

吉非替尼(Iressa)对鼻咽癌 CNE- I 细胞系抑制作用的研究

毛中萍¹, 周翔², 冯建国³, 马胜林³ (1. 浙江省绍兴第二人民医院耳鼻喉科, 浙江 绍兴 312000; 2. 武警浙江总队杭州医院肿瘤科, 杭州 310051; 3. 浙江省肿瘤医院, 杭州 310020)

摘要:目的 研究表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂吉非替尼(Iressa)在体外对鼻咽癌 CNE- I 细胞系的抑制作用。方法 MTT 法检测 Iressa 对 CNE- I 细胞的吸光度 A_{550} 值并计算抑制率; 培养瓶克隆形成率实验; 流式细胞术检测 CNE- I 细胞在 10, 30 $\mu\text{g/mL}$ 的 Iressa 作用后 24, 48h 细胞周期和凋亡率变化。结果 MTT 数据显示 CNE- I 细胞的抑制率与 Iressa 浓度成正比, 随 Iressa 浓度升高, 抑制作用越明显, 经计算 $\text{IC}_{50} = 13.155 \mu\text{g/mL}$ 。培养瓶克隆形成率实验, 对照组克隆形成率为 $33.2 \pm 1.8\%$, 而 10 $\mu\text{g/mL}$ Iressa 组、30 $\mu\text{g/mL}$ Iressa 组均为 0, 提示 Iressa 能明显抑制 CNE- I 细胞增殖。流式细胞术分析显示 Iressa 处理 48h 使 CNE- I 细胞凋亡率明显升高, 且随浓度升高凋亡率升高越明显 ($P < 0.001$), 细胞周期结果显示 Iressa 使细胞周期 G0-G1 期比例升高, S 期和 G2-M 期比例下降, 但除 10 $\mu\text{g/mL}$ Iressa 组 G2-M 期比例下降明显以外 ($P = 0.042$), 其他各组间差异无显著性。结论 Iressa 在体外对鼻咽癌 CNE- I 细胞有显著抑制增殖和促进凋亡作用。

关键词: 鼻咽癌; 吉非替尼(Iressa); MTT 法; 流式细胞术

中图分类号: R969.4 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2006)03-0182-04

Study the effect of iressa on nasopharyngeal carcinoma CNE- I cell line

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the restraining effect of iressa, a selective small molecule EGFR tyrosine kinase inhibitor, on nasopharyngeal carcinoma CNE- I cell line. **METHODS** We tested the antiproliferative and proapoptotic activity of iressa in CNE- I cell line with MTT method and flow cytometry. **RESULTS** With different concentrations of iressa, a dose-dependent growth inhibition was observed in CNE- I cell line and IC₅₀ was 13. 155μg/mL. The cloning efficiency of the untreated control was 33. 2 ± 1. 8% and that of the cells treated with 10 μg/mL and 30 μg/mL iressa were 0. Cell cycle and apoptosis rate were detected by Flow cytometer. Compared with control untreated cells, the apoptosis rate remarkably increased after 48 hours of treatment with 10μg/mL and 30 μg/mL Iressa. **CONCLUSION** This study showed iressa has remarkably antiproliferative and proapoptotic effect on nasopharyngeal carcinoma cell line CNE- I *in vitro*. **KEY WORDS:** nasopharyngeal carcinoma; iressa; MTT method; Flow cytometry

表皮生长因子传导的信号在肿瘤的进展中如肿瘤血管生成、远处播散和抑制凋亡等过程都起了关键性作用。分子靶向药物 Iressa(ZD1839)是表皮生长因子酪氨酸激酶抑制剂,通过抑制表皮生长因子酪氨酸激酶活性抑制肿瘤细胞的生长和增殖,促进凋亡,是目前 FDA 批准进入临床的治疗对标准铂类和紫杉醇方案耐药的 非小细胞肺癌(NSCLC)的有效药物,而国外研究报道 Iressa 对头颈部鳞癌、卵巢癌、结肠癌等肿瘤细胞系具有抑制作用。本试验主要研究 Iressa 在体外对鼻咽癌细胞系 CNE- I 的促进凋亡作用。

1 材料

Iressa(易瑞沙),阿斯利康公司产品,剂型:250mg/片,用 pH 值 = 2 的稀盐酸溶解过滤,配制成 2. 5mg/mL 的药液, - 20℃ 保存,使用时用 1640 培养液配制成不同的浓度。MTT (噻唑蓝),华美生物技术有限公司产品,用 PBS 液配制成 5mg/mL 的溶液。流式细胞术使用 BD 公司 ABC 试剂盒 PI 染色,流式细胞仪为美国 BD 公司 FACSCalibur。鼻咽癌 CNE- I 细胞系传代培养于 Gibco 公司的 1640 培养液中(含 15% 小牛血清),37℃, 5% CO₂ 条件下,贴壁生长。

2 方法

2.1 MTT 法测 Iressa 对 CNE- I 细胞的抑制率

对数生长期的 CNE- I 细胞,制成单细胞悬液,按每孔 5 × 10³ 个接种于一块 96 孔板。培养 24h 后,每孔加入含 Iressa 浓度分别是 0, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80μg/mL 的培养液 200μL,每种浓度设 8 个复孔。继续培养 48h,每孔加入 5mg/mL 的 MTT 20μL,继续培养 4h,吸去原培养液,每孔加入酸化异丙醇 100μL,至 Formanza 结晶完全溶解,酶标仪测各孔吸光度值 A₅₅₀。计算细胞抑制率 = 100% × [对照组吸光值(A) - 实验组吸光值(A)] / 对照组吸光值(A)。

2.2 流式细胞术测 Iressa 作用后 CNE- I 细胞的凋亡率和细胞周期改变

对数生长期的 CNE-I细胞,制成单细胞悬液,按每瓶1.5 × 10⁵ 个接种 27 个培养瓶,培养 24h 后,随机平均分为 3 组:对照组、10μg/mL Iressa 组、30μg/mL Iressa 组。10μg/mL Iressa 组和 30μg/mL Iressa 组分别加入含 10μg/mL 和 30μg/mL 的 Iressa 的培养液 3mL,对照组为单纯培养液 3mL,继续培养。

加药后 24,48,72h 每组各拍摄 1 张倒置显微镜下照片,随机各取 3 瓶细胞消化后收集细胞悬液,1 500r/min 离心 5min 后去上液,加入 PBS 液 3mL,振荡后相同条件离心,去上液,再重复 PBS 液洗涤 1 次,去上液,体积分数为 75% 乙醇固定 24h。PI 染色前 PBS 液洗涤 2 次,去上液,BD 公司 ABC 试剂盒 PI 染色,4℃ 避光 30min,流式细胞术测细胞周期和凋亡率。

2.3 培养瓶克隆形成率

将 CNE-I细胞按每瓶 10³ 个细胞接种于 9 个培养瓶中,随机分为 3 组,每组 3 瓶。对照组加入 3mL 培养液,10μg/mL Iressa 组加入含 10μg/mL Iressa 的培养液 3mL,30μg/mL Iressa 组加入含 30μg/mL Iressa 的培养液 3mL。继续培养至长出肉眼可见的克隆,终止培养,去原培养液,PBS 液洗 2 次,甲醇 3 mL 固定 15min,去固定液,姬姆萨染色 30min,流水洗去染色液,空气中干燥。显微镜下计数大于 50 个细胞的克隆数。计算克隆形成率 = 每组平均克隆数/每瓶接种细胞数。

2.4 统计学处理

使用 SPSS 11.0 统计软件进行分析,MTT 法测得吸光度值 A₅₅₀ 的比较采用 t 检验,各组凋亡率和细胞周期,及克隆形成率采用单因素方差分析和 q 检验。

3 结果

3.1 MTT 检测结果见表 1 和图 1。

表1 Iressa 对 CNE- I 细胞的吸光度值和抑制率

Tab 1 The aborbance and inhibitory rate of iressa on CNE- I cell line

Iressa 浓度(μg/mL)	OD ₅₅₀	抑制率(%)
0	0.044 3 ± 0.006 5	0
1	0.040 1 ± 0.006 4	9. 5
5	0.041 3 ± 0.004 3	6. 7
10	0.025 1 ± 0.004 3	43. 3
15	0.017 8 ± 0.005 2	59. 8
20	0.015 8 ± 0.006 0	64. 3
30	0.006 0 ± 0.004 7	86. 5
40	0.002 0 ± 0.003 4	94. 1
50	0.002 6 ± 0.002 4	95. 5
60	0.002 6 ± 0.003 9	94. 1
80	0.001 4 ± 0.002 3	96. 8

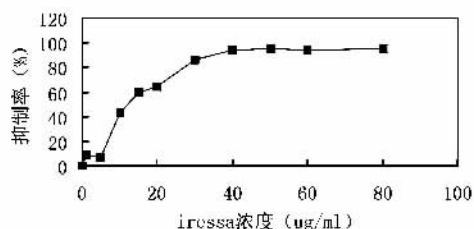


图1 不同浓度 iressa 作用 72h CNE- I 细胞抑制率

Fig 1 The inhibitory rate of different concentration of iressa on CNE- I cell after 72h incubation

根据以上数据计算 $IC_{50} = 13.155 \mu\text{g/mL}$ 。经检验当 Iressa 浓度 $\geq 10 \mu\text{g/mL}$ 时实验组吸光度值 A_{550} 与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。Iressa 浓度为 40, 50, 60, 80 $\mu\text{g/mL}$ 时, 各组间 A_{550} 无明显差别 ($P > 0.05$), 提示 Iressa 浓度 $\geq 40 \mu\text{g/mL}$ 再增加药物浓度不增加对 CNE- I 细胞的抑制率。

3.2 流式细胞测各组细胞周期和凋亡率变化见表 2, 3, 加药后不同时间拍摄各组细胞显微镜下照片。CNE- I 细胞加药后 24h 10 $\mu\text{g/mL}$ Iressa 组和 30 $\mu\text{g/mL}$ Iressa 组 G0-G1 期比例升高, 从 $(48.13 \pm 10.11)\%$ 分别升高到 $(75.72 \pm 11.06)\%$ 和 $(60.95 \pm 2.74)\%$, 但各组间比较无显著性差异 ($P = 0.071$); 10 $\mu\text{g/mL}$ Iressa 组 G2-M 期比例与对照组和 30 $\mu\text{g/mL}$ Iressa 组比较下降明显 ($P = 0.042$), 但后两组之间无明显差别 ($P > 0.05$); S 期比例各组间无明显差异 ($P > 0.05$)。加药后 24h 各组凋亡率随 Iressa 浓度升高而有所升高, 但差异无显著性 ($P > 0.05$), 加药后 48h, 10 $\mu\text{g/mL}$ Iressa 组和 30 $\mu\text{g/mL}$ Iressa 组凋亡率均明显升高 ($P < 0.001$), 以 30 $\mu\text{g/mL}$ Iressa 组升高最明显。相差显微镜下观察到加药后 24h CNE- I 细胞出现变形、颗粒加深、凋亡和坏死, 30 $\mu\text{g/mL}$ 组比 10 $\mu\text{g/mL}$ 组明显, 且随时间延长变化越明显, Iressa 处理 72h 后, 30 $\mu\text{g/mL}$ 组 CNE- I 细胞几乎全部凋亡和坏死, 可见明显细胞碎片。

表2 Iressa 处理 24h 各组 CNE- I 细胞的细胞周期

Tab 2 Cell cycle of CNE- I cell after treatment with iressa for 24h

组 别	G0-G1 期比例 (%)	G2-M 期比例 (%)	S 期比例 (%)
对照组	48.13 ± 10.11	22.38 ± 6.61	29.49 ± 3.75
10 $\mu\text{g/mL}$ Iressa 组	75.72 ± 11.06	1.22 ± 1.73	23.06 ± 9.33
30 $\mu\text{g/mL}$ Iressa 组	60.95 ± 2.74	21.26 ± 8.30	17.80 ± 11.04

表3 放疗后 24, 48h 各组凋亡率

Tab 3 Apoptosis rat of CNE- I cell after irradiation for 24, 48h

组 别	24h 凋亡率 (%)	48h 凋亡率 (%)
对照组	2.14 ± 1.04	0.77 ± 0.15
10 $\mu\text{g/mL}$ Iressa 组	3.72 ± 2.12	4.69 ± 2.40
30 $\mu\text{g/mL}$ Iressa 组	4.67 ± 3.86	48.41 ± 6.61

3.3 培养 9d, 对照组肉眼可见明显的细胞集落, 固定细胞, 姬姆萨染色后计数对照组克隆数分别为 352, 316, 327, 克隆

形成率为 $(33.2 \pm 1.8)\%$, 10 $\mu\text{g/mL}$ Iressa 组和 30 $\mu\text{g/mL}$ Iressa 组没有克隆形成, 克隆形成率均为 0。对照组与后两组比较差异明显 ($P < 0.001$)。

4 结论

Iressa 具有剂量依赖性的抑制 CNE- I 细胞增殖和生长的作用, Iressa 作用 72h 的 $IC_{50} = 13.155 \mu\text{g/mL}$, 当 Iressa 浓度为 40, 50, 60, 80 $\mu\text{g/mL}$, CNE- I 细胞抑制率在 94.1% 至 96.8% 之间, 各组间抑制率无明显差别, 再增加药物浓度不增加抑制率。培养瓶克隆形成率对照组为 $(33.2 \pm 1.8)\%$, 10 $\mu\text{g/mL}$ Iressa 组、30 $\mu\text{g/mL}$ Iressa 组均为 0, 显示 Iressa 具有很强的抑制 CNE-细胞的增殖作用, 在较低的浓度下就可以抑制 CNE- I 细胞增殖。相差显微镜下观察到加药后 24h CNE- I 细胞出现变形、颗粒加深、凋亡和坏死, 30 $\mu\text{g/mL}$ 组比 10 $\mu\text{g/mL}$ 组明显, 且随时间延长变化越明显, Iressa 处理 72h 后, 30 $\mu\text{g/mL}$ 组 CNE- I 细胞几乎全部凋亡和坏死。流式细胞分析显示 Iressa 处理 24h 使 CNE-细胞周期中的 G0-G1 期比例升高, G2-M 期和 S 期比例下降, 凋亡率升高, 但除 10 $\mu\text{g/mL}$ Iressa 组 G2-M 期比例下降明显以外 ($P = 0.042$), 各组间比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。Iressa 处理 48h 使 CNE-细胞凋亡率明显升高, 30 $\mu\text{g/mL}$ Iressa 组凋亡率达 $48.41 \pm 6.61\%$, 较 10 $\mu\text{g/mL}$ Iressa 组凋亡更明显 ($P < 0.001$)。提示 Iressa 具有抑制细胞分裂增殖和促进凋亡的作用, 高浓度的 Iressa 具有直接杀伤 CNE- I 细胞的作用。

5 讨论

许多癌基因能够编码生长因子受体或生长因子样受体蛋白, 在人类的大部分上皮源性肿瘤的发展中起重要作用。表皮生长因子受体 EGFR 酪氨酸激酶家族起到把细胞外信号转导到细胞内的作用, 增加了肿瘤细胞的增殖, 阻止凋亡, 增强了其活性、黏附性和侵袭性, EGFR 传导的信号在肿瘤的进展中如肿瘤血管生成、远处播散和抑制凋亡等过程都起了关键性作用^[1]。EGFR 的活性不仅对细胞的增殖是关键的, 而且高度表达的 EGFR 使肿瘤对荷尔蒙、化学治疗、放射治疗产生耐受^[2]。针对 EGFR 和它的信号转导的靶向治疗能抑制肿瘤细胞的增殖、血管生成和 DNA 损伤修复。而 Iressa (ZD1839) 为口服吸收的小分子酪氨酸激酶抑制剂, 其作用机制是与 ATP 竞争性地和 EGFR 的酪氨酸激酶胞内区位点结合, 抑制 EGFR 跨膜细胞表面受体上酪氨酸激酶的自身磷酸化, 阻止细胞增殖, 促进凋亡。2003 年 Iressa (ZD1839) 被美 FDA 批准治疗对标准含铂类和紫杉醇方案耐药的非小细胞肺癌 (NSCLC)。Bianco 等^[3]报道 Iressa 对头颈部鳞癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、结肠癌等肿瘤细胞系具有放疗协同作用。Cohen 等^[4]进行的 II 期临床试验研究了口服 Iressa 单药治疗难治性的复发和转移的头颈部鳞癌的疗效和不良反应, 有效率达 10.6%, 疾病控制率达 53%, 中位疾病进展期 3.4 个月, 中位生存期 8.1 个月, 仅 3 例病人出现 3 度腹泻, 并发现皮肤毒性反应的严重程度对预测疗效、疾病进展和生存期有重要意义, 而皮疹的进展对预测治疗的有效性和疾病改善有统计学意义。Belón 等^[5]进行的 II 期临床试验初步评估

Iressa 联合多西紫杉醇和顺铂治疗复发和转移的头颈部鳞癌的疗效和不良反应,有效率达 62.5%,其中完全缓解 37.5%,部分缓解 25%.,疾病控制率达 75%。中位疾病无进展生存期 5.1 个月,血液系统毒性反应没有比单独多西紫杉醇与顺铂联合化疗增加。Magne 等^[6]在研究 Iressa 联合顺铂和 5-Fu 作用于 CAL33 细胞系(一种高表达 EGFR 的人类头颈部癌细胞系),先予 Iressa 处理 48h,再加入顺铂和 5-Fu 作用 48h。结果发现 Iressa 单药诱导细胞聚集于 G0-G1 期,在 24h p21、p27 和 Bax 表达增高,Bcl2 表达和 Akt 磷酸化明显降低,48h 时 DNA-PK 降低,ZD1839 单独应用对 caspase-3 活性没有影响,但是与顺铂/5-Fu 联合应用时在 96h 出现 caspase-3 的明显增高。因此他们认为 Iressa 通过影响关键的细胞通路控制细胞增殖、凋亡和 DNA 的修复。我们在实验中也发现 Iressa 作用 24h,CNE- I 细胞周期中 G0-G1 期比例升高,但是统计学上无显著性差异。我们在实验中发现 Iressa 在体外具有显著的抑制鼻咽癌 CNE- I 细胞系增殖和促进凋亡的作用,在较低的剂量如 10 μ g/mL 时就能明显抑制 CNE- I 细胞增殖,在高剂量 30 μ g/mL 时可直接杀伤 CNE- I 细胞。提示 Iressa 可能治疗鼻咽癌有效,为进一步的基础和临床研究提供理论依据。

参考文献

[1] Woodburn J R. The epidermal growth factor receptor and its inhi-

bition in cancer therapy[J]. Pharmacol Ther, 1999, 82(2-3): 241-250.

- [2] Akimoto T, Hunter N R, Buchmiller L, *et al.* Inverse relationship between epidermal growth factor receptor expression and radiocurability of murine carcinomas[J]. Clin Cancer Res., 1999, 5: 2884-2890.
- [3] Cataldo Bianco, Giampaolo Tortora, Roberto Bianco, *et al.* Enhancement of Antitumor Activity of Ionizing Radiation by Combined Treatment with the Selective Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitor ZD1839 (Iressa) [J]. Clin Cancer Res, 2002, 8:3250-3258.
- [4] Cohen E E, Rosen F, Stadler W M, *et al.* Phase II Trial of ZD1839 in Recurrent or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck[J]. J Clin Oncol, 2003, 21:1980-1987.
- [5] Belón J, Irigoyen A, Rodríguez I, *et al.* Preliminary results of a phase II study to evaluate gefitinib combined with docetaxel and cisplatin in patients with recurrent and/or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck. J Clin Oncol, (Suppl) 2005, 23:5563.
- [6] Magne N, Fischel JL, Tiffon C, *et al.* Molecular mechanisms underlying the interaction between ZD1839 (Iressa) and cisplatin/5-fluorouracil[J]. Br J Cancer, 2003, 89(3):585-592.

收稿日期:2005-06-21