

## · 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.06.004

## 阻断表皮生长因子受体和环氧合酶-2 信号途径对肺腺癌细胞的抗增殖作用

牟晓燕\*, 王亚丽, 白小燕, 刘庆亮 (山东大学附属省立医院 呼吸科, 山东 济南 250021)

[摘要] 目的:探讨表皮生长因子受体抑制剂吉非替尼(gefitinib)联合新型环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)抑制剂塞来昔布(celecoxib)对肺腺癌 A549 细胞株的抑制作用及其可能机制。方法:肺腺癌 A549 细胞培养于 RPMI 1640 培养液中,实验分为正常对照组、吉非替尼 5  $\mu\text{mol/L}$  组、塞来昔布 25  $\mu\text{mol/L}$  组、吉非替尼 5  $\mu\text{mol/L}$  加塞来昔布 25  $\mu\text{mol/L}$  组。药物干预细胞 48 h 后,倒置相差显微镜观察细胞形态学变化,锥虫蓝拒染法检测药物对细胞生长的影响,Annexin V/PI 法和 Hoechst33258 染色法检测细胞凋亡,流式细胞术检测药物作用周期,免疫荧光和 Real-time PCR 法检测 EGFR、COX-2 蛋白的表达及 EGFR mRNA 的表达情况。结果:吉非替尼联合塞来昔布组相比单药组,A549 细胞明显出现大量颗粒和空泡,细胞变圆并开始脱落。吉非替尼与塞来昔布单药对 A549 细胞抑制作用具有时间和剂量依赖性,加药 48 h 时吉非替尼(5  $\mu\text{mol/L}$ )联合塞来昔布(25  $\mu\text{mol/L}$ )组抑制率为(58.2  $\pm$  4.6)%,明显高于单药组( $P < 0.01$ )。联合用药组 A549 细胞凋亡率明显高于单独用药组(33.9% vs 6.0%, 8.8%),其 S 期细胞明显减少、G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期明显增加( $P < 0.01$ );EGFR、COX-2 蛋白的表达明显减弱( $P < 0.05$ ),EGFR mRNA 相对表达量(0.28  $\pm$  0.05)明显高于单独用药组( $P < 0.05$ )。结论:吉非替尼和塞来昔布联合对肺腺癌 A549 细胞增殖的抑制具有明显协同作用,其可能机制是诱导凋亡、增强 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期阻滞和进一步下调活化的 EGFR 与 COX-2 的表达。

[关键词] 吉非替尼;塞来昔布;肺肿瘤;A549 细胞;凋亡;表皮生长因子受体;环氧合酶-2

[中图分类号] R734 [文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2009)06-0570-07

## Inhibitory effect of blocking both epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 pathway on proliferation of lung cancer A549 cells

MOU Xiao-yan, WANG Ya-li, BAI Xiao-yan, LIU Qing-liang (Department of Respiration, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the inhibitory effects of gefitinib (epidermal growth factor receptor inhibitor) combined with celecoxib (cyclooxygenase-2 inhibitor) against human lung cancer A549 cells and the possible mechanism. **Methods:** A549 cells were cultured in RPMI 1640 medium and were divided into 4 groups: normal control group, 5  $\mu\text{mol/L}$  gefitinib group, 25  $\mu\text{mol/L}$  celecoxib group, and 5  $\mu\text{mol/L}$  gefitinib + 25  $\mu\text{mol/L}$  celecoxib group. The morphological changes of A549 cells were observed under inverted microscope 48 h after treatment; the effects of drugs on growth of A549 cells were detected by MTT assay; the apoptosis and cell cycles of A549 cells were measured by Annexin V/PI and Hoechst 33258 staining, respectively; and the expression of EGFR protein, COX-2 protein, and EGFR mRNA were determined by immunofluorescence and real-time PCR. **Results:** Compared with gefitinib and celecoxib groups, many granules and vacuoles were observed in the gefitinib and celecoxib combination group, and cells became round and there was defluxion. Both gefitinib and celecoxib inhibited the growth of A549 cells in a time- and dose-dependent manner. After treatment for 48 h, the inhibitory rate was (58.2  $\pm$  4.6)% in the combination group, which was significantly higher than those of the other two groups. Apoptosis rate in the combination group was also significantly higher than those in the other two groups (33.9% vs 6.0%, 8.8%), and the cell proportion in S phase significantly decreased and in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phases significantly increased ( $P < 0.01$ ). EGFR protein, COX-2 protein, and EGFR mRNA expression in A549 cells was significantly decreased in the combination treatment group compared with those in the other two groups ( $P < 0.05$ ).

[基金项目] 山东省科技攻关资助项目(No. ZR2009CM125)。Supported by the Science and Technology Project of Shandong Province (No. ZR2009CM125)

[作者简介] 牟晓燕(1966-),女,山东省济南市人,教授,主要从事肺癌发病机制和治疗的研究。E-mail: mxy66@126.com

\* 通信作者(Corresponding author)。E-mail: mxy66@126.com

**Conclusion:** Gefitinib and celecoxib can synergistically inhibit the growth of A549 cells, possibly through promoting apoptosis, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest, and down-regulating activated EGFR and COX-2 expression.

[ **Key words** ] gefitinib; celecoxib; lung neoplasms; A549 cell; apoptosis; epidermal growth factor receptor; cyclooxygenase-2

[ Chin J Cancer Biother, 2009, 16( 6 ): 570-576 ]

肺癌发病率逐年上升,已成为人类癌症死亡的首要原因。但目前肺癌化疗的疗效似乎达到平台,客观有效率约 30%,中位生存期 8~9 个月,1 年生存率 30%~40%<sup>[1]</sup>。因此,寻找更为有效和安全的治疗手段成为当前肺癌研究的一个热点。

肿瘤分子靶向治疗(molecular targeted therapy)为肺癌的治疗提供了新的思路和希望<sup>[2]</sup>。目前国内外对这领域的研究不断深入,针对不同细胞表面分子的新型靶向药物不断涌现,其中作用于表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的靶向药物是较为重要的一类。吉非替尼(gefitinib)是表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂,与腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine-triphosphate, ATP)竞争性地和 EGFR 的酪氨酸激酶胞内区位点结合,从而阻止细胞增殖,促进凋亡<sup>[3]</sup>。但单药疗效有限,多靶点联合治疗是目前研究的焦点。

研究表明<sup>[4-5]</sup>, EGFR 和环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)信号途径相互促进,共同参与了肺癌的发生、发展。EGFR 抑制剂和 COX-2 抑制剂联用对肺腺癌的生长可能具有协同抑制作用。塞来昔布(celecoxib)是一种新型非类固醇抗炎药,能特异性地抑制 COX-2,阻止前列腺素类物质的产生发挥抗肿瘤作用。目前国内外对吉非替尼和塞来昔布联合应用的报道较少。本实验研究吉非替尼联合塞来昔布对肺腺癌 A549 细胞增殖和凋亡的作用,探讨其联合作用的可行性和内在机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

吉非替尼(产品批号 FC076)、塞来昔布(产品批号 BK070044)分别由美国 AstraZeneca 公司、美国辉瑞制药有限公司惠赠。RPMI 1640 培养液购自 Invitrogen GIBCO 公司,胎牛血清购自杭州四季青有限公司,二甲亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司。EGFR、COX-2 兔抗人多克隆-抗购自武汉博士德公司, FITC 标记羊抗兔 IgG 购自北京中杉公司, TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司,反转录试剂盒和实时荧光定量 PCR 试剂盒购自 TAKARA 公司, Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期试剂盒购自美国晶美

公司, Hoechst33258 染液购自 Sigma 公司。倒置相差显微镜和成像系统为日本 OLYMPUS 公司产品。流式细胞仪为 BD 公司产品。荧光定量 PCR 仪为美国应用生物系统公司产品。

### 1.2 细胞培养和实验分组

人肺腺癌细胞株 A549 由山东大学附属省立医院中心实验室惠赠,以含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。吉非替尼、塞来昔布分别用适量 DMSO 配成浓度为 0.01 mol/L、0.1 mol/L 的母液,储存在 -20 °C 药物活性无改变,每次实验前用新鲜培养液配成相应工作浓度。所有实验中的 DMSO 终质量分数均小于 0.1%,根据 Augustine-Rauch 等<sup>[6]</sup>的研究成果,该质量分数的 DMSO 对实验结果无显著影响。药物作用实验分组如下:A 组为正常对照组;B 组为吉非替尼(5 μmol/L);C 组为塞来昔布(25 μmol/L);D 组为吉非替尼 + 塞来昔布(5 + 25 μmol/L),均以 RPMI 1640 培养液配制药物。

### 1.3 倒置相差显微镜观察药物作用后人肺腺癌 A549 细胞的形态变化

取 A549 对数生长期细胞,调成密度为 5 × 10<sup>5</sup>/ml,接种 24 h,按上述方法分组加药后,48 h 后倒置相差显微镜观察细胞的生长状况及形态学改变,并用摄像系统软件记录。

### 1.4 锥虫蓝拒染法检测吉非替尼、塞来昔布对 A549 细胞增殖的抑制作用

取对数生长期细胞,每孔 100 μl 接种于 96 孔培养板中,24 h 后分别加入不同终浓度的吉非替尼(0.5、1、10、25、50、100、150 μmol/L)、塞来昔布(15、20、25、50、100、150、200 μmol/L)、吉非替尼 + 塞来昔布(5 + 25 μmol/L)、RPMI 1640 全培养液的空白对照,另设溶剂 DMSO 对照组,每组设置 5 个平行复孔。置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 24、48、72 h 后,锥虫蓝拒染法光镜下计数,以药物作用时间为横坐标,抑制率为纵坐标,绘制细胞生长抑制曲线。上述实验重复 3 次。

### 1.5 Annexin V /PI 染色法与 Hoechst33258 染色法检测用药后 A549 细胞的凋亡情况

Annexin V /PI 法:加药 48 h 后收集不同处理组

细胞, PBS 洗 2 次, 调整细胞密度至  $1 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $1\ 000 \times g$  离心 10 min, 弃去上清, 用 Annexin V -FITC 和 PI 4 °C 避光染色 15 min, 上流式细胞仪检测。

Hoechst33258 染色法: 加药 48 h 后收集不同处理组细胞, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 加入  $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$  Hoechst 33258 染液, 37 °C 孵育 30 min, 荧光显微镜观察、照像。每种处理随机选择至少 10 个观察视野, 以凋亡阳性细胞数所占细胞总数的百分比为细胞凋亡率(%)。通过金正均法计算吉非替尼和塞来昔布联合应用对促进细胞凋亡的协同作用指数  $q$ ;  $q = E_{a+b} / (E_a + E_b - E_a \times E_b)$ ,  $E_{a+b}$  为联合处理组细胞凋亡率,  $E_a$ 、 $E_b$  分别为应用 a 药和 b 药单纯处理的细胞凋亡率;  $q$  值在 0.85 ~ 1.15 间时为两药单纯相加,  $q > 1.15$  为两药合用有协同作用,  $q < 0.85$  为两药合用有拮抗作用<sup>[7]</sup>。

### 1.6 流式细胞术检测用药后 A549 细胞周期的变化

细胞以  $5 \times 10^5/\text{ml}$  接种 24 h, 分组加药, 48 h 后收集细胞, PBS 漂洗 2 次, 按照细胞周期检测试剂盒说明书操作, 最后上机检测, 并用 Multicycle for windows 软件分析细胞周期分布的变化。

### 1.7 免疫荧光法检测用药后 A549 细胞中 EGFR 和 COX-2 蛋白的表达

细胞接种在盖片上, 24 h 后分组加药, 继续孵育 48 h 后, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 0.2% Triton X-100 通透 20 min, 山羊血清封闭 30 min, 吸弃。EGFR 和 COX-2 一抗(1:50)4 °C 湿盒内过夜, FITC 标记二抗(1:50)37 °C 避光孵育 1.5 h, PBS 洗 3 遍。甘油封片后照荧光摄片。PBS 代替一抗作为阴性对照。

### 1.8 Real-Time PCR 法检测用药后 A549 细胞中 EGFR mRNA 的表达

细胞培养及处理方法同上, TRIzol 法提取细胞的总 RNA, 37 °C 恒温逆转录 15 min, 85 °C 5 s 灭活逆转录酶。依据美国国立医学图书馆基因数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov)提供的 EGFR mRNA 序列, 设计 PCR 引物, 引物序列: EGFR-UP: 5'-ACTGC-CAGAACTGACCAAAATC -3'; EGFR-DOWN: 5'-CCTGCAGCACACTGGTTGTG -3'。内参引物 GAPDH-UP: 5'-CTGCTCCTCCTGTTCCGACAGT-3'; GAPDH-DOWN: 5'-CCGTTGACTCCGACCTTCAC-3'。引物浓度 200 nmol/L, 2 × SYBR Green PCR Mast Mix, 模板 5 μl, 整个反应体系 20 μl; 反应条件: 95 °C 预变性 2 min, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 1 min, 40 个循环。每个样本设置 3 个复孔, 整个反应过程中荧光信号强度变化由 ABI Prism® 7500 型荧光定量 PCR 仪监测, 电脑自动分析显示结果。

### 1.9 统计学分析

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS 11.5 软件进行  $t$  检验、 $\chi^2$  检验和方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 吉非替尼、塞来昔布单独或联合作用后 A549 细胞形态的变化

正常对照组细胞紧密贴壁, 边界清楚透明度高, 生长旺盛, 可见各期核分裂相。3 组药物对 A549 细胞均有抑制作用。吉非替尼单药组细胞略变圆, 形态改变, 空泡和颗粒增多, 细胞间隙增大; 塞来昔布单药组细胞贴壁减慢, 胞内出现空泡和颗粒。联合用药组相比单独用药组细胞明显皱缩变圆脱落, 颗粒增多, 见细胞碎片和凋亡小体(图 1)。

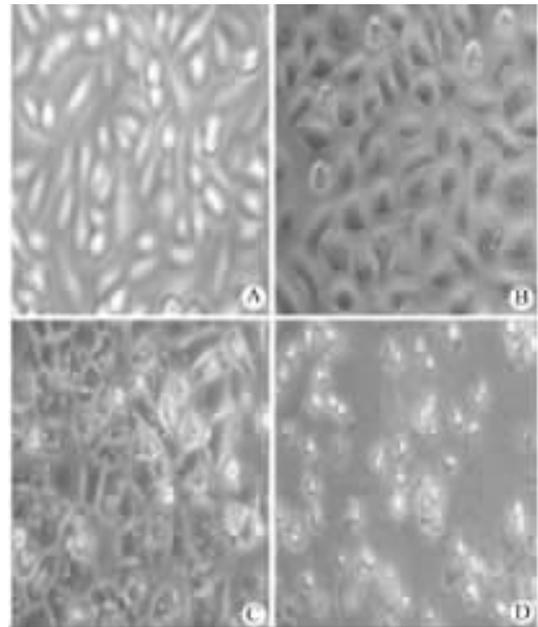


图 1 吉非替尼和塞来昔布单独或联合作用后 A549 细胞形态学变化(×200)

Fig.1 Morphological changes of A549 cells treated with gefitinib, celecoxib or both (×200)

A: Normal control group for 48 h; B: 5 μmol/L gefitinib for 48 h; C: 25 μmol/L celecoxib for 48 h; D: 5 μmol/L gefitinib + 25 μmol/L celecoxib for 48 h

### 2.2 吉非替尼、塞来昔布单独或联合作用对 A549 细胞增殖的抑制作用

锥虫蓝拒染法检测结果显示: 药物作用 48 h 后, 单药吉非替尼和塞来昔布对细胞的抑制作用具有剂量依赖性; 同种药物各剂量间细胞抑制率具有统计学差异( $P < 0.01$ ); 在浓度 1 ~ 150 μmol/L 间, 相同剂量吉非替尼和塞来昔布作用 48 h 后细胞抑

制率之间具有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 2A)。5  $\mu\text{mol/L}$  吉非替尼和 25  $\mu\text{mol/L}$  塞来昔布单独或联合作用不同时间, 相同剂量同种药物不同作用时间组细胞抑制率差异亦有统计学意义 ( $P < 0.01$ , 图 2B), 但联合用药组 24 h 和 48 h 组间无明显差异 ( $P > 0.05$ )。加药 48 h, 单药吉非替尼 (5  $\mu\text{mol/L}$ )、塞来昔布 (25  $\mu\text{mol/L}$ ) 细胞抑制率分别为 (24.8  $\pm$  2.1)%、(21.5  $\pm$  1.7)%, 吉非替尼联合塞来昔布 (5 + 25  $\mu\text{mol/L}$ ) 组抑制率为 (58.2  $\pm$  4.6)%, 明显高于单药组 ( $P < 0.01$ , 图 2B)。

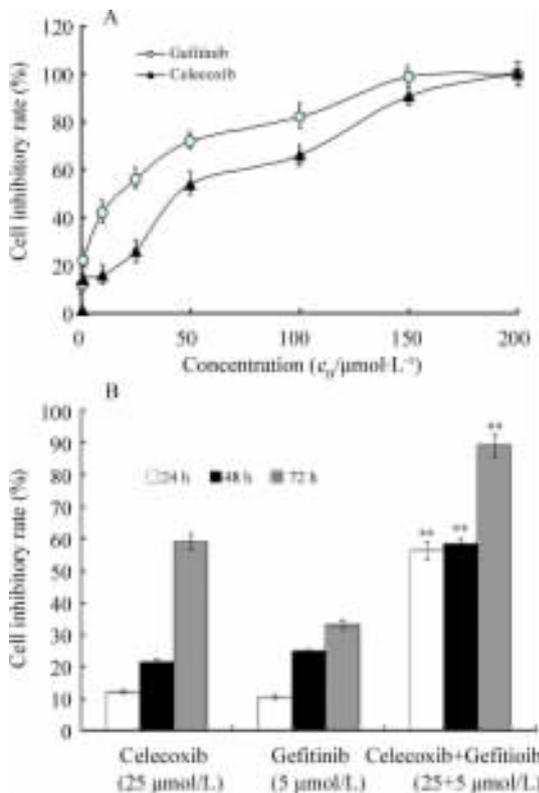


图 2 吉非替尼和塞来昔布单独或联合作用对 A549 细胞增殖的抑制作用

Fig. 2 Inhibitory effect of gefitinib and celecoxib alone or in combination against proliferation of A549 cells

A: A549 cells treated with different dosage of gefitinib and celecoxib; B: A549 cells treated with 5  $\mu\text{mol/L}$  gefitinib and 25  $\mu\text{mol/L}$  celecoxib alone or in combination for different time periods  
\*\*  $P < 0.01$  vs celecoxib or gefitinib

### 2.3 吉非替尼、塞来昔布单独或联合作用对 A549 细胞凋亡的影响

Annexin V/PI 染色显示: 正常对照组早期凋亡率为 0.66%, 5  $\mu\text{mol/L}$  吉非替尼联合 25  $\mu\text{mol/L}$  塞来昔布处理细胞 48 h 后, 可见 33.9% 的细胞凋亡,

明显高于 5  $\mu\text{mol/L}$  吉非替尼、25  $\mu\text{mol/L}$  塞来昔布单独作用的细胞凋亡率 (6.0%、8.8%; 图 3)。为进一步验证, 采用 Hoechst33258 染色观察凋亡细胞。正常细胞核染色均匀, 形状规则; 凋亡细胞核呈现核固缩浓染, 核分叶呈月牙状或蚕豆状, 碎裂呈米粒状。48 h 后联合用药组凋亡率高达 32.4%, 远高于单药吉非替尼组 (7.12%) 和塞来昔布组 (8.43%) (图 4)。通过金正均法计算协作指数  $q = 1.89$ , 提示吉非替尼与塞来昔布联用具有协同作用。

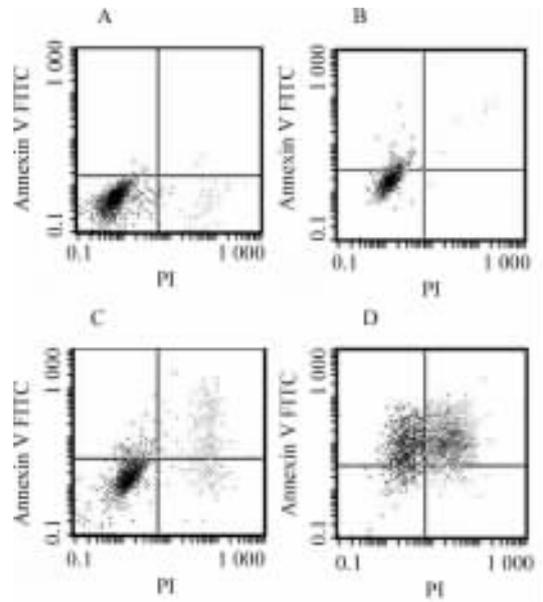


图 3 Annexin V/PI 染色检测吉非替尼和塞来昔布单独或联合作用促进 A549 细胞的凋亡

Fig. 3 Gefitinib and celecoxib alone or in combination increased apoptosis of A549 cells detected by Annexin V/PI staining

A: Normal control group for 48 h; B: 5  $\mu\text{mol/L}$  Gefitinib for 48 h; C: 25  $\mu\text{mol/L}$  celecoxib for 48 h; D: 5  $\mu\text{mol/L}$  + 25  $\mu\text{mol/L}$  celecoxib for 48 h

### 2.4 吉非替尼、塞来昔布单独或联合作用对 A549 细胞周期的影响

单药吉非替尼、塞来昔布组 S 期细胞依次为 (37.4  $\pm$  1.6)%、(21.0  $\pm$  3.1)%,  $G_0/G_1$  % 依次为 (61.4  $\pm$  5.2)%、(51.8  $\pm$  4.7)%, 提示吉非替尼、塞来昔布均引起  $G_0 \sim G_1$  期阻滞。与单药组相比, 联合用药组 S 期细胞比例明显减少 ( $P < 0.01$ ),  $G_0/G_1$  期细胞比例明显增加 ( $P < 0.01$ ), 由此可见联合用药  $G_0 \sim G_1$  期阻滞作用增强 (表 1)。

### 2.5 吉非替尼、塞来昔布单独或联合作用对 EGFR 和 COX-2 蛋白表达的影响

EGFR 和 COX-2 主要分布于细胞膜和细胞质, 在正

常对照组荧光很强,提示在正常 A549 细胞中两者均高表达。联合用药组 EGFR 和 COX-2 荧光强度均很弱,与单药组相比差别具有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 5)。

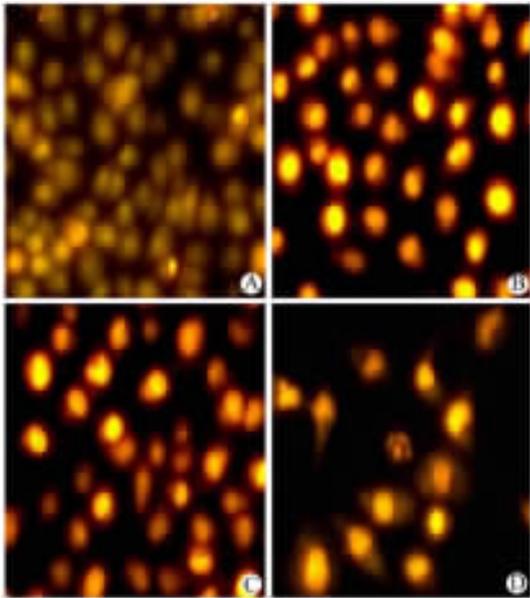


图 4 Hoechst 33258 染色法检测吉非替尼和塞来昔布单独或联合作用后 A549 细胞的凋亡( ×200 )

Fig. 4 Apoptosis of A549 cells treated with gefitinib and celecoxib alone or in combination as detected by Hoechst 33258 staining ( ×200 )

A: Normal control group for 48 h; B: 5 μmol/L gefitinib for 48 h; C: 25 μmol/L celecoxib for 48 h; D: 5 μmol/L gefitinib + 25 μmol/L celecoxib for 48 h

### 2.6 吉非替尼、塞来昔布单独或联合作用对 A549 细胞 EGFR mRNA 表达的影响

加入终浓度为 5 μmol/L 的吉非替尼作用 48 h 后, A549 细胞 EGFR mRNA 的相对表达量为 ( $0.45 \pm 0.07$ ); 25 μmol/L 塞来昔布组 A549 细胞 EGFR mRNA 的相对表达量为( $0.59 \pm 0.11$ ), 加药组与正常对照组相比差异显著( $P < 0.01$ )。联合用药组 A549 细胞 EGFRmRNA 的相对表达量为( $0.28 \pm 0.05$ ), 明显低于单独用药吉非替尼组( $P < 0.05$ )和单独用药塞来昔布组( $P < 0.01$ )。荧光实时定量 PCR 过程中 EGFR、GAPDH 的熔解曲线为单一特异峰, 无非特异产物, 说明扩增准确、特异性好。在扩增目的基因时同时设不加模板 cDNA 的阴性对照(加入 GAPDH 上下游引物), 扩增曲线为一水平直线, 说明操作过程中没有 cDNA 污染, 实验的结果可靠。

表 1 流式细胞术检测吉非替尼和塞来昔布单独或联合作用后 A549 细胞周期的变化( % )

Tab.1 Changes of cell cycles of A549 cells treated with gefitinib and celecoxib alone or in combination as detected by flow cytometry( % )

| Group                 | G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> | S                       | G <sub>2</sub>         |
|-----------------------|--------------------------------|-------------------------|------------------------|
| Control               | 11.2 ± 2.2                     | 58.9 ± 5.2              | 29.9 ± 2.9             |
| Gefitinib             | 61.4 ± 5.2**                   | 37.4 ± 1.6**            | 1.2 ± 0.3**            |
| Celecoxib             | 51.8 ± 4.7**                   | 21.0 ± 3.1**            | 27.2 ± 2.4             |
| Gefitinib + celecoxib | 87.2 ± 6.4 <sup>△△</sup>       | 3.2 ± 0.9 <sup>△△</sup> | 9.6 ± 1.4 <sup>△</sup> |

\*\* $P < 0.01$  vs control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>△△</sup> $P < 0.01$  vs gefitinib or celecoxib group

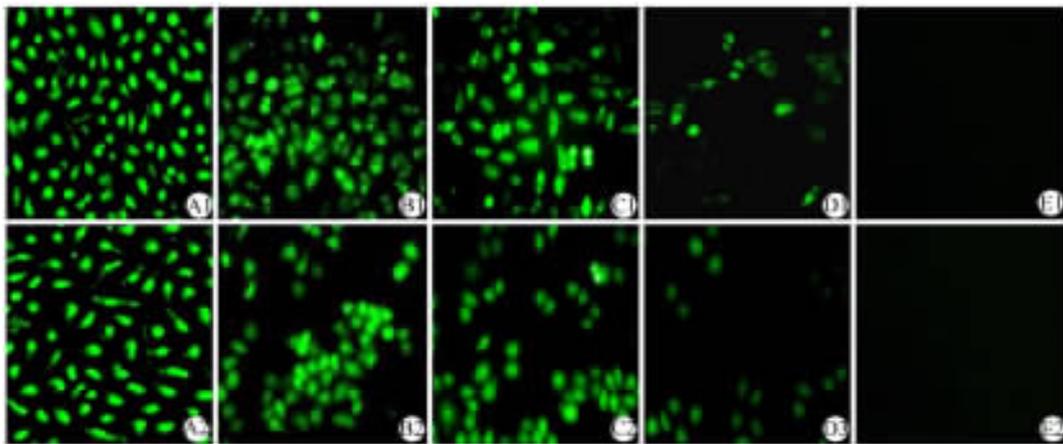


图 5 免疫荧光检测吉非替尼和塞来昔布单独或联合作用后 A549 细胞 EGFR 和 COX-2 的表达( ×200 )

Fig. 5 Expression of EGFR and COX-2 in A549 cells treated with gefitinib and celecoxib alone or in combination as detected by immunofluorescence ( ×200 )

A1 ~ E1: EGFR; A2 ~ E2: COX-2; A: Control; B: Gefitinib; C: Celecoxib; D: Gefitinib + celecoxib; E: Negative control

### 3 讨论

分子靶向治疗是利用肿瘤细胞与正常细胞之间分子细胞生物学上的差异,采用封闭受体、抑制血管生成、阻断信号转导通路等方法作用于肿瘤细胞特定的靶点,特异性地抑制肿瘤细胞的生长,促使肿瘤细胞凋亡<sup>[8]</sup>。分子靶向治疗具有更高的选择性,毒副作用小,是今后肿瘤治疗的新趋势。其中作用于 EGFR 的靶向药物是较为重要的一类。EGFR 是一相对分子质量为 170 000 的跨膜糖蛋白,其胞外结构可与配体结合,胞内结构具有酪氨酸激酶活性,属于受体酪氨酸激酶家族。配体通过与 EGFR 相互作用,激活下游 Ras 系统、AKT 系统、PLC/PKC 系统,从而将有丝分裂信号向下传递,调控细胞周期,调节细胞增生、存活、黏附、迁移和分化,促进损伤修复<sup>[9-10]</sup>。

吉非替尼是一种表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂,治疗经治的 NSCLC 患者可以获得 8% ~ 19% 的客观肿瘤缓解率<sup>[11]</sup>,但是目前 EGFR 抑制剂单药疗效有限,和其他药物联合的多靶点治疗是研究的焦点。塞来昔布是一种高度选择性 COX-2 抑制剂,在体内、外都能抑制肺癌生长,诱导细胞凋亡<sup>[10]</sup>。国外研究<sup>[12-14]</sup>表明,EGFR 和 COX-2 信号途径相互促进,共同参与了肺腺癌的发生、发展,吉非替尼和塞来昔布具有协同作用。本实验试图研究吉非替尼联合塞来昔布对 A549 细胞生长的抑制作用和 EGFR、COX-2 蛋白表达的影响。

凋亡是消除突变和损伤的主要途径,细胞凋亡的途径主要有两条:一条是通过胞外信号激活细胞内的凋亡酶 caspase,一条是通过线粒体释放凋亡酶激活因子激活 caspase。本研究结果显示,联合用药组对细胞的增殖抑制作用和细胞凋亡率明显高于单独用药组,提示联合用药可能通过促进细胞凋亡发挥作用。根据 Choe 等<sup>[15]</sup>的研究成果,可能机制是:吉非替尼联合塞来昔布通过线粒体依赖性和非依赖性两种途径促进 caspase-9 和 caspase-8 前体活化成为 caspase-9、caspase-8,后者再活化下游的 caspase-3,活化的 caspase-3 使 PARP 被切割降解,使其降解而丧失其 DNA 修复功能,促进细胞的凋亡。

细胞周期中存在 G<sub>1</sub>/S 和 G<sub>2</sub>/M 期两个重要的调控点,G<sub>1</sub> 期内的正调控点积累到一定程度,周期越过 G<sub>1</sub>/S 交界点,细胞不再依赖于细胞外促生长因子而顺序完成整个细胞周期,因而,G<sub>1</sub>/S 调控点是影响细胞周期的关键。本实验结果显示,单用吉非替尼或塞来昔布处理细胞,G<sub>1</sub> 期细胞均增高,说

明两种药物对周期的作用机制相似,均引起细胞 G<sub>1</sub> 期阻滞。吉非替尼联合塞来昔布用药后,87.2% 的细胞阻滞在 G<sub>1</sub> 期,说明两者可通过共同周期阻滞机制,发挥协同作用,调节细胞周期进程,诱导细胞凋亡而有效抑制肿瘤细胞的生长。

EGFR 和 COX-2 在非小细胞肺癌等上皮源性肿瘤中同时高表达,参与了肿瘤的发生、发展,在肿瘤生长过程中的细胞增殖、抑制凋亡、血管生成和转移扩散中发挥重要的作用<sup>[16-18]</sup>。Lippman 等<sup>[19]</sup>研究表明,COX-2 催化合成的前列腺素 2(PGE<sub>2</sub>),在促进癌细胞增殖的同时激活 EGFR,活化后激活胞质中 MAPK,继续传递信息;同时,EGFR 与其配体结合,启动胞内 MAPK 信号转导途径,通过 NF- $\kappa$ B 途径促进 COX-2 的表达。COX-2 和 EGFR 相互促进,两个信号通路间交叉对话<sup>[20]</sup>。本研究显示:吉非替尼、塞来昔布单独作用对细胞增殖有明显抑制作用,且呈时间、剂量依赖性。两者联用抑制作用更明显。免疫荧光和 Real-time PCR 结果发现:A549 细胞中有 COX-2 和 EGFR 同时高表达,提示 COX-2 和 EGFR 信号途径均参与了肺腺癌的发生、发展;吉非替尼、塞来昔布同时下调了 EGFR 和 COX-2 蛋白、EGFR mRNA 的表达,两药联用抑制作用更明显,提示两药联用同时增强了对两个信号途径的抑制作用,EGFR 和 COX-2 双靶点阻滞是二者协同作用的一个重要原因。联合用药既能克服单药耐药的发生,又可在机体能耐受单药不良反应的剂量范围内,产生最大的肿瘤抑制效应。因此,同时阻滞 COX-2 和 EGFR 信号途径可能是肺腺癌治疗的潜在有效途径之一。

在人肺癌 A549 细胞系的体外作用中,吉非替尼和塞来昔布都具有一定的抑瘤效应;联合应用时,两者具有明显的协同效应,其协同作用的分子机制是促进凋亡、增强 G<sub>0</sub> ~ G<sub>1</sub> 期阻滞和进一步下调了活化的 EGFR 和 COX-2 mRNA 及蛋白的表达。提示联合靶向 EGFR 和 COX-2 信号途径治疗肺癌具有良好的应用前景,但还需进一步的动物体内实验和临床研究证实。

### [参考文献]

- [1] Ji H, Li D, Chen L, *et al.* The impact of human EGFR kinase domain mutations on lung tumorigenesis and *in vivo* sensitivity to EGFR targeted therapies [J]. *Cancer Cell*, 2006, 9(6): 485-495.
- [2] 曾益新, 张晓实, 刘强. 分子靶向治疗: 肿瘤治疗的里程碑 [J]. *癌症*, 2008, 27(8): 785-787.
- [3] Becker JC, Muller-Tidow C, Serve H, *et al.* Role of receptor tyrosine kinases in gastric cancer: new targets for a selective therapy

- [ J ]. World J Gastroenterol, 2006, 12( 21 ): 3297-3305.
- [ 4 ] Lippman SM, Gibson N, Subbaramaiah K, *et al.* Combined targeting of the epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 pathways [ J ]. Clin Cancer Res, 2005, 11( 17 ): 6097-6099.
- [ 5 ] Choe MS, Zhang X, Shin HJ, *et al.* Interaction between epidermal growth factor receptor- and cyclooxygenase 2-mediated pathways and its implications for the chemoprevention of head and neck cancer [ J ]. Mol Cancer Ther, 2005, 4( 9 ): 1448-1455.
- [ 6 ] Augustine-Rauch KA, Zhang Q, Kleinman M, *et al.* A study of vehicles for dosing rodent whole embryo culture with non aqueous soluble compounds [ J ]. Reprod Toxicol, 2004, 18( 3 ): 391-398.
- [ 7 ] 杨艳娜, 王 艳, 王星光, 等. 曲古抑菌素 A 和紫杉醇对子宫内膜癌 Ark2 细胞凋亡和线粒体膜电位的影响 [ J ]. 癌症, 2008, 27( 8 ): 816- 821.
- [ 8 ] Sirotiak FM. Studies with ZD1839 in preclinical models [ J ]. Semin Oncol, 2003, 30( 1 Suppl 1 ): 12-20.
- [ 9 ] Solomon B, Hagekyriakou J, Trivett MK, *et al.* EGFR blockade with ZD1839 ( "Iressa" ) potentiates the antitumor effects of single and multiple fractions of ionizing radiation in human A431 squamous cell carcinoma. Epidermal growth factor receptor [ J ]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2003, 55( 3 ): 713-723.
- [ 10 ] Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, *et al.* Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer [ J ]. N Engl J Med, 2005, 353( 2 ): 123-132.
- [ 11 ] Kris MG, Natale RB, Herbst RS, *et al.* Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small-cell lung cancer: a randomized trial [ J ]. JAMA, 2003, 290( 16 ): 2149-2158.
- [ 12 ] Zhang X, Chen ZG, Choe MS, *et al.* Tumor growth inhibition by simultaneously blocking epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 in a xenograft model [ J ]. Clin Cancer Res, 2005, 11( 17 ): 6261-6269.
- [ 13 ] Gadgeel SM, Ali S, Philip PA, *et al.* Response to dual blockade of epidermal growth factor receptor ( EGFR ) and cyclooxygenase-2 in non-small cell lung cancer may be dependent on the EGFR mutational status of the tumor [ J ]. Cancer, 2007, 110( 12 ): 2775-2784.
- [ 14 ] Reuter CW, Morgan MA, Eckardt A. Targeting EGF-receptor-signalling in squamous cell carcinomas of the head and neck [ J ]. Br J Cancer, 2007, 96( 3 ): 408-416.
- [ 15 ] Choe MS, Chen Z, Klass CM, *et al.* Enhancement of docetaxel-induced cytotoxicity by blocking epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 pathways in squamous cell carcinoma of the head and neck [ J ]. Clin Cancer Res, 2007, 13( 10 ): 3015-3023.
- [ 16 ] Patel S, Chiplunkar S. Role of cyclooxygenase-2 in tumor progression and immune regulation in lung cancer [ J ]. Indian J Biochem Biophys, 2007, 44( 6 ): 419-428.
- [ 17 ] 陆颖影, 靖大道, 王兴鹏, 等. 吡喹酮与埃罗替尼对胰腺癌细胞生长的协同抑制作用 [ J ]. 胃肠病学, 2007, 12( 4 ): 209-213.
- [ 18 ] Bloomston M, Bhardwaj A, Ellison EC, *et al.* Epidermal growth factor receptor expression in pancreatic carcinoma using tissue microarray technique [ J ]. Dig Surg, 2006, 23( 1-2 ): 74-79.
- [ 19 ] Lippman SM, Gibson N, Subbaramaiah K, *et al.* Combined targeting of the epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 pathways [ J ]. Clin Cancer Res, 2005, 11( 17 ): 6097-6099.
- [ 20 ] Jalili A, Pinc A, Pieczkowski F, *et al.* Combination of an EGFR blocker and a COX-2 inhibitor for the treatment of advanced cutaneous squamous cell carcinoma [ J ]. J Dtsch Dermatol Ges, 2008, 6( 12 ): 1066-1069.
- [ 收稿日期 ] 2009 - 10 - 04 [ 修回日期 ] 2009 - 11 - 08  
[ 本文编辑 ] 王 莹

## · 科技动态 ·

### miR-15a 和 miR-16 在前列腺癌中的作用

在前列腺癌中存在有部分 13 号染色体长臂基因组序列的缺失, 而 miR-15a 和 miR-16 即表达于此段基因组中。该文作者发现, miR-15a 和 miR-16 在前列腺癌中表达明显降低, 并且 miR-15a 和 miR-16 对于前列腺癌的增殖、凋亡、细胞周期、迁移、侵袭和贴壁非依赖的生长均有作用, 具体表现为 miR-15a 和 miR-16 能够抑制前列腺癌细胞的增殖、促进凋亡、阻滞细胞周期、减少迁移和侵袭、降低贴壁非依赖的生长, 即 miR-15a 和 miR-16 表现为明显的抑癌基因特点。

miRNA 发挥作用的方式通常为抑制其靶基因的表达。作者通过生物信息学预测和实验验证, 发现 miR-15a 和 miR-16 能够抑制抗凋亡基因 Bcl-2 的表达, 抑制细胞周期蛋白 CCND1 的表达, 抑制肿瘤相关基因 WNT3A 的表达。并且, 这些肿瘤相关基因的下游信号途径同样能被 miR-15a 和 miR-16 抑制。在前列腺癌细胞中, 这些分子的表达和活化与 miR-15a 和 miR-16 的表达存在明显的负相关。因此得出结论: 前列腺癌中 miR-15a 和 miR-16 的表达缺失导致了上述肿瘤相关基因的表达和活化。

最后, 作者在体内前列腺癌模型中证明了 miR-15a 和 miR-16 的抑癌作用。miR-15a 和 miR-16 能够显著抑制荷前列腺癌小鼠肿瘤的生长, 并能导致荷瘤中肿瘤细胞的坏死。在前列腺局部注射 miR-15a 和 miR-16 抑制剂后, 小鼠出现了前列腺增生。据此, 作者经体内实验证明了 miR-15a 和 miR-16 与前列腺癌明确的相关性。

[ 侯 晋 摘译, 陈涛涌 审阅. Bonci D, Coppola V, Musumeci M, *et al.* Nat Med, 2008, 14( 11 ): 1271-1277. ]