

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.11.003

EGFRvⅢ的表达对吉非替尼作用卵巢癌 SKOV3 细胞敏感性的影响

张 莉¹, 包乐纹²

(1. 天津医科大学附属肿瘤医院妇科, 天津 300060; 2. 天津市肿瘤防治重点实验室, 天津 300060)

【摘要】目的:探讨 EGFRvⅢ的表达与卵巢癌 SKOV3 细胞对化疗药吉非替尼敏感性之间的关系,为临床治疗并合理选用抗肿瘤药物提供参考。方法:将质粒 pcDNA4/TO-EGFRvⅢ稳定转染入 SKOV3 细胞,并用 zeocin 抗生素筛选出稳定表达 EGFRvⅢ蛋白的细胞株(命名为 SKOV3-EGFRvⅢ),用 MTT 法检测转染稳定株和原始株在吉非替尼作用下细胞的存活能力。然后,以吉非替尼分别对 2 株细胞建立的裸鼠异体肿瘤模型进行治疗,通过测量肿瘤体积大小评价肿瘤模型对吉非替尼的敏感性。结果:通过 Western blot 鉴定,SKOV3-EGFRvⅢ稳定株建立成功;MTT 法结果表明 SKOV3-EGFRvⅢ细胞在吉非替尼的作用下,其死亡率低于原始细胞株,且吉非替尼对 SKOV3-EGFRvⅢ细胞建立的裸鼠肿瘤模型的抑制效果明显低于原始细胞株。结论:EGFRvⅢ的过表达导致卵巢癌 SKOV3 细胞及其体外移植肿瘤模型对化疗药吉非替尼的敏感性减弱。

【关键词】EGFRvⅢ;SKOV3 细胞;敏感性;吉非替尼

【中国图书分类法分类号】R737

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-05-03

Effect of EGFRvⅢ expression on sensitivity of ovarian cancer SKOV3 cell after Gefitinib treatment

ZHANG Li¹, BAO Lewen²

(1. Department of Gynecologic Oncology, the Affiliated Cancer Hospital, Tianjin Medical University;

2. Key Laboratory of Cancer Prevention and Treatment in Tianjin)

【Abstract】Objective: To determine the relationship between EGFRvⅢ expression and sensitivity of SKOV3 cell to Gefitinib and to give rational guidance to clinical medication. **Methods:** Plasmid pcDNA4/TO-EGFRvⅢ was stably transfected into SKOV3 cell and the cell strains stably expressing EGFRvⅢ were screened out by zeocin antibiotics and named SKOV3-EGFRvⅢ. MTT was used to assess the viability of SKOV3-EGFRvⅢ cell and SKOV3 cell treated by Gefitinib. Nude mice allograft tumor models bearing SKOV3 and SKOV-EGFRvⅢ were treated by Gefitinib. The sensitivity of the tumor model to Gefitinib was assessed by measuring the tumor size. **Results:** Results of Western blot indicated that SKOV3-EGFRvⅢ cell strain was successfully established. According to the results of MMT, after being treated by Gefitinib, the mortality was lower in SKOV3-EGFRvⅢ cell than in SKOV3 cell and the inhibition effect of Gefitinib was less intense on tumor model carrying SKOV3-EGFRvⅢ cell than on that carrying SKOV3. **Conclusion:** Over expression of EGFRvⅢ in ovarian cancer SKOV3 cell results in its decreased sensitivity to Gefitinib.

【Key words】EGFRvⅢ; SKOV3 cell; sensitivity; Gefitinib

自 1962 年 Cohen^[1]首次发现表皮生长因子(Epidermal growth factor, EGF)以来,针对 EGF 与其受体相互作用的研究文献数以万计。目前研究的热点集中在 ErbB 受体家族。表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor, EGFR)是 ErbB 受体家族最重要的成员之一,因其在接近 80%的肿瘤细胞中高表达以及与肿瘤细胞的增殖、生长和转移等密切

相关,而作为肿瘤治疗的一个重要的靶点进行开发。EGFRvⅢ作为 EGFR 最常见和最重要的突变形式之一,其胞外区 2~7 外显子的 801 bp 碱基的删除突变,使外显子 1 和外显子 8 相连接,并且在其结合点处新产生了 1 个甘氨酸,产生的突变与野生型 EGFR 相比缺失了 6~273 位氨基酸残基^[2]。普遍认为 EGFRvⅢ胞内区片段的组成型自磷酸化的激活对其致癌性至关重要^[3,4]。吉非替尼是一种 EGFR 的酪氨酸激酶抑制剂^[5],在体内,吉非替尼广泛抑制异

作者介绍:张 莉(1972-),女,主治医师,
研究方向:妇科肿瘤。

种移植于裸鼠的人肿瘤细胞衍生系的肿瘤生长,并提高化疗、放疗及激素治疗的抗肿瘤活性。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

人卵巢癌细胞株 SKOV3 购于中科院上海细胞库,EGFR 多克隆抗体(sc-03)(此抗体结合 EGFR 胞内片段,因此可以用作同时检测 EGFR 和 EGFRv III 蛋白)购自 Santa Cruz 公司,转染试剂 TurboFect™ 购自 Fermentas 公司,MTT 试剂盒购自北京鼎国生物有限公司,质粒 pcDNA4/TO-EGFRv III 由 University of Texas Southwestern Medical Center Aryn. Habib 教授惠赠。吉非替尼药片(规格 250 mg 中国阿斯利康制药有限公司)研磨成粉末溶解于二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)中,配成浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的溶液。

1.2 实验方法

1.2.1 SKOV3-EGFRv III 稳定株的构建 提前 1 d 将处于对数生长期的 SKOV3 铺于 6 孔板,按照转染试剂 TurboFect™ 说明将质粒 pcDNA4/TO-EGFRv III 转染入 SKOV3 细胞中,转染 48 h 后在培养基中加入 zeocin,使其终浓度为 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。之后每隔 1、2 d 更换此浓度的培养液并持续 4 周左右直到建立起稳定的转染细胞株为止。

1.2.2 Western blot 检测 SKOV3-EGFRv III 稳定细胞株 EGFR 和 EGFRv III 蛋白的表达 收集 SKOV3-EGFRv III 和 SKOV3 细胞(每种细胞各约 5×10^7 个),提取总蛋白,蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。取 80 μg 总蛋白进行 8% 分离胶和 5% 浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳,完毕后将蛋白电转印至硝酸纤维素(Nitrocellulose filter membrane, NC)膜,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h 后加抗 EGFR 一抗(浓度为 1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜,之后 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,然后加 HRP 标记的二抗(浓度为 1:2 000)室温摇床 2 h,再用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,化学发光法 BeyoECL Plus 显影。

1.2.3 MTT 法测定吉非替尼对 SKOV3-EGFRv III 和 SKOV3-EGFRv III 的抑制效果 将 SKOV3-EGFRv III 和 SKOV3-EGFRv III 细胞分别铺于 24 孔板,每种细胞各铺 6 孔。待细胞生长至对数期(每孔细胞数量约为 2.0×10^5 个),每孔加入 2.5 μg 吉非替尼溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h 后用 PBS 洗净,再加入 20 μl 溶液(5 mg/ml),继续培养 5 h 后,每孔加入 150 μl DMSO,置于摇床上振荡 15 min 使结晶物充分溶解。在酶标仪 $A_{490\text{nm}}$ 处检测各孔的吸光度值。

1.2.4 裸鼠移植肿瘤模型的建立及其在吉非替尼治疗下的生长状态 24 只裸鼠平均分为 4 组,第 1、3 组和第 2、4 组分别接种对数生长期的 SKOV3-EGFRv III 和 SKOV3 于裸鼠前腋下,接种的细胞数量约为 2×10^6 个/只。接种后待肿瘤体积大小为 100 mm^3 左右时(接种肿瘤细胞后 2 周左右),对 1、2 组裸鼠腹腔注射 25 μg 吉非替尼溶液,每隔 2 d 注射 1 次,治疗持续 2 周;对 2、4 组裸鼠腹腔注射相等体积的 PBS 溶液

作为对照。治疗期间每天测量肿瘤体积大小。肿瘤体积测量方法为:肿瘤体积(mm^3)=长(mm)×宽(mm)×宽(mm)/2。

2 结果

2.1 SKOV3-EGFRv III 稳定株的建立

在抗生素 zeocin 持续作用下,转染 EGFRv III 蛋白的 SKOV3 稳定株的建系成功,并命名为:SKOV3-EGFRv III。通过 Western blot 鉴定(图 1);细胞 SKOV3-EGFRv III 表达 EGFRv III 蛋白。

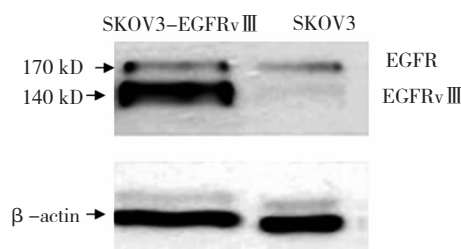


图 1 Western blot 鉴定细胞 EGFRv III 蛋白的表达

Fig.1 EGFRv III protein expression detected by Western blot

2.2 MTT 实验结果

通过 MTT 实验结果(图 2)可以得出,SKOV3-EGFRv III 肿瘤细胞的生长不受吉非替尼的抑制,但是吉非替尼可以抑制 SKOV3 肿瘤细胞的生长,并显著促进其死亡。

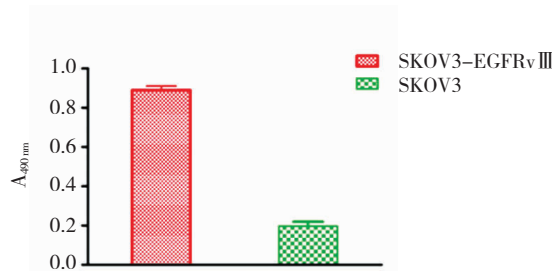


图 2 MTT 检测吉非替尼作用下细胞活力

Fig.2 Cell viability after Gefitinib therapy detected by MTT assay

2.3 裸鼠移植肿瘤模型在吉非替尼下的生长曲线(图 3)

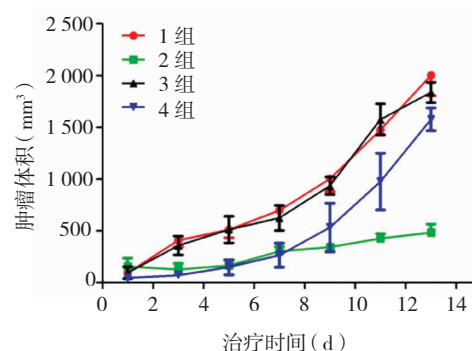


图 3 吉非替尼治疗下各组肿瘤移植模型的肿瘤生长趋势

Fig.3 Tumor growth trend in each tumor transplant model after Gefitinib therapy

从图 3 可以看出,裸鼠荷 SKOV3-EGFRv III 肿瘤模型的生长速度不受吉非替尼的影响。相反,SKOV3 肿瘤模型在吉非替尼治疗下,其生长得到明显的抑制。

3 讨 论

目前,大量的文献报道 EGFRv III 表达和肿瘤的耐药有相关性。Sok 等^[6]的研究指出表达 EGFRv III 的头颈癌细胞对顺铂药物和 EGFR 治疗单抗 C225 具有一定的抵抗作用。Learn 等^[7]的研究报道表明表达 EGFRv III 脑胶质瘤细胞对吉非替尼具有耐药性。另有研究报道称^[7],由于表达 EGFRv III 的肿瘤细胞能分泌带有 EGFRv III 蛋白的囊泡,从而导致低表达 EGFRv III 的蛋白增加了肿瘤的恶性程度,并同时导致了肿瘤对 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂(如吉非替尼)的耐药性。有文献报道^[8],在凋亡诱导因子 staurosporine 和 anisomycine 以及吉非替尼的作用下,人脑胶质瘤和乳腺癌细胞的 EGFR 和 EGFRv III 会内化到线粒体,此时表达 EGFRv III 的肿瘤细胞对 staurosporine 和 anisomycine 以及 Iressa 的作用具有抵抗性。另有文献报道^[9],单一的化疗药物 erlotinib 对 U87-EGFRv III 肿瘤模型的治疗效果不明显,但当以肝细胞生长因子的中和单克隆抗体和 erlotinib 联合用药能有效地抑制肿瘤模型,这对有效治疗表达 EGFRv III 肿瘤有一定的启示意义。

对于 EGFRv III 介导肿瘤细胞产生耐药性的机制目前尚不完全明了。一些学者针对 EGFRv III 介导的耐药机制做了一些深入的研究。最简单的解释是由于 EGFRv III 胞外区 6~273 位氨基酸残基的缺失导致了跨膜区和胞内区结构和构象的改变。这一理论最早由 Huang 等^[3]提出,并得到了其他研究的证实。他们的实验表明 EGFRv III 和 EGFR 的胞内区的片段并不完全等同,并且由于 EGFRv III 胞内区片段构象的改变而导致了位于 EGFRv III 胞内区介导 EGFRv III 内化和溶酶体化的基序无法暴露。此外, Fernandes 等^[10]报道 EGFRv III 的同源二聚化高度依赖于胞外区片段上 N 端糖基化位点所介导的构象改变,而这些结构上的不同导致 EGFRv III 可以结合上其他一些不同的配体并激活下游不同的信号通路^[10-13]。另外一种理论是由于 EGFRv III 和 EGFR 胞内区片段构象的不同因此对吉非替尼具有不同的亲和力。结果,吉非替尼可以更容易和更特异地结合到 ATP 结合位点从而阻止 EGFR 酪氨酸残基的

自磷酸化。但由于和吉非替尼的低亲和力,EGFRv III 酪氨酸残基的自磷酸化始终维持并处在一种程度低的状态,最终组成型的 EGFRv III 信号通路得以建立,并且细胞逐渐适应了这种组成型的信号通路。还有研究表明^[14]EGFRv III 的表达会介导一些之前低表达基因的扩增和表达,例如,一些侵袭性相关基因的表达。最近有研究表明^[15],另外一种针对 EGFR 的化疗药 Cetuximab 虽然能够导致 EGFRv III 细胞内化,但同样不能抑制表达 EGFRv III 的肿瘤的生长,其机制正在进一步研究之中。

总而言之,本研究通过稳定转染质粒 pcDNA4/TO-EGFRv III 使 SKOV3 细胞高表达 EGFRv III 蛋白,并通过体外的 MTT 实验和体内肿瘤模型实验验证了高表达 EGFRv III 的蛋白的 SKOV3-EGFRv III 细胞及其建立的肿瘤模型对化疗药吉非替尼的敏感性降低,为指导临床的用药提供了一定价值的参考。

参 考 文 献

- [1] Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal[J]. J Biol Chem, 1962, 237: 1555-1562.
- [2] Friedman H S, Bigner D D. Glioblastoma multiforme and the epidermal growth factor receptor[J]. N End J Med, 2005, 353(19): 1997-1999.
- [3] Huang H S, Nagane M, Klingbeil C K, et al. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling[J]. J Biol Chem, 1997, 272(5): 2927-2935.
- [4] Nagane M, Coufal F, Lin H, et al. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis[J]. Cancer Res, 1996, 56(21): 5079-5086.
- [5] Miyake K, Tani K, Kakiuchi S, et al. Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (gefitinib) augments pneumonitis, but attenuates lung fibrosis in response to radiation injury in rats[J]. J Med Invest, 2012, 59(1-2): 174-185.
- [6] Sok J C, Coppers F M, Thomas S M, et al. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRv III) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(17): 5064-5073.
- [7] Learn C A, Hartzell T L, Wistrand C J, et al. Resistance to tyrosine kinase inhibition by mutant epidermal growth factor receptor variant III contributes to the neoplastic phenotype of glioblastoma multiforme[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(9): 3216-3224.
- [8] Cao X, Zhu H, Ali-Osman F, et al. EGFR and EGFRv III undergo

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.11.004

荔枝核总黄酮对肝纤维化大鼠核转录因子- κ B 及基质金属蛋白酶-2 表达的影响罗伟生¹, 欧士钰², 靳雅玲², 覃浩², 孙旭锐²

(1. 广西中医药大学第一附属医院消化内科, 南宁 530001; 2. 桂林医学院附属医院消化内科, 桂林 541004)

【摘要】目的: 观察核转录因子- κ B (Nuclear transcription factors- κ B, NF- κ B) 及基质金属蛋白酶-2 (Matrix metalloproteinases-2, MMP-2) 在实验性大鼠肝纤维化肝组织中的表达, 探讨荔枝核总黄酮 (Total flavone from Litchi chinensis Sonn., TFL) 抗肝纤维化的作用机制。方法: 大鼠随机分为正常对照组、模型组、TFL 高剂量组、TFL 低剂量组及秋水仙碱 (Colchicine, Col) 组。模型组、TFL 高剂量组、TFL 低剂量组及 Col 组以二甲亚硝胺 (Dimethylnitrosamine, DMN) 腹腔注射 4 周制作大鼠肝纤维化模型; 造模同时 TFL 高、低剂量组分别以 TFL [200、100 mg/(kg·d)], Col 组以 Col 0.1 mg/(kg·d) 灌胃给药, 正常对照组及模型组给予等体积生理盐水灌胃, 6 周后处死大鼠, 计算大鼠肝脾指数, 检测血清天冬氨酸氨基转移酶 (Aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸氨基转移酶 (Alanine aminotransferase, ALT)、透明质酸 (Hyaluronic acid, HA)、层粘连蛋白 (Laminin, LN)、MMP-2, 取肝脏同一部位行 HE、Masson 染色观察大鼠肝纤维化程度, 采用免疫组化检测各组肝组织 NF- κ B、MMP-2 的表达。结果: TFL 高、低剂量组血清 AST、ALT、HA、LN、MMP-2 水平及肝脾指数较模型组明显降低 ($P < 0.01$), 肝组织 NF- κ B、MMP-2 表达及纤维化程度评分亦较模型组明显减低 ($P < 0.05$)。结论: TFL 具有显著的抗肝纤维化作用, 其机制可能与其抑制 NF- κ B、MMP-2 的高表达有关。

【关键词】荔枝核总黄酮; 肝纤维化; 核转录因子- κ B; 基质金属蛋白酶-2**【中国图书分类法分类号】**R575.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-03-07Effect of total flavone from Litchi chinensis Sonn. on the expressions of NF- κ B and MMP-2 in rats with hepatic fibrosisLUO Weisheng¹, OU Shiyu², JIN Yaling², QIN Hao², SUN Xurui²

(1. Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Guangxi University of Chinese Medicine;

2. Department of Digestive Medicine, the Affiliated Hospital, Guilin Medical University)

【Abstract】Objective: To observe the levels of nuclear transcription factors- κ B (NF- κ B) and matrix metalloproteinases-2 (MMP-2)**作者介绍:** 罗伟生 (1959-), 男, 教授, 博士,

研究方向: 慢性肝病的基础与临床研究。

基金项目: 广西卫生厅重点课题资助项目 (编号: 2010052); 广西中医药大学药效研究重点实验室开放课题资助项目 (编号: 10-046-04-k12)。in the liver tissues of rats with hepatic fibrosis and to explore the anti-hepatic fibrosis mechanism of total flavone from Litchi chinensis Sonn. (TFL). **Methods:** Rats were randomized into normal control group, model group, TFL high dose group, TFL

stress and EGFR kinase inhibitor-induced mitochondrial translocation: a potential mechanism of EGFR-driven antagonism of apoptosis[J]. Mol Cancer, 2011, 10: 26.

[9] Lal B, Goodwin C R, Sang Y, et al. EGFRvIII and c-Met pathway inhibitors synergize against PTEN-null/EGFRvIII + glioblastoma xenografts [J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8(7): 1751-1760.

[10] Fernandes H, Cohen S, Bishayee S. Glycosylation-induced conformational modification positively regulates receptor-receptor association: a study with an aberrant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII/DeltaEGFR) expressed in cancer cells [J]. J Biol Chem, 2001, 276(7): 5375-5383.

[11] Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, et al. Inter-cellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells [J]. Nat Cell Biol, 2008, 10(5): 619-624.

[12] Moscatello D K, Montgomery R B, Sundaresan P, et al. Transferrin-mediated and altered signal transduction by a naturally occurring mutant EGF receptor [J]. Oncogene, 1996, 13(1): 85-96.

[13] Moscatello D K, Holgado-Madruga M, Emlet D R, et al. Constitutive activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a naturally occurring mutant epidermal growth factor receptor [J]. J Biol Chem, 1998, 273(1): 200-206.

[14] Lal A, Glazer C A, Martinson H M, et al. Mutant epidermal growth factor receptor up-regulates molecular effectors of tumor invasion [J]. Cancer Res, 2002, 62(12): 3335-3339.

[15] Dreier A, Barth S, Goswami A, et al. Cetuximab induces mitochondrial translocation of EGFRvIII, but not EGFR: involvement of mitochondria in tumor drug resistance [J]. Tumor Biol, 2012, 33(1): 85-94.

(责任编辑: 冉明会)