

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.07.001

• 基础研究 •

KEAP1 基因及其突变位点对非小细胞肺癌细胞株作用的实验初步研究 *

李 燕¹ 龚美玲² 叶小萍³ 张琳琳⁴ 郑翠侠^{1,2Δ}

(1 上海交通大学医学院附属第九人民医院呼吸内科 上海 200011; 2 同济大学附属杨浦区中心医院呼吸内科 上海 200082;

3 上海交通大学医学院附属第九人民医院中心实验室 上海 200011; 4 上海中医药大学附属中西医结合医院 上海 200082)

摘要 目的:研究 KEAP1 基因及 KEAP1 基因突变位点对肺癌细胞株的作用。**方法:**通过 Western blot 方法,比较携带 KEAP1 基因突变的肺癌细胞株(A549,NCI-H460,NCI-H838)与 KEAP1 基因野生型的肺癌细胞株(NCI-H292, NCI-H1299, 95D, SPC-A1)之间, NRF2 基因与 NRF2 下游基因 HO-1 的蛋白表达水平,检测并比较两组细胞的活性氧(ROS)含量;以新发现的非小细胞肺癌(NSCLC)病人的 KEAP1 体细胞突变作为模板构建 KEAP1 突变质粒,对自身存在 KEAP1 突变的肺癌细胞株 A549,通过改造的 pMSCV 逆病毒转染体系,分别构建过表达空载,野生型及突变型 KEAP1 的 A549 稳定细胞株,比较过表达不同质粒的细胞间丙二醛(MDA)含量及 NRF2 下游抗氧化等相关基因的表达水平;通过克隆形成实验检测细胞增殖情况。**结果:**KEAP1 基因突变组肺癌细胞株与 KEAP1 基因无突变的对照组细胞株相比,NRF2 和 HO-1 蛋白表达显著增高,活性氧水平显著降低($P<0.01$);过表达野生型 KEAP1 与过表达空载的 A549 细胞相比,NRF2 及其下游基因转录水平表达显著下降($P<0.01$),蛋白水平表达下降,细胞内丙二醛水平显著增高($P<0.01$),克隆形成率显著降低($P<0.01$),而过表达突变型 KEAP1 与过表达空载的 A549 细胞相比,NRF2 及其下游基因表达、细胞内丙二醛水平、克隆形成率均无显著差异($P>0.05$)。**结论:**KEAP1 基因具有抑癌作用,其突变为失活型突变,突变后 KEAP1/NRF2 通路激活,KEAP1 基因突变可能通过改变细胞的氧化应激水平,促进肺癌的发生发展。

关键词:非小细胞肺癌;NRF2;KEAP1;体细胞突变**中图分类号:**R-33;R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)07-1201-07

The Functional Study of KEAP1 Gene and Its Mutation in NSCLC Cell Line: A Preliminary Experimental Study *

LI Yan¹, GONG Mei-ling², YE Xiao-ping³, ZHANG Lin-lin⁴, ZHENG Cui-xia^{1,2Δ}

(1 Department of Respiration, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 200011, China; 2 Yangpu Hospital, Tongji University, Shanghai, 200082, China; 3 The Core Laboratory in Medical Center of Clinical Research, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 200011, China; 4 Shanghai Traditional Chinese Medicine Integrated Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200082, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the function of mutant KEAP1 and its mutation in lung cancer cells. **Methods:** Western blot were conducted to determine the expression of Nrf2 and its target gene HO-1 in lung cancer cells with or without KEAP1 mutation. A549-constantly expressing pMSCV, wild type KEAP1 and mutant KEAP1 were established by retroviral transfection. The clonogenic assay was performed to explore the effect of wild type Keap1 and mutant Keap1 on the proliferation ability of lung cancer cells. **Results:** The protein expression of NRF2 downstream gene HO-1 in KEAP1 / NRF2 mutant lung cancer cell lines group were increased compared with the non-mutant lung cancer cell lines group, and the level of reactive oxygen species (ROS) in the mutant group was significantly inhibited compared with the control group ($P<0.01$). Wide-type KEAP1 overexpression decreased the mRNA and protein expression of NRF2 target genes, increased the MDA level and suppressed proliferation in A549 cells compared with empty vector-transfected A549 cells ($P<0.01$), while over expression of mutant KEAP1 caused no significant differences ($P>0.05$). **Conclusions:** KEAP1 mutation may cause the loss of KEAP1 function, KEAP1 mutation may cause tumor genesis and development by changing the oxidative stress of tumor cells.

Key words: NSCLC; NRF2; KEAP1; Somatic mutation**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R734.2 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2021)07-1201-07

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81472177;81772460)

作者简介:李燕(1991-),女,硕士研究生,主要研究方向:肺癌,E-mail:liyanelaine@163.com

Δ 通讯作者:郑翠侠(1966-),女,博士生导师,教授,主要研究方向:肺癌发病机制,E-mail:zcx9566@163.com,电话:13564845697

(收稿日期:2020-07-28 接受日期:2020-08-24)

前言

肺癌目前居于癌症所致死亡原因的首位^[1]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占有肺癌病理类型 80% 以上。非小细胞肺癌的发生发展机制目前尚不完全清楚。近年来随着以二代测序技术为代表的新技术的兴起,人们发现了更多新的肺癌的致病基因,肺腺癌病人中分子靶向药物的应用已经取得了巨大的成功,而肺鳞癌的靶向治疗研究相对滞后,因此寻找新的肺鳞癌致病突变或驱动基因突变,进一步探索其发病机制,将为开发肺鳞癌的靶向治疗策略提供坚实的理论基础。

我们前期研究^[2]发现 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein1, KEAP1)、核转录因子 E2 相关因子 2 (homo sapiens nuclear factor erythroid 2-like 2, NRF2)在肺鳞癌组织中具有较高的突变频率。KEAP1 是 NRF2 自身的内源性抑制物,它是一个由 627 个氨基酸残基组成的多肽,可通过自身 DGR 结构域与 NRF2 结合^[3]。NRF2 是一个亮氨酸拉链转录因子,作用于在细胞保护酶类基因的上游调节区,调节下游的靶基因包括血红素加氧酶-1(HO1)谷胱甘肽合成相关基因(GCLC,GCLM)等^[4]。在正常状态下,细胞胞质中两个 KEAP1 蛋白以二聚体的形式和胞质中的 NRF2 结合,KEAP1 同时结合 Cullin3,形成 Keap1-Cul3-ring box 1 (Rbx1) E3 泛素连接酶,以该形式介导 NRF2 的泛素化,使 NRF2 进一步被蛋白酶体降解^[5];而在氧化应激状态下,NRF2 降解被中止,入核后和抗氧化反应元件结合,介导下游多种抗氧化蛋白和 II 相解毒酶类代谢相关酶的转录,保护细胞免受氧化应激的损伤^[6]。

KEAP1/NRF2 通路因其显著的抗氧化及排除毒物等作用,NRF2 通常被认为发挥对人体保护作用。但是近年来随着在包括肺癌、肝癌、黑色素瘤等很多肿瘤中,异常增高的 NRF2 被检测出来,而且发现 NRF2 的高表达常伴有较差的预后^[7],KEAP1/NRF2 促进肿瘤发生的作用引起了越来越多的关注^[8]。因此,本研究采用携带突变型 KEAP1 基因及野生型 KEAP1 基因的肺癌细胞株,并选取前期发现 NSCLC 患者携带的 KEAP1 基因突变位点,构建出过表达突变型,野生型 KEAP1 及空载的 A549 稳定细胞株,通过检测 KEAP1/NRF2 通路下游基因表达水平及功能学研究,探讨 KEAP1 基因及其突变位点对 NSCLC 细胞株增殖的影响及可能机制,希望为肺鳞癌的靶向治疗提供新的靶点及思路。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料及试剂

HEK-293T 细胞株来自本课题组实验室,NCI-H292、NCI-H460、NCI-H838、95D 细胞株购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,NCI-H1299、A549 细胞株,SPCA1 细胞株由瑞金医院呼吸与危重症医学科项铁课题组赠予,慢病毒载体 pMSCV PIG (Puro IRES GFP empty vector)、gag-pol 质粒、VSVG 质粒来自本课题组实验室;质粒小量提取试剂盒购自德国 QIAGEN 公司;反转录试剂盒、Real-time PCR 试剂盒、限制性内切酶、载体连接试剂盒 DNA Ligation Kit Ver.2.1、定点诱变试剂盒、pGEM-Teasy 载体购自北京全式金公司,Lipofec-

tamine 2000(Invitrogen);活性氧(ROS)测定试剂盒(化学荧光法)、丙二醛(MDA)测定试剂盒(TBA 法)(南京建成);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(凯基生物);核蛋白及浆蛋白提取试剂盒、蛋白酶抑制剂 COCKTAIL 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司 Anti-KEAP1 抗体购自 Proteintech; Anti-NRF2 抗体购自 Abcam; Anti-HO1 抗体购自 cell signaling technology 公司, anti-DDDDKtag 抗体购自 arigo biolaboratories 公司(ARG62342,) Anti-LAMIN A/C 抗体购自 cell signaling technology 公司;一代测序及引物合成由上海博尚生物有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 NCI-H292, NCI-H460, NCI-H838, NCI-H1299,95D,SPC-A1 细胞均培养于含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基。A549 细胞培养于含 10%胎牛血清的 F-12K 培养基。HEK-293T 细胞培养于含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基。细胞于 37℃,5% CO₂ 细胞培养箱培养,肺癌细胞 2-3 天换液,293T 细胞 1-2 天换液。细胞密度达到 90-95%时按 1:3-8 进行传代

1.2.2 蛋白质免疫印迹法检测蛋白 贴壁生长的细胞弃去上清,PBS 清洗 3 次,冰浴下使用 RIPA 与 PMSF 体积比为 100:1 的细胞裂解液,提取总蛋白,使用细胞核蛋白及浆蛋白提取试剂盒(Thermo Fisher Scientific),分别提取核蛋白及浆蛋白,BCA 法对蛋白定量后上样,经 SDS-PAGE 电泳后,于冰浴条件下转膜至 PVDF 膜,洗膜后室温封闭 2 小时,加入以合适比例稀释的一抗,4℃孵育过夜,洗膜后加入合适比例稀释的二抗,室温孵育 2 小时,滴加显影液后经 Amersham600 型超敏化学发光成像系统曝光显影。

1.2.3 比色实验实时荧光定量 PCR 收集对数生长的细胞,Trizol 法提取 RNA,用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒(TAKARA)进行逆转录,以得到的 cDNA 为模板,使用 SYBR™ Premix Ex Taq™ 试剂盒(TAKARA)行 Real-time PCR,所使用的引物序列列于表 1。基因表达分析使用 2^{-ΔΔCt} 相对定量法来表示,所有样本以 β-ACTIN 作为参照基因,每个样本均设置复孔。

1.2.4 细胞凋亡稳转细胞株的构建 (1) pMSCV-keap1-3Flag, pMSCV-keap1-F174L-3Flag 慢病毒载体的构建:对本实验室前期在非小细胞肺癌组织中发现的 KEAP1 基因第 522 位胞嘧啶突变为腺嘌呤的突变点(KEAP1:NM_012289:exon2:c.C522A:p.F174L),作为突变型 KEAP1 构建质粒。以 293T 细胞的 cDNA 为模板,克隆 KEAP1 的 CDS 区(上游引物:5'-ATGCAGCCAGATCCAGGCTAGC-3',下游引物:5'-TCAACAGGTACAGTTCT GCTGGTC-3'),产物与 pGEM-Teasy 载体连接,得到 KEAP1-Teasy 质粒;用 Fast Mutagenesis System 对 KEAP1 进行定点诱变(上游引物:5'-GTGCCTGCAGTGACTTACTGGTGCAGCAG-3',下游引物:5'-TAAGTCACTGCAGGCACGGA CAACGCTGTGCG-3'),得到突变型 KEAP1 质粒(KEAP1-F174L);以 Keap1-Teasy 质粒为模版,在 keap1 前端加 Xho I 酶切位点及 Kozak 序列,末端加 3flag 和 Hpa I 酶切位点,(上游引物:5'-TATACTCGAGGCCACCATGCAGCCAGATCCCAGGCCT-3',下游引物:5'-GCGCGTTAACTCACTTGTGTCGTCATCTCTTTGTAGTCGATGTCATGGTCTTTGTAGTCTCCGTCAT

GGTCTTTGTAGTCACAGGTACAGTTCTG-3'), 得到 keap1-3Flag 质粒。以同样方法构建 keap1-F174L-3Flag 质粒; 分别以 keap1-3flag, keap1-mut-3Flag 和 pMSCV 为模板, 用 *Xho* I 和 *Hpa* I 限制性内切酶体系做双酶切反应, 产物经电泳鉴定及凝胶纯化后使用 DNA 连接试剂盒(TAKARA)进行连接, 得到 pMSCV-keap1-3flag 及 pMSCV-keap1-F174L-3Flag 慢病毒载体。(2)慢病毒包装与目的细胞的感染:将对数生长期的 293T

细胞铺板后培养过夜,至细胞密度达到 60%-70%时,用本实验室方法进行慢病毒包装^[9],收集病毒。将对数生长期的 A549 细胞铺板培养过夜至细胞密度达到 50%左右时进行感染。病毒感染 8 小时后换成正常培养液。(3)稳转细胞株的筛选:病毒感染细胞 48 小时后,培养液中加入嘌呤霉素,使达到筛选浓度(15 μ g/mL),持续加药 3 周,筛选后的细胞提蛋白,做 Western blot 检测 KEAP1 表达水平。鉴定过表达成功的细胞株用于后续实验。

表 1 Real-time PCR 引物
Table 1 Real - time PCR primers

Gene	Primer-F	Primer-R
GCLC	TGAAGGGACACCAGGACA	GCAGTGTGAACCCAGGACAG
GCLM	AATCTTGCCCTCCTGCTGTGTGA	TGCGCTTGAATGTCAGGAATGC
GSR	ACCCCGATGTATCACGCAGTTA	TGTCAAAGTCTGCCTTCGTTGC
TXN	TTTCAGGAAGCCTTGGACGCT	GCAACATCCTGACAGTCATCCAC
TXNRD	ACGGTGATGCTGGCAATAGG	CTGGGGTGAGCTCCACCTTA
NQO1	CAGTGGTTTGAGTCCCTGCC	CCCCGTGGATCCCTTGCAG
G6PD	TTCATGTGGCTGTTGAGGCG	CAGTGGCTGACATCCGCAAA
NRF2	ATAGCTGAGCCCAGTATC	CATGCACGTGAGTGCTCT
HO-1	GCTGCTGACCCATGACACCAAGG	AAGGACCCATCGGAGAAGCGGAG
KEAP1	ATTTTGGGGAGGTGGCCAAG	TTGACCCAGTTGATGCAGGC
β -ACTIN	ACCTCTATGCCAACACAGTGC	CCGATCCACACAGAGTACTTGC

1.2.5 活性氧(Reactive oxygen species, ROS)及丙二醛(MDA)的检测 收集对数生长的肺癌细胞,使用 ROS 测定试剂盒(南京建成)对细胞内 ROS 水平进行检测,在流式细胞仪上按照 FITC 条件检测荧光,其细胞平均荧光强度代表细胞内 ROS 水平;用 MDA 测定试剂盒(南京建成)对细胞内 MDA 水平进行检测。

1.2.6 克隆形成实验 收集对数生长期的肺癌细胞,计数后以 1000 个细胞/孔均匀接种于 6 孔板中,镜下观察到大于 50 个细胞的细胞克隆出现时终止培养。弃去培养液,PBS 清洗 3 次,用甲醛固定 15 分钟后加结晶紫染色液孵育 10 分钟,拍照观察并计数。

2 结果

2.1 KEAP1 突变的肺癌细胞组与 KEAP1 野生的肺癌细胞组相比,在蛋白水平上,NRF2 下游基因及 NRF2 表达均增高

通过查询文献及 COSMIC 的 Cell Lines Project v84 数据库,收集 3 种存在 KEAP1 基因突变而 NRF2 基因野生的 NSCLC 细胞(A549,NCI-H460,NCI-H838)作为突变组细胞,4 种 KEAP1 和 NRF2 基因均野生的 NSCLC 细胞(NCI-H292,NCI-H1299,95D,SPCA1)作为对照组细胞。对两组肺癌细胞分别提总蛋白及核蛋白,做 Western blot,检测 NRF2/HO1 抗氧化通路(Nrf2/HO1 Antioxidant Pathway)的 NRF2 及 HO1 的蛋白表达情况。结果显示突变组肺癌细胞核中 NRF2 蛋白表达明显高于对照组肺癌细胞;突变组肺癌细胞 HO1 蛋白表达显著高于对照组肺癌细胞(图 1)。

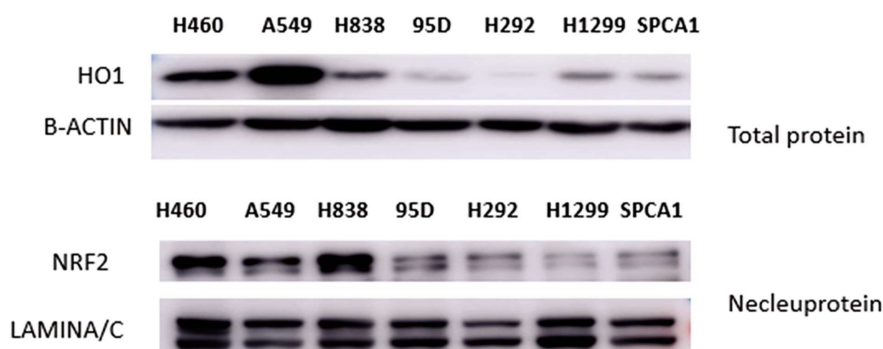


图 1 KEAP1 基因突变的非小细胞肺癌细胞(A549,H460,H838)与 KEAP1 基因野生的非小细胞肺癌细胞(95D, H292, H1299, SPCA1),细胞核中 NRF2 及其细胞中 NRF2 下游重要抗氧化蛋白 HO-1 的表达情况。核蛋白以 LAMIN A/C 作为内参蛋白,总蛋白以 β -ACTIN 作为内参蛋白。
Fig.1 Western blot results of NRF2/HO1 pathway in KEAP1 mutant NSCLC cells(A549, H460, H838) and KEAP1 wide-type NSCLC cells(H292, H1299, 95D, SPCA1).LAMIN A/C and β -ACTIN was used as normalization control

2.2 KEAP1 突变的肺癌细胞组的活性氧水平低于 KEAP1 野生的肺癌细胞组

两组细胞在同样条件下孵育, 每株细胞加入等量 DMSO 作为阴性对照, 在流式细胞仪上按照 FITC 条件检测荧光, 其细

胞平均荧光强度代表细胞内 ROS 水平(图 2A)。结果 KEAP1 突变组肺癌细胞组(H460, A549, H838)的活性氧水平(1282 ± 276.1)显著低于非突变组肺癌细胞组(95D, SPCA1, H1299)的活性氧水平(292.6 ± 27.97)(图 2B)。

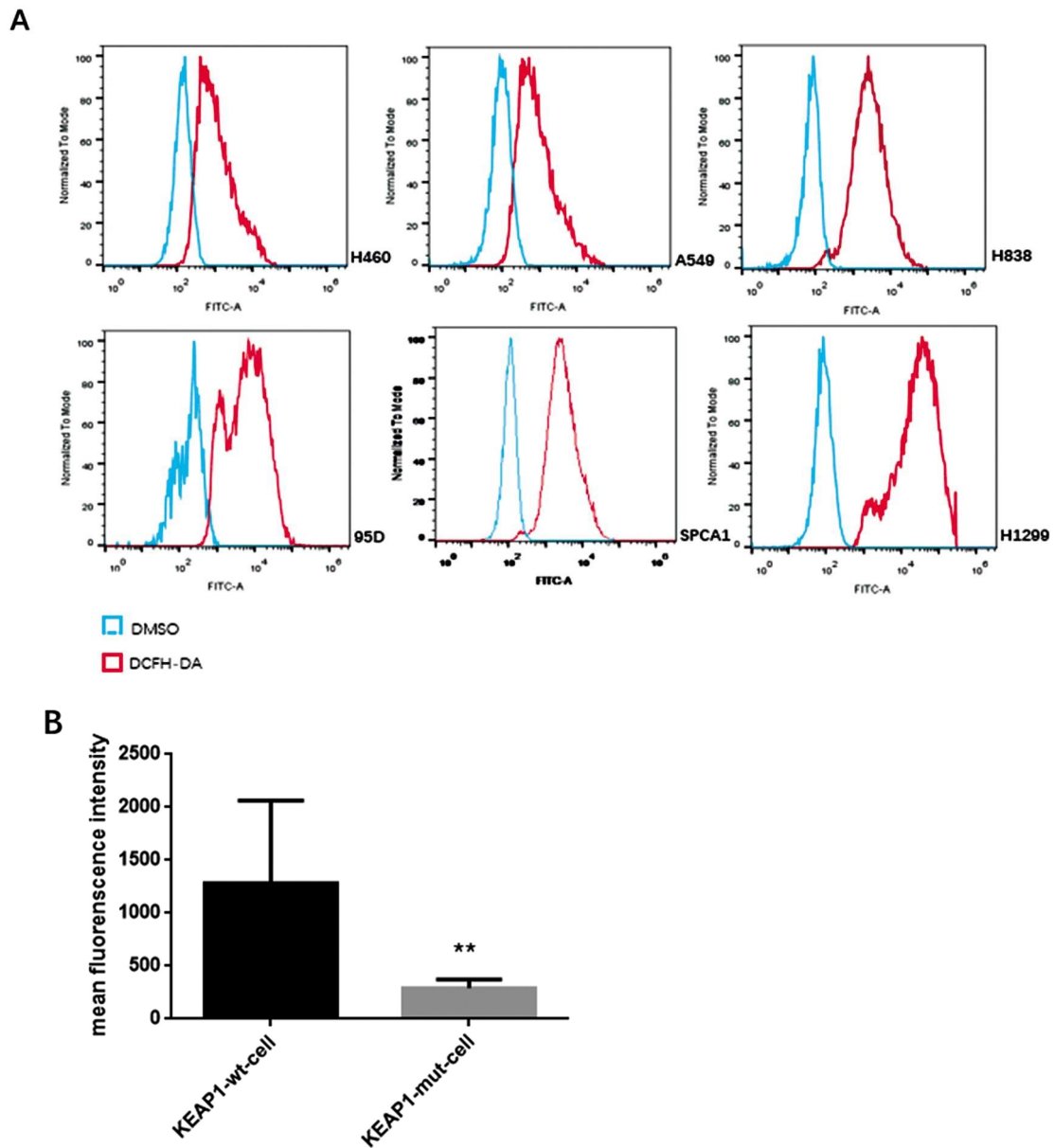


图 2 KEAP1 突变组肺癌细胞的活性氧 ROS 水平(1282 ± 276.1)显著低于非突变组肺癌细胞(292.6 ± 27.97)。

结果以均值 $\pm$ 标准误差表示, ** 代表 $P < 0.01$ 。

Fig.2 Comparison of ROS levels in KEAP1-wt-cells and KEAP1-mut cells. Error bars represent $\bar{x} \pm$ SEM. **, $P < 0.01$.

2.3 A549 过表达野生型 KEAP1 后, NRF2 及下游抗氧化基因 HO1 的蛋白表达显著降低, 过表达 F174L 突变型 KEAP1 后, NRF2 及下游抗氧化基因 HO1 的蛋白表达无显著差异

对稳定过表达空载, 野生型 KEAP1 及 F174L 突变型 KEAP1 的 NSCLC 细胞株 A549 做 qPCR。分别提总蛋白和核蛋白做 Western blot。A549 细胞本身具有 KEAP1 基因突变, 与稳定过表达空载的对照组相比, 过表达野生型 KEAP1 的肺癌细胞中 NRF2 及下游抗氧化基因 HO1 的蛋白表达显著降低, 过表达 F174L 突变型 KEAP1 的肺癌细胞中 NRF2 及下游抗氧化基因 HO1 的蛋白表达无明显差异(图 3A)。与稳定过表达空

载的对照组相比, 过表达野生型 KEAP1 的肺癌细胞中 NRF2 下游靶基因 HO1、GCLC、GCLM、TXN、NQO1、GSR、FTH1 的 mRNA 表达显著降低, 过表达 F174L 突变型 KEAP1 的肺癌细胞则无明显差异(图 3B)。提示从 NSCLC 患者发现的 F174 突变型 KEAP1, 促进 NRF2 蛋白的表达及发挥转录因子作用。

2.4 A549 过表达野生型 KEAP1 后, 细胞丙二醛水平显著升高, 过表达 F174L 突变型 KEAP1 后, 细胞丙二醛水平无显著差异

构建稳转细胞株所用的 pMSCV 载体上有 EGFP 位点, 不能通过检测绿色荧光反应细胞内 ROS 水平, 故通过检测丙二醛水平来反应细胞的氧化损伤水平。结果显示, 过表达空载和

过表达 F174L 突变型 KEAP1 基因的肺癌细胞中丙二醛水平均明显高于过表达野生型 KEAP1 基因的肺癌细胞。提示本身具有 KEAP1 突变的肺癌细胞过表达野生型 KEAP1 后,细胞氧

化应激水平增高,过表达突变 KEAP1 基因后,增高的氧化应激水平被逆转(图 4)。

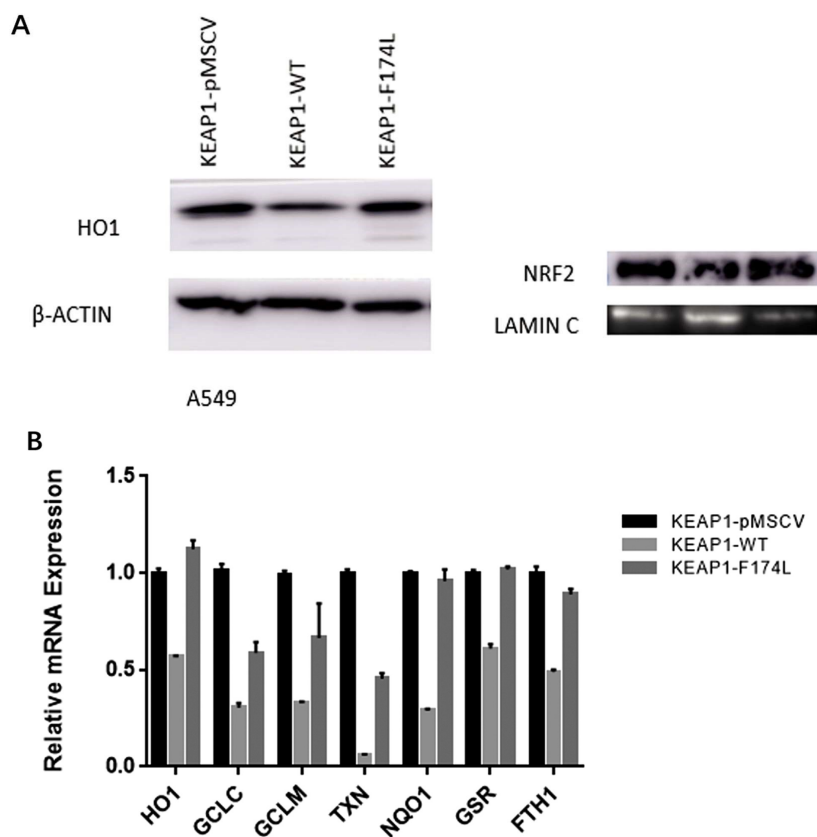


图 3A.比较稳定过表达空载,野生型 KEAP1 及 F174L 突变型 KEAP1 的 A549 细胞间 NRF2 及下游抗氧化基因 HO1 的蛋白表达水平。B.比较稳定过表达空载,野生型 KEAP1 及 F174L 突变型 KEAP1 的 A549 细胞间 NRF2 下游靶基因 HO1、GCLC、GCLM、TXN、NQO1、GSR、FTH1 的 mRNA 表达水平。Western blot 中核蛋白以 LAMIN A/C 作为内参,总蛋白以 β -ACTIN 作为内参。qPCR 中以 β -ACTIN 作为内参。

Fig.3 A. Compare the protein expression of NRF2 and NRF2 target gene HO1 in KEAP1-pMSCV, KEAP1-WT, and KEAP1-F174L A549 cells. B. Compare the mRNA expression of NRF2 target genes (HO1, GCLC, GCLM, TXN, NQO1, GSR and FTH1) in KEAP1-pMSCV, KEAP1-WT, and KEAP1-F174L A549 cells.

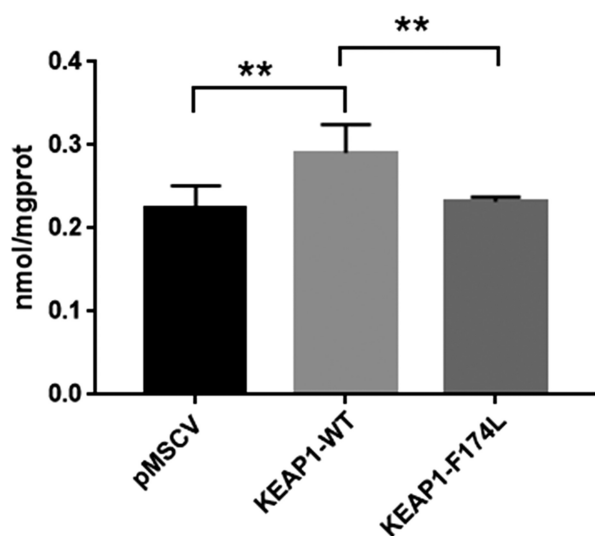


图 4 比较稳定过表达空载,野生型 KEAP1 及 F174L 突变型 KEAP1 的肺癌细胞间丙二醛水平。结果以均值 $\pm$ 标准差表示,**代表 $P < 0.01$ 。
Fig.4 Comparison of MDA levels in KEAP1-pMSCV, KEAP1-WT, and KEAP1-F174L A549 cells. Error bars represent $\bar{x} \pm SD$. **, $P < 0.01$.

2.5 A549 过表达野生型 KEAP1 后,克隆形成能力显著降低;过表达 F174L 突变型 KEAP1 后,克隆形成能力无显著差异

过表达空载,野生型 KEAP1 (KEAP-WT),突变型 KEAP1 (F174L) 的 A549 细胞,以 800 个细胞/孔接种于六孔板,进行克隆形成试验。可见三种细胞克隆形成数有明显差异。与空载对照相比,过表达野生型 KEAP1 的 A549 细胞克隆形成数明显减少,而过表达 F174L 突变型 KEAP1 的 A549 细胞克隆形成数没有明显差异(图 5)。提示 KEAP1 基因可以抑制肺癌细胞增殖,F174L 突变的 KEAP1 基因可能促进细胞增殖。

3 讨论

肺癌目前居于癌症所致死亡原因的首位^[1]。非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 作为肺癌的主要类型,主要包括腺癌(约占 50%)和鳞癌(约占 40%)^[18]。非小细胞肺癌的发生发展机制目前尚不完全清楚。近年来随着以二代测序技术为代表的新技术的兴起,人们发现了更多新的肺癌的致病基因,针对致病基因的靶向治疗在肺腺癌患者中的治疗中已经取得了巨大的成功,但与肺腺癌研究的蓬勃进展相比,肺鳞癌的靶向治疗研究相对滞后。NSCLC 最常见的 EGFR 突变,在临床肺

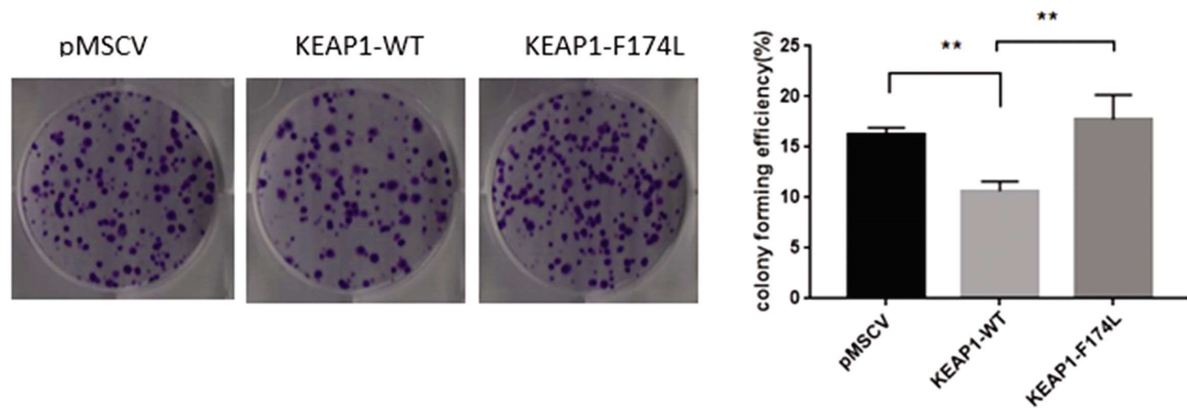


图5 克隆形成实验发现过表达空载,野生型 KEAP1(KEAP-WT),突变型 KEAP1(F174L)的肺癌细胞 A549 间,克隆形成率有明显差异,提示三种细胞的增殖能力有明显差异。**代表 $P < 0.01$ 。

Fig.5 Effect of KEAP1-WT and KEAP1-F174L on the colony forming efficiency of A549 and H460 cells. Error bars represent $\bar{x} \pm SD$ **, $P < 0.01$.

鳞癌患者中的突变率明显低于肺癌患者,大部分的 EGFR-TKI 只对对肺腺癌患者有益。目前发现的肺鳞癌驱动基因有 TP53,成纤维细胞生长因子受体 1(fibroblast growth factor receptor1,FGFR1)^[19],盘状结构域受体(discoidin domain receptor tyrosine kinase 2,DDR2)^[20],磷脂酰肌醇-3-激酶阿尔法催化亚单位(phosphoinositide-3-kinase catalytic alpha polypeptide,PIK3CA)^[21]等,但目前肺鳞癌临床仍无有效的靶向药物。因此寻找新的肺鳞癌致病突变或驱动基因突变,进一步探索其发病机制,将为开发肺鳞癌的靶向治疗策略提供坚实的理论基础。

KEAP1/NRF2 信号通路是体内重要的抗氧化及解毒通路,生理情况下在维持细胞内环境稳态,降低细胞的氧化应激刺激方面起着十分重要的作用。既往研究认为 KEAP1/NRF2 通路有助于癌症的预防及治疗^[22-25],有研究发现 NRF2 基因缺陷小鼠更容易发生癌变^[22],也有研究报道 NRF2 基因缺陷会促进肿瘤的转移^[24,25]。但近年来越来越多的研究发现在多种肿瘤组织中,NRF2 表达有异常增高^[26-28]。

我们课题组前期通过对携带 TP53 热点突变的 13 例(10 例肺鳞癌,3 例肺腺癌)NSCLC 患者的肿瘤组织及癌旁组织进行全基因组/全外显子组测序,结果发现 KEAP1、NRF2 基因在肺鳞癌组织中的突变频率较高,且 KEAP1 和 NRF2 基因的突变在肺鳞癌病人中是互斥的^[2],即 KEAP1 突变的肺鳞癌病人中 NRF2 基因无突变,反之亦然。近年来多项研究表明在肾脏、肝脏、血液系统等肿瘤中也发现了 KEAP1、NRF2 基因的突变^[29]。KEAP1 和 NRF2 基因是机体调节氧化应激的 2 个关键基因,而且这 2 个基因有直接的相互作用,提示我们这两个基因可能在肺鳞癌的发生发展中起到关键性作用。

正常细胞中当作为氧化应激产物的活性氧过多时,可以造成 DNA 损伤从而导致细胞发生基因突变,既往研究表明肿瘤细胞增殖旺盛,代谢迅速,和对应的正常细胞相比,活性氧水平明显增高,故临床上常常使用抗氧化物,通过降低细胞活性氧水平来预防或治疗癌症^[30]。但近年来有研究发现肿瘤细胞常伴有较低的活性氧水平,由此可以避免过高的活性氧对细胞的调控及损伤,使细胞可以处于持续增殖状态^[31,32]。

本研究通过对携带突变 KEAP1 基因与野生 KEAP1 基因的肺癌细胞株对比,发现两组肺癌细胞中,NRF2 及下游抗氧化

及解毒靶基因的表达存在显著差异,在 KEAP1 基因突变的肿瘤细胞中的表达显著高于 KEAP1 基因野生的肿瘤细胞,正常情况下,KEAP1 通过介导 NRF2 的泛素化降解来抑制 NRF2,表达的差异提示 KEAP1 突变为失活型突变。另外,通过对 KEAP1 基因突变与野生的 NSCLC 细胞株进行活性氧或丙二醛水平的检测,进一步提示 KEAP1 突变激活 NRF2 的功能,NRF2 作为转录因子,突变后促进对下游抗氧化基因的转录,使细胞对氧自由基的清除能力增强,细胞氧化应激水平下降。

为了研究 KEAP1 在非小细胞肺癌尤其是肺鳞癌中的生物学功能,我们选择本实验室前期在非小细胞肺癌组织中发现的 KEAP1 基因第 522 位胞嘧啶突变为腺嘌呤的突变点(KEAP1:NM_012289:exon2:c.C522A:p.F174L),作为突变型 KEAP1 的突变位点构建质粒,该突变通过软件预测为可以改变蛋白质结构或功能,很可能是有害的。我们构建了过表达空载,野生型 KEAP1,及突变型 KEAP1 的 A549 稳转细胞株。通过平板克隆实验,对比过表达不同类型 KEAP1 基因的肺癌细胞的克隆形成能力。结果显示,过表达野生型 KEAP1 可明显抑制肿瘤细胞的增殖能力,而过表达突变型 KEAP1 的 A549 细胞,功能实验和过表达空载的细胞结果无明显差异,提示突变型的 KEAP1 逆转了野生型 KEAP1 对自身携带 KEAP1 突变的 A549 细胞的肿瘤抑制作用。提示本研究报道的 KEAP1 突变位点很可能是 KEAP1 的致病突变位点。

我们通过检测并对比 KEAP1 突变与无突变的肺癌细胞中,活性氧水平的差异,发现 KEAP1 突变的肺癌细胞,活性氧水平显著较低,提示 KEAP1 突变可降低肺癌细胞的氧化应激水平。同时,我们通过检测并比较过表达空载,野生型 KEAP1 和突变型 KEAP1 的 A549 细胞中丙二醛水平与功能实验,发现本身具有 KEAP1 基因突变的 A549 细胞过表达野生型 KEAP1 后,丙二醛水平显著升高,克隆形成率显著降低,进一步提示 KEAP1 基因突变可降低肺癌细胞的氧化应激水平。实验结果提示,KEAP1 基因突变可能通过改变细胞氧化应激水平来参与肿瘤细胞的发生发展。

综上所述,我们通过对 KEAP1 基因及其突变位点对非小细胞肺癌细胞株作用的研究,提示 KEAP1 基因具有抑癌作用,突变后可能通过激活 KEAP1/NRF2 通路,改变细胞的氧化应

激水平, 从而促进肺癌的发生发展。基于 KEAP1/NRF2 在 NSCLC 尤其是肺鳞癌中存在较高的突变频率, 本研究可能对 NSCLC 的个体化治疗开拓新的治疗思路, 改善 NSCLC 的治疗现状。

参考文献(References)

- [1] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma[J]. *Nature*, 2014, 511(7511): 543-550
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(1): 7-30
- [3] Chen W, Zheng R, Zhang S, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2013[J]. *Cancer Lett*, 2017, 401: 63-71
- [4] Morgensztern D, Ng SH, Gao F, et al. Trends in stage distribution for patients with non-small cell lung cancer: a National Cancer Database survey[J]. *J Thorac Oncol*, 2010, 5(1): 29-33
- [5] Zhang LL, Kan M, Zhang MM, et al. Multiregion sequencing reveals the intratumor heterogeneity of driver mutations in TP53-driven non-small cell lung cancer[J]. *Int J Cancer*, 2017, 140(1): 103-108
- [6] Padmanabhan B, Tong KI, Ohta T, et al. Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer[J]. *Mol Cell*, 2006, 21(5): 689-700
- [7] Mitsuishi Y, Motohashi H, Yamamoto M. The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism [J]. *Front Oncol*, 2012, 2: 200
- [8] Sporn MB, Liby KT. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context[J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(8): 564-571
- [9] Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, et al. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2 [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(16): 7130-7139
- [10] Cho HY, Kleeberger SR. Nrf2 protects against airway disorders[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 244(1): 43-56
- [11] Suzuki T, Motohashi H, Yamamoto M. Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2013, 34(6): 340-346
- [12] Singh A, Bodas M, Wakabayashi N, et al. Gain of Nrf2 function in non-small-cell lung cancer cells confers radioresistance [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 13(11): 1627-1637
- [13] Satoh H, Moriguchi T, Takai J, et al. Nrf2 prevents initiation but accelerates progression through the Kras signaling pathway during lung carcinogenesis[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(13): 4158-4168
- [14] Solis LM, Behrens C, Dong W, et al. Nrf2 and Keap1 abnormalities in non-small cell lung carcinoma and association with clinicopathologic features[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(14): 3743-3753
- [15] Taguchi K, Fujikawa N, Komatsu M, et al. Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox homeostasis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(34): 13561-13566
- [16] Spitz MR, Duphorne CM, Detry MA, et al. Dietary intake of isothiocyanates: evidence of a joint effect with glutathione S-transferase polymorphisms in lung cancer risk[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2000, 9(10): 1017-1020
- [17] 郑翠侠, 张晓娜, 韩兵, 等. 小鼠骨生成诱导因子基因逆转录病毒载体的构建及其在 293T 细胞中的表达[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2010, 30(12): 1501-1504
- [18] Davidson MR, Gazdar AF, Clarke BE. The pivotal role of pathology in the management of lung cancer [J]. *Journal of Thoracic Disease*, 2013, 5 (Suppl 5): S463-478
- [19] Weiss J, Sos ML, Seidel D, et al. Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer [J]. *Science Translational Medicine*, 2010, 2(62): 62-93
- [20] Hammerman PS, Sos ML, Ramos AH, et al. Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer[J]. *Cancer Discovery*, 2011, 1(1): 78-89
- [21] Piperdi B, Merla A, Perez-Soler R. Targeting angiogenesis in squamous non-small cell lung cancer[J]. *Drugs*, 2014, 74(4): 403-13
- [22] Ramos-Gomez M, Dolan PM, Itoh K, et al. Interactive effects of nrf2 genotype and oltipraz on benzo [a]pyrene-DNA adducts and tumor yield in mice[J]. *Carcinogenesis*, 2003, 24(3): 461-7
- [23] Hayes JD, McMahon M, Chowdhry S, et al. Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway [J]. *Antioxidants & redox signaling*, 2010, 13(11): 1713-48
- [24] Satoh H, Moriguchi T, Taguchi K, et al. Nrf2-deficiency creates a responsive microenvironment for metastasis to the lung [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(10): 1833-43
- [25] Rachakonda G, Sekhar KR, Jowhar D, et al. Increased cell migration and plasticity in Nrf2-deficient cancer cell lines [J]. *Oncogene*, 2010, 29(25): 3703-14
- [26] Kim YR, Oh JE, Kim MS, et al. Oncogenic NRF2 mutations in squamous cell carcinomas of oesophagus and skin [J]. *The Journal of pathology*, 2010, 220(4): 446-51
- [27] Ohta T, Iijima K, Miyamoto M, et al. Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth[J]. *Cancer research*, 2008, 68(5): 1303-9
- [28] Renaud CO, Ziros PG, Chartoumpakis DV, et al. Keap1/Nrf2 Signaling: A New Player in Thyroid Pathophysiology and Thyroid Cancer[J]. *Frontiers in endocrinology*, 2019, 10: 510
- [29] Menegon S, Columbano A, Giordano S. The Dual Roles of NRF2 in Cancer[J]. *Trends in molecular medicine*, 2016, 22(7): 578-93
- [30] Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy [J]. *Nature reviews Drug discovery*, 2013, 12(12): 931-47
- [31] Zhou Z, Song J, Nie L, et al. Reactive oxygen species generating systems meeting challenges of photodynamic cancer therapy [J]. *Chemical Society reviews*, 2016, 45(23): 6597-626
- [32] Sabharwal SS, Schumacker PT. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? [J]. *Nature reviews Cancer*, 2014, 14(11): 709-21