

奥希替尼联合槲皮素对 H1975 细胞增殖的协同抑制作用

刘伟¹, 李蔷薇², 王静³, 潘跃银¹

摘要 目的 探索奥希替尼联合槲皮素对非小细胞肺癌(NSCLC) H1975 细胞的增殖抑制作用以及潜在的作用机制。方法 采用 MTT 法检测 2.625、5.25、10.5、21.42、84 nmol/L 奥希替尼和 15.625、31.25、62.5、125、250、500 μ mol/L 槲皮素对细胞增殖的抑制效应(设置单一药物组及药物联合组) 根据检测的结果计算出奥希替尼和槲皮素对细胞的半数抑制浓度(IC_{50}) 以及联合指数(CI)。单药组、两药联合组及空白对照组的细胞凋亡率采用流式细胞仪进行检测。Western blot 检测各组细胞中 Akt/p-Akt、Bcl-2 及 Bax 蛋白的表达水平变化。结果 不同浓度的奥希替尼和槲皮素均可抑制 H1975 细胞的增殖($P < 0.01$), IC_{50} 值分别为 (21.54 ± 1.05) nmol/L 和 (109.7 ± 1.08) μ mol/L; 各浓度奥希替尼与槲皮素联合时的 CI 值均 < 1 , 表现为协同抑制效应。两药联合作用后表现出更强的诱导细胞凋亡作用。奥希替尼联合槲皮素组相对两药单药组可观察到 p-Akt 及 Bcl-2 蛋白的表达明显下调($P < 0.01$), 而两药联合组 Bax 蛋白的表达水平显著高于单药组($P < 0.01$)。结论 奥希替尼联合槲皮素表现出的协同效应使 H1975 细胞增殖受到明显抑制, 其机制可能与药物作用使 p-Akt 蛋白的表达下调以及促细胞凋亡有关。

关键词 非小细胞肺癌; 槲皮素; 奥希替尼; 药物疗法; 细胞增殖与凋亡

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)08-1184-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.08.004

我国肺癌的发病率和死亡率在所有癌症中位居第一位, 而其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC) 所占比例最多, 约为 80% ~ 85%^[1-2]。腺癌约占非小细胞肺癌的 55% 左右, 其最常见的肿瘤驱动基因是表皮生长因子受体(epi-

dermal growth factor receptor, EGFR) 基因敏感性突变^[3]。约 65% EGFR 突变的肺癌患者使用第一代 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKIs) 10 ~ 14 个月后出现继发性耐药^[4]。因 T790M 突变导致耐药的患者改用第三代 EGFR-TKI 奥希替尼(osimertinib) 后无进展生存期也仅为 8 ~ 18 个月, 最终仍不可避免出现耐药^[5]。

天然类黄酮槲皮素(quercetin) 所具有的抗肿瘤特性已受到研究人员的关注和认可^[6]。第一代 EGFR-TKI 吉非替尼联合槲皮素表现出显著的协同抗肿瘤作用^[7]。该研究的目的是探讨奥希替尼与槲皮素联合使用后对 NCI-H1975 细胞增殖以及凋亡潜在的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料 H1975 细胞株由广东省肺癌研究所无偿馈赠。奥希替尼购自英国 Astra Zeneca 公司; 槲皮素、二甲基亚砜(DMSO) 购于美国 Sigma 公司; MTT、ECL 检测试剂盒及 BCA 蛋白浓度测定试剂盒、兔抗人 β -actin 多克隆抗体及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(即二抗) 购于北京索莱宝公司; RPMI-1640 培养液购自美国 HyClone 公司; Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒购于南京建成公司; 胎牛血清(FBS)、青链霉素混合液、SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒和 RIPA 裂解液均购自北京碧云天生物公司; 兔抗人磷酸化 Akt(p-Akt) 单克隆抗体、兔抗人 Bax 单克隆抗体、兔抗人 Bcl-2 单克隆抗体、兔抗人蛋白激酶 B(Akt) 多克隆抗体购自于英国 abcam 公司。

1.2 药物配制与保存 RPMI-1640 培养液按 10% FBS 的体积分数、 1×10^5 U/L 青霉素、 1×10^5 μ g/L 链霉素浓度配制保存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱。奥希替尼用 PBS 溶解, 而槲皮素则用 DMSO 溶解, 置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。使用时, 根据所需实验浓度用培养液予以稀释, 且 DMSO 最终的体积浓度需 $< 0.1\%$ 。

1.3 细胞培养 H1975 细胞置于 RPMI-1640 新鲜培养基中, 保存于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱内。H1975 细胞的传代时间为 48 ~ 72 h, 取对数生长期的培养细

2019-05-27 接收

基金项目: 安徽省卫生计生委中医药科研课题(编号: 2016zy29)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院肿瘤科, 合肥 230022

² 中国科学技术大学附属第一医院西区肿瘤表观遗传学研究室, 合肥 233004

³ 安徽医科大学第三附属医院老年医学科, 合肥 230061

作者简介: 刘伟, 男, 硕士研究生;

潘跃银, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: yueyinpan1965@126.com

胞用于实验。

1.4 使用 MTT 法检测奥希替尼联合槲皮素对 H1975 细胞增殖的影响 将 H1975 细胞消化混匀接种于 96 孔板(各孔细胞数 5×10^3) ,培养箱中培养 24 h; 用 PBS 将奥希替尼稀释成 2.625、5.25、10.5、21、42、84 $\mu\text{mol/L}$ 浓度梯度组,同样用 DMSO 分别将槲皮素稀释成 15.625、31.25、62.5、125、250、500 $\mu\text{mol/L}$ 浓度梯度组。再用 RPMI-1640 培养基按 1:1 000 分别稀释各浓度组的奥希替尼至终浓度为 2.625、5.25、10.5、21、42、84 nmol/L 、各浓度组的槲皮素至终浓度为 15.625、31.25、62.5、125、250、500 $\mu\text{mol/L}$ 。同时将各浓度组的奥希替尼和槲皮素在同一管中稀释 1 000 倍,即为奥希替尼和槲皮素联合组。将原孔培养基弃去,3 块 96 孔板分别加入稀释后的奥希替尼、槲皮素及两药联合组,每个稀释度设置 6 个复孔,并相应设置 PBS 和 DMSO 对照组以及空白对照组。CO₂ 培养箱培养 72 h 后,每孔加入 10 μl MTT(5 g/L) 溶液。细胞在培养箱中孵育 4 h 后,使用 1 ml 注射器小心吸走各孔中的上清液,每孔加入 100 μl DMSO(200 μl /孔),摇床摇动 15 min。使用酶标仪读取各孔的吸光度(optical density, OD) 值,根据 OD 值计算可得出奥希替尼及槲皮素对细胞的抑制率。利用 GraphPad Prism5 软件计算两药半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀) ,使用 Compu Syn 软件计算两药联合指数(CI) 值。

1.5 流式细胞仪检测奥希替尼联合槲皮素对 NCI-H1975 细胞整体凋亡的影响 根据以上 MTT 检测得出的结果,将奥希替尼、槲皮素稀释至 22 nmol/L 和 110 $\mu\text{mol/L}$,然后将 H1975 细胞分成 4 组:空白对照组、22 nmol/L 奥希替尼组、110 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素组、22 nmol/L 奥希替尼 + 110 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素联合组,将各组药物加入 6 孔板中(每孔细胞数为 1×10^6 个)。处理 72 h 后进行细胞凋亡检测,将 6 孔板中的各组细胞培养液吸出至合适离心管内,使用 PBS 液轻轻洗涤贴壁细胞 2 次,最后使用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化细胞。待细胞消化下来后,使用吸管将细胞加入此前收集细胞培养液的离心管内,稍稍混匀,离心后收集细胞沉淀,用 PBS 液轻轻使细胞重悬后计数;取 5×10^5 个重悬的细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,接种至新的 6 孔板中。各孔加入 500 μl Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒中的结合液,轻轻使细胞重悬;再加入 5 μl Annexin V-FITC,轻轻混匀;最后加入 5 μl 碘化丙啶,

再次混匀。随后在室温下将细胞用铝箔包裹避光孵育 10 min,然后应用流式细胞仪检测,待检测完成后使用 FlowJo7.6.1 软件分析出各分组细胞的凋亡率。

1.6 蛋白免疫印迹法检测奥希替尼联合槲皮素作用后对 H1975 细胞中 p-Akt、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达的影响 收集 22 nmol/L 奥希替尼、110 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素、22 nmol/L 奥希替尼 + 110 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素作用 72 h 后细胞,以及空白对照组细胞进行 Western blot 检测。步骤如下:将细胞消化,离心 5 min 收集细胞;用 PBS 液轻轻洗涤细胞 2 次,再次离心收集细胞沉淀;每管细胞沉淀加入 100 μl RIPA(含 1 mmol PMSF);将细胞吹匀,放置于冰上裂解 30 min,在此期间每 5 min 将细胞上下颠倒操作 1 次,收集上清液即为裂解后蛋白液;BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定各蛋白质的浓度后沸水煮 15 min,低温高速离心机离心 10 min(12 000 r/min)。将各待测样品加入 8% ~ 10% SDS-PAGE 凝胶中电泳,然后冰浴下转膜,接着在室温条件下用 5% 脱脂奶粉将转好的膜封闭 2 h。加入按合适比例的抗体稀释,其中 anti-Bax 按 1:3 000 稀释;anti-Bcl-2 按 1:1 000 稀释;anti-Akt 按 1:3 000 稀释;anti-p-Akt 按 1:5 000 稀释;anti- β -actin 按 1:2 000 稀释。放置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,然后使用 TBST 液清洗 3 次,每隔 10 min 洗 1 次,之后加入二抗,抗体稀释度为 1:3 000,室温孵育约 1 h,再次 TBST 液涮洗 5 次,每 10 min 洗 1 次。避光显影后使用 Image J 软件分析待测蛋白的灰度值。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件对该实验结果进行分析,重复实验操作 3 次,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。通过 LSD-*t* 检验进行组内的成对比较,并通过方差分析进行组间比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 奥希替尼联合槲皮素作用对 H1975 细胞的增殖抑制效应 MTT 结果显示,作用 72 h 后,奥希替尼和槲皮素对 H1975 细胞的 IC₅₀ 值分别为 (21.54 ± 1.05) nmol/L 和 (109.7 ± 1.08) $\mu\text{mol/L}$,细胞增殖的抑制率随着药物浓度的增加而增高,不同浓度的药物对细胞抑制率的差异有统计学意义($F = 59.34, 101.25, P < 0.01$) (图 1)。经过计算,不同浓度的奥希替尼联合槲皮素处理组 CI 值均 < 1 ,显示出明确的协同抑制作用(图 2)。

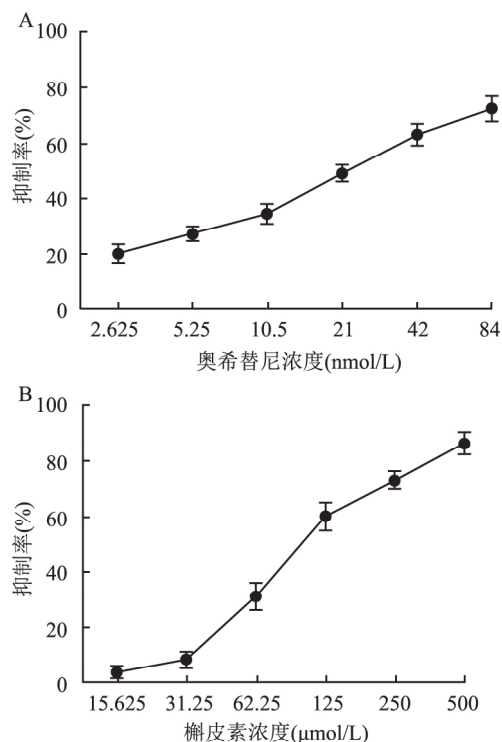


图1 MTT 检测奥希替尼和槲皮素对 NSCLC H1975 细胞的增殖抑制效应
A: 奥希替尼处理组; B: 槲皮素处理组

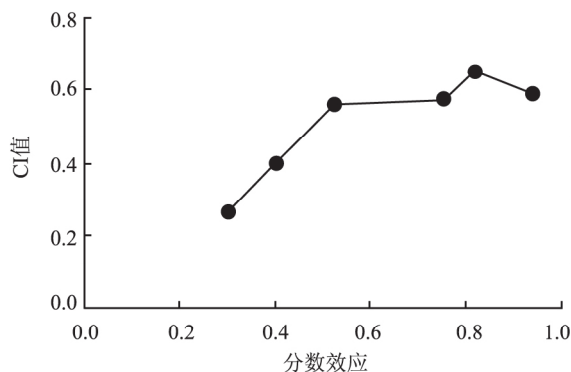


图2 奥希替尼联合槲皮素 作用于 NSCLC H1975 细胞的 CI 值

2.2 各药物处理组 H1975 细胞的凋亡率 经流式细胞仪检测, 奥希替尼单药和槲皮素单药处理 72 h 后的 H1975 细胞的凋亡率分别为 17.14% 和 23.5%, 而两药联合处理后为 47.8%。与单药组及对照组比较, 奥希替尼和槲皮素联合组细胞的凋亡率明显增高, 差异有统计学意义 ($F = 226.38$, $P < 0.01$) (图 3)。

2.3 奥希替尼和槲皮素处理后 H1975 细胞中 Akt/p-Akt 及 Bcl-2、Bax 蛋白的表达 根据 Western blot 检测结果可见, 与对照组、奥希替尼单药处理组和槲

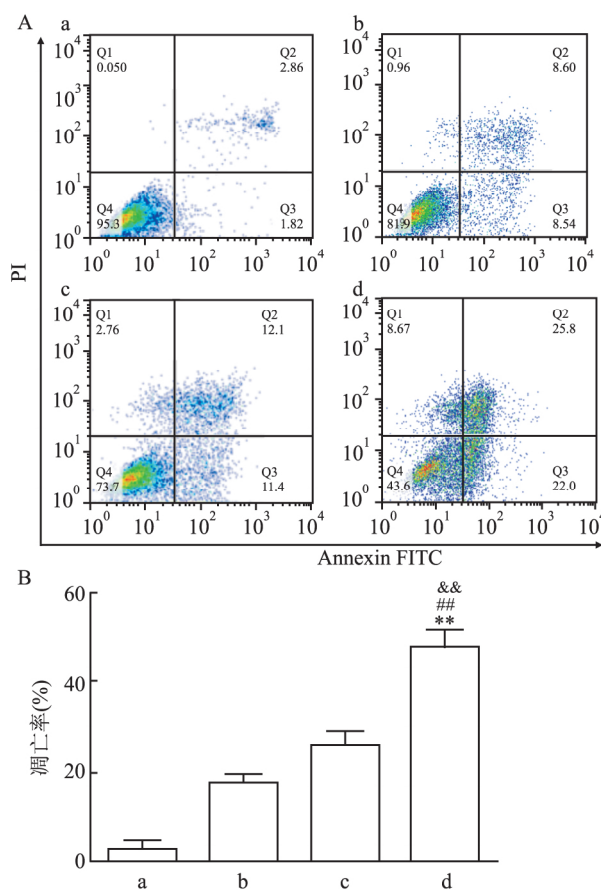


图3 流式细胞术检测奥希替尼联合槲皮素对 NSCLC H1975 细胞凋亡率的影响

A: 各组细胞的流式细胞仪检测结果; B: 各组细胞的凋亡率; a: 对照组; b: 奥希替尼单药组; c: 槲皮素单药组; d: 两药联合组; 与对照组比较: $**P < 0.01$; 与奥希替尼单药组比较: $##P < 0.01$; 与槲皮素单药组比较: $&&P < 0.01$

皮素单药处理组比较, 两药联合处理组中, H1975 细胞中 p-Akt 蛋白的表达水平明显下调, 差异有统计学意义 ($F = 143.48$, $P < 0.01$); 联合组 bcl-2 蛋白表达水平显著低于对照组和单药组, 差异有统计学意义 ($F = 58.72$, $P < 0.01$)。与奥希替尼单药组比较, 奥希替尼和槲皮素两药组 bax 蛋白表达水平明显升高, 差异有统计学意义 ($F = 73.31$, $P < 0.01$) (图 4)。

3 讨论

亚洲 EGFR 阳性的非小细胞肺癌在肺癌中所占比例为 30% ~ 40% [8]。分子靶向药物的出现改变了该类型肺癌的治疗模式, 第一代 EGFR-TKI 初始取得良好疗效, 但很快出现继发性耐药, 而最常见的耐药原因为 T790M 突变 (约 60%) [9]。第三代 EGFR-TKI 奥希替尼可选择性抑制 T790M 突变的

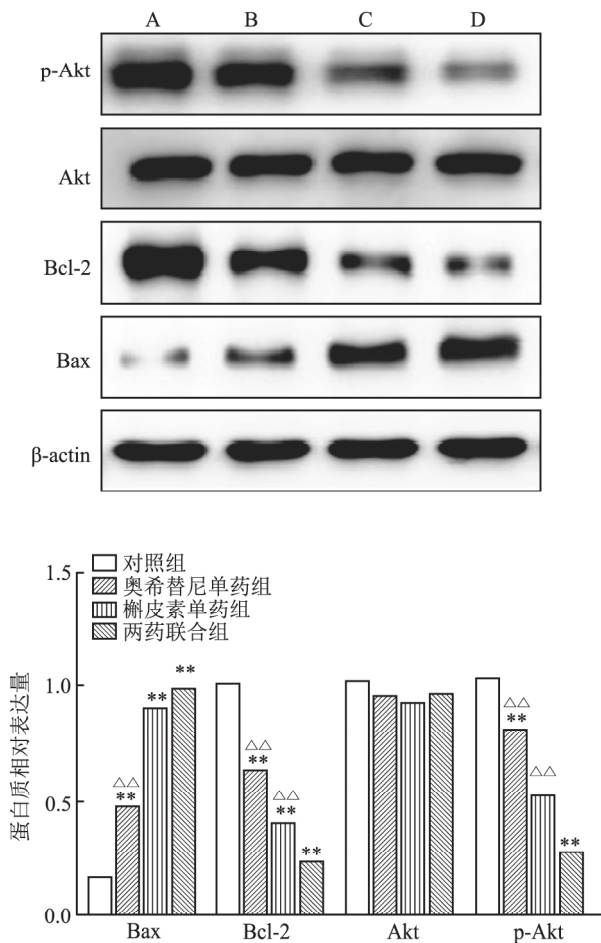


图4 Western blot 检测奥希替尼联合槲皮素对 NSCLC H1975 细胞中目的蛋白 (Akt、p-Akt、Bcl-2 及 Bax) 表达的影响

A: 对照组; B: 奥希替尼单药组; C: 槲皮素单药组; D: 两药联合组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与两药联合组比较: △△ $P < 0.01$

EGFR^[5]。而根据 Jänne et al^[10] 对 127 例 EGFR-T790M 突变阳性的患者所进行的 I 期临床试验中, 对奥希替尼的客观缓解率达到 61%, 然而中位无进展生存期仅仅为 9.6 个月。

槲皮素是一种天然的类黄酮, 槲皮素是一种天然类黄酮, 存在于许多中草药和食品中, 如银杏、三七、苹果、洋葱、绿茶等。其抗肿瘤特性贯穿于癌变的各个阶段, 从肿瘤发生到侵袭和转移, 并在不同的遗传、生化和免疫方面发挥作用, 因此在近年来引起了癌症研究人员的关注^[6]。研究^[11]显示, 槲皮素通过不同类型癌细胞的细胞内机制, 增强了紫杉醇和顺铂等几种化疗药物对肿瘤细胞的生长抑制作用。

磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) / 蛋白激酶 B (Akt) 信号转导途径是肿瘤发生发展过程中起关键性作用的一类信号通路。在多种肿瘤中观察到 PI3K/Akt 通路的过度激活, 致使细胞

凋亡受阻^[12]。Wang et al^[13] 研究发现当 PI3K/Akt 通路的活性被抑制时, 顺铂耐药的肺非小细胞肺癌细胞对化疗药物的敏感性增强。当 PI3K 开始活化, AKT 的蛋白结构转变为具有激酶活性的 p-Akt, 使得下游效应分子中具有抗凋亡效应的原癌基因如 Bcl-2 的表达也随之增加, 从而抵抗放化疗所引起的肿瘤细胞凋亡, 而 Bax 是 Bcl-2 的同源基因, 其编码的蛋白与 Bcl-2 形成异源二聚体后可对 Bcl-2 的表达产生抑制作用, 因而被认为是一种重要的促细胞凋亡基因^[14]。

本研究将第三代 EGFR-TKI 奥希替尼联合槲皮素作用于 T790M 突变阳性的 H1975 细胞, 验证两种药物是否具有协同作用。实验结果表明, 奥希替尼联合槲皮素可以更显著地抑制细胞增殖, 各实验组的 CI 值均 < 1 , 显示出协同抑制作用。流式细胞术还进一步表明, 奥希替尼联合槲皮素组所引起的 H1975 细胞凋亡比单一药物组更为明显, 表现出更强的诱导细胞凋亡作用, 其机制可能为两药联合后下调 Akt 的磷酸化水平, 使得抗凋亡 Bcl-2 蛋白的表达受到抑制而促凋亡 Bax 蛋白的表达量增加。由此可见, 槲皮素联合奥希替尼可对 H1975 细胞产生协同抗增殖与促凋亡作用。当然, 本研究为体外实验, 尚未建立动物模型验证, 其作用有待进一步研究证实。

参考文献

- [1] Are C, Rajaram S, Are M, et al. A review of global cancer burden: trends, challenges, strategies, and a role for surgeons [J]. J Surg Oncol 2013, 107(2): 221-6.
- [2] Chen W, Zheng R, Zhang S, et al. Annual report on status of cancer in China, 2010 [J]. Chin J Cancer Res 2014, 26(1): 48-58.
- [3] Saad N, Poudel A, Basnet A, et al. Epidermal growth factor receptor T790M mutation-positive metastatic non-small-cell lung cancer: focus on osimertinib (AZD9291) [J]. Onco Targets Ther, 2017, 10: 1757-66.
- [4] Wu M, Yuan Y, Pan Y Y, et al. Combined gefitinib and pemetrexed overcome the acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer [J]. Mol Med Rep 2014, 10(2): 931-8.
- [5] Cross D A, Ashton S E, Ghiorghiu S, et al. AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer [J]. Cancer Discov 2014, 4(9): 1046-61.
- [6] Lee S H, Lee E J, Min K H, et al. Quercetin enhances chemosensitivity to gemcitabine in lung cancer cells by inhibiting heat shock protein 70 expression [J]. Clin Lung Cancer 2015, 16(6):

- e235-43.
- [7] 王 静,袁 媛,潘跃银,等. 吉非替尼联合槲皮素对非小细胞肺癌 PC9/GR 细胞增殖的协同抑制作用[J]. 肿瘤 2018 ,38 (3):182-8.
- [8] Midha A ,Dearden S ,McCormack R. EGFR mutation incidence in non-small cell lung cancer of adenocarcinoma histology: a systematic review and global map by ethnicity (mutmapII) [J]. *Am J Cancer Res* 2015 5(9):2892-911.
- [9] Martin M J ,Eberlein C ,Taylor M , et al. Inhibition of oxidative phosphorylation suppresses the development of osimertinib resistance in a preclinical model of EGFR-driven lung adenocarcinoma [J]. *Oncotarget* ,2016 7(52):86313-25.
- [10] Jänne P A ,Yang J C ,Kim D W , et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med* 2015 ,372(18):1689-99.
- [11] Mukherjee A ,Khuda-Bukhs A R. Quercetin down-regulates IL-6/STAT-3 signals to induce mitochondrial-mediated apoptosis in a non-small-cell lung-cancer cell line , A549 [J]. *J Pharmacopuncture* 2015 ,18(1):19-26.
- [12] Song B Q ,Chi Y ,Li X , et al. Inhibition of notch signaling promotes the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells through autophagy activation and PTEN-PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Cell Physiol Biochem* ,2015 ,36(5):1991-2002.
- [13] Wang H J ,Yang Z X ,Dai X T , et al. Bisdemethoxycurcumin sensitizes cisplatin-resistant lung cancer cells to chemotherapy by inhibition of CA916798 and PI3K/AKT signaling [J]. *Apoptosis* ,2017 22(9):1157-68.
- [14] 赵 楠,王 红,穆春青,等. 雷公藤红素抑制 A549 人肺癌细胞的增殖并增加其凋亡 [J]. 细胞与分子免疫学杂志 2018 ,34 (12):1111-5.

Synergistic effect of osimertinib combined with quercetin inhibiting H1975 cells proliferation

Liu Wei¹ ,Li Qiangwei² ,Wang Jing³ ,et al

(¹Dept of Oncology ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230022;

²Laboratory of Tumor Epigenetics ,The First Affiliated Hospital of University of

Science and Technology of China ,West District ,Hefei 233004; ³Dept of Geriatrics ,

The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230061)

Abstract Objective To explore the effect of osimertinib combined with quercetin inhibiting non-small cell lung cancer(NSCLC) H1975 cells proliferation and potential mechanism. **Methods** MTT method was used to detect the effects of osimertinib (2. 625 ,5. 25 ,10. 5 ,21 ,42 and 84 nmol/L) and quercetin (15. 625 ,31. 25 ,62. 5 ,125 ,250 and 500 μ mol/L) as single drug and the combination of the two drugs on proliferation of H1975 cells. The half inhibitory concentration (IC₅₀) and the combination index (CI) values of osimertinib and quercetin on H1975 cells were calculated. The apoptotic rate of each group of H1975 cells was detected by flow cytometry. The changes of Akt/ p-Akt ,bcl-2 and bax protein expression levels in cells of each group were tested by Western blot. **Results** Osimertinib and quercetin at different concentrations could inhibit the proliferation of H1975 cells(both $P < 0. 01$). The IC₅₀ values were (21. 54 $\pm$ 1. 05) nmol/L and (109. 7 $\pm$ 1. 08) μ mol/L ,respectively. CI values were < 1 when osimertinib combined with quercetin at all concentrations ,showing a synergistic inhibitory effect. The combination of the two drugs showed a stronger effect of inducing apoptosis. The expressions of p-Akt and bcl-2 proteins in the osimertinib combined with quercetin group were significantly down-regulated compared with the single drug groups (both $P < 0. 01$) ,while the bax protein expression level in the combination group was significantly higher than that in the single drug groups($P < 0. 01$). **Conclusion** Osimertinib and quercetin can exert synergistic action ,which can significantly inhibit H1975 cell proliferation. The mechanism may be related to the down-regulation of p-Akt protein expression and the promotion of apoptosis.

Key words non-small cell lung cancer; quercetin; osimertinib; drug therapy; cell proliferation and apoptosis