

新型TK抑制剂达克替尼在肺腺癌细胞增殖和凋亡的影响

郭李玲¹, 毛俊²

¹甘肃医学院附属医院全科医学科, 甘肃 平凉

²甘肃医学院基础医学院生物化学与分子生物学, 甘肃 平凉

Email: guorabbit@sina.com

收稿日期: 2021年7月5日; 录用日期: 2021年7月19日; 发布日期: 2021年8月16日

摘要

目的: 探究新型TK抑制剂达克替尼对人肺腺癌A549细胞增殖与侵袭作用及机制。方法: 人肺腺癌A549细胞为研究对象, 根据预实验结果, 将人肺腺癌细胞系A549分成3组, 即空白对照组, 低剂量组和高剂量组。RT-PCR检测EFGR和凋亡蛋白Caspase-3和Caspase-9的表达, 流式细胞仪检测细胞的分裂周期和细胞凋亡率, CCK-8检测细胞的增殖。结果: 空白对照组, 低剂量组和高剂量组的EFGR, Caspase-3和Caspase-9 mRNA相对表达量相对量比较具有统计学差异($P < 0.05$); 空白对照组的EFGR mRNA相对表达量相对量要明显高于低剂量组和高剂量组($P < 0.05$), 空白对照组的Caspase-3和Caspase-9 mRNA相对表达量要明显低于低剂量组和高剂量组($P < 0.05$), 低剂量组和高剂量组的EFGR, Caspase-3和Caspase-9 mRNA相对表达量相对量比较无统计学差异($P > 0.05$)。低剂量组和高剂量组的G0/G1期比例明显高于空白对照组($P < 0.05$); S期和G2期比例明显低于空白对照组($P < 0.05$)。低剂量组和高剂量组的总凋亡率明显高于空白对照组($P < 0.05$); 高剂量组晚期凋亡率明显高于低剂量组($P < 0.05$)。药物处理2天后, 空白对照组的细胞增值率要明显高于低剂量组和高剂量组($P < 0.05$); 药物处理3天后, 空白对照组的细胞增值率要明显高于低剂量组和高剂量组($P < 0.05$)。结论: 低剂量达克替尼可以抑制肺腺癌细胞的增殖, 促进肺腺癌细胞的凋亡, 并且可以抑制EFGR的表达, 可以作为耐药性肺腺癌的治疗方案。

关键词

达克替尼, 肺腺癌, 增殖, 凋亡

Effect of a Novel TK Inhibitor Dacomitinib on Proliferation and Apoptosis of Lung Adenocarcinoma Cells

Liling Guo¹, Jun Mao²

¹Department of General Medicine, The Affiliated Hospital of Gansu Medical College, Pingliang Gansu

²Department of the Biochemistry and Molecular Biology, College of the Basic Medicine, Gansu Medical College, Pingliang Gansu

Email: guorabbit@sina.com

Received: Jul. 5th, 2021; accepted: Jul. 19th, 2021; published: Aug. 16th, 2021

Abstract

Objective: The objective is to investigate the proliferation and invasion of human lung adenocarcinoma A549 cells induced by a novel TK inhibitor, dacomitinib, and its mechanism. **Methods:** Human lung adenocarcinoma cell line A549 was divided into three groups according to the preliminary results, namely the blank control group, the low-dose group and the high-dose group. The expression of EFGR and Caspase-3 and Caspase-9 was detected by RT-PCR. The cycle of cell division and apoptotic rate of the cell were detected by flow cytometry. The cell proliferation was detected by CCK-8. **Results:** The relative expressions of EFGR, caspase-3 and caspase-9 mRNA in blank control group, low-dose group and high-dose group were statistically different ($P < 0.05$). The relative expression of EFGR mRNA in the blank control group was significantly higher than that in the low-dose group and the high-dose group ($P < 0.05$). The relative expression of Caspase-3 and caspase-9 mRNA in the blank control group was significantly lower than that in the low-dose group and high-dose group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the relative expression of EFGR, caspase-3 and caspase-9 mRNA between the low-dose group and the high-dose group ($P > 0.05$). The proportions of G0/G1 phase in low-dose group and high-dose group were significantly higher than those in blank control group ($P < 0.05$), while the proportions of S phase and G2 phase were significantly lower than those in blank control group ($P < 0.05$). The total apoptotic rate of the low-dose group and the high-dose group significantly higher than that of the blank control group ($P < 0.05$), and the late apoptotic rate of the high-dose group was significantly higher than that of the low-dose group ($P < 0.05$). After 2 days of drug treatment, the cell increment rate of blank control group was significantly higher than that of low-dose group and high-dose group ($P < 0.05$); after 3 days of drug treatment, the cell increment rate of blank control group was significantly higher than that of low-dose group and high-dose group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Low-dose of dacomitinib can inhibit the proliferation of lung adenocarcinoma cells, promote the apoptosis of lung adenocarcinoma cells, and inhibit the expression of EFGR. It can be used as a therapeutic regimen for drug-resistant lung adenocarcinoma.

Keywords

Dacomitinib, Lung Adenocarcinoma, Proliferation, Apoptosis

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

肺癌是临床上的多发病,尤其是随着生活环境的改变,生活压力的激增,人们饮食习惯的改变,肺癌的发病率明显升高。据流行病学统计结果显示,全球每年新增的肺癌患者约几万例,多见于发展中国家[1] [2] [3]。目前对于肺癌患者的治疗,化疗方案是较为理想的治疗方案。有研究表明,表皮生长因子

受体酪氨酸激酶抑制剂(Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors, EGFR-TKIs)是比较有效的治疗方案之一, 比如吉非替尼等[4], 但是, 该类治疗方案也存在一定的问题, 比如药物耐药性的问题[5]。并且与表皮生长因子(EGFR)的表达量相关, 为了解决这个问题, 第二代 TKI 应运而生, 代表药物是达克替尼。有研究表明, 达克替尼可以抑制 EGFR 的表达, 从而达到抑制耐药性的作用[6]。但是, 关于达克替尼的细胞学实验较少, 因此, 本研究以人肺腺癌 A549 细胞为研究对象, 验证达克替尼的生物学行为, 以期新型 TK 抑制剂达克替尼治疗人肺腺癌提供理论依据。

2. 材料与方法

2.1. 肺腺癌细胞系 A549 的培养

细胞系购自北京索莱宝生物有限公司, 均经过 str 检测, 证明细胞没有被污染。

2.2. 实验分组

根据预实验结果, 将人肺腺癌细胞系 A549 分成 3 组, 即空白对照组, 低剂量组和高剂量组。低剂量组细胞给予 1 $\mu\text{mol/L}$ 的达克替尼进行处理 3 h; 高剂量组细胞给予 10 $\mu\text{mol/L}$ 的达克替尼进行处理 3 h; 空白对照组细胞给予等计量的 PBS 溶液进行对照处理。

2.3. 实时荧光定量 PCR 检测 Akt1、Caspase-3 和 Caspase-9 mRNA 的表达水平

收集上述 3 组细胞, 加入 1 mL Trizol 试剂, 充分混合后, 提取细胞总 RNA, 室温条件下根据逆转录试剂盒说明书, 将总 RNA 逆转录为 cDNA, -20°C 低温冰箱保存。然后根据荧光定量 PCR 试剂盒说明书, 加入 cDNA 和 USP-22 基因和 ERK5 的引物模板(如表 1 所示), 置于 Applied Biosystems PCR 仪进行反应, 设置条件按照说明书。统计并记录各样本 CT 值。

Table 1. The primer sequence of target gene

表 1. 目的基因的引物序列

引物名称	引物序列	引物长度	退火温度
EGFR	正义链 5'-ATGCGTGCGTGAATGCGTCATGA-3'	57 kb	56 $^{\circ}\text{C}$
	反义链 5'-GTGTGCGTGAACGTGCTGAATT-3'		
Caspase-3	正义链 5'-TTGATTGCGTGCAAGTCGTGTGAT-3'	32 kb	66 $^{\circ}\text{C}$
	反义链 5'-ATAATTGCTGACGTGCACGTGCTA-3'		
Caspase-9	正义链 5'-GTTGCGCACGTGCAACGTGGCCTG-3'	45 kb	64 $^{\circ}\text{C}$
	反义链 5'-TTTGCGCTGACTGCGTGTGCCCAAT-3'		
GAPDH	正义链 5'-GTTGCGCTGTGCTGACGTGCGTGGAC-3'	37 kb	59 $^{\circ}\text{C}$
	反义链 5'-AATTGCAACGTGCAACGTGCAATGGA-3'		

2.4. 细胞凋亡水平

利用流式细胞仪进行检测, 加入 AV-PI 试剂盒的混合制剂, 然后流式细胞仪上机测试, 验证细胞的凋亡水平。

2.5. 细胞增殖能力

利用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖能力, 加入 CCK-8 试剂盒的混合制剂, 利用酶标仪进行测定, 波

长为 450 nm。

2.6. 统计学方法

计数资料用 $\bar{X} \pm s$ 形式表示, SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 3 组的 RT-PCR 数据结果, 细胞增值率和细胞凋亡率比较采用单因素方差分析, 组间的比较采用 q 检验, 认为 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3. 结果

3.1. EFGR, Caspase-3 和 Caspase-9 的 mRNA 相对表达量

结果表明, 空白对照组, 低剂量组和高剂量组的 EFGR, Caspase-3 和 Caspase-9 的 mRNA 相对表达量比较具有统计学差异($F = 10.209, 9.892, 11.092; P < 0.05$); 其中低剂量组和高剂量组的 EFGR 的 mRNA 相对表达量要明显低于空白对照组($P < 0.05$), Caspase-3 和 Caspase-9 的 mRNA 相对表达量要明显高于空白对照组($P < 0.05$) (见图 1)。

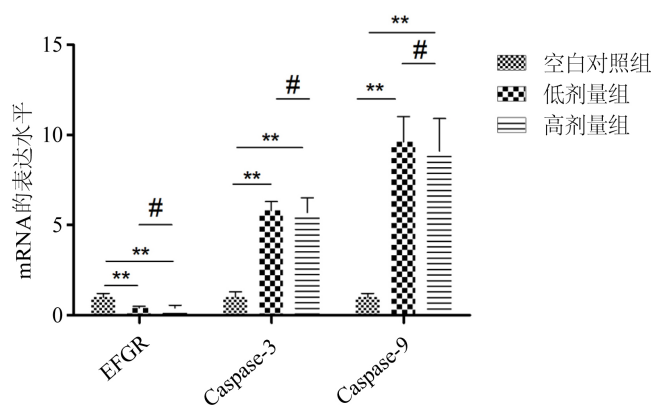


Figure 1. The relative mRNA expression of EFGR, caspase-3 and caspase-9. Note: ** indicates statistical difference ($P < 0.05$); # indicates no statistical difference ($P > 0.05$)

图 1. EFGR, Caspase-3 和 Caspase-9 的 mRNA 相对表达量。注: **表示具有统计学差异($P < 0.05$); #表示没有统计学差异($P > 0.05$)

3.2. 3 组细胞周期比较结果

结果表明, 低剂量组和高剂量组的 G0/G1 期比例明显高于空白对照组($P < 0.05$); S 期和 G2 期比例明显低于空白对照组($P < 0.05$) (见图 2)。

3.3. 3 组细胞凋亡率比较结果

结果表明, 低剂量组和高剂量组的总凋亡率明显高于空白对照组($P < 0.05$); 高剂量组晚期凋亡率明显高于低剂量组($P < 0.05$) (见图 3)。

3.4. 3 组细胞增殖率比较结果

结果显示, 药物处理 2 天后, 空白对照组的细胞增值率要明显高于低剂量组和高剂量组($q = 2.293, 2.775; P < 0.05$); 药物处理 3 天后, 空白对照组的细胞增值率要明显高于低剂量组和高剂量组($q = 2.887, 2.461; P < 0.05$) (见图 4)。

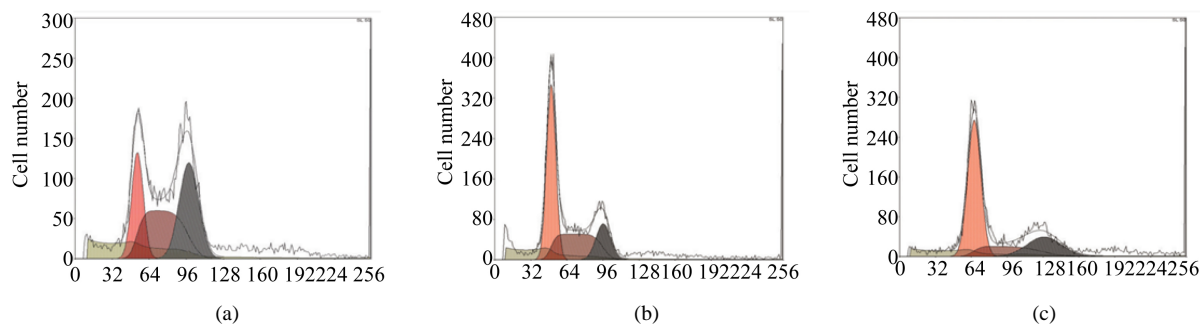


Figure 2. The comparison of cell cycle among three groups. (a) The blank control group; (b) The low-dose group; (c) The high-dose group

图 2. 3 组细胞周期比较结果。(A) 空白对照组; (B) 低剂量组; (C) 高剂量组

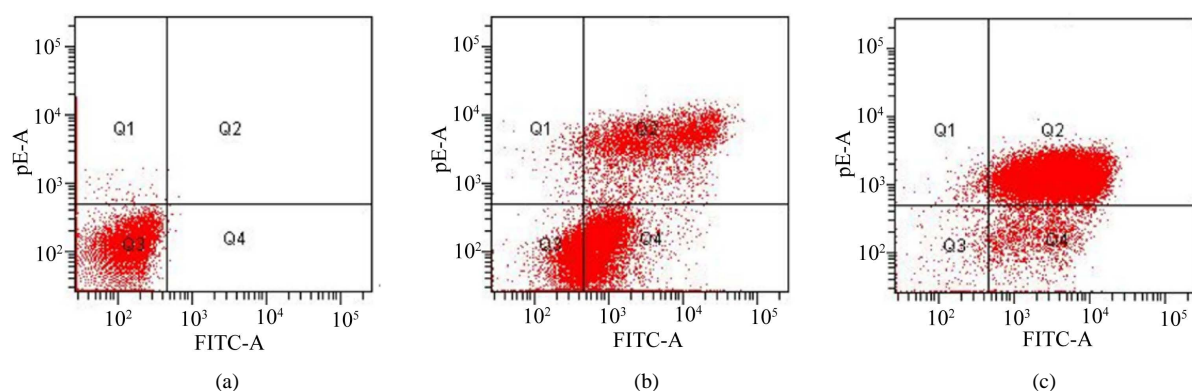


Figure 3. The comparison of apoptosis rate among three groups. (a) The blank control group; (b) The low-dose group; (c) The high-dose group

图 3. 3 组细胞凋亡率比较结果。(a) 空白对照组; (b) 低剂量组; (c) 高剂量组

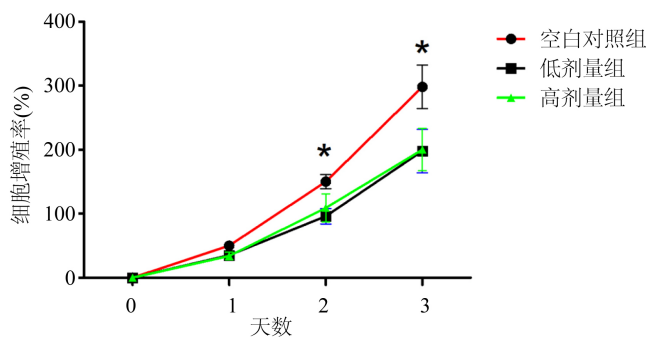


Figure 4. The comparison of proliferation rate among three groups. Note: * indicates statistical difference ($P < 0.05$)

图 4. 3 组细胞增殖率比较结果。注: *表示具有统计学差异($P < 0.05$)

4. 讨论

本研究结果表明, 根据预实验结果给予 1 $\mu\text{mol/L}$ 低剂量的达克替尼和 10 $\mu\text{mol/L}$ 高剂量的达克替尼两种浓度进行处理, 并且加入等量 PBS 溶液进行对比研究。RT-PCR 检测 EFGR 和凋亡蛋白 Caspase-3 和 Caspase-9 的表达。流式细胞仪检测细胞的分裂周期和细胞凋亡率, CCK-8 检测细胞的增殖。结果表明, 达克替尼处理人肺腺癌 A549 细胞, 可以明显降低 EFGR mRNA 相对表达量和蛋白表达量, 增加

Caspase-3 和 Caspase-9 mRNA 相对表达量和蛋白表达量。并且, 低剂量组和高剂量组的 G0/G1 期比例明显高于空白对照组($P < 0.05$); 低剂量组和高剂量组的总凋亡率明显高于空白对照组($P < 0.05$); 药物处理 3 天后, 空白对照组的细胞增值率要明显高于低剂量组和高剂量组($P < 0.05$)。说明, 达克替尼可以抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡。可以作为 EFGR 阳性的肺腺癌 A549 细胞的治疗药物。

对于肺腺癌患者而言, 尤其是晚期肺腺癌, 表皮生长因子受体(Epidermal Growth Factor Receptor, EFGR)突变是其耐药性的主要特点[7] [8] [9]。周玮玮等人[10]利用量子点(QDs)荧光探针检测人肺腺癌组织, 结果表明, 晚期肺腺癌组织可见 EFGR 的高表达。史张等人[11]对 581 例肺腺癌患者进行检测, 可见 132 例 EFGR 的高突变, 结果表明, EFGR 的高突变与肺腺癌的增殖和侵袭有关。本研究在前人的基础上, 利用第二代表表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors, EGFR-TKIs)达克替尼进行治疗, 结果表明, 达克替尼可以抑制 EFGR 的 mRNA 相对表达水平和蛋白表达水平, 说明达克替尼可以抑制 EFGR 的表达。

既往研究表明, Caspase-3 和 Caspase-9 是与细胞凋亡密切相关, 因此, 也有学者称他们为“凋亡相关蛋白”, 将 Caspase-3 和 Caspase-9 作为细胞凋亡的指示分子[12] [13] [14]。本研究以 Caspase-3 作为凋亡的靶点, 结果表明, 达克替尼可以促进 Caspase-3 的 mRNA 相对表达水平和蛋白表达水平, 说明达克替尼可以促进肺腺癌细胞的凋亡。另外, 本研究利用 CCK-8 试剂盒检测细胞的增殖, 结果表明, 药物处理 2 天后, 空白对照组的细胞增值率要明显高于低剂量组和高剂量组($P < 0.05$); 药物处理 3 天后, 空白对照组的细胞增值率要明显高于低剂量组和高剂量组($P < 0.05$)。结果说明, 达克替尼可以抑制肺腺癌细胞的增殖。并且与达克替尼的剂量无关。

综上所述, 低剂量达克替尼可以抑制肺腺癌细胞的增殖, 促进肺腺癌细胞的凋亡, 并且可以抑制 EFGR 的表达, 可以作为耐药性肺腺癌的治疗方案。

参考文献

- [1] Jordan, E.J., Kim, H.R., Arcila, M.E., *et al.* (2017) Prospective Comprehensive Molecular Characterization of Lung Adenocarcinomas for Efficient Patient Matching to Approved and Emerging Therapies. *Cancer Discovery*, **7**, 15 p. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-1337>
- [2] Velcheti, V., Hida, T., Reckamp, K.L., *et al.* (2017) Phase 2 Study of Lenvatinib in Patients with RET Fusion-Positive Adenocarcinoma of the Lung. *European Journal of Cancer*, **72**, S178. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(17\)30651-2](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(17)30651-2)
- [3] Feng, M., Zhu, J., Liang, L., *et al.* (2017) Diagnostic Value of Tumor Markers for Lung Adenocarcinoma-Associated Malignant Pleural Effusion: A Validation Study and Meta-Analysis. *International Journal of Clinical Oncology*, **22**, 283-290. <https://doi.org/10.1007/s10147-016-1073-y>
- [4] Ono, A., Kenmotsu, H., Watanabe, M., *et al.* (2014) Mutant Allele Frequency Predicts the Efficacy of EGFR-TKIs in Lung Adenocarcinoma Harboring the L858R Mutation. *Annals of Oncology*, **25**, 1948-1953. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu251>
- [5] Kim, I.A., Lee, J.S., Kim, H.J., *et al.* (2018) Cumulative Smoking Dose Affects the Clinical Outcomes of EGFR-Mutated Lung Adenocarcinoma Patients Treated with EGFR-TKIs: A Retrospective Study. *BMC Cancer*, **18**, Article No. 768. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4691-0>
- [6] Zhou, F., Ma, W., Li, W., *et al.* (2018) Thick-Wall Cavity Predicts Worse Progression-Free Survival in Lung Adenocarcinoma Treated with First-Line EGFR-TKIs. *BMC Cancer*, **18**, Article No. 1033. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4938-9>
- [7] Chen, H., Yang, X., Liu, H., *et al.* (2017) Correlation between Serum Tumor Markers and Efficacy of First-Line EGFR-TKIs in Patients with Advanced Lung Adenocarcinoma. *Chinese Journal of Lung Cancer*, **1**, 76-87.
- [8] Ma, X., Zhu, H., Guo, H., *et al.* (2016) Risk Factors of Brain Metastasis during the Course of EGFR-TKIs Therapy for Patients with EGFR-Mutated Advanced Lung Adenocarcinoma. *Oncotarget*, **7**, 81906-81917. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11918>
- [9] Ming-Szu, H., Jr-Hau, L., Lin, Y.C., *et al.* (2016) The Content of Mutant EGFR DNA Correlates with Response to

EGFR-TKIs in Lung Adenocarcinoma Patients with Common EGFR Mutations. *Medicine*, **95**, e3991.

<https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003991>

- [10] 周玮玮, 王磊, 苗玉, 等. 量子点荧光探针检测肺腺癌组织中 EGFR 的表达[J]. 标记免疫分析与临床, 2018, 25(5): 736-739.
- [11] 史张, 宋长恩, 施睿峰, 等. 肺腺癌 CT 及临床特征与 EGFR 19 号外显子突变的相关性研究[J]. 临床放射学杂志, 2017, 36(4): 490-494.
- [12] Bose, T.O., Pham, Q.M., Jellison, E.R., *et al.* (2013) CD11a Regulates Effector CD8 T Cell Differentiation and Central Memory Development in Response to Infection with *Listeria Monocytogenes*. *Infection and Immunity*, **81**, 1140-1151. <https://doi.org/10.1128/IAI.00749-12>
- [13] Tai, W., Chen, Z. and Cheng, K. (2013) Expression Profile and Functional Activity of Peptide Transporters in Prostate Cancer Cells. *Molecular Pharmaceutics*, **10**, 477-487. <https://doi.org/10.1021/mp300364k>
- [14] Ferrone, S. and Marincola, F.M. (1995) Loss of HLA Class I Antigens by Melanoma Cells: Molecular Mechanisms, Functional Significance and Clinical Relevance. *Immunology Today*, **16**, 487-494. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80033-6](https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)80033-6)