

# 依西美坦联合同期或序贯放射对 MCF-7细胞放射敏感性的影响

陈刚<sup>1</sup>, 金冶宁<sup>2</sup>, 张顺康<sup>1</sup>, 王鑫<sup>1</sup>

1. 上海市黄浦区中心医院放疗科, 上海 200002 ;  
2. 上海交通大学医学院附属瑞金医院放疗科, 上海 200025

**[摘要]** 背景与目的: 放疗和内分泌治疗是乳腺癌术后辅助治疗的重要组成部分, 但关于二者相互作用的研究较少。辅助放疗和内分泌治疗的最佳时序至今尚无定论, 而两者的时序安排对临床却非常重要。本研究通过探讨依西美坦同期或序贯放射对人乳腺癌MCF-7细胞株放射敏感性的影响及其可能的机制, 为临床制定最佳的治疗模式提供理论依据。**方法:** 将人乳腺癌MCF-7细胞株分成单纯放射组、放射前加依西美坦组和放射后加依西美坦组, 采用克隆形成试验法检测各组的放射敏感性, 用MTT法检测各组的细胞增殖率, 用DAPI染色法检测各组的细胞凋亡率, 用蛋白[质]印迹法(Western blot)检测各组Bcl-2和Bax蛋白的表达情况。**结果:** 放射前加依西美坦组和放射后加依西美坦组的放射增敏比(sensitive enhancement ratio, SER)分别为1.51和1.37; 与单纯放射组相比, 依西美坦联合放射组肿瘤细胞抑制率和细胞凋亡率均明显升高; 依西美坦联合放射组能明显使Bax蛋白升高, Bcl-2蛋白降低, 但放射与依西美坦的使用顺序差异无统计学意义。**结论:** 依西美坦对MCF-7细胞具有放射增敏作用, 可能与促进细胞凋亡有关, 放射与依西美坦的使用顺序对效果无影响。

**[关键词]** 依西美坦; MCF-7细胞; 放射敏感性

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2016.05.017

中图分类号: R737.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2016)05-0452-06

**Effect of concurrent or sequential exemestane combined with radiation on radiosensitivity of MCF-7 cells** CHEN Gang<sup>1</sup>, JIN Yening<sup>2</sup>, ZHANG Shunkang<sup>1</sup>, WANG Xin<sup>1</sup> (1. Department of Radiation Oncology, Huangpu District Central Hospital, Shanghai 200002, China; 2. Department of Radiotherapy, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University, School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Correspondence to: CHEN Gang E-mail: fodeng73@163.com

**[Abstract]** **Background and purpose:** Radiotherapy and endocrine therapy are both important parts of adjuvant therapy for breast cancer, yet few studies have been conducted focusing on the interaction between radiation and endocrine therapy. Up to now, no conclusion has been drawn on the timing sequence of adjuvant radiation and endocrine therapy, which is indeed crucial in clinical practice. This study intended primarily to investigate the effect of concurrent or sequential exemestane combined with radiation on radiosensitivity of MCF-7 cells and its possible mechanism, and further to provide rationale for optimal clinical treatment modality. **Methods:** MCF-7 cells were arranged into three trial groups: the radiation group, exemestane sequenced with radiation group and exemestane followed radiation group. Radiosensitivity was evaluated by clonogenic assay, cell proliferation was measured by MTT assay, the ability to induce cell apoptosis was evaluated by DAPI staining assay, the changes of Bcl-2 and Bax were detected by Western blot. **Results:** Sensitive enhancement ratios (SER) were 1.51 and 1.37 in the exemestane sequenced with radiation group and exemestane followed radiation group, respectively. Compared with the radiation group, the percentage of cellular proliferation inhibition and apoptosis increased obviously in the exemestane sequenced with radiation group and exemestane followed radiation group. Exemestane combined with radiation made the Bax protein increase obviously and the Bcl-2 protein lowered significantly. **Conclusion:** Exemestane can enhance the radiosensitivity of MCF-7 cells, whose mechanism might be relevant to the promotion of cellular apoptosis. However,

the treatment sequence does not affect the outcome.

[Key words] Exemestane; MCF-7 cell; Radiosensitivity

乳腺癌的综合治疗包括手术、放疗、化疗、内分泌治疗和靶向治疗等,作为术后辅助治疗的重要手段,放疗属于局部治疗,而化疗与内分泌治疗同属全身治疗范畴。目前认为,辅助化疗与放疗、内分泌治疗联合时应先化疗再序贯放疗和内分泌治疗<sup>[1-3]</sup>。但辅助放疗和内分泌治疗的时序性研究至今尚无定论。依西美坦作为第三代芳香化酶抑制剂(aromatase inhibitors, AI),能提高绝经后受体阳性高复发风险的患者的无病生存率,不良反应低,成为这部分患者的一线治疗用药<sup>[4-5]</sup>。本研究通过观察依西美坦联合同期或序贯放射对人乳腺癌MCF-7细胞放射敏感性的影响,为临床制定最佳的治疗模式提供一定的理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和试剂

人乳腺癌MCF-7细胞购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所细胞库;DMEM高糖培养液、胎牛血清和胰蛋白酶购自美国Gibco公司;染色剂噻唑蓝(MTT)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;依西美坦购自美国Selleckchem公司,溶解在二甲基亚砜中,半抑制浓度(50% inhibiting concentration, IC<sub>50</sub>)为30 μmol/L;抗Bcl-2(ab117115)、抗Bax(ab7997)和抗β-actin(ab6276)抗体购自英国Abcam公司。

### 1.2 细胞培养

人乳腺癌MCF-7细胞用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 mg/mL链霉素的DMEM高糖培养液,置于37 ℃、CO<sub>2</sub>体积分数为5%的培养箱中培养。

### 1.3 实验分组

将MCF-7细胞分为单纯放射组、依西美坦组、放射前加依西美坦组和放射后加依西美坦组。放射前加依西美坦组在放射前1天加入20 μmol/L依西美坦,放射后加依西美坦组在放射后24 h加入20 μmol/L依西美坦。

### 1.4 照射方法

采用美国Varian公司Clinac ix直线加速器。照射条件:6 MV X线,剂量率为300 cGy/min,源皮距100 cm,照射野大小为20 cm×20 cm,加1 cm等效补偿膜。

### 1.5 克隆形成实验

取指数生长期细胞,用0.25%的胰酶消化后制成单细胞悬液,按照剂量0、2、4、6和8 Gy分别在96孔中接种200、200、400、600和800个细胞,每个剂量点设3个平行样本,按上述方法分为放射组、放射前加依西美坦组和放射后加依西美坦组,照射后的细胞继续培养14 d,待出现集落时终止培养,弃培养液,用calceinAM染色10 min,计数细胞大于50个以上的集落数,计算存活分数绘制剂量效应曲线。克隆率(plating efficiency, PE)=对照组每孔克隆数/每孔种植细胞数×100%,并以PE作为校正系数计算存活分数(surviving fraction, SF)。SF=实验组每组克隆数/(每孔细胞种植数×克隆率)。数据分析使用GraphPad Prism 5.0软件,以单靶多击拟合细胞存活曲线,并计算平均致死剂量(mean lethal dose, D<sub>0</sub>)、准阈剂量(quasi-threshold, D<sub>q</sub>)、SF2值和放射增敏比(sensitive enhancement ratio, SER)。

### 1.6 MTT法检测细胞增殖情况

采用MTT法检测依西美坦对MCF-7细胞增殖情况。将指数生长期的细胞,以每孔5×10<sup>3</sup>个细胞接种于96孔板,按上述实验分组方法分为放射组、放射前加依西美坦组和放射后加依西美坦组,同时加细胞组不作处理作为对照组以及空白组。照射方法为单次照射4 Gy,培养6 d后进行检测。每组设立4个复孔,每孔加入20 μL MTT(以磷酸缓冲盐溶液PBS配成5 mg/mL),37 ℃温育4 h后,每孔加二甲基亚砜100 μL,在酶联免疫检测仪上以490 nm波长测定各孔吸光度(D)值,计算细胞生长抑制率。抑制率=(1-D<sub>实验组</sub>)/D<sub>对照组</sub>×100%。

### 1.7 DAPI染色法检测细胞凋亡情况

将指数生长期的MCF-7细胞,以每孔 $5 \times 10^3$ 个细胞接种于96孔板,细胞按上述方法分4个处理,设立空白对照。照射方法为单次照射4 Gy,药物浓度为20  $\mu\text{mol/L}$ 。培养10 d后进行细胞检测,检测时PBS洗3遍,加DAPI荧光染色剂(质量浓度为10  $\mu\text{g/mL}$ )反应30 min,用荧光显微镜观察细胞核凋亡情况,并计数统计。

### 1.8 蛋白[质]印迹法(Western blot)检测Bcl-2和Bax蛋白表达情况

将指数生长期的MCF-7细胞以每孔 $6 \times 10^6$ 个细胞接种于10 mm培养皿,按上述实验分组分为依西美坦组、放射组、放射前加依西美坦组和放射后加依西美坦组,照射方法为单次照射4 Gy,药物浓度为20  $\mu\text{mol/L}$ 。培养10 d后刮取细胞用于检测。首先用BAC对蛋白进行定量。用12%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质,凝胶上的蛋白带转移到硝酸纤维素膜(NC膜)上,以5%脱脂奶粉室温封闭1 h,然后加入一抗(抗Bcl-2抗体、抗Bax抗体、抗 $\beta$ -actin 1:5 000)4  $^{\circ}\text{C}$ 温育过夜,增强化学发光法显色。用FluorChem软件(美国CB公司)扫描分析。

### 1.9 统计学处理

所有数据采用Graphpad Prism 5.0软件分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 依西美坦增强放射敏感性

根据各组克隆数得出克隆形成率和存活分数,运用单击多靶模型进行曲线拟合(图1),并得出放射学参数(表1)。结果表明,依西美坦具有放射增敏作用,放射前或放射后加入的放射增敏比分别为1.51和1.37,放射前加入放射敏感性更强。

### 2.2 依西美坦联合放射明显抑制细胞增殖

MTT结果显示,单纯依西美坦虽然可以抑制MCF-7细胞增殖,跟对照组相比差异无统计学意义( $t=1.809, P=0.1447$ ),而单纯放疗能明显抑制细胞增殖( $t=3.127, P=0.0353$ ),两者联合能明显加强细胞生长抑制的程度( $t=6.875,$

$P=0.0023; t=7.486, P=0.0017$ ),但同期组和序贯组对细胞的抑制率差异无统计学意义( $t=2.019, P=0.1136$ ,图2)。

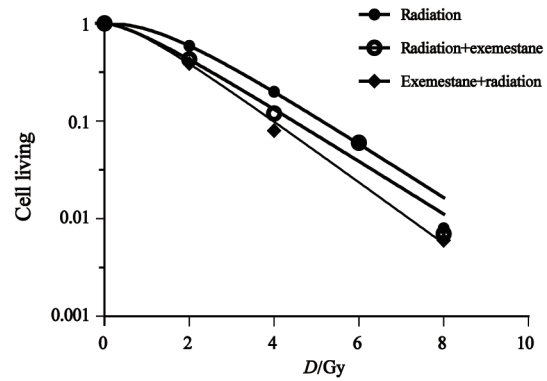


图1 MCF-7细胞经不同处理后的细胞存活曲线

Fig.1 Survival curves of MCF-7 cells after different treatment modalities

表1 MCF-7细胞经不同处理后的放射生物学参数

Tab.1 Radio-biological parameters of MCF-7 cells after different treatment modalities

Treatment	Do	Dq	SF2	SER
Radiation	1.56	1.59	0.59	
Radiation+exemestane	1.60	0.80	0.43	1.37
Exemestane+radiation	1.38	0.83	0.39	1.51

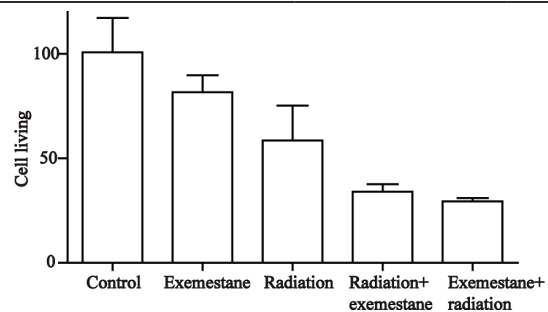


图2 MCF-7细胞经不同处理后的细胞生长抑制率曲线

Fig.2 Growth-inhibition rate curves of MCF-7 cells after different treatment modalities

### 2.3 依西美坦联合放射促进细胞凋亡

用DAPI染色法观察并计算细胞核凋亡情况。结果显示,与对照组相比,单纯依西美坦对细胞凋亡影响不显著( $t=2.00, P=0.1161$ ),而单纯放疗能促进细胞凋亡( $t=9.400, P=0.0007$ ),依西美坦联合放射能进一步促进细胞凋亡( $t=19.00, P < 0.0001$ ),但同期组和序贯组间差异无统计学意义( $t=0.6325, P=0.5614$ ,图3、4)。

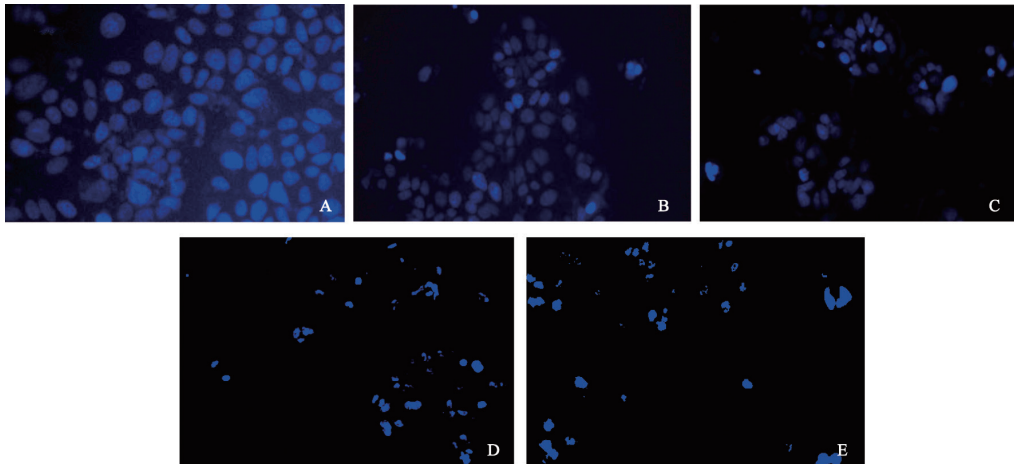


图3 DAPI染色法荧光显微镜下观察各组细胞核凋亡

(×20)

Fig. 3 Fluorescence and electron microscopic observation of nucleus apoptosis in each group of cells with DAPI stain method

A: Control; B: Exemestane; C: Radiation; D: Exemestane followed radiation group ; E: Exemestane sequenced with radiation group

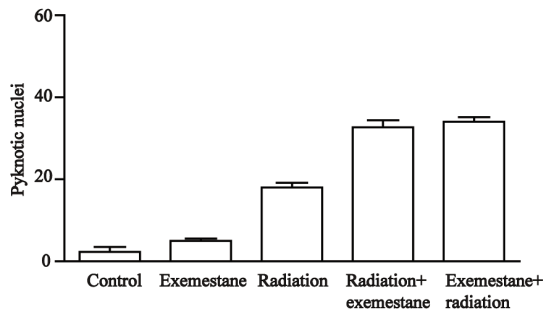


图4 MCF-7细胞经不同处理后细胞凋亡情况

Fig. 4 Apoptosis of MCF-7 cells after different treatment modalities

### 2.4 依西美坦联合放疗促进Bcl-2降低和Bax升高

Western blot检测结果显示, 与对照组相比, Bcl-2抗凋亡指数各组都有降低( $t$ 值分别为15.02、12.94、14.60和17.56,  $P$ 值分别为0.000 1、0.000 2、0.000 1和0.000 1), 但同期组和序贯组间差异无统计学意义( $t=1.436$ ,  $P=0.224 4$ ); 处理组对Bax的表达均有影响(与对照组比较,  $t$ 值分别为4.276、3.865、7.171和8.357,  $P$ 值分别为0.012 9、0.018 1、0.002 0和0.001 1), 均能使Bax升高, 但同期组和序贯组间差异无统计学意义( $t=1.290$ ,  $P=0.266 6$ , 图5)。

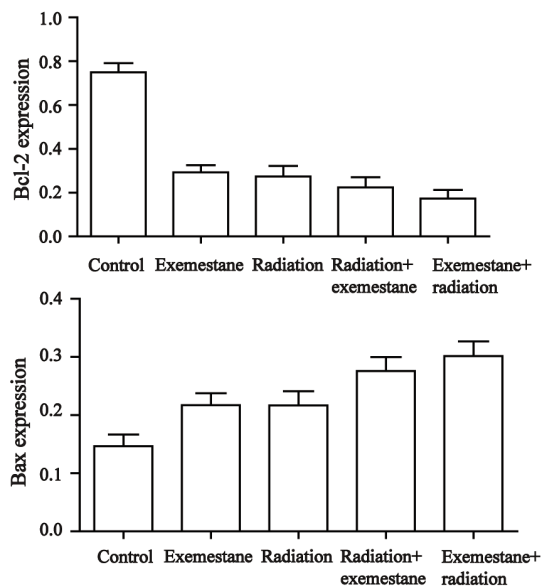
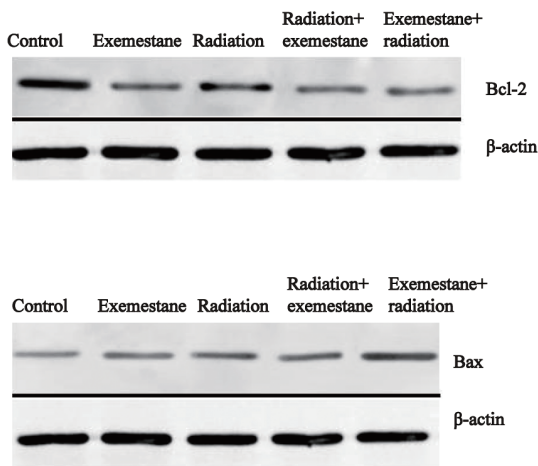


图5 MCF-7细胞经不同处理后Bcl-2、Bax表达情况

Fig. 5 Expressions of Bcl-2 and Bax in MCF-7 cells after different treatment modalities

### 3 讨 论

乳腺癌内分泌治疗目前应用于临床安全有效的药物以三苯氧胺(tamoxifen, TAM)和第三代AI为代表<sup>[6]</sup>。

以阿那曲唑、来曲唑和依西美坦为代表的第三代AI的出现是乳腺癌内分泌治疗史上的一个转机,目前有多个大型临床试验均显示其具有比TAM更好的疗效<sup>[7-8]</sup>。ATAC试验的10年随访结果显示,阿那曲唑组的无病生存期、无病生存率、复发时间及复发率均优于TAM组,且对侧乳腺癌的发生率显著降低;但是两组的总生存率差异无统计学意义<sup>[9]</sup>。BIG1-98试验中位随访时间为74个月,其研究结果显示,来曲唑组较TAM组能显著改善患者的无病生存期,显著降低绝经后激素受体阳性乳腺癌患者的死亡和远处复发风险<sup>[10]</sup>。IES试验中位随访时间为91个月,该研究结果显示,与5年TAM组比较,TAM治疗2~3年后改为依西美坦治疗2~3年组的无病生存期及总生存期有显著提高<sup>[11]</sup>。因此,在乳腺癌内分泌治疗上,无论起始治疗、序贯或转换治疗还是后期延续治疗,第三代AI对于绝经后激素受体阳性的乳腺癌患者在长期疗效和安全性方面更具有优势<sup>[12-15]</sup>。

由于第三代AI上市时间短,国内外为数不多的研究主要集中于来曲唑与放疗的相互作用<sup>[16-18]</sup>。

同是第三代AI,但依西美坦和来曲唑作用机制不同,来曲唑为非甾体类的AI,主要作用于芳香化酶的细胞色素P450酶,其作用是可逆的;而依西美坦为甾体类芳香化酶致死性抑制剂,它结构上与该酶的自然底物雄烯二酮和睾酮结构相似,为芳香酶的伪底物,通过不可逆地与该酶的活性位点结合而使其失活,形成中间产物而引起永久性的酶灭活,从而抑制雌激素的合成,明显降低绝经妇女血液循环中的雌激素水平<sup>[19-20]</sup>,而且不影响可的松和醛固酮的合成。但依西美坦与放疗的相互作用情况目前

尚缺乏相关的研究。

本研究的成克隆试验结果显示,无论放射前或放射后联合依西美坦处理MCF-7细胞,依西美坦均具有放射增敏作用,MTT结果也进一步说明两者联合应用时细胞生长明显受到抑制。本研究还发现,依西美坦放射增敏机制可能与促进细胞凋亡有关。因为通过DAPI染色法观察细胞核固缩情况,结果显示,单纯依西美坦对细胞凋亡影响不明显,但联合放射能促进细胞凋亡,而且使抗凋亡指数Bcl-2降低和促凋亡指数Bax升高,能进一步增加放射诱导的细胞毒作用<sup>[21]</sup>。

但实验室研究与临床研究结论往往存在不一致性。本研究结果显示,依西美坦联合同期或序贯放射均能提高人乳腺癌MCF-7细胞的放射敏感性,其具有放射增敏作用。同期依西美坦是否会导致增加患者放疗的不良反应,另一方面,延迟依西美坦的起始时间是否会影响疗效,或在放射治疗预防局部复发的同时是否会失去全身治疗的保障,这些问题仍需我们进一步开展前瞻性临床随机对照研究来探讨乳腺癌术后放疗联合AI内分泌治疗的时序性,寻找最佳治疗模式来指导临床实践,使患者获得更好的生存受益。

#### [参 考 文 献]

- [1] SENEVIRATNE S, CAMPBELL L, SCOTT N, et al. Ethnic differences in timely adjuvant chemotherapy and radiation therapy for breast cancer in New Zealand: a cohort study [J]. BMC Cancer, 2014, 14: 839-847. doi: 10.1186/1471-2407-14-839.
- [2] ABBAS H, ELYAMANY A, SALEM M, et al. The optimal sequence of radiotherapy and chemotherapy in adjuvant treatment of breast cancer [J]. Int Arch Med, 2011, 4(1): 35-41.
- [3] ABU-HAMAR A H, BARAKAT A F, ELGANTIRY M, et al. Sequence of radiation therapy and chemotherapy as adjuvant treatment in breast cancer [J]. J Egypt Natl Canc Inst, 2010, 22(1): 95-104.
- [4] 刘颖,马骥,赵庆丽,等. 依西美坦治疗绝经后乳腺癌的临床疗效及安全性观察 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(12): 2332-2334.
- [5] IWATA H, MASUDA N, OHNO S, et al. A randomized, double-blind, controlled study of exemestane versus

- anastrozole for the first-line treatment of postmenopausal Japanese women with hormone-receptor-positive advanced breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2013, 139(2): 441-451.
- [ 6 ] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2015版) [J]. *中国癌症杂志*, 2015, 25(9): 692-754.
- [ 7 ] SCHIAVON G, SMITH I E. Status of adjuvant endocrine therapy for breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2014, 16(2): 206-222.
- [ 8 ] 王娟娟, 李建, 柴源, 等. 乳腺癌内分泌治疗现状 [J]. *临床与病理杂志*, 2015, 35(1): 100-105.
- [ 9 ] CUZICK J, SESTAK I, BAUM M, et al. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial [J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(12): 1135-1141.
- [ 10 ] COLLEONI M, GIOBBIE-HURDER A, REGAN M M, et al. Analyses adjusting for selective crossover show improved overall survival with adjuvant letrozole compared with tamoxifen in the BIG 1-98 study [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(9): 1117-1124.
- [ 11 ] BLISS J M, KILBURN L S, COLEMAN R E, et al. Disease-related outcomes with long-term follow-up: an updated analysis of the intergroup exemestane study [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(7): 709-717.
- [ 12 ] EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP (EBCTCG), DOWSETT M, FORBES J F, et al. Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomized trials [J]. *Lancet*, 2015, 386(10001): 1341-1352.
- [ 13 ] BUZDAR A, HOWELL A, CUZICK J, et al. Comprehensive side-effect profile of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: long-term safety analysis of the ATAC trial [J]. *Lancet Oncol*, 2006, 7(8): 633-643.
- [ 14 ] 姚舒洋, 徐兵河. 戈舍瑞林联合来曲唑治疗晚期绝经前乳腺癌的临床疗效研究 [J]. *中国全科医学*, 2012, 15(3): 259-261.
- [ 15 ] 杜雨柔, 赵亚东, 刘斌, 等. 口服来曲唑对绝经后乳腺癌患者血清血管内皮生长因子的影响 [J]. *实用临床医药杂志*, 2011, 15(19): 97-98.
- [ 16 ] AZRIA D, LARBOURET C, CUNAT S, et al. Letrozole sensitizes breast cancer cells to ionizing radiation [J]. *Breast Cancer Res*, 2005, 7(1): 156-163.
- [ 17 ] BOLLET M A, KIROVA Y M, ANTONI G, et al. Responses to concurrent radiotherapy and hormone therapy and outcome for large breast cancers in post-menopausal women [J]. *Radiother Oncol*, 2007, 85(3): 336-345.
- [ 18 ] 彭苗, 刘晓清, 丁颖, 等. 乳腺癌术后放射治疗同期或序贯联合内分泌治疗的临床研究 [J]. *广东药学院学报*, 2011, 27(5): 1-4.
- [ 19 ] PAGANI O, REGAN M M, WALLEY B A, et al. Adjuvant exemestane with ovarian suppression in premenopausal breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(2): 107-118.
- [ 20 ] 朱悦茗, 李丹, 吴学勇. 乳腺癌内分泌治疗研究进展 [J]. *上海医药*, 2012, 33(18): 9-13.
- [ 21 ] VARELA C L, AMARAL C, TAVARES DA SILVA E, et al. Exemestane metabolites: Synthesis, stereochemical elucidation, biochemical activity and anti-proliferative effects in a hormone-dependent breast cancer cell line [J]. *Eur J Med Chem*, 2014, 87(24): 336-345.
- (收稿日期: 2015-10-09 修回日期: 2015-12-30)