

论著

文章编号:1000-5404(2013)15-1558-04

TGF- β 1 介导的上皮-间质转分化在 Gefitinib 耐药中的作用

刘明¹,任敦强²,郑丽霞¹,于宝丹¹,徐军¹ (510120 广州,广州医科大学附属第一医院呼吸科,广州呼吸疾病研究所,呼吸疾病国家重点实验室¹;266003 山东 青岛,青岛大学医学院附属医院呼吸科²)

[摘要] **目的** 调查上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者接受吉非替尼(Gefitinib)治疗反应性中的作用及机制。**方法** 突变富集 PCR 法检测 NSCLC 患者 EGFR 突变状况;免疫组化法检测癌组织中上皮钙粘蛋白(E-cadherin)和纤维连接蛋白(Fibronectin)的表达情况,探讨 EMT 与表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKIs)治疗敏感性的关系。体外选取人肺腺癌细胞系 PC9 细胞,经 TGF- β 1 反复处理 4 周,观察细胞形态学变化;MTT 检测 TGF- β 1 处理后细胞对 Gefitinib 敏感性的影响;Western blot 验证 EMT 相关标记蛋白表达变化并检测 EGFR 信号通路下游蛋白的变化。**结果** 43 例 NSCLC 标本中,EGFR 19、21 外显子突变率为 58.14% (25/43)。具有 EGFR 基因突变的肿瘤 E-cadherin 的表达水平显著高于 EGFR 野生型(70.00% vs 30.00%, $P < 0.05$)。接受 Gefitinib 总体有效率为 46.51% (20/43),具有 E-cadherin 阳性表达的患者治疗反应性明显好于 Fibronectin 阳性的患者(65.00% vs 30.43%, $P < 0.05$)。TGF- β 1 可诱导 PC9 细胞向间质型细胞形态转化,上调 Fibronectin 的表达;与亲本 PC9 细胞相比,TGF- β 1 处理的细胞对 Gefitinib 的敏感性下降($P < 0.05$);这种敏感性的下降伴随着 AKT 和 STAT3 的持续活化。**结论** EMT 在 EGFR-TKI 耐药中发挥着重要作用,TGF- β 1 诱导的 EMT 可影响 PC9 细胞对 Gefitinib 的敏感性,这种效应可能是通过持续活化 AKT 和 STAT3 而发挥作用。

[关键词] 肺肿瘤;TGF- β 1;上皮-间质转化;表皮细胞生长因子受体;耐药

[中图分类号] R329.24; R734.2; R965 **[文献标志码]** A

Role of TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in resistance to gefitinib in non-small cell lung cancer

Liu Ming¹, Ren Dunqiang², Zheng Lixia¹, Yu Baodan¹, Xu Jun¹ (¹Department of Respiratory Diseases, Guangzhou Institute of Respiratory Diseases, State Key Laboratory of Respiratory Disease, First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510120; ²Department of Respiratory Diseases, Affiliated Hospital of Qingdao Medical College, Qingdao University, Qingdao, Shandong Province, 266003, China)

[Abstract] **Objective** To clarify the role and mechanism of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in the sensitivity of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients treated with gefitinib. **Methods** Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations were detected by mutant-enriched PCR assay, and the expression of E-cadherin and fibronectin were evaluated by immunohistochemistry (IHC). Cultured PC9 cells were treated with TGF- β 1 for 4 weeks, and the morphological changes were observed by phase-contrast microscopy. MTT assay was used to detect the sensitivity of cells to gefitinib. In addition, the expression of EMT-related marker proteins (E-cadherin and fibronectin) and EGFR downstream signaling molecules (p-ERK, p-AKT and p-STAT3) were assessed by Western blotting. **Results** EGFR gene mutations were identified in 25 of 43 samples (58.14%). The frequency of E-cadherin-positive samples was significantly higher in the samples with EGFR mutants than in those with wild-type EGFR (70.00% vs 30.00%, $P < 0.05$), and the overall response rate to gefitinib was 46.51% (20/43). The treatment responsiveness in the E-cadherin-positive patients was significantly higher than that in the fibronectin-positive patients (65.00% vs 30.43%, $P < 0.05$). TGF- β 1 could induce an EMT morphological alteration and up-regulate the expression of fibronectin in PC9 cells. The sensitivity to gefitinib was decreased in the PC9 cells treated with TGF- β 1, and the activation

[基金项目] 国家自然科学基金(81200050);呼吸疾病国家重点实验室青年基金(2011-A8)

[通信作者] 徐军,电话:(020)34281606,E-mail:xufeili@vip.163.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130619.1518.007.html>(2013-06-19)

of AKT and STAT3 were observed *in vitro*. **Conclusion** EMT plays an important role in the resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors (TKIs). Induction of EMT by TGF- β 1 may contribute to the decreased efficacy of gefitinib therapy through sustaining activation of AKT and STAT3.

[**Key words**] lung neoplasms; TGF- β 1; epithelial-mesenchymal transition; epidermal growth factor receptor; resistance

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81200050) and the Project for Young Scholars of State Key Laboratory of Respiratory Diseases (2011-A8). Corresponding author: Xu Jun, Tel: 86-20-34281606, E-mail: xufeili@163.com

肺癌发病率高、死亡率高,大多数患者就诊时已为晚期,失去手术根治机会,传统的放、化疗效果差^[1-3]。以表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKIs)为代表的分子靶向药物的发现及临床应用,为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者的治疗带来了曙光,然而随着治疗的进行,该药不可避免地发生耐药^[3-4]。因此探索耐药机制,开发新的克服耐药策略显得尤为关键。近年研究表明,上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)可能是非小细胞肺癌患者对EGFR-TKIs耐药的机制之一^[5-6],然而详细机制尚不明确。本研究探讨EMT状态与EGFR-TKIs耐药之间的联系及可能的分子机制,旨在为NSCLC患者耐药的治疗提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集广州医学院第一附属医院2006年9月至2011年6月行手术切除,接受吉非替尼(Gefitinib)治疗并经病理证实为肺癌标本43例。包括男性20例,女性23例,中位年龄62(34~81)岁。患者骨髓造血功能、肝肾功能基本正常。入选者均签署知情同意书,均接受250 mg/d Gefitinib口服治疗,根据实体瘤的疗效评价标准(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST)^[7]进行疗效评估。

1.2 材料及试剂

人肺腺癌PC9细胞由上海市肺科医院周彩存教授惠赠,TGF- β 1购自R&D公司,E-cadherin、STAT3、p-STAT3、AKT、p-AKT、ERK、p-ERK购自Cell Signaling Technology公司,Fibronectin购自Santa Cruz公司,HRP标记山羊抗小鼠或抗兔IgG购自Cell Signaling Technology公司,即用型免疫组织化学超敏Ultra Sensitive TMS-P试剂盒、DAB显色试剂盒购自福建迈新公司。

1.3 细胞培养

PC9细胞在37℃、5% CO₂条件下用含10%胎牛血清、1640培养基中培养。细胞经TGF- β 1 5 ng/mL处理4周,每3天换液1次。

1.4 EGFR 突变分析

2片10 μ m石蜡切片经脱蜡、脱水后提取DNA,按本室前期建立的酶切富集PCR法^[8]检测EGFR基因19、21外显子突变情况。结果进一步进行测序验证。

1.5 免疫组织化学检测肺癌组织标本蛋白表达

石蜡切片经脱蜡、水化、抗原修复等处理后加入一抗4℃过夜。二抗室温孵育1 h, DAB显色,苏木精复染;盐酸酒精分化;脱水、透明;中性树脂封固。用已知阳性切片做阳性对照, PBS代替一抗做阴性对照。结果判定:细胞膜和(或)细胞质着棕黄色染色颗粒提示阳性显色结果。随机观察10个高倍视野,根据切片中癌细胞阳性数的百分率将表达结果分为:阴性为无棕黄色染色或染色阳性细胞数<10%;阳性细胞数 \geq 10%均为阳性。

1.6 Western blot 检测蛋白表达

收集细胞提取蛋白,BCA试剂盒计算蛋白浓度。上样,90 V电泳30 min,110 V电压分离蛋白,380 mA转膜2 h,5%脱脂牛奶封闭30 min。加入一抗4℃孵育过夜,TBST洗膜5 min \times 3次后,加入对应HRP标记二抗,室温下孵育1 h后, TBST洗膜5 min \times 3次,然后显色,KOADA成像系统成像。

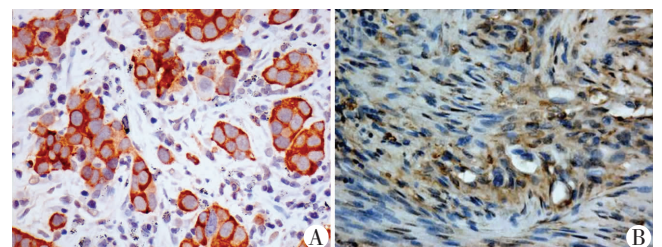
1.7 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件,两组间比较行 t 检验,多组间比较行方差分析。

2 结果

2.1 E-cadherin、Fibronectin 在 NSCLC 组织标本中的表达及与 EGFR 突变和治疗反应性的关系

在NSCLC组织中E-cadherin阳性表达率为46.51%(20/43),表达主要定位于肿瘤细胞膜,部分可见细胞核染色;Fibronectin阳性表达率为53.49%(23/43),主要表达于细胞膜和细胞质(图1)。43例NSCLC标本中25例检测存在EGFR基因19、21外显子的突变,突变率为58.14%(25/43)。其中16例为外显子19缺失突变,9例为外显子21 L858点突变。具有EGFR基因突变的肿瘤E-cadherin的表达水平显著高于EGFR野生型(70.00% vs 30.00%, $P < 0.05$)。接受Gefitinib总体有效率为46.51%(20/43),具有E-cadherin阳性表达的患者治疗反应性明显好于Fibronectin阳性的患者($P < 0.05$)。见表1。



A: E-cadherin 表达; B: Fibronectin 表达

图1 E-Cadherin 和 Fibronectin 蛋白在 NSCLC 组织中的表达 (x400)

表1 E-cadherin、Fibronectin 表达与 EGFR-TKIs 治疗反应性的关系

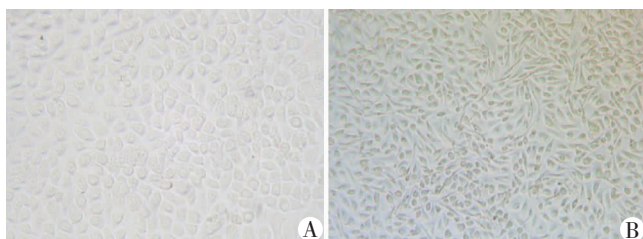
阳性表达 例数	EGFR-TKIs 治疗反应性			EGFR 19,21 外显子突变		
	有效	无效	P	阳性	阴性	P
E-cadherin 20	13(65.00%)	7(35.00%)	0.023	15(75.00%)	5(25.00%)	0.037
Fibronectin 23	7(30.43%)	16(69.57%)		10(43.48%)	13(56.52%)	

2.2 MTT 法检测 TGF-β1 处理后细胞对 Gefitinib 敏感性的影响

经 TGF-β1 处理 4 周后的细胞,再给予 Gefitinib 0.02 μmol/L 作用 48 h,MTT 法检测细胞对药物的敏感性发现,与正常未经 TGF-β1 处理的 PC9 细胞相比,TGF-β1 处理 4 周后的细胞对 Gefitinib 的敏感性明显下降[抑制率(41.6 ± 8.5)% vs (28.8 ± 7.2)%, P < 0.05]。

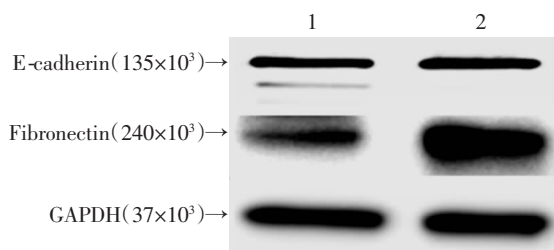
2.3 TGF-β1 诱导 PC9 细胞形态学变化以及对上皮间质标记蛋白表达的影响

通过相差显微镜观察,未处理的 PC9 细胞呈上皮细胞形态,经 TGF-β1 刺激后,部分细胞呈现梭形改变(图 2)。Western blot 均显示 TGF-β1 并对 PC9 细胞上皮标记蛋白 E-cadherin 的表达影响并不明显,然而纤连蛋白 Fibronectin 的表达量却显著增加(图 3)。



A: 未处理 PC9 细胞;B: 经 TGF-β1 刺激后的 PC9 细胞

图 2 相差显微镜下观察 TGF-β1 诱导 PC9 细胞形态学变化 (×200)

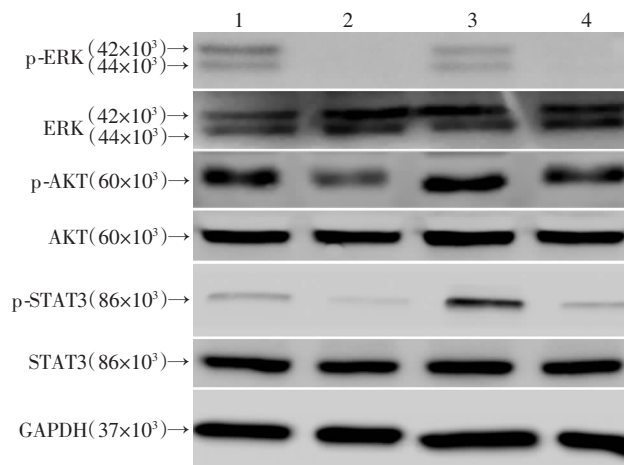


1: 未处理 PC9 细胞;2: 经 TGF-β1 刺激后的 PC9 细胞

图 3 Western blot 检测 E-Cadherin 和 Fibronectin 蛋白的表达变化

2.4 TGF-β1 对 EGFR 下游相关信号通路的影响

PC9 细胞和经 TGF-β1 处理的 PC9 细胞,给予 Gefitinib 0.02 μmol/L 作用 6 h,收集蛋白,Western blot 检测显示,PC9 细胞经 Gefitinib 作用后,EGFR 下游的 p-ERK、p-STAT3 均被明显抑制,p-AKT 被部分抑制;而经 TGF-β1 处理的 PC9 细胞 p-ERK 表达降低,而 p-STAT3、p-AKT 则明显激活,经 Gefitinib 处理仍然处于持续活化状态(图 4)。



1: PC9 细胞; 2: 经 Gefitinib 处理的 PC9 细胞; 3: 经 TGF-β1 处理的 PC9 细胞; 4: 经 Gefitinib + TGF-β1 处理的 PC9 细胞

图 4 Western blot 检测 EGFR 信号通路下游相关蛋白的表达变化

3 讨论

EGFR-TKIs 在改善 NSCLC 疗效与提高患者生活质量中的价值已经得到国际多中心临床研究的肯定,特别是对具有 EGFR 激酶区域特征性突变的 NSCLC 患者疗效显著。但随着治疗的进行,这些患者均不可避免地产生耐药而导致疾病进展。因此,阐明 EGFR-TKIs 耐药的机制,对于更好发挥吉非替尼的药效潜力,进一步提高肺癌的临床治疗水平,具有重要意义。T790M 突变及 c-Met 原癌基因的扩增被认为是 NSCLC 患者对 EGFR-TKIs 产生耐药的最主要机制,然而这些机制仅能解释部分患者的耐药,仍有许多机制尚不清楚^[9-10]。本研究通过体内外实验进一步发现并证实,EMT 状态可在一定程度上反映 EGFR-TKIs 治疗的反应性,TGF-β1 可诱导 PC9 细胞发生 EMT 从而影响 PC9 细胞对 Gefitinib 的敏感性,这种效应可能是通过持续活化 AKT 和 STAT3 而发挥作用。

EMT 是指上皮细胞在形态学上发生向成纤维细胞或间充质细胞表型的转变并获得迁移的能力,是正常发育、伤口愈合以及恶性上皮肿瘤发生的基础^[11]。近年研究显示,EMT 可能参与了 EGFR-TKIs 的耐药发生^[5-6]。Yauch 等^[12]报道对 erlotinib 不敏感的肺癌组织往往合并 vimentin 和/或 Fibronectin 等标记物的表达,进而推测 E-cadherin 表达水平可作为预测 NSCLC 患者对 erlotinib 临床效果的一个新的生物学标记。邓沁芳等^[13]探讨了肿瘤 EMT 状态与 EGFR 基因型,以及该患者临床病理特征的关系,发现以上皮或间质型来区分那些最可能受益于靶向 EGFR 治疗的患者人群具有重要的临床意义;女性患者的上皮表型显著高于

男性,差异具有统计学意义;腺癌类型以及非吸烟者也倾向于呈现上皮表型,与临床上 Gefitinib 有效人群的特征一致。本研究进一步探讨了肿瘤 EMT 状态与 EGFR-TKIs 的治疗反应性关系,提示 EMT 与 EGFR-TKIs 的治疗敏感性直接相关。

为了进一步探讨 EMT 与 EGFR-TKIs 治疗敏感性的关系及相关机制,我们进行了相关的体外实验。利用 TGF- β 1 作为诱导剂模拟 EMT 的发生,结果显示经 TGF- β 1 处理的 PC9 细胞部呈现梭形改变,相应的间质标记蛋白 Fibronectin 的表达上调。这个结果与张慧君等^[14]的研究报道一致。我们进一步研究发现 TGF- β 1 诱导的 EMT 可降低细胞对 Gefitinib 的敏感性。对于肿瘤发生 EMT 后 EGFR-TKIs 治疗敏感性下降的机制尚不十分清楚,有研究认为可能是 EMT 降低了肿瘤细胞生长或增殖对 EGFR 信号通路的需求。研究证实 TGF- β 、经典及非经典 Wnt 3 条信号通路协同作用诱导激活细胞 EMT 程序,之后以自分泌的方式维持最终的间质细胞状态,在上皮细胞中下调内源的自分泌信号抑制因子可诱导细胞启动 EMT 程序。与之相反,当在细胞中添加相关信号通路抑制剂时,发现自分泌信号破坏可导致原代乳腺上皮细胞迁移及自我更新受到抑制,并降低了转化衍生物诱导的肿瘤形成及转移^[15]。也有研究提示,EMT 促进耐药的发生可能是由于肿瘤细胞由对 EGFR 信号依赖转变为其他信号通路依赖,如成纤维生长因子受体(fibroblast growth factor receptor,FGFR)、血小板源性生长因子(platelet derived growth factor receptor,PDGFR)或者 α 5 β 1 整合素^[16]。除了经典的 Smad 信号,TGF- β 也可通过激活 ERK MAPK 激酶,Rho GTP 酶和 PI 3 激酶/Akt 等激活的非 Smad 信号通路参与上皮间质转化的发生。本研究发现 TGF- β 1 激活 AKT 和 STAT3 参与了 EMT 的发生,进而影响了患者对 Gefitinib 治疗的敏感性。

综上所述,EMT 状态可部分反映 EGFR-TKI 治疗的反应性,TGF- β 1 可诱导 PC9 细胞发生 EMT,从而影响 PC9 细胞对 Gefitinib 的敏感性,这种效应可能是通过持续活化 AKT 和 STAT3 而发挥作用。

参考文献:

[1] Goldstraw P, Ball D, Jett J R, *et al.* Non-small-cell lung cancer[J]. *Lancet*, 2011, 378(9804): 1727-1740.
[2] Linardou H, Dahabreh I J, Bafaloukos D, *et al.* Somatic EGFR mutations and efficacy of tyrosine kinase inhibitors in NSCLC[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2009, 6(6): 352-366.

[3] Pao W, Chmielecki J. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(11): 760-774.
[4] 吴国明, 钱桂生. 晚期非小细胞肺癌 EGFR-TKIs 治疗的耐药机制研究--挑战中蕴含新的曙光[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(20): 2031-2034.
[5] Thomson S, Buck E, Petti F, *et al.* Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity of non-small-cell lung carcinoma cell lines and xenografts to epidermal growth factor receptor inhibition[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(20): 9455-9462.
[6] Suda K, Tomizawa K, Fujii M, *et al.* Epithelial to mesenchymal transition in an epidermal growth factor receptor-mutant lung cancer cell line with acquired resistance to erlotinib[J]. *J Thorac Oncol*, 2011, 6(7): 1152-1161.
[7] Therasse P, Arbuck S G, Eisenhauer E A, *et al.* New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92(3): 205-216.
[8] He C, Liu M, Zhou C, *et al.* Detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by mutant-enriched PCR assay for prediction of the response to gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer[J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(10): 2393-2399.
[9] Yao Z, Fenoglio S, Gao D C, *et al.* TGF-beta IL-6 axis mediates selective and adaptive mechanisms of resistance to molecular targeted therapy in lung cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(35): 15535-15540.
[10] Giaccone G, Wang Y. Strategies for overcoming resistance to EGFR family tyrosine kinase inhibitors[J]. *Cancer Treat Rev*, 2011, 37(6): 456-464.
[11] Lim J, Thiery J P. Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development[J]. *Development*, 2012, 139(19): 3471-3486.
[12] Yauch R L, Januario T, Eberhard D A, *et al.* Epithelial versus mesenchymal phenotype determines *in vitro* sensitivity and predicts clinical activity of erlotinib in lung cancer patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(24 Pt 1): 8686-8698.
[13] 邓沁芳, 周彩存, 苏春霞. 非小细胞肺癌上皮-间质转化与 EGFR 突变以及临床病理特征之间的关系[J]. 肿瘤防治研究, 2008, 35(4): 258-262.
[14] 张慧君, 张雷, 王和勇, 等. TGF-beta1 诱导人肺腺癌 PC9 细胞上皮-间质转化的研究[J]. 中国肺癌杂志, 2010, 13(1): 34-37.
[15] Scheel C, Eaton E N, Li S H, *et al.* Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast[J]. *Cell*, 2011, 145(6): 926-940.
[16] Thomson S, Petti F, Sujka-Kwok I, *et al.* Kinase switching in mesenchymal-like non-small cell lung cancer lines contributes to EGFR inhibitor resistance through pathway redundancy[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2008, 25(8): 843-854.

(收稿: 2013-01-09; 修回: 2013-04-17)

(编辑 邓强庭)