

IGF-1R 抑制剂与厄洛替尼对 卵巢上皮性癌 HO-8910 细胞凋亡的影响

卫爱宁¹, 许荣华¹, 庄雅丽¹, 高 萍¹, 任 梅¹, 王晓华²

摘要 目的 观察单用胰岛素样生长因子 1 型受体 (IGF-1R) 抑制剂鬼臼苦素 (PPP) 或联合表皮生长因子受体抑制剂厄洛替尼对卵巢上皮性癌 HO-8910 细胞的影响。方法 使用 PPP 处理 HO-8910 细胞后, 采用 SRB 法检测细胞的增殖情况; PI 染色法检测细胞周期; Annexin-V 和 PI 双染检测细胞凋亡; 依据中效原理, 使用 CombiDrug 软件分析 PPP 与厄洛替尼的协同作用。结果 PPP 可抑制 HO-8910 细胞增殖, 呈现时间剂量依赖性, 其抑制作用与诱导细胞 G₂/M 期阻滞和凋亡相关; PPP 联合厄洛替尼较单用 PPP 或厄洛替尼能显著抑制 HO-8910 细胞增殖, 两者联合具有协同作用。结论

特异性抑制 IGF-1R 可以抑制卵巢癌细胞生长, 诱导其凋亡; 在卵巢癌的治疗中, IGF-1R 和 EGFR 可能具有联合靶向治疗价值。

关键词 卵巢上皮性癌; 胰岛素样生长因子 1 型受体; 表皮生长因子受体; 靶向治疗

中图分类号 R 711.75; R 737.31

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2012)09-1043-04

卵巢癌是常见的女性生殖器官恶性肿瘤, 发病率仅次于子宫颈癌和子宫体癌, 病死率居各类妇科肿瘤的首位, 对妇女生命造成严重威胁^[1]。铂类和紫杉醇联合是当前卵巢癌治疗的首选药物治疗方案, 但大部分患者对铂类药物耐药。解析卵巢癌的化疗耐药机制, 寻找特异有效的治疗靶点在卵巢癌的治疗中尤其重要。研究^[2]表明 60% 的卵巢上皮性癌 (epithelial ovarian cancer, EOC) 过表达表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR), 可能与卵巢癌对铂类药物的耐药有关。

该研究观察特异性胰岛素样生长因子 1 型受体 (insulin-like growth factor-1 receptor, IGF-1R) 抑制剂鬼臼苦素 (picropodophyllin, PPP) 对 HO-8910 细胞的增殖和凋亡作用, 同时观察 PPP 联合 EGFR 抑

制剂厄洛替尼对 HO-8910 细胞生长的影响, 探讨 IGF-1R 和 EGFR 的联合靶向价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与细胞株 DMEM 培养基及胎牛血清 (南京凯基生物科技有限公司); PPP (英国 TOCRIS 公司); Annexin V-FITC 试剂盒 (上海明睿生物技术有限公司); 细胞周期与凋亡检测试剂盒 (上海碧云天生物科技有限公司); 磺酰罗丹明 B (美国 Sigma 公司), 厄洛替尼和卵巢癌细胞株 HO-8910 (由复旦大学药学院馈赠)。

1.1.2 主要仪器 SynergyTM HT 多功能酶标仪 (美国伯腾公司); 气套式细胞培养箱 311 型 (美国赛默飞世尔公司); 超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); 研究级倒置显微镜 IX71-A21PH (日本奥林巴斯公司); FACSCalibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HO-8910 细胞采用含 10% 胎牛血清及 100 u/ml 的青霉素、100 μg/ml 的链霉素的 DMEM 完全培养基在 37℃、5% CO₂ 条件下培养。

1.2.2 SRB 法检测细胞增殖 将处于对数生长期的肿瘤细胞以 90 μl/孔接种于 96 孔培养板, 贴壁生长 24 h 后再加入不同浓度 (0.0625、0.125、0.25、0.5、1 μmol/L) 的 PPP 和不同浓度 (2.5、5、10、20、40 μmol/L) 的厄洛替尼处理细胞, 对照组含 1% DMSO, 每个浓度设 3 复孔; 检测单药对细胞作用时, 加入不同浓度 (0.25、0.5、1、10 μmol/L) 的 PPP 处理细胞, 对照组含 1% DMSO; 37℃、5% CO₂ 条件下培养, 在设定的时间点 (48 h、72 h) 参照文献^[3] 使用 SRB 法检测细胞增殖。

1.2.3 细胞周期测定 收集 HO-8910 细胞并调整细胞密度为 4 × 10⁵/ml, 以 1 ml/孔接种于 6 孔板, 生长 24 h 后撤血清培养 24 h, 再使用含 0.1% DM-SO (对照组) 或者含 1 μmol/L PPP 的 DMEM 培养 36 h 后, 收集悬浮和贴壁细胞, PBS 洗涤后, 使用预冷的 70% 乙醇溶液 -20℃ 固定过夜, 按照试剂盒的说明书操作使用流式细胞仪检测细胞周期。

2012-03-13 接收

作者单位: ¹安徽医科大学妇幼保健临床学院 (合肥市妇幼保健院) 综合妇科, 合肥 230061

²安徽医科大学第一附属医院体检中心, 合肥 230022

作者简介: 卫爱宁, 女, 大专;

许荣华, 女, 主管护师, 责任作者, E-mail: 1059850351@qq.com;

庄雅丽, 女, 副主任医师, 责任作者, E-mail: hfzhy1.07@163.com

1.2.4 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡

0.25%的胰酶消化收集细胞,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 1 ml 预冷的 PBS,轻轻震荡使细胞悬浮,重复上述步骤,按照试剂盒的说明操作使用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.5 药物联合应用评价 使用 CombiDrug 统计软件,以中效原理(Chou-Talalay 联合指数法)为基础,绘制剂量-效应曲线及不同效应下的合用指数曲线(Fa-CI 曲线),由两药合用的效应与合用指数的关系图表,定量评价两药之间的关系:CI < 1,两药合用效应协同;CI = 1,两药合用效应相加;CI > 1,两药合用效应拮抗。

1.3 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计分析,组间比较采用非配对 *t* 检验或单因素方差分析。

2 结果

2.1 PPP 对 HO-8910 细胞生长的作用 不同浓度 PPP 处理 48、72 h 后使用 SRB 法检测细胞活力,结果显示 PPP 呈时间和剂量依赖性方式抑制 HO-8910 细胞生长。见图 1。

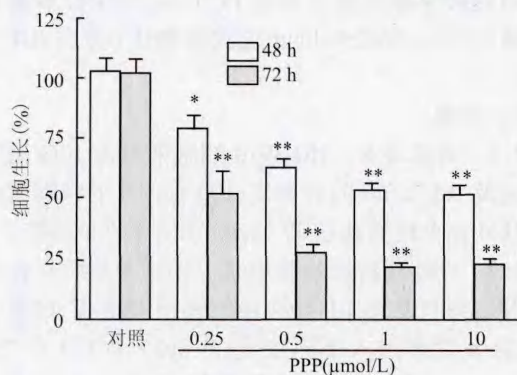


图 1 PPP 对 HO-8910 细胞生长的影响

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 PPP 对 HO-8910 细胞周期的影响 流式细胞仪检测结果显示,与对照组相比,PPP(1 μmol/L)处理 36 h 出现明显的凋亡峰(Sub G₁)。见图 2。与对照组相比,PPP 处理 36 h 诱导细胞 G₂/M 期阻滞(67 ± 1.86 vs 12 ± 1.10),差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 3。

2.3 PPP 对 HO-8910 细胞凋亡的影响 PPP(1 μmol/L)处理细胞 24 h 后进行 Annexin-V 和 PI 双染检测细胞凋亡。与对照组相比,PPP 诱导 HO-8910 细胞凋亡(17.5 ± 0.2 vs 4.2 ± 0.1),差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 4。

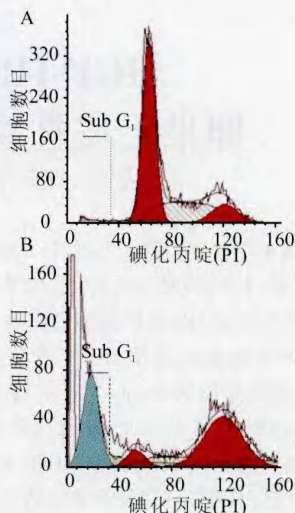


图 2 PPP 对 HO-8910 细胞周期和凋亡的影响

A: 对照组; B: PPP 处理组

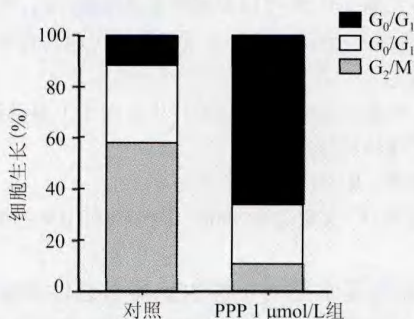


图 3 PPP 影响 HO-8910 细胞周期的分布

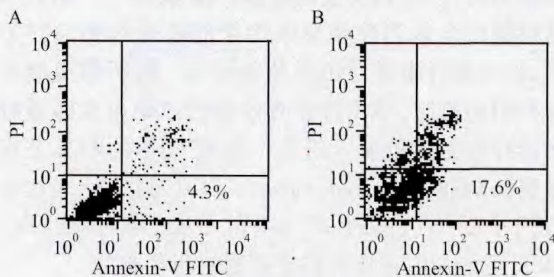


图 4 PPP 对 HO-8910 细胞凋亡的作用

A: 对照组; B: PPP 处理组

2.4 PPP 联合厄洛替尼对 HO-8910 细胞的效应

PPP 作用 HO-8910 细胞 72 h 的半数抑制浓度(IC₅₀)值为(0.229 ± 0.035) μmol/L, PPP、厄洛替尼单用或联合用药随着药物浓度增加,对 HO-8910 细胞生长的抑制效应也增加。见表 1。

2.5 应用中效原理分析 PPP 联合厄洛替尼对 HO-8910 细胞的效应 PPP 联合厄洛替尼对 HO-8910 细胞增殖的效应-联合指数曲线见图 5,药物大部分作用范围(Fa > 0.15)联合指数 CI < 1,证实 PPP 联合厄洛替尼抑制 HO-8910 细胞增殖时具有协同作

用。见图 5。

表 1 不同浓度 PPP、厄洛替尼单用及合用对 HO-8910 的效应($n=3, \bar{x} \pm s$)

药物	药物浓度($\mu\text{mol/L}$)	抑制率(%)
PPP	0.062 5	12.1 \pm 2.5
	0.125	17.2 \pm 2.4
	0.25	44.0 \pm 0.6
	0.5	70.7 \pm 0.3
	1	74.3 \pm 0.2
厄洛替尼	2.5	13.3 \pm 1.0
	5	20.0 \pm 1.6
	10	25.2 \pm 2.0
	20	30.1 \pm 2.7
	40	43.4 \pm 4.1
PPP + 厄洛替尼	0.062 5 \pm 2.5	21.0 \pm 2.4
	0.125 \pm 5	45.6 \pm 2.0
	0.25 \pm 10	73.6 \pm 1.7
	0.5 \pm 20	83.9 \pm 1.5
	1 \pm 40	86.0 \pm 1.2

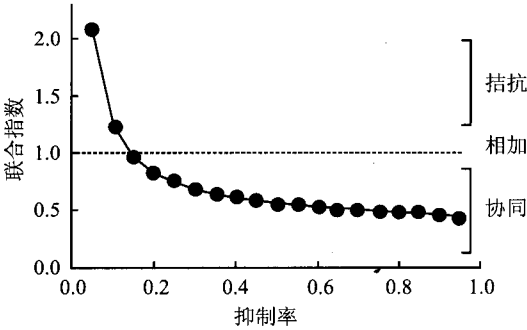


图 5 PPP 联合厄洛替尼对 HO-8910 细胞的效应-联合指数曲线

3 讨论

EGFR 在肺癌、结肠癌和卵巢癌等多种肿瘤组织中过表达^[4], 当前正在开展多项靶向 EGFR 治疗卵巢癌的临床试验, 然而, 初步结果并未取得满意的临床疗效^[5]。近来研究^[6]显示 EGFR 和 IGF-1R 介导的信号通路存在交叉对话, 抑制 IGF-1R 信号通路可以增强肿瘤细胞对 EGFR 小分子激酶抑制剂的敏感性。胰岛素样生长因子参与排卵后创口的修复、细胞增殖与表型转化, 可能参与卵巢癌的发生发展; 此外, IGF-1R 的高表达与卵巢癌对顺铂耐药有关^[2], 可能是 EOC 治疗的理想靶点^[7]。

IGF-1R 与胰岛素受体在激酶区域的结构上有高度同源性, 在选用抑制 IGF-1R 的方法时除了临床应用价值外, 还需考虑其对胰岛素受体的影响。PPP 是一种有效、无毒、高特异性的 IGF-1R 抑制剂^[8-9], 几乎不影响胰岛素受体, 可抑制 IGF-1R 磷酸化反应, 阻断其介导的细胞信号转导通路, 抑制肿

瘤细胞生长。笔者观察到 PPP 呈时间和剂量依赖性的方式抑制 HO-8910 细胞生长, 说明抑制 IGF-1R 可能抑制卵巢癌细胞生长。细胞周期的两个重要检定点位于 G₁/S、G₂/M 期之间, IGF-1R 介导的信号可通过调节细胞周期蛋白影响细胞周期。下调 IGF-1R 后可以使不同细胞出现 G₁ 期或 G₂/M 期阻滞, 进一步细胞周期分布揭示 PPP 诱导 HO-8910 细胞 G₂/M 期阻滞, 且 Sub G₁ 期细胞明显增多, 说明 PPP 诱导细胞凋亡。Annexin V 和 PI 双染检测 PPP 处理的 HO-8910 细胞证实 PPP 可以诱导细胞凋亡。

与单药作用组相比, 厄洛替尼和 PPP 联合能显著抑制肿瘤细胞生长, 使用中效原理分析药物的相互作用, 厄洛替尼和 PPP 在抑制 HO-8910 细胞生长方面具有协同效应。这证实联合抑制 IGF-1R 和 EGFR 更具肿瘤生长抑制作用, 厄洛替尼联合 PPP 是抑制该组合通路的有效策略。

综上所述, 特异性抑制 IGF-1R 可以抑制卵巢癌细胞生长, 诱导其凋亡。在卵巢癌的治疗中, IGF1R 和 EGFR 可能具有联合靶向治疗价值。

参考文献

[1] Posadas E M, Davidson B, Kohn E C. Proteomics and ovarian cancer: implications for diagnosis and treatment: a critical review of the recent literature[J]. Curr Opin Oncol, 2004, 16(5):478-84.

[2] Eckstein N, Servan K, Hildebrandt B, et al. Hyperactivation of the insulin-like growth factor receptor I signaling pathway is an essential event for cisplatin resistance of ovarian cancer cells[J]. Cancer Res, 2009, 69(7):2996-3003.

[3] 马晓丽, 孙海基, 赵云, 等. 美加明对人肺腺癌 A549 细胞增殖和迁移的影[J]. 肿瘤, 2011, 31(1):39-43.

[4] 倪琛琛, 于敏, 张志红. EGFR 与 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白在非小细胞癌组织中的表达及其意义[J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(12):1264-6.

[5] Sheng Q, Liu J. The therapeutic potential of targeting the EGFR family in epithelial ovarian cancer[J]. Br J Cancer, 2011, 104(8):1241-5.

[6] 范理宏, 祁慧薇, 王杰军. IGF-1R 抑制剂联用可增强人非小细胞肺癌 PC9/G 细胞对吉非替尼的敏感性[J]. 肿瘤, 2011, 31(3):222-7.

[7] Beauchamp M C, Yasmeen A, Knafo A, et al. Targeting insulin and insulin-like growth factor pathways in epithelial ovarian cancer[J]. J Oncol, 2010, 2010:257058.

[8] Girmata A, Girmata L, del Prete F, et al. Cyclolignans as inhibitors of the insulin-like growth factor-1 receptor and malignant cell growth[J]. Cancer Res, 2004, 64(1):236-42.

[9] Klinakis A, Szabolcs M, Chen G, et al. Igfr as a therapeutic target in a mouse model of basal-like breast cancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(7):2359-64.

亚硒酸钠对贫铀气管灌注大鼠免疫损伤的防护作用

苏翠文^{1,2}, 杨陟华², 潘秀颀², 徐 龙², 刘坤璐², 李若曦^{1,2}, 朱茂祥²

摘要 目的 观察亚硒酸钠对贫铀(DU)气管灌注大鼠免疫损伤的防护作用。方法 225只Wistar大鼠随机分为正常对照组、DU染毒组、DU+低硒组、DU+中硒组、DU+高硒组,每组45只。采用单次气管灌注贫铀悬液500 μg/只染毒,DU+低硒组、DU+中硒组、DU+高硒组自DU染毒前3天灌喂分别给予50、200、500 μg/kg的硒溶液,每天一次直至活杀。分别在气管灌注后第7、14、28天活杀大鼠,分别测定体重、肺铀含量、外周血细胞参数、T淋巴细胞及其亚群、血清免疫球蛋白IgG。结果 DU染毒组大鼠早期体重下降、白细胞数升高、红细胞数、T淋巴细胞总数及免疫球蛋白IgG显著降低;DU+低硒组、DU+中硒组、DU+高硒组各项指标与DU染毒组比较有明显改善。结论 亚硒酸钠对DU气管灌注大鼠免疫损伤有防护作用。

关键词 亚硒酸钠;贫铀;气管灌注;免疫损伤;防护作用

中图分类号 R 979.6

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2012)09-1046-04

贫铀(depleted uranium, DU)是天然铀的副产

品,主要成分包括²³⁵U和²³⁸U,含量分别为约0.2%和99.8%,其在军事领域广泛被应用^[1]。DU和铀元素一样具有很强的放射性及化学毒性^[2]。研究^[3]显示吸入DU气溶胶后,机体肺、肾、脾会发生明显的病理损伤。本实验室前期研究^[4]结果表明,氧化应激在DU致机体损伤中及其重要。微量元素硒具有极强的抗氧化作用、提高机体免疫力、排毒解毒抗污染等生物学特性^[5-7],但过量的硒也会使机体的生长发育产生不良影响^[8]。该研究观察亚硒酸钠对大鼠气管灌注DU的免疫防护作用,旨在为DU损伤医学防护提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 225只清洁级Wistar大鼠,♂,体重200~220 g,购于维通利华实验动物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂与仪器 DU颗粒(核工业总公司202厂);乙醚(北京化工厂);亚硒酸钠(Sigma公司,纯度:99%);J-22抗干扰型铀荧光增强剂(北京地质研究院);细胞稀释液(北京兰桥康泰医学科技有限公司);PerCP-CD8a抗体、FITC-CD3抗体、PE-CD4抗体、红细胞裂解液(BD Pharmingen公司);

2012-05-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:30873205)

作者单位:¹安徽医科大学研究生院,合肥 230032

²军事医学科学院放射与辐射医学研究所,北京 100850

作者简介:苏翠文,女,硕士研究生;

朱茂祥,男,研究员,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:

zhumx@nic.bmi.ac.cn

The effect of IGF-1R and erlotinib on the apoptosis of HO-8910 cells

Wei Aining, Xu Ronghua, Zhuang Yali, et al

(School of Clinic Maternal and Child Care Service, Anhui Medical University,

Hefei Maternal and Child Care Service Center, Hefei 230061)

Abstract Objective To investigate the effect of inhibition of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) and (or) epidermal growth factor receptor (EGFR) on ovarian cancer (HO-8910 cell) *in vitro*. **Methods** Cell viability was assessed by using the Sulforhodamine B (SRB) assay after the HO-8910 cell was treated with PPP. Cell cycle was analyzed by using flow cytometry (FCM) with propidium iodide (PI) labeling method. The rate of apoptosis was detected by FCM with Annexin V-FITC and PI double labeling method. Synergistic interaction on human ovarian cancer cell line HO-8910 was evaluated using the combination index (CI) method. **Results** PPP significantly inhibited the HO-8910 cell growth in a time-dose-dependent manner, and its inhibition role may relate to induced G₂/M phase arrest and enhanced apoptosis. In addition, PPP showed a synergistic effect on HO-8910 cells with the cyto-toxicity of erlotinib. **Conclusion** Specific suppression of IGF-1R inhibits cell growth and induces apoptosis, and it may exert a synergistic effect with EGFR inhibitor in ovarian cancer *in vitro*.

Key words ovarian cancer; insulin-like growth factor-1 receptor; epidermal growth factor receptor; targeted therapy