

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.04.010

· 基础研究 ·

## HGF 诱导不同 EGFR 基因型非小细胞肺癌细胞对厄洛替尼的耐药

玄香兰<sup>1</sup>, 张佳<sup>2</sup>, 安昌善<sup>2</sup> (1. 延边第二人民医院 呼吸内科, 吉林 延吉 133000; 2. 延边大学附属医院 呼吸内科, 吉林 延吉 133000)

**[摘要]** **目的:** 探究肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF) 体外诱导不同 EGFR 基因型非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC) 细胞对厄洛替尼的耐药及其可能的机制。**方法:** 用 HGF、厄洛替尼单独或联合处理人 NSCLC 细胞株 PC9(EGFR 突变型, 敏感株)、H292(EGFR 野生型, 敏感株)、A549(EGFR 野生型, 原发性耐药株), 实验分为四组: C 组(不加药对照组)、H 组(HGF 处理)、E 组(厄洛替尼处理组)、HE 组(HGF + 厄洛替尼联合处理组)。MTT 法检测其对细胞增殖的影响, 流式细胞术检测其对细胞周期和凋亡的影响, Western blotting 检测其对细胞中 c-Met、EGFR、ErbB3 及其磷酸化蛋白表达的影响。**结果:** 厄洛替尼对 3 种细胞增殖抑制的作用均呈浓度依赖性, HGF 处理能够缓解厄洛替尼对瘤细胞增殖的抑制作用。3 种细胞的 HE 组凋亡率均显著低于 E 组(均  $P < 0.05$ )。厄洛替尼阻滞 3 种细胞周期于 G<sub>1</sub> 期, 对于 H292、A549 细胞, HE 组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期比例显著低于 E 组( $P < 0.05$ )。HE 组 p-Met 蛋白含量较 E 组显著升高( $P < 0.05$ ), 而 p-EGFR 和 p-ErbB3 表达无显著差异( $P > 0.05$ )。**结论:** 在体外, HGF 能够诱导不同 EGFR 基因型 NSCLC 细胞株对厄洛替尼耐药, 其机制可能与其诱导 c-Met 磷酸化活化有关。

**[关键词]** 肝细胞生长因子; 厄洛替尼; 非小细胞肺癌; c-Met; 耐药

**[中图分类号]** R734.2; R730.54

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2014)04-0413-06

## HGF-induced resistance to erlotinib in EGFR-mutated and EGFR wildtype non-small lung cancer cells *in vitro*

Xuan Xianglan<sup>1</sup>, Zhang Jia<sup>2</sup>, An Changshan<sup>2</sup> (1. Department of Respiratory Disease, Yanbian Second People's Hospital, Yanji 133000, Jilin, China; 2. Department of Respiratory Disease, Yanbian University-Affiliated Hospital, Yanji 133000, Jilin, China)

**[Abstract]** **Objective:** To assess differences in erlotinib resistance between EGFR-mutated and EGFR wildtype non-small lung cancer (NSCLC) cells following hepatocyte growth factor (HGF) *in vitro*. **Methods:** EGFR-mutated NSCLC PC9 cells and EGFR-wild type NSCLC H292 and A549 cells were left untreated (control) or treated with HGF, erlotinib or HGF plus erlotinib. Cell viability was assessed by MTT assays, cell apoptosis and cell cycle progression by flow cytometry and protein contents of c-Met, EGFR and ErbB3 by Western blotting. **Results:** Erlotinib resulted in a significant proliferation inhibition in all three types of NSCLC cells in a dose-dependent manner and HGF effectively attenuated the erlotinib-induced proliferation inhibition. In all three types of cells studied, the apoptosis rate in the combination treatment (HGF plus erlotinib) group was lower than that in the erlotinib group ( $P < 0.05$ ), and erlotinib induced G<sub>1</sub> arrest. In H292 and A549 cells, the proportion of cells at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase was significantly lower in the combination treatment group than in the erlotinib group ( $P < 0.05$ ). Protein content of c-Met was significantly higher in the combination treatment than in the erlotinib group ( $P < 0.05$ ) whereas protein contents of p-EGFR and p-ErbB3 were not different between treatment groups ( $P > 0.05$ ) in all three types of cells. **Conclusion:** HGF may induce erlotinib resistance differentially in EGFR wildtype and EGFR-mutated NSCLC cells, possibly an Met activation-dependent mechanism.

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 81160291)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81160291)

**[作者简介]** 玄香兰(1983-),女,吉林省和龙市人,硕士,主要从事胸部肿瘤的基础及临床研究,E-mail: xuanxianglan101@hotmail.com

**[通信作者]** 安昌善(An Changshan, corresponding author), E-mail: cs\_an2003@aliyun.com

[ **Key words** ] hepatocyte growth factor( HGF ); erlotinib; non-small lung cancer( NSCLC ); c-Met; resistance

[ Chin J Cancer Biother, 2014, 21(4): 413-418 ]

表皮生长因子受体( epidermal growth factor receptor, EGFR )酪氨酸激酶抑制剂( tyrosine kinase inhibitor, TKI )逐渐成为治疗非小细胞肺癌( non-small cell lung cancer, NSCLC )的重要手段<sup>[1-3]</sup>, 可用于 NSCLC 的一线治疗<sup>[4-6]</sup>。临床上使用的 EGFR-TKI 主要有吉非替尼( gefitinib, 商品名: 易瑞沙 )和厄洛替尼( erlotinib, 商品名: 特罗凯 ), 但因存在原发性或获得性耐药而仅对部分有特殊基因突变或肿瘤标志物表达的 NSCLC 患者有效, 对非选择的 NSCLC 患者有效率只有 20%<sup>[7]</sup>。目前, NSCLC 患者对 EGFR-TKI 的耐药机制尚不完全明确。肝细胞生长因子( hepatocyte growth factor, HGF )是 c-Met 的配体, 而 c-Met 在肿瘤增殖、侵袭过程中起重要作用。在体外, HGF 诱导不同基因型 NSCLC 细胞对吉非替尼耐药, 且与 c-Met 激活有关<sup>[8-9]</sup>。本研究选择 EGFR 突变型和野生型 NSCLC 细胞, 使用 HGF、厄洛替尼单独或联合处理, 旨在探讨 HGF 处理对不同 EGFR 基因型 NSCLC 细胞对厄洛替尼耐药性的影响及其可能的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

人 NSCLC 细胞株 PC9( EGFR 突变型, 敏感株 )、H292( EGFR 野生型, 敏感株 )、A549( EGFR 野生型, 原发性耐药株 )均由上海市肺科医院中心实验室提供; 盐酸厄洛替尼原料购自济南汇丰达化工有限公司; HGF 购自美国 Humanzyme 公司; MTT 粉购自美国 AMRESCO 公司; FITC Annexin V 凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司; 细胞周期流式仪分析试剂盒购自上海杰美医药科技有限公司。兔抗人 p-Met( Tyr1349, 145 kD )、c-Met( 190/56 kD )、p-EGFR( Tyr1068, 170 kD )、EGFR( 175 kD )、p-ErbB3( Tyr1289, 185 kD )、ErbB3( 185 kD )、GAPDH( 35 kD )抗体购自美国 EPITMICS 公司, HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗购自美国 JECTIION 公司。NC 膜购自美国 Whatman 公司。ECL 化学发光试剂购自美国 Thermo 公司。

### 1.2 细胞培养及药物配制

分别将 PC9、H292、A549 细胞常规培养于含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养液中, 置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温细胞培养箱中孵育, 每 3~4 d 传代 1 次。HGF 用无菌双离子水稀释成 100 μg/ml 的母液。厄

洛替尼原料用 DMSO 溶解稀释成质量浓度为 50 μmol/ml 的母液, 用药时 DMSO 终质量百分浓度应小于 0.1%。

### 1.3 MTT 实验检测 HGF 与厄洛替尼单独或联用对 NSCLC 细胞增殖的影响

取 100 μl 含细胞数为  $1 \times 10^3$  个的细胞悬液接种于 96 孔板, 每种细胞设实验组( HGF + 厄洛替尼处理组 )、对照组( 厄洛替尼处理组 )、空白组( 不用药 ), 每组设 5 个复孔。细胞贴壁后, 按分组向孔内加入 40 ng/ml HGF 和浓度为 0、0.01、0.04、0.1、0.4、1 μmol/L 的厄洛替尼。72 h 后, 每孔加入 20 μl MTT( 终浓度为 5 mg/ml ), 4 h 后, 离心、弃上清液, 每孔加入 200 μl DMSO, 摇床上混匀约 30 min 至结晶完全溶解, 用酶标仪测量波长 530 nm 处光密度( *D* )值。细胞存活率( % ) = ( 实验组平均 *D* 值 - 空白组平均 *D* 值 ) / ( 对照组平均 *D* 值 - 空白组平均 *D* 值 ) × 100%。实验重复 3 次。用细胞存活率做出量效曲线, 用作图法分析得出两种药物对不同细胞的 IC<sub>50</sub>。

### 1.4 流式细胞术检测 HGF 与厄洛替尼单独或联用对 NSCLC 细胞凋亡的影响

将实验分为 C 组( 不用药对照组 )、H 组( HGF 处理组 )、E 组( 厄洛替尼处理组 )、HE 组( HGF + 厄洛替尼处理组 )。取  $5 \times 10^5$  个对数生长期细胞接种于 6 孔板。贴壁后弃原培养液, 按实验分组加入 1 μmol/L 厄洛替尼和 40 ng/ml HGF。48 h 后, 胰酶消化并收集全部细胞到 5 ml 试管, 离心、弃上清液, 生理盐水洗涤 1 次。加入  $1 \times$  Binding Buffer 调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/ml, 取 100 μl(  $1 \times 10^5$  个细胞 )到新的 5 ml 试管。各管内加入 5 μl FITC 和 5 μl PI, 室温、避光 15 min。上机前加入 400 μl  $1 \times$  Binding Buffer, 在 1 h 内进行检测。实验重复 3 次。

### 1.5 流式细胞术检测 HGF 与厄洛替尼单独或联用对 NSCLC 细胞周期的影响

取  $1 \times 10^5$  个对数生长期细胞接种于 6 孔板。贴壁后弃原培养液, 按 C、H、E、HE 组加入 1 μmol/L 厄洛替尼和 40 ng/ml HGF。48 h 后, 胰酶消化并收集全部细胞到 5 ml 试管, 离心、弃上清液, 生理盐水洗涤 1 次。每管加入 500 μl 1 号工作液( 500 μl 裂解液 + 2.5 μl 染色液 + 10 μl 去干扰剂 ), 室温避光孵育 1 h。每管加入 500 μl 2 号工作液( 500 μl 保存液 + 4 μl 染色液 ), 流式细胞仪检测细胞周期。实

验重复 3 次。

1.6 Western blotting 检测 HGF 与厄洛替尼单独或联用对 NSCLC 细胞内 c-Met、EGFR 和 ErbB3 蛋白表达的影响

取  $5 \times 10^5$  个对数生长期的三种细胞接种于 6 孔板,细胞贴壁后饥饿过夜,加入 40 ng/ml HGF 处理 15、30、60 min,冰上裂解细胞提取总蛋白,用 BCA 法定量,取 30 ~ 40  $\mu\text{g}$  蛋白经 8% ~ 10% SDS-PAGE 分离后转印至 NC 膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入兔抗人 p-Met 一抗(1:1 000),4  $^{\circ}\text{C}$  过夜,加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗(1:1 000),ECL 化学发光试剂显色、曝光成像。ImageJ2x 软件测定各条带灰度值,确定各细胞的最佳 HGF 处理时间。将三种细胞分为 C 组、H 组、E 组和 HE 组,先以 1  $\mu\text{mol/L}$  厄洛替尼处理 24 h,继而加入 40 ng/ml HGF 并按最佳处理时间处理,Western blotting 方法检测细胞内 p-Met、c-Met、p-EGFR、EGFR、p-ErbB3、ErbB3 的表达。

1.7 统计学处理

应用 SPSS17.0 统计学软件对结果进行统计学处理。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用 *t* 检验。以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 HGF 处理缓解厄洛替尼导致的细胞增殖抑制

厄洛替尼对 PC9、H292、A549 细胞的生长抑制作用均呈浓度依赖性。HGF 单独处理三种细胞出现不同程度促进细胞增殖作用,尤其对 A549 细胞的促增殖作用显著[(111.0  $\pm$  4.7)% vs (100  $\pm$  0.0)% , $P < 0.05$ ]。HGF 诱导 PC9、H292、A549 细胞的药物浓度-细胞存活率曲线与非诱导曲线相比明显往右侧移位(图 1)。以 PC9 细胞为例,HGF 处理后,厄洛替尼作用于 PC9 细胞的  $\text{IC}_{50}$  显著升高[(8.59  $\pm$  1.26) vs (0.05  $\pm$  0.01)  $\mu\text{mol/L}$ ,  $P < 0.05$ ],作用于 H292 细胞的  $\text{IC}_{50}$  至少提高 100 倍、A549 细胞的  $\text{IC}_{50}$  至少提高 2 倍。

2.2 HGF 处理降低厄洛替尼导致的 NSCLC 细胞凋亡

流式细胞术检测结果(表 1)显示,PC9、H292、A549 细胞的 HE 组凋亡率与 E 组相比显著减少( $P < 0.05$ )。

2.3 HGF 处理减少厄洛替尼导致的 NSCLC 细胞周期阻滞

流式细胞术检测结果(表 2)显示,三种细胞的 E 组  $G_0/G_1$  期比例较 C 组明显升高( $P < 0.05$ )。PC9 细胞的 HE 组  $G_0/G_1$  期比例与 E 组无显著差异

( $P > 0.05$ )。而 H292 和 A549 细胞中,HE 组  $G_0/G_1$  期比例与 E 组相比明显减少,S 期比例明显增多( $P < 0.05$ )。

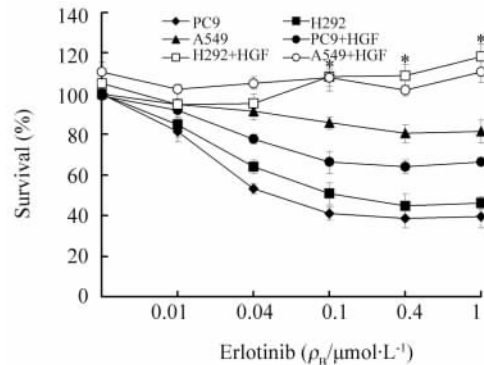


图 1 HGF 处理缓解厄洛替尼导致的 NSCLC 细胞增殖抑制

Fig. 1 Treating with HGF relieved the proliferation inhibition of NSCLC cells caused by erlotinib

\*  $P < 0.05$  vs related control

表 1 HGF 处理降低厄洛替尼导致的 NSCLC 细胞凋亡(%)

Tab. 1 Treating with HGF decreased the apoptosis of NSCLC cells caused by erlotinib (%)

Group	PC9	H292	A549
C	4.9 $\pm$ 2.1	12.8 $\pm$ 4.2	4.8 $\pm$ 1.4
H	4.4 $\pm$ 1.3	15.4 $\pm$ 5.1	2.4 $\pm$ 1.1
E	11.7 $\pm$ 4.0	18.7 $\pm$ 9.4	9.1 $\pm$ 2.6
HE	6.1 $\pm$ 1.5*	3.0 $\pm$ 1.2*	3.9 $\pm$ 1.2*

\*  $P < 0.05$  vs E group

2.4 HGF 处理不同时间提高 NSCLC 细胞中 p-Met 表达

Western blotting 检测结果(图 2)显示,HGF 迅速活化 c-Met,随着时间的推移,各细胞中 p-Met 蛋白含量出现不同程度的变化。PC9、H292、A549 细胞内 p-Met 的表达分别于 15、30、15 min 时显著升高,选择此时间进行后续实验。

2.5 HGF 缓解厄洛替尼对 NSCLC 细胞中 p-Met 表达的抑制

Western blotting 检测结果(图 3)显示,与 C 组比较,3 种细胞 H 组的 p-EGFR、p-ErbB3 蛋白表达均无显著差异( $P > 0.05$ ),E 组与 HE 组表达显著降低( $P < 0.05$ ),但 E 组与 HE 组间表达量无显著差异( $P > 0.05$ )。H 组、HE 组分别与 C 组、E 组比较,p-Met 蛋白表达显著升高( $P < 0.05$ )。

表 2 HGF 处理减少厄洛替尼导致的 NSCLC 细胞周期阻滞(%)  
Tab. 2 Treating with HGF relieved arrest of NSCLC cell cycle caused by erlotinib(%)

Phase	C	H	E	HE
PC9				
G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	76.83 ± 3.34	76.21 ± 5.89	88.61 ± 4.41 <sup>△</sup>	88.53 ± 5.67
S	13.28 ± 5.52	13.79 ± 3.45	4.95 ± 1.32	5.94 ± 1.13
G <sub>2</sub> /M	9.90 ± 2.97	9.99 ± 3.30	6.45 ± 2.25	5.53 ± 1.33
H292				
G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	30.05 ± 3.54	31.92 ± 4.41	46.34 ± 4.37 <sup>△</sup>	29.21 ± 2.76*
S	27.91 ± 2.78	25.96 ± 3.98	17.95 ± 2.89	29.04 ± 3.78*
G <sub>2</sub> /M	42.04 ± 5.65	42.12 ± 4.38	35.72 ± 5.09	41.79 ± 5.04
A549				
G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	66.52 ± 3.03	58.98 ± 5.32	82.72 ± 8.54 <sup>△</sup>	72.75 ± 5.88*
S	24.39 ± 4.89	31.53 ± 3.65	9.93 ± 2.94	19.36 ± 4.72*
G <sub>2</sub> /M	9.09 ± 2.79	9.48 ± 2.29	7.35 ± 3.46	7.88 ± 1.31

\* P < 0.05 vs E group; <sup>△</sup> P < 0.05 vs C group

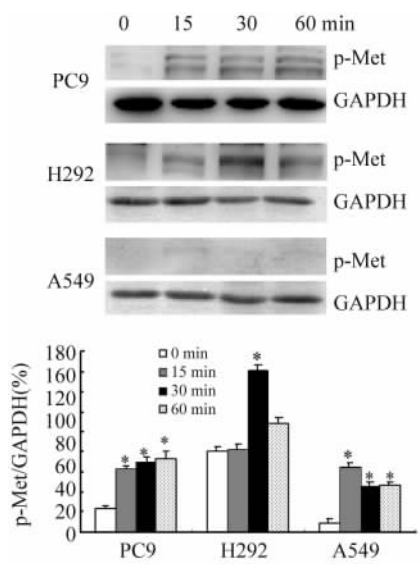


图 2 HGF 处理不同时间后提高 NSCLC 细胞中 p-Met 表达  
Fig. 2 Treating with HGF in different time enhanced the expression of p-Met in NSCLC cells

\* P < 0.05 vs 0 min group

### 3 讨论

肺癌是全世界恶性肿瘤病死中最常见的病因, 其中 NSCLC 占肺癌的 80%。应用最有效的常规化疗治疗, 肺癌患者中位生存期只有 8 ~ 10 个月。EGFR-TKI 在改善晚期 NSCLC 远近期疗效与生活质

量中的作用令人欣慰。然而存在 EGFR-TKI 的原发、继发耐药问题。EGFR-TKI 治疗有效率与 EGFR 突变有很大相关性, EGFR 突变 NSCLC 患者有效率为 70% ~ 75%, 未突变患者仅为 10% ~ 15%<sup>[10]</sup>。开始对 EGFR-TKI 明显疗效的患者经一段时间后治疗逐渐出现获得性耐药, 其机制尚未完全明确。EGFR 二次突变( T790M )<sup>[11]</sup>和 MET 基因扩增是<sup>[12]</sup>EGFR-TKI 耐药的两大主要分子机制, 其它可能的机制有胰岛素样生长因子 1 受体( IGF-1R) 过表达<sup>[13]</sup>、蛋白酪氨酸磷酸酶基因( phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN) 缺失<sup>[14]</sup>、BIM 下调<sup>[15]</sup>、整合素  $\beta$ 1 上调<sup>[16]</sup>、EML4-ALK 融合基因<sup>[17-18]</sup>、HGF 高表达<sup>[19]</sup>等。

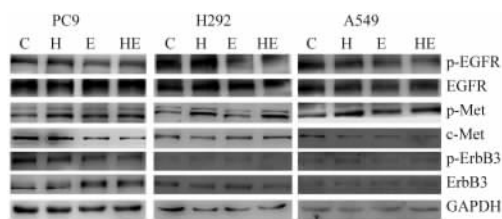


图 3 HGF 缓解厄洛替尼对 NSCLC 细胞中 p-Met 表达的抑制  
Fig. 3 HGF relieved the inhibition of p-Met expression in NSCLC cells caused by erlotinib

C: Control; H: HGF; E: Erlotinib; HE: HGF and Erlotinib

肿瘤细胞除了表达 EGFR 外同时还表达其他含

酪氨酸激酶活性的穿膜受体,称之为 EGFR 旁路酪氨酸激酶信号,包括 c-Met,它们所引导的信号通路常常重叠、功能上发生碰撞<sup>[20]</sup>。Met 信号传导通路通过多种机制介导,调控肿瘤的发生、转移、血管生成与抗凋亡。异常的 Met 信号激活肿瘤细胞内 Akt、Stat、Erk 信号通路,这可能是抗肿瘤治疗原发或继发性耐药的原因之一。HGF 与特异性 c-Met 受体结合,使其发生自身磷酸化,激活细胞内信号途径,促进多种组织细胞增生分裂、促细胞运动和促血管生成。在各种恶性肿瘤包括 NSCLC 组织中发现异常的 HGF/c-Met 信号通道,与不良预后相关。Senguta 等<sup>[21]</sup>发现,高侵袭状态肺癌患者血清中 HGF 含量明显升高,其可能与 EGFR-TKI 耐药有关。本研究选择的三种 NSCLC 细胞分别具有以下特点:PC9 具有 EGFR 基因突变型敏感株(19 外显子缺失),H292 为 EGFR 基因野生型敏感株,A549 为 EGFR 基因野生型耐药株。厄洛替尼抑制 PC9、H292、A549 细胞增殖作用均呈浓度依赖性,HGF 诱导后 IC<sub>50</sub>显著升高,说明 HGF 增加了细胞耐药性。厄洛替尼促进细胞凋亡,HGF 诱导后则明显降低其促进细胞凋亡作用。厄洛替尼阻滞细胞周期主要在 G<sub>1</sub> 期<sup>[22]</sup>。本研究发现,HGF 诱导后 G<sub>1</sub> 期比例减少、S 期比例增多,说明 HGF 可促进细胞分裂。但这种作用根据 EGFR 的基因型而有不同表现:在 EGFR 野生型细胞株中,HGF 促使 G<sub>1</sub> 期有效过渡到 S 期;而在 EGFR 突变型细胞株中,G<sub>1</sub> 及 S 期比例无差异,可能是由于其作用于细胞周期的信号通道有所不同。以上结果提示,HGF 通过改善细胞活性、减少细胞凋亡或促进细胞分裂诱导肺癌细胞对厄洛替尼耐药,其机制有待进一步研究。

在体外,HGF 诱导 NSCLC 细胞中 c-Met 磷酸化,且磷酸化速度比较迅速,每株细胞的激活点不一致,但最终激活的蛋白是一致的。检测厄洛替尼作用于 HGF 诱导前及诱导后细胞中 c-Met 及其磷酸化蛋白发现,3 种 NSCLC 细胞 HGF 诱导前后(E 组与 HE)c-Met 表达无明显差异,但 HE 组 p-Met 蛋白表达显著升高,提示在厄洛替尼作用的前提下,HGF 可导致 c-Met 磷酸化,且与 EGFR 基因型无关。本研究中,在 H 组与 C 组细胞内 EGFR、ErbB3 及其磷酸化蛋白表达无差异,在 E 组与 HE 组细胞内 p-EGFR、p-ErbB3 蛋白表达均受抑制,但两组间含量均无显著差异,表明 HGF 诱导 c-Met 活化不依赖 EGFR 或 ErbB3。

本研究发现,在体外加入外源性 HGF 能够介导 NSCLC 细胞对厄洛替尼的耐药,并且其耐药机制与

活化的 c-Met 相关,为联合应用 c-Met 抑制剂或 HGF 拮抗剂治疗 NSCLC、提高患者对厄洛替尼的敏感性提供实验依据。

## [参考文献]

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Miller VA, Riely GJ, Zakowski MF, et al. Molecular characteristics of bronchioloalveolar carcinoma and adenocarcinoma, bronchioloalveolar carcinoma subtype, predict response to erlotinib [J]. J Clin Oncol, 2008, 26(9): 1472-1478.
- [4] Jackman DM, Miller VA, Cioffredi LA, et al. Impact of epidermal growth factor receptor and KRAS mutations on clinical outcomes in previously untreated non-small cell lung cancer patients: Results of an online tumor registry of clinical trials [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(16): 5267-5273.
- [5] Sequist LV, Joshi VA, Jänne PA, et al. Response to treatment and survival of patients with non-small cell lung cancer undergoing somatic EGFR mutation testing [J]. Oncologist, 2007, 12(1): 90-98.
- [6] Inoue A, Kobayashi K, Usui K, et al. First-line gefitinib for patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring epidermal growth factor receptor mutations without indication for chemotherapy [J]. J Clin Oncol, 2009, 27(9): 1394-1400.
- [7] Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, et al. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small cell lung cancer (the IDEAL 1 trial) [J]. J Clin Oncol, 2003, 21(12): 2237-2246.
- [8] 玄香兰, 安昌善, 周彩存. 肝细胞生长因子诱导敏感非小细胞肺癌细胞对吉非替尼耐药及机制的研究 [J]. 中国肺癌杂志, 2013, 16(1): 1-6.
- [9] 玄香兰, 安昌善, 周彩存. C-Met 信号通道参与 HGF 诱导不同基因型非小细胞肺癌细胞株对吉非替尼耐药 [J]. 中国肺癌杂志, 2013, 16(9): 464-469.
- [10] Mitsudomi T, Yatabe Y. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer [J]. Cancer Sci, 2007, 98(12): 1817-1824.
- [11] Pao W, Miller V, Politi K, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain [J]. PLoS Med, 2005, 2(3): e73.
- [12] Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling [J]. Science, 2007, 316(5827): 1039-1043.
- [13] Gualberto A, Pollak M. Emerging role of insulin-like growth factor

- receptor inhibitors in oncology: Early clinical trial results and future directions [ J ]. *Oncogene*, 2009, 28 ( 34 ): 3009-3021.
- [ 14 ] Bianco R, Shin I, Ritter CA, et al. Loss of PTEN/MMAC1/TEP in EGF receptor-expressing tumor cells counteracts the antitumor action of EGFR tyrosine kinase inhibitors [ J ]. *Oncogene*, 2003, 22 ( 18 ): 2812-2822.
- [ 15 ] Li Z, Zhou S, Zhang L, et al. BIM induction of apoptosis triggered by EGFR-sensitive and resistance cell lines of non-small-cell lung cancer [ J ]. *Med Oncol*, 2011, 28( 2 ): 572-577.
- [ 16 ] Ju L, Zhou C, Li W, et al. Integrin beta1 over-expression associates with resistance to tyrosine kinase inhibitor gefitinib in non-small cell lung cancer [ J ]. *J Cell Biochem*, 2010, 111( 6 ): 1565-1574.
- [ 17 ] Tiseo M, Gelsomino F, Boggiani D, et al. EGFR and EML4-ALK gene mutations in NSCLC: A case report of erlotinib-resistant patient with both concomitant mutations [ J ]. *Lung Cancer*, 2011, 71 ( 2 ): 241-243.
- [ 18 ] Li Y, Ye X, Liu J, et al. Evaluation of EML4-ALK fusion proteins in non-small cell lung cancer using small molecule inhibitors [ J ]. *Neoplasia*, 2011, 13 ( 1 ): 1-11.
- [ 19 ] Wang W, Li Q, Yamada T, et al. Crosstalk to stromal fibroblasts induces resistance of lung cancer to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15 ( 21 ): 6630-6638.
- [ 20 ] Yu H, Wei W, Hao X, et al. Inducing effects of hepatocyte growth factor on the expression of vascular endothelial growth factor in human colorectal carcinomal cells through MEK and PI3K signaling pathways [ J ]. *Chin Med J*, 2007, 120( 9 ): 743-748.
- [ 21 ] Senguta S, Gherardi E, Sellers LA, et al. Hepatocyte growth factor/scater factor can induce angiogenesis independently of vascular endothelial growth factor [ J ]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23( 1 ): 69-75.
- [ 22 ] Chang GC, Hsu SL, Tsai JR, et al. Molecular mechanisms of ZD1839-induced G1-cell cycle arrest and apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells [ J ]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 68 ( 7 ): 1453-1464.
- [ 收稿日期 ] 2014 - 04 - 10 [ 修回日期 ] 2014 - 05 - 30  
[ 本文编辑 ] 黄静怡

· 科技动态 ·

## X 盒结合蛋白 1 在三阴性乳腺癌发生和发展中的重要作用

肿瘤微环境不同于正常组织的生理环境,其表现为低氧、低糖及炎性细胞浸润等,而肿瘤细胞如何在这种不利细胞生长的条件下生存呢?最近康奈尔大学的 Glimcher 教授发表在 *Nature* 上的论文表明,在低氧条件下,三阴性乳腺癌( triple negative breast cancer, TNBC)细胞内质网应激反应信号通路中的内质网跨膜蛋白肌醇酶 1 $\alpha$ ( inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$ , IRE1 $\alpha$  )、内质网类似激酶( PKR like ER kinase, PERK )被活化,活化的 IRE1 $\alpha$ 、PERK 通过剪切 X-盒结合蛋白 1( X-box binding protein 1, XBP1 ) mRNA 产生剪切体 XBP1<sub>s</sub>, XBP1<sub>s</sub> 和另外一个低氧诱导的转录因子缺氧诱导因子 1a ( hypoxia-inducible factor-1a, HIF1a ) 在细胞核内结合,协同 HIF1a 的目的基因转录,促进三阴性肿瘤细胞的生长和复发。

作者首先发现, XBP1<sub>s</sub> 特异性表达在基底样 TNBC 细胞系和 TNBC 患者肿瘤组织中。敲除 XBP1 能抑制基底样乳腺癌细胞系在基质中形成克隆的能力,并能抑制小鼠原位乳腺癌移植模型中肿瘤的生长和肺转移。探究其原因发现,在乳腺癌移植模型中敲除 XBP1 主要影响了肿瘤组织内血管的生成。进一步研究发现,在小鼠乳腺癌移植模型中敲除 XBP1 可以抑制或延缓肿瘤的复发,作者认为敲除 XBP1 可能影响了 CD44<sup>high</sup> CD24<sup>low</sup> 细胞亚群在 MDA-MB-231 和乳腺癌组织中的数量。随后在 MCF10A 中诱导出 CD44<sup>high</sup> CD24<sup>low</sup> 表型的细胞,发现其 XBP1<sub>s</sub> 的表达显著高于 CD44<sup>low</sup> CD24<sup>high</sup> 细胞。敲除 MCF10A 细胞中的 XBP1, 诱导出 CD44<sup>high</sup> CD24<sup>low</sup> 的数量显著减少。在乳腺癌病人组织中分选出的 CD44<sup>high</sup> CD24<sup>low</sup> 和 CD44<sup>low</sup> CD24<sup>high</sup> 也存在相似的结果。

由于 XBP1 是转录因子,所以作者对多种细胞系进行 XBP1 的免疫共沉淀测序,结果表明 XBP1 与 HIF1a 结合的 DNA 基序相似,其结合能力在低氧、无糖的条件下进一步加强,并且这种结合作用特异地存在于基底样细胞系中,而不存在于管腔细胞系中。HIF1a 在 CD44<sup>high</sup> CD24<sup>low</sup> 中是显著高表达的,且对 CD44<sup>high</sup> CD24<sup>low</sup> 是不可缺少的。进一步的研究表明, XBP1 与 HIF1a 在细胞核内相互直接结合,共同招募 RNA 聚合酶 II, 起始 HIF1a 目的基因的转录。

通过对 XBP1 转录谱的分析发现, 96 个直接受 XBP1 调控的特异性基因与 HIF1a 调控的基因之间存在显著的相关性,而且这些基因与肿瘤的复发也显著相关。

最后,作者提出抑制内质网应激反应信号通路中的 XBP1<sub>s</sub>, 并联合化疗药物,可能提高治疗 TNBC 的疗效。

[ 谈勤春 摘译, 刘秋燕 审阅. Chen X, Iliopoulos D, Zhang Q, et al. *Nature*, 2014, 508( 7494 ): 103-107. ]