

BRAF 抑制剂 PLX4032 和放疗联合治疗 高级神经胶质瘤

张春满 郑云峰 米娟

【摘要】 目的 探讨 BRAF 抑制剂 PLX4032 联合放疗对高级别神经胶质瘤的疗效。**方法** 选择两株细胞分别为 AM-38(BRAF V600E)和 GBM8(BRAF wildtype),用 Cell Titre Glo 方法检测细胞的 IC_{50} ;用克隆形成实验检测 PLX4032 对不同放射剂量的增敏作用;用流式细胞仪检测 PLX4032 和放疗对细胞凋亡和周期的作用。**结果** PLX4032 显著抑制 BRAF V600E 细胞的增殖($IC_{50} = 2 \mu M$)而对野生型细胞没有作用;克隆形成实验发现在 BRAF V600E 细胞上随着剂量增加,联合治疗组比单独放疗组的抑制作用更显著($P < 0.05$),而野生型细胞株上联合组和单独放疗组没有显著性差异($P > 0.05$);流式细胞分析发现在 BRAF V600E 突变细胞上,联合治疗组细胞凋亡数显著增加,与对照组和单独治疗组相比有显著差异($P < 0.05$),而在野生型细胞株上没有显著性差异;流式分析发现在 BRAF V600E 突变细胞上,与对照组相比,单独放疗组和联合治疗组在 G0/G1 期细胞数都减少,G2/M 期细胞数增加,而且联合治疗组与单独放疗组相比有显著差异。**结论** BRAF 抑制剂 PLX4032 与放疗联合治疗 BRAF V600E 突变的高级别神经胶质瘤的疗效较好。

【关键词】 BRAF 抑制剂 放疗 神经胶质瘤

【中图分类号】 R739.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2016)02-0098-04

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2016.02.007

The effect of combining BRAF inhibitor PLX4032 and radiation in advanced glioma Zhang Chunman, Zheng Yunfeng, Mi Juan, Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Yanan University, Yanan 716000

【Abstract】 Objective To investigate the role of BRAF inhibitor PLX4032 in combination with radiotherapy on advanced glioma. **Methods** BRAF V600E-mutated cancer cell line(AM-38)and BRAFV600E wild-type cancer cell line(GBM8)were obtained. We performed cell viability assay to detect the IC_{50} of the inhibitor PLX4032 by the Cell Titre Glo assay and clonogenic assays using combinations of radiation and PLX4032. Cell apoptosis and cell cycle were evaluated by flow cytometry. **Results** PLX4032 significantly inhibited the proliferation of BRAF V600E cells ($IC_{50} = 2 \mu M$) and had no effect on wild-type cells. By clonogenic assay, combination group had more significant inhibitory effect than radiotherapy alone group for BRAF V600E cells with increasing dose ($P < 0.05$), while there was no significant difference ($P > 0.05$) on the wild-type cell lines between radiotherapy alone group and the combination group. For apoptosis, flow cytometry analysis showed that cell apoptosis proportion of combination group were significantly different compared to the control group and alone group in the BRAF V600E cells ($P < 0.05$), whereas there's no significant differences in the wild-type cell lines. For the cell cycle, flow analysis found that alone and combined groups have reduced the number of G0/G1 phase of the cell and caused the cell G2/M phase arrest compared to the control group in the BRAF V600E mutated cell. There were significant difference between the combination group and alone groups. **Conclusion** These studies provide the pre-clinical rationale for clinical trials of concurrent radiotherapy and BRAF V600E inhibitors.

【Key words】 BRAF inhibitor Radiation therapy Glioma

高级神经胶质瘤(high-grade glioma, HGG)目

前主要通过手术切除,然后辅以放疗以及化疗进行治疗,这些方式在其治疗上取得一定进展,延长了患者的生存期,总的中位生存期不超过 15 个月^[1]。尽管随着对肿瘤基因的不断深入研究,已经为肿瘤的

个体化治疗开拓了新的道路,但由于肿瘤是基因异质性的,当单独用靶向药物进行治疗时会形成耐药,因此迫切寻找新方法来改善治疗效果,特别是对于难治性神经系统恶性肿瘤^[2]。

RAF 在脑肿瘤的形成和治疗过程中都有重要作用^[3]。基因学研究表明 BRAF V600E 在人类肿瘤发生进展中作为癌基因发挥作用,这些脑肿瘤患者包括少量的成人脑肿瘤和 6%~25% 的儿科脑瘤^[4]。体外研究表明 RAF 的持续激活也能促进胶质瘤的形成。有一项研究报道发现 BRAF V600E 突变的儿科胶质瘤比野生型儿科胶质瘤患者在治疗以及预后方面表现更差^[5]。大量文献表明 RAF 的持续激活或者过表达在放疗的响应过程中也具有重要作用^[6]。

BRAF V600E 抑制剂可通过抑制 MAPK 磷酸化从而导致细胞周期阻滞以及增加细胞凋亡^[7]。FDA 批准威罗替尼 (PLX4032) 用于靶向 BRAF V600E 突变的黑色素肿瘤治疗^[8],而且临床前数据表明 PLX4032 和放疗联合可用于治疗不同肿瘤^[9]。因此,本研究通过 PLX4032 和放疗联合治疗 BRAF V600E 突变的脑神经胶质瘤,以期为该靶向药物与放疗联合治疗脑肿瘤能够进入临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及突变检测

BRAF 突变和野生型细胞株为 AM-38 和 GBM8,购自中科院上海细胞库,用含 10% FBS 胎牛血清 (FBS, hyclone) 的 DMEM 培养基,放置于 37℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中进行培养。细胞进行 BRAF 基因序列的检测,确认 AM-38 存在 BRAF V600E 突变,GBM8 为野生型。

1.2 细胞增殖实验

用 Cell Titre Glo 试剂盒 (购自 Promega 公司) 进行检测,细胞接种到 96 孔板中,每孔 100 uL 培养基,2000~3000 个细胞数,加入不同浓度药物进行处理 72 h 后每孔加入 25 uL Cell Titre Glo 检测试剂,酶标仪读板对活细胞数进行检测,并计算每株细胞的半数抑制浓度 IC₅₀。每个药物浓度设置 3 个复孔。

1.3 细胞凋亡和周期检测

每个 6 cm 培养皿铺 1×10⁶ 个细胞。将细胞分 4 组:对照组、药物组 (5 μM PLX4032)、放疗组 (培养 6 h 进行 6 Gy 照射后继续培养) 及联合组 (含 5 μM PLX4032 的培养液培养 6 h 进行 6 Gy 照射后

继续培养); 72 h 后收集细胞,采用 Annexin V-FITC 和 PI 双染细胞 (BD Pharmigen TM, San Diego, CA),流式细胞仪进行凋亡检测;每组重复 3 个样本; 24 h 后收集细胞,预冷 70% 乙醇固定后用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,加 100 μL 含 RNase A 的 37℃ 水浴 30 min,加入 400 μL PI 染色混匀。4℃ 避光 30 min,用流式细胞仪检测,每组重复 3 个样本,取均值。

1.4 克隆形成实验

细胞用胰酶消化处理后重悬保证形成单个细胞,将细胞接种到 6 孔板中,每个孔中的细胞数为 500 个,接种 24 h 之后加入不同浓度药物进行处理,药物处理 24 h 后分别照射不同剂量治疗 (0、2、4、6 Gy),每个剂量设置 3 个复孔;分为 4 组:对照组、药物组、单纯放疗组以及联合联合组。药物组和联合治疗组中的浓度根据细胞增殖实验中得到的 IC₂₅ (最大抑制浓度的 25%) 设置。每天观察,10~14 d 后,细胞数 50 个以上为 1 个克隆 4% PFA 固定后,结晶紫染色,对克隆数进行检测。

1.5 统计方法

采用统计软件 SPSS 17.0,计量资料采用均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,行方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PLX4032 对两株细胞的抑制率

利用 Cell Titre Glo 试剂盒对两株细胞 PLX4032 的 IC₅₀ 进行检测发现,AM38 BRAFV600E 突变细胞株上为 (2 ± 0.35) μM,而在 GBM BRAF 野生型细胞株未检测到 (>20 μM) (表 1)。

表 1 BRAF 突变状态以及 PLX4032 在两株细胞上的 IC ₅₀		
细胞株	BRAF 突变状态	Cell Titre Glo 检测 (μM)
AM38	V600E 杂合	2 ± 0.35
GBM6	野生型 (wildtype)	>20

2.2 PLX4032 对细胞放射增敏作用

用克隆形成实验检测 BRAF 抑制剂对放疗的增敏作用,选择 PLX4032 0.5 μM 与 2、4、6 三个不同放射剂量进行联合,发现对于 GBM6 (BRAF 野生型) 细胞,随着放射剂量的增加,联合治疗组和单纯放疗组没有显著性差异 ($P > 0.05$),而对于 AM38 (BRAF V600E) 细胞,随着放射剂量增加,联合治疗组与单纯放疗组有显著性差异 ($P < 0.05$)。

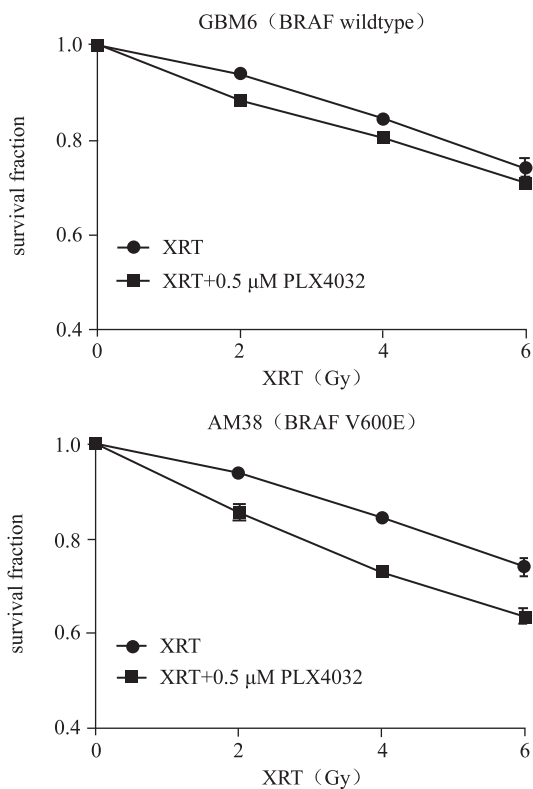


图 1 BRAF 抑制剂对疗效的增敏作用

2.3 PLX4032 对细胞凋亡作用

由图 2 可以看到,在 BBM6 BRAF 野生型细胞上药物组、单纯放射组以及联合治疗组对细胞凋亡没有明显影响($P>0.05$);在 AM38BRAF V600E 突变细胞上联合治疗组与单纯放疗组、药物组相比有显著性差异($P<0.05$),联合治疗组细胞凋亡比例达到49.3%。

2.4 PLX4032 对细胞周期作用

流式细胞仪检测对细胞 AM38(V600E)周期的影响发现,与对照组相比,发现药物组、单纯放疗组以及联合治疗组的细胞 G0/G1 期细胞数明显减少($P<0.05$),联合治疗组该期细胞数最少;同时与联合治疗相比,药物组以及单纯放疗组 G0/G1 期细胞数也有显著性差异($P<0.05$)。与对照组相比,药物组、单纯放疗组以及联合治疗组 G2/M 期细胞数明显增加($P<0.05$),联合治疗组增加最明显;与联合治疗组相比较,药物组以及单纯放疗组 G2/M 期细胞数目也有显著性差异($P<0.05$)(表 2)。

3 讨论

随着科学发展证明分子通路可促进神经胶质瘤的形成,从而使得脑瘤的靶向治疗已成为临床实验

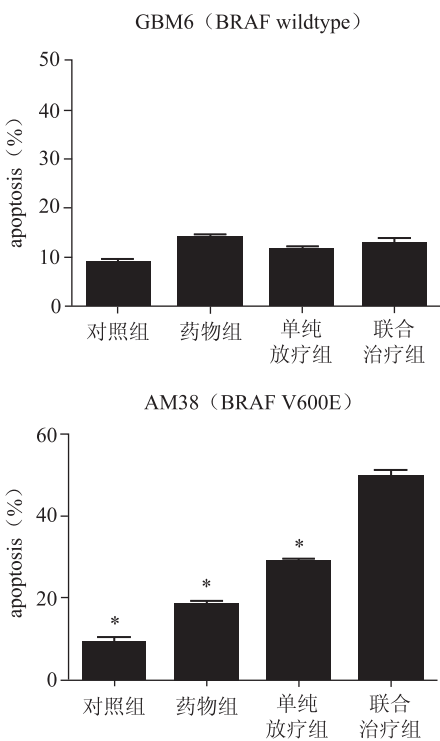


图 2 PLX4032 和放疗对细胞凋亡的影响
注:与 PLS+ XRT(联合治疗组)比较, * $P<0.05$ 。

表 2 流式细胞仪检测细胞周期分布

组别	G0/G1	S	G2/M
对照组	69.3 ± 2.18	17.8 ± 2.09	12.9 ± 1.43
药物组	60.4 ± 1.82 *	14.2 ± 0.82	25.4 ± 0.76 *
单纯放疗组	52.1 ± 0.68 *	19.2 ± 0.56	28.7 ± 1.46 *
联合治疗组	43.3 ± 1.56 * #	17.6 ± 1.03	39.1 ± 0.21 * #

注:与对照组相比, * $P<0.05$;与药物组以及单纯放疗组比较, # $P<0.05$

的重点^[4,10]。以前的研究已经表明 RAF 的持续激活在放射治疗中具有一定作用^[5],而且几种新型靶向 BRAFV600E 抑制剂已经在临床上得到检验,其中 dabrafenib 已被证明可通过血脑屏障有效抑制 BRAF V600E 突变的脑转移瘤^{7,11]}。放疗在高级别神经胶质瘤和复发胶质瘤的治疗中起着关键作用,对于患者的生存和预后都有重要影响^[12];体外数据也表明放疗和 BRAF V600E 靶向抑制剂联合具有一定协同作用以及在体内动物模型的数据也已经表明放疗可以增加 BRAF V600E 黑色素瘤细胞株对 BRAF V600E 抑制剂的敏感性,同时越来越多的研究报道发现靶向药物的耐药性极大限制药物在临床上的进一步应用^[13]。因此,研究 RAF 抑制剂和放疗联合治疗 BRAF V600E 突变的胶质瘤具有很重要的临床应用价值。

克隆形成实验是放射生物学检测细胞毒性的标准方法,成克隆的细胞必为贴壁和有增殖活力的细胞,同时克隆形成率反映细胞群体依赖性和增殖能力两个重要性状^[14]。本研究通过克隆形成实验结果表明,PLX4320(一个 BRAF V600E 抑制剂)与放疗联合在 BRAFV600E 突变的神经胶质瘤细胞上具有联合抑制作用,其中 BRAF V600E 抑制剂用了较低的浓度 IC₂₅,而这种联合作用在野生型的胶质瘤细胞株上没有作用,这一结果与在黑色素瘤细胞上的一些临床前的数据基本一致^[15]。但是该抑制剂与放疗联合作用具体是叠加还是协同本研究并没有进一步分析,有待于下一步研究,同时对于这种联合作用还存在着一定争议,Dasgupta 的研究结果表明 BRAF 抑制剂和放疗在体外具有叠加作用^[16-17],而 Nicolaides 的研究证实了在体外和体内都具有协同作用^[5]。流式细胞仪分析发现联合治疗组在 BRAF V600E 胶质瘤细胞上显著增加了细胞凋亡,与单独放疗组 and 对照组相比都具有显著性差异,而在野生型细胞中对细胞凋亡没有明显作用。对于细胞周期进行分析发现,联合治疗组细胞在 G2/M 期细胞数明显增加,从而表明靶向治疗和放疗结合可将细胞周期阻滞在 G2/M 期,这一结果跟另外一项研究的结果有差异,Sala 等人报道发现 BRAF 抑制剂和放疗结合可将细胞周期阻滞在 G0/G1 期^[18],可能本研究与 Sala 等研究用的 BRAF 特异性抑制剂(PLX4720)不同以及用到的浓度和放射剂量不同。

BRAF V600E 抑制剂 PLX4032 已经被 FDA 批准用于治疗 BRAFV600E 突变的转移性黑色素瘤以及 GSK2118436(dabrafenib)目前也在临床试验阶段,因此安全有效的 BRAF V600E 抑制剂可被临床上用于黑色素瘤、甲状腺瘤以及结直肠癌的治疗,并且 PLX4032 的临床试验证实 BRAF V600E 突变肿瘤的治疗通过单一的靶向药物治疗疗效并不理想。本研究结果表明放疗和 BRAF V600E 抑制剂联合可导致 BRAF V600E 细胞的周期阻滞、凋亡增加以及降低克隆形成,从而为靶向 BRAF V600E 这一有前景的抑制剂在临床上能够得到广泛的应用提供了一定依据。

参 考 文 献

- [1] Lecavalier-Barsoum MQ, Abdulkarim B. Adjuvant treatment of anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas [Z], 2014; CD007104.
- [2] Perez-Herrero E, Fernandez-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy[Z], 2015; 52-79.
- [3] Horbinski C. To BRAF or not to BRAF: is that even a question anymore[J]. Neuropathol Exp Neurol, 2013, 72(1): 2-7.
- [4] Berghoff AS, Preusser M. BRAF alterations in brain tumours: molecular pathology and therapeutic opportunities[J]. Curr Opin Neurol, 2014, 27(6): 689-696.
- [5] Nicolaides TP, Li HF, Solomon DA, et al. Targeted therapy for BRAF(V600E) malignant astrocytoma[J]. Clinical Cancer Research, 2011, 17(24): 7595-7604.
- [6] Myung JK, Cho H, Park CK, et al. Analysis of the BRAF (V600E) mutation in central nervous system tumors[J]. Transl Oncol, 2012, 5(6): 430-436.
- [7] McArthur G A. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF (V600E) and BRAF (V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study[J]. Lancet Oncol, 2014, 15(3): 323-332.
- [8] Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation[J]. N Engl J Med, 2011, 364(26): 2507-2516.
- [9] Ducassou A, Delannes M, Delannes M, et al. Radiosensitization induced by vemurafenib[J]. Cancer radiother, 2013, 17(4): 304-307.
- [10] Koelsche C. Mutant BRAF V600E protein in ganglioglioma is predominantly expressed by neuronal tumor cells[J]. Acta Neuropathol, 2013, 125(6): 891-900.
- [11] Schiffman JD, Hodgson JG, Vandenberg SR, et al. Oncogenic BRAF mutation with CDKN2A inactivation is characteristic of a subset of pediatric malignant astrocytomas[J]. Cancer Res, 2010, 70(2): 512-519.
- [12] Shaw EG, Wang MH, Coons SW, et al. Randomized trial of radiation therapy plus procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy for supratentorial adult Low-Grade glioma: initial results of RTOG 9802[J]. Journal of Clinical Oncology, 2012, 30(25): 3065-3070.
- [13] Ravan MC, Matalka MS. Vemurafenib in patients with BRAF V600E mutation-positive advanced melanoma[J]. Clin Ther, 2012, 34(7): 1474-1486.
- [14] 苏筠, 楚建军, 任峰, 等. 丙戊酸钠对人脑胶质瘤细胞系 SHG-44 的放疗增敏作用[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(2): 296-299.
- [15] Larkin J, Del Vecchio M, Ascierto PA, et al. Vemurafenib in patients with BRAF(V600) mutated metastatic melanoma: an open-label, multicentre, safety study[J]. Lancet Oncology, 2014, 15(4): 436-444.
- [16] Dasgupta T, Haas-Kogan DA, Yang XD, et al. Genotype-dependent cooperation of ionizing radiation with BRAF inhibition in BRAF V600E-mutated carcinomas[J]. Invest New Drugs, 2013, 31(5): 1136-1141.
- [17] Dasgupta T. Survival advantage combining a BRAF inhibitor and radiation in BRAF V600E-mutant glioma[Z], 2015.
- [18] Sala E, Mologni L, Truffa S, et al. BRAF silencing by short hairpin RNA or chemical blockade by PLX4032 leads to different responses in melanoma and thyroid carcinoma cells[J]. Mol Cancer Res, 2008, 6(5): 751-759.

(2015-12-09 收稿)