

Iressa 与顺铂联合抑制舌鳞癌细胞增殖的实验研究

孙传政^{1,2}, 陈福进¹, 曾木圣¹, 李晓江², 宋立兵¹, 李满枝¹, 曾宗渊¹, 隋军²

(1. 华南肿瘤学国家重点实验室//中山大学肿瘤防治中心头颈科, 广东 广州 510060;

2. 昆明医学院第三附属医院//云南省肿瘤医院头颈科, 云南 昆明 650118)

摘要:【目的】探讨 EGFR 靶向治疗药物 Iressa 与顺铂联用对舌鳞癌细胞增殖的抑制作用。【方法】采用 MTT 的方法检测 Iressa 与顺铂联用对舌鳞癌细胞系 Tscga 和 Tca8113 抑制作用的效率。【结果】Iressa 抑制 Tscga 和 Tca8113 细胞增殖的 IC₅₀ 值分别为 18.03 μmol/L 和 29.98 μmol/L ($P=0.002$); Iressa 与顺铂联用加强了对舌鳞癌细胞系 Tscga、Tca8113 的增殖抑制, 而且当 Iressa 提前 24 h 或 48 h 使用时, 这种协同作用更加明显。【结论】Iressa 可抑制舌鳞癌细胞系 Tscga 和 Tca8113 的增殖, 与顺铂联用可协同抑制 Tscga 和 Tca8113 的增殖, 这种抑制作用具有浓度和顺序依赖性。

关键词:舌鳞状细胞癌; 吉非替尼; 顺铂

中图分类号: R739.86

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2008)01-0038-04

Iressa in Combination with Cisplatin on Inhibiting Tongue Squamous Cell Carcinoma

SUN Chuan-zheng^{1,2}, CHEN Fu-jin², ZENG Mu-sheng², LI Xiao-jiang¹,

SONG Li-bing², LI Man-zhi², ZENG Zong-yuan², SUI Jun¹

(1. Department of Head and Neck Surgery, The Third Affiliated Hospital, Kunming Medical College, Kunming 650118, China; 2. State Key Laboratory of Oncology in Southern China//Department of Head and Neck Surgery, Cancer Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objectives】To evaluate the inhibiting effects of Iressa in combination with cisplatin (DDP) on tongue squamous cell carcinoma lines Tscga and Tca8113. 【Methods】The effect of Iressa in combination with cisplatin on tongue squamous cell carcinoma lines (Tscga and Tca8113) was detected by MTT assay. 【Results】The IC₅₀s of Iressa on Tscga and Tca8113 cell lines were 18.03 μmol/L and 29.98 μmol/L, respectively ($P = 0.002$). Synergistic inhibiting effects were found when Iressa in combination with cisplatin, especially Iressa used before the cisplatin 24 h or 48 h. 【Conclusions】Iressa can inhibit the proliferation of tongue squamous cell carcinoma lines by the manner of dose-dependent and sequence-dependent. Synergistic inhibiting effects were found when Iressa in combination with cisplatin.

Key words: tongue squamous cell carcinoma; iressa; cisplatin

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008,29(1):38-41,45]

头颈鳞癌的综合治疗在过去的 30 年里尽管取得一些进展,但其治愈率仅从 54%提高到 59%^[1],尤其是局部晚期、复发、转移或第二原发癌的患者预后更差,这就需要积极探索新的治疗模式。近来

以表皮生长因子受体-酪氨酸激酶(epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase, EGFR-TK)为靶点的靶向治疗不断取得进展^[2,3]。EGFR 为 170 KD 的跨膜受体,当它与配体结合后,可引起细胞

收稿日期:2007-01-03

基金项目:广东省科技计划项目(2KM04505S)

作者简介:孙传政(1971-),湖北随州人,博士生,主治医师,现在昆明医学院第三附属医院(云南省肿瘤医院)头颈科工作;陈福进,通讯作者,教授, E-mail: scz007@126.com

的生长、增殖和分化,在正常的细胞生长过程中发挥重要的调控作用^[4];其在头颈部鳞癌中的过表达与肿瘤的分化程度低、晚期、降低的无复发生存率和总生存率相关,EGFR 高表达的肿瘤恶性程度高、侵袭性强,这些特性 EGFR 在肺癌中的作用相似^[5]。EGFR 在头颈癌中的表达率国外报道为 80%~100%,国内报道在 40%~60%。针对 EGFR 的靶向治疗药物其中一类是可口服的小分子的化合物(如 Iressa,吉非替尼)。研究发现 Iressa 可以诱导细胞周期阻滞和凋亡、减少肿瘤新生血管的形成和抑制转移、与放化疗联用可以发挥协同作用^[6],因此积极探索 EGFR-TK 抑制剂在头颈肿瘤治疗中的价值具有一定的现实意义。

1 材料和方法

1.1 细胞株

舌鳞癌细胞株 Tca8113 和 Tscga 分别由上海交通大学附属第九人民医院和武汉大学口腔医院建系,由中山大学肿瘤防治中心华南肿瘤学国家重点实验室收藏提供。

1.2 细胞培养

Tca8113 和 Tscga 均置于 RPMI1640 培养基(含 100 mL/L 胎牛血清、链霉素 0.1 mg/mL)中,在 37 ℃,饱和湿度,含体积分数 5%CO₂ 的培养箱中培养。定期换液,倒置相差显微镜下观察,待细胞接近长满培养瓶底时(约 2~3 d),用 0.25%胰蛋白酶消化传代。胎牛血清为杭州四季青公司产品;倒置相差显微镜为 Olympus 产品。

1.3 Iressa 和 DDP 处理细胞

Iressa (吉非替尼)为 AstraZeneca 公司产品; cisplatin(顺铂,DDP)为 Faulding 公司产品。将在培养箱中培养 24 h、细胞已贴壁生长的 96 孔板取出,吸出每孔内的培养基,加入含不同浓度 Iressa 的 RPMI1640 条件培养基,Iressa 的浓度为 4.6、9.1、16.2 μmol/L,DDP 的浓度为 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 μmol/L,每孔总体积 200 μL,按时间顺序加药。每一浓度设 3 个复孔,对照组培养基内加细胞不加药物,空白对照孔内不加细胞只加培养基,按要求加入全部药物后继续在培养箱中培养 48 h。

1.4 MTT 比色试验

溴化二甲噻唑二苯四唑氮 [3-(4,5-

dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]购自 Sigma 公司;酶标仪为 BIO-TEK 公司产品。细胞培养 44h 后加入浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL/孔,反应 4h 后吸净孔内液体,每孔加入 DMSO(二甲基亚砷,Amresco 公司产品)100 μL 振荡 10 min,上酶标仪测定波长为 570 nm 时的吸光值。实验重复 3 次,取 3 次实验结果的平均值作为最终实验结果。以时间为横轴,细胞增殖抑制率为纵轴,绘制细胞生长曲线。按下列公式计算肿瘤细胞增殖抑制率:

$$\text{肿瘤细胞增殖抑制率} = \left(1 - \frac{\text{药物处理组 A 值} - \text{空白对照组 A 值}}{\text{细胞对照组 A 值} - \text{空白对照组 A 值}}\right) \times 100\%$$

1.5 统计方法

采用 SPSS10.0 统计软件,配对样本均数间的比较采用配对样本 *T* 检验,多个样本间均数的比较用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Iressa 单药对舌鳞癌细胞株增殖抑制作用

Iressa 单药对舌鳞癌细胞株 Tscga、Tca8113 均有明显的增殖抑制作用,这种作用呈剂量依赖性。Iressa 抑制 Tscga 和 Tca8113 细胞增殖的 IC₅₀ 值分别为 18.03 μmol/L 和 29.98 μmol/L。

2.2 Iressa 与 DDP 联用的效应

本研究发现 Iressa 与 DDP 同时联用(图 1)、Iressa 作用 24 h 后再与 DDP 联用(图 2)、Iressa 作用 48 h 后再与 DDP 联用(图 3)均加强了 Iressa 对 Tscga 的增殖抑制作用,当 Iressa 提前 24 h 或 48 h 使用时,这种协同作用更加明显;而且在每组实验中随着 Iressa 或 DDP 浓度的增加对 Tscga 的增殖抑制作用逐渐增强。

2.3 Iressa 与 DDP 联用对 Tscga 细胞系的作用

本研究发现 Iressa 与 DDP 同时联用(图 4)、Iressa 作用 24 h 后再与 DDP 联用(图 5)、Iressa 作用 48 h 后再与 DDP 联用(图 6)均加强了 Iressa 对 Tca8113 的增殖抑制作用,当 Iressa 提前 24 h 或 48 h 使用时,这种协同作用更加明显;而且在每组实验中随着 Iressa 或 DDP 浓度的增加对 Tca8113 的增殖抑制作用逐渐增强。其抑制作用曲线均与 Iressa 与 DDP 联用对舌鳞癌细胞系 Tscga

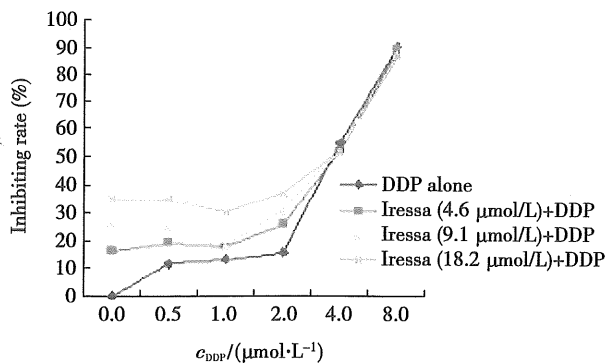


图 1 Iressa 与 DDP 同时联用对 Tssca 的增殖抑制作用 ($P < 0.001$)

Fig.1 Effect of Iressa in combination with DDP at same time on Tssca ($P < 0.001$)

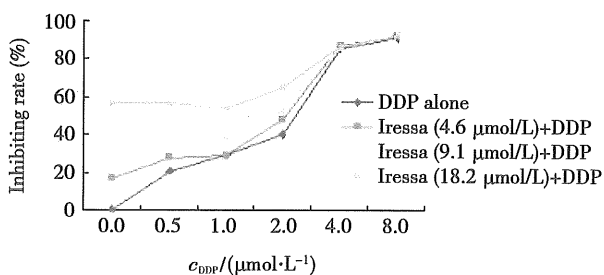


图 2 Iressa 作用 24 h 后再与 DDP 联用对 Tssca 的增殖抑制作用 ($P < 0.001$)

Fig.2 Effect of Iressa alone 24 h and then in combination with DDP on Tssca ($P < 0.001$)

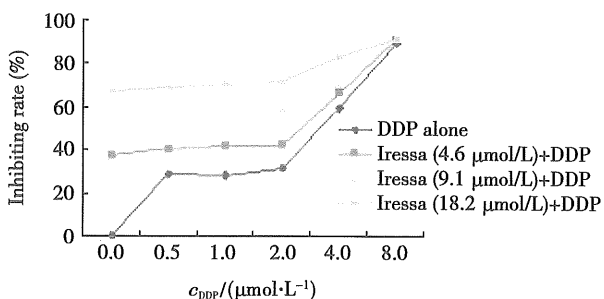


图 3 Iressa 作用 48 h 后再与 DDP 联用对 Tssca 的增殖抑制作用 ($P < 0.001$)

Fig.3 Effect of Iressa alone 48 h and then in combination with DDP on Tssca ($P < 0.001$)

的作用曲线类似。

3 讨论

由于解剖位置的关系, 所以存在一定比例的头颈鳞癌患者在确诊时已无根治性手术或放疗的机会, 而化疗的疗效又难以让人满意, 因此当针对

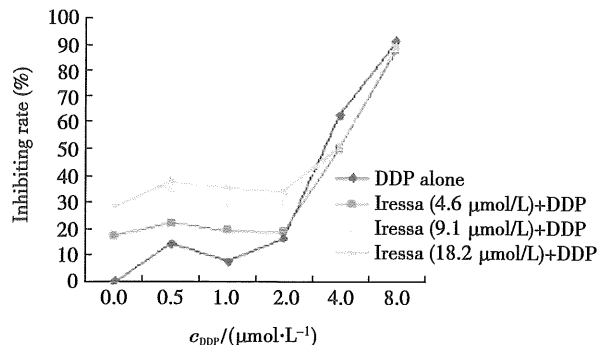


图 4 Iressa 与 DDP 同时联用对 Tca8113 的增殖抑制作用 ($P < 0.001$)

Fig.4 Effect of Iressa in combination with DDP at same time on Tca8113 ($P < 0.001$)

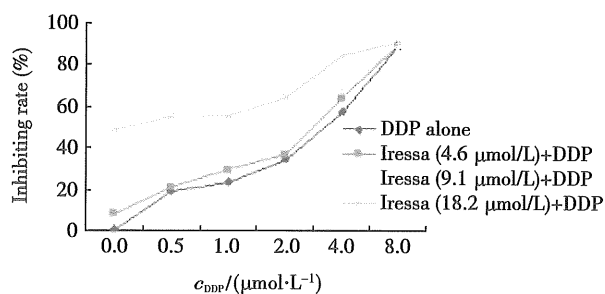


图 5 Iressa 作用 24 h 后再与 DDP 联用对 Tca8113 的增殖抑制作用 ($P < 0.001$)

Fig.5 Effect of Iressa alone 24 h and then in combination with DDP on Tca8113 ($P < 0.001$)

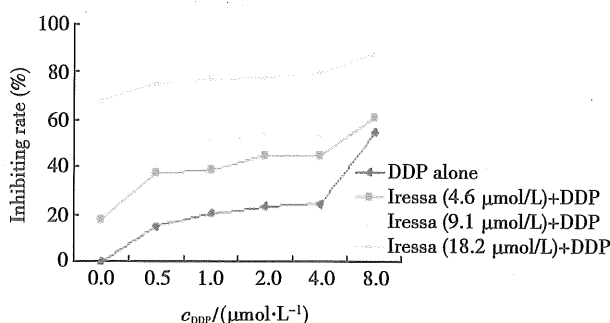


图 6 Iressa 作用 48 h 后再与顺铂联用对 Tca8113 的增殖抑制作用 ($P < 0.001$)

Fig.6 Effect of Iressa alone 48 h and then in combination with DDP on Tca8113 ($P < 0.001$)

EGFR 的靶向治疗药物 Iressa 开始用于 NSCLC 的临床研究时, 即开始了对治疗 HNSCC 的临床和基础研究。本研究发现 Iressa 单药对舌鳞癌细胞株 Tssca、Tca8113 均有明显的增殖抑制作用, 这种抑制作用呈剂量依赖性。其增殖抑制作用可能是通过以下两条途径, 即低浓度诱导 G_0/G_1 期阻滞、

高浓度诱导凋亡来完成的(另文待发),这与多位学者发现的 Iressa 抑制肺腺癌的增殖机制相一致^[7,8]。

研究发现 EGFR 外显子突变与 Iressa 治疗 NSCLC 的疗效密切相关^[2,3],所以,EGFR18~21 号外显子突变的检测可初步预测 Iressa 治疗 NSCLC 的疗效。体外重建突变 EGFR,它在 EGF 配体的诱导下和野生型 EGFR 相比,急剧地增加了抗凋亡的能力^[9];用 Iressa 或用 iRNA 技术抑制突变 EGFR,则导致肿瘤细胞迅速凋亡。对 Iressa 治疗头颈鳞癌疗效的预测的分子标记物却知之甚少^[10],目前的研究尽管发现在头颈鳞癌中存在类似 NSCLC 中 EGFR 外显子 18~21 突变的报道^[9],但还没有支持 EGFR 突变可以预测其疗效的报道,最近研究发现 EGFR 家族的其他成员以及边缘细胞(side population)可能在 Iressa 对 HNSCC 治疗的疗效方面发挥了作用^[10,11]。Tssca、Tca8113 两个舌鳞癌细胞系 EGFR 基因 18~21 号外显子除 20 号外显子存在同一位点的同一突变外,即 2361G-A, Q787Q,该突变没有导致氨基酸的改变故为无义突变,18~21 外显子未见活化突变(另文待发),这表明无活化突变的细胞系 Tssca 和 Tca8113, Iressa 仍然可以诱导其发生 G0/G1 期阻滞和凋亡,表明头颈鳞癌与 NSCLC 一样,至少 EGFR18~21 外显子的活化突变不是 Iressa 有效的唯一前提,这与大样本的 NSCLC 研究结果相一致,Kwak 等^[12,13]发现 Iressa 治疗有效者中只有 50%存在这类突变,而 EGFR 突变者中也只有 46%对 Iressa 敏感。

本研究发现 Iressa 与 DDP 联用加强了 Iressa 对 Tssca 和 Tca8113 的增殖抑制作用,而且当 Iressa 提前 24 h 或 48 h 使用时,这种协同作用更加明显。这与 Bonner 等^[7]的研究结果一致,Bonner 等将 Iressa 和放疗或 DDP-5Fu 联用也发现 Iressa 先于放疗时产生最好的效果,Iressa 和 DDP-5Fu 联用具有协同作用,当 Iressa 先于 DDP-5Fu 使用时得到最好的细胞毒性效果,进一步研究发现二者联用可以协同通过线粒体和肿瘤坏死因子受体-配体两条途径诱导肿瘤细胞的凋亡;由于 DDP-5Fu 可诱导 DNA 修复通路 DNA-PK 的上调,而 Iressa 与其联用可下调 DNA-PK 的表达,这可能与 Iressa 对化疗和放疗增敏作用有关,所以这些研究结果支持 Iressa 与 DDP-5Fu 的联用^[8]。Magne 等^[14]研究

发现 Iressa 可以增加 DDP、CBP、Taxol、Docetaxel、ADM 的抑瘤效果,Iressa 与 DDP/5-Fu 联用对头颈鳞癌细胞系的疗效具有顺序依赖性,当其先于化疗药物使用时可获得更好的效果;但这与 Zhu^[15]对肝细胞癌在荷瘤鼠进行的体内实验结果不同,他们发现当 Iressa 后于顺铂使用时可以加强化疗药物对移植瘤的增殖抑制作用,这种差异可能与不同的肿瘤细胞株类型有关。

总之,本研究发现 Iressa 可以抑制无 EGFR18~21 外显子活化突变的舌鳞癌细胞的增殖,其与 DDP 联用可以发挥协同作用,而且具有一定的顺序和浓度依赖,其作用机制和预测其在头颈鳞癌治疗中的疗效仍有待研究。

参考文献:

- [1] Wirth LJ, Haddad RI, Lindeman NI, et al. Phase I study of gefitinib plus celecoxib in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. *J Clin Oncol*, 2005,23(28):6976-6981.
- [2] Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to Gefitinib therapy [J]. *Science*, 2004,304(5676):1497-1500.
- [3] Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to Gefitinib [J]. *N Engl J Med*, 2004,350(21):2129-2139.
- [4] 徐立,张昌卿,冯凯涛,等. 肝细胞癌及癌旁肝组织 EGFR 和 EGFR vIII 的表达及其临床意义 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2006,27(4):467-471.
- [5] 张彬,熊敏. 转移力不同的肺癌细胞株对表皮生长因子和受体的表达 [J]. *中山医科大学学报*, 1996,17(3):171-176.
- [6] Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2003,21(14):2787-2799.
- [7] Bonner JA, Maihle NJ, Folven BR, et al. The interaction of epidermal growth factor and radiation in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines with vastly different radiosensitivities [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1994,9(2):243-247.
- [8] Magne N, Fischel JL, Tiffon C, et al. Molecular mechanisms underlying the interaction between ZD1839 ('Iressa') and cisplatin/5-fluorouracil [J]. *Br J Cancer*, (下转第 45 页 to page 45)