



第四军医大学

The Fourth Military Medical University

分类号 R734.2

U D C 616.2

密 级 公开

博士学位论文

多环芳香烃受体介导的非小细胞肺癌
EGFR TKIs 耐药机制研究

叶明翔

培 养 类 别 全日制

学 位 类 型 学术学位

一级学科(专业类) 临床医学

二级学科(专业) 内科学(呼吸系病)

研 究 方 向 肺癌靶向治疗耐药分子机制

指 导 教 师 张艰 教授(主任医师)

培 养 单 位 西京医院呼吸内科

二〇一七年五月

独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所提交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：_____日期：_____

保护知识产权声明

本人完全了解第四军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为第四军医大学。本人保证毕业离校后，发表论文等使用本论文工作成果时第一署名单位仍然为第四军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：_____导师签名：_____日期：_____

目 录

缩略语表	1
中文摘要	3
ABSTRACT	7
前 言	11
文献回顾	13
正 文	53
第一部分 AhR 在 NSCLC 表达和意义	53
1 实验材料	53
2 实验方法	56
3 结果	66
4 讨论	76
第二部分 抑制 AhR 增敏 EGFR TKIs	79
1 实验材料	79
2 实验方法	81
3 结果	87
4 讨论	93
第三部分 活化 AhR 信号通路导致 EGFR TKIs 耐药	95
1 实验材料	95
2 实验方法	98
3 结果	109
4 讨论	127
第四部分 AhR 激活 SRC 信号通路的分子机制	131
1 实验材料	131
2 实验方法	134

3 结果	136
4 讨论	141
小 结	144
参考文献	145
个人简历和研究成果	155
致 谢	158

缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
AhR	aryl hydrocarbon receptor	多环芳香烃受体
Akt	protein kinase B	蛋白激酶 B
ALK	anaplastic lymphoma kinase	间变性淋巴瘤激酶
ALCL	anaplastic large cell lymphoma	间变性大细胞淋巴瘤
BIM	Bcl-2 interacting mediator of cell death	BIM 蛋白
cfDNA	cell-free DNA	游离 DNA
CNG	copy number gain	基因拷贝数增加
CTCs	circulating tumor cells	循环肿瘤细胞
ctDNA	circulating tumor DNA	循环肿瘤 DNA
ddPCR	droplet digital PCR	数字 PCR
DDR2	discoidin domain receptor 2	盘状结构域受体 2
EGF	epidermal growth factor	表皮生长因子
EGFR	epidermal growth factor receptor	表皮生长因子受体
EGFR KDD	EGFR kinase domain duplication	EGFR 激酶结构域复制
EML4	echinoderm microtubule-associated protein-like 4	棘皮动物微管相关类蛋白 4
EMT	epithelial-mesenchymal transition	上皮间质转化
Erk	extracellular regulated protein kinase	细胞外调节蛋白激酶
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1	成纤维细胞生长因子受体 1

FISH	fluorescence in situ hybridization	荧光原位杂交
HGF	hepatocyte growth factor	肝细胞生长因子
IMT	inflammatory myofibroblastic tumor	炎性肌纤维母细胞瘤
Jak2	Janus kinase 2	Jak2 激酶
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase	分裂素原活化蛋白激酶
NGS	next generation sequencing	二代测序
NSCLC	non-small cell lung cancer	非小细胞肺癌
ORR	objective response rate	客观缓解率
OS	overall survival	总生存期
PFS	progression-free survival	疾病无进展期
PI3K	phosphoinositide 3-kinase	磷脂酰肌醇 3-激酶
PTEN	phosphatase and tensin homolog	磷酸酶与张力蛋白同源基因
RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma	RAF 蛋白
Stat	signal transducers and activators of transcription	信号传导及转录激活因子
TCGA	The Cancer Genome Atlas	癌症基因组图谱
TKIs	tyrosine kinase inhibitors	酪氨酸激酶抑制剂

多环芳香烃受体介导的非小细胞肺癌 EGFR TKIs 耐药 机制研究

博士研究生：叶明翔

导 师：张 艰 教授

辅 导 教 师：张 健 副教授

第四军医大学西京医院呼吸内科，西安 710032

资助基金项目：国家自然科学基金（81472192，81272517）

中文摘要

肺癌是世界上致死率最高的恶性肿瘤，非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer, NSCLC）占全部肺癌病例 85%以上，是最常见的肺癌类型，研究 NSCLC 发生发展的机理一直是本领域的重点和难点。随着分子生物学研究手段的进步，人们已经意识到 NSCLC 不再是一种疾病，而是一类由特定基因驱动的异质性疾病，过去一尘不变的治疗模式已经不能适应个体化治疗的需求，以表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor, EGFR）、间变性淋巴瘤激酶（anaplastic lymphoma kinase, ALK）和 ROS1 激酶为代表的靶向治疗引领 NSCLC 精准医疗时代的到来，吉非替尼、厄洛替尼和克唑替尼等一系列酪氨酸激酶抑制剂（tyrosine kinase inhibitors, TKIs）显著改善了 NSCLC 患者预后，极大的提高了患者生活质量，是过去十年肿瘤临床治疗和基础研究的重大突破。不幸的是几乎所有患者在接受 TKIs 治疗一段时间后耐药复发，严重影响了 TKIs 的长期疗效和临床应用，因此阐明 TKIs 耐药的分子机制、制定克服耐药的治疗策略、尽最大可能推迟耐药现象出现是临床医生和科学家共同面临的难题和挑战。TKIs 耐药原因尚未完全解析，以 EGFR TKIs 获得性耐药为例，仍有约 20% 患者耐药机制不清，这部分患者也没有切实有效的耐药后治疗方案。

多环芳香烃受体 (aryl hydrocarbon receptor, AhR) 是一个受配体活化的胞内受体, 在过去的近 40 年里人们一直认为 AhR 信号通路活化后转录激活下游代谢酶, 其全部功能由转录因子活性介导; 近些年研究发现 AhR 还有一些生物学功能不依赖其转录活性, 且 AhR 调控细胞增殖、分化、凋亡、周期转化等新功能与代谢酶表达无关。AhR 在多种实体瘤组织和细胞系中过度表达, 回顾性研究提示 AhR 表达水平与肿瘤恶性程度正相关。课题组前期研究发现 AhR 蛋白在 TKIs 耐药的患者标本中表达亦增加, 但其意义并不清楚。

本文揭示了 AhR 蛋白负向调控 NSCLC TKIs 敏感性的作用, 提出活化的 AhR 作为衔接蛋白 (adaptor protein) 招募 Src 和 Jak2 两种激酶, 形成的 Jak2-AhR-Src 复合物可以绕过 EGFR 旁路活化下游 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路导致 TKIs 耐药; 在高表达内源性 AhR 蛋白的耐药细胞用药物或 shRNA 抑制 AhR 可以逆转 TKIs 耐药性, 而在敏感细胞过表达 AhR 则导致 TKIs 耐药性; 此外, AhR 与 Src 和 Jak2 蛋白相互作用不依赖其转录因子活性, 活化的 AhR 瞬时转位到近膜侧, 携带胞浆内 Src 蛋白与 Jak2 结合, 促使 Jak2 磷酸化 Src, Jak2 TKIs 和 Src TKIs 可以阻断 AhR 蛋白介导的激酶旁路。本研究发现 AhR 蛋白招募激酶的新功能, 阐明了 TKIs 耐药患者 AhR 表达增加的意义及其导致耐药的分子机制, 为克服 EGFR TKIs 耐药提供新的思路。

方法:

- (1) TCGA 数据库和组织芯片分析 AhR 在 mRNA 和蛋白水平与 NSCLC 恶性程度、淋巴结侵犯和患者预后的相关性。
- (2) 构建野生型 AhR (AhR WT) 和组成型活化 AhR (AhR CA) 表达载体和 shRNA, 包装慢病毒感染细胞, MTT、平板克隆、Western blot、IHC、TUNEL 染色等实验研究上调和下调 AhR 对 EGFR TKIs 敏感性的影响。
- (3) 构建入核信号缺失的 AhR Δ NLS 突变体, shRNA 下调 ARNT、cyp1a1 和 cyp1b1 表达, 检测 AhR 转录活性对 EGFR TKIs 敏感性的影响。
- (4) 慢病毒感染细胞过表达 Src 或 shRNA 下调 Src, 使用 Src TKIs 抑制其激酶活性, MTT、Western blot、IHC 等实验研究 Src 在 AhR 信号通路活化导致 EGFR TKIs 耐药中的作用。

- (5) 蛋白激酶芯片筛选引起 Src 磷酸化的激酶, HEK293 细胞转染 Jak2、Src 和 AhR 质粒, IP 和 Western blot 实验研究 AhR 和 Jak2/Src 激酶的相互作用。

结果:

- (1) AhR 在 mRNA 水平与 NSCLC 级别和预后无明显相关性, 相反, AhR 在蛋白水平表达越高, 肿瘤侵袭性越强, 患者预后越差。Western blot 结果显示 TKIs 耐药细胞 AhR 蛋白表达亦增加。
- (2) AhR 抑制剂 α -NF 或 shRNA 下调 AhR, 细胞学水平表达增敏 EGFR TKIs, 阻断下游 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路, 在裸鼠体内明显抑制瘤体体积, 诱导细胞凋亡。
- (3) 慢病毒过表达 AhR WT 或配体活化 AhR 信号通路导致敏感细胞 EGFR TKIs 耐药, Western blot 显示细胞 Akt 和 Erk 磷酸化水平增加且不能被 EGFR TKIs 抑制, 然而过表达 AhR CA 则不能诱导耐药, 不增加 Akt 和 Erk 磷酸化水平。
- (4) 突变 AhR 入核信号 NLS, shRNA 下调 ARNT, cyp1a1 和 cyp1b1, 去除 AhR 转录因子活性并不影响 AhR 上述效应, 说明 AhR 引起耐药的作用与其靶基因转录无关。
- (5) 生物信息学预测和体内外功能学实验显示 Src 激酶活化是 AhR 导致耐药的关键事件, AhR 通过其 SH2 结合模体招募 Src 并促进 Y416 位点磷酸化, 旁路活化下游 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路。Src TKIs 或 Src shRNA 联合 EGFR TKIs 可以阻断持续性活化的 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路, 体外抑制细胞增殖, 体内减少 Ki67 阳性细胞比例, 克服 EGFR TKIs 耐药。
- (6) 蛋白激酶芯片结果强烈提示 Jak2 磷酸化下游激酶的作用, IP 实验显示活化 AhR 信号通路促进 AhR 蛋白瞬时转位到细胞近膜侧, 招募 Jak2 和 Src 两个激酶, 使下游 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 通路活化, Jak2 TKIs 和 Jak2 shRNA 抑制 Src 磷酸化, 克服 AhR 活化导致的 EGFR TKIs 耐药。

结论:

总结整个课题, 我们发现一个新的 EGFR TKIs 耐药机制: 活化的 AhR 促进 Src 磷酸化, 旁路激活下游 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路。AhR 本身不是激酶, 但可

以通过招募其它激酶提供旁路信号，导致敏感细胞 TKIs 耐受。值得注意的是 AhR 与 Jak2/Src 蛋白相互作用不依赖其经典的转录因子活性，AhR 作为 adaptor 介导 Jak2 和 Src 相互作用，形成的 Jak2-AhR-Src 复合物绕过 EGFR 磷酸化 Akt 和 Erk，故 Jak2、AhR 和 Src 均可作为克服 TKIs 耐药的治疗靶点。

关键词：非小细胞肺癌；靶向治疗耐药；多环芳香烃受体；Src；Jak2

Molecular mechanisms of resistance to EGFR TKIs driven by aryl hydrocarbon receptor in non-small cell lung cancer

Candidate for master: Ye Mingxiang

Supervisor: Zhang Jian

Tutor: Zhang Jian

Department of Pulmonary Medicine, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University,
Xi'an 710032, China

Sponsored Programs: National Natural Science Foundation (81472192, 81272517)

Abstract

Lung cancer is the leading cause of cancer-related mortality world wide. Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the most common type of lung cancer, which accounts for over 85% of all cases, and tremendous efforts has been made to understand the molecular mechanisms of NSCLC tumorigenesis and progression. In the light of rapidly development of cancer cell biology, we began to realize that NSCLC is no longer a single disease, instead, it is a group of heterogeneous malignancies driven by oncogenes, and the all-in-one way treatment strategy is no longer applicable. The identification of activating mutations in epidermal growth factor receptor (EGFR) and rearrangement in anaplastic lymphoma kinase (ALK) and ROS1 kinase has led a new era of precision medicine, in which gefitinib-, erlotinib- and crizotinib-based targeted therapy significantly improved the prognosis and quality of life in NSCLC patients with distinct clinicopathological features. Unfortunately, resistance to these tyrosine kinase inhibitors (TKIs) inevitably occurs within years after treatment and severely impaires the long-term clinical efficacy of targeted therapy. The underlying mechanism of resistance in 20% EGFR TKIs resistant

patients is not fully understood. Therefore, the elucidation of unknown resistance mechanism and the development of alternative strategies are urgently needed.

The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-activated intracellular receptor that transcriptionally activates downstream metabolic enzymes expression. For the past four decades, the transcriptional activity of AhR is believed to mediate all the biological effects of AhR signaling, while recent studies revealed that AhR signaling in cell proliferation, differentiation, apoptosis and cell cycle control did not require its transcriptional activity. AhR is ubiquitously overexpressed in various solid tumors and cancer cell lines. Retrospective analysis showed that AhR expression level is associated with disease stage and progression. Our preliminary study also indicates AhR expression is increased in TKIs resistant tumors, but its association and significance with TKIs sensitivity is not clear.

In the present study, we showed that AhR protein negatively regulates sensitivity to TKIs in NSCLC. AhR acts as an adaptor protein to recruit Src and Jak2 kinases that resembles Jak2-AhR-Src complex to bypass EGFR and activates downstream PI3K/Akt and MEK/Erk signaling, leading to resistance to EGFR TKIs. Inhibition of AhR by pharmacological and molecular approaches overcomes TKIs resistance in NSCLC cells expressing high endogenous level of AhR, whereas activation of AhR signaling in sensitive cells promotes TKIs resistance. The cross-talk between AhR and Src, AhR and Jak2, does not depend on its transcriptional activity, in which the liganded AhR protein transiently translocate to the cell membrane and provides docking sites for Jak2 and Src. Simultaneous inhibition of Jak2 or Src kinases abolishes the bypass track and overcomes resistance to EGFR TKIs. Our study highlighted a transcriptional-independent function of AhR protein and underlies a novel TKIs resistant mechanism, potentially pointing out a new strategy to overcome resistance to targeted therapy.

Methods

- (1) The prognostic correlation of AhR expression at mRNA and protein levels were analyzed in TCGA database and tissue array.

- (2) Expression vectors for AhR WT, AhR CA and AhR shRNA were generated. Cells stably overexpressing AhR or AhR shRNA were tested for TKIs sensitivity by MTT, colonies formation, Western blot, IHC and TUNEL assays.
- (3) To determine effect of transcriptional activity of AhR on TKIs sensitivity, AhR mutant lacking nuclear localization sequence (NLS) were generated. shRNAs were also used to inhibit ARNT, cyp1a1 and cyp1b1 expression.
- (4) Src was stably overexpressed or down-regulated by lentivirus. The effect of Src on TKIs sensitivity was assessed by MTT, Western blot and IHC, respectively.
- (5) Phospho-protein kinase array was used to determine the kinase upstream of Src. Expression vectors for Jak2, Src and AhR were expressed in HEK293 cells, and their interactions were assessed by IP and Western blot.

Result

- (1) AhR at mRNA level did not correlated with NSCLC grade and patient survival. In contrast, high expression of AhR at protein level indicated unfavorable prognosis. Western blot analysis also indicated increased AhR protein expression in TKIs resistant cell lines.
- (2) Inhibition of AhR by AhR inhibitor α -NF or AhR shRNA sensitized resistant cells to TKIs. Simultaneous inhibition of EGFR and AhR signaling abolished PI3K/Akt and MEK/Erk signaling and induced tumor shrinkage and apoptosis *in vivo*.
- (3) Activation of AhR signaling by AhR WT overexpression or AhR ligands in sensitive cells led to a TKIs resistant phenotype, in which Akt and Erk were constitutively phosphorylated despite EGFR TKIs treatment. In contrast, overexpression of AhR CA mutant failed to recapitulate a similar effect.
- (4) Mutation in AhR NLS or shRNA-mediated down-regulation of ARNT, cyp1a1 and cyp1b1 did not affect TKIs sensitivity.
- (5) Bioinformatic analysis and functional experiments indicated increased Src phosphorylation was crucial for AhR-induced TKIs resistance. AhR recruited Src through its SH2 binding motif and promoted Src Y416 phosphorylation and restored

downstream PI3K/Akt and MEK/Erk pathways. Simultaneous inhibition of Src and EGFR abrogated Akt and Erk phosphorylation, inhibited cell proliferation and Ki67-positive cell proportion, and overcame resistance to EGFR TKIs.

- (6) Phospho-protein kinase array strongly indicated Jak2 as an immediate upstream kinase of Src. IP experiment suggested that AhR transiently translocated into the cell membrane and provided docking sites for Jak2 and Src interaction. Inhibition of Jak2 activity by Jak2 TKIs or Jak2 shRNA also restored EGFR TKIs sensitivity.

Conclusion

Collectively, we identified a novel EGFR TKIs resistant mechanism, in which activated AhR increases Src phosphorylation and restores downstream PI3K/Akt and MEK/Erk signaling. Although AhR is not a protein kinase, AhR may act as an adaptor to recruit other kinases to lead to TKIs resistance. Of noted, this effect did not depend on its transcriptional activity and AhR serves as a bridge linking Src to Jak2 kinase. The Jak2-AhR-Src complex bypass EGFR to phosphorylate Akt and Erk in resistant cells. Therefore, Jak2, AhR and Src are promising therapeutic targets for overcoming TKIs resistance.

Keywords: non-small cell lung cancer; targeted therapy resistance; aryl hydrocarbon receptor; Src; Jak2

前 言

虽然 *K-RAS* 突变早在 1984 年就已发现，但一直没有特异性针对肿瘤细胞突变型 *K-RAS* 抑制剂问世，NSCLC 诊断和治疗在很长一段时间内还是依据组织病理学分型，直到 2004 年发现表皮生长因子（epidermal growth factor receptor, EGFR）突变预示酪氨酸激酶抑制剂（tyrosine kinase inhibitors, TKIs）吉非替尼和厄洛替尼的高度敏感性，NSCLC 诊断和治疗进入了一个突飞猛进的时代，2007 年又在 NSCLC 中发现间变性淋巴瘤激酶（anaplastic lymphoma kinase, ALK）和 ROS1 基因重排，携带这两种重排基因的患者对克唑替尼反应性较好。突变的 EGFR、ALK 和 ROS1 主导了 NSCLC 细胞最关键的生命活动，科学家将其定义为肿瘤驱动基因（oncogenic driver genes），与化疗不同的是 TKIs 可以选择性杀伤驱动基因突变的肿瘤细胞，对驱动基因未突变的肿瘤细胞和正常细胞不具有明显毒性，是 NSCLC 靶向治疗（targeted therapy）的典范。大量前瞻性、多中心、随机对照临床试验证实对于驱动基因突变的 NSCLC 患者，TKIs 靶向治疗的总体有效率和疾病控制率优于标准化疗方案，且患者生活质量明显提高，极大地改善了 NSCLC 患者预后。EGFR 在亚裔、女性、不吸烟的肺腺癌患者突变频率高达 50%，我国又是一个肺癌大国，NSCLC 患者数量位居全球第一，因此检测驱动基因的突变状态指导临床用药将使我国 NSCLC 患者极大获益。

遗憾的是驱动基因突变患者接受靶向治疗一段时间后对药物耐受，疾病再次进展。自从 2005 年发现 T790M 耐药突变以来，TKIs 耐药机制研究从未间断，以 EGFR TKIs 耐药为例，目前比较明确的机制包括 T790M 耐药突变，c-Met 基因扩增，肿瘤病理类型转化，HER2 基因扩增等，但仍有约 20% 患者 TKIs 耐药机制不清，这类耐药后患者究竟采取何种治疗方案尚未达成共识。此外 ALK TKIs 耐药和 ROS1 TKIs 耐药的原因亦不完全清楚，学术界针对耐药细胞来源的“二次突变”学说和“压力筛选”学说的争论从未停止，故 TKIs 耐药分子机制仍然是研究热点和难点。

本课题研究的多环芳香烃受体（aryl hydrocarbon receptor, AhR）是肿瘤耐药领域关注较少的分子。最初的研究表明 AhR 作为经典的配体活化转录因子参与了多种毒

性物质和药物代谢,然而我们的研究发现 AhR 在调控 NSCLC 细胞 TKIs 敏感性方面发挥重要作用,异常活化的 AhR 信号导致 TKIs 耐药,而药物或 shRNA 抑制 AhR 可以逆转细胞耐药性;我们还发现 AhR 导致耐药的作用并不是通过其经典的转录效应,取而代之的是 AhR 作为 adaptor 招募胞内激酶旁路活化 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路。本课题将重点研究 AhR 调控 EGFR TKIs 敏感性的作用和分子机制,特别是 AhR 如何不通过转录因子活性引起旁路激酶磷酸化。本课题提出的 AhR 介导 EGFR TKIs 耐药新机制,可能为针对 AhR 克服靶向治疗耐药难题提供理论基础。

文献回顾

1 肺癌概述

肺癌 (lung cancer) 是起源于支气管肺泡和粘膜上皮的恶性肿瘤，其发病原因迄今不明，研究表明吸烟、空气污染、电离辐射、职业性致癌因子暴露、原癌基因激活和抑癌基因失活等危险因素可以引起细胞癌变，导致肺癌发生。世界卫生组织 (WHO) 公布的数据显示全球每年约新增肺癌患者 180 万，占全部新增癌症患者总数 13%。肿瘤学权威期刊 CA-Cancer J Clin 报道肺癌发病率在美国癌症病人中排名第二 (美国男性癌症发病率第一位为前列腺癌，女性为乳腺癌)，而肺癌死亡率不论男性女性均排名第一，在美国每年造成超过 15 万人死亡 (图 1A)^[1]。我国国家癌症中心赫捷院士牵头去年在 CA-Cancer J Clin 上发布了中国癌症统计数据，文中指出 2015 年中国肺癌发病 73.33 万例，其中男性 50.93 万例、女性 22.4 万例；同年死亡 61.02 万例，其中男性 43.24 万例、女性 17.78 万例，由此可见肺癌是我国最常见的癌症，也是癌症死亡的首要原因 (图 1B)^[2]。因此，肺癌的预防、诊断和治疗不仅是一个棘手的世界难题，更是我国面临的重大挑战，中国科学家和医学家有责任和义务深入研究肺癌发生发展的机理，制定适合国人的肺癌治疗方案，努力解决肺癌这一严重威胁公共健康的巨大难题。

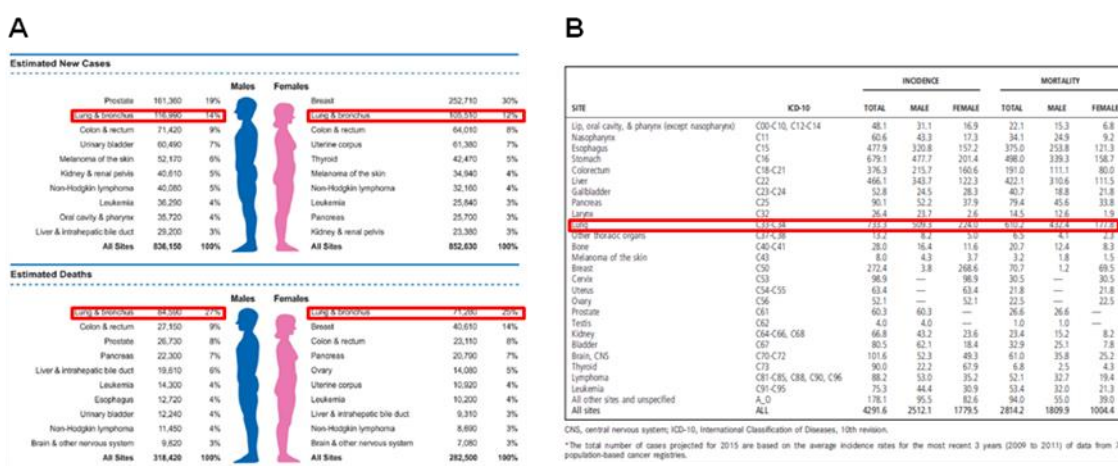


图 1. 美国 (A) 和我国 (B) 癌症发病率和死亡率统计数据^[1,2]

依据病理学特征，国际肺癌研究协会 (IASLC) 与 WHO 通常将肺癌分为小细胞

肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 和非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 两大类, 后者可以进一步分为腺癌 (adenocarcinoma)、鳞癌 (squamous cell carcinoma)、腺鳞癌 (adenosquamous carcinoma) 和大细胞癌 (large cell carcinoma) 等。SCLC 是一种具有神经内分泌特性的恶性肿瘤, 临床上肿瘤倍增时间短、侵袭性强、易发生广泛转移, 尽管初治患者对依托泊甙联合顺铂化疗 (EP 方案) 有效率高达 60% – 80%, 但化疗结束后 SCLC 很快复发, 患者 5 年生存率不到 6%^[31]。相比 SCLC, NSCLC 更加常见, 临床上 85% 肺癌病例为 NSCLC。在相当长一段时间内, NSCLC 被认为是“一种”疾病, 即所有的 NSCLC 患者都采取相同的或者相似的治疗方案, 包括手术切除 (仅限于 IIIA 期以前)、化疗和放疗。然而肺癌起病隐匿, 早期症状极不典型, 大多患者就诊时已经失去手术机会, 不得不采取非手术治疗 (化疗和放疗)。细胞毒类化疗药物曾经是晚期 NSCLC 首选, 除了骨髓抑制和胃肠道不适等不良反应, 化疗药物总体有效率不到 30%, 患者中位生存期仅 8 – 10 月。与上世纪七十年代相比, NSCLC 患者 5 年生存率仅由 13% 提高到 15%^[41], 这种微小的 5 年生存率变化显然与过去几十年来在 NSCLC 药物研发中投入的时间、金钱和精力严重不相符, 从哲学辩证观点来看, 这种投入和产出相悖的矛盾现象可能是由于我们对 NSCLC 本质认识不足, 研发的药物未能击中 NSCLC 发生发展最关键的环节, 因此我们需要重新认识 NSCLC, 有目的性的研究调控 NSCLC 生物学特性的核心信号和分子, 最终设计出类似“打靶”性质的药物用于 NSCLC 治疗。

2 NSCLC 驱动基因与精准医学

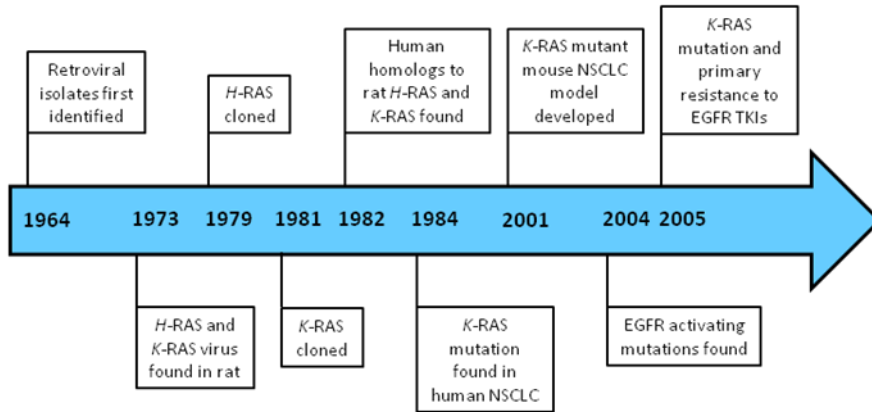
众所周知机体各项生命活动受到基因的严密调控, 这些基因表达或功能异常可以引起各种疾病。肿瘤细胞基因表达调控更加复杂, 例如仅针对细胞增殖这一项至少存在 PI3K/Akt、RAS/RAF/MEK/Erk、Jak2/Stat 三条信号通路, 理论上说必须同时阻断这三条信号才能有效的抑制肿瘤细胞增殖; 然而这些信号又参与了正常细胞的增殖过程, 药物抑制肿瘤细胞 PI3K/Akt、RAS/RAF/MEK/Erk、Jak2/Stat 信号的同时必然也抑制了正常细胞的生长, 导致各种毒副作用。为了更安全高效的杀伤肿瘤细胞, 我们需要区分 PI3K/Akt、RAS/RAF/MEK/Erk、Jak2/Stat 信号通路来源, 即选择性抑制“肿瘤细胞特异性” PI3K/Akt、RAS/RAF/MEK/Erk、Jak2/Stat 信号而不抑制正常细胞的信号, 故找出引起 PI3K/Akt、RAS/RAF/MEK/Erk、Jak2/Stat 信号在肿瘤

细胞中异常活化的关键基因显得尤其重要。

虽然细胞癌变需要经历非常复杂的过程与步骤，但研究发现癌变环节中有特定基因发挥主导作用，例如抑癌基因 *Rb* 突变后可引起视网膜母细胞瘤，*APC* 基因突变可以在 85% 的结肠癌患者中检出，超过 95% 慢性粒细胞白血病患者携带 *BCR-ABL* 融合基因；科学家将这类与细胞癌变和肿瘤生物学行为密切相关的基因定义为肿瘤驱动基因（*oncogenic driver gene*），国内学者生动的把肿瘤驱动基因比喻为“驾驶员”：体内细胞往好的方向走还是往坏的方向走，由驾驶员决定。健康人细胞的驾驶员都是好的，因此不发生癌变；假如这个驾驶员突变了，或因其他原因变成坏的驾驶员，正常细胞就变成了癌细胞，所以要让这个癌细胞终结，就要对准这个变坏的驾驶员并把它消灭掉，也就是我们说的靶向治疗（*targeted therapy*）。

2.1 *K-RAS*

K-RAS 是 *RAS* 家族（还包括 *H-RAS* 和 *N-RAS*）重要成员，半个世纪之前科学家发现了一种可以引起大鼠肉瘤的逆转录病毒并命名为 *RAS*，随后人源 *RAS* 基因被克隆^[5]。原癌基因 *K-RAS* 定位于 12p1.1，全长约 35 kb，编码相对分子量 21 kDa 的 *K-RAS* 蛋白。正常情况下 *K-RAS* 蛋白定位于细胞膜内侧与 GDP 结合失活，当细胞增殖信号被激活时，*K-RAS* 蛋白与 GTP 结合活化，从而促进细胞增殖与分化；同时 *K-RAS* 蛋白具有 GTPase 活性可以分解 GTP 为 GDP，*K-RAS* 蛋白再次与 GDP 结合，信号通路终止。故野生型 *K-RAS* 通过调控 GTP 和 GDP 平衡有序的开放或关闭 *K-RAS* 信号通路，维持机体正常的生长发育^[6]。1984 年 Mariano Barbacid 实验室发表了一篇具有重要意义的研究论文，作者从一例 66 岁的男性肺鳞癌患者的肿瘤组织中检测到 *K-RAS* G12R 突变，该突变在同一患者的正常肺组织中未检出并且可以引起小鼠 NIH 3T3 细胞癌变^[7]。2001 年 Tyler Jacks 实验室报道了在肺部条件性表达 *K-RAS* G12D 突变的小鼠自发形成 NSCLC，病理类型以腺癌为主^[8]，因此突变的 *K-RAS* 是 NSCLC 中第一个被鉴定出来的驱动基因（图 2）。

图 2. *K-RAS* 研究历程示意图

K-RAS 突变位点多位于第 12 号、13 号和 61 号密码子, 以 *K-RAS* G12D 和 G12V 点突变最常见。突变导致原癌基因激活成癌基因, 编码蛋白构象改变, *K-RAS* 蛋白与 GDP 结合能力减弱, 信号失活的自我调控机制被阻断, 下游 RAS/RAF/MEK/Erk 和 RAS/PI3K/Akt 通路持续活化, 细胞增殖与分化失控^[9]。在高加索人种 (Caucasians) 中约 25% NSCLC 患者携带 *K-RAS* 突变, 这些 NSCLC 患者以男性、具有吸烟史和低分化腺癌为主 (少见于鳞癌, 至今未在 SCLC 发现), 但与患者年龄和 NSCLC 分级无明显相关性^[10]。亚裔人种 (East Asians) *K-RAS* 突变率低于高加索人种, 国内和日本报道的数据为 5% – 10%^[11-13]。*K-RAS* 突变提示 NSCLC 预后不良, 临床医生很早以前就注意到带有 *K-RAS* 突变的 NSCLC 患者术后的生存时间短于 *K-RAS* 野生型 NSCLC 患者^[14, 15]; 在一项研究 *K-RAS* 对 NSCLC 患者化疗疗效影响的 II/III 期临床试验中, *K-RAS* 野生型 NSCLC 化疗后中位生存时间为 42 月, 而 *K-RAS* 突变的 NSCLC 中位生存时间仅 25 月 ($HR=0.59, P=0.09$)^[16]; 此外, *K-RAS* 突变还预示 EGFR 靶向治疗原发性耐药 (详见“NSCLC 靶向治疗耐药的分子机制”章节)。

由于 *K-RAS* 突变后与 GDP 结合的功能削弱, 这种 loss-of-function 带来的突变很难被药物抑制。目前供实验室研究用的 RAS 抑制剂有三类: (1) RAS 蛋白合成抑制剂 (siRNA 或 miRNA, 难以用于临床); (2) 法尼基转移酶抑制剂 (抑制 RAS 蛋白细胞膜定位); (3) RAS 下游信号抑制剂 (RAF、MEK、Erk、PI3K 抑制剂等)。这些抑制剂毒副作用较大, 一部分正处于临床试验阶段 (详见“基于驱动基因的肿瘤靶向治疗”章节), 故临床上尚无可用的 *K-RAS* 抑制剂。

2.2 EGFR

2.2.1 EGFR 突变

表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 是一种广泛表达于上皮细胞膜表面的酪氨酸激酶受体, 该受体表达受原癌基因 ErbB1 调控, ErbB1 基因共有 28 个外显子, 编码 1186 个氨基酸^[17]。EGFR 蛋白由胞外配体结合区、跨膜区和胞内激酶结构区三个部分组成。当无配体刺激时, EGFR 以无活性的单体形式存在; EGFR 胞外配体结合区与表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 或转化生长因子 α (transforming growth factor α , TGF α) 等配体结合后可与自身形成 EGFR-EGFR 同源二聚体或与其它 ErbB 蛋白形成 EGFR-ErbB 异源二聚体, 导致 EGFR 蛋白空间构象改变, 胞内激酶结构区 ATP 结合位点暴露, 在 Mg^{2+} 催化下酪氨酸残基发生磷酸化, 从而激活下游 PI3K/Akt 和 RAS/RAF/MEK/Erk 信号通路, 诱导靶基因转录, 调控细胞增殖与分化^[18]。

与正常细胞相比, EGFR 在上皮来源的肿瘤细胞中表达量增加, 故科学家设想 EGFR 靶点可能用于肿瘤治疗。上世纪九十年代, 一代 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitors, TKIs) 吉非替尼 (Gefitinib, Iressa; AstraZeneca) 和厄洛替尼 (Erlotinib, Tarceva; Genentech/OSI Pharmaceuticals) 问世, 但最初临床实践中 TKIs 二线/三线治疗晚期 NSCLC 患者疗效并不理想, 不同研究小组的试验结论甚至相反, TKIs 总体有效率不足 10%^[19-21]。亚组分析显示对 TKIs 敏感的 NSCLC 大多是女性、不吸烟和腺癌患者^[22-24], 但究竟是什么原因当时并不清楚。2004 年两篇具有划时代意义的研究论文首次揭示了 NSCLC 患者对 EGFR TKIs 反应性的分子机制: Dana-Farber 癌症研究所 Matthew Meyerson 团队对 58 例 NSCLC 标本进行酪氨酸激酶 PCR 扩增和外显子测序, 发现其中 3 例肺腺癌标本存在 EGFR 第 21 外显子 CTG \rightarrow CGG 突变, 导致编码的 EGFR 蛋白第 858 位亮氨酸 (leucine, L) 被精氨酸 (arginine, R) 替换 (L858R), 而这种突变在同一患者正常肺组织中未检出。此外, 这篇 Science 论文作者还鉴定出 EGFR G719S 突变和 EGFR delE746_A750 突变, 携带 EGFR 突变的 NSCLC 患者在使用吉非替尼 2 月后病灶在影像上明显缓解^[25]; 麻省总医院 (MGH) 肿瘤中心 Thomas Lynch 教授几乎同一时间在 N Engl J Med 杂志报道了 EGFR 突变与吉非替尼敏感性的因果关系, 在细胞学水平, 纳摩尔浓度吉非替尼即可抑制突变 EGFR 磷酸化, 而微摩尔浓度吉非替尼仍不能有效抑制野生型

EGFR 磷酸化。携带 EGFR L858R 和 EGFR delE746_A750 突变 NSCLC 患者服用吉非替尼可以迅速缓解临床症状，但 EGFR 野生型 NSCLC 患者对吉非替尼反应较差。对吉非替尼敏感 NSCLC 患者基因测序，作者还发现 EGFR delL747_T751、EGFR G719C 和 EGFR L861Q 等突变^[26]。这两篇论文强烈提示 EGFR 突变导致的 gain-of-function 可以用作 EGFR TKIs 敏感性的预测指标。那么为什么 EGFR 突变后对 TKIs 敏感性会显著增加呢？科学家分析了 EGFR 基因突变特征发现这些突变位点多集中于第 18 外显子到第 21 外显子，这一段区域负责编码 EGFR 酪氨酸激酶 ATP 结合区域。当这些外显子发生突变后引起蛋白质空间构象改变，EGFR 可以在无配体刺激情况下自动暴露 ATP 结合区域，ATP 结合位点由“闭合的”失活状态变成“打开的”激活状态，与 ATP 结合后使 EGFR 磷酸化（图 3A）。TKIs 竞争性结合 ATP 结合位点，使 EGFR 不能自动磷酸化，从而阻断突变 EGFR 驱动的 NSCLC 细胞存活与增殖，诱导细胞凋亡（图 3B）。

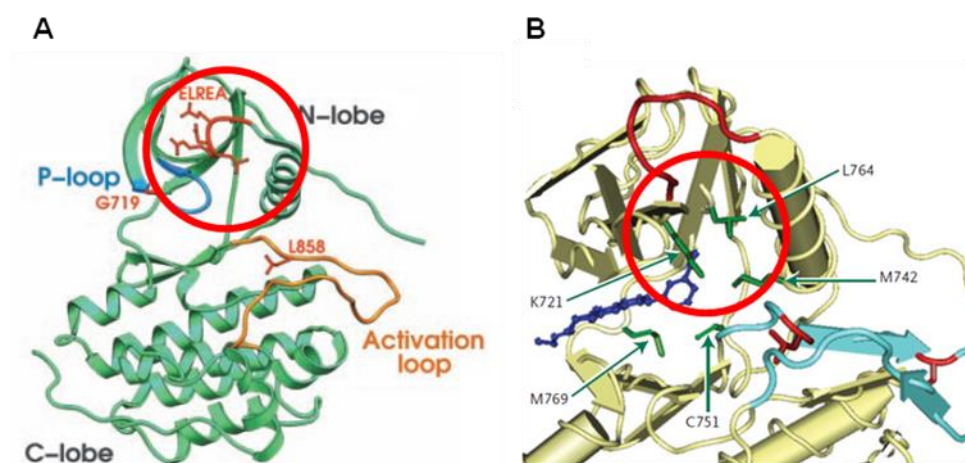


图 3. 突变的 EGFR 蛋白 3D 结构示意图^[25]：(A) EGFR 突变后，ATP 结合位点（红色圆圈所示）暴露，EGFR 自动磷酸化；(B) 吉非替尼（红色圆圈中蓝色药物结构式）竞争性结合 ATP 结合位点，抑制 EGFR 磷酸化。

前文提到对 EGFR TKIs 敏感的患者以女性、不吸烟和腺癌多见，临床上将这类患者定义为“优势人群”（selected population）。流行病学研究发现 EGFR 在优势人群中突变频率较高，其中亚裔优势人群突变率达 50%，远远超过高加索优势人群 10% 的突变率。这个发现较合理的解释了早期 BR.21, ISEL 和 INTEREST 临床试验中 TKIs 敏感性的亚组差异，提示以亚裔患者为主体的优势人群，NSCLC 发病和疾病进展过

程更加依赖 EGFR 信号 (EGFR-addicted), 使用 TKIs 阻断 EGFR 通路可能使更多亚裔患者受益, 故 EGFR TKIs 被形象的比喻为“上帝赠予东方人的礼物”^[27,28]。我国医学专家在 EGFR TKIs 临床应用领域也做出了卓越贡献。由香港中文大学 Tony Mok 教授和广东省肺癌研究所吴一龙教授领衔的 Iressa Pan-Asia Study (IPASS) 是一项评价吉非替尼对比卡铂紫杉醇 (CP) 联合化疗一线治疗晚期 NSCLC 亚裔优势人群疗效、安全性和耐受性的开放、随机、多中心 III 期临床研究^[29]。研究共纳入 1217 例 IIIB/IV 期未接受治疗 NSCLC 患者, 随机化后 609 例患者接受吉非替尼 250 mg/d 治疗, 608 例患者接受 CP 方案治疗, 经 22 月随访发现对于 EGFR 突变 NSCLC, 吉非替尼组患者中位疾病无进展期 (progression free survival, PFS) 为 9.7 月, 显著优于 CP 组 ($HR=0.48, P<0.0001$), 有效率 ORR 达 71.2%; 但对于无 EGFR 突变 NSCLC, CP 组 PFS 优于吉非替尼组, 吉非替尼 ORR 仅 1.1%。IPASS 研究不仅明确了 EGFR 突变在指导 TKIs 临床选择中的重要作用, 更重要的是, 它使人们对 NSCLC 的认识从病理分型提升到驱动基因分型, 对今后靶向治疗药物的研发以及未来关于靶向治疗临床研究的设计思路都产生了重要影响, 是近十年来 NSCLC 靶向治疗的里程碑。另外, 上海市肺科医院周彩存教授领衔的 OPTIMAL 研究评估了厄洛替尼对比卡铂吉西他滨 (CG) 联合化疗在伴有 EGFR 突变 IIIB/IV 期 NSCLC 患者的疗效和耐受性, 结果显示, 厄洛替尼组中位 PFS 显著长于 CG 化疗组 (13.1 月 vs. 4.6 月, $HR=0.16, P<0.0001$), 厄洛替尼常见的不良反应为转氨酶升高和皮疹, 化疗组 3/4 级毒性反应发生率高于厄洛替尼组^[30]。OPTIMAL 研究证实了厄洛替尼在 EGFR 突变 NSCLC 患者的安全性和有效性以及对比化疗的优势, 是中国医生针对肿瘤驱动基因给全世界 NSCLC 患者做出的巨大贡献, 对于 EGFR 突变 NSCLC 患者首选 TKIs 治疗已经成为国内外专家共识。需要特别指出的是由我国科学家设计研发, 具有我国完全自主知识产权的 EGFR TKIs 埃克替尼 (Icotinib, Conmana) 在 III 期临床试验 (ICOGEN) 中展现出与吉非替尼类似的疗效, 甚至在 PFS、ORR、总生存期 (overall survival, OS) 和不良反应上优于吉非替尼, 同时埃克替尼每月医药费用低于进口药吉非替尼和厄洛替尼, 已被我国食品药品监督管理局 (CFDA) 批准用于 EGFR 突变的局部晚期或转移性 NSCLC 患者一线治疗^[31]。

虽然吉非替尼、厄洛替尼和埃克替尼在 EGFR 突变 NSCLC 疗效优于化疗, 科学家提出如果将 TKIs 和化疗联合用于 EGFR 突变患者, 能否进一步提高 ORR 和 PFS?

Dana-Farber 癌症研究所 Pasi Jänne 教授领衔的 CALGB 30406 II 期临床研究旨在对比 TKIs 单药和 TKIs 联合化疗的安全性和有效性。研究入组 181 例 EGFR 突变优势人群，随机分配至厄罗替尼单药组 ($n = 81$) 和厄罗替尼联合 CP 化疗组 ($n = 100$)，两组 PFS 分别为 5.0 月和 6.6 月，差异不具有统计学意义 ($P = 0.1988$)，但厄罗替尼联合 CP 化疗组药物不良反应发生率明显高于厄罗替尼单药组；亚组分析显示不论是厄罗替尼单药组还是厄罗替尼联合 CP 化疗组，EGFR 突变 NSCLC 患者 ORR、PFS 和 OS 优于 EGFR 野生型患者^[32]。因此对于 EGFR 突变 NSCLC 患者不推荐 TKIs 联合化疗作为一线治疗。

2.2.2 EGFR 激酶结构域复制和 EGFR 融合基因

由于 TKIs 在 EGFR 突变的 NSCLC 患者相比化疗安全高效，故临床上常规对优势人群进行 EGFR 基因突变检测，以期让患者最大获益。EGFR 突变位点集中于第 18 外显子到第 21 外显子，这一区域被定义为“突变热点” (hot-spot)，目前 EGFR 检测试剂盒覆盖全部突变热点，但对于突变热点以外的 EGFR 外显子，常用的检测手段不能发现有无突变^[33]。近期范德堡大学 Christine Lovly 教授团队用二代测序 (next generation sequencing, NGS) 方法对一例 33 岁男性不吸烟腺癌患者进行 EGFR 突变检测，在突变热点内未发现 TKIs 敏感突变，然而却发现该患者编码 EGFR 酪氨酸激酶结构域的第 18 外显子到第 25 外显子发生复制，之间以连接子 linker 相连，即该患者 EGFR 激酶结构域重复 (EGFR kinase domain duplication, EGFR KDD) (图 4)。体外过表达 EGFR KDD 可以诱导细胞转化和癌变，提示 EGFR KDD 也是一个肿瘤驱动基因。此外 TKIs 可以有效抑制被 EGFR KDD 转化的 Ba/F3 细胞 EGFR 磷酸化，阻断下游信号转导；带有 EGFR KDD NSCLC 患者服用 TKIs 自觉症状和影像学上获得明显缓解。作者对于 EGFR KDD 可以被 TKIs 抑制的原因解释为两个酪氨酸激酶结构域可以自动结合形成同源二聚体，使 EGFR KDD 在不需要配体情况下自动磷酸化 (图 4)。TKIs 可以抑制 EGFR KDD 磷酸化，阻断下游信号通路，所以 EGFR KDD 也是一个敏感突变，带有 EGFR KDD NSCLC 患者对 TKIs 有效^[34]。

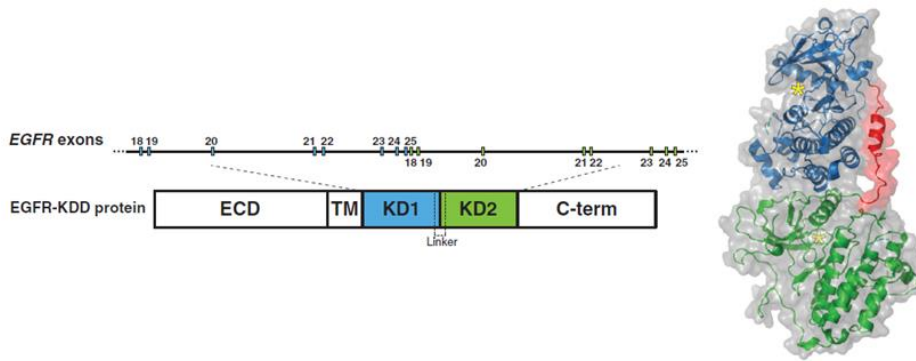


图 4. EGFR KDD 基因和蛋白 3D 结构示意图^[34]: EGFR 第 18 外显子到第 25 外显子倍增后编码的 EGFR 蛋白含有两个酪氨酸激酶结构域（蓝色和绿色部分），之间以 linker 相连（红色部分）。这两个结构域相互结合形成二聚体，使得 EGFR 自动磷酸化（黄色星号）从而激活下游信号通路。

运用 NGS 技术，Christine Lovly 教授团队还发现另一种 EGFR 敏感突变：EGFR-RAD51 融合基因^[35]。这种新的突变由 EGFR 基因从第 25 外显子断裂并与 RAD51 基因融合而来，编码的 EGFR-RAD51 融合蛋白仍然具有传递 EGFR 信号的 Y845 磷酸化位点（图 5）。EGFR-RAD51 也是一个肿瘤驱动基因，且可以被 TKIs 抑制，可能的机制是包含有 EGFR 酪氨酸激酶结构域的片段与 RAD51 融合后蛋白更加稳定，也更容易自发形成二聚体，并激活 EGFR 信号通路（图 5）。

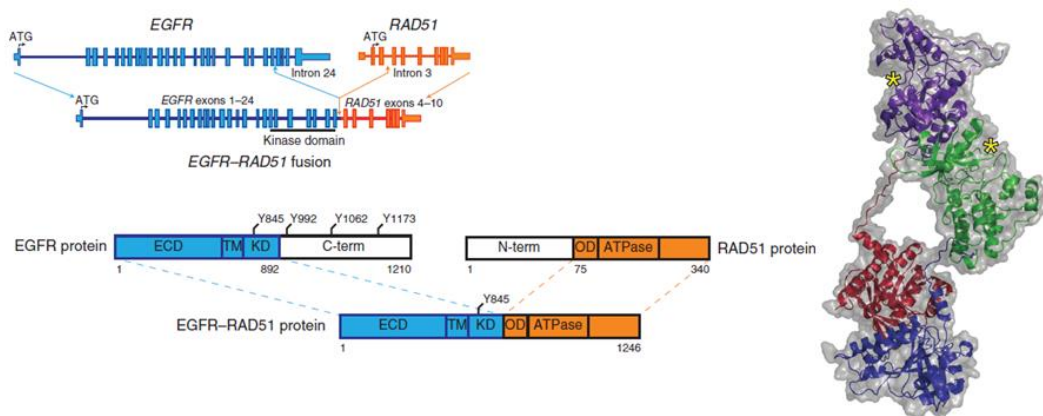


图 5. EGFR-RAD51 融合基因和蛋白 3D 结构示意图^[35]: EGFR 基因从第 25 外显子断裂并与 RAD51 基因融合，融合基因仍然具有酪氨酸激酶结构域和 Y845 磷酸化位点。EGFR-RAD51 蛋白可以自发形成同源二聚体，传递 EGFR 信号通路（紫色部分表示第一个 EGFR-RAD51 融合蛋白激酶结构域，红色表示 RAD51 蛋白部分；绿色

部分表示第二个 EGFR-RAD51 融合蛋白激酶结构域，蓝色表示 RAD51 蛋白部分；EGFR-RAD51 融合蛋白形成二聚体后的活性中心以黄色星号表示）。

以上研究提示如果我们仅仅通过常规手段检测 EGFR 突变热点，容易忽视一些比较罕见的 TKIs 敏感突变，导致一部分可以从 TKIs 治疗获益的 NSCLC 患者漏诊。因此当我们在优势人群中未发现 EGFR 常见突变，不能武断地判定患者不适宜 TKIs 治疗，比较稳妥的方法是根据患者的客观情况和主观意愿进行 NGS 检测，不仅能够发现罕见的 EGFR TKIs 敏感突变，还有可能找到新的肿瘤驱动基因，指导制定个体化治疗方案，使每位患者最大获益。

2.3 ALK 基因重排和 ROS1 基因重排

在驱动基因 EGFR 突变和 *K-RAS* 突变发现后，基因检测已经成为 NSCLC 诊疗的规范，但仍有一大部分 NSCLC 患者不存在 EGFR 突变和 *K-RAS* 突变，因此 NSCLC 很可能存在其它驱动基因。直到 2007 年日本科学家在一例肺腺癌患者肿瘤组织中发现了 EML4-ALK 融合基因。

间变性淋巴瘤激酶（anaplastic lymphoma kinase, ALK）基因定位于 2p23，编码的 ALK 蛋白是一种具有酪氨酸激酶活性的跨膜受体，属于胰岛素受体超家族。ALK 基因在高等哺乳动物中高度保守，提示该基因具有重要功能^[36]。ALK mRNA 和蛋白在胚胎时期的神经系统表达丰度较高，随着神经系统发育完全，ALK 表达水平逐渐下降，在成年人脑组织中仅有痕量 ALK 表达，说明 ALK 在正常情况下参与神经系统发育^[37]。ALK 在肿瘤中表达异常最早见于间变性大细胞淋巴瘤（anaplastic large cell lymphoma, ALCL），Morris 教授发现 ALCL 患者 2 号和 5 号染色体转位，导致核仁磷酸蛋白（nucleophosmin, NPM）和 ALK 激酶结构域融合重排，形成 NPM-ALK 融合基因，ALK 在 NPM 启动子驱动下持续活化，下游 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路高度激活，引起细胞转化和癌变^[38]。随后在炎性肌纤维母细胞瘤、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、食管鳞癌和神经母细胞瘤中均发现 ALK 基因重排，推测 ALK 可能参与了多系统肿瘤的发生发展过程^[39]。东京大学 Hiroyuki Mano 教授团队通过构建基因表达文库，从 1 例 *K-RAS* 和 EGFR 突变阴性日本 NSCLC 患者肿瘤组织中检测到 EML4-ALK 融合基因^[40]。该基因由棘皮动物微管相关类蛋白 4（echinoderm

microtubule-associated protein-like 4, EML4) 在第 13 外显子断裂反向融合于 ALK 外显子上游而来, 根据 ALK 融合片段的大小分为 10 余种变异体, 其中以变异体 1 (EML4-ALK v1, E13:A20) 和变异体 3a/b (EML4-ALK v3a/b, E6a/b:A20) 最常见。通过体外转化 NIH 3T3 和 Ba/F3 细胞, 体内基因重组实验证实 EML4-ALK 各种变异体均具有强烈的恶性转化和致瘤能力, 可能的原因是融合蛋白使两个 EML4-ALK 分子 ALK 激酶结构域相互结合形成稳定的同源二聚体, 增加 ALK 自动磷酸化并持续激活下游信号, 驱动 NSCLC 细胞生长和增殖。随后在 NSCLC 中还发现 KIF5B-ALK、TFG-ALK 和 KLC1-ALK 等 ALK 基因重排形式, 实验证实它们的功能与 EML4-ALK 类似, 均是 NSCLC 驱动基因^[41-43]。

ALK 基因重排阳性 NSCLC 患者也具有特定的临床、病理和生物学特征。研究发现 50 岁以下患者较 50 岁以上患者 ALK 基因重排阳性率高, 不吸烟者较吸烟者阳性率高, 在腺癌中阳性率高于非腺癌。与 ALK 基因重排阴性患者相比, 阳性 NSCLC 患者肿瘤组织富含粘液, 印戒细胞比例超过 10%, 在分化差的 NSCLC 中更易检出 ALK 基因重排^[44]。多数文献报道 ALK 基因重排阳性 NSCLC 通常不伴有 *K-RAS* 和 *EGFR* 突变, 亦有文献报道约 8% ALK 基因重排阳性 NSCLC 同时携带 *K-RAS* 或 *EGFR* 突变^[45, 46]。目前 ALK 基因重排检测的金标准是原位荧光杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH), 通过设计一对分裂探针即可判定 ALK 基因是否被其它基因片段插入, 但这种检测方法具有一定局限性, 例如无法区分 EML4-ALK 变异体; 阳性结果判定标准存在主观性 (高倍镜下分裂探针距离超过 2 倍探针直径, 每个视野 15% 以上细胞荧光分离); 价格昂贵不易普及等。由 Cell Signaling Technology 研发的单克隆抗体 D5F3 高度特异性识别 EML4-ALK 融合蛋白, 曾用作 ALK 基因重排筛查。这株单克隆抗体已被罗氏公司开发为 Ventana 检测试剂盒, 在不影响检测特异性前提下, Ventana 试剂盒大大提高了 ALK 融合蛋白检测敏感性, 分别于 2013 年和 2015 年被 CFDA 和 FDA 批准用于 ALK 基因重排诊断^[47]。此外反转录 PCR 和 PCR 偶联测序在筛查 ALK 基因重排具有一定用途。

大样本筛查发现 NSCLC 患者 ALK 基因重排发生率为 3% – 5%, 虽然比例不高, 但我国每年新增 ALK 基因重排阳性 NSCLC 患者绝对数保守估计 30000 例 (美国为 8000 例), 这部分患者迫切需要安全有效的治疗^[48]。克唑替尼 (Crizotinib, Xalkori; Pfizer) 是一个竞争 ATP 的 II 型氨基吡啶类酪氨酸激酶抑制剂, 体外激酶抑制实验表

明克唑替尼可以抑制 13 种蛋白激酶 (c-Met、ALK、RON、Axl、Tie-2、TrkA、TrkB、AbL、IRK、Lck、Sky、VEGFR2 和 PDGFR β)^[49]。2010 年 MGH 肿瘤中心 Eunice Kwak 教授在 *N Engl J Med* 发表研究论文报道了克唑替尼在 ALK 基因重排阳性 NSCLC 患者的有效性和安全性 (PROFILE 1001 试验)。82 例经 FISH 确认 ALK 基因重排的 NSCLC 患者接受 250 mg, 每天 2 次克唑替尼口服治疗后, ORR 为 57% (46 例部分缓解, 1 例完全缓解), 药物常见的不良反应为胃肠道不适, 患者完全可耐受, 鉴于克唑替尼的显著疗效, 美国 FDA 快速审批该药直接进入 II/III 期临床试验^[50]。PROFILE 1005 试验进一步显示克唑替尼在一线化疗失败的 ALK 基因重排阳性晚期 NSCLC 患者 ORR 达 60%, 中位 PFS 8.1 月, 患者临床症状明显改善。由 MGH 肿瘤中心 Alice Shaw 教授牵头的 PROFILE 1007 试验对比了克唑替尼和化疗在既往接受过一个含铂方案晚期或转移性 ALK 基因重排阳性 NSCLC 患者的疗效和安全性。克唑替尼组中位 PFS 为 7.7 月, 化疗组为 3.0 月 ($HR=0.49, P<0.001$); 化疗 ORR 为 20% 而克唑替尼 ORR 为 65% ($P<0.001$); 克唑替尼相关的常见不良反应为视力障碍、胃肠道副作用和转氨酶升高, 患者症状有更多改善, 总体生活质量也有更大提高^[51]。近期, PROFILE 1014 试验揭示克唑替尼在既往未经治疗 ALK 基因重排阳性 NSCLC 患者优于培美曲塞联合铂类标准化疗方案, 患者平均治疗 6 周起效, 肿瘤显著缩小。克唑替尼组 PFS 为 10.9 月, 化疗组为 7.0 月 ($HR=0.45, P<0.001$); ORR 分别为 74% 和 45% ($P<0.001$); 两组均未达中位 OS, 但克唑替尼组 1 年生存率为 84%, 化疗组为 79%^[52]。另一项克唑替尼对比铂类双药化疗在 ALK 基因重排阳性中国 NSCLC 患者的 PROFILE 1029 临床试验进一步证实克唑替尼组 PFS 明显延长 (11.1 月 vs. 6.8 月, $HR=0.39, P<0.0001$), ORR 显著提高 (88% vs. 46%, $P = 0.0001$), 说明克唑替尼作为一线治疗优于标准化疗方案。FDA 和 CFDA 分别于 2011 年和 2013 年批准克唑替尼用于治疗局部晚期或转移性 ALK 基因重排阳性 NSCLC。

仅在 ALK 基因重排结果发表后 4 个月, Cell Signaling Technology 团队运用磷酸化蛋白组学方法筛选了 41 株 NSCLC 细胞系和 150 例 NSCLC 肿瘤标本, 报道了 ROS1 基因重排^[53]。ROS1 基因定位于 6q22, 编码 ROS1 酪氨酸激酶, ROS1 基因重排检出率约 1%, 常见的重排方式是 FIG-ROS1、SLC34A2-ROS1、CD74-ROS1、EZR-ROS1 和 TPM3-ROS1^[54]。非常有意思的是 ROS1 和 ALK 同属胰岛素受体超家族, 两者在酪氨酸激酶结构域 ATP 结合位点具有 78% 同源性^[55], 因此 ALK TKIs 克唑替尼也可

以抑制 ROS1 磷酸化，这种偶然发现的 off-target 效应使 ROS1 基因重排阳性 NSCLC 患者可以从克唑替尼治疗中获益（图 6）。MGH 肿瘤中心 Alice Shaw 教授近期在 N Engl J Med 发表了克唑替尼用于 ROS1 基因重排阳性 NSCLC 患者治疗的研究论文，50 例确诊 ROS1 基因重排 NSCLC 患者以不吸烟和腺癌多见，患者接受 250 mg，每天 2 次克唑替尼口服治疗后 ORR 为 72%，中位 PFS 19.2 月^[56]。因此克唑替尼被 FDA 评价为“治疗 ROS1 基因重排阳性 NSCLC 的突破性治疗药物”。

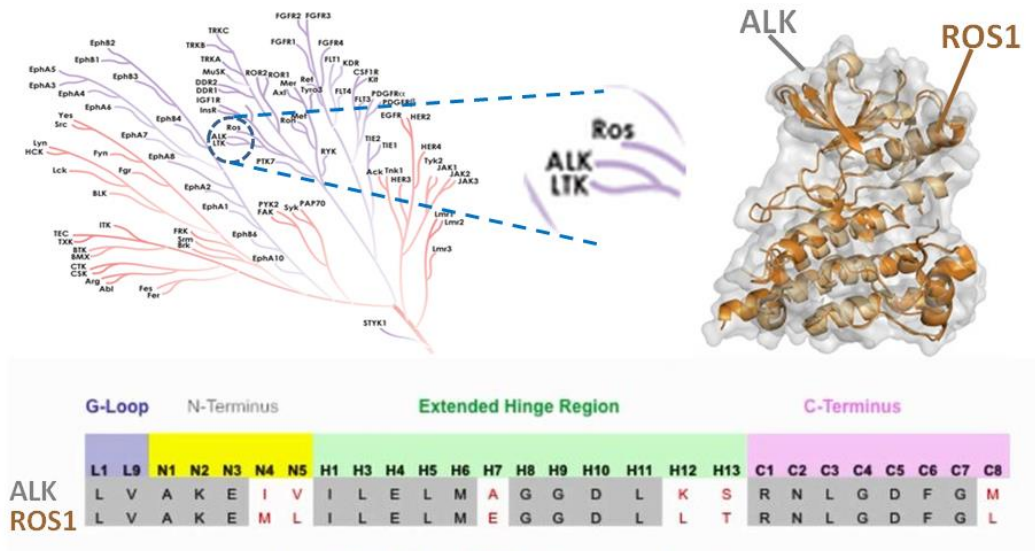


图 6. ALK 和 ROS1 同源性示意图^[55]：在人激酶库中，ALK 和 ROS1 同属胰岛素受体超家族，两者定位非常相近，蛋白结构类似，特别是在酪氨酸激酶结构域 ATP 结合位点，ALK 和 ROS1 具有 78% 同源性。

克唑替尼在 ALK 和 ROS1 基因重排阳性 NSCLC 患者具有很多相似性：（1）两种重排类型患者对克唑替尼平均起效时间均为 7.9 周；（2）克唑替尼在两种重排类型患者 ORR 相近，分别为 61% 和 72%；（3）ALK 和 ROS1 不论与哪个基因重排，克唑替尼一样有效，即克唑替尼既可以抑制 EML4-ALK，也可以抑制 KIF5B-ALK，既可以抑制 FIG-ROS1，也可以抑制 SLC34A2-ROS1，药效与具体重排类型无关。然而，ALK 和 ROS1 基因重排阳性 NSCLC 患者对克唑替尼反应还是有细微差别，主要体现在（1）克唑替尼在 ALK 基因重排阳性 NSCLC 患者平均 PFS 为 9.3 月（PROFILE 1007 和 PROFILE 1014 报道的中位 PFS 分别为 7.7 月和 10.9 月），而 ROS1 基因重排阳性 NSCLC 患者 PFS 为 19.2 月，较 ALK 阳性患者大大延长；（2）ROS1 阳性 NSCLC

患者对克唑替尼出现耐药的时间明显长于 ALK 阳性患者。故 ALK 和 ROS1 两种 NSCLC 驱动基因既有共性，也有特性，如果能够选择性抑制其中一种驱动基因能否达到更佳效果？可喜的是 ALK 特异性 TKIs 和 ROS1 特异性 TKIs 已经在实验室合成，目前正处于临床研究阶段，我们也期待尽早见到阳性结果。

2.4 其它 NSCLC 驱动基因

随着 EGFR 突变、ALK 基因重排和 ROS1 基因重排肿瘤驱动基因陆续在 NSCLC 患者中被发现，人们意识到 NSCLC 已经不在是“一种疾病”，过去的组织病理学分类和“一视同仁 (all-in-one way)”的治疗方案已经跟不上现代医学快速进步发展的步伐。EGFR 突变发现者之一 Matthew Meyerson 教授就指出“到 Dana-Farber 癌症研究所就诊的肿瘤患者，我们不再关注他得的是肺癌或是食管癌，不再关注他是鳞癌还是腺癌，我们在意的是驱动他体内肿瘤细胞增殖的信号是什么？患者是否存在 EGFR 突变、ALK 基因重排和 ROS1 基因重排？临床上是否有可用的药物能够对抗这些驱动基因”。K-RAS、EGFR、ALK 和 ROS1 占据了 NSCLC 基因突变谱的“半壁江山”，目前国内大多数三甲医院均已开展 NSCLC 优势人群基因突变检测。在基因检测技术更新换代后，越来越多的 NSCLC 驱动基因被鉴定出来，并且这些驱动基因的分布在不同人种之间存在差异（图 7）^[57]。

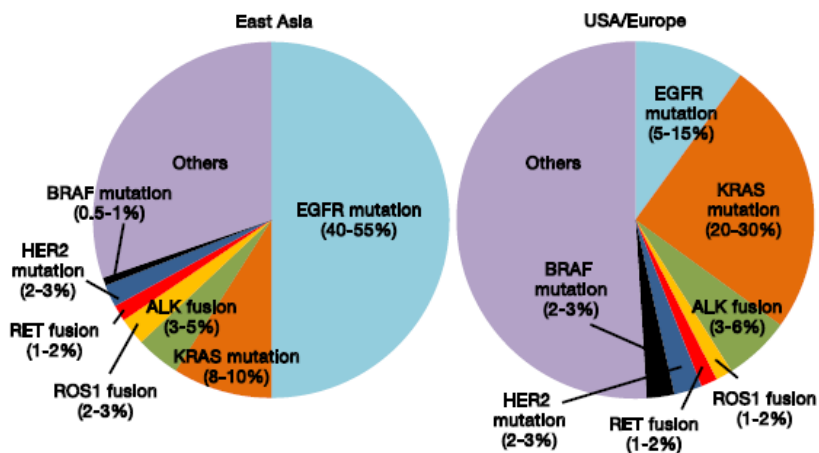


图 7. 肺腺癌驱动基因分布示意图^[57]

2.4.1 BRAF 突变

BRAF 是 RAS 信号通路上的丝氨酸/苏氨酸活性蛋白激酶，负责传递 RAS/RAF/MEK/Erk 细胞增殖信号。大约 8% 人类肿瘤存在 BRAF 突变，最常见的突变形式是第 15 外显子 1799 位核苷酸由 T 突变为 A，导致编码蛋白第 600 位缬氨酸被谷氨酰胺取代(BRAF V600E)，突变后 BRAF 激酶活性可增加 500 倍以上，MEK/Erk 信号持续激活，促进肿瘤发生和转移^[58, 59]。在黑素瘤中，80% 以上 BRAF 突变为 V600E，随后在结直肠癌、甲状腺癌和毛细胞白血病中也发现 BRAF V600E 突变^[60-64]。NSCLC 中 BRAF 突变率为 1% - 3%，吸烟者突变率略高于不吸烟者，除了 V600E 还有 L596V、G594G 和 G468A 突变^[65]。在 CCSP-rtTA/Tet-on BRAF V600E 转基因小鼠肺部特异性表达突变的 BRAF 6 周后可以观察到腺瘤，16 周后发展为腺癌；去除 BRAF V600E 表达后肿瘤体积明显缩小，Erk 磷酸化水平显著降低，说明 BRAF 突变是诱发 NSCLC 和维持肿瘤细胞增殖的重要信号^[66]。2011 年发表在 J Clin Oncol 一篇回顾性研究显示相比 BRAF 野生型 NSCLC，带有 BRAF 突变 NSCLC 侵袭性更强，组织病理学表现为微乳头状浸润癌，患者术后 PFS 和 OS 更短^[65]。2013 年美国临床肿瘤学年会 (ASCO) 上公布了 BRAF 抑制剂 Dabrafenib 用于一线化疗失败且 BRAF 突变阳性 IV 期 NSCLC 试验数据，结果显示 Dabrafenib ORR 为 54%，反应持续时间达 49 周 (NCT01336634)。美国 FDA 已授予批准 Dabrafenib 突破性疗法，用于治疗既往接受过一线含铂化疗的转移性 BRAF V600E 突变阳性 NSCLC。

2.4.2 RET 基因重排

在 NSCLC 中 RET 基因可以与 KIF5B、CCDC6、TRIM33 和 NCOA4 易位融合，其中以 KIF5B-RET 重排最常见并与其它基因突变事件互斥^[67]。RET 基因重排在 NSCLC 检出率约 1%，但对于年轻、不吸烟、低分化腺癌的 pan-negative 患者（指 K-RAS, EGFR, ALK、ROS1、BRAF 等突变均阴性）检出率可以提升到 7% - 17%^[68]。目前主要通过 RT-PCR 和 FISH 检测 RET 基因重排，正处于临床试验阶段的 RET TKIs 包括 Cabozantinib、Vandetanib 和 Lenvatinib。

2.4.3 HER2 突变

HER2 (ErbB2) 和 EGFR 同属 ErbB 受体酪氨酸激酶家族，是乳腺癌中研究比较透彻的一个原癌基因。两项大样本研究报道了 HER2 突变在 NSCLC 发生频率：第一

项研究对 120 例 NSCLC 患者肿瘤组织进行 HER2 测序,发现 5 例(4.2%)患者 HER2 突变且不伴有 *K-RAS* 和 *EGFR* 突变^[69];另一项研究分析了 671 例手术切除的 NSCLC 标本,发现 11 例(1.2%)存在 HER2 突变,以不吸烟腺癌患者多见^[70]。HER2 突变后激酶活性增加,致瘤性明显增强,在小鼠支气管肺泡上皮选择性表达突变的 HER2 可以迅速导致 NSCLC^[71]。小样本量临床研究显示 Neratinib、Dacomitinib 和 Afatinib 等 TKIs 在 HER2 突变 NSCLC 具有一定治疗作用。

2.4.4 肺鳞癌驱动基因

相比肺腺癌,肺鳞癌驱动基因研究相对落后。尽管研究者一直未放弃寻找肺鳞癌驱动基因,但肺腺癌驱动基因很少在肺鳞癌中被检出,一些在腺癌有效的药物如贝伐单抗和培美曲塞在鳞癌中疗效不理想。因此,晚期鳞癌患者治疗选择较腺癌患者要少很多。目前在鳞癌中发现的驱动基因主要有 3 个: *PIK3CA* 突变、*DDR2* 突变和 *FGFR1* 扩增。

PIK3CA 突变的直接后果是 *PI3K/Akt* 信号持续激活,后者在肿瘤发生发展过程中的作用这里不再赘述。美国癌症和肿瘤基因图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)研究已证实 *PIK3CA* 是肺鳞癌的重要驱动基因(突变率 2% – 6.5%,腺癌突变率 1.3% – 2.7%),以第 9 外显子 E545K (26.7%) 和第 20 外显子 H1407R (12.9%) 最常见^[72]。需要指出的是 *PIK3CA* 突变与 *EGFR* 突变并不互斥,前者可以降低 *EGFR* 突变患者对 TKIs 敏感性,在 *EGFR* TKIs 获得性耐药的的患者中,约 5% 存在 *PIK3CA* 突变。*BYL719*、*BKM120* 和 *BEZ235* 是三种针对肺鳞癌 *PIK3CA* 突变的抑制剂。体外细胞实验和动物实验显示三种药物均能抑制 *PIK3CA* 突变细胞生长并促进凋亡。临床前研究还证实它们具有抗血管生成作用。此外, *PIK3CA* 在 33% – 43% 鳞癌中扩增,而在腺癌中扩增率仅 5%^[73]。目前鳞癌相关 *PIK3CA* 抑制剂均处于 I/II 期临床试验阶段。

盘状结构域受体 2 (discoidin domain receptor 2, *DDR2*) 是一种只能被胶原激活而不能被生长因子激活的酪氨酸激酶受体,通过活化 *Src* 和 *Stat* 信号促进细胞增殖。*DDR2* 在鳞癌中突变率约 4%,非鳞癌中突变率不到 1%^[74]。多靶点 TKIs 达沙替尼 (Dasatinib) 可以抑制 *DDR2* 突变引起的 *Src* 过度激活,体内实验亦证实 *DDR2* 移植瘤经达沙替尼口服处理后瘤体体积缩小;遗憾的是评估达沙替尼在晚期肺鳞癌患者疗效的试验因药物毒性反应提前终止,达沙替尼在 *DDR2* 突变鳞癌患者的安全性

和有效性仍待评价^[75]。尼洛替尼（Nilotinib）也是一种可抑制 DDR2 的 TKIs，目前该药用于晚期实体瘤 II 期临床试验正在进行。

成纤维细胞生长因子受体 1（fibroblast growth factor receptor 1, FGFR1）在 20% 肺鳞癌中扩增，导致 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路异常活化，促进细胞增殖和癌变，而肺腺癌中扩增率仅 2%^[76]。韩国学者检测了 369 例手术切除的肺鳞癌标本，发现 FGFR1 扩增与吸烟有关；研究还发现 FGFR1 扩增鳞癌患者术后预后较差，PFS（58.5 月 vs. 80 月）和 OS（58.6 月 vs. 80 月）均短于 FGFR1 未扩增鳞癌患者^[77]。FGFR TKIs（AZD4547、BGJ398、Dovitinib 等）I/II 期临床研究已经在肺鳞癌中展开。

2.5 基于驱动基因的肿瘤靶向治疗

人类基因组计划（human genome project, HGP）解析了健康人体约 2.5 万个基因和 30 亿个碱基的密码，绘制出人类基因图谱，破译了人类遗传信息的奥秘，极大地推动了医学科学和生物技术的迅猛发展。人们从中认识到某些疾病与基因突变导致的细胞遗传和功能异常密切相关，那么能否绘制出疾病基因图谱作为诊断和治疗的依据呢？2015 年，时任美国总统奥巴马在国情咨文中谈及 HGP 的成果并宣布启动精准医疗计划（precision medicine initiative），该计划拟斥资 2.15 亿美元，致力于通过测序和大数据分析来判断患者是否对药物有应答，在基因组层面加深对疾病的认识。利用高通量测序或全外显子测序等检测手段获得每位患者 DNA 突变、基因拷贝数变化、染色体易位等海量信息，结合生物信息学手段筛选出有价值的基因组变异（单核苷酸变异、插入突变、缺失突变、基因扩增、染色体断裂等），分析药物反应性分子标记，从而使医生能够准确了解病因、针对性用药，达到治愈疾病的目的。此外，由测序技术衍生而来的功能成像技术、转录组学技术、代谢组学技术、蛋白组学技术和表观遗传组学技术也被用于疾病研究。目前美国已建立针对 2500 余种疾病的基因检测方法，并已实现合法化用于临床，甚至成为疾病防治的常规手段。癌症是精准医疗计划中最有希望实现治愈的疾病，约有 7000 万美元投入癌症组学研究，用于解码肿瘤驱动基因及助力开发新的治疗方法。目前 TCGA 数据库已建立 34 种常见肿瘤的测序信息，发现了近 1000 万个癌症相关突变，从中找出发挥驱动基因作用的突变和迅速研发针对驱动基因的药物是未来几年的研究重点。

精准医学概念一经抛出，纷纷获得了国际同行的广泛响应，人们对疾病的认识

从“循证医学”过渡到“精准医学”。以 NSCLC 为例，2004 年以前人们只是观察到吉非替尼和厄洛替尼在部分一线化疗失败后患者有效，“亚裔、女性、不吸烟和腺癌”是当时发现的“证”，但并不是每一个具有“证”的 NSCLC 患者都对 TKIs 有反应；BR.21 和 ISEL 两个使用吉非替尼治疗晚期 NSCLC 试验结论相反；这些问题曾经困惑了临床医生很长时间，直到 2004 年发现 EGFR 突变人们才能很准确的锁定 TKIs 敏感 NSCLC 患者，EGFR 突变状态才是决定 TKIs 是否有效的 biomarker！这意味着 NSCLC 不再意味着一尘不变的化疗，也不是一尘不变的 TKIs 治疗，而是先进行 EGFR 突变检测，biomarker 阳性患者接受 TKIs 靶向治疗，biomarker 阴性患者接受化疗，即“同癌异治”。与之类似的还有克唑替尼的临床应用，只有 ALK 基因重排 biomarker 阳性的患者才能从克唑替尼靶向治疗获益，而阴性患者只能接受化疗。此类临床研究的共同点是同样为 NSCLC 患者，基因突变状态决定患者的治疗方案，这种临床研究模式称为 Umbrella Trial，中文形象的翻译为“保护伞研究”，意味着只有驱动基因突变这个 biomarker 阳性的 NSCLC 患者才能被 TKIs 这把“保护伞”保护起来（图 8）。

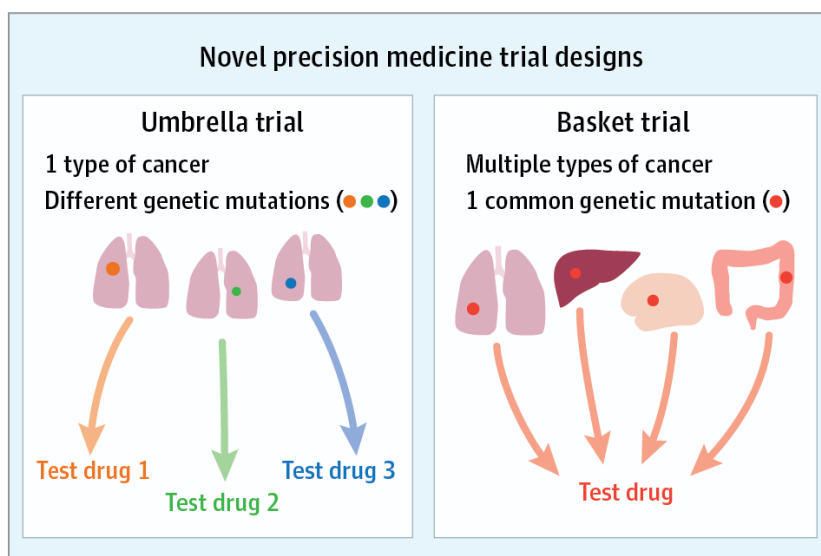


图 8. Umbrella Trial 和 Basket Trial 设计示意图：Umbrella Trial 意在针对同一肿瘤（图中以肺癌为例）的不同突变（图中以橙色、绿色和蓝色表示）给予相应药物治疗；Basket Trial 意在针对同一驱动基因（图中以红色表示）引起的不同肿瘤（图中以肺癌、肝癌、脑肿瘤和结肠癌为例）给予同样的药物治疗。

NSCLC 领域第一个完整的 Umbrella Trial 是由美国德州大学 MD Anderson 肿瘤中心牵头完成的前瞻性 BATTLE-1 研究 (Biomarker-integrated Approaches of Targeted Therapy for Lung Cancer Elimination), 研究入组 255 例经测序或 FISH 证实携带驱动基因突变 NSCLC, 其中 97 例随机给予 TKIs 治疗, 剩余 158 例严格按照 biomarker 分为 4 组, 分别给予厄洛替尼 (EGFR 突变组, $n=34$)、索拉菲尼 (*K-RAS/BRAF* 突变组, $n=77$)、凡德替尼 (VEGF 高表达组, $n=37$) 和贝沙罗汀/厄洛替尼 (RXR 高表达/*CycD1* 扩增组, $n=16$), 主要观察指标为 8 周疾病控制率 (图 9)。结果显示 TKIs 总体有效率为 46%, 特别是索拉菲尼在 *K-RAS/BRAF* 突变组 8 周疾病控制率高达 79%, 远远超过厄洛替尼 (14%) 和凡德替尼 (0%) 在 *K-RAS/BRAF* 突变组的控制率, 结果充分肯定了 biomarker 指导 TKIs 个体化用药的重要意义^[78]。该团队跟进研究 biomarker 指导下 *K-RAS* 突变 NSCLC 患者最佳药物选择, 2016 年在 J Clin Oncol 杂志更新了试验数据并将其命名为 BATTLE-2 (图 9)^[79]。BATTLE-2 试验表明接受厄洛替尼治疗的 NSCLC 患者, *K-RAS* 突变组 OS 短于 *K-RAS* 野生组 (9 月 vs. 6 月); *K-RAS* 突变 NSCLC 患者接受不含厄洛替尼的 TKIs 治疗组 PFS 和 8 周疾病控制率优于包含厄洛替尼的 TKIs 治疗组。目前正在进行的 Lung-MAP 试验 (Lung Master Protocol) 是一项基于肺鳞癌 biomarker 的 Umbrella Trial (phase II/III biomarker-driven master protocol for second line therapy of squamous cell lung cancer), 通过入组一线含铂化疗失败的晚期肺鳞癌患者, 检测鳞癌相关 biomarker 后进一步分为 A 组 (PD-L1 高表达)、B 组 (PIK3CA 突变)、C 组 (CDK4/6 扩增)、D 组 (FGFR 扩增) 和 E 组 (*c-Met* 扩增), 患者给予针对各自 biomarker 的抑制剂或多西他赛化疗, 观察终点是 PFS 和 OS。Lung-MAP 试验预计在 2021 年结束, 研究结果必然推进肺鳞癌 biomarker 检测和药物研发^[80]。

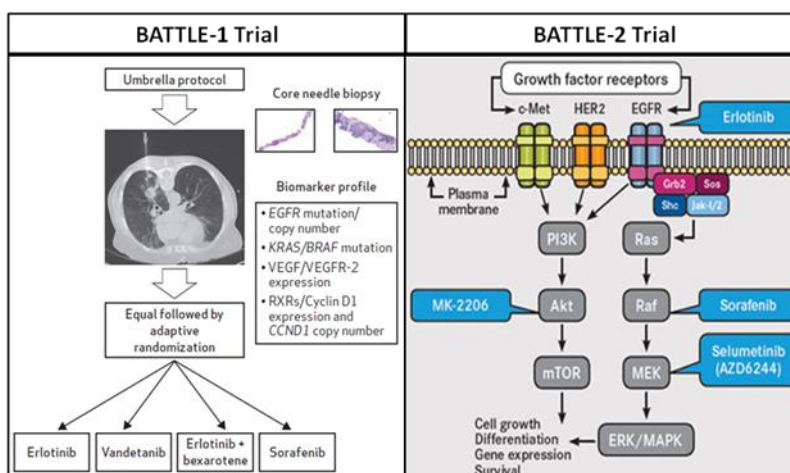


图 9. BATTLE Trial 设计示意图^[78, 79]

值得注意的是驱动基因并不是某种特定类型肿瘤“独有”，而是多种肿瘤“共享”，也就是说一种驱动基因可以驱动多种肿瘤，那么针对这样的驱动基因，在 NSCLC 有效的药物对于其它肿瘤是否一样有效呢？答案是肯定的！一个典型的例子就是克唑替尼除了用于治疗 ALK 基因重排的 NSCLC，还可以用于 ALK 基因重排的炎性肌纤维母细胞瘤（inflammatory myofibroblastic tumor, IMT）。IMT 由分化的肌纤维母细胞性梭形细胞组成，是一种低度恶性间叶组织来源的肿瘤，临床上约 50% IMT 患者带有 ALK 基因重排，最常见的重排类型是 TPM3-ALK。根据这一个 biomarker，可以把 IMT 分为 ALK 重排阳性和 ALK 重排阴性两类^[81]。Dana-Farber 癌症研究所一研究小组入组 2 例 IMT 患者，评估克唑替尼用于 IMT 的有效性。第一例 IMT 患者经 FISH、RT-PCR 和 IHC 证实存在 ALK 基因重排，在接受克唑替尼 200 mg – 250 mg，每天 2 次口服治疗 3 月后影像学上完全缓解；第二例 IMT 患者 ALK 基因重排阴性，克唑替尼 250 mg 口服，每天 2 次，治疗 1 月不仅无效，瘤体体积反而增大。因此，克唑替尼在不同亚型 IMT 药效截然相反，检测 ALK 基因重排状态可以预测 IMT 患者能否从克唑替尼治疗获益，故 TPM3-ALK 可作为克唑替尼在“ALK-addicted IMT”有效性的 biomarker^[82]。EML4-ALK 融合基因发现者 Hiroyuki Mano 教授提议将“ALK-addicted cancer”重新定义为“ALKoma”，这种分型方式强调肿瘤驱动基因的主导作用，不再刻意强调肿瘤的病理类型和组织起源，取而代之的是驱动基因和 biomarker 对用药选择的决定性作用，理论上所有携带 ALK 基因重排的肿瘤患者均可以从克唑替尼靶向治疗获益，即“异癌同治”^[83]。这种临床研究模式称为 Basket

Trial, 中文翻译为“篮子研究”, 即带有相同驱动基因的不同肿瘤可以放在同一个篮子里, 用同一种 TKIs 治疗(图 8)。目前一项全球 12 个中心参与的 Ib 期 Basket Trial 旨在评估克唑替尼用于 NSCLC 以外的 ALKoma 安全性和有效性 (NCT01121588), 预计今年公布试验结果。正在如火如荼进行的 NCI-MATCH (National Cancer Institute - Molecular Analysis for Therapy Choice) Trial 是迄今为止试验对象最多、精密度最高的 Basket Trial。试验不是关注某个癌种, 而是不断增加的肿瘤 biomarker 和靶向药物; 纳入的研究对象是携带驱动基因突变的实体瘤和淋巴瘤患者, 不论患者为何种类型肿瘤, 需要参考驱动基因突变情况给予对应的药物治疗 (NCT02465060)^[84]。试验从 2015 年 7 月开展至今, 已完成 645 例样本全基因组测序, 基因突变药物匹配率为 9% (即每 100 种突变中就有 9 种突变有对应的药物), 目前共有 24 种靶向药物在研 (Arms A – Z1D), 预计在几十年时间内完成 5000 例患者全基因组突变检测, 希望将药物匹配率提升至 23%, 寻找稀有突变患者入组, 设计针对性治疗方案 (表 1)。

表 1. NCI-MATCH Trial 主要分子靶标和对应药物

Arm	Target	Drug(s)	Arm	Target	Drug(s)	Arm	Target	Drug(s)
A	EGFR mut	Afatinib	I	PIK3CA mut	Taselisib	U	NF2 loss	Defactinib
B	HER2 mut	Afatinib	N	PTEN mut	GSK2636771	V	c-kit mut	Sunitinib
C1	c-Met amp	Crizotinib	P	PTEN loss	GSK2636771	W	FGFR1/2/3	AZD4547
C2	c-Met ex 14 sk	Crizotinib	Q	HER 2 amp	Trastuzumab	X	DDR2 mut	Dasatinib
E	EGFR T790M	AZD9291	R	BRAF nonV600	Trametinib	Y	AKT1 mut	AZD5363
F	ALK transloc	Crizotinib	S1	NF1 mut	Trametinib	Z1A	N-RAS mut	Binimetinib
G	ROS1 transloc	Crizotinib	S2	GNAQ/GNA11	Trametinib	Z1B	CCND1,2,3 amp	Palbociclib
H	BRAF V600	Dabrafenib	T	SMO/PTCH1	Vismodegib	Z1D	dMMR	Nivolumab

2.6 NSCLC 液态活检

活检 (biopsy) 标本在显微镜下观察组织的形态学改变一直是疾病诊断的金标准, 然而形态学特征并不能全面反映疾病本质。随着分子生物学和生物信息学快速发展和不断进步, 人们已经能够从基因水平认识疾病, 特别是精准医疗时代到来, 人们对肿瘤的认知更加深入细化, NSCLC 不再是“一种疾病”, 而是“一类”由特定基因驱动的异质性疾病, 通过检测相应的 biomarker 可以进一步分为 K-RAS 突变

NSCLC、EGFR 突变 NSCLC、ALK 基因重排 NSCLC 和 ROS1 基因重排 NSCLC 等。因此国内外临床指南均推荐 NSCLC 患者在接受治疗前进行基因突变检测。既往首选气管镜下活检或 CT 引导下细针穿刺活检等侵入性检查，患者需要承受一定痛苦和侵入性操作带来的并发症。另一方面，肿瘤细胞通常会在 8 – 10 月对靶向治疗药物耐药，患者需要进行多次重复活检（repeated biopsy）查明耐药原因。如何能在早期发现耐药，及时采取措施延缓疾病进展，如何动态监测肿瘤对治疗药物的反应，减轻多次侵入性检查给患者带来的不适是广大临床医生面临的难题。基于上述原因，液态活检（liquid biopsy）技术应运而生，为肿瘤诊断和治疗、预后评估和预防复发提供了重要手段，在临床实践中展现出巨大潜力，加速了精准医疗的发展。

液态活检的标本是人体各种体液，其中以血液标本最常用。肿瘤在生长过程中不断释放遗传信息进入血液，用特殊的检测方法在肿瘤早期即可捕捉到这些遗传信息，从而帮助医生早期诊断肿瘤，阻止疾病进一步发展。液态活检的对象主要是血液中游离 DNA（cell-free DNA, cfDNA）和循环肿瘤细胞（circulating tumor cells, CTCs）。cfDNA 是细胞凋亡和坏死后释放入血的 DNA 片段，正常情况下单核巨噬细胞可以很快清除凋亡和坏死的细胞，故健康人 cfDNA 含量极少，几乎无法检测；肿瘤细胞因为增殖迅速，加上相对缺氧的微环境，细胞凋亡和坏死程度显著增加，释放入血的 cfDNA 增多，此外癌症病人抗肿瘤免疫通常被抑制，cfDNA 不易被清除，稳定性升高，故外周血 cfDNA 含量较健康人明显增加，可以通过 PCR 扩增联合基因测序技术判断驱动基因突变状态，制定个体化治疗方案。由于癌症病人 cfDNA 主要来源于肿瘤细胞，故又称为 ctDNA（circulating tumor DNA）。ctDNA 能较全面的反映肿瘤细胞基因突变状态，弥补组织活检标本合格率低和缺乏异质性的不足，检测操作主要流程包括：① 抽取 3 – 5 ml 全血；② 4 – 5 h 内完成 DNA 抽提；③ 特异性扩增突变基因片段。上述全部操作可以在 12 h 内完成，也就是说癌症患者上午抽血，下午就可以知晓驱动基因突变状态，极大的缩短了诊断时间^[85]。既然 ctDNA 血检省时省力，那么这种方法的敏感性和准确性怎样呢？我国学者较早开展了 ctDNA 血检与组织活检结果一致性的临床研究，北京肿瘤医院王洁教授入组 230 例 NSCLC 患者，分别采用 ctDNA 血检和组织活检两种方法判定 EGFR 突变状态，结果显示两者一致率 87%，其中组织活检 EGFR 突变的 77 例患者中有 63 例 ctDNA EGFR 突变血检阳性；组织活检 EGFR 野生型的 153 例患者中有 137 例 ctDNA 血检 EGFR 野生型^[86]。

国外研究亦显示 652 例 NSCLC 患者 ctDNA 血检和组织活检结果一致性达 94.3%，完善了约 20% 难以获得组织标本患者基因突变信息^[87]。美国 FDA 已批准 Roche Cobas 试剂盒和 Qiagen Therascreen 试剂盒用于 EGFR 突变的液态活检，并批准 ctDNA 血检作为 EGFR 突变检测的补充手段。

ctDNA 血检创伤小、可重复性高，且能反应肿瘤异质性，特别适用于疗效检测和预测复发。Dana-Farber 癌症研究所 Geoffrey Oxnard 教授采用数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 方法检测外周血 ctDNA，发现 TKIs 治疗 2 周后 ctDNA 突变型 EGFR 拷贝数迅速降低的 NSCLC 患者比拷贝数不变化的 NSCLC 患者更长时间获益^[88]；Geoffrey Oxnard 教授另一项研究显示 ddPCR 血检 ctDNA 可以在疾病进展前 4-24 周发现 T790M 耐药突变，这为医生及时制定个体化治疗策略提供了充足的时间。最近刚获批上市的三代 EGFR TKIs 奥希替尼 (Osimertinib/AZD9291; AstraZeneca) 用于治疗 T790M 突变耐药患者，FDA 明确要求使用奥希替尼前需要重复活检确定有无 T790M 突变，然而晚期 NSCLC 患者通常不适宜重复活检，重复活检的组织也不一定满足基因检测需求。Geoffrey Oxnard 教授对使用奥希替尼治疗的 216 例耐药患者检测 T790M 突变，发现血检和组织活检结果一致性 70%，血检 T790M 阳性和组织活检 T790M 阳性患者奥希替尼 ORR (63% vs. 62%) 和 PFS (9.7 月 vs. 9.7 月) 一致；对于血检 T790M 阴性的患者 (ORR 46%，PFS 8.2 月) 再次进行组织活检，其中 30% 患者 T790M 突变阳性，这部分假阴性 NSCLC 患者奥希替尼 ORR 为 69%，PFS 为 16.5 月；因此 ctDNA 血检存在局限性，血检突变阳性可以作为组织活检的重要参考，但对于血检突变阴性患者最好进行组织活检确认，以免遗漏突变患者^[89]。

CTCs 是从实体瘤脱离并进入外周血的肿瘤细胞，CTCs 可由破溃的血管被动入血，也可经上皮间质转化主动入血，可以反应原发病灶分子表型，目前多用于分析肿瘤异质性和监测疾病进程。CTCs 以单细胞或细胞团块存在，在外周血含量很低，需要经血细胞裂解和 CTCs 富集技术才能捕获。捕获 CTCs 的数量可以作为评价疗效的指标，若早期肺癌患者术前外周血 CTCs 数目越多，则患者术后 PFS 和 OS 越短^[90]。CTCs 还可用于基因突变检测和药物敏感实验。MGH 肿瘤中心 Daniel Haber 教授从 6 例乳腺癌患者外周血中分离的 CTCs 保留了原发乳腺癌病灶的细胞形态和遗传学特征，基因表达谱与组织活检标本高度吻合，可以通过 PCR、FISH、NGS 等方法检测基因突变；实验室中 CTCs 药物敏感性筛选结果也与临床病史一致，故可以采用患者

体内来源的肿瘤细胞指导临床用药, 这种策略可行性已被其它科学家证实^[91]。另外, CTCs 并非一尘不变, 在疾病发展不同阶段, 上皮型 CTCs、间质型 CTCs 和混合型 CTCs 所占比例不断变化, 因此动态监测 CTCs 可以实时反映患者体内肿瘤负荷, 是监测疗效和疾病进展的有效手段。

3 NSCLC 靶向治疗耐药的分子机制

3.1 原发性耐药

原发性耐药 (primary resistance 或 *de novo* resistance) 指的是未经治疗的 NSCLC 患者 (treatment-naïve) 一开始就对 TKIs 耐药, 也就是说这类原发性耐药的患者不适宜 TKIs 治疗, 而应该进行放化疗。原发性耐药的机制目前研究的比较清楚, 以 EGFR TKIs 原发性耐药为例, 主要包括三个方面原因: ① *K-RAS* 突变; ② *PTEN* 缺失; ③ *BIM* 低表达与多态性缺失。

前文已经提到了 *K-RAS* 突变多见于高加索人种和吸烟者, 这一点与 *EGFR* 突变的优势人群不同。*K-RAS* 信号通路和 *EGFR* 信号通路都可以促进细胞增殖, *K-RAS* 突变激活 *RAS/RAF/MEK/Erk* 通路, 而 *EGFR* 突变亦可以激活该通路。换言之, *RAS* 是 *EGFR* 信号转导下游的一个效应分子, 不论是 *K-RAS* 突变还是 *EGFR* 突变, 最终都是通过活化 *RAS/RAF/MEK/Erk* 信号发挥驱动基因的效应。对于 *K-RAS* 突变 NSCLC 患者, *EGFR* TKIs 仅能抑制由 *EGFR* 驱动的 *RAS/RAF/MEK/Erk* 信号而不能抑制由突变 *K-RAS* 驱动的 *RAS/RAF/MEK/Erk* 信号, 这类患者接受 *EGFR* TKIs 治疗后 *RAS/RAF/MEK/Erk* 信号仍处于活化状态, 细胞可以继续增殖。另一方面, *K-RAS* 突变和 *EGFR* 突变很少同时出现在同一个病例, 这两个驱动基因有各自的优势人群, *K-RAS* 突变 NSCLC 患者 *EGFR* 通常为野生型, 故对吉非替尼和厄洛替尼等一代 *EGFR* TKIs 耐受。

PTEN (phosphatase and tensin homolog) 基因定位于 10q23.3, 编码的 *PTEN* 蛋白具有脂质磷酸酶和蛋白磷酸酶双重活性。生理状况下 *PTEN* 蛋白最重要的功能是分解 *PIP3*, 终止 *PI3K/Akt* 信号。*PTEN* 缺失或失活引起 *PIP3* 胞内聚集, *PI3K/Akt* 信号持续活化, 加速细胞增殖并抑制凋亡, 促进肿瘤细胞侵袭转移。*PTEN* 基因缺失与 *EGFR* TKIs 原发性耐药相关, HCC827 和 H1650 细胞均携带 *EGFR*_del E746 - A750 敏感突变, 前者对厄洛替尼敏感 ($IC_{50} = 0.02 \mu M$) 而后者对厄洛替尼不敏感 ($IC_{50} =$

2.13 μM), Western blot 结果显示 HCC827 细胞经厄洛替尼处理后 Akt 磷酸化被完全阻断, 而 H1650 细胞 Akt 磷酸化不能被厄洛替尼阻断。聚类分析显示 H1650 细胞 PTEN 基因缺失, 导入外源性 PTEN 基因则可恢复 H1650 细胞对厄洛替尼敏感性, 而下调 PC-9 敏感细胞 PTEN 表达则导致厄洛替尼耐药, 这个发现在 EGFR 突变 NSCLC 患者组织标本中得以验证, 约 5% EGFR 突变 NSCLC 患者同时存在 PTEN 缺失, 这是 EGFR TKIs 原发性耐药的重要机制^[92,93]。

还有一个比较明确的原发性耐药原因是 BIM 低表达状态和基因多态性缺失。BIM 是 BCL-2 家族的促凋亡蛋白, EGFR TKIs 敏感细胞不仅基础水平 BIM 蛋白高于耐药细胞, TKIs 处理进一步诱导敏感细胞 BIM 蛋白表达增加, 促进细胞凋亡^[94]。Costa 等近期报道了 BIM 基础表达水平可以预示 EGFR 突变 NSCLC 患者 TKIs 治疗有效性, 亚组分析显示高表达基础水平 BIM 的 NSCLC 患者接受厄洛替尼一线治疗 PFS 为 12.9 月, 远远超过 BIM 低表达组 (PFS 为 7.2 月, $P = 0.0003$); 两个亚组 OS 也具有统计学差异, 分别为 28.6 月和 22.1 月 ($P = 0.0364$)^[95]。有意思的是 BIM 是一个多态性基因, 正常情况下 BIM 第 4 外显子被剪切, 编码的蛋白具有促凋亡活性; 当多态性缺失时, BIM 基因第 3 外显子被剪切, 编码的 BIM 异构体不具有促凋亡结构域, 细胞凋亡减少, 导致 EGFR TKIs 原发性耐药。上海市肺科医院周彩存教授研究发现 BIM 多态性缺失是 EGFR 突变 NSCLC 患者预后不良的独立因素, BIM 多态性缺失的 EGFR 突变 NSCLC 患者 TKIs 治疗 PFS (4.7 月 vs. 11 月, $P = 0.03$) 和 ORR (25% vs. 66%, $P = 0.01$) 明显短于 BIM 野生型患者。韩国的研究团队也报道了约 19% TKIs 原发性耐药 NSCLC 患者 BIM 多态性缺失, 提示 BIM 多态性检测和 BIM 蛋白表达水平检测一样重要, 两者都是 EGFR TKIs 疗效的预测指标^[96]。

最后, EGFR 基因非敏感突变 (第 20 外显子插入突变, 第 18 外显子点突变等) 也和 TKIs 原发性耐药有关, 但因为临床检出率不高, 这里不再赘述。

3.2 获得性耐药

获得性耐药 (acquired resistance) 又称继发性耐药 (secondary resistance) 指的是连续应用 TKIs 治疗临床获益超过 6 月, 在此情况下出现的疾病进展^[97]。不同驱动基因出现 TKIs 获得性耐药的时间并不一致, 其中吉非替尼中位耐药时间为 8-10 月, 克唑替尼中位耐药时间为 1-2 年, 且以神经系统复发常见。获得性耐药严重限制了

TKIs 长期药效, 本人认为靶向治疗 OS 和化疗 OS 没有差异的可能原因之一就是 TKIs 获得性耐药, 故获得性耐药分子机制是一个亟待解决的临床难题和治疗瓶颈。科学家通过十余年研究, 总结出下列 4 种重要机制。

3.2.1 耐药突变

驱动基因突变 NSCLC 患者 TKIs 耐药后, 二次活检 (repeated biopsy) 和驱动基因再次测序 (resequencing) 提示复发病灶引入了新的突变, 体外细胞实验和体内动物模型证明新突变导致肿瘤细胞对 TKIs 耐受, 故称之为“耐药突变” (resistant mutation)。EGFR TKIs 耐药突变最早报道于 2005 年, 两个独立的研究团队同时发现 EGFR T790M 突变导致 TKIs 耐药, 临床上检出率约 50%^[98, 99]。正常情况下, 吉非替尼和厄罗替尼以氢键可逆性结合 EGFR 酪氨酸激酶结构域第 790 位苏氨酸 (Threonine, T) 残基, 竞争 ATP 结合位点, 抑制 EGFR 磷酸化; T790M 突变改变了这一区域的空间构象, 吉非替尼和厄罗替尼不能与 EGFR 形成氢键, 不能竞争 ATP 结合位点, 使得突变的 EGFR 一直处于磷酸化状态, 持续激活下游信号通路, 细胞增殖不会因为 TKIs 处理而停止, 表现为 TKIs 耐药。国外学者形象的把 T790M 突变比喻为“守门员突变” (gatekeeper mutation): 未突变时门户是开放的, TKIs 可以竞争结合 ATP 结合位点, 抑制 EGFR 信号通路; 突变后门户关闭, TKIs 不能进入 ATP 结合位点, 不能抑制信号转导, 因此克服“守门员突变” TKIs 耐药的有效方法就是研发更强效的 TKIs。与吉非替尼和厄罗替尼相比, 二代 EGFR TKIs 阿法替尼 (Afatinib; Boehringer Ingelheim)、dacomitinib (PF00299804; Pfizer) 和 HKI-272 (Puma Biotechnology) 以共价键竞争 ATP 结合位点, 既可以抑制突变的 EGFR, 也可以抑制野生型 EGFR, 是不可逆性 EGFR 抑制剂。体外细胞学实验证实二代 TKIs 可以克服 T790M 突变引起的耐药, 但临床上用于 T790M 突变患者疗效并不理想, 可能原因是二代 TKIs 需要在较高血药浓度才能抑制 T790M 突变, 这种情况下药物的毒副作用往往不能耐受^[100], 于是科学家研发出了第三代 EGFR TKIs。第一个问世的三代 TKIs 是 WZ4006, 该药可以有效抑制 T790M 但不知什么原因最后没有进入临床研究; 第二个三代 TKIs 是 CO-1686, 该药正处于 II 期临床试验阶段; 第三个三代 TKIs 最受人瞩目, AZD9291 (AstraZeneca) 是单苯胺嘧啶类化合物, 可以共价结合 EGFR 第 797 位半胱氨酸 (cysteine, C) 残基抑制 ATP 结合位点。AZD9291 一个突出的药理作用是它可以选择性抑制突变的 EGFR。研究表明 AZD9291 抑制 EGFR 敏感突变和 T790M 耐药突

变的效率相近, 正常血药浓度 AZD9291 不能够抑制野生型 EGFR, 因此 AZD9291 的安全性和有效性优于二代 TKIs 阿法替尼, 皮疹和胃肠道反应等副作用 (与野生型 EGFR 受到抑制有关) 发生率明显降低^[101]。近期, Dana-Farber 癌症研究所 Pasi Jänne 教授在 *N Engl J Med* 杂志上报道了 AZD9291 用于一代 TKIs 耐药 NSCLC 患者的安全性和有效性^[102]。AZD9291 总体有效率为 51% ($n = 222$), 亚组分析显示 T790M 突变组 ($n = 127$) ORR 和 PFS 分别为 61% 和 9.6 月, 88% 患者治疗有效时间超过 6 月; 非 T790M 突变组 ($n = 61$) ORR 仅 21%, 中位 PFS 2.8 月, 所以存在 T790M 突变 NSCLC 患者使用 AZD9291 疗效更好, T790M 突变是 AZD9291 有效性的预测指标。美国 FDA 于 2015 年 11 月加速批准 AZD9291 (后更名为奥希替尼 Osimertinib) 用于治疗 EGFR T790M 突变阳性晚期 NSCLC, 但奥希替尼和联合化疗相比, 疗效孰优孰劣尚属未知。几个月前 Tony Mok 教授和吴一龙教授也在 *N Engl J Med* 杂志公布了 AURA3 试验的最新结果, 这是一项对比奥希替尼和标准化疗 (卡铂/顺铂+培美曲塞) 用于一线 TKIs 治疗失败且 T790M 突变 NSCLC 患者的随机、开放、国际多中心的 III 期临床试验, 研究入组 419 例患者, 按 2:1 分配接受口服奥希替尼治疗或 6 个周期化疗。结果显示奥希替尼组 ORR 显著高于化疗组 (71% vs. 31%, $P < 0.001$); 在 144 例伴有脑转移的患者中, 奥希替尼组 PFS 为 8.5 月, 而化疗组仅 4.2 月; 奥希替尼 III 级以上副反应发生率也低于化疗 (47% vs. 23%), 说明奥希替尼在 T790M 突变的 NSCLC 是一种更加安全高效的治疗手段^[103]。

耐药突变也可以导致 ALK 靶向治疗和 ROS1 靶向治疗耐药, 临床上约 25% 克唑替尼耐药患者携带耐药突变。2010 年 Hiroyuki Mano 团队在 *N Engl J Med* 杂志报道了第一例 ALK 基因重排阳性 NSCLC 患者对克唑替尼获得性耐药的病例, 研究人员发现耐药后的肿瘤细胞多出了 C1156Y 和 L1196M 两种突变, 其中 L1196M 也是守门员突变, 阻碍克唑替尼进入 ATP 结合位点; C1156Y 虽然不是守门员突变, 但可以间接改变 ATP 结合位点空间构象, 使药物与之解离, 促进克唑替尼耐药性^[104]。与 EGFR TKIs 耐药突变不同的是 ALK 激酶结构域存在多种耐药突变 (T790M 是已知的唯一 EGFR TKIs 耐药突变), 包括 G1202R、S1206Y、F1174C、F1174L、D1203N、I1171T、I151T-ins、L1152P 和 G1269A, 并且耐药患者可以同时存在两种以上耐药突变, 故二代 ALK TKIs 需要覆盖多个耐药突变位点才能克服 ALK 靶向治疗耐药, 代表性的药物有色瑞替尼 (Ceritinib)、Alectinib、ASP3026 和 AP26113。色瑞替尼因

为毒副作用小且能透过血脑屏障，耐药患者 ORR 达 57%，于 2013 年通过 FDA 加速审批用于克唑替尼治疗失败或不耐受克唑替尼的 ALK 基因重排阳性 NSCLC^[105]。此外，ALK 耐药突变 NSCLC 患者还伴有 ALK 基因拷贝数增加 (copy number gain, CNG)，通常先出现 CNG 再出现耐药突变，提示 ALK 阳性 NSCLC 患者对克唑替尼耐药是多因素、多步骤过程。G2032R 是近期发现可引起 ROS1 阳性 NSCLC 对克唑替尼耐药的突变，目前有三种药物 (Foretinib、Cabozantinib 和 Lorlatinib) 体外对该耐药突变有效^[106]。

3.2.2 旁路激酶信号

EGFR、ALK 和 ROS1 都是驱动肺癌细胞增殖的酪氨酸激酶，使用 TKIs 阻断这些激酶信号可以有效地杀灭肿瘤细胞。但如果肿瘤细胞表达新的酪氨酸激酶，原来有效的 TKIs 就不再起效，这种耐药模型称为旁路激酶信号 (bypass kinase track)。人们对于“旁路”这个词并不陌生，临床上的心脏搭桥手术 (heart bypass operation) 就是给心肌在冠状动脉以外提供血供，使心肌细胞在冠脉阻塞的情况下仍然可以获得能量供应，不至于发生坏死，这种旁路对人体是有益的；驱动基因的作用好比冠脉，TKIs 阻断敏感细胞“冠脉血供”，细胞很快凋亡坏死。若肿瘤细胞表达一个新的酪氨酸激酶，获得额外的“血液供应”，细胞增殖信号不会被 TKIs 阻断，这种情况下的旁路不利于治疗，需要同时切断原先的激酶信号和旁路激酶信号才能有效杀伤肿瘤细胞。2007 年发表的 Science 论文揭示了 TKIs 耐药的第一个旁路激酶信号，论文作者 Jeffrey Engelman 教授用吉非替尼慢性刺激 HCC827 敏感细胞，获得耐药细胞 HCC827 GR5 和 HCC827 GR6，这两株耐药细胞没有 T790M 突变，吉非替尼处理可以抑制 EGFR 磷酸化而不能抑制 Akt 磷酸化 (这一点和 T790M 突变细胞不同，后者用吉非替尼处理后 EGFR 与 Akt 磷酸化均不受抑制)。基因芯片结果显示耐药细胞 c-Met 基因扩增，编码的 c-Met 蛋白也是一个酪氨酸激酶。耐药细胞通过增加 c-Met 表达绕过 EGFR 磷酸化 Akt，故单独使用吉非替尼不能阻断 PI3K/Akt 信号通路；同理，单独使用 c-Met 抑制剂也不能阻断耐药细胞 PI3K/Akt 信号通路；吉非替尼联合 c-Met 抑制剂 PHA-665752 则可以完全切断耐药细胞 PI3K/Akt 信号通路，阻断 Akt 磷酸化，克服 HCC827 GR5 和 HCC827 GR6 细胞耐药性。临床上约 5% EGFR TKIs 耐药患者 c-Met 基因扩增，这部分患者可能从 EGFR TKIs 和 c-Met TKIs 联合治疗获

益^[107]。部分耐药患者血浆中肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 水平增高, HGF 作为 c-Met 配体激活 c-Met 信号通路亦导致 EGFR TKIs 耐药^[108]。HER2 扩增也是 EGFR TKIs 耐药的旁路激酶信号^[109]。

克唑替尼耐药的旁路主要有 EGFR、c-kit 和 RAS^[110]。约 44% 克唑替尼耐药患者 EGFR 磷酸化水平增加, 绕过 ALK 和 ROS1 磷酸化下游信号, 克唑替尼联合吉非替尼可以抑制克隆形成, 克服细胞耐药性; c-kit 作用与之类似, 耐药标本中检出率约 15%, 伊马替尼对于这类患者有效; RAS 突变活化下游 RAF/MEK/Erk 信号通路, 导致克唑替尼耐药。

3.2.3 病理类型转化

前文反复提到带有驱动基因突变的肺癌绝大部分是腺癌, SCLC 极少有驱动基因突变, 故不采用 TKIs 靶向治疗。2006 年 *N Engl J Med* 发表一篇 NSCLC 经 TKIs 治疗耐药后病理类型变化的病例报道, 患者是一名 45 岁高加索女性不吸烟 IV 期腺癌患者, 口服 EGFR TKIs 有效, 18 月后病情进展, 二次活检标本显示病理类型为 SCLC, EGFR 突变阳性, 患者继续口服 EGFR TKIs 治疗并接受依托泊苷化疗 6 月病情再次进展, 停止治疗 4 周后死亡, 尸检标本发现肿瘤多处转移, 5 处转移灶病理类型均为 SCLC, EGFR 突变阳性, 未发现腺癌成分^[111]。腺癌经治疗转化为 SCLC 同样见于亚裔患者, 日本人 2007 年报道了一例 46 岁女性不吸烟 III 期腺癌患者在化疗和吉非替尼治疗后脑转移, 原发灶二次活检标本提示 SCLC, 基因检测结果 EGFR delE746_A750, 患者接受 4 个周期顺铂+伊立替康化疗后病情缓解, 再次活检肺部病灶, 病理类型又变为腺癌并伴有 EGFR delE746_A750 突变^[112]。2011 年 MGH 肿瘤中心 Lecia Sequist 教授分析 37 例 EGFR TKIs 获得性耐药的肿瘤标本, 5 例患者 (14%) 由 NSCLC 转为 SCLC, 作者认为 EGFR 在 NSCLC 是驱动基因突变 (driver mutation), 但在 SCLC 是伴随突变 (passenger mutation) 不起主导作用, SCLC 增殖不依赖 EGFR 信号 (non-EGFR-addicted), 因此组织病理学类型转化也是 TKIs 耐药的原因^[113]。

NSCLC EGFR TKIs 耐药后转化为 SCLC 报道越来越多, 科学家从三个方面解释了这种遗传学变化: ① 肿瘤异质性。该观点认为最初的肿瘤病灶内同时存在 NSCLC 和 SCLC 两个克隆, NSCLC 占大多数, 活检标本中 NSCLC 比例高, SCLC 含量较少, 不易发现。TKIs 选择性杀伤 NSCLC 而对 SCLC 无效, SCLC 逐渐扩增最后成为

主导克隆；② 肿瘤干细胞理论。该观点认为存在 EGFR 突变肿瘤干细胞亚群，治疗前主要朝 NSCLC 方向分化，治疗后朝 SCLC 方向分化；③ 抑癌基因 Rb 缺失。全部 SCLC 转化的标本 Rb 表达缺失，但 T790M 突变的耐药标本仍然表达 Rb^[113]。另外一种在治疗后出现小细胞癌转化的是前列腺癌，超过 90% 去势治疗抵抗的前列腺癌 Rb 表达缺失。提示 Rb 在小细胞癌发生过程中发挥重要作用^[114]。对于 TKIs 耐药后 SCLC 转化的治疗方案尚未达成共识，专家建议耐药后快速转化的 SCLC 患者可按照 SCLC 处理（认为 SCLC 是肿瘤主体成分，此时不宜继续 TKIs 治疗，改用含铂化疗），缓慢转化的 SCLC 患者采用 TKIs 联合化疗（认为这类患者 NSCLC 和 SCLC 比重相当，按照 NSCLC 和 SCLC 方案同时处理）。临床上还观察到 TKIs 耐药后肿瘤细胞上皮 biomarker 消失，间质 biomarker 表达增加，这种变化称为上皮间质转化（epithelial-mesenchymal transition, EMT）。目前认为 EMT 与肿瘤细胞侵袭迁移能力增加和干性增强有关，耐药后 EMT 的肿瘤一般不伴有 T790M 突变、c-Met 扩增和 SCLC 转化^[115]。

3.2.4 肿瘤进化演变

前面阐述的耐药突变、旁路激酶信号、病理类型转化等机制合理解释了 EGFR TKIs 耐药原因，但困扰已久的疑惑是 T790M 突变和 c-Met 扩增的耐药细胞从何而来？以 T790M 耐药突变为例，实验室用吉非替尼诱导 PC-9 敏感细胞（EGFR delE746_A750）TKIs 耐药，可以获得两个 T790M 突变克隆 PC-9 GR2 和 PC-9 GR3。不同的是 GR2 在吉非替尼诱导的第 6 周就耐药并出现 T790M 突变，而 GR3 克隆在诱导的第 24 周耐药和出现 T790M 突变。两个耐药克隆另一个显著的差别是对三代 EGFR TKIs WZ4002 敏感性不同：GR3 克隆对 WZ4002 敏感性明显低于 GR2 克隆。论文通讯作者 Jeffrey Engelman 教授认为这种反应性差别的原因是 T790M 突变起源不同！通过单细胞培养和高敏感度数字 PCR，他们发现亲本细胞中约 0.002% 细胞药物处理前即带有 T790M 突变，这一群比例低、绝对数少细胞被定义为 Pre-existing T790M（图 10 中蓝色细胞），PC-9 细胞在吉非替尼筛选后不带有 T790M 突变的细胞短期内大量凋亡，Pre-existing T790M 细胞因为对吉非替尼耐药持续增殖成为优势克隆，WZ4002 可以克服 T790M 耐药突变，这是早期出现 T790M 的 GR2 细胞对 WZ4002 敏感的细胞学基础（Pre-existing model）；相反，GR3 克隆并不是由 Pre-existing T790M

扩增而来，该克隆是亲本细胞在吉非替尼长期刺激下大量死亡，极少量存活的细胞不断突变以逃避凋亡，逐渐进化出 T790M 来适应吉非替尼对 EGFR 信号的抑制作用（图 10 中红色细胞）。这种情况下 T790M 突变细胞已经不完全依赖 EGFR 信号，即使 WZ4002 可以完全阻断 EGFR，Akt 和 Erk 磷酸化也不能有效诱导细胞凋亡，故 GR3 克隆对 WZ4002 敏感性较差（Evolution model）^[116]。这篇文章的发现对 TKIs 耐药后治疗有很重要指导作用，强调耐药细胞不同起源对治疗反应性的巨大差别。回顾性研究提示 TKIs 治疗失败表现形式不一而足，可以概括为快速进展（肿瘤负荷迅速增加，症状评分 ≥ 2 ）、缓慢进展（肿瘤负荷轻微增加，症状评分 ≤ 1 ）和局部进展（孤立性颅内或颅外进展，症状评分 ≤ 1 ）。按照 Jeffrey Engelman 教授观点，快速进展病例大多是肿瘤进化产生 T790M，肿瘤细胞不再依赖 EGFR 信号，TKIs 失去诱导肿瘤细胞凋亡的作用，此时应当停用 TKIs 改用化疗；缓慢进展和局部进展的病例倾向于 Pre-existing T790M 克隆性筛选过程，肿瘤细胞仍然依赖 EGFR 信号，这类患者可以继续使用 TKIs 并考虑联合化疗或局部治疗。虽然临床上还没有区分早期 T790M（T790M^{early}）和晚期 T790M（T790M^{late}）患者治疗方案，我们相信 T790M^{early} 和 T790M^{late} 患者预后并不一样，T790M^{early} 患者可能从三代 EGFR TKIs 治疗更多获益。

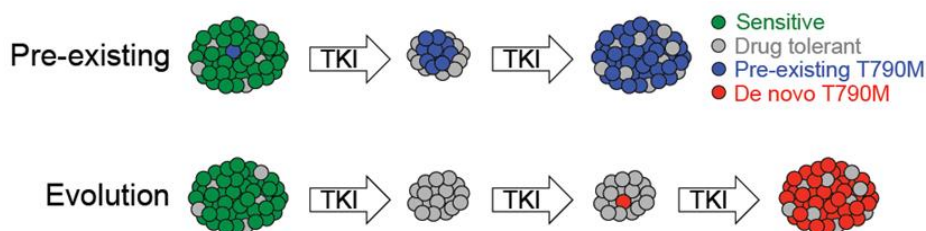


图 10. EGFR TKIs T790M 突变耐药模型^[116]

Pre-existing model 和 Evolution model 在 ALK TKIs 耐药中同样存在。Alice Shaw 教授近期报道了一例 ALK 基因重排阳性 NSCLC 患者耐药克隆演变的病例^[117]。患者是一名 52 岁 ALK 阳性女性，全外显子测序（whole-exome sequencing, WES）显示肿瘤组织中极少量细胞带有 C1156Y 耐药突变（图 11 浅蓝色区域），患者克唑替尼一线治疗获益 18 月后腹部转移，淋巴结活检标本显示 50% 肿瘤细胞携带 C1156Y。患者随后入组三代 ALK TKIs Lorlatinib 临床试验，Lorlatinib 治疗 5 周后肝脏病灶缩小 41%，8 月后肿瘤再次进展，肝脏病灶活检发现 C1156Y 和 L1198F 突变，后者抑制

Lorlatinib 与 ALK 酪氨酸激酶结构域结合引起耐药。约 29% 细胞携带 C1156Y 突变，35% 细胞携带 L1198F 突变，两者比例相近提示 L1198F 细胞可能是由 C1156Y 细胞进化而来（图 11 深蓝色区域）。这个病例耐药进展过程可以用 Jeffrey Engelman 教授观点剖析：患者在克唑替尼治疗前存在 C1156Y 耐药突变，即 Pre-existing C1156Y，克唑替尼治疗 18 月筛选出 Pre-existing C1156Y 克隆，可以认为是肿瘤缓慢进展，换用 Lorlatinib 治疗有效；Lorlatinib 治疗前未检测到 L1198F，故 Lorlatinib 耐药后为 Evolution L1198F，进展较快，理论上需要停用 TKIs 改用化疗。这个病例特殊之处是 L1198F 突变可以抵消 C1156Y 突变的作用，换言之，单独存在 C1156Y 突变时克唑替尼不能与 ALK 结合，C1156Y 和 L1198F 同时突变后克唑替尼反而能与 ALK 结合抑制其激酶活性，这名患者在 Lorlatinib 耐药后换回克唑替尼治疗并再次获益。

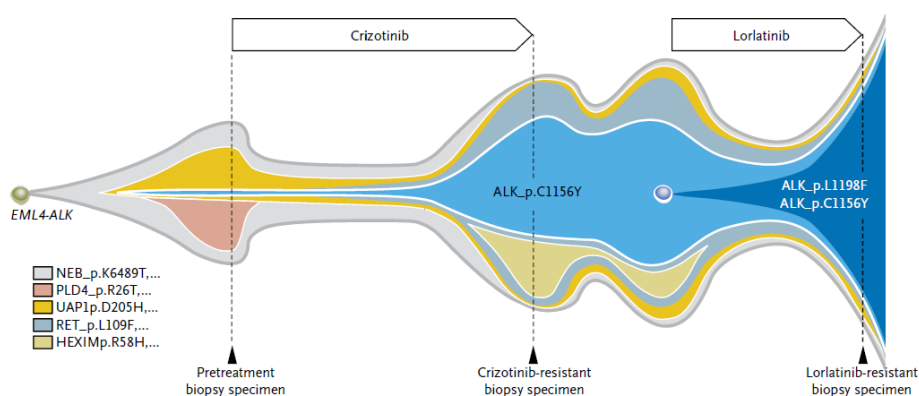


图 11. ALK 基因重排阳性患者 TKIs 耐药细胞比例示意图^[117]

总结前述肿瘤细胞 TKIs 耐药机制，我们可以体会到耐药现象背后的原因非常复杂，既有肿瘤细胞自身因素，也有肿瘤微环境的推动作用。尽管现在基因突变检测手段越来越精密，我们尚没有完全解析耐药的奥秘，至今仍有 20% 患者耐药机制不清；即使是耐药机制已知的患者，治疗方案并未达成共识！有的学者认为对于驱动基因突变的 NSCLC，应先给予一代 TKIs 治疗，患者耐药后改用二代或者三代 TKIs 循序渐进；另一部分学者认为 TKIs 耐药不可避免，EGFR 突变患者迟早会出现 T790M，ALK 基因重排阳性患者迟早出现 C1156Y 和 L1196M，不如一开始就接受奥希替尼和 Lorlatinib 治疗，这样既可以覆盖耐药突变，也避免了患者更换药物带来的不适；还有的学者认为三代 TKIs 也会耐药，最近发现的 EGFR C797S 突变可以导致

奥希替尼耐药^[118]，于是人们又开始研发第四代 TKIs，TKIs 序贯化疗是否推迟耐药突变出现时间……诸如此类问题还有很多，这需要科学家和医学家携手合作，from bench to bedside，才有可能使 NSCLC 患者长期获益。

4 AhR 信号通路

多环芳香烃受体 (aryl hydrocarbon receptor, AhR) 又称二噁英受体 (dioxin receptor)，基因定位于染色体 7p15，由 11 个外显子和 10 个内含子组成，编码 848 个氨基酸，是 bHLH/PAS (basic Helix-Loop-Helix Per-Arnt-Sim) 蛋白家族成员，根据其名称可以推测 AhR 主要被多环芳香烃 (polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH) 活化。AhR 在哺乳动物之间保守性较高，人和小鼠 AhR 蛋白同源率为 80%，由 N 端 bHLH 结构域、PAS-A 结构域、PAS-B 结构域和 C 端富含谷氨酰胺 (Q-rich) 的转录激活结构域组成。各结构域定位和功能如图 12 所示。虽然 PAS-B 结构域已被证实介导 AhR 与配体结合，但最新研究表明不同配体与 PAS-B 结合的位置各异，PAS-B 结构域可以进一步分为 4 个 binding pocket，每种配体都有各自亲和力最高的 binding pocket，可能的原因是 4 个 binding pocket 大小和电荷不一样，所以不同 AhR 配体刺激后的功能略有差异^[119]。



图 12. AhR 结构和功能域示意图^[119]

AhR 在非活化状态时定位于胞浆，与热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, Hsp90)、AhR 相互作用蛋白 (AhR interacting protein, AIP) 和热休克蛋白 p23 形成无活性的复合物。当机体暴露于 2,3,7,8-四氯代二苯-并-对二噁英 (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin, TCDD)、苯并芘 (benzopyrene, BaP) 和六氯苯 (hexachlorobenzene, HCB) 等 PAH 时，配体与 PAS-B 结构域结合引起 AhR 蛋白空间构象变化，AhR 与 Hsp90、AIP 及 p23 解离，暴露位于 N 端的核定位信号 (nuclear localization signal, NLS)，AhR 与配体结合进入细胞核与核转位因子 (AhR nuclear

translocator, ARNT) 形成具有转录活性的 AhR-ARNT 异源二聚体, 后者以非对称形式识别 DNA 上二噁英反应元件 (dioxin responsive element, DRE), 即 AhR 结合 TC/TGC 序列而 ARNT 结合 GCGTG 序列, 诱导下游基因表达 (图 13) [120, 121]。采用分子克隆方法去除 PAS-B 结构域可以使 AhR 在不依赖配体情况下自动进入细胞核, 持续性激活靶基因表达, 这种截短体称为组成性活化 AhR (constitutive activated AhR, AhR CA) [122], 本课题后续研究也会用到 AhR CA 表达载体。

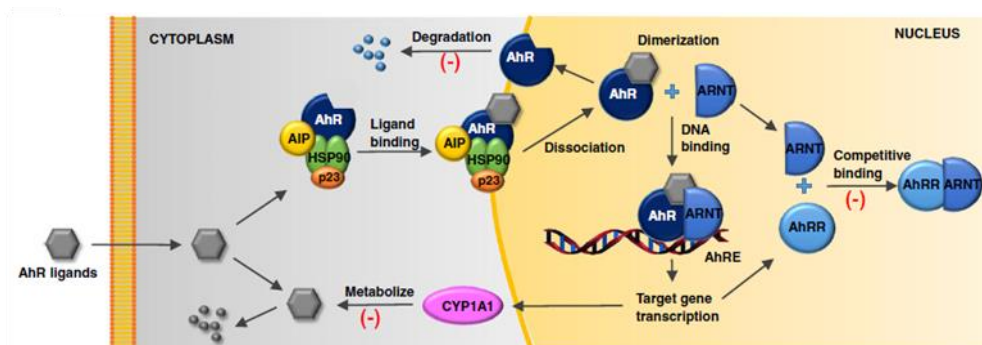


图 13. AhR 信号通路示意图 [120, 121]

AhR 信号通路活化后会自动终止。目前已知的终止机制有两种: ① AhR 入核完成转录功能后被转运出核, 在胞浆内泛素化修饰后被 26S 蛋白酶体降解 [123-125]。AhR 蛋白半衰期在不同细胞系中并不一致, 有研究报道 AhR 半衰期最短为 2-4 h, 最长超过 16 h, 这可能与 AhR 被何种配体活化有关 [126, 127]。AhR 受 TCDD 活化后半衰期最短, 这可能跟 TCDD 性质稳定, 不易被降解, 导致 AhR 信号持续激活有关, 而其余易被分解的配体活化 AhR 信号后 AhR 蛋白半衰期明显延长 [128]; ② AhR 转录产物 AhR 抑制子 (AhR repressor, AhRR) 转运进入细胞核, 与 AhR 竞争形成 AhRR-ARNT 二聚体, 后者抑制 AhR-ARNT 与 DNA 结合, AhR 信号通路终止 [129]。

AhR 信号与胚胎分化发育关系非常密切, 在胚胎着床早期 AhR 信号就已开始发挥作用 [130]。小鼠胚胎发育第 4 天子宫血管 AhR 表达上调, 第 5 天受精卵着床部位基质细胞 AhR 表达显著增加, 第 7 天蜕膜血管高表达 AhR, 第 8-9 天蜕膜 CYP1A1 转录增加, 第 10 天时胎盘和周围血管壁 AhR 表达强阳性 [131]。AhR 主要参与神经系统和心血管系统发育。在线虫中 AhR 促进 GABA 能运动神经元分化 [132]; 果蝇 Spineless 基因 (AhR 同系基因) 突变可引起周围神经发育和视网膜视觉细胞发育缺

陷^[133, 134]；在小鼠胚胎发育 9.5 – 10 天，AhR 广泛表达于神经上皮、神经管和原始心脏，同期上述器官 CYP1A1 转录水平亦增加；胚胎发育第 14 – 16 天，AhR 表达于肋骨和椎骨，随后表达于角膜、视网膜、三叉神经节、嗅球、肾上腺和肌肉组织并持续至出生^[135]。

AhR 基因敲除小鼠心脏、子宫、消化道、肝脏和脾脏具有不同程度发育缺陷，23% 小鼠出生后即死亡；存活下来的小鼠均有心肌肥大和 T/B 淋巴细胞缺失，81% 小鼠肝脏血管壁肥厚，53% 小鼠呈现纤维化体质，在生殖、受孕和泌乳等活动中存在障碍^[136]。AhR 信号过度活化对机体也有诸多不利影响。使用非致死剂量 TCDD 喂养雌性孕鼠，子鼠腭裂和眼裂畸形概率上升，畸胎数目明显增加；CA AhR 转基因小鼠心脏、肝脏和肾脏细胞化生，小鼠胸腺缩小^[137]；越南战争幸存者多有大剂量植物杀伤药橙剂（主要成分是 TCDD 及其衍生物）暴露史，其后代子女无一例外出现智力低下、肢体残缺、颅骨和四肢骨关节畸形、头面部和内脏器官发育不全^[138]。AhR 信号不仅可以影响胚胎期细胞分化发育，对于成年个体细胞亦具有分化调控作用。例如成年人 TCDD 或 BaP 染毒后外露皮肤的表皮细胞过度增殖角化，真皮层毛囊细胞被破坏，引起氯痤疮等皮肤损害^[139]。因此 AhR 信号在个体分化发育各个阶段都发挥了重要作用，过度抑制或过度活化 AhR 均对个体不利。

4.1 AhR 转录效应

AhR 作为配体激活的转录因子启动多种基因表达。最经典的靶基因是微粒体中的 CYP1A1 和 CYP1B1。CYP1A1 和 CYP1B1 是一类生物转化酶（biotransformation enzyme），定位于内质网和线粒体内膜，主要在肝脏和小肠表达，在甾体激素代谢、药物代谢和环境化合物代谢中发挥重要作用。以 TCDD 代谢为例，当 TCDD 进入人体弥散至肝细胞，TCDD 与肝细胞 AhR 结合引起 AhR 核转位，AhR-ARNT 转录复合物结合 CYP1A1 和 CYP1B1 基因启动子上游 DRE，促进 CYP1A1 和 CYP1B1 mRNA 转录和蛋白表达。除了 CYP1A1 和 CYP1B1，GST（Glutathione-S-Transferase, GST）和 UGT（UDP-glucuronosyltransferases）等生物转化酶也可以被 TCDD 诱导，这些生物转化酶通过添加羟基（-OH）、氨基（-NH₂）、巯基（-SH）和羧基（-COOH）等亲水基团，将不溶于水的 TCDD 转化为可溶于水的芳香族化合物，促进 TCDD 排泄，因此 AhR 转录激活下游靶基因的一个很重要功能就是解毒^[140]。除了 TCDD，HCB

等其它 PAH 也可经上述生物转化步骤排出体外。然而 BaP 在生物转化后毒性反而增强。可能的原因是 TCDD 和 HCB 本身就是致癌物 (carcinogen)，羟化和环化修饰后毒性降低；BaP 本身不具有直接致癌作用，属于前致癌物/间接致癌物 (pro-carcinogen)，BaP 进入人体活化 AhR 信号，迅速上调 CYP1A1 和 CYP1B1 表达，后者将前致癌物/间接致癌物 BaP 生物转化为致癌物 7, 8-二氢二羟基-9, 10-环氧化苯并芘 (BPDE)，BPDE 具有高亲电性，易与 DNA 共价结合使 DNA 复制过程受损并诱发基因突变与细胞癌变；敲除 AhR 基因后 CYP1A1 和 CYP1B1 表达不能被诱导，BaP 不能转化为 BPDE，小鼠对 BaP 毒性和致癌性耐受^[141, 142]。

除了 PAH 等环境污染物，激素和药物也能够活化 AhR 信号，诱导下游基因表达 (表 2)。事实上部分激素和药物以无活性前体形式存在，需要在肝脏生物转化后才具有活性^[143]。以他莫昔酚 (Tamoxifen) 为例，市面上出售的他莫昔酚是弱活性的前体药，口服后经肝脏代谢转变为有活性的 4-羟基他莫昔酚^[144]。他莫昔酚和 4-羟基他莫昔酚均能激活 AhR 信号通路，诱导下游 UGT 表达，使药物在 UGT 催化下灭活，转化为葡萄糖醛酸结合复合物经肾脏排出体外，如果 UGT 基因突变则不利于药物清除并影响他莫昔酚临床疗效^[145-147]。由此可见 AhR 信号及下游靶基因转录不仅在毒物代谢中发挥重要作用，还参与了激素和药物代谢，维持适当的激素信号和血药浓度，保持内环境稳态。

表 2. AhR 信号通路激活剂和下游基因诱导剂

Contaminants	Endobiotics	Drugs
PAH	17 β -Estradiol	Tamoxifen
Aromatic amines	Retinoids	Chlorzoxazone
Heterocyclic amines	Thyroxine (T4)	Clozapine
3-Methylcholanthrene	Uroporphyrinogen	Cyclobenzaprine
		Imipramine
		Propranolol
		Theophylline
		Zoxazolamine

4.2 AhR 非转录效应

活化 AhR 信号通路除了启动靶基因转录 (genomic effect), 还具有不依赖转录的非基因组效应 (non-genomic effect)。研究证实 AhR 信号与多条信号通路相互联系, 共同调控细胞增殖与分化^[148, 149]。TCDD 可以抑制细胞增殖, 但敲除 CYP1A1 和 CYP1B1 并不影响其增殖抑制作用, 说明 TCDD 活化 AhR 产生了转录非依赖的效应。目前已明确的分子机制有两种: ① TCDD 促进 AhR 与去磷酸化的 Rb 结合, 使其不能在 G1 期发生磷酸化, 从而抑制 E2F 下游基因表达, 阻滞细胞周期于 G1 期^[150]; ② TCDD 活化 AhR, 诱导 p21 和 p27 表达 (AhR 不能与 p21 和 p27 启动子结合, 故不认为 p21 和 p27 上调受 AhR 转录调控), 后者抑制细胞周期依赖的蛋白激酶 (cyclin-dependent kinase, CDK), 导致 G1 期阻滞, 细胞增殖受抑^[151]。

AhR 信号还可以拮抗雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 信号, 这与 PAH 生殖毒性相符。虽然这种拮抗作用与 CYP1A1 和 CYP1B1 代谢雌激素有关, 但更重要的原因是 AhR 可以激活蛋白酶体系统降解 ER。一系列研究证明 TCDD 可以促进 AhR 和 Cul4B 形成 E3 泛素连接酶复合物, 促进 ER 泛素化降解^[152], 后续研究还发现 AhR 还可以降解雄激素受体 (androgen receptor, AR) 和 β -catenin^[153]。NF- κ B 信号通路与 AhR 也有相互作用, Vogel 等发现 TCDD 激活 AhR 促进形成 RelB/AhR 复合物, 增加炎症因子 TNF- α , IL-1 β 和 IL-8 合成, 调控炎症反应程度^[154]。这些非基因组效应并不依赖 CYP1A1 和 CYP1B1 转录, 使得对 AhR 信号通路的研究不再限于毒物、激素和药物代谢, 越来越多的研究更加关注 AhR 的非基因组效应。

4.3 AhR 与免疫应答

近些年研究发现 AhR 信号对免疫应答具有调控作用。小鼠经 TCDD 染毒后外周血 CD4⁺和 CD8⁺ T 淋巴细胞总数明显减少, 小鼠胸腺萎缩, 胸腺细胞分化滞后, 敲除小鼠 AhR 基因后 TCDD 免疫毒性消失; Nohara 等构建了 T 淋巴细胞特异的 AhR CA 转基因小鼠, 发现转基因小鼠表型与 TCDD 染毒小鼠一致, 表现为胸腺细胞数目减少, CD8⁺淋巴细胞比例增加, 提示 AhR 介导了 TCDD 免疫毒性作用, AhR 活化可以直接抑制胸腺细胞发育和分化^[155]。AhR 调控免疫细胞分化的作用可能与其诱导细胞因子表达有关。Esser 实验室报道了 TCDD 调控胸腺细胞分化的分子机制, 他们发现 TCDD 处理胸腺细胞后增加 IL-2 水平, 后者是调控胸腺细胞分化的重要细胞因子; 在 IL-2 启动子远端存在 3 个 DRE, AhR-ARNT 复合物结合其中 2 个 DRE 可以诱导

IL-2 表达, TCDD 处理后 AhR 过度活化, IL-2 表达增加引起胸腺萎缩和胸腺细胞分化^[156]。

近期研究还显示 AhR 可以调节辅助 T 细胞 17 (T helper cell-17, Th17) 和调控性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 两者平衡发挥免疫调控作用, 然而不同 AhR 配体的免疫调控效应不尽相同。TCDD 主要增加 Treg 亚群的数量并抑制 Th17 亚群发挥免疫抑制作用; 相反, FICZ 主要上调 Th17 亚群比例并抑制 Treg 亚群, 这一作用在多个自身免疫病动物模型中得到验证^[157]。此外, 敲除小鼠 AhR 后 T 细胞主要向 Th17 方向分化, 亦有证据显示 AhR 抑制 B 细胞介导的体液免疫, 提示生理状态下 AhR 更倾向发挥免疫抑制作用^[158]。

4.4 AhR 与肿瘤发生发展

AhR 在人体广泛表达, 第一次注意到 AhR 是在 1972 年研究 BaP 的皮肤毒性。生理状况下, AhR 在皮肤角质细胞表达量很低, 但在分化的角质细胞中 AhR 表达迅速升高, 后续研究证实是 AhR 信号通路活化导致角质细胞分化, 这也是 PAH 引起氯痤疮的分子机理。随后研究发现 AhR 在多种肿瘤组织和肿瘤细胞表达增加并与 PAH 致癌性正相关。PAH 进入呼吸道可诱发肺癌, 研究显示 47% AhR 野生型小鼠吸入 PAH 发生肺癌, 而 AhR 敲除小鼠呼吸道 PAH 染毒不引起肺癌; BaP 可以诱发基因突变与细胞癌变, 慢性皮肤接触可引起皮肤癌, 但这种致癌作用在 AhR 敲除小鼠消失; 另外, PAH 可以通过胎盘增加子代肿瘤风险。与 AhR 基因敲除小鼠相比, AhR 野生型雌性孕鼠在妊娠第 13–18 天 PAH 染毒, 子代小鼠患肝癌和肺癌的风险提高 2–5 倍^[159]。这些结果明确提示 AhR 与肿瘤的相关性, 但并不足以直接证明 AhR 信号异常活化诱发肿瘤, 直到科学家构建出 AhR CA 转基因小鼠, 发现小鼠自发形成胃癌才证实 AhR 确实是一个肿瘤驱动基因。AhR 的肿瘤驱动效应并不完全依赖外源性 PAH, 因为在无 PAH 暴露的乳腺癌、肺癌、胃癌、白血病、胰腺癌、前列腺癌和胶质瘤等患者的肿瘤标本中, AhR 仍处于过表达或活化状态, 且 AhR 表达水平高低与肿瘤病理分级、临床分期、淋巴结侵犯状态正相关, 提示 AhR 内源性配体亦可活化 AhR 驱动细胞癌变与肿瘤进展^[160]。

既然 AhR 在多系统肿瘤发生发展的多个阶段均有重要作用, 那么 AhR 信号通路很有可能通过多种机制诱发肿瘤^[148], 目前比较公认的机制包括: ① 诱导代谢酶。

虽然大部分毒性物质经 CYP1A1 和 CYP1B1 等解毒酶代谢后转变成无毒或低毒物质，但代谢的中间产物毒性较高，且代谢过程产生的氧自由基和高能电子直接损伤 DNA，诱发基因突变；② 抑制 p53。DNA 损伤会激活 p53，后者参与 DNA 修复。而 AhR 活化后可以激活 MDM2，导致 p53 蛋白降解，损伤不能被及时修复；③ 维持细胞干性。这一点在造血干细胞（HSC）比较显著，PAH 抑制 HSC 分化，使干细胞和祖细胞不能分化为白细胞、红细胞和血小板，最终引起白血病；④ 扰乱细胞周期。前文已提到 AhR 抑制 Rb 和 CDK，阻滞细胞于 G1 期；⑤ 抗细胞凋亡。AhR 配体具有类似细胞因子的作用，可以在缺乏生长因子情况下维持 PI3K/Akt 信号，使细胞凋亡逃逸；⑥ 减弱细胞接触抑制。体外单层培养的细胞在融合度达 100% 时即停止生长，这种现象称为接触抑制（contact inhibition）。TCDD 可以解除这种抑制信号使细胞持续增殖并发生上皮间质转化，增加细胞侵袭迁移的能力；⑦ 促进血管新生。可能与 VEGF 表达增加有关；⑧ 活化 NF- κ B 信号，加剧炎症反应；⑨ 改变细胞外基质与微环境；⑩ 抑制肿瘤免疫。由此可见 AhR 信号的作用非常广泛，与多条肿瘤相关信号通路密切联系，研发安全高效的 AhR 抑制剂可能使 AhR 驱动的肿瘤患者获益。

本课题组长期以来关注肺癌的发病机理与个体化治疗，我们重点阅读了 AhR 驱动肺癌发生发展的相关文献。既往研究表明烟草燃烧产生的烟雾中包含 PAH，导致 AhR 信号在吸烟者多处于活化状态，下游的 CYP1A1 和 CYP1B1 在 I 型和 II 型肺泡上皮细胞持续性表达，但很多不吸烟肺癌患者 AhR 信号也持续活化，这可能与 AhR 内源性配体含量增加有关^[161]。与此一致的是在肺癌标本中，CYP1A1 和 CYP1B1 表达水平与 AhR 正相关。台湾的研究团队分析了 AhR 在 7 株 NSCLC 细胞（4 株腺癌和 3 株鳞癌）和 85 例肺癌标本（54 例腺癌，31 例鳞癌，4 例大细胞癌，2 例腺鳞癌和 4 例小细胞癌）表达水平，结果显示腺癌细胞 AhR mRNA 是正常支气管肺泡上皮 Beas2B 细胞 AhR mRNA 2 倍以上，而鳞癌细胞 AhR mRNA 表达水平低于 Beas2B 细胞。AhR 蛋白表达与 mRNA 结果一致，腺癌细胞 AhR 蛋白含量明显高于鳞癌细胞；在肺癌组织标本中，腺癌 AhR 蛋白表达水平最高，阳性率为 42.6%，其次为鳞癌（9.7%），大细胞癌表达水平最低，AhR 蛋白表达与患者性别和年龄无明显相关性^[162]。该团队进一步研究发现肺腺癌组织 AhR、CYP1A1 和 CYP1B1 表达水平升高，而癌旁肺组织 AhR、CYP1A1 和 CYP1B1 表达量很低；siRNA 下调腺癌细胞 AhR 表达降低细胞内活性氧水平并抑制增殖，提示抑制 AhR 可能用于腺癌治疗^[163]。

综上所述, AhR 是一个肿瘤驱动基因和潜在治疗靶点, 现阶段针对 AhR 的研究大多集中于其转录依赖的代谢活性, AhR 的 non-genomic effect 研究尚不全面, AhR 在 NSCLC 靶向治疗耐药中的作用也不甚清楚, 本课题的主要目的是探究 AhR 调控 NSCLC TKIs 敏感性的作用和分子机制, 为克服 TKIs 耐药难题提供理论和实验依据。

正 文

第一部分 AhR 在 NSCLC 表达和意义

1 实验材料

1.1 细胞

Beas2B	购自 ATCC
HCC827	MGH Jeffrey Engelman 教授馈赠
PC-9	广东省人民医院吴一龙教授馈赠
H358	购自 ATCC
H292	购自 ATCC
A549	购自 ATCC
SPC-A-1	购自上海细胞库
H1975	购自 ATCC

1.2 NSCLC 组织芯片

NSCLC 组织芯片购自西安科芯生物技术有限公司（图 1-1），所有标本来自开胸或胸腔镜下取得的肺癌手术标本中心组织，手术时间在 2005 年至 2013 年之间，所有标本经 HE 染色证实富含大量肿瘤细胞，病理学专家确诊 NSCLC。手术标本剪成约 1.0 cm × 1.0 cm 大小组织块，0.9%生理盐水漂洗除去残留血细胞，4%多聚甲醛过夜固定，常规石蜡包埋切片，组织钻孔器制备用于芯片的组织小块，重新包埋成组织芯片蜡块并切片，切片厚度 5 μm 用于 IHC 染色。组织芯片含 57 例 NSCLC 标本，3 例正常肺组织标本（用于评估 AhR 本底表达水平）和 2 例胎盘标本（AhR 阳性对照，用于评估抗体效价）。回顾性分析患者肿瘤分级、淋巴结转移情况和预后。

Raw : Column = 7: 9

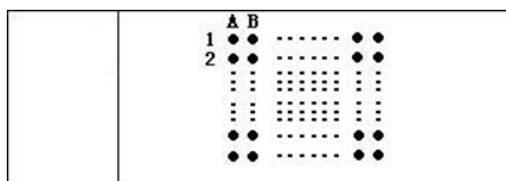
2 placenta spots as positive control

1 empty spot as negative control

Total cases: 62

Diameter: 1.5 mm

Thickness: 5 μm



	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	Placenta Normal	Placenta Normal	Blank	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor
2	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor
3	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor
4	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor
5	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor
6	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor
7	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Tumor	Lung Normal	Lung Normal	Lung Normal

图 1-1 NSCLC 组织芯片示意图

1.3 NSCLC 原发病灶和转移淋巴结标本

经第四军医大学伦理委员会批准，充分告知患者及其家属，选取 2016 年 10 月在我校唐都医院胸外科手术的 4 例 NSCLC 患者原发病灶和若干周围淋巴结标本，其中男性 1 例（IIb 期），女性 3 例（Ib 期 1 例，IIb 期 2 例），平均年龄 56.3 岁，病理类型均为腺癌。活检确认淋巴结转移的标本用于后续 Western blot 实验。

1.4 试剂

RPMI 1640 培养基	Hyclone 公司
DMEM 培养基	Hyclone 公司
胰酶	Hyclone 公司
胎牛血清	Gibco 公司
青霉素/链霉素溶液	Hyclone 公司
MTT	MP Biomedicals 公司
低熔点琼脂粉	Sigma 公司
Trizol	Takara 公司
反转录试剂盒	Takara 公司

SYBR Premix Ex Taq II	Takara 公司
RIPA 裂解液	碧云天生物技术研究所
蛋白酶/磷酸酶抑制剂 Cocktail	Roche 公司
BCA 蛋白定量试剂盒	Takara 公司
5×loading buffer	碧云天生物技术研究所
Tris	MP Biomedicals 公司
甘氨酸	MP Biomedicals 公司
SDS	MP Biomedicals 公司
丙烯酰胺	MP Biomedicals 公司
甲双叉丙烯酰胺	碧云天生物技术研究所
过硫酸铵	碧云天生物技术研究所
TMEMD	MP Biomedicals 公司
甲醇	天津市富宇精细化工有限公司
预染蛋白 marker	Fermentas 公司
硝酸纤维素膜 (NC 膜)	Millipore 公司
Tween 20	科昊生物工程有限责任公司
BSA	MP Biomedicals 公司
兔抗 AhR 抗体 (IHC 用)	Abcam 公司
兔抗 AhR 抗体 (WB 用)	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 PARP 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 Cleaved caspase-3 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 pEGFR 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 EGFR 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 pAkt 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 Akt 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 pErk 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 Erk 抗体	Cell Signaling Technology 公司
小鼠抗 β -actin 抗体	Sigma 公司

HRP 标记抗兔 IgG	Cell Signaling Technology 公司
HRP 标记抗小鼠 IgG	Cell Signaling Technology 公司
ECL 发光试剂盒	Millipore 公司
显影粉	科昊生物工程有限责任公司
定影粉	科昊生物工程有限责任公司
胶片	Canon 公司

1.4 设备和耗材

超净工作台	Yatai Kelong 公司
细胞 CO ₂ 培养箱	Thermo 公司
细胞培养皿	Thermo 公司
移液器	Gilson 公司
负压吸引器	其林贝尔仪器制造有限公司
高压灭菌锅	TOMY 公司
电子天平	上海良平仪器仪表有限公司
磁力搅拌器	上海司乐仪器有限公司
纯水仪	Millipore 公司
SDS-PAGE 电泳槽	Tanon 公司
SDS-PAGE 转膜槽	Tanon 公司

2 实验方法

2.1 AhR 生物信息学分析

TCGA 数据库分析 AhR mRNA 在 NSCLC 表达和突变情况，回顾性分析各患者肿瘤分级、分期和随访信息，评估 AhR 表达水平与患者预后相关性。TCGA 数据库分析需要较强的生物信息学技术背景，本课题组暂时无法独立完成，故该部分内容由浙江大学病理系董辰方教授帮助完成。

2.2 NSCLC 组织芯片 IHC

2.2.1 IHC 按照标准方案操作，简要步骤如下：

- (1) 烤片：玻片置于烤片机上，65℃烤片 30 min。
- (2) 脱蜡：玻片置于二甲苯 I/II 中过缸，每次 15 min，然后依次放入 100%，95%，75%和 50%梯度乙醇溶液中水化，每次 5 min。
- (3) 抗原修复：
- (4) 封闭内源性过氧化物酶：修复后的玻片置于 3% H₂O₂ 溶液中，室温孵育 30 min。
- (5) 血清封闭：PBS 漂洗切片 3 次，每次 5 min，IHC 笔圈画带有组织标本的区域，滴加正常山羊血清，均匀覆盖标本，室温孵育 30 min。
- (6) 一抗杂交：拭去玻片上的山羊血清，滴加 BSA 稀释的 AhR 抗体 (1/100)，均匀覆盖标本，4℃冰箱过夜孵育。
- (7) 二抗杂交：PBS 漂洗玻片 3 次，每次 5 min，滴加 SP 试剂盒中的抗兔二抗和辣根过氧化物酶 (HRP) 底物，室温孵育 60 min。
- (8) DAB 显色：PBS 漂洗玻片 3 次，每次 5 min，逐滴滴加 DAB 显色液，镜下观察显色情况，及时终止显色。
- (9) 苏木素复染：滴加苏木素染液，室温孵育 2 min，自来水轻柔冲洗玻片，洗去多余染液。
- (10) 脱水透明：玻片依次通过 75%，95%和 100%乙醇脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。

2.2.2 IHC 结果判读

IHC 结果按照半定量积分法评分，每例标本随机选取 5 个高倍镜视野，根据 AhR 阳性区域面积和染色强度进行 IHC 评分。

AhR 阳性区域面积评分标准：

- (1) 阳性细胞数 ≤5% 计 0 分
- (2) 阳性细胞数 6% - 25% 计 1 分
- (3) 阳性细胞数 26% - 50% 计 2 分
- (4) 阳性细胞数 51% - 75% 计 3 分

(5) 阳性细胞数 > 75% 计 4 分

AhR 染色强度评分标准:

- (1) 显色黄色计 1 分
- (2) 显色棕黄色计 2 分
- (3) 显色棕褐色计 3 分

AhR IHC 评分 = AhR 阳性区域面积评分 × AhR 染色强度评分

另外, 以正常肺组织 AhR IHC 评分为基准, 高于该评分的为 AhR 高表达 NSCLC (AhR^{high}), 低于该评分的为 AhR 低表达 NSCLC (AhR^{low})。

2.2.3 生存分析

采用 GraphPad Prism 5.0 软件绘制 NSCLC 生存曲线, 随访时患者存活记为 0, 患者死亡记为 1, 患者生存时间采用 Log-rank 检验, * $P < 0.05$ 认为有统计学差异。

2.3 细胞鉴定、培养和冻存

2.3.1 细胞复苏

打开细胞超净台紫外灯灭菌 30 min 以上。从液氮中取出冻存的细胞, 核对细胞名称和冻存时间, 置于 37°C 热水中迅速融化复温, 1200 rpm 离心 5 min, 转移冻存管于细胞超净台中, 75% 乙醇擦拭冻存管表面, 小心拧开冻存管盖, 负压吸引器吸弃上清。用移液器吸取 1 ml 含有 10% 胎牛血清 (FBS) 和青霉素/链霉素双抗的培养液重悬细胞, 吹打均匀后放入细胞培养皿中, 继续添加 4 ml 细胞培养液, 轻柔摇匀, 置于 37°C 5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 次日观察细胞活力和贴壁情况并更换新鲜培养液。

2.3.2 细胞培养

所有细胞按照 ATCC 推荐的条件下培养。Beas2B 和 SPC-A-1 细胞使用含 10% FBS 和 1% 双抗 DMEM 培养液培养, HCC827、PC-9、H358、H292、A549 和 H1975 细胞使用含 10% FBS 和 1% 双抗 RPMI 1640 培养液培养。待细胞融合度达 80% - 90%, 无菌 PBS 漂洗细胞, 0.05% 胰酶消化, 镜下观察细胞呈圆形后加入细胞培养液终止消化, 轻柔吹打细胞, 制成单细胞悬液, 按 1:3 - 1:4 比例传代。

2.3.3 细胞鉴定

为保证本课题使用的细胞系来源可靠，所有细胞一律进行 STR 鉴定。细胞基因组提取由本课题组自行完成，STR 分析由我校 DNA 分型鉴定中心完成。采用天根基因组试剂盒提取细胞基因组大致步骤如下：

- (1) 胰酶消化细胞转入 1.5 ml EP 管中，10000 rpm 离心 1 min，吸弃上清，加入 200 μ l 缓冲液 GA，涡旋器充分震荡。
- (2) 加入 20 μ l Proteinase K 溶液，震荡混匀。
- (3) 加入 200 μ l 缓冲液 GB，充分颠倒混匀，70 $^{\circ}$ C 水浴加热 10 min。
- (4) 加入 200 μ l 无水乙醇，充分震荡混匀 15 sec。
- (5) 将上述所得溶液和沉淀加入吸附柱 CB3 中，12000 rpm 离心 30 sec，倒掉废液，吸附柱 CB3 放回收集管中。
- (6) 吸附柱 CB3 中加入 500 μ l 缓冲液 GD，12000 rpm 离心 30 sec，倒掉废液，吸附柱 CB3 放回收集管中。
- (7) 吸附柱 CB3 中加入 600 μ l 漂洗液 PW，倒掉废液，吸附柱 CB3 放回收集管中。
- (8) 重复操作步骤 7。
- (9) 吸附柱 CB3 放回收集管中，12000 rpm 离心 2 min，倒掉废液，空气干燥 5 min。
- (10) 吸附柱 CB3 放入新的收集管中，向吸附膜中央滴加 50 - 200 μ l 洗脱缓冲液 TE，室温放置 2 min，12000 rpm 离心 2 min，收集管中所得液体即为基因组 DNA。Nanodrop 2000 测定 DNA 浓度和纯度，TE 缓冲液稀释至 5 ng/ μ l，做好标记送 DNA 分型鉴定中心检测。

2.3.4 细胞冻存

选取生长状态良好的细胞，提前一天换液，次日吸弃培养液，PBS 漂洗，胰酶消化细胞，培养液终止消化。将培养液和细胞转入无菌离心管，1200 rpm 离心 5 min，转移离心管于细胞超净台中，75%乙醇擦拭离心管表面，小心拧开离心管盖，负压吸引器吸弃上清。用移液器吸取 2 ml 细胞冻存液（细胞培养液：FBS：DMSO = 5:4:1）重悬细胞，吹打均匀后移入细胞冻存管中，盖紧冻存管盖，标明细胞名称和冻存时间，梯度降温至 -80 $^{\circ}$ C，放入液氮罐中长期保存。

2.3.5 MTT 实验

选取处于对数生长期细胞，超净台中胰酶消化传代，制备成单细胞悬液，血细胞板计数，培养液稀释细胞密度至 2.5×10^4 个/ml，按每孔 5000 个细胞接种 96 孔板，

设置 6 个复孔，剩余孔以无菌 PBS 充填，以减少培养液挥发。待细胞贴壁后负压吸引器吸弃上清，更换为含有药物的新鲜培养液，96 孔板放回细胞培养箱继续培养。达到预定培养时间后避光条件下每孔加入 20 μl 无菌 MTT 溶液 (5 mg/ml)，继续培养 2–4 h 可以观察到紫色的甲瓚形成。小心吸弃上清培养液，每孔加入 100–150 μl DMSO 溶解甲瓚，酶标仪读取各孔在 490 nm 处吸光度值 OD490，绘制细胞生长曲线，计算各孔细胞活力。

2.3.6 软琼脂克隆形成实验

配制 1.4% 和 0.7% 低熔点琼脂溶液，高压灭菌后置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱中保存，维持琼脂溶液不凝固。配制含 20% FBS 的 2 \times DMEM 培养液，37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴。将 1.4% 低熔点琼脂溶液与 2 \times DMEM 培养液等体积混合，趁热灌入 6 孔板，室温冷却后转入 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存，使琼脂充分凝固。超净台中胰酶消化细胞，血细胞板计数，2 \times DMEM 培养液调整细胞密度至 2×10^3 个/ml，取 0.5 ml 与等体积 0.7% 低熔点琼脂溶液混合，灌入 6 孔板上层，室温冷却后四周水封，凝胶表层覆盖 1 ml 含药物的 DMEM 培养液，6 孔板放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 细胞培养箱中培养 3 周，镜下观察克隆形成情况（软琼脂克隆形成实验操作难度较大，灌胶时混合液温度不能太高，以免烫伤细胞，同时灌胶操作速度要快，否则冷却不均匀凝胶易碎。灌胶完毕后培养时间较长，需要小心操作防止污染）。

2.4 qPCR

2.4.1 RNA 提取

细胞处理完毕后吸弃上清，加入 1 ml Trizol 裂解，轻柔吹打直至无细胞团块，转移液体至 1.5 ml EP 管。向 EP 管中加入 200 μl 三氯甲烷，上下颠倒充分混匀，室温静置 15 min，12000 rpm 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min，可见管中液体分为三层，由上到下依次为水相、蛋白相和有机相，小心吸取 400–500 μl 水相移入另一洁净 EP 管中，加入等体积异丙醇，上下颠倒混匀，室温静置 10 min，12000 rpm 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min，此时可见 EP 管底部有少许白色沉淀。吸弃上清，向管中加入 1 ml 预冷 75% 乙醇溶液，7500 rpm 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min，吸净上清，空气干燥 EP 管底部沉淀。20–30 μl DEPC 水溶解沉淀，Nanodrop 2000 测定 RNA 纯度和浓度，样品保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

2.4.2 反转录

使用 Takara 公司 PrimeScript™ RT Master Mix 反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA，反转录反应体系如下：

RNA	500 ng
5×PrimeScript Mix	2 μl
H ₂ O	补齐
Total	10 μl

反转录条件：

37°C	15 min
85°C	5 sec
4°C	1 min

2.4.3 PCR 扩增

反转录完成后使用 Takara 公司 SYBR Premix Ex Taq II 扩增基因片段，PCR 反应体系如下：

cDNA	1000 ng
SYBR Premix Ex Taq II	10 μl
Forward (F)	0.5 μl
Reverse (R)	0.5 μl
H ₂ O	补齐
Total	20 μl

每个基因设置 3 个复孔，各基因引物序列如下：

cyplal F	AAGGATGAGCCAGCAGTAT
cyplal R	AGAGGTCCAAGACGATGTT
cyp1b1 F	TACTCGGAGCACTGGAAGGT

cyp1b1 R	CACCCATACAAGGCAGACG
IDO1 F	TTCAGTGCTTTGACGTCCTG
IDO1 R	TGGAGGAACTGAGCAGCAT
IDO2 F	TGCTTCATGCCTTTGATGAG
IDO2 R	GAAGGCCTTATGGGAAGGAG
TDO F	GGGAACTACCTGCATTTGGA
TDO R	GTGCATCCGAGAAACAACCT
β -actin F	GGGACCTGACTGACTACCTCA
β -actin R	GACTCGTCATACTCCTGCTTG

加样完成后上机扩增，PCR 反应条件如下：

98°C	3 min	
98°C	10 sec	← ×45 cycles
55°C	10 sec	
72°C	15 sec	
72°C	10 min	

2.4.4 结果分析

设置内参基因 β -actin Ct 值，目的基因 Ct 值减去 β -actin Ct 值，得到 Δ Ct。实验组各目的基因 Δ Ct 值减去对照组各基因 Δ Ct 值，并取差值的负值，即 $-\Delta\Delta$ Ct，实验组各目的基因相对于对照组内参基因的表达水平为 $2^{-\Delta\Delta$ Ct}。

2.5 Western blot

2.5.1 细胞蛋白提取

细胞融合度达 80% 左右时终止培养，吸弃培养液，PBS 漂洗，向培养皿中加入 1 ml PBS 溶液，刮匙刮取贴壁细胞并转入洁净的 1.5 ml EP 管中，12000 rpm 4°C 离心 1 min。吸弃上清，加入 100 – 200 μ l 含有 Cocktail 的 RIPA 裂解液重悬细胞沉淀，冰

上裂解 30 min, 40 Hz 超声粉碎后继续裂解 10 min, 12000 rpm 4℃离心 5 min, 上清即为细胞蛋白样品。

2.5.2 组织蛋白提取

从-80℃冰箱取出保存的组织标本, 室温融化。电子天平称取 0.1 g 组织块, 眼科剪剪碎后置于研钵中, 加入少量液氮速冻研磨 (注: 组织融化后变软很难研磨, 可以分次加入液氮速冻), 加入 400 – 500 μ l 含有 Cocktail 的 RIPA 裂解液重悬细胞沉淀, 冰上裂解 30 min, 40 Hz 超声粉碎后继续裂解 10 min, 12000 rpm 4℃离心 5 min, 上清即为细胞蛋白样品 (注: 组织标本通常富含脂肪, 裂解后上清表层多有一层脂肪组织, 不要将这层脂肪混入蛋白上清, 否则会影响后续蛋白定量)。

2.5.3 蛋白定量和变性

采用 Takara 公司 BCA 定量试剂盒测定蛋白样品浓度。试剂 A 和试剂 B 按 50:1 比例混合均匀, 加入洁净 96 孔板中, 每孔 200 μ l。依次加入 10 μ l 0 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml、1.5 mg/ml 和 2 mg/ml BSA 标准品, 其余各孔加入 2 μ l 蛋白样品, 37℃孵育 30 min, 酶标仪读取各孔在 550 nm 处吸光度, 根据标准品浓度和吸光度值绘制标准曲线, 计算各孔蛋白样品浓度。各组蛋白样品加入 1/5 体积 5 \times loading buffer, 100℃煮沸变性 10 min, 冷却至室温后保存于-20℃冰箱。

2.5.4 缓冲液配制

Western blot 实验中各缓冲液配方如下所示。

PBS 缓冲液

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g
调节 pH 7.4, 定容至 1 L	

SDS-PAGE 电泳缓冲液

Tris	3.02 g
甘氨酸	14.4 g
SDS	4 g

定容至 1 L

SDS-PAGE 转膜缓冲液

Tris	3.02 g
甘氨酸	14.4 g

定容至 1 L

30% AB

丙烯酰胺	29 g
甲双叉丙烯酰胺	1 g

定容至 100 ml

10% SDS

SDS	5 g
-----	-----

定容至 50 ml

10% AP

过硫酸铵	1g
------	----

定容至 10 ml

2.5.5 SDS-PAGE 凝胶制备

洗净 Western blot 玻璃板并晾干，组装配胶装置。先配制下层分离胶，配方如下：

1.5 M Tris	1 ml
------------	------

H ₂ O	1.62 ml
30% AB	1.34 ml
10% SDS	40 μ l
10% AP	40 μ l
TEMED	6 μ l

上述液体混匀后迅速灌胶，异丙醇压平液面，室温静置 30 min 凝固，倒净残留异丙醇，配制上层浓缩胶，配方如下：

1 M Tris	0.5 ml
H ₂ O	1 ml
30% AB	0.4 ml
10% SDS	20 μ l
10% AP	20 μ l
TEMED	3 μ l

上述液体混匀后迅速灌胶并插入梳子，室温静置 15 min 凝固，配胶完成。

2.5.6 蛋白电泳

组装蛋白电泳装置，倒入 SDS-PAGE 电泳缓冲液，小心拔出梳子。将蛋白样品从冰箱中取出，室温融化，离心混匀。每孔加入总量 20 – 30 μ g 蛋白样品，预染 marker 标记蛋白分子量大小，剩余各孔以 1 \times loading buffer 补齐，插上电极，盖好电泳槽盖子，打开电泳仪电源开始电泳。电泳条件：浓缩胶 120V，分离胶 160V，待溴酚蓝指示剂移动至 SDS-PAGE 凝胶底层时关闭电源，电泳结束。

2.5.7 转膜

打开电泳槽盖子，取出电泳装置，小心拆开 Western blot 玻璃板，沿玻璃板边缘切胶。打开转膜夹，黑面朝下，白面朝上，依次垫上海绵垫、滤纸、SDS-PAGE 胶、NC 膜、滤纸和海绵垫，固定转膜夹并放入转膜槽中，槽中倒满转膜缓冲液，插上电极，盖好转膜槽盖子，转膜装置四周填充冰块后开始转膜。转膜条件：300 mA 1.5 h。

2.5.8 封闭

待转膜结束后取出转膜夹中的 NC 膜，此时可以看到膜上的预染 marker。将 NC 膜放入丽春红染色液中染色显示蛋白条带，根据预染 marker 位置标记各条带分子量大小。PBST 洗去丽春红染色液，5% BSA 溶液室温封闭 1 h。

2.5.9 抗体杂交

从 BSA 封闭液中取出 NC 膜，置于含有 AhR (1/1000) 和 β -actin (1/2000) 的塑封袋中，4℃过夜孵育。次日 PBST 漂洗 3 次，每次 5 min。将漂洗过的 NC 膜置于含有 HRP 标记抗兔 IgG (1/5000) 和抗鼠 IgG (1/5000) 塑封袋中室温孵育 1 h。

2.5.10 ECL 发光

PBST 漂洗 NC 膜 3 次，每次 5 min。避光条件下等体积混匀 H_2O_2 和鲁米诺工作液，将 NC 膜、ECL 发光液和胶片带入暗室曝光，待显影出现明显条带时将胶片放入定影液中，自来水冲洗干净后晾干。扫描仪获取图像，ImageJ 软件分析蛋白条带灰度。

2.6 统计学分析

每组实验重复 3 次，两组差异比较采用 *t* 检验。 $*P < 0.05$ 认为有差异有统计学意义。

3 结果

3.1 AhR 在 TCGA 数据库表达和突变情况

我们首先在 TCGA 数据库中分析 AhR mRNA 在 NSCLC 表达情况，结果显示 AhR 基因表达主要有点突变、缺失和扩增三种情况（图 1-2）。AhR 基因点突变主要见于 SCLC，突变频率约 5%；NSCLC 主要表现为 AhR 基因扩增，扩增频率 4% - 5%；AhR 基因缺失的频率较低，不到 1%。值得注意的是 AhR 基因扩增主要见于腺癌，这个结论在多个生物数据库中得以验证，因此我们后续研究主要集中于肺腺癌。

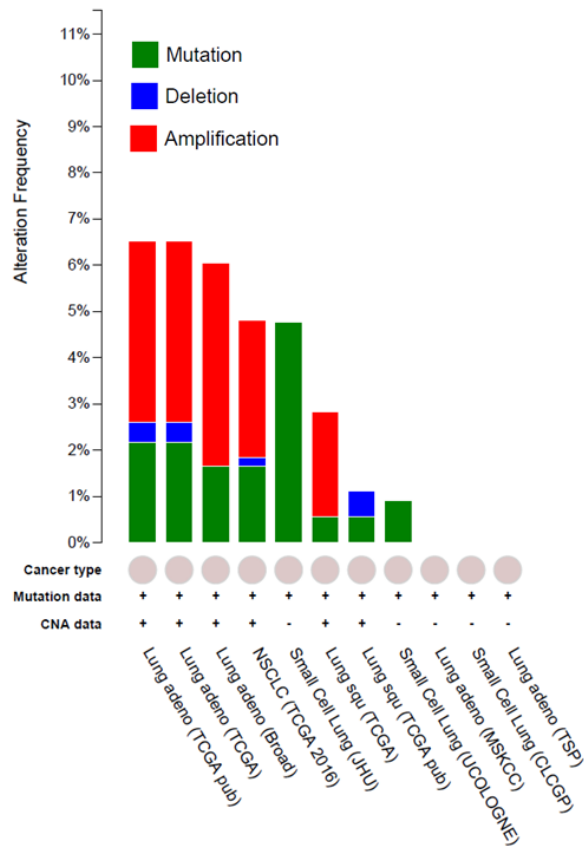


图 1-2. TCGA 数据库分析 AhR mRNA 在肺癌标本中表达和突变情况

3.2 AhR mRNA 与肺腺癌分期、淋巴结浸润和转移的关系

由于 AhR 是一个癌基因且在腺癌中扩增，我们推测 AhR mRNA 可能作为肺腺癌预后不良的指标。遗憾的是 TCGA 数据库结果显示 AhR mRNA 在不同级别肺腺癌表达不具有统计学差异，各期 AhR mRNA 中位表达水平相近，约为 β -actin mRNA 12 倍；不论是否有淋巴结侵犯 (N1, N2, N3) 还是无淋巴结侵犯 (N0)，肺腺癌 AhR mRNA 表达水平亦没有差异；AhR 表达水平高并不意味着肺腺癌转移性强，无转移肺腺癌 (M0) AhR mRNA 水平与有转移肺腺癌 (M1) AhR mRNA 水平无统计学差异；最后，AhR mRNA 并不能作为提示肺腺癌复发的指标 (图 1-3)。上述结果提示 AhR mRNA 与肺腺癌分期、淋巴结浸润、转移和复发无明显相关性。

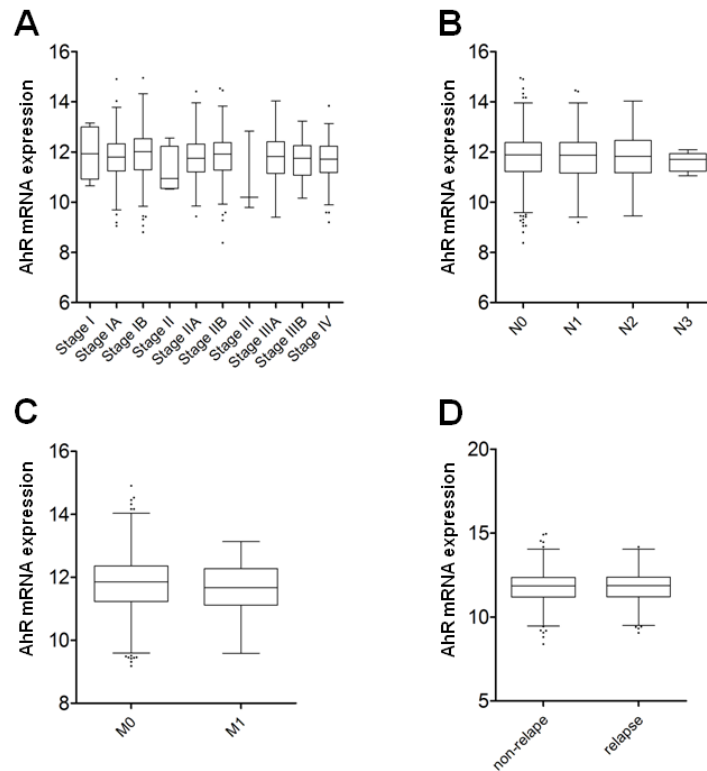


图 1-3. TCGA 数据库分析 AhR mRNA 表达与肺腺癌分期 (A)、淋巴结侵犯 (B)、远处转移 (C) 和复发 (D) 相关性

3.3 AhR mRNA 与肺腺癌预后的关系

我们从 TCGA 数据库中调取了肺腺癌患者随访资料, 以 AhR mRNA 在正常肺组织表达为基准, 将腺癌患者分为 AhR mRNA^{high} 和 AhR mRNA^{low} 两组。PFS 曲线显示随着 AhR 表达水平增高, 腺癌进展速度有加快趋势, 但比较 AhR^{high} 和 AhR^{low} 两组 PFS P 值为 0.2312, 不具有统计学差异; 此外, AhR^{high} 和 AhR^{low} 两组肺腺癌患者 OS 分别为 4.1 年和 4.3 年 ($P = 0.4181$), 差别没有统计学意义 (图 1-4)。

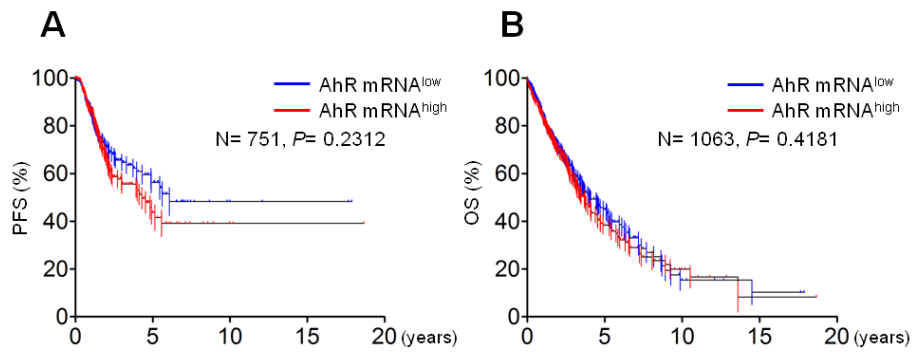


图 1-4. TCGA 数据库分析 AhR mRNA 表达水平与肺腺癌患者 PFS (A) 和 OS (B) 相关性

3.3 AhR 蛋白表达与肺腺癌生存期的关系

我们接下来探究 AhR 在蛋白质水平与肺腺癌的预后关系。我们选取 2005 年至 2013 年进行肺癌根治术患者 57 例，所有患者病理类型为腺癌。入组患者基本信息如表 1-1 所示。

表 1-1. 组织芯片肺腺癌患者信息

性别	
男	32
女	25
年龄	
最小	29
最大	76
平均	56.4
吸烟史	
吸烟	21
不吸烟	36
肿瘤分级	
I	15
II	20
III	22

淋巴结转移	
N0	29
N1	19
N2	9
随访结果	
存活	26
死亡	31
总计	57

为了检测 AhR 抗体用于 IHC 效价，我们在胎盘组织中检测 AhR 蛋白表达情况，最终确定 AhR 抗体稀释比为 1/100。我们根据 AhR 蛋白在正常肺组织的表达情况，以此为基准将腺癌患者分为 AhR protein^{high} 和 AhR protein^{low} 两组（简称为 AhR^{high} 和 AhR^{low}）（图 1-5）。

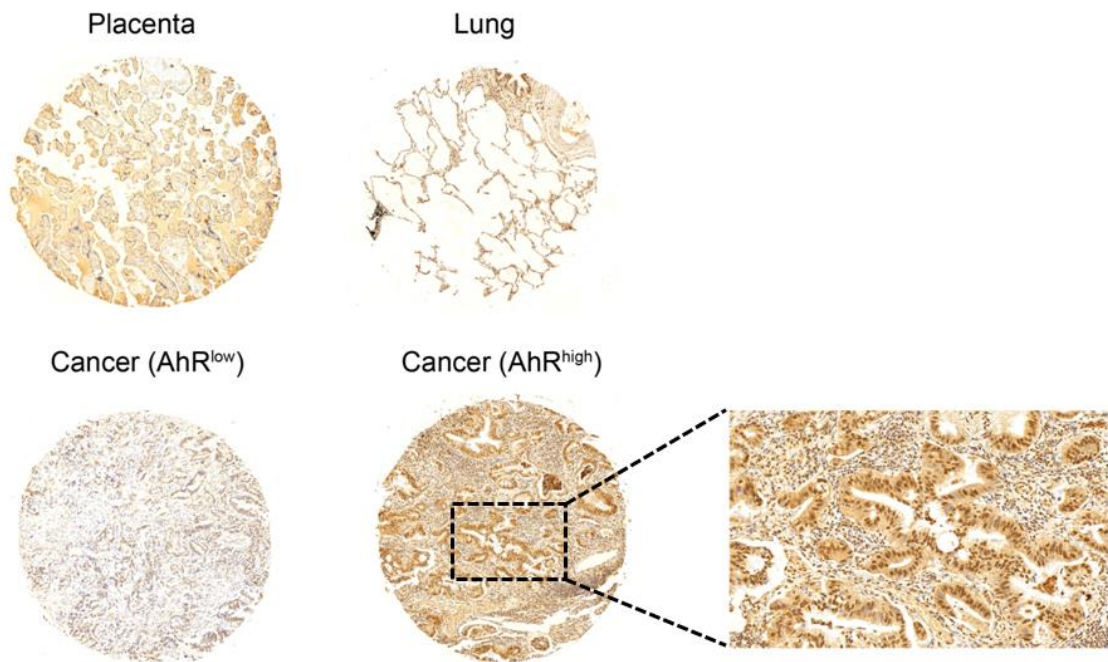


图 1-5. 组织芯片 AhR IHC 典型结果示意图

我们回顾了两组肺腺癌患者随访资料，遗憾的是部分患者中途失访，故无法统计 PFS 信息。我们最后一次随访时间是 2016 年 10 月，当时联系到所有患者，但已有

一些患者死亡，所以我们只能分析 AhR 蛋白表达与肺腺癌 OS 的相关性。截至最后一次随访，AhR^{high} 组腺癌患者中位 OS 为 2.75 年，而 AhR^{low} 组腺癌患者尚有超过一半存活，故我们暂时不能给出其中位 OS，可以肯定的是这组患者其中位 OS 超过 8 年，较显著 AhR^{low} 组显著延长 ($P = 0.0309$) (图 1-6)。

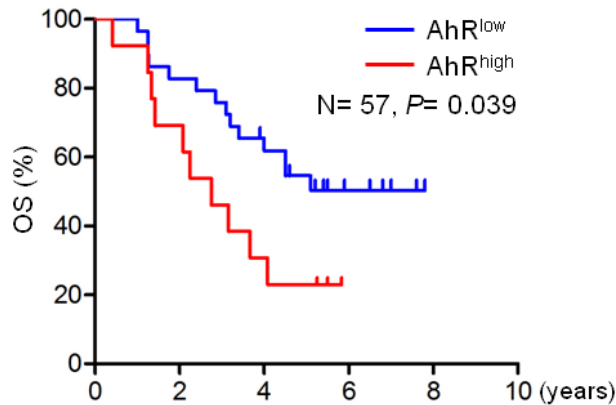


图 1-6. AhR 蛋白与肺腺癌患者 OS 相关性

3.4 AhR 蛋白表达与肺腺癌患者分级和淋巴结侵犯的关系

本研究的 57 例腺癌患者中，I 期患者 15 例，II 期患者 20 例，III 期患者 22 例。我们对各期腺癌患者进行 AhR 蛋白表达 IHC 评分，发现随着肿瘤分级的增加，IHC 评分亦增加。I 期患者评分最低，II 期和 III 期患者评分显著高于 I 期患者，差异具有统计学意义 (图 1-7A)。

AhR 蛋白 IHC 评分亦和腺癌患者淋巴结侵犯状态相关。29 例无淋巴结侵犯的腺癌患者评分最低，19 例 N1 淋巴结转移患者次之，9 例 N2 淋巴结转移患者最高。N1 组和 N2 组 AhR IHC 评分与 N0 组相比具有统计学差异 (图 1-7B)。

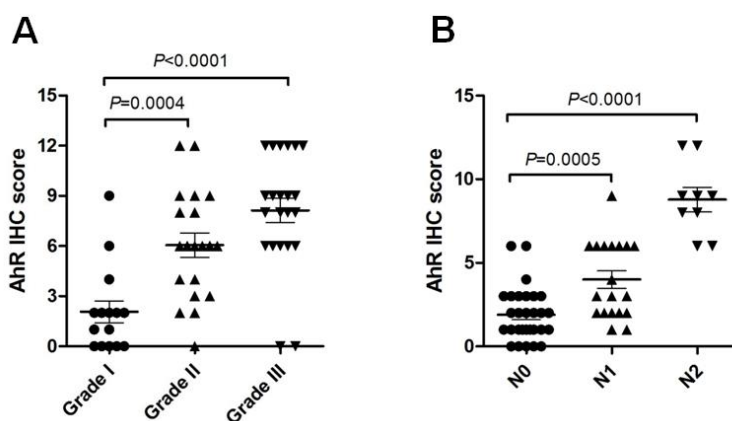


图 1-7. AhR 蛋白表达与肺腺癌患者分级 (A) 和淋巴结侵犯 (B) 相关性

3.5 AhR 蛋白作为 NSCLC 治疗靶点探究

AhR mRNA 和蛋白在 NSCLC 分级、淋巴结转移和预后的差异提示检测 AhR 蛋白表达水平更具有临床意义。AhR 作为一个癌基因，编码的蛋白是否也具有促进肿瘤细胞增殖，抑制肿瘤细胞凋亡的功能呢？为了解答这一问题，我们首先比较了 AhR 蛋白在 7 种 NSCLC 细胞系中表达水平，Western blot 结果显示 AhR 在 HCC827、PC-9、H358、H292、A549、SPC-A-1 和 H1975 细胞均有表达。我们同时检测了正常支气管上皮 Beas2B 细胞 AhR 蛋白表达水平，以此为参考，将上述 7 种 NSCLC 细胞进一步分为 AhR^{low} 和 AhR^{high} 两组。HCC827、PC-9、H358、H292 和 A549 细胞 AhR 蛋白表达水平与 Beas2B 细胞相近，归类为 AhR^{low} 细胞；SPC-A-1 和 H1975 细胞 AhR 蛋白表达水平明显高于 Beas2B 细胞，归类为 AhR^{high} 细胞（图 1-8）。



图 1-8. Western blot 检测 AhR 蛋白在 NSCLC 细胞系中表达

有意思的是 AhR^{high} 细胞不仅 AhR 表达蛋白水平较 AhR^{low} 细胞增加，前者 AhR 信号通路上其它基因表达亦增加。我们选择 PC-9 为 AhR^{low} 细胞代表，H1975 为 AhR^{high} 细胞代表，采用 qPCR 检测了两株细胞色氨酸代谢限速酶 IDO1、IDO2 和 TDO

以及 AhR 靶基因 *cyp1a1* 和 *cyp1b1* 表达, 结果显示这些基因在 H1975 细胞表达水平明显高于 PC-9 细胞 (图 1-9)。我们推测 AhR^{high} 细胞 AhR 信号通路亦处于活化状态。

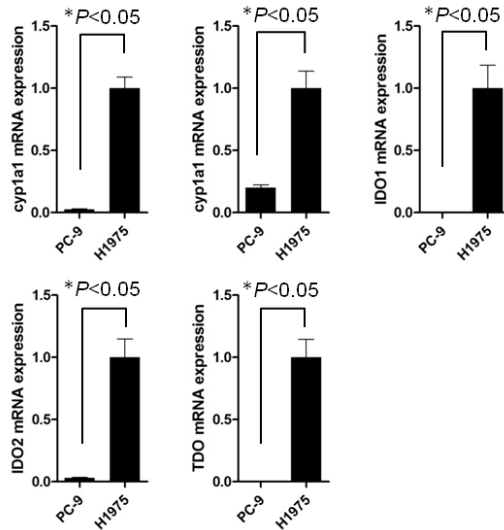


图 1-9. qPCR 检测 *cyp1a1*, *cyp1b1*, IDO1, IDO2 和 TDO 在 NSCLC PC-9 和 H1975 细胞表达水平

既然 AhR 蛋白表达水平与信号通路活化状态在 NSCLC 细胞中各异, 那么 AhR^{high} 细胞增殖是否更依赖 AhR 信号? 换言之, 能否将 AhR^{high} 细胞定义为 AhR-addicted 细胞? 我们还是选取 PC-9 和 H1975 两株细胞进行实验。由于这两株细胞都带有 EGFR 突变, 为了避免 EGFR 信号的干扰作用, 我们还选取了另一株 EGFR 野生的 AhR^{high} 细胞 SCP-A-1 用于功能学研究。我们将这三株细胞接种于 96 孔板, 给予梯度 AhR 抑制剂 α -萘黄酮 (α -Naphthoflavone, α -NF) 处理 48 h, MTT 检测细胞活力。结果显示 SCP-A-1 和 H1975 这两株高表达 AhR 蛋白的细胞对 α -NF 较敏感, 而低表达 AhR 蛋白的 PC-9 细胞对 α -NF 不敏感, 1 μ M 和 10 μ M α -NF 不能抑制 PC-9 细胞增殖 (图 1-10)。

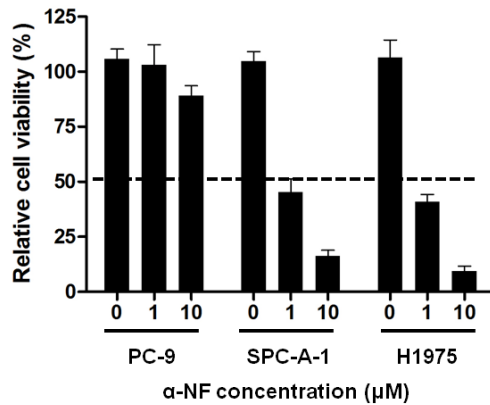


图 1-10. MTT 检测 PC-9, SPC-A-1 和 H1975 细胞 α -NF 敏感性

Western blot 得到类似结果, α -NF 不引起 PC-9 细胞 PARP 和 caspase-3 剪切, 对 EGFR 信号通路没有抑制作用; 相反, α -NF 剂量依赖地促进 SPC-A-1 细胞和 H1975 细胞凋亡。虽然 α -NF 不引起 EGFR 磷酸化水平变化, 但高浓度 α -NF 可以抑制 Akt 和 Erk 磷酸化。 α -NF 诱导凋亡, 抑制 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路的作用可能与 AhR 蛋白表达水平有关, 因为同等剂量 α -NF 处理后 H1975 细胞凋亡和信号通路受抑制程度更明显 (图 1-11)。因此, AhR 信号在 AhR^{high} 细胞增殖和抗凋亡过程中确实发挥作用, 阻断 AhR 可能抑制细胞增殖, 诱导细胞凋亡。

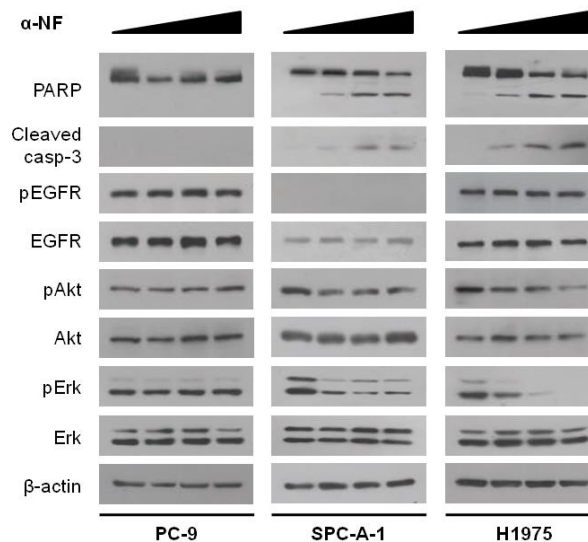


图 1-11. Western blot 检测 α -NF 诱导 PC-9, SPC-A-1 和 H1975 细胞凋亡和抑制 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路转导作用

我们继续提问：使用 AhR 配体活化 AhR 信号能否促进 AhR^{high} 细胞增殖？我们选择三种常见的 AhR 配体 TCDD、 β -萘黄酮 (β -Naphthoflavone, β -NF) 和犬尿氨酸 (Kynurenine, Kyn) 或对照溶剂作用 H1975 细胞，MTT 法在处理后第 1, 3, 5 天检测细胞在 490 nm 处吸光度，评估细胞增殖情况。AhR 配体处理后第 1 天 H1975 细胞活力与溶剂组相比不具有差异，然而从第 3 天还是至第 5 天，AhR 配体处理组细胞活力明显增高 (* $P < 0.05$)，但第 5 天时随着 AhR 配体浓度升高，细胞活力略有下降趋势，这可能和 AhR 配体自身毒性作用有关。AhR 配体促进细胞增殖的作用确实是由 AhR 受体介导的，因为 TCDD、 β -NF 和 Kyn 对 AhR^{low} PC-9 细胞增殖无促进作用 (图 1-12)。

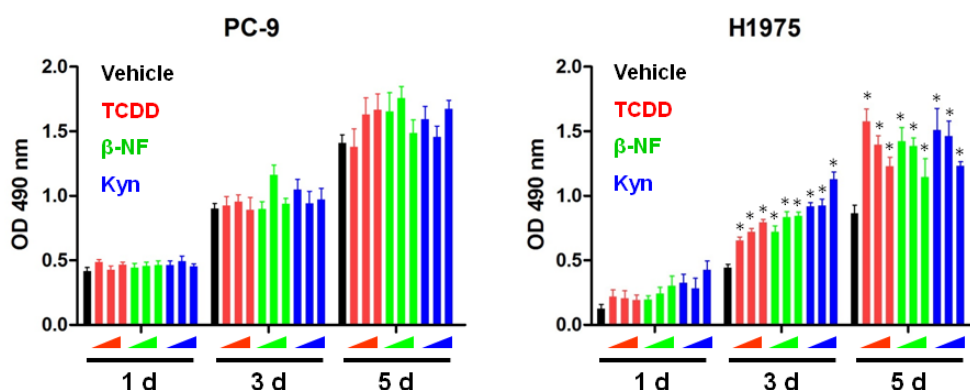


图 1-12. MTT 检测 AhR 配体对 PC-9 和 H1975 细胞增殖的作用

AhR 配体除了短期内促进 H1975 细胞增殖，长期处理亦可增加细胞活力。我们将 H1975 细胞接种于软琼脂平板，给予 β -NF 和 Kyn 处理 3-4 周，观察细胞形成软琼脂克隆的能力 (TCDD 本身具有较大的细胞毒性作用且易挥发，不适宜长期使用，故软琼脂克隆形成实验我们选择毒性较小且不易挥发的 β -NF 和 Kyn)。溶剂对照组很少有软琼脂克隆形成，而 β -NF 和 Kyn 处理组克隆数目明显增加，且体积略有增大，说明活化 AhR 信号在短时程和长时程内均能促进 AhR^{high} 细胞增殖 (图 1-13)。

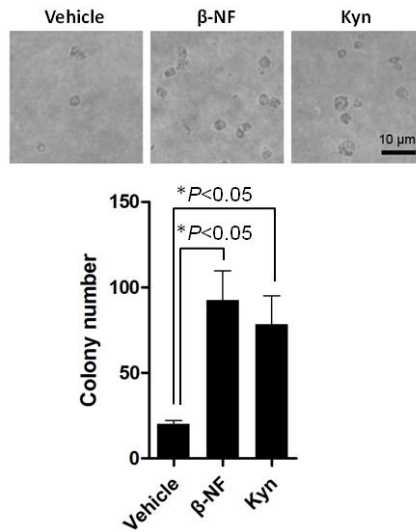


图 1-13. AhR 配体促进 H1975 细胞软琼脂克隆形成

4 讨论

本部分研究首先阐明了 AhR 与 NSCLC 肿瘤级别、淋巴结侵犯和预后的关系。我们从 TCGA 数据库入手,发现 AhR mRNA 在 NSCLC 高表达,这可能与 AhR 基因扩增有关。然而 AhR 在 mRNA 水平表达增加并不意味着患者肿瘤级别越高,淋巴结侵犯越明显,患者生存时间越短。相反,组织芯片结果提示 AhR 蛋白的高表达预示患者预后不良,Western blot 检测 NSCLC 组织病灶和淋巴结转移灶发现后者 AhR 蛋白表达水平进一步增加,这种 mRNA 和蛋白水平不相符的现象还见于 ER、HER2、INK4a 和 c-Myc 等癌基因,提示检测癌基因在蛋白水平的表达更有临床意义^[164-166]。

AhR 蛋白在 NSCLC HCC827、PC-9、H358、H292、A549、SPC-A-1 和 H1975 细胞中均有表达,其中 SPC-A-1 和 H1975 细胞表达水平较高,归类 AhR^{high} 细胞,其余细胞归类为 AhR^{low} 细胞。我们推测 AhR^{high} 细胞更加依赖 AhR 信号通路,或者可以将其理解为 AhR 驱动的 NSCLC 细胞,抑制 AhR 信号可能选择性杀伤 AhR-addicted NSCLC 细胞。我们用 AhR 抑制剂 α -NF 处理低表达内源性 AhR 的 PC-9 细胞和高表达内源性 AhR 的 SPC-A-1 和 H1975 细胞,MTT 检测细胞增殖和活力。 α -NF 也是一种 PAH,但与 AhR 结合形成的 α -NF-AhR 复合物对 DNA 亲和力下降,AhR 转录活性受到抑制,所以经常用作 AhR 信号通路抑制剂,其同系物 β -NF 与 AhR 结合激活下游靶基因表达,用于研究 AhR 信号通路各类效应^[167,168]。随着 α -NF 浓度

增加, SPC-A-1 和 H1975 细胞活力降低, 1 μM $\alpha\text{-NF}$ 即可抑制 50% 以上细胞增殖, Western blot 显示细胞凋亡增加, PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号被抑制, PARP 和 caspase-3 剪切片段增多; PC-9 细胞对 $\alpha\text{-NF}$ 处理不敏感, 即使 10 μM $\alpha\text{-NF}$ 也不能抑制其增殖, 梯度 $\alpha\text{-NF}$ 处理 48 h 亦不能诱导其凋亡, PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号不被抑制, 说明 $\alpha\text{-NF}$ 的细胞毒性作用具有选择性, 仅能抑制 AhR^{high} 细胞增殖, 诱导 AhR^{high} 细胞凋亡, 抑制 AhR^{high} 细胞 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路。需要注意的是 $\alpha\text{-NF}$ 的细胞毒性作用并不通过 EGFR, 因为不论 EGFR 是否突变 $\alpha\text{-NF}$ 均能诱导 AhR^{high} 细胞凋亡。在相同剂量和相同时间 $\alpha\text{-NF}$ 处理条件下, H1975 细胞凋亡程度比 SPC-A-1 细胞更明显, Akt 和 Erk 磷酸化水平被抑制程度更高, 这与 H1975 细胞内源性 AhR 蛋白表达高于 SPC-A-1 细胞的结论一致, 提示 AhR 可能作为驱动基因促进 NSCLC 细胞增殖, 抑制 AhR 信号可以诱导 AhR-addicted NSCLC 细胞凋亡。

AhR 可能作为 NSCLC 驱动基因还体现在 AhR 配体促进 NSCLC 细胞增殖。前文提到 PAH 等环境污染物是 AhR 外源性配体, 但即使在无 PAH 暴露的个体亦可检测到 AhR 信号通路持续活化, 实验室培养的细胞不加 PAH 处理 *cyp1a1* 和 *cyp1b1* 等 AhR 下游靶基因亦持续表达, 提示可能存在 AhR 内源性配体。科学家在过去的四十余年中一直致力于寻找 AhR 内源性配体, 这方面研究标志性成果是德国海德堡大学 Christiane Opitz 发现色氨酸 (tryptophan, Trp) 代谢产物 Kyn 活化 AhR 信号通路^[169]。体内 95% 以上 Trp 被吲哚胺双加氧酶 (indoleamine-2,3-dioxygenases 1 and 2, IDO1/2) 和色氨酸双加氧酶 (tryptophan-2,3-dioxygenase, TDO) 代谢为 Kyn, Kyn 进一步羟化水解后生成尼克酰胺、吡啶羧酸和犬尿喹啉酸, 后者和尿色素发色团有密切联系; 很少部分 Trp 经色氨酸羟化酶催化生成 5-羟色胺, 作为神经递质调节情绪^[170]。Trp 代谢为 Kyn 的限速酶是 IDO1/2 和 TDO, 生理情况下前者广泛表达于肝脏以外组织细胞而后者主要表达于肝细胞。肿瘤细胞 IDO1/2 和 TDO 表达水平明显增加, 患者血液中 Kyn 含量也高于健康人, 导致 AhR 信号通路持续活化。AhR^{high} H1975 细胞 IDO1、IDO2 和 TDO 表达水平亦高于 AhR^{low} PC-9 细胞, 使 H1975 细胞可以产生更多 Kyn 活化 IDO/TDO-Kyn-AhR 信号通路, 诱导 *cyp1a1* 和 *cyp1b1* 等靶基因表达, 驱动细胞增殖。我们还发现 AhR 配体促进细胞增殖的作用必须依赖 AhR, H1975 细胞 TCDD、 $\beta\text{-NF}$ 和 Kyn 处理后 3 天, 细胞活力明显高于溶剂对照组, 且细胞活力与 TCDD、 $\beta\text{-NF}$ 和 Kyn 浓度呈正比; AhR 配体处理组第 5 天细胞活力仍高于溶剂对照

组,但随着配体浓度增加细胞活力略有下降,这可能与 AhR 配体自身毒性和 AhR 信号通路持续性活化的毒理作用有关。TCDD、 β -NF 和 Kyn 并不增加 PC-9 细胞活力,各 AhR 配体处理组吸光度值与溶剂对照组没有差异。AhR 信号通路活化不仅在短时间内促进细胞增殖,还可以在长时间内增加细胞活力,促进 H1975 细胞在软琼脂上形成克隆。

综上所述,第一部分研究内容强烈提示 AhR 信号通路的促癌作用,高表达 AhR 蛋白 NSCLC 恶性程度更高、侵袭转移能力越强、患者预后越差。AhR^{high} NSCLC 细胞更加依赖 AhR 信号,AhR 配体促进 AhR^{high} NSCLC 细胞增殖,AhR 抑制剂诱导 AhR^{high} NSCLC 细胞凋亡,提示 AhR 可能作为 AhR-addicted NSCLC 治疗靶点。

第二部分 抑制 AhR 增敏 EGFR TKIs

1 实验材料

1.1 细胞

H1975	购自 ATCC
HEK293	购自上海细胞库

1.2 动物

裸鼠	第四军医大学实验动物中心
----	--------------

1.3 载体和质粒

pLKO.1-puro	Invitrogen 公司
pSingle-tTS-shRNA	Clontech 公司

1.4 试剂

RPMI 1640 培养基	Hyclone 公司
DMEM 培养基	Hyclone 公司
胰酶	Hyclone 公司
胎牛血清 FBS	Gibco 公司
Dox-system approved FBS	Clontech 公司
青霉素/链霉素溶液	Hyclone 公司
胰蛋白胨	OXOID 公司
酵母提取物	OXOID 公司
琼脂粉	科昊生物工程有限责任公司
嘌呤霉素 Puromycin	Sigma 公司
强力霉素 Doxycycline	Sigma 公司
G418	MP Biomedicals 公司

Afatinib	Selleck 公司
α -NF	Selleck 公司
TUNEL 试剂盒	Roche 公司
RIPA 裂解液	碧云天生物技术研究所以
蛋白酶/磷酸酶抑制剂 Cocktail	Roche 公司
BCA 蛋白定量试剂盒	Takara 公司
5 \times loading buffer	碧云天生物技术研究所以
Tris	MP Biomedicals 公司
甘氨酸	MP Biomedicals 公司
SDS	MP Biomedicals 公司
丙烯酰胺	MP Biomedicals 公司
甲双叉丙烯酰胺	碧云天生物技术研究所以
过硫酸铵	碧云天生物技术研究所以
TMEMD	MP Biomedicals 公司
甲醇	天津市富宇精细化工有限公司
预染蛋白 marker	Fermentas 公司
硝酸纤维素膜 (NC 膜)	Millipore 公司
Tween 20	科昊生物工程有限责任公司
BSA	MP Biomedicals 公司
兔抗 AhR 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 PARP 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 Cleaved caspase-3 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 pEGFR 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 EGFR 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 pAkt 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 Akt 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 pErk 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 Erk 抗体	Cell Signaling Technology 公司

小鼠抗 β -actin 抗体	Sigma 公司
HRP 标记抗兔 IgG	Cell Signaling Technology 公司
HRP 标记抗小鼠 IgG	Cell Signaling Technology 公司
ECL 发光试剂盒	Millipore 公司
显影粉	科昊生物工程有限责任公司
定影粉	科昊生物工程有限责任公司
胶片	Canon 公司

1.5 设备和耗材

超净工作台	Yatai Kelong 公司
细胞 CO ₂ 培养箱	Thermo 公司
细胞培养皿	Thermo 公司
移液器	Gilson 公司
负压吸引器	其林贝尔仪器制造有限公司
高压灭菌锅	TOMY 公司
电子天平	上海良平仪器仪表有限公司
磁力搅拌器	上海司乐仪器有限公司
纯水仪	Millipore 公司
SDS-PAGE 电泳槽	Tanon 公司
SDS-PAGE 转膜槽	Tanon 公司
激光共聚焦显微镜	Nikon 公司

2 实验方法

2.1. AhR shRNA 构建

2.1.1 shRNA 质粒构建

慢病毒是实现基因稳定上调或下调表达的有效手段，我们希望稳定下调 AhR^{high} H1975 细胞 AhR 表达，于是构建 AhR shRNA 质粒和 GFP shRNA 对照质粒，骨架载体 pLKO.1-puro 图谱见图 2-1。

GFP	CCGGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTCGAGATGAACTTCAGGGTC
shRNA	AGCTTGCTTTTTT
AhR	CCGGATCCACAGTCAGCCATAATAACTCGAGTTATTATGGCTGACTGTG
shRNA.1	GATTTTTTGG
AhR	CCGGCGGCATAGAGACCGACTTAATCTCGAGATTAAGTCGGTCTCTAT
shRNA.2	GCCGTTTTT

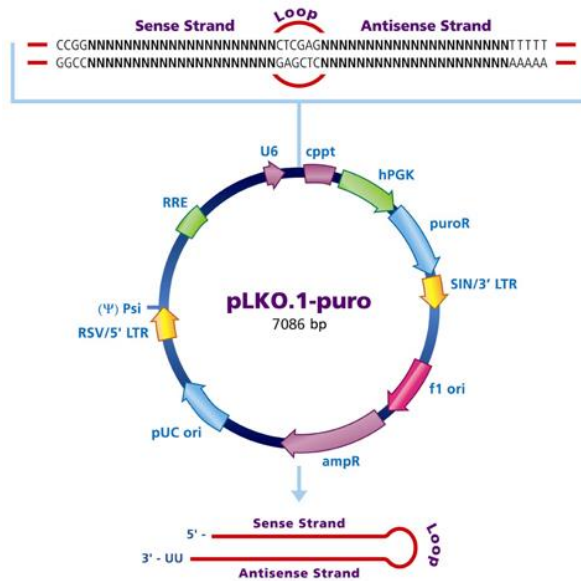


图 2-1. pLKO.1-puro shRNA 质粒图谱

2.1.2 转化

将外源性 DNA 导入感受态细胞的过程叫做转化。常用的感受态细胞有 DH5 α 、Top10 和 Stb13 大肠杆菌，前两者适合非病毒载体转化，pLKO.1-puro shRNA 是病毒载体，我们选择 Stb13 感受态细胞用于转化。

-80 $^{\circ}$ C 冰箱中取出 Stb13 感受态细胞，冰上融化，吸取 10 μ l 退火产物加入到装有感受态细胞的 EP 管中，轻弹管壁使之混合，冰上静置 30 min；打开水浴锅，调节水温 42 $^{\circ}$ C，将 EP 管放入水浴锅内，热休克 90 sec，重新置于冰上；超净台中打开 EP 管盖，加入 1 ml 无抗性 LB 培养液，调节转速 110 rpm，37 $^{\circ}$ C 摇床上孵育 45 min。LB 培养基配方如下：

胰蛋白胨	10 g
酵母提取物	5 g
NaCl	5 g

调节 pH 7.2, 定容至 1 L

2.1.3 涂菌

将 EP 管重摇床上取出, 5000 rpm 室温离心 2 min, 吸弃上清, 管中留下 100 μ l LB 培养液用于重悬细菌; 预热的青霉素 (Amp) 抗性 LB 琼脂平板上倒入少许无菌涂菌珠, 重悬的菌液均匀涂布于涂菌珠上, 盖好 LB 琼脂平板, 超净台内水平晃动平板, 使菌液均匀分布于 LB 琼脂平板, 将平板倒置, 放入 37 $^{\circ}$ C 生化培养箱过夜培养。Amp 抗性 LB 琼脂平板配方如下:

胰蛋白胨	10 g
酵母提取物	5 g
NaCl	5 g
琼脂粉	30 g
Amp	100 mg

调节 pH 7.2, 定容至 1 L

2.1.4 挑克隆摇菌

待 LB 琼脂平板上长出肉眼可见菌落时取出, 超净台中用无菌 10 μ l 枪头尖端挑取 3-5 个克隆, 放入 5 ml Amp 抗性 LB 培养液中, 盖好菌种管盖子, 调节转速 220 rpm, 37 $^{\circ}$ C 摇床上孵育 8-12 h。

注意事项: 挑取克隆时最好选择中等大小的菌落, 过大和过小的菌落提取质粒的浓度和纯度通常不高。

2.1.5 质粒提取

采用天根质粒小提试剂盒提取质粒的大致步骤如下:

- (1) 吸附柱 CP3 中加入 500 μ l 平衡液 BL, 12000 rpm 离心 1 min, 倒掉废液, 吸附柱 CP3 放回收集管中。
- (2) 取 5 ml 菌液 12000 rpm 离心 1 min, 倒掉上清。250 μ l 溶液 P1 重悬离心管底部的菌体沉淀, 充分吹打均匀直至无明显团块。
- (3) 离心管中加入 250 μ l 溶液 P2, 轻柔上下颠倒 10 次混匀。
- (4) 离心管中加入 350 μ l 溶液 P3, 轻柔上下颠倒 10 次混匀, 12000 rpm 离心 10 min。
- (5) 将上述所得上清加入吸附柱 CP3 中, 12000 rpm 离心 1 min, 倒掉废液, 吸附柱 CP3 放回收集管中。
- (6) 吸附柱 CP3 中加入 500 μ l 溶液 PD, 12000 rpm 离心 1 min, 倒掉废液, 吸附柱 CP3 放回收集管中。
- (7) 吸附柱 CP3 中加入 600 μ l 漂洗液 PW, 12000 rpm 离心 1 min, 倒掉废液, 吸附柱 CP3 放回收集管中。
- (8) 重复操作步骤 7。
- (9) 吸附柱 CP3 放回收集管中, 12000 rpm 离心 2 min, 倒掉废液, 空气干燥 5 min。
- (10) 吸附柱 CP3 放入新的收集管中, 向吸附膜中央滴加 50 – 100 μ l 洗脱缓冲液 EB, 室温放置 2 min, 12000 rpm 离心 2 min, 收集管中所得液体即为质粒 DNA。
Nanodrop 2000 测定质粒浓度和纯度, 做好标记备用。

2.1.7 测序

质粒交给公司用 U6 promoter 进行 Sanger 测序, 测序引物序列 ATGGACTATCATATGCTTACCGTA。

2.2 AhR shRNA 慢病毒包装

慢病毒包装的原理是将干扰质粒和包装质粒共转 HEK293 细胞, 质粒表达后在细胞内完成病毒复制和包装过程, 最终释放到细胞外, 以病毒颗粒形式存在于细胞培养液中。我们采取这种方式获取 shRNA 慢病毒, 简要步骤如下:

- (1) HEK293 细胞培养: 从液氮中取出 HEK293 细胞, 细胞复苏和培养步骤如前述, 细胞转染前一天换液。
- (2) 质粒和脂质体准备: 细胞超净台中准备 2 个 EP 管, 各加入 500 μ l Opti-MEM

培养液。其中一管中加入 4 μg shRNA 干扰质粒、3 μg psPAX2 和 1 μg pMD2.G 包装质粒，另一管加入 20 μl lipofectamine 2000。

- (3) DNA 脂质体复合物形成：将两管液体混合，轻弹管壁使质粒和脂质体混匀，室温孵育 5 min。
- (4) 细胞转染：将上述混合物逐滴滴加到 HEK293 细胞培养液中，轻轻晃动培养皿使其与培养液充分混合，细胞放入培养箱中培养 4–6 h 换液。
- (5) 慢病毒获取：换液后 48 h 达到出毒高峰，此时收集细胞上清，培养皿中添加 3–4 ml 培养液继续培养 24 h，再次收集细胞上清。将两次收集的细胞上清混合，2000 rpm 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min，0.45 μm 滤膜过滤，病毒液用 2 ml EP 管分装，-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。
- (6) 注意事项：shRNA 慢病毒的本质是 HIV，虽然包装质粒 psPAX2 和 pMD2.G 经过改造不再具有自主复制能力，但仍有潜在感染人体风险。为确保实验者安全，涉及慢病毒的全部操作需在生物安全柜完成，接触过病毒液的培养皿、枪头、EP 管等耗材务必定点存放，经次氯酸钠溶液处理后才能收集丢弃；HEK293 细胞贴壁不牢固，转染时需要轻柔操作，以免细胞受到震荡；转染前需要调整 HEK293 细胞至最佳状态，活力低的细胞出毒效果通常不好；病毒液要避免反复冻融，以免降低病毒活性。

2.3 稳转细胞筛选

细胞按 5000 - 10000 个/孔密度接种于 6 孔板。冰上融化病毒液。在生物安全柜中将病毒液和细胞培养液 1: 1 混合加入 6 孔板中感染细胞，加入终浓度为 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ polybrene 中和细胞表面电荷，2000 rpm 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 6 孔板 5 min。感染后 48 h 吸弃病毒液，使用含有 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ puromycin 培养液培养细胞 1 周，可见筛选后仍有部分细胞存活，扩大培养这部分细胞，Western blot 鉴定细胞蛋白表达水平。

2.4 可诱导 AhR shRNA 构建和表达

AhR 干扰片段酶切连接到 pSingle-tTS-shRNA 载体，经上述转化、涂菌、挑克隆、摇菌、质粒提取和测序等步骤，获得 pSingle-tTS-AhR shRNA 质粒（图 2-2）。

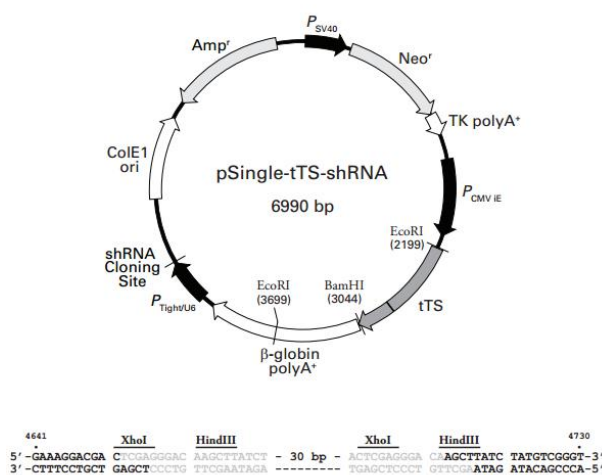


图 2-2. pSingle-tTS-shRNA 质粒图谱

pSingle-tTS-shRNA 和 pLKO.1-puro shRNA 最大的不同之处在于前者必须在强力霉素 Doxycycline (Dox) 诱导下才能表达干扰序列，可以人为“定时”下调目的基因表达。我们将 pSingle-tTS-AhR shRNA 质粒转染细胞，利用载体上自带的 Neo^r 抗性基因 G418 筛选获得稳转细胞，1 μg/ml Dox 诱导 shRNA 表达，Western blot 检测目的基因干扰效率。

2.5 MTT 实验

见前述。

2.6 Western blot

见前述。

2.7 裸鼠荷瘤实验

通过第四军医大学动物伦理委员会同意审批后，我们用裸鼠在体内评估抑制 AhR 信号增敏 EGFR TKIs 的作用。培养 H1975 GFP shRNA 和 AhR shRNA.1 细胞，胰酶消化传代，血细胞板计数。调整细胞密度至 2×10^7 个/ml，取 100 μl 细胞悬液与等体积 Matrigel 混匀置于冰上。75%乙醇溶液消毒 4–6 周龄裸鼠皮肤，使用 1 ml 注射器

将 200 μ l 细胞 Matrigel 混合液注射至裸鼠皮下，注射部位选择在裸鼠后肢背侧较容易操作，注射完毕留针 30 sec，以免液体溢出，再次消毒背部皮肤，裸鼠送回 SPF 级动物房饲养。

注射后约 2 周可见绿豆大小瘤体。H1975 GFP shRNA 组裸鼠随机分为两组，每组 6 只，分别给予 Afatinib 100 mg/kg 灌胃或等体积溶剂灌胃处理，每天灌胃一次。H1975 AhR shRNA.1 组裸鼠亦随机分为两组，每组 6 只，给予 Afatinib 或溶剂灌胃。每 3 天测量一次裸鼠背部瘤块大小，灌胃处理 3 周后 CO₂ 麻醉处死裸鼠，剥离瘤体，4% 多聚甲醛固定。

2.8 TUNEL 染色检测凋亡

细胞在凋亡早期 DNA 断裂形成 3'-OH 端，生物素标记的 dUTP 在脱氧核糖核苷酸末端转移酶 (TdT Enzyme) 催化下与 3'-OH 端结合，卵白素标记的 FITC 再与生物素结合，荧光显微镜下可以准确定位凋亡细胞。我们使用 Roche 公司 TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 试剂盒原位检测荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡，大致步骤如下：

- (1) 石蜡包埋、切片、烤片、脱蜡见前述。
- (2) 1% Triton X-100 溶液室温打孔 5 min，PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。
- (3) Proteinase K 工作液室温孵育切片 30 min，PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。
- (4) TdT 酶反应液避光孵育切片 1 h，PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。
- (5) 卵白素 FITC 工作液避光孵育切片 30 min，PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。
- (6) 荧光封片剂封片，共聚焦显微镜拍照。

3 结果

3.1 shRNA 稳定下调 H1975 细胞 AhR 表达

为了鉴定我们构建的 shRNA 下调 AhR 表达的效率，我们包装制备 AhR shRNA 慢病毒并感染高表达内源性 AhR 蛋白的 H1975 细胞，经 puromycin 筛选获得 H1975 AhR shRNA.1 和 AhR shRNA.2 两株稳转细胞，Western blot 检测 AhR 蛋白表达变化

(图 2-3)。GFP shRNA 用于慢病毒对照。结果显示 H1975 AhR shRNA.1 和 AhR shRNA.2 两株细胞 AhR 蛋白表达水平明显下降，而 H1975 GFP shRNA 细胞 AhR 蛋白表达不受影响，说明我们构建的 shRNA 有效抑制目的基因表达。

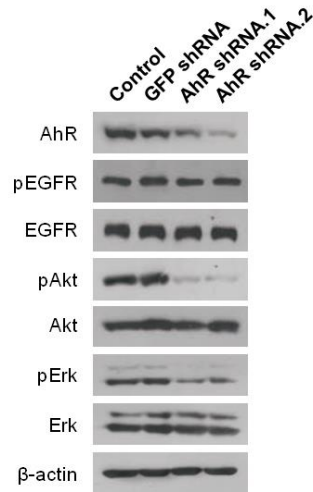


图 2-3. Western blot 检测 shRNA 下调 H1975 细胞 AhR 表达

H1975 细胞不仅高表达 AhR，它还一株 EGFR L858R/T790M 突变的肺腺癌细胞。之前已经有大量文献报道该细胞增殖和凋亡依赖 EGFR 信号，那么抑制 AhR 蛋白表达是否影响 EGFR 信号呢？我们比较了正常 H1975 细胞，GFP shRNA 对照细胞和两株 AhR shRNA 细胞 EGFR 信号通路上关键分子的表达，Western blot 显示下调 AhR 不影响 EGFR 磷酸化，但是 Akt 和 Erk 磷酸化水平受到明显抑制（图 2-3）。这与我们在第一部分实验中观察到的 AhR 抑制剂 α -NF 剂量依赖地抑制 SPC-A-1 和 H1975 细胞 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号转导结果一致，说明 α -NF 的药理作用是通过抑制 AhR 实现的。我们推测 AhR 信号与 EGFR 没有直接作用，但与其下游的 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号存在联系。

3.2 下调 AhR 表达抑制 H1975 细胞增殖

既然 AhR shRNA 抑制 H1975 细胞 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号转导，后者又是细胞增殖的关键信号，下调 AhR 是否抑制 H1975 细胞增殖呢？我们通过 MTT 实验测定细胞活力，发现 GFP shRNA 对照细胞活力与正常 H1975 细胞相当，而 AhR shRNA 细胞增殖受到显著抑制，两株细胞活力只有 GFP shRNA 对照细胞 60% – 70%，证明

AhR 促进细胞增殖，下调 AhR 表达后细胞增殖受抑（图 2-4）。

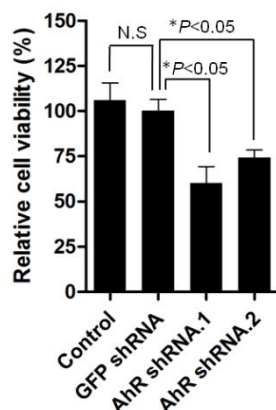


图 2-4. 下调 AhR 表达抑制 H1975 细胞增殖

3.3 条件性下调 AhR 表达诱导 H1975 细胞凋亡

PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号与细胞凋亡关系非常密切，我们推测下调 AhR 抑制 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号，有可能导致细胞凋亡。Western blot 检测 H1975 AhR shRNA.1 和 AhR shRNA.2 稳转细胞确实发现 PARP 蛋白剪切，说明细胞发生凋亡，但对照细胞 GFP shRNA 也检测到 PARP 剪切片段，我们考虑是 puromycin 本身具有较强的细胞毒性作用，筛选过程中就会诱导细胞凋亡，这样就无法反应凋亡是 AhR 表达抑制引起的还是 puromycin 药物毒性引起的。为了最大程度降低凋亡背景信号，我们构建了强力霉素 Doxycycline (Dox) 诱导的 pSingle-tTS-AhR shRNA，将 pSingle-tTS-AhR shRNA 和对照 pSingle-tTS-GFP shRNA 转染 H1975 细胞，利用载体骨架上携带的 G418 抗性基因筛选稳转细胞株。稳转细胞在 Dox 处理后表达 AhR shRNA 或 GFP shRNA，抑制相关基因表达。需要指出的是操作 Dox 可诱导系统时必须使用 Dox-system approved FBS，因为牛饲料中一般都添加了 Dox 成分，普通 FBS 中有少量 Dox 会造成 shRNA linkage（即不加 Dox 情况下 shRNA 也有表达），Dox-system approved FBS 经过纯化处理，不含有内源性 Dox，可以避免 linkage 现象。

在 Dox 诱导条件下 AhR 蛋白表达减少，但 pSingle-tTS-GFP shRNA 组细胞 AhR 蛋白表达不受影响，说明干扰序列特异性识别 AhR 基因。Dox 诱导后 AhR 下调组细胞凋亡，PARP 片段化而 GFP 对照组 PARP 不发生变化。因此，AhR 下调直接引起 H1975 细胞凋亡（图 2-5）。

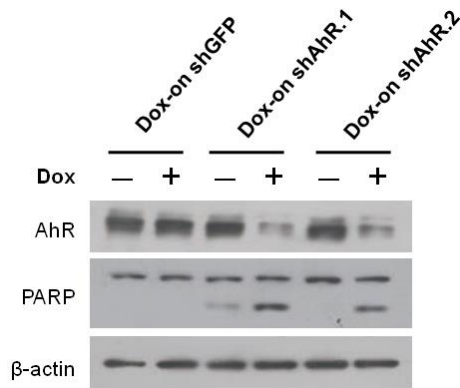


图 2-5. 条件性下调 AhR 表达诱导 H1975 细胞凋亡

3.4 AhR 抑制剂体外增敏 EGFR TKIs

上述结果提示 H1975 细胞依赖 EGFR 和 AhR 两条信号通路，我们推测同时抑制 EGFR 和 AhR 两条信号可以更有效杀伤 H1975 细胞。Western blot 结果显示 EGFR TKIs Afatinib 和 AhR 抑制剂 α -NF 单独使用即可诱导 H1975 细胞凋亡。前者通过抑制 EGFR 磷酸化抑制下游 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路，后者不经 EGFR 抑制 Akt 和 Erk 磷酸化，说明 Afatinib 和 α -NF 作用的靶点不同。当两药联用时细胞凋亡最明显，PARP 和 caspase-3 剪切更多，PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路被完全阻断（图 2-6）。

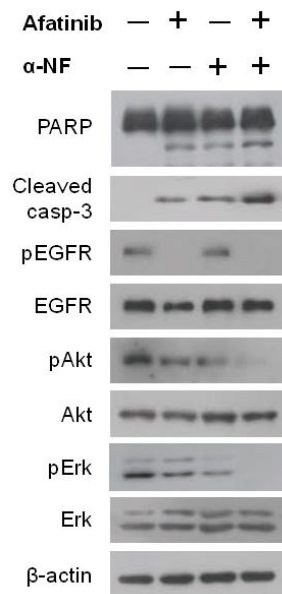


图 2-6. α -NF 增敏 H1975 细胞 Afatinib 敏感性

3.5 AhR shRNA 体外增敏 EGFR TKIs

H1975 GFP shRNA 对照细胞经梯度 Afatinib (0, 0.1, 0.5, 1 μM) 处理 24 h, EGFR 磷酸化被完全阻断, 但下游 Akt 和 Erk 磷酸化并未消失; Afatinib 亦阻断 H1975 AhR shRNA.1 细胞和 AhR shRNA.2 细胞 EGFR 磷酸化, 与 GFP shRNA 对照细胞不同的是下调 AhR 的 H1975 细胞在 Afatinib 处理后下游 Akt 和 Erk 磷酸化被完全阻断。我们有理由相信 EGFR 和 AhR 在两个水平调控 H1975 细胞 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号, 阻断 AhR 信号通路可以增敏 EGFR TKIs (图 2-7)。

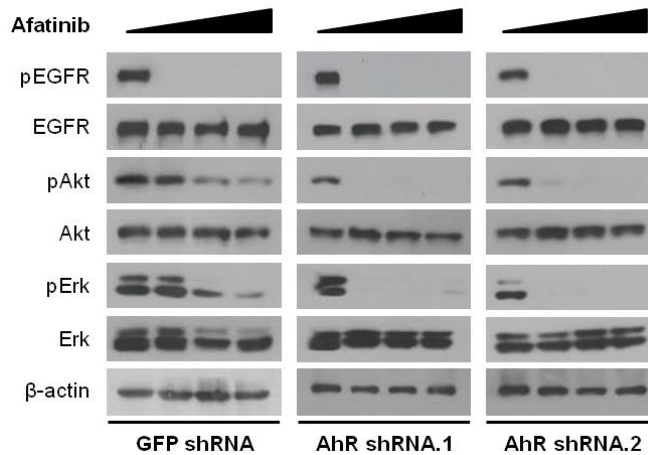


图 2-7. Western blot 检测 shRNA 下调 AhR 增敏 H1975 细胞 Afatinib 敏感性

3.6 AhR shRNA 体内增敏 EGFR TKIs

最后, 我们在裸鼠体内评估了抑制 AhR 信号通路增加 EGFR TKIs 的作用。α-NF 对正常细胞有毒性作用, 因此这部分实验我们通过 shRNA 稳定下调 AhR 信号通路。我们将下调表达的 H1975 AhR shRNA.1 细胞和对照 H1975 GFP shRNA 细胞注射到裸鼠皮下, 建立荷瘤小鼠模型, 给予 Afatinib 或溶剂灌胃处理, 记录瘤体大小变化 (图 2-8)。

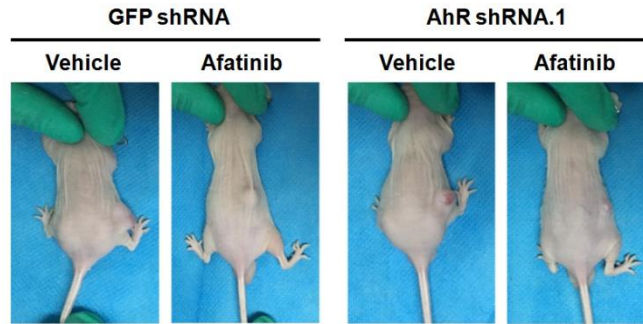


图 2-8. 裸鼠荷瘤实验体内评估下调 AhR 增敏 H1975 细胞 Afatinib 敏感性作用

我们每 3 天测量一次瘤体大小,连续监测了 21 天,发现 Afatinib 可以抑制 H1975 GFP shRNA 细胞在体内生长。与溶剂对照组相比, Afatinib 在观察终点显著抑制瘤体体积,但不能让肿瘤消失。Afatinib 在 H1975 AhR shRNA.1 荷瘤小鼠也显著抑制瘤体体积,但在第 21 天瘤体几乎消失,说明 H1975 AhR shRNA.1 瘤体对 Afatinib 更敏感(图 2-9)。

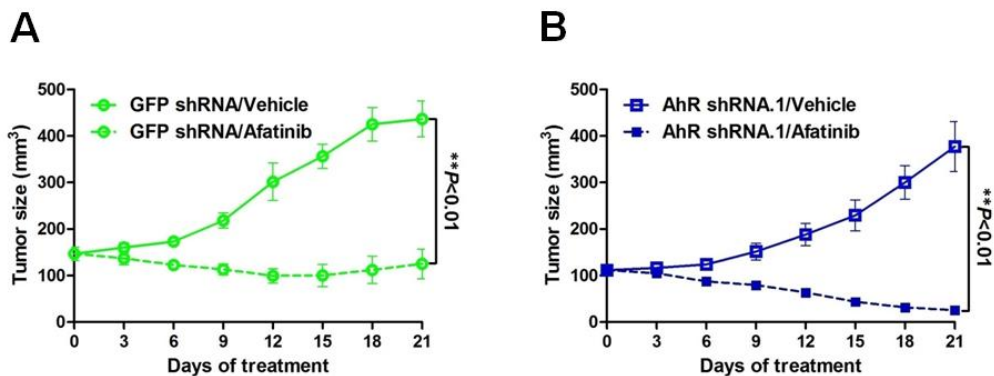


图 2-9. H1975 GFP shRNA 细胞和 H1975 AhR shRNA.1 细胞裸鼠体内生长曲线

我们用 TUNEL 染色原位检测荷瘤小鼠细胞凋亡情况, GFP shRNA 和 AhR shRNA.1 细胞在溶剂处理组很少发生凋亡, TUNEL 阳性细胞数目很少。Afatinib 处理后 GFP shRNA 细胞凋亡增加, TUNEL 阳性细胞数增多; 而 AhR shRNA.1 组 Afatinib 处理后细胞凋亡比例更高, TUNEL 阳性细胞数比 GFP shRNA 组更多, 提示抑制 AhR 在体内体外均能增敏 EGFR TKIs (图 2-10)。

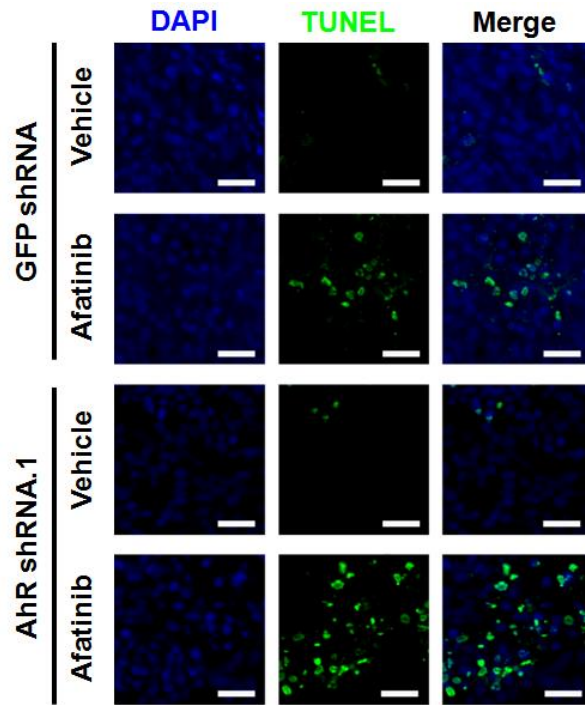


图 2-10. TUNEL 染色检测 H1975 GFP shRNA 和 H1975 AhR shRNA.1 细胞凋亡

4 讨论

本部分研究主要从分子水平抑制 AhR 表达并在体内评估下调 AhR 对 TKIs 敏感性的影响。我们设计的 2 对 shRNA 有效下调 H1975 细胞 AhR 蛋白表达，抑制率 > 50%。MTT 结果显示 H1975 AhR shRNA 细胞增殖受抑，细胞活力降低，这与我们之前观察到的 α -NF 抑制 H1975 细胞增殖的结论一致。除了直接抑制 AhR，抑制 AhR 内源性配体 Kyn 的产生亦能发挥抗肿瘤作用。前文已经提到 IDO 和 TDO 催化 Trp 代谢为 Kyn 是内源性 AhR 信号重要来源，IDO 和 TDO 抑制剂阻断 Kyn 合成，故也可作为抗肿瘤治疗靶点^[171]。研究表明高表达 IDO 和 TDO 提示患者预后不良和化疗耐药，肿瘤细胞免疫微环境失调，T 细胞和树突状细胞功能受抑^[172]；IDO 抑制剂和 TDO 抑制剂减弱 AhR 信号免疫抑制作用，一定程度上恢复抗肿瘤免疫效应和化疗敏感性，目前 ClinicalTrials.gov 网站有 15 项注册的 IDO/TDO 抑制剂和疫苗用于肿瘤治疗的 I/II 期临床试验，课题组将持续关注研究进展。

本部分研究还提示 AhR^{high} H1975 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 细胞增殖信号至少有 EGFR 和 AhR 两个来源，这也揭示了为何 H1975 细胞对 Afatinib 单药处理相对不敏

感以及为何 T790M 突变 NSCLC 患者不能从 Afatinib 治疗长期获益^[173]，因此 EGFR TKIs 联合 AhR 抑制剂才能有效杀伤耐药细胞。细胞学实验显示 Afatinib 和 α -NF 对 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号有一定抑制作用，两者联合处理 H1975 细胞 24 h，Akt 和 Erk 磷酸化被完全阻断，细胞凋亡明显增加。裸鼠体内实验亦提示同时抑制 EGFR 和 AhR 诱导 H1975 细胞凋亡的作用，与 GFP shRNA 对照组裸鼠相比，AhR shRNA.1 组裸鼠 Afatinib 灌胃后 TUNEL 阳性细胞数显著增加，瘤体体积开始缩小时间更早，观察终点瘤体几乎消失。故我们推测可以给予 EGFR 突变的 AhR^{high} NSCLC 患者 TKIs 和 α -NF 联合治疗，充分阻断肿瘤细胞 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路，诱导 TKIs 耐药细胞凋亡，克服 EGFR TKIs 耐药性。

我们尚不能明确肿瘤细胞何时产生 AhR 信号依赖性与依赖程度。结合目前主流观点，AhR 在耐药细胞表达增加很有可能是肿瘤异质性和进化的结果，即最开始实体瘤内部就有很少量高表达 AhR 的细胞克隆，TKIs 杀伤大部分敏感细胞，这些 AhR^{high} 克隆逐渐扩增成为主要克隆，最终表现为耐药后肿瘤细胞 AhR 蛋白表达增加；另一方面，虽然突变的 EGFR 主导了 NSCLC 细胞各项重要生命活动，但不能排除 AhR 信号在某些特定的细胞功能上有重要作用，肿瘤细胞在 TKIs 压力筛选下从 EGFR-addicted NSCLC 进化为 EGFR/AhR-addicted NSCLC，最终对 EGFR TKIs 单药处理耐受，此时联合 EGFR TKIs 和 AhR 抑制剂可以诱导 EGFR/AhR-addicted NSCLC 凋亡。如果这个假设存在，AhR 蛋白不仅能作为逆转耐药的治疗靶点，还可以作为预测 TKIs 有效性的 biomarker，若 AhR 在治疗前的标本低表达，患者可以从靶向治疗获益，若 AhR 在治疗前的标本高表达，患者很有可能短期内耐药，不能持久获益，需要联合 AhR 抑制剂进一步治疗。

综上所述，本部分研究提示 AhR 是逆转 NSCLC EGFR TKIs 耐药的潜在靶点，shRNA 下调 AhR 表达可以诱导 AhR^{high} 细胞凋亡，EGFR TKIs 联合 AhR 抑制剂可以阻断耐药细胞 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路，恢复 TKIs 敏感性，检测 AhR 蛋白表达水平可能用于预测 TKIs 耐药性。

第三部分 活化 AhR 信号通路导致 EGFR TKIs 耐药

1 实验材料

1.1 细胞

PC-9	广东省人民医院吴一龙教授馈赠
H1975	购自 ATCC
HEK293	购自上海细胞库
H3122	Dana-Farber 癌症研究所 Pasi Jänne 教授馈赠
HCC78	Dana-Farber 癌症研究所 Pasi Jänne 教授馈赠

1.2 动物

裸鼠	第四军医大学实验动物中心
----	--------------

1.3 载体和质粒

pENTR221-AhR	Invitrogen 公司
pcDNA4.0	Invitrogen 公司
GV358	吉凯公司
pLKO.1 cyp1a1 shRNA	北京生命科学研究所 (NIBS)
pLKO.1 cyp1b1 shRNA	NIBS
pLKO.1 ARNT shRNA	NIBS
pLKO.1 Src shRNA	NIBS
pLenti6.3 mCherry	本课题组构建
pLenti6.3 HA-Src WT	圣母大学 Siyuan Zhang 教授馈赠
pLenti6.3 HA-Src Y527F	圣母大学 Siyuan Zhang 教授馈赠

1.4 试剂

RPMI 1640 培养基	Hyclone 公司
---------------	------------

DMEM 培养基	Hyclone 公司
胰酶	Hyclone 公司
胎牛血清 FBS	Gibco 公司
青霉素/链霉素溶液	Hyclone 公司
嘌呤霉素 Puromycin	Sigma 公司
MTT	MP Biomedicals 公司
Gefitinib	Selleck 公司
Afatinib	Selleck 公司
AZD9291	Selleck 公司
TCDD	Sigma 公司
β -NF	Sigma 公司
Kyn	Sigma 公司
RIPA 裂解液	碧云天生物技术研究
蛋白酶/磷酸酶抑制剂 Cocktail	Roche 公司
BCA 蛋白定量试剂盒	Takara 公司
胶回收试剂盒	Omega 公司
5 \times loading buffer	碧云天生物技术研究
Tris	MP Biomedicals 公司
甘氨酸	MP Biomedicals 公司
SDS	MP Biomedicals 公司
丙烯酰胺	MP Biomedicals 公司
甲双叉丙烯酰胺	碧云天生物技术研究
过硫酸铵	碧云天生物技术研究
TMEMD	MP Biomedicals 公司
甲醇	天津市富宇精细化工有限公司
预染蛋白 marker	Fermentas 公司
硝酸纤维素膜 (NC 膜)	Millipore 公司
Tween 20	科昊生物工程有限责任公司

BSA	科昊生物工程有限责任公司
兔抗 PARP 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 AhR 抗体 (IHC 和 IF 用)	Abcam 公司
兔抗 AhR 抗体 (WB 用)	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 ARNT 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 pEGFR 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 EGFR 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 pAkt 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 Akt 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 pErk 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 Erk 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 pSrc 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 Src 抗体	Cell Signaling Technology 公司
小鼠抗 β -actin 抗体	Sigma 公司
小鼠抗 Flag 抗体 (IP 用)	Sigma 公司
小鼠抗 Flag 抗体 (WB 用)	Abbkine 公司
小鼠抗 cyp1a1 抗体	Millipore 公司
兔抗 cyp1b1 抗体	Santa Cruz 公司
HRP 标记抗兔 IgG	Cell Signaling Technology 公司
HRP 标记抗小鼠 IgG	Cell Signaling Technology 公司
ECL 发光试剂盒	Millipore 公司
显影粉	科昊生物工程有限责任公司
定影粉	科昊生物工程有限责任公司
胶片	Canon 公司

1.5 设备和耗材

超净工作台	Yatai Kelong 公司
细胞 CO ₂ 培养箱	Thermo 公司
细胞培养皿	Thermo 公司

移液器	Gilson 公司
负压吸引器	其林贝尔仪器制造有限公司
高压灭菌锅	TOMY 公司
电子天平	上海良平仪器仪表有限公司
磁力搅拌器	上海司乐仪器有限公司
纯水仪	Millipore 公司
SDS-PAGE 电泳槽	Tanon 公司
SDS-PAGE 转膜槽	Tanon 公司
激光共聚焦显微镜	Nikon 公司

2 实验方法

2.1 AhR 表达载体构建

2.1.1 cDNA 模板和载体骨架

AhR ORF 克隆在 pENTR221 载体（图 3-1），该载体是 Gateway 系统入门载体，不能用于基因表达。

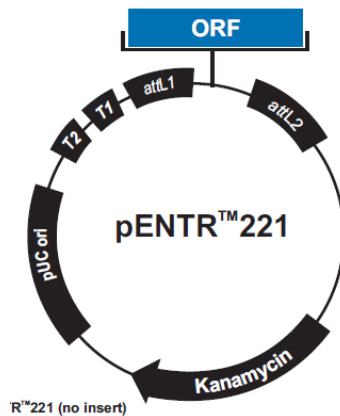


图 3-1. pENTR221-AhR 质粒图谱

我们选择 pcDNA4.0 作为表达载体（图 3-2），该载体包含 CMV 启动子和多个克隆位点。通过比对 AhR ORF 序列，选择 PstI/XhoI 作为克隆位点。

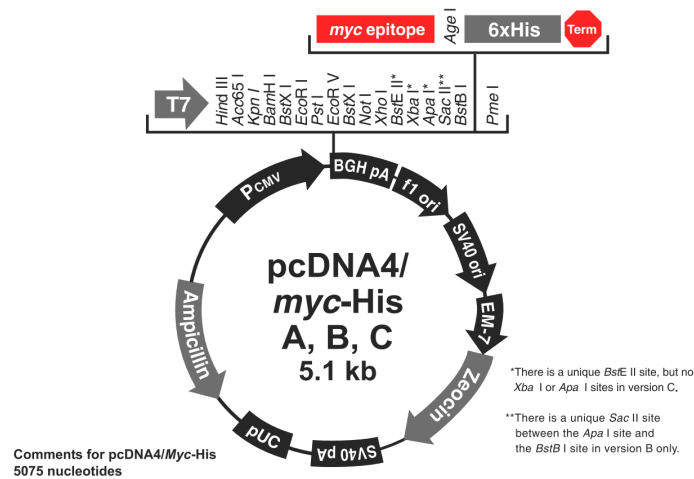


图 3-2. pcDNA4.0 质粒图谱

2.1.2 AhR 基因全长扩增

为了方便后续检测，我们在 AhR 基因 3'端加上 Flag 标签，设计引物时 Flag 之前加上保护碱基、酶切位点、Kozak 序列和初始码，根据这一原则，用于扩增 AhR ORF 引物序列设计如下：

PstI-Flag-AhR F:

CCCctgcagACCATGGACTACAAGGACGATGATGACAAGATGAACAGCAGCAGCG
CCAACATCA

AhR-XhoI R:

CCCctgcagTTACAGGAATCCACTGGATGTCA

PCR 反应体系:

AhR ORF	500 ng
2×Phanta Max Master Mix	10 μl
PstI-Flag-AhR F	0.5 μl
AhR-XhoI R	0.5 μl
H ₂ O	补齐
Total	20 μl

PCR 反应条件:

98°C	3 min	
98°C	30 sec	← ×25 cycles
55°C	30 sec	
72°C	2.5 min	
72°C	10 min	
4°C	10 min	

2.1.3 PCR 扩增产物与 pcDNA4.0 载体双酶切

PCR 反应结束后产物用 PstI 和 XhoI 两种限制性内切酶酶切，酶切体系如下：

PCR 产物	20 μl
PstI	1 μl
XhoI	1 μl
10×H buffer	3 μl
H ₂ O	5 μl
Total	30 μl

pcDNA4.0 载体也用 PstI 和 XhoI 两种限制性内切酶酶切，酶切体系如下：

pcDNA4.0	2 μg
PstI	1 μl
XhoI	1 μl
10×H buffer	3 μl
H ₂ O	5 μl
Total	30 μl

酶切条件：37°C 1 h。

2.1.4 DNA 电泳

称取 0.5 g 琼脂糖放入锥形烧瓶中，量筒量取 50 ml TAE 缓冲液，倒入烧瓶，微波炉中大火加热煮沸 2 min，室温冷却。待琼脂糖凝胶溶液不烫手时加入 5 μ l 溴化乙啶，震荡混匀，趁热灌胶。

TAE 缓冲液配方如下：

Tris	4.84 g
冰醋酸	1.142 ml
EDTA	0.744 g
调节 pH 7.4，定容至 1 L	

酶切结束后 PCR 管中加入 3 μ l 10 \times loading buffer 终止反应，依次上样。打开 DNA 电泳仪，设置电压 100 V，开始电泳。

2.1.5 胶回收

待溴酚蓝指示剂移动至琼脂糖凝胶下 1/3 时停止电泳，从电泳槽中取出凝胶，放入呈像仪，紫外线下观察酶切片段大小，拍照记录。迅速切下 DNA 片段所在位置的凝胶，放入洁净 EP 管，使用胶回收试剂盒纯化 DNA，简要步骤如下：

- (1) 向装有凝胶块的 EP 管中加入 200 μ l XP2 buffer，55 $^{\circ}$ C 水浴加热 10 min，直至凝胶全部溶解。
- (2) 上述溶液加入 DNA 吸附柱中，10000 g 离心 1 min。
- (3) 倒净收集管中的废液，DNA 吸附柱中加入 300 μ l XP2 buffer，13000 g 离心 1 min。
- (4) 倒净收集管中的废液，DNA 吸附柱中加入 700 μ l 漂洗液 SPW buffer，13000 g 离心 1 min。
- (5) 倒净收集管中的废液，13000 g 离心 2 min。
- (6) 向 DNA 吸附柱中央滴加 15 μ l 洗脱液 EB，静置 2 min，13000 g 离心 1 min，收集管中液体即为纯化的 DNA 片段。

2.1.6 产物连接

使用 T4 ligase 试剂盒连接 pcDNA4.0 和 AhR DNA 片段，反应体系如下：

pcDNA4.0 片段	3 μ l
AhR 片段	9 μ l
T4 ligase	1 μ l
10 \times T4 buffer	2 μ l
H ₂ O	5 μ l
Total	20 μ l

连接条件：16℃过夜。

2.1.7 转化、涂菌、挑克隆、摇菌、质粒提取

见前述。

2.1.8 测序鉴定

使用 CMV-F 正向引物和 BGH polyA 反向引物测序，测序引物序列如下：

CMV-F: CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG

BGH polyA: TAGAAGGCACAGTCGAGG

2.2 AhR 突变体构建

上述 AhR 表达载体构建成功后，我们将其命名为 pcDNA4.0 Flag-AhR WT，在此基础上我们构建组成性活化的 pcDNA4.0 Flag-AhR CA 和缺失入核信号的 pcDNA4.0 Flag-AhR Δ NLS 突变体。

2.2.1 突变引物

采用经典的点突变方法，设计 AhR CA 和 AhR Δ NLS 突变引物。与 AhR WT 相比，AhR CA 缺失第 288 至第 421 位氨基酸，AhR Δ NLS 缺失第 13 至第 39 位氨基酸，突变引物序列如下：

AhR CA F: ATTTTATCTTTGCCATAATGGATCCCTTAC

AhR CA R: TCCATTATGGCAAAGATAAAATTTTGGTCC

AhR Δ NLS F: ATCACCTACGCCAGTAGAGACCGACTTAATACAGAGTTG

AhR Δ NLS R: ATTAAGTCGGTCTCTACTGGCGTAGGTGATGTTGGCGCT

2.2.2 突变反应

以 pcDNA4.0 Flag-AhR WT 位模板，使用突变引物 PCR 扩增质粒全长（包括载体骨架和插入的 ORF 两部分），反应体系如下：

pcDNA4.0 Flag-AhR WT	50 ng
2×Phanta Max Master Mix	10 μ l
AhR CA/ Δ NLS F	0.5 μ l
AhR CA/ Δ NLS R	0.5 μ l
H ₂ O	补齐
Total	20 μ l

PCR 反应条件：

98°C	3 min	
98°C	30 sec	← ×35 cycles
55°C	30 sec	
72°C	7 min	
72°C	10 min	
4°C	10 min	

反应结束后用甲基化碱基内切酶 DpnI 降解模板质粒，酶切体系如下：

PCR 产物	20 μ l
DpnI	1 μ l
10×T buffer	3 μ l
H ₂ O	6 μ l
Total	30 μ l

酶切条件：37°C 过夜。

次日向 PCR 管中加入 3 μ l 醋酸钠溶液 (3 M, pH 5.2) 和 75 μ l 无水乙醇, 离心混匀, -80°C 冰箱速冻 30 min, 12000 rpm 4°C 离心沉淀 DNA, 小心吸弃上清, 10 μ l 超纯水溶解沉淀。

2.2.3 转化、涂菌、挑克隆、摇菌、质粒提取、测序鉴定

见前述。

2.3 AhR 过表达稳转细胞构建

2.3.1 AhR 慢病毒载体

AhR ORF 通过无缝连接克隆至 GV358 慢病毒载体 (图 3-3), 转化、涂菌、挑克隆、摇菌、质粒提取、测序鉴定等操作见前述。

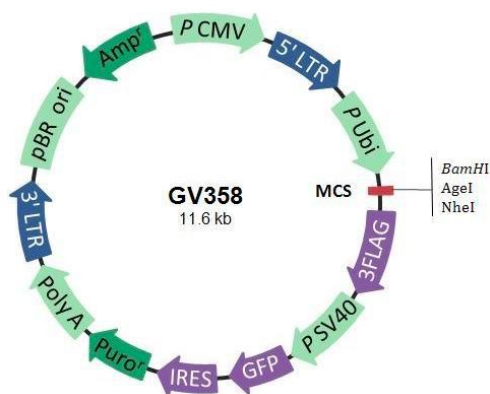


图 3-3. GV358 质粒图谱

2.3.2 AhR 慢病毒包装

见前述。

2.3.3 稳转细胞筛选

见前述。

2.4 Src 过表达稳转细胞构建

2.4.1 Src 慢病毒载体

HA-Src WT 和 HA-Src Y527F 质粒骨架为 pLenti6.3, 这是一个 Gateway 系统表达载体, 目的基因先克隆至 pENTR3C, 通过 LR 重组反应克隆至 pLenti6.3, 测序鉴定

后用于慢病毒包装。这部分工作已由圣母大学 Siyuan Zhang 教授完成，本课题使用的 HA-Src WT 和 HA-Src Y527F 质粒由 Siyuan Zhang 实验室提供（图 3-4）。

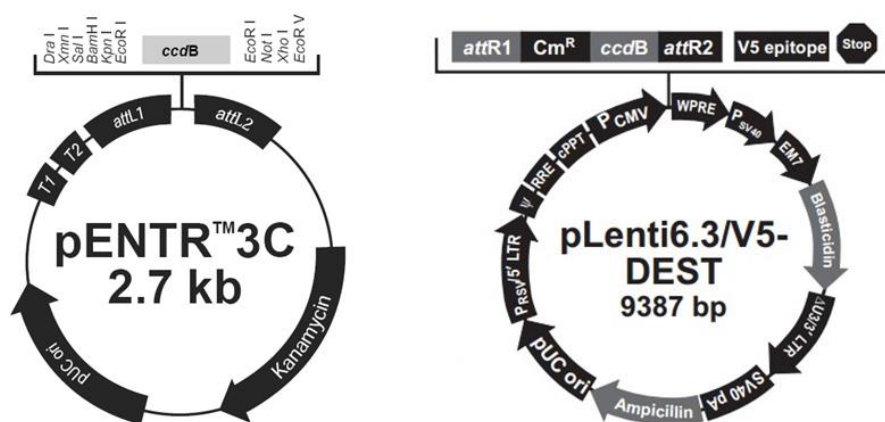


图 3-4. pENTR3C 和 pLenti6.3 质粒图谱

2.4.2 Src 慢病毒包装

见前述。

2.4.3 稳转细胞筛选

见前述。需要指出的是 pLenti6.3 载体上带的真核抗性基因是杀稻瘟菌素 Blasticidin，故筛选过表达 Src 和对照 mCherry 稳转细胞时选用 5 μg/ml Blasticidin。

2.5 Src 低表达稳转细胞构建

2.5.1 Src shRNA 慢病毒载体

pLKO.1-Src shRNA 由 NIBS 生物文库中心提供，共 3 个干扰位点，干扰序列如下：

Src CCGGGCTCGGCTCATTGAAGACAATCTCGAGATTGTCTTCAATGAG

shRNA.1 CCGAGCTTTTTG

Src CCGGGACAGACCTGTCCTTCAAGAACTCGAGTTCTTGAAGGACAG

shRNA.2 GTCTGTCTTTTTG

Src CCGGCTGACTGAGCTCACCACAAAGCTCGAGCTTTGTGGTGAGCT

shRNA.3 CAGTCAGTTTTTTG

2.5.2 Src shRNA 慢病毒包装

见前述。

2.5.3 稳转细胞筛选

见前述。

2.6 cyp1a1、cyp1b1 和 ARNT 低表达稳转细胞构建

2.6.1 shRNA 慢病毒载体

cyp1a1、cyp1b1 和 ARNT 干扰序列已克隆至 pLKO.1-puro 慢病毒载体，由 NIBS 生物文库中心提供菌液，本课题从中提取质粒。cyp1a1、cyp1b1 和 ARNT 不是本课题重点研究的基因，故针对每个基因只设计了 1 个干扰位点，各基因干扰序列如下：

cyp1a1 CCGGGCTGACTTCATCCCTATTCTTCTCGAGAAGAATAGGGATGAA

shRNA GTCAGCTTTTTG

cyp1b1 CCGGCGCGACATGATGGACGCCTTTCTCGAGAAAGGCGTCCATCAT

shRNA GTCGCGTTTTG

ARNT CCGGGGCTCAAGGAGATCGTTTATTCTCGAGAATAAACGATCTCCT

shRNA TGAGCCTTTTTG

2.6.2 cyp1a1、cyp1b1 和 ARNT shRNA 慢病毒包装

见前述。

2.6.3 稳转细胞筛选

见前述。

2.7 MTT 实验

见前述。

2.8 平板克隆实验

选取处于对数期细胞，胰酶消化，血细胞板技术，调整细胞密度至 1000 个/ml。吸取 1 ml 稀释后的细胞悬液与 4 ml 细胞培养液混匀，置于 6 cm 细胞培养皿中 10–15 天，当出现肉眼可见细胞克隆时终止培养，吸弃细胞培养液，PBS 漂洗后室温固定 15 min（甲醇：冰醋酸 = 3：1），吉姆萨染液染色 15–30 min，自来水洗净残留染液，

敞开细胞培养皿空气干燥，拍照并记录形成克隆数目。

2.9 免疫共沉淀实验

免疫共沉淀 (immunoprecipitation, IP) 是证明蛋白质相互作用的重要实验，主要流程包括蛋白提取、免疫复合物捕获、免疫复合物沉淀和 Western blot。简要步骤如下：

2.9.1 蛋白提取

细胞给予处理后终止培养，吸弃培养液，PBS 漂洗，向培养皿中加入 1 ml PBS 溶液，刮匙刮取贴壁细胞并转入洁净的 1.5 ml EP 管中，12000 rpm 4℃ 离心 1 min。吸弃上清，加入 400 – 500 μ l 含有 Cocktail 的 RIPA 裂解液重悬细胞沉淀，冰上裂解 30 min，12000 rpm 4℃ 离心 5 min，上清即为细胞蛋白样品。

2.9.2 蛋白定量

采用 Takara 公司 BCA 定量试剂盒测定蛋白样品浓度。试剂 A 和试剂 B 按 50:1 比例混合均匀，加入洁净 96 孔板中，每孔 200 μ l。依次加入 10 μ l 0 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml、1.5 mg/ml 和 2 mg/ml BSA 标准品，其余各孔加入 2 μ l 蛋白样品，37℃ 孵育 30 min，酶标仪读取各孔在 550 nm 处吸光度，根据标准品浓度和吸光度值绘制标准曲线，计算各孔蛋白样品浓度。各组蛋白样品等体积分成两份，一份加入 1/5 体积 5 \times loading buffer，100℃ 煮沸变性 10 min，冷却至室温后保存于 -20℃ 冰箱。另一份用于捕获免疫复合物。

2.9.3 免疫复合物捕获

取等量的细胞蛋白样品，RIPA 裂解液调整各组蛋白样品终体积一致，按每 500 μ g 总蛋白加入 1 μ g 抗体比例向各 EP 管中加入小鼠抗 HA 标签一抗，封口膜密封各 EP 管，4℃ 冰箱中旋转过夜。

2.9.4 免疫复合物沉淀

次日从冰箱中取出 EP 管，打开各管盖子，加入 50 – 100 μ l Protein A/G agarose beads，封口膜密封各 EP 管，4℃ 冰箱中旋转孵育 2 h；5000 rpm 4℃ 离心 5 min，1 ml PBS 重悬 agarose beads，4℃ 冰箱中旋转漂洗 3 次，每次 5 min；向各管加入与 agarose beads 等体积的 2 \times loading buffer，100℃ 煮沸变性 10 min，冷却至室温后保存于 -20℃

冰箱。

2.9.5 Western blot

见前述。

2.9.6 注意事项

- (1) 用于 IP 实验的蛋白样品，一般不建议超声裂解，以免破坏蛋白相互作用。
- (2) 捕获免疫复合物的一抗效价一定要高，各公司都有 IP 专利抗体，可以按需选用。
- (3) Protein A/G agarose beads 静置分层，使用前需震荡混匀，吸取 agarose beads 悬液时可以剪去枪头前端尖锐部分。
- (4) IP 样品上样前可低速离心，上样的样品应该是离心后的上清，不要吸到底部的 agarose beads 沉淀。
- (5) IP 样品上样时需同时上样全细胞提取物 (whole cell lysate, WCL)，证明细胞样品中确实包含了欲检测的蛋白。
- (6) IP 样品转膜后丽春红染色通常观察不到清晰的条带 (重链和轻链除外)，此时继续往后操作即可。
- (7) IP 样品 ECL 发光时在 55 kD 和 25 kD 处可见非常明显的蛋白条带，分别是 IgG 重链和轻链，勿与目的蛋白条带混淆。

2.10 裸鼠荷瘤实验

通过第四军医大学动物伦理委员会同意审批后，我们用裸鼠在体内评估抑制 Src 克服 AhR 导致 EGFR TKIs 耐药的作用。培养 PC-9 AhR WT/GFP shRNA 和 PC-9 AhR WT/Src shRNA.1 细胞，胰酶消化传代，血细胞板计数。调整细胞密度至 2×10^7 个/ml，取 100 μ l 细胞悬液与等体积 Matrigel 混匀置于冰上。75%乙醇溶液消毒 4-6 周龄裸鼠皮肤，使用 1 ml 注射器将 200 μ l 细胞 Matrigel 混合液注射至裸鼠皮下，注射部位选择在裸鼠后肢背侧较容易操作，注射完毕留针 30 sec，以免液体溢出，再次消毒背部皮肤，裸鼠送回 SPF 级动物房饲养。

注射后约 2 周可见绿豆大小瘤体。PC-9 AhR WT/GFP shRNA 组裸鼠随机分为两组，每组 6 只，分别给予 Gefitinib 100 mg/kg 灌胃或等体积溶剂灌胃处理，每天灌胃

一次。PC-9 AhR WT/Src shRNA.1 组裸鼠亦随机分为两组，每组 6 只，给予 Gefitinib 或溶剂灌胃。每 3 天测量一次裸鼠背部瘤块大小，灌胃处理 3 周后 CO₂ 麻醉处死裸鼠，剥离瘤体，4%多聚甲醛固定，石蜡包埋切片，IHC 染色检测各组小鼠 Gefitinib 处理后 Ki67 表达情况。

2.11 EGFR TKIs 耐药患者二次活检标本验证

为了验证 AhR 信号活化引起 TKIs 耐药的临床相关性，我们希望在 TKIs 耐药的组织标本中 IHC 检测 AhR 表达水平。患者耐药后通常不愿意接受二次活检，因此临床检测 AhR 在 TKIs 耐药前后表达水平有一定难度。本部分实验得到协和医院呼吸内科王梦昭教授和 304 医院肿瘤科高红军教授大力支持，两位教授慷慨提供了 TKIs 耐药前后自体对照标本（即 EGFR 突变患者在 TKIs 治疗前进行第一次活检，同一患者在 TKIs 治疗耐药后进行第二次活检）5 对用于 AhR IHC，IHC 步骤和结果判读见前述。

2.12 统计学分析

每组实验重复 3 次，两组差异比较采用 *t* 检验。 $*P < 0.05$ 认为有差异有统计学意义。

3 结果

3.1 过表达 AhR WT 促进 PC-9 细胞增殖

利用慢病毒感染和抗生素筛选，我们在低表达内源性 AhR 蛋白的 PC-9 细胞中上调 AhR，获得了过表达 AhR 及其突变体的 PC-9 细胞。由于慢病毒载体上自带 GFP 基因，故可在荧光显微镜下观察 GFP 信号推测目的基因表达水平。PC-9 细胞在病毒感染 48 h 后 puromycin 筛选 1 周，光镜和荧光显微镜下分别观察细胞形态和 GFP 荧光，GFP 阳性率几乎 100%，提示未感染细胞已全部清除，可用于后续实验（图 3-5）。

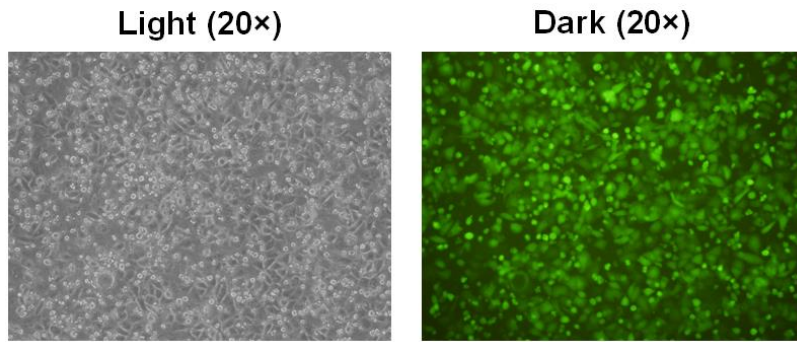


图 3-5. 荧光显微镜观察 PC-9 细胞感染效率

PC-9 细胞过表达 AhR WT (PC-9 AhR WT 细胞) 或 AhR CA (PC-9 AhR CA 细胞), 对照组过表达病毒载体上 GFP (PC-9 GFP 细胞), MTT 检测 AhR WT 及其 AhR CA 突变体对细胞增殖的影响。结果显示 PC-9 AhR CA 细胞 (蓝色曲线) 和 PC-9 GFP 细胞 (绿色曲线) 在 490 nm 处吸光度值无明显差异; 相反, PC-9 AhR WT 细胞 (红色曲线) 从接种后第 3 天起增殖变快, 第 7 天时细胞活力显著高于 PC-9 GFP 细胞 (图 3-6)。

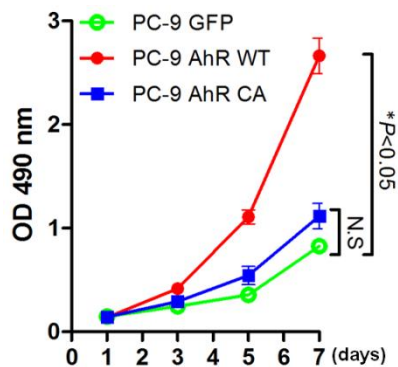


图 3-6. MTT 检测 PC-9 GFP, PC-9 AhR WT 和 PC-9 AhR CA 细胞增殖

3.2 过表达 AhR WT 引起 PC-9 细胞 Gefitinib 耐药

PC-9 是一株 EGFR delE746_A750 突变的肺腺癌细胞, 该细胞对 EGFR TKIs 高度敏感, 经常用于 TKIs 耐药研究。既然过表达 AhR WT 促进 PC-9 细胞增殖, 那么是否影响 TKIs 敏感性? 我们将过表达 GFP、AhR WT 和 AhR CA 的 PC-9 细胞接种 96 孔板, 给予梯度 Gefitinib (0, 1, 5, 20, 40, 80, 100 nM) 处理 48 h, MTT 检测细胞活力, 结果显示 PC-9 GFP 细胞 (绿色曲线) 对 Gefitinib 非常敏感, IC_{50} 约 17 nM;

PC-9 AhR CA 细胞（蓝色曲线）对 Gefitinib 也非常敏感， IC_{50} 约 28 nM；与这两株细胞不同的是过表达 AhR WT 的 PC-9 细胞（红色曲线）对 Gefitinib 耐受，MTT 细胞生存曲线提示 PC-9 AhR WT 细胞 Gefitinib IC_{50} 超过 100 nM，说明过表达 AhR WT 可以导致 Gefitinib 耐药，而过表达 AhR CA 对 Gefitinib 敏感性无明显影响（图 3-7）。

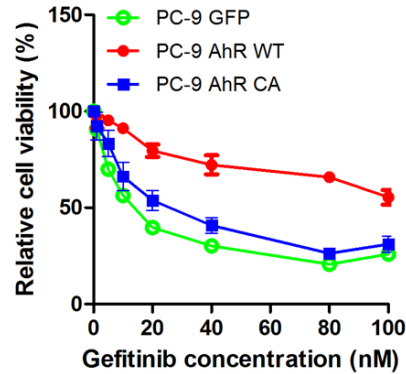


图 3-7. MTT 检测 PC-9 GFP, PC-9 AhR WT 和 PC-9 AhR CA 细胞 EGFR TKIs Gefitinib 敏感性

由于 MTT 只能反映细胞对药物短期的敏感性，我们接下来通过平板克隆实验研究 AhR 表达状态对 Gefitinib 敏感性的长期影响。我们将 PC-9 GFP、PC-9 AhR WT 和 PC-9 AhR CA 细胞各 1000 个接种于 6 cm 细胞培养皿，给予终浓度为 20 nM Gefitinib 连续刺激 10–15 天，观察细胞形成克隆的情况。这三株细胞在 DMSO 对照组均能形成克隆，各组的克隆数目没有明显差异（图 3-8）；然而 Gefitinib 刺激后 PC-9 GFP 和 PC-9 AhR CA 细胞大量死亡，在观察终点只有极少数克隆形成；我们观察到虽然 PC-9 AhR WT 细胞在 Gefitinib 刺激后也有大部分细胞死亡，但尚有半数细胞存活，在观察终点可见许多细胞克隆，克隆数目约为 DMSO 对照组 30% - 35%，显著高于 PC-9 GFP 和 PC-9 AhR CA 细胞，说明过表达 AhR WT 导致 TKIs 耐药是一个持久效应。

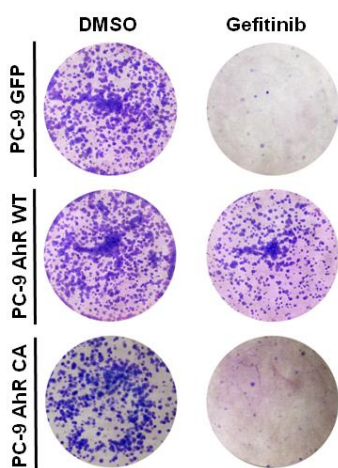


图 3-8. 平板克隆实验检测 PC-9 GFP, PC-9 AhR WT 和 PC-9 AhR CA 细胞 EGFR TKIs Gefitinib 敏感性

我们接下来评估过表达 AhR WT 引起的耐药表型是否仅限于 TKIs。PC-9 GFP 和 PC-9 AhR WT 细胞接种于 96 孔板，给予梯度顺铂（0, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ ）或紫杉醇（0, 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ ）处理 48 h，MTT 实验评估两组细胞对化疗药的敏感性。结果显示 PC-9 细胞对顺铂和紫杉醇的敏感性不因 AhR WT 过表达而改变，PC-9 AhR WT 细胞（红色曲线）和 PC-9 GFP 细胞（绿色曲线）细胞活力曲线几乎重合，说明 AhR WT 过表达选择性改变 EGFR TKIs 敏感性，对于化疗药物的敏感性没有影响（图 3-9）。

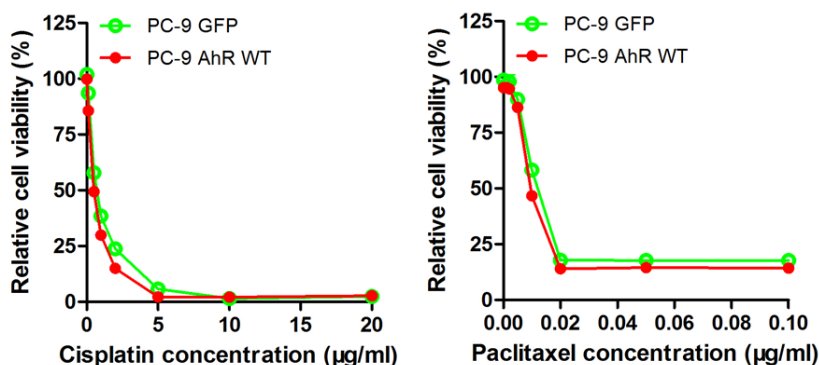


图 3-9. MTT 检测 PC-9 GFP, PC-9 AhR WT 和 PC-9 AhR CA 细胞化疗药物顺铂和紫杉醇敏感性

AhR WT 对 PC-9 细胞药物敏感性的选择性和差异提示 AhR 信号通路可能与 EGFR 信号通路存在联系,为了验证这一假设,我们检测了过表达 AhR WT 和 AhR CA 对 EGFR 及下游 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路的影响(图 3-10)。Western blot 结果显示 AhR WT 和 AhR CA 慢病毒有效上调 PC-9 细胞 AhR 蛋白表达,但 EGFR 磷酸化水平没有明显变化;非常有趣的是 Akt 和 Erk 磷酸化水平在 AhR WT 过表达后增加,而过表达 AhR CA 对 pAkt 和 pErk 水平没有明显影响。

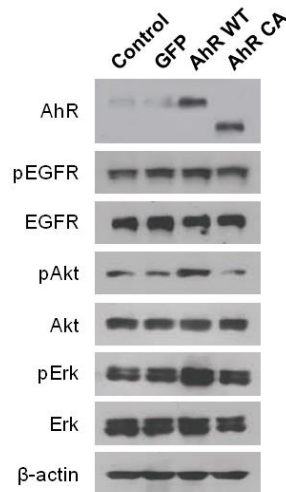


图 3-10. 过表达 AhR WT 和 AhR CA 对 PC-9 细胞 EGFR 及下游 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路的影响

我们还检测了各组过表达细胞在 Gefitinib 处理后 EGFR、PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路变化情况。PC-9 GFP、PC-9 AhR WT 和 PC-9 AhR CA 细胞给予梯度 Gefitinib (0, 0.1, 0.5, 1 μ M) 处理 6 h, 收集细胞样品提取蛋白, Western blot 结果显示三株细胞在 Gefitinib 处理后 EGFR 磷酸化被有效阻断, PC-9 AhR GFP 和 PC-9 AhR CA 细胞在 Gefitinib 处理后 Akt 和 Erk 磷酸化亦被阻断, 但 PC-9 AhR WT 细胞 Gefitinib 处理后 Akt 和 Erk 持续磷酸化, 即使终浓度为 1 μ M Gefitinib 亦不能抑制 pAkt 和 pErk 表达水平(0.1 μ M Gefitinib 即可抑制 PC-9 AhR GFP 和 PC-9 AhR CA 细胞 pAkt 和 pErk 表达)(图 3-11)。

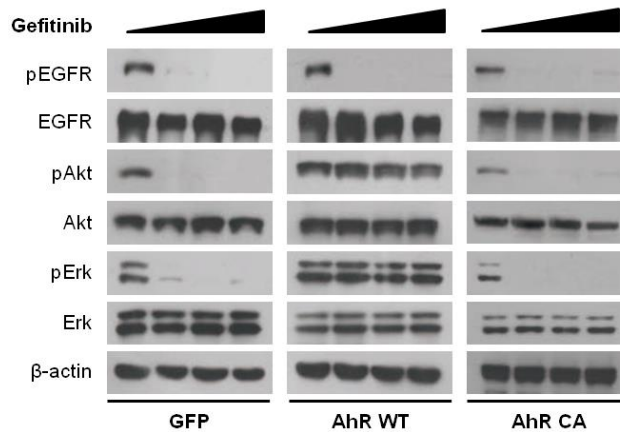


图 3-11. Western blot 检测 PC-9 GFP、PC-9 AhR WT 和 PC-9 AhR CA 细胞 Gefitinib 处理后 EGFR、PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路变化情况

3.3 AhR 配体活化 AhR 信号通路引起 H1975 细胞 AZD9291 耐药

除了 AhR 蛋白表达增加, AhR 信号通路活化的另一途径是配体含量增加。TCDD 虽为 AhR 高亲和力配体, 但细胞毒性太强, 本身具有杀伤细胞作用, 故我们用毒性较小的 AhR 配体 β -NF 和 Kyn 刺激高表达内源性 AhR 蛋白的 H1975 细胞。H1975 是 EGFR L858R/T790M 突变细胞, 一代 EGFR TKIs Gefitinib 不能抑制 T790M 而三代 EGFR TKIs AZD9291 可以有效抑制 T790M 耐药突变, 故我们选用 AZD9291 评估 AhR 配体对于 H1975 细胞 EGFR TKIs 的影响。H1975 细胞分为 6 组, 给予 1 μ M AZD9291, 10 μ M β -NF + 1 μ M AZD9291, 100 μ M Kyn + 1 μ M AZD9291 处理 24 h, Western blot 检测细胞凋亡和 EGFR 信号通路转导情况 (图 3-12)。AZD9291 可以有效抑制 T790M 耐药突变, 阻断 EGFR 磷酸化, 抑制 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路, 诱导 H1975 细胞凋亡。AhR 配体 β -NF 和 Kyn 对 EGFR 磷酸化水平没有明显影响, 但可以增加 pAkt 和 pErk 表达水平。 β -NF 和 Kyn 并不能维持 AZD9291 处理后 EGFR 磷酸化水平, 但可以维持 Akt 和 Erk 磷酸化。与此一致的是 β -NF 和 Kyn 处理后 AZD9291 诱导 H1975 凋亡减少, PARP 蛋白剪切水平降低。

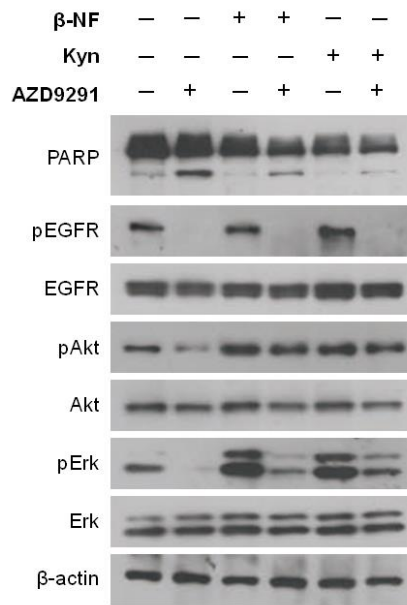


图 3-12. AhR 配体抑制 AZD9291 诱导 H1975 细胞凋亡

3.4 AhR 在 TKIs 耐药二次活检标本表达增加

为了验证 AhR 蛋白表达与 NSCLC TKIs 治疗耐药的临床相关性，我们采用 IHC 检测 AhR 蛋白在 5 对耐药前后标本的表达。这 5 例患者均带有 EGFR 突变并接受一线 EGFR TKIs 治疗，患者开始 TKIs 治疗前的标本 IHC 检测显示所有患者均表达 AhR 蛋白，表达强度+。患者耐药后行复发部位二次活检，genotyping 结果证实第 1、3、4 例患者出现 T790M 突变，第 2 例和第 5 例患者无 T790M 突变和 Met 扩增。用于 genotyping 的组织标本进一步行 IHC 检测，第 1 例患者耐药后 AhR 蛋白表达水平和耐药前相当，而第 3 例和第 4 例患者耐药标本中 AhR 蛋白表达水平增加，表达强度+++；第 2 例患者 AhR 蛋白表达没有明显变化，而第 5 例患者表达增加（图 3-13）。

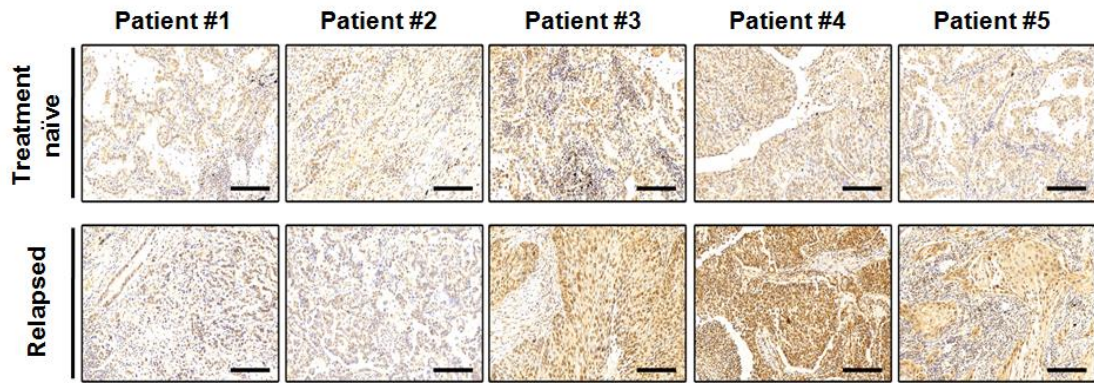


图 3-13. AhR 蛋白在耐药二次活检标本表达增加

3.5 AhR 活化 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号不依赖转录活性

AhR 蛋白作为配体依赖的转录因子, 与 ARNT 结合形成异源二聚体, 启动 *cyp1a1* 和 *cyp1b1* 等靶基因表达。那么 AhR 蛋白过表达引起 TKIs 耐药的作用是否依赖其转录活性呢? 我们将高表达 AhR 蛋白的 H1975 细胞去血清过夜培养, 最大程度降低内源性磷酸化信号。次日, 我们使用 AhR 配体 TCDD 刺激 H1975 细胞, 15 min 和 30 min 后收集细胞样品, Western blot 检测 Akt 和 Erk 磷酸化水平, 结果显示 TCDD 作用 15 min 后 pAkt 和 pErk 表达水平就明显增加, 在 TCDD 作用 30 min 时 Akt 磷酸化水平进一步增加; 为了排除 TCDD 可能的 off-target effect, 我们给与 H1975 AhR shRNA.1 和 H1975 AhR shRNA.2 细胞同样处理, 发现 pAkt 和 pErk 表达水平不因 TCDD 处理而增加, 说明 TCDD 促进 Akt 和 Erk 磷酸化的作用由 AhR 介导 (图 3-14)。

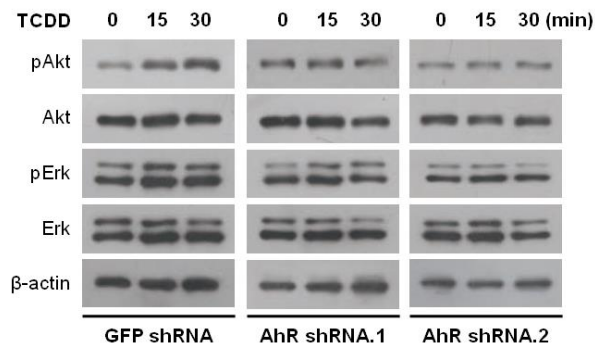


图 3-14. TCDD 激活 AhR 促进 Akt 和 Erk 磷酸化

从作用时程上看, TCDD 处理 H1975 细胞虽然可以立即激活 AhR, 但 15 min 和 30 min 的处理时间不足以引起 AhR 蛋白入核和基因转录。qPCR 结果显示 TCDD 处

理 15 min 和 30 min 后 *cyp1a1* 和 *cyp1b1* mRNA 转录与未处理组相比不具有差异, 提示 TCDD 促进 Akt 和 Erk 磷酸化的作用可能不依赖 AhR 转录效应 (图 3-15)。

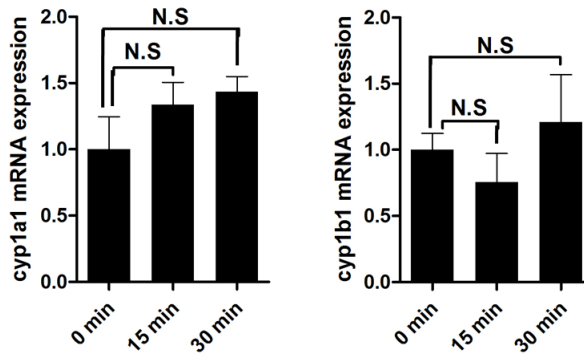


图 3-15. qPCR 检测 H1975 细胞 TCDD 处理 15 min 和 30 min 后 *cyp1a1* 和 *cyp1b1* mRNA 表达变化

我们还利用形态学检测手段判断 TCDD 作用时程和 AhR 转录效应的关系。H1975 细胞接种于共聚焦小皿中, 去血清过夜培养后 10 nM TCDD 处理 15 min 和 30 min, 细胞经 4% 多聚甲醛固定后 AhR 一抗 4℃ 过夜孵育, FITC 标记二抗室温孵育 1 h, DAPI 复染细胞核, 激光共聚焦显微镜下观察 AhR 蛋白细胞定位。我们观察到 AhR 蛋白在未用 TCDD 处理的 H1975 细胞主要定位于胞浆, 少量 FITC 信号定位于细胞核, 这可能与内源性配体活化 AhR 信号有关。TCDD 处理 15 min 和 30 min 后, 大部分 AhR 蛋白还是定位于细胞质, 未发生明显的核转位, 说明此时 AhR 转录激活 *cyp1a1* 和 *cyp1b1* 表达的作用尚未启动。作为 AhR 蛋白入核的阳性对照, 10 nM TCDD 处理 H1975 细胞 12 h 可见 FITC 信号明显聚集于细胞核, AhR 蛋白发生核转位 (图 3-16)。

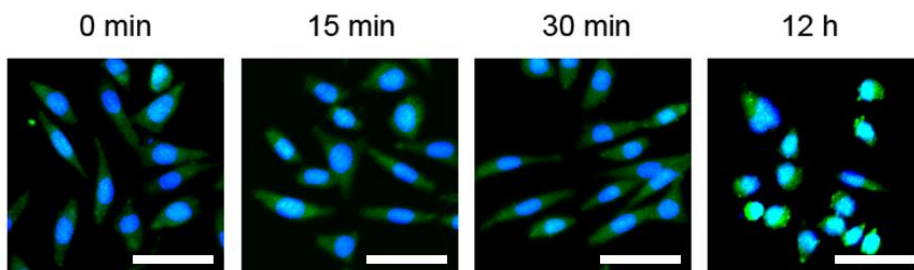


图 3-16. 激光共聚焦显微镜观察 TCDD 处理后 AhR 蛋白定位

AhR 蛋白入核转录靶基因的重要环节包括 NLS 结构域暴露和与 ARNT 结合形成异源二聚体,如果 AhR 信号通路增加 Akt 和 Erk 磷酸化不依赖其转录活性,去除 NLS 结构域或下调 ARNT 应该不影响 pAkt 和 pErk 表达水平。我们在 HEK293 细胞表达 AhR Δ NLS 截短体或下调 ARNT 表达,去血清过夜培养后给予 10 nM TCDD 处理 30 min, Western blot 检测细胞 Akt 和 Erk 磷酸化水平(图 3-17)。结果显示 TCDD 增加 pAkt 和 pErk 表达的能力不因为 NLS 结构域缺失或 ARNT 下调而减弱,这两株 AhR 转录活性缺陷的细胞在 TCDD 处理 30 min 后 Akt 和 Erk 磷酸化仍然增加。

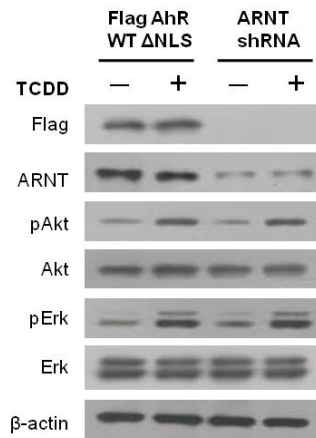


图 3-17. 抑制 AhR 转录活性后 Western blot 检测 Akt 和 Erk 磷酸化水平

cyp1a1 和 cyp1b1 是 AhR 转录的重要靶基因,介导了 AhR 信号通路的毒物代谢作用。shRNA 不仅下调 H1975 细胞 cyp1a1 和 cyp1b1 本底表达,还可以抑制 TCDD 诱导下 cyp1a1 和 cyp1b1 表达。然而 cyp1a1 和 cyp1b1 表达高低并不影响 AhR 信号活化增加 Akt 和 Erk 磷酸化的作用(图 3-18)。

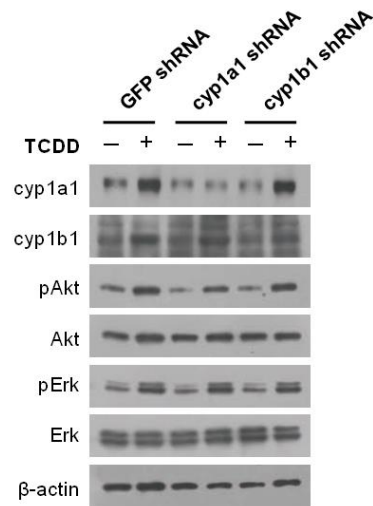


图 3-18. Western blot 检测 shRNA 下调 cyp1a1 和 cyp1b1 表达对 Akt 和 Erk 磷酸化的作用

3.6 Src 激酶介导 AhR 旁路耐药

上述结果说明 AhR 信号活化可以在不影响 EGFR 磷酸化前提下增加 Akt 和 Erk 磷酸化，并且后者不能被 EGFR TKIs 阻断，这种作用模式和旁路激酶信号导致靶向治疗耐药非常相似，但是 AhR 蛋白本身不是激酶，结构上也缺乏酪氨酸激酶结构域，AhR 信号又是如何引起 Akt 和 Erk 磷酸化呢？这个问题困扰了课题组很长时间，直到我们在深入分析 AhR 蛋白结构时注意到其内部有多个可能与 SH2 和 SH3 结构域相互作用的位点，而 SH2 和 SH3 结构域通常存在于各种蛋白激酶中，提示 AhR 活化后可能与某蛋白激酶发生作用，后者才是直接引起 Akt 和 Erk 磷酸化水平增加的分子（图 3-19）。

■ Summary for sequence 'AHR_HUMAN'.

KEY

DOMAINS: SMART/Fam domain Signal peptide (pred.) Low-complexity region Coiled-coil (pred.) TM helix (pred.)

GLOBPLOT: GlobDom Disorder

2D STRUCT: Strand Helix Loop 3/10 Helix

MOTIFS: Favourable Context Sparse/Smart filtered Neutral Annotated: TP FP TN FN <-> Assigned by homology

CONSCORE: low Conservation medium Conservation High Conservation

Phospho ELM: Phosphorylated Serine Phosphorylated Threonine Phosphorylated Tyrosine

(Mouseover the matches for more details)

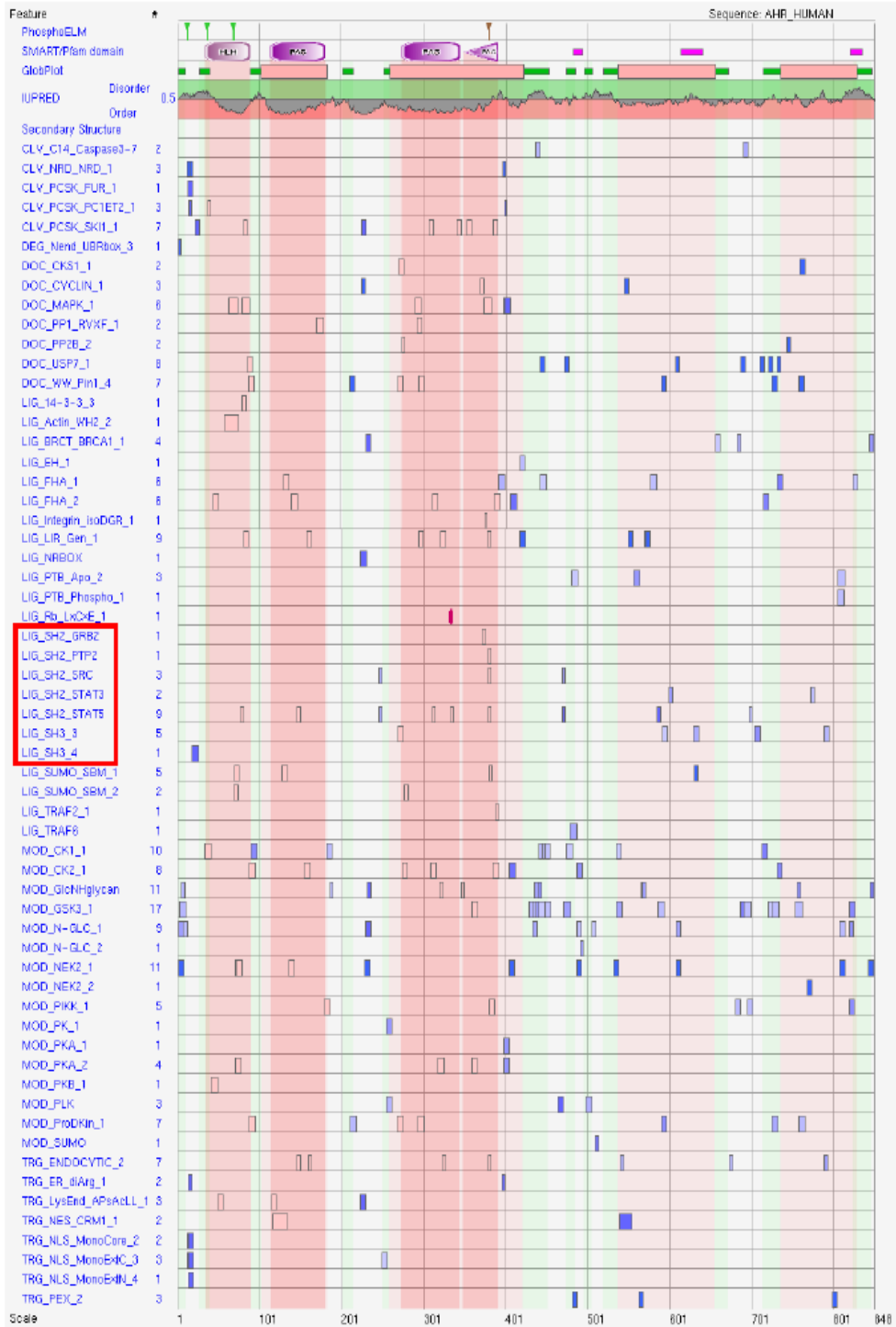


图 3-19. AhR 生物信息学分析提示多个 SH2 和 SH3 结构域相互作用的位点

带有 SH2 和 SH3 结构域的蛋白激酶数量很多，我们重点关注可以与 AhR 蛋白相互作用并导致靶向治疗耐药的激酶，最后锁定非受体酪氨酸激酶 Src。我们重新分析了 Src 在 NSCLC 细胞中表达情况，发现虽然 Src 总蛋白在各 NSCLC 细胞中表达水平不存在差异，但磷酸化的 Src 蛋白（特指 Y416 位点磷酸化）仅在 AhR^{high} NSCLC 细胞中检出（图 3-20）。

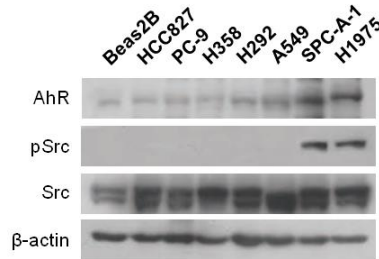


图 3-20. AhR 蛋白表达水平与 Src 磷酸化相关性

为了验证 AhR 蛋白和 pSrc 蛋白表达相关性，我们比较了下调和上调 AhR 对 pSrc 表达水平的影响。shRNA 下调 AhR^{high} H1975 细胞 AhR 表达可以抑制 Src 磷酸化，而慢病毒上调 AhR^{low} PC-9 细胞 AhR WT 表达增加 Src 磷酸化，提示 AhR 表达与 Src 磷酸化正相关（图 3-21）。

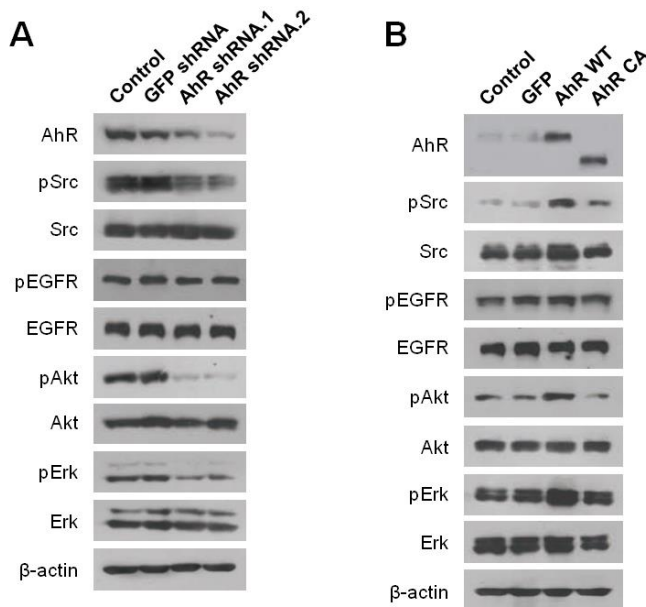


图 3-21. 下调 (A) 和上调 (B) AhR 对 Src 磷酸化水平的影响

蛋白质相互作用预测到 AhR 蛋白 C 端有一个保守的 SH2 结构域结合模体 (SH2

domian binding motif), 这个模体的具体功能尚不清楚。我们构建了缺失这一模体的 Δ SH2 突变体并在 HEK293 细胞瞬时表达, IP 实验显示无 TCDD 处理时 AhR 和 Src 结合非常微弱, 10 nM TCDD 处理 30 min 后 AhR 和 Src 结合明显增强。 Δ SH2 突变体不论有无 TCDD 处理均不能和 Src 结合, 说明该模体是介导 AhR 与 Src 蛋白相互作用的重要功能区域 (图 3-22)。

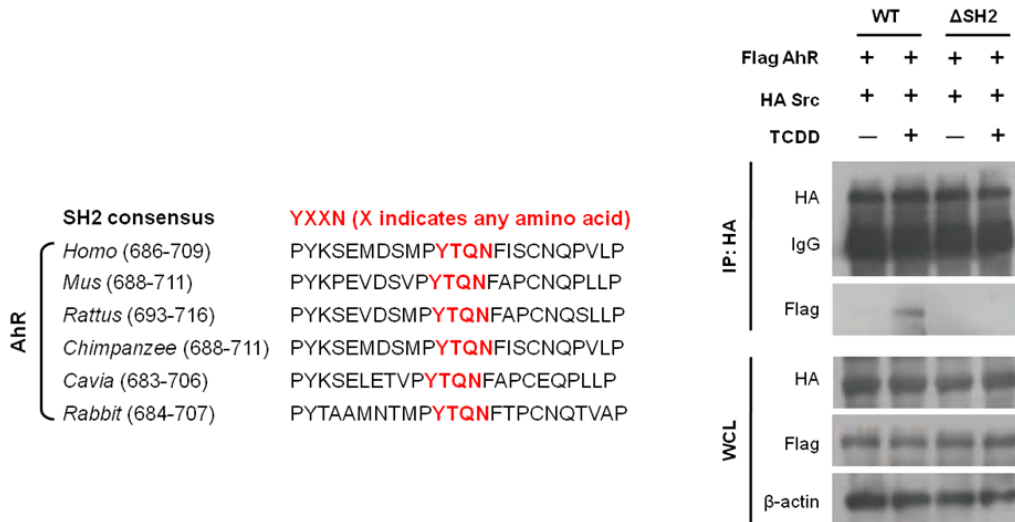


图 3-22. 生物信息学分析和 IP 实验证明 SH2 结构域结合模体介导 AhR 与 Src 蛋白相互作用

既然明确了 AhR 与 Src 存在蛋白相互作用, 那么这种相互作用是否导致 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 通路持续性活化和 TKIs 耐药是我们接下来研究的科学问题。我们首先用 Src TKIs 阻断 Src 磷酸化, 观察 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 通路能否继续维持。PC-9 细胞过表达 AhR WT 并用 β -NF 刺激充分活化 AhR 信号, 可以发现 Src、Akt 和 Erk 在 1 μ M Gefitinib 处理情况下仍然处于磷酸化状态, 然而 1 μ M Gefitinib 与 1 μ M Dasatinib 或 1 μ M PP2 联用时 Src 磷酸化被完全抑制, pAkt 和 pErk 表达亦受到明显抑制; 相似的实验结果还见于用 Kyn 刺激下活化的 PC-9 AhR WT 细胞 (图 3-23)。

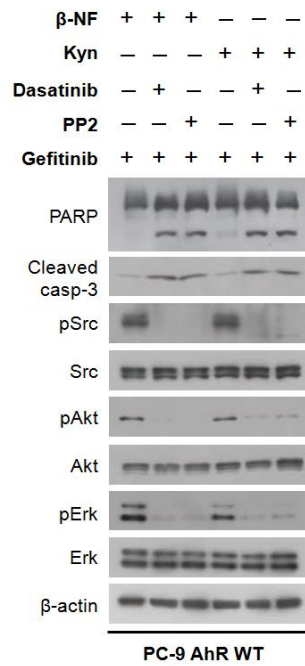


图 3-23. Western blot 检测抑制 Src 对 PC-9 AhR WT 细胞 Akt 和 Erk 磷酸化的影响

此外我们还用 3 对 shRNA 下调 Src 表达。与 GFP shRNA 对照组相比，1 μ M Gefitinib 可以抑制 Src 低表达 PC-9 AhR WT 细胞 Akt 和 Erk 磷酸化，提示 Src 是联系 AhR 信号与 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号的桥梁，AhR 通过促进 Src 磷酸化维持 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号持续活化（图 3-24）。

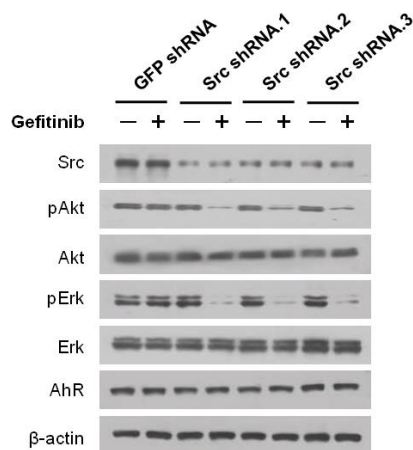


图 3-24. Western blot 检测 shRNA 抑制 Src 对 PC-9 AhR WT 细胞 Akt 和 Erk 磷酸化的影响

本部分最后一项研究内容是 Src 激活是否足以导致 TKIs 耐药？如果是，这种耐药性仅限于 EGFR TKIs 还是包括其它 TKIs？我们是用慢病毒感染的方法在敏感细胞过表达 Src，需要指出的是我们过表达的是持续活化状态的 Src 突变体 Src Y527F，对照细胞过表达 mCherry，使用 Blasticidin 筛选稳转细胞，荧光显微镜下观察对照组细胞筛选效率（图 3-25）。

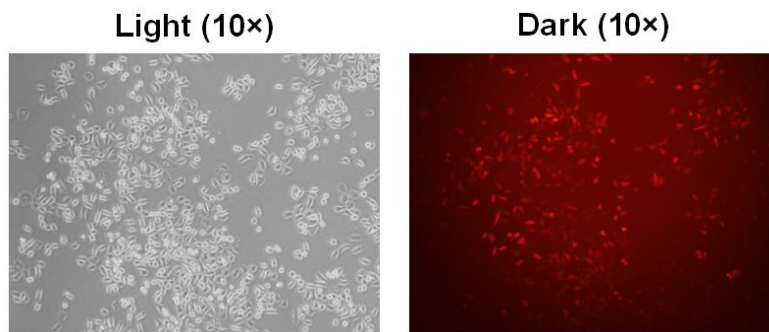


图 3-25. 荧光显微镜观察 Src 和 mCherry 对照细胞感染效率

Western blot 结果显示在 PC-9 细胞过表达 Src Y527F 可以明显增加 pSrc 和 Src 表达水平，引起下游 Akt 和 Erk 磷酸化水平增加，而对照组 mCherry 细胞中 Akt 和 Erk 磷酸化水平不发生变化（图 3-26）。

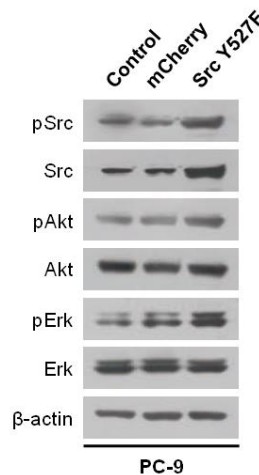


图 3-26. 过表达 Src 对 PC-9 细胞 Akt 和 Erk 磷酸化的影响

过表达 Src Y527F 和 mCherry 的稳转细胞给予 1 μ M Gefitinib 处理 6 h，发现 PC-9 Src Y527F 细胞 Akt 和 Erk 磷酸化不能被抑制，而 PC-9 mCherry 细胞 Akt 和 Erk 磷酸

化被完全阻断，提示活化的 Src 可以维持 PC-9 细胞 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路（图 3-27）。

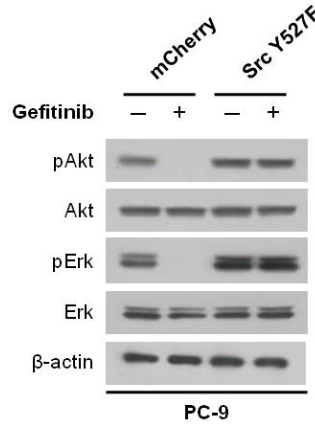


图 3-27. 过表达 Src 导致 PC-9 细胞 Akt 和 Erk 持续磷酸化

过表达 Src Y527F 维持 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路的作用不仅限于 EGFR 突变的 NSCLC 细胞，在 ALK 基因重排阳性 H3122 细胞和 ROS1 基因重排阳性 HCC78 细胞过表达 Src Y527F 也能维持 Crizotinib 处理后 Akt 和 Erk 磷酸化状态，说明 Src 旁路激酶信号可能导致 NSCLC 细胞对多种 TKIs 耐药（图 3-28）。

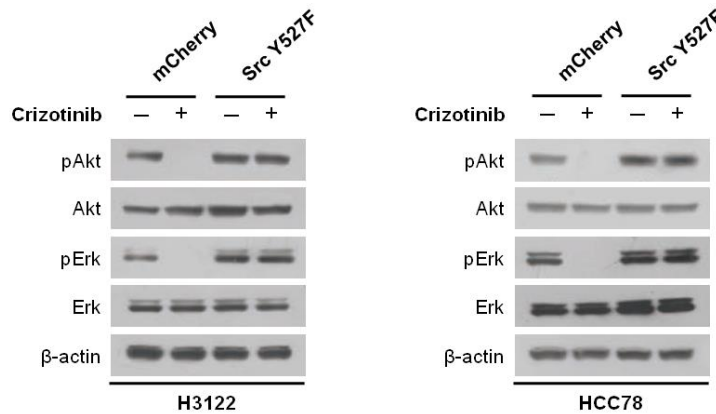


图 3-28. 过表达 Src 导致 H3122 细胞和 HCC78 细胞 Akt 和 Erk 持续磷酸化

最后我们在体外和体内评估活化 Src 信号通路对 TKIs 敏感性影响。EGFR、ALK 和 ROS1 驱动的 NSCLC 细胞稳定过表达 Y527F 或 mCherry 后接种于 96 孔板，1 μ M Gefitinib 或 1 μ M Crizotinib 处理 48 h，MTT 检测 TKIs 对细胞增殖的抑制作用。结果显示 TKIs 可以有效抑制 mCherry 组细胞增殖，抑制率>70%；过表达 Src Y527F 的 NSCLC 细胞对 TKIs 敏感性下降，抑制率<50%，与 mCherry 组细胞相比差异具有统

计学意义 (图 3-29)。

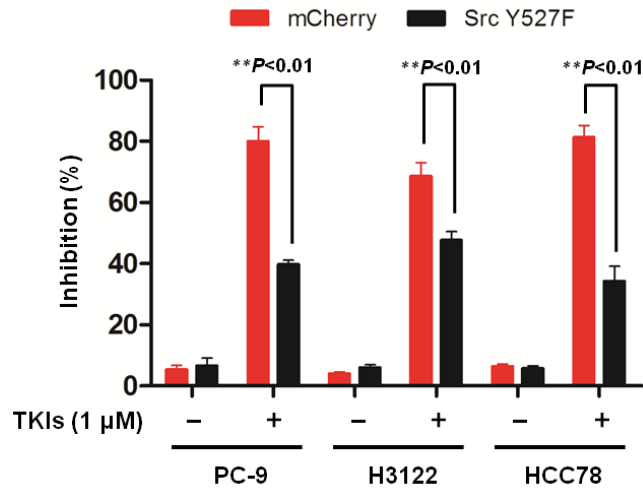


图 3-29. 过表达 Src 导致 PC-9, H3122 和 HCC78 细胞 TKIs 耐药

我们将 PC-9 AhR WT/GFP shRNA 和 PC-9 AhR WT/Src shRNA.1 细胞注射至裸鼠皮下并给予 100 mg/kg Gefitinib 或等体积溶剂灌胃处理, IHC 结果显示溶剂对照组 PC-9 AhR WT/GFP shRNA 和 PC-9 AhR WT/Src shRNA.1 细胞增殖活跃, Ki67 阳性率 45% - 50%; PC-9 AhR WT/GFP shRNA 对 Gefitinib 处理耐受, 给药后 Ki67 阳性率 20% - 25%; PC-9 AhR WT/Src shRNA.1 细胞对 Gefitinib 敏感, Ki67 阳性率<5%, 提示活化 Src 信号通路能够导致 TKIs 耐药, 抑制 Src 可以逆转 AhR 高表达引起的耐药 (图 3-30)。

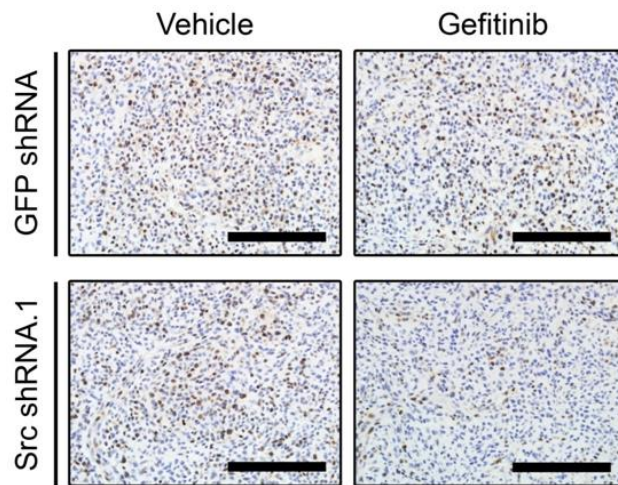


图 3-30. 抑制 Src 在体内克服 AhR 活化引起的 TKIs 耐药

4 讨论

本部分研究是整个课题的核心内容，结合前面抑制 AhR 信号通路增敏 EGFR TKIs，我们推测活化 AhR 可能导致 EGFR TKIs 耐药。在低表达内源性 AhR 的 PC-9 细胞慢病毒感染上调 AhR 表达，我们发现 PC-9 AhR WT 细胞增殖加快，细胞活力增加，MTT 和平板克隆实验证实 PC-9 AhR WT 细胞对 Gefitinib 产生了耐药性。然而 PC-9 细胞过表达 AhR CA 并不像预期的那样出现耐药表型，PC-9 AhR CA 细胞增殖速度和细胞活力与对照细胞 PC-9 GFP 没有差异，Gefitinib 敏感性也未发生变化，这样的结果让我们很费解，直到我们发现 PC-9 AhR WT 和 PC-9 AhR CA 两株细胞对顺铂和紫杉醇的敏感性相当，即 AhR 信号通路活化导致的耐药仅限于 TKIs。化疗药物杀伤肿瘤细胞的原理和 TKIs 不同，前者直接损伤 DNA 或抑制细胞分裂，后者主要抑制酪氨酸激酶，阻断下游 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号转导。Western blot 结果显示过表达 AhR WT 增加 pAkt 和 pErk 表达，而过表达 AhR CA 不能增加 pAkt 和 pErk 表达，PC-9 AhR WT 细胞 Gefitinib 处理后 Akt 和 Erk 持续磷酸化，而 PC-9 AhR CA 细胞 Gefitinib 处理后 Akt 和 Erk 磷酸化被完全阻断，这是导致 Gefitinib 敏感性差异的分子基础。其它课题组也观察到 AhR 维持 Akt 和 Erk 磷酸化的作用：高表达 AhR 的 Hepa 1c1c7 小鼠肝癌细胞对凋亡刺激不敏感，紫外线照射后 pAkt 表达迅速升高，但低表达 AhR 的 LA1 小鼠肝癌细胞对凋亡刺激敏感，紫外线照射不增加 pAkt 表达；使用 AhR 抑制剂阻断 Hepa 1c1c 细胞 AhR 信号通路，Akt 磷酸化水平明显降低；另一项研究亦证实 TCDD 活化 AhR 信号通路，促进 Akt 和 Erk 磷酸化，使肺癌细胞抵抗凋亡刺激；其余 AhR 配体亦可活化 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号，增加肿瘤细胞侵袭转移能力。因此 AhR 过表达导致的 TKIs 耐药与旁路激酶信号耐药非常相似，两者都不依赖 EGFR，都可以维持 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号，都可以抵抗 TKIs 诱导的细胞凋亡。不同的是 AhR 不是蛋白激酶，二级和三级结构中亦缺乏激酶结构域，AhR 信号通路活化如何引起 Akt 和 Erk 磷酸化水平增加是我们的研究重点。

AhR 信号活化上调 Akt 和 Erk 磷酸化的作用非常迅速，H1975 细胞 10 nM TCDD 处理 15 min 后 pAkt 和 pErk 表达水平就明显增加，shRNA 下调 AhR 表达后 TCDD 不能诱导 pAkt 和 pErk 表达，说明 TCDD 增加 Akt 和 Erk 磷酸化的作用就是通过活化 AhR 实现的。qPCR 检测 AhR 靶基因 *cyp1a1* 和 *cyp1b1* 发现 TCDD 处理后 15 min

和 30 min, 靶基因转录并未增加, 即 AhR 诱导 Akt 和 Erk 磷酸化的时程与其转录激活靶基因的时程不匹配, 激光共聚焦显微镜观察后进一步发现 TCDD 处理 30 min 后大部分 AhR 蛋白仍然定位于胞浆, 未能进入胞核发挥转录作用, 这个发现引出了“AhR 蛋白通过转录非依赖活性增加 Akt 和 Erk 磷酸化”假设。我们后续研究中利用突变 AhR NLS 序列、shRNA 下调 ARNT、shRNA 下调靶基因 *cyp1a1* 和 *cyp1b1* 等一系列分子生物学手段抑制 AhR 转录作用也确认了上述假设, 即 AhR 导致 TKIs 耐药的作用与其转录功能无关, 与此相似的是 AhR 与 ER 相互作用也不依赖转录活性。科学家很久以前就注意到 TCDD 可以拮抗 ER 信号通路, 抑制 ER 阳性乳腺癌细胞增殖, 但具体的分子机制并不清楚^[174]。2007 年一篇发表在 Nature 上的研究论著深入揭示了 AhR 抑制 ER 信号通路的机理, 作者发现 TCDD 激活 AhR 并促进 AhR 蛋白与 Cul4B 形成具有泛素连接酶活性的 Cul4B-AhR 复合物, 后者通过蛋白酶体途径降解 ER 蛋白, 终止 ER 信号转导, 并且 Cul4B-AhR 复合物泛素连接酶活性不依赖 AhR 转录效应。在这个模型中 AhR 蛋白本身不具有泛素连接酶活性, 必须与 Cul4B 形成 Cul4B-AhR 复合物才能降解 ER 蛋白, 即降解 ER 蛋白的执行分子是 Cul4B, AhR 蛋白仅作为 adaptor 促进 ER 蛋白与 Cul4B 蛋白相互作用^[152]。这篇文章给我们很大启发, 提示在 TKIs 耐药模型中 AhR 蛋白也能作为 adaptor 招募其它有激酶活性的蛋白磷酸化 Akt 和 Erk, 旁路信号引起耐药。生物信息学分析预测到 AhR 蛋白内部有和 Src 蛋白相互作用的位点, 我们接下来研究 AhR 与 Src 相互作用以及 Src 对 TKIs 耐药性的影响。

Src 是人类发现的第一个癌基因, 这项成果获 1989 年诺贝尔生理学或医学奖。Src 基因编码的 Src 蛋白是一种非受体酪氨酸激酶 (non-receptor tyrosine kinase), 由 N 端豆蔻酰化序列、SH4 结构域、SH3 结构域、SH2 结构域、酪氨酸激酶结构域和 C 端调控结构域组成, 全长 536 个氨基酸。豆蔻酰化序列主要功能是调控 Src 蛋白细胞膜定位; SH3 结构域和 SH2 结构域是介导 Src 与其它蛋白相互作用的区域, 这一区域氨基酸保守性较高, 通常 SH3 结构域结合富含脯氨酸的蛋白基序, SH2 结构域识别磷酸化的酪氨酸残基, 将胞外生长因子信号传递至胞内; 酪氨酸激酶结构域是 Src 蛋白最重要的结构, ATP 结合位点位于该结构域; C 末端主要功能是调控 Src 激酶活性及蛋白相互作用^[175]。与受体酪氨酸激酶不同的是 Src 蛋白不能与生长因子结合, 只有生长因子先结合受体酪氨酸激酶, Src 蛋白通过 SH3 和 SH2 结构域与激活的受

酪氨酸激酶相互作用才能向下传递 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 细胞生长信号。Src 激酶活性取决于其激酶结构域 Y416 和 C 端调控结构域 Y527 酪氨酸残基磷酸化水平，蛋白三维结构分析显示 Src 非活化状态下 Y527 位点磷酸化，导致 Src 蛋白 C 端与 SH3 结构域和 SH2 结构域结合，包埋激酶活性位点 Y416 于蛋白内部，不使其磷酸化，Src 激酶失活；当生长因子刺激后 Y527 去磷酸化并与 SH3 结构域和 SH2 结构域解离，暴露 Y416 激酶活性位点，Src 信号活化。生理状态下 Y416 和 Y527 磷酸化水平保持动态平衡，Src 信号适时适度地开放或关闭，调控细胞增殖、凋亡、分化、粘附等生命活动，维持内环境稳态。Src 蛋白过量表达或 Y416 高度磷酸化时，下游 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路持续活化，细胞增殖、凋亡、分化、粘附过程失控，可以促进细胞癌变和肿瘤形成。体外过表达 Src 可转化小鼠成纤维细胞，转化后的细胞亦可在小鼠体内成瘤。在人乳腺癌和结直肠癌等肿瘤组织中均检测到 Y416 磷酸水平高于正常组织 4–6 倍，且磷酸化水平与肿瘤分级分期正相关。临床上 80% 肺腺癌，50% 肺鳞癌 Src 表达增加，提示 Src 可能是 NSCLC 潜在驱动基因和治疗靶点。FDA 批准使用的 Src TKIs 包括达沙替尼 (Dasatinib; SPRYCEL, Bristol-Myers Squibb)、Saracatinib (AZD0530, AstraZeneca) 和 Bosutinib (SKI-606, Wyeth)。体内外研究表明达沙替尼可以有效抑制 Src 激酶活性，抑制肿瘤细胞侵袭迁移和整合素介导的细胞粘附。达沙替尼对于间质起源或 EMT 的肿瘤细胞抑制作用较明显，此外，达沙替尼还能抑制肿瘤细胞转移，在前列腺癌骨转移动物模型中达沙替尼显著抑制骨转移灶大小并诱导细胞凋亡。虽然 SCLC 也高表达 Src，达沙替尼单药用于一线化疗失败 SCLC 无效^[176]；达沙替尼治疗 NSCLC 最有意义的成果是 MD Anderson 癌症中心 Faye Johnson 教授团队 2010 年发表在 J Clin Oncol 杂志上的评估达沙替尼一线用于 NSCLC 安全性和有效性的 II 期临床研究，入组 34 例未经治疗 NSCLC 患者给予达沙替尼 150–200 mg/d 口服治疗，ORR 为 43%，最主要不良反应是疲倦和呼吸困难，可能与达沙替尼增加胸水量有关^[177]。

Src 信号通路活化导致靶向治疗耐药的里程碑式研究成果是 Siyuan Zhang 教授发表的 Nature Med 论文，文中指出 Src 磷酸化水平增加可以绕过多种受体酪氨酸激酶，持续性活化下游 PI3K/Akt 信号通路，导致 ErbB2 阳性乳腺癌细胞曲妥珠单抗耐药^[178]。IP 实验发现 AhR 蛋白与 Src 蛋白在 TCDD 刺激下结合增强，并且这种蛋白相互结合依赖 AhR 靠近 C 端 SH2 结构域结合模体。我们重新分析了 NSCLC 细胞 AhR

和 Src 表达相关性,发现各细胞 Src 总蛋白没有明显差异,但 Y416 位点磷酸化 Src 蛋白在高表达 AhR 蛋白的 SPC-A-1 和 H1975 细胞中表达水平明显高于其它 AhR^{low} 细胞,shRNA 下调 H1975 细胞 AhR 表达抑制 Src 磷酸化,而在 PC-9 细胞过表达 AhR WT 增加 Src 磷酸化,说明 AhR 表达水平与 Src 磷酸化水平正相关。Gefitinib 联合 Src TKIs Dasatinib 或 PP2 抑制 Src 磷酸化可以完全阻断 PC-9 AhR WT 细胞 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路,shRNA 下调 Src 表达亦可克服过表达 AhR WT 导致的 TKIs 耐药,因此 Src 是 AhR 活化后发挥旁路信号的激酶,直接在 PC-9, H3122 和 HCC78 细胞过表达 Src Y527F 突变体亦可维持 Akt 和 Erk 磷酸化,导致 Gefitinib 和 Crizotinib 耐药。

综上所述,第三部分研究内容证实活化 AhR 信号通路导致 TKIs 耐药,进一步揭示了 AhR 蛋白作为 adaptor 招募 Src,以转录非依赖形式降低 TKIs 敏感性。Src 激酶绕过 EGFR、ALK 和 ROS1 持续性活化下游 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路,引起多种 TKIs 耐药,联合 Src TKIs 可以有效阻断上述耐药机制,克服 AhR 信号通路活化导致的耐药。但是 Src 为什么在 AhR 高表达细胞中磷酸化水平增加? AhR 又是怎样招募 Src 蛋白? Src 磷酸化水平又是如何调控……这些问题尚未解决,我们将在最后一部分研究中探究 Src 活化的分子机制。

第四部分 AhR 激活 Src 信号通路的分子机制

1 实验材料

1.1 细胞

PC-9	广东省人民医院吴一龙教授馈赠
H1975	购自 ATCC
HEK293	购自上海细胞库

1.2 载体和质粒

pCMV3 Myc Jak2	本课题组构建
pcDNA4.0 Flag AhR WT	本课题组构建
pLKO.1 Jak2 shRNA	北京生命科学研究所 (NIBS)
pLenti6.3 HA-Src WT	圣母大学 Siyuan Zhang 教授馈赠

1.3 试剂

RPMI 1640 培养基	Hyclone 公司
DMEM 培养基	Hyclone 公司
胰酶	Hyclone 公司
胎牛血清 FBS	Gibco 公司
青霉素/链霉素溶液	Hyclone 公司
嘌呤霉素 Puromycin	Sigma 公司
MTT	MP Biomedicals 公司
Gefitinib	Selleck 公司
Afatinib	Selleck 公司
AZD9291	Selleck 公司
TCDD	Sigma 公司
β -NF	Sigma 公司

Kyn	Sigma 公司
RIPA 裂解液	碧云天生物技术研究所
蛋白酶/磷酸酶抑制剂 Cocktail	Roche 公司
BCA 蛋白定量试剂盒	Takara 公司
胶回收试剂盒	Omega 公司
5×loading buffer	碧云天生物技术研究所
Tris	MP Biomedicals 公司
甘氨酸	MP Biomedicals 公司
SDS	MP Biomedicals 公司
丙烯酰胺	MP Biomedicals 公司
甲双叉丙烯酰胺	碧云天生物技术研究所
过硫酸铵	碧云天生物技术研究所
TMEMD	MP Biomedicals 公司
甲醇	天津市富宇精细化工有限公司
预染蛋白 marker	Fermentas 公司
硝酸纤维素膜 (NC 膜)	Millipore 公司
Tween 20	科昊生物工程有限责任公司
BSA	MP Biomedicals 公司
兔抗 PARP 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 AhR 抗体 (IHC 和 IF 用)	Abcam 公司
兔抗 AhR 抗体 (WB 用)	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 ARNT 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 pEGFR 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 EGFR 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 pAkt 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 Akt 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 pErk 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 Erk 抗体	Cell Signaling Technology 公司

兔抗 pSrc 抗体	Cell Signaling Technology 公司
兔抗 Src 抗体	Cell Signaling Technology 公司
小鼠抗 β -actin 抗体	Sigma 公司
小鼠抗 Flag 抗体 (IP 用)	Sigma 公司
小鼠抗 Flag 抗体 (WB 用)	Abbkine 公司
小鼠抗 cyp1a1 抗体	Millipore 公司
兔抗 cyp1b1 抗体	Santa Cruz 公司
HRP 标记抗兔 IgG	Cell Signaling Technology 公司
HRP 标记抗小鼠 IgG	Cell Signaling Technology 公司
ECL 发光试剂盒	Millipore 公司
显影粉	科昊生物工程有限责任公司
定影粉	科昊生物工程有限责任公司
胶片	Canon 公司

1.4 设备和耗材

超净工作台	Yatai Kelong 公司
细胞 CO ₂ 培养箱	Thermo 公司
细胞培养皿	Thermo 公司
移液器	Gilson 公司
负压吸引器	其林贝尔仪器制造有限公司
高压灭菌锅	TOMY 公司
电子天平	上海良平仪器仪表有限公司
磁力搅拌器	上海司乐仪器有限公司
纯水仪	Millipore 公司
SDS-PAGE 电泳槽	Tanon 公司
SDS-PAGE 转膜槽	Tanon 公司
激光共聚焦显微镜	Nikon 公司

2 实验方法

2.1 蛋白激酶筛选

H1975 细胞经溶剂或 AhR 配体处理 30 min, 使用 R&D System 公司 Human Phospho-Kinase Array Kit 检测细胞内蛋白激酶活性变化。该 Kit 由 4 张包被了激酶抗体的 NC 膜组成, 每张 NC 膜分为 A (1 – 10) 和 B (11 – 18) 两部分, 示意图如下 (图 4-1):

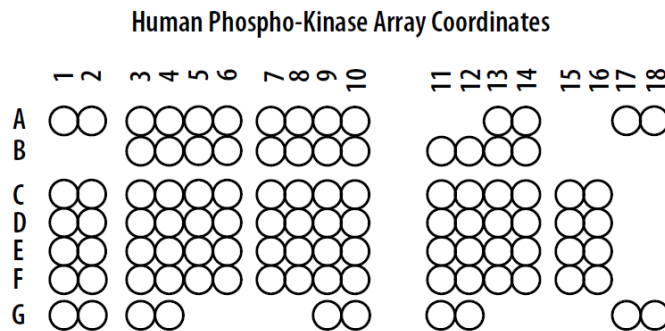


图 4-1. Phospho-Kinase Array 芯片示意图

2.1.1 细胞准备和样品处理

H1975 细胞接种于 10 cm 细胞培养皿, 待细胞融合度达 80% 去血清过夜培养, 次日给予终浓度为 10 nM TCDD、10 μ M β -NF 和 100 μ M Kyn 处理 30 min, 对照组细胞给予等体积溶剂处理。预冷 PBS 漂洗细胞, 细胞刮收集细胞样品于 1.5 ml EP 管中, 用 Human Phospho-Kinase Array Kit 中 buffer 6 冰上裂解细胞 30 min, 12000 rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min, BCA 法测定蛋白浓度, 各组样品分出 500 μ g 用于蛋白激酶芯片实验。

2.1.2 蛋白激酶芯片杂交

- (1) 揭去 A 膜和 B 膜表面保护层, 正面朝上, 置于随 Kit 配套的 8 格板中, 向各格中加入 1 ml buffer 1, 脱色摇床上室温封闭 1 h。
- (2) 500 μ g 蛋白样品用 buffer 1 稀释成终体积为 2 ml 的混合液, 吸尽 8 格板中 buffer 1, 每格加入 1 ml 混合液, 充分覆盖 A 膜和 B 膜, 脱色摇床上 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。
- (3) 将 A 膜和 B 膜从 8 格板中取出, 20 ml 1 \times Wash buffer 漂洗 3 次, 每次 10 min。
- (4) A 膜和 B 膜重新放入 8 格板中, A 膜用 1/5000 稀释的 Detection Antibody Cocktail A, B 膜用 1/5000 稀释的 Detection Antibody Cocktail B, 每格加入 1 ml,

脱色摇床上室温孵育 2 h。

- (5) 将 A 膜和 B 膜从 8 格板中取出, 20 ml 1×Wash buffer 漂洗 3 次, 每次 10 min。
- (6) A 膜和 B 膜重新放入 8 格板中, 1×buffer2/3 按照说明书标注稀释 Streptavidin-HRP, 每格加入 1 ml, 脱色摇床上室温孵育 30 min。
- (7) 20 ml 1×Wash buffer 漂洗 3 次, 每次 10 min。
- (8) ECL 发光。

2.1.3 结果判读分析

A 膜和 B 膜上均有用于定位的标记, 阅读胶片时先找到标记点, 对照说明书上排列顺序判断各点代表哪种激酶。同一种激酶以溶剂对照组的灰度值为基准, 各处理组灰度值以对照组倍数表示。

2.2 Jak2 低表达稳转细胞构建

2.2.1 Jak2 shRNA 慢病毒载体

pLKO.1-Jak2 shRNA 由 NIBS 生物文库中心提供, 共 2 个干扰位点, 干扰序列如下:

Jak2 CCGGGCTTTGTCTTTCGTGTCATTACTCGAGTAATGACACGAAAGACA

shRNA.1 AAGCTTTTTT

Jak2 CCGGGCAGAATTAGCAAACCTTATACTCGAGTATAAGGTTTGCTAATT

shRNA.2 CTGCTTTTTT

2.2.2 Jak2 shRNA 慢病毒包装

见前述。

2.2.3 稳转细胞筛选

见前述。

2.3 蛋白膜浆分离实验

使用 Pierce 公司 Mem-PER Membrane Protein Extraction Kit 分离细胞膜蛋白和浆蛋白, 按照试剂盒说明书操作。

2.4 IP 实验

见前述。

2.5 Western blot

见前述。

3 结果

3.1 AhR 信号活化后蛋白激酶筛选

我们用 3 种 AhR 配体活化 H1975 细胞 AhR 信号，蛋白激酶芯片筛选 AhR 活化后发生变化的蛋白激酶，以上调/下调倍数>2 位 cut-off 值，从激酶芯片中挑选出 17 个位点(图 4-2)，对应的激酶有 Akt、Erk、AMPK α 、Src、Stat2、Stat5a、Stat6、Stat5b、p70S6K 和 Stat3。有意思的是所有 Stat 家族蛋白在 AhR 配体组磷酸化水平平均增加(图 4-3)，这个发现引起了我们的注意，一般来说同一家族的蛋白磷酸化水平平均增加的情况见于上游蛋白激酶的活化，换言之，Stat 上游激酶磷酸化可以导致 Stat 家族激酶活化，于是我们根据芯片结果推测上游可能活化的蛋白激酶。

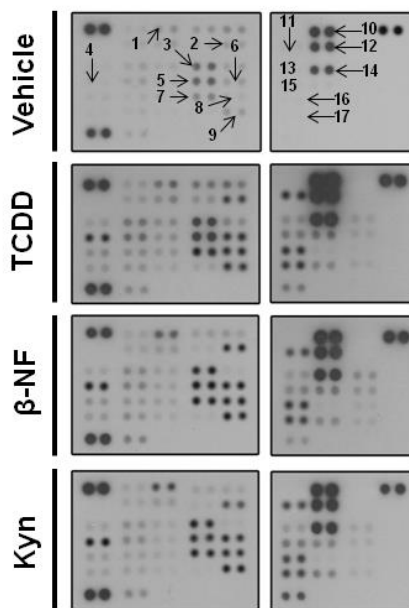


图 4-2. Phospho-Kinase Array 芯片原始结果

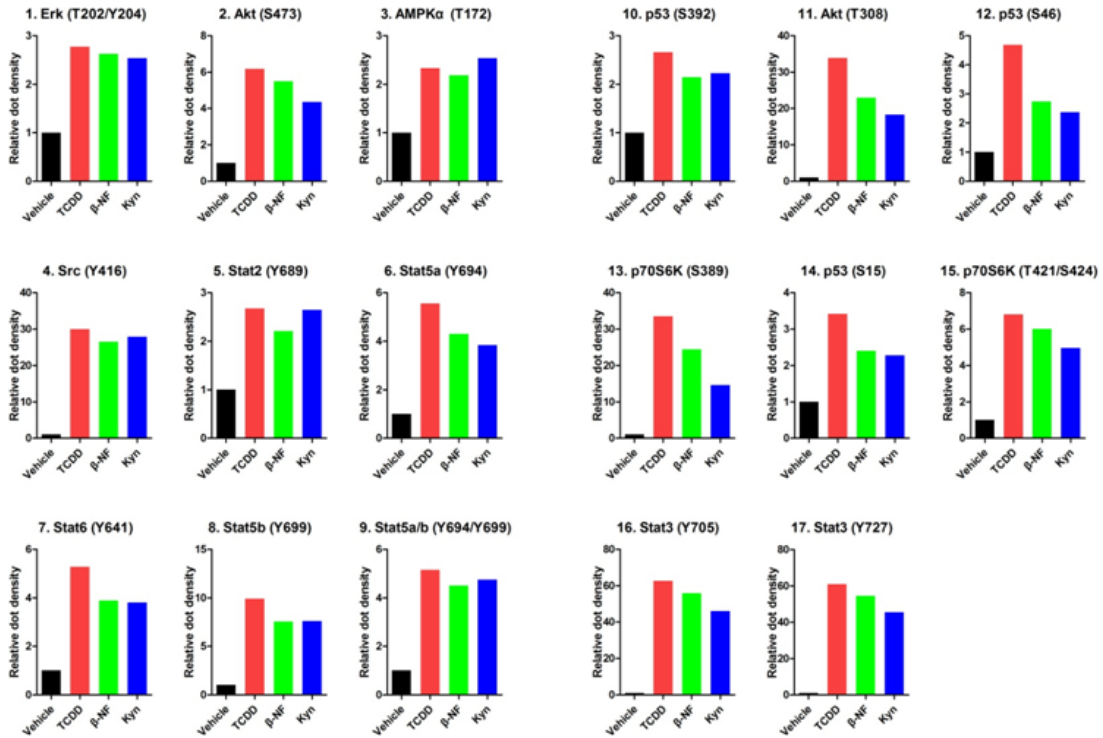


图 4-3. Phospho-Kinase Array 芯片结果分析

3.2 AhR 信号活化后 Jak2 激酶磷酸化 Src

大量文献提示 Stat 家族主要受 Jak2 磷酸化，而 Jak2 并未包含在上述蛋白激酶芯片中，我们接下来探究 Jak2 对 Src 磷酸化水平的影响。虽然不同 NSCLC 细胞 Jak2 总蛋白表达水平不一致，但磷酸化 Jak2 在高表达内源性 AhR 和 pSrc 的 NSCLC 细胞更高，提示 AhR、Src 和 Jak2 三者相互作用的可能性（图 4-4）。

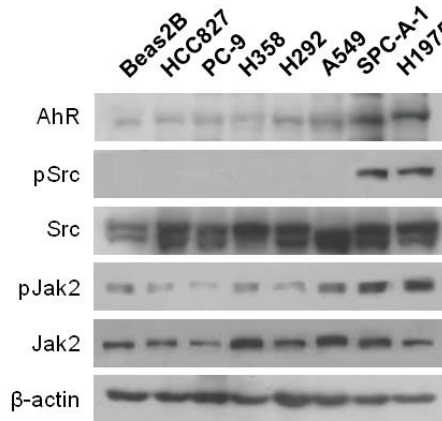


图 4-4. Western blot 检测 NSCLC 细胞 AhR、Src 和 Jak2 表达

我们推测 AhR 信号活化后促进 Src 与 Jak2 相互作用，后者是引起 Src 磷酸化的酪氨酸激酶，使用 Jak2 TKIs Ruxolitinib 抑制 H1975 细胞 Jak2 磷酸化可以减少 pSrc 表达水平（图 4-5）。

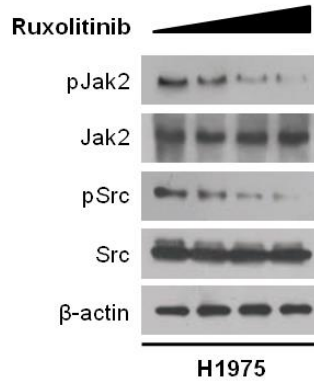


图 4-5. Ruxolitinib 抑制 H1975 细胞 Jak2 和 Src 磷酸化

PC-9 AhR WT 和 H1975 细胞在 TCDD 处理后 Src 磷酸化水平迅速增加，下游 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路随之活化。利用 shRNA 下调 Jak2 表达，Src 磷酸化水平不随 TCDD 处理而增加，Akt 和 Erk 磷酸化水平亦不发生变化，提示 AhR 信号促进 Jak2 磷酸化 Src（图 4-6）。

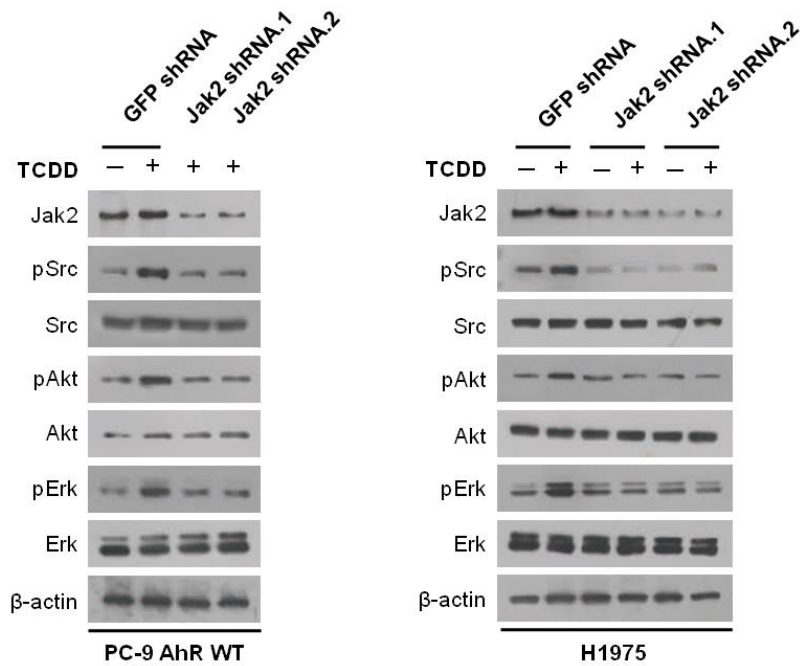


图 4-6. shRNA 抑制 Jak2 表达下调 Src、Akt 和 Erk 磷酸化

为了证明 AhR 信号诱导的 Jak2 和 Src 相互作用, HEK293 细胞瞬时转染 HA Src、Myc Jak2 和 Flag AhR 质粒, 10 nM TCDD 处理 30 min 后提取细胞总蛋白进行 IP 实验。我们用 HA 标签抗体捕获和 Src 相互作用的蛋白质, Western blot 结果显示未经 TCDD 活化的 HEK293 细胞中 Src 与 AhR 有微弱的结合, 考虑是内源性配体活化 AhR 信号, Src 与 Jak2 几乎不结合; 细胞 TCDD 处理后 Src 与 AhR 结合明显增强, 并且此时与 Jak2 亦有相互作用。Src 与 Jak2 相互作用必须依赖 AhR, 在 AhR 缺失状态下 Src 与 Jak2 相互作用消失且不能被 TCDD 诱导, 故 AhR 是联系 Jak2 与 Src 相互作用的关键分子, AhR 信号通路活化促进两者结合, Src 磷酸化水平增加, 后者激活 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号导致 TKIs 耐药 (图 4-7)。

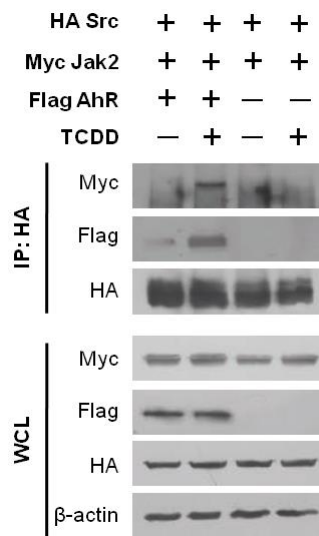


图 4-7. IP 实验证明 AhR 介导 Src 和 Jak2 相互作用

上述结果强烈提示 AhR 活化的 NSCLC 细胞中存在 Jak2-Src 旁路, 并且 AhR 作为介导 Src 与 Jak2 相互作用的伴侣蛋白促进二者结合, 我们将其归结为 Jak2-AhR-Src 旁路激酶信号, 这样 PC-9 AhR WT 细胞同时具有 EGFR 激酶信号和 Jak2-AhR-Src 旁路激酶信号, EGFR TKIs 和 Jak2 TKIs 单药不能完全阻断下游 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 通路, 细胞对上述 TKIs 耐药; 相反, 如果 EGFR TKIs 和 Jak2 TKIs 联用则可以抑制 PI3K/Akt 和 MEK/Erk, 克服 TKIs 耐药 (图 4-8)。

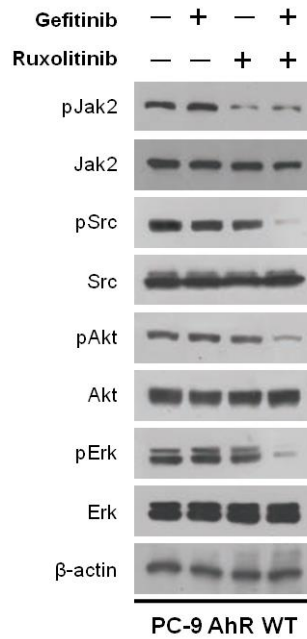


图 4-8. Jak2 抑制剂克服过表达 AhR WT 细胞 TKIs 耐药

3.3 AhR 瞬时膜转位促进 Jak2 磷酸化 Src

AhR 蛋白非活化状态下定位于细胞浆，受配体活化后进入细胞核启动靶基因转录。Src 是胞浆和胞核内表达的酪氨酸激酶，而 Jak2 是细胞膜表面的蛋白受体，三者定位不尽相同，那么 AhR 在时空上是如何介导 Src 与 Jak2 蛋白相互作用呢？我们用 10 nM TCDD 处理 H1975 细胞 15 min、30 min 和 60 min，分离细胞膜蛋白和胞浆蛋白，以 EGFR 为胞膜蛋白内参， α -tubulin 为胞浆蛋白内参，发现 AhR 蛋白在细胞膜瞬时富集，TCDD 处理 30 min 达到高峰，随后减少，而 AhR 在胞浆蛋白组分中随 TCDD 处理时间延长逐渐减少（图 4-9）。

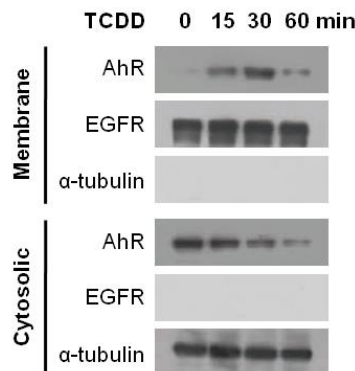


图 4-9. 膜浆蛋白分离实验检测 AhR 蛋白瞬时膜转位

AhR 蛋白细胞膜瞬时富集的时程和 Src 磷酸化一致，而 Src 激酶一旦磷酸化即可自动放大磷酸化信号，使 Src 一直处于磷酸化状态，因此 AhR 蛋白瞬时膜转位是 Src 被 Jak2 磷酸化的充要条件。这个结论较为合理地解释了过表达 AhR WT 和 AhR CA 对 TKIs 敏感性的不同影响：AhR CA 由于缺失配体结合结构域，AhR 信号在无配体刺激条件下活化，AhR 蛋白自动进入细胞核而不发生瞬时发生细胞膜转位，Src 没有机会和 Jak2 相互作用，不能在 Y416 位点磷酸化，从而不能旁路激活 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路，不能引起 TKIs 耐药。为了证明这个假设，我们构建了 AhR CA Δ NLS 突变体，与 AhR CA 不同的是这个突变体 AhR 蛋白持续性定位于胞浆，不能进入细胞核，如果上述假设成立，AhR CA Δ NLS 可以介导 Src 与 Jak2 相互作用，旁路活化 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号。HEK293 细胞转染 AhR WT 并用 10 nM TCDD 处理 30 min，Akt 和 Erk 磷酸化水平迅速增加；转染 AhR CA 组细胞不论有无 TCDD 处理，Akt 和 Erk 磷酸化水平均不发生变化；转染 AhR CA Δ NLS 组细胞不需 TCDD 处理 Akt 和 Erk 磷酸化水平就与 AhR WT + TCDD 组细胞相当，TCDD 处理后 Akt 和 Erk 磷酸化未进一步增加，说明 AhR CA Δ NLS 不需要配体刺激就已处于活化状态（图 4-10）。

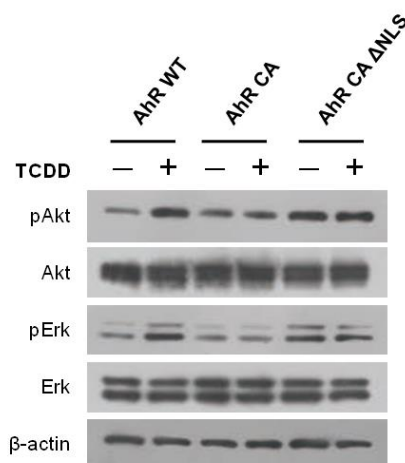


图 4-10. 除去 AhR CA 的 NLS 序列增加 Akt 和 Erk 磷酸化

4 讨论

本部分研究主要目的是阐明 AhR 调控 Src 磷酸化的分子机制，我们使用 3 种配体活化 AhR 信号，蛋白激酶芯片筛选出 17 个明显变化的位点，这 17 个位点中包含

了全部的 Sata 家族蛋白, Stat2、Stat5a、Stat6、Stat5b 磷酸化水平在 AhR 配体处理后均显著升高, 强烈提示 Stat 家族蛋白上游的激酶处于活化状态。查阅大量文献后, 我们锁定到 Jak2 激酶 (Janus kinase 2)。

Jak2 可以被多种细胞因子活化, 包括干扰素、白介素、促红细胞生成素、生长因子等, 活化的 Jak2 激酶活性增强, 磷酸化带有 SH2 和 SH3 结构域的蛋白, 转导细胞生长信号。Jak2/Stat 信号最重要的功能是调控造血, 特别是 Jak2 基因 V617F 突变引起 Jak2/Stat 信号持续活化, 导致骨髓增殖性疾病和红细胞增多症。Jak2/Stat 信号在多种实体瘤异常活化, 临床上约 60% NSCLC 标本 Jak2 磷酸化水平增加, 后者可能诱导 VEGF 和 FGF 表达促进肿瘤血管生成^[179]; 大鼠乳腺上皮细胞过表达促红细胞生成素受体并用促红细胞生成素激活 Jak2/Stat 信号, 细胞侵袭、迁移和形成克隆的能力明显增加, 胞内 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路活化, Jak2 TKIs 则能阻断促红细胞生成素的上述效应^[180], 提示 Jak2 信号在肿瘤发生发展过程的关键作用; 2009 年 Cancer Cell 发表一篇全面评价 Jak2 TKIs AZD1480 用于实体瘤的研究论著, AZD1480 可以完全阻断 Jak2 介导的 Stat3 入核, 在体内体外抑制多株 Sata3-addicted 肿瘤细胞增殖^[181]; 另一个被 FDA 批准用于治疗 Jak2 突变骨髓增殖性疾病的 TKIs Ruxolitinib 在肿瘤治疗中亦有一定作用, Ruxolitinib 在体外阻断肝癌细胞 Jak2/Stat 信号, 抑制肝癌细胞增殖, 在体内的耐受性较好, 与化疗联合可以延长胰腺癌患者生存时间; 促红细胞生成素激活 Jak2 可以促进 ErbB2 阳性乳腺癌细胞 Akt 和 Erk 磷酸化, 导致 ErbB2 靶向治疗失效, TKIs 或 shRNA 抑制 Jak2 则恢复曲妥珠单抗敏感性^[182]。我们受到这些结果启发, 推测 Jak2 可能磷酸化 Src 维持下游 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路。

Ruxolitinib 和 shRNA 抑制 Jak2 同时明显抑制 Src 磷酸化, 阻断 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号转导, 这与我们预期结果一致, 但 Jak2 与 Src 相互作用是否依赖 AhR? AhR WT 过表达的 TKIs 耐药细胞中阻断 Jak2 能否克服 TKIs 耐药? 我们通过 IP 实验回答第一个问题, 发现 TCDD 刺激后形成 Src-AhR-Jak2 复合物, 在无 TCDD 刺激或无 AhR 存在情况下 Src 不能与 Jak2 结合, 说明 AhR 蛋白作为 adaptor 不仅招募 Src, 还招募 Jak2, 提供 Src 与 Jak2 相互作用的条件; 另一方面 TCDD 刺激后 AhR 蛋白瞬时膜转位, 可以带着 Src 蛋白定位到胞浆近膜侧, 使 Jak2 激酶磷酸化 Src, 旁路活化 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路, 故本课题发现的完整耐药模型是 AhR 高表达和信

号通路活化招募 Src 和 Jak2 两种激酶，Src 与 Jak2 蛋白相互作用，持续性磷酸化下游 Akt 和 Erk，导致 TKIs 耐药，阻断 Jak2 或 Src 旁路激酶信号可以克服 TKIs 耐药（图 4-11）。

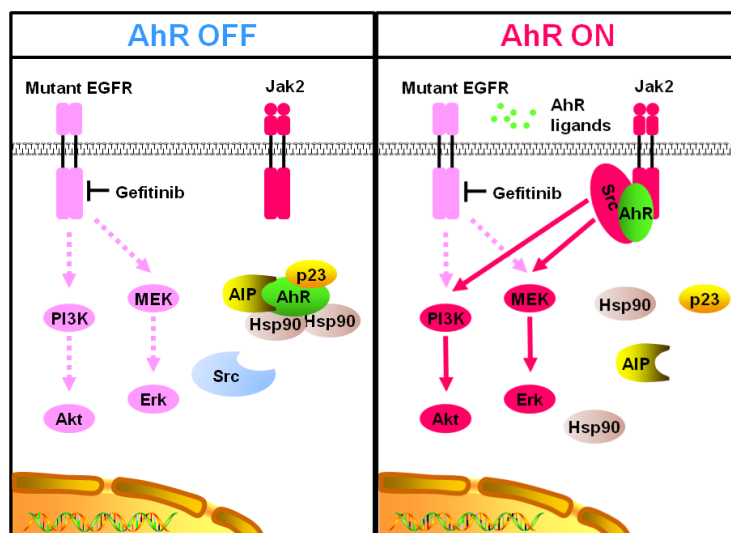


图 4-11. 活化 AhR 信号通路招募 Jak2 和 Src 导致 EGFR TKIs 耐药作用模式图

这种模型较合理的解释了 AhR 在耐药细胞和耐药标本的高表达现象，也揭示了本身不具有激酶活性的蛋白是如何在 TKIs 处理后维持 Akt 和 Erk 磷酸化，突出了 AhR 作为 adaptor 的非转录活性，这与 AhR 作为泛素连接酶降解 ER 的作用模式相似，两者均脱离 AhR 经典的 genomic effect 而强调其非经典的 non-genomic effect，这样的发现不仅更新了我们对于 TKIs 耐药分子机制的认识，也推动了 AhR 转录靶基因代谢毒性物质以外的研究，人们已经意识到 AhR 调控细胞增殖、凋亡、周期转化、激酶信号转导等一系列 non-genomic effect，并设计研发了新型 AhR 抑制剂 SR1 和 GNF351 用于体外扩增造血干细胞和治疗自身免疫病^[183, 184]，相信 AhR 还参与了很多病理生理过程，在肿瘤治疗领域除了调控靶向治疗敏感性，AhR 还有可能调控免疫治疗反应性，阻断 AhR 信号能否提高抗 PD-L1/PD-1 有效率？筛查内源性 AhR 表达水平能否预测肿瘤患者免疫治疗的有效性？这些问题尚未解决，本课题组后续将深入研究 AhR 调控 PD-L1/PD-1 的作用和机制，以期助力肿瘤免疫治疗，为提高免疫治疗有效性提供理论和实验依据。

小 结

本课题从 TCGA 数据库入手, 从分子、细胞、动物和患者 4 个层次全面评估了 AhR 蛋白对于 TKIs 靶向治疗敏感性的影响和机制, 报道了 AhR 作为 adaptor 导致 TKIs 耐药的新功能, 这些发现不仅更新了人们对 TKIs 耐药性的认识, 更突出了 AhR 转录因子活性以外的功能。本课题的重要发现归纳为以下 4 个方面:

- (1) AhR 蛋白可作为 NSCLC 预后的预测指标, AhR 蛋白表达水平与患者生存时间负相关。
- (2) AhR 蛋白在 TKIs 耐药细胞系和患者标本高表达。药物或 shRNA 抑制 AhR 信号通路恢复 EGFR TKIs 敏感性; 敏感细胞过表达 AhR 或配体活化 AhR 信号通路导致 TKIs 耐药。
- (3) AhR 以转录活性非依赖方式招募 Src 并瞬时膜转位, AhR-Src 复合物在近膜侧与 Jak2 激酶相互作用, 后者磷酸化 Src 旁路活化 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路。Src 被 Jak2 磷酸化必须由 AhR 介导, AhR 蛋白发挥 adaptor 作用。
- (4) 抑制 Src 或 Jak2 激酶活性亦能克服 AhR 活化引起的 TKIs 耐药。Src 和 Jak2 是 AhR “耐药旁路” 上的关键激酶。

参考文献

1. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer Statistics, 2017*. CA Cancer J Clin, 2017. **67**(1): p. 7-30.
2. Chen, W., et al., *Cancer statistics in China, 2015*. CA Cancer J Clin, 2016. **66**(2): p. 115-32.
3. Pietanza, M.C., et al., *Small cell lung cancer: will recent progress lead to improved outcomes?* Clin Cancer Res, 2015. **21**(10): p. 2244-55.
4. Spiro, S.G. and G.A. Silvestri, *One hundred years of lung cancer*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(5): p. 523-9.
5. Ellis, R.W., et al., *The p21 src genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes*. Nature, 1981. **292**(5823): p. 506-11.
6. Vojtek, A.B. and C.J. Der, *Increasing complexity of the Ras signaling pathway*. J Biol Chem, 1998. **273**(32): p. 19925-8.
7. Santos, E., et al., *Malignant activation of a K-ras oncogene in lung carcinoma but not in normal tissue of the same patient*. Science, 1984. **223**(4637): p. 661-4.
8. Johnson, L., et al., *Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1111-6.
9. Schubbert, S., K. Shannon, and G. Bollag, *Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(4): p. 295-308.
10. Tam, I.Y., et al., *Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation patterns in non-small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(5): p. 1647-53.
11. Keohavong, P., et al., *K-ras mutations in lung carcinomas from nonsmoking women exposed to unvented coal smoke in China*. Lung Cancer, 2003. **41**(1): p. 21-7.
12. Gao, B., et al., *Spectrum of LKB1, EGFR, and KRAS mutations in chinese lung adenocarcinomas*. J Thorac Oncol, 2010. **5**(8): p. 1130-5.
13. Zhou, W. and D.C. Christiani, *East meets West: ethnic differences in epidemiology and clinical behaviors of lung cancer between East Asians and Caucasians*. Chin J Cancer, 2011. **30**(5): p. 287-92.
14. Meng, D., et al., *Prognostic value of K-RAS mutations in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review with meta-analysis*. Lung Cancer, 2013. **81**(1): p. 1-10.
15. Mascaux, C., et al., *The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis*. Br J Cancer, 2005. **92**(1): p. 131-9.
16. Schiller, J.H., et al., *Lack of prognostic significance of p53 and K-ras mutations in primary resected non-small-cell lung cancer on E4592: a Laboratory Ancillary Study on an Eastern Cooperative Oncology Group Prospective Randomized Trial of Postoperative Adjuvant Therapy*. J Clin Oncol, 2001. **19**(2): p. 448-57.
17. Downward, J., et al., *Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences*. Nature, 1984. **307**(5951): p. 521-7.

18. Hynes, N.E. and H.A. Lane, *ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(5): p. 341-54.
19. Shepherd, F.A., et al., *Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(2): p. 123-32.
20. Bezjak, A., et al., *Symptom improvement in lung cancer patients treated with erlotinib: quality of life analysis of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21*. J Clin Oncol, 2006. **24**(24): p. 3831-7.
21. Kim, E.S., et al., *Gefitinib versus docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer (INTEREST): a randomised phase III trial*. Lancet, 2008. **372**(9652): p. 1809-18.
22. Herbst, R.S., et al., *Selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 is generally well-tolerated and has activity in non-small-cell lung cancer and other solid tumors: results of a phase I trial*. J Clin Oncol, 2002. **20**(18): p. 3815-25.
23. Albanell, J., et al., *Pharmacodynamic studies of the epidermal growth factor receptor inhibitor ZD1839 in skin from cancer patients: histopathologic and molecular consequences of receptor inhibition*. J Clin Oncol, 2002. **20**(1): p. 110-24.
24. Ranson, M., et al., *ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, is well tolerated and active in patients with solid, malignant tumors: results of a phase I trial*. J Clin Oncol, 2002. **20**(9): p. 2240-50.
25. Paez, J.G., et al., *EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy*. Science, 2004. **304**(5676): p. 1497-500.
26. Lynch, T.J., et al., *Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib*. N Engl J Med, 2004. **350**(21): p. 2129-39.
27. Sasaki, H., et al., *EGFR and erbB2 mutation status in Japanese lung cancer patients*. Int J Cancer, 2006. **118**(1): p. 180-4.
28. Sasaki, H., et al., *EGFR Mutation status in Japanese lung cancer patients: genotyping analysis using LightCycler*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(8): p. 2924-9.
29. Mok, T.S., et al., *Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma*. N Engl J Med, 2009. **361**(10): p. 947-57.
30. Zhou, C., et al., *Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study*. Lancet Oncol, 2011. **12**(8): p. 735-42.
31. Shi, Y., et al., *Icotinib versus gefitinib in previously treated advanced non-small-cell lung cancer (ICOGEN): a randomised, double-blind phase 3 non-inferiority trial*. Lancet Oncol, 2013. **14**(10): p. 953-61.
32. Janne, P.A., et al., *Randomized phase II trial of erlotinib alone or with carboplatin and paclitaxel in patients who were never or light former smokers with advanced lung adenocarcinoma: CALGB 30406 trial*. J Clin Oncol, 2012. **30**(17): p. 2063-9.
33. Pao, W., et al., *EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(36): p. 13306-11.
34. Gallant, J.N., et al., *EGFR Kinase Domain Duplication (EGFR-KDD) Is a Novel Oncogenic Driver in Lung Cancer That Is Clinically Responsive to Afatinib*. Cancer Discov, 2015. **5**(11): p. 1155-63.
35. Konduri, K., et al., *EGFR Fusions as Novel Therapeutic Targets in Lung Cancer*. Cancer Discov,

2016. **6**(6): p. 601-11.
36. Stoica, G.E., et al., *Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin*. J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 16772-9.
 37. Iwahara, T., et al., *Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system*. Oncogene, 1997. **14**(4): p. 439-49.
 38. Morris, S.W., et al., *Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma*. Science, 1994. **263**(5151): p. 1281-4.
 39. Chiarle, R., et al., *The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(1): p. 11-23.
 40. Soda, M., et al., *Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer*. Nature, 2007. **448**(7153): p. 561-6.
 41. Takeuchi, K., et al., *KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinas identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(9): p. 3143-9.
 42. Togashi, Y., et al., *KLC1-ALK: a novel fusion in lung cancer identified using a formalin-fixed paraffin-embedded tissue only*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31323.
 43. Shaw, A.T. and J.A. Engelman, *ALK in lung cancer: past, present, and future*. J Clin Oncol, 2013. **31**(8): p. 1105-11.
 44. Shaw, A.T., et al., *Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK*. J Clin Oncol, 2009. **27**(26): p. 4247-53.
 45. Won, J.K., et al., *Concomitant ALK translocation and EGFR mutation in lung cancer: a comparison of direct sequencing and sensitive assays and the impact on responsiveness to tyrosine kinase inhibitor*. Ann Oncol, 2015. **26**(2): p. 348-54.
 46. Baldi, L., et al., *Concomitant EGFR mutation and ALK rearrangement in lung adenocarcinoma is more frequent than expected: report of a case and review of the literature with demonstration of genes alteration into the same tumor cells*. Lung Cancer, 2014. **86**(2): p. 291-5.
 47. Minca, E.C., et al., *ALK status testing in non-small cell lung carcinoma: correlation between ultrasensitive IHC and FISH*. J Mol Diagn, 2013. **15**(3): p. 341-6.
 48. Wong, D.W., et al., *The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS*. Cancer, 2009. **115**(8): p. 1723-33.
 49. Christensen, J.G., et al., *Cytoreductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma*. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(12 Pt 1): p. 3314-22.
 50. Kwak, E.L., et al., *Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2010. **363**(18): p. 1693-703.
 51. Shaw, A.T., et al., *Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer*. N Engl J Med, 2013. **368**(25): p. 2385-94.
 52. Solomon, B.J., et al., *First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer*. N Engl J Med, 2014. **371**(23): p. 2167-77.
 53. Rikova, K., et al., *Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1190-203.
 54. Bergethon, K., et al., *ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers*. J Clin Oncol, 2012. **30**(8): p. 863-70.

55. Ou, S.H., et al., *ROS1 as a 'druggable' receptor tyrosine kinase: lessons learned from inhibiting the ALK pathway*. Expert Rev Anticancer Ther, 2012. **12**(4): p. 447-56.
56. Shaw, A.T., et al., *Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2014. **371**(21): p. 1963-71.
57. Kohno, T., et al., *Beyond ALK-RET, ROS1 and other oncogene fusions in lung cancer*. Transl Lung Cancer Res, 2015. **4**(2): p. 156-64.
58. Solit, D.B., et al., *BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition*. Nature, 2006. **439**(7074): p. 358-62.
59. Dhomen, N., et al., *Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice*. Cancer Cell, 2009. **15**(4): p. 294-303.
60. Satyamoorthy, K., et al., *Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation*. Cancer Res, 2003. **63**(4): p. 756-9.
61. Dankort, D., et al., *Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma*. Nat Genet, 2009. **41**(5): p. 544-52.
62. Samowitz, W.S., et al., *Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers*. Cancer Res, 2005. **65**(14): p. 6063-9.
63. Xing, M., et al., *Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer*. JAMA, 2013. **309**(14): p. 1493-501.
64. Tiacci, E., et al., *Simple genetic diagnosis of hairy cell leukemia by sensitive detection of the BRAF-V600E mutation*. Blood, 2012. **119**(1): p. 192-5.
65. Marchetti, A., et al., *Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer harboring BRAF mutations*. J Clin Oncol, 2011. **29**(26): p. 3574-9.
66. Dankort, D., et al., *A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors*. Genes Dev, 2007. **21**(4): p. 379-84.
67. Takeuchi, K., et al., *RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer*. Nat Med, 2012. **18**(3): p. 378-81.
68. Wang, R., et al., *RET fusions define a unique molecular and clinicopathologic subtype of non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2012. **30**(35): p. 4352-9.
69. Hirsch, F.R., M. Varella-Garcia, and F. Cappuzzo, *Predictive value of EGFR and HER2 overexpression in advanced non-small-cell lung cancer*. Oncogene, 2009. **28 Suppl 1**: p. S32-7.
70. Shigematsu, H., et al., *Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas*. Cancer Res, 2005. **65**(5): p. 1642-6.
71. Perera, S.A., et al., *HER2YVMA drives rapid development of adenosquamous lung tumors in mice that are sensitive to BIBW2992 and rapamycin combination therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(2): p. 474-9.
72. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers*. Nature, 2012. **489**(7417): p. 519-25.
73. Kawano, O., et al., *PIK3CA gene amplification in Japanese non-small cell lung cancer*. Lung Cancer, 2007. **58**(1): p. 159-60.
74. Hammerman, P.S., et al., *Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer*. Cancer Discov, 2011. **1**(1): p. 78-89.
75. Brunner, A.M., et al., *Treatment-related toxicities in a phase II trial of dasatinib in patients with squamous cell carcinoma of the lung*. J Thorac Oncol, 2013. **8**(11): p. 1434-7.

76. Weiss, J., et al., *Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer*. *Sci Transl Med*, 2010. **2**(62): p. 62ra93.
77. Seo, A.N., et al., *FGFR1 amplification is associated with poor prognosis and smoking in non-small-cell lung cancer*. *Virchows Arch*, 2014. **465**(5): p. 547-58.
78. Kim, E.S., et al., *The BATTLE trial: personalizing therapy for lung cancer*. *Cancer Discov*, 2011. **1**(1): p. 44-53.
79. Papadimitrakopoulou, V., et al., *The BATTLE-2 Study: A Biomarker-Integrated Targeted Therapy Study in Previously Treated Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer*. *J Clin Oncol*, 2016.
80. Herbst, R.S., et al., *Lung Master Protocol (Lung-MAP)-A Biomarker-Driven Protocol for Accelerating Development of Therapies for Squamous Cell Lung Cancer: SWOG S1400*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(7): p. 1514-24.
81. Cook, J.R., et al., *Anaplastic lymphoma kinase (ALK) expression in the inflammatory myofibroblastic tumor: a comparative immunohistochemical study*. *Am J Surg Pathol*, 2001. **25**(11): p. 1364-71.
82. Butrynski, J.E., et al., *Crizotinib in ALK-rearranged inflammatory myofibroblastic tumor*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(18): p. 1727-33.
83. Mano, H., *ALKoma: a cancer subtype with a shared target*. *Cancer Discov*, 2012. **2**(6): p. 495-502.
84. McNeil, C., *NCI-MATCH launch highlights new trial design in precision-medicine era*. *J Natl Cancer Inst*, 2015. **107**(7).
85. Diaz, L.A., Jr. and A. Bardelli, *Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA*. *J Clin Oncol*, 2014. **32**(6): p. 579-86.
86. Bai, H., et al., *Epidermal growth factor receptor mutations in plasma DNA samples predict tumor response in Chinese patients with stages IIIB to IV non-small-cell lung cancer*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(16): p. 2653-9.
87. Sacher, A.G., et al., *Prospective Validation of Rapid Plasma Genotyping for the Detection of EGFR and KRAS Mutations in Advanced Lung Cancer*. *JAMA Oncol*, 2016. **2**(8): p. 1014-22.
88. Oxnard, G.R., et al., *Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA*. *Clin Cancer Res*, 2014. **20**(6): p. 1698-705.
89. Oxnard, G.R., et al., *Association Between Plasma Genotyping and Outcomes of Treatment With Osimertinib (AZD9291) in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer*. *J Clin Oncol*, 2016. **34**(28): p. 3375-82.
90. Krebs, M.G., et al., *Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer*. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(12): p. 1556-63.
91. Yu, M., et al., *Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility*. *Science*, 2014. **345**(6193): p. 216-20.
92. Sos, M.L., et al., *PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR*. *Cancer Res*, 2009. **69**(8): p. 3256-61.
93. Kim, G.W., et al., *Multiple resistant factors in lung cancer with primary resistance to EGFR-TK inhibitors confer poor survival*. *Lung Cancer*, 2015. **88**(2): p. 139-46.
94. Faber, A.C., et al., *BIM expression in treatment-naive cancers predicts responsiveness to kinase inhibitors*. *Cancer Discov*, 2011. **1**(4): p. 352-65.

95. Costa, C., et al., *The impact of EGFR T790M mutations and BIM mRNA expression on outcome in patients with EGFR-mutant NSCLC treated with erlotinib or chemotherapy in the randomized phase III EURTAC trial.* Clin Cancer Res, 2014. **20**(7): p. 2001-10.
96. Zhao, M., et al., *The Bim deletion polymorphism clinical profile and its relation with tyrosine kinase inhibitor resistance in Chinese patients with non-small cell lung cancer.* Cancer, 2014. **120**(15): p. 2299-307.
97. Jackman, D., et al., *Clinical definition of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer.* J Clin Oncol, 2010. **28**(2): p. 357-60.
98. Pao, W., et al., *Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain.* PLoS Med, 2005. **2**(3): p. e73.
99. Kobayashi, S., et al., *EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib.* N Engl J Med, 2005. **352**(8): p. 786-92.
100. Riely, G.J., *Second-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer.* J Thorac Oncol, 2008. **3**(6 Suppl 2): p. S146-9.
101. Finlay, M.R., et al., *Discovery of a potent and selective EGFR inhibitor (AZD9291) of both sensitizing and T790M resistance mutations that spares the wild type form of the receptor.* J Med Chem, 2014. **57**(20): p. 8249-67.
102. Janne, P.A., et al., *AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer.* N Engl J Med, 2015. **372**(18): p. 1689-99.
103. Mok, T.S., et al., *Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer.* N Engl J Med, 2017. **376**(7): p. 629-640.
104. Choi, Y.L., et al., *EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors.* N Engl J Med, 2010. **363**(18): p. 1734-9.
105. Shaw, A.T., et al., *Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer.* N Engl J Med, 2014. **370**(13): p. 1189-97.
106. Zou, H.Y., et al., *PF-06463922 is a potent and selective next-generation ROS1/ALK inhibitor capable of blocking crizotinib-resistant ROS1 mutations.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(11): p. 3493-8.
107. Engelman, J.A., et al., *MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling.* Science, 2007. **316**(5827): p. 1039-43.
108. Yano, S., et al., *Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations.* Cancer Res, 2008. **68**(22): p. 9479-87.
109. Takezawa, K., et al., *HER2 amplification: a potential mechanism of acquired resistance to EGFR inhibition in EGFR-mutant lung cancers that lack the second-site EGFR T790M mutation.* Cancer Discov, 2012. **2**(10): p. 922-33.
110. Katayama, R., et al., *Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers.* Sci Transl Med, 2012. **4**(120): p. 120ra17.
111. Zakowski, M.F., et al., *EGFR mutations in small-cell lung cancers in patients who have never smoked.* N Engl J Med, 2006. **355**(2): p. 213-5.
112. Morinaga, R., et al., *Sequential occurrence of non-small cell and small cell lung cancer with the same EGFR mutation.* Lung Cancer, 2007. **58**(3): p. 411-3.
113. Sequist, L.V., et al., *Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors.* Sci Transl Med, 2011. **3**(75): p. 75ra26.

114. Oser, M.G., et al., *Transformation from non-small-cell lung cancer to small-cell lung cancer: molecular drivers and cells of origin*. Lancet Oncol, 2015. **16**(4): p. e165-72.
115. Uramoto, H., et al., *Epithelial-mesenchymal transition in EGFR-TKI acquired resistant lung adenocarcinoma*. Anticancer Res, 2010. **30**(7): p. 2513-7.
116. Hata, A.N., et al., *Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to epidermal growth factor receptor inhibition*. Nat Med, 2016. **22**(3): p. 262-9.
117. Shaw, A.T., et al., *Resensitization to Crizotinib by the Lorlatinib ALK Resistance Mutation L1198F*. N Engl J Med, 2016. **374**(1): p. 54-61.
118. Thress, K.S., et al., *Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M*. Nat Med, 2015. **21**(6): p. 560-2.
119. Salzano, M., et al., *Human aryl-hydrocarbon receptor and its interaction with dioxin and physiological ligands investigated by molecular modelling and docking simulations*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **413**(2): p. 176-81.
120. Dolwick, K.M., H.I. Swanson, and C.A. Bradfield, *In vitro analysis of Ah receptor domains involved in ligand-activated DNA recognition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(18): p. 8566-70.
121. Watson, A.J. and O. Hankinson, *Dioxin- and Ah receptor-dependent protein binding to xenobiotic responsive elements and G-rich DNA studied by in vivo footprinting*. J Biol Chem, 1992. **267**(10): p. 6874-8.
122. Kohle, C., et al., *Conditional expression of a constitutively active aryl hydrocarbon receptor in MCF-7 human breast cancer cells*. Arch Biochem Biophys, 2002. **402**(2): p. 172-9.
123. Ikuta, T., Y. Kobayashi, and K. Kawajiri, *Cell density regulates intracellular localization of aryl hydrocarbon receptor*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 19209-16.
124. Ikuta, T., et al., *Nucleocytoplasmic shuttling of the aryl hydrocarbon receptor*. J Biochem, 2000. **127**(3): p. 503-9.
125. Berg, P. and I. Pongratz, *Differential usage of nuclear export sequences regulates intracellular localization of the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor*. J Biol Chem, 2001. **276**(46): p. 43231-8.
126. Song, Z. and R.S. Pollenz, *Ligand-dependent and independent modulation of aryl hydrocarbon receptor localization, degradation, and gene regulation*. Mol Pharmacol, 2002. **62**(4): p. 806-16.
127. Pollenz, R.S. and C. Buggy, *Ligand-dependent and -independent degradation of the human aryl hydrocarbon receptor (hAHR) in cell culture models*. Chem Biol Interact, 2006. **164**(1-2): p. 49-59.
128. Henry, E.C., S.L. Welle, and T.A. Gasiewicz, *TCDD and a putative endogenous AhR ligand, ITE, elicit the same immediate changes in gene expression in mouse lung fibroblasts*. Toxicol Sci, 2010. **114**(1): p. 90-100.
129. Evans, B.R., et al., *Repression of aryl hydrocarbon receptor (AHR) signaling by AHR repressor: role of DNA binding and competition for AHR nuclear translocator*. Mol Pharmacol, 2008. **73**(2): p. 387-98.
130. Kitajima, M., et al., *Expression of the arylhydrocarbon receptor in the peri-implantation period of the mouse uterus and the impact of dioxin on mouse implantation*. Arch Histol Cytol, 2004. **67**(5): p. 465-74.
131. Buchanan, D.L., et al., *Anti-estrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mouse uterus: critical role of the aryl hydrocarbon receptor in stromal tissue*. Toxicol Sci, 2000. **57**(2): p. 302-11.
132. Huang, X., J.A. Powell-Coffman, and Y. Jin, *The AHR-1 aryl hydrocarbon receptor and its co-factor the AHA-1 aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator specify GABAergic neuron*

- cell fate in C. elegans*. Development, 2004. **131**(4): p. 819-28.
133. Kim, M.D., L.Y. Jan, and Y.N. Jan, *The bHLH-PAS protein Spineless is necessary for the diversification of dendrite morphology of Drosophila dendritic arborization neurons*. Genes Dev, 2006. **20**(20): p. 2806-19.
134. Wernet, M.F., et al., *Stochastic spineless expression creates the retinal mosaic for colour vision*. Nature, 2006. **440**(7081): p. 174-80.
135. Abbott, B.D., L.S. Birnbaum, and G.H. Perdew, *Developmental expression of two members of a new class of transcription factors: I. Expression of aryl hydrocarbon receptor in the C57BL/6N mouse embryo*. Dev Dyn, 1995. **204**(2): p. 133-43.
136. Fernandez-Salguero, P.M., et al., *Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice*. Vet Pathol, 1997. **34**(6): p. 605-14.
137. Brunnberg, S., et al., *The constitutively active Ah receptor (CA-Ahr) mouse as a potential model for dioxin exposure--effects in vital organs*. Toxicology, 2006. **224**(3): p. 191-201.
138. Stellman, J.M., et al., *The extent and patterns of usage of Agent Orange and other herbicides in Vietnam*. Nature, 2003. **422**(6933): p. 681-7.
139. Sorg, O., et al., *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) poisoning in Victor Yushchenko: identification and measurement of TCDD metabolites*. Lancet, 2009. **374**(9696): p. 1179-85.
140. Xue, W. and D. Warshawsky, *Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review*. Toxicol Appl Pharmacol, 2005. **206**(1): p. 73-93.
141. Murray, G.I., et al., *Regulation, function, and tissue-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001. **41**: p. 297-316.
142. Shimizu, Y., et al., *Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(2): p. 779-82.
143. Jin, U.H., S.O. Lee, and S. Safe, *Aryl hydrocarbon receptor (AHR)-active pharmaceuticals are selective AHR modulators in MDA-MB-468 and BT474 breast cancer cells*. J Pharmacol Exp Ther, 2012. **343**(2): p. 333-41.
144. Desta, Z., et al., *Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **310**(3): p. 1062-75.
145. Wu, X., et al., *The tamoxifen metabolite, endoxifen, is a potent antiestrogen that targets estrogen receptor alpha for degradation in breast cancer cells*. Cancer Res, 2009. **69**(5): p. 1722-7.
146. Stearns, V., et al., *Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(23): p. 1758-64.
147. Goetz, M.P., et al., *Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes*. J Clin Oncol, 2005. **23**(36): p. 9312-8.
148. Marlowe, J.L. and A. Puga, *Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis*. J Cell Biochem, 2005. **96**(6): p. 1174-84.
149. Puga, A., C. Ma, and J.L. Marlowe, *The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways*. Biochem Pharmacol, 2009. **77**(4): p. 713-22.
150. Puga, A., et al., *Aromatic hydrocarbon receptor interaction with the retinoblastoma protein potentiates repression of E2F-dependent transcription and cell cycle arrest*. J Biol Chem, 2000. **275**(4): p. 2943-50.

151. Huang, G. and C.J. Elferink, *Multiple mechanisms are involved in Ah receptor-mediated cell cycle arrest*. Mol Pharmacol, 2005. **67**(1): p. 88-96.
152. Ohtake, F., et al., *Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase*. Nature, 2007. **446**(7135): p. 562-6.
153. Vinggaard, A.M., E.C. Joergensen, and J.C. Larsen, *Rapid and sensitive reporter gene assays for detection of antiandrogenic and estrogenic effects of environmental chemicals*. Toxicol Appl Pharmacol, 1999. **155**(2): p. 150-60.
154. Vogel, C.F. and F. Matsumura, *A new cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and RelB, a member of the NF-kappaB family*. Biochem Pharmacol, 2009. **77**(4): p. 734-45.
155. Nohara, K., et al., *Constitutively active aryl hydrocarbon receptor expressed specifically in T-lineage cells causes thymus involution and suppresses the immunization-induced increase in splenocytes*. J Immunol, 2005. **174**(5): p. 2770-7.
156. Lai, Z.W., T. Pineau, and C. Esser, *Identification of dioxin-responsive elements (DREs) in the 5' regions of putative dioxin-inducible genes*. Chem Biol Interact, 1996. **100**(2): p. 97-112.
157. Quintana, F.J., et al., *Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor*. Nature, 2008. **453**(7191): p. 65-71.
158. Sherr, D.H. and S. Monti, *The role of the aryl hydrocarbon receptor in normal and malignant B cell development*. Semin Immunopathol, 2013. **35**(6): p. 705-16.
159. Armstrong, B., et al., *Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review and meta-analysis*. Environ Health Perspect, 2004. **112**(9): p. 970-8.
160. Andersson, P., et al., *A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(15): p. 9990-5.
161. Martey, C.A., et al., *The aryl hydrocarbon receptor is a regulator of cigarette smoke induction of the cyclooxygenase and prostaglandin pathways in human lung fibroblasts*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **289**(3): p. L391-9.
162. Lin, P., et al., *Overexpression of aryl hydrocarbon receptor in human lung carcinomas*. Toxicol Pathol, 2003. **31**(1): p. 22-30.
163. Chang, J.T., et al., *Requirement of aryl hydrocarbon receptor overexpression for CYP1B1 up-regulation and cell growth in human lung adenocarcinomas*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(1): p. 38-45.
164. Gotteland, M., et al., *Estrogen receptors (ER) in human breast cancer. The significance of a new prognostic factor based on both ER protein and ER mRNA contents*. Cancer, 1994. **74**(3): p. 864-71.
165. Hirsch, F.R., et al., *Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis*. J Clin Oncol, 2003. **21**(20): p. 3798-807.
166. Field, J.K., et al., *Elevated expression of the c-myc oncoprotein correlates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma*. Oncogene, 1989. **4**(12): p. 1463-8.
167. Gasiewicz, T.A. and G. Rucci, *Alpha-naphthoflavone acts as an antagonist of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by forming an inactive complex with the Ah receptor*. Mol Pharmacol, 1991. **40**(5): p. 607-12.
168. Nannelli, A., et al., *Effect of beta-naphthoflavone on AhR-regulated genes (CYP1A1, 1A2, 1B1, 2S1, Nrf2, and GST) and antioxidant enzymes in various brain regions of pig*. Toxicology, 2009. **265**(3): p. 69-79.

169. Opitz, C.A., et al., *An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor*. Nature, 2011. **478**(7368): p. 197-203.
170. Ball, H.J., et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(3): p. 467-71.
171. Uyttenhove, C., et al., *Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase*. Nat Med, 2003. **9**(10): p. 1269-74.
172. Okamoto, A., et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase serves as a marker of poor prognosis in gene expression profiles of serous ovarian cancer cells*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(16): p. 6030-9.
173. Katakami, N., et al., *LUX-Lung 4: a phase II trial of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed during prior treatment with erlotinib, gefitinib, or both*. J Clin Oncol, 2013. **31**(27): p. 3335-41.
174. Safe, S., M. Wormke, and I. Samudio, *Mechanisms of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor crosstalk in human breast cancer cells*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2000. **5**(3): p. 295-306.
175. Lin, P.H., et al., *Transformation of mouse cells by wild-type mouse c-Src*. Oncogene, 1995. **10**(2): p. 401-5.
176. Miller, A.A., et al., *A phase II study of dasatinib in patients with chemosensitive relapsed small cell lung cancer (Cancer and Leukemia Group B 30602)*. J Thorac Oncol, 2010. **5**(3): p. 380-4.
177. Johnson, F.M., et al., *Phase II study of dasatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2010. **28**(30): p. 4609-15.
178. Zhang, S., et al., *Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways*. Nat Med, 2011. **17**(4): p. 461-9.
179. Zhao, M., et al., *JAK2/STAT3 signaling pathway activation mediates tumor angiogenesis by upregulation of VEGF and bFGF in non-small-cell lung cancer*. Lung Cancer, 2011. **73**(3): p. 366-74.
180. Behera, R., et al., *Activation of JAK2/STAT3 signaling by osteopontin promotes tumor growth in human breast cancer cells*. Carcinogenesis, 2010. **31**(2): p. 192-200.
181. Hedvat, M., et al., *The JAK2 inhibitor AZD1480 potently blocks Stat3 signaling and oncogenesis in solid tumors*. Cancer Cell, 2009. **16**(6): p. 487-97.
182. Hurwitz, H.I., et al., *Randomized, Double-Blind, Phase II Study of Ruxolitinib or Placebo in Combination With Capecitabine in Patients With Metastatic Pancreatic Cancer for Whom Therapy With Gemcitabine Has Failed*. J Clin Oncol, 2015. **33**(34): p. 4039-47.
183. Lahoti, T.S., et al., *Aryl hydrocarbon receptor antagonism mitigates cytokine-mediated inflammatory signalling in primary human fibroblast-like synoviocytes*. Ann Rheum Dis, 2013. **72**(10): p. 1708-16.
184. Boitano, A.E., et al., *Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells*. Science, 2010. **329**(5997): p. 1345-8.

个人简历和研究成果

个人简历

叶明翔，男，汉族，1988年3月出生，中共党员，原总后勤部学习成才先进个人，荣立三等功一次，在校期间获嘉奖4次，奖学金4次。

2006/09 – 2011/06，第四军医大学口腔医学系临床医学专业，获学士学位

2011/09 – 2014/06，第四军医大学西京医院呼吸内科攻读硕士研究生，导师：张艰 副教授，研究方向：肺癌发生发展分子机制

2014/09 – 2017/06，通过硕博连读答辩，第四军医大学西京医院呼吸内科攻读博士研究生，导师：张艰 副教授，研究方向：肺癌靶向治疗耐药分子机制

发表论文

1. **Mingxiang Ye[#]**, Yong Zhang[#], Xinxin Zhang, Jianbin Zhang, Pengyu Jing, Liang Cao, Nan Li, Xia Li, Libo Yao, Jian Zhang, Jian Zhang. Targeting FBW7 as a strategy to overcome resistance to targeted therapy in non-small cell lung cancer. **Cancer Res.** [Epub ahead of print] (IF 8.556)
2. **Mingxiang Ye[#]**, Yong Zhang[#], Hongjun Gao[#], Yan Xu[#], Pengyu Jing, Jianxiong Wu, Xinxin Zhang, Jie Xiong, Chenfang Dong, Libo Yao, Jian Zhang, Jian Zhang. Aryl hydrocarbon receptor transcriptionally independently activates Src and promotes resistance to targeted therapy in non-small cell lung cancer. **Clin Cancer Res.** (Minor revision) (IF 8.738)
3. **Mingxiang Ye[#]**, Xinxin Zhang[#], Nan Li, Yong Zhang, Pengyu Jing, Ning Chang, Jianxiong Wu, Xinling Ren, Jian Zhang. ALK and ROS1 as targeted therapy paradigms and clinical implications to overcome crizotinib resistance. **Oncotarget.** 2016; 7(11): 12289-304. (IF 5.008)
4. **Mingxiang Ye[#]**, Jin Zhang[#], Jian Zhang, Qing Miao, Libo Yao, Jian Zhang. Curcumin promotes apoptosis by activating the p53-miR-192-5p/215-XIAP pathway in non-small cell lung cancer. **Cancer Lett.** 2015; 357(1): 196-205. (IF 5.992)

5. **Mingxiang Ye[#]**, Yan Li[#], Hong Yin, Jian Zhang. Curcumin: updated molecular mechanisms and intervention targets in human lung cancer. **Int J Mol Sci.** 2012; 13(3): 3959-78. (IF 2.464)
6. **Mingxiang Ye[#]**, Yilin Zhao[#], Yan Li[#], Qing Miao, Zhikui Li, Xinling Ren, Liqiang Song, Hong Yin, Jian Zhang. Curcumin reverses cis-platin resistance and promotes human lung adenocarcinoma A549/DDP cell apoptosis through HIF-1 α and caspase-3 mechanisms. **Phytomedicine.** 2012; 19(8-9): 779-87. (IF 2.972)
7. Yuan Lu, Li Liu, Yuan Wang, Fakai li, Jian Zhang, **Mingxiang Ye**, Hu Zhao, Xiang Zhang, Jin Zhao, Bo Yan, Angang Yang, Huasong Feng, Rui Zhang, Xinling Ren. siRNA delivered by EGFR-specific scFv sensitizes EGFR-TKI-resistant human lung cancer cells. **Biomaterials.** 2016; 76: 196-207. (IF 8.387)
8. Yi Ru, Qin hao Wang, Xiping Liu, Mei Zhang, Daixing Zhong, **Mingxiang Ye**, Yuanchun Li, Hua Han, Libo Yao, Xia Li. The chimeric ubiquitin ligase SH2-U-box inhibits the growth of imatinib-sensitive and resistant CML by targeting the native and T315I-mutant BCR-ABL. **Sci Rep.** 2016; 6: 28352. (IF 5.228)
9. Yuan Lu, Yuan Wang, Mi Zhang, Li Liu, Fakai Li, Jian Zhang, **Mingxiang Ye**, Hu Zhao, Jing Zhao, Bo Yan, Angang Yang, Rui Zhang, Xia Li, Xinling Ren. HER2-siRNA delivered by EGFR-specific single chain antibody inhibits NSCLC cell proliferation and tumor growth. **Oncotarget.** 2016; 7(17): 23594-607. (IF 5.008)
10. Yuan Zhang, Yu Wang, Yifang Wei, Mengyang Li, Shentong Yu, **Mingxiang Ye**, Hongmei Zhang, Suning Chen, Wenchao Liu, Jian Zhang. MiR-129-3p promotes docetaxel resistance of breast cancer cells via CP110 inhibition. **Sci Rep.** 2015; 5: 15424. (IF 5.578)

学术奖励

1. Scholar-In-Training Award from AACR New Horizons in Cancer Research Conference 2014: Harnessing Breakthroughs – Targeting Cures
2. Scholar-In-Training Award from AACR New Horizons in Cancer Research Conference 2015: Bringing Cancer Discoveries to Patients
3. Scholar-In-Training Award from AACR New Horizons in Cancer Research Conference 2016: Delivering Cures Through Cancer Science
4. Poster Award from AACR New Horizons in Cancer Research Conference 2016:

Delivering Cures Through Cancer Science

5. 中华医学会呼吸分会 2016 年年会大会发言
6. 中华医学会呼吸分会第十四届中青年呼吸学者论坛优秀论文奖

致 谢

韩愈在《师说》中言道：师者，所以传道授业解惑也。在我看来，导师张艰教授给予我的指导还应加上一条：人情练达即文章！跟随导师学习 6 年，期间不仅投入到自然科学研究中，还初窥社会科学门径；导师在学业上对我耳提面命，恨不得 6 年时间内将她渊博的学识倾囊相授，为了我们能顺利完成研究，导师四处奔波寻求课题合作，搭建各类平台，欠下了无数人情；曾经轻率不羁的我有时固执己见，无意冒犯了导师，是您以宽广的胸怀和长辈的身份一次次点拨教诲，教导我要虚怀若谷，放大格局，在我最迷茫困惑的时候，您一番醍醐灌顶、满满正能量的言辞令我如梦初醒；为了开拓我们的视野，带动团队研究的积极性和热情，您毫不犹豫支持我们参加学术会议，带领我们一同赴会，现场指点迷津……您为我们做的太多太多，任何感谢的话语在这浓厚的师生情谊面前都显得苍白无力，是您引导我迈开科研道路的第一步，是您造就了意气风发但又泰然雍容的我，那个固执懵懂、不掩泪笑的少年，早已消失在岁月的洗礼之中了……我不是您最优秀的学生，但我一定要做最尊敬您的学生，不论走到天涯海角，我的全部荣誉都是您无偿赋予的，您外化于形的和蔼笑容、内化于心的至情至性、从内而外，由浅至深，逐步挥发出来的人格魅力是我永远的避风塘！

其次，我要感谢基础部生化教研室的张健副教授，对于我提出的各种稀奇古怪的问题，张教授总是欣然解答，鼓励我大胆创新；我们研究的 AhR 在肿瘤耐药领域可供参考的结果很少，张教授亲自查阅文献并把我引荐给国内外专家，在无数次激烈讨论后 Jak2-AhR-Src 模型才浮出水面，实验拿到阳性结果了，张教授替我高兴，实验未出结果，张教授更多的是鼓励和原因分析，这种亦师亦友的融洽关系给我留下了美好回忆。

硕博 6 年，我有幸结识了一批阳光开朗、努力上进的同学和朋友们，和你们一起生活、一起学习、一起品味酸甜苦辣的生活很充实快乐。作为同门师兄，我非常感谢张勇硕士和张信信硕士在研究上给予的帮助、在生活上给予的照应、在精神上给予的理解支持，希望你们珍惜来之不易的学习机会，继续潜心研究，不忘初心，

相信你们一定会闯出属于自己的一片蓝天。

最后，感谢父母生养之恩。在外求学不知寒暑，但父母确清楚记得我已离家 11 年了。每年回家都能发现父母又添了几根银发，但他们总是把思念和焦虑隐藏在关爱和微笑背后，每当我要离开时父母望子成龙的心态又战胜了一切不舍。父母对子女的爱是世间最伟大的，即将毕业之际祝愿天下的父母身体健康、万事如意！

叶明翔

2017 年 3 月于西安