doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.17.004

丝氨酸生物合成途径介导肺腺癌细胞 EGFR-TKIs 靶向治疗适应性耐药 *

周 烨 顾玮铭 梁 倩 罗鸣宇 沈 瑛△

（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：研究丝氨酸生物合成途径（SSP）在肺腺癌使用表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂（EGFR-TKIs）治疗后引起的适应性耐药中发挥的作用，探究早期适应性耐药机制以寻找抗耐药靶标。**方法：**使用 EGFR-TKIs 药物短时刺激肺腺癌细胞系后，利用 Western blotting 和 qRT-PCR 技术检测丝氨酸生物合成途径中关键酶的蛋白及 mRNA 水平变化，同时利用 LC-MS 检测细胞内丝氨酸生物合成途径产物及相关代谢产物变化情况。通过 CCK8 法检测敲低关键酶对细胞增殖的影响。体内实验进行肺腺癌细胞裸鼠皮下移植瘤注射，采用剂量爬坡法构建体内适应性耐药模型，检测肿瘤组织中关键酶表达情况。**结果：**1.细胞内丝氨酸生物合成途径关键酶 PHGDH、PSAT1、PSPH 的蛋白表达水平在不同药物作用时间和浓度下有不同程度上调，且 mRNA 水平也上调了 20-50%左右（$P<0.05$）；2.HCC827 细胞中 SSP 及下游代谢通路产物如 P-Serine、Serine、Glycine、AMP 等均有显著性上调（$P<0.01$）；3.敲低关键酶 PSAT1 及 PSPH 后可抑制细肺腺癌细胞 HCCC827 及 PC9 的增殖，与对照组相比最高抑制率可达 60%左右（$P<0.01$）；4.体内诱导 PC9 细胞适应性耐 erlotinib 后，肿瘤组织中的 PHGDH 及 PSAT1 表达均有明显上调。**结论：**丝氨酸生物合成途径介导了肺腺癌 EGFR-TKIs 靶向治疗的适应性耐药，其关键酶有望作为抗耐药靶标进行联合治疗，从而提高 EGFR-TKIs 靶向药物的早期疗效并最终克服耐药性的产生。

关键词：丝氨酸生物合成途径；肺腺癌；EGFR-TKIs；适应性耐药

中图分类号：R-33；R966；R734.2 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273（2019）17-3218-07

Serine Biosynthesis Pathway Mediated the Adaptive Resistance to EGFR-TKIs in Lung Adenocarcinoma*

ZHOU Ye, GU Wei-ming, LIANG Qian, LUO Ming-yu, SHEN Ying△

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

ABSTRACT Objective: To investigate the role of serine biosynthesis pathway in adaptive resistance to EGFR-TKIs in lung adenocarcinoma and to explore the adaptive resistance mechanism in initial therapy, thus nominating the novel targets of overcoming drug resistance. **Methods:** The protein expression of serine biosynthesis pathway key enzymes in lung adenocarcinoma cells was measured by Western blotting and the mRNA levels of them was detected by qRT-PCR after the short-time treatment with EGFR-TKIs, meanwhile, the metabolites of serine biosynthesis pathway and the relevant metabolites in lung adenocarcinoma cells were detected by LC-MS. The effect of cell proliferation was measured by using CCK8 assay after the knockdown of key enzymes. And the adaptive resistance model in vivo was constructed to detect the protein levels of the key enzymes in tumors by using murine subcutaneous xenografts which were treated with dosage escalation of erlotinib. **Results:** 1. The protein levels of serine biosynthesis pathway key enzymes including PHGDH, PSAT1, PSPH in lung adenocarcinoma cells were all significantly up-regulated under different drug concentration and treatment time, and their mRNA levels also increased about 20 %-50 %($P<0.05$); 2. The metabolites of serine biosynthesis pathway and downstream pathways such as P-Serine, Serine, Glycine and AMP were up-regulated significantly in HCC827 cells ($P<0.01$); 3. The depletion of key enzymes PSAT1 and PSPH suppressed the proliferation of lung adenocarcinoma cells and the highest inhibition rate compared to control can be up to about 60 %($P<0.01$); 4.After the PC9 xenografts adaptively resistant to erlotinib in vivo, the protein levels of PHGDH and PSAT1 in tumors were both up-regulated. **Conclusions:** Serine biosynthesis pathway mediated the adaptive resistance to EGFR-TKIs in lung adenocarcinoma, and its key enzymes could be the promising targets for combination strategy to enhance the response of EGFR-TKIs and eventually overcome the occurrence of drug resistance.

Key words: Serine biosynthesis pathway; Lung adenocarcinoma; EGFR-TKIs; Adaptive resistance

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

Article ID: 1673-6273(2019)17-3218-07

* 基金项目：国家自然科学基金项目（81473232; 81773748）

作者简介：周烨（1993-），硕士研究生，研究方向：肿瘤药理学，电话：18817287028，E-mail: secret9378@126.com

△ 通讯作者：沈瑛，博士，副研究员，主要研究方向：肿瘤药理学，E-mail: yshen0510@sjtu.edu.cn

（收稿日期：2019-02-25 接受日期：2019-03-21）

前言

丝氨酸生物合成途径(Serine biosynthesis pathway,SSP)作为糖酵解通路的分支之一,是细胞代谢的重要途径[1],可以从头合成丝氨酸,为癌细胞增殖提供能量和物质基础[2-4],对维持胞内氧化还原状态亦具有重要作用[5]。已有多篇文献证实其与多种癌症的发生发展密切相关[6,7]。肺癌是全球死亡率最高的恶性肿瘤[8],其中肺腺癌是最主要的亚型占40%且发病率逐年递增[9]。以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)为代表的分子靶向药物[10]治疗肺腺癌的疗效显著,是目前EGFR阳性突变肺腺癌晚期患者临床治疗的一线药物[11-13]。但随着用药时间的延长不可避免地出现了复发及耐药现象,成为靶向治疗的一大障碍[14]。在众多耐药机制中代谢重编程受到广泛关注[15-17]。但SSP与肺癌靶向治疗耐药是否相关尚未有报道,本课题组前期研究首次提出SSP关键酶PHGDH(Phosphoglycerate dehydrogenase)在肺腺癌获得性耐药中发挥重要作用[18],而本研究主要探究SSP在EGFR-TKIs适应性耐药中的作用。所谓适应性耐药是肿瘤细胞在药物治疗早期通过反馈机制导致的药物耐受,从而使残存的癌细胞继续增殖,最终导致获得性耐药的产生[19]。所以研究适应性耐药机制至关重要,对提高EGFR-TKIs初始疗效、克服后期耐药具有重要意义[20]。为此,本研究主要通过药物短时刺激的方法模拟体外适应性耐药,利用Western blotting、qRT-PCR、LC-MS等方法探究肺腺癌细胞SSP关键酶和代谢产物的变化,并用CCK8法检测敲低关键酶对细胞增殖的影响进行反向验证,最后构建体内适应性耐药模型进一步确证。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

人肺腺癌细胞系PC9、HCC827、H1975均由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保存并使用。

RPMI 1640培养基,无葡萄糖RPMI 1640培养基购自意大利Gibco公司;胎牛血清购自美国Gemini公司;青霉素-链霉素(P/S)溶液,谷氨酰胺(Glutamine)溶液,PBS,0.25 %胰蛋白酶购自上海源培生物科技股份有限公司;PHGDH,Ku86抗体购自美国Santa Cruz公司,PSAT1抗体购自美国GeneTex公司;PSPH抗体购自美国Abcam公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG、抗兔IgG购自美国CST公司;RIPA裂解液,Western一抗稀释液,蛋白酶抑制剂PMSF购自碧云天公司;ECL显色液,预染蛋白分子量marker,BCA蛋白定量试剂盒购自美国Thermo Fisher公司;0.45 μm PVDF膜购自美国Millipore Billeric公司;Cell Counting Kit(CCK8)试剂盒日本东仁化学科技有限公司;RNA抽提试剂盒、逆转录及qRT-PCR试剂盒均自日本Takara公司;厄洛替尼购自美国LC Laboratories公司;奥希替尼购自美国Selleck公司;U-13C-Glucose购自Cambridge Isotope Laboratories公司;siRNA由上海吉玛制药技术有公司合成,正义链序列如下(5'-3'):siPSAT1#1:CCUCGGUCCUGGAAUACAATT,siPSAT1#2:CCAGACAACUAUAAGGUGATT,siPSAT1#3:GCCAAGAAGTTTGGGACTATA,siPSAT1#4:CCAGACAACTATAAGGTGATT,siPSPH#1:AGGCTGAAATTCTACTTTA,siPSPH#3: AGGAGCGAAATGTTCAGGT,siPSPH#5:AGGTGCAGAGACTCATAGC;Mock:UUCUCCGAACGUGUCACGUTT。

1.2 实验仪器及实验动物

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;倒置显微镜购自日本Nikon公司;低温高速离心机,移液器购自德国Eppendorf公司;实验用超纯水系统购自美国Millipore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;Odyssey双色红外成像系统购自美国LI-COR公司;荧光定量PCR仪购自瑞士罗氏公司。

本实验所用SPF级BALB/c免疫缺陷型裸鼠,3-4周龄,雌性,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,动物实验操作符合《实验动物管理条例》要求。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养及传代 完全培养基配方:10 %胎牛血清(FBS),RMPI 1640培养基,2 mM L-谷氨酰胺,100 U/mL青霉素,100 U/mL链霉素。将细胞于75 cm^2培养瓶培养,待汇合度达80 %左右时传代,用真空泵吸除培养基,取5 mL PBS溶液洗涤1-2次,加入1 mL 0.25 %胰蛋白酶使其覆盖所有细胞表面,置于37℃,5 % CO_2恒温培养箱孵育2-3 min后,于显微镜下观察确认全部消化下来后,加入5 mL新鲜培养液终止消化。用移液器轻轻吹打细胞,制成单细胞悬液,按1:3的比例分装至新培养瓶中,补充新鲜完全培养基至终体积为15 mL,十字摇晃均匀后将细胞置于37℃,5% CO_2恒温培养箱中培养,每日于显微镜下观察细胞生长情况,一般2天传代一次,视细胞状态隔天半换液。

1.3.2 短时加药实验 待培养瓶中的细胞长满之后,用0.25 %胰蛋白酶消化细胞,制成密度约为2.5× 10^5 cells/mL的单细胞悬液,每孔2 mL接种至6孔板中,摇晃均匀后置于培养箱过夜培养。细胞贴壁24 h后汇合度达到70 %左右即可加入药物。药物母液配制方法如下:采用无菌EP管称取适量Erlotinib和Osimertinib粉剂,经计算后加入相应体积二甲基亚砜(DMSO)溶液配制成10 mM的药物母液,涡旋震荡充分溶解至溶液澄清透明后分装,置于-80℃冰箱保存,1个月之内使用。药物工作液配制:加药前取出药物母液置于室温融解,先使用PBS进行1000倍稀释,之后再用完全培养基进行梯度稀释至相应浓度,加入细胞培养板中继续培养相应时间。

1.3.3 免疫印迹法(Western blotting) 蛋白样品准备:细胞加药作用指定时间后用,弃掉培养基用PBS洗板2次后吸干。将6孔板置于冰板上,向每孔加入150 μL RIPA裂解液(事先加入1 mM PMSF),静置5 min于冰上裂解刮取蛋白,收集于1.5 mL EP管中。置于冰上裂解20 min,每5 min涡旋一次充分裂解。放入事先预冷的离心机中4℃,14000 rpm离心10 min,取上清,做BCA定量后,按照1:4的比例加入5× SDS上样缓冲液吹打混匀后,100℃煮沸5 min使蛋白变性,稍微冷却后即可上样;电泳:将事先配制好的凝胶板置于胶架上放置在电泳槽中,加入电泳缓冲液,取下梳齿,加入marker和蛋白样品,60 V电压条件下跑完浓缩胶后调至90 V,跑完分离胶使溴酚蓝跑至凝胶底部;转膜:将PVDF膜在甲醇中活化5 min,同时将滤

纸用事先预冷好的转膜液润湿。将凝胶板从电泳槽中取出,切除浓缩胶后置于转膜液中活化,打开转膜夹子按照负极 - 滤纸 - 凝胶 -PVDF 膜 - 滤纸 - 正极的顺序放置好，在转膜槽中加入冰袋填满转膜液,置于 4℃冷室 100 V 电压转膜 1.5-2.5 h(根据蛋白分子量大小决定时间长短);封闭:转膜结束后将 PVDF 膜取出,置于 5 %脱脂牛奶中室温摇床封闭 1 h;孵育一抗:封闭完成后用 TBST 洗膜 5 min,根据 marker 将膜裁剪开,加入一抗,4 ℃摇床孵育过夜；孵育二抗：将一抗回收,TBST 洗膜三次,每次 5 min。用 5 %脱脂牛奶按 1:5000 比例稀释二抗,室温摇床孵育 1.5-2 h;显影:用 TBST 洗膜三次,每次 5 min,ECL 显色液显影。

1.3.4 LC-MS **检测细胞内** U-^{13}C-Glucose **来源的** SSP **代谢产物量** 收样:在加药前将原有细胞培养基吸除,用不含葡萄糖的培养基洗板一遍,加入含有 2 mg/mL U-13C-Glucose 的无糖培养基平衡，同时加入药物处理 6 h 后，除去上清,PBS 洗板两次,放入液氮中淬灭,保存于 -80℃冰箱;样品前处理:每孔加入 1 mL 80 %的预冷甲醇(含内标 phe-D5),冰上刮板裂解,收集于 1.5 mL EP 管中。4℃ 20000 × g 离心 20 min 后收集上清,真空室温浓缩至 100 μL 左右，加入等体积 80%乙腈 - 水溶液涡旋复溶,4℃ 20000 × g 离心 20 min 后取上清 120μL 于进样瓶中待测;检测:色谱柱：ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱(1× 100 mm,1.7 μm);负离子模式:流动相 A:水,含 10 mM 甲酸铵,0.1 %甲酸;流动相 B:95 %乙腈 - 水,含 10 mM 甲酸铵,0.1 %甲酸;柱温:40℃;流速:0.35 mL/min;进样量:5 μL;正离子模式:流动相 A:水,0.1 %甲酸;流动相 B:乙腈,0.1 %甲酸;流速:0.35 mL/min;进样量:5 μL。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),电喷雾电压:5500 V;雾化气及辅助加热气压力:50 psi;气帘气压力:35 psi;离子源温度:500℃;数据分析:在 mutiquant 软件中,分析各个代谢物以及内标的峰面积,根据下述公式计算细胞各个代谢物相对含量:AA 相对含量 =AA $_{代谢物}$ /AA $_{内标\ IS}$),最后通过细胞计数进行归一化处理。

1.3.5 **体内实验** 将订购的裸鼠随机分成两组，每组 6 只,剪耳标记。稳定一周后,将大量扩增的 PC9 细胞系消化后收集于离心管,1000 rpm 离心 5 min 后去除上清，用 PBS 重悬进行细胞计数,1000 rpm,5 min 再离心一遍，去除上清后用 HBSS 缓冲液重悬细胞收集于 EP 管中,置于冰盒上保持细胞活力。摇晃均匀后，用注射器抽取 100 μL 细胞悬液，接种于腋窝背部皮下,左右两侧各一个点,每个点接种 1.5× 10^6 个细胞。接种七天后长出实体瘤,体积达 100 cm^3 即可开始给药。Vehicle 组为溶剂对照组,Erlotinib 组采用剂量爬坡法的给药方式诱导体内适应性耐药[18],给药浓度从 10 mg/kg 小鼠体重 / 天梯度上升,灌胃给药,游标卡尺测量肿瘤大小。停止给药后,将裸鼠全部处死,取出肿瘤组织保存于 -80℃,用于后续蛋白提取。

1.3.6 siRNA **转染** 首先将规格为 1 OD 的 siRNA 粉末按照说明,加入 125 μL 无菌无酶水,配置成浓度为 20 mM 的母液,分装备用。转染方法如下:

6 孔板:将消化后的细胞计数后,用无双抗的完全培养基以每孔 2.0× 10^5 cells 的密度种 6 孔板,待细胞过夜贴壁后即可加入 siRNA。每孔剂量（20 nM)A 液:Lipo 3000 5 μL + Opti MEM 125 μL,B 液:siRNA 2 μL + Opti MEM 125 μL,A 液和 B 液混合,静置 5 min 后逐滴加入,摇晃均匀;转染 24 h 后换液,继续培养 48 h。转染结束后即可洗板收样，提取蛋白 Western blotting 检测敲低效率。

96 孔板:将消化后的细胞计数后,用无双抗的完全培养基以 4000 个细胞每孔的密度种于 96 孔板中。待细胞过夜贴壁后,即可加入 siRNA 转染。每孔剂量(20 nM)A 液:Lipo 3000 0.2 μL + Opti MEM 5 μL,B 液:siRNA 0.1 μL + Opti MEM 5 μL,A 液和 B 液混合后,静置 5 min,将枪头贴近液面加入,摇晃均匀,同步设定对照组及 Mock 组,置于细胞培养箱转染 72 h。

1.3.7 CCK8 **法细胞活力检测** 当细胞在 96 孔板中生长 72 h 后,此时照细胞汇合度达到 90 %以上时,即可进行细胞活力测定,用于反映细胞增殖能力。将 CCK8 试剂用无血清培养基按照 1:10 的比例稀释混匀，将 96 孔板中的细胞培养基甩掉,每孔加入 100 μL CCK8 工作液，在 37℃培养箱中孵育 20-30 min,用酶标仪(450 nm)测定吸光值,直至对照组细胞吸光值达到 1.0 左右即可停止检测,分析数据计算细胞活力。

1.3.8 RNA **提取及** qRT-PCR **反应** RNA 提取操作按照 Takara 试剂盒(Code:No.9767)说明书进行。qRT-PCR 操作按照 Takara 试剂盒(Code:No.RR036A)说明书进行,采用 Thermal Cycler Dice™ Real Time System II 扩增仪的操作方法。引物序列:PSAT1:F:GAAGGTGTGCTGACTATGTGGTGAC;R:GGTTGAGGTTCCAGGTGCTTGG;PSPH:F:ATGATTGGAGATGGTGCCACAGATATG;R:CGTTATCCTTGACTTGTTGCCTGATC。

1.4 统计学分析

实验数据均采用 mean± SEM 表示,t-test 进行两组间差异性检验,GraphPad Prism6 软件作图;Western blotting 条带应用 Image J 软件分析。$P<0.05$ 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 肺腺癌细胞在 EGFR-TKIs 短时刺激后 SSP 关键酶表达情况

结果显示，肺腺癌细胞 PC9、HCC827、H1975 细胞在 Erlotinib 或 Osimertinib 梯度浓度下作用 6 h，丝氨酸生物合成途径的 3 个关键酶 PHGDH（Phosphoglycerate dehydrogenase)、PSAT1（Phosphoserine aminotransferase)、PSPH(Phosphoserine phosphatase)的蛋白表达水平均有显著性上调,Ku86 为内参蛋白(图 1A)。之后分别取 Erlotinib 5 nM 作用于 PC9 细胞、1 μM 作用于 HCC827 细胞 3 h、6 h、9 h 后,Western 检测发现 PHGDH、PSAT1、PSPH 蛋白表达量均有显著性上调且具有时间依赖性(图 1B)。qRT-PCR 结果显示给予 PC9 细胞 Erlotinib 5 nM 6 h、给予 HCC827 细胞 Erlotinib 1 μM 6 h 后，胞内 PSAT1 及 PSPH 的 mRNA 水平亦均有显著性上调(PC9 PSAT1:$P<0.05$;PSPH:$P<0.01$;HCC827 PSAT1:$P<0.01$;PSPH:$P<0.001$,图 1C)。

2.2 HCC827 细胞在 Erlotinib 短时刺激后 SSP 代谢产物变化

采用 LC-MS 的方法检测肺腺癌 HCC827 细胞在 1 μM erlotinib 刺激 6 h 后细胞内 13C-Glucose 来源的 SSP 相关代谢产

物的变化，图 2 结果显示：HCC827 细胞内 13C 标记的即葡萄糖来源的磷酸丝氨酸（P-Serine，M+3）、丝氨酸（Serine，M+3）、甘氨酸（Glycine，M+2）、腺嘌呤核糖核苷酸（AMP，M+1）的产量较对照组（Control）组均有显著性增加（P-Serine、Serine：$P<0.01$；Glycine、AMP：$P<0.0001$）。

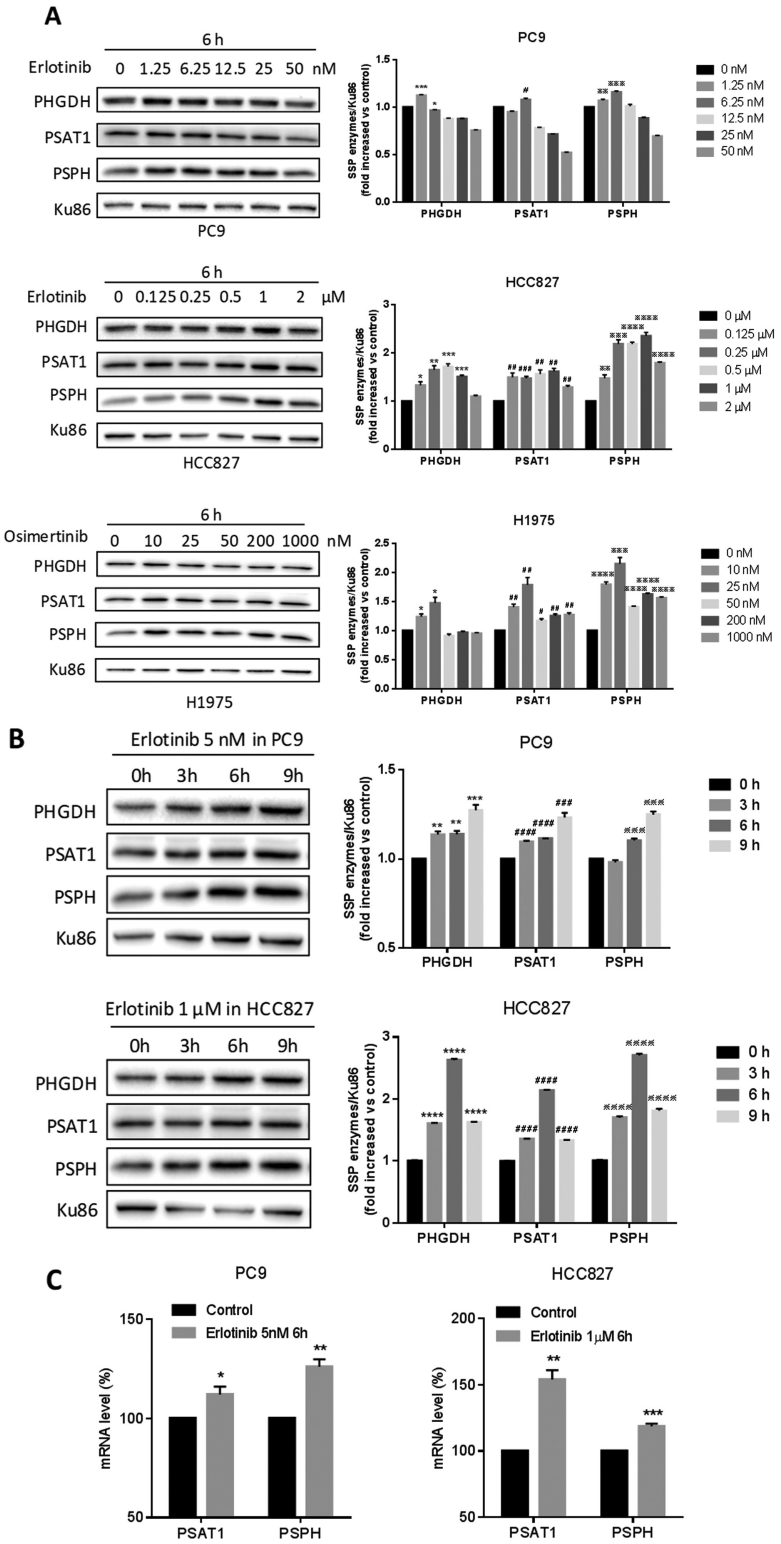

图 1 肺腺癌细胞在 EGFR-TKIs 短时刺激后 SSP 关键酶表达情况

Fig.1 Expression of SSP enzymes in lung adenocarcinoma cells after the short-time treatment with EGFR-TKIs

注：A 给予肺腺癌细胞梯度浓度药物 6 h 后 SSP 关键酶蛋白表达情况；B 给予细胞固定浓度药物作用不同时间点 SSP 关键酶蛋白表达情况；C 最优浓度及作用时间下细胞内 SSP 关键酶 mRNA 水平。

Note: A Expression of SSP enzymes in lung adenocarcinoma cells after EGFR-TKIs treatment with various concentration for 6 hours; B Expression of SSP enzymes in lung adenocarcinoma cells at post EGFR-TKIs treatment hours 0,3,6,9 with fixed concentration; C The mRNA level of intracellular SSP enzymes after EGFR-TKIs treatment with optimal concentration and time.

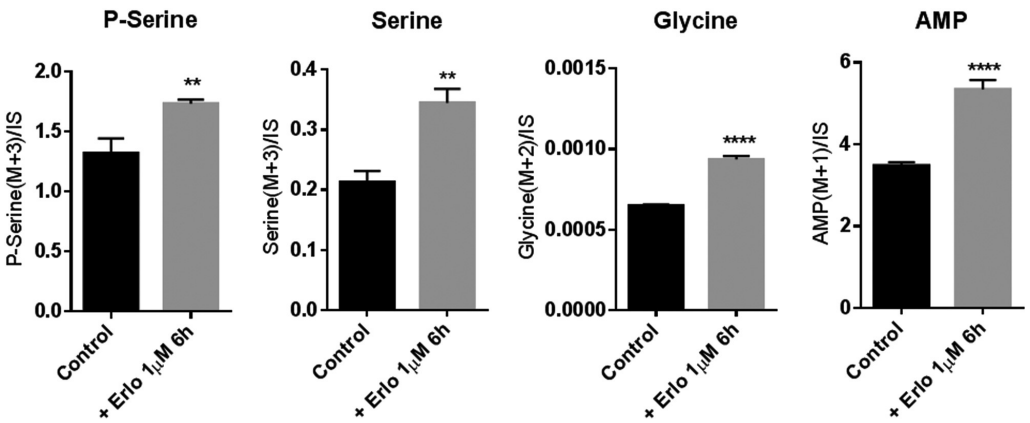

图 2 LC-MS 检测 HCC827 细胞在 1μM erlotinib 作用 6h 后胞内 13C-Glucose 来源的 SSP 代谢产物变化

Fig.2 Intracellular 13C-Glucose derived SSP metabolites concentration quantified by LC-MS in the cells extracts after treatment with 1 μM erlotinib for 6 hours.

2.3 敲低 PSAT1 或 PSPH 对肺腺癌细胞增殖的影响

分别给予 PC9 细胞 20 nM siPSAT1#1、#2、#3、#4 作用 72 h 后利用 Western blotting 验证敲低效果(图 3A),在 96 孔板中利用 CCK8 法检测细胞活力,图 3B 显示 siPSAT1s 对 PC9 细胞均有明显的增殖抑制作用(siPSAT1#1 $P<0.001$;siPSAT1#2 $P<0.0001$;siPSAT1#3 $P<0.05$;siPSAT1#4 $P<0.01$);同样地,分别给予 PC9 及 HCC827 细胞 20 nM siPSPH#1、#3、#5 作用 72 h 后利用 Western blotting 验证敲低效果(图 3C),利用 CCK8 法检测细胞活力,图 3D 显示与 Mock 组相比,siPSPHs 对 PC9 及 HCC827 细胞的增殖亦有明显抑制作用(PC9: siPSPH#1、#3、#5 $P<0.0001$;HCC827:siPSPH#1 $P<0.05$;siPSPH#3、#5 $P<0.01$)。其中 Con 组为无处理组,用于计算细胞增殖抑制率。

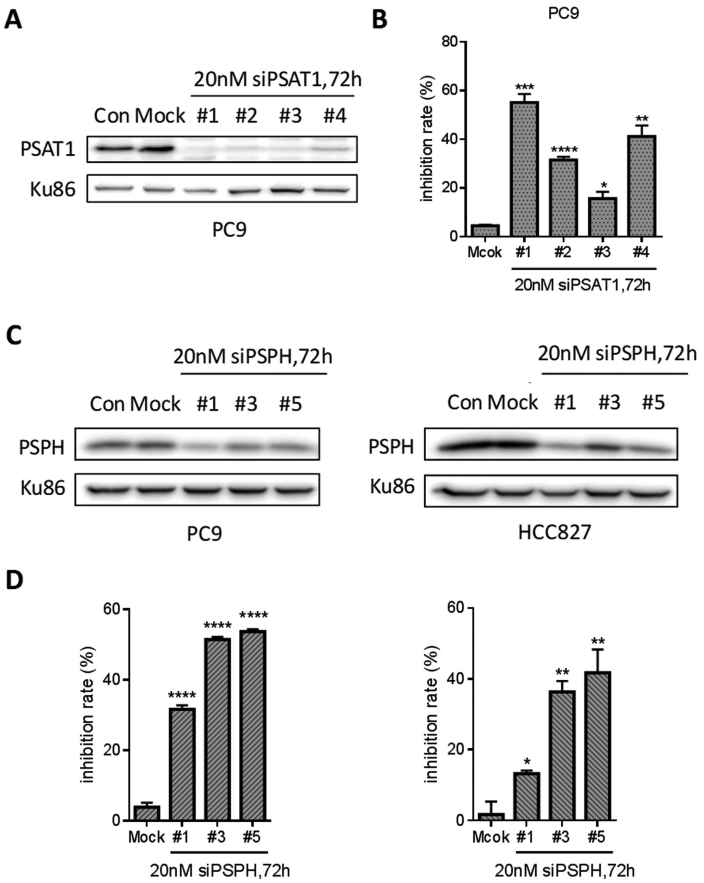

图 3 siPSAT1s 或 siPSPHs 对肺腺癌细胞增殖的影响

Fig.3 The effect of siPSAT1s or siPSPHs on proliferation of the lung adenocarcinoma cells

注:A 免疫印迹法检测 siPSAT1 序列敲低效率;B 20nM siPSAT1s 作用 72h 对 PC9 细胞的增殖抑制作用;C 免疫印迹法检测 siPSPH 序列敲低效率;D 20 nM siPSPHs 作用 72 h 对 PC9 及 HCC827 细胞的增殖抑制作用。

Notes: A Knockdown efficiency of PSAT1 by siPSAT1s was measured by immunoblotting; B The proliferation inhibition of PC9 cells after 20nM siPSAT1s transfection for 72h; C Knockdown efficiency of PSPH by siPSPHs was measured by immunoblotting; D The proliferation inhibition of PC9 and HCC827 cells after 20nM siPSPHs transfection for 72 h.

2.4 体内诱导 PC9 细胞对 erlotinib 适应性耐药

将 PC9 细胞接种于裸鼠皮下后将裸鼠随机分为两组，分别每天给予药物溶剂及 erlotinib，采用剂量爬坡法构建体内适应性耐药模型使 erlotinib 组小鼠肿瘤体积缓慢增加（图 4A），处死裸鼠后取出的肿瘤组织蛋白免疫印迹结果显示 erlotinib 组肿瘤中 PHGDH 及 PSAT1 蛋白表达量较对照组(Vehicle)有明显增加，图 4B 为蛋白条带及灰度分析统计图，与体外结果趋势一致。

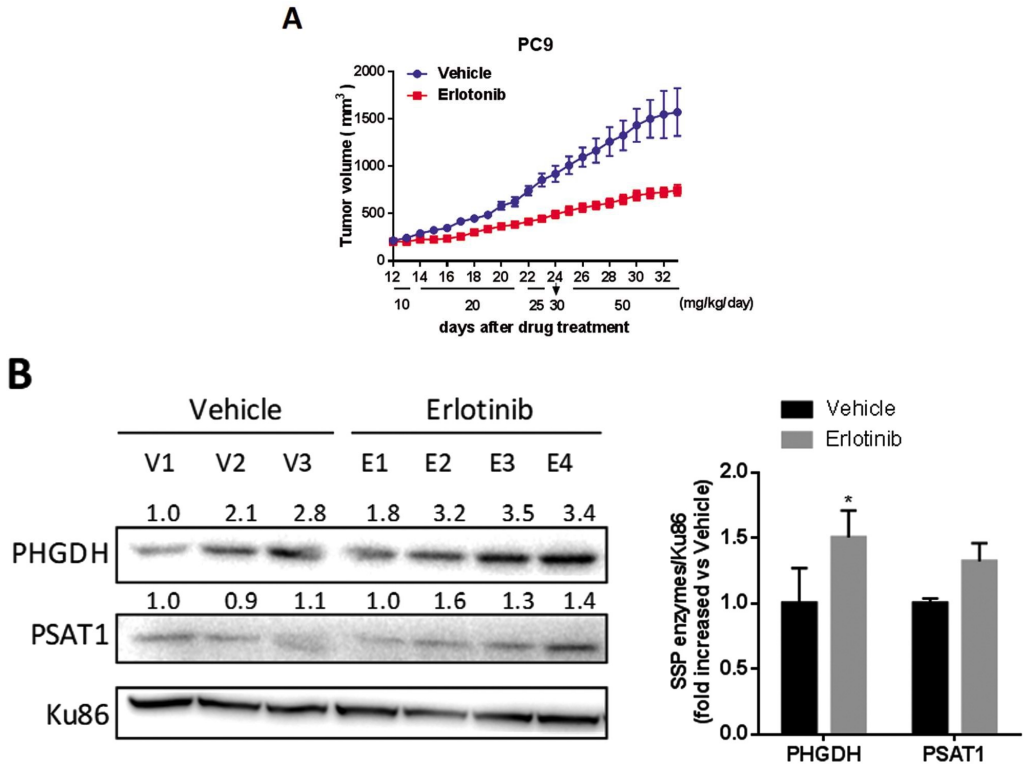

图 4 体内诱导 PC9 细胞对 erlotinib 适应性耐药

Fig.4 PC9 xenografts adaptive resistance to erlotinib treatment in vivo

注：A PC9 细胞裸鼠皮下移植瘤生长曲线；B 免疫印迹法检测肿瘤组织中 PHGDH 及 PSAT1 蛋白表达。

Note: A Tumor growth curve of subcutaneous PC9 xenografts in nude mice; B Immunoblotting of PHGDH, PSAT1 in the tumors.

3 讨论

近年来大量的研究探究了 EGFR-TKIs 获得性耐药的机制，但除获得性耐药外，越来越多的证据显示小部分癌细胞可以在 EGFR-TKIs 治疗早期通过多种应激反馈机制如激活 Stat3[21]、NF-κB[22]通路等抵抗药物压力，实现适应性耐药存活下来，最终导致获得性耐药的产生。所以适应性耐药与靶向药物治疗初期疗效受限及后期复发有直接关系。本课题组在前期 SSP 关键酶 PHGDH 介导肺腺癌细胞对 erlotinib 的获得性耐药研究基础上，继续探究丝氨酸生物合成途径的激活能否介导 EGFR-TKIs 适应性耐药及其他关键酶 PSAT1、PSPH 是否也能介导获得性耐药。

为了解决这一问题，我们在体外采用药物短时刺激肺腺癌细胞系的方法模拟适应性耐药过程，结果显示胞内 SSP 关键酶 PHGDH、PSAT1、PSPH 的表达均有明显上调，可喜的是这种现象在三代抑制剂 osimertinib 适应性耐药过程中也是成立的，说明 SSP 的激活可能在肺腺癌一、三代 EGFR-TKIs 耐药中具有普适性，其有望成为多种 EGFR-TKIs 共同抗耐药靶标。由于 SSP 不仅可以从头合成丝氨酸，更重要的是它还参与的下游代谢途径如甘氨酸、半胱甘酸、核苷酸的合成、一碳单位循环，参与 NADPH 及 GSH 的生成[23]。所以为了验证其生物学功能，我们用 LC-MS 检测发现药物短时刺激后 SSP 及下游多种代谢产物如 P-Serine、Serine、Glycine、AMP 等的产量均有明显增加，说明可能是肿瘤细胞在药物压力下激活 SSP 生成以上代谢物为耐药生存提供所需的能量及物质基础，并且还可能用于生成 GSH 及 NADPH 维持细胞氧化还原平衡，这一猜想还有待后续实验的验证。之后我们运用 siRNA 敲低关键酶 PSAT1、PSPH 的方法进行反向验证，发现细胞增殖确实受到明显抑制，验证了之前的猜想。体内实验中剂量爬坡法诱导 PC9 细胞耐 erlotinib 后肿瘤组织中 SSP 关键酶是明显上调的，说明 SSP 介导适应性耐药这一机制在体内水平亦成立。但具体的分子生物学机制尚未明确，所以之后的工作中，我们将深入挖掘 SSP 介导耐药的机制并寻找出调控它的上游基因，且目前正同步研究 SSP 关键酶 PSAT1 及 PSPH 在获得性耐药中的作用。

综上所述，丝氨酸生物合成途径可介导肺腺癌 EGFR-TKIs 靶向治疗耐药适应性耐药，其关键酶 PHGDH、PSAT1、PSPH 均发挥重要作用，有望成为抗耐药靶标。本研究首次将丝氨酸生物合成途径与肺腺癌 EGFR-TKIs 适应性耐药联系起来，为揭开 EGFR-TKIs 耐药机制提供了新思路，对提高肺腺癌 EGFR-TKIs 靶向治疗疗效、克服耐药具有重要意义。

参 考 文 献(References)

[1] Mattaini K R, Sullivan M R, Vander Heiden M G. The importance of

serine metabolism in cancer[J]. J Cell Biol, 2016, 214(3): 249-257

[2] Maddocks O D, Labuschagne C F, Adams P D, et al. Serine metabolism supports the methionine cycle and DNA/RNA methylation through de novo ATP synthesis in cancer cells[J]. Molecular cell, 2016, 61(2): 210-221

[3] Tedeschi P M, Markert E K, Gounder M, et al. Contribution of serine, folate and glycine metabolism to the ATP, NADPH and purine requirements of cancer cells[J]. Cell death & disease, 2013, 4(10): e877

[4] Ducker G S, Chen L, Morscher R J, et al. Reversal of cytosolic one-carbon flux compensates for loss of the mitochondrial folate pathway[J]. Cell metabolism, 2016, 23(6): 1140-1153

[5] Yang M, Vousden K H. Serine and one-carbon metabolism in cancer [J]. Nature Reviews Cancer, 2016, 16(10): 650

[6] Possemato R, Marks K M, Shaul Y D, et al. Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer[J]. Nature, 2011, 476(7360): 346

[7] DeNicola G M, Chen PH, Mullarky E, et al. NRF2 regulates serine biosynthesis in non-small cell lung cancer [J]. Nature genetics, 2015, 47(12): 1475

[8] Siegel, R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2019

[9] Bender E. Epidemiology: The dominant malignancy [J]. Nature, 2014, 513(7517): S2-S3

[10] Tan D S W, Mok T S K, Rebbeck T R. Cancer Genomics: Diversity and Disparity Across Ethnicity and Geography[J]. Journal of Clinical Oncology, 2016, 34(1): 91-101

[11] Wu YL, Huang C, Qin S, et al. First-line erlotinib versus gemcitabine/cisplatin in patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: analyses from the phase III, randomized, open-label, ENSURE study [J]. Annals of Oncology, 2015, 26(9): 1883-1889

[12] Maemondo, M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or Chemotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer with Mutated EGFR [J]. New England Journal of Medicine, 2010, 362(25): 2380-2388

[13] Wu Y L, Zhou C, Hu C P, et al. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial [J]. The lancet oncology, 2014, 15(2): 213-222

[14] Chong C R, Jänne P A. The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer [J]. Nature medicine, 2013, 19 (11): 1389

[15] Chiang C T, Demetriou A N, Ung N, et al. mTORC2 contributes to the metabolic reprogramming in EGFR tyrosine-kinase inhibitor resistant cells in non-small cell lung cancer [J]. Cancer letters, 2018, 434: 152-159

[16] Broxterman H J, Gotink K J, Verheul H M. Understanding the causes of multidrug resistance in cancer: a comparison of doxorubicin and sunitinib[J]. Drug resistance updates, 2009, 12(4-5): 114-126

[17] Apicella, M, Giannoni E, Fiore S, et al. Increased lactate secretion by cancer cells sustains non-cell-autonomous adaptive resistance to MET and EGFR targeted therapies [J]. Cell metabolism, 2018, 28 (6): 848-865. e6

[18] Dong J K, Lei H M, Liang Q, et al. Overcoming erlotinib resistance in EGFR mutation-positive lung adenocarcinomas through repression of phosphoglycerate dehydrogenase[J]. Theranostics, 2018, 8(7): 1808

[19] Ma P, Fu Y, Chen M, et al. Adaptive and acquired resistance to EGFR inhibitors converge on the MAPK pathway [J]. Theranostics, 2016, 6(8): 1232

[20] Nathanson D A, Gini B, Mottahedeh J, et al. Targeted therapy resistance mediated by dynamic regulation of extrachromosomal mutant EGFR DNA[J]. Science, 2014, 343(6166): 72-76

[21] Lee H J, Zhuang G, Cao Y, et al. Drug resistance via feedback activation of Stat3 in oncogene-addicted cancer cells [J]. Cancer cell, 2014, 26(2): 207-221

[22] Blakely C M, Pazarentzos E, Olivas V, et al. NF-κB-activating complex engaged in response to EGFR oncogene inhibition drives tumor cell survival and residual disease in lung cancer[J]. Cell reports, 2015, 11(1): 98-110

[23] Xiao W, Wang R S, Handy D E, et al. NAD (H) and NADP (H) redox couples and cellular energy metabolism[J]. Antioxidants & redox signaling, 2018, 28(3): 251-272

[28] Paynter NP, Chasman DI, Buring JE, et al. Cardiovascular disease risk prediction with and without knowledge of genetic variation at chromosome 9p21.3[J]. Ann Intern Med, 2009, 150(2): 65-72

[29] Vachon CM, van Gils CH, Sellers TA, et al. Mammographic density, breast cancer risk and risk prediction [J]. Breast Cancer Res, 2007, 9 (6): 217

[30] Spitz MR, Etzel CJ, Dong Q, et al. An expanded risk prediction model for lung cancer[J]. Cancer Prev Res (Phila), 2008, 1(4): 250-254

[31] Wang LE, Hu Z, Sturgis EM, et al. Reduced DNA repair capacity for removing tobacco carcinogen-induced DNA adducts contributes to risk of head and neck cancer but not tumor characteristics [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(2): 764-774