

miR-34a 调控肺癌 EGFR 耐药细胞株中 MET 信号通路探讨

陈晓霞, 李 剑

(上海市浦东新区浦南医院, 上海 200125)

摘 要: [目地] 研究肺癌耐药细胞株 HCC827/GR 中 MET 信号通路的调控, 明确肺癌获得性耐药的分子机制。[方法] 使用 HCC827 细胞 [epidermal growth factor receptor(EGFR) 基因 19 外显子缺少的肺腺癌细胞株], 在此细胞的基础上培养吉非替尼耐药细胞株。检测耐药细胞株中 MET 的表达, 并使用 RT-PCR 的方法检测 miR-34a 的表达; 使用 TargetScan 等生物信息学软件预测 miR-34a 的下游靶点, 并在细胞内验证 miR-34a 是否可以调控 MET 的表达。[结果] 与 HCC827 细胞相比, HCC827/GR 细胞株对吉非替尼明显耐药。在耐药 HCC827/GR 细胞株中, miR-34a 低表达, MET 高表达, 而在 HCC827 细胞株中, miR-34a 高表达, MET 低表达。TargetScan 生物信息学软件提示, MET 是 miR-34a 的下游靶点之一。将携带荧光报告基团和 MET 3'UTR 的载体与 miR-34a 共转染入细胞后荧光度下降。[结论] miR-34a 可能通过调控靶基因 MET 而参与 EGFR-TKI 的获得性耐药。

关键词: 肺癌; 获得性耐药; miR-34a; MET

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2013)12-1020-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2013.12.A014

miR-34a Regulating MET Signaling Pathway in EGFR Resistant Lung Cancer Cell Lines

CHEN Xiao-xia, LI Jian

(Shanghai Punan Hospital, Shanghai 200125)

Abstract: [Purpose] To study the miR-34a regulating MET signaling pathway in EGFR resistant lung cancer cell lines, and to investigate the mechanisms of acquired resistance of lung cancer. [Methods] On the basis of HCC827 cells (epidermal growth factor receptor gene exon 19 deletions in lung adenocarcinoma cell lines), the gefitinib resistant cell lines were cultured. the expression of MET and miR-34a in the drug-resistant cell lines were detected by RT-PCR method. The downstream target of miR-34a were predicted by bioinformatics software such as TargetScan. Whether miR-34a could regulate the expression of MET in the intracellular was verified. [Results] HCC827/GR cell lines resistant to gefitinib approximately 100-fold compared with HCC827 cells. Low expression of miR-34a and high expression of MET in the resistant cell lines was found, while high expression of miR-34a and low expression of MET in the HCC827 cells. TargetScan bioinformatics software indicated MET is one of downstream target of miR-34a. The fluorescence was decreased when the vectors carried fluorescent reporter group and MET 3'UTR and miR-34 were co-transfected into cells. [Conclusion] MiR-34a involves in EGFR-TKI acquired resistance. It might regulate target genes MET.

Key words: lung cancer; acquired resistance; miR-34a; MET

近年来以表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 为靶点的分子靶向治疗受到肿瘤学家和临床医生的普遍关注, 其中 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitor, TKI) 如吉非

替尼和厄洛替尼在多个国家被批准为晚期肺癌的一线治疗药物 (针对 EGFR 突变阳性的晚期肺癌人群)。与传统的化疗相比, EGFR-TKI 可以延长疾病无进展生存期 (progression free survival, PFS), 并改善患者的生活质量^[1]。但是经研究发现, 几乎所有治疗有效的患者在经过治疗后, 病情最终都会出现进

收稿日期: 2013-06-17; 修回日期: 2013-08-19

基金项目: 浦东新区卫生局卫生科技项目 (PW2011A-18)

通讯作者: 李剑, 15618071293@163.com

展,即产生了获得性耐药。获得性耐药的机制目前不完全明确,而 T790M 突变^[2]及原癌基因 *MET* 的扩增是最常见的机制。Engleman 等^[3]在《Science》上报道,*MET* 基因扩增后可以通过 ErbB3 持续活化 PI3K 等下游信号通路,从而绕过了 EGFR-TKI 的治疗靶点 EGFR。但 *MET* 在肺癌细胞中是如何被调控的目前仍少见相关报道。

微小 RNA(microRNA, miR)是一类高度保守、长度约 20~24 个核苷酸序列的非编码单链小 RNA。近年来的研究表明,miR 与肿瘤的发生、发展、转移及耐药都有密切的关系^[4]。成熟的 miR 通过碱基互补配对,与调控的靶基因的 mRNA 的 3'UTR 段相结合,沉默或者降解 mRNA,调控基因的表达。在肺癌的研究中,miR-34 家族近年来备受关注。miR-34 家族包括 miR-34a、miR-34b 和 miR-34c,其在基因的修复蛋白 p53 的调控通路中发挥着重要的作用。多项研究表明,miR-34 家族的转录受 p53 的调控,并参与 p53 的调控通路^[5]。而生物信息学软件也提示 miR-34a 可以调控 SIRT1 和 E2F3 等,进行肿瘤细胞的周期、凋亡及增殖的调控。

在我们的前期实验中,我们发现在耐药的细胞株 HCC827/GR 中,*MET* 高表达,这和 Engelman 等^[6]的报道一致。同时,也发现耐药细胞株中 miR-34a 的表达较敏感细胞株中明显降低,我们推测 miR-34a 可能通过调控 *MET* 参与肺癌细胞对 EGFR-TKI 的耐药。本研究通过检测耐药细胞株及敏感细胞株中 miR-34a 及 *MET* 的表达,探讨肺癌耐药细胞株中 *MET* 信号通路的调控。

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;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 HCC827 由同济大学附属上海市肺科医院肿瘤免疫实验室提供;HCC827 细胞用含 10%的胎牛血清、100U/ml 青霉素和 100μg/ml 链

霉素的 DMEM 培养,置于 37℃、二氧化碳体积分数为 5%的饱和湿度培养箱中培养。HCC827/GR 通过 HCC827 暴露于一定浓度的吉非替尼,培养并传代 6 个月后获得。

1.3 细胞总 RNA 的提取及纯化

分别收集 HCC827 及耐药细胞 HCC827/GR 2×10^6 个,按照 Qiagen 的 RNA 提取试剂盒说明书提供的方法和步骤提取总 RNA,用 Agilent Bioanalyzer 分析 RNA 分子的完整性指数(RNA integrity number, RIN),评价 RNA 是否符合进一步实验的要求。按照试剂盒说明书纯化总 RNA。

1.4 miR-34a 的靶基因预测

通过研究常用的三大 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>)] 靶基因预测软件,对 miR-34a 的潜在靶基因进行预测,取三个软件预测的靶基因的交集作为最终靶基因。

1.5 qRT-PCR 检测 miR-34a 的表达

为了证实 miR-34a 在 HCC827 及 HCC827/GR 细胞株中的表达,我们进行 qRT-PCR 验证(以 U6 作为内参),以验证 miRNA 的可靠性及可重复性。qRT-PCR 采用两步法,反应条件为:第 1 步 95℃ 2min;第 2 步 95℃ 15s, 60℃ 30s,共 40 个循环。以 $-\Delta\Delta Ct$ 表示 miRNA 的表达水平, $\Delta Ct = Ct_{\text{目标 miRNA}} - Ct_{\text{U6}}$,每个实验重复 3 次。

1.6 Western-blot 检测 MET 的表达

将指数生长期的 HCC827 和 HCC827/GR 细胞用一次性刮刀轻轻刮下,利用裂解液提取总蛋白,然后进行 SDS-PAGE 分离目的蛋白:电泳结束后取下凝胶电转移到硝酸纤维素膜上:用含 5%脱脂奶粉的 TBST 液体封闭硝酸纤维素膜 2h,一抗孵育 4℃ 过夜(工作液稀释比例为 1:200),二抗孵育 1h(工作液稀释比例为 1:6000),将硝酸纤维素膜置于增强化学发光试剂中反应 2min,暗室中经 X 线片曝光,常规方法显影、定影,胶片用 Gel-Pro3.1 软件分析,目的蛋白的相对表达量以目的蛋白条带灰度值与内参 GADPH 条带灰度值的比值来表示。

1.7 荧光报告载体的建立及荧光素酶的检测

根据文献,建立 *MET* 3'UTR 的 mutant 及 wild-type 两个载体,用 Lipofectaming2000 转染试剂转染,

方法参考说明书共转染海肾荧光素酶表达载体及 miR-34a mimic,并以 mimic Negative Control 作为对照。共分为 3 组:miR-34a mimic 转染组,miR-34a control 转染组和阴性对照组(NC 组)。转染 48 h 后裂解细胞,检测荧光素酶活性。根据 Promega 公司的双荧光素酶检测试剂盒提供的方法,述实验每组设 3 个平行,以转染 Negative Control 的细胞作为阴性对照,每组实验重复 3 次。根据 Promega 公司的双荧光素酶检测试剂盒提供的方法检测荧光素酶活性,将待测细胞用 PBS 洗涤后再用 100 μ l 的被冻裂解液将细胞裂解 15min,裂解物用 Promega 公司的 Glomax20/20lumino-meter 荧光检测仪检测,向测量管中加入 100 μ l 的 LARII 和 20 μ l 的细胞裂解液,测量荧光 1,再加入 100 μ l 的 Stop&Glo 试剂,测量荧光 2;以荧光 1/荧光 2 的值作为相对荧光素酶活性。

1.8 统计学处理

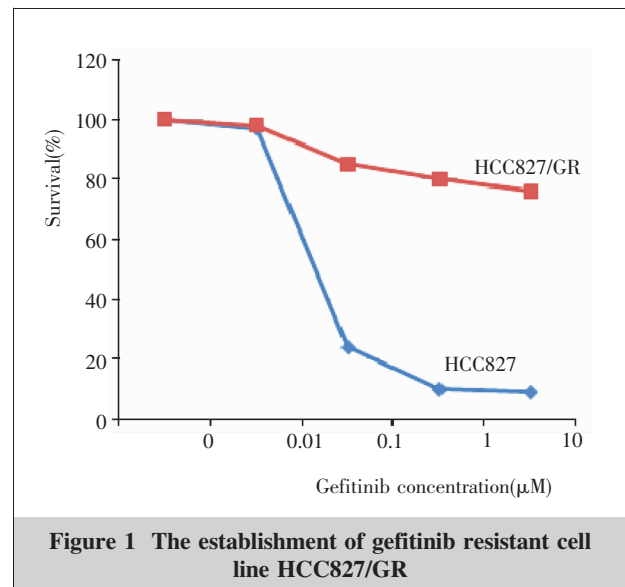
采用 SPSS17.0 统计学软件进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x}+s$ 表示,两样本的均数比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功获得耐药细胞株

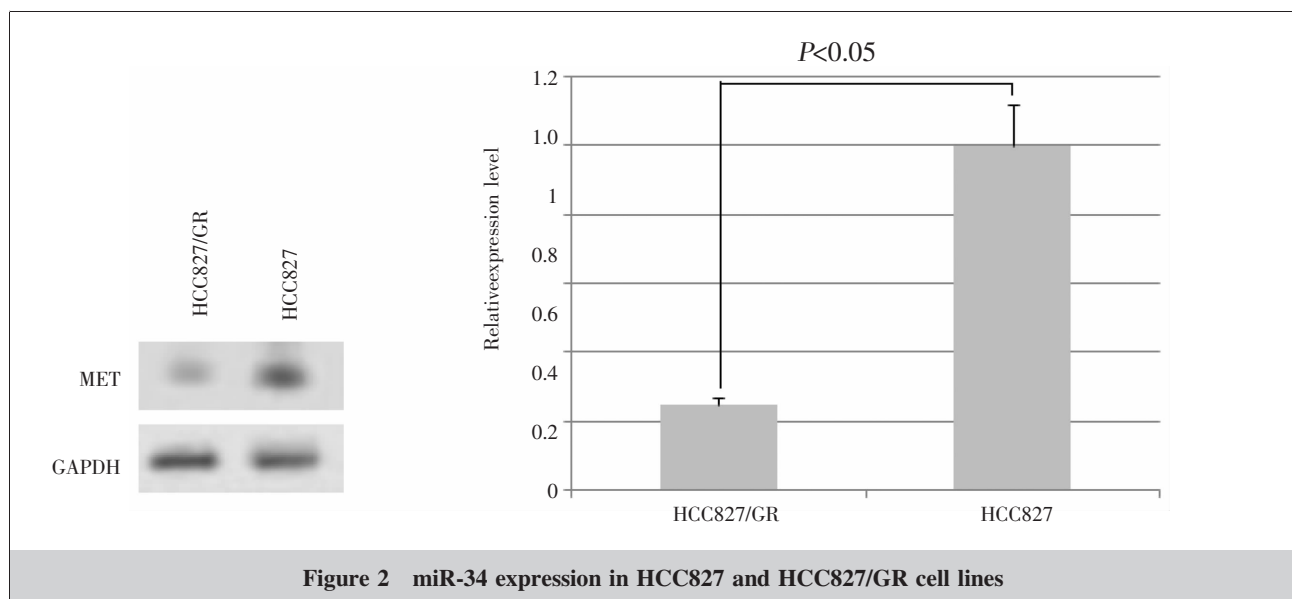
将 HCC827 暴露于浓度逐渐递加的吉非替尼中并传代 6 个月,并且在吉非替尼中进行细胞培养,挑

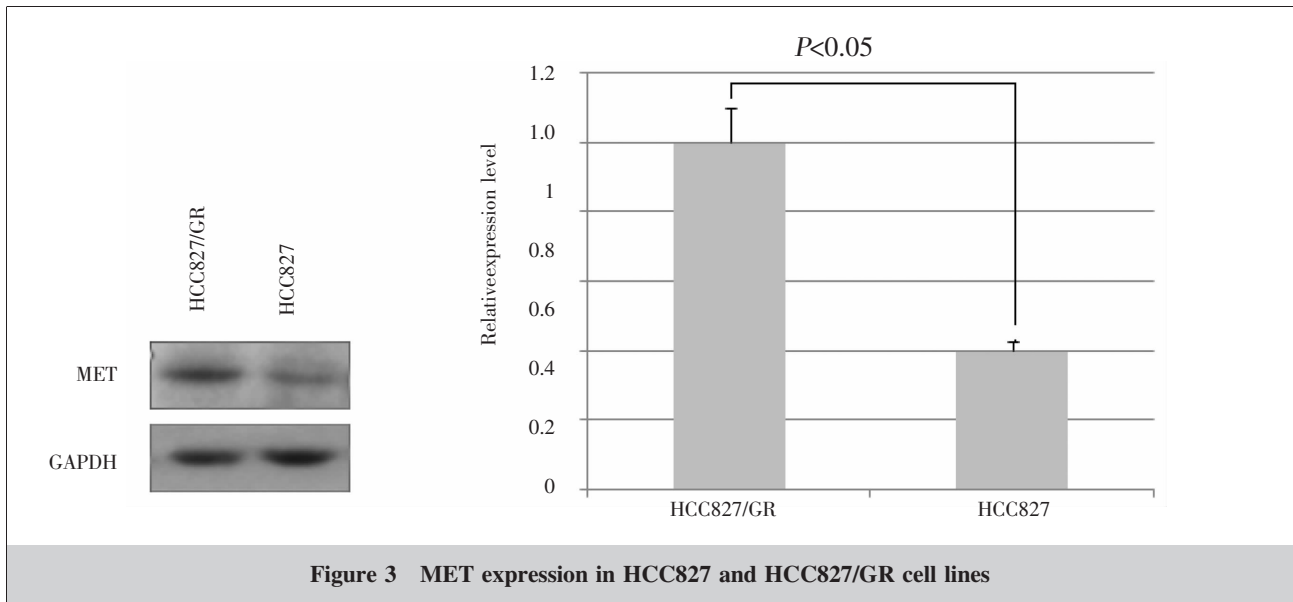
选耐药细胞的亚克隆,为亚克隆进行传代并培养,并命名为 HCC827/GR,MTT 实验显示,HCC827/GR 比 HCC827 对吉非替尼耐药(Figure 1)。



2.2 miR-34a 及 MET 在耐药细胞及敏感细胞株中的表达

RT-PCR 结果显示,在耐药细胞株 HCC827/GR 中,miR-34a 的表达明显降低,而在 HCC827 中,miR-34a 的表达量增高(Figure 2)。Western-blot 的结果显示,在耐药细胞株中,MET 的表达量增高,而在敏感细胞株中表达降低(Figure 3)。



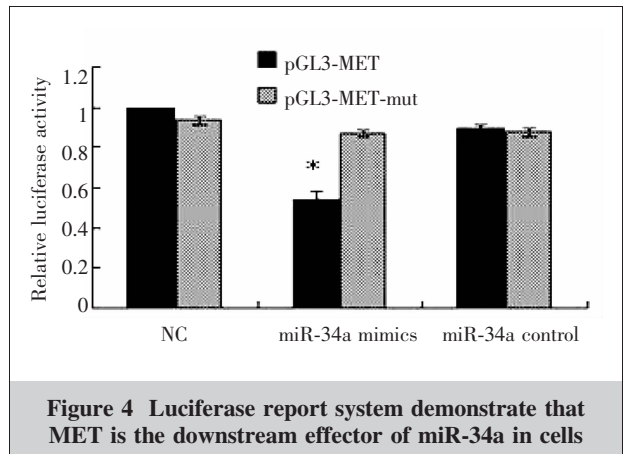


2.3 预测 miR-34a 潜在的靶基因

通过三大常用的 miRNA 靶基因分析软件分析,发现 miR-34a 存在 655 个可能的下游靶点,*MET* 为其中之一,*MET* 基因的 3'UTR 的 51~57 及 2165~2171 为 miR-34a 的结合靶点(Table 1)。

2.4 荧光报告基因中荧光素酶的测定

为验证在细胞内 miR-34a 可以结合 *MET* 的 3'UTR 段,克隆了 *MET* 3'UTR 的突变和野生载体,共转染到荧光报告基因中。发现相比较于突变型,只有转染了野生型和 miR-34a mimic 的荧光素酶活性明显下降,而突变型和 miR-34a mimic,或者野生型和 miR-34a 对照的荧光素酶的活性没有变化(Figure 4)。



3 讨论

非编码小分子 RNA (microRNA, miR) 通常为长度为 18~24 个核苷酸序列的单链 RNA 分子,它通过不完全碱基互补配对的方式作用于靶 mRNA,导致靶 mRNA 降解或者转录受到抑制,从而影响细胞

基因的表达、细胞周期的调控、细胞增殖及凋亡等生命过程。近年来的研究发现,miRNA 在肿瘤的发生及发展过程中扮演了重要的角色,通常认为 miRNA 在肿瘤中有癌基因及抑癌基因的作用。miR-34a 是公认的抑癌基因,它是抑癌基因 p53 的直接靶点,在胰腺癌、乳腺癌、肺癌、肾癌、结肠癌等多种实体瘤中异常表达。且 Zenz 等^[6,7]发现,miR-34a 和 p53 共同调控慢性淋巴细胞白血病 (chronic lymphocytic

Table 1 MET is one of miR-34a predicting downstream targets by TargetScan

Site	Object region and miRNA	Seed sequence matching	Site type	3'pairing	Local AU contribution	Position contribution
The 51~57 site of has-miR-34a MET 3'UTR	5'GUCCAAUGGUUUUUCACUGCCU 3'UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU	7mer-m8	-0.120	0.012	-0.066	-0.055
The 2165~2171 site of has-miR-34a MET 3'UT	5'GAAUUAGAUACUUGUCACUGCCU 3'UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU	7mer-m8	-0.120	0.003	-0.066	-0.049

leukemia, CLL)的化疗耐药。在结肠癌中,miR-34a 可以通过 SIRT1 而调控对 DLD-1 结肠癌细胞对 5-Fu 的耐药^[8]。我们的研究中也发现在耐药细胞株中 miR-34a 异常高表达,提示其可能是导致 EGFR-TKI 获得性耐药的原因之一。

c-MET 为原癌基因,是 MET 蛋白的编码基因。MET 蛋白的配体为肝细胞生长因子(HGF),MET/HGF 通路在多种肿瘤细胞中异常表达,包括肺癌。Ma 等^[9]的研究表明,100%的非小细胞肺癌中有 MET 蛋白的表达,其中 61%为过表达;通过进一步分析发现,MET 在各种类型肺癌中的表达差异不明显。在肺癌的 EGFR-TKI 耐药研究中,Engelman 等^[3]发现 MET 扩增后可以激活 ErbB3 旁路,从而“绕过”被抑制的 EGFR 通路,旁路激活 EGFR 的下游通路,将信号传递到细胞内,从而导致细胞对 TKI 药物的不敏感。我们的研究中也发现 MET 在耐药细胞中明显高表达,和此前的报道一致;同时也发现 miR-34a 在耐药细胞株中低表达,而通过生物信息学软件如 TargetScan 等发现 miR-34a 的预测靶点中包括 *MET* 基因。因此,我们推测 miR-34a 可以通过调控 MET 导致 EGFR-TKI 的耐药。

本研究发现 MET 和 miR-34a 在耐药细胞株中呈反向表达,TargetScan 等生物信息学软件也提示 MET 是 miR-34a 的潜在靶点。我们使用荧光载体将 MET 及 MET 的突变载体与 miR-34a mimic 共同转染至细胞内,发现 MET 与 miR-34a mimic 共转染后,荧光强度明显下降,而 MET 突变载体与 miR-34a mimic 及 MET 与 miR-34a 对照物都没有荧光强度的变化,提示 miR-34a 与 MET 在细胞内可以结合,也验证了生物学信息学软件的预测。但是值得注意的是,每个微小 RNA 的潜在靶点成百上千,在细胞内被验证的并不多,这些潜在的靶点是否可以起到生物学功能并不清楚,而且微小 RNA 的调控是属于网络调控,因此 miR-34a/MET 可能是调控 EGFR-TKI 的耐药因素之一,且细胞株的实验结果仍需要在组织标本中进行验证。

综上所述,我们的研究表明 miR-34a/MET 可能是调控 EGFR-TKI 的耐药机制之一,提示 miR-34a 或者 MET 可能成为逆转 EGFR-TKI 的新的治疗靶点。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Oxnard GR, Arcila ME, Sima CS, et al. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant lung cancer: distinct natural history of patients with tumors harboring the T790M mutation [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(6): 1616-1622.
- [3] Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling[J]. *Science*, 2007, 316(5827): 1039-1043.
- [4] Cherni I, Weiss GJ. miRNAs in lung cancer: large roles for small players[J]. *Future Oncol*, 2011, 7(9): 1045-1055.
- [5] Hermeking H. MiR-34a and p53 [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(9): 1308.
- [6] Zenz T, Mohr J, Edelmann J, et al. Treatment resistance in chronic lymphocytic leukemia: the role of the p53 pathway[J]. *Leuk Lymphoma*, 2009, 50(3): 510-513.
- [7] Zenz T, Mohr J, Eldering E, et al. miR-34a as part of the resistance network in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Blood*, 2009, 113(16): 3801-3808.
- [8] Akao Y, Noguchi S, Iio A, et al. Dysregulation of microRNA-34a expression causes drug-resistance to 5-FU in human colon cancer DLD-1 cells [J]. *Cancer Lett*, 2011, 300(2): 197-204.
- [9] Ma PC, Jagadeeswaran R, Jagadeesh S, et al. Functional expression and mutations of c-Met and its therapeutic inhibition with SU11274 and small interfering RNA in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(4): 1479-1488.