

# 自噬与非小细胞肺癌EGFR-TKI耐药的研究进展

谢雨琼 李春春 曹江\*

(浙江大学医学院附属第二医院, 临床研究中心, 杭州 310009)

**摘要** 肺癌是目前世界上发病率和死亡率均居首位的恶性肿瘤, 其中大多数是非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)。在对NSCLC的治疗中, 酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)的应用已成为靶向表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的重要治疗手段。但由于获得性耐药问题的出现, 使得这类靶向药物的作用受到限制。近年来大量研究表明, 除了基因突变等分子水平的因素外, 细胞自噬(autophagy)在非小细胞肺癌EGFR-TKI靶向药物耐药中也发挥了重要的作用。该文重点就自噬与非小细胞肺癌EGFR-TKI靶向药物耐药的研究进展进行分析, 旨在为解决自噬相关的EGFR-TKI耐药提供更多思路。

**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; 获得性耐药; 自噬

## Advances of Autophagy and EGFR-TKI Drug Resistance in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer

Xie Yuqiong, Li Chunchun, Cao Jiang\*

(Clinical Research Center, the Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China)

**Abstract** Lung cancer is currently the top malignancy with the highest morbidity and mortality worldwide, most of which belongs to non-small cell lung cancer (NSCLC). Application of tyrosine kinase inhibitors (TKIs) has become an important therapeutic approach targeting epidermal growth factor receptor (EGFR) for treatment of NSCLC patients. However, the arising acquired-resistance significantly limits the efficacy of these targeting agents. Besides factors at molecular level such as genetic mutations, a number of investigations in recent years showed that autophagy played an important role in acquired-resistance to EGFR-TKIs of NSCLC. In this review, we focus on summarizing recent advances in autophagy and acquired-resistance to EGFR-TKIs of NSCLC, aiming to provide more ideas to overcome the autophagy-associated acquired-resistance to EGFR-TKI in NSCLC treatment.

**Keywords** non-small cell lung cancer; epidermal growth factor receptor; tyrosine kinase inhibitor; acquired-resistance; autophagy

最新研究报告显示, 2015年我国肺癌发生总数预计为733 300人, 肺癌死亡总数预计为610 200人, 占所有癌症新发病例(17.1%)和死亡病例(21.7%)首位, 其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占肺癌发生总数的85%左右, 这些情况在全球范围

内也类似<sup>[1-2]</sup>。针对性地应用靶向表皮细胞生长因子受体的酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI)药物治疗已成为晚期NSCLC的重要治疗手段, 但不可避免地在治疗6~12个月后会出現获得性耐药<sup>[3]</sup>, 严重影

收稿日期: 2016-04-19 接受日期: 2016-06-12

国家自然科学基金(批准号:30271450、81172516)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0571-87315201, E-mail: caoj@zju.edu.cn

Received: April 19, 2016 Accepted: June 12, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30271450, 81172516)

\*Corresponding author. Tel: +86-571-87315201, E-mail: caoj@zju.edu.cn

网络出版时间: 2016-09-01 15:59:50 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160901.1559.006.html>

响其治疗效果,使得NSCLC患者5年生存率仅约为15%,晚期NSCLC中位生存期仅为10~12个月<sup>[4]</sup>。目前,EGFR-TKI耐药机制研究主要集中于EGFR 20号外显子T790M二次突变;受体酪氨酸激酶补偿效应,包括肝细胞生长因子受体(hepatocyte growth factor receptor, MET)、胰岛素样生长因子受体1(insulin-like growth factor 1 receptor, IGF-1R)、人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2);激活促血管生成janus激酶2(janus kinase 2, JAK2)-信号转导子和转录激活子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)信号途径;上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)表型改变等<sup>[5]</sup>。针对EGFR二次突变及其他补偿途径激活引起的获得性耐药,第二代不可逆EGFR-TKI及相关抑制剂的应用在临床上也已取得了一定的疗效,但总体上还是不能令人满意,因此需要深入研究更多涉及获得性耐药的相关机制<sup>[6]</sup>。

近年来,在应用吉非替尼、厄洛替尼等EGFR-TKI类药物治疗非小细胞肺癌时多数伴随自噬现象,使得自噬在EGFR-TKI获得性耐药中发挥的作用逐渐被人们认知。因此,本文从自噬角度出发,就EGFR-TKI药物治疗非小细胞肺癌耐药的研究进展进行综述,为克服EGFR-TKI耐药寻求新的解决方案。

## 1 自噬与NSCLC EGFR-TKI获得性耐药

### 1.1 自噬的双重作用

自噬是进化过程中相对保守的由溶酶体介导的细胞自我消化过程,可以清除细胞体内异常蛋白质,吞噬受损细胞器,防止活性氧(reactive oxygen species, ROS)介导的DNA损伤,保持细胞稳态,防止癌症发生<sup>[7-8]</sup>。

自噬另一方面的作用与促进细胞死亡相关,具体有两种方式。一种方式是,在凋亡功能完善的细胞中,自噬小体作为胱冬肽酶(Caspase)-8的活化平台,胱冬肽酶-8与死亡域相关蛋白(Fas-associated protein with death domain, FADD)、自噬相关蛋白5(autophagy-related protein 5, ATG5)形成复合物,以自噬接头蛋白1(sequestosome 1, SQSTM1)-ATG5-FADD依赖性方式被激活促进凋亡发生<sup>[9]</sup>。一些自噬相关分子也可以直接促进凋亡的发生,如ATG5经钙调蛋白酶依赖性剪切后转移到线粒体上,与凋

亡抑制蛋白(B-cell lymphoma-extra large, Bcl-X<sub>L</sub>)形成复合物,引起内源性细胞凋亡。ATG5的C-端与FADD结合,引起胱冬肽酶依赖性的细胞凋亡。同时,ATG5参与的细胞自噬为凋亡提供能量,帮助磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PtdSer)、溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidylcholine, LPC)暴露,便于吞噬细胞识别,清除凋亡细胞,防止细胞执行坏死程序。自噬促进细胞死亡的第二种方式,是在凋亡相关蛋白(bcl-2-associated X protein, BAX)/(bcl-2 homologous antagonist killer, BAK)功能缺陷细胞中,当细胞受到药物刺激后,大量自噬的发生使细胞关键组分被降解,无法完成物质的循环过程,造成细胞毁灭性的伤害,这个过程与c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinases, JNK)途径活化相关,称为自噬性细胞死亡或II型程序性细胞死亡。沉默自噬相关基因、添加自噬抑制剂可抑制自噬性细胞死亡,而胱冬肽酶抑制剂Z-VAD-FMK无法挽救细胞死亡<sup>[10]</sup>。

### 1.2 EGFR-TKI获得性耐药中的自噬调节信号转导

在肿瘤放疗、化疗及靶向治疗过程中,由自噬降解的细胞器及蛋白质可以重新被作为原料和能量来源,帮助细胞适应压力环境,促进细胞存活,与肿瘤耐药相关<sup>[11-13]</sup>。

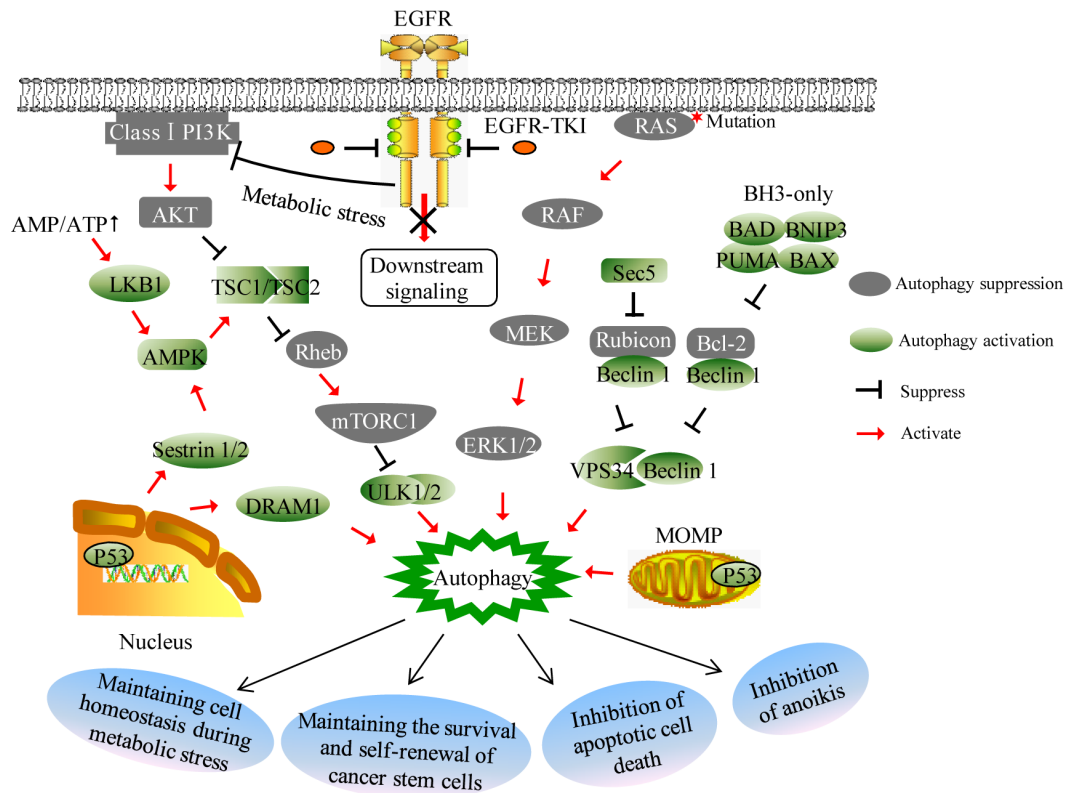
在EGFR-TKI类药物吉非替尼、厄洛替尼等给药过程中,均伴随保护性自噬现象。Tang等<sup>[14]</sup>通过长期吉非替尼处理获得的耐药细胞体内自噬水平明显提高。自噬抑制剂能提高吉非替尼对细胞的杀伤能力,促进凋亡发生。Li等<sup>[15-16]</sup>报道,厄洛替尼在治疗EGFR-TKI敏感突变型NSCLC时,自噬通路肿瘤抑制因子P53(tumor protein p53)-腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)被活化,从而引起保护性自噬,使细胞耐药。敲除自噬相关基因ATG5或Beclin 1[又称ATG6(autophagy-related gene 6)]后,细胞对厄洛替尼的敏感性显著增加。Liu等<sup>[17]</sup>发现,吉非替尼与化疗药物顺铂联用,并未表现出协同效果,未能明显增强对NSCLC的杀伤能力。这个现象与两种药物引发的自噬有明显关联,加入自噬抑制剂后,可显著增加细胞凋亡。Sugita等<sup>[18]</sup>也报道,大环内酯类抗菌素克拉霉素通过抑制NSCLC自噬流,引起内质网应激,明显提高吉非替尼药物敏感性。

靶向EGFR的TKI药物治疗引起的保护性自噬,是癌细胞在EGFR下游信号通路被阻断的情况下,多条自噬信号通路共同调节,如磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)-mTORC1、P53-AMPK-mTORC1、EGFR-Rubicon(RUN and cysteine rich domain containing beclin 1 interacting protein)-Beclin 1等,最终导致的EGFR-TKI获得性耐药,而且自噬在调控肿瘤干细胞干性维持和存活、抑制程序性凋亡、抑制失巢凋亡促进肿瘤转移上也发挥着一定的作用(图1)。

**1.2.1 PI3K-AKT-mTORC1** PI3K-AKT-mTORC1是最重要的自噬调节通路。营养充足条件下,活化的EGFR可激活下游I型PI3K及AKT, AKT磷酸化TSC2, 导致TSC1/TSC2复合物不稳定, mTORC1处

于磷酸化状态,从而抑制自噬发生。当吉非替尼或厄洛替尼治疗NSCLC后, EGFR活化被抑制, 导致I型PI3K及AKT活性下降, TSC1/TSC2复合物维持其GTP酶激活蛋白(GTPase activating protein, GAP)活性, 负调控Rheb, 使Rheb-GTP转变为Rheb-GDP, 抑制mTORC1磷酸化<sup>[19]</sup>。活化的ULK1/2复合物进一步激活由VPS34、Beclin 1、ATG14L、磷脂酰肌醇3-激酶调节亚基4(phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 4, 也称为p150)组成的III型PI3K复合物, 参与早期自噬体的形成, 促进自噬发生, 为代谢压力下的细胞存活提供能量来源<sup>[20]</sup>。

**1.2.2 P53-AMPK-mTORC1-ULK1** 正常生理状态下, P53位于细胞质中, 通过抑制家族相互作用蛋白200(family interactive protein 200, FIP200), 阻碍ULK



TSC1/2: 结节性硬化蛋白1/2; Rheb: RAS脑组织同源类似物; ULK1/2: unc-51样自噬激活激酶1/2; VPS34: 磷脂酰肌醇3-激酶; AMP: 腺苷酸; ATP: 三磷酸腺苷; LKB1: 肝激酶B1; Sestrins 1/2: P53调节蛋白; DRAM1: DNA损伤相关自噬调节子1; Bcl-2: B淋巴细胞瘤-2; BAD: Bcl-2相关死亡启动蛋白; PUMA: p53正向细胞凋亡调控因子; BNIP3: Bcl-2和腺病毒E1B 19 kDa相互作用蛋白3; SEC5: 外排体复合物亚基5; RAS: 大鼠肉瘤蛋白; RAF: 快速生长纤维肉瘤蛋白; MEK: MAPK激酶; ERK1/2: 细胞外调节蛋白激酶1/2; MOMP: 线粒体外膜通透性改变。

TSC1/2: tuberous sclerosis complex protein 1/2; Rheb: RAS homolog enriched in brain; ULK1/2: unc-51 like autophagy activating kinase1/2; VPS34: phosphatidylinositol 3-kinase; AMP: adenosine monophosphate; ATP: adenosine triphosphate; LKB1: liver kinase B1; Sestrins 1/2: p53-regulated protein related gene; DRAM1: DNA damage regulated autophagy modulator 1; Bcl-2: B-cell lymphoma-2; BAD: Bcl-2-associated death promoter; PUMA: p53 up-regulated modulator of apoptosis protein; BNIP3: Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3; SEC5: subunit of exocyst complex 5; RAS: rat sarcoma; RAF: rapidly accelerated fibrosarcoma; MEK: mitogen-activated protein kinase kinase; ERK1/2: extracellular regulated protein kinase 1/2; MOMP: mitochondrial outer membrane permeabilization.

图1 NSCLC EGFR-TKI治疗中的自噬调节信号转导

Fig.1 Autophagy signaling in EGFR-TKI treatment of NSCLC



复合物活化, 对自噬起到负调控作用。当NSCLC接受EGFR-TKI治疗后, 面临能量匮乏、DNA损伤等压力情况下, 胞质型P53转移至细胞核中, 与自噬相关基因的启动子区域结合, 上调促自噬基因转录水平, 如*Sestrins 1/2*、*AMPK*、磷酸酶及张力蛋白同源基因(phosphatase and tensin homolog, *PTEN*)、*DRAM1*。代谢压力引起的AMP/ATP升高也可以通过LKB1活化AMPK<sup>[15]</sup>。一方面, AMPK可直接磷酸化mTOR调节相关蛋白(regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin, RAPTOR); 另一方面, AMPK可磷酸化TSC2, 增强TSC1/TSC2的GTP酶激活蛋白活性, 通过负调控Rheb而抑制mTORC1复合物活性<sup>[21]</sup>。mTORC1功能被抑制后, 减少其对ULK1 Ser757的磷酸化, 从而解除对AMPK与ULK1结合位点占位, 促进了AMPK对ULK1 Ser317和Ser777的磷酸化<sup>[22]</sup>。经磷酸化活化的ULK1进一步可磷酸化ATG14L-VPS34-Beclin 1复合物中Beclin 1的Ser14, 激活III型PI3K复合物, 促进自噬的发生<sup>[23-24]</sup>。此外, 一部分胞质P53也可以转移到线粒体基质, 与亲环素D(cyclophilin D)一起促进线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)开放, 低强度的mPTP开放引起线粒体自噬, 用于降解功能障碍的线粒体, 促进能量循环利用, 使细胞在压力情况下得以存活。核内P53还可以调控Bcl-2家族蛋白质水平, 抑制*Bcl-2*、*Bcl-X<sub>L</sub>*、髓细胞白血病基因-1(myeloid cell leukemia-1, *Mcl-1*)转录, 并上调BH3蛋白质BAD、BAX、PUMA、BNIP3的水平, 进一步促进自噬的发生<sup>[9]</sup>。

**1.2.3 EGFR-Rubicon-Beclin 1** 无论是被配体激活的野生型EGFR, 还是突变活化型EGFR, 都能导致Beclin 1(Tyr229、Tyr233、Tyr352)多位点磷酸化, 从而促进其与自噬抑制因子Bcl-2和Rubicon结合, 抑制自噬发生<sup>[25]</sup>。当吉非替尼或厄洛替尼处理NSCLC细胞后, 未活化的EGFR经P38-丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)和小窝蛋白介导发生内吞后, 在SEC5作用下与Rubicon结合, 降低Rubicon与Beclin 1结合能力, 促进Beclin 1与VPS34自噬复合物形成, 导致自噬的发生<sup>[26]</sup>。

**1.2.4 RAS/RAF/MEK/ERK1/2** RAS调节自噬具有双重性。在正常组织中, RAS通过激活I型PI3K抑制自噬发生。而分析厄洛替尼耐药的NSCLC, 发现存在*N-RAS*突变或*RAF1*拷贝数增加, 它们可以通过

RAS/RAF/MEK/ERK1/2途径引起自噬, 维持细胞存活及代谢<sup>[27]</sup>。

**1.2.5 其他自噬调节信号通路** 除了上述明确参与NSCLC EGFR-TKI耐药的自噬调节通路以外, 以下信号通路可能也与自噬引起的耐药相关, 如NOX4-ROS和JNK1-Bcl-2-Beclin 1等。厄洛替尼治疗头颈部肿瘤时, 上调还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶4(NADPH oxidase 4, NOX4)表达, 提高H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>介导的氧化应激, 从而引起细胞保护性自噬, 产生耐药<sup>[28-29]</sup>。在EGFR-TKI造成的代谢压力条件下, JNK1被活化。一方面, JNK1通过磷酸化Bcl-2(Thr69、Ser70、Ser87)释放出游离Beclin 1, 激活自噬发生; 另一方面, JNK1转移至细胞核, 激活转录因子亚基(jun proto-oncogene, c-Jun)/(fos proto-oncogene, c-Fos), 增强对*Beclin 1*转录活性。同时, 被JNK1磷酸化的转录因子叉头框蛋白(forkhead box O proteins, FoxOs), 由胞质转移至核内, 提高*ATG*相关基因的转录能力<sup>[30]</sup>。以上信号通路虽然在NSCLC EGFR-TKI耐药中未有报道, 但对后续耐药机制的研究具有一定的参考价值。

**1.2.6 自噬参与肿瘤干细胞干性维持和存活** 肿瘤干细胞是指具有自我复制更新能力的干细胞样癌细胞, 自噬在维持肿瘤干细胞的存活及自我更新过程中起着重要的作用<sup>[31-32]</sup>。在NSCLC、卵巢癌、食管癌、乳腺癌中, 都有报道肿瘤干细胞与肿瘤复发转移及耐药性相关<sup>[33-36]</sup>。吉非替尼治疗NSCLC细胞时, 高表达干细胞分子标记乙醛脱氢酶家族1成员A1(aldehyde dehydrogenase 1 family member A1, ALDH1A1)细胞表现出明显耐药性<sup>[37-38]</sup>。二代EGFR-TKI阿法替尼耐药的NSCLC细胞系HCC827-ACR中, 发现其过量表达ALDH1A1和ATP结合盒亚家族B成员1(ATP-binding cassette subfamily B member 1, ABCB1), 表明耐药与肿瘤干细胞的存在相关<sup>[39]</sup>。

**1.2.7 自噬抑制程序性凋亡及失巢凋亡** 自噬可以通过内吞方式降解凋亡相关蛋白质, 在一定程度上抑制EGFR-TKI引起的细胞凋亡<sup>[40]</sup>。NSCLC在EGFR-TKI处理后, 破损的线粒体外膜通透性改变会导致释放多种蛋白质, 如细胞凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)、核酸内切酶G(endonuclease G, endoG)、细胞色素C(cytochrome C)、次级线粒体源性胱冬肽酶激活剂(second mitochondria-derived activator of caspases, SMAC),

从而引起内源性凋亡<sup>[41]</sup>。自噬能选择性地吞噬受损的线粒体,减少促凋亡蛋白释放的机率,减少内源性凋亡的发生。外源性凋亡途径中关键的一步是胱冬肽酶-8的激活。一方面,自噬选择性地清除胞质中胱冬肽酶-8,抑制外源性凋亡发生。另一方面,胱冬肽酶-8还能通过活化促凋亡蛋白(Bcl-2 homology 3 interacting-domain death agonist, BID)引起线粒体外膜通透性改变,所以在一定程度上线粒体自噬可以缓解胱冬肽酶-8引起的内源性凋亡。肿瘤细胞脱离细胞外基质或与相邻细胞脱离时,会引起局部黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)信号通路异常,非受体型酪氨酸激酶(sarcoma, SRC)过度活化,最终诱导失巢凋亡发生。自噬能选择性地清除SRC,抑制失巢凋亡的发生,促进肿瘤细胞转移<sup>[9]</sup>。

## 2 自噬相关药物克服EGFR-TKI获得性耐药

### 2.1 自噬抑制剂的应用

EGFR-TKI靶向治疗曾对EGFR突变敏感型NSCLC具有显著治疗效果,但大量体内外实验表明,EGFR-TKI在治疗NSCLC时会诱发保护性自噬,引起获得性耐药最终导致疾病复发。因此,可否通过抑制自噬来克服EGFR-TKI的耐药性,提高靶向药物的治疗效果,对于攻克肿瘤靶向治疗中的耐药瓶颈具有重要的促进作用。

目前用于临床试验的自噬抑制剂主要是美国食品和药物管理局(food and drug administration, FDA)批准的原用于疟疾的治疗药物氯喹(chloroquine, CQ)和羟基氯喹(hydroxy chloroquine, HCQ)。

NCT01026844是I期临床试验,主要研究HCQ联合厄洛替尼治疗NSCLC的作用效果。该研究结果确定用于II期临床试验HCQ浓度为1 000 mg,厄洛替尼浓度为150 mg。中位无进展生存期HCQ组1.8月(95%置信区间: 0.7, 1.8), HCQ联合厄洛替尼组为2.0月(95%置信区间: 1.5, 3.8)。总生存期HCQ组9.0月(95%置信区间: 1.4, 38.5), HCQ联合厄洛替尼组为10.6月(95%置信区间: 3.6, 14.1)<sup>[42]</sup>。其他自噬抑制剂参与NSCLC治疗临床试验项目都在招募或研究进行中(表1)。

### 2.2 自噬促进剂的应用

自噬性细胞死亡又被称作II型程序性细胞死亡,当自噬超过细胞所能承受的范围,导致大量自噬小体聚集,就会促进细胞走向死亡程序。NSCLC细胞系H1299由于过量表达野生型EGFR且P53缺乏,其对EGFR-TKI敏感性较差。联合自噬促进剂雷帕霉素可明显增加细胞对厄洛替尼的敏感性,促进EGFR-TKI类药物对野生型NSCLC杀伤<sup>[43]</sup>。硫化舒林酸酰胺(sulindac sulfide amide, SSA)在治疗NSCLC时,通过抑制AKT/mTOR信号通路,引起大量细胞自噬,且不伴随聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)剪切等凋亡特征。沉默自噬相关基因ATG7可减弱SSA引起的细胞死亡,胱冬肽酶抑制剂Z-VAD-FMK作用后无法挽救细胞死亡,说明SSA是通过促进自噬发生最终导致了细胞死亡<sup>[44]</sup>。

针对靶向药物中出现的自噬现象,研究人员提出,能否通过抑制mTORC1促进自噬的方式,推动细胞走向死亡程序。目前用于临床试验的自噬促进剂主要是雷帕霉素、依维莫司、RAD001、替西

表1 自噬抑制剂治疗NSCLC

Table 1 Ongoing clinical trials targeting autophagy inhibition for non-small cell lung cancer treatment

试验编号 Clinical trials identifier	分期 Phase	自噬药物 Autophagy modulator	辅助治疗 Additional treatment	试验标题 Title
NCT01026844	I	Hydroxy chloroquine	Erlotinib	Hydroxychloroquinewith or without erlotinib in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC)
NCT00977470	II	Hydroxy chloroquine	Erlotinib	Erlotinibwith or without hydroxychloroquine in chemo-naive advanced NSCLC and (EGFR) mutations
NCT00809237	I/II	Hydroxy chloroquine	Gefitinib	Gefitinib and HCQ in metastatic NSCLC
NCT01649947	II	Hydroxy chloroquine	Paclitaxel, carboplatin, bevacizumab	Modulation of autophagy in patients with advanced/recurrent non-small cell lung cancer
NCT00728845	I/II	Hydroxy chloroquine	Bevacizumab, carboplatin, paclitaxel	Hydroxychloroquine, carboplatin, paclitaxel, and bevacizumab in recurrent advanced non-small cell lung cancer

表2 自噬促进剂治疗NSCLC

Table 2 Ongoing clinical trials targeting autophagy induction for non-small cell lung cancer treatment

试验编号 Clinical trials identifier	分期 Phase	自噬药物 Autophagy modulator	辅助治疗 Additional treatment	试验标题 Title
NCT00555256	I	Rapamycin	Sunitinib	A phase I study of sunitinib and rapamycin in advanced non-small cell lung cancer
NCT00096486	II	Everolimus	Gefitinib	Gefitinib and everolimus in treating patients with stage IIIB or stage IV or recurrent non-small cell lung cancer
NCT00456833	I	RAD001	Erlotinib	Combination of RAD001 and erlotinib in patients with advanced non-small cell lung cancer previously treated only with chemotherapy
NCT01827267	II	Temsirolimus	Neratinib	Neratinib with and without temsirolimus for patients with HER2 activating mutations in non-small cell lung cancer

罗莫司。一项II期临床试验NCT00096486招募62人(98% IV期, 吸烟者/有吸烟史, 85%腺癌)招募进组接受依维莫司5 mg及吉非替尼250 mg每天一次剂量治疗。研究发现, 8/62人症状达到部分缓解, 缓解率为13%(95%置信区间: 5%, 21%), 无进展生存期4个月, 中位生存期为12个月。其中, 5人经基因检测后不含EGFR突变, 表明症状缓解可能与依维莫司相关。同时, 依维莫司及吉非替尼联合治疗对2例含KRAS(G12F)突变的NSCLC患者有效<sup>[45]</sup>。其他自噬促进剂参与NSCLC治疗临床试验项目还在研究进行中(表2)。

### 2.3 提高自噬抑制剂专一性和高效性

CQ及其衍生物虽然可以通过抑制自噬来加强对肿瘤细胞的杀伤能力, 但作用靶点并不专一。研究表明, 其还能通过Notch1使肿瘤血管网络正常化, 增加血液灌注, 减少缺氧, 提高化疗药物的投递, 从而抑制细胞侵袭转移, 这个过程并不依赖于自噬的抑制<sup>[46]</sup>。同时, 临床试验研究也表明, 即使高剂量的HCQ也只能适度对自噬进行调节, 无法高效抑制自噬发生。3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)、LY294002, 除了抑制III型PI3K外, 还能抑制I型PI3K、mTORC1、糖原合成酶激酶3 $\beta$ (glycogen synthase kinase 3 beta, GSK3 $\beta$ )等相关蛋白激酶, 所以研发更高效、专一性的新型自噬抑制剂变得极为迫切<sup>[47]</sup>。

目前, 可针对性研究的自噬靶点有Beclin 1、ULK1、ATG4、ATG7、VPS34。通过高通量的药物筛选鉴定出的专一、高效针对VPS34的低分子量激酶抑制剂SAR405, 能与VPS34 ATP结合域特异性结合, 导致晚期内体溶酶体融合障碍, 在肾细胞癌治疗中SAR405和mTOR抑制剂依维莫司表现出协同促

进作用<sup>[48]</sup>。类似专一性针对VPS34的小分子抑制剂还包括PIK-III、VPS34-IN1, 它们对I、II型PI3K及其他相关激酶无抑制作用, 从而可以专一、高效地抑制自噬<sup>[49-50]</sup>。Lys05是CQ新型二聚体衍生物, 相比于HCQ, 能更高效、高浓度地在溶酶体聚集。体内实验表明, Lys05无论是单一治疗还是联合BARF抑制剂, 都能明显抑制自噬发生, 提高抗肿瘤的效果<sup>[51]</sup>。

### 3 总结与展望

自噬是一种正常细胞面对代谢压力环境下的自我保护机制, 而在NSCLC的EGFR-TKI靶向治疗过程中却扮演了“双刃剑”角色。一方面, 自噬降解受损的细胞器及错误折叠的蛋白质, 防止基因组不稳定性, 维持肿瘤细胞的能量代谢及干细胞存活, 与获得性耐药相关; 另一方面, 自噬又可以通过促进凋亡或自噬性细胞死亡方式使肿瘤细胞走向死亡程序。随着人们对NSCLC靶向治疗中自噬作用及机制越来越多地了解, 在今后的肿瘤治疗过程中, 希望有明确的指标来指导TKI联合自噬抑制剂及自噬促进剂的使用时机, 抑制保护性自噬发生的同时能有效地促进自噬性死亡, 克服由自噬带来的获得性耐受, 例如当凋亡功能缺陷时, 是否应推荐联合自噬促进剂的使用等。同时, 如何动态监测EGFR-TKI治疗后NSCLC内自噬发生的程度, 从而更好地指导自噬相关药物的剂量选择及疗效控制这一方面, 也非常值得进一步研究。

总之, 在第三代不可逆EGFR-TKI类药物(rociletinib, AZD9291)深入研发的基础上, 若同时也能正确认识自噬在EGFR-TKI治疗耐药过程中发生、发展及其作用机制, 联合针对性靶点的自噬相关药物, 对于克服EGFR-TKI耐药、改善NSCLC临床治



疗中出现的问题将具有重要意义。

### 参考文献 (References)

- 1 Chen W, Zheng R, Baade PD, Zhang S, Zeng H, Bray F, *et al.* Cancer statistics in China, 2015. *CA Cancer J Clin* 2016; 66(2): 115-32.
- 2 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016; 66(1): 7-30.
- 3 Obenauf AC, Zou Y, Ji AL, Vanharanta S, Shu W, Shi H, *et al.* Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression. *Nature* 2015; 520(7547): 368-72.
- 4 Liu D, Yang Y, Zhao S. Autophagy facilitates the EGFR-TKI acquired resistance of non-small-cell lung cancer cells. *J Formos Med Assoc* 2014; 113(3): 141-2.
- 5 Lin Y, Wang X, Jin H. EGFR-TKI resistance in NSCLC patients: Mechanisms and strategies. *Am J Cancer Res* 2014; 4(5): 411-35.
- 6 Juchum M, Gunther M, Laufer SA. Fighting cancer drug resistance: Opportunities and challenges for mutation-specific EGFR inhibitors. *Drug Resist Updat* 2015; 20: 12-28.
- 7 Kenific CM, Debnath J. Cellular and metabolic functions for autophagy in cancer cells. *Trends Cell Biol* 2015; 25(1): 37-45.
- 8 Liu H, He Z, Simon HU. Protective role of autophagy and autophagy-related protein 5 in early tumorigenesis. *J Mol Med (Berl)* 2015; 93(2): 159-64.
- 9 Marino G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15(2): 81-94.
- 10 Shimizu S, Yoshida T, Tsujioka M, Arakawa S. Autophagic cell death and cancer. *Int J Mol Sci* 2014; 15(2): 3145-53.
- 11 Macintosh RL, Ryan KM. Autophagy in tumour cell death. *Semin Cancer Biol* 2013; 23(5): 344-51.
- 12 Santoni M, Pantano F, Amantini C, Nabissi M, Conti A, Burattini L, *et al.* Emerging strategies to overcome the resistance to current mTOR inhibitors in renal cell carcinoma. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1845(2): 221-31.
- 13 Jutten B, Rouschop KM. EGFR signaling and autophagy dependence for growth, survival, and therapy resistance. *Cell Cycle* 2014; 13(1): 42-51.
- 14 Tang MC, Wu MY, Hwang MH, Chang YT, Huang HJ, Lin AM, *et al.* Chloroquine enhances gefitinib cytotoxicity in gefitinib-resistant nonsmall cell lung cancer cells. *PLoS One* 2015; 10(3): e0119135.
- 15 Li YY, Lam SK, Mak JC, Zheng CY, Ho JC. Erlotinib-induced autophagy in epidermal growth factor receptor mutated non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2013; 81(3): 354-61.
- 16 Li YY, Lam SK, Zheng CY, Ho JC. The effect of tumor microenvironment on autophagy and sensitivity to targeted therapy in EGFR-mutated lung adenocarcinoma. *J Cancer* 2015; 6(4): 382-6.
- 17 Liu JT, Li WC, Gao S, Wang F, Li XQ, Yu HQ, *et al.* Autophagy inhibition overcomes the antagonistic effect between gefitinib and cisplatin in epidermal growth factor receptor mutant non-small-cell lung cancer cells. *Clin Lung Cancer* 2015; 16(5): e55-66.
- 18 Sugita S, Ito K, Yamashiro Y, Moriya S, Che XF, Yokoyama T, *et al.* EGFR-independent autophagy induction with gefitinib and enhancement of its cytotoxic effect by targeting autophagy with clarithromycin in non-small cell lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 461(1): 28-34.
- 19 Han W, Pan H, Chen Y, Sun J, Wang Y, Li J, *et al.* EGFR tyrosine kinase inhibitors activate autophagy as a cytoprotective response in human lung cancer cells. *PLoS One* 2011; 6(6): e18691.
- 20 Fumarola C, Bonelli MA, Petronini PG, Alfieri RR. Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer. *Biochem Pharmacol* 2014; 90(3): 197-207.
- 21 Kim YC, Guan KL. mTOR: A pharmacologic target for autophagy regulation. *J Clin Invest* 2015; 125(1): 25-32.
- 22 Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 2011; 13(2): 132-41.
- 23 Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang YY, Kim J, *et al.* ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol* 2013; 15(7): 741-50.
- 24 Mandell MA, Jain A, Arko-Mensah J, Chauhan S, Kimura T, Dinkins C, *et al.* TRIM proteins regulate autophagy and can target autophagic substrates by direct recognition. *Dev Cell* 2014; 30(4): 394-409.
- 25 Wei Y, Zou Z, Becker N, Anderson M, Sumpter R, Xiao G, *et al.* EGFR-mediated Beclin 1 phosphorylation in autophagy suppression, tumor progression, and tumor chemoresistance. *Cell* 2013; 154(6): 1269-84.
- 26 Tan X, Thapa N, Sun Y, Anderson RA. A kinase-independent role for EGF receptor in autophagy initiation. *Cell* 2015; 160(1/2): 145-60.
- 27 Ramirez M, Rajaram S, Steininger RJ, Osipchuk D, Roth MA, Morinishi LS, *et al.* Diverse drug-resistance mechanisms can emerge from drug-tolerant cancer persister cells. *Nat Commun* 2016; 7: 10690.
- 28 Sobhakumari A, Schickling BM, Love-Homan L, Raeburn A, Fletcher EV, Case AJ, *et al.* NOX4 mediates cytoprotective autophagy induced by the EGFR inhibitor erlotinib in head and neck cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 272(3): 736-45.
- 29 Okon IS, Coughlan KA, Zhang M, Wang Q, Zou MH. Gefitinib-mediated reactive oxygen specie (ROS) instigates mitochondrial dysfunction and drug resistance in lung cancer cells. *J Biol Chem* 2015; 290(14): 9101-10.
- 30 Zhou YY, Li Y, Jiang WQ, Zhou LF. MAPK/JNK signalling: A potential autophagy regulation pathway. *Biosci Rep* 2015; 35(3): doi: 10.1042/BSR20140141.
- 31 Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* 2013; 501(7467): 328-37.
- 32 Ojha R, Bhattacharyya S, Singh SK. Autophagy in cancer stem cells: A potential link between chemoresistance, recurrence, and metastasis. *Biores Open Access* 2015; 4(1): 97-108.
- 33 Larzabal L, El-Nikhely N, Redrado M, Seeger W, Savai R, Calvo A. Differential effects of drugs targeting cancer stem cell (CSC) and non-CSC populations on lung primary tumors and metastasis. *PLoS One* 2013; 8(11): e79798.
- 34 Zhao Y, Bao Q, Schwarz B, Zhao L, Mysliwicz J, Ellwart J, *et al.* Stem cell-like side populations in esophageal cancer: A source of chemotherapy resistance and metastases. *Stem Cells Dev* 2014; 23(2): 180-92.

- 35 Wang S, Mou Z, Ma Y, Li J, Li J, Ji X, *et al.* Dopamine enhances the response of sunitinib in the treatment of drug-resistant breast cancer: Involvement of eradicating cancer stem-like cells. *Biochem Pharmacol* 2015; 95(2): 98-109.
- 36 Choi DS, Blanco E, Kim YS, Rodriguez AA, Zhao H, Huang TH, *et al.* Chloroquine eliminates cancer stem cells through deregulation of Jak2 and DNMT1. *Stem Cells* 2014; 32(9): 2309-23.
- 37 Huang CP, Tsai MF, Chang TH, Tang WC, Chen SY, Lai HH, *et al.* ALDH-positive lung cancer stem cells confer resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Lett* 2013; 328(1): 144-51.
- 38 Shien K, Toyooka S, Yamamoto H, Soh J, Jida M, Thu KL, *et al.* Acquired resistance to EGFR inhibitors is associated with a manifestation of stem cell-like properties in cancer cells. *Cancer Res* 2013; 73(10): 3051-61.
- 39 Hashida S, Yamamoto H, Shien K, Miyoshi Y, Ohtsuka T, Suzawa K, *et al.* Acquisition of cancer stem cell-like properties in non-small cell lung cancer with acquired resistance to afatinib. *Cancer Sci* 2015; 106(10): 1377-84.
- 40 Radogna F, Dicato M, Diederich M. Cancer-type-specific crosstalk between autophagy, necroptosis and apoptosis as a pharmacological target. *Biochem Pharmacol* 2015; 94(1): 1-11.
- 41 Fuchs Y, Steller H. Live to die another way: Modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015; 16(6): 329-44.
- 42 Goldberg SB, Supko JG, Neal JW, Muzikansky A, Digumarthy S, Fidias P, *et al.* A phase I study of erlotinib and hydroxychloroquine in advanced non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2012; 7(10): 1602-8.
- 43 Gorzalczany Y, Gilad Y, Amihai D, Hammel I, Sagi-Eisenberg R, Merimsky O. Combining an EGFR directed tyrosine kinase inhibitor with autophagy-inducing drugs: A beneficial strategy to combat non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* 2011; 310(2): 207-15.
- 44 Gurpinar E, Grizzle WE, Shacka JJ, Mader BJ, Li N, Piazza NA, *et al.* A novel sulindac derivative inhibits lung adenocarcinoma cell growth through suppression of Akt/mTOR signaling and induction of autophagy. *Mol Cancer Ther* 2013; 12(5): 663-74.
- 45 Price KA, Azzoli CG, Krug LM, Pietanza MC, Rizvi NA, Pao W, *et al.* Phase II trial of gefitinib and everolimus in advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2010; 5(10): 1623-9.
- 46 Maes H, Kuchnio A, Peric A, Moens S, Nys K, De Bock K, *et al.* Tumor vessel normalization by chloroquine independent of autophagy. *Cancer Cell* 2014; 26(2): 190-206.
- 47 Rebecca VW, Amaravadi RK. Emerging strategies to effectively target autophagy in cancer. *Oncogene* 2016; 35(1): 1-11.
- 48 Ronan B, Flamand O, Vescovi L, Dureuil C, Durand L, Fassy F, *et al.* A highly potent and selective Vps34 inhibitor alters vesicle trafficking and autophagy. *Nat Chem Biol* 2014; 10(12): 1013-9.
- 49 Dowdle WE, Nyfeler B, Nagel J, Elling RA, Liu S, Triantafellow E, *et al.* Selective VPS34 inhibitor blocks autophagy and uncovers a role for NCOA4 in ferritin degradation and iron homeostasis *in vivo*. *Nat Cell Biol* 2014; 16(11): 1069-79.
- 50 Bago R, Malik N, Munson MJ, Prescott AR, Davies P, Sommer E, *et al.* Characterization of VPS34-IN1, a selective inhibitor of Vps34, reveals that the phosphatidylinositol 3-phosphate-binding SGK3 protein kinase is a downstream target of class III phosphoinositide 3-kinase. *Biochem J* 2014; 463(3): 413-27.
- 51 McAfee Q, Zhang Z, Samanta A, Levi SM, Ma XH, Piao S, *et al.* Autophagy inhibitor Lys05 has single-agent antitumor activity and reproduces the phenotype of a genetic autophagy deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(21): 8253-8.