

索拉非尼联合表阿霉素对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖作用的影响及机制

胡 燕, 黄宇贤, 陈晓华, 罗荣城

(南方医科大学南方医院, 广州 510515)

摘要:目的 探讨索拉非尼联合表阿霉素对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖作用的影响及可能机制。方法 MTT 法测 MCF-7 细胞培养 1~14 d 的吸光度, 绘制生长曲线并在第 14 天检测其体外克隆形成率。于 24、48、72 h 分别测索拉非尼及表阿霉素半数抑制浓度 (IC_{50}) 值。实验分为空白对照组、索拉非尼单药组、表阿霉素单药组、联合组。根据索拉非尼及表阿霉素的 IC_{50} 值设定联合给药浓度及时间, 用 MTT 法测定 72 h 时索拉非尼及表阿霉素单用组与联合组 MCF-7 细胞的增殖抑制率。结果 生长曲线示 MCF-7 细胞在 1~4 d 生长速度较快, 之后减慢, 10 d 后生长趋于停滞。MCF-7 细胞在 14 d 的克隆形成率为 37.2%。索拉非尼 24、48、72 h 的 IC_{50} 值分别为 (7.85 ± 0.86) 、 (3.45 ± 0.16) 、 (2.10 ± 0.64) $\mu\text{mol/L}$, 表阿霉素 24、48、72 h 的 IC_{50} 值分别为 (6.52 ± 0.62) 、 (1.61 ± 0.82) 、 (1.13 ± 0.51) $\mu\text{mol/L}$ 。72 h 时索拉非尼组 MCF-7 抑制率明显低于表阿霉素组, MCF-7 抑制率高于其他两组 ($P < 0.05$), 细胞抑制率随药物浓度增加而增加 ($P < 0.05$)。结论 索拉非尼联合表阿霉素对乳腺癌细胞 MCF-7 细胞增殖有抑制作用; 其机制可能是两药联用抑制或阻断了细胞增殖和生存相关因素的作用。

关键词: 乳腺肿瘤; 乳腺癌; 索拉非尼; 表阿霉素; 药物治疗

中图分类号: R979.1; R737.9 文献标志码: A 文章编号: 1002-266X(2010)11-0037-03

Effects of sorafenib and epirubicin on the proliferation of breast cancer MCF-7 cell in vitro and its mechanism

HU Yan, HUANG Yu-xian, CHEN Xiao-hua, LUO Rong-cheng

(Oncology Center, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, P. R. China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of sorafenib and epirubicin (EPI) on the proliferation of breast cancer MCF-7 cells and its probable mechanism. **Methods** MTT assay was utilized to detect the light absorbance (A) from day 1 to 14 to determine growth kinetics. Giemsa was utilized to detect the cloning efficiency of MCF-7 cells. The IC_{50} of sorafenib and EPI was assessed after the MCF-7 cells incubated for 24, 48, 72 h. The best concentration and time of coadministration was decided according to the IC_{50} results. Four different groups were set up, they were control group, sorafenib group, EPI group, sorafenib + EPI group. The inhibitory effects of sorafenib, EPI and sorafenib + EPI treatment on MCF-7 proliferation in vitro were assessed by MTT assay after incubated for 72 h. **Results** The growth curve showed that the growth velocity of MCF-7 cells was fast at the first 4 days, but slowed down 5 days after, and stayed at a standstill in last stage. The cloning efficiency of MCF-7 cells was 37.2%. The IC_{50} of Sorafenib at 24, 48, 72 h are (7.85 ± 0.86) , (3.45 ± 0.16) , (2.10 ± 0.64) $\mu\text{mol/L}$, the IC_{50} of EPI at 24, 48, 72 h were (6.52 ± 0.62) , (1.61 ± 0.82) , (1.13 ± 0.51) $\mu\text{mol/L}$. Sorafenib and EPI both significantly inhibited the proliferation of MCF-7 cells at 72 h, showing a synergistic effect of their actions in combined use ($P < 0.05$). In the combination group, the inhibition rate increased as the concentration of administration increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Sorafenib and EPI have synergistic effects in inhibiting the proliferation of MCF-7 cells.

Key words: breast neoplasms, breast cancer; sorafenib; epirubicin; drug therapy

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 通常发生在乳房腺上皮组织。索拉非尼是一种多靶点抗肿瘤药物, 主要用于晚期肾细胞癌的治疗。Bianchi 等^[1]研究表明, 索拉非尼 400 mg 单药治疗转移性乳腺癌有较高的疾病稳定率。表阿霉素为一细胞周期非特异性药物, 对多种移植性肿瘤均有效。2009 年

5~10 月, 我们观察了索拉非尼与表阿霉素对乳腺癌细胞 MCF-7 细胞增殖作用的影响, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料 细胞株: 人乳腺癌细胞株 MCF-7 (山东大学药物分析研究所, 培养传代于含 10% 新生牛血清的 RPMI1640 培养液中, 选择对数生长期细胞进

行实验)。药物及试剂:索拉非尼(应用 100% DMSO 溶解,于 -20°C 保存,用时稀释),DMSO 终浓度 $<0.5\%$ 。表阿霉素(EPI),RPMI1640(Gibco 公司),小牛血清,MTT 及 DMSO。

1.2 细胞生长曲线绘制 将 MCF-7 细胞以 1×10^4 /每孔,接种于 96 孔板,每组 3 个复孔,于培养的 1~14 d 每天用 MTT 比色法检测 3 个复孔的吸光度(A)值,以时间为横坐标,A 值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.3 克隆形成率检测 取生长良好的 MCF-7 细胞,计数,细胞按 300/孔的浓度接种于 6 孔板中,设 3 个复孔,置于培养箱中培养,于 14 d 时取出观察,细胞已形成克隆,弃培养液,常规固定、姬姆萨染色,计数 >50 个细胞的克隆数。克隆形成率($\%$)=(克隆数/接种细胞数) $\times 100\%$ 。

1.4 药物浓度确定 采用 MTT 法分析 MCF-7 细胞对索拉非尼、表阿霉素药物敏感性:靶细胞均以 1×10^4 /ml 浓度接种于 96 孔培养板,100 μL /孔,培养过夜后加入药物,索拉非尼设 7 个浓度梯度,分别为 20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 5 $\mu\text{mol/L}$;表阿霉素设 8 个浓度梯度,分别为 20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 5、0.156 25 $\mu\text{mol/L}$,每种药物浓度设 3 个复孔,实验重复 3 次,并设不含药物对照组。分别培养 24、48、72 h 后每孔加入 20 μL MTT 溶液,继续培养 4 h,每孔加入二甲基亚砜 150 μL ,振荡器上充分混匀,于自动酶标仪 490 nm 波长下测定 A 值,计算 50% 细胞生长抑制所需的各药浓度(IC_{50}),确定下一步实验药物浓度。

1.5 药物干预及抑制率测定 采用 MTT 法。取对数生长期 MCF-7 细胞,以 1×10^4 /孔的密度接种于 96 孔板,培养 24 h 后加入药物。索拉非尼剂量分别为 0.01、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、2.0 $\mu\text{mol/L}$;表阿霉素药物剂量分别为 0.01、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.0 $\mu\text{mol/L}$;实验分为空白对照组、索拉非尼组、表阿霉素组、联合组[(0.01 + 0.01)、(0.1 + 0.05)、(0.2 + 0.1)、(0.4 + 0.2)、(0.8 + 0.4)、(1.6 + 0.8)、(2.0 + 1.0) $\mu\text{mol/L}$]。每个剂量设 4 个复孔,加药后分别培养 72 h,每孔加 MTT(5 mg/ml)20 μL ,继续培养 4 h,加入 DMSO 150 μL ,振荡 10 min,用酶标仪(波长 490 nm)测定各孔的 A 值,计算细胞增殖抑制率。抑制率($\%$)=(对照组 A 值 - 实验组 A 值)/对照组 A 值 $\times 100\%$ 。采用协同用 q 值判断索拉非尼和表阿霉素联用的性质。计算公式: $q = \text{EAB}/(\text{EA} + \text{EB} - \text{EAEB})$ 式中 EA 和 EB 为各药单用抑制率,EAB 为两药合用抑制率。 $q > 1.15$ 为

协同作用, $0.85 \leq q \leq 1.15$ 为相加作用, $q < 0.85$ 为拮抗作用。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件,各组间细胞抑制率比较采用重复测量方差分析,各组间及联合组组内 A 值比较采用单向方差分析,多重比较均采用 LSD 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞生长曲线 见图 1。MCF 细胞生长初期(4 d 内)生长速度较快,之后逐渐减慢,10 d 后细胞生长趋于停滞。

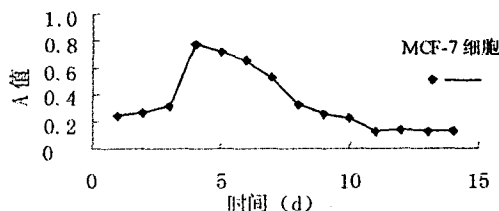


图 1 MCF-7 细胞生长曲线

2.2 克隆形成率 平板克隆形成实验显示 14 d 后 3 个孔形成的克隆数分别为 102、104、129 个/孔,克隆形成率为 37.2%。

2.3 药物浓度确定 索拉非尼和表阿霉素对 MCF-7 细胞的抑制作用呈浓度和时间依赖性,不同时间点 MCF-7 细胞的 IC_{50} 值见表 1。

表 1 不同时间点 MCF-7 细胞的 IC_{50} 值 ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$)

时间(h)	索拉非尼	表阿霉素
24	7.85 ± 0.86	6.52 ± 0.62
48	3.45 ± 0.16	1.61 ± 0.82
72	2.10 ± 0.64	1.13 ± 0.51

2.4 细胞增殖抑制率 MCF-7 细胞经索拉非尼 + 表阿霉素联合处理后,在 72 h 出现细胞生长抑制作用,与单用索拉非尼或表阿霉素相比,细胞抑制率明显增高。联合组抑制率为 29%~57%,索拉非尼组抑制率为 9%~26%,表阿霉素组抑制率为 16%~32%,两两比较, $P < 0.05$;其中,索拉非尼 2 $\mu\text{mol/L}$ + 表阿霉素 1 $\mu\text{mol/L}$ 在 72 h 的 q 值为 1.17,表现为协同作用,其余组 q 值为 0.93~1.12,表现为相加作用。联合组抑制率随药物浓度增加而增加, $P < 0.05$ 。

3 结论

乳腺癌发病率占全身各种恶性肿瘤的 7%~10%,其发病常与遗传有关,以 40~60 岁、绝经期前后的妇女发病率较高。肿瘤的存在、生长及转移依赖于肿瘤细胞的增殖和肿瘤血管生成,有研究表明同时作用于这两个环节可以达到治疗目的^[3]。Ras/Raf 信号转导通路是细胞增殖和血管生成的重

要中间通路,活化的 Ras 信号和突变的 B-Raf 通路使得 Ras/Raf 信号通路异常活跃,该通路亦可提高生长因子的受体。索拉非尼是首个口服的多激酶抑制剂,靶向作用于肿瘤细胞和肿瘤血管上的丝氨酸/苏氨酸激酶和受体酪氨酸激酶。其可有力抑制 Raf-1,且有较强的激酶选择特性。在体外还表现出对野生型及 V599E 突变 B-Raf 活性的抑制作用^[4]。在新生血管形成及肿瘤进展中,索拉非尼对多种酪氨酸激酶受体有明显抑制作用,包括 VEGFR-2、VEGFR-3、PDGFR、Flt-3、c-Kit 等。此外,索拉非尼抑制细胞周期蛋白及细胞周期相关蛋白(如 CyclinD1、cdk4、cdk6)^[5],使增殖期细胞不能通过“G₁~S”调节点,阻滞在 G₁ 期从而阻断细胞周期进展,进而影响细胞生长促进凋亡^[6]。但 Moreno-Aspitia 等^[7]进行一项研究表明索拉非尼作为一种单药,虽然有良好的耐受性,可在已接受过前期化疗的转移性乳腺癌患者中,可测量的肿瘤病灶未明显缩小。表阿霉素能直接嵌入 DNA 核碱对之间,干扰转录过程,阻止 mRNA 形成,从而抑制 DNA 和 RNA 合成。此外,表阿霉素对拓扑异构酶 II 亦有抑制作用。日本乳腺癌协会的一项研究表明,对免疫组化染色后定义为 TOP2A 阳性和 BRCA1 阴性的患者术前予含表阿霉素的化疗方案可得到更高的病理学完全缓解率^[2]。邓放等^[8]研究表明,表阿霉素联合组蛋白去乙酰化酶抑制剂 MS-275 可明显上调 p21、p53 蛋白的表达,增加对乳腺癌细胞 MCF-7 的细胞毒性。本研究显示,索拉非尼及表阿霉素单药对乳腺癌 MCF-7 细胞均有增殖抑制作用,且呈剂量依赖性,而二者联用有协同抑制细胞增殖的作用,与单药相比差异有显著性。其机制可能是两药联用抑制或阻断了细胞增殖和生存相关因素的作用,从而协同影响 MCF-7 细胞增殖及存活。

随着分子靶向治疗研究的不断深入,生物化疗这一全新的肿瘤治疗模式越来越受到人们的关注,本实验通过联用索拉非尼和表阿霉素体外实验证明了对乳腺癌的抗肿瘤作用,为临床乳腺癌的生物化疗治疗模式提供了参考,但其内在机制仍需进一步探讨。

参考文献:

- [1] Bianchi G, Loibl S, Zamagni C, et al. Phase II multicenter, uncontrolled trial of sorafenib in patients with metastatic breast cancer[J]. *Anticancer Drugs*, 2009, 20(7): 616-624.
- [2] Miyoshi Y, Kurosumi M, Kurebayashi J, et al. Predictive factors for anthracycline-based chemotherapy for human breast cancer[J]. *Breast Cancer*, 2009, 36(27): 287-292.
- [3] Strumberg D. Preclinical and clinical development of the oral multikinase inhibitor sorafenib in cancer treatment[J]. *Drugs TAay (Bare)*, 2005, 41(12): 773-784.
- [4] Wilhelm SM, Carter C, Tang L, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(19): 7099-7109.
- [5] Jane EP, Premkumar DR, Pollack IF. Coadministration of Sorafenib with rottlerin potently inhibits cell proliferation and migration in human malignant glioma cells[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 319(3): 1070-1080.
- [6] Liu L, Cao Y, Chen C, et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma mAel PLC/PRF/5[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(24): 11851-11858.
- [7] Moreno-Aspitia A, Morton RF, Hillman DW, et al. Phase II trial of sorafenib in patients with metastatic breast cancer previously exposed to anthracyclines or taxanes: North Central Cancer Treatment Group and MayoClinic Trial N0336[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(1): 11-15.
- [8] 邓放,王广义,任强. MS-275 与表阿霉素合用对乳腺癌 MCF-7 细胞的影响[J]. *中国妇幼保健*, 2007, 22(31): 4466-4468.

(收稿日期: 2009-12-28)

· 告读者 ·

文后参考文献的著录方法

按 GB/T7714-2005《文后参考文献著录规则》采用顺序编码制著录,依照其在文中出现的先后顺序用阿拉伯数字加方括号标出。参考文献中的作者 1~3 名全部列出,3 名以上只列前 3 名,后加“等”或其他与之相应的文字。外文期刊名称用缩写,以《Index Medicus》中的格式为准;中文期刊用全名。论文题目后加文献类型及标识,如专著[M]、期刊文章[J]等。每条参考文献均须著录起止页。作者必须认真核对参考文献原文,无误后将其按引用顺序(用阿拉伯数字)排列于文末。