

miR-21 促进肺癌 EGFR-TKI 耐药细胞株上皮—间质细胞转化的研究

王银华¹, 谷 宏², 周 勤¹, 韦永明¹, 胡 俊¹, 叶 斌¹, 刘 飞¹, 施秀华¹, 王永生³

(1. 芜湖市第二人民医院, 安徽 芜湖 241000; 2. 芜湖市南陵县医院, 安徽 芜湖 241300;

3. 南京大学医学院附属鼓楼医院, 江苏 南京 210008)

摘 要: [目的] 研究 miR-21 是否可以调控上皮—间质转化 (EMT) 而参与肺癌获得性耐药。[方法] 使用 HCC827 细胞 (EGFR 基因 19 外显子缺失的肺癌细胞株), 在此细胞的基础上培养吉非替尼耐药细胞株 HCC827/GR。检测耐药细胞株中 miR-21 的表达, 同时观察耐药细胞的形态变化, 及在耐药细胞株中抑制 miR-21 表达后检测耐药细胞株的侵袭能力及 EMT 相关蛋白 E-cadherin 和 Vimentin 的表达。[结果] 与敏感细胞株 HCC827 相比, HCC827/GR 细胞株对吉非替尼的耐药倍数约为 100 倍; 同时在耐药细胞株中我们发现 miR-21 较敏感株表达增高约 5.3 倍, 同时细胞形态发生了明显变化。通过检测 EMT 相关蛋白, 我们发现耐药细胞株中 EMT 相关蛋白 Vimentin 明显高表达, 而上皮相关蛋白 E-cadherin 明显低表达, 当 miR-21 被抑制后, 耐药细胞株侵袭能力下降, 同时 Vimentin 表达量下降, 而 E-cadherin 表达量增高。[结论] miR-21 可能通过促进 EMT 参与肺癌 EGFR-TKI 的获得性耐药。

关键词: 肺肿瘤; 获得性耐药; miR-21; EMT

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)08-0654-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.08.B009

MiR-21 Promotes Epithelial to Mesenchymal Transition in EGFR-TKI Resistant Lung Cancer Cells

WANG Yin-hua¹, GU Hong², ZHOU Qin¹, et al.

(1. The Second People's Hospital of Wuhu, Wuhu 241000, China; 2. Nanling County Hospital, Wuhu 241300, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the association of epithelial mesenchymal transition and miR-21 in EGFR-TKI acquired resistant cell line—HCC827/GR. [Methods] Resistant cell line HCC827/GR based on EGFR-TKI sensitive cell line HCC827 (exon 19 deletion in EGFR gene) was established. The expression of miR-21 was detected by RT-PCR, meanwhile the morphological change was observed. MiR-21 was inhibited in HCC827/GR and invasion capacity and EMT related biomarkers such as E-cadherin and Vimentin were detected by Western blot. [Results] Compared with HCC827, HCC827/GR demonstrated 100 times resistance to EGFR-TKI. Moreover, we observed that miR-21 was more than 5 folds higher in HCC827/GR compared with HCC827, and HCC827/GR demonstrated mesenchymal phenotype. We also found that expression of Vimentin increased while expression of E-cadherin decreased compared with HCC827. When miR-21 was inhibited in HCC827/GR, expression of Vimentin decreased while expression of E-cadherin increased. [Conclusion] MiR-21 may promote EMT in lung cancer, which contributes to EGFR-TKI acquired resistance.

Subject words: lung neoplasms; acquired resistance; miR-21; EMT

肺癌发病率呈现逐年上升的趋势, 在世界范围内, 肺癌是男性最常见的恶性肿瘤, 占新诊断病例的 17% 及癌症死亡原因的 23%, 而在女性肿瘤中, 发病率也迅速上升^[1]。其中晚期肿瘤约占新发肿瘤的一半左右, 作为晚期肺癌的最主要治疗手段之一——化疗的疗效目前已达到平台期, 中位生存期约 8~10 个月^[2]。随着分子靶向治疗的发展, 晚期肺癌的治疗已经进入崭新的时代, 特别是上皮生长因子受体抑

制剂 (epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI) 的临床运用, 给晚期肺癌患者带来了福音^[3]。但是经研究发现几乎所有初始治疗有效的患者最终都会疾病进展, 即产生了获得性耐药, 因此探讨 EGFR-TKI 靶向治疗耐药的机制有助于指导临床治疗^[4]。

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、转移及耐药密切相关。miR 通过沉默或者降解 mRNA 而在

通讯作者: 周 勤, 主任医师, 学士; 芜湖市第二人民医院肿瘤科, 安徽省芜湖市九华山中路 263 号 (241000); E-mail: 632556250@qq.com
收稿日期: 2014-05-23; **修回日期:** 2014-07-06

转录水平起到调控基因的作用^[5]。MiR-21 进化高度保守,研究发现在多种肿瘤(包括肺癌),与相应的邻近正常组织相比,miR-21 在肿瘤组织中明显高表达。上调 miR-21 的表达可以促进肿瘤的发生和发展,而抑制 miR-21 的表达则可以抑制肿瘤细胞增殖,提示 miR-21 可能具备癌基因的功能^[6]。

在我们的前期实验中,我们发现在吉非替尼耐药的细胞株中,miR-21 高表达^[7]。同时,也发现耐药细胞株的细胞形态发生了明显的变化,由敏感细胞株 HCC827 的鹅卵石状上皮形态变成梭形、纺锤形,而且其细胞间隙略变大,细胞和细胞之间的连接变得松散,我们推测 HCC827/GR 可能发生了上皮-间质转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)。同时检测的生物标志物也提示在功能上耐药细胞株发生了 EMT。当我们抑制 miR-21 的表达后,耐药细胞株发生 EMT 变化。本研究通过研究吉非替尼耐药细胞株的 EMT 转化发现 miR-21 可能通过诱导 EMT 参与吉非替尼耐药,为将来逆转 EGFR-TKI 耐药提供思路。

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;单抗及二抗购自美国 Abcam 公司;RNA 抽提和纯化试剂盒购自德国 Qia-gen 公司;qRT-PCR 试剂盒及所有引物均购自美国 ABI 公司,吉非替尼购自武汉胜天宇生物科技有限公司,miR-21 抑制剂购自上海吉玛基因公司。

1.2 细胞培养

人肺腺癌细胞株 HCC827 由新加坡国立癌症研究中心提供;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 0.01μmol/L 的吉非替尼,传代 6 个月,并在吉非替尼中进行细胞培养,挑选耐药细胞的亚克隆,这个亚克隆进行传代并培养,并命名为 HCC827/GR。

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 qRT-PCR 检测 miR-21 的表达

为了证实 miR-21 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),来验证 miR-21 是否与耐药相关。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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示 miRNA 的表达水平, $\Delta C_t = C_{t \text{ 目标 miRNA}} - C_{t \text{ U6}}$,每个实验重复 3 次。

1.5 Western blot 检测 Vimentin 和 E-cadherin 的表达

将处于指数生长期的 2 组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 1:6 000),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 GAPDH 条带灰度值的比值来表示。

1.6 划痕实验

将处于对数生长期的细胞以 0.25% 胰酶消化处理,离心弃上清,以完全培养基重悬细胞沉淀,吹匀后计数细胞并调整至所需细胞的浓度,接种单细胞悬液于 6 孔板中,待 24h 细胞密度达 90% 时,换正常培养基为无血清的基础培养基,待细胞贴壁率达 100% 时,用无菌枪头在每个孔中长满的单层细胞上迅速而轻轻地划 1~2 道痕,1×PBS 冲洗去掉脱落的细胞,换无血清的培养基继续培养 24h,并在 5h 及 24h 后拍照观察,我们利用显微镜自带的测量工具测量同一位点上 5、24h 划痕的宽度,计算迁移距离,细胞迁移距离 = $1/2(5h \text{ 划痕宽度} - 24h \text{ 划痕宽度})$ 。

1.7 Transwell 检测细胞的侵袭性

把 Transwell 倒置,在 Transwell 的 PVDF 膜下表面涂一层 Fibronectin (10μg/ml, 50μl), 37℃ 2h, PBS 洗 1 遍后,放入预先每孔加有 600μl 的培养基(含 10% 血清)的 24 孔板内,后在 Transwell 的内室加入细胞(100μl, 用含 0.1% 血清的培养基稀释好自己所需密度),放入培养箱 12h 后,取出 Transwell,用棉签擦去 PVDF 膜靠近内室那一面的细胞,另一面的细胞用甲醛室温固定 30min,结晶紫染色 20min,用

清水洗 3 遍以上,然后在显微镜下观察细胞,计数。

1.8 统计学处理

应用 SPSS17.0 统计学软件进行实验结果的统计学分析,计量数据使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数的比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 耐药细胞株的获得和 EMT 转换

按照文献提供的实验方法^[7],MTT 实验显示, HCC827/GR 比 HCC827 对吉非替尼耐药(Figure 1A), 当吉非替尼浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 时, HCC827/GR 与 HCC827 生存率分别为 78% 和 10% ($P = 0.002$)。我们观察发现耐药细胞株相比较敏感细胞株,细胞形态发生了明显变化,由原来聚积在一起的圆形变为散开的纺锤型(Figure 1B),形态学提示上皮细胞形态转换为间质细胞形态。在耐药细胞株我们检测了 EMT 相关蛋白,发现间质细胞相关蛋白 Vimentin 表达明显升高,而上皮细胞相关蛋白 E-cadherin 表达明显降低,验证了在耐药细胞株发生了 EMT 转换(Figure 1C)。

2.2 miR-21 在敏感及耐药细胞株中的表达

RT-PCR 的结果显示,在耐药细胞株 HCC827/GR 中,miR-21 的表达增高约 5.3 倍,而在 HCC827 中,miR-21 的表达量减低;两组表达量的比较有统计学差异 ($P = 0.034$)。而 Southern blot 也证实了 miR-21 在 HCC827/GR 中的表达明显高于 HCC827(Figure 2)。

2.3 耐药细胞及敏感细胞的侵袭性研究

划痕实验显示,5h 时间点上,耐药和敏感细胞均没有细胞越过“划痕”,而 24h 后,耐药和敏感细胞的迁移距离分别为 $(242.03 \pm 4.22) \mu\text{m}$ 和 $(10.12 \pm 2.35) \mu\text{m}$,两组比较有统计学差异 ($P = 0.001$),提示耐药细胞 HCC827/GR 的侵袭性强于 HCC827。Transwell 结果显示,24h 后迁移到下室的耐药 HCC827/GR 细胞数为 (386 ± 4) 个,而 HCC827 细胞数为 (102 ± 2) 个,约减少了 3.2 倍,两组相比较有统计学差异 ($P = 0.025$)(Figure 3)。

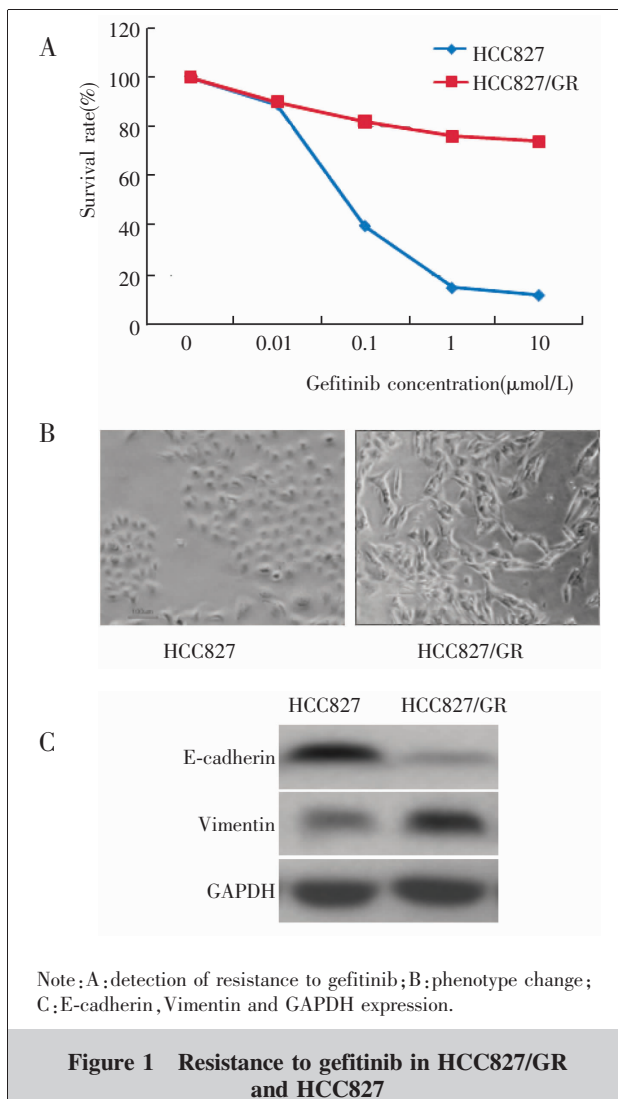
2.4 耐药细胞株中抑制 miR-21 表达后 EMT 相关蛋白表达的检测

根据 Lipofectamine2000 的使用说明书,在 HCC827/GR 细胞中使用 Lipofectamine2000 转染 miR-21 的抑制剂 antagomir-21(上海吉玛基因合成)抑制其在耐药细胞株中表达,我们发现抑制 miR-21 表达后,相比较于对照组(未抑制 miR-21 的表达),

E-cadherin 的表达量明显增高,而 Vimentin 的表达量减低(Figure 4)。提示细胞 miR-21 被抑制后,耐药细胞株 Vimentin 表达量减低,提示其发生了间质—上皮细胞转换。

2.5 耐药细胞株中抑制 miR-21 表达后侵袭性的检测

通过载体抑制在耐药细胞株中抑制 miR-21 表达后,划痕实验显示,5h 时间点上,两组细胞均未越过“划痕”,提示侵袭性无差别;但在 24h 时间点上,miR-21 未被抑制的细胞移动距离为 $(198.28 \pm 3.21) \mu\text{m}$,而 miR-21 被抑制后的耐药细胞移动距离为 $(8.66 \pm 3.61) \mu\text{m}$,提示 miR-21 被抑制后,细胞的侵袭能力下降。Transwell 结果也显示在 24h 后 miR-21 被抑制的情况下迁移到下室的细胞数量由 (420 ± 3) 个减少为 miR-21 未被抑制组的 (203 ± 2) 个,两组相比较有统计学差异 ($P = 0.046$)(Figure 5)。



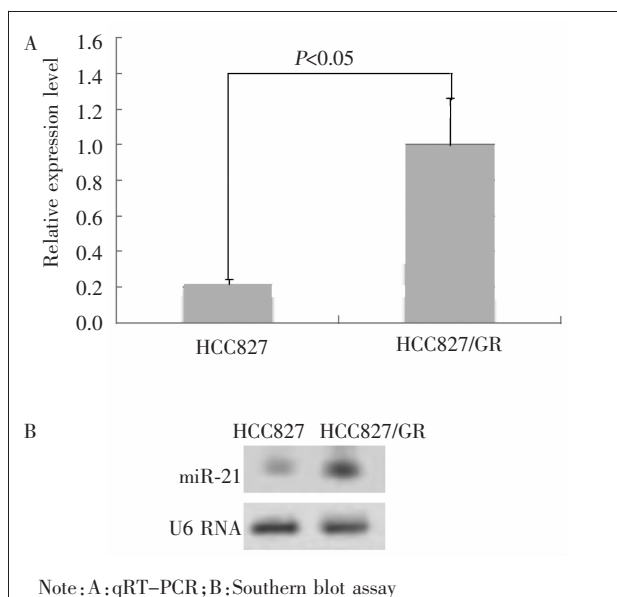


Figure 2 Expression of miR-21 in HCC827/GR and HCC827

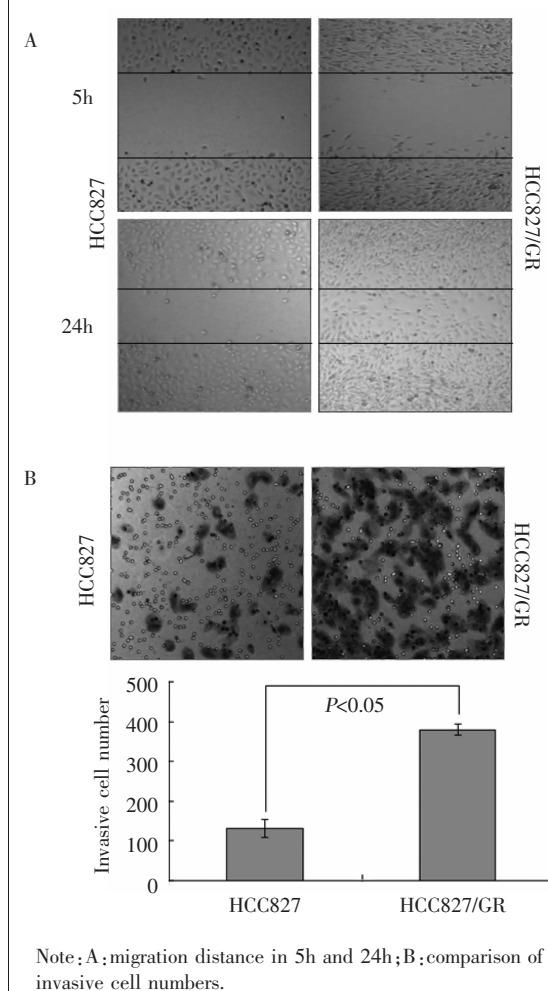
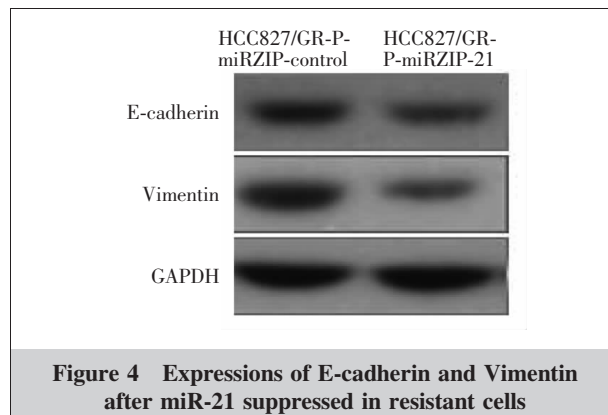


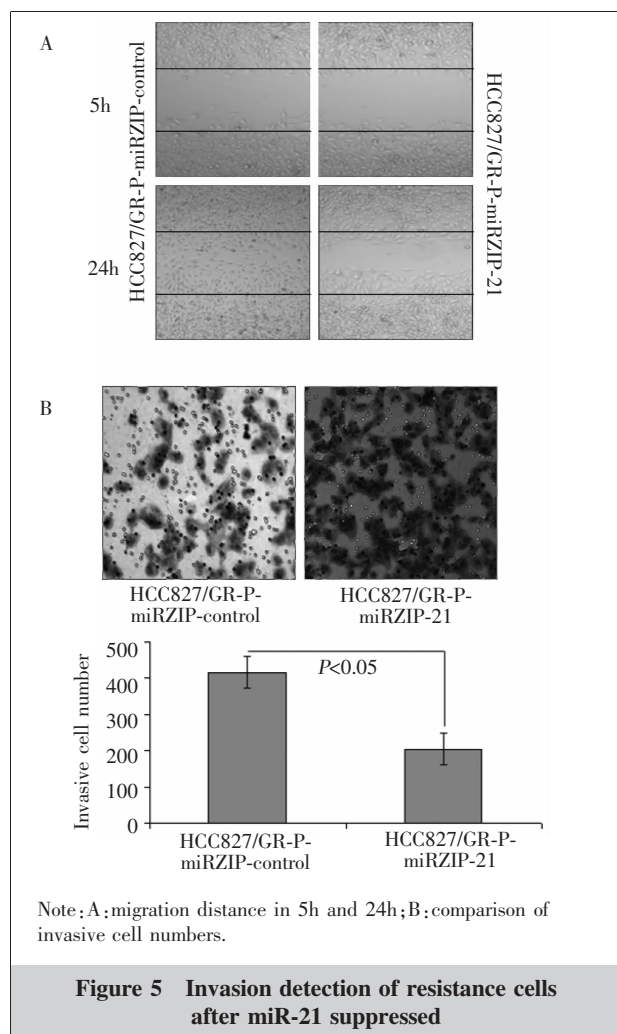
Figure 3 Invasion detection of resistant cells



3 讨论

miR-21 定位于人 17 号染色体上,在进化上高度保守。大量研究表明 miR-21 在许多类型的肿瘤中高表达,包括非小细胞肺癌,其与肿瘤的发生和发展密切相关,发挥着癌基因的作用。Yanaihara 等^[8]利用基因芯片发现,相比较周围正常组织,非小细胞肺癌中有 43 个 microRNA 异常表达,其中 miR-21 表达量升高。张哲等^[9]的研究也表明,miR-21 在非小细胞肺癌组织中的表达水平明显高于其在癌旁肺组织中的表达水平,并与非小细胞肺癌患者 TNM 分期、癌细胞的分化及淋巴结转移相关。Seike 等^[10]也发现在不吸烟的肺癌患者中 miR-21 表达量明显升高。在我们的研究中,我们也发现在 EGFR-TKI 的耐药细胞株中,miR-21 表达明显升高,提示其还可能与 EGFR-TKI 耐药相关。

EMT 即上皮间质转换,越来越多的研究表明其在肿瘤细胞的侵袭及转移过程中起着重要的作用。EMT 受各种因素的调控,在体外 EMT 形成的模型中,信号分子与细胞膜表面特异性受体结合,进而通过细胞内信号转导,激活细胞核内的转录因子,从而使得细胞表型发生不同程度的转化。上皮细胞通常聚集在一起,不具有侵袭性,而间质细胞则具有较强的侵袭能力。在我们的研究中,发现耐药细胞的形态明显发生了变化,由原来聚积在一起的圆形变为散开的纺锤型,我们推测细胞可能发生了上皮—间质转换。在形态学转换为间质细胞的耐药细胞株中我们发现 miR-21 明显表达增高至少 5 倍以上,提示其可能导致耐药,当我们抑制 miR-21 表达后,我们发现细胞的侵袭能力明显下调,且细胞形态发生了间质—上皮转换。与相关研究一致^[11],EMT 转换在



EGFR-TKI 耐药中扮演了重要的角色, 而逆转 EMT 的过程可以增高厄洛替尼对 NSCLC EGFR-TKI 耐药的疗效。

Cottonham 等^[12]的研究中发现在结肠癌细胞 LIM1863 中, miR-21 可以增强 TGF β 的功能, 不仅可以影响细胞形态的改变, 还可以促进细胞迁徙和侵袭性。TIAM1 是 miR-21 的下游靶点, 并证实 miR-21 在结肠癌细胞中可能通过调控 TIAM1 促进细胞的 EMT 转换。而在 Han 等^[13]的研究中, 发现在乳腺癌细胞 MCF-7 中, miR-21 可以通过激活“间质”细胞相关因子如 N-cadherin、Vimentin 及 α -SMA 来促进细胞的 EMT 转换, 并抑制“上皮”细胞因子的合成。和相关报道一致^[14], 我们课题组也曾报道 miR-21 在吉非替尼耐药细胞中高表达^[15], 本研究还发现 miR-21 可以促进耐药细胞的迁徙和侵袭性增强, 并促进 EMT 转换, miR-21/EMT 转换这一轴心可能是

EGFR-TKI 的耐药机制之一。

综上所述, miR-21 可能通过促进 HCC827 腺癌细胞的 EMT 而参与 EGFR-TKI 的耐药, 因此, miR-21/EMT 这一轴心可能成为干预 EGFR-TKI 耐药的新靶点。

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] Wang F, Wang LD, Li B, et al. Gefitinib compared with systemic chemotherapy as first-line treatment for chemotherapy-naïve patients with advanced non-small cell lung cancer: a meta-analysis of randomised controlled trials [J]. Clin Oncol, 2012, 24(6): 396-401.
- [3] D'Arcangelo M, Cappuzzo F. Erlotinib in the first-line treatment of non-small-cell lung cancer [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2013, 13(5): 523-533.
- [4] Jackman D, Pao W, Riely GJ, et al. Clinical definition of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer [J]. Clin Oncol, 2010, 28(2): 357-360.
- [5] Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review [J]. EMBO Mol Med, 2012, 4(3): 143-159.
- [6] Gao W, Xu J, Liu L, et al. A systematic-analysis of predicted miR-21 targets identifies a signature for lung cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2012, 66(1): 21-28.
- [7] Li B, Ren S, Li X, et al. MiR-21 overexpression is associated with acquired resistance of EGFR-TKI in non-small cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 2014, 83(2): 146-153.
- [8] Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis [J]. Cancer Cell, 2006, 9(3): 189-198.
- [9] Zhang Z, Wei X, Xu LJ. Expression of microRNA21 in non-small cell lung carcinoma and its significance [J]. China Medical Herald, 2013, 10(15): 132-137. [张哲, 魏翔, 徐利军. 微小核糖核酸 21 在非小细胞肺癌中的表达及意义 [J]. 中国医药导报, 2013, 10(15): 132-137.]
- [10] Seike M, Goto A, Okano T, et al. MiR-21 is an EGFR-regulated anti-apoptotic factor in lung cancer in never-smokers [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(29): 12085-12090.
- [11] Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer [J]. Oncogene, 2010, 29(34): 4741-4751.
- [12] Cottonham CL, Kaneko S, Xu L. miR-21 and miR-31 converge on TIAM1 to regulate migration and invasion of colon carcinoma cells [J]. Biol Chem, 2010, 285(46): 35293-35302.
- [13] Han M, Liu M, Wang Y, et al. Re-expression of miR-21 contributes to migration and invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition consistent with cancer stem cell characteristics in MCF-7 cells [J]. Mol Cell Biochem, 2012, 363(1-2): 427-436.
- [14] Zhang JG, Wang JJ, Zhao F, et al. MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. Clin Chim Acta, 2010, 411(11): 846-852.
- [15] Wang YS, Ding JJ, Miao LY, et al. Difference of microRNA expression profiles between EGFR double mutations human lung adenocarcinoma cell line H1975 and EGFR single mutation cell line PC9 [J]. China Cancer, 2013, 22(9): 743-747. [王永生, 丁晶晶, 苗立云, 等. 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 [J]. 中国肿瘤, 2013, 22(9): 743-747.]