

培美曲塞和吉非替尼不同时序应用对人肺腺癌细胞的作用和机制

边劲, 王琳, 寻琛, 黄伟, 秦叔逵

Sequence-dependent Effects and Mechanism of Pemetrexed and Gefitinib on Human Lung Adenocarcinoma Cells

BIAN Jin, WANG Lin, XUN Chen, HUANG Wei, QIN Shukui

Department of Medical Oncology, Cancer Center of PLA, PLA 81st Hospital, Nanjing 210002, China

Corresponding Author: Wang Lin, E-mail:wanglin81yy@163.com



Abstract: Objective To investigate the anti-proliferative and apoptotic effect of different sequences of combined pemetrexed and gefitinib on human lung adenocarcinoma cells A549 and PC-9, and to probe the possible mechanisms. **Methods** MTT assay was used to measure cell proliferation. Flow cytometry using annexin V-FITC/PI staining was employed to measure cell apoptosis and cell cycle. The expression of phosphorylation of EGFR, AKT, ERK and TS protein were detected by Western blot. **Results** Sequential pemetrexed followed by gefitinib or cocurrent pemetrexed and gefitinib remarkably enhanced the anti-proliferation effects ($P < 0.05$). Sequential pemetrexed followed by gefitinib or cocurrent pemetrexed and gefitinib enhanced the apoptosis effect on PC-9 and A549 cells. Pemetrexed induced the phosphorylation of EGFR, AKT and ERK, while gefitinib significantly suppressed the phosphorylation of EGFR, AKT, ERK and TS expression. Gefitinib mainly blocked the cells in G_0/G_1 phase and pemetrexed blocked the cells in S phase. The percentage of cells in G_2/M phase was increased in sequential pemetrexed followed by gefitinib or cocurrent pemetrexed and gefitinib group ($P < 0.05$). Sequential pemetrexed followed by gefitinib or concurrent pemetrexed and gefitinib had a more significant effect on decreasing the expression of p-EGFR, p-AKT and p-ERK. **Conclusion** Both concurrent pemetrexed and gefitinib or sequential pemetrexed followed by gefitinib have synergistic effects on the expression of p-EGFR, p-AKT and p-ERK, moreover sequential pemetrexed followed by gefitinib has more synergistic effects than concurrent pemetrexed and gefitinib. The phosphorylation of EGFR, AKT and ERK induced by pemetrexed and TS expression suppressed by gefitinib may contribute to the synergistic effects.

Key words: Lung adenocarcinoma; Pemetrexed; Gefitinib; Cell cycle; Cell apoptosis

摘要: 目的 探讨培美曲塞与吉非替尼不同时序应用对肺腺癌细胞A549和PC-9生长及凋亡的影响,并阐述其可能机制。**方法** MTT法检测各组细胞的增殖抑制情况,流式细胞仪检测各组细胞凋亡及细胞周期分布,Western印迹法检测对EGFR下游信号通路及TS酶蛋白水平表达的影响。**结果** 培美曲塞序贯吉非替尼、培美曲塞同步联合吉非替尼对PC-9和A549细胞增殖抑制率及凋亡率较单药组均提高($P < 0.05$),培美曲塞可以提高EGFR、AKT、ERK磷酸化水平,而吉非替尼表现为抑制作用,同时吉非替尼降低TS酶表达。培美曲塞序贯吉非替尼,培美曲塞同步联合吉非替尼抑制EGFR、AKT、ERK磷酸化水平较单药更强。吉非替尼主要将PC-9、A549细胞阻滞在 G_0/G_1 期;培美曲塞主要将细胞阻滞在S期。培美曲塞序贯吉非替尼、培美曲塞同步联合吉非替尼较其他组 G_2/M 期细胞比例提高($P < 0.05$)。**结论** 培美曲塞序贯吉非替尼、培美曲塞同步联合吉非替尼在PC-9、A549细胞中均起到协同增效作用,且培美曲塞序贯吉非替尼协同作用更为显著,可能主要与培美曲塞诱导EGFR、AKT、ERK磷酸化及吉非替尼降低TS酶作用有关。

关键词: 肺腺癌;培美曲塞;吉非替尼;细胞周期;细胞凋亡

中图分类号: R734.2; R979.1; R329.2⁺5 **文献标识码:** A

0 引言

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,严重危害人类健康。化疗和运用表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)的生物治疗是治疗晚期非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)

收稿日期: 2013-09-25; 修回日期: 2013-12-11

基金项目: 南京军区医学科技创新课题项目(ZD19)

作者单位: 210002 南京,解放军八一医院全军肿瘤中心

通信作者: 王琳, E-mail:wanglin81yy@163.com

作者简介: 边劲(1987-),男,硕士在读,主要从事肿瘤内科工作

患者的两种重要手段。如何将EGFR-TKI和传统化疗药物这两种不同作用机制的药物联合应用从而使患者获得更大疗效,成为目前研究的热点。日本WJTOG0203Ⅲ期临床研究证实,先化疗后序贯吉非替尼能够提高肺腺癌患者的总生存时间^[1]。2011年ASCO会议报道的一项多中心开放Ⅱ期临床研究表明培美曲塞同步联合厄洛替尼能提高晚期肺癌患者的中位无疾病进展时间和中位总生存时间^[2]。那么,化疗序贯或同步联合EGFR-TKI究竟何为最佳给药方式?

本实验通过研究培美曲塞和吉非替尼不同时序应用对肺腺癌细胞增殖和凋亡的影响,旨在探讨两药最佳给药方式,并且阐明其可能机制。

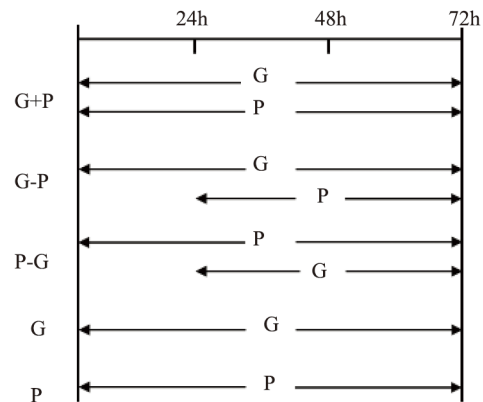
1 材料与方法

1.1 材料

人肺腺癌PC-9细胞(突变型)、A549细胞(野生型)由中国人民解放军八一医院实验科提供。吉非替尼和培美曲塞分别由阿斯利康制药有限公司及美国礼来公司提供。胎牛血清、胰蛋白酶均购自北京中杉金桥公司。内参(β -actin)、磷酸化表皮生长因子受体(p-EGFR)一抗、磷酸化蛋白激酶B(p-AKT)一抗、磷酸化胞外调节蛋白激酶(p-ERK)一抗、兔源及鼠源二抗均购自Cell Signaling公司,抗TS单克隆抗体一抗购自美国Zymed公司。Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。

1.2 细胞培养和分组

人肺腺癌细胞PC-9、A549分别用含10%小牛血清的DMEM、RPMI 1640高糖培养液置于37℃、5%CO₂饱和湿度的培养箱中常规培养。取对数生长期的两种细胞制成每毫升 1.0×10^5 个细胞悬液,分别接种于96孔板中,每孔接种100 μ l,每组设置6个复孔。细胞分组如下:(1)空白对照组(C), (2)吉非替尼单独作用72h组(G), (3)培美曲塞单独作用72h组(P), (4)培美曲塞与吉非替尼同步联合作用72h组(G+P), (5)先培美曲塞24h后序贯吉非替尼共同作用48h组(P-G), (6)先吉非替尼24h后序贯培美曲塞共同作用48h组(G-P),见图1。吉非替尼在PC-9、A549中初始浓度分别设置为(0.02、0.04、0.08、0.16、0.32 μ mol/L)和(1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 μ mol/L),培美曲塞在两种细胞中均设置为(0.01、0.1、1.0、10、100 μ mol/L),计算出培美曲塞和吉非替尼在PC-9、A549细胞中作用72h的IC₅₀。然后吉非替尼在PC-9细胞中选择浓度(0.02、0.04 μ mol/L)、A549细胞中选择浓度(2.0、4.0 μ mol/L)与培美曲塞浓度(0.01、0.1、



G:gefitinib;P:pemetrexed;G-P:sequential gefitinib followed by pemetrexed; G+P:concurrent gefitinib and pemetrexed;P-G:sequential pemetrexed followed by gefitinib

图1 培美曲塞和吉非替尼不同时序给药的联合方式

Figure1 Different sequences of pemetrexed combined with gefitinib

1.0 μ mol/L)分别序贯或同步联合作为后续实验浓度。

1.3 MTT法检测不同时序给药对PC-9、A549细胞生长抑制作用

按不同给药方式干预72h后弃培养液,加100 μ l (5 g/L) MTT,温育4h后弃上清液,加入100 μ l 盐酸异丙醇,振荡10 min后,用酶联免疫检测仪测定570 nm波长下各孔吸光值(OD),各种药物浓度重复3次实验,计算各组细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率(%) = $(1 - OD_{\text{实验组}} / OD_{\text{空白对照组}}) \times 100\%$ 。

1.4 流式细胞仪检测不同时序给药后各组细胞凋亡及周期分布

取生长良好的对数生长期的A549、PC-9细胞以每孔2 ml浓度为每毫升 1.0×10^5 个接种于6孔板中,温箱培养24h,按实验设计分组给药,作用72h后收集细胞。(1)细胞凋亡检测:用PBS洗涤细胞2次,离心后,收集细胞。加入500 μ l的Binding Buffer悬浮细胞,根据说明书加入Annexin V-FITC和PI染液,混匀、室温、避光,反应10~15 min,上流式细胞仪检测细胞凋亡率。(2)细胞周期检测:用PBS洗液洗涤细胞1次,收集细胞。70%乙醇固定,4℃保存过夜,染色前用PBS洗去固定液,加入RNase A 37℃水浴30 min。再加入PI染色混匀,4℃避光30 min,上机检测。实验重复3次。

1.5 Western印迹法检测不同时序给药后EGFR信号通路p-EGFR、p-AKT、p-ERK及TS酶蛋白的表达

按实验设计分组给药,作用72h后收集细胞。细胞裂解液裂解细胞,收集细胞总蛋白。BCA法

测定蛋白浓度,将蛋白质样品进行SDS-PAGE电泳,转移至硝酸纤维膜上;室温封闭2 h,用含0.05% Tween 200的TBS缓冲液漂洗3次,加入相应的单克隆抗体(1:800稀释),4℃培育过夜,TBST漂洗3次后加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000稀释),37℃摇床温育2 h;电化学发光显色系统显色、曝光、显影,凝胶分析系统分析蛋白的表达情况。

1.6 统计学方法

采用SPSS13.0统计软件分析,数据采用均数±标准差表示,多组间计量资料采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两药不同时序作用PC-9、A549细胞后对细胞的增殖抑制作用

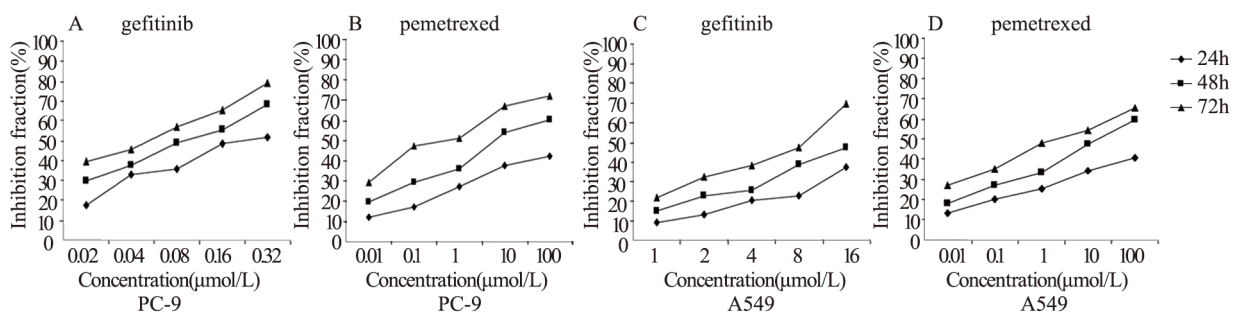
培美曲塞和吉非替尼各浓度单药组对PC-9、A549细胞均存在增殖抑制作用,呈时间和浓度依赖性,见图2。吉非替尼作用A549细胞72 h的 IC_{50} 远高于PC-9细胞,约为其200倍,见表1。两种细胞中,各个浓度组中培美曲塞序贯吉非替尼组(P-G)、培美曲塞同步联合吉非替尼组(P+G)均较单药组抑制率有不同程度提高($P<0.05$)。并且培美曲塞序贯吉非替尼组(P-G)抑制率均更优于培美曲塞同步联合吉非替尼组(P+G)($P<0.05$)。而吉非替尼序贯培美曲塞组(G-P)对两种细胞的抑制率均无明显协同增效作用,见图3。

2.2 两药不同时序作用PC-9、A549细胞后对各组

表1 培美曲塞和吉非替尼单药对PC-9和A549细胞作用72h的 IC_{50} ($\bar{x}\pm s$)

Table1 IC_{50} value of pemetrexed and gefitinib alone on PC-9 cells and A549 cells for 72h($\bar{x}\pm s$)

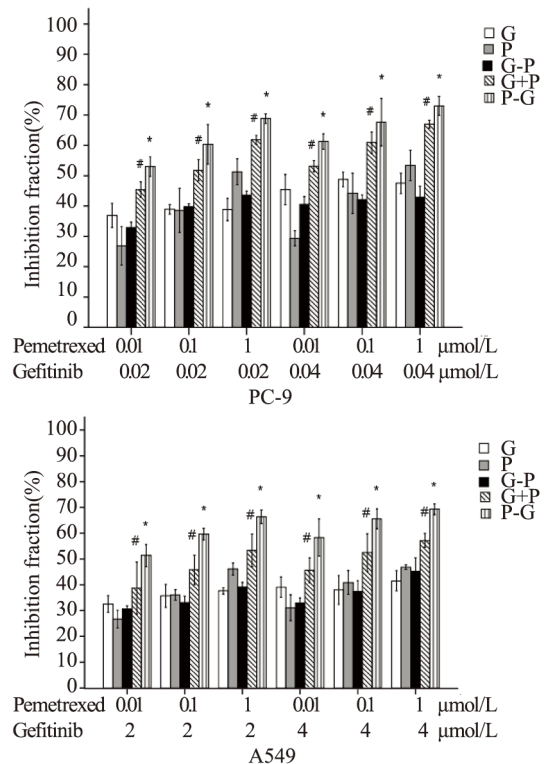
Drugs	IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)	
	PC-9	A549
Pemetrexed	0.483±0.040	2.742±0.505
Gefitinib	0.049±0.004	8.937±0.356



A: gefitinib on PC-9 cells; B: pemetrexed on PC-9 cells; C: gefitinib on A549 cells; D: pemetrexed on A549 cells

图2 培美曲塞和吉非替尼单药作用于人肺腺癌细胞PC-9和A549的量效曲线

Figure2 Dose-effect curves of pemetrexed and gefitinib alone on PC-9 cells and A549 cells



*: $P<0.05$, compared with G, P and G+P; #: $P<0.05$, compared with G and P

图3 培美曲塞和吉非替尼不同时序给药对PC-9和A549细胞的增殖抑制作用

Figure3 Sequence-dependent effects of pemetrexed and gefitinib on the anti-proliferation of PC-9 cells and A549 cells

细胞周期分布及凋亡的影响

在PC-9、A549细胞中分别选择0.04、4.0 $\mu\text{mol/L}$ 吉非替尼与1.0 $\mu\text{mol/L}$ 培美曲塞单药及联合作用,吉非替尼单药作用于PC-9、A549细胞72 h后将细胞主要阻滞在 G_0/G_1 期,较C组分别提高约27.47%、19.31% ($P<0.05$)。培美曲塞单药作用于PC-9、A549细胞72 h后将细胞主要阻滞在S期,较C组分别提高25.34%、24.28% ($P<0.05$)。培美曲塞序贯吉非替尼组(P-G)、培美曲塞同步联合吉非替尼组(G+P)的 G_2/M 期细胞比例在PC-9细胞中较C组提高10.32%、12.36%,在A549细胞中

提高约13.93%、18.74% ($P<0.05$), 见图4。两种细胞中, 培美曲塞和吉非替尼单药均可以不同程度的诱导细胞凋亡, 培美曲塞序贯(P-G)或同步联合吉非替尼组(G+P)较单药组均进一步提高了凋亡率($P<0.05$), 并且培美曲塞序贯(P-G)较同步(P+G)联合吉非替尼凋亡效应更加明显($P<0.05$), 而吉非替尼序贯培美曲塞(G-P)未提高单药的凋亡效应, 见表2。

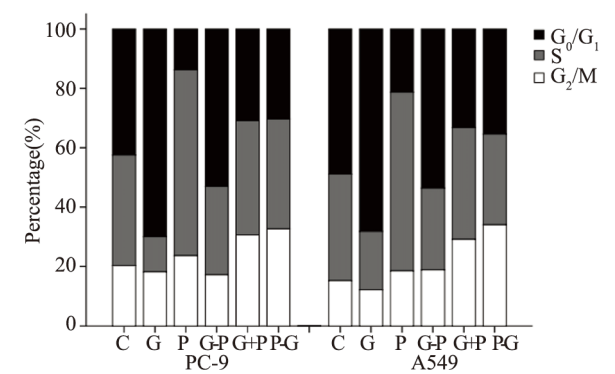


图4 培美曲塞和吉非替尼不同时序给药对PC-9和A549细胞周期的影响

Figure4 Sequence-dependent effects of pemetrexed and gefitinib on the cell cycles of PC-9 cells and A549 cells

表2 培美曲塞和吉非替尼不同时序给药后PC-9和A549细胞的凋亡情况($n=6, \bar{x}\pm s$)

Table2 Sequence-dependent effects of pemetrexed and gefitinib on the apoptosis rates of PC-9 cells and A549 cells ($n=6, \bar{x}\pm s$)

Groups	Apoptosis rates (%)	
	PC-9	A549
C	3.22±0.34	1.93±0.31
G	12.71±0.68	16.57±2.07
P	11.04±1.47	10.22±1.01
G-P	14.25±2.23	14.80±1.61
G+P	25.42±2.90 [#]	24.85±2.07 [#]
P-G	29.49±1.42 ^{#*}	31.90±2.83 ^{#*}

Notes:C: control; [#]: $P<0.05$, compared with G and P;^{*}: $P<0.05$, compared with G, P and G+P

2.3 两药不同时序作用后对细胞EGFR信号通路蛋白p-EGFR、p-AKT、p-ERK及TS酶蛋白表达的影响

本课题组前期预实验研究发现PC-9、A549均表达EGFR, 鉴于在两种细胞中得出同样的最佳给药方式, 选择A549细胞采用Western印迹法检测两药不同时序作用后对细胞p-EGFR、p-AKT、p-ERK及TS酶蛋白表达的影响。结果表明, A549细胞较高表达p-EGFR、p-AKT、p-ERK及TS酶蛋白。与未用药相比, 培美曲塞单药可以显著提高p-EGFR、p-ERK的表达。吉非替尼显著降低

p-EGFR、p-AKT、p-ERK及TS酶蛋白的表达, 培美曲塞序贯吉非替尼(P-G)、培美曲塞同步联合吉非替尼组(P+G)较单药组均进一步降低p-EGFR、p-AKT、p-ERK的表达, 见图5。

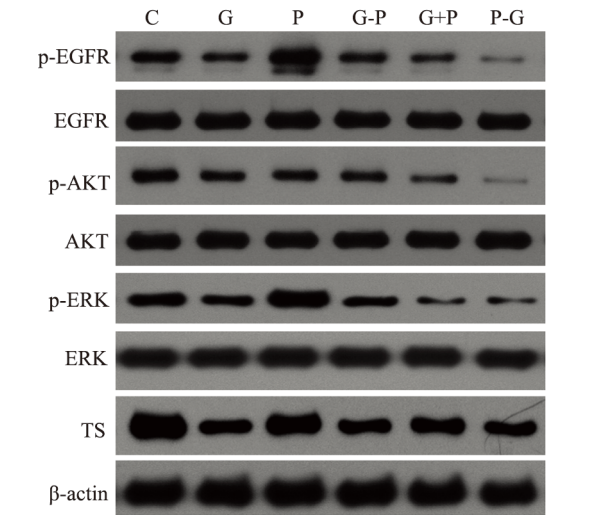


图5 培美曲塞和吉非替尼不同时序给药对p-EGFR、p-AKT、p-ERK及TS酶蛋白表达的影响

Figure5 Sequence-dependent effects of pemetrexed and gefitinib on the expressions of p-EGFR, p-AKT, p-ERK and TS zymoprotein

3 讨论

临床研究显示化疗与EGFR-TKI同时或序贯应用可能存在优势人群, 而这种优势人群可能与EGFR突变状态有关, INTACT-1^[3]、INTACT-2^[4]、TRIBUTE^[5]和TALENT^[6]研究失败的一个重要原因可能与试验开展时尚没有认识到EGFR-TKI获益的潜在人群有关。FAST-ACT II 研究公布的结果表明, EGFR突变患者接受化疗序贯厄洛替尼较之序贯安慰剂, 无论是PFS还是OS均显著延长^[7-8]。但是关于化疗序贯或联合EGFR-TKI是否存在EGFR突变选择性还存在争议。因此, 本实验同时选择PC-9细胞(EGFR突变型)和A549细胞(EGFR野生型)进行研究。

本研究中无论是EGFR突变型的PC-9还是EGFR野生型的A549细胞, 培美曲塞序贯吉非替尼(P-G)、培美曲塞同步联合吉非替尼(G+P)对细胞的增殖抑制及诱导细胞凋亡作用均优于单药组, 且培美曲塞序贯吉非替尼(P-G)的作用在两种细胞中均更加显著。

研究发现培美曲塞可以增强EGFR、AKT、ERK磷酸化水平, 而吉非替尼呈抑制作用。培美曲塞序贯(P-G)和同步联合吉非替尼(G+P)较单药组均进一步降低p-EGFR、p-AKT、p-ERK表

达。结果说明,化疗可以上调EGFR、AKT、ERK磷酸化,从而使吉非替尼抑制EGFR、AKT、ERK磷酸化的敏感度增强,这可能是协同增效的细胞学机制之一。

Takezawa等^[9]曾将吉非替尼或BIBW 2992与培美曲塞、5-Fu、S-1分别同步联合在多种肺腺癌细胞中均获得了协同效应,同时发现吉非替尼和BIBW 2992可以显著降低TS酶,并且认为协同增效的可能机制之一就是EGFR-TKI降低TS酶从而增加了培美曲塞、5-Fu、S-1的效应。虽然目前EGFR-TKI降低TS酶的具体机制还不十分明确,但大量临床研究已经证实TS酶是培美曲塞疗效的预测指标^[10],而在本研究中同样发现吉非替尼可以显著降低TS酶,这可能是培美曲塞联合吉非替尼协同增效的另一个机制,而之所以培美曲塞序贯吉非替尼可以获得更好的协同效应可能是由于序贯可以避免两药的相互干扰从而更好的激活EGFR信号通路,使后续的吉非替尼较之同步联合发挥更强的抑制效应。

吉非替尼序贯培美曲塞无论在PC-9还是在A549细胞中均未起到协同增效作用,而吉非替尼抑制细胞的EGFR、AKT、ERK磷酸化不能被培美曲塞逆转,因此从EGFR信号通路这一角度无法解释二者为何会产生拮抗作用。通过观察细胞周期发现,吉非替尼使大部分细胞阻滞在G₀/G₁期,而培美曲塞将细胞大部分阻滞在S期。培美曲塞主要作用于S期,先吉非替尼可能将更多的细胞阻滞在G₀/G₁期,因而削弱了后续培美曲塞的作用。另外,我们还发现在PC-9、A549细胞中,培美曲塞序贯和同步联合吉非替尼组G₂/M期细胞较其他组细胞比例有所增加。已知化疗药物诱导细胞损伤后,部分细胞在G₂/M期开始DNA修复和分裂,从而逃避凋亡。培美曲塞序贯或同步联合吉非替尼可能将细胞阻滞在G₂/M期,从而进一步干扰损伤细胞的修复,维持培美曲塞诱导的凋亡,这或许可以从细胞周期角度解释培美曲塞序贯或同步联合吉非替尼可以起到协同增效作用。

本研究初步证实无论在PC-9细胞还是A549细胞,培美曲塞序贯吉非替尼(P-G)、培美曲塞同步联合吉非替尼(P+G)均能起到协同增效作用,且培美曲塞序贯吉非替尼(P-G)方式更优。但是在药物剂量上存在较大差别,PC-9细胞的敏感度要远优于A549细胞。但本实验仅仅选择了一种突变型和一种野生型细胞,还有待于在更多的突变和野生型细胞加以证实,并且结合临床如何设计

最为优化的序贯方案以期更好地指导临床方案的选择还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Takeda K, Hida T, Sato T, *et al.* Randomized phase III trial of platinum-doublet chemotherapy followed by gefitinib compared with continued platinum-doublet chemotherapy in Japanese patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a west Japan thoracic oncology group trial(WJTOG0203)[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(5): 753-60.
- [2] Pawel JV, Szekely ZP, Vinolas N, *et al.* A randomized phase II study of pemetrexed versus pemetrexed plus erlotinib in second-line treatment for locally advanced or metastatic, non-squamous NSCLC[J]. *Clin Oncol*, 2011, 29 (abstr7526).
- [3] 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): 777-84.
- [4] 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): 785-94.
- [5] 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*, 2005, 23(25): 5892-9.
- [6] 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): 1545-52.
- [7] Wu YL, Lee JS, Thongprasert S, *et al.* Intercalated combination of chemotherapy and erlotinib for patients with advanced stage non-small-cell lung cancer (FASTACT-2): a randomized, double-blind trial[J]. *Lancet Oncol*, 2013, 14(8): 777-86.
- [8] Mok TSK, Lee JS, Zhang L, *et al.* Biomarker analyses and overall survival(OS) from the randomized, placebo-controlled, phase 3, FASTACT-2 study of intercalated erlotinib with gemcitabine/platinum in first-line advanced non-small cell lung cancer(NSCLC)[J/OL]. *Ann Oncol*, 2012, 23(Suppl9): a12260 [2012-11-25]. <http://www.webges.com/cslide/library/esmo/mylibrary/search/author/0/L.20%Zhang>.
- [9] Takezawa K, Okamoto I, Tanizaki J, *et al.* Enhanced anticancer effect of the combination of BIBW2992 and thymidylate synthase-targeted agents in non-small cell lung cancer with the T790M mutation of epidermal growth factor receptor[J]. *Mol Cancer Ther*, 9(6):1647-56.
- [10] Chen CY, Chang YL, Shih JY, *et al.* Thymidylate synthase and dihydrofolate reductase expression in non-small cell lung carcinoma: the association with treatment efficacy of pemetrexed[J]. *Lung Cancer*, 2011, 74(1):132-8.

[编辑校对: 安凤]