

• 论 著 •      doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.17.001  
网络首发    http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190513.1040.004.html(2019-05-14)

# SU11274 逆转肝细胞生长因子诱导的 PC-9 肺癌细胞株对吉非替尼耐药及其机制研究\*

张 佳,尹海莲,宋 勉,安昌善<sup>△</sup>  
(延边大学附属医院呼吸内科,吉林延吉 133000)

**[摘要]** 目的 探讨 SU11274 在裸鼠体内逆转肝细胞生长因子(HGF)诱导的 PC-9 肺癌细胞株对吉非替尼耐药及其机制。方法 采用 PC-9 肺癌细胞株[表皮生长因子受体(EGFR)突变型、敏感株]、人胚肺成纤维细胞(MRC-5 细胞),分别用酶联免疫吸附测定(ELISA)法、四甲基偶氮唑盐(MTT)法和 Western blot 法测定 HGF 的水平、细胞的增殖和蛋白的表达。建立 PC-9 肺癌细胞株的移植瘤模型,设对照组(C 组)、吉非替尼组(G 组)、HGF 组(H 组)、HGF+SU11274 组(HS 组)、HGF+0.1%二甲基亚砷(DMSO)组(HD 组)、HGF+吉非替尼组(HG 组)、HGF+吉非替尼+SU11274 组(HGS 组);测定各组肿瘤的体积和质量,测定间质表皮转化因子(c-Met)及其下游通道蛋白的表达来对各组肿瘤进行统计学分析。结果 MRC-5 细胞能产生高水平的 HGF,刺激 PC-9 细胞中的 c-Met 和下游信号蛋白的磷酸化。吉非替尼可抑制 PC-9 细胞移植瘤的生长。将 MRC-5 细胞和 PC-9 细胞共同接种时,被激活的 c-Met 及其下游通道蛋白 p-Met、p-Akt、p-Stat3 和 p-Erk1/2 的表达高于单独接种 PC-9 细胞的表达。HG 组的肿瘤生长抑制程度比 HGS 组低( $P<0.05$ ),且 HG 组的肿瘤体积比 HGS 组大( $P<0.05$ );HG 组 c-Met、Akt、Stat3、Erk1/2 的表达强度比 HGS 组高( $P<0.05$ )。结论 SU11274 和吉非替尼联合应用可逆转由 MRC-5 分泌的 HGF 诱导 PC-9 肺癌细胞株对吉非替尼耐药,其机制可能与 c-Met 及其下游通道蛋白表达的抑制有关。

**[关键词]** 肝细胞生长因子;吉非替尼;间质表皮转化因子;SU11274;耐药  
**[中图法分类号]** R734.2      **[文献标识码]** A      **[文章编号]** 1671-8348(2019)17-2881-05

## Reverse effect of SU11274 on the resistance of lung cancer cell line PC-9 to Gefitinib induced by hepatocyte growth factor and its mechanism\*

ZHANG Jia ,YIN Hailian ,SONG Mian ,AN Changshan<sup>△</sup>  
(Department of Respiratory Medicine ,Affiliated Hospital of Yanbian University ,Yanji ,Jilin 133000 ,China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of SU11274 on the resistance of hepatocyte growth factor (HGF)-induced lung cancer cell line PC-9 to Gefitinib in nude mice and the mechanism thereof. **Methods** Lung cancer cell line PC-9 [mutated epidermal growth factor (EGFR), sensitive strain] and human embryonic lung fibroblasts (MRC-5 cells) were selected. HGF concentration, cell proliferation, and protein expression were determined by ELISA, MTT, and Western blot. The tumor model of PC-9 was created. The experiments were divided into the control group (group C), the Gefitinib group (group G), the HGF group (group H), the HGF+SU11274 group (group HS), the HGF+0.1% DMSO group (group HD), the HGF+Gefitinib group (group HG), and the HGF+Gefitinib+SU11274 group (group HGS). Each group are statistically analyzed by monitoring the volume and mass of tumors and determining the expression of c-mesenchymal-epithelial transition factor (c-Met) and its downstream channel proteins. **Results** MRC-5 cells can produce high level of HGF to impulse the phosphorylation of c-Met proteins and downstream channel proteins in PC-9 cells. Gefitinib can inhibit the growth of transplantation tumor in PC-9 cell. When PC-9 cells were co-inoculated with MRC-5 cells, the expressions of activated c-Met and downstream channel protein p-Met, p-Akt, p-Stat3 and p-Erk1/2 were higher than those of PC-9 cells inoculated alone. Of group HG, the inhibitory effect on HGF-mediated tumor growth was lower ( $P<0.05$ ), the tumor volume is larger ( $P<0.05$ ), and the expression of c-Met, Akt, Stat3 and Erk1/2 were higher than those of group HGS ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The combination of SU11274 and Gefitinib can reverse HGF (secreted by MRC-5)-induced Gefitinib resistance of lung cancer

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(8116029)。 作者简介:张佳(1986—),主治医师,在读博士研究生,主要从事肺癌的诊治研究。  
<sup>△</sup> 通信作者,E-mail:cs-an2003@aliyun.com。

cell line PC-9, and the mechanism may be related to the inhibition of c-Met and its downstream channel proteins.

**[Key words]** hepatocyte growth factor; Gefitinib; c-mesenchymal-epithelial transition factor; SU11274; resistance

吉非替尼开创了非小细胞肺癌(non small cell lung cancer, NSCLC)新的靶向治疗模式,但因其尚不明确的耐药机制,致使肺癌的 5 年生存率仍不容乐观<sup>[1-3]</sup>。间质表皮转化因子(c-mesenchymal-epithelial transition factor, c-Met)被证实是唯一能结合肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)的高亲受体, HGF 与 c-Met 结合后, c-Met 自体磷酸化, 激活细胞内多种信号通路<sup>[4-6]</sup>, 促使肿瘤的进展、侵袭、转移和血管生成<sup>[7]</sup>。c-Met 抑制剂主要包括小分子抑制剂、抗 c-Met 抗体、生物性抑制剂、HGF 拮抗剂<sup>[8-13]</sup>。SU11274 是一种靶向 c-Met 小分子的酪氨酸激酶抑制剂, 具有抗肿瘤细胞增殖、侵袭和抗血管生成作用。本研究旨在进一步探讨 SU11274 在裸鼠体内逆转 HGF 诱导的 PC-9 肺癌细胞株对吉非替尼耐药及其机制。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** (1)细胞: PC-9 细胞由同济大学附属上海市肺科医院中心实验室提供; 人胚肺成纤维细胞 MRC-5 由上海生命科学院细胞库提供。(2)药物及试剂: 吉非替尼原料购自济南汇丰达化工有限公司; 四甲基偶氮唑盐(MTT)粉购自美国 Amresco 公司; SU11274(相对分子质量为 568.09)购自美国 Sigma 公司。磷酸化 c-Met (p-Met, Tyr1234/1235, 145 × 10<sup>3</sup>)、c-Met(140, 170 × 10<sup>3</sup>)、细胞外信号调节激酶 1/2 (Erk1/2, 42/44 × 10<sup>3</sup>)、磷酸化 Erk1/2 (p-Erk1/2, Tyr202/Y204, 42/44 × 10<sup>3</sup>)购自美国 CST 公司。(3)动物: 4 周龄、SPF 级、雌性 BALB/c 裸鼠 49 只, 购买于上海斯莱克实验动物有限公司, 许可证号 SCXK(沪)2003-0003。食物 120 °C 高压蒸气灭菌 45 min, 每日使其维持 14 h 无光、10 h 光照的明暗周期, 饮水过氯化水为 12~15 ppm。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及药物配制** 将 PC-9 细胞悬浮液放入含 10% 胎牛血清达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM)的离心管内, 离心、洗涤, 弃上清液, 加入适当培养基, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温细胞培养箱中孵育, 24 h 后更换 1 次细胞培养液, 每 2~3 天待细胞长满培养瓶时传液换代。取 SU11274 10 mg, 用 220 μL 二甲基亚砜(DMSO)溶解配制最终浓度小于 0.1%。

**1.2.2 MTT 法检测 HGF、吉非替尼、SU11274 单独或联合处理后 PC-9 细胞增殖** 取对数生长期的 PC-9 细胞用胰酶消化后, 以 5 × 10<sup>3</sup> 个/孔细胞接种在 96 孔板, 细胞贴壁后, 加入干预药物及细胞因子, 细胞培养箱中孵育 72 h。将 20 μL MTT(5 mg/mL)加入每孔内, 继续放进细胞培养箱中孵育 4 h。1 200 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 200 μL DMSO 再加入每孔

中, 充分混匀约 30 min 至结晶完全溶解。用酶标仪测量波长 530 nm 时光密度(OD)值, 以上步骤重复进行 3 次。

**1.2.3 流式细胞仪检测 HGF、吉非替尼和 SU11274 单独或联合处理后 PC-9 细胞凋亡** 取对数生长期的 PC-9 细胞按 1 × 10<sup>5</sup> 个/孔接种于 6 孔板, 培养 24 h。细胞贴壁后弃原培养液, 给予相应药物及细胞因子处理。72 h 后, 收集全部细胞, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 1 次, 再用 1 × Binding Buffer 缓冲液调整细胞浓度为 1 × 10<sup>6</sup> 个/mL, 取 100 μL(1 × 10<sup>5</sup> 个/孔细胞)到新的 5 mL 试管, 各管内加入 5 μL 异硫氰酸荧光素(FITC)和 5 μL 碘化丙啶(PI), 轻轻摇匀, 室温(20~25 °C)、避光 15 min。上机前加入 1 × Binding Buffer 缓冲液 400 μL, 1 h 后进行检测。按以上步骤重复进行 3 次。

**1.2.4 Western blot 检测不同浓度的 SU11274 处理后及 HGF、吉非替尼和 SU11274 单独或联合处理后 PC-9 细胞内 c-Met 及其下游通道蛋白表达** 取 5 × 10<sup>5</sup> 个/孔对数生长期的 PC-9 细胞, 给予相应处理后 -20 °C 保存。立即冰上裂解细胞, 离心收集各组蛋白裂解液。用二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量法蛋白定量。取 30~40 μg 蛋白经 8%~10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后, 转印至 NC 膜上, 用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 一抗孵育 TBST 洗膜, 二抗室温摇床孵育再次 TBST 洗膜, 化学发光(ECL)试剂显色、曝光成像。

**1.2.5 裸鼠移植瘤模型的建立及药物抑瘤的分析(SU11274+吉非替尼)** 将 PC-9 细胞和 MRC-5 细胞消化后, 吹打, 混匀, 使其分别悬浮在 DMEM 培养基, 制成最终密度 PC-9 为 5 × 10<sup>6</sup> 个/mL、MRC-5 为 5 × 10<sup>6</sup> 个/mL 的细胞悬液。将 49 只 4 周龄裸鼠分为 7 组, 每组 7 只, 即对照组(C 组)、HGF 组(H 组)、HGF+SU11274 组(HS 组)、HGF+0.1% DMSO 组(HD 组)、吉非替尼组(G 组)、HGF+吉非替尼组(HG 组)、HGF+吉非替尼+SU11274 组(HGS 组)。C 组和 G 组每只裸鼠右侧肋下皮下接种 PC-9 细胞悬液 100 μL, H 组、HS 组、HD 组、HG 组、HGS 组每只裸鼠右侧肋下皮下接种 PC-9+MRC-5 细胞悬液混合液 100 μL。当肿瘤直径达到 4 mm 时, C 组、H 组、HS 组和 HD 组给予 1% Tween-80 灌胃, G 组、HG 组、HGS 组接受 25 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> 的吉非替尼灌胃, 同时, HS 组、HGS 组接受 100 μg/d 的 SU11274 瘤内注射, HD 组接受 100 μL 的 0.1% DMSO 瘤内注射, 每周给药 5 d, 连续 4 周。每天测量 1 次裸鼠的质量, 每隔 3~4 d 用游标卡尺测量肿瘤直径(L)、短径(D),

计算肿瘤体积,肿瘤体积( $V=0.5\times L\times D^2$ ),绘制肿瘤生长曲线。末次给药后断颈处死裸鼠,剥离肿瘤组织,称取质量计算抑瘤率。抑瘤率=(对照组瘤体质量-实验组瘤体质量)/对照组瘤体质量 $\times 100\%$ 。

**1.2.6 免疫组织化学(IHC)法检测 SU11274 处理后 PC-9 细胞移植瘤组织中 c-Met 及其下游通道蛋白表达** 将已经剥离的肿瘤组织按常规方法进行固定、包埋,并制成石蜡切片。石蜡切片脱蜡并水化后用 PBS 洗涤 3 次 $\times 3\text{ min}$ 。用 3% 的过氧化氢 PBS 溶液孵育切片 30 min 后 PBS 溶液洗涤 3 次 $\times 3\text{ min}$ 。将石蜡切片用微波法进行抗原修复,5%羊血清室温孵育 30 min 后甩去羊血清,加入一抗室温孵育 1 h 后 4℃ 过夜,孵育二抗后室温孵育 2 h。快速加入二氨基联苯胺(DAB),孵育约 5 min,PBS 溶液洗 3 次 $\times 3\text{ min}$ 。苏木素染色,PBS 返蓝 5 min,脱水,透明,以中性树脂胶封片。拍摄所有切片,每组中随机抽取 10 张照片,用 IPP6.0 图像分析软件进行定量分析。

**1.3 统计学分析** 实验数据采用 SPSS17.0 统计软件进行处理,计量资料用  $\bar{x}\pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析或  $t$  检验,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

**2.1 MRC-5 细胞分泌 HGF 酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测的结果显示**,PC-9 细胞培养上清液中未检测到 HGF,而在 MRC-5 细胞的培养上清液中检测到 HGF 水平为( $1\,262.07\pm 89.78$ ) pg/mL,二者比较差异有统计学意义( $P<0.04$ )。

**2.2 MRC-5 细胞分泌的 HGF 对 NSCLC 细胞中 c-Met 及其下游通道蛋白表达的影响** Western blot 检测结果显示,PC-9 细胞与 MRC-5 细胞培养上清液混合培养前后,PC-9 细胞中的 c-Met 及其下游蛋白的表达差异无统计学意义( $P>0.05$ );而其磷酸化的蛋白

表达活性明显增加( $P<0.05$ )。定量检测也可见与 MRC-5 细胞培养上清液混合培养后,PC-9 细胞中 c-Met 及其下游蛋白表达水平差异无统计学意义( $P>0.05$ ),而 p-Met 及其下游蛋白水平明显增加( $P<0.05$ ),见图 1。

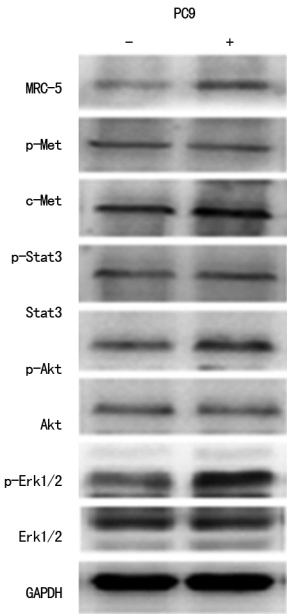


图 1 HGF 刺激 NSCLC 细胞中 c-Met 及其下游蛋白表达

**2.3 SU11274 作用下吉非替尼对 PC-9 细胞各组移植瘤生长的抑制作用** PC-9 细胞移植瘤的 C、H、HS、HD 组在治疗开始时至第 25 天,组间肿瘤体积比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。在治疗开始第 7~25 天,G、HG、HGS 组移植瘤体积均明显缩小( $P<0.05$ ),G、HGS 组移植瘤体积在第 25 天为( $84.3\pm 15.69$ )  $\text{mm}^3$ 、( $66.11\pm 17.79$ )  $\text{mm}^3$ ,而 HG 组为( $201.57\pm 48.52$ )  $\text{mm}^3$ 。各组裸鼠 PC-9 细胞移植瘤体积不同时期比较,见表 1、图 2。

表 1 各组裸鼠 PC-9 细胞移植瘤体积不同时期比较( $\bar{x}\pm s,n=7,\text{mm}^3$ )

|       | 第 4 天             | 第 7 天                            | 第 11 天                            | 第 14 天                            | 第 18 天                            | 第 21 天                            | 第 25 天                            |
|-------|-------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| C 组   | 39.66 $\pm$ 13.57 | 159.50 $\pm$ 71.34 <sup>a</sup>  | 242.53 $\pm$ 74.85 <sup>a</sup>   | 265.09 $\pm$ 53.37 <sup>a</sup>   | 405.26 $\pm$ 155.9 <sup>a</sup>   | 457.71 $\pm$ 136.24 <sup>a</sup>  | 598.24 $\pm$ 233.41 <sup>a</sup>  |
| H 组   | 40.23 $\pm$ 14.92 | 175.85 $\pm$ 76.10 <sup>ab</sup> | 266.39 $\pm$ 77.24 <sup>ab</sup>  | 297.91 $\pm$ 129.12 <sup>ab</sup> | 421.95 $\pm$ 156.71 <sup>ab</sup> | 507.53 $\pm$ 143.10 <sup>ab</sup> | 711.25 $\pm$ 331.50 <sup>ab</sup> |
| HS 组  | 67.82 $\pm$ 18.75 | 182.85 $\pm$ 94.65 <sup>ac</sup> | 290.94 $\pm$ 125.76 <sup>ac</sup> | 353.56 $\pm$ 157.20 <sup>ac</sup> | 429.30 $\pm$ 212.71 <sup>ac</sup> | 550.48 $\pm$ 258.56 <sup>ac</sup> | 659.34 $\pm$ 332.85 <sup>ac</sup> |
| HD 组  | 54.85 $\pm$ 20.42 | 165.49 $\pm$ 72.01 <sup>a</sup>  | 239.87 $\pm$ 126.63 <sup>a</sup>  | 259.32 $\pm$ 123.71 <sup>a</sup>  | 335.05 $\pm$ 113.64 <sup>a</sup>  | 420.97 $\pm$ 129.32 <sup>a</sup>  | 579.32 $\pm$ 210.21 <sup>a</sup>  |
| G 组   | 41.90 $\pm$ 23.55 | 47.96 $\pm$ 13.99                | 60.10 $\pm$ 18.39                 | 55.15 $\pm$ 8.19                  | 51.85 $\pm$ 13.17                 | 59.79 $\pm$ 8.35                  | 84.30 $\pm$ 15.69                 |
| HG 组  | 44.85 $\pm$ 12.71 | 74.49 $\pm$ 30.2 <sup>a</sup>    | 69.8 $\pm$ 22.35 <sup>a</sup>     | 86.10 $\pm$ 12.99 <sup>a</sup>    | 114.23 $\pm$ 16.38 <sup>a</sup>   | 137.68 $\pm$ 28.04 <sup>a</sup>   | 201.57 $\pm$ 48.52 <sup>a</sup>   |
| HGS 组 | 63.98 $\pm$ 31.86 | 60.97 $\pm$ 11.61                | 58.43 $\pm$ 24.87                 | 74.31 $\pm$ 18.53                 | 60.16 $\pm$ 7.31 <sup>d</sup>     | 63.73 $\pm$ 25.23 <sup>d</sup>    | 66.11 $\pm$ 17.79 <sup>d</sup>    |

<sup>a</sup>: $P<0.01$ ,与 G 组比较;<sup>b</sup>: $P<0.01$ ,与 HG 组比较;<sup>c</sup>: $P<0.01$ ,与 HGS 组比较;<sup>d</sup>: $P<0.05$ ,与 HG 组比较

**2.4 SU11274 对吉非替尼抑制裸鼠 PC-9 细胞移植瘤质量的影响** 第 25 天时裸鼠处死后称取瘤质量。在 PC-9 细胞的移植瘤中,其瘤质量 C 组为( $680\pm 373$ ) mg,H 组为( $805\pm 492$ ) mg,HS 组为( $713\pm 258$ ) mg,HD 组为( $566\pm 364$ ) mg,C、H、HS、HD 组裸鼠移植瘤质量组间比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。G 组瘤质量为( $29\pm 12$ ) mg,HG 组为( $66\pm$

10) mg,HGS 组为( $33\pm 17$ ) mg,G 组的瘤体质量明显小于 C 组和 HG 组,其差异有统计学意义( $P<0.05$ );HG 组肿瘤质量小于 H 组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );HGS 组肿瘤质量小于 HS 组及 HG 组,其差异均有统计学意义( $P<0.05$ );而 HGS 组肿瘤质量与 G 组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见图 2。吉非替尼对 PC-9 细胞 G 组、HGS 组抑瘤率分别为



95.80%和 95.15%，而对 HG 组的抑瘤率为90.30%。

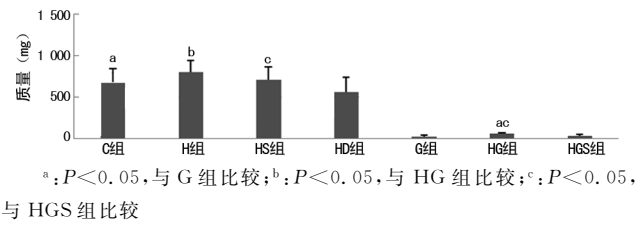


图 2 各组裸鼠 PC-9 细胞移植瘤质量比较( $\bar{x}\pm s, n=7$ )

**2.5 SU11274 对 PC-9 细胞移植瘤组织中 c-Met 及其下游通道蛋白表达的影响** 将剥离出的裸鼠移植瘤组织进行 IHC 检测发现 c-Met 和 p-Met 是位于细胞膜和细胞质的蛋白。与 HS、HGS 组比较, p-Met 在 C、H、HD、G、HG 组的表达强度明显升高( $P<0.05$ );与 C、G 组比较, H、HD、HG 组 p-Met 的表达

强度明显升高( $P<0.05$ )。Stat3 在细胞内位于细胞质, Stat3 经磷酸化后进入细胞核。各组 Stat3 的表达强度比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );而 H、HD、HG 组中可见 p-Stat3 的表达强度, 与 C、HS、G、HGS 组比较明显增高( $P<0.05$ )。Akt 和 p-Akt 均存在于细胞质, 各组 Akt 的表达强度比较, 差异无统计学差异( $P>0.05$ );而 p-Akt 在 H、HD、HG 组中的表达强度, 明显高于 C、HS、G、HGS 组( $P<0.05$ )。Erk1/2 在细胞内的定位在细胞质, 其经磷酸化后, 生成 p-Erk1/2 进入细胞核, 各组 Erk1/2 表达强度差异无统计学意义( $P>0.05$ );而 p-Erk1/2 表达强度在 H、D、HG 组明显高于 C、HS、G、HGS 组( $P<0.05$ ), 见图 3、表 2。

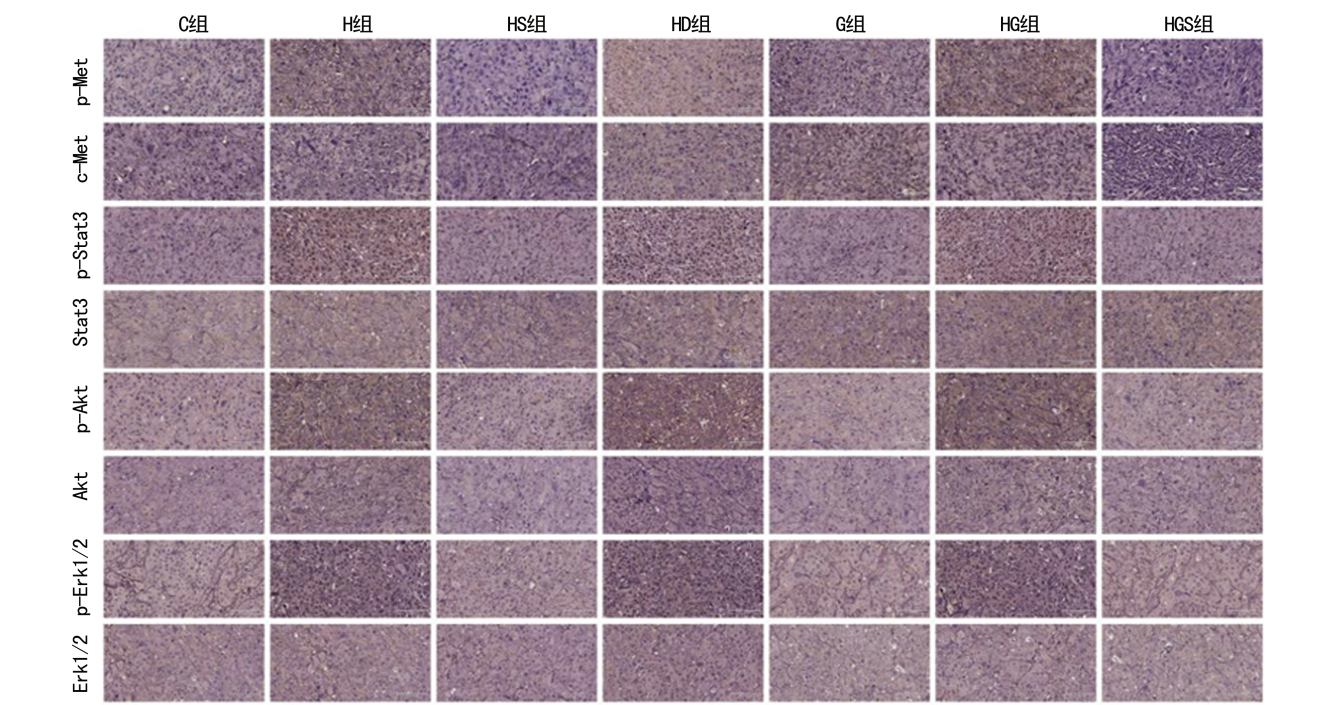


图 3 各组 PC-9 细胞移植瘤组织中 c-Met 及其下游通道蛋白的表达(IHC,  $\times 200$ )

表 2 各组 PC-9 细胞移植瘤组织中 c-Met 及其下游通道蛋白的表达水平比较( $\bar{x}\pm s, n=7$ )

| 组别    | p-Met                     | c-Met                    | p-Stat3                   | Stat3       | p-Akt                     | Akt         | p-Erk1/2                  | Erk1/2      |
|-------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|-------------|---------------------------|-------------|
| C 组   | 0.167±0.032 <sup>a</sup>  | 0.139±0.022 <sup>a</sup> | 0.100±0.042               | 0.132±0.032 | 0.157±0.011               | 0.101±0.024 | 0.121±0.011               | 0.113±0.015 |
| H 组   | 0.225±0.012 <sup>ab</sup> | 0.150±0.024 <sup>a</sup> | 0.233±0.025 <sup>ab</sup> | 0.140±0.010 | 0.225±0.004 <sup>ab</sup> | 0.102±0.028 | 0.216±0.034 <sup>ab</sup> | 0.122±0.017 |
| HS 组  | 0.028±0.016               | 0.053±0.034              | 0.114±0.051               | 0.125±0.011 | 0.146±0.006               | 0.100±0.044 | 0.123±0.008               | 0.130±0.023 |
| HD 组  | 0.172±0.007 <sup>ab</sup> | 0.154±0.005 <sup>a</sup> | 0.244±0.029 <sup>ab</sup> | 0.122±0.010 | 0.244±0.006 <sup>ab</sup> | 0.102±0.037 | 0.221±0.038 <sup>ab</sup> | 0.137±0.024 |
| G 组   | 0.154±0.018 <sup>a</sup>  | 0.153±0.017 <sup>a</sup> | 0.096±0.019               | 0.141±0.030 | 0.151±0.004               | 0.098±0.012 | 0.101±0.008               | 0.115±0.005 |
| HG 组  | 0.218±0.017 <sup>ab</sup> | 0.147±0.042 <sup>a</sup> | 0.252±0.022 <sup>ab</sup> | 0.140±0.017 | 0.228±0.017 <sup>ab</sup> | 0.110±0.029 | 0.210±0.041 <sup>ab</sup> | 0.116±0.012 |
| HGS 组 | 0.026±0.009               | 0.031±0.016              | 0.091±0.022               | 0.129±0.013 | 0.153±0.009               | 0.109±0.041 | 0.108±0.008               | 0.121±0.005 |

<sup>a</sup>,  $P<0.05$ , 与 HS、HGS 组比较; <sup>b</sup>,  $P<0.05$ , 与 C、G 组比较

3 讨 论

在 NSCLC 的治疗中,表皮生长因子受体酪氨酸酶抑制剂(EGFR-TKIs)有着不可替代的重要地位。高水平的 HGF 通过促进具有 c-Met 扩增的细胞亚群生长、活化 c-Met 及下游信号通路及影响 T790M 突

变等方式使 EGFR-TKIs 产生获得性耐药<sup>[14-15]</sup>。因此针对 HGF/c-Met 继发突变的靶向治疗,可能逆转 EGFR-TKIs 的耐药。

本实验中,当用 SU11274 处理由 HGF 诱导的 PC-9 细胞时,被激活的 c-Met 和其下游的通道蛋白的



磷酸化开始受到抑制。而 MTT 法测定细胞存活率显示, HGF 诱导 PC-9 细胞后存活率增加, 而在用 SU11274 处理 72 h 之后恢复到原来水平。检测细胞凋亡的结果示 HGS 组与 HG 组间存在明显差异, 这表明, 在 c-Met 抑制剂 SU11274 的作用下, 吉非替尼对 HGF 诱导的 PC-9 细胞的凋亡率都出现显著提高。免疫印迹结果显示 HGF 可明显刺激 c-Met 磷酸化及磷酸化的 Akt、Stat3、Erk1/2 等下游通道蛋白的表达。PC-9 细胞中, HGF 在吉非替尼作用下仍可刺激 c-Met、Akt、Stat3、Erk1/2 的磷酸化, SU11274 可抑制其表达。综上表明, c-Met 的抑制剂 SU11274 能够逆转由 HGF 诱导的 PC-9 肺癌细胞株对吉非替尼的耐药, 其机制可能与抑制 HGF 活化的 c-Met 及其下游通道蛋白表达有关。

进一步体内实验中, 将 PC-9 细胞与 MRC-5 细胞混合种植于裸鼠右侧肋下皮下, 部分组再分别以吉非替尼、SU11274 处理, 检测肿瘤的体积及质量, 吉非替尼能够抑制 PC-9 细胞 G、HG、HGS 组移植瘤的生长, 但是对 G、HGS 组的抑制作用更加明显。表明吉非替尼能够抑制 PC-9 细胞移植瘤的生长 ( $P < 0.01$ ), HGF 可抑制其作用, SU11274 又可逆转 HGF 的抑制作用 ( $P < 0.01$ )。IHC 检测结果显示 PC-9 细胞中 HS、HGS 组 p-Met 及 c-Met 表达明显低于其余各组, 而 H、HD、HG 组中 p-Met、p-Stat3、p-Akt、p-Erk1/2 表达高于 C、HS、G、HGS 组。Akt、Stat3、Erk1/2 在各组间表达水平比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。表明 c-Met 的抑制剂 SU11274 能够逆转由 HGF 诱导的 PC-9 肺癌细胞株对 EGFR-TKIs 的耐药, 其机制可能与抑制 HGF 活化的 c-Met 及其下游通道蛋白表达有关。

EGFR-TKIs 在 NSCLC 的治疗中意义重大, 因其耐药的出現限制了其疗效及应用, 改善这种限制, 提高患者的疗效是目前最有意义的工作之一。本实验通过体内、外实验研究发现经 c-Met 的抑制剂 SU11274 处理后, 抑制了 c-Met 及其下游的通道蛋白 c-Met、Stat3、Akt、Erk1/2 的磷酸化, 从而逆转了 HGF 诱导的敏感 NSCLC 细胞株对吉非替尼的耐药。表明针对 HGF/c-Met 靶点的治疗为 NSCLC 患者能够获得更有效的个体化靶向治疗提供了很大的可能性, 有望为肺癌患者提供新的生机。

## 参考文献

- [1] ESFAHANI K, COHEN V. HSP90 as a novel molecular target in non-small-cell lung cancer [J]. Lung Cancer (Auckl), 2016(7):11-17.
- [2] NEW M, KEITH R. Early detection and chemoprevention of lung cancer[J]. F1000Res, 2018(7):61.
- [3] CHANG G C, TSENG C H, HSU K H, et al. Predictive factors for EGFR-tyrosine kinase inhibitor retreatment in patients with EGFR-mutated non-small-cell lung cancer-A multicenter retrospective SEQUENCE study [J]. Lung Cancer, 2017(104):58-64.
- [4] TURKE A B, ZEJNULLAHU K, WU Y L, et al. Preexistence and clonal selection of Met amplification in EGFR mutant NSCLC [J]. Cancer Cell, 2010, 17(1):77-88.
- [5] WU H Y, FAN F T, LIU Z G, et al. Norcantharidin combined with EGFR-TKIs overcomes HGF-induced resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer cells via inhibition of Met/PI3k/Akt pathway [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2015, 76(2):307-315.
- [6] GELSOMINO F, FACCHINETTI F, HASPINGER E R, et al. Targeting the Met gene for the treatment of non-small-cell lung cancer [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2014, 89(2):284-299.
- [7] AHSAN A. Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors and therapeutic approaches: an update [J]. Adv Exp Med Biol, 2016(893):137-153.
- [8] TODE N, KIKUCHI T, SAKAKIBARA T, et al. Exome sequencing deciphers a germline MET mutation in familial epidermal growth factor receptor-mutant lung cancer [J]. Cancer Science, 2017, 108(6):1263-1270.
- [9] SHIEH J M, TANG Y A, YANG T H, et al. Lack of association of c-Met-N375S Sequence variant with lung cancer susceptibility and prognosis [J]. Int J Med Sci, 2013, 10(8):988-994.
- [10] GAO W, HAN J. Overexpression of ING5 inhibits HGF-induced proliferation, invasion and EMT in thyroid cancer cells via regulation of the c-Met/PI3K/Akt signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2018(98):265-270.
- [11] PAO W, CHMIELECKI J. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10(11):760-774.
- [12] TANG C, JARDIM D L, FALCHOOK G S, et al. MET nucleotide variations and amplification in advanced ovarian cancer: characteristics and outcomes with c-Met inhibitors [J]. Oncoscience, 2014, 1(1):5-13.
- [13] WEN P Y, SCHIFF D, CLOUGHESY T F, et al. A phase II study evaluating the efficacy and safety of AMG 102 (rilutumumab) in patients with recurrent glioblastoma [J]. Neuro Oncology, 2011, 13(4):437-446.
- [14] YANO S, YAMADA T, TAKEUCHI S, et al. Hepatocyte growth factor expression in EGFR mutant lung cancer with intrinsic and acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in a Japanese cohort [J]. J Thorac Oncol, 2011, 6(12):2011-2017.
- [15] XU L, KIKUCHI E, XU C X, et al. Combined EGFR/Met or EGFR/HSP90 inhibition is effective in the treatment of lung cancers codriven by mutant EGFR containing T790M and Met [J]. Cancer Res, 2012, 72(13):3302-3311.