

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.001993

二甲双胍通过干预上皮-间质转化逆转尼古丁诱导的肺癌吉非替尼耐药

胡菁¹,李军¹,李丹丹²,张露¹,张慧¹,陈虹¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院呼吸与危重症医学科,重庆 400016;

2. 空军军医大学(第四军医大学)唐都医院呼吸与危重症医学科,西安 710000)

【摘要】目的:探讨尼古丁(nicotine, NIC)诱导 EGFR 敏感突变 PC-9 肺癌细胞株吉非替尼耐药及二甲双胍对其作用。**方法:**PC-9 分成 4 组:空白组、尼古丁组、二甲双胍组、尼古丁和二甲双胍组,利用定量反转录聚合酶链反应(quantificational real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测 E-cadherin 和 Vimentin 信使核糖核酸(messenger ribonucleic acid, mRNA)的表达, Western blot 检测 E-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达,细胞计数试剂盒(cell counting Kit-8, CCK-8)检测不同分组细胞对吉非替尼药物敏感情况。Transwell 小室实验检测细胞侵袭迁移。**结果:**尼古丁诱导 PC-9 细胞上皮间质转化呈时间浓度依赖,在 10 $\mu\text{mol/L}$ 尼古丁处理 72 h 后,发生 E-cadherin 下调和 Vimentin 上调最明显,故选该条件做以下实验。CCK-8 提示,相比空白组,尼古丁组 PC-9 细胞对吉非替尼敏感性减弱,在吉非替尼浓度为 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 最明显($P=0.000$)。Matrigel 侵袭实验提示尼古丁组穿膜细胞数较空白组明显增多[(15.70 \pm 1.53)个/高倍视野 vs. (32.70 \pm 2.08)个/高倍视野, $F=75.406$, $P=0.000$, $P=0.000$];迁移实验的结果与之相似。与空白组相比,尼古丁组 E-cadherin mRNA 表达水平明显降低[(0.932 \pm 0.100) vs. (0.459 \pm 0.024)], $F=25.924$, $P=0.000$, $P=0.000$], Vimentin mRNA 表达水平明显升高[(1.200 \pm 0.200) vs. (1.973 \pm 0.129)], $F=20.998$, $P=0.000$, $P=0.000$ 。蛋白水平变化与之相同。尼古丁+二甲双胍组可以增加尼古丁作用 PC-9 对吉非替尼的敏感性,在吉非替尼浓度为 0.05、0.10、0.50、1.00、5.00 $\mu\text{mol/L}$ 时有统计学意义。尼古丁+二甲双胍组可以减弱尼古丁组的穿膜数[(17.00 \pm 2.00)个/高倍视野 vs. (32.70 \pm 2.08)个/高倍视野, $F=75.406$, $P=0.000$, $P=0.000$],迁移实验呈现相同的结果。相比于尼古丁组,尼古丁+二甲双胍组上调 E-cadherin mRNA[(0.459 \pm 0.024) vs. (0.838 \pm 0.058)], $F=25.924$, $P=0.000$, $P=0.000$],下调 Vimentin mRNA[(1.973 \pm 0.129) vs. (1.467 \pm 0.115)], $F=20.998$, $P=0.000$, $P=0.003$]。**结论:**尼古丁通过上皮间质转化诱导 PC-9 细胞吉非替尼耐药,二甲双胍可以逆转上述现象。

【关键词】尼古丁;吉非替尼耐药;上皮间质转化;二甲双胍**【中图分类号】**R730.261**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-11-13

Metformin reverses nicotine-induced gefitinib resistance by epithelial-mesenchymal transition

Hu Jing¹, Li Jun¹, Li Dandan², Zhang Lu¹, Zhang Hui¹, Chen Hong¹

(1. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; 2. Department of Respiratory Medicine, The Tang Du Hospital of The Fourth Military Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the molecular basis for nicotine (NIC) to induce resistance of epithelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKI) in EGFR-mutated PC-9 cells and the effect of the metformin in the process. **Methods:** PC-9 cells were divided into 4 groups, namely control group, NIC group, MET group and MET+NIC group. EMT markers were detected by quantificational real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot. Cell counting Kit-8 (CCK-8) assays were used to evaluate the sensibility to gefitinib of different group cells. The invasion ability and migration ability of different groups were detected by Transwell assay. **Results:** Nicotine induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) of PC-9 cells in a time and concentration dependent manner. Down-regulation

作者介绍:胡菁, Email: 821019572@qq.com,

研究方向:肺癌的基础与临床。

通信作者:陈虹, Email: hopehong2003@126.com。

基金项目:国家临床重点专科经费资助项目(编号:卫办医政函[2012]649号);重庆市卫生局资助项目(编号:ZY20132165号)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190222.0924.044.html> (2012-02-22)

of E-cadherin and up-regulation of Vimentin were most significant with a treatment of 10 $\mu\text{mol/L}$ nicotine for 10 h, so further experiments were completed under this condition. CCK-8 displayed reduction of gefitinib sensitivity of PC-9 cells in the NIC group compared with the control group, especially with a gefitinib concentration of 0.05 $\mu\text{mol/L}$ ($F=82.005, P=0.000, P=0.000$). In invasion assays, more penetrating cells were observed in the NIC group than in the control group [(15.70 \pm 1.53) vs. (32.70 \pm 2.08), $F=75.406, P=0.000, P=0.000$]. Migration assays presented similar results [(102.70 \pm 7.02) vs. (18.70 \pm 2.08), $F=204.038, P=0.000, P=0.000$]. E-cadherin mRNA expression decreased [(0.932 \pm 0.100) vs. (0.459 \pm 0.024), $F=25.924, P=0.000, P=0.000$] and Vimentin mRNA expression increased [(1.200 \pm 0.200) vs. (1.973 \pm 0.129), $F=20.998, P=0.000, P=0.000$] in the NIC group compared with the control group, and Western blot showed the same results. Cells in the MET+NIC group displayed higher sensitivity to gefitinib, which is statistically significant with a gefitinib concentration of 0.05, 0.10, 0.50, 1.00 and 5.00 $\mu\text{mol/L}$. Fewer cells penetrated the Matrigel in the NIC+MET group [(17.00 \pm 2.00) vs. (32.70 \pm 2.08), $F=75.406, P=0.000, P=0.000$] and migration assays presented similar results [(51.70 \pm 5.03) vs. (102.70 \pm 7.02), $F=204.038, P=0.000, P=0.000$]. E-cadherin mRNA expression was upregulated [(0.459 \pm 0.024) vs. (0.838 \pm 0.058), $F=25.924, P=0.000, P=0.000$], and Vimentin mRNA expression was downregulated [(1.973 \pm 0.129) vs. (1.467 \pm 0.115), $F=20.998, P=0.000, P=0.003$] in the NIC+MET group compared with the NIC group. Western blot showed the same results.

Conclusion: Nicotine induced EGFR-TKI resistance in PC-9 cells by EMT in non-small cell lung cancer, which could be reversed by metformin.

[Key words] nicotine; gefitinib resistance; epithelial mesenchymal transition; metformin

肺癌是全球肿瘤相关死亡率最高的恶性肿瘤,其中 85%是非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)^[1],肺癌患者早期症状并不明显,导致总体五年生存率只有约 15.9%^[2]。表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epithelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKI)如吉非替尼、厄洛替尼,可以有效提高 EGFR 敏感突变(19 外显子缺失和 21 外显子 L858R)肺腺癌病人的无进展生存期。然而研究显示,同样是接受吉非替尼或厄洛替尼治疗的 EGFR 突变型肺腺癌患者,正在吸烟者较非吸烟者拥有更低客观缓解率(objective remission rate, ORR)、疾病控制率(disease control rate, DCR)、无进展生存期(progression free survival, PFS)和总生存期(overall survival, OS)^[3-5]。由此可见,吸烟与 EGFR-TKI 治疗效果密切相关。

非小细胞肺癌 EGFR-TKI 耐药机制涉及 T790M 二次突变、EGFR 旁路激活、上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[6-7],上皮间质转化是一个高度程序化的过程。上皮细胞缺失上皮特征(E-cadherin 的下调),获得间质细胞特征(Vimentin 上调),细胞间粘连消失,从而促进细胞的侵袭和转移,导致 EGFR-TKI 耐药^[8-9]。因此,抑制 EMT 也许可以逆转 EGFR-TKI 耐药。

尼古丁作为香烟中的主要活性成分,虽然不是直接致癌,但是可以诱导人类癌细胞发生上皮间质

转化,并且促进肺癌的进展^[10-11]。二甲双胍(metformin, MET)是一种经典的治疗糖尿病的经典药物,其在肿瘤、心血管疾病还有多囊卵巢综合征中发挥重要作用^[12]。二甲双胍可以通过抑制 IL-6/STST3 信号通路来逆转 EMT 从而克服 EGFR-TKI 耐药^[13]。基于以上结论,本课题组提出科学假设,尼古丁通过上皮间质转化诱导非小细胞肺癌 EGFR-TKI 治疗耐药;二甲双胍可以通过逆转上皮间质转化从而克服 EGFR-TKI 耐药。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人肺腺癌细胞株 PC-9(EGFR 19 外显子缺失)获赠自第四军医大学附属西京医院张艰教授。于 5%CO₂, 恒湿 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱进行培养。用含 10%FBS 的 RPMI1640 培养液培养细胞。隔天换培养液,每 3~4 d 传代细胞,其对数生长期细胞用于后期实验。药物处理前一般先无血清处理细胞 6~8 h,尼古丁处理浓度分别为 0.0、0.1、1.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 。吉非替尼原药由英国 Tocris Bioscience 公司购买,原药常温保存。尼古丁由 Sigma 公司购买,液体 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。将 25 mg 吉非替尼原药溶于 5.6 mL 二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)中,配制成 10 mmol 储存浓度,0.22 $\mu\text{mol/L}$ 滤器过滤后置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。SB431542 和二甲双胍分别购自美国 MCG 公司和美仑生物。E-cadherin 抗体、Vimentin 抗体以及 GAPDH 抗体购自 Cell Signaling Technology。胎牛血清购自 PAN 公司,RP-

MI1640 培养液和胰酶消化液均购自 Hyclone。MTT 试剂购自 Sigma 分装。ECL 发光液和二甲亚砜分别购自 Millipore Corporation 和 Thermo 公司;化学发光仪,Bio-Rad 公司;低温高速离心机,Sigma 公司;移液枪,Eppendorf 公司;流式细胞仪,BD 公司;SDS 电泳系统,北京六一生物科技有限公司;二氧化碳恒温细胞培养箱、全波长酶标仪以及电热恒温水浴箱,Thermo 公司;超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;-80 °C 超低温冰箱,日本三洋公司。

1.2 qRT-PCR 法检测 E-cadherin、Vimentin 的表达

按照总 RNA 试剂盒说明书要求来提取各组总 RNA,以 PrimeScript RT reagent Kit 说明书逆转录获取互补脱氧核糖核酸 (complementary DNA, cDNA), 然后按照灭菌蒸馏水、cDNA、上游引物、下游引物、SYBR Premix Ex Taq 配成 10 μ L 反应体系加入八连管;最后在荧光定量 PCR 仪上先 95 °C 30 s 预变性,然后 95 °C 5 s,59 °C 30 s,以此重复扩增 40 个循环。用于扩 Vimentin 目的片段的上游引物为 5'-GAGTC-CACTGAGTACCGGAG-3',下游引物为:5'-ACGAGCCATTT-CCTCCTTCA-3',E-cadherin 目的片段的上游引物为:5'-CGTAGCAGTGACGAATGTGG-3',下游引物为:5'-CTGGGC-AGTGTAGGATGTGA-3',GADPH 目的片段的上游引物为:5'-ACCTGACCTGCCGTCTAGAA-3',下游引物为:5'-TCCA-CCACCCTGTTGCTGTA-3'。

1.3 Western blot 检测 E-cadherin、Vimentin 的表达

提取各组细胞总蛋白检测 E-cadherin、Vimentin 的表达,每孔上样量为 80 μ g;使用 10%聚丙烯酰胺凝胶在恒压 120 mV 条件下进行电泳,在 250 mA 恒流条件下将凝胶上的蛋白转到膜上;然后使用 5%脱脂牛奶室温封闭 2 h;4 °C 孵育兔抗人 E-cadherin 单克隆抗体(1:1 000)、兔抗人 Vimentin 单克隆抗体(1:1 000)、兔抗人 GAPDH 单克隆抗体(1:1 000)过夜。使用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,相同种属二抗(1:3 000)室温孵育膜 2 h;再次使用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,最后使用 ECL 发光液曝光,利用 Bio-Rad 蛋白成像系统显影蛋白条带。

1.4 CCK-8 法检测吉非替尼对不同处理组 PC-9 细胞增殖抑制情况

将 100 μ L 空白对照组、10 μ mol/L 尼古丁组、二甲双胍+10 μ mol/L 尼古丁组 PC-9 细胞接种于 96 孔板(2 000 个/孔),每孔加入含 10%胎牛血清的培养液培养;24 h 后待细胞贴壁后更换为含不同浓度吉非替尼(0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5 μ mol/L)的培养液,设置阴性对照组(不加吉非替尼)及空白对照组(不加细胞),每个浓度设 3 个复孔;72 h 后每孔加入 CCK-8 试剂 10 μ L 或者加入含 10% CCK-8 的培养液,继续培养 1~2 h;用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度(absorbance, A)值。细胞存活率计算公式=[(A_{实验组}-A_{空白对照组})/(A_{阴性对照组}-A_{空白对照组})] \times 100%。利用 GraphPad Prism 5 软件以吉非替尼浓度对数值作为横坐标,细胞存活率为纵坐标作出浓度-抑

制率曲线,从而得出 IC₅₀。

1.5 Transwell 实验检测细胞侵袭迁移能力

Matrigel 与无血清培养液按照 1:8 比例稀释,每个 Transwell 上室加入 60 μ L,迁移实验不加 Matrigel,在 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养过夜;各组细胞用 0.25%胰酶消化后,用无血清培养液重悬细胞,每个 Transwell 上室加入 0.1 mL 细胞悬液(约 1 \times 10⁴ 个细胞),下室加入 0.6 mL 含 10%胎牛血清的培养液,在 37 °C、5%CO₂ 孵箱中培养 24 h;取出小室并弃去上室液体,用 PBS 洗 2 次,4%多聚甲醛固定 15 min,结晶紫染色 20 min;用 PBS 液洗 2 次,于倒置相差显微镜下进行拍照计数检测细胞侵袭迁移能力。

1.6 统计学方法

采用 GraphPad Prism 作图软件,SPSS 22.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组之间的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 吉非替尼敏感细胞株呈现上皮特征

PC-9 肺癌细胞株经不同浓度吉非替尼处理后,IC₅₀ 大约为(0.042 \pm 0.004) μ mol/L(图 1),前期实验中吉非替尼耐药型细胞株 PC-9(PC-9 gefitinib resistance,PC-9GR)其 IC₅₀ 值较敏感型细胞株 PC-9 升高。前期实验观察到 PC-9GR 细胞呈现 Vimentin 高表达,E-cadherin 低表达。与之相反,PC-9 细胞呈现 E-cadherin 高表达,Vimentin 低表达。这些数据表明上皮间质转化可能在吉非替尼耐药株耐药中起关键作用。

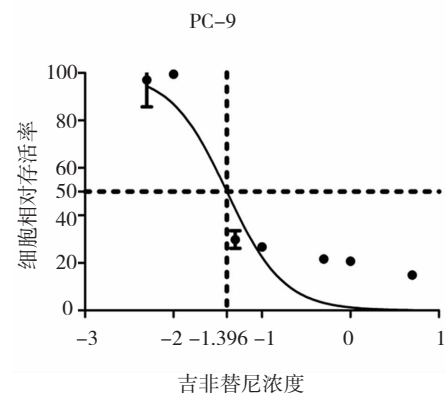
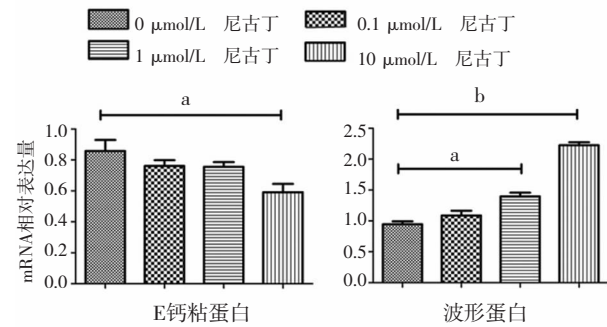


图 1 PC-9 细胞株对吉非替尼的生长曲线

2.2 尼古丁促进 PC-9 细胞上皮间质转化并呈时间浓度依赖

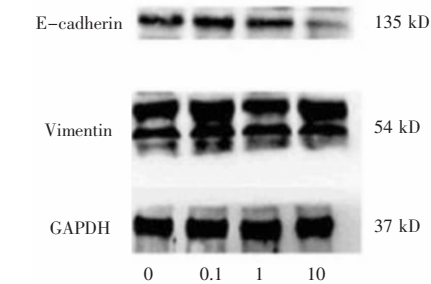
为进一步探讨尼古丁对敏感型肺腺癌细胞的影响,将饥饿处理的 PC-9 细胞株暴露于不同浓度和时间的尼古丁,qRT-PCR 实验结果显示,随着尼古丁浓度的增加,E-cadherin 的表达减少,方差分析结果显示各组间 E-cadherin 有明显统计学差异($F=4.749,P=0.035$),组间两两比较结果示

10 $\mu\text{mol/L}$ 尼古丁组 E-cadherin 的表达明显小于空白组 [(0.592 \pm 0.093) vs. (0.858 \pm 0.123), $P=0.006$](图 2A)。随着尼古丁浓度的增加, Vimentin 的表达升高, 方差分析结果显示各组间波形蛋白有明显统计学差异 ($F=94.701$, $P=0.000$), 事后两两分析结果显示 1 $\mu\text{mol/L}$ 尼古丁组 Vimentin 的表达明显高于空白组 [(1.397 \pm 0.103) vs. (0.946 \pm 0.081), $P=0.001$], 10 $\mu\text{mol/L}$ 尼古丁组 Vimentin 的表达明显高于空白组 [(2.225 \pm 0.084) vs. (0.946 \pm 0.081), $P=0.000$](图 2A)。运用 Western blot 显示相同的结果: 随着尼古丁处理时间的增加, E-cadherin 的表达减少, Vimentin 的表达增加(图 2C)。在尼古丁处理 72 h 后, 上皮间质转化最明显。随着尼古丁处理浓度的增加, E-cadherin 的表达逐渐减少(图 2B)。并且经过尼古丁处理后的 PC-9 细胞由上皮形态转化为间质样细胞形态(图 3B)。综上所述, 尼古丁能诱导敏感细胞株 PC-9 发生上皮间质转化, 在 10 $\mu\text{mol/L}$ 尼古丁处理 72 h 时上皮间质转化最明显, 故选用此做以下研究。具体数据见表 1~3。

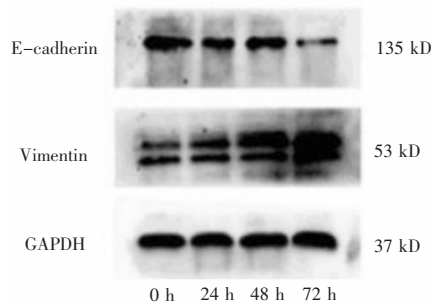


a: $P < 0.01$; b: $P < 0.005$

A. 不同浓度尼古丁诱导上皮间质 mRNA 水平改变



B. 不同浓度尼古丁诱导蛋白表达



C. 不同时间尼古丁诱导蛋白表达

图 2 尼古丁诱导 PC-9 细胞上皮间质转化

表 1 不同浓度尼古丁诱导 PC-9 细胞 mRNA 表达 ($n=3$)

组别	E-cadherin	Vimentin
空白组	0.86 \pm 0.12	0.95 \pm 0.08
0.1 mol/L 尼古丁组	0.76 \pm 0.06	1.09 \pm 0.13
1.0 mol/L 尼古丁组	0.76 \pm 0.05	1.40 \pm 0.11
10.0 mol/L 尼古丁组	0.76 \pm 0.05	2.23 \pm 0.08
<i>F</i> 值	4.749	94.701
<i>P</i> 值	0.035	0.000
空白组和 0.1 mol/L 尼古丁组 <i>P</i> 值	0.214	0.124
空白组和 1.0 mol/L 尼古丁组 <i>P</i> 值	0.191	0.001
空白组和 10.0 mol/L 尼古丁组 <i>P</i> 值	0.006	0.000

表 2 不同浓度尼古丁诱导 PC-9 细胞 EMT 蛋白相对表达量 ($n=3, \%$)

组别	E-cadherin	Vimentin
空白组	1.12 \pm 0.28	0.92 \pm 0.08
0.1 mol/L 尼古丁组	1.03 \pm 0.25	1.02 \pm 0.11
1.0 mol/L 尼古丁组	0.88 \pm 0.26	0.95 \pm 0.17
10.0 mol/L 尼古丁组	0.46 \pm 0.14	0.21 \pm 0.02
<i>F</i> 值	4.507	4.439
<i>P</i> 值	0.039	0.041
空白组和 0.1 mol/L 尼古丁组 <i>P</i> 值	0.665	0.257
空白组和 1.0 mol/L 尼古丁组 <i>P</i> 值	0.261	0.740
空白组和 10.0 mol/L 尼古丁组 <i>P</i> 值	0.010	0.011

表 3 不同时间尼古丁诱导 PC-9 细胞 EMT 蛋白相对表达量 ($n=3, \%$)

组别	E-cadherin	Vimentin
空白组	0.23 \pm 0.06	0.08 \pm 0.01
24 h 尼古丁组	0.16 \pm 0.05	0.11 \pm 0.02
48 h 尼古丁组	0.13 \pm 0.05	0.14 \pm 0.03
72 h 尼古丁组	0.08 \pm 0.02	0.17 \pm 0.04
<i>F</i> 值	6.154	8.783
<i>P</i> 值	0.018	0.007
空白组和 24 h 尼古丁组 <i>P</i> 值	0.093	0.092
空白组和 48 h 尼古丁组 <i>P</i> 值	0.023	0.008
空白组和 72 h 尼古丁组 <i>P</i> 值	0.003	0.001

2.3 尼古丁诱导吉非替尼敏感细胞 PC-9 耐药并促进细胞的侵袭迁移能力

饥饿处理的 PC-9 细胞暴露 10 $\mu\text{mol/L}$ 尼古丁 72 h 后, PC-9 细胞对 EGFR-TKI 的耐药性在吉非替尼浓度为 0.05 时最明显, 两两分析结果显示尼古丁组细胞存活率明显高于空白组 [(54.083 \pm 0.380) vs. (36.684 \pm 2.703), $P=0.000$](图 3A)。侵袭实验提示尼古丁组 PC-9 细胞通过基质胶的细胞数量明显增多相比于空白组 [(32.70 \pm 2.08) 个/高倍视野 vs. (15.70 \pm 1.53) 个/高倍视野, $P=0.000$](图 3B、C)。迁移实验表明, 尼古丁组处理 PC-9 细胞后通过膜的细胞数量相比于空

白组数量增加(102.70 ± 7.02)个/高倍视野 vs. (18.70 ± 2.08)个/高倍视野, $P=0.000$](图 3B、D)。这些结果表明尼古丁导致敏感细胞株 PC-9 发生耐药并促进其侵袭和迁移。

2.4 二甲双胍逆转尼古丁诱导 PC-9 细胞的吉非替尼耐药和侵袭迁移

如上所述,尼古丁诱导 PC-9 细胞吉非替尼的耐药,接着探索二甲双胍是否能逆转尼古丁导致的吉非替尼耐药。PC-9 细胞饥饿处理后,先用 5 mmol/L 二甲双胍处理 4~6 h,然后再用 10 μmol/L 尼古丁处理 72 h。在吉非替尼浓度为 0.05 μmol/L 时,方差分析结果显示各组间细胞生存率有明显统计学差异 ($F=82.005, P=0.000$),事后两两分析结果显示尼古丁组细胞存

活率明显高于对照组[(54.083 ± 0.380) vs. (36.684 ± 2.703), $P=0.000$],尼古丁+二甲双胍组细胞存活率低于尼古丁组 [(41.692 ± 1.164) vs. (54.083 ± 0.380), $P=0.000$](图 3A)。在吉非替尼浓度为 0.1、0.5、1、5 μmol/L 时均有意义(图 3A)。尼古丁+二甲双胍组的 PC-9 细胞的侵袭能力相比尼古丁组减少 [(17.00 ± 2.00)个/高倍视野 vs. (32.7 ± 2.08)个/高倍视野, $P=0.000$](图 3B、C)。迁移实验同样提示尼古丁+二甲双胍组相比尼古丁组的 PC-9 细胞穿膜数减少 [(51.7 ± 5.03)个/高倍视野 vs. (102.7 ± 7.02)个/高倍视野, $P=0.000$](图 3B、D)。以上证据表明,二甲双胍能够逆转尼古丁导致的敏感细胞 PC-9 吉非替尼耐药和侵袭迁移。见表 4、5。

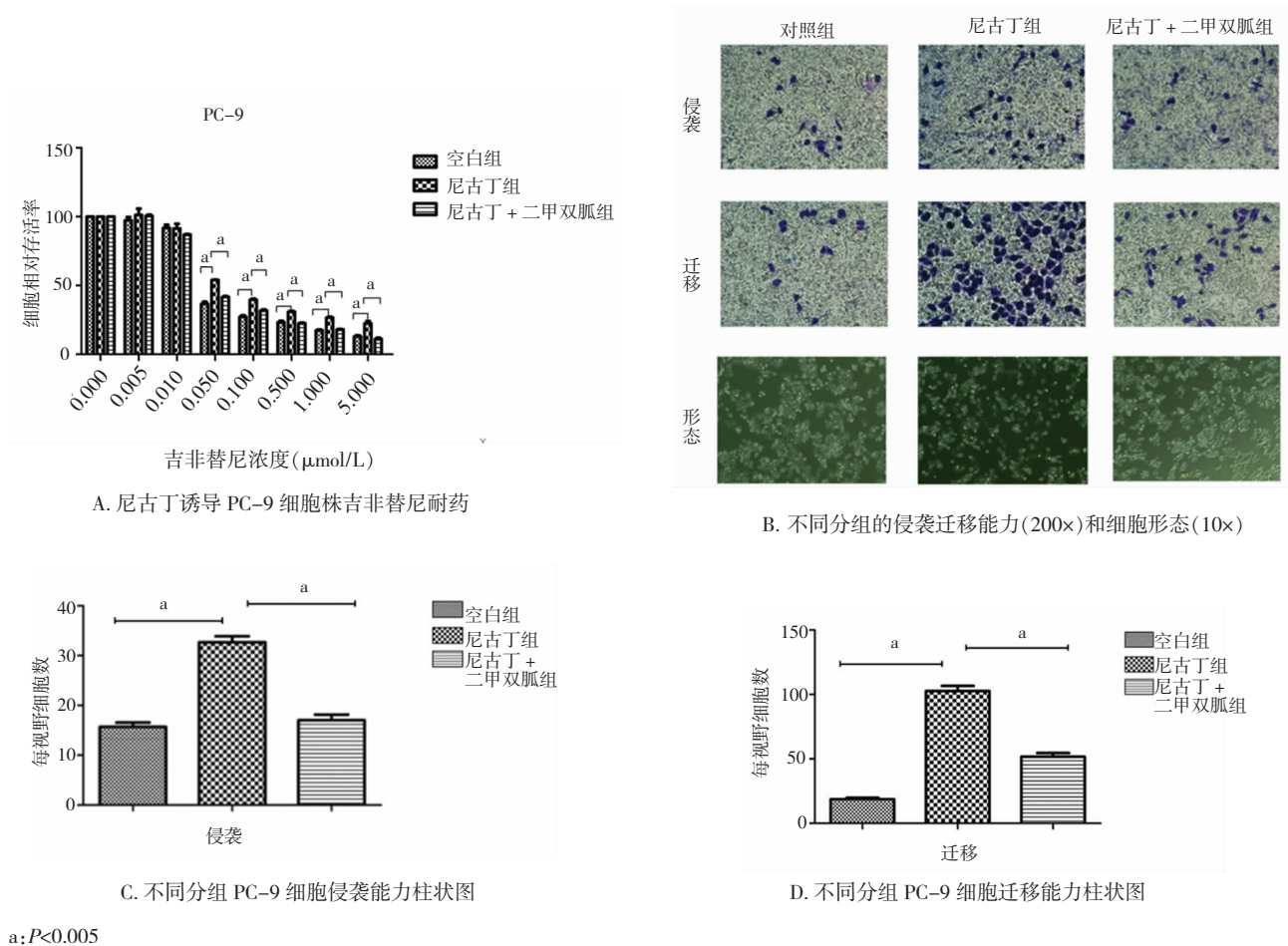


图 3 尼古丁诱导 PC-9 细胞株吉非替尼耐药和侵袭迁移

表 4 尼古丁诱导 PC-9 细胞耐药 (n=3)

组别	0.05 μmol/L	0.10 μmol/L	0.50 μmol/L	1.00 μmol/L	5.00 μmol/L
空白组	36.68 ± 2.70	27.27 ± 1.87	23.32 ± 1.82	17.46 ± 1.01	13.12 ± 1.15
尼古丁组	54.08 ± 0.38	39.69 ± 1.26	30.92 ± 1.16	26.71 ± 0.97	22.42 ± 3.01
尼古丁 + 二甲双胍组	41.69 ± 1.16	31.80 ± 1.34	22.60 ± 0.93	18.12 ± 0.51	11.23 ± 1.44
F 值	82.005	51.742	34.895	107.996	25.938
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001
空白组和尼古丁组 P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001
NIC和尼古丁 + 二甲双胍组 P 值	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001

a: $P < 0.005$

表 5 不同分组 PC-9 细胞的侵袭迁移 (n=3)

分组	侵袭个数	迁移个数
空白组	15.67 ± 1.53	18.67 ± 2.08
尼古丁组	32.67 ± 2.08	102.67 ± 7.02
尼古丁 + 二甲双胍组	17.00 ± 2.00	51.67 ± 5.03
F 值	75.406	204.038
P 值	0.000	0.000
空白组和尼古丁组 P 值	0.000	0.000
尼古丁和尼古丁 + 二甲双胍组 P 值	0.000	0.000

表 6 不同分组 PC-9 细胞 mRNA 表达 (n=3)

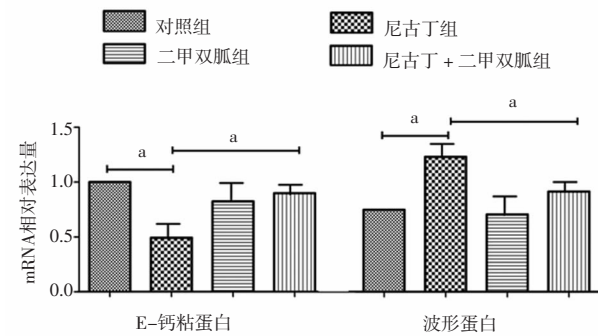
分组	E-cadherin	Vimentin
空白组	0.93 ± 0.08	1.20 ± 0.12
尼古丁组	0.46 ± 0.01	1.97 ± 0.10
二甲双胍组	0.77 ± 0.04	1.13 ± 0.10
尼古丁 + 二甲双胍组	0.84 ± 0.03	1.47 ± 0.04
F 值	25.924	20.998
P 值	0.000	0.000
空白组和尼古丁组 P 值	0.000	0.000
尼古丁和尼古丁 + 二甲双胍组 P 值	0.000	0.003

2.5 二甲双胍逆转尼古丁诱导 PC-9 细胞的上皮间质转化

qRT-PCR 实验结果显示,尼古丁相比于空白组,E-cadherin 的 mRNA 的含量低于空白组[(0.459 ± 0.024) vs. (0.932 ± 0.100),P=0.000],Vimentin 的 mRNA 的含量高于空白组 [(1.973 ± 0.129)vs.(1.200 ± 0.200),P=0.000]。尼古丁+二甲双胍组相比于尼古丁组,E-cadherin 的 mRNA 的含量明显升高 [(0.838 ± 0.058) vs. (0.459 ± 0.024),P=0.000],Vimentin 的 mRNA 的含量降低[(1.467 ± 0.115) vs. (1.973 ± 0.129),P=0.003]。蛋白水平呈现相同的改变(图 4A、B)。而且预先使用二甲双胍能让尼古丁处理后的 PC-9 细胞部分重获上皮形态(图 3B)。这些结果表明,二甲双胍能够逆转尼古丁诱导的肺癌细胞上皮间质转化。见表 6、7。

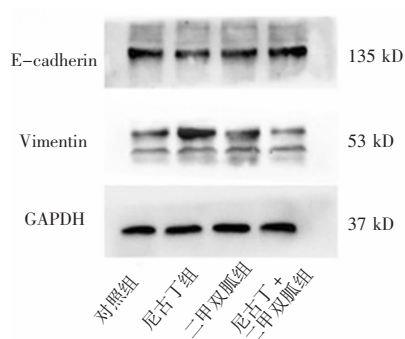
表 7 不同分组 PC-9 细胞 EMT 蛋白相对表达量 (n=3,%)

分组	E-cadherin	Vimentin
空白组	0.90 ± 0.11	3.01 ± 0.43
尼古丁组	0.55 ± 0.11	5.48 ± 0.52
二甲双胍组	0.83 ± 0.16	2.83 ± 0.43
尼古丁 + 二甲双胍组	0.86 ± 0.01	2.88 ± 0.67
F 值	6.414	18.314
P 值	0.016	0.001
空白组和尼古丁组 P 值	0.004	0.000
尼古丁和尼古丁 + 二甲双胍组 P 值	0.009	0.000



a: P<0.005

A. 不同分组 EMT 相关蛋白 mRNA 表达



B. 不同分组 EMT 相关蛋白表达

图 4 二甲双胍逆转尼古丁诱导的上皮间质转化

3 讨论

吸烟是全球最严重的社会问题。香烟成分复杂,里面存在超过 4 000 多种化学成分,其中存在大量的致癌物质,与脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 结合,激活原癌基因,抑制抑癌基因,最终导致肿瘤的发生发展^[14]。肺癌基因敏感突变中,表皮生长因子受体 19 (epidermal growth factor receptor19, EGFR19) 外显子缺失突变与 EGFR21 外显子L858R 是最常见的突变,是临床上运用 EGFR-TKI 治疗肺癌的重要依据之一,目前吸烟者和既往吸烟者 EGFR 突变率是 11%^[15]。但是,吸烟会影响 EGFR 敏感性突变的 NSCLC 患者靶向药物治疗效果,EGFR 突变肺癌患者吸烟指数 ≥ 30 包/年是靶向药物治疗疗效的阴性预测因子。香烟中的成分多样,其中许多成分是肿瘤促进因子和辅致癌物质^[3]。本实验选取香烟中的尼古丁成分进行研究,来探讨单一成分对肺癌的影响。基于以上结果,故本实验选用 EGFR19 外显子缺失突变的 PC-9 肺腺癌细胞株作为研究对象,探讨尼古丁对敏感肺癌细胞株的吉非替尼耐药可能的机制。

以往对尼古丁的认识局限其成瘾性,并且认为其无致癌性,故相关尼古丁电子烟运用于吸烟者帮助其戒烟。但是现在观点认为尼古丁不仅具备成瘾性,还可以促进肿瘤细胞增殖和癌组织血管生成、侵袭迁移^[16-18]。在本研究中,10 $\mu\text{mol/L}$ 尼古丁处理 PC-9 后对吉非替尼的敏感性降低,体外实验验证了尼古丁可以加速肺癌细胞耐药。人每吸完一支香烟,人体肺泡中的尼古丁的含量可达到 6-60 $\mu\text{mol/L}$ ^[19-20],故本实验选取 10 $\mu\text{mol/L}$ 尼古丁浓度很好地模拟人体吸烟情况,说明单一成分尼古丁使 PC-9 敏感细胞株发生靶向药物耐药,促进肿瘤细胞侵袭迁移,但是其下游机制没有阐述,探讨何种下游通路机制在其中发挥作用是本课题组下一步的研究目标。

尼古丁作为香烟中的关键成分,可以通过 EGFR 信号和尼古丁乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptors, nAChRs)来诱导 EGFR-TKI 耐药^[5]。本实验表明尼古丁可以促进肺癌细胞发生上皮间质转化,10 $\mu\text{mol/L}$ 尼古丁有明显的促进细胞侵袭转移、对吉非替尼耐药作用。浓度低、时间短的情况下,尼古丁促进细胞上皮间质转化的作用不明显,也许尼古丁需要足够的时间和浓度才能诱发 EMT 的产生。

EGFR-TKI 耐药机制复杂,其中上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是其中机制之一,上皮间质转化就是细胞失去极性的过程。在体内实验中,上皮间质转化决定了非小细胞肺癌对厄洛替尼的敏感性,高表达的 E-钙黏蛋白提高非小细胞肺癌病人 EGFR-TKI 药物的敏感性^[21]。在体外实验中,E-钙黏蛋白与 EGFR-TKI 药物敏感性有关。在肺癌患者中重获 E-钙黏蛋白表达可以增加对 EGFR-TKI 的敏感性^[22-23]。研究发现,尼古丁诱导 PC-9 细胞发生 EMT 后,肺癌细胞对吉非替尼的敏感度降低,促进细胞的侵袭迁移,更进一步证实 EMT 和靶向药物治疗疗效关系密切。但也有人认为 EMT 仅仅是细胞的一种表型,并不是其肺癌细胞发生耐药的机制,EMT 的调节有多种信号通路的调节,需更进一步的研究了解其背后的机制。

二甲双胍是一种广泛用于降低血糖的一线药,除此之外还可以治疗慢性心血管疾病,多囊卵巢综合征,以及肿瘤。二甲双胍可以通过改善人体的高血糖和高胰岛素水平以及激活 AMPK 通路影响细

胞的呼吸链^[24],最近研究发现转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor, TGF- $\beta 1$)是最新的二甲双胍作用靶点并且其可以直接结合于 TGF- $\beta 1$,并且抑制该分子结合于相应受体^[12]。临床研究显示,在患有 2 型糖尿病的进展期 NSCLC 患者中,二甲双胍联合 EGFR-TKI 能够获得更长的 PFS 和 OS^[25]。二甲双胍能够针对性地作用于导致肿瘤关键性步骤的肿瘤干细胞^[26]。本实验展现了预处理二甲双胍可以逆转上皮间质转化和尼古丁导致的吉非替尼耐药。这些证据表明二甲双胍可以作为 EGFR-TKI 治疗非小细胞肺癌的辅助用药。

总之,尼古丁可以通过上皮间质转化诱导人肺癌细胞株 PC-9 吉非替尼耐药,深入了解香烟成分对肺癌细胞的影响,可以帮助寻找烟草暴露诱导耐药的重要因素,而且有助于吸烟者或者电子烟吸入者进一步认识吸烟及其单一成分对人体的危害,从而促进其早日戒烟。

参 考 文 献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Ettinger DS, Akerley W, Borghaei H, et al. Non-small cell lung cancer, version 2. 2013 [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2013, 11(6): 645-653.
- [3] Kim MH, Kim HR, Cho BC, et al. Impact of cigarette smoking on response to epidermal growth factor receptor (EGFR)-tyrosine kinase inhibitors in lung adenocarcinoma with activating EGFR mutations [J]. Lung Cancer, 2014, 84(2): 196-202.
- [4] Fukuhara T, Maemoudo M, Inoue A, et al. Factors associated with a poor response to gefitinib in the NEJ002 study: smoking and the L858R mutation [J]. Lung Cancer, 2015, 88(2): 181-186.
- [5] Togashi Y, Hayashi H, Okamoto K, et al. Chronic nicotine exposure mediates resistance to EGFR-TKI in EGFR-mutated lung cancer via an EGFR signal [J]. Lung Cancer, 2015, 88(1): 16-23.
- [6] LoPiccolo J, BluMenthal GM, Bernstein WB, et al. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations [J]. Drug Resist Updat, 2008, 11(1-2): 32-50.
- [7] Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors [J]. Sci Transl Med, 2011, 3(75): 75ra26.
- [8] 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.
- [9] Uramoto H, Iwata T, Onitsuka T, et al. Epithelial-mesenchymal transition in EGFR-TKI acquired resistant lung adenocarcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(7):2513-2517.
- [10] Mai H, May WS, Gao F, et al. A functional role for nicotine in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(3):1886-1891.
- [11] Brenner C, Kroemer G. Apoptosis. Mitochondria--the death signal integrators[J]. *Science*, 2000, 289(5482):1150-1151.
- [12] Xiao H, Zhang J, Xu Z, et al. Metformin is a novel suppressor for transforming growth factor(TGF)-beta1[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:28597.
- [13] Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, et al. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients[J]. *BMJ*, 2005, 330(7503):1304-1305.
- [14] DeMarini DM, Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review[J]. *Mutat Res*, 2004, 567(2-3):447-474.
- [15] Dogan S, Shen R, Ang DC, et al. Molecular epidemiology of EGFR and KRAS mutations in 3,026 lung adenocarcinomas; higher susceptibility of women to smoking-related KRAS-mutant cancers[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(22):6169-6177.
- [16] Matta SG, Balfour DJ, Benonltz NL, et al. Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research[J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2007, 190(3):269-319.
- [17] Shin VY, Wu WK, Ye YN, et al. Nicotine promotes gastric tumor growth and neovascularization by activating extracellular signal-regulated kinase and cyclooxygenase-2[J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25(12):2487-2495.
- [18] Heeschen C, Chang E, Aicher A, et al. Endothelial progenitor cells participate in nicotine-mediated angiogenesis[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 48(12):2553-2560.
- [19] Dasgupta P, Rizwani W, Pillai S, et al. Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines[J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(1):36-45.
- [20] Clunes LA, Bridges A, Alexis N, et al. In vivo versus in vitro airway surface liquid nicotine levels following cigarette smoke exposure[J]. *J Anal Toxicol*, 2008, 32(3):201-207.
- [21] Yauch RL, Januario T, Eberhard DA, 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.
- [22] Witta SE, Gemmill RM, Hirsch FR, et al. Restoring E-cadherin expression increases sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer cell lines [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(2):944-950.
- [23] 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.
- [24] Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain[J]. *Biochem J*, 2000, 348(Pt 3):607-614.
- [25] Chen H, Yao W, Chu Q, et al. Synergistic effects of metformin in combination with EGFR-TKI in the treatment of patients with advanced non-small cell lung cancer and type 2 diabetes[J]. *Cancer Lett*, 2015, 369(1):97-102.
- [26] Rattan R, Ali Fehmi R, Munkarah A. Metformin: an emerging new therapeutic option for targeting cancer stem cells and metastasis[J]. *J Oncol*, 2012, 2012:928127.

(责任编辑:冉明会)

《重庆医科大学学报》

在线投稿网址: cyxb.alljournals.ac.cn