

· 基础研究 ·

联合靶向阻断 EGFR 和 mTOR 信号通路对 鼻咽癌细胞生长影响的研究

张 宁^{1,2}, 刘 勇¹, 张 欣¹, 李仕晟¹, 黄东海¹, 邱元正¹, 肖健云¹, 田勇泉¹

(1. 中南大学湘雅医院耳鼻咽喉头颈外科, 湖南长沙 410008; 2. 河南开封市第一人民医院耳鼻咽喉科, 河南开封 475000)

摘 要: 目的 观察联合阻断表皮生长因子受体 (EGFR) 和雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 介导的信号通路对鼻咽癌细胞株 CNE-1 及 CNE-2 的影响。方法 EGFR 酪氨酸激酶拮抗剂 (Tarceva)、mTOR 抑制剂 (Rapamycin) 单独 (单独处理组) 和联合处理 (联合处理组) 鼻咽癌细胞株 CNE-1 及 CNE-2 后, CCK-8 法检测细胞生长抑制率, 流式细胞法检测细胞周期和凋亡率。结果 ① Tarceva、Rapamycin 单独处理组对 CNE-1 和 CNE-2 细胞株均产生剂量依赖性抗增殖作用。② 联合用药组 CNE-1 和 CNE-2 细胞生长抑制率显著大于两者单独处理组生长抑制率之和 ($P < 0.05$)。③ 联合处理组的 G1 期细胞比例大于单独处理组之和 ($P < 0.05$)。联合处理组的细胞凋亡率高于单独处理组 ($P < 0.05$)。结论 Tarceva 及 Rapamycin 联合靶向治疗能协同性地抑制鼻咽癌细胞生长, 这种效应可能通过增加 G1 期细胞阻滞及凋亡来实现。

关 键 词: 鼻咽癌; 表皮生长因子受体; 雷帕霉素靶蛋白; 酪氨酸激酶拮抗剂; 分子靶向治疗
中图分类号: R739.63; R34 文献标识码: A 文章编号: 1007-1520(2010)02-0086-05

Effect of cell growth inhibition through simultaneously targeted blocking epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and mTOR signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma

ZHANG Ning, LIU Yong, ZHANG Xin, et al.

(Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** The aim of the investigation was to verify that simultaneously blocking both EGFR and mTOR mediated pathways may be an efficient way to inhibit cell growth in nasopharyngeal carcinoma. **Methods** The effect of cell growth inhibition through a combination of EGFR-selective tyrosine kinase inhibitor Tarceva and mTOR inhibitor Rapamycin was evaluated. Cell growth assay and flow cytometric analysis were applied to assessing the cell cycle and apoptosis in both CNE-1 and CNE-2 cell lines. **Results** ① Tarceva and Rapamycin demonstrated a concentration dependent anti-proliferative effect on both CNE-1 and CNE-2 cell lines ($P < 0.05$). ② The inhibition rate of cell growth in the group treated with a combination of two agents was higher than the sum of that in the two groups treated with only one agent ($P < 0.05$). ③ The combination of Tarceva and Rapamycin significantly induced G1 cell arrest ($P < 0.05$) and increased apoptosis rate

基金项目: 湖南省科技厅项目 (2007SK2003; 2007SK3050), 国家自然科学基金 (30872852), 高等学校博士学科点专项科研基金课题 (20090162110065)。

作者简介: 张 宁, 女, 硕士研究生。

通讯作者: 田勇泉, Email: Tianyq@mail.csu.edu.cn.

($P < 0.05$) compared with the groups treated with single agent and the control group. **Conclusion** Results of the investigation suggest that a combination of Tarceva and Rapamycin induced cell growth inhibition in a synergistic way, which may be resulted from the increased rates of G1 cell arrest and apoptosis.

Key words: Nasopharyngeal carcinoma; Epidermal growth factor receptor; Mammalian target of Rapamycin; Tarceva; Molecular targeted therapy

鼻咽癌为我国南方及东南亚地区高发的恶性肿瘤。尽管放疗和化疗等治疗手段不断改进,其 5 年生存率一直徘徊在 50%~60%。目前,随着肿瘤生物学的发展,分子靶向治疗已逐渐成为当前恶性肿瘤治疗研究的热点。以表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)^[1]或哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian Target of Rapamycin, mTOR)^[2]为靶点的分子靶向治疗方案疗效令人鼓舞。然而,考虑到肿瘤的发生发展为一多因素参与、多步骤的全身性系统性疾病;且单一分子靶向药物治疗所需药物剂量大、毒副作用大^[3]。因此,自 Torrance 等^[4]于 2000 年首次在国际上报道联合应用 EGFR 酪氨酸蛋白激酶抑制剂(Tarceva)和 COX-2 抑制剂(Celecoxib)能有效抑制家族性结肠息肉生长后,对恶性肿瘤进行多靶点的联合靶向治疗方案亦逐步引起重视。迄今为止,针对 EGFR 及 mTOR 信号通路的联合靶向治疗研究在鼻咽癌中尚未见报道。

本研究通过 CCK-8 法、流式细胞法观察单独和联合运用 EGFR 特异性酪氨酸蛋白激酶抑制剂(Tarceva)和 mTOR 特异性抑制剂(Rapamycin)对鼻咽癌细胞株 CNE-1 与 CNE-2 的生长、凋亡及细胞周期的影响,从而对 EGFR 和 mTOR 抑制剂联合靶向治疗鼻咽癌进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

RPMI-1640 及胰酶细胞消化液购于北京 Solarbio 科技有限公司;胎牛血清购于杭州四季青生物有限公司;CCK-8 试剂盒购于上海碧云天生物试剂有限公司。Tarceva 购于美国 Calbiochem 公司;Rapamycin 购于美国 Sigma 公司。全自动酶标仪 DG-3022 购于上海华东电子仪器厂;流式细胞仪购于美国 Becton Dickinson。

1.2 细胞培养

人鼻咽癌细胞株 CNE-1 及 CNE-2 由中南大学湘雅医院耳鼻咽喉头颈外科实验室提供。37℃,5% CO₂ 条件下,在含有 10% 的胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素的 RPMI-1640 培养基中培养,常规胰酶消化传代。试验均选用处于对数生长期的细胞。

1.3 细胞生长抑制率测定

单独处理组用药时细胞生长测定:取对数生长期的 CNE-1 和 CNE-2 细胞以 5 000 个/孔(100 μl/孔)种入 96 孔板,每孔设 3 个复孔,置于 37℃,5% CO₂ 培养箱培养。24 h 后处理组分别加入 Tarceva 及 Rapamycin 单独干预,使其浓度为 Tarceva 0~40 μmol/L 或 Rapamycin 0~200 nmol/L,对照组加入同等体积 PBS,继续培养。72 h 后每孔加入 20 μl CCK-8 溶液,置于培养箱孵育 1 h。该实验重复 3 次。酶标仪中在 450 nm 波长测定吸光度(optical density, OD),计算公式生长抑制率=(对照组 OD-实验组 OD)/(对照组 OD-底本 OD)。绘制细胞生长抑制曲线。

联合处理组用药时细胞生长测定:取对数生长期的 CNE-1 和 CNE-2 细胞以 5 000 个/孔(100 μl/孔)种入 96 孔板,每孔设 3 个复孔,置于培养箱培养。24 h 后处理组加入 Tarceva 及 Rapamycin 联合干预,我们选择 IC₃₀ 的药物浓度进行联合用药实验,两药物的 IC₃₀ 浓度分别为 Tarceva 15 μmol/L, Rapamycin 100 nmol/L,对照组加入同体积 PBS,置于培养箱继续培养 72 h 后,每孔采用 CCK-8 法测定细胞生长抑制率,该实验重复 3 次。

1.4 流式细胞检测(FCM)

取对数生长期的 CNE-1 及 CNE-2 细胞以 2×10^5 个/孔加入 6 孔板,培养 24 h 后加入 Tarceva 及 Rapamycin 干预,使药物浓

度为 Tarceva 组 $15\ \mu\text{mol/L}$ 、Rapamycin 组 $100\ \text{nmol/L}$ 、联合处理组 Tarceva $15\ \mu\text{mol/L}$ 、Rapamycin $100\ \text{nmol/L}$ 、对照组以同体积 PBS 处理。置于培养箱继续培养 72 h 后收集各组细胞, $1000\ \text{r/min}$ 离心 5 min, 弃培养液。3 ml PBS 洗 3 次, 离心去 PBS, 加入冰预冷的 70% 的乙醇 $4\ ^\circ\text{C}$ 固定 24 h 以上。离心弃去固定液, 3 ml PBS 重悬 5 min, 调整细胞浓度为 10^6 个/L。400 目的筛网过滤 1 次, $1000\ \text{r/min}$ 离心 5 min, 弃去 PBS。用 1 ml PI 染液, $4\ ^\circ\text{C}$ 避光 30 min。该实验重复 3 次。流式细胞仪分析采用 Nidletri 法, 汞激光激发波长为 488 nm, 分析软件为 Cellquest 和 mcafit LT for machitash V1.01, 计算细胞的各周期比例和凋亡率。

1.5 统计分析

所有计量资料均采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。先进行正态性检验和方差齐性检验, CCK-8 法结果采用两因素方差分析加 LSD 法两两比较。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Tarceva 和 Rapamycin 单独处理组对鼻咽癌细胞株 CNE-1 及 CNE-2 生长的影响

CNE-1 及 CNE-2 经 Tarceva 或 Rapamycin 处理, 均呈现出剂量依赖性生长抑制。Tarceva 处理 CNE-1 和 CNE-2 细胞的 IC30 为 $15\ \mu\text{mol/L}$ (图 1), Rapamycin 处理 CNE-1 和 CNE-2 细胞的 IC30 为 $100\ \text{nmol/L}$ (图 2)。

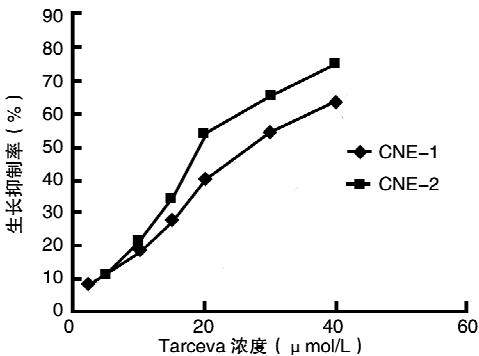


图 1 不同浓度 Tarceva 处理后鼻咽癌细胞株 CNE-1 及 CNE-2 的生长抑制曲线

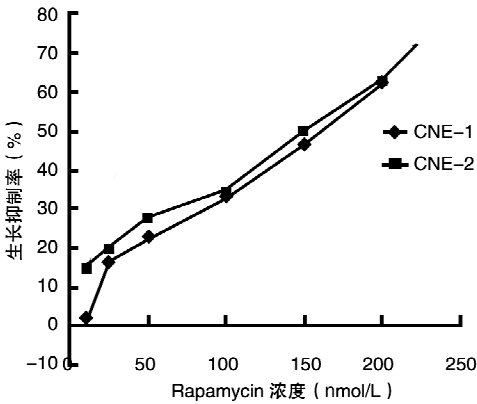


图 2 不同浓度 Rapamycin 处理后鼻咽癌细胞株 CNE-1 及 CNE-2 的生长抑制曲线

2.2 Tarceva 和 Rapamycin 联合处理对鼻咽癌细胞株 CNE-1 及 CNE-2 的生长抑制

为检验在浓度为 IC30 时联合使用 Tarceva 和 Rapamycin 对鼻咽癌细胞株 CNE-1 及 CNE-2 的生长抑制效果强于单独用药, 我们将联合用药后的 2 种细胞的生长抑制率与单独用药后细胞生长抑制率之和进行对比, 结果显示联合用药后 CNE-1 细胞的生长抑制率为 $(65.38 \pm 3.06)\%$, CNE-2 为 $(75.54 \pm 4.67)\%$ 。均明显大于 2 种药物单独用药后细胞生长抑制率之和 ($P < 0.05$) (图 3)。

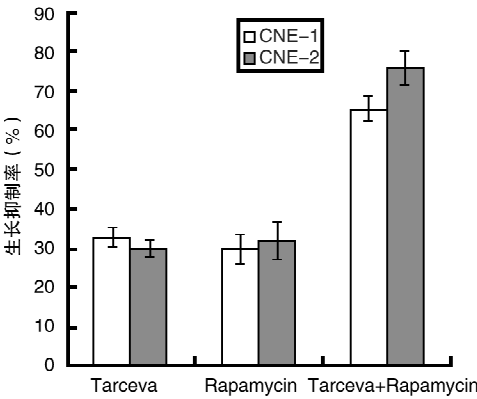


图 3 Tarceva 和 Rapamycin (IC30 浓度) 处理鼻咽癌细胞株 CNE-1 及 CNE-2 细胞株的生长抑制率

2.3 Tarceva、Rapamycin 联合和单独处理前后 CNE-1、CNE-2 细胞生长周期和凋亡率的变化

经流式细胞术检测分析联合处理组与

对照组、Rapamycin 处理组、Tarceva 处理组进行组间比较发现,在 CNE-1 和 CNE-2 细胞中,联合处理组出现显著的 G1 期细胞阻滞 ($P < 0.05$) (表 1,2);且联合处理组细胞凋亡率亦高于 Rapamycin 处理组、Tarceva 处理组及对照组的细胞凋亡率 ($P < 0.05$)。

表 1 联合处理组、单独处理组 CNE-1 细胞生长周期及凋亡率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	细胞生长周期			凋亡率
	G1 期	G2 期	S 期	
联合用药	79.85 ± 5.46	11.70 ± 1.15	12.30 ± 1.27	9.01 ± 2.31
Tarceva 处理组	64.35 ± 1.73	14.33 ± 2.46	23.13 ± 2.74	5.65 ± 1.73
Rapamycin 处理组	66.10 ± 1.30	11.40 ± 1.02	22.18 ± 3.15	5.26 ± 1.32
对照组	55.23 ± 1.51	13.00 ± 1.34	32.00 ± 1.85	1.88 ± 0.38

表 2 联合处理组、单独处理组 CNE-2 细胞生长周期及凋亡率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	G1 期	G2 期	S 期	凋亡率
联合用药	82.65 ± 2.70	10.95 ± 2.51	9.90 ± 3.97	10.02 ± 1.43
Tarceva 处理组	63.25 ± 2.09	14.40 ± 1.39	23.02 ± 1.18	4.52 ± 0.83
Rapamycin 处理组	62.01 ± 2.22	15.37 ± 1.10	22.43 ± 0.26	5.34 ± 1.03
对照组	55.07 ± 1.64	13.23 ± 1.68	31.67 ± 1.58	2.16 ± 0.58

3 讨论

现有研究表明,EGFR 与 mTOR 在鼻咽癌组织中均有高表达,且其高表达常提示患者复发快、转移早、预后差及对化疗药物抵抗等^[5-8]。单独靶向阻断 EGFR 或 mTOR 信号通路在体内外实验中,可抑制头颈鳞癌的生长^[9]。本实验在体外实验中,通过 CCK-8 法和 FCM 观察到,Tarceva 和 Rapamycin 均呈剂量依赖性抑制鼻咽癌细胞株 CNE-1 和 CNE-2 的生长,且 Tarceva 和 Rapamycin 联合治疗组与单独用药及对照组相比出现显著的 G1 期细胞阻滞及凋亡率升高。这些证据均提示 Tarceva 和 Rapamycin 在体外能够抑制鼻咽癌细胞生长,并影响肿瘤细胞的生长周期及凋亡。

虽然,EGFR 和 mTOR 在肿瘤细胞生长过程中发挥着不同的生理功能,但已有大量的证据表明 EGFR 和 mTOR 信号通路之间具有相互作用,即“交叉对话”(cross-talking)。EGFR 是重要的膜受体,EGFR 活化后介导 AKT、MAPK^[9], PKCα^[10] 等信号分子,经与 mTOR 直接相关的 TSC1/TSC2 异二聚体调

节 mTOR 的活性。Chaturvedi 等^[11] 在体外实验中发现 Rapamycin 在抑制 mTOR 信号通路的同时,却又经 c-Src 活化 EGFR 导致肿瘤细胞 Rapamycin 的耐药,阻断 EGFR 信号通路有助于提高 mTOR 抑制剂 Rapamycin 的敏感性。由此可知,EGFR 信号通路与 mTOR 信号通路之间的“交叉对话”使 Tarceva 和 Rapamycin 联合靶向治疗方案具有理论上的可行性及必要性。

EGFR 与 mTOR 抑制剂产生协同或相加的抗癌效应在非小细胞肺癌、乳腺癌、前列腺癌等多种恶性肿瘤中已有报道^[12-14]。本研究在体外实验中探讨联合使用 EGFR 抑制剂和 mTOR 抑制剂在鼻咽癌细胞中的作用。实验所选择的 Tarceva 和 Rapamycin 都已经用于临床抗癌防癌治疗。该研究结果显示 Tarceva 联合 Rapamycin 对抑制鼻咽癌细胞 CNE-1 和 CNE-2 生长均具有协同作用。通过作用 72 h 后进行的 FCM 检测发现,该联合方案对于提高细胞的凋亡率及增加 G1 期细胞阻滞均具有明显的协同效果。说明联合阻断 EGFR 和 Rapamycin 信号通路对细胞生长的负性调节具有明显的协同作用,而协同作用与 G1 期细胞阻滞及凋亡率的增

加有关。

本实验通过体外实验证明了联合使用 EGFR 抑制剂和 mTOR 抑制剂比单独用药能更有效地抑制鼻咽癌细胞 CNE-1 和 CNE-2 的生长,二者具有协同抑癌作用。该协同效应主要通过增加 G1 期细胞阻滞及凋亡率来实现。本研究结果为联合靶向阻断 EGFR 和 mTOR 信号通路治疗鼻咽癌提供了新思路。

参考文献:

- [1] Dancy J. Epidermal growth factor receptor inhibitors in clinical development [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004, 58(3): 1003 - 1007.
- [2] Rao RD, Buckner JC, Sarkaria JN. Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors as anti-cancer agents [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2004, 4(8): 621 - 635.
- [3] 储大同. 肿瘤分子靶向治疗的现状及进展 [J]. *中国实用内科杂志*, 2005, 25(8): 673 - 675.
- [4] Torrance CJ, Jackson PE, Montgomery E, et al. Combinatorial chemoprevention of intestinal neoplasia [J]. *Nat Med*, 2000, 6(9): 1024 - 1028.
- [5] Taheri-Kadkhoda Z, Magnusson B, Svensson M, et al. Expression modes and clinical manifestations of latent membrane protein 1, Ki-67, cyclin-B1, and epidermal growth factor receptor in nonendemic nasopharyngeal carcinoma [J]. *Head Neck*, 2009, 31(4): 482 - 492.
- [6] Chua DT, Nicholls JM, Sham JS, et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor expression in patients with advanced stage nasopharyngeal carcinoma treated with induction chemotherapy and radiotherapy [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004, 59(1): 11 - 20.
- [7] Huang XM, Dai CB, Mou ZL, et al. Overproduction of cyclin D1 is dependent on activated mTORC1 signal in nasopharyngeal carcinoma: implication for therapy [J]. *Cancer Lett*, 2009, 279(1): 47 - 56.
- [8] 陈英杰,刘健,陶雅君,等. PTEN、PI3K 和 mTOR 在鼻咽癌中的表达及意义 [J]. *现代肿瘤医学*, 2009, 17(1): 41 - 43.
- [9] Jimeno A, Kulesza P, Wheelhouse J, et al. Dual EGFR and mTOR targeting in squamous cell carcinoma models, and development of early markers of efficacy [J]. *Br J Cancer*, 2007, 96(6): 952 - 959.
- [10] Fan QW, Cheng C, Knight ZA, et al. EGFR signals to mTOR through PKC and independently of Akt in glioma [J]. *Sci Signal*, 2009, 2(55): ra4. Erratum in: *Sci Signal*, 2009, 2(60): er4.
- [11] Chaturvedi D, Gao X, Cohen MS, et al. Rapamycin induces transactivation of the EGFR and increases cell survival [J]. *Oncogene*, 2009, 28(9): 1187 - 1196.
- [12] Buck E, Eyzaguirre A, Brown E, et al. Rapamycin synergizes with the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib in non-small-cell lung, pancreatic, colon, and breast tumors [J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(11): 2676 - 2684.
- [13] Wang LH, Chan JL, Li W. Rapamycin together with hereceptin significantly increased anti-tumor efficacy compared to either alone in ErbB2 over expressing breast cancer cells [J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(1): 157 - 164.
- [14] Masiello D, Mohi MG, McKnight NC, et al. Combining an mTOR antagonist and receptor tyrosine kinase inhibitors for the treatment of prostate cancer [J]. *Cancer Biol Ther*, 2007, 6(2): 195 - 201.

(修回日期:2010-03-01)