

候选药物 TW918 对 K-Ras 突变型人肺腺癌 A549 细胞的体外抑制作用

王凤玲¹, 杨育才², 李谦¹, 王立强¹

(1. 华侨大学 生物医学学院, 福建 泉州 362021;

2. 台湾大学 生化科学系, 台湾 台北 106170)

摘要: 探讨候选药物 TW918 对 K-Ras 突变型人肺腺癌 A549 细胞的体外抑制作用. 以 MTT 法检测 TW918 对 A549 细胞的增殖抑制作用; 流式细胞术检测 A549 细胞周期和凋亡的变化; Western blotting 检测相关蛋白的表达. 结果表明: 候选药物 TW918 可以以时间和剂量依赖性地抑制 A549 细胞的增殖, 且作用 72 h 时抑制效果比吉非替尼高 9.93 倍; 引起细胞周期阻滞于 G1 期, 并诱导细胞发生凋亡; 降低 A549 细胞中 p-EGFR 的表达, 并抑制其下游 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的激活. TW918 对 K-Ras 突变导致的吉非替尼原发耐药型 A549 细胞具有较好的体外抗肿瘤活性, 其机制与抑制 EGFR 及 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的活化有关.

关键词: K-Ras 突变; 肺腺癌; 吉非替尼; 表皮生长因子受体; PI3K/AKT/mTOR; 信号通路

中图分类号: R 963

文献标志码: A

近年来, 针对肿瘤特定分子靶点的靶向抗癌药物在疗效上具有很大的突破, 如表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKIs)、吉非替尼(gefitinib)和埃罗替尼(erlotinib)的开发与应用, 给非小细胞肺癌(NSCLC)患者带来了曙光. 但部分 NSCLC 患者出现对 EGFR-TKIs 原发耐药或继发耐药, 限制了该类药物的使用. 许多临床研究及体内外实验发现, 部分 NSCLC 患者对 gefitinib, erlotinib 原发耐药与 K-Ras 基因突变有关^[1]. 目前, 临床上对于 K-Ras 基因突变导致的 gefitinib 原发耐药尚无有效的解决方案. 本课题组以 4-7-二氯喹啉为药效母核合成了一系列喹啉萘酰胺类新化合物, 经前期筛选得到候选药物 TW918, 化学名称为 N-(2-苯胺基)-6-(7-氯喹啉-4-酰氧基)-2-萘酰胺, 分子式为 $C_{26}H_{18}ClN_3O_2$, 相对分子质量为 $439\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. TW918 在体外对 NSCLC 细胞 H460, 人肺腺癌 A549 具有较好的抗肿瘤效果^[2]. A549 细胞是 EGFR 野生型并携带 K-Ras 基因突变的 gefitinib 原发耐药 NSCLC 细胞株^[3]. 本文通过研究 TW918 对 A549 细胞的体外抑制作用, 探讨其可能的作用机制.

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

候选药物 TW918: 批号 20140201, 纯度 98.20%, 由华侨大学生物医学学院与厦门大学药学院合作合成; 人肺腺癌细胞 A549(中科院上海细胞生物研究所); gefitinib(英国 Astra Zeneca 公司); 胰蛋白酶、RPMI 1640 和胎牛血清(美国 Gibco 公司); MTT, 二甲基亚砜(DMSO)和 β -actin(美国 Sigma 公司); 兔抗人 p-EGFR, AKT, p-AKT, mTOR, p-mTOR, 4EBP, p-4EBP, P70S6K 和 p-P70S6K 单抗(Cell Signaling 公司); Annexin V-FITC 凋亡试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司).

ChemiDoc XRS 型凝胶成像系统、Mini-PROTEAN Tetra C 型垂直板电泳和转膜装置(美国 Bio-Rad 公司); FACS Calibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司).

收稿日期: 2014-07-06

通信作者: 王立强(1970-), 男, 教授, 博士, 主要从事药剂学和新药开发的研究. E-mail: wlq1599@163.com.

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(2010J01208); 福建省泉州市科技计划重点项目(2013Z35)

1.2 实验方法

1.2.1 A549 细胞培养 细胞单层接种在含体积分数为 10% 的胎牛血清和青霉素与链霉素(终浓度为 $1.667 \mu\text{kat} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 RPMI 1640 培养液中,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,5% 二氧化碳培养箱中培养.

1.2.2 gefitinib 对 A549 细胞增殖的影响 取对数生长期的 A549 细胞,以 5×10^3 个每孔接种于 96 孔板中.培养 24 h,待细胞完全贴壁后,分别加入不同浓度的 gefitinib($2.5, 5, 10, 20, 40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),阴性对照组加入体积分数为 0.1% 的 DMSO.72 h 后,每孔加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 溶液 $10 \mu\text{L}$,继续培养 4 h 后弃上清液,每孔加入 $150 \mu\text{L}$ DMSO, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 震荡 15 min 后用酶标仪在 570 nm 波长处检测其吸光度值.按公式计算细胞增殖抑制率:抑制率 = $(1 - \text{实验组吸光值} / \text{对照组吸光值}) \times 100\%$.实验重复 3 次.

1.2.3 TW918 对 A549 细胞增殖的影响 接种对数生长期的 A549 细胞于 96 孔板,待细胞贴壁后,加入不同浓度的 TW918($0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),另设加入体积分数为 0.1% 的 DMSO 为阴性对照组.分别在培养 24,48,72 h 后,每孔加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 溶液 $10 \mu\text{L}$,继续培养 4 h 后弃上清液.每孔加入 DMSO $150 \mu\text{L}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 震荡 15 min,用酶标仪检测其在 570 nm 波长处的吸光度,计算细胞增殖抑制率.实验重复 3 次.

1.2.4 流式细胞仪检测 A549 细胞周期 取对数生长期的 A549 细胞,以 2×10^5 个每孔接种于 6 孔板中.待细胞贴壁后,每孔加入浓度分别为 $2.5, 5, 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TW918,阴性对照组加入体积分数为 0.1% 的 DMSO.继续培养 24 h 后,胰酶消化收集细胞,PBS 洗涤 2 次,加入 1 mL 冰预冷的体积分数为 70% 的乙醇,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 固定过夜.离心弃上清液,加入 $200 \mu\text{L}$ RNase A, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,加入 1 mL PI 染料, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 闭光染色 20 min,流式细胞仪检测细胞周期.用 Cell Quest 软件分析各组细胞的周期分布,G1 期、G2 期和 S 期细胞所占比例.实验重复 3 次.

1.2.5 流式细胞仪检测 A549 细胞凋亡率 A549 细胞接种于 6 孔板,分别加入 $2.5, 5, 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TW918 和 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 gefitinib,阴性对照组加入体积分数为 0.1% 的 DMSO.药物作用 48 h 后,离心收集细胞.加入 $500 \mu\text{L}$ 结合缓冲液(binding buffer)悬浮细胞液,调整细胞浓度.首先加入 $5 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC 染料,然后加入 $10 \mu\text{L}$ PI 染料,室温下避光反应 15 min,1 h 内用流式细胞仪检测分析细胞凋亡率.实验重复 3 次.

1.2.6 TW918 对 A549 细胞 EGFR 蛋白磷酸化表达的影响 药物作用 2 h 后,加入 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ EGF 刺激因子继续培养 10 min.离心收集细胞,加入细胞裂解液在冰上裂解 30 min,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,弃上清液. BCA 法蛋白定量后,分别取等量蛋白加入上样缓冲液, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min.采用体积分数为 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白后,电转移至 PVDF 膜上,用体积分数为 5% 的脱脂奶粉于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下封闭过夜.加入兔抗人 p-EGFR 一抗(按 1 : 1 000 稀释)室温孵育 2 h,TBST 缓冲液洗涤 3 次.加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗(1 : 1 000 稀释),室温孵育 90 min 后,充分漂洗.加入化学发光试剂后放入暗盒中压片,并依次显影、定影、摄像,得到目的蛋白条带.以 $\beta\text{-actin}$ (1 : 2 000) 为内参,实验重复 3 次.

1.2.7 TW918 对 A549 细胞 PI3K/AKT/mTOR 信号通路蛋白表达的影响 收集药物作用 24 h 后的细胞,裂解提取蛋白.蛋白定量后分别取等量蛋白加入体积分数为 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳进行分离,电转移至 PVDF 膜上,用体积分数为 5% 的脱脂奶粉封闭后,加入 p-AKT,AKT,p-mTOR,mTOR,p-P70S6K,P70S6K,p-4EBP,4EBP 一抗(1 : 1 000 稀释)室温孵育 2 h,TBST 缓冲液洗涤.然后加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗(1 : 1 000 稀释),室温孵育 90 min 后,充分漂洗.加入化学发光试剂后放入暗盒中压片,并依次显影、定影、摄像,得到目的蛋白条带.以 $\beta\text{-actin}$ (1 : 2 000) 为内参.

1.3 数据统计分析

所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 12.0 统计包进行统计分析.

2 结果与分析

2.1 gefitinib 和 TW918 对 A549 细胞增殖的影响

A549 细胞经 gefitinib 作用 72 h 后,细胞增殖受到不同程度的抑制, IC_{50} 为 $(10.23 \pm 1.03) \mu\text{mol} \cdot$

L^{-1} . 对比以往的研究^[3-5], gefitinib 对 K-Ras 野生型 NSCLC 细胞 H322 的 IC_{50} 为 $0.1 \mu mol \cdot L^{-1}$, 对 K-ras 突变型 NSCLC 细胞 A549 的 IC_{50} 为 $(8.3 \pm 1.5) \mu mol \cdot L^{-1}$, 有研究者将 $IC_{50} < 1 \mu mol \cdot L^{-1}$ 的细胞株定为 gefitinib 敏感型细胞, 将 $IC_{50} > 7 \mu mol \cdot L^{-1}$ 的细胞株定位 gefitinib 耐药型细胞. 因此, 可以确认所用的 A549 细胞相对于 gefitinib 是耐药细胞株.

不同剂量的 gefitinib 和 TW918 对 A549 细胞增殖抑制的影响, 如图 1 所示. 图 1 中: η 为细胞抑制率; $c(\text{gefitinib})$ 为 gefitinib 的浓度; $c(\text{TW918})$ 为 TW918 的浓度. 候选药物 TW918 可以时间和剂量依赖性抑制对 gefitinib 耐药的 A549 细胞的增殖(图 1(b)). 由图 1(b)可知: 在 24, 48, 72 h 的 IC_{50} 分别为 (5.17 ± 1.42) , (2.86 ± 0.83) , $(1.03 \pm 0.74) \mu mol \cdot L^{-1}$. 比较 2 种药物分别作用 gefitinib 原发耐药细胞株 72 h 后的 IC_{50} 发现, TW918 对耐药细胞株 A549 的生长抑制作用比 gefitinib 高 9.93 倍.

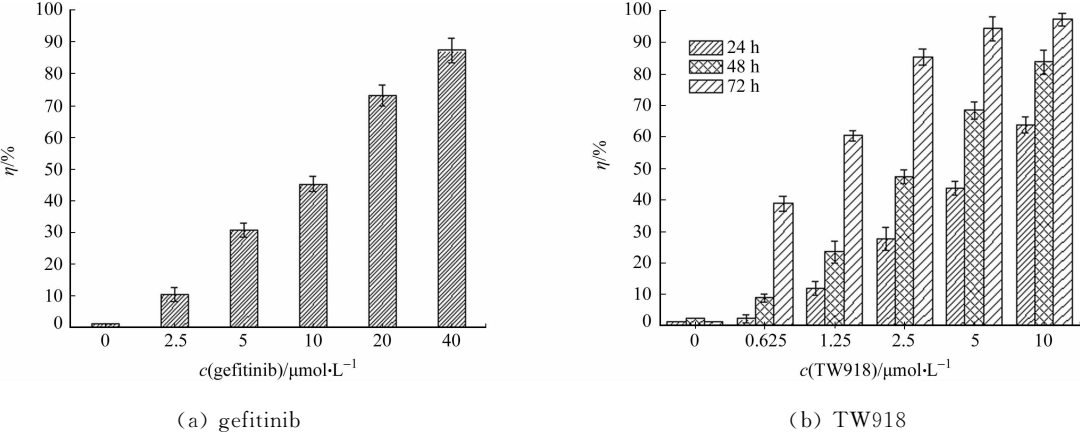


图 1 gefitinib 和 TW918 对 A549 细胞增殖抑制的影响

Fig. 1 Effects of gefitinib and TW918 on A549 cells proliferation

2.2 TW918 对 A549 细胞周期及凋亡的影响

不同剂量 TW918 对 A549 细胞凋亡的影响, 如图 2 所示. 图 2 中: N 为细胞数量; F 为荧光强度. 由图 2 可知: TW918 作用 A549 细胞 24 h 后, 与体积分数为 0.1% 的 DMSO 对照组相比, 随着剂量的增加, G1 期细胞所占比例逐渐增多, 而 G2 期和 S 期逐渐减少, 提示 TW918 可以剂量依赖性的诱导 A549 细胞周期阻滞于 G1 期.

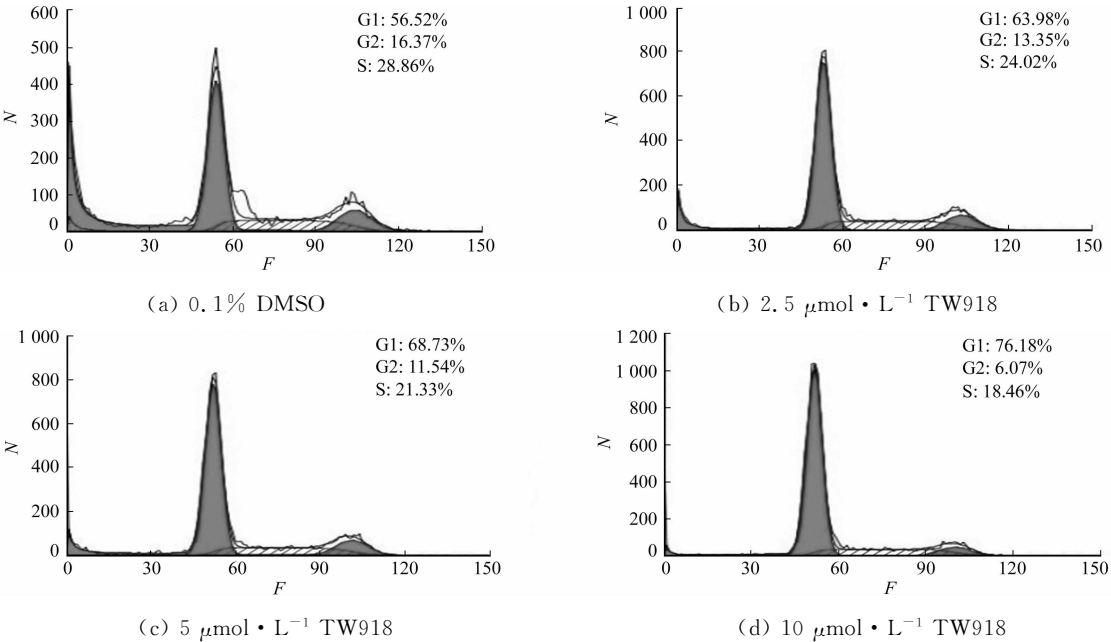


图 2 不同剂量 TW918 作用 24 h 后对 A549 细胞周期分布的影响

Fig. 2 Effects of different doses of TW918 on cell cycle of A549 cells after 24 hours

TW918 对 A549 细胞凋亡的影响, 如图 3, 4 所示. 图 3 中: $I(\text{Annexin V-FITC})$ 和 $I(\text{PI})$ 分别表示

Annexin V-FITC 和 PI 两种荧光染料的强度. 图 4 中: δ 为细胞凋亡率. Annexin V-FITC/PI 检测细胞凋亡结果表明: 随着 TW918 剂量的增加, 右上象限(晚期凋亡率)和右下象限(早期凋亡率) A549 凋亡细胞所占比例逐渐增加, 与 gefitinib 对照组比较, 相同浓度的 TW918 诱导 A549 细胞凋亡的效果差异有高度的统计学意义($P < 0.01$). 说明对于 gefitinib 耐药的 A549 细胞株, 化合物 TW918 能更有效的诱导细胞发生凋亡.

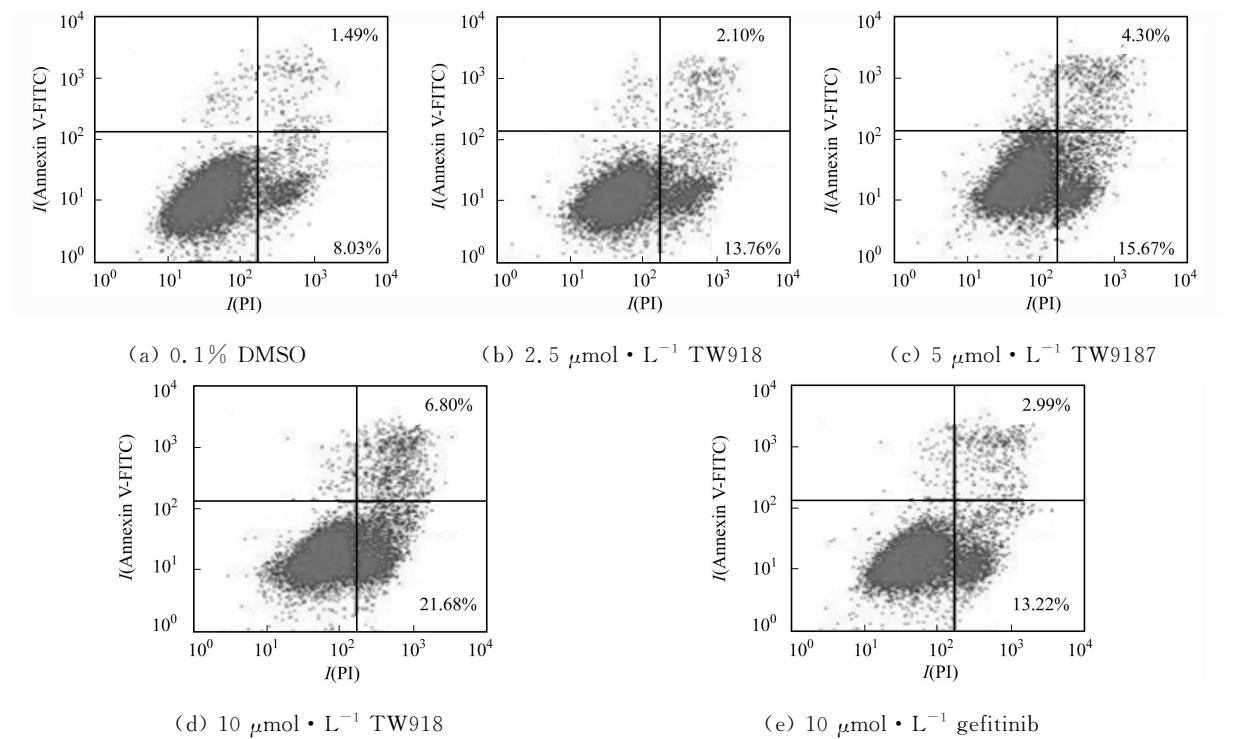


图 3 不同剂量 TW918 作用 48 h 后对 A549 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effects of different doses of TW918 on A549 cells apoptosis after 48 hours

2.3 TW918 对 A549 细胞 p-EGFR 蛋白表达的影响

A549 细胞经 EGF 刺激处理后, p-EGFR 的表达量显著增高. 候选药物 TW918 作用 A549 细胞 2 h 后再加入 EGF 刺激, 通过 Western blotting 检测 p-EGFR 的表达. 结果显示: 随着 TW918 剂量的增加 p-EGFR 的表达量逐渐降低; 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 gefitinib 能够完全抑制 p-EGFR 的表达. 证明 TW918 对过多 EGF 刺激而引起的 EGFR 的磷酸化活性形式的表达有一定的抑制作用, 如图 5 所示.

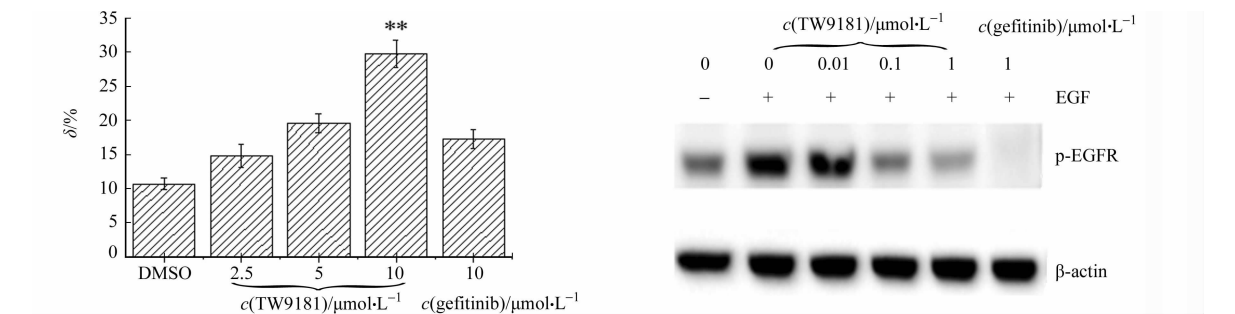


图 4 TW918 诱导 A549 细胞凋亡比例统计图

Fig. 4 Cell apoptosis percentage of groups treated with TW918

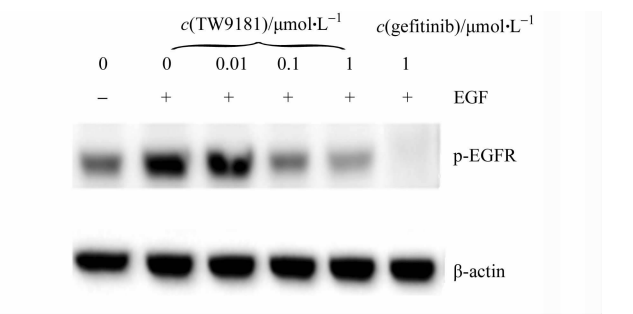


图 5 TW918 对 A549 细胞 EGFR 磷酸化表达的影响

Fig. 5 Effects of TW918 on activation of EGFR in A549 cells

2.4 TW918 对 A549 细胞 PI3K/AKT/mTOR 信号通路中蛋白表达的影响

gefitinib 和 TW918 分别作用 A549 细胞 24 h 后, 与 DMSO 对照组比较, AKT, mTOR, P70S6K, 4EBP 蛋白的表达量没有明显变化; 而 gefitinib 组和 TW918 组 p-AKT, p-P70S6K 蛋白的表达量均降低, 且 TW918 组降低效果更明显. gefitinib 对 PI3K/AKT/mTOR 信号通路下游 p-mTOR, p-4EBP 蛋白的表达没有影响, 而 TW918 能显著抑制其磷酸化的表达, 如图 6 所示.

证明 TW918 能通过抑制 AKT,mTOR 蛋白的磷酸化活化,抑制 gefitinib 耐药 A549 细胞株中异常激活的 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,并对 mTOR 下游 P70S6K,4EBP 蛋白磷酸化的活化也有一定的抑制作用.

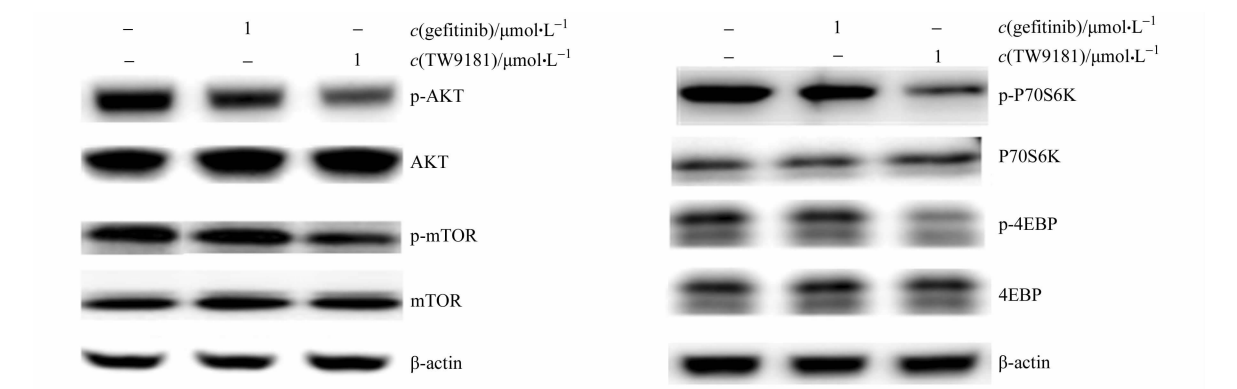


图 6 TW918 和 gefitinib 对 A549 细胞 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响
Fig. 6 Effects of TW918 and gefitinib on PI3K/AKT/mTOR signal pathway in A549 cells

3 结论

人表皮生长因子受体(epidermal growth factor,EGFR)在许多肿瘤中存在过度表达,并与肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移及血管生成等有关.据报道^[6],40%~80% 的 NSCLC 患者存在 EGFR 的过表达,选择 EGFR 为靶点是近年来治疗 NSCLC 的前沿手段,gefitinib 和 erlotinib 主要作为二线或三线药物治疗以顺铂类为基础化疗失败的患者^[7].其中,gefitinib 作用于高和低表达 EGFR 的细胞系,都能有效抑制 EGFR 上全部酪氨酸磷酸化位点^[8].但随着 gefitinib,erlotinib 等单靶点 EGFR-TKIs 在临床中的使用,研究者发现,部分 NSCLC 患者出现原发耐药或继发耐药导致的肿瘤进展.

NSCLC 靶向治疗中 EGFR-TKIs 耐药机制多种多样,主要的机制为靶点耐药突变和旁路信号通路激活.2005 年,Pao 等^[1]最先发现 K-Ras 基因突变与 NSCLC 患者的 gefitinib 原发耐药有关.之后,Tiseo 等^[9]研究发现,K-Ras 基因第 12 密码子单个核苷酸以 G 代替 T(G12C)和 G 代替 A(G12D)的点突变后,编码的异常 Ras 蛋白对 Ras-GAPs 诱导的 GTP 水解成 GDP 不敏感,使 Ras 蛋白一直处于活化状态.持续激活的 Ras 蛋白,可以绕过 EGFR 而激活 PI3K/AKT 和 Raf/MEK/MAPK 2 条信号通路,促进肿瘤细胞的增殖、迁移,增强肿瘤细胞抗凋亡能力,使患者对 EGFR-TKIs 的治疗不敏感^[1].Dancey 等^[10]利用 K-Ras 反义核酸封闭 K-Ras 基因的表达后,发现能够明显抑制 gefitinib 耐药 NSCLC 细胞的增殖和转移.La 等^[4]发现,mTOR 靶向抑制剂依维莫司也可以通过抑制 PI3K/AKT 下游 mTOR 的活化,抑制 gefitinib 耐药 NSCLC 细胞株 A549 的增殖.

候选药物 TW918 对 gefitinib 原发耐药的 A549 细胞有增殖抑制作用;可以诱导细胞周期阻滞于 G1 期并引起细胞发生凋亡.1 μmol·L⁻¹的 TW918 作用于 A549 细胞后可以抑制 EGF 刺激而引起的 EGFR 的激活.虽然抑制效果较 gefitinib 差,但作用 24 h 后,能够显著抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的激活.说明 TW918 主要通过抑制 gefitinib 耐药细胞株中异常激活的 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,克服耐药细胞株由于 AKT,mTOR 的磷酸化活化导致的 gefitinib 耐药.并且该信号通路下游的 p70S6K 和 4EBP 的活化也受到抑制,从而进一步抑制蛋白的合成,将细胞周期阻滞于 G1 期并促进细胞凋亡,最终达到抗肿瘤疗效.实验结果表明:候选药物 TW918 对 K-Ras 突变导致的 gefitinib 原发耐药的人肺腺癌 A549 细胞具有较好的体外抗肿瘤活性,是潜在的抗 gefitinib 耐药 NSCLC 的候选药物.至于 TW918 对 gefitinib 继发耐药及其他机制导致的原发耐药的 NSCLC 是否也具有抗肿瘤活性,仍有待进一步的实验研究.

参考文献:

[1] PAO W, MILLER V A, POLITI K A, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is

- associated with a second mutation in the EGFR kinase domain[J]. PLOS Med, 2005, 2(3): e73.
- [2] 章九云, 韩静, 张勇, 等. 4-取代-7-氯喹啉衍生物的合成及抗肿瘤活性的初步评价[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(5): 88-94.
- [3] DONG Song, ZHANG Xu-chao, CHENG Hua, et al. Everolimus synergizes with gefitinib in non-small-cell lung cancer cell lines resistant to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors[J]. Cancer Chemoth Pharm, 2012, 70(5): 707-716.
- [4] LA M S, GALETTI M, ALFIERI R R, et al. Everolimus restores gefitinib sensitivity in resistant non-small cell lung cancer cell lines[J]. Biochem Pharmacol, 2009, 78(5): 460-468.
- [5] MUKOHARA T, ENGELMAN J A, HANNA N H, et al. Differential effects of gefitinib and cetuximab on non-small-cell lung cancers bearing epidermal growth factor receptor mutations[J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97(16): 1185-1194.
- [6] HYNES N E, LANE H A. ERBB receptors and cancer: The complexity of targeted inhibitors[J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(5): 341-354.
- [7] RECK M, van ZANDWIJK N, GRIDELLI C, et al. Erlotinib in advanced non-small cell lung cancer: Efficacy and safety findings of the global phase IV tarceva lung cancer survival treatment study[J]. J Thorac Oncol, 2010, 5(10): 1616-1622.
- [8] PEDERSEN M W, PEDERSEN N, OTTESEN L H, et al. Differential response to gefitinib of cells expressing normal EGFR and the mutant EGFRvIII[J]. Br J Cancer, 2005, 93(8): 915-923.
- [9] TISEO M, ROSSI G, CAPELLETTI M, et al. Predictors of gefitinib outcomes in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): Study of a comprehensive panel of molecular markers[J]. Lung Cancer, 2010, 67(3): 355-360.
- [10] DANCEY J E. Agents targeting ras signaling pathway[J]. Curr Pharm Des, 2002, 8(25): 2259-2267.

***In Vitro* Inhibition Effects a Candidate Drug TW918 on K-Ras Mutatant Human Lung Adenocarcinoma Cell Line A549**

WANG Feng-ling¹, YANG Yu-cai², LI Qian¹, WANG Li-qiang¹

(1. School of Biomedical Sciences, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China;

2. Department of Biochemical and Technology, National Taiwan University, Taipei 106170, China)

Abstract: This paper is to report the study of the *in vitro* inhibition effects of a candidate drug TW918 on human lung adenocarcinoma cell line A549, which is heterozygous for the K-Ras mutations. Antiproliferative effects on A549 cells was assessed by MTT assay. Cell cycle distribution and apoptosis were detected by flow cytometer. The protein expression was measured by Western blotting. TW918 showed a strong inhibition of A549 cells proliferation in a time and concentration dependent manner, 9.93 times higher than gefitinib after 72 h. TW918 could induce cell cycle arrested at G1 phase and apoptosis. TW918 also inhibited the expression of p-EGFR and the activation of PI3K/AKT/mTOR signal pathway in A549 cells. In conclusion, TW918 has the antitumor effects on gefitinib resistant cell line A549, bearing the K-Ras mutations, through inhibiting EGFR and PI3K/AKT/mTOR signal pathway.

Keywords: K-Ras mutations; lung adenocarcinoma; gefitinib; epidermal growth factor; PI3K/AKT/mTOR; signal pathway

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 刘源岗)