文章编号:1000-5404(2006)02-0125-04

论著

EGFR抑制剂吉非替尼对肝癌细胞增殖和凋亡的影响

何 怡[1,3],王 东[1],张沁宏[2],卿 毅[1],杨宇馨[1] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]肿瘤中心,[2]病理科,重庆 400042;[3]解放军44医院肿瘤科,贵阳 550009)

提 要:目的 探讨表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)抑制剂吉非替尼对人肝癌细胞株SMMC-7721增殖和凋亡的影响,为原发性肝癌的分子靶向治疗提供实验依据。**方法** 应用免疫组化法检测SMMC-7721细胞中EGFR的表达,不同浓度吉非替尼处理SMMC-7721细胞48 h后,MTT法检测细胞对该药物敏感性,流式细胞仪检测细胞凋亡变化。**结果** SMMC-7721细胞中EGFR呈强阳性表达,吉非替尼明显下调EGFR表达,抑制SMMC-7721细胞生长,呈剂量时间依赖性,8 mmol/L吉非替尼组细胞凋亡率为(58.58±2.95)%,显著高于对照组(0.11±0.04)%,($P<0.01$)。**结论** 吉非替尼能够通过诱导细胞凋亡抑制SMMC-7721细胞生长,因而有望为肝癌的分子靶向治疗提供新的有效途径。

关键词: 吉非替尼(ZD1839);表皮生长因子受体;肝细胞癌
中图法分类号: R73053;R735.7;R979.1 **文献标识码:** A

Effect of EGFR inhibitor gefitinib on proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells

HE Yi[1,3], WANG Dong[1], ZHANG Qin-hong[2], QING Yi[1], YANG Yu-xin[1] ([1]Department of Pathology, [2]Cancer Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042; [3]Department of Oncdogy, The 44th Hospital of PLA, Guiyang 550009, China)

Abstract: Objective To detect the effect of gefitinib, an inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase (EGFR-TK), on the proliferation and apoptosis of human HCC SMMC-7721 cells, and to provide the evidence for potential molecular target therapy in the HCC clinical treatment. **Methods** The expression of EGFR were evaluated by immunohistochemical staining in HCC cells. After different concentration of gefitinib-treatment for 48 h, MTT method was used to detect the sensitivity of HCC SMMC-7721 cells to gefitinib. The human HCC cell lines SMMC-7721 was painted by AnnexinV-FITC/Propidium iodide(PI) and assayed its apoptotic rates by FCM. **Results** The expression of EGFR was positive intensively in human HCC cell line SMMC-7721. Gefitinib induced a dose and time-dependent apoptosis of the human HCC cell line SMMC-7721. The apoptosis rate of 8 mmol/L gefitinib group was(58.58±2.95)%, significantly higher than control group (0.11±0.04)%. **Conclusion** Gefitinib can inhibit the growth of human HCC cells by inducing cell apoptosis. Thus, EGFR-TK inhibition appears to be a promising novel approach for future treatment strategies of HCC.

Key words: gefitinib(ZD1839); epidermal growth factor receptor; hepatocellular carcinoma

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)是一分子量为170 $\times 10^3$的跨膜糖蛋白,其胞外结构可与配体结合,胞内结构具有酪氨酸激酶活性,属于受体酪氨酸激酶家族(receptor tyrosine kinase, RTKs)。现已证实在多种恶性肿瘤中其表达增强,近年研究表明,EGFR在肝细胞癌(HCC)中也存在过度表达。我们采用免疫组织化学技术及肝癌细胞体外实验,检测EGFR在培养的SMMC-7721细胞中的表达情况,并用表皮生长因子受体抑制剂吉非替尼(Iressa, ZD1839)处理细胞株,观察细胞增殖和凋亡变化,希望为原发性肝细胞癌分子靶向治疗探索一条新的途径。

作者简介:何 怡(1976-),女,云南省大理市人,硕士研究生,医师,主要从事肿瘤化疗分子机制方面的研究。电话:(023)68757374
通讯作者:王 东,电话:(023)68757706,E-mail: dongwang64@hotmail.com
收稿日期:2005-07-21;修回日期:2005-11-04

1 材料与方法

1.1 材料

① 人肝癌细胞株 SMMC-7721(第三军医大学基础医学部药理学教研室);② DMEM 培养基、小牛血清、胰蛋白酶、HEPES(HyClone 公司);③ MTT、DMSO(Sigma 公司);④ 鼠抗人单克隆抗体 EGFR(Zymed 美国),DAB 显色剂(Zymed 美国);⑤ S-P 免疫组化试剂盒(北京中山公司);⑥ AnnexinV/FITC 及 PI 试剂盒(北京晶美生物有限公司);⑦ 倒置显微镜(Olympuls 公司);⑧ DMN-9602 酶标分析仪(北京普朗新技术有限公司);⑨ 96 孔细胞培养板、6 孔细胞培养板、细胞培养瓶(Corning 公司);⑩ CO_2 细胞培养箱(Thermo 公司)。

1.2 细胞培养与药物

人肝癌 SMMC-7721 细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基,置 37 ℃、5% CO_2 孵箱培养,培养液加 1% 双抗(青霉素、链霉素)、1% HEPES,24 ~ 36 h 传代,传代前用 0.25% 胰酶消化。

吉非替尼为 AstraZeneca 公司产品,250 mg/片,分子量为 446,以 2 ml DMSO 溶解后储存于 -20 ℃ 备用,其药物活性无改变,每次实验前用新鲜培养液按一定比例稀释到终浓度,所有实验中 DMSO 终浓度均小于 0.05%。Augustine-Rauch 等[1] 的研究结果表明,在体外胚胎细胞发育毒性研究中,DMSO 浓度不超过 0.1%,就对实验结果无显著影响。

1.3 免疫细胞化学

①将对数生长期的 SMMC-7721 细胞接种于含盖玻片的 6 孔板内,常规培养,待细胞生长至单层时,取出玻片,PBS 缓冲液洗,950 ml/L 乙醇固定 15 min,再用 PBS 洗后 4 ℃ 备用。② EGFR 免疫细胞化学染色,操作按试剂盒说明书进行。

1.4 MTT 比色法及细胞生长抑制曲线

取对数生长期的细胞,经胰酶消化后吹打成单细胞悬液,调整浓度为 5×10^5/ml,接种于 96 孔培养板中,每孔 200 μl。24 h 后,弃原培养液,加含不同浓度药物的新培养液,每种浓度设 3 个平行复孔,另设阴性对照组。置 37 ℃、5% CO_2 培养 48 h,各孔加入 MTT(5 mg/ml),继续培养 4 h,去上清液,然后加入 DMSO,振荡 10 min,用酶标仪检测 D 值(波长 = 490 nm)。根据下列公式计算各浓度药物对 SMMC-7721 细胞的抑制率:平均细胞抑制率 IR = (1 - 用药组 D 值/对照组 D 值) × 100%。以药物浓度、时间为横坐标,抑制率为纵坐标,绘制细胞生长抑制曲线。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

收集不同浓度药物处理 48 h 的细胞,常规胰酶消化后,制成单细胞悬液,离心弃上清液,再经预冷的 PBS 洗 2 次,按 AnnexinV/FITC 及 PI 试剂盒提供方法依次加入结合缓冲液、AnnexinV/FITC 及 PI,4 ℃ 避光 30 min 后上机测试,采用 FACScort 流式细胞仪对样品进行检测,每次计细胞数 10 000 个,激发波长 488 nm,分析软件 Cell Quest 计算凋亡率。

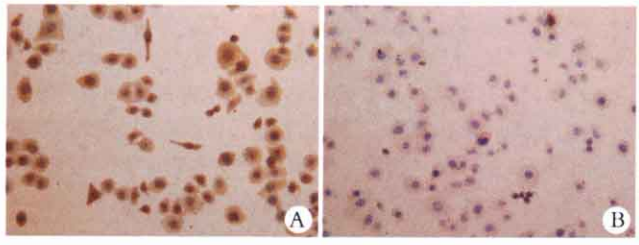
1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.0 软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 免疫细胞化学

EGFR 主要定位于 SMMC-7721 细胞的细胞膜与细胞浆(图 1),呈强阳性表达,经 8 mmol/L 吉非替尼处理后,EGFR 表达明显降低,所有阴性对照均为阴性。

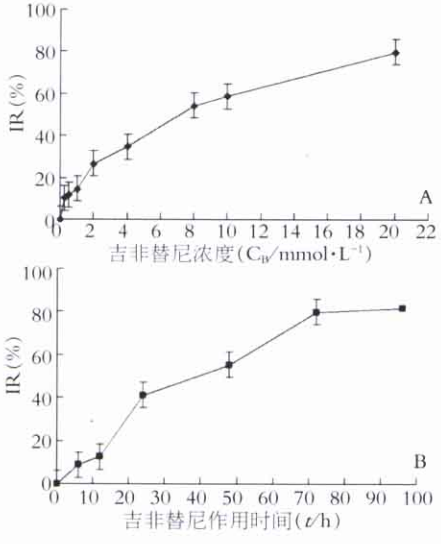


A:对照组;B:8 mmol/L 吉非替尼处理组

图 1 EGFR 免疫细胞化学染色 (S-P × 200)

2.2 MTT 法检测细胞生长抑制曲线

MTT 法显示当药物浓度为 8 mmol/L 时,细胞的相对抑制率约为 54%,且随着药物浓度提高,细胞的相对抑制率也相应提高。当药物浓度固定时,细胞的相对抑制率随着作用时间延长而升高,当作用时间为 48 h 时,细胞相对抑制率约为 55%(图 2)。

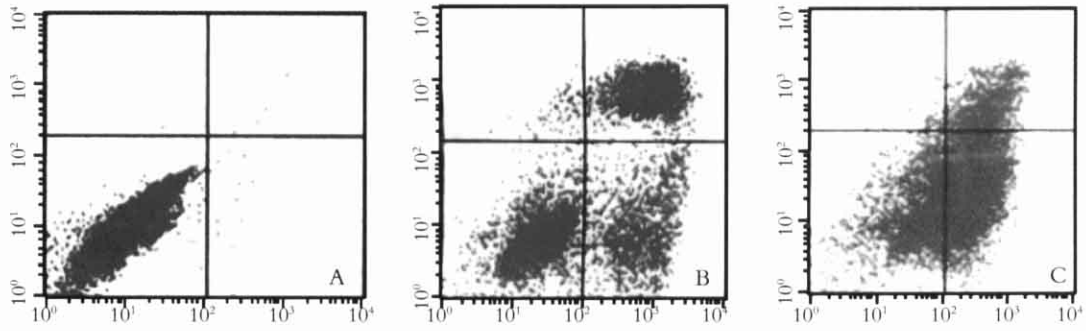


A:量效关系;B:时效关系

图 2 吉非替尼对 SMMC7721 细胞生长的影响

2.3 细胞凋亡分析

吉非替尼作用于 SMMC7721 细胞 48 h 后,流式细胞仪检测到细胞凋亡,且细胞凋亡率随着药物浓度增高而增高。处理组与对照组之间有显著性差异($P < 0.01$),低浓度组与高浓度组间存在显著性差异($P < 0.01$)(图 3)。



AnnexinV-FITC/PI 双染法，左下象限 AnnexinV-FITC$^-$/PI$^-$ 细胞为活细胞，右下象限 AnnexinV-FITC$^+$/PI$^-$ 细胞为凋亡细胞）
A：非药物处理细胞正常生长 48 h 后，细胞凋亡率为（0.11 ± 0.04）%；B：4 mmol/L 吉非替尼作用细胞后，细胞凋亡率为（15.79 ± 0.86）%；C：8 mmol/L 吉非替尼作用细胞后，细胞凋亡率为（58.58 ± 2.95）%

图3　吉非替尼诱导细胞凋亡情况

3　讨论

HCC 是最常见的恶性肿瘤之一，在美国、欧洲和亚洲地区，随着慢性肝炎、肝硬化、肥胖发生率的提高，HCC 的发病率也不断上升[2,3]，虽然由于外科手术的进步和早期诊断水平的提高，HCC 的切除率有所提高，但根治性切除、肝移植等方法仅适用于少数病人，对于进展期 HCC，部分切除术、化疗栓塞及系统化疗仍是目前常用的治疗方法。然而，对于不能切除的 HCC 患者，上述方法虽然能够提高存活率，却不能显著改善总的生存数[4,5]。因此，现在迫切需要一种新的治疗方法。近年来，许多证据表明表皮生长因子受体（EGFR）可在包括非小细胞肺癌（nonsmallcell lung cancer，NSCLC）在内的多种上皮源性肿瘤中过表达，预示存活率低、预后差、转移可能性大，可作为肿瘤基因治疗的靶位。一些报道指出，EGFR 在 HCC 中也存在过度表达[6]，与肿瘤的侵袭性生长特点有密切关系[7-9]。尤其在低分化的 HCC 患者中，EGFR 已被证实与肿瘤早期复发有关，是预后不良的因素之一[6]。

吉非替尼（ZD1839）是一种小分子的酪氨酸激酶抑制剂，实验表明 ZD1839 可抑制高度、中度甚至低度表达 EGFR 的癌细胞的生长[10]，ZD1839 单药治疗曾接受化疗的进展期 NSCLC 患者，有明显的抗肿瘤活性和缓解临床症状，并有很好的耐受性；除了 NSCLC，体外试验发现 ZD1839 还可以抑制许多部位癌细胞的生长，包括头颈部、口腔、膀胱、前列腺、乳腺、卵巢和结肠癌[11]。

我们探索了高特异性的表皮生长因子酪氨酸激酶抑制剂吉非替尼对人肝癌细胞株的作用。实验显示，EGFR 在 SMMC-7721 细胞呈过度表达，主要定位于细胞膜。在药物敏感性研究中，MTT 法显示细胞的相对抑制率随着药物浓度提高及作用时间的延长而升高，说明 SMMC-7721 细胞对吉非替尼敏感性较高。进一步选用流式细胞仪检测，证实吉非替尼通过诱导细胞凋亡能够抑制 SMMC-7721 的生长，且低浓度组与高浓度组之间存在显著性差异（$P < 0.01$）。有报道，吉非替尼能够诱导神经内分泌胃肠道肿瘤[12]、头颈部肿瘤[13]及恶性胸膜间皮瘤[14] G_1/S 期细胞停滞。在原发性肝细胞癌中，肝细胞生长因子（hepatocyte growth factor，HGF）、转化生长因子 α（transforming growth factor，TGF-α）及胰岛素样生长因子（insulin-like growth factor，IGF）等均可激活 EGFR，从而促进了肝癌的生长[15-17]，吉非替尼抑制肝癌细胞生长与其抑制 EGFR 表达、阻断细胞信号转导通路密切相关。研究表明，吉非替尼对化疗药物显示出协同效应[18,19]，潜在机制包括抗损伤修复、促进化疗诱导凋亡[20]以及抗生长因子介导的化疗抗药性[21]。总之，吉非替尼对于肝癌患者来说，是一个有前景的靶向治疗药物，更多的机制尚待进一步研究。

参考文献：

[1] AUGUSTINE RAUCH K A, ZHANG Q, KLEINMAN M, *et al*. A study of vehicles for dosing rodent whole embryo culture with non aqueous soluble compounds[J]. Reprod Toxicol, 2004, 18(3): 391 - 398.

[2] EL SERAG H B, DAVILA J A, PETERSEN N J, *et al*. The continuing increase in the incidence of hepatocellular carcinoma in the United States: an update[J]. Ann Intern Med, 2003, 139(10): 817 - 823.

[3] MCGLYNN K A, TSAO L, HSING A W, *et al*. International trends and patterns of primary liver cancer[J]. Int J Cancer, 2001, 94(2): 290 - 296.

[4] LLOVET J M, BURROUGHS A, BRUIX J. Hepatocellular carcinoma [J]. Lancet, 2003, 362(9399): 1907 - 1917.

[5] 何 怡，王 东，李增鹏，等. CD117、C - erb B - 2蛋白在原发性肝细胞性肝癌中的表达及意义[J]. 消化外科，2005，4(2)：103 - 107.

[6] DAVEAU M, SCOTTE M, FRANCOIS A, *et al*. Hepatocyte growth factor, transforming growth factor alpha, and their receptors as combined markers of prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Mol Carcinog, 2003, 36(3): 130 - 141.

[7] MOSER G J, WOLF D C, GOLDSWORTHY T L. Quantitative relationship between transforming growth factor-alpha and hepatic focal phenotype and progression in female mouse liver[J]. Toxicol Pathol, 1997, 25(3): 275 - 283.

[8] KIRA S, NAKANISHI T, SUEMORI S, *et al*. Expression of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in human hepatocellular carcinoma[J]. Liver, 1997, 17(4): 177 - 182.

[9] DECICCO L A, KONG J, RINGER D P. Carcinogen-induced alteration in liver epidermal growth factor receptor distribution during the promotion stage of hepatocarcinogenesis in rat[J]. Cancer Lett, 1997, 111(1-2): 149 - 156.

[10] SIROTNAK F M. Studies with ZD1839 in preclinical models[J]. Semin Oncol, 2003, 30(1 Suppl 1): 12 - 20.

[11] BASELGA J. EGFR therapy in other tumor types[J]. EJC, 2003, 1(5): 107 - 109.

[12] HOPFNER M, SUTTER A P, GERST B, *et al*. A novel approach in the treatment of neuroendocrine gastrointestinal tumours. Targeting the epidermal growth factor receptor by gefitinib (ZD1839)[J]. Br J Cancer, 2003, 89(9): 1766 - 1775.

[13] HUANG S M, LI J, ARMSTRONG E A, *et al*. Modulation of radiation response and tumor-induced angiogenesis after epidermal growth factor receptor inhibition by ZD1839 (Iressa)[J]. Cancer Res, 2002, 62(15): 4300 - 4306.

[14] JANNE P A, TAFFARO M L, SALGIA R, *et al*. Inhibition of epidermal growth factor receptor signaling in malignant pleural mesothelioma[J]. Cancer Res, 2002, 62(18): 5242 - 5247.

[15] SCHARF J G, BRAULKE T. The role of the IGF axis in hepatocarcinogenesis[J]. Horm Metab Res, 2003, 35(11 - 12): 685 - 693.

[16] SCHOEDEL K E, TYNER V Z, KIM TH, *et al*. HGF, MET, and matrix-related proteases in hepatocellular carcinoma, fibrolamellar variant, cirrhotic and normal liver[J]. Mod Pathol, 2003, 16(1): 14 - 21.

[17] ITO Y, TAKEDA T, SAKON M, *et al*. Expression and clinical significance of erb-B receptor family in hepatocellular carcinoma[J]. Br J Cancer, 2001, 84(10): 1377 - 1383.

[18] KOIZUMI F, KANZAWA F, UEDA Y, *et al*. Synergistic interaction between the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib ("Iressa") and the DNA topoisomerase Ⅰ inhibitor CPT-11 (irinotecan) in human colorectal cancer cells[J]. Int J Cancer, 2004, 108(3): 464 - 472.

[19] CIARDIELLO F, CAPUTO R, BORRIELLO G, *et al*. ZD1839 (IRESSA), an EGFR-selective tyrosine kinase inhibitor, enhances taxane activity in bcl-2 overexpressing, multidrug-resistant MCF-7 ADR human breast cancer cells[J]. Int J Cancer, 2002, 98(3): 463 - 469.

[20] XU J M, AZZARITI A, COLUCCI G, *et al*. The effect of gefitinib (Iressa, ZD1839) in combination with oxaliplatin is schedule-dependent in colon cancer cell lines[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2003, 52(6): 442 - 448.

[21] WOODBURN J R. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy[J]. Pharmacol Ther, 1999, 82(2 - 3): 241 - 250.

(编辑 薛国文)

(上接124页)

行分根修复。20颗患牙利用高速手机将下颌磨牙的2个根从根分叉处分开，形成两个独立的牙根，必要时进行切龈术，使残根暴露于龈缘上2 mm以上，按照单根牙进行桩核的牙根预备，用"富士"核模型套装完成根管桩及前磨牙核模型，按烤瓷牙要求制备第2前磨牙，取模，灌注模型，把2个前磨牙核桩模型及包含核桩的全口石膏模型送制作室，待2个前磨牙核桩及3个前磨牙联冠完成后，进行口内调验，粘固。5颗严重根分叉病变的患牙经完善的根管治疗和彻底根分叉治疗后，按上法分根，制作2个前磨牙联冠，要求联冠颈缘成"W"型，便于牙根间的清洁。进行口内调试，粘固。

2 结果

经3年随访观察25例患者均无任何不适感觉，自觉咬物有力，效果较好；检查发现1颗修复体瓷体部分脱落，未发现修复体整体脱落及松动病例，根分叉病变愈合，成功率96%。

3 讨论

分根术后进行桩核修复治疗为下颌第1磨牙的保存探索了新的方法。核桩直径不宜太大，应为根的1/3，以保留足够的牙根组织，烤瓷冠的边缘应位于根断端下1～2 mm，形成所谓的"套圈"作用，以抵抗由桩产生的侧向应力，而保护牙根免于折裂。分根后恢复成前磨牙形态，明显减少了单个牙根所受的张力，因此3年观察效果较为理想，与前牙的核桩修复疗效相近。下颌第1磨牙修复成2个前磨牙后，为了增加固位力，更好抵抗侧向及旋转力对牙根的破坏作用，应与稳固的第2前磨牙修复成3个单位的联冠增加其使用寿命，提高咀嚼效能。

关键词：分根术；固定桥；下颌磨牙

中图法分类号：R783.4 文献标识码：B

参考文献：

[1] 王佳敏，刘世森，孔令华，等. 严重缺损牙38例的保存治疗[J]. 第四军医大学学报，2004，25(14)：1305 - 1307.

[2] 邱子劲，李 珣，王丽萍. 分根术对磨牙根分叉病变或残根的保存治疗[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志，2002，2(2)：94 - 95.

[3] 王 懿，张少锋，王延荣，等. 磨牙半切术后修复治疗的三维有限元应力分析[J]. 临床口腔医学杂志，2004，20(2)：77 - 79.

(编辑 龙 亮)