

doi:10.3969/j.issn.1674-4616.2021.05.014

上皮间质转化引起非小细胞肺癌耐药的机制 及中医药治疗进展*

夏尽力 邓海滨[△]

上海中医药大学附属龙华医院肿瘤二科,上海 200032

关键词 上皮间质转化;非小细胞肺癌;耐药;中医药**中图分类号** R273 **文献标志码** A

上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是上皮细胞获得间充质表型的基本形态发生过程,其在肿瘤的侵袭、转移和耐药中起到重要的作用。近年来,EMT在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)耐药中的作用受到广泛关注。许多EMT相关的信号通路、转录因子都被证实参与了NSCLC治疗耐药,靶向EMT也被认为是克服耐药的新机会。中医药在干预EMT引起的NSCLC耐药中扮演了重要的角色,能够通过抑制EMT的发生而延缓肿瘤耐药,从而起到增效减毒的作用。现本文就EMT引起NSCLC耐药机制及中医药干预治疗进展进行概述如下。

1 EMT及其相关信号调控

1.1 EMT概述

经历EMT后,上皮细胞标志物E-钙粘蛋白(E-cadherin)、闭合蛋白(Occludin)等表达下降,并开始表达间质标志物N-钙粘蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、纤维连接蛋白(Fibronectin)等,在大多数情况下,E-cadherin的丢失或表达降低是EMT的标志。EMT并不是简单的从上皮到间质表型的转换,在肿瘤进展过程中,EMT通常诱导上皮细胞处于混合的上皮-间充质状态,在各种内源性和外源性信号的影响下,细胞可以变得更具间质表现或恢复到更具上皮性的表型(间质-上皮转化),它被认为与肿瘤干细胞表型和多重耐药的发展有关^[1]。EMT过程中基因表达的变化导致了大量的表型变化,如细胞形态变化、

粘附丧失和获得干细胞样特征,从而导致了肿瘤侵袭、转移及耐药。

1.2 EMT相关信号通路及转录因子

EMT涉及的信号通路十分复杂,目前有关具体机制尚未全部掌握。其中关键的信号通路包括转化生长因子 β (TGF- β)、Wnt、Notch和Hedgehog等。在NSCLC中,TGF- β 是研究重点。TGF- β 通过Smad依赖途径和非Smad依赖途径介导EMT的发生。在Smad依赖途径中,TGF- β 配体在细胞表面结合的I型受体(ALK5)被II型受体磷酸化,这导致Smad2、Smad3磷酸化,并与Smad4形成复合物;TGF- β 受体激活后,Smad复合物不仅能激活转录因子的表达,而且能提高转录因子的活性,如诱导Vimentin、Fibronectin等间充质基因的表达,从而导致EMT的发生和肿瘤的侵袭转移及治疗耐药。在非Smad依赖途径中,TGF- β 通过RHO-GTP酶、PI3K和MAPK等介导EMT的发生。其他信号通路,包括Notch、Wnt、Hedgehog,也参与在EMT中。这些信号通路导致了转录因子的激活,其中包括的SNAIL、E12/E47、TWIST1/TWIST2和ZEB1/ZEB2等已经被确定为EMT的主要调控因子。还有一些新的EMT转录因子,如SOX和FOX转录因子^[2-3];这些转录因子是EMT的重要诱导者,在EMT的发生发展中起重要作用。例如SNAIL(又称SNAIL1)和SLUG(又称SNAIL2)在胚胎发育、组织纤维化和肿瘤转移过程中可激活EMT过程,抑制上皮表型基因的表达;SNAIL既能参与抑制E-cadherin基因的表达,还可激活间质表型基因的表达,从而发挥促进EMT的作用。TWIST1、TWIST2属于bHLH转录因子,在EMT的发生、发展过程中亦具有关键作用。与SNAIL一样,TWIST也可下调上皮表型基因的表

*上海市教育委员会科研创新计划重大项目(No. 2017-01-07-00-10-E00064);上海市中医药领军人才计划[No. ZY(2018-2020)-RCPY-1001]

[△]通信作者,Corresponding author,E-mail:13661578200@139.com

达,并激活间质表型基因的表达。在肿瘤细胞中, TWIST1 可通过组蛋白甲基化抑制 E-cadherin 的启动子、激活 N-cadherin 的启动子,从而抑制 E-cadherin 的表达,并诱导 N-cadherin 的表达,促进 EMT 的发生;与 TWIST1 相比, TWIST2 具有更强的诱导 EMT 的作用。其他转录因子,如 ZEB1、ZEB2、FOX 和 SOX 对 EMT 也具有诱导和调节作用^[4-7]。

2 NSCLC 耐药

目前,肿瘤的耐药可分为固有性耐药和获得性耐药。固有性耐药是指肿瘤细胞初始便对药物不敏感,其耐药因子在治疗前已经产生;而获得性耐药是肿瘤细胞初始对药物敏感,但经过数个疗程的治疗,疗效逐渐降低而产生不敏感的现象,其耐药因子是在药物治疗过程中形成的;其耐药机制广泛且多样,如药物外排、EMT、肿瘤干细胞生成、药物靶点突变等。很多耐药因子都参与了肿瘤耐药过程。如肺耐药相关蛋白(lung resistance-related protein, LRP)可以介导细胞核和细胞质之间的细胞毒性药物的转运,使细胞内的药物浓度降低,诱导产生多药耐药(multidrug resistance, MDR),尤其是对顺铂、阿霉素、足叶乙苷等化疗药物。磷酸化糖蛋白(phosphorylated glycoprotein, P-gp)由 MDR1 基因编码,其耐药性的产生是由于 P-gp 通过其疏水位点和疏水性与紫杉醇、蒽环类等化疗药物结合,将进入细胞内的药物泵出细胞,从而表现为耐药,P-gp 高表达是导致 MDR 现象的重要依据。除 P-gp、LRP 蛋白外,肺癌的耐药性还与 MRP 蛋白、GST 和 TOPO II 酶、凋亡基因 Bcl-2、p53 表达水平有关,与 NF- κ B、PI3K/Akt、PKC 信号通路等也有关^[8-10]。在 NSCLC 中,转移和耐药(包括化疗和靶向治疗)仍然是患者生存率低的重要原因^[11]。在临床上,化疗和靶向治疗已是成熟的癌症治疗方法,长期以来它们被用作单一疗法或与手术或放疗相结合来治疗肿瘤。然而,无论是经典的细胞毒性药物还是分子靶向药物都面临耐药性的挑战^[12]。

3 EMT 引起 NSCLC 耐药的主要机制

EMT 与肿瘤耐药之间的关系虽然被研究了很久,但其具体的机制仍不清楚。在上皮性癌症发生过程中,具有间充质特征的细胞群体被认为与肿瘤的发生、发展、耐药有关。与上皮细胞相比,间充质细胞往往对多种抗癌药物具有更强的耐药性^[13]。其可能与 EMT 促进肿瘤干细胞生成、下调细胞毒性药物诱导的癌细胞凋亡等有关。

3.1 EMT 促进肿瘤干细胞生成引起耐药

肿瘤干细胞(CSC)是假定为具有干细胞特性的肿瘤细胞亚群,是具有无限自我更新能力和分裂能力的类干细胞。研究发现,相同肿瘤中的 CSC 比缺乏“干性”的肿瘤细胞(即非 CSC)在常规化疗和靶向治疗后对药物的抵抗力更强,而 CSC 和非 CSC 之间的表型差异似乎主要归因于前者 EMT 程序的激活所引起的表观遗传学变化^[14]。EMT 还可以将循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTC)与 CSC 联系起来,使这些具有干细胞特性的肿瘤细胞亚群能够在外周循环中存活,导致耐药的发生^[15]。

接受 EMT 的肿瘤细胞可获得干细胞样属性,从而促进 CSC 的产生。EMT 与 CSC 具有共同的关键信号通路和耐药表型。通过激活 Hedgehog、Notch 和 Wnt 等途径,CSC 表现出自我更新的能力。TGF- β 可诱导 EMT 的产生,进而还可促进 CSC 生成^[16]。胡翘廷等^[17]发现经 TGF- β 1 诱导 NSCLC 细胞株(PC-9)发生 EMT 后,CSC 含量显著增加;发生了 EMT 的吉非替尼获得性耐药细胞株(PC-9/AB)中 CSC 含量明显高于 PC-9 细胞,通过逆转 EMT, PC-9/AB 细胞中 CSC 含量降低,并且对吉非替尼的敏感性部分恢复。

3.2 EMT 下调细胞毒性药物诱导的癌细胞凋亡

吉非替尼等 EGFR-TKIs 通常被用于 NSCLC 的治疗,EGFR-TKI 可以与 EGFR 的 ATP 位点结合,从而降低其活性,诱导癌细胞凋亡。然而,研究表明,间充质表型比上皮表型对 EGFR-TKI 更具抵抗力,EMT 不仅与最初的敏感性有关,而且与对 EGFR-TKI 的获得性耐药有关,E-cadherin 的恢复可增强 NSCLC 细胞对 EGFR-TKI 的敏感性^[18]。

与 EMT 相关的 SLUG 蛋白是 SNAIL 蛋白超家族成员之一,SLUG 蛋白的表达在耐药细胞模型中起着关键作用。研究发现,与吉非替尼敏感株(PC9)相比,吉非替尼耐药株(PC9/gef)中 SLUG 蛋白表达显著增加,从而阻止靶向药物诱导肿瘤细胞凋亡。而 SLUG 蛋白表达下调不仅可以逆转 EMT 的发生,还可以恢复靶向药物的敏感性。癌细胞凋亡与内在的凋亡途径有关,该途径可分为抗凋亡蛋白、促凋亡蛋白和 BH3-only 蛋白。经吉非替尼处理后,BH3-only 蛋白和抗凋亡蛋白均无明显变化,而促凋亡蛋白 Bim 的 3 种亚型表达量均显著提高,SLUG 蛋白通过下调 Bim 来产生吉非替尼的耐药性^[19]。Notch 通路也被报道与耐药有关,Notch-1 可以直接或间接的调控促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白来调节癌细胞的存活。研究发现,吉非替尼耐药株中 Notch-1 表达高度上调,

Notch-1 可以保护 NSCLC 细胞免受吉非替尼诱导的凋亡,沉默 Notch-1 的表达后逆转了 EMT 的发生。Notch 抑制剂 DAPT 可使吉非替尼耐药株恢复对吉非替尼的再敏感,并在肿瘤生长抑制方面产生了有效的反应^[20]。

4 中医药干预 NSCLC 耐药的研究进展

4.1 单味中药在 NSCLC 耐药的作用

中医药可广泛应用于 NSCLC 治疗的各个阶段,对 NSCLC 的治疗作用不可忽视。研究表明,许多单味中药和中药复方可提高 NSCLC 对细胞毒性药物和分子靶向药物的疗效。三七具有化痰止血、活血定痛的作用,其有效成分为三七总皂苷。阮越勇等^[21]发现在三七总皂苷干预下,经历过 TGF- β 1 介导产生 EMT 的 A549 细胞 E-cadherin 增高, Fibronectin 和 Vimentin 降低,提示三七总皂苷能使上皮细胞保持原来的特性,逆转 EMT 并延缓靶向耐药的发生。姜黄具有破血、行气、通经、止痛的作用,姜黄素是从姜科、天南星科植物的根茎中提取的化学成分。李优等^[22]研究发现,姜黄素不仅能够逆转 TGF- β 1 介导的 NSCLC 发生 EMT,还可以逆转 TGF- β 1 介导的 A549 细胞发生侵袭转移。姜黄素能够抑制 E-cadherin 的下调,显著降低 N-cadherin 和 Vimentin 的表达,且与姜黄素的浓度呈现一定的剂量依赖性。高宝安等^[23]研究证明白花蛇舌草乙醇提取物使肺腺癌耐药细胞株(A549/DDP)对顺铂的耐药倍数下降近一半,对顺铂的敏感性增加近两倍,并显著降低多药耐药相关蛋白的表达。苦参具有清热燥湿、利尿的功效。沈云飞等^[24]发现,苦参可以降低吉非替尼诱导的 NSCLC 耐药细胞(PC9/ZD)中 Vimentin 及 N-cadherin 的表达,增加 E-cadherin 表达,提示苦参可逆转 PC9/ZD 细胞发生 EMT 和增加其对 EGFR-TKIs 的敏感性。

4.2 中药复方在 NSCLC 耐药的作用

较单味中药而言,中药复方防治或延缓 NSCLC 耐药的发生效果更佳。罗杨等^[25]研究发现,吉非替尼联合除痰解毒方比单用吉非替尼效果更佳,能延缓靶向耐药的发生,提示了除痰解毒方对 NSCLC 的治疗具有协同增效的作用;而其逆转 NSCLC 靶向耐药的机制与升高 E-cadherin,降低 SNAIL 和 Vimentin,从而逆转 EMT 有关。张敏等^[26]实验研究发现,中药复方益气养阴解毒方能在不降低 EGFR-TKI 疗效的前提下,减少皮疹、腹泻等不良反应的发生,明显改善患者的生活质量,其有效性及安全性均优于单纯 EGFR-TKI 组,并减少耐药的产生,具有增效减毒的作用。

汪一帆等^[27]研究发现使用中药抑肺饮后, Lewis 肺癌中 E-cadherin 的表达量上升,且抑肺饮联合顺铂组表达量最高;而 Vimentin 呈下调状态,并在抑肺饮联合顺铂组中最低。肺岩宁方主要由白术、生黄芪、干蟾皮、山慈菇、石见穿、黄精等益气养精、抑癌解毒中药组成,对 NSCLC 起攻补兼施之功效。赵晓珍等^[28-29]研究发现经肺岩宁方治疗后,EMT 发生过程中的 Vimentin 虽无明显改变,但 Fibronectin 和 N-cadherin 的表达显著性下降;与 EMT 相关的 TWIST、SNAIL 在肺岩宁方联合顺铂组表达显著降低,E-cadherin 显著升高;提示了肺岩宁方可以逆转 EMT 的发生。康小红等^[30]研究结果显示,肺岩宁方联合靶向药物治疗晚期肺腺癌的中位疾病进展时间明显优于单用靶向药物治疗组,提示肺岩宁方具有一定的延缓或防治 EGFR-TKIs 耐药的作用;同时发现 EGFR-TKI 耐药的细胞株上皮出现间质细胞表型,证实了 EMT 的发生,提示肺岩宁方延缓耐药的机制与 EMT 有关。

5 问题与展望

EMT 在 NSCLC 治疗耐药起到了重要的作用。然而,引起 NSCLC 耐药的机制比较复杂,EMT 并不是唯一的因素,且现代研究也没有阐明 EMT 引起 NSCLC 多重耐药的具体机制。因此有待进一步围绕 EMT 相关信号通路、基因水平等展开更加深入的研究。现代医学治疗 NSCLC 的方法已经相当成熟,但容易产生耐药性,毒副作用较多,对身体的损伤也较大。中医药减小肿瘤体积的能力虽不如现代医药,但现代医药联合中医药可以有效逆转 EMT 引起的 NSCLC 治疗耐药问题,达到事半功倍的效果;同时,还可以极大地减少现代药物带来的皮疹、腹泻等毒副作用。可见,中西医结合治疗 NSCLC 将为干预 EMT 途径引起的 NSCLC 治疗耐药提供新思路。

参 考 文 献

- [1] Gloushankova NA, Zhitnyak IY, Rubtsova SN. Role of epithelial-mesenchymal transition in tumor progression[J]. *Biochemistry(Mosc)*, 2018, 83(12):1469-1476.
- [2] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3):178-196.
- [3] Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition [J]. *Sci Signal*, 2014, 7(344):re8.
- [4] Dong C, Wu Y, Wang Y, et al. Interaction with Suv39 H1 is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in

- breast cancer[J]. *Oncogene*, 2013, 32(11):1351-1362.
- [5] Way TD, Huang JT, Chou CH, et al. Emodin represses TWIST1-induced epithelial-mesenchymal transitions in head and neck squamous cell carcinoma cells by inhibiting the β -catenin and Akt pathways[J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50(2):366-378.
- [6] Liu L, Chen X, Wang Y, et al. Notch3 is important for TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer bone metastasis by regulating ZEB-1[J]. *Cancer Gene Ther*, 2014, 21(9):364-372.
- [7] Guo W, Keckesova Z, Donaher JL, et al. Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state[J]. *Cell*, 2012, 148(5):1015-1028.
- [8] 郭亚楠, 蒋兵, 郭红云, 等. 非小细胞肺癌耐药机制及其逆转耐药的研究进展[J]. *甘肃医药*, 2020, 39(10):871-875.
- [9] 孙彬栩, 杨佩颖. 非小细胞肺癌多药耐药机制及其逆转的研究进展[J]. *疑难病杂志*, 2013, 12(1):77-79.
- [10] 刘超, 邓智勇. 肺癌多药耐药机制及其逆转方法的研究进展[J]. *标记免疫分析与临床*, 2016, 23(9):1086-1090.
- [11] Du B, Shim JS. Targeting epithelial-mesenchymal transition(EMT) to overcome drug resistance in cancer[J]. *Molecules*, 2016, 21(7):965.
- [12] Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance[J]. *Annu Rev Med*, 2002, 53:615-627.
- [13] Wilson C, Nicholes K, Bustos D, et al. Overcoming EMT-associated resistance to anti-cancer drugs via Src/FAK pathway inhibition[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(17):7328-7341.
- [14] Shibue T, Weinberg RA. EMT, CSCs, and drug resistance; the mechanistic link and clinical implications[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(10):611-629.
- [15] Mitra A, Mishra L, Li S. EMT, CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(13):10697-10711.
- [16] Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells[J]. *Cell*, 2008, 133(4):704-715.
- [17] 胡翹廷, 周娟, 程东海, 等. 肿瘤干细胞在 NSCLC 细胞 EMT 介导的 EGFR-TKI 获得性耐药中的作用[J]. *实用医学杂志*, 2016, 32(8):1223-1225.
- [18] 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.
- [19] Chang TH, Tsai MF, Su KY, et al. Slug confers resistance to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183(8):1071-1079.
- [20] Xie M, He CS, Wei SH, et al. Notch-1 contributes to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor acquired resistance in non-small cell lung cancer in vitro and in vivo[J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(16):3559-3572.
- [21] 阮越勇, 张浩军, 疏欣杨, 等. 三七总皂苷对肺癌 A549 细胞上皮间质转化的抑制作用[J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(1):76-81.
- [22] 李优, 王剑, 牟好, 等. 姜黄素通过 PI3K/AKT/mTOR 通路抑制 TGF- β 1 诱导的肺癌细胞上皮间质转化[J]. *肿瘤学杂志*, 2016, 22(8):607-614.
- [23] 高宝安, 陈世雄, 邓红艳, 等. 白花蛇舌草乙醇提取物对肺腺癌 A549/DDP 细胞的耐药逆转及其机制[J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(11):2714-2716.
- [24] 沈云飞, 詹建伟. 苦参对耐吉非替尼人肺腺癌 PC9/ZD 细胞上皮间质转化及吉尼药物敏感性的影响[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2019, 29(9):706-708, 713, 787.
- [25] 罗杨, 童冰杰, 赵宾, 等. 除痰解毒方通过 EMT 途径逆转肺癌吉非替尼耐药[J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(1):34-40.
- [26] 张敏, 李平, 张梅, 等. 益气养阴解毒方联合 EGFR-TKI 治疗晚期非小细胞肺癌的临床观察[J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(7):1673-1675.
- [27] 汪一帆, 柴可群, 应翔华, 等. 中药抑肺饮对 Lewis 肺癌移植瘤生长及细胞 EMT 的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(8):1940-1942.
- [28] 赵晓珍, 徐振晔, 吴中华. 肺岩宁方对 EMT 间质细胞标志因子 Vimentin, Fibronectin 和 N-cadherin 表达的影响[J]. *上海中医药大学学报*, 2008, 22(6):47-49.
- [29] 赵晓珍, 徐振晔, 吴中华. 肺岩宁方调节上皮-间质细胞转化因子 Twist, Snail, Sip 1 及 E-cadherin 的研究[J]. *肿瘤*, 2008, 28(1):29-31, 73.
- [30] 康小红, 王立芳, 王中奇, 等. 肺岩宁方延缓 TKIs 靶向治疗晚期肺腺癌耐药的临床观察[J]. *新中医*, 2012, 44(9):52-54.

(收稿日期:2020-12-28)