

· 论 著 ·

IL-6 诱导非小细胞肺癌 Gefitinib 耐药的作用和机制*

韩睿, 李力, 林采余, 王玉波, 何勇[△]

(第三军医大学大坪医院呼吸内科, 重庆 400042)

摘要:目的 明确 IL-6 诱导非小细胞肺癌(NSCLC)细胞对表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)药物吉非替尼(Gefitinib)发生耐药的作用,探讨其可能机制。方法 使用噻唑蓝(MTT)、划痕实验、蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测 IL-6 处理肺癌细胞株 PC-9 后其对 Gefitinib 的敏感性、细胞迁移能力、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)表达等的变化;构建 IL-6 高表达细胞株 PC-9psb388,检测其与 PC-9 相比在对 Gefitinib 的敏感性、细胞迁移能力、p-mTOR 蛋白表达等方面的变化;使用雷帕霉素联合 IL-6 处理 PC-9、IL-6 单独处理 PC-9 以及雷帕霉素单独处理 PC-9psb388,MTT 检测 3 组细胞 Gefitinib 敏感性的变化;使用 PC-9、PC-9psb388 细胞构建裸鼠移植瘤模型,对比两组移植瘤大小并用免疫组织化学检测 p-mTOR 蛋白和 IL-6 的表达。结果 IL-6 处理 PC-9 组较未处理组对 Gefitinib 的敏感性显著降低,细胞迁移能力增强,p-mTOR 蛋白表达增高。PC-9psb388 对 Gefitinib 的敏感性与 PC-9 相比明显降低,细胞迁移能力增强并且 p-mTOR 蛋白活化增高。雷帕霉素联合 IL-6 处理 PC-9 组对 Gefitinib 的敏感性较 IL-6 单独处理 PC-9 组升高,p-mTOR 蛋白表达降低。同样雷帕霉素处理 PC-9psb388 组对 Gefitinib 的敏感性较未处理组增高,且 p-mTOR 蛋白活化降低。在动物实验中,PC-9psb388 组裸鼠移植瘤体积明显大于 PC-9 组,检测移植瘤组织中 IL-6 和 p-mTOR 蛋白的表达发现,PC-9psb388 组显著高于 PC-9 组。结论 IL-6 可能通过活化 p-mTOR 蛋白诱导非小细胞肺癌发生 EGFR-TKI 耐药。

关键词:白细胞介素 6;吉非替尼;耐药;癌,非小细胞肺;雷帕霉素

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.15.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)15-1825-04

Study on effect and mechanisms of IL-6 induced Gefitinib resistance in non-small cell lung cancer*

Han Rui, Li Li, Lin Caiyu, Wang Yubo, He Yong[△]

(Department of Respiratory Disease, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To evaluate the effect and mechanism of IL-6 induced Gefitinib resistance in non small cell lung cancer (NSCLC). Methods The sensitivity of cells to Gefitinib, the invasion ability of cells and the expression of phosphorylated p-mTOR was assessed by MTT assay, Transwell assay and Western blot, respectively. PC-9psb388 stable over expressing human recombinant IL-6(hrIL-6) cell line was established by transfecting PC-9 cells with a lentivirus psb388 expressing IL-6 and stable transfectants over-expressing IL-6 in human lung cancer cell line PC-9. The sensitivity of cells to Gefitinib, the invasion ability, expression of p-mTOR were then detected. PC-9/PC-9psb388 xenografts were established and the expression of p-mTOR and IL-6 in tumor sections were then detected. Results The sensitivity of PC-9 cells to Gefitinib was reduced by IL-6, the invasion ability of PC-9 cells and the expression of p-mTOR was significantly increased with IL-6 treatment. The sensitivity of PC-9 cells to Gefitinib was prominent higher in PC-9psb388 cells, while the invasion ability of PC-9psb388 cells and the expression of p-mTOR was higher than PC-9 cells. The sensitivity to Gefitinib was improved and expression of p-mTOR reduced in rapamycin-treated PC-9psb388 cells and IL-6 stimulated PC-9 cells. Tumor volume of PC-9psb388 xenografts was significantly higher than that of PC-9 cells. The expression of p-mTOR and IL-6 in tumor sections of PC-9psb388 group were higher than that of PC-9 group. Conclusion IL-6 could elevate the expression of p-mTOR to induce Gefitinib resistance in non small cell lung cancer(NSCLC).

Key words: interleukin-6; Gefitinib; resistance; carcinoma, non-small-cell lung; rapamycin

表皮生长因子受体(EGFR)信号通路在肺癌的发生、发展过程中发挥着非常重要的作用,对有 EGFR 突变的非小细胞肺癌(NSCLC)患者,表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)吉非替尼(Gefitinib)和厄洛替尼(Erlotinib)已成为其有效的靶向治疗药物^[1]。然而在 EGFR-TKI 治疗过程中,许多对 EGFR-TKI 药物敏感的患者逐渐发生 EGFR-TKI 耐药,即获得性耐药^[2]。获得性耐药的机制主要有以下几个方面:(1)T790M 二次突变;(2)MET 扩增;(3)肝细胞生长因子(HGF)过表达;(4)转化为小细胞肺癌;(5)发生上皮间质转化

(EMT),此外仍有近 30% 的患者耐药机制不详^[3]。因此,进一步研究 EGFR-TKI 耐药机制及其相关影响因素对 NSCLC 患者的分子靶向治疗具有非常重要的意义。

临床研究显示,使用 EGFR-TKI 治疗的患者外周血 IL-6 水平显著增高,但 IL-6 是否是导致 EGFR-TKI 耐药的关键始动因素仍需进一步研究^[4]。本实验通过分析多种 NSCLC 细胞株 IL-6 表达水平后发现:多种 EGFR-TKI 敏感肺癌细胞株的 IL-6 表达水平显著低于对 EGFR-TKI 耐药细胞株。当 EGFR-TKI 敏感细胞株经 IL-6 处理后,其对 EGFR-TKI 药物

* 基金项目:国家高技术研究发展(863)计划基金资助项目(2012AA02A201);国家自然科学基金资助项目(81172113,81071912,81301840);第三军医大学基金资助项目(2012XLC08)。作者简介:韩睿(1988-),硕士在读,主要从事肺癌靶向治疗研究。△ 通讯作者,Tel:(023)68757791;E-mail:heyong@dphospital.tmmu.edu.cn。

的敏感性降低,与此同时伴随着 p-mTOR 蛋白活化。前期有众多研究表明在多种肿瘤细胞中 p-mTOR 蛋白的活化可以促进肿瘤细胞的生长以及降低抗癌药物的疗效^[5],故笔者推测 IL-6 诱导肺癌 EGFR-TKI 耐药的作用机制可能与 IL-6 诱导肺癌细胞 p-mTOR 活化有关。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂 人肺癌细胞株 PC-9、HCC827、H1650、H1975、H460、A549 购自美国国家细胞库(ATCC), Gefitinib、MTT、雷帕霉素购自 Sigma 公司, RPMI-1640 培养基购自 Hyclone 公司,胎牛血清购自 Gibco 公司, IL-6 ELISA 试剂盒购自 USCN 公司, Anti-mTOR(phospho)(Ser2248)、Anti-mTOR、Anti-IL-6、山羊抗兔 IgG 等抗体购自美国 Abcam 公司, β -actin 购自美国 CST 公司,免疫组化试剂盒购自碧云天公司,6 周龄雌性裸鼠购自第三军医大学动物中心。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肺癌细胞株 PC-9 培养于含 10% 胎牛血清、100 μ g/mL 青、链霉素的 RPMI-1640 培养基,重组高表达 IL-6 肺腺癌细胞株 PC-9psb388 培养于含 10% 胎牛血清、100 μ g/mL 青、链霉素以及 1% 嘌呤霉素的 RPMI-1640 培养基中,二者均培养于 37 $^{\circ}$ C、90% 湿度、5% CO_2 的培养箱中。

1.2.2 MTT 法检测药物细胞毒性 收集处于对数生长期细胞,按每孔 1×10^4 个细胞接种 96 孔板,培养 24 h 后弃上清液,每个实验孔加入含不同浓度的 Gefitinib 培养基 150 μ L。在培养箱中继续培养 48 h 后,每孔加入 MTT(5 mg/mL)20 μ L,37 $^{\circ}$ C 培养 4 h,加入二甲亚砷(DMSO)150 μ L 振荡 15 min,放入全波长酶标仪检测吸光度值。按照以下公式计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率 = [(对照组吸光度值 - 药物处理组吸光度值)/对照组吸光度值] $\times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.2.3 ELISA 检测 IL-6 的表达 取处于对数生长期的肺癌细胞,胰酶消化后用 RPMI-1640 培养基重悬成 $3 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 细胞悬液,按每孔 100 μ L 分别接种于六孔板中,培养 48 h 换用无血清培养基继续培养 12 h 后收集各孔细胞培养液,1 000 r/min 离心 10 min 后取上清液,-20 $^{\circ}$ C 保存。使用 ELISA 检测各实验组细胞株 IL-6 表达水平,具体操作严格根据 ELISA 试剂盒说明书要求进行。

1.2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 p-mTOR、mTOR 蛋白表达 胰酶消化并收集各实验组细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后,按每 1×10^7 细胞加入 100 μ L 预冷的细胞裂解液,超声破碎后冰上静置 30 min,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液加入 $5 \times$ 十二烷基硫酸钠(SDS)凝胶上样缓冲液 100 $^{\circ}$ C 煮沸变性 5 min。样品蛋白通过 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离后经半干转膜仪转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,5% 脱脂牛奶常温封闭 1 h,4 $^{\circ}$ C 过夜孵育一抗 [p-mTOR(1 : 1 000)、mTOR(1 : 1 000)、 β -actin 抗体(1 : 1 000)],TBST 洗膜,二抗常温孵育 1 h[Goat Anti-Rabbit(1 : 5 000)],TBST 洗膜,ECL 发光显影液显影, Bio-RAD 成像系统采集图像。

1.2.5 裸鼠移植瘤实验 胰酶消化处于对数生长期的 PC-9 和 PC-9psb388 细胞,生理盐水洗涤后,用生理盐水混悬成 $5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 细胞悬液。将 12 只 6 周龄的雌性裸鼠分为 A、B 两组,A 组裸鼠于腋下接种 PC-9 细胞 100 μ L,B 组接种 PC-9psb388 细胞悬液 100 μ L。当裸鼠移植瘤生长到约 50 mm^3 时,两组裸鼠按 1 mg/kg 的剂量口服 Gefitinib。服药期间每周

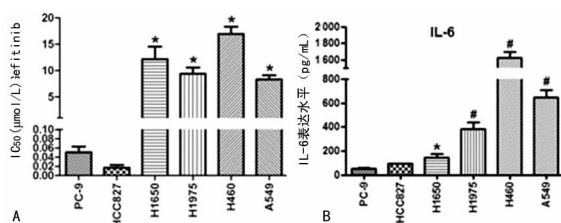
测量 2 次裸鼠移植瘤体积,裸鼠移植瘤体积等于(长 \times 宽²)/2 (长、宽单位:mm),待口服 Gefitinib 4 周后,处死裸鼠取出移植瘤,石蜡包埋后用免疫组织化学检测肿瘤组织中 IL-6 和 p-mTOR 蛋白的表达情况。

1.2.6 免疫组织化学检测移植瘤组织中 IL-6 和 p-mTOR 蛋白的表达 移植瘤标本固定后,常规石蜡包埋切片,取 0.8 μ m 切片,脱蜡、水化、抗原修复、封闭、4 $^{\circ}$ C 过夜孵育一抗 [Anti-IL-6(1 : 100)]、[Anti-mTOR(phospho)(1 : 100)]、二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min、DAB 显色、苏木精复染、脱水封片拍照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Gefitinib 耐药肺癌细胞株 IL-6 表达水平显著高于 Gefitinib 敏感株 选取 6 种处于对数生长期的肺癌细胞株,使用 MTT、ELISA 方法分别检测 6 种肺癌细胞株对 Gefitinib 的半数致死浓度(IC₅₀)值以及细胞培养基上清液中 IL-6 的表达情况。结果显示:对 Gefitinib 敏感的肺癌细胞株 PC-9、HCC827 细胞培养基上清液 IL-6 表达水平较不敏感细胞株 H1650、H1975、H460、A549 低($P < 0.05$),见图 1。



A: 各组细胞 Gefitinib 的 IC₅₀ 值, * : $P < 0.01$, 与 PC-9 组比较; B: 各组细胞 IL-6 表达水平, * : $P < 0.05$, # : $P < 0.01$, 与 HCC827 组比较。

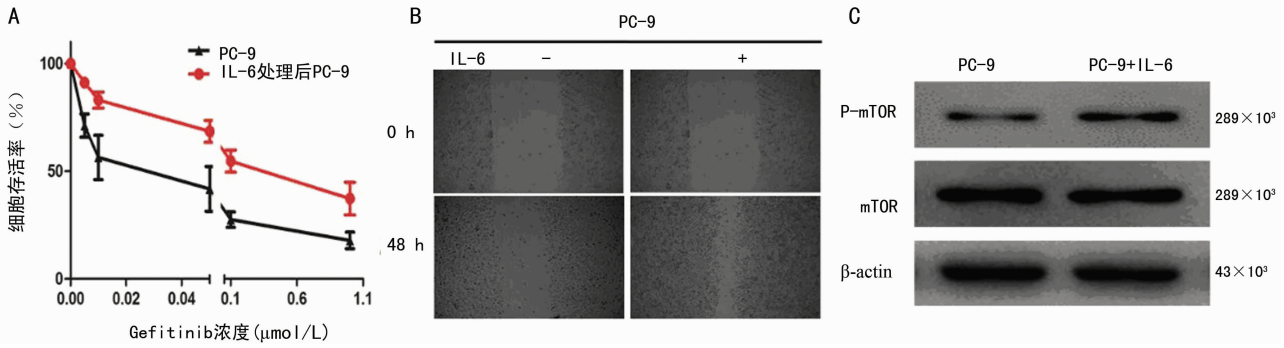
图 1 Gefitinib 耐药肺癌细胞株 IL-6 表达水平显著高于 Gefitinib 敏感株

2.2 外源性 IL-6 处理 PC-9 诱导 Gefitinib 耐药, 迁移增强, p-mTOR 表达增强 PC-9 经外源性 10 ng/mL 浓度的 IL-6 处理 48 h 后通过 MTT、划痕实验、Western blot 等方法检测发现:经 IL-6 处理后 PC-9 细胞对 Gefitinib 的敏感性降低、而迁移能力以及 p-mTOR 蛋白表达增高,见图 2。

2.3 内源性高表达 IL-6 诱导 PC-9 Gefitinib 耐药, 迁移增强 PC-9psb388 细胞是将高表达 IL-6 的慢病毒载体 pSB388-LV 转染入 PC-9 细胞后,通过嘌呤霉素筛选所得。ELISA 实验证实 PC-9psb388 细胞较 PC-9 细胞 IL-6 表达水平显著升高。取对数生长期的 PC-9psb388 细胞,通过 MTT、划痕实验和 Western blot 等方法检测发现:PC-9psb388 与 PC-9 细胞相比对 Gefitinib 的敏感性降低、而迁移能力以及 p-mTOR 蛋白表达增高,见图 3。

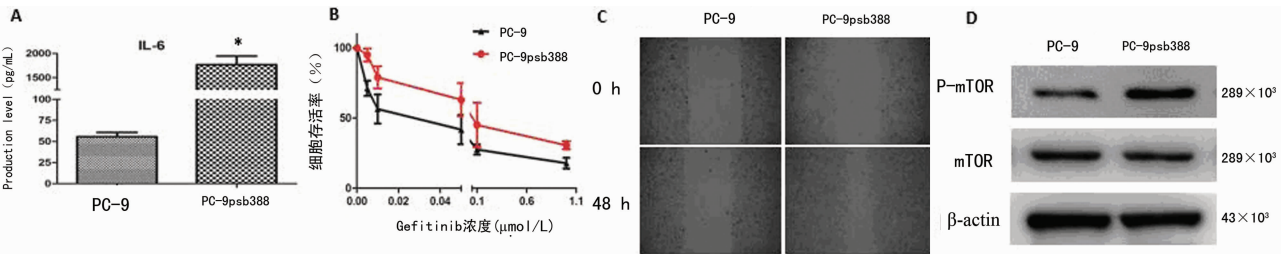
2.4 雷帕霉素降低 IL-6 诱导的肺腺癌细胞对 Gefitinib 耐药 PC-9 经外源性 10 ng/mL 的 IL-6 联合 20 nmol/L 雷帕霉素处理 48 h 后通过 MTT、Western blot 等方法检测发现:IL-6 联合雷帕霉素处理组 PC-9 细胞较 IL-6 单独处理组,p-mTOR 蛋白表达降低且对 Gefitinib 的敏感性增高。PC-9psb388 经 20 nmol/L 雷帕霉素处理 48 h 后通过 MTT、Western blot 等方法检测发现:经雷帕霉素处理后 PC-9psb388 较未处理组:p-mTOR 蛋白表达降低且对 Gefitinib 的敏感性增高,见图 4。

2.5 IL-6 诱导裸鼠移植瘤对 Gefitinib 耐药 移植瘤实验验证 ($P < 0.05$), 见图 5。
 实 PC-9 组裸鼠移植瘤体积增长速度明显小于 PC-9psb388 组



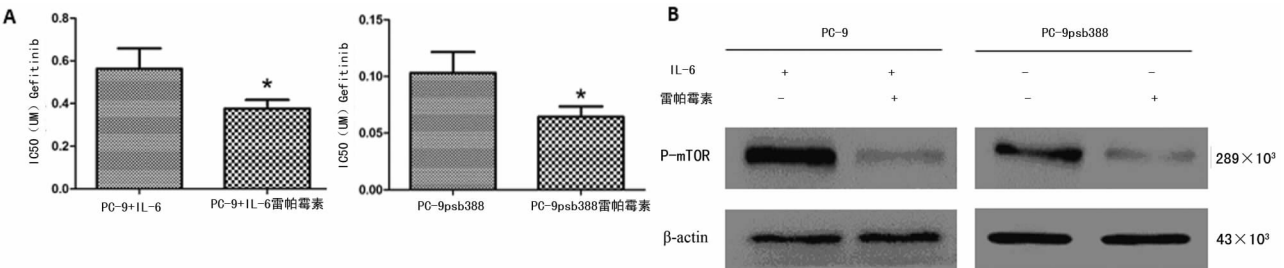
A: MTT 检测 IL-6 处理的 PC-9 细胞对 Gefitinib IC_{50} 值; B: 划痕实验检测 IL-6 处理的 PC-9 细胞迁移能力变化; C: Western blot 检测 IL-6 处理的 PC-9 细胞 p-mTOR 表达变化。

图 2 IL-6 诱导 Gefitinib 耐药能力、迁移能力变化



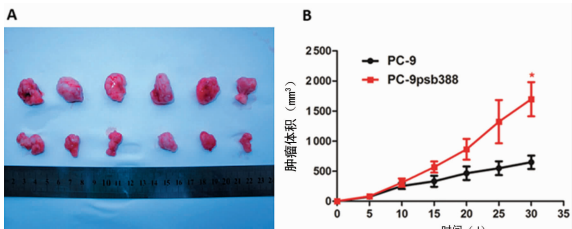
A: ELISA 检测 PC-9 与 PC-9psb388 的 IL-6 表达; *: $P < 0.01$, 与 PC-9 比较; B: MTT 检测 PC-9 与 PC-9psb388 Gefitinib 的 IC_{50} 值; C: 划痕实验检测 PC-9 与 PC-9psb388 细胞迁移能力; D: Western blot 检测 PC-9 与 PC-9psb388 的 p-mTOR 表达。

图 3 IL-6 高表达诱导 Gefitinib 耐药能力、迁移能力、p-mTOR 蛋白表达变化



A: MTT 检测 IL-6、雷帕霉素不同方式处理 PC-9、PC-9psb388 细胞后对 Gefitinib 的 IC_{50} 值; *: $P < 0.05$, 与 PC-9+IL-6 比较; Δ : $P < 0.05$, 与 PC-9psb388 比较; B: Western blot 检测 IL-6、雷帕霉素不同方式处理 PC-9 的 p-mTOR 情况表达。

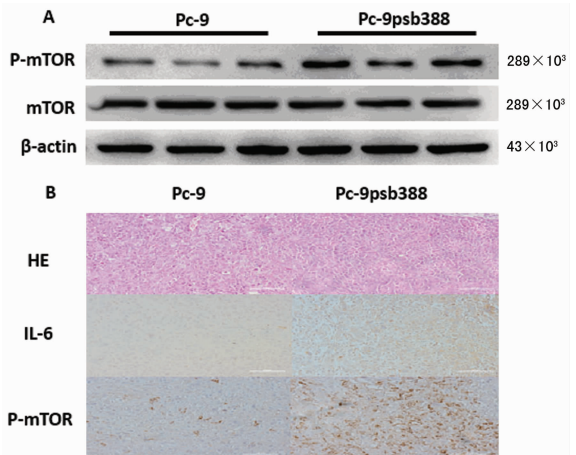
图 4 雷帕霉素处理后 IL-6 诱导对 Gefitinib 耐药影响



A: 裸鼠移植瘤体积对比图; B: 裸鼠移植瘤体积生长曲线; *: $P < 0.05$, 与 PC-9 组比较。

图 5 IL-6 高表达诱导裸鼠移植瘤对 Gefitinib 耐药的影响

2.6 PC-9psb388 移植瘤 IL-6 表达增高, p-mTOR 活化增强
 通过对两组裸鼠移植瘤组织提取蛋白做 Western blot 检测, 以及制作石蜡切片做免疫组织化学检测发现: PC-9psb388 组移植瘤组织中 IL-6 和 p-mTOR 蛋白的表达显著高于 PC-9 组, 见图 6。



A: Western blot 检测裸鼠移植瘤 p-mTOR 蛋白表达; B: 裸鼠移植瘤 IL-6、p-mTOR 蛋白表达情况(免疫组织化学 $\times 200$)。

图 6 两组移植瘤中 IL-6 表达及 p-mTOR 活化情况

3 讨 论

据统计,约 70% EGFR 酪氨酸激酶外显子区域突变的肺癌患者对 EGFR-TKI 药物 Gefitinib 和 Erlotinib 敏感^[6],但是多数患者都会出现不同程度的获得性耐药。目前,获得性耐药的机制一部分已被提出并论证,但仍有许多耐药机制不详。本研究通过对多种 NSCLC 细胞株 IL-6 表达水平进行分析发现,对 Gefitinib 敏感的 NSCLC 细胞株的 IL-6 表达水平均明显低于耐药的 NSCLC 细胞株。当用 IL-6 处理 Gefitinib 敏感 NSCLC 细胞株 PC-9 48 h 后,PC-9 对 Gefitinib 的敏感性显著降低。因此,本研究认为 IL-6 在 NSCLC 患者 Gefitinib 获得性耐药中发挥了重要的作用。

IL-6 作为一种多功能因子,参与肿瘤的生长、分化和微环境免疫调节等。对肿瘤细胞血管生成,抑制肿瘤细胞凋亡以及肿瘤细胞耐药有着重要影响^[7]。有研究报道,晚期肿瘤患者其血清 IL-6 水平明显升高,IL-6 的表达水平在一定程度上预示患病的风险^[8-9]。在肺癌发生、发展方面,IL-6 也体现出了非常重要的作用,其与肺癌的发生率关系非常密切^[10]。不仅如此,IL-6 在肿瘤细胞耐药方面也发挥着一定的作用,本实验发现在对 Gefitinib 耐药的多种肺癌细胞中 IL-6 表达普遍较高。此外,IL-6 在乳腺癌中还能诱导 EMT 发生,同时也与肿瘤干细胞(CSC)活性关系密切,而 EMT 与 CSC 进一步又影响着 EGFR-TKI 药物的耐药发生^[11-12]。本实验通过外源性 IL-6 处理的 PC-9 细胞株,构建内源性高表达 IL-6 的 PC-9psb388 细胞株,建立 PC-9 和 PC-9psb388 两组裸鼠移植瘤模型证实 IL-6 可以诱导非小细胞肺癌 Gefitinib 耐药的发生同时伴有 p-mTOR 蛋白表达增高。p-mTOR 信号通路在肿瘤发生、发展中起着非常重要的作用,与肿瘤密切相关的细胞增殖、细胞周期蛋白合成、细胞迁移等均受 p-mTOR 的调节,并且多种肿瘤如乳腺癌、肺癌中都有 p-mTOR 信号通路的异常调节情况^[13]。此外有研究表明,p-mTOR 的活化可直接影响 EGFR-TKI 药物的敏感性,当用抑制剂抑制 p-mTOR 蛋白的表达,EGFR-TKI 对 NSCLC 细胞的杀伤效应增强^[14]。可见 p-mTOR 在 NSCLC 发生 EGFR-TKI 获得性耐药的过程中发挥着重要的作用。

本实验通过 IL-6 处理 PC-9 细胞,构建内源性高表达 IL-6 的 PC-9psb388 模型,建立裸鼠移植瘤模型来研究 IL-6 对 NSCLC Gefitinib 耐药的影响及其可能的机制,证实了 IL-6 诱导的 NSCLC Gefitinib 耐药与 IL-6 诱导 p-mTOR 蛋白活化密切相关。至于是否还有其他机制参与其中,如上皮间叶转化和肿瘤干细胞将在今后做进一步研究。

参考文献:

[1] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(25): 2380-2388.

[2] Nakagawa T, Takeuchi S, Yamada T, et al. EGFR-TKI resistance due to BIM polymorphism can be circumvented in combination with HDAC inhibition[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(8): 2428-2434.

[3] Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, et al. Geno-

typic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors[J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(75): 7526.

- [4] Kim SM, Kwon OJ, Hong YK, et al. Activation of IL-6R/JAK1/STAT3 signaling induces De Novo resistance to irreversible EGFR inhibitors in non-small cell lung cancer with T790M resistance mutation[J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(10): 2254-2264.
- [5] Peng DJ, Wang J, Zhou JY, et al. Role of the Akt/mTOR survival pathway in cisplatin resistance in ovarian cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 394(3): 600-605.
- [6] Jackman DM, Miller VA, Cioffredi LA, et al. Impact of epidermal growth factor receptor and KRAS mutations on clinical outcomes in previously untreated non-small cell lung cancer patients; results of an online tumor registry of clinical trials[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(16): 5267-5273.
- [7] Wojcik E, Jakubowicz EJ, Skotnicki P, et al. IL-6 and VEGF in small cell lung cancer patients[J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(5): 1773-1778.
- [8] Chang CH, Hsiao CF, Yeh YM, et al. Circulating interleukin-6 level is a prognostic marker for survival in advanced nonsmall cell lung cancer patients treated with chemotherapy[J]. *Int J Cancer*, 2013, 132(9): 1977-1985.
- [9] Pine SR, Mechanic LE, Enewold L, et al. Increased levels of circulating interleukin 6, interleukin 8, C-reactive protein, and risk of lung cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2011, 103(14): 1112-1122.
- [10] Lagiou P, Trichopoulos D. Inflammatory biomarkers and risk of lung cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2011, 103(14): 1073-1075.
- [11] Sullivan NJ, Sasser AK, Axel AE, et al. Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells[J]. *Oncogene*, 2009, 28(33): 2940-2947.
- [12] Kim NH, Cho HJ, Cho SM, et al. Blockade of interleukin-6 receptor suppresses the proliferation of cancer stem cells in H460 lung cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2012, 41(1): 310-316.
- [13] Dobashi Y, Watanabe Y, Miwa C, et al. Mammalian target of rapamycin: a central node of complex signaling cascades[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2011, 4(5): 476-495.
- [14] Fei SJ, Zhang XC, Dong S, et al. Targeting mTOR to overcome epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor resistance in non-small cell lung cancer cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69104.