

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.04.004

· 研究快报 ·

## 紫杉醇序贯吉非替尼对三维培养非小细胞肺癌细胞的抑制作用及其机制

鞠立霞<sup>1</sup>,周彩存<sup>2</sup>(1. 同济大学附属上海市肺科医院 中西医结合科,上海 200433; 2. 同济大学附属上海市肺科医院 肿瘤科,上海 200433)

**[摘要]** **目的:**探讨序贯或联合吉非替尼(gefitinib,G)和紫杉醇(paclitaxel,P)对三维细胞模型中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC)的抑制作用及其机制。**方法:**采用超低黏附表面细胞培养板培养人 NSCLC 细胞株 A427、Calu-3,使其形成三维细胞模型;分别采用磺酸罗丹明 B(sulforhodamine B,SRB)、Cell Titer-Blue 法检测紫杉醇序贯吉非替尼(P-G)、吉非替尼序贯紫杉醇(G-P)及紫杉醇联合吉非替尼(P+G)处理对贴壁和三维培养细胞增殖的抑制作用,流式细胞术检测细胞周期,Western blotting 检测细胞中 EGFR 和 Akt 总蛋白及其磷酸化的水平。**结果:**单层细胞培养时,P-G、G-P 和 P+G 处理后,A427 细胞的存活率分别为(39.5±0.07)%、(57.7±0.03)%和(53.7±0.05)%,Calu-3 细胞的存活率分别为(23.9±0.02)%、(58.2±0.05)%和(48.8±0.07)%,以 P-G 的抑制作用最强( $P<0.05$ );三维细胞模型中,P-G、G-P 和 P+G 处理后,A427 细胞的存活率分别为(19.9±2.89)%、(43.2±8.64)%和(36.6±9.79)%,Calu-3 细胞的存活率分别为(10.2±0.76)%、(50.0±3.45)%和(31.4±6.15)%,也以 P-G 的抑制作用最强( $P<0.05$ );而且,P-G 对这两细胞的抑制作用,三维培养细胞显著强于单层培养细胞( $P<0.05$ )。P-G 治疗可提高 subG<sub>1</sub> 期细胞比例,并诱导细胞阻滞在 G<sub>1</sub> 期;P-G 治疗可明显下调三维培养细胞中磷酸化 Akt 和磷酸化 EGFR 的水平。**结论:**三维细胞模型中,P-G 较 P+G 或 G-P 对 NSCLC 细胞的增殖有更强的抑制作用,可能与细胞周期阻滞和磷酸化 Akt、EGFR 水平下调有关。

**[关键词]** 非小细胞肺癌;EGFR-TKI;紫杉醇;吉非替尼;三维细胞模型

**[中图分类号]** R734.2; R730.51; R730.53 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2012)04-0363-06

## Inhibitory effect of paclitaxel followed by gefitinib on three-dimensional non-small cell lung cancer cell lines and its mechanism

JU Li-xia<sup>1</sup>, ZHOU Cai-cun<sup>2</sup>(1. Department of Integrated Medicine, Affiliated Shanghai Pulmonary Hospital of Tongji University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Oncology, Affiliated Shanghai Pulmonary Hospital of Tongji University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the inhibitory effect and mechanism of sequential or combined treatment of gefitinib (G) and paclitaxel (P) on three-dimensional non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines. **Methods:** The human NSCLC cell lines A427 and Calu-3 were cultured in the ultralow attachment plates and the three-dimensional cell clusters were formed; the inhibitory effect of paclitaxel followed by gefitinib (P-G), gefitinib followed by paclitaxel (G-P), and paclitaxel combined with gefitinib (P+G) on the monolayer and three-dimensional cell lines were detected using sulforhodamine B (SRB) and Cell Titer-Blue assay, respectively; the cell cycle was detected by flow cytometry; and the expression of total EGFR and Akt protein and their phosphorylation were detected using Western blotting. **Results:** In the monolayer cells, the survival rates of A427 cells in the group of P-G, G-P, and P+G were (39.5±0.07)%, (57.7±0.03)% and (53.7±0.05)% respectively. Those of Calu-3 cells in the group of P-G, G-P and P+G were (23.9±0.02)%, (58.2±0.05)% and (48.8±0.07)% respectively. The inhibitory effect of P-G was the strongest ( $P<0.05$ ). In the three-dimensional cells, the survival rates of A427 cells in the group of P-G, G-P and P+G were (19.9±

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 30873023);同济大学青年优秀人才培养计划项目(No. 1511219011)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30873023), and the Program for Young Excellent Talents in Tongji University (No. 1511219011)

**[作者简介]** 鞠立霞(1978-),女,吉林省长春市人,博士,主治医师,主要从事肺癌的个体化治疗。E-mail:jvlxia@126.com

**[通信作者]** 鞠立霞(JU Li-xia, corresponding author),E-mail:jvlxia@126.com

**[网络出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20120727.1107.005.html>

2.89)% , ( 43.2 ± 8.64 )% and ( 36.6 ± 9.79 )% respectively. Those of Calu-3 cells in the group of P-G, G-P and P + G were ( 10.2 ± 0.76 )% , ( 50.0 ± 3.45 )% , ( 31.4 ± 6.15 )% respectively. The inhibitory effect of P-G was the strongest (  $P < 0.05$  ). In addition, the inhibitory effects of P-G on A427 and Calu-3 in the three-dimensional cells were stronger than those in the monolayer cells (  $P < 0.05$  ). The sequence of P-G resulted in an increase of subG<sub>1</sub> proportion and arrested monolayer cells in G<sub>1</sub> phase. The phosphorylation of EGFR and Akt was decreased in subsequent exposure to P-G.

**Conclusion:** The sequence of P-G seems to be superior to the reverse schedule or combination in the inhibition of proliferation of NSCLC cells, based on the factors of G<sub>1</sub> arrest and the decrease of phosphorylation of Akt and EGFR in three-dimensional cells.

[ **Key words** ] non-small cell lung cancer; EGFR-TKI; paclitaxel; gefitinib; three-dimensional cell model

[ Chin J Cancer Biother, 2012, 19(4): 363-368 ]

单层细胞培养技术所取得的研究结果与体内实验结果不相符合,因为细胞在体外环境中增殖,逐渐丧失了原有的性状。动物实验完全在体内进行,由于体内多种因素的制约,以及体内和外界环境相互影响而变得复杂化,难以研究单一过程。另外,动物实验所观察到的结果,往往是最终表现,而非研究者较为关心的某个中间过程。因此,三维细胞培养技术应运而生,它使细胞能够在三维空间结构中生长、迁移,更接近于生物的体内环境<sup>[1]</sup>。吉非替尼(gefitinib, G)是表皮细胞生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI),紫杉醇(paclitaxel, P)是一种疗效肯定的有丝分裂抑制剂。吉非替尼与紫杉醇的联合用药在肿瘤的临床试验中尚未取得理想的疗效<sup>[2-3]</sup>。但 Cheng 等<sup>[4]</sup>发现,在单层培养细胞中,紫杉醇序贯吉非替尼(P-G)可获得比两者联合更好的效果,分析认为联合用药临床试验失败的原因可能与未按照 EGFR-TKI 的预测基因选择患者或两药的序贯顺序不当造成。由于三维细胞模型能模仿体内环境,可更好地反映药物在体内的真实作用,而又不受体内诸多其他因素的影响,本课题建立非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)细胞三维培养模型,观察和比较紫杉醇和吉非替尼不同序贯顺序和联合用药方案对 NSCLC 细胞的抑制效果,并探讨其可能的作用机制,为探索该两药最佳的临床试验序贯用药方案,从而为取得理想的临床试验疗效提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株和主要试剂

EGFR 阳性的 NSCLC 细胞株 A427 和 Calu-3 由加拿大麦吉尔大学癌症药物研究实验室提供,细胞均置于含 10% 胎牛血清、10 mmol/L HEPES、2 mmol/L L-谷氨酰胺和抗生素的 DMEM 培养基中传

代培养。吉非替尼购自 Astra Zeneca 公司,紫杉醇购自 Bristol-Myers Squibb 公司。DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、磺酰罗丹明 B(sulforhodamine B, SRB)、Cell Titer-Blue 试剂购自 Wisent St Bruno 公司,EGFR、Akt、p-EGFR、p-Akt 购自 CST 公司。流式细胞仪购自 Beckman Coulter 公司,超低黏附力细胞培养板购自 Corning 公司。

### 1.2 三维细胞模型的构建

Corning 公司的超低黏附表面细胞培养板是一种通过共价结合亲水性的和带中性电荷的水凝胶的培养板,由于蛋白质和其他生物大分子是通过疏水或离子相互作用被动吸附于聚苯乙烯表面的,故该培养板的水凝胶表面通过抑制非特异性的固定来抑制细胞黏附<sup>[5-6]</sup>。采用 Corning 的 6 孔或 96 孔超低黏附细胞培养板,每孔分别加入 2 ml 或 200  $\mu$ l、密度为  $5 \times 10^4$  / ml 的 A427 或 Calu-3 细胞悬液,24 h 后细胞呈球形生长,且状态良好,即可作为三维细胞培养模型。

### 1.3 SRB 法检测吉非替尼和紫杉醇对单层细胞生长的抑制作用

取对数生长期的 A427 和 Calu-3 细胞,制成密度为  $5 \times 10^4$  / ml 的细胞悬液,按 100  $\mu$ l/孔将细胞悬液铺于 96 孔板,设定无药对照孔和空白对照孔,培养 24 h 后,各孔分别加入 10 % DMEM 培养液配制的相应浓度的药物 100  $\mu$ l。吉非替尼终浓度为 0.2、0.39、0.78、1.56、3.125、6.25、12.5、25、50、100  $\mu$ mol/L,紫杉醇的终浓度为 0.2、0.39、0.78、1.56、3.125、6.25、12.5、25、50、100 nmol/L。药物处理后,在 37  $^{\circ}$ C 下孵育 2 h,每孔加入三氯乙酸固定细胞,风干,再加入 4 g/L 的 SRB 100  $\mu$ l,孵育 30 min 后用乙酸清洗 5 次,最后加入 Tris 碱(10 mmol/L) 100  $\mu$ l 摇匀震荡 5 min,用 Bio-Rad 公司酶联仪检测波长 492 nm 处的 D 值。运用 GraphPad Prism 软件(GraphPad Software Inc, San Diego, CA)和 S 形剂量反应曲线计算 50% 细胞死亡的药物浓度(IC<sub>50</sub> 值)。

实验设联合用药(P+G)组,按吉非替尼和紫杉醇的 $IC_{50}$ 同时加入两药,共同孵育96 h;紫杉醇序贯吉非替尼(P-G)组,先加紫杉醇孵育48 h,再加入吉非替尼继续孵育48 h;吉非替尼序贯紫杉醇(G-P)组,先加吉非替尼孵育48 h,再加入紫杉醇继续孵育48 h。每组均设3个复孔,实验重复3次。

#### 1.4 Cell Titer-blue 法检测三维细胞的生长

A427 和 Calu-3 细胞在超低黏附表面细胞培养板中培养24 h后已呈球形生长,按1.3中的分组用药方案加入吉非替尼和紫杉醇,继续孵育72 h;序贯给药组,前药加入后36 h加后药,继续孵育36 h。向药物处理后的细胞中加入Titer-blue试剂,37℃孵育2 h,应用Gemini XPS 荧光酶标仪(590EX/600EM)分析。

#### 1.5 Western blotting 法检测吉非替尼和紫杉醇对信号蛋白的影响

在A427和Calu-3细胞三维模型接受吉非替尼和紫杉醇处理后,用RIPA裂解液裂解,提取细胞总蛋白,采用Bradford法检测总蛋白浓度(用牛血清白蛋白作为标准品)。总蛋白经SDS-PAGE分离,然后转移至PVDF膜,丽春红染料染色,5%脱脂奶粉PBST室温封闭1 h,分别加EGFR、磷酸化EGFR单抗(1:200)和Akt、p-Akt、ERK、p-ERK单抗(1:500)4℃孵育过夜;将膜用PBST洗3次,每次10 min;加入荧光二抗孵育1 h,再次将膜用PBST洗3次,每次10 min,应用Odyssey红外成像系统检测蛋白表达水平。以组成型表达蛋白 $\beta$ -actin做对照,并测定其相应的灰度值。

#### 1.6 流式细胞术检测 A427 和 Calu-3 细胞的细胞周期

分别按每孔 $1 \times 10^6$ 个细胞数将细胞加于6孔板中,37℃孵育24 h形成三维细胞模型后,按分组用药方案分别加入吉非替尼和紫杉醇,处理48 h后,收集细胞,PBS洗2遍。按Annexin V-PE试剂盒操作步骤染色,用流式细胞仪检测细胞周期。

#### 1.7 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 17.0统计软件,组间差异比较采用 $t$ 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 吉非替尼和紫杉醇序贯或联合处理对单层 A427 和 Calu-3 细胞增殖能力的影响

SRB法检测结果显示,吉非替尼对A427和Calu-3细胞增殖抑制的 $IC_{50}$ 值分别为( $9.51 \pm 1.38$ )

和( $5.62 \pm 0.92$ ) $\mu\text{mol/L}$ ;紫杉醇的 $IC_{50}$ 值分别为( $9.25 \pm 0.92$ )和( $1.22 \pm 0.69$ ) $\text{nmol/L}$ 。对A427细胞株,P-G处理后细胞存活率为( $39.5 \pm 0.07$ )%,P+G处理后细胞存活率为( $53.7 \pm 0.05$ )%,G-P处理后细胞的存活率为( $57.7 \pm 0.03$ )%,P-G处理对细胞生长的抑制效果明显强于后两者( $P < 0.05$ )。对Calu-3细胞株,P-G处理后细胞存活率为( $23.9 \pm 0.02$ )%,P+G处理后细胞存活率为( $48.8 \pm 0.07$ )%,G-P处理后细胞存活率为( $58.2 \pm 0.05$ )%,P-G处理对细胞生长的抑制效果明显强于另外两用药方案( $P < 0.05$ ,图1)。结果提示,对单层A427和Calu-3细胞,P-G抑制细胞增殖的能力最强。

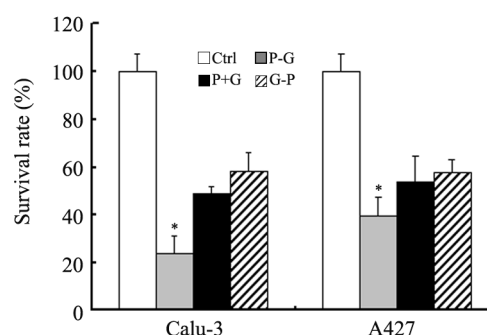


图1 序贯或联合紫杉醇与吉非替尼对贴壁A427、Calu-3细胞增殖的影响

Fig. 1 Effects of sequential or combined paclitaxel and gefitinib on monolayer A427 and Calu-3 cells

P-G: Paclitaxel followed by gefitinib; P+G: Paclitaxel combined with gefitinib; G-P: Gefitinib followed by paclitaxel  
\*  $P < 0.05$  vs G-P or P+G

### 2.2 序贯或联合吉非替尼和紫杉醇对三维培养 A427 和 Calu-3 细胞增殖能力的影响

A427 和 Calu-3 细胞在超低黏附培养板中形成了三维细胞模型(图2)。吉非替尼对A427和Calu-3细胞增殖抑制的 $IC_{50}$ 值分别为( $58.18 \pm 0.39$ )和( $24.17 \pm 0.92$ ) $\mu\text{mol/L}$ ;紫杉醇的 $IC_{50}$ 值分别为( $38.46 \pm 0.46$ )和( $16.95 \pm 0.18$ ) $\text{nmol/L}$ 。对A427细胞株,P-G处理后细胞存活率为( $19.9 \pm 2.89$ )%,P+G处理后细胞的存活率为( $36.6 \pm 9.79$ )%,G-P处理后细胞的存活率为( $43.2 \pm 8.64$ )%,P-G的增殖抑制效果明显强于后两者( $P < 0.05$ )。对Calu-3细胞株中,P-G处理后细胞存活率为( $10.2 \pm 0.76$ )%,P+G处理后细胞存活率为( $31.4 \pm 6.15$ )%,G-P处理后细胞存活率为( $50.0 \pm 3.45$ )%,P-G处理后细胞的生长抑制效果明显强于后两者( $P < 0.05$ ,图3)。结果提

示,对三维培养的 A427 和 Calu-3 细胞中,P-G 抑制细胞增殖的能力最强。

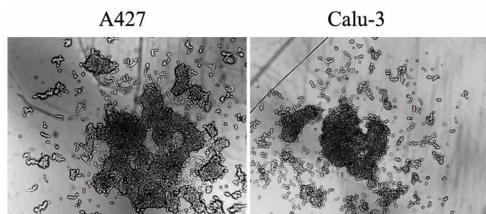


图 2 A427 和 Calu-3 的三维细胞模型( ×100 )

Fig. 2 Three-dimensional model of A427 and Calu-3 cells ( ×100 )

### 2.3 序贯或联合吉非替尼和紫杉醇对三维培养细胞的细胞周期的影响

细胞周期检测结果(表 1)显示,吉非替尼将 A427 和 Calu-3 细胞阻滞在 G<sub>1</sub> 期,紫杉醇将 A427 和 Calu-3 细胞阻滞在 G<sub>2</sub>/M 期;P-G 时细胞周期变为阻滞在 G<sub>1</sub> 期,而 G-P 时细胞周期阻滞在 G<sub>2</sub>/M

期。结果同时提示,P-G 组 subG<sub>1</sub> 期细胞比例明显增加,说明其导致细胞凋亡的比例明显升高。

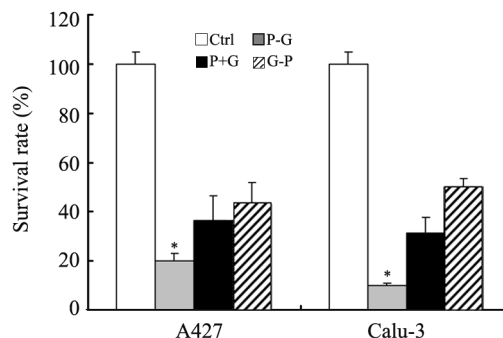


图 3 序贯或联合紫杉醇与吉非替尼对三维培养 A427、Calu-3 细胞增殖的影响

Fig. 3 Effects of sequential or combined paclitaxel and gefitinib on three-dimensional A427 and Calu-3 cells

P-G: Paclitaxel followed by gefitinib; P+G: paclitaxel combined with gefitinib; G-P: Gefitinib followed by paclitaxel  
\* P < 0.05 vs G-P or P+G

表 1 吉非替尼和紫杉醇对 A427 和 Calu-3 细胞周期分布的影响( % )

Tab.1 Effects of gefitinib and paclitaxol on cell cycle distribution of A427 and Calu-3 cells ( % )

Treatment	SubG <sub>1</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub> /M	S
A427				
Control	2.43 ± 1.54	51.43 ± 7.20	14.83 ± 3.62	33.75 ± 3.59
G	8.79 ± 1.85	81.36 ± 1.40	8.38 ± 0.11	10.26 ± 1.29
P	12.16 ± 2.26	55.85 ± 4.96	14.58 ± 2.80	29.57 ± 2.16
P-G	52.43 ± 5.60*	75.58 ± 1.98	13.29 ± 0.40	11.13 ± 1.58
P+G	40.51 ± 2.54	62.49 ± 1.36	22.37 ± 1.56	15.14 ± 2.91
G-P	20.53 ± 4.20	40.13 ± 0.28	48.59 ± 1.40*	11.28 ± 1.68
Calu-3				
Control	2.92 ± 0.17	55.57 ± 1.70	15.66 ± 1.60	28.77 ± 3.30
G	7.78 ± 1.68	73.77 ± 1.85	12.44 ± 0.17	13.80 ± 2.04
P	12.05 ± 3.28	33.57 ± 2.40	51.02 ± 0.75	15.41 ± 1.65
P-G	27.42 ± 1.13*	74.20 ± 1.70	12.09 ± 0.98	13.71 ± 0.72
P+G	18.81 ± 1.24	85.50 ± 1.13	5.44 ± 0.04	9.05 ± 1.16
G-P	19.41 ± 1.02	62.46 ± 4.23	23.54 ± 3.82	14.00 ± 0.41

\* P < 0.05 vs other treatment groups

### 2.4 序贯或联合吉非替尼和紫杉醇对三维培养细胞的 EGFR 下游信号通路的影响

结果如图 4 所示,P-G 或 P+G 处理三维培养 A427、Calu-3 细胞,均可使 p-EGFR 和 p-Akt 有所下

降,但 P-G 使 EGFR 下游信号分子磷酸化水平下降得更明显。由此说明,P-G 下调三维培养 A427、Calu-3 细胞的 EGFR 及其下游信号分子 Akt 的能力最强。

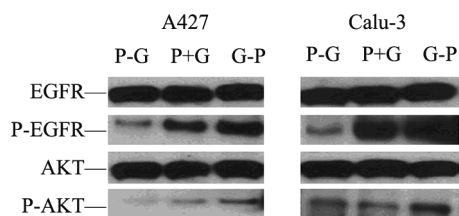


图4 序贯或联合紫杉醇和吉非替尼对三维培养 A427、Calu-3 细胞中 EGFR 及 Akt 表达的影响

Fig. 4 Effects of sequential or combined paclitaxel and gefitinib on EGFR and Akt expression in three-dimensional A427 and Calu-3 cells

### 3 讨论

铂类为基础的双药化疗是晚期 NSCLC 的主要治疗措施。但数据表明,化疗疗效极为有限,亟需更好的治疗策略用于晚期 NSCLC 的治疗。吉非替尼是可逆性的 EGFR-TKI, INTEREST 临床试验显示,在非选择的 NSCLC 中,吉非替尼作为二线治疗,疗效不低於紫杉醇。但是吉非替尼与紫杉醇的联合用药在临床试验中并未取得理想的疗效<sup>[7]</sup>。在 INTACT-1 和 INTACT-2 临床试验中,吉非替尼联合顺铂 + 吉西他滨方案或联合紫杉醇 + 卡铂方案,联合用药并未取得比单纯双药化疗更好的临床疗效<sup>[2,3]</sup>。另外,在 TALENT 和 TRIBUTE 试验中,应用厄洛替尼联合顺铂 + 吉西他滨方案或联合紫杉醇 + 卡铂方案的结果也显示,联合用药未延长患者的生存时间<sup>[8,9]</sup>。很多学者开始深入思考疗效不理想是否由其联合或序贯用药顺序所造成。

三维培养细胞药物实验体系模拟药物在体内的真实环境,而又不受体内诸多其他因素的影响,可观察到近似于体内的药理和药效,以此模型研究新药可以减少动物试验,降低开发成本<sup>[10-11]</sup>。目前国内对三维培养细胞模型的应用还较少,主要集中在细胞建模,如徐强等<sup>[12]</sup>采用 I 型胶原和细胞外基质胶建立胰腺癌三维细胞模型,发现能更好地模拟体内肿瘤细胞的生长状况。王萍等<sup>[13]</sup>通过倒挂悬滴式的培养方法构建内皮细胞三维芽生模型,发现内皮细胞团在纤维胶中能形成明显的管腔样结构,认为该方法能成为体外观察管腔形成的有效方法。张恒等<sup>[14]</sup>采用三维胶原构建细胞模型,发现原代肺腺癌组织在体外立体生长情况良好,并且保留了侵袭性。

本课题观察了三维培养的 NSCLC A427、Calu-3 细胞模型中联合或序贯吉非替尼和紫杉醇对细胞增

殖的影响,发现在三维细胞模型中吉非替尼和紫杉醇的 IC<sub>50</sub> 较单层细胞中明显升高,说明三维模型更接近于体内环境。比较不同细胞模型中各用药方案抑制细胞增殖的强度,在单层细胞模型中,P-G 用药方案对两种细胞的抑制作用最强,在三维细胞模型中,也是 P-G 方案的抑制作用最强。另外还可以发现,对 Calu-3, P-G、P + G 组对细胞的抑制力在三维细胞模型中明显强于单层细胞 ( $P < 0.05$ ); 对 A427, P-G 组对细胞的抑制力在三维细胞模型中也明显强于单层细胞 ( $P < 0.05$ )。结果提示,P-G 序贯方案对两种 NSCLC 细胞增殖的抑制作用,不仅分别在三维和贴壁培养模型中强度最大,而且在三维模型中的强度显著强于单层模型。本研究结果同目前临床试验的结果较为一致,说明三维细胞模型似乎更能体现体内的真实情况。细胞周期分析结果显示,P-G 对细胞周期的阻滞更明显;P-G 较 G-P 或 P + G 可更明显降低 EGFR 下游信号分子 Akt 的磷酸化水平。这些结果一方面说明紫杉醇序贯吉非替尼具有更好的抑瘤效果,同时也显示了三维细胞模型的结果较符合临床效果,这种模型更接近于人体,是一种方便可行的体内实验替代模型。

吉非替尼是 EGFR-TKI 类靶向治疗的代表性药物之一,其主要的机制是通过抑制 EGFR 的磷酸化而阻止信号下传,诱导细胞凋亡;其对细胞周期的作用是诱导 G<sub>1</sub> 期阻滞<sup>[15]</sup>。有丝分裂是紫杉醇介导的细胞毒作用的关键<sup>[16]</sup>。暴露于吉非替尼首先诱导细胞处于 G<sub>1</sub> 期阻滞,从而使其免受后续紫杉醇介导的细胞毒作用;而 P-G 处理时,紫杉醇将细胞周期阻滞在 G<sub>2</sub>/M 期<sup>[17]</sup>后,细胞的繁殖受到抑制,而后续使用的吉非替尼又使残存细胞的细胞周期阻滞在 G<sub>1</sub> 期,因而造成 P-G 对细胞的生长抑制明显强于 G-P。本研究的结果与 Mahaffey 等<sup>[18]</sup>的研究相一致,他们的研究也发现紫杉醇序贯特罗凯可明显提高 subG<sub>1</sub> 期细胞数量。

紫杉醇能激活细胞生存信号,如 MEK-ERK 和 PI3K-Akt 通路<sup>[19-20]</sup>。因此,先给予紫杉醇处理后,细胞中的磷酸化 Akt 升高,接着吉非替尼作用可使磷酸化 Akt 明显下降<sup>[21]</sup>。但如果先给予吉非替尼,使磷酸化 Akt 下调,之后紫杉醇的作用却使磷酸化 Akt 升高,造成细胞生存信号增强。所以,本研究发现,P-G 较 G-P 更明显降低 Akt 的磷酸化水平。本研究同样发现,磷酸化 EGFR 呈现出与磷酸化 Akt 相似的变化,可能由于两者为上下游信号关系,但其中具体机制还有待进一步探讨。

尽管目前几个临床试验,如 INTACT-1、

INTACT-2、TALENT 和 TRIBUTE 的结果显示,吉非替尼联合紫杉醇未延长患者的生存时间<sup>[2-3,6-7]</sup>,但本研究发现,在三维细胞模型中,通过改变序贯或联合用药的顺序,P-G 具有更好的疗效。近期的临床研究中初步证实,化疗序贯厄洛替尼作为一线治疗晚期 NSCLC 有效。研究采用吉西他滨联合顺铂或卡铂(GC),第二阶段序以厄洛替尼(GC-E)治疗,与第二阶段序以安慰剂组(GC-P)比较,GC-E 组显著改善患者无进展生存期<sup>[22]</sup>。研究结果表明,在 NSCLC 治疗中,EGFR-TKI 和细胞毒性药物联合使用的最佳顺序可能是细胞毒性药物序贯 EGFR-TKI。本研究结果还证明,三维细胞模型可以较真实地反应体内实验的结果,而且更方面、更快捷。三维细胞模型中的实验结果可以为将来的临床试验提供更为实用的数据,从而减少大量动物实验。

致谢:感谢中国国家留学生基金委的支持及加拿大麦吉尔大学 Bertrand J. Jean-Claude 教授在实验上给予的诸多帮助。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Sundstrom L, Biggs T, Laskowski A, et al. OrganDots-an organotypic 3D tissue culture platform for drug development [ J ]. *Expert Opin Drug Discov*, 2012, 7( 6 ): 525-534.
- [ 2 ] Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, et al. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small cell lung cancer: A phase III trial-INTACT 1 [ J ]. *J Clin Oncol*, 2004, 22( 5 ): 777-784.
- [ 3 ] Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, et al. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small cell lung cancer: A phase III trial-INTACT 2 [ J ]. *J Clin Oncol*, 2004, 22( 5 ): 785-794.
- [ 4 ] Cheng H, An SJ, Zhang XC, et al. In vitro sequence-dependent synergism between paclitaxel and gefitinib in human lung cancer cell lines [ J ]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011, 67( 3 ): 637-646.
- [ 5 ] Yamamoto Y, Ito A, Kato M, et al. Preparation of artificial skeletal muscle tissues by a magnetic force-based tissue engineering technique [ J ]. *J Biosci Bioeng*, 2009, 108( 6 ): 538-543.
- [ 6 ] Ito A, Jitsunobu H, Kawabe Y, et al. Construction of heterotypic cell sheets by magnetic force-based 3-D coculture of HepG2 and NIH3T3 cells [ J ]. *J Biosci Bioeng*, 2007, 104( 5 ): 371-378.
- [ 7 ] Kim ES, Hirsh V, Mok T, et al. Gefitinib versus docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer ( INTEREST ): A randomised phase III trial [ J ]. *Lancet*. 2008, 372( 9652 ): 1809-1818.
- [ 8 ] Gatzemeier U, Pluzanska A, Szczesna A, et al. Phase III study of erlotinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced non-small cell lung cancer: The tarceva lung cancer investigation trial [ J ]. *J Clin Oncol*, 2007, 25( 12 ): 1545-1552.
- [ 9 ] Herbst RS, Prager D, Hermann R, et al. TRIBUTE: A phase III trial of erlotinib hydrochloride ( OSI-774 ) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer [ J ]. *J Clin Oncol*, 2004, 23( 25 ): 5892-5899.
- [ 10 ] Göbel U. 3D cell culture systems-towards primary drug discovery platforms: An interview with Heinz Ruffner ( novartis ) and Jan Lichtenberg ( Inspiro ) [ J ]. *Biotechnol J*, 2012, 7( 7 ): 833-834.
- [ 11 ] Devolder R, Kong HJ. Hydrogels for *in vivo*-like three-dimensional cellular studies [ J ]. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2012. [ Epub ahead of print ]
- [ 12 ] 徐强, 胡亚, 廖泉, 等. 胰腺癌细胞在二维和三维培养系统中的生长特性研究 [ J ]. *中国普外基础与临床杂志*, 2011, 18( 1 ): 33-38.
- [ 13 ] 王萍, 孙立, 林森森, 袁胜涛. 内皮细胞三维培养芽生模型的构建 [ J ]. *中国药科大学学报*, 2012, 43( 1 ): 60-63.
- [ 14 ] 张恒, 陈胜喜, 张春芳等. 原代肺腺癌组织的三维培养 [ J ]. *肿瘤*, 2008, 28( 12 ): 1095-1098.
- [ 15 ] Lu Y, Liu P, Van den Bergh F, et al. Modulation of gene expression and cell-cycle signaling pathways by the EGFR inhibitor gefitinib ( Iressa ) in rat urinary bladder cancer [ J ]. *Cancer Prev Res ( Phila )*, 2012, 5( 2 ): 248-259.
- [ 16 ] Zhang HL, Ruan L, Zheng LM, et al. Association between class III  $\beta$ -tubulin expression and response to paclitaxel/vinorelbine-based chemotherapy for non-small cell lung cancer: A meta-analysis [ J ]. *Lung Cancer*, 2012. [ Epub ahead of print ].
- [ 17 ] Carney BK, Caruso Silva V, Cassimeris L. The microtubule cytoskeleton is required for a G2 cell cycle delay in cancer cells lacking stathmin and p53 [ J ]. *Cytoskeleton ( Hoboken )*, 2012, 69( 5 ): 278-289.
- [ 18 ] Mahaffey CM, Davies AM, Lara PN Jr, et al. Schedule-dependent apoptosis in K-ras mutant non-small cell lung cancer cell lines treated with docetaxel and erlotinib: Rationale for pharmacodynamic separation [ J ]. *Clin Lung Cancer*, 2007, 8( 9 ): 548-553.
- [ 19 ] Mac Keigan JP, Taxman DJ, Hunter D, et al. Inactivation of the antiapoptotic phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway by the combined treatment of taxol and mitogen-activated protein kinase kinase inhibition [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8( 7 ): 2091-2099.
- [ 20 ] McDaid HM, Horwitz SB. Selective potentiation of paclitaxel ( taxol )-induced cell death by mitogen-activated protein kinase kinase inhibition in human cancer cell lines [ J ]. *Mol Pharmacol*, 2001, 60( 2 ): 290-301.
- [ 21 ] Pick A, Wiese M. Tyrosine kinase inhibitors influence ABCG2 expression in EGFR-positive MDCK BCRP cells via the PI3K/Akt signaling pathway [ J ]. *Chem Med Chem*, 2012, 7( 4 ): 650-662.
- [ 22 ] Mok TS, Wu YL, Yu CJ et al. Randomized, placebo-controlled, phase II study of sequential erlotinib and chemotherapy as first-line treatment for advanced non-small-cell lung cancer [ J ]. *J Clin Oncol*, 2009, 27( 30 ): 5080-5087.

[ 收稿日期 ] 2012 - 05 - 18

[ 修回日期 ] 2012 - 07 - 10

[ 本文编辑 ] 王莹