

• 基础研究 •

MDM2/MDMX-p53 双靶点蛋白增效厄洛替尼抗胰腺癌活性的研究*

井佳瑜, 董丹凤, 樊杨威, 吴胤璜, 李恩孝[△], 董旭媛[△]

710061 西安, 西安交通大学第一附属医院 肿瘤内科

[摘要] 目的: 因对总生存时间的提高仅 0.4 个月, 厄洛替尼在胰腺癌中的应用一直存在争议。本课题组前期成功合成了可阻断 MDM2/MDMX-p53 的抑制蛋白, 本研究拟通过联合该抑制蛋白探讨提高厄洛替尼在胰腺癌中的抗肿瘤活性的可行性。方法: MTT 法检测细胞增殖、流式细胞仪测定细胞凋亡、Matrigel transwell 检测细胞侵袭能力, 了解联合双靶点抑制蛋白对比厄洛替尼单药对细胞生物活性的影响, Western-blotting 方法检测相关蛋白表达情况探讨联合用药的抗肿瘤增效机制。构建裸鼠移植瘤模型研究双靶点抑制蛋白联合厄洛替尼的体内抗肿瘤活性。结果: 联合双靶点抑制蛋白可上调 p53 表达, 下调 MDM2、MDMX 和 EGFR 表达, 从而促进厄洛替尼抑制胰腺癌细胞增殖、促进凋亡、抑制细胞侵袭转移; 体内研究显示双靶点抑制蛋白有协同抗肿瘤作用, 各组移植瘤抑瘤率分别为: 厄洛替尼 22.47%、MDM2/MDMX-p53 抑制蛋白组 28.41%、联合治疗组 55.39%, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论: 联合 MDM2/MDMX-p53 双靶点抑制蛋白可增加厄洛替尼的体内、体外抗胰腺癌活性, 有望为胰腺癌的治疗带来新的希望。

[关键词] MDM2/MDMX-p53 抑制蛋白; 厄洛替尼; 胰腺癌

[中图分类号] R735.9; R73-36+1 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1674-0904.2021.02.002

引文格式: Jing JY, Dong DF, Fan YW, et al. Anti-cancer activity of erlotinib combined with MDM2/MDMX-p53 inhibitor in pancreatic cancer cells [J]. J Cancer Control Treat, 2021, 34(2): 99-107. [井佳瑜, 董丹凤, 樊杨威, 等. MDM2/MDMX-p53 双靶点蛋白增效厄洛替尼抗胰腺癌活性的研究[J]. 肿瘤预防与治疗, 2021, 34(2): 99-107.]

Anti-Cancer Activity of Erlotinib Combined with MDM2/MDMX-p53 Inhibitor in Pancreatic Cancer Cells

Jing Jiayu, Dong Danfeng, Fan Yangwei, Wu Yinying, Li Enxiao, Dong Xuyuan

Department of Medical Oncology, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi, China

Corresponding author: Li Enxiao, E-mail: doclienxiao@sina.com; Dong Xuyuan, E-mail: 2005dongxuyuan@163.com

This study was supported by Natural Science Foundation of Shaanxi Province (No. 2020JQ-505).

[Abstract] **Objective:** The clinical application of erlotinib in patients with pancreatic cancer has been controversial due to its limitation in improving overall survival (only 0.4 months). Our study aimed to enhance the anti-pancreatic cancer activity of erlotinib by combining the MDM2/MDMX-p53 inhibitor. **Methods:** For the in vitro study, MTT was applied to detect cell viability; cell apoptosis was evaluated by flow cytometry; Matrigel transwell assays were employed to detect cell invasion ability. Western blotting was used to learn the expression level of associated proteins in order to reveal the possible mechanisms. Nude mice subcutaneous transplantation tumor models were established to learn the in vivo anti-tumor activity of erlotinib combined with MDM2/MDMX-p53 inhibitor. **Results:** For the in vitro study, MDM2/MDMX-p53 inhibitor could significant-

ly inhibit cell proliferation, promote cell apoptosis, and impair cell invasion. For the in vivo study, the inhibition rates were 22.47% (the erlotinib group), 28.41% (the MDM2/MDMX-p53 inhibitor group), 55.39% (the combination group), respectively; and the difference was statistically significant (P

[收稿日期] 2020-04-26 **[修回日期]** 2020-11-11

[基金项目] * 陕西省自然科学基金 (编号: 2020JQ-505)

[通讯作者] [△] 李恩孝, E-mail: doclienxiao@sina.com; 董旭媛, E-mail: 2005dongxuyuan@163.com

<0.01). Further study revealed the combined treatment showed MDM2/mdmx-p53 inhibitor could up-regulate p53, down-regulate MDM2, MDMX and EGFR, which might contribute to the improvement of the anti-cancer activity of erlotinib. **Conclusion:** MDM2/MDMX-p53 inhibitor can improve the anti-tumor activity of erlotinib in pancreatic cancer both in vitro and in vivo. Further studies were needed if the combined treatment could be developed as a promising strategy for pancreatic cancer in clinic.

[Key words] MDM2/MDMX-p53 inhibitor; Erlotinib; Pancreatic cancer

胰腺癌是一种常见的消化道恶性肿瘤,患者预后极差,被称为“癌症之王”。大多数患者在确诊时已经发展为局部晚期或者已出现远处转移,无法手术治疗。晚期胰腺癌的治疗方案是以姑息性化疗为主的综合治疗,但以吉西他滨为主单药或者联合其他细胞毒性药物的化疗对胰腺癌的有效率很低,且副作用非常大,耐受性差^[1-3]。近些年研究者在胰腺癌靶向治疗领域的探索多以失败告终,仅 EGFR 抑制剂厄洛替尼取得了阳性的临床研究结果。但其对总生存期(overall survival, OS)的改善仅 0.4 个月,令厄洛替尼的临床应用备受争议^[4-7]。因此,亟需探索增强厄洛替尼疗效的方法,提高患者生存及预后。

野生型 p53 在抑制肿瘤的形成中起着重要作用,MDM2/MDMX 是 p53 蛋白的重要负调控因子,一些恶性肿瘤中高表达的 MDM2/MDMX 会降低 p53 蛋白的水平和功能,从而加速肿瘤的形成和进展。通过抑制 MDM2 和 MDMX 或可恢复 p53 的肿瘤抑制功能,从而发挥抗肿瘤作用。最近有研究报道 MDM2 抑制剂可通过激活 p53 诱导 DYRK1A 降解,降低 EGFR 的稳定性,从而间接抑制 EGFR 蛋白表达^[8-10]。这些研究提示我们抑制 MDM2/MDMX 可激活 p53,同时下调 EGFR 表达,有可能与 EGFR 抑制剂有协同抗肿瘤作用。

课题组在前期研究中已经成功合成了具有透膜性且能靶向阻断 MDM2-p53 和 MDMX-p53 相互作用的重组蛋白,即 MDM2/MDMX-p53 抑制蛋白,并已发现该重组蛋白在胰腺癌中具有很好的抗肿瘤活性^[11]。本研究主要使用 p53 野生型胰腺癌细胞株 ASPC-1 和 p53 突变型胰腺癌细胞株 PANC-1,分别给予厄洛替尼、MDM2-p53 抑制剂、MDM2/MDMX-p53 抑制蛋白联合厄洛替尼、MDM2 抑制剂联合厄洛替尼等处理。通过 MTT、细胞凋亡实验等体外探讨联合 MDM2/MDMX-p53 抑制蛋白是否可增效厄洛替尼的抗肿瘤活性。进一步构建裸鼠移植瘤模型,探讨 MDM2/MDMX-p53 抑制蛋白能否在体内促进厄洛替尼的抗胰腺癌活性。并应用 Western-blotting 等方法对相关机制进行初步探讨,从实验上探

寻提高胰腺癌治疗疗效的可行性方法。

1 材料与方法

1.1 材料

两种人胰腺癌细胞株:PANC-1 和 ASPC-1,前者购于上海吉凯基因化学技术有限公司,后者由西安交通大学医学院转化医学中心提供。MDM2/MDMX-p53 蛋白抑制剂的制备参考本课题组前期研究文献^[11]。实验裸鼠(24 只)为 Balb/c、nu/nu 雌性裸鼠,4~8 周龄,体重 18~22 g,SPF 级。

1.2 方法

MTT 实验:细胞贴壁生长后,分别加入不同浓度梯度的 MDM2/MDMX-p53 抑制蛋白、MDM2-p53 抑制剂(Nutlin-3a)以及 Erlotinib,培育 48 h;加入 MTT 溶液 20 μ L 孵育 4 h,在酶联免疫仪上选择 490 nm 波长测定吸光度值,并计算 5 孔平均值;绘制细胞的生长曲线,了解药物对细胞活性的影响。

Matrigel transwell 小室检测细胞的侵袭能力:实验分为 6 组,处理组 1:阴性对照组;处理组 2:单用 IC50 浓度(ASPC-1 细胞 3.482 μ g/mL;PANC-1 细胞 4.461 μ g/mL)的厄洛替尼组;处理组 3:单用 IC10 浓度(ASPC-1 细胞 10.08 μ g/mL;PANC-1 细胞 14.072 μ g/mL)的 MDM2-p53 抑制剂 Nutlin-3a 组;处理组 4:单用 IC10 浓度(ASPC-1 细胞 5.268 μ g/mL;PANC-1 细胞 6.679 μ g/mL)的 MDM2/MDMX-p53 双靶点抑制蛋白组;处理组 5:联合使用 IC50 浓度的厄洛替尼和 IC10 浓度的单靶点抑制剂组;处理组 6:联合使用 IC50 浓度的厄洛替尼和 IC10 浓度的双靶点抑制蛋白组。各组加入相应药物后进行试验,具体操作参考说明书(BD 公司)进行。

Annexin V/7-AAD 检测细胞凋亡:细胞分组及空白对照同前,处理 24 h 后参照凋亡试剂盒说明书,流式细胞仪检测凋亡。Western-blotting 检测蛋白的表达水平:细胞分组同前,分别给与不同抑制剂处理后 48 h 候收集蛋白,各单克隆抗体具体情况如下:p53 抗体(Abcam),稀释比例 1:1 000;MDM2 抗体(Abcam),稀释比例 1:1 000;MDMX 抗体(Ab-

cam), 稀释比例 1:1 000; EGFR 抗体 (CST), 稀释比例 1:1 000; HRP 标记 GAPDH (Proteintech), 稀释比例 1:5 000。HRP 标记兔二抗 (CST), 稀释比例 1:10 000。操作步骤同其他 Western-blotting 试验步骤。

体内实验: ASPC-1 细胞悬液皮下接种于 24 只裸鼠的右后肢。实验裸鼠随机分为 4 组, 每组 6 只, 每组均接受不同药物干预, 第一组: 等体积 PBS 口服; 第二组: MDM2/MDMX-p53 抑制蛋白 20mg/kg/d, 瘤内注射; 第三组: 厄洛替尼 50 mg/kg/d, 灌胃; 第四组: 厄洛替尼 50 mg/kg/d, 灌胃 + MDM2/MDMX-p53 抑制蛋白 20 mg/kg/d, 瘤内注射。观察肿瘤的生长情况, 每 2 d 测量肿瘤大小和裸鼠体重变化, 以肿瘤体积为纵坐标、时间为横坐标绘制肿瘤生长曲线, 计算抑瘤率: 抑瘤率 (%) = (阴性对照组瘤重 - 干预组瘤重) / 阴性对照组瘤重 × 100%。

1.3 统计分析

所有实验结果用 SPSS 18.0 统计软件进行统计学分析, 计量资料均采用均数 ± 标准差表示。多组间差异的比较采用单因素方差分析。所有统计分析均为双侧概率检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 厄洛替尼联合双靶点抑制蛋白可更有效地抑制胰腺癌细胞的增殖活性

不同浓度梯度的 MDM2/MDMX-p53 抑制蛋白、MDM2-p53 抑制剂 (Nutlin-3a) 和厄洛替尼作用于 ASPC-1 细胞或 PANC1 细胞 48 h, 绘制细胞生长抑制曲线, 计算其 IC₅₀、IC₁₀ 值。结果显示: MDM2/MDMX-p53 双靶点抑制蛋白抑制 ASPC1 细胞和 PANC1 细胞增殖活性的能力强于 MDM2-p53 抑制剂 (图 1A、C)。其中双靶点抑制蛋白、Nutlin-3a 分别处理 ASPC-1 细胞后的 IC₁₀ 为 5.27 μg/mL 和 10.08 μg/mL; 而在 PANC-1 细胞中, 双靶点抑制蛋白、Nutlin-3a 分别处理细胞后的 IC₁₀ 为 6.68 μg/mL 和 14.07 μg/mL。为了说明双靶点抑制蛋白以及单靶点抑制剂可促进厄洛替尼的抗胰腺癌作用, 而非其自身抗胰腺癌的活性, 我们选取低浓度 (IC₁₀) 作为联合用药的浓度。结果显示: 厄洛替尼联合双靶点抑制蛋白比联合单靶点抑制剂能更显著地抑制 ASPC1 细胞和 PANC1 细胞的增殖活性 (图 1B、D)。

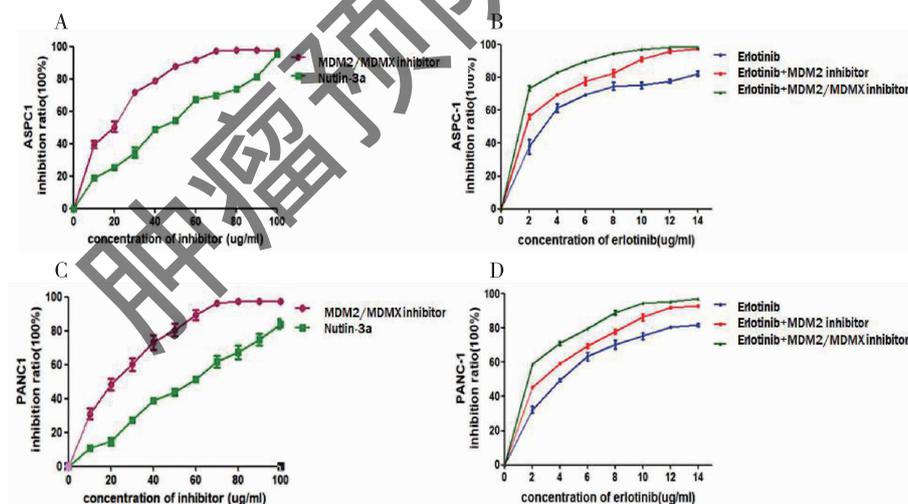


图 1 厄洛替尼联合双靶点抑制蛋白可显著抑制胰腺癌细胞增殖活性

Figure 1. Activity of Erlotinib Combined with MDM2/MDMX-p53 Inhibitor in Pancreatic Cancer Cells

A. ASPC-1 cells were treated with stepwise increased concentrations of MDM2/MDMX-p53 inhibitor and nutlin-3α for 48 h; IC₁₀ for MDM2/MDMX-p53 inhibitor and nutlin-3α were 5.268 μg/mL and 10.08 μg/mL, respectively. B. ASPC-1 cells were treated with stepwise increased erlotinib, erlotinib combined with MDM2/MDMX-p53 inhibitor (5.268 μg/mL) and erlotinib combined with nutlin-3α (10.08 μg/mL) for 48 h; IC₅₀ for erlotinib was 3.482 μg/mL. C. PANC-1 cells were treated with stepwise increased concentrations of MDM2/MDMX-p53 inhibitor and nutlin-3α for 48 h; IC₁₀ for MDM2/MDMX-p53 inhibitor and nutlin-3α were 6.679 μg/mL and 14.072 μg/mL, respectively. D. PANC-1 cells were treated with stepwise increased erlotinib, erlotinib combined with MDM2/MDMX-p53 inhibitor (6.679 μg/mL) and erlotinib combined with nutlin-3α (14.072 μg/mL) for 48 h; IC₅₀ for erlotinib was 4.461 μg/mL.

MDM2/MDMX-p53 inhibitor and nutlin-3α are referred to as MDM2/MDMX inhibitor and MDM2 inhibitor in the figure.

2.2 厄洛替尼联合双靶点抑制蛋白抑制胰腺癌细胞的侵袭能力

实验分组同试验方法中分组,分别加相应药物干预处于对数生长期的 ASPC-1 胰腺癌细胞株 48 h。用 Matrigel transwell 小室实验检测细胞的侵袭能力。在 ASPC-1 细胞株中(图 2A、B),不同干预措施能降低 ASPC-1 细胞的侵袭能力,各处理组平均穿膜细胞数依次为:(91.50 ± 2.65)个、(43.75 ± 1.71)个、(41.5 ± 1.29)个、(39.75 ± 1.71)个、(28.50 ±

1.29)个、(19.25 ± 0.96)个,厄洛替尼联合 MDM2/MDMX-p53 抑制蛋白干预后穿膜细胞数显著减少,差异具有统计学意义。(F = 339.858, P < 0.01)。在 PANC-1 细胞株中(图 2C、D),结果显示:各处理组平均穿膜细胞数为:(71.25 ± 2.63)个、(42.25 ± 2.22)个、(43.25 ± 1.71)个、(37.75 ± 2.06)个、(32.00 ± 1.83)个、(16.75 ± 1.50)个,厄洛替尼联合 MDM2/MDMX-p53 抑制蛋白干预后穿膜细胞数减少,差异具有统计学意义(F = 337.089, P < 0.01)。

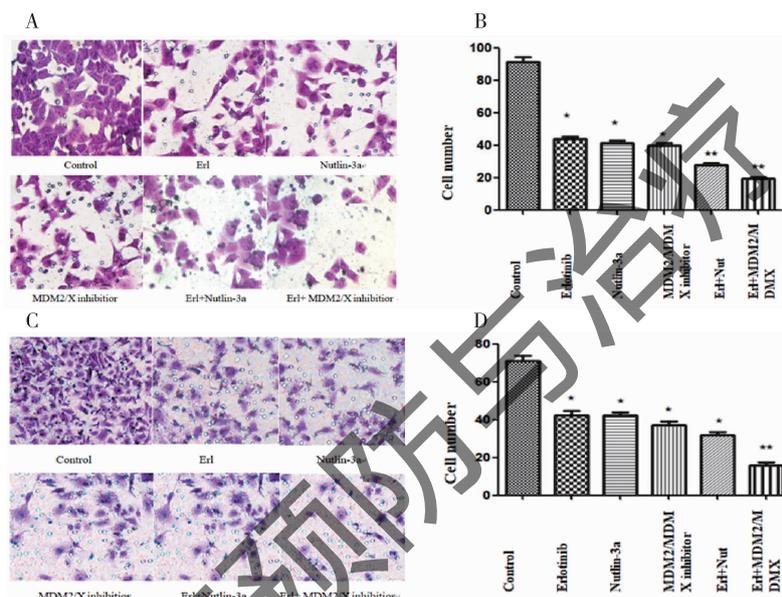


图 2 厄洛替尼联合双靶点抑制蛋白抑制胰腺癌细胞的侵袭能力

Figure 2. Invasion Assay of Erlotinib Combined with MDM2/MDMX-p53 Inhibitor in Pancreatic Cancer Cells

A. Matrigel transwell assays were employed to detect the invasion ability of ASPC-1 cells in 48h; the control group, the erlotinib group (3.482 μg/mL), the nutlin-3α group (10.08 μg/mL), the MDM2/MDMX-p53 inhibitor group (5.268 μg/mL), the erlotinib combined with nutlin-3α group and the erlotinib combined with MDM2/MDMX-p53 inhibitor group were incubated with indicated inhibitors at certain concentrations; penetrated cells were stained as is shown in Panel A. B. Number of penetrated cells in ASPC-1 cells (*P < 0.05, **P < 0.01). C. Matrigel transwell assays were employed to detect the invasion ability of PANC-1 cells in 48h; the control group, the erlotinib group (4.461 μg/mL), the nutlin-3α group (14.072 μg/mL), the MDM2/MDMX-p53 inhibitor group (6.679 μg/mL), the erlotinib combined with nutlin-3α group, and the erlotinib combined with MDM2/MDMX-p53 inhibitor group were incubated with indicated inhibitors at certain concentrations; penetrated cells were stained as is shown in Panel C. D. Number of penetrated cells in PANC-1 cells (*P < 0.05, **P < 0.01).

The control group, the erlotinib group, the nutlin-3α group, the MDM2/MDMX-p53 inhibitor group, the erlotinib combined with nutlin-3α group and the erlotinib combined with MDM2/MDMX-p53 inhibitor group are referred to as Control, Erl, Nutlin-3α, MDM2/X inhibitor, Erl + Nutlin-3α, and Erl + MDM2/X inhibitor, respectively, in Panel A and C, and are referred to as Control, Erlotinib, Nutlin-3α, MDM2/MDMX inhibitor, Erl + Nut, and Erl + MDM2/MDMX, respectively, in Panel B and D, respectively.

2.3 厄洛替尼联合双靶点抑制蛋白促进胰腺癌细胞的凋亡

参照试验方法中的实验分组分别干预处于对数生长期的 ASPC-1 细胞株 48 h,流式细胞仪分析细胞凋亡情况。结果显示(图 3A):阴性对照组早期

凋亡细胞比例为零,各处理组早期凋亡细胞比例依次为 9.53% ± 1.54%、5.46% ± 1.64%、2.91% ± 2.05%、1.83% ± 0.48%、1.37% ± 0.53%;各处理组干预后 ASPC-1 细胞早期凋亡比例增加,与对照组相比,这种差异具有统计学意义(F = 234.198,

$P < 0.05$)。对比其他组,厄洛替尼联合 MDM2/MDMX-p53 抑制蛋白诱导 ASPC-1 细胞凋亡的比例更高($P < 0.05$)。

PANC-1 细胞处理 48 h 后流式细胞仪分析凋亡情况。结果显示(图 3B):阴性对照组无早期凋亡细胞,各处理组早期凋亡细胞比例依次为 $7.67\% \pm$

1.42% 、 $4.98\% \pm 2.01\%$ 、 $2.62\% \pm 1.03\%$ 、 $1.65\% \pm 0.55\%$ 、 $1.27\% \pm 0.34\%$;各处理组干预后 PANC-1 细胞早期凋亡比例增加,与对照组相比,这种差异具有统计学意义($F = 318.710, P < 0.05$)。对比其他组,厄洛替尼联合 MDM2/MDMX-p53 抑制蛋白诱导 PANC-1 细胞凋亡的比例更高($P < 0.05$)。

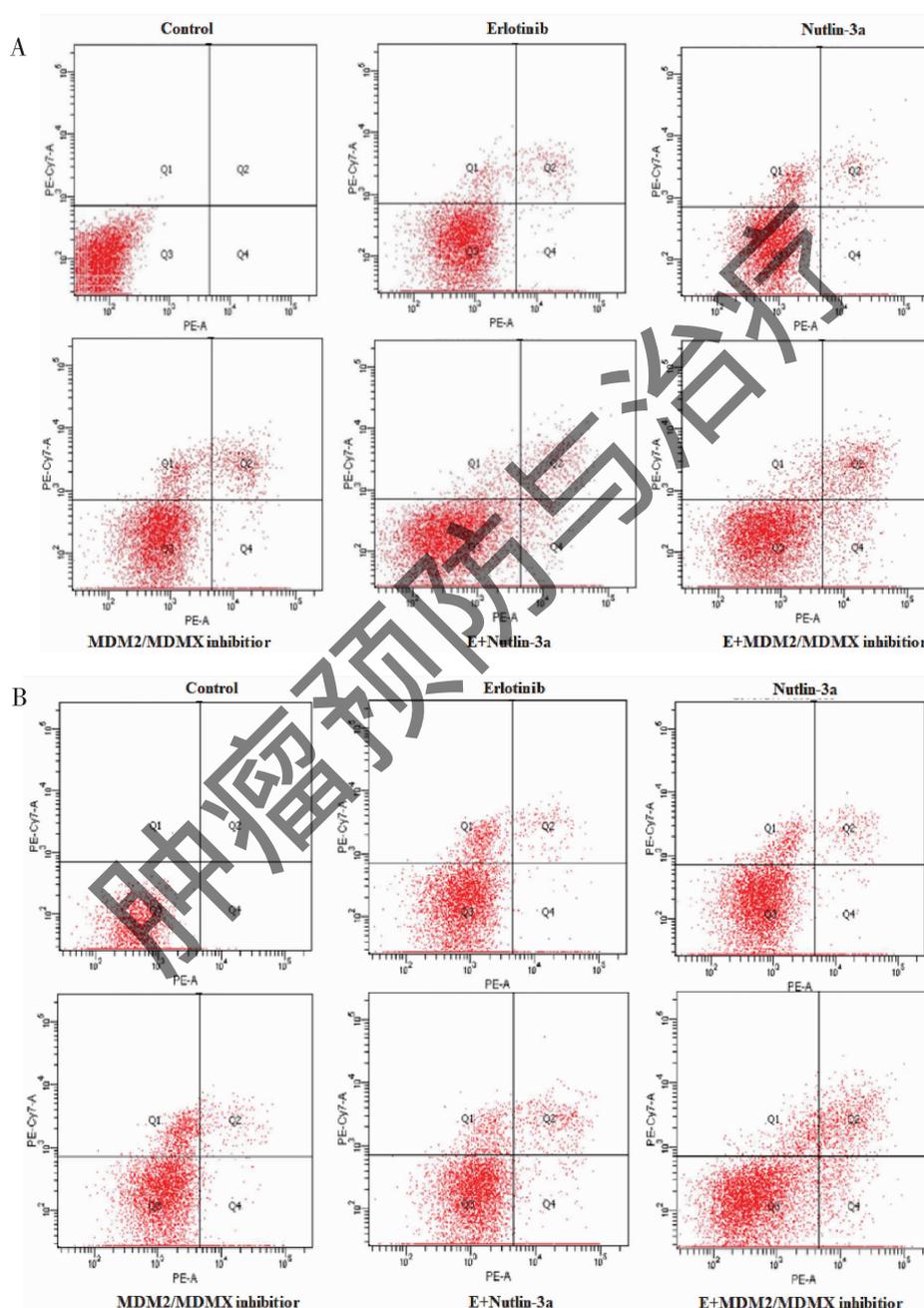


图 3 厄洛替尼联合双靶点抑制蛋白促进胰腺癌细胞的凋亡

Figure 3. Erlotinib Combine with MDM2/MDMX-p53 Inhibitor Promotes Apoptosis

A. ASPC-1 cells were treated with DMSO, erlotinib, nutlin-3 α , MDM2/MDMX-p53 inhibitor, erlotinib combined with nutlin-3 α and erlotinib combined with MDM2/MDMX-p53 inhibitor for 48 h, respectively. Flow cytometry was performed to show tumor cell apoptosis.

B. PANC-1 cells were treated with DMSO, erlotinib, nutlin-3 α , MDM2/MDMX-p53 inhibitor, erlotinib combined with nutlin-3 α and erlotinib combined with MDM2/MDMX-p53 inhibitor for 48h, respectively. Flow cytometry was performed to show tumor cell apoptosis.

DMSO, erlotinib, nutlin-3 α , MDM2/MDMX-p53 inhibitor, erlotinib combined with nutlin-3 α and erlotinib combined with MDM2/MDMX-p53 inhibitor are referred to as Control, Erlotinib, Nutlin-3 α , MDM2/MDMX inhibitor, E + Nutlin-3 α , and E + MDM2/MDMX inhibitor, respectively.

2.4 厄洛替尼联合 MDM2/MDMX-p53 双靶点抑制蛋白体外抗肿瘤作用机制研究

用 Western-blotting 方法检测经过处理后胰腺癌细胞中相关蛋白的表达情况。ASPC-1 细胞分别加入 DMSO (control)、Erl (厄洛替尼 3.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、MDM2/MDMX inhibitor (5.27 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、Com (厄洛替尼联合 MDM2-p53 抑制蛋白组), 处理 48 h 后收集细胞蛋白, Western blotting 方法检测 p53 蛋白、MDM2、MDMX、EGFR 蛋白的表达水平。PANC-1 细

胞分别加入 DMSO (control)、Erl (厄洛替尼 4.46 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、MDM2/MDMX inhibitor (6.68 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、Com (厄洛替尼联合 MDM2-p53 抑制蛋白组), 处理 48 h 后收集细胞蛋白, Western blotting 方法检测 P53 蛋白、MDM2、MDMX、EGFR 蛋白的表达水平。结果显示厄洛替尼联合 MDM2/MDMX-p53 双靶点抑制蛋白在两种胰腺癌细胞中均可下调 MDM2/MDMX 表达, 上调 p53 表达, 下调 EGFR 表达, 在 ASPC1 细胞中更为显著 (图 4)。

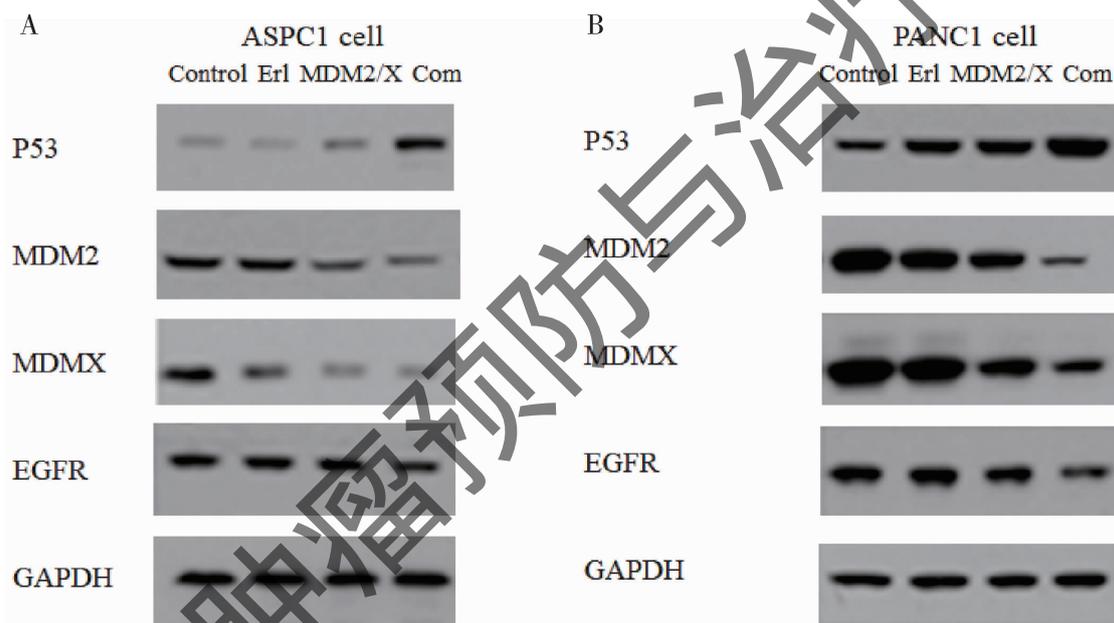


图 4 厄洛替尼联合 MDM2/MDMX-p53 双靶点抑制蛋白体外抗肿瘤机制

Figure 4. Mechanisms of Anti-tumor Activity of Erlotinib Combined with MDM2/MDMX-p53 Inhibitor

A. ASPC-1 cells were incubated with DMSO, erlotinib (3.482 $\mu\text{g}/\text{mL}$), MDM2/MDMX-p53 (5.268 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and erlotinib combined with MDM2/MDMX-p53 for 48 h; cells were then harvested for western blotting; expression levels of p53, MDM2, MDMX and EGFR proteins were shown in Panel A. B. ASPC-1 cells were incubated with DMSO, erlotinib (4.461 $\mu\text{g}/\text{mL}$), MDM2/MDMX-p53 (6.68 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and erlotinib combined with MDM2/MDMX-p53 for 48h; cells were then harvested for western blotting; expression levels of p53, MDM2, MDMX and EGFR proteins were shown in Panel B.

DMSO, erlotinib, MDM2/MDMX-p53 and erlotinib combined with MDM2/MDMX-p53 are referred to as Control, Erl, MDM2/X and Com, respectively, in the figure.

2.5 厄洛替尼联合双靶点抑制剂抑制胰腺癌裸鼠移植瘤的生长

按照实验分组对成瘤裸鼠进行干预处理, 21 d 后各处理组荷瘤小鼠如图所示 (图 5A)。各组干预下裸鼠移植瘤的抑瘤率分别为 22.47%、28.41%、55.39%。厄洛替尼联合 MDM2/MDMX-p53 抑制蛋

白能显著抑制裸鼠移植瘤的生长, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 5B)。裸鼠移植瘤的生长曲线显示, 厄洛替尼联合 MDM2/MDMX-p53 抑制蛋白组干预后肿瘤体积缩小; 各干预组裸鼠体重无明显差异 (图 5C), 说明厄洛替尼联合 MDM2/MDMX 抑制蛋白可安全、显著地抑制裸鼠移植瘤的生长。

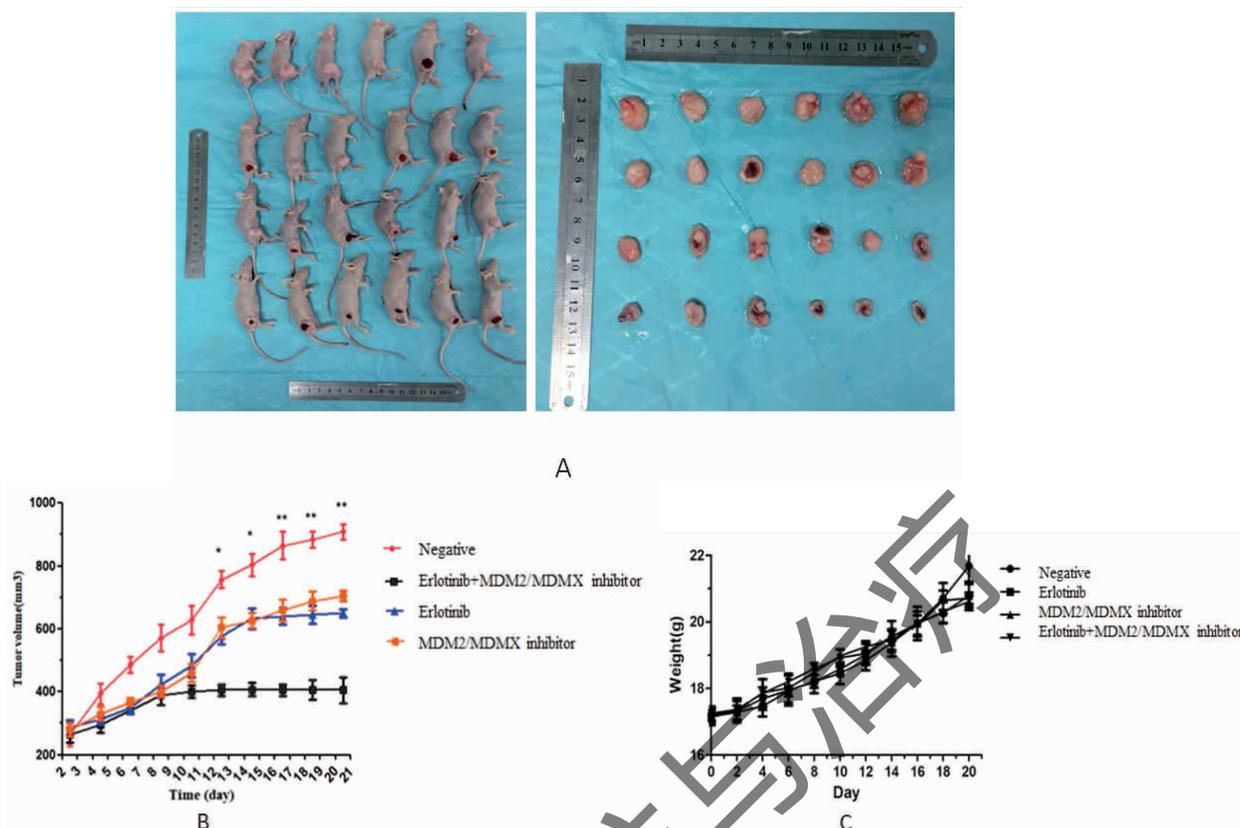


图 5 双靶点抑制蛋白联合厄洛替尼的体内抗肿瘤活性
Figure 5. In Vivo Anti-tumor Activity of Erlotinib Combined with MDM2/MDMX-p53 Inhibitor

A. Tumors growing in mice and tumors harvested from mice that treated with DMSO (the first row), erlotinib (the second row), MDM2/MDMX-p53 (the third row) and erlotinib combined with MDM2/MDMX-p53 (the fourth row); B. Tumor growth of mice treated with DMSO, erlotinib, MDM2/MDMX-p53 and erlotinib combined with MDM2/MDMX-p53, respectively; C. Weigh changes of mice treated with DMSO, erlotinib, MDM2/MDMX-p53 and erlotinib combined with MDM2/MDMX-p53.

DMSO, erlotinib, MDM2/MDMX-p53 and erlotinib combined with MDM2/MDMX-p53 are referred to as Negative, Erlotinib, MDM2/MDMX inhibitor, and Erlotinib + MDM2/MDMX inhibitor, respectively, in the figure.

3 讨论

恶性肿瘤的治疗已经逐渐从“细胞毒药物为主导的化疗”时代向“靶向药物精准治疗”时代转变。作为“癌症之王”的胰腺癌,其肿瘤细胞与其他恶性肿瘤有一些共同的增殖、侵袭和转移机制,也伴有抑癌基因 *p53*、*ATM* 的失活或原癌基因如 *CTNBI*、*MDM2* 的异常激活和过表达^[8-10],但又有其独特性和复杂性。多年来在胰腺癌内科治疗领域,尤其是靶向治疗领域,一直没有取得飞跃性的突破^[9-10]。2013 年一项 III 期临床试验证实,在 49% 的胰腺癌患者肿瘤组织中存在 EGFR 过表达^[10]。随后更多研究表明,EGFR 的过表达对胰腺癌的发生、发展十分重要,并且影响胰腺癌患者的预后^[9-11]。厄洛替尼可选择性地抑制细胞内的 EGFR,阻止其激活和下游信号转导。然而,胰腺癌患者对厄洛替尼的临

床反应较差,仅小部分患者可能受益,使得其应用备受争议。

MDM2/MDMX 是 *p53* 的负调控因子,能抑制 *p53* 的活性,使用 MDM2/MDMX 抑制剂能降低 MDM2/MDMX 的表达水平,减少 *p53* 的降解,恢复 *p53* 的转录活性。并且,MDM2 抑制剂能间接负调控 EGFR 蛋白水平,降低 EGFR 蛋白的表达水平^[5]。因此,MDM2/MDMX-p53 抑制蛋白联合厄洛替尼可能起到协同抗胰腺癌的作用。

我们前期设计和构建了靶向抑制 MDM2/MDMX-p53 的原核表达载体,可表达高纯度、具有透膜性的 MDM2/MDMX-p53 抑制蛋白^[11]。体外研究结果显示,厄洛替尼联合 MDM2/MDMX-p53 抑制蛋白有抗胰腺癌活性,能抑制 *p53* 野生型和 *p53* 突变型胰腺癌细胞的增殖、侵袭能力,并且能诱导胰腺癌细胞的凋亡,对比单用厄洛替尼、单用抑制剂、厄洛替

尼联合 MDM2-p53 抑制剂,厄洛替尼联合 MDM2/MDMX-p53 抑制蛋白的抑制作用更强。Western-blotting 方法检测 p53、MDM2、MDMX、EGFR 蛋白的表达情况时,p53 野生型和 p53 突变型胰腺癌细胞中蛋白表达情况不一样,反映了作用机制可能并不相同。p53 野生型胰腺癌细胞中 p53 蛋白表达水平上调,MDM2、MDMX、EGFR 蛋白表达水平下调,对比单用厄洛替尼组,联合使用双靶点抑制蛋白组 EGFR 表达水平降低更多。这可能是由于 MDM2/MDMX-p53 抑制蛋白有效结合了 MDM2、MDMX,降低其表达水平并且阻止其与 p53 结合,减少 p53 降解,而 p53 能负调控 DYRK1A,促进 EGFR 降解,从而间接降低了 EGFR 的表达水平。DYRK1A 在肿瘤中高度表达,与肿瘤的发生密切相关^[12],它是一种双特异性的酪氨酸磷酸化调节激酶,通过磷酸化 EGFR 信号调节因子而阻止 EGFR 的降解^[13];同时,EGFR 蛋白表达水平下调会通过 PI3K/AKT 通路促进 MDM2 蛋白降解,并抑制 MDM2 蛋白的泛素促进功能,最终导致 p53 恢复抑癌活性,表达水平上调。在非小细胞肺癌、肝细胞肝癌中,阻断 PI3K/AKT/MDM2 通路可抑制肿瘤发生、发展^[14-15]。结合既往报道,MDM2/MDMX-p53 抑制蛋白与厄洛替尼协同抗肿瘤的具体机制还需要进一步研究来证实。此外,p53 突变型胰腺癌细胞中,厄洛替尼联合 MDM2/MDMX-p53 抑制蛋白处理后,MDM2 和 MDMX 表达水平减低,细胞增殖抑制、侵袭能力降低,但 p53 和 EGFR 蛋白的表达水平无明显变化,提示可能 MDM2/MDMX 具有不依赖于 p53 的独立致癌作用,具体机制有待进一步研究揭示。

本研究进一步探讨了双靶点抑制蛋白联合厄洛替尼的体内抗肿瘤活性,结果显示,对比单用厄洛替尼、双靶点抑制蛋白,厄洛替尼联合双靶点抑制蛋白对胰腺癌裸鼠皮下移植瘤的抑制作用更强。说明联合治疗在体内也能发挥协同抗肿瘤活性,且毒副作用可控。然而,尽管体内外研究充分肯定了厄洛替尼联合 MDM2/MDMX-p53 抑制蛋白在胰腺癌中抗肿瘤活性以及安全性,但将其应用于临床还需要大量的临床前研究和临床试验来证实。

综上所述,基于本研究的体外、体内实验结果,我们有理由相信在未来的胰腺癌治疗中,这种协同抗癌治疗效果会表现出明显的优势。而如何筛选出优势人群、如何选择合适的患者都将是未来可能面临的问题。进一步深入并在机制方面研究厄洛替尼联合 MDM2/MDMX-p53 抑制蛋白的抗胰腺癌作用,

可为我们提供更多的实验依据。另外,胰腺癌的异质性较大,单一遗传背景的细胞系可能无法很好地代表胰腺癌本身的生物学活性,后续研究中通过构建 PDX 模型,有望更好地模拟胰腺癌的特点,并进一步探讨联合治疗的可行性和有效性。

作者声明:本文全部作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任;并承诺论文中涉及的原始图片、数据资料等已按照有关规定保存,可接受核查。

学术不端:本文在初审、返修及出版前均通过中国知网(CNKI)科技期刊学术不端文献检测系统的学术不端检测。

同行评议:经同行专家双盲外审,达到刊发要求。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

文章版权:本文出版前已与全体作者签署了论文授权书等协议。

[参考文献]

- [1] Siddiqui NS, Godara A, Byrne MM, *et al.* Capecitabine for the treatment of pancreatic cancer[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2019,20(2):1-11.
- [2] Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2016,22(44):9694.
- [3] Li Z, Wang M, Yao X, *et al.* Development of a novel EGFR-Targeting antibody-drug conjugate for pancreatic cancer therapy[J]. *Target Oncol*, 2019(2):1-13.
- [4] Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, *et al.* Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: A phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group[J]. *J Clin Oncol*, 2007,25(15):1960-1966.
- [5] Xu X, Liu Q, Zhang C, *et al.* Inhibition of DYRK1A-EGFR axis by p53-MDM2 cascade mediates the induction of cellular senescence[J]. *Cell Death Differ*, 2019,10(4):282.
- [6] Fountzilias C, Chhatrala R, Khushalani N, *et al.* A phase II trial of erlotinib monotherapy in advanced pancreatic cancer as a first- or second-line agent[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2017,80(3):497-505.
- [7] Cardin DB, Goff LW, Chan E, *et al.* Dual Src and EGFR inhibition in combination with gemcitabine in advanced pancreatic cancer: Phase I results[J]. *Invest New Drugs*, 2018,36(3):442-450.
- [8] Lemos A, Leao M, Soares J, *et al.* Medicinal chemistry strategies to disrupt the p53-MDM2/MDMX interaction[J]. *Med Res Rev*, 2016,36(5):789-844.
- [9] Boeck S, Jung A, Laubender RP, *et al.* EGFR pathway biomarkers in erlotinib-treated patients with advanced pancreatic cancer:

- Translational results from the randomised, crossover phase 3 trial AIO-PK0104 [J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(2): 469-476.
- [10] Ciliberto D, Staropoli N, Chiellino S, *et al.* Systematic review and meta-analysis on targeted therapy in advanced pancreatic cancer [J]. *Pancreatol*, 2016, 16(2): 249-258.
- [11] Fan Y, Li M, Ma K, *et al.* Dual-target MDM2/MDMX inhibitor increases the sensitization of doxorubicin and inhibits migration and invasion abilities of triple-negative breast cancer cells through activation of TAB1/TAK1/p38 MAPK pathway [J]. *Cancer Biol Ther*, 2018, 21(2): 1-16.
- [12] Johns TG, Luwor RB, Murone C, *et al.* Antitumor efficacy of cytotoxic drugs and the monoclonal antibody 806 is enhanced by the EGF receptor inhibitor AG1478 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(26): 15871-15876.
- [13] Learn CA, Hartzell TL, Wikstrand CJ, *et al.* Resistance to tyrosine kinase inhibition by mutant epidermal growth factor receptor variant III contributes to the neoplastic phenotype of glioblastoma multiforme. [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(9): 3216.
- [14] Wang Y, Sun H, Xiao Z, *et al.* XWL-1-48 exerts antitumor activity via targeting topoisomerase II and enhancing degradation of Mdm2 in human hepatocellular carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 9989.
- [15] Qiu X, Guan X, Liu W, *et al.* DAL-1 attenuates epithelial to mesenchymal transition and metastasis by suppressing HSPA5 expression in non-small cell lung cancer [J]. *Oncol Rep*, 2017, 9(26): 1-10.



· 读者 · 作者 · 编者 ·

《肿瘤预防与治疗》文章荐读:2020 年中国临床肿瘤学会《食管癌诊疗指南》解读

食管癌是常见的消化道肿瘤,其发病率在全球恶性肿瘤中排第 7 位,死亡率排第 6 位。中国是食管癌高发国家,每年新发病例约占全球的一半,其在男性的发病率和死亡率分别位于第 5 位和第 4 位。基于循证医学证据,结合我国食管癌特色,中国临床肿瘤学会(Chinese Society of Clinical Oncology, CSCO)2019 年在人民卫生出版社首次发表了《食管癌诊疗指南》(ISBN 978-7-117-28359-5)。伴随着食管癌临床研究的不断进展,该指南于 2020 年迎来了第二次更新。“2020 年中国临床肿瘤学会《食管癌诊疗指南》解读”一文对 2020 版《食管癌诊疗指南》进行了解读,以期对广大医务工作者在加深该指南理解和指导临床诊疗实践方面起到帮助作用。

阅读该文请登陆本刊网站 www.zlyfyzl.cn,或点击推荐文章链接 http://125.71.214.100:801/Jwk_zlyf/CN/abstract/abstract406.shtml 查看。

本刊编辑部