

· 基础论著 ·

盐酸埃克替尼诱导肺癌 HCC827 细胞周期阻滞及其机制研究

穆晓东 姜艳霞 张晔 刘云鹏 曲秀娟 侯科佐 康健 胡雪君

【摘要】 目的 研究国家一类新药盐酸埃克替尼(Icotinib)对人非小细胞肺癌细胞 HCC827 的增殖抑制及细胞周期的影响,并探讨其作用机制。方法 实验分为空白组、对照组和 Icotinib 处理组,采用四甲基偶氮唑盐法(MTT)检测 Icotinib 对人肺癌 HCC827 细胞增殖的影响;流式细胞仪检测细胞周期变化;Western blot 检测相关蛋白表达,应用 SPSS 13.0 进行统计学分析。结果 Icotinib 以时间-剂量依赖的方式抑制 HCC827 细胞增殖,48 h 的 IC₅₀ 为 0.60 μmol/L,72 h 的 IC₅₀ 为 0.06 μmol/L;Icotinib 诱导 HCC827 细胞发生明显的 G₁ 期阻滞并具有剂量依赖性。进一步对周期相关蛋白检测发现,Icotinib 处理组较对照组相比,显著上调 p21 蛋白表达,抑制 cyclin D1 及 cyclin A 表达,但对 cyclin E 作用不明显。检测还发现 Icotinib 处理组明显下调 ERK 的磷酸化水平。结论 Icotinib 能够明显抑制 HCC827 细胞增殖,引起细胞 G₁ 期阻滞,其机制可能与上调 p21 及抑制 cyclin D1、cyclin A 蛋白表达水平相关。并且 MAPK/ERK 信号通路在其介导的生物学效应中起重要作用。

【关键词】 癌,非小细胞肺; 细胞周期; 盐酸埃克替尼; MAPK/ERK 通路

Effects of icotinib on cell cycle arrest in human lung cancer HCC827 cells MU Xiao-dong, JIANG Yan-xia, ZHANG Ye, LIU Yun-peng, QU Xiu-juan, HOU Ke-zuo, KANG Jian, HU Xue-jun. Department of Respiratory Disease, The First Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China
Corresponding author: HU Xue-jun, Email: cmuhuxuejun@yahoo.cn

【Abstract】 **Objective** To explore the effects of icotinib on the cell proliferation and cell cycle in human non-small cell lung cancer (NSCLC) HCC827 cells, and to further investigate the mechanism of action. **Methods** Cell proliferation was measured by using MTT assay. Cell cycle changes were determined by flow cytometry. The expressions of proteins were detected by Western blot. All experimental data were dealt with SPSS (13.0 soft). **Results** Icotinib significantly inhibited HCC827 cell viability in a concentration and time dependent manner, the concentration of inhibited cell viability (IC₅₀) for 48 h was 0.60 μmol/L, 72 h was 0.06 μmol/L. Icotinib induced significant G₁ phase arrest of HCC827 cells in a concentration-dependent manner. Further more, icotinib could upregulated the expression of p21, decreased the expression of cyclin D1 and cyclin A, but had no effect on cyclin E. In addition, after treated 24 h, icotinib could inhibit the expressions of the phosphorylated ERK obviously in HCC827 cells. **Conclusions** Icotinib inhibited the activation of the ERK signaling pathway, which consequently upregulated the expression of p21, downregulated cyclin D1 and cyclin A in HCC827 cells. Furthermore, MAPK/ERK pathway plays an important role in the biological effects of icotinib.

【Key words】 Carcinoma, non-small-cell lung; Cell cycle; Icotinib; MAPK/ERK pathway

肺癌是恶性肿瘤中发病率最高的肿瘤之一,在发达国家及发展中国家的发达地区,其病死率在所有肿瘤中居首位^[1]。对于晚期非小细胞肺癌(NSCLC),以铂类为基础的联合化疗方案及新一代的细胞毒性化疗药物如吉西他滨、培美曲塞及紫杉醇的应用,能够改善

晚期患者生活质量,减轻症状,延长生存时间。目前,以吉非替尼为代表的表皮生长因子受体(EGFR)分子靶向药物的出现给肺癌治疗带来了新希望,尤以 EGFR 突变患者为最大获益人群^[2]。

盐酸埃克替尼(Icotinib)是新型靶向表皮生长因子受体酪氨酸激酶小分子化学制剂(EGFR-TKIs),能与 ATP 特异地、竞争性地结合在 EGFR 酪氨酸激酶功能区,从而抑制其自发磷酸化活性,阻断癌细胞增殖及凋亡等相关的信号传导^[3]。本实验旨在探讨盐酸埃克替尼对 EGFR 突变的人肺癌 HCC827 细胞增殖抑制及细胞周期的影响,并对其相关机制进行研究,为该酪氨酸激酶

DOI:10.3877/ema.j.issn.1674-0785.2013.05.039

基金项目:国家自然科学基金(81172369,81270036);辽宁省科技厅项目(2011404013-5)

作者单位:110001 沈阳,中国医科大学第一附属医院呼吸内科(穆晓东、姜艳霞、康健、胡雪君),肿瘤内科(张晔、刘云鹏、曲秀娟、侯科佐)

通讯作者:胡雪君,Email:cmuhuxuejun@yahoo.cn

抑制剂应用于人 NSCLC 的临床治疗提供理论依据。

材料与amp;方法

一、材料

盐酸埃克替尼(Icotinib)由浙江贝达药业有限公司惠赠,RPMI-1640培养基购自Gibco公司,胎牛血清购自天津血液病研究所。四甲基偶氮唑盐、二甲基亚砷购自美国Sigma公司。鼠抗人p21、cyclin D1、cyclin A、cyclin E抗体及兔抗人 β -actin抗体购自Santa Cruz公司。兔抗人p-ERK和ERK抗体购自Cell Signaling公司。辣根过氧化物酶标记的二抗购自北京中山金桥生物技术有限公司,ECL试剂盒购自Pierce公司。

二、方法

1. 细胞培养:肺癌细胞HCC827由本实验室常规传代培养,在含10%胎牛血清、100 U/ml庆大霉素的RPMI-1640培养液中,37℃、饱和湿度及5% CO₂的培养箱中培养,每周换液2~3次,胰酶消化传代。

2. MTT法进行细胞活力检测:取对数生长期HCC827细胞株,接种于96孔板(8000个/孔),培养贴壁后分别加入0.01~10 μ mol/L的Icotinib,每组设3个复孔,并设空白组(不接种细胞)、对照组(只含等量溶剂)和实验组,每孔终体积为200 μ l。分别培养48 h及72 h后,每孔加入MTT溶液(5 mg/ml)25 μ l,继续孵育4 h,小心吸掉孔内上清液。加入二甲基亚砷200 μ l/孔,振荡至结晶物充分溶解,在酶标仪上选择570 nm波长,空白孔调零,测定各孔光吸收值,计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

3. 细胞周期检测:取对数生长期细胞(2×10^5 个/孔)接种于6孔板,培养贴壁后分为对照组,0.01 μ mol/L和0.1 μ mol/L的Icotinib处理组。24 h后胰酶消化细胞,70%乙醇(预冷)4℃过夜保存。次日弃上清,将细胞悬于0.5 ml冷PBS中,加10 mg/ml的RNase 10 μ l,37℃水浴30 min,加0.5 mg/ml的PI染料10 μ l,避光30 min,用FACS-can流式细胞仪检测,CELLQUEST软件分析结果。

4. Western blot检测蛋白表达:取对数生长期细胞(2×10^5 个/孔)接种于6孔板,培养贴壁后分别加入0.01 μ mol/L、0.1 μ mol/L和1 μ mol/L的Icotinib。作用24 h后收集细胞,用200 μ l含有蛋白酶抑制剂(100 mg/L PMSF, 2 mg/L Aprotinin)的裂解液[1% Triton X-100, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaF, 1 mmol/L Na₃VO₄], 4℃裂解40 min, 12 000 \times g离心25 min,取上清,紫外分光光度计法进行蛋白定量。与3 \times 样品缓冲液混合后,煮沸5 min。将样品在10%的

SDS-聚丙烯酰胺中进行电泳2 h后,转印至硝酸纤维素膜上。用含5%脱脂奶粉的TBST室温封闭1 h后,加入相应一抗,4℃过夜。TBST漂洗4次后加入辣根过氧化物酶标记二抗,室温作用20 min, TBST充分漂洗4次,ECL法显色,GIS凝胶图像分析,使用灰度分析软件分析周期相关蛋白p21、细胞周期蛋白(cyclin) D1、cyclin A和cyclin E、p-ERK、ERK蛋白表达量,将目的条带与内参条带蛋白表达量的相对值进行统计学分析。

三、统计学处理

所有数据均为3次独立实验结果,以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用SPSS 13.0统计软件进行统计学分析。使用Image J灰度分析软件对Western blot蛋白条带进行分析。两组之间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

结 果

1. Icotinib对HCC827细胞活力及细胞周期的影响:0.01~10 μ mol/L的Icotinib处理HCC827细胞48 h的IC₅₀为0.60 μ mol/L,72 h的IC₅₀为0.06 μ mol/L(图1)。流式细胞仪分析显示,0.01 μ mol/L和0.1 μ mol/L的Icotinib作用HCC827细胞24 h,G1期比例分别为(52.69 \pm 1.56)%和(61.11 \pm 0.84)%,明显高于对照组(46.10 \pm 0.43)%,有统计学差异($P < 0.05$)(图2)。结果显示,Icotinib对HCC827细胞有明显抑制细胞增殖及G1期阻滞作用。

2. Icotinib对HCC827细胞周期相关蛋白表达的影响:分别用0.01 μ mol/L、0.1 μ mol/L和1 μ mol/L的Icotinib处理HCC827细胞24 h,检测周期相关蛋白p21、cyclin D1、cyclin A和cyclin E蛋白表达情况。结果显示:与对照组相比,Icotinib处理组可上调p21蛋白表达水平,下调cyclin D1及cyclin A表达,但对cyclin E作用不明显。且随着Icotinib剂量的增加,其抑制程度增加(图3)。

3. Icotinib对HCC827细胞ERK磷酸化的影响 Icotinib处理HCC827细胞24 h(同上),Western blot方法进一步检测ERK的磷酸化状态。结果表明:与对照组相比,0.1 μ mol/L和1 μ mol/L的Icotinib处理组明显下调ERK的磷酸化水平(图4)。

讨 论

肿瘤是一种细胞周期紊乱性疾病,细胞周期的调控异常在肿瘤细胞的发生过程中起重要的作用^[4]。目前的研究发现,利用药物调控肿瘤细胞周期是治疗肿瘤的一个重要手段。根据细胞周期中细胞分裂的特点,可以将其分为三个时相:G0/G1期,S期及G2/M

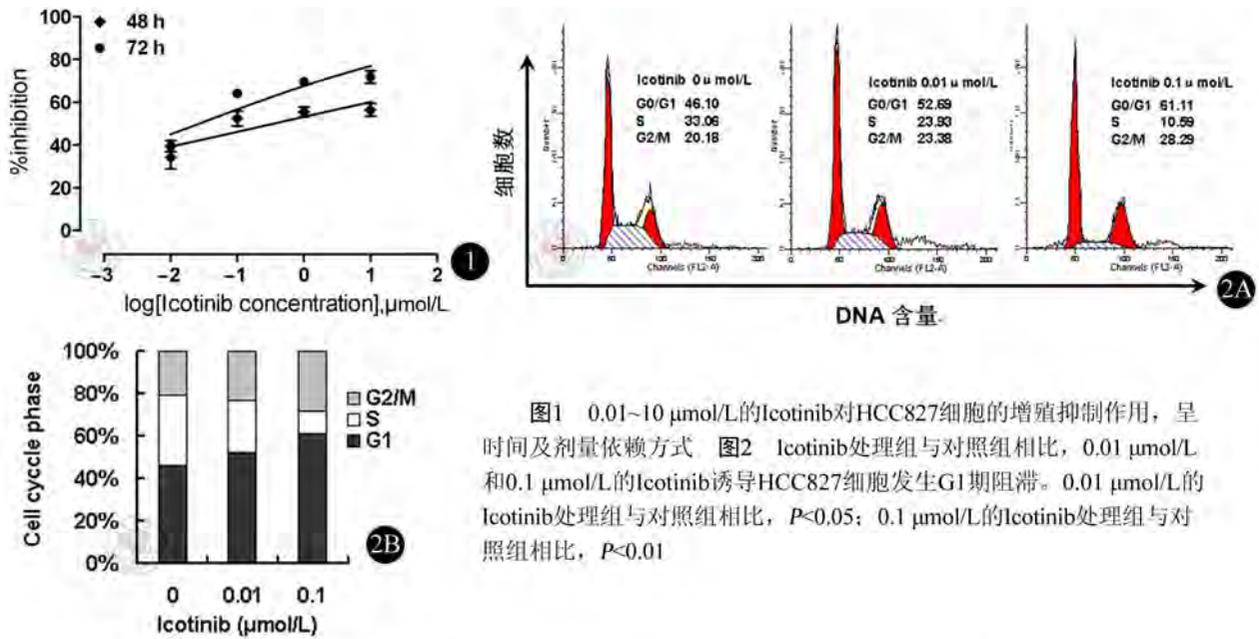


图1 0.01~10 μmol/L的Icotinib对HCC827细胞的增殖抑制作用,呈时间及剂量依赖方式 图2 Icotinib处理组与对照组相比,0.01 μmol/L和0.1 μmol/L的Icotinib诱导HCC827细胞发生G1期阻滞。0.01 μmol/L的Icotinib处理组与对照组相比, $P < 0.05$; 0.1 μmol/L的Icotinib处理组与对照组相比, $P < 0.01$

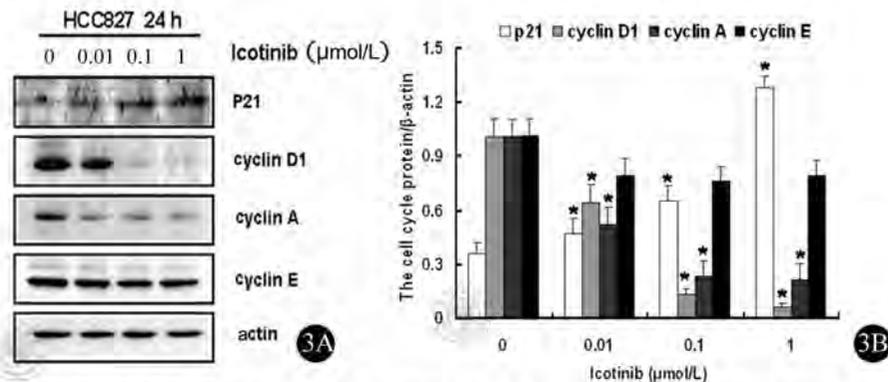


图3 p21、cyclin D1、cyclin A及cyclin E蛋白的表达。3A: Icotinib作用HCC827细胞24 h后, p21、cyclin D1、cyclin A及cyclin E蛋白的表达。3B: 不同细胞周期蛋白表达的灰度分析,不同浓度的Icotinib处理组与对照组比较, $*P < 0.05$

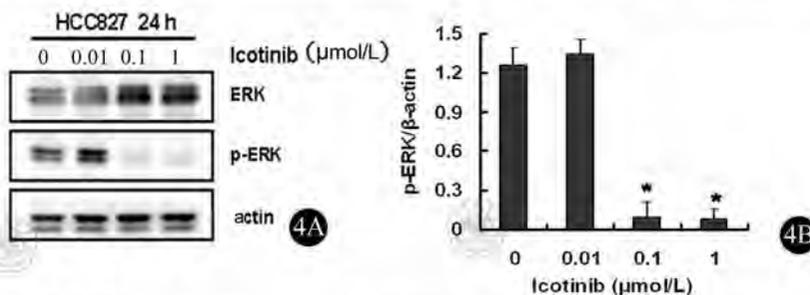


图4 p-ERK及ERK蛋白的表达。4A: Icotinib作用HCC827细胞24 h后, p-ERK及ERK蛋白的表达。4B: 不同浓度的p-ERK蛋白表达灰度分析。0.1 μmol/L和1 μmol/L的Icotinib处理组与对照组比较, $*P < 0.05$

期。G1/S是细胞周期进程中重要调节点,其转换与否受 cyclin 及细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子(CDKI)的调控^[5]。在细胞周期的每个时相都有其特异的 cyclin 表达,cyclin D1、cyclin A 及 cyclin E 主要负责调控 G1/S 期转换,而 cyclin B 是 G2/M 期转换的关键因素^[6]。p21 蛋白是 CDKI 家族的一员,作为 p53 的下游蛋白,在功能上继承了 p53 的抑癌作用,因此是一个重要的抑癌分子,p21 可以与 cyclin D1 及 cyclin A 结合,从而抑

制其活性,使细胞周期停滞在 G1 期^[7]。

Icotinib 是一种口服的小分子 EGFR-TKIs,化学结构和 Iressa(易瑞沙,吉非替尼)相似,其主要通过竞争 EGFR 胞内区酪氨酸的 ATP 结合位点,进而抑制 EGFR 自发磷酸化作用,阻断下游信号通路的活化。本研究结果发现 Icotinib 显著抑制突变的 NSCLC(EGFR Exon 19 del mutation)细胞增殖,明显诱导 HCC827 细胞 G1 期阻滞。我们进一步的研究证实,Icotinib 处理人

HCC827 细胞后,显著上调 p21 表达,进而抑制 cyclin D1 及 cyclin A 表达水平。

丝裂原活化蛋白激酶(MAPK/ERK)信号通路是细胞内重要信号转导通路之一,在促细胞增殖、抑制细胞凋亡、调控细胞周期等方面起重要作用^[8]。细胞外信号调节激酶(ERK),是 PI3K 关键下游效应分子之一,研究表明持续异常活化的 ERK 可通过磷酸化多种其下游底物,如 Jun、Myc、E2F 等转录因子^[9],抑制 p21 及 p27 表达,使细胞周期发生紊乱,增殖失控,最终导致癌症的发生^[10]。相关研究显示癌基因 cyclin D 与包括 NSCLC 在内的多种肿瘤的发生、发展及生物学行为密切相关^[11],说明 MAPK/ERK 信号通路在 NSCLC 的生长中起重要作用。本研究深入探讨了 Icotinib 对人肺癌 HCC827 细胞 MAPK/ERK 通路的影响。结果表明,对照组 HCC827 细胞存在 ERK 活化,0.1 μmol/L 和 1 μmol/L 的 Icotinib 处理组较对照组细胞相比,显著下调了 ERK 的磷酸化,从而有效抑制了 MAPK/ERK 信号转导通路,提示 MAPK/ERK 途径可能在 Icotinib 诱导 HCC827 细胞周期阻滞中发挥重要作用。

总之,我们的研究结果显示 Icotinib 能够明显抑制 HCC827 细胞增殖,引起细胞周期阻滞,其机制与上调 p21 及抑制 cyclin D1、cyclin A 蛋白表达水平相关,MAPK/ERK 信号通路可能在其介导的生物学效应中起重要作用。

参 考 文 献

[1] Micheli A, Mugno E, Krogh V, et al. Cancer prevalence in European

registry areas. *Ann Oncol*, 2002, 13: 840-865.

- [2] Gridelli C, De Marinis F, Di Maio M, et al. Gefitinib as first-line treatment for patients with advanced non-small-cell lung cancer with activating epidermal growth factor receptor mutation; Review of the evidence. *Lung Cancer*, 2011, 71: 249-257.
- [3] Francis H, Solomon B. The current status of targeted therapy for non-small cell lung cancer. *Intern Med J*, 2010, 40: 611-618.
- [4] Lin CB, Lin CC, Tsay GJ. 6-Gingerol Inhibits Growth of Colon Cancer Cell LoVo via Induction of G2/M Arrest. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 326096.
- [5] Ebastian S, Sreenivas P, Sambasivan R, et al. MLL5, a trithorax homolog, indirectly regulates H3K4 methylation, represses cyclin A2 expression, and promotes myogenic differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 4719-4724.
- [6] Zhao X, Yang W, Shi C, et al. The G1 phase arrest and apoptosis by intrinsic pathway induced by valproic acid inhibit proliferation of BGC-823 gastric carcinoma cells. *Tumour Biol*, 2011, 32: 335-346.
- [7] Hsiao YP, Huang HL, Lai WW, et al. Antiproliferative effects of lactic acid via the induction of apoptosis and cell cycle arrest in a human keratinocyte cell line (HaCaT). *J Dermatol Sci*, 2009, 54: 175-184.
- [8] McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al. Mutations and Deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR Cascades. *Oncotarget*, 2012, 3: 954-987.
- [9] Fu Y, Wang Q, Yang XG, et al. Vanadyl bisacetylacetonate induced G1/S cell cycle arrest via high-intensity ERK phosphorylation in HepG2 cells. *J Biol Inorg Chem*, 2008, 13: 1001-1009.
- [10] Kim KM, Lee SG, Kim JM, et al. Helicobacter pylori gamma-glutamyl transpeptidase induces cell cycle arrest at the G1-S phase transition. *J Microbiol*, 2010, 48: 372-377.
- [11] Zhang LQ, Jiang F, Xu L, et al. The role of cyclin D1 expression and patient's survival in non-small-cell lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Clin Lung Cancer*, 2012, 13: 188-195.

(收稿日期:2012-11-05)

(本文编辑:戚红丹)

穆晓东,姜艳霞,张晔,等. 盐酸埃克替尼诱导肺癌 HCC827 细胞周期阻滞及其机制研究[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版, 2013, 7(5): 2016-2019.

中 华 临 床 医 师 杂 志