

· 基础研究 ·

c-Src 在乳腺癌抗雌激素受体 α 治疗过程中的表达变化及其耐药机制的研究

范晓萍¹, 于子溢², 楼龙泉², 肇毅^{2*}¹南京医科大学第二附属医院超声医学科, 江苏 南京 210011; ²南京医科大学第一附属医院乳腺外科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的: 探讨原癌基因 c-Src 在乳腺癌抗雌激素受体 α (estrogen receptor, ER α) 治疗过程中的变化及其耐药机制。方法: 用雌激素受体阻滞剂三苯氧胺 (tamoxifen, TAM) 长期处理 ER α 阳性的 MCF-7 细胞建立 TAM 耐药细胞 (TAM-R)。用免疫印迹实验检测 c-Src、ER α 、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 在耐药细胞上的表达, 用免疫沉淀法检测这些分子间的相互作用, 并用 c-Src 抑制剂 PP2 阻断其磷酸化, 观察其对耐药的逆转作用。结果: 与原生的 MCF-7 细胞相比, c-Src、ER α 、EGFR 在 TAM-R 上的表达量没有改变, 但是, c-Src 磷酸化水平在耐药细胞上表达明显增高。并且在耐药细胞上, ER α 与 EGFR 之间的相互结合明显增高, PP2 可以明显阻断两分子间的相互作用。更重要的是, 经 PP2 处理后耐药细胞的生长可再次被 TAM 抑制, 即 PP2 可以逆转耐药细胞的耐药性。结论: c-Src 是介导 ER α 与 EGFR 之间相互作用的关键分子, 阻断这种相互作用可以重新获得对 TAM 治疗的敏感性, 提示 c-Src 抑制剂可以和 TAM 交替使用来提高乳腺癌的治疗效果。

[关键词] 原癌基因 c-Src; 乳腺癌; 雌激素受体; 表皮生长因子受体; 耐药

[中图分类号] R737.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)07-966-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20190704

Study on the alteration of c-Src during anti-estrogen receptor α therapy and mechanisms of resistance mediated by c-Src in breast cancer cells

Fan Xiaoping¹, Yu Ziyi², Lou Longquan², Zhao Yi^{2*}¹Department of Ultrasonic Medicine, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011;²Department of Breast Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the function of oncogene c-Src in the process of anti-estrogen receptor α therapy and how it mediates the resistance in estrogen receptor (ER)-positive breast cancer cells. **Methods:** Wild-type MCF-7 cells were long-term treated with tamoxifen (TAM) and established tamoxifen resistant cells (TAM-R). The expression of c-Src, ER α , and epithelial growth factor receptor (EGFR) was detected by immunoblotting. The interactions between ER α and EGFR were measured by immunoprecipitation. The c-Src inhibitor PP2 was used to block the tyrosine kinase activity of c-Src. **Results:** Compared with wild-type MCF-7 cells, expression levels of ER α , EGFR, and c-Src were not altered in TAM-R cells. However, the phosphorylation of c-Src was increased in TAM-R cells. Further examination demonstrated that interaction between ER α and EGFR was increased in TAM-R cells. Blocking c-Src phosphorylation by PP2 dissociated the interaction between ER α and EGFR in TAM-R cells. Importantly, TAM could once again remarkably inhibit cell growth of TAM-R cells after treated by PP2. Thus, the c-Src inhibitor could reverse TAM-R cells to TAM-sensitive cells. **Conclusion:** Our results suggested that c-Src is a critical molecule to mediate tamoxifen resistance in breast cancer cells through increasing the interaction between ER α and EGFR. Blocking interaction between ER α and EGFR by PP2 can recover the sensitivity to TAM in resistant cells. All of these findings demonstrated that the c-Src inhibitor can be alternatively used with ER α target therapy to treat ER-positive breast cancer thereby improving the therapeutic effects on breast cancer patients.

[Key words] oncogene c-Src; breast cancer; estrogen receptor; epidermal growth factor receptor; resistance

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(07):966-970]

[基金项目] 江苏省人力资源和社会保障厅“六大人才高峰”资助项目(2013-WSW-026)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: doctorzhaoyi@sina.cn

抗雌激素受体 α (estrogen receptor, ER α)治疗是ER α 阳性乳腺癌患者术后的首选辅助治疗,其中三苯氧胺(tamoxifen, TAM)是最为经典的抗ER α 药物^[1]。但是,耐药是该治疗过程中不可避免的挑战。因此,有多项研究探讨乳腺癌抗ER α 治疗的耐药机制。其中,细胞膜表面的生长因子受体信号通路的增强最引人注目,这些受体包括表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、HER-2和胰岛素样生长因子-1受体(insulin-like growth factor-1 receptor, IGF-1R)^[2-5],具体以何种生长因子受体为主,可能与细胞类型有关^[2-5]。但是,抗生长因子受体治疗并不能解决临床所有耐药的问题,提示还有其他机制参与。

我们最近研究发现原癌基因c-Src与乳腺癌的发生、发展有非常密切的关系,特别是三阴性乳腺癌细胞对c-Src抑制剂的治疗非常敏感^[6]。c-Src是细胞膜上重要的酪氨酸激酶,可以同时介导ER α 与生长因子受体的信号通路^[7-8]。也有研究报道,c-Src的磷酸化水平增高可以降低乳腺癌细胞对TAM的反应性^[9],同时抗c-Src的磷酸化与抗ER α 可以提高乳腺癌患者的治疗效果^[10]。因此在本研究中,我们将建立抗ER α 治疗的耐药细胞株并进一步探讨c-Src在耐药形成过程中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

TAM购自美国Sigma-Aldrich公司,ER α 和EGFR抗体购自美国Santa Cruz公司,c-Src和p-c-Src抗体购自美国Cell Signaling Technology公司,c-Src拮抗剂PP2购自美国Calbiochem公司,Alexa Fluor 488(绿色)标记的抗兔二抗以及Alexa Fluor 568标记的鬼笔环肽(红色)购自美国Molecular Probe公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和分组

MCF-7细胞购于上海中科院细胞生物研究所,用含5%胎牛血清的IMEM培养液培养细胞。传代后分为两组,耐药组(TAM-R)在培养液中加入TAM(终浓度0.1 $\mu\text{mol/L}$)持续处理12个月,对照组(MCF-7)用等量的TAM溶剂酒精处理。每个月取部分细胞,MTT法检测TAM对细胞增殖的抑制作用,以观察细胞对TAM的反应性。

1.2.2 MTT实验

MCF-7或TAM-R细胞分别接种于96孔板,3 500个/孔。24 h后,根据实验需要,用TAM(终浓

度0.1 $\mu\text{mol/L}$)或c-Src拮抗剂PP2处理细胞并设立相应的溶剂对照组,每组设3个复孔。5 d后用MTT法检测细胞的生长。每组实验至少重复3次。

1.2.3 免疫荧光染色实验

在6孔板中放入消毒盖玻片,MCF-7与TAM-R细胞分别接种在盖玻片上。2 d后用三聚甲醛在室温下固定20 min,冰丙酮-20 $^{\circ}\text{C}$ 下打孔2~4 min。5%正常羊血清室温孵育1 h。PBS清洗3次后,加入c-Src抗体,在4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育16~18 h。PBS清洗3次后,Alexa Fluor 488(绿色)标记的二抗在室温下孵育1 h。Alexa Fluor 568标记的鬼笔环肽(红色)孵育15~20 min以标记细胞肌动蛋白。取出盖玻片,荧光显微镜(Zeiss AxioVert.A1)下观察细胞骨架(红色)及c-Src(绿色)在细胞内的分布。

1.2.4 免疫印迹实验

MCF-7与TAM-R细胞分别接种在60 mm的培养皿上,当细胞达到90%融合时,用蛋白裂解液裂解细胞,14 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心10 min,收集上清。检测样本的蛋白浓度,每个样本上样50 μg 总蛋白进行SDS-PAGE电泳。电泳结束后,蛋白转到硝纤维素膜上,用不同的抗体检测蛋白表达。Image J软件相对定量条带的灰度。

1.2.5 免疫沉淀实验

MCF-7与TAM-R细胞分别接种在10 cm的培养皿上,当细胞达到90%融合时,用蛋白裂解液裂解细胞,14 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心10 min,收集上清。检测样本的蛋白浓度。每个样本取1 mg总蛋白与特异的抗体在4 $^{\circ}\text{C}$ 作用4 h,然后加入40 μL 的G蛋白珠,4 $^{\circ}\text{C}$ 下持续转动16~18 h。14 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心20 s,小心弃去上清液。用蛋白裂解液清洗G蛋白珠2次。加入50 μL 2 \times 上样缓冲液在G蛋白珠中,95 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸5 min。最后用溶解在上样缓冲液中的蛋白进行SDS-PAGE电泳、转膜,用不同的抗体检测。

1.3 统计学方法

用SPSS19.0统计软件进行统计分析,计量数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞对TAM反应性的改变以及相关受体的表达水平

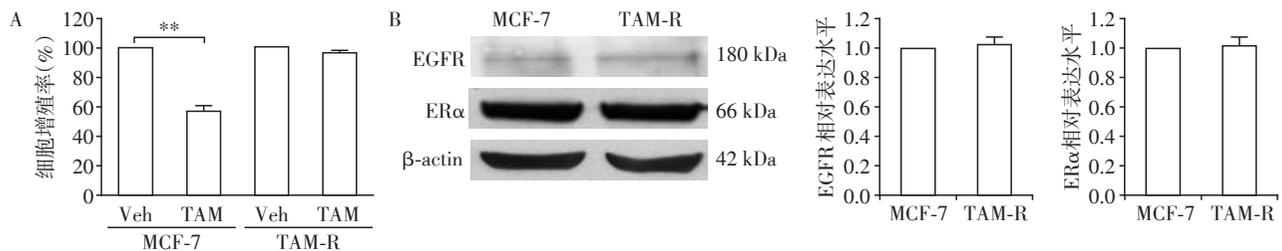
MCF-7细胞以终浓度0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的TAM作用5 d后,细胞增殖率是溶剂对照组(Veh)的(56.67 \pm 3.68)%,两组间差异有统计学意义($P < 0.001$,图

1A)。耐药组(TAM-R)细胞以相同浓度TAM处理后,细胞增殖率是溶剂对照组(Veh)的(96.2 ± 1.79)%,两组间差异无统计学意义,说明此浓度TAM几乎不能抑制细胞生长(图1A),TAM-R即为耐药细胞株。

通过免疫印迹实验检测与耐药有关的受体ERα及EGFR的表达水平,结果发现MCF-7细胞和TAM-R细胞上的ERα与EGFR蛋白表达水平没有显著改变(图1B)。

2.2 c-Src在耐药细胞上的表达及分布

c-Src是介导ERα与EGFR信号通路的重要分子^[7-8]。与MCF-7细胞相比,TAM-R细胞上的c-Src总蛋白量并没有改变,但是磷酸化水平明显提高(图2A)。另外,c-Src在TAM-R上的分布也与MCF-7不同。在MCF-7细胞上,c-Src(绿色)主要分布在细胞膜上,与肌动蛋白染色(红色)重叠为黄色;而TAM-R细胞的形态与MCF-7细胞明显不同,细胞体积变大,细胞膜表面有更多丝样伪足,部分c-Src分



A: MCF-7和TAM-R细胞对TAM(终浓度0.1 μmol/L)反应性。两组比较,**P < 0.001, n=3; B: ERα与EGFR在MCF-7与TAM-R细胞上的表达。
图1 乳腺癌细胞对TAM的反应及受体分子的表达

Figure 1 Growth response to tamoxifen and expression levels of receptors in breast cancer cells

布在细胞膜,很明显有一部分c-Src分布在细胞浆(图2B)。提示长期TAM治疗可以提高c-Src磷酸化水平并且改变乳腺癌细胞的形态与细胞骨架结构。

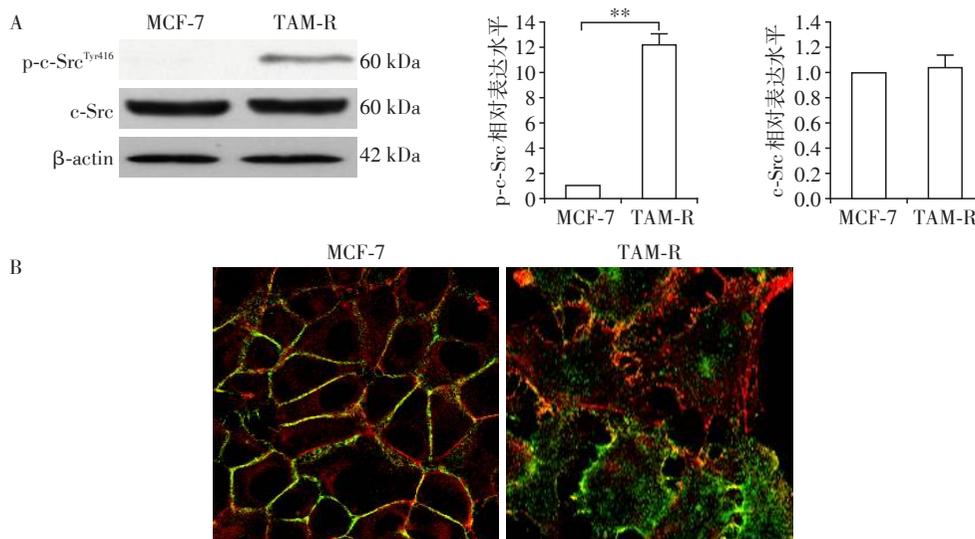
2.3 c-Src介导ERα与EGFR之间的相互作用

c-Src主要通过其酪氨酸激酶的活性来发挥生物学功能^[6],我们选用特异性c-Src抑制剂PP2来抑制c-Src磷酸化水平(图3A)。进一步实验发现,在

TAM-R细胞上,ERα与EGFR以及c-Src与EGFR相互结合明显高于MCF-7细胞,而PP2可以阻断这种分子间的相互结合(图3B)。该结果提示在TAM-R细胞上,ERα与EGFR之间的交叉反应增强,c-Src是介导该交叉反应的核心分子。

2.4 c-Src抑制剂可以逆转TAM-R的耐药性

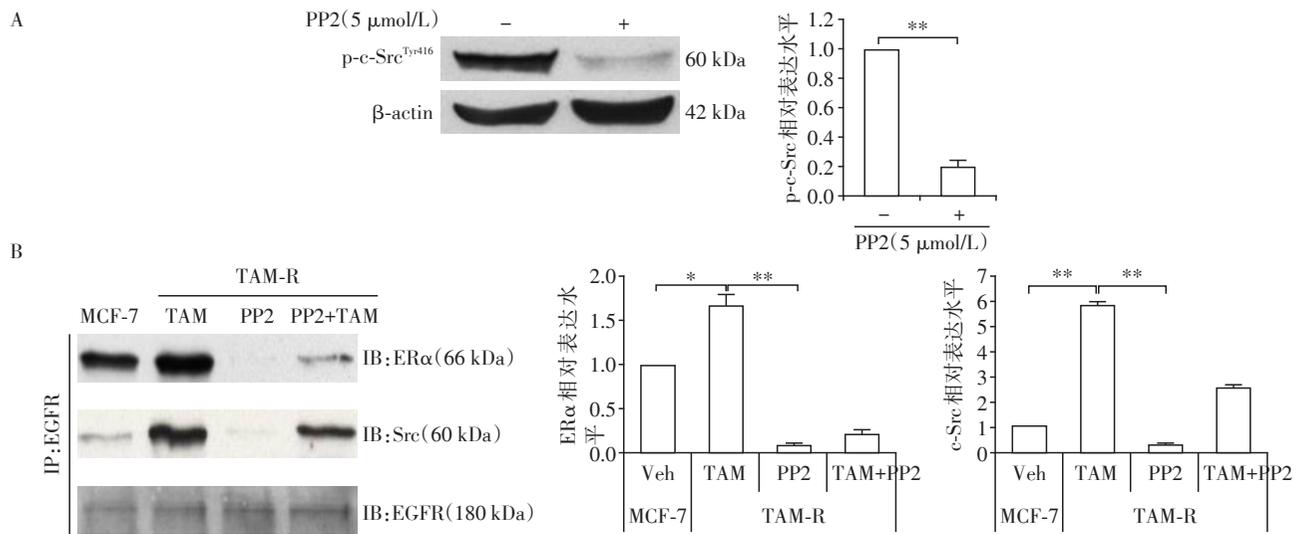
在培养系统中撤除TAM并不能改变TAM-R的



A: 磷酸化c-Src与总c-Src在MCF-7与TAM-R细胞上的表达,两组比较,**P < 0.01, n=3; B: c-Src在MCF-7与TAM-R细胞内的分布(×400)。

图2 c-Src分子TAM-R细胞上的表达及分布

Figure 2 Expression and distribution of c-Src in TAM-R resistant breast cancer cells



A: PP2(5 μ mol/L)有效抑制 c-Src 的磷酸化;B: PP2(5 μ mol/L)阻断 EGFR 和 ER α 、c-Src 的结合。两组比较,* P < 0.05,** P < 0.01(n =3)。

图3 c-Src 抑制剂阻断受体间的相互作用

Figure 3 The c-Src inhibitor blocked the interaction between receptors in breast cancer cells

耐药性,对 TAM 的反应性与持续 TAM 处理的细胞相似。为了进一步明确 c-Src 是否在 TAM-R 形成耐药的过程中起主要作用,分别在维持 TAM 处理或撤除 TAM 的 TAM-R 细胞中加入 c-Src 抑制剂 PP2。每个月取部分细胞检测 TAM 对细胞生长的抑制作用,分别以相应的溶剂处理组作为对照。结果显示如果培养系统没有 TAM,PP2 可以使 TAM-R 细胞在 3 个月后恢复到对 TAM 的完全敏感状态,即此时 TAM (1×10^{-7} mol/L)对 TAM-R 细胞的抑制率接近 TAM 对 MCF-7 细胞的抑制率(约 40%);而如果培养系统仍然维持有 TAM,PP2 可以使 TAM-R 细胞在 10 个月后恢复到对 TAM 的完全敏感状态(图 4)。该结果提示 c-Src 是介导 TAM 耐药的重要分子。

3 讨论

c-Src 在乳腺癌的发生、发展过程中发挥重要的作用^[6,11],并且作为一个重要分子参与细胞膜表面黏附分子之间的相互作用从而增加肿瘤细胞的浸润性^[12]。本研究发现 c-Src 的磷酸化水平在耐药细胞上明显升高,其更为重要的功能是介导 ER α 与 EGFR 相互作用,使乳腺癌细胞逐渐失去对抗 ER α 靶向治疗的敏感性。抑制 c-Src 的磷酸化可以明显阻断 ER α 与 EGFR 之间的交叉反应。更有临床意义的是,c-Src 抑制剂可以明显逆转 TAM-R 的耐药性。

在乳腺癌细胞抗 ER α 治疗耐药的诸多研究中,细胞膜表面生长因子受体信号通路的增强最为引人注目^[2-5],目前认为 ER α 与生长因子受体是乳腺癌

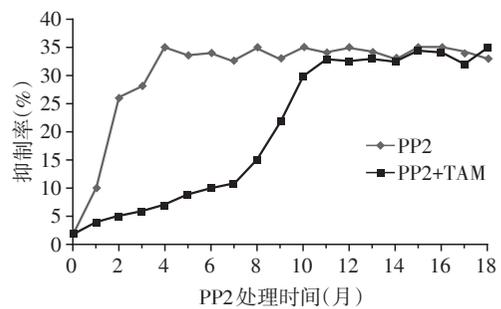


图4 c-Src 抑制剂逆转 TAM-R 的耐药性

Figure 4 The c-Src inhibitor reversed tamoxifen resistance to sensitivity in breast cancer cells

细胞上两条平行的生长通路,长期抗 ER α 治疗,反馈性地使生长因子通路增强,从而使乳腺癌细胞可以逃逸抗 ER α 的治疗。在我们建立的耐药细胞株上,并没有检测到生长因子受体表达的增加,但是 c-Src 的磷酸化明显增强,c-Src 本身除了促进肿瘤的生长、增加肿瘤细胞转移的能力外^[13],还起到介导分子的作用,连接 ER α 与 EGFR 之间的交叉反应。c-Src 抑制剂可以逆转耐药细胞为敏感细胞,也进一步说明 c-Src 在耐药过程中的重要作用。本研究提出了一个新的抗 ER α 治疗的耐药机制,在以后研究中也更关注于分子间的相互作用。

另外,我们也发现了耐药细胞的体积变大,并且细胞骨架在耐药后也发生了明显改变,导致 c-Src 在细胞内的分布发生了改变。与我们一致的研究结果同样显示耐药细胞体积更大并且胞浆细胞骨架丰富^[14]。目前还不清楚细胞骨架改变的根本原

因,在 TAM 耐药的细胞上,很多细胞骨架结构分子的表达被上调^[15]。c-Src 与膜相关的分子有非常紧密的联系,有可能改变这些膜相关分子的表达也会改变细胞骨架^[16]。因此,抗 ER α 的治疗不仅仅是单纯阻断了核受体 ER α ,而是从细胞核到细胞浆、细胞膜、细胞骨架的整体改变,最终导致了耐药。这些结果对以后更深入研究乳腺癌的辅助治疗有重要的参考价值。

[参考文献]

- [1] Jordan VC. Tamoxifen as the first targeted long-term adjuvant therapy for breast cancer[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2014, 21(3):R235-R246
- [2] Fan P, Wang J, Santen RJ, et al. Long-term treatment with tamoxifen facilitates translocation of estrogen receptor alpha out of the nucleus and enhances its interaction with EGFR in MCF-7 breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(3):1352-1360
- [3] Shou J, Massarweh S, Osborne CK, et al. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2004, 96(12):926-935
- [4] Fagan DH, Uselman RR, Sachdev D, et al. Acquired resistance to tamoxifen is associated with loss of the type I insulin-like growth factor receptor: implications for breast cancer treatment [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(13):3372-3380
- [5] Knowlden JM, Jones HE, Barrow D, et al. Insulin receptor substrate-1 involvement in epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor receptor signalling: implication for Gefitinib ('Iressa') response and resistance [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2008, 111(1):79-91
- [6] Lou L, Yu Z, Wang Y, et al. c-Src inhibitor selectively inhibits triple-negative breast cancer overexpressed vimentin *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(5):1648-1659
- [7] Auricchio F, Migliaccio A, Castoria G. Sex-steroid hormones and EGF signaling in breast and prostate cancer cells: targeting the association of Src with steroid receptors [J]. *Steroids*, 2008, 73(9-10):880-884
- [8] Tice DA, Biscardi JS, Nickles AL, et al. Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(4):1415-1420
- [9] Morgan L, Gee J, Pumford S, et al. Elevated Src kinase activity attenuates tamoxifen response *in vitro* and is associated with poor prognosis clinically [J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(16):1550-1558
- [10] Hiscox S, Jordan NJ, Smith C, et al. Dual targeting of Src and ER prevents acquired anti-hormone resistance in breast cancer cells [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 115(1):57-67
- [11] Huang C, Zhang Z, Chen L, et al. Acetylation within the N- and C-terminal domains of Src regulates distinct roles of STAT3-mediated tumorigenesis [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(11):2825-2838
- [12] Planas-Silva MD, Bruggeman RD, Grenko RT, et al. Role of c-Src and focal adhesion kinase in progression and metastasis of estrogen receptor-positive breast cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 341(1):73-81
- [13] Hiscox S, Morgan L, Green TP, et al. Elevated Src activity promotes cellular invasion and motility in tamoxifen resistant breast cancer cells [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2006, 97(3):263-274
- [14] Fan P, Yue W, Wang JP, et al. Mechanisms of resistance to structurally diverse antiestrogens differ under premenopausal and postmenopausal conditions: Evidence from *in vitro* breast cancer cell models [J]. *Endocrinology*, 2009, 150(5):2036-2045
- [15] Fan P, Cunliffe HE, Griffith OL, et al. Identification of gene regulation patterns underlying both oestrogen- and tamoxifen-stimulated cell growth through global gene expression profiling in breast cancer cells [J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50(16):2877-2886
- [16] Zhao Y, Planas-Silva MD. Mislocalization of cell-cell adhesion complexes in tamoxifen-resistant breast cancer cells with elevated c-Src tyrosine kinase activity [J]. *Cancer Lett*, 2009, 275(2):204-212

[收稿日期] 2018-09-26