

曲妥珠单抗与顺铂序贯联合应用对乳腺癌细胞抑制作用的研究

吴志勇, 孙胜杰, 焦顺昌(解放军总医院肿瘤内科, 北京 100853)

[摘要] 目的: 探讨曲妥珠单抗(HER)与顺铂(DDP)联合抑制作用最佳序贯方式以及HER对于DDP作用的影响及机制。方法: 利用MTT法及流式细胞技术测定HER、DDP以及不同序贯联合应用对人乳腺癌细胞(MDA-MB453)的抑制率及细胞周期的影响。结果: 两药联合应用对乳腺癌细胞的抑制效果均好于单药顺铂组($P < 0.01$); 其中以同时使用时效果最好。使用DDP前应用HER组 G_0/G_1 、S期细胞所占比例减少, G_2/M 期细胞增多。结论: 曲妥珠单抗与顺铂同时应用时, 可最大程度增强顺铂的抑制作用。序贯应用的差异与细胞周期的变化有关。

[关键词] 曲妥珠单抗; 化疗; 顺铂; MDA-MB453细胞株; 细胞周期

[中图分类号] R965

[文献标识码] A

[文章编号] 1672-8157(2012)01-0026-03

Inhibitory effects of combination treatment of trastuzumab and cisplatin in different sequences on human breast cancer cells in vitro

WU Zhi-yong, SUN Sheng-jie, JIAO Shun-chang(Department of Medical Oncology, PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the best sequence of combination treatment of trastuzumab (HER) with cisplatin (DDP) on the breast cancer in vitro and its mechanism. **Methods:** The inhibition ratio of HER treatment, DDP treatment and HER+DDP combination treatment in different sequences to breast cancer cells were measured by MTT and change of cell cycle was detected by flow cytometry (FCM). **Results:** The inhibition ratio was better in combination treatment of HER with DDP than in the monotherapy of DDP ($P < 0.01$), and the simultaneous treatment was the best choice. Compared with the group of single chemotherapy, the group using HER before DDP had a better result in the decreasing of proportions of G_0/G_1 , S phase and the increase of G_2/M phase. **Conclusion:** Simultaneous use of HER and DDP in combination treatment had a more significant inhibition activity to breast cancer cells than other methods. The application of difference sequence in groups were related with the variance of cell cycle.

[KEY WORDS] Trastuzumab; Chemotherapy; Cisplatin; MDA-MB453 cell line; Cell cycle

HER-2(human epidermal growth factor receptors-2)基因的过度表达是乳腺癌的重要预后不良因素。曲妥珠单抗(赫赛汀, trastuzumab)是以HER-2/neu蛋白为靶点设计的人源化单克隆抗体。大量研究表明, 曲妥珠单抗可明显提高化疗对HER-2/neu过度表达乳腺癌的疗效, 并可广泛应用于治疗的各个阶段^[1]。但是在联合治疗方案中, 曲妥珠单抗的使用最佳时机仍有待明确, 因此, 我们设计了关于曲妥珠单抗联合化疗序贯方式研究的系列实验, 已报道的曲妥珠单抗与多西他赛、吉西他滨的序贯联合应用的结果, 与临床应用情况基本吻合^[2-4]。本文旨在寻找曲妥珠单抗与顺铂联合应用的最佳序贯方式, 并初步探讨其机制, 从而为临床治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 药品和试剂 MI/1640培养液(美国GIBCO公司); 胎牛血清(北京元亨圣马生物技术研究所); MTT(美国AMRESCO公司); 顺铂(齐鲁制药); 曲妥珠单抗(上海罗氏制药)。

1.1.2 主要设备 二氧化碳孵箱(美国Baxter); 96孔板(美国COSTOR3599); 酶标仪(上海雷勃分析仪器有限公司, 型号: Multiskan MK3353); YKH2 II型液体快速混合器(江西医疗器械厂)。

1.2 方法

人乳腺癌细胞株MDA-MB453其Her-2/neu基因扩增为阳性, 由解放军总医院肿瘤内科提供, 用细胞计数板计数活细胞数。

1.2.1 MTT法测定药物作用抑制率 将 2.0×10^4 个细胞接种于96孔板(200 μ L/孔), 培养24 h; 将药物

[通信作者] 焦顺昌, 男, 主任医师, E-mail: jiaosc@vip.sina.com

[作者简介] 吴志勇, 男, 硕士研究生, 研究方向: 肿瘤的生物治疗与化疗增殖。E-mail: zhiyong_wu2000@yahoo.com.cn

按照不同浓度加入,共培养 60 h;加入 5% MTT 20 μL/孔,4 h后加入 DMSO 200 μL/孔,振荡;用酶标仪(波长 492 nm)测定 OD 值,最后结果取均值,以未处理组作为对照组,按下列公式计算各组的抑制率:抑制率(%) = 1 - (实验组 OD₄₉₂ / 对照组 OD₄₉₂) × 100%。

1.2.2 MTT 法测定顺铂与曲妥珠单抗以不同序贯方式联合应用的抑制率 分别设立 DDP 前 24 h 应用 HER 组、DDP 前 18 h 应用 HER 组、DDP 前 12 h 应用 HER 组、DDP 前 6 h 应用 HER 组、DDP+HER 同时作用组、DDP 后 6 h 应用 HER 组、DDP 后 12 h 应用 HER 组、DDP 后 18 h 应用 HER 组、DDP 后 24 h 应用 HER 组序贯结合方式。将顺铂与曲妥珠单抗加入孔中。顺铂加入后培养 60 h,MTT 法测定各组的 OD 值,重复操作 3 次,取平均值,计算出实验组抑制率。

利用以下金氏公式计算参数 Q 判断两药的合并用药效应:

$$Q = E_{(a+b)} / (E_a + E_b - E_a \cdot E_b)$$

其中, E_a 代表 HER 的抑制率, E_b 代表 DDP 的抑制率, E_(a+b) 为两药联合应用的抑制率,即实测合并效应,分母 E_a + E_b - E_a · E_b 为期望合并效应, Q 为两者

相比。Q 值在 0.85 ~ 1.15 时,合并效应为相加作用, Q 值 > 1.15 为协同作用, Q 值 < 0.85 为拮抗作用^[5]。

流式细胞仪分析 DDP 与 HER 以不同序贯方式联合对 MDA-MB453 细胞细胞周期的影响。

1.3 统计学分析

采用 SPSS10.0 统计软件,单因素方差分析比较各组,数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法测定药物作用于 MDA-MB453 细胞抑制率

通过计算得出 DDP 30% 抑制率浓度约为 29.17 μg · mL⁻¹。HER 15% 抑制率约为 7.19 μg · mL⁻¹。

2.2 MTT 法测定各实验组抑制率及 Q 值

结果见表 1。结果表明两药联合应用时效果均好于单药 DDP 组的抑制率 (30.98%, P < 0.01); 其中两药同时应用组及加入 DDP 后应用 HER 组联合抑制率明显高于在 DDP 前应用 HER 组, Q 值提示各组均为相加作用,其中以两药同时使用时相加作用效果最好 (Q = 1.106)。

表 1 不同序贯方式顺铂与曲妥珠单抗联合对乳腺癌细胞的抑制率. n = 9, $\bar{x} \pm s$

Tab 1 Inhibition ratio of combined treatment of HER and DDP in different sequences to breast cancer cells. n = 9, $\bar{x} \pm s$

组别	HER 抑制率/%	HER + DDP 抑制率/%	Q 值
单药 DDP	-	30.98 ± 1.537	-
加入 DDP 前 24 h 应用 HER	15.83 ± 0.095	36.57 ± 1.141*	0.872 ± 0.012
加入 DDP 前 18 h 应用 HER	17.58 ± 0.291	39.71 ± 1.192*	0.921 ± 0.021
加入 DDP 前 12 h 应用 HER	16.44 ± 0.863	39.39 ± 1.204*	0.930 ± 0.062
加入 DDP 前 6 h 应用 HER	14.03 ± 0.778	41.42 ± 3.196*	1.018 ± 0.055
DDP + HER 同时应用	20.46 ± 1.298	49.88 ± 1.531*	1.106 ± 0.071**
加入 DDP 后 6 h 应用 HER	28.23 ± 1.462	47.03 ± 0.988*	0.932 ± 0.060
加入 DDP 后 12 h 应用 HER	26.61 ± 1.353	48.04 ± 1.386*	0.973 ± 0.047
加入 DDP 后 18 h 应用 HER	28.23 ± 2.904	49.91 ± 1.798*	0.988 ± 0.103
加入 DDP 后 24 h 应用 HER	28.71 ± 2.481	50.80 ± 1.675*	1.000 ± 0.094

注: 联合作用组抑制率与单药 DDP 抑制率间差异具有统计学意义, *P < 0.01; 两药同时应用组 Q 值与其他组 Q 值间差异具有统计学意义, **P < 0.01

Note: the difference of inhibition ratio between HER+DDP and DDP was statistically significant, *P < 0.01; Q-value difference between simultaneously combined group and other groups was statistically significant, **P < 0.01

2.3 流式细胞仪分析顺铂与曲妥珠单抗以不同序贯方式联合应用对细胞周期的影响

结果见表 2。结果表明,与单药 DDP 化疗组相比, DDP 前应用 HER 组 G₀/G₁、S 期细胞所占比例减少, G₂/M 期细胞增多,而其他组则未见明显变化,提示此组中两药的相加作用较弱与细胞周期的影响有关。

3 讨论

实验结果显示: 曲妥珠单抗与顺铂联合应用抑

制作用强于单药顺铂,其机制在于: HER-2 过度表达可降低肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,联合使用曲妥珠单抗可引起 HER-2 蛋白的内化,而减少表达,从而提高肿瘤细胞化疗敏感性,而取得较好的抑制率^[6-7]。此外,顺铂作用于细胞 DNA 引起损伤的启动自身保护机制—非常规 DNA 合成进行 DNA 修复, Pietras RJ 等^[8]证明顺铂联合使用曲妥珠单抗可明显减少顺铂引起的非常规 DNA 合成,从而取得较好的治疗效果。

表2 乳腺癌细胞经曲妥珠单抗与顺铂处理后各细胞周期的变化, % , n = 3, $\bar{x} \pm s$

Tab 2 Changes of cell cycle of cancer cell with treatment of HER and DDP.%, n = 3, $\bar{x} \pm s$

组别	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照组	56.27 ± 0.87	30.69 ± 1.43	13.04 ± 0.65
单药DDP	51.85 ± 2.52	26.09 ± 2.11	22.05 ± 0.72
单药HER	65.32 ± 2.32	24.11 ± 1.73	10.57 ± 2.15
加入DDP前12h应用HER	30.94 ± 2.01*	21.64 ± 1.34*	47.42 ± 3.38*
DDP+HER同时应用	49.60 ± 1.37	24.79 ± 1.93	25.61 ± 2.82
加入DDP后6h应用HER	53.89 ± 2.04	24.61 ± 1.45	21.50 ± 0.93

注: 联合作用组细胞周期与单药DDP进行单因素方差分析, *P < 0.01

Note: one-factor analysis of variance of cell cycle between combined treatment group and DDP group, *P < 0.01

在两药不同序贯方式联合应用的对比中发现, 顺铂前应用曲妥珠单抗效果较差。可能因为顺铂主要针对增殖活跃的细胞, 而先使用曲妥珠单抗会使肿瘤细胞停止在G₀/G₁期而降低了肿瘤细胞的增殖活性, 所以也在一定程度上降低了对细胞毒药物的敏感性。细胞周期结果显示: 与单药顺铂比较, 先应用曲妥珠单抗后应用顺铂组出现了明显的S、G₂/M期阻滞, 但对肿瘤细胞的抑制作用却没有明显增高。可能是因为应用曲妥珠单抗后激活了一些通路增加S、G₂/M期细胞周期检测点而增强了细胞DNA修复^[9], 降低了两药联合的抑制作用。

本实验再次证实了曲妥珠单抗与顺铂对于肿瘤细胞的生长抑制作用及对细胞周期的影响。并得出

了两药不同序贯方式联合使用时, 均表现为相加作用, 其中同时应用时效果最好, 并利用流式细胞技术初步证明这种差异同细胞周期的变化有一定的关系。本次实验为进一步的临床应用及研究提供实验依据, 但是不同的个体、细胞系及亚群是否具有相同规律, 是否还涉及到其他机制, 还有待进一步的基础及临床研究。

[参考文献]

- [1] 周琼, 殷文瑾, 陆劲松. 曲妥珠单抗在乳腺癌治疗中的进展[J]. 外科理论与实践, 2011, 16: 92-95.
- [2] 吴志勇, 焦顺昌, 彭亮. 赫赛汀与泰索帝序贯联合应用对乳腺癌细胞抑制作用的研究[J]. 现代肿瘤医学, 2007, 15(3): 329-332.
- [3] 吴志勇, 焦顺昌, 赫赛汀与健择以序贯方式联合应用对乳腺癌细胞抑制作用的研究[J]. 中国药物应用与监测, 2006, 5: 40-44.
- [4] Yardley DA, Burris HA 3rd, Hanson S, et al. Weekly gemcitabine and trastuzumab in the treatment of patients with HER2-overexpressing metastatic breast cancer[J]. Clin Breast Cancer, 2009, 9(3): 178-183.
- [5] 金正均. 合并用药中的相加[J]. 中国药理学报, 1980, 1: 70-76.
- [6] 金志军, 张惜阴. 卵巢癌C-erbB2表达与顺铂敏感性关系的研究[J]. 中华妇产科杂志, 1995, 30(11): 676.
- [7] 王娟, 胡建铭. 曲妥珠单抗联合顺铂对卵巢癌细胞株的抑制作用[J]. 苏州大学学报(医学版), 2010, 30(5): 1036-1039.
- [8] Pietras RJ, Fendly BM, Chazin VR, et al. Antibody to HER-2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells[J]. Oncogene, 1994, 9: 1829-1838.
- [9] 李红智, 郑易, 林鹏, 等. 赫赛汀诱导乳腺癌细胞凋亡及其对细胞周期的影响[J]. 基础与临床, 2007, 27(11): 1251-1256.

(收稿日期: 2011-08-13 修回日期: 2011-12-20)

· 讣告 ·

著名的心脏病学和老年医学专家、保健专家王士雯教授逝世

《中国药物应用与监测》杂志顾问、中国工程院院士, 我国著名的心脏病学和老年医学专家、杰出的保健专家王士雯教授, 因病医治无效, 于2012年1月30日在北京逝世, 享年79岁。

王士雯院士的一生是为事业拼搏的一生, 是为医疗、科研创新的一生。我们将永远怀念她!

《中国药物应用与监测》编辑部