

## eIF4E 在非小细胞肺癌耐药性中的作用

李 敏, 谌 茜, 马 倬, 吴丹丹, 倪 萍, 翟溯澜, 李 萍, 邹美娟, 王雪融

(南京医科大学基础医学院药理学系, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 探讨 eIF4E 对厄洛替尼耐药细胞株细胞增殖的影响及作用机制. 在配对的厄洛替尼敏感和耐药细胞株 (HCC827-EP、HCC827-ER) 上, 采用实时定量 PCR 检测 mRNA 水平的变化, Western Blot 检测蛋白水平的变化; 通过 SRB 检测细胞的生长和药物的抑制率的变化. 以及用脂质体转染 eIF4E 的小干扰 RNA, 用上述方法检测多种信号分子 mRNA、蛋白水平的变化, 及对细胞生长和对药物抑制率的影响. 结果显示, 与 HCC827-EP 相比, eIF4E 在 HCC827-ER 上高表达; HCC827-ER 转染 eIF4E siRNA 的细胞生长速度明显减慢, 从第 3 d 起差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 在相同浓度的厄洛替尼作用下, 转染 eIF4E siRNA 的细胞具有更高的抑制率, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ). 结论: 下调 eIF4E 的表达能够增强厄洛替尼对 NSCLC 的抑制作用, eIF4E 的高表达参与了厄洛替尼获得性耐药的产生.

**[关键词]** 非小细胞肺癌, eIF4E, 厄洛替尼, 耐药性, EGFR

**[中图分类号]** R965.2; R734.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2014)02-0091-05

## eIF4E Promotes Drug Resistance in Non-small Cell Lung Carcinoma

Li Min, Chen Xi, Ma Zhuo, Wu Dandan, Ni Ping, Zhai Sulan, Li Ping, Zou Meijuan, Wang Xuerong

(Department of Pharmacology, School of Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

**Abstract:** To observe the effects of eIF4E on the proliferation of erlotinib resistant cells and mechanism. Paired erlotinib sensitive and resistant HCC827-EP and HCC827-ER cells were used. Protein and mRNA expression levels were detected by Western blot and quantitative RT-PCR. The 5 ds growth curve and inhibition effects of erlotinib were determined by SRB assay. Downregulation of eIF4E expression were achieved by transfection of cells with siRNA targeting eIF4E using lipofectamine, and nonsense siRNA were used as control. eIF4E expression was increased in HCC827-ER cells compared with HCC827-EP cells. And downregulation of eIF4E expression inhibited the growth of HCC827-ER cells ( $P < 0.05$ ) and sensitized their responses erlotinib possibly through downregulation of eIF4E expression ( $P < 0.05$ ). Downregulation of eIF4E expression inhibited the growth of NSCLCs and enhanced the inhibitory effects of erlotinib.

**Key words:** NSCLC, eIF4E, erlotinib, drug resistance, EGFR

肺癌是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一, 其 5 年存活率明显低于其他恶性肿瘤<sup>[1]</sup>. 尽管肺癌的早期诊断和规范化治疗都取得了一定的进步, 但多数患者确诊时已处于中晚期, 因此化疗药物和靶向药物联合手术及放疗成为了治疗肺癌的主要手段<sup>[2]</sup>. 近年来, 随着分子靶向药物的迅速发展, 表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制 (Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI) 的研究和应用受到了广泛的关注. 厄洛替尼作为 EGFR-TKIs 典型代表药物已成为晚期非小细胞肺癌 (Non-small cell lung carcinoma, NSCLC) 的标准治疗药物<sup>[3,4]</sup>. 但同时多数 NSCLC 患者在使用厄洛替尼后 6 ~ 12 个月会出现程度不同的耐药现象, 导致药物疗效降低<sup>[5]</sup>. 故研究其耐药机制尤为重要.

真核翻译起始因子 4E (Eukaryotic translation initiation factor 4E, eIF4E) 是真核生物蛋白质合成翻译起始步骤中生成翻译起始复合物的必需因子, 是真核生物蛋白质合成翻译起始的限速因子<sup>[6]</sup>. eIF4E 是一种原癌基因, 它在恶性肿瘤中高表达, 并且与肿瘤的发生、浸润和转移密切相关<sup>[7,8]</sup>.

收稿日期: 2013-09-19.

基金项目: 国家自然科学基金 (30873099、81102458、811172004)、基础医学院优势学科、校引进人才启动基金.

通讯联系人: 王雪融, 博士, 教授, 研究方向: 肿瘤药理. E-mail: wangxrwn@hotmail.com

本文主要研究 eIF4E 对肺癌细胞的生长和药物敏感性的影响,探讨其在厄洛替尼获得性耐药方面的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

厄洛替尼敏感细胞株(HCC827-EP)和厄洛替尼耐药细胞株(HCC827-ER)由美国 Emory 大学 Dr. Shi-Yong Sun 馈赠。

### 1.2 试剂

厄洛替尼购自 LC Laboratories 公司。GAPDH 兔多克隆抗体购于美国 Bioworld 公司;Akt、p-eIF4E、p-Met (Tyr1234/1235)和 Met 兔多克隆抗体购于美国 Cell signaling technology 公司;eIF4E、Akt1 Phospho (pS473)兔多克隆抗体购于美国 Epitomics 公司;Cyclin D1 兔多克隆抗体购于中国碧云天生物公司; $\beta$ -actin 鼠多抗购于中国博士德生物公司。RPMI 1640 培养液购自 HyClone 公司。eIF4E siRNA 购自 Invitrogen 公司。Oligo (dT)18 随机引物、eIF4E、GAPDH 引物由 Invitrogen 公司合成。SYBR Green PCR Master Mix 购自 Roche 公司。

### 1.3 细胞培养

厄洛替尼敏感细胞株(HCC827-EP)和厄洛替尼耐药细胞株(HCC827-ER)培养于含 5% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,置 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养。

### 1.4 RNA 干扰技术

细胞以  $5 \times 10^5$  密度接种于 6 孔板,按 Lipofectamine 2000 说明书将 100 mmol/L eIF4E siRNA 及 Control siRNA 进行转染。转染后 24h 或者 48h 进行后续实验。

### 1.5 SRB 法测定细胞存活率

将消化后的细胞以 1 500 个/孔接种于 96 孔板。用 10% 三氯乙酸 4  $^{\circ}\text{C}$  固定,连续 5 d。固定后的细胞用去离子水洗净并晾干,0.4% 磺酰罗丹明 B(Sulforhodamine B,SRB)常温染色 15 min,1% 乙酸溶液反复清洗并晾干,10 mmol/L Tris 碱溶液常温溶解 5 min。酶标仪在 500 nm 波长处读取吸光度值后计算细胞的存活率。

### 1.6 Western blot

用全细胞蛋白裂解液裂解细胞,提取总蛋白,进行 Western blot 分析,具体方法见文献[9]。

### 1.7 实时定量 PCR

细胞接种于 6 孔板,加入 400  $\mu\text{L}$  Trizol,提取总 RNA 并进行逆转录,具体方法见文献[9]。用 SYBR Green 荧光染料进行靶基因相对定量检测。引物序列参照文献[10,11]设计,序列如下:eIF4E,F:5'-CCTA-CAGAACAGATGGGCACTC-3';R:5'-GCCCAAAAGTCTTCAACAGTATCA-3'。反应条件:50  $^{\circ}\text{C}$  2 min;95  $^{\circ}\text{C}$  10 min;95  $^{\circ}\text{C}$  15 s;60  $^{\circ}\text{C}$  1 min,共 40 个循环。

### 1.8 统计学处理

所有数据均采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用  $t$  检验,所有结果均采用 GraphPad InStat 3 统计软件进行统计。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

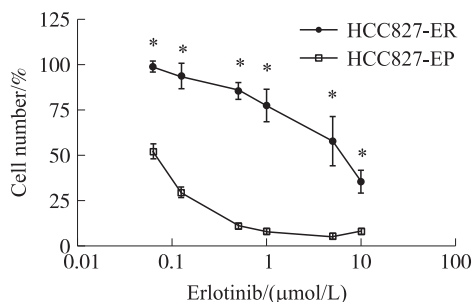
## 2 结果

### 2.1 eIF4E mRNA 在厄洛替尼耐药细胞株中的表达升高

厄洛替尼敏感细胞株(HCC827-EP)是天然的具有 EGFR 突变的细胞株,其对厄洛替尼作用极其敏感。厄洛替尼耐药细胞株(HCC827-ER)是在 HCC827-EP 细胞的基础上,给予长时间厄洛替尼的药物处理而培养的具有耐药性的细胞,其对厄洛替尼的敏感性明显低于 HCC827-EP(图 1)。实时定量 RT-PCR 结果显示,与 HCC827-EP 相比,eIF4E 在 HCC827-ER 中 mRNA 表达明显升高,平均升高至 5.5 倍,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。说明 eIF4E 的表达升高可能与厄洛替尼耐药性相关(图 2)。

### 2.2 eIF4E 在厄洛替尼敏感细胞株中过表达

Western blot 检测配对的 HCC827-EP 和 HCC827-ER 蛋白表达。结果显示,eIF4E 在 HCC827-ER 中蛋白表达明显增加,cyclin D1 的表达也有明显升高(图 3A)。p-Akt (Ser473)、Akt、p-Met (Tyr1234/1235)、Met 的蛋白表达均升高,与既往研究报道一致(图 3B)。



配对的 HCC827-EP 和 HCC827-ER, 分别给予 0.062 5  $\mu\text{mol/L}$ 、0.125  $\mu\text{mol/L}$ 、0.5  $\mu\text{mol/L}$ 、1  $\mu\text{mol/L}$ 、5  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$  厄洛替尼作用 72 h, 用 SRB 法检测药物敏感性, \*  $P < 0.05$

图 1 厄洛替尼对敏感细胞株和耐药细胞株的作用

Fig. 1 The inhibitory of erlotinib in HCC827-EP and HCC827-ER

### 2.3 下调 eIF4E 表达抑制厄洛替尼耐药细胞株的生长

eIF4E 在 HCC827-ER 中 mRNA 和蛋白水平均有明显升高, 提示 eIF4E 可能参与了厄洛替尼的获得性耐药. 我们通过下调 eIF4E 的表达, 研究其对细胞生长的影响和细胞对厄洛替尼耐药性的影响. 用 eIF4E siRNA 和 control siRNA 转染 HCC827-ER 后, Western blot 检测干扰效率. 结果显示, eIF4E 蛋白表达下调明显, cyclin D1 也有明显的下调 (图 4). 我们检测了下调 eIF4E 后对细胞生长的影响, SRB 结果显示, 转染 eIF4E siRNA 的细胞生长速度明显减慢, 从第 3 d 起差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (图 5).

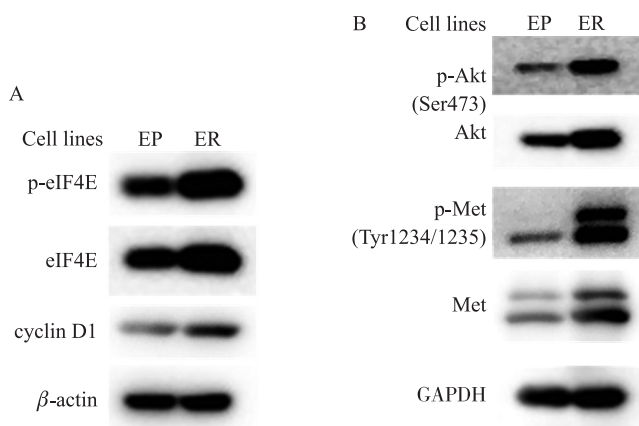
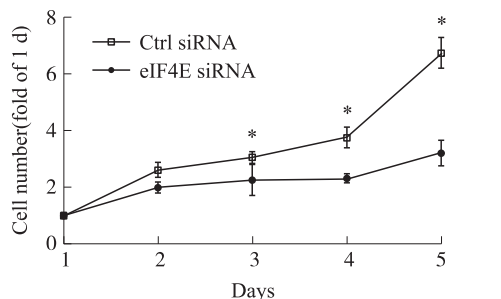


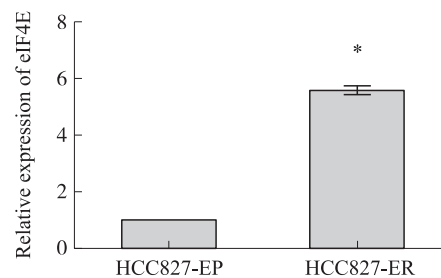
图 3 Western blot 检测 HCC827-EP 和 HCC827-ER 蛋白表达的变化

Fig. 3 Protein expressions in HCC827-ER detected by Western blot



HCC827-ER 转染 eIF4E siRNA 和 control siRNA, 处理 24 h 后重新接种于 96 孔板, SRB 法检测 5 d 的生长, \*  $P < 0.05$

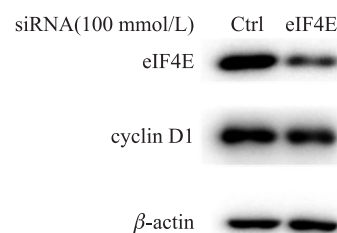
图 5 下调 eIF4E 的表达抑制 HCC827-ER 细胞生长  
Fig. 5 Knockdown of eIF4E inhibited the growth of HCC827-ER



配对的 HCC827-EP 和 HCC827-ER, qRT-PCR 检测 eIF4E mRNA 的表达, \*  $P < 0.05$

图 2 eIF4E mRNA 在 HCC827-ER 中表达增高

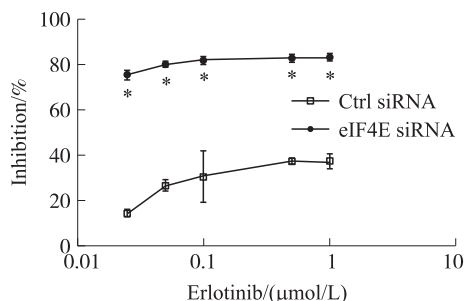
Fig. 2 eIF4E mRNA expression increased in HCC827-ER



HCC827-ER 转染 eIF4E siRNA 和 control siRNA, 处理 48 h 后收集蛋白, Western blot 检测蛋白表达

图 4 下调 eIF4E 的表达检测蛋白表达的变化

Fig. 4 Knockdown of eIF4E effects protein expression



HCC827-ER 转染 eIF4E siRNA 和 control siRNA, 处理 24 h 后重新接种于 96 孔板, 分别给予 0.025  $\mu\text{mol/L}$ 、0.5  $\mu\text{mol/L}$ 、0.5  $\mu\text{mol/L}$ 、1  $\mu\text{mol/L}$  厄洛替尼作用 72 h, 用 SRB 法检测药物抑制率, \*  $P < 0.05$

图 6 下调 eIF4E 的表达增强 HCC827-ER 对厄洛替尼的敏感性  
Fig. 6 Knockdown of eIF4E enhanced the inhibitory of erlotinib

## 2.4 下调 eIF4E 表达增强耐药细胞株对厄洛替尼的敏感性

用 eIF4E siRNA 和 control siRNA 转染 HCC827-ER 后,分别给予浓度为 0.025  $\mu\text{mol/L}$ 、0.05  $\mu\text{mol/L}$ 、0.1  $\mu\text{mol/L}$ 、0.5  $\mu\text{mol/L}$ 、1  $\mu\text{mol/L}$  的厄洛替尼,作用 72 h 后用 SRB 法检测厄洛替尼对细胞生长的抑制率.结果显示,在相同浓度的厄洛替尼作用下,转染 eIF4E siRNA 的细胞具有更高的抑制率,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ) (图 6).

综上所述,在 HCC827-ER 细胞中下调 eIF4E 能够抑制细胞的生长,并且能加强耐药细胞对厄洛替尼的敏感性.

## 3 讨论

厄洛替尼是表皮生长因子受体激酶抑制剂(EGFR-TKIs),现已成为临床治疗非小细胞肺癌常规治疗药物.NSCLC 患者在初期治疗中可以达到较好的治疗效果,但在接受治疗 6~12 个月后会出耐药性(或称为获得性耐药,acquired resistance).厄洛替尼获得性耐药的产生涉及到多种因素,EGFR 的突变在其中发挥重要的作用<sup>[12,13]</sup>.NSCLC 患者使用 EGFR-TKIs 治疗后,50% 的病人会发生 790M(苏氨酸 790 突变为蛋氨酸).未经过 EGFR-TKIs 治疗的病人的肿瘤细胞中很少能检测到这种突变<sup>[14-16]</sup>.

EGFR-TKIs 获得性耐药的产生可能与 EGFR 信号通路成分及其调节因子的基因表达改变有关,如 EGFR 的高表达,PI3K/Akt 通路、c-Met 基因扩增或高表达、下游 K-Ras/Raf 的突变及 NF- $\kappa$ B 信号转导通路的激活导致的细胞耐药等.

eIF4E 是一种帽结合蛋白,通过与 mRNA 的 5' 端的帽子结构特异性地结合,从而在真核生物翻译的起始过程中发挥重要的作用<sup>[6]</sup>.近年来,eIF4E 在人类肿瘤发生发展进程中的作用受到了广泛的关注,例如乳腺癌、结肠癌、肺癌、头颈部肿瘤等.有研究表明,eIF4E 的过表达可以显著性改变细胞表型,促进细胞增殖,及诱导细胞的转化、肿瘤形成和转移<sup>[17]</sup>.细胞周期蛋白(cyclin D1)是细胞周期中短暂出现的基因表达产物,它的主要功能是促进细胞增殖<sup>[18]</sup>.目前,cyclin D1 已被公认为是一种原癌基因,它的过表达可以导致细胞增殖异常从而发生癌变<sup>[19]</sup>.我们在厄洛替尼耐药细胞株 HCC827-ER 中发现,eIF4E 和磷酸化 eIF4E 蛋白表达明显增高,同时 cyclin D1 蛋白表达也有明显增加,这个现象提示了 eIF4E 有可能参与了厄洛替尼获得性耐药.为了进一步证实这一观点,我们在 HCC827-ER 中下调了 eIF4E 的表达,western blot 结果显示,转染 eIF4E siRNA 的实验组中 cyclin D1 表达有明显降低,提示我们 eIF4E 表达降低后影响了细胞周期.结合 5 d 的生长曲线的结果,转染 eIF4E siRNA 的细胞生长速度明显减慢,说明 eIF4E 的过表达影响了 HCC827-ER 细胞生长.给予相同浓度厄洛替尼作用 72 h 后,转染 eIF4E siRNA 的细胞具有更高的抑制率.综上所述,在 HCC827-ER 细胞中下调 eIF4E 能够抑制细胞的生长,并且能加强耐药细胞对厄洛替尼的敏感性.我们的实验结果提示 eIF4E 可能参与了厄洛替尼的获得性耐药,为耐药机制的研究提供了新的分子靶点,但是 eIF4E 在耐药性中的作用是否通过其他信号通路调控仍待进一步研究.

## [参考文献]

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008 [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2008, 58(2): 71-96.
- [2] Ferlay J, Shin H R, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 [J]. International Journal of Cancer, 2010, 127(12): 2 893-2 917.
- [3] Kosaka T, Yamaki E, Mogi A, et al. Mechanisms of resistance to EGFR TKIs and development of a new generation of drugs in non-small-cell lung cancer [J/OL]. BioMed Research International, 2011; 7 [2011-04-11]. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/165214>.
- [4] Cappuzzo F, Ciuleanu T, Stelmakh L, et al. Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 study [J]. The Lancet Oncology, 2010, 11(6): 521-529.
- [5] Goodfellow I G, Roberts L O. Eukaryotic initiation factor 4E [J]. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2008, 40(12): 2 675-2 680.
- [6] De Benedetti A, Graff J R. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases [J]. Oncogene, 2004, 23(18): 3 189-3 199.

- [7] Graff J R, Konicek B W, Carter J H, et al. Targeting the eukaryotic translation initiation factor 4E for cancer therapy[J]. *Cancer Research*, 2008, 68(3): 631–634.
- [8] Thumma S C, Kratzke R A. Translational control: a target for cancer therapy[J]. *Cancer Letters*, 2007, 258(1): 1–8.
- [9] Ma Z, Zhu L, Luo X, et al. Perifosine enhances mTORC1-targeted cancer therapy by activation of GSK3 $\beta$  in NSCLC cells[J]. *Cancer Biology and Therapy*, 2012, 13(11): 1 009–1 017.
- [10] Mathis J M, Williams B J, Sibley D A, et al. Cancer-specific targeting of an adenovirus-delivered herpes simplex virus thymidine kinase suicide gene using translational control[J]. *The Journal of Gene Medicine*, 2006, 8(9): 1 105–1 120.
- [11] Nowak D E, Tian B, Jamaluddin M, et al. RelA Ser276 phosphorylation is required for activation of a subset of NF- $\kappa$ B-dependent genes by recruiting cyclin-dependent kinase 9/cyclin T1 complexes[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2008, 28(11): 3 623–3 638.
- [12] Zhou B B S, Peyton M, He B, et al. Targeting ADAM-mediated ligand cleavage to inhibit HER3 and EGFR pathways in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Cell*, 2006, 10(1): 39–50.
- [13] 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 Medicine*, 2005, 2(3): e73.
- [14] Chen G, Kronenberger P, Teugels E, et al. Effect of siRNAs targeting the EGFR T790M mutation in a non-small cell lung cancer cell line resistant to EGFR tyrosine kinase inhibitors and combination with various agents[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013, 431(3): 623–629.
- [15] Maheswaran S, Sequist L V, Nagrath S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells[J]. *New England Journal of Medicine*, 2008, 359(4): 366–377.
- [16] Kobayashi S, Boggon T J, Dayaram T, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib[J]. *New England Journal of Medicine*, 2005, 352(8): 786–792.
- [17] Rosenwald I B. The role of translation in neoplastic transformation from a pathologist's point of view[J]. *Oncogene*, 2004, 23(18): 3 230–3 247.
- [18] Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control[J]. *Gene*, 2002, 299(1): 35–55.
- [19] Inaba T, Matsushime H, Valentine M, et al. Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human cyclin D genes[J]. *Genomics*, 1992, 13(3): 565–574.

[责任编辑:黄 敏]

(上接第 90 页)

- [8] Ohsawa K, Imai Y, Kanazawa H, et al. Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia[J]. *Journal of Cell Science*, 2000, 113(17): 3 073–3 084.
- [9] Sasaki Y, Ohsawa K, Kanazawa H, et al. Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 286: 292–297.
- [10] Schulze J O, Quedenau C, Roske Y, et al. Structural and functional characterization of human Iba proteins[J]. *FEBS Journal*, 2008, 275(18): 4 627–4 640.
- [11] Iida H, Doiguchi M, Yamashita H, et al. Spermatid-specific expression of Iba1, an ionized calcium binding adapter molecule-1, in rat testis[J]. *Biology of Reproduction*, 2001, 64(4): 1 138–1 146.
- [12] Autieri M V, Carbone C, Mu A. Expression of allograft inflammatory factor-1 is a marker of activated human vascular smooth muscle cells and arterial injury[J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2000, 20: 1 737–1 744.
- [13] Autieri M V, Kelemen S E, Wendt K W. AIF-1 is an actin-polymerizing and Rac1-activating protein that promotes vascular smooth muscle cell migration[J]. *Circulation Research*, 2003, 92(10): 1 107–1 114.
- [14] Chen X, Kelemen S E, Autieri M V. AIF-1 expression modulates proliferation of human vascular smooth muscle cells by autocrine expression of G-CSF[J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2004, 24: 1 217–1 222.
- [15] 曹祥荣, 束峰钰, 张锡然, 等. 毛冠鹿与 3 种鹿属动物的线粒体细胞色素 b 的系统进化分析[J]. *动物学报*, 2002, 48(1): 44–49.
- [16] 张文, 汤文文, 庞宏, 等. 毛冠鹿睾丸组织 cDNA 文库的构建及 P1 精蛋白基因的克隆[J]. *兽类学报*, 2006, 26(2): 164–170.
- [17] Tian Y, Autieri M V. Cytokine expression and AIF-1-mediated activation of Rac2 in vascular smooth muscle cells: a role for Rac2 in VSMC activation[J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2007, 292(2): 841–849.

[责任编辑:黄 敏]