

人肺腺癌吉非替尼获得性耐药株 H1975 细胞与敏感株 PC9 细胞 miRNA 谱表达差异

王永生*,丁晶晶*,苗立云,黄 妹,蔡后荣
(南京大学医学院附属南京市鼓楼医院,江苏 南京 210008)

摘要: [目的] 分析人肺腺癌吉非替尼耐药细胞株 H1975 (epidermal growth factor receptor, EGFR 基因双突变) 和人肺腺癌吉非替尼敏感细胞株 PC9 (EGFR 单突变) 细胞株微小 RNA (microRNA, miRNA) 表达谱的差异。 [方法] 用 Agilent human miRNA 芯片分别检测 H1975 细胞与 PC9 细胞株的 miRNA 表达谱, Agilent Feature Extraction 软件分析并筛选表达差异达 5 倍以上的 miRNA, 生物学软件分析表达差异 miRNA 的可能靶基因。实时定量 PCR (qRT-PCR) 验证 miRNA 芯片结果。 [结果] 与 PC9 细胞相比, H1975 细胞株中 22 个 miRNA 表达上调 >5 倍, 24 个 miRNA 表达下调 >5 倍。qRT-PCR 结果验证了芯片的结果 (上调的如 hsa-miR-489, hsa-miR-210 和 hsa-miR-21 等; 下调的如 hsa-miR-205, hsa-miR-200c 和 hsa-miR-155 等), 同时发现, 其中 33 个异常表达的 miRNA 有潜在的靶基因, 靶基因超过 100 个的有 24 个 miRNA。 [结论] H1975 吉非替尼耐药与 miRNA 谱异常表达有关, miRNA 可能通过调控靶基因而参与 EGFR-TKI 的获得性耐药。

关键词: 肺癌; 耐药; 微小 RNA; 基因芯片; 酪氨酸激酶抑制剂

中图分类号: R730.53 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2013)09-0743-05

doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2013.09.A015

Difference of microRNA Expression Profiles between EGFR Double Mutations Human Lung Adenocarcinoma Cell Line H1975 and EGFR Single Mutation Cell Line PC9

WANG Yong-sheng, DING Jin-jin, MIAO Li-yun, et al.

(Drum Tower Hospital, Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China)

Abstract: [Purpose] To differentiate microRNA (miRNAs) profiles in EGFR double mutations cell line-H1975 versus EGFR single mutation cell line-PC9. [Methods] The microRNA(miRNA) expression profiles of H1975 and PC9 cells were analyzed by Agilent human miRNA microarray. The Agilent Feature Extraction software was used to analyze the differential expression of miRNA, and bioinformatics software was used to predict the potential target genes of differentially expressed miRNAs. RT-PCR was used to confirm the result of microRNA microarray. [Results] Twenty-two miRNAs were up-regulated and 24 down-regulated over 5 folds in H1975 compared with PC9 cell line. RT-PCR confirmed the result of miRNA microarray (hsa-miR-489, hsa-miR-21 and hsa-miR-21, et al. were up-regulated; hsa-miR-205, hsa-miR-200c and hsa-miR-155, et al. were down-regulated). The bioinformatics analysis revealed that 33 miRNAs had their potential target genes, and 24 of which had the potential target genes over 100. [Conclusion] The acquired resistance to EGFR-TKI might be correlated to de-regulated miRNAs.

Key words: lung cancer; drug resistance; micro RNAs; microarray analysis; tyrosine kinase inhibitor TKI

肺癌在发达及发展中国家的发病率逐年增高, 5 年生存率约 15%^[1]。非小细胞肺癌约占肺癌的 85%, 早期肺癌以手术治疗为主, 晚期肺癌则以放疗为基础的化疗。近年来, 以表皮生长因子受体

(epidermal growth factor receptor, EGFR) 为靶标的分子靶向治疗受到普遍关注, 其中针对 EGFR 的小分子酪氨酸激酶抑制剂 (Gefitinib 和 Erlotinib) 已被多个国家的食品药品监督管理局批准用于治疗晚期非小细胞肺癌。多项研究表明, 与一线含铂双药相比, 吉非替尼或厄洛替尼明显改善患者的无疾病进展生存期 (progression free survival, PFS), 靶向治疗和化疗

收稿日期: 2012-12-20; 修回日期: 2013-02-16

通讯作者: 蔡后荣, E-mail: caihourong@yahoo.com.cn

* 作者对此文贡献相等

结合可延长患者总生存期^[2]。但是临床研究发现大多数初次治疗有效的患者经过1年或者更长时间的治疗后,病情进展,即产生获得性耐药。T790M突变和c-MET扩增是诱导EGFR为靶标的药物耐药主要原因。T790M突变是EGFR基因20外显子790密码子的错义突变,可导致获得性耐药,这种耐药机制约占所有耐药机制的50%^[3]。

微小RNA(microRNA, miRNA)是一类高度保守、非编码、长度约为20~24个核苷酸的单链小RNA。研究表明miRNA调控约1/3人类基因,与肿瘤发生、发展等密切相关。有研究表明某些miRNA可以导致肿瘤耐药。本研究通过miRNA芯片分析EGFR T790M双突变及EGFR单突变细胞株的miRNA表达差异,初步探讨miRNA是否参与调控肺癌对EGFR-TKI的获得性耐药(T790M突变机制)。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM及新鲜小牛血清购自Hyclone公司;电化学发光试剂盒购置美国GE公司;蛋白定量试剂盒购自美国Bio-Rad公司;RNA抽提和纯化试剂盒购自德国Qiagen公司;Agilent miRNA microarray芯片购自美国Agilent公司;qRT-PCR试剂盒及所有引物均购自美国ABI公司。

1.2 细胞培养

人肺腺癌细胞株H1975和PC9均由同济大学附属上海市肺科医院肿瘤免疫实验室提供;H1975及PC9用含10%胎牛血清、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素的DMEM培养,置于37℃、CO₂体积分数为5%的饱和湿度培养箱中培养。

1.3 细胞总RNA提取及纯化

分别收集H1975及PC9细胞2×10⁶个,按照Qiagen RNA提取试剂盒说明书提取总RNA,用Agilent Bioanalyzer分析RNA分子的完整性指数(RNA integrity number, RIN),评价RNA是否符合实验要求。按照试剂盒说明书纯化总RNA。

1.4 miRNA microarray 芯片杂交

分别取H1975细胞及PC9细胞总RNA各100ng送上海博豪生物科技有限公司,进行Agilent miRNA microarray芯片杂交。通过pCp-Cy3标记及

Agilent human miRNA芯片V12.0检测两种细胞的表达谱。该芯片含866个人miRNA和89个病毒miRNA,芯片结果由Agilent扫描仪进行扫描,去除本底信号,将标准化的Cy3信号取绝对数,采用Feature Extraction软件进行分析。

1.5 H1975和PC9细胞表达差异的miRNA靶基因预测

采用三大miRNA靶基因预测数据库[Miranda(<http://www.microrna.org/microrna/home.do>), Targetscan(<http://www.targetscan.org/>)和PicTar(<http://pictar.bio.nyu.edu>)]中的靶基因预测软件,对miRNA差异性表达的潜在靶基因进行预测,取三个软件预测的靶基因交集作为最终的潜在靶基因。

1.6 RT-PCR 芯片结果验证

在上调和下调的miRNA中各选取3个miRNA(上调表达的hsa-miR-489、hsa-miR-210和hsa-miR-21*,下调表达的hsa-miR-205、hsa-miR-200c和hsa-miR-155)进行RT-PCR实验(以U6作为内参),验证miRNA的可靠性及可重复性。RT-PCR反应条件为:95℃,2min;95℃,15s,60℃,30s,40个循环。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示miRNA的表达水平, $\Delta Ct = Ct_{\text{目标miRNA}} - Ct_{U6}$,每个实验重复3次。

1.7 统计学处理

应用SPSS17.0统计学软件进行分析,计量数据使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H1975和PC9细胞总RNA质量鉴定

H1975细胞的28s/18s为1.6,而PC9细胞为1.9,均符合后续实验要求。Agilent bioanalyzer数据分析显示H1975细胞的RIN为9.3,而PC9细胞RIN为9.7,提示其RNA完整性良好,符合RNA后续分析要求(Figure 1)。

2.2 H1975细胞和PC9细胞miRNA表达谱差异

在H1975细胞中表达上调差异达5倍以上的miRNA有22个,其中最显著的为hsa-miR-489,达159倍;而下调表达差异达5倍以上的有24个,其中hsa-miR-205最为显著,达305倍(Figure 2)。

2.3 miRNA潜在靶基因预测

miRNA靶基因分析软件显示在异常表达的

miRNA 中,33 个 miRNA 有潜在靶基因,其中 24 个 miRNA 下游潜在靶基因超过 100 个(Figure 3)。

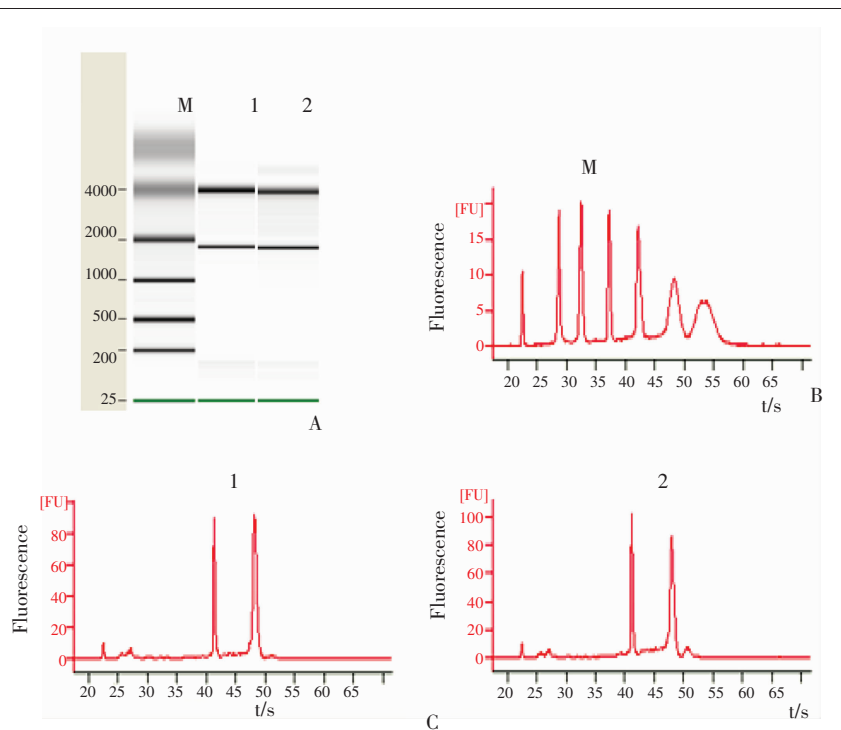
2.4 芯片结果验证

在 H1975 细胞中 ,miRNA-489 上调表达 155.4 倍 ,miRNA-210 上调表达达 10.4 倍,而 miRNA-21* 上调表达 6.5 倍;而下调表达的 miRNA 中,miRNA-205 为 301 倍,miRNA-200c 为 12.5 倍,而 miRNA-155 为 8.1 倍,与芯片结果基本一致(Figure 4)。

3 讨 论

随着肿瘤学研究的进展,靶向治疗药物在晚期肺癌的治疗中发挥重要的作用。EGFR-TKI 吉非替尼、厄洛替尼、埃可替尼等已被我国药品管理局(SFDA)批准用于晚期肺癌的治疗。但是临床研究发现前期靶向治疗有效的病人可进展为 EGFR-TKI 获得性耐药,从而使靶向药物的有效性受到限制。有学者发现约 50%患者其获得性耐药的产生与 EGFR 基因 20 外显子的 T790M 错义突变有关,认为此位点突变可改变 EGFR 酪氨酸激酶结构域的构象,从而干扰 EGFR-TKI 与 EGF 受体结合,是 TKI 类药物获得性耐药产生的主要机制。

有研究表明 T790M 位点并非使用 EGFR-TKI 后才发生突变,部分患者在治疗前肿瘤细胞中即存在比例较低的 EGFR-T790M 突变亚群。Inukai 等^[4]发现在 280 例非小细胞肺癌患者中,在吉非替尼治疗前采用 PCR 方法可检测到 9 例 T790M 突变患者。Rosell 等^[5]发现在 129 例未经



A:Electrophoresis patterns of total RNAs;B;and C;the analysis of RNA integrity in PC9 and H1975 cells. M:Marker;1:H1075 cell line;2:PC9 cell line.

Figure 1 Electrophoresis patterns of PC9 and H1975 cells

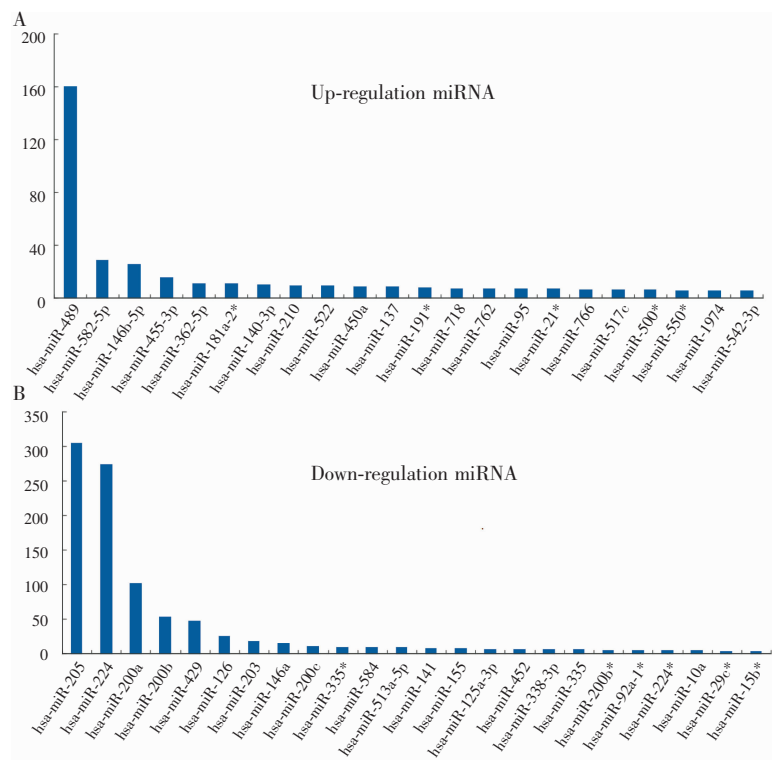


Figure 2 Different expression of miRNAs in H1975 and PC9 cells

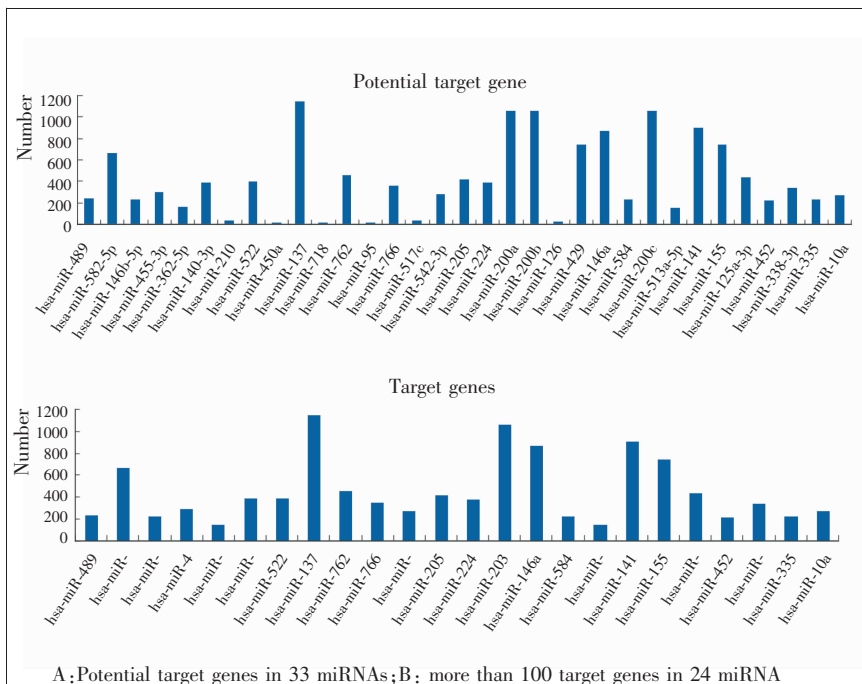


Figure 3 Target genes analysis of miRNA

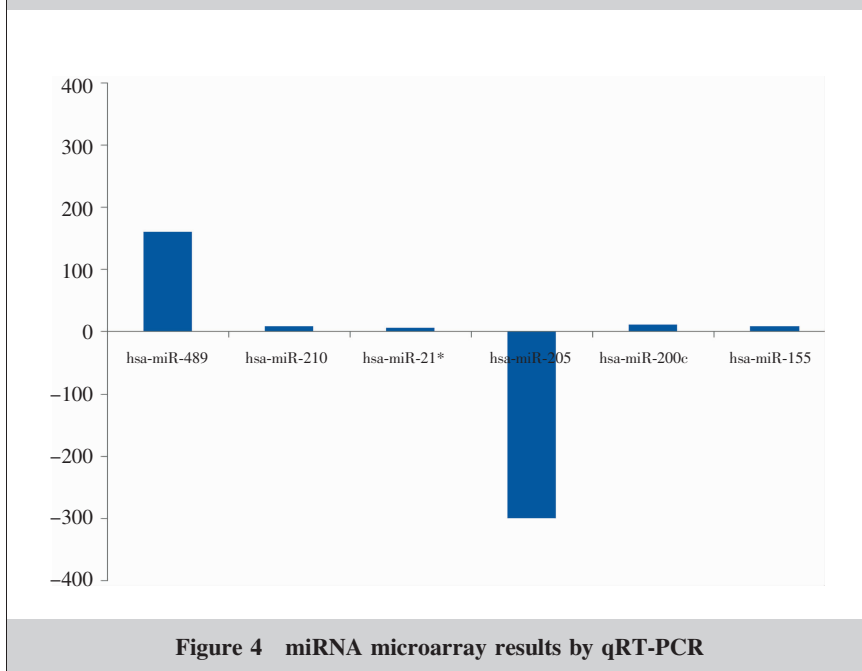


Figure 4 miRNA microarray results by qRT-PCR

厄洛替尼治疗的非小细胞肺癌患者中,45例(35%)存在T790M突变,且与厄洛替尼治疗的无进展生存期相关。因此,认为此突变细胞亚群在EGFR-TKI治疗前以较小比例的亚克隆形式存在,经过EGFR-TKI治疗后,在药物的压力选择下,对TKI不敏感的亚群逐渐增殖到占主要比例的细胞亚群。针对此亚群的第二代EGFR-TKI(如阿法替尼)疗效已经在多个大

型的临床研究中得到了证实^[6,7]。

微小RNA(microRNA,miRNA)是细胞内非编码的短、单链调控RNA分子,约有1000多种,调控近三分之一的人类基因。它与mRNA 3'UTR端完全或者不完全结合抑制mRNA的翻译。miRNA参与正常细胞增殖、分化、凋亡以及肿瘤细胞的形成、分裂、转移等生物学行为^[8]。有研究证实miRNA参与肿瘤细胞耐药过程。Pogribny等^[9]发现耐顺铂的乳腺癌细胞株-MCF-7/CDDP转染miRNA-7和miRNA-345后,细胞株对顺铂的敏感性增高,提示这两种miRNA有调节耐药的作用。Dong等^[10]研究发现将miRNA-21转染至胰腺癌细胞MIA PaCa-2后,细胞内Bcl-2表达上调,导致细胞凋亡速度减慢及耐药性增加。

我们研究组检测了H1975和PC9的EGFR外显子19及外显子20T790M突变情况,发现PC9只有EGFR19外显子缺失,而H1975不仅19外显子缺失,还有20外显子的T790M突变,H1975对吉非替尼的耐药性为PC9的100倍以上。通过比较H1975和PC9细胞株的miRNA表达谱发现,双突变的H1975细胞中有22个miRNA的上调表达超过5倍,24个下调表达超过5倍的。其中,表达最高的miRNA-

489可以抑制癌基因Dek,从而稳定肌肉干细胞^[11]。对于下调最明显的miRNA-205的研究比较多,miRNA-205在乳腺癌细胞中抑制癌基因HER3的表达^[12]。我们的研究发现H1975细胞株的耐药机制为T790M突变,其miRNA的表达特征明显,与对EGFR-TKI敏感的细胞株PC9相比较,上调达5倍的有22个,下调5倍以上的也有24个。因此,此群

miRNA 可能通过调控 T790M 突变亚群细胞中的基因参与 EGFR-TKI 耐药机制,但是通过何种机制调控耐药则需要进一步的实验验证。

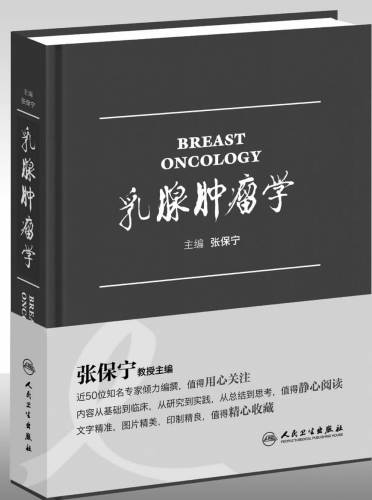
参考文献:

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Zhou C, Wu YL, Chen G, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study[J]. Lancet Oncol, 2011, 12(8): 735-742.
- [3] Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, et al. Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(19): 5764-5769.
- [4] Inukai M, Toyooka S, Ito S, et al. Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer [J]. Cancer Res, 2006, 66(16): 7854-7858.
- [5] Rosell R, Molina MA, Costa C, et al. Pretreatment EGFR T790M mutation and BRCA1 mRNA expression in erlotinib-treated advanced non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(5): 1160-1168.
- [6] Yang JC, Shih JY, Su WC, et al. Afatinib for patients with

lung adenocarcinoma and epidermal growth factor receptor mutations (LUX-Lung 2): a phase 2 trial[J]. Lancet Oncol, 2012, 13(5): 539-548.

- [7] Miller VA, Hirsh V, Cadranel J, et al. Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial [J]. Lancet Oncol, 2012, 13(5): 528-538.
- [8] Almeida MI, Reis RM, Calin GA. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers[J]. Mutat Res, 2011, 717(1-2): 1-8.
- [9] Pogribny IP, Filkowski JN, Tryndyak VP, et al. Alterations of microRNAs and their targets are associated with acquired resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin [J]. Int J Cancer, 2010, 127(8): 1785-1794.
- [10] Dong J, Zhao YP, Zhou L, et al. Bcl-2 upregulation induced by miR-21 via a direct interaction is associated with apoptosis and chemoresistance in MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells[J]. Arch Med Res, 2011, 42(1): 8-14.
- [11] Iorio MV, Casalini P, Piovan C, et al. microRNA-205 regulates HER3 in human breast cancer[J]. Cancer Res, 2009, 69(6): 2195-2200.
- [12] Markou A, Tsaroucha EG, Kaklamani L, et al. Prognostic value of mature microRNA-21 and microRNA-205 overexpression in non-small cell lung cancer by quantitative real-time RT-PCR[J]. Clin Chem, 2008, 54(10): 1696-1704.

书 讯



由中国医学科学院肿瘤医院张保宁教授主编的《乳腺肿瘤学》于2013年由人民卫生出版社出版发行。该书汇聚近50位知名专家,历时2年精心编写而成。该书以“全、新、实用”为编写原则,从基础到临床系统介绍乳腺肿瘤的病因与发病机制、预防与控制、诊断与鉴别诊断、综合治疗策略以及各种治疗方法的新理论、新技术,并融入编写专家个人丰富实践经验的分析与总结。该书编写科学性与实用性相得益彰,图文并茂。大16开,精装,117万字。定价188.00元。新华书店、医学专业书店及图书网店均有销售;人民卫生出版社东单瑞康图书零售中心电话:010-59787592,010-65264830;策划编辑刘艳梅邮箱:13691566816@163.com,期待您提出宝贵意见和建议。