论著

文章编号:1000-5404(2014)16-1656-04

自噬在表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂耐药中的作用

刘 明,周承志,郑丽霞,欧阳铭 (510120 广州,广州医科大学附属第一医院呼吸内科,广州呼吸疾病研究所,呼吸疾病国家重点实验室)

[摘要] **目的** 探讨自噬在表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor tyrosine kinases inhibitor,EGFR-TKI)耐药中的作用。**方法** 浓度递增筛选法诱导非小细胞肺癌 PC9 细胞株对 erlotinib 耐药,Western blot 检测自噬相关分子 LC3B、P62、Beclin1 的表达,观察自噬抑制剂氯喹(chloroquine,CQ)PC9 及其耐药细胞株敏感性的影响,Western blot 检测 P-ERKl/2、P-AKT 蛋白的表达情况。**结果** 成功诱导对 erlotinib 耐药的细胞株 PER,其 IC_{50} 为(9.6±2.1)μmol/L,是亲本 PC-9 细胞的 192 倍,且自噬相关分子 LC3B、P62、Beclin1 的表达明显增高。CQ 可显著提高 erlotinib 对 PC9 和 PER 细胞的敏感性。P-ERKl/2、P-AKT 在耐药 PER 细胞株中持续活化,联合给予自噬抑制剂 CQ 则可部分恢复 erlotinib 对 P-ERKl/2、P-AKT 信号的抑制作用。**结论** 自噬参与了 EGFR-TKI 耐药的发生,联合自噬抑制剂和 EGFR-TKI 有望成为克服耐药的新策略。

[关键词] 自噬;表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂;耐药;肺癌

[中图法分类号] R394.3;R734.2;R915 [文献标志码] A

Role of autophagy in EGFR-TKI resistance of non-small cell lung cancer cells

Liu Ming, Zhou Chengzhi, Zheng Lixia, Ouyang Ming (Guangzhou Institute of Respiratory Disease, State Key Laboratory of Respiratory Diseases, First Affiliated Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510120, China)

[**Abstract**] **Objective** Investigate the role of autophagy in the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) resistance in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** Stepwise erlotinib selection was used to establish the EGFR-TKI-resistant cell line PER from human NSCLC cell line PC9. Autophagy marker LC3B, P62, and Beclin1 were detected by Western blotting. The influence of autophagy inhibitor chloroquine (CQ) on the drug sensitivity of the PER and PC9 cells was tested. Cell viability was measured by MTT assay and the expression of P-ERKl/2 and P-AKT were measured by Western blotting. **Results** The resistant cell line PER had IC_{50} value of 9.6±2.1 μmol/L to erlotinib, 192 times higher than that of the PC9 cells (0.05±0.02 μmol/L). The expression of LC3B, P62 and Beclin1 in the PER cells was obviously higher than in the PC9 cells. Cytotoxicity induced by erlotinib was greatly enhanced after autophagy inhibition with CQ. The persist activation of P-ERKl/2 and P-AKT in the PER cells could be inhibited by treatment with CQ. **Conclusion** Autophagy may be involved in EGFR-TKI resistance of NSCLC. Autophagy inhibition thus represents a novel strategy to potentiate erlotinib efficacy in NSCLC treatment.

[**Key words**] autophagy; epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor; resistance; non-small cell lung cancer

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81200050) and the Project of State Key Laboratory of Respiratory Diseases (2011-A8). Corresponding author: Liu Ming, Tel: 86-20-34281606, E-mail: mingliu128@hotmail.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81200050),呼吸疾病国家重点实验室青年基金(2011-A8)

[通信作者] 刘 明,电话:(020)34281606,E-mail: mingliu128@hotmail.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140717.1609.003.html(2014-07-17)

肺癌是当今世界上对人类健康与生命危害最大的恶性肿瘤之一,发病率和死亡率近年来呈明显上升趋势,严重威胁着人类健康[1-2]。随着对非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)异常信号转导途径的不断阐明,近年来,以表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor tyrosine kinases inhibitor, EGFR-TKI)为代表的分子靶向药物的应用,为肺癌患者带来了曙光[3-4]。然而即便患者具有EGFR-TKI 治疗敏感的突变,随着治疗时间的延长最终均不可避免地产生获得性耐药而导致疾病进展[5-6]。因此,EGFR-TKI 耐药问题已经成为限制晚期 NSCLC 治疗疗效进一步提高的瓶颈,明确 EGFR-TKI 耐药性产生的机制以及研究克服 EGFR-TKI 耐药的治疗方法已经成为 NSCLC 治疗领域中的研究热点。近年研究发现,细胞内自噬调控机制的异常与多种疾病相关,特别是自噬在肿瘤发生、发展中的作用以及自噬激活与抗肿瘤药物的作用是目前研究的热点领域之一[7-9]。越来越多的研究证实,自噬是肿瘤对放、化疗及生物治疗耐药的重要机制之一[10-12],然而其在 EGFR-TKI 耐药中的作用尚不清楚。因此,本研究拟研究自噬在EGFR-TKI 耐药中的作用机制,探索其在 EGFR-TKI 靶向治疗中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 试剂

RPMI1640 培养液和胎牛血清购自美国 Gibco 公司;MTT 购自美国 Sigma 公司;Erlotinib 片购自上海罗氏制药有限公司;自噬相关标记蛋白 LC3B(#2775)、P62(#5114)、Beclin1(#3738)以及 GAPDH(#3683)抗体均购自 Cell Signaling Technology 公司;HRP 标记山羊抗小鼠或抗兔 IgG 购自 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 PC9 细胞及 erlotinib 耐药细胞株 PER 的诱导

人肺腺癌 PC9 细胞由上海市肺科医院周彩存教授惠赠;细胞在 37 ℃ 5% CO_2 条件下用含 10% 胎牛血清、1640 培养基中培养。采用 erlotinib 剂量梯度筛选方法建立 erlotinib 耐药的细胞株,从 0.02 μmol/L 开始,逐步增加 erlotinib 的浓度至 10 μmol/L,体外培养共 5 个月。以不同药物浓度的对数值为横坐标,细胞抑制率为纵坐标绘制剂量反应曲线,并计算药物半数抑制浓度 IC_{50}。

1.3 MTT 法检测细胞增殖及抑制

将对数生长期的 PC9 和 PER 细胞接种于 96 孔板,于 5% CO_2,37 ℃,饱和湿度下培养。待细胞融合至 70% ~80% 时,弃去孔内原培养液。分别加入不同浓度的 erlotinib、自噬抑制剂,或联合加入 erlotinib、自噬抑制剂,培养 48 h 后每孔分别加入 10 μL MTT,孵育 4 h 后吸弃上清液,每孔加入 DMSO 150 μL,振荡 10 min,用酶标仪在 450 nm 波长处检测光密度值[$D(450)$]。细胞抑制率通过以下公式计算得出:细胞存活率% =[实验组平均 $D(450)$值 - 空白组平均 $D(450)$值]/[对照组平均 $D(450)$值 - 空白组平均 $D(450)$值] ×100%,实验重复 3 次。

1.4 Western blot 检测相关蛋白表达变化

收集细胞提取蛋白,BCA 试剂盒计算蛋白浓度。上样,90 V 电泳 30 min,110 V 电压分离蛋白,380 mA 转膜 2 h,5% 脱脂牛奶封闭 30 min。加入一抗 4 ℃孵育过夜,TBST 洗膜 5 min × 3 次后,加入对应 HRP 标记二抗,室温下孵育 1 h 后,TBST 洗膜 5 min ×3 次,然后显色,KOADA 成像系统成像。

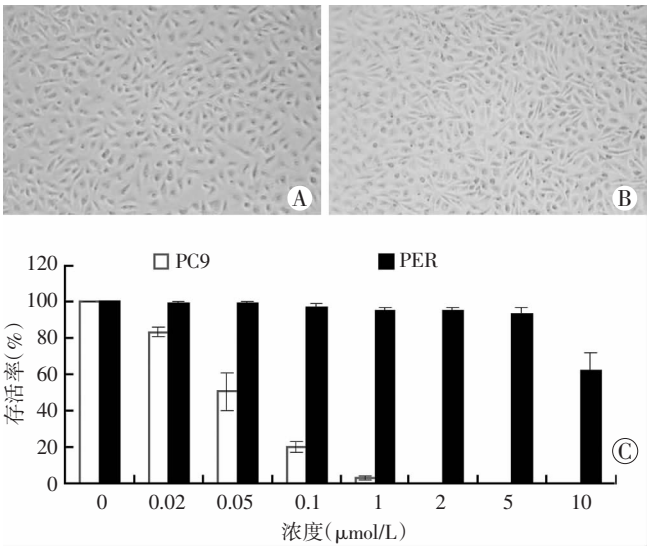
1.5 统计学分析

统计学分析均采用 SPSS 13.0 进行,两组间比较用 t 检验,多组间比较采用方差分析。检验水准 $\alpha = 0.05$。

2 结果

2.1 Erlotinib 耐药细胞株 PER 的诱导[13]

亲代 PC9 细胞对 erlotinib 敏感性,IC_{50} 为(0.05 ± 0.02) μmol/L;利用梯度递增的方法成功诱导 erlotinib 耐药细胞株 PER,细胞形态与 PC9 细胞无明显差异,IC50 达(9.6 ± 2.1) μmol/L,是 PC9 细胞的 192 倍,两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)无药培养 2 周,其 IC50 无明显变化(9.3 ± 2.3) μmol/L($P > 0.05$,图 1)。



A、B:倒置显微镜观察 PC9 细胞株与 PER 细胞株形态变化,C:不同浓度 erlotinib 处理两细胞株的细胞存活率比较

图 1 Erlotinib 耐药细胞株 PER 的建立

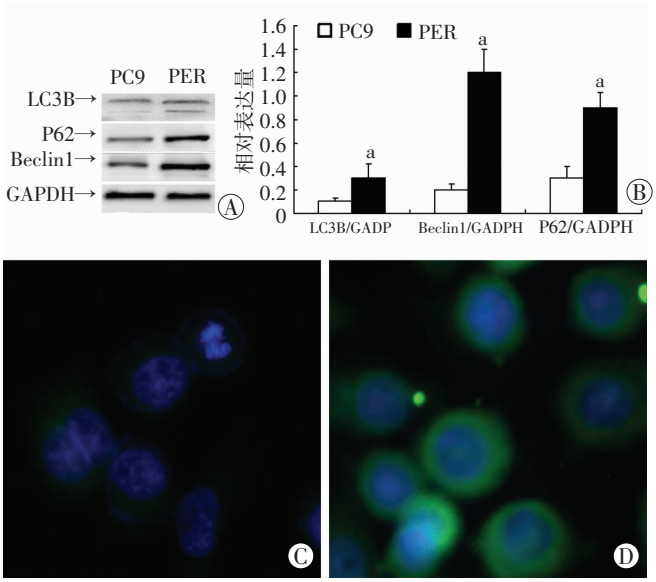
2.2 自噬相关分子 LC3B、P62、Beclin1 在 PC9 及耐药细胞 PER 中的表达

Western blot 检测 LC3B、P62 及 Beclin1 蛋白表达发现,3 种自噬相关分子在耐药细胞 PER 中的表达均明显高于亲本 PC9 细胞株($P < 0.05$,见图 2)。

2.3 自噬抑制剂影响 erlotinib 的疗效

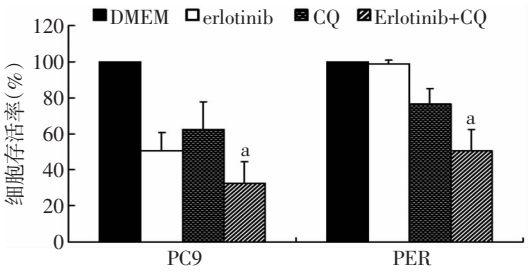
0.05 μmol/L erlotinib 可明显抑制 PC9 细胞的增殖,不能抑制 PER 的增殖;自噬抑制剂 CQ 对 PC9 和 PER 细胞的增殖均

有抑制，联合应用 CQ 和 erlotinib 可发现，CQ 可显著提高 erlotinib 对 PC9 和 PER 细胞的敏感性（$P<0.05$，见图3）。



A：Western blot 检测结果；B：半定量分析结果　a：$P<0.05$，与 PC9 比较；C：P62 在 PC9 细胞中的表达；D：P62在 PER 细胞中的表达

图2　自噬相关分子在 PC9 及耐药细胞 PER 中的表达

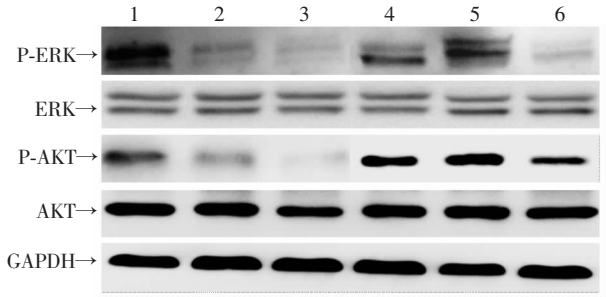


a：$P<0.05$，与 erlotinib 比较

图3　自噬抑制剂影响 erlotinib 的疗效

2.4　自噬抑制剂影响 P-ERK、P-AKT 信号

Western blot 检测发现，0.5 μmol/L erlotinib 可明显抑制 PC9 细胞 P-ERK、P-AKT 的表达，而在耐药 PER 细胞株中则持续活化，联合给予自噬抑制剂 CQ 则可部分恢复 erlotinib 对上述信号的抑制作用（图4）。



1：PC9，2：PC9 + erlotinb；3：PC9 + erlotinb + CQ；4：PER；5：PER + erlotinb；6：PER + erlotinb + CQ

图4　自噬抑制剂对 P-ERK、P-AKT 信号的影响

3　讨论

EGFR-TKI 获得性耐药的分子机制十分复杂，目前得到普遍认同的是 EGFR 基因外显子 20 的 T790M 二次突变和 c-MET 原癌基因扩增。然而以上耐药机制也仅能解释约 50% 的耐药现象，仍有 50% 患者对 EGFR-TKI 的耐药机制尚不明确[14-15]。因此，进一步阐明 EGFR-TKI 耐药性产生的机制，并以此开发克服耐药的新策略显得尤为迫切。

研究表明，无论 EGFR 基因 T790M 二次突变，还是 c-MET 基因扩增介导的吉非替尼获得性耐药均需要 EGFR 及其下游 MAPK/ERK 或 PI3K/Akt 信号分子的持续活化来维持肿瘤的存活；因此，近年来针对以上耐药机制，人们进行了一些有益的治疗探索。新一代 EGFR 酪氨酸激酶不可逆抑制剂或 MET 抑制剂和吉非替尼的联合治疗在体外能够显著抑制吉非替尼获得性耐药细胞的增殖、存活，并促进凋亡。我们前期研究也发现，TGF-β1 诱导的上皮间质转化参与了 EGFR-TKI 获得性耐药的发生，这种效应可能是通过持续活化 AKT 和 STAT3 而发挥作用[16]。

近年来，细胞自噬（autophagy）的研究引起了人们的重视，研究发现自噬是细胞适应环境变化、防御病原微生物侵袭、维持内环境稳定的重要机制。在多种人类肿瘤中存在有自噬活性的改变，自噬在肿瘤的发生、发展过程中起到了重要作用[11]。自噬与肿瘤关系密切，随着研究的深入，人们认识到自噬对肿瘤细胞的作用具有促进和抑制的双重作用，这种两面性取决于疾病进展的不同阶段，细胞周围环境的变化和治疗干预措施的不同。它既是体内的“垃圾处理厂”，也是“废品回收站”；它既可以抵御病原体的入侵，又可保卫细胞免受细胞内毒物的损伤[10-12]。本研究发现，自噬在耐药细胞株表达明显增加，提示自噬可能参与 EGFR-TKI 的耐药发生。越来越多的研究证实，自噬是肿瘤对放、化疗及生物治疗耐药的重要机制之一[17-18]，比如，自噬相关基因的缺失可使耐药细胞对放疗的再次敏感[19]，联合使用自噬抑制剂氯喹，可以明显提高抗白血病药物伊马替尼的疗效[20]，干预自噬，增强了组蛋白去乙酰化酶的抑制剂 SAHA，对伊马替尼耐药的慢性粒细胞白血病的抗肿瘤的效果[21]。某些抗肿瘤治疗药物有可能通过 Autophagy 机制发挥作用，如被广泛用于乳腺癌治疗的药物它莫西芬可能通过激活细胞自噬，由神经酰胺介导上调 Beclin1 表达发挥作用[22]。某些肿瘤细胞由于存在凋亡通路特异基因的突变，不能发生凋亡形式的程序性细胞死亡，却仍可通

过自噬途径得到清除。研究表明,自噬还可保护肿瘤细胞免受放化疗损伤,这种保护作用的机制可能是通过自噬清除受损的大分子或线粒体等细胞器,从而保护肿瘤细胞免于发生凋亡性程序性细胞死亡。还有研究提示,细胞自噬是导致肺癌细胞对顺铂产生耐受的重要机制之一,顺铂耐受的细胞能够通过上调一些自噬相关分子如 LC3, Beclin1, 下调凋亡效应分子如 Caspase-3 水平,从而逃避凋亡而存活[23]。这些均提示抑制肿瘤细胞自噬活性甚至自噬性死亡是一条有价值的增加抗肿瘤疗效,克服耐药的新方法。本研究发现,抑制自噬可以增加肺癌对 EGFR 抑制剂的敏感性,联合应用自噬抑制剂及 EGFR 抑制剂可以更加有效地治疗非小细胞肺癌。Erlotinib 可通过抑制 EGFR 下游的增殖信号如 ERK、AKT 从而抑制肿瘤细胞的增殖,而对于耐药细胞株则无效,本研究发现,在耐药细胞株 PER,自噬抑制剂可部分恢复 erlotinib 对上述信号的抑制作用,这可能是其克服 EGFR-TKI 耐药、提高药物敏感性的机制之一。

综上所述,本研究成功构建了 erlotinib 耐药的细胞株,并由此观察到自噬在 erlotinib 耐药中发挥着重要作用,联合应用自噬抑制剂有望成为克服 EGFR-TKI 耐药的新策略。

参考文献:

[1] Siegel R, Ma J, Zou Z, *et al*. Cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9-29.

[2] Reck M, Heigener D F, Mok T, *et al*. Management of non-small-cell lung cancer: recent developments[J]. Lancet, 2013, 382(9893): 709-719.

[3] Ramalingam S S, Owonikoko T K, Khuri F R. Lung cancer: New biological insights and recent therapeutic advances[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 91-112.

[4] Cataldo V D, Gibbons D L, Perez-Soler R, *et al*. Treatment of non-small-cell lung cancer with erlotinib or gefitinib[J]. N Engl J Med, 2011, 364(10): 947-955.

[5] Gainor J F, Shaw A T. Emerging paradigms in the development of resistance to tyrosine kinase inhibitors in lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2013, 31(31): 3987-3996.

[6] Wheeler D L, Dunn E F, Harari P M. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2010, 7(9): 493-507.

[7] Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(10): 722-737.

[8] Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy[J]. Nat Cell Biol, 2013, 15(7): 713-720.

[9] Choi A M, Ryter S W, Levine B. Autophagy in human health and disease[J]. N Engl J Med, 2013, 368(7): 651-662.

[10] Gewirtz D A. Autophagy and senescence in cancer therapy[J]. J Cell Physiol, 2014, 229(1): 6-9.

[11] Guo J Y, Xia B, White E. Autophagy-mediated tumor promotion[J]. Cell, 2013, 155(6): 1216-1219.

[12] Hu Y L, Jahangiri A, Delay M, *et al*. Tumor cell autophagy as an adaptive response mediating resistance to treatments such as antiangiogenic therapy[J]. Cancer Res, 2012, 72(17): 4294-4299.

[13] Liu M, Zheng L, He C, *et al*. Overcome the EGFR-TKIs resistance with cucurbitacin BE compound by targeting STAT3, ERK1/2 and AKT[J]. Eur Respir J, 2012, 9(9): 829s

[14] Pao W, Chmielecki J. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10(11): 760-774.

[15] Engelman J A, Janne P A. Mechanisms of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(10): 2895-2899.

[16] 刘明, 任敦强, 郑丽霞, 等. TGF-β1 介导的上皮-间质转分化在 Gefitinib 耐药中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(15): 1558-1561.

[17] White E, DiPaola R S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(17): 5308-5316.

[18] Livesey K M, Tang D, Zeh H J, *et al*. Autophagy inhibition in combination cancer treatment[J]. Curr Opin Investig Drugs, 2009, 10(12): 1269-1279.

[19] Apel A, Herr I, Schwarz H, *et al*. Blocked autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy[J]. Cancer Res, 2008, 68(5): 1485-1494.

[20] Maclean K H, Dorsey F C, Cleveland J L, *et al*. Targeting lysosomal degradation induces p53-dependent cell death and prevents cancer in mouse models of lymphomagenesis[J]. J Clin Invest, 2008, 118(1): 79-88.

[21] Carew J S, Nawrocki S T, Kahue C N, *et al*. Targeting autophagy augments the anticancer activity of the histone deacetylase inhibitor SAHA to overcome Bcr-Abl-mediated drug resistance[J]. Blood, 2007, 110(1): 313-322.

[22] Gonzalez-Malerva L, Park J, Zou L, *et al*. High-throughput ectopic expression screen for tamoxifen resistance identifies an atypical kinase that blocks autophagy[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(5): 2058-2063.

[23] Ren J H, He W S, Nong L, *et al*. Acquired cisplatin resistance in human lung adenocarcinoma cells is associated with enhanced autophagy[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2010, 25(1): 75-80.

(**收稿**:2014-03-09;**修回**:2014-05-04)

(编辑 邓强庭)