可调节 ABCG-2、OCT-4 的产生，缺氧 HIF-2α/ABCG2/MDR 途径可促进乳腺癌细胞多药耐药^[5, 22]。

本研究发现，在治疗晚期胃癌时，实验组中 ABCG-2、OCT-4、HIF-2α 的 mRNA 及蛋白表达较对照组降低，其机制可能通过降低 HIF-2α-ABCG2 和 HIF-2α-OCT-4 通路的表达，改善 FOLFOX4 化疗方案的化疗抵抗、多药耐药。本研究还发现，塞来昔布联合 FOLFOX4 化疗方案有协同抗肿瘤作用，能协同抑制肿瘤的发展和转移，逆转多药耐药，提高治疗效果。本研究为晚期胃癌的联合靶向治疗提供新的思路和方法，具有良好的临床应用前景，但仍需要进一步探索。

参 考 文 献:

[1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
 [2] KUO C H, HU H M, TSAI P Y, et al. Short-term celecoxib intervention is a safe and effective chemopreventive for gastric carcinogenesis based on a Mongolian gerbil model[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(39): 4907-4914.

- [3] ROCHA F T, LOURENÇO L G, JUCÁ M J, et al. Chemoprevention by celecoxib in reflux-induced gastric adenocarcinoma in Wistar rats that underwent gastrojejunostomy[J]. *Acta Cir Bras*, 2009, 24(3): 189-194.
- [4] ZHOU H C, LIU H B. The mechanism and prospect of celecoxib treatment of gastric cancer[J]. *Chinese Journal of Digestive Surgery*, 2013, 12(4): 317-320.
- [5] ZHANG X Q, ZHANG H M, SUN X E, et al. Inhibitory effects and mechanism of 5-fluorouracil combined with celecoxib on human gastric cancer xenografts in nude mice[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(1): 105-111.
- [6] WHO handbook for reporting results of cancer treatment[M]. London: WHO Publication, 1979: 45.
- [7] HAGHIGHI S, KASBKAR H, ESMAEILPOUR K, et al. Oxaliplatin, 5 fluorouracil and leucovorin (FOLFOX4) as first line chemotherapy in elderly patients with advanced gastric cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(7): 3277-3280.
- [8] JIN M L. New progress in advanced gastric cancer systemic chemotherapy[J]. *Theory Pract Surg*, 2003, 8(1): 18-20.
- [9] GAO X M, ZHANG R, DONG Q Z, et al. Properties and feasibility of using cancer stem cells in clinical cancer treatment[J]. *Cancer Biol Med*, 2016, 13(4): 489-495.
- [10] DAUER P, NOMURA A, SALUJA A, et al. Microenvironment in determining chemo-resistance in pancreatic cancer: Neighborhood matters[J]. *Pancreatol*, 2017, 17(1): 7-12.
- [11] RUI LIU, HONGGANG ZHENG, WEIDONG LI, et al. Antitumor enhancement of Fei-Liu-Ping ointment in combination with celecoxib via cyclooxygenase-2-mediated lung metastatic inflammatory microenvironment in Lewis lung carcinoma xenograft mouse model[J]. *J Transl Med*, 2015, 13(1): 366-380.
- [12] BING LIU, SHIGUI YAN, LIYAN QU, et al. Celecoxib enhances anticancer effect of cisplatin and induces anoikis in osteosarcoma via PI3K/Akt pathway[J]. *Cancer Cell Int*, 2017, 17(1): 1-8.
- [13] XU H B, SHEN F M, LV Q Z. Celecoxib enhanced the cytotoxic effect of cisplatin in chemo-resistant gastric cancer xenograft mouse models through a cyclooxygenase-2-dependent manner[J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 776(1): 1-8.
- [14] MENG C, LU Z, FANG M, et al. Effect of celecoxib combined with chemotherapy drug on malignant biological behaviors of gastric cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(11): 7622-7632.
- [15] JUSTIN E. SWARTZ, AJIT J. POTHENI, INGE STEGEMAN, et al. Clinical implications of hypoxia biomarker expression in head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review[J]. *Cancer Medicine*, 2015, 4(7): 1101-1116.
- [16] HU Y. Research progress of hypoxia inducible factor -1 alpha and 2 alpha in malignant tumors[J]. *Oncology Progress*, 2014, 12(2): 122-125.
- [17] ZHANG J, LI L. Stem cell niche: microenvironment and beyond[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(15): 9499-9503.
- [18] ZHOU Y Y, ZENG F Y. Maintenance of pluripotent and self-renewal transcription factors oct-4/Nanog of embryonic stem cells and associated control networks[J]. *Genetics*, 2008, 30(5): 529-536.
- [19] BUITRAGO W, ROOP D R. Oct-4: the almighty POU ripotent regulator[J]. *J Invest Dermatol*, 2007, 127(2): 260-262.
- [20] ZHANG H M, LIU X J, WANG J Y, et al. Correlation of HIF-2 α , ABCG2 and OCT-4 with chemotherapy resistance in human gastric cancer[J]. *Medical Journal of Chinese People's Liberation Army*, 2015, 40(10): 816-820.
- [21] CHEN F, FENG Y G, REN P P. The Correlation of helicobacter pylori infection and expression of HIF-2 α , Oct-4 in gastric carcinoma tissues[J]. *Journal of Chinese Oncology*, 2016, 22(10): 789-793.
- [22] LEI XIANG, ZHI-HENG LIU, QIN HUAN, et al. Hypoxia-inducible factor-2a is associated with ABCG2 expression, histology-grade and Ki67 expression in breast invasive ductal carcinoma[J]. *Diagnostic Pathology*, 2012, 7(1): 32-38.

(王荣兵 编辑)