

论著

文章编号:1000-5404(2014)13-1376-04

吉非替尼通过自噬促进 PC-9 肺癌细胞凋亡的实验研究

李 博,叶明翔,姜秀秀,张 艰 (710032 西安,第四军医大学西京医院呼吸内科)

[摘要] 目的 探讨自噬对吉非替尼(Gefitinib)诱导 EGFR 突变型 NSCLC PC-9 细胞凋亡的影响及机制。方法 MTT 法检测 Gefitinib 对 PC-9 细胞的生长抑制作用;AO 染色观察经 Gefitinib 处理后 PC-9 细胞嗜酸性自噬泡(acidic vesicular organelles,AVOs)的变化情况;Western blot 检测自噬标记物 LC3、凋亡相关蛋白 PARP、Caspase-3 以及 Akt/mTOR 信号通路的表达;流式细胞术检测 Gefitinib 及 Gefitinib 联合自噬诱导剂 Rapamycin 作用下细胞凋亡情况。结果 MTT 及流式细胞术显示 Gefitinib 呈剂量依赖性抑制 PC-9 细胞生长并促进其凋亡,AO 染色后,经 Gefitinib 处理的 PC-9 细胞内可观察到红染的 AVOs,Western blot 显示 Gefitinib 能够诱导 PC-9 细胞自噬标记物 LC3 表达。Gefitinib 联合 Rapamycin 显著增强 Gefitinib 对于 PC-9 细胞的杀伤作用,并且降低 PC-9 细胞中 Akt/mTOR 的磷酸化水平。结论 Gefitinib 能够诱导 PC-9 细胞发生自噬,增强细胞自噬能够促进 Gefitinib 杀伤 PC-9 细胞的作用。

[关键词] 非小细胞肺癌;吉非替尼;自噬

[中图分类号] R734.2;R965;R979.19

[文献标志码] A

Gefitinib improves apoptosis in lung adenocarcinoma cell line PC-9 through induction of autophagy

Li Bo, Ye Mingxiang, Jiang Xiuxiu, Zhang Jian (Department of Respiratory Diseases, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi Province, 710032, China)

[Abstract] **Objective** To determine the effect and underlying mechanism of autophagy on the apoptosis in gefitinib-induced non-small cell lung cancer cell (NSCLC) line PC-9 with epidermal growth factor receptor (EGFR)-mutation. **Methods** MTT assay was applied to assess cell viability in PC-9 cells after gefitinib treatment. Acridine orange staining was used to detect the formation of acidic vesicular organelles (AVOs) after the treatment. Western blot analysis was used to determine the expression of autophagy marker LC3, apoptosis-related proteins PARP, Caspase-3 and cleaved Caspase-3, and signal pathway proteins Akt and mTOR. Flow cytometry was used to measure the apoptosis in presence or absence of autophagy inducer rapamycin. **Results** Gefitinib treatment inhibited cell growth and induced cell apoptosis in a dose-dependent manner in PC-9 cells shown by MTT assay and flow cytometry, enhanced autophagy for more AVOs formed by acridine orange staining, and significantly upregulated LC3. Gefitinib in combination with rapamycin promoted cytotoxic effect of gefitinib to PC-9 cells and down-regulated Akt/mTOR phosphorylation. **Conclusion** Gefitinib induces autophagy in PC-9 cells, and induction autophagy facilitates gefitinib-induced apoptosis.

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

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81272518). Corresponding author: Zhang Jian, Tel: 86-29-84771133, E-mail: zhangjian197011@yahoo.com

自噬 (autophagy) 是真核细胞应对内外环境变化的一种应激反应,实现对蛋白质等大分子和细胞器的降解,用于合成新的蛋白质和细胞器,在维持细胞内环境稳定中发挥重要作用^[1]。其监测主要依赖于形态学观察和自噬标记物检测^[2]。研究表明,自噬对于肿

瘤细胞具有“保护”和“杀伤”双重作用^[3]。如骨髓瘤细胞自噬信号增强后肿瘤细胞对阿霉素和长春新碱的敏感性降低,自噬促进细胞存活^[4];而在胶质瘤细胞中活化自噬信号可增强 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 的细胞毒性作用,自噬则发挥杀伤肿瘤细胞的作用^[5]。

吉非替尼 (Gefitinib) 是一种口服的表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂 (epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKIs),临床上用于治疗 EGFR 基因突变的非小细胞肺癌 (non-small-cell

[基金项目] 国家自然科学基金(81272518)

[通信作者] 张 艰,电话:(029)84771133, E-mail:zhangjian197011@yahoo.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140513.0853.004.html> (2014-05-13)

lung cancer, NSCLC)^[6-7]。大规模临床试验表明 EGFR 基因突变的 NSCLC 患者使用 EGFR-TKIs 疗效优于化疗^[8]。近期实验研究显示 Gefitinib 能够诱导 EGFR 野生型 NSCLC A549 和 H1299 细胞自噬,使用氯喹或 siRNA 抑制 Gefitinib 诱导的自噬可以显著增强 Gefitinib 杀伤 A549 和 H1299 细胞的作用,说明 Gefitinib 诱导的自噬对于 EGFR 野生型肺癌细胞具有促生存 (prosurvival) 作用^[9]。但亦有报道证明 Gefitinib 诱导的自噬具有促凋亡 (proapoptotic) 作用^[10-12]。

由此可见,自噬在肿瘤的发生、发展过程中似乎扮演着双重角色,自噬在 NSCLC EGFR 分子靶向治疗中究竟发挥促生存还是促凋亡作用? Gefitinib 诱导的自噬在 EGFR 野生型和 EGFR 突变型 NSCLC 细胞中发挥的作用是否相同? 究竟抑制自噬还是促进自噬有利于 Gefitinib 杀伤肺癌细胞? 这些问题至今尚无定论。本研究综合运用吖啶橙 (acridine orange, AO) 染色、流式细胞术和 Western blot 等方法对这一系列问题进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺腺癌 PC-9 细胞 (EGFR 19 外显子缺失) 由广东省人民医院吴一龙教授惠赠。Gefitinib 由 AstraZenca 公司惠赠,雷帕霉素 (Rapamycin)、四甲基偶氮唑蓝 (MTT)、青链霉素 (P/S)、二甲基亚砷 (DMSO) 购自 Sigma 公司, RPMI1640 培养基购自 HyClone 公司,胎牛血清购自 Gibco 公司,蛋白酶抑制剂 cocktail 购自 Roche 公司, RIPA 细胞裂解液和蛋白定量试剂盒购自博士德生物工程有限公司,兔抗 LC3B、Caspase-3、PARP、mTOR、p-mTOR、Akt、p-Akt 抗体,鼠抗 β -actin 抗体,辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的羊抗兔 IgG、HRP 偶联的羊抗鼠 IgG 购自 Cell Signaling Technology 公司, ECL 发光液购自 Millipore 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 PC-9 细胞用含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 RPMI1640 培养基于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养,待细胞融合度达 80% 时传代,每 2~3 天更换培养液。

1.2.2 MTT 法检测细胞存活率 分别取对数生长期的 PC-9 细胞,经 0.25% 胰酶消化后以 3×10^3 /孔密度接种 96 孔板,过夜使细胞完全贴壁。次日按梯度给予终浓度分别为 5、10、50、100、500 nmol/L、1、5 μ mol/L Gefitinib,每个浓度设置 8 个复孔。培养 48 h 后每孔加入 20 μ L 无菌 5 mg/ml MTT 溶液,继续孵育 4 h 后吸去培养液,每孔加入 100 μ L DMSO,充分震荡,用酶标仪在 570 nm 处测定光密度值 $[D(570)]$,按照公式计算细胞存活率。

细胞存活率 = $[D(570)_{\text{实验孔}} - D(570)_{\text{空白孔}}] / [D(570)_{\text{对照孔}} - D(570)_{\text{空白孔}}] \times 100\%$

1.2.3 AO 染色观察细胞自噬现象 取对数生长期细胞,常规胰酶消化,离心, PBS 漂洗,以 1×10^5 /孔密度接种 6 孔板,待细胞贴壁后分别给予 DMSO (对照), 50、100、500 nmol/L、1 μ mol/L Gefitinib。自噬诱导剂 Rapamycin 作为阳性对照。细

胞经上述处理 48 h 后加入终浓度为 50 μ mol/L 的 AO 染料, 37 °C 避光孵育 15 min, PBS 漂洗 3 次,每次 5 min, 荧光显微镜下观察红染的嗜酸性自噬泡 (acidic vesicular organelles, AVOs)。

1.2.4 Western blot 检测自噬标志蛋白、凋亡相关蛋白以及 Akt/mTOR 信号通路表达水平 收集处理过的细胞,冰上裂解 30 min,超声粉碎细胞后继续裂解 10 min, 4 °C 12 000 r/min 离心 15 min,吸取上清,蛋白定量试剂盒测定蛋白质浓度,加入 1/5 体积的上样缓冲液煮沸 5 min 制备成蛋白样品。取 50 μ g 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳并转移至硝酸纤维素 (NC) 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 抗 LC3B (1:1 000)、Caspase-3 (1:1 000)、PARP (1:1 000)、mTOR (1:1 000)、p-mTOR (1:1 000)、Akt (1:1 000)、p-Akt (1:1 000)、 β -actin (1:1 000) 抗体 4 °C 过夜杂交, HRP 标记的二抗室温孵育 1 h, 滴加 ECL 发光液, 化学发光成像系统成像分析。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率 细胞常规消化离心, 预冷 PBS 漂洗 2 次, 75% 冰乙醇 4 °C 固定, 制备成单细胞悬液, 每个样品加入 10 μ L Annexin V-FITC 和 10 μ L 碘化丙啶 (PI), 充分混合, 流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.3 统计学处理

采用 Graphpad Prism 5.0 软件作图并分析数据。多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 *t* 检验, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。每个实验重复 3 次。

2 结果

2.1 Gefitinib 抑制 PC-9 细胞增殖

PC-9 细胞经不同浓度 Gefitinib (5、10、50、100、500 nmol/L, 1 μ mol/L 和 5 μ mol/L) 处理 48 h 后 MTT 结果显示细胞增殖明显受到抑制, 细胞生存率显著下降, 且 Gefitinib 浓度越大, PC-9 细胞的活力越低 (图 1), 表明 Gefitinib 抑制 PC-9 细胞生长且呈剂量依赖性。

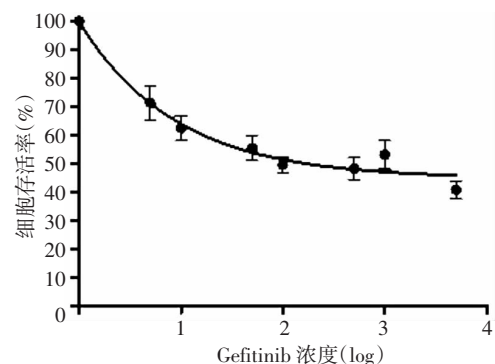


图 1 不同浓度 Gefitinib 作用下 PC-9 细胞的生存曲线

2.2 Gefitinib 诱导 PC-9 细胞凋亡

将 Gefitinib 按照 0、50、100、500 nmol/L、1 μ mol/L 和 5 μ mol/L 浓度梯度作用 PC-9 细胞 48 h, 细胞凋亡率分别为 (0.94 \pm 0.19)%、(7.00 \pm 1.33)%、(15.64 \pm 1.51)%、(19.64 \pm 1.66)%、(28.57 \pm 1.97)%、(38.37 \pm 1.82)%, 细胞凋亡率随着 Gefitinib 浓度的增加而递增 (图 2), Gefitinib 各处理组细胞凋亡率与对照组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

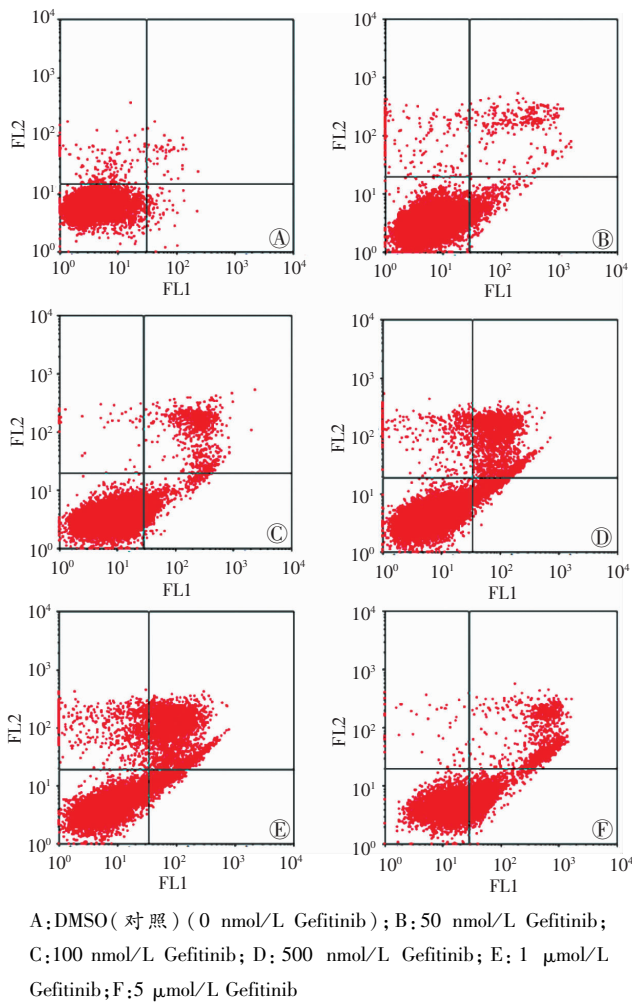


图2 不同浓度 Gefitinib 作用下 PC-9 细胞的凋亡情况

2.3 Gefitinib 诱导 PC-9 细胞发生自噬

经终浓度为 10 nmol/L 的自噬诱导剂 Rapamycin (阳性对照) 处理 48 h 后, PC-9 细胞内出现大量红染的 AVOs。DMSO 处理后细胞很少出现 AVOs。经 Gefitinib 处理后, 细胞内均出现大量红染的 AVOs (图 3)。Western blot 检测结果亦显示, 随着 Gefitinib 浓度的增加, 细胞自噬标记物 LC3 的表达增加 (图 4)。

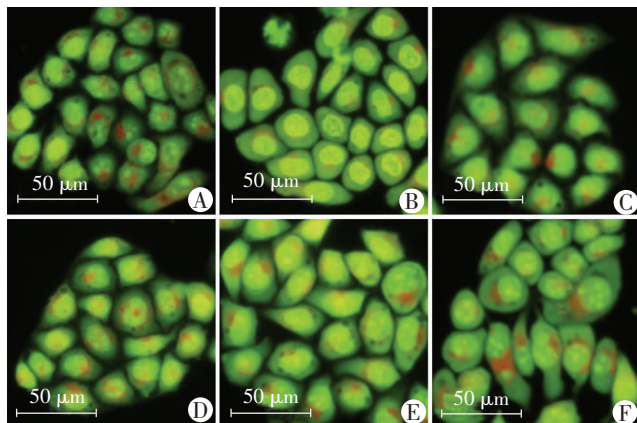


图3 Gefitinib 促进 PC-9 细胞 AVOs 产生

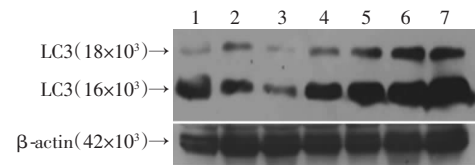


图4 Gefitinib 上调 PC-9 细胞自噬标记物 LC3 表达

2.4 增强自噬促进 Gefitinib 诱导 PC-9 细胞凋亡

流式细胞术结果 (图 5) 显示 1 μmol/L Gefitinib 处理 PC-9 细胞 48 h 可以引起 (25.84 ± 3.53)% 细胞发生凋亡率, 自噬诱导剂 Rapamycin (10 nmol/L) 处理 PC-9 细胞并不引起凋亡, 而 Gefitinib + Rapamycin 联合处理 PC-9 细胞后细胞凋亡率增加为 (45.23 ± 2.57)%, 与 Gefitinib 单药处理组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。Gefitinib 作用于 PC-9 细胞可引起 PARP 剪切及 Caspase-3 活化, 而 Gefitinib + Rapamycin 联合作用于 PC-9 细胞, PARP 剪切和 Caspase-3 活化程度明显增加 (图 6)。

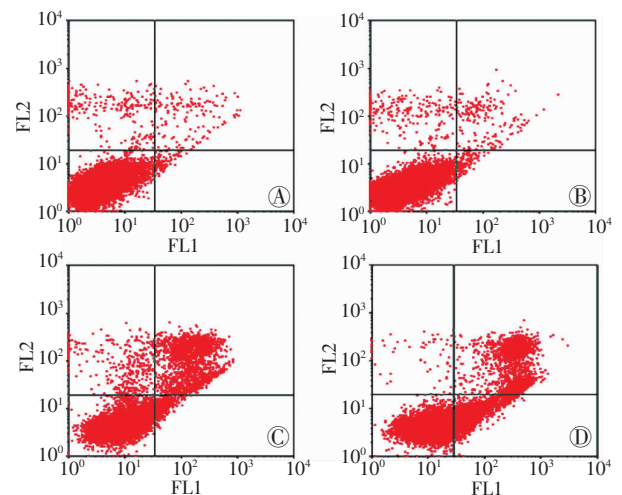


图5 Gefitinib 和 Rapamycin 处理 PC-9 细胞引起细胞凋亡

2.5 自噬抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的活化

Gefitinib 作用于 PC-9 细胞可以引起 PI3K/Akt/mTOR 信号转导抑制, 导致 Akt 和 mTOR 蛋白磷酸化 (p-Akt 和 p-mTOR) 表达减少。自噬诱导剂 Rapamycin 对 PI3K/Akt/mTOR 也有一定抑制作用。当 Gefitinib 联合 Rapamycin 作用于 PC-9 细胞后, PI3K/Akt/mTOR 信号受到强烈抑制, 细胞生存信号明显减弱, 细胞更易发生凋亡或坏死 (图 7)。

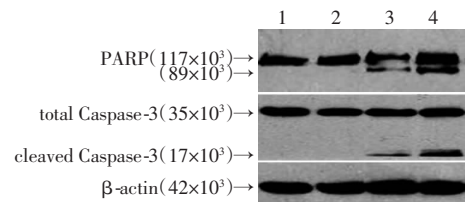
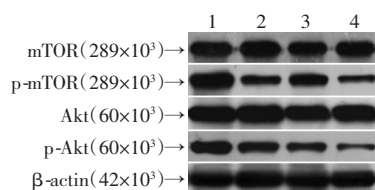


图6 Gefitinib 和 Rapamycin 处理 PC-9 细胞引起凋亡相关蛋白的变化



1: DMSO; 2: 10 nmol/L Rapamycin; 3: 1 μmol/L Gefitinib; 4: 1 μmol/L Gefitinib + 10 nmol/L Rapamycin

图7 Gefitinib 和 Rapamycin 处理 PC-9 细胞 PI3K/Akt/mTOR 信号蛋白表达

3 讨论

自噬又称为Ⅱ型程序性细胞死亡,与肿瘤的发生、发展关系密切。自噬既可以促进细胞生存,又可以促进细胞死亡,在不同类型的组织细胞中发挥的作用不一而论^[13-14]。自噬对于肿瘤细胞具有保护和杀伤双重作用,适度自噬可以促使肿瘤细胞降解部分蛋白质和细胞器维持能量供给,过度自噬则导致重要功能蛋白质和细胞器受到破坏,进而发生细胞凋亡或坏死^[15]。

自噬的双向调节作用可以影响放化疗和分子靶向药物杀伤肿瘤细胞的作用。前期研究表明 EGFR 靶向药物 Gefitinib 诱发 EGFR 野生型 NSCLC A549 和 H1299 细胞自噬,并且这种自噬具有细胞保护作用,能够部分抵抗 Gefitinib 的细胞毒作用^[9]。本研究重点探讨 Gefitinib 在 EGFR 突变型 NSCLC 细胞自噬过程中的作用和机制。结果显示 EGFR 19 外显子缺失突变的人肺腺癌 PC-9 细胞经 Gefitinib 处理后细胞内 AVOs 数量显著增加,自噬标记物 LC3 表达上升,说明 Gefitinib 能够剂量依赖的诱发 EGFR 突变型 NSCLC 细胞自噬。MTT、流式细胞术和 Western blot 检测结果也证明 Gefitinib 抑制 PC-9 细胞增殖,诱导细胞凋亡。

本研究结果发现 PC-9 细胞自噬可能是一种促凋亡作用。自噬诱导剂 Rapamycin 可以显著增加 Gefitinib 杀伤 PC-9 细胞的作用,促进细胞凋亡,PARP 剪切和 Caspase-3 活化。同时,我们还注意到 Gefitinib 和 Rapamycin 对 PI3K/Akt/mTOR 信号的调控作用。大量研究已证实 PI3K/Akt/mTOR 是细胞增殖和存活的关键信号,该信号受到抑制后,细胞增殖变慢,活力降低,细胞皱缩,最后发生凋亡。Gefitinib 和 Rapamycin 处理 PC-9 细胞均可引起 p-Akt 和 p-mTOR 表达降低,而 Gefitinib 联合 Rapamycin 处理 PC-9 细胞后,PI3K/Akt/mTOR 信号受到显著抑制,p-Akt 和 p-mTOR 蛋白表达进一步降低,提示 Gefitinib 和自噬可能协同抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号,两者协同进一步诱发 PC-9 细胞凋亡^[16-18]。

综上所述,我们认为调控细胞自噬对于改进肿瘤治疗策略和抗肿瘤药物的研发具有重要意义,阐明自噬在不同来源和类型的肿瘤细胞中发挥的具体作用,

将调控自噬作为辅助治疗可能是未来肿瘤个体化治疗的新思路,具有良好的研究价值和应用前景。

参考文献:

- [1] Yang Z, Klionsky D J. Eaten alive; a history of macroautophagy[J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(9): 814-822.
- [2] Harris J, Hanrahan O, De-Haro S A. Measuring autophagy in macrophages[J]. Curr Protoc Immunol, 2009, Chapter 14: Unit 14.14.
- [3] Apel A, Zentgraf H, Buchler M W, et al. Autophagy-A double-edged sword in oncology[J]. Int J Cancer, 2009, 125(5): 991-995.
- [4] Pan Y, Gao Y, Chen L, et al. Targeting autophagy augments *in vitro* and *in vivo* antimyeloma activity of DNA-damaging chemotherapy[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(10): 3248-3258.
- [5] Takeuchi H, Kondo Y, Fujiwara K, et al. Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors[J]. Cancer Res, 2005, 65(8): 3336-3346.
- [6] Lynch T J, Bell D W, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib[J]. N Engl J Med, 2004, 350(21): 2129-2139.
- [7] Paez J G, Janne P A, Lee J C, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy[J]. Science, 2004, 304(5676): 1497-1500.
- [8] Mok T S, Wu Y L, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma[J]. N Engl J Med, 2009, 361(10): 947-957.
- [9] Han W, Pan H, Chen Y, et al. EGFR tyrosine kinase inhibitors activate autophagy as a cytoprotective response in human lung cancer cells[J]. PLoS One, 2011, 6(6): e18691.
- [10] La-Monica S, Galetti M, Alfieri R R, et al. Everolimus restores gefitinib sensitivity in resistant non-small cell lung cancer cell lines[J]. Biochem Pharmacol, 2009, 78(5): 460-468.
- [11] Milton D T, Riely G J, Azzoli C G, et al. Phase I trial of everolimus and gefitinib in patients with advanced non small-cell lung cancer[J]. Cancer, 2007, 110(3): 599-605.
- [12] Price K A, Azzoli C G, Krug L M, et al. Phase II trial of gefitinib and everolimus in advanced non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2010, 5(10): 1623-1629.
- [13] Ito H, Daido S, Kanzawa T, et al. Radiation-induced autophagy is associated with LC3 and its inhibition sensitizes malignant glioma cells[J]. Int J Oncol, 2005, 26(5): 1401-1410.
- [14] Scott R C, Juhsz G, Neufeld T P. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death[J]. Curr Biol, 2007, 17(1): 1-11.
- [15] 王树彦, 周易明, 陈宗祐. 自噬与肿瘤的发生和治疗研究进展[J]. 复旦学报: 医学版, 2008, 35(6): 928-931, 934.
- [16] Yang Z, Klionsky D J. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation[J]. Curr Opin Cell Biol, 2010, 22(2): 124-131.
- [17] Jorissen R N, Walker F, Pouliot N, et al. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling[J]. Exp Cell Res, 2003, 284(1): 31-53.
- [18] Baselga J. Targeting the phosphoinositide-3 (PI3) kinase pathway in breast cancer[J]. Oncologist, 2011, 16(Suppl 1): 12-19.

(收稿:2013-12-11;修回:2014-02-09)

(编辑 邓强庭)