

## 基础研究 • Basic Research

## 洛伐他汀克服非小细胞肺癌PC9细胞株吉非替尼耐药的体外研究

吉 泽<sup>1</sup>, 范理宏<sup>2</sup>, 季现秀<sup>2</sup>, 宋 丽<sup>2</sup>, 祁慧薇<sup>2</sup>

1. 苏州大学医学院临床医学系, 苏州 215006; 2. 上海交通大学附属第六人民医院肺内科, 上海 200233

**[摘要]** 目的: 研究联合洛伐他汀 (lovastatin) 和吉非替尼 (gefitinib) 对体外诱导吉非替尼获得性耐药的非小细胞肺癌细胞株 PC9 细胞凋亡以及相关蛋白表达的影响, 并探讨其可能的机制。方法: 应用洛伐他汀联合吉非替尼处理耐吉非替尼的非小细胞肺癌 PC9 细胞株后, 采用 WST-1 法检测不同药物处理对 PC9 细胞增殖的影响, Hoechst33342 荧光染色法观察细胞凋亡形态, FCM 法观察细胞凋亡状况, 蛋白质印迹法检测凋亡相关蛋白的表达水平。结果: 洛伐他汀联合吉非替尼可在体外诱导耐吉非替尼的 PC9 细胞凋亡, 抑制其细胞增殖; 洛伐他汀联合吉非替尼可诱导耐吉非替尼的 PC9 细胞中磷酸化表皮生长因子受体 (phosphorylated epidermal growth factor receptor, p-EGFR)、磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated protein kinase B, p-AKT) 和磷酸化细胞外调节蛋白激酶 1/2 (phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2, p-ERK1/2) 蛋白表达水平明显下调。结论: 在体外诱导吉非替尼获得性耐药的非小细胞肺癌细胞株 PC9 中, 洛伐他汀可以克服吉非替尼耐药, 两者具有良好的协同作用, 提示两药联合对于出现吉非替尼耐药的临床治疗可能具有很大的应用潜力。

**[关键词]** 癌, 非小细胞肺; 药物耐受性; 细胞凋亡; 洛伐他汀; 吉非替尼; 信号通路蛋白

**[中图分类号]** 734.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1000-7431 (2011) 08-0682-06

**Lovastatin overcomes gefitinib resistance in human non-small cell lung cancer cell line PC9 *in vitro***JI Ze<sup>1</sup>, FAN Li-hong<sup>2</sup>, JI Xian-xiu<sup>2</sup>, SONG Li<sup>2</sup>, QI Hui-wei<sup>2</sup>

1. Department of Clinical Medicine, Medical College, Soochow University, Suzhou 215006, China; 2. Department of Respiratory Medicine, Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the effects of lovastatin combined with gefitinib on the apoptosis and the expressions of apoptosis-related proteins of non-small cell lung cancer cell line PC9, which was induced by gefitinib *in vitro* to acquire drug resistance, as well as to explore the possible mechanism. **Methods:** Lovastatin combined with gefitinib was applied to treat the PC9 cells with acquired gefitinib-resistance. Then the proliferation of PC9 cells treated with different drugs was detected by WST-1 method. The morphology of apoptosis was observed under an inverted phase contrast microscope after Hoechst33342 staining. Apoptosis rates in different treatment groups were detected by flow cytometry (FCM). The expressions of apoptosis-related proteins were detected by Western blotting. **Results:** Lovastatin combined with gefitinib could induce apoptosis of PC9 cells with acquired gefitinib-resistance *in vitro*. The expressions of phosphorylated epidermal growth factor receptor (p-EGFR), phosphorylated protein kinase B (p-AKT) and phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (p-ERK) were significantly decreased by combination of lovastatin and gefitinib. **Conclusion:** For non-small cell lung cancer cell line PC9 with acquired drug-resistance which is induced by gefitinib *in vitro*, lovastatin can overcome gefitinib-resistance. The combination of both drugs shows a great synergistic effect, suggesting that the combination treatment of lovastatin and gefitinib may have great considerable clinical potential in non-small cell lung cancer with gefitinib-resistance.

**[KEY WORDS]** Carcinoma, non-small cell lung; Drug tolerance; Apoptosis; Lovastatin; Gefitinib; Signaling pathway proteins

[Tumor, 2011, 31 (8): 682-687]

吉非替尼 (gefitinib) 是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) 类靶向药物, 目前主要用于治疗已接受过铂类为基础治疗的非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer,

**[基金项目]** 上海市卫生局科研课题计划项目 (编号: 054014)

Correspondence to: FAN Li-hong (范理宏)

E-mail: fanlih@yahoo.com.cn

Received 2011-02-22 Accepted 2011-03-28

NSCLC) 进展期患者<sup>[1]</sup>。对于具有吉非替尼敏感性 *EGFR* 突变的患者, 应用吉非替尼治疗效果较好, 生存期明显延长; 然而, 靶向药物同样存在着原发耐药和继发耐药的问题。目前, 对于出现吉非替尼耐药的 NSCLC, 应选择何种治疗方案仍无定论。国外有研究证实, 在体外实验中, 洛伐他汀 (*lavastatin*) 可诱导伴有 *K-ras* 突变的肺癌细胞株发生细胞凋亡<sup>[2]</sup>。而目前国内关于洛伐他汀是否可以克服吉非替尼耐药, 尚无相关文献报道。本实验旨在研究洛伐他汀与吉非替尼的联合应用是否可以克服 NSCLC 获得性吉非替尼耐药的问题, 并探讨其可能的作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞株及其培养** 吉非替尼获得性耐药的人 NSCLC 细胞株 PC9<sup>[3]</sup> 由同济大学附属上海市肺科医院周彩存教授惠赠。上海市肺科医院中心实验室通过实验证实, 耐吉非替尼细胞株 PC9 诱导成功, 而且验证其耐药性在无药培养液中可维持 1 年以上。PC9 细胞株置于含 10% 新生胎牛血清、100 U/mL 的青霉素以及 100 μg/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养液中传代培养。

**1.2 主要试剂和仪器** 吉非替尼为英国 AstraZenca 公司产品; 洛伐他汀为美国 Sigma 公司产品; RPMI 1640 培养液和胎牛血清为美国 Gibco 公司产品; WST-1 细胞毒检测试剂盒和 Hoechst33342 染色液为碧云天生物技术研究所产品; Annexin V - 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 细胞凋亡检测试剂盒为美国 BD 公司产品; 兔抗人磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated protein kinase B, p-AKT) 多克隆抗体和 β-actin (作为内对照) 为美国 Santa Cruz 公司产品; 兔抗人磷酸化细胞外调节蛋白激酶 1/2 (phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2, p-ERK1/2) 多克隆抗体和兔抗人磷酸化表皮生长因子受体 (phosphorylated epidermal growth factor receptor, p-EGFR) 多克隆抗体为美国 Cell Signal 公司产品; 流式细胞仪为美国 Beckman Coulter 公司产品; 酶标仪为美国 Wellscan 公司产品。

**1.3 实验分组** 洛伐他汀和吉非替尼分别用无水乙醇和 DMSO 溶解, 二者的药物浓度和药物处理时间参照 Park 等<sup>[2]</sup> 研究方法, 且进行浓度梯度预实验。不同药物处理分组如下: (1) 正常对照组, 以完全培养液 (RPMI 1640 培养液 + 10% 胎牛血清) 正常培养; (2) 吉非替尼处理组, 稀释后吉非替尼终浓度为 1 μmol/L; (3) 洛伐他汀

处理组, 稀释后洛伐他汀终浓度为 5 μmol/L; (4) 吉非替尼联合洛伐他汀处理组, 稀释后吉非替尼和洛伐他汀终浓度分别为 1 μmol/L 和 5 μmol/L。加药后的各组细胞均置于 37 °C、CO<sub>2</sub> 体积分数为 5% 的培养箱中培养。

### 1.4 Hoechst33342 荧光染色法检测细胞凋亡

4 组经不同药物处理后的 PC9 细胞分别在培养箱中培养 24 h, 收集细胞, PBS 漂洗 2 次。6 孔板每孔中加入 Hoechst33342 染色液 1 mL (充分覆盖细胞), 在培养液中反应 30 min 后, 弃染色液, 再用 PBS 洗涤 3 次, 倒置相差荧光显微镜下观察凋亡细胞形态。

### 1.5 WST-1 法检测细胞增殖

取对数生长期的 PC9 细胞, 按 2 000 个 (100 μL) / 孔将细胞悬液铺于 96 孔板。设定空白对照孔, 其余分别加入终浓度为 1 μmol/L 的吉非替尼、终浓度为 5 μmol/L 的洛伐他汀以及两药联合。孵育 24、48 和 72 h 后, 每孔中再加入 10 μL 配置好的 WST-1 溶液, 置于 37 °C 细胞培养箱中孵育 4 h, 然后把 96 孔板置于摇床上摇动 1 min, 充分混匀待测体系。最后用酶标仪检测波长为 450 nm 的各孔吸光度 (*D*) 值。实验设药物处理组、无药对照组 (不加药物的细胞悬液) 和空白对照组 (只加 DMSO 液), 实验重复 3 次。实验结束后, 按以下公式计算细胞存活率。细胞存活率 = (药物处理孔 *D* 值 - 空白对照孔 *D* 值) / (无药对照孔 *D* 值 - 空白对照孔 *D* 值) × 100%。

**1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡** 4 组经不同药物处理后的 PC9 细胞培养 48 h 后, 各组分别收集 3 × 10<sup>5</sup> 个细胞, 胰酶消化, 4 °C 条件下 94 × *g* 离心 5 min, 弃上清液。细胞用 PBS 洗 2 次后, 悬浮于 200 μL 上样缓冲液, 加入 10 μL FITC 标记的 Annexin V, 轻轻混匀, 4 °C 避光反应 15 ~ 20 min。再加入 5 μL 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 和 300 μL 上样缓冲液, 混匀, 流式细胞仪检测 PC9 细胞的凋亡情况。Annexin V /PI 凋亡结果判定标准: Annexin V (+) /PI (-) 表示早期凋亡细胞; Annexin V (+) /PI (+) 表示晚期凋亡细胞和坏死细胞; Annexin V (-) /PI (-) 表示存活细胞; Annexin V (-) /PI (+) 表示细胞收集过程中出现的损伤细胞。实验重复 3 次。

### 1.7 蛋白质印迹法检测凋亡相关蛋白表达水平

各组细胞加药培养 48 h 后收集细胞, 提取蛋白, 并以考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 分离蛋白后进行转膜, 将转上蛋白的聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜置于含 5% 脱脂奶粉的 Tris 盐缓冲液 - 吐温液 (Tris-buffered

saline-Tween, TBST) 中, 4 °C 过夜, TBST 漂洗。分别加入兔抗人 p-EGFR 一抗 (1:5 000 稀释)、兔抗人 p-AKT 一抗 (1:500 稀释) 和兔抗人 p-ERK1/2 一抗 (1:1 000 稀释), 室温下温育 2 h 后, 以 TBST 液在平缓摇动条件下漂洗 3 次, 每次各 10 min。然后再加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:10 000 稀释), 在室温下温育 90 min 后, 充分漂洗。最后采用电化学发光法进行显像, 暗室中进行 X 射线曝光压片, 再显影, 定影, 得到目的蛋白条带。实验重复 3 次, 其中用  $\beta$ -actin 作为内对照。

1.8 统计学方法 应用 SPSS 16.0 统计学软件进行结果数据的统计分析。计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。

单因素分析采用  $t$  检验, 多因素分析采用方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 吉非替尼和洛伐他汀处理后耐药细胞的形态变化 经 Hoechst33342 染色液染色后, 倒置相差显微镜下观察发现, 正常对照组 (图 1A) 细胞生长旺盛, 形态规则, 呈淡蓝染色; 吉非替尼处理组 (图 1B) 和洛伐他汀处理组 (图 1C) 两组与正常对照组相似, 未见明显的漂浮死细胞; 而两药联合组 (图 1D) 细胞形态不规则, 可见细胞核固缩、碎裂, 可见较多的漂浮死细胞。

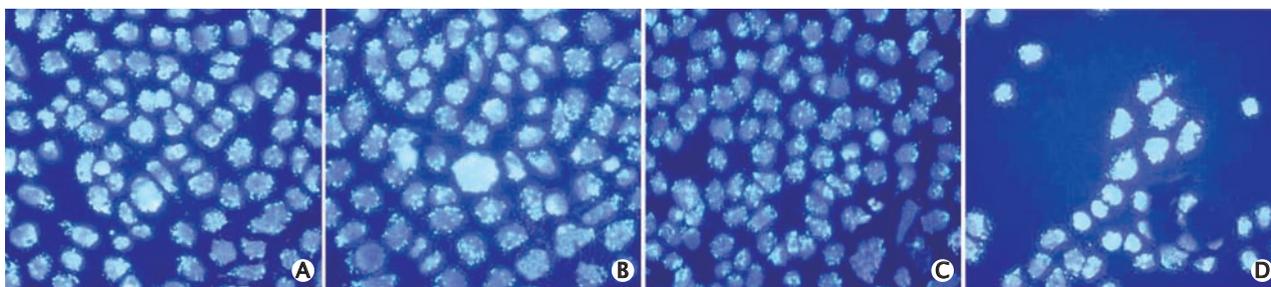


Fig.1 Morphological changes of gefitinib-resistant PC9 cells treated with different drugs (A: Normal control; B: 1  $\mu$ mol/L gefitinib; C: 5  $\mu$ mol/L lovastatin; D: 5  $\mu$ mol/L lovastatin + 1  $\mu$ mol/L gefitinib) were observed under an inverted phase contrast microscope ( $\times 400$ ) with Hoechst33342 staining. The photos showed that lovastatin combined with gefitinib could induce cell nuclear condensation, fragmentation, and more dead cell floating in gefitinib-resistant PC9 cells.

图 1 倒置相差显微镜下观察 Hoechst33342 染色液染色后各药物处理后吉非替尼耐药 PC9 细胞的形态学变化

2.2 吉非替尼耐药 PC9 细胞对不同药物的敏感性 WST-1 法检测结果显示, 洛伐他汀与吉非替尼两药联合处理 24、48 和 72 h 与未处理对照 (0 h) 相比, 吉非替尼耐药 PC9 细胞的细胞存活率显著降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ , 图 2); 两药联用组与吉非替尼处理组比较, 细胞存活率亦降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 2)。以上结果显示, 两药联用较单用吉非替尼对耐吉非替尼的 PC9 细胞的增殖抑制作用增加, 提示洛伐他汀与吉非替尼具有协同作用。

2.3 洛伐他汀能够促进吉非替尼诱导的细胞凋亡 FCM 法检测结果显示, 正常对照组中吉非替尼耐药 PC9 细胞的细胞凋亡率为 2.5%, 吉非替尼处理组和洛伐他汀处理组的耐药细胞凋亡率分别为 5.5% 和 9.4%, 两药联用组的细胞凋亡率为 65.5%。两药联用组与正常对照组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ , 图 3); 两药联用组与单用吉非替尼或者洛伐他汀比较, 差异亦有统计学意义 ( $P < 0.01$ , 图 3)。以上结果表明, 洛伐他汀具有

明显的诱导吉非替尼耐药 PC9 细胞凋亡的作用。

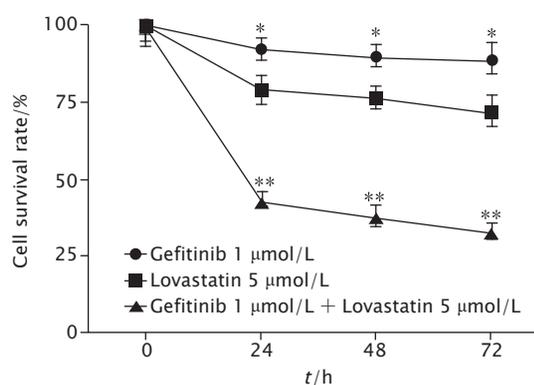
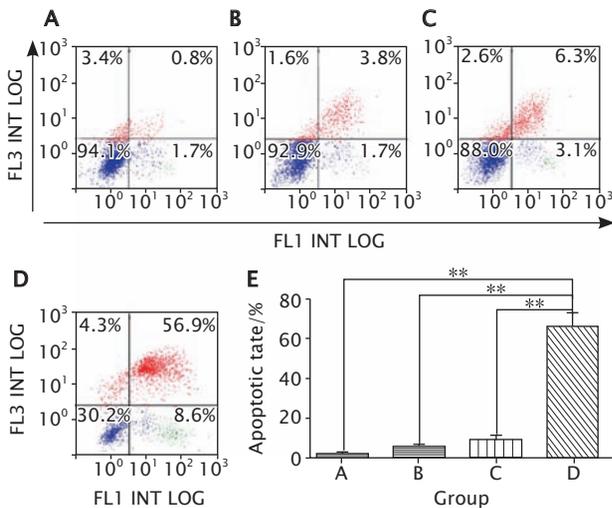


Fig.2 Inhibitory effects of different drug treatments on the PC9 cell proliferation tested by WST-1. The lovastatin combined with gefitinib significantly inhibited PC9 cell proliferation as compared with single gefitinib ( $n = 3$ ). \* $P < 0.05$ , vs 5  $\mu$ mol/L lovastatin + 1  $\mu$ mol/L gefitinib; \*\* $P < 0.01$ , vs 0 h (as the untreated control).

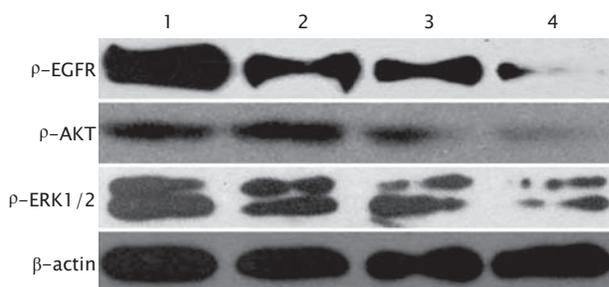
图 2 WST-1 检测不同药物处理对吉非替尼耐药 PC9 细胞增殖的抑制作用



**Fig.3** The apoptotic rates of PC9 cells treated with different drugs (A: Normal control; B: 1  $\mu\text{mol/L}$  gefitinib; C: 5  $\mu\text{mol/L}$  lovastatin; D: 5  $\mu\text{mol/L}$  lovastatin + 1  $\mu\text{mol/L}$  gefitinib) detected by flow cytometry (Annexin V -FITC/PI). The group of lovastatin combined with gefitinib could significantly induce apoptosis of gefitinib-resistant PC9 cells *in vitro* (E,  $n = 3$ ).  $**P < 0.01$ .

图3 FCM法检测洛伐他汀具有诱导吉非替尼耐药PC9细胞凋亡的作用

2.4 洛伐他汀与吉非替尼联用对凋亡相关蛋白表达的影响 应用蛋白质印迹法检测 p-EGFR、p-AKT 和 p-ERK1/2 蛋白的表达水平, 结果显示, 洛伐他汀与吉非替尼两药联用与单用吉非替尼或者洛伐他汀相比可明显抑制凋亡相关信号通路蛋白 p-EGFR、p-AKT 和 p-ERK1/2 的表达 (图4)。



**Fig.4** Expressions of phosphorylated epidermal growth factor receptor (p-EGFR), phosphorylated protein kinase B (p-AKT) and phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (p-ERK) proteins in PC9 cells treated with different drugs (Lane 1: Normal control; Lane 2: 1  $\mu\text{mol/L}$  gefitinib; Lane 3: 5  $\mu\text{mol/L}$  lovastatin; Lane 4: 5  $\mu\text{mol/L}$  lovastatin + 1  $\mu\text{mol/L}$  gefitinib) detected by Western blotting. The expressions of p-EGFR, p-AKT and p-ERK1/2 proteins were decreased significantly in lovastatin combined with gefitinib treatment group.

图4 蛋白质印迹法检测不同药物处理后吉非替尼耐药PC9细胞中 p-EGFR、p-AKT 和 p-ERK1/2 蛋白的表达变化

### 3 讨论

吉非替尼系低分子量苯胺喹唑啉的衍生物, 是最早应用于治疗 NSCLC 的靶向药物, 其主要的机制是通过抑制 EGFR 的磷酸化来阻断下游的信号通路, 从而诱导肿瘤细胞的凋亡。EGFR-TKI 靶向治疗与传统的放化疗相比, 具有依从性好、不良反应少等明显的优点。虽然有多数 NSCLC 患者可从中获益, 但不可避免地, 此类药物同样存在耐药的问题, 因此如何进行后续的治疗已成为目前国内外研究的热点之一。目前, 对于出现 EGFR-TKI 类靶向药物继发耐药的患者, 是在原有靶向药物基础上加用其他药物还是更换治疗药物尚无定论。

目前, 关于吉非替尼继发耐药的机制主要有以下几个方面。(1) 耐药突变: 普遍得到认同的是二次突变学说<sup>[4,5]</sup>, 即 EGFR 20 外显子在吉非替尼治疗过程中出现二次突变 (T790M 突变); 另外还有非 T790M 继发突变, 此类突变包括 E884K<sup>[6]</sup>、L858R<sup>[6]</sup>、L747s<sup>[7]</sup> 以及 G796A 突变<sup>[8]</sup> 等, 但总发生率低于 5%。(2) 旁路激活途径: 部分 NSCLC 患者虽然没有发生 EGFR 基因二次突变, 但仍然对吉非替尼产生了继发耐药; 目前有一些研究发现其绕过 EGFR 而激活下游信号通路, 这种耐药机制统称为“旁路激活途径”, 如 Met 扩增已被证实是通过修复由 ErbB3 反式激活介导的磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B, PI3K/AKT) 通路来获得吉非替尼耐药<sup>[9]</sup>。(3) 其他可能机制: 如整合素  $\beta 1$  水平升高及其相关的肿瘤细胞黏附、迁移能力的提高, 可能与 NSCLC PC9/AB2 细胞株 EGFR-TKI 耐药相关; 另外, 有学者还提出了一些观点, 如靶基因扩增 (EGFR 基因扩增)、K-Ras 基因突变、药物细胞外俘获、上皮间质转化 (epithelial mesenchymal transformation, EMT)、第 10 号染色体丢失的磷酸酶 (gene for phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten, PTEN) 基因通路下调、胰岛素样生长因子 -1 (insulin-like growth factor, IGF-1) 等相关等。尽管以上的耐药机制众说纷纭, 但 60% ~ 70% EGFR-TKIs 继发耐药与二次突变学说和 Met 扩增这 2 种机制有关<sup>[10]</sup>, 其他吉非替尼耐药原因可能是由于影响因素 (如吸烟与否、性别、人种以及病理类型等) 的不同造成的。

洛伐他汀是一种 3-羟基-3-甲基辅酶 A (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A, HMG-CoA) 还原酶抑制剂, 它通过阻断甲羟

戊酸合成途径来治疗高胆固醇血症, 另外在一些肿瘤类型中它具有诱导细胞凋亡的作用<sup>[11]</sup>。洛伐他汀能够影响诸如类异戊二烯化合物甲基二羟戊酸 (methyl-dihydroxyvaleric acid, MVA) 的合成, MVA 可黏附至 Ras 蛋白而有利于它们锚定在细胞膜上发挥作用。洛伐他汀通过中断甲羟戊酸的合成, 抑制增殖相关的 Ras 和下游信号通路激活, 其中包括 Raf/ 丝裂原激活蛋白激酶的激酶 (mitogen-activated protein kinase kinase, MEK) / ERK 信号和 PI3K/AKT 途径。因此, 理论上洛伐他汀可以用于克服肿瘤耐药的问题。

本实验中使用的耐吉非替尼 PC9 细胞株系一种具有 EGFR 19 外显子突变的人肺腺癌细胞, 是由对具有 19 外显子 E746 ~ A750 缺失突变的吉非替尼高度敏感性 PC9 细胞株进行诱变和筛选获得的高度耐药性细胞株。已有研究者应用 MTT 和 FCM 法对细胞的药物敏感性和凋亡率进行检测, 证明耐药细胞株的建立成功; 同时对耐药的 PC9 细胞 19 ~ 21 外显子基因进行测序, 结果未发现 T790M 突变; c-Met 蛋白表达水平也无异常升高, 而与药物敏感的 PC9 细胞相比, 耐药细胞株 PC9 细胞整合素  $\beta 1$  的蛋白表达水平明显升高; 结果提示, 整合素  $\beta 1$  升高及其相关的肿瘤细胞黏附、迁移能力的异常提高可能参与了 EGFR-TKI 的获得性耐药<sup>[3,12]</sup>。

本研究分别采用 Hoechst33342 染色、WST-1 法以及 FCM 法检测耐药的 PC9 细胞凋亡, 结果显示洛伐他汀与吉非替尼联合应用可显著促进肿瘤细胞凋亡; 同时, 蛋白质印迹法检测信号通路蛋白 p-EGFR、p-AKT 和 p-ERK1/2 表达, 结果显示两药联合可显著抑制蛋白的表达, 提示两药具有明显的协同作用。目前, 国外的相关研究报道尚较少, 其中 Park 等<sup>[2]</sup>、Cemeus 等<sup>[13]</sup> 和 Jeon 等<sup>[14]</sup> 的实验结论与本实验大致相同; 但与 Park 等<sup>[2]</sup> 研究的对象不同, 本研究对象是具有 EGFR 19 外显子突变的耐吉非替尼的人肺腺癌细胞株, 是对 Park 等研究内容的丰富和补充, 为临床上出现吉非替尼耐药的 NSCLC 患者的治疗提供了一种非常有希望的解决策略。国内也尚无类似报道, 仅周子辉等<sup>[15]</sup> 应用洛伐他汀联合 GP 方案治疗中晚期 NSCLC 患者, 观察其疗效和不良反应, 结果显示, 联合治疗可减轻化疗的某些不良反应, 提高临床获益率和改善患者的生存质量。

EGFR 主要通过 3 条通路调控癌细胞的增殖、存活及凋亡, 包括 Ras/Raf/ERK、PI3K/AKT 和信号转导及转录激活因子 (signal transducers

and activators of transcription, STAT) 途径, 而 EGFR、AKT 和 ERK 的磷酸化状态 (即 p-EGFR、p-AKT 和 p-ERK1/2) 为其活化状态, 能够发挥其生物学功能。本研究选用的耐吉非替尼的 PC9 细胞株获得耐药性的机制可能与整合素  $\beta 1$  升高有关。整合素  $\beta 1$  是一种细胞表面黏附分子, 可以改变肿瘤的微环境。肿瘤微环境的改变是导致发生耐药的重要原因之一。受体酪氨酸激酶和整合素  $\beta 1$  可通过不同的途径活化 AKT, 而 PI3K/AKT 途径在抗凋亡信号转导中发挥重要作用, 可通过调控肿瘤细胞的凋亡而导致耐药。此外, 整合素在缺少外源性配体的情况下也能够激活受体酪氨酸激酶, 包括 EGFR。

目前关于他汀类对化疗或者靶向治疗药物产生协同作用的准确机制尚不十分清楚。笔者根据本实验结果推测, 洛伐他汀和吉非替尼两药联用克服 NSCLC 吉非替尼耐药的机制可能是: (1) 洛伐他汀作为一种 HMG-CoA 还原酶抑制剂, 使 HMG-CoA 不能转变成 MVA, MVA 产物减少, 尤其焦磷酸法尼酯 (farnesylpyrophosphate, FPP) 的合成受到抑制, 关键信号转导蛋白 Ras 的法尼基化会受阻, 阻断了 Ras/Raf/ERK 信号通路, 影响了它作为信号传递子在亚细胞的定位和功能, 进而影响细胞周期的调控, 抑制肿瘤细胞增殖<sup>[16]</sup>; (2) 洛伐他汀可上调 PTEN 的蛋白表达水平 [PTEN 主要是通过其脂质磷酸酶活性作用于 PI3K 的下游靶分子磷脂酸肌醇-3, 4, 5-三磷酸 (phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate, PIP3)], 从而阻断 PI3K/AKT 信号通路来实现其抑癌作用, 同时增强化疗药物的敏感性, 诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[17]</sup>; (3) 洛伐他汀可改善内皮功能和增强吉非替尼活性, 阻断了 EGFR 下游的信号通路, 从而克服了吉非替尼耐药<sup>[13]</sup>。

总之, 本研究结果证实, 洛伐他汀与吉非替尼联合应用在克服吉非替尼耐药方面以及增加吉非替尼的细胞毒性作用方面是一种非常有希望的治疗策略。但是否可真正用于临床上已出现吉非替尼或其他 EGFR-TKI 靶向药物继发耐药的 NSCLC 的治疗, 还需要进行更多、更深入的研究来评估和证实。

#### [ 参考文献 ]

- [1] FUKUOKA M, YANO S, GIACCONE G, *et al.* Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small cell lung cancer (The

- IDEAL 1 Trial[J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(12): 2237-2246.
- [2] PARK I H, KIM J Y, JUNG J I, *et al.* Lovastatin overcomes gefitinib resistance in human non-small cell lung cancer cells with K-Ras mutations[J]. *Invest New Drugs*, 2009, 28(6): 791-799.
- [3] 栗 波, 苏春霞, 张海平, 等. 吉非替尼耐药细胞株的筛选和基因谱表达研究 [J]. *肿瘤*, 2008, 28(7): 552-557.
- [4] KOBAYASHI S, BOGGON T J, DAYARAM T, *et al.* EGFR mutation and resistance of non-small cell lung cancer to gefitinib[J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(8): 786-792.
- [5] PAO W, MILLER V A, POLITI K A, *et al.* Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain[J]. *PLoS Med*, 2005, 2(3): e73.
- [6] CHOONG N W, DIETRICH S, SEIWERT T Y, *et al.* Gefitinib response of erlotinib-refractory lung cancer involving meninges—role of EGFR mutation[J]. *Nat Clin Pract Oncol*, 2006, 3(1): 50-57.
- [7] COSTA D B, 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.
- [8] URAMOTO H, UCHIUMI T, IZUMI H, *et al.* A new mechanism for primary resistance to gefitinib in lung adenocarcinoma: the role of a novel G796A mutation in exon 20 of EGFR[J]. *Anticancer Res*, 2007, 27(4B): 2297-2303.
- [9] ENGELMAN J A, ZEJNULLAHU K, MITSUDOMI T, *et al.* MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling[J]. *Science*, 2007, 316(5827): 1039-1043.
- [10] ROSRLL R, TARON M, SANCHEZ J J, *et al.* Setting the benchmark for tailoring treatment with EGFR tyrosine kinase inhibitors[J]. *Future Oncol*, 2007, 3(3): 277-283.
- [11] MANTHA A J, HANSON J E, GOSS G, *et al.* Targeting the mevalonate pathway inhibits the function of the epidermal growth factor receptor[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(6): 2398-2407.
- [12] 鞠立霞, 周彩存, 唐 亮, 等. 吉非替尼获得性耐药的非小细胞肺癌细胞株 PC9/AB2 相关耐药机制研究 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2010, 33(5): 354-358.
- [13] CEMEUS C, ZHAO T T, BARRETT G M, *et al.* Lovastatin enhances gefitinib activity in glioblastoma cells irrespective of EGFR VIII and PTEN status[J]. *J Neurooncol*, 2008, 90(1): 9-17.
- [14] JEON J H, KIM S K, KIM H J, *et al.* Lipid raft modulation inhibits NSCLC cell migration through delocalization of the focal adhesion complex[J]. *Lung Cancer*, 2010, 69 (2): 165-171.
- [15] 周子辉, 彭艳红. 洛伐他汀联合 GP 方案治疗中晚期非小细胞肺癌的初步临床研究 [J]. *健康必读杂志: 下半月*, 2010, 4: 12-13.
- [16] JOHNSON M D, WOODARD A, OKEDIJI E J, *et al.* Lovastatin is a potent inhibitor of meningioma cell proliferation: evidence for inhibition of a mitogen associated protein kinase[J]. *J Neurooncol*, 2002, 56(2): 133-142.
- [17] 姜 达, 张增叶, 刘月娥. 洛伐他汀对人肺腺癌细胞 A549 的体外作用及其机制研究 [C]. 2008 第五届中国肿瘤学术大会论文集, 2008: 481-482.

[ 本文编辑 ] 张俊彦