



第四军医大学

The Fourth Military Medical University

分类号 R737.9

U D C 615.2

密 级 公开

# 硕士学位论文

**细胞自噬在 HER2 阳性乳腺癌细胞获得  
Lapatinib 耐药过程中的机制和功能研究**

陈苏宁

培 养 类 别 全日制

学 位 类 型 学术学位

一级学科(专业类) 药学

二级学科(专业) 药剂学

研 究 方 向 乳腺癌耐药

指 导 教 师 文爱东 教授 (主任药师)

培 养 单 位 西京医院药剂科

二〇一五年五月

# 独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈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 .....	4
ABSTRACT .....	8
前 言 .....	13
文献回顾 .....	14
正 文 .....	26
第一部分 Lapatinib 耐药 HER2 阳性细胞株的筛选及耐药性分析 .....	26
1 材料 .....	26
1.1 细胞系 .....	26
1.2 主要试剂与材料 .....	27
1.3 主要仪器设备 .....	27
1.4 常用缓冲液 .....	28
2 方法 .....	28
2.1 细胞培养、传代、冻存和复苏 .....	28
2.2 BT-474 和 AU-565 耐药细胞的构建及培养 .....	30
2.3 MTT 法分析细胞对拉帕替尼的敏感性 .....	30
2.4 EdU 分析 .....	31
2.5 软琼脂克隆形成能力分析 .....	32
2.6 统计学分析 .....	32
3 结果 .....	33
3.1 MTT 法分析细胞对 Lapatinib 的耐药性 .....	33
3.2 EdU 法分析亲本细胞和耐药细胞在 Lapatinib 处理时细胞增殖能力差异 .....	33
3.3 软琼脂克隆法分析亲本细胞和耐药细胞在 Lapatinib 处理时克隆形成能力的差异 .....	34
4 讨论 .....	35
第二部分 细胞自噬促进 HER2 阳性细胞株获得 Lapatinib 耐药性的功能评价 .....	36
1 材料 .....	36
1.1 主要试剂与材料 .....	36

1.2 主要仪器设备	37
2 方法	38
2.1 细胞培养、传代、冻存和复苏	38
2.2 透射电镜检测细胞自噬体	38
2.3 GFP-LC3 转染及细胞定位分析	38
2.4 MTT 检测耐药细胞的药物敏感性	39
2.5 EdU 分析检测耐药细胞的药物敏感性	39
2.6 细胞平板克隆形成能力分析	40
2.7 流式细胞术检测细胞凋亡	40
3 结果	41
3.1 透射电镜观察到自噬体形成	41
3.2 激光共聚焦显微镜观察 GFP-LC3 转染的细胞自噬体聚集状态	41
3.3 MTT 分析耐药细胞的药物敏感性	42
3.4 EdU 分析耐药细胞的药物敏感性	43
3.5 平板克隆检测耐药细胞克隆生长情况明显改变	44
3.6 流式细胞检测可见耐药细胞凋亡状态改变	45
4 讨论	46
第三部分 细胞自噬在 Lapatinib 耐药细胞中活化的分子机制研究	48
1 材料	48
1.1 主要试剂与材料	48
1.2 常用缓冲液	49
1.3 常用仪器	49
2 方法	50
2.1 细胞培养	50
2.2 细胞样品收集、蛋白定量和 Western Blotting 分析	50
2.3 MTT 检测 AMPK 抑制剂对 BT-474 <sup>LapR</sup> 耐药细胞药物敏感性的影响	51
3 结果	51
3.1 AMPK 在 BT-474 <sup>LapR</sup> 耐药细胞中处于活化状态	51
3.2 抑制 AMPK 信号通路可以阻断细胞自噬过程	52
3.3 抑制 AMPK 信号通路增加 BT-474 <sup>LapR</sup> 细胞对 Lapatinib 的治疗敏感性	53
4 讨论	53

第四部分 Lapatinib 耐药细胞的 ROS 水平分析及 BR 干预研究 .....	55
1 材料 .....	55
1.1 主要试剂与材料 .....	55
1.2 常用缓冲液 .....	55
1.3 常用仪器 .....	56
2 方法 .....	56
2.1 细胞 ROS 水平检测 (DCFH-DA 标记法) .....	56
2.2 细胞增殖状态检测 .....	57
2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡状态 .....	57
3 结果 .....	58
3.1 BR 可以协同 Lapatinib 抑制 BT-474 <sup>LapR</sup> 的增殖 .....	58
3.2 BT-474 <sup>LapR</sup> 的 ROS 水平降低 .....	58
3.3 BR 可以上调 BT-474 <sup>LapR</sup> 的 ROS 水平 .....	59
3.4 BR 抑制 BT-474 <sup>LapR</sup> 的 DNA 复制能力依赖于 ROS 水平的增加 (EdU 分析) .....	60
3.5 BR 协同 Lapatinib 促进 BT-474 <sup>LapR</sup> 的凋亡依赖于 ROS 水平的增加 (流式细 胞术分析) .....	60
4 讨论 .....	61
小 结 .....	62
参考文献 .....	63
个人简历和研究成果 .....	71
致 谢 .....	73

## 缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
3-MA	3-Methyladenine	3-甲基腺嘌呤
AMPK	Adenosine Monophosphate Activated Protein Kinase	腺苷酸活化蛋白激酶
ATG	autophagy-related gene	自噬相关基因
Atg14L	Autophagy-related protein 14L	自噬相关蛋白 14L
Atg6	Autophagy-related protein 6	自噬相关蛋白 6
AP	Ammonium persulfate	过硫酸铵
BA	Bafilomycin A	巴伐洛霉素 A
Bax	BCL2-Associated X Protein	BCL2 相关 X 蛋白
Bcl-2	B-cell lymphoma-2	B 淋巴细胞瘤-2 基因
BR	Berberine	小檗碱
BSA	Albumin from Bovine Serum	牛血清白蛋白
CMA	chaperone-mediated autophagy	分子伴侣介导的自噬
CML	chronic myelocytic leukemia	慢性粒细胞性白血病
CQ	Chloroquine	氯喹
CSCs	Cancer Stem Cells	肿瘤干细胞
DCFH-DA	Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate	二氯-二氢-荧光素二乙酸盐
DRAM	Damage-Regulated Autophagy Modulator	损伤调控自噬调节子
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
EdU	5-ethynyl-2-deoxyuridine	5-乙炔基-2-脱氧尿嘧啶核苷

EGF	Epidermal Growth Factor	表皮生长因子
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	表皮生长因子受体
ER	Estrogen Receptor	雌激素受体
GFP-LC3	LC3 fused Green Fluorescence Protein	LC3 融合绿色荧光蛋白
GSH	Glutathione	谷胱甘肽
GSK	GlaxoSmithKline	葛兰素史克
HCQ	Hydroxychloroquine	羟化氯喹
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor-2	人表皮细胞生长因子受体
HO-1	Heme oxygenase 1	血红素加氧酶 1
JNK	c-Jun N-terminal kinase	c-Jun 氨基末端激酶
LC3- I	Type I LC3	I 型 LC3 蛋白
LC3- II	Type II LC3	II 型 LC3 蛋白
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	丝裂原活化的蛋白激酶
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin	哺乳动物雷帕霉素靶蛋白
MTT	3- (4,5-cimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide	3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐
NAC	N-acetyl cysteine	N-乙酰半胱氨酸
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate	还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸
OS	Overall Survival	总体生存期
p70SK	Stress Kinases S6 kinase p70	应激激酶 S6-p70
PFS	Progression-Free Survival	无疾病进展生存期
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase	磷脂酰肌醇-3-激酶
PR	Progesterone Receptor	孕激素受体

PTEN	Phosphatase and tensin homolog	磷酸酯酶与张力蛋白同源物
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis	p53 上调的凋亡调节子
ROS	reactive oxygen species	活性氧
shRNA	short hairpin RNA	短发卡 RNA
SOD	Superoxide Dismutases	超氧化物歧化酶
TKI	Tyrosine Kinase Inhibitor	酪氨酸激酶抑制剂
TTP	Time to Progression	疾病进展时间
UVRAG	UV radiation resistance-associated gene	紫外线照射抵抗相关基因



# 细胞自噬在 HER2 阳性乳腺癌细胞获得 Lapatinib 耐药过程中的机制和功能研究

硕士研究生：陈苏宁

导 师：文爱东 教授

辅导教师：张 健 副教授

第四军医大学第一附属医院药剂科，西安 710032

资助基金项目：国家自然科学基金（81202091）

## 中文摘要

从 20 世纪 70 年代末开始，全球乳腺癌的发病率呈持续上升趋势。2014 年美国肿瘤学会在《肿瘤临床医生期刊》（A Cancer Journal for Clinicians）公布的数据显示，乳腺癌依旧是女性人群中最为常见的癌症。据其预计，乳腺癌将占女性所有新发肿瘤（Estimated New Cases）的四分之一左右，死亡率（Estimated Deaths）也仅次于肺癌，排名第二。中国虽然不是乳腺癌的高发国家，但近年来发病率却一直处于高位。截至 2008 年，中国乳腺癌新发数量占全世界的 12.2%，死亡数量则占到了 9.6%。尤其值得注意的是，我国乳腺癌患者的平均诊断年龄约为 50 岁，与西方女性的平均年龄（约为 61 岁）相比提前了约 11 年时间。由此可见，无论在西方国家还是在我国，乳腺癌都已成为女性最常见的、发病率最高的恶性肿瘤，而且在我国的发病年龄正趋于年轻化，严重影响着女性身心健康。

目前，乳腺癌的治疗方法主要包括手术、化疗、放疗和分子靶向药物治疗等多种手段。其中，分子靶向药物的研发和应用最为迅速。依据人表皮细胞生长因子受体 2（Human Epidermal growth factor Receptor-2, HER2）、雌激素受体（Estrogen

Receptor, ER) 和孕激素受体 (Progesterone Receptor, PR) 三种受体在乳腺癌细胞的不同表达水平, 将乳腺癌分为四种不同的亚型, 即 Luminal A 型、Luminal B 型、HER2 阳性和三阴型。HER2 是一个与肿瘤发生密切相关的细胞膜表面受体, 它的高表达与乳腺癌患者的不良预后密切相关。经统计显示, 有近 1/4 的乳腺癌患者属于 HER2 阳性, 而这类患者的预后较差, 且恶性程度较高。因此, 针对 HER2 受体的分子靶向药物研究显得尤为重要。美国 Genentech 公司研发了人源化 HER2 单克隆抗体--曲妥珠单抗 (Trastuzumab, 商品名: 赫塞汀, Herceptin), 因其联合化疗可以显著延长 HER2 阳性转移性乳腺癌的总生存期, 于 1998 年获得美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准上市, 成为单克隆抗体类靶向药物研究的里程碑。随后, FDA 又批准将 Trastuzumab 第一个用于乳腺癌的新辅助治疗。不幸的是, 大部分 HER2 阳性患者在使用 Trastuzumab 治疗 1 年左右会出现耐药现象, 进而导致肿瘤转移复发。

拉帕替尼 (Lapatinib) 是葛兰素史克公司 (GlaxoSmithKline, GSK) 研发的一种针对 HER2 的新型小分子抑制剂, 它可以同时抑制 HER2 和表皮生长因子受体 (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) 胞内段的 ATP 结合位点, 阻断下游增殖信号的传递, 从而达到抗肿瘤的目的。2007 年该药被 FDA 批准应用于临床, 与卡培他滨 (Capecitabine) 合并治疗晚期或复发性的乳腺癌, 特别是已经发生 Trastuzumab 耐药的乳腺癌。临床研究发现, 联合应用 Capecitabine 和 Lapatinib 治疗复发性晚期或转移性乳腺癌, 可明显延长疾病的进展时间 (Time to Progression, TTP) 和无疾病进展生存期 (Progression-Free Survival, PFS)。这证明 Lapatinib 对进展期乳腺癌具有明显的治疗效果。研究表明, 表皮生长因子 (Epidermal Growth Factor, EGF) 等配体与 HER2 受体结合后可以激活 HER2 信号转导通路, 诱发下游信号分子通路的级联反应。HER2 受体的活化可以诱导 PI3K、Akt、mTOR、p70SK 等分子的活化, 促使其发生磷酸化, 加速肿瘤细胞的增殖。而 Lapatinib 则通过阻断 HER2 下游促增殖信号的传递, 抑制 PI3K、Akt 等分子活化和 HER2 阳性乳腺癌细胞的增殖, 从而达到治疗肿瘤的目的。可是, 临床试验显示 Lapatinib 的临床反应率仅有 24% 左右, 获益率也处于较低水平。原发性或获得性耐药严重制约着 Lapatinib 在临床的应用, 治疗失败的主要原因是产生耐药, 阐明其耐药性机制并进行有效的干预, 将有助于进一步提高该药的临床应用价值。

自噬 (Autophagy) 是细胞在营养不足、药物干预等极端条件下进行自我保护的重要机制之一。自噬可以促进细胞生存, 但是过度的自噬却促进细胞凋亡。因此, 究竟“细胞自噬是促进还是抑制肿瘤细胞的存活”是一个充满争议的话题。近期有研究表明, 细胞自噬可能参与肿瘤细胞获得耐药性的过程, 而 PI3K/Akt/mTOR、LKB1/AMPK/mTOR 等信号通路可能是细胞自噬发生的主要上游调控分子。同时, 细胞中的活性氧类 (Reactive Oxygen Species, ROS) 与自噬也表现出密切的关系, 参与到肿瘤细胞耐药性的获得过程中, 激活耐药细胞的 ROS 水平可能成为逆转肿瘤耐药的重要机制之一。

基于以上研究背景, 我们试图通过本课题的探索回答如下问题: (1) 在 HER2 阳性乳腺癌细胞获得 Lapatinib 耐药性的过程中, 细胞自噬是否发挥重要作用? (2) 是否可以通过抑制细胞自噬过程恢复 Lapatinib 的治疗敏感性? (3) 细胞自噬活化的分子机制是什么? (4) 小檗碱 (Berberine, BR) 等药物是否可以通过上调 ROS 水平杀伤 Lapatinib 耐药细胞? 通过解答以上问题, 我们将明确 HER2 阳性乳腺癌细胞获得 Lapatinib 耐药性的机制, 并为恢复 Lapatinib 的治疗敏感性提供重要理论依据。

#### 研究方法和结果:

1. 具有 Lapatinib 耐药性的 HER2 阳性细胞株的筛选及耐药性分析: (1) 利用 Lapatinib 处理 HER2 高表达的乳腺癌细胞系 BT-474 和 AU-565, 逐渐增加 Lapatinib 的作用浓度, 维持筛选 12 个月, 最终获得具有 Lapatinib 耐药性的细胞; (2) 利用 MTT、平板克隆和软琼脂克隆形成能力分析等方法对 BT-474 耐药细胞 (BT-474<sup>LapR</sup>) 和 AU-565 耐药细胞 (AU-565<sup>LapR</sup>) 的耐药能力进行检测。结果: 所筛选的耐药细胞经过细胞增殖、平板克隆形成以及软琼脂克隆形成等多方面检测均表现出稳定的耐药性, 可以满足后续机制研究的需要。
2. 细胞自噬促进 HER2 阳性细胞株获得 Lapatinib 耐药性的功能评价: (1) 利用透射电镜分析细胞自噬体是否在 BT-474<sup>LapR</sup> 和 AU-565<sup>LapR</sup> 细胞中增加; (2) 用细胞自噬标记分子 GFP-LC3 融合蛋白转染 BT-474 和 AU-565 细胞系, 并用激光共聚焦显微镜观察自噬体的分布变化; (3) 利用 MTT、EDU、平板克隆和流式细胞术等方法对 BT-474<sup>LapR</sup> 和 AU-565<sup>LapR</sup> 细胞进行检测, 观察细胞的功能变化; (4) 利用细胞自噬的抑制剂 3-甲基腺嘌呤 (3-Methyladenine, 3-MA)、氯喹 (Chloroquine, CQ) 和巴伐洛霉素 A (Bafilomycin A, BA) 联合 Lapatinib 作用耐药细胞, 并进行细胞

增殖能力和凋亡分析。结果：细胞自噬可以促进 HER2 阳性细胞株获得 Lapatinib 耐药性，抑制细胞自噬可以显著增强耐药细胞对 Lapatinib 的治疗敏感性。

3. 细胞自噬在 Lapatinib 耐药细胞中活化的机制分析：（1）利用 Western-blotting 技术分析 AMPK-mTOR 信号通路相关分子在 BT-474<sup>Par</sup> 和 BT-474<sup>LapR</sup> 细胞中的表达差异；（2）利用 AMPK 磷酸化的抑制剂 Compound C 阻断 AMPK 下游信号通路，分析其对耐药细胞功能的影响。结果：磷酸化 AMPK 在 BT-474<sup>LapR</sup> 细胞中的表达明显增加，提示 AMPK 在耐药细胞中处于活化状态，这可能是诱发细胞自噬的主要原因。Compound C 阻断 AMPK 下游信号通路后，LC3- I 向 LC3- II 的转化受到明显的阻断，细胞水平的 Lapatinib 治疗敏感性显著增加。
4. Lapatinib 耐药细胞的 ROS 状态分析及 BR 干预研究：（1）利用 MTT、EdU、流式细胞术等方法检测 Lapatinib 和/或 BR 对 BT-474<sup>LapR</sup> 细胞增殖和凋亡功能的影响；（2）利用 ROS 试剂盒检测 BR 对 BT-474<sup>Par</sup> 和 BT-474<sup>LapR</sup> 细胞 ROS 水平的影响。结果：利用 DCFH-DA 标记和流式细胞术分析，发现 BT-474<sup>LapR</sup> 细胞的 ROS 水平显著低于 BT-474<sup>Par</sup> 细胞。BR 可以通过上调 ROS 水平显著增加耐药细胞对 Lapatinib 的治疗敏感性，并诱导耐药细胞凋亡。

#### 结论：

1. 所筛选的 Lapatinib 耐药乳腺癌细胞系 BT-474 和 AU-565 具有稳定的耐药性；
2. Lapatinib 耐药细胞的自噬形成能力增加，并促进 HER2 阳性细胞获得 Lapatinib 耐药性；
3. 利用自噬抑制剂阻断耐药细胞的自噬过程有助于恢复耐药细胞对 Lapatinib 的治疗敏感性；
4. BR 可通过上调 ROS 水平恢复耐药细胞的治疗敏感性。

**关键词：**拉帕替尼；人表皮细胞生长因子受体 2；乳腺癌；耐药性；自噬；凋亡；氯喹；3-甲基腺嘌呤；巴伐洛霉素 A

# **Mechanism and functional research of autophagy promoting Lapatinib resistance of HER2-positive breast cancer cells**

Candidate for master: Chen Suning

Supervisor: Wen Aidong

Tutor: Zhang Jian

Department of Pharmacy, Xijing hospital, Fourth Military Medical University,

Xi'an 710032, China

Sponsored Programs: NSFC (81202091)

## **Abstract**

Since late 1970s, the global incidence of breast cancer increase a lot. The American Cancer Society released cancer statistics data on *A Cancer Journal for Clinicians* every year, which showing that breast cancer is still one of the most common cancers among women. Breast cancer is expected to account for about a quarter of the new estimated new cases of all women cancer types. Its mortality rate (estimated deaths) ranks the second after lung cancer.

Although China is not with high incidence of breast cancer, however, in recent years the incidence rate of breast cancer increased a lot. Until 2008, the new cases of breast cancer in China accounts for 12.2% of the global, deaths accounted for 9.6%.

Data released from the Chinese National Cancer Center and Bureau of Disease Prevention and Control of Ministry of Health in 2009 showed that breast cancer incidence ranked the first of female malignant tumors. Notably, however, the average diagnostic age of Chinese breast cancer patients is about 50 years old, ahead about 11 years than the

average age of the western women (about 61 years old). Thus, breast cancer has become one of the most common and highest incidences of malignant tumors both in the western countries and China. Especially, the onset age of breast cancer in our country is becoming more younger, seriously affecting women's physical and mental health.

Now there are several different therapy strategies of breast cancer, including surgery, radiotherapy, chemotherapy and molecular targeting therapy etc. And the molecular targeting drugs developed most rapidly among all the fields. According to the expression levels of three different receptors of HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor-2), ER (estrogen receptor) and PR (progesterone receptor), breast cancer is classified into four different subtypes, such as Luminal A, Luminal type B, HER2 positive and triple negative.

HER2 is a cell membrane receptor closely related to tumorigenesis. Its high expression will predict the worse prognosis of breast cancer patients. The statistics show that nearly a quarter of breast cancer patients are HER2 positive, and most of them with advanced malignant diagnosis. Therefore, it's vital significance to develop the molecular drugs targeting HER2 receptor.

The humanized HER2 monoclonal antibody (Trastuzumab), developed by Genentech company, can significantly extend the overall survival of HER2 positive metastatic breast cancer. Trastuzumab was approved by the United States FDA in 1998, and became the milestone of monoclonal antibody targeting drugs research. Later, FDA approved Trastuzumab as the first drug for the neoadjuvant therapy of breast cancer. However, most of HER2 positive patients acquired resistance after one year treatment of Trastuzumab, and finally caused distant metastasis.

Lapatinib is a new small molecule inhibitor, which can inhibit the intracellular ATP binding sites of HER2 and EGFR, and block the downstream proliferation signal transduction. Clinical studies have confirmed that combination of Capecitabine and Lapatinib can significantly extend the time to progression (TTP) and progression-free survival (PFS). Especially, Lapatinib was still effective to breast cancer patients resistant to Trastuzumab treatment. Lapatinib targeting HER2 was approved to treat the advanced or recurrent breast cancer with combination of Capecitabine by USA FDA and China

SFDA in 2007 and 2013 respectively.

Studies have shown that EGF (epidermal growth factor) can activate HER2 receptor signal transduction signaling, triggering downstream signal cascade reactions. HER2 receptor activation can induce PI3K, Akt, mTOR and p70SK activation, and promote the proliferation of tumor cells. Lapatinib can inhibit PI3K and Akt activation to block downstream signal transduction and the proliferation of HER2 positive breast cancer cells. However, the clinical response rate of Lapatinib is only about 24%. Primary or acquired resistance to Lapatinib severely limited its therapeutic efficacy. Therefore, the development of drug resistance is the major reason of treatment failure of Lapatinib. The resistance mechanism elucidation and effective intervention will help to further improve its clinical application.

Autophagy is one of important mechanisms of cellular self-protection under extreme conditions, such as nutritional deficiencies and drug intervention etc. Autophagy can promote cell survival, but excessive autophagy induces cell apoptosis. Therefore, whether autophagy to promote or inhibit the tumor cell survival is still under controversy. Recent studies have shown that autophagy may participate in the process of tumor cells acquiring resistance. And PI3K/Akt/mTOR, LKBI/AMPK/mTOR signaling pathway might be the main upstream regulatory signaling. At the same time, the response of cellular reactive oxygen species (ROS) was also involved in the process of tumor cells to acquire resistance. To activate the cellular ROS level might be one of important mechanisms to reverse tumor drug resistance.

Based on the above research background, in this subject we mainly answer the following questions: (1) Whether cellular autophagy plays important role in HER2 positive breast cancer cells acquiring resistance of Lapatinib; (2) Whether autophagy inhibition can restore Lapatinib treatment sensitivity; (3) What is the molecular mechanism of autophagy activation? (4) Compare the ROS level differences between parental and resistant cells and elucidate whether berberine can kill Lapatinib resistant cells through raising cellular ROS levels. Answering these questions will clarify the mechanism of Lapatinib resistance of HER2 positive breast cancer cells. And provide

important therapeutic strategy to restore Lapatinib sensitivity.

**Methods and Results:**

1. Screening and validation of HER2 positive cell lines with Lapatinib resistance: (1) Treat HER2 positive breast cancer cell lines BT-474 and AU-565 with gradual increasing dosage of Lapatinib. And maintain for 12 months to select the stable cells with Lapatinib resistance; (2) Analyze the resistance ability of BT-474 and AU-565 cells through MTT, plate cloning and soft agar colony formation ability etc. Results: The selected resistant cells demonstrated Lapatinib resistance capacity with cell proliferation, colony formation, which is suitable for the following experiments.
2. Functional evaluation of autophagy promoting HER2 positive breast cells to acquire Lapatinib resistance: (1) Whether autophagy increases in BT-474 and AU-565 resistant cells using transmission electron microscopy analysis; (2) Transfect GFP-LC3 fusion protein (autophagy biomarker) into BT-474 and AU-565 cells and then detect the autophagosome distribution using laser confocal microscope; (3) Determining the function of BT-474 and AU-565 Lapatinib-resistant cells by MTT, EDU, colony formation and flow cytometry analysis respectively; (4) Treat the Lapatinib-resistant cells with autophagy inhibitors (CQ, 3-MA and BA) and analyze the cell proliferation and apoptosis. Results: Autophagy can promote the HER2 positive cell lines acquiring Lapatinib resistance. And inhibiting autophagy may significantly enhance the sensitivity of resistant cells to Lapatinib.
3. Mechanism analysis of autophagy activation in Lapatinib resistant cells: (1) Analyze the expression difference of AMPK/mTOR signaling pathway in BT-474<sup>Par</sup> and BT-474<sup>Lap<sup>R</sup></sup> cells using Western blot; (2) Use AMPK phosphorylation inhibitor Compound C to block AMPK signaling pathway and analyzes its impact on drug resistant cells function. Results: The phosphorylation level of AMPK increased in BT-474<sup>Lap<sup>R</sup></sup> cells, suggesting AMPK activation in resistant cells, maybe the main reason inducing cell autophagy. Compound C could block the downstream signaling pathways of AMPK and the transformation from LC3- I to LC3- II. Thus, increase the sensitivity of Lapatinib treatment.



4. Analyze reactive oxygen species status in Lapatinib resistant cells and berberine intervention research: (1) Using MTT, EdU and flow cytometry analysis to determine whether berberine could inhibit BT-474<sup>Lap<sup>R</sup></sup> cells proliferation and increase apoptosis; (2) Using reactive oxygen species detection kit to analyze how berberine affecting the proliferation of BT-474<sup>Lap<sup>R</sup></sup> cells. Results: DCFH-DA labeling and flow cytometry analysis showed that there was less ROS in BT-474<sup>Lap<sup>R</sup></sup> cells. Berberine can dramatically increased the sensitivity to Lapatinib and induced resistant cell apoptosis through increasing intracellular ROS levels.

**Conclusion:**

1. The resistant breast cancer cells of BT-474 and AU-565 had stable resistance to Lapatinib.
2. Autophagy increased in Lapatinib resistant breast cancer cells, and promoted the cells acquiring Lapatinib resistance.
3. Autophagy inhibitors could restore sensitivity of resistant cells to Lapatinib treatment.
4. Berberine can increase ROS levels of BT-474<sup>Lap<sup>R</sup></sup> to increase the sensitivity of Lapatinib treatment.

**Key words:** Lapatinib; HER2; Breast cancer; Drug resistance; Autophagy; Apoptosis; CQ; 3-MA; BA.

## 前 言

从 20 世纪 70 年代末开始，全球乳腺癌的发生率呈持续上升趋势。美国肿瘤学会公布的 2014 年统计数据显示，乳腺癌依然是女性人群最常见的肿瘤。乳腺癌每年新发病例约占所有肿瘤类型的四分之一左右，稳居女性肿瘤的首位，而其死亡率也仅次于肺癌，排名第二。虽然中国不是乳腺癌的高发国家，但是，近年来其发病率在我国却一直处于高位。值得关注的是，我国乳腺癌患者的平均诊断年龄约为 50 岁，比西方女性的平均年龄（约为 61 岁）提前了约 11 年时间。由此可见，乳腺癌已成为女性最常见的、发病率最高的恶性肿瘤。

HER2 是一个与肿瘤发生密切相关的细胞膜表面受体，它的高表达与乳腺癌患者的不良预后密切相关。人源化 HER2 单克隆抗体 Trastuzumab 联合化疗可以显著延长 HER2 阳性转移性乳腺癌的总生存期。然而，大部分 HER2 阳性患者在使用 Trastuzumab 治疗 1 年左右会出现耐药。小分子抑制剂 Lapatinib 可以同时抑制 HER2 和 EGFR 胞内段的 ATP 结合位点，阻断下游增殖信号的传递、抑制肿瘤生长。它与 Capecitabine 联合治疗晚期或复发性、特别是已经发生 Trastuzumab 耐药的乳腺癌可以收到良好的效果。但耐药同样困扰和限制着 Lapatinib 在临床的应用，阐明 Lapatinib 的耐药机制并进行有效的干预，将有助于提高其临床应用价值。

研究表明，细胞自噬可能参与了肿瘤细胞获得耐药性的过程，而 PI3K/Akt/mTOR、LKB1/AMPK/mTOR 等信号通路则是细胞自噬发生的主要上游调控分子。本课题首先明确细胞自噬是否在 HER2 阳性乳腺癌细胞获得 Lapatinib 耐药性过程中发挥重要作用，并阐明其分子作用机制。通过分析亲本细胞和耐药细胞中 ROS 水平的差异，明确小檗碱等药物是否可以通过上调 ROS 水平杀伤 Lapatinib 耐药细胞。上述疑问的解答，使我们初步明确了 HER2 阳性乳腺癌细胞获得 Lapatinib 耐药性的机制，为恢复其治疗敏感性提供了重要理论依据。

# 文献回顾

## 一、HER2 阳性乳腺癌及 Lapatinib 应用现状

### (一) HER2 阳性乳腺癌的特点及作用

乳腺癌是女性人群最常见的恶性肿瘤，严重威胁着女性健康。据美国肿瘤协会公布的 2014 年数据显示，乳腺癌的发病率为女性罹患肿瘤的首位，约占所有女性新发肿瘤的四分之一，其死亡率也仅次于肺癌，排名第二，约占肿瘤死亡患者的 15%。预计美国 2015 年将有乳腺癌新发病例 231,840 人<sup>[1]</sup>。由于社会经济形态、生活方式等因素的快速转变，近年来，乳腺癌在我国的发病率呈急剧上升趋势。2008 年的数据显示，我国共有 169,452 例患者被诊断为进展型乳腺癌（invasive breast cancer）。中国乳腺癌新发数量占全世界的 12.2%，死亡数量则占到了 9.6%<sup>[2]</sup>。我国乳腺癌患者的平均诊断年龄约为 50 岁，比西方女性的平均年龄（约为 61 岁）提前了约 11 年时间。预计到 2021 年，每 10 万名女性（55-69 岁）中乳腺癌发病人数将从现有的少于 60 人激增至 100 人左右<sup>[2]</sup>。由此可见，乳腺癌已成为女性最常见的、发病率最高的恶性肿瘤。

HER2、ER 和 PR 三种受体在乳腺癌中有不同的表达状态。根据表达水平的不同，并结合细胞形态学特征，通常可将乳腺癌分成四种亚型，即 Luminal A 型（ER 阳性和/或 PR 阳性，HER2 阴性）、Luminal B 型（ER 阳性和/或 PR 阳性，HER2 阳性）、HER2 阳性（ER 和 PR 阴性，且 HER2 阳性）和 Basal-like 型或称三阴型（ER、PR 和 HER2 均为阴性）。其中 HER2 阳性乳腺癌约占总体的 20%-25%<sup>[3]</sup>。现已明确，HER2 的过度表达可显著增加乳腺癌细胞的增殖、侵袭和远处转移能力，是乳腺癌患者死亡的重要原因。研究显示，即使控制了乳腺癌原发病灶，仍有超过 37% 的 HER2 阳性乳腺癌患者出现脑转移<sup>[4-7]</sup>。因此，针对 HER2 的分子靶向药物研发受到人们的高度关注。

人表皮生长因子受体（HER/EGFR）家族属于酪氨酸激酶受体，共有 4 个成员，分别是 EGFR（HER1）、HER2、HER3 和 HER4（图 1）。其结构主要包括细胞膜外侧的配体结合域、跨膜结合域和细胞膜内侧的酪氨酸激酶结合域<sup>[8]</sup>。这些受体的活化可激活 PI3K/Akt 等多条下游信号通路，调控细胞的增殖、凋亡、侵袭和转移，HER2

是其中最为重要的成员之一，目前尚未发现 HER2 的天然配体。EGF 等可与 HER2 的胞外段结合，促使其发生同源性或异源性二聚体化，从而激活胞内段的构象改变和磷酸化，并激发下游级联反应<sup>[8]</sup>。利用特异性的抗体封闭其胞外段的受体结合区，或利用小分子抑制剂阻断其胞内段的 ATP 结合位点，都可以抑制 HER2 的促增殖作用（图 1）。由于 EGFR 家族的四种受体、多种配体之间存在交互作用，同时其下游分子 MAPK 和 PI3K 等信号通路之间存在着数种反馈回路和多个不同层次的调控，使得 HER2 的分子调控网络变得异常复杂<sup>[9]</sup>。

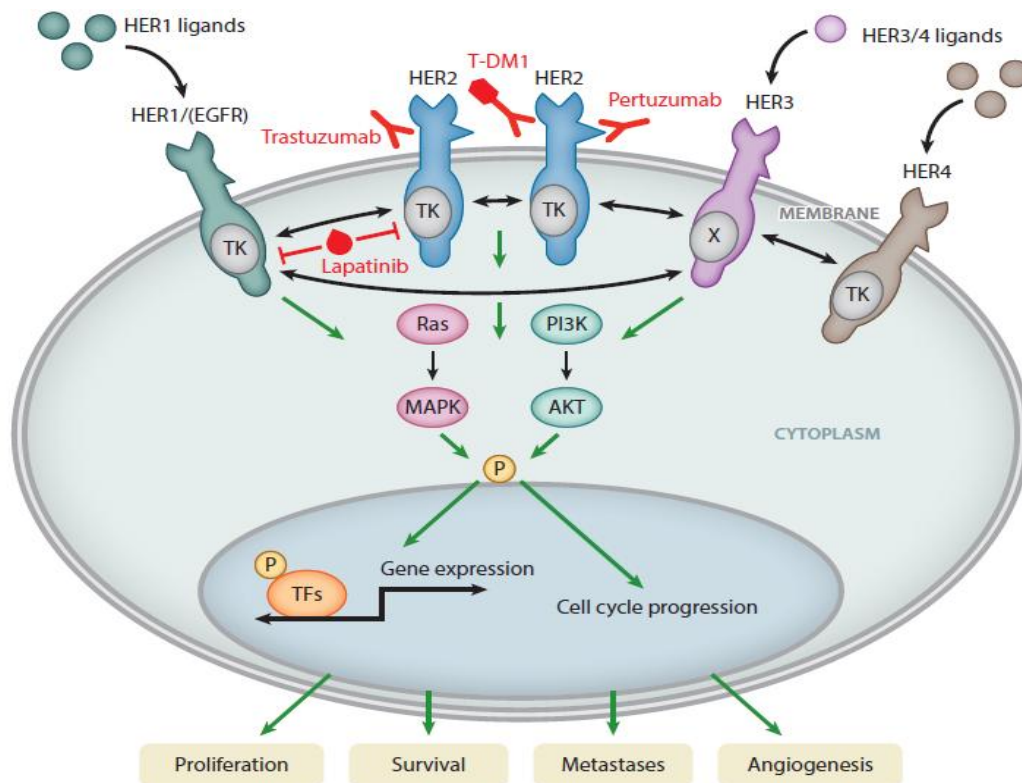


图 1 人表皮生长因子家族成员及受体酪氨酸激酶抑制剂作用示意图

**Figure 1 Members of epidermal growth factor family and working model of receptor tyrosine kinase inhibitors**

(Reference from: Rimawi MF et al. *Annu Rev Med.* 2015; 66: 111-28)

Slamon DJ 等首次发现，HER2/neu 在大约 30% 的乳腺癌组织中存在扩增，并且 HER2 的高表达与乳腺癌患者的不良预后密切相关<sup>[10]</sup>。体内外实验结果均证实 HER2 是一个癌基因，可以促使肿瘤细胞的快速增殖。这一特性使得 HER2 成为乳腺癌的

重要分子标记, 并成为 HER2 阳性乳腺癌治疗的重要靶标<sup>[11]</sup>。因此, 人们分别针对 HER2 的胞外段配体结合区和胞内段磷酸化区域进行靶向干预, 研发分子靶向治疗药物, 抑制 HER2 的生物活性, 阻断该受体向下游传递信号, 从而抑制肿瘤的生长。

## (二) HER2 分子靶向药物及 Lapatinib 研究现状

由于 HER2 的表达水平是决定 HER2 阳性乳腺癌增殖侵袭能力的关键因素, 因此, 针对 HER2 的分子靶向药物成为治疗 HER2 阳性乳腺癌的有力工具。目前, 该领域的研发已经取得一定的成果, 分子靶向治疗药物如 Trastuzumab、帕妥珠单抗 (Pertuzumab) 和 Lapatinib 等已在临床开始应用, 而 HER2 的阳性状态是应用该类靶向治疗药物的重要指标。

Trastuzumab 是 Genetech 公司研发的特异性针对 HER2 胞外结合区的人源化抗体, 于 1998 年获得美国 FDA 批准上市, 用于进展期乳腺癌的治疗, 之后又被批准用于乳腺癌的新辅助化疗。在与阿霉素、环磷酰胺和紫杉醇等化疗药物联用时, Trastuzumab 可显著延长 HER2 阳性患者的临床治疗反应率、无病生存期和总体生存期<sup>[12]</sup>。然而, 由于 HER2 可以与 EGFR、HER3 形成异源二聚体, 激活下游增殖信号通路。因此, Trastuzumab 单药应用的临床反应率只有 12-34%, 仅 35% 左右的 HER2 阳性乳腺癌患者对 Trastuzumab 治疗方案有效, 并且多数患者在治疗 1 年左右出现耐药现象<sup>[13]</sup>。乳腺癌细胞通过 HER2 受体基因突变、其它受体旁路途径启动 HER2 下游信号通路、PI3K/Akt 及 Ras/MAPK 信号通路的持续活化、HER2 受体内化转位入核等多种机制获得 Trastuzumab 的耐药性, 最终导致治疗失败<sup>[14, 15]</sup>。在此情况下, 研发新型的小分子抑制剂帮助克服 Trastuzumab 耐药性成为临床急需解决的问题。

新开发的 Pertuzumab 可以阻断 HER2 与 EGFR、HER3 的结合。临床试验显示, Pertuzumab 联合 Trastuzumab 的治疗效果优于 Trastuzumab 的单药应用<sup>[16]</sup>。GSK 公司研发的小分子抑制剂 Lapatinib 也已应用于 HER2 阳性乳腺癌的治疗。Lapatinib 作为新型的受体酪氨酸激酶抑制剂 (Tyrosine Kinase Inhibitor), 可以同时抑制 EGFR 和 HER2 胞内段激酶区 ATP 结合位点。这种双重抑制作用可以更有效的拮抗 HER2 下游信号通路的传递, 从而抑制肿瘤细胞的快速增殖。相对于 Trastuzumab 等单一受体阻断剂, Lapatinib 具有更好的治疗效果, 尤其是已产生 Trastuzumab 耐药的患者, 在应用 Lapatinib 时依然可以获得良好的疗效。值得关注的是, 由于分子结构较小, Lapatinib 更易透过血脑屏障, 在乳腺癌脑转移的治疗方面发挥作用。目前利用

Lapatinib 治疗转移性脑肿瘤已经成为临床研究的热点，并被证实可以用于已经发生转移的肿瘤治疗<sup>[17]</sup>。同时，相对于 Trastuzumab 严重的心脏毒性而言，Lapatinib 的不良反应主要表现为腹泻和皮疹等症状，患者依从性会更好<sup>[18]</sup>。

单独应用 Lapatinib 治疗难治性 HER2 阳性转移乳腺癌的疗效并不显著，但在联用化疗药物如 Capecitabine 时可收到较好的效果。通过 III 期临床随机试验证实，Lapatinib 与 Capecitabine 的联用效果明显优于 Capecitabine 的单独使用。Lapatinib 与紫杉醇的联用相对于安慰剂与紫杉醇的组合也可显著提高肿瘤治疗的反应率，延长患者 PFS 和总体生存期 (Overall Survival, OS)<sup>[19-21]</sup>。

### (三) Lapatinib 耐药机制研究现状

虽然 Lapatinib 在 HER2 阳性乳腺癌的治疗中显示出很好的应用前景，但是仍有相当多的患者无法从中获益。临床研究显示，Lapatinib 的临床治疗反应率仅为 24%，而原发性和获得性（继发性）耐药是导致 Lapatinib 治疗失败的主要原因。因此，有针对性的研究 Lapatinib 的耐药机制或许可以为恢复其治疗敏感性提供新的思路。

目前已经发现的 Lapatinib 耐药机制主要包括：（1）PI3K 突变或 p110 $\alpha$  过表达，可导致下游的增殖信号过度活化，而 PI3K 抑制剂 BAY 80-6946 和 p110 $\alpha$  特异性抑制剂 BYL719 有助于逆转耐药性<sup>[22, 23]</sup>（图 2）；（2）AXL 等其它受体的活化，可导致 HER2 受体非依赖的 Akt 等下游信号通路的活化<sup>[24]</sup>；（3）癌基因 Ras 的过表达，可导致 MEK-ERK 等增殖信号活化，MEK 抑制剂联合 Lapatinib 可以促进耐药细胞的凋亡；（4）Src 激酶的过度活化，可促进细胞增殖；（5）缺氧导致 HIF1 $\alpha$  信号通路的活化，可抑制 DUSP2 的表达，促进 HER2 阳性乳腺癌细胞在缺氧状态下对 Lapatinib 耐药。虽然针对 Lapatinib 的研究已经取得一定的进展，但是其耐药机制仍未能完全阐明。

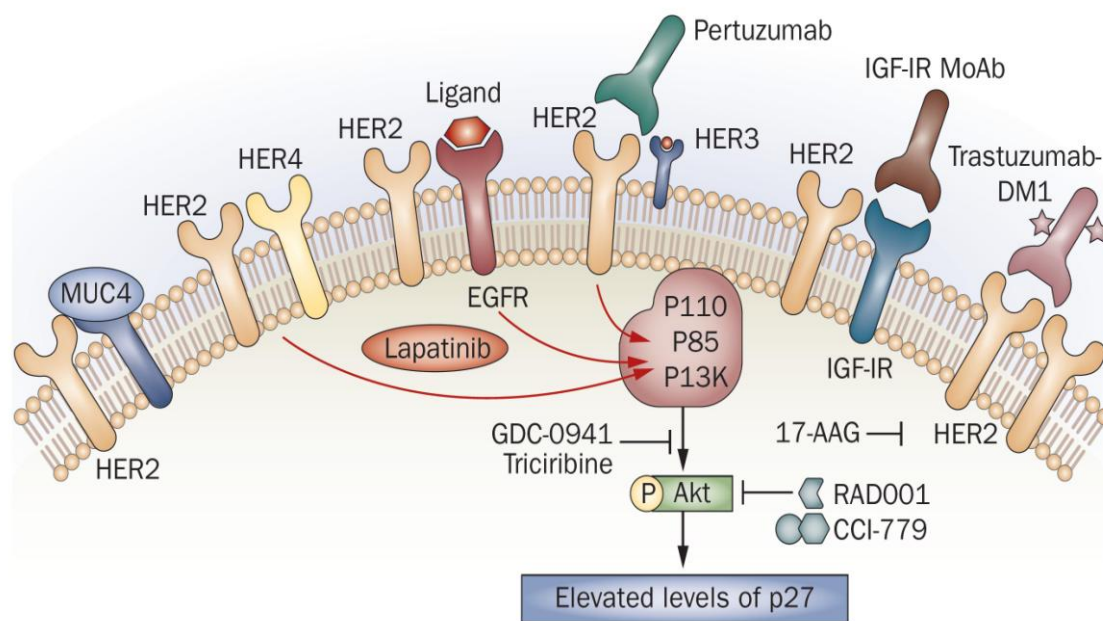


图 2 曲妥珠单抗和拉帕替尼的分子耐药机制

Figure 2 Molecular mechanism of Trastuzumab and Lapatinib resistance

(Reference from: Esteva FJ. *et al. Nat Rev Clin Oncol.* 2010; 7(2): 98-107)

## 二、细胞自噬研究进展

### (一) 细胞自噬的发生过程

Ashford 和 Porter 于 1962 年首次发现了细胞自噬现象 (autophagy)。“Autophagy”一词来源于希腊语，意思是“自己吃自己”。在生理或病理条件下都可能诱发自噬，这是细胞适应外界环境变化的重要机制之一。当细胞经受理化因素、能量不足等应激条件刺激时，自噬过程即被启动。需降解的细胞器、结构异常的蛋白质、部分细胞质内容物等成分被双层膜结构的自噬小泡包裹形成自噬体 (autophagosome)，并最终与溶酶体融合形成自噬溶酶体，降解其所包裹的内容物，从而促进细胞能量代谢的再利用和某些细胞器的更新<sup>[25]</sup>。

根据降解底物被转运至溶酶体的途径不同，可将细胞自噬分为以下三种不同类型：微自噬 (microautophagy)、巨自噬 (macroautophagy) 和分子伴侣介导的自噬 (chaperone-mediated autophagy, CMA)<sup>[26, 27]</sup>。一般意义上的自噬通常指的是巨自噬。自噬是真核细胞中普遍存在的一种生物现象，在细胞生理活动中负责降解异常的蛋白、细胞器等成分，对维持正常的细胞结构和功能起到至关重要的作用。尤其是在

饥饿等营养条件不足时,细胞可以通过自噬过程选择性的降解部分蛋白和线粒体等,以维持能量的供应。

细胞自噬过程以自噬体的形成作为特征性的标志。尽管人们对自噬体形成的具体步骤和详细分子机制尚未完全阐明,但已明确其形成的三个基本阶段(见图3)<sup>[28]</sup>。

(1) **初始阶段**: 在内质网或高尔基体上形成新月形的隔离膜,称为初始吞噬泡(phagophore),这一过程主要受到 AMPK、mTOR、ATG1/ULK 等上游信号分子的调控;(2) **自噬体膜延伸阶段**: 所形成的新月形隔离膜不断延伸,最终闭合,形成球形的自噬体或吞噬小体,其内包含有将被降解的细菌、蛋白质或受损细胞器。这一过程受到众多自噬相关基因(autophagy-related gene, ATG)的调控,主要包括 Beclin、ATG5、ATG12 和 ATG16L 等分子的调控。球形的自噬体膜结构形成后,ATG5/ATG12/ATG16L 复合物从自噬体上脱离。随后,ATG4 和 ATG3、ATG7 相继酶切 LC3,并促使 LC3- I 转化为 LC3- II。LC3- II 与自噬体膜结合后,促进其闭合并与溶酶体融合;(3) **自噬体成熟阶段**: 自噬体和溶酶体膜融合形成自溶酶体,所包裹的线粒体细胞器、蛋白等内容物被降解,释放氨基酸、脂肪酸等代谢物供细胞循环利用。

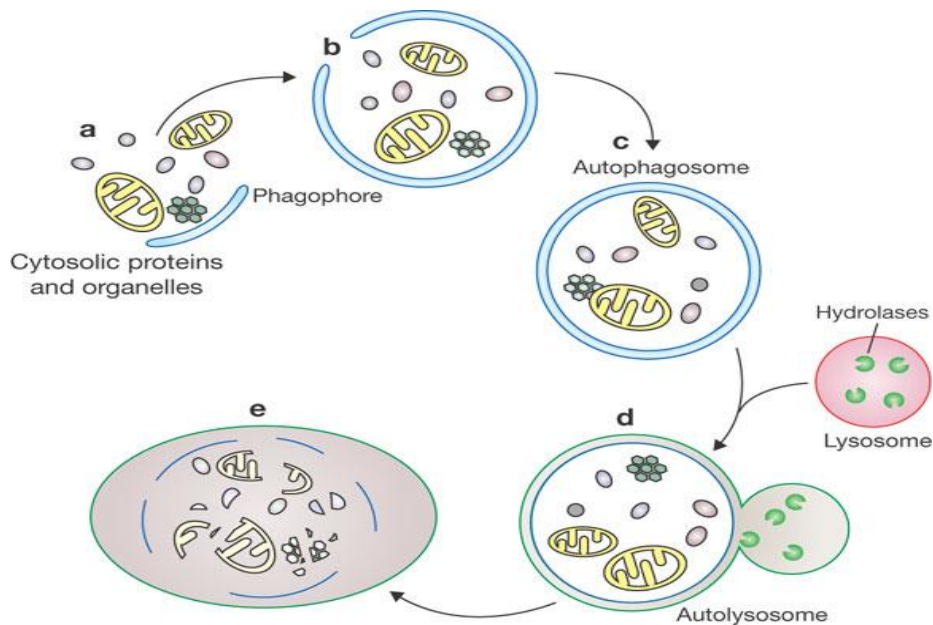


图3 细胞自噬体的形成过程

Figure 3 Autophagosome formation process

(Reference from: Xie Z. *et al. Nat Cell Biol.* 2007; 9(10): 1102-9.)



## (二) 细胞自噬与细胞凋亡、肿瘤细胞耐药

大量研究证实, 细胞自噬在肿瘤发生、发展过程中发挥重要作用。然而, 文献报道的结果并不一致。究其原因主要是细胞自噬在肿瘤发生、快速增殖和耐药等不同阶段扮演着不同的角色。总体而言, 细胞自噬在肿瘤演进中可能发挥了抑制和促进的双重作用, 但具体发挥何种作用则取决于肿瘤的进展程度以及整体状况<sup>[29]</sup>。在肿瘤发生阶段, 细胞自噬可通过控制炎症状况、组织损伤以及基因的不稳定性等, 最终诱发细胞凋亡, 抑制肿瘤细胞增殖。然而, 在肿瘤发展、转移和产生耐药性的过程中, 自噬通过降解自身细胞器和蛋白等结构成分, 维持能量供应, 使得细胞能在缺氧、营养缺陷等极端不利条件下存活, 成为促进肿瘤细胞生长的重要原因<sup>[25, 30]</sup>。

细胞自噬与凋亡之间的关系十分密切<sup>[31]</sup>, 自噬在促进或抑制细胞凋亡两方面都有一定的证据支持。自噬相关基因 *Atg5* 和 *Atg7* 的基因剔除小鼠均表现出进行性的运动功能和行为障碍, 其主要原因是细胞自噬不能有效清除结构异常的蛋白质。自噬关键调控基因 *Beclin 1* 被认为是一个抑癌基因, 其在乳腺癌等肿瘤组织中的表达明显降低。*Beclin 1* 杂合性缺失小鼠易发多种肿瘤<sup>[32]</sup>。然而, 大量证据表明, 细胞自噬可以促进细胞在葡萄糖剥夺、生长因子缺乏、缺氧或放化疗等不利条件下的存活, 有助于维持细胞的能量供应, 并保护基因组的完整性<sup>[33, 34]</sup>。

细胞自噬在肿瘤细胞耐药过程中的作用备受关注, 大量研究显示自噬有利于肿瘤细胞在放化疗等极端条件下存活, 这成为导致肿瘤细胞耐药和转移复发的重要原因<sup>[31]</sup>。细胞自噬可以促进 HER2 阳性细胞对 Trastuzumab 产生耐药, LC3 shRNA 则可以抑制细胞自噬过程, 并恢复耐药细胞对 Trastuzumab 治疗的敏感性<sup>[35]</sup>。细胞自噬也可以促进慢性粒细胞性白血病 (chronic myelocytic leukemia, CML) 细胞获得对分子靶向药物伊马替尼 (Imatinib) 的耐药性<sup>[36]</sup>、促使结直肠癌细胞获得对顺铂和 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 等药物的耐药性<sup>[37]</sup>。而利用 RNAi 干预细胞自噬关键分子的表达或自噬抑制剂都可以恢复这些耐药细胞对治疗的敏感性。因此, 阐明细胞自噬在肿瘤细胞获得耐药性过程中的机制和生物学功能有助于克服肿瘤细胞耐药性, 为临床治疗提供重要的药物作用靶点。

细胞自噬抑制剂可以阻断细胞自噬过程, 在逆转肿瘤耐药研究中广泛应用。最常用的自噬抑制剂包括 CQ 或羟化氯喹 (Hydroxychloroquine, HCQ)、3-MA 和 BA 等<sup>[31]</sup>。它们的作用机制不尽相同, CQ 和 HCQ 属于溶酶体腔碱化剂, 主要通过中和

溶酶体 pH 值阻断自噬发生过程；3-MA 通过抑制 III 型 PI3K 的激活抑制自噬的启动过程；BA 属于质子泵抑制剂，通过抑制自噬体与溶酶体的融合而抑制自噬体的形成。目前已有部分临床试验开始评价细胞自噬抑制剂联合化疗是否有助于提高肿瘤的疗效。

### （三）细胞自噬的分子调控机制

如前描述，细胞自噬过程包括自噬信号的激活、细胞自噬体形成等多个步骤，其调控过程涉及上游调控环节和细胞自噬体形成过程的调节。细胞自噬的启动过程是主要调控环节，主要包括 PI3K-Akt-mTOR, LKB1-AMPK-mTOR, P53, Beclin1 和 Bcl-2 等分子信号通路。

PI3K-Akt-mTOR 是调控细胞增殖状态的主要信号通路之一，在多种肿瘤细胞中发现了 PI3K (I 型) 的突变，如 E542K、E545D 和 E545K 等。这些突变导致 PI3K-Akt 信号的组成型活化，激活 mTOR (mammalian target of rapamycin) 而抑制细胞自噬过程。抑癌基因 PTEN 可以阻断 Akt 的活化信号，从而激活细胞自噬。mTOR 是感应细胞增殖的主要信号，mTOR 信号通路的活化直接抑制 Atg1/ULK 激酶的活化和细胞自噬。而 mTOR 抑制剂雷帕霉素 (Rapamycin) 和 RAD001 则可以抑制 mTOR 活化启动细胞自噬过程<sup>[38, 39]</sup>。

AMP 激活的蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 由  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  三个亚基组成，是感应细胞能量状态的感受器。当细胞能量供应不足时，细胞内 ATP 浓度的降低伴随 AMP 浓度的增加并与 AMPK 的  $\gamma$  亚基结合，促使其空间构象发生变化。LKB1 等可催化 AMPK $\alpha$  亚基的 172 位苏氨酸发生磷酸化，从而激活 AMPK<sup>[40]</sup>。AMPK 可拮抗 mTOR 的活化进而激活细胞自噬过程，抑制肿瘤细胞增殖。AMPK 抑制剂 Compound C 则可阻断细胞自噬过程。值得注意的是，二甲双胍、阿司匹林、白藜芦醇、小檗碱、洛伐他汀、没食子酸和辣椒素等均可以激活 AMPK/mTOR 信号通路，无论是单独使用还是联合其他化疗药物，在治疗中都表现出抑制肿瘤生长的作用<sup>[41]</sup>。目前正有 40 余项临床随机试验正在观察单独或联合使用二甲双胍和阿司匹林预防或治疗肿瘤的效果，其实验结果可能为抗肿瘤治疗提供更多的选择。

抑癌基因 p53 可以激活 AMPK 并抑制 mTOR，激活细胞自噬过程。同时 p53 还可以激活凋亡相关的下游分子诱发细胞自噬过程，如 Sestrin2、DRAM (damage-regulated autophagy modulator)、Bax 和 PUMA 等<sup>[42, 43]</sup>。Beclin1 也被称为

Atg6, 它主要通过与其 Vps34, UVRAG 和 Atg14L 等形成复合物参与细胞自噬体形成初始阶段的调控。而 Bcl-2 则主要通过与其 Beclin1 结合, 抑制细胞自噬过程<sup>[31]</sup>。除此之外, 缺氧、内质网应激 (Endoplasmic Reticulum Stress)、反应活性氧、营养代谢、炎症等多种信号通路也可以调控细胞自噬过程。

### 三、活性氧 (ROS) 与肿瘤耐药

活性氧 (ROS, Reactive oxygen species) 包括超氧阴离子、过氧化物和含氧自由基等。ROS 是细胞能量代谢过程中的副产物, 成对电子在线粒体氧化呼吸链传递时发生泄漏是 ROS 产生的主要来源。药物处理、理化因素等多种应激条件均可造成大量 ROS 的产生, 导致线粒体结构和功能受损、基因组不稳定性增加等, 从而诱发细胞发生周期阻滞、细胞自噬、细胞凋亡等<sup>[44]</sup>。

ROS 可与细胞基因组、线粒体、蛋白质等结合, 破坏蛋白质的空间结构, 促使细胞核和线粒体发生 DNA 断裂、突变等一系列损伤, 是导致细胞基因组结构不稳定的重要原因<sup>[45]</sup>。为了维持相对稳定的细胞氧化还原水平, 细胞内存在着相应的 ROS 清除体系, 如超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽还原酶 (GSH)、NADPH 等抗氧化酶体系等, 及时的清除代谢过程中不断产生的 ROS。但是, 缺氧、营养不足、癌基因过度激活等因素可诱发大量的 ROS 产生, 破坏细胞氧化还原稳态, 易诱发细胞发生恶性转化<sup>[46]</sup>。研究证实, ROS 与肿瘤的发生、发展密切相关。癌基因 Kras 可以通过上调 ROS 水平诱导正常上皮细胞发生非锚定依赖性的生长, 而拮抗线粒体途径的 ROS 产生则可以抑制 Kras 的在体成瘤能力<sup>[46]</sup>。

然而, 在肿瘤细胞获得耐药性的过程中, 细胞内低水平的 ROS 反而更有利于耐药细胞和肿瘤干细胞的存活。抑制细胞内源性 ROS 水平, 减少 ROS 对其基因组等结构的破坏是维持肿瘤细胞的耐药性和恶性表型的重要机制之一<sup>[47]</sup>。肿瘤细胞通过促进 ROS 的清除和降低细胞内源性 ROS 的产生等两方面的机制, 降低细胞的 ROS 水平, 有利于肿瘤细胞在化疗药物干预作用下的存活 (图 4)。氯硝柳胺等药物可通过增加 ROS 水平选择性的杀伤肿瘤干细胞, 提高肿瘤治疗效果<sup>[48]</sup>。5-FU、奥沙利铂等化疗药物也是通过增加 ROS 水平杀伤肿瘤细胞<sup>[49, 50]</sup>。可见, 增加细胞内源性 ROS 水平将成为新的肿瘤治疗策略, 有助于提高化疗药物的临床疗效。

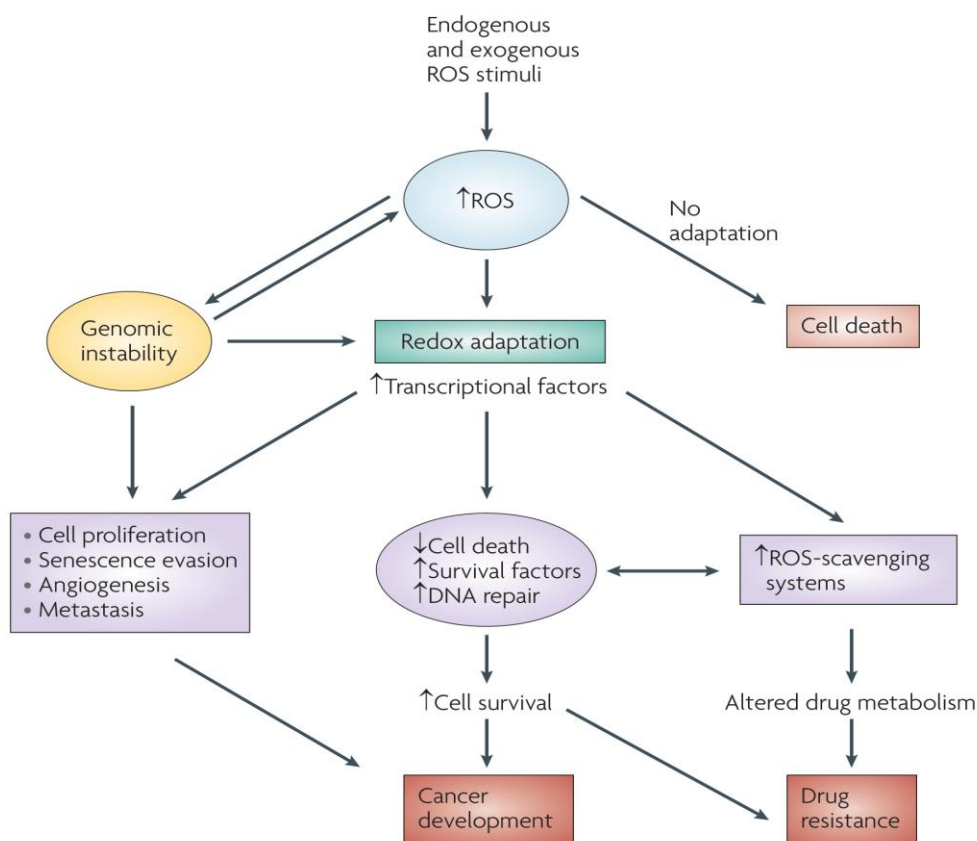


图4 ROS与肿瘤发生和肿瘤耐药

Figure 4 Redox adaptation in cancer development and drug resistance

(Reference from: Trachootham D. *et al. Nat Rev Drug Discov.* 2009; 8(7): 579-91.)

#### 四、小檗碱的抗肿瘤作用研究

小檗碱（BR）又称黄连素，是我国的一种传统药物，为毛茛科植物黄连根茎中提取的异喹啉生物碱。BR具有很强的抑菌作用，能够对痢疾杆菌、肺炎球菌等多种病菌产生抑制作用，尤其对痢疾杆菌的作用最强。BR口服后不易入血，基本以原药形式从肠道排出体外。因此，BR的血药浓度较低，副作用较少，在临床上常用来治疗细菌性胃肠炎、痢疾等消化道疾病。

除抗菌作用外，近期的研究表明BR还具有许多其它药理活性，可用于肿瘤和炎症、心血管和代谢紊乱等疾病的治疗<sup>[51-53]</sup>，特别是其抗肿瘤活性备受关注。研究发现，BR可以抑制乳腺癌、肺癌、结肠癌和肝癌等多种肿瘤细胞的增殖，促进细胞凋亡或细胞周期停滞<sup>[51]</sup>，使其在G0/G1期或G2/M期表现出停滞状态<sup>[54, 55]</sup>。BR与长春新碱或伊立替康等药物联用时具有明显的协同效应，可抑制肝癌细胞的增殖能力，

并降低其耐药性。在人非小细胞肺癌细胞 (A54 和 H1299)、人乳腺肿瘤干细胞 (Cancer Stem Cells, CSCs) 和前列腺癌细胞 (DU145/PC-3 和 LNCaP) 的体内、体外实验中均证实了 BR 的抗肿瘤作用<sup>[56-59]</sup>。另外, BR 还可以通过激活 Beclin-1 和抑制 mTOR 信号通路激活细胞自噬凋亡<sup>[60]</sup>。最近的一项研究发现, BR 可以通过 p53 通路竞争性的结合 Sp1 和 Ets1, 从而在转录水平下调人黑色素瘤细胞系 A375 的 DAXX 的表达, 促进肿瘤细胞凋亡<sup>[61]</sup>。图 5 是 BR 抗肿瘤作用的可能机制<sup>[62]</sup>。

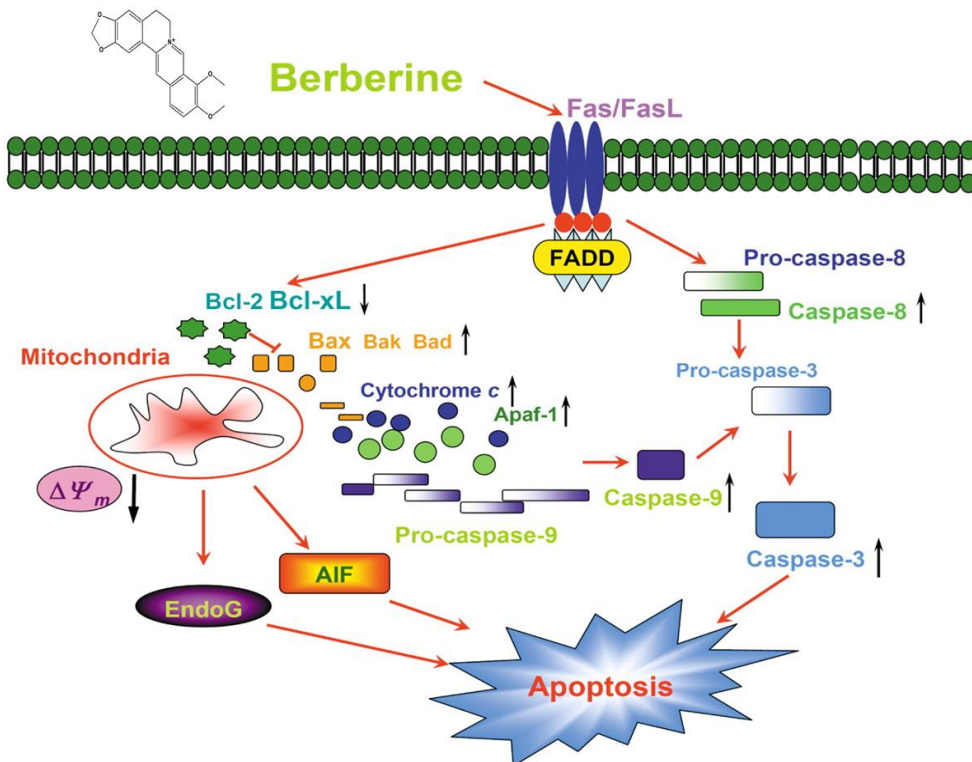


图 5 小檗碱的抗肿瘤作用

Figure 5 Proposed model for BR -mediated anti-cancer effect

(Reference from: Ho YT. *et al. Anticancer Res.* 2009; 29(10): 4063-70)

如前所述, ROS 在肿瘤发生、发展过程中具有十分重要的作用, 而耐药细胞通常 ROS 水平较低, 而且维持这一低水平状态有利于耐药细胞的生存。那么, BR 能否通过调控 ROS 水平杀伤肿瘤细胞呢? 研究显示, BR 可以通过上调 ROS 水平增加 AMPK 活性, 抑制肿瘤细胞的黏着和侵袭, 而 AMPK $\alpha$ 1 的下调则可抵消 BR 的这些效果。进一步研究发现, BR 可以通过抑制 MAPK、JNK、Akt 和钙离子通道等多种途径增加 ROS 水平, 诱导肝癌细胞凋亡<sup>[63]</sup>。同时, 通过上调 ROS, 激活 Caspase-3

和线粒体依赖的细胞凋亡通路，促进人舌鳞癌细胞凋亡<sup>[62]</sup>。BR 还可以联合放疗提高具有放射治疗抵抗的前列腺癌细胞的凋亡，其主要作用机制是通过激活 Bax, caspase-3 等凋亡信号，并抑制 HO-1 清除 ROS 的能力<sup>[64]</sup>。但是，针对 BR 调控 ROS 的研究结果不尽相同。也有部分报道显示，BR 可以抑制 ROS 的产生。考虑可能与细胞模型、处理条件、检测指标等多个因素相关。例如，BR 可以诱导 ROS 在前列腺癌细胞生成，而在正常上皮细胞则无此表现<sup>[65, 66]</sup>。

# 正文

## 第一部分 Lapatinib 耐药 HER2 阳性细胞株的筛选及耐药性分析

乳腺癌是女性最常见、发病率最高的恶性肿瘤，约占女性肿瘤的四分之一。目前，全球每年约有 1,300,000 名女性被诊断为乳腺癌，并有约 470,000 名女性患者死于乳腺癌。我国的乳腺癌发病率和死亡率近年来均呈现出明显的上升趋势，且发病年龄更趋向于年轻化。HER2 阳性乳腺癌约占乳腺癌总数的 25% 左右，通常预后较差。目前，HER2 阳性乳腺癌的治疗多以 HER2 靶向治疗结合化疗为主。Lapatinib 是 GSK 公司生产的同时抑制 EGFR 和 HER2 的小分子抑制剂，可与 Capecitabine 联合治疗晚期或转移性乳腺癌。然而令人遗憾的是，Tomasello G 等将 Lapatinib 作为一线药物进行的临床实验结果显示，该药的总体反应率仅为 24% 左右，其临床反应率和获益率等均处于较低水平。可见耐药问题是 Lapatinib 治疗失败的主要原因。为了研究 Lapatinib 的耐药机制，并寻求解决问题的方法。在本部分实验中，我们着重进行 Lapatinib 耐药株的筛选。首先选取 HER2 阳性乳腺癌细胞 BT-474 和 AU-565，分别给予 Lapatinib 处理并维持 12 个月，最终获得具有耐药性的细胞株。为评价耐药细胞对 Lapatinib 的耐药能力，分别利用 MTT、平板克隆和软琼脂克隆形成能力等方法进行检测，证实所筛选的耐药细胞具有稳定耐药性，为后续实验奠定基础。

### 1 材料

#### 1.1 细胞系

人 HER2 阳性乳腺癌细胞系 BT-474 和 AU-565 均购自美国 ATCC (American Type Tissue Culture Collection)。

## 1.2 主要试剂与材料

Lapatinib	美国 Selleck Chemicals 公司
DMEM 培养基	美国 Gibco 公司
RPMI-1640 培养基	美国 Gibco 公司
胎牛血清	美国 Gibco 公司
胰蛋白酶	美国 Sigma-Aldrich 公司
DMSO	美国 Sigma-Aldrich 公司
MTT	美国 Sigma-Aldrich 公司
Giemsa stain	美国 Sigma-Aldrich 公司
Cell-Light™ EdU DNA Cell Proliferation Kit	广州锐博生物科技有限公司
脂质体 Lipofectamine™2000	Invitrogen 公司
质粒提取试剂盒	天根公司
GFP-LC3	浙江大学惠赠
DAPI	美国 Sigma-Aldrich 公司
细胞裂解液 (RIPA)	碧云天生物技术研究
细胞培养瓶、冻存管、细胞培养皿	美国 CORNING 公司
Triton X-100	美国 Sigma-Aldrich 公司
甲醛	美国 Sigma-Aldrich 公司

## 1.3 主要仪器设备

移液器	法国 Gilson 公司
光学显微镜	日本 Olympus 公司
超净工作台	西安净化仪器设备厂
CO <sub>2</sub> 培养箱	美国 Thermo Scientific 公司
普通医用冰箱 DW-25W388 型	青岛海尔公司
超低温冰箱 Forma 702 型	美国 Thermo Scientific 公司
415D 微量高速离心机	德国 Eppendorf 公司
电子天平	美国 Thermo Scientific 公司
Infinite® F500 多功能酶标仪	瑞士 Tecan 公司



荧光显微镜

日本 Olympus 公司

## 1.4 常用缓冲液

**PBS 缓冲液:** KCl 0.2 g, NaCl 8.0 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g, 加蒸馏水至 800 mL, 定容至 1 L, 并将 pH 值调至 7.4。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养、传代、冻存和复苏

人 HER2 阳性乳腺癌细胞系 BT-474 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, AU-565 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基在 37°C、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。利用光学显微镜观察细胞状态, 根据生长情况, 每 3 天左右更换一次培养基。

#### 1) 常规耗材的消毒:

实验用玻璃吸管、离心管、细胞培养皿等均使用强酸浸泡过夜、高压蒸汽灭菌 30 分钟, 烘箱烘干备用; 细胞培养瓶、96 孔板等均使用强酸浸泡过夜, 烘干后 <sup>60</sup>Co 照射消毒。

#### 2) 超净台的消毒:

每次无菌操作前均需用 75% 酒精擦拭干净台面, 再以紫外线照射 30 分钟以上。

#### 3) 细胞实验常用液体的配制:

**细胞培养基:** DMEM 和 RPMI-1640 培养基经微孔滤膜过滤后, 在无菌环境下按 9:1 的比例加入胎牛血清进行配制, 并进行无菌实验验证。将配制好的培养基置于无菌 6 孔板中, 每孔约 2 mL, 静置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中 72 小时。肉眼观察无浑浊、异物, 光学显微镜下观察无微生物生长时方可使用。保存条件: 4°C 密封冷藏。

**0.25% 胰蛋白酶消化液:** 将胰蛋白酶粉末与 PBS 按 0.25 g : 100 mL 的比例进行配制, 充分溶解后过滤除菌。保存条件: 4°C 密封冷藏。

**细胞冻存液:** 含 10% 胎牛血清的培养基和 DMSO 按照 9:1 的比例混合, 使用时在无菌环境下现配。

#### 4) 其它实验用液体的配制:

根据具体情况采用高压蒸汽灭菌法消毒, 或利用一次性无菌滤器于超净台内过滤除菌, 并分装成小包装, 以避免多次冻融。保存条件: 根据需要 4°C 密封冷藏或

-20℃密封冻存。

5) 无菌操作:

在进行无菌操作前,应在洁净流动水源下清洗双手及手腕,待干燥后戴上一一次性乳胶手套,以 75%酒精擦拭消毒。操作台中物品应摆放有序,避免手或其它物品接触容器口。开瓶时,应用 75%酒精棉球擦拭瓶口,待干燥后用酒精灯外焰快速灼烧,开盖后用外焰依次消毒瓶口及瓶盖。使用完毕后仍需用酒精灯外焰灭菌后方可盖住瓶盖。

6) 细胞培养和传代:

在无菌条件下,细胞培养瓶中加入适量细胞和足量的含 10%胎牛血清的培养基,静置于 37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱,待细胞增殖至培养瓶底约 80%时即可进行传代。用弯头滴管吸取培养瓶中液体轻吹瓶壁数次,弃去瓶中培养基和悬浮的死细胞。用 2-3 mL PBS 缓冲液冲洗细胞后,在瓶中加入约 1 mL 的 0.25%胰蛋白酶消化细胞。室温下水平静置 2-3 分钟后,利用光学显微镜观察细胞形态。当细胞开始变圆并部分的脱离瓶壁时,加入 1 mL 含有血清的培养基终止消化。用弯头滴管轻吹瓶底使细胞悬浮于培养基中。把细胞悬液收集到离心管中,800 rpm 离心 5 分钟。弃去管中上清,加入适量的培养基,并以滴管轻吹,使细胞重悬。将细胞悬液均匀分成 2-3 份,分别移入细胞培养瓶中常规培养。通常细胞会在 24 小时内贴壁生长。

7) 细胞冻存和复苏:

细胞的冻存和复苏应遵循“慢冻快融”的原则。

**细胞冻存:** 应选取对数生长期的细胞,提前 24 小时更换一次培养基。冻存时先用 0.25%胰蛋白酶消化细胞,将细胞悬液移入离心管 800 rpm 离心 5 分钟。弃去上清液,加入细胞冻存液,以滴管重悬细胞并移入冻存管中。消毒管口,密封并标注细胞相关信息、冻存时间。冻存的细胞先放置于 4℃ 冰箱保存 30 分钟,再置于-20℃ 冰箱冻存 2 小时,-80℃冰箱冻存过夜,液氮罐中长期保存。

**细胞复苏:** 取出冻存管,于 37℃温水中快速融化细胞,在无菌环境中将细胞悬液移入离心管,并加入 9 倍体积的培养基,800 rpm 离心 5 分钟。弃去上清,用培养基重悬细胞后接种于细胞培养瓶,加入足量培养基,静置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,24 小时后可再更换一次培养基。

## 2.2 BT-474 和 AU-565 耐药细胞的构建及培养

### 1) Lapatinib 储备液的配制:

Lapatinib 呈黄色粉末状, 分子量为 581, 可在无菌环境下用 DMSO 溶解稀释成 2 mM 的储备液, 经滤器过滤除菌后分装于 EP 管中, 标注名称、浓度及配制时间, 避光保存于 -20℃ 冰箱。

### 2) BT-474 耐药细胞的构建及培养:

将人乳腺癌细胞株 BT-474 利用含有 Lapatinib (终浓度为 0.5 - 2  $\mu\text{M}$ ) 的培养基持续培养, 逐渐增加 Lapatinib 的浓度, 维持筛选 12 个月, 以形成 BT-474 的 Lapatinib 耐药细胞 (Resistant, 以下简称为 BT-474<sup>LapR</sup>)。用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。0.25%胰蛋白酶消化传代, 根据细胞生长情况, 每 3 天左右传代 1 次, 光学显微镜下观察细胞形态。

### 3) AU-565 耐药细胞的构建及培养:

将人乳腺癌细胞株 AU-565 利用含终浓度为 1 - 5  $\mu\text{M}$  Lapatinib 的 RPMI-1640 培养基持续培养, 逐渐增加 Lapatinib 浓度, 维持筛选 12 个月, 以形成 AU-565 的 Lapatinib 耐药细胞 (Resistant, 以下简称为 AU-565<sup>LapR</sup>)。用含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640, 于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。0.25%胰蛋白酶消化传代, 根据细胞生长情况, 每 3 天左右传代 1 次, 光学显微镜下观察细胞形态。

## 2.3 MTT 法分析细胞对拉帕替尼的敏感性

### 1) MTT 溶液的配制:

MTT 呈黄色粉末状, 需在无菌、避光环境下按 100 mg : 20 mL 的比例溶解于 PBS 中, 充分搅拌使之溶解, 经滤器过滤除菌后分装于 EP 管中, 标注名称、浓度及配制时间, 避光保存于 4 °C 冰箱。效期: 2 周。

### 2) 将处于对数生长期的 BT-474 亲本细胞 (Parental, 以下简称为 BT-474<sup>Par</sup>) 和 BT-474<sup>LapR</sup> 分别用 0.25%胰蛋白酶常规消化后离心, 收集细胞沉淀。用含血清的培养基重悬细胞并计数, 按 $1 \times 10^4$ 个细胞/孔的标准接种于 96 孔板, 添加培养基至 100 $\mu\text{L}$ 。

AU-565 亲本细胞 (Parental, 以下简称为 AU-565<sup>Par</sup>) 和 AU-565<sup>LapR</sup> 按  $8 \times 10^3$  个细胞/孔接种, 操作方法同上。

- 3) 接种 24 小时后观察细胞生长情况，待贴壁后弃去原培养基，加入 200  $\mu\text{L}$  含不同浓度 Lapatinib 的培养基 (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 和 16  $\mu\text{M}$ )，每个浓度设 5 个复孔，放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  培养箱中常规培养。
- 4) 加药 96 小时后每孔加入浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20  $\mu\text{L}$ ，37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 4 小时后终止培养。
- 5) 小心吸弃孔内培养基，加入 150  $\mu\text{L}$ /孔的 DMSO，震荡 10 分钟，使紫色结晶物充分溶解。利用酶标仪在 490 nm 波长测定吸光度值并计算均值。以 Lapatinib 浓度为横坐标，细胞相对增殖率为纵坐标，用 GraphPad Prism 5.0 软件绘制细胞增殖曲线。

## 2.4 EdU 分析

5-乙炔基-2-脱氧尿嘧啶核苷 (5-ethynyl-2-deoxyuridine, EdU) 是一种胸腺嘧啶核苷结构类似物，在细胞增殖时能掺入正在复制的 DNA 分子中。基于 EdU 与染料的共轭反应 (呈红色)，可以高效快速地检测处于 S 期的细胞比例，反映细胞的增殖状态。

- 1) 常规培养并收集 BT-474 和 AU-565 细胞系，消化离心后制成单细胞悬液。
- 2) 细胞计数后按照  $4 \times 10^4$  个细胞/孔，将细胞接种至 24 孔板，培养基补至 500  $\mu\text{L}$ 。
- 3) 待细胞贴壁后，更换新鲜培养基并加入 Lapatinib (0.5 - 2  $\mu\text{M}$ ) 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 48 小时，空白对照组培养基中仅含 DMSO。
- 4) 用细胞培养基稀释 EdU 溶液至终浓度为 50  $\mu\text{M}$ ，每孔加入 200  $\mu\text{L}$  含 EdU 的培养基孵育细胞 4 小时。
- 5) 吸弃上清，用 PBS 洗涤 2 次，每孔加入 200  $\mu\text{L}$  含 4% 多聚甲醛的细胞固定液，孵育 30 分钟。
- 6) 用含甘氨酸的脱色液漂洗并吸弃上清，PBS 洗涤 2 次，每次 5 分钟；每孔加入 200  $\mu\text{L}$  含 0.5% Triton X-100 的 PBS 脱色，摇床孵育 10 分钟；PBS 清洗细胞 2 次，每次 5 分钟。
- 7) EdU 检测：  
按如下列顺序配置适量 1 $\times$ Apollo 反应液 (现用现配)：去离子水- Apollo 反应缓冲液 (试剂 B)- Apollo 催化剂溶液 (试剂 C)- Apollo 荧光染料 (试剂 D)- Apollo

缓冲添加剂（试剂 E）。

- 8) 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  1 $\times$ Apollo 染色反应液，避光，室温孵育 30 分钟。
- 9) 吸弃上清，PBS 洗涤 2 次后加入 DAPI 反应液（100  $\mu\text{L}$ /孔），避光，室温孵育 30 分钟；然后用 PBS 洗涤 2 次，洗脱 DAPI 反应液，每次 5 分钟。
- 10) 用荧光显微镜分析结果并记录数据，进行统计学分析。

表 1 1 $\times$ Apollo 反应液的配制

试剂				
Apollo 染色反应液	500 $\mu\text{L}$	1 mL	5 mL	10 mL
去离子水	469 $\mu\text{L}$	938 $\mu\text{L}$	4.69 mL	8.39 mL
Apollo 反应缓冲液（试剂 B）	25 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	250 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$
Apollo 催化剂溶液（试剂 C）	5 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
Apollo 荧光染料溶液（试剂 D）	1.5 $\mu\text{L}$	3 $\mu\text{L}$	15 $\mu\text{L}$	30 $\mu\text{L}$
Apollo 缓冲添加剂（试剂 E）	5 mg	9 mg	44 mg	88 mg

## 2.5 软琼脂克隆形成能力分析

- 1) 取对数生长期 BT-474<sup>Par</sup> 和 BT-474<sup>LapR</sup> 细胞分别用 0.25% 胰蛋白酶消化后离心，收集细胞沉淀，重悬后进行细胞计数，调整细胞密度至  $1 \times 10^3$  个/mL。
- 2) 制备下层琼脂（浓度为 0.5%），按 0.5 mL/孔浇注 24 孔板，室温凝固。
- 3) 制备上层琼脂（浓度为 0.3%），与细胞悬液混匀，使达到 500 个细胞/mL，按 1 mL/孔浇注 24 孔板，室温凝固。
- 4) 常规培养 3-4 周。
- 5) 将培养板置于光学显微镜下，观察细胞克隆数，并计算克隆形成率（克隆形成率 = (集落数/接种细胞数)  $\times 100\%$ )。

## 2.6 统计学分析

用 SPSS 16.0 统计软件对实验中所得到的数据进行统计分析。对结果进行 T-test 分析，评价各处理组间是否存在统计学差异。统计学显著差异设置为  $*p < 0.05$ ，有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 MTT 法分析细胞对 Lapatinib 的耐药性

分别给予 BT-474<sup>Par</sup> 和 BT-474<sup>LapR</sup>、AU-565<sup>Par</sup> 和 AU-565<sup>LapR</sup> 不同浓度的 Lapatinib 作用 96 小时。结果显示 BT-474<sup>Par</sup> 和 AU-565<sup>Par</sup> 在 Lapatinib 浓度为 0.125  $\mu\text{M}$  时，增殖均受到明显的抑制。随着 Lapatinib 浓度的增加，细胞增殖能力显著降低。而 BT-474<sup>LapR</sup> 和 AU-565<sup>LapR</sup> 在 Lapatinib 浓度为 4  $\mu\text{M}$  时仍能维持 60% 以上的增殖能力（图 1-1）。耐药细胞的 IC<sub>50</sub> 显著高于亲本细胞，说明耐药细胞具有很好的耐药能力。

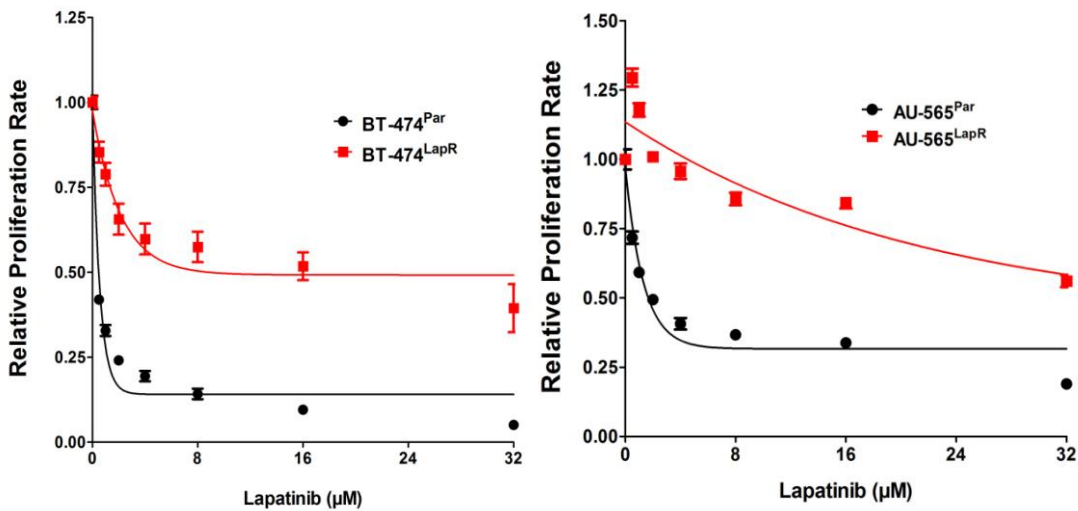


图1-1 MTT分析在不同浓度的Lapatinib作用下，BT-474和AU-565亲本细胞和耐药细胞的增殖能力

Fig 1-1 Proliferation analysis of parental and resistant BT-474 and AU-565 cells

#### 3.2 EdU 法分析亲本细胞和耐药细胞在 Lapatinib 处理时细胞增殖能力差异

为进一步明确耐药细胞和亲本细胞在 Lapatinib 处理时细胞增殖能力的差异，利用 EdU 标记法检测在 2  $\mu\text{M}$  Lapatinib 处理时的差异。结果如图 1-2 所示，BT-474<sup>Par</sup> 和 AU-565<sup>Par</sup> 仅有 15% 左右的细胞处于 S 期 (DNA 复制)，而 BT-474<sup>LapR</sup> 和 AU-565<sup>LapR</sup> 有近 50% 的细胞在 Lapatinib 作用下仍然处于快速增殖状态，说明耐药细胞具有很好的耐药性。

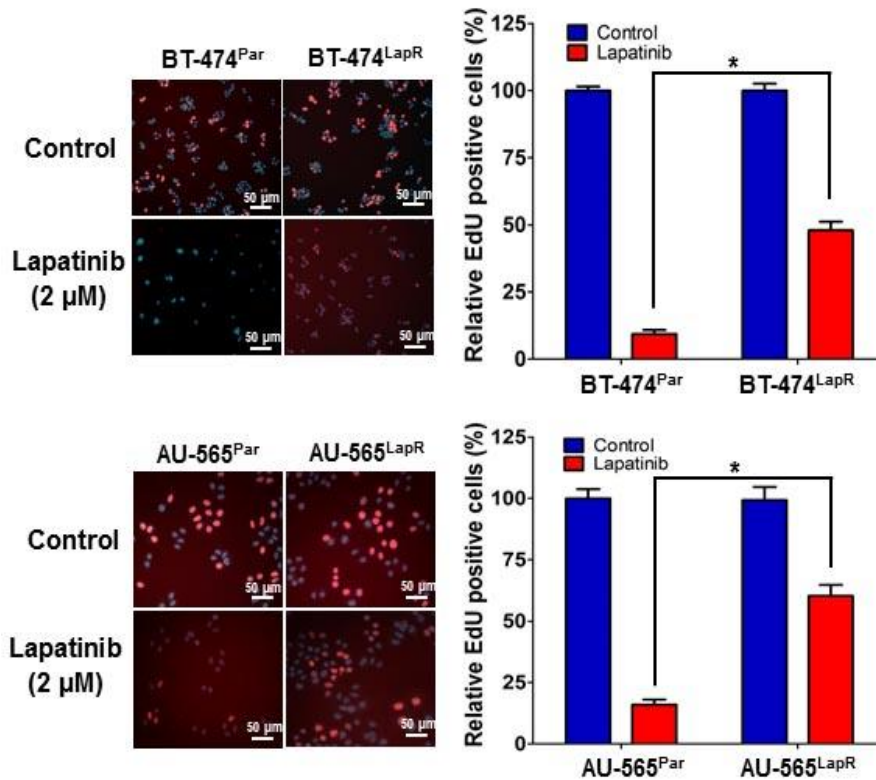


图1-2 EdU分析在不同浓度Lapatinib作用下，BT-474和AU-565亲本和耐药细胞的增殖能力

Fig 1-2 Proliferation and DNA replication analysis of parental and resistant BT-474 and AU-565 cells treated with different concentration of Lapatinib (EdU assay)

### 3.3 软琼脂克隆法分析亲本细胞和耐药细胞在Lapatinib处理时克隆形成能力的差异

为了分析 BT-474 细胞在三维培养状态下的克隆形成能力，利用软琼脂克隆形成实验进行评价。随着 Lapatinib 浓度的增加，BT-474<sup>Par</sup> 形成克隆的数目逐渐减少，在 100 nM 的 Lapatinib 作用下几乎不能形成细胞克隆。而 BT-474<sup>LapR</sup> 的克隆形成能力较 BT-474<sup>Par</sup> 显著增强（图 1-3， $p < 0.05$ ），即使在高浓度 Lapatinib 的作用下，依然有约 40% 的细胞可以形成显著的细胞克隆。这一结果说明，BT-474<sup>LapR</sup> 在 Lapatinib 作用下依然具有很好的软琼脂克隆形成能力。

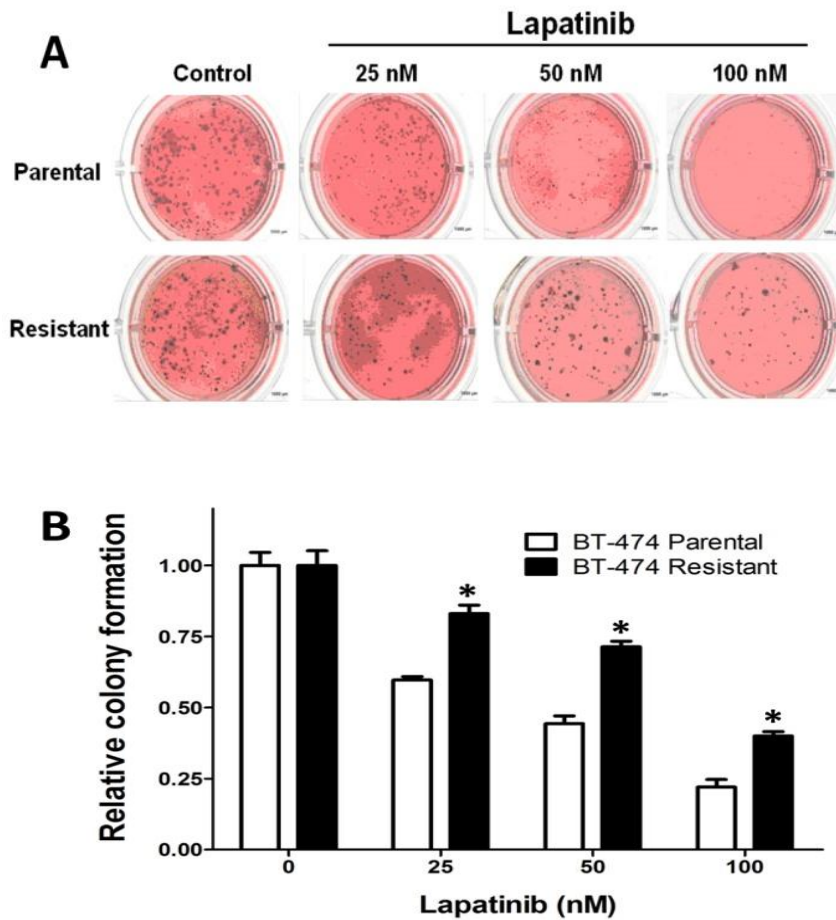


图 1-3 软琼脂克隆形成实验分析 BT-474<sup>Par</sup> 和 BT-474<sup>Lap<sup>R</sup></sup> 细胞的克隆形成能力(n=3)

Fig 1-3 Soft agar colony formation analysis of BT-474<sup>Par</sup> and BT-474<sup>Lap<sup>R</sup></sup> cells treated with different concentration of Lapatinib (n=3)

## 4 讨论

Lapatinib 治疗 HER2 阳性乳腺癌的疗效严重受限于耐药性的产生，阐明其耐药机制显得尤为重要。而获得具有稳定的 Lapatinib 耐药性的细胞株是我们开展耐药机制和功能研究的重要基础。本部分实验中，我们利用 HER2 阳性的乳腺癌细胞系 BT-474 和 AU-565，分别给予 0.5 - 2  $\mu\text{M}$  和 1 - 5  $\mu\text{M}$  的 Lapatinib 长期处理，逐渐增加药物剂量，持续筛选 12 个月以获得耐药株。再利用 MTT、EdU 和软琼脂克隆形成能力分析等多种方法，证实所筛选出的耐药细胞具有稳定的 Lapatinib 耐药性。该部分工作为阐明 Lapatinib 的耐药分子机制研究奠定重要基础。



## 第二部分 细胞自噬促进 HER2 阳性细胞株 获得 Lapatinib 耐药性的功能评价

在第一部分的实验中，我们通过 12 个月的筛选最终获得稳定的 BT-474 和 AU-565 的 Lapatinib 耐药细胞株。相比国内外相同领域的实验室，我们此次建立的 BT-474<sup>LapR</sup> 和 AU-565<sup>LapR</sup> 的 IC50 值比文献报道的细胞系更高，而且具有十分稳定的耐药性。撤除 Lapatinib 一个月后，对耐药细胞再次进行耐药性分析，结果显示 IC50 仅有部分的降低，与未撤药组的耐药性接近。

虽然关于 Lapatinib 耐药性的研究已有部分报道，但是其耐药性机制仍未完全阐明。利用之前已建立的耐药细胞株，在此部分实验中，我们着重研究细胞自噬在 HER2 阳性细胞株获得 Lapatinib 耐药过程中的作用。

我们首先利用透射电镜分别对 BT-474 和 AU-565 的亲本和耐药细胞形态进行观察，确认自噬体是否在耐药细胞中增加。进而利用 GFP-LC3 分别转染亲本和耐药细胞，观察自噬体关键分子 LC3 在细胞中的分布情况。利用自噬抑制剂 CQ、3-MA 等阻断自噬过程，再给予 Lapatinib 作用，分析细胞增殖状况。最后，利用平板克隆形成、流式细胞技术等检测细胞的克隆形成能力和凋亡情况，评价细胞自噬是否能够促进 HER2 阳性乳腺癌细胞获得 Lapatinib 的耐药性。

### 1 材料

#### 1.1 主要试剂与材料

Lapatinib	美国 Selleck Chemicals 公司
DMEM 培养基	Gibco 公司
RPMI-1640 培养基	Gibco 公司
胎牛血清	Gibco 公司
胰蛋白酶	华美生物技术有限公司
DMSO	美国 Sigma-Aldrich 公司
MTT (ThiazolylBlue Tetrazolium Bromide)	美国 Sigma-Aldrich 公司

Giemsa stain	美国 Sigma-Aldrich 公司
3-MA	美国 Sigma-Aldrich 公司
BA	美国 Sigma-Aldrich 公司
CQ	美国 Sigma-Aldrich 公司
Cell-Light™ EdU DNA Cell Proliferation Kit	广州锐博生物科技有限公司
TritonX-100	上海源叶生物科技有限公司
Glycine	美国 Sigma-Aldrich 公司
Propidium Iodide	BD Pharmingen™
Annexin V-FITC	BD Pharmingen™
脂质体 Lipofectamine™2000	Invitrogen 公司
质粒提取试剂盒	天根公司
GFP-LC3	浙江大学惠赠
DAPI	美国 Sigma-Aldrich 公司
细胞培养瓶	美国 CORNING 公司
冻存管	美国 CORNING 公司
细胞培养皿	美国 CORNING 公司

## 1.2 主要仪器设备

CO <sub>2</sub> 恒温细胞培养箱	美国 Thermo Scientific 公司
冷冻高速离心机	美国 Thermo Scientific 公司
高速离心机	美国 Thermo Scientific 公司
微量高速离心机	德国 Eppendorf 公司
多功能酶标仪	瑞士 Tecan 公司
共聚焦荧光显微镜	日本 Olympus 公司
JEM-1230 透射电子显微镜	日本电子株式会社
流式细胞仪	美国 Becton Dickinson 公司
Nanodrop-2000c	美国 Thermo 公司

## 2 方法

### 2.1 细胞培养、传代、冻存和复苏

操作方法与第一部分相同。

### 2.2 透射电镜检测细胞自噬体

- A 撤除 Lapatinib, 将处于对数生长期的 BT-474<sup>LapR</sup> 和 AU-565<sup>LapR</sup> 耐药细胞用不含 Lapatinib 的培养基培养一周。
- B 用 0.25% 胰蛋白酶分别消化 BT-474<sup>Par</sup>/BT-474<sup>LapR</sup> 和 AU-565<sup>Par</sup>/AU-565<sup>LapR</sup>, 移入 EP 管, 以 1500 rpm, 离心 15 分钟, 使细胞形成团块。
- C 吸弃上清液, 将 1 mL 电镜固定液沿管壁轻轻加入离心管内, 送电镜室包埋处理, 干燥切片后进行电镜观察。

### 2.3 GFP-LC3 转染及细胞定位分析

- 1) 撤除 Lapatinib, 将处于对数生长期的 BT-474<sup>LapR</sup> 和 AU-565<sup>LapR</sup> 细胞用不含 Lapatinib 的培养基培养一周。
- 2) 将 BT-474<sup>Par</sup>/BT-474<sup>LapR</sup> 和 AU-565<sup>Par</sup>/AU-565<sup>LapR</sup> 常规消化、离心, 重悬细胞并计数。
- 3) 在 6 孔板内预先放入高压灭菌的载玻片, 按  $1 \times 10^5$  个细胞/孔接种于 6 孔板中, 补充培养基至 2 mL。“十”字形晃动 6 孔板, 使细胞在孔中均匀分布, 放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养至细胞贴壁且密度达到 60%。
- 4) 配制转染液:
  - A A 液: (100 μL 无血清培养基+ 2 μg GFP-LC3 质粒)/孔, 用移液器轻轻吹打均匀, 室温下放置 5 分钟。
  - B B 液: (100 μL 无血清培养基+ 5 μL TurboFect 转染试剂)/孔, 用移液器吹打均匀, 室温下放置 5 分钟。
  - C 将 A 液与 B 液充分混匀, 室温下放置 15 分钟, 使脂质体和质粒充分混合。
- 5) 弃去 6 孔板中原培养基, 以不含血清的培养基漂洗 2 次, 并在每孔中加入 1.3 mL。
- 6) 将 A、B 混合液以 200 μL/孔与培养基混匀, 放置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中, 6 小时后更换成含 10% 血清的培养基。

- 7) 细胞转染 24 小时后, 用 PBS 冲洗细胞 2 次, 4% 多聚甲醛室温避光孵育 15 分钟。
- 8) 用 PBS 漂洗细胞 2 次, 加入 1 mL DAPI 工作液 (PBS 稀释, 1:1000), 室温避光孵育 10 分钟。PBS 漂洗细胞 2 次, 以荧光封片剂封片。
- 9) 共聚焦显微镜下观测, 照相。

#### 2.4 MTT 检测耐药细胞的药物敏感性

- 1) 自噬抑制剂的配制:

A CQ: PBS 稀释, 配制浓度为 40 mM 的储备液, -20℃ 避光保存。

B 3-MA: PBS 稀释, 配制浓度为 40 mM 的储备液, -20℃ 避光保存。

C BA: DMSO 稀释, 配制浓度为 20  $\mu$ M 的储备液, -20℃ 避光保存。

- 2) 将 BT-474<sup>LapR</sup> 和 AU-565<sup>LapR</sup> 细胞常规消化、离心, 重悬细胞并计数, 按 BT-474<sup>LapR</sup> 细胞  $1 \times 10^4$  个/孔, AU-565<sup>LapR</sup> 细胞  $8 \times 10^3$  个/孔的标准分别接种于 96 孔板, 培养基补至 100  $\mu$ L/孔, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

- 3) 24 小时后观察细胞生长情况, 待贴壁后弃去原培养基, 将细胞设为 4 组: Control 组、Lapatinib 组 (Lapatinib 2  $\mu$ M), 自噬抑制剂单药组 (CQ 20  $\mu$ M / 3-MA 500  $\mu$ M / BA 20 nM) 和 Lapatinib+自噬抑制剂联用组 (Lapatinib 2  $\mu$ M, CQ 20  $\mu$ M / 3-MA 500  $\mu$ M / BA 20 nM)。根据分组加入相应药物, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中常规培养。

- 4) 加药 96 小时后, 每孔加入浓度为 5 mg/mL MTT 溶液 20  $\mu$ L, 37℃ 孵育 4 小时。

- 5) 吸弃孔内培养基, 加入 150  $\mu$ L/孔的 DMSO, 震荡 10 分钟, 使紫色结晶物充分溶解。利用酶标仪在 490 nm 波长测定吸光度值并计算均值。以药物分组为横坐标, 细胞相对增殖率为纵坐标, 用 GraphPad Prism 5.0 软件绘制细胞增殖曲线。

#### 2.5 EdU 分析检测耐药细胞的药物敏感性

- 1) 常规培养 BT-474<sup>LapR</sup> 和 AU-565<sup>LapR</sup> 细胞, 消化、离心, 重悬细胞并计数, 按 BT-474<sup>LapR</sup> 细胞  $1 \times 10^5$  个/孔, AU-565<sup>LapR</sup> 细胞  $8 \times 10^4$  个/孔的标准分别接种于 6 孔板, 添加培养基至 4 mL/孔, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中常规培养 24 小时。

- 2) 待细胞贴壁后弃去原培养基, 将细胞设为 4 组: Control 组、Lapatinib 组 (Lapatinib 2  $\mu$ M), 自噬抑制剂单药组 (CQ 20  $\mu$ M) 和 Lapatinib+自噬抑制剂联用组 (Lapatinib 2  $\mu$ M, CQ 20  $\mu$ M)。根据分组加入相应药物及培养基, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中常规培养。

- 3) 药物作用 96 小时后, 每孔加入 200  $\mu\text{L}$  终浓度为 50  $\mu\text{M}$  的 EdU 进行细胞增殖能力检测。EdU 分析的具体操作步骤参见第一部分。

## 2.6 细胞平板克隆形成能力分析

- 1) 将处于对数生长期的 BT-474<sup>Par</sup>、BT-474<sup>LapR</sup>、AU-565<sup>Par</sup> 和 AU-565<sup>LapR</sup> 分别用 0.25 % 胰蛋白酶消化后离心, 收集细胞沉淀, 重悬细胞并计数, 按  $1 \times 10^3$  个细胞/孔接种于 6 孔板, 添加培养基至 2 mL。
- 2) 细胞接种 24 小时后, 将 BT-474<sup>Par</sup> 分为 Control 组和 Lapatinib 组 (Lapatinib 400 nM); 将 BT-474<sup>LapR</sup> 分为 Control 组、Lapatinib 组 (Lapatinib 400 nM), 自噬抑制剂组 (CQ 5  $\mu\text{M}$ ) 和 Lapatinib+自噬抑制剂联用组 (Lapatinib 400 nM, CQ 5  $\mu\text{M}$ )。AU-565<sup>Par</sup> 和 AU-565<sup>LapR</sup> 细胞分组方法与 BT-474 细胞相同, 给药量为: Lapatinib 2  $\mu\text{M}$ , CQ 5  $\mu\text{M}$ 。每 3 天换液一次, 并重新加入相应的药物, 常规培养 10-14 天。
- 3) 肉眼观察出现细胞克隆时终止培养, 甲醛固定 15 分钟, PBS 冲洗 2 次。
- 4) 加入 2 mL 吉姆萨染色液/孔, 常温染色 20 分钟后用 PBS 洗涤 2 次, 自然干燥后计数细胞克隆数并拍照。

## 2.7 流式细胞术检测细胞凋亡

- 1) 常规培养 BT-474<sup>Par</sup>/BT-474<sup>LapR</sup> 和 AU-565<sup>Par</sup>/AU-565<sup>LapR</sup>。BT-474<sup>Par</sup> 分为 Control 组和 Lapatinib 组 (Lapatinib 2  $\mu\text{M}$ ); BT-474<sup>LapR</sup> 分为 Control 组、Lapatinib 组 (Lapatinib 2  $\mu\text{M}$ ), 自噬抑制剂单药组 (CQ 10  $\mu\text{M}$  / 3-MA 500  $\mu\text{M}$ ) 和 Lapatinib + 自噬抑制剂联用组 (Lapatinib 2  $\mu\text{M}$ , CQ 10  $\mu\text{M}$  / 3-MA 500  $\mu\text{M}$ )。根据分组加入相应的药物, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  培养箱常规培养 72 小时。  
AU-565<sup>Par</sup> 分为 Control 组和 Lapatinib 组 (Lapatinib 2  $\mu\text{M}$ ); AU-565<sup>LapR</sup> 分为 Control 组、Lapatinib 组 (Lapatinib 2  $\mu\text{M}$ ), 自噬抑制剂单药组 (CQ 20  $\mu\text{M}$  / 3-MA 500  $\mu\text{M}$ ) 和 Lapatinib + 自噬抑制剂联用组 (Lapatinib 2  $\mu\text{M}$ , CQ 20  $\mu\text{M}$  / 3-MA 500  $\mu\text{M}$ ), 操作方法同上。
- 2) 用 0.25% 胰蛋白酶将细胞消化后收集细胞沉淀, 以 800 rpm 离心 5 分钟, 预冷 PBS 液洗涤 2 次, 保证细胞数大于  $1 \times 10^6$  个/mL。
- 3) 用孵育缓冲液洗涤 1 次, 1000 rpm 离心 5 分钟。
- 4) 用 100  $\mu\text{L}$  标记溶液重悬细胞, 室温下避光孵育 15 分钟。

- 5) 离心 5 分钟 (1000 rpm), 收取细胞沉淀, 并用孵育缓冲液清洗 1 次。
- 6) 流式细胞仪分析, 选用激发波长 488 nm, 分别检测 FITC 荧光 (515 nm) 和 PI (560 nm)

### 3 结果

#### 3.1 透射电镜观察到自噬体形成

细胞自噬体的形成是细胞自噬过程活化的特征性标志。为了明确细胞自噬是否在 Lapatinib 耐药细胞中处于活化状态, 我们利用透射电镜分别分析了 BT-474 和 AU-565 的亲本和耐药细胞。结果如图 2-1 所示, 相对于 BT-474<sup>Par</sup> 和 AU-565<sup>Par</sup> 细胞, 在 BT-474<sup>LapR</sup> 和 AU-565<sup>LapR</sup> 细胞中有明显的细胞自噬体形成, 呈典型的双层膜结构。这说明细胞自噬在 Lapatinib 耐药细胞中处于活化状态。

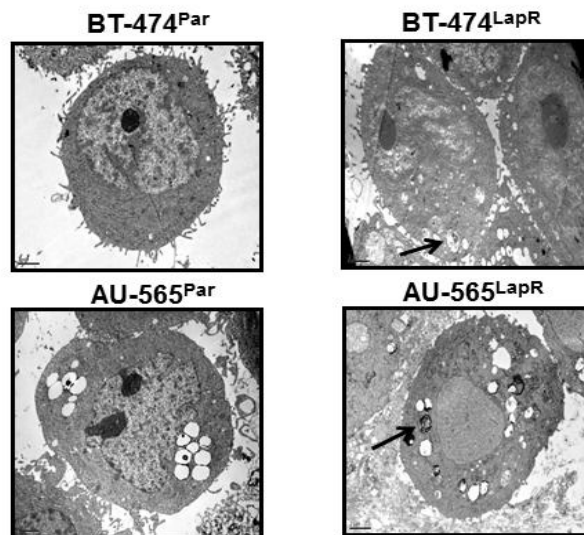


图 2-1 透射电镜检测自噬体形成

Figure 2-1 Autophagosome detection with Transmission Electron Microscopy (TEM)

(箭头所指为形成的细胞自噬体)

#### 3.2 激光共聚焦显微镜观察 GFP-LC3 转染的细胞自噬体聚集状态

LC3 由 I 型转化为 II 型并聚集在自噬体膜上是自噬体形成的典型标记。将 GFP-LC3 融合基因转染细胞后, 利用激光共聚焦显微镜观察 GFP-LC3 在细胞内的分布聚集形式可以反映细胞的自噬体形成状态。如图 2-2 所示, GFP-LC3 在 BT-474<sup>Par</sup> 和 AU-565<sup>Par</sup> 细胞中以弥散性分布为主, 而在 BT-474<sup>LapR</sup> 和 AU-565<sup>LapR</sup> 细胞中则呈现

出聚集状态。这一结果说明细胞自噬体在 Lapatinib 耐药细胞中明显增加。

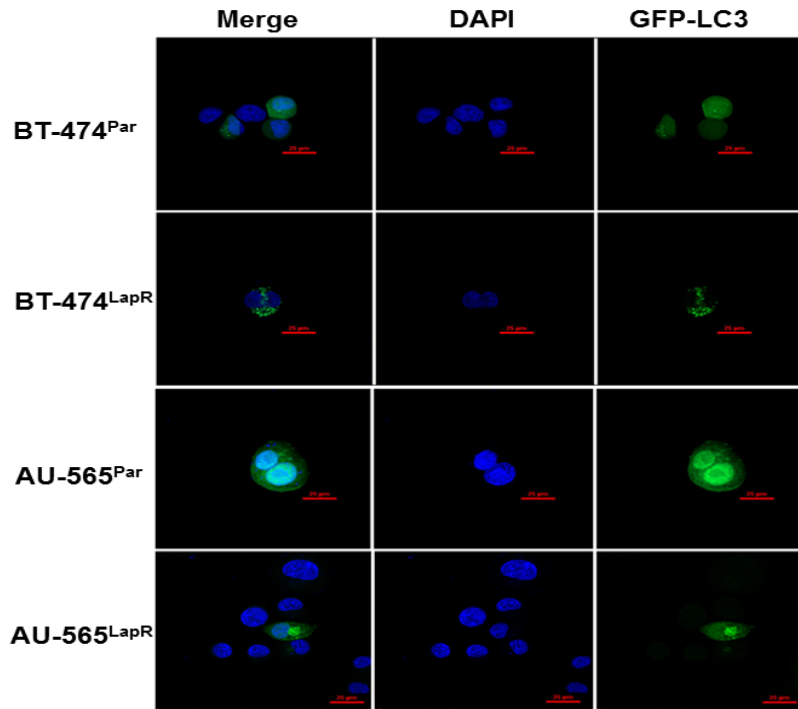


图2-2 激光共聚焦显微镜观察GFP-LC3转染的细胞自噬体聚集状态

Fig 2-2 Detection of autophagosome distribution with GFP-LC3 transfection under confocal microscope

### 3.3 MTT 分析耐药细胞的药物敏感性

明确细胞自噬在耐药细胞中表达明显增加后，我们进一步分析自噬是否参与了 HER2 阳性细胞获得 Lapatinib 耐药性的过程。分别利用细胞自噬抑制剂 CQ、3-MA 或 BA 单独或联合 Lapatinib 处理 BT-474<sup>LapR</sup> 和 AU-565<sup>LapR</sup> 细胞，以 MTT 分析细胞增殖状态。结果显示，三种细胞自噬抑制剂 CQ、3-MA 和 BA 均能不同程度的增加 Lapatinib 的抑制增殖能力（图 2-3），说明抑制细胞自噬过程有助于提高耐药细胞对 Lapatinib 的治疗敏感性。

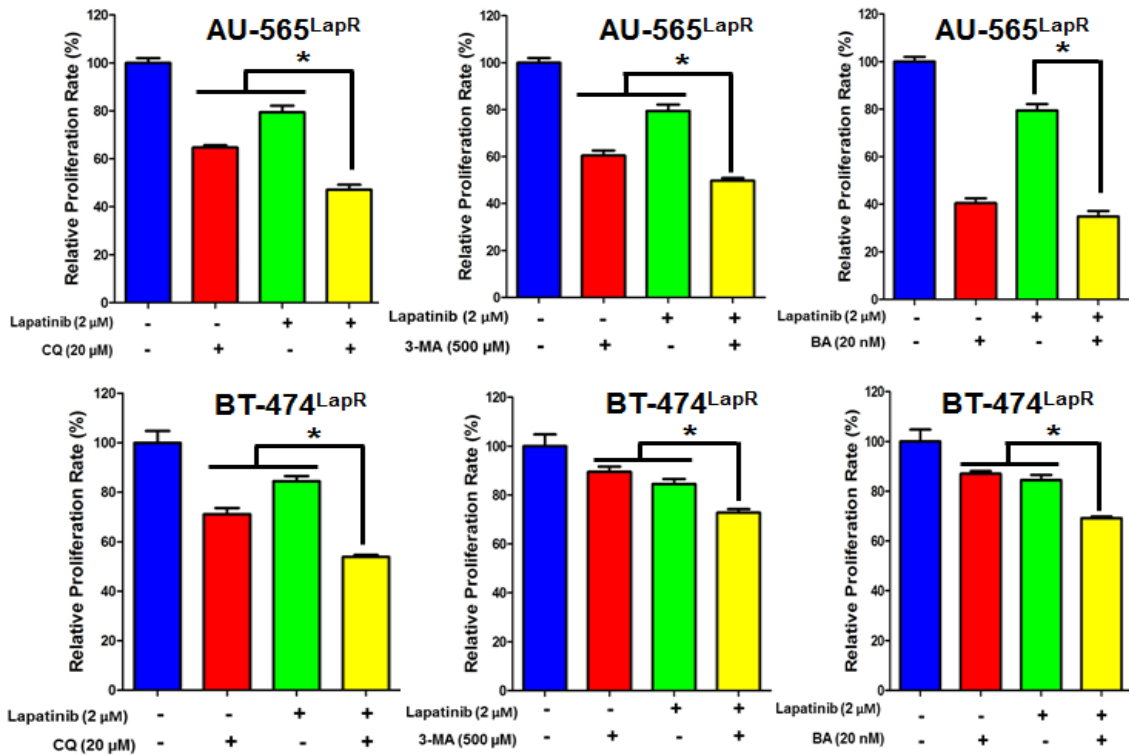


图2-3 激光共聚焦显微镜观察GFP-LC3转染的细胞自噬体聚集状态

Fig 2-3 Detection of autophagosome distribution with GFP-LC3 transfection under confocal microscope

### 3.4 EdU 分析耐药细胞的药物敏感性

为进一步证明细胞自噬促进 HER2 阳性乳腺癌细胞获得 Lapatinib 的耐药性，我们分别利用自噬抑制剂 CQ 单独或联合 Lapatinib 作用于 BT-474<sup>LapR</sup> 和 AU-565<sup>LapR</sup> 细胞，EdU 方法检测细胞的增殖状态。结果如图 2-4 所示，CQ 可以显著增强 Lapatinib 的疗效，具有联合效应。结合 MTT 和 EdU 的分析结果，阻断细胞自噬过程可以恢复耐药细胞对 Lapatinib 的治疗敏感性。



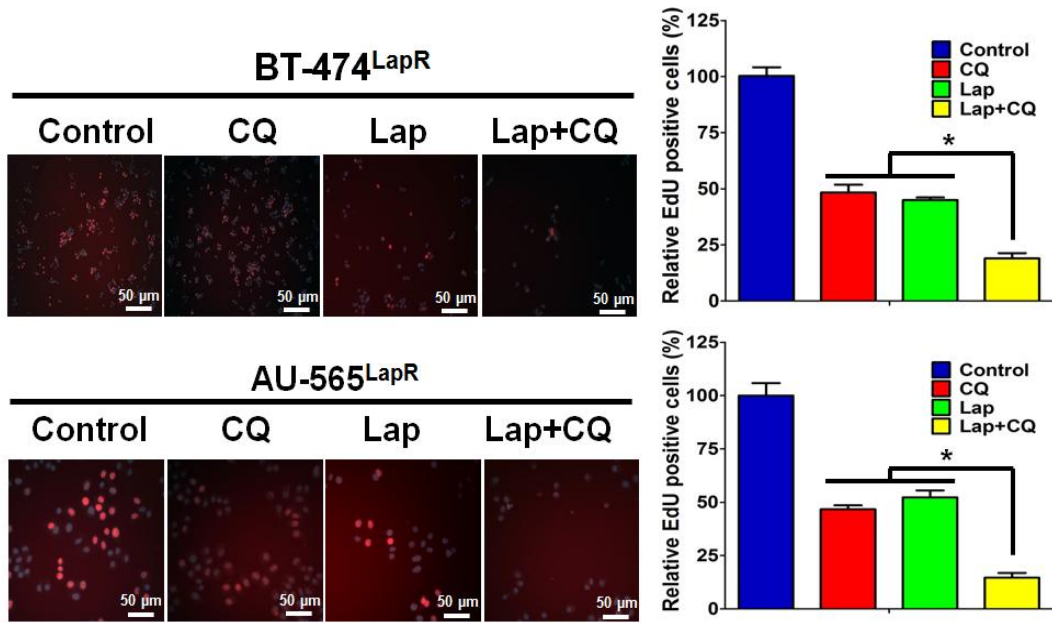


图2-4 EdU分析耐药细胞的药物敏感性

Fig 2-4 Detection of autophagosome distribution with GFP-LC3 transfection under confocal microscope

### 3.5 平板克隆检测耐药细胞克隆生长情况明显改变

为进一步明确自噬在耐药细胞获得 Lapatinib 耐药性过程中的作用，我们利用平板细胞克隆形成实验，检测细胞自噬抑制剂 CQ 单独或联合 Lapatinib 作用于耐药细胞的效果，分析 CQ 能否增强 Lapatinib 抑制耐药细胞克隆形成的能力。结果如图 2-5 所示，Lapatinib 显著抑制 BT-474<sup>Par</sup> 和 AU-565<sup>Par</sup> 的克隆形成能力，但 BT-474<sup>LapR</sup> 和 AU-565<sup>LapR</sup> 在 Lapatinib 作用下依然可以形成克隆。CQ 的加入可协助 Lapatinib 抑制 BT-474<sup>LapR</sup> 和 AU-565<sup>LapR</sup> 的克隆形成。该结果说明，阻断细胞自噬过程有助于提高 Lapatinib 抑制耐药细胞克隆形成的能力。

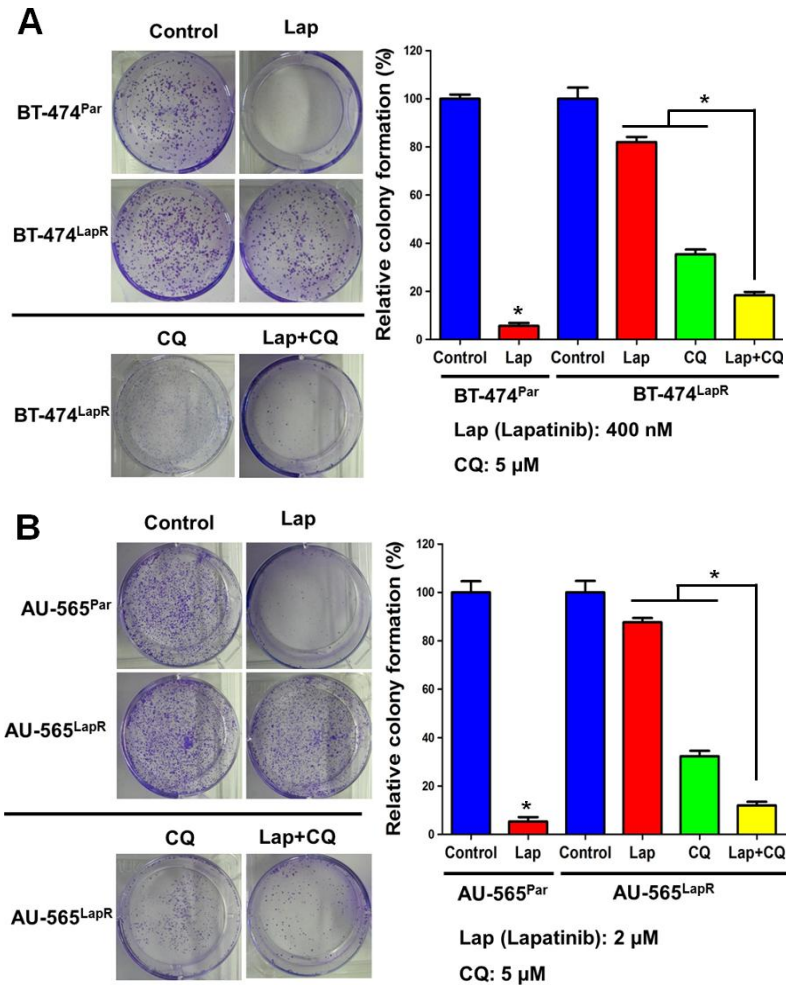


图2-5 阻断细胞自噬过程抑制耐药细胞的平板克隆形成能力

Fig 2-5 Autophagy inhibitor synergized with Lapatinib to block the plate colony formation of resistant cells (A: BT-474 cells; B: AU-565 cells)

### 3.6 流式细胞检测可见耐药细胞凋亡状态改变

在明确细胞自噬抑制剂可以促进 Lapatinib 抑制耐药细胞增殖能力的基础上，我们利用流式细胞术分析自噬抑制剂是否可以提高 Lapatinib 诱导耐药细胞凋亡的作用。结果如图 2-6 所示，Lapatinib 可以明显诱导 BT-474<sup>Par</sup> 和 AU-565<sup>Par</sup> 的凋亡，凋亡率达到 25% 左右。而 BT-474<sup>LapR</sup> 和 AU-565<sup>LapR</sup> 对 Lapatinib 具有显著的耐药性，单药应用时仅有约 5% 的凋亡率，在联用 CQ 或 3-MA 时可产生良好的联合杀伤效果。特别是，CQ 联用 Lapatinib 的杀伤效果最为强烈，凋亡率约为 25%，明显高于 Lapatinib 单药应用组。

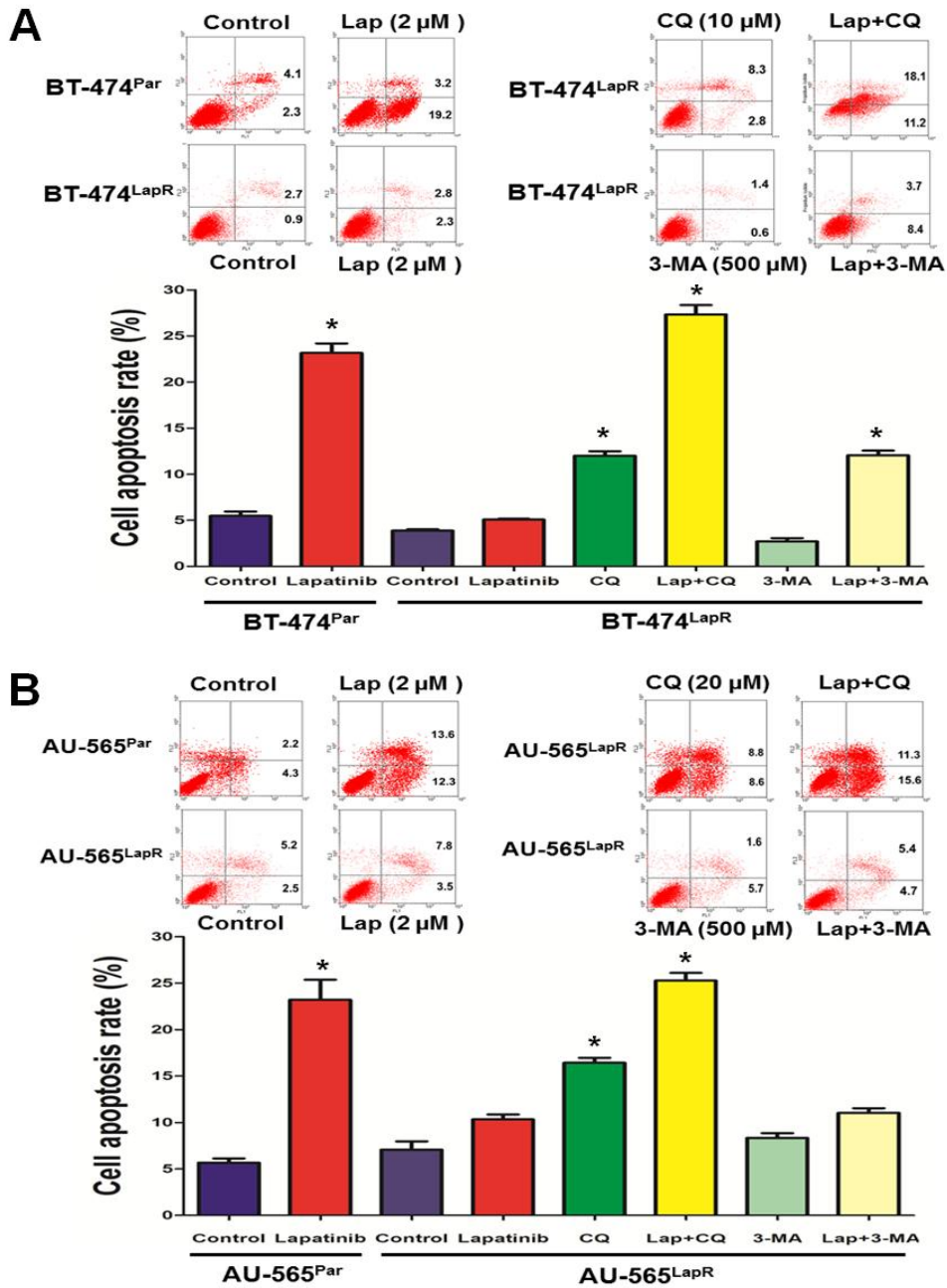


图2-6 阻断细胞自噬过程促进Lapatinib诱导耐药细胞的凋亡

Fig 2-6 Autophagy inhibitor synergized with Lapatinib to promote the apoptosis of Lapatinib resistant cells (A: BT-474 cells; B: AU-565 cells)

#### 4 讨论

在本部分实验中，我们首先利用透射电镜观察到 Lapatinib 耐药细胞中的自噬小体增加。结合 GFP-LC3 融合基因在耐药细胞内的聚集分布状态，可以说明细胞自噬

在 Lapatinib 耐药细胞中处于活化状态。

为明确细胞自噬能否导致耐药细胞获得耐药性，我们分别利用三种抑制剂阻断自噬过程，并通过 MTT、EdU 方法分析自噬抑制剂对耐药细胞增殖能力的影响，以平板克隆形成能力检测耐药细胞克隆生长情况，利用流式细胞术检测自噬抑制剂对耐药细胞凋亡状态的影响。通过以上多个实验从不同角度均证实阻断细胞自噬过程有利于恢复耐药细胞对 Lapatinib 的治疗敏感性。目前，国际上基于相同观点的临床试验正在进行中。我们的实验结果为这一新的治疗策略提供了有力的理论支撑。

## 第三部分 细胞自噬在 Lapatinib 耐药细胞中活化的分子机制研究

在前两部分实验中，我们首先建立了 HER2 阳性乳腺癌细胞的 Lapatinib 耐药细胞株，明确细胞自噬在 Lapatinib 耐药细胞中增加，并且发挥了保护性作用，成为促进细胞获得 Lapatinib 耐药性的重要因素。本部分实验中我们重点解析细胞自噬在耐药细胞中活化的原因和分子机制。

首先，我们利用 Western Blotting 技术对自噬的关键调控分子 AMPK 的活化状态进行了检测。进而利用 AMPK 的抑制剂拮抗 AMPK 下游信号通路，分析细胞自噬标记分子的表达水平，并联合 AMPK 抑制剂和 Lapatinib 共同作用于耐药细胞，分析 AMPK-mTOR-autophagy 信号通路在 Lapatinib 耐药细胞获得耐药性过程中的生物学功能。本部分的实验结果初步明确了细胞自噬在 Lapatinib 耐药细胞中活化的分子机制，为后续功能研究的深入奠定基础。

### 1 材料

#### 1.1 主要试剂与材料

DMEM 细胞培养基	美国 Hyclone 公司
胎牛血清	美国 Gibco 公司
胰蛋白酶	美国 Gibco 公司
蛋白裂解液	美国 Gibco 公司
Cocktail 蛋白酶抑制剂	美国 Roche 公司
MTT	美国 Sigma-Aldrich 公司
Lapatinib	美国 Selleck Chemicals 公司
BSA	中国碧云天公司
Compound C (Dorsomorphin)	美国 Sigma-Aldrich 公司

Tris 和甘氨酸	宝泰克生物工程公司
Tween-20	BIB 公司
辣根过氧化物酶标记的羊抗兔或鼠 IgG 抗体	中国博士德公司
GAPDH 抗体	中国博士德公司
兔抗人 p-AMPK、AMPK、p-mTOR、mTOR、LC3B 抗体	美国 Cell signaling 公司
$\beta$ -actin 抗体	中国博士德公司
增强型化学发光系统 (ECL)	美国 Pierce 公司
5 $\times$ Loading Buffer	碧云天生物技术研究
过硫酸铵 (AP)	碧云天生物技术研究
BCA 蛋白定量试剂盒	美国 Thermo Scientific 公司
蛋白印迹 Marker #SM1851	加拿大 Fermentas 公司
蛋白印迹 Marker #SM0671	加拿大 Fermentas 公司
NC 膜	美国 Millipore 公司

## 1.2 常用缓冲液

**PBS** 缓冲液：配方同前。

**TBST** 缓冲液：Tris 24.2 g, NaCl 80 g, 加入 600 mL 蒸馏水，搅匀使其溶解，加蒸馏水使其定容至 1 L，加入盐酸调整 pH 值至 7.6，即为 10 $\times$ TBS 储存缓冲液。使用时取 100 mL TBS 储存缓冲液，加 900 mL 蒸馏水、1 mL 吐温-20，混匀后即为 TBST 工作缓冲液。

## 1.3 常用仪器

细胞培养瓶及细胞培养板	美国 Corning 公司
CO <sub>2</sub> 恒温细胞培养箱	美国 Heraeus 公司
低温高速离心机	德国 Eppendorf 公司

光学倒置显微镜	日本 Olympus 公司
Nano-drop2000c	美国 Thermo 公司
全自动化学发光图像分析仪	上海天能公司
蛋白电泳和电转移槽	美国 Bio-Rad 公司
多功能酶标仪	瑞士 Tecan 公司

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

人 HER2 阳性乳腺癌细胞系 BT-474<sup>Par</sup> 和 BT-474<sup>LapR</sup> 以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中常规培养。BT-474<sup>LapR</sup> 的 Lapatinib 维持浓度为 2 μM。利用光学显微镜观察细胞状况, 根据生长情况, 3 天左右更换一次培养基。AMPK 抑制剂 Compound C 的浓度分别为 0, 1, 5 和 10 μM。

### 2.2 细胞样品收集、蛋白定量和 Western Blotting 分析

- 1) 分别收集 BT-474<sup>Par</sup> 和 BT-474<sup>LapR</sup>、以及药物处理后的细胞。将收集的细胞样品置于冰上, 并用冰浴的 PBS 漂洗 2 次。刮取细胞样品, 并收集于 1.5 mL 离心管中。3000 rpm 离心 5 分钟 (4℃), 弃上清, 保留细胞沉淀。加入含有蛋白酶抑制剂 (Cocktail) 的 RIPA 蛋白裂解液重悬细胞沉淀, 并置于冰上裂解 20 分钟, 不时利用移液器吹打细胞, 彻底裂解细胞样品。然后, 12, 000 rpm 离心 20 分钟 (4℃), 将离心上清 (细胞裂解液) 转移至新的离心管中, 进行细胞样品的蛋白含量测定。
- 2) 蛋白定量 (BCA 法) 及样品变性
  - A 按照 BCA 法蛋白定量试剂盒操作说明, 以 200 μL/孔计算所需 A 液和 B 液的用量 (96 孔板), 按 50:1 的比例配置 A 液: B 液。
  - B 将 BSA 蛋白标准品 (2 mg/mL) 等比稀释, 分别在对照和待测孔内加入 10 μL 蛋白标准品或 2 μL 蛋白样品, 并以 2、1、0.5、0.25、0.125、0 (mg/mL) 的蛋白标准品吸光度绘制标准曲线。
  - C 将加样后的 96 孔板置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱孵育 30 分钟。
  - D 利用酶联免疫检测仪, 分别测定不同浓度的蛋白标准品和待测样品在 A560 的吸光度值。根据不同浓度标准品的吸光值, 绘制标准曲线, 并计算各待测样品的浓度。

- E** 根据所计算的蛋白浓度，取适量细胞样品并加入四分之一体积的  $5\times$  Loading buffer，置于  $100^{\circ}\text{C}$  加热 10 分钟使蛋白变性， $12,000\text{ rpm}$  离心 10 分钟，取上清液进行蛋白电泳分析。
- 3) 蛋白电泳和 Western Blotting 分析**
- A** 依据待检测目的蛋白的分子量，选择并配制 9% - 15% 浓度的分离胶。
- B** 蛋白质电泳：蛋白样品在浓缩胶泳动时，电压维持在  $120\text{ V}$ ；样品进入分离胶后，将电压调高至  $160\text{ V}$ ，直至溴酚蓝（指示剂）泳动至分离胶底部时终止电泳。
- C** 转膜：轻轻取下蛋白电泳胶，使 NC 膜与胶充分贴合，不留气泡；然后按照滤纸、胶、NC 膜、滤纸的顺序放入转移夹槽，以恒压  $100\text{ V}$  转膜 120 - 150 分钟。
- D** 染色：转移结束后，取出 NC 膜置于 5% 丽春红溶液中染色，并观察转膜效果；利用  $1\times$  TBST 缓冲液洗涤 NC 膜 2 次，清洗丽春红。
- E** 封闭：5% 脱脂牛奶室温封闭 1 小时。
- F** 一抗孵育：p-AMPK、AMPK、p-mTOR、mTOR、LC3B、 $\beta$ -actin 抗体均按 1:1000 稀释，抗体置于  $4^{\circ}\text{C}$  过夜。
- G** 用  $1\times$  TBST 洗膜 3 次，每次 5 分钟，二抗（兔抗和鼠抗 HRP 标记二抗，1:3000）室温孵育 1 小时。
- H** 显影：用  $1\times$  TBST 缓冲液洗膜 3 次，每次 5 分钟，利用全自动 ECL 图像分析仪或在暗室 X 光片显影。

### 2.3 MTT 检测 AMPK 抑制剂对 BT-474<sup>LapR</sup> 耐药细胞药物敏感性的影响

为明确 AMPK 信号通路所诱发的细胞自噬功能，利用 AMPK 抑制剂 Compound C 与 Lapatinib 联合应用，检测 Compound C 是否能增强耐药细胞的药物敏感性。Lapatinib 浓度为  $2\ \mu\text{M}$ ，Compound C 浓度为  $5\ \mu\text{M}$ ，药物作用于细胞 96 小时后进行 MTT 分析。细胞接种以及 MTT 分析的具体操作步骤见第一部分 2.3。

## 3 结果

### 3.1 AMPK 在 BT-474<sup>LapR</sup> 耐药细胞中处于活化状态

我们分别收集 BT-474<sup>Par</sup> 和 BT-474<sup>LapR</sup> 细胞样品，进行 Western Blotting 检测。AMPK-mTOR 信号通路是调控细胞自噬最关键的上游调控机制之一，第 172 位苏氨酸磷酸化状态反映了 AMPK 的活化水平。如图 3-1 显示，p-Thr172 AMPK 在 BT-474<sup>LapR</sup> 中的表达明显增加。同时，细胞自噬的标记分子 LC3 在 BT-474<sup>LapR</sup> 中由 I 型转为 II 型的比例明显增加，说明细胞自噬在耐药细胞中处于活化状态。



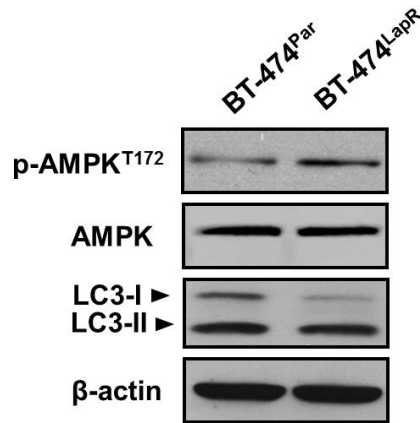


图 3-1 AMPK在BT-474<sup>LapR</sup>耐药细胞中处于活化状态

Fig 3-1 AMPK signaling activates in BT-474<sup>LapR</sup> cells

### 3.2 抑制 AMPK 信号通路可以阻断细胞自噬过程

在明确 AMPK 信号通路在 BT-474<sup>LapR</sup> 细胞中活化的基础上，我们进一步分析 AMPK 信号通路的活化是否成为调控细胞自噬的关键因素。利用浓度分别为 0，1，5 和 10  $\mu\text{M}$  的 AMPK 抑制剂 Compound C 阻断 AMPK 信号通路，然后收集细胞样品进行 AMPK/mTOR 信号通路相关分子的表达检测。如图 3-2 所示，磷酸化 AMPK 的表达水平随着 Compound C 的剂量增加逐渐降低，但磷酸化 mTOR 的表达水平却逐渐增加。同时 LC3 由 I 型转为 II 型的效率受到明显抑制。

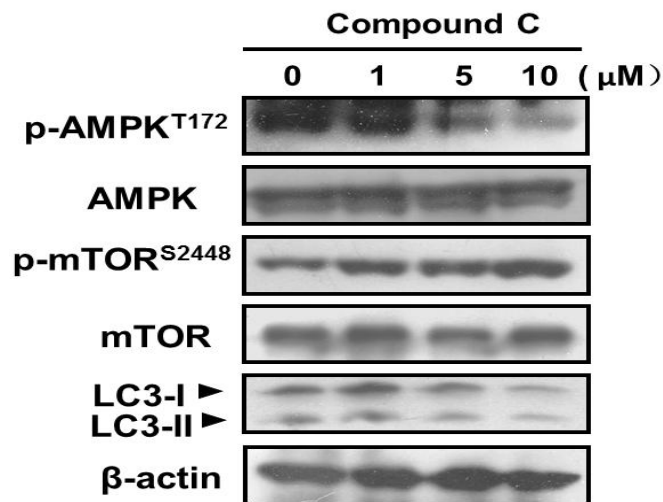


图 3-2 抑制 BT-474<sup>LapR</sup> 细胞的 AMPK 信号通路阻断细胞自噬过程

Fig 3-2 AMPK signaling inhibition abrogates autophagy of BT-474<sup>LapR</sup> cells

### 3.3 抑制 AMPK 信号通路增加 BT-474<sup>LapR</sup> 细胞对 Lapatinib 的治疗敏感性

鉴于 AMPK 抑制剂可以有效拮抗 BT-474<sup>LapR</sup> 细胞的自噬过程，我们进一步利用 MTT 方法分析 AMPK 抑制剂能否增加 Lapatinib 的治疗敏感性。分别利用 1  $\mu\text{M}$  Lapatinib 单药或联合 5  $\mu\text{M}$  Compound C 作用于 BT-474<sup>LapR</sup> 细胞，96 小时后分析细胞增殖状态。结果如图 3-3 所示，Compound C 可以显著增强 BT-474<sup>LapR</sup> 对 Lapatinib 的治疗敏感性，说明阻断 AMPK 信号通路和细胞自噬过程有助于恢复耐药细胞对 Lapatinib 的临床疗效。

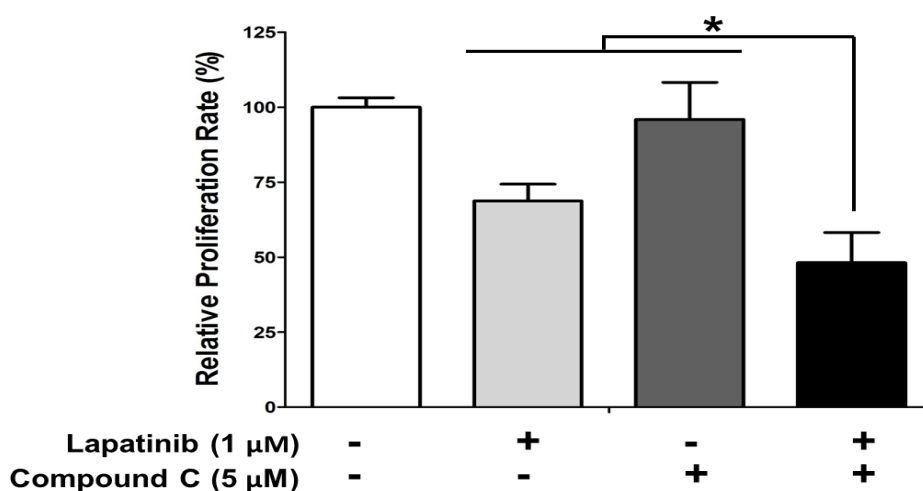


图 3-3 抑制 AMPK 信号通路增加 BT-474<sup>LapR</sup> 细胞对 Lapatinib 的治疗敏感性

Fig 3-3 Inhibition of AMPK signaling promotes sensitivity of BT-474<sup>LapR</sup> cells to Lapatinib treatment.

## 4 讨论

已有越来越多的证据表明，细胞自噬在肿瘤细胞获得放化疗耐药过程中发挥着重要作用。我们在前两部分实验中证实细胞自噬水平在 Lapatinib 耐药细胞中明显增加，但细胞自噬活化的机制尚未阐明。在本部分实验中，我们对细胞自噬的关键调控分子-AMPK/mTOR 信号通路进行了表达水平分析。结果显示，磷酸化 AMPK 在耐药细胞中显著增加，使用 AMPK 活化的抑制剂可以明显阻断细胞自噬过程。这证明，AMPK 的活化可以促进细胞自噬过程，而抑制 AMPK 信号通路将解除细胞自噬的保护性作用，从而恢复耐药细胞对 Lapatinib 的处理敏感性。

在本部分实验中，我们仅选用了 BT-474 细胞。而 AU-565 细胞的 AMPK 本底表达水平较低，很难检测到。这也反映出了细胞遗传背景等多方面因素均会影响实验结果。或许 AMPK 信号通路的活化并非 AU-565<sup>LapR</sup> 细胞中细胞自噬激活的主要原因，但这需要我们在后续的工作中继续对细胞自噬活化的其它原因进行分析。

## 第四部分 Lapatinib 耐药细胞的 ROS 水平分析及 BR 干预研究

活性氧 (ROS) 与细胞自噬的发生密切相关。我们在前三部分实验中首先建立了 HER2 阳性乳腺癌细胞株, 明确了自噬在耐药细胞中呈高表达状态。利用自噬抑制剂阻断细胞自噬过程后, 耐药细胞对 Lapatinib 的敏感性明显增加。由于 ROS 与细胞自噬高度相关, 因此在本部分研究中我们拟阐明 ROS 在 Lapatinib 耐药细胞中的变化规律。实验主要利用 DCFH-DA 标记方法, 以明确 Lapatinib 耐药细胞与亲本细胞间的 ROS 水平差异。

据文献报道, BR 可以上调 ROS 促进肿瘤细胞的凋亡。我们在此利用 BR 作用于耐药细胞, 分析它是否可以协同 Lapatinib 提高耐药细胞的敏感性。本部分实验主要依靠 MTT、流式细胞术分析细胞增殖和凋亡等指标。

### 1 材料

#### 1.1 主要试剂与材料

DMEM 细胞培养基、胎牛血清 胰蛋白酶	美国 Gibco 公司
MTT	美国 Sigma-Aldrich 公司
活性氧检测试剂盒	中国碧云天公司
DCFH-DA	美国 Sigma-Aldrich 公司
Lapatinib	美国 Selleck Chemicals 公司
N-乙酰半胱氨酸 (NAC)	美国 Sigma-Aldrich 公司
BR	美国 Sigma-Aldrich 公司

#### 1.2 常用缓冲液

PBS 缓冲液: 配制方法同前。

### 1.3 常用仪器

细胞培养瓶、培养板	美国 Corning 公司
CO <sub>2</sub> 恒温细胞培养箱	美国 Heraeus 公司
低温高速离心机	德国 Eppendorf 公司
光学倒置显微镜	日本 Olympus 公司
酶标仪	美国 Bio-Rad 公司
低温超速离心机	美国 Beckman 公司
流式细胞仪	美国 Beckman 公司
激光共聚焦显微镜	日本 Nikon 公司

## 2 方法

### 2.1 细胞 ROS 水平检测 (DCFH-DA 标记法)

- 1) BR 溶液的配制: DMSO 稀释, 配制浓度为 1 mM 的储备液, -20℃ 保存。
- 2) ROS 检测试剂盒 (Reactive Oxygen Species Assay Kit) 主要利用荧光探针 DCFH-DA 进行 ROS 水平的检测。DCFH-DA 探针自身并不产生荧光, 但可以自由穿透细胞膜进入细胞。进入细胞的 DCFH-DA 可被相应的酯酶水解, 生成 DCFH, 并且所生成的 DCFH 不能自由穿出细胞膜, 从而使得 DCFH 探针富集在细胞内。细胞内的 ROS 可进一步氧化 DCFH 探针, 生成具有荧光的 DCF。因此, DCF 的荧光强度就可以反应细胞的 ROS 水平。本部分实验主要是利用 ROS 检测试剂盒分析 Lapatinib 耐药细胞与亲本细胞之间 ROS 水平的差异, 并明确 BR 是否可以上调细胞的 ROS 水平。同时, NAC 可以作为谷胱甘肽转移酶的底物, 增加细胞抗氧化能力, 清除 ROS。利用 NAC 可阻断 BR 诱导的 ROS 水平上调。
  - A 选取生长状态良好的 BT-474<sup>Par</sup> 和 BT-474<sup>LapR</sup>, 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 常规离心收集细胞沉淀。
  - B 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基重悬细胞, 制成单细胞悬液。
  - C 细胞计数板计数, 调整细胞浓度, 按  $8 \times 10^4$  个/孔接种于 24 孔板中, 每个样品设 3 个复孔, 每孔溶液体积为 200  $\mu$ L, 置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中过夜。

- D** 实验分组为: BT-474<sup>Par</sup>, BT-474<sup>LapR</sup>; BT-474<sup>LapR</sup> (control), BT-474<sup>LapR</sup> + BR (10  $\mu$ M), BT-474<sup>LapR</sup> + BR (10  $\mu$ M) + NAC (100  $\mu$ M), NAC 提前 1 hr 加入。
- E** 细胞培养 72 小时后, 利用无血清 DMEM 培养基, 配制终浓度为 10  $\mu$ M 的 DCFH-DA 探针工作液 (1:1000)。去除培养基, 每孔加入 400  $\mu$ L 稀释好的 DCFH-DA, 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 保温箱培养 20 分钟。
- F** 以无血清 DMEM 培养基清洗细胞 3 次, 充分去除未进入细胞的残留 DCFH-DA 探针。
- G** 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞, 用流式细胞仪选取 488 nm 激发波长, 525 nm 发射波长检测 DCF 的荧光强度。
- H** 重复实验 3 次, 并进行统计分析, 以 \* $p < 0.05$  具有统计学意义。

## 2.2 细胞增殖状态检测

MTT 法分析 BR 和/或 Lapatinib 作用下细胞的增殖情况, 以评价 BR 是否能协同 Lapatinib 抑制 BT-474<sup>LapR</sup> 的增殖。所使用的 BR 的浓度为 10  $\mu$ M, Lapatinib 的浓度设为 2  $\mu$ M。实验分组为: BT-474<sup>LapR</sup> (control), BT-474<sup>LapR</sup> + Lapatinib (2  $\mu$ M), BT-474<sup>LapR</sup> + BR (10  $\mu$ M), BT-474<sup>LapR</sup> + Lapatinib (2  $\mu$ M) + BR (10  $\mu$ M)。加药 72 小时后检测细胞的增殖状态, 具体操作方法同前。

EdU 法分析 BR 和/或 NAC 作用下细胞的 DNA 复制能力, 以评价 BR 抑制 BT-474<sup>LapR</sup> 增殖是否依赖于 ROS 水平的增加。所使用的 BR 的浓度为 10  $\mu$ M, NAC 为 100  $\mu$ M, 需提前 1 小时加入。实验分组为: BT-474<sup>LapR</sup> (control), BT-474<sup>LapR</sup> + BR (10  $\mu$ M), BT-474<sup>LapR</sup> + BR (10  $\mu$ M) + NAC (100  $\mu$ M)。加药 72 小时后检测细胞的增殖状态, 具体操作方法同前。

## 2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡状态

- 1) 选取生长状态良好的 BT-474<sup>LapR</sup>, 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 离心收集细胞沉淀。
- 2) 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基重悬细胞, 制成单细胞悬液。将细胞均匀分种至 6 个 25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。
- 3) 待细胞状态良好并生长至 80%, 按如下分组加入相应浓度的药物: Control 组, Lapatinib (2  $\mu$ M), BR (10  $\mu$ M), Lapatinib (2  $\mu$ M) + BR (10  $\mu$ M), NAC (100  $\mu$ M), Lapatinib (2  $\mu$ M) + BR (10  $\mu$ M) + NAC (100  $\mu$ M), NAC 提前 1 小时加入, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。

- 4) 药物作用 72 小时后, 0.25%胰蛋白酶消化细胞, 离心收集细胞沉淀, 使细胞数大于  $1 \times 10^6$  个/mL。
- 5) 流式细胞仪分析, 具体检测参数见第二部分实验 2.7。

### 3 结果

#### 3.1 BR 可以协同 Lapatinib 抑制 BT-474<sup>LapR</sup> 的增殖

虽然关于 BR 的抗肿瘤作用已有相关研究, 但在抑制具有 Lapatinib 耐药性的 BT-474 细胞增殖方面的效果尚不明确。为此, 分别利用 10  $\mu$ M 的 BR 单药或联合 Lapatinib (2  $\mu$ M) 作用于 BT-474<sup>LapR</sup> 细胞, 并进行 MTT 分析。结果显示, BR 可以明显增强 Lapatinib 的增殖抑制能力(图 4-1), 证明 BR 可以协同 Lapatinib 抑制 BT-474<sup>LapR</sup> 的增殖。

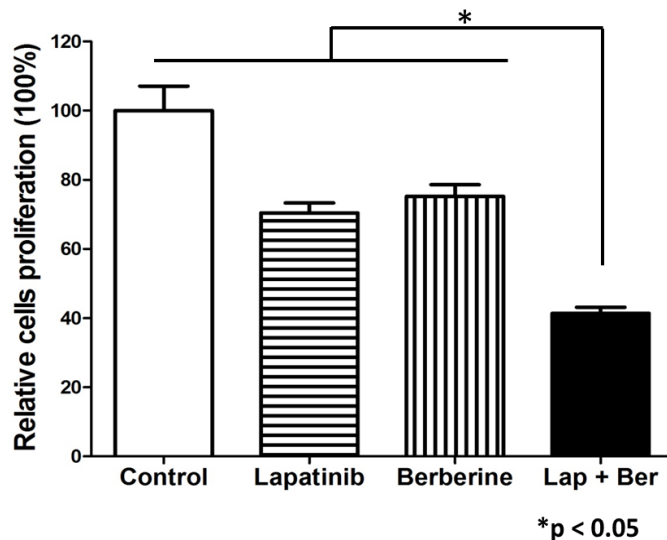


图 4-1 BR 可以协同 Lapatinib 抑制 BT-474<sup>LapR</sup> 细胞的增殖 (BR, 10  $\mu$ M; Lapatinib, 2  $\mu$ M)

Figure 4-1 BR synergized with Lapatinib to inhibit the proliferation of BT-474<sup>LapR</sup> cells. (BR, 10  $\mu$ M; Lapatinib, 2  $\mu$ M)

#### 3.2 BT-474<sup>LapR</sup> 的 ROS 水平降低

为了明确 ROS 在 BT-474<sup>Par</sup> 与 BT-474<sup>LapR</sup> 细胞之间的差异, 利用 DCFH-DA 荧光染料分别标记 BT-474<sup>Par</sup> 与 BT-474<sup>LapR</sup>, 用流式细胞术分析 DCF 的荧光强度。实验结果显示, DCF 阳性细胞在 BT-474<sup>Par</sup> 中的比例约为 15.25%, 而在 BT-474<sup>LapR</sup> 仅为 4.52%

(图 4-2)。这一结果说明 BT-474<sup>LapR</sup> 细胞的 ROS 水平较 BT-474<sup>Par</sup> 明显降低，低 ROS 水平可能是其获得耐药性的机制之一。

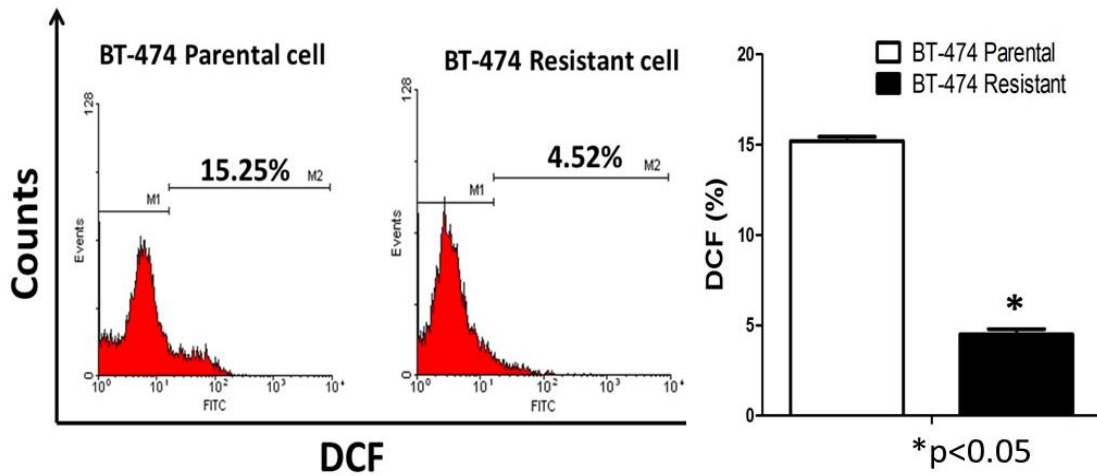


图 4-2 BT-474<sup>Par</sup> 和 BT-474<sup>LapR</sup> 的 ROS 水平分析(DCFH-DA 标记)

Figure 4-2 ROS level analysis between BT-474<sup>Par</sup> and BT-474<sup>LapR</sup> cells using DCFH-DA labelling

### 3.3 BR 可以上调 BT-474<sup>LapR</sup> 的 ROS 水平

为了明确 BR 是否能上调 BT-474<sup>LapR</sup> 的 ROS 水平，我们利用 10  $\mu$ M 的 BR 作用 BT-474<sup>LapR</sup>，72 小时后收取样品进行 ROS 水平分析。同时，利用 100  $\mu$ M 的 NAC 预处理细胞 1 小时后再加入 BR 进行 ROS 水平分析。结果如图 4-3 所示，BR 可以显著上调 BT-474<sup>LapR</sup> 的 ROS 水平（平均从 3.81%上调至 26.39%），但这一作用又可以受到 NAC 的抑制（从 26.39%降低至 18.16%）。

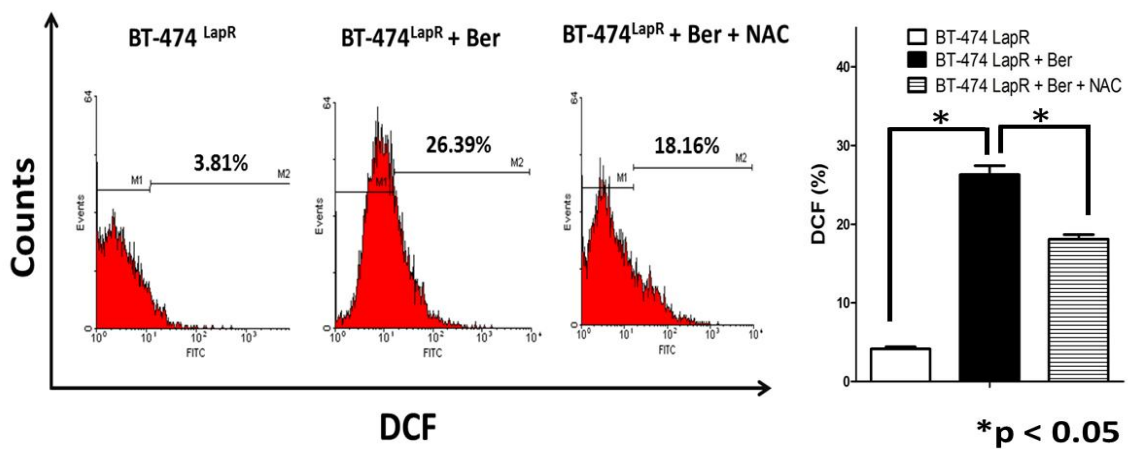




图 4-3 BR 可以上调 BT-474<sup>LapR</sup> 细胞的 ROS 水平

Figure 4-3 BR increased ROS level of BT-474<sup>LapR</sup> cells (Berberine, 10  $\mu$ M; NAC, 100  $\mu$ M)

### 3.4 BR 抑制 BT-474<sup>LapR</sup> 的 DNA 复制能力依赖于 ROS 水平的增加 (EdU 分析)

为了明确 BR 是否通过上调 ROS 水平抑制 BT-474<sup>LapR</sup> 的增殖能力, 分别应用 BR 和/或 NAC 作用于 BT-474<sup>LapR</sup> 72 小时, 然后利用 EdU 方法检测细胞的 DNA 复制能力。结果如图 4-4 所示, BR 可以显著抑制 BT-474<sup>LapR</sup> 的 DNA 复制能力。但是, ROS 清除剂 NAC 可以拮抗 BR 的抑制作用, 说明 BR 是通过上调 ROS 水平抑制 BT-474<sup>LapR</sup> 的 DNA 复制能力。

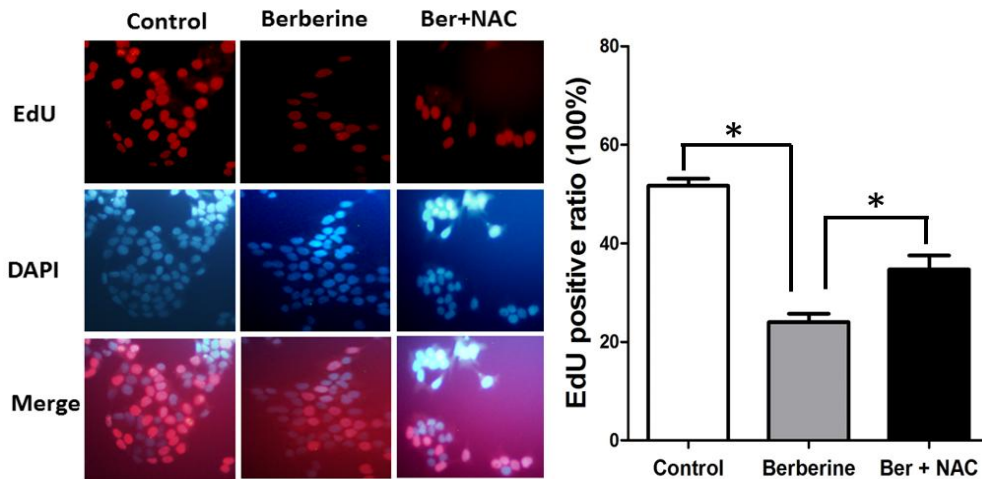


图 4-4 BR 抑制 BT-474<sup>LapR</sup> 的 DNA 复制能力依赖于 ROS 水平增加

Figure 4-4 BR inhibited DNA synthesis ability of BT-474<sup>LapR</sup> cells dependent on ROS level increase (BR, 10  $\mu$ M; NAC, 100  $\mu$ M)

### 3.5 BR 协同 Lapatinib 促进 BT-474<sup>LapR</sup> 的凋亡依赖于 ROS 水平的增加 (流式细胞术分析)

为进一步明确 BR 是否能协同 Lapatinib 促进 BT-474<sup>LapR</sup> 的凋亡, 分别利用 BR 和/或 Lapatinib 处理 BT-474<sup>LapR</sup>, 72 小时后收取细胞样品进行流式细胞术检测细胞凋亡水平。如图 4-5 所示, BR 可以诱导 BT-474<sup>LapR</sup> 的凋亡, 并且可协同促进 Lapatinib 诱导耐药细胞的凋亡, 而这种促凋亡能力可以被 NAC 所拮抗。

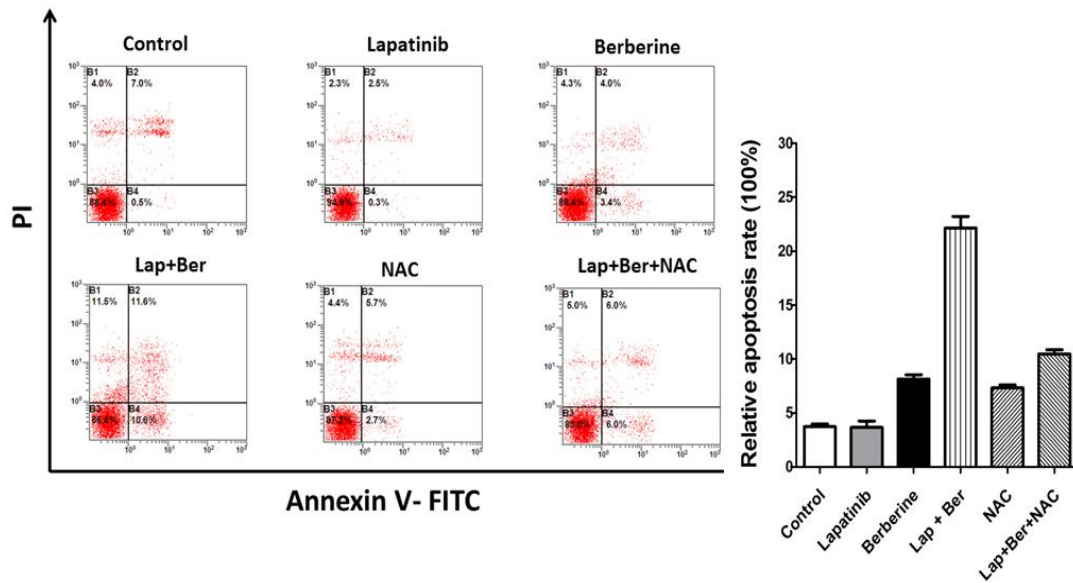


图 4-5 BR 可以协同 Lapatinib 促进 BT-474<sup>Lap<sup>R</sup></sup> 的凋亡

Figure 4-5 BR synergized with Lapatinib to induce the apoptosis of BT-474<sup>Lap<sup>R</sup></sup> cells dependent on ROS level increase (BR, 10  $\mu$ M; NAC, 100  $\mu$ M)

#### 4 讨论

在本部分实验中,我们重点利用 DCFH-DA 荧光标记分析发现 BT-474<sup>Lap<sup>R</sup></sup> 的 ROS 水平明显低于 BT-474<sup>Par</sup>。进一步研究证实 BR 可以上调 BT-474<sup>Lap<sup>R</sup></sup> 的 ROS 水平, 并抑制耐药细胞的增殖和 DNA 复制能力, 促进耐药细胞的凋亡。联合应用 BR 和 Lapatinib 可以显著增强后者杀伤耐药细胞的能力。同时, 利用 ROS 清除剂 NAC 可以明显拮抗 BR 的功能, 说明 BR 的抗肿瘤活性依赖于其上调 ROS 水平。

虽然 BR 并非传统的肿瘤化疗药物, 但其抗肿瘤活性日益受到重视。我们的研究进一步证明了 BR 有助于恢复 Lapatinib 耐药细胞的药物敏感性。BR 上调 ROS 的机制可能是通过调控细胞线粒体代谢途径、或清除 ROS 的氧化还原相关信号通路等, 但具体机制还需要进一步研究。揭示 BR 调控 ROS 的分子机制将有助于为解决 Lapatinib 的耐药问题提供新的研究思路。

## 小 结

1. 建立了具有稳定的 Lapatinib 耐药性的 HER2 阳性乳腺癌细胞株 BT-474<sup>LapR</sup> 和 AU-565<sup>LapR</sup>。
2. 分别通过 MTT、EdU、软琼脂克隆形成等方法确认所筛选耐药细胞的耐药性。
3. 利用透射电镜分析细胞自噬体、GFP-LC3 融合基因转染细胞分析自噬体聚集分布状态等方法，发现细胞自噬在 Lapatinib 耐药细胞中处于活化状态。
4. 利用自噬抑制剂拮抗耐药细胞的自噬过程，证实细胞自噬抑制剂可以协同 Lapatinib 抑制耐药细胞的增殖、促进耐药细胞的凋亡。
5. 发现 AMPK-mTOR 信号通路在 BT-474<sup>LapR</sup> 细胞中处于活化状态，是细胞自噬水平增加的重要原因。
6. 抑制 BT-474<sup>LapR</sup> 中 AMPK-mTOR 信号通路可以促进耐药细胞对 Lapatinib 的治疗敏感性。
7. BT-474<sup>LapR</sup> 细胞的 ROS 水平较 BT-474<sup>Par</sup> 细胞低，BR 可以通过上调 BT-474<sup>LapR</sup> 的 ROS 水平抑制细胞增殖、促进细胞凋亡。

## 参考文献

- [1] Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. (2015) Cancer statistics, 2015, *CA Cancer J Clin.* **65**, 5-29.
- [2] Zheng, H. L., Yan, S. M., Hu, D. H., Zhang, X., Zhang, Y. T., Guan, Q. H. & Ding, Q. L. (2014) Extracellular redox state regulates catecholamine biosynthesis in PC12 cells with insulin resistance, *Horm Metab Res.* **46**, 412-8.
- [3] Liu, D., Yang, Y. & Zhao, S. (2014) Autophagy facilitates the EGFR-TKI acquired resistance of non-small-cell lung cancer cells, *J Formos Med Assoc.* **113**, 141-2.
- [4] Weil, R. J., Palmieri, D. C., Bronder, J. L., Stark, A. M. & Steeg, P. S. (2005) Breast cancer metastasis to the central nervous system, *Am J Pathol.* **167**, 913-20.
- [5] Clayton, A. J., Danson, S., Jolly, S., Ryder, W. D., Burt, P. A., Stewart, A. L., Wilkinson, P. M., Welch, R. S., Magee, B., Wilson, G., Howell, A. & Wardley, A. M. (2004) Incidence of cerebral metastases in patients treated with trastuzumab for metastatic breast cancer, *Br J Cancer.* **91**, 639-43.
- [6] Brufsky, A. M., Mayer, M., Rugo, H. S., Kaufman, P. A., Tan-Chiu, E., Tripathy, D., Tudor, I. C., Wang, L. I., Brammer, M. G., Shing, M., Yood, M. U. & Yardley, D. A. (2011) Central nervous system metastases in patients with HER2-positive metastatic breast cancer: incidence, treatment, and survival in patients from registHER, *Clin Cancer Res.* **17**, 4834-43.
- [7] Bendell, J. C., Domchek, S. M., Burstein, H. J., Harris, L., Younger, J., Kuter, I., Bunnell, C., Rue, M., Gelman, R. & Winer, E. (2003) Central nervous system metastases in women who receive trastuzumab-based therapy for metastatic breast carcinoma, *Cancer.* **97**, 2972-7.
- [8] Rimawi, M. F., Schiff, R. & Osborne, C. K. (2015) Targeting HER2 for the treatment of breast cancer, *Annu Rev Med.* **66**, 111-28.
- [9] Citri, A. & Yarden, Y. (2006) EGF-ERBB signalling: towards the systems level, *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**, 505-16.
- [10] Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A. & McGuire, W. L. (1987)

Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene, *Science*. **235**, 177-82.

- [11] (2014) New guidelines for HER2+ breast cancer, *Cancer Discov*. **4**, OF2.
- [12] Ramakrishna, N., Temin, S., Chandarlapaty, S., Crews, J. R., Davidson, N. E., Esteva, F. J., Giordano, S. H., Gonzalez-Angulo, A. M., Kirshner, J. J., Krop, I., Levinson, J., Modi, S., Patt, D. A., Perez, E. A., Perlmutter, J., Winer, E. P. & Lin, N. U. (2014) Recommendations on disease management for patients with advanced human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer and brain metastases: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline, *J Clin Oncol*. **32**, 2100-8.
- [13] Vogel, C. L., Cobleigh, M. A., Tripathy, D., Gutheil, J. C., Harris, L. N., Fehrenbacher, L., Slamon, D. J., Murphy, M., Novotny, W. F., Burchmore, M., Shak, S., Stewart, S. J. & Press, M. (2002) Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer, *J Clin Oncol*. **20**, 719-26.
- [14] Cordo Russo, R. I., Beguelin, W., Diaz Flaque, M. C., Proietti, C. J., Venturutti, L., Galigniana, N., Tkach, M., Guzman, P., Roa, J. C., O'Brien, N. A., Charreau, E. H., Schillaci, R. & Elizalde, P. V. (2014) Targeting ErbB-2 nuclear localization and function inhibits breast cancer growth and overcomes trastuzumab resistance, *Oncogene*. **0**.
- [15] (2015) Chemotherapy helps overcome trastuzumab resistance, *Cancer Discov*. **5**, OF7.
- [16] Baselga, J., Cortes, J., Kim, S. B., Im, S. A., Hegg, R., Im, Y. H., Roman, L., Pedrini, J. L., Pienkowski, T., Knott, A., Clark, E., Benyunes, M. C., Ross, G., Swain, S. M. & Group, C. S. (2012) Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer, *N Engl J Med*. **366**, 109-19.
- [17] Kaplan, M. A., Isikdogan, A., Koca, D., Kucukoner, M., Gumusay, O., Yildiz, R., Dayan, A., Demir, L., Geredeli, C., Kocer, M., Arslan, U. Y., Inal, A., Akman, T., Coskun, U., Sener, N., Inanc, M., Elkiran, E. T., Ozdemir, N. Y., Durnali, A. G., Suner, A., Alici, S., Tarhan, M. O., Boruban, C., Oksuzoglu, B. & Urakci, Z. (2014) Clinical outcomes in patients who received lapatinib plus capecitabine combination therapy for HER2-positive breast cancer with brain metastasis and a comparison of survival with those who received trastuzumab-based therapy: a study by the Anatolian Society of Medical Oncology, *Breast Cancer*. **21**, 677-83.

- [18] Burstein, H. J., Storniolo, A. M., Franco, S., Forster, J., Stein, S., Rubin, S., Salazar, V. M. & Blackwell, K. L. (2008) A phase II study of lapatinib monotherapy in chemotherapy-refractory HER2-positive and HER2-negative advanced or metastatic breast cancer, *Ann Oncol.* **19**, 1068-74.
- [19] Geyer, C. E., Forster, J., Lindquist, D., Chan, S., Romieu, C. G., Pienkowski, T., Jagiello-Gruszfeld, A., Crown, J., Chan, A., Kaufman, B., Skarlos, D., Campone, M., Davidson, N., Berger, M., Oliva, C., Rubin, S. D., Stein, S. & Cameron, D. (2006) Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer, *N Engl J Med.* **355**, 2733-43.
- [20] Cameron, D., Casey, M., Press, M., Lindquist, D., Pienkowski, T., Romieu, C. G., Chan, S., Jagiello-Gruszfeld, A., Kaufman, B., Crown, J., Chan, A., Campone, M., Viens, P., Davidson, N., Gorbounova, V., Raats, J. I., Skarlos, D., Newstat, B., Roychowdhury, D., Paoletti, P., Oliva, C., Rubin, S., Stein, S. & Geyer, C. E. (2008) A phase III randomized comparison of lapatinib plus capecitabine versus capecitabine alone in women with advanced breast cancer that has progressed on trastuzumab: updated efficacy and biomarker analyses, *Breast Cancer Res Treat.* **112**, 533-43.
- [21] Guan, Z., Xu, B., DeSilvio, M. L., Shen, Z., Arpornwirat, W., Tong, Z., Lorvidhaya, V., Jiang, Z., Yang, J., Makhson, A., Leung, W. L., Russo, M. W., Newstat, B., Wang, L., Chen, G., Oliva, C. & Gomez, H. (2013) Randomized trial of lapatinib versus placebo added to paclitaxel in the treatment of human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing metastatic breast cancer, *J Clin Oncol.* **31**, 1947-53.
- [22] Eichhorn, P. J., Gili, M., Scaltriti, M., Serra, V., Guzman, M., Nijkamp, W., Beijersbergen, R. L., Valero, V., Seoane, J., Bernards, R. & Baselga, J. (2008) Phosphatidylinositol 3-kinase hyperactivation results in lapatinib resistance that is reversed by the mTOR/phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor NVP-BEZ235, *Cancer Res.* **68**, 9221-30.
- [23] Elster, N., Cremona, M., Morgan, C., Toomey, S., Carr, A., O'Grady, A., Hennessy, B. T. & Eustace, A. J. (2015) A preclinical evaluation of the PI3K alpha/delta dominant inhibitor BAY 80-6946 in HER2-positive breast cancer models with acquired resistance to the HER2-targeted therapies trastuzumab and lapatinib, *Breast Cancer Res Treat.* **149**, 373-83.
- [24] Liu, L., Greger, J., Shi, H., Liu, Y., Greshock, J., Annan, R., Halsey, W., Sathe, G. M., Martin, A.

- M. & Gilmer, T. M. (2009) Novel mechanism of lapatinib resistance in HER2-positive breast tumor cells: activation of AXL, *Cancer Res.* **69**, 6871-8.
- [25] White, E. (2012) Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer, *Nat Rev Cancer.* **12**, 401-10.
- [26] Hussey, S., Terebiznik, M. R. & Jones, N. L. (2008) Autophagy: healthy eating and self-digestion for gastroenterologists, *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* **46**, 496-506.
- [27] Majeski, A. E. & Dice, J. F. (2004) Mechanisms of chaperone-mediated autophagy, *Int J Biochem Cell Biol.* **36**, 2435-44.
- [28] Xie, Z. & Klionsky, D. J. (2007) Autophagosome formation: core machinery and adaptations, *Nature cell biology.* **9**, 1102-9.
- [29] Maycotte, P. & Thorburn, A. (2014) Targeting autophagy in breast cancer, *World J Clin Oncol.* **5**, 224-40.
- [30] Debnath, J. (2011) The multifaceted roles of autophagy in tumors-implications for breast cancer, *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* **16**, 173-87.
- [31] Chen, S., Rehman, S. K., Zhang, W., Wen, A., Yao, L. & Zhang, J. (2010) Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance, *Biochim Biophys Acta.* **1806**, 220-9.
- [32] Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A. J. & Heintz, N. (2003) Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 15077-82.
- [33] Lum, J. J., Bauer, D. E., Kong, M., Harris, M. H., Li, C., Lindsten, T. & Thompson, C. B. (2005) Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis, *Cell.* **120**, 237-48.
- [34] Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V. & White, E. (2007) Role of autophagy in cancer, *Nat Rev Cancer.* **7**, 961-7.
- [35] Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferraro, C. & Menendez, J. A. (2009) Autophagy facilitates the development of breast cancer resistance to the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab, *PLoS One.* **4**, e6251.
- [36] Bellodi, C., Lidonnici, M. R., Hamilton, A., Helgason, G. V., Soliera, A. R., Ronchetti, M., Galavotti, S., Young, K. W., Selmi, T., Yacobi, R., Van Etten, R. A., Donato, N., Hunter, A.,

- Dinsdale, D., Tirro, E., Vigneri, P., Nicotera, P., Dyer, M. J., Holyoake, T., Salomoni, P. & Calabretta, B. (2009) Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells, *J Clin Invest.* **119**, 1109-23.
- [37] Li, J., Hou, N., Faried, A., Tsutsumi, S., Takeuchi, T. & Kuwano, H. (2009) Inhibition of autophagy by 3-MA enhances the effect of 5-FU-induced apoptosis in colon cancer cells, *Annals of surgical oncology.* **16**, 761-71.
- [38] Jaber, N., Dou, Z., Chen, J. S., Catanzaro, J., Jiang, Y. P., Ballou, L. M., Selinger, E., Ouyang, X., Lin, R. Z., Zhang, J. & Zong, W. X. (2012) Class III PI3K Vps34 plays an essential role in autophagy and in heart and liver function, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **109**, 2003-8.
- [39] Xiong, Y., Yepuri, G., Forbitech, M., Yu, Y., Montani, J. P., Yang, Z. & Ming, X. F. (2014) ARG2 impairs endothelial autophagy through regulation of MTOR and PRKAA/AMPK signaling in advanced atherosclerosis, *Autophagy.* **10**, 2223-38.
- [40] Jiang, L. B., Cao, L., Yin, X. F., Yasen, M., Yishake, M., Dong, J. & Li, X. L. (2015) Activation of autophagy via Ca<sup>2+</sup>-dependent AMPK/mTOR pathway in rat notochordal cells is a cellular adaptation under hyperosmotic stress, *Cell Cycle.* **14**, 867-79.
- [41] Chen, S., Zhu, X., Lai, X., Xiao, T., Wen, A. & Zhang, J. (2014) Combined cancer therapy with non-conventional drugs: all roads lead to AMPK, *Mini Rev Med Chem.* **14**, 642-54.
- [42] Yang, A., Rajeshkumar, N. V., Wang, X., Yabuuchi, S., Alexander, B. M., Chu, G. C., Von Hoff, D. D., Maitra, A. & Kimmelman, A. C. (2014) Autophagy is critical for pancreatic tumor growth and progression in tumors with p53 alterations, *Cancer Discov.* **4**, 905-13.
- [43] Iacobuzio-Donahue, C. A. & Herman, J. M. (2014) Autophagy, p53, and pancreatic cancer, *N Engl J Med.* **370**, 1352-3.
- [44] Wang, R., Paul, V. J. & Luesch, H. (2013) Seaweed extracts and unsaturated fatty acid constituents from the green alga *Ulva lactuca* as activators of the cytoprotective Nrf2-ARE pathway, *Free Radic Biol Med.* **57**, 141-53.
- [45] Sabharwal, S. S. & Schumacker, P. T. (2014) Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel?, *Nat Rev Cancer.* **14**, 709-21.
- [46] Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W. W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M.,



- Kalyanaraman, B., Mutlu, G. M., Budinger, G. R. & Chandel, N. S. (2010) Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**, 8788-93.
- [47] Trachootham, D., Alexandre, J. & Huang, P. (2009) Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?, *Nature reviews Drug discovery.* **8**, 579-91.
- [48] Jin, Y., Lu, Z., Ding, K., Li, J., Du, X., Chen, C., Sun, X., Wu, Y., Zhou, J. & Pan, J. (2010) Antineoplastic mechanisms of niclosamide in acute myelogenous leukemia stem cells: inactivation of the NF-kappaB pathway and generation of reactive oxygen species, *Cancer Res.* **70**, 2516-27.
- [49] Tobon-Velasco, J. C., Vazquez-Victorio, G., Macias-Silva, M., Cuevas, E., Ali, S. F., Maldonado, P. D., Gonzalez-Trujano, M. E., Cuadrado, A., Pedraza-Chaverri, J. & Santamaria, A. (2012) S-allyl cysteine protects against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in the rat striatum: involvement of Nrf2 transcription factor activation and modulation of signaling kinase cascades, *Free Radic Biol Med.* **53**, 1024-40.
- [50] Chapple, S. J., Siow, R. C. & Mann, G. E. (2012) Crosstalk between Nrf2 and the proteasome: therapeutic potential of Nrf2 inducers in vascular disease and aging, *Int J Biochem Cell Biol.* **44**, 1315-20.
- [51] Ellis, B. C., Graham, L. D. & Molloy, P. L. (2014) CRNDE, a long non-coding RNA responsive to insulin/IGF signaling, regulates genes involved in central metabolism, *Biochim Biophys Acta.* **1843**, 372-86.
- [52] Zhou, L., Yang, Y., Wang, X., Liu, S., Shang, W., Yuan, G., Li, F., Tang, J., Chen, M. & Chen, J. (2007) Berberine stimulates glucose transport through a mechanism distinct from insulin, *Metabolism.* **56**, 405-12.
- [53] Vuddanda, P. R., Chakraborty, S. & Singh, S. (2010) Berberine: a potential phytochemical with multispectrum therapeutic activities, *Expert Opin Investig Drugs.* **19**, 1297-307.
- [54] He, S., Liu, S. & Zhu, H. (2011) The sequence, structure and evolutionary features of HOTAIR in mammals, *BMC Evol Biol.* **11**, 102.
- [55] Caley, D. P., Pink, R. C., Trujillano, D. & Carter, D. R. (2010) Long noncoding RNAs, chromatin, and development, *ScientificWorldJournal.* **10**, 90-102.

- [56] Katiyar, S. K., Meeran, S. M., Katiyar, N. & Akhtar, S. (2009) p53 Cooperates berberine-induced growth inhibition and apoptosis of non-small cell human lung cancer cells in vitro and tumor xenograft growth in vivo, *Mol Carcinog.* **48**, 24-37.
- [57] Ma, X., Zhou, J., Zhang, C. X., Li, X. Y., Li, N., Ju, R. J., Shi, J. F., Sun, M. G., Zhao, W. Y., Mu, L. M., Yan, Y. & Lu, W. L. (2013) Modulation of drug-resistant membrane and apoptosis proteins of breast cancer stem cells by targeting berberine liposomes, *Biomaterials.* **34**, 4452-65.
- [58] Mantena, S. K., Sharma, S. D. & Katiyar, S. K. (2006) Berberine, a natural product, induces G1-phase cell cycle arrest and caspase-3-dependent apoptosis in human prostate carcinoma cells, *Mol Cancer Ther.* **5**, 296-308.
- [59] Lee, S. J., Noh, H. J., Sung, E. G., Song, I. H., Kim, J. Y., Kwon, T. K. & Lee, T. J. (2011) Berberine sensitizes TRAIL-induced apoptosis through proteasome-mediated downregulation of c-FLIP and Mcl-1 proteins, *Int J Oncol.* **38**, 485-92.
- [60] Wang, N., Feng, Y., Zhu, M., Tsang, C. M., Man, K., Tong, Y. & Tsao, S. W. (2010) Berberine induces autophagic cell death and mitochondrial apoptosis in liver cancer cells: the cellular mechanism, *J Cell Biochem.* **111**, 1426-36.
- [61] Li, J., Gu, L., Zhang, H., Liu, T., Tian, D., Zhou, M. & Zhou, S. (2013) Berberine represses DAXX gene transcription and induces cancer cell apoptosis, *Lab Invest.* **93**, 354-64.
- [62] Ho, Y. T., Lu, C. C., Yang, J. S., Chiang, J. H., Li, T. C., Ip, S. W., Hsia, T. C., Liao, C. L., Lin, J. G., Wood, W. G. & Chung, J. G. (2009) Berberine induced apoptosis via promoting the expression of caspase-8, -9 and -3, apoptosis-inducing factor and endonuclease G in SCC-4 human tongue squamous carcinoma cancer cells, *Anticancer Res.* **29**, 4063-70.
- [63] Hyun, M. S., Hur, J. M., Mun, Y. J., Kim, D. & Woo, W. H. (2010) BBR induces apoptosis in HepG2 cell through an Akt-ASK1-ROS-p38MAPKs-linked cascade, *J Cell Biochem.* **109**, 329-38.
- [64] Hur, J. M. & Kim, D. (2010) Berberine inhibited radioresistant effects and enhanced anti-tumor effects in the irradiated-human prostate cancer cells, *Toxicol Res.* **26**, 109-15.
- [65] Meeran, S. M., Katiyar, S. & Katiyar, S. K. (2008) Berberine-induced apoptosis in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species generation, *Toxicol Appl Pharmacol.* **229**, 33-43.

- [66] Zhang, L. Y., Wu, Y. L., Gao, X. H. & Guo, F. (2014) Mitochondrial protein cyclophilin-D-mediated programmed necrosis attributes to berberine-induced cytotoxicity in cultured prostate cancer cells, *Biochemical and biophysical research communications*. **450**, 697-703.

## 个人简历和研究成果

### 个人简历:

姓 名: 陈苏宁

性 别: 女

出生年月: 1978 年 12 月

民 族: 汉 族

籍 贯: 江苏省南京市

### 学习与工作经历:

1997.09-2000.06 第二军医大学药学院 学员

2000.07-2009.09 第四军医大学第一附属医院药剂科 药师

2003.09-2006.06 第四军医大学药学系专升本 学员

2009.09-至今 第四军医大学第一附属医院药剂科 主管药师

2012.09-2015.06 第四军医大学第一附属医院药剂科 硕士研究生

### 研究成果:

1. 陈苏宁, 韦伊芳, 赖晓凤, 张媛, 张健, 文爱东. Lapatinib 耐药性 HER2 阳性乳腺癌细胞株的建立及鉴定. *现代肿瘤医学*, 2015, 23(05): 598 - 600.
2. **Chen S**, Zhu X, Lai X, Xiao T, Wen A, Zhang J. Combined Cancer Therapy with Non-Conventional Drugs: All Roads Lead to AMPK. *Mini Rev Med Chem*. 2014; 14(8): 642-54. (IF=3.1)
3. **Chen S**, Zhou J, Xi M, Jia Y, Wen A. Pharmacogenetic variation and metformin response. *Curr Drug Metab*. 2013; 14(10):1070 - 82. (IF=3.4)
4. Ma J, Guo Y, **Chen S**, Zhong C, Xue Y, Zhang J, Liu W. Metformin enhances tamoxifen-mediated tumor growth inhibition in ER-positive breast carcinoma. *BMC Cancer*. 2014; 11(14):172. (IF=3.3, co-first author)

5. Lai X, Wei Y, Zhao H, **Chen S**, Bu X, Lu F, Qu D, Yao L, Zheng J, Zhang J. The effect of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and ZnO nanoparticles on cytotoxicity and glucose metabolism in lung epithelial cells. *J Appl Toxicol*. 2015; (Epub ahead of print). (IF= 3.174)
6. Yifang Wei, Xiaofeng Lai, Shentong Yu, **Suning Chen**, Yongzheng Ma, Yuan Zhang, Huichen Li, Xingmei Zhu, Libo Yao and Jian Zhang. Exosomal microRNA-221/222 enhances tamoxifen resistance in recipient ER-positive breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;147(2):423-31. (IF=4.469)
7. Xingmei Zhu, Lin Wu, Hongyu Qiao, Tenglong Han, **Suning Chen**, Xueying Liu, Ru Jiang, Yifang Wei, Dayun Feng, Yuan Zhang, Yongzheng Ma, Shengyong Zhang, and Jian Zhang. Autophagy stimulates apoptosis in HER2-overexpressing breast cancers treated by lapatinib. *J Cell Biochem*. 2013;114(12):2643-53. (IF=3.368)
8. 总后勤部卫生部军队临床药师师资培训合格证书（2014）
9. 第四军医大学院校师资培训合格证书（2014）
10. 第四军医大学硕士优秀研究生（2014 年度）
11. 参编《生命之窗-生物化学与分子生物学》（2013）
12. 第四军医大学硕士研究生一等奖学金（2012 年度）
13. 承担国家自然科学基金青年项目 1 项（81202091）

## 致 谢

衷心感谢导师文爱东教授在我硕士学习期间给予的淳淳教导。您渊博的专业知识，敬业的工作精神，缜密的科学思维以及乐观的处事态度都对我硕士的学习和今后的工作有很大的启发。您能因材施教，根据个人兴趣进行引导，支持我在外学习，为我提供了难得的学习实践和自我提升的机会，让我能够心无旁骛的投入到科学研究中。这一阶段的学习使我的科研能力得到了全方位的提高，为我将来的科研之路打下了坚实的基础。

衷心感谢基础医学院生物化学与分子生物学教研室的各位教授和同事们对我的指导和帮助，谢谢你们为我实验提供的各种便利条件，今天我能取得这些成绩离不开你们的辛勤付出。我将在今后的学习和工作中牢记你们的教诲，以你们扎实、严谨的工作作风为榜样，克服自己的不足，脚踏实地的学习和工作。

感谢与我一起工作过的各位硕士、博士们对我的帮助和鼓励，使我从一个实验菜鸟成长为略懂一二的硕士研究生。

最后，深深地感谢我的家人，感谢你们一直以来对我的关爱和付出，使我能够放下包袱，全身心的投入到科研工作中。这份亲情我将永远铭记在心！