

磷脂酰肌醇 3 激酶抑制剂对三阴性乳腺癌细胞增殖及迁移的影响

唐小飞¹, 姜立花², 曾凡新², 傅洁民², 董志¹

(1. 重庆医科大学生物化学与分子药理学重点实验室, 重庆 400016;

2. 重庆复创医药研究有限公司药理与毒理实验室, 重庆 400061)

【摘要】目的:为了研究磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphoinositide 3 kinase, PI3K)抑制剂单用及其联合表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)抑制剂对三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)细胞增殖、迁移的影响。**方法:**通过细胞增殖实验、克隆形成实验、细胞划痕愈合实验、流式细胞仪以及 ELISA 实验来分析 PI3K 抑制剂 PF-04691502(以下简称为 PF)单用或与 EGFR 抑制剂吉非替尼联合抗 TNBC 细胞(HCC1937 和 MDA-MB 231)增殖、迁移的影响。**结果:**PF 可显著抑制 TNBC 细胞的增殖, 对 TNBC 细胞克隆的形成、迁移和蛋白激酶 B[(protein kinase B, PKB), 又名 Akt]的磷酸化均有显著抑制作用($P<0.05$), 并可将 TNBC 细胞阻滞于 G1 期($P<0.05$)。小剂量 PF 联合 EGFR 抑制剂吉非替尼可协同抑制 TNBC 细胞的增殖、克隆形成、迁移及 Akt 的磷酸化。**结论:**PI3K 抑制剂单用可显著抑制 TNBC 细胞的增殖、克隆形成和迁移, 与 EGFR 抑制剂合用可形成明显的协同效应。其作用机制可能与其降低 Akt 磷酸化水平及 G1 期细胞周期阻滞作用有关。

【关键词】磷脂酰肌醇 3 激酶; 三阴性乳腺癌; 靶向治疗; 表皮生长因子受体; 吉非替尼; 联合治疗

【中国图书分类号】R965.1; R966; R969.2; R979.1+9

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-11-15

Effects of phosphoinositide 3-kinase inhibitor on the proliferation and migration of triple-negative breast cancer cell lines

TANG Xiaofei¹, JIANG Lihua², ZENG Fanxin², FU Jieming², DONG Zhi¹

(1. Key Laboratory of Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University;

2. Center of Pharmacology and Toxicology, Chongqing Fochon Pharmaceutical CO., LTD)

【Abstract】Objective: To study the effects of phosphoinositide 3kinase(PI3K) inhibitor alone and in combination with epidermal growth factor receptor(EGFR) inhibitor on the proliferation and migration of triple-negative breast cancer(TNBC) cell lines. **Methods:** Effects of PF-04691502(PF), a PI3K inhibitor, alone or in combination with gefitinib, a EGFR inhibitor, on the proliferation and migration of TNBC cell lines(HCC1937 and MDA-MB 231) were measured by the proliferation, colony formation, wound-healing, flow cytometry and ELISA. **Results:** PF prevented the proliferation, colony formation and migration of TNBC cell lines, inhibited the protein kinase B(PKB or Akt) phosphorylation of these cell lines and retarded the cells in G1 phase($P<0.05$). Significant synergistic effects were observed when in combination with gefitinib, a EGFR inhibitor. **Conclusions:** PI3K inhibitor when used alone could prevent the proliferation, colony formation and migration of TNBC cell lines and when used in combination with EGFR inhibitors could form significant synergistic effects, mechanisms of which may relate with its inhibition of Akt phosphorylation and G1 phase arrest.

【Key words】phosphoinositide 3kinase; triple-negative breast cancer; target therapy; epidermal growth factor receptor; gefitinib; combined therapy

三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)与其它乳腺癌亚型相比,其肿块直径较大,复发率较高,预后较差,常发生远处转移,是否转移与肿瘤的大小无关^[1-3];由于 TNBC 中雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone re-

ceptor, PR)和人表皮生长因子受体-2(human epidermal growth factor receptor-2, HER-2)均为阴性表达,因此现有的靶向药物对其治疗效果不佳,迫切需要寻找到新的靶向药物。研究发现^[4],磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphoinositide 3kinase, PI3K)信号通路在调节细胞功能和相关基因的表达中起着重要的作用;其中 PIK3CA 基因的突变或 10 号染色体丢失的磷酶基因及张力蛋白同源物(phosphatase and tension

作者介绍:唐小飞, Email: xf-tang@126.com,

研究方向:新药筛选与药理毒理研究。

通信作者:董志, Email: zhidong073@hotmail.com。

homolog detected on chromosome ten, PTEN) 基因的缺失而引起 PI3K/蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB), 又名 Akt/雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路异常的活化, 与 TNBC、非小细胞肺癌等多种肿瘤的发展都有着密切的关系; 因此目前处于临床 II 期阶段的小分子化合物 PF-04691502 (以下简称为 PF)^[9] 作为一个全新的双重 PI3K/mTOR 抑制剂, 可以通过抑制 Akt 和 mTOR 蛋白的磷酸化, 进而抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 因此 PF 有可能对 TNBC 抑制作用。

Corkery 等^[6] 研究发现 TNBC 中表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 的表达异常增高, 但是单一的 EGFR 抑制剂吉非替尼对 TNBC 细胞的抑制活性并不理想。因此, 通过 PF 将 PI3K/Akt/mTOR 信号通路阻断的同时再给予吉非替尼, 来探讨其是否具有协同抗 TNBC 的作用, 为其运用于 TNBC 的临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RPMI1640 购自 Gibco (Lot#1002646, 美国); DMEM 购自 Gibco (Lot#900149, 美国); 新型四唑盐 [3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfonyl)-2H-tetrazolium, MTS] 购自 Promega (Cell Titer 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Lot#0000009269, 美国); 胎牛血清购自 Gibco (FBS, Lot#1069982, 美国); 胰蛋白酶购自 Sigma (Lot#081M1274V, 美国); 人 P-Akt (S473) ELISA kit 购自南通飞宇生物技术有限公司 (Lot#05/2012, 中国); PF-04691502 来自重庆复创医药研究有限公司 (用 PF 来表示, CAS: 1013101-36-4, 纯度 $\geq 99\%$, 中国); 吉非替尼购自 Adamas-beta (用 G 来表示, Lot#P01036), 浓度均为 20 mmol/L 的二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶液。

PF 的分子式为: 2-Amino-8-[trans-4-(2-hydroxyethoxy)cyclohexyl]-6-(6-methoxy-3-pyridinyl)-4-methylpyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-one。

1.2 细胞株

人 TNBC 细胞株 HCC1937 和 MDA-MB 231 购自上海中科院细胞库。HCC1937 细胞用 RPMI1640 培养基, MDA-MB 231 用 DMEM 培养基, 均含有 10% FBS, 于 37 °C 和 5% CO₂ 条件下进行培养。倒置显微镜下观察细胞生长到约 80% 时, 以 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 隔日换液, 3~4 d 传代 1 次。

1.3 细胞增殖实验

取 HCC1937 和 MDA-MB 231 细胞分别以 3 000 个/孔和 1 000 个/孔接种至 96 孔板中。将其置于 CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 加入不同浓度的 PF (1.0、0.5、0.1 $\mu\text{mol/L}$) 以及 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMSO; 每组实验设 6 个复孔。在 CO₂ 培养箱中培养 5 d 后, 将其置换为无 FBS 的培养基 100 μL /孔, 并加入

MTS, 10 μL /孔, 37 °C 孵育 2 h, 测定 490 nm 波长处的吸光度 (absorbance, A) 值, 按下式计算百分抑制率, 实验重复 3 次。肿瘤细胞生长抑制率 (f_a)% = [(实验对照组 A 值 - 给药组 A 值)/(实验对照组 A 值 - 空白对照组 A 值)] $\times 100\%$ 。

1.4 细胞迁移能力的检测

根据文献[7], 取 HCC1937 和 MDA-MB 231 细胞分别以 100 万个/孔和 30 万个/孔接种于 6 孔板中 (预先在 6 孔板背面划 3 条平行线)。孵育 24 h 后, 用 10 μL 枪头在细胞平面上垂直于背侧线划 3 条平行线, 弃去培养基, 用 PBS 冲洗 2 次。其中对照组加入 DMSO (1.0 $\mu\text{mol/L}$), 实验组加入 PF (1.0、0.5、0.1 $\mu\text{mol/L}$), 血清浓度为 0.2%, 并在 37 °C 进行孵育, 并于 0 h 和 24 h 时间点在划痕的十字交叉处进行拍照 (即每组为 9 个点), 比较不同处理条件对细胞迁移能力的影响。

1.5 细胞克隆形成率的检测

根据文献[8], 取 HCC1937 和 MDA-MB 231 细胞以 300 个/孔接种于 6 孔板中。在 CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 设置 1 个空白对照组 (有细胞, 不加药物) 和 1 个 DMSO (1.0 $\mu\text{mol/L}$) 对照组, 再以 PF (1.0、0.5、0.1 $\mu\text{mol/L}$) 为实验组, 每组设 3 个复孔。在 CO₂ 培养箱中继续培养 24 h 后, 弃去含药物的条件培养基, PBS 洗 2 次, 加入完全培养基培养 7 d, 在倒置显微镜下对细胞数大于 50 个的克隆进行计数, 实验重复 3 次, 并按下式计算克隆百分率: 克隆百分率 (%) = (实验组克隆数/空白对照组克隆数) $\times 100\%$ 。

1.6 流式细胞仪分析细胞周期

不同浓度的 PF (1.0、0.5、0.1 $\mu\text{mol/L}$) 以及 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMSO 干预 48 h 后, 收集细胞 1×10^6 个, 加入预先准备好的 0.7 ml 冰乙醇中; 混匀固定, 4 °C 放置过夜。上机前, 收集所有固定标本, 离心弃上清, PBS 洗后, 加入碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染液 (50 mg/L) 含有 RNase (1 g/L) 避光室温染色 30 min, 上机检测。

1.7 对 PF 与吉非替尼的联合作用进行检测

1.7.1 MTS 法检测联合作用 根据细胞增殖实验的方法测算出 PF 和吉非替尼的半数有效量 (ED₅₀), 并根据其 ED₅₀ 的比值作为联合给药的比例; 再分别按照上述实验方法, 检测其联合给药对 TNBC 细胞增殖、克隆的形成以及迁移等的影响。

1.7.2 ELISA 试剂盒检测人磷酸化 Akt 水平 用 DMSO、吉非替尼、PF 及吉非替尼+PF 处理细胞 1 h 后, 胰酶消化, PBS 洗 3 次, 裂解细胞, 5 000 r/min 离心 15 min, 取上清液按照人 P-Akt (S473) ELISA 试剂盒说明书进行检测, 绘制 P-Akt 标准曲线, 并计算 Akt 磷酸化水平。

1.8 统计学处理

实验结果用均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS 17.0 进行方差分析, 两两比较采用 LSD-t 法, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

药物联合作用效果通过 Chou-Talalay 中效原理^[10] 进行评价, 其原理为: 中效方程 $fa/fu = (D/D_m)_m$ 取对数转化为线性方程 $lg(fa/fu) = mlg(D) - mlg(D_m)$ (fa 为百分抑制率, $fu = 1 - fa$, m 为方程斜率, D 为药物的浓度, D_m 为中效浓度)。药物联合作用指数 (combine index, CI) 的计算公式为:

$$CI = \frac{(D)_1}{(Dx)_1} + \frac{(D)_2}{(Dx)_2} = \frac{(D)_1}{(D_m)_1 [fa/(1-fa)]^{1/m1}} + \frac{(D)_2}{(D_m)_2 [fa/(1-fa)]^{1/m2}}$$

两药单用产生 X 效应时所需浓度分别为 $(Dx)_1$ 和 $(Dx)_2$, 两药合用产生 X 效应所需浓度 $Dx(1,2)$ 均由“中效方程”求得; 两药合用时产生 X 效应所需浓度为 $(D)_1$ 和 $(D)_2$, 通过 $(D)_1 + (D)_2 = Dx(1,2)$ 计算; 剂量减少指数 (dose reduce index, DRI) 的计算式为: $DRI_n = (Dx)_n / (D)_n$ 。在联合作用中, 当 CI 值 > 1 时, 即表现为拮抗作用; 当 CI 值 $= 1$ 时, 即表现为相加作用; 当 CI 值 < 1 时, 即表现为协同作用。

2 结果

2.1 PI3K 抑制剂 PF 对 TNBC 细胞增殖的影响

不同浓度的 PF (1.0、0.5、0.1 $\mu\text{mol/L}$) 处理 HCC1937 和 MDA-MB 231 细胞 5 d 后, MTS 方法检测结果如图 1 所示; 试验组与 DMSO 组相比, 细胞增殖活性明显降低且表现出浓度依赖的抑制效果。

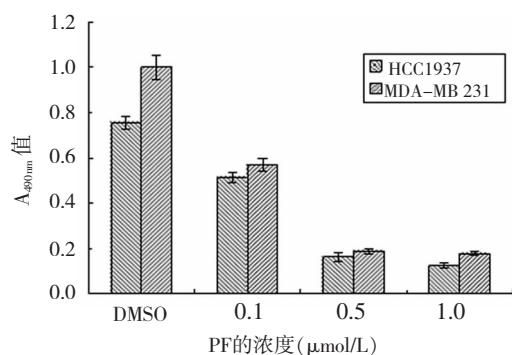


图 1 PF 对 TNBC 细胞增殖的影响

Fig.1 Effects of PF on proliferation of TNBC cells

2.2 PI3K 抑制剂 PF 对 TNBC 细胞迁移能力的影响

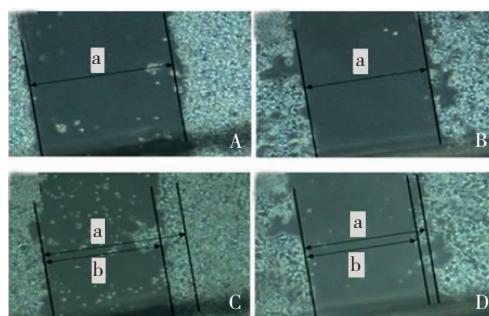
细胞划痕愈合实验结果显示 (表 1 和图 2), PF (1.0、0.5、0.1 $\mu\text{mol/L}$) 能够显著抑制 HCC1937 和 MDA-MB 231 细胞的迁移能力; 与对照组相比, 其迁移的距离具有显著性差异 ($P < 0.05$) 且结果显示 PF 对 MDA-MB 231 细胞迁移能力的影响比 HCC1937 更强。

表 1 PF 对 TNBC 细胞迁移能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Tab.1 Effects of PF on ability of migration of TNBC cells ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别 (浓度)	迁移距离 (cm)	
	HCC1937	MDA-MB 231
DMSO (1.0 $\mu\text{mol/L}$)	0.69 $\pm$ 0.13	0.48 $\pm$ 0.11
PF (1.0 $\mu\text{mol/L}$)	0.17 $\pm$ 0.04 ($P_1=0.000$)	0.14 $\pm$ 0.04 ($P_4=0.000$)
PF (0.5 $\mu\text{mol/L}$)	0.40 $\pm$ 0.08 ($P_2=0.000$)	0.21 $\pm$ 0.09 ($P_5=0.000$)
PF (0.1 $\mu\text{mol/L}$)	0.55 $\pm$ 0.08 ($P_3=0.002$)	0.39 $\pm$ 0.05 ($P_6=0.022$)

注: 方差分析中, F 值 = 53.413/36.135; 分别与 DMSO 组相比, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义



a. 0 h 时的划痕距离; b. 24 h 时的划痕距离; A、C. DMSO (1.0 $\mu\text{mol/L}$) 处理 HCC1937 细胞 0 h 和 24 h; B、D. PF (1.0 $\mu\text{mol/L}$) 处理 HCC1937 细胞 0 h 和 24 h (40 $\times$)

图 2 用倒置荧光显微镜分析 PF 对 TNBC 细胞迁移能力的影响 (40 $\times$)

Fig.2 Effects of PF on TNBC cell migration analyzed by inverted fluorescence microscope (40 $\times$)

2.3 PI3K 抑制剂 PF 对 TNBC 细胞克隆形成的影响

实验结果表明 (表 2), PI3K 抑制剂 PF 对 TNBC 细胞克隆的形成具有抑制作用, 而对 HCC1937 的抑制作用比 MDA-MB 231 更强, 与 DMSO 组相比, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 PF 均能显著抑制 TNBC 细胞 (HCC1937 和 MDA-MB 231) 克隆的形成。

表 2 PF 对 TNBC 细胞克隆形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

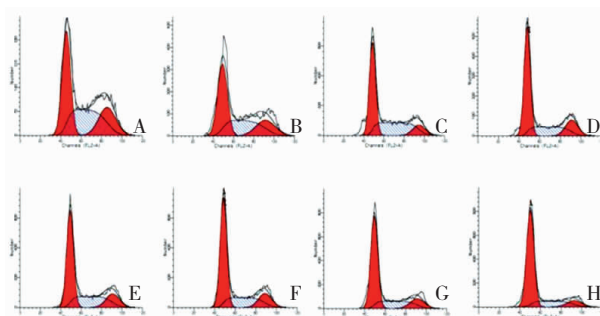
Tab.2 Effects of PF on colony formation of TNBC cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别 (浓度)	克隆百分率 (%)	
	HCC1937	MDA-MB 231
DMSO (1.0 $\mu\text{mol/L}$)	93.37 $\pm$ 4.21	95.93 $\pm$ 3.49
PF (1.0 $\mu\text{mol/L}$)	8.53 $\pm$ 3.08 ($P_1=0.000$)	21.75 $\pm$ 9.95 ($P_4=0.000$)
PF (0.5 $\mu\text{mol/L}$)	48.14 $\pm$ 7.67 ($P_2=0.000$)	72.71 $\pm$ 6.93 ($P_5=0.005$)
PF (0.1 $\mu\text{mol/L}$)	79.87 $\pm$ 7.79 ($P_3=0.026$)	88.91 $\pm$ 7.37 ($P_6=0.273$)

注: 方差分析中, F 值 = 116.415/63.002; 分别与 DMSO 组相比, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义

2.4 PI3K 抑制剂 PF 对 TNBC 细胞周期的影响

实验结果表明 (图 3 和表 3), PI3K 抑制剂 PF 对 TNBC 细胞表现出 G1 期阻滞作用, 且作用呈浓度依赖性; 其中实验组 (PF 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 和 1.0 $\mu\text{mol/L}$) 与对照组 (DMSO 1.0 $\mu\text{mol/L}$) 相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。



A~D. HCC1937 细胞, E~H. MDA-MB231 细胞; A、E. DMSO (1.0 $\mu\text{mol/L}$), B、F. PF (0.1 $\mu\text{mol/L}$), C、G. PF (0.5 $\mu\text{mol/L}$), D、H. PF (1.0 $\mu\text{mol/L}$)

图 3 PF 对 TNBC 细胞周期的影响

Fig.3 Effects of PF on the phase retardation of TNBC cells

表 3 PF 对 TNBC 细胞 G1 期的阻滞作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.3 G1 phase retardation in TNBC cells induced by PF

组别 (浓度)	HCC1937	MDA-MB 231
DMSO (1.0 $\mu\text{mol/L}$)	40.4 $\pm$ 1.3	54.8 $\pm$ 2.6
PF (0.1 $\mu\text{mol/L}$)	45.6 $\pm$ 1.6 ($P_1=0.064$)	59.2 $\pm$ 2.5 ($P_4=0.053$)
PF (0.5 $\mu\text{mol/L}$)	49.4 $\pm$ 3.7 ($P_2=0.006$)	63.1 $\pm$ 2.1 ($P_5=0.003$)
PF (1.0 $\mu\text{mol/L}$)	57.6 $\pm$ 4.1 ($P_3=0.000$)	71.4 $\pm$ 2.3 ($P_6=0.000$)

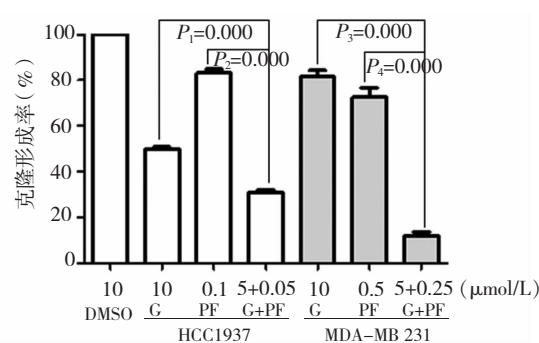
注:方差分析中, F 值=17.973/26.478;分别与 DMSO 组相比, $P<0.05$ 为差异有统计学意义

2.5 吉非替尼联合 PF 抗 TNBC 细胞的作用

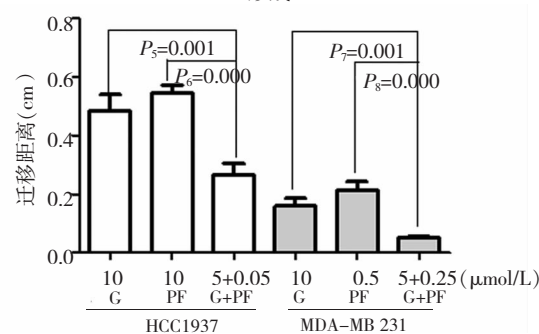
2.5.1 吉非替尼联合 PF 协同抗 TNBC 细胞增殖的作用 实验研究发现 EGFR 抑制剂吉非替尼抑制 HCC1937 和 MDA-MB 231 细胞的 ED_{50} 分别为 9.06 $\mu\text{mol/L}$ 和 9.75 $\mu\text{mol/L}$ (表 4), 药物联合作用实验发现:当吉非替尼联合 PF 处理 HCC1937 和 MDA-MB 231 细胞时 (联合比例分别为 100:1 和 10:1), 表现出了协同抑制作用 ($\text{CI}<1$); 而且在 HCC1937 细胞中, ED_{50} 处吉非替尼和 PF 的剂量分别降低了 3.26 倍和 3.81 倍 (DRI 值); 在 MDA-MB 231 细胞中也分别降低了 4.75 倍和 1.96 倍。

2.5.2 吉非替尼联合 PF 对 TNBC 细胞克隆形成及迁移的影响 首先根据 ELISA 实验结果, 得到 P-Akt 与 A 值之间的线性关系为: $y=0.0016x+0.0054$, $R^2=0.9991$, 并计算出样品的 P-Akt 含量。

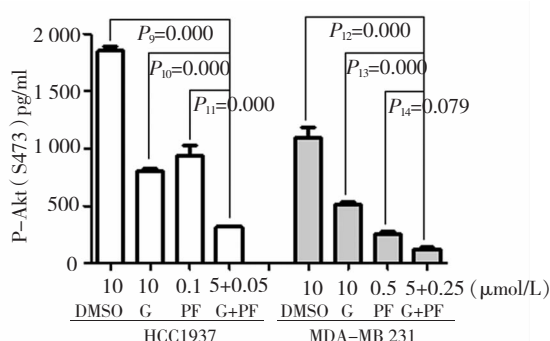
实验结果表明 (图 4A~C), 吉非替尼+PF[(5.00+0.05) $\mu\text{mol/L}$] 处理 HCC1937 细胞后, 克隆形成率为仅为 (31.05 $\pm$ 1.54)%, 较 10 $\mu\text{mol/L}$ 的吉非替尼和 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的 PF 显著降低 ($P<0.01$); 而且联合给药组与单一给药组相比, HCC1937 细胞的迁移能力和 Akt 的磷酸化水平均显著降低 ($P<0.01$)。此外, 吉非替尼+PF[(5.00+0.25) $\mu\text{mol/L}$] 对 MDA-MB 231 细胞克隆形成率仅为 (12.24 $\pm$ 2.25)%, 较其它组均显著降低 ($P<0.01$); 其对 MDA-MB 231 细胞迁移能力和 Akt 的磷酸化水平也有显著的影响 ($P<0.01$)。



A. 形成



B. 迁移



C. Akt 磷酸化

G 为吉非替尼; 方差分析中, F_A 值=576.645/174.525, F_B 值=17.217/45.186, F_C 值=164.285/83.789; 两两比较中 $P<0.05$, $P<0.01$ 为差异有统计学意义

图 4 吉非替尼联合 PF 对 TNBC 细胞克隆的影响
Fig.4 Effects of gefitinib in combination with PF on Akt phosphorylation induced by colony formation

表 4 吉非替尼联合 PF 对 TNBC 细胞增殖的影响

Tab.4 Effects of gefitinib in combination with PF on the proliferation of TNBC cells

组别	样品	ED_{50} ($\mu\text{mol/L}$)	m	r	CI 值			DRI 值 (ED_{50})	
					ED_{50}	ED_{75}	ED_{90}	$\text{DRI}_{(G)}$	$\text{DRI}_{(PF)}$
HCC1937	G	9.05 6	1.24	0.998 8					
	PF	0.106	1.41	0.997 1					
	G:PF (100:1)	2.80 9	1.32	0.991 6	0.57	0.24	0.10	3.26	3.81
MDA-MB 231	G	9.75 4	1.75	0.951 8					
	PF	0.402	1.59	0.992 5					
	G:PF (10:1)	2.25 9	1.54	0.998 3	0.72	0.33	0.15	4.75	1.96

注:G 为吉非替尼, m 为方程斜率, r 为相关系数

3 讨 论

TNBC 与临床上其它亚型的乳腺癌相比,其复发率、远处转移率及死亡率均较高^[6,10]。研究表明^[11-12],由于在 TNBC 中常发生 PIK3CA 基因的突变以及 PTEN 基因的缺失,因此当 EGFR 与配体结合形成二聚体后,更易发生 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的活化,使 Akt 等关键蛋白分子磷酸化,进一步促进细胞的增殖和迁移等。因此,PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制剂可能是 TNBC 的一种有效治疗药物。PF 作为一个 PI3K/mTOR 双重抑制剂,在治疗 TNBC 及多种晚期癌症中均表现出良好的疗效。本实验结果表明:PF 能显著抑制 TNBC 细胞的增殖、克隆的形成及迁移。因此,推测 PF 抑制 TNBC 细胞增殖和迁移的机制可能与其抑制了 Akt 的磷酸化及诱导细胞 G1 期阻滞等有关。

研究表明^[6],TNBC 中 EGFR 的表达量较正常细胞及其它亚型的乳腺癌细胞显著升高,而且 EGFR 抑制剂吉非替尼可以降低 TNBC 细胞丝裂原活化蛋白激酶和 Akt 的磷酸化,并诱导细胞 G1 期阻滞作用。实验研究发现,尽管吉非替尼对 EGFR 激酶有很强的抑制作用(ED_{50} 为 18 nmol/L),但其单用于 TNBC 细胞的增殖抑制活性并不佳(ED_{50} 约为 10 μ mol/L)。当将其与 PI3K 抑制剂 PF 联合给药时,却表现出了良好的协同效应。PF 与吉非替尼协同抗 TNBC 的作用机制可能为:吉非替尼通过阻断 EGFR-RAS 信号通路,抑制了其下游信号分子的信号转导功能;吉非替尼间接抑制了 RAS 对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的激活作用;PF 直接抑制了 PI3K/Akt/mTOR 信号通路上 PI3K 和 mTOR 两个分子的磷酸化而使该信号通路被阻断。因此,吉非替尼与 PF 联合给药就使得 EGFR-RAS 和 PI3K/Akt/mTOR 信号通路均被阻断,使其下游调节细胞功能的 Akt 等关键蛋白的磷酸化水平显著降低,进而抑制了细胞生长、增殖和迁移,并表现出了两药协同抗 TNBC 的作用。

本研究结果表明,PI3K 抑制剂对 TNBC 细胞具有良好的抑制活性且当其与 EGFR 抑制剂联合给药时又具有协同抗 TNBC 细胞增殖、克隆的形成及迁移的作用。后续研究中将进一步探讨 PI3K 抑制剂单用及其联合 EGFR 抑制剂在体内动物模型中抗 TNBC 的作用及其作用机制,从而为 PI3K 抑制剂的后续研发以及 TNBC 的临床治疗提供更多的

实验依据。

参 考 文 献

- [1] Thike A A, Cheok P Y, Jara Lazaro A R, et al. Triple negative breast cancer: clinicopathological characteristics and relationship with basal like breast cancer[J]. *Mod Pathol*, 2010, 23(1): 123-133.
- [2] 姜小良, 张 徽, 刘香丽, 等. 曲古菌素 A 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的作用[J]. *重庆医科大学学报*, 2008, 33(3): 312-316.
- [3] Jiang X L, Zhang H, Liu X L, et al. The investigation of effect of trichostatin A to breast cancer MDA-MB-231 cell line[J]. *Journal of Chongqing Medical University*, 2008, 33(3): 312-316.
- [4] 冯红蕾, 王 科, 孙笑笑, 等. 骨形态发生蛋白 9 对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖与凋亡的作用研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2010, 35(11): 1619-1623.
- [5] Feng H L, Wang K, Sun X X, et al. The effects of BMP9 expressions on proliferation and apoptosis of human breast cancer cell line MDA-MB-231[J]. *Journal of Chongqing Medical University*, 2010, 35(11): 1619-1623.
- [6] Fan Q W, Cheng C K, Nicolaides T P, et al. A dual phosphoinositide-3-kinase α /mTOR inhibitor cooperates with blockade of epidermal growth factor receptor in PTEN-mutant glioma[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(17): 7960-7965.
- [7] Yuan J, Mehta P P, Yin M J, et al. PF-04691502, a potent and selective oral inhibitor of PI3K and mTOR kinases with antitumor activity[J]. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10(11): 2189-2199.
- [8] Corkery B, Crown J, Clynes M, et al. Epidermal growth factor receptor as a potential therapeutic target in triple-negative breast cancer[J]. *Annals of Oncology*, 2009, 20(5): 862-867.
- [9] Thompson C C, Ashcroft F J, Patel S, et al. Pancreatic cancer cells over-express gelsolin family-capping proteins, which contribute to their cell motility[J]. *Gut*, 2007, 56(1): 95-106.
- [10] Weigel M T, Dahmke L, Schem C, et al. In vitro effects of imatinib mesylate on radiosensitivity and chemosensitivity of breast cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 412-425.
- [11] Chou T C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies[J]. *Pharmacol Rev*, 2006, 58(3): 621-681.
- [12] Silver D P, Richardson A L, Eklund A C, et al. Efficacy of neoadjuvant cisplatin in triple-negative breast cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(7): 1145-1153.
- [13] Kallergi G, Agelaki S, Kalykaki A, et al. Phosphorylated EGFR and PI3K/Akt signaling kinases are expressed in circulating tumor cells of breast cancer patients[J]. *Breast Cancer Res*, 2008, 10(5): R80.
- [14] Marty B, Maire V, Gravier E, et al. Frequent PTEN genomic alterations and activated phosphatidylinositol 3-kinase pathway in basal-like breast cancer[J]. *Breast Cancer Research*, 2008, 10(6): R101.

(责任编辑: 关蕴良)