

伏立诺他对肺腺癌厄洛替尼耐药细胞株耐药性的影响

吴鹏飞 郝吉庆

摘要 目的 探讨组蛋白去乙酰化酶抑制剂伏立诺他(SAHA)对肺腺癌厄洛替尼(Erlotinib)耐药细胞株PC-9/ER耐药性的影响。方法 PC-9/ER经过厄洛替尼单药、SAHA单药、厄洛替尼联合SAHA处理48 h后,MTT法检测各种药物对PC-9/ER细胞的增殖抑制率;流式细胞术检测细胞凋亡率。结果 SAHA单药对PC-9/ER具有抑制作用,呈明显的剂量依赖效应关系。无细胞毒剂量的SAHA(1 $\mu\text{mol/L}$)能明显提高PC-9/ER对厄洛替尼的敏感性。结论 SAHA能够部分改善PC-9/ER对厄洛替尼的敏感性。

关键词 肺腺癌;组蛋白去乙酰化酶抑制剂;伏立诺他;厄洛替尼;耐药性

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)10-1500-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.10.018

肺癌是全球最常见的恶性肿瘤之一,其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占85%。目前对于晚期NSCLC的一线治疗正由传统的化疗向分子靶向治疗发展。目前表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors, TKI)已广泛用于有EGFR突变的NSCLC的治疗,如:厄洛替尼、吉非替尼等。然而,在EGFR-TKI治疗一段时间后都会无法避免地出现耐药现象,严重影响治疗效果^[1-2]。探索新型药物以克服耐药已成为当前肺癌临床治疗上急需解决的问题。近年来研究^[3]证实,异常的DNA甲基化和组蛋白修饰等表观遗传学的改变,在肿瘤的发展中有着至关重要的作用。组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)抑制剂通过抑制组蛋白及非组蛋白的去乙酰化,从而抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡等来发挥抗肿瘤作用。该研究拟探讨HDAC抑制剂伏立诺他(vorinostat, SAHA)对肺腺癌厄洛替尼耐药细胞株PC-9/ER的增

殖抑制作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人肺腺癌PC-9细胞株由合肥市滨湖医院实验中心惠赠。PC-9细胞贴壁生长于含10%胎牛血清的DMEM完全培养基,在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度培养箱中常规培养,2~3 d换液传代1次,取对数生长期细胞用于后续实验。厄洛替尼耐药细胞株PC-9/ER细胞的建立,采用逐渐增加细胞培养基中厄洛替尼浓度的方法诱导耐药细胞的产生,厄洛替尼的初始浓度为10 nmol/L,体外培养48 h后,弃去培养基, PBS冲洗3遍,加入不含药物的完全培养基培养至细胞存活达80%,再逐渐增加厄洛替尼的浓度,直至PC-9在1 $\mu\text{mol/L}$ 厄洛替尼中稳定生长^[4]。

1.2 试剂及器材 DMEM培养基购自美国Hyclone公司; Annexin V-FITC / PI细胞双染凋亡检测试剂购自上海贝博生物公司; MTT粉末购自美国Sigma公司; SAHA及厄洛替尼均购自美国Selleck公司,按照说明书配制浓度为10 nmol/L的溶液,分装后保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。细胞培养箱购自美国SHELDON公司; 倒置式显微镜购自日本OLYMPUS公司; 恒温水浴锅购自上海玺恒实业有限公司; 医学净化工作台购自苏州净化设备有限公司; 酶标仪购自美国Bio-Tek仪器公司; 流式细胞仪购自美国Beckman Coulter公司。

1.3 方法

1.3.1 MTT法 取对数生长期PC-9、PC-9/ER细胞进行实验。经胰酶消化后,将细胞适当稀释后接种至96孔板中,分为实验组(加入厄洛替尼和SAHA单药或联合)、无药对照组(只加入细胞和培养基)和空白对照组(只加入培养基,无细胞)。培养于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中,24 h后按PC-9:厄洛替尼(0.005、0.01、0.1、1 $\mu\text{mol/L}$); PC-9/ER:厄洛替尼(0.25、0.5、1、2、4、8 $\mu\text{mol/L}$); SAHA(1、2、4、8 $\mu\text{mol/L}$)和厄洛替尼(0.25、0.5、1、2、4、8 $\mu\text{mol/L}$) + SAHA(无细胞毒作用的1 $\mu\text{mol/L}$)浓度梯度加药。每组设5个平行孔。药物作用48 h后,弃去上

2017-06-20 接收

基金项目:安徽省对外科技合作计划项目(编号:1503062023)

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:吴鹏飞,男,硕士研究生;

郝吉庆,女,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-

mail: ayfy_hjq@163.com

清液,加入 MTT 溶液(5 mg/L) 50 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后,吸去 MTT 溶液,每孔加入 150 μ l DMSO,于酶标仪 490 nm 处测光密度(OD)值,以观察药物对细胞增殖状况的影响,并计算各药物的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})。所有实验结果重复 3 次。计算 SAHA 对厄洛替尼的逆转倍数(reversal fold, RF)及相对逆转率%(relative reversal rate, RRR%)。RF = IC_{50} (厄洛替尼) / IC_{50} (SAHA + 厄洛替尼)。RRR% = (厄洛替尼对 PC-9/ER 的 IC_{50} - SAHA 联合厄洛替尼对 PC-9/ER 的 IC_{50}) / (厄洛替尼对 PC-9/ER 的 IC_{50} - 厄洛替尼对 PC-9 的 IC_{50})%。RF > 1 表示 SAHA 能增强厄洛替尼的作用,RF = 1 表示两药无交互作用,RF < 1 表示拮抗作用,RF 越大,说明逆转效果越好。RRR% \geq 100% 表示完全逆转作用;RRR% < 100% 表示部分逆转作用。

1.3.2 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡

分别设对照组、SAHA 单药组(1 μ mol/L)、厄洛替尼单药组(2 μ mol/L)及联合用药组(SAHA 1 μ mol/L + 厄洛替尼 2 μ mol/L)。药物处理 48 h 后,根据试剂盒说明收集细胞,加入 400 μ l 1 \times Binding Buffer 轻轻重悬细胞,加入 5 μ l Annexin V-FITC 轻轻混匀,室温避光孵育 15 min,加入 10 μ l PI 染色液混匀,冰浴避光放置 5 min,在 30 min 内进行流式细胞仪检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件对数据进行分析及处理。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组以上的数据比较采用方差分析,两组间数据比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PC-9 及 PC-9/ER 细胞对厄洛替尼的敏感性

PC-9/ER 细胞对厄洛替尼的耐药性明显高于 PC-9 细胞。厄洛替尼处理 48 h 后的 IC_{50} 分别为:PC-9 (敏感) < 0.01 μ mol/L, PC-9/ER (2.02 \pm 0.61) μ mol/L, PC-9/ER 细胞对厄洛替尼的耐药性明显高于 PC-9 细胞,其耐药倍数大于 100 倍。

2.2 SAHA 单药对 PC-9/ER 细胞增殖的影响

SAHA 单药对 PC-9/ER 细胞的生长具有抑制作用,并且随着 SAHA 浓度的提高,抑制率也提高,呈现明显的剂量依赖效应关系。PC-9/ER 细胞经 SAHA 处理 48 h 后,其 IC_{50} 为(2.63 \pm 0.11) μ mol/L。在 SAHA 浓度为 1 μ mol/L 时,SAHA 对 PC-9/ER 细胞的抑制率 < 10%,可以认为是该药物的无细胞毒浓度。

见图 1。

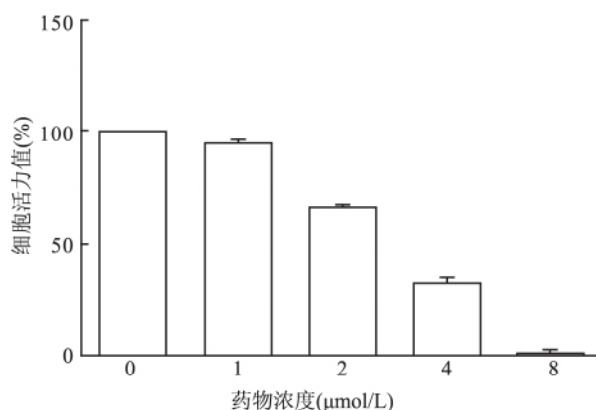


图 1 不同浓度的 SAHA 对 PC-9/ER 细胞增殖活性的影响

2.3 SAHA 联合厄洛替尼对 PC-9/ER 细胞的增殖抑制作用

PC-9/ER 细胞在 1 μ mol/L(无细胞毒浓度)的 SAHA 与厄洛替尼联合作用 48 h 后,对厄洛替尼的敏感性增加, IC_{50} 由(2.02 \pm 0.61) μ mol/L 降至(0.67 \pm 0.03) μ mol/L。RF 为 3.01, RRR% 为 66.8%,提示 SAHA 能够部分逆转 PC-9/ER 细胞对厄洛替尼的耐药性,差异有统计学意义($t = 6.283$, $P < 0.05$)。见图 2。

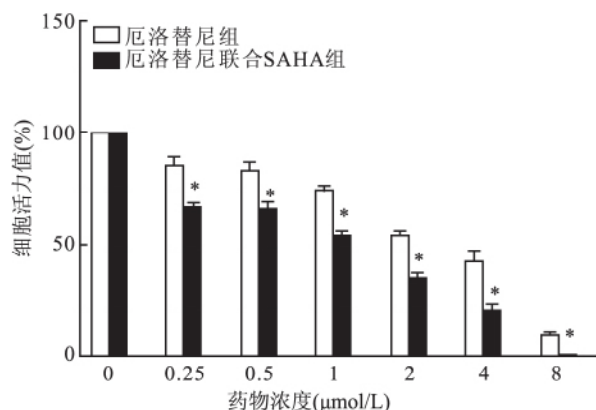


图 2 厄洛替尼及厄洛替尼联合 SAHA 对 PC-9/ER 细胞增殖活性的影响
与厄洛替尼单药组比较: * $P < 0.05$

2.4 厄洛替尼联合 SAHA 对 PC-9/ER 细胞凋亡的影响

PC-9/ER 细胞用厄洛替尼(2 μ mol/L)及 SAHA(1 μ mol/L)单药或者联合处理 48 h 后,联合用药组的凋亡率为(44.40 \pm 2.6)% ,明显高于厄洛替尼单药(18.87 \pm 2.54)% 及 SAHA 单药(15.67 \pm 2.64)% ,结果显示厄洛替尼联合 SAHA 能够明显诱导 PC-9/ER 细胞的凋亡,差异有统计学意义($F = 132.128$, $P < 0.05$)。见图 3。

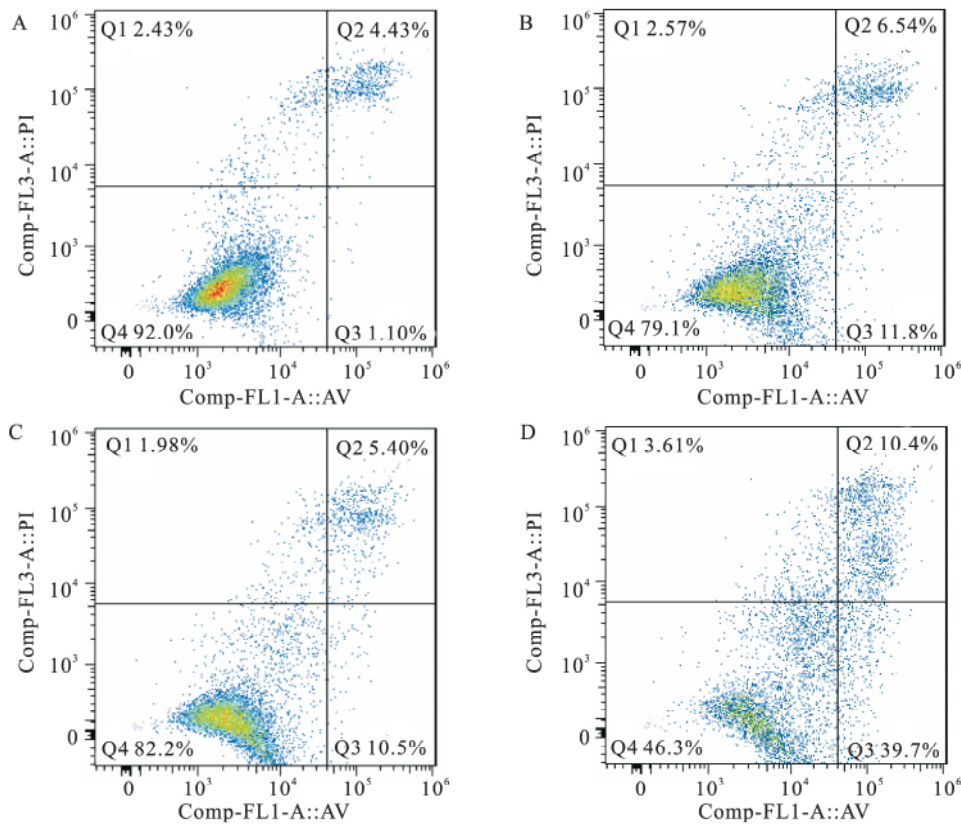


图3 厄洛替尼、SAHA 单药及联合对 PC-9/ER 细胞凋亡的影响
A: 空白对照组; B: 厄洛替尼组; C: SAHA 组; D: 厄洛替尼 + SAHA 组

3 讨论

60% NSCLC 表现出 EGFR 的高表达,提示患者预后不良。目前如吉非替尼、厄洛替尼等在内的 EGFR-TKI 被批准用于 NSCLC 的治疗。尽管临床疗效欠佳,但是部分患者在经过治疗后,生存质量改善,因此提高治疗疗效及改善耐药,对患者是有益的。研究^[5]显示 EGFR-TKI 获得性耐药的机制主要有:① T790M 二次突变;② c-Met 扩增;③ EGFR 下游信号分子的异常激活;④ 诱导血管生成等。其中,EGFR T790M 的二次突变及 c-Met 扩增是 EGFR-TKI 获得性耐药的主要机制,约占 60% 左右,而余下耐药机制尚未明确。因此明确可能的耐药机制,开发新型药物来改善其耐药现象显得尤为重要。本研究采用体外持续诱导人肺腺癌 PC-9(厄洛替尼敏感型)细胞耐药观察 SAHA 对肺腺癌厄洛替尼耐药细胞株 PC-9/ER 耐药性的影响。PC-9 细胞为 EGFR19 外显子突变型,无 Met 基因扩增或 EGFR20 外显子突变(T790M),而且对厄洛替尼敏感,因此可以在一定程度上模拟厄洛替尼获得性耐药的形

程。在持续的厄洛替尼诱导下,PC-9/ER 细胞产生明显的耐药性。经 MTT 法检测 PC-9/ER 细胞的耐药指数超过 100 倍,证实了成功建立厄洛替尼耐药细胞株。

目前研究^[6]表明,表观遗传的改变在肿瘤的发生、发展中起重要作用。组蛋白的乙酰化修饰可以影响染色质的结构,从而导致基因表达的改变^[7]。在有机体内,组蛋白乙酰化与去乙酰化是由一对相互拮抗的蛋白酶调控:组蛋白乙酰转移酶、HDAC。HDAC 可以影响癌细胞中与细胞增殖、凋亡、分化相关的基因表达,还可以促进与血管生成、细胞迁移和侵袭等相关基因的表达,同时能抑制抑癌基因(如 p53)的表达^[8]。研究^[9]显示在多数癌细胞中,HDAC 的表达升高。上述结果显示,HDAC 抑制剂在治疗肿瘤中具有较大的前景。

HDAC 抑制剂能上调促凋亡蛋白的表达,同时还能抑制抗凋亡蛋白的表达^[10]。HDAC 能够抑制促凋亡蛋白 BMF 的表达,抑制 HDAC 的活性导致 BMF 的表达增加以及促进 BMF 介导的细胞凋亡^[11]。SAHA 是一种广谱的 HDAC 抑制剂,对恶性

增殖细胞具有选择性,能够抑制其生长和诱导凋亡,同时有抗肿瘤血管生成、调节宿主免疫应答等生物学效应,且 SAHA 在多项肿瘤的联合化疗中均显示出其协同或增强作用^[12]。在本研究中,SAHA 单药即可以抑制 PC-9/ER 细胞的增殖,且在无细胞毒作用的低剂量(1 $\mu\text{mol/L}$)与厄洛替尼联合应用时,能明显提高 PC-9/ER 细胞对厄洛替尼的敏感性。此外 SAHA 与厄洛替尼联合还能明显提高 PC-9/ER 细胞的凋亡率。

综上所述,HDAC 抑制剂 SAHA 可以部分改善厄洛替尼耐药现象,可能与 SAHA 诱导凋亡有关,但其具体作用机制有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Capelletto E, Novello S. Emerging new agents for the management of patients with non-small cell lung cancer [J]. *Drugs*, 2012, 72(1): 37–52.
- [2] Suda K, Mizuuchi H, Maehara Y, et al. Acquired resistance mechanisms to tyrosine kinase inhibitors in lung cancer with activating epidermal growth factor receptor mutation—diversity, ductility, and destiny [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2012, 31(3–4): 807–14.
- [3] Bameda-Zahonero B, Parra M. Histone deacetylases and cancer [J]. *Mol Oncol*, 2012, 6(6): 579–89.
- [4] Rho J K, Choi Y J, Lee J K, et al. The role of MET activation in determining the sensitivity to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors [J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(10): 1736–43.
- [5] 刘慧慧,王孟昭,胡克,等. EGFR-TKI 在非小细胞肺癌中耐药机制的研究进展 [J]. *中国肺癌杂志*, 2013, 16(10): 535–40.
- [6] Perri F, Longo F, Giuliano M, et al. Epigenetic control of gene expression: potential implications for cancer treatment [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2017, 111: 166–72.
- [7] Di Cerbo V, Schneider R. Cancers with wrong HATs: the impact of acetylation [J]. *Brief Funct Genomics*, 2013, 12(3): 231–43.
- [8] Yan W, Liu S, Xu E, et al. Histone deacetylase inhibitors suppress mutant p53 transcription via histone deacetylase 8 [J]. *Oncogene*, 2013, 32(5): 599–609.
- [9] Falkenberg K J, Johnstone R W. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(9): 673–91.
- [10] Zhang J, Zhong Q. Histone deacetylase inhibitors and cell death [J]. *Cell Mol life Sci*, 2014, 71(20): 3885–901.
- [11] Kang Y, Nian H, Rajendran P, et al. HDAC8 and STAT3 repress BMF gene activity in colon cancer cells [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1476.
- [12] Liang B Y, Xiong M, Ji G B, et al. Synergistic suppressive effect of PARP-1 inhibitor PJ34 and HDAC inhibitor SAHA on proliferation of liver cancer cells [J]. *J Huazhong U Sci Technol Med Sci*, 2015, 35(4): 535–40.

The effects of vorinostat on erlotinib-resistance of lung adenocarcinoma cells

Wu Pengfei, Hao Jiqing

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

Abstract Objective To investigate the impact of vorinostat (SAHA) on the erlotinib-resistance of human lung adenocarcinoma cell line PC-9/ER. **Methods** PC-9/ER cells were treated with erlotinib and SAHA, alone or in combination. The effects of proliferation inhibition were assayed by MTT method, the apoptosis ratios of cells were analyzed by flow cytometry. **Results** The results showed that SAHA inhibited the proliferation of PC-9/ER cells in a dose-dependent manner alone. The non-toxic doses of SAHA (1 $\mu\text{mol/L}$) significantly improved the sensitivity of PC-9/ER to Erlotinib, and induce apoptosis. **Conclusion** SAHA could partially improve PC-9/ER sensitivity to erlotinib.

Key words lung adenocarcinoma; histone deacetylase inhibitor; vorinostat; erlotinib; drug resistance