

鼻咽癌细胞株中 EGFR 的表达及吉非替尼联合放射照射的生物效应评估

朱蕙君 王仁生

摘要 目的 本研究旨在探讨表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的表达对鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)综合治疗的影响。**方法** 免疫荧光检测鼻咽癌 CNE1 和 HONE1 中表皮生长因子受体(EGFR)表达水平。取对数生长期细胞接种于 96 孔板中并随机分组,对照组不行特殊处理,吉非替尼组,单纯照射组及药物照射组给予不同浓度的吉非替尼及剂量的放射线照射。以 CCK-8 测量细胞活性;细胞集落实验检测吉非替尼对鼻咽癌细胞株放射敏感性的影响按单击多靶模型和线性二次模型拟合细胞存活曲线。**结果** 免疫荧光检测显示 CNE1 细胞和 HONE1 细胞内均有较高 EGFR 表达,药物照射组较单纯照射组在低放射量组时既有显著差异,吉非替尼能增强鼻咽癌细胞株的放射敏感性。**结论** 吉非替尼联合放射照射较单纯照射能提高鼻咽癌的治疗效果。

关键词 鼻咽癌 表皮生长因子受体 吉非替尼 放射照射 联合治疗

EGFR Expression in Nasopharyngeal Carcinoma Cell Lines and Assesment of the Efficacy of Combination of Gefitinib with Rradiotherapy in NPC. Zhu Huijun, Wang Rensheng. Department of Radiotherapy, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Guangxi 530021, China

Abstract Objective To investigate EGFR expression in NPC cell lines and the effects of combination therapy of EGFR Inhibitor gefitinib and radiotherapy. **Methods** Cell lines were divided into different groups. EGFR expressions were detected by immunofluorescence. Cell viabilities were detected by the cell counting kit-8 (CCK-8) assay. The influence of gefitinib on radiosensitivity was proved by clonogenic survival assay. Single-hit multitarget model was used to plot survival curves. **Results** High level EGFR was observed in NPC cell line. Combination therapy improved NPC cell death and enhance of radiosensitivity. **Conclusion** Combination therapy with gefitinib augment antitumor efficacy of radiotherapy to NPC.

Key words Nasopharyngeal carcinoma; EGFR; Gefitinib; Radiotherapy; Combination therapy

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是中国常见的恶性肿瘤之一,局部区域复发和远处转移仍是鼻咽癌治疗失败的两大主因。5 年累积复发率和远处转移率分别为 18%~30% 和 15%~25%^[1]。表皮生长因子受体(epidermal Growth Factor Receptor, EGFR)在肺癌、乳腺癌、肠癌及头颈部肿瘤中的过度表达及突变而引起下游的 MARK 和 PI₃K 通路的持续活化是导致肿瘤细胞增殖、凋亡抑制并促进肿瘤浸润转移的关键机制^[2]。近年研究证实,80%~90% 的鼻咽癌组织中存在 EGFR 过度表达,其过度表达在临床上与预后差、转移快、对化疗药物抗拒相关^[3]。近年来,以 EGFR 为靶点的低分子抑制剂吉非替尼(gefitinib)的分子靶向治疗方法,已证实是非小细胞肺癌等肿瘤治疗中应用并取得良好的疗效,但在鼻咽癌中

的研究尚处起步^[4]。本文通过观察吉非替尼结合放射照射对 CNE1 和 HONE1 细胞的干预作用,旨在探讨 EGFR 的表达对鼻咽癌的联合治疗效果的影响及其作用机制。

材料与方法

1. 细胞系:人鼻咽癌细胞株 CNE1 及 HONE1 为广西医科大学耳鼻喉科实验室保存,用含 10% FBS、100U/ml 青霉素和 100mmol/L 链霉素的 RPMI1640 培养液培养液在常规 37℃、5% CO₂ 条件下培养箱内培养至对数生长期。

2. 试剂:吉非替尼溶解于二甲基亚砜(DMSO)中,一次抗体 EGFR 兔多克隆抗体(Santa cruz 公司),免疫荧光二次抗体羊抗兔 IgG(Invitrogen 公司);细胞增殖、细胞毒性检测试剂(Cell Counting Kit-8)CCK-8,结晶紫(crystal violet)。

3. 方法:(1)免疫荧光测定 EGFR 表达:取对数生长的 CNE1 细胞和 HONE1 细胞接种于 3.5mm 盘内,24h 后光学显微镜下确定细胞生长状态。采用 4% 多聚甲醛固定 15min 后, PBS 漂洗 3 次后, Triton-100 进行通透, 5% BSA 封闭后, 分别加入一抗及二抗孵育 1h 后, PBS 漂洗 3 次后, 荧光显微镜下

作者单位:530021 南宁,广西医科大学第一附属医院放疗科

通讯作者:王仁生,主任医师,电子信箱:wrsqx@yahoo.com.cn

观察。采用 Image J 系统处理图像。(2)细胞分组及药物处理:取对数生长期鼻咽癌 CNE1 和 HONE1 细胞进行随机分组(对照组,吉非替尼组,单纯照射组及药物照射组),吉非替尼组的药物浓度为 0、0.1、1、5、10 μ mol/L。单纯照射组的放射剂量为 0、2、4、6、8Gy。药物照射组,在 30min 前先投入 0.1 μ mol/L 的吉非替尼。(3)细胞活性测定:取对数生长的 CNE1 细胞和 HONE1 细胞接种于 96 孔,每孔接种 2×10^3 个细胞,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 24h 后,分别按分组给予不同浓度的吉非替尼及剂量的放射线照射。治疗后持续培养 5~7 天。加入 10 μ l CCK-8 孵育 2h 后,在分光光度计下测量其分光光度值。根据公式:细胞存活率(%)=[(阳性组吸光度-空白组吸光度)/(阴性组吸光度-空白组吸光度)] $\times$ 100%,计算出细胞存活率。(4)克隆形成实验:以 1000 个细胞的密度接种在 6mm 内,分单纯照射组和药物照射组,24h 后进行照射。在 37 $^{\circ}$ C 恒温 CO₂ 培养箱中培养 14 天,吸静培养液,PBS 漂洗 1 次,10% 甲醛固定 20min,0.5% 的结晶紫染色后,在显微镜下观测并计数细胞的克隆数(含有 $\geq$ 50 个细胞的集落)。根据公式:贴壁率(plating efficiency,PE)=对照组集落数(0Gy 集落数)/细胞接种数 $\times$ 100%;存活分数(surviving fraction,SF)=某剂量照射后形成的集落数/(该剂量下接种细胞数 $\times$ PE)。(5)多靶单击模型计算放射增敏比:按多靶单击数学模型 $S = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^N$ 拟合细胞存活曲线。 S 指存活分数, D 为照射剂量, D_0 是在剂量效应曲线的直线部分 S 每下降 63% 所需的剂量, N 代表直线部分外延至 Y 轴的截距(称外推值), e 为自然对数的底。 D_0 反映细胞在相对高剂量区对射线的敏感性, D_0 值愈大,细胞对放射愈抗拒。 D_q 值代表存活曲线的“肩宽”,表示从开始到细胞呈指数性死亡所浪费的剂量, D_q 值小,表明细胞亚致死性损伤修复能力弱,很小的剂量就能使细胞进入致死性损伤的指数性死亡阶段。增敏比(SER):联合治疗组 D_0 /放射组 D_0 。

4. 统计学方法:采用 SPSS 16.0 软件包进行统计学处理。数据值采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$),采用 t 检验比较各组差别, $P < 0.05$ 提示差异有统计学意义。

结 果

1. 免疫荧光对 EGFR 表达的测定:在荧光显微镜放大 40 倍下观测可见,CNE1 细胞和 HONE1 细胞膜

和细胞质内均可见较强的绿色荧光。显示 EGFR 在两种细胞内均有较强表达(图 1)。

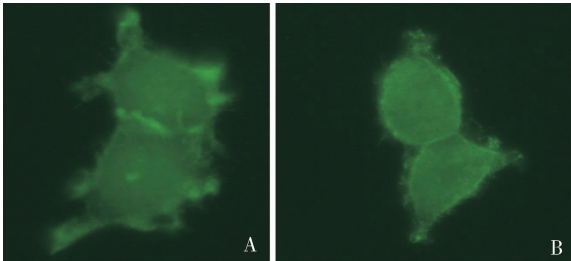


图 1 免疫荧光检测 EGFR 的表达($\times 40$)
A. CNE1 细胞株;B. HONE1 细胞株

2. 吉非替尼对细胞生长的抑制:单纯使用吉非替尼抑制细胞生长的体外实验表明,随着吉非替尼浓度的增长,细胞存活下降。但只有在较高浓度下,吉非替尼才明显抑制鼻咽癌细胞生长。而在较低浓度时,虽可抑制其生长但作用不明显(图 2)。

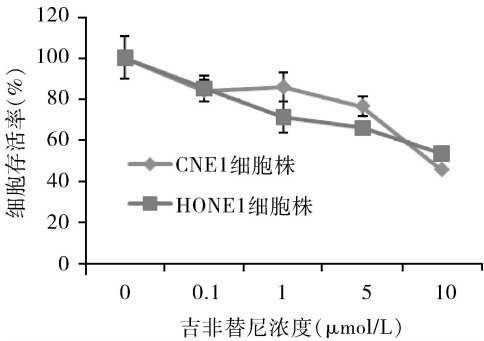


图 2 吉非替尼对细胞生长的抑制

3. 单纯照射和药物照射对细胞生长的抑制:CNE1 细胞株和 HONE1 细胞株的体外实验中均可见单纯照射组中,随着照射量的增长,细胞的生长受到明显抑制。而药物照射组表明,联合使用吉非替尼可更进一步抑制细胞生长。在低照射剂量下与单纯照射组相比细胞生存率有显著差异(表 1、图 3、图 4)。

表 1 单纯照射组和药物照射组细胞的存活率

放射剂量	CNE1 细胞株			HONE1 细胞株		
	单纯照射组(%)	药物照射组(%)	P	单纯照射组(%)	药物照射组(%)	P
2Gy	89.6 $\pm$ 1.3	72.3 $\pm$ 3.6	0.013	90.0 $\pm$ 0.7	73.2 $\pm$ 8.4	0.008
4Gy	79.0 $\pm$ 3.2	66.6 $\pm$ 4.3	0.077	73.4 $\pm$ 3.4	59.7 $\pm$ 0.7	0.020
6Gy	58.3 $\pm$ 4.3	48.3 $\pm$ 2.1	0.089	41.6 $\pm$ 7.6	31.1 $\pm$ 4.0	0.039
8Gy	31.6 $\pm$ 8.3	22.5 $\pm$ 9.2	0.300	15.1 $\pm$ 4.9	11.8 $\pm$ 1.8	0.270

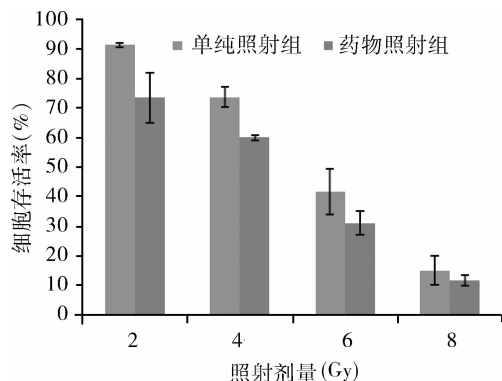


图3 单纯照射及药物照射对 CNE1 细胞生长的抑制

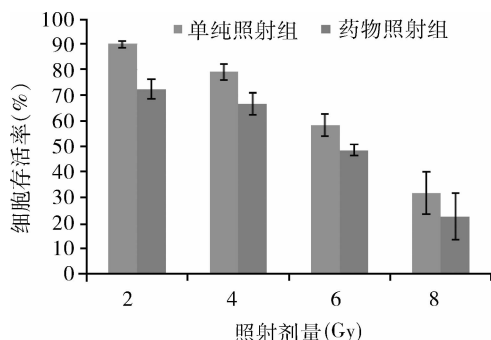


图4 单纯照射及药物照射对 HONE1 细胞生长的抑制

3. 存活曲线的绘制及 SER 值的计算: 使用 Sigmaplot 软件绘制存活曲线见图 5, 拟合方程得出: CNE1 细胞株单纯照射组细胞存活曲线的 D_0 为 2.069Gy, D_q 为 3.99Gy, 药物照射组 D_0 为 1.67Gy,

D_q 为 2.49Gy, 放射增敏比 (SER) 为 1.23。HONE1 细胞株照射组 D_0 为 2.0Gy, D_q 为 3.59Gy, 药物照射组 D_0 为 1.490Gy, D_q 为 2.71Gy, SER 为 1.35。

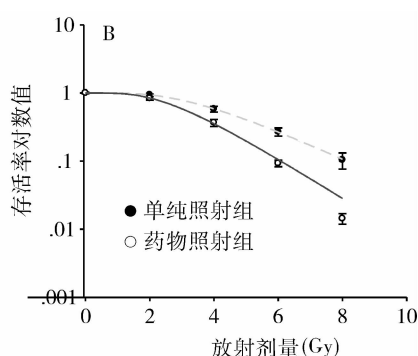
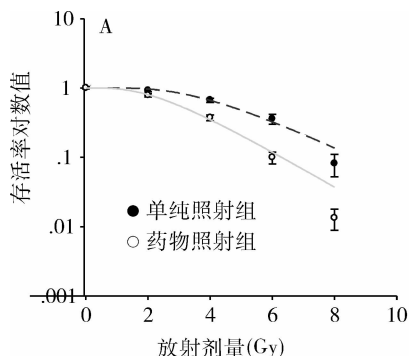


图5 单纯照射组和药物照射组的细胞存活曲线

A. CNE1 细胞株; B. HONE1 细胞株

讨 论

80% ~ 96% 的头颈部肿瘤中存在 EGFR 的过度表达及突变, EGFR 作为头颈部肿瘤的诊断和预后的标志物成为研究的重要靶点。Ma 等^[5]的研究表明, 在鼻咽癌组织中, EGFR 阳性表达率为 94%, 强阳性表达率为 50%。EGFR 表达与鼻咽癌的原发灶分期相关, EGFR 强阳性表达患者总生存率和无瘤生存率均较差。针对 EGFR 的分子靶向治疗方法备受关注, 吉非替尼可抑制 EGFR 受体的酪氨酸激酶的自身磷酸化, 抑制下游分子水平和通路活化。从而控制细胞增殖和诱导凋亡。在肺癌, 乳腺癌, 肠癌中已取得一定疗效, 而对鼻咽癌的治疗效果报道结论不一^[6,7]。临床治疗及研究旨在应用分子靶向治疗结合放化疗等联合治疗方法, 旨在提高鼻咽癌患者生存率。

本研究显示, CEN1 细胞和 HONE1 细胞中均有较高 EGFR 表达。单纯使用吉非替尼抑制细胞生长

表明, 鼻咽癌细胞 CNE1 和 HONE1 细胞吉非替尼较不敏感细胞。此结果与 Brigitte 等人的研究结果相近。由于 EGFR 及其下游通路旁通路信号网络相互影响, 单一的靶向治疗尚难达到理想的抑制效果^[7]。而药物照射组较单纯照射组表明, 联合吉非替尼能均可提高两种细胞株鼻咽癌细胞的抑制率。吉非替尼可能通过提高放射敏感性, 与放射线照射对肿瘤细胞起协同抑制作用。拟合曲线表明吉非替尼使细胞存活曲线的 D_0 值降低, 直接增加细胞对放射线的敏感性; 并且使细胞存活曲线的肩区变窄, D_q 值变小, 抑制细胞对放射线所致的潜在致死损伤的修复 (potential damage repair, PLDR) 和亚致死损伤的修复 (sublethal damage repair, SLDR)。

研究表明, 放射线照射联合 EGFR 抑制剂在体外体内实验均证明可对肿瘤细胞有直接杀伤作用, 提高肿瘤的局部控制^[8]。多数研究证明吉非替尼竞争性

抑制 EGFR 下游 MARK 和 PI_3K 通道,而诱发 G_0/G_1 期阻滞的现象,从而导致细胞凋亡增加。最近研究表明,除了 G_1 期阻滞外,联合治疗还可以延长 G_2 期,减少放射抵抗的 S 期从而增强细胞的放射敏感性^[9,10]。

PLDR 是造成放射治疗失败的主要原因,PLDR 与 DNA 双链断裂修复(DNA double strand break repair,DSB repair) 相关^[11]。放射线照射后初期野生型 EGFR(wild type EGFR)由细胞膜向细胞核内的转移进而偶联生成 DNA 修复酶(DNA-repair enzyme)是造成放射抵抗的重要机制^[12]。DNA-PKcs 蛋白在 DNA 双链断裂修复中起着重要作用,是一种与放射敏感性密切相关的修复蛋白。EGFR 通过下游 PI_3K -AKT 通道刺激 DNA-PKcs 活化,高 EGFR 的表达和活化也伴随着 DNA-PKcs 的增加。而这一过程可有效地被 EGFR 抑制剂所抑制。另外,EGFR 还被证实影响另外一种 DSB 修复的关键蛋白 Ku70/Ku80。实体瘤内细胞存在对射线和化疗药物有抗性的乏氧状态是肿瘤复发、治疗失败的主要原因。PET 动态连续观察表明,EGFR 抑制剂还可以改善细胞的含氧量而增强放射敏感性。

综上所述,本研究结果初步显示吉非替尼联合放射照射对鼻咽癌细胞的生长有显著抑制作用,并研讨其放射增敏机制。为分子靶向治疗联合放疗的综合治疗提供实验依据。

参考文献

- 高黎,易俊林,黄晓东.鼻咽癌根治性放疗 10 年经验总结[J]. 中华放射肿瘤学杂志,2006,4:249-256
- Lurje G, Lenz HJ. EGFR signaling and drug discovery[J]. Oncology. 2009,77:400-410
- Imbimbo BP, Ottonello S, Frisardi V, *et al.* Solanezumab for the treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease[J]. Expert Review of Clinical Immunology,2012, 8(2): 135-149
- Panza F, Frisardi V, Imbimbo BP, *et al.* Anti-beta-amyloid immunotherapy for Alzheimer's disease: focus on bapineuzumab[J]. Current Alzheimer Research,2011, 8(8): 808-817
- Seo JS, Baek IS, Leem YH, *et al.* SK-PC-B70M alleviates neurologic symptoms in G93A-SOD1 amyotrophic lateral sclerosis mice[J]. Brain Research,2011, 1368: 299-307
- Park SJ, Jung HJ, Son MS, *et al.* Neuroprotective effects of INM-176 against lipopolysaccharide-induced neuronal injury[J]. Pharmacology Biochemistry and Behavior,2012, 101(3): 427-433

- 王树森,管忠震,向燕群,等.鼻咽癌组织中 EGFR 和 p-ERK 蛋白表达的检测及意义[J]. 中华肿瘤杂志,2006,328:(1)28-31
- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, *et al.* Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib[J]. New England Journal of Medicine,2004,350(21):2129-2139
- Ma B, Poon T, To KF, *et al.* Prognostic significance of tumorangiogenesis, Ki67, p53 oncoprotein, epidermal growth factor receptor and HER2 receptor protein expression in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma: a prospective study[J]. Head Neck, 2003,25: 864-872
- Takeuchi K, Ito F. Receptor tyrosine kinases and targeted cancer therapeutics[J]. Biol Pharm Bull,2011,34(12):1774-1780
- Ma BB, Lui VW, Poon FF, *et al.* Preclinical activity of gefitinib in non-keratinizing nasopharyngeal carcinoma cell lines and biomarkers of response[J]. Invest New Drugs,2010,28(3):326-333
- Bonner JA, Harari PM, Giralat J, *et al.* Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck[J]. N Engl J Med, 2006,354:567-578
- Chinnaiyan P, Huang S, Vallabhaneni G, *et al.* Mechanisms of enhanced radiation response following epidermal growth factor receptor signaling inhibition by erlotinib(Tarceva)[J]. Cancer Res,2005,65: 3328-3335
- Huang SM, Harari PM. Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis[J]. Clin Cancer Res,2000,6:2166-2174
- Wilson KM, Keng PC. Radiation-induced DNA damage and repair in quiescent and proliferating human tumor cells in vitro[J]. Int J Radiat Biol. 1989,55(3):385-395
- Chen DJ, Nirodi CS. The epidermal growth factor receptor: a role in repair of radiation-induced DNA damage[J]. Clin Cancer Res, 2007,13(22 Pt 1):6555-6560

(收稿:2012-01-10)

(修回:2012-02-16)

(上接第 12 页)

- 陈彪,马秋兰.阿尔茨海默病病因学研究进展及治疗展望[J]. 中华神经科杂志,2003, 36(2): 158-160
- 费晶,刘松.阿尔茨海默病的胆碱酯酶抑制剂治疗进展[J]. 医学综述,2008, 14(9): 1397-1398
- 王杉,蒋宁,周文霞,等.阿尔茨海默病防治药物靶标的研究进展[J]. 中国新药杂志,2007, 16(11): 831-836
- 刘英华,王建枝. Tau 蛋白异常与阿尔茨海默病的关系[J]. 生命的化学,2006, 26(2): 108-110
- 赵琳,魏敏杰,金万宝.维生素 E 在阿尔茨海默病防治中的研究进展[J]. 国外医学:老年医学分册,2005, 26(5): 202-205

(收稿:2012-03-09)

(修回:2012-03-22)