

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.02.003

网络首发 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20221121.1328.010.html>(2022-11-21)

帕博西尼联合他莫昔芬对乳腺癌细胞 T-47D 的作用研究^{*}

孙俊,廖林,贾毅敏[△]

(重庆大学附属肿瘤医院药学部 400030)

[摘要] **目的** 探讨帕博西尼联合他莫昔芬对人乳腺癌细胞的影响及其相关作用机制。**方法** 将乳腺癌细胞 T-47D 随机分为对照组、帕博西尼组、他莫昔芬组、联合用药组。采用 MTT 法检测细胞增殖抑制率,流式细胞术检测细胞凋亡和周期,Western blot 检测细胞凋亡和周期相关蛋白表达,ELISA 测定免疫抑制细胞因子转化生长因子-β1(TGF-β1)、白细胞介素 10(IL-10)、程序性死亡配体 1(PD-L1)水平。**结果** 联合用药组细胞抑制率明显高于单药组和对照组,具有协同作用。与对照组和单药组比较,联合用药组细胞凋亡更加明显,阻滞细胞于 G1/S 期,Bcl-2、cyclin D1、p-Rb 蛋白表达降低及 Bax、cleaved-caspase3 蛋白表达升高,TGF-β1、IL-10、PD-L1 水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 帕博西尼联合他莫昔芬可能通过阻滞 T-47D 细胞周期于 G1/S 期、促进细胞凋亡、下调免疫抑制细胞因子发挥协同抗肿瘤作用。

[关键词] 帕博西尼;他莫昔芬;T-47D 细胞;乳腺癌

[中图分类号] R961 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2023)02-0172-05

Effects of palbociclib combined with tamoxifen on human breast cancer cell line T-47D^{*}

SUN Jun, LIAO Lin, JIA Yimin[△]

(Department of Pharmacy, Chongqing University Affiliated Tumor Hospital, Chongqing 400030, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of palbociclib combined with tamoxifen on human breast cancer cell line T-47D and its related mechanism. **Methods** The breast cancer cell line T-47D was divided into the control group, palbociclib group, tamoxifen group and combined medication group randomly. The MTT assay was used to detect the cell proliferation inhibiting rate; the cell apoptotic and cell cycle were detected by the flow cytometry, the levels of cell apoptotic and cell cycle related proteins were detected by Western blot; ELISA was used to detected the level of TGF-β1, IL-10 and PD-L1 in the culture medium. **Results** The cell inhibition rate in the combination medication group was significantly higher than that in the single medication group and control group, which had the synergistic effect; compared with the control group and single drug group, the cellular apoptosis in the combined medication group was more significant, the G1/S phase was blocked, the Bcl-2, cyclin D1 and p-Rb protein expressions were decreased and the Bax and cleaved caspase 3 protein levels were increased, the TGF-β1, IL-10 and PD-L1 levels were decreased, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Palbociclib combined with tamoxifen may play a synergistic antitumor effect by blocking the cell cycle at G1/S phase, promoting cellular apoptosis and down-regulating the immunosuppressive cytokines.

[Key words] palbociclib; tamoxifen; T-47D cells; breast cancer

乳腺癌在我国发病率和病死率分别位于女性恶性肿瘤的第 1 位和第 4 位^[1],且近 25 年全球女性乳腺癌死亡率明显上升^[2]。帕博西尼是高度选择性细胞周期蛋白依赖性激酶 4(cyclin-dependent kinase 4, CDK4)和细胞周期蛋白依赖性激酶 6(cyclin-depend-

ent kinase 6, CDK6)抑制剂,被批准用于激素受体阳性、人表皮生长因子受体-2(human epidermal growth factor receptor-2, HER-2)阴性进展期乳腺癌的一线、二线治疗^[3-4],但帕博西尼单药使用效果不佳^[5],其联合内分泌疗法已经用于治疗晚期乳腺癌患者。他莫

^{*} 基金项目:重庆市卫生计生委中医药科技项目(ZY201702039)。

作者简介:孙俊(1989—),药师,学士,主要从事肿瘤临床药学研究。

[△] 通信作者, E-mail: jym012005@qq.com。

昔芬为雌激素受体拮抗剂,可与乳腺癌细胞表面的激素受体结合,抑制乳腺癌发生、发展^[6],其是用于内分泌辅助治疗激素受体阳性、HER-2 阴性乳腺癌患者的常用药物,可降低疾病复发和扩散,提高患者生存率^[7]。大约 50% 长期使用他莫昔芬的乳腺癌患者可产生继发性耐药。而联合用药可降低细胞耐药性,同时增加乳腺癌细胞对药物的敏感性^[8-9]。本实验以帕博西尼联合他莫昔芬对人乳腺癌细胞 T-47D 进行干预,探讨二者联合使用对其细胞增殖、凋亡和免疫功能的影响及其相关分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

全自动酶标仪购自美国 Molecular Devices 公司; Western blot 电泳仪和转膜仪购自美国 Bio-rad 公司; FACSscan 流式细胞仪购自美国 BD 公司; 高速冷冻离心机购自美国 Beckman Coulter 公司; 恒温 CO₂ 细胞培养箱购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 主要试剂与药品

RPMI1640 培养基、胎牛血清和胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司; MTT 试剂、鼠抗 β -actin 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司; 10% SDS 溶液、蛋白酶抑制剂、蛋白定量试剂盒、荧光标记二抗购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Annexin V-FITC/PI 流式凋亡试剂盒购自美国 BD 公司; Bax 多克隆抗体、cyclin D1 多克隆抗体、Bcl-2 多克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司; cleaved-caspase3 购自美国 Protein tech 公司; 荧光标记二抗、Odyssey 红外激光成像系统购自美国 LI-COR 公司; ELISA 检测试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司。他莫昔芬(tamoxifen)购自阿斯利康投资(中国)有限公司; 帕博西尼(palbociclib/PD0332991)购自美国 Selleck Chemicals 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养

将人乳腺癌细胞 T-47D(上海细胞生物研究所)培养于含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 RPMI1640 培养基中,且置于含 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中常规培养,待细胞生长至对数期可用于实验。

1.3.2 MTT 法检测各组药物浓度对细胞增殖的影响

用 0.25% 胰蛋白酶消化对数生长期 T-47D 细胞,以每孔 5×10^3 个细胞/100 μ L 的密度接种于 96 孔板,待细胞贴壁后加药处理,帕博西尼组按照浓度梯度 0、10、25、50、100 nmol/L 处理,他莫昔芬组按照 0、5、10、25、50 nmol/L 浓度梯度处理,每组 3 个平行孔。细胞处理 24 h 后进行 MTT 检测。每孔加入 20 μ L MTT(5 mg/mL),培养箱孵育 4 h 后终止培养,弃上清液,加入 100 μ L DMSO 10 min 后,酶标仪检测

490 nm 处吸光度(A 值)并计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率 = $1 - (A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。计算药物对细胞生长的半数抑制浓度(inhibitory concentration 50, IC₅₀)值。后续实验均以帕博西尼和他莫昔芬 IC₅₀ 值为细胞给药浓度。

使用金氏公式^[10]计算帕博西尼和他莫昔芬联合用药的 Q 值。 $Q = E_{a+b} / (E_a + E_b - E_a E_b)$,其中 E_a 和 E_b 分别为单独药物作用的抑制率, E_{a+b} 为两药联合作用的抑制率。 $Q > 1.15$ 表示两药联合具有协同作用,0.85~1.15 表示两药联合具有相加作用,<0.85 表示两药联合具有拮抗作用。进行 3 次独立重复实验。

1.3.3 流式细胞术检测细胞凋亡

收集各组细胞 5×10^4 个,按照细胞凋亡试剂盒(Annexin V-FITC/PI 双染)说明书操作,检测细胞凋亡情况。

1.3.4 流式细胞术检测细胞周期分布

收集各组细胞 5×10^4 个,按照细胞周期试剂盒(PI 单染)说明书操作,检测细胞周期分布情况。

1.3.5 Western blot 检测蛋白表达

收集各组细胞,加入裂解液后超声破碎,提取总蛋白。BCA 测定蛋白浓度后,等量上样。蛋白电泳,转膜,封闭后加入一抗,4 °C 孵育过夜。PBST 漂洗 5 min $\times$ 3 次,加入二抗溶液,室温孵育 1 h。PBST 漂洗 5 min $\times$ 3 次,使用 Odyssey 凝胶成像仪检测蛋白显色情况,Image J 定量蛋白条带。

1.3.6 ELISA 检测细胞免疫抑制细胞因子分泌情况

各组药物作用细胞 24 h 后,取细胞培养液按照 ELISA 试剂盒说明书操作,检测免疫抑制细胞因子分泌水平。

1.4 统计学处理

采用 GraphPad Prism7 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 单药和联合用药对 T-47D 细胞增殖的影响

使用帕博西尼和他莫昔芬分别处理 T-47D 细胞 24 h 后的 IC₅₀ 分别为 45.26 nmol/L 和 12.57 nmol/L。单独用药对 T-47D 细胞增殖抑制作用与药物浓度呈正相关。与单药组比较,联合用药组对细胞的增殖抑制作用明显增加,经金氏公式检验, Q 值在 (1.28 $\pm$ 0.20) 和 (1.63 $\pm$ 0.23) 之间,提示帕博西尼和他莫昔芬联合用药对 T-47D 细胞具有明显的协同作用,见图 1。

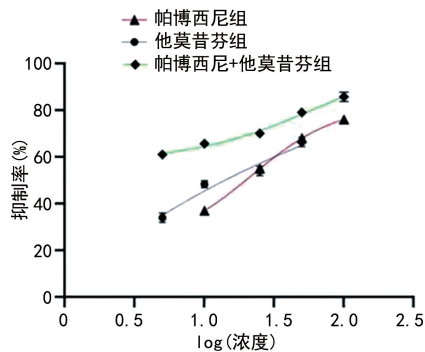


图 1 不同浓度的药物单独及联合作用 24 h 后对 T-47D 细胞增殖的影响

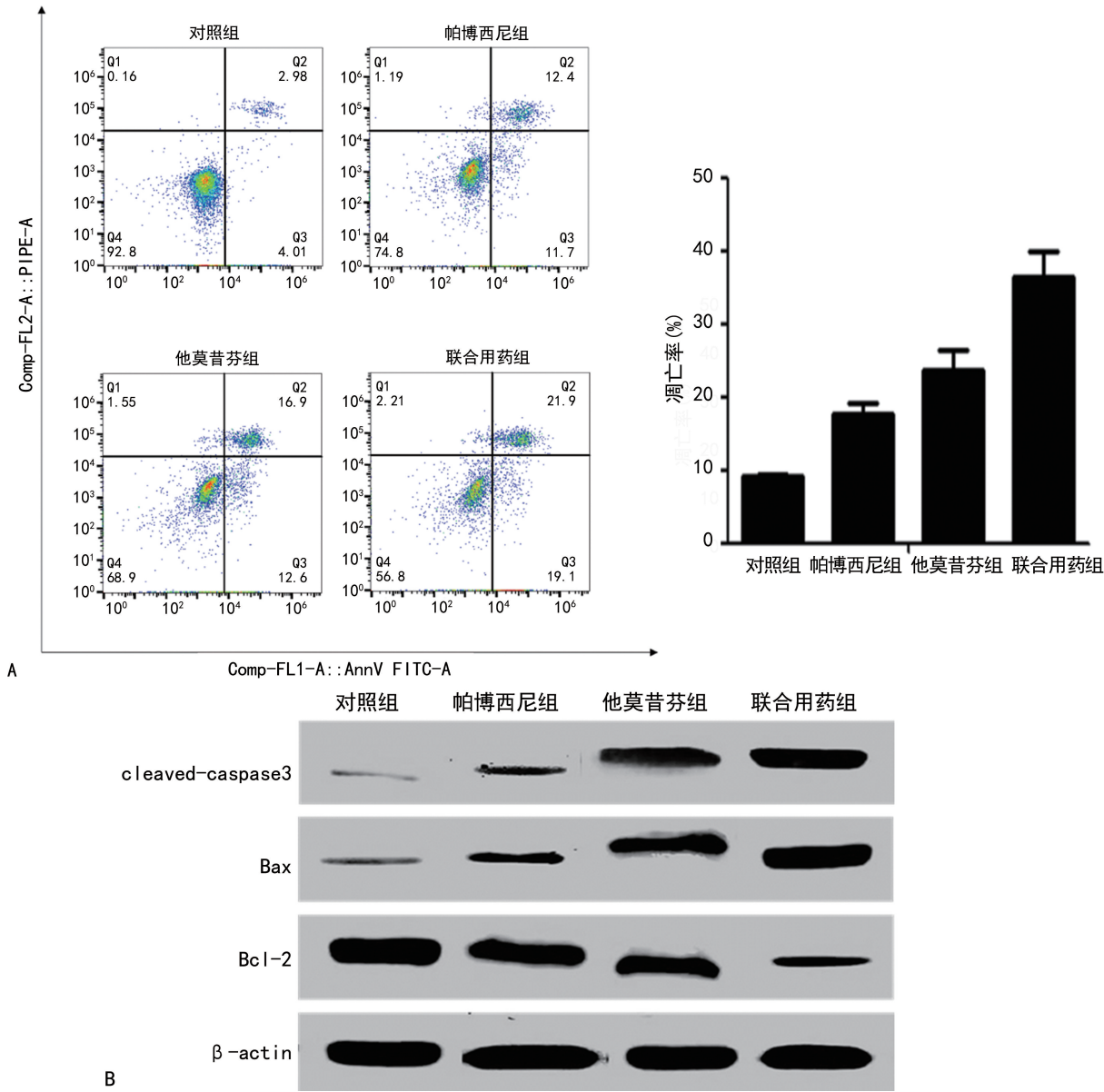
2.2 单药和联合用药对 T-47D 细胞凋亡和相关蛋白表达的影响

对照组、帕博西尼组、他莫昔芬组、联合用药组细胞凋亡率分别为(9.23±0.18)%、(17.69±1.52)%、

(23.67±2.71)%和(36.42±3.48)%。联合用药组较单药组细胞凋亡率明显增加,见图 2A。与对照组比较,帕博西尼组、他莫昔芬组及联合用药组细胞中,Bcl-2 蛋白表达明显降低,Bax 和 cleaved-caspase3 蛋白表达明显升高,联合用药组变化更为明显,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2B。

2.3 单药和联合用药对 T-47D 细胞周期及相关蛋白表达的影响

帕博西尼组阻滞[(39.36±2.51)%]细胞于 G1/S 期,他莫昔芬组阻滞[(48.52±1.17)%]细胞于 G0/G1 期,联合用药组阻滞[(62.36±5.31)%]细胞于 G1/S 期,见图 3A。与对照组比较,帕博西尼组、他莫昔芬组及联合用药组 cyclin D1 和 p-Rb 蛋白表达明显降低,联合用药组变化更为明显,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3B。



A:各组细胞凋亡率比较;B:各组相关蛋白表达。

图 2 帕博西尼、他莫昔芬单药和联合用药对 T-47D 细胞凋亡率及相关蛋白表达的影响

2.4 单药和联合用药对 T-47D 细胞免疫抑制细胞因子分泌水平的影响

与对照组比较,帕博西尼组、他莫昔芬组、联合用药组转化生长因子-β1(TGF-β1)、白细胞介素 10(IL-10)、程序性死亡配体 1(PD-L1)水平均明显降低,联合用药组降低更为明显,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

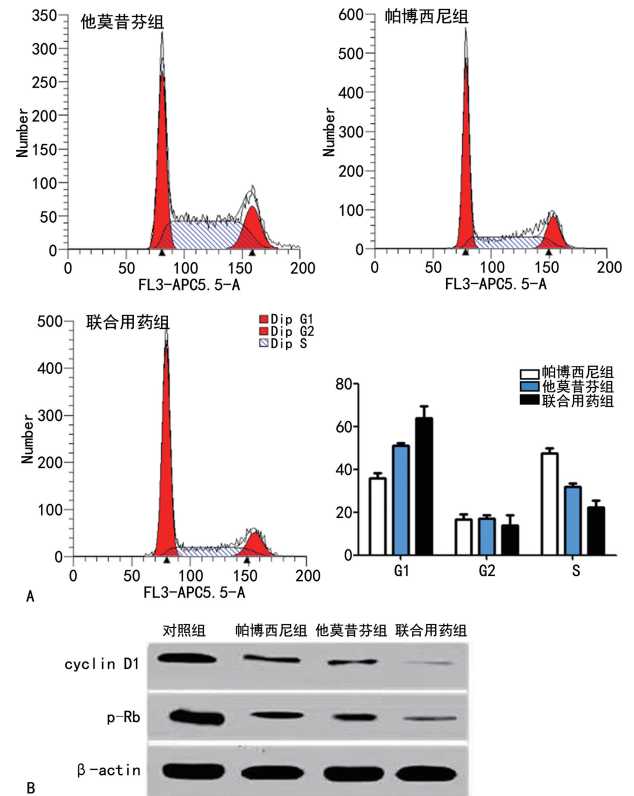


图 3 帕博西尼、他莫昔芬单药和联合用药对 T-47D 细胞周期及相关蛋白表达的影响

表 1 各组药物对 T-47D 细胞 TGF-β1、IL-10、PD-L1 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	TGF-β1	IL-10	PD-L1
对照组	297.72±20.43	239.85±17.54	412.51±53.41
帕博西尼组	167.28±9.14 ^a	154.33±11.43 ^a	281.36±49.23 ^a
他莫昔芬组	134.28±26.34 ^a	162.39±16.21 ^a	253.19±46.72 ^a
联合用药组	83.92±6.74 ^{abc}	95.61±2.57 ^{abc}	137.15±3.24 ^{abc}

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与帕博西尼组比较; ^c: $P < 0.05$, 与他莫昔芬组比较。

3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,乳腺癌细胞过度增殖、迁移和侵袭与疾病复发转移紧密相关。CDK4 和 CDK6 是细胞周期关键调节因子,触发细胞周期从 G1 期(DNA 合成前期)到 S 期(DNA 合成期),CDK4/6 过度活跃可导致细胞增殖失控。帕博西尼是 CDK4/6 抑制剂,能够与 CDK4/6 结合,抑制 RB 磷酸化进而抑制转录因子 E2F 释放,阻碍细胞由 G1 期进入 S 期,从而抑制肿瘤细胞 DNA 合成和细胞

增殖^[11]。临床研究发现,在激素受体阳性、HER-2 阴性、内分泌治疗复发的晚期乳腺癌患者中,帕博西尼疗效优于安慰剂^[12]。他莫昔芬是临床上用于乳腺癌内分泌治疗的主要药物。有研究发现,在激素受体阳性、HER-2 阴性乳腺癌患者中,帕博西尼联合内分泌治疗可提高肿瘤细胞药物敏感性,降低耐药性,疗效更好^[11]。因此,本文主要研究帕博西尼联合他莫昔芬对乳腺癌细胞 T-47D 细胞增殖、细胞凋亡、细胞周期和分泌免疫抑制细胞因子功能的影响及其相关机制。

MTT 实验结果表明,帕博西尼和他莫昔芬对 T-47D 细胞的增殖具有协同抑制作用。帕博西尼通过改变细胞周期来抑制细胞增殖^[13],他莫昔芬是通过阻断雌激素作用于乳腺癌细胞的信号通路来抑制细胞增殖^[14],而联合用药可能通过双重机制协同抑制细胞增殖,降低细胞耐药性,提高疗效。本实验使用流式细胞术和 Western blot 检测进一步证实,帕博西尼和他莫昔芬联合用药能够更加明显抑制 G1 期 T-47D 细胞的生长,且细胞周期相关蛋白 cyclin D1 和 p-Rb 蛋白表达明显降低。

流式细胞术和 Western blot 检测结果表明,帕博西尼、他莫昔芬单药和联合用药均可诱导细胞凋亡,且联合用药细胞凋亡更加明显。这可能是由于联合用药使 T-47D 细胞中抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低更明显,促凋亡蛋白 Bax 和剪切型 caspase3 蛋白表达明显升高引起的^[15-16]。

肿瘤细胞免疫逃逸是肿瘤细胞在肿瘤微环境的保护下,可不被机体免疫系统发现、识别和杀伤,其在肿瘤增殖、转移和侵袭过程中具有重要作用^[17]。免疫抑制细胞因子如 TGF-β1、IL-10、PD-L1 等是肿瘤微环境的主要成分,对肿瘤细胞的增殖和耐药具有重要影响。MA 等^[18]研究发现上调 S180 实体瘤小鼠模型体内 TGF-β1 和 IL-10 水平可促进肿瘤细胞免疫逃逸。李丽煌^[19]研究发现,乳腺癌患者病理组织中 PD1/PD-L1 阳性表达率均高于 70%,且容易造成肿瘤进展,PD1/PD-L1 阳性患者淋巴结转移率更高,3 年生存率明显降低。本研究发现,与对照组比较,帕博西尼和他莫昔芬单药均可明显降低 TGF-β1、IL-10 和 PD-L1 水平,但联合用药对免疫抑制细胞因子的下调更加明显。这提示帕博西尼与他莫昔芬联合用药可协同减弱乳腺癌细胞免疫逃逸。

综上所述,帕博西尼与他莫昔芬联合用药可明显抑制乳腺癌细胞 T-47D 增殖,促进其凋亡,其机制可能与阻滞细胞周期,下调抗凋亡蛋白表达,上调促凋亡蛋白表达,下调肿瘤免疫抑制细胞因子水平等有关,两药联合可协同发挥抗肿瘤作用。

参考文献

[1] 赫捷,陈万青,李霓,等. 中国女性乳腺癌筛查与

- 早诊早治指南(2021,北京)[J]. 中华肿瘤杂志, 2021,43(4):357-382.
- [2] AZAMJAH N, SOLTAN-ZADEH Y, ZAYERI F. Global trend of breast cancer mortality rate: a 25-year study[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2019,20(7):2015-2020.
- [3] ZARDAVAS D, PONDE N, TRYFONIDIS K. CDK4/6 blockade in breast cancer: current experience and future perspectives [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2017,26(12):1357-1372.
- [4] HEPTINSTALL A B, ADIYASA I, CANO C, et al. Recent advances in CDK inhibitors for cancer therapy[J]. Future Med Chem, 2018,10(11):1369-1388.
- [5] DEMICHELE A, CLARK A S, TAN K S, et al. CDK 4/6 inhibitor palbociclib (PD0332991) in Rb+ advanced breast cancer: phase II activity, safety, and predictive biomarker assessment [J]. Clin Cancer Res, 2015,21(5):995-1001.
- [6] ROBERTSON J F R, PARIDAENS R J, LICHFI ELD J, et al. Meta-analyses of phase 3 randomised controlled trials of third generation aromatase inhibitors versus tamoxifen as first-line endocrine therapy in postmenopausal women with hormone receptor-positive advanced breast cancer[J]. Eur J Cancer, 2021,145:19-28.
- [7] KEIKHA M, BARRETO G E, GONZALEZ J, et al. A bioinformatics study of the involved mechanisms in relapse and drug resistance of Tamoxifen-treated breast cancer[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2021,21(12):1594-1601.
- [8] DRAGANESCU M, CARMOCAN C. Hormone therapy in breast cancer[J]. Chirurgia (Bucur), 2017,112(4):413-417.
- [9] 张百红, 岳红云. CDK4/6 抑制剂的联合治疗模式[J]. 肿瘤防治研究, 2019,46(1):72-75.
- [10] 阮涛, 吴莉, 刘岐焕, 等. 吉西他滨联合卡铂诱导 NK/T 细胞淋巴瘤细胞株凋亡的研究[J]. 临床医药实践, 2021,30(4):243-249.
- [11] DE LUCA A, MAIELLO M R, D'ALESSIO A, et al. Pharmacokinetic drug evaluation of palbociclib for the treatment of breast cancer [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2018,14(9):891-900.
- [12] TURNER N C, SLAMON D J, RO J, et al. Overall survival with Palbociclib and Fulvestrant in advanced breast cancer[J]. N Engl J Med, 2018,379(20):1926-1936.
- [13] KONAR D, MARU S, KAR S, et al. Synthesis and clinical development of Palbociclib: an overview[J]. Med Chem, 2022,18(1):2-25.
- [14] SHAGUFTA AHMAD I. Tamoxifen a pioneering drug: an update on the therapeutic potential of tamoxifen derivatives [J]. Eur J Med Chem, 2018,143:515-531.
- [15] AHAGH M H, DEHGHAN G, MEHDIPOUR M, et al. Synthesis, characterization, anti-proliferative properties and DNA binding of benzo-chromene derivatives: increased Bax/Bcl-2 ratio and caspase-dependent apoptosis in colorectal cancer cell line [J]. Bioorg Chem, 2019, 93: 103329.
- [16] HASSAN M, WATARI H, ABUALMAATY A, et al. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 150845.
- [17] LEI X, LEI Y, LI J K, et al. Immune cells within the tumor microenvironment: biological functions and roles in cancer immunotherapy [J]. Cancer Lett, 2020, 470:126-133.
- [18] MA L, SHAN W, DING X, et al. Intermittent hypoxia induces tumor immune escape in murine S180 solid tumors via the upregulation of TGF-beta1 in mice [J]. Sleep Breath, 2021, 25(2):719-726.
- [19] 李丽煌. 乳腺癌组织 PD1、PDL1 表达变化及其与患者临床病理参数、预后的关系探究[J]. 中外医疗, 2020,39(23):39-41.

(收稿日期:2022-04-08 修回日期:2022-10-08)