

## · 基础研究 ·

## 南方红豆杉水提物抑制 T790M 突变及 c-MET 扩增导致的吉非替尼耐药体外研究

张郅晨茜<sup>1</sup> 杨兴辉<sup>1</sup> 舒琦瑾<sup>2</sup>

**摘要** 目的 研究南方红豆杉水提物抑制 T790M 突变及 c-MET 扩增所致吉非替尼耐药机制。方法 应用 MTT 法检测不同浓度南方红豆杉水提物 (0.25、0.5、1、2、4 mg/mL) 和吉非替尼 (3、6、12、18、30  $\mu\text{mol/L}$ ) 对 H1975、H820 细胞株增殖的影响,根据结果筛选最佳后续实验药物浓度,计算各组半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 和两药联合指数 (CI); 将对照组 (1640 培养液)、南方红豆杉组 (0.25  $\mu\text{mol/L}$ )、吉非替尼组 (3  $\mu\text{mol/L}$ ) 及联合组 (南方红豆杉 0.25  $\mu\text{mol/L}$  + 吉非替尼 3  $\mu\text{mol/L}$ ) H1975 和 H820 细胞药物处理 72 h 后,采用 Western Blot 检测 EGFR、p-EGFR、AKT、p-AKT 及 PI3K 蛋白表达,采用 qRT-PCR 检测 EGFR、PI3K 及 AKT mRNA 表达。结果 在 H1975 和 H820 细胞中联合组达到  $\text{IC}_{50}$  所需的吉非替尼浓度明显小于吉非替尼组,且  $\text{CI} < 1$ 。在 H1975 细胞中,与对照组比较,南方红豆杉组 EGFR、p-EGFR、PI3K 及 p-AKT 蛋白表达降低 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),吉非替尼组 AKT 蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ ),联合组 EGFR、p-EGFR、AKT、p-AKT 及 PI3K 蛋白表达降低 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。与吉非替尼组比较,南方红豆杉组 EGFR、p-EGFR、p-AKT 蛋白表达降低 ( $P < 0.01$ ),联合组 EGFR、p-EGFR、PI3K 及 p-AKT 蛋白表达降低 ( $P < 0.01$ )。在 H820 细胞中,与对照组比较,南方红豆杉组 EGFR、PI3K、p-AKT 蛋白表达下调 ( $P < 0.01$ ),联合组 p-EGFR、PI3K、p-AKT 蛋白表达降低 ( $P < 0.01$ )。与吉非替尼组比较,南方红豆杉组 EGFR、p-AKT 蛋白表达降低 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),联合组 p-EGFR、PI3K、p-AKT 蛋白表达降低 ( $P < 0.01$ )。在 H1975 及 H820 细胞中,与对照组比较,吉非替尼组 AKT 及 PI3K mRNA 表达降低 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),南方红豆杉组及联合组 EGFR、AKT 及 PI3K mRNA 表达降低 ( $P < 0.01$ )。与吉非替尼组比较,联合组 EGFR、AKT 及 PI3K mRNA 表达降低 ( $P < 0.01$ )。结论 南方红豆杉水提物能增强吉非替尼对 H1975、H820 细胞增殖抑制作用,可抑制 T790M 突变和 c-MET 扩增所致的吉非替尼耐药,其机制与抑制 EGFR/PI3K/AKT 通路有关。

**关键词** 南方红豆杉; 吉非替尼; T790M 突变; c-MET 基因扩增; 耐药机制

**Aqueous Extract of *Taxus Chinensis* var. *Mairei* Inhibits Gefitinib Resistance Induced by T790M Mutation and c-MET Amplification *In Vitro*** ZHANG Gao-chen-xi<sup>1</sup>, YANG Xing-hui<sup>1</sup>, and SHU Qi-jin<sup>2</sup>  
1 First College of Clinical Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310053); 2 Department of Oncology, First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310006)

**ABSTRACT Objective** To explore the mechanism that aqueous extract *Taxus chinensis* var. *mairei* (AETC) inhibits gefitinib resistance which was caused by T790M gene mutation and c-MET gene amplification. **Methods** The inhibitory effect of AETC (0.25, 0.5, 1, 2, 4 mg/mL) and gefitinib (3, 6, 12, 18, 30  $\mu\text{mol/L}$ ) against H1975 and H820 cell lines was detected by MTT assay. On the basis of MTT results, the best concentration of follow-up experimental drugs was screened, the 50% inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) and the combined index (CI) were calculated. H1975 and H820 cell were divided to four groups, i.e. control group (H1640 Culture medium), AECT group (0.25  $\mu\text{mol/L}$ ), gefitinib group (3  $\mu\text{mol/L}$ ) and combination group (AECT 0.25  $\mu\text{mol/L}$  + gefitinib 3  $\mu\text{mol/L}$ ). After 72 hours of intervention, Western Blot and qRT-PCR

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81173247)

作者单位: 1. 浙江中医药大学第一临床医学院 (杭州 310053); 2. 浙江中医药大学附属第一医院肿瘤科 (杭州 310006)

通讯作者: 舒琦瑾, Tel: 0571-87072196, E-mail: shuqijh@163.com.cn

DOI: 10.7661/j.cjim.20190626.022

were used to determine the protein and mRNA expression of EGFR and its downstream pathways of each group. **Results** In H1975 and H820 cells, the concentration of gefitinib required for  $IC_{50}$  in the combination group was significantly lower than that in the gefitinib group, and the CI value was less than 1. In H1975 cells, compared with the control group, the expression of EGFR, p-EGFR, PI3K and p-AKT in AETC group decreased ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), the expression of AKT in gefitinib group decreased ( $P < 0.05$ ), and the expression of EGFR, p-EGFR, AKT, p-AKT and PI3K in combination group decreased ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ). Compared with gefitinib group, the expressions of EGFR, p-EGFR and p-AKT in AETC group decreased ( $P < 0.01$ ), while the expression of EGFR, p-EGFR, PI3K and p-AKT in combination group decreased ( $P < 0.01$ ). In H820 cells, compared with the control group, the expression of EGFR, PI3K and p-AKT protein was down-regulated in AETC group ( $P < 0.01$ ), while the expression of p-EGFR, PI3K and p-AKT protein was down-regulated in combination group ( $P < 0.01$ ). Compared with gefitinib group, the expression of EGFR and p-AKT protein in AETC group decreased ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), while the expression of p-EGFR, PI3K and p-AKT protein in combination group decreased ( $P < 0.01$ ). In H1975 and H820 cells, the expression of AKT and PI3K mRNA in gefitinib group was lower than that in control group ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), while the expression of EGFR, AKT and PI3K mRNA in AETC group and combination group was lower than that in control group ( $P < 0.01$ ). Compared with gefitinib group, the expression of EGFR, AKT and PI3K mRNA in combined group was decreased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** AETC can enhance the inhibitory effect of gefitinib on the proliferation of H1975 and H820 cells and inhibit the gefitinib resistance induced by T790M mutation and c-MET amplification through controlling EGFR/PI3K/AKT pathway.

**KEYWORDS** *Taxus chinensis* var. *mairei*; gefitinib; T790M mutation; c-MET gene over-expression; resistance mechanism

肺癌是世界范围内常见的恶性肿瘤之一,发病率逐年增长,死亡率位居所有癌症之首<sup>[1,2]</sup>。其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占肺癌总数的 85%,其 5 年生存率仅为 15%~16%,大部分患者发现时已是中晚期,失去手术机会<sup>[3,4]</sup>。表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor tyrosine-kinase inhibitor, EGFR-TKI)是一种新兴的 NSCLC 治疗药物,具有高效、不良反应少的特点,是目前晚期 EGFR 突变 NSCLC 患者的一线治疗方案<sup>[5]</sup>,但是应用中发现继发性耐药不可避免,数据显示耐药一般在 8~10 个月出现<sup>[6]</sup>。笔者前期实验研究证明南方红豆杉水提取物(aqueous extract *Taxus chinensis* var. *mairei*, AETC)能增强厄洛替尼对肿瘤细胞的抑制作用<sup>[7]</sup>,在此基础上,本研究通过探究 AETC 抑制 T790M 突变及 c-MET 扩增所致吉非替尼耐药的分子机制,以期延长靶向药物临床使用时间,为中西医联合治疗 NSCLC 提供实验数据。

## 材料与方法

1 细胞 人肺腺癌 H1975 细胞株(EGFR exon 20 T790M-L858R, 吉非替尼耐药细胞株):同济大学附属上海肺科医院周彩存教授惠赠。H820 细胞株(c-MET 基因扩增, 吉非替尼耐药细胞株)购自上海众

华生物科技有限公司,货号:ZH1072。

2 药物 南方红豆杉饮片购自宁波泰康红豆杉生物工程有限公司(生产批号:100513),并委托该公司进行质检,结果显示南方红豆杉符合质量检验标准。吉非替尼标准品:100 mg/支,天津彬馨博澳科技发展有限公司,货号:S1025。

2.1 南方红豆杉母液制备方法 参照参考文献[8]将 100 g 南方红豆杉置于医用不锈钢锅浸泡过夜,加 8 倍水煮沸 30 min,倒出药液,加 8 倍水煮沸 20 min,再加 5 倍水煮沸 20 min。将 3 次药液经真空抽滤器过滤,置于电磁炉上浓缩至约 100 mL,置于旋转蒸发仪 80 ℃水浴浓缩至约 50 mL,入真空干燥箱中干燥,得浸膏 13.02 g,按 100%浓度计算得率为 13.02%。用消毒刮刀刮下,药品呈粉末状。取 200 mg AETC,加入 10 mL 超纯水,溶解后,经高速冷冻离心机 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,经 0.22 μm 微孔滤膜除菌,制成母液浓度 20 mg/mL,置 -20 ℃冰箱备用。

2.2 吉非替尼母液制备方法 参照药物说明书,取 44.7 mg 吉非替尼标准品粉末溶于 2 mL DMSO 中,置于超声波仪 37 ℃水浴 30 min,使其完全溶解。稀释 100 倍后,用 DMSO 定容至 10 mL,使吉非替尼浓度为 0.5 mmol/L, -20 ℃保存。实验时用培养液稀

释至所需浓度。

3 试剂及仪器 Western Blot 抗体:  $\beta$ -actin (No.DW9562) 购自杭州达文生物有限公司; PI3K (No.AF6241)、AKT (No.AF6261) 购自美国 Affinity Bioscience 公司; p-AKT (No.4060S)、EGFR (No.4267S)、p-EGFR (No.3777S) 购自美国 Cell Signaling 公司; 羊抗鼠 (No. WD-0990)、羊抗兔 (No. WD-GAR007) 二抗购自杭州达文生物有限公司; qRT-PCR 试剂 (No.RN002) 购自奕杉生物科技有限公司。MP4 + ChemidocXRS 型蛋白印记检测系统 (美国 Bio-Rad 公司); 3111 型水套式  $\text{CO}_2$  细胞培养箱 (美国 Thermo 公司); ABI7500 全自动荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); 细胞培养瓶、培养皿、96 孔板 (美国 Corning 公司); NanoDrop1000 紫外分光光度计 (美国 Thermo 公司); Western Blot 套装设备 (美国 Bio-Rad 公司)。

4 细胞培养 人肺腺癌 H1975 及 H820 细胞株在含 10% 胎牛血清的 1640 培养液中培养, 培养箱保持在 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^{\circ}\text{C}$ 、饱和湿度条件下, 根据细胞生长状态, 1~2 天换液 1 次, 3~4 天传代 1 次, 取对数生长期细胞进行实验。

5 MTT 法检测细胞株增殖 收集对数期生长的细胞, 调整细胞悬液浓度约  $5 \times 10^4/\text{mL}$ , 接种于 96 孔板, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$ 。于 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^{\circ}\text{C}$  的培养箱中培养 24 h, 至细胞单层铺满孔底。分为 4 组: (1) AETC 组: 用不同浓度的 AETC (0.25、0.5、1、2、4 mg/mL)<sup>[9]</sup> 干预; (2) 吉非替尼组: 用不同浓度的吉非替尼 (3、6、12、18、30  $\mu\text{mol/L}$ ) 干预; (3) 联合组: 选取 0.25 mg/mL (低细胞毒性,  $<1/10 \text{ IC}_{50}$ )<sup>[10]</sup> AETC+3、6、12、18、30  $\mu\text{mol/L}$  吉非替尼进行干预; (4) 对照组: 加入 1640 培养液每孔均加入 100  $\mu\text{L}$ 。每个浓度设置 5 个复孔, 培养箱中培养 72 h。取出培养板, 每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTT 溶液 (5 mg/mL, 即 0.5% MTT), 在培养箱中继续培养 4 h, 2 000 r/min 离心, 弃去 96 孔板培养液。每孔加入 100  $\mu\text{L}$  DMSO, 置摇床上低速振荡 15 min, 使结晶物充分溶解。在酶标仪 490 nm 波长处测量各孔的吸光值 (OD 值)。肿瘤细胞生长抑制率 (inhibition ratio, IR),  $\text{IR}(\%) = (1 - \text{药物组 OD 值} / \text{对照组 OD 值}) \times 100\%$ 。实验重复 3 次。

6 两药合用指数计算 计算两药合用指数 (combination index, CI),  $\text{CI} = D_1/Dx_1 + D_2/Dx_2 + aD_1D_2/(Dx_1Dx_2)$ ; 其中  $Dx_1$  和  $Dx_2$  为 2 种药物单独使用时到达效应值 (fraction of system affected by drug, fa) 即抑制率水平时的浓度,  $D_1$  和  $D_2$  则是 2 种

药物联合时到达相同效应值时所需要的浓度。当 2 种药物彼此不抵抗时,  $a = 1$ ; 当 2 种药物彼此抵抗时,  $a = 0$ 。如果  $\text{CI} < 1$ , 认为两药物联用为协同作用; 如果  $\text{CI} = 1$ , 认为两药联用为相加作用; 如果  $\text{CI} > 1$ , 则认为两药联用为拮抗作用。计算半数抑制浓度 (50% inhibitory concentration,  $\text{IC}_{50}$ ), 即凋亡细胞与全部细胞数之比为 50% 时所对应的浓度。

7 Western Blot 检测 EGFR、p-EGFR、AKT、p-AKT 及 PI3K 蛋白表达 取对数生长期的肺腺癌 H1975 及 H820 细胞, 分为对照组、AETC 组、吉非替尼组和联合组, 实验组药物浓度根据 MTT 结果设定, 分别予以 1640 培养液、AETC (0.25 mg/mL)、吉非替尼 (3  $\mu\text{mol/L}$ ) 及 AETC 联合吉非替尼干预 (AETC 0.25 mg/mL + 吉非替尼 3  $\mu\text{mol/L}$ ), 培养 24 h 后刮取并收集培养瓶细胞, 用裂解液提取蛋白, 测量蛋白浓度, 计算上样量, 根据内参蛋白  $\beta$ -actin 调整上样量, 保证每样品孔蛋白量一致, 电泳后转膜 250 mA、2 h, 将蛋白转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1~2 h, 根据蛋白分子量切割 PADF 膜, 置入相应一抗 (抗体稀释浓度为 1:1 000, EGFR、p-EGFR、AKT、p-AKT、PI3K 及  $\beta$ -actin), 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 洗膜后置入二抗 (抗体稀释浓度为 1:1 000,  $\beta$ -actin 选羊抗鼠, 其余蛋白选羊抗兔), 室温孵育 2 h, 蛋白印记检测仪中曝光, 比较各组灰度值, 实验重复 3 次。

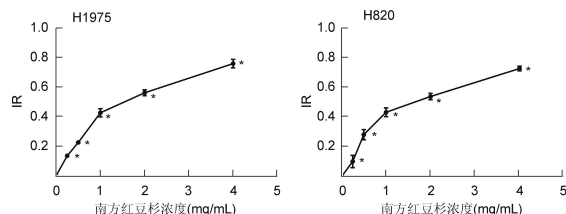
8 qRT-PCR 检测 EGFR、PI3K 及 AKT mRNA 表达 收集对数期生长的细胞, 以 10% 胎牛血清的培养液稀释药物, 调整细胞悬液浓度至约  $5 \times 10^4/\text{mL}$ , 取 8 mL 接种于培养瓶, 实验组药物根据前期实验结果和 MTT 结果设定, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的细胞培养箱内培养 48 h。用 Trizol-离心柱法提取细胞总 RNA, 取 1~2  $\mu\text{L}$  溶解后的 RNA 用紫外分光光度计测定 RNA 浓度, 确定 RNA 的纯度及浓度,  $A_{260}/A_{280}$  为 1.8~2.0。根据说明书调整逆转录反应体系与溶解曲线, 以 GAPDH 为内参, 进行逆转录实验。荧光定量结果采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  方法分析, 统计相对表达量的差值, 实验重复 3 次。

9 统计学方法 所有数据输入计算机, 用 SPSS 21.0 统计软件分析处理。计量资料数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间两两比较采用 One-Way ANOVA, 两组间均数比较采用独立样本  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1 AETC 对细胞 IR 的影响 (图 2) 不同浓度 AETC (0.25、0.5、1、2、4 mg/mL) 分别作用于 H1975 和

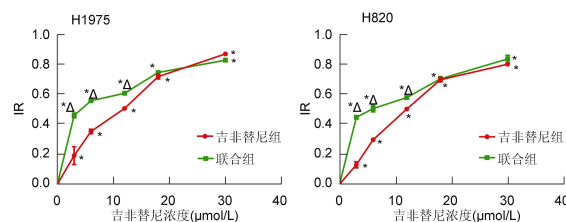
H820 细胞 72 h 后,对两细胞均有明显的抑制作用,呈剂量-效应关系。与对照组比较,H1975 细胞及 H820 细胞 IR 均升高 ( $P<0.01$ )。H1975 细胞  $IC_{50}$  为 1.508 mg/mL, H820 细胞  $IC_{50}$  为 1.514 mg/mL。



注:与对照组比较, \*  $P<0.01$

图 1 AETC 对 H1975 及 H820 细胞 IR 的影响

2 吉非替尼组及联合组 H1975、H820 细胞 IR 比较(图 3) 当吉非替尼浓度为 3、6、12  $\mu\text{mol/L}$  时,与吉非替尼组比较,联合组 H1975、H820 IR 升高 ( $P<0.01$ )。当吉非替尼浓度  $>18 \mu\text{mol/L}$  时,两组 IR 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。



注:与对照组比较, \*  $P<0.01$ ;与吉非替尼组比较,  $\Delta P<0.01$

图 2 吉非替尼组及联合组 H1975、H820 细胞 IR 比较

3 各组 H1975 和 H820 细胞株  $IC_{50}$  及 CI 比较(表 1) 与吉非替尼组比较,联合组  $IC_{50}$  降低 ( $P<0.01$ )。AETC 和吉非替尼 CI 均  $<1$ 。

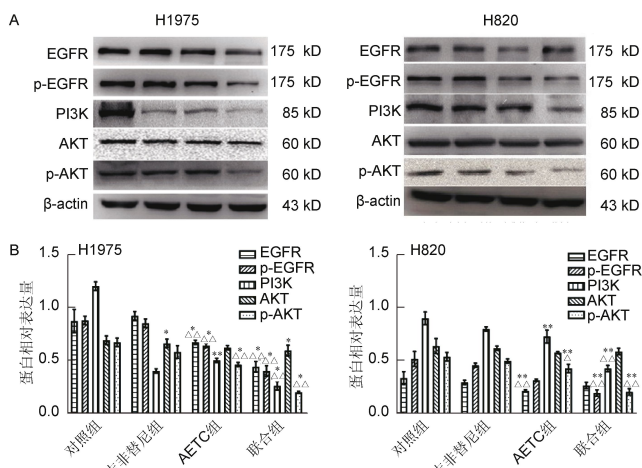
表 1 各组 H1975 和 H820 细胞株  $IC_{50}$  和 CI 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | n | H1975              |       | H820               |       |
|------|---|--------------------|-------|--------------------|-------|
|      |   | $IC_{50}$          | CI    | $IC_{50}$          | CI    |
| AETC | 5 | 1.508 $\pm$ 0.159  | 0.614 | 1.514 $\pm$ 0.184  | 0.683 |
| 吉非替尼 | 5 | 11.477 $\pm$ 1.424 |       | 11.534 $\pm$ 0.294 |       |
| 联合   | 5 | 4.415 $\pm$ 0.245* |       | 5.130 $\pm$ 0.603* |       |

注:与吉非替尼组比较, \*  $P<0.01$

4 各组 EGFR、p-EGFR、AKT、p-AKT、PI3K 蛋白表达比较(图 4) 在 H1975 细胞中,与对照组比较,AETC 组 EGFR、p-EGFR、PI3K 及 p-AKT 蛋白表达下调 ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ),吉非替尼组 AKT 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ ),联合组 EGFR、p-EGFR、AKT、p-AKT 及 PI3K 蛋白表达降低 ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ )。与吉非替尼组比较,AETC 组 EGFR、p-EGFR、p-AKT 蛋白表达降

低 ( $P<0.01$ ),联合组 EGFR、p-EGFR、PI3K 及 p-AKT 蛋白表达降低 ( $P<0.01$ )。在 H820 细胞中,与对照组比较,AETC 组 EGFR、PI3K、p-AKT 蛋白表达下调 ( $P<0.01$ ),联合组 p-EGFR、PI3K、p-AKT 蛋白表达降低 ( $P<0.01$ )。与吉非替尼组比较,AETC 组 EGFR、p-AKT 蛋白表达降低 ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ),联合组 p-EGFR、PI3K、p-AKT 蛋白表达降低 ( $P<0.01$ )。

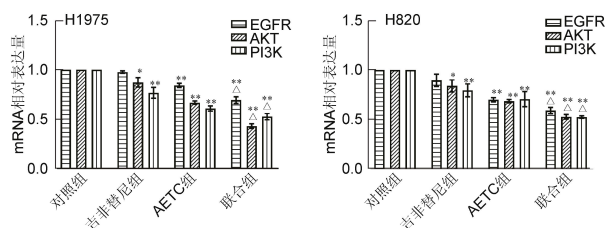


注: A 为蛋白表达印记; B 为各组蛋白表达定量比较;与对照组比较,

\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ ;与吉非替尼组比较,  $\Delta P<0.05$ ,  $\Delta\Delta P<0.01$

图 3 各组 EGFR、p-EGFR、AKT、p-AKT、PI3K 蛋白表达比较

5 各组 EGFR、AKT 及 PI3K mRNA 表达比较(图 4) 在 H1975 及 H820 细胞中,与对照组比较,吉非替尼组 AKT 及 PI3K mRNA 表达降低 ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ),AETC 组及联合组 EGFR、AKT 及 PI3K mRNA 表达降低 ( $P<0.01$ )。与吉非替尼组比较,联合组 EGFR、AKT 及 PI3K mRNA 表达降低 ( $P<0.01$ )。



注:与对照组比较, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ ;与吉非替尼组比较,  $\Delta P<0.01$

图 4 各组 EGFR、AKT 及 PI3K mRNA 表达比较

## 讨论

红豆杉作为传统中药材,在我国历史上流传已久,应用广泛,古称“血榧”、“赤杉”、“红豆树”等。目前对红豆杉药性理论等研究和考证尚不完善,《钦定授时

通考》记载“味甘,平涩,无毒,治五痔,去三虫,轻身明目”<sup>[11]</sup>,李良松等<sup>[12]</sup>通过整理史料,提出了红豆杉味甘、微苦,性平,入肺、胃、大肠经,功效为解毒散积、活络止痛、利水消肿、化食驱虫。

南方红豆杉作为红豆杉的一种,为国家一级重点保护珍稀抗癌植物,被称为“活化石”,与恐龙同期存在于地球并留存至今。如今,浙江省作为南方红豆杉的主要生长区,已有大量的南方红豆杉种植基地,其中新昌、宁波苗场已形成产业,社会经济效益佳<sup>[13]</sup>。目前已在浙江省中医院应用多年,疗效佳、未见明显副作用,广受患者好评。

前期实验研究证明 AETC 能增强紫杉醇和厄洛替尼对人肺腺癌细胞的增殖抑制,疗效呈相加效果,说明 AETC 能增强抗肿瘤药物对人肺腺癌细胞的抑制作用<sup>[7,14]</sup>。因此,笔者推断 AETC 能增强吉非替尼对耐药细胞株增殖的抑制作用。本研究选取的 H1975 和 H820 细胞株均是吉非替尼耐药细胞株,前者包含 T790M 突变,后者包含 MET 基因扩增。

第一代 EGFR-TKIs 获得性耐药的机制主要包括二次耐药突变(20 外显子 T790M 突变)、旁路激活(MET 及 HER2 扩增)、组织学转化等<sup>[15,16]</sup>,其中 T790M 突变占 50%~60%<sup>[17,18]</sup>,c-MET 基因扩增、突变等占 5%~22%<sup>[19,20]</sup>,两者为第一代 EGFR-TKIs 获得性耐药的主要机制。

T790M 突变是 EGFR20 号外显子发生了 T790M 突变,即酪氨酸激酶活化区域的苏氨酸残基被蛋氨酸取代,且此突变发生在开始治疗与产生耐药的时间段内。该突变使 EGFR 基因激酶域重新与 ATP 结合,减少与吉非替尼和厄洛替尼的亲和力,顺利激活下游 PI3K/AKT/mTOR 等信号通路,从而引发耐药<sup>[21]</sup>。针对 T790M 突变,目前开发了二代靶向药阿法替尼和三代靶向药奥希替尼(AZD9291),前者有研究显示其对总生存期(overall survival, OS)较吉非替尼无明显改善<sup>[17]</sup>,后者存在副作用较大、价格昂贵、出现再次耐药<sup>[22]</sup>的缺点。

MET 基因是一个原癌基因,类似于 EGFR 的跨膜 TKI 受体,位于 HGF 基因下游,其蛋白产物 MET 是肝细胞生长因子/离散因子(hepatocyte growth factor/scatter factor, HGF/SF)的受体,具有酪氨酸激酶活性。临床证据表明,c-MET 既可以作为肺癌的原发致癌驱动基因,也是 EGFR-TKIs 治疗发生获得性耐药的原因之一<sup>[23]</sup>。该基因扩增、突变可以激活 PI3K/AKT 和 MAPK 信号通路从而绕过被靶向抑制的 EGFR 基因激活下游信号通路造成耐药,促进肿瘤细胞

增殖<sup>[23,24]</sup>。Shi P 等<sup>[25]</sup>研究发现联用 EGFR-TKIs 与 MET 抑制剂能更好地抑制肿瘤细胞增殖。Yang H 等<sup>[26]</sup>研究发现在使用 MET 抑制剂或 MET 敲除后,患者对吉非替尼的敏感性得以恢复,提示 MET 扩增是造成肿瘤耐药的重要原因之一。但目前 c-MET 抑制剂价格昂贵,不良反应较多,应用局限,因此研发高效、低毒、经济的 c-MET 抑制剂迫在眉睫。

本研究发现不同浓度的 AETC 对 H1975 和 H820 细胞具有抑制作用,随着浓度增加,对细胞生长的抑制作用不断增强。在吉非替尼浓度<18  $\mu\text{mol/L}$  时,联合组对 H1975 和 H820 细胞株的增殖抑制作用明显增强( $P<0.05$ ),并且联合组达到  $\text{IC}_{50}$  时所需的吉非替尼浓度明显降低,CI 值<1。综上,AETC 能增强吉非替尼对耐药细胞株的增殖抑制,两药具有协同作用。

本研究为进一步探究 AETC 联合吉非替尼克服 T790M 突变和 c-MET 扩增所致耐药的机制,采用 Western Blot 和 qRT-PCR 检测 EGFR/PI3K/AKT 信号通路相关蛋白和 mRNA 表达。结果提示联合组 H1975 和 H820 细胞中 p-EGFR、p-AKT、PI3K 等蛋白及相应 mRNA 表达下调,说明 AETC 联合吉非替尼对 H1975 和 H820 细胞 EGFR/PI3K/AKT 信号通路有抑制作用。而 mRNA 与蛋白表达相同的下降趋势则提示 AETC 可能是通过抑制 mRNA 合成、转录,实现对通路的调节,该结论仍需进一步实验证明。

中医药在增强 EGFR-TKIs 抗肿瘤效果、克服耐药等方面开展了一些研究,但大多针对吉非替尼某一耐药机制或某种耐药细胞<sup>[27,28]</sup>。但本研究结果提示 AETC 能增强吉非替尼对 T790M 突变和 MET 扩增的细胞系的增殖抑制作用,说明其作用具有广谱性。

虽然近年来不断出现 EGFR-TKIs 新药,但是耐药问题尚无法解决。而实验结果提示 AETC 有望克服 T790M 突变和 c-MET 扩增所致吉非替尼耐药,其作用机制与抑制 PI3K/AKT 通路有关。为 AETC 与 EGFR-TKIs 联合应用理论依据,证明两者联合使用的合理性和有效性,同时为中医药现代化应用提供新思路。

**利益冲突:**本研究及笔者在经济财务及其他方面并无利益冲突。

## 参 考 文 献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016,

- 66(2): 115-132.
- [3] Siegel R, Ward E, Brawley O, et al. Cancer statistics in China [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 14(3): 121.
  - [4] Boloker G, Wang C, Zhang J. Updated statistics of lung and bronchus cancer in United States(2018)[J]. *J Thorac Dis*, 2018, 10(3): 1158-1161.
  - [5] Lee CK, Brown C, Gralla RJ, et al. Impact of EGFR inhibitor in non-small cell lung cancer on progression-free and overall survival: a meta-analysis[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2013, 105(9): 595-605.
  - [6] Wang J, Wang B, Chu H, et al. Intrinsic resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in advanced non-small-cell lung cancer with activating EGFR mutations[J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 3711-3726.
  - [7] 单双双, 舒琦瑾. 南方红豆杉水提物协同厄洛替尼对人肺癌 A549 细胞 COX-2、MMP-2 表达的影响[J]. *新疆医科大学学报*, 2013, 36(6): 789-792.
  - [8] 李秀云主编. 中药房中药店工作手册[M]. 广州: 广东科技出版社, 1991: 103.
  - [9] 舒琦瑾, 谢长生, 屠小龙. 南方红豆杉水提物抑制 EGFR/MAPK 通路诱导人肺癌 A549 细胞凋亡的研究[J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(11): 3412-3416.
  - [10] Guimares LA, Jimenez PC, Sousa TdaS, et al. Chromomycin A2 induces autophagy in melanoma cells[J]. *Mar Drugs*, 2014, 12(12): 5839-5855.
  - [11] 鄂尔泰, 张廷玉. 钦定授时通考. 文渊阁四库全书. 第 732 册[M]. 台北: 台湾商务印书馆股份有限公司, 1986: 1.
  - [12] 李良松, 冯仲科, 刘德庆. 红豆杉名实与功用通考[J]. *中国中药志*, 2011, 36(12): 1682-1685.
  - [13] 叶明旺, 叶金乐, 张晓燕, 等. 浙江南方红豆杉自然资源保护利用及人工繁育技术研究[J]. *福建林业科技*, 2008, 35(1): 201-203, 208.
  - [14] 李萍, 舒琦瑾. 南方红豆杉水提物联合紫杉醇对人肺癌 A549 细胞增殖的抑制作用研究[J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(7): 2534-2537.
  - [15] Minari R, Bordi P, Tiseo M, et al. Third-generation epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors in T790M-positive non-small cell lung cancer: review on emerged mechanisms of resistance [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2016, 5(6): 695-708.
  - [16] Normanno N, Maiello MR, Chicchinelli N, et al. Targeting the EGFR T790M mutation in non-small-cell lung cancer [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2017, 21(2): 159-165.
  - [17] 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.
  - [18] Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(8): 2240-2247.
  - [19] Nurwidya F, Takahashi F, Murakami A, et al. Acquired resistance of non-small cell lung cancer to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors[J]. *Respir Investig*, 2014, 52(2): 82-91.
  - [20] Zhang K, Yuan Q. Current mechanism of acquired resistance to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors and updated therapy strategies in human non-small cell lung cancer[J]. *J Cancer Res Ther*, 2016, 12(Suppl): C131-C137.
  - [21] Hata AN, Niederst MJ, Archibald HL, et al. Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to epidermal growth factor receptor inhibition[J]. *Nat Med*, 2016, 22(3): 262-269.
  - [22] Ou SI, Cui J, Schrock AB, et al. Emergence of novel and dominant acquired EGFR solvent-front mutations at Gly796 (G796S/R) together with C797S/R and L792F/H mutations in one EGFR (L858R/T790M) NSCLC patient who progressed on osimertinib [J]. *Lung Cancer*, 2017, 108: 228-231.
  - [23] 俞晓晴, 徐艳珺, 范云. c-MET 通路和抑制剂在非小细胞肺癌中的研究进展[J]. *中国肺癌杂志*, 2017, 20(4): 287-292.
  - [24] Choi YJ, Kim SY, So KS, et al. AUY922 effectively overcomes MET-and AXL-mediated resistance to EGFR-TKI in lung cancer cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119832.
  - [25] Shi P, Oh YT, Zhang G, et al. Met gene amplification and protein hyperactivation is a mechanism of resistance to both first and third generation EGFR inhibitors in lung cancer treatment [J]. *Cancer Lett*, 2016, 380(2): 494-504.
  - [26] Yang H, Wang R, Peng S, et al. Hepatocyte growth factor reduces sensitivity to the epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, gefitinib, in lung adenocarcinoma cells harboring wildtype EGFR [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(13): 16273-16281.
  - [27] 杨小兵, 庄媛媛, 龙顺钦, 等. 扶正抗癌方对吉非替尼在肺癌 H1650、A549 细胞上的增效作用[J]. *广东医学*, 2018, 39(20): 3002-3009.
  - [28] 路京, 陈子龙, 闵朕, 等. 紫草素逆转由肝细胞生长因子诱导的肺癌吉非替尼耐药[J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(1): 62-67.

(收稿: 2018-09-20 在线: 2019-08-15)

责任编辑: 赵芳芳