

吉西他滨与厄洛替尼联合治疗胰腺癌的试验研究

张强¹, 秦爱玉², 秦玉刚¹

作者单位:¹航天中心医院肝胆外科, 北京 100049; ²广饶县中医院急诊科, 山东 东营 257300

摘要: **目的** 探究吉西他滨与厄洛替尼联合使用对体外胰腺癌细胞的影响。 **方法** 2018年4月至2019年4月,在航天中心医院肝胆外科选用胰腺癌细胞PANC-1对数生长期细胞。实验分组:厄洛替尼组、吉西他滨组、联合作用组(1:2, 1:1, 2:1, 3:1), 每组设12个培养皿。用八肽胆囊收缩素-8(Cholecystokinin octapeptide-8, CCK-8)法检测吉西他滨及厄洛替尼分别对PANC-1细胞的细胞毒性试验,并计算出两种药物分别对PANC-1细胞的半抑制浓度(50% Inhibiting Concentration, IC₅₀)。根据两种药物对PANC-1的IC₅₀值的影响,按照不同比例重复观察两种药物联合使用对细胞的细胞毒性情况,以中位药效法(Chou-Talalay法)分析两种药物的联合作用效果。用细胞平板克隆形成实验观察吉西他滨、厄洛替尼及两种药物联合作用对胰腺癌细胞PANC-1的细胞克隆形成的影响。 **结果** 在给予系列浓度的厄洛替尼和吉西他滨培养液培养胰腺癌PANC-1细胞后,在一定时间内,不同浓度的吉西他滨和厄洛替尼均能抑制PANC-1细胞增殖,并且抑制作用随浓度增加而增强,且一定浓度下,药物处理时间越长,抑制作用越强(128 nM厄洛替尼浓度72 h细胞抑制率为(76.72±5.51)%; 320 nM吉西他滨浓度72 h细胞抑制率为(75.43±0.97)%。吉西他滨和厄洛替尼对胰腺癌PANC-1细胞生长的影响具有时间-浓度依赖性。通过IC₅₀计算软件计算药物处理48 h时的IC₅₀值,结果显示厄洛替尼对PANC-1的IC₅₀值为12 nM,吉西他滨对PANC-1的IC₅₀值为80 nM。厄洛替尼和吉西他滨联合使用可以增大细胞抑制率,减少单独使用吉西他滨的起效时间[厄洛替尼:吉西他滨为3:1时,72h细胞抑制率为(89.89±1.56)%, IC₅₀值为(3.89±1.65)nmol/L]。随着细胞生长抑制率的增加,CI值逐渐下降。当细胞生长抑制率达到35%时,联合效应开始出现协同作用(小于0.9)。当细胞生长抑制率为40%时,CI下降(均小于0.5),具有的协同作用。同时,2:1组曲线低于3:1组曲线,说明厄洛替尼和吉西他滨浓度比为2:1的协同效应优于浓度比3:1。对照组细胞数为361;单独加厄洛替尼组细胞数为128;单独加吉西他滨组细胞数为114,联合作用组细胞数为118、98、76、80。 **结论** 吉西他滨和厄洛替尼单独使用均能在体外抑制人胰腺癌细胞的生长,发挥抑制胰腺癌肿瘤细胞增殖的作用。两种药物联合使用可以降低两种药物的使用剂量并起到药物的协同作用,达到并提高抑制胰腺癌肿瘤细胞增殖的效果。

关键词: 胰腺肿瘤; 吉西他滨; 厄洛替尼; 细胞增殖; 半数抑制浓度; 克隆细胞

Preliminary study of gemcitabine combined with erlotinib in the treatment of pancreatic cancer

ZHANG Qiang¹, QIN Aiyu², QIN Yugang¹

Author Affiliations: ¹Department of Hepatobiliary Surgery, Space Center Hospital, Beijing 100049, China; ²Department of Emergency, Guangrao Hospital of Traditional Chinese Medicine, Dongying, Shandong 257300, China

Abstract: **Objective** To explore the effect of gemcitabine and erlotinib on pancreatic cancer. **Methods** Human pancreatic cancer cells PANC-1 in the logarithmic phase in the Department of Hepatobiliary Surgery, Space Center Hospital from April 2018 to April 2019 were selected. Experimental groups: erlotinib group, gemcitabine group, combined group (1:2, 1:1, 2:1, 3:1), each group with 12 culture dishes. The cytotoxicity of gemcitabine and erlotinib on PANC-1 cells was detected by Cholecystokinin octapeptide-8 (CCK-8) assay. The half inhibition concentration (IC₅₀) values of gemcitabine and erlotinib on PANC-1 cells were calculated. According to the influence of the two drugs on the IC₅₀ value of PANC-1, the cytotoxicity of the two drugs on the cells was observed repeatedly according to different proportions, and the combined effect of the two drugs was analyzed by the median pharmacodynamic (Chou Talalay) method. The effect of gemcitabine, erlotinib and combination of gemcitabine and erlotinib on the colony formation of PANC-1 cells was observed by cell plate clone formation assay. **Results** After a series of concentrations of erlotinib and gemcitabine were given to culture pancreatic cancer PANC-1 cells, the different concentrations of gemcitabine and erlotinib could inhibit the proliferation of PANC-1 cells within a certain period of time, and the inhibitory effect increased with the increase of concentration. At a certain concentration, the longer the drug treatment time was, the stronger the inhibitory effect [72h cell inhibition rate of 128nM erlotinib and 320nM gemcitabine concentration is (76.72 ± 5.51)% and (75.43 ± 0.97)%, respectively]. The effects of

gemcitabine and erlotinib on the growth of pancreatic cancer PANC-1 cells were time and concentration dependent. The IC₅₀ values of erlotinib and gemcitabine were 12 nM and 80 nM, respectively. The combination of erlotinib and gemcitabine can increase the cell inhibition rate and reduce the onset time of gemcitabine alone [erlotinib:gemcitabine = 3:1, 72 h cell inhibition rate was (89.89 ± 1.56)%, and IC₅₀ value was (3.89 ± 1.65) nmol/L]. With the increase of cell growth inhibition rate, CI value decreased gradually. When the cell growth inhibition rate reached 35%, the synergistic effect began to appear (less than 0.9). When the cell growth inhibition rate was 40%, CI decreased (all less than 0.5), which had a synergistic effect. At the same time, the 2:1 group curve was lower than the 3:1 group curve, indicating that the synergistic effect of erlotinib and gemcitabine concentration ratio of 2:1 was better than the concentration ratio of 3:1. The number of cells in control group was 361, the number of cells in erlotinib alone group was 128; the number of cells in gemcitabine group was 114, and the number of cells in combined treatment group (1:2, 1:1, 2:1, 3:1) was 118, 98, 76 and 80. **Conclusions** Gemcitabine and erlotinib alone can inhibit the growth of human pancreatic cancer cells in vitro and play a role in inhibiting pancreatic cancer. The combined use of the two drugs can reduce the dosage of the two drugs and play a synergistic role to achieve and improve the effect of suppressing pancreatic cancer tumor cells proliferation.

Key words: Pancreatic neoplasms; Gemcitabine; Erlotinib; Cell proliferation; 50% Inhibitory concentration; Clone cells

胰腺癌是消化系统肿瘤的一种,具有早期难发现,发病预后差,治疗难度大等特点^[1]。近年来胰腺癌呈现出病发群体年轻化、发病死亡率上升的趋势,故寻找更好的治疗方案引起广泛的关注^[2]。尽管通过手术切除可以根治胰腺癌,但由于病人确诊时多为晚期使得术后存活率大大降低。吉西他滨是一种细胞周期特异性的DNA合成和修复抑制剂,是延长晚期胰腺癌病人生存时间的最佳化疗药物^[3-4]。胰腺癌细胞具有获得性或内在的耐药性特点,使得吉西他滨单独使用存在治疗失败后没有后续治疗方案的缺点,治疗效果并不理想。因此需要新型的其他治疗药物与它联合使用,在一定程度上达到增强抑癌作用,减少某些不良反应的效果^[5-6]。厄洛替尼是一种可以抑制表皮生长因子受体信号通路转导的小分子抑制药,具有一定的抗肿瘤作用^[7]。本研究于2018年4月至2019年4月探讨吉西他滨与厄洛替尼联合使用对体外胰腺癌细胞的药物联合作用,为胰腺癌的治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂 吉西他滨(江苏豪森药业股份有限公司,批号160605)、厄洛替尼(上海罗氏制药有限公司,批号SH0039);胎牛血清(杭州四季青公司,批号2016-0596);RPMI-1640(RPMI是Roswell Park Memorial Institute的缩写,代指洛斯维·帕克纪念研究所。RPMI是该研究所研发的一类细胞培养基,1640是培养基代号。)培养基(Gibco公司,美国,批号AAXR0596);八肽胆囊收缩素-8(Cholecystokinin octapeptide-8, CCK-8)试剂盒(上海碧云天生物技术研究所,批号2018-11A1058);胰蛋白酶(上海碧云天生物技术研究所,批号2018-06A0012);Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物发展有限公司,批号NJ180023)。

1.2 细胞培养 人胰腺癌细胞系购自中国医学科学院基础医学研究所。在温度为37℃、二氧化碳含量为5%的细胞培养箱中用含有10%的胎牛血清的RPMI1640培养液培养人胰腺癌细胞系。细胞单层贴壁生长,待细胞贴壁生长完全后用胰蛋白酶消化细胞,使其分散成单细胞悬液,进行传代培养。本研究所用胰腺癌细胞PANC-1(人胰腺癌细胞PANC-1)均为对数生长期细胞(目前无资料认为胰腺癌细胞株PANC-1在RPMI1640培养基中培养是会影响PANC-1的活性)。

1.3 PANC-1细胞形态学观察 用0.25%胰蛋白酶将处于对数生长期的PANC-1细胞制备成单细胞悬液,用6孔板培养细胞,每孔以 1.0×10^3 量接种细胞并补充培养液至每孔2 mL,每两天更换一次培养液。加入厄洛替尼1.5 mg分别作用24、48、72 h后,在倒置显微镜下观察细胞形态改变,与对照组做比较(每个时间点设置12个培养皿)。

1.4 CCK-8细胞增殖-毒性检测 用CCK-8法分别检测吉西他滨与厄洛替尼对Panc-1细胞增殖的影响。用胰蛋白酶处理对数生长期的PANC-1细胞,制成单细胞悬液,通过细胞计数将细胞悬液浓度调整为 5×10^4 /mL,以 1×10^4 /孔的细胞数量接种细胞到96孔板。将细胞培养板放入37℃、5%二氧化碳的细胞培养箱中,待细胞贴壁后,将原培养液换为含有不同浓度梯度吉西他滨(0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 nM)和厄洛替尼(0, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 nM)的培养液,每个浓度设6个重复孔,其中,药物浓度为0是对照组,另外给培养板留1个孔只加入培养液作为调零孔。加药后将培养板放回细胞培养箱分别培养24、48、72 h(注:每个时间点设置12个培养皿)。药物作用结束前1 h,向各孔加入10 μL CCK-8,继续培养1 h。用酶标仪在450 nm波长下检测每

个孔的吸光度(A)值,计算细胞抑制率,细胞抑制率 = $[1 - (A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白调零}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白调零}})] \times 100\%$, 绘制生长曲线。并计算出两种药物分别对 PANC-1 细胞的半抑制浓度 (50% inhibiting concentration, IC50)。

1.5 Chou-Talalay 法进行药物联合分析 我们根据两种药物对 PANC-1 的 IC50 值,按照不同比例(厄洛替尼:吉西他滨 = 1:2、1:1、2:1、3:1)和不同处理时间(24、48、72 h)重复观察两种药物联合使用对 PANC-1 细胞的细胞毒性情况,以 Chou-Talalay 法分析两种药物的联合作用效果。我们收集所有实验的结果,并获得每个数据点的平均值,用组合指数 CI 来反映两种药物之间的作用:CI < 1 表示协同作用,CI > 1 分别表示拮抗作用。

1.6 细胞平板克隆实验 实验分组:厄洛替尼组、吉西他滨组、联合作用组(1:2、1:1、2:1、3:1),每组设 12 个培养皿。用 0.25% 胰蛋白酶将处于对数生长期的 PANC-1 细胞制备成单细胞悬液,用 6 孔板培养细胞,每孔以 1.0×10^3 量接种细胞并补充培养液至每孔 2 mL,每组设置 3 个复孔。将细胞分散均匀后,放入 37 ℃、5% 二氧化碳的细胞培养箱中培养 1~3 周。每天固定时间拿出 6 孔板在显微镜下观察细胞状态,当出现肉眼可见的克隆时,终止培养,弃去上清液,用 PBS 冲洗 3 次左右,加入 4% 多聚甲醛固定 15 min。用结晶紫染色液对细胞染色后,漂洗,空气干燥。在倒置显微镜低倍镜下,观察细胞形态,并计数各孔细胞克隆形成数,最后计算克隆形成率。克隆形成率 = (克隆数/接种细胞数) × 100%。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计分析软件进行处理。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,不同时间点比较行重复测量方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,组内两两比较采用差值 *t* 检验。计数资料采用例(%)表示,组间比较采用 χ^2 分析,多组之间两两比较采用 *P* 值修正的方法。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PANC-1 细胞形态 用厄洛替尼处理后,正常细胞数量减少,细胞收缩,细胞间距离变大,细胞培养液中出现细胞碎片。随着厄洛替尼作用时间的延长,细胞变化更加明显(见图 1)。

2.2 细胞毒性试验结果 CCK-8 试验结果显示:在给予系列浓度的厄洛替尼和吉西他滨培养液培养胰腺癌 PANC-1 细胞后,在一定时间内,不同浓度的吉西他滨和厄洛替尼均能抑制 PANC-1 细胞增殖,

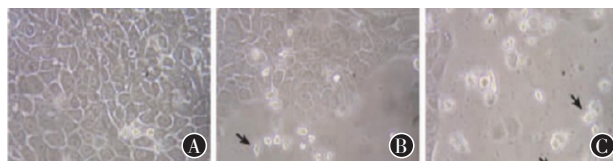


图1 倒置显微镜下观察厄洛替尼处理后胰腺癌PANC-1细胞变化:
A为24 h,B为48 h,C为72 h

并且抑制作用随浓度增加而增强,且一定浓度下,药物处理时间越长,抑制作用越强[128 nM 厄洛替尼浓度 72 h 细胞抑制率为 $(76.72 \pm 5.51)\%$; 320 nM 吉西他滨浓度 72 h 细胞抑制率为 $(75.43 \pm 0.97)\%$]。各浓度组与对照组相比,均差异有统计学意义(*P* < 0.05)。结果说明,吉西他滨和厄洛替尼对胰腺癌 PANC-1 细胞生长的影响具有时间-浓度依赖性。通过 IC50 计算软件计算药物处理 48 h 时的 IC50 值,结果显示厄洛替尼对 PANC-1 的 IC50 值为 12 nM,吉西他滨对 PANC-1 的 IC50 值为 80 nM。(见表 1,2)。

表1 厄洛替尼对 12 例 PANC-1 细胞的抑制率比较/(%, $\bar{x} \pm s$)

厄洛替尼浓度	细胞抑制率		
	24 h	48 h	72 h
2 nM	13.28±7.04	46.19±21.95 ^a	89.23±3.53 ^{a,y}
4 nM	25.75±3.58 ^a	26.64±3.78 ^a	56.68±23.02 ^{xy}
8 nM	35.34±2.85 ^{ab}	30.72±1.05 ^{abx}	32.65±2.68 ^{abxy}
16 nM	46.61±2.61 ^{abc}	40.71±5.38 ^{abcx}	37.03±5.84 ^{abcx}
32 nM	55.53±1.47 ^{abcd}	61.11±4.89 ^{abcdx}	56.19±2.78 ^{abcdxy}
64 nM	69.45±4.98 ^{abcde}	69.41±1.65 ^{abcdex}	63.57±2.10 ^{abcdx}
128 nM	77.38±4.26 ^{abcdef}	78.89±4.86 ^{abcdefx}	76.72±5.51 ^{abcdefx}
球形检验 χ^2/P 值	0.14, 0.931		
组间差异(药物浓度) <i>F/P</i> 值	1 173.64, 0.000		
主体内效应(时间点) <i>F/P</i> 值	386.48, 0.000		
交互效应 <i>F/P</i> 值	6.85, 0.000		

注:球形性校 *P* > 0.05, 分析选取主体内效应检验,无需校正。显著性标记 a、b、c、d、e 分别为和 A、B、C、D、E 组同时点相比 *P* < 0.05。时间精细比较显著性标记 X、Y 为和组内第 1、2 时间点比较, *P* < 0.05。结果说明:同一时间点 24 h,不同浓度其细胞抑制率均不同。同一浓度不同时间点,浓度 2、4、8、32 三个时间点均差异有统计学意义。浓度 16、浓度 64 和浓度 128 三个浓度组,48 h 和 72 h 比较差异无统计学意义,其余均差异有统计学意义。

2.3 药物联合试验结果 根据厄洛替尼与吉西他滨对 PANC-1 的 IC50 值,分别按照不同比例重复观察两种药物联合使用对细胞的细胞毒性情况。

不同组合药物对 PANC-1 细胞的抑制率:整体比较(两因素重复测量方差分析)知:组间差异、时

表2 吉西他滨对12例PANC-1细胞的抑制率比较/(%, $\bar{x} \pm s$)

吉西他滨浓度	细胞抑制率		
	24 h	48 h	72 h
5 nM	9.33±4.15	11.07±4.16	37.80±20.13 ^{XY}
10 nM	14.39±9.21	18.63±2.21 ^a	17.08±1.79 ^{aXY}
20 nM	20.39±6.14 ^a	26.5±8.22 ^{abx}	27.73±5.36 ^{abxy}
40 nM	25.96±6.11 ^{ab}	35.39±3.52 ^{abcx}	43.07±3.17 ^{abcsy}
80 nM	32.43±2.85 ^{abc}	49.04±10.06 ^{abcx}	51.86±3.78 ^{abcdxy}
160 nM	47.08±7.52 ^{abcde}	55.69±2.35 ^{abcedx}	64.46±3.23 ^{abcedxy}
320 nM	58.92±2.11 ^{abcdef}	68.25±4.95 ^{abcedfx}	75.43±0.97 ^{abcedfxy}
球形检验 χ^2 ,P值	1.45,0.458		
组间差异(药物浓度) F ,P值	530.13,0.000		
主体内效应(时间点) F ,P值	472.85,0.000		
交互效应 F ,P值	11.53,0.000		

注:球形性校 $P>0.05$,分析选取主体内效应检验,无需校正。显著性标记a、b、c、d、e 分别为和A、B、C、D、E组同时点相比 $P<0.05$ 。时间精细比较显著性标记X、Y 为和组内第1、2时间点比较, $P<0.05$ 。结果说明:同一时间点24 h,浓度5和浓度10浓度10和浓度20,浓度20和浓度40,浓度40和浓度80,结果比较差异无统计学意义,其余各组比较均差异有统计学意义。同一浓度不同时间点,浓度5、10、24 h和48 h比较差异无统计学意义,其余浓度组三个时间点比较均差异有统计学意义

间差异及交互作用均差异有统计学意义($P<0.05$)。两两精细比较并结合主要数据分析:厄洛替尼和吉西他滨联合使用可以增大细胞抑制率,减少单独使用吉西他滨的起效时间[厄洛替尼:吉西他滨为3:1是时,72 h细胞抑制率为(89.89±1.56)%,IC50值为(3.89±1.65)nmol/L]。详见表3,4。

2.4 Chou-Talalay 法分析吉西他滨与厄诺替尼的联合作用效果 采用Chou-Talalay法分析吉西他滨与厄诺替尼的联合指数CI,在不同的联合给药方案中,2:1组和3:1组处理24、48、72 h均表现出协同作用,尤其是48 h,从细胞生长抑制率CI图中可以看出,随着细胞生长抑制率的增加,CI值逐渐下降。当细胞生长抑制率达到35%时,联合效应开始出现协同作用(小于0.9)。当细胞生长抑制率为

表3 不同组合药物对12例PANC-1细胞的抑制率比较/(%, $\bar{x} \pm s$)

药物组合 (厄洛替尼: 吉西他滨)	细胞抑制率		
	24 h	48 h	72 h
A→1:0	43.89±3.00	33.17±4.28 ⁱ	53.29±5.08 ⁱ
B→0:1	64.42±4.99 ^a	78.20±4.29 ^{at}	80.13±5.34 ^{at}
C→1:2	50.60±6.05 ^{ab}	49.52±8.40 ^{ab}	59.52±8.34 ^{adt}
D→1:1	67.34±4.20 ^{ac}	85.54±8.43 ^{abet}	82.22±3.14 ^{act}
E→2:1	63.87±2.94 ^{acd}	63.45±3.96 ^{abcd}	70.54±3.77 ^{abcdt}
F→3:1	81.97±4.21 ^{abcde}	91.61±3.96 ^{abcdet}	89.89±1.56 ^{abcdet}
整体分析	(HF系数:0.829 5)		
组间 F ,P值	344.191,0.000		
时间 F ,P值	79.761,0.000		
交互 F ,P值	16.391,0.000		

注:整体分析为两因素重复测量方差分析,资料球形性校正采用HF系数法。组间精细比较为LSD- t 检验,显著性标记a、b、c、d、e 分别为和A、B、C、D、E组同时点相比 $P<0.05$ 。时间精细比较为差值 t 检验,与组内第1时间点比较 $P<0.05$

40%时,CI下降(均小于0.5),具有的协同作用。同时,2:1组曲线低于3:1组曲线,说明厄洛替尼和吉西他滨浓度比为2:1的协同效应优于浓度比3:1(图2,表5)。

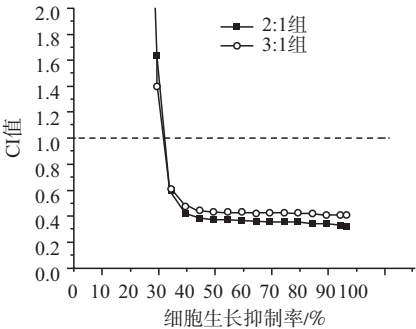


图2 不同组合药物处理24 h时的细胞抑制率CI图

2.5 细胞平板克隆形成实验结果 每组接入1 000个细胞,3周后平板克隆形成实验结果为:对照组细胞数为361;单独加厄洛替尼组细胞数为128;单独

表4 不同组合药物处理下PANC-1细胞的IC50值/(nmol/L, $\bar{x} \pm s$)

药物作用时间	单独给药		联合给药(厄洛替尼:吉西他滨)			
	厄洛替尼	吉西他滨	1:2	1:1	2:1	3:1
24 h	25.71±1.27	206.28±2.01	27.36±2.16	26.58±2.63	20.53±3.18	18.28±2.14
48 h	12.36±2.05	80.59±1.02	12.03±1.72	10.47±2.18	7.54±2.39	5.51±1.93
72 h	6.63±1.41	35.31±0.93	6.52±3.11	5.84±1.68	4.41±2.06	3.89±1.65
整体分析	(HF系数:0.683 9)		(HF系数:0.715 2)			
组间 F ,P值	290.526,0.000		292.153,0.000			
时间 F ,P值	136.472,0.000		115.866,0.000			
交互 F ,P值	19.201,0.000		7.129,0.000			

加吉西他滨组细胞数为114,联合作用组细胞数为118、98、76、80。结果表明,加入药物后细胞克隆形成率下降,且两种药物联合干预PANC-1细胞导致细胞克隆形成数低于单独使用吉西他滨或厄洛替尼干预,其细胞克隆形成率也下降($P < 0.05$),见表6。

表5 不同组合药物处理48 h时的CI值

细胞抑制率	CI值				联合效应			
	1:2	1:1	2:1	3:1	1:2	1:1	2:1	3:1
60%	0.29	0.43	0.36	0.43	协同	协同	协同	协同
70%	0.28	0.43	0.36	0.43	协同	协同	协同	协同
80%	0.27	0.43	0.35	0.42	协同	协同	协同	协同
90%	0.26	0.43	0.35	0.42	协同	协同	协同	协同
95%	0.25	0.41	0.34	0.41	协同	协同	协同	协同
97%	0.24	0.41	0.33	0.41	协同	协同	协同	协同

表6 不同组合药物处理下PANC细胞克隆形成情况

组别	细胞克隆形成数	细胞克隆形成率/%
对照组	361	36.1
厄洛替尼	128	12.8
吉西他滨	114	11.4
1:2(厄洛替尼:吉西他滨)	118	11.8
1:1(厄洛替尼:吉西他滨)	98	9.8
2:1(厄洛替尼:吉西他滨)	76	7.6
3:1(厄洛替尼:吉西他滨)	80	8.0
χ^2 值		10.185
P 值		0.013

注:对照组与厄洛替尼: $\chi^2 = 8.209$; $P = 0.008$ 。对照组与吉西他滨: $\chi^2 = 6.052$; $P = 0.025$ 。对照组与1:2(厄洛替尼:吉西他滨): $\chi^2 = 9.217$; $P = 0.010$ 。对照组与1:1(厄洛替尼:吉西他滨): $\chi^2 = 11.568$; $P = 0.015$ 。对照组与2:1(厄洛替尼:吉西他滨): $\chi^2 = 16.227$; $P = 0.005$ 。对照组与3:1(厄洛替尼:吉西他滨): $\chi^2 = 12.369$; $P = 0.003$ 。厄洛替尼与1:2(厄洛替尼:吉西他滨): $\chi^2 = 6.755$; $P = 0.031$ 。厄洛替尼与1:1(厄洛替尼:吉西他滨): $\chi^2 = 8.176$; $P = 0.029$ 。厄洛替尼与2:1(厄洛替尼:吉西他滨): $\chi^2 = 10.528$; P 值=0.006。厄洛替尼与3:1(厄洛替尼:吉西他滨): $\chi^2 = 12.563$; $P = 0.013$ 。1:2(厄洛替尼:吉西他滨)与1:1(厄洛替尼:吉西他滨): $\chi^2 = 7.115$; $P = 0.021$ 。1:2(厄洛替尼:吉西他滨)与2:1(厄洛替尼:吉西他滨): $\chi^2 = 6.172$; $P = 0.018$ 。1:2(厄洛替尼:吉西他滨)与3:1(厄洛替尼:吉西他滨): $\chi^2 = 6.759$; $P = 0.015$ 。1:1(厄洛替尼:吉西他滨)与2:1(厄洛替尼:吉西他滨): $\chi^2 = 8.986$; $P = 0.008$ 。1:1(厄洛替尼:吉西他滨)与3:1(厄洛替尼:吉西他滨): $\chi^2 = 12.953$; $P = 0.016$ 。2:1(厄洛替尼:吉西他滨)与3:1(厄洛替尼:吉西他滨): $\chi^2 = 7.579$; $P = 0.017$ 。

3 讨论

近年来,随着生活环境和生活方式的改变,胰腺癌发病率也逐渐上升,并伴随着发群体年轻化、发病死亡率升高等特征^[8-9]。胰腺癌细胞中表皮生长因子受体过度表达,这对肿瘤细胞的增殖起到促

进作用,导致胰腺癌预后性差^[10]。其发病初期症状不明显,使得多数病人错失了最佳手术时间^[11]。只能通过后期治疗来提高生存的概率,延长生存时间^[12]。治疗晚期胰腺癌最有常用的方法是使用化疗药物^[13]。吉西他滨单药是目前晚期胰腺癌的标准治疗药物,具有一定的临床收益率和客观缓解率。胰腺癌已经获得了对吉西他滨的抵抗力,使得这种治疗方法受到耐受性的限制,且治疗失败后存在缺失后续有效治疗方案的缺点^[14-15]。因此,研发新型药物或者寻找合适药物与吉西他滨协同作用对胰腺癌的治疗极为重要。但是在大规模随机临床试验中发现多种以吉西他滨为基础的联合化疗方案都未能显示出比吉西他滨单药有更好的生存获益^[16-17]。厄洛替尼是一种新型抗肿瘤药物,它与三磷酸腺苷存在竞争关系,可以抑制在癌组织中表达率很高的人表皮生长因子受体酪氨酸激酶活性,抑制磷酸化反应,从而阻滞下游信号传导,达到抑制癌细胞增殖作用^[18]。厄洛替尼在治疗非小细胞肺癌中发挥作用,在其他肿瘤疾病治疗中也能起到促进作用^[19-20]。本研究通过比较吉西他滨与厄洛替尼的单独使用与联合使用对体外胰腺癌细胞生长影响,来初步探讨两种药物的联合作用效果。

在PANC-1细胞形态观察实验中,用厄洛替尼处理细胞,并观察不同时间处理下细胞形态改变。正常的胰腺癌细胞在离体培养条件下贴壁生长活跃、细胞数量较多,且个体饱满,轮廓清晰。而加药处理后,细胞出现皱缩现象,细胞间隙变大,数量减少。随着处理时间的延长,细胞的生长状态与正常贴壁生长差别更明显。这说明厄洛替尼起到了抑制细胞生长的作用,且抑制效果与作用时间相关。

在细胞毒性试验中,用不同浓度的吉西他滨和厄洛替尼培养液培养胰腺癌PANC-1细胞,细胞抑制率均较对照组高,表明吉西他滨和厄洛替尼都可以抑制胰腺癌细胞的增殖。控制处理时间不变,随着药物浓度的增加,细胞抑制率也增大。控制药物浓度不变,随着药物处理时间的延长,细胞抑制率也增大。这表明一定条件下,吉西他滨和厄洛替尼对癌细胞生长的影响具有时间-浓度依赖性。

在药物联合分析实验中,厄洛替尼和吉西他滨联合使用可以增大细胞抑制率,减少单独使用吉西他滨的起效时间,降低IC50值。采用Chou-Talalay法分析吉西他滨与厄洛替尼的联合指数CI,在细胞抑制率达到一定数值后,联合指数小于1,吉西他滨与厄洛替尼发挥协同作用。这为胰腺癌细胞对吉西他滨产生耐药性提供了新的解决思路,可以通过

厄洛替尼的协同作用来减少吉西他滨的使用量,使得吉西他滨作用失败后还可以继续采取其他补救措施。

在细胞平板克隆实验中,接入相同数量细胞,药物处理一段时间后,药物联合作用组比单独加厄洛替尼或吉西他滨组的细胞克隆数量减少,细胞克隆形成率下降,这表明两种药物联合对用对 PANC-1 细胞的生长影响作用较大,联合使用两种药物对体外胰腺癌细胞增殖的抑制更有效。

综上所述,吉西他滨和厄洛替尼单独使用均能在体外抑制人胰腺癌细胞的生长,发挥抑制胰腺癌肿瘤的作用。吉西他滨和厄洛替尼联合使用可以降低两种药物的使用剂量并起到药物的协同作用,达到并提高抑制体外胰腺癌细胞增殖的效果。尽管厄洛替尼与吉西他滨联合治疗胰腺癌有一定功效,但其疗效是否伴有严重不良反应仍需被考虑。

参考文献

- [1] DORJEE P, LONG ZW. A mixed treatment comparison of toxicity of gemcitabine combined with different targeted drugs in the treatment of advanced or metastatic pancreatic cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2018, 19(6): 497-506.
- [2] WANG-GILLAM A, LI CP, BODOKY G, et al. Nanoliposomal irinotecan with fluorouracil and folinic acid in metastatic pancreatic cancer after previous gemcitabine-based therapy (NAPOLI-1): a global, randomised, open-label, phase 3 trial [J]. *Lancet*, 2016, 387(10018): 545-557.
- [3] LI Y, CHEN Y, LI J, et al. Co-delivery of microRNA-21 antisense oligonucleotides and gemcitabine using nanomedicine for pancreatic cancer therapy[J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(7): 1493-1503.
- [4] UENO H, IKEDA M, UENO M, et al. Phase I/II study of nab-paclitaxel plus gemcitabine for chemotherapy-naïve Japanese patients with metastatic pancreatic cancer [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2016, 77(3): 595-603.
- [5] WANG Y, HU GF, ZHANG QQ, et al. Efficacy and safety of gemcitabine plus erlotinib for locally advanced or metastatic pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2016, 10: 1961-1972.
- [6] SHULTZ DB, PAI J, CHIU W, et al. A novel biomarker panel examining response to gemcitabine with or without erlotinib for pancreatic cancer therapy in NCIC clinical trials group PA.3 [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147995. DOI: 10.2147/DDDT.S105442.
- [7] 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.
- [8] HAAS M, SIVEKE JT, SCHENK M, et al. Efficacy of gemcitabine plus erlotinib in rash-positive patients with metastatic pancreatic cancer selected according to eligibility for FOLFIRINOX: a prospective phase II study of the 'Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie' [J]. *Eur J Cancer*, 2018, 94: 95-103.
- [9] KIM E, KIM K, KYU CE, et al. Chemoradiotherapy after gemcitabine plus erlotinib in patients with locally advanced pancreatic cancer [J]. *J Buon*, 2017, 22(4): 1046-1052.
- [10] TORRES C, LINARES A, ALEJANDRE MJ, et al. Interplay between gemcitabine and erlotinib over pancreatic adenocarcinoma gells [J]. *Pancreas*, 2016, 45(2): 269-280.
- [11] IRIGOYEN A, GALLEGÓ J, GUILLÉN PC, et al. Gemcitabine-erlotinib versus gemcitabine-erlotinib-capecitabine in the first-line treatment of patients with metastatic pancreatic cancer: efficacy and safety results of a phase IIb randomised study from the Spanish TTD Collaborative Group [J]. *Eur J Cancer*, 2017, 75: 73-82.
- [12] OZAKI T, NAKAMURA M, OGATA T, et al. Depletion of pro-oncogenic RUNX2 enhances gemcitabine (GEM) sensitivity of p53-mutated pancreatic cancer Panc-1 cells through the induction of pro-apoptotic TAp63 [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(44): 71937-71950.
- [13] XIE J, LIU JH, LIU H, et al. Tanshinone IIA combined with adriamycin inhibited malignant biological behaviors of NSCLC A549 cell line in a synergistic way [J]. *BMC Cancer*, 2016, 16(1): 899.
- [14] GNANAMONY M, GONDI C. Chemoresistance in pancreatic cancer: emerging concepts [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(4): 2507-2513.
- [15] MIAO X, KOCH G, AIT-UDHIA S, et al. Pharmacodynamic modeling of cell cycle effects for gemcitabine and trabectedin combinations in pancreatic cancer cells [J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7: 421.
- [16] LEE JM, LEE HS, HYUN JJ, et al. Prognostic value of inflammation-based markers in patients with pancreatic cancer administered gemcitabine and erlotinib [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2016, 8(7): 555-562.
- [17] MOON DC, LEE HS, LEE YI, et al. Concomitant statin use has a favorable effect on gemcitabine-erlotinib combination chemotherapy for advanced pancreatic cancer [J]. *Yonsei Med J*, 2016, 57(5): 1124-1130.
- [18] CZARNECKA AM, KORZE-P, NOWAK-DEMENT A, et al. Prolonged complete response following gemcitabine-erlotinib combined therapy in advanced pancreatic cancer [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(2): 1101-1104.
- [19] SCHULER M, YANG J, PARK K, et al. Afatinib beyond progression in patients with non-small-cell lung cancer following chemotherapy, erlotinib/gefitinib and afatinib: phase III randomized LUX-Lung 5 trial [J]. *Ann Oncol*, 2016, 27(3): 417-423.
- [20] GOFF LW, CARDIN DB, WHISENANT JG, et al. A phase I trial investigating pulsatile erlotinib in combination with gemcitabine and oxaliplatin in advanced biliary tract cancers [J]. *Invest New Drugs*, 2017, 35(1): 95-104.

(收稿日期: 2019-07-09, 修回日期: 2019-09-11)