

## Bim 在克唑替尼诱导 EML4-ALK 融合基因阳性肺腺癌细胞株 H2228 凋亡中的作用机制\*

530021 南宁 广西医科大学附属肿瘤医院化疗二科  
周韶璋, 宋向群, 曾爱屏, 王惠临, 宁瑞玲, 于起涛<sup>1</sup>

**【摘要】目的** 探讨 Bim 在克唑替尼诱导 EML4-ALK 融合基因阳性肺腺癌细胞株 H2228 凋亡过程中的作用机制。**方法** 在不同时间点(24、48、72h)用不同浓度克唑替尼分别处理 EML4-ALK 阳性肺腺癌 H2228 细胞株和 EML4-ALK 阴性肺癌 A549 细胞株,采用 MTT 法检测克唑替尼作用 72h 的细胞增殖抑制情况;PI 单染流式细胞仪检测经 300nmol/L 克唑替尼作用 24、48 和 72h 的细胞凋亡率;采用 Western blotting 法检测克唑替尼诱导前后 Bim 蛋白(Bim-EL、Bim-L 和 Bim-S)的表达水平,同时对促凋亡分子 Bid 和抗凋亡分子 Bcl-2、Bcl-xL 的蛋白水平进行联合检测;采用 siRNA 技术“沉默”Bim 基因的表达,用流式细胞仪检测 siRNA“沉默”Bim 基因后克唑替尼诱导 H2228 细胞株的凋亡率。**结果** 克唑替尼作用 72h 后,肺腺癌 H2228 细胞株和 A549 细胞株的细胞增殖抑制率均随着克唑替尼药物浓度的增加而逐渐升高,呈剂量依赖性。克唑替尼作用于 H2228 细胞 72h 的 IC<sub>50</sub> 值为 335nmol/L。300nmol/L 克唑替尼作用 H2228 细胞株 24、48、72h 后的凋亡率分别为(19.19±0.61)%、(35.47±1.17)%、(43.58±4.84)%,作用 A549 细胞株的凋亡率分别为(12.71±0.1)%、(18.22±0.13)%、(19.36±0.45)%。随着克唑替尼(300nmol/L)作用时间的延长,细胞凋亡率亦随之增加,并呈时间依赖性( $P<0.05$ )。在凋亡细胞中发现 Bim 蛋白水平升高,以及抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-xL 表达降低,但促凋亡蛋白 Bid 在不同药物浓度及时间点的表达水平无明显变化。此外,经 siRNA 技术“沉默”Bim 基因后,克唑替尼诱导的 H2228 细胞株凋亡率明显降低。**结论** 克唑替尼通过下调抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-xL 及上调 Bim 的表达水平来发挥其诱导细胞凋亡作用,该过程可被 Bim siRNA 抑制。

**【关键词】** Bim; EML4-ALK 阳性; 肺腺癌细胞株; 凋亡; 克唑替尼

中图分类号:R734.2 文献标识码:A 文章编号:1009-0460(2014)08-0690-06

### Role of Bim in crizotinib-induced apoptosis of EML4-ALK fusion gene positive lung adenocarcinoma cell line H2228

ZHOU Shaozhang, SONG Xiangqun, ZENG Aiping, WANG Huilin, NING Ruiling, YU Qitao. No.2 Chemotherapy Department, Guangxi Medical University Affiliated Tumor Hospital, Nanning 530021, China

Corresponding author: YU Qitao, E-mail: yqt178@163.com

**【Abstract】 Objective** To explore the role of BH3-only sub-family member Bim in crizotinib-induced apoptosis of EML4-ALK fusion gene positive lung adenocarcinoma cell line H2228. **Methods** EML4-ALK positive cell line H2228 and EML4-ALK negative cell line A549 were treated with crizotinib at various concentrations for different time(24h,48h,72h). Proliferation inhibition rate of cell lines were determined by MTT method. With PI staining in flowcytometry, crizotinib-induced apoptosis with concentration of 300nmol/L of different time(24h,48h,72h) were measured. The expression of Bim (Bim-EL, Bim-L and Bim-S) as well as pro-apoptosis factor Bid and anti-apoptosis factor Bcl-2 and Bcl-xL of cell lines before and after crizotinib administration were examined by Western blotting. SiRNA technology was used to ‘silent’ the Bim gene expression. Proliferation inhibition rate of cell lines after silent Bim gene were determined by MTT method. **Results** As concentration of crizotinib increased, crizotinib-induced proliferation inhibition rates of H2228 and A549 cell lines for 72h were increased in a dose-dependent manner. IC<sub>50</sub> of H2228 cell line treated by crizotinib for 72h was 335nmol/L. After treated by 300nmol/L crizotinib for 24h,48h,72h, the apoptosis rates of H2228 and A549 cell lines were (19.19±0.61)%, (35.47±1.17)%, (43.58±4.84)% and (12.71±0.1)%, (18.22±0.13)%, (19.36±0.45)%, respectively. Apoptosis rate of H2228 cell line increased with the concentration and exposure time of crizotinib. Up-regulated expression of Bim at pro-

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81060188,8126037);广西卫生厅重点项目(桂厅重 2010075)

<sup>1</sup> 通讯作者, E-mail: yqt178@163.com

tein levels together with down-regulated anti-apoptosis proteins Bcl-2 and Bcl-xL and in variant pro-apoptosis factor Bid after exposure to crizotinib was confirmed by Western blotting. Crizotinib-induced proliferation inhibition of H2228 cell line significantly decreased after Bim gene was silent by siRNA technology. **Conclusion** Crizotinib inhibits proliferation in lung adenocarcinoma cell line H2228 with dose and time-dependent manner. Crizotinib induces apoptosis of H2228 cell line by down-regulating anti-apoptosis proteins Bcl-2 and Bcl-xL as well as up-regulating expression of Bim. These pro-apoptosis processes can be blocked by Bim siRNA.

**[Key Words]** Bim; EML4-ALK positive; Lung adenocarcinoma cell lines; Apoptosis; Crizotinib

随着对癌症机制的深入研究,近年来出现了以表皮生长因子受体(EGFR)突变为靶点的靶向治疗药物,并且在临床上取得了显著的疗效。而棘皮动物微管相关蛋白样 4-间变性淋巴瘤激酶(EML4-ALK)融合基因阳性的非小细胞肺癌(NSCLC)是近年来发现的一种新的肺癌亚型,克唑替尼是该融合基因及间叶细胞表皮生长因子(mesenchymal epithelial growth factor, c-Met)的双靶点小分子酪氨酸激酶抑制剂,于 2011 年获美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于临床,在 ALK 易位癌症患者的治疗中取得良好的疗效<sup>[1]</sup>。

Bim(Bcl-2 interacting mediator of cell death)是 Bcl-2 家族中 BH3-only 亚家族成员,是近年研究较多的一种重要凋亡调节基因。已有研究证实,在吉非替尼等靶向治疗药物治疗有效的肺癌患者中,其癌细胞内 Bim 表达明显增加,提示 Bim 基因在肿瘤的靶向治疗中起到重要作用<sup>[2]</sup>。但 Bim 在克唑替尼治疗 EML4-ALK 阳性肺癌中的作用还有待研究。

本研究拟通过流式细胞术、免疫印迹(Western blotting)等方法对克唑替尼作用下肺癌细胞的生长和凋亡及 Bim 信号通路相关蛋白进行比较和分析,并采用 siRNA 干扰 Bim 蛋白的表达以进一步了解 Bim 的功能,探索 Bim 在克唑替尼治疗 NSCLC 中的作用机制,为今后临床筛选酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors, TKIs)敏感优势人群、靶向药物疗效评估及耐药机制提供理论依据和分子生物学参考。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂及仪器** 克唑替尼粉末制剂购自美国 Selleckchem 公司,将其溶解于二甲基亚砜(DMSO)中,制成浓度为  $10^7$  nmol/L 的溶液后储存于  $-80^\circ\text{C}$  的冰箱中备用,使用时用新鲜 RPMI 1640 培养基稀释到相应浓度,并使其中 DMSO 的终浓度小于 0.1%。RPMI 1640 培养基购自 Hyclone 公司,胎牛血清、胰蛋白酶替代物均购自 Gibco 公司,乙二胺四乙酸

(EDTA) 购自 Hyclon 公司,三羟甲基氨基甲烷(Tris-base)、十二烷基硫酸钠(SDS)、甘氨酸均购自 Sigma 公司,聚偏二氟乙烯(PVDF 膜)购自 Millipore 公司, Bcl-xL、Bcl-2 抗体、Bcl-2、Bad、磷酸化 Bad、poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)、cleaved-PARP、Bim 抗体、 $\beta$ -actin 抗体以及兔源和鼠源二抗均购自 Cell Signaling 公司,MTT 试剂盒购自启东子生物有限公司,BCA 试剂盒购自 Merck 公司,Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒和细胞周期检测试剂盒均购自 BD 公司。Western blotting 仪器设备购自美国 Bio-Rad 公司。

**1.2 细胞株及细胞培养** EML4-ALK 融合基因阳性的 NSCLC 细胞株 H2228 与 EML4-ALK 阴性的 NSCLC 细胞株 A549 由广东省肺癌研究所赠送。细胞株置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱内,并用含 10% 灭活新生牛血清的 RPMI 1640 培养液进行传代培养,每 1~2 天换液 1 次,每 7~9 天传代 1 次,选取对数生长期的细胞用于实验。

**1.3 MTT 比色法检测** 取生长良好的对数期 H2228 细胞和 A549 细胞,用培养基将细胞浓度调至  $6 \times 10^3 \sim 6 \times 10^4$  /ml,加入 96 孔细胞培养板中,每孔 200  $\mu\text{l}$ ,置于培养箱 24h 后,更换培养液为含不同浓度克唑替尼的培养液,H2228 细胞按浓度 0、10、30、90、270、810 nmol/L 分为 6 组,A549 细胞按浓度 0、10、100、1000、10 000、100 000 nmol/L 分为 6 组。每组设 4 个复孔,每孔终体积为 200  $\mu\text{l}$ ,再置于培养箱继续培养 72h,小心吸去孔内培养液,每孔避光加入 MTT(5mg/ml)溶液 20  $\mu\text{l}$ ,继续避光培养 4h,去上清,每孔加入 DMSO 后低速震荡 10min,在酶标仪 492nm 波长处测量各孔的吸光值(A)并计算细胞的增殖抑制率和  $\text{IC}_{50}$  值。增殖抑制率(%) =  $[1 - \text{加药组 A 值} / \text{对照组 A 值}] \times 100\%$ ;  $\text{IC}_{50} = \text{Log}^{-1} \{ X_m - i [\sum p - (3 - P_m - P_n) / 4] \}$  ( $X_m$ :设计的最大浓度的对数值; $i$ :最大剂量比相临剂量的对数值; $\sum p$ :各组生长抑制率之和; $P_m$ :最大阳性反应率; $P_n$ 最小阳性反应率)。

1.4 流式细胞术检测 取生长良好的对数期 H2228 细胞和 A549 细胞,细胞浓度分为  $4 \times 10^5$ /ml、 $5 \times 10^5$ /ml、 $6 \times 10^5$ /ml 共 6 组分别加入 6 孔板中,每孔 1ml,待细胞贴壁后,更换为含克唑替尼的培养基(根据 MTT 结果选择浓度为 300nmol/L)。H2228 细胞和 A549 细胞均按细胞浓度从大到小分别培养 24、48、72h,分别收集各孔培养液,用 PBS 洗涤 2 次后,用不含 EDTA 的胰酶消化细胞,消化完全后加入培养液吹打细胞,将原培养液、洗涤液、消化液及吹打细胞的培养液收集到同一离心管,以 1000r/min 离心 10min,每 2 孔 1 个离心管,弃上清液;按照细胞凋亡试剂盒说明书进行细胞染色,避光孵育 15min 后加入缓冲液,用流式细胞仪检测细胞凋亡。实验重复 3 次。

1.5 Western blotting 检测 按照蛋白质提取试剂盒说明书操作,提取各细胞株的总蛋白质。所得蛋白质经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,转移至 PVDF 膜。然后分别使用 TBST 稀释的  $\beta$ -actin 抗体(按照 1:1000 稀释)及 COL4A3 抗体(按照 1:1000 稀释)室温孵育 PVDF 膜 2h。用 TBST 稀释的 HRP 标记的兔、鼠二抗(按照 1:15 000 稀释)室温孵育 PVDF 膜 2h。红外荧光二抗(DyLight 680 conjugate)显色,计算机扫描蛋白质条带并作灰度分析。

1.6 RNA 干扰 将对数生长期的 H2228 细胞株分为 4 组,分别为 Bim siRNA+克唑替尼组、negative siRNA+克唑替尼组、克唑替尼单独作用组及空白对照组。将细胞株接种于 6 孔、24 孔细胞培养板中,接种时分别调整细胞密度为  $4 \times 10^5$ /孔和  $1 \times 10^5$ /孔,用含 10% 小牛血清无抗生素的 HyQ DMEM 培养液培养,37℃ 饱和湿度培养下过夜,待细胞贴壁。Bim siRNA+克唑替尼组和 negative siRNA+克唑替尼组转染前需用无血清无抗生素的 HyQ DMEM 培养液稀释特异性 Bim siRNA、negative siRNA 及脂质体 2000(Lipofectamine 2000),使 Bim siRNA、negative siRNA 和脂质体 2000 的最终浓度分别为 100nmol/L 和 120ml/L。两者在室温混匀静置,期间将培养板中培养液换成含 5% 小牛血清无抗生素的 HyQ 培养液,20min 后再将稀释好的 Bim siRNA 和 negative siRNA 加入相应的实验孔中,转染 6h 换成含 10% 小牛血清 HyQ DMEM 继续培养。转染 24h 后用  $0.3 \mu\text{mol/L}$  克唑替尼处理细胞 48h,待药物作用后收集各孔细胞,在流式细胞仪中进行检测。每组实验重复 3 次。

1.7 统计学分析 应用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理。数据用均数 $\pm$ 标准差表示,组间比较用  $t$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 克唑替尼对 H2228 和 A549 细胞株增殖抑制作用的影响 克唑替尼作用 72h 后,H2228 和 A549 细胞的增殖抑制率随着克唑替尼药物浓度的升高相应增加,且呈剂量依赖性。克唑替尼作用 H2228 细胞 72h 的  $\text{IC}_{50}$  值为 335nmol/L。见表 1、图 1。

表 1 不同浓度的克唑替尼处理 H2228 和 A549 细胞 72h 后的增殖抑制率( $\bar{x} \pm s, \%$ )

克唑替尼 (nmol/L)	H2228	克唑替尼 (nmol/L)	A549
10	3.41 $\pm$ 3.01	10	2.18 $\pm$ 1.22
30	8.98 $\pm$ 2.31	100	9.02 $\pm$ 2.61
90	20.68 $\pm$ 3.56	1000	9.86 $\pm$ 1.34
270	27.39 $\pm$ 3.51	10 000	31.02 $\pm$ 3.80
810	66.25 $\pm$ 4.34	100 000	37.42 $\pm$ 3.99

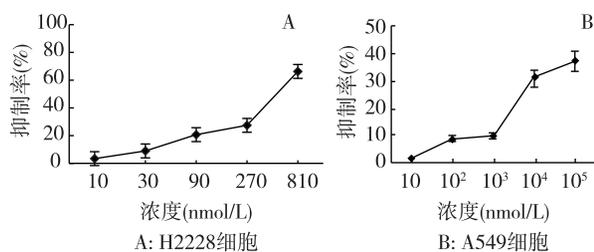
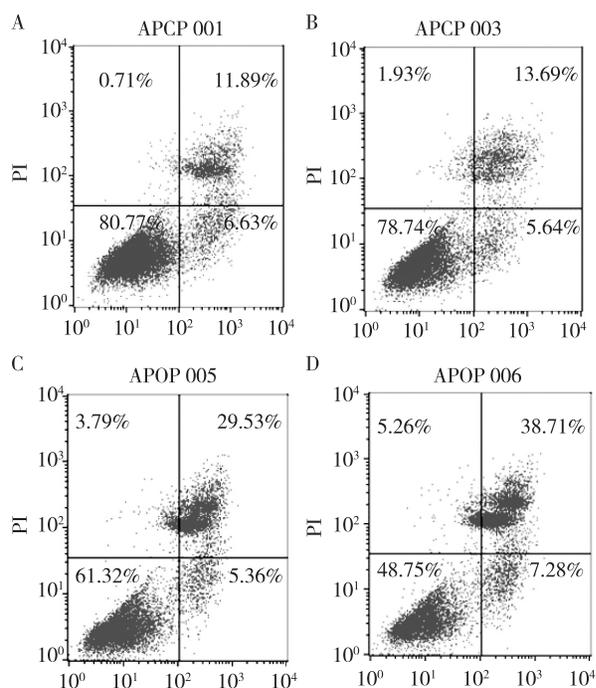


图 1 不同浓度的克唑替尼处理 H2228 和 A549 细胞 72h 后的增殖抑制率

2.2 克唑替尼诱导 H2228 和 A549 细胞株凋亡的情况  $300 \text{ nmol/L}$  克唑替尼作用 H2228 细胞 24、48、72h 的凋亡率分别为  $(19.19 \pm 0.61)\%$ 、 $(35.47 \pm 1.17)\%$ 、 $(43.58 \pm 4.84)\%$ ,作用 A549 细胞株的凋亡率分别为  $(12.71 \pm 0.1)\%$ 、 $(18.22 \pm 0.13)\%$ 、 $(19.36 \pm 0.45)\%$ 。随着克唑替尼( $300 \text{ nmol/L}$ )作用时间的延长,细胞凋亡率亦随之增加,并呈时间依赖性( $P < 0.05$ )。 $300 \text{ nmol/L}$  克唑替尼作用 A549 细胞 48h 的凋亡率仅为 18.22%,而作用 H2228 细胞 24h 的凋亡率为 35.47%,表明 H2228 细胞对克唑替尼诱导的凋亡相对 A549 细胞更具有敏感性。见图 2。

2.3 Bim、促凋亡分子 Bid 及抗凋亡分子 Bcl-2、Bcl-xL 的蛋白表达水平 结果显示 Bim 3 个异构体



A: 作用 A549 细胞 72h; B: 作用 H2228 细胞 24h; C: 作用 H2228 细胞 48h; D: 作用 H2228 细胞 72h

图 2 300nmol/L 克唑替尼在不同时间点诱导 H2228 和 A549 细胞凋亡的情况

Bim-S、Bim-L、Bim-EL 在 H2228 细胞株中的表达水平随着作用时间的延长(0、24、48、72h)均呈上升趋势,且在 48h 达到高峰;而在相对不敏感的 EML4-ALK 阴性细胞株 A549 中的表达变化不明显。2 个细胞株中,促凋亡蛋白 Bid 的表达水平无明显变化,而抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-xL 随着克唑替尼作用时间的延长,蛋白的表达水平呈不同程度的下降趋势。在 H2228 细胞株中,Bcl-xL 的表达水平在克唑替尼作用 24h 时明显下降,而 Bcl-2 的表达水平在克唑替尼作用 48h 时才明显下降;在 A549 细胞株中,Bcl-xL 的表达水平在克唑替尼作用 48h 时下降,而 Bcl-2 的表达水平在克唑替尼作用 72h 出现下降。见图 3、图 4。

2.4 采用 siRNA 技术“沉默”Bim 基因表达对克唑替尼诱导 H2228 细胞株凋亡的影响 结果显示经克唑替尼作用并转染 Bim siRNA 的细胞中 Bim 蛋白水平较克唑替尼单独作用组及空白对照组明显下降。Bim siRNA+克唑替尼组、negative siRNA+克唑替尼组、克唑替尼单独作用组及空白对照组的凋亡率分别为(28.5±4.58)%、(42.6±3.97)%、(47.6±2.21)%和(6.1±1.14)%。见图 5。

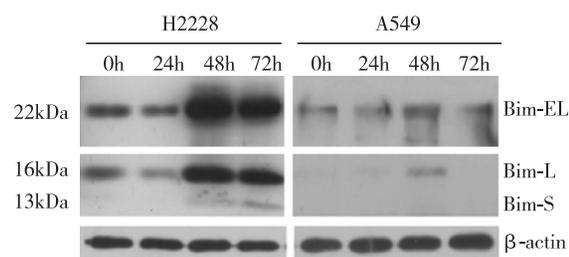


图 3 克唑替尼(300nmol/L)在不同时间点作用 H2228 和 A549 细胞 Bim 的表达情况

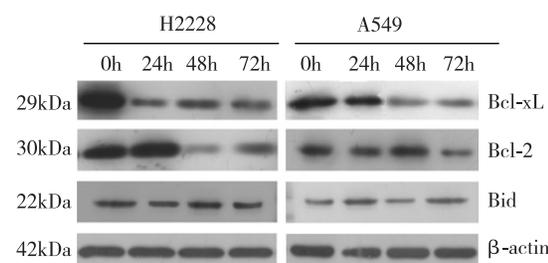
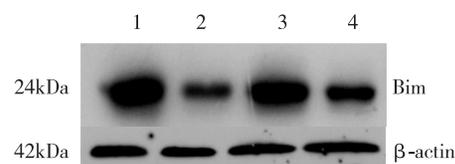


图 4 克唑替尼(300nmol/L)在不同时间点作用 H2228 和 A549 细胞 BH3-only 家族成员的表达情况



1: 克唑替尼; 2: Bim siRNA+克唑替尼; 3: negative siRNA+克唑替尼; 4: 空白对照组

图 5 Western blotting 检测 Bim siRNA 转染 H2228 细胞株后 Bim 蛋白表达水平

### 3 讨论

Bcl-2 家族蛋白是细胞凋亡的关键调节分子,在细胞凋亡的内在信号通路中扮演重要作用。内在信号通路即线粒体凋亡通路,是内部传感器的破坏和细胞应激下的物理化学改变引起 Bax 活化转运到线粒体外膜使外膜通透性改变继而释放细胞色素 C,激活下游的 Caspase 9 而诱导凋亡<sup>[3]</sup>。50%~90% 肺癌中 Bcl-2 过表达,这表明 Bcl-2 在肺癌的发病机制中起关键作用,但是 Bax 的过表达只在肺癌细胞中才具有促凋亡作用,而在正常细胞系中无此作用<sup>[4]</sup>。Bim 为 Bcl-2 蛋白家族的促凋亡成员,属于 Bcl-2 家族蛋白 BH3 亚家族成员,均被认为是重要的凋亡诱导因子。目前已证实能够结合于 Bim

启动子上的转录因子,如 FOX3a (FKHRL1)、Myb、RUNX3 等<sup>[5-8]</sup>,在转录后按不同剪接可形成不同的 Bim 异构体,即短型 (Bim-S)、长型 (Bim-L) 和超长型 (Bim-EL),不同的异构体活性亦不完全相同。此外,在翻译后水平通过磷酸化来调控 Bim 的活性<sup>[9]</sup>。目前已知 Bim 广泛表达于各种正常细胞,其凋亡调节功能已在造血细胞、神经细胞、前列腺癌细胞、乳腺癌细胞等多种细胞系中得到了肯定。有研究发现 Bim 基因的缺失可导致多种肿瘤的发生<sup>[10]</sup>。

p53 上调的细胞凋亡调控因子 (p53 up-regulated modulator of apoptosis, PUMA) 也属于 Bcl-2 家族蛋白 BH3 亚家族成员,可依赖和不依赖 p53 快速诱导凋亡<sup>[11]</sup>,其通过与 Bcl-2/Bcl-xL 和 Bax/Bak 相互作用发挥其促凋亡作用。Sun 等<sup>[12]</sup>通过对头颈细胞癌的研究证明了 EGFR 抑制 PUMA 的表达,因而用 EGFR 选择性 TKIs 可以使 PUMA 表达上调。提示 PUMA 在靶向治疗中可能起到重要作用。而 Bim 和 PUMA 同属 BH3 亚家族成员,目前已有多项研究表明 Bim 在靶向药物诱导肿瘤细胞凋亡中起到重要作用。Piechocki 等<sup>[13]</sup>通过构建 HER2/Neu 和 Fas 过表达的细胞株发现吉非替尼治疗导致促凋亡因子 (Bim 和 Bax) 增加和抗凋亡因子 (Bcl-2 和 Bcl-xL) 下降具有剂量依赖性。吉非替尼诱发了内在凋亡通路。Gong 等<sup>[14]</sup>对于 EGFR 突变的肺腺癌细胞株 (H3255、PC-9、H1650、H1975) 给予厄洛替尼,发现在敏感细胞株中 Bim 表达增强。而在用 RNA 干扰技术阻断 Bim 的表达消除了厄洛替尼诱导突变细胞株凋亡的能力后,在耐药细胞株中 Bim 的表达变化并不明显,此外还发现 EGFR-TKIs 是通过抑制细胞外信号调节激酶 (ERK) 信号途径上调 Bim 表达,从而诱导癌细胞凋亡。Costa 等<sup>[2]</sup>研究证实, T790M 突变阻断了吉非替尼诱导的 Bim 表达上调和细胞株凋亡;在吉非替尼等靶向治疗药物有效的肺癌患者中,其癌细胞内 Bim 表达明显增加,而原来对靶向药物敏感的癌细胞在 Bim 基因被敲除后出现耐药,并发现吉非替尼可能通过抑制 AKT、ERK 信号途径提高 Bim 表达,提示 Bim 基因在靶向治疗中起到重要作用。Li 等<sup>[15]</sup>通过类似 BH3 结构域模拟肽,表明其对肺癌的靶向作用,提示 Bim 等 BH3 促凋亡亚家族成员在靶向治疗中可能起到关键作用。

克唑替尼为针对 ALK/c-Met 双靶点的小分子酪

氨酸激酶抑制剂,进入胞浆后与位于细胞膜内侧的酪氨酸激酶 ATP 结合域相结合,通过阻断该通路的信号传导来实现细胞的生长抑制和促进凋亡。2012 年 Shaw 等<sup>[16]</sup>报道克唑替尼用于二线治疗的随机多中心 III 期临床研究 (PROFILE 1007),结果显示克唑替尼组中位无进展生存期为 7.7 个月,客观缓解率高达 65%。目前已经证明 EML4-ALK 参与了 3 条包括受体酪氨酸激酶 (RTKs) 的主要信号通路: MAPK/MEK/ERK、PI3K/AKT 和 RAS/STAT3<sup>[17]</sup>。有研究表明, EML4-ALK 融合基因通过激活 ERK 和 STAT3 信号通路,引起 Bim 水平下降及生存素水平升高,从而发挥抗凋亡及促进肿瘤生长的作用,而 ALK 抑制剂可通过抑制 ERK 信号通路上调 Bim 诱导细胞凋亡,发挥抗肿瘤作用<sup>[18]</sup>。本研究亦发现克唑替尼作用 EML4-ALK 阳性细胞株 H2228 时,其细胞凋亡率明显高于对照细胞株 A549,且呈时间依赖性。克唑替尼能诱导 EML4-ALK 阳性细胞凋亡,抑制其增殖,这与其他研究结果<sup>[19]</sup>一致。本研究在凋亡细胞中还检测出 Bim 蛋白水平显著升高,推测克唑替尼可能通过上调 Bim 诱导 EML4-ALK 阳性细胞凋亡。

目前认为 Bim 的促凋亡机制为 Bim 通过与抗凋亡分子 Bcl-2 家族成员,如 Bcl-2、Bcl-xL 的结合,使后者不能与促凋亡分子如 Bid、Bax 和 Bak 结合,从而发挥促凋亡作用<sup>[20]</sup>。因此我们采用 Western blotting 的方法进一步对促凋亡分子 Bid,抗凋亡分子 Bcl-2、Bcl-xL 进行蛋白水平的检测,结果显示促凋亡蛋白 Bid 在各时间点的表达无明显变化,而抗凋亡分子 Bcl-2 和 Bcl-xL 随着克唑替尼作用时间的延长,蛋白表达水平均有不同程度的减少趋势,其中 H2228 细胞株中的 Bcl-2 和 Bcl-xL 蛋白水平下降均早于 A549 细胞株,两种细胞系中抗凋亡分子 Bcl-xL 的蛋白表达水平降低都早于抗凋亡分子 Bcl-2。推测克唑替尼诱导的细胞凋亡中, Bim 通过抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-xL 的表达,而不是增强凋亡分子 Bid 的表达,从而促进细胞的凋亡,且 Bcl-xL 分子发挥作用早于 Bcl-2 分子。

RNA 干预指双链 RNA 对基因表达的阻断作用,双链 RNA 经酶切后会形成很多小片段,称为小分子 RNA (small-interfering RNAs, siRNAs),这些小片段一旦与信使 RNA (mRNA) 中的同源序列互补结合,会导致 mRNA 失去功能,使相应基因沉默。通过 RNA 干扰技术抑制基因表达,有可能成为抗肿瘤治疗研究的新方向<sup>[33-38]</sup>。本研究将 Bim 作为分

子靶点,采用 siRNA 技术特异性“沉默”Bim 基因在克唑替尼诱导 H2228 细胞株中的表达。经流式细胞仪发现转染 Bim siRNA 组细胞凋亡率显著下降,说明 Bim 分子在克唑替尼诱导 H2228 细胞凋亡中的表达与细胞的凋亡率呈正相关,Bim 是克唑替尼诱导细胞凋亡重要的效应子。然而,我们也观察到 H2228 细胞株经 Bim 基因“沉默”后克唑替尼诱导的细胞凋亡并未完全被抑制,推测在 siRNA 转染细胞之前的胞浆内 Bim 遗留有关,此外可能与其他促凋亡因子活性升高有关。因此,推测克唑替尼诱导细胞凋亡可能还有其他信号通路分子参与该过程,这需要今后进一步研究。

综上所述,克唑替尼通过抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-xL 的表达上调 Bim 水平从而诱导 EML4-ALK 阳性细胞凋亡,促凋亡分子 Bim 是该过程的关键因子。由于克唑替尼等 TKIs 类药物作用于靶细胞后,通常会引发多通路、多分子的后继变化,通过研究其诱导细胞凋亡的分子机制,有助于遴选关键分子,通过诱导上调肿瘤细胞中相关促凋亡分子的表达水平或联合“沉默”降低相关抗凋亡分子的表达,为今后深入研究靶向耐药机制提供分子生物学基础。

## 参考文献

- [ 1 ] Okamoto I, Nakagawa K. Echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase-targeted therapy for advanced non-small cell lung cancer: molecular and clinical aspects[J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(8):1391-1396.
- [ 2 ] Costa DB, Halmos B, Kumar A, et al. BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations[J]. *PLoS Med*, 2007, 4(10):1669-1679.
- [ 3 ] Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis[J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 351(1-2):41-58.
- [ 4 ] Kaliberov SA, Buchsbaum DJ, Gillespie GY, et al. Adenovirus-mediated transfer of BAX driven by the vascular endothelial growth factor promoter induces apoptosis in lung cancer cells[J]. *Mol Ther*, 2002, 6(8):190-198.
- [ 5 ] Gilley J, Coffey PJ, Ham J. FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons[J]. *J Cell Biol*, 2003, 162(4):613-622.
- [ 6 ] Essafi A, Fernandez MS, Hassen YA, et al. Direct transcriptional regulation of Bim by FOXO3a mediates ST15 71-induced apoptosis in Bcr-Abl-expressing cells [J]. *Oncogene*, 2005, 24(14):2317-2329.
- [ 7 ] Biswas SC, Liu DX, Greene LA, et al. Bim is a direct target of a neuronal E2F-dependent apoptotic pathway [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(37):8349-8358.
- [ 8 ] Yano T, Kosei I, Hiroshi F, et al. The RUNX3 tumor suppressor upregulates Bim in gastric epithelial cells undergoing transforming growth factor $\beta$ -induced apoptosis[J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(12):4474-4488.
- [ 9 ] Putcha GV, Le S, Frank S, et al. JNK-mediated Bim phosphorylation potentiates Bax-dependent apoptosis[J]. *Neuron*, 2003, 38(6):899-914.
- [ 10 ] Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(25):2385-2394.
- [ 11 ] Yu J, Zhang L. No PUMA, no death: implications for p53-dependent apoptosis[J]. *Cancer Cell*, 2003, 4(4):248-249.
- [ 12 ] Sun Q, Ming L, Thomas SM, et al. PUMA mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in head and neck cancer cells[J]. *Oncogene*, 2009, 28(24):2348-2357.
- [ 13 ] Piechocki MP, Yoo GH, Dibley SK, et al. Iressa induces cytostasis and augments Fas-mediated apoptosis in acinic cell adenocarcinoma overexpressing HER2/neu[J]. *Int J Cancer*, 2006, 119(2):441-454.
- [ 14 ] Gong Y, Somwar R, Politi K, et al. Induction of BIM is essential for apoptosis triggered by EGFR kinase inhibitors in mutant EGFR-dependent lung adenocarcinomas[J]. *PLoS Med*, 2007, 4(10):294.
- [ 15 ] Li Z, Zhao J, Du Y, et al. Down-regulation of 14-3-3 $\beta$  suppresses anchorage-independent growth of lung cancer cells through anoikis activation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(1):162-167.
- [ 16 ] Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(25):2385-2394.
- [ 17 ] Zhang S, Wang F, Keats J, et al. Crizotinib-resistant mutants of EML4-ALK identified through an accelerated mutagenesis screen [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2011, 78(6):999-1005.
- [ 18 ] Takezawa K, Okamoto I, Nishio K, et al. Role of ERK-BIM and STAT3-survivin signaling pathways in ALK inhibitor-induced apoptosis in EML4-ALK-positive lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(8):2140-2148.
- [ 19 ] Zou HY, Li Q, Lee JH, et al. An orally available small-molecule inhibitor of c-Met, PF-2341066, exhibits cytoreductive antitumor efficacy through antiproliferative and antiangiogenic mechanisms [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(9):4408-4417.
- [ 20 ] Strasser A. The role of BH3-only proteins in the immune system [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(3):189-200.

收稿日期:2014-02-12; 修回日期:2014-03-26