

雷公藤甲素联合吉非替尼对EGFR突变NSCLC细胞的协同效应分析

张 艺^{1*}, 郭 芬^{2#}(1.咸宁市中心医院/湖北科技学院附属第一医院呼吸与危重症医学科,湖北咸宁 437100; 2.湖北科技学院临床医学院医学实验实训中心,湖北咸宁 437100)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2023)18-2219-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.18.09



摘要 目的 探讨雷公藤甲素(TPL)联合表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)吉非替尼对EGFR突变非小细胞肺癌(NSCLC)细胞的协同效应及潜在机制。**方法** 体外培养人NSCLC细胞系H1975(EGFR T790M/L858R突变的耐药细胞系)和H1299(EGFR野生型的非耐药细胞系),采用MTT法检测细胞存活率并通过联合用药指数(CI)评价TPL和吉非替尼的联用效应。将H1975细胞分为空白组、低、高浓度TPL组(5、15 nmol/L),吉非替尼组(2 μmol/L),低浓度TPL+吉非替尼组、高浓度TPL+吉非替尼组(5 nmol/L TPL+2 μmol/L 吉非替尼、15 nmol/L TPL+2 μmol/L 吉非替尼),采用流式细胞术检测其凋亡及周期分布情况;利用分子对接技术预测TPL与EGFR的结合能力,并采用流式细胞术检测细胞中磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)通路及自噬相关蛋白[微管相关蛋白1轻链3α(MAP1LC3A)、MAP1LC3B]的表达情况。**结果** TPL对H1975和H1299细胞的增殖均有一定的抑制作用,且有浓度、时间依赖趋势;5或15 nmol/L TPL联合吉非替尼作用48 h对H1975细胞的增殖均有协同抑制效应(CI<1),而对H1299细胞则无协同作用(CI>1)。与空白组比较,各药物组的细胞凋亡率和G₀/G₁期细胞的比例均显著升高,S期、G₂/M期(个别TPL组除外)细胞的比例均显著降低,且联用组效果更优(P<0.05)。分子对接结果显示,TPL的羟基可与EGFR T790M/L858R突变编码产物的Thr854残基形成氢键。与空白组比较,各药物组细胞中通路相关蛋白的表达均显著下调,自噬相关蛋白的表达均显著上调,且联用组效果更优(P<0.05)。**结论** TPL联合吉非替尼可协同抑制EGFR突变NSCLC细胞的增殖活性,其作用机制可能与下调PI3K/Akt/mTOR通路和诱导细胞自噬有关。

关键词 雷公藤甲素;吉非替尼;表皮生长因子受体;酪氨酸激酶抑制剂;非小细胞肺癌;磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白通路;自噬;耐药

Analysis of the synergistic effect of triptolide combined with gefitinib on EGFR-mutant NSCLC cells

ZHANG Yi¹, GUO Fen²(1. Dept. of Respiratory and Critical Care Medicine, Xianning Central Hospital/the First Affiliated Hospital of Hubei University of Science and Technology, Hubei Xianning 437100, China; 2. Medical Experiment Center, Clinical Medical College of Hubei University of Science and Technology, Hubei Xianning 437100, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To investigate the synergistic effect of triptolide (TPL) combined with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) gefitinib on EGFR-mutated non-small cell lung cancer (NSCLC) cells and its potential mechanism. **METHODS** Human NSCLC cell lines H1975 (EGFR T790M/L858R mutated drug-resistant cell lines) and H1299 (EGFR wild-type non-drug-resistant cell lines) were cultured *in vitro*. MTT method was used to detect cell activity, and the effect of combined medication was evaluated by the combination index (CI). The H1975 cells were divided into blank group, low-concentration and high-concentration groups of TPL (5 nmol/L or 15 nmol/L), gefitinib group (2 μmol/L), low-concentration and high-concentration groups of TPL+gefitinib (5 nmol/L TPL+2 μmol/L gefitinib, 15 nmol/L TPL+2 μmol/L gefitinib). Flow cytometry was used to detect the apoptosis of H1975 cells and the distribution of the cell cycle. Molecular docking studies were used to predict the binding ability of TPL to EGFR. The expressions of phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway and autophagy-related proteins [microtubule-associated protein 1 light chain 3α (MAP1LC3A), MAP1LC3B] in H1975 cells were detected by flow cytometry. **RESULTS** TPL had a strong inhibitory effect on the proliferation of H1975 and H1299 cells in a time-dependent and dose-dependent manner. Forty-eight hours treatment of 5 or 15 nmol/L TPL combined with

* 第一作者 副主任医师。研究方向:慢性阻塞性肺疾病、哮喘、肺炎、肺癌、间质性肺病的基础与临床。E-mail:bichez955393@163.com

通信作者 主任医师。研究方向:肿瘤内科基础与临床。E-mail:87146788@qq.com

gefitinib had a synergistic inhibitory effect on the proliferation of H1975 cells ($CI < 1$), while there was no synergistic inhibitory effect on H1299 cells ($CI > 1$). Compared with the blank group, the apoptosis rate and the proportion of H1975 cells at G_0/G_1 phase were increased significantly in administration groups, while the proportions of cells at S phase and G_2/M phase (except for several TPL groups) were decreased significantly, and the combination group had better effects ($P < 0.05$). Molecular docking studies showed that the hydroxyl radical of TPL could form hydrogen bonds with the Thr854 residue of the product encoded by *EGFR* T790M/L858R mutation. Compared with the blank group, the expressions of pathway-related proteins were down-regulated significantly in administration groups, while those of autophagy-related proteins were up-regulated significantly, and the combination group had better effects ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS** TPL combined with gefitinib can synergistically inhibit the proliferation activity of *EGFR*-mutated NSCLC cells, the mechanism of which may be related to the down-regulation of PI3K/Akt/mTOR pathway and induction of autophagy.

KEYWORDS triptolide; gefitinib; epidermal growth factor receptor; tyrosine kinase inhibitor; non-small cell lung cancer; phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin pathway; autophagy; drug resistance

肺癌是癌症致死的首要原因,其中约85%的肺癌为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),严重影响人类健康^[1]。近年来,表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)编码基因分型的鉴定和EGFR酪氨酸激酶抑制剂(EGFR tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKIs)靶向药物的发展,极大地改变了EGFR基因突变晚期NSCLC患者的治疗结局^[2]。然而,几乎所有的EGFR基因突变阳性患者都会在治疗1年内对EGFR-TKIs产生获得性耐药^[3],故探寻能够预防或克服EGFR-TKIs耐药的治疗方案成为该领域的主要研究方向。

近期研究证实,某些天然药物成分可通过不同的信号通路来推迟或阻止EGFR-TKIs耐药的发生^[4]。雷公藤甲素(triptolide, TPL)是从中药雷公藤中提取分离的一种二萜类化合物,具有显著的抗肿瘤活性,且在逆转化疗药物耐药方面具有一定潜力^[5-6],然而其具体机制尚不清楚。既往有研究证实,TPL可调节多种生物学过程关键蛋白的表达,且与磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, 又称Akt)通路的关系尤其密切^[7];同时,PI3K/Akt通路与EGFR-TKIs耐药的发生密切相关^[8]。为此,本课题组基于PI3K/Akt通路,以耐药细胞为对象,初步探索TPL对第一代EGFR-TKIs吉非替尼获得性耐药的抑制作用及潜在机制,旨在为进一步阐明TPL的药理作用提供参考,亦为预防或逆转EGFR-TKIs耐药提供候选治疗策略。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括BD Accuri C6型流式细胞仪(美国BD Biosciences公司)、XBQ-2H型细胞培养仪(上海佐研仪器科技有限公司)、LD-96A型酶标仪(山东莱恩德智能科技有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

TPL对照品(批号111567-202005,纯度 $\geq 98\%$)购自中国食品药品检定研究院;吉非替尼片(批号211102,规格0.25 g)购自日本Kagamiishi Plant, Nipro Pharma Corporation。TPL对照品和吉非替尼片均保存于二甲亚砜(DMSO)中(最终质量浓度均为100 $\mu\text{g/mL}$),临用前以无血清培养基稀释至相应质量浓度。

RPMI 1640培养基购自美国Gibco公司;核糖核酸酶I购自美国Sigma-Aldrich公司;碘化丙啶(propidium iodide, PI)试剂购自北京百奥莱博科技有限公司;MTT试剂(批号c7062)购自北京博奥森生物技术有限公司;兔源PI3K p85 α 单克隆抗体(批号ab191606)、兔源Akt3+Akt2+Akt1重组单克隆抗体(批号ab32505)、小鼠源哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)单克隆抗体(批号ab87540)、兔源微管相关蛋白1轻链3 α (microtubule-associated protein 1 light chain 3 α , MAP1LC3A)单克隆抗体(批号ab52768)、兔源MAP1LC3B多克隆抗体(批号ab51520)、Alexa Fluor[®]488标记的山羊抗兔IgG二抗(批号ab150077)、Alexa Fluor[®]488标记的山羊抗鼠IgG二抗(批号ab96879)均购自英国Abcam公司。

1.3 实验细胞

人EGFR低敏感性NSCLC细胞系H1975(即EGFR T790M/L858R突变的耐药细胞系)和高敏感性NSCLC细胞系H1299(即EGFR野生型的非耐药细胞系)均购自日本Riken细胞库。

2 方法

2.1 细胞培养

将H1299和H1975细胞置于含有10%胎牛血清、L-谷氨酰胺(2 mmol/L)、1%青霉素-链霉素双抗和25 mmol/L HEPES缓冲液的RPMI 1640培养基中,在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养。待细胞生长融合度达90%

时,用0.25%胰酶消化并按照1:3的比例传代继续培养,取传至第2代的细胞进行后续实验。

2.2 TPL、吉非替尼单用及两药联合对2种细胞敏感性影响的检测

待H1299和H1975细胞铺满培养皿60%左右时,取生长良好的细胞以 2.5×10^5 个/孔接种于6孔板中,在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养(培养条件下同)。待细胞完全贴壁后,分为空白组(仅含细胞和培养液)、不同浓度TPL组(1、5、10、15、20、25、30 nmol/L,参考相关文献^[6]和预实验结果设置)、不同浓度吉非替尼组(1、2、4、8、12、16、20 $\mu\text{mol/L}$,参考相关文献^[7]和预实验结果设置)、不同浓度TPL+吉非替尼组(5 nmol/L TPL分别联合2、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 吉非替尼,10 nmol/L TPL分别联合2、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 吉非替尼,参考前期MTT筛选结果设置),每组设6个复孔。弃去培养液,各药物组加入相应药液,空白组不作处理。培养24、48、72 h后,收集各组细胞,加入5 mg/mL MTT试剂20 μL ,在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下孵育4 h,使用酶标仪于490 nm波长处检测各孔的光密度(optical density, OD)值并计算细胞存活率:细胞存活率(%)=药物组OD值/空白组OD值 $\times 100\%$ 。计算吉非替尼(作用24、48、72 h)的半数抑制浓度(IC_{50})和吉非替尼单用及两药联用(作用48 h)的药物敏感度指数(sensitivity index, SI): $\text{SI} = \Delta X / \Delta Y$ (式中, ΔX 是细胞存活数, ΔY 是正常细胞总数)。若 $\text{SI} = 1.0$,表示细胞对药物的敏感性不明显; $\text{SI} > 1.0$,表示细胞对药物的敏感性较高; $\text{SI} < 1.0$,表示细胞对药物的敏感性较低^[9]。采用中位药效法(Chou-Talalay法)计算TPL联合吉非替尼作用48 h的联合用药指数(combination index, CI): $\text{CI} = d_1/D_1 + d_2/D_2$ (式中, d_1 和 d_2 分别为联合用药时吉非替尼和TPL的浓度; D_1 和 D_2 分别为产生与联合用药相等效应时吉非替尼和TPL单用的浓度)。 $\text{CI} > 1$ 为两药拮抗, $\text{CI} = 1$ 为两药相加, $\text{CI} < 1$ 为两药协同^[6];以受影响的细胞比例(F_a)为横坐标、CI为纵坐标绘制散点图,若 F_a 为0.2~0.8则表示药物有效^[7]。

2.3 TPL联合吉非替尼对H1975细胞凋亡及周期分布影响的检测

取生长良好的H1975细胞以 2×10^5 个/孔接种于6孔板中,培养,待细胞贴壁后,分为空白组(仅含细胞和培养液),低、高浓度TPL组(5、15 nmol/L,参考“2.2”项下结果设置),吉非替尼组(2 $\mu\text{mol/L}$,参考“2.2”项下结果设置),低浓度TPL+吉非替尼组、高浓度TPL+吉非替尼组(5 nmol/L TPL+2 $\mu\text{mol/L}$ 吉非替尼,15 nmol/L TPL+2 $\mu\text{mol/L}$ 吉非替尼,参考“2.2”项下结果设置),每组设6个复孔。弃去培养液,各药物组加入相应药液,空

白组不作处理。培养24、48 h后,收集各组细胞,并固定于冷的75%乙醇中,随后用含200 mmol/L Na_2PO_4 和0.1% Triton X-100试剂的DNA缓冲液处理,再以含200 $\mu\text{g/mL}$ 核糖核酸酶I的PI试剂染色,使用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率及周期分布情况。

2.4 TPL与EGFR分子对接分析

从PDB蛋白质数据库(<https://www.rcsb.org/>)加载EGFR T790M/L858R突变型及野生型编码产物的晶体结构,去除水分子后,基于AMBER99力场对其进行质子化处理;利用MMFF94s力场优化TPL的分子结构。利用MOE分子对接软件模拟TPL和EGFR的结合位点。基于结合对接能量对TPL的所有结合位点进行排序,并选择能量最低的构象进行结合模式展示。

2.5 TPL联合吉非替尼对H1975细胞PI3K/Akt/mTOR通路及自噬相关蛋白表达影响的检测

采用流式细胞术检测。取生长良好的H1975细胞以 2×10^5 个/孔接种于6孔板中,培养,待细胞贴壁后,按“2.3”项下方法分组、干预。培养24、48 h后,收集各组细胞,分别用核因子固定液和渗透缓冲液固定和渗透,然后加入PI3K、Akt、mTOR、MAP1LC3A、MAP1LC3B一抗(稀释比例均为1:2 000), $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜;再加入相应二抗(稀释比例均为1:1 000),孵育1 h。使用酶标仪检测并使用FlowJo V10软件分析目的蛋白的荧光强度以表示其表达水平。

2.6 统计学方法

采用SPSS 26.0软件对数据进行统计分析。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD- t 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 TPL、吉非替尼单用及两药联合对2种细胞敏感性的影响

随着浓度的增加和时间的延长,TPL、吉非替尼对H1975和H1299细胞增殖的抑制作用逐渐增强,且具有浓度、时间依赖趋势(图1A、1B)。作用24、48、78 h时,吉非替尼对H1975细胞的 IC_{50} 分别为15.10、11.67、7.31 $\mu\text{mol/L}$,对H1299细胞的 IC_{50} 分别为15.78、12.75、9.48 $\mu\text{mol/L}$ 。作用48 h时,吉非替尼对H1975细胞的SI为0.73;与5或15 nmol/L的TPL联用后,SI分别升至1.88、2.30,提示联用后药物对H1975细胞的敏感性有所增加;此外,两药联合作用48 h对H1975细胞的CI均小于1(F_a 约为0.5),提示两药联合对H1975细胞的增殖具有协同抑制效应。但两药联用对H1299细胞的CI均大于1(F_a 多低于0.2),提示两药联合对H1299细胞的增殖并无上述协同抑制效应(图1C、图1D)。

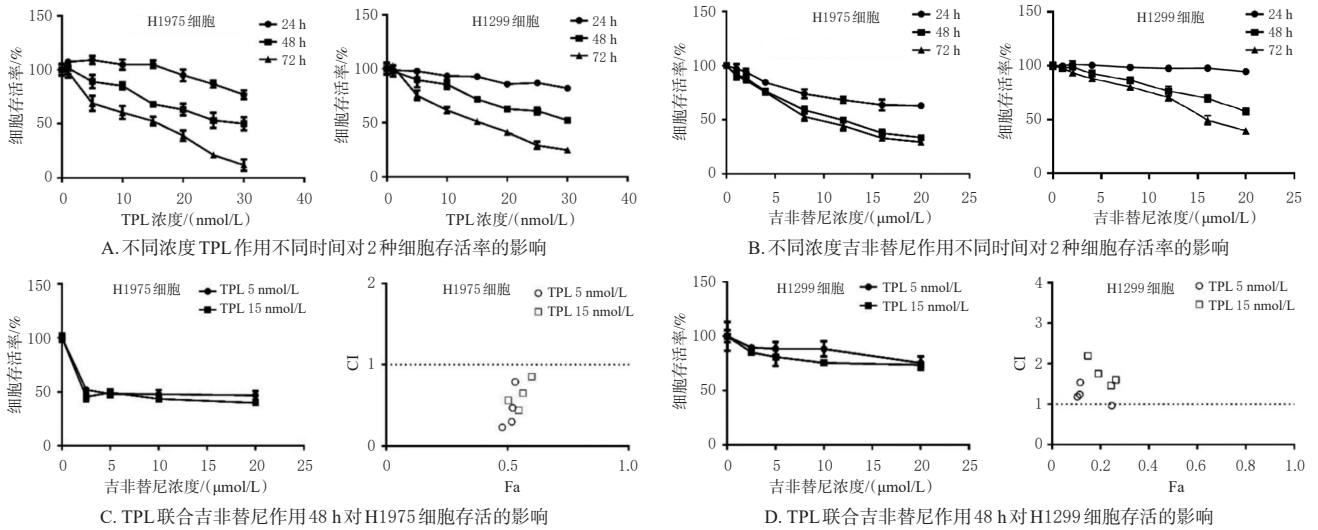


图1 TPL、吉非替尼单用及两药联用对2种细胞敏感性的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.2 TPL联合吉非替尼对H1975细胞凋亡及周期分布的影响

H1975细胞培养24 h或48 h时,各药物组细胞的凋亡率均较空白组显著升高($P<0.05$)。同时,与空白组比较,各药物组G₀/G₁期细胞的比例均显著升高,S期、G₂/M期(仅高浓度TPL组作用48 h和联用组)细胞的比例均显著降低,且高浓度TPL组细胞的凋亡率及周期变化普遍较吉非替尼组,联用组较吉非替尼、TPL单用组,高浓度联用组较低浓度联用组更明显($P<0.05$)。结果见表1。

3.3 TPL与EGFR分子对接分析

TPL的羟基可与EGFR T790M/L858R突变编码产物的Thr854残基形成氢键,结合对接能量为-6.504

kcal/mol(1 kcal=4.19 kJ);而TPL与EGFR野生型编码产物之间没有氢键,结合对接能量为-4.460 kcal/mol。结果见图2。

3.4 TPL联合吉非替尼对H1975细胞PI3K/Akt/mTOR通路及自噬相关蛋白表达的影响

与空白组比较,各药物组培养24、48 h时通路相关蛋白PI3K、Akt、mTOR的表达均显著下调,而自噬相关蛋白MAP1LC3A、MAP1LC3B的表达均显著上调,且高浓度TPL组上述指标的变化均较吉非替尼组,联用组较吉非替尼、TPL单用组,高浓度联用组较低浓度联用组更明显($P<0.05$),结果见图3。

表1 TPL联合吉非替尼对H1975细胞凋亡率及周期分布的影响($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

组别	培养24 h				培养48 h			
	凋亡率	G ₀ /G ₁ 期比例	S期比例	G ₂ /M期比例	凋亡率	G ₀ /G ₁ 期比例	S期比例	G ₂ /M期比例
空白组	11.32±2.25	57.60±4.63	21.49±2.60	10.71±1.03	22.16±2.38	61.23±8.21	30.64±5.13	20.85±3.91
吉非替尼组	27.52±2.33 ^a	63.15±5.04 ^a	16.31±1.41 ^a	9.86±0.42	35.47±2.55 ^a	65.20±4.23 ^a	21.03±2.08 ^a	18.73±4.05
低浓度TPL组	26.43±2.64 ^a	64.58±7.41 ^a	12.61±5.12 ^a	12.48±5.45	35.33±3.51 ^a	67.41±2.52 ^a	22.75±5.00 ^a	18.18±3.42
高浓度TPL组	38.93±6.56 ^{abc}	70.21±6.38 ^{ab}	10.96±4.58 ^{ab}	11.32±2.10	40.43±2.43 ^{abc}	74.61±6.23 ^{abc}	17.72±0.39 ^{abc}	16.68±0.62 ^a
低浓度TPL+吉非替尼组	46.69±2.64 ^{abcd}	77.82±5.26 ^{abcd}	6.63±1.24 ^{abcd}	7.12±1.49 ^{abcd}	50.78±2.30 ^{abcd}	85.79±4.73 ^{abcd}	11.81±3.29 ^{abcd}	9.80±2.44 ^{abcd}
高浓度TPL+吉非替尼组	52.12±4.81 ^{abcde}	85.69±6.42 ^{abcde}	4.43±0.26 ^{abcde}	5.49±0.69 ^{abcde}	62.54±3.66 ^{abcde}	93.87±6.90 ^{abcde}	7.24±0.58 ^{abcde}	5.70±0.28 ^{abcde}

a: 与空白组比较, $P<0.05$; b: 与吉非替尼组比较, $P<0.05$; c: 与低浓度TPL组比较, $P<0.05$; d: 与高浓度TPL组比较, $P<0.05$; e: 与低浓度TPL+吉非替尼组比较, $P<0.05$ 。

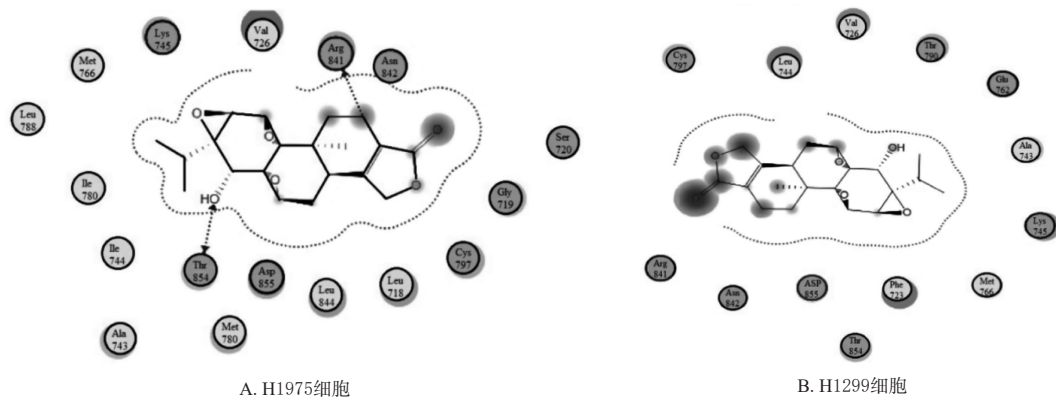
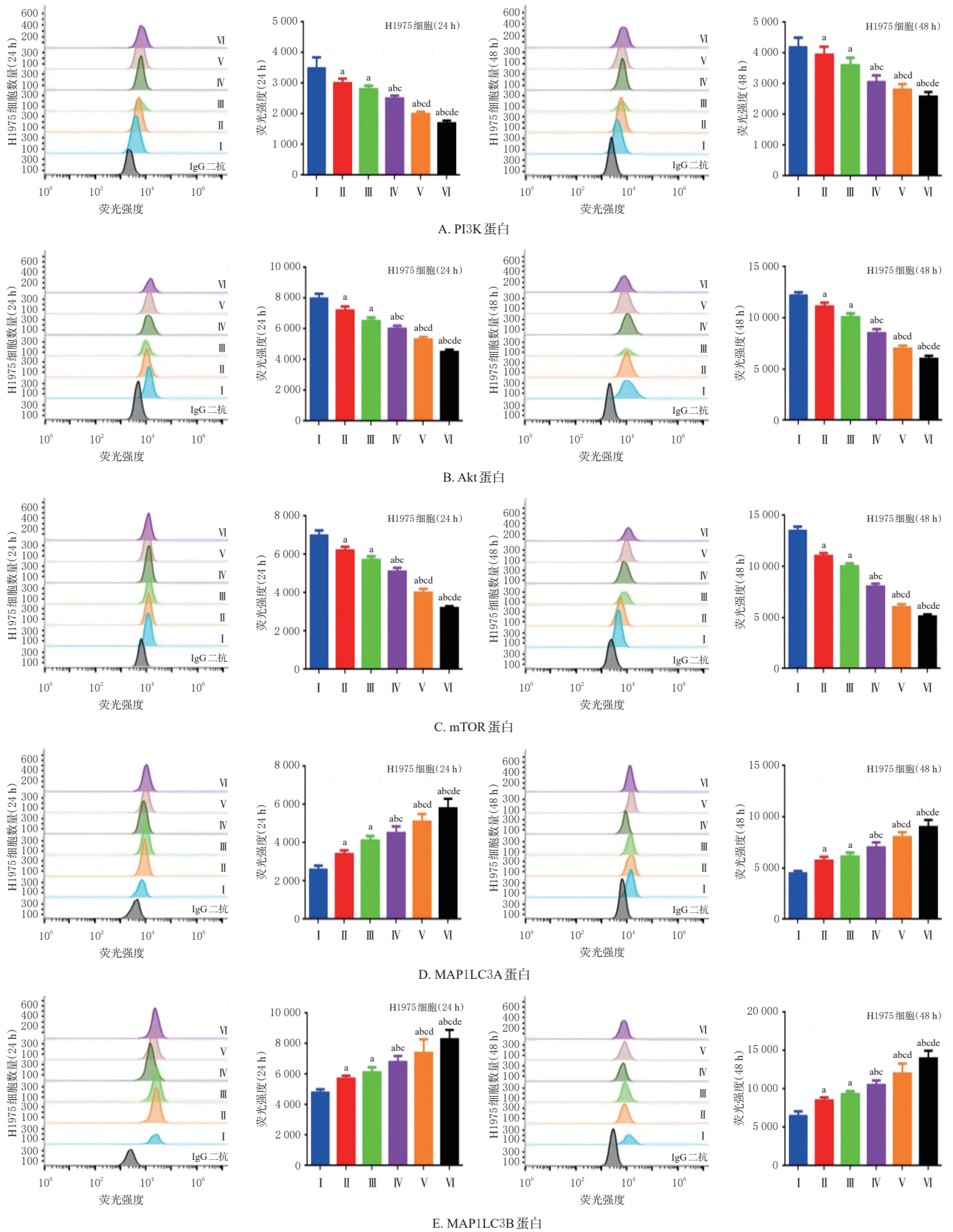


图2 TPL与EGFR T790M/L858R突变和EGFR野生型编码产物结合的二维模型



I : 空白组; II : 吉非替尼组; III : 低浓度TPL组; IV : 高浓度TPL组; V : 低浓度TPL+吉非替尼组; VI : 高浓度TPL+吉非替尼组; a: 与空白组比较, $P < 0.05$; b: 与吉非替尼组比较, $P < 0.05$; c: 与低浓度TPL组比较, $P < 0.05$; d: 与高浓度TPL组比较, $P < 0.05$; e: 与低浓度TPL+吉非替尼组比较, $P < 0.05$ 。

图3 TPL联合吉非替尼对H1975细胞PI3K/Akt/mTOR通路和自噬相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

4 讨论

吉非替尼是第一代EGFR-TKIs,可通过竞争性结合EGFR结构域中的腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)位点而阻止酪氨酸磷酸化,阻断EGFR所介导的信号通路持续激活,从而发挥抗肿瘤作用,该药被广泛用于EGFR基因突变阳性NSCLC患者的一线治疗^[1,7-8]。然而临床实践显示,多数患者用药后不久便会发生EGFR-TKIs耐药,从而导致治疗失败^[10-11]。

TPL是一种具有强烈细胞毒性的环氧二萜内酯化合物,对乳腺癌、前列腺癌、肺癌等肿瘤细胞均有显著的抑制作用,还可增强5-氟尿嘧啶、顺铂、阿霉素等化疗药物的抗肿瘤作用,从而提高化疗药物的治疗效果^[6,12]。本研究发现,不同浓度的TPL对H1975、H1299细胞的增殖有一定的抑制作用,且有时间和浓度依赖趋势。

药物相互作用评价在医药学各个领域都具有重要的价值,特别是在需联合用药的恶性肿瘤化疗领域,其中CI分析是评估化疗药物相互作用的常用指标之一,当Fa值为0.2~0.8、CI<1则表示联用药物具有协同效应^[6-7,13]。本研究结果显示,不同浓度的TPL联合吉非替尼可对H1975细胞的增殖产生协同抑制效应(Fa约0.5, CI<1);而两药联合对H1299细胞几乎没有上述效应(Fa多低于0.2, CI>1),同时反映药物敏感度的SI也从单用的0.73升至联用的1.88、2.30,可能是因为H1299细胞为吉非替尼敏感细胞,而H1975细胞因存在EGFR T790M/L858R突变而对吉非替尼不敏感,TPL联合吉非替尼增加了耐药细胞的敏感性,提示TPL有逆转吉非替尼耐药的潜力。此外,细胞凋亡和细胞周期检测结果同样显示,TPL联合吉非替尼可明显诱导H1975细胞凋亡并将其阻滞于G₀/G₁期。这些结果均证实了TPL联合吉非替尼可发挥显著的抗肿瘤作用,能更有效地抑制肿瘤细胞的生长,诱导其凋亡并阻滞细胞周期。

本研究进行的计算机模拟分子对接发现,与EGFR野生型编码产物相比,TPL与EGFR T790M/L858R突变型编码产物的结合更稳定,进一步佐证了TPL联合吉非替尼的协同抑制作用。有研究表明,TPL可通过氢键与EGFR结构域中的ATP结合,结合自由能为-5.69 kcal/mol,且结合是稳定的^[14]。本研究结果与上述研究基本一致,提示化合物的结构特征决定了其与EGFR的亲合力,这可能也是影响联用药物协同效应的重要原因。

由于细胞对药物的敏感性涉及多种因子和途径的复杂交替过程,因此揭示联合靶向治疗的特定分子途径是一项具有挑战性的工作。PI3K/Akt途径是EGFR下

游的一条重要信号通路,EGFR磷酸化激活后可形成Shc-Grb2-SOS1复合物,从而激活PI3K,激活的PI3K可催化磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸的生成并进一步促进Akt激活,从而抑制肿瘤细胞凋亡并促进其生长^[15-16]。本研究结果显示,吉非替尼、TPL单用和两者联用均可下调PI3K、Akt蛋白的表达,且两者联用的效果优于吉非替尼、TPL单用。这提示PI3K/Akt通路可能是TPL的潜在作用靶点之一,TPL联合吉非替尼具有协同增效的效果。

现代医学研究表明,自噬与化疗敏感性的关系较为复杂,其中MAP1LC3A、MAP1LC3B等蛋白是MAP1LC3/LC3自噬家族成员,可反映细胞的自噬水平^[17]。有研究指出,mTOR通路与自噬有关,抑制mTOR通路可部分激活细胞自噬^[18];同时,作为PI3K/Akt通路下游的重要调控因子,mTOR可促使肿瘤细胞对化疗/靶向药物产生耐药性^[19]。考虑到诱导自噬与EGFR-TKIs耐药有关^[20],本研究检测了MAP1LC3A、MAP1LC3B、mTOR蛋白的表达情况。结果显示,吉非替尼、TPL单用和两者联用均可显著上调细胞中MAP1LC3A、MAP1LC3B的表达,下调mTOR蛋白的表达,且两者联用的效果优于吉非替尼、TPL单用。这提示H1975细胞的自噬得以增多,其对药物的敏感性有所提高;同时,PI3K/Akt/mTOR通路可能是TPL作用的另一潜在靶点。

综上所述,TPL联合吉非替尼可对EGFR T790M/L858R突变NSCLC细胞产生协同抑制作用,其作用可能与下调PI3K/Akt/mTOR通路和诱导细胞自噬有关。这一结论为TPL的增效作用提供了潜在的研究方向,但仍需后续动物实验予以验证。

参考文献

- [1] LAMB Y N. Osimertinib: a review in previously untreated, EGFR mutation-positive, advanced NSCLC[J]. Target Oncol, 2021, 16(5):687-695.
- [2] NAGANO T, TACHIARA M, NISHIMURA Y. Molecular mechanisms and targeted therapies including immunotherapy for non-small cell lung cancer[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2019, 19(8):595-630.
- [3] DU X J, YANG B W, AN Q L, et al. Acquired resistance to third-generation EGFR-TKIs and emerging next-generation EGFR inhibitors[J]. Innovation(Camb), 2021, 2(2):100103.
- [4] LIU L L, XIONG X. Clinicopathologic features and molecular biomarkers as predictors of epidermal growth factor receptor gene mutation in non-small cell lung cancer patients[J]. Curr Oncol, 2021, 29(1):77-93.

- [5] HOU Z Y, TONG X P, PENG Y B, et al. Broad targeting of triptolide to resistance and sensitization for cancer therapy[J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2018, 104: 771-780.
- [6] 白利平, 康向鹏, 林立, 等. 自噬介导的雷公藤甲素提高西妥昔单抗对SW480细胞治疗效果的实验研究[J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(3): 396-402.
- [7] TONG X P, JIANG P, LI Y, et al. Combined treatment with triptolide and tyrosine kinase inhibitors synergistically enhances apoptosis in non-small cell lung cancer H1975 cells but not H1299 cells through EGFR/Akt pathway[J]. *Chem Pharm Bull(Tokyo)*, 2019, 67(8): 864-871.
- [8] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [9] PARK C H, AMARE M, SAVIN M A, et al. Prediction of chemotherapy response in human leukemia using an *in vitro* chemotherapy sensitivity test on the leukemic colony-forming cells[J]. *Blood*, 1980, 55(4): 595-601.
- [10] 刘畅, 李振华, 阮艳琴, 等. 非小细胞肺癌EGFR-TKIs靶向治疗获得性耐药机制及治疗方案研究进展[J]. *临床合理用药杂志*, 2022, 15(1): 176-180.
- [11] 刘世光, 田伶俐, 史冬梅, 等. 吉非替尼联合重组人血管内皮抑制素治疗EGFR突变非小细胞肺癌的临床效果观察[J]. *解放军医药杂志*, 2022, 34(3): 6-9.
- [12] GAO J, ZHANG Y F, LIU X H, et al. Triptolide: pharmacological spectrum, biosynthesis, chemical synthesis and derivatives[J]. *Theranostics*, 2021, 11(15): 7199-7221.
- [13] LIU J, CHENG H, HAN L, et al. Synergistic combination therapy of lung cancer using paclitaxel- and triptolide-coated lipid-polymer hybrid nanoparticles[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 3199-3209.
- [14] ZHAO G F, HUANG Z A, DU X K, et al. Molecular docking studies of traditional Chinese medicinal compounds against known protein targets to treat non-small cell lung carcinomas[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(2): 1132-1138.
- [15] XIE C Q, ZHOU P, ZUO J, et al. Triptolide exerts proapoptotic and cell cycle arrest activity on drug-resistant human lung cancer A549/Taxol cells via modulation of MAPK and PI3K/Akt signaling pathways[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(5): 3586-3590.
- [16] ZHU W, LI Y H, ZHAO J J, et al. The mechanism of triptolide in the treatment of connective tissue disease-related interstitial lung disease based on network pharmacology and molecular docking[J]. *Ann Med*, 2022, 54(1): 541-552.
- [17] MIAO C C, HWANG W, CHU L Y, et al. LC3A-mediated autophagy regulates lung cancer cell plasticity[J]. *Autophagy*, 2022, 18(4): 921-934.
- [18] GREMKE N, POLO P, DORT A, et al. mTOR-mediated cancer drug resistance suppresses autophagy and generates a druggable metabolic vulnerability[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4684.
- [19] WU J, ZHAO X G, SUN Q F, et al. Synergic effect of PD-1 blockade and endostar on the PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy and angiogenesis in Lewis lung carcinoma mouse model[J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2020, 125: 109746.
- [20] ZHANG Z R, ZHANG M X, LIU H, et al. AZD9291 promotes autophagy and inhibits PI3K/Akt pathway in NSCLC cancer cells[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(1): 756-767.

(收稿日期:2023-03-02 修回日期:2023-08-03)

(编辑:张元媛)