

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.014.005
文章编号: 1005-8982 (2018) 014-0024-07

EGFR TKIs 联合化疗的给药顺序对 NSCLC 细胞促凋亡的影响

高峰, 张泽峰, 王涛, 王瑞

(河北医科大学第四医院 胸外一科, 河北 石家庄 050011)

摘要: **目的** 探究表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂 (EGFR TKIs) 与化疗药物单用、联用, 以及顺序给药时, 对获得性 TKI 耐药的非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞系凋亡的影响。 **方法** 选用存在 TKI 耐药基因突变 (T790M, cMET) 的 NSCLC 细胞系 PC9ER、H1975 和 HCC827GR, 以及 TKI 敏感基因突变 (19 外显子突变) 的细胞系 PC9 和 HCC827。采用 MTS 法检测化疗药物顺铂和紫杉醇, 以及 TKI 厄洛替尼单用、联用, 或者顺序给药干预各 NSCLC 细胞系时的细胞活性状态, 并利用集落形成试验加以验证。采用 Western blot 检测各处理组蛋白裂解液中细胞凋亡标志物 cPARP 含量变化。 **结果** MTS 法和集落形成试验结果发现, EGFR TKIs 联合化疗能协同增加 NSCLC 细胞系的细胞毒性。同时给予 EGFR TKIs 和化疗或先化疗再用 EGFR TKIs, 可获得最佳干预效果。Western blot 检测结果表明, 联合用药后 cPARP 蛋白表达升高。而且先化疗后 EGFR TKIs 干预比两者顺序颠倒的促凋亡作用更强。 **结论** 先化疗后 EGFR TKIs 干预的最优给药顺序可使对获得性 TKI 耐药的 NSCLC 细胞系产生最强的促凋亡作用。

关键词: 非小细胞肺癌; 获得性耐药; 化疗; 表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

Effect of EGFR-TKIs and chemotherapy combinations and administration sequence on apoptosis of NSCLC cells

Feng Gao, Ze-feng Zhang, Tao Wang, Rui Wang

(First Department of Thoracic Surgery, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050011, China)

Abstract: Objective To explore the effect of epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs) and chemotherapeutic drug alone, concurrent and sequential administration on apoptosis of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells with acquired TKI-resistance. **Methods** NSCLC cell lines with TKI-resistance gene mutations (T790M and cMET) such as PC9ER, H1975 and HCC827GR as well as TKI-sensitive gene mutation (exon 19) cell lines PC9 and HCC827 were selected. Cell viability was detected by MTS assay when chemotherapy drugs Cisplatin, Paclitaxel and TKI Erlotinib were used alone, in combination or in sequential administration for intervention of NSCLC cell lines, and verified using colony formation assay. The content of apoptosis marker cPARP in cell lysate was detected in each treatment group by Western blot. **Results** MTS assay and colony formation revealed that the combination of EGFR-TKIs and chemotherapeutic drugs could synergistically increase the cytotoxicity to NSCLC cell lines. Simultaneous use of EGFR-TKIs and chemotherapeutic drugs or chemotherapy followed by EGFR-TKIs provided the maximum intervention. Western blot showed that the apoptotic marker cPARP expression was significantly increased when two drugs were simultaneously used. Moreover, chemotherapy

收稿日期: 2016-11-03

[通信作者] 张泽峰, E-mail: hggye@163.com

then EGFR-TKIs intervention could obtain a more powerful pro-apoptotic performance than the reverse order intervention. **Conclusions** The sequence of chemotherapy followed by EGFR-TKI is likely to be the most active strategy, and could have the greatest effect on apoptosis in cell lines with acquired TKI-resistance.

Keywords: NSCLC; acquired resistance; chemotherapy; EGFR-TKIs

表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 突变的非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 细胞具有对 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitors, TKIs) 高度敏感的反应特性^[1]。由于患者对 EGFR TKIs 具有极高的耐受性, 以及其对无进展生存期的显著改善, 一线应用 EGFR TKIs 成为晚期 NSCLC 患者的标准化治疗方案^[2-3], 但是患者在接受 9 ~ 13 个月的 EGFR TKIs 治疗后, 开始出现获得性 TKIs 耐药^[4-5]。持续用药后难以回避的耐药成为制约 TKIs 应用的最大瓶颈^[6]。根据实体瘤疗效评价标准, 肿瘤耐药后, 继续应用 EGFR TKI 单药或者联合其他治疗方式依旧值得考虑^[7], 为此, 本文探究 EGFR TKIs 联合化疗的不同给药方案对 NSCLC 细胞系促凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞系和试剂

EGFR 突变的 NSCLC 细胞系: PC9 (19 号外显子突变)、H1975 (L858R+T790M 突变)、HCC827 (19 号外显子突变) 和 HCC827GR (19 号外显子突变 + cMET 扩增) 由广东肺癌研究所馈赠。PC9ER (19 号外显子突变 +T790M 突变) 由郑州大学医学科学院临床药理研究所馈赠。

厄洛替尼、WZ4002、顺铂和紫杉醇购自武汉永臻生物科技有限公司, 溶于 DMSO 或水 (顺铂), 小剂量分装存储于 -20℃ 冰箱。

1.2 MTS 细胞毒性试验

各细胞系用含 10% 胎牛血清 (四季青, 浙江天杭生物科技有限公司) 的 DMEM 高糖培养基 (美国 HyClone 公司) 在 37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 细胞培养箱 (美国 Thermo 公司 Forma Steri-Cult 型) 中培养。待细胞处于对数生长期时, 取 96 孔细胞培养板, 加入 100 μl 孔含 1 × 10⁴ 个细胞的完全培养基铺板, 培养 72 h 后, PC9、PC9ER、HCC827、HCC827GR 及 H1975 细胞分别加入顺铂 (终浓度为 0.01、0.10、1.00 和 10.00 μmol/L) 或紫杉醇 (终浓度为 0.001、0.010

和 0.100 μmol/L), 各处理组设置 3 ~ 6 个复孔。药物处理 72 h 后, 加入 20 μl 孔 MTS 复合物 (美国 Promega 公司) 继续培养 4 h 后显色。检测前摇晃培养板 10 s, 混匀颜色。用酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司 Elx800 型) 于 490 nm 波长处检测吸光度值。实验重复 3 次, 结果用 Graph Pad Prism 软件进行分析, 使用非线性回归模型对曲线进行拟合。各药物处理组相对空白对照组减少的细胞数用百分比表示。

1.3 集落形成试验

待细胞处于对数生长期时, 取 24 孔细胞培养板, 加入 500 μl 孔含 1 × 10³ 个细胞的完全培养基铺板, 不同药物处理组设置 ≥ 2 个复孔, 实验重复 3 遍。7 d 后抽弃药物, 更换为完全培养基, 使细胞培养增殖。当细胞克隆生长出现差异时, 弃培养基, 用 PBS 缓冲液冲洗 2 次, 甲醇固定, 0.005% 结晶紫 (德国默克公司) 对细胞核染色后用倒置显微镜 (日本奥林巴斯公司, IX83) 拍照。显微镜下计数 < 50 个细胞克隆数, 计算集落形成率。集落形成率 (%) = (集落数 / 接种细胞数) × 100%。

1.4 Western bolt 检测

将细胞以 2 × 10⁵ 个 / 孔铺于 6 孔板, 1 ml / 孔铺于完全培养基。待其贴壁生长 1~2 d 后进行相应药物干预。用 PBS 缓冲液冲洗 3 次, 使用细胞裂解液进行裂解。使用 Bio-Rad 蛋白分析仪 (美国 Bio Rad 公司, Hercules) 在 595 nm 波长处测定各组蛋白浓度。将各组蛋白用去离子水平衡后, 加入 3 × 蛋白分离缓冲液煮沸 5 min, -80℃ 存储。

取 5 μl 蛋白 Marker, 以及包含不加药对照组在内的 6 组各 25 μl 样品上样, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后电转于 PVDF 膜。将膜封闭处理以防抗体非特异性结合, 4℃ 一抗孵育过夜。次日, 充分洗膜后, 加入含辣根过氧化物酶 HRP 标记的二抗, 避光孵育 1 h 后洗膜, 最后暗室曝光, 晾干胶片后, 扫描。实验独立重复 3 次, 采用 Image J 软件对灰度值进行分析。

抗体的使用: cPARP、ERK1/2 和兔抗 IgG HRP-

抗体(英国 Abcam 公司)溶于 5% BSA 的 TBST 溶液中,稀释倍数分别为 1 : 10 000、1 : 3 000 和 1 : 5 000。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EGFR 突变细胞系对不同浓度 EGFR TKIs 和化疗药物的耐受性

为建立药物细胞毒性梯度,本实验首先采用顺铂或紫杉醇处理 EGFR 突变细胞系 72 h,采用 MTS 法检测细胞活性变化。结果:①当采用顺铂干预时,对照组细胞活力为 $(1.36 \pm 5.92)\%$,而干预组为 $(-7.32 \pm 6.81)\%$,经 t 检验,差异有统计学意义 ($t = 2.353, P = 0.040$)。浓度达 $1 \mu\text{mol/L}$ 即可对 PC9 和 PC9ER 细胞产生毒性作用。对于其他细胞系,顺铂浓度 $> 3.3 \mu\text{mol/L}$ 才能检测到细胞毒性(见图 1A)。②当采用紫杉醇对细胞进行干预时, $3.3 \mu\text{mol/L}$ 浓度下能检测到细胞毒性,且 PC9 对紫杉醇最为敏感(见图 1B)。③在集落形成试验中,笔者同样对各细胞系进行更长时间的顺铂、紫杉醇和 EGFR TKIs 干预。顺铂在 7 d 的集落形成试验中对受测细胞系产生的细胞毒性与 MTS 法结果相似(见图 1C)。由于 H1975 对紫杉醇高度敏感,而无法判断给药顺序差异对其产生的细胞毒性影响。耐药细胞系(PC9ER、HCC827GR 和 H1975)对厄洛替尼高度耐受,但 PC9ER 对 WZ4002 却极为敏感。

总之,对 EGFR TKIs 敏感和耐药的 PC9、HCC827 细胞系在对化疗药物的敏感性上几乎没有差别,说明 TKI 与化疗药物的敏感及耐药机制并不相同(见图 1A、B)。为了后续试验,本实验选择顺铂干预 PC9 和其他细胞系的浓度分别为 1.0 和 $3.3 \mu\text{mol/L}$;选取不仅能够对全系细胞产生细胞毒性且不会导致细胞全部死亡的紫杉醇浓度为 $3.3 \mu\text{mol/L}$ 。对于 EGFR TKIs,笔者总结前人和自己的研究结果,选取能够使敏感和耐受细胞系产生最大细胞毒性差异的厄洛替尼和 WZ4002,浓度均为 $1 \mu\text{mol/L}$ 。

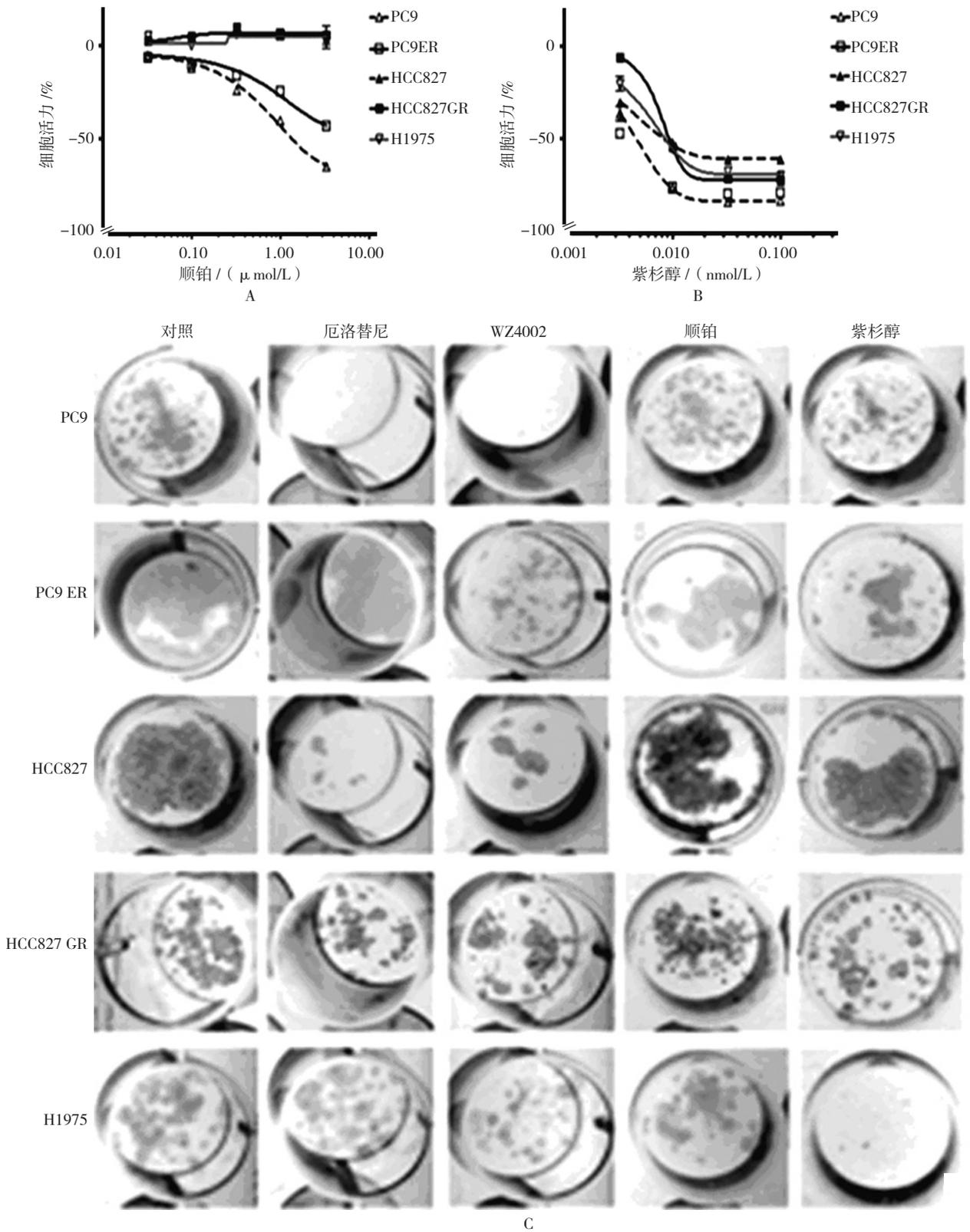
2.2 EGFR TKIs 和化疗不同给药顺序对细胞毒性的影响

为探究 EGFR TKIs 和化疗不同给药顺序对各

EGFR 突变细胞系的影响,本实验将药物单用、联用,以及顺序给药干预各细胞系 7 d,并采用集落形成试验进行分析。对照组细胞活力为 $(0.56 \pm 1.86)\%$,而干预组为 $(-7.06 \pm 5.91)\%$,经 t 检验,差异有统计学意义 ($t = 3.013, P = 0.013$)。HCC827GR、H1975 细胞对顺铂和紫杉醇具有更高的敏感性,特别是在 PC9 或 PC9ER 细胞中,厄洛替尼或 WZ4002 与顺铂或紫杉醇联用比单用能产生更强的细胞毒性。当 EGFR TKIs 和化疗药物顺序给药时,在 TKI 干预前给予化疗比两者顺序颠倒能产生更强的细胞毒性。实际上,在大多数情况下,先 TKI 后化疗的给药顺序完全屏蔽了后者对细胞产生的毒性作用。相似的结果也出现在那些对 EGFR TKIs 耐药和特殊的突变抑制剂 WZ4002 干预的细胞系中。在预实验中,笔者同样检测了联合用药时不同的组合时间(4 d 或 2+2 d)对 PC9ER 细胞系的影响,结果与 6 d 或 3+3 d 的干预时间并无区别。此外,因 HCC827 细胞系对厄洛替尼太过敏感,联合用药时因效果难以评估而将其从后续实验中剔除。见图 2。

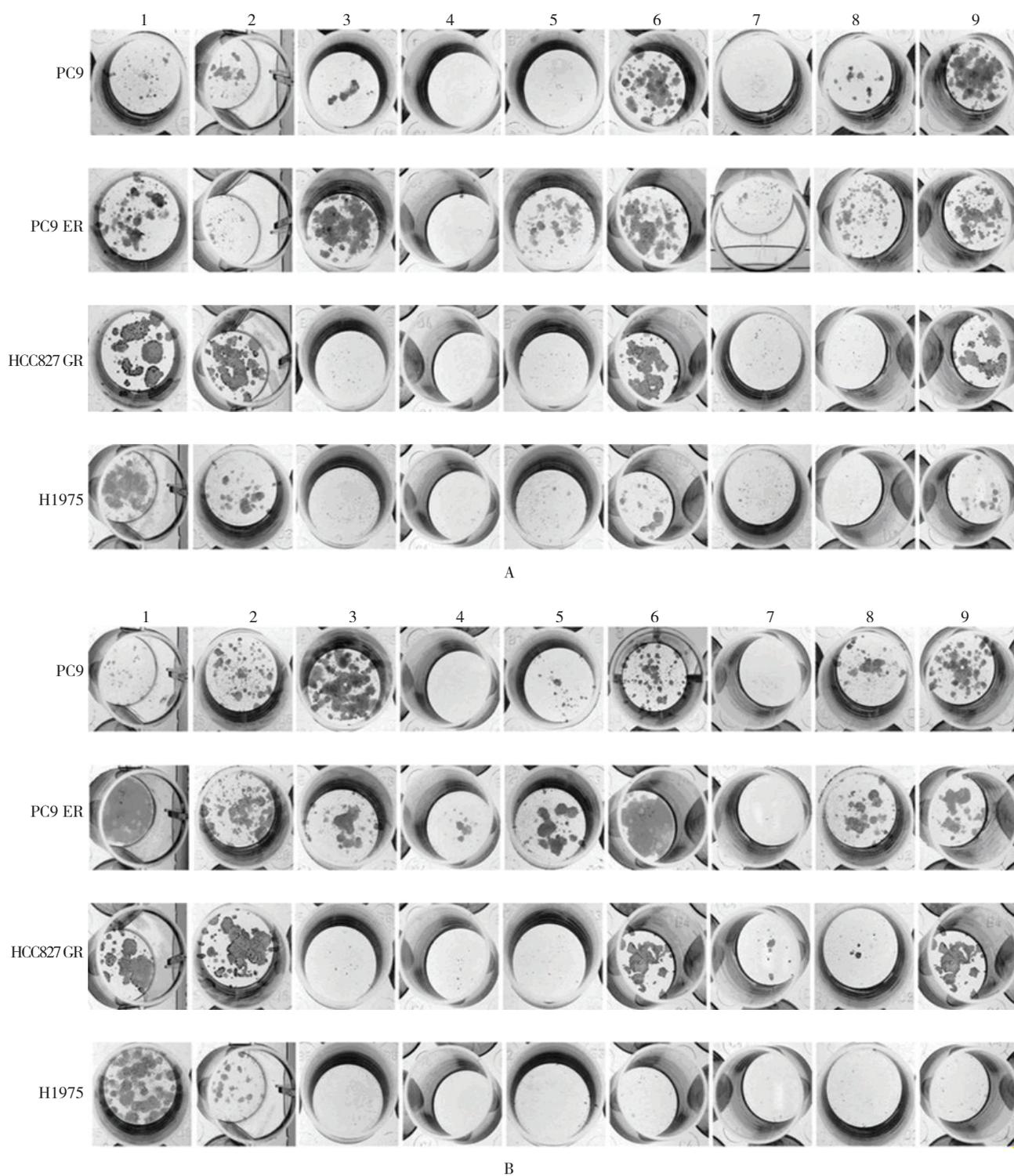
2.3 化疗药物和厄洛替尼联用对厄洛替尼耐药模型凋亡的影响

在厄洛替尼耐药细胞系中研究厄洛替尼和化疗药物同时或顺序给药(6 d 或 3+3 d)时,细胞裂解蛋白中的细胞凋亡标志物 cPARP 的表达,以表示细胞凋亡反应率的差异。厄洛替尼本身对 PC9ER 和 HCC827GR 的诱导凋亡作用极弱,但在 H1975 细胞系凋亡相对明显。顺铂对 PC9ER 和 H1975 细胞都有一定的促凋亡作用,而紫杉醇只对后者有促凋亡作用。然而发现仅在 HCC827GR 细胞中,紫杉醇和厄洛替尼联用较两者前后顺序使用细胞凋亡率升高。在某些情况下,两药同时干预甚至出现细胞凋亡率下降。最显著的凋亡反应总是出现在先化疗药物处理,后厄洛替尼干预的细胞系中。只有采用先紫杉醇后厄洛替尼的给药顺序干预 PC9ER 细胞系和先顺铂后厄洛替尼的给药顺序干预 HCC827GR 细胞系在本质上算唯一的诱导凋亡实验,而其他的给药顺序只有些许或者毫无促凋亡现象(见图 3)。在预实验中,笔者对 PC9ER 细胞系采用不同的药物干预时间(4 d 或 2+2 d),发现与 6 d 和 3+3 d 的干预时间并无不同。ERK1/2 作为内参照来验证蛋白质是否均匀加载。



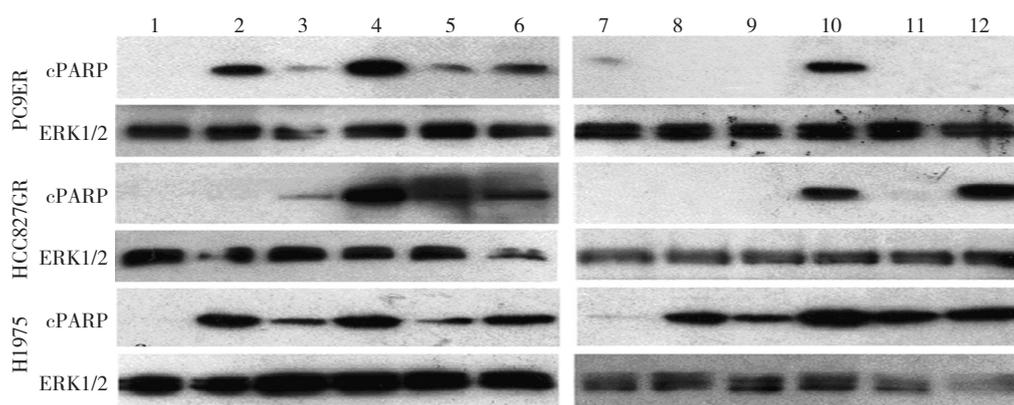
A: 顺铂干预 72 h 后细胞生长情况; B: 紫杉醇干预 72 h 后细胞生长情况; C: 厄洛替尼、WZ4002、顺铂及紫杉醇干预 7 d 后各细胞系集落形成情况。

图 1 EGFR 突变的 NSCLC 细胞系的 MTS 细胞毒性试验结果



A: 顺铂单用及与其他药物顺序组合对各细胞系的干预情况; 1: 厄洛替尼; 2: WZ4002; 3: 顺铂; 4: 顺铂和厄洛替尼; 5: 先顺铂后厄洛替尼; 6: 先厄洛替尼后顺铂; 7: 顺铂和 WZ4002; 8: 先顺铂后 WZ4002; 9: 先 WZ4002 后顺铂。B: 紫杉醇单用及与其他药物顺序组合对各细胞系的干预情况; 1: 厄洛替尼; 2: WZ4002; 3: 紫杉醇; 4: 紫杉醇和厄洛替尼; 5: 先紫杉醇后厄洛替尼; 6: 先厄洛替尼后紫杉醇; 7: 紫杉醇和 WZ4002; 8: 先紫杉醇后 WZ4002; 9: 先 WZ4002 后紫杉醇

图 2 EGFR TKIs 和化疗药物对各细胞系增殖的影响



1、7: 对照; 2: 顺铂; 3、9: 厄洛替尼; 4: 先顺铂后厄洛替尼; 5: 先厄洛替尼后顺铂; 6: 厄洛替尼和顺铂; 8: 紫杉醇; 10: 先紫杉醇后厄洛替尼; 11: 先厄洛替尼后紫杉醇; 12: 厄洛替尼和紫杉醇

图 3 各处理组细胞裂解蛋白的表达

3 讨论

在 EGFR 突变的 NSCLC 患者中, 对 EGFR TKIs 的获得性耐药是影响其疗效发挥的主要限制因素^[8-9]。虽然针对获得性耐药已提出一些治疗策略^[10-12], 但目前并无切实可行的公认方案。肿瘤进展后的化疗、放疗和 TKI 继续服用, 以及更新药物的干预是目前的主要治疗策略^[13], 但有助于医师在这些治疗策略间进行选择的预测因素极为有限。

本实验结果表明, TKI 联合顺铂或紫杉醇具有协同作用。由于药物狭窄的毒性窗和预实验发现 4 或 6 d 的药物处理时间并无区别, 本实验选择了唯一的 1 种药物浓度和为 6 d 的药物处理时间。有趣的是, 对于 TKI 具有极高耐药性的细胞系模型中, 本实验检测到 TKI 能够提高化疗药物的细胞毒性。此外, T790M 二次突变和 cMET 扩增作为 TKI 最常见的耐药机制, 其对药物的反应性无显著差异。同样本实验取得相似的结果, 第 1 代 TKI 厄洛替尼与化疗联用的协同作用无论是对野生型还是突变型 EGFR 均具有亲和力。笔者观察到协同作用背后, 第 3 代突变型 EGFR 特异性抑制药物 WZ4002 对突变型 EGFR 的抑制作用极为显著。在 TKI 联合化疗药物的协同作用方面, 本实验取得相似的结果。本研究结果表明, 如果 EGFR TKIs 和化疗相结合, 药物的给药顺序至关重要。如果先 TKI 干预, 后化疗处理, 未出现协同作用, 但是采取 TKI 和化疗药物同时或先化疗药物后 TKI 的给药顺序时, 协同作用显著。本研究的 TKI 耐药模型与前人研究的 TKI 敏感 NSCLC 模型具有相似的结果, 先化疗后 TKI 治疗优于其他给药方式^[14]。临床上, 通常给

予 NSCLC 患者周期性化疗, 同时联用 TKI 很可能只在化疗第 1 阶段有协同作用^[15]。根据本研究结果, 针对获得性 EGFR TKIs 耐药, 先化疗后 TKI 可能是最为有效的给药顺序。可以推测, 先化疗后 TKI 的治疗方式可以预先抑制获得性耐药的发展。已经证实, 患者可同时并发多种耐药机制, 而化疗和 TKI 2 种治疗方式的联用可能阻止更多耐药情况的发生。

总之, EGFR TKIs 结合化疗干预 EGFR 突变的 NSCLC 细胞系可以产生协同作用, 且给药顺序极为关键。这种顺序给药策略值得临床深入探究。

参考文献:

- [1] SEQUIST L V, YANG J C, YAMAMOTO N, et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(27): 3327-3334.
- [2] WU Y L, ZHOU C, HU C P, et al. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(2): 213-222.
- [3] 刘莉, 陆远, 王媛, 等. EGFR、HER2、CXCR4 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义 [J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(6): 1069-1073.
- [4] CHONG C R, JANNE P A. The quest to overcome resistance to EGFR targeted therapies in cancer[J]. *Nat Med*, 2013, 19(11): 1389-1400.
- [5] YU H A, SIMA C S, HUANG J, et al. Local therapy with continued EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy as a treatment strategy in EGFR-mutant advanced lung cancers that have developed acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors[J]. *J Thorac Oncol*, 2013, 8(3): 346-351.

- [6] 韩洪利. 非小细胞肺癌对 TKI 耐药及其逆转机制的研究进展 [J]. 山东医药, 2015, 55(6): 101-105.
- [7] GOLDBERG S B, OXNARD G R, DIGUMARTHY S, et al. Chemotherapy with Erlotinib or chemotherapy alone in advanced non-small cell lung cancer with acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors[J]. *Oncologist*, 2013, 18(11): 1214-1220.
- [8] WALTER A O, SJIN R T, HARINGSMA H J, et al. Discovery of a mutant-selective covalent inhibitor of EGFR that overcomes T790M-mediated resistance in NSCLC[J]. *Cancer Discov*, 2013, 3(12): 1404-1415.
- [9] 方健. EGFR 突变 NSCLC 二线 TKIs 治疗优化选择 [J]. 医学与哲学, 2014, 35(22): 20-23.
- [10] XIAO B K, YANG J Y, DONG J X, et al. Meta-analysis of seven randomized control trials to assess the efficacy and toxicity of combining EGFR-TKI with chemotherapy for patients with advanced NSCLC who failed first-line treatment[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(7): 2915-2921.
- [11] PARK S, KEAM B, KIM S H, et al. Pemetrexed singlet versus nonpemetrexed-based platinum doublet as second-line chemotherapy after first-line epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor failure in non-small cell lung cancer patients with EGFR mutations[J]. *Cancer Res Treat*, 2015, 47(4): 630-637.
- [12] TAN P S, LOPES G, ACHARYYA S, et al. Bayesian network meta-comparison of maintenance treatments for stage III b/ IV non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients with good performance status not progressing after first-line induction chemotherapy: results by performance status, EGFR mutation, histology and response to previous induction[J]. *Eur J Cancer*, 2015, 51(16): 2330-2344.
- [13] HASEGAWA Y, ANDO M, MAEMONDO M, et al. The role of smoking status on the progression-free survival of non-small cell lung cancer patients harboring activating epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations receiving first-line EGFR tyrosine kinase inhibitor versus platinum doublet chemotherapy: a meta-analysis of prospective randomized trials[J]. *Oncologist*, 2015, 20(3): 307-315.
- [14] MIYAUCHI E, INOUE A, KOBAYASHI K, et al. Efficacy of chemotherapy after first-line gefitinib therapy in EGFR mutation-positive advanced non-small cell lung cancer-data from a randomized phase III study comparing gefitinib with carboplatin plus paclitaxel (NEJ002)[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2015, 45(7): 670-676.
- [15] HARTMANN J T, KOLLMANNNSBERGER C, CASCORBI I, et al. A phase I pharmacokinetic study of matuzumab in combination with paclitaxel in patients with EGFR-expressing advanced non-small cell lung cancer[J]. *Invest New Drugs*, 2013, 31(3): 661-668.

(童颖丹 编辑)