

[文章编号] 1000-4718(2009)06-1104-07

EGFR/HER2 基因敲减对 SPC - A - 1 细胞株细胞生物学特性及相关信号通路的影响*

苏 健¹, 钟文昭², 郭爱林¹, 李文瑜², 陈志红¹, 安社娟¹, 陈世良¹, 谢 至¹
(广东省人民医院 ¹医学研究中心, ²肿瘤中心, 广东省医学科学院, 广东 广州 510080)

[摘要] 目的: 探讨 EGFR/HER2 基因沉默对非小细胞肺癌细胞株 EGFR 酪氨酸激酶信号转导通路的交互影响及其与细胞增殖、凋亡和周期改变的关系。方法: 设计并合成 EGFR、HER2 及 EGFR/HER2 共干扰序列, 构建含干扰序列的载体, 进行瞬时转染; 应用实时荧光定量、蛋白印迹法检测基因沉默效果; 用四甲基偶氮唑盐比色法、流式细胞仪检测基因沉默后生物学特性改变; 蛋白印迹法检测 EGFR 下游信号通路蛋白 Akt、p - Akt、p - Erk1/2、p - p38 表达水平变化; 采用 SPSS13.0 软件分析结果。结果: 在 SPC - A - 1 细胞系中, EGFR 干扰组、HER2 干扰组、EGFR 联合 HER2 干扰组和 EGFR - HER2 共干扰组体外细胞增殖率均有下降趋势; 除 EGFR 干扰外, 其余各组均可诱发凋亡; 各组的细胞周期 G₁ 期和 S 期细胞比例有显著改变; 基因沉默效果检测显示 EGFR 和 HER2 基因蛋白水平被下调。下游信号通路蛋白检测示 EGFR 下游信号通路蛋白 Akt、p - Akt、p - Erk1/2、p - p38 表达水平和细胞增殖、凋亡以及细胞周期改变之间未发现明显相关规律。结论: 单纯 EGFR 干扰 SPC - A - 1 细胞不能诱发显著凋亡, HER2 和 EGFR/HER2 基因共沉默后诱发的人肺腺癌 SPC - A - 1 细胞凋亡比阴性对照显著增加。EGFR/HER2 基因沉默后诱发的细胞增殖、凋亡和细胞周期改变与 EGFR 家族下游信号通路蛋白之间未发现显著相关关系。

[关键词] 癌, 非小细胞肺; RNA 干扰; 受体, 表皮生长因子

[中图分类号] R73 **[文献标识码]** A

Relationship between EGFR/HER2 gene knocked down and the downstream signal pathway in SPC - A - 1

SU Jian¹, ZHONG Wen - zhao², GUO Ai - lin¹, LI Wen - yu², CHEN Zhi - hong¹, AN She - juan¹, CHEN Shi - liang¹, XIE zhi¹

(¹Center of Medical Research, ²Cancer Center, Guangdong General Hospital, Guangzhou 510080, China. E - mail: sujian2008lin@yahoo.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** RNAi technique was applied to explore the relationship between downstream signal pathway in EGFR family and the cell proliferation, cell cycle alteration, apoptosis after EGFR/HER2 RNA interference. **METHODS:** Sequence - specific siRNA for EGFR and HER2 were designed as literatures described. "Tuschl rules" and BLAST on the full length of EGFR/HER2 cDNA were used to ensure the sequence - specific siRNA for EGFR/HER2 joint interference. Based on the above sequence - specific siRNA, recombinant plasmids with GFP and neomycin resistance marker were constructed. Six groups including mock, negative control, shRNA - EGFR, shRNA - HER2, shRNA - EGFR/HER2 and shRNA - EGFR + shRNA - HER2 were established by transient transfection. Real time quantitative RT - PCR was used to detect the silencing of the EGFR/HER2 gene level. Western blotting was used to measure the levels of EGFR/HER2 protein and protein phosphorylation expression. Transfected cells were stimulated with EGF 15 min before protein extraction. MTT assay and flow cytometry were used to evaluate the cell proliferation, apoptosis and cell cycle distribution after RNAi. The protein expression levels of downstream signaling pathway proteins including Akt, p - Akt, p - Erk1/2, p - p38 were measured by real time quantitative RT - PCR and Western blotting. Randomized block analysis of variance and SNK methods were used to compare the differences between groups. **RESULTS:** Cell proliferation was inhibited in the groups of shRNA - EGFR, shRNA - HER2, shRNA - EGFR + shRNA - HER2 and shRNA - EGFR/HER2 by MTT assay. Cell cycle analysis by flow cytometry showed that apoptosis ratio in shRNA - HER2 ($P < 0.01$), shRNA - EGFR/HER2

[收稿日期] 2008 - 11 - 19 [修回日期] 2009 - 03 - 26

* [基金项目] 广东省科技计划资助项目 (No. 2007B031515010); 广东省中医药局科研基金资助项目 (No. 1060032; No. 2008375); 广东省医学科研基金资助项目 (No. A007014)

E - mail: sujian2008lin@yahoo.cn

($P < 0.01$) and shRNA - EGFR + shRNA - HER2 ($P < 0.05$) groups were significantly higher than those in negative control group, while there was no statistical difference between shRNA - EGFR and negative control ($P > 0.05$), and that the distributions in phase G₁ and phase S in shRNA - EGFR ($P < 0.01$), shRNA - HER2 ($P < 0.01$), shRNA - EGFR/HER2 ($P < 0.01$) and shRNA - EGFR + shRNA - HER2 ($P < 0.01$) were significantly different compared with the negative control. The level of EGFR/HER2 protein and protein phosphorylation expression were down regulated. The cell proliferation, apoptosis and cell cycle alterations induced by EGFR/HER2 RNA interference showed no significant relationship with downstream signal pathway molecular in EGFR family. **CONCLUSION:** EGFR gene knockdown may not cause significant apoptosis in SPC - A - 1 cell line. The variations of cell proliferation, apoptosis and cell cycle alterations induced by EGFR/HER2 RNA interference were not found to have significant relationship with downstream signal pathway molecules in EGFR family.

[**KEY WORDS**] Carcinoma, non - small - cell lung; RNA interference; Receptors, epidermal growth factor

表皮生长因子受体(human epidermal growth factor receptor, HER)家族由4个成员组成,分别为HER1(EGFR/erbB1)、HER2(Neu/erbB2)、HER3(erbB3)和HER4(erbB4)。其中,EGFR及HER2在非小细胞肺癌(non - small cell lung cancer, NSCLC)中高表达,与正常细胞的增殖分化有关,并且调控肿瘤发生、生长、凋亡、血管生成、侵袭以及转移,是目前肿瘤领域重要的基因治疗靶点^[1,2]。

EGFR/HER2基因是肺癌生长的重要调控基因,EGFR/HER2的过表达是晚期肺癌的表现并提示预后不良^[3-5],本研究尝试用RNA干扰方法研究EGFR/HER2基因改变对细胞生物学特性及信号转导通路的影响。

材 料 和 方 法

1 材料

人肺腺癌A549、人肺腺癌SPC - A - 1、人肺鳞癌L78、人大细胞肺癌H460细胞株由本室贮存。带有GFP和新霉素抗性筛选标记的重组质粒载体pGPU6从上海吉玛制药有限公司购买。Akt、p - Akt、p - Erk1/2、p - p38购自Cell signal。

2 方法

2.1 确定EGFR、HER2基因及EGFR/HER2共干扰序列 EGFR和HER2干扰序列参考文献记载^[7];EGFR/HER2共干扰序列通过EGFR/HER2基因全长序列比对取其编码区连续同源片段结合“Tuschl法则”寻找。

2.2 重组载体的构建及鉴定 以上述确定的干扰序列为模板,由上海吉玛制药有限公司协助构建带有GFP和新霉素抗性筛选标记的重组质粒(pGPU6_GFP_Neo载体)。

2.3 细胞培养及筛选 倒掉原培养基,加入适量消化液,待细胞变圆开始悬浮,加入含10%小牛血清的RPMI - 1640培养基,轻轻摇动培养瓶及用吸管吹打,使细胞从瓶壁脱落,稍离心,去上清,重新加入培

养基,分装。37℃、5% CO₂恒温培养。

培养人肺腺癌A549、人肺腺癌SPC - A - 1、人肺鳞癌L78、人大细胞肺癌H460细胞等4种细胞株,比较各自于6、12、24、48、72、96、120和144h的转染效率、对转染试剂的耐受性,并Western blotting和免疫组化测定细胞EGFR和HER2蛋白表达水平,以筛选用于进一步RNAi研究的细胞株。

2.4 瞬时转染 设立(1)只加转染试剂的空转对照(mock)、(2)阴性干扰序列对照(control)、(3)EGFR干扰(shRNA - EGFR)、(4)HER2干扰(shRNA - HER2)、(5)EGFR干扰联合HER2干扰(shRNA - EH1)和(6)EGFR - HER2共干扰(shRNA - EH2)6组。脂质体Lipofectamine 2000介导将各组质粒转染肺腺癌细胞。

2.5 基因沉默后生物学特性改变

① MTT法检测细胞体外增殖率 细胞接种到96孔板,在转染后6、32、56、80h检测细胞增殖能力;加入20 μL MTT溶液(5 g/L) 37℃孵育4h后,加入DM-SO 150 μL,振摇10 min,用酶标仪检测490 nm A值。

② 流式细胞仪测定凋亡率和细胞周期改变 取1 × 10⁶细胞制成单细胞悬液,经70%乙醇固定过夜,PBS清洗,加入PI室温孵育30 min,流式细胞仪检测细胞周期。

2.6 基因沉默效果检测 用Western blotting法检测EGFR/HER2蛋白及其磷酸化蛋白表达水平变化。转染后提取细胞蛋白之前15 min用EGF 100 μg/L刺激以增加磷酸化蛋白表达。

2.7 下游信号通路蛋白检测 用Western blotting检测EGFR下游信号通路蛋白Akt、p - Akt、p - Erk1/2、p - p38表达水平变化。探讨EGFR/HER2沉默后肿瘤细胞生物学特性改变的机制。

3 统计学处理

不同批次细胞重复3次,各组数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(One way ANOVA),两两比较用SNK法。检验水准

为 $P < 0.05$ 。采用 SPSS13.0 统计分析软件。

结 果

1 细胞的选择

4 种肺癌细胞株 EGFR/HER2 细胞免疫组化结果显示:人肺腺癌 A549、人肺腺癌 SPC - A - 1、人肺鳞癌 L78 和人大细胞肺癌 H460 细胞株均表现为 EGFR 高表达和 HER2 中等强度表达。人肺腺癌

SPC - A - 1 是上述 4 种肺癌细胞株中 EGFR 和 HER2 表达水平相对较高的一种细胞株。

2 转染效率 - 时间关系

人肺腺癌 SPC - A - 1 细胞株是上述 4 种肺癌细胞株中转染效率最高、对转染试剂耐受性好、转染后生长态势良好的细胞株。转染后绿色荧光蛋白表达的高峰出现在 48 - 72 h,见图 1。后续实验应用 SPC - A - 1 细胞。

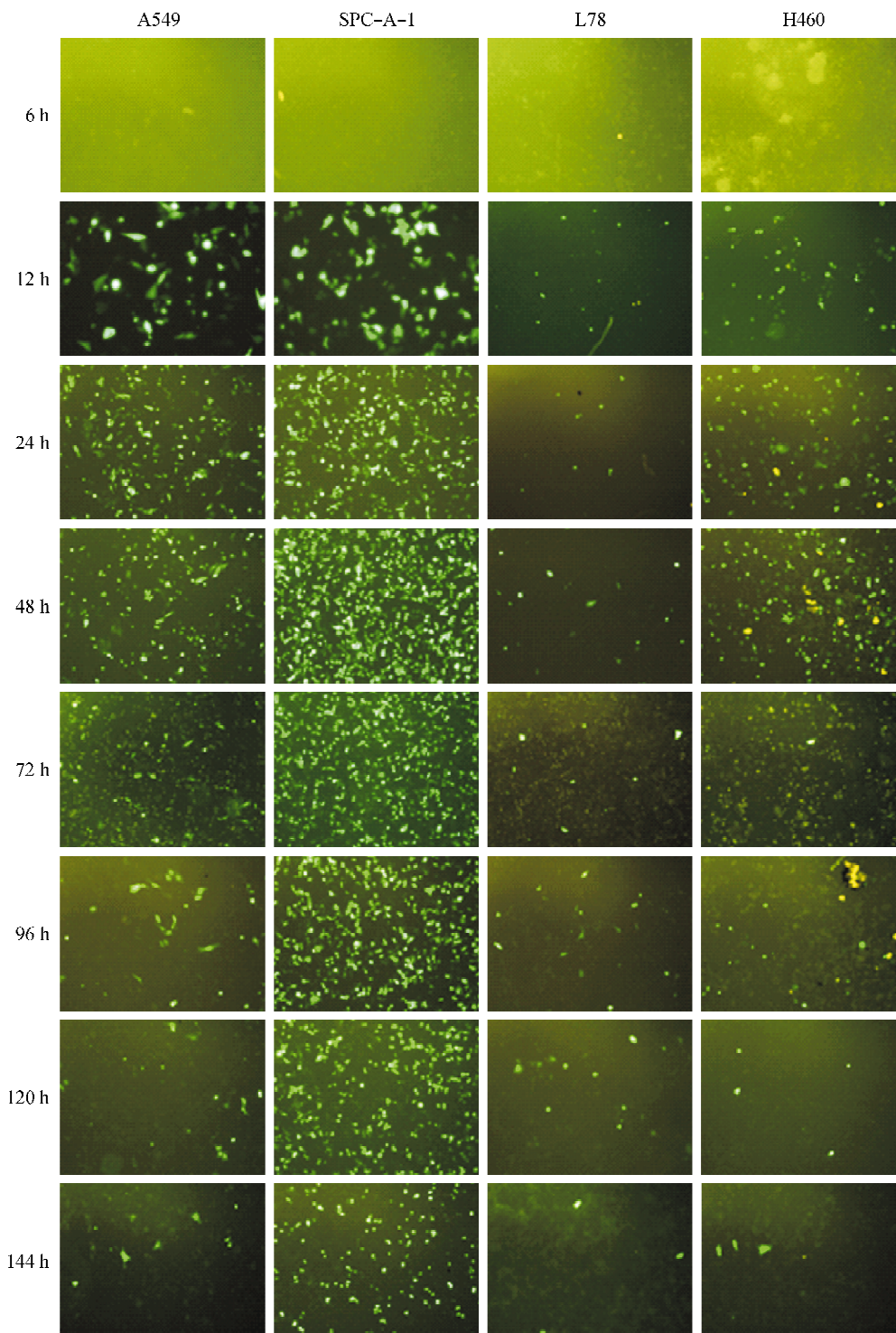


Fig 1 Comparison of transfection efficiency between lung cancer cell line($\times 100$).

图 1 肺癌细胞转染效率比较

3 EGFR、HER2 基因及 EGFR/HER2 共干扰序列的选择

虽然文献表明 EGFR (Gene ID: BC094761) 和 HER2 (Gene ID: NM_004448) 同源性达 80%, 但 EG-

FR/HER2 基因全长序列比对仅发现其编码区连续同源片段 1 个, 长度 23 bp, 根据“Tuschl 法则”取其 18 个碱基末端加 AA 设计成 EGFR/HER2 共干扰序列 (siRNA - EH), 见表 1。

表 1 本研究所采用的干扰序列

Tab 1 The interference sequence in the study

siRNA	Sense/antisense strands	Position
siRNA - EGFR	5' - CACAGUGGAGCGAAUUCUTT - 3' 3' - TTGUGUACCCUCGCUUAAGGA - 5'	328 - 348 (EGFR)
siRNA - HER2	5' - CUCUGGAGGAAAAGAAAGUTT - 3' 3' - TTGAGACCUCCUUUCUUUCA - 5'	2 549 - 2 567 (HER2)
siRNA - EGFR/HER2	5' - TTCAAGUCCUDGACGACUUUG - 3' 3' - CTCAAAGUCGUCGAGGACUUG - 5'	2 949 - 2 968 (EGFR) 3 089 - 3 108 (HER2)

4 沉默后细胞生物学特性检测

4.1 细胞增殖 各干预组和对照组相比有增生受抑制趋势, 见图 2。

4.2 细胞凋亡 利用随机区组方差分析比较各处理、时点对凋亡测量值的影响, 表明存在处理和时间双重效应差异, 见表 2、图 3, 各处理组中除了 shRNA - EGFR ($P > 0.05$) 以外, 其余 mock ($P < 0.05$)、shHER2 ($P < 0.01$)、EH1 ($P < 0.05$) 和 EH2 ($P < 0.01$) 等各组 and 阴性对照间 (control) 均有显著差异。

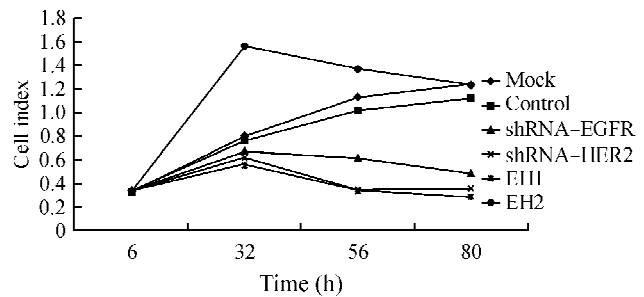


Fig 2 Cell proliferation curve.

图 2 细胞增殖曲线

表 2 不同时间点不同处理组细胞凋亡率测量值

Tab 2 Apoptosis rate in different treatment groups at different time points ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Time (h)	Mock	Control	shRNA - EGFR	shRNA - HER2	EH1	EH2
24	0.45 ± 0.07	5.14 ± 1.03 ^{△△}	13.91 ± 0.65 ^{**}	25.65 ± 2.89 ^{**}	14.75 ± 0.63 ^{**}	20.05 ± 0.35 ^{**}
48	0.50 ± 0.00	14.35 ± 0.35 ^{△△}	26.45 ± 1.34 ^{**}	38.40 ± 0.28 ^{**}	20.00 ± 0.14 ^{**}	27.30 ± 0.42 ^{**}
72	0.90 ± 0.14	17.70 ± 1.13 ^{△△}	24.70 ± 0.14 ^{**}	38.65 ± 0.35 ^{**}	35.55 ± 0.92 ^{**}	38.25 ± 0.78 ^{**}

^{△△} $P < 0.01$ vs mock group; ^{**} $P < 0.01$ vs control.

4.3 细胞周期 表 3 提示各处理组、各时点之间细胞周期分布不同, P_1 为处理组之间比较结果, P_2 为各时间点之间比较结果。利用多元方差分析比较各处理组、各时点之间细胞周期分布是否相同, 结果见表 4。对存在处理组间有差异的细胞周期 G_1 、 S 分别以 mock、control 为对照进行两两比较, 表明各处理组和对照之间存在显著差异。

5 沉默效果和沉默后引起下游信号转导通路改变的检测

5.1 免疫组化结果 EGFR 和 HER2 基因干扰后的免疫组化结果见图 4、5。

5.2 Western blotting 结果 EGFR 和 HER2 基因总蛋白和磷酸化蛋白水平能被下调。EGFR 下游信号通路蛋白 Akt、p - Akt、p - Erk1/2、p - p38 表达水平和细胞增殖、凋亡以及细胞周期改变之间未发现明显规律关联, 见图 6。

讨 论

国内外已有 RNAi 沉默 EGFR 基因的相关报道: Du 等^[6] 设计了 siRNA - EGFR 并构建质粒表达载体, 在脑胶质瘤动物模型中通过静脉注射 siRNA - EGFR 抑制种植瘤的 EGFR 表达, 提高胶质瘤小鼠的生存。张敏等^[7] 认为 RNAi 干扰 EGFR 能为 NSCLC 提供新的基因治疗策略。

研究发现, EGFR 和 HER2 敲减后能观察到肿瘤细胞株形态学凋亡、增殖抑制和细胞周期改变。通过定量统计分析发现 HER2 和 EGFR/HER2 联合干扰所致凋亡率增加及细胞周期分布改变与对照组间有显著差异, EGFR/HER2 沉默后对细胞增殖影响与细胞凋亡相一致, 表明 EGFR/HER2 干扰抑制 SPC - A - 1 增殖的机制中, 诱导细胞凋亡占据了重要地位。

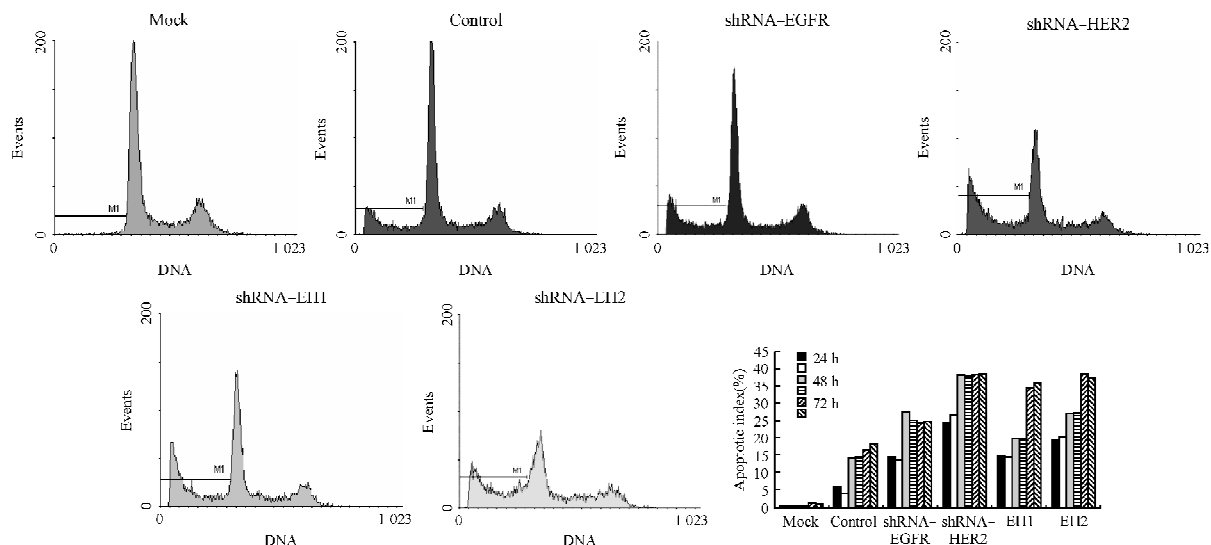


Fig 3 The apoptotic index of flow cytometry after EGFR/HER2 gene silencing in SPC - A - 1 cell line.

图3 SPC - A - 1 肺腺癌 EGFR/HER2 基因沉默后流式细胞仪测凋亡指数

表3 各处理组随时间推移的细胞周期变化规律

Tab 3 The role of cell cycle alteration in different groups at various time points ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Group	Time (h)	Cell cycle (%)			P_1	P_2
		G_1	G_2	S		
Mock	24	54.75 ± 2.33	19.30 ± 3.11	25.95 ± 0.78		
	48	60.1	3.2	36.6		
	72	50.05 ± 0.07	14.05 ± 0.64	35.90 ± 0.57		
Control	24	55.00 ± 1.56	12.70 ± 0.85	32.25 ± 2.47		
	48	59.8	8.3	31.9		
	72	55.80 ± 1.98	12.75 ± 0.21	31.55 ± 1.91		
shRNA - EGFR ^Δ	24	59.55 ± 1.06	15.70 ± 1.27	24.75 ± 0.21		
	48	64.9	3.8	31.3		
	72	59.05 ± 0.64	14.85 ± 0.64	26.05 ± 0.07		
shRNA - HER2 ^Δ	24	65.05 ± 0.78	12.65 ± 3.75	24.85 ± 0.64	<0.05	<0.01
	48	67.2	3.2	29.5		
	72	62.55 ± 2.33	13.20 ± 1.84	24.35 ± 0.49		
EH1 ^Δ	24	64.00 ± 1.13	13.25 ± 0.64	23.60 ± 0.57		
	48	65.4	5.5	29.1		
	72	59.40 ± 0.85	13.95 ± 0.35	26.65 ± 0.49		
EH2	24	61.80 ± 1.56	13.00 ± 0.85	25.20 ± 0.00		
	48	67.9	3.1	29.0		
	72	62.75 ± 2.62	13.55 ± 1.91	23.65 ± 0.64		

^Δ $P < 0.05$ vs control.

表4 处理组间细胞周期差异

Tab 4 The difference of cell cycle among arms

Group	Group	P
Control	Mock	>0.05
	shRNA - EGFR	<0.01
	shRNA - HER2	<0.01
	EH1	<0.01
	EH2	<0.01
Mock	Control	>0.05
	shRNA - EGFR	<0.01
	shRNA - HER2	<0.01
	EH1	<0.01
	EH2	<0.01

EGFR 活化后形成同源或异源二聚体刺激其自体磷酸化,从而导致下游信号转导通路的级联放大和激活,通过 MAPK 和 PI3K/AKT 通路调节癌细胞生存、增殖和凋亡;MAPK 途径中,ERK 主要介导细胞增殖和分化,而 JNK、p38 主要介导细胞凋亡,PI3K/AKT 则主要调控细胞生存和凋亡,这些通路之间也存在交通,Nagy 等^[8]认为,抑制细胞生长的机制是诱导细胞凋亡或阻滞细胞周期。在本实验观察中,EGFR/HER2 基因沉默后诱发的细胞凋亡和周期改变与 EGFR 家族下游两条主要信号通路(AKT 和 MAPK)之间未发现一致性规律变化:EGFR/HER2

敲减后 pAKT 水平和阴性对照 (control) 对比有增高趋势, 但和空白对照 (mock) 并无显著差异。MAPK 通路中主要负责调控细胞生长、分化的 Erk 表达 EGFR/HER2 敲减各组未见规律变化。主要负责调控

炎症、凋亡的 p38 在 EGFR/HER2 联合干扰组 (EH1) 有所下调, EGFR 和 HER2 单独敲减后对上述两条通路的蛋白分子都未见明显影响。而 HER2 敲减后引起的凋亡比 EGFR 敲减更显著, 难以解释上

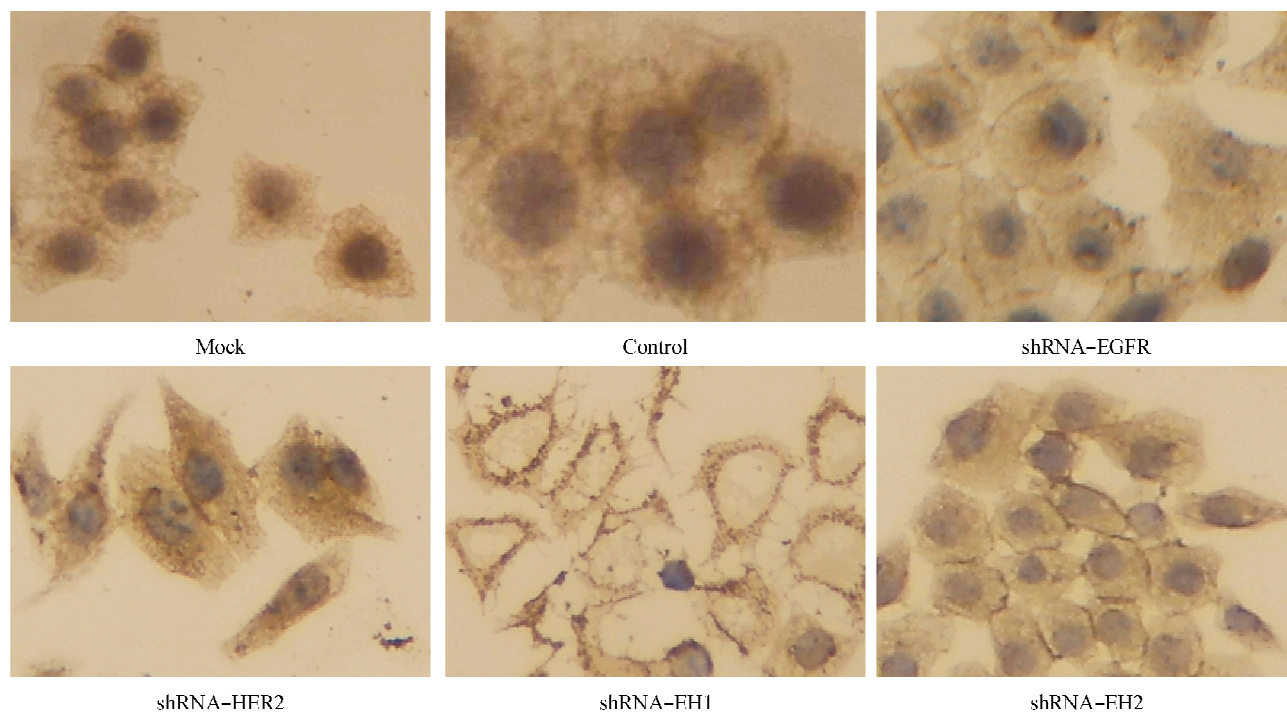


Fig 4 Immunohistochemistry of EGFR after EGFR/HER2 gene silencing in SPC - A - 1 cells (×400).

图 4 SPC - A - 1 肺腺癌 EGFR/HER2 基因沉默后细胞免疫组化

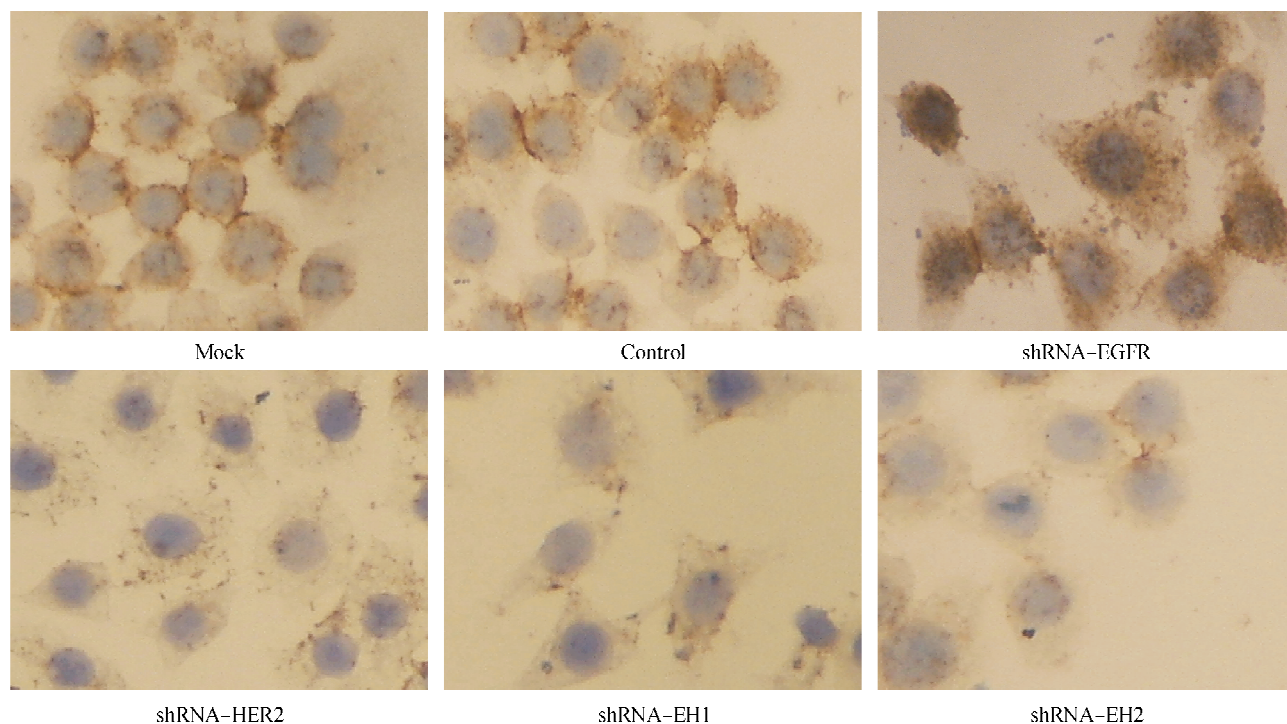


Fig 5 Immunohistochemistry of HER2 after EGFR/HER2 gene silencing in SPC - A - 1 cells (×400).

图 5 SPC - A - 1 肺腺癌 EGFR/HER2 基因沉默后细胞免疫组化

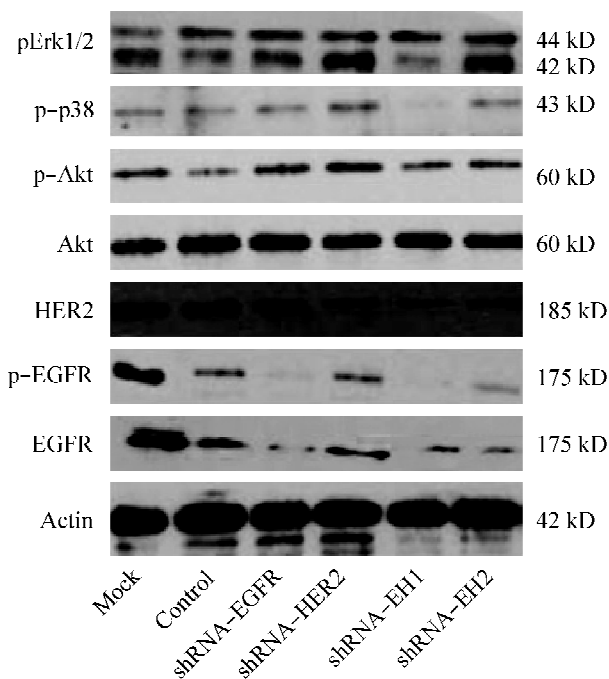


Fig 6 The levels of downstream signal pathway protein in EGFR/HER2 gene silencing.

图 6 EGFR/HER2 沉默后对下游信号蛋白分子的影响

述机制。吴一龙等^[9]曾报道肺腺癌的酪氨酸激酶转导通路异常有多种类型,由此决定了肺腺癌不同的生物学行为和不同的预后,针对这一阴性结果,可能由于 EGFR 信号通路的网络复杂性,部分阻断 EGFR/HER2 并不能引起下游分子的规律变化,也可能提示 EGFR/HER2 RNAi 所诱导的凋亡不完全依赖于这两条通路,另外本实验各方面的稳定性仍需进一步改善。为提高肿瘤细胞的凋亡效应,本实验选用 HER2 基因联合 EGFR 干扰,模拟 EGFR/HER2 双重酪氨酸激酶受体抑制剂 lapatinib 的机制。结果表明,HER2 和 EGFR - HER2 共干扰能取得更强的凋亡效应,可能的机制是 HER2 异源二聚体介导的促细胞增殖信号比 EGFR 介导的同源二聚体更强,尽管联合应用 HER2 的 RNAi 能提高肿瘤细胞的凋亡,

但和单纯 EGFR 干扰相比凋亡率无显著差异,说明 EGFR 和 HER2 在肿瘤细胞凋亡的信号转导途径中都有重要作用,但可能还有其它因子的参与,仍需要进一步的研究和探讨。

[参 考 文 献]

[1] Prenzel N, Fischer OM, Streit S, et al. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2001, 8(1):11-31.

[2] 何强,梁力建,彭宝岗,等. ErbB2 通过 FAK - Src - MAPK 信号通路诱导细胞转化和移动侵袭[J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(12):2363-2365.

[3] Scagliotti GV, Selvaggi G, Novello S, et al. The biology of epidermal growth factor receptor in lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(12 Pt 2):4227s-4232s.

[4] 吴曙华,蒋绍庆,段光军. HER2、HER1 在非小细胞肺癌中过度表达及其临床意义[J]. *肿瘤*, 2005, 25(5):462-465.

[5] 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.

[6] Du Q, Thonberg H, Zhang HY, et al. Validating siRNA using a reporter made from synthetic DNA oligonucleotides[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 325(1):243-249.

[7] 张敏,张新,白春学,等. RNA 干扰技术抑制 A549 细胞表皮生长因子受体表达的研究[J]. *中华肿瘤杂志*, 2004, 26(12):317-321.

[8] Nagy P, Arndt - Jovin DJ, Jovin TM. Small interfering RNAs suppress the expression of endogenous and GFP - fused epidermal growth factor receptor (erbB1) and induce apoptosis in erbB1 - overexpressing cells[J]. *Exp Cell Res*, 2003, 285(1):39-49.

[9] 吴一龙,林嘉颖,杨学宁,等. 肺腺癌患者酪氨酸激酶信号传导通路的异常与临床预后[J]. *中华医学杂志*, 2004, 84(12):992-996.