

吉西他滨联合厄洛替尼抑制胰腺癌细胞增殖^{*}

黄欣昊^{1,2,*}, 柳千帆¹, 宋春灼¹, 朱海涛^{2,3***}

(1. 贵州医科大学 临床医学院, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学附院 肝胆外科, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学附院 临床研究中心, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] **目的:** 探讨吉西他滨(GEM)与厄洛替尼(ERL)联合应用对胰腺癌 PANC-1 细胞的抑制作用。**方法:** 选用人胰腺癌细胞 PANC-1 的对数生长期细胞,采用 CCK-8 法检测 GEM、或 ERL 分别对 PANC-1 细胞的细胞毒性,并计算各自的半数抑制浓度(IC_{50});根据两种药物对 PANC-1 细胞的 IC_{50} 值进行不同比例组合,观察两种药物联合应用时对 PANC-1 细胞抑制情况,采用 Chou-Talalay 法分析药物合用的效应;将 PANC-1 细胞设置为无干预组(对照组)、GEM 组、ERL 组、GEM 联合 ERL 组(联合组),观察 PANC-1 细胞克隆形成情况。**结果:** GEM 对 PANC-1 细胞的 IC_{50} 为 80 nmol/L,ERL 对 PANC-1 细胞的 IC_{50} 为 12 nmol/L;ERL:GEM 的浓度比 5:1 时,药物联合作用对 PANC-1 细胞的抑制率接近 50%,高于浓度比 1:1 和 10:1,且差异均有统计学意义($P < 0.05$);GEM 合用 ERL 的 Chou-Talalay 联合指数(CI)为 0.4,合用效果为协同作用;与对照组比较,GEM 组、ERL 组及联合组的 PANC-1 细胞克隆形成数均明显下降($P < 0.05$),且联合组的克隆形成数分别低于 GEM 组或 ERL 组($P < 0.05$)。**结论:** GEM 和 ERL 联合使用具有协同作用,既降低了两种药物单独使用时的剂量,又提高了对胰腺癌 PANC-1 细胞增殖的抑制效果。

[关键词] 吉西他滨;厄洛替尼;胰腺肿瘤;药物协同作用;细胞增殖;联合治疗

[中图分类号] R735.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)08-0903-05

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.08.007

Study on the Drug Effects of Gemcitabine Combined with Erlotinib in Inhibiting the Proliferation of Pancreatic Cancer Cells

HUANG Xinhao^{1,2}, LIU Qianfan¹, SONG Chunzhuo¹, ZHU Haitao^{2,3}

(1. College of Clinical Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Clinical Research Center of Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of this study was to investigate the drug effects of the gemcitabine (GEM) combined with erlotinib (ERL) on the proliferation of pancreatic cancer cells. **Methods:** All the experiments were conducted with logarithmic growth phase cells of the PANC-1. The cytotoxicity test of GEM and ERL on PANC-1 cells was detected by CCK-8 method, and the inhibition concentration of half (IC_{50}) was calculated. According to the different proportion of IC_{50} values of the two drugs on panc-1 cells, the inhibition of the two drugs combination on panc-1 cells was observed and the effect of it was analyzed by Chou-Talalay method. PANC-1 cells were set as non-intervention group (control group) and GEM group, ERL group, GEM combined with ERL group (combined group), and the formation of PANC-1 cell clones was observed. **Results:** The IC_{50} of GEM to panc-1 cells was 80 nmol/L, and the IC_{50} of ERL to panc-1 cells was 12 nmol/L. When the concentration ratio of ERL:GEM was 5:1, the inhibition rate on panc-1 cells by drug combination was nearly 50%, which was higher than

*[基金项目] 贵州省科技计划项目[黔科合平台人才(2018)5779-31]

** 贵州医科大学 2016 级硕士研究生

*** 通信作者 E-mail:2816497455@qq.com

网络出版时间:2019-08-27 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190827.1841.007.html>

the concentration ratio 1:1 and 10:1, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). GEM combined ERL chou-talalay index (CI) was 0.4, and the combined effect was synergistic. Compared with the control group, the number of cell clones of PANC-1 cells in GEM group, ERL group and combination group was significantly decreased ($P < 0.05$), and the number of clone formation in the combined group was significantly lower than that in the GEM group and the ERL group ($P < 0.05$).

Conclusion: The combination of GEM and ERL has a synergistic effect, and can reduce the dosage of the drug to achieve and enhance the inhibition effect of panc-1 cell proliferation in pancreatic cancer.

[Key words] gemcitabine; erlotinib; pancreatic neoplasms; synergistic effect; cell proliferation; combination therapy

胰腺癌是中国发病率居前 10 位、癌症致死位列第 7 的恶性肿瘤,全世界每年预计有 227 000 人死于胰腺癌^[1-2]。虽然近年来胰腺癌的诊疗取得了一定的进展,但晚期患者的 5 年生存率仍然只有 3%^[3]。目前手术切除治疗是唯一可以治愈胰腺癌的技术手段,但仅限于病灶未扩散到胰腺之外的患者,且有 80%~85% 的晚期患者无法应用手术治疗^[2,4]。大多数化学制剂对于胰腺癌的效果也十分有限^[5],吉西他滨(gemcitabine, GEM)是目前胰腺癌化学治疗的一线首选药物,但并不能明显提高患者的生存时间,单独使用时患者还易出现对药物的抵抗,至今抵抗机制尚不明确^[6-9]。因此,联合使用其他的药物治疗胰腺癌是目前推荐的解决方案,表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)抑制剂厄洛替尼(erlotinib, ERL)联合 GEM 是临床上常用的分子靶向药物的联用方案^[2,7],与单用 GEM 相比,联合 ERL 的治疗方案可以延长患者的生存时间,但其效果以及作用机制还有待进一步研究^[10-11],本研究分别通过单独使用 GEM、ERL,或两种药物联合用药,观察药物对胰腺癌细胞的毒性作用以及细胞克隆形成情况,探寻对胰腺癌治疗的新方案。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株、药物及试剂 人胰腺癌细胞 PANC-1 细胞由中国科学院干细胞库提供, GEM、ERL 购自美国 Selleck Chemicals 公司, DMEM 高糖培养基购自美国 GIBCO 公司,胎牛血清购自以色列 Biological Industries 公司, 0.25% 胰酶溶液(含 0.02% EDTA)购自美国 GIBCO 公司, PBS 购自美国 Hyclone 公司, DMSO 购自美国 Hyclone 公司, CCK-8 细胞毒性试剂盒购自上海东仁生物技术公司。

1.1.2 主要仪器 Navios 三激光 10 色流式细胞分析仪购自美国 BECKMAN 公司, Optima XPN-80 超高速离心机购自美国 BECKMAN 公司, 371 型细胞培养箱购自美国 thermo 公司, AB2-4S1 型生物安全柜购自新加坡艺思高科技公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及药物配制 所有物品均灭菌处理,在紫外线照射消毒 30 min 后的生物安全柜中进行细胞操作。人胰腺癌 PANC-1 细胞置于 37 ℃ 的 5% CO₂ 恒温潮湿环境中培养、分化,每 2~3 d 用无菌 PBS 磷酸缓冲液清洗,换新鲜完全培养基, PANC-1 细胞处于细胞对数生长期,长满至 80% 时进行细胞传代,以保证实验所用的细胞均为对数生长期的 PANC-1 细胞。将 GEM、ERL 低速离心 3 min 后, GEM 用无菌的 PBS 磷酸化缓冲液稀释, ERL 用 DMSO 稀释,稀释后的药液避光保存在 -20 ℃ 冰箱中。

1.2.2 细胞分组 取对数生长期的 PANC-1 细胞。进行如下干预: GEM 各浓度组(0、10、20、50、100 及 250 nmol/L)、ERL 各浓度组(0、10、20、50、100 及 200 nmol/L); GEM + ERL 各浓度组(GEM:ERL 浓度比分别为 1:1、1:5、1:10、1:20 及 1:50)。在细胞平板克隆实验中设立:对照组(无药物处理)、GEM 干预组[GEM 的半数抑制浓度(IC_{50})]、ERL 干预组(ERL 的 IC_{50})、联合组(两种药物合用的浓度根据实验确定)。分别用相应浓度的含药培养基培养 PANC-1 细胞 24 h。

1.2.3 GEM 或 ERL 单独应用对 PANC-1 细胞毒性实验 取对数生长期的 PANC-1 细胞,用 0.25% 含 EDTA 胰酶消化,离心后轻轻吹打成单细胞悬液,并进行细胞计数。以每孔 5 000 个细胞接种至 96 孔细胞培养板中,放入 37 ℃ 的 5% CO₂ 恒温培养箱中培养;待细胞长至 80%,换无血清培养,分别将含有 GEM(0、10、20、50、100 及 250 nmol/L)、或 ERL(0、10、20、50、100 及 200 nmol/L)的培养基

加入 96 孔细胞培养板中,培养 24 h,避光加入 10% 的 CCK-8 液,避光 37 ℃ 孵育 2 h,用化学酶标仪在波长为 450 nm 的波长下检测、记录吸光度值 (Optical density, *OD*),并计算药物对细胞的抑制率 [抑制率 = (对照组 *OD* - 实验组 *OD*) / (对照组 *OD* - 实验组 *OD*) × 100%],通过 GraphPad Prism 7.0 软件绘制两种药物各自对细胞的抑制率曲线,并计算各自的 *IC*₅₀。

1.2.4 GEM 及 ERL 联合应用对 PANC-1 细胞毒性试验 为了探究药物组合,本研究通过设置多种不同浓度的 GEM 与 ERL 组合比例,并采用 CCK-8 细胞毒性法检测 GEM 与 ERL 联合应用时对 PANC-1 细胞的抑制情况。在先前描述的条件下接种细胞,但此处用于评估的药物干预剂量是基于每种单独药物的 *IC*₅₀ 制定的。在每个平板中两种药物的组合保证大于 2 种,并重复至少 2 次。采用 Chou-Talalay 联合指数 (combination index, *CI*) 法计算 *CI* [*CI* = (A 药单用浓度/A 药联用浓度) + (B 药单用浓度/B 药联用浓度)] 分析两种药物合用时药物相互作用的性质,Chou-Talalay 法规定 *CI* < 1 药物组合有协同作用,*CI* = 1 药物组合有加成作用,*CI* > 1 药物组合有拮抗作用;同时根据 Chou-Talalay 的等效原则,仅选择 GEM 与 ERL 合用抑制率 50% 的组合与 2 种单药的 *IC*₅₀ 进行研究分析^[12-13]。

1.2.5 细胞克隆实验 将 PANC-1 细胞设置为无

干预组(对照组)、GEM 组、ERL 组、GEM 联合 ERL 组(联合组)分别进行干预。对照组无任何药物处理,GEM 组或 ERL 组药物干预浓度分别为各自的 *IC*₅₀,联合组中 GEM 及 ERL 的药物浓度取决于药物联合分析实验。将细胞对数生长期 PANC-1 细胞,制成单细胞悬液,取 6 000 个细胞均匀接种于 6 孔板中,放入细胞培养箱中培养。待细胞贴壁稳定生长后,根据不同处理组各自的相应药物浓度继续培养细胞,培养 12 d 后用 4% 多聚甲醇固定 30 min,再加入 0.25% 结晶紫染液室温静染 45 min。用相机拍照保留结果,通过 Image J 软件处理图像并计算细胞克隆数。

1.3 统计学方法

所有数据采用 SPSS 23.0 软件分析,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *q* 检验,*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GEM 或 ERL 对 PANC-1 细胞的毒性

用 GraphPad Prism 7.0 软件绘制两种药物分别对细胞的抑制率曲线,并计算得出 GEM 对 PANC-1 细胞的 *IC*₅₀ = 80 nmol/L,ERL 对 PANC-1 细胞的 *IC*₅₀ = 12 nmol/L。见图 1。

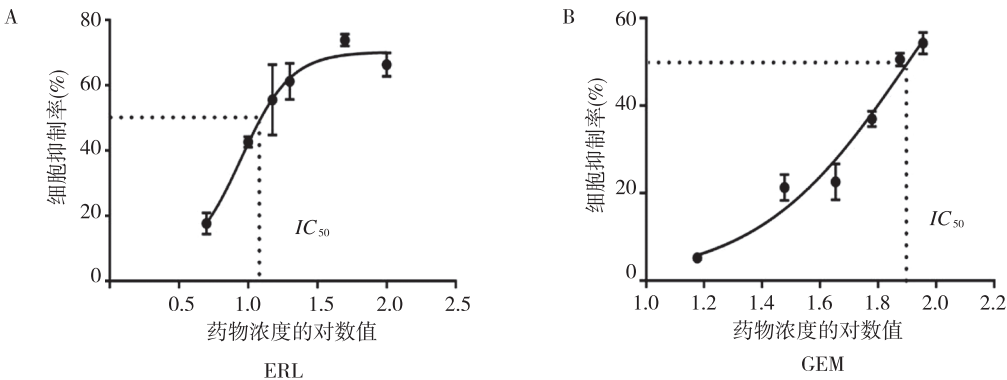


图 1 GEM 或 ERL 对 PANC-1 细胞的抑制率

Fig. 1 Inhibition rate curves of GEM or ERL to PANC-1 cells

2.2 GEM 和 ERL 联合应用对 PANC-1 细胞的毒性

将 GEM 与 ERL 进行多种不同比例的浓度组合用于 PANC-1 细胞,结果显示,ERL:GEM 的浓度比为 5:1 时,对 PANC-1 细胞的抑制率接近 50%,高

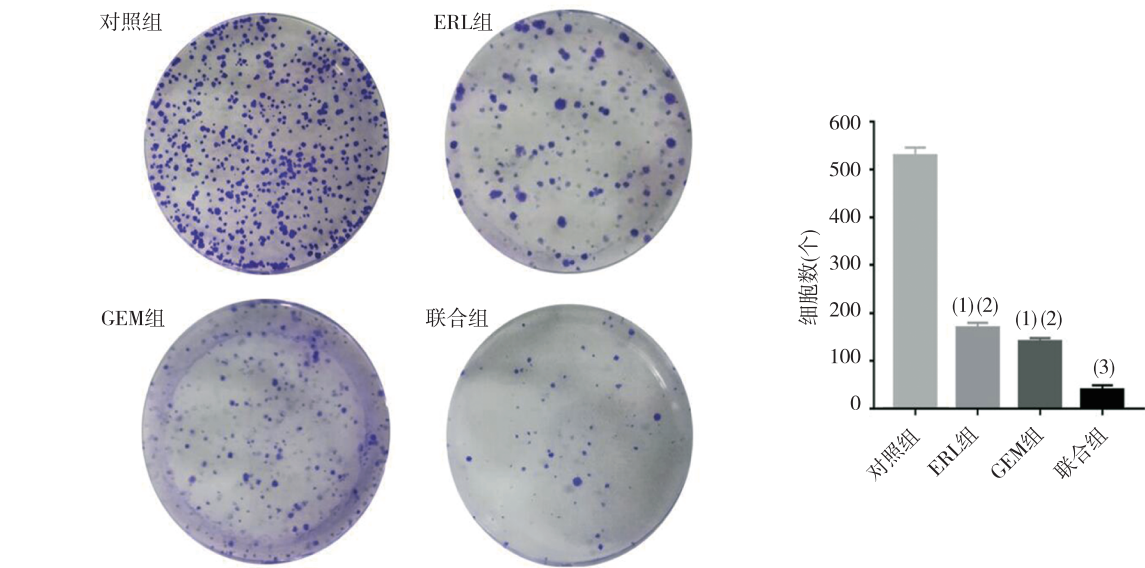
于浓度比 1:1 和 10:1,且差异均有统计学意义 (*P* < 0.05),见表 1。因此选择 GEM 与 ERL 5:1 组合用于后续实验。根据 Chou-Talalay 法分析结果可以得知,在 PANC-1 细胞中,GEM 与 ERL 合用 *CI* = 0.4,药物合用有协同作用。

表 1 不同浓度比例 GEM 与 ERL 联合应用
对 PANC-1 细胞的抑制率($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 The inhibition rate of PANC-1 cells by a
combination of various ratios of GEM and ERL

ERL: GEM(浓度比)	抑制率(%)
1:1	32.83 ± 4.20 ⁽¹⁾
5:1	51.39 ± 4.67
10:1	40.77 ± 1.16 ⁽¹⁾

注: ⁽¹⁾与 GEM 和 ERL 浓度比为 5:1 时比较, $P < 0.05$ 。

2.3 细胞克隆
与对照组比较,GEM 组、ERL 组、GEM 和 ERL 联合组的 PANC-1 细胞克隆数均显著下降,差异均有统计学意义($P < 0.01$, 或 $P < 0.0001$); GEM 和 ERL 联合组 PANC-1 细胞克隆数显著低于 GEM 组和 ERL 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。



注: ⁽¹⁾与联合组比较, $P < 0.05$; 与对照组比较, ⁽²⁾ $P < 0.01$, ⁽³⁾ $P < 0.0001$ 。

图 2 GEM、ERL 单独或联合应用对 PANC-1 细胞的细胞平板克隆的影响
Fig.2 Cellular plate cloning results of drugs intervention in PANC-1 cells

3 讨论

部分胰腺癌患者在确诊时病情已经发展到了终末期,错失了手术机会,即使是有手术治疗机会,患者也面临着术后的高复发率^[14-15]。已有研究表明,术后检测切缘分级为 0 级的患者,2 年后胰腺癌的复发率依然可以高达 80%^[4]。尽管近年来,化疗方案在胃肠道等消化系统肿瘤的治疗上取得了较大进展,但胰腺癌仍然对大部分化疗方案不敏感,甚至出现耐药的情况^[5]。寻找新的胰腺癌药物治疗方案,了解胰腺癌可能的分子机制是目前研究的重中之重。GEM 是目前胰腺癌化疗的首选药物,它是脱氧胞苷的水溶性类似物,可以通过抑制 DNA 双链的合成、修复来抑制细胞的分裂与增殖,从而抑制肿瘤的生长,但治疗效果有限,即使采用了周密的全身性支持治疗,患者在治疗晚期依然会

对 GEM 出现的耐药情况^[15-18]。因此,目前改善 GEM 治疗效果的主要策略是将 GEM 与靶向或细胞毒性药物联合使用^[6,11]。ERL 是首个经美国食品药品监督管理局(food and drug administration, FDA)批准的、可与 GEM 联用后促进患者生存期出现优势的 药物,是一种具有选择性的靶向可逆性抑制 EGFR 受体的小分子酪氨酸激酶抑制剂^[6,11]。研究表明,大部分胰腺癌中 EGFR 的表达都有明显上调^[19-21],且 ERL 的抗肿瘤性与抑制 EGFR 的表达有着密切联系^[18]。本课题组前期研究表明,GEM 联合 ERL 治疗裸鼠转移性胰腺癌时,可有效地抑制肿瘤的发生发展^[22]。本次研究结果显示,通过 Chou-Talalay 法进行药物联合分析 GEM 联合 ERL 有协同效应。Carolina 等^[23]的研究结果与本研究结果类似。细胞克隆形成实验表明,GEM 联合 ERL 可以抑制胰腺癌的发生发展,且优于 GEM 和 ERL 的单独使用效应,该结果与本课题组前期

裸鼠的实验研究结果趋势相同^[22]。

综上所述,GEM 和 ERL 联合使用具有协同作用,降低了两种药物的使用剂量,同时加强了抑制胰腺癌细胞增殖的效果,从而为胰腺癌治疗中 GEM 与 ERL 联合治疗提供了初步的科学依据,也为胰腺癌治疗的研究提供了较有价值的潜在方向。

4 参考文献

- [1] 郑荣寿,孙可欣,魏文强,等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志,2019,4(1): 19-28.
- [2] VINCENT A,HERMAN J,SCHULICK R,et al. Pancreatic cancer[J]. The Lancet,2011,378(9791):607-627.
- [3] SIEGEL R L,MILLER K D,JEMAL A. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer,2018,68(1):7-30.
- [4] JORG K,MURRAY K,MINOTI A,et al. Pancreatic cancer [J]. Nature Reviews,2016,2: 16022.
- [5] OETTL H,LEHMANN T. Gemcitabine-resistant pancreatic cancer: a second-line option[J]. The Lancet,2016, 387(10018):507-514.
- [6] HIDALGO M. Pancreatic cancer[J]. The New England Journal of Medicine,2010,362: 1605-1621.
- [7] ALEKSANDRA A,ALICE D,MARCO F. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current and Evolving Therapies [J]. International Journal of Molecular Sciences,2017,18 (7):1338-1379.
- [8] MAY TUN S,LEI Z. Current Standards of Chemotherapy for Pancreatic Cancer [J]. Clinical Therapeutics,2017,39 (11): 2125-2134.
- [9] TADROS S,SHUKLA S K,KING R J,et al. De novo lipid synthesis facilitates gemcitabine resistance through endoplasmic reticulum stress in pancreatic cancer[J]. Cancer Res,2017,77(20):5503-5519.
- [10] MIYABAYASHI K,IJICHI H,MOHRI D,et al. Erlotinib prolongs survival in pancreatic cancer by blocking gemcitabine-induced MAPK signals[J]. Cancer Res,2013, 73(7):2221-2254.
- [11] MOORE M J,GOLDSTEIN D,HAMM J,et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group[J]. The Official Journal Of the American Society of Clinical Oncology,2007, 25(15):1960-1965.
- [12] 王士群,朱宇珍,郑学宝. Chou-Talalay 在抗肿瘤联合用药中的研究应用概况[J]. 中国现代应用药学, 2013,30(4): 449-453.
- [13] CHOU T C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method[J]. Cancer Res,2010,70(2):440-446.
- [14] RYAN D P,HONG T S,BARDEESY N. Pancreatic adenocarcinoma[J]. N Engl J Med,2014,371(11):1039-1049.
- [15] MARIANNE SINN M B,TORSTEN L,KLAUS G,et al. CONKO-005 adjuvant chemotherapy with gemcitabine plus erlotinib versus gemcitabine alone in patients after R0 resection of pancreatic cancer a multicenter randomized phase III trial[J]. Journal of Clinical Oncology, 2017,35(29):3330-3340.
- [16] DE SOUSA CAVALCANTE L,MONTEIRO G. Gemcitabine: metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer[J]. European Journal Pharmacology,2014,741:8-16.
- [17] KULKE M H,BLASZKOWSKY L S,RYAN D P,et al. Capecitabine plus erlotinib in gemcitabine-refractory advanced pancreatic cancer[J]. The Official Journal Of The American Society of Clinical Oncology,2007,25(30):4787-4792.
- [18] MANOJ AMRUTKAR,IVAR P GLADHAUG. Pancreatic cancer chemoresistance to gemcitabine [J]. Cancers, 2017,9(11): 157-179.
- [19] DCUNHA SANTOS G,DHANI N,DONG T,et al. Molecular predictors of outcome in a phase 3 study of gemcitabine and erlotinib therapy in patients with advanced pancreatic cancer: National cancer institute of canada clinical trials group study pa3 [J]. Cancer, 2010,116 (24):5599-5607.
- [20] NATAL C,KRISTOPHER K F,MALCOLM M. Assessing the role of the EGF receptor in the development and progression of pancreatic cancer[J]. Gastrointestinal Cancer: Targets and Therapy,2014,4: 23-27.
- [21] CHRISTINE M A,BARBARA M. GRUNER K T,et al. EGF receptor is required[J]. Cancer Cell,2012,22(3): 304-317.
- [22] CHEN L,ZHOU D,LIU Z,et al. Combination of gemcitabine and erlotinib inhibits recurrent pancreatic cancer growth in mice via the JAK-STAT pathway[J]. Oncol Rep,2018,39(3):1081-1089.
- [23] CAROLINA TORRES A L,MARIA J A,ROGELIO JE-SUS P M,et al. Interplay between gemcitabine and erlotinib over pancreatic adenocarcinoma cells [J]. Pancreas,2016,45(2): 269-280.

(2019-04-29 收稿,2019-07-28 修回)
中文编辑: 严 征; 英文编辑: 冉海勇