

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.27.008

文章编号: 1005-8982(2017)27-0037-08

E 盒结合锌指蛋白 2 对非小细胞肺癌预后的意义及其介导的多药耐药机制

刘志波¹, 刘春玲²

(1. 青海大学附属医院 肿瘤内科, 青海 西宁 810001; 2. 河北省秦皇岛市海港医院 肿瘤科, 河北 秦皇岛 066000)

摘要:目的 探讨 E 盒结合锌指蛋白 2(ZEB2)对非小细胞肺癌(NSCLC)预后的意义及介导的多药耐药机制。**方法** 选取 72 例 NSCLC 患者癌组织及癌旁组织,免疫组织化学染色检测组织 ZEB2 的表达,分析 ZEB2 表达与 NSCLC 患者临床资料及生存预后的关系。按照转染类型将细胞分为 3 组:ZEB2-siRNA 组、ZEB2-NC 组和空白对照组(Mock)。采用小干扰 RNA(siRNA)技术降低 A549 细胞 ZEB2 表达,分别采用不同浓度顺铂、紫杉醇处理 A549 细胞,CCK-8 法检测细胞对化疗药物的敏感性,流式细胞术检测细胞周期和凋亡率,Western blot 检测细胞耐药蛋白 P-糖蛋白(P-gp)、肺耐药相关蛋白(LRP)表达。**结果** ZEB2 蛋白在癌组织阳性表达率为 77.8%(56/72),癌旁组织阳性表达率为 23.6%(17/72),ZEB2 蛋白在癌组织阳性表达率高于癌旁组织($P < 0.01$)。肿瘤直径 ≥ 5 cm 组 ZEB2 阳性表达率高于肿瘤直径 < 5 cm 组,Ⅲ、Ⅳ期组 ZEB2 阳性表达率高于 I、II 组,淋巴结转移组 ZEB2 阳性表达率高于无淋巴结转移组,中低分化组 ZEB2 阳性表达率高于高分化组,各组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。ZEB2 阳性组总生存率和无病生存期低于阴性组($P < 0.05$)。Mock 组、ZEB2-NC 组和 ZEB2-siRNA 组细胞存活率均随化疗药物浓度增加而降低,其中 ZEB2-siRNA 组细胞存活率低于 ZEB2-NC 组($P = 0.000$)。经 Cisplatin、Paclitaxel 处理后,与 Mock 组、ZEB2-NC 组比较,ZEB2-siRNA 组细胞凋亡率增加, G_0/G_1 期所占百分率降低,S 期所占百分率升高,组间比较差异有统计学意义($P = 0.000$)。ZEB2-siRNA 组 P-gp、LRP 蛋白表达水平低于 Mock 组和 ZEB2-NC 组($P = 0.000$),ZEB2-NC、Mock 组 P-gp、LRP 蛋白表达比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** NSCLC 组织 ZEB2 表达上调,抑制 ZEB2 可以降低耐药蛋白 P-gp、LRP 表达,并逆转肺癌的多药耐药特性。

关键词: E 盒结合锌指蛋白 2;非小细胞肺癌;预后;多药耐药;P-糖蛋白;肺耐药相关蛋白

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

Prognostic value of Zinc finger E-box-binding homeobox 2 in non-small cell lung cancer and its role in multidrug resistance

Zhi-bo Liu¹, Chun-ling Liu²

(1. Department of Oncology, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining, Qinghai 810001, China; 2. Department of Oncology, Qinhuangdao Haigang Hospital, Qinhuangdao, Hebei 066000, China)

Abstract: Objective To investigate the prognostic value of Zinc finger E-box-binding homeobox 2 (ZEB2) in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its role in multidrug resistance. **Methods** In *in vivo* study, a total of 72 patients diagnosed with NSCLC were included in this study, and tumor tissue and adjacent normal tissue samples of them were collected. Expression of ZEB2 was measured by Immunohistochemical staining. Potential relationship between ZEB2 and clinic survival data was analyzed. In *in vitro* study, genetic knockdown models of ZEB2 in A549 cells line were established by siRNA. Cells were divided into 3 groups: ZEB siRNA group, sequence control group, and negative control (Mock) group. Drug

cytotoxicity was measured by CCK-8 assays after co-incubation with Cisplatin or Paclitaxel. Cell cycle and apoptosis rate was measured by flow cytometry. Expression levels of p-glycoprotein (P-gp) and LRP was determined by Western blot. **Results** ZEB2 positive cells in cancer tissue was significantly increased when compared with normal tissue (77.8% vs 23.6%, $P = 0.000$). ZEB2 positive cells in group with tumor diameter larger than 5 cm, III~IV phase, lymphatic metastasis, and poor and middle differentiation were dramatically increased when compared with those in group with tumor diameter <5 cm, I~II phase, metastasis-free, and well differentiation ($P < 0.05$), respectively. Overall survival and cancer-free survival in ZEB2 positive group was significantly lower than those in ZEB2 negative group ($P < 0.05$). Cellular survival of A549 cell line in Mock group, ZEB2-NC group and ZEB2-siRNA group was significantly decreased with treatment of Cisplatin or Paclitaxel in a dose-dependent manner. Cellular survival of A549 cell line in ZEB2-siRNA group was significantly lower than that of Mock group and ZEB2-NC group ($P = 0.000$). Flow Cytometry data suggested that, after treatment with Cisplatin and Paclitaxel, cell apoptosis and S phase ratio increased while G₀/G₁ phase ratio decreased significantly compared with those in Mock group and ZEB2-NC group ($P = 0.000$). Expression levels of P-gp, LRP in ZEB2-siRNA group were significantly downregulated compared with Mock group and ZEB2-NC group ($P = 0.000$) while no significant difference of P-gp, LRP protein between Mock group and ZEB2-NC group ($P > 0.05$). **Conclusion** ZEB2 are up-regulated in NSCLC tissue, and inhibition of ZEB2 reverses the P-gp- and LRP-dependent multidrug resistance of NSCLC.

Keywords: zinc finger e-box-binding homeobox; non-small cell lung cancer; prognosis; multidrug resistance; p-glycoprotein; lung resistance-related protein

肺癌是世界范围内发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,据我国最新的调查显示^[1],中国肺癌发病率居各种恶性肿瘤的首位。非小细胞肺癌^[2](non-small cell lung cancer, NSCLC)是肺癌最常见的分型,在肺癌中所占的比例约为 85%。全身化疗是 NSCLC 治疗的主要措施,尽管初治 NSCLC 对多数化疗药物敏感性较高,但是极易出现耐药性,使肿瘤细胞发生多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 而导致化疗失败。E 盒结合锌指蛋白 2(zinc finger E-box-binding homeobox 2, ZEB2) 属于锌指转录因子家族成员之一^[3],通过与 E-钙黏附蛋白(epithelia-cadherin, E-cadherin)启动子区 E-box 结合,抑制 E-cadherin 表达,促进细胞上皮间质转化(EMT),导致肿瘤细胞发生 MDR。P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)是存在于细胞膜表面的耐药糖蛋白, P-gp 能够起到类似能量依赖性“药物泵”作用^[4],将药物从细胞内泵出细胞外,减弱药物对肿瘤细胞的杀灭作用而诱导耐药。肺耐药相关蛋白(lung resistance-related protein, LRP)是存在于细胞核内的一种耐药蛋白^[5],其将进入细胞核内的药物通过小囊泡的形式排出细胞外,使细胞核避免受到化疗药物的损伤而产生耐药。本研究以 ZEB2 作为研究目标,通过耐药蛋白 P-gp、LRP 角度探讨 ZEB2 诱导 NSCLC 多药耐药的作用机制,旨在为逆转 MDR 治疗 NSCLC 提供理论基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2012 年 1 月 -2016 年 12 月在青海大学附属医院行手术治疗的 72 例 NSCLC 患者作为研究对象。其中,腺癌 33 例,鳞癌 39 例;术中切除癌组织和癌旁组织(距癌组织切缘 >5 cm),立即置于液氮中保存待检。本研究经本院伦理委员会批准,患者自愿捐献样本组织供研究使用,并签署知情同意书。术前未进行放疗、化疗等抗癌治疗,术后样本组织经病理检查确诊。

1.2 实验试剂

肺癌细胞系 A549(购自美国菌种保藏中心),通用型 SP 检测试剂盒(购自北京中杉金桥生物科技公司),鼠抗人 ZEB2 抗体、鼠抗人 P-gp 抗体、鼠抗人 LRP 抗体(购自美国 Sigma 公司),鼠抗人 GAPDH 抗体(购自 Santa Cruz 公司),Trizol 试剂(购自美国 Invitrogen 公司),Prime Script RT reagent Kit(购自 TaKaRa 公司),ZEB2 干扰 RNA 序列(由上海吉玛制药技术有限公司设计合成),ZEB2-siRNA 序列:5'-GAAUGACUAGGGCUAUUA-3',阴性对照(ZEB2-NC)序列:5'-CGUAUGCGGUACUCUAAUTT-3'。脂质体 Lipofectamine™ 2000(购自美国 Invitrogen 公司)。DMEM 培养基(购自 Gibco 公司),CCK-8 试剂盒、Annexin-V FITC 凋亡检测试剂盒、Annexin-V PE

凋亡检测试剂盒及碘化丙啶 PE(购自碧云天生物技术研究所)。顺铂(Cisplatin)(购自江苏豪森药业集团有限公司),紫杉醇(Paclitaxel)(购自海口市制药有限公司),流式细胞仪(购自美国 BD 公司),PVDF 膜、ECL 化学发光试剂盒(购自 Millipore 公司)。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学染色检测组织 ZEB2 表达 取癌组织和癌旁组织切片,以 PBS 代替一抗作为阴性对照,按照免疫 SP 检测试剂盒说明书进行操作,实验简述如下:切片常规脱蜡至水,加热修复抗原,再滴加 3%过氧化氢消除内源性过氧化物。滴加 100 μ l ZEB2 抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;第 2 天用 PBS 缓冲液冲洗 3 次,再滴加 2 滴二抗,室温继续孵育 30 min。加入 DAB 染液后苏木精复染,自来水冲洗,脱水透明后中性树胶封固,显微镜下观察,以细胞质上出现黄色或棕黄色颗粒作为阳性染色。随机选择 5 个视野进行阳性细胞计数,阳性结果判定参考以下标准,染色强度:0 分:无染色;1 分:淡黄色;2 分:黄色或棕黄色;3 分:棕褐色。阳性细胞比例:0 分:<5%,1 分:5%~25%;2 分:26%~50%;3 分:51%~75%;4 分:>75%。免疫染色评分(immunoreactive score, IRS)以染色强度和阳性细胞比例综合判定,两者相乘,IRS 评分 0~12 分,其中 ≤ 4 分为阴性,>4 分为阳性。

1.3.2 随访 术后对患者以电话或门诊复查方式规律随访,本研究随访截止时间为 2017 年 3 月 20 日。定义无病生存期(disease-free survival, DFS):从术后第 2 天开始至疾病复发、远处转移或因非小细胞肺癌死亡的时间;总生存期(overall survival, OS):从术后第 2 天开始至因任何原因引起死亡的时间。

1.3.3 细胞培养及分组处理 A549 细胞均接种于 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清、100 u/ml 青霉素和 100 u/ml 链霉素),在培养箱中 37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳 CO₂ 培养。每隔 2 天更换 1 次培养基。A549 细胞待融合达 80%~90%时进行瞬时转染,转染前将 ZEB2-siRNA 或 ZEB2-NC 用 150 μ l PBS 溶解,使之终浓度为 20 μ mol/L。按照转染类型将细胞分为 3 组:ZEB2-siRNA 组、ZEB2-NC 组和空白对照组(Mock), ZEB2-siRNA 组:将 1 μ l Lipofectamine™ 2000 与 1.5 μ l ZEB2-siRNA 混匀,静置 5 min,再加入 400 μ l 细胞悬液,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 继续培养 6 h,更换培养基,再培养 48 h 进行转染后其他检测操作。ZEB2-NC 组加入 1.5 μ l ZEB2-NC,其余操作同 ZEB2-siRNA

组。Mock 组仅加入 1 μ l Lipofectamine™ 2000 脂质体,其余操作同 ZEB2-siRNA 组。

1.3.4 实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测 ZEB2 mRNA 表达 取生长旺盛期 MRC-5 细胞及转染后 A549 细胞,加入 1 ml Trizol 试剂提取总 RNA。取 1 μ l 总 RNA 进行 PCR 扩增,PCR 反应体系 10 μ l: dNTP 0.5 μ l, RNase inhibitor 1 μ l, M-MLV 逆转录酶 0.5 μ l, 1 \times buffer 3 μ l, 加入 ddH₂O 补充至 10 μ l; 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 总计 40 个循环。ZEB2 正向:5'-CGCATTTCCTGCTACT-3', 反向:5'-TGGTCG TAGCCAGGAATACTG-3'; GAPDH 正向:5'-GAGT CAACGGATTTGGTCGT-3', 反向:5'-CATGGGTGGA ATCATATTGGA-3'。定量分析结果以 Ct 值表示,以 GAPDH 作为内参,2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 作为目的基因相对表达量。

1.3.5 CCK-8 法检测细胞对化疗药物的敏感性 将细胞铺于 96 孔板中(5 \times 10³ 个/孔),孵育 24 h 后,分别加入浓度为 25、50、100 及 200 μ g/ml 的顺铂和 25、50、100 及 200 μ g/ml 的紫杉醇,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养 24 h,再向每孔中加入预先配置好的 CCK-8 试剂(10 μ l/孔),37 $^{\circ}$ C 继续孵育,于 450 nm 处检测吸光度值。

1.3.6 流式细胞术检测细胞周期 细胞接种于 96 孔板中(1 \times 10⁶ 个/孔),培养 24 h 后加入抑制率最高浓度的顺铂、紫杉醇。继续培养 24 h,收集贴壁细胞,加入 70%乙醇于 -20 $^{\circ}$ C 固定 12 h,第 2 天弃去固定液,加入 RNA 酶反应 30 min,再加入 5 μ l PI 染液染色 30 min,上机检测,每次实验平行操作 3 次。

1.3.7 流式细胞术检测细胞凋亡率 细胞接种于 96 孔板中(1 \times 10⁶ 个/孔),培养 24 h 后加入抑制率最高浓度的顺铂、紫杉醇。继续培养 24 h,收集贴壁细胞,依次加入 400 μ l Annexin V 和 5 μ l Annexin V-FITC 染液,避光孵育 15 min,上机检测,每次实验平行操作 3 次。

1.3.8 Western blot 检测细胞 P-gp、LRP 蛋白表达 细胞接种于 96 孔板,培养 24 h 后加入抑制率最高浓度的顺铂、紫杉醇。继续培养 24 h,取对数生长期细胞,弃去培养液,PBS 冲洗,加入离心管中,再加入 1 ml RIPA 裂解液置于冰浴上裂解 30 min,4 $^{\circ}$ C 条件下离心 15 min,BCA 蛋白浓度试剂盒检测蛋白纯度。将 20 μ g 蛋白提取液置于 10% SDS-PAGE 电泳分离,常规湿法转膜,加入 5%脱脂牛奶孵育封闭 2 h。分

别加入 P-gp、LRP 抗体,4℃孵育 24 h。再滴加二抗 37℃孵育 2 h。PBS 冲洗 3 次,按照 ECL 化学发光显影试剂盒显影,以 β -actin 作为内参照,分析目的条带相对表达量。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。先进行正态性分布和方差齐性检验。对符合正态性分布的计量资料,多组间比较用单因素方差分析(one-way ANOVA)。方差齐时多组间比较用 Bonferroni 法,方差不齐时用 Welch 近似 F 检验。计数资料比较用配对设计的四格表 χ^2 检验。生存分析用 Kaplan-Meier 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ZEB2 蛋白在癌组织和癌旁组织中的表达

ZEB2 阳性主要表达于细胞质,以出现黄色或棕黄色颗粒沉淀为阳性细胞(见图 1)。ZEB2 蛋白在癌组织阳性表达率为 77.8%(56/72),癌旁组织阳性表达率为 23.6%(17/72),ZEB2 蛋白在癌组织阳性表达率高于癌旁组织,两组间比较差异有统计学意义($\chi^2=42.258, P=0.000$)。

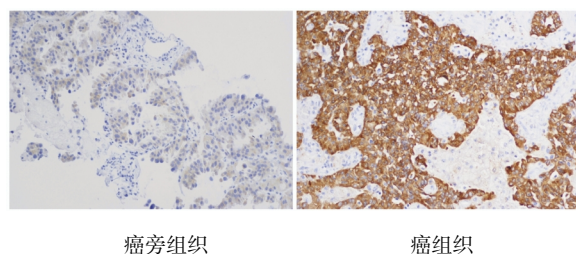


图 1 ZEB2 蛋白在癌组织和癌旁组织中的表达 ($\times 200$)

2.2 ZEB2 表达与 NSCLC 患者临床资料及预后的关系

ZEB2 表达与肿瘤直径、TNM 分期、淋巴结转移、分化程度有关,肿瘤直径 ≥ 5 cm 组 ZEB2 表达阳性率高于肿瘤直径 < 5 cm 组,III、IV 期组 ZEB2 表达阳性率高于 I、II 组,淋巴结转移组 ZEB2 表达阳性率高于无淋巴结转移组,中低分化组 ZEB2 表达阳性率高于高分化组,各组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见附表。72 例非小细胞肺癌患者共有 68 例获得完整随访,中位随访时间 53.8 个月,其中阴性组随访 15 例,阳性组随访 53 例。生存分析显示,ZEB2 阳性组总生存率和无病生存期低于阴性组($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 抑制 ZEB2 表达对顺铂、紫杉醇作用后 A549 细胞生存率的影响

qRT-PCR 和 Western blot 检测结果显示,ZEB2-siRNA 组 ZEB2 mRNA 和蛋白表达水平低于 ZEB2-NC 组($P < 0.01$),ZEB2-NC 和 Mock 组 ZEB2 mRNA 和蛋白表达水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 3A、B。提示转染 ZEB2 siRNA 能够抑制 A549 细胞 ZEB2 的表达。Mock 组、ZEB2-NC 组和 ZEB2-siRNA 组细胞存活率均随顺铂、紫杉醇的浓度增加而降低,其中 ZEB2-siRNA 组细胞存活率低于 ZEB2-NC 组($P < 0.01$),ZEB2-NC 和 Mock 组细胞存活率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 3C、D。

2.4 抑制 ZEB2 表达对顺铂、紫杉醇作用后 A549 细胞凋亡率的影响

经顺铂、紫杉醇处理后,ZEB2-siRNA 组细胞凋亡率高于 Mock 组和 ZEB2-NC 组($P < 0.01$),ZEB2-NC、Mock 组细胞凋亡率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 4A、B。

附表 ZEB2 表达与 NSCLC 临床资料的关系

临床资料	例数	ZEB2		χ^2 值	P 值
		阳性	阴性		
性别					
男	39	28	11	1.762	0.184
女	33	28	5		
肿瘤直径					
< 5 cm	41	27	14	7.834	0.004
≥ 5 cm	31	29	2		
年龄					
< 60 岁	31	25	6	0.259	0.611
≥ 60 岁	41	31	10		
病理分型					
腺癌	33	24	9	0.899	0.343
鳞癌	39	32	7		
TNM 分期					
I、II	30	17	13	13.261	0.000
III、IV	42	39	3		
淋巴结转移					
是	28	17	11	7.718	0.005
否	44	39	5		
分化程度					
高分化	16	8	8	10.045	0.010
中分化	32	26	6		
低分化	24	22	2		

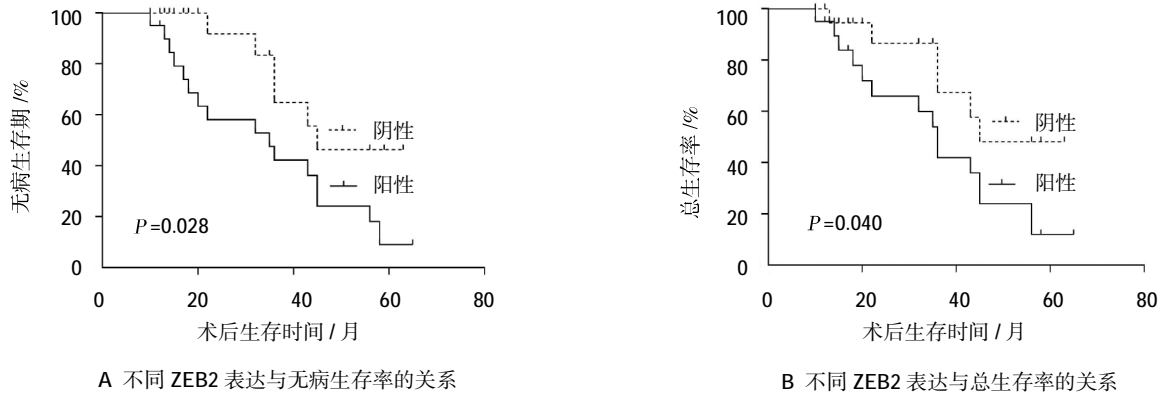
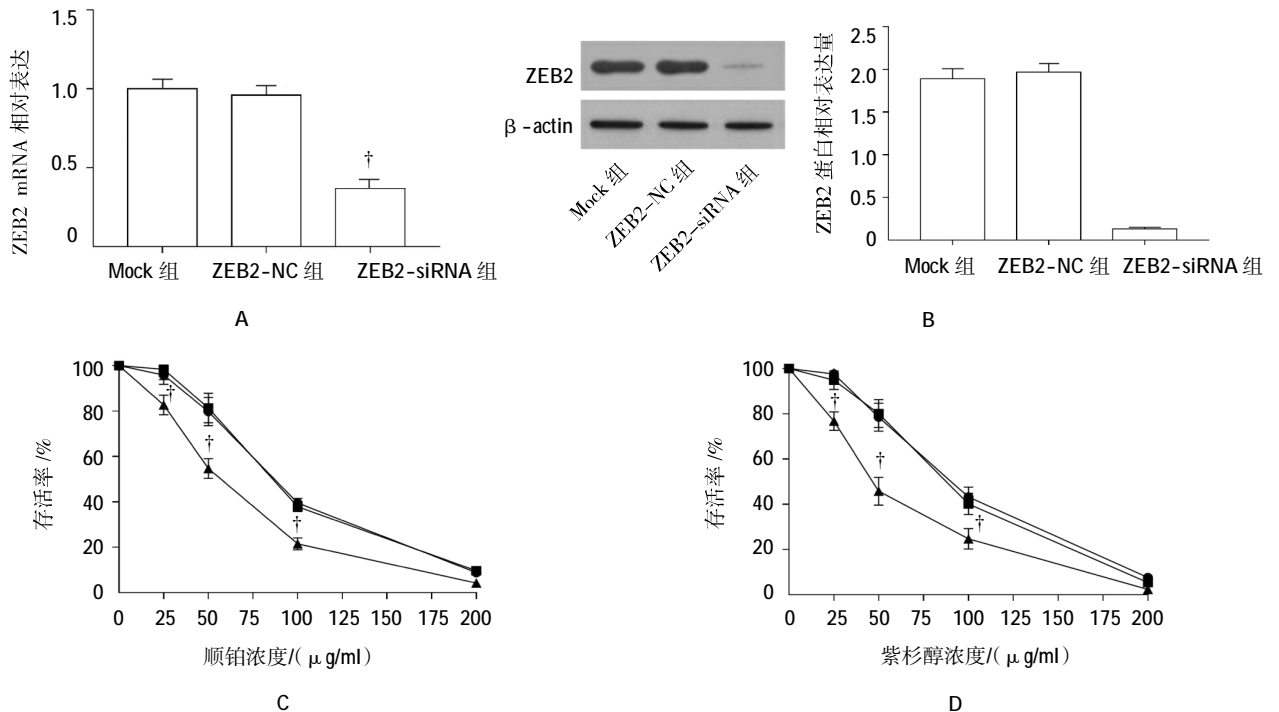


图 2 ZEB2 表达与 NSCLC 患者预后的关系



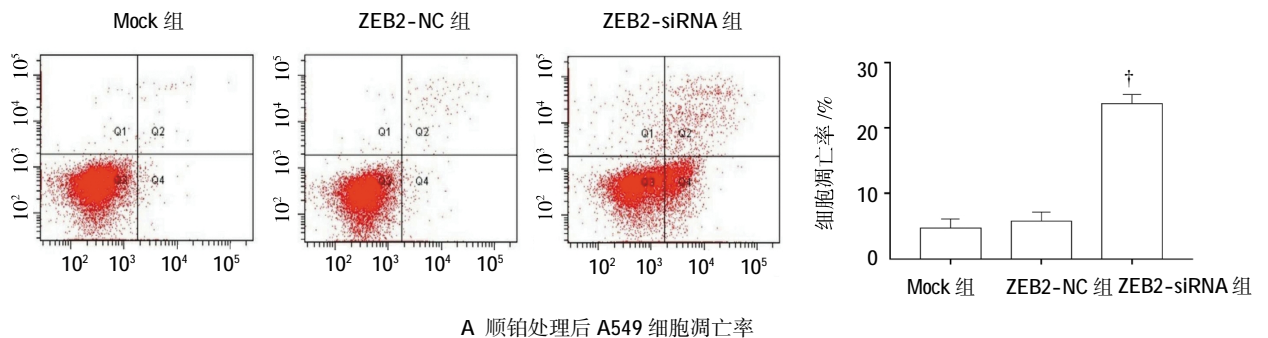
A: 转染 ZEB2 siRNA 后各组细胞 ZEB2 mRNA 表达; B: 转染 ZEB2 siRNA 后各组细胞 ZEB2 蛋白表达; C: 不同浓度顺铂处理后 A549 细胞生存率; D: 不同浓度紫杉醇处理后 A549 细胞生存率。† 与 ZEB2-NC 组比较, $P < 0.01$

图 3 不同浓度顺铂、紫杉醇作用后 A549 细胞生存率比较

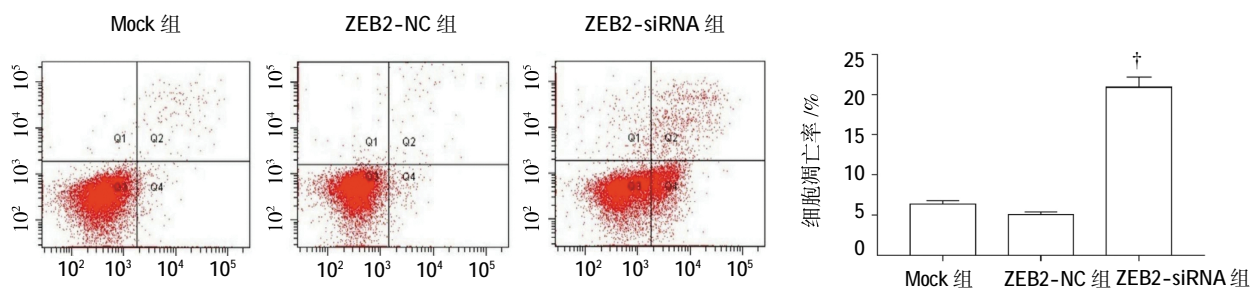
2.5 抑制 ZEB2 表达对顺铂、紫杉醇作用后 A549 细胞周期分布的影响

经顺铂、紫杉醇处理后, 与 Mock 组、ZEB2-NC

组比较, ZEB2-siRNA 组 G_0/G_1 期百分率降低, S 期百分率升高, 组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), ZEB2-NC 和 Mock 组细胞周期率比较差异无统计学



A 顺铂处理后 A549 细胞凋亡率



B 紫杉醇处理后 A549 细胞凋亡率

[†] 与 ZEB2-NC 组比较, $P < 0.01$

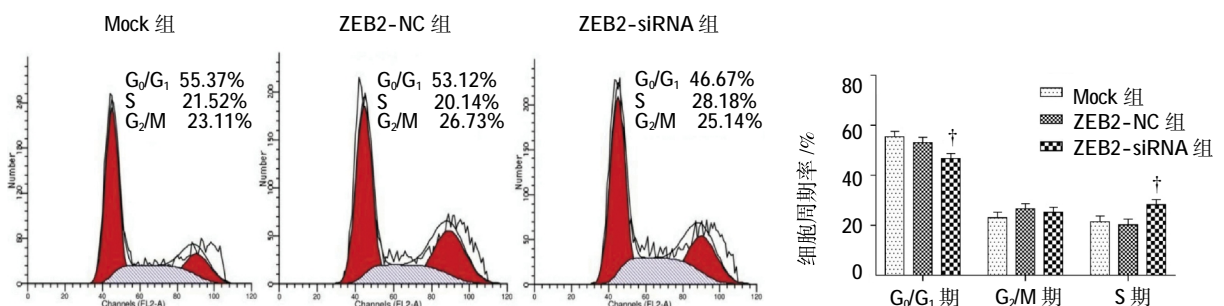
图 4 顺铂、紫杉醇处理后 A549 细胞凋亡率变化

意义 ($P > 0.05$)。见图 5。

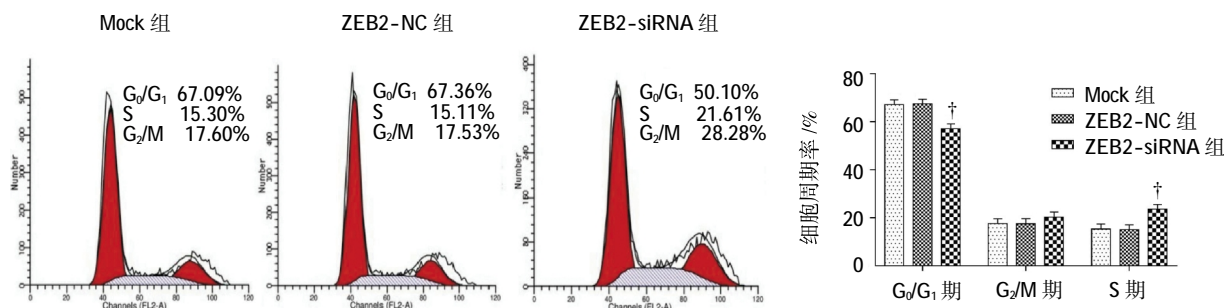
2.6 抑制 ZEB2 表达对顺铂、紫杉醇作用后 A549 细胞 P-gp、LRP 蛋白表达的影响

比较, ZEB2-siRNA 组 P-gp、LRP 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$), ZEB2-NC 和 Mock 组 P-gp、LRP 蛋白表达比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 6。

Western blot 结果显示, 与 Mock 组、ZEB2-NC 组



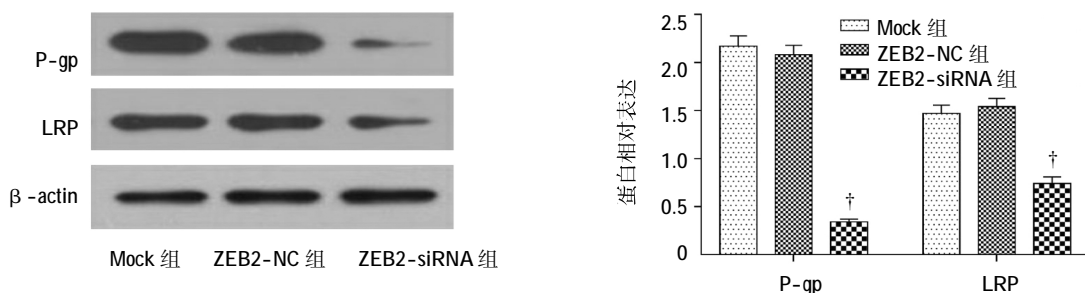
A 顺铂处理后 A549 细胞周期变化



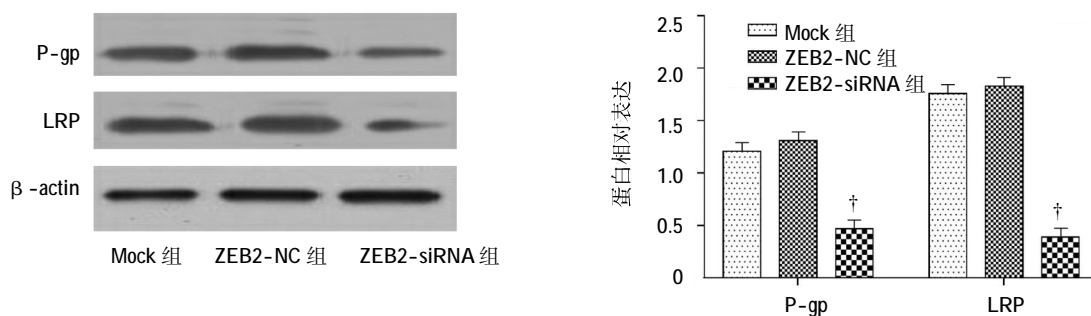
B 紫杉醇处理后 A549 细胞周期变化

[†] 与 ZEB2-NC 组比较, $P < 0.01$

图 5 顺铂、紫杉醇处理后 A549 细胞周期变化



A 顺铂处理后细胞 P-gp、LRP 蛋白表达



B 紫杉醇处理后细胞 P-gp、LRP 蛋白表达。† 与 ZEB2-NC 组比较, $P < 0.01$

图 6 顺铂、紫杉醇处理后 A549 细胞周期变化

3 讨论

ZEB2 是 snail 家族重要的转录抑制因子, 通过 BMP 和 TGF- β 信号途径调控下游转录因子表达, 发挥相应的生物学功能。有研究^[6]显示, ZEB2 通过上皮-间质转化(EMT)调控肿瘤的发生、进展和转移。SI 等^[7]报道称乳腺癌组织 ZEB2 呈高表达, 且 ZEB2 蛋白表达水平与乳腺癌分化程度、TNM 分期和淋巴结转移有关。REN 等^[8]证实, ZEB2 促进 EMT 的发生, 导致细胞之间的黏附作用减弱, 进而诱导小细胞肺癌侵袭和转移。本研究分别对 NSCLC 组织和癌旁组织 ZEB2 表达进行分析, 结果显示 ZEB2 蛋白在癌组织阳性率高于癌旁组织, 且 ZEB2 表达与肿瘤大小、TNM 分期、淋巴结转移及分化程度有关, 说明 ZEB2 具有 NSCLC 诊断和病情评估的潜在价值。有报道^[9]称, ZEB2 高表达能够抑制周期蛋白(cyclin), 促进抑癌蛋白磷酸化, 导致细胞增殖、侵袭和转移。XIA 等^[10]报道称 ZEB2 表达上调的肝癌患者生存时间明显高于 ZEB2 低表达者, ZEB2 对恶性肿瘤的预后评估具有重要指导作用。本研究对 NSCLC 患者进行长期随访, 结果显示 ZEB2 阳性组总生存期和无病生存率低于阴性组, 提示癌组织 ZEB 表达水平可以作为 NSCLC 预后的重要评估指标。

手术联合全身化疗是治疗 NSCLC 的主要手段。目前 NSCLC 细胞对多数化疗药物敏感, 然而重复使用化疗药物极易出现抗药性, 导致发生 MDR 现象而使化疗失败, 这亦是 NSCLC 远期生存率低的原因之一^[11]。MADER 等^[12]也指出, NSCLC 初期对化疗药物敏感, 但很快发生耐药而导致化疗失败, 患者预后差, 且极易复发, 5 年生存率低。肿瘤细胞 MDR 现象成为临床亟待解决的问题。EMT 是导致恶性肿瘤发生 MDR 的主要原因, 有报道^[13]显示, 乳腺癌细胞 ZEB2 表达上调, 诱导 EMT 转化, 导致对 5-FU 耐药。王庆

海等^[14]也认为, ZEB2 与卵巢癌的顺铂耐药密切相关。本研究显示抑制 ZEB2 表达后, 顺铂、紫杉醇处理使 A549 细胞存活率降低, 提示降低 ZEB2 表达可能提高 A549 细胞对化疗药物的敏感性。GAO 等^[15]采用 CCK-8 法分析显示, 转染 ZEB2-642 的小细胞肺癌耐药指数降低, 降低 ZEB2 表达可降低小细胞肺癌的耐药性。本研究利用流式细胞术分析发现, 经顺铂、紫杉醇处理后, ZEB2-siRNA 组细胞凋亡率高于 Mock 组和 ZEB2-NC 组, 化疗药物诱导凋亡率增加也说明细胞对化疗药物的耐药性降低。国外有报道称^[16], ZEB2 调控的靶基因可能参与肿瘤细胞周期调节, 进而诱导耐药。本研究进一步对各组细胞的周期分布进行分析, 结果发现经顺铂、紫杉醇处理后, ZEB2-siRNA 组 G₀/G₁ 期所占百分率降低, S 期所占百分率升高, 说明抑制 ZEB2 表达促进化疗药物对 A549 细胞在 S 期的阻滞, 使化疗药物对细胞的杀伤作用增加, 耐药性降低。

MDR 的发生机制非常复杂, 耐药蛋白的表达在该过程中发挥着关键作用。P-gp 和 LRP 是两种重要的耐药蛋白, P-gp 通过将细胞内的药物泵出细胞外, 导致细胞内有效药物浓度降低而诱导耐药。刘俊等^[17]报道, 胰腺癌细胞 P-gp 高表达, 可以选择性的将依托泊苷、5-FU、长春新碱等化疗药物泵出细胞, 使细胞发生 MDR。LRP 能够将进入细胞核内的化疗药物重新转运至小囊泡内排出细胞外, 使细胞核 DNA 免受化疗药物的损伤而产生耐药。梁梦等^[18]报道, 化疗耐药型卵巢癌患者 LRP 阳性率高于化疗敏感型, LRP 也是预测卵巢癌化疗敏感的独立预后因素。但是在非小细胞肺癌中, 关于 ZEB2 和 P-gp、LRP 关系的研究尚未见报道。本研究显示, 经过顺铂、紫杉醇处理后, ZEB2-siRNA 组 P-gp、LRP 蛋白表达水平降低, 提示 ZEB2 可能通过 P-gp 和 LRP 蛋白介导 A549 细胞发生 MDR。但是 ZEB2 与 P-gp、

LRP 之间并不是孤立事件,很可能通过某种信号通路进行转导而诱导耐药,限于研究的篇幅,本研究暂未探讨 ZEB2 与 P-gp、LRP 之间的信号转导通路,这也是笔者后续研究的重点。

综上所述,NSCLC 组织 ZEB2 表达上调,抑制 ZEB2 可以降低耐药蛋白 P-gp、LRP 表达,并逆转肺癌的多药耐药特性。

参 考 文 献:

- [1] 昌盛,代敏,任建松,等. 中国 2008 年肺癌发病、死亡和患病情况的估计及预测[J]. 中华流行病学杂志, 2012, 33(4): 391-394.
- [2] HEUSCH P, KÖHLER J, WITTSACK H J, et al. Hybrid [18F]-FDG PET/MRI including non-Gaussian diffusion-weighted imaging (DWI): Preliminary results in non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. *Eur J Radiol*, 2013, 82(11): 2055-2060.
- [3] KUMAR P A, KOTLYAREVSKA K, DEJKHMARON P, et al. Growth hormone (GH) -dependent expression of a natural anti-sense transcript induces zinc finger E-box-binding homeobox 2 (ZEB2) in the glomerular podocyte: a novel action of gh with implications for the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(41): 31148-31156.
- [4] 邓镇,罗森珊,赵元淑,等. GluN2A 抑制剂对癫痫持续状态大鼠脑内 P-糖蛋白表达的影响[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2014, 13(2): 168-172.
- [5] MATSUNAGA T, YAMAJI Y, TOMOKUNI T, et al. Nitric oxide confers cisplatin resistance in human lung cancer cells through upregulation of aldo-keto reductase 1B10 and proteasome[J]. *Free Radic Res*, 2014, 48(11): 1371-1385.
- [6] 曹永梅,吕毅,刘玉静,等. miR-200 及其靶基因 ZEB1/2 在急性肺损伤后早期肺纤维化中上皮-间质转化(EMT)过程[J]. 昆明医科大学学报, 2016, 37(12): 1-7.
- [7] SI W, HUANG W, ZHENG Y, et al. Dysfunction of the Reciprocal Feedback Loop between GATA3-and ZEB2-Nucleated Repression Programs Contributes to Breast Cancer Metastasis[J]. *Cancer Cell*, 2015, 27(6): 822-836.
- [8] REN D, WANG M, GUO W, et al. Double-negative feedback loop between ZEB2 and miR-145 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties in prostate cancer cells[J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 358(3): 763-778.
- [9] TECHASEN A, NAMWAT N, LOILOME W, et al. Tumor necrosis factor- α modulates epithelial mesenchymal transition mediators ZEB2 and S100A4 to promote cholangiocarcinoma progression[J]. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2014, 21(9): 703-711.
- [10] XIA L, HUANG W, TIAN D, et al. Forkhead box Q1 promotes hepatocellular carcinoma metastasis by transactivating ZEB2 and VersicanV1 expression[J]. *Hepatology*, 2014, 59(3): 958-973.
- [11] GHOSH G, YAN X, LEE A G, et al. Quantifying the sensitivities of EGF receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors in drug resistant non-small cell lung cancer (NSCLC) cells using hydrogel-based peptide array[J]. *Biosens Bioelectron*, 2010, 26(2): 424-431.
- [12] MADER R M, FOERSTER S, SARIN N, et al. NSCLC cells adapted to EGFR inhibition accumulate EGFR interacting proteins and down-regulate microRNA related to epithelial-mesenchymal transition[J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2014, 52(1): 92-94.
- [13] AHMAD A, ABOUKAMEEL A, KONG D, et al. Phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor mediates epithelial-mesenchymal transition regulated by miR-200 in breast cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(9): 3400-3409.
- [14] 王庆海,蒋惠萍,邓晓洁,等. 上皮性卵巢癌中 ZEB2 和 C-myc 蛋白的表达及临床意义[J]. 南方医科大学学报, 2015, 14(12): 1765-1769.
- [15] GAO Y, ZHANG W, HAN X, et al. YAP inhibits squamous transdifferentiation of Lkb1-deficient lung adenocarcinoma through ZEB2-dependent DNp63 repression[J]. *Nat Commun*, 2014, 5(14): 4629.
- [16] CHU P Y, HU F W, YU C C, et al. Epithelial-mesenchymal transition transcription factor ZEB1/ZEB2 co-expression predicts poor prognosis and maintains tumor-initiating properties in head and neck cancer[J]. *Oral Oncol*, 2013, 49(1): 34-41.
- [17] 刘俊,黄陈,孙晶,等. HIF-1 α 、P-gp 在胰腺癌中的表达及其临床病理学的意义[J]. 中华肝胆外科杂志, 2011, 17(1): 36-38.
- [18] 梁梦,周英琼,郭芳,等. GST- π 、ERCC1、MRP 和 LRP 在卵巢癌组织中的表达及意义[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(5): 10-14.

(王荣兵 编辑)