

肺岩宁方联合吉非替尼抑制肺癌裸鼠移植瘤细胞H1975生长及其作用机制



康小红, 王立芳, 王中奇, 邓海滨, 赵晓珍, 徐振晔

Mechanism of Feiyanning Combined with Gefitinib inhibiting growth of Lung Adenocarcinoma Cell H1975 in Xenograft Nude Mice Models

KANG Xiaohong, WANG Lifang , WANG Zhongqi, DENG Haibin, ZHAO Xiaozhen, XU Zhenye

Department of Medical Oncology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 200032, China

Corresponding Author: XU Zhenye, E-mail: xuzhengye1947@126.com

Abstract:Objective To investigate the potential mechanisms of Feiyanning combined with Gefitinib inhibiting growth of lung adenocarcinoma cell H1975. **Methods** H1975 human lung adenocarcinoma cells were implanted subcutaneously in the left armpits of male athymic nude mice to establish transplantation tumor models of human lung cancer. Forty models were randomly and evenly divided into four groups, Control group, Feiyanning group (F), Gefitinib (G) group and F+G group, and treated with corresponding drugs for 4 weeks. Tumor volume, tumor weight and body weight were measured to draw up tumor growth curves and calculated the tumor weight inhibition rates. The apoptotic rates were measured by TUNEL stain method, and the expressions of EGFR-PI3K/AKT pathway related proteins were detected by Western blot. **Results** The tumor weight inhibition rates were 0, 21.91%, 25.11%, 53.28% of groups of Control, Gefitinib, Feiyanning and F+G respectively. The apoptotic rate of F+G was (55.06±2.39) %, which was increased significantly compared with Control group (15.11±1.6) %, Gefitinib group (26.64±0.69) % and Feiyanning group (28.88±1.61) % ($P<0.01$). The result of Western blot showed that the expressions of p-EGFR, p-AKT and p-mTOR were decreased significantly in F + G group. **Conclusion** Feiyanning combined with Gefitinib may be blockade EGFR-PI3K/AKT pathway to inhibit the tumor growth and induce apoptosis of lung adenocarcinoma cell H1975 in xenograft nude mice models.

Key words: Feiyanning; Gefitinib; Tyrosine kinase inhibitors (TKIs);Lung cancer; EGFR-PI3K/AKT pathway

摘要: 目的 观察肺岩宁方联合吉非替尼对肺腺癌裸鼠移植瘤细胞H1975生长的影响并探讨其可能的作用机制。**方法** 成功建立H1975细胞裸鼠皮下移植瘤模型后, 随机分为模型组、吉非替尼组、肺岩宁方组及联合用药组, 每组10只, 分别用相应药物干预4周, 检测肿瘤体积、瘤重、体重等, 绘制肿瘤生长曲线, 计算肿瘤抑制率; 应用TUNEL法检测移植瘤细胞凋亡; 应用Western blot法检测EGFR-PI3K/AKT信号通路相关蛋白表达。**结果** 各组的抑瘤率模型组为0, 吉非替尼组21.91%, 肺岩宁方组25.11%, 联合用药组53.28%; 各组移植瘤组织中肿瘤细胞的凋亡率分别为模型组(15.11±1.6)%, 吉非替尼组(26.64±0.69)%, 肺岩宁方组(28.88±1.61)%, 联合用药组(55.06±2.39)%。联合用药组与模型组及单用吉非替尼、肺岩宁方相比差异有统计学意义($P<0.01$)。Western blot结果显示肺岩宁方联合吉非替尼在不影响EGFR、AKT、mTOR总蛋白表达的情况下, 可显著下调p-EGFR、p-AKT、p-mTOR水平。**结论** 肺岩宁方联合吉非替尼可显著抑制H1975肺癌裸鼠移植瘤的生长, 促进肿瘤细胞凋亡, 其作用机制可能与阻断EGFR-PI3K/AKT信号通路有关。

关键词: 肺岩宁; 吉非替尼; 酪氨酸酶抑制剂; 肺癌; EGFR-PI3K/AKT信号通路

中图分类号: R734.2 文献标识码: A

收稿日期: 2012-10-15; 修回日期: 2012-12-17
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30701114); 上海市浦东新区中医领军型人才资助项目(PWZ12009-04)
作者单位: 200032上海, 上海中医药大学附属龙华医院肿瘤科
通信作者: 徐振晔, E-mail: xuzhenye1947@126.com
作者简介: 康小红(1978-), 女, 博士在读, 主治医师, 主要从事中医药防治恶性肿瘤的实验与临床研究

0 引言

肺癌是世界发病率和死亡率最高的肿瘤, 非小细胞肺癌(NSCLC)约占所有肺癌的80%, 且多数在确诊时已为晚期, 其5年生存率不足15%^[1]。以小分子酪氨酸酶抑制剂(TKIs)吉非替尼、厄洛替尼等为代表的分子靶向治疗因良好的临床疗效

给晚期肺腺癌患者带来希望。但是随后耐药的产生严重限制了其临床应用,而针对TKIs耐药,目前临床尚缺乏有效的预防手段。

肺岩宁方是上海中医药大学附属龙华医院徐振晔教授多年临床治疗肺癌的经验方,主要功效为补肾益气养精、解毒散结抗癌。相关实验研究表明肺岩宁方可能通过影响核小体构象调控因子的表达干预异常细胞周期来抑制肺癌细胞生长增殖^[2];可能通过抑制血管生成^[3-4]、抑制上皮间质细胞转化(EMT)^[5]等来防治非小细胞肺癌的复发和转移。临床研究^[6]亦显示,该方对于肺气不足、肾精亏损的非小细胞肺癌患者具有良好的临床疗效。我们在前期的临床观察中发现^[7],肺岩宁方联合TKIs可显著延缓靶向药物耐药产生的时间,但是机制尚不明确,本研究通过观察肺岩宁方联合吉非替尼对H1975移植瘤生长及耐药相关因子的影响,旨在探讨肺岩宁方防治靶向药物耐药的可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物与细胞株 Balb/c裸小鼠50只,购于上海斯莱克实验动物有限公司(许可证号:SCXK(沪)2007-0005),雄性,4~6周龄,体重质量(20±2)g,于龙华医院实验动物中心,无特殊病原菌(SPF)环境中饲养。人肺腺癌细胞株H1975(EGFR exon20 T790M-L858R)购于美国物种保存中心(American Type Culture Collection, ATCC),细胞在37℃, 5%CO₂条件下培养于含10%胎牛血清、100 u/ml青链霉素的RPMI1640培养液中。

1.1.2 主要实验试剂 肺岩宁方由生黄芪、黄精、灵芝、七叶一枝花、山慈菇、干蟾皮等组成,由龙华医院中药房提供,常规水煎,水浴浓缩至生药含量为2.0 g/ml, 4℃保存。吉非替尼购于阿斯利康公司。TUNEL试剂盒购于Roche公司。Western blot用抗体:EGFR、p-EGFR(Tyr1068)购于Epitomics公司;Akt、p-Akt(Ser473)、mTOR、p-mTOR(Ser2448)购于Cell signaling公司。

1.2 实验方法

1.2.1 裸小鼠皮下移植瘤模型的建立及分组 取对数生长期的H1975细胞用0.25%胰酶消化后,调至浓度为1×10⁷个/毫升的细胞悬液,接种于裸鼠左侧腋部皮下,每只0.2 ml,待瘤块直径约3 mm左右,从中选取肿瘤体积较均匀的40只裸小鼠随机分为4组:模型组10只,0.9%氯化钠溶液(0.4 毫升/只)灌胃;吉非替尼组10只,吉非替尼(40 mg/kg)灌胃;肺岩宁方组10

只,肺岩宁方(40 g/kg)灌胃;联合用药组10只,吉非替尼(40 mg/kg)和肺岩宁(40 g/kg)灌胃。共给药4周。

1.2.2 肿瘤体积及肿瘤抑制率 给药期间一周两次用游标卡尺测定肿瘤最长径(a)和最短径(b),计算移植瘤体积V。计算公式:V(mm³)=ab²×1/2,根据肿瘤体积大小绘制肿瘤的生长曲线图。于第28天称体重并处死裸鼠,取瘤块称重,按照公式:抑瘤率=(1-用药组平均瘤重/模型组平均瘤重)×100%,计算抑制率。应用金均法^[8],计算q值来评估两药合用效果,q=E_{A+B}/[E_A+(1-E_A)×E_B],E_{A+B}为两药合用时的抑瘤率,E_A和E_B为各药单独应用时的抑瘤率。q<0.85表示两药有拮抗作用,0.85≤q≤1.15表示两药有相加作用,q>1.15表示两药有协同作用。

1.2.3 TUNEL法检测移植瘤凋亡指数 按照TUNEL凋亡试剂盒说明书具体操作步骤进行,以细胞核染成棕黄色的细胞为凋亡细胞,随机选取5个高倍镜(×400)视野计算凋亡率,凋亡率=(凋亡细胞数/肿瘤细胞总数)×100%。

1.2.4 Western blot法检测EGFR、p-EGFR(Tyr1068)、Akt、p-Akt(Ser473)、mTOR、p-mTOR(Ser2448)等蛋白表达 取出冷冻肿瘤组织在液氮中迅速研磨成粉末,加入细胞裂解液(含蛋白酶和磷酸酶抑制剂),冰上裂解后于4℃ 12 000 g离心15 min,取上清液,应用BCA分析试剂测定蛋白浓度,50 μg蛋白质在SDS-PAGE电泳分离,半干法转移至PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温封闭2 h,一抗4℃过夜,TBST洗膜3次,加入二抗室温孵育2 h,TBST洗膜3次,加入ECL发光液暗室中X线片显影,图像扫描,以β-actin蛋白的表达为内参照,应用凝胶图像分析软件分析目标条带灰度值。

1.3 统计学方法

应用SPSS18.0软件包进行统计学分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多样本间比较应用单因素方差分析,以P<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺岩宁、吉非替尼及联合用药对裸鼠移植瘤生长的影响

根据肿瘤体积绘制肿瘤生长曲线,实验结束时,各组肿瘤体积分别为:模型组(1 890.08±267.9)mm³;吉非替尼组(1 686.67±399.8)mm³;肺岩宁组(1 520.42±187.9)mm³;联合用药组(987.83±366.7)mm³。肺岩宁组、吉非替尼组与模型组相比肿瘤生长差异无统计学意义,联合用药组与模型

组、吉非替尼组及肺岩宁方组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图1。

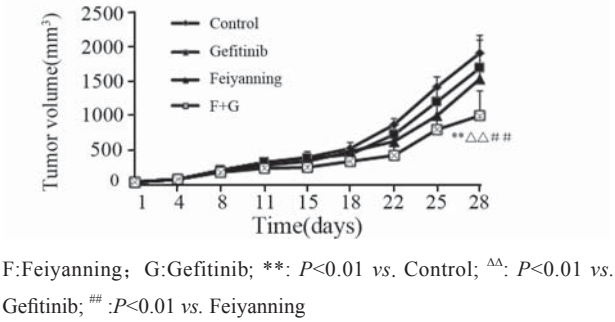


图1 肺岩宁联合吉非替尼对裸鼠移植瘤体积的影响
Figure1 Effects of Feiyaning combined with gefitinib on tumor volume of H1975 xenografts

2.2 肺岩宁方、吉非替尼及联合用药对瘤重及肿瘤抑制率的影响

实验结束后处死裸鼠, 称瘤重及体重, 计算肿瘤抑制率, 各组的抑瘤率为: 模型组0%; 吉非替尼组21.91%; 肺岩宁方组25.11%; 联合用药组53.28%。吉非替尼组和肺岩宁方组瘤重与模型组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 联合组与单用吉非替尼和肺岩宁组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 两药合用 q 值为1.284, 提示肺岩宁方与吉非替尼联合后具有协同增效作用。

2.3 肺岩宁方、吉非替尼及联合用药对肿瘤凋亡的影响

应用TUNEL法检测肿瘤细胞凋亡情况, 凋亡细胞形态为: 染色质浓缩、边缘化, 核膜裂解, 染色质分割成块状。各组移植瘤组织中肿瘤细胞的凋亡率分别为: 模型组 (15.11 ± 1.6)%; 吉非替尼组 (26.64 ± 0.69)%; 肺岩宁方组 (28.88 ± 1.61)%; 联合用药组 (55.06 ± 2.39)%。联合用药组能明显促使肿瘤凋亡, 与模型组及单用吉非替尼和肺岩宁方组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图2、3。

2.4 肺岩宁方、吉非替尼及联合用药组对移植瘤组织中EGFR-PI3K/AKT信号通路相关蛋白表达的影响

应用Western blot方法检测H1975移植瘤组织中EGFR、p-EGFR、AKT、p-AKT、mTOR、

p-mTOR的表达, 结果显示肺岩宁方及联合用药组可在不影响EGFR、AKT、mTOR等总蛋白表达的情况下, 下调其磷酸化水平, 从而抑制EGFR-PI3K/AKT信号通路的活化, 见图4。

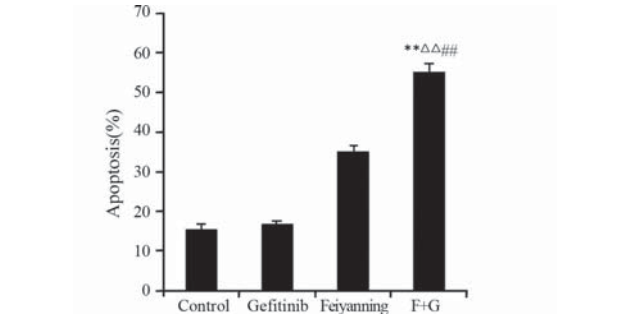


图3 各组裸鼠H1975移植瘤肿瘤细胞凋亡率情况
Figure3 Apoptosis rates of H1975 xenografts

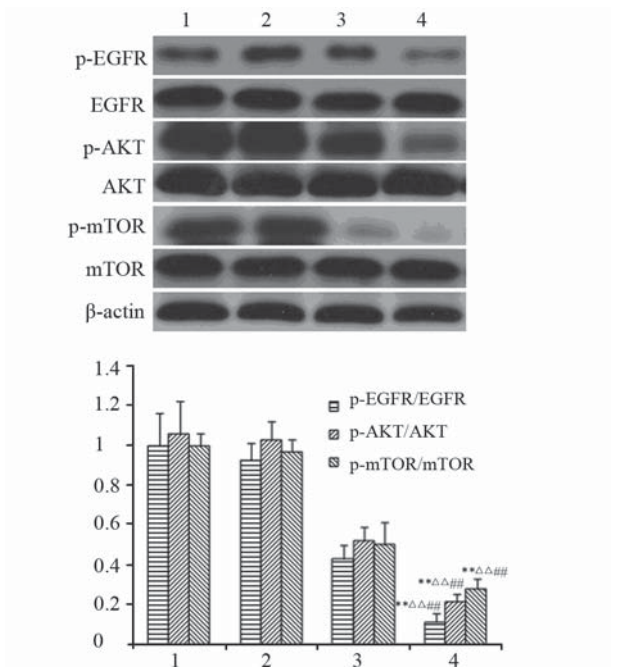
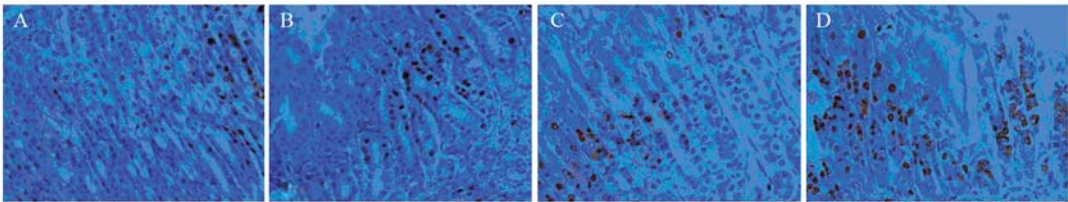


图4 肿瘤组织中EGFR-PI3K/AKT 信号通路相关蛋白的表达
Figure4 Expressions of EGFR-PI3K/AKT pathway related proteins in tumor tissues



A: Control; B: Gefitinib; C: Feiyaning; D: F+G
图2 各组裸鼠H1975移植瘤肿瘤细胞TUNEL染色 (TUNEL $\times 200$)
Figure2 TUNEL staining of H1975 xenografts in each group (TUNEL $\times 200$)

3 讨论

吉非替尼是目前用于NSCLC靶向治疗的第一代小分子酪氨酸酶抑制剂(TKIs)药物,其作用于酪氨酸激酶结构域的三磷酸腺苷(ATP)结合位点,干扰ATP结合,能通过AKT和MAPK途径阻断EGFR信号转导通路,阻止表达EGFR的人癌细胞生长^[9]。多数晚期肺腺癌患者可从TKIs治疗中获益。然而无论近期疗效如何,经TKIs治疗后的NSCLC患者最终都会不可避免的出现TKIs耐药。研究发现在获得性耐药中约50%的是由于EGFR-T790M突变,约5%~20%是因MET基因扩增,约30%原因不明^[10]。针对这些机制,虽已研发出第二代不可逆TKIs,如BIBW2992(Afatinib)、PF-00299804(Dacomitinib)等和第三代突变抑制剂CO-1686,以及MET基因抑制剂等,但这些药物皆处于临床试验阶段,具体疗效还有待于进一步评估。此外,TKIs联合PI3K抑制剂或者mTOR抑制剂也有望克服TKIs耐药,但这种治疗方案同样也处于临床前研究。因此,目前临床上缺乏有效的手段防止TKIs耐药。

基于临床应用发现肺岩宁方联合TKIs可显著延缓靶向药物耐药产生的时间,以及其对非小细胞肺癌具有良好的临床疗效,本实验以含有EGFR-T790M突变的肺腺癌细胞移植瘤细胞H1975为模型,观察肺岩宁方、吉非替尼及联合用药的抑瘤效果。由于EGFR-T790M突变后,酪氨酸激酶活化域的790位苏氨酸残基被蛋氨酸取代,削弱了抑制剂与其靶点的相互作用^[11],不能阻断EGFR信号转导通路,故而对吉非替尼耐药。但有趣的是,本研究结果显示肺岩宁方联合吉非替尼却能明显抑制移植瘤的生长,促进肿瘤凋亡,与单用肺岩宁方及吉非替尼相比差异有统计学意义,两药合用 q 值为1.284,提示肺岩宁方与吉非替尼联用具有协同增效作用。那么这种协同作用是否与抑制EGFR信号通路有关呢?课题组检测了EGFR信号通路相关蛋白EGFR、p-EGFR、AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR等表达水平,结果显示肺岩宁方联合吉非替尼在不影响EGFR、AKT、mTOR总蛋白表达的情况下,可显著下调p-EGFR、p-AKT、p-mTOR水平,从而抑制EGFR-PI3K/AKT信号通路的活化,与单用肺岩宁方及吉非替尼相比差异有统计学意义,提示肺岩宁方与吉非替尼联用后,可能通过阻断EGFR-PI3K/AKT信号通路来抑制H1975肺腺癌移植瘤生长,促进其凋亡。

综上所述,肺岩宁方联合吉非替尼可能通过阻断EGFR信号通路,抑制EGFR、AKT、mTOR等蛋白的活化,从而抑制肿瘤增殖,促进凋亡。那么,肺岩宁方是如何协同吉非替尼来阻断EGFR信号通路的,是改变了吉非替尼与EGFR-T790M突变位点的结合,还是影响了吉非替尼在体内的

代谢过程?这些还有待于进一步研究证实。

参考文献:

- [1] Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer[J]. Chest, 2003, 123(1 Suppl): 21S-49S.
- [2] Zheng Z, Wang JY, Wang Q, *et al.* Effects of Chinese herbal medicine Feiyaning decoction on expressions of nucleosome conformation-regulating factors H3-K56, Rtt109, Asf1 and E2F1 in Lewis-bearing mice[J]. Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao, 2012, 10(4): 448-53. [郑展, 王菊勇, 王青, 等. 肺岩宁对Lewis肺癌荷瘤小鼠瘤组织中核小体构象调控因子H3-K56、Rtt109、Asf1及E2F1表达的影响[J]. 中西医结合学报, 2012, 10(4): 448-53.]
- [3] Wang ZQ, Deng HB, Wu J, *et al.* The relationships between angiogenesis and matrix metalloproteinase-2, -9 in mice tumor intervened by Feiyaning recipe's components[J]. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi, 2011, 31(9): 1229-33. [王中奇, 邓海滨, 吴继, 等. 肺岩宁方组分对小鼠肿瘤血管生成与MMP-2、MMP-9关系的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(9): 1229-33.]
- [4] Wang ZQ, Deng HB, Zhang LM, *et al.* The effects of Feiyaning recipe's components on tumor growth, pulmonary metastasis and microvessel density in Lewis lung cancer mice. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy[J]. 2012, 27(2): 477-80. [王中奇, 邓海滨, 张丽曼, 等. 中药肺岩宁方及其拆方对小鼠Lewis肿瘤生长、肺转移和微血管密度的影响[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(2): 477-80.]
- [5] Zhao XZ, Wu ZH, Xu ZY, *et al.* Effects of Feiyaning on the expression of epithelial-mesenchymal factors in highly metastatic lung cancer cells 95-D[J]. Zhongguo Fei Ai Za Zhi, 2011, 14(6): 467-71. [赵晓珍, 吴中华, 徐振晔, 等. 肺岩宁方对人高转移95-D肺癌细胞上皮-间质细胞标志因子表达的影响[J]. 中国肺癌杂志, 2011, 14(6): 467-71.]
- [6] Xu ZY, Jin CJ, Shen DY, *et al.* Clinical study on treatment of advanced non-small-cell lung cancer with chinese herbal medicine in different stages combined with chemotherapy[J]. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi, 2007, 27(10): 874-8. [徐振晔, 金长娟, 沈得义, 等. 中药分阶段结合化疗治疗晚期非小细胞肺癌的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(10): 874-8.]
- [7] Kang XH, Wang LF, Wang ZQ, *et al.* Clinical observation of Feiyaning recipe delay EGFR-TKIs resistance in advanced lung adenocarcinoma[J]. Xin Zhong Yi, 2012, 44(9): 52-4. [康小红, 王立芳, 王中奇, 等. 肺岩宁方延缓TKIs靶向治疗晚期肺腺癌耐药的临床观察[J]. 新中医, 2012, 44(9): 52-4.]
- [8] Jin ZJ. The additive effect in drug combination[J]. Zhongguo Yao Li Xue Bao, 1980, 1(2): 70-6. [金正均. 合并用药中的相加[J]. 中国药理学报, 1980, 1(2): 70-6.]
- [9] Bruton A. What went wrong with Iressa[J]. Lancet Oncol, 2002, 3(12): 708.
- [10] Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, *et al.* MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling[J]. Science, 2007, 316(5827): 1039-43.
- [11] Balk MN, Gong Y, Riely GJ, *et al.* Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(21): 6494-501.

[编辑:安 凤; 校对:黄园玲]