

培美曲塞二钠与吉非替尼对肺腺癌细胞的放射增敏作用

赵维勇, 赵滑峰, 王海静, 邵彦彦, 张丽珍*

(南京医科大学第二附属医院放疗科, 江苏 南京 210011)

[摘要] **目的:**研究培美曲塞二钠与吉非替尼单独及联合运用对肺腺癌细胞放射增敏作用及机制。**方法:**单独或联合使用培美曲塞二钠和吉非替尼处理人肺腺癌细胞株 A549, 使用噻唑蓝比色法(MTT)检测药物对细胞增殖的影响; 采用克隆形成试验检测药物联合放射线对细胞的生长抑制作用; 使用流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡的变化; Western blot 检测细胞内 Akt 和 p-Akt 的表达变化。**结果:**培美曲塞二钠和吉非替尼对人肺腺癌细胞 A549 增殖具有抑制作用, 体外培养克隆形成实验分析显示, 放疗+两药联用组的准阈剂量(Dq)、平均致死剂量(D0)及 2 Gy 照射时的存活分数(SF2)均明显低于单纯放疗组、放疗+培美曲塞二钠组及放疗+吉非替尼组; 培美曲塞二钠和吉非替尼放射增敏比(sensitivity enhanced ratio, SER)分别为 1.17 和 1.48, 两药联合 SER 为 2.62。培美曲塞二钠和吉非替尼使细胞阻滞在 G1/G0 期, 与放射线联合作用后, S 期细胞比例进一步降低。培美曲塞二钠和吉非替尼均可以提高放射线诱导的凋亡, 两药联用后细胞的凋亡率最高。药物作用前后、照射前后及药物增敏照射后 Akt 水平没有明显改变; 培美曲塞二钠和吉非替尼均能抑制 p-Akt 表达; 与单纯照射组相比, 培美曲塞二钠和吉非替尼联合照射组 p-Akt 水平显著减低, p-Akt/Akt 的比值最低。**结论:**培美曲塞二钠和吉非替尼各自均有放射增敏作用, 两药联合使用可以明显提高放疗效果, 其机制可能与减少 S 期细胞、增强放射线诱导凋亡和抑制 PI3K/Akt 信号转导通路有关。

[关键词] 培美曲塞二钠; 吉非替尼; 肺腺癌; 放射增敏

[中图分类号] R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)10-1243-08

doi:10.7655/NYDXBNS20171004

Combined effects of pemetrexed disodium and gefitinib on radiation sensitivity in human lung adenocarcinoma cells

Zhao Weiyong, Zhao Huafeng, Wang Haijing, Shao Yanyan, Zhang Lizhen*

(Department of Radiotherapy, the Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011, China)

[Abstract] **Objective:** To study the radiosensitization effects of pemetrexed disodium and gefitinib on human lung adenocarcinoma cells. **Methods:** Human lung adenocarcinoma A549 cells were treated with pemetrexed and/or gefitinib, and cell proliferation was examined by MTT. Colony formation was performed to detect growth inhibition effects of pemetrexed and/or gefitinib combined with radiation on A549 cells. Flow cytometry was performed to detect the changes of cell cycle and apoptosis. Expressions of intracellular Akt and p-Akt were detected by Western blot. **Results:** Pemetrexed and gefitinib inhibited cell proliferation of human lung adenocarcinoma A549 cells. Compared with cells treated with radiation only, radiation+pemetrexed, and radiation+gefitinib, the Dq, D0 and SF2 of cells treated with radiation+pemetrexed+gefitinib were significantly decreased. The SERs of cells treated with pemetrexed, gefitinib, and pemetrexed+gefitinib were 1.17, 1.48 and 2.62, respectively. Both pemetrexed and gefitinib induced G1/G0 phase arrest. When combined with radiation, the proportion of S phase cells was further reduced. Both pemetrexed and gefitinib enhanced radiation-induced apoptosis by decreasing p-Akt level. The p-Akt level was lowest in the cells treated with radiation+pemetrexed+gefitinib. **Conclusion:** Both pemetrexed and gefitinib have radiosensitization effects on A549 cells. Combination of the two drugs significantly improves the inhibitory effect of radiation through reducing S phase cells, enhances radiation induced apoptosis, and inhibits PI3K/Akt signaling pathway. This combination regimen may provide a promising strategy for lung cancer therapy.

[Key words] pemetrexed disodium; gefitinib; human lung adenocarcinoma; radiosensitivity

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(10): 1243-1250]

[基金项目] 南京医科大学校基金重点项目(2014NJMUZD069)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhanglizhen2010@126.com

肺癌是全世界范围内发病率最高的恶性肿瘤,在中国,其发病率和病死率均位于首位^[1]。肺癌综合治疗包括手术、放疗、化疗和靶向治疗,其中放疗在根治性治疗、术后辅助治疗和晚期姑息治疗中占据着不可替代的重要地位。随着放射治疗技术和设备的改善和提高,放射治疗的效果有了一定程度地提高,但由于肺腺癌放射抵抗性较小细胞肺癌、鳞癌强,即使最大可能提高照射剂量或改变照射方法,临床疗效仍较差,因此必须提高肿瘤细胞放射敏感性以改善肺腺癌的治疗效果。

目前增强放射敏感性的手段主要有改善组织乏氧状态、抑制端粒酶、干扰微管蛋白功能以及激活细胞凋亡途径等^[2]。培美曲塞二钠是肺腺癌常用的化疗药物,通过破坏细胞内叶酸依赖性的正常代谢过程,抑制细胞复制,从而抑制肿瘤生长^[3]。研究显示培美曲塞二钠可以提高胸膜间皮瘤细胞的放射敏感性^[4]。吉非替尼是表皮生长因子(epidermal growth factor receptor, EGFR)抑制剂,通过与三磷酸腺苷竞争结合至 EGFR 胞内酪氨酸激酶功能域,抑制受体自磷酸化而阻止下游信号转导,产生抗肿瘤作用,用于晚期肺腺癌的一、二线治疗^[5]。研究显示放疗可提高 EGFR 表达,联合吉非替尼可以提高肺癌的放疗疗效^[5]。

目前培美曲塞二钠和吉非替尼用于非小细胞肺腺癌的治疗,但培美曲塞二钠和吉非替尼能否与放射治疗结合提高放射敏感性及其机制均鲜见报道。因此,本研究对培美曲塞二钠和吉非替尼单独和联合放疗对人肺腺癌 A549 细胞增殖、克隆形成能力等进行比较,通过对比细胞周期、Akt 信号通路活化水平的变化探讨其放射增敏作用和机制,为肺癌的综合治疗提供新的治疗策略。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺腺癌细胞株 A549、Annexin V-FITC/PI 检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒、蛋白提取试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司)。RPMI 1640 培养基(Gibco 公司,美国),小牛血清(CS,杭州四季青生物工程材料有限公司),二甲基亚砜(DMSO,上海久亿化学试剂有限公司),四甲基偶氮唑盐(MTT, Amresco 公司,美国),p-Akt、Akt 单克隆抗体(Bioworld 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和分组

A549 细胞在含 10%CS 的 RPMI 1640 培养液,

37 ℃、5%CO₂ 及相对湿度条件下培养。实验分组:分为空白对照(Control 组)、单用培美曲塞二钠(P 组)、单用吉非替尼(G 组)、两药联用组(P+G 组)、放疗组(RT 组)、放疗+培美曲塞二钠(P+RT 组)、放疗+吉非替尼(G+RT 组)、放疗+两药联用组(P+G+RT 组)。

1.2.2 MTT 实验

制备单细胞悬液,按 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板,每组设 5 个复孔。37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后加入药物,并设立阴性对照组;培养 72 h 后每孔加入 5 mg/mL MTT 20 μ L,继续孵育 4 h,弃去培养基,每孔加入 150 μ L DMSO 震荡溶解,酶标仪 490 nm 处检测各孔吸光度值。抑制率(%)=(1-实验组吸光度值/对照组吸光度值)×100%。通过机率单位加权回归法(Bliss 法)计算 IC₅₀。

1.2.3 克隆形成实验

接种细胞至 6 孔板,每孔 1 000 个细胞,培养 24 h 贴壁后,进行分组处理,分为 Control、P 组、G 组、P+G 组、RT 组、P+RT 组、G+RT 组、P+G+RT 组。培美曲塞二钠和吉非替尼药物作用浓度分别为 29.154 ng/mL、0.015 μ mol/L,空白对照组及放疗组均加入对照溶媒,加入含药物的培养液 2 h 后放疗,照射剂量分别为 0、1、2、4、6、8 Gy。每个浓度及组内设 5 个复孔。处理结束后继续培养 48 h,弃去含药物的培养液,换完全培养液,培养 10~14 d。当 6 孔细胞培养板中出现肉眼可见的克隆时,弃培养液,PBS 洗涤 2 次,加纯甲醇溶液固定 15 min。弃固定液,加适量 Giemsa 应用液染色 10~30 min,洗去染色液,计数各孔细胞数>50 个的细胞集落数。计算存活分数(单纯放疗组以空白对照组克隆数计算贴壁率,放疗联合药物作用组以单独药物作用组克隆数计算贴壁率),绘制剂量效应曲线。贴壁率(plating efficiency, PE)=对照组每孔克隆数/每孔细胞种植数×100%;存活率或存活分数(surviving fraction, SF)=实验组每孔克隆数/(每孔种植数×贴壁率)。以单击多靶数学模型拟合细胞存活曲线,计算出放疗组和放疗联合药物组的平均致死剂量(D0)值,放射增敏效应以放射增敏比(sensitivity enhanced ratio, SER)表示,定义为单独放疗组与放疗联合药物组的 D0 之比。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期

将对数生长期的细胞消化接种到 6 孔板中,待细胞贴壁后根据组别设置加入相应的含药培养基,同时设立阴性对照组,每个浓度及组内设 5 个复孔。药物作用 72 h 后,用 PBS 洗涤并收集细胞,采用 Annexin V-

FITC/PI 检测试剂盒双染,避光放置 10 min,流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。收集细胞加入 400 μL PI 染色混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光 30 min,流式细胞仪检测细胞周期分布。

1.2.5 蛋白质免疫印迹(Western blot)

将变性完全的蛋白样品按 70 μg /孔加入聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE),电泳 100 min 后,恒流 200 mA 转膜,5%脱脂奶粉封闭液中室温孵育 1 h 封闭。加入一抗(1:400 稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 轻摇过夜,PBST 缓冲液洗膜 4 次,每次 10 min。将膜与辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000 稀释)室温下摇荡孵育 1 h,PBST 洗膜 4 次,每次 10 min。将显影液加于 PVDF 膜上,室温放置 1 min。暗室中覆盖感光胶片,根据荧光强度决定曝光时间。

1.3 统计学方法

所有实验重复 3 次,运用 SPSS 17.0 统计软件分析。数据用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。实验组与对照组比较使用方差分析, $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

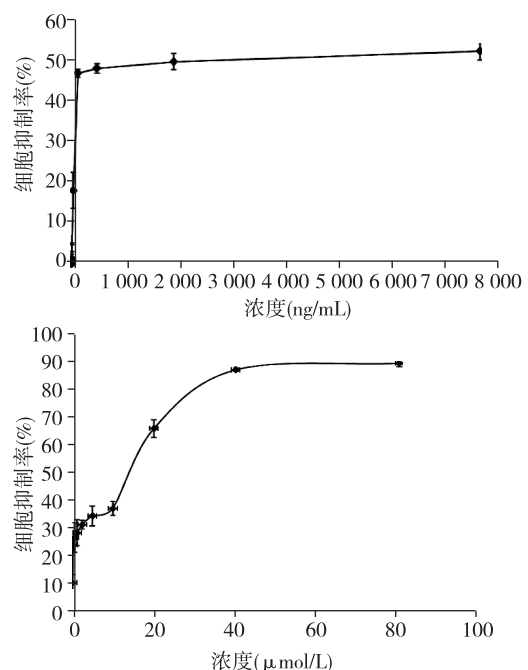
2.1 培美曲塞二钠、吉非替尼对人肺腺癌细胞 A549 的增殖抑制作用

不同浓度 P 组、G 组刺激 A549 细胞 72 h 的体外生长抑制曲线见图 1。培美曲塞二钠和吉非替尼对肺癌细胞的抑制作用均呈剂量依赖性,计算出培美曲塞二钠和吉非替尼的 IC_{50} 值分别为 1 485.33 ng/mL 和 7.20 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2 克隆形成法检测培美曲塞二钠、吉非替尼联合放射线对人肺腺癌细胞 A549 存活的影响

根据 MTT 实验,培美曲塞二钠、吉非替尼对 A549 细胞均有抑制作用,随剂量增加而增强。培美曲塞二钠、吉非替尼的后续实验浓度为 29.154 ng/mL、0.015 $\mu\text{mol/L}$ 。

单纯放射组、培美曲塞二钠、吉非替尼单药或联合放射组细胞 SF 及克隆形成随着照射剂量的升高而降低(图 2),使用单击多靶模型对 SF 和放射剂量进行曲线拟合(图 3)。根据拟合的细胞存活曲线及相关公式,得出相应参数 D_0 、准阈剂量(D_q)、SER 值,P+RT 组、G+RT 组、P+G+RT 组的 D_q 、2 Gy 照射时的存活分数(SF2) 值均低于 RT 组,提示培美曲塞二钠、吉非替尼均可使 A549 细胞的放射敏感性明显增强,其 SER 为 1.17 和 1.48;两者联合应用能明显增强放射作用,SER 为 2.62(图 4)。



A: 培美曲塞二钠对人肺腺癌细胞 A549 增殖的抑制作用($n=3$);

B: 吉非替尼对人肺腺癌细胞 A549 增殖的抑制作用($n=3$)。

图 1 培美曲塞二钠和吉非替尼对人肺腺癌细胞 A549 增殖的抑制作用

Figure 1 Pemetrexed and gefitinib inhibit cell proliferation of human lung adenocarcinoma A549 cells

2.3 Annexin V-FITC/PI 染色法检测培美曲塞二钠、吉非替尼联合放射线对 A549 细胞凋亡的影响

为研究培美曲塞二钠、吉非替尼两药联合作用进一步提高放射线对 A549 细胞放射增敏效应的可能机制,用流式细胞仪检测各组细胞经不同处理后的细胞凋亡改变。培美曲塞二钠和吉非替尼均可增加放射线诱导的凋亡 [(18.54 \pm 2.06)% vs. (8.98 \pm 0.65)%, $P<0.05$; (23.78 \pm 2.08)% vs. (8.98 \pm 0.65)%, $P<0.05$], 但两药联用可以使凋亡率达到最高 [(36.0 \pm 2.74)% vs. (8.98 \pm 0.65)%, $P<0.05$], 提示两药联合可以进一步提高放射线诱导的凋亡(图 5)。

2.4 PI 染色法检测培美曲塞二钠、吉非替尼联合放射线对 A549 细胞周期的影响

用流式细胞仪检测各组细胞经不同处理 72 h 后细胞周期的比例(图 6)。与 Control 组相比, P 组和 G 组均导致 G1/G0 期细胞比例增加 [(54.42 \pm 0.28)% vs. (18.60 \pm 0.95)%, $P<0.05$; (63.62 \pm 0.27)% vs. (18.60 \pm 0.95)%, $P<0.05$]; P+G 组 G1/G0 期细胞比例进一步升高 [(80.17 \pm 0.32)% vs. (18.60 \pm 0.95)%, $P<0.05$]。同时 S 期和 G2/M 期细胞比例降低, P、G 及 P+G 组均导致 S 期细胞比例降低 [(19.53 \pm 0.50)% vs. (30.04 \pm 1.35)%, $P<0.05$; (17.18 \pm 0.46)%

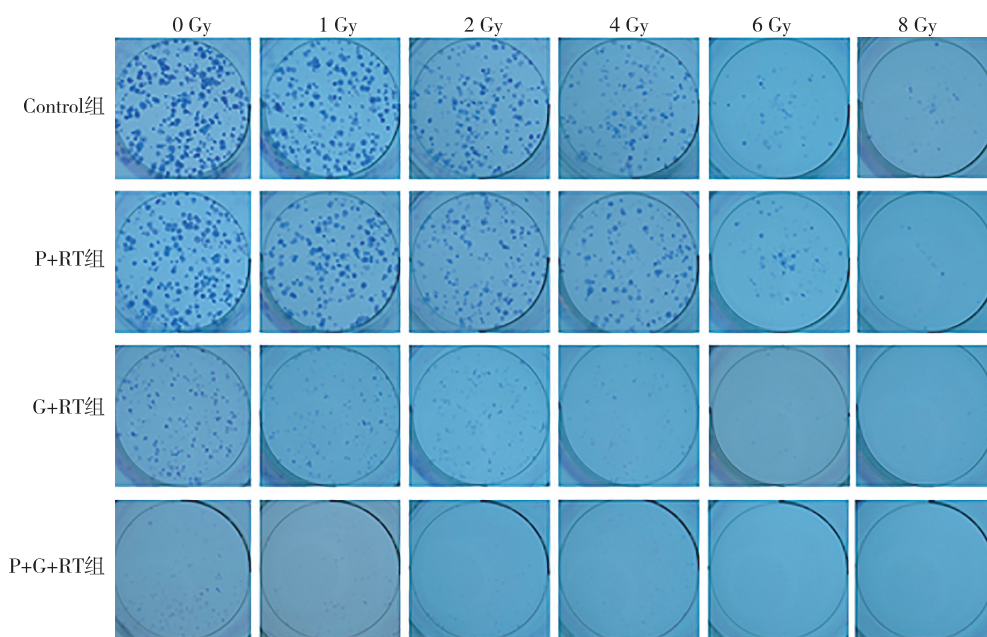


图 2 培美曲塞二钠、吉非替尼不联合或联合放射线对人肺腺癌细胞 A549 存活的影响

Figure 2 Effects of pemetrexed and/or gefitinib combined with radiation on survival of human lung adenocarcinoma A549 cells

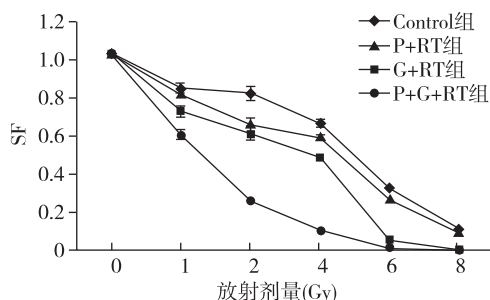
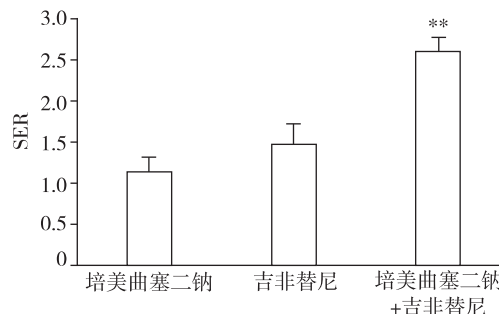


图 3 根据单击多靶模型拟合细胞存活曲线 ($n=3$)

Figure 3 Cell survival curve by multitarget-single hitting model ($n=3$)

$vs. (30.04 \pm 1.35)\%$; $(10.76 \pm 0.45)\%$ $vs. (30.04 \pm 1.35)\%$, $P < 0.05$]; P 组 G2/M 期细胞比例有所降低 $[(26.05 \pm 0.61)\%$ $vs. (51.36 \pm 1.21)\%$, $P > 0.05$]; G 及 P+G 组 G2/M 期细胞比例明显下降 $[(19.20 \pm 0.34)\%$ $vs. (51.36 \pm 1.21)\%$, $P < 0.05$; $(9.07 \pm 0.31)\%$ $vs. (51.36 \pm 1.21)\%$, $P < 0.05$]

RT 组 G1/G0 期、S 期、G2/M 期比例分别为 $(28.98 \pm 1.06)\%$ 、 $(21.73 \pm 1.13)\%$ 及 $(49.29 \pm 1.42)\%$ 。P+RT 组、G+RT 组、P+G+RT 组 G1/G0 期细胞比例均明显增加 $[(68.66 \pm 0.39)\%$ $vs. (28.98 \pm 1.06)\%$, $P < 0.05$; $(77.94 \pm 0.37)\%$ $vs. (28.98 \pm 1.06)\%$, $P < 0.05$; $(90.84 \pm 0.37)\%$ $vs. (28.98 \pm 1.06)\%$, $P < 0.05$]。同时 P+RT 组、G+RT 组、P+G+RT 组 S 期细胞比例均明显降低 $[(13.22 \pm 0.32)\%$ $vs. (21.73 \pm 1.13)\%$, $P < 0.05$; $(11.28 \pm 0.42)\%$ $vs. (21.73 \pm 1.13)\%$, $P < 0.05$; $(3.08 \pm 0.39)\%$ $vs. (21.73 \pm 1.13)\%$, $P < 0.05$]。与 RT 组比较, P+RT 组、



两组比较, $^*P < 0.01, n=3$ 。

图 4 培美曲塞二钠、吉非替尼单独或联合作用的放射增敏比
Figure 4 Radiosensitization ratio of pemetrexed sodium and gefitinib alone or combination

G+RT 组、P+G+RT 组 G2/M 期细胞比例也明显降低 $[(18.12 \pm 0.42)\%$ $vs. (49.29 \pm 1.42)\%$, $P < 0.05$; $(10.78 \pm 0.42)\%$ $vs. (49.29 \pm 1.42)\%$, $P < 0.05$; $(6.08 \pm 0.38)\%$ $vs. (49.29 \pm 1.42)\%$, $P < 0.05$]。

以上结果表明, 培美曲塞二钠和吉非替尼可以使细胞阻滞在 G1/G0 期;联合放射线后, S 期细胞比例减少, 两药合用时更明显。

2.5 Western blot 检测培美曲塞二钠、吉非替尼联合放射线对 A549 细胞蛋白表达的影响

各组 Akt 蛋白质的表达无明显差异。与 Control 组相比, P 组 p-Akt/Akt 比值有所降低 $(0.623 \pm 0.010 vs. 0.766 \pm 0.033, P > 0.05)$ 。G 组和 P+G 组 p-Akt/Akt 比值明显降低 $(0.474 \pm 0.005 vs. 0.766 \pm 0.033, P < 0.05; 0.465 \pm 0.005 vs. 0.766 \pm 0.033, P < 0.05)$; RT 组 p-Akt/Akt 比值与 Control 组相比有所降低 $(0.586 \pm$

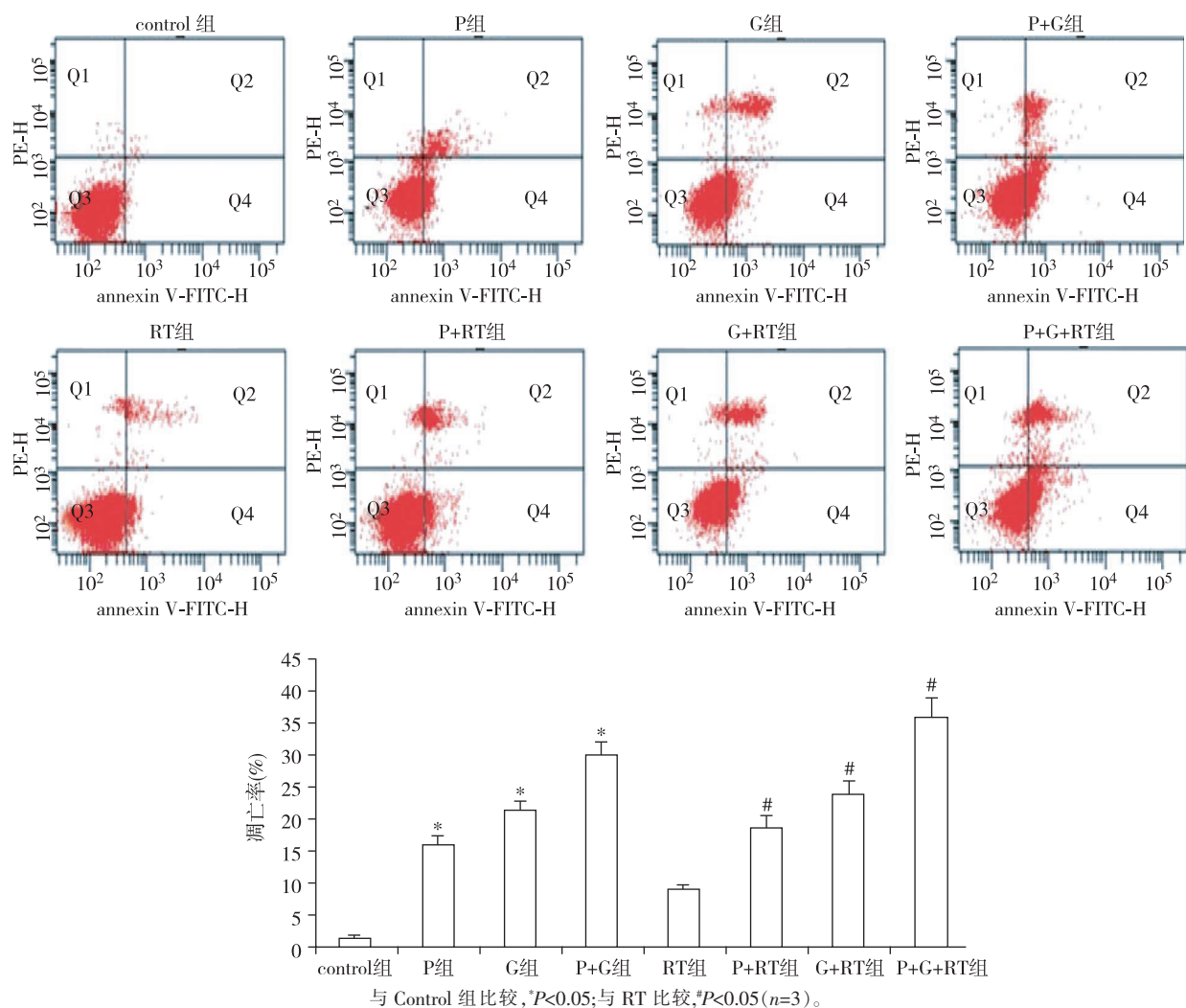


图 5 培美曲塞二钠、吉非替尼单独或联合放射线对人肺腺癌细胞 A549 凋亡的影响

Figure 5 Effects of pemetrexed and/or gefitinib combined with radiation on apoptosis of human lung adenocarcinoma A549 cells

0.015 vs. 0.766±0.033, $P>0.05$)。与 RT 组比较,P+RT、G+RT 及 P+G+RT 组 p-Akt/Akt 比值明显降低(0.477±0.002 vs. 0.586±0.015, $P<0.05$;0.368±0.002 vs. 0.586±0.015, $P<0.05$;0.292±0.002 vs. 0.586±0.015, $P<0.05$,图 7)。以上结果表明,培美曲塞二钠和吉非替尼可以使 Akt 磷酸化水平减低;与放射线联合作用后,Akt 磷酸化水平仍进一步减低,两药合用时更明显。

3 讨论

肺癌是一种危害极其严重的恶性肿瘤,已成为各种肿瘤死亡的首要原因,发病率和死亡率呈逐年上升趋势。手术治疗、放疗、化疗是肿瘤治疗中最传统的 3 种方法,其中放疗在肺癌治疗过程中占据着不可替代的重要地位。随着放射治疗技术和设备的改善和提高,治疗效果有了一定程度地提高,但并没

有显著性改善,仍有多数肿瘤存在一定的放射抵抗,即使用最大可能的照射剂量或改变照射方法,临床上放射野内复发的情况依旧存在。

放射抵抗的成因是多方面的,其中最重要的是由于实体肿瘤中普遍存在 10%~50%的乏氧细胞,其对射线有抵抗作用,一般比有氧细胞强 2.5~3.0 倍,这限制了肿瘤放疗的效果。为了增加乏氧细胞对放射的敏感性,曾进行了很多努力和尝试,比如加大放疗剂量、使用乏氧细胞增敏剂、放疗和化疗药物联合应用等^[2]。随着在细胞和分子水平对肿瘤形成机制的研究深入,以及放射线和药物作用机制的阐明,放射增敏已涉及细胞微环境、血管形成、放射所致细胞信号转导过程、DNA 损伤和细胞周期紊乱、凋亡、分化等多个非常复杂的领域。既往放射增敏剂有铂类、抗代谢药物、紫杉醇类等,主要是通过增加 DNA 损伤、细胞周期阻滞等提高放疗疗效,同时增加了正常

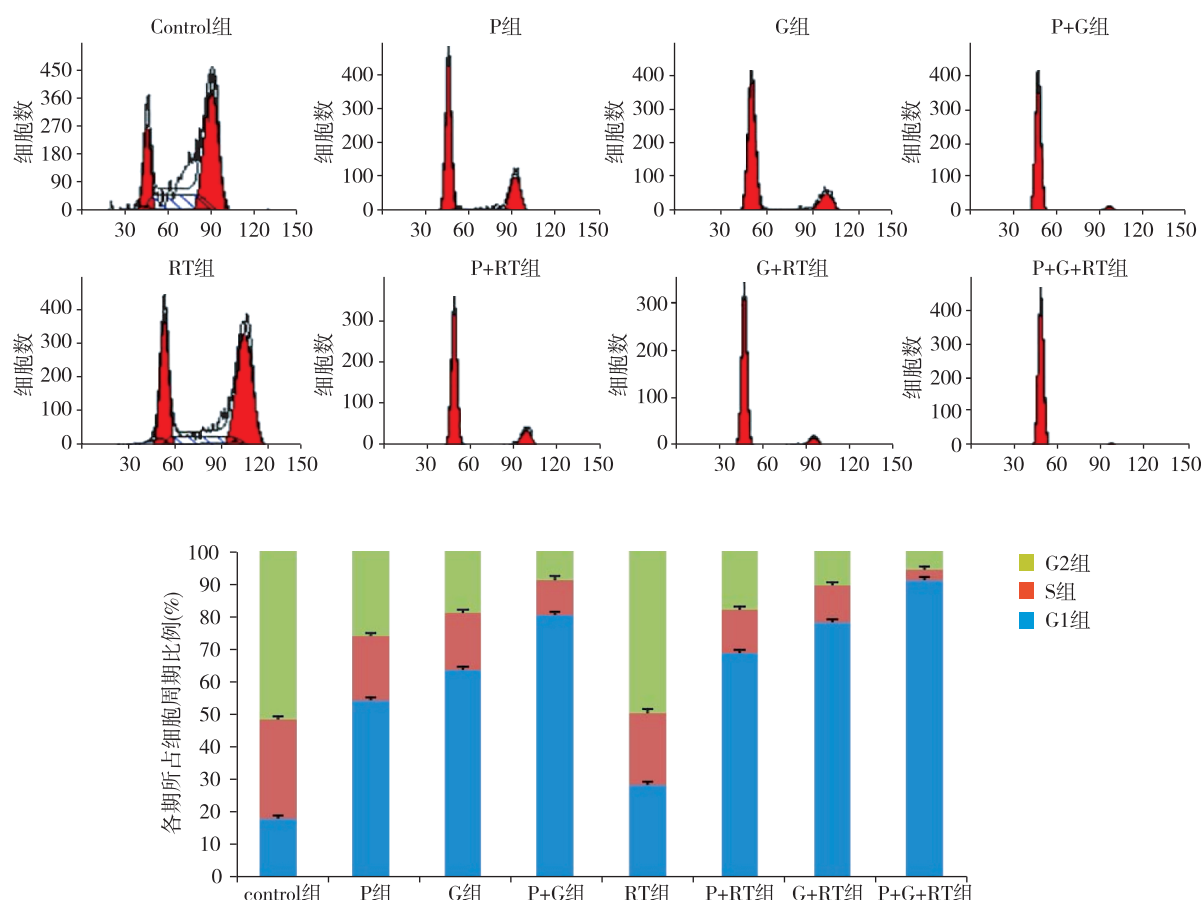
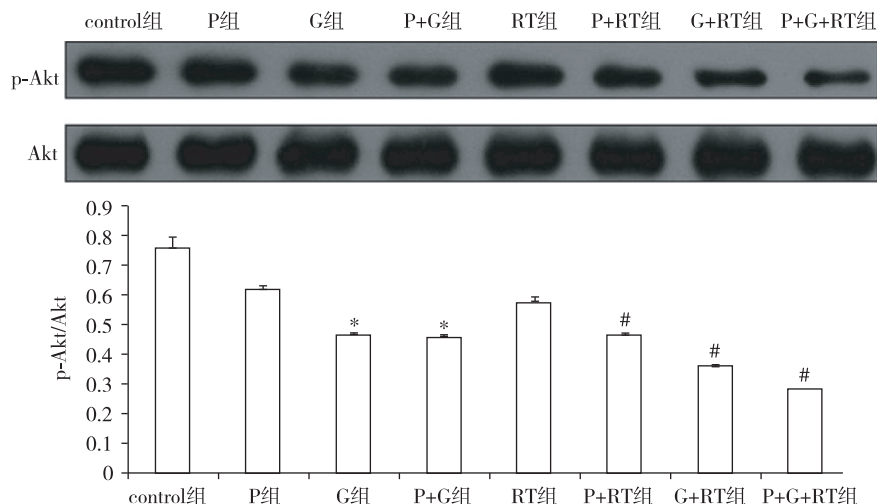


图 6 培美曲塞二钠、吉非替尼单独或联合放射线对人肺腺癌 A549 细胞周期的影响 (n=3)

Figure 6 Effects of pemetrexed and/or gefitinib combined with radiation on cell cycle of human lung adenocarcinoma A549 cells (n=3)



与 Control 比较, * $P < 0.05$; 与 RT 比较, # $P < 0.05$ (n=3)。

图 7 培美曲塞二钠、吉非替尼单独或联合放射线对人肺腺癌 A549 细胞蛋白表达的影响

Figure 7 Effects of pemetrexed and/or gefitinib combined with radiation on protein expression of human lung adenocarcinoma A549 cells

组织的损伤^[6-8]。作用于细胞信号转导的小分子化合物及单克隆抗体目前已应用于临床,取得很好的疗效,同时不良反应小。研制开发不同的信号通路抑制剂并将其用于肺癌放疗的辅助治疗已成为人们关

注的焦点,而其机制的研究可为增敏剂的临床应用和新药研制开发提供理论依据^[3]。最新研究发现:①通过影响细胞周期可实现放射增敏,将细胞阻滞在放射敏感性最高的时期。目前研究认为,肿瘤细胞对

于电离辐射的反应依赖于在细胞周期中所处的位置,G₀期有一定抵抗性,G₁/S边界及G₂/M期敏感性最高,而S期尤其是晚S期最低^[9];②促进肿瘤细胞凋亡来提高放疗疗效;③通过影响信号转导通路来提高放疗疗效,放射损伤虽然是通过细胞内DNA损伤实现的,但同时也和细胞质信号转导有关。研究证实,多个信号通路如Ras/MEK/ERK和PI3K/Akt/mTOR等与放射增敏密切相关^[10-11]。

培美曲塞二钠是一种结构上含有核心为吡咯嘧啶基团的抗叶酸制剂,通过破坏细胞内叶酸依赖性的正常代谢过程,抑制细胞复制,从而抑制肿瘤生长。体外研究显示,培美曲塞二钠可抑制胸苷酸合成酶、二氢叶酸还原酶和甘氨酸核苷酸甲酰转移酶的活性,这些酶均是合成叶酸所必需的酶,参与胸腺嘧啶核苷酸和嘌呤核苷酸的生物再合成过程,培美曲塞二钠通过运载叶酸的载体和细胞膜上的叶酸结合蛋白运输系统进入细胞内。培美曲塞二钠进入细胞后,在叶酰多谷氨酸合成酶的作用下转化为多谷氨酸的形式,存留于细胞内成为胸苷酸合成酶和甘氨酸核苷酸甲酰转移酶的抑制剂。多谷氨酸化在肿瘤细胞内呈现时间-浓度依赖性过程,而在正常组织内浓度很低,其代谢物在肿瘤细胞内的半衰期延长,从而延长了药物在肿瘤细胞内的作用时间。临床前研究显示培美曲塞二钠体外可抑制多种肿瘤细胞生长,包括白血病、肺癌、间皮瘤、乳癌、结肠癌以及卵巢癌等,并对多种类型的瘤株呈现剂量依赖性的抗癌活性,在与其他抗肿瘤化疗药物联用时也显示出较好的抗癌活性^[4]。培美曲塞二钠具有潜在的抗叶酸作用,多项研究发现培美曲塞二钠和放疗联合可能提高疗效,具有放射协同和增敏作用^[4]。Wouters等^[12]提出放疗前先给予肺癌细胞培美曲塞二钠作用24h后,继以吉西他滨作用1h,可以提高放疗疗效,认为培美曲塞二钠诱导hENT1和dCK表达增加,从而与放疗协同。

吉非替尼为酪氨酸激酶抑制剂小分子化合物,主要通过与三磷酸腺苷竞争结合至EGFR胞内酪氨酸激酶功能域,抑制受体自磷酸化,阻止下游信号转导,最终产生抗肿瘤作用。一些研究发现,放疗可提高EGFR表达,加用分子靶向类药物可提高放疗疗效^[13-14]。

培美曲塞二钠和EGFR抑制剂(吉非替尼)目前广泛应用于肺腺癌的治疗,但培美曲塞二钠和吉非替尼能否与放射治疗结合,提高放射敏感性;是否能成为新的有效的放射增敏剂,以及放射增敏的机制

等鲜见报道。

本研究采用MTT、克隆形成、流式细胞术等方法,对培美曲塞二钠和吉非替尼单独和联合放疗对人肺腺癌A549细胞增殖、克隆形成能力等进行比较,发现培美曲塞二钠和吉非替尼具有抑制人A549细胞增殖的作用,随剂量增加而增强。P+G+RT组的D_q、D₀及SF₂均明显低于RT组,P+RT组及G+RT组SER分别为1.17和1.48,P+G+RT组SER为2.62。两药联用的放射增敏效应明显高于单药的放射增敏效应,两药联合使用可进一步提高放射增敏作用。流式细胞术检测细胞周期结果显示培美曲塞二钠和吉非替尼可以使细胞阻滞在G₁/G₀期;与放射线联合作用后,S期细胞比例降低,两药合用作用更明显。凋亡检测结果显示培美曲塞二钠和吉非替尼均可以提高放射线诱导的凋亡,但两药联用可以使其凋亡率达到最高,提示两药联合作用可以进一步提高放射线诱导的细胞凋亡。肺腺癌细胞在药物作用前后、照射前后及药物+照射后,Akt在蛋白表达水平没有明显改变;培美曲塞二钠和吉非替尼均能抑制p-Akt的表达;与RT组相比,P+RT和G+RT组p-Akt蛋白的表达减低,P+G+RT组p-Akt/Akt的比值最低。

本研究发现培美曲塞二钠和吉非替尼各自均有放射增敏作用,两药联合使用可以明显提高放疗效果。其机制可能涉及S期细胞减少,同时进一步增强了放射线诱导的细胞凋亡;另外可以推断培美曲塞二钠和吉非替尼两药都可抑制PI3K/Akt信号转导通路。培美曲塞二钠和吉非替尼具有协同作用,原因之一可能是培美曲塞二钠作用后诱导EGFR磷酸化,而吉非替尼则阻止了EGFR信号转导通路,从而降低蛋白表达;此外,培美曲塞二钠和吉非替尼都作用于EGFR信号转导通路,降低Akt磷酸化,从而促进细胞凋亡。因此p-Akt的降低可能解释培美曲塞二钠与吉非替尼联合使用引起的细胞凋亡率增加。

[参考文献]

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132
- [2] Linam J, Yang X. Recent developments in radiosensitization[J]. Anticancer Res, 2015, 35(5): 2479-2485
- [3] Rollins KD, Lindley C. Pemetrexed: a multitargeted antifolate[J]. Clin Ther, 2005, 27(9): 1343-1382
- [4] Yoshida D, Ebara I, Sato Y, et al. Interaction of radiation and pemetrexed on a human malignant mesothelioma cell line in vitro[J]. Anticancer Res, 2011, 31(9): 2847-2851

- [5] Ellis M, Coakley N, Feld R, et al. Use of the epidermal growth factor receptor inhibitors gefitinib, erlotinib, afatinib, dacomitinib, and icotinib in the treatment of non-small-cell lung cancer: a systematic review[J]. *Curr Oncol*, 2015, 22(3): e183–e215
- [6] Ahmad S. Platinum-DNA interactions and subsequent cellular processes controlling sensitivity to anticancer Platinum complexes[J]. *Chem Biodivers*, 2010, 7(3): 543–566
- [7] Berger SH, Wyatt MD. Uracil in DNA: Consequences for carcinogenesis and chemotherapy[J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76(6): 697–706
- [8] Regine WF, Winter KA, Abrams RA, et al. Fluorouracil *vs* gemcitabine chemotherapy before and after fluorouracilbased chemoradiation following resection of pancreatic adenocarcinoma: a randomized controlled trial[J]. *JAMA*, 2008, 299(9): 1019–1026
- [9] Jorgensen J. Enhancing radiosensitivity: targeting the DNA repair pathways[J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(8): 665–670
- [10] Shimura T. Acquired radioresistance of cancer and the AKT/GSK3 β /cyclin D1 overexpression cycle[J]. *J Radiat Res*, 2011, 52(5): 539–544
- [11] Toulany M, Rodemann HP. Membrane receptor signaling and control of DNA repair after exposure to ionizing radiation[J]. *Nuklearmedizin*, 2010, 49 (Suppl 1): S26–S30
- [12] Wouters A, Pauwels B, Lardon F, et al. *In vitro* study on the schedule-dependency of the interaction between pemetrexed, gemcitabine and irradiation in non-small cell lung cancer and head and neck cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2010, 10:441
- [13] Sato Y, Ebara T, Sunaga N, et al. Interaction of radiation and gefitinib on a human lung cancer cell line with mutant EGFR gene *in vitro* [J]. *Anticancer Res*, 2012, 32 (11): 4877–4881
- [14] 高子夜, 庄亮, 陈元. 吉非替尼对肺癌细胞株 HCC827 和 H358 放射敏感性及其机制研究[J]. *中国肺癌杂志*, 2012, 15(6): 324–331

[收稿日期] 2016-08-02

(上接第 1233 页)

- sensitive nonisotopic detection [J]. *Science*, 1998, 281 (5385): 2016–2018
- [5] Byers RJ, Hitchman ER. Quantum dots brighten biological imaging[J]. *Prog Histochem Cytochem*, 2011, 45(4): 201–237
- [6] Wilson WL, Szajowski PF, Brus LE. Quantum confinement in size-selected, surface-oxidized silicon nanocrystals[J]. *Science*, 1993, 262(5137): 1242–1244
- [7] Gao X, Cui Y, Levenson RM, et al. *In vivo* cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots[J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(8): 969–976
- [8] Medintz IL, Uyeda HT, Goldman ER, et al. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing[J]. *Nat Mater*, 2005, 4(6): 435–446
- [9] Zhu H, Zhang S, Ling Y, et al. pH-responsive hybrid quantum dots for targeting hypoxic tumor siRNA delivery[J]. *J Control Release*, 2015, 220 (Pt A): 529–544
- [10] Walther C, Meyer K, Rennert R, et al. Quantum dot-carrier peptide conjugates suitable for imaging and delivery applications[J]. *Bioconjug Chem*, 2008, 19(12): 2346–2356
- [11] Li H, Shih WH, Shih WY, et al. Transfection of aqueous CdS quantum dots using polyethylenimine[J]. *Nanotechnology*, 2008, 19(47): 475101
- [12] Layek B, Lipp L, Singh J. Cell penetrating peptide conjugated chitosan for enhanced delivery of nucleic acid[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(12): 28912–28930
- [13] Xu H, Li Z, Si J. Nanocarriers in gene therapy: a review [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2014, 10(12): 3483–2507
- [14] Pathak A, Vyas SP, Gupta KC. Nano-vectors for efficient liver specific gene transfer[J]. *Int J Nanomedicine*, 2008, 3(1): 31–49
- [15] Loh XJ, Lee TC, Dou Q, et al. Utilising inorganic nanocarriers for gene delivery[J]. *Biomater Sci*, 2016, 4(1): 70–86
- [16] Kean T, Biodegradation TM. Biodistribution and toxicity of chitosan[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, 62(1): 9–11
- [17] Illum L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient[J]. *Pharm Res*, 1998, 15(9): 1326–1331
- [18] Wedmore I, Mcmanus JG, Pusateri AE, et al. A special report on the chitosan-based hemostatic dressing: experience in current combat operations[J]. *J Trauma*, 2006, 60 (3): 655–658
- [19] Chen N, He Y, Su Y, et al. The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(5): 1238–1244
- [20] Nurunnabi M, Khatun Z, Huh KM, et al. *In vivo* biodistribution and toxicology of carboxylated graphene quantum dots[J]. *ACS Nano*, 2013, 7(8): 6858–6867

[收稿日期] 2016-11-16