

盐酸埃克替尼联合 $1\alpha,25$ -二羟基维生素 D_3 对人肺腺癌 A549 细胞增殖及 EGFR 表达的影响

冯应勤¹,朱金峰¹,何兴端¹,沈浩军¹,梅家转²,文建国³,鲁培¹

(¹郑州大学第一附属医院肿瘤科,河南 郑州 450000;²郑州人民医院肿瘤科,河南 郑州 450000;³河南省高等学校临床医学重点学科开放实验室,河南 郑州 450000)

[摘要] 目的:研究盐酸埃克替尼和 $1\alpha,25$ -二羟基维生素 D_3 单药及联合用药对人肺腺癌 A549 细胞增殖及表皮生长因子受体(EGFR)表达的影响。方法:盐酸埃克替尼和 $1\alpha,25$ -二羟基维生素 D_3 单药及联合用药处理 A549 细胞后,用 CCK-8 法检测细胞增殖抑制率的变化;用 Western blot 法及 RT-PCR 法分别检测细胞 EGFR 蛋白及 EGFR mRNA 表达的变化。结果:与单药盐酸埃克替尼组和 $1\alpha,25$ -二羟基维生素 D_3 组相比,联合用药组具有更强的细胞增殖抑制作用(P 均 < 0.05);联合用药组及 $1\alpha,25$ -二羟基维生素 D_3 单药组 EGFR 蛋白及 EGFR mRNA 表达水平较阴性对照组及盐酸埃克替尼单药组有明显升高(P 均 < 0.05)。结论:盐酸埃克替尼与 $1\alpha,25$ -二羟基维生素 D_3 联合用药对人肺腺癌 A549 细胞具有协同抗增殖作用;其机制可能与 $1\alpha,25$ -二羟基维生素 D_3 升高了 EGFR mRNA 及 EGFR 蛋白的表达,从而更有利于盐酸埃克替尼发挥抗肿瘤作用有关。

[关键词] 盐酸埃克替尼; $1\alpha,25$ -二羟基维生素 D_3 ;表皮生长因子受体;细胞增殖;基因表达

[中图分类号] R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)05-563-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140506

Combination of icotinib hydrochloride and $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 on proliferation and expression of EGFR of human lung adenocarcinoma cell line A549

Feng Yingqin¹, Zhu Jinfeng¹, He Xingduan¹, Shen Haojun¹, Mei Jiazhuang², Wen Jianguo³, Lu Pei¹

(¹Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000; ²Department of Oncology, People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450000; ³Key-Disciplines Laboratory Clinical-Medicine Henan, Zhengzhou 450000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of icotinib hydrochloride and $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 on proliferation and expression of EGFR of human lung adenocarcinoma cell line A549. **Methods:** The human lung adenocarcinoma A549 cell was cultured and treated by icotinib hydrochloride, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 and combination of these two medicines at different concentrations and time intervals. The CCK-8 assay was applied to analyze the proliferation inhibition rate. The expressions of EGFR total protein and EGFR mRNA were detected by western blotting and RT-PCR, respectively. **Results:** Compared with the single drug group, there was synergistic effect observed in the groups treated with icotinib hydrochloride and $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 along ($P < 0.05$). Compared with the control group and the group treated with icotinib hydrochloride alone, the expressions of EGFR total protein and EGFR mRNA of the group treated with $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 alone or the combination group were elevated dramatically ($P < 0.05$). **Conclusion:** There was synergistic effect in the cells treated with combination icotinib hydrochloride with $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 . This may attribute to up-regulation of the expressions of EGFR mRNA and EGFR total protein by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 , and further to the anti-tumor effect of icotinib hydrochloride.

[Key words] icotinib hydrochloride; $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 ; epidermal growth factor receptor; cell proliferation; gene expression

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(05):563-567]

肺癌的发病率和病死率高居世界之首。近年来表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKIs)

的出现为肺癌患者带来了福音。然而 EGFR-TKIs 对肺癌患者有其较为苛刻的应用条件,即必须是具有

EGFR 基因有效突变的患者,然而在所有的肺腺癌患者中 EGFR 突变发生率只有 10%左右^[1],所以要想提高肺癌患者治疗的整体有效率,更应关注另外不具有 EGFR 有效突变的患者。有研究表明 EGFR-TKIs 药物亦对 EGFR 扩增或过表达的患者有效^[2-4]。

1 α ,25-二羟基维生素 D₃ 不仅在调控钙、磷代谢及维持骨稳定状态等方面发挥重要作用,而且对肿瘤的发生发展及预后均具有一定的作用,已有研究证明其对 A549 细胞具有增殖抑制作用^[5]。另一方面,已有众多研究表明,在多种肿瘤细胞系中,1 α ,25-二羟基维生素 D₃ 对 EGFR 基因的表达具有调控作用^[6-9],但在肺癌中研究较少。基于此,本研究欲探讨 1 α ,25-二羟基维生素 D₃ 与盐酸埃克替尼联合用药对 A549 细胞是否具有协同抗增殖作用及其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人肺腺癌 A549 细胞为本实验室常用细胞系;盐酸埃克替尼由浙江贝达药业有限公司惠赠;1 α ,25-二羟基维生素 D₃ (Sigma 公司,美国);抗 EGFR 抗体 (CST 公司,美国);CCK-8 试剂 (碧云天生物技术研究所);BCA 蛋白定量试剂盒 (武汉博士德生物工程技术有限公司);胎牛血清 (浙江天杭生物科技有限公司);RPMI-1640 培养液 (赛默飞世尔生物化学制品有限公司,北京);RT-PCR 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,EGFR 基因上游引物序列为:5'-GTGGCTGTTATGTCCTCATTGCC-3',下游引物为:5'-ACACTTCTTCAGGCAGGTGCCACC-3',产物长度 637 bp;内参 β -actin 基因上游引物为:5'-GCTACGTCGCCCTGGACTTC-3',下游引物为:5'-GTCATAGTCCGCCTAGAAGC-3',产物长度 490 bp。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8 法测定细胞增殖

取对数生长期细胞,制备成单细胞悬液,调整细胞密度为 3×10^4 个/ml,以每孔 100 μ l 接种于 96 孔板,培养 24 h 后,处理组分别加入终浓度为 10、20、40 μ mol/L 的盐酸埃克替尼或终浓度为 1、10、100 nmol/L 的 1 α ,25-二羟基维生素 D₃ 或终浓度为 20 μ mol/L 的盐酸埃克替尼 + 10 nmol/L 的 1 α ,25-二羟基维生素 D₃。分别培养 3、5、7 d,每组设 5 个复孔。阴性对照组加相同体积的培养液。每 3 d 换液 1 次。待细胞培养至预定时间点后,每孔加入

CCK-8 溶液 10 μ l,37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h,置酶标仪上检测波长 450 nm 处各孔的吸光度值。

1.2.2 Western blot 法检测细胞中 EGFR 蛋白的表达

取对数生长期细胞以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板内,培养 24 h,处理组分别加入终浓度为 20 μ mol/L 的盐酸埃克替尼、10 nmol/L 的 1 α ,25-二羟基维生素 D₃ 及 20 μ mol/L 的盐酸埃克替尼 + 10 nmol/L 的 1 α ,25-二羟基维生素 D₃。培养 5 d 后,用蛋白裂解液 (RIPA) 分别提取细胞总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度,加入蛋白上样缓冲液,调整蛋白含量为 3 g/L,100 $^{\circ}$ C 水浴加热变性,蛋白上样量为 20 μ l,行 SDS-PAGE 分离蛋白,然后将蛋白转印至 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 液室温下封闭 3 h,加入一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,加入二抗,室温摇床孵育 1 h。ECL 法化学发光显影。用 Gel-Pro Analyzer 4 软件对所得条带进行灰度值分析。

1.2.3 RT-PCR 法检测 EGFR mRNA 的表达

实验分组同 1.2.2,用 TRIzol 分别提取细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA 后进行 PCR 反应,反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,95 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,共进行 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,电泳结束后将凝胶置于凝胶成像系统拍照并保存好图片,用 Gel-Pro Analyzer 4 软件对所得条带进行灰度值分析。以上实验均重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理和分析,根据数据正态性及方差齐性检验结果,多个样本的比较采用单因素方差分析或 Kruskal-Wallis 检验,多个样本间的两两比较采用 LSD-*t* 检验或 Mann-Whitney M 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 盐酸埃克替尼与 1 α ,25-二羟基维生素 D₃ 引起 A549 细胞增殖的改变

经不同浓度的盐酸埃克替尼、1 α ,25-二羟基维生素 D₃ 及两药联合处理 A549 细胞 3~7 d 后,A549 细胞的吸光度值均随作用时间的增加而降低 (P 均 < 0.05),均存在时间依赖性;同一时间 40 μ mol/L 的盐酸埃克替尼与 20 μ mol/L 的相比,吸光度值改变没有统计学意义 (P 均 > 0.05),提示盐酸埃克替尼对 A549 细胞的作用可能在 20 μ mol/L 处达到饱和;1 nmol/L 1 α ,25-二羟基维生素 D₃ 吸光度值与阴性对照组无统计学意义 (P 值均 > 0.05),且同一时间 10 nmol/L 1 α ,25-二羟基维生素 D₃ 处理组的

吸光度值与 1 nmol/L 的相比无统计学意义 (P 均 > 0.05), 提示 1 α ,25-二羟基维生素 D₃ 对 A549 细胞具有抗增殖作用的最低药物浓度为 10 nmol/L (表

1,2)。两药联用组与同等剂量单药组相比,吸光度值均明显降低(P 均 < 0.05)。两药联用组与同等剂量单药组抑制率对比见图 1。

表 1 盐酸埃克替尼对 A549 细胞作用不同时间的吸光度值

Table 1 OD value of A549 cells treated with icotinib hydrochloride at different concentration and time

时间	阴性对照组	盐酸埃克替尼组($\mu\text{mol/L}$)			F	P
		10	20	40		
3 d	0.504 1 \pm 0.016 5	0.442 5 \pm 0.016 8	0.382 8 \pm 0.016 1	0.349 4 \pm 0.044 1*	33.780	0.000
5 d	0.793 9 \pm 0.015 3	0.556 0 \pm 0.020 0	0.498 8 \pm 0.011 0	0.479 6 \pm 0.012 3*	463.598	0.000
7 d	1.395 1 \pm 0.015 2	0.903 4 \pm 0.019 3	0.724 3 \pm 0.014 3	0.704 4 \pm 0.017 6*	1 854.028	0.000
F		822.043	773.759	201.313		
P		0.000	0.000	0.000		

与 20 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸埃克替尼组比较,* $P > 0.05$ 。

表 2 1 α ,25-二羟基维生素 D₃ 对 A549 细胞作用不同时间的吸光度值

Table 2 OD value of A549 cells treated with 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ at different concentration and time

时间	阴性对照组	1 α ,25-二羟基维生素 D ₃ (nmol/L)			F	P
		1	10	100		
3 d	0.504 1 \pm 0.016 5	0.4844 \pm 0.026 1*	0.473 2 \pm 0.018 1*	0.387 0 \pm 0.013 2	36.899	0.000
5 d	0.793 9 \pm 0.015 3	0.7838 \pm 0.016 7*	0.768 2 \pm 0.018 5*	0.520 3 \pm 0.010 7	355.250	0.000
7 d	1.395 1 \pm 0.015 2	1.3713 \pm 0.016 4*	1.348 6 \pm 0.019 4*	0.826 7 \pm 0.021 5	1 115.905	0.000
F		2 488.183	2 843.394	1 019.623		
P		0.000	0.000	0.000		

与阴性对照组比较,* $P > 0.05$; 与 1 nmol/L 1 α ,25-二羟基维生素 D₃ 组比较,* $P > 0.05$ 。

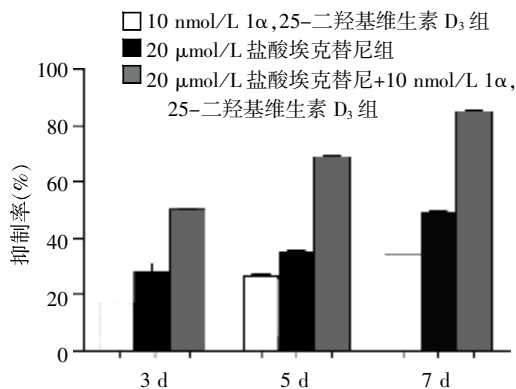


图 1 CCK-8 法检测单药及联合用药对 A549 细胞增殖的抑制作用

Figure 1 The inhibitory effect of single drug and the combination on the proliferation of A549 cells detected by CCK-8 method

2.2 盐酸埃克替尼和 1 α ,25-二羟基维生素 D₃ 对 A549 细胞 EGFR 蛋白表达的影响

用 20 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸埃克替尼、10 nmol/L 1 α ,25-二羟基维生素 D₃ 及 20 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸埃克替尼 + 10 nmol/L 1 α ,25-二羟基维生素 D₃ 处理 A549 细胞后,1 α ,25-二羟基维生素 D₃ 单药组和两药联用组

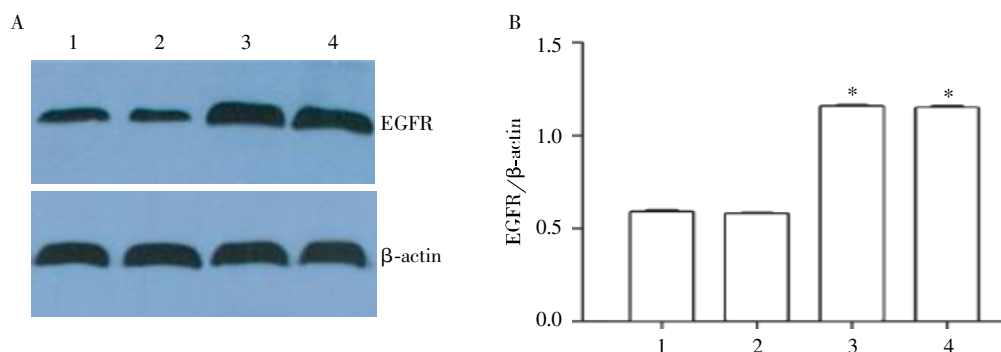
EGFR 总蛋白表达水平与阴性对照组和盐酸埃克替尼单药组相比有明显升高(P 均 < 0.05 ,图 2)。

2.3 盐酸埃克替尼和 1 α ,25-二羟基维生素 D₃ 对 A549 细胞 EGFR mRNA 表达的影响

A549 细胞经 20 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸埃克替尼、10 nmol/L 1 α ,25-二羟基维生素 D₃ 及 20 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸埃克替尼 + 10 nmol/L 1 α ,25-二羟基维生素 D₃ 处理后,1 α ,25-二羟基维生素 D₃ 单药组和两药联用组 EGFR mRNA 表达水平较阴性对照组和盐酸埃克替尼单药组明显升高(P 均 < 0.05 ,图 3)。

3 讨论

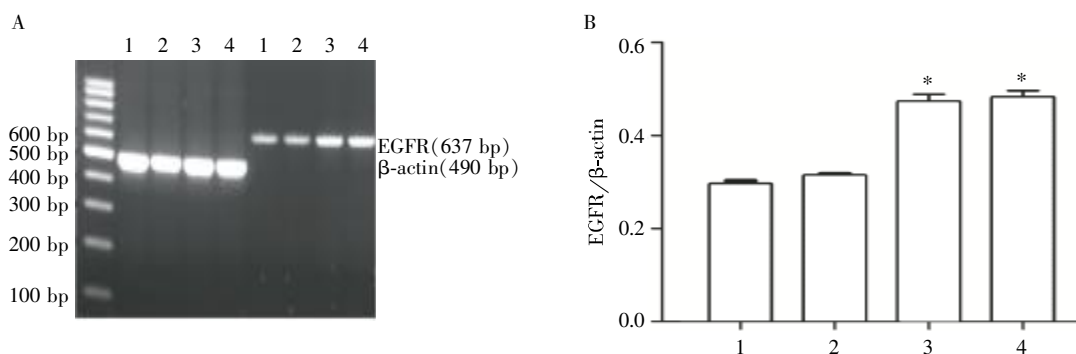
盐酸埃克替尼属于 EGFR-TKI 类小分子靶向抗癌创新药,主要用于具有 EGFR 有效突变的患者。国内外研究表明,EGFR 基因扩增或过表达患者亦有可能从 EGFR-TKIs 治疗中受益^[2-4]。近年来,1 α ,25-二羟基维生素 D₃ 的抗肿瘤作用得到学者们的广泛关注,1 α ,25-二羟基维生素 D₃ 通过上调 P27 蛋白^[10] 和下调 P21 蛋白^[11] 等机制将细胞阻滞于 G0/G1 期,其显著增强化疗药物的抗肿瘤作用已在体内外均得到证明^[12-13]。研究表明,1 α ,25-二羟基维生素 D₃



1: 阴性对照组; 2: 20 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸埃克替尼组; 3: 10 nmol/L $1\alpha, 25\text{-二羟基维生素 D}_3$ 组; 4: 20 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸埃克替尼+10 nmol/L $1\alpha, 25\text{-二羟基维生素 D}_3$ 组; 与 1 组及 2 组相比, $*P < 0.05$ 。

图 2 Western blotting 法检测 EGFR 蛋白表达变化

Figure 2 Expressions of EGFR total protein detected by western blotting



1: 阴性对照组; 2: 20 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸埃克替尼组; 3: 10 nmol/L $1\alpha, 25\text{-二羟基维生素 D}_3$ 组; 4: 20 $\mu\text{mol/L}$ 盐酸埃克替尼+10 nmol/L $1\alpha, 25\text{-二羟基维生素 D}_3$ 组; 与 1 组及 2 组相比, $*P < 0.05$ 。

图 3 RT-PCR 法检测 EGFR mRNA 表达变化

Figure 3 Expressions of EGFR mRNA detected by RT-PCR

对 P27 蛋白的调控存在 1 个上游信号通路, 即 $1\alpha, 25\text{-二羟基维生素 D}_3$ 对 EGFR 的调控^[8], 而关于 $1\alpha, 25\text{-二羟基维生素 D}_3$ 与 EGFR 的关系已在很多肿瘤中被初步阐明。如在乳腺癌 BT474 细胞中, $1\alpha, 25\text{-二羟基维生素 D}_3$ 可在转录水平使 EGFR mRNA 升高 200%~500%^[6]; 在成骨细胞样细胞 MMR106-01 中, $1\alpha, 25\text{-二羟基维生素 D}_3$ 通过增强 EGFR mRNA 的稳定性来提高 EGFR 的水平^[7]。然而 $1\alpha, 25\text{-二羟基维生素 D}_3$ 并不是在所有肿瘤中均能上调 EGFR 的表达^[8-9], 学者们推断 $1\alpha, 25\text{-二羟基维生素 D}_3$ 对 EGFR 的影响及其作用机制具有细胞特异性。本研究通过从蛋白及核酸两个水平来探讨 $1\alpha, 25\text{-二羟基维生素 D}_3$ 对肺腺癌 A549 细胞 EGFR 表达的影响, 得出 $1\alpha, 25\text{-二羟基维生素 D}_3$ 能明显上调人肺腺癌 A549 细胞 EGFR 蛋白及 EGFR mRNA 的表达, 可能因此更有利于盐酸埃克替尼发挥抗肿瘤作用, 增殖抑制试验结果亦表明两药联用具有协同抗增殖作用。至于 $1\alpha, 25\text{-二羟基维生素 D}_3$ 调控

EGFR 表达的机制, 有研究显示 $1\alpha, 25\text{-二羟基维生素 D}_3$ 的抗肿瘤作用主要通过维生素 D 受体(VDR)来实现^[14], 而有研究显示 VDR 作用元件位于 EGFR 基因启动子区域^[9], 但在 A549 细胞中尚需要进一步的研究。Arcidiacono 等^[15]则证明在继发性甲状旁腺功能亢进的老鼠模型中, EGFR 的活化会影响 $1\alpha, 25\text{-二羟基维生素 D}_3$ 的疗效; 用厄洛替尼抑制 EGFR 活化可阻止 VDR 的减少, 而 $1\alpha, 25\text{-二羟基维生素 D}_3$ 正是通过 VDR 发挥其抗增殖等作用的, 这也可能是盐酸埃克替尼与 $1\alpha, 25\text{-二羟基维生素 D}_3$ 具有协同抗增殖作用的分子机制之一, 值得进一步研究。

[参考文献]

[1] Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101 (36): 13306-13311

- [2] Lee Y, Shim HS, Park MS, et al. High EGFR gene copy number and skin rash as predictive markers for EGFR tyrosine kinase inhibitors in patients with advanced squamous cell lung carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(6): 1760-1768
- [3] Hirsch FR, Varella-Garcia M, McCoy J, et al. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number detected by fluorescence in situ hybridization associates with increased sensitivity to gefitinib in patients with bronchioloalveolar carcinoma subtypes: a Southwest Oncology Group Study [J]. J Clin Oncol, 2005, 23(28): 6838-6845
- [4] 马丽, 韩晓红, 王帅, 等. 盐酸埃克替尼对肺癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中华医学杂志, 2012, 92(36): 2561-2564
- [5] Kim SH, Chen G, King AN, et al. Characterization of vitamin D receptor (VDR) in lung Adenocarcinoma [J]. Lung Cancer, 2012, 77(2): 265-271
- [6] McGaffin KR, Acktinson LE, Chrysogelos SA. Growth and EGFR regulation in breast cancer cells by vitamin D and retinoid compounds [J]. Breast Cancer Res Treat, 2004, 86(1): 55-73
- [7] González EA, Disthabanchong S, Kowalewski R, et al. Mechanisms of the regulation of EGF receptor gene expression by calcitriol and parathyroid hormone in MMR106-01 cells [J]. Kidney Int, 2002, 61(5): 1627-1634
- [8] Shen Z, Zhang X, Tang J, et al. The coupling of epidermal growth factor receptor down regulation by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 to the hormone-induced cell cycle arrest at the G1-S checkpoint in ovarian cancer cells [J]. Mol Cell Endocrinol, 2011, 338(1-2): 58-67
- [9] Malloy PJ, Peng L, Wang J, et al. Interaction of the vitamin D receptor with a vitamin D response element in the Mullerian-inhibiting substance (MIS) promoter; regulation of MIS expression by calcitriol in prostate cancer cells [J]. Endocrinology, 2009, 150(4): 1580-1587
- [10] Cheng HT, Chen JY, Huang YC, et al. Functional role of VDR in the activation of p27Kip1 by the VDR/Sp1 complex [J]. Cell Biochem, 2006, 98(6): 1450-1456
- [11] Hershberger PA, Modzelewski RA, Shurin ZR, et al. $1,25$ -Dihydroxycholecalciferol ($1,25$ -D $_3$) inhibits the growth of squamous cell carcinoma and down-modulates p21 (Waf1/Cip1) *in vivo* and *in vitro* [J]. Cancer Res, 1999, 59(11): 2644-2649
- [12] Zhang Q, Kanterewicz B, Shoemaker S, et al. Differential response to $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin $D(3)$ ($1\alpha,25$ (OH) $(2)D(3)$) in non-small cell lung cancer cells with distinct oncogene mutations [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2013, 136: 264-270
- [13] Trump DL, Hershberger PA, Bernardi RJ, et al. Anti-tumor activity of calcitriol: pre-clinical and clinical studies [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2004, 89-90(1-5): 519-526
- [14] Ramnath N, Kim S, Christensen PJ. Vitamin D and lung cancer [J]. Expert Rev. Respir Med, 2011, 5(3): 305-309
- [15] Arcidiacono MV, Sato T, Alvarez-Hernandez D, et al. EGFR activation increases parathyroid hyperplasia and calcitriol resistance in kidney disease [J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(2): 310-320

[收稿日期] 2013-12-17