

• 论著 •

厄洛替尼对胰腺癌细胞的靶向治疗作用

郝建军 吴德全

【摘要】 目的 探讨厄洛替尼在治疗胰腺癌中的可能作用。**方法** 采用 MTT 法来检测分析厄洛替尼的 50% 生长抑制剂量 (GI_{50}) 及其对胰腺癌细胞株的生长因子活动的影响。应用免疫印迹分析来观察 ErbB 受体家族中的 4 个成员在胰腺癌细胞株中的表达水平。应用软琼脂实验来检测细胞集落的形成。**结果** 厄洛替尼抑制胰腺癌细胞株的细胞增殖的 GI_{50} 浓度范围从 $0.1 \mu M$ 到大于 $2.5 \mu M$ 。厄洛替尼能完全抑制表皮生长因子 (EGF) 诱导的细胞增殖。**结论** 厄洛替尼是通过表皮生长因子受体依赖途径来抑制胰腺癌细胞生长, 这表明, 厄洛替尼为治疗胰腺癌提供了一个可能的新方法。

【关键词】 EGFR (表皮生长因子受体) 胰腺癌 生长 胰腺癌细胞

1 材料与方法

1.1 细胞培养 人胰腺癌细胞 Aspc-1、Bxpc-3、Capan-1 与 T3M4 培养于 RPMI-1640 培养基 Colo-357、Panc-1 与 Mia-paca-2 应用 DMEM 培养, 培养基均含 10% 的小牛血清, 100 U/ml 青霉素及 100 mg/L 链霉素。

1.2 MTT 实验 应用噻唑氮蓝 (MTT) 比色分析法测定细胞生长情况。具体方法如下: 应用 96 孔板, 每孔种植 5000 个细胞培养过夜, 次日, 加入不同浓度厄洛替尼 (终浓度为: 0, 0.5, 1, 2.5, 5 $\mu mol/L$) 或者联合使用生长因子, 继续培养 48 小时, 于检测前 4 小时, 每孔加入 MTT 50 μg , 4 h 后移去培养基, 应用酸性异丙醇溶液裂解细胞, 于 570 nmol/L 条件下检测吸光度值 (OD 值), 根据检测结果绘制细胞生长抑制曲线, 且 GI_{50} 计算公式为 $100 \times (T - T_0) / (C - T_0) = 50$ 。

1.3 免疫印迹分析 培养的单层细胞用预冷的 PBS 洗涤两次, 并用含有完全去 EDTA 蛋白酶体抑制剂的裂解缓冲液裂解细胞。BCA 蛋白定量法对蛋白进行定量。细胞裂解液用 SDS-PAGE 进行分离并点转移至 NC 膜上。用封闭液浸泡 NC 膜后, 接着用特异的抗体在 4 $^{\circ}C$ 过夜孵育。然后用 TBST 冲洗 NC 膜, 再与 HRPO 共价连接的二抗在室温下孵育 1 h。最后用加强的化学发光法检测抗体。

1.4 软琼脂分析 用 3 ml 含 0.3% Difco Noble 琼脂的完全培养基悬浮细胞 ($\times 10^3$ /孔)。然后把悬浮液转移到盛有含 0.5% 琼脂的 1.5 ml 培养基的 12 孔板中。在第 0, 2 和 4 天加入特定浓度的厄洛替尼或 EGF 继续培养。14 天后, MTT 过夜孵育, 对 >0.05 mm 的克隆计数, 并与对照组比较。

1.5 数据的统计分析 所有的数据均用 SPSS 10.0 软件包处理, 以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。t 检验做统计分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胰腺癌细胞厄洛替尼半数致死量 在一定剂量浓度下, 厄洛替尼能对本实验所采用的 7 种胰腺癌细胞系中的 6 种细胞系细胞生长造成抑制影响, 且呈剂量依赖性 (图 1)。厄洛

替尼半数致死量的范围从 $0.1 \mu M$ 至大于 $2.5 \mu M$, 其中 Aspc-1 和 Capan-1 细胞最为敏感 ($0.1 \mu M$), Panc-1 细胞最不敏感 ($2.5 \mu M$ 浓度下 22% 细胞被抑制)。

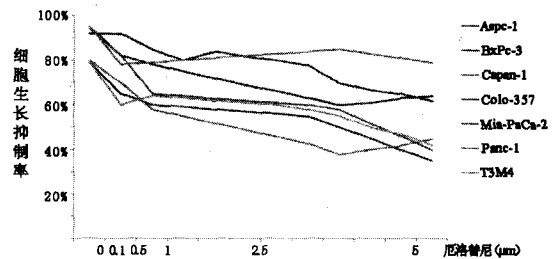


图 1 厄洛替尼对胰腺癌细胞株的影响

表 1 厄洛替尼的 GI_{50} 浓度和不同细胞 EGFR 表达水平^a

胰腺癌细胞	GI_{50} (μM)	EGFR
Aspc-1	0.1	+++
Bxpc-3	>2.5	++
Capan-1	0.1	+++
Colo-357	>2.5	+
Mia-PaCa-2	1.75	+
Panc-1	>2.5	++
T3M4	1.25	++

注: Western 印迹分析结果来估计 EGFR 的表达水平 (+, 弱阳性; ++, 中等阳性; +++, 强阳性)。

2.2 胰腺癌细胞系的 EGFR 表达 我们的结果显示所有检测的细胞系细胞表达 EGFR 的水平各有不同, Aspc-1 和 Capan-1 的表达量最高, Colo-357 和 Mia-PaCa-2 最低 (图 2 和表 1)。这些结果与半数致死量的结果部分吻合。与之对应的, 半数致死量值最高的 Panc-1 细胞系, 呈现了 EGFR 的中度表达, 另外 Mia-PaCa-2 显示了较低水平的 EGFR 表达量以及中度的半数致死量值。我们同时又用免疫印迹法检测了七株细胞系 ErbB-2, ErbB-3, ErbB-4 的表达水平。所有细胞系都表达 ErbB-2, 以 Mia-PaCa-2 的表达量最高, Bxpc-3 的表达最低, 另一方面, ErbB-3 的表达水平, Aspc-1 和 Capan-1 最高, Colo-357, Mia-PaCa-2 和 Panc-1 最低 (图 2)。上述结果表明 EGFR 的表达水平并不是决定胰腺癌细胞对厄洛替尼敏感性的唯一因素。

作者单位: 齐齐哈尔医学院附属第三医院普外科, 哈尔滨医科大学在读硕士研究生 (郝建军)

哈尔滨医科大学第二临床学院普外科 (吴德全)

邮 编 161006 收稿日期 2011-09-17

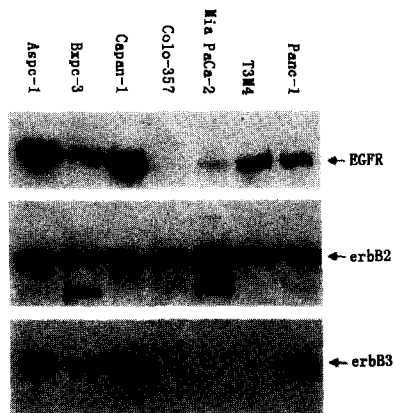


图2 EGFR, ErbB-2 和 ErbB-3 在胰腺癌细胞株中的表达。应用 Western 印迹分析来检测 EGFR, ErbB-2 和 ErbB-3 的表达水平。

2.3 厄洛替尼对生长因子诱导的胰腺癌细胞增殖的效应

胰腺癌过表达多种生长因子及其受体。为了验证其对 EGFR 信号通路是否有特异阻断作用,我们将 Panc-1, Colo-357, Capan-1, T3M4 细胞与 EGF 培养,然后在厄洛替尼加入与否 72 h 后,测定细胞生长。在受检的 4 种细胞系中,显示了生长因子剂量依赖的细胞增殖,其中各细胞系最大效应值为 $+13.7 \pm 1.4\%$ Panc-1, $+47.7 \pm 11.1\%$ T3M4, $+14.1 \pm 3.3\%$ Colo-357, $+40.3 \pm 20.7\%$ Capan-1。在这 4 株细胞系中,厄洛替尼完全阻抑了 EGF 诱导的增殖。

2.4 厄洛替尼在锚定非依赖性生长中的效应 软琼脂实验。在缺乏厄洛替尼时,在 Colo-357 细胞系中,EGF 能使克隆形成效能与未处理细胞比起来增加 $+21.1 \pm 14.4\%$ 。在 $1\mu\text{M}$ 厄洛替尼单独存在的情况下,克隆形成效能下降 $-94.7 \pm 2.9\%$,在 EGF 和 $1\mu\text{M}$ 厄洛替尼同时存在的情况下,EGF 诱导的克隆形成效能下降 $-84.0 \pm 5.9\%$ 。更高浓度的厄洛替尼 ($10\mu\text{M}$) 几乎能完全抑制基底和 EGF 诱导的克隆形成效能。

3 讨论

许多生长因子受体及其配体在胰腺癌中是高表达的,它们影响肿瘤的生长分化、侵袭、转移和血管生成。体外和体内的实验研究表明,EGFR 的活化参与调控在细胞转化和肿瘤病理中起着重要作用的几个细胞功能,包括增殖与分化,转移,诱导血管生成及抗化疗与放疗^[1]。基于这些资料,显示了表皮生长因子受体可能是治疗人类癌症的一个新靶点。厄洛替尼是一种 I 型人表皮生长因子酪氨酸激酶抑制剂,其在细胞内通过与三磷酸腺苷竞争结合受体酪氨酸激酶的胞内区催化部分,抑制磷酸化反应,从而阻止下游的细胞信号转导。体外实验研究已经表明,其对肺癌、大肠癌细胞的生长起着抑制作用。EGFR 属于 ErbB 酪氨酸激酶受体家族成员。这个受体家族包括四个成员,胰腺癌细胞常常过表达 EGFR, ErbB-2, ErbB-3, ErbB-4。人胰腺癌细胞的体外实验显示

EGF, TGF- α , HB-EGF 和双调蛋白显著增强了这些细胞的增殖^[2-3]。因此,胰腺癌细胞中 ErbB 受体家族的过表达提示自分泌和/或旁分泌机制在胰腺癌细胞生长的致病机理中起到了重要的作用。EGFR 及其配体 EGF/TGF- α 的同存与肿瘤的侵袭加强、肿瘤切除后更短的生存时间^[2] 以及与肿瘤的预后相关^[3]。

厄洛替尼是一个选择性的小分子 EGFR-TK1,能阻断涉及肿瘤细胞增殖生长的信号通路。实验已经证明厄洛替尼不仅仅减少细胞增殖而且诱导细胞周期进入停滞期,加速细胞凋亡,有抗血管生成作用^[4]。我们从实验中已经得出了浓度依赖的厄洛替尼在抑制胰腺癌细胞生长过程中有不同的半数致死量。半数致死量的值与 EGFR 的表达具有部分一致性,这预示着厄洛替尼通过靶向 EGFR 发挥其抑制作用。但是,表达较低水平 EGFR 的 Mia-PaCa-2 cells 半数致死量的值达到了 $1.75\mu\text{M}$,它有可能作用于除了 EGFR 外的其他靶点。厄洛替尼与化疗联合具有协同效应,在非小细胞肺癌的病人中观察到相对较高的临床反应频率,这可能是由于厄洛替尼阻断了 EGFR, ErbB-2, ErbB-3 信号通路。因此,我们推论厄洛替尼在胰腺癌中主要通过 EGFR 通路发挥效应,但也不能排除其他靶点和信号通路的可能性。我们的实验表明低浓度的厄洛替尼弱化了胰腺癌细胞的克隆形成效能。因为非锚定依赖性生长和细胞侵袭是肿瘤细胞升高生物毒性的标志,厄洛替尼能阻断这两个行为提示其可能是一个抑制肿瘤扩散和转化的很好的药物。

综上所述,虽然与病人血浆中厄洛替尼的水平比起来,在胰腺癌细胞中的半数致死量值相对较高,但低浓度的厄洛替尼能显著抑制胰腺癌细胞系细胞的侵袭和克隆形成。考虑到胰腺癌糟糕的预后和高发的 EGF 家族受体和配体过表达,厄洛替尼凭借其显著的动力学机制为胰腺癌的治疗提供了一个有前景的新试剂。

参 考 文 献

- [1] Normanno N, Bianco C, De Luca A and Salomon DS: The role of EGF-related peptides in tumor growth[J]. Front Biosci 6: D685-D707, 2001
- [2] Korc M, Chandrasekar B, Yamanaka Y, Friess H, Buchler M and Beger HG: Overexpression of the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer of epidermal growth factor alpha[J]. J Clin Invest, 1992, 90: 1352-1360
- [3] Zhu Z, Kleeff J, Friess H, et al: Epirigulin is up-regulated in pancreatic cancer and stimulates pancreatic cancer cell growth [J]. Biochem Biophys Res Commun 273: 1019-1024, 2000
- [4] Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, et al: Inhibition of growth factor production and angiogenesis in human cancer cells by Tarceva, a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor[J]. Clin Cancer Res, 2007, 7: 1459-1465