

索拉非尼联合塞来昔布对胆管癌细胞株 SK - ChA - 1 增殖的影响

万云燕¹, 李玲², 黄军利³, 黄榕³, 应可满³, 陈强⁴, 罗琪⁵, 李文岗^{1,3}

(1 福建医科大学福总临床医学院, 福州 350025; 2 湖北医药学院附属太和医院普外 1 科, 湖北 十堰 442000;

3 解放军 174 医院, 福建 厦门 361001; 4 厦门大学生命科学院, 福建 厦门 361005;

5 厦门大学附属第一医院, 福建 厦门 361001)

摘要:目的 研究索拉非尼联合塞来昔布在体外对胆管癌细胞株 SK - ChA - 1 增殖的影响。方法 体外培养人胆管癌细胞株 SK - ChA - 1, 通过 MTT 法检测索拉非尼单用或与塞来昔布联用时对胆管癌细胞株增殖的抑制作用, Western Blot 分析索拉非尼单用或与塞来昔布联用时对胆管癌细胞株内多聚 ADP 核糖聚合酶 (PARP) 蛋白表达的影响。结果 索拉非尼抑制胆管癌细胞株 SK - ChA - 1 的增殖并诱导细胞凋亡。索拉非尼联合塞来昔布协同抑制胆管癌细胞株 SK - ChA - 1 的增殖。塞来昔布使索拉非尼诱导的胆管癌细胞株 SK - ChA - 1 的凋亡增加。结论 索拉非尼联合塞来昔布能协同抑制胆管癌细胞株 SK - ChA - 1 的增殖, 这与塞来昔布使索拉非尼诱导的细胞凋亡增加有关。

关键词: 胆管肿瘤; 索拉非尼; 塞来昔布; 体外研究

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1001 - 5256(2013)01 - 0068 - 04

Effect of sorafenib and celecoxib combination therapy on proliferation of the human cholangiocarcinoma cell line SK - ChA - 1 in vitro

WAN Yunyan, LI Ling, HUANG Junli, et al. (Fuzhou General Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350025, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of sorafenib and celecoxib combination therapy on proliferation of human cholangiocarcinoma (CC) cells, using the cultured SK - ChA - 1 cell line. **Methods** Inhibition of SK - ChA - 1 cell proliferation by sorafenib alone and in combination with celecoxib was studied in vitro using the MTT assay. The anti - neoplastic mechanisms of sorafenib alone and in combination with celecoxib were assessed by Western blot detection of changes in the caspase cleavage substrate poly ADP - ribose polymerase (PARP).

Results SK - ChA - 1 cells treated with sorafenib alone showed a dose - dependent growth inhibition and degradation of PARP. Combination treatment with sorafenib and celecoxib synergistically increased the growth inhibition effects and enhanced the degradation of PARP.

Conclusion Combination treatment with sorafenib and celecoxib results in a synergistic anti - proliferative effect in the human CC cell line SK - ChA - 1; the addition of celecoxib enhances sorafenib - induced apoptosis.

Key words: bile duct neoplasms; sorafenib; celecoxib; in vitro

索拉非尼能抑制胆管癌细胞的增殖^[1-3], 但 II 期临床试验却发现索拉非尼单用的疗效有限^[4-5]。最近有文献报道: 索拉非尼联合塞来昔布在体外能协同抑制肝癌细胞的增殖^[6], 但索拉非尼联合塞来昔布抗胆管癌的作用尚未见报道。本实验以胆管癌细胞株 SK - ChA - 1 为研究对象, 探讨索拉非尼联合塞来昔布在体外对胆管癌细胞增殖的影响, 以期临床联合

用药提供理论依据。

1 材料与方

1.1 材料 人胆管癌细胞株 SK - ChA - 1, 由美国伯明翰阿拉巴马大学陈亚兵教授惠赠。索拉非尼由拜耳公司惠赠, 塞来昔布购自美国辉瑞制药有限公司, 均用 DMSO 溶解后贮存于 -20℃ 备用, 每次实验前用新鲜培养液按一定比例稀释到所需浓度, 并使得 DMSO 的最终浓度不超过 0.1%; 甲基噻唑基四唑 (MTT) 购自美国 Amresco 公司; DMSO 和 β - actin 抗体购自美国 Sigma 公司; 多聚 ADP 核糖聚合酶 (poly ADP - ribose polymerase, PARP) 抗体购自美国 Santa

收稿日期: 2012 - 05 - 06 修回日期: 2012 - 06 - 20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81072014)

作者简介: 万云燕 (1979 -), 男, 主治医师, 在读硕士, 主要从事肝胆疾病的研究。

通信作者: 李文岗, 电子邮箱: lwg11861@163.com。

Cruz 公司; Anti - mouse IgG - HRP 购自美国 Pierce 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 细胞培养在含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养液中 置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度环境的培养箱中培养。

1.2.2 MTT 比色法 将对数生长期的细胞接种于 96 孔板(6000/孔) 放入 37℃、5% CO₂ 培养箱中过夜 第 2 d 贴壁后弃去培养液 加入含不同浓度索拉非尼(0、1、2.5、5、7.5、10、15 μmol/L) 或塞来昔布(40、50 μmol/L) 的培养液 每个浓度 3 个复孔 终体积 200 μl/孔 另外设两孔作为空白对照组(不含细胞的 RPMI 1640 培养液) 边缘孔用 PBS 填充。分别继续培养 24、48、72 h 后 每孔移除 100 μl 培养基 加入 10 μl MTT(5 mg/ml) 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续孵育 4 h 后 每孔加 100 μl 10% SDS - 0.01 M HCl 的裂解液温育过夜并检测 560 nm 处各孔的吸光度(OD) 值 以空白对照组调零。细胞存活率 = 实验组 OD 值/对照组 OD 值 × 100%; 细胞抑制率 = 100% - 细胞存活率。

1.2.3 Western Blot 分析 不同浓度的索拉非尼(0、2.5、5、7.5、10、15 μmol/L) 单独或与 50 μmol/L 塞来昔布联合处理细胞 24 h 后 收获所有细胞 冰上裂解 20 min 于 4℃ 以 13 000 × g 的速度离心 30 min 收集上清 用 BCA 蛋白分析试剂盒测定蛋白浓度。取 40 μg 蛋白/孔上样 12% SDS - PAGE 电泳分离蛋白。将分离后的蛋白转移到 NC 膜上 0.5% 脱脂奶粉封闭液室温封闭 1 h 加入相应的一抗溶液 室温孵育 2 h; PBST 洗 3 次 加入相应的 1:10 000 的二抗溶液 室温孵育 1 h; PBST 洗 3 次 双蒸水漂洗 增强型化学发光剂孵育后曝光显影。Western Blot 分析均以 β - actin 为内参 所用一抗浓度如下: PARP 抗体(浓度 1:1000) β - actin 抗体(浓度 1:2000)。

1.3 统计学方法 用 SPSS 11.0 对数据进行统计分析 数据以均数 ± 标准差表示($\bar{x} \pm s$); 组间比较采用单因素方差分析(One - Way ANOVA) 两两比较采用 LSD - t 检验 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。协同性分析用金正均 q 值法判断 $q = E_{A+B} / (E_A + E_B - E_A \times E_B)$ (实测合并效应) / $(E_A + E_B - E_A \times E_B)$ (预期合并效应) 其中 E_A 、 E_B 为单独用药时细胞生长抑制率 E_{A+B} 为联合用药的实际细胞生长抑制率。 $q < 0.85$ 则判断为拮抗作用; $0.85 \leq q < 1.15$ 则判断为相加作用; $q \geq 1.15$ 则判断为协同作用。所有实验均至少重复 3 次。

2 结果

2.1 索拉非尼联合塞来昔布协同抑制胆管癌细胞株 SK - ChA - 1 的增殖

2.1.1 索拉非尼抑制胆管癌细胞株 SK - ChA - 1 的增殖 将 0、1、2.5、5、7.5、10、15 μmol/L 的索拉非尼分别与胆管癌细胞株 SK - ChA - 1 共孵育 24、48、72 h MTT 法分析显示索拉非尼能抑制胆管癌细胞株 SK - ChA - 1 的增殖 其 24、48、72 h 的半数抑制浓度(50% concentration of inhibition IC₅₀) 分别为(16.1 ± 1.7)、(9.1 ± 1.1)、(6.5 ± 0.7) μmol/L 差异具有统计学意义($F = 48.37$ $P < 0.01$ 组间两两比较 $P < 0.05$) 即索拉非尼对胆管癌细胞株 SK - ChA - 1 的生长抑制具有时间依赖性。同时索拉非尼对胆管癌细胞株 SK - ChA - 1 的生长抑制还具有浓度依赖性。当索拉非尼浓度 ≥ 2.5 μmol/L 时 相同浓度不同时间点的抑制率比较 $F = 6.3 \sim 68.4$ P 值均 < 0.05 (图 1)。

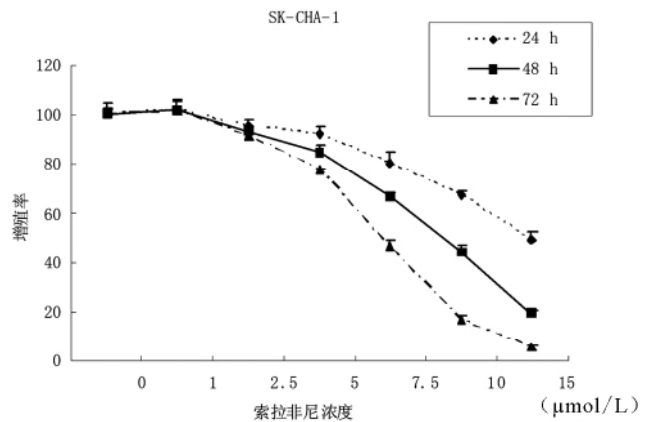


图 1 索拉非尼抑制胆管癌细胞株 SK - ChA - 1 的增殖

2.1.2 索拉非尼联合塞来昔布协同抑制胆管癌细胞株 SK - ChA - 1 的增殖 分别将 40、50 μmol/L 的塞来昔布与不同浓度梯度的索拉非尼共同处理细胞株 48 h MTT 法分析显示塞来昔布能增强索拉非尼对胆管癌细胞株 SK - ChA - 1 的生长抑制 最大抑制率可以由 80.6% 增加到 97%。同塞来昔布联用时 其 48 h 的 IC₅₀ 值分别降为(6.1 ± 1.0)、(4.6 ± 0.6) μmol/L 同索拉非尼单用时比较差异具有统计学意义($F = 19.13$ $P < 0.05$; 联用与单用相比 P 均 < 0.05) (图 2)。

为进一步分析索拉非尼和塞来昔布是否具有协同抗癌活性 计算了不同剂量联合用药时的 q 值 40 μmol/L 的塞来昔布和索拉非尼联合时主要表现为相加作用 而

50 $\mu\text{mol/L}$ 的塞来昔布和索拉非尼联用时出现明显的协同作用(表1)。

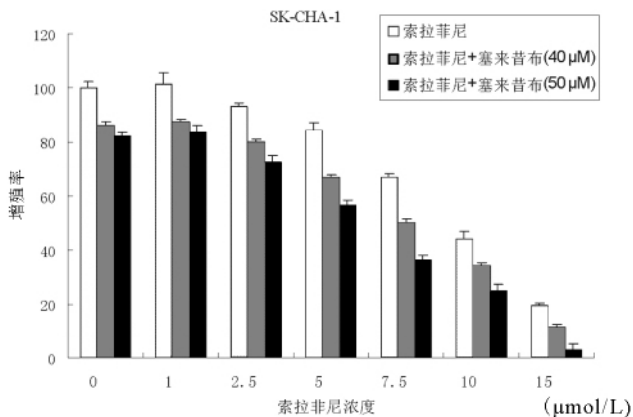


图2 索拉非尼联合塞来昔布协同抑制胆管癌细胞株 SK-ChA-1 的增殖

表1 各种浓度的索拉非尼和不同浓度的塞来昔布联用时的 q 值

细胞株	塞来昔布 (μM)	和不同浓度索拉非尼($\mu\text{mol/L}$) 联用时的 q 值					
		1.0	2.5	5.0	7.5	10	15
SK-ChA-1	40	1.03	1.00	1.22	1.17	1.06	1.06
	50	0.98	1.17	1.41	1.42	1.18	1.16

2.2 塞来昔布使索拉非尼诱导的胆管癌细胞株 SK-ChA-1 的凋亡程度增加 为了明确索拉非尼单用或联合应用时其抗增殖活性是否与诱导细胞凋亡有关,用免疫印迹法分析了细胞内 PARP 的水平及其降解程度。PARP 是细胞凋亡核心成员胱天蛋白酶 (caspase) 的切割底物,其降解产物可作为细胞凋亡的标志。将 0、2.5、5、7.5、10、15 $\mu\text{mol/L}$ 的索拉非尼单用或与 50 $\mu\text{mol/L}$ 的塞来昔布联合应用处理胆管癌细胞 24 h,免疫印迹分析发现索拉非尼能诱导胆管癌细胞株 SK-ChA-1 凋亡并具有浓度依赖性,50 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布单独处理胆管癌细胞 24 h 并不诱导细胞凋亡,但联合用药时能使索拉非尼诱导的细胞凋亡程度增加(图3)。

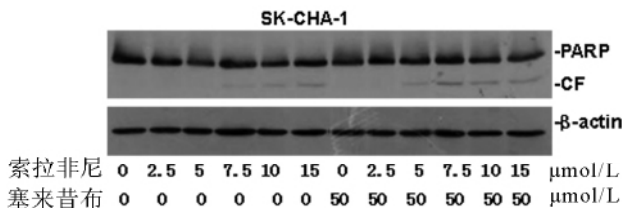


图3 塞来昔布使索拉非尼诱导的胆管癌细胞株 SK-ChA-1 的凋亡程度增加

3 讨论

胆管细胞癌是一种高度恶性的胆道系统肿瘤,对常规化疗不敏感,预后差,根治性手术切除和肝移植是目前唯一有效的治愈方法^[7-8]。但多数患者就诊时已处于晚期,仅 20%~30% 的患者适合行根治性手术治疗^[9]。即使进行了根治性切除,目前也无有效的手段预防术后的复发和转移,因此为了提高生存率,寻找新的有效的化疗药物迫在眉睫。

索拉非尼是一种口服多激酶抑制剂,能抑制 Raf-1、B-Raf、B-Raf V600E、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、PDGFR-h、Flt-3 和 c-Kit 等多种激酶活性,已被美国食品及药物管理局 (FDA) 批准用于晚期肾癌及肝癌的治疗^[10]。在临床前试验中发现:索拉非尼也具有抗胆管细胞癌的活性,索拉非尼能抑制 Raf 激酶活性,通过诱导细胞凋亡或抑制细胞周期来抑制胆管癌细胞的增殖,同时索拉非尼还能抑制血管内皮生长因子受体 (VEGFR) 和血小板衍生生长因子受体 (PDGFR) 影响肿瘤新生血管的形成,索拉非尼对胆管癌裸鼠移植瘤淋巴管的生成也有抑制作用^[1-3,11]。本研究也证实:索拉非尼在体外能抑制胆管细胞癌的增殖并具有的时间依赖性和浓度依赖性,索拉非尼能通过诱导细胞凋亡抑制胆管癌细胞的增殖。但近期国外的两个 II 期临床试验却发现:索拉非尼单用在晚期胆管癌患者的疗效有限^[4-5]。这可能与胆管癌多为乏血供肿瘤,病灶内难以达到有效血药浓度有关,而联合用药可以提高药物的敏感性,减少耐药,不过由于胆管癌患者多合并有梗阻性黄疸,肝功能不良,一般情况差,索拉非尼与常规化疗药物联用可能并不能使患者获益,以索拉非尼为基础的联合靶向治疗可能成为未来的方向。

最近有文献报道,口服塞来昔布能延长胆管癌患者的生存时间,服药期间未发现严重的不良反应^[12]。塞来昔布是一种选择性环氧合酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 抑制剂,COX-2 与胆管癌的发生密切相关,COX-2 的异常表达使细胞内前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) 的合成增加,进而刺激胆管癌细胞增殖,抑制其凋亡^[13];同时高浓度的 PGE₂ 还促使细胞内 MMP9 的表达上调,有利于胆管癌细胞的侵袭^[14]。塞来昔布能抑制 COX-2 的活性,减少细胞内 PGE₂ 的合成,诱导细胞凋亡^[15]。不过最近研究发现塞来昔布诱导胆管癌细胞凋亡的浓度远远高于抑制 PGE₂ 合成所需的浓度,塞来昔布可能通过 COX-2 非依赖途径

抑制胆管癌细胞增殖^[16-17]。塞来昔布也可增强多种化疗药物对肿瘤的杀伤作用^[12],最近研究发现塞来昔布在体外能增强索拉非尼抗肝细胞癌的活性^[6],因此在本试验中,研究了塞来昔布是否也能增强索拉非尼抗胆管细胞癌的活性。本研究发现:塞来昔布与索拉非尼联合对胆管细胞癌具有协同抗癌活性,塞来昔布和索拉非尼联用时进一步抑制了胆管癌细胞的增殖,较低浓度的塞来昔布和索拉非尼联用主要表现为相加作用,大剂量的塞来昔布和索拉非尼联用时表现出明显的协同作用,这种协同抗增殖活性与细胞凋亡进一步增加有关。塞来昔布可能通过抑制 STAT3 的磷酸化,下调 McI-1 的表达来诱导细胞凋亡^[6];塞来昔布也可能通过抑制 AKT 的磷酸化,促进 caspase-9 和 caspase-3 活化,激活内源性凋亡途径促进细胞进一步凋亡^[16-17]。本研究发现:尽管大剂量的塞来昔布和索拉非尼联用时表现协同作用,但临床口服用药可能很难达到细胞试验所需剂量,不过最近有一例索拉非尼肝动脉灌注化疗成功应用于胆管癌的报道^[18],因此索拉非尼联合塞来昔布的肝动脉灌注化疗可能为胆管癌的治疗带来新的希望。

综上所述,索拉非尼和塞来昔布在体外能协同抑制胆管癌细胞的增殖,这种协同抗癌活性与塞来昔布使索拉非尼诱导的细胞凋亡增加有关,相关分子机制有待进一步研究。索拉非尼联合塞来昔布的肝动脉灌注化疗可能为胆管癌的治疗带来新的希望,但尚需进一步行临床前动物实验。

参考文献:

- [1] Huether A, Hopfner M, Baradari V, et al. Sorafenib alone or as combination therapy for growth control of cholangiocarcinoma[J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 73(9): 1308-1317.
- [2] Blechacz BRA, Smoot RL, Bronk SF, et al. Sorafenib inhibits signal transducer and activator of transcription-3 signaling in cholangiocarcinoma cells by activating the phosphatase shattproof 2[J]. *Hepatology*, 2009, 50(6): 1861-1870.
- [3] Sugiyama H, Onuki K, Ishige K, et al. Potent in vitro and in vivo antitumor activity of sorafenib against human intrahepatic cholangiocarcinoma cells [J]. *J Gastroenterol*, 2011, 46(6): 779-789.
- [4] El-Khoueiry AB, Rankin CJ, Ben-Josef E, et al. SWOG 0514: a phase II study of sorafenib in patients with unresect-

- able or metastatic gallbladder carcinoma and cholangiocarcinoma[J]. *Invest New Drugs*, 2012, 30(4): 1646-1651.
- [5] Bengala C, Bertolini F, Malavasi N, et al. Sorafenib in patients with advanced biliary tract carcinoma: a phase II trial [J]. *Br J Cancer*, 2009, 102(1): 68-72.
- [6] Liu Y, Liu A, Li H, et al. Celecoxib inhibits interleukin-6/interleukin-6 receptor-induced JAK2/STAT3 phosphorylation in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cancer Prev Res*, 2011, 4(8): 1296-1305.
- [7] Furuse J. Targeted therapy for biliary tract cancer [J]. *lancet oncol*, 2010, 11(1): 5-6.
- [8] Lim K, Han C, Xu L, et al. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 activates β -Catenin in human cholangiocarcinoma cells: evidence for inhibition of these signaling pathways by ω 3 polyunsaturated fatty acids [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(2): 553-560.
- [9] Doycheva I, Levy C. Advances in diagnosis and treatment of cholangiocarcinomas [J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2010, 6(12): 765-767.
- [10] Kim AR, Balis FM, Widemann BC. Sorafenib and sunitinib [J]. *The Oncologist*, 2009, 14(8): 800-805.
- [11] 黄发昆,石铮. 索拉非尼对裸鼠胆管癌移植瘤淋巴管生成的影响[J]. *中华肿瘤杂志*, 2010, 34(11): 808-812.
- [12] 吴高松,马小鹏,汪杰,等. 塞来昔布治疗肝门部胆管癌 24 例 [J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(34): 3558-3560.
- [13] Fava G, Lorenzini I. Molecular pathogenesis of cholangiocarcinoma [J]. *Int J Hepatol*, 2012, 2012: 630543.
- [14] Itatsu K, Sasaki M, Yamaguchi J, et al. Cyclooxygenase-2 is involved in the up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in cholangiocarcinoma induced by tumor necrosis factor- α [J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(3): 829-841.
- [15] 吴高松,刘正人. 塞来昔布 (celecoxib) 通过前列腺素 E2 途径影响胆管癌细胞株生长和凋亡 [J]. *外科理论与实践*, 2003, 8(2): 137-140.
- [16] Lai GH, Zhang Z, Sirica AE. Celecoxib acts in a cyclooxygenase-2-independent manner and in synergy with emodin to suppress rat cholangiocarcinoma growth in vitro through a mechanism involving enhanced akt inactivation and increased activation of caspases-9 and -31 [J]. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2(3): 265-271.
- [17] Zhang Z, Lai GH, Sirica AE. Celecoxib-induced apoptosis in rat cholangiocarcinoma cells mediated by Akt inactivation and Bax translocation [J]. *Hepatology*, 2004, 39(4): 1028-1037.
- [18] Qun W, Tao Y. Effective treatment of advanced cholangiocarcinoma by hepatic arterial infusion chemotherapy combination with sorafenib: one case report from China [J]. *Hepato-gastroenterology*, 2010, 57(99-100): 426-429.

(本文编辑: 刘晓红)