

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2024.23.1355

• 基础研究 •

DCLK1激活FAK/PI3K/AKT/mTOR信号通路促进A549细胞的恶性行为

闫锐, 肖泽儒, 黄旭颖, 安广宇, 葛洋

DCLK1 Promotes Malignancy of A549 Cell Line by Activating FAK/PI3K/AKT/mTOR Pathway

YAN Rui, XIAO Zeru, HUANG Xuying, AN Guangyu, GE Yang

Department of Oncology, Beijing Chaoyang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100020, China

Corresponding Author: GE Yang, E-mail: interna-1@163.com

Abstract: Objective To investigate the effects of doublecortin-like kinase 1 (DCLK1) on the malignant biological behaviors, such as proliferation, migration, and invasion, of A549 cell line and their corresponding mechanisms. **Methods** DCLK1-overexpressing A549 cell lines were established through lentiviral infection, and DCLK1 expression was validated by using RT-PCR and Western blot analysis. Proliferation ability was assessed with CCK-8 and plate cloning assays, and migration and invasion abilities were examined with Transwell assays. The pathway regulated by DCLK1 in lung adenocarcinoma was analyzed on the basis of the TCGA lung adenocarcinoma cohort with pathway enrichment analysis and verified through Western blot analysis. **Results** DCLK1 overexpression in A549 cells promoted cell proliferation, migration, and invasion. The inhibition of the FAK/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway impaired the DCLK1-mediated malignant behavior of A549 cells. **Conclusion** DCLK1 promotes the malignant behavior of A549 cells through the activation of the FAK/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway.

Key words: Doublecortin-like kinase 1; A549 cell line; FAK/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway; Proliferation; Migration and invasion

Funding: National Natural Science Foundation of China-Youth Foundation (No. 82303649); Golden Seed Project of Beijing Chao-Yang Hospital, Capital Medical University (No. CYJZ202226)

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

摘要: 目的 探讨双肾上腺素皮质样激酶1 (DCLK1) 对A549细胞增殖、迁移、侵袭等恶性生物学行为的影响, 并探究可能涉及的相关分子机制。**方法** 慢病毒感染法建立稳定表达DCLK1分子的A549细胞系, 反转录-聚合酶链技术和蛋白质印记法进行鉴定。CCK-8与平板克隆实验检测过表达DCLK1后细胞增殖能力变化。Transwell实验观察过表达DCLK1对细胞迁移与侵袭能力的影响。癌症基因组图谱 (TCGA) 数据库分析DCLK1对肺腺癌细胞的调控富集通路, 蛋白质印记法进行验证。**结果** DCLK1在A549细胞中过表达可增加细胞的增殖、迁移与侵袭等能力, 而抑制FAK/PI3K/AKT/mTOR信号通路可削弱DCLK1对A549细胞的恶性调控。**结论** DCLK1通过激活FAK/PI3K/AKT/mTOR信号通路, 促进A549细胞的恶性生物学行为。

关键词: 双肾上腺素皮质样激酶1; A549细胞系; FAK/PI3K/AKT/mTOR信号通路; 增殖; 迁移与侵袭

中图分类号: R734

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



0 引言

据2022年世界卫生组织统计显示, 肺癌是全球

发病率与致死率最高的恶性肿瘤^[1]。其病理类型主要分为非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 与小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC), 其中非小细胞肺癌包括大细胞肺癌、肺鳞癌、肺腺癌等^[2]。研究表明, 在罹患肺癌的人群中约85%的患者病理类型均为非小细胞肺癌, 而肺腺癌 (lung adenocarcinoma, LUAD) 是其中最主要的病理组织学类型^[3]。尽管目前靶向治疗在具有表皮生长因子受体 (epithelial growth factor receptor, EGFR) 敏感突变的肺腺癌患者中取得了良好的临

收稿日期: 2023-12-22; 修回日期: 2024-03-22

基金项目: 国家自然科学基金-青年项目 (82303649); 首都医科大学附属北京朝阳医院金种子项目 (CYJZ202226)

作者单位: 100020 北京, 首都医科大学附属北京朝阳医院肿瘤科

通信作者: 葛洋 (1981-), 女, 博士, 主任医师, 主要从事DCLK1在消化道肿瘤中的作用机制及临床应用, E-mail: interna-1@163.com, ORCID: 0000-0002-4855-6417

作者简介: 闫锐 (1990-), 女, 博士, 副研究员, 主要从事肺癌治疗耐药相关方面的研究, ORCID: 0000-0002-5052-4377

床疗效,但对于EGFR野生型的肺腺癌患者却无有效靶点进行干预,这大大降低了肺腺癌临床治疗的客观缓解率,使晚期肺腺癌患者的总体5年生存率仍不足30%^[4]。因此,着力聚焦肺腺癌,尤其是积极寻找EGFR野生型的肺腺癌驱动基因,继而进行靶向干预,有望进一步改善患者预后。

双肾上腺素皮质样激酶1(doublecortin-like kinase 1, DCLK1)是首次发现于神经系统的钙依赖性激酶,主要发挥调节微管运动的功能^[5-6]。近年来,随着DCLK1晶体结构的揭示^[7],研究者发现其在神经系统外同样具有重要功能,尤其是对于恶性肿瘤的发生、发展起到重要推动作用。前期研究显示,在结肠癌、食管癌、胰腺癌等多种消化道肿瘤中,DCLK1高表达可促进肿瘤远处转移,并与多种病理危险因素显著相关,提示患者预后不佳^[8-11]。最近研究发现DCLK1在肺癌中也呈现高表达状态,并参与顺铂治疗耐药^[12]。DCLK1对EGFR野生型肺腺癌细胞是否同样可调控肿瘤的恶性行为以及相关调控机制仍未见报道。因此,本研究初步探索了DCLK1对A549(EGFR-WT)细胞的生物学行为调控,为EGFR野生型肺腺癌的靶向治疗提供新的思路与选择。

1 材料与方法

1.1 实验材料

细胞高糖DMEM培养基、胎牛血清、青/链霉素混合液(100×)、0.25%胰蛋白酶购自江苏凯基生物公司;plvx-IRES-ZsGreen1载体以及包装质粒psPAX2、pMD2.G均来自清华大学;DH5 α 大肠杆菌感受态购自上海唯地生物公司;高保真限制性内切酶与连接酶均购自美国NEB公司;DNA转染试剂购自北京零客创智生物科技公司;细胞减血清培养基购自美国Gibco公司;RNA提取试剂、反转录试剂以及qPCR SYBR Green Master Mix购自上海翌圣生物;质粒测序与引物合成均由北京睿博兴科公司完成;蛋白裂解液、苯甲基磺酰氟(PMSF)、蛋白上样缓冲液5×Loading均购自北京Solarbio公司;Western blot实验涉及一抗购自美国CST公司;Western blot实验涉及二抗购自上海碧云天公司;ECL化学发光显影液购自美国Millipore公司;细胞增殖能力检测试剂购自上海翌圣生物公司;基质胶购自美国BD公司;PI3K通路抑制剂购自美国Selleck公司。

1.2 细胞培养

人肺腺癌表皮生长因子受体野生型细胞系A549

以及人胚肾细胞293FT均购自美国ATCC细胞资源库。A549细胞与293FT细胞利用DMEM高糖培养基培养。所有细胞系均利用完全培养基(90%体积DMEM+10%体积胎牛血清+1%体积双抗混合液)培养,培养条件为37℃,5%CO₂的湿润细胞孵箱。依照细胞培养状态与实验要求进行换液与传代。

1.3 DCLK1过表达载体的构建

设计DCLK1的PCR扩增引物,进行DCLK1基因扩增。对PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳后,回收目的条带。载体与DCLK1基因产物同样经EcoRI-HF酶、XbaI酶进行双酶切,酶切条件均为37℃,1 h。随后,将酶切载体通过琼脂糖凝胶电泳,再进行线性化回收。利用DNA纯化试剂盒将酶切后的DCLK1扩增产物进行回收。最后,通过T4连接酶将DCLK1基因片段连接到plvx-IRES-ZsGreen1线性载体中。通过DH5 α 感受态进行载体的转化,并最终通过测序对连接载体进行鉴定。

1.4 A549过表达DCLK1细胞系的建立

利用10 cm培养皿进行慢病毒包装。将目的载体与包装载体按照2:1:1质量比例进行混合并置于无菌1.5 ml EP管中,再加入10 μ l DNA转染试剂,500 μ l细胞减血清培养基混合吹打均匀,室温静置30 min,配置成转染脂质体待用。慢病毒包装前,提前将293FT细胞更换为新鲜不含双抗的培养基,然后将转染脂质体加入培养上清液中,3天后可进行慢病毒的收集。收集后的慢病毒经5 000 rpm,10 min离心,去除细胞碎片将上清液过滤、除菌并收集,随后加入预感染的目的细胞(A549)。细胞在慢病毒感染72 h后,通过流式分选,选取感染成功的目的细胞^[13]。

1.5 平板克隆实验

将细胞接种于六孔板中,每孔接种的细胞数为200个。约2周后,去除上清液,用高压后无菌PBS缓冲液清洗2次。随后,无水乙醇固定10 min,再使用0.1%结晶紫溶液进行染色15~30 min,1×PBS缓冲液清洗后可进行拍照统计,实验过程每组设置3个复孔。

1.6 CCK-8增殖实验

将细胞接种于96孔板,每孔接种的细胞数为5 000个。分别于铺板后的24、48、72、96 h向孔中加入含10% CCK-8和90%的无血清培养基,孵箱孵育1 h,随后在酶标仪450 nm波长条件下测定OD值并绘制细胞增殖曲线。

1.7 Transwell 实验

1.7.1 迁移实验 将2×10⁴个细胞接种于Transwell

上室中并使用无血清培养基重悬，下室添加600 μL 完全培养基。24 h后，将小室取出并去除培养基后，无水乙醇固定10 min，再使用0.1%结晶紫溶液进行染色15~30 min，随后用1 \times PBS缓冲液清洗。干燥后，取景显微镜（4倍镜下）拍照，每组细胞取3~5视野计数统计^[14]。

1.7.2 侵袭实验 将于-20 $^{\circ}\text{C}$ 储存的基质胶提前放置于冰上融化，将基质胶按照体积1:8稀释后提前一天铺至于Transwell上室，每孔100 μl 。次日，将Transwell板取出，按照迁移实验方法，接种细胞。同样，在下室中加入600 μl 完全培养基。48 h后进行侵袭细胞染色^[14]。

1.8 蛋白质提取与蛋白印迹实验

配置蛋白裂解液：RIPA+1%磷酸酶抑制剂+1%蛋白酶抑制剂。将拟提取蛋白的细胞培养皿置于冰上，去除细胞培养上清液，用1 \times PBS缓冲液清洗。继而，向10 cm培养皿中加入150~200 μl 蛋白裂解液，在冰上静置15 min进行蛋白裂解。待液体呈黏稠状后，收集并进行超声裂解。随后，经4 $^{\circ}\text{C}$ ，12 000 r/min离心后，所得上清液即为细胞总蛋白。BCA蛋白定量试剂盒对蛋白进行定量，加入蛋白上样缓冲液，经金属浴95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min进行蛋白变性。

配置蛋白凝胶，取等量蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳。随后，利用半干转（两张膜条件为200 mA，1.5 h）将凝胶中蛋白转入PVDF膜中，经8%脱脂牛奶进行1 h封闭。1 \times TBST简单洗膜后，可进行一抗的4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。次日，利用1 \times TBST进行洗膜，每次5 min，共3次。再于室温条件下进行二抗1 h孵育，再次利用1 \times TBST进行3次洗膜。最后，用ECL化学发光显影液进行蛋白印迹的曝光与统计学分析^[15]。

1.9 RNA的提取、反转录与实时荧光定量PCR

每皿中细胞加入1 ml TRIzol，混匀后将悬液吸出加入1.5 ml 无RNA酶的EP管中。加入200 μl 氯仿，震荡混匀10 s，静置10 min。待液体分层后，4 $^{\circ}\text{C}$ ，12 000 r/min，离心15 min。随后，小心吸取上层液体于新的1.5 ml无RNA酶的EP管中，加入450 μl 异丙醇，混匀后于室温静置10~15 min，进行RNA沉淀。再次于4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机中12 000 r/min，离心10 min。留取管底白色RNA沉淀，加入75%的无水乙醇（无RNA酶水配置）洗涤，待液体完全蒸发，加入RNAase-free水溶解RNA，Nanodrop测定RNA浓度。利用反转录试剂盒，对1 μg RNA进行反转录，得到的cDNA溶液稀释后经ABI 7500 PCR仪对cDNA进行实时荧光定量PCR，以GAPDH为内参，对扩增值进行分析^[15]。

1.10 TCGA数据库分析

TCGA获取肺腺癌患者信息（<https://xenabrowser.net/datapages/>）。R语言提取与DCLK1最相关基因进行通路富集分析。经热图分析，明确DCLK1与FAK/PI3K/AKT/mTOR信号通路相关性。

1.11 统计学方法

所有结果均以平均值 \pm 标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示。GraphPad Prism 9.0进行统计分析。*t*检验用于两组之间的比较， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有实验经过3次独立重复，每次实验设置3个复孔。

2 结果

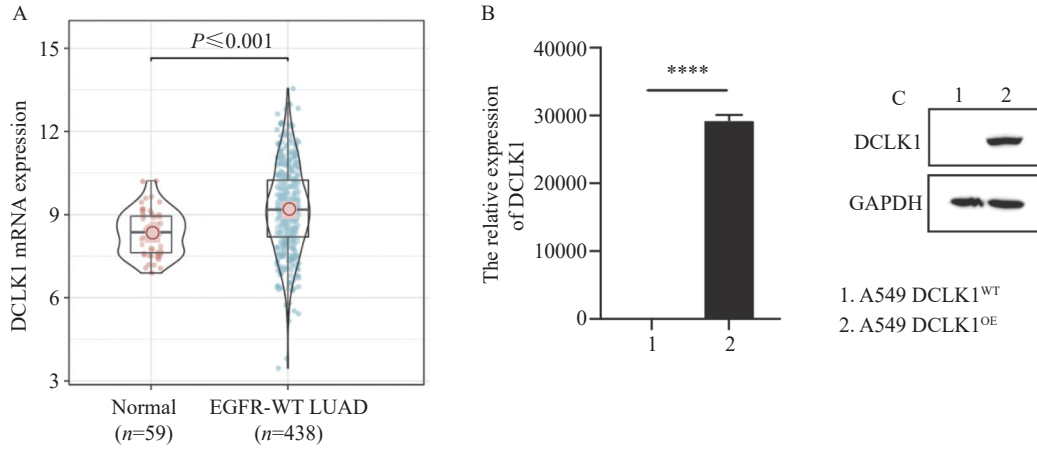
2.1 TCGA数据分析DCLK1在EGFR野生型肺腺癌中的表达以及构建DCLK1过表达的A549细胞系

首先，TCGA数据库提取出EGFR野生型（EGFR-WT）肺腺癌患者临床信息，将肿瘤组织与癌旁正常肺组织进行对比后，发现DCLK1的表达含量在EGFR-WT的LUAD患者中显著升高（图1A）。为进一步证实DCLK1对EGFR野生型肺腺癌细胞是否具有促进其恶性行为的作用，我们选取了EGFR野生型的肺腺癌细胞A549进行验证，通过慢病毒感染，我们成功建立了DCLK1过表达的A549细胞系，并利用实时荧光定量PCR与Western blot进行过表达验证（图1B~C）。

2.2 DCLK1促进A549细胞增殖与迁移、侵袭

CCK-8实验比较两组细胞的增殖能力。结果显示，A549 DCLK1^{WT}组细胞24、48、72 h测定细胞增殖OD值为1.18 \pm 0.11、2.3 \pm 0.14、3.26 \pm 0.27，而A549 DCLK1^{OE}组细胞的OD值为1.68 \pm 0.16、3.07 \pm 0.029、3.84 \pm 0.01，可见DCLK1^{OE}组A549细胞的增殖能力显著高于DCLK1^{WT}组细胞（ $t=4.156$ ， $P < 0.05$ ； $t=9.234$ ， $P < 0.001$ ； $t=3.704$ ， $P < 0.05$ ）（图2A）。平板克隆实验显示，A549 DCLK1^{WT}组细胞7天所成克隆数为4.66 \pm 1.15，而A549 DCLK1^{OE}组细胞所成克隆数为19.33 \pm 3.05，两组比较差异有统计学意义（ $t=4.718$ ， $P < 0.01$ ）（图2B）。提示，过表达DCLK1的A549细胞增殖能力显著高于亲本对照细胞。

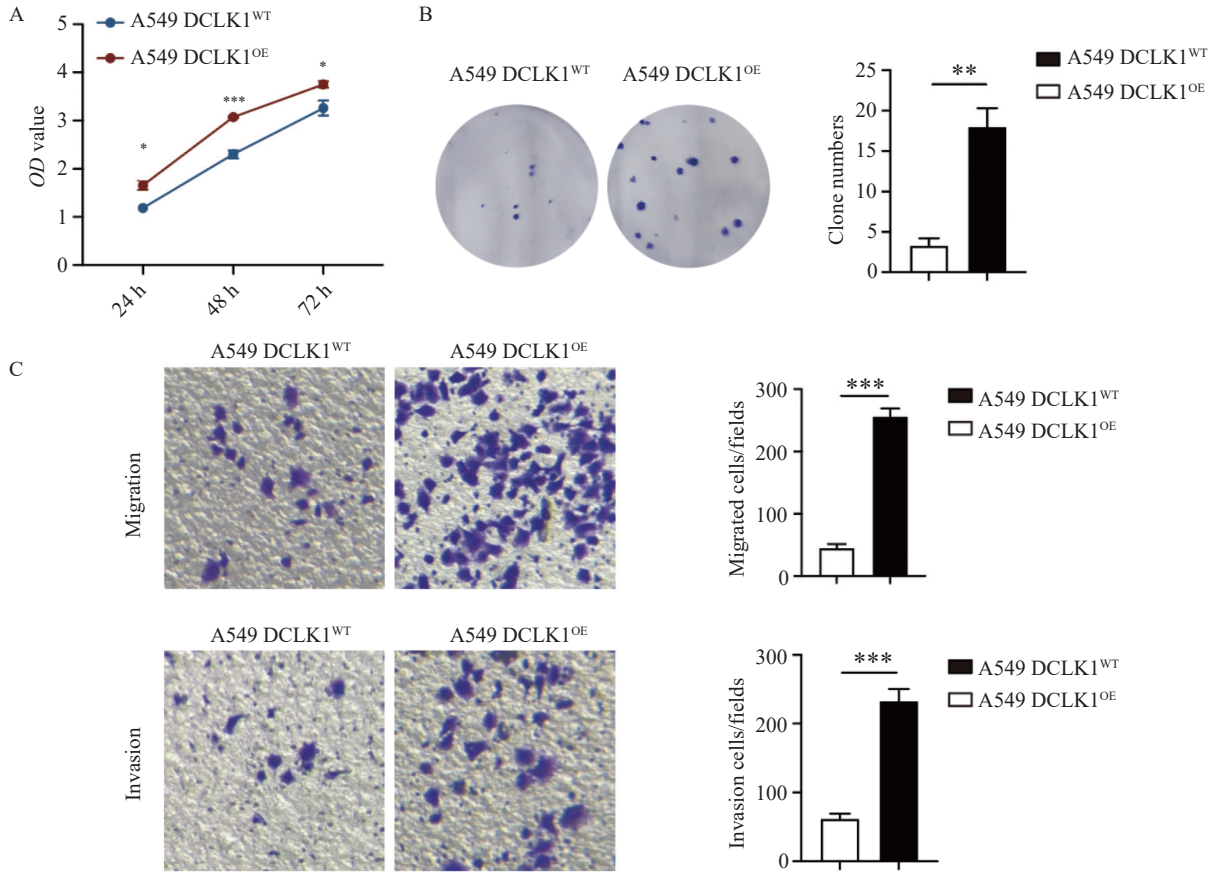
Transwell实验显示，DCLK1^{OE}组A549细胞24 h所迁移的细胞数为240.33 \pm 25.14，显著高于DCLK1^{WT}组细胞38.33 \pm 3.79（ $t=13.33$ ， $P < 0.001$ ）。侵袭实验结果显示，DCLK1^{OE}组A549细胞24 h所侵袭细胞数为213.67 \pm 23.18，而DCLK1^{WT}组细胞的侵袭细胞数为39.33 \pm 7.37（ $t=10.63$ ， $P < 0.001$ ），提示DCLK1过表达可显著促进A549细胞的迁移与侵袭能力（图2C）。



A: TCGA data analysis of DCLK1 expression in the lung tissue of patients with LUAD and EGFR-WT versus normal lung tissue; B: Validation of DCLK1 overexpression in A549 cells by RT-PCR; C: Validation of DCLK1 overexpression in A549 cells by Western blot analysis.

图1 DCLK1在EGFR野生型肺腺癌中高表达

Figure 1 DCLK1 is highly expressed in EGFR wild-type lung adenocarcinoma



A: CCK-8 assay verified the effect of DCLK1 on the proliferation of A549 cells; B: Plate cloning assay verified the effect of DCLK1 on the proliferation of A549 cells; C: Transwell assay tested the effect of DCLK1 on the migration and invasion of A549 cells. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$; DCLK1: doublecortin-like kinase 1; DCLK1^{OE}: DCLK1 overexpression.

图2 DCLK1过表达对A549细胞的增殖、迁移与侵袭能力的影响

Figure 2 Effects of DCLK1 overexpression on the proliferation, migration, and invasion of A549 cells

2.3 TCGA分析与Western blot证实DCLK1与FAK/-PI3K/AKT/mTOR信号通路相关性

为进一步明确DCLK1促进A549即EGFR-WT细胞恶性行为的分子机制，我们通过癌症基因组图谱

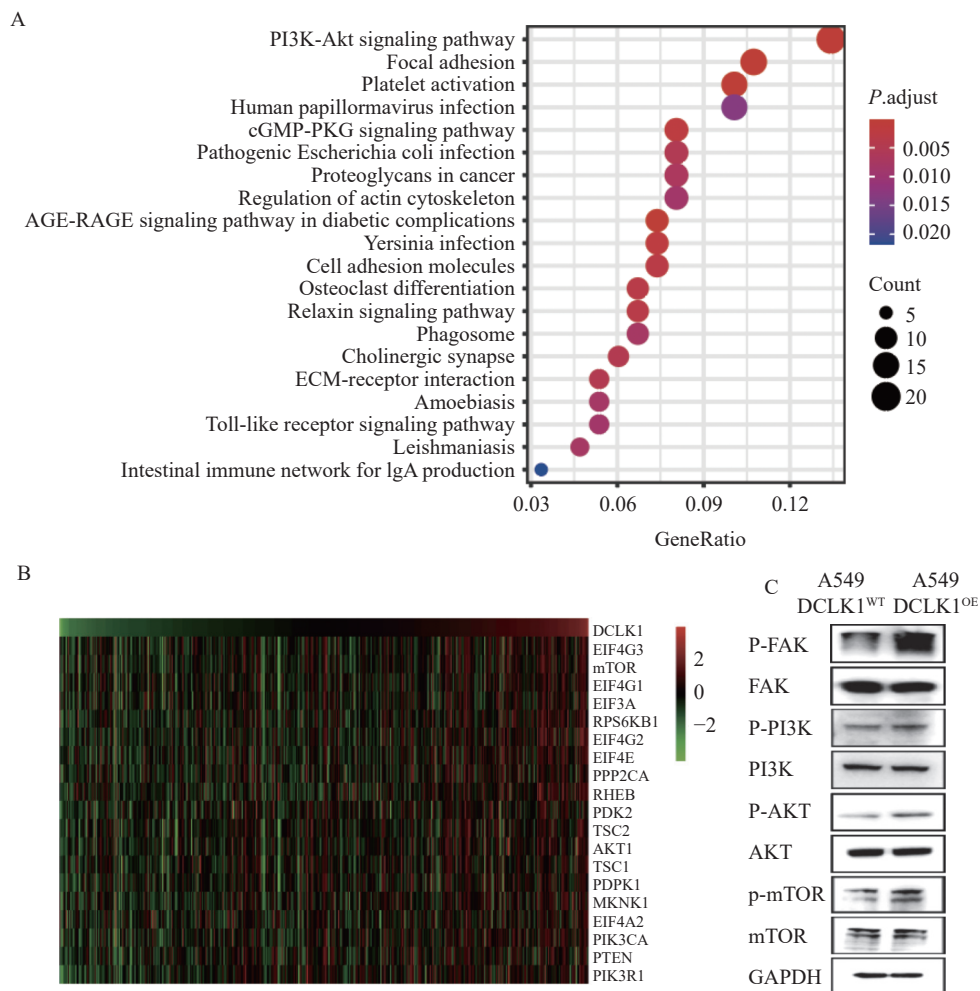
(TCGA)数据库获取EGFR野生型的肺腺癌患者信息，然后使用R语言内的资源提取与DCLK1最相关的前350个基因进行富集分析。气泡图结果表明，PI3K/AKT通路和细胞黏附通路与DCLK1的相

关性最强 (图3A)。热图结果显示, PI3K/AKT/mTOR信号通路的代表性基因与DCLK1的表达相关, 包括mTOR、AKT1、PTEN、PIK3CA (图3B), 提示DCLK1高表达的EGFR野生型肺腺癌患者PI3K/AKT/mTOR信号通路显著激活。Western blot结果复核验证, DCLK1^{OE}的A549细胞中FAK/PI3K/AKT/mTOR信号通路显著激活, 表现为p-mTOR、p-AKT、p-PI3K、p-FAK磷酸化增加 (图3C)。

2.4 抑制FAK/PI3K/AKT/mTOR信号通路可降低DCLK1对A549细胞恶性调控

为进一步探究DCLK1是否通过激活FAK/PI3K/AKT/mTOR通路促进肺腺癌的侵袭和转移, 我们在成功建立过表达DCLK1的A549细胞系中使用了PI3K途径的经典抑制剂LY294002^[16-17], 随后重新评估A549细胞的增殖、侵袭和转移能力。结果表明, LY294002可显著遏制DCLK1诱导的细胞增殖

加速。CCK-8实验显示, LY294002处理A549细胞可显著抑制细胞增殖速度, 96 h A549 DCLK1^{WT}-DMSO细胞增殖OD值为1.74±0.40, A549 DCLK1^{WT}-LY294002细胞增殖OD值为0.68±0.12, A549 DCLK1^{OE}-DMSO细胞增殖OD值为2.78±0.24, A549 DCLK1^{OE}-LY294002细胞增殖OD值为0.98±0.13 (A549 DCLK1^{WT} DMSO组与A549 DCLK1^{WT}-LY294002、A549 DCLK1^{OE}-DMSO组比较, $t=5.310$, $P<0.0001$; $t=5.606$, $P<0.0001$; A549 DCLK1^{OE} DMSO组与A549 DCLK1^{OE}-LY294002组比较, $t=12.80$, $P<0.0001$) (图4A)。平板克隆实验可见, A549 DCLK1^{WT}-DMSO组细胞克隆形成数为22.66±3.05, A549 DCLK1^{WT}-LY294002组细胞克隆形成数为9.66±1.52, A549 DCLK1^{OE}-DMSO组细胞克隆形成数为42.00±3.60, A549 DCLK1^{OE}-LY294002组细胞克隆形成数为24.00±5.29 (A549 DCLK1^{WT} DMSO组与A549 DCLK1^{WT}-LY-



A: Bioinformatics analysis of gene expression in patients with lung adenocarcinoma and wild-type EGFR from the TCGA cohort. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway enrichment was performed; B: Heatmap showing the correlation between DCLK1 and representative genes in the PI3K/AKT/mTOR pathway; C: Detection of FAK/PI3K/AKT/mTOR pathway activation in the DCLK1^{OE} A549 cell line with Western blot analysis.

图3 DCLK1激活EGFR野生型肺腺癌的FAK/PI3K/AKT/mTOR信号通路

Figure 3 DCLK1 induces FAK/PI3K/AKT/mTOR signaling activation in EGFR wild-type lung adenocarcinoma

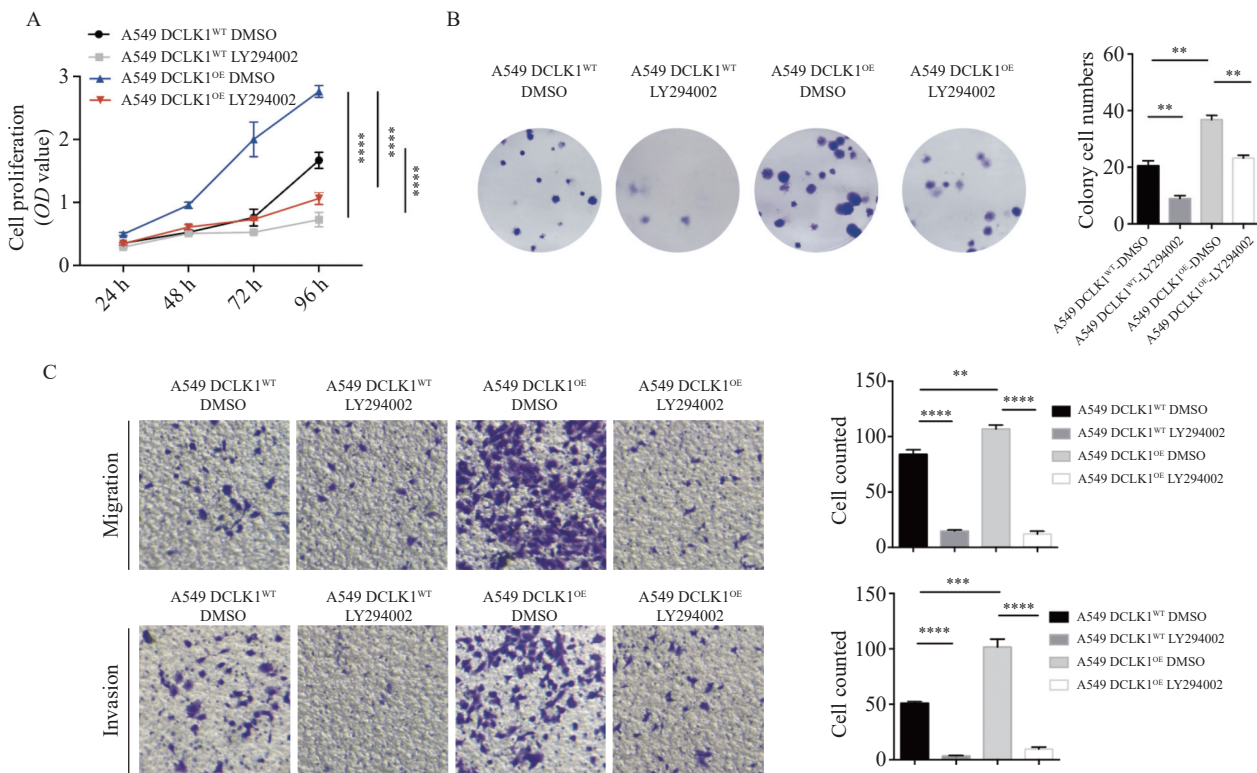
294002、A549 DCLK1^{OE}-DMSO组比较, $t=6.592$, $P<0.01$; $t=7.086$, $P<0.01$; A549 DCLK1^{OE} DMSO组与A549 DCLK1^{OE}-LY294002组比较, $t=4.869$, $P<0.01$) (图4B)。由此可见, 阻断FAK/PI3K/AKT/mTOR信号通路可显著抑制DCLK1分子对A549细胞增殖能力的影响。迁移实验中, A549 DCLK1^{WT} DMSO处理组细胞迁移数为 70.66 ± 1.52 , A549 DCLK1^{WT} LY294002处理组细胞迁移数为 15.33 ± 4.93 , A549 DCLK1^{OE} DMSO处理组细胞迁移数为 112.66 ± 12.50 , A549 DCLK1^{OE} LY294002处理组细胞迁移数为 17.33 ± 4.16 (A549 DCLK1^{WT} DMSO组与A549 DCLK1^{WT}-LY294002、A549 DCLK1^{OE}-DMSO组比较, $t=18.56$, $P<0.0001$; $t=5.775$, $P<0.01$; A549 DCLK1^{OE} DMSO组与A549 DCLK1^{OE}-LY294002组比较, $t=13.19$, $P<0.0001$) ; 而对应细胞侵袭数目分别为 49.33 ± 2.08 、 7.66 ± 4.04 、 109.66 ± 8.02 、 23.33 ± 2.51 (A549 DCLK1^{WT} DMSO组与A549 DCLK1^{WT}-LY294002、A549 DCLK1^{OE}-DMSO组比较, $t=15.88$, $P<0.0001$; $t=12.61$, $P<0.001$; A549 DCLK1^{OE} DMSO组与A549 DCLK1^{OE}-LY294002组比较, $t=17.79$, $P<0.0001$) (图4C)。使用LY294002抑制剂后可显著抑制

DCLK1对A549细胞迁移与侵袭能力的促进作用。

3 讨论

近十年来, 随着分子靶向治疗的出现, 肺腺癌的治疗发生了巨大变化。2009年, IPASS研究宣布了一项令人兴奋的临床研究结果, 即与化疗相比, 含有表皮生长因子受体(EGFR)敏感突变的肺腺癌患者可以从表皮生长因子受体-酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKI)治疗中取得更显著的临床获益, 这为NSCLC患者开启了靶向治疗的新时代^[18]。目前, 针对EGFR敏感突变的肺腺癌患者, 国内外指南一致推荐应用EGFR-TKI进行一线治疗^[18-20]。但对于野生型患者, 目前仍以化疗为主。因此, 对于EGFR野生型肺腺癌患者积极寻找驱动基因, 继而靶向干预, 对提高患者治疗效果以及改善患者预后具有重要意义。

研究显示, DCLK1作为恶性肿瘤驱动的前15位基因, 对多种肿瘤的发生、发展均具有重要驱动作用^[8,21-23]。Panneerselvam等发现DCLK1在肺癌中呈现高表达状态, 可促进肺癌细胞的上皮-间质



A: CCK-8 assay of DCLK1^{OE} A549 cells treated with LY294002; B: Plate cloning assay of DCLK1^{OE} A549 cells treated with LY294002; C: Transwell experiment determined the migration and invasion abilities of DCLK1^{WT} and DCLK1^{OE} A549 cells treated with LY294002; **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

图4 应用PI3K/AKT/mTOR信号通路抑制剂-LY294002可降低DCLK1对A549细胞恶性行为的影响

Figure 4 LY294002, inhibitor of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, reduces the effect of DCLK1 on the malignancy of A549 cells

转化过程 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 以及提高其肿瘤干性特征, 但相关研究并未聚焦肺腺癌病理类型^[12]。本团队前期研究还发现, DCLK1 还可参与肺腺癌EGFR-TKI治疗耐药, 且DCLK1抑制剂 (DCLK1-IN-1) 与TKI具有显著协同作用^[24]。但DCLK1在EGFR野生型肺腺癌中的作用以及调控机制, 仍鲜有报道。

本研究结果显示, 在A549细胞中过表达DCLK1可促进细胞的增殖、迁移与侵袭, 而通过TCGA数据库分析, 明确了DCLK1在EGFR野生型肺腺癌中的激活通路。PI3K/AKT/mTOR信号通路的经典抑制剂LY294002可逆转DCLK1对A549细胞的恶性驱动作用, 提示DCLK1可通过激活FAK/PI3K/AKT/mTOR通路促进A549细胞的恶性行为。

本研究通过选取A549细胞初步探究了DCLK1对EGFR野生型肺腺癌细胞系的影响以及可能的分子机制。后续研究可通过扩大细胞系种类, 进一步夯实本研究的发现。同时, 可利用动物模型等体内实验, 明确DCLK1对EGFR-WT肺腺癌细胞的肿瘤体内生长作用。如今, 靶向于DCLK1分子已具有商品化的特异性抑制剂以及单克隆抗体等^[25-26]。因此, 未来对于EGFR野生型且DCLK1高表达的肺腺癌患者, 有望通过靶向DCLK1取得良好的临床获益。

利益冲突声明:

所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献:

[1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, *et al.* Cancer statistics, 2022[J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(1): 7-33.

[2] Relli V, Trerotola M, Guerra E, *et al.* Abandoning the Notion of Non-Small Cell Lung Cancer[J]. *Trends Mol Med*, 2019, 25(7): 585-594.

[3] Gelatti ACZ, Drilon A, Santini FC. Optimizing the sequencing of tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation-positive non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. *Lung Cancer*, 2019, 137: 113-122.

[4] Lu T, Yang X, Huang Y, *et al.* Trends in the incidence, treatment, and survival of patients with lung cancer in the last four decades[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 943-953.

[5] Francis F, Koulakoff A, Boucher D, *et al.* Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons[J]. *Neuron*, 1999, 23(2): 247-256.

[6] Burgess HA, Reiner O. Doublecortin-like kinase is associated with microtubules in neuronal growth cones[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2000, 16(5): 529-541.

[7] Patel O, Roy MJ, Kropp A, *et al.* Structural basis for small molecule targeting of Doublecortin Like Kinase 1 with DCLK1-IN-1[J]. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 1105.

[8] Chandrakesan P, Yao J, Qu D, *et al.* Dclk1, a tumor stem cell marker, regulates pro-survival signaling and self-renewal of intestinal tumor cells[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 30.

[9] Qu D, Weygant N, Yao J, *et al.* Overexpression of DCLK1-AL Increases Tumor Cell Invasion, Drug Resistance, and KRAS

Activation and Can Be Targeted to Inhibit Tumorigenesis in Pancreatic Cancer[J]. *J Oncol*, 2019, 2019: 6402925.

[10] Ge Y, Fan X, Huang X, *et al.* DCLK1-Short Splice Variant Promotes Esophageal Squamous Cell Carcinoma Progression via the MAPK/ERK/MMP2 Pathway[J]. *Mol Cancer Res*, 2021, 19(12): 1980-1991.

[11] Weygant N, Ge Y, Qu D, *et al.* Survival of Patients with Gastrointestinal Cancers Can Be Predicted by a Surrogate microRNA Signature for Cancer Stem-like Cells Marked by DCLK1 Kinase[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(14): 4090-4099.

[12] Panneerselvam J, Mohandoss P, Patel R, *et al.* DCLK1 Regulates Tumor Stemness and Cisplatin Resistance in Non-small Cell Lung Cancer via ABCD-Member-4[J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2020, 18: 24-36.

[13] Ge Y, Liu H, Zhang Y, *et al.* Inhibition of DCLK1 kinase reverses epithelial-mesenchymal transition and restores T-cell activity in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Transl Oncol*, 2022, 17: 101317.

[14] Liu Q, Liu H, Huang X, *et al.* A targetable MYBL2-ATAD2 axis governs cell proliferation in ovarian cancer[J]. *Cancer Gene Ther*, 2023, 30(1): 192-208.

[15] Li L, Liu J, Xue H, *et al.* A TGF- β -MTA1-SOX4-EZH2 signaling axis drives epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis[J]. *Oncogene*, 2020, 39(10): 2125-2139.

[16] Caffa I, Spagnolo V, Vermieri C, *et al.* Fasting-mimicking diet and hormone therapy induce breast cancer regression[J]. *Nature*, 2020, 583(7817): 620-624.

[17] Jiao W, Mi X, Yang Y, *et al.* Mesenchymal stem cells combined with autocrosslinked hyaluronic acid improve mouse ovarian function by activating the PI3K-AKT pathway in a paracrine manner[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 49.

[18] 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.

[19] 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.

[20] 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 multicentre, open-label, randomised, phase 3 study[J]. *Lancet Oncol*, 2011, 12(8): 735-742.

[21] Kim JH, Park SY, Jeon SE, *et al.* DCLK1 promotes colorectal cancer stemness and aggressiveness via the XRCC5/COX2 axis[J]. *Theranostics*, 2022, 12(12): 5258-5271.

[22] Liu H, Yan R, Xiao Z, *et al.* Targeting DCLK1 attenuates tumor stemness and evokes antitumor immunity in triple-negative breast cancer by inhibiting IL-6/STAT3 signaling[J]. *Breast Cancer Res*, 2023, 25(1): 43.

[23] Yang WQ, Zhao WJ, Zhu LL, *et al.* XMD-17-51 Inhibits DCLK1 Kinase and Prevents Lung Cancer Progression[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 603453.

[24] Yan R, Fan X, Xiao Z, *et al.* Inhibition of DCLK1 sensitizes resistant lung adenocarcinomas to EGFR-TKI through suppression of Wnt/beta-Catenin activity and cancer stemness[J]. *Cancer Lett*, 2022, 531: 83-97.

[25] Sureban SM, Berahovich R, Zhou H, *et al.* DCLK1 Monoclonal Antibody-Based CAR-T Cells as a Novel Treatment Strategy against Human Colorectal Cancers[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 12(1): 54.

[26] Ferguson FM, Nabet B, Raghavan S, *et al.* Discovery of a selective inhibitor of doublecortin like kinase 1[J]. *Nat Chem Biol*, 2020, 16(6): 635-643.

[编辑校对: 黄园玲]

作者贡献:

闫锐: 实验设计与论文撰写

肖泽儒、黄旭颖: 数据分析

安广宇: 核查与修订论文

葛洋: 提出研究思路及进行总体把关与修订