doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.08.009
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.08.009
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(8):1102–1106.

· 基础研究 ·

表皮生长因子受体抑制剂联合 5– 氟尿嘧啶对胆管癌细胞增殖与迁移、侵袭能力的影响

曾杰宏，彭思远，谢博文，刘铮凯，陈晨，李浩，蒋波

（湖南师范大学第一附属医院 / 湖南省人民医院 肝胆外科，湖南 长沙 410006）

摘　要

目的：探讨表皮生长因子受体（EGFR）抑制剂 AG1478 联合 5– 氟尿嘧啶（5-FU）对胆管癌细胞体外增殖、迁移和侵袭的影响。

方法：体外培养人胆管癌 QBC939 细胞，分别用 AG1478（10 μmol/L）、5-FU（100 mg/L）以及联合两药处理 24 h 后，分别采用 CCK-8 法、划痕试验、Matrigel 侵袭小室法检测细胞增殖、迁移及侵袭情况。

结果：AG1478 与 5-FU 单独作用后，QBC939 细胞增殖、迁移和侵袭能力均明显降低（均 $P<0.05$），而与任一单独用药比较，联合用药对细胞增殖、迁移和侵袭能力的抑制作用均明显增强（均 $P<0.05$）。

结论：EGFR 抑制剂与 5-FU 联合应用可能是抑制胆管癌细胞生长、迁移和侵袭有效方法。

关键词　胆管肿瘤；受体，表皮生长因子；氟尿嘧啶；抗肿瘤联合化疗方案

中图分类号：R735.8

Effects of epidermal growth factor receptor inhibitor plus 5-fluorouracil on proliferation, migration and invasiveness of cholangiocarcinoma cells

ZENG Jiehong, PENG Siyuan, XIE Bowen, LIU Zhengkai, CHEN Chen, LI Hao, JIANG Bo

(Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital, Hunan Normal University/Hunan Provincial Hospital, Changsha 410006, China)

Abstract

Objective: To investigate the effects of epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor AG1478 in combination with 5-fluorouracil (5-FU) on proliferation, migration and invasiveness of cholangiocarcinoma cells in vitro.

Methods: Human cholangiocarcinoma QBC939 cells were cultured in vitro and exposed to AG1478 (10 μmol/L) and 5-FU (100 mg/L) alone or in combination for 24 h. The cell proliferation, migration and invasiveness were measured by CCK-8 assay, wound-scratch assay and Matrigel invasion chamber assay, respectively.

Results: The abilities of proliferation, migration and invasion of QBC939 cells were significantly decreased after either lone AG1478 or 5-FU treatment (all $P<0.05$), and above effects were further enhanced by the combined treatment compared with either lone drug treatment (all $P<0.05$).

Conclusion: Combination use of EGFR inhibitor and 5-FU may be an effective method for inhibiting the growth,

基金项目：湖南省卫生厅医药卫生科研计划资助项目（B2012–088）；湖南省科学技术厅科技计划资助项目（2014FJ3033）。

收稿日期：2015–05–25；**修订日期：**2015–07–10。

作者简介：曾杰宏，湖南师范大学第一附属医院 / 湖南省人民医院硕士研究生，主要从事肝胆胰外科方面的研究。

通信作者：蒋波，Email: jiangbo@medmail.com.cn

© 版权归中国普通外科杂志所有

migration and invasiveness of cholangiocarcinoma cells.

Key words Bile Duct Neoplasms; Receptor, Epidermal Growth Factor; Fluorouracil; Antineoplastic Combined Chemotherapy Protocols

CLC number: R735.8

胆管癌是一类起源于肝内外胆管上皮细胞的恶性肿瘤[1]，其发病率及死亡数正逐年上升[2-3]。笔者前期研究[4]发现表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR）家族中ErbB4在人肝内胆管癌组织中阳性表达率明显高于癌旁组织和结石患者胆管组织。因此，调控EGFR信号通路对于治疗胆管癌具有潜在意义。本研究联合使用EGFR抑制剂AG1478与5–氟尿嘧啶（5-FU），观察两者对胆管癌QBC939细胞增殖、迁移及侵袭的影响，探讨AG1478与5-FU联合用药对胆管癌的作用，为临床治疗提供理论基础依据。

1　材料与方法

1.1 细胞株与主要材料

人胆管癌细胞株（QBC939）由湖南省人民医院临床医学研究所保存。AG1478购自德国Calbiochem公司，5-FU购自上海旭东海普公司。CCK-8购自南京唯赞公司，瑞氏吉姆萨染料购自北京solarbio公司。

1.2 细胞培养与药物处理分组

用含10%胎牛血清的低糖DMEM培养基在37 ℃、5%CO_2饱和湿度的培养箱中培养，待其融合度达到80%以上进行传代。取对数期细胞进行实验。药物处理分组如下：对照组，AG1478（10 μmol/L）组，5-FU（100 mg/L）组，AG1478（10 μmol/L）与5-FU（100 mg/L）联合用药组。

1.3 细胞增殖能力检测

CCK-8法用于测定药物对细胞增殖能力的影响。细胞悬液接种于96孔培养板（100 μL/孔），贴壁后加入药物，分别设置单独用药组以及联合用药组，每组设4个复孔，同时设定只含培养基组作为空白组，消除背景干扰。孵育24 h后，每孔加入10 μL CCK-8溶液，37 ℃孵育4 h后，测定A_{450}。细胞存活率（%）=[（A实验–A空白）/（A对照–A空白）]×100%。

1.4 体外细胞迁移试验

划痕试验用于检测药物对细胞迁移能力的影响。细胞接种于6孔板中，待生长至90%融合，无血清饥饿处理后用10 μL移液头在中央区域划痕造成无细胞划痕区。PBS冲洗3次后加入含不同药物的培养基，培养24 h，分别于0和24 h在同一伤口位置拍照，并计数划痕区域的细胞数，以未加药组迁移细胞数为对照计算相对迁移百分率。

1.5 体外细胞侵袭试验

Transwell小室结合Matrigel检测药物对细胞侵袭能力的影响。用培养基稀释Matrigel（2:1）均匀涂布Transwell小室上室，待干燥后加入200 μL无血清培养基重悬的细胞悬液（5×10^4个细胞），分别加入不同药物。下室加入500 μL含10%胎牛血清的培养基。在细胞培养箱中培养24 h，用棉签小心拭去上室未转移细胞，PBS洗涤后用4%多聚甲醛固定，并用瑞氏吉姆萨染液染色后计数。

1.6 统计学处理

采用SPSS 16.0统计软件，数据均采用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）示。组间差异采用单因素方差分析与LSD检验，$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1 AG1478 和 5-FU 对 QBC939 细胞增殖的影响

药物处理24 h后，各组具有明显变化，且检测效果佳，故选择24 h统计各组中药物对细胞增殖的影响。单独使用AG1478和5-FU对QBC939细胞增殖具有一定的抑制作用，当联合应用AG1478和5-FU时，有效抑制QBC939细胞增殖能力，AG1478组、5-FU组和联合用药组细胞存活率分别（86.22±5.14）%、（64.30±3.31）%和（51.71±2.41）%。统计学分析显示，各组细胞存活率差异有统计学意义（F=42.658，$P<0.05$）。多重比较结果显示各组细胞存活率为：AG1478组>5-FU组>联合用药组，组间差异均有统计学意义（均$P<0.05$）（图1）。

© 版权归中国普通外科杂志所有

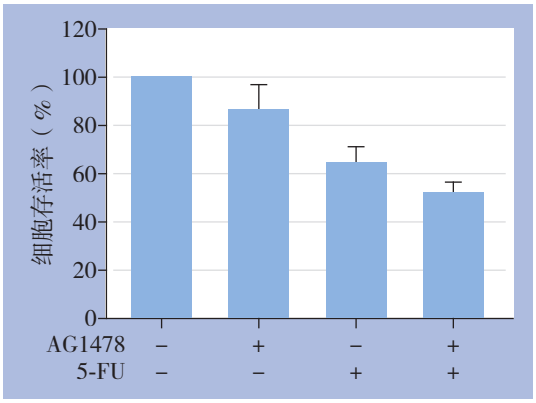

图 1　各组 QBC939 细胞存活率比较

Figure 1　Comparison of the cell viability among groups of QBC939 cells

2.2 AG1478 和 5-FU 对 QBC939 细胞迁移的影响

划痕实验中，制造划痕后24 h，对照组两侧细胞融合即细胞迁移率100%，故以24 h作为药物处理时间。单独使用AG1478和5-FU以及联合用药均能有效抑制QBC939细胞迁移能力；统计学分析显示，各组细胞迁移率差异有统计学意义（F=47.204，P<0.05）。多重比较结果显示各组细胞迁移率为：AG1478组>5-FU组>联合用药组，组间差异均有统计学意义（均P<0.05）（图2）。

2.3 AG1478 和 5-FU 对 QBC939 细胞侵袭的影响

Transwell小室侵袭实验中，对照组、AG1478组、5-FU组和联合用药组侵袭细胞数目分别为139 ± 7、55 ± 5、87 ± 7、29 ± 4。相比于对照组，单独以及联合用药组均能抑制QBC939细胞的侵袭能力，且联合用药组侵袭细胞数目明显低于单独用药组，各组间差异均有统计学意义（F=205.466，P<0.05）（图3）。多重比较结果显示各组侵袭细胞数为：对照组>5-FU组>AG1478组>联合用药组，组间差异均有统计学意义（均P<0.05）。

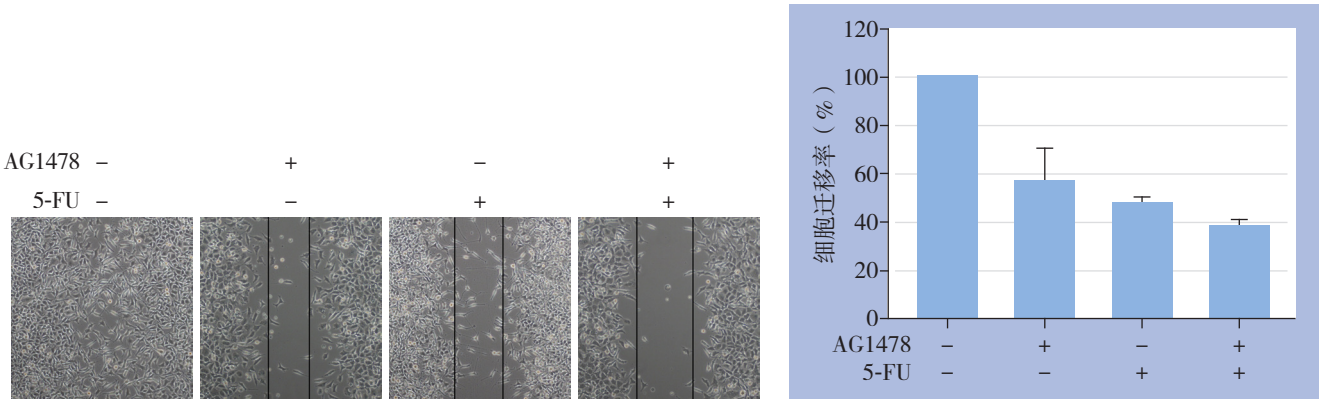

图 2　各组 QBC939 细胞迁移率的比较（×20）

Figure 2　Comparison of the cell migration rate among groups of QBC939 cells (×20)

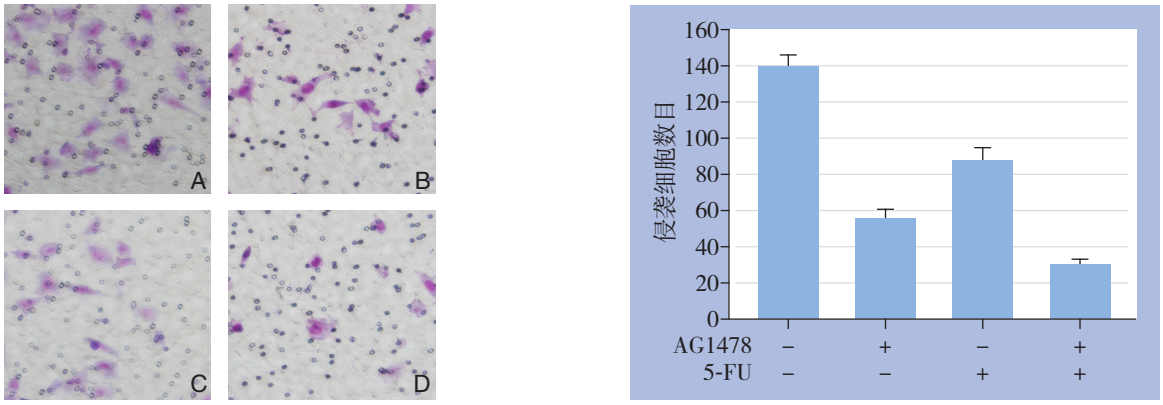

图 3　各组 QBC939 细胞侵袭能力比较（×40）　A：空白对照组；B：AG1478 组；C：5-FU 组；D：联合用药组

Figure 3　Comparison of invasion ability among groups of QBC939 cells (×40)　A: Blank control group; B: AG1478 group; C: 5-FU treatment group; D: Combination treatment group

© 版权归中国普通外科杂志所有

3 讨　论

近年来胆管癌根治切除技术进步巨大，围手术期病死率日益减少[5-6]，胆管癌行根治术的预后仍然较差，据国内外文献报导其5年生存率仅仅为15%~40%[7-8]。虽然胆管癌的诊断技术已取得进展，但是大部分诊断明确的胆管癌患者已失去手术机会。传统的化疗及放疗对胆管癌的治疗作用有限[9]。对于能行根治性切除的患者，部分医院已经采用手术切除并辅助抗肿瘤药物如氟尿嘧啶植入剂等药物，但是由于胆管癌的高耐药性[10]，效果亦不显著。

生物–化学治疗已成为恶性肿瘤综合治疗的新动向[11]。且在肿瘤治疗的临床实践中，联合用药具有改善药物抵抗、提高药物疗效、降低毒副作用等优点。EGFR过表达于多种肿瘤，如胰腺癌和胃癌[12]，且其过表达常与不良预后和复发有关，亦有研究[13]证实，EGFR过表达于肝内胆管结石合并肝内胆管癌组织，因此已有靶向EGFR通路中关键蛋白的分子靶向药物用于临床，如EGFR受体酪氨酸激酶特异性抑制剂吉非替尼[14]，有研究[15]表明吉非替尼能通过EGFR/Akt/β-catenin信号通路有效抑制鼻咽癌干细胞。因此，本研究探讨联合应用EGFR抑制剂AG1478与5-FU的作用，为临床联合用药提供实验依据。

研究结果显示，在胆管癌QBC939细胞中，EGFR抑制剂AG1478与5-FU均显著抑制细胞增殖，将10 μmol/L AG1478与100 mg/L 5-FU联合作用于细胞时，较单独用药组具有更强的抑制细胞增殖的作用。同时，考察了AG1478与5-FU联合用药对QBC939细胞迁移和侵袭能力的影响。结果证实联合用药时，QBC939细胞增殖、迁移和侵袭能力均较单独用药明显降低。这可能基于AG1478与5-FU作用靶位不同，5-FU是治疗消化道肿瘤的重要药物，但是作为细胞毒性药物，其副作用及耐药性阻碍其大剂量长时间应用[16]。AG1478可能通过阻断EGFR与配体结合，阻断PI3K/PKC/IKK途径，抑制NF-κB的活化，降低细胞侵袭迁移能力[17]。且EGFR分子靶向治疗的针对性较强，毒副作用相对较小[18]，因此在胆管癌的治疗中，EGFR抑制剂如吉非替尼、埃罗替尼和西妥昔单抗[19-20]等药物与5-FU联用具有一定前景，但两者联用的具体机制有待进一步探讨。

参考文献

[1] Patel T. Cholangiocarcinoma-controversies and challenges[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011, 8(4):189-200.

[2] 孟令勤, 刘金钢. 肝外胆道癌分子流行病学研究的新进展[J]. 现代肿瘤医学, 2012, 20(5):1055-1059.

[3] Patel T. Worldwide trends in morality from biliary tract malignancies[J]. BMC Cancer, 2002, 2:10.

[4] 谭永辉, 吕品, 聂盛丹, 等. 肝内胆管癌中ErbB4的表达及临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(2):180-184.

[5] Aljiffry M, Abdulelah A, Walsh M, et al. Evidence-based approach to cholangiocarcinoma: a systematic review of the current literature[J]. J Am Coll Surg, 2009, 208(1):134-147.

[6] Sharma R, Gibbs JF. Recent advances in the management of primary hepatic tumours refinement of surgical techniques and effect on outcome[J]. J Surg Oncol. 2010, 101(8):745-754.

[7] 毛志远, 郭晓川, 张婷婷, 等. 影响胆管癌预后的因素研究[J]. 华西医学, 2014, 29(11):2046-2049.

[8] Mavros MN, Economopoulos KP, Alexiou VG, et al. Treatment and prognosis for patients with intrahepatic cholangiocarcinoma: systematic review and meta-analysis[J]. JAMA Surg, 2014, doi: 10.1001/jamasurg.2013.5137.

[9] Sirica AE. Cholangiocarcinoma: molecular targeting strategies for chemoprevention and therapy[J]. Hepatology, 2005, 41(1):5-15.

[10] Maroni L, Pierantonelli I, Banales JM,等. 遗传学在胆管细胞癌发展中的重要性[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(2):151-162.

[11] Blechacz B, Gores GJ. Cholangiocarcinoma: advances in pathogenesis, diagnosis, and treatment[J]. Hepatology, 2008, 48(1):308-321.

[12] Arnold D, Peinert S, Voigt W, et al. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: present and future role in gastrointestinal cancer treatment: a review[J]. Oncologist, 2006, 11(6):602-611.

[13] 黄奋, 周泉波, 李海刚,等. 肝内胆管结石合并肝内胆管癌组织中EGFR的表达及其意义[J]. 中国普通外科杂志, 2011, 20(2):200-203.

[14] Lee J, Park SH, Chang HM, et al. Gemcitabine and oxaliplatin with or without erlotinib in advanced biliary-tract cancer: a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study[J]. Lancet Oncol, 2012, 13(2):181-188.

[15] 马磊. 吉非替尼通过EGFR/AKT/β-catenin途径抑制鼻咽癌肿瘤干细胞[D]. 广州:南方医科大学, 2009:96-97.

[16] 李永盛, 江翰, 王子豪, 等. 叶酸靶向修饰纳米粒加载5-氟尿嘧啶治疗胆管癌的实验研究[J]. 中国普通外科杂志, 2013, 22(8):976-981.

© 版权归中国普通外科杂志所有

[17] 黄奋, 陈汝福, 周泉波, 等. 肝内胆管结石合并肝内胆管癌组织中NF-κB的表达及其意义[J]. 中国普通外科杂志, 2010, 19(8):925-928.

[18] 邢荣春, 郑军. EGFR分子靶向治疗肝胆肿瘤的研究进展[J]. 中国普通外科杂志, 2013, 22(8):1069-1073.

[19] Ariyama H, Qin B, Baba E, et al. Gefitinib, a selective EGFR tyrosine kinase inhibitor, induces apoptosis through activation of Bax in human gallbladder adenocarcinoma cells[J]. J Cell Biochem, 2006, 97(4):724-734.

[20] Zhang ZC, Sirica AE. Simultaneous inhibition of ErbB1 and ErbB2 signaling significantly enhances the growth suppression of rat and human cholangiocarcinoma cell lines[J]. FASEB J, 2007, 21(Meeting Abstract Supplement):A71.

（本文编辑　宋涛）

本文引用格式：曾杰宏, 彭思远, 谢博文, 等. 表皮生长因子受体抑制剂联合5-氟尿嘧啶对胆管癌细胞增殖与迁移、侵袭能力的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(8):1102–1106. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.08.009

Cite this article as: ZENG JH, PENG SY, XIE BW, et al. Effects of epidermal growth factor receptor inhibitor plus 5-fluorouracil on proliferation, migration and invasiveness of cholangiocarcinoma cells[J]. Chin J Gen Surg, 2015, 24(8):1102–1106. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.08.009

本刊常用词汇英文缩写表

C —反应蛋白	CRP	甲型肝炎病毒	HAV	心电图	ECG
Toll 样受体	TLRs	碱性成纤维细胞转化生长因子	bFGF	心脏监护病房	CCU
氨基末端激酶	JNK	聚合酶链反应	PCR	血管紧张素 II	AngII
白细胞	WBC	抗生物素蛋白 – 生物素酶复合物法	ABC 法	血管内皮生长因子	VEGF
白细胞介素	IL	辣根过氧化物酶	HRP	血管性血友病因子	vWF
半数抑制浓度	IC_{50}	链霉抗生物素蛋白 – 生物素酶复合物法	SABC 法	血红蛋白	Hb
变异系数	CV	磷酸盐缓冲液	PBS	血肌酐	SCr
标记的链霉抗生物素蛋白 – 生物素法	SP 法	绿色荧光蛋白	GFP	血尿素氮	BUN
表皮生长因子	EGF	酶联免疫吸附测定	ELISA	血小板	PLT
丙氨酸转氨酶	ALT	美国食品药品管理局	FDA	血压	BP
丙二醛	MDA	脑电图	EEG	血氧饱和度	SO_2
丙型肝炎病毒	HCV	内毒素 / 脂多糖	LPS	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	NADPH
超氧化物歧化酶	SOD	内皮型一氧化氮合酶	eNOS	严重急性呼吸综合征	SARS
磁共振成像	MRI	内生肌酐清除率	CCr	一氧化氮	NO
极低密度脂蛋白胆固醇	VLDL-C	尿素氮	BUN	一氧化氮合酶	NOS
低密度脂蛋白胆固醇	LDL-C	凝血酶时间	TT	乙二胺四乙酸	EDTA
动脉血二氧化碳分压	$PaCO_2$	凝血酶原时间	PT	乙酰胆碱	ACh
动脉血氧分压	PaO_2	牛血清白蛋白	BSA	乙型肝炎病毒	HBV
二甲基亚砜	DMSO	热休克蛋白	HSP	乙型肝炎病毒 e 抗体	HBeAb
反转录 – 聚合酶链反应	RT-PCR	人类免疫缺陷病毒	HIV	乙型肝炎病毒 e 抗原	HBeAg
辅助性 T 细胞	Th	人绒毛膜促性腺激素	HCG	乙型肝炎病毒表面抗体	HBsAb
肝细胞生长因子	HGF	三磷酸腺苷	ATP	乙型肝炎病毒表面抗原	HBsAg
干扰素	IFN	三酰甘油	TG	乙型肝炎病毒核心抗体	HBcAb
高密度脂蛋白胆固醇	HDL-C	生理氯化钠溶液	NS	乙型肝炎病毒核心抗原	HBcAg
谷胱甘肽	GSH	世界卫生组织	WHO	异硫氰酸荧光素	FLTC
固相 pH 梯度	IPG	双蒸水	ddH_2O	诱导型一氧化氮合酶	iNOS
核糖核酸	RNA	丝裂原活化蛋白激酶	MAPK	原位末端标记法	TUNEL
核因子 – κ B	NF- κ B	四甲基偶氮唑盐微量酶反应	MTT	杂合性缺失	LOH
红细胞	RBC	苏木精 – 伊红染色	HE	增强化学发光法	ECL
红细胞沉降率	ESR	胎牛血清	FBS	肿瘤坏死因子	TNF
环氧化酶 –2	COX-2	体质量指数	BMI	重症监护病房	ICU
活化部分凝血活酶时间	APTT	天冬氨酸氨基转移酶	AST	转化生长因子	TGF
活性氧	ROS	脱氧核糖核酸	DNA	自然杀伤细胞	NK 细胞
获得性免疫缺陷综合征	AIDS	细胞间黏附分子	ICAM	直接胆红素	DBIL
肌酐	Cr	细胞外基质	ECM	总胆固醇	TC
基质金属蛋白酶	MMP	细胞外调节蛋白激酶	ERK	总胆红素	TBIL
计算机 X 线断层照相技术	CT	纤连蛋白	FN		

© 版权归中国普通外科杂志所有