

自噬相关蛋白在 EGFR-TKI 耐药 NSCLC 患者中的表达及其相关性

张欣伟¹, 王 勇², 罗 辉¹, 刘 琴³, 李 勇^{1*}

(1. 南昌大学第一附属医院肿瘤科, 江西 南昌 330006; 2. 赣州市人民医院肿瘤科, 江西 赣州 341000;

3. 南昌大学第一附属医院呼吸与危重症医学科, 江西 南昌 330006)

摘要:目的 探讨自噬相关蛋白在表皮生长因子酪氨酸激酶受体抑制剂(epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI) 耐药非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC) 患者中的表达及其相关性。方法 选取对吉非替尼敏感(EGFR-S 组)和耐药(EGFR-R 组)的晚期肺癌患者肿瘤组织标本各 40 例, 采用免疫组织化学、Western blot 和 RT-qPCR 检测自噬相关蛋白 Beclin1、LC3 II 和 p62 的表达, 并与 EGFR 耐药进行相关性分析。结果 免疫组织化学和 Western blot 检测显示, 与 EGFR-S 组比较, Beclin1 和 LC3 II 蛋白在 EGFR-R 组中表达更低; p62 蛋白在 EGFR-R 组中表达更高(均 $P < 0.05$)。RT-qPCR 检测显示, EGFR-R 组较 EGFR-S 组 Beclin1 mRNA 表达下调为(0.55 ± 0.65), LC3 II mRNA 表达下调为(0.54 ± 0.43), p62 mRNA 表达上调为(2.54 ± 0.86) 倍(均 $P < 0.05$)。Beclin1 和 LC3 II 蛋白($r = -0.723, r = -0.705$)及 mRNA($r = -0.462, r = -0.417$)表达与 EGFR 耐药负相关(均 $P < 0.01$), p62 蛋白($r = 0.742, P < 0.01$)及 mRNA($r = 0.460, P < 0.01$)表达与 EGFR 耐药正相关。结论 自噬水平的低下与 EGFR-TKI 耐药密切相关, 自噬表达水平与 EGFR-TKI 耐药的出现呈负性相关。

关键词: 癌, 非小细胞肺/药物疗法; 肺肿瘤/药物疗法; 自噬; 蛋白酪氨酸激酶类/治疗应用; 蛋白酪氨酸激酶类/拮抗剂和抑制剂; 受体, 表皮生长因子/治疗应用; 抗药性, 肿瘤; 免疫组织化学

中图分类号: R734.2; R730.53 文献标志码: A 文章编号: 1001-1692(2019)06-0508-05

Expression and correlation of autophagy-related proteins in EGFR-TKI resistant non-small-cell lung cancer patients

Zhang Xinwei¹, Wang Yong², Luo Hui¹, Liu Qin³, Li Yong¹

(1. Department of Medical Oncology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China;

2. Department of Medical Oncology, Ganzhou People's Hospital, Ganzhou 341000, China; 3. Department of Respiratory and

Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

Corresponding to: Li Yong, E-mail: liyongesco@email.ncu.edu.cn

Abstract: Objective To explore the expression and correlation of autophagy-related proteins in epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) resistant non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients. **Methods** Eighty lung adenocarcinoma tissues which were sensitive or resistant to gefitinib were collected. The patients were divided into the EGFR-TKI sensitive (EGFR-S) group and EGFR-TKI resistant (EGFR-R) group. The expression of autophagy-related proteins Beclin1, LC3 II and p62 were detected by immunohistochemistry, Western blot and RT-qPCR. In addition, a correlation analysis was made between autophagy-related proteins and EGFR-TKI resistance. **Results** Immunohistochemistry and Western blot analysis showed that the expressions of Beclin1 and LC3 II proteins were lower and the expression of

收稿日期: 2019-07-19

DOI: 10.13267/j.cnki.syzlzz.2019.06.006

基金项目: 国家自然科学基金(81560379); 江西省自然科学基金面上项目(20181BAB205046); 江西省科技支撑计划项目(2015BBG70236); 江西省教育厅重点项目(GJJ170012)

作者简介: 张欣伟(1995-), 女, 江西上饶人, 硕士生, 从事肺癌基础与临床研究

* 通信作者 E-mail: liyongesco@email.ncu.edu.cn

p62 protein was higher in the EGFR-R group than those in the EGFR-S group (all $P < 0.05$). RT-qPCR showed that the mRNA expression of Beclin1 in the EGFR-R group was down-regulated to (0.55 ± 0.65) compared with that in the EGFR-S group, the mRNA expression of LC3 II was down-regulated to (0.54 ± 0.43) , but the mRNA expression of p62 was up-regulated to (2.54 ± 0.86) (all $P < 0.05$). The expressions of proteins and mRNA of Beclin1 ($r = -0.723, r = -0.462$) and LC3 II ($r = -0.705, r = -0.417$) were positively correlated with EGFR-TKI resistance, but the expression of protein and mRNA of p62 ($r = 0.742, r = 0.460$) was negatively correlated with EGFR-TKI resistance (all $P < 0.01$). **Conclusions**

The low expression of autophagy is closely related to EGFR-TKI resistance, and there is significant negative correlation between the expression levels of autophagy related proteins and EGFR-TKI resistance.

Key words: carcinoma, non-small-cell lung/drug therapy; lung neoplasms/drug therapy; autophagy; protein-tyrosine kinases/therapeutic use; protein-tyrosine kinases/antagonists & inhibitors; receptor, epidermal growth factor/therapeutic use; drug resistance, neoplasm; immunohistochemistry

肺癌是最常见恶性肿瘤之一。在我国,肺癌是第 1 位癌症死因,也是人群死亡率上升最快的癌症,其中 80% 为非小细胞肺癌 (non-small-cell lung cancer, NSCLC)。表皮生长因子酪氨酸激酶受体抑制剂 (epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI) 在 EGFR 突变的 NSCLC 中具有较好的疗效,选择高,不良反应较小,不仅能够改善患者预后,还可以延缓肿瘤进展。EGFR-TKI 是通过抑制酪氨酸激酶的活性,阻断肿瘤细胞增殖和生长的通路,从而抑制肿瘤细胞的生长、迁移和加快其凋亡。但不同个体疗效差异很大,最终 EGFR-TKI 耐药的出现和疾病的进展还是难以避免。自噬是在饥饿、缺氧和应激等条件下细胞内部分物质降解的现象,普遍发生在真核细胞内^[1]。自噬与肿瘤 EGFR-TKI 抑制剂耐药有关,通过调控自噬的表达可能逆转肿瘤细胞对 EGFR-TKI 的耐药^[2]。但目前关于自噬与 NSCLC 患者出现 EGFR-TKI 耐药的关系及其机制尚不明确。本研究初步探讨自噬相关蛋白在 EGFR-TKI 耐药 NSCLC 患者中的表达水平及与 EGFR-TKI 耐药的相关性,为后续机制深入探究及 NSCLC 患者出现 EGFR-TKI 耐药寻找有效标志物提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

标本来自于 2018 年 2 月至 2019 年 2 月南昌大学第一附属医院 52 例和赣州市人民医院 28 例晚期肺腺癌患者,所有患者均经支气管镜或经皮肺穿刺活检获取足量组织标本。患者分为 EGFR 敏感 (EGFR-S) 组 40 例与 EGFR 耐药 (EGFR-R) 组 40 例。EGFR-S 组为经基因检测确定为 EGFR 敏感突变患者;EGFR-R 组为经基因检测确定为 EGFR 原发耐药突变患者,或敏感突变患者口服吉非替尼出

现进展,再次活检经基因检测确定为继发耐药患者。80 例肺腺癌患者均为 IV 期,其中男性 47 例,女性 33 例,年龄 48 ~ 78 岁, (62.18 ± 7.69) 岁。EGFR-S 组 40 例,男性 25 例,女性 15 例,年龄 (61.40 ± 7.40) 岁;EGFR-R 组 40 例,男性 22 例,女性 18 例,年龄 50 ~ 78 岁, (62.95 ± 7.90) 岁。两组在性别、年龄和分期方面比较,差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。

蛋白质提取试剂盒购自美国 Pierce 公司。Beclin1 抗体购自上海 Abcam 公司。LC3 II 抗体购自美国 Sigma 公司。p62 抗体购自美国 BD bioscience 公司。兔抗多克隆抗体购自美国 Cell Signaling 公司。羊抗兔二抗抗体购自美国 Proteintech 公司。ECL 发光试剂盒购自上海碧云天公司。Trizol 购自法国 Transgene 公司。逆转录试剂盒和 2 × SYBR 试剂盒购自日本 Takara 公司。

1.2 免疫组织化学法

4% 多聚甲醛常规灌注固定,取材置于 20% 蔗糖溶液 4℃ 中固定过夜。放入包埋盒,脱水透明处理,然后石蜡浸蜡 2 次,制作包埋块,切片与贴片后进行脱蜡,抗原修复,3% H_2O_2 灭活内源性过氧化氢酶,10% 羊血清、4℃ 过夜封闭,一抗 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜,二抗 37℃ 孵育 1 h,洗膜,滴加 DAB 显色液显色,苏木精复染,脱水透明,中性树胶封固,拍照。

1.3 Western blot 检测

冷 PBS 洗 2 遍,加入细胞裂解液,组织破碎仪破碎,4℃ 下 2 000 r/min 离心,20 min,取上清,提取细胞总浓度,BCA 法测蛋白浓度,取 20 μ g 样品煮沸变性,然后进行 Tricine-SDS-PAGE 电泳,转膜,5% 脱脂奶粉 37℃ 封闭 2 h,一抗 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜,二抗 37℃ 孵育 1 h,洗膜,ECL 显色,分析条带灰度值,以目的条带与 β -actin 调对灰度比值来表示蛋白质表达量。

1.4 RT-qPCR 检测自噬相关蛋白 mRNA 分子表达

采用 RNA 提取试剂盒抽提组织中 RNA, 检测 RNA 浓度, 使用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 经过染色后进行荧光实时定量 PCR 反应。PCR 反应: 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 40 个循环。Beclin1 正向引物为 5'-TACCACAGCCCAGGCGAAAC-3', 反向引物为 5'-CCAGTGACCTTCAGTCTTCGGC-3'; LC3 II 正向引物为 5'-TCAGACCGGCCTTTCAAGCA-3', 反向引物为 5'-CTCGATGATCACCGGATTTTG-3'; p62 正向引物为 5'-TTCCAGCACAGAGGAGAAGAGC-3', 反向引物为 5'-GATTCTGGCATCTGTAGGGACTG-3'; GAPDH 正向引物为 5'-TGAAGTCGGAGTCAACG-GAT-3', 反向引物为 5'-CCTGGAAGATGGTGATGG-GAT-3'。以 GAPDH 作为内参。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件分析数据。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较采用 *t* 检验。蛋

白阳性表达在 EGFR-S 组和 EGFR-R 组的差异用 χ^2 检验(或 Fisher 精确检验)。采用 Spearman 相关分析评估自噬相关蛋白表达与 EGFR 耐药的相关性。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 自噬相关蛋白在 EGFR-S 组与 EGFR-R 组中的表达情况

免疫组织化学法检测发现, 与 EGFR-S 组比较, 自噬相关蛋白 Beclin1 和 LC3 II 在 EGFR-R 组中表达更低; p62 在 EGFR-R 组中表达更高(图 1)。在 EGFR-S 组和 EGFR-R 组中, Beclin1 阳性表达率分别为 92.5% (37/40) 和 12.5% (5/40), LC3 II 阳性表达率分别为 95.0% (38/40) 和 15.0% (6/40), 自噬负性相关蛋白 p62 阳性表达率分别为 5.0% (2/40) 和 90.0% (36/40), 差异均具有统计学意义(均 $P < 0.01$, 表 1)。

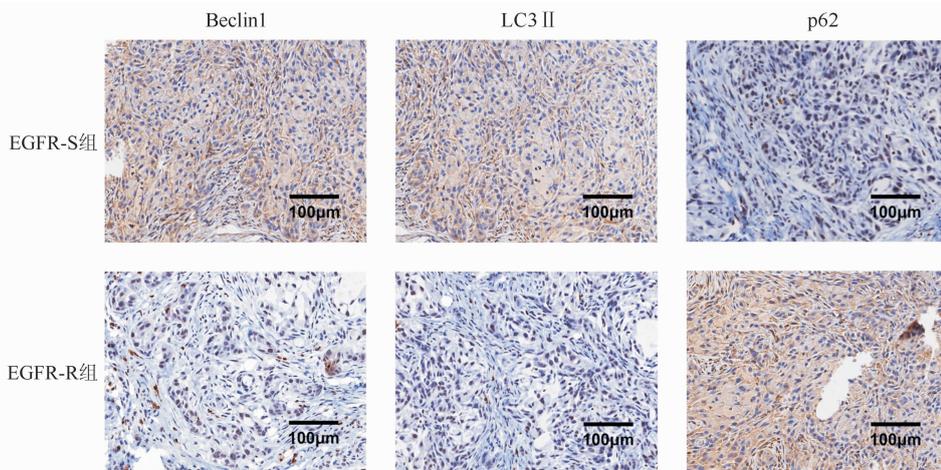


图 1 免疫组织化学法检测自噬相关蛋白 Beclin1、LC3 II 和 p62 在 EGFR-S 组和 EGFR-R 组中的表达(HE × 200)
Fig. 1 Immunohistochemistry detecting the expression of autophagy-related proteins in the EGFR-S and EGFR-R groups (HE × 200)

表 1 免疫组织化学法检测 Beclin1、LC3 II 和 P62 蛋白在 EGFR-S 和 EGFR-R 组中的表达(例, %)

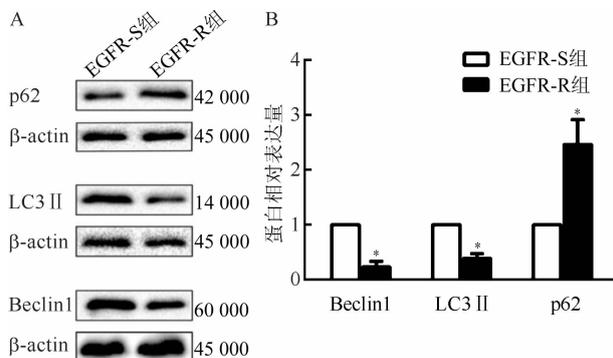
Table 1 Expression of autophagy-related proteins in the EGFR-S and EGFR-R groups by immunohistochemistry (case, %)

检测蛋白	总例数	EGFR-S 组 (n = 40)	EGFR-R 组 (n = 40)	P 值
Beclin1				
- ~ +	38	3(7.5)	35(87.5)	<0.01
+ + ~ + + +	42	37(92.5)	5(12.5)	
LC3 II				
- ~ +	36	2(5.0)	34(85.0)	<0.01
+ + ~ + + +	44	38(95.0)	6(15.0)	
p62				
- ~ +	42	38(95.0)	4(10.0)	<0.01
+ + ~ + + +	38	2(5.0)	36(90.0)	

Western blot 检测 EGFR 敏感及耐药肺腺癌患者组织中自噬相关蛋白的表达发现, EGFR-R 组较 EGFR-S 组 Beclin1 蛋白质表达下调为 (0.23 ± 0.09); LC3 II 蛋白表达下调为 (0.39 ± 0.15); 自噬负性相关蛋白 p62 蛋白表达上调为 (2.76 ± 0.21) 倍, 差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$, 图 2)。

2.2 EGFR-S 和 EGFR-R 组自噬相关蛋白 mRNA 的表达情况

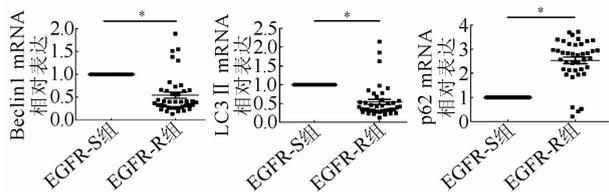
EGFR-R 组较 EGFR-S 组 Beclin1 mRNA 表达下调为 (0.55 ± 0.65), LC3 II mRNA 表达下调 (0.54 ± 0.43), p62 mRNA 表达上调 (2.54 ± 0.86), 差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$, 图 3)。



注 A:采用 Western blot 检测 Beclin1、LC3 II 和 p62 蛋白表达;B:QuantityOne 软件半定量分析 Beclin1、LC3 II 和 p62 蛋白表达倍数变化;* 与 EGFR-S 组比较, $P < 0.05$

图 2 Western blot 检测自噬相关蛋白 Beclin1、LC3 II 和 p62 在 EGFR-S 组和 EGFR-R 组中的表达

Fig. 2 Western blot detecting the expression of autophagy-related proteins in the EGFR-S and EGFR-R groups



注 * $P < 0.05$

图 3 RT-qPCR 检测 Beclin1、LC3 II 和 P62 mRNA 在 EGFR-S 和 EGFR-R 组中的表达

Fig. 3 Expression of autophagy-related proteins in the EGFR-S and EGFR-R groups detected by RT-qPCR

2.3 自噬相关蛋白与 EGFR 耐药相关性分析

应用 Spearman 相关分析表明,通过免疫组织化学法检测自噬相关蛋白,EGFR 耐药与 Beclin1 ($r = -0.723, P < 0.01$)、LC3 II ($r = -0.705, P < 0.01$) 呈负相关,与 p62 呈正相关 ($r = 0.742, P < 0.01$);通过 RT-PCR 检测自噬相关蛋白 mRNA,EGFR 耐药与 Beclin1 ($r = -0.462, P < 0.01$)、LC3 II ($r = -0.417, P < 0.01$) 呈低度负相关,与 p62 呈低度正相关 ($r = 0.460, P < 0.01$)。

3 讨论

随着分子靶向药物的出现,以 EGFR 为靶点的 EGFR-TKI 为晚期 NSCLC 患者的治疗带来希望^[3-4]。但是,不同个体对于 EGFR-TKI 疗效差异很大,而且无论其短期疗效如何,几乎所有的患者最终都不可避免地出现 EGFR-TKI 耐药和疾病进展^[5-6]。因此,寻找可预测 EGFR-TKI 耐药的标志物将有助于筛选适合应用 EGFR-TKI 治疗的 NSCLC 患者。目前临

床上对 EGFR 突变的检测是对吉非替尼疗效和是否出现耐药有力的预测手段。EGFR 突变与吉非替尼的疗效具有相关性,EGFR 突变使 EGFR 活性增加,下游增殖通路激活。其中外显子 19 缺失和 21 点突变是最常见的 EGFR 突变类型^[7-8]。EGFR 耐药机制非常复杂,最主要机制是 T790M 突变,占 50% ~ 60%,其他机制包括人类表皮生长因子受体 2 (epidermal growth factor receptor 2, HER2) 扩增、c-Met 扩增和磷脂酰肌醇-3-激酶催化亚基 α (phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit α , PIK3CA) 突变^[9]。

自噬是细胞内受损、变性或衰老的蛋白质和细胞器运输到溶酶体,被溶酶体消化降解的细胞自我消化过程。近年来因自噬异常与肿瘤的能量代谢、细胞死亡及抗癌治疗的反应相联系而受到广泛关注^[9-10]。自噬过程复杂多样,通过多种自噬相关基因表达来调节不同的细胞信号通路。Beclin1、LC3 II 和 p62 是自噬的重要标志蛋白,参与自噬相关信号通路调控自噬水平。其中,Beclin1 和 LC3 II 参与自噬的起始阶段,激活多种细胞信号通路而上调自噬;而 p62 可以下调自噬,其表达与自噬水平呈负相关^[11-12]。自噬与 EGFR-TKI 的耐药密切相关,但目前的观点存在极大分歧。本研究结果显示,在对 EGFR 敏感的肺腺癌组织中,自噬正性相关蛋白 Beclin1 和 LC3 II 蛋白及其 mRNA 高表达,负性相关蛋白 p62 及其 mRNA 低表达;而在 EGFR 耐药的肺腺癌组织中,表达却成相反趋势。表明在对 EGFR-TKI 敏感的 NSCLC 组织中自噬处于高表达水平,而出现耐药的组织中自噬处于低表达水平。并通过相关性分析发现,自噬表达水平与 EGFR 耐药的呈现负性相关。激活与自噬相关的 PI3K/Akt 和 mTOR 信号通路后下调细胞自噬水平,能够造成 EGFR-TKI 耐药的产生^[13]。在使用雷帕霉素上调自噬水平后,EGFR-TKI 的抗癌作用明显增强^[14]。但也有研究则持相反观点,即激活自噬,能够减弱 EGFR-TKI 的药效,引起耐药^[15]。另外,也有观点表示自噬对 EGFR-TKI 的耐药影响有双重作用,这取决于肿瘤的类型^[12]。

有学者认为,自噬对 EGFR-TKI 的作用取决于自噬水平,当自噬低水平时,对肿瘤细胞起到保护作用,帮助细胞清除残骸而促进其生长,引起耐药;当自噬达到高水平时,能够诱导肿瘤细胞凋亡,提高 EGFR-TKI 的敏感性,增强药物疗效^[16-17]。该观点与本研究结果一致。可见,自噬水平的低下可能与 EGFR-TKI 耐药的出现密切相关。自噬相关蛋白及

其 mRNA 的表达水平高低可能可以作为肺腺癌患者对 EGFR-TKI 是否敏感的预测分子,但这也有待进一步大量研究样本的证实。

综上所述,自噬在 EGFR-TKI 耐药的肺腺癌组织中处于低水平表达,自噬表达水平与 EGFR-TKI 耐药的出现呈负性相关。可见细胞自噬水平的变化与 EGFR-TKI 的耐药有着密切的关系。但其具体机制尚不清楚,仍有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Kenific CM, Debnath J. Cellular and metabolic functions for autophagy in cancer cells[J]. Trends Cell Biol, 2015, 25(1):37-45.
- [2] Liu Z, He K, Ma Q, et al. Autophagy inhibitor facilitates gefitinib sensitivity *in vitro* and *in vivo* by activating mitochondrial apoptosis in triple negative breast cancer[J]. PLoS One, 2017, 12(5):e0177694.
- [3] Ramalingam SS, Owonikoko TK, Khuri FR. Lung cancer: New biological insights and recent therapeutic advances [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):91-112.
- [4] Cataldo VD, Gibbons DL, Pérez-Soler R, et al. Treatment of non-small-cell lung cancer with erlotinib or gefitinib [J]. N Engl J Med, 2011, 364(10):947-955.
- [5] Gainor JF, Shaw AT. Emerging paradigms in the development of resistance to tyrosine kinase inhibitors in lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2013, 31(31):3987-3996.
- [6] Wheeler DL, Dunn EF, Harari PM. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2010, 7(9):493-507.
- [7] 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):958-967.
- [8] Tanaka T, Matsuoka M, Sutani A, et al. Frequency of and variables associated with the EGFR mutation and its subtypes[J]. Int J Cancer, 2010, 126(3):651-655.
- [9] Scott RC, Juh sz G, Neufeld TP. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death[J]. Curr Biol, 2007, 17(1):1-11.
- [10] Chen T, Stephens PA, Middleton FK, et al. Targeting the S and G2 checkpoint to treat cancer[J]. Drug Discov Today, 2012, 17(5/6):194-202.
- [11] 何沛敏, 童欣, 李冠武. EGFR 抑制剂耐药拮抗策略在非小细胞肺癌治疗中的进展[J]. 汕头大学学报:自然科学版, 2019, 34(2):62-70.
- [12] Sun Q, Fan W, Zhong Q, et al. Regulation of Beclin1 in autophagy[J]. Autophagy, 2009, 5(5):713-716.
- [13] Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(5):335-348.
- [14] Fung C, Chen X, Grandis JR, et al. EGFR tyrosine kinase inhibition induces autophagy in cancer cells[J]. Cancer Biol Ther, 2012, 13(14):1417-1424.
- [15] Han W, Pan H, Chen Y, et al. EGFR tyrosine kinase inhibitors activate autophagy as a cytoprotective response in human lung cancer cells[J]. PLoS One, 2011, 6(6):e18691.
- [16] Tang Z, Hu B, Zang F, et al. Nrf2 drives oxidative stress-induced autophagy in nucleus pulposus cells via a Keap1/Nrf2/p62 feedback loop to protect intervertebral disc from degeneration [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(7):510.
- [17] 叶侠栋, 吴凤英, 任涛. 非小细胞肺癌 EGFR-TKI 耐药后的治疗策略[J]. 实用肿瘤杂志, 2017, 32(3):204-207.