

[文章编号] 1007-7669(2024)08-0600-07

[DOI号] 10.14109/j.cnki.xyylc.2024.08.07

埃克替尼联合二甲双胍对耐药非小细胞肺癌 H1975 细胞的抗肿瘤作用

吴婷婷^{1,2}, 杨帆^{1,2}, 常珂^{1,2}, 任春霞², 余自成²

(1. 同济大学医学院, 上海 200092; 2. 同济大学附属杨浦医院 药学部, 上海 200090)

[关键词] 埃克替尼; 二甲双胍; 癌, 非小细胞肺; 药物协同作用

[摘要] 目的 研究埃克替尼联合二甲双胍对耐药非小细胞肺癌 H1975 细胞的抗肿瘤作用及可能机制。方法 用 CCK-8 法检测埃克替尼 (0、0.1、1、5、10、20、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)、二甲双胍 (0、2、4、8、16、32、64 $\text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$) 以及埃克替尼 [0、0.125、0.25、0.5、1 倍半数抑制浓度 (IC_{50})] 联合二甲双胍 (0.5 倍 IC_{50}) 对 H1975 细胞增殖的抑制作用和联合指数 (CI); 采用划痕实验检测细胞的迁移能力; 采用侵袭实验检测细胞的侵袭能力; 采用 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测细胞凋亡率; 采用 Western blot 法检测相关蛋白表达水平。结果 埃克替尼和二甲双胍抑制 H1975 细胞 48 h 的 IC_{50} 分别为 (49.90 ± 4.84) $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 (13.20 ± 1.27) $\text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。埃克替尼与二甲双胍对 H1975 细胞具有协同抑制作用 ($\text{CI} < 1$)。与二甲双胍组和埃克替尼组比较, 联合用药组的细胞迁移率显著下降、细胞侵袭能力显著降低、细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.05$); Akt、mTOR 的磷酸化蛋白水平和 Bcl-2 的表达水平显著下降, AMPK 的磷酸化蛋白水平和 Bax 的表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。结论 埃克替尼联用二甲双胍对非小细胞肺癌 H1975 细胞具有显著的协同抑制增殖作用和促凋亡作用, 其机制可能与激活 AMPK、抑制 Akt/mTOR 信号通路有关。

[中图分类号] R965

[文献标志码] A

Anti-tumor effect of icotinib combined with metformin on non-small cell lung cancer H1975 cells

WU Ting-ting^{1,2}, YANG Fan^{1,2}, CHANG Ke^{1,2}, REN Chun-xia², YU Zi-cheng²

(1. School of Medicine, Tongji University, SHANGHAI 200092, China; 2. Department of Pharmacy, Yangpu Hospital, School of Medicine, Tongji University, SHANGHAI 200090, China)

[KEY WORDS] icotinib; metformin; carcinoma, non-small cell lung; drug synergism

[ABSTRACT] AIM To study the anti-tumor effect of icotinib combined with metformin on non-small cell lung cancer (NSCLC) H1975 cells and its possible mechanism. METHODS CCK-8 assay was used to detect the proliferation inhibitory effect and combination index (CI) of icotinib monotherapy (0, 0.1, 1, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$), metformin monotherapy (0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 $\text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$), and icotinib (0, 0.125, 0.25, 0.5, 1 times of IC_{50}) combined with metformin (0.5 times of IC_{50}) on the H1975 cells. The migratory ability of the cells was detected by scratch test, and the invasive ability of the cells was detected by invasion test. Annexin V-FITC/PI flow cytometry was used to detect the

[收稿日期] 2023-03-15 [接受日期] 2024-03-01

[基金项目] 上海市科学技术委员会科研计划项目 (19ZR1450600); 上海市临床药学重点专科建设项目支持课题

[作者简介] 吴婷婷, 女, 硕士在读, 主要从事临床药学的研究, E-mail: ttwu97@163.com。余自成, 男, 主任药师, 博士, 主要从事临床药学和药理学相关研究, E-mail: yzcheng666@qq.com

[责任作者] 余自成

rate of apoptosis. Western blot was used to detect the expression level of related proteins. RESULTS The IC_{50} of icotinib and metformin for the inhibition on H1975 cells after 48 h were $(49.90 \pm 4.84) \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(13.20 \pm 1.27) \text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. Icotinib and metformin produced a synergistic effect in H1975 cells ($CI < 1$). Compared with the metformin group and the icotinib group, the migration rate and invasion ability of combination group were significantly decreased, and the apoptosis rate was significantly increased ($P < 0.05$); the expression of p-Akt, p-mTOR and Bcl-2 were significantly decreased, while the expression of p-AMPK and Bax were significantly increased ($P < 0.05$). CONCLUSION Icotinib and metformin have significant synergic antitumor effects and proapoptotic effects on non-small cell lung cancer H1975 cells, and the underlying mechanism may be related to enhancing activation of AMPK and inhibition of Akt/mTOR signaling pathway.

肺癌是全球发病率排第 2 位、死亡率排第 1 位的恶性肿瘤, 其中 85% 以上的肺癌为非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) [1]。埃克替尼 (icotinib) 是我国第一个自主研发成功的表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) - 酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitors, TKIs), 适用于具有 EGFR 基因敏感突变的局部晚期或转移性 NSCLC 患者 [2], 但绝大多数患者在服药 6~12 个月后会因产生耐药性而出现疾病进展 [3]。近年来, 有多项研究发现口服降糖药物二甲双胍 (metformin) 具有抑制肿瘤细胞增殖的作用 [4,5]。已有学者探索了 EGFR-TKIs 与二甲双胍联合用药发挥对 NSCLC 细胞的协同抑制作用, 试图解决 EGFR-TKIs 的耐药问题, 但相关研究结果尚未有明确统一的结论。例如, 研究显示, 二甲双胍可通过恢复耐 EGFR-TKIs 吉非替尼肺癌细胞的上皮间质转化 (epithelial to mesenchymal transition, EMT), 逆转细胞对吉非替尼的耐药性, 增强吉非替尼对 NSCLC 细胞的抑制作用 [6]; 而与 EGFR-TKIs 厄洛替尼联用后, 二甲双胍则可能通过影响 NSCLC 细胞的自噬与凋亡作用, 减弱厄洛替尼的抗癌效果 [7]。基于此, 本研究探讨了埃克替尼联合二甲双胍对耐药 NSCLC 细胞的抗肿瘤作用, 以期对 NSCLC 的临床治疗提供思路。

材料与方法

材料与设备 ChemiDoc XRS+ 化学发光成像系统 (Bio-Rad 公司), CKX41 倒置相差显微镜 (Olympus 公司), BD FACSCanto 11 流式细胞仪 (BD 公司), Fluoroskan FL 酶标仪 (Thermo Fisher 公司), NU-5810E 二氧化碳细胞培养箱 (Thermo Fisher 公司) 等。

主要药品与试剂 埃克替尼 (批号: 610798-31-7, 纯度 >99%) 由浙江贝达药业股份有限公司惠赠, 二甲双胍 (批号: 657-24-9, 纯度 >98.5%) 由贵州天安药业股份有限公司惠赠, 两药分别以二甲基亚砷

(DMSO) 和磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 溶解, 均于 -20°C 保存备用, 使用前以 RPMI 1640 培养基稀释至实验所需浓度。胎牛血清 (批号: 10099141C) 购自美国 Gibco 公司; 兔抗人表皮生长因子 (EGFR)、磷酸化表皮生长因子 (p-EGFR)、单磷酸腺苷依赖的蛋白激酶 (AMPK)、磷酸化 AMPK (p-AMPK)、蛋白激酶 B (Akt)、磷酸化 Akt (p-Akt)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)、磷酸化 mTOR (p-mTOR)、B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗试剂盒、CCK-8 试剂盒、Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒和 ECL 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; DMSO、PBS、RPMI 1640 培养基购自武汉赛维尔生物公司。

细胞培养 人肺腺癌细胞株 H1975 (同时具有 21 号外显子 L858R 敏感突变以及 20 号外显子 T790M 耐药突变的耐药细胞) 购自中国科学院上海细胞生物研究所。细胞用 RPMI 1640 培养液 (含有 10% 胎牛血清) 在 37°C 、含 5% CO_2 的孵箱中常规培养, 生长至约 80% 融合时传代, 隔日更换培养基。

细胞活力和抑制率检测 取对数生长期的 H1975 细胞, 制备单细胞悬液, 调整细胞密度为 5×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 接种于 96 孔板, 每孔接种 100 μL , 置于 5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后将细胞分为对照组、埃克替尼组、二甲双胍组和联合用药组。其中, 对照组不加药物, 埃克替尼组加入不同浓度 (0、0.1、1、5、10、20、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的埃克替尼溶液, 二甲双胍组加入不同浓度 (0、2、4、8、16、32、64 $\text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的二甲双胍溶液, 联合用药组加入不同浓度的埃克替尼 [0、0.125、0.25、0.5、1 倍半数抑制浓度 (IC_{50})] 和二甲双胍溶液 (0.5 倍 IC_{50}), 每组设 6 个复孔, 实验重复 3 次。培养 48 h 后, 每孔分别加入 CCK-8 试剂 10 μL , 避光孵育 1.5 h, 以不加细胞的空白培养基为空白组进行对照, 用酶标仪在 450 nm 波长处检测吸光度 (A) 值。

$$\text{细胞活力}(\%) = \frac{\text{实验组 A 值} - \text{空白组 A 值}}{\text{对照组 A 值} - \text{空白组 A 值}} \times 100\%$$

抑制率(%) = (1 - 细胞活力) × 100%。利用 Graphpad Prism 8.0 软件计算药物的 IC₅₀ 值, 利用 CompuSyn 1.0.1 软件对 CCK-8 法的检测结果进行分析, 绘制效应 (Fa) - 联合指数 (CI) 图。若 CI < 1, 认为两药具有协同作用; 若 CI = 1, 认为两药具有相加作用; 若 CI > 1, 则认为两药具有拮抗作用^[8]。

细胞迁移能力检测 取对数生长期的 H1975 细胞, 以 2×10^5 个 · mL⁻¹ 接种于 6 孔板上, 每孔 2 mL, 培养 24 h 后用 10 μL 枪头垂直划痕, 弃上清液, 以 PBS 洗涤 3 次, 分别设置对照组 (不加药物)、二甲双胍 (6 mmol · mL⁻¹) 组、埃克替尼 (25 μmol · mL⁻¹) 组以及联合用药组 (二甲双胍 6 mmol · mL⁻¹ + 埃克替尼 25 μmol · mL⁻¹), 在加药 0、24 和 48 h 后于倒置显微镜下观察、拍照, 采用 Image J 1.8.0 软件分析划痕距离, 并用 Graphpad Prism 8.0 软件计算细胞迁移率。细胞迁移率 = (0 h 时的划痕间距 - 24 h 或 48 h 时的划痕间距) / 0 h 时的划痕间距 × 100%。实验重复 3 次。

细胞侵袭能力检测 将 Millicell 小室 (孔径 8 μm) 放入 24 孔培养板中, 用 Matrigel 基质胶 (每孔 50 μL) 包被 Millicell 小室底部的聚碳酸酯膜, 于 37 °C 放置过夜, 使其成凝胶状。将 H1975 细胞按上述方法分组及给药, 处理 48 h 后, 分别以 2×10^5 个 · mL⁻¹、每孔 100 μL 接种于 Millicell 的上室, 下室中加入 RPMI 1640 培养液 (含 10% 胎牛血清) 600 μL。培养 48 h 后, 取出 Millicell 小室, 用棉签擦去聚碳酸酯膜上的上层细胞, 将 Millicell 小室以 4% 多聚甲醛固定 30 min, 结晶紫染色 30 min。取聚碳酸酯膜上的下层细胞在显微镜下计数穿膜细胞, 以各药物组相对对照组的穿膜数比较细胞侵袭能力, 即细胞侵袭能力 = 药物组穿膜细胞数 / 对照组穿膜细胞数。实验重复 3 次。

细胞凋亡率检测 取对数生长期的 H1975 细胞, 以 2×10^5 个 · mL⁻¹ 接种于 6 孔板上, 每孔 2 mL, 培养 24 h 后, 按上述方法分组及给药, 处理 48 h。按照 Annexin V-FITC/PI 试剂说明书收集细胞, 经 Annexin V-FITC/PI 染色后利用流式细胞仪检测细胞凋亡率。实验重复 3 次。

蛋白表达检测 取对数生长期的 H1975 细胞, 以 2×10^5 个 · mL⁻¹ 接种于 6 孔板上, 每孔 2 mL, 培养 24 h 后, 按上述方法分组及给药, 处理 48 h 后收集细胞, 提取细胞总蛋白, 采用 BCA 法定量检测蛋白浓度。取 20 μg 蛋白样品进行十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (浓缩胶 80 V, 20 min; 分离胶 120

V, 80 min), 之后转移至聚偏二氯乙烯膜上, 用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h; 以 TBST 清洗后, 加入相应一抗 (稀释比例 1:1 000) 于 4 °C 孵育过夜; 以 TBST 清洗后, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (稀释比例 1:2 000), 继续孵育 2 h。以 TBST 清洗后, 采用 ECL 发光试剂避光显色。实验重复 3 次。采用 Image J 1.8.0 软件以 GAPDH 为内参蛋白计算目的蛋白的表达水平。目的蛋白相对表达水平 = 目的蛋白条带灰度值 / 内参蛋白条带灰度值。

统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计学软件进行分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组数据间的比较采用单因素方差分析, 两组间的数据比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

结 果

对 H1975 细胞增殖的影响 CCK-8 法检测结果显示, H1975 细胞增殖抑制率随着埃克替尼和二甲双胍浓度的升高而升高, 埃克替尼和二甲双胍单药作用 H1975 细胞 48 h 的 IC₅₀ 分别为 (49.90 ± 4.84) μmol · mL⁻¹ 和 (13.20 ± 1.27) mmol · mL⁻¹。

不同浓度埃克替尼、二甲双胍单药及联合给药对 H1975 细胞活力的影响情况见图 1。结果显示, 与埃克替尼组比较, 联合用药组的细胞活力均呈下降趋势。用 CompuSyn 1.0.1 软件导出 Fa-CI 图 (图 1D), 结果显示, 6.25、12.5、25、50 μmol · mL⁻¹ 埃克替尼与 6 mmol · mL⁻¹ 二甲双胍的 CI 均 < 1, 表明埃克替尼和二甲双胍联合使用对 H1975 细胞增殖具有良好的协同抑制效应, 且埃克替尼与二甲双胍的质量浓度分别为 25 μmol · mL⁻¹、6 mmol · mL⁻¹ 时的协同效应最佳 (CI 值最低), 因此后续实验均以上述浓度处理细胞。

对 H1975 细胞迁移的影响 细胞迁移结果见图 2。处理 24 h 后, 对照组、二甲双胍组、埃克替尼组和联合用药组的细胞迁移率分别为 (44.63 ± 4.79)%、(26.70 ± 1.98)%、(28.24 ± 2.18)% 和 (22.37 ± 2.82)%、各给药组的细胞迁移率均显著小于对照组 ($P < 0.05$)。处理 48 h 后, 上述 4 组细胞迁移率分别为 (69.41 ± 5.76)%、(46.55 ± 4.86)%、(46.87 ± 5.66)% 和 (29.94 ± 1.16)%、各给药组的细胞迁移率均显著小于对照组 ($P < 0.05$), 且联合用药组的细胞迁移率显著小于埃克替尼组和二甲双胍组 ($P < 0.05$)。

对 H1975 细胞侵袭能力的影响 处理 48 h 后, 将对照组穿出 Millicell 小室的细胞数 (穿膜细胞数) 设置为 1, 埃克替尼组的相对穿膜细胞数为 0.57 ± 0.04, 二甲双胍组为 0.43 ± 0.02, 联合用药组为 0.14 ± 0.01,

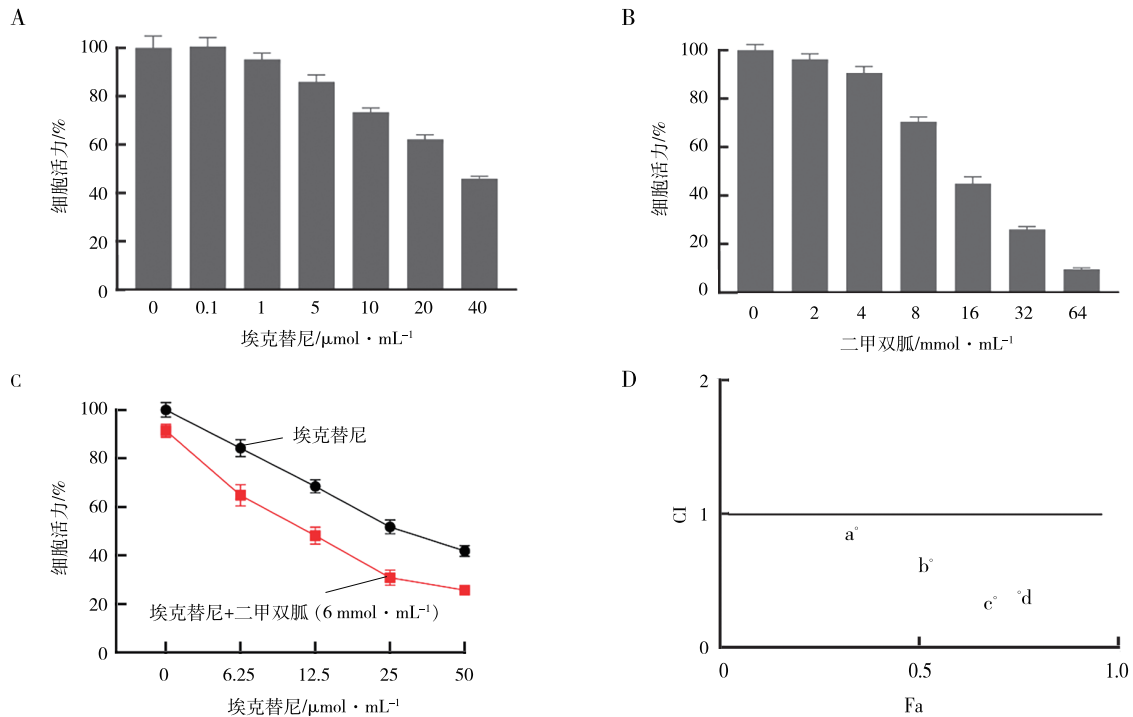


图 1 埃克替尼和二甲双胍对 H1975 细胞活力的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$) A: 埃克替尼对细胞增殖的影响, B: 二甲双胍对细胞增殖的影响, C: 埃克替尼联合二甲双胍对细胞增殖的影响, D: 埃克替尼联合二甲双胍对细胞的效应 (F_a) - 联合指数 (CI) 图 (图中圆圈 a、b、c、d 分别代表 6.25、12.5、25、50 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 埃克替尼与 6 $\text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 二甲双胍的 CI 值)

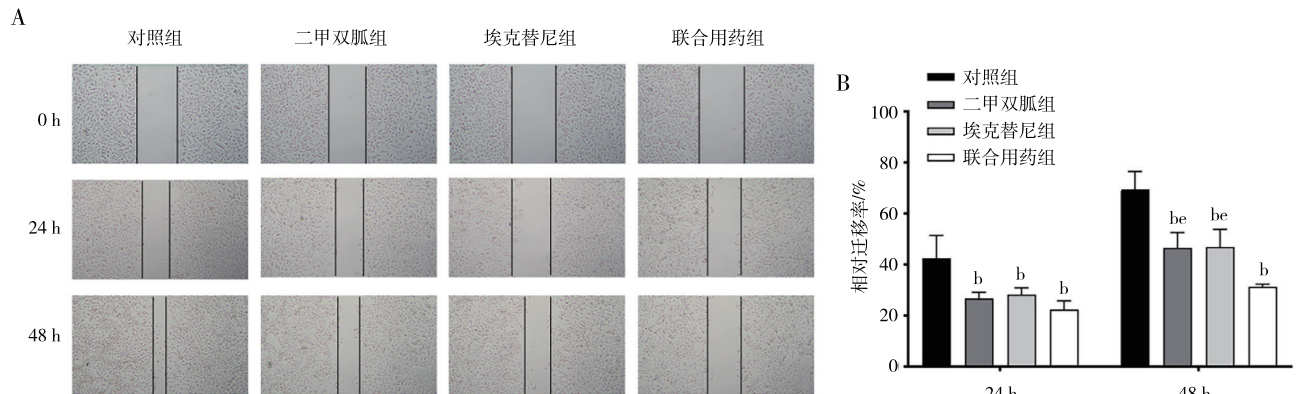


图 2 埃克替尼和二甲双胍对 H1975 细胞迁移能力的影响 A: 细胞迁移图 ($\times 100$), B: 各组细胞的相对迁移率 ($n=3, \bar{x} \pm s$)。经单因素方差分析: 与对照组比较, $^b P < 0.05$; 与联合用药组比较, $^a P < 0.05$

各给药组的相对穿膜细胞数均显著少于对照组 ($P < 0.05$), 且联合用药组的相对穿膜细胞数显著少于埃克替尼组和二甲双胍组 ($P < 0.05$)。见图 3。

对 H1975 细胞凋亡的影响 处理 48 h 后, 对照组、二甲双胍组、埃克替尼组和联合用药组的细胞凋亡率分别为 $(8.3 \pm 0.92)\%$ 、 $(16.67 \pm 3.2)\%$ 、 $(18.1 \pm 3.82)\%$ 、 $(34.87 \pm 4.34)\%$, 各给药组的细胞凋亡率均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 且联合用药组的细胞凋亡率显著高于埃克替尼组和二甲双胍组 ($P < 0.05$)。见图 4。

对 H1975 细胞相关蛋白表达的影响 处理 48 h 后, 埃克替尼组细胞的 p-EGFR 水平显著低于对照组 ($P < 0.01$), 且联合用药组细胞的 p-EGFR 水平显著低于埃克替尼组和二甲双胍组 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 各给

药组细胞中的 p-AMPK 和 Bax 的表达水平均显著升高, p-Akt、p-mTOR 和 Bcl-2 的表达水平均显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且联合给药组的上述效果较埃克替尼组和二甲双胍组更为显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图 5。

讨论

EGFR-TKIs 类药物的上市, 为 NSCLC 的治疗带来了希望, 现已成为 EGFR 敏感突变 NSCLC 的一线治疗药物^[9]。埃克替尼作为我国自主研发的首个小分子靶向抗癌药, 可通过选择性结合细胞酪氨酸激酶区, 阻断 EGFR 下游信号通路传导, 适用于治疗具有 EGFR 基因敏感突变的局部晚期或转移性 NSCLC 患

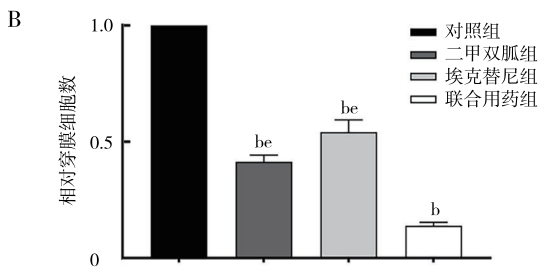
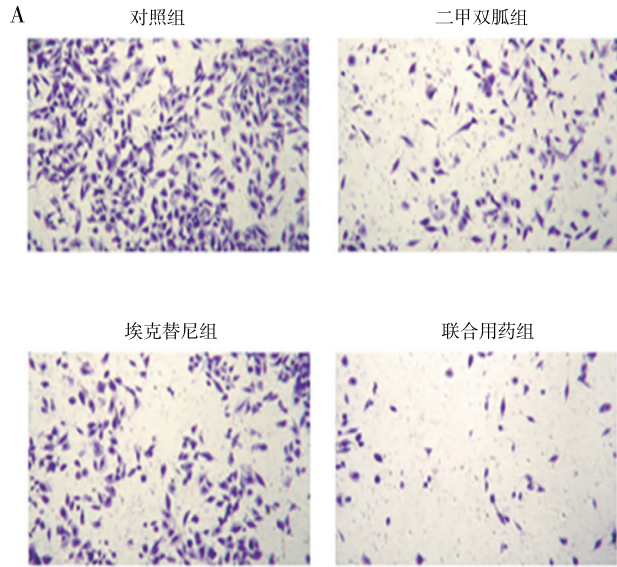


图3 埃克替尼和二甲双胍对 H1975 细胞侵袭能力的影响 A: 各组细胞侵袭图 (结晶紫染色, $\times 100$), B: 各组相对穿膜 ($n=3, \bar{x} \pm s$) 数。经单因素方差分析: 与对照组比较, $^b P < 0.05$; 与联合用药组比较: $^c P < 0.05$

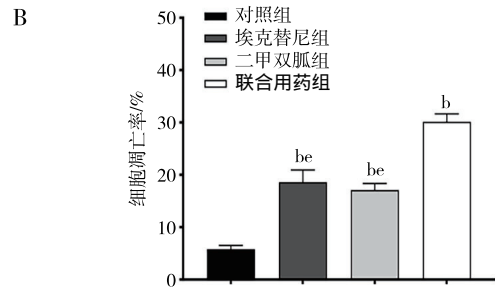
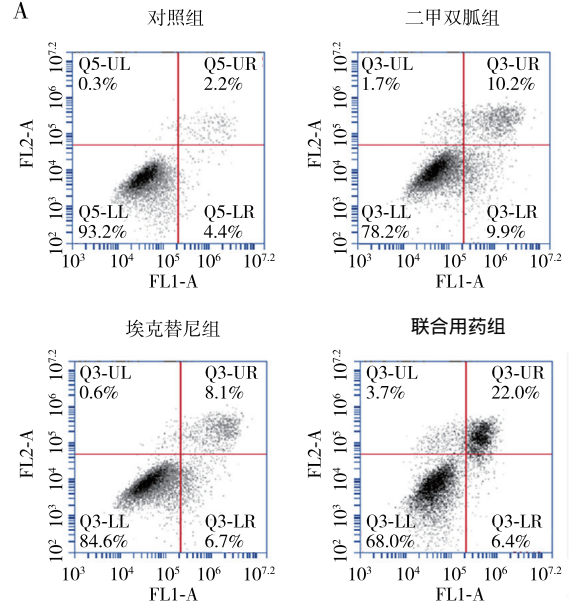


图4 埃克替尼和二甲双胍对 H1975 细胞凋亡率的影响 A: 各组 H1975 细胞流式凋亡图, B: 各组 H1975 细胞凋亡率 ($n=3, \bar{x} \pm s$)。经单因素方差分析: 与对照组比较, $^b P < 0.05$; 与联合用药组比较, $^c P < 0.05$

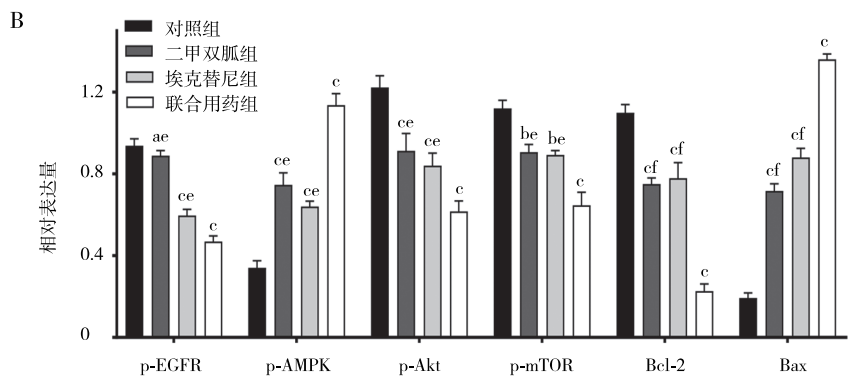
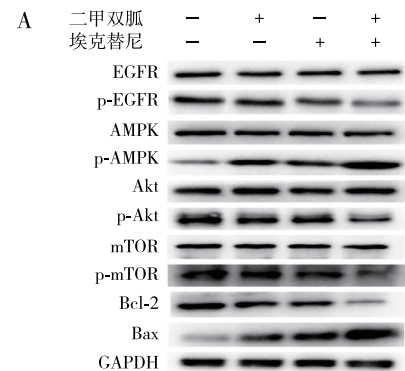


图5 埃克替尼和二甲双胍对 H1975 细胞相关蛋白表达的影响 A: 各组 H1975 细胞的蛋白印迹图, B: 各组 H1975 细胞的相对 GAPDH 蛋白表达量 ($n=3, \bar{x} \pm s$)。经单因素方差分析: 与对照组比较, $^a P > 0.05$, $^b P < 0.05$, $^c P < 0.01$; 与联合用药组比较, $^d P < 0.05$, $^e P < 0.01$

图5 埃克替尼和二甲双胍对 H1975 细胞相关蛋白表达的影响 A: 各组 H1975 细胞的蛋白印迹图, B: 各组 H1975 细胞的相对 GAPDH 蛋白表达量 ($n=3, \bar{x} \pm s$)。经单因素方差分析: 与对照组比较, $^a P > 0.05$, $^b P < 0.05$, $^c P < 0.01$; 与联合用药组比较, $^d P < 0.05$, $^e P < 0.01$

者。但在用药 6~12 个月后, 50%~60% 的 EGFR 基因敏感突变会产生 T790M 耐药突变^[10], 一定程度上限制了其长期疗效和临床应用, 因此探讨埃克替尼耐药问题的解决方案对改善 NSCLC 患者具有重要的临床价值。

针对埃克替尼等小分子靶向药物的耐药问题, 目前的策略主要有两种: (1) 开发针对耐药靶点的新药,

如以奥希替尼为代表的第三代 EGFR-TKIs, 此类药物是 EGFR 不可逆抑制剂, 对具有 T790M 耐药突变的患者疗效显著, 但由于新药开发上市进程缓慢, 且价格昂贵, 患者的经济负担重。此外, 无论是一线还是二线使用奥希替尼, 患者在治疗数月后仍会因 EGFR 突变, 尤其是 18、20 和 21 号外显子的突变产生耐药性^[11]。(2) 通过联合放疗、化疗或合用其他药物

延缓埃克替尼等小分子靶向药物获得性耐药的发生或增加耐药细胞对药物的敏感性。近年来,通过联合用药解决埃克替尼耐药问题已成为重要的研究热点。例如,有研究发现,联合组蛋白去乙酰化酶抑制剂西达本胺可通过抑制大鼠 RAS/MAPK 通路增加埃克替尼对 NSCLC 的抗癌作用^[12];联合赖甲环素可通过抑制生长因子受体结合蛋白介导的 Akt/ERK/STAT3 信号通路逆转 NSCLC 细胞对埃克替尼的获得性耐药^[13];另外,千金藤素也可通过调控 p53 信号促进细胞自噬从而逆转人 NSCLC 细胞对埃克替尼的耐药性^[14]。

二甲双胍作为一种安全有效的经典降糖药物,近年来被发现具有潜在抗肿瘤作用,已有较多研究探索了二甲双胍与抗肿瘤药物联用以增强抗肿瘤效果或增加耐药肿瘤细胞对抗肿瘤药物敏感性的作用。例如,有研究表明,二甲双胍能提高吉西他滨对转移性乳腺癌的抗癌效果^[15];联合二甲双胍能增强索托拉西布对 NSCLC 细胞的细胞毒性作用^[16]。本研究探讨了埃克替尼与二甲双胍联用以具有 EGFR T790M 耐药突变的 H1975 细胞的协同抑制作用,并探讨了其可能的相关机制。本研究发现,埃克替尼联合二甲双胍对 H1975 细胞增殖有明显的抑制作用,且该作用具有协同作用;联合二甲双胍也可进一步增强埃克替尼对 H1975 细胞迁移和侵袭的抑制作用,提高 H1975 细胞的凋亡率。

细胞凋亡是细胞死亡的一种形式,受多种分子信号通路调控,线粒体通路是关键通路之一^[17]。细胞凋亡的线粒体途径受 Bcl-2 家族蛋白的调控,包括 Bcl-2 和 Bax,其中 Bcl-2 是抗凋亡蛋白,而 Bax 可拮抗其抗凋亡作用,还能直接促进肿瘤细胞凋亡^[18]。本研究结果表明,埃克替尼联合二甲双胍可明显提高 H1975 细胞的 Bax 蛋白表达水平,并降低 Bcl-2 蛋白表达水平,提示两药联用可能通过调控线粒体凋亡通路诱导 H1975 细胞凋亡。

EGFR 是上皮生长因子细胞增殖和信号传导的受体,对细胞的生长、增殖等生理过程发挥重要的作用,是埃克替尼作用的关键靶点。AMPK 是细胞能量稳态调节中的关键蛋白激酶,激活后的 AMPK 可将糖异生、脂质和蛋白质合成等过程中的系列酶直接磷酸化,进而抑制细胞的生长代谢;此外,其还可抑制 mTOR 的磷酸化^[19,20]。Akt 是一种原癌基因,在调控各种不同细胞功能(包括代谢、生长、增殖、存活、转录以及蛋白质合成等)中发挥重要作用,也是 mTOR 的重要上游信号^[21]。本研究结果发现,二甲双胍单药对 H1975 细胞的 EGFR 磷酸化无明显作用,但可

以直接激活 AMPK 并抑制下游 mTOR 磷酸化;此外,二甲双胍也可直接抑制 Akt/mTOR 的磷酸化。埃克替尼则通过抑制 EGFR 和 Akt/mTOR 的磷酸化以及激活 AMPK 发挥抗肿瘤作用。两药联用,可以进一步促进 H1975 细胞 AMPK 的磷酸化蛋白水平的表达,以及抑制 Akt、mTOR 的磷酸化蛋白水平表达。因此,本研究推测二甲双胍可能通过激活 AMPK 和抑制 Akt/mTOR 信号通路增强埃克替尼对 NSCLC 耐药细胞的抑制作用。

综上所述,联用二甲双胍能显著增强埃克替尼对 H1975 细胞增殖、迁移、侵袭的抑制作用及促凋亡作用,上述作用可能与激活 AMPK 和抑制 Akt/mTOR 信号通路有关。但该结论有待今后通过多种耐药细胞株以及耐药动物模型进一步证实,或可通过 NSCLC 患者应用埃克替尼与二甲双胍的临床观察予以评价。

[参考文献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, *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.
- [2] 吴婷婷,任春霞,朱李飞,等.埃克替尼治疗非小细胞肺癌的研究进展 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2021, 40 (8): 550–555. WU TT, REN CX, ZHU LF, *et al.* Research progress of icotinib in treatment of non-small cell lung cancer [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem*, 2021, 40 (8): 550–555.
- [3] LEI L, WANG WX, ZHU YC, *et al.* Real-world efficacy and potential mechanism of resistance of icotinib in Asian advanced non-small cell lung cancer with EGFR uncommon mutations: a multi-center study [J]. *Cancer Med*, 2020, 9 (1): 12–18.
- [4] KHEIRANDISH M, MAHBOOBI H, YAZDANPARAST M, *et al.* Anti-cancer effects of metformin: recent evidences for its role in prevention and treatment of cancer [J]. *Curr Drug Metab*, 2018, 19 (9): 793–797.
- [5] DENG J, PENG M, WANG ZR, *et al.* Novel application of metformin combined with targeted drugs on anticancer treatment [J]. *Cancer Sci*, 2019, 110 (1): 23–30.
- [6] KURIMOTO R, IWASAWA S, EBATA T, *et al.* Drug resistance originating from a TGF- β /FGF-2-driven epithelial-to-mesenchymal transition and its reversion in human lung adenocarcinoma cell lines harboring an EGFR mutation [J]. *Int J Oncol*, 2016, 48 (5): 1825–1836.
- [7] XIAO ZG, GAERTNER S, MORRESI-HAUF A, *et al.* Metformin triggers autophagy to attenuate drug-induced apoptosis in NSCLC cells, with minor effects on tumors of diabetic patients [J]. *Neoplasia*, 2017, 19 (5): 385–395.
- [8] CHOU TC. Drug combination studies and their synergy

- quantification using the Chou-Talalay method [J]. *Cancer Res*, 2010, 70 (2): 440–446.
- [9] 吴婷婷, 杨帆, 任春霞, 等. EGFR-TKIs 治疗非小细胞肺癌获得性耐药机制研究进展 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 31 (3): 229–235. WU TT, YANG F, REN CX, *et al.* Research progress on the mechanism of EGFR-TKIs in treatment of acquired drug resistance of non-small cell lung cancer [J]. *Chin J Clin Pharm*, 2022, 31 (3): 229–235.
- [10] CASTELLANOS E, FELD E, HORN L. Driven by mutations: the predictive value of mutation subtype in EGFR-mutated non-small cell lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2017, 12 (4): 612–623.
- [11] 陈远, 刘苓霜. 第三代 EGFR-TKIs 耐药机制及第四代 EGFR 抑制剂研究进展 [J]. *现代肿瘤医学*, 2023, 31 (13): 2536–2540. CHEN Y, LIU LS. Research progress on the mechanism of drug resistance of the third generation EGFR-TKIs and the fourth generation EGFR inhibitors [J]. *J Mod Oncol*, 2023, 31 (13): 2536–2540.
- [12] ZHANG NN, LIANG CX, SONG WY, *et al.* Antitumor activity of histone deacetylase inhibitor chidamide alone or in combination with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor icotinib in NSCLC [J]. *J Cancer*, 2019, 10 (5): 1275–1287.
- [13] CHEN Y, WU J, YAN HF, *et al.* Lymecycline reverses acquired EGFR-TKI resistance in non-small-cell lung cancer by targeting GRB2 [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 159: 105007.
- [14] 刘然, 邢爽, 王璐, 等. 千金藤素通过调控 p53 信号介导的自噬逆转人非小细胞肺癌细胞的埃克替尼耐药性 [J]. *临床肺科杂志*, 2022, 27 (5): 744–750, 772. LIU R, XING S, WANG L, *et al.* Cepharanthine reverses icotinib resistance in human non-small cell lung cancer cells by regulating p53 signaling-mediated autophagy [J]. *J Clin Pulm Med*, 2022, 27 (5): 744–750, 772.
- [15] 王文婷, 彭钊, 邓祖亮, 等. 二甲双胍联合吉西他滨对胰腺癌细胞增殖、迁移及上皮间质转化的影响 [J]. *山东医药*, 2021, 61 (10): 41–44. WANG WT, PENG Z, DENG ZL, *et al.* Effects of metformin combined with gemcitabine on proliferation, migration, and epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells [J]. *Shandong Med J*, 2021, 61 (10): 41–44.
- [16] BARRIOS-BERNAL P, LUCIO-LOZADA J, RAMOS-RAMIREZ M, *et al.* A novel combination of sotorasib and metformin enhances cytotoxicity and apoptosis in KRAS-mutated non-small cell lung cancer cell lines through MAPK and P70S6K inhibition [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (5): 4331.
- [17] STRASSER A, VAUX DL. Cell death in the origin and treatment of cancer [J]. *Mol Cell*, 2020, 78 (6): 1045–1054.
- [18] SPITZ AZ, GAVATHIOTIS E. Physiological and pharmacological modulation of Bax [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2022, 43 (3): 206–220.
- [19] LIN SC, HARDIE DG. AMPK: sensing glucose as well as cellular energy status [J]. *Cell Metab*, 2018, 27 (2): 299–313.
- [20] 董莹, 臧奕. AMPK 在肿瘤发生发展中的研究现状 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2020, 36 (10): 1165–1173. DONG Y, ZANG Y. The role of AMPK in tumorigenesis and development [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2020, 36 (10): 1165–1173.
- [21] HUA H, ZHANG HY, CHEN JZ, *et al.* Targeting Akt in cancer for precision therapy [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14 (1): 128.