

吉非替尼对肺癌细胞株A549和H1975放射敏感度的影响及其机制

曹喆¹, 庄亮², 陈元²

Effects and Mechanism of Gefitinib on Radiosensitivity of Non-small Cell Lung Cancer Cell Lines A549 and H1975

CAO Zhe¹, ZHUANG Liang², CHEN Yuan²

1. Clinical Nursing Department, Nursing College, Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100, China; 2. Cancer Center, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology

Corresponding Author: CHEN Yuan, E-mail: chenyan008@163.com



Abstract: Objective In this study, we specifically investigated the effect and the mechanism of gefitinib, the tyrosine kinase inhibitor of epidermal growth factor receptor (EGFR), on radiosensitizing the non-small cell lung cancer (NSCLC) A549 and H1975 cell lines. **Methods** Two cell lines of NSCLC A549 and H1975 were divided into two groups, the X ray and X-ray plus gefitinib groups. The former was irradiated with X rays only, and the latter was treated with 10 μmol/L gefitinib for 24 h before irradiation under the same conditions. The cells were tested by cloning formation assay to identify the radiosensitivity of both groups. Immunostaining for confocal microscopy was used to observe the localization of nuclear γ -H₂AX foci at different time points after irradiation. Nuclear EGFR expression was detected by Western blot after radiotherapy. **Results** The cloning formation assay revealed that the surviving fraction at 2 Gy (SF2) of the gefitinib-interfering group (0.3475) was lower than that of the X ray group (0.4833) in A549 cells. There was no significant difference between the SF2 values of the two respective groups in H1975 cells (0.3094 vs 0.3207). The confocal microscopy results found that the average number of γ -H₂AX foci in the X ray plus gefitinib group was more than that in the X ray group on every time point after 4 Gy irradiation in A549 cells. But there was no remarkable difference of the average number of γ -H₂AX foci in H1975 cells between the two groups. Based on Western blot analyses, EGFR protein of A549 cells translocated into the nuclear in the X ray group after 4 Gy irradiation, but most of those located in cytoplasm in the X ray plus gefitinib group. However, EGFR protein expressed in the nuclear of H1975 cells, seldom in the nucleus, for both treatment groups. **Conclusion** Gefitinib enhances the radiosensitivity of A549 cells, which may be attributed to the suppression of EGFR transport into the nucleus to recover the double strand break(DSB). However, gefitinib does not affect H1975 cells, related to EGFR remains in the cytoplasm after irradiation.

Key words: Epidermal growth factor receptor(EGFR); Gefitinib; Lung neoplasmas; A549; H1975; γ -H₂AX

摘要: 目的 本研究旨在探讨小分子表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)酪氨酸激酶抑制剂吉非替尼是否能增加肺癌细胞株A549和H1975的放疗敏感度和其机制。**方法** 选取两种非小细胞肺癌细胞株A549和H1975, 分为单纯X线组和X线+吉非替尼组。单纯X线组采用单纯X线照射, X线+吉非替尼组经10 μmol/L吉非替尼作用24 h后行X线照射。两株细胞不同分组细胞, 采用克隆形成实验检测放射敏感度, 免疫荧光激光共聚焦显微镜观察X线照射后不同时间点细胞核中磷酸化H₂AX(γ -H₂AX)亮点在细胞中的定位情况, Western blot法检测放疗后胞质胞核蛋白中EGFR的表

达。**结果** 克隆形成实验中, A549细胞X线+吉非替尼组在各放疗剂量点的SF2值(0.3475)低于单纯X线组(0.4833); H1975细胞X线+吉非替尼组与单纯X线组在各放疗剂量点的SF2值分别为0.3094和0.3207, 无明显差异。免疫荧光结果显示, 照射4 Gy后各时间点X线+吉非替尼组A549细胞核中 γ -H₂AX亮点相比单纯X线多;

收稿日期: 2013-05-29; 修回日期: 2013-07-17

基金项目: 吴阶平医学基金会基金资助项目(320.6720.10013); 国家自然科学基金资助项目(30801351)

作者单位: 1. 437100 咸宁, 湖北科技学院护理学院临床护理教研室; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤中心

通信作者: 陈元, E-mail: chenyan008@163.com

作者简介: 曹喆(1980-), 女, 硕士, 讲师, 主要从事恶性肿瘤治疗及教学工作

单纯X线组和X线+吉非替尼组H1975细胞 γ -H₂AX亮点在各时间点无明显差异; Western blot结果显示, A549细胞经4 Gy照射后EGFR有入核现象, 而预先经吉非替尼处理再接受4Gy照射, EGFR蛋白绝大部分位于细胞质内; H1975细胞, 单纯X线组和X线+吉非替尼组EGFR蛋白均在细胞质中表达, 胞核中几乎没有, 且两组无明显差异。结论 吉非替尼能增加肺癌细胞株A549的放射敏感性, 可能与阻止放疗后EGFR入核进行双链断裂(double strand break, DSB)修复有关; 对H1975细胞无影响, 与其放疗后EGFR不入核相关。

关键词: 表皮生长因子受体; 吉非替尼; 肺肿瘤; A549细胞; H1975细胞; γ -H₂AX

中图分类号: R730.55;R734.2 **文献标识码:** A

0 引言

放疗和分子靶向治疗是非小细胞肺癌的重要治疗手段, 但针对EGFR的靶向治疗只有小部分人受益, 且易耐药。有研究显示, 吉非替尼与放疗联用可增加肿瘤细胞凋亡率, 主要机制同厄洛替尼相似, 抑制EGFR与DNA-PK的结合^[1]。EGFR单克隆抗体C225与放疗的协同作用比较明确, 其机制是抑制了放疗后活化的EGFR进入核内激活DNA-PK进行的DSB修复^[2]。本实验选取A549细胞, EGFR为野生型; H1975细胞, EGFR为双重突变(L858R/T790M)作为研究对象^[3], 分析吉非替尼对含有不同状态EGFR的NSCLC细胞是否有放射增敏效应及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人NSCLC细胞株A549由同济医院妇产科国家重点实验室惠赠; NCI-H1975购于中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心。实验药品吉非替尼由英国阿斯利康公司惠赠, 称重研磨溶于DMSO, 终浓度为10 mmol/L, 分装后-20℃保存备用。主要试剂: Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139), clone JBW301 (Millipore公司); Mouse EGFR (14C8): sc-81450 (Santa Cruz公司), Lamin B1 polyclonal anti-body (Biovision公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人NSCLC细胞株A549和NCI-H1975采用含10%灭活胎牛血清RPMI1640培养液, 于37℃、5%CO₂、相对湿度90%的细胞培养箱中培养, 隔天换液, 细胞每4~5天传代一次。细胞呈贴壁生长, 取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 MTT法检测吉非替尼作用A549\HA1975细胞

的IC₅₀值及细胞增殖抑制率 配制0.5 mg/ml的MTT溶液, 采用0.22 μ m的滤膜过滤除菌, 4℃避光保存。接种培养细胞, 药物处理组加入吉非替尼的终浓度分别为0.001、0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、5.0、10、50、100 μ mol/ml, 每孔重复3次。每孔加10%DMEM 100 μ l, 同时每组设一空白对照孔(仅加PBS, 没有接种细胞)置37℃ 5%CO₂培养箱内培养。吉非替尼作用24 h后, 每天取培养细胞一板, 每孔加MTT 100 μ l, 置培养箱内继续培养4 h。取出培养板吸弃培养液, 同时每孔加入150 μ l DMSO。置脱色摇床上振摇15 min, 使结晶物充分溶解。在酶标仪上595 nm波长处检测各孔OD值(吸光度), 纪录结果。实验重复3次, 取3次实验结果的平均值作为实验结果。按下列公式计算肿瘤细胞增殖抑制率: 肿瘤细胞增殖抑制率(%) = [1 - (药物处理组OD值-空白对照组OD值)/(细胞对照组OD值-空白对照组OD值)] \times 100%

1.2.3 细胞照射及实验分组 室温于同济医院肿瘤中心直线加速器(瑞典ELEKTA-precise)室, 源皮距100 cm, 机架角度180°, 6 MV-X线照射, 培养皿/24孔板/培养瓶底部垫置1 cm有机玻璃板。2株细胞A549和H1975均分别分为2组: 单纯X线照射组、X线+吉非替尼组, 前者进行单纯X线照射, 后者在10 μ mol/L吉非替尼作用24 h后再进行X线照射。

1.2.4 克隆形成实验 常规消化细胞, 计数, 稀释, 接种不同细胞数于60 mm直径培养皿中培养。细胞贴壁后, 单纯X线照射组更换新鲜培养液, X线+吉非替尼组改为含吉非替尼浓度为10 μ mol/L的培养液作用24 h, 分别接受0、1、2、3、4、6、8 Gy单剂量照射, 每个剂量点设3个平行样本。照射后培养10~14 d, PBS漂洗后用甲醇固定20 min, 0.1%结晶紫染色15 min, 室温自然干燥。低倍显微镜下计数 \geq 50个细胞的克隆数。以0 Gy组计算克隆形成效率(plating efficiency, PE), 计算各个剂量下的细胞存活率(survival fraction, SF), PE=(0 Gy剂量下集落数/细胞接种数) \times 100%, SF=某一剂量照射组细胞形成的克隆数/(该组细胞种植数 \times PE), 根据LQ模型SF=exp(- α D- β D²)拟合曲线计算得到SF₂, 重复3次。

1.2.5 免疫荧光法 收集对数生长期细胞, 调整细胞悬液浓度为1 \times 10⁵/ml, 接种于24孔板, 使细胞在盖玻片上贴壁生长, 以4 GyX线照射, X线+吉非替尼组以10 μ mol/L吉非替尼提前24 h预处理; 取照射后0、15、30、45、60 min细胞, PBS

洗, 1%多聚甲醛10 min, 70%酒精10 min固定; 0.2%Triton X-100, 10 min破膜; PBS洗3遍, 5%山羊封闭血清室温下封闭10 min; 加入一抗1:100 (γ -H₂AX), 18 h, 4℃; PBS洗3遍, TRITC-II抗1:50, 1 h, 37℃; Hoechst33342染核, 浓度0.005 mg/10 ml, 避光孵育15 min, PBS洗, 甘油封片, 固定至载玻片上, 避光保存, 激光共聚焦显微镜观察照相(日本Olympus), 显微镜图像分析软件计数亮点(美国Image-pro plus)。

1.2.6 免疫印记法 以4GyX线照射铺满瓶底80%~90%的细胞, X线+吉非替尼组以10 μ mol/L吉非替尼提前24 h预处理, 取照射后0、15、30、60 min细胞(5×10^6)~(1×10^7)个/毫升, 提取细胞质、细胞核蛋白进行蛋白定量(BCA蛋白浓度测定试剂盒, Pierce, NO.2161297), 分装保存于-80℃。制备5%浓缩胶, 8%分离胶, 以60 μ g蛋白上样, 电泳, 先180 mA转膜120 min, 再350 mA转膜90 min, 5%脱脂奶粉室温封闭90 min, EGFR 1:500稀释4℃孵育过夜, PBS洗, HRP-II抗1:2,000稀释室温孵育2 h, PBS洗, ECL室温5 min, 暗室胶片曝光。扫描胶片, 凝胶成像灰度定量系统(美国Bio-Rad)对蛋白条带进行灰度分析。

1.3 统计学方法

各组实验均重复3次, 数据取均数, 实验数据采用SPSS 13.0软件进行统计学处理, 免疫印记结果采用重复测量资料方差分析, 其余实验结果采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT检测IC₅₀及细胞增殖抑制率

吉非替尼对A549、H1975细胞增殖的抑制作用呈剂量依赖性, 其抑制A549细胞增殖IC₅₀值是30 μ mol/L, 抑制H1975细胞增殖IC₅₀值是27 μ mol/L。不同浓度吉非替尼对A549、H1975细胞增殖抑制率, 见图1。结合本课题组前期实验^[4-5], 吉非替尼的半衰期及本实验结果选取实验浓度10 μ mol/L。

2.2 克隆形成实验检测 α 、 β 和SF2值

用Sigmaplot软件拟合A549、H1975细胞剂量生存曲线, 以放疗剂量为横坐标, SF值取对数作为纵坐标, 结果显示X线+吉非替尼组A549细胞相比单纯X线组生存曲线有明显差异, 两条曲线分开较大, 见图2, X线+吉非替尼组A549的SF2值明显小于单纯X线组(单纯X线组: $\alpha = 0.2983$, $\beta = 0.0537$, SF2 = 0.4833; X线+吉非替尼组: $\alpha = 0.3354$, $\beta = 0.1097$, SF2 = 0.3475)。而H1975细胞,

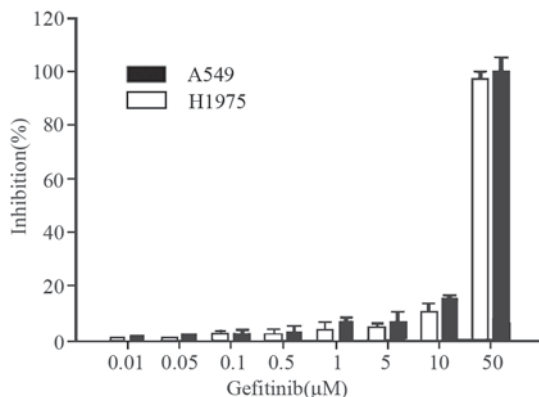


图1 吉非替尼对A549和H1975细胞增殖的抑制率
Figure1 Inhibition rate of Gefitinib on the growth of A549 and H1975

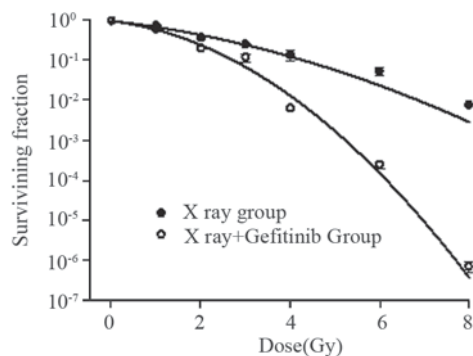


图2 A549细胞生存曲线
Figure2 Survival curve of A549 cell dose

X线+吉非替尼组和单纯X线组的生存曲线无明显差异(单纯X线组: $\alpha = 0.2804$, $\beta = 0.1441$, SF2 = 0.3207; X线+吉非替尼组: $\alpha = 0.2812$, $\beta = 0.1527$, SF2 = 0.3094), 见图3。

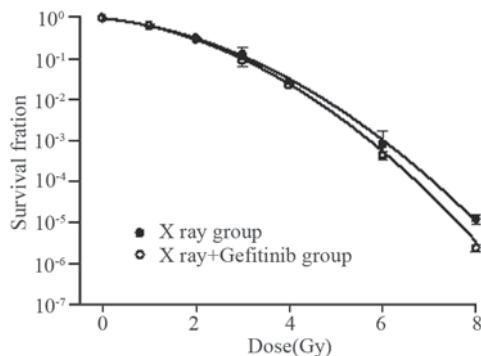
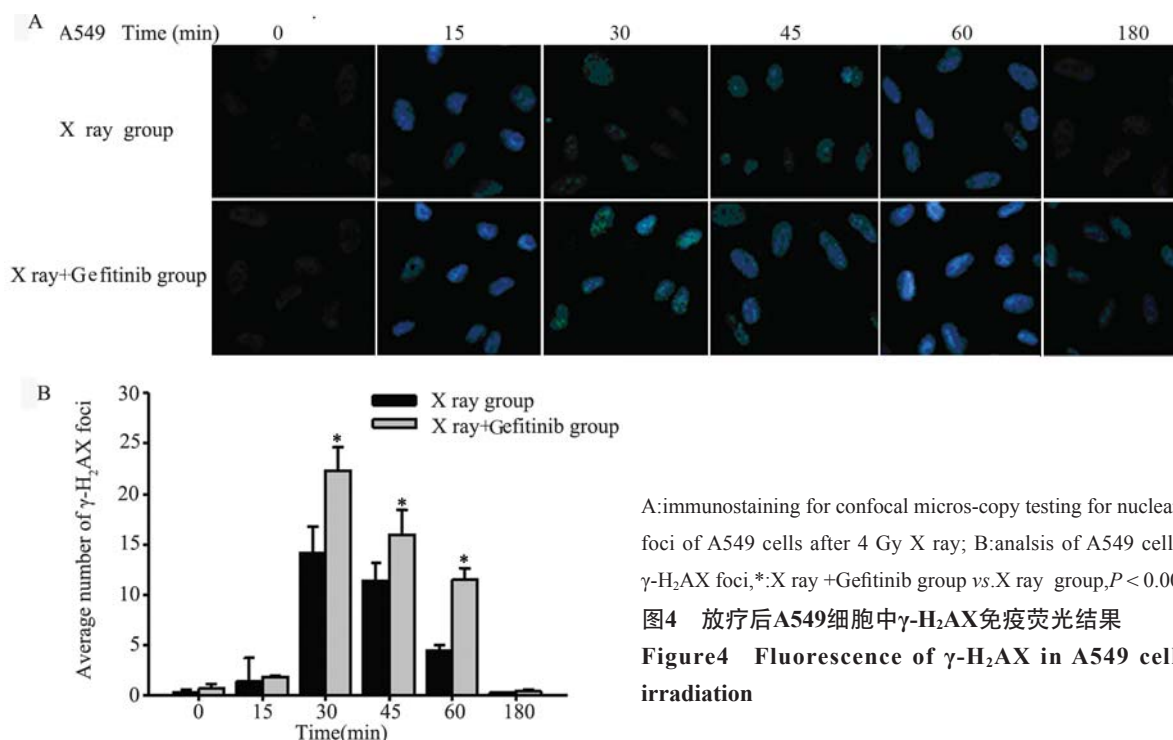


图3 H1975细胞生存曲线
Figure3 Survival curve of H1975 cell dose

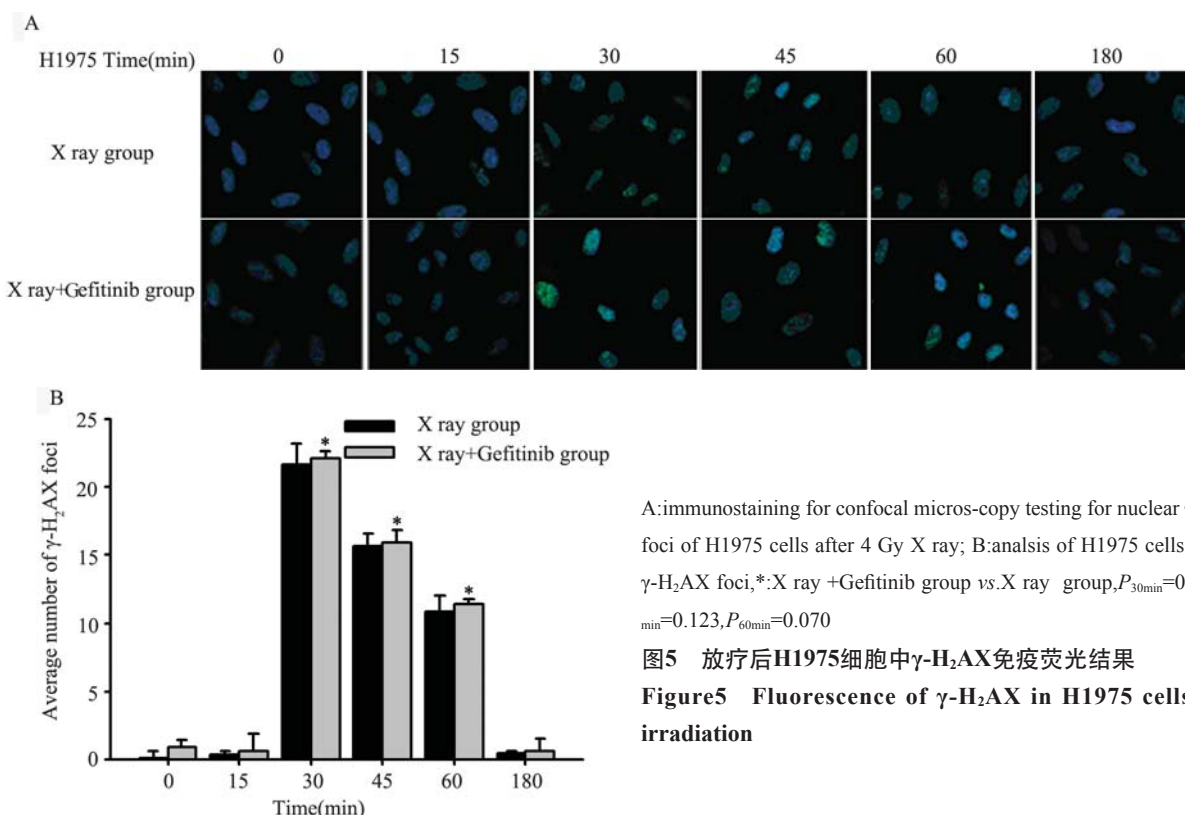
2.3 激光共聚焦显微镜观察放疗后细胞核内 γ -H₂AX亮点情况

激光共聚焦显微镜观察经4 GyX线照射后不同时间点各组细胞核内 γ -H₂AX亮点情况, 蓝色为细胞核, 绿色亮点为 γ -H₂AX亮点, 各组细胞均在15 min时细胞核内开始出现绿色亮点, 在30 min时细胞核内绿色亮点最明显, 60 min后开始消失;



A:immunostaining for confocal micros-copy testing for nuclear γ -H₂AX foci of A549 cells after 4 Gy X ray; B:analysis of A549 cells nuclear γ -H₂AX foci,*:X ray +Gefitinib group vs.X ray group, $P < 0.001$

图4 放疗后A549细胞中 γ -H₂AX免疫荧光结果
Figure4 Fluorescence of γ -H₂AX in A549 cells after irradiation



A:immunostaining for confocal micros-copy testing for nuclear γ -H₂AX foci of H1975 cells after 4 Gy X ray; B:analysis of H1975 cells nuclear γ -H₂AX foci,*:X ray +Gefitinib group vs.X ray group, $P_{30min}=0.108, P_{45min}=0.123, P_{60min}=0.070$

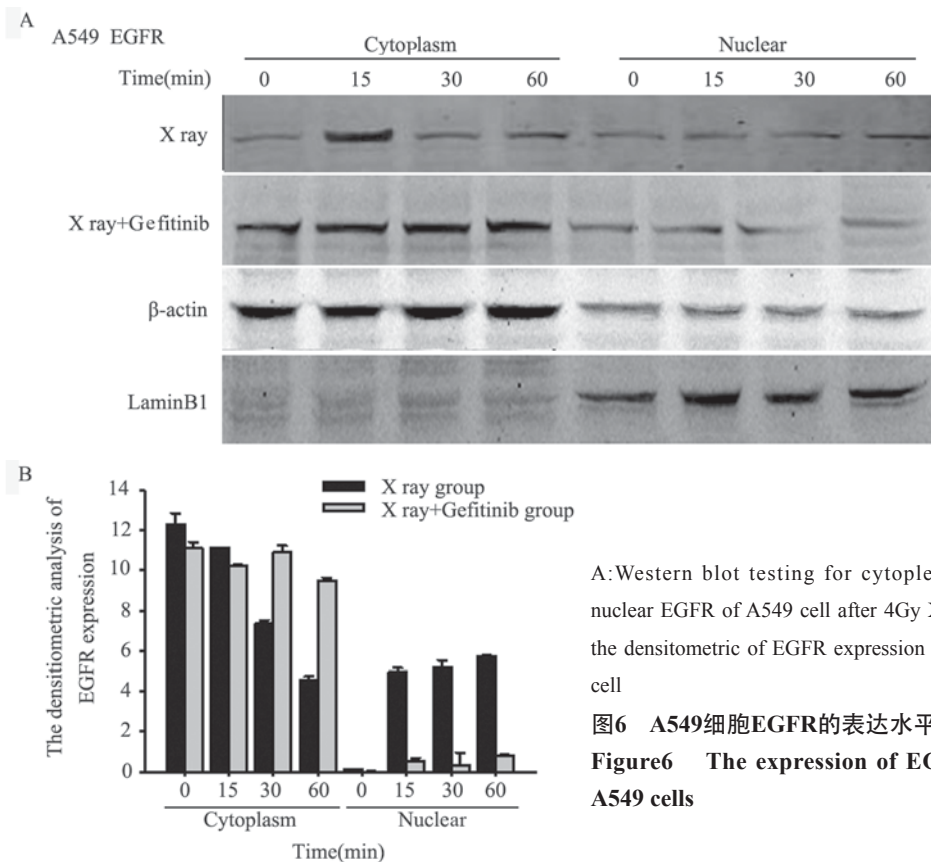
图5 放疗后H1975细胞中 γ -H₂AX免疫荧光结果
Figure5 Fluorescence of γ -H₂AX in H1975 cells after irradiation

A549细胞X线+吉非替尼组比单纯X线组各时间点绿色荧光更明显, 见图4A, 而H1975细胞X线+吉非替尼组对比单纯X线组各时间点无明显差别, 见图5A。每组随机选取30个细胞, 用Image-pro plus软件计数亮点, 比较相同时间点X线+吉非替尼组与单纯X线组 γ -H₂AX亮点平均值, A549细胞X线+吉非替尼组比单纯X线组30、45、60 min时 γ -H₂AX表达明显增高, 见图4B; 而H1975细胞X线+吉非

替尼组相比单纯X线组30、45、60 min时 γ -H₂AX表达则无明显差异, 见图5B。

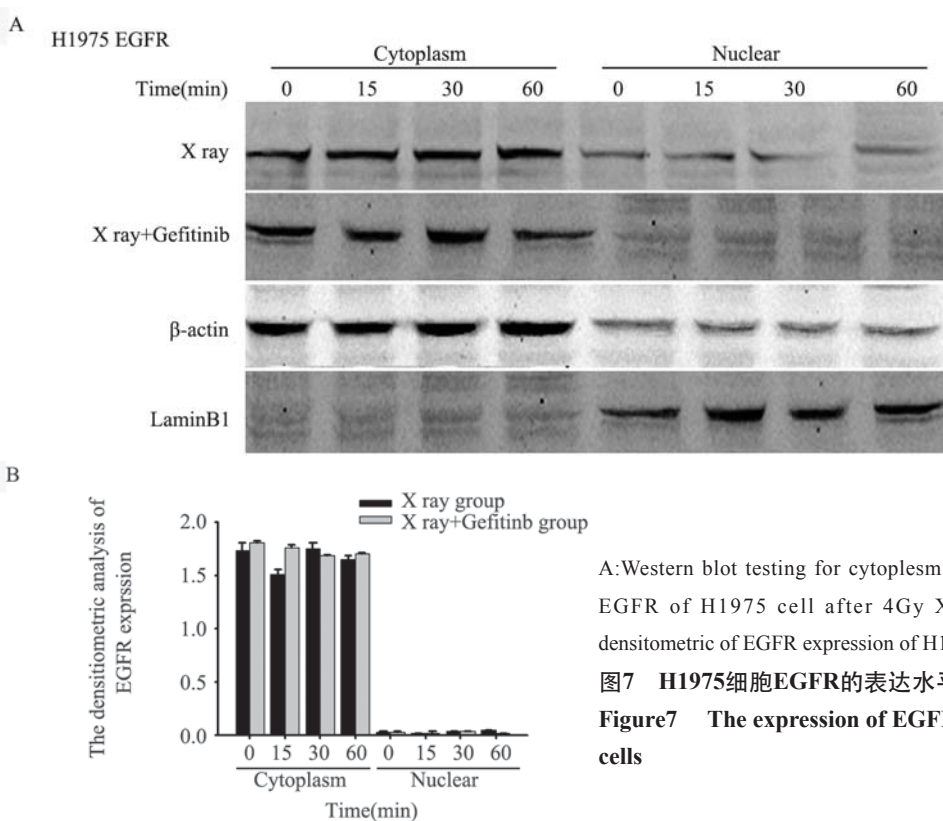
2.4 Western blot检测4 Gy放疗后胞质胞核中EGFR表达情况

A549细胞单纯X线组EGFR在放疗后有入核情况, 从放疗后15 min开始EGFR在胞核中表达逐渐增多, 到60 min时条带达最深, 而胞质中EGFR表达随时间呈递减趋势, 说明4 Gy放疗后EGFR从胞



A:Western blot testing for cytoplasm and nuclear EGFR of A549 cell after 4Gy X ray;B: the densitometric of EGFR expression of A549 cell

图6 A549细胞EGFR的表达水平
Figure6 The expression of EGFR in A549 cells



A:Western blot testing for cytoplasm and nuclear EGFR of H1975 cell after 4Gy X ray;B: the densitometric of EGFR expression of H1975 cell

图7 H1975细胞EGFR的表达水平
Figure7 The expression of EGFR in H1975 cells

质进入胞核，见图6A；X线+吉非替尼组EGFR绝大部分在胞质中表达，核内EGFR表达很少，且条带无递增或递减变化。采用凝胶成像灰度定量系统计算各条带的灰度值，做成柱状图，分别对

胞质、胞核内EGFR表达的两组数据进行重复测量资料方差分析，差异有统计学意义 ($P_{胞质}=0.043$, $P_{胞核}=0.004$)，见图6B。结果表明A549细胞在放疗后60 min内，在相同的时间点，X线+吉非替尼组

细胞核EGFR表达均少于单纯X线组,可能是由于吉非替尼通过某种途径阻止EGFR放疗后入核。H1975细胞单纯X线组和X线+吉非替尼组EGFR在各时间段均在胞质中表达,且胞质中条带无递增或递减变化,胞核中无EGFR条带,见图7A。采用凝胶成像灰度定量系统计算各条带的灰度值,并做成柱状图,分别对胞质、胞核内EGFR表达的两组数据进行重复测量资料方差分析,差异无统计学意义($P_{\text{胞质}}=0.288, P_{\text{胞核}}=0.623$),见图7B。结果表明H1975细胞在放疗后60 min内,在各相同时间点,单纯X线组和X线+吉非替尼组EGFR表达无差异,且EGFR在胞核中表达明显少于胞质。

3 讨论

放射线可直接或间接作用于DNA,导致DNA损伤,其中DNA双链断裂(DNA double strand break, DSB)是最致命的,DSB的修复方式主要有两种:同源重组(homologous recombination, HR)和DNA非同源性末端连接(nonhomologous end joining, NHEJ)。HR主要在低等生物如酵母细胞中起作用,或在人类等哺乳动物细胞的晚S期和G₂/M期发挥作用,主要由ATM蛋白主导,居于从属地位;NHEJ修复在哺乳动物细胞中居于主要地位,由DNA依赖性蛋白激酶(DNA-dependent protein kinase, DNA-PK)主导^[6]。DNA-PK由调节亚单位Ku蛋白二聚体(包括Ku80和Ku70亚单位)及催化亚单位DNA-PKcs(DNA-PK catalytic subunit)组成。当DSB产生后,Ku80和Ku70亚单位迅速形成异源二聚体,与受损DNA末端结合,激活DNA-PKcs,引导XRCC4和DNA-Ligase IV组成复合物,最后由DNA-Ligase IV定位并连接断裂的DNA双链末端完成修复^[6]。

外源性化学、物理及生物性物质所致的DSB都可能使组蛋白H₂AX发生快速磷酸化,形成 γ -H₂AX。 γ -H₂AX的形成在DNA的DSB中不仅起到损伤的标志性作用,而且在DNA的DSB修复中具有连接的作用^[7]。由于 γ -H₂AX的数量与DNA损伤的数量存在一一对应的关系,因此, γ -H₂AX可以作为低剂量电离辐射衡量肿瘤放疗敏感度的指示因子^[8]。

EGFR的活化有两种形式:自身形成同二聚体,在受到某些因素如表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)刺激,或基因突变致构象改变情况下被激活;与HER家族其他成员(主要是HER2和HER3)形成异二聚体,在受到刺激的情况下被激活。EGFR激活后将磷酸化胞内端的特异性酪氨酸残基,活化胞内的下游通路,如Ras/Raf/MAPK和PI3K/AKT通路,发挥调节细胞凋亡、生

存、增殖和有丝分裂等作用^[9]。Dittmann等^[10]发现EGFR除了通过上述信号转导通路以外,还有一种直接入核的途径:放射线除了直接导致DSB,还能使细胞中和细胞间的水电离,产生大量氧自由基,细胞外的氧自由基作用于细胞膜上的一些膜受体如EGFR,EGFR活化后直接通过胞质进入胞核,与DNA-PK结合,激活DNA-PK的催化亚基DNA-PKcs,进行受损DNA修复。

放射线引起的EGFR入核与scr激酶激活EGFR进入细胞质膜微囊相关。Scr激酶分别在Y845残端激活EGFR和Y14残端激活caveolin-1,两者激活后形成复合物进入细胞质膜微囊,包含有EGFR的微囊通过微管转运至高尔基复合体/内质网,并融合为内质网膜。EGFR存在于易位子Sec61复合体中,并可以被其释放进入胞质。Sec61易位子广泛存在于内质网和内质网/高尔基复合体过渡区域,在蛋白合成期将分泌蛋白和跨膜蛋白插入内质网。通过PKC ϵ 途径EGFR在T654残端磷酸化,并与核转运蛋白 α 和 β 结合,这一过程使EGFR通过细胞核孔进入细胞核^[11]。而与核转运蛋白结合的先决条件是核定位位点(nuclear localization site, NLS),Lin等^[12]证实了EGFR序列中该位点的存在及其功能,并且EGFR磷酸化的T654残端正好位于该EGFR核定位位点。

本实验选取A549和H1975细胞作为研究对象,旨在探讨吉非替尼对此两株细胞是否有放疗增敏作用,其机制是否同C225,即抑制放疗后活化的EGFR直接进入核内激活DNA-PK进行的DSB修复^[3]。

根据克隆形成实验,计算SF值绘制剂量生存曲线,发现A549细胞X线+吉非替尼组各剂量点细胞存活率及SF2值均低于单纯X线组,说明前者放疗后发生增殖性死亡的细胞多于后者,吉非替尼能增加A549细胞的放疗敏感性。而H1975细胞X线+吉非替尼组和单纯X线组SF2值并无明显差异,吉非替尼对细胞株H1975无明显放疗增敏效应。

我们用免疫荧光技术观察以 γ -H₂AX焦点形成特征的DNA双链断裂,通过激光共聚焦荧光显微镜观察放疗后不同时间点细胞核内 γ -H₂AX的表达,并比较 γ -H₂AX亮点平均值,发现A549细胞两组均可观察到放疗后细胞核内 γ -H₂AX的表达,且在放疗后30 min达到高峰,60 min后逐渐消失,X线+吉非替尼组的 γ -H₂AX亮点在各时间点均明显多于单纯X线组,这说明了吉非替尼使A549细胞放疗后DSB形成增多,表现出放疗增敏作用。而H1975细胞,两组 γ -H₂AX亮点的变化及持续时间无明显差异,说明放疗后两组DSB基本相同,吉非替尼对H1975细胞无放疗增敏作用。

本实验通过Western blot检测放疗后两株细胞EGFR入核情况,结果与激光共聚焦荧光显微镜所观察到的一致。A549细胞单纯X线组在放疗后60 min内胞质EGFR表达随时间减少,胞核EGFR表达随时间增多,X线+吉非替尼组EGFR大部分在胞质中表达,细胞核内很少。Dittmann等^[10]前期研究发现野生型EGFR肺癌细胞A549受X线照射后,迅速入核与胞核内DNA-PK结合,进行DNA损伤修复,出现放射抵抗。结合本实验结果分析,吉非替尼可能是通过抑制放疗后A549细胞EGFR入核与DNA-PK结合,从而阻止受损DNA进行修复,产生放疗增敏作用。Tanaka等^[13]报道,吉非替尼与厄洛替尼的作用机制也许不同,因为他们未观察到A549细胞加药组放疗后胞质及胞核内EGFR表达的变化。产生不同结果的原因可能与加药浓度高低有关,本实验吉非替尼的浓度为10 $\mu\text{mol/L}$,而Tanaka的研究^[13]中浓度仅为1 $\mu\text{mol/L}$ 。与此同时,H1975细胞单纯X线组和X线+吉非替尼组EGFR均在胞质中表达,没有观察到放疗后入核情况,且各时间点无趋势差异,组间也无差异。Das等^[14]研究发现,具有L858R + T790M 双重突变的H1975细胞对放射线相对敏感,且放疗后在胞核中未检测到EGFR的表达。本实验结果与之相似,由此推测H1975细胞对放射线的敏感度不受吉非替尼影响,原因与H1975细胞具有双重突变的EGFR在两种条件下均不入核,无法与核内DNA-PK结合完成DNA损伤修复相关。此外,吉非替尼通过与ATP竞争,结合于EGFR-TK胞内端的催化区域(EGFR结构域中高度保守的ATP结合位点),阻止EGFR的自磷酸化及下游的信号传导,亦可影响A549细胞修复。而H1975细胞EGFR发生二次突变T790M,Kobayashi^[15]和Pao等^[3]研究显示T790残基位于EGFR催化区域的ATP结合位点,该位点是吉非替尼和厄洛替尼的关键作用点。当该点的苏氨酸被甲硫氨酸替换后,出现两种药物结合到此位点的空间阻碍现象,可见吉非替尼对H1975细胞作用甚微。

综上所述,吉非替尼是否还通过其他途径影响A549细胞放疗敏感度;达到增敏效果需要多大的用药浓度;对其他不同状态的EGFR是否有放疗增敏作用;能否将EGFR作为放疗增敏的靶点应用于临床,以上问题还需进一步验证。

参考文献:

[1] Friedmann BJ, Caplin M, Savic B, *et al.* Interaction of the epidermal growth factor receptor and the DNA-dependent protein kinase pathway following gefitinib treatment[J]. *Mol Cancer*

Ther,2006,5(2):209-18.

- [2] Dittmann K, Mayer C, Rodemann HP. Inhibition of radiation-induced EGFR nuclear import by C225 (Cetuximab) suppresses DNA-PK activity[J]. *Radiother Oncol*,2005,76(2):157-61.
- [3] Pao W, Miller VA, Politi KA, *et al.* Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain[J]. *PLoS Med*,2005,2(3):e73.
- [4] Deng J, Zhuang L, Chen Y. Effect and mechanism of radiosensitivity of non-small cell lung cancer cell line H358 following gefitinib treatment[J]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2011,14(11):841-7.[邓洁,庄亮,陈元.吉非替尼对肺癌细胞株H358放疗敏感性的影响及其机制[J].*中国肺癌杂志*,2011,(14):11841-7.]
- [5] Gao ZY, Zhuang L, Chen Y. Effect and mechanism of gefitinib inhibition on non-small cell lung cancer radiosensitivity of HCC827 and H358 cell lines[J]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*,2012,15(6):324-31.[高子夜,庄亮,陈元.吉非替尼对肺癌细胞株HCC827和H358放疗敏感性的影响及其机制研究[J].*中国肺癌杂志*,2012,15(6):324-31.]
- [6] Collis SJ, DeWeese TL, Jeggo PA, *et al.* The life and death of DNA-PK[J]. *Oncogene*,2005,24(6):949-61.
- [7] Rogakou EP, BoonC, Redon C, *et al.* Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo[J]. *J Cell Biol*,1999,146(5): 905-16.
- [8] Thiriet C, Hayes JJ. Chromatin in need of a fix: phosphorylation of H2AX connects chromatin to DNA repair[J]. *Mol Cell*,2005,18(6):617-22.
- [9] Mass RD. The HER receptor family: a rich target for therapeutic development[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*,2004,58(3):932-40.
- [10] Dittmann K, Mayer C, Fehrenbacher B, *et al.* Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase[J]. *J Biol Chem*,2005,280(35):31182-9.
- [11] Dittmann K, Mayer C, Rodemann HP. Nuclear EGFR as novel therapeutic target: insights into nuclear translocation and function[J]. *Strahlenther Onkol*,2010,186(1):1-6.
- [12] Lin SY, Makino K, Xia W, *et al.* Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor[J]. *Nat Cell Biol*,2001,3(9):802-8.
- [13] Tanaka T, Munshi A, Brooks C, *et al.* Gefitinib radiosensitizes non-small cell lung cancer cells by suppressing cellular DNA repair capacity[J]. *Clin Cancer Res*,2008,14(4):1266-73.
- [14] Das AK, Sato M, Story MD, *et al.* Non-small-cell lung cancers with kinase domain mutations in the epidermal growth factor receptor are sensitive to ionizing radiation[J]. *Cancer Res*,2006,66(19):9601-8.
- [15] Kobayashi S, Boggon TJ, DayaramT, *et al.* EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib[J]. *N Engl J Med*,2005,352(8):786-92.

[编辑:周永红;校对:邱颖慧]