

沉默 FGL1 对肺腺癌细胞吉非替尼药物敏感性的影响

高薇薇, 孙翠兰, 郝吉庆

摘要 目的 研究沉默纤维蛋白原样蛋白 1(FGL1)对肺腺癌细胞吉非替尼药物敏感性的影响。方法 实时荧光定量 PCR 及 Western blot 法检测 FGL1 在肺腺癌吉非替尼敏感细胞株 PC9 与吉非替尼耐药细胞株 PC9/GR 中差异性表达;然后在吉非替尼耐药株 PC9/GR 中沉默 FGL1 表达;CCK-8 实验检测各组细胞增殖情况;流式细胞术测定各组细胞总凋亡率;Western blot 实验测定各组凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Caspase-3 及 Cleaved-Caspase-3 的表达水平。结果 FGL1 在 PC9/GR 细胞中呈高表达;沉默 FGL1 可抑制 PC9/GR 的增殖,且提高了 PC9/GR 细胞凋亡率($P < 0.05$);Western blot 表明,Caspase-3 在各组细胞中表达差异无统计学意义($P > 0.05$);与 PC9/GR 组比较,吉非替尼组 Bax、Bcl-2 表达无明显

差异,而 Cleaved-Caspase-3 表达上调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。沉默 FGL1 后,Bcl-2 蛋白表达下调,Bax、Cleaved-Caspase-3 蛋白表达上调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 沉默 FGL1 可增强肺腺癌耐药细胞对吉非替尼的敏感性,抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,FGL1 可能是治疗表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKIs)耐药性患者的一个潜在靶点。

关键词 肺腺癌;纤维蛋白原样蛋白 1;EGFR-TKIs 耐药;吉非替尼药物敏感性

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)06-0854-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.06.007

2020-03-27 接收

基金项目:安徽省 2018 年度重点研究与开发计划项目(编号:1804h08020240)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院肿瘤内科,合肥 230022

作者简介:高薇薇,女,硕士研究生;

郝吉庆,女,副教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: ayfy_hjq@163.com

肺癌发病率逐年上升,已成为全世界癌症相关死亡的主要原因之一^[1]。非小细胞肺癌(non small lung cancer, NSCLC)是最常见的肺癌病理类型,约占总数的 85%,而其中肺腺癌为最主要的病理类型。近年来,随着对分子靶向药物的深入研究,酪氨

pc-MAPK1 and miR-206 mimic + pc-MAPK1 group, the expression of miR-206 was measured by qRT-PCR, cell growth was measured by Brdu staining, cell invasion was measured by Transwell, the expression of Mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), epithelial cadherin (E-cadherin), vimentin (vimentin), cAMP response element binding protein (CREB), phosphorylated CREB (P-CREB), Ets-like Transcription factor-1 (Elk-1), P-Elk-1, proto-oncogene (c-Myc), P-c-Myc and vascular endothelial growth factor (VEGF) were measured by Western blot. Subcutaneous xenograft tumors of nude mice with miR-206 transfected or non-transfected CAOV3 cells were established. The volume of the transplanted tumors was measured. The expression levels of miR-206 and MAPK1 were detected by qRT-PCR. The expression levels of Elk-1, P-Elk-1, c-Myc and Pc-Myc expression was detected by Western blot. Ki67 and vimentin expression were detected by immunohistochemistry. **Results** miR-206 targeted the inhibition of MAPK1 expression. Compared with the control group, the percentage of BrdU positive cells and the number of invasive cells in the miR-206 mimic group reduced ($t = 4.27, P = 0.002; t = 3.43, P = 0.008$), the expression of E-cadherin increased ($t = 4.13, P = 0.003$), P-CREB/CREB, P-Elk-1/Elk-1, Pc-Myc/c-Myc ratios and the expression of vimentin were down-regulated ($t = 3.27, P = 0.010; t = 3.26, P = 0.010; t = 3.28, P = 0.010; t = 3.51, P = 0.007$). miR-206 mimic reduced the volume of subcutaneously transplanted tumors of CAOV3 cells in nude mice ($t = 6.51, P < 0.001$), increased the expression of miR-206 in the tissues of transplanted tumors ($t = 4.65, P = 0.001$), reduced MAPK1 mRNA levels, VEGF expression, P-Elk-1/Elk-1 and Pc-Myc/c-Myc ratio ($t = 3.86, P = 0.004; t = 3.37, P = 0.009; t = 3.34, P = 0.009; t = 3.40, P = 0.008$), and reduced the percentage of Ki67 and Vimentin positive cells ($t = 4.45, P = 0.002; t = 4.22, P = 0.002$). **Conclusion** miR-206 over expression can inhibit ovarian carcinoma cell CAOV3 growth and mobility via obstructed activation of MAPK signal pathway.

Key words miR-206; ovarian carcinoma; MAPK signal pathway; growth; movement

酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors ,TKIs) 类分子靶向药物在治疗表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor ,EGFR) 敏感突变的晚期肺腺癌方面取得了重大进展,其中吉非替尼在临床上显著提高了肺腺癌患者的生存率。但在 EGFR-TKIs 治疗平均 9.2 ~ 14.7 个月后继发性耐药会不可避免地发生^[2]。因此,如何提高 EGFR-TKIs 耐药患者的药物敏感性是目前临床亟待解决的难题。此外,研究^[3-4]表明程序性死亡蛋白配体 1(programmed death protein-ligand 1 ,PD-L1) 高表达也与 EGFR-TKIs 耐药性存在密切关系。纤维蛋白原样蛋白 1(fibrinogen-like protein 1 ,FGL1) 是最新发现的免疫逃逸分子,在肺癌、乳腺癌、前列腺癌、黑色素瘤和结肠直肠癌中表达升高,其中肺癌上调百分比最高(35%)^[5],但 FGL1 是否参与 EGFR-TKIs 耐药尚无研究。该研究观察沉默 FGL1 对人肺腺癌吉非替尼耐药细胞 PC9/GR 药物敏感性的影响及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞培养 人肺腺癌吉非替尼敏感细胞株 PC9 和人肺腺癌吉非替尼耐药细胞株 PC9/GR 购自中国科学院上海细胞库,均培养于含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和链霉素的 DMEM 培养基中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.1.2 主要试剂和仪器 高糖 DMEM 培养基购自美国 Hyclone 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物公司; lipofectamine™ 2000 瞬时转染试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; CCK-8 试剂盒购自美国 Apexbio 公司; Annexin V-FITC / PI 细胞双染凋亡检测试剂盒购自上海优宁维生物技术公司; 荧光定量 PCR 试剂盒及逆转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; Bcl-2、Bax、Caspase-3(一抗) 购自美国 Abcam 公司; 山羊抗兔多抗、山羊抗鼠多抗(二抗) 购自北京中杉金桥公司; 吉非替尼购自大连美仑生物科技有限公司,按照说明书配成浓度为 10 mmol/L 的溶液,分装后存放于 -20 °C 冰箱中备用。细胞培养箱为美国 SHEL-DON 公司产品; 酶标仪为美国 Bio-Tek 仪器公司产品; 流式细胞仪为英国 BD Bio-sciences 公司产品。该实验中使用的基因和引物序列列表 1,无关的通用序列用为阴性对照。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染 将 3 条不同序列的 siRNA 随机

命名为 FGL1-siRNA-1、2、3,实验分为 4 组: 对照组(转染 NC-siRNA)、siFGL1-1 组(转染 FGL1-siRNA-1)、siFGL1-2 组(转染 FGL1-siRNA-2)、siFGL1-3 组(转染 FGL1-siRNA-3)。取对数生长期的肺腺癌吉非替尼耐药细胞 PC9/GR,稀释为 3.0×10^5 个/ml 的细胞悬液,接种至 6 孔板中培养,待细胞融合至 70% 时,换成无双抗无血清的培养基,应用 lipofectamine™ 2000 试剂盒进行瞬时转染,严格按照试剂盒说明书要求操作,放于 37 °C 培养箱培养 6 h,换成完全培养基继续培养 48 h。采用 Western blot 法和 RT-qPCR 法确定转染效率。

表 1 siRNA 的序列及实时定量 PCR 目的基因的引物

基因	引物序列(5'-3')
FGL1-siRNA	F: GCCGUUAUGCACAAUAUAATT R: UUAUAUUGUGCAUAACGGCTT
FGL1	F: ATGGAGGAGGATGGACTGTAA R: TGAGTGGTCAAGAAGTGAAGAT

1.2.2 FGL1 mRNA 和蛋白的表达情况 应用 RT-qPCR 法测定 PC9 组、PC9/GR 组及转染的 PC9/GR-siNC、PC9/GR-siFGL1 细胞中 FGL1 表达情况: TR-Izol 法提取总 RNA,逆转录获得产物 cDNA,采用 Takara SYBR Green 荧光定量试剂盒测定 FGL1 表达情况,以 GAPDH 为管家基因,由公式 $Folds = 2^{-\Delta\Delta CT}$ 检测目的基因的相对表达强度。应用 Western blot 法检测各组 FGL1 蛋白表达情况: 收集各组细胞,加入细胞裂解液 RIPA/PMSF(100 : 1) 将细胞重悬,冰上裂解 30 min,4 °C、14 000 r/min 离心 30 min,取上清液,BCA 法测定总蛋白浓度,在 SDS-PAGE 凝胶中电泳,转膜、封闭, β -actin、FGL1、Bcl-2、Bax、Caspase-3(1 : 1 000) 一抗 4 °C 孵育过夜,HRP 标记的山羊抗鼠与山羊抗兔 IgG(1 : 10 000) 二抗室温孵育 1 h,用 ECL 化学发光试剂盒进行显影,以 β -actin 为内参。

1.2.3 CCK-8 实验测定细胞增殖 收集 PC9、PC9/GR 细胞及转染的 PC9/GR-siNC、PC9/GR-siFGL1 细胞,各组细胞稀释为 4×10^4 个/ml 细胞悬液,接种于 96 孔板中,每孔 100 μ l,培养 24 h 后,把含不同浓度梯度的吉非替尼培养基加入对应各组孔中,(吉非替尼药物浓度梯度设定: 0、0.08、0.04、0.2、1、5、10、20、40 μ mol/L),培养 48 h 后每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液,孵育 2 h 后,酶标仪上测吸光度(optical density ,OD) 450 值。细胞活力值(%) = [(实验组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组

OD 值] × 100% ,并计算各组的 IC₅₀ 值。每组浓度设 5 个复孔,独立重复实验 3 次。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率 设置 PC9/GR 组、PC9/GR-siNC 组、吉非替尼组、PC9/GR-siFGL1 组及吉非替尼 + PC9/GR-siFGL1 组,取 6 孔板作 PC9/GR 细胞瞬时转染 24 h 后,吉非替尼组和 PC9/GR-siFGL1 + 吉非替尼组同时加入含有终浓度 5 μmol/L 吉非替尼的 5% FBS 的 DMEM 培养基,培养 24 h 后,参考试剂盒说明书收取细胞,2 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用预冷的 PBS(4 ℃)重悬 1 次,再次 2 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 300 μl 的 1 × Binding Buffer 重悬细胞,再加入 5 μl 的 Annexin V-FITC,充分混匀,室温下避光孵育 15 min,上机前 5 min 再加入 5 μl 的 PI 及 200 μl 的 1 × Binding Buffer,充分混匀,上机检测凋亡率。独立重复实验 3 次。

1.2.5 Western blot 测定细胞中凋亡相关蛋白的表达 实验分组同 1.2.4 项。取 6 孔板作 PC9/GR 细胞瞬时转染 24 h 后,吉非替尼组和 PC9/GR-siFGL1 + 吉非替尼组同时加入含有终浓度 5 μmol/L 吉非替尼的 5% FBS 的 DMEM 培养基 24 h 后,收集细胞,提取总蛋白,步骤同 1.2.2 项。

1.3 统计学处理 采用 IBM SPSS 22.0 软件分析并处理数据,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间数据比

较采用 *t* 检验,多组间数据比较采用单因素方差分析,以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FGL1 在细胞株 PC9 和 PC9/GR 细胞中表达

Western blot 及实时荧光定量 PCR 检测结果显示:PC9/GR 组细胞中 FGL1 表达水平高于 PC9 组,差异有统计学意义(*P* < 0.05),见图 1A、B。另外,与 PC9/GR-siNC 组相比,PC9/GR-siFGL1-2 组和 PC9/GR-siFGL1-3 组 FGL1 表达明显下调,差异有统计学意义(*P* < 0.05),但 PC9/GR-siFGL1-2 组 FGL1 表达下调最显著,故选取 PC9/GR-siFGL1-2 组的 FGL1-siRNA 进行后续实验。见图 1C、D。

2.2 CCK-8 实验测定不同方式处理后耐药细胞 PC9/GR 增殖活性 CCK-8 实验结果显示:吉非替尼对 PC9 组、PC9/GR 组及 PC9/GR-siFGL1 组细胞增殖的抑制作用均随着浓度的增加而逐渐增强。PC9/GR 组细胞的吉非替尼 IC₅₀ 高于 PC9 组细胞的吉非替尼 IC₅₀,差异有统计学意义(*P* < 0.001)。此外,与 PC9/GR 组和 PC9/GR-siNC 组相比,PC9/GR-siFGL1 组细胞的吉非替尼 IC₅₀ 明显降低,差异有统计学意义(*P* < 0.001),PC9/GR-siNC 组与 PC9/GR 组细胞 IC₅₀ 比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。见图 2。

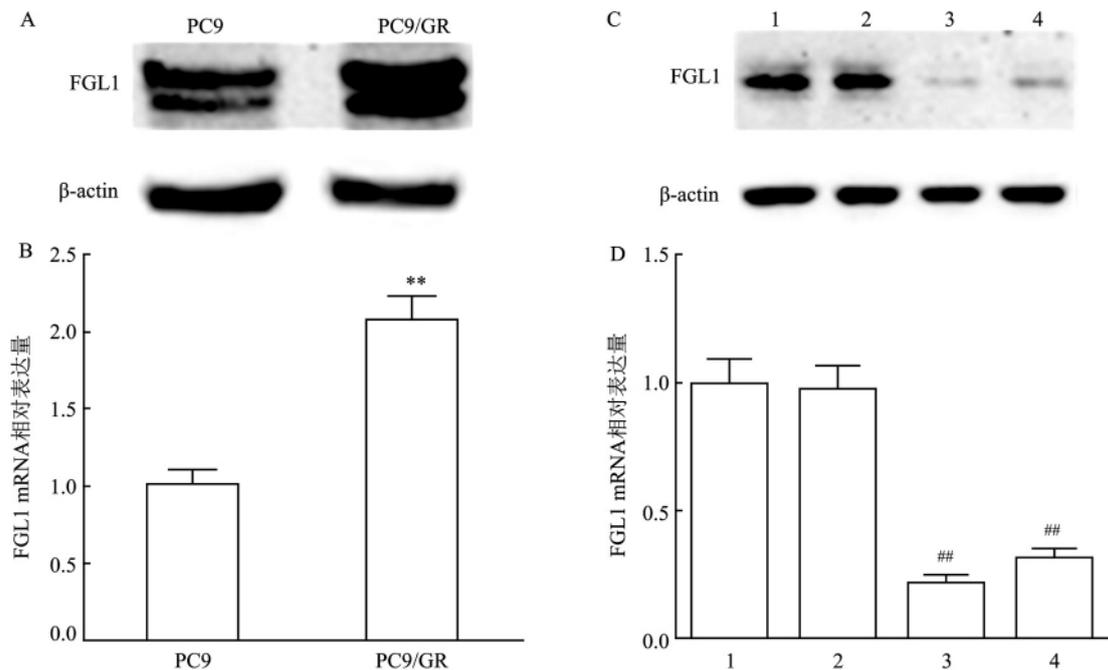


图1 Western blot 实验和实时荧光定量 PCR 检测 FGL1 的表达量

A: PC9 组与 PC9/GR 组细胞中 FGL1 蛋白的表达; B: PC9 组与 PC9/GR 组细胞中 FGL1 mRNA 的表达; C: 转染后 4 组细胞 FGL1 蛋白的表达; D: 转染后 4 组细胞 FGL1 mRNA 的表达; 1: siNC; 2: siFGL1-4; 3: siFGL1-2; 4: siFGL1-3; 与 PC9 组比较: ** *P* < 0.01; 与 siNC 组比较: ## *P* < 0.01

2.3 流式细胞术检测沉默 FGL1 对 PC9/GR 细胞凋亡的影响 流式细胞术检测各组细胞总凋亡率, PC9/GR 组 [(5.69 ± 0.89) %]、PC9/GR-siNC 组 [(6.04 ± 0.85) %]、吉非替尼组 [(11.56 ± 1.75) %]、PC9/GR-siFGL1 组 [(25.58 ± 1.86) %]、吉非替尼 + PC9/GR-siFGL1 组 [(35.02 ± 2.58) %] 5 组细胞总凋亡率之间差异有统计学意义 ($F = 103.711, P < 0.0001$)。与 PC9/GR 组比较, 吉非替尼组细胞总凋亡率有所升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。而沉默 FGL1 后, PC9/GR 细胞

凋亡率明显升高, 联合吉非替尼后, 细胞总凋亡率最高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.001$)。PC9/GR-siNC 组与 PC9/GR 组比较, 细胞总凋亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 3)。

2.4 Western blot 检测各组细胞凋亡相关蛋白的表达情况 Western blot 法结果显示, 无活性的 Caspase-3 在各组细胞中表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 PC9/GR 组相比, 单独应用吉非替尼后, Bax 蛋白表达有所上调, Bcl-2 蛋白表达有所下调, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而

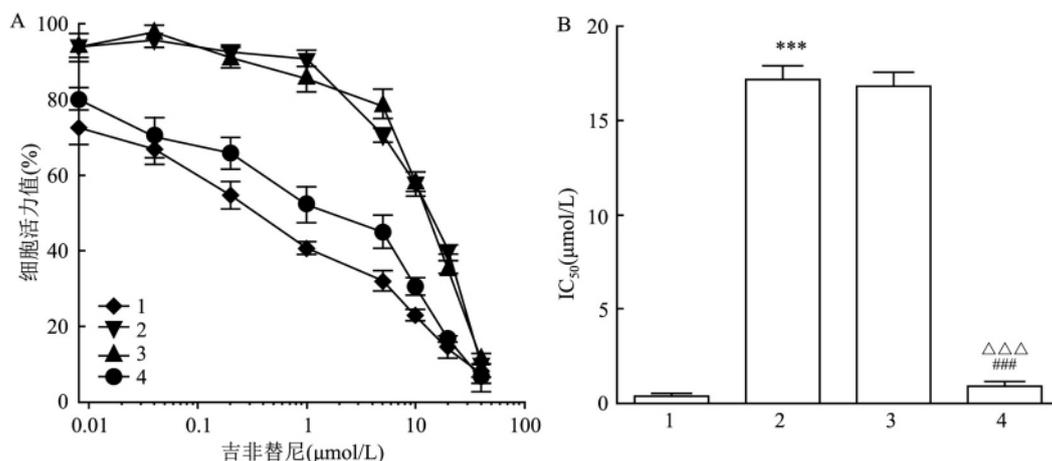


图 2 CCK-8 实验测定吉非替尼对 PC9、PC9/GR、PC9/GR-siNC 和 PC9/GR-siFGL1 细胞的增殖抑制效应

A: CCK-8 实验检测 4 组细胞的细胞活力; B: 4 组细胞的 IC₅₀ 值; 1: PC9 组; 2: PC9/GR 组; 3: PC9/GR-siNC 组; 4: PC9/GR-siFGL1 组; 与 PC9 组比较: *** $P < 0.001$; 与 PC9/GR-siNC 组比较: ### $P < 0.001$; 与 PC9/GR 组比较: $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$

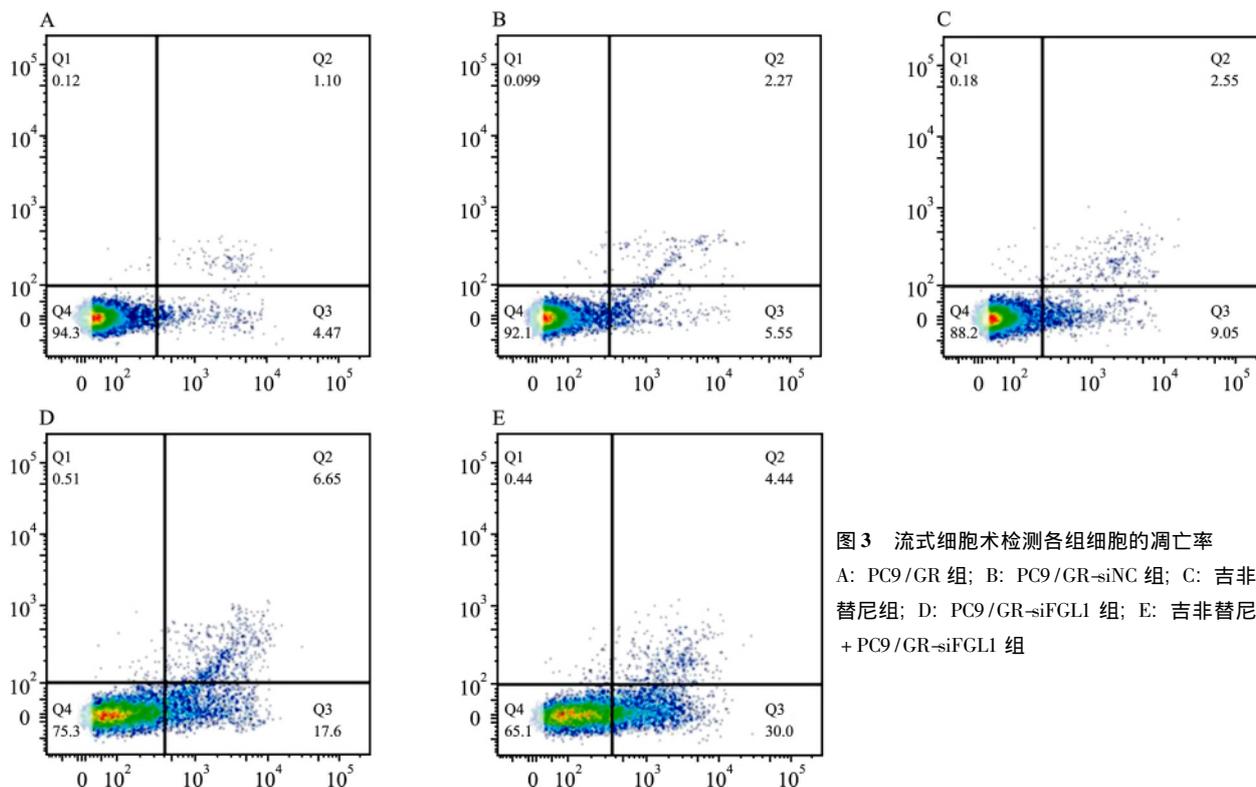


图 3 流式细胞术检测各组细胞的凋亡率
A: PC9/GR 组; B: PC9/GR-siNC 组; C: 吉非替尼组; D: PC9/GR-siFGL1 组; E: 吉非替尼 + PC9/GR-siFGL1 组

Cleaved-Caspase-3 表达上调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而沉默 FGL1 后,Bcl-2 蛋白表达下调,Bax 蛋白表达上调,且联合吉非替尼后,Bcl-2 下调、Bax 上调更加明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。此外,沉默 FGL1 后,活化的 Cleaved-Caspase-3 表达水平明显上调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。PC9/GR-siNC 组与 PC9/GR 组比较,各蛋白表达差异均无统计学意义($P > 0.05$) (图 4)。

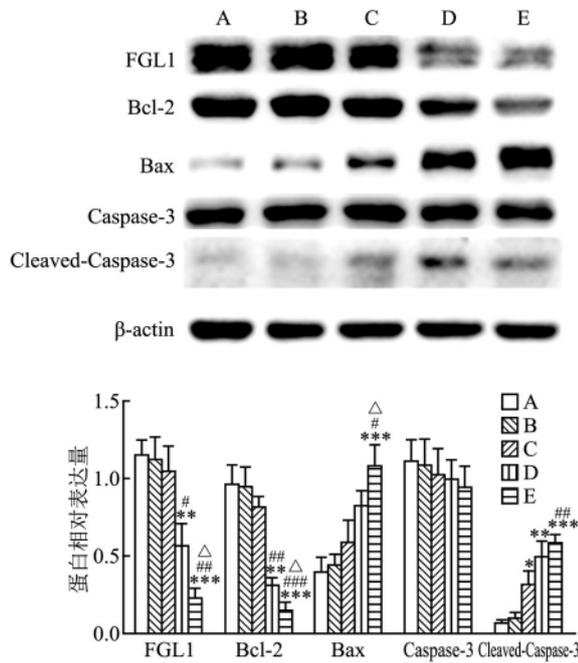


图 4 Western blot 检测各组凋亡相关蛋白的表达水平

A: PC9/GR 组; B: PC9/GR-siNC 组; C: 吉非替尼组; D: PC9/GR-siFGL1 组; E: 吉非替尼 + PC9/GR-siFGL1 组; 与 PC9/GR 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与吉非替尼组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; 与 PC9/GR-siFGL1 组比较: Δ $P < 0.05$

3 讨论

在欧美国家中,约 10% ~ 15% 的肺腺癌患者携带 EGFR 酪氨酸激酶域内的激活突变,而在亚洲国家中,EGFR 突变病例高达 40% ~ 50% [6-7]。目前,EGFR-TKIs 类靶向药物已作为晚期 EGFR 敏感突变的肺腺癌患者的一线标准治疗方案,然而,EGFR-TKIs 继发性耐药的发生大大缩短了患者的生存期。研究 [8] 显示继发性耐药机制有多种,包括 T790M 突变、MET 基因激活、ERBB2 基因扩增、小细胞肺癌的上皮间质转化等,也与 PD-L1 高表达相关。而 FGL1 与 PD-L1 相同,与 T 细胞表面的相应受体相结合,从而逃逸机体免疫监视,但对 FGL1 是否参与吉非替尼继发性耐药研究较少。

FGL1 在多种肿瘤中表达上调,Zhang et al [9] 研究表明在胃腺癌中,FGL1 高表达的患者预后差,且沉默 FGL1 可抑制胃腺癌细胞的侵袭和迁移。本研究显示,与吉非替尼敏感细胞 PC9 相比,FGL1 在吉非替尼耐药细胞 PC9/GR 中表达明显上调。采用小干扰 RNA (siRNA) 技术沉默 PC9/GR 细胞 FGL1 基因,用于后续实验。CCK-8 实验结果显示相比较于 PC9/GR 细胞和 PC9/GR-siNC 细胞,沉默 FGL1 基因后 PC9/GR 细胞的增殖能力明显下降,表明沉默 FGL1 能够抑制肺腺癌吉非替尼耐药细胞 PC9/GR 的增殖。不同浓度的吉非替尼处理后,PC9、PC9/GR、PC9/GR-siNC、PC9/GR-siFGL1 各组细胞的吉非替尼 IC₅₀ 分别为 (0.39 ± 0.26)、(18.18 ± 1.26)、(16.82 ± 0.75)、(0.94 ± 0.25) μmol/L,表明 PC9/GR 细胞确实对吉非替尼耐药,并且沉默 FGL1 的 PC9/GR 耐药细胞吉非替尼 IC₅₀ 明显低于对照组细胞,表明沉默 FGL1 一定程度上恢复了 PC9/GR 对吉非替尼敏感性。

Bcl-2 是 Bcl-2 家族的抗凋亡蛋白,在乳腺癌、慢性淋巴细胞白血病等多种肿瘤细胞中,Bcl-2 的表达下调可诱导细胞凋亡,甚至克服耐药性 [10-11]。且 Zou et al [12] 研究发现,沉默 Bcl-2 可提高耐吉非替尼耐药的 H1975 肺癌细胞系对吉非替尼的敏感性。Bax 基因是 Bcl-2 基因家族中一个促进凋亡的基因,参与细胞色素 C 的释放并诱导 Caspase 依赖的凋亡途径 [13-14]。本研究中,流式细胞术实验证实 PC9/GR-siFGL1 组细胞凋亡率增加,而吉非替尼 + PC9/GR-siFGL1 组 PC9/GR 细胞凋亡率更高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Western blot 结果提示沉默 FGL1 或联合吉非替尼均能引起抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Caspase-3 是细胞中一组半胱氨酸蛋白酶,同时参与内外源性凋亡途径。正常情况下,Caspase-3 是无活性的,但在细胞接受凋亡刺激后,下游 Caspases 级联激活,进而诱导细胞发生凋亡 [15]。本研究结果显示,Caspase-3 在各组细胞中表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$),PC9/GR-siFGL1 组及联合组 Cleaved-Caspase-3 和 Bax 蛋白表达增加,与流式细胞术检测细胞凋亡率的结果一致,进一步说明沉默 FGL1 及联合吉非替尼均能诱导肺腺癌耐药细胞凋亡,且联合处理更加促进细胞凋亡。以上结果可能是通过下述机制实现的:通过上调促凋亡蛋白表达、下调抗凋亡蛋白表达以促进耐药细胞凋亡,从而导致沉默 FGL1 增强了 PC9/GR 细胞吉非替尼药物敏感性,对

于沉默 FGL1 是否还存在其他恢复药物敏感性的机制仍需深入研究。

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer Statistics, 2017 [J]. *CA Cancer J Clin* 2017, 67(1): 7–30.
- [2] Westover D, Zugazagoitia J, Cho B C, et al. Mechanisms of acquired resistance to first-and second-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors [J]. *Ann Oncol*, 2018, 29(suppl_1): i10–9.
- [3] Su S, Dong Z Y, Xie Z, et al. Strong programmed death ligand 1 expression predicts poor response and de novo resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors among NSCLC patients with EGFR mutation [J]. *J Thorac Oncol*, 2018, 13(11): 1668–75.
- [4] Hsu K H, Huang Y H, Tseng J S, et al. High PD-L1 expression correlates with primary resistance to EGFR-TKIs in treatment naïve advanced EGFR-mutant lung adenocarcinoma patients [J]. *Lung Cancer*, 2019, 127: 37–43.
- [5] Wang J, Sanmamed M F, Datar I, et al. Fibrinogen-like protein 1 is a major immune inhibitory ligand of LAG-3 [J]. *Cell*, 2019, 176(1–2): 334–47.
- [6] 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): 958–67.
- [7] Yatabe Y, Kerr K M, Utomo A, et al. EGFR mutation testing practices within the Asia Pacific region: results of a multicenter diagnostic survey [J]. *Thorac Oncol*, 2015, 10(3): 438–45.
- [8] Lim S M, Syn N L, Cho B C, et al. Acquired resistance to EGFR targeted therapy in non-small cell lung cancer: Mechanisms and therapeutic strategies [J]. *Cancer Treat Rev*, 2018, 65: 1–10.
- [9] Zhang Y, Qiao H X, Zhou Y T, et al. Fibrinogen-like-protein 1 promotes the invasion and metastasis of gastric cancer and is associated with poor prognosis [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(2): 1465–72.
- [10] Lima R T, Martins L M, Guimaraes J E, et al. Specific downregulation of bcl-2 and xIAP by RNAi enhances the effects of chemotherapeutic agents in MCF-7 human breast cancer cells [J]. *Cancer Gene Ther*, 2004, 11(5): 309–16.
- [11] Tumilasci V F, Oliere S, Nguyen T L, et al. Targeting the apoptotic pathway with BCL-2 inhibitors sensitizes primary chronic lymphocytic leukemia cells to vesicular stomatitis virus-induced oncolysis [J]. *J Virol*, 2008, 82(17): 8487–99.
- [12] Zou M, Xia S, Zhuang L, et al. Knockdown of the Bcl-2 gene increases sensitivity to EGFR tyrosine kinase inhibitors in the H1975 lung cancer cell line harboring T790M mutation [J]. *Int J Oncol*, 2013, 42(6): 2094–102.
- [13] Um H D. Bcl-2 family proteins as regulators of cancer cell invasion and metastasis: a review focusing on mitochondrial respiration and reactive oxygen species [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(5): 5193–203.
- [14] Renault T T, Dejean L M, Manon S. A brewing understanding of the regulation of Bax function by Bcl-xL and Bcl-2 [J]. *Mech Ageing Dev*, 2017, 161(Pt B): 201–10.
- [15] Liang S, Sun K, Wang Y, et al. Role of Cyt-C/caspases-9, 3, Bax/Bcl-2 and the FAS death receptor pathway in apoptosis induced by zinc oxide nanoparticles in human aortic endothelial cells and the protective effect by alpha-lipoic acid [J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 258: 40–51.

Effect of silencing FGL1 on sensitivity of gefitinib in lung adenocarcinoma cells

Gao Weiwei, Sun Cuilan, Hao Jiqing

(Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effect of silenced fibrin original protein 1 (FGL1) on the drug sensitivity of gefitinib in lung adenocarcinoma cells. **Methods** Real-time quantitative PCR and Western blot were used to detect the differential expression of FGL1 in lung adenocarcinoma gefitinib-sensitive cell line PC9 and gefitinib-resistant cell line PC9/GR. FGL1 expression was silenced in gefitinib resistant strain PC9/GR. CCK-8 assay was used to detect cell proliferation in each group. Flow cytometry was used to determine the apoptosis rate of each group. Western blot was used to determine relative expression levels of apoptotic proteins Bcl-2, Bax, Caspase-3 and Cleaved-Caspase-3. **Results** FGL1 was highly expressed in PC9/GR cells. Silencing FGL1 inhibited the proliferation of PC9/GR and increased the apoptosis rate of PC9/GR cells ($P < 0.05$). Western blot showed no significant difference in the expression of Caspase-3 in each group ($P > 0.05$). Compared with the control group, the expression of Bax and Bcl-2 in gefitinib group showed no significant difference, while the expression of Cleaved-Caspase-3 was up-regulated, with statistically significant difference ($P < 0.05$). After FGL1 was silenced, Bcl-2 protein expression was down-regulated, while Bax and Cleaved-Caspase-3 protein expression was up-regulated, with statistically significant differences ($P < 0.05$). **Conclusion** Silencing FGL1 can increase the sensitivity of lung adenocarcinoma cells to gefitinib, inhibit cell proliferation, promote cell apoptosis, and provide potential therapeutic targets for gefitinib resistant lung adenocarcinoma patients.

Key words lung adenocarcinoma; fibrinogen-like protein 1; EGFR-TKIs resistance; gefitinib sensitivity