

三代 EGFR-TKI 奥希替尼(AZD9291) 耐药细胞系建立及耐药标志预测分析*

苗留飞, 杨 阳, 余柏增, 张家勋, 李晓军

(南京大学医学院附属金陵医院/东部战区总医院中心实验科, 南京 210002)

摘要:目的 建立三代表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)奥希替尼耐药细胞系(PC9-OR)并分析其耐药标志。**方法** 浓度梯度递增构建奥希替尼耐药 PC9 细胞系(PC9-OR)。利用生物信息学分析 AZD9291 耐药细胞株表达谱芯片和测序数据筛选出耐药细胞高表达基因;荧光定量 PCR 验证表达;Logistics 构建回归诊断模型并用 ROC 曲线验证其诊断效能。**结果** 成功构建 PC9-OR 耐药细胞株,对 3 组独立 PC9-OR 细胞表达谱数据生物信息分析,发现 19 个基因表达在至少两个数据集中表达上调,3 个基因在 3 个耐药细胞数据集表达均上调。荧光定量 PCR 检测 PC9-OR 细胞耐药相关基因有 11 个表达上调。Logistics 回归显示 5 个基因诊断效能较好,ROC 联合诊断模型显示曲线下面积 0.985。**结论** 构建了三代 EGFR-TKI 奥希替尼耐药细胞系 PC9-OR,发现一组基因可以作为 EGFR-TKI 耐药的标志,可能为临床及时发现 EGFR-TKI 耐药提供依据。

关键词:表皮生长因子受体;酪氨酸激酶抑制剂;非小细胞肺癌;奥希替尼(AZD9291);耐药标志

中图分类号:R734.2;R730.43 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2019)05-028-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2019.05.008

Establishment of the Third Generation of EGFR-TKI Resistant Cell Line and Resistance Gene Signature

MIAO Liu-fei, YANG Yang, YU Bai-zeng, ZHANG Jia-xun, LI Xiao-jun

(Department of Clinical Laboratory, Jinling Hospital Affiliated Nanjing University
Medical College/General Hospital of Eastern Theater Command, Nanjing 210002, China)

Abstract: **Objective** To identify molecular signature of third generation EGFR-TKI (AZD9291) acquired resistance. **Methods** AZD9291 drug-resistant PC9 cell line (PC9-OR) was established by concentration gradient increment method. AZD9291 resistance-related genes were obtained by integrated analysis of drug-resistant cell lines expression profiles from GEO database. The expressions of all genes were verified by fluorescence quantitative PCR. The diagnostic efficacy of resistant signature was verified by logistic regression and ROC curve in an independent GEO profile. **Results** PC9-OR cell line was successfully constructed. It was found that 19 genes were up-regulated in at least two independent datasets and 3 genes were up-regulated in three drug-resistant cell datasets. Eleven of them was confirmed in PC9-OR cells by fluorescence quantitative PCR. The signature of drug-resistant cells was obtained by using logistic regression. The area under ROC curve was 0.982 2 in GSE34228. **Conclusion** Constructed a cell line which was resistant to the third generation EGFR-TKI. Based on cell line- and large scale datasets, definite a resistance signature for EGFR-TKI, which may provide a basis for detection of EGFR-TKI resistance in clinical use.

Keywords: epidermal growth factor receptor(EGFR); tyrosine kinase inhibitor(TKI); non-small cell lung cancer(NSCLC); osimertinib AZD9291; drug resistance signature

肺癌位居我国恶性肿瘤发病首位^[1],约 50% 的亚洲非小细胞肺癌(non small cell lung cancer, NSCLC)患者存在表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)敏感突变^[2],EGFR 酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI)已经成为 EGFR 敏感突变阳性晚期 NSCLC 患者的一线治疗药物^[3]。长期使用 EGFR-TKI 治疗不可避

免地产生获得性耐药^[4-5]。第三代 EGFR-TKI 奥希替尼(osimertinib, AZD9291)针对 EGFR T790M 突变,被广泛用于一代 EGFR-TKI 获得性耐药后替代治疗^[6]。AZD9291 耐药机制复杂多样,未被完全明确,给临床 AZD9291 耐药后治疗策略的选择带来困难。本研究通过自主构建 AZD9291 耐药细胞系 PC9-OR,生物信息学挖掘 GEO 数据库耐药细胞表达谱数据,筛选差异表达

* 基金项目:国家临床重点专科建设项目(2014ZDZK003-1);江苏省博士后基金(2018K280C)。

作者简介:苗留飞(1994—),男,硕士,主要从事肺癌靶向药耐药标志的研究,E-mail:1939187763@qq.com。

通讯作者:李晓军,女,主任技师,博士后导师,主要从事肿瘤实验诊断研究,E-mail:xiaojunli62@126.com。

基因,构建耐药预测模型并评估其诊断效能。

1 材料与方法

1.1 实验细胞 PC9 细胞系(购自上海吉凯基因化学技术有限公司)培养于含 10 ml/dl 胎牛血清(Gibco)RPMI 1640 培养基(Gibco)中,置于 37℃, 5%(v/v)CO₂、饱和湿度培养箱进行培养。

1.2 试剂和仪器 奥希替尼(AZD9291)购自 Selleck 公司;DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司;RNA 提取(RNA isoplus)、反转录、荧光定量(SYBR Green)试剂盒购自 Takara 公司;荧光定量 PCR 仪(ABI);引物合成及 Sanger 测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.3 方法

1.3.1 PC9 细胞系验证:天根细胞 DNA 提取试剂盒提取 PC9 细胞 DNA,经相应 18,19,20,21 号外显子引物 PCR 扩增后进行 sanger 测序,与参考序列比对。

1.3.2 奥希替尼耐药 PC9 细胞系构建及细胞毒性实验:奥希替尼起始浓度 10 nmol/L,视细胞生长状况隔两周将药物浓度翻倍,约 5 个月加至 1 μ mol/L,1 μ mol/L 维持两周,CCK8 检测细胞 IC₅₀ 并计算耐药指数 RI(耐药细胞 IC₅₀/亲本细胞 IC₅₀)^[7]。

1.3.3 利用 qPCR 技术检测 PC9 和 PC9-OR:首先 RNAisoplus 提取细胞总 RNA,反转录成 cDNA 后进行 qPCR。以 GAPDH 为内参,利用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算目的基因的相对表达量。

1.3.4 数据挖掘及可能耐药基因检测:三代 EGFR-TKI 耐药细胞表达谱芯片数据 GSE106765^[8], GSE75602^[9]和测序数据 GSE103350。所有数据进行 RMA 标准化处理后经过 log₂ 对数转化。分别用 limma 包和 DEseq2 包分析差异表达基因,FC > 2 倍且 P < 0.05 被认为差异具有统计学意义。

1.3.5 耐药 signature 的构建:利用 logistics 回归构建多个基因联合诊断的回归模型,ROC 曲线在独立数据集 GSE34228 中评价模型诊断效能。

1.4 统计学分析 芯片和测序数据用 R 软件分析处理,ROC 曲线使用 STATA 软件绘制,两组之间计量数据使用 student *t* test 检验, P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PC9 细胞系鉴定 测序显示,PC9 细胞 EGFR 基因 19 号外显子 5 个氨基酸缺失(Δ ELREA)。

2.2 三代 EGFR-TKI 耐药细胞系构建 通过浓度梯度递增加药,构建了对奥希替尼耐药的细胞系 PC9-OR,见图 1。PC9 的 IC₅₀ = 0.006 1 μ mol/L,

PC9-OR 的 IC₅₀ > 10 μ mol/L,耐药指数大于 1 639。

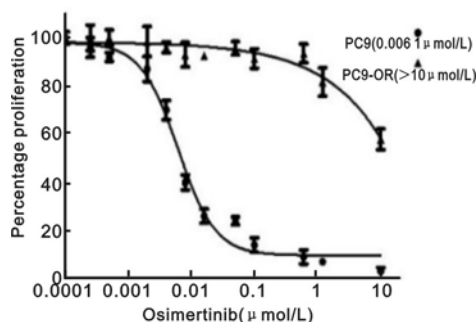
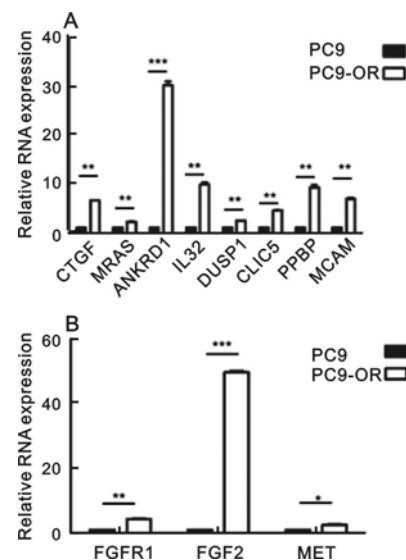


图1 PC9 和 PC9-OR 耐药细胞的 IC₅₀

2.3 差异表达基因的筛选与 qPCR 验证 利用 GEO 数据库 (GSE106765, GSE75602 和 GSE103350),分析多个耐 AZD9291 细胞株差异基因,分别有 47,372,45 个表达上调基因。其中共同表达上调的 3 个,分别为 MRAS, CTGF 和 ANKRD1。对在 2 个或者 2 个以上细胞数据中表达升高的基因进行荧光定量 PCR 验证,结果显示 CTGF, MRAS, ANKRD1, IL32, DUSP1, CLIC4, PPBP 和 MCAM 的表达上调显著,见图 2A。同时已知的 AZD9291 耐药基因 FGFR1, FGF2 和 MET 在我们构建的 PC-OR 中表达也升高,见图 2B。



A:不同数据集共同高表达基因 RNA 表达量;B:已知耐药基因的 RNA 表达量。

(** P < 0.01; *** P < 0.001)

图2 PC-9 和 PC9-OR 细胞基因表达

2.4 EGFR 耐药性预测 独立数据集 GSE34228 中用 Logistic 回归构建不同高表达基因的耐药预测模型,结果显示,MRAS, MET, ANKRD1, MCAM 和 FGFR1 具有较好的诊断效能,联合诊断 ROC 曲线下面积达 0.982 2,见图 3。

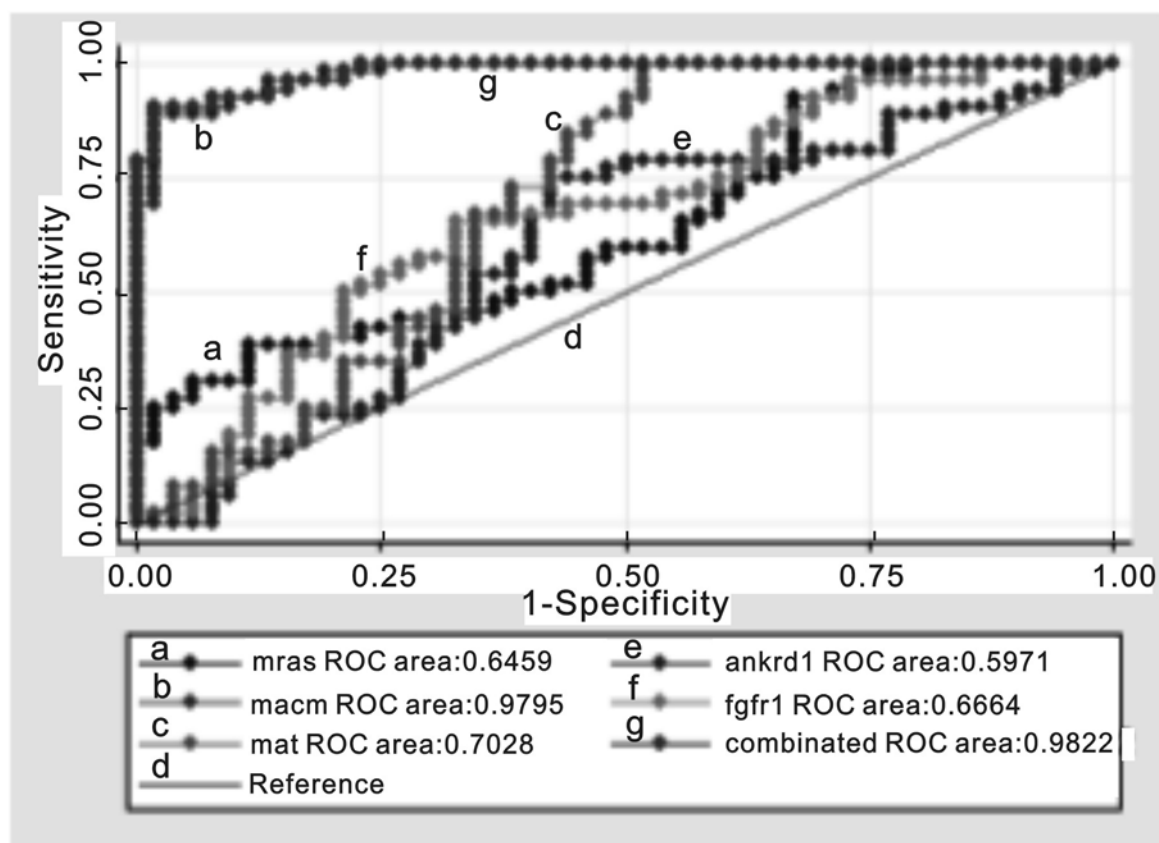


图3 差异表达基因的 ROC 曲线

3 讨论 长期使用 AZD9291 会出现肿瘤的获得性耐药,表现为出现 EGFR 下游信号分子 RAS 或 BRAF 激活突变^[10-11], Her-2 及 MET 扩增旁路激活 EGFR 下游受体酪氨酸激酶^[12], Aurora kinase^[13], PIK3C^[14], FGF2-FGFR1 自分泌环^[15]以及转化为小细胞肺癌^[16]。

我们自主构建了三代 EGFR-TKI 奥希替尼耐药细胞系 PC9-OR。为了获得非小细胞肺癌耐药的共同基因特征,我们运用了多个 AZD9291 耐药细胞的高通量测序及芯片数据整合分析^[7-8]。在 PC9-OR 上进行了验证,获得了 11 个 AZD9291 耐药细胞中高表达的基因。利用独立的 EGFR-TKI 耐药细胞株,我们发现 ANKRD1, MET, MRAS, MCAM 和 TGFR1 等 5 个高表达基因对三代 EGFR-TKI 耐药具有较好地诊断效能,联合诊断效能 0.982 2。这五个基因可以作为 EGFR-TKI 耐药的标志用于预测 EGFR-TKI 耐药。

同时这些基因可以为下一步细胞学实验验证耐药机制提供新的思路。MET 是一个编码酪氨酸激酶受体的原癌基因,其配体是肝细胞生长因子(human hepatocyte growth factor, HGF), HGF/MET 信号通路在组织损伤修复、促有丝分裂等过程中发挥重要作用, MET 扩增激活了细胞内如

PI3K-Akt, Ras-MAPK, STAT3 等多种信号通路,可以介导对一代、三代 EGFR-TKI 耐药^[17]。MRAS 编码一个小 GTPase 的 ras 家族成员,这些膜相关蛋白在包括细胞生长和分化在内的多个过程中作为信号转导物发挥作用,而 ras 信号的失调与许多类型的癌症有关,其编码蛋白可能在 TNF α 和 MAPK 信号通路中起作用^[18]。锚蛋白重复域 1 (ankyrin repeat domain 1, ANKRD1) 被报道与 ZEB1 共同参与了奥希替尼耐药 NSCLC 细胞系 PC9-OR, HCC827-OR 细胞的 EMT 演变,还可能通过促进细胞 bcl-2 表达起到抗凋亡作用^[9]。黑色素瘤细胞黏附分子(melanoma cell adhesion molecule, MCAM) 又称 CD146, 与部分细胞黏附分子有同源性,介导细胞黏附、维持细胞形态及调控细胞增殖、运动等。有报道 MCAM 通过上调干性相关基因、抑制 β -catenin 表达、促进细胞迁移和侵袭介导了一代 EGFR-TKI 获得性耐药^[19]。可以激活下游很多信号级联转导分子,调控细胞发生与增殖等多种生物学过程, FGFR1 扩增曾被报道介导了一例患者的奥希替尼获得性耐药^[15]。

建立 EGFR-TKI 耐药基因标志可以为预测肿瘤耐药的发生提供依据,同时也可以为后期建立 EGFR-TKI 早期血清学标志奠定基础。目前 EG-

FR-TKI 耐药预测表型多基于体外耐药细胞系^[20], 由于有限的三代 EGFR-TKI 临床样本的数据, 给耐药机制和耐药表型标志物的建立带来了困难。本研究建立 EGFR-TKI 的耐药预测基因集, 结果显示高表达耐药基因特征的细胞具有 EGFR-TKI 抗性, 能够对 EGFR-TKI 耐药有一定的提示作用。同时, 肿瘤在体内的状态具有更复杂的表型和局部微环境, 尽管我们在多株 EGFR-TKI 耐药细胞株上都获得了验证, 但是由于肿瘤的异质性, 我们需要进一步在肿瘤患者体内进行相关的验证。

参考文献:

- [1] 刘延梅, 马少君, 马庆, 等. 非小细胞肺癌患者组织 EGFR 基因突变状况及预后分析[J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(1): 22-25.
LIU Yanmei, MA Shaojun, MA Qing, Analysis of the status and outcome of epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer patients [J]. J Mod Lab Med, 2019, 34(1): 22-25.
- [2] KOBAYASHI Y, MITSUDOMI T. Not all epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer are created equal: Perspectives for individualized treatment strategy [J]. Cancer Sci, 2016, 107(9): 1179-1186.
- [3] ETTINGER D S, WOOD D E, AISNER D L, et al. Non-small cell lung cancer, version 5, 2017, NCCN clinical practice guidelines in oncology [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2017, 15(4): 504-535.
- [4] BELL D W, GORE I, OKIMOTO R A, et al. Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR [J]. Nat Genet, 2005, 37(12): 1315-1316.
- [5] 宋勇, 高健伟. 精准医学时代的晚期非小细胞肺癌内科治疗进展[J]. 医学研究生学报, 2017, 30(11): 1121-1127.
SONG Yong, GAO Jianwei. Medical treatment of nonsmall cell lung cancer: An update [J]. J Med Postgra, 2017, 30(11): 1121-1127.
- [6] JANNE P A, YANG J C, KIM D W, et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer [J]. N Engl J Med, 2015, 372(18): 1689-1699.
- [7] TANG Zhenghai, JIANG Xiaoming, GUO Xia, et al. Characterization of osimertinib (AZD9291)-resistant non-small cell lung cancer NCI-H1975/OSIR cell line [J]. Oncotarget, 2016, 7(49): 81598-81610.
- [8] HATA A N, NIEDERST M J, ARCHIBALD H L, et al. Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to epidermal growth factor receptor inhibition [J]. Nat Med, 2016, 22(3): 262-269.
- [9] TAKAHASHI A, SEIKE M, CHIBA M, et al. Ankyrin repeat domain 1 overexpression is associated with common resistance to afatinib and osimertinib in EGFR-mutant lung cancer [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 14896.
- [10] SORIA J C, OHE Y, VANSTEENKISTE J, et al. Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer [J]. N Engl J Med, 2018, 378(2): 113-125.
- [11] ORTIZ-CUARAN S, SCHEFFLER M, PLENKER D, et al. Heterogeneous mechanisms of primary and acquired resistance to third-generation EGFR inhibitors [J]. Clin Cancer Res, 2016, 22(19): 4837-4847.
- [12] MARTINEZ-MARTI A, FELIP E, MATITO J, et al. Dual MET and ERBB inhibition overcomes intra-tumor plasticity in osimertinib-resistant advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) [J]. Ann Oncol, 2017, 28(10): 2451-2457.
- [13] SHAH K N, BHATT R, ROTOW J, et al. Aurora kinase A drives the evolution of resistance to third-generation EGFR inhibitors in lung cancer [J]. Nat Med, 2019, 25(1): 111-118.
- [14] SEQUIST L V, WALTMAN B A, DIAS-SANTAGATA D, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors [J]. Sci Transl Med, 2011, 3(75): 75ra26.
- [15] KIM T M, SONG A, KIM D W, et al. Mechanisms of acquired resistance to AZD9291: a mutation-selective, irreversible EGFR inhibitor [J]. J Thorac Oncol, 2015, 10(12): 1736-1744.
- [16] MINARI R, BORDI P, DEL RE M, et al. Primary resistance to osimertinib due to SCLC transformation: Issue of T790M determination on liquid re-biopsy [J]. Lung Cancer, 2018, 115: 21-27.
- [17] DRILON A, CAPPUZZO F, OUSI I, et al. Targeting MET in lung cancer: will expectations finally be MET? [J]. J Thorac Oncol, 2017, 12(1): 15-26.
- [18] YOUNG L C, RODRIGUEZ-VICIANA P. MRAS: A close but understudied member of the RAS family [J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2018, 8(12): a033621.
- [19] ZHANG Fan, WANG Jia, WANG Xiaobo, et al. CD146-mediated acquisition of stemness phenotype enhances tumour invasion and metastasis after EGFR-TKI resistance in lung cancer [J]. Clin Respir J, 2019, 13(1): 23-33.
- [20] LE X, PURI S, NEGRAO M V, et al. Landscape of EGFR-dependent and -independent resistance mechanisms to osimertinib and continuation therapy beyond progression in EGFR-mutant NSCLC [J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(24): 6195-6203.

收稿日期: 2019-07-12

修回日期: 2019-07-24