

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.02.008

FGFR1 通过调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路介导非小细胞肺癌对吉非替尼的耐药 *

陈 坤^{1,2} 雷 杰¹ 张志培¹ 孙 盈¹ 田 丰¹ 李小飞¹ 王小平^{1△}

(1 空军军医大学第二附属医院胸腔外科 陕西 西安 710038; 2 泾阳县医院 陕西 咸阳 713700)

摘要 目的:探讨成纤维细胞生长因子受体 1(FGFR1)诱导非小细胞肺癌(NSCLC)吉非替尼获得性耐药的机制。**方法:**用吉非替尼诱导 PC9 细胞构建耐药细胞株 PC9/GR, 用 CCK-8、平板克隆形成、transwell 技术检测细胞的增殖和迁移能力, 用流式细胞术检测细胞的凋亡状况, qRT-PCR、免疫荧光和蛋白免疫印迹技术检测基因表达水平。进一步采用 FGFR1 抑制剂 PD173074 或 siRNA-FGFR1 处理 PC9/GR 细胞, 检测细胞的增殖、迁移、克隆形成能力的变化及 Akt、p-Akt、mTOR 和 p-mTOR 表达的变化。**结果:**PC9/GR 细胞的增殖、迁移及对吉非替尼的耐受能力显著增强; FGFR1 在 PC9/GR 细胞中的表达水平显著升高; 用 PD173074 处理 PC9 细胞后, 其增殖、迁移能力及对吉非替尼的耐受能力显著下降; 敲低 FGFR1 后 Akt 和 mTOR 的磷酸化水平显著下降。**结论:**FGFR1 通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路介导非小细胞肺癌对吉非替尼的耐药。

关键词:非小细胞肺癌; 纤维细胞生长因子受体 1; PI3K/AKT/mTOR 信号通路; 吉非替尼; 耐药机制

中图分类号:R-33; R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)02-236-08

FGFR1 Mediates the Resistance of Non-small Cell Lung Cancer to Gefitinib by Activating PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway*

CHEN Kun^{1,2}, LEI Jie¹, ZHANG Zhi-pe¹, SUN Ying¹, TIAN Feng¹, LI Xiao-fei¹, WANG Xiao-ping^{1△}

(1 Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China;

2 Department of Hepatobiliary & Thoracic Surgery, JingYang Hospital, Xianyang, Shaanxi, 713700, China)

ABSTRACT Objective: To explore the mechanism of fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) in inducing NSCLC resistance to gefitinib. **Methods:** Continuous induction of PC9 cells by gefitinib to construct PC9/GR cell lines. CCK-8 assay and plate clone formation were used to evaluate the growth of the cell. Cells migration ability was assessed through transwell experiment. Annexin V/PI staining and flow cytometry were employed for the detection of apoptosis. QRT-PCR assay was used to detect the mRNA expression levels of the target genes, and immunofluorescence assay and western blotting were used to detect the protein expression levels of the target genes. **Results:** The proliferation, migration and gefitinib tolerance ability of PC9/GR cells were significantly enhanced. The expression level of FGFR1 in PC9/GR was significantly higher than that in PC9 cells. PD173074 treatment of PC9 cells significantly suppressed its proliferation, migration and gefitinib tolerance ability. Knocking down FGFR1 resulted in a significant decrease in Akt and mTOR phosphorylation levels. **Conclusion:** FGFR1 mediates the resistance of non-small cell lung(NSCLC) to gefitinib through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway.

Key words: NSCLC; FGFR1; PI3K/AKT/mTOR signaling pathway; Gefitinib; Resistance mechanisms

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

Article ID: 1673-6273(2019)02-236-08

前言

肺癌的发病率和死亡率在我国高居恶性肿瘤的首位^[1], 而非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占肺癌总发病率的 85%^[2]。吉非替尼是表皮生长因子酪氨酸激酶受体抑制剂(epidermal growth factor tyrosine kinase receptor inhibitor, EGFR-TKI), 广泛应用于晚期非小细胞肺癌的治疗^[3]。约 80% 携带 EGFR 阳性突变的 NSCLC 患者经 EGFR-TKIs 治疗后无进展生存期显著延长^[4], 但几乎所有的患者再治疗后均出现

EGFR-TKIs 获得性耐药^[5]。以往的研究表明 EGFR-TKI 的耐药机制主要包括 EGFR 基因的二次突变(EGFR T790M)及 MET 原癌基因的扩增^[6]。此外, 肝细胞因子过表达、上皮间质转化、EGFR 扩增及转化为小细胞肺癌等均涉及 EGFR-TKI 获得性耐药, 但仍有约 30% 的获得性耐药机制未知^[6]。

既往研究表明抑制成纤维细胞生长因子受体 1(fibroblast growth factor receptor 1, FGFR1)的表达可增强阿法替尼或贝伐单抗的治疗效果, 并使原本对阿法替尼或贝伐单抗产生耐药的非小细胞肺癌细胞重新对阿法替尼或贝伐单抗敏感^[6-8], 但其发

* 基金项目: 陕西省自然科学基金项目(2016JM8009)

作者简介: 陈坤(1983-), 硕士研究生, 主要研究方向: 非小细胞肺癌分子靶向药物耐药机制的研究, E-mail: 15991027186@163.com

△ 通讯作者: 王小平(1964-), 博士生导师, 副教授, 主要研究方向: 非小细胞肺癌分子靶向药物耐药机制的研究, E-mail: wangxiaopingmd@163.com

(收稿日期: 2018-07-02 接受日期: 2018-08-07)

挥作用的机制尚不清楚。为此,我们构建了吉非替尼耐药的 NSCLC 细胞系,旨在探讨 FGFR1 介导 EGFR-TKIs 获得性耐药的机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 培养基和试剂 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)培养基和胎牛血清购自 GIBCO 公司。反转录试剂盒、FastStart Essential DNA Green Master 和 Annexin-V-FLUOS Staining Kit 购自美国罗氏公司(Roche 公司)。Western 印迹试剂盒购自西安晶彩生物有限公司。FGFR1(#9740S)、PI3K(#4249S)、p-PI3K(#4228S)、Akt(#2920S)、p-Akt(#4060S)、mTOR(#2983S)、p-mTOR(#5536S)、GAPDH(#5174S)抗体购自 Cell Signaling Technology 公司(CST 公司)。TRLzol 试剂盒 Lipofectamine 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司。siFGFR1 和阴性对照序列购自上海吉玛基因有限公司。吉非替尼(Gefitinib)、雷帕霉素(Rapamycin)和 FGFR1 抑制剂(PD173074)购自美国 Selleck 公司。CCK-8 试剂盒购自西安壮志生物有限公司。Tanon 5500 全自动化学发光成像分析系统购自上海天能科技有限公司。CytoFLEX 流式细胞仪购自 BECKMAN COULTER。CFX96 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 BIO-RAD 公司。FGFR1 克隆引物如下:F:R;和 siFGFR1 序列如下,

Sense#1:5'GCAGUGACACCACCUACUUTT3',
Antisense#1:5'AAGUAGGUGGUGUCACUGCTT3';
Sense#2:5'GCAGGAUGGUCCCUUGUAUTT3',
Antisense#2:5'AUACAAGGGACCAUCCUGCTT3';
Negative control 序列如下:
Sense:5'UUCUCCGAACGUGUCACGUTT3',
Antisense:5'ACGUGACACGUUCGGAGAATT3';
由上海生工生物有限公司合成。

1.1.2 细胞系 人肺癌 PC9 细胞系购自 ATCC 细胞库,PC9/GR 细胞系由本课题组诱导构建,方法如下:我们将 PC9 细胞暴露于浓度逐渐增加的吉非替尼。初始浓度用 40 nmol/L 吉非替尼,随后逐步增加到 55 nmol/L,70 nmol/L 和 100 nmol/L。所得细胞能够在 100 nM 吉非替尼中持续生长 6 个月。后期为了维持 PC9/GR 的耐药性,我们用含 800 ng/mL 吉非替尼的 DMEM 高糖培养基培养。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 用含 10%FBS 的 DMEM 高糖培养基培养 PC9 细胞;用含 10%FBS 和 800ng/mL 吉非替尼的 DMEM 高糖培养基培养 PC9/GR 细胞。培养条件为:温度 37℃,CO₂ 浓度 5%。

1.2.2 siRNA 和过表达质粒的转染 我们用上述引物从 PC9 细胞中克隆得到 FGFR1 的编码序列,将所得序列克隆到 PCD-NA3.1(+)质粒中。通过 Lipofectamine 2000 将上述质粒或 siRNA 转染到 PC9 细胞中。

1.2.3 CCK-8 实验 ①在 96 孔板中每孔接种 100 μ L 细胞悬液(2 000 个细胞);②分别用不同浓度的吉非替尼及 PD173074 处理细胞 72 h;③每隔 24 h 取出一块细胞培养板,弃培养基,每孔加入混合液(CCK8:无血清培养基=1:10)100 μ L;37℃ 孵育 1 h;④用酶标仪在 450 nm 处检测吸光值;⑤经计算绘制出生长曲线。

1.2.4 平板克隆形成实验 ①在 6 孔板中接种 PC9 或

PC9/GR 细胞悬液 2 mL(200 个细胞);②待细胞贴壁后,在培养基中加入 10 nmol/L 的吉非替尼,每隔 3 天换一次培养液;③持续诱导直到形成肉眼可见克隆;④弃培养液,用 PBS 洗涤 2 遍,加入 2 mL 4%多聚甲醛,室温固定 15-20 min;⑤弃多聚甲醛,加入 2 mL 的结晶紫染液,室温染色 30 min;⑥回收结晶紫染液,用双蒸水缓慢冲洗 6 孔板,直至背景干净,室温晾干,拍照并保存。

1.2.5 细胞凋亡实验 ①在 6 孔板中接种 2 mL PC9 或 PC9/GR 细胞悬液;②当细胞密度达到 80%左右时,撤除血清,添加 100 nmol/L 吉非替尼处理 24 h;③用 0.25%的胰蛋白酶将细胞消化下来,将细胞浓度调整到为(5~10) $\times 10^5$ 个/mL,取 1 mL 细胞,1000 r/min 4℃离心 10 min,弃上清;④用 1 mL 预冷的 PBS 重悬细胞,1000 r/min 4℃离心 10 min,弃上清,重复该步骤 2 次;⑤用 200 μ L 结合缓冲液重悬细胞,加入 5 μ L 的 PI 和 10 μ L Annexin V-FITC,轻轻混匀,室温避光反应 15 min;⑥加入 300 μ L 结合缓冲液,立即上机检测。

1.2.6 蛋白印迹实验 ①用 6 孔板培养细胞,待细胞密度达到 80%时用预冷的 PBS 洗涤 2 遍;②每孔中加入 100 μ L RAPI 裂解液,冰上裂解 10 min;③按照 ABC 蛋白定量试剂盒说明书进行蛋白定量;④加入相应体积的上样缓冲液,沸水煮 1 min;⑤聚丙烯酰胺凝胶电泳:每孔加 50 μ g 蛋白,60 V 电泳 30 min,120 V 电泳 90 min;⑥转膜:300 mA 120 min;⑦孵育一抗:4℃过夜;⑧孵育二抗,室温 1 h;⑨经 TBST 洗涤后,应用化学发光成像系统检测结果。

1.2.7 细胞免疫实验 ①将 PC9 或 PC9/GR 细胞接种到激光共聚焦专用皿中;②待细胞密度达到 30-40%弃培养基,PBS 洗涤 2 遍;③用 4%的多聚甲醛室温固定 15 min;④经 PBS 洗涤后用 0.3%的 TritonX-100 室温打孔 10 min;⑤经 PBS 洗涤后用 1%的 BSA 室温封闭 30 min;⑥孵育一抗,4℃过夜;⑦孵育二抗,室温避光 1 h;⑧0.1-1 μ g/mL DAPI 室温复染 1 min;⑨经 PBS 洗涤后用封片剂封片,在激光共聚焦显微镜下检测。

1.2.8 Transwell 实验 ①将 Transwell 专用小室放置于 24 孔板中,下部添加 500 μ L 完全培养基,小室内添加 200 μ L 无血清培养基重悬的细胞(约 2×10^3 个细胞);②正常培养 24 h;③取出后用 PBS 淋洗,用棉签擦除内部贴壁细胞;④用 4%多聚甲醛室温固定 15 min;⑤弃甲醛,用结晶紫染液室温染色 20 min;⑥用蒸馏水涮洗,晾干,显微镜下拍照并计数。

1.3 统计学分析

所有数据均采用 SPSS13.0 软件处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验。计数资料用率表示,组间比较采用 χ^2 检验。P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PC9/GR 细胞的增殖和迁移能力显著升高

如方法部分所述,我们将 PC9 细胞暴露于浓度逐渐增加的吉非替尼,诱导获得吉非替尼耐药细胞系 PC9/GR(图 1A)。采用 CCK-8 实验检测 PC9 和 PC9/GR 细胞的 OD 值,结果显示 72 小时后 PC9/GR 细胞的 OD 值约为 PC9 细胞的 1.72 倍(图 1B)。随后,我们通过 transwell 实验检测了 PC9 和 PC9/GR 细胞的迁移能力,结果显示每个视野包含的 58 ± 5 个 PC9 细胞和 146 ± 8 个 PC9/GR 细胞(图 1C)。最后,我们检测了吉非替尼(10 nmol/L)对 PC9 和 PC9/GR 细胞体外克隆形成能力的

影响,发现吉非替尼对 PC9 细胞的抑制作用显著强于 PC/GR 显著强于 PC9 细胞。细胞(图 2C)。这些结果表明 PC9/GR 细胞的增殖和迁移能力

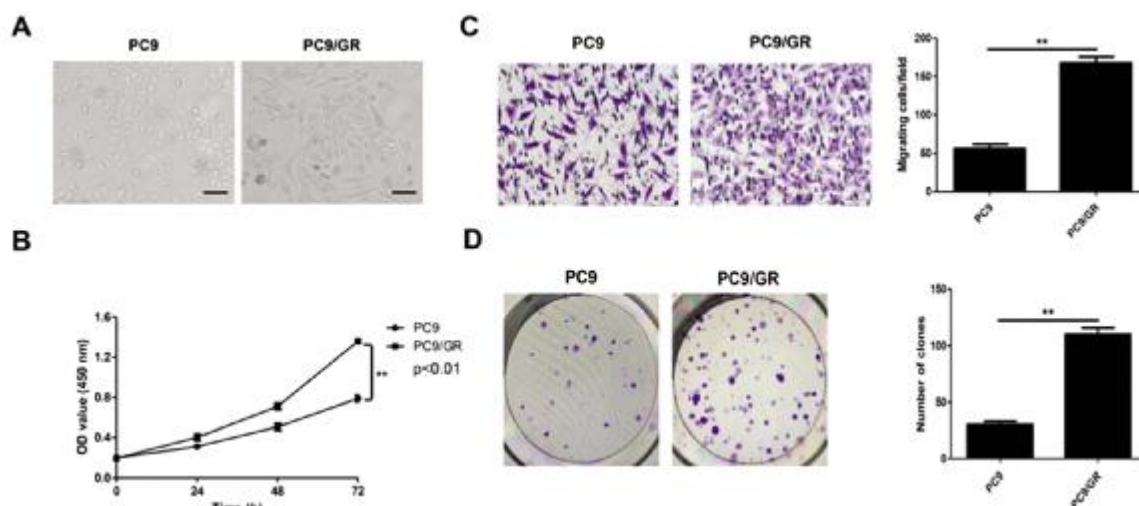


图1 PC9/GR 细胞增殖和迁移能力较 PC9 细胞显著增强

Fig.1 The proliferation and migration ability of PC9/GR cells were significantly enhanced compared with those of PC9 cells

注:A. PC9 和 PC9/GR 细胞形态;B. CCK-8 实验检测 PC9 和 PC9/GR 细胞的增殖能力;C. Transwell 实验检测 PC9 和 PC9/GR 细胞的迁移能力;D. 平板克隆形成实验检测吉非替尼对 PC9 和 PC9/GR 细胞增殖能力的抑制作用。(**P<0.01)

Note: A. Cell morphology of PC9 and PC9/GR; B. CCK-8 assay was used to detect the proliferation capacity of PC9 and PC9/GR cells; C. Transwell experiment was used to detect the migration ability of PC9 and PC9/GR cells; D. Plate clone formation was used to evaluate the inhibition effect of gefitinib on the growth of PC9 and PC9/GR cells. **P<0.01.

2.2 FGFR1 在 PC9/GR 细胞中高表达

为了研究 FGFR1 在肺癌细胞吉非替尼耐药中是否发挥重要作用,我们通过下述实验检测了 FGFR1 在 PC9 和 PC9/GR 细胞中的表达。首先,我们通过 qRT-PCR 实验检测了两株细胞中 FGFR1 mRNA 的表达水平,结果显示 PC9/GR 细胞中 FGFR1 mRNA 的表达水平显著高于 PC9 细胞(图 2A)。随后,

我们又通过蛋白印迹实验和细胞免疫荧光实验进一步研究了 FGFR1 蛋白在上述两株细胞中的表达水平,结果显示 PC9/GR 细胞中 FGFR1 的蛋白表达水平显著高于 PC9 细胞(图 2B&C),提示 FGFR1 可能与非小细胞肺癌细胞对吉非替尼的耐药相关。

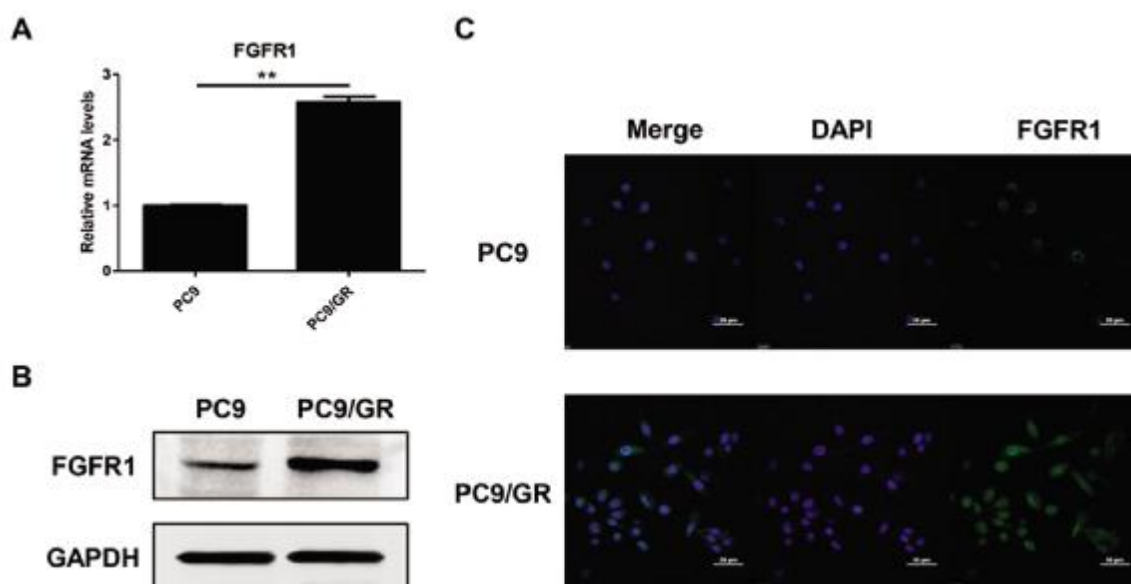


图2 FGFR1 在 PC9/GR 细胞中的表达水平较其在 PC9 细胞中显著升高

Fig.2 The expression level of FGFR1 in PC9/GR was significantly higher than that in PC9 cells

注:A. qRT-PCR 检测 FGFR1 mRNA 在 PC9 和 PC9/GR 细胞中的表达水平;B. 蛋白印迹实验检测 FGFR1 在 PC9 和 PC9/GR 细胞中的蛋白表达水平;C. 细胞免疫荧光实验检测 FGFR1 在 PC9 和 PC9/GR 细胞中的蛋白表达水平。(**P<0.01)

Note: A. The mRNA expression level FGFR1 was detected by qRT-PCR assay; B&C. Immunofluorescence assay and immunoblot assay were used to detect the protein expression level of FGFR1. **P<0.01.

2.3 FGFR1 与 PC9 细胞的增殖和迁移相关并介导其对吉非替尼的耐受

为了明确 FGFR1 对非小细胞肺癌细胞的增殖、迁移和凋亡能力的影响,我们进行了下列研究。首先,我们用 FGFR1 的抑制剂 PD173074(25 nmol/L)和对照溶剂对 PC9 细胞进行处理,然后通过 CCK-8 实验检测细胞的 OD 值,结果显示 PC9 细胞经 PD173074 处理 72 小时后 OD 值约为对照组的 61.8%(图 3A)。随后,我们设计了平板克隆形成实验,结果显示 PC9 细胞经 PD173074(10 nmol/L)后每个孔形成 40 ± 6 个克隆,对照组每个孔中形成 79 ± 11 个克隆,克隆形成数目明显减少(图

3B)。为了明确 FGFR1 对非小细胞肺癌细胞迁移能力的影响,我们设计了 Transwell 实验,结果显示经 PD173074 处理后 PC9 细胞的迁移能力显著下降,约为对照组的 53.5%(图 3C)。最后,为了明确 FGFR1 对非小细胞肺癌细胞存活的影响,我们分别或同时应用吉非替尼和 PD173074 处理 PC9 细胞,在血清撤除 24 小时后,通过 Annexin V/PI 染色和流式细胞术检测,分析 FGFR1 对非小细胞肺癌细胞凋亡的影响。结果显示,吉非替尼能显著促进 PC9 细胞的凋亡,且经 PD173074 处理后细胞凋亡水平显著升高(图 3D)。上述结果提示,FGFR1 可能与非小细胞肺癌细胞的增殖、迁移及对吉非替尼的耐受性相关。

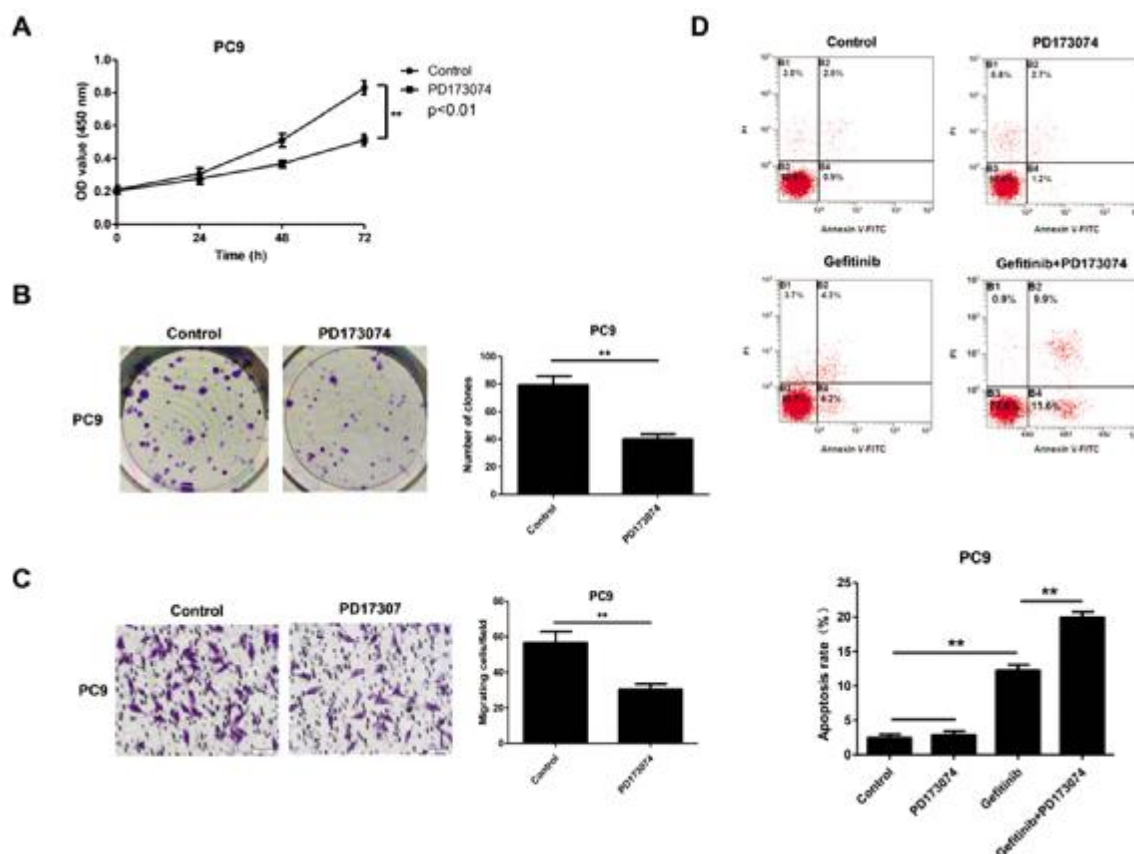


图3 PD173074 能够显著抑制 PC9 细胞的增殖和迁移并促进凋亡

Fig.3 PD173074 treatment of PC9 cells significantly suppressed its proliferation, migration and promoted the apoptosis

注:A.CCK-8 实验检测 PD173074 处理对 PC9 细胞增殖能力影响;B. 平板克隆形成实验检测 PD173074 处理对 PC9 细胞增殖能力的影响;

C. Transwell 实验检测 PD173074 处理 PC9 细胞迁移能力影响;D. 流式细胞术检测 PC9 细胞的抗凋亡能力。(**P<0.01)

Note: A&B. CCK-8 assay and plate colony formation were used to evaluate the growth of PD173074-treated PC9 cells; C. Transwell experiment was used to detect the migration ability of PD173074-treated PC9 cells; D. The anti-apoptosis ability of PC9 cells was detected by flow cytometry. **P<0.01.

2.4 FGFR1 通过 PI3K/Akt/mTOR 通路介导非小细胞肺癌对吉非替尼的耐药

以往的研究表明 PI3K/Akt/mTOR 通路是非小细胞肺癌中重要的靶点^[9]。为了明确 PI3K/Akt/mTOR 通路在非小细胞肺癌对吉非替尼耐受进程中是否发挥作用,我们通过蛋白印迹实验和细胞免疫荧光实验检测了 Akt、p-Akt、mTOR 和 p-mTOR 的表达水平。结果显示 AKT 和 mTOR 在 PC9 和 PC9/GR 细胞中表达水平无显著差异,但 p-AKT 和 p-mTOR 在 PC9/GR 细胞中显著高表达(图 4)。

为了明确 FGFR1 是否调控 PI3K/Akt/mTOR 通路介导非

小细胞肺癌对吉非替尼的耐药,我们在 PC9 细胞中通过 siRNA 敲低 FGFR1 的表达,同时过表达 FGFR1,通过蛋白印迹实验检测 Akt、p-Akt、mTOR 和 p-mTOR 表达水平的变化。结果显示,在 PC9 细胞中敲低 FGFR1 后 Akt 和 mTOR 的表达水平无显著变化,p-Akt 和 p-mTOR 表达水平显著降低;在 PC9 细胞中过表达 FGFR1 后 Akt 和 mTOR 的表达水平无显著变化,p-Akt 和 p-mTOR 表达水平显著升高(图 5)。为了明确 PI3K/Akt/mTOR 通路对非小细胞肺癌增殖、凋亡和克隆形成能力的影响,我们用 mTOR 的经典抑制剂雷帕霉素(10 nmol/L)处理 PC9 细胞,然后通过 CCK-8 实验检测细胞的 OD 值,结果

显示经雷帕霉素处理 72 小时, 处理组细胞的 OD 值约为对照组的 56.2%(图 6A)。随后, 我们设计了平板克隆形成实验, 结果显示 PC9 细胞经雷帕霉素 (10 nmol/L) 后每个孔形成 25 ± 6 个克隆, 对照组每个孔中形成 79 ± 11 个克隆, 克隆形成数目显著减少(图 6B)。最后, 我们通过 Annexin V/PI 染色和流式细胞

术检测, 分析雷帕霉素对非小细胞肺癌细胞凋亡的影响。结果显示, 雷帕霉素能显著促进 PC9 细胞的凋亡, 且经雷帕霉素处理后细胞凋亡水平显著升高(图 6C)。上述结果提示, FGFR1 通过 PI3K/Akt/mTOR 通路介导非小细胞肺癌对吉非替尼的耐药。

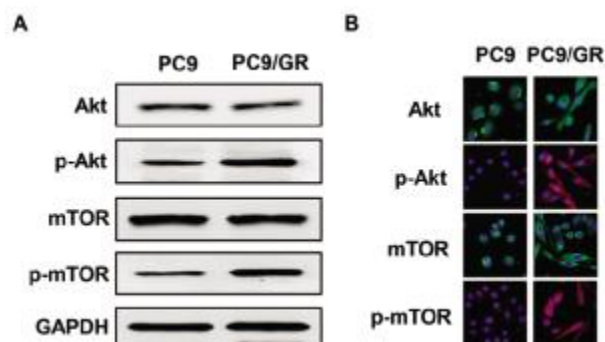


图 4 Akt 和 mTOR 在 PC9/GR 细胞中的磷酸化显著高于 PC9 细胞
Fig.4 The phosphorylation level of Akt and mTOR in PC9/GR cells were significantly higher than that in PC9 cells

注: A 和 B. 蛋白印迹实验和细胞免疫荧光实验检测 Akt, p-Akt, mTOR 和 p-mTOR 的表达水平。

Note: A&B. Immunofluorescence assay and western blotting were used to detect the protein expression levels of Akt, p-Akt, mTOR and p-mTOR.

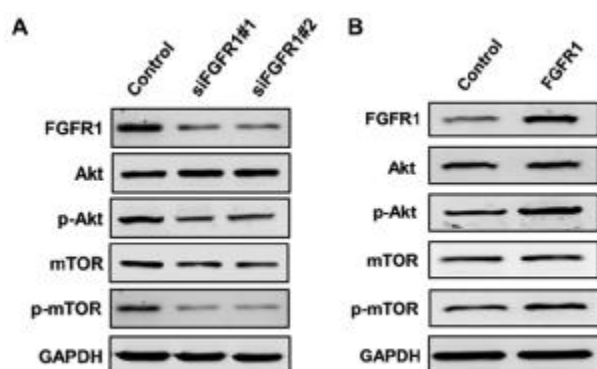


图 5 敲低或过表达 FGFR1 对 Akt 和 mTOR 总量及磷酸化水平的影响
Fig.5 Effects of knockdown or over expression of FGFR1 on total and phosphorylation levels of Akt and mTOR

注: A. 敲低 FGFR1 后 Akt 和 mTOR 总量不变磷酸化水平显著降低; B. 过表达 FGFR1 后 Akt 和 mTOR 总量不变磷酸化水平显著升高。

Note: A. Knocking down FGFR1 had no effect on total Akt and mTOR, but their phosphorylation levels were significantly decreased;

B. Overexpressing FGFR1 had no effect on total Akt and mTOR, but their phosphorylation levels were significantly increased.

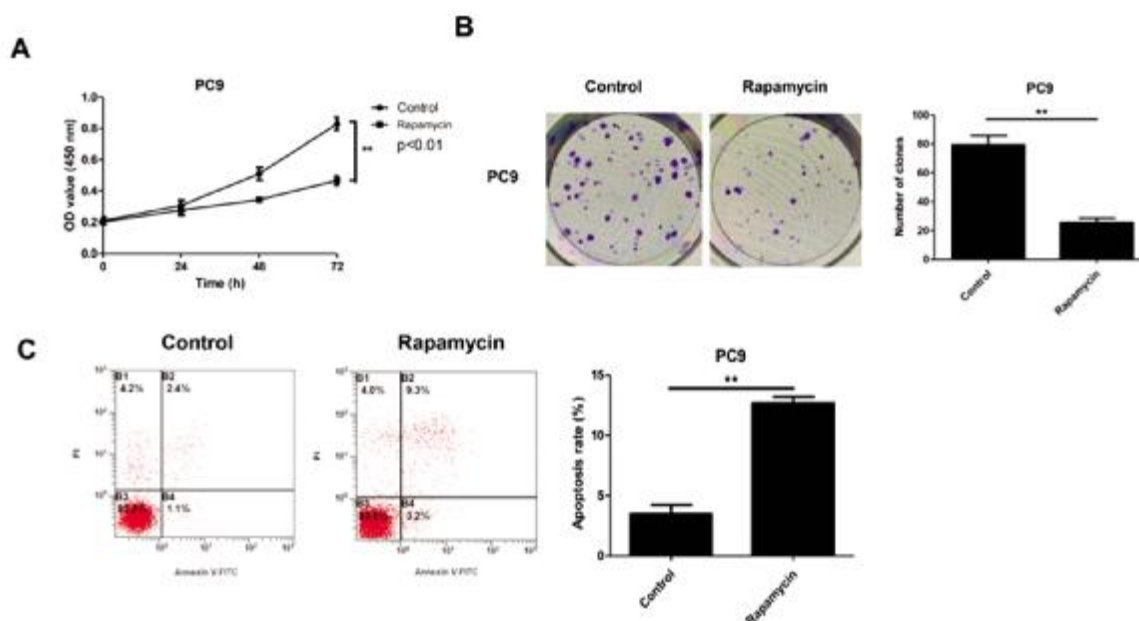


图 6 雷帕霉素能够显著抑制 PC9 细胞的增殖并促进凋亡

Fig.6 Rapamycin treatment of PC9 cells significantly suppressed its proliferation and promoted the apoptosis

注: A.CCK-8 实验检测雷帕霉素处理对 PC9 细胞增殖能力影响; B. 平板克隆形成实验检测雷帕霉素处理对 PC9 细胞增殖能力的影响; C. 流式细胞术检测 PC9 细胞的抗凋亡能力。 (**P<0.01)

Note: A&B. CCK-8 assay and plate colony formation were used to evaluate the growth of rapamycin-treated PC9 cells; C. The anti-apoptosis ability of PC9 cells was detected by flow cytometry. **P<0.01.

3 讨论

肺癌是世界上最常见的恶性肿瘤, 也是全球癌症相关致死

的主要原因。尽管过去的几十年中, 在肺癌的检测和治疗方面取得了重大进展, 但是肺癌的发病率和死亡率并没有显著下降。非小细胞肺癌占有肺癌的 85%, 包括鳞状细胞癌、腺癌和

大细胞肺癌三种亚型^[2],其五年生存率仅为 18%左右,因为约 65%的 NSCLC 患者被确诊时已处于晚期^[10]。虽然手术切除是 NSCLC 潜在治愈的最佳治疗选择,但仅一小部分病人适合。化学治疗和放射治疗是临床上治疗 NSCLC 的常用手段,然而 NSCLC 对放疗和化疗不敏感也是其死亡率高居全球癌症死亡率首位的重要原因^[10]。

吉非替尼和厄洛替尼均为第一代 EGFR-TKIs,近十几年来被广泛作为晚期 NSCLC 患者的一线治疗方案,或者作为化疗失败的 NSCLC 患者的备用方案^[311-13]。与传统的化疗方案相比 EGFR-TKIs 能够有效延长 NSCLC 患者的无进展生存期^[14]。约 80%携带 EGFR1 激活型突变的 NSCLC 患者经第一代 EGFR-TKIs 治疗后无进展生存期延长约 9.7 个月,剩余 20%左右的患者却对 EGFR-TKIs 表现出初始抗性^[14]。然而,EGFR-TKIs 获得性耐药几乎是不可避免的,这也严重影响到 NSCLC 靶向治疗的效果^[5,15-17]。T790M 突变^[18],Met 扩增^[19],TTEN 丢失^[20],IGF-IR 过表达^[21]以及 AXL^[22]和 Slug^[23]均被认识是 EGFR-TKI 耐药表型的潜在因素。在接受 EGFR-TKIs 治疗的 NSCLC 患者中,约有 31.5%的人会出现 T790M 突变,这说明该突变与新的耐药机制相关^[18]。在 EGFR 阳性突变的 NSCLC 细胞中激活替代途径,如 Met 扩增^[19]或 IGF-IR 过表达^[21],也导致细胞对 EGFR-TKIs 耐药。此外,PTEN 丢失及 MAPK、ABCG2、IGF1R、AXL 和 BCL-2 的过表达均被报道与 EGFR-TKIs 的耐药相关^[24,25]。然而,EGFR 突变型患者对 EGFR-TKIs 耐受的机制仍未完全阐明,因此研究靶向药的耐药机制,开发针对 NSCLC 的新的靶向药物势在必行。

FGFR1 是 4 型酪氨酸激酶家族中的一员,是一个跨膜受体蛋白,在生理过程和肿瘤进展中发挥着重要作用^[26]。在正常情况下,FGFR1 信号是由生长因子受体触发的,如成纤维细胞生长因子 2(FGF2),导致 FGFR1 受体的二聚化和转磷酸化。活化的 FGFR1 能够激活下游信号通路的活性,包括 PAS/MAPK 信号通路,PI3K/AKT 信号通路和 STAT 依赖通路^[26]。FGFR1 的组成型活化主要通过三种机制:基因扩增,易位或活性突变。由于 FGFR 扩增、自分泌刺激、基因融合或者激活突变等导致的 FGFR 信号异常,与许多肿瘤的发生发展相关^[27]。已有的研究表明,FGFR1 在肺鳞癌(20%)^[28],小细胞肺癌(5%)^[29],头颈部鳞癌(17%)^[30]中显著扩增。FGFR1 扩增是肺癌中最常见的驱动机制之一,仅次于 EGFR 突变且远多于 ALK,ROS1 或 RET 重排以及其它治疗靶标的突变^[31]。Wang^[32]等人的研究结果表明在 FGFR1 高表达的肺癌细胞系中,FGFR1-ERK1/2-SOX2 信号通路能够促进肿瘤细胞的增殖、上皮间质转化及转移。Ji^[33]等人的研究证实,在 FGFR1 高表达的 NSCLC 细胞系中,FGFR1 能够通过调节 Hedgehog 信号通路促进 NSCLC 细胞干细胞样表型。Wang^[34]等人对以往的 12 项研究进行荟萃分析,结果显示 FGFR1 扩增在肺鳞癌中是一个不良的预后因子。近年来的研究表明,FGFR1 在阿法替尼或贝伐单抗的治疗效果中发挥重要作用^[6-8,35,36]。Koichi 等人的研究发现,阿法替尼耐药的细胞中活化的 pEGFR、突变型 EGFR、HER2、HER3 及 Met 等蛋白表达量显著下降,而 FGFR1 的表达水平显著升高,EGFR 家族蛋白的表达受损似乎可以补偿性的激活 FGFR1 驱动的信号通路^[7]。

在本研究中我们发现,FGFR1 在 PC9/GR 细胞系中表达量显著升高,且能够显著地促进 NSCLC 细胞的增殖和迁移,抑制 NSCLC 细胞的凋亡;同时我们发现敲低 FGFR1 或者用 PD173074 抑制 FGFR1 的活性后 PC9 细胞的增殖和迁移能力显著下降,且对吉非替尼的敏感性显著增加,上述结果与 Hideki^[37]等人的研究结果一致。因此,我们推测 FGFR1 可能在 NSCLC 对吉非替尼的耐药机制中发挥重要作用。

PI3K/AKT/mTOR 是参与细胞周期、增殖及能量代谢的关键信号通路,该通路的异常也与肿瘤的发生发展关系密切^[37]。PI3K 是一种脂质激酶,它是由一个调节亚基 p85 和一个催化亚基 p110 组成的异二聚体,它能够被许多细胞外因子激活,并参与到细胞生长和生存。AKT 是 PI3K 下游的重要分子,其过度酸化与 NSCLC 细胞的化疗耐药密切相关^[38]。一旦 AKT 过度磷酸化,它能够激活细胞质和细胞核中的多种靶基因,以促进细胞的增殖和生存。

mTOR 是 AKT 的关键下游分子,活化的 mTOR 可以刺激真核细胞启动子 E4 并导致细胞增殖。PI3K/AKT/mTOR 是 EGFR 下游的一条重要信号通路,活化的 EGFR 促进 PIP2 向 PIP3 的转变^[39],而后者又能激活 AKT 导致 Thr308, Ser473 和 Ser129 三个调节位点的磷酸化^[40]。EGFR-PI3K-AKT-mTOR 信号通路在多种肿瘤细胞中发挥作用,包括新陈代谢、细胞生长和增殖、凋亡、存活和分化,有助于肿瘤的进展。PI3K/AKT/mTOR 信号通路的失调与 NSCLC 的发生及其对吉非替尼的耐药密切相关^[41-43]。Zhao 等人的研究结果表明,吉非替尼可以通过封锁 PI3K/AKT/mTOR 信号通路来诱导肺癌细胞的自噬和凋亡^[42]。Li 等人的研究也证实,阻塞 PI3K/AKT 信号通路和 MEK/ERK 信号通路能够有效克服 NSCLC 细胞对吉非替尼的耐药^[44]。然而,Wang 等人的研究发现 MIR31HG 能够通过 EGFR/PI3K/AKT 介导 NSCLC 对吉非替尼的耐药^[45]。本研究发现 Akt 和 mTOR 的表达水平在 PC9 和 PC9/GR 细胞中无显著变化,但 p-Akt 和 p-mTOR 在 PC9/GR 细胞中的表达显著升高,且 Akt 和 mTOR 的磷酸化水平与 FGFR1 的表达水平变化趋势一致。这里我们虽然证明了 FGFR1 能够通过调节 PI3K/AKT/mTOR 信号通路介导 NSCLC 对吉非替尼的耐药,但尚未明确 FGFR1 究竟是通过何种方式调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的。在未来的研究中,我们将去探索 FGFR1 调控 PI3K/AKT/mTOR 的具体机制,以及应用体内 NSCLC 模型进行研究,将有望为开发 NSCLC 的新靶点提供新的线索。

参考文献(References)

- [1] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2016, 66(2): 115-132
- [2] Herrbst R S, Heymach J V, Lippman S M. Lung cancer [J]. The New England journal of medicine, 2008, 359(13): 1367-1380
- [3] Cataldo V D, Gibbons D L, Perez-soler R, et al. Treatment of non-small-cell lung cancer with erlotinib or gefitinib [J]. The New England journal of medicine, 2011, 364(10): 947-955
- [4] Meng S, Wang G, Lu Y, et al. Functional cooperation between HIF-1alpha and c-Jun in mediating primary and acquired resistance to gefitinib in NSCLC cells with activating mutation of EGFR [J]. Lung

- cancer (Amsterdam, Netherlands), 2018, 121: 82-90
- [5] Jackman D, Pao W, Riely G J, et al. Clinical definition of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer[J]. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2010, 28(2): 357-360
- [6] Tera H, Soejima K, Yasuda H, et al. Activation of the FGF2-FGFR1 autocrine pathway: a novel mechanism of acquired resistance to gefitinib in NSCLC [J]. *Molecular cancer research : MCR*, 2013, 11(7): 7597-7567
- [7] Azumak K, Kawahara A, Sonoda K, et al. FGFR1 activation is an escape mechanism in human lung cancer cells resistant to afatinib, a pan-EGFR family kinase inhibitor [J]. *Oncotarget*, 2014, 5 (15): 5908-5919
- [8] Gyanchandani R, Ortega Ales M V, Myers J N, et al. A proangiogenic signature is revealed in FGF-mediated bevacizumab-resistant head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Molecular cancer research: MCR*, 2013, 11(12): 1585-1596
- [9] Heaveys S, O'byrne K J, Gately K. Strategies for co-targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in NSCLC [J]. *Cancer treatment reviews*, 2014, 40(3): 445-456
- [10] Reck M, Heigener D F, Mok T, et al. Management of non-small-cell lung cancer: recent developments [J]. *Lancet (London, England)*, 2013, 382(9893): 709-719
- [11] Oxnard G R, Miller V A. Use of erlotinib or gefitinib as initial therapy in advanced NSCLC[J]. *Oncology (Williston Park, NY)*, 2010, 24(5): 392-399
- [12] Santelmo C, Ravaioli, Barzotti E, et al. Coexistence of EGFR mutation and ALK translocation in NSCLC: literature review and case report of response to gefitinib [J]. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 2013, 81(2): 294-296
- [13] Nakagawa K, Kudoh S, Ohe Y, et al. Postmarketing surveillance study of erlotinib in Japanese patients with non-small-cell lung cancer (NSCLC): an interim analysis of 3488 patients (POLARSTAR)[J]. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 2012, 7(8): 1296-1303
- [14] An N, Zhang Y, Niu H, et al. EGFR-TKIs versus taxanes agents in therapy for nonsmall-cell lung cancer patients: A PRISMA-compliant systematic review with meta-analysis and meta-regression [J]. *Medicine*, 2016, 95(50): e5601
- [15] Inoue A, Suzuki T, Fukuhara T, et al. Prospective phase II study of gefitinib for chemotherapy-naïve patients with advanced non-small-cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations [J]. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2006, 24(21): 3340-3346
- [16] Riely G J, Politti K A, Miller V A, et al. Update on epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer [J]. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2006, 12(24): 7232-7241
- [17] Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial [J]. *The Lancet Oncology*, 2010, 11(2): 121-128
- [18] Kobayashi S, Boggon T J, Dayaram T, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib[J]. *The New England journal of medicine*, 2005, 352(8): 786-792
- [19] Engelman J A, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling[J]. *Science (New York, NY)*, 2007, 316(5827): 1039-1043
- [20] 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[J]. *Cancer research*, 2010, 70(21): 8715-8725
- [21] Morgillo F, Kim W Y, Kim E S, et al. Implication of the insulin-like growth factor-IR pathway in the resistance of non-small cell lung cancer cells to treatment with gefitinib[J]. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2007, 13(9): 2795-2803
- [22] Zhang Z, Lee J C, Lin L, et al. Activation of the AXL kinase causes resistance to EGFR-targeted therapy in lung cancer [J]. *Nature genetics*, 2012, 44(8): 852-860
- [23] Chang T H, Tsai M F, Su K Y, et al. Slug confers resistance to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor [J]. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2011, 183(8): 1071-1079
- [24] Ellis L M, Hicklin D J. Resistance to Targeted Therapies: Refining Anticancer Therapy in the Era of Molecular Oncology [J]. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2009, 15(24): 7471-7478
- [25] Garraway L A, Janne P A. Circumventing cancer drug resistance in the era of personalized medicine [J]. *Cancer discovery*, 2012, 2(3): 214-226
- [26] Dieci M V, Arnedos M, Andre F, et al. Fibroblast growth factor receptor inhibitors as a cancer treatment: from a biologic rationale to medical perspectives[J]. *Cancer discovery*, 2013, 3(3): 264-279
- [27] Carter E P, Fearona A E, Grose R P. Careless talk costs lives: fibroblast growth factor receptor signalling and the consequences of pathway malfunction[J]. *Trends in cell biology*, 2015, 25(4): 221-233
- [28] Schildhaus H U, Heukamp L C, Merklebach-bruse S, et al. Definition of a fluorescence in-situ hybridization score identifies high- and low-level FGFR1 amplification types in squamous cell lung cancer[J]. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 2012, 25(11): 1473-1480
- [29] Peifer M, Fernandez-cuesta L, Sos M L, et al. Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer[J]. *Nature genetics*, 2012, 44(10): 1104-1110
- [30] Freier K, Schwaenen C, Sticht C, et al. Recurrent FGFR1 amplification and high FGFR1 protein expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC)[J]. *Oral oncology*, 2007, 43(1): 60-66
- [31] Schildhaus H U, Nogva L, Wolf J, et al. FGFR1 amplifications in squamous cell carcinomas of the lung: diagnostic and therapeutic implications[J]. *Translational lung cancer research*, 2013, 2(2): 92-100
- [32] Wang K, Ji W, Yu Y, et al. FGFR1-ERK1/2-SOX2 axis promotes cell proliferation, epithelial-mesenchymal transition, and metastasis in FGFR1-amplified lung cancer[J]. *Oncogene*, 2018

- [33] Ji W, Yu Y, Li Z, et al. FGFR1 promotes the stem cell-like phenotype of FGFR1-amplified non-small cell lung cancer cells through the Hedgehog pathway[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(12): 15118-15134
- [34] Wang Y, Gao W, Xu J, et al. The Role of FGFR1 Gene Amplification as a Poor Prognostic Factor in Squamous Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis of Published Data [J]. *BioMed research international*, 2015, 763080
- [35] Vander Wekken A J, Sabe A, Hiltermann T J, et al. Resistance mechanisms after tyrosine kinase inhibitors afatinib and crizotinib in non-small cell lung cancer, a review of the literature [J]. *Critical reviews in oncology/hematology*, 2016, 100(107-16)
- [36] Burbridge M F, Bossard C J, Saunier C, et al. S49076 is a novel kinase inhibitor of MET, AXL, and FGFR with strong preclinical activity alone and in association with bevacizumab[J]. *Molecular cancer therapeutics*, 2013, 12(9): 1749-1762
- [37] Lorusso P M. Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Solid Tumors[J]. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2016, 34(31): 3803-3815
- [38] Tsurutani J, Fukuoka J, Tsurutani H, et al. Evaluation of two phosphorylation sites improves the prognostic significance of Akt activation in non-small-cell lung cancer tumors [J]. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2006, 24(2): 306-314
- [39] Cully M, You H, Levine A J, et al. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis[J]. *Nature reviews Cancer*, 2006, 6(3): 184-192
- [40] Vivanco I, Sawyers C L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer [J]. *Nature reviews Cancer*, 2002, 2(7): 489-501
- [41] Sun Z, Li Q, Zhang S, et al. NVP-BEZ235 overcomes gefitinib-acquired resistance by down-regulating PI3K/AKT/mTOR phosphorylation[J]. *OncoTargets and therapy*, 2015, 8(269-77)
- [42] Zhao Z Q, Yu Z Y, Li J, et al. Gefitinib induces lung cancer cell autophagy and apoptosis via blockade of the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Oncology letters*, 2016, 12(1): 63-68
- [43] Zheng R, Jiang H, Li J, et al. Polyphyllin II Restores Sensitization of the Resistance of PC-9/ZD Cells to Gefitinib by a Negative Regulation of the PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway [J]. *Current cancer drug targets*, 2017, 17(4): 376-385
- [44] Li H, Schmid-bindert, Wang D, et al. Blocking the PI3K/AKT and MEK/ERK signaling pathways can overcome gefitinib-resistance in non-small cell lung cancer cell lines [J]. *Advances in medical sciences*, 2011, 56(2): 275-284
- [45] Wang B, Jiang H, Wang L, et al. Increased MIR31HG lncRNA expression increases gefitinib resistance in non-small cell lung cancer cell lines through the EGFR/PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Oncology letters*, 2017, 13(5): 3494-500

(上接第 210 页)

- [10] Liu Y, Liu G, Zhang H, et al. MiRNA-199a-5p influences pulmonary artery hypertension via downregulating Smad3 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 473(4): 859-866
- [11] Yang X, Lei S, Long J, et al. MicroRNA-199a-5p inhibits tumor proliferation in melanoma by mediating HIF-1 α [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(6): 5241-5247
- [12] Wang Y, Luo J, Wang X, et al. MicroRNA-199a-5p Induced Autophagy and Inhibits the Pathogenesis of Ankylosing Spondylitis by Modulating the mTOR Signaling via Directly Targeting Ras Homolog Enriched in Brain (Rheb) [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(6): 2481-2491
- [13] Gurtan AM, Sharp PA. The role of miRNAs in regulating gene expression networks[J]. *J Mol Biol*, 2013, 425(19): 3582-3600
- [14] Kilic E, Kilic U, Reiter RJ, et al. Prophylactic use of melatonin protects against focal cerebral ischemia in mice: role of endothelin converting enzyme-1[J]. *J Pineal Res*, 2004, 37(4): 247-251
- [15] Danae Campos-Melo, Cristian A. Droppelmann, Kathryn Volkening, et al. Comprehensive Luciferase-Based Reporter Gene Assay Reveals Previously Masked Up-Regulatory Effects of miRNAs [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(9): 15592-15602
- [16] Minlee Kim, Nicole Kogan, Frank J. Slack. Cis-acting elements in its 3' UTR mediate posttranscriptional regulation of KRAS[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(11): 11770-11784
- [17] Orom UA, Lund AH. Experimental identification of microRNA targets[J]. *Gene*, 2010, 451: 1-5
- [18] Reczko M, Maragkakis M, Alexiou P, et al. Hatzigeorgiou A.G. Functional microRNA targets in protein coding sequences[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28: 771-776
- [19] Gurtan AM, Sharp PA. The role of miRNAs in regulating gene expression networks[J]. *J Mol Biol*, 2013, 425(19): 3582-3600
- [20] Wider D, Picard D. Secreted dual reporter assay with Gaussia luciferase and the red fluorescent protein mCherry[J]. *PLoS One*, 2017, 12(12): e0189403
- [21] Kenneth W Witwer, Marc K Halushka. Toward the promise of microRNAs-Enhancing reproducibility and rigor in microRNA research [J]. *RNA Biol*, 2016, 13(11): 1103-1116