

· 论 著 ·

# 奥希替尼治疗吉非替尼诱导的 T790M 突变型 NSCLC 的体外研究

王立民, 张丹, 张盼盼, 黄艳, 刘晨, 王红阳

华北理工大学附属医院呼吸科, 河北 唐山 063000

**摘要:** **目的** 探讨新型靶向药物奥希替尼对非小细胞肺癌(NSCLC)T790M 突变细胞株体外活性的作用,指导临床 NSCLC 患者用药选择。**方法** 体外培养人肺腺癌细胞株 NCI-H1650,应用吉非替尼诱导细胞产生获得性耐药,成功建立耐药细胞株 NCI-H1650/GR,分别应用不同浓度吉非替尼和奥希替尼体外杀伤耐药细胞株,比较两种药物对耐药细胞株抑制率等指标。**结果** 聚合酶链式反应-高分辨率融解曲线分析(PCR-HRMA)方法发现吉非替尼诱导敏感细胞株 NCI-H1650 获取了 T790M 突变耐药细胞株 NCI-H1650/GR;MTT 法显示,在不同药物浓度下,奥希替尼对 NCI-H1650/GR 细胞的抑制率均明显高于吉非替尼,且均随药物浓度增加,抑制率上升;在各时间节点和不同药物浓度下活细胞数奥希替尼均明显低于吉非替尼。**结论** 奥希替尼可能成为第一代表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂治疗失败的且具有 T790M 突变 NSCLC 患者的不错选择。

**关键词:** 奥希替尼; 吉非替尼; 表皮生长因子受体; 酪氨酸激酶抑制剂; 非小细胞肺癌

**中图分类号:** R 734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2019)02-0169-04

## Effect of osimertinib on gefitinib induced T790M mutant type NSCLC in vitro

WANG Li-min, ZHANG Dan, ZHANG Pan-pan, HUANG Yan, LIU Chen, WANG Hong-yang

Department of Respiration, Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China

Corresponding author: HUANG Yan, E-mail: amanda2003sea@163.com

**Abstract: Objective** To explore the effect of novel targeted drug osimertinib on activity of non-small cell lung cancer (NSCLC) T790M mutant cell line in vitro to guide the clinical medication selection of NSCLC patients. **Methods** Human lung adenocarcinoma cell line NCI-H1650 cells were cultured in vitro and acquired drug-resistant was produced by induction of gefitinib, and thus the drug-resistant cell line NCI-H1650/GR was successfully built. Different concentrations of gefitinib and osimertinib were used to kill drug-resistant cell lines in vitro. The inhibition rates on drug-resistant cell lines and other indicators of two drugs were compared. **Results** Polymerase chain reaction-high resolution melting analysis (PCR-HRMA) showed that the sensitive cell line NCI-H1650 cells were induced to T790M mutant drug-resistant cell line NCI-H1650/GR cells by gefitinib. Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay showed that under different concentrations of drugs, the inhibition rates of osimertinib on NCI-H1650/GR cells were significantly higher than those of gefitinib, and the inhibition rates increased with the increase of drug concentration for both two drugs. At different time points and different drug concentrations, the numbers of alive cells for osimertinib were significantly lower than those for gefitinib. **Conclusion** Osimertinib may be a good choice for NSCLC patients with T790M mutant and treatment failure of tyrosine kinase inhibitors.

**Key words:** Osimertinib; Gefitinib; Epidermal growth factor receptor; Tyrosine kinase inhibitor; Non-small cell lung cancer

**Fund programs:** Key Technology Research Project of Hebei Provincial Commission of Health and Family Planning (ZD20140302); Tangshan City Science and Technology Project (12140209A-23)

在中晚期非小细胞肺癌(NSCLC)领域中,近年来最重要的研究进展是肺癌驱动基因及与分子靶向

治疗的研究。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)基因是 NSCLC 的经典驱动基

因,对于不可手术切除的非小细胞肺癌,EGFR 基因突变检测已成为临床医生常规治疗选择。PIONEER 研究显示,51.4% 亚裔肺腺癌患者伴有 EGFR 敏感突变,在非吸烟肺腺癌患者中更是高达 60%<sup>[1]</sup>。因此,EGFR-酪氨酸激酶抑制剂(TKIs)已成为 EGFR 基因突变型晚期 NSCLC 一线治疗方法。更多前瞻性临床研究结果证实 EGFR-TKI 一线治疗 EGFR 突变型晚期 NSCLC 患者在客观缓解率(objective response rate, ORR)和无疾病进展时间(progression free survival, PFS)方面均显著优于传统含铂两药联合方案<sup>[2-10]</sup>,充分奠定了 EGFR-TKI 在 EGFR 敏感突变型 NSCLC 患者中的一线治疗地位。尽管第一代 EGFR-TKIs 取得了可喜的临床疗效,但耐药问题仍不可避免的出现,多数经 EGFR-TKIs 治疗的患者会在 9~14 个月后出现获得性耐药。现有证据显示获得性耐药机制主要包括 EGFR 二次突变;旁路激活;HER2 基因扩增;Met 基因扩增<sup>[11]</sup>;肺癌病理亚型的表型转化等。其中以 EGFR 二次突变中的 T790M 突变最常见,大约占 50%<sup>[12]</sup>。而第三代 EGFR TKIs 奥希替尼对传统敏感突变以及 T790M 突变高度敏感,但对野生型 EGFR 几乎无抑制作用。在本研究中,我们选择第 19 外显子缺失突变 NSCLC 细胞株 NCI-H1650,观察细胞在吉非替尼长期反复作用下发生的生物学变化,以及发生了 T790M 突变的细胞对奥希替尼的治疗反应。

## 1 材料与方法

1.1 细胞株及试剂 人肺腺癌细胞株 NCI-H1650,购自中国科学院上海细胞库,奥希替尼、吉非替尼均为英国 AstraZeneca 公司产品,DMSO(上海久亿化学试剂有限公司)溶解,浓度为  $1 \times 10^5 \mu\text{mol/L}$ , $-20^\circ\text{C}$  保存。培养基为 90% RPMI-1640 + 10% FBS(ExCell Biology FSS500)。

### 1.2 细胞培养和吉非替尼耐药模型建立

1.2.1 耐药细胞株培养建立 应用 RPMI-1640 完全培养基(含 10% 胎牛血清)在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度条件下培养人肺腺癌细胞株 NCI-H1650,经消化、传代肿瘤细胞呈单层贴壁生长。在逐步递增吉非替尼浓度并间歇作用下,诱导产生获得性耐药细胞株 NCI-H1650/GR。

1.2.2 人肺腺癌细胞株 NCI-H1650 和耐药细胞株 NCI-H1650/GR 基因突变检测 应用聚合酶链式反应-高分辨率融解曲线分析(polymerase chain reaction-high resolution melting analysis,PCR-HRMA)方法分别检测 NCI-H1650 和 NCI-H1650/GR 细胞 EGFR

18~21 外显子。

### 1.3 MTT 法检测细胞抑制率和耐药指数

1.3.1 细胞接种及培养 应用 0.25% 胰蛋白酶与 0.02% EDTA 混合液处理呈对数生长期的 NCI-H650 和 NCI-H1650/GR 细胞,用 RPMI-1640 培养基调整细胞浓度为  $3 \times 10^4/\text{ml}$ ,按 100  $\mu\text{l}$ /孔,接种于 96 孔板内,放入  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度的孵育箱中培养 24 h。

1.3.2 加药 用 RPMI-1640 完全培养基倍比稀释吉非替尼、奥希替尼,浓度从 200  $\mu\text{mol/L}$  到 6.25  $\mu\text{mol/L}$ 。在实验组各孔中加入稀释好的药液 100  $\mu\text{l}$ ,使药物浓度从 100  $\mu\text{mol/L}$  开始直到 3.125  $\mu\text{mol/L}$  结束,再将培养板放入孵育箱培养 72 h。

1.3.3 酶标仪比色 将培养板每孔中加入 MTT (5 mg/ml)20  $\mu\text{l}$ ,再次培养箱孵育 4 h 终止培养,3 400 rpm 离心 15 min,弃去上清后加入 150  $\mu\text{l}$  二甲亚砜(DMSO),振荡溶解后用酶标仪检测各孔 OD 值,波长选择 492 nm。

1.3.4 计算耐药指数 以药物浓度为横轴,抑制率为纵轴,做为量-效曲线,求得半数抑制率(IC<sub>50</sub>),耐药指数(RI) = 耐药细胞 IC<sub>50</sub>/亲本细胞 IC<sub>50</sub>。

### 1.4 耐药细胞株 NCI-H1650/GR 的奥希替尼作用生长抑制曲线

1.4.1 接种细胞 应用 0.25% 胰蛋白酶与 0.02% EDTA 混合液处理呈对数生长期的 NCI-H1650/GR 细胞,用 RPMI-1640 培养基调整细胞浓度为  $1 \times 10^4/\text{ml}$ ,按 1.5 ml/孔,接种于 12 孔板。

1.4.2 加药 根据吉非替尼和奥希替尼浓度将 NCI-H1650/GR 细胞分别分为 3 组,即 15、30、60  $\mu\text{mol/L}$  三组,每组 12 个孔。按照分组每孔加入不同终浓度的吉非替尼和奥希替尼,然后放入培养箱中培养。

1.4.3 计数活细胞 应用台盼蓝染色细胞,血细胞计数板分别计数未蓝染的细胞,每孔计数 3 次,取平均值作为每孔最终的细胞数,每 24 小时计数细胞存活数,连续计数 5 d。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间均数比较用 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。通过机率单位加权回归法(Bliss 法)计算 IC<sub>50</sub>。

## 2 结果

2.1 体外吉非替尼耐药细胞株 NCI-H1650/GR 培养及建立

**2.1.1 MTT 法检测细胞抑制率和耐药指数** 细胞株 NCI-H1650 经过 10 个月吉非替尼体外诱导耐药培养, 获得了耐药细胞株 NCI-H1650/GR。MTT 检测结果提示, 随着药物浓度的增加, 吉非替尼对 NCI-H1650 细胞和 NCI-H1650/GR 细胞的抑制率上升, 绘制量-效曲线图(图 1) 并求得 NCI-H1650 细胞和 NCI-H1650/GR 细胞的 IC<sub>50</sub> 分别为 17.61 μmol/L 和 38.570 μmol/L; NCI-H1650/GR 细胞对吉非替尼的耐药指数为 2.190。

**2.1.2 耐药细胞株 NCI-H1650/GR 对吉非替尼作用生长抑制曲线** 以时间为横轴, 细胞株活细胞数为纵轴绘制生长抑制曲线(图 2), 由图可见, 在相同作用时间内, 随着吉非替尼药物浓度增加, 细胞株 NCI-H1650 和 NCI-H1650/GR 存活细胞数均减少。在第 1 天, 初始剂量吉非替尼(15 μmol/L) 作用下, 两组细胞株活细胞数均降低, 但在各时间节点和不同药物浓度下活细胞数耐药细胞株 NCI-H1650/GR 均明显高于 NCI-H1650 细胞株。

**2.1.3 细胞株 EGFR 基因突变检测结果** 应用 PCR-HRMA 方法分别检测 NCI-H1650 和 NCI-H1650/GR 细胞 EGFR 18~21 外显子, 发现 NCI-H1650 细胞株为 19 外显子突变, 无 T790M 突变, 而 NCI-H1650/GR 细胞株除 19 外显子突变外还出现 20 外显子 T790M 突变。

**2.2 奥希替尼对耐药细胞株 NCI-H1650/GR 的抑制率** MTT 法检测奥希替尼对耐药细胞株 NCI-H1650/GR 抑制率。结果提示, 在不同药物浓度下, 奥希替尼对 NCI-H1650/GR 细胞的抑制率均明显高于吉非替尼, 且两组均随药物浓度增加, 抑制率上升(图 3)。

**2.3 奥希替尼对耐药细胞株 NCI-H1650/GR 的作用生长抑制曲线** 以时间为横轴, 细胞株活细胞数为纵轴绘制生长抑制曲线(图 4), 由图可见, 在相同作用时间内, 随着药物浓度增加, NCI-H1650/GR 存活细胞数均减少。在第 1 天, 初始剂量奥希替尼和吉非替尼(15 μmol/L) 作用下, 两组细胞株活细胞数均降低, 但在各时间节点和不同药物浓度下活细胞数奥希替尼组均明显低于吉非替尼组。

### 3 讨论

吉非替尼(Gefitinib, 商品名易瑞沙) 是世界上第一个 EGFR-TKIs。一项多中心、开放性研究显示, 对于 EGFR 突变阳性转移性 NSCLC 患者, 吉非替尼单药口服治疗后客观缓解率为 70%, 中位缓解期 8.3 个月, 其结果明显优于含铂类一线化疗药物<sup>[13]</sup>。对于吉非替尼与一线化疗药物的有效性和安全性问题,

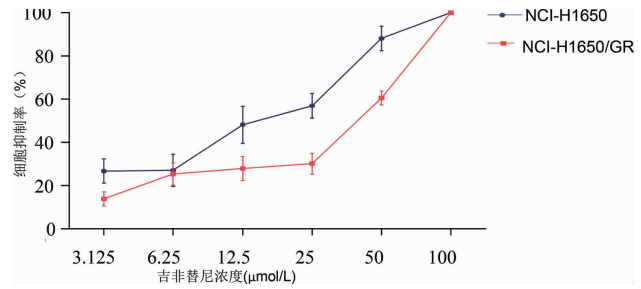


图 1 吉非替尼对亲本株及耐药株的抑制

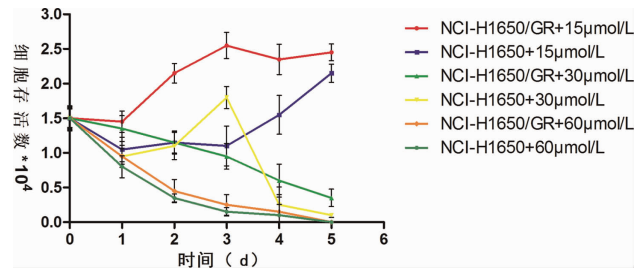


图 2 吉非替尼干预下的亲本株及耐药株生长抑制曲线

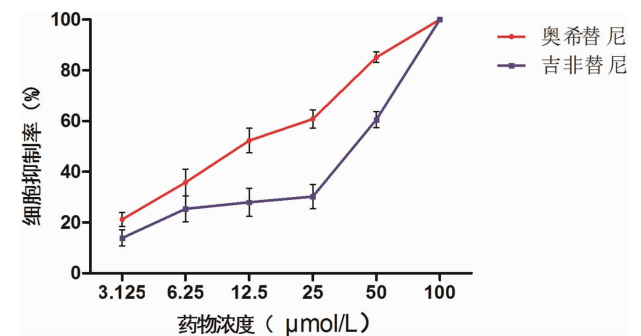


图 3 奥希替尼对耐药细胞株 NCI-H1650/GR 抑制率

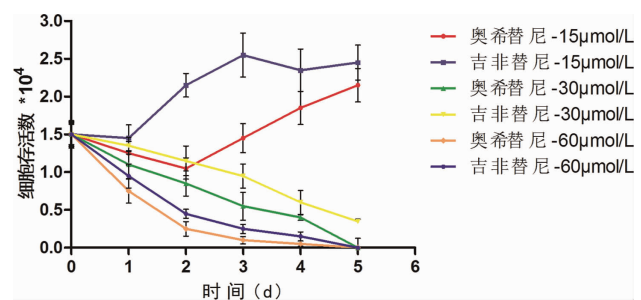


图 4 奥希替尼对耐药细胞株 NCI-H1650/GR 生长抑制曲线

日本开展一项 III 期临床研究入组 230 名 EGFR 突变且未经过化疗的转移性 NSCLC 患者, 随机接受吉非替尼或卡铂/紫杉醇治疗, 吉非替尼组的中位 PFS 为 10.8 个月, 客观缓解率 73.7%, 中位生存时间 30.5 个月, 较化疗组均有明显优势<sup>[14]</sup>。贵永贤等<sup>[15]</sup>亦报道一线治疗 EGFR 突变晚期 NSCLC 患者吉非替尼更优于多西他赛联合顺铂化疗方案。尽管第一代 EGFR-TKIs 临床疗效确切, 但仍会出现耐药问题, 很快疾病再次进展。

奥希替尼(Osimertinib) 是针对第一代 EGFR-TKIs 耐药问题研制的新型靶向药物, AURA-3 III 期临床研究显示, 在既往接受过第一代 EGFR-TKIs 治疗

的肺癌患者中,筛选出疾病进展后经基因突变检测确定存在 T790M 获得性突变的患者,给予奥希替尼治疗,其 ORR 高达 71%,PFS 为 10.1 个月<sup>[16]</sup>。

针对奥希替尼治疗 NSCLC 患者的研究结果较少,目前临床数据有限,本研究应用人肺腺癌细胞株 NCI-H1650 经过体外培养,并给予吉非替尼刺激产生第一代 EGFR-TKIs 细胞株 NCI-H1650/GR,分离鉴定耐药细胞株 NCI-H1650/GR,继而给予奥希替尼体外抑制试验,结果表明,人肺腺癌细胞株 NCI-H1650 为 19 外显子基因突变细胞,可以作为吉非替尼治疗的敏感靶向细胞,细胞株 NCI-H1650 经过吉非替尼 10 个月的诱导培养后出现获得性耐药,经基因突变检测筛选出 T790M 突变细胞株作为耐药细胞株,经过多次提纯优化培养后成功获得了吉非替尼获得性耐药细胞株 NCI-H1650/GR,将耐药细胞株分成两组,一组继续接受吉非替尼抑制试验,另一组接受奥希替尼抑制试验,通过观察抑制率和生长抑制曲线,我们发现奥希替尼能很好抑制耐药细胞株 NCI-H1650/GR 生长,其结果印证了 AURA-3 III 期临床研究。

#### 参考文献

- [1] Shi Y, Li J, Zhang S, et al. Molecular epidemiology of EGFR mutations in asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology-Mainland China Subset Analysis of the PIONEER study[J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0143515.
- [2] Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(10): 947-957.
- [3] Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(2): 121-128.
- [4] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(25): 2380-2388.
- [5] Zhou C, Wu YL, Chen G, 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 multi-centre, open-label, randomised, phase 3 study[J]. *Lancet Oncol*, 2011, 12(8): 735-742.
- [6] Han JY, Park K, Kim SW, et al. First-SIGNAL: first-line single-agent irressa versus gemcitabine and cisplatin trial in never-smokers with adenocarcinoma of the lung[J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(10): 1122-1128.
- [7] Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Spanish lung cancer group in collaboration with groupe Francais de pneumo-cancerologie and associazione Italiana oncologis toracica. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EUR-TAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13(3): 239-246.
- [8] Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N, et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(27): 3327-3334.
- [9] Wu YL, Zhou C, Hu CP, et al. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(2): 213-222.
- [10] Yang JCH, Wu YL, Schuler M, et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials[J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(2): 141-151.
- [11] Morgillo F, Della Corte CM, Fasano M, et al. Mechanisms of resistance to EGFR-targeted drugs: lung cancer[J]. *ESMO Open*, 2016, 1(3): e000060.
- [12] Wang S, Song Y, Yan F, et al. Mechanisms of resistance to third-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors[J]. *Front Med*, 2016, 10(4): 383-388.
- [13] Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(2): 121-128.
- [14] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(25): 2380-2388.
- [15] 贵永贤, 田国防. 吉非替尼治疗表皮生长因子受体突变晚期非小细胞肺癌的临床研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2015, 31(16): 1597-1599.
- [16] Mok TS, Wu YL, Ahn MJ, et al. Osimertinib or platinum-pemetrexed in EGFR T790M-positive lung cancer[J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(7): 629-640.

收稿日期: 2018-07-01 编辑: 王娜娜