

乳腺癌细胞EGFR表达水平与长春瑞滨敏感度的相关性研究

宁永玲^{1,2} 谢叶文² 陈洁² 周洪^{1*} 戚春建^{2*}

(¹南京医科大学基础医学院, 南京 210029; ²南京医科大学附属常州市第二人民医院, 常州 213003)

摘要 乳腺癌是较早开始个体化治疗的肿瘤之一。表皮细胞生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的表达与乳腺癌组织学分期、生长速度呈正相关, 可作为乳腺癌患者预后的指标之一。临床上, 长春瑞滨(Vinorelbine, NVB)主要作为耐药性晚期乳腺癌的挽救性化疗药物, 单药治疗亦具有一定疗效。该研究结果发现, 乳腺癌组织EGFR表达与NVB的敏感性相关($P=0.001$), 而与紫杉醇、阿霉素及5-氟尿嘧啶无相关性。EGFR阴性乳腺癌细胞MDA-MB-435s对NVB耐药, 而EGFR阳性细胞MCF-7则敏感, 但是EGFR中和性抗体会降低敏感性。进一步研究发现, NVB会引起MCF-7表面EGFR表达上调, 以及胞内ERK1/2激酶的磷酸化, 且这一效应会被抗EGFR抗体部分抑制。研究结果表明, 乳腺癌细胞对NVB的敏感性与膜表面EGFR表达水平相关, 提示EGFR可作为NVB治疗敏感性的预测分子。

关键词 长春瑞滨; 表皮细胞生长因子受体; 乳腺癌

Correlation between EGFR Expression on Breast Cancer and NVB Sensitivity

Ning Yongling^{1,2}, Xie Yewen², Chen Jie², Zhou Hong^{1*}, Qi Chunjian^{2*}

(¹College of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China;

²The Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Changzhou No.2 People's Hospital, Changzhou 213003, China)

Abstract Breast cancer treatment has been individualized for a long time. Epidermal growth factor receptor (EGFR), whose expression level in tissue was generally associated with high tumor grade and elevated growth fraction, was a postoperative prognostic factor for breast cancer. As a salvage treatment after anthracyclines and taxanes in advanced breast cancer, vinorelbine (NVB) also had encouraging activity when used as a single agent. We found that EGFR expression in primary breast cancer specimens was significantly correlated with NVB sensitivity ($P=0.001$), while no significant correlation with paclitaxel, adriamycin or 5-fluorouracil. EGFR-negative breast cancer line MDA-MB-435s was resistant to NVB, while EGFR-positive line MCF-7 had a high sensitivity to NVB which could be reduced by anti-EGFR antagonistic antibody. Moreover, NVB upregulated EGFR expression in MCF-7 and affected ERK1/2 phosphorylation consequently, which could be partially inhibited by pretreatment inhibitory anti-EGFR antibody. Our study showed that breast cancer cells sensitivity to NVB was

收稿日期: 2013-11-07 接受日期: 2013-12-17

国家自然科学基金(批准号: 81272323)和江苏省自然科学基金(批准号: BK2011244、BK2012590)资助的课题

*通讯作者。Tel: 025-86862901, E-mail: hzhou@njmu.edu.cn; Tel: 0519-88107307, E-mail: qichunjian@gmail.com

Received: November 7, 2013 Accepted: December 17, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81272323) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (Grant No.BK2011244, BK2012590)

*Corresponding authors. Tel: +86-25-86862901, E-mail: hzhou@njmu.edu.cn; Tel: +86-519-88107307, E-mail: qichunjian@gmail.com

网络出版时间: 2014-03-03 11:55 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.03.0365.html>

associated with EGFR expression on cell membrane, suggesting EGFR expression may be used as a predictive marker for breast cancer treatment strategy.

Key words vinorelbine; epidermal growth factor receptor (EGFR); breast cancer

个体化治疗在肿瘤治疗中越来越显得重要。乳腺癌是较早开始个体化治疗的肿瘤之一,比如雌激素受体(estrogen receptor, ER)/孕激素受体(progesterone receptor, PR)阳性乳腺癌患者的内分泌治疗^[1]、人表皮生长因子受体-2(human epidermal growth factor receptor-2, HER-2)阳性乳腺癌的单克隆抗体治疗^[2]等,对肿瘤细胞表面各种特异性分子的明确鉴定有利于优化肿瘤治疗。

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是一种分子量为170 kDa的膜糖蛋白,其胞外区是配体结合结构域,胞浆结构域则具有酪氨酸特异性蛋白激酶活性和自体磷酸化位点。表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)是EGFR重要的配体之一,关于EGFR/EGF的结构及信号传导通路已有广泛深入的研究。据报道,30%~40%乳腺癌细胞表达EGFR,乳腺癌标本中EGFR的表达与组织学分期、生长速度呈正相关,而与ER表达呈负相关^[3]。这表明,EGFR可作为乳腺癌的术后预后分子。

长春瑞滨(Vinorelbine, NVB)为半合成长春新碱类化疗药,通过阻止微管蛋白聚合形成微管和诱导微管的解聚,使细胞周期的有丝分裂终止,并最终导致癌细胞死亡。大量临床试验已证实了NVB对乳腺癌的疗效。临床上,多是将NVB作为蒽环类和/或紫杉类耐药性晚期乳腺癌的挽救性化疗药物^[4]。NVB单药治疗乳腺癌具有一定疗效,且毒性较小。一项II期临床试验结果表明,NVB对乳腺癌的治疗效果与紫杉醇相当,较多西紫杉醇稍差^[5]。Depenbrok等^[6]发现,NVB会改变人乳腺癌细胞表面受体与EGF的结合能力,从而可能影响细胞的活性与增殖。EGFR酪氨酸激酶结构域突变与非小细胞肺癌对EGFR酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors, TKIs)的体外敏感性以及体内临床应答极其相关,这表明EGFR可作为TKIs治疗的预测分子。本研究中,我们将使用乳腺癌细胞来评估EGFR表达对NVB治疗的预测价值。

1 材料与方法

1.1 样本采集

手术标本取自50例2007年8月至2008年12月常

州市第二人民医院收治的乳腺癌患者。所有患者经病例确诊,术前均无化疗或内分泌治疗,临床资料见表1。研究内容经医院伦理委员会审查批准,全部患者均签署知情同意书。

1.2 细胞株和主要试剂

人乳腺癌细胞株MCF-7及MDA-MB-435s购自ATCC。RPMI 1640培养基及胎牛血清购于Gibco公司。细胞株常规复苏后接种于25 cm²培养瓶中,用含10%血清的RPMI 1640培养基于37℃、5% CO₂条件下培养。细胞铺满80%瓶底时,以0.25%胰酶消化,离心、重悬后,按1:3传代培养。抗EGFR抗体、抗Erk/p-Erk抗体购自Cell Signaling公司,NVB购自Pierre Febre公司。

1.3 免疫组织化学染色检测EGFR、HER-2的表达

均使用DAKO公司检测试剂盒进行检测。乳腺癌标本经7%福尔马林固定后进行石蜡包埋,切片厚度为5 μm。EGFR、HER-2均是以膜表面着色为阳性。以染色的胞膜完整性和色度为评分标准:-:阴性;+:淡黄色细颗粒,弱阳性;++:棕黄色颗粒,阳性;+++ :褐黄色粗颗粒,强阳性。用阳性细胞和阴性细胞分别作为阳性和阴性对照。

1.4 ATP肿瘤化疗药敏检测(ATP-tumor chemosensitivity assay, ATP-TCA)

ATP-TCA是一种常见的肿瘤化疗药敏检测

表1 50例乳腺癌患者的临床特征

Table 1 Clinical characteristics of 50 patients with breast cancer

临床特征 Characteristic	结果 Results
Age (y)	
Median	56 years
Range	32~79 years
Menopausal status	
Premenopausal	22(44%)
Postmenopausal	28(56%)
Histopathologic grading	
G ₁	15(30%)
G ₂	24(48%)
G ₃	6(12%)
G ₄	5(10%)

方法之一, 与临床结果有很好的相关性, 可体外预测肿瘤细胞或组织的化疗药物敏感性^[7]。取1~2 cm²大小的手术标本, 使用酶消化法得到乳腺癌原代细胞单细胞悬液。化疗药物检测浓度(test drug concentration, TDC)参考药物血峰浓度, 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)、阿霉素(adriamycin, ADM)、紫杉醇(pachitaxel, PTX)、NVB的TDC分别为25 µg/mL、1 µg/mL、13.8 µg/mL及1 µg/mL。将药物储存液依次倍比稀释为200%、100%、50%、25%、12.5% TDC, 体系为100 µL。最大抑制剂组和无药组作为对照。所有组均设3个复孔, 每孔细胞数为2×10⁴。37 °C、5% CO₂培养5~6 d后, 加入50 µL裂解液以及荧光素-荧光素酶, 上机检测。评分标准主要依据50%抑制浓度(50% inhibition concentration, IC₅₀)和90%抑制浓度(90% inhibition concentration, IC₉₀): -: 耐药, IC₉₀>100% TDC及IC₅₀>25% TDC; +: 轻敏, IC₉₀≤100% TDC及IC₅₀>25% TDC; ++: 敏感, IC₉₀>100% TDC及IC₅₀≤25% TDC; +++: 强敏, IC₉₀≤100% TDC及IC₅₀≤25% TDC。

1.5 Western blot

细胞用PBS洗涤后, 用1 mL预冷的RIPA缓冲液

(1×PBS, 1% NP-40, 0.5%脱氧胆酸钠, 0.1% SDS)及抑制剂(10 mg/mL PMSF, 30 µg/mL抑肽酶aprotinin, 100 mmol/L钒酸钠)重悬后, 置于冰上30 min。4 °C, 10 000×g, 离心10 min后取上清。用10% SDS-PAGE分离后转膜。4 µg/mL的EGFR抗体、Erk抗体或p-Erk抗体孵育1 h后, TBST(50 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 0.1%吐温20, pH7.5)洗涤2次。再加入40 mU/mL的POD标记的二抗孵育30 min。TBST洗涤4次后, 化学发光检测, 曝光。

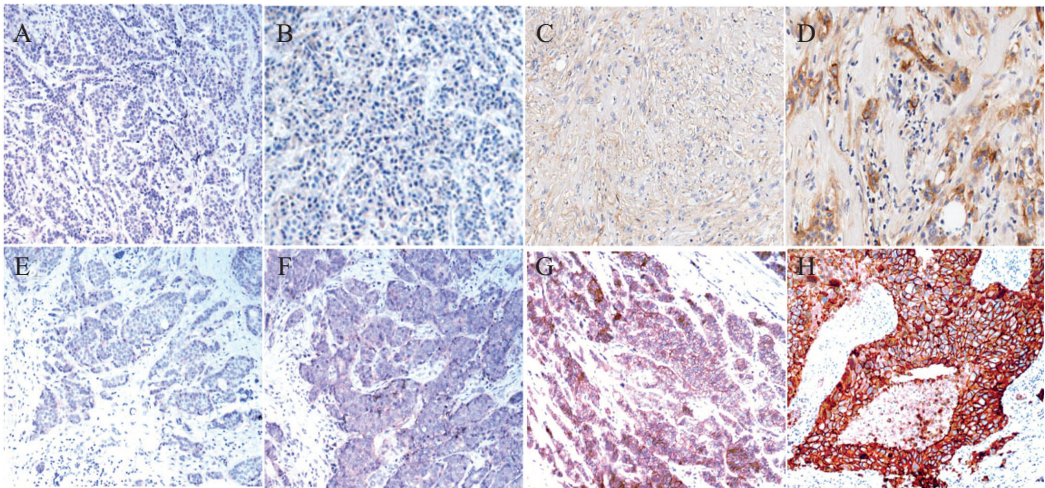
1.6 数据统计

实验数据以mean±S.D.形式表示均数, 比较采用t检验或单因素方差分析(ANOVA); 病理结果与化疗药敏相关性使用Spearman’s相关分析。P<0.05表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化法检测乳腺癌组织中EGFR和HER-2的表达

EGFR和HER-2蛋白在乳腺癌组织中呈不同水平的表达, 免疫组化染色后, 通过胞膜着色程度和完整性判定分为4个等级: 阴性、弱阳性(淡黄色)、阳



A-D依次表示乳腺癌组织中EGFR表达水平为-、+、++、+++; E-H依次表示HER-2表达水平为-、+、++、+++。
A-D represented EGFR expression level of breast cancer tissues as -, +, ++, +++, respectively; E-H represented HER-2 expression level as -, +, ++, +++, respectively.

图1 免疫组化检测EGFR和HER-2在乳腺癌组织中的表达

Fig.1 Expressions of EGFR/HER-2 in breast cancer tissues detected by immunohistochemistry

表2 50例乳腺癌标本中EGFR、HER-2的表达情况

Table 2 Expression status of EGFR/HER-2 in 50 breast cancer specimens

表达情况	阴性	弱阳	阳性	强阳
Expression status	Negative	Weak positive	Positive	Strong positive
EGFR	30(60%)	8(16%)	7(14%)	5(10%)
HER-2	21(42%)	14(28%)	7(14%)	8(16%)

性(棕黄色)和强阳性(褐黄色), 各级示意图1。共检测乳腺癌标本50例。其中EGFR阴性、弱阳、阳性、强阳分别占60%、16%、14%和10%; HER-2阴性、弱阳、阳性、强阳分别占42%、28%、14%和16%(表2)。

2.2 乳腺癌组织体外药敏检测结果

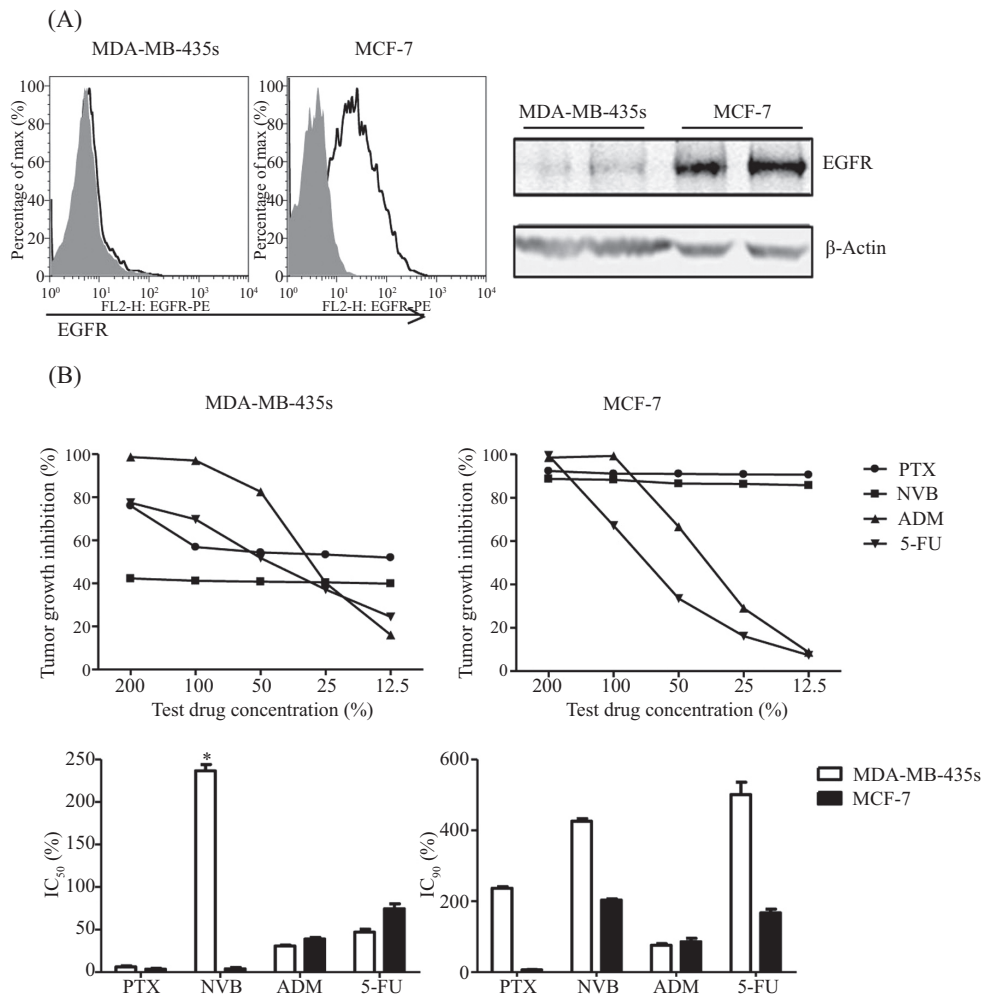
前期的研究发现, ATP-TCA法可以有效地检测肿瘤细胞对于化疗药物的敏感性^[7]。本实验结果显示, 患者乳腺癌细胞对5-FU、ADM、PTX、NVB的敏感率分别为6%、24%、62%和42%。Spearman's 相关分析结果显示, EGFR表达情况与PTX、ADM或5-FU的敏感度无相关性, 但是与NVB呈正相关性($P=0.001$); 而HER-2表达情况与PTX、NVB或

表3 化疗药物敏感度与乳腺癌组织HER-2、EGFR表达的相关性分析

Table 3 Correlation between drug sensitivity and HER-2 or EGFR expressions in breast cancer tissues

药物 Drug	统计值 Statistic	人表皮生长 因子受体-2 HER-2	表皮生长 因子受体 EGFR
PTX	Correlation coefficient	-0.035	0.038 8
	P	0.809	0.788
ADM	Correlation coefficient	0.304	0.223
	P	0.031 8*	0.119
5-FU	Correlation coefficient	-0.232	-0.128
	P	0.104	0.375
NVB	Correlation coefficient	0.064	0.452
	P	0.657	0.001*

* $P<0.05$ 。

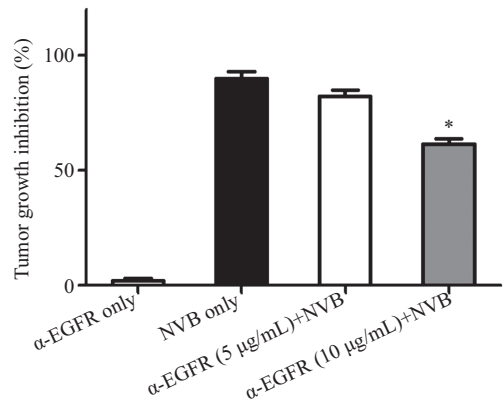


A: 流式细胞术、Western blot检测人乳腺癌细胞株MCF-7和MDA-MB-435s上EGFR表达水平; B: 分别用4种药物(PTX、NVB、ADM、5-FU), 5种浓度梯度(200%, 100%, 50%, 25%, 12.5% TDC)处理MCF-7和MDA-MB-435s。48 h后, 检测化疗药物的敏感度, 绘制肿瘤细胞生长抑制曲线, 并计算 IC_{50} 和 IC_{90} 。t检验, * $P<0.05$, MDA-MB-435s组与MCF-7组比较。

A: expression of EGFR on human breast cancer cells MCF-7 and MDA-MB-435s measured by flow cytometry (solid, isotype IgG) or Western blot; B: growth inhibition curves of MCF-7 and MDA-MB-435s exposed to four reagents (PTX, NVB, ADM, 5-FU) with various test concentrations (200%, 100%, 50%, 25%, 12.5% TDC) for 48 h and compared IC_{50} and IC_{90} (% TDC) values. * $P<0.05$ MDA-MB-435s group vs MCF-7 group.

图2 人乳腺癌细胞株EGFR的表达以及化疗药敏结果

Fig.2 Chemosensitivity results and EGFR expression of human breast cancer cells



MCF-7分别用0, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$ 抗EGFR抗体预处理1 h后, 再与NVB(100% TDC)共培养。48 h后用ATP-TCA法检测细胞生长抑制情况。* $P<0.05$, 与单独NVB组、EGFR抗体(5 $\mu\text{g/mL}$)+NVB组比较。

MCF-7 cells was pretreated with 0, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$ anti-EGFR for 1 h and then incubated in presence of NVB (100% TDC). Growth inhibition was tested by ATP-TCA after 48 h. * $P<0.05$ vs NVB only group and α -EGFR (5 $\mu\text{g/mL}$)+NVB group.

图3 不同浓度抗EGFR抗体预处理MCF-7对NVB药敏的影响
Fig.3 Effects of pre-treatments with different concentrations of anti-EGFR antibody on senvity of MCF-7 to NVB

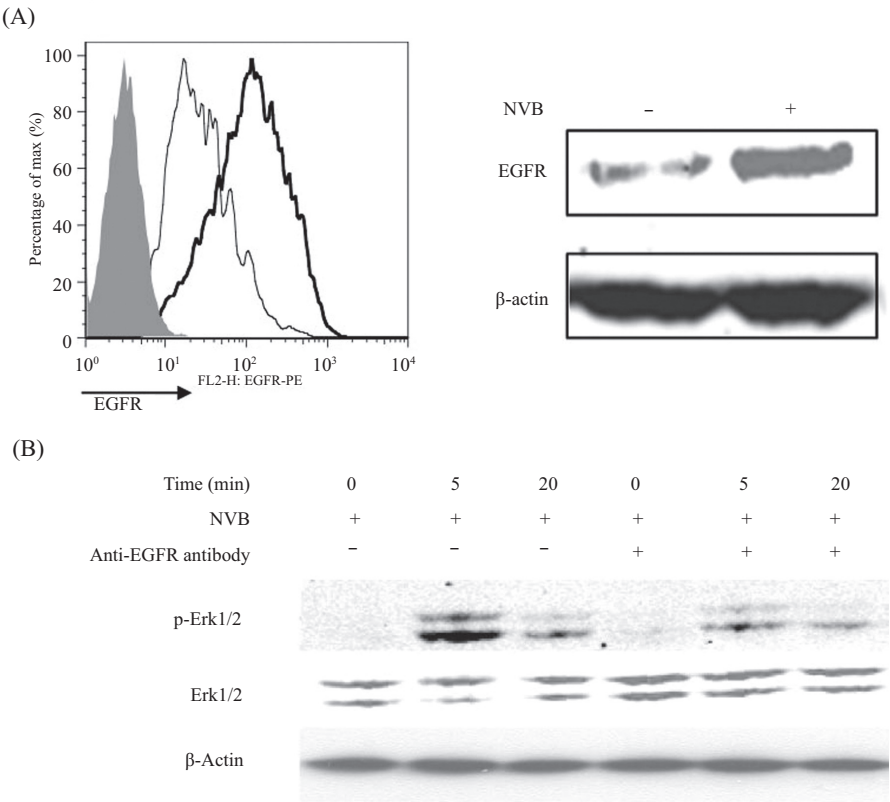
5-FU的敏感度无相关性, 但是与ADM呈正相关性 ($P=0.0318$)(表3)。

2.3 乳腺癌细胞株MCF-7和MDA-MB-435s的药敏检测结果

流式检测和Western blot检测结果均显示, 乳腺癌细胞株MCF-7高表达EGFR, 而MDA-MB-435s几乎不表达(图2A), 因此我们选取MCF-7和MDA-MB-435s作为实验对象。用ATP-TCA分别检测它们对PTX、NVB、ADM及5-FU的敏感度。结果显示, MCF-7对NVB敏感($\text{IC}_{50}=3.83\pm1.72$, $\text{IC}_{90}=203.01\pm3.89$), 对PTX强敏感($\text{IC}_{50}=3.45\pm1.02$, $\text{IC}_{90}=6.21\pm2.28$); 而MDA-MB-435s对NVB不敏感($\text{IC}_{50}=236.48\pm7.51$, $\text{IC}_{90}=425.66\pm7.38$)(图2B)。

2.4 抗EGFR抗体对NVB抑制乳腺癌细胞的影响

为了进一步探讨乳腺癌细胞EGFR表达对NVB敏感度的影响, 使用不同浓度的抗EGFR抗体对细胞进行预处理1 h, 再加入100% TDC的NVB。48 h后, 检测NVB对MCF-7的抑制情况。结果显示, 单



A: MCF-7经NVB处理后分别用流式细胞术(虚线为对照组, 黑线为NVB组)和Western blot检测EGFR表达水平; B: 再分析下游信号分子Erk1/2的磷酸化水平, 以及抗EGFR抗体预处理引起的变化。

A: MCF-7 cells were incubated in presence of 1 $\mu\text{g/mL}$ NVB for 24 h, then EGFR expression was measured by flow cytometry (solid: isotype IgG; light line: non-stimulation; dark line: NVB stimulation) or Western blot; B: MCF-7 cells were pretreated with anti-EGFR antibody or control IgG for 1 h and then exposed to 1 $\mu\text{g/mL}$ NVB for 24 h. Their lysates were analyzed using antibodies specific for phosphorylated and unphosphorylated Erk1/2.

图4 NVB处理后EGFR及下游信号分子在MCF-7中表达的变化
Fig.4 The changes of EGFR and down signal molecules expressions in MCF-7 treated with NVB

独EGFR单克隆抗体处理对乳腺癌细胞MCF-7生长无明显影响,但是却会明显降低NVB对它的抑制作用(图3)。NVB单独组,肿瘤细胞抑制率为 $(89.80 \pm 3.20)\%$;用 $10 \mu\text{g/mL}$ 抗EGFR抗体预处理后,肿瘤细胞抑制率下降为 $(61.50 \pm 2.44)\%$ 。

2.5 NVB对MCF-7上EGFR的表达及胞内ERK1/2磷酸化的影响

用 $1 \mu\text{g/mL}$ NVB处理MCF-7 24 h后,用流式细胞术或Western blot法检测EGFR表达情况。结果显示, NVB会引起MCF-7上调表达EGFR(图4A)。进一步研究发现, NVB刺激还会引起ERK1/2激酶磷酸化,并在5 min时达到最高, 20 min时明显下降;如果使用封闭性抗EGFR抗体预处理1 h,则会部分抑制这种效应(图4B)。

3 讨论

正常细胞的生长调控需要细胞因子与受体相互作用的参与,这种相互作用一旦失调便有可能导致细胞恶性转化。EGFR属于酪氨酸激酶生长因子受体家族的成员。已有研究表明, EGFR的表达会影响一些化疗药物的疗效^[8]。在乳腺癌患者中, EGFR表达阳性者为30%~40%,且EGFR的表达与病理分型及临床疗效相关^[9]。Depenbrock等^[6]报道, NVB会引起人乳腺癌细胞表面受体的表观结合位点的增加,从而增强与EGF的结合能力。他们还发现,这种作用不是通过直接改变细胞膜成分或细胞因子受体来实现,而是通过细胞质机制引起受体结合发生改变。我们的研究结果发现,乳腺癌组织EGFR表达与NVB的敏感性相关($P=0.001$),与其他3种药物(PTX、ADM、5-FU)未呈现相关性;HER-2同样是表皮生长因子受体酪氨酸激酶家族成员之一,但我们没有发现NVB敏感性与其表达水平相关,这表明NVB的敏感性与乳腺癌EGFR表达的相关性具有一定特异性。

以往的研究表明, EGFR表达会影响激素治疗和化疗的疗效^[10],可用于预后评估。本研究中,我们发现乳腺癌细胞EGFR的表达与NVB敏感性相关。EGFR阳性细胞MCF-7细胞株对NVB非常敏感,而EGFR阴性细胞株MDA-MB-435s则表现为耐药。在MCF-7中, NVB会引起功能性EGFR的上调,而EGFR中和性抗体则会降低NVB的敏感性。NVB促使乳腺癌细胞表面EGFR的表达上调,进而又可以增强细胞对药物的敏感性,这样就形成了一种正反馈效应。乳腺癌组织EGFR的表达水平也与NVB敏感强度呈

正相关。这些结果都与以往研究结果一致^[6]。

进一步对EGFR的下游信号分子通路研究发现, NVB刺激还会引起MCF-7细胞胞内ERK1/2激酶的磷酸化,而且这一效应会被抑制性EGFR抗体部分抑制。可以推测,化疗药物处理后,肿瘤细胞增加细胞因子受体的表达,可能是非致死损伤的细胞需要加速分裂的一种细胞应答机制。

总之,我们的研究结果表明乳腺癌细胞对NVB的敏感性与膜表面EGFR表达水平相关,暗示了EGFR或许可作为NVB治疗敏感性的预测分子用于乳腺癌患者的个性化治疗,但是这一结果尚需要进一步的研究和临床试验来得以证实。

参考文献 (References)

- 1 Ruddy KJ, Desantis SD, Gelman RS, Wu AH, Punglia RS, Mayer EL, *et al.* Personalized medicine in breast cancer: Tamoxifen, endoxifen, and CYP2D6 in clinical practice. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 141(3): 421-7.
- 2 Goldhirsch A, Gelber RD, Piccart-Gebhart MJ, de Azambuja E, Procter M, Suter TM, *et al.* 2 years versus 1 year of adjuvant trastuzumab for HER2-positive breast cancer (HERA): An open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2013; 382(9897): 1021-8.
- 3 Rimawi MF, Shetty PB, Weiss HL, Schiff R, Osborne CK, Chamness GC, *et al.* Epidermal growth factor receptor expression in breast cancer association with biologic phenotype and clinical outcomes. *Cancer* 2010; 116(5): 1234-42.
- 4 Oostendorp LJ, Stalmeier PF, Donders AR, van der Graaf WT, Ottevanger PB. Efficacy and safety of palliative chemotherapy for patients with advanced breast cancer pretreated with anthracyclines and taxanes: A systematic review. *Lancet Oncol* 2011; 12(11): 1053-61.
- 5 Capasso A. Vinorelbine in cancer therapy. *Curr Drug Targets* 2012; 13(8): 1065-71.
- 6 Depenbrock H, Shirvani A, Rastetter J, Hanauske AR. Effects of vinorelbine on epidermal growth factor-receptor binding of human breast cancer cell lines *in vitro*. *Invest New Drugs* 1995; 13(3): 187-93.
- 7 Qi CJ, Ning YL, Zhu YL, Min HY, Ye H, Qian KQ. *In vitro* chemosensitivity in breast cancer using ATP-tumor chemosensitivity assay. *Arch Pharm Res* 2009; 32(12): 1737-42.
- 8 Morinaga R, Okamoto I, Fujita Y, Arao T, Sekijima M, Nishio K, *et al.* Association of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutations with EGFR amplification in advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 2008; 99(12): 2455-60.
- 9 Carvalho MI, Guimarães MJ, Pires I, Prada J, Silva-Carvalho R, Lopes C, *et al.* EGFR and microvessel density in canine malignant mammary tumours. *Res Vet Sci* 2013; 95(3): 1094-9.
- 10 Marks RA, Zhang S, Montironi R, McCarthy RP, MacLennan GT, Lopez-Beltran A, *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in prostatic adenocarcinoma after hormonal therapy: A fluorescence *in situ* hybridization and immunohistochemical analysis. *Prostate* 2008; 68(9): 919-23.