

· 论著 ·

他莫西芬与 β -榄香烯或吉非替尼联合治疗
对乳腺癌 MCF-7 细胞的影响张斌^{1,3} 张霞⁴ 张政容³ 刘越坚² 张阳⁵

【摘要】 目的 探讨内分泌药物与中药或化疗药物的联合应用对乳腺癌 MCF-7 细胞的影响。**方法** 分别应用 1.5×10^{-6} mol/L 或 0.15×10^{-6} mol/L 他莫西芬(tamoxifen, TAM)与梯度浓度(5、10、20、40、80 $\mu\text{g/ml}$)的 β -榄香烯(β -elemene, β -ELE)或吉非替尼(gefitinib)序贯或同时作用于乳腺癌 MCF-7 细胞。应用 MTT 法检测不同用药方案对 MCF-7 细胞的增殖抑制作用,计算药物联合指数(combine index, CI)来评价疗效。流式细胞仪检测不同方案对 MCF-7 细胞周期的影响。细胞增殖抑制率采用重复测量方差分析进行比较,细胞周期数据采用方差分析。**结果** 与 β -ELE 单独作用组相比,随着 β -ELE 浓度的增加,TAM 与 β -ELE 联合用药组的细胞增殖抑制率显著升高(分组: $F=34809.538, P=0.000$; β -ELE 浓度: $F=118.540, P=0.000$, 交互作用: $F=312.912, P=0.000$)。与 gefitinib 单独作用组相比,随着 gefitinib 浓度的增加,TAM 与 gefitinib 联合用药组的细胞增殖抑制率显著升高,差异具有统计学意义(分组: $F=21186.430, P=0.000$; gefitinib 浓度: $F=415.842, P=0.000$; 交互作用: $F=134.464, P=0.000$)。TAM 浓度为 1.5×10^{-6} mol/L 时, β -ELE-TAM、TAM- β -ELE 两种方案的 CI 值($0.8627 \pm 0.0088, 0.8388 \pm 0.0072$)低于 TAM+ β -ELE 方案(0.9464 ± 0.0038)(P 均 <0.050)。gefitinib-TAM、TAM-gefitinib 两种方案的 CI 值($0.3383 \pm 0.0024, 0.4481 \pm 0.0029$)低于 TAM+gefitinib 方案(0.5319 ± 0.0015)(P 均 <0.050)。流式细胞仪检测显示,20 $\mu\text{g/ml}$ 及 40 $\mu\text{g/ml}$ β -ELE 作用于 MCF-7 细胞后, G_0/G_1 期细胞比例由 49.26% 提高到 64.04% 和 63.88%; 10 $\mu\text{g/ml}$ 及 20 $\mu\text{g/ml}$ gefitinib 作用于 MCF-7 细胞后, G_0/G_1 期细胞比例由 49.26% 提高到 54.89%, 68.35%。**结论** β -ELE 及 gefitinib 与 TAM 序贯联用具有协同作用,同时应用具有叠加作用,均可使 MCF-7 细胞阻滞于 G_0/G_1 期并抑制细胞增殖。

【关键词】 乳腺肿瘤; 化学疗法, 辅助; 他莫西芬; β -榄香烯; 吉非替尼

【中图法分类号】 R737.9 **【文献标志码】** A

Effect of combined use of tamoxifen with β -elemene or gefitinib in breast cancer MCF-7 cells Zhang Bin^{1,3}, Zhang Xia⁴, Zhang Gairong³, Liu Yuejian², Zhang Yang⁵. ¹Department of Oncology, ²Experimental Center, First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, China; ³Graduate School, Dalian Medical University, Dalian 116044, China; ⁴Department of Medical Oncology, Shandong Provincial Tumor Hospital, Jinan 250017, China; ⁵Department of Medical Oncology, Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116044, China

Corresponding author: Zhang Yang, Email: zydl@medmail.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of combined use of endocrine drug with traditional Chinese medicine or chemotherapy drug in breast cancer MCF-7 cells. **Methods** MCF-cells were divided into several groups respectively receiving the sequential or combined treatment of tamoxifen (TAM, 1.5×10^{-6} mol/L and 0.15×10^{-6} mol/L) and β -elemene (β -ELE) or gefitinib at gradient concentrations of 5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{g/ml}$. After the different drug treatments, the proliferation inhibition rates of MCF-7 cells were assayed by MTT, the efficacy of the drug combination was evaluated by the combine index (CI), and the cell cycle was detected by flow cytometry. The inhibition rates were compared by repeated measurement analysis of variance, and the data

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2015.02.002

基金项目:山东省自然科学基金(ZR2013C03050)、山东省医学科学院青年基金(2013-35)及大连医科大学附属第一医院青年基金(2014QN004)资助项目

作者单位:116011 大连医科大学附属第一医院肿瘤科¹、实验中心²;116044 大连医科大学研究生院³;250017 济南,山东省肿瘤医院肿瘤内三科⁴;116027 大连医科大学附属第二医院肿瘤内科⁵

通信作者:张阳,Email:zydl@medmail.com.cn

on cell cycle were analyzed by variance analysis. **Results** Compared with β -ELE group, with the increase of β -ELE concentration, the proliferation inhibition rates of MCF-7 cells after the different regimen of β -ELE plus TAM were significantly increased (groups: $F = 34809.538$, $P = 0.000$; β -ELE concentration: $F = 118.540$, $P = 0.000$; interaction: $F = 312.912$, $P = 0.000$). Compared with gefitinib group, with the increase of gefitinib concentration, the proliferation inhibition rates of MCF-7 cells after the different regimen of gefitinib plus TAM were significantly increased (groups: $F = 21186.430$, $P = 0.000$; gefitinib concentration: $F = 415.842$, $P = 0.000$; interaction: $F = 134.464$, $P = 0.000$). With TAM at the concentration of 1.5×10^{-6} mol/L, CI value of β -ELE-TAM or TAM- β -ELE was lower than that of TAM + β -ELE ($0.8627 \pm 0.0088/0.8388 \pm 0.0072$ vs 0.9464 ± 0.0038 , both $P < 0.050$); CI value of gefitinib-TAM or TAM-gefitinib was lower than that of TAM + gefitinib ($0.3383 \pm 0.0024/0.4481 \pm 0.0029$ vs 0.5319 ± 0.0015 , both $P < 0.050$). The results of flow cytometry showed that the proportion of MCF-7 cells at phase of G_0/G_1 was increased from 49.26% to 64.04% and 63.88% after the treatment of 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ β -ELE, from 49.26% to 54.89% and 68.35% after the treatment of 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ gefitinib. **Conclusions** The sequential treatment of TAM and β -ELE or gefitinib has synergistic effect and the combined treatment has additive effect. It can cause MCF-7 cells arrested in G_0/G_1 phase and inhibit cell proliferation.

[Key words] Breast neoplasms; Chemotherapy, adjuvant; Tamoxifen; β -elemene; Gefitinib

乳腺癌是内分泌依赖性肿瘤,雌激素的长期刺激对乳腺癌的发生具有重要作用。100 多年前学者们就采用卵巢切除来治疗晚期乳腺癌^[1]。20 世纪 70 年代抗雌激素药物——他莫西芬(tamoxifen, TAM)的临床应用,开创了乳腺癌内分泌治疗的新时代^[2]。内分泌治疗不良反应小,服用方便,临床效果与化疗相似,但目前认为其不宜与化疗同期应用。本实验探讨了肿瘤内分泌药物与中药或化疗药物的联合应用对乳腺癌 MCF-7 细胞的影响,为临床工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

MCF-7 细胞系来自中国科学院上海细胞资源库,DMEM/H-G 培养基及胎牛血清购于美国 Hyclone 公司, β -榄香烯(β -elemene, β -ELE)由大连远大制药有限公司提供,吉非替尼(gefitinib)购于美国 AstraZeneca 公司, TAM 购于加拿大 TRC 公司。细胞由含 10% 胎牛血清的 DMEM/H-G 培养液进行培养。TAM 用 DMSO(购于美国 Gibco 公司)溶解配置成 3.0×10^{-2} mol/L 溶液(使用时用细胞培养液稀释成相应浓度), -20°C 冰箱保存。gefitinib 应用 DMSO 溶解配置成 20 g/L 溶液, -20°C 冰箱保存(使用时用细胞培养液稀释成相应浓度)。

1.2 细胞培养

将 MCF-7 细胞放在含 10% FBS 的 DMEM/H-G 培养基中,在 37°C 、5% CO_2 条件下培养,每 3 ~ 4 d 传代 1 次。

1.3 方案

TAM 与 β -ELE 联合。 β -ELE 序贯 TAM 组

(β -ELE-TAM): β -ELE 按梯度浓度(5、10、20、40、80 $\mu\text{g/ml}$)作用于 MCF-7 细胞 48 h 后加入 TAM (1.5×10^{-6} mol/L 或 0.15×10^{-6} mol/L)继续作用细胞 72 h; TAM 序贯 β -ELE 组(TAM- β -ELE): 将 TAM (1.5×10^{-6} mol/L 或 0.15×10^{-6} mol/L)作用 MCF-7 细胞 72 h 后加入 β -ELE (5、10、20、40、80 $\mu\text{g/ml}$)作用细胞 48 h; 同时作用组(β -ELE + TAM), β -ELE (5、10、20、40、80 $\mu\text{g/ml}$)与 TAM (1.5×10^{-6} mol/L)混合作用于细胞,48 h 后弃混合培养液,只加入含 TAM 的培养液再作用 24 h。

TAM 与 gefitinib 联合: gefitinib 序贯 TAM 组(gefitinib-TAM): gefitinib 按梯度浓度(5、10、20、40、80 $\mu\text{g/ml}$)作用于 MCF-7 细胞 48 h 后加入 TAM (1.5×10^{-6} mol/L 和 0.15×10^{-6} mol/L)继续作用 72 h; TAM 序贯 gefitinib 组(TAM-gefitinib): TAM (1.5×10^{-6} mol/L 和 0.15×10^{-6} mol/L)作用细胞 72 h 后加入 gefitinib (5、10、20、40、80 $\mu\text{g/ml}$)作用细胞 48 h; 同时作用组(gefitinib + TAM): gefitinib (5、10、20、40、80 $\mu\text{g/ml}$)与 TAM (1.5×10^{-6} mol/L)混合作用细胞,48 h 后弃混合培养液,只加入含 TAM 的培养液再作用 24 h。

TAM 浓度为 0.15×10^{-6} mol/L 时,对细胞增殖抑制作用微弱,不满足后续实验要求,故同时作用组未设置该浓度。

1.4 MTT 法检测细胞活性

取对数生长期的上述细胞,以细胞数 $5.0 \times 10^5/\text{ml}$ 接种 96 孔培养板。为避免周边效应,培养板的周边孔弃用。实验组及对照组细胞培养均设 3 个平行孔,空白孔仅放置培养液。待细胞生长至 40% ~ 50% 融合时,按照实验方案分别加入

gefitinib(梯度浓度 5、10、20、40、80 $\mu\text{g/ml}$)或 β -ELE(梯度浓度 5、10、20、40、80 $\mu\text{g/ml}$)培养 48 h,和(或)TAM(1.5×10^{-6} 或 0.15×10^{-6} mmol/L 两种剂量),培养 72 h 后吸取培养基,加入方案设计序贯药物,继续培养,全部培养共 120 h,再加入新鲜配置的 MTT 溶液(5 mg/ml) 20 μl ,继续孵育 4 h,吸去孔内液体,每培养孔加入 200 μl DMSO,震荡 15~20 min,酶联仪 492 nm 测定吸光度值(D 值),采用 D 值计算细胞增殖抑制率,增殖抑制率(%) = $1 - [(\text{实验孔 } D \text{ 值} - \text{空白孔 } D \text{ 值}) / (\text{对照孔 } D \text{ 值} - \text{空白孔 } D \text{ 值})] \times 100\%$ [3]。实验重复 3 次。

1.5 联合方案疗效评价

产生效应 f 的药物浓度可分解为联合药物的浓度 D_1 和 D_2 ,对于产生任一效应 f 时的药物联合指数(combine index, CI)可用下列公式算出: $CI = D_1/D_{n1} + D_2/D_{n2} + \alpha D_1 D_2 / D_{n1} D_{n2}$ [3]。式中 D_1 和 D_2 分别代表联合用药产生效应 f 时的浓度,而 D_{n1} 和 D_{n2} 分别代表药物单用时产生效应 f 时的浓度。根据推测两药不排斥或相互排斥, α 取值 1 或 0; $CI \leq 1.1$ 为叠加作用, $0.8 \leq CI < 0.9$ 为低度协同作用, $0.6 \leq CI < 0.8$ 为中度协同作用, $0.4 \leq CI < 0.6$ 为高度协同作用, $0.2 \leq CI < 0.4$ 为强协同作用 [3]。全部实验均重复 3 次,取平均值。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期

取对数生长期的细胞,胰酶消化收集细胞,PBS 洗两遍,弃上清液,加入 1 ml 70% 预冷乙醇中,轻轻摇匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 12 h 以上。PBS 洗涤去乙醇,室温下离心,离心机半径 15 cm,1000 r/min, PBS 洗两遍。用 0.5 ml PBS 重悬细胞,加入核糖核酸酶 A(RNaseA),调整 RNaseA 浓度至 0.5 mg/ml,温水浴 30 min,加入 PI,调整 PI 浓度至 50 $\mu\text{g/ml}$ 。

全部实验均重复 3 次,取平均值。

1.7 统计学方法

应用 SPSS 16.0 软件,各组抑制率比较采用重复测量方差分析,细胞周期数据采用方差分析, LSD 法进行两两比较, $P < 0.05$ 。为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞增殖抑制率的比较

TAM 与 β -ELE 联合处理后,与 β -ELE 单独作用组相比,随着 β -ELE 浓度的增加,各联合用药组均表现出明显的细胞增殖抑制作用,具体统计数值见表 1。值得注意的是,在 β -ELE 低浓度 5 $\mu\text{g/ml}$ 及 10 $\mu\text{g/ml}$ 时, β -ELE-TAM 方案的细胞增殖抑制率高于 TAM- β -ELE 方案,但是这种现象在 TAM 浓度为 0.15×10^{-6} mol/L 时更为明显,其增殖抑制率分别为 $(26.38 \pm 2.05)\%$ 比 $(9.62 \pm 0.89)\%$ ($P < 0.050$) 和 $(31.38 \pm 1.55)\%$ 比 $(22.81 \pm 1.84)\%$ ($P < 0.050$)。可见,低浓度 β -ELE(5 $\mu\text{g/ml}$ 及 10 $\mu\text{g/ml}$) 应用在 TAM 之前对细胞抑制作用更强,尤其在 TAM 低浓度时差异明显。

TAM 与 gefitinib 联合处理后,与 gefitinib 单独作用组相比,随着 gefitinib 浓度的增加,各联合用药组均表现出明显的细胞增殖抑制作用,具体统计数值见表 2。在 gefitinib 低浓度 5 $\mu\text{g/ml}$ 及 10 $\mu\text{g/ml}$ 时,gefitinib-TAM 方案的细胞增殖抑制率高于 TAM-gefitinib 方案,但是这种现象在 TAM 浓度为 0.15×10^{-6} mol/L 时更为明显,其增殖抑制率分别为 $(27.39 \pm 1.02)\%$ 比 $(4.74 \pm 0.25)\%$ ($P < 0.050$) 和 $(35.03 \pm 0.98)\%$ 比 $(22.00 \pm 1.05)\%$ ($P < 0.050$)。可见,低浓度 gefitinib(5 $\mu\text{g/ml}$ 及 10 $\mu\text{g/ml}$) 应用在 TAM 之前对细胞抑制作用更强,尤其在

表 1 不同用药方案处理后 MCF-7 细胞的增殖抑制率比较($\bar{x} \pm s, \%$)

分组	β -ELE($\mu\text{g/ml}$)				
	5	10	20	40	80
β -ELE	0.01 ± 0.01	2.81 ± 0.25	15.80 ± 1.33	47.09 ± 2.53	95.30 ± 1.86
β -ELE-TAM(1.5)	33.98 ± 1.86	36.59 ± 1.80	56.33 ± 2.47	80.22 ± 1.56	98.00 ± 0.89
TAM(1.5)- β -ELE	25.25 ± 1.88	33.44 ± 2.07	65.89 ± 2.55	76.95 ± 1.82	97.63 ± 1.88
β -ELE + TAM(1.5)	12.40 ± 0.90	17.99 ± 2.02	31.27 ± 2.29	61.86 ± 3.09	95.71 ± 1.81
β -ELE-TAM(0.15)	26.38 ± 2.05	31.38 ± 1.55	40.35 ± 1.45	74.39 ± 1.95	98.04 ± 0.92
TAM(0.15)- β -ELE	9.62 ± 0.89	22.81 ± 1.84	54.36 ± 2.18	61.32 ± 2.10	96.64 ± 2.07

注:分组差异有统计学意义, $F = 34809.538$, $P = 0.000$;不同浓度的 β -ELE 作用后 MCF-7 细胞增殖抑制率差异也有统计学意义, $F = 118.540$, $P = 0.000$;分组与 β -ELE 浓度具有交互作用, $F = 312.912$, $P = 0.000$;分组之间除了 β -ELE-TAM(1.5) 和 TAM(1.5)- β -ELE 之间差异无统计学意义($P = 0.416$),其余差异都有统计学意义($P < 0.050$), β -ELE 为 β -榄香烯;TAM 为他莫西芬

表 2 不同用药方案处理后 MCF-7 细胞的增殖抑制率比较($\bar{x}\pm s, \%$)

分组	gefitinib($\mu\text{g/ml}$)				
	5	10	20	40	80
gefitinib	0.01 \pm 0.01	1.23 \pm 0.24	24.32 \pm 1.91	39.48 \pm 1.64	50.46 \pm 2.14
gefitinib-TAM(1.5)	38.32 \pm 0.76	50.27 \pm 1.83	63.12 \pm 1.84	83.36 \pm 1.22	92.82 \pm 0.91
TAM(1.5)-gefitinib	21.97 \pm 1.19	44.86 \pm 1.31	55.42 \pm 1.80	81.48 \pm 1.33	96.41 \pm 0.81
gefitinib+TAM(1.5)	25.46 \pm 2.03	36.96 \pm 1.17	46.33 \pm 2.17	70.39 \pm 1.90	86.11 \pm 1.80
gefitinib-TAM(0.15)	27.39 \pm 1.02	35.03 \pm 0.98	58.90 \pm 1.34	71.46 \pm 1.32	91.53 \pm 1.06
TAM(0.15)-gefitinib	4.74 \pm 0.25	22.00 \pm 1.05	40.45 \pm 1.43	48.73 \pm 1.80	59.30 \pm 3.22

注:分组差异有统计学意义, $F=21186.430$, $P=0.000$;不同浓度的 gefitinib 作用后增殖抑制率差异也有统计学意义, $F=415.842$, $P=0.000$;分组与 gefitinib 浓度作用具有交互作用, $F=134.464$, $P=0.000$;分组之间差异均有统计学意义, $P<0.050$; gefitinib 为吉非替尼; TAM 为他莫西芬

TAM 低浓度时差异明显。

2.2 药物联合指数分析

以 $1.5\times 10^{-6}\text{mol/L}$ 的 TAM 作为研究浓度,发现 β -ELE-TAM 方案、TAM- β -ELE 方案与 TAM+ β -ELE 方案的 CI 值分别为 0.8627 ± 0.0088 、 0.8388 ± 0.0072 、 0.9464 ± 0.0038 , β -ELE-TAM、TAM- β -ELE 两种方案的 CI 值低于 TAM+ β -ELE 同时作用方案,两种药物序贯应用具备协同作用,而 TAM+ β -ELE 方案为叠加作用。3 种方案的 CI 值差异有统计学意义($F=199.916$, $P=0.000$),两两比较差异均有统计学意义($P<0.050$)。

gefitinib-TAM 方案、TAM-gefitinib 方案与 TAM+gefitinib 方案的 CI 值分别为 0.3383 ± 0.0024 、 0.4481 ± 0.0029 及 0.5319 ± 0.0015 , gefitinib-TAM、TAM-gefitinib 两种方案的 CI 值低于 TAM+gefitinib 同时作用方案,协同作用较高,3 种方案的 CI 值差异有统计学意义($F=5154.000$, $P=0.000$),两两比较差异均有统计学意义($P<0.050$)。

2.3 流式细胞仪检测细胞周期

MTT 结果显示 gefitinib $10\mu\text{g/ml}$ 及 $20\mu\text{g/ml}$ 与 β -ELE $20\mu\text{g/ml}$ 及 $40\mu\text{g/ml}$ 的剂量对增殖抑

制率影响差异较大,针对该两组剂量笔者进行流式细胞仪的细胞周期检测。根据 MTT 结果,采用了 β -ELE $20\mu\text{g/ml}$ 及 $40\mu\text{g/ml}$ 与 gefitinib $10\mu\text{g/ml}$ 及 $20\mu\text{g/ml}$ 分别作用于 MCF-7 细胞 48 h 后进行流式细胞仪检测。 G_0/G_1 期细胞比例均可见提高,两种剂量 β -ELE 作用后,由 $(49.26\pm 1.74)\%$ 提高到 $(64.04\pm 1.39)\%$ 和 $(63.88\pm 1.81)\%$;两种剂量 gefitinib 作用后,由 49.26% 提高到 $(54.89\pm 1.31)\%$ 及 $(68.35\pm 2.54)\%$ (表 3,图 1)。

3 讨论

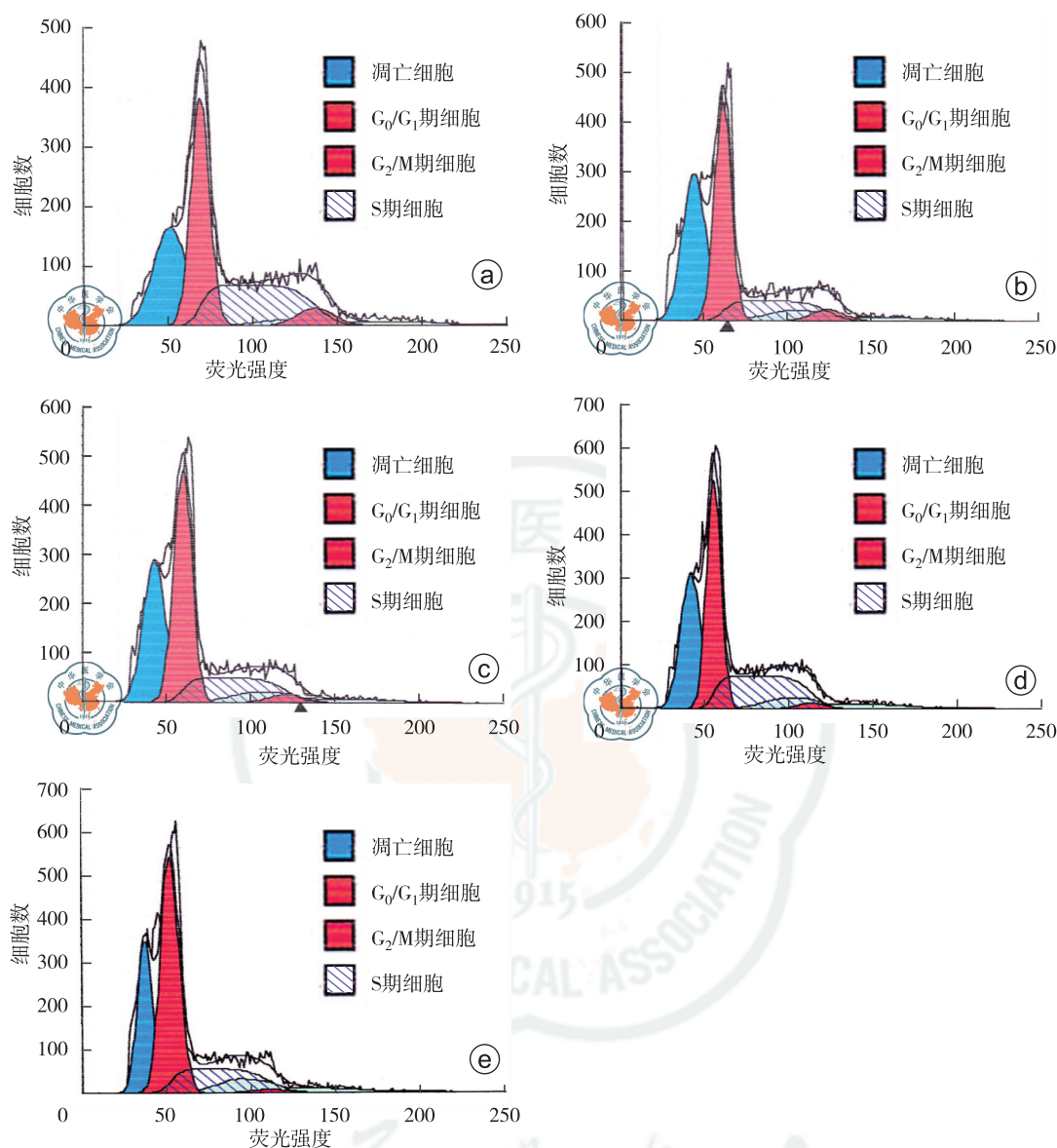
乳腺癌的内分泌治疗始于 1896 年学者们用卵巢切除治疗晚期乳腺癌,至今已有上百年的历史^[1]。乳腺癌的内分泌治疗在肿瘤的内分泌治疗中最为成熟和卓有成效。内分泌治疗是乳腺癌综合治疗的重要组成部分,适应对象为 ER 或 PR 阳性,肿瘤生长缓慢,术后无瘤生存期较长,伴或不伴骨和软组织转移,无症状的内脏转移以及既往内分泌治疗有效的乳腺癌患者^[4]。

TAM 是目前应用最广泛的内分泌治疗药物,对适应人群的疗效甚至优于化疗。江泽飞等^[5]将 369 例乳腺癌根治术后患者分为内分泌治疗组和

表 3 不同用药方案作用后 MCF-7 细胞周期的变化($\bar{x}\pm s, \%$)

分组	凋亡率	G_0/G_1	G_2/M	S
对照组	25.76 \pm 2.08	49.26 \pm 1.74	7.76 \pm 0.48	42.98 \pm 1.41
20 $\mu\text{g/ml}$ β -ELE	34.19 \pm 2.26 ^a	64.04 \pm 1.39 ^a	6.71 \pm 1.33	29.25 \pm 0.54 ^a
40 $\mu\text{g/ml}$ β -ELE	29.60 \pm 1.02 ^{ab}	63.88 \pm 1.81 ^a	4.71 \pm 0.67 ^{ab}	31.41 \pm 1.18 ^a
10 $\mu\text{g/ml}$ gefitinib	28.37 \pm 1.89 ^b	54.89 \pm 1.31 ^{abc}	2.95 \pm 0.55 ^{abc}	42.16 \pm 0.76 ^{bc}
20 $\mu\text{g/ml}$ gefitinib	24.26 \pm 1.55 ^{bcd}	68.35 \pm 2.54 ^{abcd}	2.14 \pm 0.67 ^{abc}	29.51 \pm 1.90 ^{ad}
检验值	13.313	55.479	26.903	91.440
P 值	0.001	0.000	0.000	0.000

注:^a与对照组比较, $P<0.050$;^b与 20 $\mu\text{g/ml}$ β -ELE 组比较, $P<0.050$;^c与 40 $\mu\text{g/ml}$ β -ELE 组比较, $P<0.050$;^d与 10 $\mu\text{g/ml}$ gefitinib 组比较, $P<0.050$



注:β-ELE 为 β-榄香烯;gefitinib 为吉非替尼;a 为 MCF-7 对照组;b 为 20 μg/ml β-ELE 作用组;c 为 40 μg/ml β-ELE 作用组;d 为 10 μg/ml gefitinib 作用组;e 为 20 μg/ml gefitinib 作用组

图 1 β-榄香烯或吉非替尼作用后 MCF-7 细胞周期分布

化疗组,其中内分泌治疗组 194 例,服用 TAM 5 年(绝经前患者均先行双侧卵巢切除术),化疗组 175 例,采用 CMFVP(甲氨喋呤+环磷酰胺+氟尿嘧啶+长春新碱+泼尼松)或 CMF(环磷酰胺+甲氨喋呤+氟尿嘧啶)方案治疗。结果发现内分泌治疗组和化疗组的绝经后患者 5 年无瘤生存率为 78.4% 比 45.4% ($P < 0.05$),总生存率为 83.3% 比 52.9% ($P < 0.05$);而绝经前患者为 72.8% 比 35.7% ($P < 0.05$),80.7% 比 60.0% ($P < 0.05$)^[5]。化疗与内分泌治疗各有优势,但在临床工作中,不建议内分泌治疗与化疗同时应用。IGT0100(SWOG_8814) III 期前瞻性的随机临床

研究结果显示:TAM 在与化疗同时应用期间,可能会抵消化疗疗效,建议在化疗结束后单独应用 TAM,且序贯效果需要较长时间才能体现^[6]。而内分泌治疗起效较慢,是否将其他疗法与内分泌治疗同时应用,起到协同作用,从而尽可能快的发挥疗效? 本实验采用中药榄香烯与分子靶向治疗药物 gefitinib 与 TAM 合用,并通过不同的作用顺序探讨联合治疗的疗效,旨在为内分泌治疗开拓新的临床思路。

gefitinib 是以 HER-1 为靶点的小分子酪氨酸激酶抑制剂。HER 家族是一组跨膜受体,包括 4 个成员,即 HER-1、HER-2、HER-3 和 HER-4。在

对 ER 阳性乳腺癌的治疗中,ER 和 HER-2 通路的交联可导致二者相互影响,该结果来自抗 ER 治疗和 EGFR 家族治疗的研究^[7]。gefitinib 治疗乳腺癌的临床前研究较多,但多数研究显示单药 gefitinib 治疗复发转移乳腺癌疗效较差^[8]。Fountzilas 等^[9]进行的 gefitinib 与泰素、卡铂的联合治疗研究,取得了 57.3% 的近期有效率(完全缓解+部分缓解),但与既往紫杉醇与卡铂联合治疗报道的结果相似,即联合 gefitinib 后疗效未见增加。有文献报道,吉非替尼可通过抑制 EGFR/HER-2 而改善 TAM 的疗效,延缓耐药,并可以造成 ER 转阴后的再表达^[10-11],而这些改变均与 MAPK 信号转导途径关系密切。

β -ELE 用于肿瘤治疗已经多年,主要作用除对肿瘤细胞的直接杀伤及促进凋亡外,还具有放疗增敏,逆转化疗耐药的作用^[12-13],但其与内分泌药物的联合治疗研究目前仍较少。有研究发现: β -ELE 使 TAM 对乳腺癌 MCF-7 细胞的抑制作用显著增强,提示 β -ELE 与 TAM 具有协同增效作用,这可能与影响细胞周期进程,协同促进凋亡,下调基因 bcl-2、PS2 表达有关^[14-15]。

TAM 是通过和雌激素竞争与 ER 结合,抑制雌激素促增殖的作用使细胞阻滞于 G_0/G_1 期,从而实现其抗肿瘤的作用^[16]。另外,TAM 抗肿瘤机制也可能与增强肿瘤细胞凋亡功能密切相关,TAM 可以下调 Survivin 的表达,使癌细胞抗凋亡能力下降,从而诱导凋亡^[17-18]。

本实验以 1.5×10^{-6} mol/L 的 TAM 作为研究浓度,是因为其相当于临床上人体口服 TAM 20 mg/d 的剂量^[13]。本研究发现,与 TAM+ β -ELE 方案相比, β -ELE-TAM、TAM- β -ELE 序贯方案的 CI 值较低,提示具有较高的协同作用。进一步测定发现,TAM 1.5×10^{-6} mol/L 与 0.15×10^{-6} mol/L 两种浓度组均具有相同的作用趋势,增殖抑制率具有浓度相关性。笔者发现在 β -ELE 浓度为 5 μ g/ml 及 10 μ g/ml 时联合应用 TAM, β -ELE-TAM 对细胞的增殖抑制优于 TAM- β -ELE 方案,在 TAM 0.15×10^{-6} mol/L 时更为明显,细胞增殖抑制率分别为 $(26.38 \pm 2.05)\%$ 比 $(9.62 \pm 0.89)\%$ 和 $(31.38 \pm 1.55)\%$ 比 $(22.81 \pm 1.84)\%$,而 β -ELE 其他高浓度组则未见此现象。为什么在低浓度组可以出现,而高浓度组却未见明显差异,而且在刺激量区间使用低剂量的 TAM 即可以出现较强的细胞增殖抑制作用? 笔者推测是否在无毒剂量

时, β -ELE 打开了抑制细胞增殖促进凋亡的分子通路,或者是造成了细胞周期的改变,增强了 TAM 的周期特异性促凋亡作用。这有待于进一步的实验研究来探讨。总之,TAM 与 β -ELE 联用具有协同作用,TAM 与 β -ELE 序贯联用方法优于混合应用,低浓度 β -ELE (5 μ g/ml 及 10 μ g/ml) 应用在 TAM 之前对细胞杀伤作用强,在 TAM 低浓度时(0.15×10^{-6} mol/L)时作用明显。

本研究发现,gefitinib-TAM 方案、TAM-gefitinib 方案与 TAM+gefitinib 方案相比较,CI 值低于 TAM+gefitinib 同时作用方案,协同作用较高。进一步研究同样发现 TAM 1.5×10^{-6} mol/L 与 0.15×10^{-6} mol/L 两种剂量组均见相同的作用趋势,增殖抑制率具有剂量相关性,在 gefitinib 浓度为 5 μ g/ml 及 10 μ g/ml 时,细胞增殖抑制率方面 gefitinib-TAM 显示出优于 TAM-gefitinib 方案的趋势,在 TAM 0.15×10^{-6} mol/L 时较为明显,细胞增殖抑制率分别为 $(27.39 \pm 1.02)\%$ 比 $(4.74 \pm 0.25)\%$ 和 $(35.03 \pm 0.98)\%$ 比 $(22.00 \pm 1.05)\%$,与较高剂量组不同。这些现象均与 TAM 与 β -ELE 联用作用结果相似。TAM 与 gefitinib 联用序贯方法优于同时应用,低剂量 gefitinib (5 μ g/ml 及 10 μ g/ml) 应用在 TAM 之前对细胞杀伤作用强,在 TAM 较低浓度(0.15×10^{-6} mol/L)时作用明显。

流式细胞仪检测结果发现:经 gefitinib 与 β -ELE 两种药物预处理后,MCF-7 细胞的 G_0/G_1 期比例均见提高,两种剂量 gefitinib 作用后,由 49.26% 提高到 54.89% 和 68.35%,而两种剂量 β -ELE 作用后,由 49.26% 提高到 64.04% 和 63.88%。因此,笔者推测药物联合作用的产生可能原因主要有两点,首先,经 gefitinib 与 β -ELE 作用后, G_0/G_1 期比例提高,而 TAM 也具有 G_0/G_1 期细胞阻滞的作用,故 S 期细胞减少,细胞增殖受到抑制。其次,抗凋亡 Survivin 蛋白在整个细胞周期虽然都有表达,但主要表达于细胞周期的 G_2/M 期,S 期的表达量高于 G_0/G_1 期^[19],后者抗凋亡能力减弱,随即应用的 TAM 再次下调 Survivin 蛋白的表达,而促进了细胞凋亡。其分子机制仍有待进一步研究。

在避免加重其不良反应的前提下,TAM 的标准口服剂量 (20 mg/d) 只相当于体外培养中所加 TAM 的中等浓度,即 1.50×10^{-6} mol/L^[13]。此浓度下 TAM 对 MCF-7 细胞的增殖抑制率较低。因此,如何能够提高同样浓度下 TAM 的抗癌活

性,对提高临床疗效具有一定参考价值。本文通过对 gefitinib 和 β -ELE 分别与 TAM 不同顺序的联合应用,发现了序贯治疗的优势,同时也证实了两者间确实具备协同增效的作用,其分子生物学机制尚不清楚。如何在临床中发挥内分泌治疗的优势,并通过与其他药物的联合来提高治疗的有效率将成为乳腺癌内分泌治疗的研究重点。

参 考 文 献

- [1] Locker GY. Hormonal therapy of breast cancer [J]. *Cancer Treat Rev*, 1998, 24(3):221-240.
- [2] 杨名添,连臻强. 乳腺癌内分泌治疗的进展[J/CD]. *中华乳腺病杂志(电子版)*, 2007, 1(1):14-24.
- [3] 孙君重,蒋双,肖文华,等. 反义硫代寡核苷酸与榄香烯乳剂合用抗乳腺癌活性的体外研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2006, 33(12):661-664.
- [4] 孙燕,周际昌. 临床肿瘤内科手册[M]. 第 4 版. 北京:人民卫生出版社,2003:297.
- [5] 江泽飞,宋三泰,刘晓晴,等. 369 例 ER 阳性乳腺癌辅助内分泌治疗的前瞻性临床研究[J]. *中华肿瘤杂志*, 2001, 23(5):420-422.
- [6] Albain KS, Barlow WE, Ravdin PM, et al. Adjuvant chemotherapy and timing of tamoxifen in postmenopausal patients with endocrine-responsive, node-positive breast cancer: a phase 3, open-label, randomised controlled trial[J]. *Lancet*, 2009, 374(9707):2055-2063.
- [7] Zhang B, Zhang X, Tang B, et al. Investigation of elemene-induced reversal of tamoxifen resistance in MCF-7 cells through oestrogen receptor α (ER α) re-expression[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 136(2):399-406.
- [8] Zhang X, Zhang B, Liu J, et al. Mechanisms of Gefitinib-mediated reversal of tamoxifen resistance in MCF-7 breast cancer cells by inducing ER α re-expression [J]. *Sci Rep*, 2015, 3(5):7835.
- [9] Fountzilas G, Pectasides D, Kalogera-Fountzila A, et al. Paclitaxel and carboplatin as first-line chemotherapy combined with gefitinib (IRESSA) in patients with advanced breast cancer: a phase I/II study conducted by the Hellenic Cooperative Oncology Group [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2005, 92(1):1-9.
- [10] Shou J, Massarweh S, Osborne CK, et al. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2004, 96(12):926-935.
- [11] Bayliss J, Hilger A, Vishnu P, et al. Reversal of the estrogen receptor negative phenotype in breast cancer and restoration of antiestrogen response [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(23):7029-7036.
- [12] 李国权,谢冰冰,陈英海,等. β -榄香烯对人肺腺癌裸鼠移植瘤放疗增敏作用与 HIF-1 α CAIX 的相关性研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2011, 38(6):312-315.
- [13] 胡军,金伟,杨佩满,等. β -榄香烯逆转人乳腺癌 MCF-7/ADM 细胞对阿霉素耐药性的研究[J]. *中华肿瘤杂志*, 2004, 26(5):268-270.
- [14] 周小娟,郑棋,赵小丽,等. 榄香烯联合三苯氧胺对乳腺癌 MCF-7 细胞株的抑制效应[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2007, 28(1):74-77.
- [15] 马海琳,周小娟,刘娟,等. β -榄香烯联合三苯氧胺抑制乳腺癌 MCF-7 细胞生长的实验研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2008, 16(4):510-514.
- [16] Salami S, Karami-Tehrani F. Biochemical studies of apoptosis induced by tamoxifen in estrogen receptor positive and negative breast cancer cell lines [J]. *Clin Biochem*, 2003, 36(4):247-253.
- [17] Pratt MA, Niu M, White D, et al. Differential regulation of protein expression, growth and apoptosis by natural and synthetic retinoids [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 90(4):692-708.
- [18] Nakayama Y, Sakamoto H, Satoh K, et al. Tamoxifen and gonadal steroids inhibit colon cancer growth in association with inhibition of thymidylate synthase, survivin and telomerase expression through estrogen receptor beta mediated system [J]. *Cancer Lett*, 2000, 161(1):63-71.
- [19] 唐发清,顾焕华,胡智,等. EB 病毒潜伏膜蛋白 1 通过 Survivin 介导细胞增殖和抑制细胞凋亡[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2003, 19(5):646-652.

(收稿日期:2014-03-20)

(本文编辑:刘军兰)

张斌,张霞,张改容,等. 他莫西芬与 β -榄香烯或吉非替尼联合治疗对乳腺癌 MCF-7 细胞的影响[J/CD]. *中华乳腺病杂志(电子版)*, 2015, 9(2):78-84.