

非小细胞肺癌 *EGFR* 基因少见突变 *P733L* 对第 1 代和第 3 代 *EGFR*-TKI 敏感性的研究^Δ

车娟娟*,王 婧,甄洪超,林海珊,尚 昆,俞 静[#](首都医科大学附属北京友谊医院肿瘤科,北京 100050)

中图分类号 R979.1 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2024)07-0774-05

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2024.07.002



摘要 目的:探讨表皮生长因子受体(*EGFR*)基因少见突变 *P733L* 对第 1 代和第 3 代 *EGFR* 酪氨酸激酶抑制剂(*EGFR*-TKI)的敏感性。方法:通过四唑盐比色法和平板克隆实验分析 *EGFR L858R* 和 *P733L* 肺癌细胞对第 1 代和第 3 代 *EGFR*-TKI 的敏感性;通过 Transwell 实验分析第 1 代和第 3 代 *EGFR*-TKI 对 *EGFR L858R* 和 *P733L* 肺癌细胞迁移的抑制作用;通过检测凋亡蛋白分析第 1 代和第 3 代 *EGFR*-TKI 促进 *EGFR L858R* 和 *P733L* 肺癌细胞凋亡的作用。结果:第 1 代和第 3 代 *EGFR*-TKI 对 *EGFR L858R* 和 *P733L* 细胞的增殖、克隆形成和细胞迁移都有抑制作用。与 *EGFR* 野生型肺癌细胞相比,第 1 代和第 3 代 *EGFR*-TKI 处理后, *EGFR L858R* 和 *P733L* 细胞的 *EGFR* 激酶活性受到抑制,细胞凋亡明显增加。结论:*EGFR P733L* 突变细胞对第 1 代和第 3 代 *EGFR*-TKI 的敏感性与 *EGFR L858R* 突变细胞的敏感性相似,本研究为 *EGFR* 基因少见突变从 *EGFR*-TKI 治疗中获益提供了实验证据。

关键词 非小细胞肺癌;表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂; *EGFR* 少见突变; *EGFR P733L*; 药物敏感性

Sensitivity of *EGFR P733L* Rare Mutation to the First-and Third-Generation *EGFR*-TKIs in Non-Small Cell Lung Cancer^Δ

CHE Juanjuan, WANG Jing, ZHEN Hongchao, LIN Haishan, SHANG Kun, YU Jing (Dept. of Oncology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To analyze the sensitivity of epidermal growth factor receptor (*EGFR*) *P733L* rare mutation to the first-and third-generation *EGFR*-tyrosine kinase inhibitor (TKIs) in non-small cell lung cancer. **METHODS:** Sensitivity of *EGFR L858R* and *P733L* to the first-and third-generation *EGFR*-TKIs was analyzed by MTT and clone formation experiments. Inhibition effect of the first-and third-generation *EGFR*-TKIs on the migration of *EGFR L858R* and *P733L* lung cancer cells was analyzed by Transwell assay. Role of the first-and third-generation *EGFR*-TKIs in promoting apoptosis of *EGFR L858R* and *P733L* lung cancer cells was analyzed by the detection of apoptosis proteins. **RESULTS:** The first-and third-generation *EGFR*-TKIs inhibited the cell proliferation, clone formation, and cell migration of *EGFR L858R* and *P733L*. Compared with the wild-type *EGFR* lung cancer cells, the *EGFR* kinase activity of *EGFR L858R* and *P733L* cells was inhibited and cell apoptosis increased significantly after the first-and third-generation *EGFR*-TKIs treatment. **CONCLUSIONS:** The sensitivity of *EGFR P733L* mutant cells to the first-and third-generation *EGFR*-TKIs is similar to that of *EGFR L858R* mutant cells, which provides experimental evidence for the benefit of rare mutations in *EGFR* gene from *EGFR*-TKIs treatment.

KEYWORDS Non-small cell lung cancer; Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor; *EGFR* rare mutation; *EGFR P733L*; Drug sensitivity

表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, *EGFR*-TKI)是表皮生长因子受体(*EGFR*)敏感突变型(*L858R*, *19Del*)非小细胞肺癌患者的标准治疗药物。但 *EGFR*-TKI 对含有少见 *EGFR* 突变患

者的疗效差异较大。据报道,*EGFR*-TKI 对一些少见 *EGFR* 突变的患者仍然具有显著疗效。

EGFR 基因突变是非小细胞肺癌(NSCLC)高频发生的驱动基因突变,*EGFR* 突变使得 *EGFR* 激酶结构域能够自磷酸化并激活下游激酶级联途径,促进肿瘤细胞增殖和生存^[1]。第 1 代 *EGFR*-TKI 已被广泛用于 *EGFR* 敏感突变的 NSCLC 患者的标准治疗,开启了 NSCLC 靶向治疗的时代^[2-3]。*EGFR* 基因最常见的突变是 19 号外显子缺失(*19Del*)和 21 号外显子 *L858R* 点突变,这两种突变占有所有 *EGFR* 突变 NSCLC 患者的 90% 以

Δ 基金项目:国家自然科学基金面上项目(No. 81774221)

* 副主任医师。研究方向:非小细胞肺癌侵袭转移机制的研究。

E-mail: juanjuanche2024@163.com

通信作者:主任医师。研究方向:肿瘤放疗增敏及肿瘤精准

治疗和耐药监测。E-mail: yujing026@ccmu.edu.cn

上^[4-5]。第3代EGFR-TKI具有EGFR突变选择性,用于治疗T790M获得性耐药突变肺腺癌患者^[6-7]。FLAURA研究结果显示,在一线治疗中,第3代EGFR-TKI(奥希替尼)的无进展生存期优于第1代EGFR-TKI,已经成为新的治疗标准^[8-10]。

临床实践发现,在对EGFR-TKI敏感的患者中检测到EGFR基因少见突变^[10-13]。TAILOR研究发现,约25%的突变阴性患者对第1代EGFR-TKI(厄洛替尼)有应答^[14]。这些研究表明了EGFR-TKI对一部分含有EGFR基因少见突变肺癌患者的治疗有效性,但是大部分EGFR基因少见突变对EGFR-TKI的反应性并不确定,尤其对于第3代EGFR-TKI。因此,有必要对此进行研究,使更多患者受益于靶向治疗。前期在EGFR敏感突变阴性的NSCLC患者中发现了EGFR P733L突变,根据TCGA数据库,EGFR P733L发生率<5‰,关于此突变的功能和生物学意义以及对EGFR-TKI的反应性都不清楚。本研究从分子水平探讨了EGFR基因少见突变位点P733L对第1代和第3代EGFR-TKI的敏感性。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

PC9细胞在含有10%胎牛血清、1%青霉素(10 000 U/mL)/链霉素(10 000 U/mL)的RPMI-1640培养基中生长,放置于37℃、5%CO₂培养箱中培养。

1.2 仪器

Heracell型CO₂培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司);GloMax型酶标仪(美国Promega公司);Centrifuge 5804 R型低温离心机(德国Eppendorf公司);ChemiDocXRS+型化学发光系统(美国Bio-Rad公司)。

1.3 药品与试剂

奥希替尼(AZD9291,目录号:S7297)、厄洛替尼(目录号:S7786)购于中国Selleck公司;实验用胎牛血清购于德国PAN公司;青霉素和链霉素、RPMI-1640培养基购于美国Gibco公司;结晶紫购于北京索莱宝科技有限公司。

1.4 慢病毒包装

体外合成野生型EGFR、EGFR L858R和P733L点突变的序列,构建到pLV-EGFP慢病毒表达质粒上。用四质粒包装系统转染293t细胞,48 h后收取病毒液。将慢病毒分别感染PC9细胞,建立稳定表达野生型EGFR、EGFR L858R和P733L点突变的肺腺癌细胞系。

1.5 四唑盐(MTT)比色法分析

将细胞(3 000~5 000个/孔)接种至96孔板中,24 h后,用0、0.25、0.5、1、2、4、8、16 μmol/L的第1代EGFR-TKI(厄洛替尼)以及0、0.000 01、0.000 1、0.001、0.01、0.1、1、10 μmol/L的第3代EGFR-TKI(奥希替尼)处理细胞72 h,每组设置5个副孔,每个孔加入10%浓度MTT溶液20 μL,细胞培养箱中继续孵育4 h,吸弃溶液,加入二甲基亚砜150 μL,震荡10 min,用酶标仪测定560 nm波长下的吸光值。

1.6 平板克隆实验

将1 000个/孔的PC9细胞接种至6孔板中,24 h后用2.5 μmol/L厄洛替尼以及0.1 μmol/L奥希替尼处理细胞,隔日换液,培养14 d,用4%多聚甲醛溶液固定细胞30 min,在室

温(25℃)下使用结晶紫染色细胞20 min,冲洗细胞,计数细胞团>50个细胞的克隆数。

1.7 Transwell实验

将含有1×10⁵个细胞的细胞悬液加入至Transwell小室中,在24孔板中加入600~800 μL的完全培养基,每个样本分别各设3个复孔,然后将各组的Transwell小室放至24孔板中,置于含5%CO₂的37℃培养箱中静置培养24 h。取出Transwell小室,用棉签轻轻擦去上室内没有穿孔的细胞,然后在4%的多聚甲醛溶液中固定15 min,将Transwell小室分别放入0.1%的结晶紫溶液中染色15 min,待Transwell小室晾干后在显微镜(200×)下观察,随机选取10个视野,观察并计数穿过小室的细胞数量。

1.8 蛋白质印迹分析

蛋白质样品在8%~12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶上分离,用湿转法转移到PVDF膜(Bio-Rad)上。用5%脱脂牛奶封闭60 min,加一抗4℃孵育过夜,一抗分别为EGFR抗体(CST)、GAPDH抗体(Abcam)、Cleaved PARP抗体(CST)和Caspase-3抗体(CST),用TBS-T洗膜30 min,加二抗室温孵育60 min,用TBS-T洗膜30 min,用化学发光底物增强化学发光系统观察结果。

1.9 统计学分析

用GraphPad Prism 10.0软件进行统计分析,组间两两比较采用t检验,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 构建过表达EGFR少见点突变的细胞

将野生型EGFR、敏感突变EGFR L858R和少见点突变EGFR P733L通过慢病毒感染的方式感染PC9细胞,建立野生型(WT-PC9)和突变型(L858R-PC9、P733L-PC9)EGFR细胞系,通过蛋白质印迹法确认野生型和突变型EGFR在细胞内过表达,见图1。结果证实,野生型EGFR(WT)、L858R和P733L在PC9肺腺癌细胞中稳定表达。

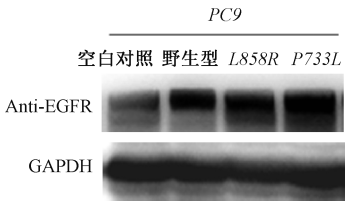
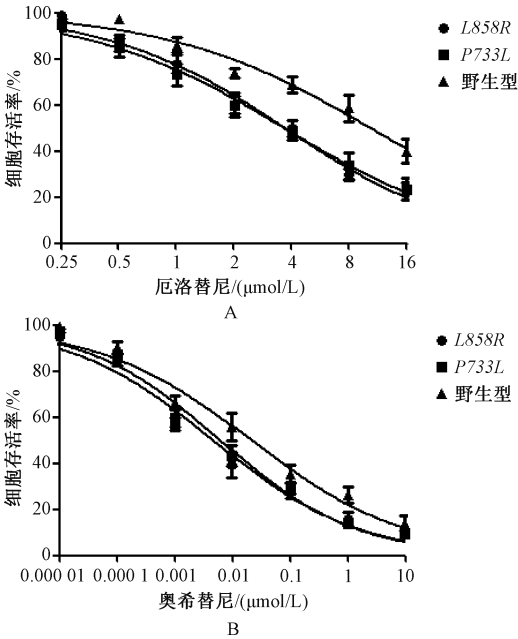


图1 EGFR、EGFR L858R和EGFR P733L过表达细胞的建立

2.2 EGFR少见点突变对第1代和第3代EGFR-TKI敏感

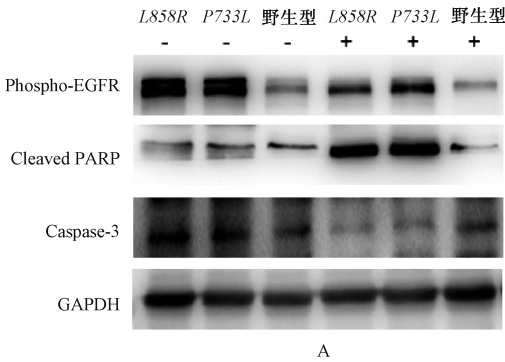
为了研究EGFR少见点突变P733L对第1代和第3代EGFR-TKI的敏感性,进行了MTT和平板克隆实验。(1)MTT实验结果见图2。与WT-PC9野生型对照组相比,第1代EGFR-TKI对L858R-PC9[半数抑制浓度(IC₅₀):3.671 μmol/L vs. 10.36 μmol/L,P<0.05]和P733L-PC9(IC₅₀:3.644 μmol/L vs. 10.36 μmol/L,P<0.05)的细胞活性均有不同程度的抑制作用,且随着药物浓度的增加,对细胞活性的抑制程度更为明显。L858R-PC9和P733L-PC9两组IC₅₀的差异无统计学意义(P>0.05)。同样,与野生型对照组相比,L858R-PC9(IC₅₀:

0.004 7 $\mu\text{mol/L}$ vs. 0.021 6 $\mu\text{mol/L}$, $P<0.05$) 和 *P733L-PC9* (IC_{50} :0.006 2 $\mu\text{mol/L}$ vs. 0.021 6 $\mu\text{mol/L}$, $P<0.05$) 对第 3 代 EGFR-TKI 也更加敏感, *L858R-PC9* 和 *P733L-PC9* 两组 IC_{50} 的差异无统计学意义 ($P>0.05$)。(2) 平板克隆实验见图 3。与野生型对照组相比, 第 1 代 EGFR-TKI 能抑制 *L858R-PC9* 和 *P733L-PC9* 的细胞克隆形成, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); *L858R-PC9* 和 *P733L-PC9* 两组克隆形成率的差异无统计学意义 ($P>0.05$)。用第 3 代 EGFR-TKI 处理细胞时, *L858R-PC9* 和 *P733L-PC9* 的细胞克隆形成率显著低于野生型对照组, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); *L858R-PC9* 和 *P733L-PC9* 两组克隆形成率的差异无统计学意义 ($P>0.05$)。



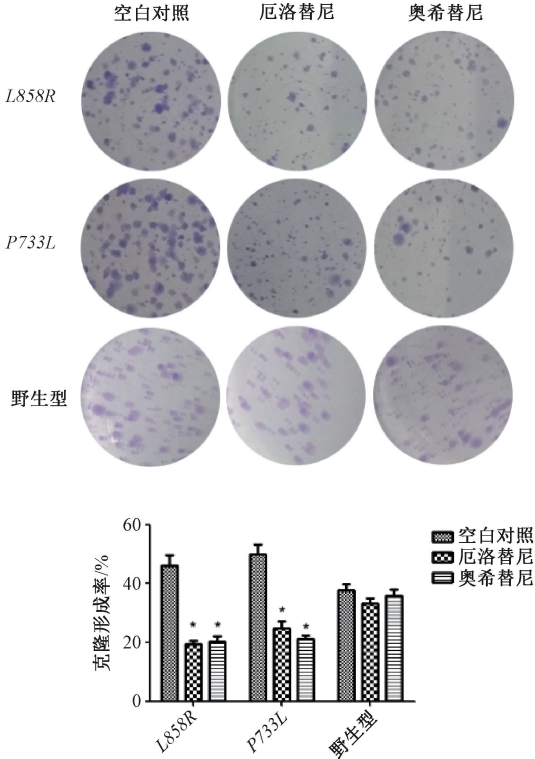
A. 第 1 代 EGFR-TKI(厄洛替尼)处理 PC9 细胞 72 h;
B. 第 3 代 EGFR-TKI(奥希替尼)处理 PC9 细胞 72 h。

图 2 MTT 细胞活性分析



A. 厄洛替尼; B. 奥希替尼。

图 4 细胞凋亡蛋白检测

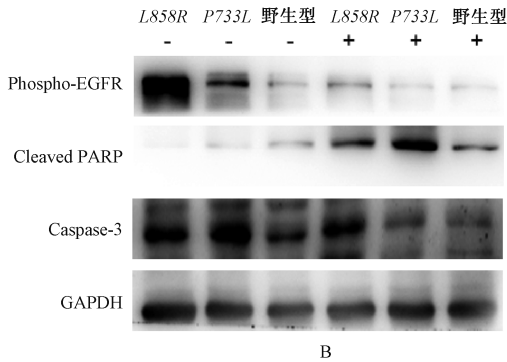


与野生型对照组比较, * $P<0.05$ 。

图 3 细胞克隆形成分析

2.3 第 1 代和第 3 代 EGFR-TKI 诱导 EGFR 少见突变的肺癌细胞发生凋亡

分别用第 1 代和第 3 代 EGFR-TKI 处理 *WT-PC9*、*L858R-PC9* 和 *P733L-PC9* 细胞, 首先检测 EGFR 磷酸化水平, 结果显示, *L858R-PC9* 和 *P733L-PC9* 细胞均表现出 EGFR 磷酸化水平的降低; 另外, *L858R-PC9* 和 *P733L-PC9* 细胞均表现出 Cleaved PARP 蛋白水平的升高以及 Caspase-3 蛋白降解的增加, 见图 4。

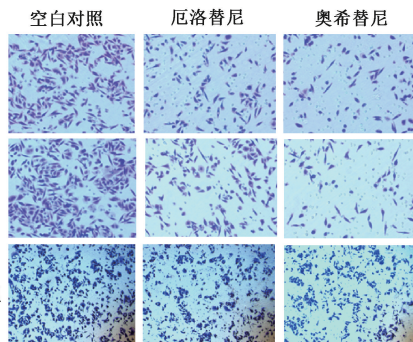


B. 奥希替尼。

2.4 第 1 代和第 3 代 EGFR-TKI 抑制表达 EGFR 少见突变的肺癌细胞迁移

分别用第 1 代和第 3 代 EGFR-TKI 处理上述细胞, Transwell 实验检测细胞迁移的变化, 用第 1 代 EGFR-TKI 处理细胞后, 与 *WT-PC9* 野生型对照细胞相比, *L858R-PC9* 和 *P733L-PC9* 细胞的迁移水平都受到了显著抑制, 差异均有统计

学意义 ($P<0.05$); *L858R-PC9* 和 *P733L-PC9* 两组迁移水平的差异无统计学意义 ($P>0.05$)。同样, 与 *WT-PC9* 野生型对照细胞相比, 第 3 代 EGFR-TKI 也显著抑制了 *L858R-PC9* 和 *P733L-PC9* 细胞的迁移, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); *L858R-PC9* 和 *P733L-PC9* 两组迁移水平的差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见图 5。



与 WT-PC9 野生型对照细胞比较, * $P < 0.05$ 。

图5 细胞迁移分析

3 讨论

EGFR19Del 和 *EGFR L858R* 突变是 EGFR-TKI 治疗获益的明确预测因子,然而,少见的 EGFR 突变对目前 EGFR-TKI 治疗效果的差异较大。关于这些少见 *EGFR* 突变对 EGFR-TKI 敏感性的数据很少,大部分来自小型回顾性研究或病例报告,并且在绝大多数此类病例中没有明确的治疗标准。非常少的研究报道了对 EGFR-TKI 敏感和耐药的少见突变,例如,在对第 1 代 EGFR-TKI 有反应的病例中检测到 *P733L/S*、*N756D*、*E758G*、*N756D* 和 *E758G* 等突变^[13,15-17]。KCSG-LU15-09 研究报告了 *G719X* 等少见突变的 NSCLC 患者接受第 3 代 EGFR-TKI 奥希替尼治疗安全、有效^[18]。Yang 等^[19] 的研究报告了第 2 代 EGFR-TKI 阿法替尼对于部分含有 18~21 外显子少见突变 NSCLC 患者的疗效。然而,并没有太多的实验证据表明这些突变对第 1 代 EGFR-TKI 敏感,而对第 3 代 EGFR-TKI 的敏感性更是未知。本研究通过体外实验证实了少见的 *EGFR P733L* 突变对第 1 代和第 3 代 EGFR-TKI 都敏感,为少见 *EGFR* 突变进行靶向治疗提供了实验证据。

EGFR P733L 是 19 外显子的少见点突变,结构和激酶活性未知,在对第 1 代 EGFR-TKIs 治疗有效的 2 例肺腺癌患者中检测到此突变^[20]。本研究通过 MTT 和平板克隆实验证实 *EGFR P733L* 和 *EGFR L858R* 对第 1 代 EGFR-TKI 的敏感性相似,并且也都对第 3 代 EGFR-TKI 敏感。此外,EGFR-TKI 能够抑制 *EGFR P733L* 激酶活性,表明 *EGFR P733L* 与第 1 代和第 3 代 EGFR-TKI 都有较强的亲和性。

Caspase-3 是凋亡途径中的关键分子之一,其激活表明凋亡已进入不可逆阶段。PARP 剪切被认为是凋亡性细胞死亡的常见标志物。EGFR-TKI 能够诱导含有 *EGFR* 敏感突变的肺癌细胞发生凋亡^[21]。因此,检测了在含有 *EGFR P733L* 少见突变肺癌细胞中,第 1 代和第 3 代 EGFR-TKI 诱导细胞凋亡的水平,结果发现第 1 代和第 3 代 EGFR-TKI 处理后,剪切的

PARP 和 Caspase-3 降解的水平显著增加,表明 EGFR-TKI 同样促进了 *EGFR P733L* 少见突变肺癌细胞发生凋亡。

综上所述,第 1 代和第 3 代 EGFR-TKI 能够抑制 *EGFR P733L* 少见突变肺癌细胞的活性,导致凋亡增加和迁移抑制,对扩大 EGFR-TKI 在人群中的应用具有潜在的临床价值。

参考文献

- [1] JI H B, LI D N, CHEN L, et al. The impact of human *EGFR* kinase domain mutations on lung tumorigenesis and *in vivo* sensitivity to *EGFR*-targeted therapies[J]. *Cancer Cell*, 2006, 9(6): 485-495.
- [2] MOK T S, WU Y L, THONGPRASERT S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(10): 947-957.
- [3] ZHOU C C, WU Y L, CHEN G Y, 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[J]. *Lancet Oncol*, 2011, 12(8): 735-742.
- [4] SHI Y K, AU J S K, THONGPRASERT S, et al. A prospective, molecular epidemiology study of *EGFR* mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER)[J]. *J Thorac Oncol*, 2014, 9(2): 154-162.
- [5] SHARMA S V, BELL D W, SETTLEMAN J, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(3): 169-181.
- [6] MOK T S, WU Y L, AHN M J, et al. Osimertinib or platinum-pemetrexed in *EGFR* T790M-positive lung cancer[J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(7): 629-640.
- [7] GOSS G, TSAI C M, SHEPHERD F A, et al. Osimertinib for pretreated *EGFR* Thr790Met-positive advanced non-small-cell lung cancer (AURA2): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study[J]. *Lancet Oncol*, 2016, 17(12): 1643-1652.
- [8] SORIA J C, OHE Y, VANSTEENKISTE J, et al. Osimertinib in untreated *EGFR*-mutated advanced non-small-cell lung cancer[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(2): 113-125.
- [9] PLANCHARD D, BOYER M J, LEE J S, et al. Postprogression outcomes for osimertinib versus standard-of-care *EGFR*-TKI in patients with previously untreated *EGFR*-mutated advanced non-small cell lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(7): 2058-2063.
- [10] REUNGWETWATTANA T, NAKAGAWA K, CHO B C, et al. CNS response to osimertinib versus standard epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with untreated *EGFR*-mutated advanced non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(33): 3290-3297.
- [11] LAURIE S A, GOSS G D. Role of epidermal growth factor receptor inhibitors in epidermal growth factor receptor wild-type non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(8): 1061-1069.
- [12] KLUGHAMMER B, BRUGGER W, CAPPUZZO F, et al. Examining treatment outcomes with erlotinib in patients with advanced non-small cell lung cancer whose tumors harbor uncommon *EGFR* mutations[J]. *J Thorac Oncol*, 2016, 11(4): 545-555.
- [13] JOHN T, TAYLOR A, WANG H, et al. Uncommon *EGFR* mutations in non-small-cell lung cancer: a systematic literature review of prevalence and clinical outcomes[J]. *Cancer Epidemiol*, 2022, 76: 102080.

(下转第 782 页)