

网络出版时间: 2021-11-25 8:12 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20211124.1045.007.html>

m⁶A 去甲基酶 FTO 促进 HER2 阳性乳腺癌细胞对曲妥珠单抗耐药

纪琳娣^{1,2}, 徐婷婷^{1,2}, 殷 梧^{1,2}, 程 民^{1,2}, 吴新春^{1,2}, 卞 庚^{1,2}, 程联胜³, 胡世莲^{1,2}, 沈国栋^{1,2}

摘要 目的 探讨 N⁶-甲基腺嘌呤(m⁶A)去甲基酶肥胖相关蛋白(FTO)在乳腺癌细胞对曲妥珠单抗耐药中的作用及新型抗人表皮生长因子受体 2(HER2)人源化 A21 抗体(HuA21)对耐药性乳腺癌细胞增殖的影响。方法 制备曲妥珠单抗耐药细胞株(BT474/TR),光学显微镜观察 BT474/TR 与 BT474 细胞形态,四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞增殖,免疫荧光法检测增殖相关抗原(Ki67)表达,流式细胞术检测细胞周期,qPCR 和 Western blot 法检测 FTO 与甲基转移酶样蛋白 3 抗体(METTL3)表达。结果 BT474/TR 出现细胞核固缩、伪足消失,细胞增殖速度下降。曲妥珠单抗处理 BT474 不同时间至形成耐药细胞,Ki67 表达逐渐降低($P < 0.05$),S 期细胞比例逐渐减小($P < 0.05$),FTO 表达逐渐增加($P < 0.05$),但是 METTL3 表达没有变化。FTO 抑制剂甲氧基苯胺(MA2)促进 BT474/TR 细胞增殖,且提高其对曲妥珠单抗的敏感性($P < 0.05$)。HuA21 抗体对 BT474/TR 细胞增殖具有抑制作用($P < 0.05$),且联合 MA2 和曲妥珠单抗对 BT474/TR 细胞抑制效果更好($P < 0.05$)。结论 HER2 阳性乳腺癌细胞 FTO 基因表达与其对曲妥珠单抗耐药之间存在相关性,抑制 FTO 活性可以增强乳腺癌耐药细胞对曲妥珠单抗治疗的敏感性;HuA21 抗体对曲妥珠单抗耐药性乳腺癌细胞有抑制作用。

关键词 乳腺癌;HER2;曲妥珠单抗;m⁶A;HuA21

中图分类号 R 737.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)12-1885-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.12.008

乳腺癌高居女性恶性肿瘤发病率的首位^[1],严重危害健康。自从曲妥珠单抗(Trastuzumab,商品名 Herceptin)用于人表皮生长因子受体 2(human

epidermal growth factor receptor 2, HER2) 阳性乳腺癌治疗以来,患者获益良多;但经临床广泛应用显示约半数 HER2 阳性乳腺癌病例会出现耐药现象,导致肿瘤进展或复发^[2]。N⁶-甲基腺嘌呤(m⁶A)甲基化是一种广泛发生于哺乳动物 RNA 的表观遗传学修饰方式,脂肪量与肥胖相关基因(FTO)是其中一种 m⁶A 去甲基酶,参与个体发育及肿瘤发生发展等生理病理进程^[3-5]。该研究旨在探讨 FTO 与 HER2 阳性乳腺癌对曲妥珠单抗治疗抵抗的相关性,并探索自主研发的新型抗 HER2 人源化 A21 抗体(HuA21)对耐药性乳腺癌细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料 人乳腺癌细胞株 BT474 购自中国科学院细胞库,曲妥珠单抗购自罗氏旗下 Genentech 公司;甲氧基苯胺(MA2)由中国科学院上海药物研究所杨财广教授赠送;HuA21 购自合肥瀚科迈博生物技术有限公司;胎牛血清(FBS)购自美国 CLARK Bioscience 公司;RPMI 1640 培养基购自武汉赛维公司;CCK-8 试剂盒购自南京诺唯赞公司;Ki67 免疫荧光抗体、鼠抗人 FTO 与 METTL3 抗体、兔抗人 β -actin 抗体及辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔、羊抗鼠 IgG 购自美国 CST 公司;RNA 提取试剂盒购自德国 Analytik Jena 公司;荧光定量 PCR 试剂盒及逆转录试剂盒购自北京全式金生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 曲妥珠单抗耐药细胞株制备 参考 Ding et al^[6] 方法采用体外间接梯度法诱导耐药株,当细胞可以在 80 μ g/ml 药物浓度下稳定生长时认定为曲妥珠单抗耐药株(BT474/TR),将其用于后续实验。

1.2.2 细胞处理与形态观察 取对数生长期的 BT474 细胞,加入 10 μ g/ml 曲妥珠单抗,分别处理 0、4、8 d;BT474/TR 被 10 μ g/ml 曲妥珠单抗处理 8 d,用于后续实验,分别在荧光显微镜下观察曲妥珠单抗处理前后的细胞形态学变化。

1.2.3 免疫荧光检测 药物处理后的细胞爬片,预

2021-09-20 接收

基金项目:安徽省对外合作项目(编号:202004b11020019);安徽省中央引导地方科技发展专项项目(编号:2019b12030026、2019b11030012);中央高校基本科研业务费专项资金资助(编号:WK9110000064)

作者单位:¹ 安徽医科大学附属省立医院老年医学科,合肥 230001

² 安徽省老年医学研究所,肿瘤免疫与营养治疗安徽省重点实验室,合肥 230001

³ 合肥瀚科迈博生物技术有限公司,合肥 230088

作者简介:纪琳娣,女,硕士研究生;

沈国栋,男,博士,研究员,责任作者,E-mail: gdshe@ustc.edu.cn

冷 PBS 清洗,经 4% 多聚甲醛固定、0.5% TritonX-100 室温通透,封闭、清洗、4 °C 过夜孵育荧光一抗 Ki67、PBS 清洗、室温避光孵育荧光二抗、DAPI 染核、滴加抗淬灭液后拍照,使用 Image-Pro Plus 6.0 软件对荧光值进行量化分析。

1.2.4 细胞周期分析 药物处理后的细胞制备成单细胞悬液,70% 乙醇固定细胞形态,4 °C 过夜。离心去除乙醇,清洗后向每管细胞沉淀加入 500 μ l 配置好的 CCAA 溶液(含 PI 染液 50 μ g/ml 与核糖核酸酶 100 μ g/ml),室温避光孵育 30 min 后使用安捷伦 NovoCyte 流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.5 qPCR 检测 提取细胞内总 RNA 后进行 qPCR 实验^[7],采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的计算方式来表示基因的相对表达量。以 GAPDH 为内参,内参及目的蛋白引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物名称与序列

引物名称	序列
FTO-Forward Primer	5'-GCCGCTGCTTGTGAGACCTTC-3'
FTO-Reverse Primer	5'-CTGCTCTGCTCTTAATGTCCAC-3'
METTL3-Forward Primer	5'-ACACTGCTTGCTTGGTGTCA-3'
METTL3-Reverse Primer	5'-AATCTTTCGAGTGCCAGGGG-3'
GAPDH-Forward Primer	5'-CTCGCTCCTGGAAGATGGTGAT-3'
GAPDH-Reverse Primer	5'-CTTCATTGACCTCAACTACATGG-3'

1.2.6 Western blot 实验 收集细胞沉淀、裂解、离心、取上清液,BCA 法进行蛋白定量,水浴锅内 100 °C 煮 10 min 使蛋白充分变性。继续进行上样、跑胶、转膜、封闭等步骤,以人抗兔 β -actin 作为一抗内参,分别以人抗鼠的 FTO、METTL3 作为目的蛋白一抗,4 °C 孵育过夜,室温孵育二抗 1 h 后进行化学显影,应用 Imagine J 软件对蛋白条带进行灰度值测定。

1.2.7 CCK-8 细胞增殖检测 在 96 孔板每孔铺入适量细胞,培养 72 h 后弃去培养基,每孔加入 100 μ l 新鲜培养基和 10 μ l CCK-8 试剂,450 nm 波长测吸光度。

1.2.8 药物处理 分别以 0、0.1、1、10、100、1 000 μ mol/L 浓度梯度的 MA2 预先处理 BT474/TR 48 h,更换不含 MA2 的新鲜培养基继续培养 72 h 后进行 CCK-8 实验,选取对细胞生长促进作用最强的浓度进行后续实验。BT474/TR 细胞分别分为 Control 组(对照组)、Tra 组(10 μ g/ml 曲妥珠单抗处理 72 h)、HuA21 组(10 μ g/ml HuA21 处理 72 h)、MA2 + Tra 组(40 μ mol/L 的 MA2 预处理 48 h 后 10 μ g/ml 的曲妥珠单抗处理 72 h)、MA2 + Tra + HuA21 组(40

μ mol/L 的 MA2 预处理 48 h 后 10 μ g/ml 的曲妥珠单抗和 10 μ g/ml HuA21 联合处理 72 h) 行 CCK-8 实验。

1.2.9 m⁶A 甲基化检测 使用 m⁶A 甲基化测定试剂盒方法检测 HER2 过表达的人乳腺癌细胞株 BT474 经曲妥珠单抗处理 0、2、4 d 和自行制备的曲妥珠单抗耐药株 BT474/TR 的 m⁶A 水平。

1.3 统计学处理 各组实验数值以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,采用 SPSS 19.0 进行统计分析,两组独立样本均值比较用 t 检验,多组数据采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义,每组数据均重复 3 次。

2 结果

2.1 BT474/TR 细胞形态变化、细胞增殖速度比较

比较 BT474 和 BT474/TR 细胞的形态变化,如图 1 所示,两种细胞均表现为聚团生长,形态舒展饱满,边缘规则。曲妥珠单抗处理后,BT474/TR 形态无明显变化,但 BT474 细胞数目减少,胞体皱缩渐变成圆形,边缘不规则,伪足消失。CCK-8 实验提示 BT474 组与同时时间点的 BT474 + Tra 组、BT474/TR 组和 BT474/TR + Tra 组相比细胞增殖速度减慢($F = 27.21$, $P < 0.05$)。经曲妥珠单抗处理 0、4、8 d 的 BT474 及 BT474/TR 细胞增殖相关抗原 Ki67 表达比例逐渐减少($F = 40.56$, $P < 0.05$,图 2),细胞周期内 S 期细胞比例依次降低($F = 135.20$, $P < 0.05$,图 3)。

2.2 耐药株 BT474/TR 去甲基酶 FTO 表达情况

BT474 细胞在接受曲妥珠单抗处理至转变成曲妥珠单抗耐药株 BT474/TR 过程中 mRNA 的 m⁶A 甲基化水平逐渐下降($F = 109.59$, $P < 0.05$,图 4)。生物信息学方法分析 TCGA 数据库显示,乳腺癌中 Her2 基因与 METTL3、METTL14、METTL16、FTO、YTHDF1、YTHDF2 基因表达之间存在相关性(图 5)。qPCR 和 Western blot 结果显示曲妥珠单抗处理 4、8 d 的 BT474 及经曲妥珠单抗处理 8 d 的 BT474/TR 相较于对照组,去甲基酶 FTO 表达量逐渐增加($F = 71.48、100.36$, $P < 0.05$),甲基转移酶 METTL3 表达量未见明显变化(图 6)。

2.3 MA2 和 HuA21 联合作用可增强 BT474/TR

对曲妥珠单抗的敏感性 CCK-8 检测不同浓度的 FTO 抑制剂 MA2 预处理对 BT474/TR 细胞促增殖作用,如图 7 所示,10 μ mol/L 浓度的 MA2 对 BT474/TR 细胞增殖作用最强($F = 72.73$, $P < 0.05$)。

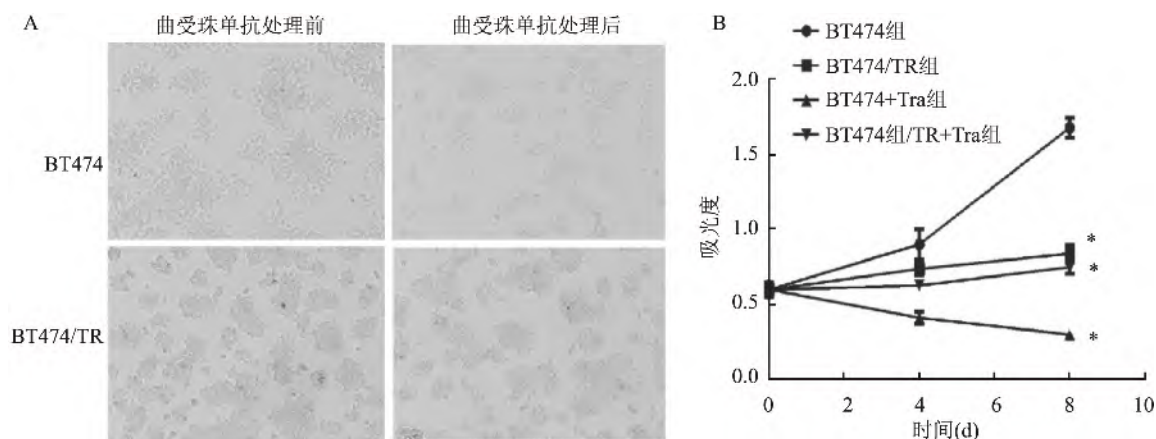


图1 BT474 和 BT474/TR 细胞形态和增殖速度比较 ×40

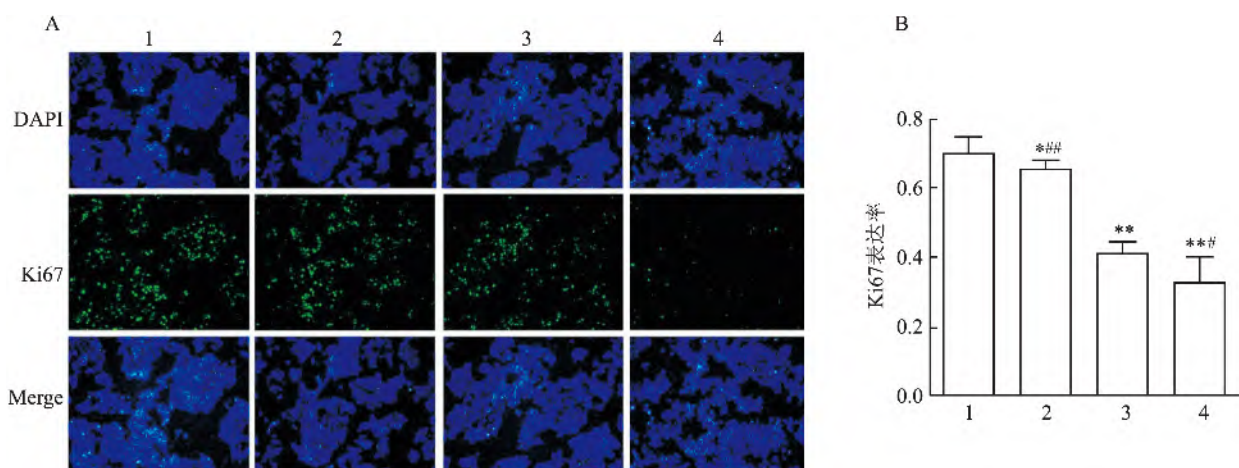
A: 细胞形态; B: CCK-8 实验检测敏感株和耐药株对曲受珠单抗的耐受性; 与 BT474 组比较: * $P < 0.05$ 

图2 免疫荧光检测细胞增殖因子 Ki67 变化 ×40

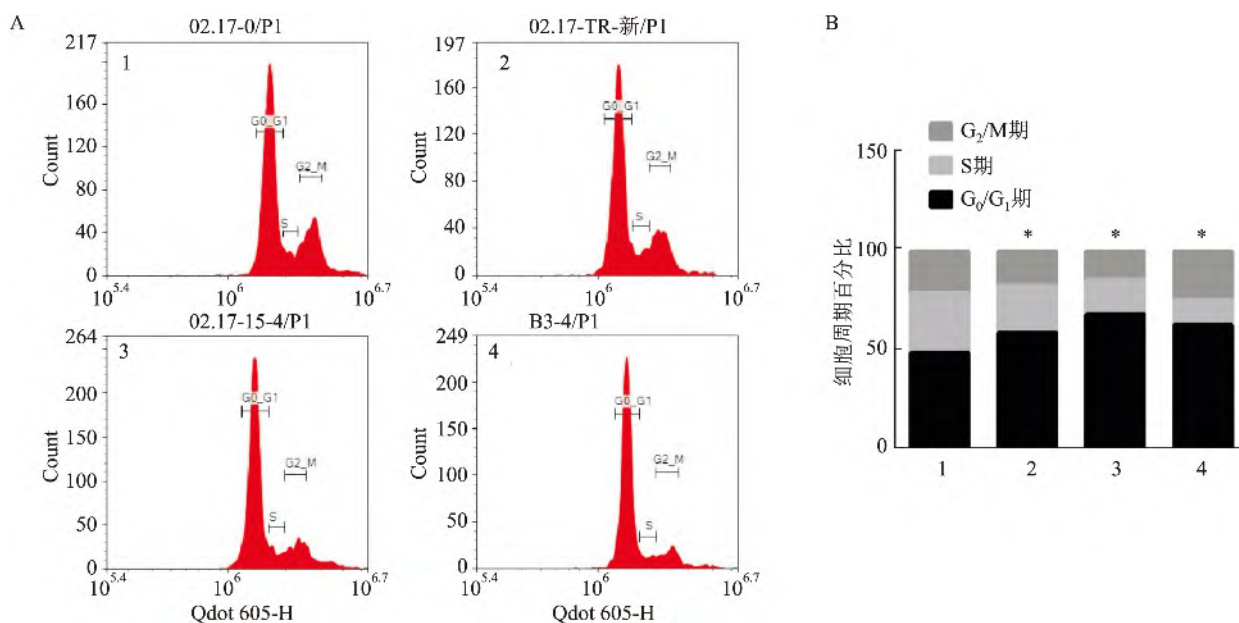
A: 不同处理条件下 Ki67 表达情况; B: 不同处理条件下 Ki67 表达量; 1: BT474 + Tra 0 d 组; 2: BT474 + Tra 4 d 组; 3: BT474 + Tra 8 d 组; 4: BT474/TR + Tra 8 d 组; 与 BT474 + Tra 0 d 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 BT474/TR + Tra 8 d 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 

图3 流式检测细胞周期变化

A: 不同处理条件下细胞周期情况; B: 不同处理条件下细胞周期内比例直方图; 1: BT474 + Tra 0 d 组; 2: BT474 + Tra 4 d 组; 3: BT474 + Tra 8 d 组; 4: BT474/TR + Tra 8 d 组; 与 BT474 + Tra 0 d 组比较: * $P < 0.05$

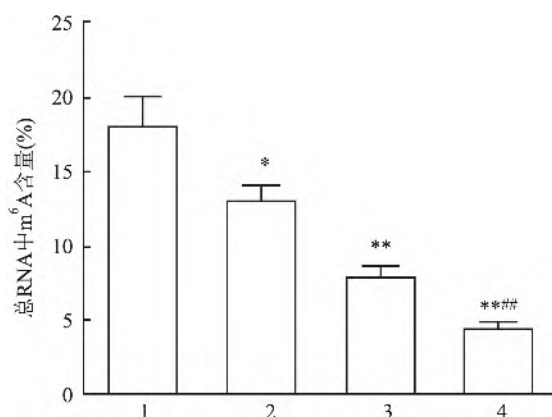


图4 m⁶A 甲基化测定试剂盒检测 RNA 总 m⁶A 含量

1: BT474 + Tra 0 d 组; 2: BT474 + Tra 2 d 组; 3: BT474 + Tra 4 d 组; 4: BT474/TR + Tra 4 d 组; 与 BT474 + Tra 0 d 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 BT474 + Tra 2 d 组比较: *** $P < 0.01$

经 MA2 预处理的 BT474/TR 对曲妥珠单抗的敏感性增加 ($F = 164.90$, $P < 0.05$) , 同时在 MA2 预处理的基础上联合使用曲妥珠单抗和 HuA21 较单独使用曲妥珠单抗对耐药株的抑生长作用更好 ($F = 30.72$, $P < 0.05$) 。

3 讨论

针对人 HER2 阳性的乳腺癌类型 , 目前一线治疗方案是曲妥珠单抗联合化疗 , 但是一部分患者在接受曲妥珠单抗治疗初期显示无效或是在治疗期内逐渐产生耐药现象 , 使 HER2 阳性乳腺癌的治疗遭遇了瓶颈。研究^[8]报道 HER2 阳性乳腺癌对曲妥珠单抗的耐药机制主要有曲妥珠单抗同 ErbB2 受体的

有效结合受阻、EGFR 家族受体和 IGF-1R 等共表达以及 PI3K-AKT 信号通路的异常活化等方面 , 但尚无相关药物进入临床使用 , 迫切需要开展新的曲妥珠单抗耐药机制的研究。

已有研究^[9-10]表明肿瘤细胞处于休眠期或者静止期会对药物治疗产生抵抗。该研究中表明人乳腺癌 HER2 阳性细胞 BT474 在转变为曲妥珠单抗耐药株的过程中 , 细胞形态发生显著变化 , 细胞周期停顿在 S 期 , 细胞增殖相关因子 Ki67 表达下降 , 曲妥珠单抗对肿瘤细胞的增殖抑制作用减弱 , 提示耐药株处于一种生长增殖不活跃的休眠状态 , 改变耐药株的这种休眠状态 , 恢复对曲妥珠单抗的敏感性是解决 BT474/TR 耐药性问题的关键。近年来大量的研究证实 m⁶A 甲基化在肿瘤发生发展与化疗耐药等方面发挥着重要的作用^[11-14] , 该研究表明 , 敏感细胞株 BT474 在接受曲妥珠单抗处理至转变成曲妥珠单抗耐药株 BT474/TR 过程中 , 总 mRNA 的 m⁶A 甲基化水平逐渐下降 , 去甲基酶 FTO 表达量逐渐增加 , 甲基转移酶 METTL3 表达量未见明显变化。使用去甲基酶 FTO 抑制剂 MA2 抑制 BT474/TR 细胞 FTO 蛋白活性后 , 结果显示耐药株对曲妥珠单抗的敏感性增加。

HuA21 是该课题组自主研发的一种新型抗 HER2 人源化单克隆抗体 , 识别的是 HER2 胞外域的 I 区的识别表位 , 有别于曲妥珠单抗结合胞外域的 IV 区的表位 , 这就为曲妥珠单抗和 HuA21 联合使用增强对肿瘤细胞的杀伤作用提供了结构基础 ,

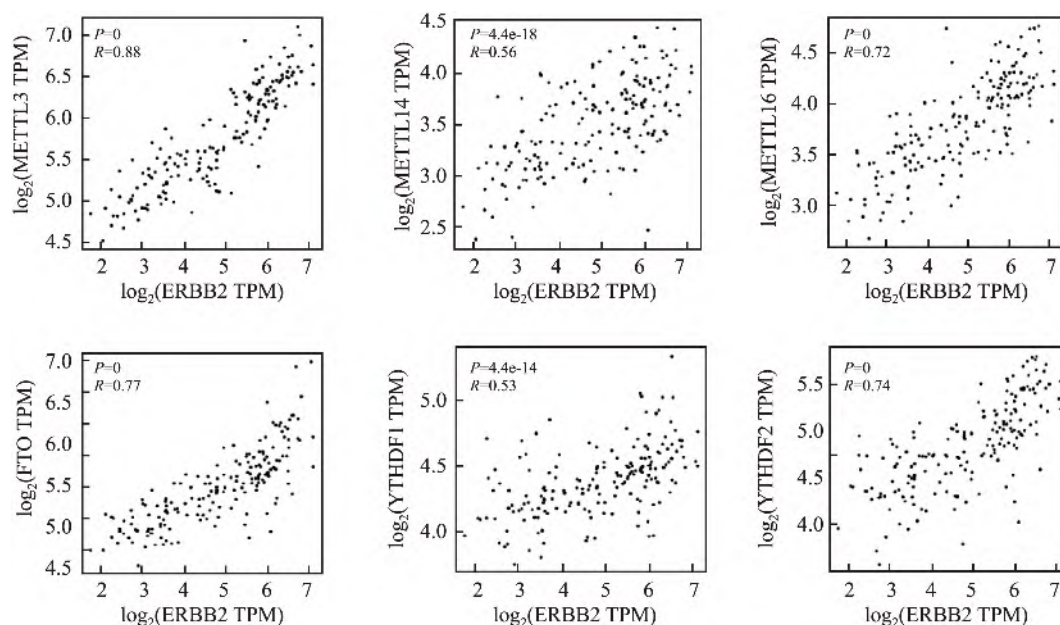


图5 HER2 与 m⁶A 甲基化相关酶表达之间的相关性分析

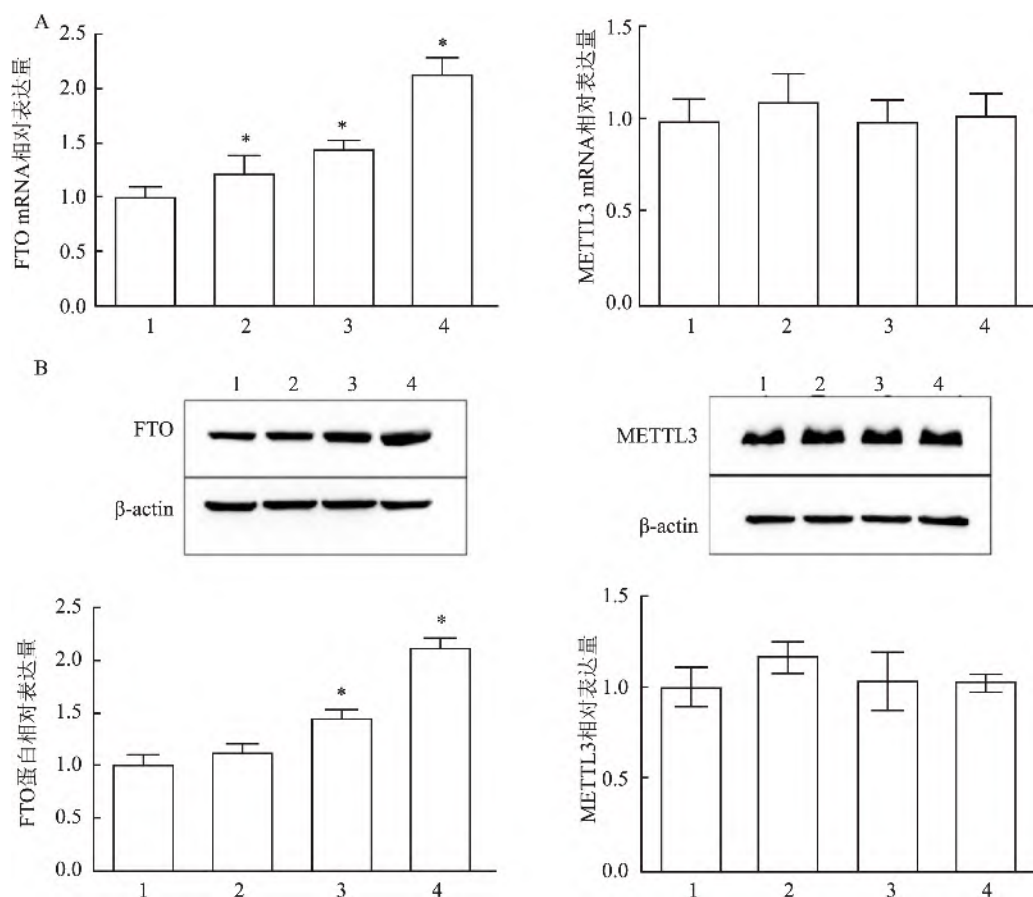


图6 qPCR和Western blot实验检测FTO和METTL3表达

A: qPCR检测FTO和METTL3 mRNA表达; B: Western blot检测FTO和METTL3蛋白表达; 1: BT474 + Tra 0 d组; 2: BT474 + Tra 4 d组; 3: BT474 + Tra 8 d组; 4: BT474/TR + Tra 8 d组; 与BT474 + Tra 0 d组比较: * $P < 0.05$

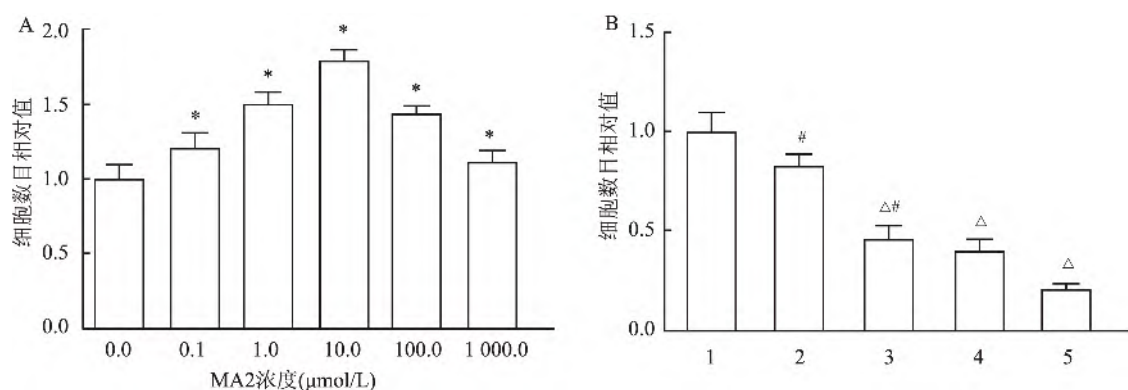


图7 HuA21与MA2减弱BT474/TR细胞对曲妥珠单抗的耐药性

A: 不同浓度MA2对BT474/TR的促增殖作用; B: 不同处理条件下BT474/TR对曲妥珠单抗敏感性的改变; 1: Control组; 2: Tra组; 3: HuA21组; 4: MA2 + Tra组; 5: MA2 + Tra + HuA21组; 与MA2 0.0 μmol/L组比较: * $P < 0.05$; 与Control组比较: $\Delta P < 0.05$; 与MA2 + Tra + HuA21组比较: # $P < 0.05$

在应用FTO抑制剂MA2预处理以增加耐药株BT474/TR的 m^6A 甲基化程度基础上联合使用抗HER2抗体HuA21和曲妥珠单抗可加强对肿瘤细胞的杀伤作用。

综上所述,抑制人乳腺癌HER2阳性耐药曲妥珠单抗细胞BT474/TR的去甲基酶FTO活性,增加

m^6A 甲基化程度,可改善BT474/TR对曲妥珠单抗的耐药作用。联合使用抗HER2抗体HuA21和曲妥珠单抗可加强对肿瘤细胞的杀伤作用。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics

- 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209–49.
- [2] Liu Y, Wang R, Zhang L, et al. The lipid metabolism gene FTO influences breast cancer cell energy metabolism via the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Oncology letters*, 2017, 13(6): 4685–90.
- [3] Niu Y, Lin Z, Wan A, et al. RNA N6-methyladenosine demethylase FTO promotes breast tumor progression through inhibiting BNIP3 [J]. *Molecular cancer*, 2019, 18(1): 46.
- [4] Li J, Han Y, Zhang H, et al. The m⁶A demethylase FTO promotes the growth of lung cancer cells by regulating the m⁶A level of USP7 mRNA [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 512(3): 479–85.
- [5] Stratigopoulos G, Padilla S L, Leduc C A, et al. Regulation of fto/ftm gene expression in mice and humans [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008, 294(4): R1185–96.
- [6] Ding K, Wu Z, Li X, et al. LMO4 mediates trastuzumab resistance in HER2 positive breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(4): 594–609.
- [7] 刘芬芬, 高倩, 程民. 人表皮生长因子受体2与wnt/β-catenin信号相互作用促进卵巢癌细胞转移 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(3): 331–8.
- [8] Thill M. New Frontiers in oncology: biosimilar monoclonal antibodies for the treatment of breast cancer [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2015, 15(3): 331–8.
- [9] Kurppak J, Liu Y, To C, et al. Treatment-induced tumor dormancy through YAP-mediated transcriptional reprogramming of the apoptotic pathway [J]. *Cancer Cell*, 2020, 37(1): 104–22, e12.
- [10] Lan Q, Peyvandi S, Duffey N, et al. Type I interferon/IRF7 axis instigates chemotherapy-induced immunological dormancy in breast cancer [J]. *Oncogene*, 2019, 38(15): 2814–29.
- [11] Li J, Han Y, Zhang H, et al. The m⁶A demethylase FTO promotes the growth of lung cancer cells by regulating the m⁶A level of USP7 mRNA [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 512(3): 479–85.
- [12] Huang H, Weng H, Chen J. m⁶A Modification in coding and non-coding RNAs: roles and therapeutic implications in cancer [J]. *Cancer Cell*, 2020, 37(3): 270–88.
- [13] Ma S, Chen C, Ji X, et al. The interplay between m⁶A RNA methylation and noncoding RNA in cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 121.
- [14] An S, Huang W, Huang X, et al. Integrative network analysis identifies cell-specific trans regulators of m⁶A [J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(4): 1715–29.

m⁶A demethylase FTO promotes the resistance of HER2-positive breast cancer cell to trastuzumab

Ji Lindi^{1 2}, Xu Tingjuan^{1 2}, Yin Wu^{1 2}, et al

(¹Dept of Geriatrics, Anhui Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Hefei 230001;

²Gerontology Institute of Anhui Province, Anhui Provincial Key Laboratory of Tumor Immunotherapy and Nutrition Therapy, Hefei 230001)

Abstract Objective To explore the role of m⁶A demethylase FTO in the resistance of breast cancer cell to trastuzumab and the effect of the new anti-HER2 antibody HuA21 on the proliferation of drug-resistant breast cancer cell.

Methods Trastuzumab-resistant cell line BT474/TR was prepared. The morphology of BT474/TR and BT474 cells were observed under optical microscope. MTT, immunofluorescence and flow cytometry were used to detect cell proliferation, the expression of proliferation-related antigen Ki67 and cell cycle. qPCR and Western blot methods were used to determine the expression of m⁶A-related enzymes FTO and METTL3. **Results** BT474/TR showed pyknosis of the nucleus, the pseudopodia disappeared, and the cell proliferation rate decreased. As BT474 transited to BT474/TR with trastuzumab treatment, Ki67 expression and S phase cell proportion gradually decreased ($P < 0.05$), and FTO expression gradually increased ($P < 0.05$). However, there was no difference in METTL3 expression. The FTO inhibitor MA2 promoted the BT474/TR proliferation and increased its sensitivity to trastuzumab treatment ($P < 0.05$). HuA21 antibody had an inhibitory effect on the proliferation of BT474/TR cells ($P < 0.05$), and the combination of MA2 and trastuzumab had a better inhibitory effect on BT474/TR cells ($P < 0.05$). **Conclusion** There is a correlation between the resistance of HER2-positive breast cancer cell to trastuzumab and FTO gene expression and the inhibition of FTO activity can enhance the sensitivity of drug-resistant cells to trastuzumab treatment. Moreover, HuA21 antibody has an inhibitory effect on the proliferation of BT474/TR cells.

Key words breast cancer; HER2; trastuzumab; m⁶A; HuA21