

表皮生长因子受体突变细胞系H1650 耐药机制探讨

韩瑞丽 王小丽 钟殿胜 赵娟 陈哲 孙琳琳 王竞 张金棒

【摘要】背景与目的 表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 高表达和突变与40%左右的肺癌有关, 已成为靶向治疗药物研究热点; 随着Gefitinib和Erlotinib作为EGFR酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitor, TKI) 代表药物应用于临床, 继而产生的耐药现象亦成为临床一大难题, 部分耐药机制仍不清楚。本研究探讨非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 细胞系H1650耐药机制。方法 选用real-time RT-PCR检测EGFR野生型NSCLC细胞系中EGFR mRNA表达水平; MTT检测癌细胞对Erlotinib的药物敏感性; Western blot检测EGFR突变NSCLC细胞系突变情况和Erlotinib及PI3K抑制剂 (LY294002) 对EGFR突变型NSCLC细胞下游信号蛋白磷酸化水平的影响。结果 EGFR野生型细胞系中, EGFR mRNA表达水平高低不一, 但均对Erlotinib耐药; EGFR突变型细胞系中, HCC827和H1650为同种突变类型, HCC827对Erlotinib敏感, H1650则相对耐药; 检测显示, H1650细胞中PTEN表达缺失, 给予Erlotinib和LY294002处理后, HCC827中p-AKT明显被抑制, 但H1650中p-AKT下调不明显。结论 在NSCLC细胞系中, Erlotinib药物敏感性与EGFR的mRNA表达高低无关, 但与EGFR的突变类型有关; H1650对Erlotinib相对耐药可能与PTEN缺失导致的p-AKT持续活化有关。

【关键词】 肺癌; 表皮生长因子受体; 突变; Erlotinib耐药

【中图分类号】 R734.2

Molecular Mechanism of Erlotinib Resistance in Epidermal Growth Factor Receptor Mutant Non-small cell Lung Cancer Cell Line H1650

Ruili HAN¹, Xiaoli WANG¹, Diansheng ZHONG^{2,3}, Juan ZHAO¹, Zhe CHEN¹, Linlin SUN³, Jing WANG³, Jinbang ZHANG¹

¹Department of Respiratory Medicine; ²Department of Medical Oncology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China; ³Tianjin Lung Cancer Institute, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Ruili HAN and Xiaoli WANG contributed equally to this paper.

Corresponding author: Diansheng ZHONG, E-mail: zhongdsh@hotmail.com

【Abstract】 Background and objective Epidermal growth factor receptor (EGFR) overexpression and mutations were existed in more than 40% of the lung cancer, and it's the one of molecular targets in clinical treatment. But the EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKI)-resistance is becoming a challenging clinical problem as following the application of EGFR-TKIs, Gefitinib or Erlotinib. However, the mechanistic explanation for resistance in the some cases is still lacking. Here we researched the resistance mechanism of H1650 cells. **Methods** Using real-time RT-PCR to analyze the EGFR mRNA expression level in EGFR wild-type non-small cell lung cancer (NSCLC) cells; MTT analysis detected the cytotoxicity for NSCLC cells to Erlotinib; Western blot analysis examined the mutant situations and the downstream signaling protein phosphorylation level in EGFR-mutant NSCLC cells with the treatment of Erlotinib or/and PI3K inhibitor, LY294002. **Results** In the EGFR wild-type NSCLC cells, the expression level of EGFR mRNA varied dramatically and all the cells showed resistant to Erlotinib; In the EGFR-mutant cells, HCC827 and H1650 (the same activating-mutation type), HCC827 cells were Erlotinib-sensitive as well as H1650 demonstrated primary relative resistance. Western blot analysis showed the loss of PTEN and the p-AKT level was not inhibited with the treatment of Erlotinib or/and LY294002 in H1650 cells, while HCC827 cells were no PTEN loss and definitively decrease of p-AKT level. **Conclusion** EGFR wild-type NSCLC cells were resistant to Erlotinib no matter of how EGFR mRNA expression level. EGFR-activating mutations correlated with responses to Erlotinib. The PTEN loss and activa-

本研究受国家自然科学基金资助项目 (No.30971307, No.81071915) 和天津市应用基础及前沿技术研究 (No.10JCYBJC13700) 资助

韩瑞丽与王小丽为共同第一作者

作者单位: 300052 天津, 天津医科大学总医院呼吸科 (韩瑞丽, 王小丽, 赵娟, 陈哲, 张金棒); 肿瘤科 (钟殿胜); 天津市肺癌研究所 (钟殿胜, 孙琳琳, 王竞) (通讯作者: 钟殿胜, E-mail: zhongdsh@hotmail.com)

tion of AKT signaling pathway contributed to Erlotinib resistance in *EGFR*-mutant NSCLC cell line H1650.

【 Key words 】 Lung neoplasms; Epidermal growth factor receptor; Mutation; Erlotinib resistance

This study was supported by the grants from National Natural Science Foundation of China (to Diansheng ZHONG)(No.30971307, No.81071915) and Tianjin Natural Science Foundation (to Diansheng ZHONG) (No.10J CY-BJC13700).

肺癌主要分为非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 和小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC), 其中80%-85%为NSCLC。尽管现代医学的诊疗技术已经有了相当的进展, 采取了手术为主、放化疗等综合治疗手法, 肺癌总的5年生存率仍只有13%-15%^[1]。研究^[2,3]发现, 表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, *EGFR*) 在50%-90%的NSCLC患者中高表达, 参与肿瘤的血管新生、迁移和粘附过程, 其扩增和突变已被认为是肺部肿瘤发生的主要机制之一。厄洛替尼 (Erlotinib, Tarceva) 是*EGFR*酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitor, TKI), 通过特异性结合在*EGFR*胞内酪氨酸激酶区域抑制*EGFR*活化而发挥抗癌作用^[4]。本研究探讨了NSCLC细胞系*EGFR*基因的表达水平及其抑制剂Erlotinib对NSCLC细胞系的毒性作用。

1 材料与方法

1.1 材料 人NSCLC细胞系A549、H460、H157、H1299、H1792、CALU-1、H1650、H1975和HCC827购自美国模式培养物集存库 (American Type Culture Collection, ATCC)。RPMI-1640培养基、新生小牛血清购于GIBCO公司; Trizol Reagent购自美国Invitrogen公司; 反转录试剂、SYBR Premix Ex Taq购自TAKARA公司, MTT试剂盒购于美国Promega公司, p-AKT、p-ERK、AKT、ERK、PTEN抗体均购于美国Cell Signaling Technology公司, GAPDH抗体购于美国Santa Cruz公司, 二抗HRP-羊抗兔IgG、二抗羊抗鼠IgG购于北京中杉生物技术有限公司, PVDF膜购于美国Amersham Biosciences。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含10%小牛血清的RPMI-1640培养基、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素配制1640完全培养基, 37 °C、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中传代培养, 0.125%胰酶消化传代, 3 d-4 d传一代。所有实验均采用对数生长期细胞。

1.2.2 Real-time RT-PCR 用Trizol试剂提取处于对数生长期细胞总RNA, 反转录mRNA为cDNA, 使用real-time RT-PCR技术检测基因的表达情况。PCR引物序列

为: *EGFR*: Forward: GCGTTCGGCACGGTGTATAA; Reverse: GGCTTTCGGAGATGTTGCTTC; 参照基因GAPDH: Forward: GGAGTCAACGGATTTGGTTCG; Reverse: CTGTGATTTGGAGGGATCTCG, 扩增长度为240 bp。PCR扩增体系20 μL, 第一步: 预变性 95 °C、30 s、1个循环, 第二步: PCR反应: 95 °C、5 s, 60 °C、34 s, 40个循环。以GAPDH为内参照, 2^{-ΔΔCT}法计算*EGFR*基因表达差异。

1.2.3 MTT法检测细胞存活率 取对数生长期细胞, 常规胰酶消化制成单细胞悬浮液, 以每孔约5×10³个细胞接种于96孔板, 每孔200 μL, 培养过夜后弃去原液, 分别加入终浓度为1×10⁻³ μM/L、1×10⁻² μM/L、1×10⁻¹ μM/L、1 μM/L、10 μM/L和20 μM/L的Erlotinib, 对照组加入等量的培养基, 每组设4个复孔, 72 h后进行MTT试验, 并绘制细胞生长曲线。

1.2.4 Western blot方法 按照文献^[5], 提取细胞总蛋白, BCA法测定蛋白浓度, 取50 μg蛋白上样, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜、封闭, 一抗4 °C过夜, 二抗室温1 h, 使用ECL化学发光试剂工作液进行蛋白信号检测, GAPDH作为蛋白加样对照。

2 结果

2.1 *EGFR*野生型NSCLC细胞系中*EGFR* mRNA表达水平及与Erlotinib细胞毒性相关性的研究

2.1.1 *EGFR*野生型NSCLC细胞系中*EGFR* mRNA表达水平 利用real-time RT-PCR技术检测了6种*EGFR*野生型NSCLC细胞系中*EGFR* mRNA表达水平。实验结果显示 (图1), H157表达水平最低; A549和CALU-1表达水平相对较低; H460和H1792表达水平较高; H1299表达水平最高, 约为H157的2,621倍, 为*EGFR*高表达的细胞系。

2.1.2 Erlotinib对上述细胞系的毒性作用 6株细胞系分别在7个浓度梯度的Erlotinib培养液中培养72 h, 利用MTT方法检测细胞毒性, 结果显示 (图2): 随着药物浓度的倍增, Erlotinib对各细胞系的生长抑制作用并没有明显增强, 均表现为明显的耐药性。其中在1 μM Erlotinib的浓度, H157细胞系的生长抑制率约为10%, A549和Calu-1的

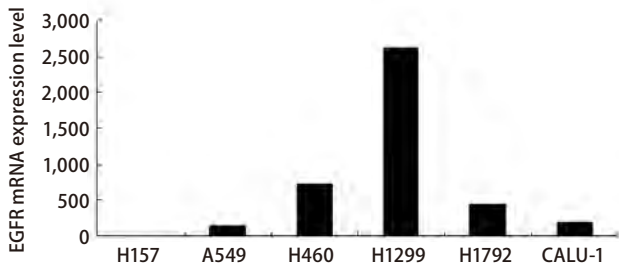


图1 *EGFR*野生型NSCLC细胞系中*EGFR* mRNA表达水平
Fig 1 The epidermal growth factor receptor (*EGFR*) mRNA expression level in *EGFR* wild-type non-small cell lung cancer (NSCLC) cells

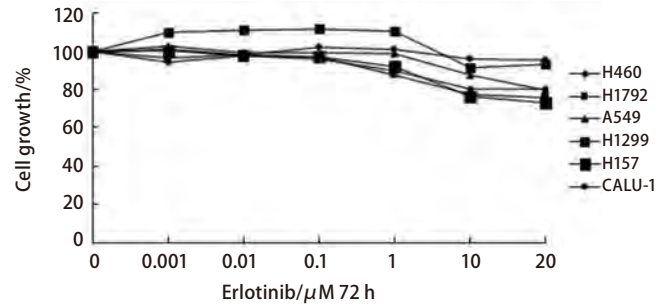


图2 MTT方法检测*EGFR*野生型NSCLC细胞对Erlotinib药物敏感性
Fig 2 The measurement of cytotoxicity for *EGFR* wild-type NSCLC cells to Erlotinib by MTT assay

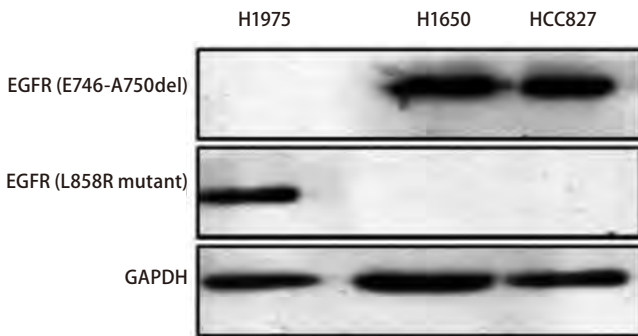


图3 Western blot方法检测*EGFR*的突变情况
Fig 3 The *EGFR* mutations in H1975, H1650 and HCC827 cells

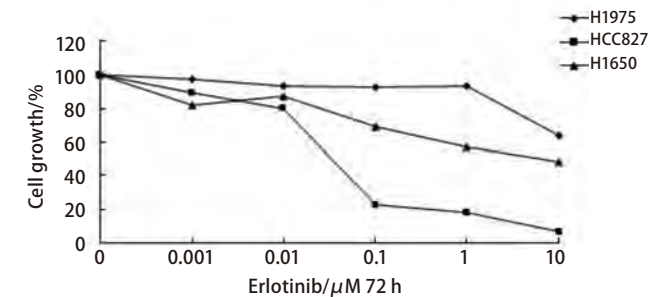


图4 MTT检测*EGFR*突变细胞系对Erlotinib药物敏感性
Fig 4 The measurement of cytotoxicity for *EGFR*-mutant NSCLC cells to Erlotinib by MTT assay

生长抑制率约为0，H460和H1792细胞系的生长抑制率分别约为12%和15%，而高表达*EGFR*的H1299细胞系的生长抑制率为0；在10 μM Erlotinib的浓度，H157细胞系的生长抑制率为24%，A549和Calu-1细胞系的生长抑制率分别约为10%和2%，H460和H1792的生长抑制率分别约为20%和21%，H1299的生长抑制率8%。上述结果表明，*EGFR*野生型NSCLC细胞系对Erlotinib耐药，且Erlotinib的细胞毒性与*EGFR* mRNA表达水平高低无关。

2.2 Erlotinib对*EGFR*突变型NSCLC细胞系毒性作用的研究 肺癌中*EGFR*突变多见于外显子18-21，即胞内酪氨酸激酶编码区，最常见突变形式包括外显子19的E746-A750del和外显子21的L858R点突变，这两种突变约占*EGFR*突变的85%-90%^[6]，发生这两种突变的肿瘤细胞对*EGFR*-TKIs敏感，称为活化突变。部分肿瘤细胞可发生二次突变，最常见二次突变为外显子20的T790M突变，为耐药突变^[7]。

H1650和HCC827细胞系均为*EGFR*外显子19的E746-A750del突变，H1975细胞系为外显子21 L858R点突变，

但同时伴有外显子20的T790M二次突变。我们利用Western blot验证了上述3种NSCLC细胞系中*EGFR*的突变情况（图3）。

3株细胞系分别在7个浓度梯度Erlotinib的培养液中培养72 h，细胞毒性实验结果显示（图4），Erlotinib能够明显抑制HCC827的生长，呈明显的浓度相关性， IC_{50} 为0.03 μM ；H1975对Erlotinib高度耐药，这些结果均与预期的一致。但实验结果显示，H1650细胞系对Erlotinib相对耐药，约为HCC827的167倍，与预期的推测不一致。

2.3 Erlotinib对H1650细胞信号传导途径的影响 *EGFR*主要的信号传导通路包括：Ras/Raf/MEK/ERK通路和PI3K/AKT通路。*EGFR*与*EGFR*-TKI结合后，抑制*EGFR*本身磷酸化，从而抑制其下游相应的信号蛋白的磷酸化。

我们用10 μM Erlotinib处理HCC827和H1650细胞2 h，结果显示，在HCC827细胞中，AKT和ERK的磷酸化水平均明显下调（图5），提示Erlotinib可以明显抑制其细胞内*EGFR*下游的信号通路；在H1650细胞中，p-ERK水平呈明显下降，但AKT的磷酸化水平无明显下降（图5）。

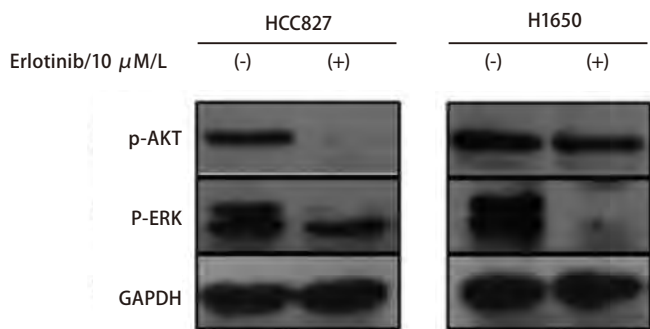


图5 Western blot方法检测Erlotinib处理HCC827和H1650后p-ERK、p-AKT的表达水平

Fig 5 HCC827 and H1650 cells were treated with Erlotinib for 2 h, Anti-p-AKT and anti-p-ERK antibody was used to detect AKT and ERK phosphorylation, with GAPDH as the loading control.

Sos等^[8]发现在H1650细胞中有PTEN的缺失。我们实验结果也证实了在H1650细胞中存在PTEN的缺失(图6)。

蛋白酪氨酸磷酸酶(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosometen, PTEN)是具有蛋白与脂质磷酸酯酶活性的双特异性磷酸酯酶,能特异地使磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸3'位脱磷酸,抑制Akt的磷酸化^[9]。PTEN的缺失可以导致Akt的活化,从而可以解释Erlotinib为什么不能抑制H1650细胞AKT磷酸化水平,但可抑制ERK的磷酸化。为了进一步探讨H1650耐药与PTEN表达缺失的相关性,我们用10 μM LY294002(PI3K抑制剂)处理H1650及HCC827细胞2 h,进而检测p-AKT的水平,结果显示(图7)HCC827细胞的p-AKT明显抑制,但对H1650细胞的p-AKT抑制作用不明显,进一步证实了因为PTEN的缺失, H1650的AKT磷酸化水平不受其上游调节;因为LY294002对Ras/Raf/MEK/ERK通路无作用,所以两种细胞系的p-ERK水平未被抑制(图7)。

综合上述结果, H1650细胞系对Erlotinib相对耐药可能与PTEN缺失导致AKT信号传导通路异常活化有关,而与Ras/Raf/MEK/ERK信号途径无关。

3 讨论

肺癌是死亡率最高的癌症之一,其中约80%-85%为NSCLC^[10],由于约70%的患者在就诊时已处于晚期,失去了手术的机会,且NSCLC对铂类等化疗药物的反应差,其5年生存率只有15%左右^[11]。

EGFR是原癌基因*C-erbB1*的表达产物,属于酪氨酸激酶生长因子受体家族成员之一,EGFR主要的信号传

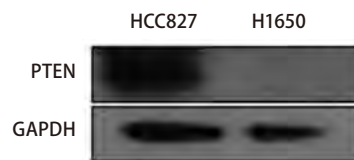


图6 Western bot检测HCC827和H1650细胞中PTEN的表达水平
Fig 6 No PTEN protein detected in H1650 cells

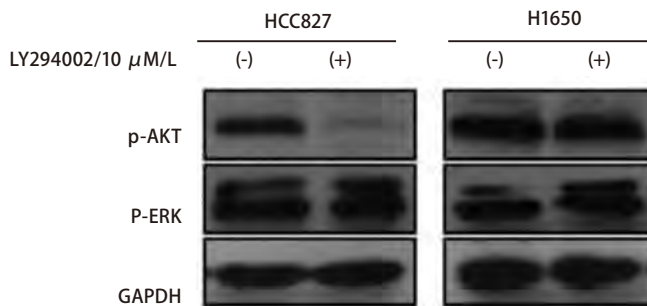


图7 Western blot检测经LY294002处理后的HCC827和H1650细胞系的p-AKT、p-ERK表达水平

Fig 7 HCC827 and H1650 cells were treated with LY294002 (PI3K inhibitor) for 2 h, Anti-p-AKT and anti-p-ERK antibody was used to detect AKT and ERK phosphorylation, with GAPDH as the loading control.

导通路包括Ras/Raf/MEK/ERK通路和PI3K/AKT通路。在肿瘤细胞中,EGFR基因突变和扩增可使EGFR酪氨酸激酶不恰当激活,促进肿瘤的血管生成和肿瘤细胞的增殖、粘附、侵袭和转移。研究^[12]显示, NSCLC伴转移的患者中,60%以上存在EGFR过度表达,且与这些患者的预后密切相关,因此以EGFR为靶点的抗癌治疗日益受到关注。EGFR突变主要发生在胞内酪氨酸激酶编码区,多发生于基因外显子18、19、20和21,与EGFR-TKIs敏感性相关的主要是位于外显子18、21的点突变和外显子19的缺失突变。其中,外显子21的点突变,使EGFR蛋白中该位点的氨基酸由亮氨酸转变为精氨酸(L858R);外显子19第746-750位密码子的缺失(19 exon E746-A750del)导致EGFR蛋白中氨基酸序列丢失,改变了受体酪氨酸激酶ATP结合槽的角度。

EGFR-TKIs通过与ATP竞争,结合于EGFR-TK胞内端的催化区域(EGFR结构域中高度保守的ATP结合位点),阻止EGFR的自磷酸化及下游的信号传导。EGFR-TKIs代表药物, Gefitinib或Erlotinib,作为二线药物已应用于标准化疗无效的NSCLC;对于存在EGFR突变的晚期NSCLC患者,EGFR-TKI一线化疗药物应用于临床已经得到了专家的共识^[13]。但随着EGFR-TKI临床应用的

日益增多,其耐药现象已成为临床工作中一大难题。引起耐药的原因多种多样,主要分为原发性和继发性耐药^[14],原发性耐药机制包括KRAS突变^[15];继发性耐药机制主要包括EGFR外显子20的T790M突变(苏氨酸转变为甲硫氨酸)和C-MET扩增两种,约占所有耐药机制的70%,尚有30%-40%患者耐药机制不清楚^[16]。

本研究显示,EGFR野生型NSCLC细胞系对Erlotinib均耐药,且Erlotinib的药物敏感性与EGFR的mRNA表达水平无关,但与EGFR突变类型相关;具有EGFR外显子19缺失突变的H1650细胞对Erlotinib相对耐药。Guo等^[17]发现在H1650细胞株中,PTEN蛋白表达缺失,因此对AKT的抑制作用消失。Yamamoto等^[18]用Gefitinib处理PC-9细胞系(存在EGFR外显子19缺失突变)7个月后诱导出耐药细胞系,经验证发现,耐药细胞系是由于PTEN蛋白表达缺失导致对Gefitinib耐药的;他们用免疫组化的方法对4例Gefitinib获得性耐药的肺癌患者进行了治疗前后PTEN蛋白表达水平的比较,其中3例患者PTEN表达水平明显低于治疗前,考虑PTEN蛋白表达水平的缺失与Gefitinib获得性耐药有关。我们的实验结果也验证了在H1650细胞中存在PTEN蛋白表达的缺失,同时发现Erlotinib虽然可以抑制H1650细胞中的p-ERK水平,但p-AKT的水平无明显变化。因此推测,H1650对Erlotinib耐药可能与PTEN缺失有关。进一步应用PI3K抑制剂LY294002处理H1650细胞,发现其也不能抑制H1650细胞的p-AKT水平,进一步证实H1650细胞p-AKT水平不受其上游调节,其对Erlotinib相对耐药与PTEN表达缺失导致AKT信号传导通路异常活化有关,而与Ras/Raf/MEK/ERK信号途径无关。

此外,亦有文献报道H1650对Erlotinib的耐药可能与抑制BIM上调^[19]和肿瘤细胞从上皮细胞向间充质细胞转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)^[20]有关,这些均有待于我们在未来的研究中进一步证实。

参 考 文 献

- 1 Sehgal SN. Rapamune (sirolimus, rapamycin): An overview and mechanism of action. *Ther Drug Monit*, 1995, 17(6): 660-665.
- 2 Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, et al. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*, 1995, 19(3): 183-232.
- 3 Idbaih A, Aimard J, Boisselier B, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2009, 35(2): 208-213.
- 4 Gurrpide A, Perez-Gracia JL, Lopez-Picazo JM, et al. Activity of gefitinib in central nervous system metastases in patients with non-small-cell lung cancer: two case reports and a review of the literature. *Clin Lung Cancer*, 2005, 7(2): 138-140.
- 5 Zhong D, Guo L, de Aguirre I, et al. LKB1 mutation in large cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2006, 53(3): 285-294.
- 6 Gazdar AF, Shigematsu H, Herz J, et al. Mutations and addiction to EGFR: The achilles 'heal' of lung cancers? *Trends Mol Med*, 2004, 10(10): 481-486.
- 7 Kosaka T, Yamaki E, Mogi A, et al. Mechanisms of resistance to EGFR-TKIs and development of a new generation of drugs in non-small-cell lung cancer. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011: 165214.
- 8 Sos ML, Koker M, Weir BA, et al. PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR. *Cancer Res*, 2009, 69(8): 3255-3261.
- 9 Georgescu MM. PTEN tumor suppressor network in PI3K-Akt pathway control. *Genes Cancer*, 2010, 1(12): 1170-1177.
- 10 Sher T, Dy GK, Adjei AA. Small cell lung cancer. *Mayo Clin Proc*, 2008, 83(3): 355-367.
- 11 Molina JR, Yang P, Cassivi SD, et al. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survival. *Mayo Clin Proc*, 2008, 83(5): 584-594.
- 12 Sharma SV, Bell DW, Settleman J, et al. Epidermal growth factor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(3): 169-181.
- 13 Wu YL, Sun Y, Liao ML, et al. The processing of epidermal growth factor receptor mutation lung cancer. *Xun Zheng Yi Xue*, 2011, 11(2): 65-68. [吴一龙, 孙燕, 廖美琳, 等. EGFR突变型肺癌的处理. *循证医学*, 2011, 11(2): 65-68.]
- 14 Balak MN, Gong Y, Riely GJ, et al. Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(21): 6494-6501.
- 15 Pao W, Wang TY, Riely GJ, et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med*, 2005, 2(1): e17.
- 16 Ghosh G, Lian X, Kron SJ, et al. Properties of resistant cells generated from lung cancer cell lines treated with EGFR inhibitors. *BMC Cancer*, 2012, 12: 95.
- 17 Guo A, Villén J, Kornhauser J, et al. Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(2): 692-697.
- 18 Yamamoto C, Basaki Y, Kawahara A, et al. Loss of PTEN expression by blocking nuclear translocation of EGR1 in gefitinib-resistant lung cancer cells harboring epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer Res*, 2010, 70(21): 8715-8725.
- 19 Deng J, Shimamura T, Perera S, et al. Proapoptotic BH3-only BCL-2 family protein BIM connects death signaling from epidermal growth factor receptor inhibition to the mitochondrion. *Cancer Res*, 2007, 67(24): 11867-11875.
- 20 Inukai M, Toyooka S, Ito S, et al. Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 2006, 66(16): 7854-7858.

(收稿: 2012-10-10 修回: 2012-10-28)
(本文编辑 南娟)