

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.09.023

Mcl-1 参与非小细胞肺癌对吉非替尼耐药的实验研究 *

姜秀秀 佟金平 李 剑 王 静 金 蕊 许银姬 张爱文 苗 姝[△]

(大连大学附属新华医院 辽宁 大连 116021)

摘要 目的:探究人髓细胞白血病基因-1(myeloid cell leukemia-1, Mcl-1)是否参与非小细胞肺癌对吉非替尼的耐药。**方法:**应用 Western blot 检测 Mcl-1 在吉非替尼敏感细胞 PC-9 和耐药细胞 H1975 表达差异;梯度浓度的吉非替尼作用于 PC-9 细胞后, Western blot 实验检测 B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 家族中抗凋亡蛋白的表达变化;应用 Western blot 实验检测 Mcl-1 在 PC-9 和 H1975 细胞内降解速度差异。**结果:**Mcl-1 在 PC-9 细胞内的表达明显低于 H1975 细胞,差异有统计学意义($P < 0.05$),并且随着吉非替尼作用浓度的升高, Mcl-1 表达逐渐降低,而 Bcl-2 和 Bcl-xL 表达基本不变,并且 PC-9 细胞内 Mcl-1 降解更迅速,半衰期明显缩短。**结论:**非小细胞肺癌对吉非替尼耐药可能与 Mcl-1 的表达量上调,降解速度减慢,半衰期延长有关。

关键词:非小细胞肺癌;吉非替尼;Bcl-2 家族;Mcl-1

中图分类号:R734.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2018)09-1709-04

Mcl-1 was involved in the Drug Resistance of Gefitinib in the Non-small Cell Lung Cancer*

JIANG Xiu-xiu, TONG Jin-ping, LI Jian, WANG Jing, JIN Rui, XU Yin-ji, ZHANG Ai-wen, MIAO Shu[△]

(Xinhua hospital, dalian university, Dalian, Liaoning, 116021, China)

ABSTRACT Objective: Explore whether Mcl-1 (myeloid cell leukemia-1) participates in gefitinib resistance of non-small cell lung cancer. **Methods:** Western blot was used to test Mcl-1 expression in gefitinib sensitive cell PC-9 and resistant cell H1975; PC-9 cell was treated by gradient concentration of gefitinib, then western blot was used to test antiapoptotic proteins expressions of the Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) family and Mcl-1 degradation speed in PC-9 cell and H1975 cell. **Results:** The expression of Mcl-1 in PC-9 was significantly lower than that in the H1975 cell ($P < 0.05$), and the expression of Mcl-1 gradually reduced along with the increase of gefitinib concentration, while the expression of Bcl-2 and Bcl-xL showed no significant change, and Mcl-1 was degraded more quickly in PC-9 cell than in H1975 cell. **Conclusion:** Up-regulated expression, slow degradation and the half-life extension of mcl-1 may contribute to the gefitinib resistance of non-small cell lung cancer.

Key words: Non-small cell lung cancer; Gefitinib; Bcl-2 family; Mcl-1

Chinese Library Classification(CLC): R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)09-1709-04

前言

肺癌的发病率呈逐年上升的趋势,死亡率亦位居各系统肿瘤第一位^[1]。到目前为止,肺癌的化疗疗效非常有限^[2]。随着近年来靶向治疗的进展,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)如吉非替尼、厄洛替尼等已应用于临床,疗效明显优于常规化疗^[3],但接受靶向治疗后 8-10 月患者易出现耐药,被迫重新选择化疗^[4]。目前已明确的耐药机制有 T790M 突变、Met 基因扩增等^[5],但约 20% 的耐药机制仍不明确。

研究表明凋亡逃逸是肿瘤细胞产生耐药的重要机制, Bcl-2 家族中抗凋亡蛋白 Bcl-2、Mcl-1 和 Bcl-xL 等负向调控细

胞凋亡过程^[6],并且 Mcl-1 在肝癌^[21]、宫颈癌^[22]、乳腺癌^[23]等肿瘤中均呈高表达状态,而下调 Mcl-1 表达可以提高化疗(放疗)药物敏感性,因此 Mcl-1 与肿瘤细胞耐药有关。此外,研究显示 Mcl-1 在非小细胞肺癌中呈过表达状态,下调 Mcl-1 表达可有诱导非小细胞肺癌细胞凋亡。因此,本研究探究了 Bcl-2 家族抗凋亡蛋白在人非小细胞肺癌吉非替尼敏感细胞和耐药细胞内的表达差异以及是否参与吉非替尼杀伤肿瘤细胞过程,旨在为非小细胞肺癌的 EGFR-TKIs 耐药机制以及提高靶向治疗疗效提供理论依据。

1 材料及方法

1.1 材料

* 基金项目:大连市医学卫生科学研究计划项目(2016-90)

作者简介:姜秀秀(1988-),女,硕士研究生,医师,主要研究方向:肺癌个体化治疗和耐药机制,

E-mail: jiangxuanlizf@163.com

[△] 通讯作者:苗姝,女,学士,主任医师, E-mail: qinxiaoyong18@sohu.com

(收稿日期:2017-07-12 接受日期:2017-08-08)

人非小细胞肺癌细胞株 PC-9、H1975 均购买于中国科学院上海细胞库。RPMI 1640 培养液、青链霉素购买于 Hyclone 公司,胎牛血清、胰蛋白酶购买于科昊生物技术有限公司,Gefitinib 购买于 Selleckchem 公司,RIPA 细胞裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、5× Loading Buffer 购买于碧云天生物技术有限公司,蛋白酶抑制剂 cocktail 购买于 Roche 公司,预染 Marker 购买于 Fermentas 公司,兔抗人 Mcl-1 抗体、鼠抗人 β -actin 抗体、HRP 标记鼠二抗、HRP 标记兔二抗购买于 Cell Signaling Technology 公司,PVDF 膜、ECL 化学发光试剂盒购买于 Millipore 公司,DEPC 水购买于 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 PC-9、H1975 均为贴壁细胞,使用含 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI1640 培养液,将冻存在液氮内的 PC-9、H1975 细胞快速取出,37℃ 水浴迅速融化,将细胞悬液转入无菌的 10 mL 离心管中,并加入 8 mL 培养液,800 rpm 室温下离心 5 min,吸弃上层液体,将细胞转入装有新鲜培养液的培养瓶中,在 37℃、5% CO₂、饱和空气湿度的孵箱内培养。

1.2.2 Western blot 实验 将细胞样品转移至 1.5 mL Ep 管中,加入含有蛋白酶抑制剂 cocktail 的 RIPA 裂解液,冰上裂解得到细胞蛋白样品。BCA 法测定蛋白样品 OD 值,计算各组样品蛋白浓度,加入 loading buffer,100℃ 煮沸 10 min,冷却待用。配制 SDS-PAGE 蛋白电泳凝胶,将制备好的蛋白样品和蛋白

Marker 缓慢加入泳道,设置电泳电压(浓缩胶 120 V,分离胶 160 V)开始电泳。取出 SDS-PAGE 胶,装转膜装置,设置电泳仪电压为 100 V,转膜时间为 1.5 h 开始转膜。取出转膜夹,根据预染蛋白 marker 做好标记,放入封闭液中室温封闭 1 h。取出 PVDF 膜,加入第一抗体,摇床上室温孵育 30 min 后转入 4℃ 冰箱过夜,次日取出 PVDF 膜放入缓冲液内漂洗,加入相应的第二抗体室温孵育 1 h。TBST 缓冲液漂洗 PVDF 膜,暗室内 ECL 成像系统曝光,保存结果图像。

1.3 统计学分析

每组实验重复 3 次,每次实验重复 3 个复孔。采用 SPSS16.0 统计软件进行数据分析。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,并进行两独立样本 t 检验,以 $P<0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 PC-9 和 H1975 细胞中 Bcl-2 家族抗凋亡蛋白的表达差异

采用 Western blot 实验检测吉非替尼敏感细胞 PC-9 和耐药细胞 H1975 内 Bcl-2 家族中抗凋亡蛋白 Bcl-2、Mcl-1、Bcl-xL 表达,结果显示:与 H1975 细胞相比,PC-9 细胞内抗凋亡蛋白 Bcl-xL 表达基本相同;Mcl-1 呈显著低表达,差异有统计学意义 ($P<0.05$);Bcl-2 呈明显高表达,差异有统计学意义 ($P<0.05$)(图 1)。

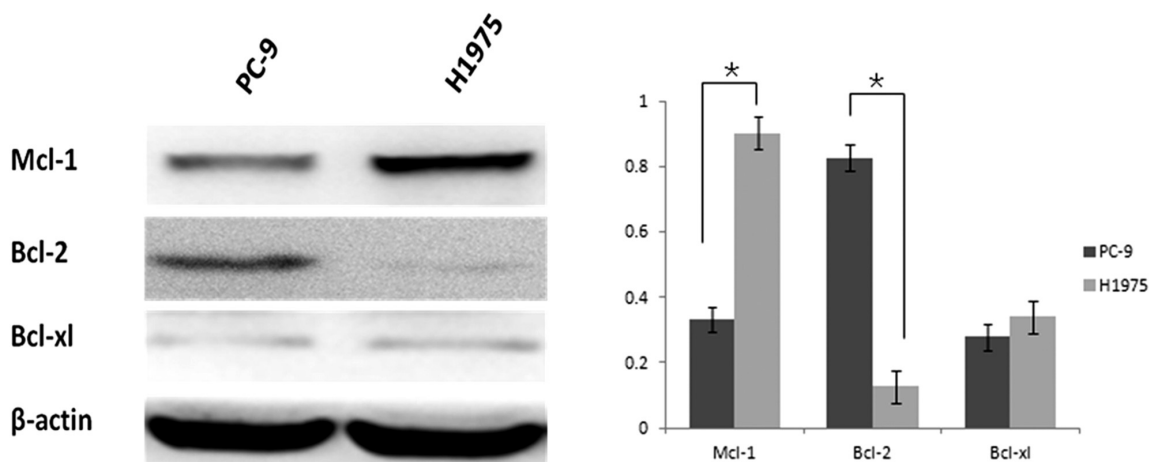


图 1 Western blot 检测 PC-9 和 H1975 细胞中 Bcl-2 家族抗凋亡蛋白的表达差异

Fig.1 The expressions of antiapoptotic proteins of Bcl - 2 family Bcl-2 family in gefitinib sensitive cell PC-9 and resistant cell H1975 Western blot test

* $P<0.05$.

2.2 不同浓度吉非替尼对 PC-9 细胞 Bcl-2 家族抗凋亡蛋白表达的影响

分别给予 0(DMSO)、0.1 μ M、0.5 μ M 和 1 μ M 的吉非替尼作用于 PC-9 细胞 24 小时,采用 Western blot 检测 PC-9 细胞内 Bcl-2 家族中抗凋亡蛋白 Mcl-1、Bcl-2、Bcl-xL 的表达变化,结果显示随着吉非替尼作用浓度的升高,Mcl-1 表达量明显降低,而 Bcl-2 和 Bcl-xL 表达量基本无变化(图 2)。

2.3 PC-9 和 H1975 细胞中 Mcl-1 蛋白降解速度比较

给予 PC-9、H1975 细胞 50 μ g/mL 放线菌素抑制细胞内的蛋白质合成,分别于 0、20 min、40 min、60 min、120 min 收集细胞,Western blot 检测 PC-9 和 H1975 细胞内 Mcl-1 降解速度,结果显示与 H1975 细胞相比,PC-9 细胞 Mcl-1 降解更迅速,半

衰期明显短(图 3)。

3 讨论

肺癌发生于支气管粘膜上皮,其发病率呈逐年上升的趋势,死亡率亦位居首位^[7]。肺癌的治疗方法有手术治疗、化疗、放疗以及免疫治疗等^[7],外科手术是肺癌治疗的首选方法,但是由于肺癌患者早期多无症状,确诊时已为晚期而错过手术时机^[8]。化疗是晚期肺癌患者的主要治疗方法,但对于非小细胞肺癌患者只有 40% 通过化疗可以获益^[9],并且化疗并不能改变肺癌的自然演变。EGFR 是原癌基因 HER1 的表达产物,与其配体结合后激活下游信号通路,促进 DNA 复制、细胞增殖转移等生物学过程^[10]。EGFR 基因突变后下游信号通路可以在无配体作用下

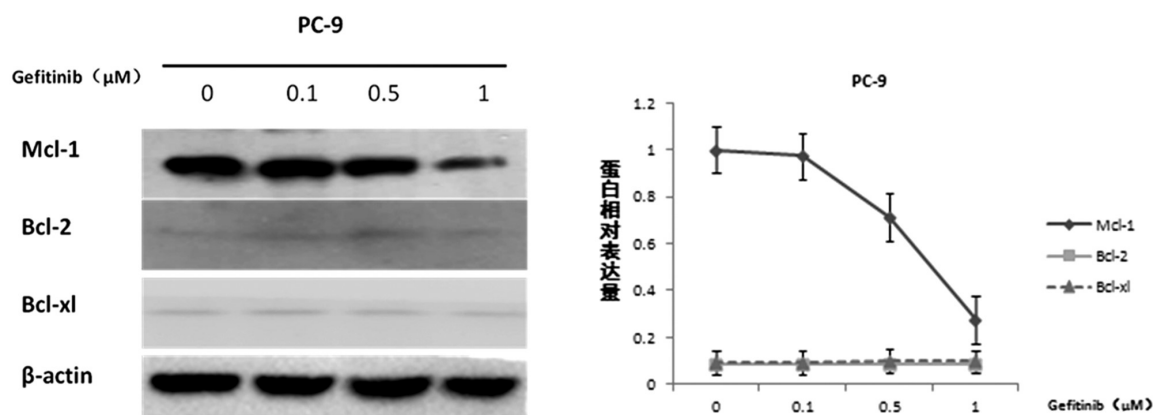


图2 不同浓度的吉非替尼对 PC-9 细胞 Bcl-2 家族抗凋亡蛋白表达的影响

Fig.2 Effect of different concentrations of gefitinib on the expressions of antiapoptotic proteins of Bcl-2 family in the PC-9 cells

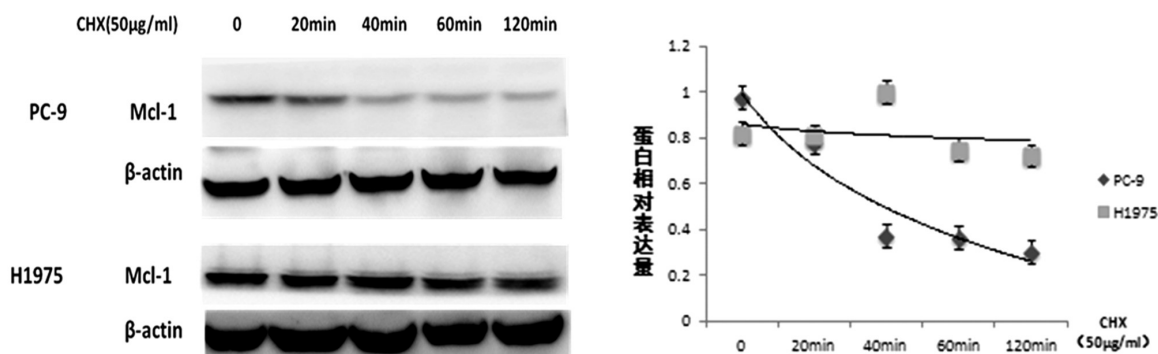


图3 PC-9 和 H1975 细胞中 Mcl-1 蛋白降解速度差异

Fig.3 Western blot test the Mcl-1 degradation speed in PC-9 cell and H1975 cell

激活,导致肿瘤的发生发展,对于伴有 EGFR 基因阳性突变(第 21 外显子 L858R 点突变和第 19 外显子缺失)^[11,12] 的非小细胞肺癌患者,靶向抑制 EGFR 信号通路可以杀伤肿瘤细胞。吉非替尼、厄洛替尼、埃克替尼等^[13]是第一代 EGFR-TKIs,通过阻断 EGFR 信号通路诱导肿瘤细胞凋亡。伴有 EGFR 阳性突变的肺癌患者 EGFR-TKIs 有效率高达 71 %-100 %,患者的 PFS 明显延长以及 QOL 明显提高^[14-17]。但临床工作者发现大部分患者在用药 8-10 月后出现药物耐受,严重限制了 EGFR-TKIs 的远期疗效^[18]。因此,探究 EGFR-TKIs 耐药机制成为近几年的研究热点。

Mcl-1 是 Bcl-2 家族中的抗凋亡蛋白,主要定位于线粒体外膜,通过调控细胞色素 c 的释放参与细胞凋亡过程^[19,20]。研究证实了在肝癌^[21]、宫颈癌^[22]、乳腺癌^[23]等肿瘤中抗凋亡蛋白 Mcl-1 呈高表达状态,下调 Mcl-1 表达可以促进肿瘤细胞凋亡,提高肿瘤对化疗(放疗)药物敏感性,因此认为 Mcl-1 与肿瘤细胞耐药有关。EGFR-TKIs 耐药机制中仍有约 20 %不明确,研究发现 Mcl-1 在非小细胞肺癌中呈高表达状态^[24],并且参与肿瘤细胞的耐药过程^[25,26]。本研究结果显示吉非替尼敏感细胞和耐药细胞中 Bcl-2 家族抗凋亡蛋白表达存在差异,具体为与吉非替尼耐药细胞相比,敏感细胞内抗凋亡蛋白 Mcl-1 呈低表达、Bcl-2 呈高表达状态、Bcl-xL 基本相同,说明 Bcl-2 家族抗凋亡蛋白可能参与吉非替尼耐药过程,尤其是存在差异性表达的抗凋亡蛋白 Mcl-1 和 Bcl-2。进一步研究显示吉非替尼杀伤肿瘤细胞时 Bcl-2 家族抗凋亡蛋白 Mcl-1 表达量的降低更显著,并且随着吉非替尼作用浓度的升高,细胞内 Mcl-1 的表达量逐渐降低,而 Bcl-xL 和 Bcl-2 表达量均无该变化趋势,因为 Mcl-1 蛋

白为抗凋亡蛋白,表达降低时可以促进细胞的凋亡。因此,我们认为吉非替尼诱导肿瘤细胞凋亡是通过降低细胞内抗凋亡蛋白 Mcl-1 的表达量实现的。此外,与耐药细胞相比,吉非替尼敏感细胞内 Mcl-1 降解更迅速,半衰期明显更短,表明 Mcl-1 在吉非替尼耐药的肺癌细胞内降解速度减慢、半衰期明显延长,提示吉非替尼诱导非小细胞肺癌凋亡是通过促进 Mcl-1 降解、缩短 Mcl-1 半衰期从而降低细胞内 Mcl-1 的表达量,最终诱导细胞凋亡。因此,吉非替尼诱导非小细胞肺癌凋亡是通过促进 Mcl-1 降解、缩短 Mcl-1 半衰期实现的,促进 Mcl-1 降解很可能逆转非小细胞肺癌的 EGFR-TKIs 耐药。

综上所述,吉非替尼通过降低 Mcl-1 的表达杀伤非小细胞肺癌细胞,Mcl-1 可能成为提高 EGFR-TKIs 疗效以及逆转耐药的新靶点,但 Mcl-1 参与非小细胞肺癌 EGFR-TKIs 耐药的具体机制以及逆转耐药方法还需要进一步的研究以明确。

参考文献(References)

- [1] He M, Yang Z, Zhang L, et al. Additive effects of chelerythrine chloride combination with erlotinib in human non-small cell lung cancer cells[J]. PLoS One, 2017, 12(4): e175466
- [2] Kim E Y, Jung J Y, Kim A, et al. ABT-737 Synergizes with Cisplatin Bypassing Aberration of Apoptotic Pathway in Non-small Cell Lung Cancer[J]. Neoplasia, 2017, 19(4): 354-363
- [3] Ma P C. Personalized targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer[J]. Cleve Clin J Med, 2012, 79 Electronic Suppl 1: S56-S60
- [4] Juan O, Popat S. Treatment choice in epidermal growth factor receptor mutation-positive non-small cell lung carcinoma: latest evidence and clinical implications[J]. Ther Adv Med Oncol, 2017, 9(3): 201-216

- [5] Yu H A, Arcila M E, Rekhtman N, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19 (8): 2240-2247
- [6] Deng J. How to unleash mitochondrial apoptotic blockades to kill cancers?[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2017, 7(1): 18-26
- [7] Pirker R. Milestones in the systemic treatment of lung cancer[J]. *Memo*, 2017, 10(1): 22-26
- [8] Poomakkoth N, Issa A, Abdulrahman N, et al. p90 ribosomal S6 kinase: a potential therapeutic target in lung cancer [J]. *J Transl Med*, 2016, 14: 14
- [9] Sun P L, Sasano H, Gao H. Bcl-2 family in non-small cell lung cancer: its prognostic and therapeutic implications[J]. *Pathol Int*, 2017, 67(3): 121-130
- [10] Bronte G, Rolfo C, Giovannetti E, et al. Are erlotinib and gefitinib interchangeable, opposite or complementary for non-small cell lung cancer treatment? Biological, pharmacological and clinical aspects[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2014, 89(2): 300-313
- [11] Seo A N, Park T I, Jin Y, et al. Novel EGFR mutation-specific antibodies for lung adenocarcinoma: highly specific but not sensitive detection of an E746_A750 deletion in exon 19 and an L858R mutation in exon 21 by immunohistochemistry [J]. *Lung Cancer*, 2014, 83(3): 316-323
- [12] Joshi M, Rizvi S M, Belani C P. Afatinib for the treatment of metastatic non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Manag Res*, 2015, 7: 75-82
- [13] Yuan D M, Song Y. Precision first-line therapy for advanced non-small-cell lung cancer patients harboring EGFR mutation [J]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2017, 39(2): 98-101
- [14] Han J Y, Park K, Kim S W, et al. First-SIGNAL: first-line single-agent irressa versus gemcitabine and cisplatin trial in never-smokers with adenocarcinoma of the lung [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(10): 1122-1128
- [15] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(25): 2380-2388
- [16] Passiglia F, Listi A, Castiglia M, et al. EGFR inhibition in NSCLC: New findings and opened questions? [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2017, 112: 126-135
- [17] Haspinger E R, Agustoni F, Torri V, et al. Is there evidence for different effects among EGFR-TKIs? Systematic review and meta-analysis of EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKIs) versus chemotherapy as first-line treatment for patients harboring EGFR mutations [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2015, 94(2): 213-227
- [18] Sullivan I, Planchard D. Next-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors for Treating EGFR-Mutant Lung Cancer beyond First Line[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2016, 3: 76
- [19] Garcia-Saez A J. The secrets of the Bcl-2 family [J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19(11): 1733-1740
- [20] Gomez-Bougie P, Halliez M, Moreau P, et al. Repression of Mcl-1 and disruption of the Mcl-1/Bak interaction in myeloma cells couple ER stress to mitochondrial apoptosis [J]. *Cancer Lett*, 2016, 383(2): 204-211
- [21] Yu Q, Liu Z Y, Chen Q, et al. Mcl-1 as a potential therapeutic target for human hepatocellular carcinoma [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2016, 36(4): 494-500
- [22] Lechanteur A, Furst T, Evrard B, et al. Promoting Vaginal Distribution of E7 and MCL-1 siRNA-Silencing Nanoparticles for Cervical Cancer Treatment[J]. *Mol Pharm*, 2017
- [23] Young A I, Law A M, Castillo L, et al. MCL-1 inhibition provides a new way to suppress breast cancer metastasis and increase sensitivity to dasatinib[J]. *Breast Cancer Res*, 2016, 18(1): 125
- [24] Kang X H, Zhang J H, Zhang Q Q, et al. Degradation of Mcl-1 through GSK-3beta Activation Regulates Apoptosis Induced by Bufalin in Non-Small Cell Lung Cancer H1975 Cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(5): 2067-2076
- [25] Kim S M, Yun M R, Hong Y K, et al. Glycolysis inhibition sensitizes non-small cell lung cancer with T790M mutation to irreversible EGFR inhibitors via translational suppression of Mcl-1 by AMPK activation[J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12(10): 2145-2156
- [26] Arechaga-Ocampo E, Lopez-Camarillo C, Villegas-Sepulveda N, et al. Tumor suppressor miR-29c regulates radioresistance in lung cancer cells[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(3): 1393394654