

不同用药顺序吉非替尼、多西他赛联用 对非小细胞肺癌细胞的体外抑制作用

玄香兰¹, 周彩存², 安昌善¹

(1 延边大学附属医院, 吉林延吉 133000; 2 上海市肺科医院)

摘要:目的 探讨不同用药顺序吉非替尼、多西他赛(DXT)联用对非小细胞肺癌(NSCLC)细胞的体外抑制作用。方法 选择人肺癌细胞株 PC-9、PC-9/G、A549, 用 MTT 法、流式细胞技术分别检测不同顺序吉非替尼、DXT 联用对 3 种细胞存活率、周期及凋亡的影响; 用药顺序分先用 DXT、后用吉非替尼(D→G 组)及先用吉非替尼、后用 DXT 组(G→D 组)。结果 与 G→D 组比较, D→G 组细胞存活率显著减少, 可使细胞阻滞在 G₂~M 期, 并增强 DXT 诱导的细胞凋亡(P 均 <0.05); G→D 组可使细胞阻滞在 G₀~G₁ 期, 并减少 DXT 诱导的细胞凋亡。结论 先用 DXT、后用吉非替尼为抑制 NSCLC 细胞增殖的最佳联用方案。

关键词:癌, 非小细胞肺; 吉非替尼; 多西他赛; 细胞存活率; 细胞周期; 细胞凋亡

中图分类号: R734.2 文献标志码: A 文章编号: 1002-266X(2012)17-0032-03

Sequence-dependent antiproliferative effects of gefitinib combined with docetaxel in non-small cell lung cancer cells in vitro

XUAN Xiang-lan¹, ZHOU Cai-cun, AN Chang-shan

(1 Yanbian University Hospital, Yanji 133000, P. R. China)

Abstract: Objective To explore the sequence-dependent antiproliferative effects of gefitinib combined with docetaxel in non-small cell lung cancer cells in vitro. **Methods** PC-9, PC-9/G and A549 cell lines were choosed. The cell survival rates were measured by MTT assay, cell cycle distribution and apoptosis were measured by flow cytometry docetaxel. According to the sequence of administration of gefitinib combined with docetaxel, the cells were divided into docetaxel followed by gefitinib group (D→G group) and gefitinib followed by docetaxel group (G→D group). **Results** Compared with the G→D group, D→G group remarkably decreased cell survival, induced G₂-M phase arrest and enhanced apoptosis induced by docetaxel; in contrast, G→D group induced G₀-G₁ phase arrest and decreased apoptosis induced by docetaxel. **Conclusion** Sequential administration of docetaxel followed by gefitinib is optimal combination schedule for the antiproliferative effects of non-small cell lung cancer cells.

Key words: carcinoma, non-small-cell lung; gefitinib; docetaxel; cell survival; cell cycle; apoptosis

为了使非小细胞肺癌(NSCLC)患者能从靶向药物和化疗中受益,目前正在寻找靶向治疗与化疗的最佳联合方案和时机。2011年,我们观察了不同顺序吉非替尼、多西他赛(DXT)联用对人肺癌细胞株 PC-9、PC-9/G、A549 细胞周期及凋亡的影响,旨在寻找抑制 NSCLC 生长的最佳联用方案

1 材料与方法

1.1 材料 人肺癌细胞株 PC-9、PC-9/G、A549(上海肺科医院中心实验室);DMEM 培养基、胰蛋白酶(鼎国生物);细胞凋亡试剂盒(BioVision 公司);流式细胞仪分析细胞试剂盒(GenMed Scientifics 公

司);全自动酶标仪(芬兰)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将盛有 PC-9(EGFR 19 外显子突变吉非替尼敏感株)、PC-9/G(吉非替尼获得性耐药)、A549(吉非替尼原发性耐药)的液氮冻存管放入 37℃ 水浴箱中快速融化,用 PBS 洗涤后移入培养瓶,加入 10 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,置 5% CO₂、37℃ 培养箱孵育,每周换液传代,保持其对数生长状态。吉非替尼原料用 DMSO 稀释成浓度 50 μmol/mL 的母液,避光、4℃ 保存,用药时 DMSO 终浓度小于 0.1%。DXT 40 mg/mL 避光、4℃ 保存,配制母液时以 1:3 比例溶于 13% 乙醇中,加药后乙醇终浓度小于 0.1%。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81160291)。

通讯作者:安昌善

1.2.2 药物半数抑制浓度(IC_{50})检测 采用 MTT 法检测药物 IC_{50} 。取 100 μ L 含细胞数 5×10^3 个的细胞悬液,接种于 96 孔板;加入 100 μ L 含不同浓度吉非替尼(浓度梯度 5 ~ 50 μ mol/L)或 DXT(浓度梯度 4 ~ 40 μ g/mL)的培养液,72 h 后每孔加入 20 μ L MTT 5 mg/mL,置细胞培养箱孵育 4 h,1 200 r/min 离心 10 min,弃上清;每孔加 DMSO 200 μ L,置摇床上充分混匀 1 h。最后用酶标仪测量波长 530 nm 时的光密度(OD)值,求出每组平均 OD 值,计算细胞存活率。细胞存活率 = (每组平均 OD 值 - 试剂空白/对照组 OD 平均值 - 试剂空白) \times 100%。用细胞存活率作出量效曲线,用作图法得出两种药物对不同细胞的 IC_{50} 。

1.2.3 不同用药顺序对细胞存活率的影响 取 100 μ L 含细胞数 5×10^3 个的细胞悬液接种于 96 孔板。各组用药顺序:G \rightarrow D 组(即吉非替尼 \rightarrow DXT 组)先加入 100 μ L 含不同浓度的吉非替尼(PC-9、PC-9/G、A549 终浓度分别为 0.04、15、30 μ mol/L),24 h 后加入 10 μ L 含不同浓度的 DXT(PC-9、PC-9/G、A549 终浓度分别为 8、18、16 μ g/mL)培养液;培养 72 h 后加入 20 μ L/孔 MTT 5 mg/mL,置细胞培养箱孵育 4 h,1 200 r/min 离心 10 min,弃上清;每孔加入 DMSO 200 μ L,摇床上充分混匀后,用酶标仪检测波长 530 nm 时的 OD 值,求出每组平均 OD 值。D \rightarrow G 组先加 DXT,后加吉非替尼,PC-9、PC-9/G、A549 终浓度同 G \rightarrow D 组。G 组单用吉非替尼;D 组单用 DXT;同时设空白对照组。实验重复 3 次,计算细胞存活率。细胞存活率 = (每组平均 OD 值 - 试剂空白/对照组平均 OD 值 - 试剂空白) \times 100%。用细胞存活率作出直方图。

1.2.4 细胞周期检测 取 1×10^5 个对数生长期细胞接种于 6 孔板,24 h 贴壁后弃培养液,用 PBS 清洗 2 遍,加入 3 mL 含不同浓度的吉非替尼或 DXT 培养液;24 h 后加 100 μ L 含不同浓度的吉非替尼或 DXT 培养液。实验分组、药物终浓度同细胞存活率检测方法。72 h 后,用 0.25% 胰酶消化收集全部细胞,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清;用冷 PBS 洗涤 2 次,加固定液 1 mL、4 $^{\circ}$ C 固定 2 h 以上;离心后去上清,用冷 PBS 洗涤 2 次,加标记液 500 μ L(500 μ L Assay Buffer + 10 μ L RNase A + 10 μ L PI),避光、室温孵育 30 min,用流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.5 细胞凋亡检测 其检测方法同细胞周期检测。加药 72 h 后,用 0.25% 胰酶消化收集全部细胞,1 500 r/min 离心 5 min 后弃上清;用冷 PBS 洗涤 2 次,加 500 μ L Binding Buffer 悬浮细胞、5 μ L An-

nexin V-PE 混匀,避光、室温反应 5 min,过滤后用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.6 统计学方法 采用 SPSS11.5 统计软件,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,细胞存活率比较用方差分析(one-way ANOVA)。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同顺序吉非替尼、DXT 联用对细胞存活率的影响 吉非替尼、DXT 均能抑制 PC-9、PC-9/G、A549 生长,其作用呈浓度依赖性(见图 1 ~ 3)。吉非替尼对 PC-9、PC-9/G、A549 的 IC_{50} 分别为 (0.05 ± 0.008) 、 (27.2 ± 2.0) 、 (28.3 ± 0.3) μ mol/L, DXT 分别为 (12.8 ± 1.9) 、 (21.4 ± 1.1) 、 (14.5 ± 0.2) μ g/mL。各组不同细胞存活率比较见表 1。

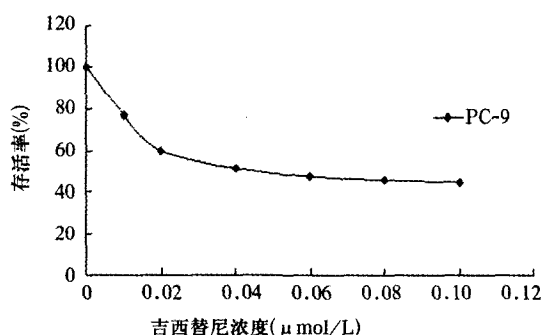


图 1 吉非替尼对 PC-9 的存活率—药物浓度曲线

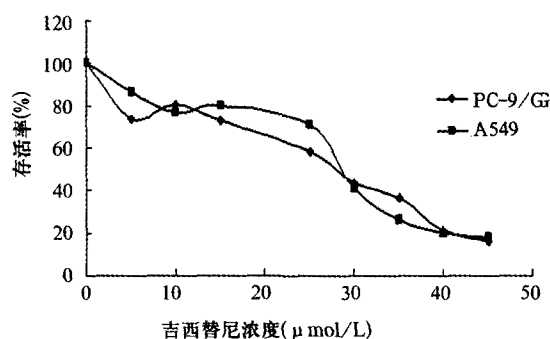


图 2 吉非替尼对 PC-9/G 和 A549 的存活率—药物浓度曲线

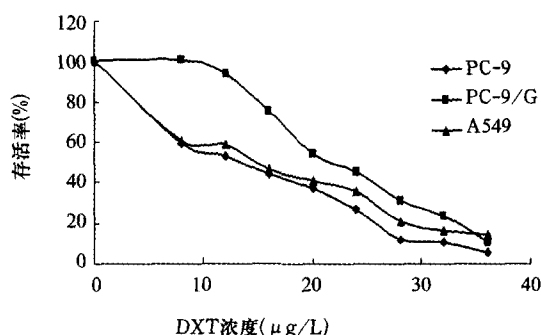


图 3 DXT 对 PC-9、PC-9/G、A549 的存活率—药物浓度曲线

表 1 各组细胞存活率比较(%, $\bar{x} \pm s$)

细胞	G 组	D 组	G→D 组	D→G 组
PC9	42.1±1.8	45.4±1.8	34.8±0.2*	27.7±0.4**
PC9/G	57.6±0.2	63.8±2.3	50.0±2.9*	41.9±0.5**
A549	58.0±1.7	48.7±1.5	43.6±1.3*	34.5±1.1**

注:与 G 组、D 组比较,* $P < 0.05$;与 G-D 组比较,** $P < 0.05$

2.2 不同顺序吉非替尼、DXT 联用对细胞周期的影响 G 组、G→D 组 PC-9、PC-9/G、A549 的 $G_0 \sim G_1$ 期细胞比例均较高, $G_2 \sim M$ 期细胞比例较少;D 组、D→G 组 $G_2 \sim M$ 期细胞比例均较高, $G_0 \sim G_1$ 期细胞比例较少。各组细胞周期细胞比例比较见表 2。

表 2 各组细胞周期细胞比例比较(%, $\bar{x} \pm s$)

细胞	G 组	D 组	G→D 组	D→G 组
PC9				
$G_0 \sim G_1$	75.7±4.9	20.1±4.5*	73.3±3.4	17.8±6.1*
S	10.2±0.4	14.5±7.9	10.5±7.4	13.8±8.5
$G_2 \sim M$	13.6±4.3	65.4±3.5*	16.2±5.9	68.4±10.4*
PC9/G				
$G_0 \sim G_1$	80.0±7.0	19.9±4.6*	71.9±4.7	20.6±5.9*
S	6.0±3.3	11.0±4.5	8.1±3.3	19.4±3.8
$G_2 \sim M$	13.8±7.7	69.1±3.1*	20.0±1.6	60.0±4.4*
A549				
$G_0 \sim G_1$	70.5±8.2	18.0±2.0*	70.5±7.8	18.0±3.9*
S	18.1±7.5	11.0±6.9	6.8±0.9	10.0±6.9
$G_2 \sim M$	11.5±1.1	71.0±6.9*	22.7±7.0	72.0±3.8*

注:与 G 组、G-D 组比较,* $P < 0.05$

2.3 不同顺序吉非替尼、DXT 联用对细胞凋亡的影响 与 G→D 组比较,D→G 组 PC-9、PC-9/G 凋亡率明显升高,A549 凋亡率无统计学差异。各组细胞凋亡率比较见表 3。

表 3 各组细胞凋亡率比较(%, $\bar{x} \pm s$)

细胞	G 组	D 组	G→D 组	D→G 组
PC9	15.5±8.7	47.7±9.2*	24.8±10.9	51.3±5.7*
PC9/G	7.8±1.3	18.0±3.5*	9.2±3.5	21.6±1.1*
A549	4.4±4.0	5.5±1.6	5.2±1.3	6.5±0.8

注:与 G 组、G-D 组比较,* $P < 0.05$

3 讨论

吉非替尼是选择性表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI),是最常用的治疗 NSCLC 的分子靶向药物,对女性、非吸烟、EGFR 突变的腺癌患者疗效显著^[1]。DXT 是治疗 NSCLC 的一、二线化疗药物。体外研究发现,吉非替尼可抑制细胞生长,阻滞细胞周期,促进细胞凋亡^[2];DXT 可促进细胞凋亡^[3];EGFR-TKIs 可增强化疗药物抑制肿瘤细胞生长的作用^[4]。但临床试验发现,同时应用吉非替尼、DXT 两类药物的 NSCLC 患者生存率并未延长^[5]。

本研究显示,PC-9、PC-9/G、A549 对吉非替尼和 DXT 均呈浓度依赖性,药物浓度越高,细胞存活率越低;吉非替尼、DXT 联用抑制细胞增殖的效果

均强于单药;先用 DXT 或吉非替尼都有协同作用,但先用 DXT 抑制细胞增殖的效果优于先用吉非替尼,其原因可能与两药作用机制不同有关。吉非替尼可影响细胞信号传导通路,使细胞增殖阻滞在 $G_0 \sim G_1$ 期;DXT 主要作用在微管形成阶段,使细胞增殖阻滞在 $G_2 \sim M$ 期。如受到外界因素影响,细胞生长周期无法到达微管形成阶段,DXT 就不能完全发挥抑制细胞生长的作用,这可能是吉非替尼拮抗 DXT 的原因。本研究显示,与 G→D 组比较,D→G 组 PC-9、PC-9/G 细胞凋亡率明显升高;提示吉非替尼可促进 DXT 诱导的凋亡,给予 DXT 前先用吉非替尼,可降低 DXT 的凋亡,说明凋亡可能为两药协同或相互拮抗的原因之一。Mahaffey 等^[6]研究发现,单用 DXT 或者先用 DXT、后用厄罗替尼处理的 NSCLC 细胞,可明显表达凋亡相关蛋白;而单用厄罗替尼或先用厄罗替尼、后用 DXT 处理的细胞则无凋亡相关蛋白表达;提示细胞凋亡是引起两类药物顺序差异的重要原因,但其药物凋亡作用相互拮抗的机制尚待进一步研究。

总之,本研究显示先用 DXT、后用吉非替尼是较理想的抑制 NSCLC 细胞增殖的最佳联用方案,无论原发性、获得性吉非替尼耐药患者,均可能在此方案中获得最大利益。

参考文献:

- [1] Mitsudomi T, Yatabe Y. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer [J]. Cancer Sci, 2007,98(12):1817-1824.
- [2] Huether A, Hopfner M, Sutter AP, et al. Erlotinib induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocellular cancer cells and enhances chemosensitivity towards cytostatics [J]. Journal of Hepatology, 2005,43(4):661-669.
- [3] Mhaidat N, Zhang XD, Jiang CC, et al. Docetaxel-induced apoptosis of human melanoma is mediated by activation of c-Jun NH2-terminal kinase and inhibited by the mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway [J]. Clin Cancer Res, 2007,13(4):1308-1314.
- [4] Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, et al. Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cell by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor [J]. Clinical Cancer Research, 2000,6(5):2053-2063.
- [5] Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, et al. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial-INTACT 2 [J]. J Clin Oncol, 2004,22(5):785-794.
- [6] Mahaffey CM, Davies AM, Lara PN Jr, et al. Schedule-dependent apoptosis in K-ras mutant non-small-cell lung cancer cell lines treated with docetaxel and erlotinib: rationale for pharmacodynamic separation [J]. Clin Lung Cancer, 2007,8(9):548-553.

(收稿日期:2012-03-12)