

选择性 COX-2 抑制剂对放射所致 DNA 损伤修复的影响

徐慧婷,于世英,夏曙,熊华,庄亮

Effects of Selective COX-2 Inhibitor on DNA Repairing after Irradiation

XU Hui-ting, YU Shi-ying, XIA Shu, XIONG Hua, ZHUANG Liang

Cancer center, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding Author: YU Shi-ying, E-mail: syyu@tjmu.edu.cn

Abstract :Objective To investigate the effects of a selective COX-2 inhibitor-celecoxib on DNA repairing after X-rays irradiation, in order to elucidate the possible mechanism of the radiosensitization of selective COX-2 inhibitor. **Methods** Human cervical carcinoma cells (HeLa) were cultured in vitro and exposed to different doses of celecoxib for 48h then with and without radiation (6Gy), flow cytometry sub-G1 fluorescence parameter line was performed to analyze the change of the apoptosis and cell cycle distribution. The DNA damage and repair were detected by single cell gel electrophoresis assay. Semi-quantitative RT-PCR and Western blot were used to measure the mRNA and protein level of ku70 and ku80 in HeLa cell lines treated with celecoxib. **Results** Celecoxib had no effect on the cell cycle distribution of HeLa cell lines, but it induced apoptosis increasing dependent on celecoxib doses. Radiation-induced apoptosis was enhanced after HeLa cells treated with celecoxib (enhancement factor = 6.96 at 100 μ mol/L), and the radiation-induced G₂/M arrest was markedly decreased by celecoxib [Radiation group (RT): G₂/M 32.35%, 100 μ mol/L celecoxib + RT: G₂/M 5.95%]. The DNA damage induced by radiation was not increased, but the DNA repair was reduced in HeLa cells treated with celecoxib (60 μ mol/L) for 48h, the mRNA and protein level of ku70 and ku80 were also significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** The results suggest that the possible mechanism of radiosensitization of a selective COX-2 inhibitor was related to inhibition of DNA repair including reduced G₂/M arrest cells and decreased DNA-PK expression.

Key words: Cyclooxygenase-2; celecoxib; G₂-M phase; DNA repair; radiation damage

摘要:目的 选择性 COX-2 抑制剂 celecoxib 对放射引起的 DNA 损伤修复的影响。方法 流式细胞仪 Sub-G₁ 法检测凋亡率和细胞周期;单细胞凝胶电泳技术检测 DNA 的损伤及修复。RT-PCR 和 Western blot 检测 DNA 修复基因 ku70、ku80 的表达。结果 celecoxib 对 HeLa 细胞的周期分布无明显改变,但可引起剂量依赖性凋亡。celecoxib 可明显提高放射引起的凋亡率,剂量增强比(DEF)在 60、80、100 μ mol/L 时分别为 3.18、4.16、6.96。同时 celecoxib 对 6Gy X 线引起的 G₂/M 期阻滞有明显的减弱作用(放射组:G₂/M 32.35%,药放组:G₂/M 5.95%);celecoxib 不明显增加放射引起的 DNA 损伤,但可明显延缓放射引起的 SSB 和 DSB 的修复($P < 0.05$);celecoxib 明显抑制 HeLa 细胞 ku70、ku80 的表达($P < 0.05$)。结论 COX-2 选择性抑制剂 celecoxib 对肿瘤细胞的放射增敏机制可能与抑制 DNA 损伤修复有关,其作用可能通过减弱辐射诱导的 G₂/M 期阻滞和抑制 DSB 重组修复酶 DNA-PK 成分 ku 的表达得以实现。

关键词: Celecoxib; HeLa 细胞;放射增敏机制;细胞周期;DNA 损伤修复

中图分类号:R73-36 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2008)08-0538-05

0 引言

环氧化酶(cyclooxygenase, COX)是花生四烯酸生物合成前列腺素(prostaglandin, PG)的限速酶,

COX 分为 COX-1 型和 COX-2 型。多数恶性肿瘤呈 COX-2 过度表达,且其表达水平与肿瘤的发生、发展、预后与转移有密切的关系。选择性 COX-2 抑制剂不仅具有抗肿瘤活性,在体内外试验^[1]和临床试验^[2]中还证实其对肿瘤具有放射增敏效应。但其放射增敏机制还不是很清楚,可能与降低 PGE₂ 水平、促进凋亡、改变细胞周期、抑制 DNA 损伤的修复、抑制血管生成等有关。本文采用人宫颈腺癌 HeLa 细胞株,观

收稿日期:2007-09-05;修回日期:2008-03-11

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤中心

通讯作者:于世英, E-mail: syyu@tin.tjmu.edu.cn

作者简介:徐慧婷(1980-),女,博士,主要从事肿瘤放疗增敏研究

察选择性 COX-2 抑制剂 celecoxib 对放射引起的 DNA 损伤修复的影响,旨在进一步阐明选择性 COX-2 抑制剂的放射增敏机制。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

宫颈癌 HeLa 细胞系由华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤中心实验室冷藏;celecoxib 药粉购自安徽森瑞有限公司;碘化丙啶(PI)、RNA 酶 A(Rnase A)购自 Sigma 公司;正常熔点、低熔点琼脂糖(NMA, LMA)购自 Gibco 公司;RT-PCR 主要试剂 Trizol 购自上海华舜生物工程有限公司,逆转录试剂盒、TaqDNA polymerase、dNTP Mix 均系美国 Fermentas 公司产品,DNA 修复基因 ku70、ku80 引物由上海赛百胜公司合成;鼠源性单克隆抗体 ku70、ku80 购自 NeoMarkers 公司;FAC Sort 流式细胞仪(美国 Becton Dickson 公司)。

1.2 细胞培养及处理

对数生长期 HeLa 细胞,0.25 %胰酶消化分离,常规传代培养于 RPMI1640 完全培养液中 37 ℃、5 % CO₂ 培养箱中培养。细胞分为空白组、给药组(celecoxib 作用 48 h)、放射组(6MV X 线 6 Gy)、药放组(celecoxib 作用 48 h 后给予 6MV X 线 6 Gy),其中 celecoxib 再按浓度梯度分为 20、40、60、80、100 μmol/L 组。

1.3 流式细胞仪 Sub-G₁ 法检测细胞周期分布及凋亡率

按每孔 10⁵ 个细胞接种于 6 孔板,待 24 h 后给予不同浓度的 celecoxib,使其终浓度分别为 20、40、60、80、100 μmol/L,空白组加同等体积的 DMSO,培养 48 h 后收获细胞并以 80 %冰乙醇固定,-20 ℃固定过夜。同上另设 6 个浓度组 celecoxib 作用 48 h 后予 6MV X 线 6 Gy 照射处理,继续培养 24 h 后收获固定细胞。固定后细胞用 PBS 洗涤 2 次,100 μl PC 缓冲液冰上孵育 30 min。PBS 洗涤细胞,加 10 mg/L PI 10 μl、50 mg/ml Rnase A 10 μl、PBS 500 μl 室温、暗处进行 DNA 染色 20 min。应用流式细胞仪经 488 nm 激光激发进行检测,应用 Cellquest 软件(美国 Becton Dickson 公司)分析结果。

1.4 单细胞凝胶电泳(single cell gel electrophoresis assay, SCGE)检测 DNA 损伤

4 组细胞(celecoxib 只取 60 μmol/L 组)每组均设平行对照组。将各组细胞消化制备成 PBS 单细胞悬液(5 × 10⁵ 个/ml),并在处理后分别于 0、15 min、30 min、1 h、2 h 时间点收取细胞悬液置冰上。碱性单细胞凝胶电泳法检测 DNA 单链断裂(SSB):

参照 Singh NP^[3]的方法,略修改。将上述各时间点收取的细胞在 30 min 内铺入附着于载玻片上的琼脂糖胶内,4 ℃ 15 min 使胶完全凝固。后将胶板浸在碱性细胞裂解液中(2.5 M NaCl、0.1 M EDTA、1 % Triton-X-100、10 % DMSO)4 ℃避光作用 2 h 或过夜;将裂解处理后的载玻片用蒸馏水清洗 2 次,置于解旋液(0.3 mol/L NaOH)中,4 ℃避光静置 20 min。随后将玻片移至盛有新鲜冰冷电泳缓冲液的水平电泳槽中 25 V、300 mA 电泳 25 min。停止电泳后将载玻片转移至中和缓冲液中 10 min,蒸馏水柔和冲洗 2~3 遍,略干后滴加浓度为 20 μg/ml 的溴化乙啶 50 μl/片,盖上盖玻片放在湿盒中,2 天内拍照保存。中性单细胞凝胶电泳法检测 DNA 双链断裂(DSB):制胶同碱性单细胞凝胶电泳法。将制好的胶板置入新配的中性裂解液(2 mol/L NaCl、30 mmol/L EDTA、1 % 十二烷基肌氨酸钠、10 mmol/L Tris、1 % Triton X-100、10 % DMSO、pH 8.2~8.5)中于 4 ℃裂解 2 h 或过夜;0.5 % TBE(2 mmol/L EDTA、90 mmol/L Tris、90 mmol/L 硼酸、pH 8.2~8.5)浸没漂洗 3 次,每次 1 h;在盛有 0.5 % TBE 电泳缓冲液的水平电泳槽中 0.6 V/cm,电泳 25 min;后同碱性单细胞凝胶电泳法。在荧光显微镜下每样本观察 100 个细胞,用 CASP Comet Assay Software Project 对彗星图像进行分析,计算各组彗星的 Oliver 尾矩(Oliver Tail Moment, OTM, 即尾部 DNA 百分含量 × 迁移 DNA 中心密度)。

1.5 半定量 RT-PCR

分析给药组(60 μmol/L celecoxib 作用 48 h)与空白组 HeLa(只给相当 DMSO)细胞 ku80、ku70 mRNA 的表达。按试剂说明书完成 RNA 抽提纯化和 cDNA 的合成,以逆转录产物为模板进行 PCR 扩增。

Ku70 引物为:5'CTCTATCGGGAAACAAATGAACCAAG-3' 25bp(正向),5'GTATCTGCACAATGCTGCAACCTCC-3' 25bp(反向),退火温度 54 ℃,扩增产物 339 bp;Ku80 引物为:5'TATGCTCCACCGAGGCACAGTTGA-3' 25bp(正向),5'ACTGCCTTCAGCCAGACTGGA GACG-3' 25bp(反向),退火温度 56 ℃,扩增产物 478 bp;β-actin 引物为:5'ctagaagcatttgcggtgg-3' 20bp(正向),5'gagctacgagctgcctgacg-3' 20bp(反向),退火温度 56 ℃,扩增产物 416 bp。PCR 产物经 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳分离,紫外灯下观察并拍照。

1.6 Western blot 检测

按给药组(60 μmol/L celecoxib 作用 48 h)与空白组 HeLa(只给相当 DMSO)提取细胞总蛋白。具体方法如下:冷的 PBS 溶液洗 3 遍,适量细胞裂解

液(150 mmol/L Tris-cl、0.02 %叠氮钠、0.1 % SDS、100 μg/ml PMSF、1 μg/ml Aprotinin、1 % NP40、0.5 %去氧胆酸钠、150 mmol/L Nacl)裂解提取总蛋白,用 10 %的分离胶做 SDS-PAGE,然后转移至 NC 膜上,5 %脱脂奶 TBST 室温封闭 1 h,分别加入一抗 4 孵育过夜,TBST 洗涤 10 min ×3 次,辣根过氧化物酶二抗室温孵育 1.5 h, TBST 洗涤 10 min,洗 3 次,ECL 曝光试剂盒曝光底片显影。

1.7 统计学方法

以上实验均重复 3 次,组间和组内采用 *t* 检验和方差分析,数据分析由 SPSS 11.0 软件完成。

2 结果

2.1 celecoxib 与射线单独和联合作用后 HeLa 细胞周期及凋亡率的变化

单独 celecoxib 作用 48h 后对 HeLa 细胞的周期分布无明显改变,但 celecoxib 可引起 HeLa 细胞发生剂量依赖性的凋亡,见表 1。

表 1 celecoxib 对细胞周期和凋亡率的影响

Tab 1 The effects of celecoxib on apoptosis and cell cycle

Groups	apoptosis %	G ₀ /G ₁ %	S %	G ₂ /M %
Control	0.54	69.91	13.20	16.61
20 μmol/L	1.35	70.02	13.98	15.00
40 μmol/L	1.28	70.63	13.05	15.42
60 μmol/L	2.48	64.48	12.52	20.90
80 μmol/L	8.47	55.13	15.95	20.86
100 μmol/L	29.82	44.16	16.42	10.14

celecoxib + 放射组与单纯放射组相比,可明显提高放射引起的凋亡率,在 celecoxib 浓度为 60、80、100 μmol/L 时,可分别增强放射诱导的凋亡率达 3.18、4.16、6.96 倍。同时 celecoxib 对 6 Gy X 线引起的 G₂/M 期阻滞有明显的减弱作用,见图 1。

2.2 celecoxib 与射线联合作用对 HeLa 细胞 DNA 损伤的影响

2.2.1 碱性单细胞凝胶电泳法检测 HeLa 细胞 SSB 如表 2 所示,空白组与加药组的 SSB 损伤之间差异无

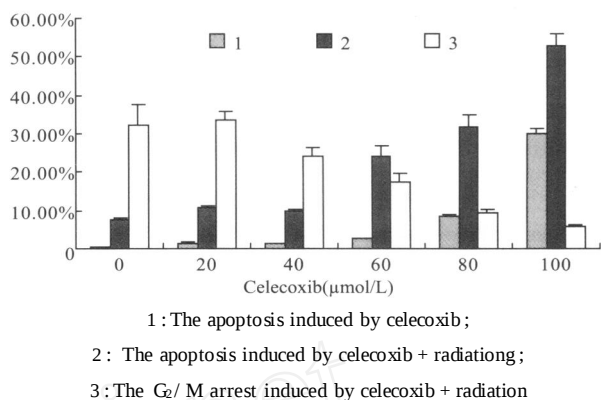


图 1 celecoxib 对放射诱导细胞凋亡和 G₂/M 期阻滞的影响
Fig 1 The effects of celecoxib on the apoptosis and G₂/M arrest induced by radiation

统计学意义 (*P* > 0.05),表明适当剂量的 celecoxib (60 μmol/L) 并不引起明显的 SSB。药放组与放射组相比,其初始 SSB (照射后 0 min 时的 SSB) 无差异 (*P* > 0.05),而药放组照射后各时间点的 SSB 均高于放射组 (*P* < 0.05);并且放射组的 SSB 于照射后 2 h 基本修复完全 (与空白组相比差异无统计学意义, *P* > 0.05),药放组的 SSB 修复较慢,至照射后 2 h 仍有明显残留的 SSB 未修复。

2.2.2 中性单细胞凝胶电泳法检测 HeLa 细胞 DSB 如表 3 所示,与 SSB 的检测结果相似,药放组与放射组相比,其初始 DSB 也无差异 (*P* > 0.05);而药放组与放射组相比,药放组的 DSB 修复速度明显低于放射组 (*P* < 0.05),至照射后 2 h 药放组仍有约 37 % 的残留 DSB 未修复。

2.3 半定量 RT-PCR 方法检测 celecoxib 对 HeLa 细胞 ku70,ku80 mRNA 表达水平的影响

空白组 ku70 (1.030 ± 0.066),ku80 (1.335 ± 0.082) mRNA 表达水平明显高于给药组 ku70 (0.744 ± 0.066),ku80 (0.596 ± 0.024) mRNA 表达水平 (*P* < 0.05),见图 2。

2.4 Western blot 检测 celecoxib 对 HeLa 细胞 ku70 和 ku80 蛋白表达的影响

表 2 碱性单细胞凝胶电泳法检测 HeLa 细胞 SSB 尾距 (OTM) ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The SSB OTM ($\bar{x} \pm s$) of HeLa cells detected by single cell gel electrophoresis assay

Groups	0 min	15 min	30 min	1 h	2 h
Control	0.387 ± 0.169	0.378 ± 0.093	0.369 ± 0.106	0.364 ± 0.143	0.355 ± 0.133
RT ⁺	7.360 ± 2.598	5.239 ± 1.694	1.791 ± 0.798	0.743 ± 0.166	0.397 ± 0.123
Celecoxib	0.410 ± 0.202	0.388 ± 0.138	0.364 ± 0.125	0.354 ± 0.114	0.354 ± 0.093
RT ⁺ + celecoxib	7.368 ± 1.999	6.244 ± 1.918	4.341 ± 1.799	2.910 ± 1.334	1.885 ± 0.340

RT⁺:Radiation; N = 9;RT + celecoxib 组与 RT⁺组的 0 min 相比, *P* > 0.05;RT + celecoxib 组与 RT⁺组其余时间点相比, *P* < 0.05;Celecoxib 组与 Control 组相比, *P* > 0.05

表 3 中性单细胞凝胶电泳法检测 HeLa 细胞 DSB 尾距 (OTM) ($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 The DSB OTM($\bar{x} \pm s$) of HeLa cells detected by single cell gel electrophoresis assay

Groups	0 min	15 min	30 min	1 h	2 h
Control	0.337 $\pm$ 0.154	0.331 $\pm$ 0.116	0.304 $\pm$ 0.126	0.284 $\pm$ 0.131	0.273 $\pm$ 0.114
RT ⁺	6.499 $\pm$ 3.180	5.117 $\pm$ 1.816	2.045 $\pm$ 0.862	0.973 $\pm$ 0.255	0.330 $\pm$ 0.143
Celecoxib	0.351 $\pm$ 0.149	0.327 $\pm$ 0.135	0.330 $\pm$ 0.147	0.303 $\pm$ 0.135	0.329 $\pm$ 0.118
RT ⁺ + celecoxib	6.716 $\pm$ 2.663	5.832 $\pm$ 1.700	4.095 $\pm$ 1.663	2.705 $\pm$ 1.246	1.760 $\pm$ 0.658

RT⁺:Radiation; N = 9;RT + celecoxib 组与 RT⁺组的 0 min 相比, $P > 0.05$;RT + celecoxib 组与 RT⁺组其余时间点相比, $P < 0.05$;Celecoxib 组与 Control 组相比, $P > 0.05$

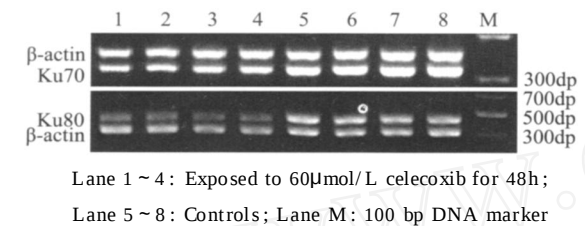


图 2 celecoxib 对 HeLa 细胞 ku70 及 ku80mRNA 表达的影响

Fig2 The effects of celecoxib on ku70 and ku80 mRNA expression in HeLa cell

结果显示宫颈癌 HeLa 细胞经 60 μ mol/L celecoxib 作用 48 h 后,ku70 (0.390 $\pm$ 0.058),ku80 (0.647 $\pm$ 0.120) 蛋白表达水平均较空白组 ku70 (0.785 $\pm$ 0.113),ku80 (1.232 $\pm$ 0.167) ($P < 0.05$) 有明显下调,见图 3。

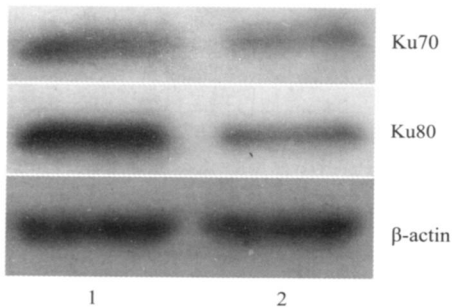


图 3 celecoxib 对 HeLa 细胞 ku70 及 ku80 蛋白表达的影响

Fig 3 The effects of celecoxib on ku70 and ku80 protein expression in HeLa cell

3 讨论

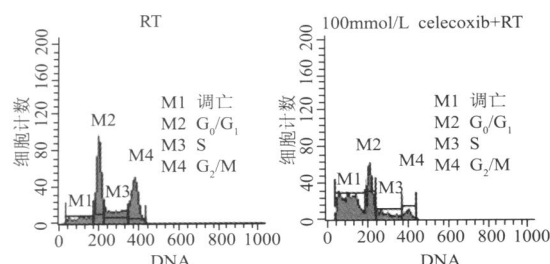
目前已有临床研究表明,放射敏感的肿瘤表达的 COX-2 蛋白水平普遍低于放射抗拒的肿瘤,且 COX-2 蛋白的表达水平与肿瘤的放射敏感性呈正相关^[4,5]。体内试验和体外试验早已证明,非甾体消炎药 (NSAIDs) 如吲哚美辛 (indomethacin) 或布洛芬 (ibuprofen) 可提高肿瘤放射效应。近期研究表明选择性 COX-2 抑制剂的放射增敏效应显著高于非选择性 COX 抑制剂,如在相同的鼠移植瘤模型中,以肿瘤生长延缓 (tumor growth delay, GD)

为评价标准,SC-236 和吲哚美辛的放射增强因子 (enhancement factor, EF) 分别为 3.64 和 1.39^[1,6]。其放射增敏机制可能与抑制 COX-2 的活性,降低细胞内 PGE₂ 水平;促放射诱导的凋亡;细胞周期改变和抑制 DNA 损伤修复有关。该实验室曾在体内外实验中证实,celecoxib 对宫颈癌 HeLa 细胞具有放射增敏作用,并在其小鼠移植瘤模型中证实 HeLa 细胞具有高 COX-2 表达^[7]。该实验研究了选择性 COX-2 抑制剂 celecoxib 与放疗结合时对宫颈癌 HeLa 细胞 DNA 损伤修复的影响。

3.1 细胞周期与放射敏感

处于不同周期的细胞,对低 LET 射线放射敏感性不同,多数实验提示处于 M 期和 G₂ 期的细胞放射敏感性最高。Raju 等^[8]发现用 SC-236 处理 NF-SA (一种鼠源肉瘤细胞) 也可引起 G₂/M 期细胞的累积 (67%),同时 cyclin A、B 以及 CDK-1 的表达下调。另外,阻滞 PG 的合成也可能导致 G₂/M 期细胞的堆积。这说明选择性 COX-2 抑制剂的放射增敏机制可能与细胞周期的再分布有关。但 Petersen 等^[9]的研究发现,经 SC-236 处理 2 天,U251 的细胞周期没有明显改变。也就是 COX-2 抑制剂诱导细胞周期阻滞与肿瘤细胞类型或其他未知因素有关。该实验也发现单独 celecoxib 作用于 HeLa 细胞不显著影响细胞周期分布,但可使放射引起的 G₂/M 期阻滞作用明显减弱。见图 4。与此类似, Park 等^[10,11]的研究也发现 celecoxib 可以显著削弱放射引起的 COX-2 阳性表达细胞的 G₂/M 期阻滞,并认为这种作用与 celecoxib 阻止 CDK1、CDK2 的磷酸化有关。

真核细胞受照射后,可以广泛诱导 G₂ 期阻滞出现,这在保证细胞的完整性、损伤后细胞的存活和保持细胞的遗传稳定性方面具有重要生物学和遗传学意义。哺乳动物细胞预先用咖啡因^[12] (可以解除照射诱导的细胞 G₂ 期阻滞) 处理后照射,可以使细胞存活率明显下降,这说明辐射诱导的细胞 G₂ 期阻滞是机体的一种保护性调节。CyclinB1-cdc2 复合物的活性状态在 G₂/M 期进程调控中起关键作用,



RT: HeLa cells after radiation treatment; 100mmol/L celecoxib + RT: HeLa cells exposed to 100mmol/L celecoxib and radiation

图4 流式细胞仪 Sub-G1 法检测细胞凋亡和周期分布

Fig4 The apoptosis and cell cycle distribution detected by FCM Sub-G1

目前普遍认为, ATM/ATR 激酶-Chk1/Chk2-cdc25C-cdc2 是放射诱导 G₂/M 期阻滞的主要途径。但 Celecoxib 如何影响上述途径,使 G₂/M 期阻滞缺失和凋亡促进的分子机制还有待进一步研究。

3.2 DNA 修复与放射敏感性

DNA 是电离射线杀伤细胞的主要靶分子,辐射诱导的 DNA 断裂及修复,与细胞内在放射敏感性有很好的相关性,可为细胞内在放射敏感性的预测指标。细胞受到分割的低剂量放射后,少部分细胞呈亚致死性损伤(SLD),在细胞存活曲线上出现亚致死性损伤的累积,表现为存活曲线出现肩部及肩区的 D_p 值(即阈值剂量)。Raju 等^[8]发现用 SC-236(50 μM, 3 天)可消除放射存活曲线上的肩部,并通过分割照射(3 Gy/次,2 次间隔 4h)证明单纯放射组(1.4)较 SC-236 + 放射组(1.1)有较高的修复能力。

双链断裂(DSB)是辐射所致细胞死亡的最重要的 DNA 损伤形式,它的修复是通过两种形式的重组修复进行的:同源重组(homologous recombination repair, HR)和非同源末端结合重组(non-homologous end joining, NHEJ),前者是低等生物修复形式,而高等生物主要是后者。DNA 依赖的蛋白激酶(DNA-PK)是参与 NHEJ 的重要分子,在 DNA 损伤修复时,首先由其 ku 亚基结合损伤 DNA 激活 DNA-PKcs 后启动 DNA 损伤修复机制。已经证实,一些哺乳动物辐射敏感细胞系不能进行 DSB 修复的原因是由于 DNA 依赖的蛋白激酶(DNA-PK)成分 Ku 的缺失。Lim 等^[13]研究发现 COX-2 抑制剂可以下调 ku70,ku80 这两种 DNA 修复相关基因的表达。MD Anderson 的 Raju 等^[14]的实验也不仅在蛋白水平证明 celecoxib 抑制 ku70 的表达,同时证明 celecoxib 还可降低 DNA-ku 的结合活性。

综上所述,COX-2 选择性抑制剂 celecoxib 对肿瘤细胞的放射增敏机制可能与抑制 DNA 损伤修

复有关,其作用可能通过减弱细胞周期 G₂/M 检测点(checkpoint)作用和减弱 DSB 重组修复酶 DNA-PK 成分 ku 的表达得以实现。但 celecoxib 如何影响细胞周期和 DNA 损伤修复的分子机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Milas L, Kishi K, Hunter N, et al. Enhancement of tumor response to gamma-radiation by an inhibitor of cyclooxygenase-2 enzyme [J]. J Natl Cancer Inst, 1999, 91 (17): 1501-1504.
- [2] Park JS, Jun HJ, Cho MJ, et al. Radiosensitivity enhancement by combined treatment of celecoxib and gefitinib on human lung cancer cells [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12 (16): 4989-4999.
- [3] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells [J]. Exp Cell Res, 1988, 175 (1): 184-191.
- [4] Nix P, Lind M, Greenman J, et al. Expression of Cox-2 protein in radioresistant laryngeal cancer [J]. Annals of Oncology, 2004, 15 (5): 797-801.
- [5] Terakado N, Shintani S, Yano J, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with radioresistance in oral squamous cell carcinoma [J]. 2004, 40 (4): 383-389.
- [6] Furuta Y, Hunter N, Barkley T Jr, et al. Increase in radiosensitivity of murine tumors by treatment with indomethacin [J]. Cancer Res, 1988, 48 (11): 3008-3013.
- [7] 高晓慧,于世英,黄河,等. Celecoxib 对人癌裸鼠移植瘤的抗癌与放射增敏作用 [J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2005, 14 (4): 329-330.
- [8] Raju U, Nakata E, Yang P, et al. In vitro enhancement of tumor cell radiosensitivity by a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 enzyme: mechanistic considerations [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2002, 54 (3): 886-894.
- [9] Petersen C, Petersen S, Milas L, et al. Enhancement of intrinsic tumor cell radiosensitivity induced by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6 (6): 2513-2520.
- [10] Shin YK, Park JS, Kim HS, et al. Radiosensitivity enhancement by celecoxib, a cyclooxygenase (COX)-2 selective inhibitor, via COX-2-dependent cell cycle regulation on human cancer cells expressing differential COX-2 levels [J]. Cancer Res, 2005, 65 (20): 9501-9509.
- [11] Park JS, Jun HJ, Cho MJ, et al. Radiosensitivity enhancement by combined treatment of celecoxib and gefitinib on human lung cancer cells [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12 (16): 4989-4999.
- [12] Deplaque G, Ceraline J, Becherel MC, et al. Caffeine and the G₂/M block override: a concept resulting from a misleading cell kinetic delay, independent of functional p53 [J]. Int J Cancer, 2001, 94 (3): 363-369.
- [13] Lim JW, Kim H, Kim KH. Expression of Ku70 and Ku80 mediated by NF-kappa B and cyclooxygenase-2 is related to proliferation of human gastric cancer cells [J]. J Biol Chem, 2002, 277 (48): 46093-46100.
- [14] Raju U, Ariga H, Dittmann K, et al. Inhibition of DNA repair as a mechanism of enhanced radioresponse of head and neck carcinoma cells by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005, 63 (2): 520-528.

[编辑校对:周永红]