

RG-14260 增强子宫内膜癌细胞化疗敏感性研究

邓守恒¹, 周保锋², 喻雄杰¹, 瞿萍¹, 徐华², 曹凤军^{1*}

(1. 湖北医药学院附属人民医院肿瘤中心, 湖北 十堰 442000;

2. 十堰市妇幼保健院妇产科, 湖北 十堰 442000)

[摘要] 目的: 研究酪氨酸磷酸化抑制剂 RG-14260 (RG) 单独或联合阿霉素、顺铂及紫杉醇对子宫内膜癌 ishikawa 细胞增殖的影响, 为临床应用 RG 治疗子宫内膜癌提供理论依据。方法: 应用 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ RG 与各 1/2 的 IC_{50} 量的阿霉素 (ADM)、顺铂 (DDP) 及紫杉醇 (PTX) 联合, MTT 法检测细胞增殖抑制率; RT-PCR 法检测 RG、阿霉素、顺铂及紫杉醇对细胞表皮生长因子受体 EGFR mRNA 表达影响; Western blot 法检测 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ RG 作用 6, 12, 24 h 后细胞 p21 蛋白表达水平。结果: RG 可显著降低细胞 EGFR 基因 mRNA 水平, 上调 p21 蛋白表达。结论: RG 通过抑制 EGFR 信号通路, 上调 p21 蛋白表达, 增强化疗药物对子宫内膜癌细胞的杀伤作用。

[关键词] 子宫内膜癌; RG-14260; 表皮生长因子受体; p21

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)07-0210-03

Experimental of RG-14260 on Improving Chemosensitivity of Human Endometrial Carcinoma Cells *in vitro*

DENG Shou-heng¹, ZHOU Bao-feng², YU Xiong-jie¹, QU Ping¹, XU Hua², CAO Feng-jun^{1*}

(1. Center of Oncology, Renmin Hospital, Hubei Medical University, Shiyan 442000, China;

2. Department of Gynaecology and Obstetrics, Shiyan Maternal and Child Health Hospital, Shiyan 442000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of RG-14260 on the proliferation and drug sensitivity of human endometrial carcinoma line ishikawa cells *in vitro*. **Method:** Cell proliferation inhibition rate of ishikawa cells was determined using MTT method after treatment with half of the IC_{50} of the ADR, DDP, PTX and $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ RG alone or combination for 24 h. The mRNA levels of EGFR after treatment with RG and drug alone was detected by RT-PCR. Western blot was used to measured p21 protein abundance after treatment with $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ RG for 6, 12, 24 h. **Result:** RG-14260 significantly decreased the mRNA expressions of EGFR and increased the abundance of p21 protein. Compared with the treatment with agents alone, combined treatment of the RG-14260 significantly increased cell proliferation inhibition rate and improved the cytotoxicity of the chemotherapeutic agents ($P < 0.05$). **Conclusion:** RG-14260 can block the EGFR pathway and increase p21 protein to inhibit the proliferation and enhance the chemosensitivity of human endometrial carcinoma ishikawa cells.

[Key words] endometrial carcinoma; RG-14260; epidermal growth factor receptor (EGFR); p21

[收稿日期] 20101123(015)

[基金项目] 湖北省教育厅基金(Q20092401); 湖北医药学院基金(2008CXZ02)

[第一作者] 邓守恒, 博士, 副教授, 从事肿瘤药理研究, Tel: 0719-8637939, E-mail: dshblue@163.com

[通讯作者] * 曹凤军, 博士, 副教授, 从事妇科肿瘤研究, Tel: 0719-8637939, E-mail: yychenping@163.com

子宫内膜癌是女性生殖道三大恶性肿瘤之一, 化学治疗是重要的治疗手段, 但近年来其疗效的提高不太理想。分子靶向治疗是目前针对恶性肿瘤提出的一种新的治疗方法, 可根据恶性肿瘤细胞与正常组织细胞之间的异型性, 使抗肿瘤药物仅杀伤肿瘤细胞, 而不影响正常组织细胞, 从而提高化疗药物抗肿瘤效果、减少毒副作用^[1]。表皮生长因子受体

(epidermal growth factor receptor, EGFR)是一种膜受体,在多种恶性肿瘤中过表达,子宫内膜癌也存在EGFR高表达且抑制该受体活性可以有效地抑制肿瘤生长^[2]。阻断EGFR通路能否增加子宫内膜癌ishikawa细胞对化疗药物的敏感性未见报道,本文对此进行了研究。

1 材料

表皮生长因子(EGF,批号315-09)、噻唑嘧(MTT,批号0309-012)为Sigma产品;EGFR抑制剂RG-14620(RG,批号6I253-2005,美国Biomol公司);DMEM培养基购自美国GIBCO公司(批号MD205);兔抗人p21单抗(批号GMS41007)及山羊抗兔的二抗(批号E032220)购自美国Santa Cruz公司;Trizol总RNA抽提试剂盒(批号102001)、RevertAid™ First strand cDNA synthesis kit (rxkgn K1621)为Fermentas公司产品;Mod 550型全自动酶标仪(美国Bio-Rad公司);AM-PLITRON II型PCR扩增仪(美国Barnscread/Thermolyne公司)。

2 方法

2.1 细胞培养及分组 子宫内膜癌细胞株ishikawa由本院临床医学研究所提供,培养于含10%小牛血清的DMEM培养基内,于37℃、饱和湿度,5%CO₂条件下培养。细胞经20 ng·mL⁻¹EGF预处理2 h后分为7组,即10 μmol·L⁻¹RG、1/2 IC₅₀阿霉素、1/2 IC₅₀顺铂、1/2 IC₅₀紫杉醇、10 μmol·L⁻¹RG + 1/2 IC₅₀阿霉素、10 μmol·L⁻¹RG + 1/2 IC₅₀顺铂、10 μmol·L⁻¹RG + 1/2 IC₅₀紫杉醇,另设空白对照细胞组,阿霉素、顺铂、紫杉醇的IC₅₀值参照文献^[3]分别为0.572,67.4 μmol·L⁻¹和719.5 nmol·L⁻¹。

2.2 MTT法检测细胞增殖 细胞分组及处理同上,各组细胞以1×10⁴个/mL接种至96孔板,每孔100 μL,每组设4个复孔,培养12,24,36 h后每孔加入5 g·L⁻¹ MTT 10 μL,作用2 h后弃去上清液,加150 μL二甲基亚砷作用30 min,上全自动酶标液在570 nm波长下读取各孔吸光度A,计算细胞抑制率。

$$\text{细胞抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{药物}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$$

2.3 RT-PCR法检测EGFR mRNA^[4] 应用10 μmol·L⁻¹RG及各1/2 IC₅₀量的阿霉素、顺铂、紫杉醇处理12 h后收集各组细胞,Trizol提取总RNA,逆转录合成cDNA用于PCR,PCR引物为,EGFR上游引物:5'-AAC ACA GTG GAG CGA ATT CCT TT-3',下游引物:5'-GGA AGT CCA TCG ACA TGT TGC

T-3',扩增产物为425 bp,反应体系25 μL,95℃预变性5 min,94℃变性1 min,55℃退火1 min,72℃延伸1 min,25个循环,最后72℃10 min结束反应。取10 μL扩增产物行1.5%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,紫外灯下观察并照相,经凝胶图像分析仪进行半定量分析。

2.4 Western blot法检测p21蛋白 细胞接种于6孔板,应用10 μmol·L⁻¹RG处理ishikawa细胞,培养6,12,24 h后收集细胞,PBS洗2次,裂解,离心,收集上清,即为细胞总蛋白,进行蛋白定量,调节每份样品蛋白浓度,加等量蛋白于上样缓冲液,煮沸,在SDS聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳。电泳后转膜,依次加入p21一抗和二抗,加入底物液显色,拍照。蛋白条带用Quanti Scan软件进行密度扫描分析。

2.5 统计学处理 全部数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 13.0统计软件进行方差分析, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 RG联合化疗对ishikawa细胞增殖的影响 MTT法检测结果显示,10 μmol·L⁻¹RG联合1/2的IC₅₀阿霉素(0.29 μmol·L⁻¹)、顺铂(0.34 μmol·L⁻¹)及紫杉醇(0.36 μmol·L⁻¹)应用后,细胞生长抑制率明显高于单药应用,有统计学意义($P < 0.05$)。10 μmol·L⁻¹RG及各1/2的IC₅₀阿霉素、顺铂和紫杉醇单独作用12 h,对ishikawa细胞产生的抑制率是15.32%,14.67%,16.14%,17.13%,而同样剂量的RG联合阿霉素、顺铂或紫杉醇作用12 h产生的抑制率则升高为34.21%,35.12%,38.11%,各联合组作用效果均明显高于单药应用($P < 0.05$),随着作用时间的延长,RG及各化疗药单独及联合应用对细胞增殖产生的抑制率也随之增加,但联合组作用效果始终明显高于单药应用($P < 0.05$),见表1。

表1 RG单药和联合化疗对ishikawa细胞增殖影响($\bar{x} \pm s, n=4$) %

组别	剂量 /μmol·L ⁻¹	抑制率		
		12 h	24 h	36 h
RG	10	15.32 ± 1.17 ^{1,2,3)}	20.16 ± 2.13 ^{1,2,3)}	24.14 ± 2.15 ^{1,2,3)}
阿霉素	0.29	14.67 ± 1.93 ¹⁾	19.61 ± 1.25 ¹⁾	23.23 ± 1.78 ¹⁾
顺铂	0.34	16.14 ± 1.36 ²⁾	21.13 ± 1.14 ²⁾	24.85 ± 1.97 ²⁾
紫杉醇	0.36	17.13 ± 1.98 ³⁾	22.34 ± 1.58 ³⁾	25.94 ± 2.11 ³⁾
阿霉素+RG		34.21 ± 2.14	40.21 ± 2.23	43.17 ± 2.33
顺铂+RG		35.12 ± 1.85	41.73 ± 2.42	42.19 ± 2.12
紫杉醇+RG		38.11 ± 2.24	45.24 ± 2.39	47.37 ± 2.57

注:与阿霉素+RG相比¹⁾ $P < 0.05$;与顺铂+RG相比²⁾ $P < 0.05$;与紫杉醇+RG相比³⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 RG 及各化疗药对 ishikawa 细胞 EGFR mRNA 表达的影响 应用 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ RG 及各 $1/2 \text{IC}_{50}$ 量的阿霉素、顺铂、紫杉醇处理 Ishikawa 细胞 12 h 后 RT-PCR 检测结果表明,阿霉素、顺铂处理组细胞内 EGFR mRNA 表达量很高,灰度值分别为 16.8 ± 1.1 , 15.7 ± 1.9 , 紫杉醇处理组灰度值降为 12.4 ± 1.6 , 相比之下 RG 组 EGFR mRNA 表达量则明显下调,灰度值仅为 1.3 ± 0.3 , 说明 RG 能显著抑制 EGFR 基因表达,见图 1。

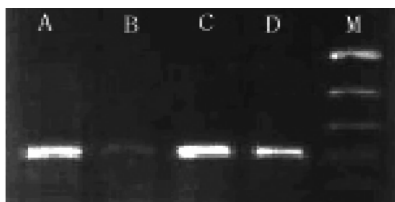


图 1 RG 及各化疗药对 ishikawa 细胞 EGFR mRNA 表达的影响
M. Marker; A. 顺铂; B. RG; C. 阿霉素; D. 紫杉醇处理组

3.3 RG 对 ishikawa 细胞 p21 蛋白表达影响

Western blot 定量检测结果发现,ishikawa 细胞中存在着 p21 蛋白的低表达,灰度值仅为 0.314 ± 0.019 , 经 RG 作用 6 h, 细胞内 p21 蛋白灰度值升为 0.467 ± 0.037 , 升高作用不明显。而作用 12, 24 h 后,灰度值则分别升至 0.684 ± 0.042 ($P < 0.05$) 和 0.896 ± 0.039 ($P < 0.01$), 上调作用显著,见图 2。

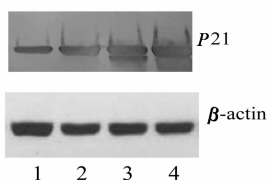


图 2 RG 对 ishikawa 细胞 p21 蛋白表达影响
(1, 2, 3, 4. 分别为对照及作用 6, 12, 24 h 结果)

4 讨论

EGFR 是 ErbB (ErbB1-4) 家族成员之一,是原癌基因 ErbB1 (HER1) 的表达产物,属受体酪氨酸蛋白激酶 (RTK)^[5], EGFR 在所有的表皮细胞、基质细胞、部分神经胶质细胞和平滑肌细胞中表达,在调节细胞生长、增殖、分化、恶变、血管生长及细胞死亡中发挥着重要的作用。研究发现,在人类已知的多种肿瘤中都存在着 EGFR 的高表达^[6-7], EGFR 的过度表达与肿瘤的发生、进展和化疗耐药有关,往往提示预后不良^[8],以 EGFR 为靶点的分子靶向治疗已成为当前恶性肿瘤治疗研究的热点。

本文应用 EGFR 特异性阻断剂 RG 处理子宫内

膜癌 Ishikawa 细胞发现,单独应用 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ RG 及各 $1/2$ 的 IC_{50} 化疗药物,细胞增殖抑制率最高达不到 26%, 而 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ RG 联合 $1/2$ 的 IC_{50} 化疗药物处理细胞,对癌细胞增殖抑制率明显升高,显著高于 RG 及各化疗药单用效果,说明 RG 有化疗的增敏作用。为证实 RG 的这些作用是否与 EGFR 信号通路有关,本文又进一步采用 RT-PCR 法检测了经 RG 及各化疗药物处理后的 ishikawa 细胞 EGFR mRNA 水平,结果发现, RG 组明显下降,顺铂和阿霉素组较高,紫杉醇组介于两者之间,而 RG 联合紫杉醇对细胞增殖抑制率又高于 RG 联合顺铂或阿霉素,说明抑制 EGFR 通路确实是 RG 化疗增敏的作用原因之一。

目前,肿瘤普遍被认为是一种以细胞周期失调为特征的疾病,而 p21 基因是目前已知具有最广泛活性的细胞周期抑制基因,参与了细胞增殖、分化、衰老、凋亡以及 DNA 损伤修复等多种功能的调节。大量研究表明, p21 的表达缺失与肿瘤的迅速生长、更差的分化和预后呈负相关,而导入外源 p21 基因后,又可使肿瘤细胞出现生长抑制^[9]。本文应用 RG 作用于子宫内膜癌细胞 6 h 后发现, p21 蛋白量升高不明显,而作用 12, 24 h 后 p21 蛋白量明显升高,说明上调 p21 也是 RG 化疗增敏作用的可能机制之一。

【参考文献】

- [1] 李岩, 马洁. 肿瘤分子靶向治疗学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 1.
- [2] 王卓然, 宋巍, 孙壮状, 等. TGF- β 1 与 EGFR 在子宫内膜癌患者内膜组织中的表达及意义 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2010, 18(7): 21.
- [3] 沈媛, 胡海燕, 陆琳. 硼替佐米诱导子宫内膜癌 Ishikawa 细胞凋亡并增强其化疗敏感性 [J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(6): 1301.
- [4] 张娇, 陈爱平, 戚玉言, 等. RNA 干扰靶向沉默 EGFR 基因对卵巢癌耐药细胞凋亡影响的实验观察 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17(5): 345.
- [5] Jorissen R N, Walker F, Pouliot N, et al. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling [J]. Exp Cell Res, 2003, 284(1): 31.
- [6] Psyri a, Kassar m, Yu Z, et al. Effect of epidermal growth factor receptor expression level on survival in patients with epithelial ovarian cancer [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(12): 8637.
- [7] Park S J, Armstrong S, Kim C H, et al. Lack of EGF receptor contributes to drug sensitivity of human germline cell [J]. Br J Cancer, 2005, 92(2): 334.
- [8] Nicholson R I, Gee J M, Harper M E. EGFR and cancer prognosis [J]. Eur J Cancer, 2001, 37(4): 9.
- [9] 翟友刚, 史朋, 谢忠平. p21 基因与肿瘤 [J]. 生命的化学, 2004, 24(6): 505.

[责任编辑 邹晓翠]