

本文引用:张群成,刘庆亮,安云霞. 曲古抑菌素 A 联合厄洛替尼对肺腺癌细胞株 PC-9/ER 增殖及凋亡的影响 [J]. 新乡医学院学报,2020,37(5):404-409. DOI:10.7683/xyxyxb.2020.05.002.

【基础研究】

曲古抑菌素 A 联合厄洛替尼对肺腺癌细胞株 PC-9/ER 增殖及凋亡的影响

张群成, 刘庆亮, 安云霞

(河南省人民医院呼吸与危重症医学科,河南 郑州 450000)

摘要: **目的** 探讨曲古抑菌素 A 联合厄洛替尼对获得性耐厄洛替尼肺腺癌细胞株 PC-9/ER 增殖、凋亡及耐药性的影响。**方法** 取对数生长期 PC-9/ER 细胞,接种于 96 孔培养板,将细胞分为 0.0、2.5、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 厄洛替尼组和曲古抑菌素 A + 0.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 厄洛替尼组、曲古抑菌素 A + 2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 厄洛替尼组、曲古抑菌素 A + 5.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 厄洛替尼组、曲古抑菌素 A + 10.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 厄洛替尼组、曲古抑菌素 A + 20.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 厄洛替尼组;0.0、2.5、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 厄洛替尼组细胞分别加入对应浓度的厄洛替尼 100 μL ,曲古抑菌素 A 联合厄洛替尼组分别加入 250 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的曲古抑菌素 A 100 μL 和对应浓度的厄洛替尼 100 μL ,48 h 后采用四甲基偶氮唑盐法检测各组细胞增殖抑制率。取对数生长期 PC-9/ER 细胞接种于 6 孔板,将细胞分为厄洛替尼组和曲古抑菌素 A + 厄洛替尼组;厄洛替尼组细胞给予 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 厄洛替尼 100 μL ,曲古抑菌素 A + 厄洛替尼组细胞给予 250 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 曲古抑菌素 A 100 μL 和 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 厄洛替尼 100 μL 进行处理,24 h 后采用流式细胞术检测 2 组细胞周期分布情况。取对数期 PC-9/ER 细胞分为空白对照组、曲古抑菌素 A 组、厄洛替尼组、曲古抑菌素 A + 厄洛替尼组;空白对照组细胞给予二甲基亚砜 100 μL ,曲古抑菌素 A 组细胞给予 250 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 曲古抑菌素 A 100 μL ,厄洛替尼组细胞给予 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 厄洛替尼 100 μL ,曲古抑菌素 A + 厄洛替尼组细胞给予 250 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 曲古抑菌素 A 100 μL 和 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 厄洛替尼 100 μL 处理细胞,24 h 后采用免疫荧光细胞化学法检测 4 组细胞中 E-钙黏蛋白(E-cadherin)的表达并观察 PC-9/ER 细胞凋亡情况,Western blot 法检测 4 组细胞中磷酸化表皮生长因子受体(p-EGFR)、E-cadherin 及 Cleaved-caspase-3 蛋白的表达。**结果** 不同浓度厄洛替尼联合曲古抑菌素 A 对 PC-9/ER 细胞增殖的抑制作用均强于单用厄洛替尼组($P < 0.05$)。不同浓度厄洛替尼联合曲古抑菌素 A 对 PC-9/ER 细胞抑制作用的联用指数均 < 1 ,二者具有协同作用。曲古抑菌素 A + 厄洛替尼组 G_2/M 期细胞所占的比例高于厄洛替尼组, G_0/G_1 和 S 期细胞所占比例低于厄洛替尼组($P < 0.05$)。曲古抑菌素 A + 厄洛替尼组 PC-9/ER 细胞中 E-cadherin 蛋白的表达水平高于空白对照组、厄洛替尼组和曲古抑菌素 A 组。Hoechst33258 染色结果显示,曲古抑菌素 A + 厄洛替尼组细胞核染色强度明显增加,细胞凋亡现象多于空白对照组、厄洛替尼组和曲古抑菌素 A 组。厄洛替尼组、曲古抑菌素 A 组和厄洛替尼 + 曲古抑菌素 A 组细胞中 p-EGFR、Cleaved-caspase-3、E-cadherin 蛋白表达水平平均高于空白对照组($P < 0.05$),曲古抑菌素 A 组和厄洛替尼 + 曲古抑菌素 A 组细胞中 p-EGFR、Cleaved-caspase-3、E-cadherin 蛋白表达水平高于厄洛替尼组($P < 0.05$),厄洛替尼 + 曲古抑菌素 A 组细胞中 p-EGFR、Cleaved-caspase-3、E-cadherin 蛋白表达水平高于曲古抑菌素 A 组($P < 0.05$)。**结论** 曲古抑菌素 A 联合厄洛替尼可以促进 PC-9/ER 细胞凋亡,其机制可能为通过促进 E-cadherin 表达而抑制信号转导通路,促进肿瘤细胞凋亡。

关键词: 曲古抑菌素 A;厄洛替尼;E-钙黏蛋白;磷酸化表皮生长因子受体

中图分类号: R734.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2020)05-0404-06

Effects of trichostatin A combined with erlotinib on proliferation and apoptosis of lung adenocarcinoma cell line PC-9 /ER

ZHANG Quncheng, LIU Qingliang, AN Yunxia

(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450000, Henan Province, China)

Abstract: Objective To observe the effect of trichostatin A combined with erlotinib on proliferation, apoptosis and

DOI:10.7683/xyxyxb.2020.05.002

收稿日期:2019-07-13

基金项目:河南省医学科技攻关项目(编号:201802040)。

作者简介:张群成(1986-),男,山东菏泽人,硕士,主治医师,主要从事肺癌基础和临床研究。

drug resistance of acquired erlotinib resistant lung adenocarcinoma cell line of PC-9/ER. **Methods** The PC-9/ER cells in logarithmic growth period were inoculated into 96-well culture plate, then the cells were divided into 0.0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ erlotinib group and trichostatin A + 0.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ erlotinib group, trichostatin A + 2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ erlotinib group, trichostatin A + 5.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ erlotinib group, trichostatin A + 10.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ erlotinib group, trichostatin A + 20.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ erlotinib group. The cells in 0.0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ erlotinib group were added with the corresponding concentration of erlotinib 100 μL respectively, and the cells in the combination group of trichostatin A and erlotinib were added with 250 nmol $\cdot \text{L}^{-1}$ trichostatin A 100 μL and the corresponding concentration of erlotinib 100 μL respectively. After 48 hours, the inhibition rate of cell proliferation in above each group was determined by methyl thiazolyl tetrazolium. The PC-9 /ER cells in logarithmic growth period were inoculated into 6-well culture plate, then the cells were divided into erlotinib group and trichostatin A + erlotinib group. The cells in erlotinib group were added with 20.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ erlotinib 100 μL ; the cells in erlotinib + trichostatin A group were added with 250 nmol $\cdot \text{L}^{-1}$ trichostatin A 100 μL and 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ erlotinib 100 μL ; after 24 hours, the cell cycle distribution in the two groups was detected by flow cytometry. The PC-9 /ER cells in logarithmic growth period were divided into blank control group, trichostatin A group, erlotinib group and trichostatin A + erlotinib group. The cells in control group were added with 100 μL dimethyl sulfoxide, the cells in trichostatin A group were added with 250 nmol $\cdot \text{L}^{-1}$ trichostatin A 100 μL , the cells in erlotinib group were added with 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ erlotinib 100 μL , the cells in trichostatin A + erlotinib group were added with 250 nmol $\cdot \text{L}^{-1}$ trichostatin A 100 μL and 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ erlotinib 100 μL . After 24 hours, the expression of E-cadherin in cells in the four groups was detected by immunofluorescence cytochemistry and the PC-9 /ER cell apoptosis was observed; the expressions of phosphor-epithelial growth factor receptor (p-EGFR), E-cadherin and Cleaved caspase-3 protein in cells in the four groups were detected by Western blot.

Results The inhibitory effect of different concentrations of erlotinib combined with trichostatin A group on the proliferation of PC-9/ER cells was stronger than that of different concentrations of erlotinib group ($P < 0.05$). The combination index of inhibition effect of different concentrations of erlotinib combined with trichostatin A on PC-9/ER cells were all < 1 , and the two drugs had synergistic effects. The proportion of the G_2/M phase cells in trichostatin A + erlotinib group was higher than that in the erlotinib group, and the proportion of the G_0/G_1 and S phase cells was lower than that in the erlotinib group ($P < 0.05$). The expression of E-cadherin protein in PC-9/ER cells in the trichostatin A + erlotinib group was higher than that in the control group, erlotinib group and trichostatin A group. The results of Hoechst33258 staining showed that the nuclear staining intensity in trichostatin A + erlotinib group increased, and the apoptosis was more than that in the blank control group, erlotinib group and trichostatin A group. The expressions of p-EGFR, Cleaved caspase-3, E-cadherin protein in PC-9/ER cells in the erlotinib group, trichostatin A group and erlotinib + trichostatin A group were higher than those in the blank control group ($P < 0.05$); the expressions of p-EGFR, Cleaved caspase-3, E-cadherin protein in PC-9/ER cells in the trichostatin A group and erlotinib + trichostatin A group were higher than those in the erlotinib group ($P < 0.05$); the expressions of p-EGFR, Cleaved caspase-3, E-cadherin protein in PC-9/ER cells in the erlotinib + trichostatin A group were higher than those in the trichostatin A ($P < 0.05$).

Conclusion Trichostatin A combined with erlotinib can promote the apoptosis of PC-9 /ER cells. The possible mechanism is to inhibit the signal transduction pathway by promoting the expression of E-cadherin.

Key words: trichostatin A; erlotinib; E-cadherin; phosphor-epithelial growth factor receptor

目前,针对表皮生长因子受体的靶向药物对非小细胞肺癌显示出了良好的效果,尤其是第3代表皮生长因子受体-酪氨酸激酶抑制剂(epithelial growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKI)药物的问世,对第1代EGFR-TKI耐药患者显示出了明显的疗效^[1],但第3代靶向药物也将不可避免地出现获得性耐药问题^[2-3]。通过联合其他药物解决TKIs药物获得性耐药问题是近年来研究的热点。表观遗传学在肿瘤的发生、发展中起着重要作用,其中最重要的是组蛋白乙酰化及去乙酰化,主要由组蛋白乙酰转移酶和组蛋白去乙酰酶调控。组

蛋白去乙酰酶抑制剂作为一种新型的抗肿瘤药物,可以通过影响肿瘤细胞的分化及增殖,下调抗凋亡蛋白表达,促进肿瘤细胞凋亡。本研究旨在探讨组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古抑菌素A联合厄洛替尼对耐药肺腺癌细胞株PC-9/ER凋亡的影响及机制。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂与仪器 获得性耐厄洛替尼肺腺癌细胞株PC-9/ER由郑州大学实验室赠送,曲古抑菌素A购自美国Biovision公司,厄洛替尼购自美国Genentech公司,BU-膜联蛋白(Annexin V)-异硫氰

酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 凋亡试剂盒购自美国 Biouniquer 公司, 细胞周期试剂盒购自美国 Beckman Coulter 公司, E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 兔抗人单克隆抗体购自美国 Cell Signaling technology 公司, 磷酸化表皮生长因子受体 (phosphor-epithelial growth factor receptor, p-EGFR) 和 caspase-3 抗体购自美国 ProteinTech Group 公司; 倒置相差显微镜购自日本 Olympus 公司, 流式细胞仪购自美国 BD 公司, 电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司, 酶标仪购自美国 Bio-Tek 仪器公司。

1.2 细胞培养及试剂配制 人肺腺癌细胞株 PC-9/ER 培养于含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 置于 37 ℃、含体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养 48 h。取 50 mg 厄洛替尼溶解至 13 mL 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 中, 使其终浓度为 10 mmol · L⁻¹, -20 ℃ 条件下保存, 待实验需要时, 将配置好的母液稀释成所需要浓度, 曲古抑菌素 A 原液置于 -20 ℃ 条件下保存, 根据所需浓度进行稀释。

1.3 四甲基偶氮唑盐 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 法检测曲古抑菌素 A 单独及联合厄洛替尼对 PC-9/ER 细胞增殖的抑制作用 取对数生长期 PC-9/ER 细胞, 磷酸盐缓冲液洗涤 3 次, 消化、收集细胞, 每孔 4 000 个接种于 96 孔培养板中, 将细胞分为 0.0、2.5、5.0、10.0、20.0 μmol · L⁻¹ 厄洛替尼组和曲古抑菌素 A + 0.0 μmol · L⁻¹ 厄洛替尼组、曲古抑菌素 A + 2.5 μmol · L⁻¹ 厄洛替尼组、曲古抑菌素 A + 5.0 μmol · L⁻¹ 厄洛替尼组、曲古抑菌素 A + 10.0 μmol · L⁻¹ 厄洛替尼组、曲古抑菌素 A + 20.0 μmol · L⁻¹ 厄洛替尼组。0.0、2.5、5.0、10.0、20.0 μmol · L⁻¹ 厄洛替尼组细胞分别加入对应浓度的厄洛替尼 100 μL, 曲古抑菌素 A 联合厄洛替尼组分别加入 250 nmol · L⁻¹ 的曲古抑菌素 A 100 μL 和对应浓度的厄洛替尼 100 μL, 每组设 3 个复孔。置于 37 ℃, 含体积分数 5% CO₂ 的培养箱中。48 h 后用胰蛋白酶消化细胞, 加入 MTT 20 μL (5 g · L⁻¹), 在波长 490 nm 处测每孔吸光度值, 计算每组平均吸光度值。细胞抑制率 = (1 - 实验组平均吸光度值/对照组吸光度值) × 100%, 上述实验重复 3 次, 计算均值。计算联用指数 (combination index, CI), 判断 2 种药物是否有协同作用。CI > 1 表示 2 种药物相互拮抗, CI = 1 表示 2 种药物作用叠加, CI < 1 表示 2 种药物有协同作用, 且 CI 越小, 协同作用越明显。

1.4 流式细胞术检测细胞周期 取对数生长期 PC-9/ER 细胞, 按每孔 2 × 10⁵ 个接种于 6 孔板, 将细胞分为厄洛替尼组和曲古抑菌素 A + 厄洛替尼组。厄洛替尼组细胞给予 20 μmol · L⁻¹ 厄洛替尼 100 μL, 曲古抑菌素 A + 厄洛替尼组细胞给予 250 nmol · L⁻¹ 曲古抑菌素 A 100 μL 和 20 μmol · L⁻¹ 厄洛替尼 100 μL 进行处理, 每组设 3 个复孔。将 6 孔板置于 37 ℃, 含体积分数 5% CO₂ 的培养箱中孵育 24 h。胰蛋白酶消化细胞后, 1 000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 加入 400 μL 1 × Binding Buffer 轻轻重悬细胞, 加入 5 μL Annexin V-FITC 轻轻混匀, 室温避光 15 min, 然后加入 10 μL 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色液, 混匀, 避光 5 min。用流式细胞仪检测各组细胞的细胞周期分布。

1.5 免疫荧光细胞化学法检测 PC-9/ER 细胞中 E-cadherin 表达及 Hoechst33258 染色法观察 PC-9/ER 细胞凋亡 将无菌盖玻片置于 6 孔板中, 取对数期 PC-9/ER 细胞, 爬片, 培养过夜。将细胞分为空白对照组、曲古抑菌素 A 组、厄洛替尼组、曲古抑菌素 A + 厄洛替尼组。空白对照组细胞给予 DMSO 100 μL, 曲古抑菌素 A 组细胞给予 250 nmol · L⁻¹ 曲古抑菌素 A 100 μL, 厄洛替尼组细胞给予 20 μmol · L⁻¹ 厄洛替尼 100 μL, 曲古抑菌素 A + 厄洛替尼组细胞给予 250 nmol · L⁻¹ 曲古抑菌素 A 100 μL 和 20 μmol · L⁻¹ 厄洛替尼 100 μL。然后置于 37 ℃, 含体积分数 5% CO₂ 的培养箱中孵育 24 h。胰蛋白酶消化细胞后, 吸尽培养液, 40 g · L⁻¹ 多聚甲醛固定 30 min, 500 μL Triton X-100 通透 30 min, 山羊血清封闭 30 min, 弃封闭液。E-cadherin 一抗孵育过夜, 加入荧光二抗, 室温避光孵育 1 h。加入 0.5 mL Hoechst33258 染色细胞核 5 min, 加 1 滴抗荧光淬灭液, 荧光显微镜下观察 E-cadherin 表达情况, 细胞内可见绿色荧光为表达阳性, 细胞内无绿色荧光为表达阴性。根据 Hoechst33258 染色判断 PC-9/ER 细胞凋亡情况。

1.6 Western blot 法检测 PC-9/ER 细胞中 E-cadherin、p-EGFR、Cleaved-caspase-3 蛋白表达 将 PC-9/ER 细胞接种于 6 孔板, 置于 37 ℃、含体积分数 5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h。胰蛋白酶消化细胞后, 将细胞分为空白对照组、曲古抑菌素 A 组、厄洛替尼组、曲古抑菌素 A + 厄洛替尼组。空白对照组细胞给予 DMSO 100 μL, 曲古抑菌素 A 组细胞给予 250 nmol · L⁻¹ 曲古抑菌素 A 100 μL, 厄洛替尼组细

胞给予 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 厄洛替尼 100 μL ,曲古抑菌素 A + 厄洛替尼组细胞给予 250 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 曲古抑菌素 A 100 μL 和 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 厄洛替尼100 μL ,24 h 后提取总蛋白,测蛋白质浓度。各组取等量蛋白质分别采用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳进行分离,然后转至聚偏二氟乙烯膜上。100 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 牛奶室温下摇动封闭后加入 E-cadherin、p-EGFR、Cleaved-caspase-3、 β -actin 一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,室温下洗膜后加入二抗,孵育 1 h。三乙醇胺缓冲盐水溶液洗膜 3 次,每次 10 min。然后进行发光显影,观察不同蛋白表达情况。采用 Quantity One 软件分析蛋白表达灰度值,蛋白相对表达水平为目的蛋白灰度值与内参蛋白灰度值的比值,以 β -actin 为内参。

表 1 厄洛替尼单独或联合曲古抑菌素 A 对肺腺癌细胞株 PC-9/ER 抑制作用

组别	<i>n</i>	细胞抑制率/%	CI
0.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 厄洛替尼组	3	4.6 \pm 0.5	-
2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 厄洛替尼组	3	7.4 \pm 0.3	-
5.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 厄洛替尼组	3	12.2 \pm 1.5	-
10.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 厄洛替尼组	3	16.5 \pm 1.8	-
20.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 厄洛替尼组	3	21.2 \pm 2.3	-
曲古抑菌素 A + 0.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 厄洛替尼组	3	15.0 \pm 0.5 ^a	-
曲古抑菌素 A + 2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 厄洛替尼组	3	16.6 \pm 1.2 ^a	0.930 24
曲古抑菌素 A + 5.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 厄洛替尼组	3	26.2 \pm 2.1 ^a	0.816 93
曲古抑菌素 A + 10.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 厄洛替尼组	3	34.7 \pm 2.4 ^a	0.672 74
曲古抑菌素 A + 20.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 厄洛替尼组	3	56.4 \pm 3.2 ^a	0.362 57

注:与对应浓度厄洛替尼组比较^a $P < 0.05$; - :无数据。

2.2 厄洛替尼联合曲古抑菌素 A 对肺腺癌细胞株 PC-9/ER 细胞周期的影响 结果见表 2。曲古抑菌素 A + 厄洛替尼组 G₂/M 期细胞所占的比例高于厄洛替尼组,G₀/G₁ 和 S 期细胞所占比例低于厄洛替尼组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 2 组细胞周期比较

组别	PC-9/ER 细胞周期 ($\bar{x} \pm s$)		
	G ₀ /G ₁ /%	S/%	G ₂ /M/%
厄洛替尼组	56.1 \pm 0.8	20.2 \pm 0.6	21.1 \pm 1.2
曲古抑菌素 A + 厄洛替尼组	39.1 \pm 0.7	7.9 \pm 0.5	52.1 \pm 1.1
<i>t</i>	27.670	27.255	-33.026
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

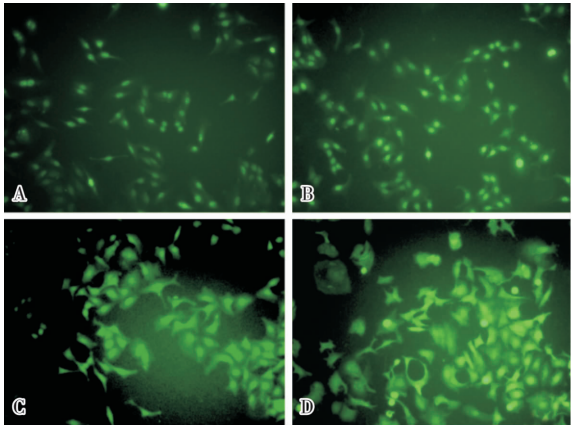
2.3 各组 PC-9/ER 细胞中 E-cadherin 表达及细胞凋亡情况 曲古抑菌素 A + 厄洛替尼组 PC-9/ER 细胞中 E-cadherin 表达水平高于空白对照组、厄洛替尼组和曲古抑菌素 A 组(图 1)。Hoechst33258 染色结果显示,曲古抑菌素 A + 厄洛替尼组细胞核染色强

1.7 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 厄洛替尼单独及联合曲古抑菌素 A 对 PC-9/ER 抑制率比较 结果见表 1。不同浓度厄洛替尼联合曲古抑菌素 A 对人肺腺癌 PC-9/ER 细胞增殖的抑制作用均强于单用厄洛替尼组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。不同浓度厄洛替尼联合曲古抑菌素 A 对 PC-9/ER 细胞抑制作用的 CI 均 < 1 ,说明二者具有协同作用。其中曲古抑菌素 A 联合 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 厄洛替尼协同效果最强(CI = 0.362 57)。

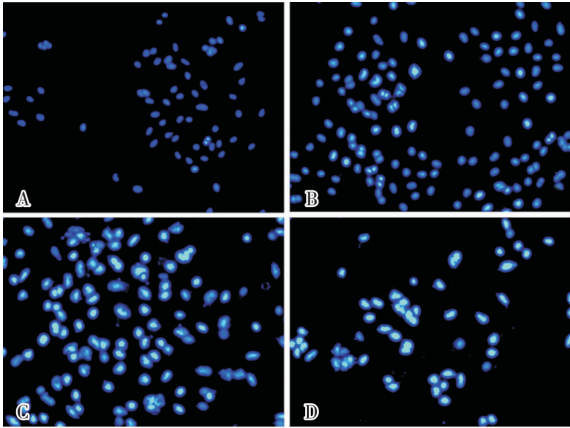
度明显增加,细胞凋亡现象多于空白对照组、厄洛替尼组和曲古抑菌素 A 组(图 2)。



A:空白对照组;B:厄洛替尼组;C:曲古抑菌素 A 组;D:曲古抑菌素 A + 厄洛替尼组。

图 1 各组 PC-9/ER 细胞中 E-cadherin 表达(荧光显微镜, $\times 200$)

Fig.1 E-cadherin expression in PC-9 /ER cells in each group(fluorescence microscope , $\times 200$)



A:空白对照组;B:厄洛替尼组;C:曲古抑菌素 A 组;D:厄洛替尼 + 曲古抑菌素 A 组。

图 2 各组 PC-9/ER 细胞凋亡情况 (荧光显微镜, ×200)

Fig.2 Apoptosis of PC-9/ER cells (fluorescence microscope, ×200)

2.4 各组 PC-9/ER 细胞中 E-cadherin、p-EGFR、Cleaved-caspase-3 表达 结果见图 3 和表 3。厄洛替尼组、曲古抑菌素 A 组和厄洛替尼 + 曲古抑菌素 A 组细胞中 p-EGFR、Cleaved-caspase-3、E-cadherin 蛋白表达水平均高于空白对照组,差异有统计学意义

表 3 4 组细胞中 p-EGFR、Cleaved-caspase-3、E-cadherin 蛋白相对表达量比较

Tab.3 Comparison of relative expression of p-EGFR,Cleaved-caspase-3 and E-cadherin protein among the four groups

组别	n	p-EGFR 蛋白	Cleaved-caspase-3 蛋白	E-cadherin 蛋白
空白对照组	3	0.12 ± 0.02	0.15 ± 0.03	0.13 ± 0.02
厄洛替尼组	3	0.20 ± 0.03 ^a	0.30 ± 0.09 ^a	0.32 ± 0.08 ^a
曲古抑菌素 A 组	3	0.21 ± 0.05 ^{ab}	0.98 ± 0.12 ^{ab}	1.02 ± 0.12 ^{ab}
曲古抑菌素 A 组 + 厄洛替尼组	3	0.28 ± 0.04 ^{abc}	1.25 ± 0.23 ^{abc}	2.13 ± 0.47 ^{abc}

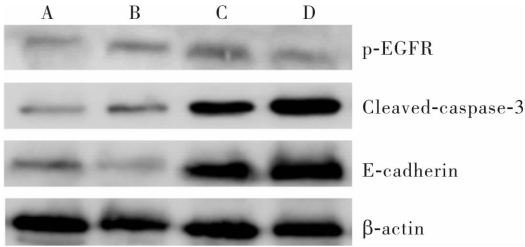
注:与空白对照组比较^a $P < 0.05$;与厄洛替尼组比较^b $P < 0.05$;与曲古抑菌素 A 组比较^c $P < 0.05$ 。

3 讨论

肺癌的发生和发展是多种机制共同作用的结果,表观遗传学在肺癌发生、发展中起着重要作用,其中包括甲基化和组蛋白的去乙酰化。组蛋白去乙酰化酶抑制剂作为表观遗传学的重要组成部分越来越多地应用于肿瘤研究^[4]。目前研究已证实,组蛋白去乙酰化酶抑制剂与肺癌的发生、发展有直接联系,组蛋白去乙酰化酶抑制剂可以抑制组蛋白去乙酰化酶的活性,提高组蛋白和非组蛋白乙酰化水平,导致染色体凝集、基因转录过程发生改变,从而使基因表达受到抑制^[5],最终导致肿瘤细胞凋亡。

组蛋白去乙酰化酶抑制剂可通过不同的机制逆转癌细胞对靶向药物 TKIs 的耐药性,CHEN 等^[6]研究发现,组蛋白去乙酰化酶抑制剂 Vorinostat 可通过影响凋亡前蛋白 BIM 和 BAX 及自噬逆转非小细胞肺癌细胞株对吉非替尼的耐药性。PARK 等^[7]研究证实,组蛋白去乙酰化酶抑制剂 SAHA 能够通过调节 E-cadherin 的表达而促进对厄洛替尼获得性耐药

($P < 0.05$);曲古抑菌素 A 组和厄洛替尼 + 曲古抑菌素 A 组细胞中 p-EGFR、Cleaved-caspase-3、E-cadherin 蛋白表达水平高于厄洛替尼组,差异有统计学意义($P < 0.05$);厄洛替尼 + 曲古抑菌素 A 组细胞中 p-EGFR、Cleaved-caspase-3、E-cadherin 蛋白表达水平高于曲古抑菌素 A 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



A:空白对照组;B:厄洛替尼组;C:曲古抑菌素 A 组;D:厄洛替尼 + 曲古抑菌素 A 组。

图 3 各组 PC-9 /ER 细胞中 E-cadherin、p-EGFR、Cleaved-caspase-3 蛋白表达 (Western blot)

Fig.3 Expression of E-cadherin, p-EGFR and Cleaved-caspase-3 proteins in PC-9 /ER cells in each group (Western blot)

的胰腺癌细胞株的凋亡。曲古抑菌素 A 是组蛋白去乙酰化酶抑制剂中的一种,可以诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞生长。TANG 等^[8]研究发现,曲古抑菌素 A 能够通过促进 IGFBP2 蛋白表达及细胞自噬作用逆转肺癌细胞对化学治疗药物的耐药过程。还有研究发现,曲古抑菌素 A 可通过调节转化生长因子- β 表达逆转放射治疗引起的上皮-间充质转化过程,调节 E-cadherin 表达,从而促进肺癌 A549 细胞凋亡^[9]。本研究发现,曲古抑菌素 A 联合厄洛替尼对耐 TKI 细胞株有明显的抑制作用,细胞凋亡较单一用药组明显增多,且细胞周期阻滞在 G_2/M 期。

E-cadherin 属于钙黏蛋白家族中重要的细胞黏附分子,在肿瘤的发生、发展及转移中发挥重要作用, E-cadherin 是上皮-间充质转化的重要标志之一^[10],其表达下调与乳腺癌的不良预后有关^[11]。有研究证实,曲古抑菌素 A 能够上调 E-cadherin 的表达,从而阻止非小细胞肺癌细胞的转移和侵袭^[12]。本研究结果显示,曲古抑菌素 A 能够增强耐药厄洛替尼的敏感性,促进细胞凋亡,且能够促进 p-

EGFR、E-cadherin 的表达,联合用药组E-cadherin表达明显增多,且 Cleaved-caspase-3 蛋白表达也明显增多,提示曲古抑菌素 A 可能是通过上调 E-cadherin 的表达而逆转厄洛替尼的耐药过程,促进细胞凋亡。

综上所述,组蛋白去乙酰酶抑制剂曲古抑菌素 A 能够逆转肺癌细胞对厄洛替尼的耐药过程,其机制可能为通过上调 E-cadherin 表达而影响 caspase-3 传导通路,促进细胞凋亡,但 E-cadherin 如何调节肺癌细胞对厄洛替尼的耐药过程及具体信号通路尚需要进一步研究。

参考文献:

[1] STEUER C E,KHURI F R,RAMALINGAM S S. The next generation of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in the treatment of lung cancer [J]. *Cancer*,2015,121(8):E1-E6.

[2] SHI P,OH Y T,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.

[3] WANG S,TSUI S T,LIU C ,et al. EGFR C797S mutation mediates resistance to third-generation inhibitors in T790M-positive non-small cell lung cancer [J]. *J Hematol Oncol*,2016,9(1):59-64.

[4] BOSE P,DAI Y,GRANT S. Histone deacetylase inhibitor (HDA-CI) mechanisms of action: emerging insights [J]. *Pharmacol Ther*,2014,143(3):323-336.

[5] ERIKSSON M,HAAG P,BRZOZOWSKA B ,et al. Analysis of chromatin opening in heterochromatic non-small cell lung cancer

tumor-initiating cells in relation to DNA-damaging antitumor treatment [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*,2018,100(1):174-187.

[6] CHEN H,WANG Y,LIN C ,et al. Vorinostat and metformin sensitize EGFR-TKI resistant NSCLC cells via BIM-dependent apoptosis induction [J]. *Oncotarget*,2017,8(55):93825-93838.

[7] PARK S J,KIM S M,MOON J H ,et al. SAHA,an HDAC inhibitor,overcomes erlotinib resistance in human pancreatic cancer cells by modulating E-cadherin [J]. *Tumour Biol*,2016,37(4):4323-4330.

[8] TANG D,YAO R,ZHAO D ,et al. Trichostatin A reverses the chemoresistance of lung cancer with high IGFBP2 expression through enhancing autophagy [J]. *Sci Rep*,2018,8(1):3917-3922.

[9] NAGARAJA S S,KRISHNAMOORTHY V,RAVIRAJ R ,et al. Effect of trichostatin A on radiation induced epithelial-mesenchymal transition in A549 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2017,493(4):1534-1541.

[10] DHAWAN U,SUE M W,LAN K C ,et al. Nanochip-induced epithelial-to-mesenchymal transition: impact of physical microenvironment on cancer metastasis [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*,2018,10(14):11474-11485.

[11] XIE Y,LI P,GAO Y ,et al. Reduced E-cadherin expression is correlated with poor prognosis in patients with bladder cancer;a systematic review and meta-analysis [J]. *Oncotarget*,2017,8(37):62489-62499.

[12] MATEEN S,RAINA K,AGARWAL C ,et al. Silibinin synergizes with histone deacetylase and DNA methyltransferase inhibitors in upregulating E-cadherin expression together with inhibition of migration and invasion of human non-small cell lung cancer cells [J]. *J Pharmacol Exp Ther*,2013,345(2):206-214.

(本文编辑:孟 月)

(上接第 403 页)

本研究结果显示,对照组 2 种细胞株 CNRIP1 基因呈甲基化状态,0.5 μmol · L⁻¹ 组也呈现甲基化状态,而1.0、1.5 μmol · L⁻¹ 组呈非甲基化状态,这可能与浓度较低时作用不完全有关。葛畅等^[9]、许春伟等^[10] 研究中也存在类似现象。

总之,CNRIP1 基因是一种潜在的抑癌基因,其异常甲基化改变可能是导致肺鳞状细胞癌发生的重要因素,其导致疾病发生的原因是引起蛋白失活。因此,期待未来能够对甲基化进一步研究,寻求导致恶性肿瘤更多的基因靶点,为制定靶向治疗及基因层面治疗提供一定的理论依据。

参考文献:

[1] SIEGEL R L,MILLER K D,JEMAL A. Cancer statistics,2018 [J]. *CA Cancer J Clin*,2018,68(12):277-300.

[2] 石远凯,孙燕,于金明,等. 中国晚期原发性肺癌诊治专家共识(2016 年版)[J]. *中国肺癌杂志*,2016,19(1):1-15.

[3] JI W M,LEE S K,LEE J O ,et al. Identification of novel hypermethylated genes and demethylating effect of vincristine in colorectal

cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*,2014,33(1):41-43.

[4] 侯箬岚. RECK、TFF2、ERβ 在子宫内膜癌中的表达及 p16 甲基化的临床意义[J]. *中国实验诊断学*,2015,8(11):1865-1869.

[5] 郭琪,胡娇,宋永春,等. 痰液 CNRIP1 基因甲基化检测对于肺癌诊断的意义[J]. *山西医科大学学报*,2019,50(1):65-68.

[6] LIU B,SONG J,LUAN J ,et al. Promoter methylation status of tumor suppressor genes and inhibition of expression of DNA methyltransferase 1 in non-small cell lung cancer[J]. *Exp Bio Med*,2016,241(14):1531-1539.

[7] 国丽,黄超,叶美,等. 胃癌中 P16、Survivin 和 Rb 基因甲基化状态[J]. *实用医学杂志*,2016,32(14):2380-2382.

[8] 曹丽,孙阳阳,曹若琼,等. 非小细胞肺癌患者血浆 RUNX3、RASSF1A、3-OST-2、DAPK、PTPRO 基因甲基化状态观察[J]. *山东医药*,2016,56(43):84-87.

[9] 葛畅,许春伟,王鲁平,等. 5'-氮杂-2'-脱氧胞苷对结直肠癌细胞株 HT-29 和 LoVo 中 MLH-1 基因甲基化状态、mRNA 及蛋白表达的影响[J]. *皖南医学院学报*,2014,33(16):478-482.

[10] 许春伟,葛畅,王鲁平,等. 5'-Aza-CdR 对 HT-29 和 LoVo 结直肠癌细胞株中 CDX2 基因甲基化状态、mRNA 表达及蛋白表达的影响[J]. *世界华人消化杂志*,2014,28(10):1423-1430.

(本文编辑:孟 月)