

伊布替尼联合 BH3 拟似物 ABT737 协同抗肿瘤作用及机制

董蓉^a, 谭笔琴^a, 阎优优^b, 严伟^{a*} (浙江大学医学院附属杭州市第一人民医院, a.浙江省临床肿瘤药理与毒理学研究室, 临床药学科, b.转化医学研究中心, 杭州 310006)

摘要: 目的 研究伊布替尼联合 BH3 拟似物 ABT737 的协同抗实体肿瘤作用及机制。方法 以 2 种类型实体肿瘤细胞, 人非小细胞肺癌细胞株 A549、H1299 和人脑胶质瘤细胞 U251、U87 为对象, 采用 SRB 法检测不同浓度伊布替尼(20, 15, 10, 7.5, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和 BH3 拟似物 ABT737(20, 15, 10, 7.5, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)单独或共同作用 24 h 后的细胞增殖情况, 计算细胞存活率和合用指数; 采用克隆形成试验检测 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 伊布替尼与 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABT737 联合作用 120 h 后的细胞克隆形成情况; 成球试验检测两药联合作用 7 d 对细胞成球能力的影响; 采用 PI 染色结合流式细胞术检测 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 伊布替尼与 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABT737 联用对 U87 和 U251 细胞凋亡的影响; RT-PCR 检测两药联合作用 24 h 后对 U87 和 U251 细胞中干细胞标记物 Sox2、Nanog 和 Oct4 mRNA 水平影响; Western blotting 检测脑胶质瘤干细胞标记物 CD44 蛋白水平的表达。结果 不同浓度伊布替尼与 BH3 拟似物 ABT737 在非小细胞肺癌和脑胶质瘤中均有协同作用, 合用组增殖抑制率均高于单用组($P<0.05$); 两药合用可抑制细胞的克隆形成能力, 协同诱导细胞凋亡; 同时两者合用可抑制肿瘤干细胞标记物 Sox2 的 mRNA 表达水平, 使 CD44 蛋白表达水平降低。结论 伊布替尼联合 ABT737 可协同抑制实体肿瘤细胞的增殖, 促进凋亡发生, 其机制可能是通过抑制肿瘤干细胞蛋白的表达。

关键词: 伊布替尼; ABT737; 肝细胞; Sox2; CD44

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2023)12-1712-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20223327

引用本文: 董蓉, 谭笔琴, 阎优优, 等. 伊布替尼联合 BH3 拟似物 ABT737 协同抗肿瘤作用及机制[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(12): 1712-1719.

Synergistic Anti-tumor Activity and Mechanism of Ibrutinib Combined with BH3 Analogue ABT737

DONG Rong^a, TAN Biqin^a, YAN Youyou^b, YAN Wei^{a*} (Affiliated Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, a.Key Laboratory of Clinical Cancer Pharmacology and Toxicology Research of Zhejiang Province, Department of Clinical Pharmacy, b.Translational Medicine Research Center, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the synergistic anti-tumor effect and mechanism of ibrutinib combined with BH3 analogue ABT737. **METHODS** Human non-small cell lung cancer cell lines A549 and H1299, and glioma cells U251 and U87 were used as subjects. SRB method was used to detect cell proliferation after 24 h of single or combined action of different concentrations of ibrutinib(20, 15, 10, 7.5, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and BH3 analogues ABT737(20, 15, 10, 7.5, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), cell survival rate and combined index was calculated. The clone formation assay was used to detect the characteristic of stemness after the combination treatment of 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ibrutinib and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABT737 for 120 h. Cell spheroidization test was used to investigate the effect of the combination treatment of two drugs on cell spheroidization ability for 7 d. PI staining together with flow cytometry was used to detected effect of the combination treatment of 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ibrutinib and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABT737 on apoptosis of U87 and U251 cells. RT-PCR was used to detect the effect of the combination treatment of the two drugs on the mRNA levels of stem cell markers Sox2, Nanog, and Oct4 in U87 and U251 cells for 24 h. Western blotting was used to detect the expression of brain glioma stem cell marker CD44 protein. **RESULTS** Different concentrations of ibrutinib and BH3 analogue ABT737 had synergistic effects in non-small cell lung cancer and glioma, and the combined group had a higher proliferation inhibition rate than the single group($P<0.05$). The combination of two drugs could inhibit the ability of cell clone formation and synergistically induce cell apoptosis. At the same time, the combination of the two drugs could inhibit the mRNA expression level of tumor stem cell marker Sox2 and reduce the expression level of CD44 protein. **CONCLUSION** Ibrutinib combined with ABT737 can synergistically inhibit the proliferation of solid tumor cells and promote apoptosis, the mechanism is possibly by inhibiting the expression of tumor stem cell proteins.

KEYWORDS: ibrutinib; ABT737; stem cell; Sox2; CD44

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划创新人才项目(2021RC103); 杭州市医药卫生科技项目(OO20190228)

作者简介: 董蓉, 女, 博士, 主管药师 E-mail: dongrongdrdr@zju.edu.cn *通信作者: 严伟, 女, 主任药师 E-mail: yanwei_115@163.com

伊布替尼是布鲁顿酪氨酸激酶(Bruton's tyrosine kinase, BTK)的靶向小分子抑制剂,其对于血液肿瘤细胞的抑制增殖、诱导分化作用非常显著,临床上应用于B细胞淋巴瘤等血液系统肿瘤的治疗^[1-3]。由于其卓越的多靶点抑制作用,对EGFR等激酶有显著的抑制活性,伊布替尼被认为是可探索用于治疗非小细胞肺癌、脑胶质瘤、三阴性乳腺癌等多种实体瘤的潜在药物^[4-5]。然而,体外实验研究表明,伊布替尼对于实体肿瘤细胞的体外抑制效果(IC₅₀)均未达到理想水平^[6]。

Bcl-2蛋白家族是调控细胞凋亡的核心成员,BH3结构域存在于Bcl-2家族蛋白近端,是促凋亡蛋白与抗凋亡蛋白形成二聚体所必需的亚结构单位,围绕Bcl-2蛋白家族研发抗肿瘤药物主要集中在BH3结构域的小分子模拟物上^[7-8]。ABT737是BH3结构域模拟物的衍生物,对Bcl-2具有高度特异性,有较强的诱导细胞凋亡的能力^[9]。最新临床试验研究表明,SYK抑制剂可增加弥漫大B细胞瘤患者对另一Bcl-2抑制剂ABT199的敏感性,而BTK激酶是SYK激酶的下效应分子之一^[10]。因此,本研究旨在考察BH3拟似物ABT737对伊布替尼的抗实体肿瘤细胞的增敏作用,探索合理的Bcl-2抑制剂与伊布替尼联合应用方案,以期为解决伊布替尼在实体肿瘤中的应用问题提供理论依据和联合用药方案。

1 仪器与试剂

IX53 倒置相差显微镜(日本奥林巴斯株式会社);Eppendorf 5207 离心机(杭州怡丹生物技术有限公司);BioTek Gen5 酶标仪(美国伯腾仪器有限公司);3111 型细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Tanon 凝胶成像系统(上海天能生命科学有限公司);ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪(杭州辉图生物科技有限公司)。

伊布替尼原料药(货号: S2680;纯度: 99.9%)、ABT737 原料药(货号: S1002;纯度: 99.9%)均购自美国 Selleck 公司;磺酰罗丹明 B(SRB 染料, Adamas 公司, 批号: 2609-88-3);三羟甲基氨基甲烷(Tris, Biofroxx 公司, 货号: EZ2811F178);DMEM 高糖培养基、RPMI1640 培养基、0.25%胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA)消化液购自浙江森瑞生物科技有限公司,批号分别为 2021071402, 2021011903, 2007010101;胎牛血清(德国 Serana Europe Group, 批号: 23060919);碘化丙啶/RNA

酶缓冲液(PI/RNase)染料(上海优宁维生物科技股份有限公司, 批号: 550825);二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量检测试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 批号: SI255483);5×loading 缓冲液(北京艾德莱生物科技有限公司, 批号: 292343);4%~20%蛋白电泳通用型预制胶(15 孔)(杭州奥谦生物科技有限公司, 批号: C30152103);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(0.45 μm, 美国 Millipore 公司, 批号: R9SA26534);免疫印迹化学发光试剂盒(批号: 100XLS30100)以及辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗(批号: 220044515)、羊抗鼠二抗(批号: 69040160)均购自美国 Biosharp 公司,批号分别为 220044515, 69040160;三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(TBST)购自杭州昊鑫生物科技股份有限公司,临用前加水 2 L 混匀,即得 TBST 溶液;兔抗人 CD44 单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司, 批号: 37259S);N-2 添加剂(货号: 17502048)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)(货号: 222656)和基因重组人表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)(货号: AF-100-15-100)均购自上海优宁维生物科技股份有限公司。

人非小细胞肺癌 A549 细胞和 H1299 细胞购于中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物研究所;脑胶质瘤 U251 细胞和 U87 细胞购于上海吉凯基因医学科技股份有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养

A549 细胞以含 10%胎牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素和 100 μg·mL⁻¹链霉素的 RPMI1640 培养基在 37 °C、5%CO₂ 培养箱中常规培养。当细胞贴壁 70%~80%时进行传代,取对数生长期细胞进行试验。

2.2 SRB 法检测药物对实体肿瘤细胞增殖的影响

取对数生长期细胞,以每孔 4×10³ 个的密度接种于 96 孔板中,每孔 100 μL,于 37 °C、5%CO₂ 条件下培养 24 h 后,将细胞随机分为空白对照组、伊布替尼组、ABT737 组、伊布替尼+ABT737 组,对应给药组中伊布替尼和 ABT737 浓度均分别为 20, 15, 10, 7.5, 5 μmol·L⁻¹,剂量设置参考笔者所在课题组前期实验数据。每组设置 3 个复孔。空白对照组加入 RPMI 1640 培养基 100 μL,各给药组分别加入含相应药物的 RPMI 1640 培养基

50 μL , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h 后, 弃去培养基。固定细胞, 每孔加入 50 μL 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 10%三氯乙酸溶液固定细胞。静置 5 min 移入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中固定 1 h, 取出用去离子水冲洗 5 遍, 室温晾干。待 96 孔板室温下晾干后, 每孔加入 0.4%的 SRB 染液(1%的乙酸配制)70 μL , 染色 30 min 后倒掉染液, 用 1%乙酸冲洗 4 次, 去除未结合的染料, 室温晾干。用 100 μL 非缓冲 Tris-base 碱液 (10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH}=10.5$)溶解与细胞蛋白结合的染料, 水平摇床上振荡 20 min, 采用酶标仪于 540 nm 处测定光吸收值。

2.3 合用指数(combination index, CI)的计算

CI 是基于 Chou-Talalay 提出的中效公式, 用于评价两药联合使用时合用效果的定量指标, 其计算公式如下:

$$\text{CI} = \frac{D_1}{D_{x1}} + \frac{D_2}{D_{x2}}$$

其中, D_1 、 D_2 为两药合用时的浓度, D_{x1} 、 D_{x2} 分别是两药单用时达到与合用相同效应所需的浓度, 可通过量效方程计算得到^[11]。

2.4 克隆形成试验检测细胞的克隆形成能力

收集对数生长期的 A549 和 H1299 细胞, U87 和 U251 细胞, 以每孔 1×10^3 个的密度接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h 后分为空白对照组和给药组(伊布替尼和 ABT737 浓度均为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。培养 5 d 后, 弃去培养基, 用磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)润洗 1 次后, 弃去上清液, 加入含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基 2 mL, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 7~10 d。待克隆形成后, 弃去培养基, 用 PBS 清洗 2 次, 磺酰罗丹明 B 染色后, 晾干, 观察细胞集落形成数量并拍照。

2.5 PI 单染结合流式细胞术检测细胞凋亡

收集对数生长期的 U87 或 U251 细胞, 以每孔 2×10^5 个的密度接种于 6 孔板中(每孔 2 mL), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h 后, 将细胞随机分为空白对照组和给药组(伊布替尼和 ABT737 浓度均为 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。每组设置 3 个复孔。空白对照组加入 RPMI 1640 培养基 2 mL, 各给药组分别加入含相应药物的 RPMI 1640 培养基 2 mL, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h 后, 收集贴壁细胞。贴壁细胞用 PBS 清洗 2 次后, 依次加入 PBS 缓冲液 500 μL 加入 PI 检测试剂盒中 PI 染液各

5 μL , 混匀, 染色 15 min 后, 采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.6 成球试验检测细胞干性

用胰酶将 U87 或 U251 细胞消化制成单个细胞悬液, 以每孔 500 个的密度接种于低吸附 6 孔板中, 每孔 2 mL, 细胞用无血清的 DMEM 培养基, 联合 1 : 100 稀释的 N-2 添加剂, 20 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ bFGF 和 20 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ EGF 重悬; 细胞于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 7 d, 间隔 2 d 添加特定培养基, 实验分为空白对照组和给药组(伊布替尼和 ABT737 浓度均为 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 在显微镜下观察克隆球形成情况并拍照记录。

2.7 RT-PCR 检测 Sox2、Nanog 和 Oct4 的 mRNA 水平

收集对数生长期的 U87 或 U251 细胞, 以每孔 2×10^5 个的密度接种于 6 孔板中(每孔 2 mL), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h 后, 将细胞随机分为空白对照组和给药组(伊布替尼和 ABT737 浓度均为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。检测各组处理的 U87 和 U251 细胞中 Sox2、Nanog 和 Oct4 的 mRNA 表达水平, 采用 Trizol 试剂提取肿瘤细胞中的总 RNA, 再逆转录成 cDNA, 参照试剂盒说明进行 PCR 反应, 以 GAPDH 为内参, 引物序列见表 1。

表 1 GAPDH、Sox2、Nanog 和 Oct4 的引物序列

Tab. 1 Primer sequences of GAPDH, Sox2, Nanog, and Oct4

基因	引物序列
<i>GAPDH</i>	F: AATGGGCAGCCGTTAGGAAA R: GCGCCCAATACGACCAAATC
<i>Sox2</i>	F: GCTACAGCATGATGCAGGACCA R: TCTGCGAGCTGGTCATGGAGTT
<i>Nanog</i>	F: CTCCAACATCCTGAACCTCAGC R: CGTCACACCATTGCTATTCTTCG
<i>Oct4</i>	F: CCTGAAGCAGAAGAGGATCACC R: AAAGCGGCAGATGGTCGTTTGG

2.8 Western blotting 检测细胞中相关蛋白的表达情况

收集对数生长期的 U87 和 U251 细胞, 以每孔 2×10^5 个的密度接种于 6 孔板中(每孔 2 mL), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h 后, 按“2.2”项下方法分组。每组设置 3 个复孔。空白对照组加入 RPMI 1640 培养基 2 mL, 各给药组分别加入含相应药物的 RPMI 1640 培养基 2 mL, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h。各孔细胞经 RIPA 裂解液裂解后, 采用 BCA 法以蛋白定量检测试剂盒测定其总蛋白浓度。蛋白经上样缓冲液稀释后, 于

100 ℃沸水中变性 15 min,冷却,200×g 离心 5 min,将沉淀置-80 ℃保存,备用。以 GAPDH 为内参进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),随后转移至 PVDF 膜上,脱脂奶粉室温封闭 1 h 后,加入 CD44 一抗(1:1 000),于 4 ℃孵育过夜;用 TBST 溶液洗膜 3 次,每次 10 min,加入 HRP 标记的二抗(1:5 000),室温孵育 1 h,再用 TBST 溶液洗膜 3 次,每次 10 min。以 ECL 显色后,置于凝胶成像系统上成像并采用 Image J 1.46 r 软件进行分析。以目标蛋白条带与内参条带的灰度值之比表示目标蛋白的相对表达量。

2.9 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 伊布替尼联合 ABT737 对实体肿瘤细胞增殖活性的影响

不同浓度伊布替尼、ABT737 单独或联合作用于脑胶质瘤细胞 U87 和 U251 和非小细胞肺癌细胞 A549、H1299,检测 24 h 后细胞增殖情况。结果发现,空白对照组的细胞存活率均为 100%左右,不同浓度合用组的细胞存活率与单用组相比,均显著下降,差异均有统计学意义($P < 0.001$ 或 $P < 0.01$),结果见表 2~5。

表 2 不同浓度 ABT737 与伊布替尼联合作用对脑胶质瘤 U87 细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 2 Combined effect of different concentrations of ABT737 and ibrutinib on the survival rate of glioma U87 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞存活率/%			CI 值
	伊布替尼组	ABT737 组	伊布替尼+ ABT737 组	
5	91.3±4.61	96.26±1.38	78.50±5.41 ¹⁾²⁾	0.62
7.5	89.3±1.30	96.94±2.06	76.09±5.96 ¹⁾²⁾	0.83
10	86.1±3.02	85.64±3.69	54.86±9.21 ¹⁾²⁾	0.54
15	77.3±3.87	81.54±5.10	27.23±3.80 ¹⁾²⁾	0.35
20	74.9±3.86	73.12±4.50	17.34±3.87 ¹⁾²⁾	0.32

注:与伊布替尼组相比,¹⁾ $P < 0.001$;与 ABT737 组相比,²⁾ $P < 0.001$ 。
Note: Compared with ibrutinib group, ¹⁾ $P < 0.001$; compared with ABT737 group, ²⁾ $P < 0.001$ 。

CI 是可用于评价两药联合时合用效果的定量指标。一般认为当 CI 值 < 0.9 时,说明 2 种药物在该对应浓度下合用具有协同作用,CI 值愈接近于 0,则该协同作用愈强;CI 值 > 1.1 时,说明 2 种药物在该对应浓度下合用具有拮抗作用;当 CI 值在 0.9~1.1,则两药只是单纯的加和作用^[11]。根据不

表 3 不同浓度 ABT737 与伊布替尼联合作用对脑胶质瘤 U251 细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 3 Combined effect of different concentrations of ABT737 and ibrutinib on the survival rate of glioma U251 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞存活率/%			CI 值
	伊布替尼组	ABT737 组	伊布替尼+ ABT737 组	
5	88.62±3.36	87.53±2.89	76.80±3.75 ¹⁾²⁾	0.43
7.5	86.20±2.30	87.63±3.18	69.27±3.70 ¹⁾²⁾	0.34
10	84.53±1.85	85.20±2.17	53.47±4.28 ¹⁾²⁾	0.16
15	78.14±2.81	82.58±5.38	32.01±2.36 ¹⁾²⁾	0.06
20	74.83±2.24	79.99±6.74	21.61±5.34 ¹⁾²⁾	0.03

注:与伊布替尼组相比,¹⁾ $P < 0.001$;与 ABT737 组相比,²⁾ $P < 0.001$ 。
Note: Compared with ibrutinib group, ¹⁾ $P < 0.001$; compared with ABT737 group, ²⁾ $P < 0.001$ 。

表 4 不同浓度 ABT737 与伊布替尼联合作用对非小细胞肺癌 A549 细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 4 Combined effect of different concentrations of ABT737 and ibrutinib on the survival rate of non-small cell lung cancer A549 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞存活率/%			CI 值
	伊布替尼组	ABT737 组	伊布替尼+ ABT737 组	
5	98.09±1.98	98.05±3.09	79.04±3.02 ¹⁾²⁾	0.64
7.5	95.04±1.30	94.62±3.29	69.21±5.66 ¹⁾²⁾	0.75
10	86.70±3.23	84.73±2.57	50.93±6.31 ¹⁾²⁾	0.70
15	82.73±1.07	79.15±2.91	10.99±2.26 ¹⁾²⁾	0.38
20	74.22±7.32	70.62±2.28	6.05±0.84 ¹⁾²⁾	0.38

注:与伊布替尼组相比,¹⁾ $P < 0.001$;与 ABT737 组相比,²⁾ $P < 0.001$ 。
Note: Compared with ibrutinib group, ¹⁾ $P < 0.001$; compared with ABT737 group, ²⁾ $P < 0.001$ 。

表 5 不同浓度 ABT737 与伊布替尼联合作用对非小细胞肺癌 H1299 细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 5 Combined effect of different concentrations of ABT737 and ibrutinib on the survival rate of non-small cell lung cancer H1299 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞存活率/%			CI 值
	伊布替尼组	ABT737 组	伊布替尼+ ABT737 组	
5	94.40±2.37	90.49±1.51	81.51±1.95 ¹⁾³⁾	0.87
7.5	94.16±1.94	87.63±0.50	72.40±3.91 ¹⁾³⁾	0.88
10	89.00±0.93	78.06±2.09	61.26±2.46 ¹⁾³⁾	0.80
15	78.72±3.71	25.24±3.64	47.77±2.77 ²⁾⁴⁾	0.80
20	68.01±4.14	65.43±0.21	35.91±4.52 ²⁾⁴⁾	0.75

注:与伊布替尼组相比,¹⁾ $P < 0.001$,²⁾ $P < 0.01$;与 ABT737 组相比,³⁾ $P < 0.001$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with ibrutinib group, ¹⁾ $P < 0.001$, ²⁾ $P < 0.01$; compared with ABT737 group, ³⁾ $P < 0.001$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

同浓度的伊布替尼及 ABT737 在实体瘤细胞中的单用及合用的抑制率,采用 Calcsyn 软件分析处理得到对应的 CI 值,见表 2~5。结果发现,ABT737 在不同浓度下均可表现出与伊布替尼较强的协同作用。

3.2 ABT737 与伊布替尼联合对实体肿瘤细胞增殖克隆形成能力的影响

克隆形成试验结果表明,在脑胶质瘤细胞中,与 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABT737 或 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 伊布替尼单独相比,伊布替尼+ABT737 组的细胞集落形成明显减少,结果见图 1;在非小细胞肺癌细胞中,与伊布替尼组、ABT737 组相比,伊布替尼+ABT737 组的细胞集落形成亦显著减少,结果见图 2。以上结果共同表明,ABT737 与伊布替尼联合可显著减弱实体肿瘤细胞增殖克隆形成能力。

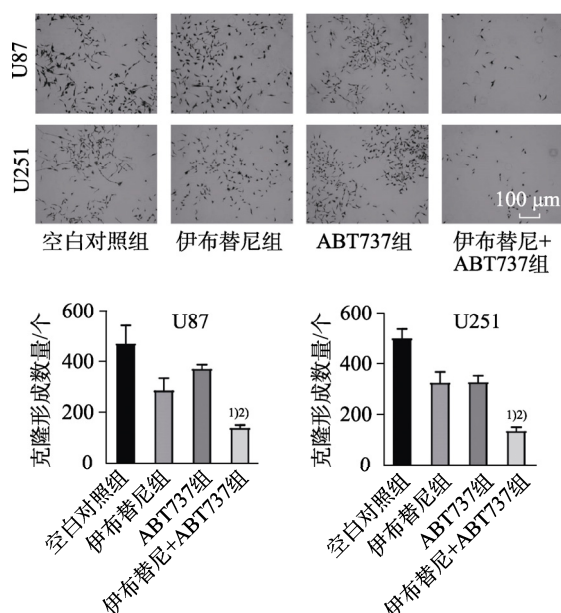


图 1 伊布替尼、ABT737 单用及伊布替尼联合 ABT737 对脑胶质瘤细胞克隆形成的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
与伊布替尼组相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与 ABT737 组相比, ²⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 1 Effects of ibrutinib, ABT737 monotherapy, and ibrutinib combined with ABT737 on glioma cell clonogenicity($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Compared with ibrutinib group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with ABT737 group, ²⁾ $P<0.001$.

3.3 ABT737 与伊布替尼联合对脑胶质瘤细胞凋亡的影响

为进一步研究伊布替尼与 ABT737 合用抗肿瘤的影响,采用合用效果较好的脑胶质瘤细胞进行进一步研究。采用 PI 染色结合流式细胞术检测各组诱导细胞凋亡的能力发现,与伊布替尼组、ABT737 组相比, $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 伊布替尼与 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABT737 合用,可显著增加细胞凋亡率,差异具有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.001$),结果见图 3。

3.4 ABT737 与伊布替尼联合对脑胶质瘤细胞成球能力的影响

已有文献报道,伊布替尼与放疗联合,具有

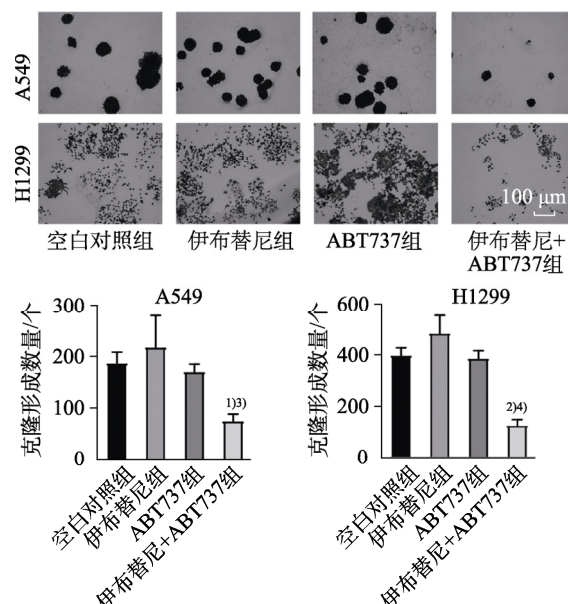


图 2 伊布替尼、ABT737 单用及伊布替尼联合 ABT737 对非小细胞肺癌细胞克隆形成的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

与伊布替尼组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与 ABT737 组相比, ³⁾ $P<0.01$, ⁴⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 2 Effects of ibrutinib, ABT737 monotherapy, and ibrutinib combined with ABT737 on clonogenicity in non small cell lung cancer cells($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Compared to the ibrutinib group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with ABT737 group, ³⁾ $P<0.01$, ⁴⁾ $P<0.001$.

抑制脑胶质瘤细胞增殖、促进凋亡的作用,其机制是通过调控肿瘤细胞的干细胞特性而实现的。因此,本研究采用成球试验考察了 ABT737 联合伊布替尼对肿瘤细胞成球能力的影响,以此检验对肿瘤细胞干细胞特性的影响。与伊布替尼组、ABT737 组相比,伊布替尼与 ABT737 合用可影响 U87 和 U251 细胞的成球能力,差异具有统计学意义($P<0.05$),结果见图 4。

3.5 ABT737 与伊布替尼联合对脑胶质瘤细胞中干细胞相关基因 Sox2 的影响

上述实验结果表明,ABT737 与伊布替尼联合可影响实体肿瘤细胞的增殖、凋亡,可能是通过影响抑制肿瘤干细胞而实现的。为进一步验证这一结论,本研究采用 RT-PCR 技术,检测两药联合对肿瘤细胞中干细胞相关基因 Sox2、Nanog 和 Oct4 表达的影响。结果显示,ABT737 与伊布替尼联合应用可显著降低脑胶质瘤细胞中干细胞相关基因 Sox2 的 mRNA 表达水平,与伊布替尼组相比,差异具有统计学意义($P<0.05$)。结果见图 5~6。

3.6 ABT737 与伊布替尼联合对脑胶质瘤干细胞标记物 CD44 表达的影响

为进一步验证上述结果,采用 Western blotting

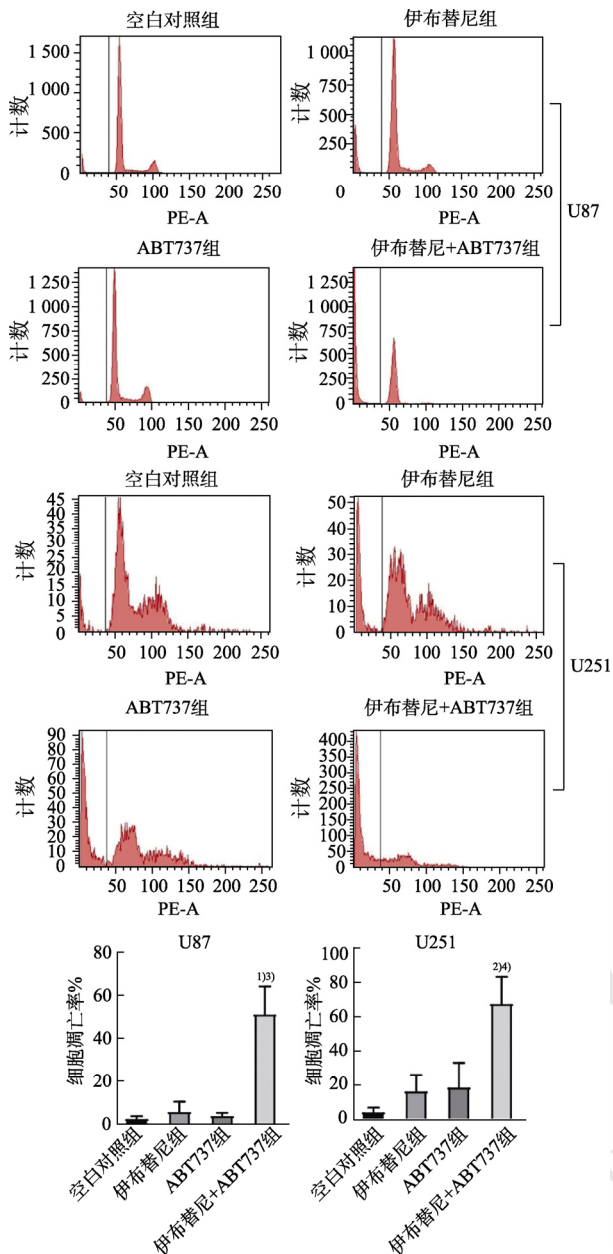


图 3 伊布替尼、ABT737 单用及伊布替尼联合 ABT737 对细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
与伊布替尼组相比, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$; 与 ABT737 组相比, ³⁾ $P<0.01$, ⁴⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 3 Effects of ibrutinib, ABT737 monotherapy, and ibrutinib combined with ABT737 on cell apoptosis ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Compared with ibrutinib group, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$; compared with ABT737 group, ³⁾ $P<0.01$, ⁴⁾ $P<0.001$ 。

检验脑胶质瘤干细胞表面标记物 CD44 的表达水平变化。与伊布替尼组、ABT737 组相比, ABT737 与伊布替尼联合应用可显著降低脑胶质瘤干细胞标记物 CD44 的表达水平, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。结果见图 7。

4 讨论

BTK 对生理和恶性 B 细胞的激活和存活至关

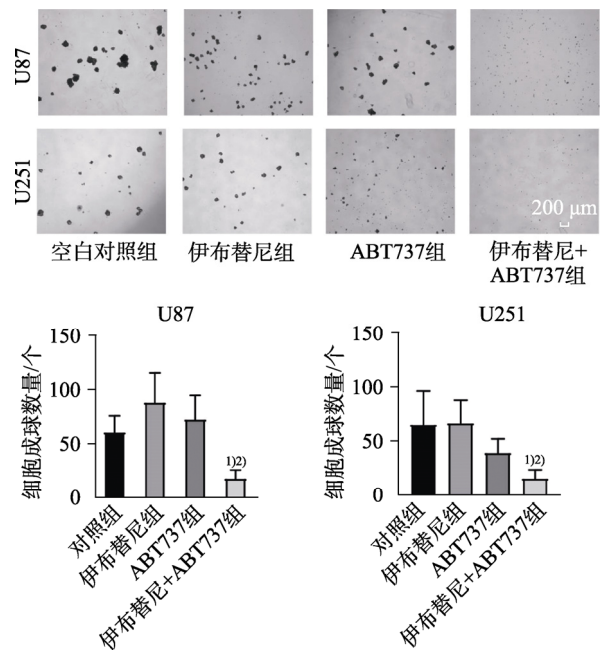


图 4 ABT737 联合伊布替尼对肿瘤细胞成球能力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

与伊布替尼组相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与 ABT737 组相比, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 4 Effects of ABT737 combined with ibrutinib on the sphere formation tumor cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Compared with ibrutinib group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with ABT737 group, ²⁾ $P<0.05$ 。

重要。近年来, 口服 BTK 抑制剂伊布替尼成为治疗血液系统恶性肿瘤的突破性疗法^[12]; 同时, 由于伊布替尼的多靶点抑制作用, 例如可抑制与实体恶性肿瘤有关的激酶 EGFR、HER2 等, 伊布替尼被认为是潜在的实体瘤治疗药物。因此, 人们致力于证明伊布替尼可作为实体恶性肿瘤的治疗选择。然而, 虽然大多数临床前研究表明伊布替尼在某些特定适应症(如胰腺癌和乳腺癌)中是一种有效的治疗选择, 但多个临床试验与这些观察结果相矛盾。尽管伊布替尼作为单一疗法失败了, 但最新研究表明它可能成为多药方案的重要组成部分: 多个试验结果表明伊布替尼不仅在体外可与其他化合物(如曲美替尼或达克利司)之间产生协同作用, 而且也可作为放射和化疗的增敏剂^[6,13]。因此, 期望探索伊布替尼在实体肿瘤中合理的药物合用方案。

逃避细胞凋亡是肿瘤的主要特征之一, Bcl-2 家族蛋白的表达变化在肿瘤的发生发展中起着重要的作用, 破坏其家族内抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白的平衡调节是诱导细胞凋亡的重要手段^[14-16]。BH3 结构域是调控细胞凋亡的关键性结构域, 是促凋亡与抗凋亡蛋白结合形成二聚体所必需的。ABT737 是第 1 个针对 BH3 结构域的新型抑制剂,

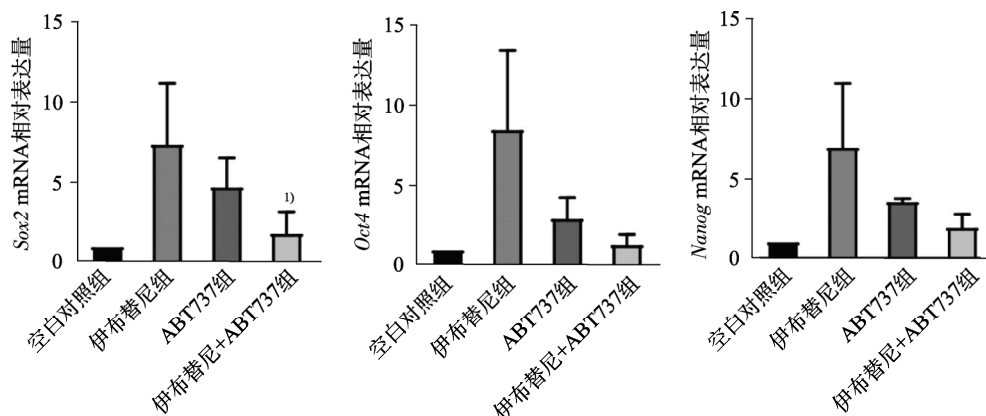


图5 ABT737联合伊布替尼对U87细胞中干细胞调控因子的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

与伊布替尼组相比, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 5 Effect of ABT737 combined with ibrutinib on stem cell regulatory factors in U87 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Compared with ibrutinib group, ¹⁾ $P<0.05$.

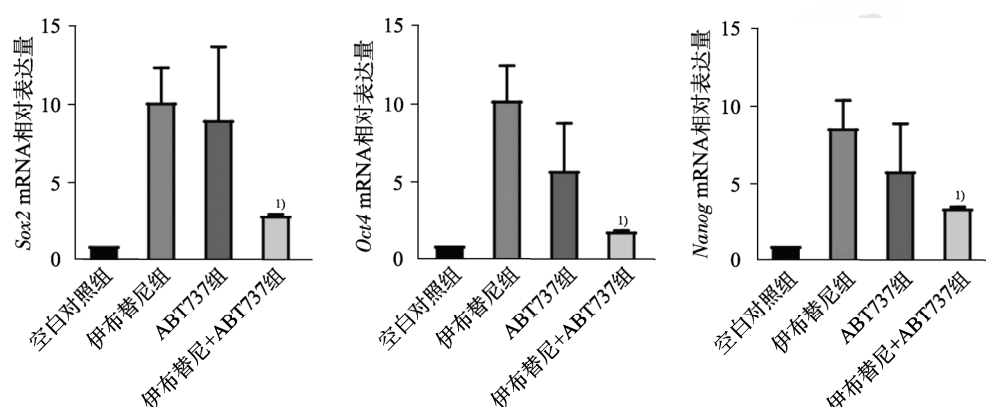


图6 ABT737联合伊布替尼对U251细胞中干细胞调控因子的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

与伊布替尼组相比, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 6 Effects of ABT737 combined with ibrutinib on stem cell transcription factors in U251 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Compared with ibrutinib group, ¹⁾ $P<0.05$.

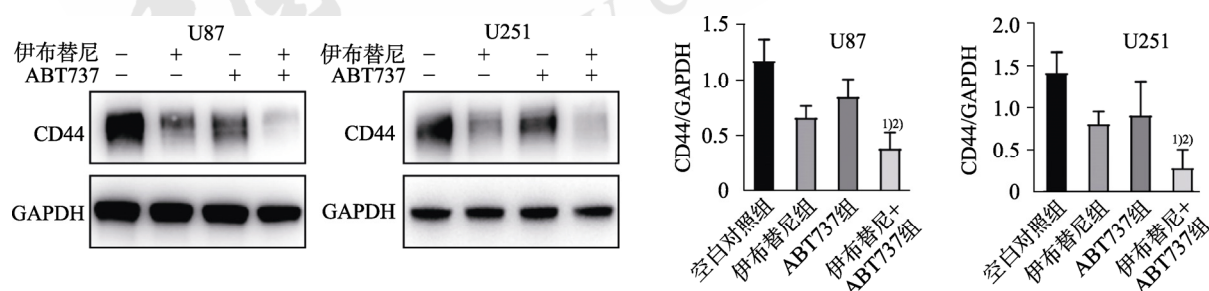


图7 ABT737与伊布替尼联合对脑胶质瘤干细胞标记物CD44表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

与伊布替尼组相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与ABT737组相比, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 7 Effect of ABT737 combined with ibrutinib on the expression of brain glioma stem cell marker CD44($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Compared with ibrutinib group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with ABT737 group, ²⁾ $P<0.05$.

能够与 Bcl-2, Bcl-xl 和 Bcl-w 结合, 从而抑制它们的抗凋亡作用^[17]。最新临床前研究表明, SYK 抑制剂可增加弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者对 ABT199 的敏感性, 而 BTK 激酶是 SYK 激酶的下游效应分子之一, 提示探索合理的 Bcl-2 抑制剂与伊布替尼联合应用方案, 可能可以解决伊布替尼在

实体肿瘤中的应用问题。在慢性淋巴细胞白血病中, 伊布替尼可有效抑制肿瘤细胞增殖, 并增加 Bcl-2 抑制剂的敏感性, 增强药物对肿瘤细胞的杀伤作用^[18]。本研究结果表明, 不同浓度的 ABT737 均可较好地协同伊布替尼的抗非小细胞肺癌和脑胶质瘤细胞增殖作用; 同时, 实验亦证明两药合

用对细胞的克隆形成能力有较强抑制作用,具体机制尚未阐明。近年来,越来越多文献报道伊布替尼在实体肿瘤中的良好抗肿瘤作用,在脑胶质瘤治疗中,伊布替尼可通过抑制 STAT3 转录活性,从而抑制肿瘤干细胞的自我更新和致瘤能力,增强放疗的治疗效果^[19]。本研究中,ABT737 协同伊布替尼的抗肿瘤效果,不仅可抑制肿瘤细胞的增殖,同时可以抑制非小细胞肺癌细胞的克隆形成和肿瘤细胞成球能力,此 2 种特性均为肿瘤干细胞的特征。因此,本研究进一步探究伊布替尼联合 ABT737 的合用机制。

肿瘤干细胞类似胚胎干细胞,是具有自我更新,多向分化潜能的细胞,在肿瘤的发生发展和耐药中发挥着重要作用。*Sox2*、*Oct4* 是能维持肿瘤干细胞个性的关键转录因子,被认为是具有促进肿瘤细胞生长、转移和耐药的关键分子^[20-21]。最新研究表明,伊布替尼可增加脑胶质瘤细胞的放疗敏感性^[22]。伊布替尼联合 ABT199 亦可更好地抑制血液瘤细胞的增殖,诱导其分化。因此,研究 ABT737 与伊布替尼的联合应用对于肿瘤干细胞的影响可能是未来两药联合应用的机制研究的方向及理论基础。笔者通过实验发现,伊布替尼联合 ABT737 不仅可降低脑胶质瘤细胞中 *Sox2* 的 mRNA 水平,亦可降低它们的蛋白水平,从而增强肿瘤细胞对伊布替尼的敏感性。

综上所述,本研究证明伊布替尼与 ABT737 联合具有协同作用,可以更好地抑制实体肿瘤细胞的生长,增加肿瘤细胞的凋亡,其机制可能是通过降低肿瘤细胞中干性相关转录因子 *Sox2* 的表达水平而实现的。本研究为非小细胞肺癌的治疗提供新的口服药物联合应用方案,为该联合应用方案在实体肿瘤治疗的拓展应用带来一定的理论基础。但本研究仅初步探讨了两药联用的体外效果,其体内联用效果仍需进一步实验证明,而其具体机制仍有待后续进一步完善。

REFERENCES

- [1] BURGER J A, BUGGY J J. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib(PCI-32765)[J]. Leuk Lymphoma, 2013, 54(11): 2385-2391.
- [2] BURGER J A, O'BRIEN S. Evolution of CLL treatment from chemimmunotherapy to targeted and individualized therapy[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(8): 510-527.
- [3] SHIRLEY M. Correction to: Bruton tyrosine kinase inhibitors in B-cell malignancies: Their use and differential features[J]. Targ Oncol, 2022, 17(1): 93.
- [4] CHANG B Y, HUANG M M, FRANCESCO M, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 ameliorates autoimmune arthritis by inhibition of multiple effector cells[J]. Arthritis Res Ther, 2011, 13(4): R115.
- [5] UCKUN F M, VENKATACHALAM T. Targeting solid tumors with BTK inhibitors[J]. Front Cell Dev Biol, 2021(9): 650414.
- [6] SZKLENER K, MICHALSKI A, ŽAK K, et al. Ibrutinib in the treatment of solid tumors: Current state of knowledge and future directions[J]. Cells, 2022, 11(8): 1338.
- [7] MONTERO J, HAQ R. Adapted to survive: Targeting cancer cells with BH3 mimetics[J]. Cancer Discov, 2022, 12(5): 1217-1232.
- [8] DIEPSTRATEN S T, ANDERSON M A, CZABOTAR P E, et al. The manipulation of apoptosis for cancer therapy using BH3-mimetic drugs[J]. Nat Rev Cancer, 2022, 22(1): 45-64.
- [9] LEE J M, KIM H S, KIM A, et al. ABT-737, a BH3 mimetic, enhances the therapeutic effects of ionizing radiation in K-ras mutant non-small cell lung cancer preclinical model[J]. Yonsei Med J, 2022, 63(1): 16-25.
- [10] BOJARCZUK K, SASI B K, GOBESSI S, et al. BCR signaling inhibitors differ in their ability to overcome Mcl-1-mediated resistance of CLL B cells to ABT-199[J]. Blood, 2016, 127(25): 3192-3201.
- [11] CHOU T C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies[J]. Pharmacol Rev, 2006, 58(3): 621-681.
- [12] BYRD J C, HILLMEN P, O'BRIEN S, et al. Long-term follow-up of the RESONATE phase 3 trial of ibrutinib vs ofatumumab[J]. Blood, 2019, 133(19): 2031-2042.
- [13] FALINI B, DE CAROLIS L, TIACCI E. How I treat refractory/relapsed hairy cell leukemia with BRAF inhibitors[J]. Blood, 2022, 139(15): 2294-2305.
- [14] OLTERSDORF T, ELMORE S W, SHOEMAKER A R, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours[J]. Nature, 2005, 435(7042): 677-681.
- [15] TSE C, SHOEMAKER A R, ADICKES J, et al. ABT-263: A potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor[J]. Cancer Res, 2008, 68(9): 3421-3428.
- [16] SOUERS A J, LEVERSON J D, BOGHAERT E R, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets[J]. Nat Med, 2013, 19(2): 202-208.
- [17] GILORMINI M, MALESYS C, ARMANDY E, et al. Preferential targeting of cancer stem cells in the radiosensitizing effect of ABT-737 on HNSCC[J]. Oncotarget, 2016, 7(13): 16731-16744.
- [18] HAMPEL P J, RABE K G, CALL T G, et al. Combined ibrutinib and venetoclax for treatment of patients with ibrutinib-resistant or double-refractory chronic lymphocytic leukaemia[J]. Br J Haematol, 2022, 199(2): 239-244.
- [19] SHI Y, GURYANOVA O A, ZHOU W C, et al. Ibrutinib inactivates BMX-STAT3 in glioma stem cells to impair malignant growth and radioresistance[J]. Sci Transl Med, 2018, 10(443): eaah6816.
- [20] FANG X G, HUANG Z, ZHAI K, et al. Inhibiting DNA-PK induces glioma stem cell differentiation and sensitizes glioblastoma to radiation in mice[J]. Sci Transl Med, 2021, 13(600): eabc7275.
- [21] HATTERMANN K, FLÜH C, ENGEL D, et al. Stem cell markers in glioma progression and recurrence[J]. Int J Oncol, 2016, 49(5): 1899-1910.
- [22] TAN B Q, HUANG Y Y, ZHANG B, et al. The effect of ibrutinib on radiosensitivity in pancreatic cancer cells by targeting EGFR/AKT/mTOR signaling pathway[J]. Biomedicine Pharmacother, 2020(128): 110133.

收稿日期: 2022-09-23
(本文责编: 李艳芳)