

5-氮杂胞苷增强非小细胞肺癌细胞对吉非替尼的敏感性及其机制

徐姝^{1,2}, 吴建中², 曹海霞², 张琰¹, 刘宇飞¹, 冯继锋^{1,2} (1. 南京医科大学附属肿瘤医院 肿瘤内科, 江苏 南京 210000; 2. 江苏省肿瘤医院 内科学实验室, 江苏 南京 210009)

[摘要] **目的:**探讨 DNA 甲基化抑制剂 5-氮杂胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR)在增强人非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)细胞对吉非替尼的敏感性中的作用及其机制。**方法:**选取 *EGFR* 突变型 NSCLC 细胞株 H1650 及 *EGFR* 野生型 NSCLC 细胞株 H1299, 5-Aza-CdR 处理后, CCK-8 法检测 H1650 及 H1299 细胞对吉非替尼敏感性的变化, real-time PCR 检测细胞中 miR-200c 及表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, *EGFR*) mRNA 的表达水平。**结果:***EGFR* 突变型及野生型 NSCLC 细胞株 H1650、H1299 对吉非替尼有一定程度的耐药性, 5-Aza-CdR 处理后 H1650 及 H1299 细胞对吉非替尼的敏感性显著增强, 表现为细胞对吉非替尼的 IC₅₀ 明显降低[(1.04 ± 0.35) vs (159.37 ± 17.48) μmol/L, (6.28 ± 1.02) vs (223.76 ± 23.63) μmol/L; *P* < 0.01]。Real-time PCR 检测结果显示, 5-Aza-CdR 处理后 *EGFR* 突变型或野生型 H1650、H1299 细胞中 miR-200c [(0.009 ± 0.003) vs (0.002 ± 0.001), (0.004 ± 0.001) vs 0; *P* < 0.01] 和 *EGFR* mRNA [(0.286 ± 0.037) vs (0.015 ± 0.012), (0.057 ± 0.014) vs (0.01 ± 0.01); *P* < 0.01] 的表达水平增高。**结论:**DNA 甲基化抑制剂 5-Aza-CdR 可上调 NSCLC 细胞中 miR-200c 及 *EGFR* mRNA 的表达, 增强其对吉非替尼的敏感性。

[关键词] 非小细胞肺癌; miR-200c; *EGFR*; 吉非替尼; 甲基化; 5-Aza-CdR

[中图分类号] R737.9; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2013)01-0026-04

5-Aza-CdR enhances sensitivity of human non-small cell lung cancer cells to gefitinib and its mechanisms

XU Shu^{1,2}, WU Jian-zhong², CAO Hai-xia², ZHANG Yan¹, LIU Yu-fei¹, FENG Ji-feng^{1,2} (1. Department of Medical Oncology, Affiliated Cancer Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210000, Jiangsu, China; 2. Laboratory of Internal Medicine, Jiangsu Cancer Hospital, Nanjing 210000, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of DNA methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) on enhancing the sensitivity of human non-small cell lung cancer (NSCLC) cells to gefitinib and its mechanisms. **Methods:** *EGFR* mutant NSCLC cell line H1650 and *EGFR* wild type NSCLC cell line H1299 were used in this study. The changes in sensitivity of H1650 and H1299 cells to gefitinib after 5-Aza-CdR treatment were detected by CCK-8 assay. The expression levels of miR-200c and epidermal growth factor receptor (*EGFR*) mRNA were evaluated by real-time PCR. **Results:** *EGFR* mutant and wild type NSCLC cell lines H1650 and H1299 showed a certain degree of drug resistance to gefitinib. The sensitivity of H1650 and H1299 cells to gefitinib increased after 5-Aza-CdR treatment, with IC₅₀ value of gefitinib to cells decreasing significantly [(1.04 ± 0.35) vs [159.37 ± 17.48] μmol/L, [6.28 ± 1.02] vs [223.76 ± 23.63] μmol/L, *P* < 0.01). Real-time PCR assay results showed that the expression level of miR-200c was increased in *EGFR* mutant H1650 cells or wild type H1299 cells after 5-Aza-CdR treatment [(0.009 ± 0.003) vs [0.002 ± 0.001], [0.004 ± 0.001] vs 0, *P* < 0.01), respectively. Besides, the expression level of *EGFR* mRNA was increased compared with 5-Aza-CdR untreated group [(0.286 ± 0.037) vs [0.015 ± 0.012], [0.057 ± 0.014] vs [0.01 ± 0.01], *P* < 0.01). **Conclusion:** The expressions of miR-200c and *EGFR* mRNA in human NSCLC H1650 and

[基金项目] 江苏省科技厅科研基金资助(No. BK2009446); 吴阶平医学基金资助(No. 320.6700.09050)。Project supported by the Research Foundation of Science and Technology Bureau of Jiangsu Province (No. BK2009446), and the WU Jie-ping Medical Foundation (No. 320.6700.09050)

[作者简介] 徐姝(1988-), 女, 江苏省沭阳县人, 硕士, 主要从事肺癌靶向治疗的基础研究。E-mail: xushu2010@163.com

[通信作者] 冯继锋(FENG Ji-feng, correspondence author), E-mail: fjf@vip.sina.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R>

H1299 cells are up-regulated by DNA methylation inhibitor 5-Aza-CdR, which increases the sensitivity of H1650 and H1299 cells to gefitinib.

[**Key words**] human non-small cell lung cancer; miR-200c; EGFR; gefitinib; methylation; 5-Aza-CdR

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(1): 26-29]

肺癌是世界上发病率及病死率最高的恶性肿瘤之一,目前治疗手段包括手术、化疗及靶向治疗,其中靶向治疗的药物以表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)为主,如吉非替尼、厄洛替尼,但临床实践发现并非所有肺癌患者都能够从中获益。研究^[1-5]发现,miR-200c 能够促进上皮组织向间质组织转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT),增强肿瘤细胞对 EGFR-TKI 靶向治疗的敏感。本实验选用了 EGFR 突变型人非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)细胞株 H1650 及 EGFR 野生型 NSCLC 细胞株 H1299,通过甲基化抑制剂 5-氮杂胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR)处理,初步探讨 5-Aza-CdR 是否影响 NSCLC 细胞株对 EGFR-TKI 药物吉非替尼的敏感性,及其与 miR-200c、EGFR mRNA 表达之间可能存在的关系。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

EGFR 突变型 NSCLC 细胞株 H1650 及 EGFR 野生型 NSCLC 细胞株 H1299 购自中国科学院上海细胞生物研究所,由南京医科大学附属肿瘤医院内科学实验室保存。RPMI 1640 培养液、胎牛血清购自美国 Gibco 公司, CCK-8 试剂盒购自日本株式会社同仁化学研究所;总 RNA 抽提试剂 TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒购自德国 Qiagen 公司,EGFR 探针引物(Hs01076092-ml)和 GAPDH 探针引物(Hs99999905-ml)购自美国 ABI 公司。吉非替尼购自英国 Astra Zeneca 公司,甲基化抑制剂 5-Aza-CdR 购自美国 Sigma 公司。

1.2 NSCLC 细胞的培养

将 NSCLC 细胞株 H1650、H1299 培养于含 10% 胎牛血清及 100 U/ml 青霉素、0.1 mg/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养液中,置于 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中,以 0.25% 胰酶消化传代,取生长状态良好的对数生长期细胞进行实验。用 RPMI 1640 培养液将 5-Aza-CdR 稀释成无毒低剂量 1 μmol/L^[5-8],5-Aza-CdR 处理 H1650 和 H1299 细胞 72 h 后,胰酶消化收集细胞。

1.3 CCK-8 法检测吉非替尼对 NSCLC 细胞存活的影响

取对数生长期的 NSCLC 细胞,按 3×10^3 /孔接种至 96 孔板,每组 5 个平行复孔。接种 24 h 细胞贴壁后,弃各组细胞的培养基,分别加入 100 μl 不同浓度的吉非替尼(0、0.5、1、2、4、8、16、32 μmol/L)。吉非替尼处理细胞 72 h 后,弃各孔细胞培养上清,于每孔加入 100 μl RPMI 1640、10 μl CCK-8,并设 5 个空白孔为空白组,置于培养箱中孵育 4 h,测定 D_{450} 值。实验重复 3 次。计算各组细胞的存活率($\%$)= $(D_{\text{实验组}} - D_{\text{空白组}})/(D_{\text{对照组}} - D_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

1.4 Real-time PCR 法检测 NSCLC 细胞中 miR-200c 及 EGFR mRNA 的表达

TRIzol 法提取细胞总 RNA,反转录成 cDNA,real-time PCR 法进行扩增。其中,miR-200c 的上游引物序列为 5'-ACACTCCAGCTGGGTTAATACTGCCGGGTA-3',下游引物序列为 5'-CTCAACTGGT GTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTCCATCAT-3';内参 U6 的上游引物为 5'-CGCTTCGGCAGCATATAC-3',下游引物为 5'-TTCACGAATTTGCGTGTCAT-3'。EGFR cDNA 的扩增使用 ABI 公司的 EGFR 探针引物和 GAPDH 探针引物,结果以 $2^{-\Delta(\Delta C_t)}$ 表示其相对表达量。

1.5 统计学处理

使用 SPSS17.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间的比较采用 t 检验分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 5-Aza-CdR 增强 NSCLC 细胞对吉非替尼的敏感性

CCK-8 法检测 NSCLC 细胞的对吉非替尼的敏感性,结果(图 1)发现 EGFR 突变型 H1650 细胞及 EGFR 野生型 H1299 细胞对吉非替尼有一定程度的耐药性,IC₅₀ 分别为(159.37 ± 17.48)、(223.76 ± 23.63) μmol/L;然而,5-Aza-CdR 处理后 H1650 及 H1299 细胞对吉非替尼的敏感性显著增强,表现为其 IC₅₀ 明显降低($P < 0.01$),分别为(1.04 ± 0.35) μmol/L、(6.28 ± 1.02) μmol/L。因此,去甲基化药物 5-Aza-CdR 能够增强 EGFR 突变型或野生型

NSCLC 细胞株对吉非替尼的敏感性。

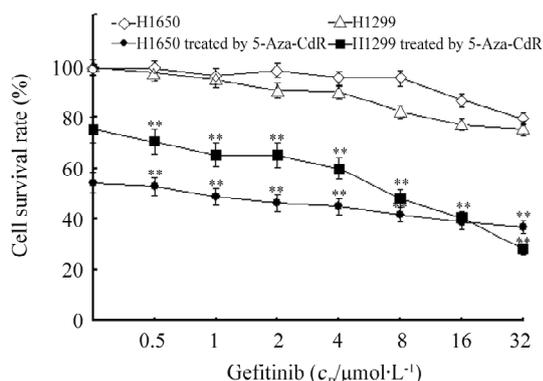


图1 5-Aza-CdR 增强 NSCLC 细胞对吉非替尼的敏感性
 Fig. 1 5-Aza-CdR enhanced the sensitivity of NSCLC cells to gefitinib
 ** P < 0.01 vs H1650 or H1299 cells

2.2 5-Aza-CdR 上调 NSCLC 细胞中 miR-200c 的表达

采用 real-time PCR 法检测 EGFR 突变型或野生型 NSCLC 细胞中 miR-200c 的表达(图 2),5-Aza-CdR 处理前,H1650 细胞中 miR-200c 的相对表达量为(0.002 ± 0.001),H1299 细胞几乎不表达 miR-200c;而 5-Aza-CdR 处理后,H1650 及 H1299 细胞中 miR-200c 的表达显著升高[(0.009 ± 0.003)、(0.004 ± 0.001),(P < 0.01)]。因此,5-Aza-CdR 能上调 EGFR 突变型或野生型 NSCLC 细胞株中 miR-200c 的表达。

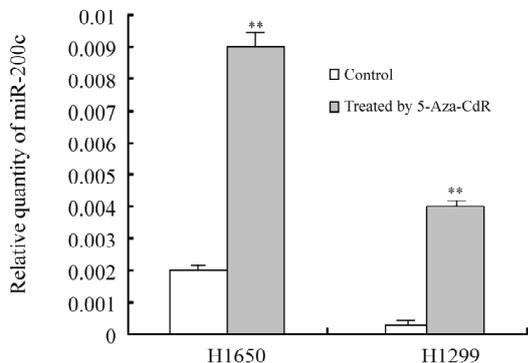


图2 5-Aza-CdR 上调 NSCLC 细胞中 miR-200c 的表达
 Fig. 2 5-Aza-CdR up-regulated the expression levels of miR-200c in NSCLC cells
 ** P < 0.01 vs control group

2.3 5-Aza-CdR 上调 NSCLC 细胞中 EGFR mRNA 的表达

采用 real-time PCR 法检测 EGFR 突变型或野生

型 NSCLC 细胞中 EGFR mRNA 的表达,结果(图 3)显示,H1650 和 H1299 细胞表达较低水平的 EGFR mRNA,5-Aza-CdR 处理后,H1650 及 H1299 细胞中 EGFR mRNA 表达水平显著上调[H1650 细胞:(0.286 ± 0.037) vs (0.015 ± 0.012),P < 0.01; H1299 细胞:(0.057 ± 0.014) vs (0.01 ± 0.01),P < 0.01]。因此,在 5-Aza-CdR 可上调 EGFR 突变型或野生型 NSCLC 细胞株中 EGFR mRNA 的表达。

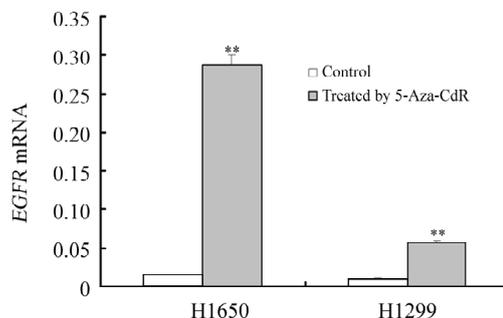


图3 5-Aza-CdR 上调 NSCLC 细胞中 EGFR mRNA 的表达
 Fig. 3 5-Aza-CdR up-regulated the expression levels of EGFR mRNA in NSCLC cells
 ** P < 0.01 vs control group

3 讨论

EGFR 是相对分子质量为 170 000 的膜糖蛋白,属于受体酪氨酸激酶家族。EGFR 活化后通过酪氨酸激酶催化下游分子磷酸化,启动一系列信号通路并最终引起相关基因的活化,参与肿瘤细胞增殖、转移和凋亡。研究^[9-14]表明,EGFR-TKI 对于 EGFR 突变型肺癌患者疗效显著,其中 19 号外显子缺失突变(E746-A750)和 21 号外显子点突变(L858R)的肺癌患者疗效尤为明显,而对于野生型 EGFR 的肺癌患者通常无效。本实验中选用的 NSCLC 细胞株为 19 外显子区缺失突变(E746-A750)的细胞株 H1650 和 EGFR 野生型细胞株 H1299,通过 CCK-8 检测证实,EGFR 野生型 H1299 细胞对吉非替尼的敏感性较差,然而同时也发现 EGFR 19 号外显子缺失突变的 H1650 细胞对吉非替尼的敏感性也较差,提示吉非替尼对 NSCLC 的治疗上可能存在其他机制。

miRNA 是一类 21 ~ 25 bp 的小分子非编码 RNA,存在于各种真核生物中,广泛地参与细胞增殖、凋亡等过程。在肿瘤的发生发展过程中也扮演着癌基因或抑癌基因的角色^[15]。EMT 为上皮组织向间质组织转化的过程,miR-200 家族分子在 EMT 中发挥了关键作用,其中,miR-200c 能够增加肿瘤细胞 E-cadherin 的表达,并降低 ZEB1、ZEB2 的表

达,增强肿瘤细胞对 EGFR-TKI 的敏感性; Bryant 等^[16]研究也发现, miR-200c 可增强 NSCLC 细胞和胰腺癌细胞对 EGFR-TKI 药物厄洛替尼的敏感性; Adam 等^[17]发现, miR-200c 能逆转膀胱癌细胞对 EGFR-TKI 的耐药; Ceppi 等^[18]发现, miR-200c 的表达能够增强肺腺癌细胞株对 EGFR-TKI 的敏感性。本实验通过 real-time PCR 法检测 NSCLC 细胞中 miR-200c 的表达量,发现 miR-200c 在吉非替尼耐药细胞株 H1650 及 H1299 中均为低表达。由此考虑 NSCLC 细胞对吉非替尼的敏感性可能与 miR-200c 的表达相关。

DNA 的甲基化是最重要的一种表观遗传修饰,主要发生在基因启动子区。多种人类肿瘤存在不同程度的 DNA 异常甲基化,此外,癌前病变中多个抑癌基因启动子区也存在不同程度的高甲基化^[19-20]。本研究应用 5-Aza-CdR 处理吉非替尼耐药细胞株 H1650 及 H1299,结果发现,H1650 及 H1299 细胞对吉非替尼的敏感性明显增强,且细胞中 miR-200c 及 EGFR 的表达水平也显著升高。提示 5-Aza-CdR 可能通过改变 miR-200c 及 EGFR 基因启动子区的甲基化状态,上调 miR-200c 及 EGFR mRNA 的表达,增强 H1650 及 H1299 细胞对吉非替尼的敏感性。

EGFR-TKI 治疗肺癌患者能够显著提高患者的缓解率,延长无进展生存期和生活质量,因此,在肺癌的临床治疗中占据重要地位。本研究提示,对于存在 EGFR-TKI 药物吉非替尼原发耐药的 EGFR 突变型或野生型 NSCLC 患者,联合去甲基化药物可能会通过上调 miR-200c 及 EGFR mRNA 的表达,逆转其对 EGFR-TKI 的耐药性,从而提高肺癌分子靶向治疗的疗效,并扩大分子靶向药物的应用范围。

[参 考 文 献]

- [1] Elson-Schwab I, Lorentzen A, Marshall CJ. MicroRNA-200 family members differentially regulate morphological plasticity and mode of melanoma cell invasion [J]. PLoS One, 2010, 5(10): 13176-13177.
- [2] Korpala M, Lee ES, Hu G, et al. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2 [J]. J Biol Chem, 2008, 283(22): 14910-14914.
- [3] 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, 2008, 9(6): 582-589.
- [4] Mongroo PS, Rustgi AK. The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition [J]. Cancer Biol Ther, 2010, 10(3): 219-222.
- [5] 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.

- [6] Christman JK. 5-Azacytidine and 5-Aza-2c-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: Mechanistic studies and their implications for cancer therapy [J]. Oncogene, 2002, 21(26): 5483-5495.
- [7] Stratthdee 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] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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 U S A, 2007, 104(52): 20932-20937.
- [13] Bivona TG, Hieronymus H, Parker J, et al. FAS and NF- κ B signalling modulate dependence of lung cancers on mutant EGFR [J]. Nature, 2011, 304(471): 523-526.
- [14] 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]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(52): 20932-20937.
- [15] Nicolas FE, Lopez-Martinez AF. MicroRNAs in human diseases [J]. Recent Pat DNA Gene Seq, 2010, 4(3): 142-154.
- [16] 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]. Br J Cancer, 2011, 10(1038): 1-9.
- [17] 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]. Clin Cancer Res, 2009, 15(16): 5060-5072.
- [18] 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.
- [19] Duffy MJ, Napieralski R, Martens JW, et al. Methylated genes as new cancer biomarkers [J]. Euro J Cancer, 2009, 45(3): 335-346.
- [20] Safar AM, Spencer H, Su X, et al. Promoter hypermethylation for molecular nodal staging in non-small cell lung cancer [J]. Arch Pathol Lab Med, 2007, 131(6): 936-941.

[收稿日期] 2012 - 08 - 30

[修回日期] 2012 - 12 - 24

[本文编辑] 周玲琳