

# 塞来昔布对细粒棘球蚴原头节生长及 p-ERK2 表达的影响

王 勃<sup>1</sup>,姜玉峰<sup>2</sup>,李芳芳<sup>1</sup>,王 卓<sup>1</sup>,邢国强<sup>1</sup>,雷 颖<sup>2</sup>,史红娟<sup>2</sup>,张示杰<sup>1</sup>,彭心宇<sup>1</sup>,吕海龙<sup>1</sup>

**摘要:**目的 探索塞来昔布对细粒棘球蚴原头节体外生长及 p-ERK2 表达的影响。**方法** 实验分组为 1640 培养基组、DMSO 组、塞来昔布溶液(50、100、150、200  $\mu\text{mol/L}$ )中体外孵育,在倒置焦镜下观察原头节的形态变化,同时通过 0.1% 伊红染色显示原头节活力。运用 Western blot 检测 DMSO、100、150、200  $\mu\text{mol/L}$  塞来昔布处理细粒棘球蚴原头节 48 h 后 p-ERK2 蛋白的表达量。**结果** 体外孵育 7 d 后,DMSO 组及空白 1640 对照组原头节的活力几乎没有改变。塞来昔布作用 1 d 后,100、150、200  $\mu\text{mol/L}$  组原头节的活力均下降;作用 3 d 后,200  $\mu\text{mol/L}$  组原头节全部被杀死,150  $\mu\text{mol/L}$  组的原头节活力为 43.9%。100  $\mu\text{mol/L}$ 、50  $\mu\text{mol/L}$  组对原头节的活力也有明显下降,但不及高浓度组显著。Western blot 结果显示 P-ERK2 的表达量随浓度增加而下降趋势明显。**结论** 塞来昔布能够抑制细粒棘球蚴原头节生长,这可能与塞来昔布下调 P-ERK2 的表达进而抑制 ERK2 信号传导通路有关。

**关键词:**塞来昔布;细粒棘球蚴;原头节;ERK2 通路

中图分类号:R383.33

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2015)06-0556-04

## Effects of celecoxib on viability and the expression of ERK2 in *Echinococcus granulosus* protoscoleces

WANG Bo<sup>1</sup>,JIANG Yu-feng<sup>2</sup>,LI Fang-fang<sup>1</sup>,WANG Zhuo<sup>1</sup>,XING Guo-qiang<sup>1</sup>,  
LEI Ying<sup>2</sup>,SHI Hong-juan<sup>2</sup>,ZHANG Shi-jie<sup>1</sup>,PENG Xin-yu<sup>2</sup>,LYU Hai-long<sup>1</sup>

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital,

School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832008, China;

2. Department of Histology and Embryology, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832008, China)

**Abstract:** The aim of this study was to explore the celecoxib in the viability of *Echinococcus granulosus* protoscoleces, and to investigate the expression of extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2). Protoscoleces of *E. granulosus* were incubated *in vitro* with celecoxib at concentrations of DMSO, 50, 100, 150, 200  $\mu\text{mol/L}$ , and the viability of protoscoleces was assessed on a daily basis by microscopic observation of movements, flame cell activity, and 0.1% eosin staining. P-ERK2 expression was determined by Western blot to evaluate the activation of ERK2. Control protoscolices incubated in the DMSO and RPMI 1640 medium were not altered and remained viable ( $95.5 \pm 0.5\%$ ) after 7 days of incubation. From day 1, the viability of protoscoleces started to decline due to the 150, 200  $\mu\text{mol/L}$  of celecoxib. After 2 days, viable protoscoleces were no longer observed in cultures treated with 200  $\mu\text{mol/L}$  of celecoxib but survival of ( $3.1 \pm 0.7\%$ ). At 150  $\mu\text{mol/L}$ , celecoxib had a clearly decreased efficacy, with ( $43.9 \pm 0.4\%$ ) of protoscolices still viable after 3 days of treatment. Protoscolex death increased with time. Only a small fraction of protoscolices were viable in cultures treated with 100  $\mu\text{mol/L}$  celecoxib after 7 days. Although 100  $\mu\text{mol/L}$ , 50  $\mu\text{mol/L}$  of celecoxib had an effect on protoscoleces, the effect was not as pronounced as that of 200  $\mu\text{mol/L}$  of celecoxib. Treatment with celecoxib down-regulated that of ERK2 protein in *Echinococcus granulosus* protoscolices. The date reported in this article demonstrate a clearly that celecoxib satisfactory action against *E. granulosus* protoscoleces *in vitro*, this effect may relate to the inhibition of ERK2 kinase signaling pathway.

国家自然科学基金资助项目(No. U1303121)资助

通讯作者:吕海龙,Email:lvhl1999@126.com

作者单位:1. 石河子大学医学院第一附属医院肝胆外科,石河子 832008;

2. 石河子大学医学院组织胚胎学教研室,石河子 832008

**Keywords:** celecoxib; *Echinococcus granulosus*; protoscoleces; ERK2 signal pathway

Supported by the National Natural Science Foundation of China( No. U1303121)

Corresponding author:Lü Hai-long, Email:lvhl1999@126.com

细粒棘球蚴病是一种危害严重的人兽共患病,在我国主要分布在畜牧地区<sup>[1]</sup>。目前对包虫病的治疗,手术仍然是主要的手段<sup>[2]</sup>,但术中易造成包虫囊肿囊液外溢,以及未杀死的原头节残留于手术创面或腹腔,这是导致手术后复发最主要的原因<sup>[3-4]</sup>,如果能寻找一种能在短时间内杀死头节又对周围正常组织损伤小的药物用于术后局部使用,有可能对预防复发起到有效的作用。

本研究以自然感染的绵羊肝细粒棘球蚴原头节为研究对象,观察塞来昔布对绵羊细粒棘球蚴原头节生长的影响,进一步评价塞来昔布用于临床抗虫治疗的可能性,为塞来昔布在肝包虫病治疗的临床应用提供依据。

## 1 材 料

自然感染细粒棘球蚴病的绵羊肝脏,由新疆石河子市西部牧业有限公司提供,塞来昔布(西乐葆)购自美国辉瑞制药有限公司,二甲基亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司,RPMI 1640 培养基购自上海哈灵生物科技有限公司,小牛血清购自杭州四季青生物有限公司,山羊抗小鼠 p-ERK2 抗体购自 Santa Cruze 公司,小鼠抗  $\beta$ -actin 单克隆抗体购自 Santa Cruze 公司。塞来昔布胶囊内容物用 DMSO 充分溶解,0.22  $\mu\text{mol/L}$  滤器过滤备用(DMSO 最终浓度<0.1%)。

## 2 方 法

**2.1 细粒棘球蚴原头节的分离及体外培养** 将新鲜的自然感染细粒棘球蚴的绵羊肝脏带回实验室,生理盐水冲洗肝脏表面,洗干净后移入无菌超净台内用 75% 酒精消毒表面,用无菌方式抽取囊内容物置培养瓶中,静置数分钟使囊和原头蚴沉淀后弃去上清液,用 PBS 液反复冲洗去掉死亡的原头蚴,保证原头节活力大于 98%(0.1% 伊红染色),然后体外培养原头节 3 d,待适应体外环境后药物作用。

**2.2 实验分组** 本实验共计 6 组:培养基对照组、DMSO 组及 50、100、150、200  $\mu\text{mol/L}$  的塞来昔布作用组。将体外培养的细粒棘球蚴原头节再次用 PBS 洗涤数次,使原头节活力接近 100%,用 RPMI 1640 培养基混匀原头节。每组培养液中加入约 2 000 个原头节,置 37 °C、10% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,每隔 24 h 取作用后的头节 80~100 个,测活力并计数。隔 3 d 换培养液及复加药 1 次,连续观察

7 d。实验独立重复 3 次。

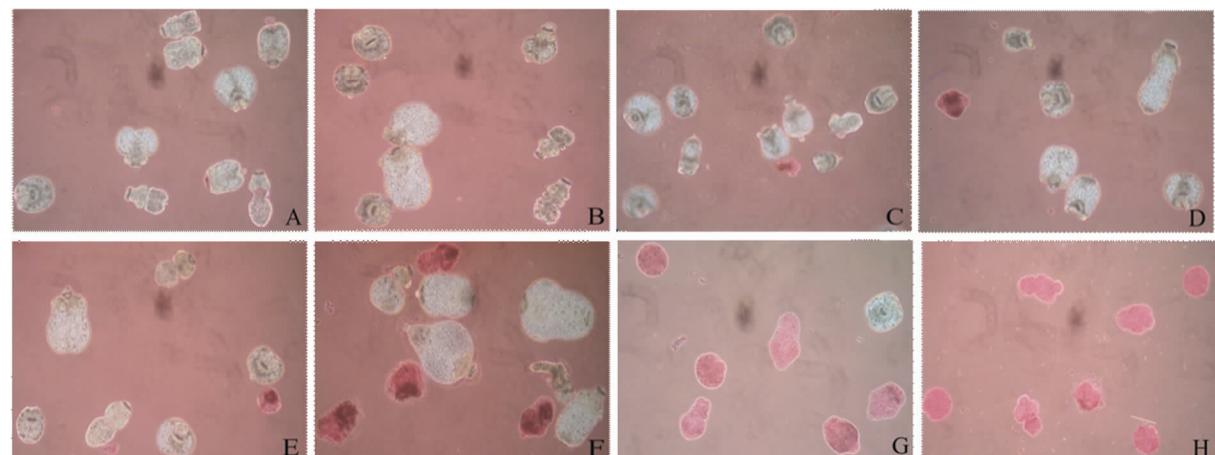
**2.3 Western blot 检测蛋白定量表达** 取 100、150、200  $\mu\text{mol/L}$  塞来昔布作用 48 h 组,DMSO 组的细粒棘球蚴原头节为对照,用 pH7.2 的磷酸盐缓冲液洗涤 3 遍,弃掉上清液,在电子天平中各组称取质量为 10 mg 的细粒棘球蚴原头节,加入 150  $\mu\text{L}$  RIPA 裂解液,用超声粉碎仪迅速使原头节粉碎,置于冰上裂解 15 min。然后移入高压过且在冰上预冷的 1.5 mL EP 管中,置 4 °C 离心机中离心,12 000 g,25 min,离心毕,小心抽取各管中的上清液置新的 EP 管中。提取总蛋白,测定蛋白含量并配平为统一浓度,每个泳道蛋白的溶液体积 5  $\mu\text{L}$ ,上样于 SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离后,转移至 PVDF 膜,5% BSA(内参用 5% 牛奶)均用 TBST 配制,在常温下封闭 2 h。一抗( $\beta$ -actin, P-ERK2)效价均为 1:1 000,4 °C 孵育 18 h,TBST 洗膜 6 次×5 min,随后加辣根过氧化物酶标记的二抗(羊抗小鼠效价为 1:25 000)室温下脱色摇床上摇动孵育 2 h,漂洗同上。暗室内加入化学发光剂显影,用胶片曝光并采图,用凝胶图像处理系统分析目的条带。

**2.4 统计学分析** 采用 SPSS17.0 统计软件进行单因素方差分析、LSD 检验及  $\chi^2$  检验,均以  $P<0.05$  为有统计学意义。

## 3 结 果

**3.1 光镜下观察塞来昔布作用后的细粒棘球蚴原头节形态变化** 倒置显微镜下观察,塞来昔布作用 24 h 后,各实验组均可见虫体不同程度的回缩,随药物浓度的增加外翻的原头节比例明显增加,体积变小。作用 3 d 后,各药物作用组原头节虫体边缘出现不同程度的损伤,边缘不规整,顶突外翻、小勾排列不齐、部分断裂脱落,虫体内钙颗粒数量减少、体积减小,顶突下方吸盘清晰可见,形态不规则。可见大部分头节因结构破坏被染成红色。空白对照组原头节顶突内陷,伊红染色拒染,可见原头节活动。

**3.2 塞来昔布对细粒棘球蚴原头节生长的影响** 不同浓度塞来昔布作用后的细粒棘球蚴原头节活力曲线见图 2。经  $\chi^2$  检验,各浓度塞来昔布作用组的原头节活力值与对照组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。DMSO 组 7 d 后活力为(95.5±0.5)% ,培养基对照组作用 7 d 后活力为(96.5±0.3)% ,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。200  $\mu\text{mol/L}$  塞来昔布作用原头节 24 h 后,活力仅为(3.1%±0.7)%。



Av Control protoscoleces B: Protoscoleces were incubated with DMSO; C: Altered protoscoleces after 1days p. i. with  $100 \mu\text{mol/L}$  celecoxib; D: Altered protoscoleces after 3 days p. i. with  $100 \mu\text{mol/L}$  celecoxib; E: Altered protoscoleces after 1days p. i. with  $150 \mu\text{mol/L}$  celecoxib; F: Altered protoscoleces after 3 days p. i. with  $150 \mu\text{mol/L}$  celecoxib; G: Altered protoscoleces after 1days p. i. with  $200 \mu\text{mol/L}$  celecoxib; H: Altered protoscoleces after 3 days p. i. with  $200 \mu\text{mol/L}$  celecoxib

图 1 光镜细粒棘球绦虫原头节的(100×)(0.1%伊红染色)

Fig. 1 Light microscopy of *E. granulosus* protoscoleces(100 × )

从活力曲线图(图 2)看出,随着药物浓度的增加和用药时间的延长,塞来昔布对原头节的抑制率增加,即药物对原头节的抑制作用具有剂量依赖性和时间依赖性。

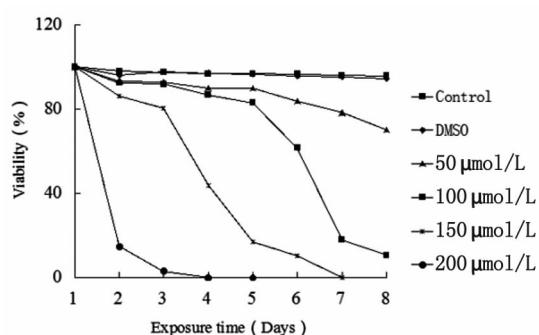


图 2 不同浓度塞来昔布作用后细粒棘球蚴原头节活力曲线

Fig. 2 Survival of *E. granulosus* protoscoleces after *in vitro* exposure to celecoxib

### 3.3 塞来昔布对 p-ERK2 蛋白表达的影响

Western blot 法检测 DMSO 及  $100$ 、 $150$ 、 $200 \mu\text{mol/L}$  塞来昔布作用原头节 48 h 后 P-ERK2 蛋白表达(图 3),以 ERK 磷酸化程度作为评估塞来昔布对原头节体内该信号通路活性影响的指标。本实验中测得各组 p-ERK2 及内参  $\beta$ -actin 蛋白的灰度值,以 P-ERK2/ $\beta$ -actin 灰度比值进行 P-ERK2 蛋白表达水平的相对半定量分析,显示不同浓度塞来昔布( $100$ 、 $150$ 、 $200 \mu\text{mol/L}$ )处理细胞 48 h 后, p-ERK2 蛋白表达量均下降,并呈现明显的浓度依赖性,组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

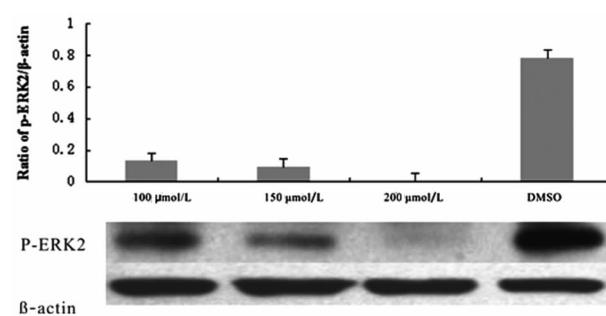


图 3 不同浓度塞来昔布作用细粒棘球蚴原头节 48 h 后磷酸化 ERK2 蛋白的表达

Fig. 3 p-ERK2 protein expression in *Echinococcus granulosus* protoscoleces following treatment with celecoxib at different doses for 48h

### 4 讨 论

新疆是肝细粒棘球蚴病的高发地区<sup>[5]</sup>,目前该病已被列入国家转移支付项目区免费救治疾病。目前手术治疗是该病的重要治疗方式,但术中头节的外溢难免导致术后复发,因此术中运用有效的局部化疗药物辅助治疗是防止复发的关键措施。目前临床肝包虫术中和术后常用的辅助化学药物有 20% 的食盐水,10% 过氧化氢,1.5% 西曲溴铵,0.15% 氯己定,阿苯达唑,10% 聚维酮碘及 95% 乙醇等。它们虽然都可以起到杀死原头节的作用,但都存在着很多缺点<sup>[5]</sup>,因此积极寻找术中抗棘球蚴的新药成为肝包虫术后防止复发研究中的一项重要课题。

塞来昔布(celecoxib)是高选择性 COX-2 抑制剂<sup>[7]</sup>,目前被用于各领域的实验及临床的研究中,可以抑制多种肿瘤细胞的生长,促进凋亡<sup>[8]</sup>。以往人

们对塞来昔布作用机制的认识仅限于其能够抑制 COX-2 的活性,而起到抑制肿瘤细胞生长的作用,但随着人们对其机制认识的不断深入,发现塞来昔布等非甾体类药可以在完全缺乏 COX 活性的细胞中发挥抑制生长的作用,说明这类药物除抑制环氧合酶的途径外,同时又有其他途径的参与而发挥抑制细胞增殖的作用<sup>[9-11]</sup>。张勇<sup>[12]</sup>等研究证实塞来昔布可通过抑制 ERK2 信号传导通路而起到抑制胃癌细胞增殖并诱导细胞凋亡的作用。

本研究观察塞来昔布对体外培养细粒棘球蚴原头节生长的影响。从实验结果得知,50、100、150、200 μmol/L 的塞来昔布作用原头节后其生长均受到抑制。倒置显微镜下观察各浓度塞来昔布作用后的原头节活动度较 DMSO 和培养基组对比呈明显下降趋势,说明不同浓度的塞来昔布均对体外培养的细粒棘球蚴原头节均有抑制生长和杀伤作用,并呈明显浓度和时间依赖。

ERK2(细胞外信号调节激酶 2)是 MAPK 信号通路中一条促进细胞生长及抗凋亡的通路,本课题组<sup>[13]</sup>研究发现 ERK 抑制剂 PD98059 体外有抑制原头节生长的作用。本研究结果显示塞来昔布能使细粒棘球蚴原头节磷酸化 ERK2 表达减少,并有较明显的浓度依赖性,表明塞来昔布能阻断 ERK2 磷酸化,从而达到抑制细粒棘球蚴原头节生长的作用,间接地表明塞来昔布抑制细粒棘球蚴原头节生长作用与 ERK2 途径有关,但是是否同时有其他作用机制共同参与,值得进一步研究。

塞来昔布于 2000 年被美国食品药品管理局首次批准用于家族性息肉病的治疗,国内已有塞来昔布用于预防肿瘤的实验研究报告<sup>[15]</sup>。本研究只是塞来昔布对细粒棘球蚴原头节生长一个初步的探索,但塞来昔布抗细粒棘球蚴原头节的作用机理还不明确,我们将在此基础上进一步深入研究,为临床开辟预防肝包虫术后复发提供新途径。

## 参考文献:

- [1] Li HM, Lou ZZ, Li L, et al. Recombinant protein of *Echinococcus granulosus* EG95[J]. Chin J Zoonoses, 2014, 30(10): 1066-1070. (in Chinese)
- [2]李宏民, 娄忠子, 李立, 等. 棘球蚴 EG95 重组蛋白研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(10): 1066-1070.
- [3] Adas G, Arikian S, Kemik O, et al. Use of albendazole sulfoxide, albendazole sulfone, and combined solutions as scolicidal agents on hydatid cysts (in vitro study)[J]. World Chin J Digestol, 2009, 15(1): 112-116.
- [4] Peng XY, Zhang SJ, Niu JH, et al. A new principle of surgical procedures for hepatic hydatid disease -An analysis of 684 cases [J]. J Abom surg, 2003, 16(1): 19-21. (in Chinese)
- [5] 彭心宇, 张示杰, 牛建华, 等. 肝包虫病外科治疗术式选择的新观点(附 684 例报道)[J]. 腹部外科, 2003, 16(1): 19-21.
- [6] Rajabi MA. Fatal reactions and methacmoglobinemia after silver nitrate irrigation of hydatid cyst[J]. Surg Pract, 2009, 13(5): 2-7.
- [7] Zeng XM, Guan YY, Wu WP. Epidemiological distribution characteristics of echinococcosis[J]. Chin J Zoonoses, 2014, 30(4): 413-417. (in Chinese)
- [8] 曾祥嫂, 官亚宜, 伍卫平. 棘球蚴病的流行病学分布特征[J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(4): 413-417.
- [9] Friedman DL, Whittom J, Leisenring W, et al. Subsequent Neoplasms in 5-Year Survivors of Childhood Cancer: The Childhood Cancer Survivor Study[J]. J Natl Cancer Inst, 2010, 102(14): 1083-1095.
- [10] Chen J, Ran Y, Hong C, et al. Anti-cancer effects of Celecoxib on nasopharyngeal carcinoma HNE-1 cells expressing COX-2 oncogene[J]. Cytotechnology, 2010, 62(5): 431-438.
- [11] Li QL, Ren MY. Research Progress in Antitumor Mechanism of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs[J]. Chin J Bases Clinics General Surg., 2010, 62(5): 431-438. (in Chinese)
- [12] 李叔林, 任明扬. 非甾体类抗炎药抗肿瘤机理的研究进展[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2012, 19 (12): 1368-1371.
- [13] Harris RE, Alshafie GA, Abouissa H, et al. Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor [J]. Cancer Res, 2000, 60(8): 2101-2103.
- [14] Honjo S, osaki M, Ardyanto TD, et al. COX-2 inhibitor, NS398, enhances Fas-mediated apoptosis via modulation of the PTEN-Akt pathway in human gastric carcinoma cell lines[J]. DNA Cell Biol, 2005, 24(3): 141-147.
- [15] Baatar D, Jones MK, Pai R, et al. Selective cyclooxygenase-2 blocker delays healing of esophageal ulcers in rats and inhibits ulceration-triggered c-Met/hepatocyte growth factor receptor induction and extracellular signal-regulated kinase 2 activation [J]. Am J Pathol, 2002, 160(3): 963-72.
- [16] Zhang Y, Jiang MD, Zeng WZ, et al. Effects of celecoxib on cell proliferation and ERK2 expression of ERK2 in gastric cancer cells[J]. World Chin J Digestol, 2005, 13(18): 2213-2216. (in Chinese)
- [17] 张勇, 蒋明德, 曾维政, 等. 塞来昔布对胃癌细胞生长及 ERK2 表达的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(18): 2213-2216.
- [18] Wang CH, Lü HL, Zhang J, et al. In vitro effects of the ERK inhibitor PD98059 on *Echinococcus granulosus* protoscoleces[J]. J Pathog Biol, 2012, 7(07): 489-492. (in Chinese)
- [19] 王成华, 吕海龙, 张晶, 等. ERK 抑制剂 PD98059 体外抗细粒棘球绦虫原头蚴作用的研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2012, 7(07): 489-492.
- [20] Lan CH, Fang DC, Xiang DB, et al. Inhibition effects of celecoxib on the growth of gastric carcinoma in vitro and in vivo[J]. Chin J Gastroenterol Hepato, 2005; 14 (2): 134-136. (in Chinese)
- [21] 兰春慧, 房殿春, 向德兵, 等. 环氧合酶-2 抑制剂 celecoxib 抑制胃癌生长的实验研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2005; 14 (2): 134-136.
- [22] Wang ZX, Shu YQ, Wang T, et al. Effects of cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib on cyclooxygenase-2 gene expression and cisplatin chemosensitivity in human lung adenocarcinoma A549 cell line[J]. Acta Universitatis Medicinalis Nanjing (Nat Sci) 2006, 26(5): 337-342. (in Chinese)
- [23] 王朝霞, 束永前, 王腾, 等. 塞来昔布对肺癌细胞的增殖抑制、环氧合酶-2 表达的影响和化疗敏感性[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2006, 26(5): 337-342.