

miR-200c 启动子区甲基化与肺癌细胞对 EGFR-TKI 耐药相关

徐 姝,吴建中,曹海霞,张 琰,刘宇飞,冯继锋*

(南京医科大学附属江苏省肿瘤医院肿瘤内科,江苏 南京 210009)

[摘要] **目的:** 初步探讨 miR-200c 启动子区甲基化与非小细胞肺癌细胞株对表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor,EGFR-TKI) 敏感性变化的关系。**方法:** 选用表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)19 外显子区缺失突变(E746-A750)的细胞株(H1650,HCC827)及 EGFR 野生型细胞株(H358,H1299),应用 MSP 法检测各细胞株 miR-200c 启动子区的甲基化状态,CCK-8 法检测各细胞株对 EGFR-TKI 吉非替尼的药物敏感性,荧光定量 PCR 法检测各细胞株 miR-200c 的相对表达量;去甲基化药物 5-aza-CdR 处理各细胞株后,观察其对吉非替尼敏感性 & miR-200c 表达量的变化。**结果:** 吉非替尼敏感细胞株 HCC827 及 H358 高表达 miR-200c,其启动子区为非甲基化状态;吉非替尼耐药细胞株 H1650 及 H1299 的 miR-200c 表达较低,其启动子区为甲基化状态;经 5-aza-CdR 处理后,吉非替尼耐药细胞株 H1650 及 H1299 的 miR-200c 及对吉非替尼的敏感性较前显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$);而吉非替尼敏感株 HCC827 及 H358 的 miR-200c 及对吉非替尼的敏感性未见有明显改变($P > 0.05$)。**结论:** miR-200c 启动子区的甲基化抑制了 miR-200c 的表达,从而使 H1650 及 H1299 细胞对吉非替尼耐药。

[关键词] miR-200c; 吉非替尼; 甲基化; 5-aza-CdR

[中图分类号] R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)01-001-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130101

Hypermethylation of miR-200c promoter correlated with EGFR-TKI resistance in lung cancer cells

Xu Shu, Wu Jianzhong, Cao Haixia, Zhang Yan, Liu Yufei, Feng Jifeng*

(Department of Oncology, the Affiliated Jiangsu Cancer Hospital of NJMU, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To examine the relationship between miR-200c promoter methylation and the response of non small cell lung cancer(NSCLC)cells to(TKI). **Methods:** NSCLC cell lines H1650,HCC827 with EGFR 19 deletion and cell lines H358 and H1299 with wild type EGFR were used in this study. The methylation of miR-200c promoter region was examined by methylation-specific PCR(MSP). The response of different cell lines to gefitinib was examined by cell counting kit-8(CCK-8)assay. The expression of miR-200c was examined by RT-PCR. When treated with 5-aza-CdR,the response to gefitinib and miR-200c expression of four cell lines H1650,HCC827,H358 and H1299 were observed. **Results:** HCC827 and H358,which were sensitive to gefitinib,highly expressed miR-200c with promoter unmethylated. H1650 and H1299,which were insensitive to gefitinib,expressed low levels of miR-200c with promoter methylated. When treated with 5-aza-CdR,H1650 and H1299 expressed higher miR-200c and were more sensitive to gefitinib than before ($P < 0.05$),while HCC827 and H358 had no alteration in miR-200c expression and the sensibility to gefitinib($P > 0.05$). **Conclusion:** As methylation of gene promoter suppressed the expression of miR-200c, the lung cancer cell lines H1650 and H1299 can be insensitive to gefitinib.

[Key words] miR-200c; gefitinib; methylation; 5-aza-CdR

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(1): 001-005]

[基金项目] 江苏省科技厅科研基金(BK2009446);吴阶平医学基金(320.6700.09050)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:fjif@vip.sina.com

肺癌是世界上发病率及病死率最高的恶性肿瘤之一,治疗手段主要包括手术、放疗及靶向治疗,其中,靶向治疗药物以表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor-tyrosine

kinase inhibitor, EGFR-TKI) 为主。目前临床上应用的 EGFR-TKI 主要有吉非替尼、厄洛替尼、埃克替尼等。研究发现, EGFR-TKI 的主要优势人群为表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR) 突变的患者, 而对 EGFR 野生型患者通常无效^[1-2], 其中, 存在 19 外显子缺失突变(E746-A750) 或 21 外显子点突变(L858R) 的患者对 EGFR-TKI 尤为敏感^[3-4], 因此在临床应用 EGFR-TKI 前需常规检测 EGFR 的突变情况。然而, 并非所有 19 或 21 外显子突变的患者均对 EGFR-TKI 敏感, 也并非所有 EGFR 野生型患者使用 EGFR-TKI 均无获益^[5-6]。近年来的研究表明, miRNAs 在许多肿瘤细胞中起到抑癌基因的作用, 而表观遗传学修饰是 miRNAs 表达异常的重要机制之一。本实验通过去甲基化药物 5-aza-CdR 处理 EGFR 突变的细胞株(H1650、HCC827) 及 EGFR 野生型细胞株(H358、H1299), 初步探讨 miR-200c 启动子区甲基化对 miR-200c 的表达及 EGFR-TKI 疗效的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺腺癌细胞 HCC827、H1650、H358、H1299 (中国科学院上海细胞生物研究所) 由南京医科大学附属江苏省肿瘤医院内科学实验室保存。RPMI1640 培养基、胎牛血清(FBS, 美国 Gibco 公司); 活细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8, 日本株式会社同仁化学研究所); Methylcode™ Bisulfite Conversion Kit、总 RNA 抽提试剂 TRIzol(美国 Invitrogen 公司), 逆转录试剂盒(德国 Qiagen 公司); 去甲基化药物 5-aza-CdR(美国 Sigma 公司), 吉非替尼(英国 Astra Zeneca 公司), 使用时将药物用 RPMI1640 稀释至目标浓度, 其中, 5-aza-CdR 是常用的去甲基化药物, 本实验根据文献采用无毒低剂量 1 μmol/L 对细胞株进行干预^[7-9]。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

将细胞培养于 RPMI1640 培养液中, 其中含有 10% 的胎牛血清, 青、链霉素 100 U/L, 常规置于 37℃、5%CO₂、100%湿度的细胞培养箱中, 细胞单层贴壁生长。实验取生长状态良好的对数生长期细胞, 以 0.25%胰酶消化传代收集。各细胞株经 1 μmol/L 的 5-aza-CdR 处理 72 h 后, 胰酶消化收集。

1.2.2 CCK-8 法测定细胞增殖及凋亡

取对数生长期的细胞, 按 3 × 10³ 个/孔接种至

96 孔板, 100 μl/孔, 每组 5 个平行复孔, 接种 24 h 待细胞贴壁后, 加入不同浓度的吉非替尼进行干预。药物干预 72 h 后, 弃各孔含药培养基, 每孔加入 100 μl RPMI1640、10 μl CCK-8, 然后置于培养箱中孵育 2 h, 在 450 nm 波长处测定吸光度值。实验重复 3 次, 并计算细胞的存活率。其中, 吉非替尼的浓度为: 0、0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00、16.00、32.00 μmol/L。

1.2.3 MSP 法检测 miR-200c 的甲基化状态

提取细胞株的 DNA, 定量后用 Methylcode™ Bisulfite Conversion Kit 试剂盒进行甲基化修饰, 并以此为模板, 分别用 miR-200c 启动子区的甲基化引物和非甲基化引物进行 PCR 扩增, 实验重复 3 次。其中, 甲基化的特异性上游引物为 5'-GAATTTGGGGTTTTAAAGTTTTTTC-3', 下游引物为 5'-CACCC-TAAATCGCTAATCACG-3'; 非甲基化的特异性上游引物为 5'-GAATTTGGGGTTTTAAAGTTTTTTT-3', 下游引物为 5'-CACACCCTAAATCACTAATCA-CAAA-3'。PCR 反应条件为: 95℃预变性 10 min, 然后以 95℃变性 30 s、56℃退火 30 s、72℃延伸 30 s 进行 40 个循环, 至 4℃时反应结束。通过 2%琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物, 凝胶成像分析, 紫外灯下观察并拍照。其中, PCR 的阳参为经过 M.Sss I 甲基转移酶修饰的正常人的外周血 DNA, 阴参为正常人外周血 DNA。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 法检测 miR-200c 的表达

TRIzol 法提取细胞总 RNA, 然后通过茎环法逆转录 miRNAs, 实验重复 3 次, 其反应程序为: 42℃共 60 min, 70℃共 10 min。最后通过荧光定量 PCR 法半定量 miR-200c 的表达, 反应程序为: 95℃预变性 20 s, 然后以 95℃变性 10 s、55℃退火 20 s、70℃延伸 45 s 进行 40 个循环。其中, miR-200c 的上游引物为 5'-ACACTCCAGCTGGGTTAATACTGCGGGTA-3', 下游引物为 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGC-AATTCAGTTGAGTCCATCAT-3'; 内参 U6 的上游引物为 5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-3', 下游引物为 5'-TTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3'。

1.3 统计学方法

使用 SPSS17.0 软件对本实验中的数据进行处理, 组间的比较采用 *T* 检验, *P* ≤ 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 吉非替尼对肺腺癌细胞增殖的影响

CCK-8 实验结果显示 (图 1), 吉非替尼对

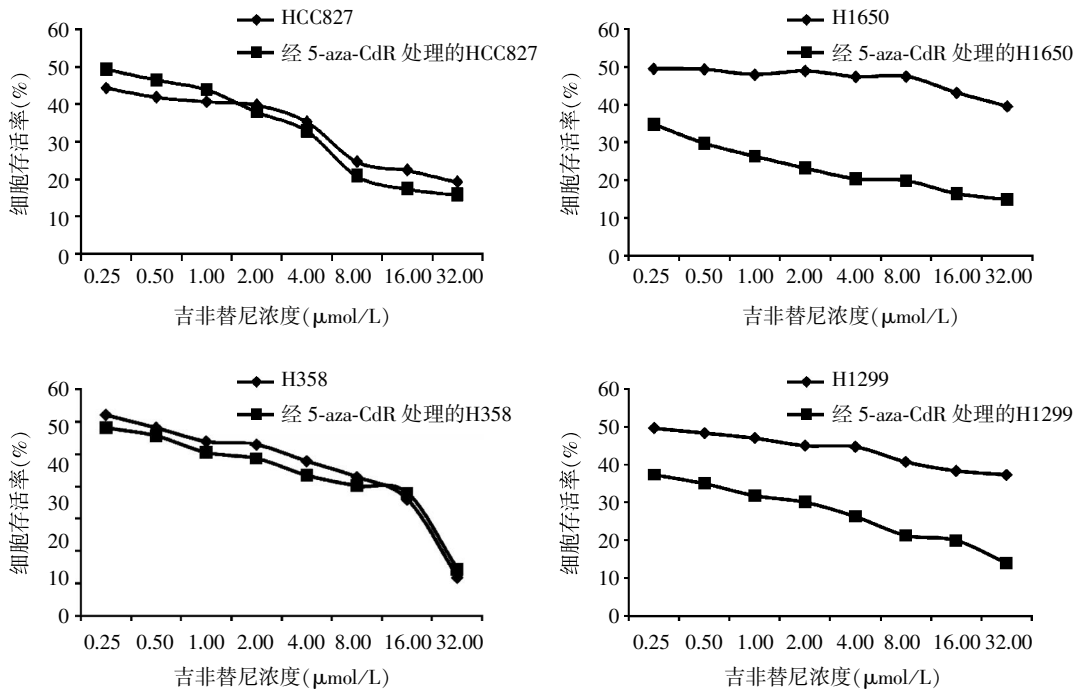


图 1 4 株细胞对照组及 5-aza-CdR 处理组在吉非替尼作用下的细胞存活率
Figure 1 Effect of gefitinib on the four cell lines and the lines treated by 5-aza-CdR

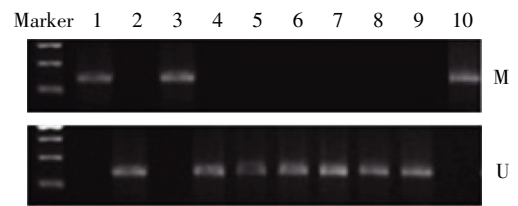
EGFR 突变型细胞株(H1650、HCC827)及 EGFR 野生型细胞株(H358、H1299)有不同程度的增殖抑制作用,细胞株 HCC827 及 H358 对吉非替尼敏感性较强,而细胞株 H1650 及 H1299 对吉非替尼敏感性差。经 5-aza-CdR 处理后,H1650 及 H1299 对吉非替尼的敏感性均较前显著增强,差异具有统计学意义(P 均 < 0.05)。

2.2 miR-200c 基因启动子区的甲基化状态

实验中通过 MSP 法检测各细胞株 miR-200c 启动子区的甲基化状态,结果发现吉非替尼敏感细胞株 HCC827 及 H358 的 miR-200c 启动子区为非甲基化状态,而吉非替尼耐药细胞株 H1650 及 H1299 为甲基化状态;5-aza-CdR 处理细胞株后,吉非替尼耐药细胞株 H1650 及 H1299 转变为非甲基化状态(图 2)。

2.3 细胞株 miR-200c 的表达量

应用实时荧光定量 PCR 法比较各细胞株经过 5-aza-CdR 处理前后的 miR-200c 相对表达量,结果发现吉非替尼敏感细胞株 HCC827 及 H358 表达较高水平的 miR-200c,而吉非替尼耐药细胞株 H1650 及 H1299 的 miR-200c 表达较低;5-aza-CdR 处理各细胞株后,吉非替尼耐药细胞株 H1650 及 H1299 的 miR-200c 表达量较前显著升高,差异具有统计学意义(P 均 < 0.01);而敏感细胞株 HCC827 及 H358 的 miR-200c 表达未见明显变化(图 3)。



1:H1650;2:经 5-aza-CdR 处理的 H1650;3:H1299;4:经 5-aza-CdR 处理的 H1299;5:HCC827;6:经 5-aza-CdR 处理的 HCC827;7:H358;8:经 5-aza-CdR 处理的 H358;9:阴参;10:阳参;M:甲基化条带;U:非甲基化条带。

图 2 用或不用及 5-aza-CdR 处理的 4 株细胞 miR-200c 启动子区的甲基化状态

Figure 2 miR-200c promoter methylation of the four cell lines and the lines treated with or without 5-aza-CdR

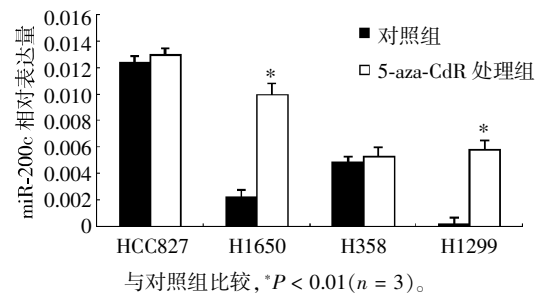


图 3 4 株细胞对照组及 5-aza-CdR 处理组的 miR-200c 相对表达量

Figure 3 The expression of miR-200c of the four cell lines and the lines treated by 5-aza-CdR

3 讨论

EGFR 是 CerbB-1(HER-1)编码的跨膜糖蛋白,其分子量为 170 000,属于受体型酪氨酸激酶家族。EGFR 活化后通过酪氨酸激酶催化下游分子磷酸化,启动了下游信号通路并最终引起一系列的相关基因活化,导致肿瘤细胞持续增殖、凋亡抑制、促使转移,以及合成血管形成因子在内的多种细胞因子,所以 EGFR-TKI 的抗肿瘤治疗成为近年来肿瘤治疗领域的研究热点。研究表明,EGFR-TKI 对于 EGFR 突变的患者疗效显著,特别是在 19 外显子缺失突变(E746-A750)和 21 外显子点突变(L858R)的患者中尤为明显;而对于 EGFR 野生型的患者通常无效。本实验中选用 19 外显子区缺失突变(E746-A750)的细胞株(H1650、HCC827)及 EGFR 野生型的细胞株(H358、H1299),然而通过 CCK-8 实验发现,EGFR 野生型的细胞株 H358 对吉非替尼较为敏感,而突变型细胞株 H1650 对吉非替尼敏感性较差。这表明 EGFR-TKI 对肺癌的治疗上可能存在其他影响其疗效的机制。

miRNAs 是一类 21~25 个碱基的小分子非编码 RNA,存在于各种真核生物中,通过与 mRNA 的不完全配对,引起靶 mRNA 的翻译抑制,进而抑制靶基因的表达。癌细胞中 miRNAs 的靶基因大多属于癌基因或者抑癌基因,这些基因与细胞的凋亡、分化、增殖和迁移等密切相关,故 miRNAs 自身也充当癌基因或抑癌基因的角色。miR-200 家族位于染色体 12p12.31 和 1p36.33,共包括 miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-141 和 miR-429 5 位成员^[10]。有研究报道,miR-200c 作为抑癌基因,通过降低 ZEB1/ZEB2 和上调 E-钙黏蛋白的表达,从而使非小细胞肺癌和胰腺癌的耐药细胞株对厄洛替尼敏感,并且能够逆转膀胱癌细胞对 EGFR-TKI 的耐药^[11-14]。Ceppi 等^[15]发现 miR-200c 的过表达不仅增强了肺腺癌细胞株对 EGFR 靶向治疗的敏感性,而且能提高化疗的疗效。本实验检测了各细胞株 miR-200c 的表达,在 EGFR 突变型细胞株中,吉非替尼相对敏感的细胞株 HCC827 的 miR-200c 表达水平较耐药细胞株 H1650 高;在 EGFR 野生型细胞株中也看到了同样的规律。这提示了 miR-200c 的表达与 EGFR-TKI 的疗效可能存在正相关关系。

肿瘤的发生发展过程涉及遗传学及表观遗传学的改变,其中 DNA 基因启动子区的甲基化是最重要的一种表观遗传修饰方式,并在多种恶性肿瘤中表现

为多个抑癌基因启动子区的高甲基化,从而下调抑癌基因的表达。本实验通过 MSP 法检测了各肺癌细胞株的 miR-200c 启动子区甲基化状态,结果发现吉非替尼敏感细胞株(HCC827 及 H358)为启动子区非甲基化,而吉非替尼耐药细胞株(H1650 及 H1299)有启动子区甲基化。使用 5-aza-CdR 处理各细胞株,吉非替尼耐药株(H1650 及 H1299)的 miR-200c 由甲基化逆转为非甲基化,miR-200c 的表达及对吉非替尼的敏感性较前显著升高;然而 miR-200c 非甲基化状态的吉非替尼敏感株(HCC827 及 H358)未见有明显 miR-200c 及吉非替尼敏感性的改变。这提示了 miR-200c 启动子区的甲基化抑制了 miR-200c 的表达,从而使细胞株对 EGFR-TKI 敏感性较差。

EGFR-TKI 能够使肿瘤缓解、延长患者生存期、改善生活质量及疾病的相关症状,因此,EGFR-TKI 在肺癌的临床治疗中占据重要的地位。本实验发现 5-aza-CdR 能够逆转细胞株的 miR-200c 启动子区甲基化状态,使 miR-200c 表达升高,从而使细胞株对 EGFR-TKI 敏感。这提示,对于 EGFR 野生型及存在 EGFR-TKI 原发耐药的 EGFR 敏感突变的患者,miR-200c 启动子区的去甲基化可能会上调 miR-200c 的表达,并逆转其对 EGFR-TKI 的耐药,从而提高肺癌患者分子靶向治疗的疗效、扩大 EGFR-TKI 的应用范围,值得临床进一步探索。

[参考文献]

- [1] Paez JG,Janne PA,Lee JC,et al. EGFR mutations in lung cancer;correlation with clinical response to gefitinib therapy[J]. Science,2004,304(5676):1497-1500
- [2] Lynch TJ,Bell DW,Sordella R,et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib[J]. N Engl J Med,2004,350(21):2129-2139
- [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] Bean J,Brennan C,Shih JY,et al. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2007,104(52):20932-20937
- [5] Bivona TG,Hieronimus H,Parker J,et al. FAS and NF-κB signalling modulate dependence of lung cancers on mutant EGFR[J]. Nature,2011,471(7339):523-526
- [6] Gadgeel SM,Ali S,Philip PA,et al. Genistein enhances

- the effect of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors and inhibits nuclear factor [J]. *Cancer*, 2009, 115(10):2165-2176
- [7] Strathdee G, MacKean MJ, Illand M, et al. A role for methylation of the hMLH1 promoter in loss of hMLH1 expression and drug resistance in ovarian cancer [J]. *Oncogene*, 1999, 18(14):2335-2341
- [8] Arnold CN, Goel A, Boland CR. Role of hMLH1 promoter hypermethylation in drug resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines [J]. *Int J Cancer*, 2003, 106(1):66-73
- [9] Kouso H, Yoshino I, Miura N, et al. Expression of mismatch repair proteins, hMLH1/hMSH2, in non-small cell lung cancer tissues and its clinical significance [J]. *Cell*, 2009, 5(3):267-277
- [10] 李鹏超, 陶俊, 吕强. MiR-200c 和 mir-141 在膀胱移行细胞癌中的表达研究 [J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2010, 30(6):768-771
- [11] Mongroo PS, Rustgi AK. The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 100(3):219-222
- [12] Katoh Y, Katoh M. Hedgehog signaling, epithelial-to-mesenchymal transition and miRNA (Review) [J]. *Int J Mol Med*, 2008, 22(3):271-275
- [13] Bryant JL, Britson J, Balko JM, et al. A microRNA gene expression signature predicts response to erlotinib in epithelial cancer cell lines and targets EMT [J]. *Bri Cancer*, 2012, 106(1):148-156
- [14] Adam L, Zhong M, Choi W, et al. miR-200 expression regulates epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer cells and reverses resistance to epidermal growth factor receptor therapy [J]. *Human Cancer Biol*, 2009, 15(16):5060-5072
- [15] Ceppi P, Mudduluru G, Kumarswamy R, et al. Loss of miR-200c expression induces an aggressive, invasive, and chemoresistant phenotype in non-small cell lung cancer [J]. *Mol Cancer Res*, 2010, 8(9):1207-1216

[收稿日期] 2012-05-27

本刊现已启用网上稿件管理系统，作者登陆
<http://jnmu.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件
审理情况。