

本文引用:周淑敏,宋艳芳,千新来,等.以埃罗替尼为靶向基团的荧光探针在肺癌检测中的应用[J].新乡医学院学报,2018,35(1):22-25. DOI:10.7683/xyxyxb.2018.01.005.

【基础研究】

以埃罗替尼为靶向基团的荧光探针在肺癌检测中的应用

周淑敏¹, 宋艳芳¹, 千新来², 魏家彬¹

(1.周口市中心医院病理科,河南 周口 460000;2.新乡医学院基础医学院病理学教研室,河南 新乡 453003)

摘要: **目的** 探讨以埃罗替尼为靶向基团的荧光探针在肺癌检测中的应用。**方法** 制备以埃罗替尼为靶向基团的荧光探针。以肺癌 A-549 细胞作为实验组,宫颈癌 CaSki、SiHa 和 C33-A 细胞作为对照组,分别应用 0.1×10^{-6} 、 1×10^{-6} 、 $10 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的荧光探针对于肺癌 A-549 细胞及宫颈癌 CaSki、SiHa 和 C33-A 细胞进行识别,荧光显微镜下观察以埃罗替尼为靶向基团的荧光探针对于 2 组细胞的识别能力。**结果** 探针浓度为 $10 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,A-549 细胞和 CaSki 细胞中均观察到强荧光信号,C33A 和 SiHa 细胞中几乎观察不到荧光信号;探针浓度为 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,A-549 细胞中可观察到强的荧光信号,C33A 中可观察到较弱的荧光信号,CaSki 和 SiHa 细胞中几乎观察不到荧光信号;探针浓度为 $0.1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,A-549 细胞中可观察到强的荧光信号,CaSki、C33A 和 SiHa 细胞中几乎观察不到荧光信号。**结论** 以埃罗替尼为靶向基团的荧光探针可特异性识别肺癌 A-549 细胞。

关键词: 埃罗替尼;肺癌;荧光探针;细胞成像**中图分类号:** R730 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2018)01-0022-04

Application of erlotinib based targeting fluorescent probe in the detection of lung cancer

ZHOU Shu-min¹, SONG Yan-fang¹, QIAN Xin-lai², WEI Jia-bin¹

(1. Department of Pathology, Zhoukou Central Hospital, Zhoukou 466000, Henan Province, China; 2. Department of Pathology, College of Basic Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To explore the application of erlotinib based targeting fluorescent probe in the detection of lung cancer. **Methods** The erlotinib based targeting fluorescent probe was prepared. The lung cancer cells of A-549 were selected as experimental group, and cervical cancer cells of CaSki, SiHa and C33-A were selected as control group. The A-549, CaSki, SiHa and C33-A cells were identified by 0.1×10^{-6} , 1×10^{-6} , $10 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ fluorescent probe; the identification ability of erlotinib based targeting fluorescent probe on cells in the two groups was observed under the inverted fluorescence microscope. **Results** When the concentration of fluorescent probe was $10 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, the strong fluorescence signal was observed in A-549 and CaSki cells, but the fluorescence signal was not observed almost in SiHa and C33-A cells. When the concentration of fluorescent probe was $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, the strong fluorescence signal was observed in A-549 cells; the weak fluorescence signal was observed in C33A cells; the fluorescence signal was not observed almost in SiHa and C33-A cells. When the concentration of fluorescent probe was $0.1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, the strong fluorescence signal was observed in A-549 cells; the fluorescence signal was not observed almost in CaSki, SiHa and C33-A cells. **Conclusion** Erlotinib based targeting fluorescent probe can specifically recognize lung cancer A-549 cells.

Key words: erlotinib; lung cancer; fluorescent probe; cellular imaging

肺癌是严重危害人类健康的常见恶性肿瘤,其发病率和病死率呈明显上升趋势^[1]。目前,肺癌的早期诊断主要依靠影像学 and 病理学检查等,前者假阳性和假阴性率较高,且检查费用昂贵,而后者具有创伤性^[2]。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是受体酪氨酸激酶家族中的重要成员之一,与配体表皮生长因子(epidermal

growth factor, EGF)结合并发生二聚化后,胞内酪氨酸激酶结构域被激活,通过酪氨酸残基磷酸化等方式激活下游的信号通路,参与细胞的分化、生存、迁移、侵袭、黏附和损伤修复等过程^[3-4]。埃罗替尼是小分子酪氨酸激酶抑制剂,属于 4-氨基喹唑啉类口服型抗肿瘤药物,主要用于治疗非小细胞肺癌等^[5]。埃罗替尼与 EGFR 的酪氨酸激酶结合具有高度特异性和可逆性的特点。本研究拟以埃罗替尼为靶向基团,制备 EGFR 胞内区的荧光探针,用于检测 EGFR 高表达的肺癌等恶性肿瘤。

DOI:10.7683/xyxyxb.2018.01.005

收稿日期:2016-06-12

作者简介:周淑敏(1979-),女,河南郸城人,硕士,主治医师,研究方向:病理诊断。

1 材料与方法

1.1 细胞及分组 肺癌 A-549 细胞和宫颈癌 CaSki、SiHa、C33-A 细胞购于中国医学科学院细胞库,其中将肺癌 A-549 细胞作为实验组,宫颈癌 CaSki、SiHa 和 C33-A 细胞作为对照组。

1.2 主要试剂 盐酸埃罗替尼购自济南健丰化工有限公司,二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)购自国药集团化学试剂有限公司,胎牛血清购自杭州四季青有限公司,F12K 培养基购自美国 GIBIO 公司,链霉素购自山东齐鲁制药有限公司,青霉素购自华北制药股份有限公司。

1.3 以埃罗替尼为靶向基团的荧光探针的制备 将 0.051 5 g (0.15 mmol) 香豆素叠氮化合物(相对分子质量为 343.38)、0.059 0 g (0.15 mmol) 埃罗替尼(相对分子质量为 393.44)和 0.005 7 g (0.03 mmol) 碘化亚铜(相对分子质量为 190.45)加入到 10 mL 水-四氢呋喃溶液(四氢呋喃:水=1:1)中,氮气保护下,45 ℃ 下搅拌反应 24 h。减压蒸馏除去四氢呋喃,析出固体,过滤,过柱提纯。将二氯甲烷-甲醇(二氯甲烷:甲醇=30:1)作为展开剂。产物的相对分子质量为 736.82。

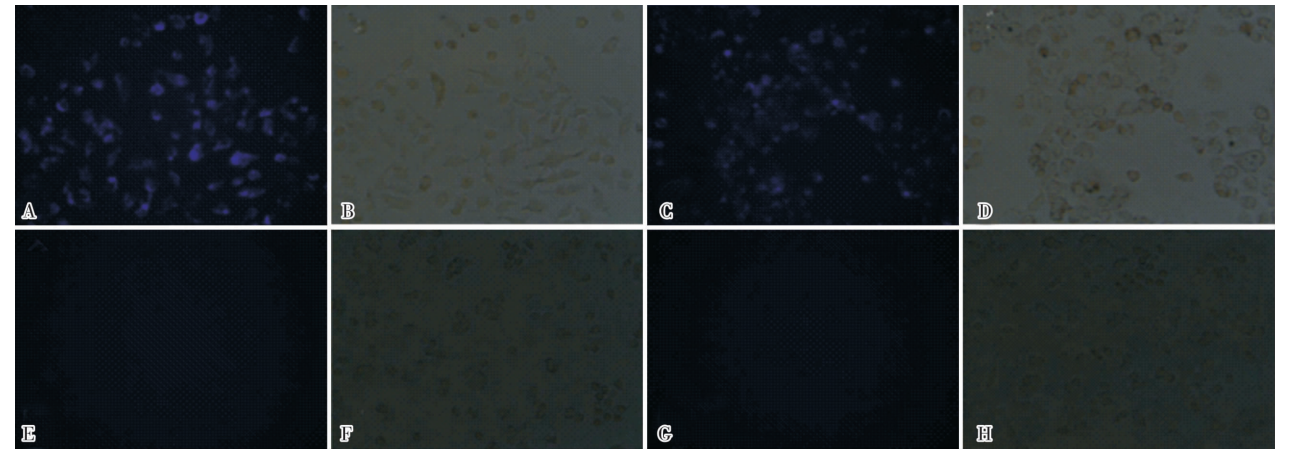
1.4 细胞培养及处理方法 肺癌 A-549 细胞和宫

颈癌 CaSki、SiHa 和 C33-A 细胞用含有体积分数 10% 胎牛血清、10 万 U · L⁻¹ 青霉素和 100 g · L⁻¹ 链霉素的 F12K 培养基或达尔伯克改良伊格爾培养基,于 37 ℃、含体积分数 5% CO₂ 的孵箱中培养细胞。取对数生长期细胞,常规消化后,将细胞加入含完全培养基的 12 孔板,于 37 ℃,体积分数 5% CO₂ 孵箱中常规培养 12 h。

1.5 细胞荧光成像 (1) 探针母液的配制:将 0.007 4 g 探针分子(0.01 mmol,相对分子质量为 736.82)溶解于 10 mL DMSO,配制成 1 × 10⁻³ mol · L⁻¹ 的溶液。(2) 细胞荧光成像:取培养的细胞,于培养基中加入小于培养液体积 1% 的探针母液(加入量),探针终浓度为 0.1 × 10⁻⁶、1 × 10⁻⁶、10 × 10⁻⁶ mol · L⁻¹,分别应用此 3 个不同浓度的荧光探针对肺癌 A-549 细胞和 CaSki、C33A、SiHa 细胞进行荧光识别,于倒置荧光显微镜下观察荧光并照相。

2 结果

2.1 2 组细胞在 10 × 10⁻⁶ mol · L⁻¹ 探针作用后细胞内荧光信号强弱分布的比较 结果见图 1。A-549 细胞和 CaSki 细胞中均观察到强荧光信号,而 C33A 和 SiHa 细胞中几乎观察不到荧光信号。



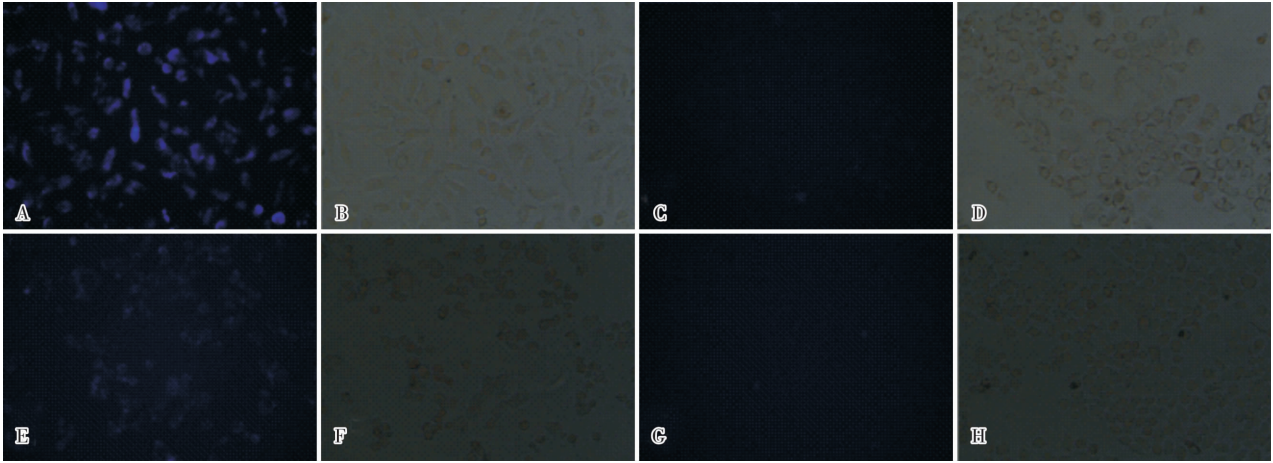
A:肺癌 A-549 细胞;B:肺癌 A-549 细胞对应的明场;C:宫颈癌 CaSki 细胞;D:宫颈癌 CaSki 细胞对应的明场;E:C33A 细胞;F:C33A 细胞对应的明场;G:SiHa 细胞;H:SiHa 细胞对应的明场。

图 1 2 组细胞在 10 × 10⁻⁶ mol · L⁻¹ 探针作用后细胞内荧光信号强弱分布的比较

Fig.1 Comparison of intracellular fluorescent signal intensity between the two groups after action of 10 × 10⁻⁶ mol · L⁻¹ probe

2.2 2 组细胞在 1 × 10⁻⁶ mol · L⁻¹ 探针作用后细胞内荧光信号强弱分布比较 结果见图 2。A-549 细胞中可观察到强的荧光信号,C33A 中可观察到

较弱的荧光信号,而 CaSki 和 SiHa 细胞中几乎观察不到荧光信号。

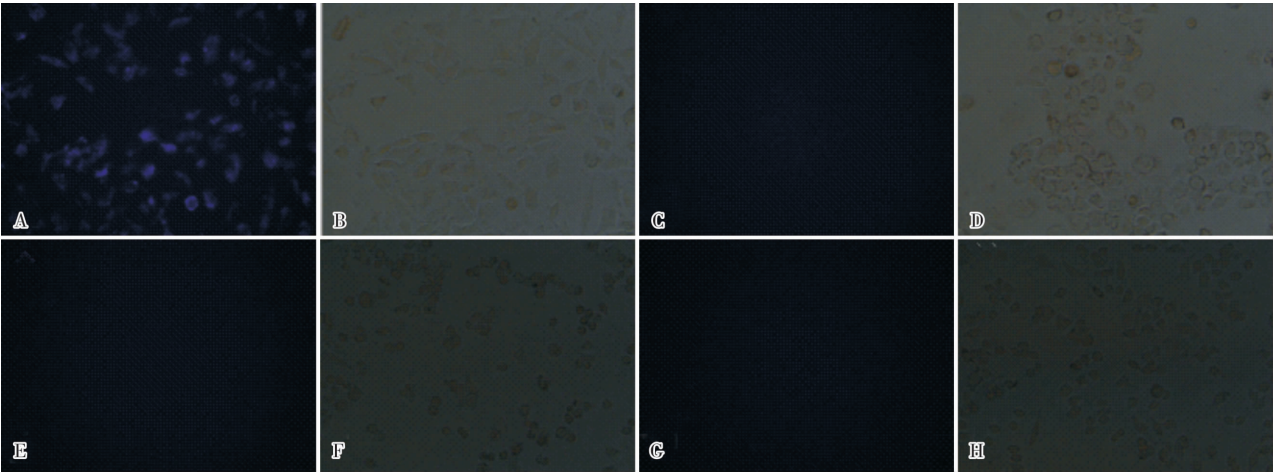


A:肺癌 A-549 细胞;B:肺癌 A-549 细胞对应的明场;C:宫颈癌 CaSki 细胞;D:宫颈癌 CaSki 细胞对应的明场;E:C33A 细胞;F:C33A 细胞对应的明场;G:SiHa 细胞;H:SiHa 细胞对应的明场。

图 2 2 组细胞在 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 探针作用后细胞内荧光信号强弱分布的比较

Fig.2 Comparison of intracellular fluorescent signal intensity between the two groups after action of $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ probe

2.3 2 组细胞在 $0.1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 探针作用后细胞内荧光信号强弱分布比较 结果见图 3。A-549 细胞中可观察到强的荧光信号,而 CaSki、C33A 和 SiHa 细胞中几乎不能观察到荧光信号。



A:肺癌 A-549 细胞;B:肺癌 A-549 细胞对应的明场;B:宫颈癌 CaSki 细胞;D:宫颈癌 CaSki 细胞对应的明场;E:C33A 细胞;F:C33A 细胞对应的明场;G:SiHa 细胞;H:SiHa 细胞对应的明场。

图 3 2 组细胞在 $0.1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 探针作用后细胞内荧光信号强弱分布的比较

Fig.3 Comparison of intracellular fluorescent signal intensity between the two groups after action of $0.1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ probe

3 讨论

EGFR 作为抗肿瘤药物的靶点,是由原癌基因 CerbB 编码的具有酪氨酸激酶活性的跨膜受体,抑制 EGFR 的表达和(或)活性,阻断相关信号转导通路,可抑制肿瘤细胞增殖和新生血管的形成,但对正常细胞影响较小^[6-7]。

临床上以 EGFR 为靶点的治疗策略主要包括 2 种:(1)针对 EGFR 表面的配体结合位点的特异性

单克隆抗体,通过作用于 EGFR 的胞膜外配体结合区,从而竞争性抑制 EGFR 与其配体 EGF 的结合,阻断受体活化和相应的信号转导通路,抑制肿瘤细胞的生长;(2)小分子酪氨酸激酶抑制剂,以埃罗替尼为代表的 4-氨基喹唑啉类化合物临床应用效果较好,其主要是通过抑制 EGFR 胞内区酪氨酸激酶活性而发挥作用,即小分子酪氨酸激酶抑制剂可直接作用于酪氨酸激酶结构域的三磷酸腺苷结合位点,干扰酪氨酸激酶与三磷酸腺苷的结合,从而抑制酪氨

酸激酶的活性,抑制酪氨酸的自磷酸化,由此阻断 EGFR 的信号转导通路,从而抑制肿瘤细胞的增殖以及新生血管的生成^[8]。

埃罗替尼是小分子酪氨酸激酶抑制剂,其与 EGFR 的酪氨酸激酶结合具有高度特异性和可逆性的特点^[9-12]。埃罗替尼口服吸收较慢但效果较好,口服给药 150 mg 后达到峰值的平均时间为 3 h,最高血药浓度约为 $(1.136 \pm 0.865) \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,生物利用度约为 80%,血浆蛋白结合率约为 90% ~ 95%^[13]。

肺癌的早期诊断日益受到重视,EGFR 在多种恶性肿瘤细胞中呈高表达状态,如肺癌、胃癌、头颈部肿瘤等,EGFR 突变状况可为临床提供及时、准确的靶向治疗,而盐酸埃罗替尼作为胞内区的肿瘤靶向药物,可特异性的与 EGFR 结合。本研究以埃罗替尼为靶向基团,制备 EGFR 胞内区的荧光探针,用于检测 EGFR 高表达的肺癌等恶性肿瘤。

本研究分别用 10×10^{-6} 、 1×10^{-6} 、 $0.1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的以埃罗替尼为靶向基团的荧光探针对肺癌 A-549 细胞和宫颈癌 CaSki、SiHa、C33-A 细胞进行荧光识别,当探针浓度为 $10 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,A-549 细胞和 CaSki 细胞中均观察到强的荧光信号;当探针浓度为 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,A-549 细胞中仍可观察到强的荧光信号,C33A 中可观察到较弱的荧光信号,而 CaSki 和 SiHa 细胞中几乎观察不到荧光信号。为了避免实验出现的弱荧光产生假阳性判断,本研究用更低浓度 $0.1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的探针来与细胞共孵育,观测 C33A 细胞是否能被探针分子识别。结果发现,A-549 细胞中仍可观察到强的荧光信号,而 CaSki、C33A 和 SiHa 细胞中几乎观察不到荧光信号。

综上所述,以埃罗替尼为靶向基团的荧光探针可用于检测 A-549 细胞,但是本研究只是初步的结果,该结果是否能够用于临床尚需进一步研究来证实。

参考文献:

[1] 孙江涛,原翔,宋开放,等. 肺癌组织中切除修复交叉互补基因 1 和核糖核苷酸还原酶亚单位 1 表达水平与非小细胞肺癌患者的疗效和生存期的关系[J]. 新乡医学院学报,2017,34(4): 270-274.

[2] FERLAY J,SHIN H R,BRAY F,et al. Estimates of worldwide burden of e&neerin 2008;GLOBOCAN 2008[J]. *Int J Cancer*,2010, 127(12):2893-2917.

[3] 陈莲,石晶明. 表皮生长因子受体抑制剂抑制大胶质细胞活化对急性高血压大鼠视网膜神经节细胞丢失的影响[J]. 眼科新进展,2014,34(8):729-732.

[4] 陈晓华,秦兆冰. 膜联蛋白和表皮生长因子受体在儿童中耳胆脂瘤组织中的表达[J]. 中华实用儿科临床杂志,2017,32(14):1104-1107.

[5] MENDOZA L. Targeted therapies in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer:update[J]. *Klin Onkol*,2009,22(4):131-138.

[6] KRASINSKAS A M. EGFR signaling in colorectal carcinoma[J]. *Patholog Res Int*,2011,2011:932932.

[7] 周建娅,莫伟芳,赵菁,等. 非小细胞肺癌患者 EGFR 基因突变的临床病理特征[J]. 中华医学杂志,2014,94(30):2332-2336.

[8] BUCHANAN F G,HOLLA V,KATKURI S,et al. Targeting cyclooxygenase-2 and the epidermal growth factor receptor for the prevention and treatment of intestinal cancer[J]. *Cancer Res*, 2007,67(19):9380-9388.

[9] 徐浩,栗思存,黄文龙,等. 埃罗替尼衍生物的合成及抗肿瘤活性[J]. 中国医科大学学报,2008,39(6):487-490.

[10] 刘小玲,李慧林. 分子靶向抗癌药物埃洛替尼的研究进展[J]. 杭州师范学院学报(医学版),2006,26(5):336-340.

[11] CHANDREGOWDA V,RAO G V,REDDY G G. One-pot conversion of 2-nitrobenzonitriles to quinazolin-4(3H)-ones and synthesis of gefitinib and erlotinib hydrochloride[J]. *Heterocycles*,2007, 71(1):39-48.

[12] 罗阿丽,李娟,杨启晨,等. 埃罗替尼对小鼠角膜上皮组织病理学及超微结构的影响[J]. 眼科新进展,2017,37(5):401-405.

[13] HIDALGO M,SIU L L,NEMUNAITIS J,et al. Phase I and pharmacologic study of OSI-774, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced solid malignancies[J]. *J Clin Oncol*,2001,19(13):3267-3279.

(本文编辑:孟 月 英文编辑:孟 月)