

MTX 对映体耐药 A549 细胞株中 EGFR 基因 mRNA 的表达分析

张白银 沈佐君 何晓东 孙余婕 张永娟

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30672011);安徽省自然科学基金资助项目(050430902);

安徽省人才开发资金资助项目(2005Z040)

作者单位:230001 合肥市,安徽医科大学附属省立医院,安徽省临床检验中心

通讯作者:沈佐君,E-mail:shenzuojun@163.com

【摘要】 目的 探讨表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)在氨甲喋呤(methotrexate, MTX)对映体 L-(+)-MTX 和 D-(-)-MTX 耐药 A549 细胞株中的表达。方法 采用 RT-PCR 方法测定肺癌 A549 敏感细胞株和 15 μmol/L、35 μmol/L、55 μmol/L 的 L-(+)-MTX 和 D-(-)-MTX A549 耐药细胞株中 EGFR mRNA 表达情况。结果 15 μmol/L、35 μmol/L、55 μmol/L L-(+)-MTX A549 耐药细胞株中 EGFR 基因表达的 mRNA 相对含量分别为肺癌 A549 敏感细胞株的 (1.55±0.26)倍、(1.86±0.13)倍、(1.20±0.05)倍。RT-PCR 结果显示,A549 敏感细胞株和 L-(+)-MTX 各浓度 A549 耐药株均扩增出 315 bp 条带,有 EGFR 基因表达,而 3 种浓度的 D-(-)-MTX 耐药细胞株中 EGFR 基因不表达。结论 MTX 诱导耐药后 A549 细胞株中 EGFR mRNA 发生变化,且在 3 种浓度两种对映体细胞株间具有明显的手性差异,MTX 可能通过改变 EGFR 基因启动子的甲基化状态,影响 EGFR 的表达。

【关键词】 表皮生长因子受体;氨甲喋呤;对映体;反转录聚合酶链反应

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2013.01.003

The mRNA expression and promoter methylation analysis of epidermal growth factor receptor in methotrexate enantiomer-resistant A549 cell lines

ZHANG Bai-yin, SHEN Zuo-jun, HE Xiao-dong, et al. Anhui Provincial Center for Clinical Laboratories, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001, China

【Abstract】 Objective To study the expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in methotrexate (MTX) enantiomer-resistant A549 cell lines [L-(+)-MTX and D-(-)-MTX]. **Methods** The expression of EGFR on genetic level was determined by RT-PCR in lung cancer A549 sensitive cells, and MTX enantiomer-resistant A549 cells [L-(+)-MTX and D-(-)-MTX], with the concentration of drug resistance was 15 μmol/L, 35 μmol/L, 55 μmol/L. **Results** The genetic expression levels of EGFR were (1.55±0.26), (1.86±0.13) and (1.20±0.05) folds in L-(+)-MTX/A549 cells compared with lung cancer A549 sensitive cells. RT-PCR results showed that there were 315 bp bands in A549 sensitive cell and L-(+)-MTX/A549 cells, but in D-(-)-MTX/A549 cells barely expressed. **Conclusion** The expression level of EGFR on genetic level in drug resistant cells have been changed, and significant difference in two enantiomer-resistant cells are appeared. The expression of EGFR is affected by MTX which alte the methylation status of EGFR.

【Key words】 Epidermal growth factor receptor; Methotrexate; Enantiomer; RT-PCR

当今世界医学的一大难题是肿瘤的治疗,而肿瘤导致患者死亡的重要原因之一是肿瘤的侵袭和转移。临床肿瘤患者死因中 90%是由于肿瘤的转移引起的,大约 30%的肿瘤患者在就诊时就已经有明显的肿瘤转移病灶。肿瘤的侵袭、转移是一个复杂的过程,涉及面很广。表皮生长因子受体(epidermal

growth factor receptor, EGFR)在多种肿瘤中表达或高表达,与不同的配体结合后激活一系列的生物信号反应,参与细胞的凋亡、增殖、分化、迁移和细胞周期循环,与肿瘤细胞的形成和恶化(肿瘤转移)息息相关^[1]。氨甲喋呤(methotrexate, MTX)作为叶酸代谢途径抗肿瘤药物的“基石”,被认为是成功用于肿瘤

化疗的药物之一^[2],然而近年来发现患者接受 MTX 治疗后肿瘤细胞容易耐药,引起转移复发,最后死亡,该问题一直没有得到有效的解决。

MTX 为手性对映体分子,自然界中存在 L 和 D 两种手性对映体结构,分别是 L-(+)-MTX 和 D-(-)-MTX。目前对于 MTX 手性问题尚未引起重视,主要原因是人们对两种构型的 MTX 对映体认识不深,D 型 MTX 被认为是无意义的污染物^[3]。而本实验室前期研究^[4]发现 MTX 对映体对癌细胞有不同的杀伤作用,该药物代谢过程中的关键酶,即二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, DHFR)对 MTX 两种对映体有立体选择性,说明 MTX 对映体可能存在着不同的作用。

本文研究采用反转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)技术检测 MTX 对映体耐药 A549 细胞株中 EGFR 基因 mRNA 表达的差异,探讨 MTX 对映体与 EGFR 基因表达的调控,了解 MTX 对映体作用肿瘤细胞而引起的肿瘤转移能力差异机制,为合理使用 MTX 药物减少肿瘤转移提供实验室依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)A549 细胞株(亲本细胞)由中国科技大学生命学院赠送。本实验室前期在 A549 细胞株体外培养的基础上^[5,6],采用大剂量浓度递增冲击诱导耐药的方法,首先以 15 $\mu\text{mol/L}$ L-(+)-MTX 药物诱导增殖期敏感细胞成稳定的 15 $\mu\text{mol/L}$ L-(+)-MTX 耐药细胞株;其次以 20 $\mu\text{mol/L}$ L-(+)-MTX 药物诱导增殖期 15 $\mu\text{mol/L}$ L-(+)-MTX 耐药细胞株细胞成稳定的 20 $\mu\text{mol/L}$ L-(+)-MTX 耐药细胞株;以 25 $\mu\text{mol/L}$ L-(+)-MTX 药物诱导增殖期 20 $\mu\text{mol/L}$ L-(+)-MTX 耐药细胞株细胞成稳定的 25 $\mu\text{mol/L}$ L-(+)-MTX 耐药细胞株;以此类推再以 30 $\mu\text{mol/L}$ 、35 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$ 、45 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 和 55 $\mu\text{mol/L}$ L-(+)-MTX 药物诱导。最终建立本文研究中使用的敏感细胞株(S,亲本细胞)、15 $\mu\text{mol/L}$ 、35 $\mu\text{mol/L}$ 、55 $\mu\text{mol/L}$ 的 L-(+)-MTX 耐药细胞株(L)和 15 $\mu\text{mol/L}$ 、35 $\mu\text{mol/L}$ 、55 $\mu\text{mol/L}$ 的 D-(-)-MTX 耐药细胞株(D)共 7 株。

1.1.2 主要试剂与仪器 L-(+)-MTX、D-(-)-MTX、RPMI1640 和胰酶(美国 Sigma 公司);胎牛血清(美国 GIBCO 公司);TRIzol Reagent(Invitrogen 公司);TaqDNA 聚合酶(北京 Promega 公司);Alpha 凝

胶成像系统(美国 ALPHA 科技公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞总 RNA 提取 分别消化收集细胞数约 10^6 个,加入 1 ml TRIzol 试剂混匀,按照 TRIzol 试剂操作说明书抽提总 RNA 溶于 20 μl DEPC 处理的水中,紫外分光光度法测定 RNA 的纯度,取 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} > 1.7$ 者继续下一步试验。

1.2.2 逆转录反应 用达安基因公司逆转录体系,取 RNA 2 μl ,加入逆转录酶 0.5 μl 、反应缓冲体系 10 μl ,逆转录条件为 42 $^{\circ}\text{C}$ 1 h,95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,转录出的 cDNA 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.3 RT-PCR 法检测 EGFR 基因表达

1.2.3.1 PCR 引物合成 根据 EGFR 和 β -actin 基因序列,采用 Primer 5.0 软件进行引物设计,设计引物序列如下:EGFR 上游引物:5'-GCAATATCAGC-CCTTAGGT-3',下游引物:5'-CCAGACATGAGAAAAGGT-3';产物大小为 315 bp; β -actin 上游引物:5'-TGCGACAATGGAAGTGAATG-3',下游引物:5'-GGATAGCATGTGGAAGTGCATAC-3',产物大小为 186 bp;以上引物均由 Invitrogen 公司合成。

1.2.3.2 RT-PCR 反应体系 反应总体积 25 μl ,逆转录产物 cDNA 2 μl ,5 \times buffer 2.5 μl ,10 mmol/L dNTP 0.5 μl ,上、下游引物各 0.5 μl ,25 mmol/L Mg-Cl₂ 溶液 1.5 μl ,Taq DNA 聚合酶 0.5 μl (1 U),加水至 25 μl 。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 4 min 预变性,95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,57 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,共 36 个循环,每份标本同时扩增 EGFR 和内参 β -actin,重复 6 次。 β -actin 的条带一致情况下,取 10 μl PCR 产物在 1.6%琼脂糖凝胶上电泳,结果用凝胶成像分析系统分析各 EGFR 光密度值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行处理,数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,其中多组之间比较采用单因素方差分析,各组间两两比较应用 SNK-q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 S、L 和 D 耐药细胞株中 EGFR 基因的 mRNA 表达水平 7 种细胞的 RT-PCR 产物在 1.6%琼脂糖凝胶上电泳,经凝胶成像分析系统分析,其中 S、以及 15 $\mu\text{mol/L}$ 、35 $\mu\text{mol/L}$ 、55 $\mu\text{mol/L}$ L 细胞株均有 EGFR mRNA 表达,且光密度值分别为 (1852 \pm 88)、(9584 \pm 122)、(8520 \pm 112)和(3607 \pm 45)。L 细胞株中 EGFR 的 mRNA 表达量分别为细胞株的(1.55 \pm 0.26)倍、(1.86 \pm 0.13)倍和(1.20 \pm 0.05)倍,差异均有统计学意义(P 均 $<$ 0.05)。而 15 $\mu\text{mol/L}$ 、35 $\mu\text{mol/L}$ 、

55 $\mu\text{mol/L}$ D 细胞株中的 EGFR mRNA 不表达,光密度值为 0。见表 1。

表 1 RT-PCR 半定量检测
细胞株中 EGFR mRNA 的表达水平($\bar{x}\pm s$)

细胞株	重复次数	EGFR 光密度值	相对于 S 的倍数
S	6	1852±88	1
15 $\mu\text{mol/L}$ L	6	9584±122 [△]	1.55±0.26
35 $\mu\text{mol/L}$ L	6	8520±112 [★]	1.86±0.13
55 $\mu\text{mol/L}$ L	6	3607±45 [▲]	1.20±0.05
F 值	-	9050.27	-
P 值	-	< 0.05	-

注:与 S 比较,[△] $P < 0.05$ ($q = 196.40$),[★] $P < 0.05$ ($q = 169.37$),[▲] $P < 0.05$ ($q = 44.58$);与 15 $\mu\text{mol/L}$ L 比较,[★] $P < 0.05$ ($q = 27.02$),[▲] $P < 0.05$ ($q = 151.82$);与 35 $\mu\text{mol/L}$ L 比较,[▲] $P < 0.05$ ($q = 124.80$)

2.2 RT-PCR 检测 A549 敏感细胞株和 L-(+)-MTX 各浓度 A549 耐药株均扩增出 315 bp 条带,说明 EGFR 有表达,而 D-(-)-MTX 各浓度 A549 耐药株均无 EGFR 表达。见图 1。

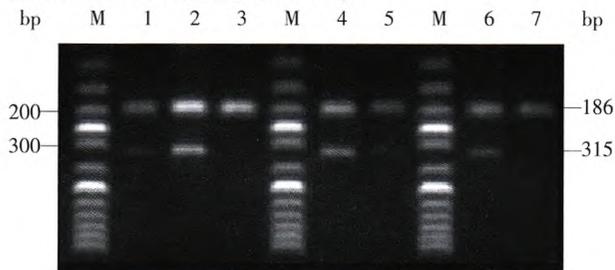


图 1 EGFR 基因在 MTX 对映体

L-(+)-MTX 和 D-(-)-MTX 耐药 A549 细胞株中的表达

注:M:50 bp 梯度 DNA Marker;1:A549 敏感细胞 (315 bp);2:15 $\mu\text{mol/L}$ L-(+)-MTX (315 bp);3:15 $\mu\text{mol/L}$ D-(-)-MTX;4:35 $\mu\text{mol/L}$ L-(+)-MTX (315 bp);5:35 $\mu\text{mol/L}$ D-(-)-MTX;6:55 $\mu\text{mol/L}$ L-(+)-MTX (315 bp);7:55 $\mu\text{mol/L}$ D-(-)-MTX;所有条带 β -actin 为 186 bp

3 讨论

肿瘤的形成受遗传学修饰和表观遗传修饰的影响,表观遗传学认为细胞内总体 DNA 的低甲基化,特异基因的高甲基化,染色体重构和基因印记与肿瘤发生发展有关^[7]。DNA 的甲基化丢失常发生在肿瘤发生的早期,其在多种肿瘤中与高恶性和易转移有关。EGFR I 型跨膜酪氨酸激酶生长因子受体定位于细胞膜,由胞内区、跨膜区及胞外区三部分组成。EGFR 的表达受其启动子 DNA 甲基化调控。EGFR 的转录沉默与 CpG 岛高甲基化相关,EGFR 基因 5' 调控区缺保守序列 CAAT 盒和 TATA 盒,富含一个高 GC 的启动子,有多个位点可以转录起始。EGFR 的过表达促进细胞的存活、增殖和迁移,与许多实体

瘤患者的低存活率密切相关,但也有部分实体瘤中 EGFR 低表达或不表达。

手性对映体形式(简称对映体)是自然界的本质属性之一,生物体内生物大分子都具有手性。生物体内对映体识别效应对化学、生物学、医学和药学的理论和实践都有重大意义^[8]。本文研究通过分别测定肺癌 A549 敏感细胞株和 15 $\mu\text{mol/L}$ 、35 $\mu\text{mol/L}$ 、55 $\mu\text{mol/L}$ L-(+)-MTX 和 D-(-)-MTX 6 种耐药 A549 细胞株中的 EGFR 在 mRNA 水平上的表达,结果表明不同 MTX 对映体单体诱导肿瘤细胞耐药后,L-(+)-MTX 中 EGFR 的 mRNA 表达量分别为 S 的 (1.55±0.26) 倍、(1.86±0.13) 倍和 (1.20±0.05) 倍,差异均有统计学意义,但是 D-(-)-MTX 中却不表达 EGFR。MTX 作为一种经典的叶酸代谢抗肿瘤药物,近年来的研究^[9,10]发现其与核酸甲基化有关:(1) MTX 能抑制细胞内 DNA 的总体甲基化水平;(2) MTX 结构类似物(叶酸)能改变 EGFR 启动子的甲基化,影响 EGFR 的表达,导致肿瘤的发生和细胞的转移能力。本文从肿瘤 MTX 对映体耐药细胞株 EGFR 表达水平的不同中分析得出 MTX 对映体耐药肿瘤细胞对 EGFR 表达机制有所不同。15 $\mu\text{mol/L}$ 、35 $\mu\text{mol/L}$ 和 55 $\mu\text{mol/L}$ L-(+)-MTX 耐药 A549 细胞株中有 EGFR 表达,D-(-)-MTX 耐药 A549 细胞株中却不表达,可能原因是 D-(-)-MTX 耐药 A549 细胞的 EGFR 基因启动子发生高甲基化,转录沉默,导致 EGFR 基因的不表达。本课题组的前期研究^[11]也发现,D-(-)-MTX 对映体耐药细胞中血管内皮生长因子 mRNA 表达水平明显高于 L-(+)-MTX 耐药细胞和亲本细胞。D-(-)-MTX 耐药细胞的 EGFR 活性和血管内皮生长因子的表达表现出反向变化,Tabernero^[12]在对 EGFR 抑制剂耐受的肿瘤细胞液发现了同样的现象。这些都提示 D-(-)-MTX 耐药细胞在影响细胞核酸甲基化上存在差别,影响 EGFR 的表达。

据以上研究可以推测,肺癌 A549 敏感株和 15 $\mu\text{mol/L}$ 、35 $\mu\text{mol/L}$ 、55 $\mu\text{mol/L}$ D-(-)-MTX 种耐药 A549 细胞株中发生甲基化,而 L-(+)-MTX 种耐药 A549 细胞株中不发生甲基化。

综上所述,即 MTX 可能通过改变 EGFR 基因启动子的甲基化状态,影响 EGFR 的表达,且对 EGFR 的表达具有手性差异。因此,本课题组将会进一步通过直接测序法,来具体明确 EGFR 基因启动子 CpG 位点的甲基化情况,为知晓 MTX 对映体作用肿瘤细胞而引起的肿瘤转移能力差异机制的研究奠定基础

础,为合理使用 MTX 药物,减少肿瘤转移提供实验依据。

4 参考文献

- 1 Yang R, Li WW, Hoang BH, et al. Quantitative correlation between promoter methylation and messenger RNA levels of reduced folate carrier. BMC Cancer, 2008, 8:12-14.
- 2 Schilsky RL. Methotrexate: an effective agent for treating cancer and building careers. The polyglutamate era. Stem Cells, 1996, 14: 29-32.
- 3 Cramer SM, Schornagel JH, Kalghatgi KK, et al. Occurrence and significance of D-methotrexate as a contaminant of commercial methotrexate. Cancer Res, 1984, 44: 1843-1846.
- 4 金鑫,沈佐君,何晓东,等.亲和毛细管电泳法测定甲氨蝶呤对映体与二氢叶酸还原酶反应动力学参数.中华检验医学杂志, 2008, 31: 317-321.
- 5 陶韶能,沈佐君,何晓东,等.氨甲喋呤对映体耐药 A549 细胞株的建立及生物物特征.肿瘤防治研究, 2009, 36: 273-277.
- 6 凡任芝,沈佐君,何晓东,等.毛细管电泳免疫-激光诱导荧光检测技术测定氨甲喋呤对映体耐药 A549 细胞株中叶酰聚谷氨酸合成酶.中华检验医学杂志, 2008, 31: 432-440.
- 7 Dansranjav T, Krehl S, Mueller T, et al. The role of promoter CpG methylation in the epigenetic control of stem cell related genes during differentiation. Cell Cycle, 2009, 15: 916-924.
- 8 Trost BM. Asymmetric catalysis: an enabling science. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 5348-5355.
- 9 Schipper RG, van den Heuvel LP, Verhofstad AA, et al. Polyamines and DNA methylation in childhood leukaemia. Biochemical Society Transactions, 2007, 35: 331-335.
- 10 Payne RE, Yagüe E, Slade MJ, et al. Measurements of EGFR expression on circulating tumor cells are reproducible over time in metastatic breast cancer patients. Pharmacogenomics, 2009, 10: 51-57.
- 11 董林,何晓东,陶韶能,等.氨甲喋呤对映体诱导的肺癌 A549 耐药细胞株中 VEGF 及其受体表达差异的研究.肿瘤, 2009, 29: 404-408.
- 12 Taberero J. The role of VEGF and EGFR inhibition: Implications for Combining Anti-VEGR and Anti-VEGR Agents. Mol Cancer Res, 2007, 5: 203-220.

(收稿日期: 2012-10-25)

(本文编辑: 李霖)

消 息

卫生部临检中心室间质评总结大会

2012 年卫生部临床检验中心室间质评计划数 52 个, 检验项目数约 230 项, 参加机构数近 4000 家, 这一规模在全球范围名列前茅。为总结工作经验, 更好地开展室间质评, 促进实验室内质量控制工作, 进一步提高全国临床检验工作的质量和水平, 卫生部临床检验中心拟定于 2013 年 5 月 20 日至 24 日在湖南省长沙市召开全国内分泌、肿瘤标志物、心肌标志物、特殊蛋白、治疗药物监测、糖化血红蛋白、POCT 血糖仪、同型半胱氨酸和 BNP/NT pro-BNP 室间质量评价总结大会, 欢迎各实验室相关工作人员参加此会。

1 会议主题

临床检验校准与溯源, 检验结果标准化/一致化与互认, 参考系统建立与应用。

2 大会主要内容

本次大会除对 2011 年-2012 年度全国内分泌、肿瘤标志物、心肌标志物、特殊蛋白、治疗药物监测、糖化血红蛋白、POCT 血糖仪、同型半胱氨酸、BNP/NT pro-BNP 等 9 项室间质量评价项目进行总结外, 还将邀请一些国内外的有关专家

就临床检验参考测定系统的建立和应用、检验系统校准的溯源、实验室内质量控制 (IQC) 与室间质评 (EQA) 的改进、检验项目的临床应用等问题进行讨论, 此外还将举行实验室质量保证的进展、室间质量评价要求、实验室质量管理、信息技术在实验室应用以及临床化学检验新技术进展等专题讲座。

3 会议时间

2013 年 5 月 20 日至 24 日

4 会议有关事项

会务费: 800 元/人

会议安排: 2013 年 5 月 20 日 8:00-22:00 报到, 地点: 枫林宾馆大堂; 5 月 21 日至 23 日讲座, 5 月 24 日中午 12:00 前撤离。

5 联系人及联系方式

联系人: 汪静

电话: 010-58115059, 58115064

传真: 010-65132968

地址: 北京东单大华路 1 号卫生部临床检验中心生化室