

## 干扰 RNA 抑制 EGFR 对乳腺癌细胞放射敏感性的影响

赵春芳, 王晓莉, 常 莉

(昆明医科大学第三附属医院, 云南省肿瘤医院放射治疗中心, 云南昆明 650118)

**[摘要]** **目的** 采用干扰 RNA 技术 (small interfering RNA, siRNA) 抑制 SKBR-3, 即 HER-2 (+++), EGFR (+++) 乳腺癌细胞 EGFR 的表达, 研究 EGFR 受抑制后 HER-2 过表达细胞对 X 线敏感性的变化. **方法** 质粒转染及鉴定: 将细胞随机分为实验组、阴性对照组和空白组, 重组质粒 EGFR-siRNA 和 Neg-siRNA 分别被转染入实验组及阴性对照组; Western blot 检测各组细胞 EGFR 的表达水平; 6MV 射线照射 4 Gy 后 0, 24 h, 48 h 收集细胞, 流式细胞术检测细胞凋亡率; 克隆形成实验检测细胞 D0, SF2 和  $\alpha$  等值. **结果** 质粒转染 SKBR-3 细胞, Western 分析表明转染 EGFR-siRNA 的阳性细胞株在蛋白质水平受到明显抑制; X 线照射 24 h 及 48 h 后, EGFR 表达受抑制细胞凋亡率均高于转染阴性质粒组和空白对照组 ( $P$  分别为 0.045 及 0.039); EGFR 受抑制的细胞 D0 值和 SF2 值分别为 1.218 和 0.376,  $\alpha$  值为 0.335. **结论** 运用 RNAi 技术可以有效抑制 EGFR 的表达从而提高 SKBR-3 细胞对 X 线的放射敏感性, EGFR 是一个较理想的肿瘤分子治疗靶点.

**[关键词]** HER-2; EGFR; RNA 干扰; 乳腺癌; SKBR-3; 放射敏感性

**[中图分类号]** Q786 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2013) 01 - 0004 - 04

## Inhibition of EGFR Expression by RNAi and Its Effect on Radiosensitivity of Breast Cancer Cell Line

ZHAO Chun - fang, WANG Xiao - li, CHANG Li

(Radiotherapy Centre, The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Yunnan Provincial Tumor Hospital, Kunming Yunnan 650118, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the role of EGFR expression inhibition in enhancing the radiosensitivity of SKBR-3 cells by using siRNA. **Methods** EGFR-SiRNA and pNeg-SiRNA were transfected into SKBR-3 cells by lipofectamine. Western blot was used to measure the expression of EGFR. After 4Gy irradiation in a single fraction, cells were collected and apoptosis was estimated by flow cytometry at 0, 24 h and 48 hr, the D0, SF2 and  $\alpha$  values of three cell lines were calculated by colone formation array. **Results** Two transfected cell lines were measured by Western blot and the result showed that the expression of EGFR was suppressed by the EGFR-siRNA. The apoptosis rates of SKBR-3/EGFR-siRNA were higher than those of control cells at 24hr and 48hr after irradiation ( $P < 0.05$ ). The D0 and SF2 values of SKBR-3/EGFR-siRNA were 1.218 and 0.376 and the  $\alpha$  value was 0.335. **Conclusion** Inhibition of EGFR by RNAi could enhance the radiosensitivity of SKBR-3 cells, so EGFR may be a good candidate target for cancer therapy.

**[Key words]** HER-2; EGFR; RNA interference; Breast carcinoma; SKBR-3; Radiosensitivity

放射治疗在肿瘤治疗中有着重要地位. 但是临床上放射治疗疗效有限, 文献报道局部晚期乳腺癌单独放疗后 5 a 生存率为 29%<sup>[1]</sup>, 很多肿瘤细胞表现出对放射线的抵抗. 所以需要寻找能提高

放射敏感性的分子靶点和途径. 目前对肿瘤细胞放疗抵抗研究较多的是分子靶点 Her-2. Her-2 与 EGFR、Her-3、Her-4 共同组成 HER 家族或 erB 家族. ErbB3 缺乏酪氨酸激酶活性, 而 ErbB2

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (81101693); 云南省科技厅 - 昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2011FB206)

**[作者简介]** 赵春芳 (1982~), 女, 白族, 云南保山市人, 医学硕士, 住院医师, 主要从事肿瘤放射治疗学研究工作.

**[通讯作者]** 常莉. E-mail:changli1981@126.com

无直接的配体. 因此, 单独的 Her-2 或 Her-3 不能介导信号转导. 目前公认 HER 家族受体主要通过形成二聚体发挥作用. 其中 Her-2 的活化形式有: 自身形成同二聚体; 与 HER 家族其他成员 (EGFR 和 HER-3) 形成异二聚体, 当二聚体中的 EGFR 或 HER-3 与相应配体结合并激活后, 被协同活化<sup>[2]</sup>. HER-2 胞外端的特异性抗体——曲妥珠单抗与放疗联用时, 体外实验证实有放疗增敏效果, 临床却没有达到预期结果<sup>[3]</sup>. 提示 EGFR/HER-2 异二聚体形成是否也参与了 HER-2 过表达细胞的放疗抵抗, 是否必须形成异二聚体才能参与放疗抵抗.

本实验以 EGFR 为研究对象, 验证该受体蛋白在肿瘤放射治疗的作用. 利用能靶向抑制 EGFR 的干扰 RNA 及阴性对照质粒, 转染 SKBR-3 细胞. 观察 3 组细胞接受相同剂量的照射后在各个时间点的凋亡率和放射生物学参数, 并探讨 HER-2, EGFR 过表达的乳腺癌细胞 EGFR 受抑制后的辐射增敏机制.

## 1 材料与方法

### 1.1 人乳腺癌细胞

SKBR-3, HER-2 (+++), EGFR (+++) 由本实验室保存.

### 1.2 质粒构建和质粒转染

质粒载体分别为 pEGFP-61 和 pGenesil-hH1, 为武汉晶赛公司产品. 编码两条 ShRNA 的质粒表达载体为: EGFR343+2307. 选取的两段人基因靶序列为 343-361 5'-GGCACGAGUAACAAGCUCAT-T-3', 2307-2325 5'-GAAGGAAACUGAAUUCAAA-3'.

$$\text{集落形成率} = \frac{\text{未受照射的空白对照组集落数}}{\text{未受照射的空白对照组接种细胞数}} \times 100\%$$

$$\text{SF} = \frac{\text{某一剂量照射实验组的集落数}}{\text{该组细胞接种数} \times \text{集落形成率}}$$

根据单击多靶模型拟合存活曲线 (Sigmaplot 9.0 软件),  $\text{SF} = \exp(-\alpha D - \beta D^2)$ . 计算不同实验组 SF2 值和  $\alpha$ 、 $\beta$  值.

### 1.7 统计学处理

本实验平均值以均数标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS 软件进行均数间  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义.

## 2 结果

转染前 1 d, 6 孔板细胞大概 80% 汇合; 取 1.5 mL EP 管 2 个, 每管分别加入 DMAEM; 取其中一个 EP 管加入 Lipofection 2000 4  $\mu\text{L}$ , 另一个加入 2.5  $\mu\text{g}$  质粒, 静置; 将 Lipofection 2000 转染试剂和质粒混匀, 静置; 将 6 孔板内一孔的液体吸去, 加入 500  $\mu\text{L}$  DMEM; 将 Lipofection 2000 与质粒的混合物加入该孔; 4~6 h 后 DMEM 完全培养基 2 mL 终止转染

### 1.3 实验分组

重组质粒 EGFR-siRNA 和 Neg-siRNA 分别被转染入实验组及阴性对照组, 未转染质粒的 SKBR-3 为空白组.

### 1.4 Western-blot 检测 3 组细胞 EGFR 的表达 (参照分子克隆)

使用 PIERCE 核蛋白提取试剂盒提取 3 组细胞蛋白并测浓度; 上样电泳, 转膜; 一抗封闭; TBST 漂洗, 二抗孵育, 显色.

### 1.5 流式细胞术检测照射 4 Gy 后细胞在 0、24 h、48 h 的凋亡率

洗涤细胞收集  $5 \times 10^5$  细胞; 加入 500  $\mu\text{L}$  的 Binding Buffer 悬浮细胞; 加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 混匀后, 加入 5  $\mu\text{L}$  Propidium Iodide, 混匀; 室温、避光、反应 15 min; 流式细胞仪检测凋亡率. 以上实验均重复 3 次.

### 1.6 克隆形成实验检测 D0, SF2, $\alpha$ 值

胰酶消化、制成单细胞悬液. 接种于 6 孔板, 贴壁生长 24 h 后转染. 转染后 48 h 进行不同剂量射线的照射. 各组细胞分别经 0、2、3、4、6、8 Gy 射线照射. 照射后培养 14 d. 计数  $\geq 50$  个细胞的集落. 每次设 3 个培养皿, 实验重复 3 次. 计算集落形成率及细胞存活分数 (surviving fraction, SF).

### 2.1 细胞转染及鉴定

Western-blot 检测 3 组细胞 EGFR 的表达, 转染 EGFR-siRNA 和空白载体后的 SKBR-3 细胞同一条件下行 Western-blot 蛋白检测, 转染空白载体的 SKBR-3 细胞和未转染组细胞有明显的免疫印迹条带, 而转染 EGFR-siRNA 组显示条带明显减弱 (见图 1), 说明干扰 RNA 能抑制 EGFR 的表达, 而各组  $\beta$ -actin 蛋白无明显变化.

### 2.2 流式细胞仪检测 3 组细胞凋亡率

6MV 射线照射 4 Gy 后 0、24 h、48 h 收集细

胞, 流式细胞术检测细胞凋亡率. 照射后 24 h 3 组细胞凋亡率增高, 但实验组凋亡率(16.54 + 2.89)% 较阴性对照组 (12.03+0.91) % 明显增高 ( $P < 0.05$ ). 照射后 48 h 实验组凋亡率 (37.11+ 2.34) % 仍较阴性对照组的 (30.01+1.64) % 和空白组的 (25.87+0.72) % 显著增高 ( $P < 0.05$ ), 而在任意一个时间点, 空白组和阴性对照组的凋亡率差异均无显著性差异( $P > 0.05$ ), 见图 2.

2.3 克隆形成实验检测 D0, SF2,  $\alpha$  值

克隆形成实验结果显示 (见图 3): X 线照射后, 空白组和阴性对照组的各组放射生物学参数均相似, 说明 2 组细胞的放射敏感性无显著性变化. 而实验组 D0, SF2,  $\alpha$  等值均降低, 表明 EGFR-siRNA 可以增强 SKBR-3 细胞对 X 线的敏感性, 见表 1.

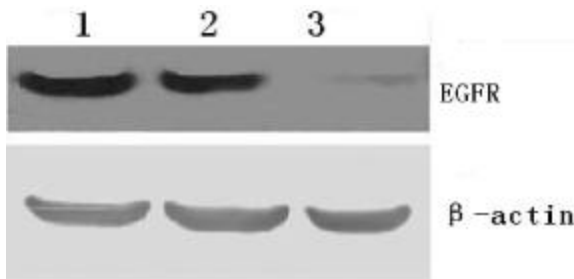


图 1 EGFR-siRNA 抑制 EGFR 蛋白的表达  
Fig. 1 EGFR expression in SKBR-3 cells after transfection with EGFR-siRNA plasmid

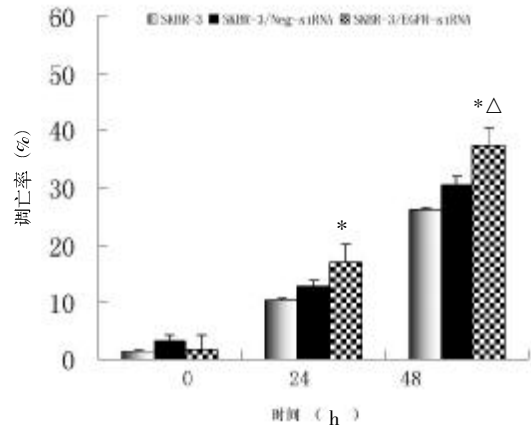


图 2 各细胞受 4 Gy 照射后凋亡率的变化  
Fig. 2 The apoptosis rate of cells irradiated with 4 Gy All data presented as mean 与阴性对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与空白组比较,  $\Delta P < 0.05$ .

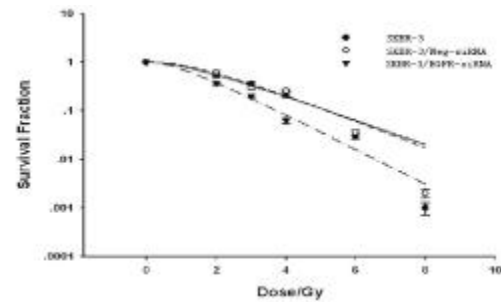


图 3 克隆形成实验检测照射后细胞生存曲线  
Fig. 3 The surviving curve of cells detected by clonogenic survival assay

表 1 克隆形成实验检测的各组细胞放射生物学参数

Tab. 1 The radiobiology parameters of cells detected by clonogenic survival assay

组 别	单击多靶模型				线性二次模型		
	D0 (Gy)	N	Dq (Gy)	SF2	$\alpha$	$\beta$	SF2
SKBR-3 组	1.731	2.359	1.486	0.590	0.217	0.047 2	0.536
SKBR-3/Neg-siRNA 组	1.599	2.600	1.538	0.584	0.167	0.056 4	0.571
SKBR-3/EGFR-siRNA 组	1.218	2.195	0.958	0.376	0.335	0.077 1	0.376

3 讨论

放疗是恶性肿瘤治疗中最重要的治疗手段之一. 但放疗疗效有限, 许多肿瘤表现出对放疗的抗拒. 所以需要研究新的放疗增敏靶点和途径. 表皮生长因子受体家族又称 HER 家族, 包括 EGFR、HER-2 (c-erbB2, Neu)、HER-3 (c-erbB3) 和 HER-4 (c-erbB4). EGFR、HER-2 过表达的肿瘤细胞常常提示治疗效果不理想以及预后较差.

目前关于 EGFR 靶点放射敏感性的研究主要

集中在药物方面, 特别是单克隆抗体和酪氨酸激酶抑制剂. 关于应用小干扰 RNA 研究 EGFR 在放射敏感性的作用较少涉及. 为此, 笔者采用 siRNA 技术抑制人乳腺癌细胞 SKBR-3 细胞 EGFR 的表达, 观察 HER-2 过表达细胞对 X 线敏感性的变化.

EGFR 过表达的肿瘤细胞接受一定剂量照射后, 胞膜上 EGFR 迅速激活, 促进细胞增殖. 原因在于 EGFR 接受辐射后逃避相应的降解, 转移入核, 并与 DSB 修复的重要组成部分——DNA-PK 结合并相互作用, 这条途径明显有别于 EGFR 结合同源配体过程<sup>[4-6]</sup>. 重复照射后, 细胞生长导致肿瘤

细胞克隆增殖增多. 这些迅速增殖的细胞可能具有更强的DNA损伤修复能力, 快速增殖和DNA损伤修复的结合能发挥放射治疗的抵抗作用.

当4 Gy射线照射后, SKBR-3/EGFR-siRNA细胞24 h和48 h凋亡率增加. 克隆形成实验中SKBR-3/EGFR-siRNA细胞的SF2, D0等值明显降低, 提示该细胞的放射敏感性降低, N值和Dq值变小, 说明抑制EGFR后SKBR-3细胞存活曲线肩区变窄, 亚致死损伤修复能力减弱. 推测EGFR表达受抑制后, 放疗引起的DNA修复不能及时进行以及EGFR参与的信号转导途径PI3K/AKT, Ras/Raf/MEK/ERK和STAT受抑制, 导致凋亡和克隆性死亡增加.

此外, 干扰EGFR的活动能影响Ras-Raf-MEK-ERK/MAPK<sup>[9]</sup>和PI3K/AKT<sup>[6]</sup>信号通路的传导, 进而影响细胞增殖、存活和转移. 另一方面, 抑制EGFR能阻止其转移, 通过诱导细胞周期停止在G<sub>1</sub>期, 防止因辐射损伤的细胞进入DNA损伤修复的S期, 增强辐射诱导的凋亡<sup>[7]</sup>.

综上所述, EGFR表达受抑制可以增加放疗敏感性. 已有研究表明多种上皮来源肿瘤组织存在EGFR过表达, 而EGFR的过表达预示着肿瘤组织对放疗的抗拒, 表明EGFR是一个有效的分子靶点. 利用靶向抑制EGFR的siRNA可以成为一条

新的治疗途径, 来提高EGFR过表达肿瘤阻滞对放疗的敏感性和治疗效果.

#### [参考文献]

- [1] 殷蔚伯. 肿瘤放射治疗学[M]. 第4版. 北京:中国协和医科大学出版社,2008:1 181.
- [2] YARDEN Y, MARK X, SLIWKOWSKI. Untangling the er-bB signaling network [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2001, 2: 127 - 137.
- [3] LIANG K, LU Y, FAN Z, et al. Sensitization of breast cancer cells to radiation by trastuzumab[J]. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2: 1 113 - 1 120.
- [4] BOEERS G, REARDON D, HEWITT T, et al. The relative role of ErbB1-4 receptor tyrosine kinase in radiation signal transduction responses of human carcinoma cells [J]. *Oncogene*, 2001, 20: 1 388 - 1 397.
- [5] SLAMON D J, CLARK G M, WONG S G, et al. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the Her-2/neu oncogene [J]. *Science*, 1987, 235: 177 - 182.
- [6] CARPENTER G, COHEN S. Epidermal growth factor[J]. *Annu Rev Biochem*, 1979, 48: 193 - 216.
- [7] LLIAKIS G. Cell cycle regulation in irradiated and nonirradiated cells[J]. *Semin Oncol*, 1997, 24: 602 - 615.

(2012-09-13 收稿)