文章编号:1000-5404(2014)10-0987-05

论著

ABCG2在非小细胞肺癌厄洛替尼耐药中的作用

张 靖[1],马 虎[2],韩 静[1],李雪涛[1],陈正堂[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军肿瘤研究所[1];563003 贵州遵义,遵义医学院附属肿瘤医院肿瘤科[2])

[摘要] **目的** 探讨ABCG2在非小细胞肺癌厄洛替尼耐药中的作用。**方法** 厄洛替尼不同浓度(1、5、25 μmol/L)处理A549细胞及其获得性耐厄洛替尼细胞(A549/ER)12、24、48 h后,荧光实时定量PCR观察ABCG2 mRNA表达变化,Western blot检测p-AKT、ABCG2蛋白表达变化。PI3K/AKT通路激活剂(IGF-1)和抑制剂(LY294002)分别作用于A549细胞及A549/ER细胞24 h后,荧光实时定量PCR和Western blot方法分别检测ABCG2 mRNA及p-AKT、ABCG2蛋白表达变化。流式细胞仪检测加入IGF-1和LY294002后ABCG2外排作用。**结果** 与未加入厄洛替尼的A549、A549/ER细胞相比,厄洛替尼(1、5、25 μmol/L)作用12、24、48 h后,随着剂量的增加和作用时间的延长,ABCG2的表达与p-AKT水平呈正相关。加入IGF-1 24 h后,A549细胞中ABCG2表达量升高,而加入LY294002的A549/ER细胞,ABCG2表达量下降,并且IGF-1作用24 h后ABCG2外排明显增高。LY294002作用24 h后A549/ER细胞ABCG2外排明显降低。**结论** ABCG2经由PI3K/AKT信号通路介导非小细胞肺癌中厄洛潜尼耐药,且阻断PI3K/AKT通路可逆转由ABCG2介导的耐药。

[关键词] 肺癌;厄洛替尼;PI3K/AKT;ABCG2
[中图法分类号] R434.2;R966;R979.19 [文献标志码] A

Role of ABCG2 in erlotinib resistance in non-small-cell lung cancer

Zhang Jing[1], Ma Hu[2], Han Jing[1], Li Xuetao[1], Cheng Zhengtang[1] ([1]Institute of Cancer, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; [2]Oncology Department Cancer Hospital, Affiliated Hospital of Zunyi, Guizhou Province, 563003, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the role of ATP-binding cassette sub-family G member 2 (ABCG2) in erlotinib resistance in non-small-cell lung cancer. **Methods** A549 cells and acquired erlotinib-resistant A549 cells (A549/ER) were separately treated with different concentrations of erlotinib for 12, 24 and 48 h respectively. Real-time PCR and Western blotting were used to observe the changes of ABCG2 expressions at mRNA and protein levels. The activator (IGF-1) and inhibitor (LY294002) of PI3K/AKT pathway were used to treat A549 cells and A549/ER cells for 24 h, respectively. The expression changes of ABCG2 mRNA and p-AKT and ABCG2 were observed by real-time PCR and Western blot analysis. The efflux effect of ABCG2 after IGF-1 and LY294002 treatment was detected by flow cytometry. **Results** Compared with the A549 and A549/ER cells without erlotinib treatment, after treated by erlotinib (1, 5 and 25 μmol/L) for 12, 24 and 48 h, the expression of ABCG2 and inhibition or activation of PI3K/AKT signaling pathway were positively correlated with the increase of dosage and treatment time. The expression level of ABCG2 was increased in A549 cells treated with IGF-1 for 24 h and decreased in A549/ER cells treated with LY294002. In addition, the efflux effect of ABCG2 was significantly increased after IGF-1 treatment for 24 h and significantly decreased after LY294002 treatment for 24 h. **Conclusion** ABCG2 mediates erlotinib resistance in non-small-cell lung cancer by PI3K/AKT pathway, and blocking the pathway will reverse the drug resistance.

[**Key words**] lung cancer; erlotinib; PI3K/AKT; ATP-binding cassette sub-family G member 2

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81272496) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2012jjB0076).
Corresponding author: Chen Zhengtang, Tel:86-23-68755625, E-mail: czt05@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81272496);重庆市自然科学基金(CSTC2012jjB0076)
[通信作者] 陈正堂,电话:(023)68755625,E-mail:czt05@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140328.0955.018.html(2014-03-28)

非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占肺癌的80%,但其5年生存率普遍低于15%[1]。近年来分子靶向治疗因其良好的临床疗效逐渐成为肿瘤治疗的热点,尤以厄洛替尼(erlotinib)为代表[2]。然而,临床上部分治疗有效的患者最终都会产生耐药,导致后期的治疗失效。因此,对厄洛替尼的耐药机制的研究已成为目前亟待解决的问题。ABCG2是ATP结合盒转运超家族成员之一,能够通过其外排泵作用促进细胞内药物主动外排,介导多种肿瘤耐药[3-4]。本课题组前期结果也证实,A549获得性耐厄洛替尼细胞(A549/ER)相对于正常A549细胞ABCG2表达量明显升高,我们推测,厄洛替尼的耐药可能是由ABCG2介导。磷醇酰肌醇3激酶/丝苏氨酸蛋白激酶(phpsphatidylinositol 3-kinase/serine-threonine kinase, PI3K/AKT)信号通路通过影响下游AKT的活化状态,参与并调节肿瘤发生\发展的细胞生物学过程[5]。因PI3K/AKT通路是厄洛替尼发挥作用的主要通路之一,我们认为ABCG2在NSCLC厄洛替尼耐药中起作用可能与PI3K/AKT信号通路调控有关。本研究采用厄洛替尼不同浓度(1、5、25 μmol/L)处理A549细胞及其获得性耐厄洛替尼细胞(A549/ER)12、24、48 h,探讨ABCG2在厄洛替尼耐药的非小细胞肺癌中的作用及其可能调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞株:人肺腺癌细胞株A549株(上海复祥生物有限公司),A549获得性耐厄洛替尼细胞(A549/ER)为本实验室诱导所得。药品与试剂:盐酸厄洛替尼(上海安格化工有限公司),纯度为99.31%。miRNA提取试剂盒,反转录试剂盒,荧光实时定量PCR试剂盒(TaKaRa,Japan);一抗:GAPDH(武汉博士德公司);ABCG2(Abcam公司,USA);p-AKT(Abcam公司);二抗:辣根过氧化物酶(武汉博士德公司);PRMI1640培养基及胎牛血清(Gibco公司,USA)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肺腺癌A549细胞株使用含10%胎牛血清的PRMI1640培养基培养,A549/ER细胞培养于含厄洛替尼终水平为25 μmol/L的10%胎牛血清的PRMI1640培养基。置于37 ℃、5% CO_2饱和湿度的细胞培养箱中,取对数生长期细胞为实验对象。

1.2.2 MTT检测A549细胞及A549/ER细胞增殖抑制 以5×10^3/孔细胞接种于96孔培养板中,培养24 h后加厄洛替尼1、5、25 μmol/L,同时设置对照组(0.1% DMSO)和空白孔,每组5个复孔,培养12、24、48 h后进行MTT实验。按公式计算细胞增殖、抑制率。

增殖率=(实验组A平均值/对照组A平均值)×100%

抑制率=(1-实验组A平均值/对照组A平均值)×100%

1.2.3 qRT-PCR检测厄洛替尼作用A549、A549/ER细胞后ABCG2 mRNA表达 将细胞以5×10^5个细胞接种于6孔板内,培养24 h后换液,A549及A549/ER细胞加入厄洛替尼浓度为1、5、25 μmol/L;分别于培养12、24、48 h后,按照TaKaRa RNA提取说明书提取总RNA。紫外分光光度计测定上述RNA样品的浓度和纯度。用PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)(TaKaRa公司)进行反转录反应后,采用Real-time PCR仪(ABI7500公司)对上述获得的cDNA进行检测。引物为:β-actin(上游:5′-GTGAAGGTGACAGCAGTCGGTT-3′;下游:5′-GAAGTGGGGTGGCTTTTAGGA-3′)和ABCG2(上游:5′-GAAACCTGGTCTCAACGCCATCC-3′;下游:5′-CGTCAGAGTGCCCATCACAACAT-3′)。扩增条件为:95 ℃ 30 s, 95 ℃ 5 s, 60℃ 34 s, 40个循环。$2^{-\Delta\Delta Ct}$法分析样品中目的基因的相对表达率。

1.2.4 Western blot检测厄洛替尼作用A549、A549/ER细胞后p-AKT、ABCG2 mRNA表达 将细胞以5×10^5个细胞接种于6孔板内,培养24 h后换液,A549及A549/ER细胞加入厄洛替尼浓度为1、5、25 μmol/L;分别于培养12、24、48 h后提取总蛋白(整个过程冰上进行)。BAC测定蛋白浓度,并将所有样品浓度调至一致,加入1/5体积的上样缓冲液,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,湿转移到PVDF膜上。5% BSA室温封闭1 h,分别加入一抗GAPDH、p-AKT、ABCG2(TBST与一抗稀释比例为1∶1 000)4 ℃孵育过夜,TBST洗膜3次。加入二抗,室温孵育1 h,TBST洗膜3次后加显影液曝光。结果用QuantityOne软件分析灰度值。

1.2.5 qRT-PCR检测IGF-1及LY294002作用A549、A549/ER细胞后ABCG2 mRNA表达 将细胞以5×10^5个细胞接种于6孔板内,培养24 h后换液,A549细胞加入IGF-1浓度为100 ng/mL,A549/ER细胞加入LY294002浓度为20 μmol/L。分别于培养24 h后提取总RNA。采用Real-time PCR仪对cDNA样本进行检测。引物为:β-actin和ABCG2(序列见表1)。$2^{-\Delta\Delta Ct}$法分析样品中目的基因的相对表达率。

1.2.6 Western blot检测IGF-1及LY294002作用A549、A549/ER细胞后p-AKT、ABCG2蛋白表达 将细胞以5×10^5个细胞接种于6孔板内,培养24 h后A549/ER细胞加入A549细胞加入IGF-1浓度为100 ng/mL,LY294002浓度为20 μmol/L。分别于培养24 h后提取总蛋白(整个过程冰上进行),之后进行Western blot方法检测。结果用QuantityOne软件分析灰度值。

1.2.7 流式细胞术检测细胞中ABCG2外排 将A549细胞、加入IGF-1 100 ng/mL的A549细胞和A549/ER细胞、加入LY294002 20 μmol/L的A549/ER细胞分别加入1 μg/mL的Rh123共培养24 h后,洗去Rh123后培养30 min使用流式细胞仪检测外排情况,由此检测细胞中$ABCG_2$外排情况。

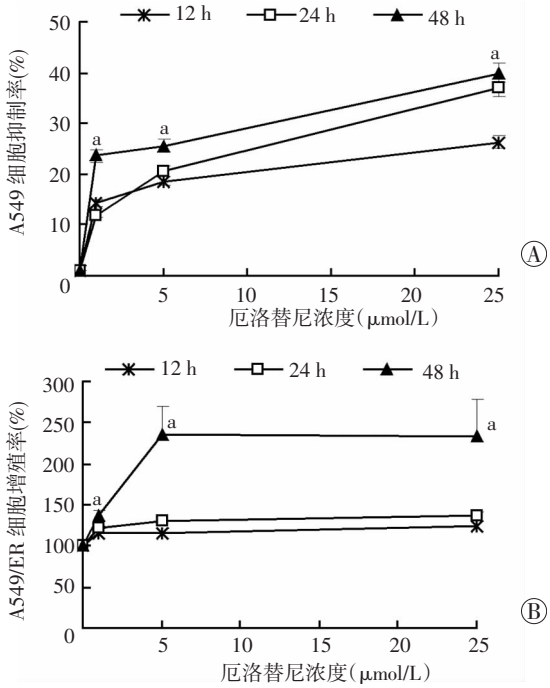
1.3 统计学分析

采用SPSS 18.0统计软件包,数据以$\bar{x}\pm s$表示,各组间均数比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 MTT 法检测厄洛替尼对 A549 细胞及 A549/ER 细胞的增殖抑制效应

结果显示,随着时间的延长和剂量的增加,厄洛替尼对 A549 细胞的抑制作用增强($P<0.05$);厄洛替尼作用 12 h 及 24 h 时对 A549/ER 细胞增殖无影响,作用 48 h 厄洛替尼对 A549/ER 增殖作用增加($P<0.05$)。见图 1。

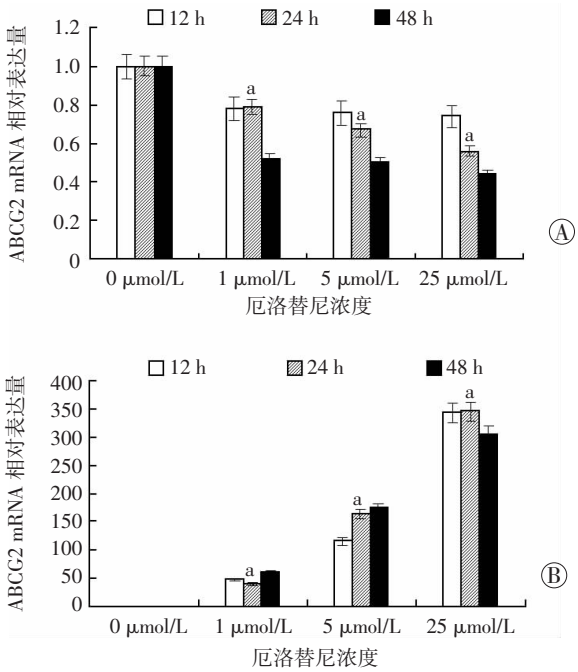


a: $P<0.05$,与 0 μmol/L 比较　A:A549 细胞;B:A549/ER 细胞

图 1　MTT 法检测不同浓度厄洛替尼处理 A549 细胞及 A549/ER 细胞不同时间的增殖抑制效应　($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

2.2 厄洛替尼作用 A549、A549/ER 细胞后 ABCG2 mRNA 表达

厄洛替尼(1、5、25 μmol/L)作用 A549 细胞 12、24、48 h 后,相较于未加入厄洛替尼的细胞,其 ABCG2 mRNA 表达明显下调($P<0.05$,图 2)。同样时间、剂量的厄洛替尼作用 A549/ER 细胞后,加入厄洛替尼的 A549/ER 细胞中 ABCG2 mRNA 表达较未加药细胞,表达明显上调($P<0.05$,图 2)。结果显示,随着剂量的增加和作用时间的延长,ABCG2 的表达量与剂量、时间呈正比。

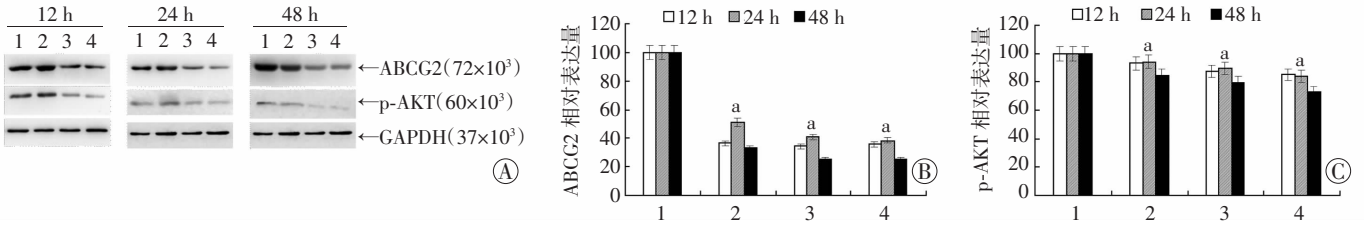


a: $P<0.05$,与 0 μmol/L 厄洛替尼比较　A:A549 细胞;B:A549/ER 细胞

图 2　qRT-PCR 检测厄洛替尼作用 A549、A549/ER 细胞不同时间后 ABCG2 mRNA 表达　($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

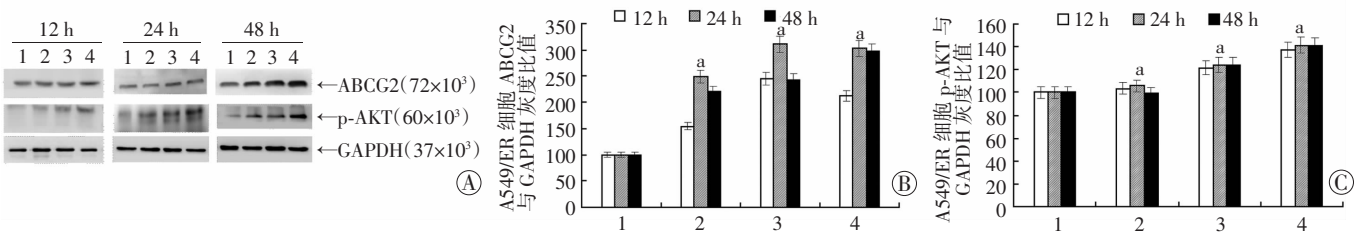
2.3 厄洛替尼作用 A549、A549/ER 细胞后 p-AKT、ABCG2 蛋白表达

厄洛替尼(1、5、25 μmol/L)作用 A549 细胞 12、24、48 h 后,相较于未加药的细胞,其 p-AKT、ABCG2 mRNA 表达明显下调($P<0.05$,图 3)。同样时间、剂量的厄洛替尼作用 A549/ER 细胞后,加入厄洛替尼的 A549/ER 细胞中 p-AKT、ABCG2 mRNA 表达较未加药细胞表达明显上调($P<0.05$,图 4)。结果显示,ABCG2 的表达与 p-AKT 活化程度具有相关性并呈现剂量和时间依赖性。



1: 0 μmol/L 厄洛替尼;2: 1 μmol/L 厄洛替尼;3:5 μmol/L 厄洛替尼;4:25 μmol/L 厄洛替尼　A:Western blot 检测 A549 细胞中 ABCG2、p-AKT 表达情况;B:半定量分析 ABCG2 表达变化($n=4$, $\bar{x}\pm s$);C:半定量分析 p-AKT 表达变化($n=4$, $\bar{x}\pm s$)　a: $P<0.05$,与 0 μmol/L 比较

图 3　Western blot 检测不同浓度厄洛替尼作用 A549 细胞 12、24、48 h 后 p-AKT、ABCG2 蛋白表达



1：0 μmol/L 厄洛替尼；2：1 μmol/L 厄洛替尼；3：5 μmol/L 厄洛替尼；4：25 μmol/L 厄洛替尼　A：Western blot 检测 A549/ER 细胞中 ABCG2、p-AKT表达；B：半定量分析 ABCG2 表达变化（$n=4$，$\bar{x}\pm s$）；C：半定量分析 p-AKT 表达变化（$n=4$，$\bar{x}\pm s$）　a：$P<0.05$，与 0 μmol/L 比较

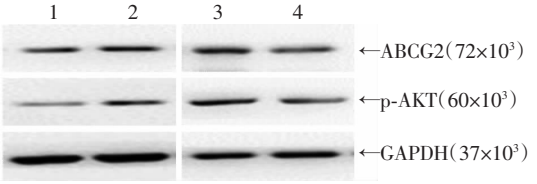
图4　Western blot 检测不同浓度厄洛替尼作用 A549/ER 细胞 12、24、48 h 后 p-AKT、ABCG2 蛋白表达

2.4　IGF-1 及 LY294002 作用 A549、A549/ER 细胞后 ABCG2 mRNA 表达变化

IGF-1 作用后的 A549 细胞，ABCG2 mRNA 表达明显上调，(1.67 ± 0.08)（$P<0.05$）。LY294002 作用后的 A549ER 细胞，ABCG2 mRNA 表达明显下调，0.72 ± 0.20（$P<0.05$）。结果显示，PI3K/AKT 激活剂和抑制剂均对 ABCG2 的表达有调节作用。

2.5　IGF-1 及 LY294002 作用 A549、A549/ER 细胞后 p-AKT、ABCG2 蛋白表达变化

IGF-1 作用后的 A549 细胞，p-AKT、ABCG2 蛋白表达明显上调（$P<0.05$），ABCG2：(148.86 ± 25.14)；p-AKT：(160.33 ± 17.01)。LY294002 作用后的 A549ER 细胞，p-AKT、ABCG2 均明显下调（$P<0.05$），ABCG2：(81.33 ± 10.26)；p-AKT：(69.33 ± 8.62)（图5）。



1：A549 细胞 control；2：A549 细胞 IGF-1 100 ng/mL 作用后；3：A549/ER 细胞 control；4：A549/ER 细胞 LY294002 20 μmol/L 作用后

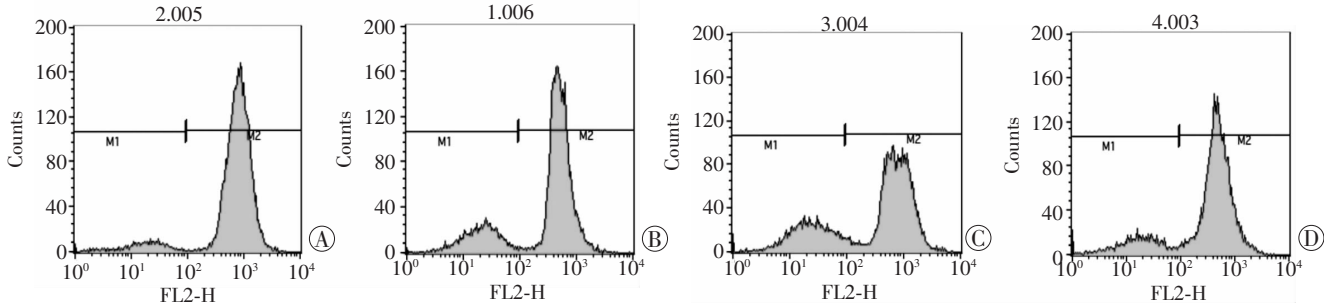
图5　Western blot 检测 IGF-1 及 LY294002 作用后 p-AKT、ABCG2蛋白表达变化

2.6　流式细胞仪检测细胞中 Rh123 外排

IGF-1 作用后的 A549 细胞，其 Rh123 外排明显高于未加入激活剂的 A549 细胞（$P<0.05$，图7）。LY294002 作用后的 A549/ER 细胞 Rh123 外排明显减少（$P<0.05$，图6）。由于 ABCG2 可以通过直接绑定 Rh123 的方式调节 Rh123 运输。结果表明：PI3K/AKT 激活剂和抑制剂有调节 Rh123 的外排作用，也就是说 PI3K/AKT 通路可以调节 ABCG2 外排。

3　讨论

厄洛替尼作为最常见的酪氨酸激酶抑制剂，因疗效确切、毒副作用小而成为目前 NSCLC 治疗中的主力药物。但因其最终会产生耐药[6]，故研究其耐药的机制成为临床研究的重点。ABCG2 最初在乳腺癌耐药细胞株中被发现，因此也被称为乳腺癌耐药蛋白（BCRP）[7]。大量的研究表明其在多种耐药细胞系和肿瘤中过表达并通过将底物泵出细胞的方法介导肿瘤多药耐药（MDR）[8]，并有研究证实其与吉非替尼等有较高的亲和力，二者结合可导致 EGFR-TKIs 主动外排到胞外，从而抑制药物的生物活性，产生耐药[9]。酪氨酸激酶抑制剂就是其底物之一[10]。本课题组前期实验也发现厄洛替尼耐药可能是由 ABCG2 介导。故此，在前期实验的基础上，着重于探讨 ABCG2 在厄洛替尼耐药的非小细胞肺癌中作用及可能调控的机制。本实验中，通过 qRT-PCR 检测发现不同浓度（1、5、25 μmol/L）厄洛替尼作用 12、24、48 后，A549 细胞中 ABCG2 表达



A：A549 细胞 control；B：A549 细胞 IGF-1 100 ng/mL 作用后；C：A549/ER 细胞 control；D：A549/ER 细胞 LY294002 20 μmol/L 作用后

图6　流式细胞仪 IGF-1 及 LY294002 作用后 ABCG2 外排情况

随浓度增加而降低,而A549/ER细胞中其ABCG2表达与其相反,ABCG2表达随浓度增加而升高。同时,Western blot结果显示A549及A549/ER细胞中ABCG2的表达变化同qRT-PCR结果一致,并且p-AKT表达变化同ABCG2表达呈正相关。证明了耐药细胞中ABCG2的表达要明显高于正常肿瘤细胞,并呈时间剂量依赖性。

为了进一步证实在厄洛替尼治疗中发挥主要作用的PI3K/AKT信号通路时候可以调控厄洛替尼耐药的NSCLC中ABCG2,我们在A549细胞中加入了PI3K/AKT通路激活剂IGF-1,其也被称为胰岛素生长因子受体1,已被证实能在体外激活PI3K/AKT信号通路,调节AKT活化,促进肿瘤细胞的生长、增殖,影响血管生成、肿瘤细胞的侵袭、转移[11]。在A549/ER细胞中加入了PI3K/AKT通路抑制剂LY294002,为一种高效的AKT激酶选择性抑制剂,其可以促进吉非替尼耐药的非小细胞肺癌细胞株的再敏性[12]。通过研究发现IGF-1可以促使A549细胞ABCG2表达升高,其升高水平与p-AKT表达变化水平呈正相关。而加入LY294002 24 h的A549/ER细胞中,其p-AKT和ABCG2表达均降低。以上研究表明,PI3K/AKT信号通路可以调节细胞中ABCG2表达变化。为了更好的验证PI3K/AKT信号通路可以调控ABCG2在厄洛替尼作用的NSCLC作用。罗丹明123(rhodamine 123,Rh123)是目前常见的外排实验试剂,已有研究证实,耐药细胞可以降低Rh123胞内积累[13-14],并发现Rh123通过直接绑定ABCG2调节Rh123运输。因此本研究使用Rh123对加入PI3K/AKT通路激活剂和抑制剂的细胞进行药物外排的检测通过检测PI3K/AKT信号通路抑制剂及激活剂对Rh123外排影响来检测ABCG2外排情况。结果发现,IGF-1作用后的A549细胞,其Rh123外排明显高于未加入激活剂的A549细胞;LY294002作用后的A549/ER细胞Rh123外排明显减少。可以说明PI3K/AKT激活剂和抑制剂有调节ABCG2外排的作用。故此我们推论,ABCG2在厄洛替尼耐药的非小细胞肺癌中起到了重要的作用,通过调节PI3K/AKT信号通路可能会逆转ABCG2介导的NSCLC靶向耐药。

参考文献:

[1] Ferlay J, Shin H R, Bray F, *et al*. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. Int J Cancer, 2010, 127(12): 2893-2917.

[2] Belani C P, Goss G, Blumenschein G Jr. Recent clinical developments and rationale for combining targeted agents in non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. Cancer Treat Rev, 2012, 38(3): 173-184.

[3] Stacy A E, Jansson P J, Richardson D R. Molecular pharmacology of ABCG2 and its role in chemoresistance[J]. Mol Pharmacol, 2013, 84(5): 655-669.

[4] Meyer-zu-Schwabedissen H E, Kroemer H K. *In vitro* and *in vivo* evidence for the importance of breast cancer resistance protein transporters (BCRP/MXR/ABCP/ABCG2)[J]. Handb Exp Pharmacol, 2011(201): 325-371.

[5] Gentry L R, Martin T D, Der C J. Mechanisms of targeted therapy resistance take a de-TOR[J]. Cancer Cell, 2013, 24(3): 284-286.

[6] Dancey J E, Schoenfeldt M. Clinical trials referral resource. Current clinical trials of erlotinib[J]. Oncology (Williston Park), 2005, 19(9): 1124, 1127-1128, 1130.

[7] Noguchi K, Katayama K, Sugimoto Y. Human ABC transporter ABCG2/BCRP expression in chemoresistance: basic and clinical perspectives for molecular cancer therapeutics[J]. Pharmgenomics Pers Med, 2014, 7: 53-64.

[8] Turk D, Szakacs G. Relevance of multidrug resistance in the age of targeted therapy[J]. Curr Opin Drug Discov Devel, 2009, 12(2): 246-252.

[9] Hegedus C, Truta-Feles K, Antalffy G, *et al*. Interaction of the EGFR inhibitors gefitinib, vandetanib, pelitinib and neratinib with the ABCG2 multidrug transporter: implications for the emergence and reversal of cancer drug resistance[J]. Biochem Pharmacol, 2012, 84(3): 260-267.

[10] Natarajan K, Xie Y, Baer M R, *et al*. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance[J]. Biochem Pharmacol, 2012, 83(8): 1084-1103.

[11] Pfaffenbach K T, Pong M, Morgan T E, *et al*. GRP78/BiP is a novel downstream target of IGF-1 receptor mediated signaling[J]. J Cell Physiol, 2012, 227(12): 3803-3811.

[12] Li H, Zhou S, Li X, *et al*. Gefitinib-resistance is related to BIM expression in non-small cell lung cancer cell lines[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2013, 28(2): 115-123.

[13] Robey R W, Medina-Perez W Y, Nishiyama K, *et al*. Overexpression of the ATP-binding cassette half-transporter, ABCG2 (Mxr/BCrp/ABCP1), in flavopiridol-resistant human breast cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(1): 145-152.

[14] Smith V, Raynaud F, Workman P, *et al*. Characterization of a human colorectal carcinoma cell line with acquired resistance to flavopiridol[J]. Mol Pharmacol, 2001, 60(5): 885-893.

(**收稿**:2014-02-09;**修回**:2014-03-10)

(编辑 汪勤俭)