文章编号:1000-5404(2014)12-1291-04

论著

阿法替尼与 PF-04691502 单用及联合对 H1975 细胞体外抗肿瘤作用研究

谭 涵[1],曾凡新[2],姜立花[2],董 志[1],傅洁民[2] (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院生物化学与分子药理学重点实验室[1];400061 重庆,重庆复创医药研究有限公司药理与毒理实验室[2])

[摘要] **目的** 研究 Pan-HER 不可逆抑制剂阿法替尼(Afatinib)和磷脂酰基醇 3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)α 抑制剂 PF-04691502(PF)单用及联合对表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)抑制剂耐药的非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)细胞株 H1975 的体外抗肿瘤作用。**方法** 通过 MTS 法、细胞划痕愈合实验、流式细胞术检测细胞周期和凋亡分析 Afatinib 和 PF 单药及联合对耐药性非小细胞肺癌细胞株 H1975 增殖、迁移等的影响。**结果** Afatinib 和 PF 单用对 H1975 细胞增殖有明显抑制作用,且抑制作用随浓度增加而加强;Afatinib 和 PF 联合时对 H1975 细胞增殖、迁移均有明显协同抑制作用;Afatinib 和 PF 单药和联合作用均主要使细胞阻滞在 G_1 期($P<0.05$);Afatinib 和 PF 单用时较对照组的细胞凋亡率增加,且当两者联合作用时凋亡率增加更显著($P<0.05$)。**结论** Pan-HER 不可逆抑制剂 Afatinib 和 PI3Kα 抑制剂 PF-04691502(PF)单用对耐药性非小细胞肺癌细胞株 H1975 有较强抑制作用,且当 Afatinib 和 PF 联合时对非小细胞肺癌细胞株 H1975 有协同抑制作用。

[关键词] Pan-HER 抑制剂;PI3Kα 抑制剂;H1975 细胞;T790M 突变;联合作用
[中图法分类号] R734.2;R965;R979.1 [文献标志码] A

Anti-tumor effect of afatinib and PF-04691502 separately or combined on NSCLC H1975 cells *in vitro*

Tan Han[1], Zeng Fanxin[2], Jiang Lihua[2], Dong Zhi[1], Fu Jiemin[2] ([1]Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Chongqing Fochon Pharmaceutical Co., Ltd, Chongqing, 400061, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the anti-tumor effect of separated or combined application of Pan-HER irreversible inhibitor afatinib and phosphoinositide 3-kinase α (PI3Kα) inhibitor PF-04691502 on epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor-resistant non-small cell lung cancer (NSCLC) H1975 cells *in vitro*. **Methods** Effects of afatinib and PF-04691502 (PF) separated or combined application on the proliferation and migration of H1975 cells were analyzed by cell cycle and apoptosis with MTS assay, wound-healing assay, and flow cytometry. **Results** Afatinib and PF alone significantly inhibited the proliferation of H1975 cells in a dose-dependent manner. Afatinib combined with PF showed an evident synergetic inhibitory effect. Afatinib and PF separated or combined application both induced cell cycle arrest at G_1 phase ($P<0.05$). As compared to the control group, afatinib and PF alone promoted cell apoptosis, and their combination induced a higher apoptotic rate of H1975 cells ($P<0.05$). **Conclusion** Pan-HER irreversible inhibitor afatinib and PI3Kα inhibitor PF alone shows significant antitumor effects on drug-resistant NSCLC H1975 cells. Moreover, their combination exhibits synergistic anti-tumor effects.

[**Key words**] Pan-HER inhibitor; PI3Kα inhibitor; H1975 cells; T790M mutation; combined effect

Corresponding author: Dong Zhi, E-mail: zhidong073@hotmail.com

[通信作者] 董 志,E-mail:zhidong073@hotmail.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140116.1055.005.html(2014-01-16)

肺癌是世界上引起死亡率最高的一种恶性肿瘤，肺癌按照临床特征可分为非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer，NSCLC）和小细胞肺癌2种类型，而NSCLC占肺癌总数的80%～85%。对于早期的NSCLC外科手术是主要的治疗方式，但其复发率很高，而且容易发生病灶转移，常常术后也要进行化疗，常规化疗药的应答持续时间较短，平均为2～3个月，中位生存期6～8个月[1]。

表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR）属于受体酪氨酸激酶受体家族，在多种类型肿瘤细胞中呈高表达，其中肺癌占40%～80%。大多数EGFR激活突变的非小细胞肺癌对第一代可逆性EGFR抑制剂如gefitinib敏感，但通常经过一段时间治疗后约50%的患者会在EGFR 20位外显子处产生T790M突变[2-3]，T790M突变导致EGFR门控区域空间位阻增大，改变EGFR激酶区ATP亲和性，从而产生获得性耐药[4-5]，因此我们需要找到更有效的方案针对耐药性患者的治疗。Afatinib是新一代Pan-HER不可逆抑制剂，它不仅是ATP的类似物，而且能与EGFR的Cys773或HER2的Cys805共价结合，从而对野生型、EGFR或HER2突变型都有较好疗效[5-6]；PI3K/Akt/mTOR是EGFR和其他激酶下游最重要的信号通路之一，因此在忽略其他通路被激活的情况下阻断任意一个此通路上的靶点都可能逆转对EGFR可逆抑制剂的耐药性[7]。PF-04691502是一个ATP竞争的PI3Kα抑制剂，对NSCLC患者（包括对EGFR TKIs耐药的患者）有潜在良好的抗肿瘤作用[8]。因此Pan-HER不可逆抑制剂与PI3Kα抑制剂联合作用对于耐药性非小细胞肺癌细胞H1975可能有良好疗效。本课题通过研究Pan-HER不可逆抑制剂Afatinib和PI3Kα抑制剂PF单药及联合对T790M突变型耐药细胞株H1975的作用，评价其疗效，旨在为临床联合治疗提供一定理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人非小细胞肺癌细胞株H1975购自上海中科院细胞库。RPMI1640购自Gibco（Lot#1002646，USA）；MTS购自Promega（Cell Titer 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay，Lot# 0000009269，USA）；胎牛血清购自Gibco（FBS，Lot# 1069982，USA）；胰蛋白酶购自Sigma（Lot#081M1274V，USA）；注射用硫酸链霉素购自华北制药股份有限公司；注射用青霉素钠购自太极西南药业股份有限公司；BIBW2992（即Afatinib，CAS：439081-18-2，纯度≥98%）和PF-04691502（用PF来表示，CAS：1013101-36-4，纯度≥99%，China）均来自重庆复创医药研究有限公司；药物均用DMSO配制为20 mmol/L的溶液。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 H1975细胞培养于100 U/mL硫酸链霉素、80 U/mL青霉素钠、10%胎牛血清浓度的RPMI1640培养基，在CO_2浓度为5%的37 ℃孵箱中培养，隔天换液。H1975隔3～4 d传代1次。每天在倒置显微镜下观察其生长状态，当细胞长满培养瓶70%～80%处于生长对数期时以0.25%的胰蛋白酶消化传代或实验待用。

1.2.2 MTS法测细胞增殖 通过测定Afatinib和PF对H1975细胞增殖的抑制作用，检测其对H1975细胞的抑制作用[7]。将H1975细胞按3 000/孔接种于96孔板，37 ℃、5% CO_2孵育24 h。实验设空白对照组、细胞液对照组和实验对照组（药物终浓度为500、250、125、62.5、31.25、15.63、7.81 nmol/L和3.90 nmol/L），孵育72 h。每孔加入20μL MTS液。孵育2 h后，用酶标仪测量490 nm处的光密度值。按照下列公式计算：细胞生长抑制率=[细胞液对照组D(490)值－实验对照组D(490)值]/[细胞液对照组D(490)值－空白对照组D(490)值]×100%，实验重复3次，求平均值。

1.2.3 Afatinib与PF联合作用检测 根据实验算出Afatinib与PF单药作用于H1975细胞时的IC_{50}值，然后以IC_{50}比值作为联合作用时给药比例，按照上述实验方法，检测出Aatinib与PF联合时对H1975细胞的抑制作用。

药物联合作用效果通过Chou-Talalay中效原理[8]进行评价，其原理为：中效方程F/Fu=(D/Dm)m取对数转化为线性方程lg(F/Fu)=mlg(D)－mlg(D_{50})（F为百分抑制率，Fu=1－F，m为方程斜率，D为药物的浓度，D_{50}为中效浓度）。药物联合作用指数（CI值）的计算公式为：CI=dx1/Dx1+dx2/Dx2（由“中效方程”求出两药联合作用产生X效应时所需浓度d1、d2，两药单独作用时产生X效应时所需浓度为D1、D2）。在联合作用中，当CI值>1时，即表现为拮抗作用；当CI值=1时，即表现为相加作用；当CI值<1时，即表现为协同作用。

1.2.4 细胞划痕实验 参考文献[9]将消化计数备用的细胞液以1×10^6/孔浓度接种于6孔板中（预先用记号笔在6孔板背面划3条横线作为定位），以十字方向混匀细胞液使其平铺在板中，将6孔板置于孵箱中孵育24 h待细胞贴壁。然后用10 μL枪头垂直于背面的横线划3条平行线，用PBS冲洗2～3次。对照组加DMSO（200 nmol/L），实验组浓度设置为：Afatinib（200 nmol/L）、PF（100 nmol/L）、Afatinib+PF（200 nmol/L+100 nmol/L，2∶1），分别在0 h和24 h在划痕交叉点处拍照（每组9个点），比较不同浓度对细胞迁移能力的影响。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期 参考文献[9-10]将消化好计数备用的细胞液以4×10^5/孔浓度接种于6孔板中，以十字方向混匀细胞液使其平铺在板子中，放入孵箱中孵育24 h。对照组加DMSO（200 nmol/L），实验组浓度设置为：Afatinib（200 nmol/L）、PF（100 nmol/L）、Afatinib+PF（200 nmol/L+

100 nmol/L,2∶1),作用 24 h。每孔加 300 μL 消化收集细胞,并用 PBS 冲洗 2~3 次,后用 70% 的冰乙醇固定,4 ℃放置过夜。检测前用 PBS 洗涤离心,加入含有 10 μL RNase A 和 25 μL PI 染色液的染色缓冲液 0.5 mL,37 ℃温浴 30 min 后用流式仪检测。

1.2.6　流式细胞仪检测细胞凋亡　参考文献[10],细胞处理及实验组和对照组浓度设置同 1.2.5,待药物作用 48 h 后每孔加 300 μL 胰酶消化收集细胞,加冷 PBS 重悬离心 2~3 次。用 195 μL binding buffer 溶液悬浮细胞,然后加入 5 μL Annexin V-FITC,轻轻混匀后于室温避光条件下孵育 10 min;离心弃上清液,加 190 μL binding buffer 溶液悬浮细胞,然后加 10 μL PI 后轻轻混匀于 2~8 ℃避光条件下孵育 5 min,然后用流式细胞仪检测。

1.3　统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法。

2　结果

2.1　Afatinib 与 PF 单药及联合作用时对 H1975 细胞增殖的影响

Afatinib 与 PF 作用 H1975 细胞 72 h 后用 MTS 法检测,结果表明不同浓度 Afatinib 和 PF 对 H1975 细胞均有抑制作用,且随着药物浓度增大对细胞抑制作用增强,呈现剂量依赖性($P<0.05$);与同浓度下 Afatinib 和 PF 单药组相比,Afatinib 与 PF 联合作用时对 H1975 细胞的抑制作用明显增强,具有浓度-效应依赖关系(表 1)。

表 1　不同浓度 Afatinib 和 PF 作用 72 h 后对 H1975 细胞增殖的抑制率比较(%,$\bar{x}\pm s$)

浓度(nmol/L)	Afatinib[a]	PF[a]	Afatinib + PF[a]
3.90	8.44±1.58	12.20±0.51	11.37±0.66
7.81	9.94±1.36	14.99±0.73	16.19±0.27
15.63	17.70±0.64	20.65±1.66	25.29±1.37
31.25	23.91±0.79	28.11±0.04	38.15±1.60
62.5	31.87±0.57	39.32±1.79	45.54±0.95
125	40.97±2.14	44.69±1.24	58.69±1.81
250	50.04±1.96	56.34±1.26	71.43±1.75
500	60.20±0.93	68.22±0.84	83.84±0.94

a:$P<0.05$,不同浓度组之间比较

2.2　Afatinib 与 PF 联合作用对 H1975 细胞的联合效应评价

用 lg(fa/fu) = mlg(D) - mlg(Dm)分别对 Afatinib、PF 及两者联合作用做线性回归,求出 m 和 D_{50},r 值均 >0.99,回归性好,Afatinib 和 PF 的联合给药组 D_{50} 值明显降低;根据结果分别算出 Afatinib 与 PF 联合作用于 H1975 细胞抑制率为 25%、50% 以及 75% 时 CI 值均 <1,表明两者有联合协同作用,且随着抑制率增大其 CI 值减小,表明协同效应随抑制率增大而增强(表 2)。

表 2　Afatinib 与 PF 联合作用于 H1975 的联合效应

Fa(X)	0.25	0.5	0.75
Dx_1(Afatinib)	35.7557	213.3	1271.9
Dx_2(PF)	22.849	150.4	966.782
$dx_{1,2}$(Afatinib + PF)	15.578/7.789	65.434/32.72	274.84/137.42
CI	0.7765	0.524	0.3582

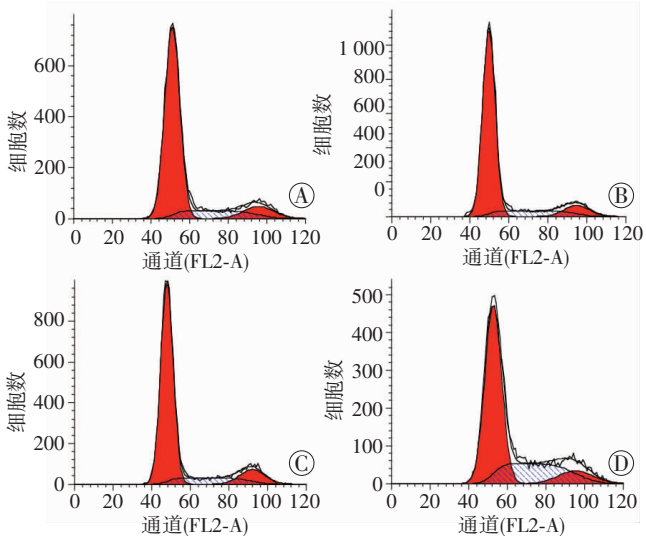
Dx:两药单独作用时产生 X 效应时所需浓度;dx:两药联合作用产生 X 效应时所需浓度

2.3　Afatinib 与 PF 单用及联合对 H1975 细胞迁移的影响

实验数据用 Image-Pro Plus6.0 软件处理,算出细胞的迁移率,Afatinib 的迁移率为(62.2±5.02)%,PF 的迁移率为(65.17±6.24)%,Afatinib + PF 联合用药组迁移率为(29.37±2.96)%。与 DMSO 对照组相比,Afatinib 和 PF 对 H1975 细胞迁移能力有明显抑制作用;且 Afatinib 和 PF 联合给药组相与单药组比较,其迁移率有统计学差异($P<0.05$)。

2.4　Afatinib 与 PF 单用及联合对细胞周期的影响

Afatinib、PF、Afatinib + PF 分别处理 H1975 细胞 24 h 后,测得其周期分布为 G_1 期细胞所占百分比分别为(77.72±1.06)%、(77.39±0.31)%、(76.12±0.41)%,与对照(DMSO)组(65.10±1.79)% 比较明显增加($P<0.05$);Afatinib 和 PF 联合给药组 G_2 期细胞所占百分比为(11.94±0.78)%,与对照(DMSO)组(9.66±0.53)% 比较明显增加($P<0.05$,图 1)。

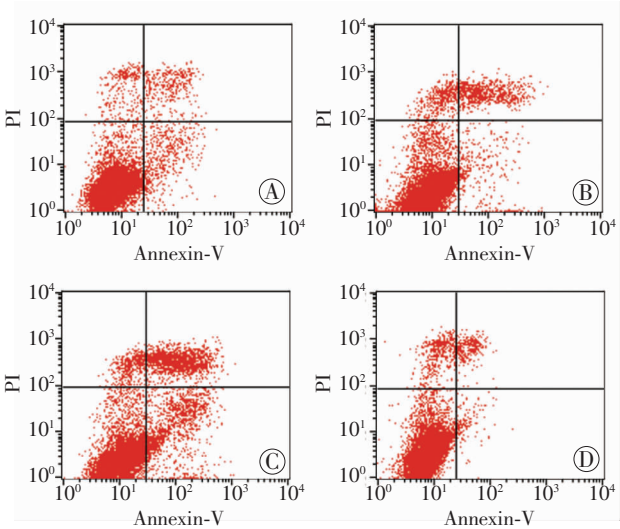


A: Afatinib 组;B: PF 组; C:Afatinib + PF 组; D:对照组(DMSO)

图 1　流式细胞术检测 Afatinib 与 PF 单药及联合对 H1975 细胞周期的影响

2.5　Afatinib 与 PF 单用及联合对细胞凋亡的影响

药物处理 H1975 细胞 24 h 后,Afatinib 和 PF 单独给药组细胞凋亡所占百分比分别为(9.06±0.27)%、(10.78±0.67)%,Afatinib 与 PF 联合用药组细胞凋亡率明显增加,所占百分比为(26.85±0.99)%,与对照(DMSO)组(3.99±0.16)% 比较,差异有统计学意义($P<0.05$,图 2)。



A:Afatinib;B:PF;C:Afatinib + PF;D:对照(DMSO)

图2 流式细胞术检测 Afatinib 与 PF 单用及联合对 H1975 细胞凋亡的影响

3 讨论

EGFR 可逆抑制剂是用于治疗 NSCLC 的一种重要的靶点抑制剂,但随着获得性耐药的出现使人们不得不寻找新的治疗方法,经研究发现对 EGFR 可逆性抑制剂耐药的机制包括 T790M 突变、MET 和 IGF-1R 基因扩增、PTEN 和 mTOR 蛋白异常、EGFR 和 HER2 基因突变,其中 T790M 突变是产生获得性耐药最主要的一种机制[7]。在对 EGFR 可逆抑制剂产生获得性耐药的患者治疗中,EGFR 不可逆抑制剂能延长其无进展生存期,但研究显示其他 EGFR 不可逆抑制剂如 PF-00299802、EKB-569、canertinib (CI-1033)和 neratinib (HKI-272)都需要相对较高的剂量才能克服对 EGFR 抑制剂的耐药性;在治疗产生获得性耐药的 EGFR 野生型和突变型患者时,需要增加药物浓度至超过耐受剂量水平才能有效诱导肿瘤细胞凋亡[7]。如 neratinib (HKI-272)用于治疗 NSCLC 的二期临床试验中初始剂量给予 320 mg/d,但由于发生腹泻副作用不得不把剂量减少到 240 mg/d[11];根据文献报道,在 Afatinib 用于治疗 NSCLC 的一期临床试验中显示基于药物剂量的限制性毒性(DLTs),其临床二期试验的推荐剂量为 40 mg/d,Afatinib 的最大耐受剂量(MTD)为 90 mg/d。PI3K 也是多种肿瘤的关键信号蛋白,在肿瘤治疗中有重要意义,研究发现 EGFR 抑制剂的作用还与下调下游 PI3K 通路中 E2F1 和 TS 的表达有关[12]。因此 Pan-HER 不可逆抑制剂 Afatinib 与 PI3Kα 抑制剂 PF-04691502 联合作用对耐药性 NSCLC 患者的治疗可能有更好的疗效。

本研究表明,Pan-HER 不可逆抑制剂 Afatinib 与 PI3Kα 抑制剂 PF-04691502 联合对 H1975 细胞体外抗肿瘤确实有协同作用(CI < 1),且随抑制率的增加其协同作用增强;联合作用时相比 Afatinib 或 PF 单药对细胞迁移的抑制作用也明显增强;本实验通过流式细胞仪分析细胞周期分布,显示 Afatinib 和 PF 单药和联合作用均主要使 H1975 细胞阻滞在 G_1 期;细胞凋亡实验表明,Afatinib 和 PF 联合组 H1975 细胞的凋亡率相比单药组显著增加。

综上所述,Afatinib 与 PF 联合对 H1975 细胞的协同抑制作用可能跟同时阻断上游靶点 EGFR 以及 PI3K 通路的 PI3K 靶点有关,进而阻断 PI3K-AKT 信号通路,抑制细胞增殖、迁移,促进细胞凋亡。

本研究对 Pan-HER 不可逆抑制剂 Afatinib 和 PI3Kα 抑制剂 PF-04691502 联合对耐药性非小细胞肺癌细胞株 H1975 的体外抗肿瘤研究显示出协同作用,在后续研究中将继续探讨两者联合在动物模型体内的作用,为今后的临床联合用药提供了理论基础。联合用药的进一步研究和评价对获得性耐药的 NSCLC 患者治疗有重要意义。

参考文献:

[1] Kosmidis P. Chemotherapy in NSCLC: historical review[J]. Lung Cancer, 2002, 38(Suppl 3): S19 - S22.
[2] Rosenzweig S A. Acquired resistance to drugs targeting receptor tyrosine kinases[J]. Biochem Pharmacol, 2012, 83(8): 1041 - 1048.
[3] Dienstmann R, De-Dosso S, Felip E, *et al*. Drug development to overcome resistance to EGFR inhibitors in lung and colorectal cancer[J]. Mol Oncol, 2012, 6(1): 15 - 26.
[4] Bar J, Onn A. Overcoming molecular mechanisms of resistance to first-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors [J]. Clin Lung Cancer, 2012, 13(4): 267 - 279.
[5] Engelman J A, Janne P A. Mechanisms of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(10): 2895 - 2899.
[6] Chen X, Zhu Q, Zhu L, *et al*. Clinical perspective of afatinib in non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2013, 81(2): 155 - 161.
[7] Krawczyk P, Mlak R, Powrozek T, *et al*. Mechanisms of resistance to reversible inhibitors of EGFR tyrosine kinase in non-small cell lung cancer [J]. Contemp Oncol (Pozn), 2012, 16(5): 401 - 406.
[8] Yuan J, Mehta P P, Yin M J, *et al*. PF-04691502, a potent and selective oral inhibitor of PI3K and mTOR kinases with antitumor activity [J]. Mol Cancer Ther, 2011, 10(11): 2189 - 2199.
[9] Jiao Y, Sun K K, Zhao L, *et al*. Suppression of human lung cancer cell proliferation and metastasis *in vitro* by the transducer of ErbB-2.1 (TOB1)[J]. Acta Pharmacol Sin, 2012, 33(2): 250 - 260.
[10] Chou T C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method[J]. Cancer Res, 2010, 70(2): 440 - 446.
[11] Giaccone G, Wang Y. Strategies for overcoming resistance to EGFR family tyrosine kinase inhibitors[J]. Cancer Treat Rev, 2011, 37 (6): 456 - 464.
[12] Takezawa K, Okamoto I, Tanizaki J, *et al*. Enhanced anticancer effect of the combination of BIBW2992 and thymidylate synthase-targeted agents in non-small cell lung cancer with the T790M mutation of epidermal growth factor receptor[J]. Mol Cancer Ther, 2010, 9(6): 1647 - 1656.

(**收稿**:2013-10-29;**修回**:2013-12-23)
(编辑 张 维)