

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.18.010

靶向 AXL 克服肺腺癌 EGFR-TKIs 获得性耐药 *

张可人 仰映婕 黄华艳 张义朋 朱 亮^Δ

(上海交通大学医学院药理学与化学生物学系 上海 200025)

摘要 目的:探索 AXL 在肺腺癌细胞(Lung adenocarcinoma cell, LAC) EGFR-TKIs 获得性耐药中的作用,为肺癌临床治疗和新型药物的研发提供实验依据。 **方法:**构建 EGFR-TKIs 获得性耐药的肺腺癌模型并通过 CCK-8 法检测耐药株对肺腺癌靶向治疗药物吉非替尼(Gefitinib)、厄洛替尼(Erlotinib)和奥希替尼(Osimertinib)的敏感性。基于基因组学分析筛选出潜在的克服耐药的靶点 AXL,通过 Western blot 和 qRT-PCR 技术检测 AXL 的表达情况,并同时检测上皮-间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)分子标志物。R428 是 AXL 的小分子抑制剂,通过 CCK-8 法、Transwell 以及划痕实验等探究靶向 AXL 对肺腺癌亲本及耐药株增殖和迁移能力的影响。 **结果:**AXL 在构建的耐药株中显著高表达,其蛋白表达水平上调 15-20 倍($P<0.001$),mRNA 水平上调 2-5 倍($P<0.01$);EGFR-TKIs 耐药株发生上皮间质转化(EMT);靶向 AXL 选择性抑制耐药株的增殖能力并且恢复了耐药株对 EGFR-TKIs 的敏感性($P<0.001$);靶向 AXL 显著抑制耐药株增强的迁移能力,与亲本株相比最高抑制率可达 80%左右($P<0.001$)。 **结论:**用遗传学和药理学手段靶向 AXL 可以显著逆转肺腺癌对 EGFR-TKIs 耐药,逆转耐药株所增强的迁移等肿瘤生物学特征,对克服 EGFR-TKIs 获得性耐药有着重要的临床治疗价值以及转化医学前景。

关键词:肺腺癌;AXL;EGFR-TKI;耐药

中图分类号:R-33;R966;R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)18-3449-07

Targeting AXL Overcomes Acquired Resistance to EGFR-TKIs in Lung Adenocarcinomas*

ZHANG Ke-ren, YANG Yi-jie, HUANG Hua-yan, ZHANG Yi-peng, ZHU Liang^Δ

(Department of Pharmacology and Chemical Biology, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 200025, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the role of AXL in the acquired resistance to EGFR-TKIs in lung adenocarcinoma cells, and provide experimental evidence for the clinical treatment of lung cancer and the development of new drugs. **Methods:** EGFR-TKIs resistant lung adenocarcinoma cell models were derived and subjected to the assays such as CCK-8 assay. Transcriptome sequencing of the cells revealed an upregulated expression of AXL, a gene intrinsically linked to and driving EMT. The upregulation of AXL was confirmed by western blot and qRT-PCR. R428 is an inhibitor of AXL. The effect of cell proliferation and migration were measured by using CCK-8 assay, transwell test and wound-healing assay after targeting AXL. **Results:** AXL was highly expressed in EGFR-TKIs resistant cells, and the expression level was up-regulated by 15-20 fold ($P<0.001$), the mRNA level was up-regulated by 2-5 fold ($P<0.01$); EGFR-TKIs resistant cells acquired epithelial-mesenchymal transition (EMT) properties; Targeting AXL increased the drug susceptibility and attenuated the proliferative capacity of drug-resistant cells; The enhanced migration ability of the resistant cells could be significantly attenuated by targeting AXL, and the highest inhibition rate compared to control can be up to about 80 % ($P<0.01$). **Conclusion:** Targeting AXL can significantly reverse the resistance in vitro and the biological characteristics of tumor cells such as the enhanced migration ability of the resistant cells, which has important clinical therapeutic value and prospects to overcome the EGFR-TKIs acquired resistance.

Key words: Lung adenocarcinoma; AXL; EGFR-TKI; Resistance

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R966; R734.2 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2019)18-3449-07

前言

肺癌是包括我国在内的多个国家发病和致死占首位的恶性肿瘤^[1]。根据肺癌的病理学特征,可以分为小细胞肺癌(Small cell lung cancer, SCLC)和非小细胞肺癌(Non-small cell lung

cancer, NSCLC),NSCLC 占 80%以上,包括腺癌、鳞癌、大细胞癌^[2]。不同种族的肺腺癌驱动基因突变谱存在较大差异,亚裔人群以表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor, EGFR)突变最为常见,发生率高达 61.5%^[3]。近十年来,以吉非替尼(Gefitinib)和厄洛替尼(Erlotinib)为代表的表皮生长因

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81872882;81573018)

作者简介:张可人(1993-),硕士研究生,研究方向:肿瘤药理学,E-mail: hedgehog2016@sjtu.edu.cn

Δ 通讯作者:朱亮(1974-),博士,教授,研究方向:肿瘤药理学,E-mail: jyzhu@shsmu.edu.cn

(收稿日期:2019-02-23 接受日期:2019-03-15)

子受体酪氨酸激酶抑制剂 (Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI) 已成为 EGFR 突变型晚期 NSCLC 最主要的治疗手段。然而,对第一代 EGFR-TKIs 敏感的患者,在治疗 9-14 个月后产生耐药。已知的耐药机制主要有 EGFR 的 T790M 突变、MET 扩增等,第三代 EGFR-TKI 奥希替尼 (Osimertinib) 对由 T790M 突变所致的耐药有克服作用^[4,5], 临床疗效显著,但遗憾的是,对奥希替尼的耐药也很快出现。目前对于 EGFR-TKIs、尤其是第三代抑制剂耐药的机制存在诸多未解之谜,严重影响肺癌的靶向治疗效果。本研究发现肺腺癌对包括第三代抑制剂奥希替尼在内的多个 EGFR-TKIs 产生的获得性耐药依赖于 AXL。AXL 属于受体酪氨酸激酶中的 TAM 家族,在多种肿瘤中高表达^[6],并参与肿瘤细胞的迁移、增殖、侵袭等过程^[7,8],且与其耐药机制密切相关^[9],因此本研究拟探索 AXL 在肺腺癌 EGFR-TKIs 获得性耐药中的作用,为肺癌临床治疗和新型药物的研发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

人肺腺癌细胞系 HCC827、H1975 来自上海交通大学医学院药理学与化学生物学系教研室细胞库,耐药模型由课题组自行构建。

厄洛替尼和吉非替尼购自美国 LC Laboratories 公司;奥希替尼购自 Selleck 公司;R428 购自 APEbio 公司;RPMI-1640 培养基购自意大利 GIBCO 公司;胎牛血清购自美国 GEMINI 公司;Gluta-Max 和双抗(青霉素/链霉素)均购自上海源培生物科技有限公司;0.25%胰蛋白酶、细胞冻存液、Marker 购自美国 Invitrogen 公司;蛋白酶抑制剂(PMSF)、细胞裂解液(RIPA)和一抗稀释液均购自江苏碧云天生物技术有限公司;CCK-8 试剂盒购自日本东仁公司;ZEB1、CD44 等抗体购自美国 Cell signaling technology 公司。

1.2 实验仪器

生物安全柜,二氧化碳细胞培养箱,多功能酶标仪购自美国 Thermo 公司;小型蛋白电泳与转印系统,制胶用玻璃板模具及梳齿购自美国 Bio-Rad 公司;低温高速离心机,移液器购自德国 Eppendorf 公司;倒置显微镜购自日本 Nikon 公司;Odyssey 双色红外成像系统购自美国 LI-COR 公司;实验用超纯水系统购自美国 Millipore 公司;荧光定量 PCR 仪购自瑞士罗氏公司;Leica SP8 TPS 激光共聚焦显微镜购自德国 Leica 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 本实验中的肺腺癌细胞株均使用 RPMI-1640 完全培养基(含 10% FBS, 2 mM L-谷氨酰胺, 100 U/mL 青霉素, 100 U/mL 链霉素)于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中贴壁过夜培养,每日于显微镜下观察细胞生长情况,通常 2-3 天传代一次。

1.3.2 EGFR-TKIs 耐药株的构建及检测 采取浓度递增法构建了 EGFR-TKIs 获得性耐药模型,初始给药时杀伤约 50% -70% 肿瘤细胞,在持续给药后肿瘤细胞逐渐对 EGFR-TKIs 敏感性下降,至 4-5 月后形成获得性耐药模型。用 EGFR-TKIs 分别作用于 H1975、H1975OR、HCC827、HCC827ER、HCC827GR 和 HCC827OR 细胞系,72h 后使用 CCK-8 试剂盒测定细胞耐药性,绘制药物浓度(对数)-抑制率曲线。

1.3.3 RNA 提取及 qRT-PCR 实验 根据 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 说明书逐步提取各组细胞 RNA。在 37℃ 15 min, 85℃ 5 s 的条件下反转录为 cDNA。SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2×) 12.5 μL、PCR Forward Primer (10 μM) 1 μL、PCR Reverse Primer (10 μM) 1 μL、RT 反应液(cDNA 溶液) 2 μL、加 dH₂O 至总体积 25 μL。95℃ 30 s, 1 个循环;95℃ 30 s, 60℃ 5 s, 40 个循环的条件下进行实时 PCR 反应。

1.3.4 激光共聚焦免疫荧光染色 根据实验需要,接种合适浓度的细胞于培养皿中,37℃, 5% CO₂ 恒温细胞培养箱中过夜培养。弃去培养液,室温下加入 4% 多聚甲醛,固定 20 min。弃掉固定液,贴壁加入预冷的 PBS 溶液,洗涤 3 次,每次 5 min。贴壁加入 0.4% Triton-X100 通透液通透细胞,室温孵育 15 min,根据蛋白分布部位的不同调整通透时间,核蛋白或胞浆蛋白需要通透,膜蛋白不需通透。弃通透液,贴壁加入预冷的 PBS 溶液,洗涤 3 次,每次 5 min。贴壁加入 1% BSA 溶液,37℃ 孵育 30 min。弃封闭液,贴壁加入 1% BSA 溶液稀释的一抗工作液,4℃ 孵育过夜。回收一抗工作液,贴壁加入预冷的 PBS 溶液,洗涤 3 次,每次 5 min。弃洗涤液,贴壁加入 1% BSA 稀释的二抗工作液,湿盒中 37℃ 避光孵育 1 h。弃二抗工作液,避光贴壁加入预冷的 PBS 溶液,洗涤 6 次,每次 5 min。用 Leica SP8 TPS 激光共聚焦显微镜在相应波长下显影成像。

1.3.5 Western blot 法检测蛋白表达 取处于对数生长期的各组细胞,以 RIPA 裂解液提取总蛋白。使用 BCA 蛋白定量试剂盒确定蛋白浓度。以 RIPA 配成相同浓度后加入 SDS 于 100℃ 加热 5 min,冷却。上样于浓缩胶浓度为 7%,分离胶浓度为 10% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶。使用电转仪将蛋白转至 PVDF 膜上,室温封闭 1 h,洗涤 3 次,每次 5 min。加入一抗工作液 4℃ 孵育过夜,次日孵育二抗,洗膜,均匀滴加显色液,用 Odyssey 双色红外成像系统在相应波长下显影成像。

1.3.6 siRNA 的转染 根据 Lipofectamine 3000 说明书,在细胞对数生长期时,将对照序列和 AXL 的 siRNA 序列与 Lipofectamine 3000 混合静置后加入各组细胞中。后续可进行 Western blot 实验和细胞增殖能力检测。

1.3.7 CCK-8 检测细胞活力 将细胞悬液接种于 96 孔板,待细胞贴壁后加入相应药物,继续培养 72 小时。在闭光环境下配制 CCK-8 试剂(CCK-8:1640 培养基=1:10)。弃去 96 孔板中的原培养液,加入 CCK-8 试剂,于 37℃ 孵育 20-30 min。使用酶标仪 460 nm 波长检测光密度值(OD),每孔设三组复孔,重复三次实验,Inhibition=(1-ODtreated/ODcontrol)×100%。

1.3.8 Transwell 实验 Transwell 板上室每孔加入基础培养基 100 μL(不含胎牛血清),下室每孔加入 500 μL RPMI-1640 完全培养基,37℃ 培养箱中培养,24 h 后使用 4% 多聚甲醛固定 30 min,0.1% 结晶紫染色过夜,次日使用 PBS 溶液清洗并使用棉签擦去上室滤膜上层细胞,置于倒置显微镜下拍照,选取多个细胞分布较均匀的视野,10% 冰醋酸萃取后于 600 nm 波长下检测吸光值,Inhibition of migration=(ODcontrol-ODtreated)/ODcontrol×100%。

1.3.9 划痕实验 收集四组细胞,接种于 96 孔板中,每组设置

10个复孔,24 h后使用 Wound Marker 进行划痕,弃培养液,PBS 溶液洗涤后加入含药培养基,放入 Incucyte 活细胞成像仪中对细胞进行实时动态监测和成像,24 h后选取视野分析。

1.4 统计学分析

实验数据均用 GraphPad Prism7 软件进行统计分析,所得结果以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示,t-test 进行差异性检验, $P < 0.05$ 表示有显著性差异(其中 $P < 0.05$ 用 "*" 表示, $P < 0.01$ 用 "**" 表示, $P < 0.001$ 用 "***" 表示, $P < 0.0001$ 用 "****" 表示)。

2 结果

2.1 AXL 在 EGFR TKIs 耐药株中高表达

本实验采取浓度递增法构建了 EGFR-TKIs 获得性耐药模型,初始给药时杀伤约 50 %-70 % 肿瘤细胞,在持续给药后肿瘤细胞逐渐对 EGFR-TKIs 敏感性下降,至 4-5 月后形成获得性耐药模型。其中,HCC827ER 细胞是对厄洛替尼(Erlotinib)耐受的 HCC827 细胞,HCC827GR 细胞是对吉非替尼(Gefitinib)耐受的 HCC827 细胞,HCC827OR 细胞是对奥希替尼(Osimertinib)耐受的 HCC827 细胞,H1975OR 细胞是对奥希替尼(Osimertinib)耐受的 H1975 细胞。耐药株稳定培养三个月后,用 CCK-8 法检测检测三种 EGFR-TKIs 对肺腺癌细胞

作用 72 h 后的细胞活力。实验结果表明(图 1A),Erlotinib 对 HCC827ER 细胞的 IC_{50} 为 $2.00 \mu\text{M}$ 。Gefitinib 对 HCC827GR 细胞的 IC_{50} 为 $12.37 \mu\text{M}$ 。Osimertinib 对 HCC827OR 细胞的 IC_{50} 为 $5.37 \mu\text{M}$,对 H1975OR 细胞的 IC_{50} 为 $4.93 \mu\text{M}$,说明耐药模型建立成功。基于自行构建的体外耐药模型,利用基因组学方法分析不同模型间的差异表达基因,最终筛选出克服肺腺癌 EGFR-TKIs 获得性耐药的潜在靶标 AXL(图 1B)。为进一步验证 AXL 在肺腺癌耐药株中的表达水平,本实验采用 Western blot 和 qPCR 检测耐药株和亲本株间 AXL 的表达水平。实验结果表明,与亲本细胞相比,在所有耐药株中 AXL 在蛋白质以及 mRNA 水平均明显高表达(HCC827GR: $P < 0.01$; HCC827ER: $P < 0.01$; HCC827OR: $P < 0.01$; H1975OR: $P < 0.01$,图 1C、图 1D)。

2.2 EGFR-TKIs 耐药株发生上皮间质转化

已有多个研究表明,AXL 可以通过介导上皮间质转化(EMT)促进肿瘤细胞侵袭、转移,从而降低机体对放疗、化疗和靶向治疗的有效反应能力,使癌细胞获得凋亡抵抗,最终导致耐药^[10-12],而 EMT 又与肿瘤细胞干性密切相关^[13]。我们通过 Incucyte 活细胞成像仪实时监测,结果发现(图 2A)肺腺癌耐药株出现侵袭状伪足结构。采用免疫荧光实验进一步对检测了肺

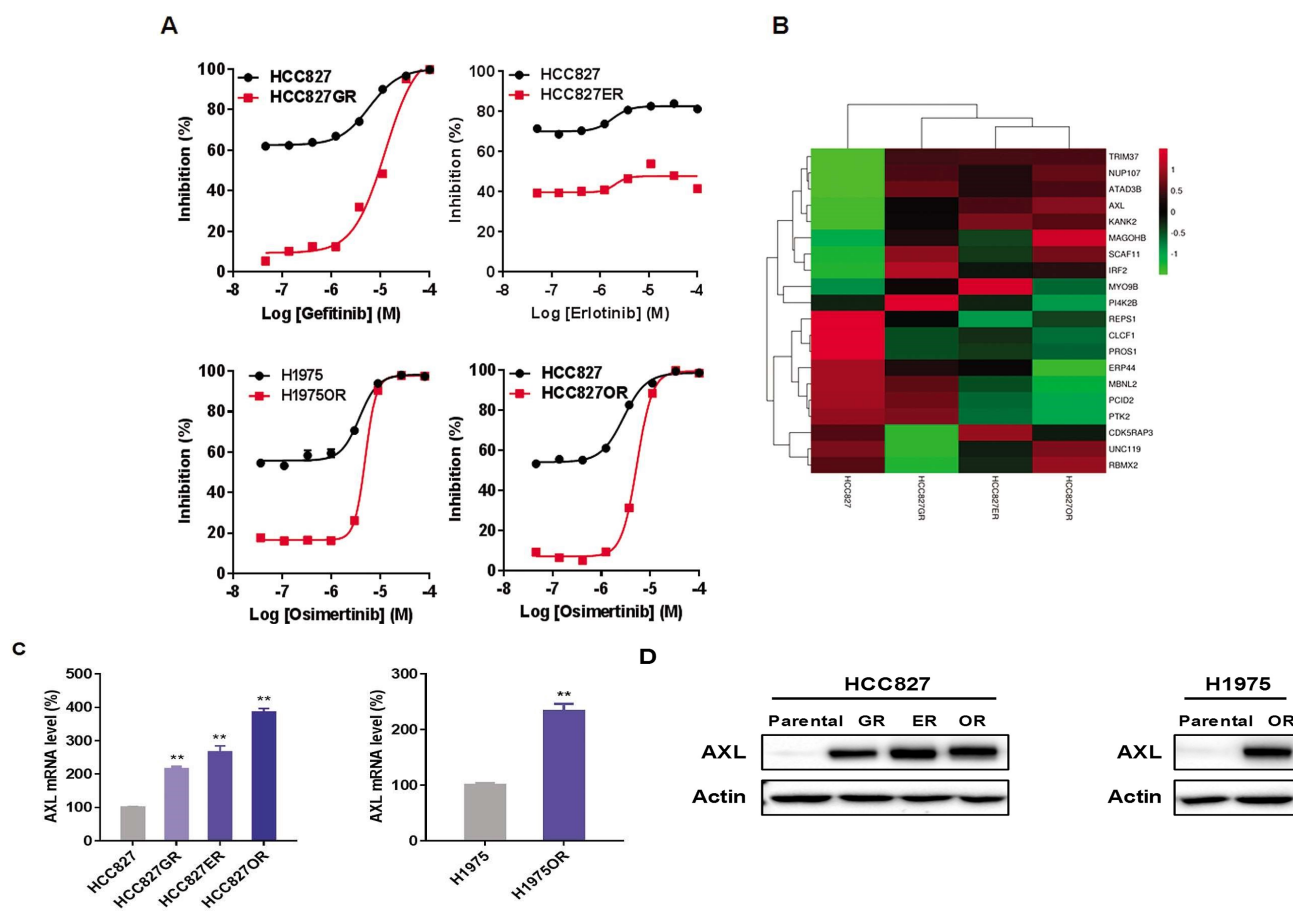


图 1 AXL 在 EGFR-TKIs 肺腺癌耐药株中表达情况

Fig.1 The expression level of AXL in EGFR-TKIs resistant lung adenocarcinoma cells

注:A 采用 CCK-8 法检测肺腺癌细胞的耐药性;B 转录组学分析筛选潜在靶点 AXL;C 细胞内 AXL mRNA 水平;D 细胞内 AXL 蛋白水平
Note: EGFR-TKIs resistant lung adenocarcinoma cell models were subjected to CCK-8 assay; B Transcriptome sequencing of the cells revealed an upregulated expression of AXL; C The mRNA level of AXL in lung adenocarcinoma cells; D The expression of AXL in lung adenocarcinoma cells.

腺癌亲本及耐药株中 EMT 和干性相关标志物的蛋白质 (图 2B),发现波形蛋白(Vimentin)、ZEB-1(Zinc finger E-box-binding

protein 1)和 CD44 表达增高。通过 Western blot 和 qPCR 实验也进一步证实,与亲本细胞相比,在所有耐药株中 E- 钙黏蛋白

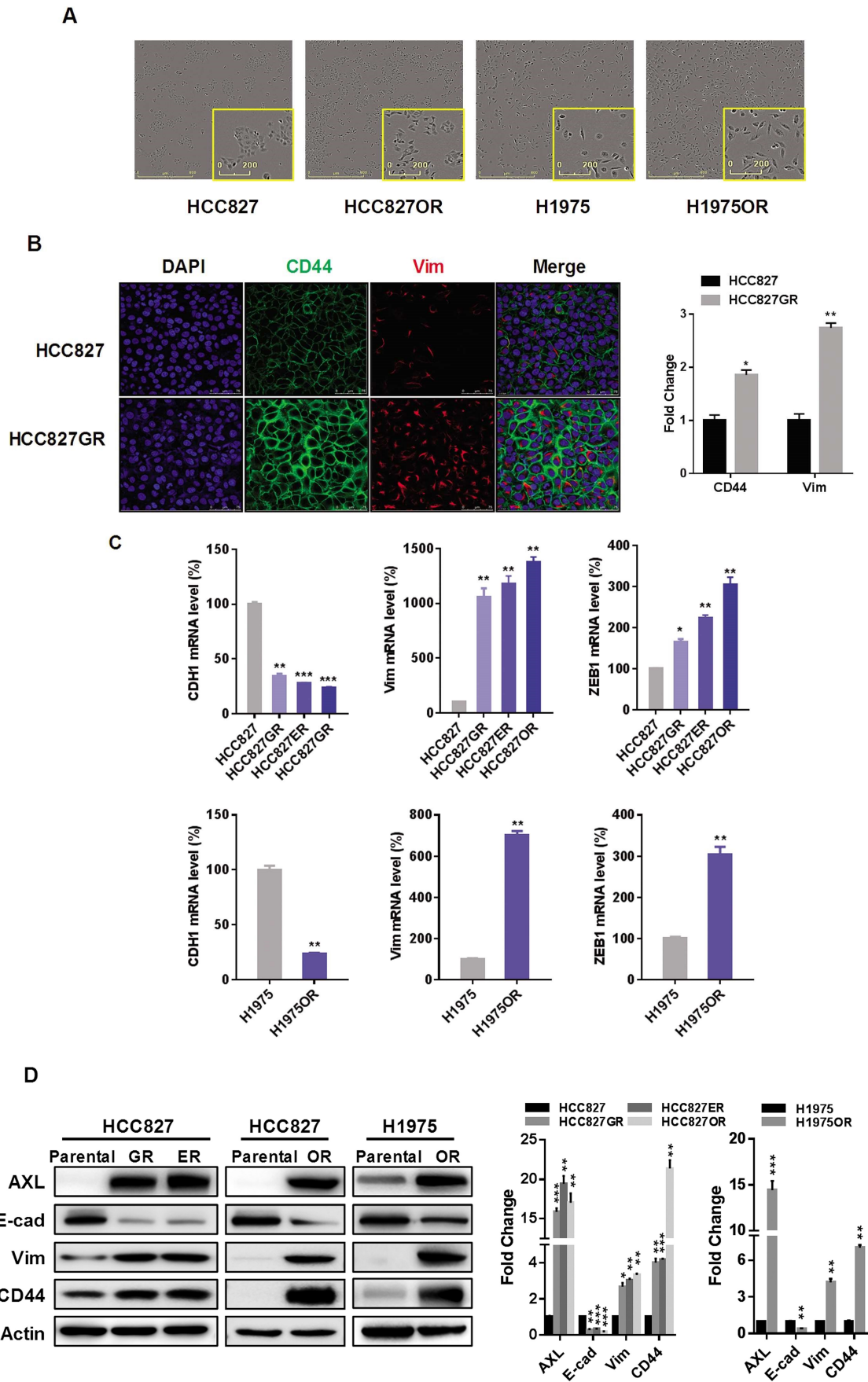


图 2 EGFR-TKIs 耐药株发生上皮间质转化(EMT)

Fig.2 EGFR-TKIs resistant cells acquired epithelial-mesenchymal transition (EMT) properties

(E-cadherin)以及 mRNA 水平表达下调(HCC827GR: $P<0.01$; HCC827ER: $P<0.001$; HCC827OR: $P<0.001$; H1975OR: $P<0.01$, 图 2C、图 2D), 波形蛋白 (Vimentin)(HCC827GR: $P<0.01$; HCC827ER: $P<0.01$; HCC827OR: $P<0.01$; H1975OR: $P<0.01$, 图 2C、图 2D), ZEB-1 以及 CD44 表达上调(HCC827GR: $P<0.05$; HCC827ER: $P<0.01$; HCC827OR: $P<0.01$; H1975OR: $P<0.01$, 图 2C、图 2D)。

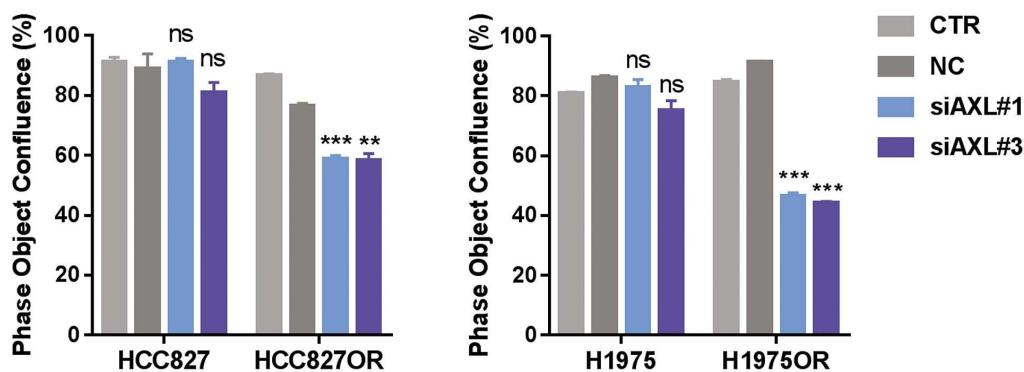
2.3 靶向 AXL 选择性抑制耐药株的增殖能力且恢复耐药株对 EGFR-TKIs 的药敏性

为了探究 AXL 与 EGFR-TKIs 耐药的相关性, 我们在 H1975、H1975OR 细胞等多个耐药模型中通过遗传学手段 siRNA 靶向 AXL, 通过 Incucyte 活细胞成像仪实时监测发现, 敲低 AXL 选择性抑制耐药株的增殖能力(图 3A), 提示 AXL 在肺腺癌细胞对 EGFR-TKIs 耐药中发挥着重要的作用。R428 (BGB324)是 AXL 高选择性小分子抑制剂, 目前在 NSCLC 和

急性髓性白血病(Acute myelogenous leukemia, AML)中的应用已进入临床III期研究。首先, 我们考察了单独使用 R428, 单独使用奥希替尼(Osimertinib)以及联合两者使用时对肺腺癌亲本及耐药株的抑制率。结果显示(图 3B), 1 μ M 的 R428 对 HCC827、HCC827OR、H1975、H1975OR 细胞抑制率分别为 34.81%、23.33%、39.68%、35.59%。2 μ M 的 Osimertinib 对 HCC827、HCC827OR、H1975、H1975OR 细胞抑制率分别为 81.97%、34.42%、74.54%、39.18%, 但当两者联合使用时, 对 HCC827OR 和 H1975OR 细胞的抑制率为 89.49%、76.66%, 说明联合 R428 可以显著增加耐药细胞株对 Osimertinib 的药敏性(HCC827: $P<0.01$; HCC827OR: $P<0.0001$; H1975: $P<0.05$; H1975OR: $P<0.001$, 图 3B)。选择性抑制 AXL 以及敲低 AXL 均可增加耐药株对 Osimertinib 的药敏性, 提示 AXL 与 EGFR-TKIs 耐药密切相关。

2.4 靶向 AXL 选择性抑制耐药株迁移能力

A



B

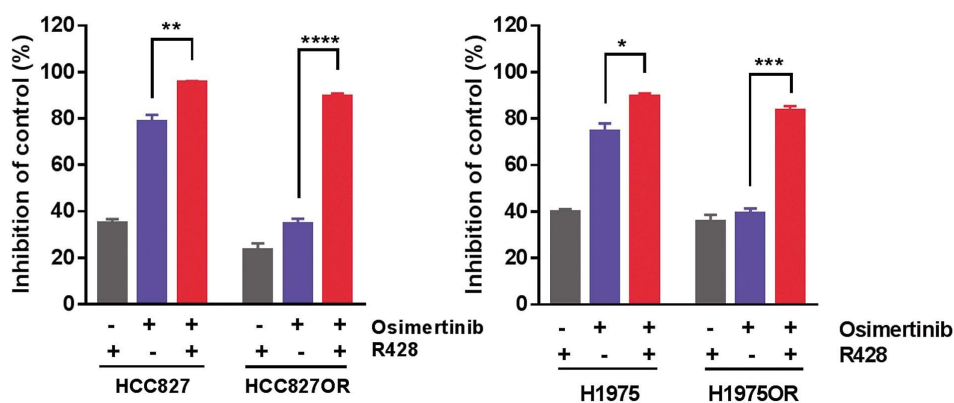


图 3 靶向 AXL 对亲本及耐药株增殖能力和药敏性的影响

Fig.3 The effect of targeting AXL on proliferation capacity and the sensitivity of EGFR-TKIs of parental and drug-resistant cells

耐药的肿瘤细胞常伴随着迁移、侵袭以及浸润等能力的增强^[14,15]。已有文献报道, AXL 参与多种上皮来源恶性肿瘤的迁移、侵袭的过程^[16], 这些特性与病人的预后不良密切相关^[17]。本研究基于 Transwell 以及划痕实验进一步探究 AXL 对肺腺癌细胞及其耐药株迁移能力的影响。Transwell 实验结果显示, 与 HCC827 亲本株相比, HCC827OR 耐药株的迁移能力明显增强($P<0.001$)。同时相比于 HCC827 亲本株, 敲低 AXL 更显著抑

制 HCC827OR 耐药株的迁移能力, 类似的结果在 H1975 及 H1975OR 细胞株中也得到了证实(图 4A)。划痕实验结果显示, 在 HCC827、HCC827OR、H1975 和 H1975OR 细胞中使用 R428 靶向 AXL, 所有细胞株的迁移能力均受到了抑制, 但相较于 HCC827 和 H1975 亲本细胞株, HCC827OR 和 H1975OR 耐药株的迁移能力受到抑制程度更显著(HCC827OR: $P<0.01$; H1975OR: $P<0.0001$, 图 4B)。以上实验均说明 AXL 与

EGFR-TKIs 耐药株增强的迁移能力密切相关。

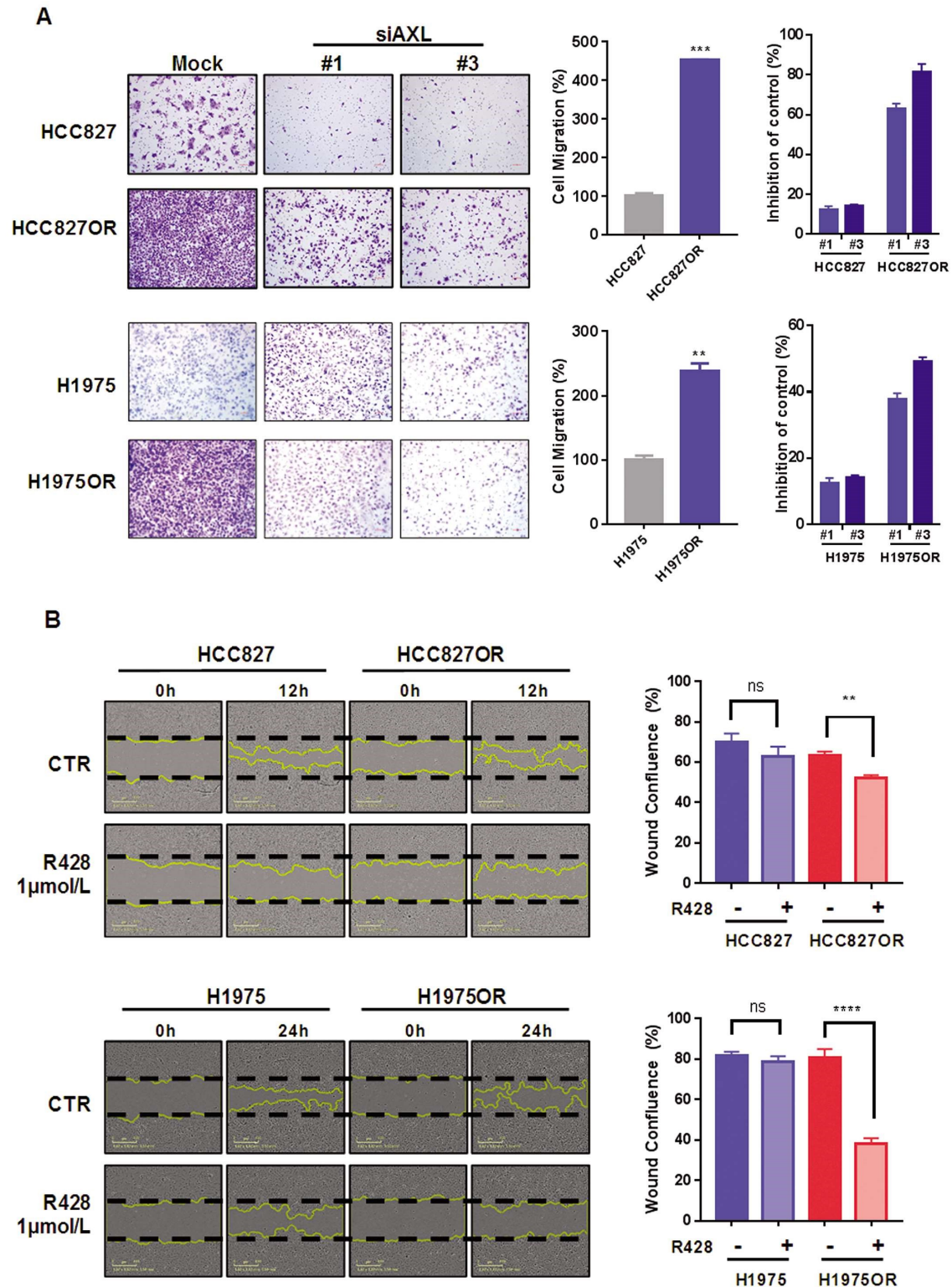


图 4 靶向 AXL 对亲本及耐药株迁移能力的影响

Fig.4 The effect of targeting AXL on the migration ability of parental and resistant cells

3 讨论

近年来,肺癌驱动基因表皮生长因子(EGFR)的分子靶向治疗取得了重大进展。以吉非替尼(Gefitinib)、厄洛替尼(Erlotinib)和奥希替尼(Osimertinib)为代表的 EGFR-TKIs 分子靶向药物,对 EGFR 基因突变阳性的肺腺癌患者治疗效果显

著。然而,初治之后几乎不可避免出现的耐药^[18],成为这些 EGFR-TKIs 最终效果的瓶颈,尤其是对第三代 EGFR-TKI 奥希替尼耐药后,至今尚无靶向药物可及,成为该疾病临床精准治疗的痛点。发现新的耐药机制、寻找新型药靶、克服 EGFR-TKIs 耐药,是该领域科学研究和临床治疗方面亟待解决的重大问

题。为了解决这一问题,本研究基于自行构建的耐药模型,利用基因组学方法,结合临床相关公共数据库,多组学整合分析筛选出克服肺腺癌 EGFR-TKIs 获得性耐药的潜在靶标 AXL。AXL 作为一种受体酪氨酸激酶,已被证实多种癌症中显著高表达,但目前关于 AXL 与肺腺癌 EGFR-TKIs 获得性耐药性的研究尚少。本研究发现在多个 EGFR-TKIs 耐药模型中,AXL 在蛋白质及 mRNA 表达水平均增高,提示 AXL 可能与 EGFR-TKIs 获得性耐药密切相关。同时,本研究还发现构建的耐药株的 EMT 相关标志物 E-钙黏蛋白(E-cadherin)表达下调,波形蛋白(Vimentin)表达增加,且迁移能力显著增强。EMT 会促使肿瘤细胞转移,从而降低机体对药物治疗的有效反应最终导致耐药^[19]。已有研究报道,AXL 能通过激活下游 PI3K-AKT、ERK-MAPK、JNK 等信号通路进而促进 EMT 的发生^[20],这为探究 AXL 与肺腺癌细胞 EGFR-TKIs 获得性耐药的相关性奠定实验基础。本研究通过 siRNA 干预以及小分子抑制剂 R428 靶向 AXL 可以显著恢复耐药株对 EGFR-TKIs 的敏感性。进一步实验也表明,相比于亲本细胞,靶向 AXL 后能明显抑制 EGFR-TKIs 耐药株的增殖以及迁移能力,类似的结果在不同肺腺癌细胞系中都得到了验证。同时,R428 作为 AXL 的小分子抑制剂,在多种体内外模型中已被证实能抑制癌细胞的增殖与转移,目前已进入了 III 期临床试验。但关于 AXL 介导 EGFR-TKIs 获得性耐药的具体分子机制尚未明确,之后的工作中我们将进一步通过 RNA-seq、基因芯片以及数据库预测来探究调控 AXL 的关键因子,并且通过对差异基因进行 pathway 和 GSEA 富集分析探究 AXL 具体通过调控哪些信号通路介导 EMT 以及耐药的产生。

综上所述,AXL 在 EGFR-TKIs 耐药株中高表达,用遗传学和药理学手段靶向该分子可以显著逆转体外耐药,逆转耐药细胞所增强的迁移等肿瘤生物学特征,提示 AXL 介导 EGFR-TKIs 获得性耐药可能与参与 EMT、肿瘤细胞的运动等相关。并且 AXL 的特异性小分子抑制剂 R428 已进入 III 期临床试验。因此,本研究对克服 EGFR-TKIs 获得性耐药有着重要的临床治疗价值以及转化医学前景。

参考文献(References)

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A, et al. Cancer statistics, 2017 [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2017, 67 (1): 7-30
- [2] Lee C K, Davies L, Wu Y L, et al. Gefitinib or Erlotinib vs Chemotherapy for EGFR Mutation-Positive Lung Cancer: Individual Patient Data Meta-Analysis of Overall Survival [J]. Journal of the National Cancer Institute, 2017, 109(6)[Epub ahead of print]
- [3] Kuwano M, Sonoda K, Murakami Y, et al. Overcoming drug resistance to receptor tyrosine kinase inhibitors: Learning from lung cancer[J]. Pharmacol Ther, 2016, 161: 97-110
- [4] Soria JC, Ohe Y, Vansteenkiste J, et al. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer [J]. N Engl J Med, 2018, 378(2): 113-125
- [5] Gay CM, Balaji K, Byers LA. Giving AXL the axe: targeting AXL in human malignancy[J]. Br J Cancer, 2017, 116(4): 415-423
- [6] Huang JS, Cho CY, Hong CC, et al. Oxidative stress enhances Axl-mediated cell migration through an Akt1/Rac1-dependent mechanism[J]. Free Radic Biol Med, 2013, 65(6): 1246-1256
- [7] Hafizi S, Ibraimi F, Dahlbäck B. C1-TEN is a negative regulator of the Akt/ PKB signal transduction pathway and inhibits cell survival, proliferation, and migration[J]. FASEB J, 2005, 19(8): 971-973
- [8] Tian Y, Zhang Z, Miao L, et al. Anexelektro (AXL) increases resistance to EGFR-TKI and activation of AKT and ERK1/2 in non-small cell lung cancer cells[J]. Oncol Res, 2016, 24(5): 295-303
- [9] Antony J, Huang RY. AXL-Driven EMT State as a Targetable Conduit in Cancer[J]. Cancer Res, 2017, 77(14): 3725-3732
- [10] Akalu YT, Rothlin CV, Ghosh S, et al. TAM receptor tyrosine kinases as emerging targets of innate immune checkpoint blockade for cancer therapy[J]. Immunol Rev, 2017, 276(1): 165-177
- [11] Ghiso E, Migliore C, Ciciriello V, et al. YAP-Dependent AXL Overexpression Mediates Resistance to EGFR Inhibitors in NSCLC [J]. Neoplasia, 2017, 19(12): 1012-1021
- [12] Schoumacher M, Burbridge M. Key Roles of AXL and MER Receptor Tyrosine Kinases in Resistance to Multiple Anticancer Therapies[J]. Curr Oncol Rep, 2017, 19(3): 19-19
- [13] Antony J, Tan TZ, Kelly Z, et al. The GAS6-AXL signaling network is a mesenchymal (Mes) molecular subtype-specific therapeutic target for ovarian cancer[J]. Sci Signal, 2016, 9(448): ra97
- [14] Lin JZ, Wang ZJ, De W, et al. Targeting AXL overcomes resistance to docetaxel therapy in advanced prostate cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(25): 41064-41077
- [15] Wang C, Jin H, Wang N, et al. Gas6/Axl axis contributes to chemoresistance and metastasis in breast cancer through Akt/GSK-3 β / β -catenin signaling[J]. Theranostics, 2016, 6(8): 1205-1219
- [16] Lee DH. Treatments for EGFR-mutant Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): The Road to A Success, Paved with Failures[J]. Pharmacol Ther, 2017, 174: 1-21
- [17] Le X, Puri S, Negrao M V, et al. Landscape of EGFR-Dependent and -Independent Resistance Mechanisms to Osimertinib and Continuation Therapy Beyond Progression in EGFR-Mutant NSCLC [J]. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research, 2018, 24(24): 6195-203
- [18] Maruccci F, Stassi G, De Maria R. Epithelial-mesenchymal transition: a new target in anticancer drug discovery[J]. Nat Rev Drug Discov, 2016, 15(5): 311-325
- [19] Antony J, Zanini E, Kelly Z, et al. The tumour suppressor OPCML promotes AXL inactivation by the phosphatase PTPRG in ovarian cancer [J]. EMBO reports, 2018, 19(8)[Epub ahead of print]