

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.05.006

细胞自噬在吉非替尼治疗非小细胞肺癌中的作用及其机制研究

徐志红¹ 张悦民¹ 郁佳敏² 高蓓莉² 胡家安^{1△}

(1 上海交通大学医学院附属瑞金医院老年病科 上海 200025; 2 上海交通大学医学院附属瑞金医院呼吸内科 上海 200025)

摘要 目的:观察吉非替尼对非小细胞肺癌细胞自噬的影响,并探讨其机制。**方法:**将 BalB/CA-nu 品系裸小鼠分成两组,每组 20 只,均造肺癌模型,其中吉非替尼治疗组小鼠在肺癌组模型的基础上给予吉非替尼 25mg/kg 14d,停药后剖杀。取组织切片,通过免疫荧光、RT-PCR 以及 Western blot 的试验方法检测自噬相关基因 Beclin1 和 MAPLC3 的表达。**结果:**免疫荧光、RT-PCR 以及 Western blot 的试验方法检测均发现肺癌组小鼠组织中 Beclin1 和 MAPLC3 表达较低,而在吉非替尼处理组中,Beclin1 和 MAPLC3 的表达明显升高,差异有统计学意义。**结论:**吉非替尼可以通过增强细胞自噬从而发挥对非小细胞肺癌的抑制作用。

关键词:吉非替尼;非小细胞肺癌;细胞自噬

中图分类号:R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)05-822-04

The Role of Gefitinat in Non Small Cell Lung Cancer Induced by Autophagy

XU Zhi-hong¹, ZHANG Yue-min¹, YU Jia-min², GAO Bei-li², HU Jia-an^{1△}

(1 Department of Geriatrics, Ruijin Hospital Affiliated Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200025, China;

2 Department of Respiratory Diseases, Ruijin Hospital Affiliated Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200025, China)

ABSTRACT Objective: To observe The role of Gefitinat in non small cell lung cancer induced by autophagy and to investigate the mechanism. **Methods:** 40 nude mice were randomly divided into two groups, the group with gefitinat was treated by infusing the stomach with the medicine, 25mg/kg. The expression of Beclin1 and MAPLC3 were determined by immunofluorescence, RT-PCR and Western blot. **Results:** The Mrna and protein level of Beclin1 and MAPLC3 in the group with gefitinat treating were both significant higher by immunofluorescence, RT-PCR and Western blot. **Conclusion:** Gefitinat can inhibit the progress of non small cell lung cancer by influence autophagy.

Key words: Gefitinat; Non small cell lung cancer; Autophagy

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

Article ID: 1673-6273(2014)05-822-04

前言

肺癌是目前世界上发病率和病死率最高的癌症之一,肺癌常分为小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC)两大类,其中非小细胞肺癌占肺癌所有病例的 80%-85%^[1-3]。非小细胞肺癌在老年人中发病率高,通常发现时已为中晚期^[4-6]。

细胞自噬(autophagy)是细胞利用溶酶体降解自身大分子物质和受损的细胞器的生物学过程。细胞自噬在维持细胞内稳态中起着非常重要的作用。其在形态学上主要表现为细胞胞质内出现双层膜自噬复合体,其中包含待降解的成分,并且其可以进一步与溶酶体融合形成自噬体,而胞质成分最终在自噬体中被代谢掉^[7-8]。而细胞自噬与肿瘤之间到底存在着怎样的关系一直是研究的热点,研究表明,靶向针对 EGFR 的西妥昔单抗药物(cetuximab)能诱导癌细胞产生细胞自噬,且细胞自噬与细胞凋亡的发生有密切的关系^[9-10]。EGFR 的靶向小分子药物吉非替尼在一些肺癌细胞株中能诱导细胞自噬的发生,但细胞自噬

在吉非替尼治疗非小细胞肺癌中的作用及其具体的分子机理还有待更深入地研究。

1 材料与方法

1.1 动物建模分组

SPF 级 BalB/CA-nu 品系裸小鼠共 40 只,平均分为两组,各 20 只(由中国医学科学院动物繁育场提供,动物质量合格证号为医动字第 01-1004 号,均为雌性,3~4 周龄,体重约 18 g)。取荷 Lewis 模型鼠生长良好的肿瘤组织 5 g,研碎后加生理盐水 15 mL 稀释成细胞悬液。采用皮下注射的方法,每只裸小鼠接种 0.2 mL 的该细胞悬液。吉非替尼治疗组在肺癌组模型的基础上给予吉非替尼 25 mg/kg/d × 14 d,停药后剖杀。

1.2 RT-PCR 检测 mRNA 的表达

采用 Trizol 法提取总 RNA,按逆转录试剂盒说明转录成 cDNA,用 PCR 试剂盒扩增 DNA。Beclin1 引物序列:上游 5'-ATCCTGGACCGTGTACCATCCAGG-3',anti-sense 5'-GTT-GAGCTGAGTGTCCAGCTGG-3';MAPLC3 引物序列:上游 5'-GAAGATGTCCGACTTATTCGAGAG-3',anti-sense 5'-ACT-CTCATACACCTCTGAGATTGG-3';GAPDH 引物序列:上游:5'-CGGAATTCGCCACCATGCAGGTCCCT-3,下游:5'-GCTCT-AGACTAGTT CACTGTCCACT-3'。PCR 的反应条件为 94℃ 预变性 1 min,然后 94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 1.5 min,72℃ 延伸

作者简介:徐志红(1971-),女,博士,副主任医师,主要从事老年疾病的诊治及机制研究,E-mail:983441262@qq.com

△通讯作者:胡家安(1961-),男,本科,主任医师,主要从事肺癌的诊治及机制研究,E-mail:jahu-rj@aliyun.com.cn

(收稿日期:2013-08-01 接受日期:2013-08-24)

1 min, 共 30 个循环, 72℃ 延伸 7 min。mRNA 表达量 = 相应 mRNA 积分光密度值 / β -actin 的积分光密度值。

1.3 Western-blotting 测蛋白含量

按照试剂盒说明书抽提蛋白, 取蛋白裂解液和细胞裂解液按照 1:9 体积混合, 吹打混匀, 静止后取上清分装, 检测蛋白浓度。内参照为 β -actin, 利用胶片条带扫描分析, 蛋白表达量 = 相应蛋白积分光密度值 / β -actin 的积分光密度值。

1.4 免疫荧光

组织用 10% 福尔马林液固定, 常规石蜡包埋, 4 μ m 连续切片, 做免疫组化染色, 免疫组化方法 S-P 法免疫组化 S-P 法步骤按说明书操作, 石蜡切片脱蜡至水, 3% H_2O_2 孵育 10 min, 热抗原修复, 封闭后加一抗, 4℃ 过夜, 依次滴加生物素标记二抗, 室温下避光孵育 30 min, PBS 再次洗涤后用 PI 和 Rnase A

染 DNA 30 min, 于激光共聚焦显微镜下观察。

1.5 统计学分析

数据采用 SPSS11.0 统计软件进行分析, 计数资料比较采用 χ^2 检验; 计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫荧光染色结果

通过对两组裸小鼠肺癌组织进行免疫荧光检测, 发现肺癌组裸小鼠组织中 Beclin1 和 MAPLC3 表达较低, 而在吉非替尼处理组中, Beclin1 和 MAPLC3 的表达明显升高, 见图 1。并且, Beclin1 和 MAPLC3 在两组中的表达阳性率比较, 差异有统计学意义, 见表 1。

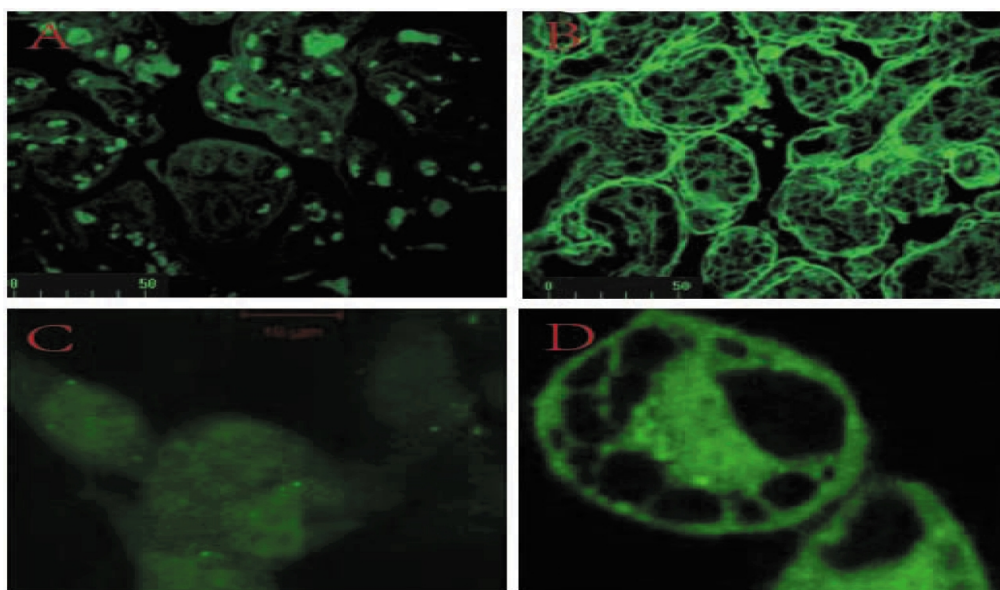


图 1 两组裸小鼠免疫荧光染色结果(A. 肺癌模型组 Beclin1; B. 吉非替尼治疗组 Beclin1; C. 肺癌模型组 MAPLC3; D. 吉非替尼治疗组 MAPLC3)
Fig.1 Immunofluorescence staining results in two groups of nude mice(A. Beclin1 in Lung cancer model group; B. Beclin1 in Gefitinib treatment group; C. MAPLC3 in Lung cancer model group; D. MAPLC3 in Gefitinib treatment group)

表 1 Beclin1 和 MAPLC3 在两组中的表达阳性率

Table 1 Positive rate of Beclin1 and MAPLC3 in the expression of the two groups

Groups	Positive rate of Beclin1 (%)	Positive rate of MAPLC3 (%)
Cancer model group	6.12	3.43
Gefitinib treatment group	23.58	34.16
χ^2	12.68	25.17
P	0.005	0.002

2.2 RT-PCR 检测

Beclin1 mRNA 和 MAPLC3 mRNA 在两组中的表达(见图 2)。Beclin1 mRNA 和 MAPLC3 mRNA 在肺癌组织中表达量较低, 而在吉非替尼治疗组肺癌组织中的相对表达量较高, 差异有统计学意义, 见表 2。

2.3 Western blot 检测

Beclin1 蛋白和 MAPLC3 蛋白在两组肺癌组织中的表达, 见图 3。我们发现 Beclin1 和 MAPLC3 在吉非替尼治疗组肺癌组织中的相对表达量较高, 而在肺癌组织中低表达, 差异有统

计学意义, 见表 3。

3 讨论

细胞自噬是一种高度保守, 并且与细胞的生长、增殖以及肿瘤的发生过程密切相关的细胞行为。自噬在维护细胞内环境稳态方面有着重要的作用, 其参与细胞中大分子物质的循环以及受损细胞的清除。完整的细胞器与大分子蛋白降解主要依赖细胞自噬的途径^[11-13]。Beclin1 是哺乳动物参与细胞自噬的重要基因, 其主要是通过 PI3K 结合形成复合体调节蛋白在自噬前

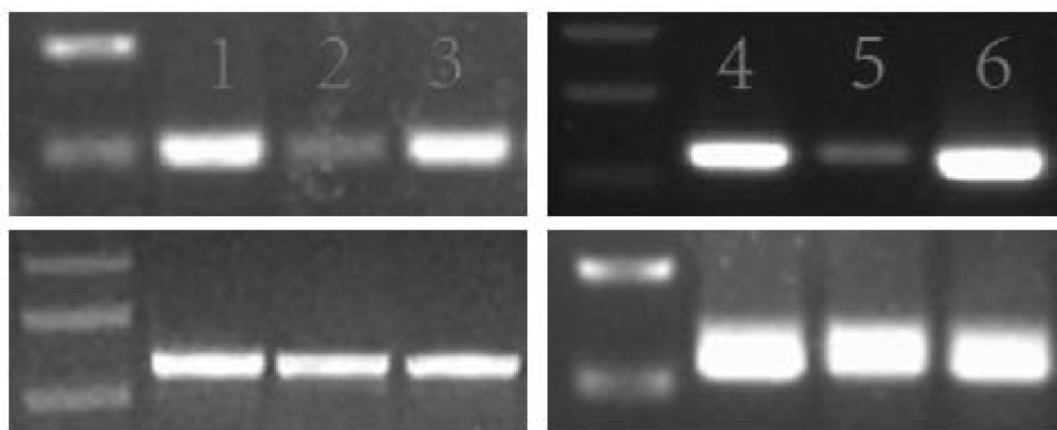


图2 Beclin1 mRNA 和 MAPLC3 mRNA 的表达(1:Beclin1 阳性对照;2:肺癌模型组中 Beclin1 的表达;3:吉非替尼治疗组中 Beclin1 的表达;4:MAPLC3 阳性对照;5:肺癌模型组中 MAPLC3 的表达;6:吉非替尼治疗组中 MAPLC3 的表达;下图:GAPDH。)

Fig.2 The expression of Beclin1 mRNA and MAPLC3 mRNA(1:Positive comparison of Beclin1;2:Expression of Beclin1 in cancer model group;3:Expression of Beclin1 in Gefitinib treatment group;4:Positive comparison of MAPLC3;5:Expression of MAPLC3 in cancer model group;6:Expression of MAPLC3 in Gefitinib treatment group;The following diagram:GAPDH)

表2 Beclin1 mRNA 和 MAPLC3 mRNA 在两组裸小鼠中的相对表达量

Table 2 The relative expression of Beclin1 mRNA and MAPLC3 mRNA in the two groups of nude mice

Groups	Case	Beclin1 mRNA	MAPLC3 mRNA
Cancer model group	20	1.31± 0.33	4.52± 1.18
Gefitinib treatment group	20	10.27± 0.58	23.85± 3.28
t	-	60.048	24.799
P	-	0.000	0.000

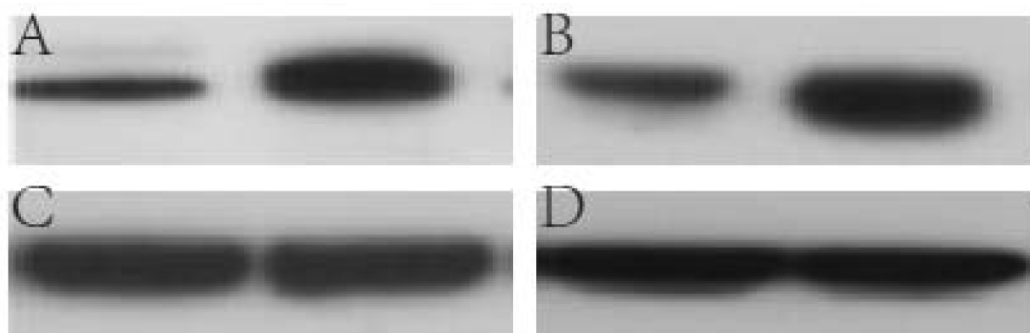


图3 Beclin1 蛋白和 MAPLC3 蛋白的表达(A. 肺癌模型组 Beclin1 与吉非替尼治疗组 Beclin1;B. 肺癌模型组 MAPLC3 与吉非替尼治疗组 MAPLC3;C. GAPDH;D. GAPDH)

Fig.3 The expression of Beclin1 protein and MAPLC3 protein(A.Beclin1 in two groups;B.MAPLC3 in two groups;C. GAPDH;D. GAPDH)

表3 Beclin1 蛋白和 MAPLC3 蛋白在两组裸小鼠中的相对表达量

Table 3 The relative expression of Beclin1 protein and MAPLC3 protein in the two groups of nude mice

Groups	Case	Beclin1 mRNA	MAPLC3 mRNA
Cancer model group	20	4.49± 0.71	3.15± 0.41
Gefitinib treatment group	20	12.37± 1.29	13.23± 4.16
t	-	23.933	10.784
P	-	0.000	0.000

体中的位置来调节细胞自噬的活性^[14,15]。近年来研究发现,Beclin1 是一种重要的抑癌基因,在多种肿瘤如乳腺癌、卵巢癌中发现存在 Beclin1 基因的缺失和突变,当 Beclin1 基因缺失时,小鼠发生肿瘤的几率较正常小鼠更高^[16,17]。MAPLC3 也是一种

在哺乳动物中参与细胞自噬的重要基因,其主要位于自噬泡膜的表面以及前自噬泡中参与机体内自噬体的形成^[18]。在肿瘤发生发展的早期,细胞自噬可以抑制肿瘤的形成,若此时细胞自噬受到阻碍,则会导致癌前病变的发展。而在很多肿瘤组织中

发现,自噬相关基因在其中都存在着不同程度的染色体缺失,导致基因突变或缺失,进而使得其表达量减少。

吉非替尼是一种小分子的酪氨酸激酶抑制剂,近年来被逐渐应用于肿瘤的临床治疗中。吉非替尼可以抑制不同程度表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的癌细胞的生长^[19,20]。临床研究证明,对于进展期的EGFR突变非小细胞肺癌的患者,应用吉非替尼可以明显的缓解临床症状,且患者的耐受性良好。

在本研究中,我们通过免疫荧光、RT-PCR以及Western blot的试验方法分别从直观的层面以及mRNA、蛋白的层面检测了肺癌模型组小鼠与吉非替尼治疗组小鼠肺癌组织中自噬相关基因Beclin1和MAPLC3的表达。在这三种检测方法中均发现肺癌组小鼠组织中Beclin1和MAPLC3表达较低,而在吉非替尼处理组中,Beclin1和MAPLC3的表达明显升高。说明吉非替尼可以有效的升高自噬相关基因Beclin1和MAPLC3的表达,增加自噬小体的产生,增强细胞自噬的功能,从而抑制癌细胞生长,抑制EGFR的表达并且阻断细胞信号转导通路,最终抑制肿瘤的发生和发展。

综上所述,我们通过实验发现吉非替尼可以通过增强细胞自噬从而发挥对非小细胞肺癌的抑制作用,可以作为肺癌靶向治疗的一种新策略,值得进一步的研究和分析。

参考文献(References)

- [1] Wang S, Wang Z. Epigenetic aberrant methylation of tumor suppressor genes in small cell lung cancer[J]. J Thorac Dis, 2013, 5(4):532-537
- [2] 王静, 张玉海, 史皆然, 等. Mcl1对晚期非小细胞肺癌患者预后意义[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(12):2277-2282
Wang Jing, Zhang Yu-mei, Shi Jie-ran, et al. Prognostic Significance of MCL1 in Advanced Non-small Cell Lung Cancer Patients[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13(12):2277-2282
- [3] Chen Y, Huang Y, Huang Y, et al. The Prognostic Value of SOX2 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis[J]. PLoS One, 2013, 8(8):e71140
- [4] Janku F, Stewart DJ, Kurzrock R. Targeted therapy in non-small-cell lung cancer--is it becoming a reality [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2010, 7(7):401-414
- [5] Cao JQ, Rodrigues GB, Louie AV, et al. Systematic review of the cost-effectiveness of positron-emission tomography in staging of non-small-cell lung cancer and management of solitary pulmonary nodules[J]. Clin Lung Cancer, 2012, 13(3):161-170
- [6] Shi X, Yu XM, Zhang YP, et al. Efficacy and safety of pemetrexed or gemcitabine combined with carboplatin as the first-line therapy in elderly patients with advanced non-small cell lung cancer [J]. Chinese Journal of Tumor, 2013, 35(3):221-224
- [7] 徐志红, 高蓓莉, 胡家安, 等. 细胞自噬对吉非替尼抑制肺癌细胞增殖的影响[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2013, 33(1):25-29
Xu Zhi-hong, Gao Bei-li, Hu Jia-an, et al. Effects of autophagy on growth inhibition of Gefitinib in non-small cell lung cancer cell lines [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science), 2013, 33(1):25-29
- [8] Kim KM, Yu TK, Chu HH, et al. Expression of ER stress and autophagy-related molecules in human non-small cell lung cancer and premalignant lesions[J]. Int J Cancer, 2012, 131(4):E362-370
- [9] Kato Y, Peled N, Wynes MW, et al. Novel epidermal growth factor receptor mutation-specific antibodies for non-small cell lung cancer: immunohistochemistry as a possible screening method for epidermal growth factor receptor mutations[J]. J Thorac Oncol, 2010, 5(10):1551-1558
- [10] Rosell R, Moran T, Queralt C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer [J]. N Engl J Med, 2009, 361(10):958-967
- [11] 童茵, 李璐, 刘辉, 等. 细胞自噬与血液肿瘤关系研究进展[J]. 浙江大学学报(医学版), 2010, 39(3):246-249, 256
Tong Yin, Li Lu, Liu Hui, et al. Research progress on autophagy in hematopoietic malignances[J]. Journal of Zhejiang University (Medical Sciences), 2010, 39(3):246-249, 256
- [12] Cherra SJ, Dagda RK, Chu CT. Review: autophagy and neurodegeneration: survival at a cost [J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2010, 36(2):125-132
- [13] 尚莹, 陆美. 肿瘤治疗过程中凋亡与自噬的关系[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(4):766-769
Shang Ying, Lu Xian. The Relationship Between Apoptosis and Autophagy in Tumor Therapy[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10(4):766-769
- [14] Shin JY, Hong SH, Kang B, et al. Overexpression of beclin1 induced autophagy and apoptosis in lungs of K-ras(LA1) mice[J]. Lung Cancer, 2013, 81(3):362-370
- [15] 王赞宏, 李莉, 彭芝兰, 等. 自噬基因 Beclin1 对宫颈癌 HeLa 细胞生长影响的体内外研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2011, 33(11):804-809
Wang Zan-hong, Li Li, Peng Zhi-lan, et al. Effect of autophagy gene Beclin 1 on the growth of cervical cancer HeLa cells in vitro and vivo [J]. Chinese Journal of Oncology, 2011, 33(11):804-809
- [16] Shahnazari S, Brumell JH. Eating twice for the sake of immunity: a phagocytic receptor that activates autophagy [J]. Cell Host Microbe, 2009, 6(4):297-298
- [17] 王日玮. 自噬基因 Beclin1 与乳腺癌的关系 [J]. 中国普通外科杂志, 2012, 21(5):591-596
Wang Ri-wei. Autophagy gene Beclin1 and breast cancer[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2012, 21(5):591-596
- [18] Liu Q, Wang JJ, Pan YC, et al. Expression of autophagy-related genes Beclin1 and MAPLC3 in non-small cell lung cancer[J]. Cancer, 2008, 27(1):25-29
- [19] 侯彦丽, 杨拴盈, 李维, 等. 吉非替尼治疗表皮生长因子受体基因突变的晚期非小细胞肺癌患者疗效的 meta 分析 [J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2012, 11(8):564-569
Hou Yan-li, Yang Shuan-ying, Li Wei, et al. Gefitinib for advanced non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor mutations: a meta analysis[J]. Chinese Journal of Multiple Organ Diseases in the Elderly, 2012, 11(8):564-569
- [20] Bergkvist GT, Yool DA. Epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in veterinary oncology[J]. Vet Comp Oncol, 2011, 9(2):81-94