

◇ 药学研究 ◇

舒尼替尼对 EGFR T790M 突变非小细胞肺癌 H1975 细胞增殖抑制作用及其机制

潘 峰¹, 田 静², 张旭超³, 潘跃银¹

摘要 目的 探讨舒尼替尼(sunitinib)对 EGFR T790M 突变的非小细胞肺癌 H1975 细胞的生长抑制作用及其可能的机制。方法 应用 MTT 法检测 sunitinib 作用 H1975 细胞的增殖抑制作用;荧光染色法观察 sunitinib 诱导细胞凋亡形态学的变化;流式细胞术检测细胞周期的变化,Western blot 分析 Bcl-2 蛋白水平的变化。结果 在 0.75 ~ 24 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内,sunitinib 明显抑制 H1975 细胞增殖,且具有浓度和时间依赖性,24、48、72 h 的半数抑制浓度(IC_{50})分别为(11.70 ± 1.49)、(6.49 ± 0.70)、(3.54 ± 0.28) $\mu\text{mol/L}$ 。荧光显微镜观察发现 sunitinib 能够诱导细胞出现核固缩、染色质凝集等典型的凋亡形态学改变。流式细胞仪检测细胞周期显示,sunitinib 阻滞 H1975 细胞于 G_0/G_1 期。Western blot 结果显示 sunitinib 能够下调 Bcl-2 蛋白的表达水平。结论 sunitinib 对 EGFR T790M 突变的 H1975 细胞具有抑制增殖、改变细胞周期分布和诱导细胞凋亡的作用。

关键词 舒尼替尼;肺癌;非小细胞肺癌;细胞凋亡;细胞周期;Bcl-2

中图分类号 R 734.2;R329.25;R 979.19

文献标识码 A **文章编号** 1000-1492(2011)12-1267-05

目前批准用于肺癌的靶向药物吉非替尼和厄洛替尼在 EGFR 激活突变的患者中已经取得很好疗效,然而 T790M 继发耐药性突变被认为是导致获得性耐药的主要原因,这部分患者不能够从 EGFR TKIs 中获益^[1]。舒尼替尼(sunitinib)是一种口服的多靶点酪氨酸酶抑制剂,已被用于治疗肾癌和对伊马替尼抵抗的胃肠道间质瘤^[2]。研究显示,sunitinib 在治疗其他实体肿瘤中显示出了较好的抗肿瘤活性^[3-4],本研究旨在探讨 sunitinib 对 H1975 肺癌细胞的增殖抑制作用及其机制,为临床应用提供实验

依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 人非小细胞肺癌 H1975 (EGFR T790M 突变)细胞株由广东省医学科学院(广东省肺癌研究所)吴一龙教授惠赠;sunitinib 购自辉瑞公司;胎牛血清、RPIM 1640 购自 HyClone 公司;MTT 购自 Sigma 公司;Annexin V-EGFP 购自 Millipore;DAPI 购自罗氏公司;Bcl-2、 β -actin 抗体购自 CST 公司;荧光显微镜购自 OLYMPUS;酶标仪购自 BioTek Instruments 公司;流式细胞仪购自 BeckMan Coulter 公司;Western 电泳仪购自 BIO-RAD Instruments 公司。

1.2 细胞培养 H1975 细胞培养于含 10% 胎牛血清、100 U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 RPIM 1640 培养液中,置于 37℃、5% CO_2 恒温培养箱中培养。每 1 ~ 2 d 传代 1 次,取对数生长期细胞进行实验。

1.3 MTT 法检测 sunitinib 对 H1975 细胞增殖抑制率 取对数生长期细胞,每孔加入 100 μl 密度为 4.0×10^7 个/L 的 H1975 细胞于 96 孔板中,经 24 h 贴壁后,次日吸出原培养基,每孔加入终浓度为 0.75、1.50、3.00、6.00、12.00、24.00 $\mu\text{mol/L}$ 的 sunitinib 200 μl ,每个药物浓度设置 6 个复孔,同时设置细胞对照组(仅含细胞和培养基不含药物的孔)和空白对照组(仅含培养基不含细胞的孔),分别培养 24、48、72 h 后,每孔加入 5 g/L MTT 20 μl ,培养 4 h 后轻轻吸尽上清,每孔加入 DMSO 150 μl ,轻轻摇晃 10 min,在 570 nm 波长用自动酶标仪测定每孔的吸光度(OD)值,实验重复 3 次。细胞抑制率($\%$) = $1 - (\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) / (\text{OD}_{\text{细胞组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) \times 100\%$,并计算 sunitinib 在 24、48、72 h 的半数抑制浓度(IC_{50})。

1.4 细胞凋亡形态学观察 取对数生长期 H1975 细胞,经消化重悬后,以 1×10^8 个/L 密度接种于 6 孔板,次日细胞贴壁后吸出旧培养基,加入浓度为 3.6 $\mu\text{mol/L}$ 的 sunitinib 2 ml 作用 72 h 后,吸出培养基,PBS 洗涤细胞 2 次,加入预先配好的试剂[Bind-

2011-06-30 接收

基金项目:安徽省科技厅重点项目(编号:07020304102)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院肿瘤科,合肥 230022

²安徽医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系,合肥 230032

³广东省肺癌研究所,广州 510080

作者简介:潘 峰,男,硕士研究生;

潘跃银,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:yueyinpan@gmail.com

ing Buffer、Annexin V-EGFP、碘化丙啶(PI);比例为100:1:1],均匀覆盖6孔板底面,避光、室温反应5 min。荧光显微镜下观察细胞形态变化,实验重复3次。

1.5 流式细胞术检测 sunitinib 对 H1975 细胞周期的影响 取对数生长期的细胞,以 1×10^8 个/L 浓度接种于6孔板中,24 h贴壁后,弃除旧培养液,加入 $3.6 \mu\text{mol/L}$ 的 sunitinib 2 ml,培养细胞72 h后,吸除培养基,PBS洗3次,胰酶消化,离心去上清,加入DAPI染液,避光反应10 min后,流式细胞仪上机检测,用Wmcycle软件分析细胞周期分布。实验重复3次。

1.6 Western blot 检测 Bcl-2 蛋白的表达水平 取对数生长期的细胞,经胰酶消化后以 5×10^8 个/L 浓度接种入细胞培养瓶内。24 h贴壁后,加入 $3.6 \mu\text{mol/L}$ 浓度的 sunitinib 5 ml 作用72 h后,用预冷的PBS洗涤细胞3次,将细胞刮入含PMSF蛋白酶抑制剂裂解液中,冰上裂解30 min, 4°C 、14 000 r/min 离心30 min后,吸取上清,分装置于 -80°C ,BCA法测定蛋白浓度,将蛋白样品($50 \mu\text{g}/\text{孔}$)加入10%浓度的SDS-聚丙烯酰胺凝胶,经电泳、转膜、5%脱脂奶粉封闭, 4°C 一抗(1:1 000)孵育过夜,常温下二抗(1:5 000)孵育1 h,转入暗室加ECL发光液,胶片曝光,显影定影后扫描并用Image J 1.43 软件分析,计算灰度比值,实验重复3次。

1.7 统计学处理 采用SPSS 13.0 统计软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组的组间均数比较用方差分析,两组均数间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 sunitinib 对 H1975 细胞增殖抑制作用 MTT法检测0.75、1.50、3.00、6.00、12.00、24.00 $\mu\text{mol/L}$ 的 sunitinib 作用 H1975 细胞24、48、72 h后,发现 sunitinib 对 H1975 细胞生长具有增殖抑制作用,且具有明显的时间和浓度的依赖性,见图1。24.0 $\mu\text{mol/L}$ sunitinib 作用细胞72 h的抑制率(93.95 ± 3.41)%。sunitinib 作用 H1975 细胞24、48、72 h的 IC_{50} 分别为(11.70 ± 1.49)、(6.49 ± 0.70)、(3.54 ± 0.28) $\mu\text{mol/L}$ 。sunitinib 不同作用时间和浓度之间存在交互效应($F = 4.513, P < 0.001$);不同时间和不同浓度 sunitinib 的增殖抑制率差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 sunitinib 对 H1975 细胞凋亡形态的影响 sunitinib($3.6 \mu\text{mol/L}$)作用 H1975 细胞72 h后,经

Annexin V-EGFP 荧光染色发现,同对照组相比, sunitinib 组处于凋亡期的细胞明显增多,出现特征性的细胞核固缩、细胞内出现空泡、染色质凝集和碎裂等凋亡现象,见图2。

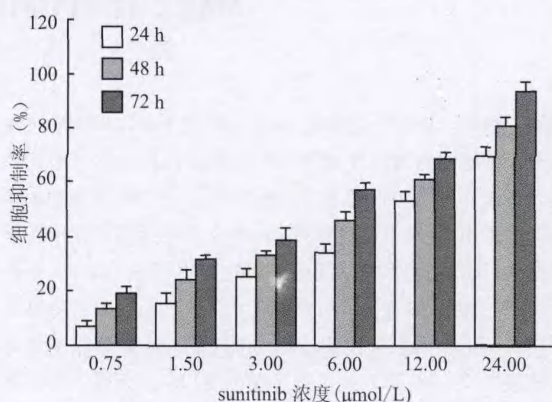


图1 MTT法检测 sunitinib 对 H1975 细胞的生长抑制作用

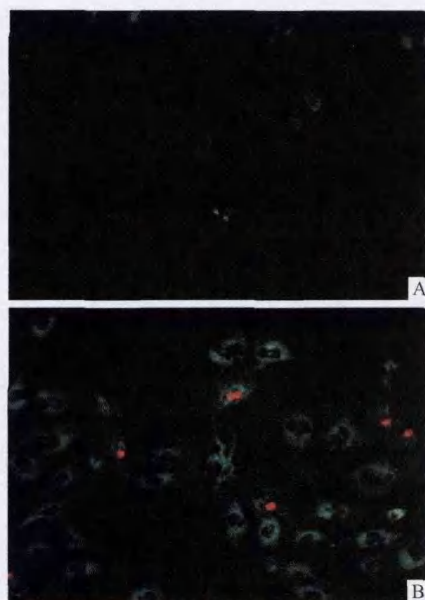


图2 sunitinib 作用 H1975 细胞72 h 形态学变化 Annexin V-EGFP $\times 400$ A:对照组;B:sunitinib 组

2.3 sunitinib 单药对 H1975 细胞周期的影响

sunitinib($3.6 \mu\text{mol/L}$)作用于 H1975 细胞72 h后发现,对照组 H1975 细胞大多数处于 G_1 和 S 期, G_2/M 期最少。sunitinib 处理后, G_0/G_1 期比例明显增加, S 期细胞比例相应减少,说明 sunitinib 为 G_1 期特异性阻滞药物,见图3。

2.4 sunitinib 对 H1975 细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响

应用 sunitinib 作用 H1975 细胞72 h的 IC_{50} ($3.6 \mu\text{mol/L}$) 浓度作用于细胞, Bcl-2 蛋白表达水平见图4A,同对照组相比, sunitinib 组 Bcl-2 蛋白表达

水平显著降低,差异具有统计学意义($P = 0.002$),见图 4B。

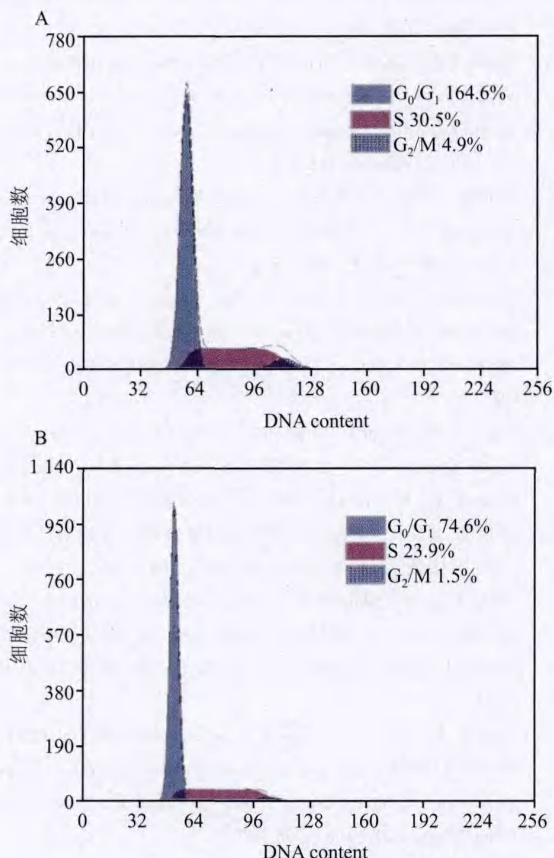


图 3 流式细胞术检测 sunitinib 作用 H1975 细胞 72 h 后细胞周期变化 A:对照组;B:sunitinib 组

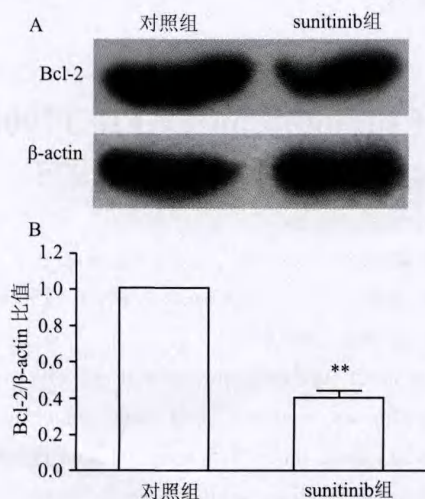


图 4 sunitinib 对 H1975 细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响 A:Bcl-2 表达水平的变化;B:Bcl-2/β-actin 比值;与对照组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

当前,吉非替尼和厄洛替尼作为二线或三线药

物用于一线以铂类为基础的化疗失败的患者^[5-6],然而研究显示 EGFR TKIs 的敏感性和 EGFR 激活突变相关,对于这部分激活突变患者能够从治疗中明显获益^[7-8],但非小细胞肺癌中 EGFR 突变的发生率仅为 10% ~ 30%^[9]。尽管部分激活突变的患者初期对 EGFR TKIs 敏感,但随着治疗时间的延长,大多患者出现 EGFR TKIs 获得性耐药,而 50% EGFR 敏感性突变患者发生获得性耐药会出现 EGFR T790M 突变。临床前和临床研究证实 T790M 突变是 EGFR TKIs 耐药的主要机制^[10-11]。因此寻找对 EGFR TKIs 继发耐药性 EGFR T790M 突变患者新的治疗药物是当前研究的重点。

本实验应用 sunitinib 作用于 EGFR TKIs 耐药的 T790M 突变的 H1975 细胞株。结果显示,在 0.75 ~ 24 $\mu\text{mol/L}$ 范围内,sunitinib 对 H1975 细胞有显著的增殖抑制作用,且抗增殖作用具有时间和浓度依赖性,72 h 的抑制率超过 90%,提示 sunitinib 可能作为 EGFR TKIs 治疗出现继发耐药的肺非小细胞肺癌患者新的药物选择。但是,先前临床研究发现给予 50 mg/d 的口服剂量,测得患者的血浆血药浓度峰值为 0.19 $\mu\text{mol/L}$,明显低于 24、48、72 h 的 IC₅₀ 浓度^[4],产生这种差异可能为 H1975 对 sunitinib 也存在耐药,EGFR T790M 突变本身对多靶点药物可能也是一种耐药性突变;另一种解释可能由于体内外实验环境不同引起药物代谢机制不同有关,因此需要进一步的体内实验加以确认。

本研究发现,sunitinib 作用后 H1975 细胞出现细胞核固缩、细胞内出现空泡、染色质凝集和碎裂等细胞凋亡典型的形态学变化。细胞凋亡是细胞在受到生理和病理性刺激后出现的自发的死亡过程^[12],最新研究显示 sunitinib 可以通过抑制 STAT 和 PI3K/AKT 等信号通路而提高凋亡,提示 STAT、PI3K/AKT 等信号通路可能参与了 Bcl-2 表达的调控^[13]。也发现 sunitinib 作用细胞后能够下调 Bcl-2 蛋白的表达水平,与 Huynh et al^[14] 在肝癌中的研究结果一致。这些结果提示 sunitinib 可能通过抑制多靶点进而阻断下游的信号通路增加抗凋亡信号的表达而发挥抗肿瘤作用。流式细胞术检测结果显示,sunitinib 能够将细胞阻滞在 G₀/G₁ 期,显示出 sunitinib 为周期性特异性阻滞药物。一项关于 sunitinib 作用鼻咽癌的研究也发现 sunitinib 能够阻滞细胞处于 G₁ 期,进而使细胞不能进入下个周期进行分裂增殖,从而抑制肿瘤的增殖,发挥抗肿瘤效应^[15]。

因此,sunitinib 能够抑制 EGFR T790M 突变非小细胞肺癌的增殖,同时 sunitinib 通过诱导细胞发生周期特异性阻滞和下调 Bcl-2 抗凋亡蛋白的表达可能是其产生抗肿瘤的机制之一。由于 sunitinib 为多靶点的抗肿瘤药物,其抗肿瘤机制复杂,体外研究显示的 sunitinib 抑制浓度范围明显高于临床研究血药浓度的剂量,需要进一步的体内实验加以深入研究。

参考文献

- [1] Chen H J, Mok T S, Chen Z H, et al. Clinicopathologic and molecular features of epidermal growth factor receptor T790M mutation and c-MET amplification in tyrosine kinase inhibitor-resistant Chinese non-small cell lung cancer[J]. *Pathol Oncol Res*, 2009, 15(4): 651-8.
- [2] Chow L Q, Eckhardt S G. Sunitinib: from rational design to clinical efficacy[J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(7): 884-96.
- [3] Tassi R, Muto A, Rangan S, et al. Response and safety of sunitinib in a heavily pre-treated metastatic non-small cell lung carcinoma patient[J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(12): 5169-73.
- [4] Faivre S, Delbaldo C, Vera K, et al. Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(1): 25-35.
- [5] Reck M, van Zandwijk N, Gridelli C, et al. Erlotinib in advanced non-small cell lung cancer: efficacy and safety findings of the global phase IV tarceva lung cancer survival treatment study[J]. *J Thorac Oncol*, 2010, 5(10): 1616-22.
- [6] Sanford M, Scott L J. Gefitinib: a review of its use in the treatment of locally advanced/metastatic non-small cell lung cancer[J]. *Drugs*, 2009, 69(16): 2303-28.
- [7] Pham D, Kris M G, Riely G J, et al. Use of cigarette-smoking history to estimate the likelihood of mutations in epidermal growth factor receptor gene exons 19 and 21 in lung adenocarcinomas[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(11): 1700-4.
- [8] Lynch T J, Adjei A A, Bunn P A Jr, et al. Summary statement: novel agents in the treatment of lung cancer; advances in epidermal growth factor receptor-targeted agents[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(14 Pt 2): 4365s-71s.
- [9] Tanaka T, Matsuoka M, Sutani A, et al. Frequency of and variables associated with the EGFR mutation and its subtypes[J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(3): 651-5.
- [10] Onitsuka T, Uramoto H, Nose N, et al. Acquired resistance to gefitinib: the contribution of mechanisms other than the T790M, MET, and HGF status[J]. *Lung Cancer*, 2010, 68(2): 198-203.
- [11] Fukui T, Mitsudomi T. Mutations in the epidermal growth factor receptor gene and effects of EGFR-tyrosine kinase inhibitors on lung cancers[J]. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*, 2008, 56(3): 97-103.
- [12] 胡雪莹, 夏瑞祥. 黄芪总苷诱导人白血病 NB4 细胞凋亡的研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2010, 45(5): 643-45.
- [13] Yang F, Jove V, Xin H, et al. Sunitinib induces apoptosis and growth arrest of medulloblastoma tumor cells by inhibiting STAT3 and AKT signaling pathways[J]. *Mol Cancer Res*, 2010, 8(1): 35-45.
- [14] Huynh H, Ngo V C, Choo S P, et al. Sunitinib (SUTENT, SU11248) suppresses tumor growth and induces apoptosis in xenograft models of human hepatocellular carcinoma[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2009, 9(6): 738-47.
- [15] Hui E P, Lui V W, Wong C S, et al. Preclinical evaluation of sunitinib as single agent or in combination with chemotherapy in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Invest New Drugs*, 2011, 29(6): 1123-31.

Antiproliferative effects and mechanism of sunitinib on EGFR T790M mutation in human non-small cell lung cancer cell line H1975

Pan Feng¹, Tian Jing², Zhang Xuchao³, et al

(¹Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032;

³Guangdong Lung Cancer Institute, Guangzhou 510080)

Abstract Objective To research the inhibitory effects and mechanism of sunitinib on acquired epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors (EGFR TKIs)-resistant in human non-small cell lung cancer cell line H1975 with EGFR T790M mutation *in vitro*. **Methods** The inhibitory effects on H1975 cells exposed to sunitinib were evaluated by MTT method. The morphological changes of apoptosis induced by sunitinib were observed by fluorescence staining under the fluorescence microscope. Cell cycle was detected by flow cytometry. The Bcl-2 protein expression levels were measured by Western blot. **Results** The MTT assay showed sunitinib had significantly anti-proliferative effects with dose-dependent and time-dependent at the concentration ranged from 0.75 to 24 $\mu\text{mol/L}$. The IC_{50} values of sunitinib on H1975 cells were (11.70 ± 1.49) , (6.49 ± 0.70) and (3.54 ± 0.28) $\mu\text{mol/L}$ at 24, 48, 72 h, respectively. Typical apoptotic morphologic changes were observed by fluorescence microscope, such

野菊花总黄酮对大鼠肺纤维化的干预作用

郑媛媛¹, 吴繁荣²

摘要 目的 研究野菊花总黄酮(TFC)对大鼠肺纤维化(PF)的预防作用。方法 30只Wistar大鼠,随机均分为假手术对照组、模型组、TFC(168、336 mg/kg)组、强的松组。除假手术对照组外其余各组大鼠气管内一次性滴注盐酸平阳霉素诱导PF模型。次日TFC两组和强的松组分别给予TFC 168、336 mg/kg及强的松3.22 mg/kg,假手术对照组、模型组用生理盐水代替。给药后第28天处死全部大鼠。观察各组肺间质纤维化形成的病理变化;检测大鼠肺组织羟脯氨酸(HYP)、血清超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量;RT-PCR法观察各组大鼠肺组织TGF- β_1 mRNA的表达。结果 与模型组比较,TFC组病理变化减轻,TFC能显著降低大鼠肺组织HYP以及血清中SOD、MDA的含量并能下调大鼠肺组织TGF- β_1 mRNA表达。结论 TFC可以改善盐酸平阳霉素诱导的PF大鼠一般情况,并通过抑制大鼠肺组织TGF- β_1 mRNA表达,以达到抗纤维化的作用。

关键词 野菊花总黄酮;肺纤维化;转化生长因子 β_1

中图分类号 R 563.13; R 965.1; R 285.5; R 914.3

文献标识码 A **文章编号** 1000-1492(2011)12-1271-04

野菊花总黄酮(TFC)是从野菊花中提取的有效部位,总黄酮含量达70%以上^[1]。研究^[2]发现TFC对多种急、慢性炎症和免疫性炎症反应具有一定拮抗作用,以及对机体免疫功能有调节作用。肺纤维化(pulmonary fibrosis, PF)是以弥漫性肺泡炎、肺泡结构紊乱和最终导致PF为病理特征的慢性炎症性疾病。不同病种的肺间质纤维化改变都从肺泡炎开

始,慢性炎症反应是PF的前奏^[3-4]。PF患病率和死亡率在肺科疾病中日趋增长,至今仍缺乏能提高PF患者生存率和生活质量的药物。本实验观察了TFC对平阳霉素诱导的PF大鼠的干预作用及其对肺组织TGF- β_1 表达的影响,旨在探讨TFC对PF作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 Wistar大鼠,♂,SPF级,180 g \pm 200 g,由安徽医科大学动物实验中心提供。

1.2 药物和主要试剂 TFC(棕黄色粉末,野菊花经正丁醇回流提取、大孔树脂吸附洗脱纯化后得到,安徽医科大学第一附属医院实验室);注射用盐酸平阳霉素(哈尔滨博莱制药有限公司,批号:090901);强的松(浙江仙琚制药股份有限公司生产,批号:091201);超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒、羟脯氨酸(HYP)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;TRIzol购自Invitrogen公司;逆转录试剂盒购自Promega公司;PCR试剂盒购自Fermentas公司;PCR引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3 主要仪器 低温高速离心机(Eppendorf公司);PCR扩增仪(Eppendorf公司)。

1.4 方法

1.4.1 大鼠造模^[5]与给药方法 常规饲养大鼠1周后,将大鼠30只随机分为假手术对照组、模型组、TFC(168、336 mg/kg)组、强的松组(3.22 mg/kg),每组6只。将大鼠用10%水合氯醛腹腔注射麻醉后,仰卧位固定于手术台上,进行气管插管。模型组、TFC(168、336 mg/kg)组、强的松组(3.22 mg/kg)一次性气管内注入平阳霉素(5 mg/kg)复制大

2011-07-07 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:090413139)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院药剂科,国家中医药管理局中药化学三级实验室,合肥 230022

²安徽医科大学药学院,合肥 230032

作者简介:郑媛媛,女,主管药师;

吴繁荣,男,讲师,责任作者, E-mail: chadiy@sina.com

as nuclear condensation and chromatin condensation. Flow cytometry assay showed that cell cycle was arrested at the G₀/G₁ phase on H1975 cells. Western blot assay indicated that sunitinib down-regulated the protein level of Bcl-2. **Conclusion** Sunitinib can exert inhibitory effects on acquired EGFR TKIs-resistant in human non-small cell lung cancer cell line H1975 with EGFR T790M mutation, and it also can change the distribution of cell cycle and induce apoptosis.

Key words: sunitinib; lung cancer; non-small cell lung cancer; apoptosis; cell cycle; Bcl-2