

AXL 对 *EGFR* 突变非小细胞肺癌细胞增殖的影响

田亚琼^{1,2}, 杨杰², 苗立云², 王永生², 蔡后荣²

(1. 南京大学医学院, 江苏 南京 210008; 2. 南京大学医学院附属鼓楼医院, 江苏 南京 210008)

摘要: [目的] 探讨 AXL 的表达能否影响含 *EGFR* 突变肺癌细胞的生长增殖能力。[方法] 研究使用了含 *EGFR* 第 19 外显子突变的 PC9 细胞株及具有更强增殖活性的耐吉非替尼的 PC9 细胞 (PC9GR), 使用基因工具使 PC9 细胞 AXL 过表达, 及敲除 AXL 在 PC9GR 的表达, 然后分别采用 MTT 试验检测转染后细胞的活力, 比较实验组和对照组细胞对吉非替尼的敏感性, 并计算 IC₅₀, 评估细胞的增殖能力, 另外选取 69 例 *EGFR* 突变肺癌患者的组织标本进行免疫组织化学染色, 分析 AXL 表达状态与患者各项临床特征之间的关系。[结果] PC9 细胞 AXL 过表达后, 细胞增殖能力明显增强, 敲除 PC9GR 细胞 AXL 表达后, 耐药细胞的增殖能力减弱, 免疫组织化学染色结果发现 AXL 阳性患者的肿瘤分化程度较阴性患者低, 肿块大小明显大于 AXL 阴性患者。[结论] AXL 与 PC9 肺癌细胞的增殖能力相关, 同样也与临床患者的肿瘤分化程度和肿瘤大小相关, 提示 AXL 可能成为一个潜在的肺癌治疗靶点。

关键词: 癌, 非小细胞肺; *EGFR*; AXL

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2016)06-0478-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2016.06.B009

Effect of AXL on the Cell Proliferation of Non-small Cell Lung Cancer with *EGFR* Mutation

TIAN Ya-qiong^{1,2}, YANG Jie², MIAO Li-yn², et al.

(1. Medical College of Nanjing University, Nanjing 210008, China; 2. Drum Tower Hospital Affiliated to Medical College of Nanjing University, Nanjing 210008, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of AXL on the cell proliferation of non-small cell lung cancer with *EGFR* mutation. [Methods] We used lentivirus as an expression vector to force AXL overexpressed in PC9 cell lines which harbor *EGFR* 19Del mutation. Meanwhile we silenced AXL in PC9 cell lines which had acquired the resistance to gefitinib and possessed higher proliferation capability than PC9, abbreviated to PC9GR. MTT assays were used to detect the viability of these cells then the cell vitality curve was pictured and IC₅₀ was calculated. At the other hand, we enrolled 69 patients who harbored *EGFR* mutation to conduct immunohistochemical staining. The relevance between AXL expression and clinical characteristics of these patients were analyzed. [Results] The viability of PC9 and PC9GR was enhanced and suppressed after the upregulation and inhibition of AXL, respectively. The staining data suggested that AXL status was related to tumor differentiation and tumor size. [Conclusion] AXL may play an important role in tumor occurrence and development and may be a novel target to NSCLC treatment.

Subject words: non-small cell lung cancer; *EGFR*; AXL

肺癌已成为全球范围肿瘤所致死亡的首要原因^[1]。约 80% 肺癌类型为非小细胞肺癌 (NSCLC), 传统治疗方法包括手术、化疗、放疗, 但即使采用最有效的

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81301882); 南京大学苗圃项目 (2062014118)

通讯作者: 蔡后荣, 主任医师, 硕士; 南京大学医学院附属鼓楼医院呼吸科, 江苏省南京市中山路 321 号 (210008); E-mail: caihourong2013@163.com

收稿日期: 2015-09-24; **修回日期:** 2015-11-04

铂类为基础的化疗方案, 目前患者 5 年生存率仍未超过 20%^[2]。表皮生长因子受体 (*EGFR*) 基因活性突变在 NSCLC 中的发现, 具有里程碑的意义, *EGFR* 在 NSCLC 中高表达与肿瘤形成、进展和预后密切相关, NSCLC 患者的 *EGFR* 突变率在亚洲非吸烟女性腺癌患者突变率较世界其他地区高, 可达 30% 以上^[3]。*EGFR* 靶向抑制剂 (*EGFR*-TKIs) 如第一代吉非替尼

和厄洛替尼,能延长患者平均无进展生存期。但影响 *EGFR* 突变患者肿瘤发生发展的因素仍有待研究,近年许多体内外研究得出 *AXL* 与 *EGFR* 突变肺癌的发生发展、耐药及预后相关,本研究使用了基因敲除和过表达的方法验证 *AXL* 对含 *EGFR* 突变肺癌细胞系增殖能力的影响,使用免疫组织化学染色的方法分析 *AXL* 表达状态与肺癌患者临床表型的关联。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

含 *EGFR* 基因 19 外显子突变的 PC9 细胞和 PC9GR 细胞由同济大学附属上海肺科医院赠予,PC9GR 细胞由 PC9 细胞经吉非替尼持续刺激半年以上获得,作用期间吉非替尼浓度逐渐增加,以培育出吉非替尼耐药细胞株。细胞培养使用含 10% 胎牛血清 (Gibco) 的 DMEM 高糖培养基 (Gibco),置于含 5% CO_2 的 37℃ 细胞培养温箱。

1.2 MTT 试验

96 孔板每孔铺 3 000 至 3 500 个细胞过夜使细胞贴壁,加入不同浓度的吉非替尼作用 72h,然后加入 20 μl MTT 溶液,置于 37℃ 恒温箱 4h,吸尽上清并加入 150 μl DMSO 置于摇床在室温下摇晃 10min 以溶解细胞中的甲瓩颗粒,最后使用酶标仪 (Bio-Rad Model 680) 在 490nm 波长下检测每孔吸光度 (OD)。细胞活力 (%) = $\text{OD}_{490}(\text{吉非替尼作用细胞}) / \text{OD}_{490}(\text{对照组细胞}) \times 100\%$,并使用 SPSS 软件计算 IC_{50} (半数抑制浓度)。共 8 组不同浓度,每组浓度设置 6 个复孔。

1.3 转染

具有 *AXL* 基因过表达和敲除功能的慢病毒载体委托上海吉凯基因化学技术有限公司构建。转染具体步骤根据产品说明书进行。转染前一天铺板,细胞密度约 30% 并进行细胞计数,根据预实验所得最佳 MOI 值进行转染,转染使用 1ml 体系,加入 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Polybrene,病毒作用于细胞 8~12h 后更换为含 10% 血清的新鲜培养基继续培养,72h 后荧光显微镜下观察绿色荧光强度和密度初步判断转染效率,再提取 RNA 和蛋白进一步使用 RT-PCR 和凝胶电泳验证转染效率,再进行后续实验。

1.4 免疫组织化学染色

选取南京大学医学院附属鼓楼医院 2013~2014

年间 69 例 *EGFR* 突变住院患者的手术切除后石蜡包埋的肺组织标本进行免疫组织化学染色。免疫组化切片厚度约 4 μm ,进行二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水及 3% 双氧水去过氧化氢酶后应用高压修复抗原,加一抗 4℃ 孵育过夜,PBS 冲洗 3 遍后加二抗 37℃ 孵育 25min,PBS 冲洗 3 遍后 DAB 显色,行苏木素复染、75% 乙醇再脱水、封片后显微镜下观察。染色结果由该院病理科两名病理学家独立判定。

1.5 统计学处理

采用 SPSS16.0 统计软件分析实验数据。*AXL* 的表达与患者临床特征之间的关系应用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。转染前后实验组和对照组间 IC_{50} 的差异采用 Student *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *AXL* 上调使 PC9 细胞的增殖能力增强

通过转染使 PC9 细胞 *AXL* 表达上调,荧光显微镜下观测转染效率在 70% 以上,RT-PCR 验证转染效率后,采用 MTT 检测转染后的细胞活力,发现 *AXL* 过表达组与不含 *AXL* 敲除功能病毒转染的对照组相比,细胞增殖能力明显增强,对吉非替尼的反应减弱,*AXL* 上调组细胞的 IC_{50} ($36.56 \pm 1.87 \text{ ng/ml}$) 较对照组 ($14.48 \pm 2.08 \text{ ng/ml}$) 明显升高 ($P = 0.008$) (Figure 1)。说明 *AXL* 过表达可增强 *EGFR* 突变细胞的增殖能力。

2.2 *AXL* 敲除使 PC9GR 细胞的增殖能力降低

通过转染敲除 PC9GR 细胞的 *AXL* 表达,采用

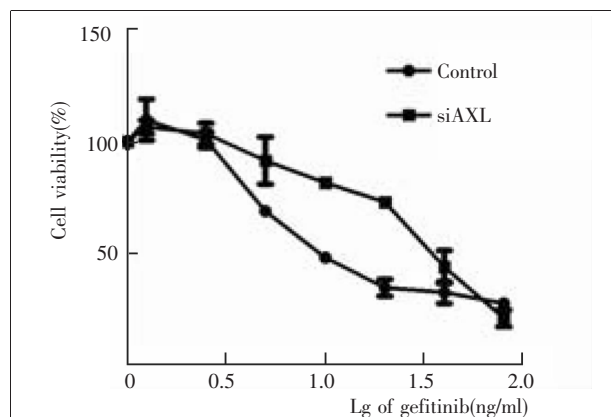


Figure 1 The sensitivity of PC9 cells to gefitinib after overexpression of *AXL*

同前的方法验证转染效率后,MTT 检测转染后细胞活力,比较敲除 AXL 的细胞与对照组细胞增殖能力,发现敲除组细胞增殖能力明显减弱,且对吉非替尼的反应增强,相应敲除组的 IC₅₀(6.86±0.32μg/ml)较对照组(11.74±0.18μg/ml)亦降低(P=0.007)(Figure 2),同样说明了 AXL 与 EGFR 突变肺癌细胞的增殖能力相关。

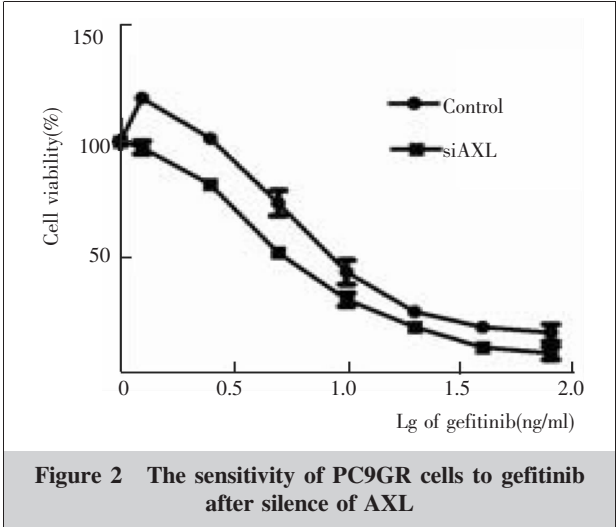


Figure 2 The sensitivity of PC9GR cells to gefitinib after silence of AXL

2.3 AXL 表达与 EGFR 突变肺癌患者临床特征的关系

选取南京大学医学院附属鼓楼医院 2013~2014 年间 69 例含 EGFR 突变的 NSCLC 患者,卡方检验发现 AXL 的表达与患者 EGFR 突变类型、年龄、性别、吸烟与否及肿瘤分期无明显关系,但与患者肿瘤的分化程度和肿块的大小明显相关,5 例 AXL 阳性患者均处于低分化状态,肿瘤分期也相对较高(Table 1),另外,AXL 阳性患者的肿块大小明显大于阴性患者(Figure 3),亦说明了 AXL 与 EGFR 突变肺癌细胞的生长增殖有关。

3 讨论

近几十年来,同许多其他类型肿瘤治疗取得的明显进展相比,肺癌的治疗进展相对缓慢,与肺癌恶性程度较高、发生发展快及发病机制复杂密切相关,发现新的治疗靶点显得尤为迫切。已有多项研究证实 AXL 在多种肿瘤中出现表达上调,包括乳腺癌^[4]、胃癌^[5]、前列腺癌^[6]、卵巢癌^[7,8]、肺癌^[9,10]等,并与肿瘤的形成、侵袭、转移、耐药、预后等病理生理过程相关。

AXL 属于 RTKs 亚家族,与 Tyro3、Mer 共同组成 TAM 家族,AXL 为分子量 140kDa 的跨膜蛋白,由胞外区、跨膜区和胞内区组成,胞外区包括两个免疫球蛋白样区和两个纤维蛋白 III 样区,广泛表达在上皮细胞、间质细胞和造血细胞等,最初从人类慢性粒细胞性白血病(CML)患者分离而来^[11]。AXL 配体为 Gas6,由生长停滞特异性基因 6(growth arrest specific gene 6)编码的蛋白,为一维生素 K 依赖的蛋白。AXL 可通过多种机制激活,包括与配体 Gas6 的结合、胞外区调节的二聚化或与 HER2/neu 的交叉^[12,13],

Table 1 The relevance between AXL expression and patients' clinical characteristics

Characteristics	Negative(%)	Positive(%)	<i>P</i>
<i>EGFR</i> mutation types			
19Del	31(48.4)	2(40.0)	1.000
L858R	33(51.6)	3(60.0)	
Age(years)			
<65	40(62.5)	4(80.0)	0.763
≥65	24(37.5)	1(20.0)	
Gender			
Female	40(62.5)	4(80.0)	0.763
Male	24(37.5)	1(20.0)	
Smoking			
No	48(75.0)	4(80.0)	1.000
Yes	16(25.0)	1(20.0)	
Tissue differentiation			
Poorly	9(14.1)	5(100.0)	<0.05
Moderate	42(65.6)	0(0.0)	
Well	13(20.3)	0(0.0)	
Stage			
I ~ II	42(65.6)	1(20.0)	0.122
III ~IV	22(34.4)	4(80.0)	

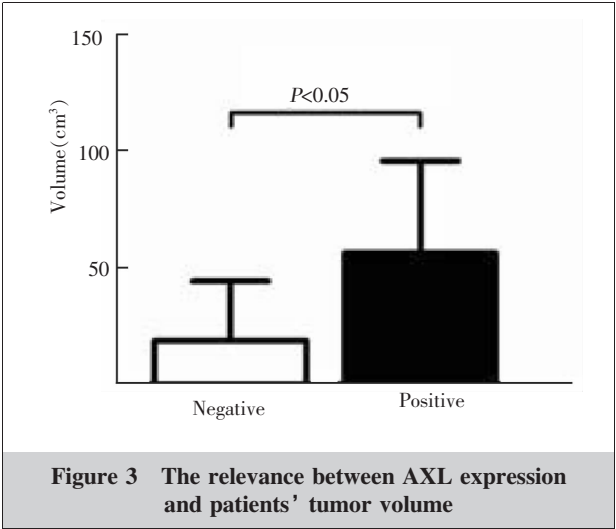


Figure 3 The relevance between AXL expression and patients' tumor volume

AXL 所介导的下游信号通路有 PI3K/AKT、MAPK/ERK1/2,具有抑制凋亡的效应^[14],具有使细胞转化的潜能。AXL 正常表达时并没有分裂原活性,而当高表达时,可使细胞过度增殖,诱导肿瘤形成。

我们的研究验证了 AXL 与 *EGFR* 突变细胞的生长增殖能力相关,同时免疫组化染色结果说明 AXL 与肺癌的肿瘤分化和肿瘤大小相关。AXL 过表达可以使吉非替尼对细胞的作用减弱,而抑制 AXL 可以增强对吉非替尼的反应性,提示 AXL 可作为含 *EGFR* 突变肺癌治疗的新靶点,并可改善对靶向药的敏感性。已有许多研究得出 AXL 基因敲除和特异性单克隆抗体均能减慢肺癌的生长速度并调节抗肿瘤药的疗效^[15,16],AXL 特异性抑制剂 R428(BGB324)已于 2013 年进入 I 期临床试验,有望用于治疗慢性粒细胞性白血病^[17],而在肺癌中的作用还有待进一步研究。从另一方面看 AXL 对肺癌的影响,AXL 抑制剂与其他 RTK 抑制剂联合应用较单独用药效果可能更佳,有文献报道,联合抑制 AXL 和 Mer 可促进肺癌细胞凋亡、阻碍肺癌细胞生长并提高对化疗的敏感性^[18]。同样,AXL 抑制剂与 *EGFR*-TKI 联合应用可亦能较两者单独作用效果好。AXL 抑制剂和 *EGFR*-TKI 联合应用治疗 *EGFR* 突变肺癌的可能性体现在,两者有共同的下游信号通路,主要是 PI3K/AKT 和 MAPK/ERK1/2^[19]。有文献发现 AXL 和 *EGFR* 在空间位置上存在共定位现象,*EGFR* 活性被 *EGFR*-TKI 抑制后可反式激活 AXL 来激活其共同的下游通路,而此时 AXL 的激活及下游更加复杂更加多样化的通路,更利于肿瘤细胞的生长增殖,甚至诱发 *EGFR*-TKI 获得性耐药^[20],故 AXL 抑制剂和 *EGFR*-TKI 联合应用不失为治疗 *EGFR* 突变肺癌的一种方法。综上所述,我们的结论验证了 AXL 可以影响 *EGFR* 突变肺癌细胞的增殖能力的观点,可能是治疗肺癌的一个新的有效靶点。

参考文献:

- [1] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1):9-29.
- [2] Siegel R, DeSantis C, Virgo K, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(4):220-241.
- [3] Rosell R, Moran T, Queralt C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer [J]. N Engl J Med, 2009, 361(10):958-967.
- [4] Berclaz G, Altermatt HJ, Rohrbach V, et al. Estrogen dependent expression of the receptor tyrosine kinase axl in normal and malignant human breast[J]. Ann Oncol, 2001, 12(6):819-824.
- [5] Wu CW, Li AFY, Chi CW, et al. Clinical significance of AXL kinase family in gastric cancer [J]. Anticancer Res, 2002, 22(2B):1071-1078.
- [6] Jacob ANK, Kalapurakal J, Davidson WR, et al. A receptor tyrosine kinase, UFO/Axl, and other genes isolated by a modified differential display PCR are overexpressed in metastatic prostatic carcinoma cell line DU145[J]. Cancer Detection and Prevention, 1999, 23(4):325-332.
- [7] Sun WS, Fujimoto J, Tamaya T. Coexpression of Gas6/Axl in human ovarian cancers[J]. Oncology, 2004, 66(6):450-457.
- [8] Rankin EB, Fuh KC, Taylor TE, et al. AXL is an essential factor and therapeutic target for metastatic ovarian cancer [J]. Cancer Res, 2010, 70(19):7570-7579.
- [9] Shieh YS, Lai CY, Kao YR, et al. Expression of Axl in lung adenocarcinoma and correlation with tumor progression[J]. Neoplasia, 2005, 7(12):1058-1064.
- [10] Wimmel A, Glitz D, Kraus A, et al. Axl receptor tyrosine kinase expression in human lung cancer cell lines correlates with cellular adhesion[J]. Eur J Cancer, 2001, 37(17):2264-2274.
- [11] Janssen JWG, Schulz AS, Steenvoorden ACM, et al. A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential[J]. Oncogene, 1991, 6(11):2113-2120.
- [12] Bose R, Molina H, Patterson AS, et al. Phosphoproteomic analysis of Her2/neu signaling and inhibition[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(26):9773-9778.
- [13] Hafizi S, Dahlback B. Gas6 and protein S. Vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily[J]. Febs J, 2006, 273(23):5231-5244.
- [14] Bellosta P, Zhang Q, Goff SP, et al. Signaling through the ARK tyrosine kinase receptor protects from apoptosis in the absence of growth stimulation [J]. Oncogene, 1997, 15(20):2387-2397.
- [15] Li Y, Ye X, Tan C, et al. Axl as a potential therapeutic target in cancer: role of Axl in tumor growth, metastasis and angiogenesis[J]. Oncogene, 2009, 28(39):3442-3455.
- [16] Ye X, Li Y, Stawicki S, et al. An anti-Axl monoclonal antibody attenuates xenograft tumor growth and enhances the effect of multiple anticancer therapies[J]. Oncogene, 2010, 29(38):5254-5264.
- [17] Sheridan C. First Axl inhibitor enters clinical trials[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(9):775-776.
- [18] Linger RM, Cohen RA, Cummings CT, et al. Mer or Axl receptor tyrosine kinase inhibition promotes apoptosis, blocks growth and enhances chemosensitivity of human non-small cell lung cancer [J]. Oncogene, 2013, 32(29):3420-3431.
- [19] Harbinksi F, Craig VJ, Sanghavi S, et al. Rescue screens with secreted proteins reveal compensatory potential of receptor tyrosine kinases in driving cancer growth[J]. Cancer Discovery, 2012, 2(10):948-959.
- [20] Meyer AS, Miller MA, Gertler FB, et al. The receptor AXL diversifies EGFR signaling and limits the response to EGFR-targeted inhibitors in triple-negative breast cancer cells[J]. Science Signaling, 2013, 6(287):14.