

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.01.008

酪氨酸蛋白激酶抑制剂联合放疗抑制乳腺癌细胞增殖 以及荷瘤裸鼠肿瘤生长

杨照环¹,何笑冬²,王颖³,李倩⁴,舒小镭³(1.唐山市工人医院肿瘤放化疗科,河北唐山 063000;2.重庆市肿瘤医院乳腺科 400016;
3.重庆市肿瘤医院放射治疗科 400016;4.重庆市肿瘤医院核医学科 400016)

摘要:目的 研究酪氨酸蛋白激酶抑制剂(TKI)联合放疗对乳腺癌细胞增殖及肿瘤生长的影响。方法 利用噻唑蓝(MTT)实验检测不同浓度的TKI对乳腺癌细胞MCF-7的抑制作用。将乳腺癌细胞分为生理盐水组,TKI干预组(TKI处理后无X射线照射),X射线干预组(X射线照射,无TKI处理)和TKI联合放疗干预组。利用克隆形成实验比较各组细胞存活率。构建乳腺癌裸鼠异位瘤模型,考察不同干预组对肿瘤生长的抑制能力。结果 克隆形成实验显示,单独利用X射线照射或者单独利用任何浓度的TKI抑制剂处理乳腺癌细胞,细胞的存活率均较处理前出现降低;但TKI联合放疗乳腺癌细胞存活率较前面两组(TKI干预组,X射线干预组)差异有统计学意义($P<0.05$)。与TKI预处理组或X射线干预组比较,TKI联合放疗干预组能够明显抑制荷瘤裸鼠肿瘤体积的增长,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 TKI抑制剂联合放疗可有效抑制乳腺癌细胞的生长。

关键词:乳腺癌;放射治疗;酪氨酸蛋白激酶;酶抑制剂

中图分类号:R737.9

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)01-0024-03

The tyrosine kinase inhibitors in combination with radiotherapy enhance the inhibition of breast cancer cells and breast cancer bearing nude mice

Yang Zhaohuan¹, He Xiaodong², Wang Ying³, Li Qian⁴, Shu Xiaolei³

(1. Department of Cancer Chemotherapy and Radiotherapy, Tangshan Gongren Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China;

2. Department of Breast Surgery, Chongqing Cancer Hospital, Chongqing 400016, China;

3. Department of Radiology, Chongqing Cancer Hospital Tumor Radiotherapy, Chongqing 400016, China;

4. Department of Nuclear Medicine, Chongqing Cancer Hospital Tum or Radiotherapy, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective In order to research the effect of tyrosine kinase inhibitor in combination with radiotherapy on the inhibition of breast cancer cells and breast cancer bearing nude mice. **Methods** Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to evaluate the inhibition of different concentrations of TKI on breast cancer cells, the breast cancer cells was divided into three groups: the TKI treatment group, the cells in the control group (no the TKI processing) and the control group (non-TKI and X-ray irradiation group). The sensitivity of the cells in each group to X-ray was compared by colony formation assay. MCF7 cells were xenografted in athymic nude mice to establish the animal model, which was used to evaluate the effect of anti-cancer. **Results** Colony forming test showed that the separated use of any concentrations of the TKI inhibitor could inhibit the breast cells, and the cell viability was significantly reduced; TKI combined with X-ray irradiation could significantly increase the sensitivity of breast cancer cells to radiation, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Compared to TKI inhibitor or X-ray irradiation alone, the combination of TKI inhibitor with X-ray irradiation could inhibit the growth of tumor effectively. **Conclusion** The TKI inhibitor in combination with radiotherapy can effectively inhibit the growth of breast cancer cells, which provides a new theoretical basis for the implementation of the clinical breast cancer radio sensitization.

Key words: breast neoplasms; radiotherapy; protein-tyrosine kinase; enzyme inhibitors

乳腺癌是目前危害妇女健康的主要恶性肿瘤,每年约有近120万妇女患上此病,且有约50万人死于乳腺癌,具有很高的致死率^[1]。相对于北美、北欧等乳腺癌高发区,虽然我国处于低发病区,但是该病的发病率却呈现出逐年上升的趋势,越来越多地影响着人类的健康^[2-3]。

乳腺癌的治疗主要有手术、内分泌治疗、化疗、放疗等手段,其中放疗在肿瘤的综合治疗中具有重要的作用^[4-5]。随着设备及技术的不断进步,在很大程度上提高了肿瘤的局部控制率。但由于多数癌细胞本身具有的原发性辐射抵抗能力或者通过放射治疗后获得的继发性辐射抵抗能力,成为了影响放射治疗疗效或者癌症复发的重要原因,上述两种情况一旦发生,

即使给予更高剂量的辐射剂量,也很难完全消灭癌细胞^[6-8]。

酪氨酸蛋白激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)主要以表皮生长因子受体为靶点,通过促进细胞凋亡、降低细胞辐射抗性、抑制血管形成和减少癌细胞再增殖等机制抑制肿瘤细胞增殖^[9]。本研究中通过研究TKI联合X射线放疗对乳腺癌细胞的增殖抑制作用以及荷瘤裸鼠的肿瘤生长,以期为TKI联合X射线放疗应用于临床提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料 乳腺癌细胞系MCF-7为唐山市工人医院肿瘤放化疗科保存;细胞培养用DMEM/F12培养基、胎牛血清为Gibco公司产品;舒尼替尼酪氨酸蛋白激酶抑制剂(TKI的一

种)为美国 FDA 产品(批号:PY595201,美国 Pfizer 制药公司);X 射线治疗仪为日立公司产品;细胞培养箱和酶标仪均为 Thermo 公司产品;其余研究中用到的仪器及材料均为本单位自有。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 从液氮罐中取出 MCF-7 细胞并解冻复苏,放入含有 13% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中,置于 5% CO₂ 浓度、饱和湿度的 37 °C 培养箱中培养 24 h 至细胞铺满皿底 85% 以上。将乳腺癌细胞分为生理盐水组,TKI 干预组(TKI 处理后无 X 射线照射),X 射线干预组(X 射线照射无 TKI 处理)和 TKI 联合放疗干预组。

1.2.2 噻唑蓝(MTT)实验 将培养的细胞置于无血清的培养基 DMEM/F12 中,同时加不同浓度(0、50、100、150、200、250、300 nmol/L)的 TKI 继续培养 12 h 后,将细胞放到 X 射线治疗仪中照射,然后将细胞移入不含 TKI 的培养基中培养 24 h,每孔加入 MTT 液至终浓度为 5 mg/μL,继续培养 5 h,弃去培养液,每孔加入 300 μL 二甲基亚砷(DMSO),用酶标仪检测各孔的 OD 值。每孔设置 3 个复孔。

1.2.3 克隆形成实验检测细胞存活率 将乳腺癌细胞消化后,经过细胞计数、稀释,接种到细胞培养皿中分别采用生理盐水、TKI、X 射线和 TKI 联合 X 射线干预,然后将细胞移入不含 TKI 的培养基中培养 4 d,用 PBS 漂洗细胞,经 1% 结晶紫染色,显微镜下计数,记录大于或等于 50 个克隆数的细胞,计算克隆形成率:克隆形成率=克隆数/接种细胞数×100%,克隆形成抑制率=(生理盐水组细胞克隆数-实验组细胞克隆数)/对照组克隆数×100%,实验重复 3 次。

1.2.4 建立裸鼠移植瘤模型检测联合治疗对肿瘤生长抑制作用 将 MCF7 细胞消化后离心,将细胞沉淀重悬于新鲜的 DMEM 培养基中,然后将 2×10⁶ MCF-7 细胞(100 μL)皮下注射接种到雌性裸鼠的背部,待肿瘤直径达到约 10 mm 左右时用于后续实验。取建模成功的荷瘤小鼠 40 只,分成 4 组,分别为生理盐水组,TKI 干预组,X 射线干预组和 TKI 联合放疗干预组,当肿瘤体积生长到 100~200 mm³ 时开始给予舒尼替尼。给药时采取灌胃给药的方式,每只小鼠每次给药 0.25 mg,每 2 天给药 1 次并测量肿瘤大小。

1.3 统计学处理 采用 SPSS10.0 软件进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,计数资料以率表示,采用 χ^2 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TKI 处理对乳腺癌细胞增殖的影响 利用不同浓度(0、50、100、150、200、250、300 nmol/L)的 TKI 培养乳腺癌细胞 12 h,在倒置显微镜下观察细胞生长状况,结果显示,任何浓度 TKI 处理的细胞均出现不同程度的凋亡,不加入 TKI 培养的细胞生长状态良好,癌细胞凋亡率随 TKI 浓度的增加呈现浓度依赖性。

2.2 MTT 实验 MTT 实验结果显示 TKI 对乳腺癌细胞的 IC₅₀ 和 IC₂₀ 分别为 113 nmol/L 和 34 nmol/L,因此,后续克隆形成实验及药瘤裸鼠实验采用 TKI 浓度为 100 nmol/L;细胞增殖抑制率随着药物浓度的增加逐渐提高,TKI 浓度为 50、100、150、200、250、300 nmol/L 对应的增殖抑制率分别为(11.2±1.8)%、(20.3±2.1)%、(25.7±3.2)%、(46.9±3.5)%、(69.7±5.3)%、(88.6±5.8)%;X 射线照射(2 Gy)增殖抑制率为(45.6±5.8)%。单独利用 X 射线照射也可以有

效抑制乳腺癌细胞的增殖。不同浓度 TKI 处理可以增加乳腺癌细胞的敏感性,且呈剂量依赖性,见表 1。

表 1 TKI 联合 X 射线对乳腺癌细胞的影响

准域剂量	TKI 浓度(nmol/L)						生理盐水组
	50	100	150	200	250	300	
0 Gy	3.38	3.25	3.12	2.98	2.73	2.52	3.58
2 Gy	2.42	2.21	1.95	1.57	1.34	1.19	2.67

2.3 克隆形成实验检测细胞存活率 克隆形成实验显示,经过 TKI 处理或 X 射线处理细胞后,细胞存活率都降低,细胞存活率均低于生理盐水组(*P*<0.01)。TKI 联合放疗干预组(TKI 100 nmol/L)细胞存活率最低,明显低于其他干预组,差异有统计学意义(*P*<0.01),见表 2。

表 2 各组细胞克隆形成的抑制情况

组别	克隆数($\bar{x} \pm s$, 个)	抑制率(%)
生理盐水组	328.00±11.32	0
TKI 干预组(TKI 100 nmol/L)	184.00±9.24	43.9
X 射线干预组	218.00±8.18	33.5
TKI 联合放疗干预组(TKI 100 nmol/L)	79.00±4.39	75.9

2.4 各组荷瘤裸鼠肿瘤的生长情况 对乳腺癌移植瘤的治疗实验结果显示,TKI 联合放疗干预组对肿瘤的生长具有最强的抑制效果,见图 1。

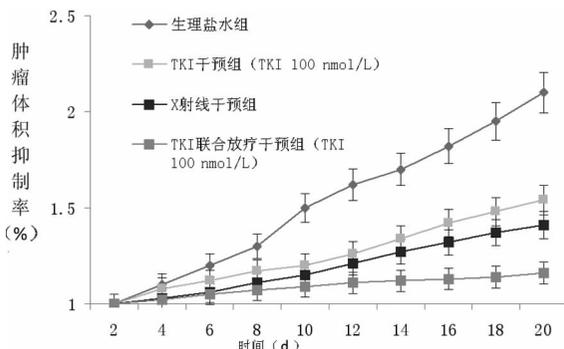


图 1 各给药组对荷瘤裸鼠肿瘤生长的抑制效果

3 讨论

乳腺癌作为女性最常见的恶性肿瘤,严重危害着广大女性的身心健康,随着医学治疗技术的进步及对癌症发生研究的深入,人们对乳腺癌生物学特性的认识观念逐渐发生变化^[10]。乳腺癌的治疗也从最初单一的手术治疗,发展到如今多种治疗方式相结合的综合治疗,大大提高了乳腺癌治疗的成功率,明显提高了乳腺癌患者的成活率^[11-12]。其中放射治疗结合药物治疗方式逐渐成为乳腺癌治疗手段的研究热点^[13]。

EGFR 是含有 1 186 个氨基酸的糖蛋白,相对分子质量为 170×10³,具有酪氨酸激酶活性,是一种跨膜分布的细胞表面传感器。EGFR 高表达具有抑制凋亡的作用和促进肿瘤内血管增生,因此它能够促进肿瘤发生、转移和侵袭^[14]。EGFR 表达异常主要表现为 EGFR 过表达和(或)突变。研究发现,EGFR 在多种肿瘤中有不同程度的表达,头颈部鳞癌中表达率为 90%~100%,肺癌中表达率为 40%~80%,肾癌中表达率为 50%~90%,结直肠癌中表达率为 25%~77%,卵巢癌中表达率为 25%~70%,前列腺癌中表达率为 39%~47%,神经胶质

瘤中表达率为 40%~63%, 乳腺癌中表达率为 14%~90%。EGFR 的过表达和(或)突变与肿瘤细胞增殖、新生血管形成、侵袭、转移、抗凋亡及对放疗耐受等密切相关^[15]。在许多肿瘤发生的过程中, EGFR 家族中的 ERBB-2 在肿瘤细胞中的表达量明显增加, 呈现过表达状态, 而 ERBB-2 的过表达可以降低肿瘤细胞对放射线的敏感性, 增强肿瘤细胞的耐受性, 进而降低放疗的成功率^[16]。因此, 选择以 ERBB-2 为靶点的药物降低肿瘤细胞对辐射的耐受性, 并结合放疗治疗在理论上是一种行之有效的方法。本研究选择的 TKI 证实利用其以 EGFR 为靶点, 通过促进细胞凋亡、降低细胞抗性辐射、抑制血管形成和减少癌症细胞再增殖的特性, 将 TKI 处理与 X 射线放疗相结合^[17-18], 验证联合处理对乳腺癌细胞的抑制作用。

研究结果显示, 只用不同浓度的 TKI 处理乳腺癌细胞, 也能在一定程度上抑制乳腺癌细胞的生长, 降低细胞的存活率, 抑制效率与 TKI 的处理浓度呈正相关。单独用 2 Gy 剂量 X 射线照射没有经过 TKI 处理的细胞, 也能很好的抑制乳腺癌细胞的生长, 降低其存活率。但是, 将 TKI 处理后的细胞, 再利用 2 Gy 剂量 X 射线照射发现, 乳腺癌细胞增殖抑制率明显增加, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。本研究采用肿瘤细胞克隆成形实验研究 TKI 联合 X 射线对肿瘤细胞的存活率的影响, 结果显示, TKI 联合 X 射线能够有效抑制肿瘤细胞的增殖。荷瘤裸鼠的实验结果证实, TKI 联合 X 射线能够有效抑制荷瘤裸鼠肿瘤的生长。

本研究初步得出 TKI 处理乳腺癌细胞可能有辐射增敏作用, 这可能是由于 TKI 可以很好地与 ERBB-2 的位点相结合, 进而阻断了乳腺癌细胞的进一步增殖引起的, 具体作用机制还需要进一步的实验证明。本研究为 TKI 在乳腺癌放疗增敏作用中的应用奠定了基础, 为临床中利用药物和放疗相结合的治疗方式提供新的理论依据。

参考文献:

- [1] Arteaga CL, Winnier AR, Poirier MC, et al. p185c-erbB-2 signaling enhances cisplatin-induced cytotoxicity in human breast carcinoma cells; association between an oncogenic receptor tyrosine kinase and drug-induced DNA repair [J]. *Cancer Res*, 1994, 54(14): 3758-3765.
- [2] Cheung PY, Yip YL, Tsao SW, et al. Id-1 induces cell invasiveness in immortalized epithelial cells by regulating cadherin switching and Rho GTPases [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(1): 157-168.
- [3] Cobb A, Roberts LK, Palucka AK, et al. Development of a HIV-1 lipopeptide antigen pulsed therapeutic dendritic cell vaccine [J]. *J Immunol Methods*, 2011, 365(1): 27-37.
- [4] Conlon JM, Mechkarska M, Coquet L, et al. Characterization of antimicrobial peptides in skin secretions from discrete populations of *Lithobates chiricahuensis* (Ranidae) from central and southern Arizona [J]. *Peptides*, 2011, 32(4): 664-669.
- [5] Cook RS, Garrett JT, Sanchez V, et al. ErbB3 ablation impairs PI3K/Akt-dependent mammary tumorigenesis [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(11): 3941-3951.
- [6] Cossarini F, Boeri E, Canducci F, et al. Integrase and fusion inhibitors transmitted drug resistance in naive patients with recent diagnosis of HIV-1 infection [J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2011, 56(2): 51-54.
- [7] Cotellet P. 3-Hydroxy-6,7-dihydropyrimido[2,1-c][1,4]oxazin-4(9H)-ones as new HIV-1 integrase inhibitors WO2011046873 A1 [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2011, 21(11): 1799-1804.
- [8] Cruz-López O, Conejo-García A, Núñez MC, et al. Novel substituted quinazolines for potent EGFR tyrosine kinase inhibitors [J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(7): 943-963.
- [9] Dallard BE, Baravalle C, Andreotti C, et al. Intramammary inoculation of Panax ginseng extract in cows at drying off enhances early mammary involution [J]. *J Dairy Res*, 2011, 78(1): 63-71.
- [10] De Brito SA, McCrory EJ, Mechelli A, et al. Small, but not perfectly formed; decreased white matter concentration in boys with psychopathic tendencies [J]. *Mol Psychiatry*, 2011, 16(5): 476-477.
- [11] de Torres JP, Casanova C, Pinto-Plata V, et al. Gender differences in plasma biomarker levels in a cohort of COPD patients; a pilot study [J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e16021.
- [12] Darling JL, Voss SD, Dunning P, et al. Imaging cancer using PET-the effect of the bifunctional chelator on the biodistribution of a (64)Cu-labeled antibody [J]. *Nucl Med Biol*, 2011, 38(1): 29-38.
- [13] Decensi A, Puntoni M, Pruneri G, et al. Lapatinib activity in premalignant lesions and HER-2-positive cancer of the breast in a randomized, placebo-controlled presurgical trial [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2011, 4(8): 1181-1189.
- [14] 薄爱华, 芦广萍, 闫爱春, 等. EGFR 和 VEGF 在乳腺癌中表达的临床意义 [J]. *中国肿瘤临床*, 2008, 34(23): 1324-1326.
- [15] 谢莹珊, 沈宜, 隆霜, 等. 乳腺癌 MDA-MB-231 细胞源 exosomes 对血管内皮细胞 EGFR 表达的影响 [J]. *重庆医学*, 2012, 41(26): 2694-2697.
- [16] Hung MC, Lau YK. Basic science of HER-2/neu; a review [J]. *Semin Oncol*, 1999, 26(4 Suppl 12): 51-59.
- [17] Kousidou OC, Tzanakakis GN, Karamanos NK. Effects of the natural isoflavonoid genistein on growth, signaling pathways and gene expression of matrix macromolecules by breast cancer cells [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2006, 6(3): 331-337.
- [18] Kurokawa H, Arteaga CL. Inhibition of erbB receptor (HER) tyrosine kinases as a strategy to abrogate antiestrogen resistance in human breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(12): 4436-4442.