

miRNA-200a 调控 FOXC1 增敏肺癌 EGFR-TKI 治疗的研究

尹媛¹, 许伟¹, 吴双双¹, 李燕¹, 赵卫红², 吴剑卿^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院老年呼吸科, ²老年肾脏科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探究 miRNA-200a 对非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)靶向治疗疗效的影响及其调控机制。方法:通过 RT-PCR、Western blot 等方法检测 NSCLC 细胞中 miRNA-200a、FOXC1 的表达量;四甲基偶氮唑盐(MTT)实验、细胞划痕实验、Transwell 实验分别检测 miRNA-200a、FOXC1 对肺腺癌细胞生长、迁移、侵袭等生物学行为的影响;荧光素酶报告实验分析 FOXC1 与 miRNA-200a 的靶向关系。结果:高表达 miRNA-200a 抑制肺腺癌细胞的生长、上皮间质转化、迁移、侵袭,并且增加肺腺癌细胞对吉非替尼的敏感性。此外,敲低 FOXC1 同样可以抑制细胞生长,恢复肺腺癌细胞对吉非替尼敏感性。结论:上调 miRNA-200a 或下调 FOXC1 可以增强 NSCLC 细胞对吉非替尼的敏感性。为克服表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂治疗的耐药性提供了一种新的有效治疗方法。

[关键词] 表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂;miRNA-200a;FOXC1;非小细胞肺癌;吉非替尼

[中图分类号] R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)09-1067-09

doi:10.7655/NYDXBNS20170901

MiRNA-200a sensitizes non-small-cell lung cancer to EGFR-TKIs by targeting FOXC1

Yin Yuan¹, Xu Wei¹, Wu Shuangshuang¹, Li Yan¹, Zhao Weihong², Wu Jianqing^{1*}

(¹Department of Geriatrics Division of Respiriology, ²Department of Geriatrics Division of Nephrology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of miRNA-200a in the efficacy of targeted therapy in non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients and its underlying mechanisms. **Methods:** Real-time polymerase chain reaction and Western blot were used to investigate the level of miRNA-200a and FOXC1. The MTT assay, wound-healing and Transwell assays were performed to measure the effect of miRNA-200a and FOXC1 on cell growth, migration, invasion and other biological behaviors. Luciferase reporter assay analyzed the relationship between FOXC1 and miRNA-200a. **Results:** We found that a high level of miRNA-200a inhibited NSCLC cells growth, EMT, migration and invasion and increased sensitivity to gefitinib by targeting FOXC1. Furthermore, suppression of FOXC1 also inhibits cells progression and restores gefitinib resistance. **Conclusion:** Upregulated miRNA-200a or knockdown of FOXC1 enhanced sensitivity to gefitinib in NSCLCs. This may provide a novel effective therapeutic approach to overcome the acquisition of resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs) therapy.

[Key words] EGFR-TKIs; miRNA-200a; FOXC1; NSCLC; gefitinib

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(09): 1067-1075]

肺癌是目前全球癌症相关死亡的首要原因,具有较强的转移倾向、频繁的复发率、广泛的耐药性^[1]。在肺癌患者中,约 85%~90% 为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),由于目前尚缺乏早期诊断技术,多数患者确诊时已处于中晚期,

虽然含铂双药联合化疗是 NSCLC 的标准治疗,但是化疗药物对改善晚期 NSCLC 患者的生存作用十分有限^[2]。因此,寻找更为有效和安全的治疗手段成为当前迫在眉睫的问题,也是肺癌研究的一个热点。近年来,以表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)为靶点的酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors, TKIs)的分子靶向治疗,为 NSCLC 患者带来了新希望,尤其对 EGFR 敏感突变人群的近期疗效非常显著。但是,大部分患者在经

[基金项目] 科技部国际科技合作专项(2014DFA31940);国家自然科学基金(81572259);江苏省干部保健课题(BJ15018)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jwuny@njmu.edu.cn

过了10~16个月的药物治疗后,不可避免地出现了获得性耐药,导致疗效局限^[3]。越来越多的研究揭示了耐药机制,如:①EGFR二次点突变,即第20外显子的T790二次点突变;②MET基因扩增;③胰岛素样生长因子1受体(insulin-like growth factor 1 receptor, IGF-1R)的激活;④PTEN表达缺失、上皮-间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)、非EGFR依赖性血管生成等^[4-6]。其中,超过50%的耐药患者存在T790突变,是EGFR-TKIs获得性耐药的最主要机制。虽然如此,仍有部分耐药的内在机制尚不清楚^[7]。因此,探索EGFR-TKIs耐药的分子机制,寻求克服耐药的方法,成为提高靶向药物治疗效果的关键。

MicroRNAs(miRNAs)是一类内源性的长约19~24个核苷酸的单链非编码RNAs,可通过miRNAs的“种子”序列与靶基因3'-非翻译区特异性结合来调节转录后的基因表达^[8]。近期研究表明miRNAs参与调节肿瘤细胞的多种生物学行为,包括增殖、分化、迁移和侵袭,在不同肿瘤中分别发挥致癌或抑癌作用,同时还与肿瘤的耐药密切相关^[9-11]。有研究显示miRNA-200可以通过抑制靶基因Fhl1/VEGFR1的表达,抑制肺腺癌细胞的侵袭和表达^[12];可通过调节ERRFI-1的表达调控膀胱癌细胞的EMT过程以及对EGFR-TKIs治疗的敏感性^[13]。综上,推测miRNA-200可以通过特定的靶基因调节NSCLC细胞对吉非替尼的敏感性。

叉头框(forkhead box, FOX)基因是一组在进化上高度保守的转录因子超家族,表达失调的FOX蛋白通常与肿瘤发生和进展相关,如细胞生长、EMT、迁移、转移等多种生物学行为^[14]。FOXCl是FOX家族的成员之一,有研究表明,FOXCl在乳腺癌和子宫内膜癌中均作为主要的调节因子,诱导肿瘤细胞的EMT、增殖和迁移^[15-16]。FOXCl的过表达,促进NSCLC患者肿瘤细胞的复发和转移,导致预后较差^[17]。此外,miRNA-495可以通过调节FOXCl的表达而抑制子宫内膜癌细胞的生长和迁移,并且可以增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[18]。因此,FOXCl基因可作为肿瘤治疗干预的直接或间接靶标。FOXCl作为miRNA-200a的靶基因,与miRNA-200a的表达水平呈负相关,FOXCl能否作为一个功能性调节因子参与NSCLC药物敏感性的调节?本研究旨在验证FOXCl与miRNA-200a的关系,并且探讨两者与吉非替尼敏感性的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料

HBE(人类支气管上皮细胞系)、A549(人类肺腺癌细胞系)、A549/DDP(A549顺铂耐药细胞系)、A549/TR(A549紫杉醇耐药细胞系)、PC9(EGFR敏感突变肺腺癌细胞系)、H1975(EGFR T790M肺腺癌细胞系)(以上细胞系均由本实验室保存)、PC9/GR(PC9吉非替尼耐药细胞系,EGFR T790M,南京医科大学公共卫生实验室惠赠)。DMEM高糖细胞培养液,Lipofectamine 2000,TRIzol(Invitrogen公司,美国);胎牛血清(ExCell Biology公司,美国);四甲基偶氮唑蓝(MTT, Amresco公司,美国);二甲亚砜(DMSO, 上海久亿);cDNA第1链合成试剂盒、Taq DNA聚合酶(Thermo Fisher公司,美国);琼脂糖(Biowest公司,西班牙);SYBR荧光定量PCR试剂盒(Toyobo公司,日本);兔抗E-Cadherin、ZO-1、N-cadherin、Vimentin、GAPDH、ZEB1抗体、羊抗兔IgG-HRP(南京凯基生物公司),兔抗FOXCl抗体(武汉三鹰公司);FITC羊抗兔、TRITC羊抗兔、FITC羊抗小鼠、TRITC羊抗小鼠(Jackson Immuno Research公司,美国);荧光素酶双报告试剂盒(Dual-Luciferase Reporter Assay System, Promega公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

将细胞接种于含10%胎牛血清和100 μg/L青、链霉素的DMEM培养液中,37℃、5%CO₂饱和湿度培养箱内培养。当培养皿中的细胞覆盖率达到80%~90%时,取样、计数。为维持耐药性,H1975和PC9/GR培养基中加入1 mg/mL吉非替尼,实验前2 d更换无吉非替尼培养基。

1.2.2 细胞转染

miRNA-200a慢病毒载体以及无关序列慢病毒载体由上海吉玛制药技术有限公司构建、鉴定、纯化并进行滴度检测。利用Lipofectamine 2000基因转染试剂盒,将siFOXCl及阴性对照无相关序列siRNA转染PC9/GR细胞。

1.2.3 RT-PCR法检测基因表达

用TRIzol抽提细胞总RNA,分光光度仪检测RNA浓度。将其逆转录成cDNA,然后用RT-PCR方法检测不同细胞系中各基因mRNA的表达水平,采用2^{-ΔΔCt}进行相对定量分析。

1.2.4 Western blot检测蛋白表达

收集PC9和PC9/GR细胞,提取总蛋白,BCA

法检测蛋白浓度,待测蛋白样品适量,加入聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,分离样本蛋白,并转移到 PVDF 膜上。5%脱脂奶粉溶液的封闭液稀释一抗,4 ℃摇床振荡孵育过夜,TBST 洗 10 min×3 次,5%脱脂奶粉封闭液稀释二抗,室温振荡 1~2 h,TBST 洗膜 10 min×3 次,显色。

1.2.5 免疫荧光法检测蛋白表达

自然晾干细胞样本,浸入 4%的多聚甲醛固定液中 30 min,PBS 浸洗 3 min×3 次。滴加 2 滴 3% H₂O₂ 甲醇溶液,室温封闭 10 min,PBS 浸洗 3 次。滴加即用型山羊血清 50~100 μL,室温孵育 20 min。滴加一抗 50~100 μL,37 ℃湿盒孵育 2 h,PBS 浸洗 3 次,再滴加二抗,37 ℃,避光孵育 1 h,PBS 浸洗 3 次。复染,封片,荧光显微镜下观察细胞中蛋白(E-cadherin、ZO-1、N-cadherin、Vimentin)的表达情况,取 3 个高表达区域拍照保存。

1.2.6 MTT 法检测细胞增殖

将对数生长期 PC9/GR 细胞接种于 96 孔培养板,置于培养箱中培养 24 h,加入 100 μL 不同浓度的吉非替尼培养基,培养 72 h,每孔加入 20 μL MTT (5 mg/mL),在培养箱继续培养 4 h,加入 150 μL DMSO 溶解,摇床 10 min 轻轻混匀,酶标仪读出每孔的吸光度值,计算抑制率及药物 IC₅₀ 值。

1.2.7 划痕法检测细胞迁移

将对数生长期的 PC9/GR 细胞消化接种到 6 孔板中,待细胞集合度达 60%左右,用 PBS 洗去漂浮细胞,换新鲜培养液,置于细胞培养箱中继续培养,培养 24 h 后,取出细胞,拍照(×100),测量细胞迁移距离。

1.2.8 Transwell 检测细胞侵袭

Transwell 上室加入 30 μL 稀释的 Matrigel,于 37 ℃孵育 120 min,使 Matrigel 聚合成胶。取细胞悬液 100 μL 加入 Transwell 小室,下室加入 500 μL 含 20% FBS 的培养基。将 24 孔板培养 24 h,用棉签擦去基质胶和上室内的非侵袭细胞,移去小室,倒置,风干。24 孔板中加入 500 μL 含 0.1%的结晶紫,将小室置于其中,使膜浸没在染料中,37 ℃ 30 min 后取出,PBS 清洗,取 3 个视野,拍照(×200),计数。

1.2.9 动物实验

分别收集培养的转染 miRNA-200a mimics 和 miRNA-200a NC 的 PC9/GR 细胞悬液,将细胞浓度调整为 1×10⁷ 个/mL,以每只 0.1 mL 接种于裸鼠右侧腋窝皮下。待肿瘤长至 80~100 mm³ 时,按照组别与给药方案(灌胃给吉非替尼,75 mg/kg,1 次/d,连

续 20 d)将动物分成 2 组,每组 3 只动物。观察动物给药过程和给药后的变化(活动、外观、精神),测量瘤径,动态观察肿瘤生长变化,给药 20 d 后手术剥取瘤块并称重。

1.2.10 荧光素酶报告基因检测

将处于对数生长期细胞制成细胞悬液,接种于 24 孔板中,于培养箱培养至细胞融合度达到 90%以上。24 孔板中加入 Dual-Glo Luciferase Reagent,室温反应 10 min 待细胞充分裂解,吸取细胞裂解液 100 μL 于检测板中,按试剂盒说明书,用发光光度计检测荧光素酶活性。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件分析,定量数据以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析。 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

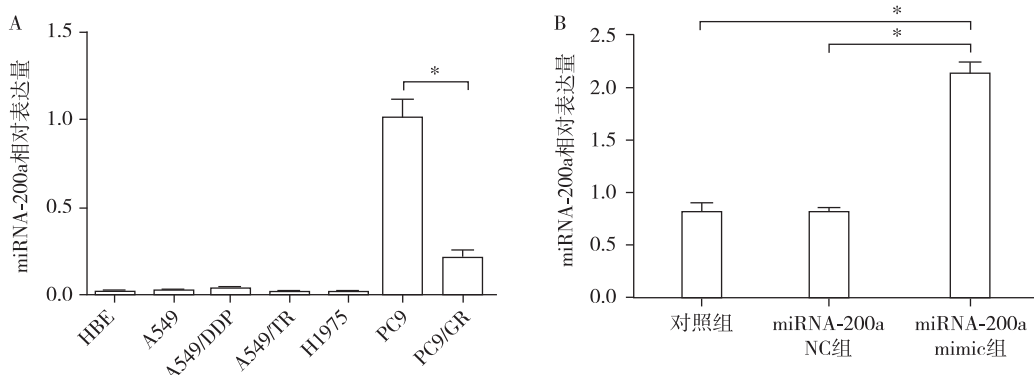
2.1 miRNA-200a 在 NSCLC 细胞系中的表达

RT-PCR 检测 miRNA-200a 在各细胞系中的表达量。结果显示,在 HBE、A549、A549/DDP、A549/TR、H1975 细胞中均低表达,且差异没有统计学意义。miRNA-200a 在 PC9(EGFR delE746-A750)细胞中表达水平较 PC9/GR(EGFR delE746-A750 T790M)细胞高 3.84 倍($P<0.05$,图 1A),因此,本实验选择 PC9 和 PC9/GR 作为研究对象。

将 miRNA-200a 的模拟物(miRNA-200a mimic 组)及其无关序列(miRNA-200a NC 组)转染至 PC9/GR 细胞中,RT-PCR 检测 miRNA-200a 的表达量,与对照组相比,转染了模拟物的 PC9/GR 细胞中的 miRNA-200a 的表达显著升高(图 1B),表明转染有效。

2.2 过表达 miRNA-200a 可增加 PC9/GR 细胞对吉非替尼的敏感性

为了探索 miRNA-200a 是否参与 EGFR-TKIs 药物敏感性的调节。分别向 PC9 和 PC9/GR 细胞培养基中加入浓度从 0.1 μmol/L 逐渐递增至 50 μmol/L 的吉非替尼,培养 72 h。通过 MTT 比色法分别检测 PC9 和 PC9/GR 细胞对药物的敏感性。结果显示,PC9/GR 细胞的半数抑制浓度(IC₅₀=14.94 μmol/L)比亲本细胞 PC9(IC₅₀=1.09 μmol/L)高约 13.7 倍,转染 miRNA-200a 模拟物的 PC9/GR 细胞的 IC₅₀(5.28 μmol/L)明显低于空白对照组,降低了约 64.7%。PC9/GR 和无关序列转染组的 IC₅₀(15.13 μmol/L)并没有显著差异(图 2A、B)。同样,吉非替尼对转染



A: 各种细胞中 miRNA-200a 的表达水平; B: 转染 miRNA-200a mimic 与 miRNA-200a NC 的 PC9/GR 细胞的 miRNA-200a 表达水平, 两组比较, * $P < 0.01$ ($n = 3$)。

图 1 miRNA-200a 在各细胞系中的表达

Figure 1 Expression of miRNA-200a in NSCLC cells

miRNA-200a 模拟物的 PC9/GR 细胞的抑制率较 miRNA-200a NC 组明显增高 ($P < 0.01$, 图 2C)。因此, 上调细胞内 miRNA-200a 的表达能增加细胞对药物的敏感性, 从而能抑制细胞的生长和增殖。

2.3 过表达 miRNA-200a 可抑制 PC9/GR 细胞的多种生物学行为

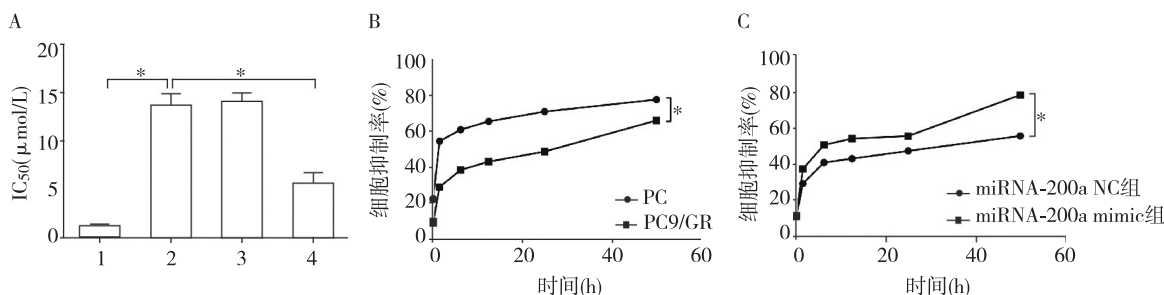
近期研究阐述了 miRNA-200 在维持膀胱癌细胞的上皮表型、抑制细胞迁移和侵袭等方面有重要作用^[19]。因此, 推断 miRNA-200a 可能会在 NSCLC 细胞中有类似作用。Western blot (图 3A) 和免疫荧光法 (图 3B) 检测上皮细胞标志物 (E-cadherin、ZO-1) 和间充质细胞标志物 (N-cadherin、Vimentin) 在 PC9、PC9/GR、转染 miRNA-200a mimics 和 miRNA-200a NC 的 PC9/GR 细胞中的表达。转染 miRNA-200a 模拟物的 PC9/GR 细胞中上皮细胞标志物高表达, 间充质细胞标志物低表达, miRNA-200a NC 组和空白转染组 (PC9/GR) 则表达结果相反, 与 PC9 细胞比较无明显变化。上述结果

表明, 高表达 miRNA-200a 能逆转 NSCLC 的 EMT 过程^[20]。诸多研究阐明一系列转录因子, 如 ZEB 基因在多种人类肿瘤细胞中可通过抑制上皮细胞标志物的表达和诱导间质细胞标志物的产生调节 EMT^[21-22]。本研究通过 RT-PCR (图 3C) 和 Western blot 法 (图 3D) 证实了 ZEB1 与间质表型的相关性, 此结果与之前的报道一致^[21-23]。上述结果表明 miRNA-200a 作为一个重要的调节因子可通过调节 ZEB1 参与 EGFR-TKIs 耐药的肺癌细胞系的 EMT 过程。

此外, 通过细胞划痕实验 (图 3E) 和 Transwell 实验 (图 3F) 分别验证了 miRNA-200a 对细胞迁移和侵袭能力的影响。PC9/GR 细胞划痕实验显示, 24 h 内, miRNA-200a NC 组细胞覆盖损伤区域, 而 miRNA-200a mimics 组部分覆盖损伤区域。相似地, Transwell 侵袭实验显示 miRNA-200a mimic 组较 miRNA-200a NC 组迁移能力明显减低 ($P < 0.01$)。

2.4 FOXC1 是 miRNA-200a 的直接靶基因

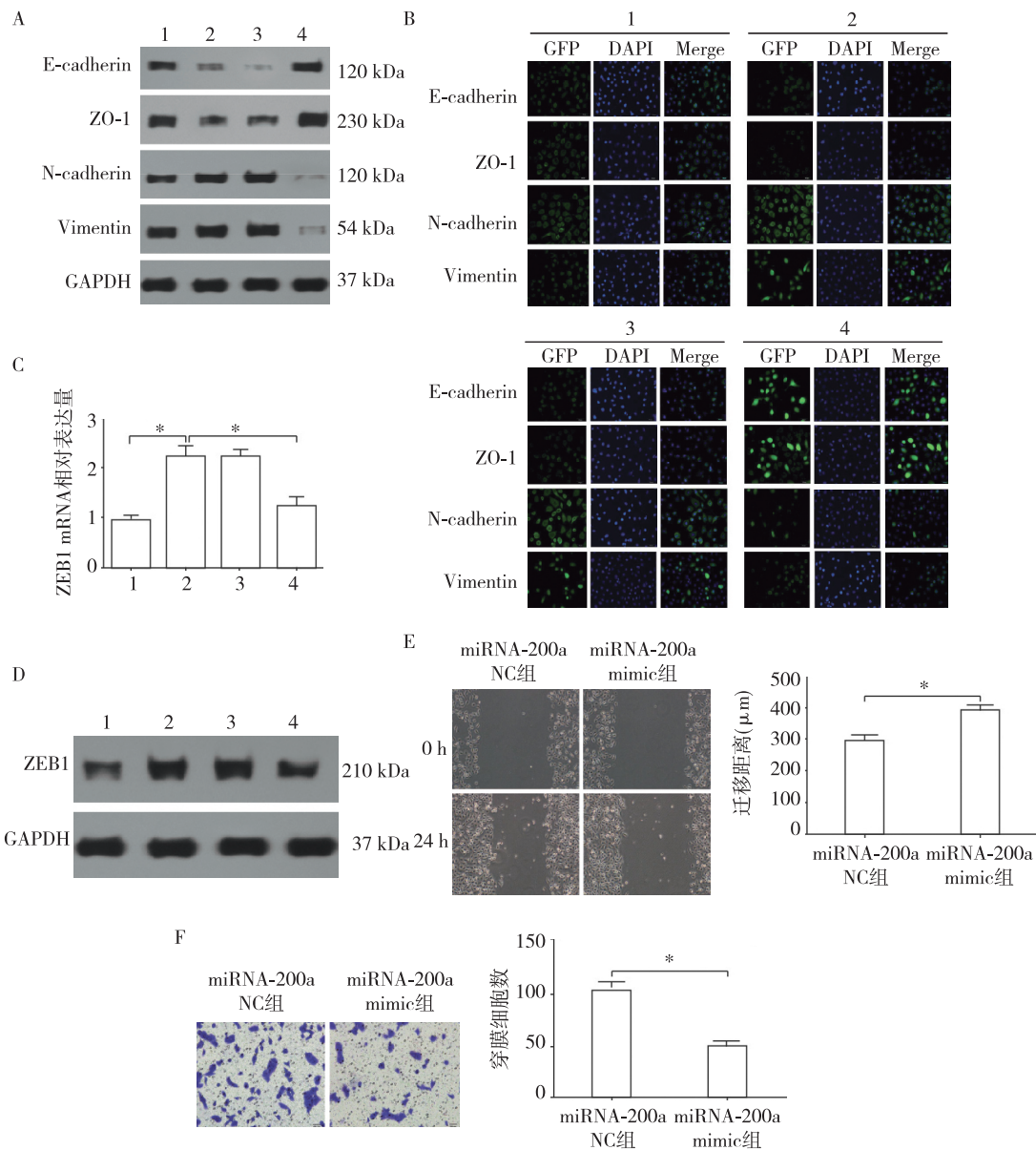
为了进一步了解 miRNA-200a 作用的机制, 通



A: 吉非替尼对各组细胞的 IC₅₀; 1: PC9 细胞; 2: PC9/GR 细胞; 3: 转染 miRNA-200a NC 的 PC9/GR 细胞; 4: 转染 miRNA-200a mimic 的 PC9/GR 细胞; B: 吉非替尼对 PC9 和 PC9/GR 的抑制率; C: 吉非替尼对转染 miRNA-200a 模拟物和阴性对照的 PC9/GR 细胞的抑制率。两组比较, * $P < 0.01$ ($n = 3$)。

图 2 过表达 miRNA-200a 增加 PC9/GR 细胞对吉非替尼的敏感性

Figure 2 Overexpression of miRNA-200a increases gefitinib sensitivity in PC9/GR cells



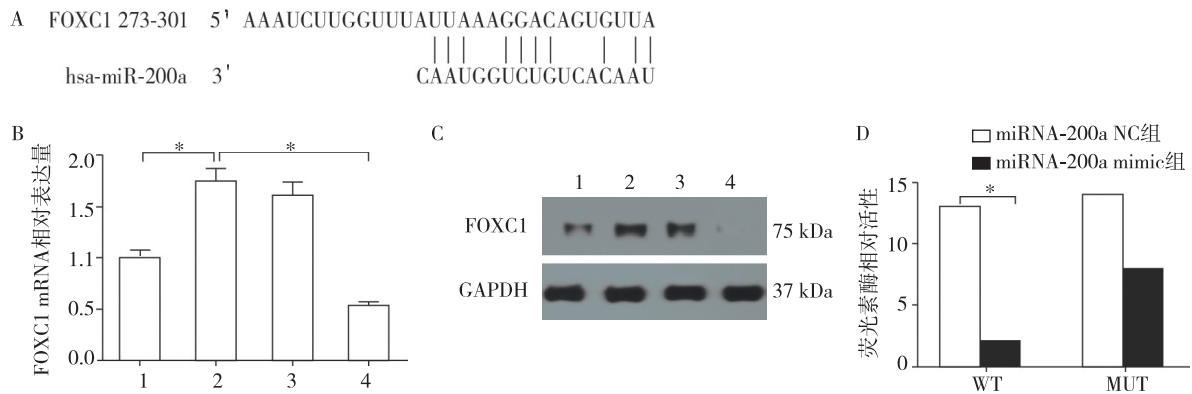
A: Western blot 检测上皮细胞标志物和间质细胞标志物; B: 免疫荧光检测各组上皮细胞标志物和间质细胞标志物的表达; C: RT-PCR 检测各组 ZEB1 mRNA 表达水平; D: Western blot 检测各组 ZEB1 蛋白表达水平; 1: PC9 细胞; 2: PC9/GR 细胞; 3: 转染 miRNA-200a NC 的 PC9/GR 细胞; 4: 转染 miRNA-200a mimic 的 PC9/GR 细胞; E: miRNA-200a 对 PC9/GR 细胞迁移的影响; F: miRNA-200a 对 PC9/GR 细胞侵袭的影响。两组比较, * $P < 0.01$ ($n = 3$)。

图 3 过表达 miRNA-200a 可抑制 PC9/GR 细胞多种生物学行为

Figure 3 Overexpression of miRNA-200a suppresses the properties of PC9/GR cells

过 microRNA、DIANA 和 miRDB 等靶基因预测软件, 根据 miSVR 评分 (-1.150 2) 和 PhastCons 评分 (0.746 0), 筛选出 FOXC1 作为 miRNA-200a 的潜在靶基因。通过预测软件发现 FOXC1 的 3'-非翻译区存在与 miRNA-200a 相对应的结合位点 (图 4A)。RT-PCR (图 4B) 和 Western blot (图 4C) 检测内源性 FOXC1 的表达水平。FOXC1 蛋白表达于肺癌细胞系, 其中 PC9 细胞中 FOXC1 蛋白水平较 PC9/GR 细胞低, 转染 miRNA-200a mimic 的 PC9/GR 细胞 FOXC1 蛋白水平较转染 miRNA-200a NC 的 PC9/GR

细胞低。结合上文结果, 得出 FOXC1 与 ZEB1 的表达水平一致, 且与 miRNA-200a 的表达水平呈负相关。据此, 推测 FOXC1 可能具有与 ZEB1 类似的作用, 即诱导细胞对 EGFR-TKIs 的敏感性。本研究构建野生型和突变型 FOXC1-Luc, 分别与 miRNA-200a mimic 或 miRNA-200a NC 共转染至 PC9/GR 细胞, 48 h 后观察荧光素酶活性。如图 4D 所示, 野生型组转染 miRNA-200a mimic 的 PC9/GR 细胞较转染 miRNA-200a NC 的 PC9/GR 细胞荧光素酶活性明显受到抑制, 而突变型组则差异不明显。FOXC1 是



A: miRNA-200a 与 FOXC1 的结合位点; B: 各组 FOXC1 mRNA 相对表达量; C: Western blot 检测各组 FOXC1 蛋白相对表达量; 1: PC9 细胞; 2: PC9/GR 细胞; 3: 转染 miRNA-200a NC 的 PC9/GR 细胞; 4: 转染 miRNA-200a mimic 的 PC9/GR 细胞; D: 野生型和突变型 FOXC1-luc 转染后各组荧光素酶相对活性。两组比较, * $P < 0.01$ ($n = 3$)。

图 4 FOXC1 是 miRNA-200a 的直接靶基因

Figure 4 FOXC1 is a direct regulatory target of miRNA-200a

miRNA-200a 的直接靶基因。

2.5 敲低 FOXC1 增加细胞对吉非替尼的敏感性, 抑制细胞的迁移和侵袭

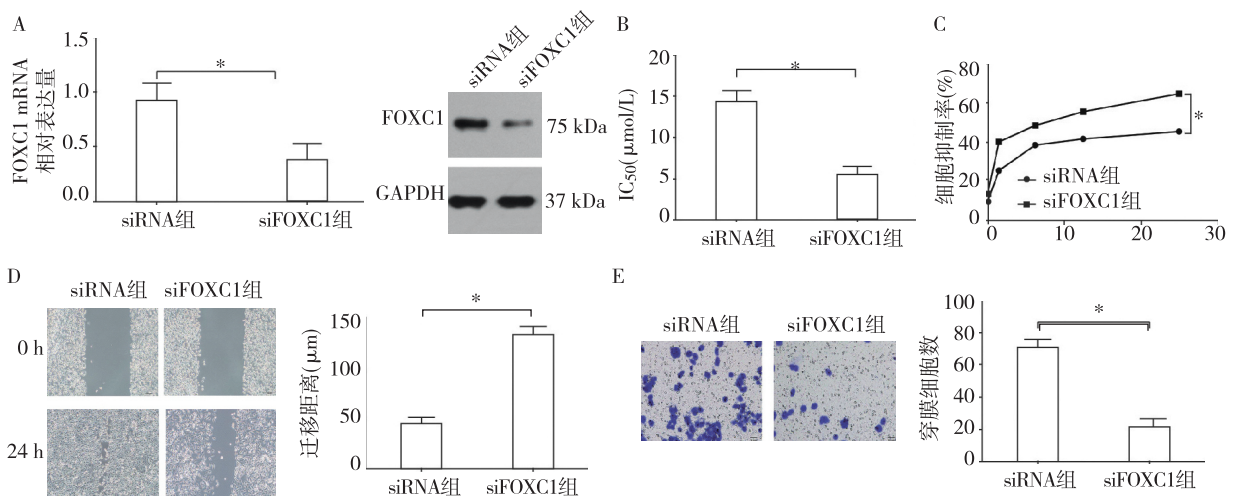
上述结果表明高表达 miRNA-200a 能抑制细胞生长, 恢复细胞对吉非替尼的敏感性。miRNA-200a 与 FOXC1 的表达呈负相关, FOXC1 是否也与 NSCLC 细胞药物敏感性有关? 将 siFOXC1 转入 PC9/GR 细胞中, 试图干扰 FOXC1 的表达。然后通过 RT-PCR 和 Western blot 法 (图 5A) 检测 FOXC1 的表达, 转染 siFOXC1 的 PC9/GR 细胞中 FOXC1 蛋白水平较无关序列转染 (siRNA) 组明显减少。同样地, 敲低 FOXC1 能增加 PC9/GR 细胞对吉非替尼的敏感性。具体地, 低表达 FOXC1 的 PC9/GR 细胞与对照组相比, IC_{50} 降低

了约 58.9% (图 5B)。吉非替尼对转染 siFOXC1 细胞的抑制率较 siRNA 组明显提高 ($P < 0.01$, 图 5C)。

细胞划痕实验 (图 5D) 和 Transwell 实验 (图 5E) 分别验证了 FOXC1 对 PC9/GR 细胞迁移和侵袭能力的影响。细胞划痕实验显示, siRNA 组细胞在 24 h 内几乎完全覆盖损伤区域, 而 siFOXC1 组则部分覆盖损伤区域。即低表达 FOXC1 的 PC9/GR 细胞迁移能力较对照组降低。Transwell 侵袭实验显示低表达 FOXC1 的 PC9/GR 细胞的侵袭能力较对照组明显降低 ($P < 0.01$)。

2.6 过表达 miRNA-200a 抑制小鼠肿瘤形成

miRNA-200a mimic 组肿瘤体积 (238.12 ± 30.00) mm^3 , miRNA-200a NC 组肿瘤体积 (326.27 ± 38.00) mm^3 , 肿



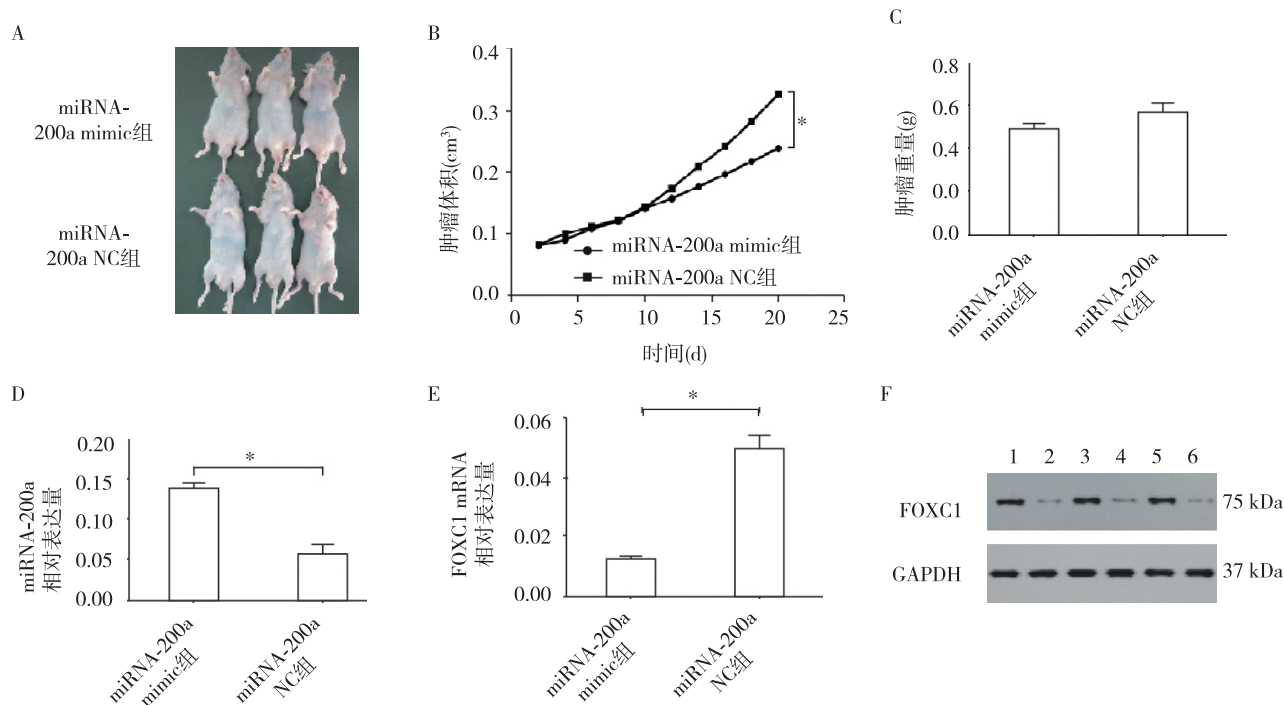
A: RT-PCR 和 Western blot 检测各组 FOXC1 mRNA 和蛋白表达; B: 转染 siFOXC1 后 PC9/GR 细胞对吉非替尼 IC_{50} 的变化情况; C: 转染 siFOXC1 后吉非替尼对 PC9/GR 细胞的抑制率; D: 转染 siFOXC1 后 PC9/GR 细胞的迁移能力变化; E: 转染 siFOXC1 后 PC9/GR 细胞的侵袭能力变化。两组比较, * $P < 0.01$ ($n = 3$)。

图 5 低表达 FOXC1 可抑制 PC9/GR 细胞多种生物学行为

Figure 5 Down-regulation of FOXC1 suppresses the properties of PC9/GR cells

瘤生长曲线显示过表达 miRNA-200a 抑制小鼠肿瘤生长(图 6A、B)。肿瘤生长曲线显示过表达 miRNA-200a 抑制小鼠肿瘤形成($P=0.013$)。两组肿瘤平均重量:miRNA-200a mimic 组 (0.49 ± 0.03)g;miRNA-200a NC 组 (0.56 ± 0.05)g,无显著统计学差异(图 6C)。RT-PCR 检测肿瘤组织中 miRNA-200a 的表达

水平,miRNA-200a 在 miRNA-200a mimic 组高表达(图 6D)。RT-PCR(图 6E)和 Western blot 法(图 6F)检测 FOXC1 的表达量,结果与 miRNA-200a 表达量相反,FOXC1 在 miRNA-200a mimic 组低表达。基于上述结果,miRNA-200a 在体内同样能下调 FOXC1,抑制肿瘤形成,增加吉非替尼的敏感性。



A: 两组肿瘤大小比较;B: 两组肿瘤体积比较;C: 两组肿瘤重量比较;D: 两组 miRNA-200a 相对表达量比较;E: 两组 FOXC1 mRNA 相对表达量比较;F: 两组 FOXC1 蛋白表达水平比较。1、3、5: miRNA-200a NC 组;2、4、6: miRNA-200a mimic 组。两组比较。 $*P<0.01(n=3)$ 。

图 6 过表达 miRNA-200a 抑制裸鼠肿瘤形成

Figure 6 Overexpression of miRNA-200a inhibits tumor growth in nude mice

3 讨论

miRNA 在转录后水平调节基因表达中起着至关重要的作用,作为抑癌基因或致癌基因,参与肿瘤的形成和发展。本研究阐明了 miRNA-200a 在肿瘤进展和诱导 NSCLC 对 EGFR-TKIs 敏感性方面起着关键性调节作用。以往研究揭示了 miRNA 调节 EMT 介导的肿瘤进展,如 miRNA-200 家族能抑制 EMT 维持上皮细胞表型^[24]。Western blot 和免疫荧光法检测细胞表型标志物的水平,探讨 miRNA-200a 和 EMT 的相关性,结果显示,在 NSCLC 中,高表达的 miRNA-200a 使 E-cadherin 和 ZO-1 表达下降,而 N-cadherin 和 Vimentin 表达上调,抑制 EMT 过程,从而抑制肿瘤进展。推断可能的机制是 E-cadherin 的缺失使细胞连接通讯丢失,导致癌细胞侵袭、扩散、转移,从而使 NSCLC 预后不良^[25]。有研究发现 miRNA-200 家族可以通过抑制 ZEB1/ZEB2、Twist 和

Snail 等基因的表达来调节 EMT,证明其通过结合到靶基因(如 E-钙黏蛋白)上游的 E 盒并抑制其转录。同时,ZEB1 也能够抑制反馈回路中 miRNA-200 的转录^[26-28]。细胞划痕实验和 Transwell 实验显示 miRNA-200a 上调抑制细胞的迁移和侵袭,对延缓肿瘤进展至关重要。还有报道称 miRNA-200a 介导 ZEB2 和 CTNNB1 的下调从而阻碍细胞生长、侵袭和迁移^[29],亦或诱导肿瘤抑制因子 DLC1 的异常表达^[30]。本研究中,动物实验同样证实过表达 miRNA-200a 能抑制肿瘤形成。综上,miRNA-200a 在 NSCLC 中发挥抑癌因子的作用,均能抑制肿瘤形成。

miRNA 被认为几乎在所有人类恶性肿瘤中存在,通过与靶基因 3'-非翻译区特异性结合来发挥作用^[31]。FOXC1 存在于多种人类恶性肿瘤中,参与包括肿瘤生长、增殖、侵袭在内的多种生物学进程^[32]。近期研究表明 FOXC1 作为功能靶基因,在

舌癌细胞中通过 miRNA-639 调节 EMT 过程^[33]。Li 等^[34]阐述了 miRNA-4792 通过敲低 FOXC1 逆转鼻咽癌细胞 EMT 和侵袭过程。然而,FOXC1 在 NSCLC 中的调节机制尚不清楚。本研究探讨了 miRNA-200a 和 FOXC1 的关系。首先,RT-PCR 和 Western blot 法分别检测了 FOXC1 在 NSCLC 细胞中的表达,结果显示,FOXC1 在 PC9 和 PC9/GR 细胞中表达减低。然后,进一步验证了 FOXC1 在体内的表达水平,同样地,FOXC1 在小鼠肿瘤组织中低表达,而 miRNA-200a 则高表达,说明 FOXC1 作为一个致癌基因,促进肿瘤生长,反映了较差的预后。靶基因预测软件筛选出 FOXC1 作为 miRNA-200a 的 1 个候选靶基因,荧光素酶报告试验证实 miRNA-200a 通过与 FOXC1 的 3'-非翻译区的直接结合发挥作用。通过 siRNA 降低 FOXC1 的表达,结果低表达的 FOXC1 可以逆转 NSCLC 细胞的迁移和侵袭。总之,FOXC1 是 miRNA-200a 的直接靶基因,过表达 miRNA-200a 或者低表达 FOXC1 均能抑制肿瘤细胞的多种生物学进程。

EGFR-TKIs 治疗对 NSCLC 有显著疗效,尤其对 EGFR 敏感突变的患者,能延长患者的总体生存率。然而,大多数接受治疗的患者最终均出现了获得性耐药^[35]。吉非替尼,第 1 代靶向治疗药物,是一种不可逆的 EGFR 小分子抑制剂,已被用作晚期 NSCLC 患者的一线治疗。但大多数患者在服用 EGFR-TKIs 后不可避免地出现了获得性耐药,导致了疗效局限。因此,如何克服 EGFR-TKIs 耐药性成为目前的热点。大量证据表明 miRNA 与 EGFR-TKIs 的耐药性相关^[9-11]。在成百上千种 miRNA 中,miRNA-200 被认为是 1 种抑癌基因^[9]。这就启发对 miRNA-200 的研究,尤其是对 EGFR-TKIs 耐药性的研究。本研究采用了 EGFR-TKIs 耐药株 PC9/GR 细胞,MTT 检测了其对于吉非替尼的敏感性。结果表明,过表达 miRNA-200a 能抑制细胞生长,恢复肺癌细胞对吉非替尼的敏感性。FOXC1 作为 miRNA-200a 的靶基因,与 miRNA-200a 的表达呈负相关,将 siFOXC1 转入 PC9/GR 细胞,降低 FOXC1,结果沉默 FOXC1 能促进 PC9/GR 细胞对吉非替尼的敏感性。因此,miRNA-200a 可以通过靶向调节 FOXC1 增加 NSCLC 细胞对吉非替尼的敏感性。这有助于应对 EGFR-TKIs 耐药问题,并为 NSCLC 患者提供新的治疗方法。

[参考文献]

- [1] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(1):9-29
- [2] Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms [J]. *Cell*, 2011, 147(2): 275-292
- [3] Greenhalgh J, Dwan K, Boland A, et al. First-line treatment of advanced epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation positive non-squamous non-small cell lung cancer [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016, 25(5):CD010383
- [4] Sharma SV, Bell DW, Settleman J, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(3):169-181
- [5] Takezawa, K, Pirazzoli V, Arcila ME, et al. HER2 amplification: A potential mechanism of acquired resistance to EGFR inhibition in EGFR-mutant lung cancers that lack the second-site EGFR T790M mutation [J]. *Cancer Discov*, 2012, 2(10):922-933
- [6] Scheffler M, Merkelbach-Bruse S, Bos M, et al. Spatial tumor heterogeneity in lung cancer with acquired epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor resistance: Targeting high level MET-amplification and EGFR T790M mutation occurring at different sites in the same patient [J]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10(6):40-43
- [7] Ohashi K, Maruvka YE, Michor F, et al. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-resistant disease [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(8):1070-1080
- [8] Toiyama Y, Hur K, Tanaka K, et al. Serum miR-200c is a novel prognostic and metastasis-predictive biomarker in patients with colorectal cancer [J]. *Annals of Surgery*, 2014, 259(4):735-743
- [9] Hassan SS, Romero R, Pineles B, et al. MicroRNA expression profiling of the human uterine cervix after term labor and delivery [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2010, 202(1):1-8
- [10] Geng Q, Fan T, Zhang B, et al. Five microRNAs in plasma as novel biomarkers for screening of early-stage non-small cell lung cancer [J]. *Respir Res*, 2014, 15(1): 149
- [11] Wang H, Wang L, Wu Z, et al. Three dysregulated microRNAs in serum as novel biomarkers for gastric cancer screening [J]. *Med Oncol*, 2014, 32(12):298
- [12] Roybal JD, Zang Y, Ahn YH, et al. MiR-200 inhibits lung adenocarcinoma cell invasion and metastasis by targeting Fli1/VEGFR1 [J]. *Mol Cancer Res*, 2011, 9(1):25-35
- [13] Adam L, Zhong M, Choi W, et al. MiR-200 expression regulates EMT in bladder cancer cells and reverses resistance to EGFR therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(16): 5060-5072
- [14] Katoh M, Katoh M. Human FOX gene family (review) [J]. *Int J Oncol*, 2004, 25(5):1495-1500

- [15] Chung TK, Lau TS, Cheung TH, et al. Dysregulation of microRNA-204 mediates migration and invasion of endometrial cancer by regulating FOXC1 [J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(5):1036–1045
- [16] Ray PS, Wang J, Qu Y, et al. FOXC1 is a potential prognostic biomarker with functional significance in basal-like breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(10):3870–3877
- [17] Wei LX, Zhou RS, Xu HF, et al. High expression of FOXC1 is associated with poor clinical outcome in non-small cell lung cancer patients [J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(2):941–946
- [18] Xu YY, Tian J, Hao Q, et al. MicroRNA-495 downregulates FOXC1 expression to suppress cell growth and migration in endometrial cancer [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(1):239–251
- [19] Hurteau GJ, Carlson JA, Spivack SD, et al. Overexpression of the microRNA hsa-miR-200c leads to reduced expression of transcription factor 8 and increased expression of E-cadherin [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(17):7972–7976
- [20] Kundu ST, Kundu ST, Byers LA, et al. The miR-200 family and the miR-183~96~182 cluster target Foxf2 to inhibit invasion and metastasis in lung cancers [J]. *Oncogene*, 2016, 35(2):173–186
- [21] Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis [J]. *Cell*, 2004, 117(7):927–939
- [22] Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis [J]. *Developmental Cell*, 2008, 14(6):818–829
- [23] Wellner U, Schubert J, Burk UC, et al. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(12):1487–1495
- [24] Sundararajan V, Gengenbacher N, Stemmler MP, et al. The ZEB1/miR-200c feedback loop regulates invasion via actin interacting proteins MYLK and TKS5 [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(29):27083–27096
- [25] Sulzer MA, Leers MP, Van Noord JA, et al. Reduced E-cadherin expression is associated with increased lymph node metastasis and unfavorable prognosis in non-small cell lung cancer [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 157(4):1319–1323
- [26] Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(5):593–601
- [27] Burk U, Schubert J, Wellner U, et al. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells [J]. *EMBO Rep*, 2008, 9(6):582–589
- [28] Bracken CP, Gregory PA, Kolesnikoff N, et al. A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(19):7846–7854
- [29] Xia H, Ng SS, Jiang S, et al. MiR-200a-mediated downregulation of ZEB2 and CTNBN1 differentially inhibits nasopharyngeal carcinoma cell growth, migration and invasion [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(1):535–541
- [30] Pacurari M, Addison JB, Bondalapati N, et al. The microRNA-200 family targets multiple non-small cell lung cancer prognostic markers in H1299 cells and BEAS-2B cells [J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(2):548–560
- [31] Lieberman J, Slack F, Pandolfi PP, et al. Noncoding RNAs and cancer [J]. *Cell*, 2013, 153(1):9–10
- [32] Myatt SS, Lam EW. The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(11):847–859
- [33] Lin ZY, Sun L, Chen W, et al. MiR-639 regulates transforming growth factor beta-induced epithelial-mesenchymal transition in human tongue cancer cells by targeting FOXC1 [J]. *Cancer Sci*, 2014, 105(10):1288–1298
- [34] Li Y, Chen X. MiR-4792 inhibits epithelial-mesenchymal-transition and invasion in nasopharyngeal carcinoma by targeting FOXC1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 468(4):863–869
- [35] Chiu CF, Chang YW, Kuo KT, et al. NF- κ B-driven suppression of FOXO3a contributes to EGFR mutation-independent gefitinib resistance [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(18):2526–2535

[收稿日期] 2017-04-03