

厄洛替尼对非小细胞肺癌增殖和自噬的影响

杜紫燕¹,王浙凤¹,李凌云²,嵇成红¹,施敏骅¹,余勇^{1*}

(¹苏州大学附属第二医院呼吸科,²实验中心,江苏 苏州 215004)

[摘要] 目的:探讨厄洛替尼对人非小细胞肺癌细胞 HCC827、A549、H1299 增殖及自噬的影响。方法:将体外培养的人肺癌 HCC827、A549、H1299 细胞株分为对照组(CON 组)、溶剂对照组(DMSO 组)和厄洛替尼处理组,采用 CCK-8 法检测厄洛替尼对细胞增殖的抑制作用,采用 Western blot 及细胞免疫荧光法检测自噬相关蛋白 LC3、Beclin-1 表达。结果:厄洛替尼以剂量依赖的方式抑制 HCC827、A549、H1299 细胞增殖,增殖抑制率由高到低分别为 HCC827、A549、H1299,3 株细胞的半数抑制浓度分别为 8.72、32.09、87.46 $\mu\text{mol/L}$;与对照组相比,厄洛替尼显著上调 LC3-II 及 Beclin-1 表达($P < 0.05$);厄洛替尼诱导 HCC827、A549、H1299 细胞株自噬,且其诱导作用呈剂量依赖性($P < 0.05$)。结论:厄洛替尼选择性抑制非小细胞肺癌增殖,并诱导非小细胞肺癌细胞自噬。

[关键词] 厄洛替尼;非小细胞肺癌;自噬

[中图分类号] R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)05-662-04

doi:10.7655/NYDXBNS20150512

Effects of erlotinib on proliferation and autophagy in non-small cell lung cells

Du Ziyang¹, Wang Xifeng¹, Li Lingyun², Ji Chenghong¹, Shi Minhua¹, Yu Yong^{1*}

(¹Department of Respiratory Diseases,²Experimental Center, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of erlotinib on proliferation and autophagy in HCC827, A549 and H1299 human non-small cell lung cancer cells. **Methods:** Three human non-small cell lung cancer cell lines HCC827, A549, H1299 were cultured *in vitro*, and were divided into control group, DMSO group, and groups treated by erlotinib in different concentrations. CCK-8 method was used for detecting the proliferation inhibition. The expression levels of autophagy-related proteins, microtubule-associated protein light chain (LC3) and Beclin-1 were detected by Western blot analysis and cell immunofluorescence method. **Results:** Erlotinib inhibited the proliferation of HCC827, A549 and H1299 cells, proliferation inhibition rate showed that HCC827 > A549 > H1299, IC_{50} of HCC827, A549 and H1299 cells were 8.72 $\mu\text{mol/L}$, 32.09 $\mu\text{mol/L}$ and 87.46 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Compared with the control groups, erlotinib enhanced expression of LC3-II and Beclin-1 significantly ($P < 0.05$). Erlotinib induced autophagy in a concentration dependent manner in HCC827, A549 and H1299 cells ($P < 0.05$). **Conclusion:** Erlotinib inhibited proliferation selectively and activated autophagy in non-small cell lung cancer cells.

[Key words] erlotinib; non-small cell lung cancer; autophagy

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(05): 662-665, 690]

肺癌的发病率和病死率位居所有恶性肿瘤之首,其中约 85% 为非小细胞肺癌,多数国家肺癌患者 5 年生存率仅为 15%^[1]。个体化多学科综合治疗

已成为非小细胞肺癌治疗趋势,其中令人瞩目的靶向治疗已成为优势人群一线治疗的推荐。厄洛替尼和吉非替尼是表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKIs)的代表,在治疗晚期非小细胞肺癌初期疗效和延长无进展生存期方面表现不俗,然而继发耐药已成为制约 TKIs 疗效的瓶颈^[2]。目前公认 TKIs 主要通过 EGFR 介导的信号转导途径导致肿

[基金项目] 苏州市科技发展计划项目(SYSD2012087);苏州大学附属第二医院博士、留学归国人员预研项目(SD-FEYBS1102)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yuyong5188@126.com

瘤细胞凋亡,而细胞程序性死亡的另一种方式——自噬与 TKIs 的关系报道甚少。本研究观察厄洛替尼诱导非小细胞肺癌细胞株 HCC827、A549、H1299 自噬的水平,初步探讨厄洛替尼诱导非小细胞肺癌细胞死亡方式,希望在此基础上从分子水平寻找更有效的诱导肺癌细胞死亡的联合方案。

1 材料和方法

1.1 材料

3 株肺腺癌细胞 HCC827、A549、H1299 (上海复祥生物有限公司);RPMI-1640 培养基(31800-022, Gibco 公司,美国)及胎牛血清(Gibco 公司,美国);CCK-8(同仁化学研究所,日本),二甲基亚砜(D8418, Sigma 公司,美国),厄洛替尼(#341250, 百灵威公司,中国),PVDF 膜(Millipore 公司,美国),一抗 LC3(#PM036, MBL, 日本)及 Beclin-1(#3495, Cell Signal Technology 公司,美国),辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(Sc-2004, Santa Cruz 公司,美国),凝胶成像分析系统(Bio-Rad, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理

3 株肺腺癌细胞株 HCC827、A549、H1299 均使用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,常规培养传代至对数生长期。根据文献报道及预实验结果,设置对照组(CON 组)、溶剂对照组(DMSO 组, 20 $\mu\text{mol/L}$) 和不同浓度厄洛替尼处理组(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)。

1.2.2 CCK-8 法进行细胞活力检测

取对数生长期细胞接种于 96 孔板(5 000 个/孔)。培养贴壁后,分别加入 0、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的厄洛替尼,并设 DMSO(20 $\mu\text{mol/L}$)组为溶剂对照,每组设 5 个复孔,每孔终体积为 200 μL 。继续培养 24 h 后,每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL ,孵育 2 h,在酶标仪上选择 450 nm 波长测定光吸收值,绘制细胞生长抑制率曲线,并计算半数抑制浓度(IC_{50})。

1.2.3 Western blot 检测自噬蛋白 LC3、Beclin-1 表达

取对数生长期细胞,将细胞数调整为 4×10^5 个/mL,接种于 5 个 60 mm 细胞培养皿中,每瓶 4 ml。培养贴壁后加入含厄洛替尼终浓度为 0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的 RPMI-1640 培养基,并设 DMSO 20 $\mu\text{mol/L}$ 组为溶剂对照,培养 24 h 后收集细胞。加入 RIPA 裂解细胞,低温高速离心后提取上清为总蛋白,BCA 试剂盒进行蛋白定量。配置 12%SDS-PAGE 凝胶,按 HCC827、

H1299、A549 细胞 16、20、20 μg /孔加样后凝胶电泳,将电泳分离的蛋白转印至 0.2 nm PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭。一抗分别用 LC3(1:1 000)、Beclin-1(1:500)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。分别加入对应的辣根过氧化物酶标记二抗(1:5 000 稀释),室温孵育 1 h,ECL 显色压片,结果经自动电泳凝胶成像分析仪采集。以 β -actin 作为内参,Image J 灰度分析软件分析结果。

1.2.4 细胞免疫荧光法检测自噬蛋白 LC3、Beclin-1 表达

取对数生长期细胞以 1×10^5 个/孔接种于 24 孔板,待细胞贴壁后,加入含厄洛替尼终浓度为 0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的 RPMI-1640 培养基,并设 DMSO 20 $\mu\text{mol/L}$ 组为溶剂对照组,培养 24 h。4%多聚甲醛固定 30 min,含 1%BSA 的 0.1%Triton-X100/PBS 封闭液反应 1 h,一抗分别用 LC3(1:200)、Beclin-1(1:150),室温反应 1 h 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。二抗使用 Alexa Fluor488 标记山羊抗兔 IgG(1:500),避光室温反应 1 h。DAPI 染核 10 min 后,于荧光显微镜(Observer A1, Zeiss 公司,德国)下观察拍照。

1.3 统计学方法

所有数据均为 3 次独立实验结果。采用 SPSS17.0 统计软件进行统计学分析,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间两两比较采用方差分析, $P \leq 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 厄洛替尼对 HCC827、A549、H1299 细胞活力的影响

厄洛替尼抑制 HCC827、A549、H1299 细胞增殖,细胞增殖抑制率由高到低分别为 HCC827、A549、H1299,并呈浓度依赖性。5~40 $\mu\text{mol/L}$ 的厄洛替尼处理 HCC827、A549、H1299 细胞 24 h, IC_{50} 分别为 8.72、32.09、87.46 $\mu\text{mol/L}$ (图 1)。

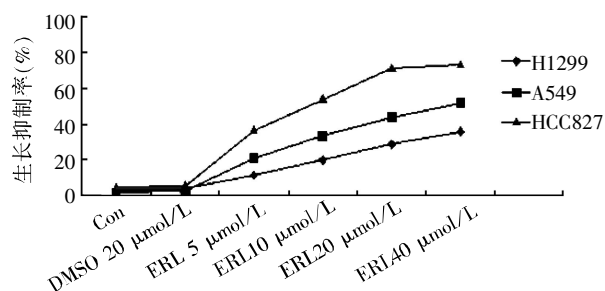
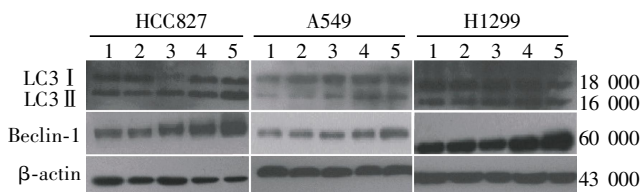


图 1 厄洛替尼(ERL)对 HCC827、A549、H1299 细胞的增殖抑制作用

Figure 1 Effects of erlotinib on the proliferation inhibition of HCC827, A549 and H1299 cells

2.2 厄洛替尼对 HCC827、A549、H1299 细胞自噬相关蛋白表达的影响

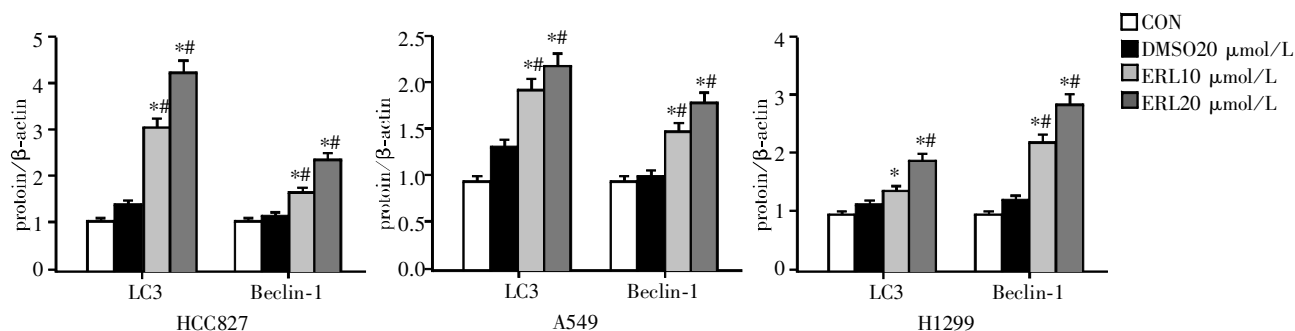
Western blot 检测结果显示:与对照组相比,厄洛替尼处理组可促进 LC3- I 向 LC3- II 转化,并上调 Beclin-1 蛋白表达水平,且随着厄洛替尼浓度增加而增加,3 种细胞 LC3- II 及 Beclin-1 的表达呈剂量依赖性(图 2~4)。



1: CON; 2: DMSO 20 μmol/L; 3: ERL 5 μmol/L; 4: ERL 10 μmol/L; 5: ERL 20 μmol/L。

图 2 厄洛替尼(ERL)处理 HCC827、A549、H1299 细胞 24 h 后 LC3、Beclin-1 蛋白表达

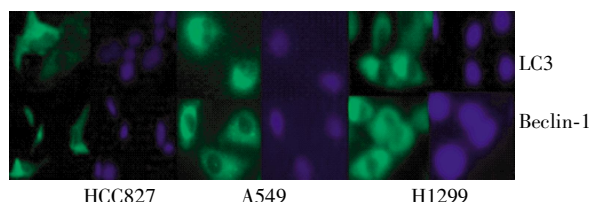
Figure 2 The expressions of LC3 and Beclin-1 of HCC827, A549 and H1299 cells treated by erlotinib for 24 h



与对照组相比差异有统计学意义, * $P < 0.05$; 不同浓度厄洛替尼组比较差异有统计学意义, # $P < 0.05$ 。

图 3 厄洛替尼(ERL)处理 HCC827、A549、H1299 细胞 24 h 后 LC3、Beclin-1 蛋白表达的灰度分析

Figure 3 Gray analysis for LC3 and Beclin-1 of HCC827, A549, H1299 cells treated by erlotinib for 24 h



绿色明亮荧光提示 LC3、Beclin-1 蛋白阳性表达,蓝色部分为同一视野下 DAPI 染核图片。

图 4 厄洛替尼(ERL)处理 HCC827、A549、H1299 细胞 24 h 后 LC3、Beclin-1 蛋白表达($\times 400$)

Figure 4 The expressions of LC3 and Beclin-1 of HCC827, A549 and H1299 cells treated by erlotinib for 24 h($\times 400$)

话机制,研究 TKIs 与肺癌自噬间的关系可能为寻找减少 TKIs 耐药的治疗手段提供新思路。自噬对

3 讨论

程序性细胞死亡方式包括凋亡和自噬,两者间错综复杂的交叉对话机制在癌肿发生发展过程中发挥重要作用。厄洛替尼对肿瘤细胞的增殖抑制作用是凋亡及其他细胞死亡方式共同作用的结果。目前公认 EGFR-TKIs 通过介导细胞凋亡实现杀伤肿瘤细胞的作用,而 EGFR-TKIs 与自噬间的研究报道相对较少。Autophagy 源于希腊语,1962 年 Ashford 和 Porter 首次在肝细胞中发现存在“自我吞噬”现象故以此命名,是真核细胞中普遍存在的一种通过溶酶体吞噬和降解自身成分的机制。自噬与肿瘤密切相关,一方面自噬有利于肿瘤细胞在营养缺乏、乏氧等不利环境中生存并保持其活性^[3],另一方面当细胞的损伤超过自噬保护负荷后,线粒体的准凋亡因子将激活细胞死亡程序从而诱导后续的凋亡^[4]。凋亡逃逸与肿瘤耐药密切相关。自噬作为另一种程序性细胞死亡方式与凋亡存在交叉对

肿瘤具有双向作用,可能是肿瘤发展不同阶段、组织类型、细胞分化状态、组织微环境以及特定的基因特征和信号转导途径共同影响着自噬的活性和结果^[5]。高自噬活性增强肿瘤细胞在恶劣环境下的生存能力,是晚期肿瘤细胞对抗各种抗肿瘤作用维持生存的有效手段^[6]。本研究聚焦于厄洛替尼对非小细胞肺癌细胞增殖与自噬相关蛋白表达的影响,为进一步通过调控自噬影响细胞增殖从而增进 TKIs 疗效提供初步的实验基础。

本研究首先观察了厄洛替尼对 HCC827、A549、H1299 细胞株的增殖抑制,上述 3 种细胞对厄洛替尼的敏感性依次降低。与 EGFR 野生型细胞株 A549、H1299 不同,HCC827 细胞株在 EGFR 酪氨酸激酶区域有 1 个获得性 E746-A750 缺失突变,

EGFR 基因表型差异可解释上述细胞株对厄洛替尼敏感性差异,为临床上 EGFR 基因检测预测 TKI 治疗晚期非小细胞肺癌疗效提供实验依据。肺癌的发生发展是多基因异常协同积累的过程,上游基因 p53 突变是早期的频发事件^[7]。p53 是重要的肿瘤抑制基因。p53 功能失调会导致细胞周期调控失衡,凋亡下降以及基因组不稳定性。为了进一步评估 p53 对 EGFR 基因野生型非小细胞肺癌耐药性的影响,本研究纳入了 p53 野生型的 A549 细胞株和 p53 缺失突变型的 H1299 细胞株,观察到在用相同浓度的厄洛替尼处理 24 h 条件下,A549 细胞株的细胞增殖抑制均高于 H1299,A549 细胞株 IC₅₀ 32.09 μmol/L,低于 H1299 细胞株的 IC₅₀ 87.46 μmol/L,结果提示 p53 缺失与 TKI 耐药现象可能相关。Gorzalczany 等^[8]研究提示联合使用 TKI 和自噬诱导剂雷帕霉素可能对部分 p53 基因缺失 TKI 治疗无反应的患者有益。本研究同时支持联合多项基因检测对预测个体化分子靶向治疗疗效具有良好的临床应用前景,其机制有待深入研究。

自噬的标志为在细胞浆内出现双层膜结构的自噬体。本研究以自噬体特异性标记蛋白 LC3 和 Beclin-1 为观察对象,评价厄洛替尼诱导非小细胞肺癌细胞株自噬的水平及浓度之间的关系。微管相关蛋白轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3,MAPLC3),简称 LC3,定位于前自噬泡和自噬泡膜表面。LC3 有 I 型和 II 型之分。自噬发生时,I 型 LC3 经泛素样加工修饰后与自噬膜表面的磷脂酰乙醇胺(PE)结合,形成 II 型 LC3,后者的水平与自噬泡数量直接相关^[9]。另一特异性基因 Beclin-1 也称 BECN1 基因,是第一个被鉴定介导哺乳动物自噬的基因,为 PI3K 通路下游的肿瘤抑制基因,编码的多功能蛋白 Beclin-1 属酵母 Atg96 同源蛋白,通过与 III 型 PI3K 形成复合体,介导自噬蛋白定位到前自噬小体,参与自噬体的形成,对自噬起正调控作用,并在肿瘤细胞分化、自噬、凋亡方面起着桥梁作用^[10]。本研究通过免疫荧光法检测和 Western blot 证实空白对照组 HCC827、A549、H1299 细胞株即存在基础水平的自噬现象,厄洛替尼处理能进一步诱发上述细胞自噬水平升高,且呈现浓度依赖性,提示自噬参与肿瘤的发生、发展,并可能与临床 TKI 继发性耐药现象相关,为进一步通过调控自噬减少 TKI 耐药提供初步的实验基础。

自噬的信号转导错综复杂,大致可以分为非 mTOR 依赖的信号通路和 mTOR 信号通路。前者主

要包括磷酸肌醇信号转导、IP3 负调控、Ca²⁺-calpain-Gsa 信号通路等;mTOR 信号通路通过直接磷酸化 Atg13,改变 Atg13 和 Atg1 的结合状态,影响自噬体的形成,主要受 PI3K 通路、AMPK、p53 的调节^[11],PI3K 通路中磷酸化 Beclin-1 结合 III 型磷脂酰肌醇三磷酸激酶,通过 PI3K/Akt/mTOR 调节自噬参与肿瘤发生、发展^[12]。本研究通过联合检测 Beclin-1 和 LC3 证实 mTOR 依赖途径参与厄洛替尼诱导非小细胞肺癌的自噬。EGF 能通过 Ras/MAPK、PI3K/Akt 和 JAK/STATs 3 条途径参与肿瘤发生发展^[13],其中 PI3K/Akt/mTOR 为 TKIs 诱导凋亡重要途径^[14]。由此推测自噬和凋亡可能共享了部分信号通路(譬如 PI3K 通路),其中涉及的靶基因及其产物具有多样化的生物学行为,在细胞死亡途径中既相互促进又相互排斥,复杂而精细地调控肿瘤细胞存亡。另有研究表明 EGFR-TKIs 诱发的自噬可能是非 EGFR 依赖性的,TKIs 可能有其他靶点,如非酪氨酸激酶受体等^[15]。

本研究发现厄洛替尼诱导 HCC827、A549、H1299 细胞株发生自噬,提示自噬参与上述肺癌细胞死亡信号的转导,自噬可能成为抗肿瘤治疗中极具潜质的靶标。文献报道自噬抑制剂羟基氯喹联合抗肿瘤药物具有协同效应并能减少化疗药物的耐药,具有成为肿瘤治疗药物的潜能^[16]。未来通过药物或基因技术抑制自噬可能有助于提高厄洛替尼抑制肿瘤细胞的活性,有望成为应对耐药的有效治疗策略,对治疗非小细胞肺癌等基础自噬活性高的肿瘤具有潜在的应用价值。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90
- [2] Brugger W, Thomas M. EGFR-TKI resistant non-small cell lung cancer(NSCLC):new developments and implications for future treatment[J]. Lung Cancer, 2012, 77(1):2-8
- [3] Kuma A, Mizushima N. Physiological role of autophagy as an intracellular recycling system:with an emphasis on nutrient metabolism[J]. Semin Cell Dev Biol, 2010, 21(7):683-690
- [4] Sy LK, Yan SC, Lok CN, et al. Timosaponin A-III induces autophagy preceding mitochondria-mediated apoptosis in HeLa cancer cells [J]. Cancer Res, 2008, 68(24):10229-10237
- [5] Parkhitko AA, Favorova OO, Henske EP. Autophagy:mechanisms, regulation, and its role in tumorigenesis[J]. Bio-