

· 基础研究 ·

蟾毒灵联合吉非替尼对肺癌细胞 H1975 的影响及机制研究

康小红 龚亚斌 王立芳 王中奇 邓海滨 赵晓珍 吴 继 徐振晔

摘要 目的 观察蟾毒灵联合吉非替尼对肺癌细胞 H1975 生长的影响,探讨蟾毒灵增强吉非替尼抗肿瘤作用的可能机制。方法 应用 MTT 法检测蟾毒灵(1~100 nmol/L)、吉非替尼(0.1~20 μ mol/L)及两药联合干预对 H1975 细胞增殖的抑制作用;流式细胞术观察蟾毒灵(10 nmol/L)、吉非替尼(1 μ mol/L)及联合用药对 H1975 细胞凋亡的影响;Western blot 检测单独用药或联合用药对表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、Met 信号通路相关蛋白表达的影响。结果 MTT 结果显示,吉非替尼浓度超过 5 μ mol/L 时才见到其对 H1975 细胞生长的抑制作用;蟾毒灵与吉非替尼联合后,可明显抑制肿瘤细胞的生长。流式细胞术结果显示,蟾毒灵联合吉非替尼干预后肿瘤细胞凋亡率为(61.64 $\pm$ 5.61)%,明显高于单用蟾毒灵的(18.34 $\pm$ 3.42)%和单用吉非替尼的(7.32 $\pm$ 1.08)%,差异有统计学意义($P < 0.01$)。Western blot 结果显示,蟾毒灵联合吉非替尼能明显下调 H1975 细胞 p-EGFR、p-Met、磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)蛋白表达。结论 蟾毒灵联合吉非替尼可显著抑制 H1975 细胞的增殖,促使肿瘤细胞凋亡;其抗肿瘤活性的机制可能与阻断 EGFR-磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3k)/Akt 信号通路有关。

关键词 蟾毒灵;吉非替尼;肺癌;表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂;磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B 信号通路

Effect of Bufalin Combined Gefitinib on Lung Cancer H1975 Cells and Its Mechanisms Research
KANG Xiao-hong, GONG Ya-bin, WANG Li-fang, WANG Zhong-qi, DENG Hai-bin, ZHAO Xiao-zhen, WU Ji, and XU Zhen-ye Department of Oncology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (200032), China

ABSTRACT Objective To observe the effect of bufalin combined Gefitinib on lung cancer H1975 cells, and to explore its potential mechanisms for anti-tumor. Methods The cytostatic effects of bufalin (1~100 nmol/L), gefitinib (0.1~20 μ mol/L), and bufalin plus gefitinib on H1975 cells were evaluated by MTT assay. Their effects on apoptosis of H1975 cells were determined by flow cytometry (FCM). Their effects on expressions of epidermal growth factor receptor (EGFR) and Met signal pathway related proteins in H1975 cells were detected by Western blot. Results Results of MTT assay showed that gefitinib over 5 μ mol/L could inhibit H1975 cells. But combined therapy of bufalin and gefitinib could potently inhibit the growth of H1975 cells. Results of FCM showed the apoptotic rate was 61.64% $\pm$ 5.61% in the bufalin plus gefitinib group, obviously higher than that of the bufalin group (18.34% $\pm$ 3.42%) and the gefitinib group (7.32% $\pm$ 1.08%), showing statistical difference ($P < 0.01$). Results of Western blot showed the protein expressions of p-EGFR, p-Met, p-Akt, and p-mTOR in H1975 cells could be markedly down-regulated by bufalin plus gefitinib. Conclusions Combination of bufalin and gefitinib potently inhibited the growth of H1975 cells, and induced cell apoptosis. The potential mechanism for anti-tumor might be in-

基金项目:国家中医药管理局中医肿瘤病学重点学科建设资助项目(No.LHZLK-1115);上海市浦东新区中医领军型人才项目(No.PWZ12009-04);国家中医临床研究基地“龙医学者,龙医团队”项目(No.LYTD-18)

作者单位:上海中医药大学附属龙华医院肿瘤科(上海 200032)

通讯作者:徐振晔, Tel:18801616152, E-mail: kxhhd@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2013.08.1081

involved in blocking EGFR-PI3k/Akt pathway.

KEYWORDS Bufalin; Gefitinib; lung cancer; epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor; phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B pathway

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是调控细胞增殖、血管生成及转移的原癌基因。在多种恶性肿瘤中,常可见到 EGFR 异常表达,因而 EGFR 成为分子靶向治疗的主要靶分子。第一代可逆性表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKIs)吉非替尼和厄洛替尼对于 EGFR 突变的肺癌患者有显著的临床疗效^[1],但随后耐药的产生,严重限制了其临床应用。对此,目前临床尚缺乏有效的治疗手段。因此,开发防治 EGFR-TKIs 耐药的治疗方案是全球的研究热点。蟾毒灵是中药蟾酥和蟾皮的主要活性成分之一,是中药制剂华蟾素注射液中主要的抗肿瘤成分。现代药理研究发现其具有显著的抗肿瘤活性^[2,3],那么蟾毒灵能否逆转 EGFR-TKIs 耐药,目前还未见相关报道。本研究通过观察蟾毒灵联合吉非替尼对 EGFR-TKIs 耐药肺癌细胞 H1975 增殖的影响,探讨其可能的作用机制。

材料与方法

1 药物、试剂及仪器 蟾毒灵(Bufalin,纯度 > 99%, MFCD 00056525)、二甲基亚砜(DMSO)、四甲基偶氮蓝(MTT):美国 Sigma 公司;吉非替尼(Gefitinib, CAS:184475-35-2):美国 Selleck 公司。蟾毒灵用无水乙醇配成 10 mmol/L 储备液, -20 ℃ 保存。吉非替尼用 DMSO 配成 20 mmol/L 储备液, -20 ℃ 保存。重组人表皮生长因子(recombinant human epidermal growth factor, hEGF):美国 Peprotech 公司;RPMI-1640 培养液:美国 Hyclony 公司;胎牛血清(FBS):美国 GIBCO 公司;Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒:美国 BD 公司;Western blot 用抗体 EGFR、p-EGFR(pY1068)、Met、p-Met(pY1349):美国 Epitomics 公司;蛋白激酶 B(Akt)、p-Akt(Ser473)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、p-mTOR(Ser2448):美国 CST 公司。主要仪器有层流超净台(SW-CJ-2D):苏州净化公司;荧光倒置显微镜(DM3000B):德国 Leica 公司;CO₂ 培养箱(MCO-20AIC):日本 SANYO 公司;酶标仪(Spectra Max M5):美国 MD 公司;流式细胞仪(FACS-Verse):美国 BD 公司;台式高速冷冻离心机

(5430R):德国 Eppendorf 公司;蛋白质电泳及电转移装置:美国 Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 细胞培养 人肺腺癌细胞株 H1975(EGFR exon 20 T790M-L858R)购于美国物种保存中心(American Type Culture Collection, ATCC)。用含 10% 胎牛血清及 100 U/mL 青、链霉素的 RPMI-1640 培养基,置于 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中常规培养,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

2.2 MTT 染色法测定肿瘤细胞增殖 取指数生长期的 H1975 细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,用培养液打匀,制成细胞悬液。用血细胞计数板计数后,稀释成浓度为 3×10^4 个细胞/mL 的细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔 100 μ L,置于培养箱培养。24 h 后分别给予蟾毒灵(1 ~ 100 nmol/L)、吉非替尼(0.1 ~ 20 μ mol/L)及蟾毒灵(10 nmol/L)加吉非替尼(1 μ mol/L)联合干预,每个浓度设置 5 个复孔。72 h 后,每孔加入 20 μ L MTT(5 mg/mL),在细胞培养箱中继续培养。4 h 后弃去上清,每孔加入 150 μ L DMSO,振荡后置酶标仪上于 490 nm 处测定每孔的吸光度(OD 值)。细胞存活率(%) = (给药组 OD 均值 - 调零孔 OD 值) / (对照组细胞 OD 均值 - 调零孔 OD 值) $\times$ 100%。

2.3 流式细胞术检测细胞凋亡 取对数生长期 H1975 细胞,接种于 24 孔板中常规培养 24 h,换含 1% FBS 的 RPMI-1640 培养 12 h 使细胞同步化。分别用蟾毒灵(10 nmol/L,根据 MTT 实验筛选的剂量)、吉非替尼(1 μ mol/L)及两药联合干预 72 h,并设空白对照组。弃去培养液用不含 EDTA 的胰酶消化,800 r/min 离心 5 min, PBS 洗涤 2 遍,用 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒检测,具体步骤按说明书进行,细胞凋亡情况应用 Cell Quest 软件进行分析。

2.4 Western blot 法检测 EGFR、Met 信号通路相关蛋白表达 应用 Western blot 方法检测 H1975 细胞中 EGFR、p-EGFR、Met、p-Met、Akt、p-Akt、mTOR 及 p-mTOR 蛋白表达。细胞接种于 6 孔板中,常规培养 24 h,加入蟾毒灵(10 nmol/L)、吉非替尼(1 μ mol/L)及两药联合干预 24 h,并设空白对照组。加入 hEGF 刺激 30 min,弃上清,用预冷的

PBS 冲洗 3 次,加入蛋白裂解液,冰上裂解 1 h,4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min,取上清,应用 BCA 分析试剂盒测定蛋白浓度,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 GAPDH 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。

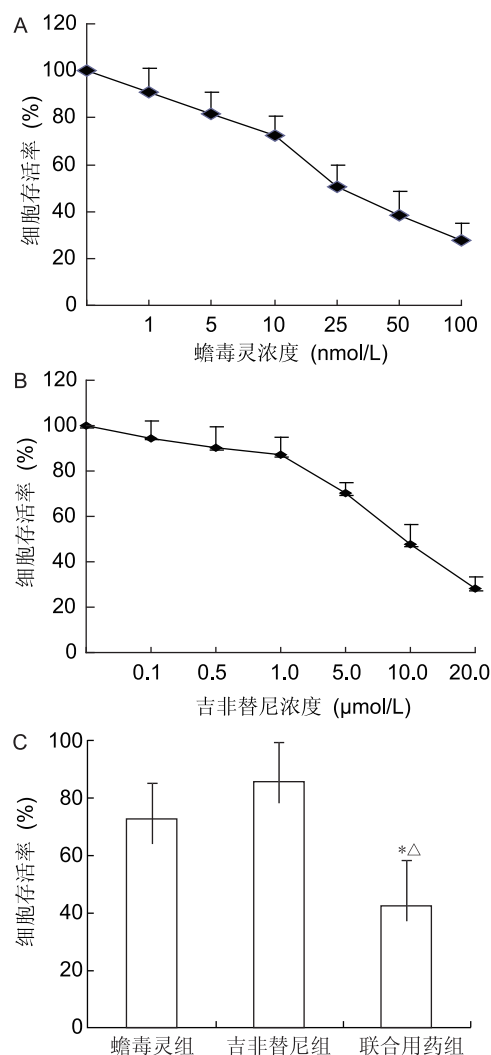
2.5 统计学方法 实验至少重复 3 次,应用 SPSS 18.0 统计软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组 H1975 细胞增殖比较(图 1) MTT 结果显示,1 ~ 100 nmol/L 蟾毒灵作用于 H1975 细胞 72 h,随着浓度的增加,其对 H1975 细胞生长抑制作用不断增强,半数抑制浓度(IC_{50})为 (20.59 ± 2.07) nmol/L。当吉非替尼浓度超过 5 μmol/L 时才见到其对 H1975 细胞生长的抑制作用,其 IC_{50} 为 (9.03 ± 1.54) μmol/L;但当吉非替尼(1 μmol/L)与蟾毒灵(10 nmol/L)联合后,H1975 细胞生长被明显抑制。

2 各组 H1975 细胞凋亡比较(图 2) 药物作用于 H1975 细胞 72h 后,应用 Annexin V/PI 双染细胞,流式细胞术检测凋亡情况,结果显示,单用蟾毒灵(10 nmol/L)细胞凋亡率为 $(18.34 \pm 3.42)\%$,单用吉非替尼(1 μmol/L)细胞凋亡率为 $(7.32 \pm 1.08)\%$,两药合用后细胞凋亡率为 $(61.64 \pm 5.61)\%$,与单用吉非替尼或蟾毒灵比较,细胞凋亡率显著增加($P < 0.01$)。

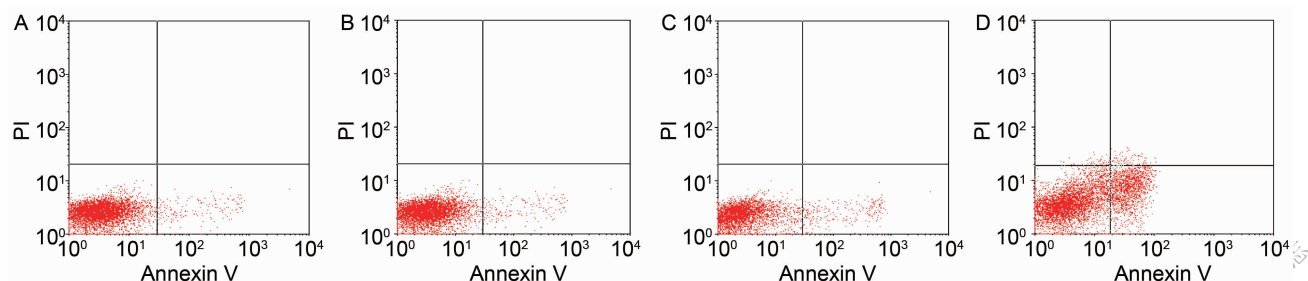
3 各组 H1975 细胞 EGFR、Met 信号通路相关



注:与蟾毒灵组比较,* $P < 0.01$;与吉非替尼组比较, $\Delta P < 0.01$

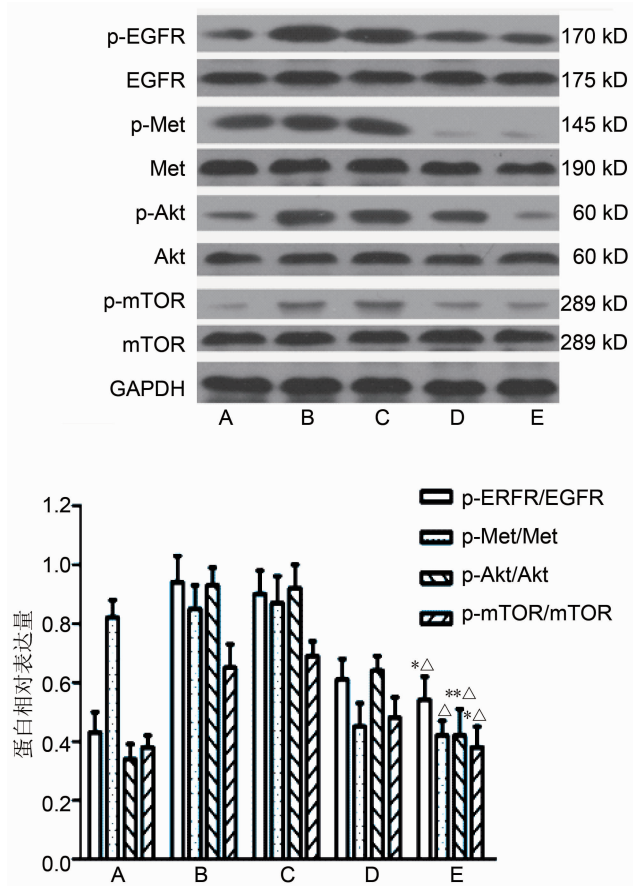
图 1 各组 H1975 细胞增殖比较

蛋白表达比较(图 3) 蟾毒灵及联合用药对 EGFR、Met、Akt、mTOR 蛋白表达无明显影响,但可不同程度下调 p-EGFR、p-Met、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达。



注:A 为空白对照组;B 为吉非替尼组;C 为蟾毒灵组;D 为联合用药组

图 2 各组 H1975 细胞凋亡比较



注:A 为空白对照组;B 为 hEGF 组;C 为吉非替尼组;D 为蟾毒灵组;E 为联合用药组;与蟾毒灵组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与吉非替尼组比较, $\Delta P < 0.01$

图3 各组 H1975 细胞 EGFR、Met 信号通路相关蛋白表达比较

讨论

肺癌是全球死亡率最高的恶性肿瘤,其中约 85% 为非小细胞肺癌。研究发现,亚洲人中约有 50% 的肺癌患者存在原癌基因 EGFR 突变,这些肿瘤细胞依赖于突变的 EGFR 进行扩增和生存,因此,EGFR-TKIs 对这部分肿瘤患者有很好的临床疗效^[4]。但几乎所有初治有效的肺癌患者在 1 年内均会对 EGFR-TKIs 产生耐药^[5]。研究发现,耐药机制主要包括 EGFR-T790M 二次突变和 c-Met 扩增,其中约 50% 的患者耐药原因在于 EGFR-T790M 二次突变^[6]。c-Met 原癌基因扩增可引起 ErbB3 - 磷酸酰肌醇 - 3 激酶/蛋白激酶 B (phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt) 信号通路的激活,从而使肿瘤细胞绕过被抑制的 EGFR 信号通路,继续增殖和生存,导致 EGFR-TKIs 耐药^[7]。T790M 突变增加了 EGFR 与 ATP 的亲和力,减少了 EGFR 与 EGFR-TKIs 的结合,

引起下游 PI3K/Akt/mTOR 等信号通路的持续活化,导致 EGFR-TKIs 耐药的产生^[8]。针对 EGFR 二次突变,目前已研发出二代不可逆性 EGFR-TKIs,如 Afatinib (BIBW2992) 和 Dacomitinib (PF299804)。它们通过不可逆地与 EGFR 结合,阻断 EGFR 的活化,对含有 EGFR-T790M 二次突变的肺癌细胞有显著的抗肿瘤活性,有望成为含有 EGFR-T790M 突变的晚期肺癌患者的标准治疗方案^[9]。但最近报道的一项 III 期临床试验结果显示, Afatinib 对吉非替尼或厄洛替尼耐药的晚期肺癌患者的有效率不足 10%,并不能提高肺癌患者的总生存期^[10]。此外,突变选择性 EGFR-TKIs (WZ4002) 以及 EGFR-TKIs 联合 PI3K/Akt 抑制剂等治疗手段也被用于治疗靶向药物耐药,但这些方案确切的疗效还有待于进一步评估,故临床迫切需要研发新的治疗策略来克服 EGFR-TKIs 耐药。

蟾毒灵是中药蟾皮、蟾酥的主要成分之一,具有较强的抗肿瘤活性。现代研究发现,蟾毒灵可通过线粒体或死亡受体介导的途径诱导肿瘤细胞凋亡^[11],通过抑制 EGFR 活化、阻断 PI3K/Akt 信号通路抑制肿瘤细胞增殖^[12,13]。因此,在理论上推测蟾毒灵可防治 EGFR-TKIs 耐药。

EGFR-T790M 突变是可逆性 EGFR-TKIs 耐药的主要原因。所以,本实验以 H1975 肺癌细胞 (EGFR exon 20 T790M-L858R) 为研究对象,观察蟾毒灵、吉非替尼及两药联合的抗肿瘤作用。MTT 结果显示,吉非替尼在 1 $\mu\text{mol/L}$ (最大血药浓度) 时,对 H1975 细胞生长无明显抑制作用,但当吉非替尼与蟾毒灵联合后,抑瘤效果明显增强;Annexin V-FITC/PI 凋亡检测结果显示,吉非替尼联合蟾毒灵后,与单用药物组比较, H1975 细胞凋亡率显著提高。这些结果提示蟾毒灵可使耐药细胞 H1975 对吉非替尼再次敏感。

为探讨蟾毒灵联合吉非替尼可能的作用机制,本研究应用 Western blot 检测 EGFR、Met 信号通路相关蛋白的表达。结果显示,蟾毒灵及联合用药对 EGFR、Met、Akt、mTOR 总蛋白表达均无明显影响,却能下调 p-EGFR、p-Met、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达。提示蟾毒灵联合吉非替尼对 EGFR-PI3k/Akt 信号通路有抑制作用。虽然本研究发现在 H1975 细胞中存在 Met 的活化,蟾毒灵也可抑制 Met 的活化 (下调 p-Met),但由于 H1975 细胞不含有 Met 扩增,其对吉非替尼耐药的主要原因是 EGFR-T790M 的二次突变,因此推测蟾毒灵增强吉非替尼的抗肿瘤作用可能在于阻断 EGFR-PI3k/Akt 信号通路。

总之,蟾毒灵联合吉非替尼可显著抑制 H1975 耐

药细胞的增殖,促使肿瘤细胞凋亡;蟾毒灵增强吉非替尼抗肿瘤活性的机制可能与阻断 EGFR-PI3k/Akt 信号通路有关。此外,本研究结果显示,蟾毒灵对 Met 的活化有抑制作用,那么蟾毒灵能否通过阻断 Met 信号通路来防治因 Met 扩增或过表达而引起的 EGFR-TKIs 耐药?这有待于后续的研究进一步证实。

参 考 文 献

- [1] Pao W, Chmielecki J. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010,10(11): 760-774.
- [2] Yin PH, Liu X, Qiu YY, et al. Anti-tumor activity and apoptosis-regulation mechanisms of bufalin in various cancer: new hope for cancer patients [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(11): 5339-5343.
- [3] Xie XB, Yin JQ, Wen LL, et al. Critical role of heat shock protein 27 in bufalin-induced apoptosis in human osteosarcomas: a proteomic-based research[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e47375.
- [4] Suda K, Tomizawa K, Mitsudomi T. Biological and clinical significance of KRAS mutations in lung cancer: an oncogenic driver that contrasts with EGFR mutation [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2010,29(1): 49-60.
- [5] Jackman D, Pao W, Riely GJ, et al. Clinical definition of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2010,28(2): 357-360.
- [6] Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors[J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(75): 75ra26.
- [7] 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): 1039-1043.
- [8] Yun CH, Mengwasser KE, Toms AV, et al. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(6): 2070-2075.
- [9] Li D, Ambrogio L, Shimamura T, et al. BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models [J]. *Oncogene*, 2008, 27(34): 4702-4711.
- [10] Miller VA, Hirsh V, Cadranel J, et al. Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomized trial[J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13(5): 528-538.
- [11] Hsiao YP, Yu CS, Yu CC, et al. Triggering apoptotic death of human malignant melanoma a375.s2 cells by bufalin: involvement of caspase cascade-dependent and independent mitochondrial signaling pathways[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 591241.
- [12] Zhu Z, Sun H, Ma G, et al. Bufalin induces lung cancer cell apoptosis via the inhibition of PI3K/Akt pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(2): 2025-2035.
- [13] Jiang Y, Zhang Y, Luan J, et al. Effects of bufalin on the proliferation of human lung cancer cells and its molecular mechanisms of action[J]. *Cytotechnology*, 2010,62(6): 573-583.

(收稿:2012-11-16 修回:2013-03-19)