

网络出版时间: 2018-8-2 09:39 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180731.1310.002.html>

D896N 突变型 EGFR 稳转细胞株的构建及其对吉非替尼敏感性的研究

潘婧¹, 彭佳², 潘跃银¹

摘要 目的 构建携带 D896N 突变型 EGFR 基因的重组质粒, 转染 Ba/F3 细胞后对其的表达及对吉非替尼的敏感性进行研究。方法 PCR 构建重组质粒 MSCV-Tel-EGFR D896N, 与 2 种辅助质粒 MLV 和 VSVG 共转染 293T 细胞包装产生慢病毒, 对 Ba/F3 细胞进行转染。Puromycin 筛选后, Western blot 检测 EGFR 及 p-EGFR 的表达; 撤除 IL-3 培养观察细胞是否正常增殖; Western blot 检测并比较 Ba/F3-Tel-EGFR L858R、Ba/F3-Tel-EGFR D896N 对于吉非替尼的敏感性。结果 酶切及测序验证重组质粒构建无误, Western blot 检测转染后的 Ba/F3 细胞中 EGFR 及 p-EGFR 有表达, 撤除 IL-3 后细胞无法正常增殖, 吉非替尼作用后 p-EGFR 明显下降。结论 成功构建了表达 D896N 突变型 EGFR 的 Ba/F3 细胞株, 初步判断该位点并非驱动基因, 但是对吉非替尼有一定敏感性。

关键词 非小细胞肺癌; EGFR 突变; 稳定转染

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)09-1327-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.09.002

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是一种多结构域的跨膜酪氨酸激酶受体,由胞外配位区、跨膜区以及在胞内带有调控羧基末端的酪氨酸激酶区组成。EGFR 激活后可以激活其下游多种信号通路,在细胞的增殖、分化以及血管形成等方面发挥重要作用^[1]。EGFR 突变与多种肿瘤的发生发展相关,研究^[2]表明,约 40% 的非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者携带 EGFR 的阳性突变。EGFR 酪氨酸激酶抑制剂(EGFR tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKI)在 EGFR 突变阳性患者中的治疗效果显著^[3]。第一代 EGFR-TKI(代表药物为吉非替尼、厄罗替尼)通过结合 EGFR 酪氨酸激酶,阻断 EGFR 的活化及下游信

号传导从而发挥作用^[4]。虽然有相当一部分 EGFR 阳性突变的 NSCLC 患者靶向治疗疗效良好,但是,并不是所有 EGFR 激酶区的突变都有驱动作用或是对药物敏感^[5]。在临床工作中,一位 NSCLC 患者的淋巴组织中检测到了 EGFR 罕见突变 D896N。根据 NCBI 上 EGFR 基因的序列, D896N 是 EGFR 的酪氨酸激酶功能区(EGFR 的 18~24 外显子为酪氨酸激酶功能区)第 896 位密码子的点突变,导致天冬氨酸变为天冬酰胺。该患者在检测出突变位点后,采取厄罗替尼治疗,经检查淋巴结有缩小。该位点至今尚无相关报道,意义不明,因此需要通过构建新的细胞株实验来判断该位点 EGFR 突变对于药物的敏感性。

1 材料与方法

1.1 材料 Tel-EGFR N 端质粒、C 端质粒、MLV、VSVG 四种质粒和 293T 细胞、Ba/F3 细胞、宿主菌 DH5 α 均由中国科学院合肥物质研究院强磁场中心刘青松实验室保存,其中 N 端质粒为包含有 Tel 基因及野生型 EGFR N 端部分序列的 MSCV 质粒, C 端质粒则为野生型 EGFR 的 C 端部分序列。293T 细胞培养于含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, Ba/F3 细胞培养于含有 10% 胎牛血清、10 ng/ml IL-3、100 U/ml 链霉素和 100 U/ml 青霉素的 RPMI 1640 培养基中。

1.2 主要试剂 限制性内切酶 EcoR I、BamH I, PCR 用 DNA 聚合酶 Prime Star 和蛋白质预染 Marker, 核酸提取纯化试剂盒(美国 Thermo 公司); 转染试剂 TransIn EL, Polybrene(美国 Sigma 公司); Opti-MEM(Minimal Essential Medium)(美国 Gibco 公司); 兔抗 EGFR 抗体、兔抗 p-EGFR 抗体、鼠抗 β -actin、兔二抗、鼠二抗(美国 CST 公司);

1.3 MSCV-Tel-EGFR D896N 重组质粒构建及鉴定

1.3.1 PCR 获得 D896N 点突变的 Tel-EGFR 序列 根据 NCBI 上 EGFR 基因的序列,进行引物设计。上游引物: 5'-TATACCCACCAGAGTAACGTCTG-GAGCTACGGG-3', 下游引物: 5'-CCCGTAGCTC-

2018-06-20 接收

基金项目: 安徽省卫生计生委中医药科研课题(编号: 2016zy29)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院肿瘤科, 合肥 230022

² 安徽医科大学第三附属医院干部病房, 合肥 230061

作者简介: 潘婧, 女, 硕士研究生;

潘跃银, 男, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: yu-eyinpan@gmail.com

CAGACGTTACTCTGGTGGGTATA-3'。模板为已有的 Tel-EGFR C 端质粒,普通 PCR 进行点突变。PCR 反应体系总共 20 μ l,包括 Tel-EGFR C 端质粒模板 0.5 μ l,上下游引物各 0.5 μ l,PrimeStar 10 μ l,ddH₂O 8.5 μ l。PCR 反应体系:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min、95 $^{\circ}$ C 变性 30 s、61 $^{\circ}$ C 退火 20 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 70 s,此过程共 25 个循环;之后 72 $^{\circ}$ C 5 min。产物经 1% 琼脂糖电泳,验证后普通 PCR 将突变前后序列连接,以前述所得突变位点前后序列为模板。PCR 反应体系总共 20 μ l,包括稀释模板 0.5 μ l,上下游引物各 0.5 μ l,Prime Star 10 μ l,ddH₂O 8.5 μ l。PCR 反应体系:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min、95 $^{\circ}$ C 变性 30 s、61 $^{\circ}$ C 退火 20 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,此过程共 5 个循环;之后 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s、72 $^{\circ}$ C 退火 20 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min;最后 72 $^{\circ}$ C 5 min。产物经 1% 琼脂糖电泳,验证后纯化。

1.3.2 质粒的重组与鉴定 用限制性内切酶 EcoR I 和 BamH I 双酶切带有 Tel-EGFR N 端序列的载体,于 37 $^{\circ}$ C 酶切 2 h 后纯化。将产物及前述步骤纯化所得产物经 1% 琼脂糖电泳,验证后以 1:1 的比例进行 PCR 连接重组。重组体系共 10 μ l,包括前述所得产物各 3.5 μ l,重组酶 1 μ l,5 $\times$ CE Buffer 2 μ l,于 PCR 仪中 37 $^{\circ}$ C 30 min。重组质粒构建后,宿主菌 DH5 α 感受态细胞进行转化,均匀涂布于含有氨苄青霉素的固体培养基表面,37 $^{\circ}$ C 培养 18~24 h 后挑取阳性克隆,置于 37 $^{\circ}$ C 温箱摇床,摇菌过夜后,质粒抽提,37 $^{\circ}$ C 下酶切验证,之后测序鉴定。

1.4 构建稳定转染的细胞株

1.4.1 慢病毒的包装 转染前将 293T 细胞调整密度为 2×10^5 /ml 加入 6 孔板中培养,次日观察细胞密度达到 80% 时进行转染。慢病毒包装过程如下:1.5 ml 离心管中加入 250 μ l Opti-MEM 培养基,依次加入重组质粒 2 μ g, VSVG 0.5 μ g, MLV 0.5 μ g,轻柔震荡混匀后加入 TransIn EL 9 μ l,再次轻柔震荡混匀后室温静置 20 min,形成复合物。静置期间 6 孔板换液。20 min 后将复合物均匀加入到 6 孔板中,轻微摇晃 6 孔板使复合物分布均匀。将细胞置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中培养 48 h 后,收集上清液,经 0.45 μ m 针式过滤器过滤后获得病毒液,4 $^{\circ}$ C 冷藏待用。

1.4.2 病毒转染 Ba/F3 细胞 细胞计数后取约 1×10^6 个细胞,离心后弃去上清液,用包装好的病毒液将细胞重悬,加入浓度 0.1% 的 Polybrene,2 300 r/min 离心 90 min,离心结束后移入 6 孔板。对照孔中铺 1×10^6 个 Ba/F3 细胞,普通培养液培养。将细

胞置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中培养 48 h 后,换液,两孔均换为含有 0.1% Puromycin 的普通培养液培养,进行抗生素筛选,48 h 后观察细胞。

1.4.3 Western blot 法检测 EGFR 及 p-EGFR 蛋白的表达 将转染了 D896N 突变型 EGFR 质粒的 Ba/F3 细胞裂解,离心后取蛋白上清液,制样。浓缩胶 120 V 电泳 30 min 后,分离胶 80 V 电泳 1 h,100 V 恒压转膜,5% 浓度的脱脂牛奶封闭 1 h,以 EGFR、p-EGFR 抗体为一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日 TBST 洗膜 3 遍,加兔二抗,室温孵育 1 h,再次 TBST 洗膜 3 遍后曝光显影。

1.4.4 观察撤除培养基中 IL-3 后对细胞的影响 将 Ba/F3-Tel-EGFR D896N 细胞培养液中的 IL-3 浓度每隔 48 h 按 1:2 的梯度降低,直至撤除 IL-3。以不加 IL-3 培养的 Ba/F3-Tel-EGFR L858R 细胞为对照,观察细胞生长情况。

1.4.5 Western blot 法检测药物对磷酸化影响 Ba/F3-Tel-EGFR D896N 和 Ba/F3-Tel-EGFR L858R 细胞计数后,各取 1×10^6 个/孔 6 孔板铺板,均加入吉非替尼,浓度梯度设置为 0、50、100、250、500、1 000 nmol/L。加药后将细胞置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中培养 0.5 h 后,收集细胞裂解,离心后收集蛋白上清液,制样。浓缩胶 120 V 电泳 30 min 后,分离胶 80 V 电泳 1 h,100 V 恒压转膜,5% 浓度的脱脂牛奶封闭 1 h,以 EGFR、p-EGFR 抗体为一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日 TBST 洗膜 3 遍,加兔二抗,室温孵育 1 h,再次 TBST 洗膜 3 遍后曝光显影。ImageJ 处理条带后,通过 GraphPad 计算获得各组半数抑制浓度(50% inhibitory concentration, IC₅₀) 值。

1.5 统计学处理 所有实验独立重复 3 次,采用 SPSS 16.0 软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组慢病毒载体构建与鉴定 酶切验证后对重组质粒进行测序,并与 NCBI 基因库中的 EGFR 基因序列比对,突变位点正确无误,质粒构建成功(图 1)。

2.2 Ba/F3-Tel-EGFR D896N 细胞株构建与验证 提取总蛋白,Western blot 结果显示稳定转染的细胞中有明显的 EGFR 及 p-EGFR 蛋白的表达,对照组 Ba/F3 细胞中则无 EGFR 及 p-EGFR 蛋白的表达,Ba/F3-Tel-EGFR D896N 细胞株转染构建成功

(图2)。

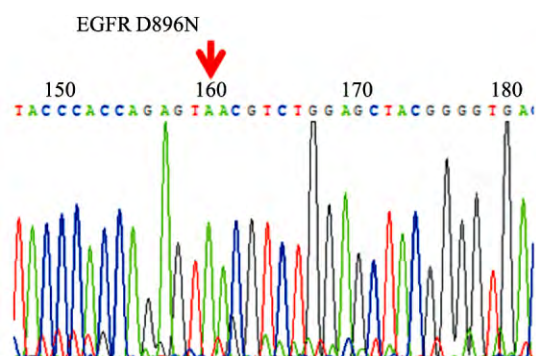


图1 重组质粒点突变测序报告

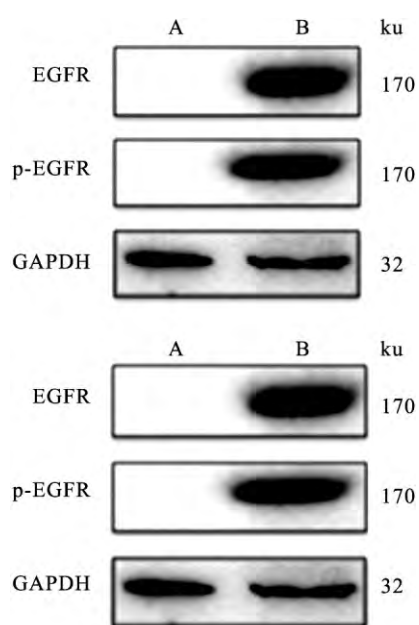


图2 Western blot 检测稳转细胞内 EGFR 和 P-EGFR 的表达

A: 对照组 Ba/F3 细胞中 EGFR、P-EGFR 蛋白的表达; B: Ba/F3-Tel-EGFR D896N 细胞中 EGFR、P-EGFR 蛋白的表达

2.3 撤除 IL-3 培养 Ba/F3-Tel-EGFRL858R 及 Ba/F3-Tel-EGFRD896N 细胞 撤除 IL-3 后 Ba/F3-Tel-EGFR D896N 细胞无法正常生长,而对照组 Ba/F3-Tel-EGFR L858R 在不含 IL-3 的培养液中依然正常生长(图3)。

2.4 吉非替尼处理后 Ba/F3-Tel-EGFR L858R 和 Ba/F3-Tel-EGFR D896N 细胞中 p-EGFR 的表达

按梯度将浓度为 0、50、100、250、500、1 000 nmol/L 的吉非替尼依次加入培养基对细胞进行处理后,两种细胞中 EGFR 磷酸化程度均随吉非替尼浓度增高逐渐降低(图4)。用 ImageJ 处理后,通过 Graph-Pad 计算获得各组 IC_{50} 值,吉非替尼对 Ba/F3-Tel-

EGFR L858R 和 Ba/F3-Tel-EGFR D896N 的 IC_{50} 值分别为 60.29 nmol/L 和 48.03 nmol/L,差异无统计学意义($P=0.076$)。见图5。

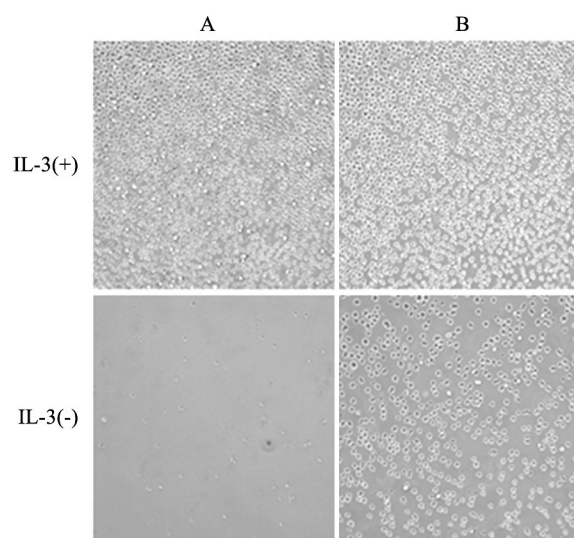


图3 光学显微镜观察细胞撤除 IL-3 后的生长情况 $\times 100$

A: Ba/F3-Tel-EGFR D896N 细胞 IL-3 培养及撤除 IL-3 培养后 4 d 细胞生长变化; B: Ba/F3-Tel-EGFR L858R 细胞 IL-3 培养及撤除 IL-3 培养后 4 d 细胞生长变化

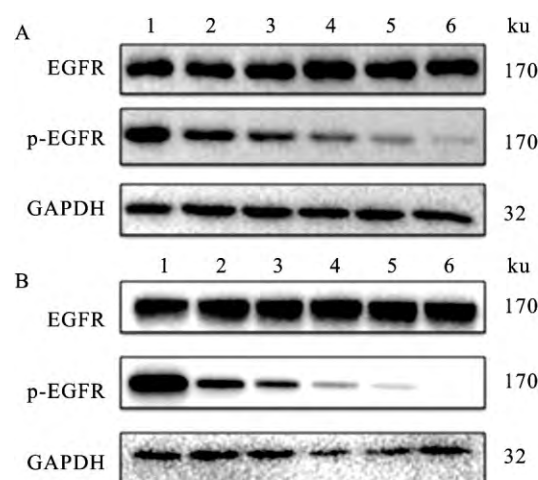


图4 Western blot 检测吉非替尼处理后 Ba/F3-Tel-EGFR L858R 和 Ba/F3-Tel-EGFR D896N 细胞中 P-EGFR 的表达

A: Ba/F3-Tel-EGFR L858R 细胞中 EGFR 磷酸化程度随吉非替尼浓度增高发生的变化; B: Ba/F3-Tel-EGFR D896N 细胞中 EGFR 磷酸化程度随吉非替尼浓度增高发生的变化; 1: 0 nmol/L; 2: 50 nmol/L; 3: 100 nmol/L; 4: 250 nmol/L; 5: 500 nmol/L; 6: 1 000 nmol/L

3 讨论

与传统的脂质体相比,慢病毒载体需要和辅助质粒共转染进行病毒包装后来感染宿主细胞,以达

到实验目的。尽管操作上相对复杂,但是慢病毒转染可将目的基因整合至细胞的染色体 DNA 中,从而使细胞株长期稳定地表达目的蛋白^[6]。本实验选用的 Ba/F3 细胞,是一种小鼠 B 淋巴细胞^[7]。选用该细胞,一是由于受体酪氨酸激酶途径在该细胞系中几乎不存在,因此为实验转染突变型 EGFR,构建稳定转染的细胞株提供了一个纯净的背景;二是由于其正常的生长和增殖需要依赖一定浓度的 IL-3,便于比较其生长和增殖条件的变化^[8]。

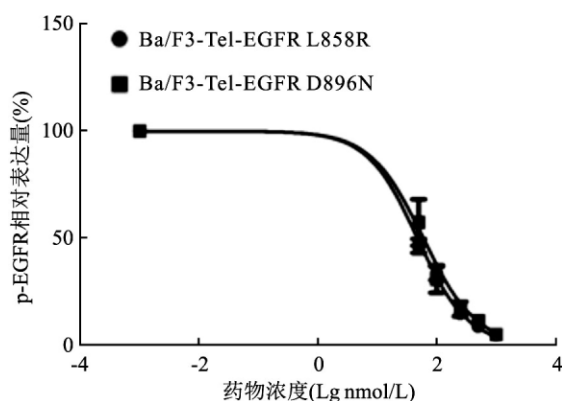


图5 Ba/F3-Tel-EGFR L858R 细胞和 Ba/F3-Tel-EGFR D896N 细胞对于吉非替尼敏感性曲线图

EGFR 为胞膜上的受体,与配体结合后二聚化,从而磷酸化激活下游通路,在细胞的增殖、迁移以及血管生成等方面发挥重要作用。在不存在酪氨酸激酶系统的 Ba/F3 细胞中,即使通过转染使其携带野生型的 EGFR,因为没有 EGF 等配体的刺激,细胞中的 EGFR 即使成功表达也无法被激活,细胞仍然需要依赖 IL-3 才能正常生长。在肺癌患者中常见的 EGFR 突变主要有 19 外显子的缺失突变和 21 外显子上的 L858R 突变^[9]。突变可使 EGFR 在不依赖配体的情况下发生自我磷酸化激活下游通路。将此类突变型的 EGFR 转入 Ba/F3 细胞,即使细胞内不存在使其发生二聚的配体,因其突变可使 EGFR 发生自我磷酸化,从而激活下游的信号通路^[10]。因此携带突变型 EGFR 的 BA/F3 细胞在撤除 IL-3 后,仍能依赖 EGFR 及其下游通路正常生长增殖。

TEL 全长约 300 kb,是一段与白血病发生相关的基因^[11]。将其插入带有 EGFR 序列的载体克隆得 Tel-EGFR,转染 Ba/F3 细胞并表达,EGFR 可在不依赖配体的情况下转化为二聚体从而激活下游通路。Wang et al^[12] 已经用这种方法成功完成了一些

突变型 EGFR 相关的实验。Tel 基因可使 EGFR 在不需要配体的情况下发生磷酸化,激活下游通路,从而使 Ba/F3 细胞在不依赖 IL-3 的情况下仍然正常生长。因此通过这种方法构建携带不同突变型 EGFR 的细胞株,比较不同细胞株中的 EGFR 磷酸化程度。本实验即以此方法成功构建质粒,转染 Ba/F3 细胞。从结果来看,Western blot 检测到 Ba/F3-Tel-EGFR D896N 细胞中表达的 EGFR 及 p-EGFR 蛋白,证明细胞内 EGFR 已成功表达并有明显的磷酸化发生,但是细胞在撤除 IL-3 后无法维持正常的生长。研究^[13]表明,EGFR 含有 28 个外显子,其中,18~24 外显子编码酪氨酸激酶功能区。根据 NCBI 上的 EGFR 序列查询,D896N 位于 EGFR 的 22 外显子,属于酪氨酸激酶功能区。因此,可以合理地猜测,该突变并非驱动突变,相反地,甚至在一定程度上破坏了 EGFR 的功能,虽然 EGFR 仍然能够发生磷酸化,已然不足以维持细胞的正常生长。

氨基端小叶(N-lobe,由 18~20 外显子编码), α C 螺旋及羧基端小叶(C-lobe,由 21~24 外显子编码)是 EGFR 的酪氨酸激酶激活区内的 3 个重要结构。存在于羧基端小叶内的活化环(A-loop),被证实是酪氨酸激酶的活化中心。DFG 序列位于 A-loop 的起始端,具有高度保守性。DCF 序列发生改变会对激酶的活性产生一定影响。常见的 L858R 突变位于 DFG 序列后一位,研究^[14]证实该突变增加了 A-loop 的稳定性,从而使 EGFR 对 EGFR-TKI 的敏感性增加。Western blot 结果表明,Ba/F3-Tel-EGFR D896N 在吉非替尼的刺激下 EGFR 磷酸化程度明显降低。而 D896N 位于 EGFR 的 22 外显子,即与 L858R 同样位于羧基端小叶。由此可以推测,D896N 突变改变了激酶的活性,使 EGFR 对吉非替尼的敏感性增加。

由于构建的 Ba/F3-Tel-EGFR D896N 细胞无法在撤除 IL-3 的培养液中正常生长,故无法进行增殖及凋亡实验来与 Ba/F3-Tel-EGFR L858R 细胞对照研究,仅能依靠 EGFR 的磷酸化情况进行初步推测,还需结合临床及动物实验进一步探究考证。

参考文献

- Jaeger F, Assunção A C, Caldeira P C, et al. Is salivary epidermal growth factor a biomarker for oral leukoplakia? A preliminary study [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2015, 119(4): 451-8.

- [2] Pao W, Chmielecki J. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(11):760–74.
- [3] Rossi A, Sacco P C, Santabarbara G, et al. Developments in pharmacotherapy for treating metastatic non-small cell lung cancer [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2017, 18(2):151–63.
- [4] Inoue A, Kobayashi K, Maemondo M, et al. Updated overall survival results from a randomized phase III trial comparing gefitinib with carboplatin-paclitaxel for chemo-naïve non-small cell lung cancer with sensitive EGFR gene mutations (NEJ002) [J]. *Ann Oncol*, 2013, 24(1):54–9.
- [5] Yoshihisa K, Tetsuya M. Not all epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer are created equal: perspectives for individualized treatment strategy [J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(9):1179–86.
- [6] Durand S, Cimorelli A. The inside out of lentiviral vectors [J]. *Viruses*, 2011, 3(2):132–59.
- [7] 术凌飞,李 国,詹铁群,等. Tpr-Met 转化的 Ba/F3 稳定株的构建 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(11):1151–3.
- [8] Warmuth M, Kim S, Gu X J, et al. Ba/F3 cells and their use in kinase drug discovery [J]. *Curr Opin Oncol*, 2007, 19(1):55–60.
- [9] Zhang Y, Sheng J, Kang S, et al. Patients with Exon 19 deletion were associated with longer progression-free survival compared to those with L858R mutation after first-line EGFR-TKIs for advanced non-small cell lung cancer: a meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9):25–8.
- [10] Yun C H, Boggon T J, Li Y, et al. Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity [J]. *Cancer Cell*, 2007, 11(3):217–27.
- [11] Zhou M H, Gao L, Jing Y, et al. Detection of ETV6 gene rearrangements in adult acute lymphoblastic leukemia [J]. *Ann Hematol*, 2012, 91(8):1235–43.
- [12] Wang A, Yan X E, Wu H, et al. Ibrutinib targets mutant-EGFR kinase with a distinct binding conformation [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(43):69760–9.
- [13] James K A, Verkhivker G M. Structure-based network analysis of activation mechanisms in the ErbB family of receptor tyrosine kinases: the regulatory spine residues are global mediators of structural stability and allosteric interactions [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11):e113488.
- [14] Hasenahuer M A, Barletta G P, Fernandez-Alberti S, et al. Pockets as structural descriptors of EGFR kinase conformations [J]. *PLoS One*, 2017, 12(12):e0189147.

The study of constructing the cell carrying EGFR D896N mutation and its sensitivity to gefitinib

Pan Jing¹, Peng Jia², Pan Yueyin¹

(¹Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Cadres Ward, The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230061)

Abstract Objective To construct a lentiviral vector carrying D896N mutant EGFR gene and to study its expression in BA/F3 cells. **Methods** PCR was used to construct the recombinant plasmid MSCV-Tel-EGFR D896N. Recombinant plasmid MSCV-Tel-EGFR D896N and two helper plasmids MLV and VSVG were co-transfected into 293T cells to produce lentivirus, which was used to transfect BA/F3 cells. After antibiotic screening, the expression of EGFR and p-EGFR were detected by Western blot, and observed whether cell proliferation was normal after removing IL-3. Western blot was used to compare the sensitivity of BA/F3-Tel-EGFR L858R and BA/F3-Tel-EGFR D896N to gefitinib. **Results** Enzyme digestion and sequencing confirmed that lentiviral vector was constructed correctly. Western blot showed that EGFR and p-EGFR were expressed in the transfected BA/F3 cells. After IL-3 was removed, the cells could not proliferate normally. The expression of p-EGFR decreased after treated with gefitinib. **Conclusion** We successfully construct the D896N mutant EGFR gene lentiviral expression vector and the BA/F3 cell line with D896N mutant EGFR. It is initially determined that this site is not a driver gene, but has some sensitivity to gefitinib.

Key words NSCLC; EGFR mutation; stable transfection