

伯格替尼通过抑制 EGFR 磷酸化增强结直肠癌细胞的辐射敏感性

胡关朔^{1,2}, 赵国平¹

摘要 目的 探究伯格替尼对结直肠癌(LOVO)细胞辐射敏感性的影响及机制。方法 Western blot 和免疫荧光检测检测不同辐射剂量处理之后 LOVO 细胞中 EGFR, p-EGFR 表达量。Western blot 检测 LOVO 细胞中 EGFR、p-EGFR、 γ -H2AX、cleaved caspase-3、cleaved caspase-7 和 cleaved caspase-9 表达量, DR-GFP 质粒系统检测非同源末端连接修复(NHEJ)水平, CCK-8 检测细胞活力, AnnexinV FITC/PI 双标记法检测细胞凋亡。结果 ①辐射处理后, LOVO 细胞 EGFR 磷酸化水平显著升高, 伯格替尼呈剂量依赖性的抑制 EGFR 磷酸化。②伯格替尼抑制非同源末端连接修复, 伯格替尼联合辐射处理 LOVO 细胞后, 细胞凋亡水平增加。结论 伯格替尼通过抑制 EGFR 磷酸化, 抑制 LOVO 细胞的非同源末端连接修复, 促进细胞凋亡, 最终增加了 LOVO 细胞的辐射敏感性。

关键词 结直肠癌 LOVO 细胞; 伯格替尼; EGFR; p-EGFR

中图分类号 Q 691.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)02-0212-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.02.010

结直肠癌是第三大最常见的癌症^[1], 在世界范围内, 每年有超过 180 万结直肠癌新增病例, 88 万例与结直肠癌有关的死亡报告^[2]。临床上, 手术切除被认为是结直肠癌的主要治疗手段, 放疗被认为是手术前后有效的治疗方式^[3]。因此, 迫切需要适当的策略来提高结直肠癌的辐射敏感性。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)与肿瘤细胞的增殖、血管生成、肿瘤侵袭、转移及细胞凋亡的抑制有关, EGFR 磷酸化激活下游通路, 促进肿瘤细胞存活, 辐射之后磷酸化表皮生长因子受体(p-EGFR)表达显著升高, p-EGFR 通过促进 DNA 损伤修复, 从而促进细胞存活^[4-7]。抑制 EGFR 磷酸化可能是提高肿瘤细胞辐射敏感性的有效手段。该文以辐射作为处理肿瘤细胞的治疗手段, 伯格替尼作为 EGFR 磷酸化抑制剂, 以结直肠癌 LOVO 细胞作为研究对象, 旨在通过使用伯格替尼抑制 EGFR 磷酸化, 增强结直肠癌细胞辐射敏感性, 从而为结直肠癌治疗提供可能的治疗方案。

2021-08-22 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31870845)

作者单位: ¹ 中国科学院合肥物质科学研究院强磁场中心, 合肥 230031

² 中国科学技术大学, 研究生院科学岛分院, 合肥 230026

作者简介: 胡关朔, 男, 硕士研究生;

赵国平, 男, 研究员, 博士生导师, 责任作者, E-mail: gpz@ipp.ac.cn

and respectively according to δ WT \times η WT, δ WT \times η KO, δ KO \times η WT, δ KO \times η KO carries out 1 : 1 cages for four months, and the number of litters per litter and reproductive cycle were counted. The serum of LSS^{+/+} (WT) and LSS^{+/-} (KO) mice was taken for sex hormone testing. The apoptosis of spermatogenic cells in the testis was observed by TUNEL staining. Western blot was used to detect the expression of Tubulin, LSS and apoptosis-related protein (GPX4/Bax/Bcl-2) in testis tissue. **Results** The breeding results showed that there was a statistical difference in the number of litters per litter between δ WT \times η WT and δ KO \times η KO, and there was no difference in the other groups. There was no statistically difference in the four groups in the reproductive cycle. There was no statistically difference between the sex hormone test results of WT and KO mice. TUNEL staining results showed that there was an increase in spermatogenic cell apoptosis in the testis tissue of the knockout mice. In the results of Western blot, there was no difference in the expression of apoptosis-related proteins (GPX4/Bax/Bcl-2) in KO mice compared with WT mice. **Conclusion** Loss of LSS gene function can lead to increased apoptosis of mouse spermatogenic cells, which may affect the fertility of mice.

Key words lansterol synthase; knockout mice; apoptosis; sex hormones; reproduction

1 材料与方法

1.1 细胞培养与辐射处理 人结肠癌细胞系 LOVO 购自中国科学院细胞库,在 DMEM/F12 (美国 HyClone 公司)培养。所有细胞系均以 10% 胎牛血清(以色列 Biological 公司)和 1% 青霉素/链霉素(上海碧云天公司)在 37℃、5% CO₂ 的环境中培养。

以伽马射线辐射器(Biobeam GM X irradiator, 德国 Leipzig 公司)作为辐射源,使用高能伽马射线照射细胞,剂量率为 3.27 Gy/min,由计算机自动控制。设备每年由厂家进行维护和校准,保证辐射剂量的精度。

1.2 细胞活力测试 CCK-8 试剂盒测定细胞活力。在 96 孔板中接种细胞悬液,5 000 个/孔细胞,伯格替尼(1 000 nmol/L)处理细胞。药物治疗 48 h 后,每孔加入 10 μl CCK-8 溶液,在细胞培养箱孵育 4 h 后用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(optical density, OD)值。

1.3 化学品及试剂 EGFR、p-EGFR(美国 CST 公司),cleaved caspase-9、cleaved caspase-7、cleaved caspase-3、γ-H2AX、ACTIN(中国 proteintech 公司),CCK-8(合肥 biosharp 公司),伯格替尼(上海 MCE 公司),膜蛋白提取试剂盒(上海碧云天公司)。

1.4 免疫荧光 将细胞接种于玻片上,用 PBST 洗涤细胞 3 次(每次 10 min),再于室温下用 100% 甲醇固定 20 min。在室温下用 0.5% Triton X-100 渗透细胞 30 min,1% BSA 在 PBST(0.1%, Triton X-100)中在室温封闭 1 h,滴加相应兔来源的单克隆抗体(p-EGFR,1:1 000)于 4℃ 孵育过夜。PBST 洗涤 3 次,滴加相应的荧光二抗室温避光孵育 30 min。PBST 洗涤 3 次,细胞核用 DAPI 孵育 3 min。PBST 洗涤 3 次,玻片面朝下置于在玻片上,滴加含有抗荧光淬灭剂的封片剂封片,荧光显微镜检测荧光。

1.5 Western blot 实验 分别收集 EGFR 敲低、单独辐射处理、单独伯格替尼处理的 LOVO 细胞,以及辐射和伯格替尼联合处理的 LOVO 细胞。用预冷的 PBS 洗涤 2 次,往细胞中加入适量 RIPA 裂解液(含有罗氏蛋白酶抑制剂),冰上充分裂解,提取蛋白并进行定量。SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,转移到 5% 脱脂奶粉 TBST 封闭液于室温封闭 1 h。孵育相应来源的单克隆抗体[鼠抗 ACTIN(1:1 000),γ-H2AX(1:1 000),兔抗:EGFR(1:1 000),p-EGFR

(1:1 000),cleaved caspase-9(1:1 000),cleaved caspase-7(1:1 000)和 cleaved caspase-3(1:1 000)],4℃ 孵育过夜,TBST 洗涤 3 次,相应二抗室温孵育 1 h,荧光检测。

1.6 流式细胞分析 用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,将细胞重新悬浮在 1× 缓冲液中,细胞密度为 1×10⁵ 个/ml。将 10⁴ 个细胞转移到 5 ml 的培养管中。添加 5 μl FITC Annexin V 和 5 μl PI。轻轻涡旋细胞,并在室温避光孵育 15 min。在每管中添加 400 μl 缓冲液,1 h 内流式细胞仪分析。

1.7 DR-GFP 质粒 质粒由军事科学院王治东实验室赠送。细胞通过两种主要途径修复 DSBs:非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和同源重组(homologous recombination, HR)。NHEJ 和 HR 的发生往往与过早衰老和肿瘤发生有关,因此用定量的方法来测量每个 DSB 修复途径是很重要的。课题组利用已经开发的荧光报告结构 DR-GFP,测量 NHEJ 和 HR。该结构是基于一个工程 GFP 基因,包含一个罕见的切割 I-SceI 内切酶诱导 DSBs 的识别位点。起始结构为 GFP 阴性,因为 GFP 基因被额外的外显子或突变灭活。成功修复 I-SceI 诱导的 NHEJ 或 HR 断裂,恢复功能性 GFP 基因。通过流式细胞分析术细胞测量计算的 GFP 阳性细胞的数量,进而提供了 NHEJ 或 HR 效率的定量测量。

1.8 构建 EGFR 敲低的 LOVO 稳转细胞系 使用三质粒系统构建慢病毒颗粒(pLKO.1, psPAX2 和 pMD2.G),psPAX2 和 pMD2.G 是辅助包装质粒。目标序列为 5'-CCCGTCGCTATCAAGGAATTA-3',构建的稳转细胞系使用含嘌呤霉素(1.5%)的完全培养基培养。

1.9 统计学处理 使用 Image J 软件对 Western blot 结果进行灰度分析。运用 GraphPad Prism 6.0 进行统计分析,每组数据进行 3 次独立实验,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析,若组间差异有统计学意义,则进一步采用 LSD-*t* 检验进行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 辐射诱导 EGFR 磷酸化水平升高 通过 Western blot 方法检测 EGFR 和 p-EGFR 的表达水平。使用 4 Gy 的辐射剂量,在不同的时间点对 EGFR 和 p-EGFR 的表达水平进行检测,结果显示辐射处理细胞 24 h 后 p-EGFR 的含量到达最高值(图

1A), 差异有统计学意义 ($F = 26.335, P < 0.01$), 用不同剂量(0 ~ 8 Gy) 辐射处理 LOVO 细胞, 24 h 后对 LOVO 细胞的 EGFR 和 p-EGFR 的表达水平进行检测。随着辐射剂量的升高, EGFR 的磷酸化水平升高(图 1B), 差异有统计学意义 ($F = 32.115, P < 0.01$)。

2.2 辐射诱导细胞膜上 EGFR 磷酸化水平升高

不同剂量(0 ~ 8Gy) 辐射处理 LOVO 细胞, 24 h 后提取 LOVO 细胞的膜蛋白并对 EGFR 磷酸化水平进行检测, Western blot 结果显示, 随着辐射剂量的增加, 细胞膜上 EGFR 的磷酸化水平增高(图 2A), 差异有统计学意义 ($F = 43.332, P < 0.01$)。通过免疫荧光检测磷酸化 EGFR 的定位, 4 Gy 辐射处理, 24 h 后

对 LOVO 细胞进行荧光检测, 结果与 Western blot 结果一致, 辐射处理之后细胞膜上 EGFR 磷酸化水平增高(图 2B)。综上所述, EGFR 是通过自身磷酸化响应辐射。

2.3 伯格替尼呈剂量依赖性抑制 EGFR 磷酸化水平

采用不同浓度的伯格替尼(0、10、100、500、1 000、3 000 nmol/L) 处理细胞 48 h 后检测细胞活力, 结果显示随着伯格替尼浓度的升高, LOVO 细胞活力被抑制(图 3A), 差异有统计学意义 ($F = 112.365, P < 0.01$)。Western blot 分析结果显示, EGFR 的磷酸化水平随着药物浓度的增加而降低(图 3B), 差异有统计学意义 ($F = 132.336, P < 0.01$)。

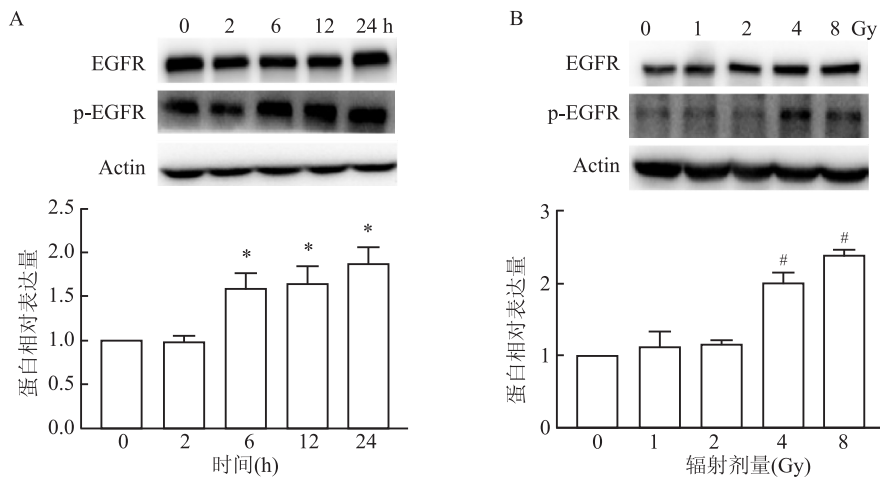


图1 辐照诱导 EGFR 磷酸化水平升高

A: EGFR 和 p-EGFR 在 4 Gy 处理 LOVO 细胞后不同时间点的蛋白表达水平; B: EGFR 和 p-EGFR 在不同辐照剂量处理 LOVO 细胞 24 h 后的蛋白表达水平; 与 0 h 比较: * $P < 0.05$; 与 0 Gy 比较: # $P < 0.05$

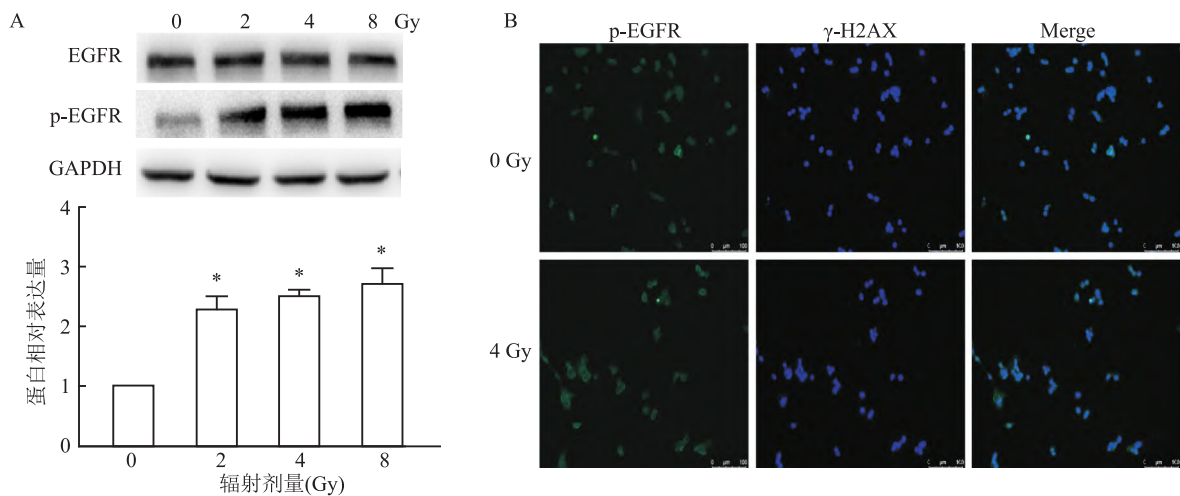


图2 辐照诱导细胞膜上 EGFR 磷酸化水平升高

A: 不同辐照剂量处理 LOVO 细胞 24 小时后提取膜蛋白 Western blot 检测 EGFR 和 p-EGFR 表达水平; B: 4 Gy 处理 LOVO 细胞 24 h 后免疫荧光检测 p-EGFR 表达量 $\times 20$; 与对照组比较: * $P < 0.05$

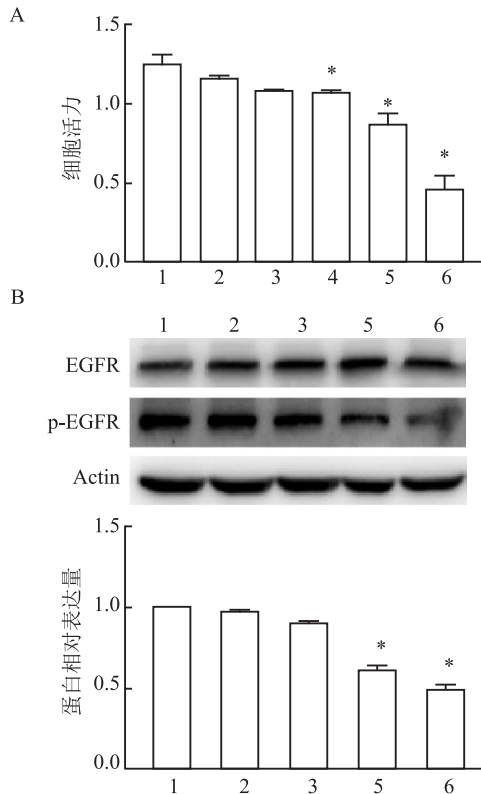


图3 伯格替尼呈剂量依赖性抑制 EGFR 磷酸化水平

A:不同浓度伯格替尼处理 LOVO 细胞 48 h 后 CCK-8 检测细胞活力;;B:不同浓度伯格替尼处理 LOVO 细胞 48 h 后提取膜蛋白 Western blot 检测 EGFR 和 p-EGFR 表达水平;1~6:0、10、100、500、1 000、3 000 nmol/L 伯格替尼;与对照组比较: * $P < 0.05$

2.4 伯格替尼处理结直肠癌细胞 LOVO 可以抑制非同源末端连接 课题组构建了 EGFR 敲低的 LOVO 细胞系,Western blot 检测敲低效果,在 EGFR 敲低的细胞系中,EGFR 和 p-EGFR 的表达显著降低(图 4A),差异有统计学意义 ($F = 21.331, P < 0.01$)。EGFR 通过参与非同源末端连接促进 DNA 损伤修复,使用 DR-GFP 系统进行检验,该系统的原理如图所示(图 4B)I-SceI 切割 AD 区域产生非同源末端,如果细胞内存在非同源末端连接,则断裂区域可被修复,报告基因 GFP 表达,发出绿光。使用 DR-GFP 质粒系统检测细胞非同源末端连接水平,结果显示在敲低 EGFR 的 LOVO 细胞中非同源末端连接被抑制,伯格替尼处理之后,非同源末端连接被抑制(图 4C),差异有统计学意义 ($F = 36.851, P < 0.01$)。

2.5 伯格替尼处理可以增强结直肠癌 LOVO 细胞的辐射敏感性 浓度为 1 000 nmol/L 的伯格替尼处理细胞 24 h 之后进行 4 Gy 辐射处理,辐射之后 24 h 进行 Western blot 检测,结果显示 γ -H2AX、cleaved

caspace-3、cleaved caspase-7 和 cleaved caspase-9 表达升高(图 5A),差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。AnnexinV FITC/PI 双标记法检测结果显示细胞总凋亡率分别为 $(6.7 \pm 2.3)\%$ 、 $(29.1 \pm 3.1)\%$ 、 $(8.2 \pm 2.2)\%$ 、 $(33.3 \pm 2.5)\%$ (图 5B),差异有统计学意义 ($F = 21.674, P < 0.01$)。

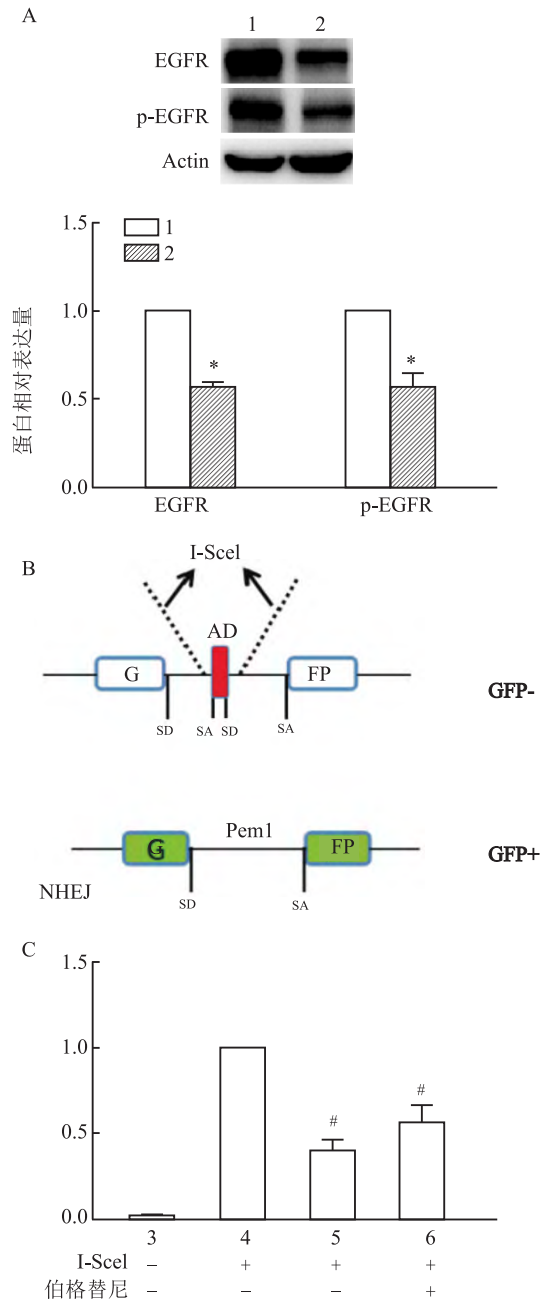


图4 伯格替尼处理结直肠癌细胞 LOVO 可以抑制非同源末端连接

A:Western blot 检测 EGFR 和 p-EGFR 表达水平;B: DR-GFP 质粒系统示意图;C:DR-GFP 质粒系统检测细胞非同源末端连接水平;1:对照组;2:EGFR 敲低组;3:阴性对照组;4:阳性对照组;5:EGFR 敲低组;6:伯格替尼(1 000 nmol/L)处理细胞组;与对照组比较: * $P < 0.05$;与阳性对照组比较:# $P < 0.05$

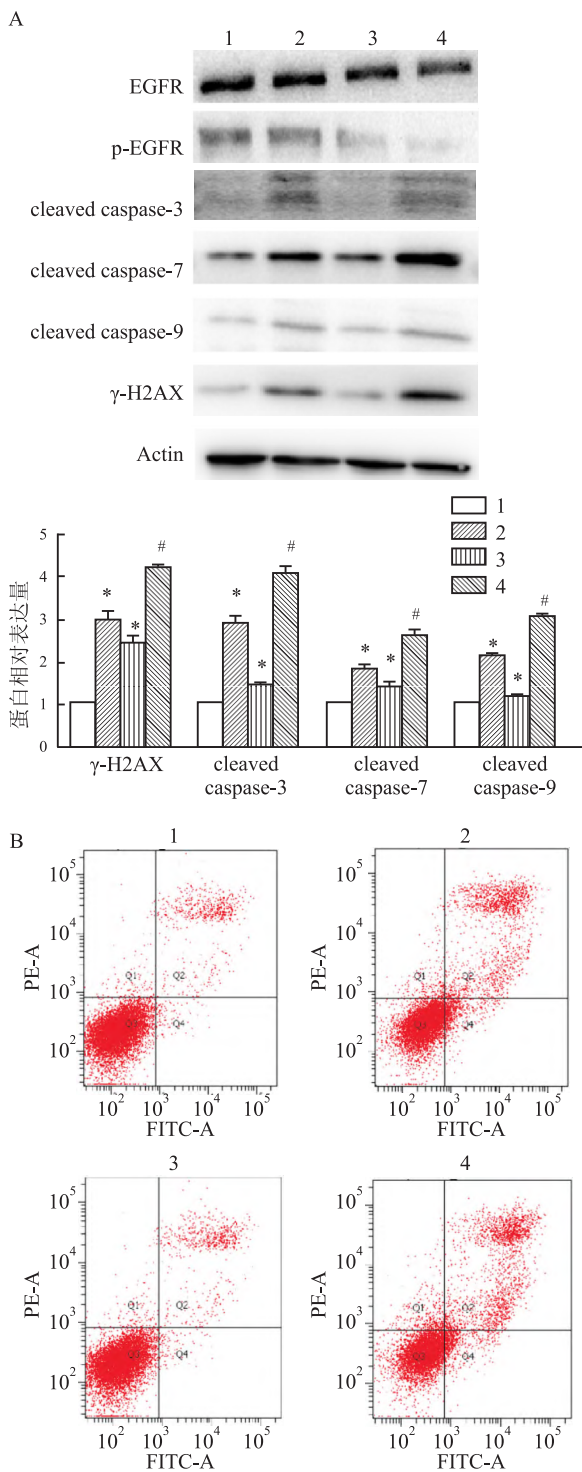


图5 伯格替尼处理可以增强结直肠癌 LOVO 的辐射敏感性

A: Western blot 检测伯格替尼与辐射联合使用后结直肠癌细胞 LOVO 中不同蛋白表达水平; B: AnnexinV FITC/PI 双标记法检测替尼与辐射联合使用后结直肠癌细胞 LOVO 的凋亡情况; 1: 对照组; 2: 辐射处理组; 3: 伯格替尼处理组; 4: 联合处理组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与辐射处理组比较: # $P < 0.01$

3 讨论

结直肠癌是威胁人类健康的一种重大疾病,放

疗是治疗结直肠癌的一种有效手段,但细胞内损伤修复机制的激活会使结直肠癌细胞对放疗产生抵抗^[8]。EGFR 信号通路的激活是产生辐射抵抗的关键因素,EGFR 对调节细胞生长、增殖和分化起着重要作用,并且与肿瘤细胞的增殖、血管生成、肿瘤侵袭、转移及细胞凋亡的抑制有关^[9]。因此探究 EGFR 信号通路在损伤修复中的作用对结直肠癌的放疗至关重要。

EGFR 活化后可以激活 ERK 和 AKT 通路促进细胞存活,并且以磷酸化形式转位入核参与 DNA 损伤修复,通过促进 DNA 损伤修复减少细胞凋亡^[10],这可能是癌细胞产生辐射抗性的主要原因。本研究显示,辐射之后结直肠癌细胞中 EGFR 的磷酸化水平升高,本实验使用 DR-GFP 质粒验证 EGFR 主要通过参与非同源末端连接修复导致辐射抵抗,与之前的报道^[11]一致。因此抑制 EGFR 的磷酸化可能是提高结直肠癌细胞辐射敏感性的有效手段。

伯格替尼是一种酪氨酸激酶抑制剂(TKI),于 2016 年 5 月被食品和药物管理局(FDA)批准上市,可以有效抑制 AKT 阳性,三突变的 EGFR 癌细胞,并在非小细胞肺癌中得到证实^[12]。本实验在结直肠癌细胞验证了伯格替尼对 EGFR 磷酸化的抑制作用,伯格替尼呈剂量依赖性的抑制 EGFR 磷酸化。使用伯格替尼处理细胞后,结直肠癌细胞非同源末端重组修复途径被显著抑制。

细胞凋亡是辐射诱导细胞死亡的主要方式^[13],cleaved caspase-9 通过激活下游效应蛋白 caspase-3 和 caspase-7 产生 cleaved caspase-3, cleaved caspase-7 进而促进细胞凋亡^[14]。本研究显示伯格替尼联合辐射处理从而触发细胞凋亡通路,最终诱导线粒体依赖的内在凋亡,线粒体依赖的内源性凋亡相关蛋白 cleaved caspase-3, cleaved caspase-7, and cleaved caspase-9 表达显著升高,从而增强结直肠癌细胞的放射增敏作用。

综上所述,伯格替尼通过抑制 EGFR 的磷酸化导致细胞的非同源末端链接修复被抑制,加剧辐射引起的 DNA 损伤,导致细胞凋亡增加。本实验首次将伯格替尼与癌症放射治疗相结合,这些数据可能为临床上结直肠癌治疗提供支持。

参考文献

[1] Roberts B S, Hardigan A A, Moore D E, et al. Discovery and validation of circulating biomarkers of colorectal adenoma by high-depth small RNA sequencing[J]. Clin Cancer Res, 2018, 24

- (9): 2092–9.
- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394–424.
- [3] Mishra J, Drummond J, Quazi S H, et al. Prospective of colon cancer treatments and scope for combinatorial approach to enhanced cancer cell apoptosis[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2013, 86(3): 232–50.
- [4] Alsahafi E N, Thavaraj S, Sarvestani N, et al. EGFR overexpression increases radiotherapy response in HPV-positive head and neck cancer through inhibition of DNA damage repair and HPV E6 downregulation[J]. *Cancer Lett*, 2021, 498: 80–97.
- [5] 邢孔芸, 陈玉蓉, 李庆, 等. YAP 基因对 HPV 感染宫颈癌细胞 TGF- α 及 EGFR 表达的调节作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(11): 1735–40.
- [6] Baptistella A R, Landemberger M C, Dias M V S, et al. Rab5C enhances resistance to ionizing radiation in rectal cancer[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2019, 97(6): 855–69.
- [7] Pal S, Kozono D, Yang X, et al. Dual HDAC and PI3K inhibition abrogates NF κ B- and FOXM1-Mediated DNA damage response to radiosensitize pediatric high-grade gliomas [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(14): 4007–21.
- [8] Alsahafi E N, Thavaraj S, Sarvestani N, et al. EGFR overexpression increases radiotherapy response in HPV-positive head and neck cancer through inhibition of DNA damage repair and HPV E6 downregulation[J]. *Cancer Lett*, 2021, 498: 80–97.
- [9] Liu Z, Fu Q, Wang Y, et al. Synergy between vinorelbine and afatinib in the inhibition of non-small cell lung cancer progression by EGFR and p53 signaling pathways[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 134:111144.
- [10] de Silva H C, Lin M Z, Phillips L, et al. IGFBP-3 interacts with NONO and SFPQ in PARP-dependent DNA damage repair in triple-negative breast cancer[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(10): 2015–30.
- [11] Uchibori K, Inase N, Araki M, et al. Brigatinib combined with anti-EGFR antibody overcomes osimertinib resistance in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14768.
- [12] Galluzzi L, Vitale I, Aaronson S A, et al. Molecular mechanisms of cell death; recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(3): 486–541.
- [13] Gao Y, Wen P, Chen B, et al. Downregulation of CDC20 increases radiosensitivity through Mcl-1/p-Chk1-Mediated DNA damage and apoptosis in tumor cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): 6692.
- [14] Chen B, Wen P, Hu G, et al. Antagonizing CDK8 sensitizes colorectal cancer to radiation through potentiating the transcription of e2f1 target gene apaf1[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8:408.

Brigatinib enhanced radiation sensitivity of colorectal cancer cells by inhibiting EGFR phosphorylation

Hu Guanshuo^{1,2}, Zhao Guoping¹

(¹Key Laboratory of High Magnetic Field and Ion Beam Physical Biology,

Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031;

²Science Island Branch of Graduate School, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

Abstract Objective To investigate the effect of Brigatinib on radiation sensitivity of colorectal cancer LOVO cells by treating colorectal cancer LOVO cells with a combination of radiation and brigatinib. **Methods** Western blot and immunofluorescence detection were used to detect the amount of epidermal growth factor receptor(EGFR), p-EGFR expression in colorectal cancer cells after treatment with different irradiation doses. The expression levels of EGFR, p-EGFR, γ -H2AX, cleaved caspase-3, cleaved caspase-7 and cleaved caspase-9 in LOVO cells were determined by Western blot, the levels of Non-homologous End Joining-NHEJ were detected by DR-GFP plasmid system, cell viability was detected by CCK-8 and apoptosis was detected by annexin FITC / PI double labeling. **Results** Radiation treatment significantly increased EGFR phosphorylation in LOVO cells, which was inhibited in a dose-dependent manner after treatment with Brigatinib. Non-homologous End Joining repair was inhibited following Brigatinib treatment, and a significant increase in apoptosis was observed in LOVO cells treated with combined Brigatinib and radiation. **Conclusion** Brigatinib inhibited non homologous end joining repair and promoted apoptosis in LOVO cells by inhibiting EGFR phosphorylation, which eventually increased the radiation sensitivity of LOVO cells.

Key words colorectal cancer cells LOVO; Brigatinib; EGFR; p-EGFR