

基因与细胞治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000218

西妥昔单抗联合紫杉醇对人鼻咽癌 CNE-1 细胞抑制作用
及其分子机制研究刘 洋, 张幸平, 杨 帆, 唐 龙, 刘 梅
(重庆医科大学附属第一医院肿瘤科, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究西妥昔单抗(Cetuximab)联合紫杉醇(Paclitaxel, PTX)对人鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC) CNE-1 细胞增殖、凋亡的影响及其可能的分子机制。**方法:**培养人 NPC CNE-1 细胞株, 随机分为空白对照组、Cetuximab 组、PTX 组、联合用药组。用 MTT 法检测细胞抑制率, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, 逆转录 PCR(RT-PCR 法)及 Western blot 法检测表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)的 mRNA 和蛋白表达。**结果:**联合用药组的细胞抑制率高于 Cetuximab 组和 PTX 组(P 值分别为 0.002、0.000); 联合用药组的凋亡率高于 Cetuximab 组和 PTX 组(P 值均为 0.000); 联合用药组的 EGFR、MMP-2 的 mRNA 表达均低于 Cetuximab 组和 PTX 组(各组间 EGFR mRNA 的表达 P 值分别为 0.000、0.001; MMP-2 mRNA 的表达 P 值均为 0.000); 联合用药组的 EGFR、MMP-2 的蛋白表达均低于 Cetuximab 组和 PTX 组(各组间 EGFR 蛋白的表达 P 值均为 0.000; MMP-2 蛋白的表达 P 值分别为 0.000、0.006)。**结论:**Cetuximab 联合 PTX 能够抑制人 NPC CNE-1 细胞的增殖, 促进其凋亡, 两者联用具有协同作用, 其分子机制可能是通过抑制肿瘤细胞 EGFR、MMP-2 的表达来实现。

【关键词】西妥昔单抗; 紫杉醇; 鼻咽癌; 增殖; 凋亡**【中图分类号】**R739.6**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-02-20

Inhibitory effect of cetuximab combined with paclitaxel on nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-1 and its molecular mechanism

Liu Yang, Zhang Xingping, Yang Fan, Tang Long, Liu Mei

(Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To study the effects of cetuximab combined with paclitaxel on proliferation and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-1 and its molecular mechanism. **Methods:** Nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-1 were cultured and divided into vacuity contrast group, cetuximab group, paclitaxel group and combination group. The inhibitory rate was detected by MTT, the apoptosis rate was analyzed by flow cytometry, and levels of epidermal growth factor receptor(EGFR), matrix metalloproteinase-2(MMP-2) were detected by RT-PCR and Western blot. **Results:** The inhibitory rate and apoptosis rate of combination group were higher than those of cetuximab group and paclitaxel group($P=0.002, P=0.000; P=0.000, P=0.000$). EGFR and MMP-2 mRNA levels of combination group were lower than those of cetuximab group and paclitaxel group($P=0.000, P=0.001; P=0.000, P=0.000$). EGFR and MMP-2 protein levels of combination group were lower than those of cetuximab group and paclitaxel group($P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.006$). **Conclusions:** The combination of cetuximab and paclitaxel can increase the apoptosis and decrease the proliferation of nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-1 with a synergistic action, the mechanism of which may through the inhibition of EGFR and MMP-2.

【Key words】cetuximab; paclitaxel; nasopharyngeal carcinoma; proliferation; apoptosis

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是好发于我国南方及东南亚的常见肿瘤之一, 具有显著的

地理及种族分布特点^[1]。放射治疗是该病的主要治疗手段, 可取得较高的局部控制率^[2]。但由于 NPC 细胞生长迅速及高转移特性, NPC 放疗后仍有较高的局部复发和(或)远处转移率。基于 NPC 细胞增殖、迁移等恶性生物学行为, 探寻能够抑制该生物学行为的治疗方式具有广阔的临床应用前景^[3]。本研究中,

作者介绍: 刘 洋, Email: 303302140@qq.com,

研究方向: 恶性肿瘤放射治疗、化疗及综合治疗。

通信作者: 张幸平, Email: zhang.xinping@163.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000218.html>

通过培养人 NPC CNE-1 细胞株,研究西妥昔单抗 (Cetuximab)联合紫杉醇 (Paclitaxel, PTX)对其增殖和凋亡的影响及其可能的分子机制,为临床合理用药提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人 NPC CNE-1 细胞株购自中科院上海细胞库;DMEM 培养基和胎牛血清均购自 GIBCO 公司;Cetuximab (100 mg/20 ml)、PTX (30 mg/5 ml)分别购自勃林格殷格翰药业公司和太极集团四川太极制药有限公司;表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)抗体、基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2)抗体均购于美国 Immunoway 公司; β -actin 购于北京康为世纪公司;PrimerScript RT 逆转录试剂盒及 QPCR SYBR GreenMix 均购于大连 TAKARA 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人 NPC CNE-1 细胞从液氮罐中取出后迅速置于 37 °C 水浴锅中预热。将细胞悬液移入 15 ml 离心管中,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清后用 5 ml 含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基重悬,移入培养瓶中在 37 °C、5%CO₂ 孵箱中培养。将处于对数生长期的细胞用胰酶常规消化、传代并接种于 12 孔板。

1.2.2 细胞分组及处理方法 当 12 孔板内细胞铺满 70%~80%后,将含血清的 DMEM 更换为不含血清的 DMEM 培养 24 h。根据临床用药剂量经体表面积公式换算后药物终浓度为:Cetuximab 256 μ g/ml、PTX 20 μ g/ml。将传代细胞随机分为 4 组:不含药物的空白对照组 (A 组)、20 μ g/ml PTX (B 组)、256 μ g/ml Cetuximab (C 组)、256 μ g/ml Cetuximab+20 μ g/ml PTX (D 组)处理。

1.2.3 MTT 法检测细胞抑制率 各组细胞用药物处理 24 h 后吸去上清,加入 160 μ l DMEM 培养基、40 μ l 0.5% MTT 溶液,CO₂ 孵箱中继续培养 4 h。吸去上清,每孔加入 200 μ l 二甲基亚砜,置于摇床上低速振荡 10 min 后,在酶标仪上检测 570 nm 波长处的吸光度 (absorbance, A) 值,每个浓度组设 6 个复孔。计算抑制率=(1-实验组 A 值/对照组 A 值)×100%。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率 细胞药物处理 24 h 后,用 0.25%胰酶消化细胞,1 000 r/min 5 min, PBS 洗涤细胞 2 次,制成单细胞悬液。取 100 μ l 细胞悬液加入 5 μ l Annexin V/ FITC 和 10 μ l 碘化丙锭 (PI) 溶液,采用流式细胞仪 (BD 公司, Franklin Lakes, 美国) CellQuest 软件进行分析。

1.2.5 RT-PCR 法检测 EGFR、MMP-2 的 mRNA 表达 Trizol 试剂提取各组细胞总 RNA。用紫外分光光度计测量各样品在 260 nm 波长处的 A 值,确定 RNA 的质量。取 1 μ g RNA 样品用 PrimerScript RT 试剂盒逆转录得到反转录产物 cDNA。PCR 扩增引物由大连 TAKARA 公司设计并合成,序列如下:EGFR 上游引物为:5'-CCGTCGCTATCAAGGATTTAAG-3',

下游引物为:5'-CGTAGCTCCAGACATCACTCTG-3',扩增长度 480 bp;MMP-2 上游引物为:5'-CACTGTGGGTGGAAATTCAGA-3',下游引物为:5'-GTCCGCCAAATAAACCGATC-3',扩增长度 480 bp;GAPDH 上游引物为:5'-CAGCGACACC-CAGCTCTC-3',下游引物为:5'-TGAGGTCCACCACCCTGT-3',扩增长度 258 bp。取 12.5 μ l QPCR SYBR GreenMix、0.4 μ l 对应的引物、1 μ l cDNA,加 QH₂O 至 25 μ l 得到反应混合物。用 CFX96™ Real-Time System 行实时荧光定量 PCR 反应,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算 mRNA 表达的相对变化。

1.2.6 Western blot 法检测 EGFR、MMP-2 的蛋白表达 细胞裂解液法分别提取各组蛋白,于 4 °C、1 200 r/min 离心 10 min,取上清进行电泳。按配方配置 4%的浓缩胶和 10%的分离胶,点样后进行 100 V、20 min、120 V、90 min 的垂直电泳和 100 V、90 min 的电转膜。取出硝酸纤维素膜 (nitrocellulose filter membrane, NC) 膜用 5%脱脂牛奶封闭 2 h, TBST 洗涤 5 min×3。根据分子量裁剪 NC 膜并分别加入 1:1 000 的 EGFR、MMP-2、 β -actin 一抗,4 °C 摇床孵育过夜。24 h 后取出 NC 膜, TBST 洗涤 5 min×3,加入 1:1 000 的 HRP 标记的二抗,室温下孵育 2 h 后用 TBST 洗涤 10 min×3,最后进行显影。计算各蛋白条带的灰度值,以目的基因灰度值/ β -actin 灰度值作为该蛋白含量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,采用单因素方差分析,然后用 LSD-t 法行组间两两比较,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 MTT 法检测各组细胞抑制率

Cetuximab 和 PTX 分别及联合作用于 CNE-1 细胞 24 h 后,细胞生长受到不同程度抑制。根据计算公式得出各组肿瘤细胞的抑制率,见表 1。B 组细胞抑制率为 (23.29±3.44)%, C 组为 (15.63±4.82)%, D 组为 (39.83±3.75)%, 单因素方差分析 $F=27.969$, $P=0.001$ 。结果表明 D 组的细胞抑制率明显高于 B 组及 C 组,差异有统计学意义 (P 值分别为 0.002、0.000)。进一步检测两药相互作用指数 (coefficient of drug interaction, CDI), CDI<1, 说明两药联用具有协同效应 [CDI 按下列公式计算: CDI=D/(B×C)。其中, D 为两药联合作用的 T/C 比值 (T/C 是给药组与对照组的吸光度比值); B、C 是药物单独作用组的 T/C 比值。当 CDI<1 时表明两药存在协同作用]。

表 1 MTT 法检测各组细胞的抑制率

Tab.1 Inhibitory rate in each group detected by MTT

药物 分组	A 值	抑制率 (%)	P 值 (组间两两比较)	
			B	C
A 组	1.115 0±0.061 7	—	—	—
B 组	0.854 1±0.013 4	23.29±3.44	—	—
C 组	0.938 9±0.002 3	15.63±4.82	0.060	—
D 组	0.669 5±0.005 1	39.83±3.75	0.002	0.000

注:—, 无相关数据

2.2 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率

图 1 为流式细胞仪检测各组细胞凋亡图片。统计学分析显示:各组细胞凋亡率分别为 $(3.43 \pm 0.20)\%$ 、 $(28.22 \pm 2.52)\%$ 、 $(22.0 \pm 1.05)\%$ 、 $(39.68 \pm 2.01)\%$,单因素方差分析 $F=237.706$, $P=0.000$ 。B、C、D 组凋亡率均较 A 组高(P 值均为 0.000);而 D 组的凋亡率明显高于 B、C 组,差异具有统计学意义(P 值均为 0.000)。

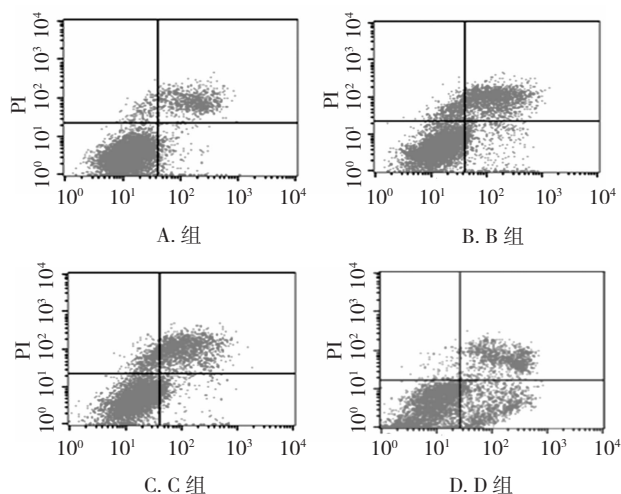


图 1 流式细胞仪检测各组细胞凋亡

Fig.1 Apoptosis in each group detected by flow cytometry

2.3 各组细胞 EGFR、MMP-2 的 mRNA 表达

图 2 为 RT-PCR 检测各组细胞 EGFR、MMP-2 的 mRNA 表达。各组 EGFR mRNA 相对含量分别为:1、 0.586 ± 0.045 、 0.431 ± 0.033 、 0.256 ± 0.066 ,单因素方差分析 $F=160.907$, $P=0.000$ 。经统计学分析后结果表明,B、C、D 组细胞的 EGFR mRNA 表达较 A 组减少(P 值均为 0.000),D 组的 EGFR mRNA 下调水平较 B、C 组明显(P 值分别为 0.000、0.001)。各组 MMP-2 mRNA 相对含量分别为:1.0、 0.571 ± 0.035 、 0.462 ± 0.040 、 0.250 ± 0.056 ,单因素方差分析 $F=201.958$, $P=0.000$ 。经统计学分析后结果表明,B、C、D 组细胞的 MMP-2 mRNA 表达较 A 组减少(P 值均为 0.000),D 组的 MMP-2 mRNA 下调水平较 B、C 组明显(P 值均为 0.000)。

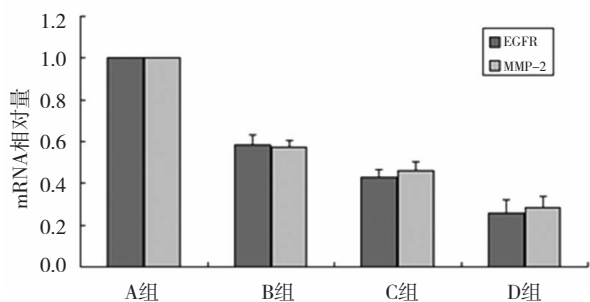


图 2 各组细胞 EGFR、MMP-2 的 mRNA 表达

Fig.2 mRNA expression of EGFR and MMP-2 in each group

2.4 各组细胞 EGFR、MMP-2 的蛋白表达

图 3 为 Western blot 法检测 EGFR、MMP-2 的蛋白表达。各组 EGFR 相对蛋白含量分别为: 0.778 ± 0.004 、 0.684 ± 0.011 、 0.571 ± 0.031 、 0.263 ± 0.014 ,单因素方差分析 $F=445.754$, $P=0.000$ 。经统计学分析后结果表明,B、C、D 组细胞的 EGFR 蛋白表达较 A 组减少(P 值均为 0.000),D 组的 EGFR 蛋白下调水平较 B、C 组明显(P 值均为 0.000)。各组 MMP-2 相对蛋白含量分别为: 0.597 ± 0.021 、 0.460 ± 0.011 、 0.375 ± 0.047 、 0.289 ± 0.020 ,单因素方差分析 $F=62.661$, $P=0.000$ 。经统计学分析后结果表明,B、C、D 组细胞的 MMP-2 蛋白表达较 A 组减少(P 值均为 0.000),D 组的 MMP-2 蛋白下调水平较 B、C 组明显(P 值分别为 0.000、0.006)。

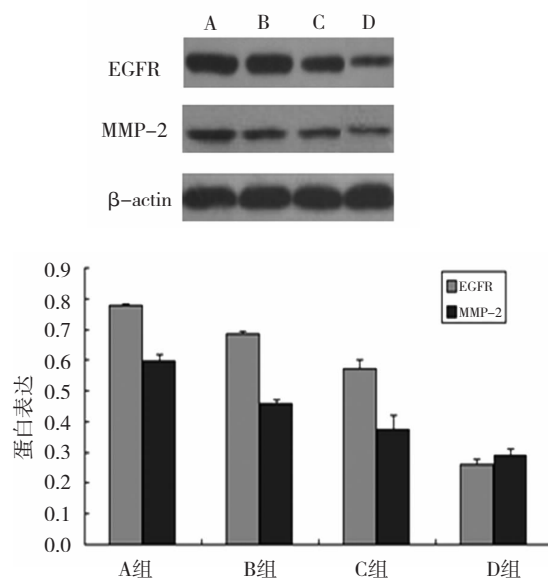


图 3 各组细胞 EGFR、MMP-2 的蛋白表达

Fig.3 Protein expression of EGFR and MMP-2 in each group

3 讨论

PTX 是头颈部肿瘤常用的化疗药物,属于细胞有丝分裂抑制剂,可诱导和促进微管蛋白聚合成微管,并抑制已形成的微管解聚,产生稳定的微管束。由于微管束的动态再生受阻,细胞在有丝分裂时不能形成正常的有丝分裂纺锤体,使肿瘤细胞阻滞于 G2/M 期,最终阻止有丝分裂的完成,从而抑制细胞的分裂与增殖^[4]。Cetuximab 是一种 EGFR 的新型人鼠嵌合型单克隆抗体,可与细胞表面的 EGFR 特异性结合,竞争性阻断 EGFR 与表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)及其他配体(如转化生长因子 n)的结合,从而阻断 EGFR 依赖的肿瘤细胞增殖、侵袭、转移以及血管生成等生物学效应^[5-6]。Cetux-

imab 已被作为治疗进展期头颈部鳞癌的分子靶向药物应用于临床,与放疗、化疗联合应用可增强疗效^[7-9]。

尽管 PTX 和 Cetuximab 均能够促进 NPC 细胞的凋亡,但两药单用时并不能完全阻断肿瘤细胞的增殖过程,无法有效地控制 NPC 的浸润和发展^[10]。临床研究显示:Cetuximab 联合 PTX 用于治疗晚期头颈部鳞状细胞癌疗效优于两药单用^[11],但两药联合应用对 NPC 细胞增殖、凋亡的影响及可能的分子机制目前仍缺乏相关的研究。

在本实验中用 Cetuximab 和 PTX 分别及共同处理人 NPC CNE-1 细胞株,通过 MMT 法和流式细胞仪来检测各药物处理后 CNE-1 细胞株的抑制率和凋亡率。结果显示,Cetuximab 组、PTX 组及联合用药组的细胞增殖均低于空白对照组,促进细胞凋亡。进一步比较联合用药组与单药组的细胞增殖和凋亡,发现两药联合应用能够更明显地抑制肿瘤细胞的增殖,促进细胞凋亡,CDI<1,说明两药联用具有协同作用。

目前,Cetuximab 与 PTX 协同抗肿瘤作用的机制尚未阐明,其潜在作用的分子靶点尚不清楚。探寻在 NPC 细胞增殖、凋亡过程中的关键分子,有助于寻找更为有效的生物治疗靶点^[12]。MMP-2 属于蛋白酶家族,是参与细胞外基质降解的关键分子,与肿瘤细胞向周围的浸润密切相关^[13]。EGFR 属酪氨酸蛋白激酶类受体家族,参与肿瘤细胞多种信号通路的转导,通过下游 PI3K、ERK、NF- κ B 等信号通路来介导细胞的增殖过程^[14]。本研究通过 RT-PCR 法和 Western blot 法检测各组 CNE-1 细胞的 EGFR、MMP-2 mRNA 和蛋白含量,结果显示 Cetuximab 和 PTX 均能抑制 CNE-1 细胞 EGFR、MMP-2 的表达,但在联合用药组中对 EGFR、MMP-2 的抑制作用更明显,进一步从分子水平证明两者联用具有协同作用的机制。本实验结果提示:下调肿瘤细胞 EGFR、MMP-2 可能是 Cetuximab 和 PTX 联用发挥协同抗肿瘤作用的分子机制,同时也为临床上 NPC 的全身治疗提供了新的分子靶点。

综上所述,Cetuximab 联合 PTX 能够明显抑制人 NPC CNE-1 细胞的增殖,促进细胞凋亡,这一作用可能是通过抑制 EGFR、MMP-2 的表达来实现。本研究为 NPC 的综合治疗提供了一定的实验依据,但还需要进一步的动物实验来验证这一结论。

参 考 文 献

- [1] Chan AT. Nasopharyngeal carcinoma[J].Annals of Oncology,2010,21(7):308-312.
- [2] Jakob M,Manz M,Herberhold S,et al.Treatment results of nasopharyngeal carcinoma in adults[J].HNO,2012,60(12):1075-1081.
- [3] 李高峰,李桂生,宁四海,等.小剂量紫杉醇同步化疗联合调强放疗治疗复发性鼻咽癌[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(16):241-242.
- [4] Tan P,Liu Y,Qiu Y,et al.Synergistic interactions of TRAIL and paclitaxel on the nasopharyngeal carcinoma cell lines in vitro[J].Journal of Clinical Otolaryngology Head and Neck Surgery,2012,26(7):319-322.
- [5] Larbouret C,Gaborit N,Chardès T,et al.In pancreatic carcinoma, dual EGFR/HER2 targeting with cetuximab/trastuzumab is more effective than treatment with trastuzumab/erlotinib or lapatinib alone;implication of receptors 'down-regulation and dimers' disruption[J].Neoplasia,2012,14(2):121-130.
- [6] Iida M,Brand TM,Starr MM,et al.Sym004,a novel EGFR antibody mixture,can overcome acquired resistance to cetuximab[J].Neoplasia,2013,15(10):1196-1206.
- [7] Christy AW,Bojan A.Targeted therapy:A novel approach in head and neck cancer[J].Indian J Dent Res,2013,24(2):261-266.
- [8] Cripps C,Winquist E,Devries MC,et al.Epidermal growth factor receptor targeted therapy in stages III and IV head and neck cancer[J].Curr Oncol,2010,17(3):37-48.
- [9] Bourhis J,Lefebvre JL,Vermorken JB.Cetuximab in the management of locoregionally advanced head and neck cancer;expanding the treatment options[J].Eur J Cancer,2010,46(11):1979-1989.
- [10] Zuo Q,Shi M,Chen J,et al.The Ras signaling pathway mediates cetuximab resistance in nasopharyngeal carcinoma[J].Biomed Pharmacother,2011,65(3):168-174.
- [11] Jiménez B,Trigo JM,Pajares BI,et al.Efficacy and safety of weekly paclitaxel combined with cetuximab in the treatment of pre-treated recurrent/metastatic head and neck cancer patients[J].Oral Oncology,2013,49(2):182-185.
- [12] Liu D,Chen C,Hu G,et al.Specific targeting of nasopharyngeal carcinoma cell line CNE1 by C225-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles with magnetic resonance imaging[J].Acta Biochim Biophys Sin(Shanghai),2011,43(4):301-306.
- [13] Li X,Wu JF.Recent developments in patent anti_cancer agents targeting the matrix metalloproteinases (MMPs)[J].Recent Pat Anticancer Drug Discov,2010,5(2):109-141.
- [14] Siena S,Sartore-Bianchi A,Di Nicolantonio F,et al.Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer[J].J Natl Cancer Inst,2009,101(19):1308-1324.

(责任编辑:冉明会)