

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.05.005

肺癌细胞系中 KEAP1 与 NRF2 相互作用区域基因突变的检测*

周建平^{1,2},李志芳¹,梁笠轩¹,徐德²

(1. 攀枝花学院医学院,四川攀枝花 617000;2. 攀枝花学院附属医院,四川攀枝花 617000)

[摘要] 目的 检测非小细胞肺癌细胞系中 KEAP1 及 NF-E2 相关因子 2(NRF2)相互作用结构域基因的突变情况。

方法 以 6 个非小细胞肺癌细胞系为材料,检测 KEAP1 基因的第 2 至第 6 外显子及 NRF2 的 DLG 和 ETGE 基序编码序列的碱基序列突变情况,推测相应的氨基酸序列变异。同时检测供试细胞系的细胞内活性氧浓度,分析目标序列突变对肺癌细胞抗氧化系统的影响。结果 在 KEAP1 基因第 4 外显子区域发现 4 个所有癌细胞系共有的突变,部分细胞系的第 3 外显子区域还存在错义突变,所有 NRF2-ETGE 基序编码序列均存在多重遗传变异。活性氧检测发现供试细胞系活性氧浓度均高于肺胚细胞。结论 KEAP1 和 NRF2 基因相互作用结构域的基因突变在供试细胞系内普遍存在,非小细胞肺癌细胞系对细胞内活性氧浓度失去调控能力是普遍现象。

[关键词] NF-E2 相关因子 2;非小细胞肺癌;KEAP1

[中图分类号] R734.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)05-0590-03

Mutation detection in the interaction domains of NRF2 and KEAP1 in lung cancer cell lines*

Zhou Jianping^{1,2},Li Zhifang¹,Liang Lixuan¹,Xu De²

(1. School of Medicine, Panzhihua University, Panzhihua, Sichuan 617000, China;

2. The Affiliated Hospital of Panzhihua University, Panzhihua, Sichuan 617000, China)

[Abstract] **Objective** To detect the interaction domains' gene mutations of KEAP1 and NRF2 in non-small-cell lung cancer cell lines, and to analyze the significance of these mutations on the study of lung cancer cell lines. **Methods** Six non-small-cell lung cancer cell lines were used as the research materials. The 2nd to 6th exons of KEAP1 and the coding sequences of DLG and ETGE motif were amplified by PCR, and the products were used for gene sequencing analysis. Obtained gene sequences were analyzed using NCBI databases to get the base locations of gene mutations, as well as the subsequent amino acid sequence changes. Meanwhile, the relative intracellular reactive oxygen species (ROS) concentrations in the tested cell lines were detected and used in the analysis of abnormal NRF2 transcriptional activity in lung cancer cell. **Results** Four mutations were detected in the 4th exon of KEAP1 gene from all the 6 cancer cell lines, several other missense mutations were also investigated in the 3rd exon of KEAP1 from some cancer cell lines. Multiple genetic variations were found in all the NRF2-ETGE motif-encoding sequences of the 6 cancer cell lines. All 6 cancer cell lines were found to have higher ROS concentration than the lung germ cell line. **Conclusion** Lung cancer cells generally contain high levels of ROS as well as gene mutations in KEAP1 and NRF2 genes which lead to abnormal transcriptional activity of NRF2 in lung cancer cell lines.

[Key words] NF-E2 related factor 2; non-small-cell lung cancer; KEAP1

NF-E2 相关因子 2(NRF2)是细胞氧化应激反应中的关键转录因子,通过与抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)相互作用,调控抗氧化蛋白和Ⅱ相解毒酶的表达^[1]。NRF2 的转录活性受胞浆蛋白(kelch-like ECH-associated protein-1, KEAP1)的负调控^[1]。KEAP1 通过其 BTB 区结合 Cul3、Kelch 区结合 NRF2,将 NRF2 连接到 E3 复合体,使泛素从 E3 转移到 NRF2 的赖氨酸残基(位于 ETGE 基序、DLG 基序之间),泛素化的 NRF2 被迅速降解^[2-3]。发生氧化应激时,KEAP1 特定的半胱氨酸残基被氧化修饰,导致 DLG 基序与 KEAP1 的亲合力减弱而分离,从而使 NRF2 免于泛素化降解。

研究发现,KEAP1 和 NRF2 的体细胞突变常见于肺癌患者体内。KEAP1 和 NRF2 的表达水平影响着非小细胞肺癌患者的化学治疗效果和无进展生存期^[4-5]。约 15% 的肺癌患者携带 KEAP1 基因的体细胞突变^[6],从而使得 KEAP1 失去了

对 NRF2 活性的负调控能力。同时,约 10% 的肺癌患者携带 NRF2 基因的体细胞变异^[1],使其能避免被 KEAP1 诱导降解,从而始终保持高度的 NRF2 转录因子活性。上述体细胞突变的存在,使得肺癌细胞能够持续大量表达抗氧化蛋白和解毒酶类,是导致癌细胞耐药的原因之一^[7-8]。本研究以肺癌研究中常用的非小细胞肺癌细胞系为材料,对其核基因组中的 KEAP1-Kelch 区和 NRF2-ETGE 基序、NRF2-DLG 基序的编码区段进行了 PCR 扩增和测序,以检测在这些常用肺癌研究材料中是否存在上述基因的突变,并结合细胞内活性氧水平的检测,分析了上述非小细胞肺癌细胞系在肺癌研究中的适用性。

1 材料与方法

1.1 肺癌细胞的准备 非小细胞肺癌细胞系 PC9、HCC827、NCI-H1975、NCI-H1299、NCI-H460、NCI-H661 和肺胚细胞系 WI-38 均购自中国科学院细胞库。冻存的细胞在 37 ℃ 快速解冻后,1 000 r/min 离心 5 min,用 RPMI 1640 基础培养基清洗

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81301893);四川省攀枝花市科技计划项目(2014TX-10-1);攀枝花学院大学生创新创业训练计划项目(2014cxxy084)。作者简介:周建平(1981—),讲师,博士,主要从事肿瘤相关细胞内信号转导网络研究。

表 1 PCR 扩增采用的正反向引物序列

靶序列	正向引物	反向引物
NRF2-ETGE	CCA AAA GGA GCA AGA GAA AGC	GCA GTC ATC AAA GTA CAA AGC AT
NRF2-DLG	GGA CAT GGA TTT GAT TGA CAT AC	CTC CTT TTG GAG TTG TTC TTG T
KEAP1 exon2	GCA AAT GGA TTC TGC TTC ACC TAC TT	TCA AAC TGT GGA GAC TAC ACC ACC AT
KEAP1 exon3	CAT CAC AAT GTA CGC GGT TCC TAT TA	GGC ACA GAA TCA AAG GTC ACT GAC TA
KEAP1 exon4	GAT GAA CCT GTC TCT TTA AGG GGG AA	GGA GAG AGA GAA GCT TGG ACT CTA TCA GAA
KEAP1 exon5	GTG AGA AGG GAG AGG AGA GAG GAA AGG TCT	TCC AGC TGG GCA ACA GAG CGA GAC CTT GTT T
KEAP1 exon6	AAG AGA CTA AGG TTT TGC TAT GTT GC	AGC TGA AAC TGA AGG ACA ACT GTG TG

1~2 次,并重悬后再离心,获得的细胞加入含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基,37 °C,5% CO₂ 培养箱内培养,每天换 1 次培养基,待细胞 80%粘连时收获细胞。

1.2 DNA 提取 采用天根快速 DNA 提取检测试剂盒, (KG203) 按说明书步骤进行 DNA 提取。首先取约 5 mg 细胞于 1.5 mL Eppendorf 管,加入 100 μL 缓冲液 B₁,用研磨杵(天根目录号:WL046)反复研磨 30 s 至样品与缓冲液 B₁ 混匀,再加入 100 μL 缓冲液 B₂,振荡混匀,12 000 r/min 离心 2 min,吸取其上清液直接用于 PCR。

1.3 PCR 扩增及产物测序 采用生工 PCR 扩增试剂盒 (B532493),按说明书进行 PCR 扩增。PCR 反应体系包括:模板、正反向引物、PCR Buffer (含 Mg²⁺)、Pfu DNA 聚合酶、dNTP。反应循环参数:95 °C 2 min 进行 DNA 变性;95 °C 20 s,58 °C 30 s,72 °C 1 min,循环 40 次;最后于 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳 20 min 后,于 Bio-Rad 荧光成像系统检测,目标产物条带切胶回收,获得 30~40 μL 的纯化产物。PCR 纯化产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,得到测序图谱及序列。PCR 扩增采用的正反向引物序列见表 1。

1.4 基因突变的检测 核酸序列位置编码参考报道在美国国家生物技术信息中心网站(NCBI,http://www.ncbi.nlm.nih.gov)的人类基因参考序列:KEAP1 (NM_012289.3)、NRF2 (NM_006164.4)。根据与参考序列比对结果,确定检测序列是否发生碱基突变,并用 lasergene 软件的 MegAlign 程序预测其对应的蛋白质氨基酸序列改变。

1.5 活性氧浓度检测 采用碧云天活性氧检测试剂盒 (S0033),按照说明书步骤处理供试的肺癌细胞。细胞的准备如 1.1 所述,待细胞长满后调整细胞浓度为 5×10⁴/mL,按实验分组接种于 48 孔培养板,每孔 300 μL,37 °C,5% CO₂ 培养箱内培养 24 h。观察细胞 80%粘连时,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗每孔细胞,加入 DHE 荧光染料,37 °C 下孵育 30 min 后,分别于荧光显微镜和荧光发光分析仪(Thermo Scientific)下拍照及检测。

2 结 果

2.1 KEAP1 的 Kelch 结构域对应外显子基因突变分析 测

序分析了 KEAP1 基因第 2 到第 6 外显子区域的 DNA 序列,发现第 3 和第 4 外显子区域存在错义突变和同义突变(表 2)。从错义突变导致的氨基酸改变可以发现,所有供试细胞系在 KEAP1 第 4 外显子区域的 4 个相同位点存在相同突变,推测可能显著减弱 KEAP1 与 NRF2 的亲合力。其中 3 个位点的氨基酸残基电荷性质发生了显著改变:第 446 位由酸性谷氨酸(E)变为碱性赖氨酸(K),第 459 位碱性精氨酸(R)变为近中性的谷氨酰胺(Q),第 493 位酸性谷氨酸(E)变为碱性赖氨酸(K),上述氨基酸的变异可导致蛋白质构象的显著改变,从而减弱甚至丧失 KEAP1 结合 NRF2 的能力。第 475 位缬氨酸(V)变为甘氨酸则可能导致蛋白质折叠能力的显著改变。同时,部分细胞系的第 3 外显子区域也存在错义突变:第 333 位甘氨酸(G)变为半胱氨酸(C),第 236 位的酸性天冬氨酸(D)变为碱性组氨酸(H)。

表 2 KEAP1 第 2-6 外显子基因突变分析

基因突变	氨基酸改变	突变类型	细胞系
exon 3			
1038G>T	G333C	错义突变	827,1299,1975,pc9
747G>C	D236H	错义突变	460
exon 4			
1377G>A	E446K	错义突变	827,1299,1975,pc9,661,460
1417G>A	R459Q	错义突变	827,1299,1975,pc9,661,460
1465T>G	V475G	错义突变	827,1299,1975,pc9,661,460
1518G>A	E493K	错义突变	827,1299,1975,pc9,661,460
1520G>A		同义突变	827,1975,pc9
1454C>G		同义突变	460

2.2 NRF2-DLG 和 NRF2-ETGE 基因序列编码基因突变分析 对 DLG 及 ETGE 基因序列的基因突变检测结果显示,NRF2-DLG 基因序列的碱基序列无突变,NRF2-ETGE 基序对应碱基序列存在多重遗传变异(表 3)。所有供试细胞系的 ETGE 基因序列对应碱基序列均存在大量的点突变,同时在 347 和 352 位点还存在缺失突变,推测其编码的氨基酸序列发生了极大改变,几乎所有位点的氨基酸均发生了改变,供试 6 个细胞系中不存在可供 KEAP1 蛋白结合的 ETGE 基因序列。

表 3 NRF2-ETGE 基因序列编码基因突变分析

缺失突变	点突变	改变的氨基酸序列 ^a	细胞系
347delA,352delC	342G>T,343A>T,346A>G,350G>T, 353A>T,354G>T,357G>T,358A>T,359A>C	77FGILF81	827
347delA,352delC	342G>T,343A>T,346A>G,350G>T,353A>T,354G>T 343A>T,346A>G,350G>T,353A>T, 354G>T,357G>T,358A>T,359A>C	77FGIL80	1299
347delA,352delC	342G>T,343A>T,346A>G,350G>T,353A>T, 354G>T,356T>C,357G>C,358A>T,359A>C	77VGILF81	1975
347delA,352delC,355delG	342G>T,343A>T,346A>G,350G>T,353A>T, 354G>T,356T>C,357G>C,358A>T,359A>C	77FGIFL81	pc9

续表 3 NRF2-ETGE 基因序列编码基因突变分析

缺失突变	点突变	改变的氨基酸序列 ^a	细胞系
347delA	343A>T,349A>T,350G>T,351A>C,353A>T, 354G>T,357G>T,358A>T,359A>C	77VEFLVVS82	661
347delA	350G>T,352C>G,353A>C,359A>C	77DEIAVT82	460

^a:NRF2-ETGE 基因序列的氨基酸序列为:77DEETGE82。

2.3 肺癌细胞内活性氧浓度检测 采用 2',7'-二氧荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)法检测供试细胞系的相对活性氧浓度发现,供试肺癌细胞内活性氧水平显著高于肺胚细胞 WI-38,其中 NCI-H1975 细胞内活性氧浓度最高,其余细胞系的活性氧浓度相当。见图 1。

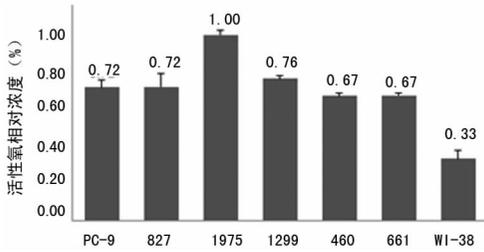


图 1 细胞内活性氧相对浓度比较

3 讨论

KEAP1/NRF2 相互作用结构域基因突变在非小细胞肺癌细胞系内普遍存在,提示 NRF2 的转录因子活性的组成型表达是肺癌细胞增殖和存活的关键因素。KEAP1-NRF2 调控系统在人类细胞的抗氧化和解毒调控中发挥着核心作用,非应激条件下,NRF2 蛋白通过与 KEAP1-泛素连接酶 E3 复合体结合,不断被泛素化降解^[9]。在氧化应激状态下,KEAP1 蛋白中的活性半胱氨酸残基被氧化修饰,造成其与 E3 连接酶亲和力下降,使得 NRF2 能够在细胞内稳定存在,从而具有转录因子活性,能够进入细胞核内诱导一系列抗氧化和解毒基因的表达^[10]。本次检测到肺癌细胞系内普遍存在着 KEAP1-Kelch 结构域和 NRF2-DLG/ETGE 基因序列基因的突变,且都可能导致蛋白质一级系列的变异,导致蛋白质功能的异常,KEAP1 蛋白不能与 NRF2 蛋白进行正确识别和结合。这意味着在供试肺癌细胞内的 KEAP1-E3 复合体均对 NRF2 失去了抑制作用,NRF2 因子可在癌细胞内稳定存在,使得癌细胞内抗氧化蛋白和解毒酶类变为组成型表达,使癌细胞的抗氧化能力最强化,以适应和拮抗癌细胞内高浓度的活性氧累积。

组成型表达的 NRF2 转录活性对肺癌细胞的存活是必需的^[11],但是对于肿瘤治疗和肿瘤研究而言,这一变化意味着不好的结果:NRF2 诱导大量解毒酶类的表达,极大地增强了癌细胞对抗癌药物的耐受性,有助于促进肺癌细胞耐药^[12-14]。研究发现,通过破坏肺癌细胞 NRF2 蛋白的稳定性,可以有效提高肺癌细胞对抗癌药物的敏感性^[13,15]。这意味着许多肺癌细胞对抗癌药物的耐药可能是 NRF2 或 KEAP1 基因突变导致的,使用具有不同遗传背景的癌细胞系进行药物测试可能得出不同的结论。因此,对于肿瘤药物研发而言,选择具有恰当遗传背景的细胞系是药物细胞测试能否成功的关键。

参考文献

[1] Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-NRF2 pathway in stress response and cancer evolution[J]. Genes Cells, 2011, 16(2): 123-140.

[2] Holland R, Hawkins AE, Eggler AL, et al. Prospective

type 1 and type 2 disulfides of Keap1 protein[J]. Chem Res Toxicol, 2008, 21(10): 2051-2060.

[3] Satoh H, Moriguchi T, Taguchi K, et al. NRF2-deficiency creates a responsive microenvironment for metastasis to the lung[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(10): 1833-1843.

[4] 曹宝山,朱翔,陈森,等. Keap1 在非小细胞肺癌中的表达及与化疗疗效相关性的研究[J]. 中国肺癌杂志, 2012, 15(10): 591-596.

[5] 倪静,秦丽娟,吴拥军,等. 肺癌组织中 NRF2、Keap1 和 NQO1 蛋白的表达[J]. 郑州大学学报(医学版), 2012, 47(4): 456-459.

[6] Singh A, Misra V, Thimmulappa RK, et al. Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer[J]. PLoS Med, 2006, 3(10): 1865-1876.

[7] Namani A, Li Y, Wang XJ, et al. Modulation of NRF2 signaling pathway by nuclear receptors: implications for cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843(9): 1875-1885.

[8] Shibata T, Ohta T, Tong KI, et al. Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(36): 13568-13573.

[9] McMahon M, Thomas N, Itoh K, et al. Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a "tethering" mechanism: a two-site interaction model for the NRF2-Keap1 complex[J]. J Biol Chem, 2006, 281(34): 24756-24768.

[10] 刘晓平. 癌症预防中的 Keap1-NRF2-ARE 通路[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2008, 13(6): 716-720.

[11] Ohta T, Iijima K, Miyamoto M, et al. Loss of Keap1 function activates NRF2 and provides advantages for lung cancer cell growth[J]. Cancer Res, 2008, 68(5): 1303-1309.

[12] Shibata T, Kokubu A, Gotoh M, et al. Genetic alteration of Keap1 confers constitutive NRF2 activation and resistance to chemotherapy in gallbladder cancer[J]. Gastroenterology, 2008, 135(4): 1358-1368.

[13] Homma S, Ishii Y, Morishima Y, et al. NRF2 enhances cell proliferation and resistance to anticancer drugs in human lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(10): 3423-3432.

[14] 莫享阳,乔洪源,欧阳学农,等. Keap1/NRF2/ARE 信号通路介导非小细胞肺癌耐药机制的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(9): 1322-1324.

[15] Zhou S, Ye W, Shao Q, et al. NRF2 is a potential therapeutic target in radioresistance in human cancer[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2013, 88(3): 706-715.