

稳定表达EGFR胞外结构域A289V突变的恶性胶质瘤细胞系的构建及鉴定

费语晨^{1,2} 刘文静³ 胡欣⁴ 王春琳⁴ 吕东来^{1,2*}

(¹安徽医科大学解放军临床学院, 合肥 230032; ²安徽医科大学第五临床医学院, 合肥 230032; ³中国科学技术大学附属第一医院临床病理中心, 合肥 230036; ⁴中国人民解放军联勤保障部队第901医院, 合肥 230031)

摘要 利用慢病毒转染技术构建两种能够稳定表达EGFR ECD A289V错义点突变的胶质瘤细胞系, 为该种突变胶质瘤的临床前研究提供细胞模型。使用同源重组酶连法构建重组质粒, 通过钙转法包装慢病毒感染U87、U251胶质瘤细胞, Western blot验证EGFR A289V突变蛋白的表达情况, Transwell侵袭实验观察两种细胞系侵袭能力的变化, 并利用CCK-8细胞活力检测实验探究TKI对其的有效性。结果显示, 所构建的质粒测序鉴定成功, 并且重组质粒感染目的细胞系后可顺利表达EGFR A289V突变蛋白。经Transwell侵袭实验和CCK-8细胞活力检测实验确认改造过的U87、U251细胞系侵袭能力增加, 且能被奥希替尼有效抑制。综上, 表达EGFR A289V突变的胶质瘤细胞系更具侵袭表现, 奥希替尼在体外环境中能够有效抑制存在此类突变的胶质瘤细胞的增殖。该实验为此种突变的药理学研究提供了可供使用的细胞模型。

关键词 胶质母细胞瘤; EGFR; 胞外结构域

Construction and Identification of Glioma Cell Lines Stably Expressing EGFR Extracellular Domain A289V Mutation

FEI Yuchen^{1,2}, LIU Wenjing³, HU Xin⁴, WANG Chunlin⁴, LÜ Donglai^{1,2*}

(¹PLA Clinical College of Anhui Medical University, Hefei 230032, China; ²the Fifth Clinical School of Medicine of Anhui Medical University, Hefei 230032, China; ³Center of Clinical Pathology of the First Hospital Affiliated to University of Science and Technology of China, Hefei 230036, China; ⁴the 901 Hospital of Joint Logistics Support Force of PLA, Hefei 230031, China)

Abstract The aim of this study was to construct two glioma cell lines with stable expression of EGFR ECD A289V missense point mutation by lentivirus transfection technique, and to provide a cell model for the pre-clinical study of this mutant glioma. The recombinant plasmid was constructed using homologous recombination enzyme linking method and the lentivirus was packaged by calcium transfer method to infect U87 and U251 glioma cells. Verification via Western blot confirmed the expression of EGFR A289V mutant protein, while Transwell invasion assay observed changes in invasion ability of both cell lines. The efficacy of TKI on CCK-8 cell viability was investigated via CCK-8 cell viability assay. Results showed that constructed plasmid was identified successfully by sequencing, and the recombinant plasmid could successfully express EGFR A289V mutant protein after infecting the target cell line. Transwell invasion assay and CCK-8 cell viability assay confirmed that the invasion ability of

收稿日期: 2023-07-31 接受日期: 2023-11-08

安徽省高校研究生科研项目(批准号: YJS20210318)和第901医院院管科研项目(批准号: 2021YGZD10)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13655600090, E-mail: lvxunhuan@163.com

Received: July 31, 2023 Accepted: November 8, 2023

This work was supported by the Anhui University Graduate Research Project (Grant No. YJS20210318), and the 901 Hospital Management Research Project (Grant No. 2021YGZD10)

*Corresponding author. Tel: +86-13655600090, E-mail: lvxunhuan@163.com

modified U87 and U251 cell lines was increased and could be effectively inhibited by Osimertinib. Overall, glioma cell lines expressing *EGFR* A289V mutation are more malignant, and Osimertinib can effectively inhibit the proliferation of glioma cells with such mutation *in vitro*. This experiment provides a useful cell model for the pharmacological study of this mutation.

Keywords glioblastoma; epidermal growth factor receptor; extracellular domain

胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)是成人中枢神经系统肿瘤中最常见的和最具恶性的肿瘤^[1]。近年来多项研究表明,GBM发生发展的进程与表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, *EGFR*)基因状态的改变密切相关^[2]。34%~64%的GBM存在*EGFR*扩增,22%~89%的GBM存在*EGFR*过表达,而50%左右*EGFR*扩增的GBM患者同时存在胞外结构域(extracellular domain, ECD)的突变^[3]。虽然胶质瘤相关的*EGFR* ECD研究数据并不多见,自1991至2022年31年间相关文献仅113篇论著,但却少而精,相当高比例发表在*Nature*、*Cancer Discover*、*PNAS*等高影响力杂志上^[4-10]。近年来有越来越多的研究者把目光投向胶质瘤与*EGFR* ECD突变的研究中。*EGFR* ECD缺失突变以*EGFR* VIII为主,而胞外区错义突变则以第289个氨基酸位点最为常见^[11-13]。多个数据库统计结果表明,*EGFR* A289V是胞外区错义突变最常见的突变形式,而且这种突变会进一步缩短患者的生存期^[8,14-15]。有研究提示,*EGFR* A289V错义突变会上调基质金属蛋白酶-1(matrix metalloproteinase-1, MMP-1)的表达水平以增强肿瘤的侵袭性^[8]。相较于GBM,针对*EGFR*的靶向治疗多集中于非小细胞肺癌领域(non-small cell lung cancer, NSCLC)^[16-18]。而在NSCLC中,经常检测到*EGFR*胞内激酶结构域的激活突变,如21外显子中的L858R和外显子19中的框内缺失突变,这些突变在GBM中很少见^[19-21]。许多*EGFR*靶向药物或抗体在穿越血脑屏障方面效率不高,从而限制了它们在胶质瘤中的应用,临床上面对带有*EGFR* A289V突变的GBM患者,如何选用靶向药物的问题亟待解决。除此之外,*EGFR* A289V突变下游信号通路的变化、对肿瘤表型的影响等问题也需要进一步研究。

因此为了更好地探索*EGFR* A289V突变引起GBM更加恶性的分子生物学机制,并寻找能有效抑制此种突变的靶向药物,本研究拟构建两种稳定过表达人*EGFR* A289V突变蛋白的GBM细胞系,旨在为研究*EGFR* ECD突变提供可供使用的细胞系。除

此之外通过使用两种酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI),观察其对所构建细胞系的抑制作用,期望能为临床上此类突变患者的靶向治疗提供一定帮助。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 本文所使用的293T细胞、STBL3感受态细胞及人胶质瘤细胞系U87、U251均由中国科学技术大学附属第一人民医院智慧病理研究所提供。骨架为pCDH-CMV-EF1-Puro的真核表达载体由智慧病理研究所保存提供。逆转录病毒包装系统(PAX₂、VSVG)由Addgene公司提供。

1.1.2 主要试剂 EGF receptor (D38B1) antibody (4267)购自美国Cell Signaling Technology公司; Flag-tag (10E1) mouse antibody (390002)购自成都正能生物技术公司; 驴抗小鼠荧光二抗(SA5-10037)及驴抗兔荧光二抗(A-21206)购自美国Invitrogen公司; *Xba* I限制性内切酶(R0145)和*Not* I-HF限制性内切酶(R0189)购自美国New England Biolabs公司; FastPure Gel DNA extraction mini kit (DC301)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; Pro Ligation-Free Cloning Kit (E086)购自ABM生物公司; 2× Taq Master Mix (E005)和2× Fast Pfu master mix (E035)购自苏州近岸蛋白科技股份有限公司; 青-链霉素、DMEM高糖液体培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)均购自Biological Industries公司。

1.2 方法

1.2.1 *EGFR*基因全长数据获取与分析 从NCBI官网(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取*EGFR*基因全长信息,以人*EGFR*野生型(以下简称*EGFR* WT)为模板,选其胞外结构域第289个氨基酸突变即*EGFR* A289V突变作为研究重点,同时以胞内结构域突变*EGFR* L858R为阳性对照。NCBI中的序列号为NM_005228.5。

1.2.2 细胞培养 人胶质瘤细胞系U87、U251和人

胚肾细胞293T均常规培养于添加10% FBS和1%青-链霉素双抗的DMEM高糖培养基中,并将其放置在37 °C、5% CO₂恒温培养箱中培养。使用复苏后第3至10代细胞用于实验。

1.2.3 重组慢病毒质粒构建 以研究所之前保存的pWPXLd-EGFR-A289V、MSCV-EGFR L858R突变质粒及pWPXLd-EGFR-WT重组质粒为模板设计特异性扩增引物, *EGFR*-forward为5'-ATA GAA GAT TCT AGA ATG CGA CCC TCC GGG AC-3'、*EGFR*-reverse为5'-ATC CTT CGC GGC CGC TCA CTT GTC ATC GTC GTC CTT GTA ATC TGC TCC AAT AAA TTC-3', 下划线所示位置为限制性核酸内切酶识别位点,加粗所示位置为在3'添加的Flag-tag标签,通过PCR获得带Flag-tag标签的*EGFR* WT、A289V、L858R全长基因片段。选取*Xba* I和*Not* I内切酶制备线性化载体,慢病毒载体pCDH-CMV-EF1-Puro双酶切产物经琼脂糖凝胶电泳分离并胶回收纯化。利用Pro Ligation-Free Cloning Kit(E086)进行同源重组酶连反应将目的*EGFR*片段与线性载体连接获得重组慢病毒质粒。将其用STBL3感受态细胞进行转化涂板,利用质粒PCR的方法筛选鉴定正确的克隆送公司测序,本文所使用的PCR引物及测序服务均由上海生工生物工程股份有限公司(以下简称生工)提供。依据测序结果抽提纯化质粒。

1.2.4 慢病毒的包装与目的细胞的感染 在包装前一天取对数生长期的293T细胞接种于10 cm培养皿中,待细胞密度达70%~80%时进行钙转法包装慢病毒。将重组质粒即pCDH-EGFR-WT、pCDH-EGFR-A289V、pCDH-EGFR-L858R分别与辅助质粒(PAX₂、VSVG)、钙转试剂按3:6:6的比例混和后缓慢加入293T细胞培养基中,轻晃混匀后置于37 °C培养箱中培养,同时设置pCDH-GFP质粒作为对照,24 h后更换新鲜培养基,于48~72 h收集含病毒的上清并将收集到的病毒液加入前一天传代好的U87、U251细胞的培养基中,等待感染24 h后,在荧光显微镜下观察pCDH-GFP质粒对照组荧光。感染目的细胞48 h后,进行传代,并加入嘌呤霉素(5 μg/mL)直至未转染的对照组细胞完全死亡以筛选稳定转染的细胞继续培养。

1.2.5 Western blot 取2×10⁶个细胞分别加入150 μL 1×RIPA裂解液,于冰上裂解约15 min后,4 °C、12 000 r/min、15 min离心取得蛋白质上清。用Bradford蛋白质浓度

测定试剂盒进行蛋白质浓度测定。采用碧云天凝胶配置试剂盒的说明书配制10%的SDS-PAGE凝胶进行电泳及转膜。转膜结束后,用5%脱脂牛奶进行常温封闭1 h。于4 °C冷室过夜孵育一抗即EGF receptor antibody(1:1 000)、Flag-tag(10E1) mouse antibody(1:1 000)及内参抗体GAPDH Rabbit mAb(1:10 000)后,PBST洗涤3次,再于室温下加入对应二抗孵育1 h,TBST清洗3次后进行曝光成像。

1.2.6 Transwell侵袭实验 将Matrigel基质胶和无血清培养基按1:5比例混合稀释,取60 μL垂直悬空滴加入BD小室中,并置于培养箱中静置2~4 h,直至基质胶和无血清培养基混合液凝固。每个BD上室中加入用300 μL无血清培养基重悬的目的细胞2×10⁴个,每个对应下室加入680 μL含10% FBS的DMEM培养基,37 °C、5% CO₂细胞培养箱孵育36 h。使用4%多聚甲醛固定液在室温下固定30 min,之后使用0.1%结晶紫溶液在室温下染色30 min。

1.2.7 CCK-8细胞活力检测实验 当药物对细胞产生抑制作用时,将目的细胞密度稀释成30 000个/mL,待进行细胞增殖检测时,将目的细胞密度稀释成20 000个/mL,按照每孔100 μL体积将细胞接种在96孔细胞培养板中,每组设置6个复孔。每次实验均设置空白对照组及阴性对照组。细胞放置在37 °C培养箱中培养。待药物对细胞增殖产生抑制作用时,于24 h后加入抑制剂,每孔100 μL。继续培养72 h后进行细胞活力检测。当进行细胞增殖能力比较实验时,于0 h、36 h加入CCK-8反应试剂检测细胞活力。每孔加入10%体积的CCK-8试剂,并在37 °C、5% CO₂细胞培养箱孵育3 h,最后用酶标仪在450 nm处测定吸光度值,并对数据进行分析。

1.2.8 数据处理 本实验涉及到的统计分析采用GraphPad Prism 9统计学软件进行,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,*t*检验和ANOVA用来分析*P*值,*P*<0.05被认为具有统计学差异,**P*<0.05,***P*<0.01,****P*<0.001,*****P*<0.000 1。

2 结果

2.1 琼脂糖凝胶电泳鉴定载体质粒双酶切结果和*EGFR*基因PCR克隆结果

本文选用骨架为CD510B-1-pCDH-CMV-EF1-Puro的慢病毒质粒pCDH-VHL-HA作为载体质粒,用*Xba* I、*Not* I进行双酶切,去除研究所之前插入的

VHL-HA中间片段并线性化质粒, 经过酶切后的片段为35 bp和7 384 bp, 通过琼脂糖凝胶电泳鉴定质粒双酶切结果, 如图1A所示。对研究所保存的重组质粒(pWPXLd-EGFR A289V、pWPXLd-EGFR WT、MSCV-EGFR L858R)上的*EGFR*基因分别进行PCR克隆, *EGFR*基因全长为3 630 bp, PCR结果提示条带位置如图1B和图1C所示, 将DNA产物纯化后送生工公司测序确认序列复制正确。

2.2 菌落PCR验证重组慢病毒载体同源重组酶连结果

将纯化且测序验证过的EGFR WT、EGFR A289V、EGFR L858R DNA产物分别与pCDH质粒通过同源重组酶连法进行连接, 后经过转化, 涂板, 过夜培养后挑取单克隆菌落进行培养, 取适量菌液进行菌落PCR, 结果如图2A所示, 将显示阳性的菌液进行培养抽提质粒, 后将所得的质粒送往公司进行测序, 确保所得质粒在预计的位置准确插入所需的*EGFR*的全长基因及相关突变序列, 质粒构建完成。

2.3 病毒颗粒感染U87、U251细胞绿色荧光检测结果

钙转法获得的病毒颗粒感染U87、U251细胞48 h后, 通过荧光显微镜可观察到对照组pCDH-GFP绿色荧光蛋白在细胞内的表达情况, 观察结果显示, U87和U251细胞均有明显的绿色荧光, 表明pCDH-puro、pCDH-EGFR-WT、pCDH-EGFR-A289V、

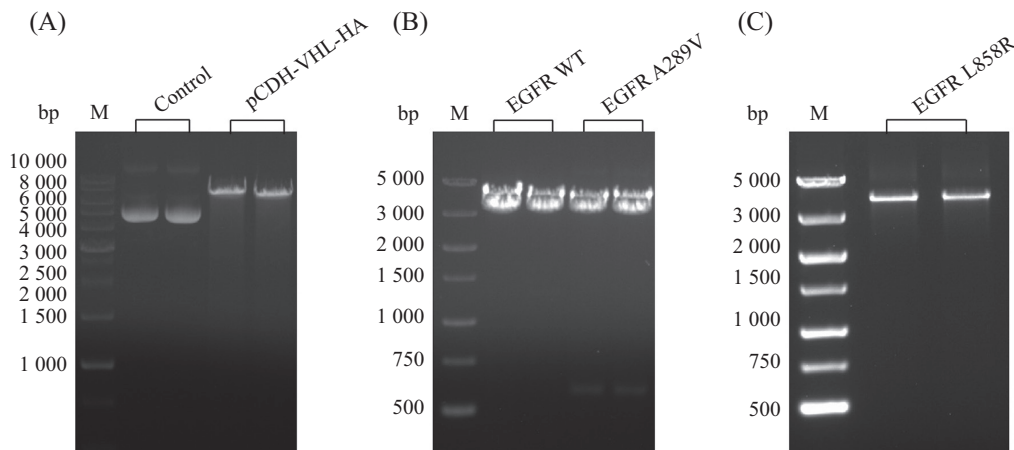
pCDH-EGFR-L858R病毒颗粒顺利感染并稳定表达。同批进行感染的pCDH-puro、pCDH-EGFR-WT、pCDH-EGFR-A289V、pCDH-EGFR-L858R病毒颗粒顺利感染U87、U251细胞, 结果如图2B和图2C所示。

2.4 Western blot检测病毒感染后U87、U251细胞中Flag-tag的表达水平

使用pCDH-puro空载质粒作为阴性对照, 将pCDH-EGFR-WT、pCDH-EGFR-A289V、pCDH-EGFR-L858R重组质粒转染进U87、U251细胞。提取经过嘌呤霉素筛选后的细胞蛋白进行Western blot(图3A和图3B)。Flag-Tag为构建重组质粒时, 人为添加在*EGFR*基因末端的序列表达的多肽结构中, 正常细胞中并不存在Flag-Tag的表达。Western blot结果显示, 稳转细胞中成功表达Flag-Tag蛋白, 同时U87、U251细胞中EGFR WT、EGFR A289V、EGFR L858R三组的EGFR蛋白表达水平升高, 并表现出与Flag-Tag蛋白大致相同的变化趋势。由此可证, 稳定过表达EGFR WT、EGFR A289V、EGFR L858R蛋白的胶质瘤细胞构建成功。

2.5 EGFR A289V突变的U87、U251细胞在体外培养时侵袭、迁移能力增强

为观察我们所构建的稳定表达EGFR A289V突变的U87、U251胶质瘤细胞系是否也存在侵袭能力的改变。我们以EGFR WT胶质瘤细胞系为阴性对照, EGFR L858R胶质瘤细胞系为阳性对照, 采用

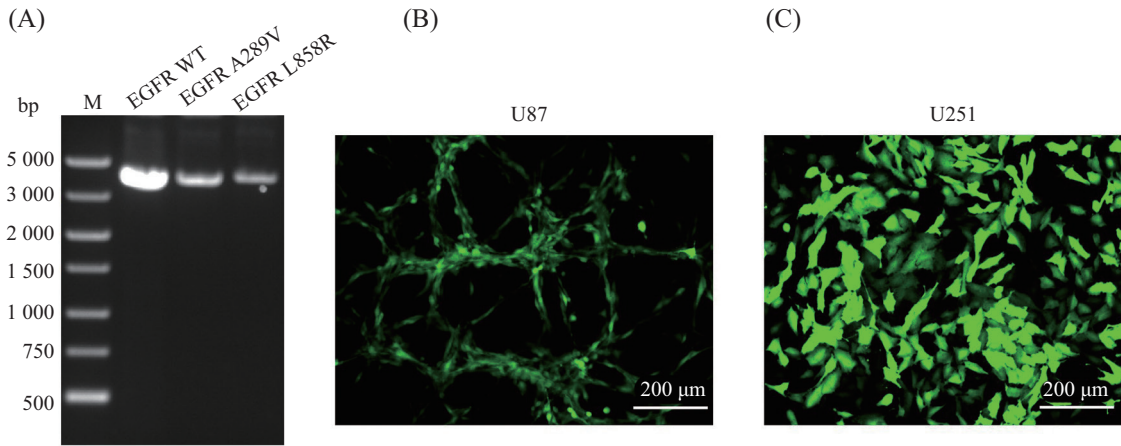


A: pCDH-VHL-HA载体质粒酶切后电泳图, M为10 Kb DNA marker, Control为未添加核酸内切酶的pCDH-VHL-HA质粒; B、C: *EGFR*基因PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图, M均为5 Kb DNA marker。

A: agarose gel electrophoresis of pCDH-VHL-HA vector plasmid after digestion. M was 10 Kb DNA marker. Control was pCDH-VHL-HA plasmid without added endonuclease; B,C: agarose gel electrophoresis of *EGFR* gene PCR amplification products, M were all 5 Kb DNA marker.

图1 载体质粒双酶切结果和*EGFR*基因PCR克隆结果

Fig.1 Results of double enzyme digestion of vector plasmid and PCR cloning of *EGFR* gene

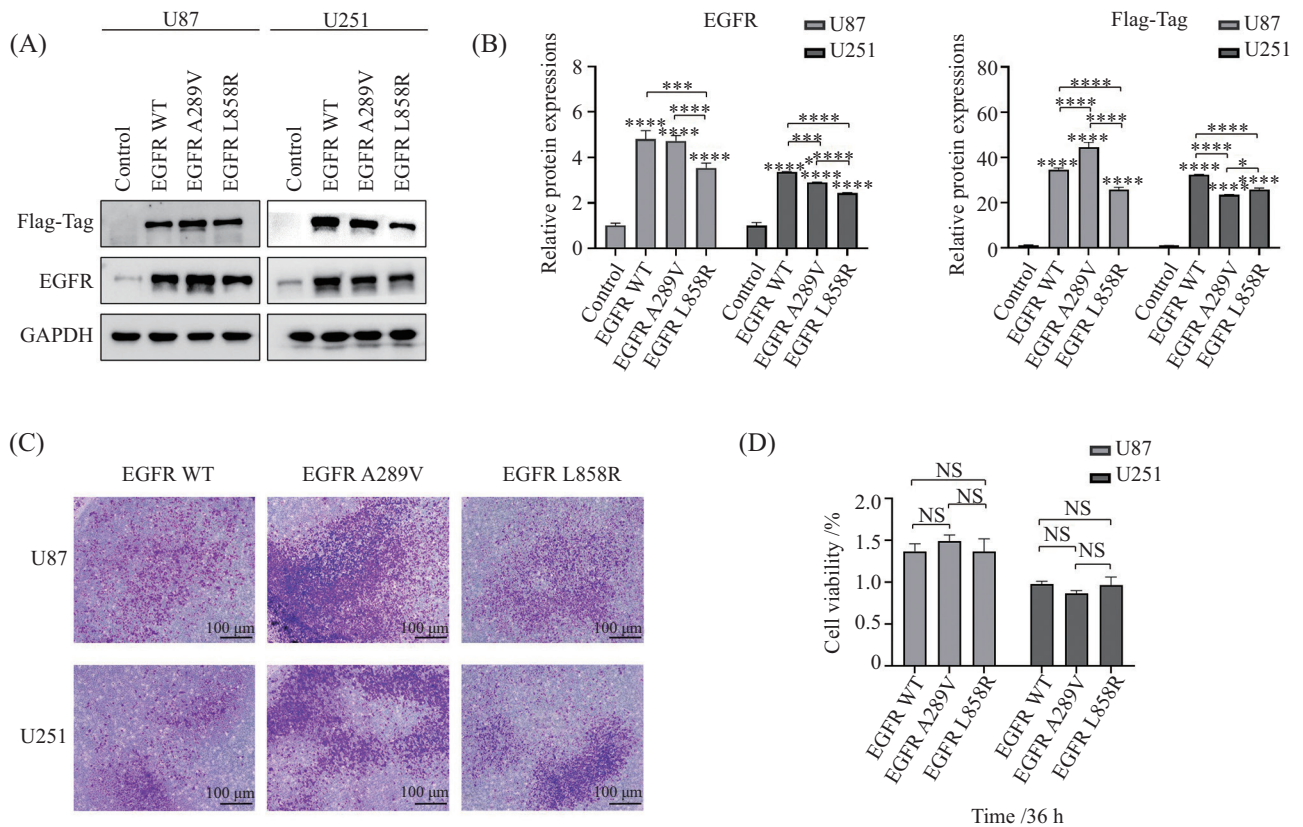


A: 基因重组质粒菌落PCR结果的琼脂糖凝胶电泳图, M为5 Kb DNA marker; B、C: 钙转法所得的pCDH-GFP病毒颗粒感染稳转细胞系绿色荧光观察结果。

A: agarose gel electrophoretic map of PCR results of gene recombinant plasmid colonies, M was 5 Kb DNA marker; B,C: green fluorescence observation of pCDH-GFP virus particle infection stable cell line obtained by calcium transfer method.

图2 重组慢病毒载体的构建与转染

Fig.2 Construction and transfection of recombinant lentiviral vector



A: Western blot检测稳转细胞系中Flag-Tag和EGFR蛋白的表达; B: U87、U251稳转细胞系Control组、EGFR WT组、EGFR A289V组和EGFR L858R组中EGFR、Flag-Tag蛋白的相对表达量; C: Transwell侵袭实验验证稳转细胞系的侵袭能力改变; D: U87、U251稳转细胞系培养36 h时增殖能力比较。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, NS: $P > 0.05$ 。

A: Western blot analysis was performed to detect the expression of Flag-Tag and EGFR proteins in stable cell lines; B: relative expression levels of EGFR and Flag-Tag proteins in Control group, EGFR WT group, EGFR A289V group and EGFR L858R group of U87 and U251 stable cell lines; C: Transwell invasion assay verified the change of invasion ability of stable cell lines; D: comparison of proliferation ability of U87 and U251 stable cell lines cultured for 36 h. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, NS: $P > 0.05$ 。

图3 稳转细胞系的鉴定与侵袭能力改变

Fig.3 Identification and change of invasion ability of stable transmissible cell lines

Transwell侵袭实验方法进行实验,结果如图3C所示。相较于EGFR WT组,存在EGFR A289V突变的U87、U251细胞穿过基质胶的细胞数量更多,这表明这类突变的细胞在侵袭方面的能力增强。与此同时,我们进行了细胞增殖实验比较同时间细胞之间生长增殖能力的差异,于培养后0 h、36 h进行细胞活力检测,结果如图3D所示。统计学分析表明各组细胞的生长增殖能力并无明显差异。因此侵袭实验中EGFR A289V和EGFR L858R突变胶质瘤细胞侵袭能力的增加并没有受到增殖能力的影响。Transwell侵袭实验和细胞增殖实验的结果共同表明,EGFR A289V突变的胶质瘤细胞在侵袭方面比起野生型具有更加恶性的表现,这与之前文献报道的结果一致^[8]。

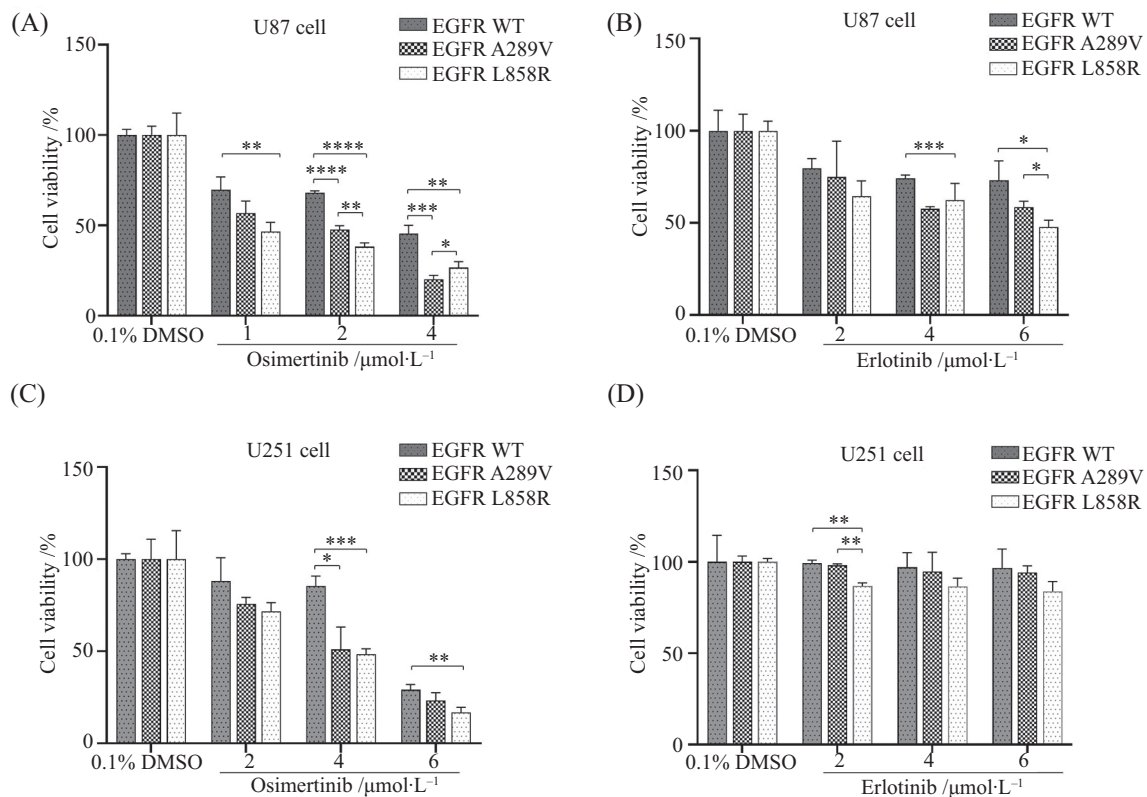
2.6 奥希替尼在体外环境中对EGFR A289V突变的U87、U251细胞具有一定的抑制作用

奥希替尼(Osimertinib, AZD9291)作为针对一、二代TKI耐药突变EGFR T790M所研发的三代TKI拥有出色的血脑屏障通透性,为脑部肿瘤的治疗提

供了前置条件。因此我们通过CCK-8细胞活力检测实验,在体外环境中对构建的U87、U251胶质瘤细胞系应用奥希替尼及第一代的TKI厄洛替尼(Erlotinib)这两种药物,主要观察在不同抑制剂的作用下,EGFR A289V突变细胞增殖活力的改变。表达EGFR A289V、EGFR L858R的U87稳转株在体外环境中均对奥希替尼反应良好,结果如图4A所示。奥希替尼对U251细胞株各组的抑制增殖效果不如U87细胞明显,但仍有一定的作用,这或许与两种细胞系本身来源不同及异质性有关,结果如图4C所示。厄洛替尼在一定程度上能轻度抑制EGFR A289V突变的U87细胞,而U251细胞却对厄洛替尼不敏感,结果如图4B和图4D所示。奥希替尼对表达EGFR A289V突变的U87、U251细胞系的抑制作用均强于第一代的厄洛替尼。

2.7 U87、U251细胞中EGFR位点的Sanger测序检测结果

为确认U87、U251细胞的EGFR位点是否存在突变状况,我们提取U87、U251细胞的DNA寄送至

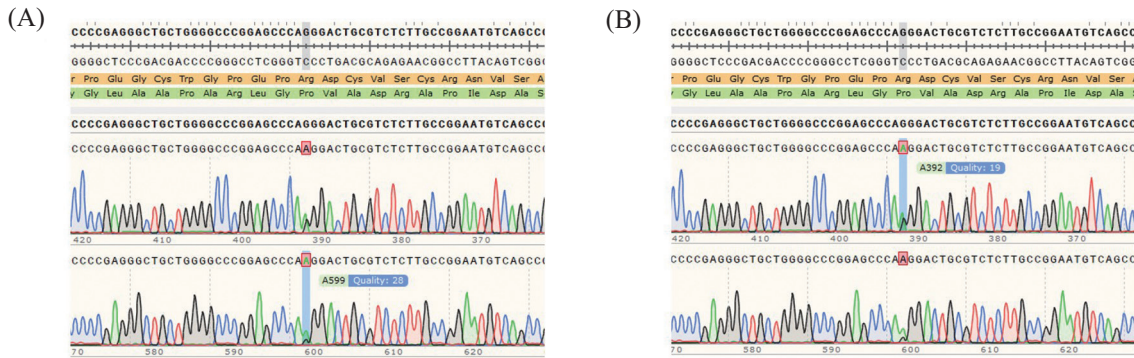


A: 奥希替尼对U87稳转细胞系的抑制作用; B: 厄洛替尼对U87细胞系的抑制作用; C: 奥希替尼对U251稳转细胞系的抑制作用; D: 厄洛替尼对U251细胞系的抑制作用。数据表示为 $\bar{x}\pm s$, * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, **** P <0.000 1。

A: inhibition of Osimertinib on stable cell line U87; B: inhibitory effect of Erlotinib on U87 cell line; C: inhibition of Osimertinib on stable cell line U251; D: inhibitory effect of Erlotinib on U251 cell line. Data are expressed as $\bar{x}\pm s$, * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, **** P <0.000 1.

图4 CCK-8验证TKI对存在EGFR A289V突变的U87、U251细胞的抑制作用

Fig.4 CCK-8 verified the inhibitory effect of TKI on U87 and U251 cells with EGFR A289V mutation



A: 正向, 测序质量为28; B: 反向, 测序质量为19。

A: forward sequencing peak map, sequencing quality was 28; B: reverse sequencing peak map, sequencing quality is 19.

图5 U251细胞第521个氨基酸编码位点Sanger测序峰图

Fig.5 Sanger sequencing peak of 521 amino acid coding site in U251 cells

表1 U87细胞STR测序结果

Table 1 STR sequencing results of U87 cells

匹配率 Match rate	细胞目录号 Cell serial	细胞名称 Cell name	位点名称 Locus names									
			D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	VWA	TH01	AM	TPOX	CS- F1PO	
/	/	U87*	11, 12	8, 11	8, 9	12, 12	15, 17	9.3, 9.3	X, X	8, 8	10, 11	
1.00	HTB-14	U-87MG	11, 12	8, 11	8, 9	12, 12	15, 17	9.3, 9.3	X, X	8, 8	10, 11	
0.72	731	CAKI-1	11, 12	11, 11	8, 12	12, 12	15, 17	6, 8	X, X	8, 11	11, 11	
0.72	749	U-CH2	10, 11	11, 11	8, 12	12, 12	17, 17	9.3, 9.3	X, X	8, 8	11, 12	
0.72	CRL-5842	NCI-H774	11, 11	8, 8	9, 11	12, 12	15, 17	6, 9.3	X, X	8, 8	10, 10	
0.72	CRL-5910	NCI-H1994	10, 11	11, 11	9, 11	12, 12	15, 19	7, 9.3	X, X	8, 8	10, 11	
0.72	CRL-7064	Hs 94.T	11, 12	12, 13	8, 9	9, 12	17, 18	7, 9.3	X, X	8, 8	10, 11	
0.72	CRL-7935	R1192	11, 12	11, 12	8, 12	12, 12	15, 17	6, 8	X, X	8, 11	10, 11	

*代表本文所用细胞系。/: 不存在。数字代表STR检测的位点具有该序列重复的数目, 其中AM为性别检测位点。

*represents the cell line used in this article. /: non-existent. The number represents the number of sites detected by STR that have repeats of the sequence, where AM is sex detection site.

苏州金唯智生物科技有限公司进行 Sanger 测序。测序结果表明, U87 细胞 *EGFR* 基因全长未产生缺失、插入或错义突变。U251 细胞仅在第 521 个氨基酸编码位点产生一项错义突变, 由精氨酸突变为赖氨酸 (即 *EGFR* R521K), 结合突变位点的正反方向测序峰图的结果, 此位点正逆向均产生套峰, 质量结果分别为 28% 和 19%, 仍有存在测序误差的可能, 具体如图 5A 和图 5B 所示。 *EGFR* R521K 突变存在于 42% 的头颈部鳞癌患者中, 暂时未有结论证明其与头颈鳞癌的预后具有相关性^[22]。同时对 70 例结直肠癌患者进行的研究表明, 此突变会降低结直肠癌的发生风险^[23]。2014 年 WANG 等^[24] 的荟萃分析表明, *EGFR* R521K 突变与癌症风险无关, 但可进一步研究其对抗癌药物的不同化学敏感性。总的来说 *EGFR*

R521K 突变对我们的研究所造成的影响不大。同时针对课题所用两种细胞系进行 STR 鉴定, 结果匹配 ATCC STR 数据库。检测报告见表 1 和表 2。

3 讨论

胶质母细胞瘤 (glioblastoma, GBM) 作为恶性程度最高的胶质瘤, 其治疗一直是医学上的难点。 *EGFR* ECD 突变在 GBM 中出现的频率较高, 已成为 GBM 靶向治疗的新方向。因此本研究构建稳定表达 *EGFR* 最常见的胞外结构域错义突变—— *EGFR* A289V 突变的胶质瘤细胞系, 并在体外环境中探索其对 TKI 的敏感性。

我们通过同源重组酶连法成功构建稳定表达 *EGFR* A289V 突变蛋白的 U87、U251 胶质瘤细胞, 并

表2 U251细胞STR测序结果
Table 2 STR sequencing results of U251 cells

匹配率 Match rate	细胞目录号 Cell serial	细胞名称 Cell name	位点名称 Locus names								
			D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	VWA	TH01	AM	TPOX	CS- F1PO
/	/	U251*	11, 12	10, 11	10, 12	12, 12	16, 18	9.3, 9.3	X, X	8, 8	11, 12
1.00	IFO50360	KNS-89	11, 12	10, 11	10, 12	12, 12	16, 18	9.3, 9.3	X, X	8, 8	11, 12
1.00	IFO50361	B2-17	11, 12	10, 11	10, 12	12, 12	16, 18	9.3, 9.3	X, X	8, 8	11, 12
0.94	325	SNB-19	11, 12	10, 11	10, 12	12, 12	16, 18	9.3, 9.3	X, Y	8, 8	11, 12
0.94	CRL-2219	SNB-19	11, 12	10, 11	10, 12	12, 12	16, 18	9.3, 9.3	X, Y	8, 8	11, 12
0.94	HTB-17	U-373 MG	11, 12	10, 11	10, 12	12, 12	16, 18	9.3, 9.3	X, Y	8, 8	11, 12
1.00	CVCL_0021	U-251MG (CCRID)	11, 12	10, 11	10, 12	12, 12	16, 18	9.3, 9.3	X, X	8, 8	11, 12
0.94	CVCL_0021	U-251MG (CLS; Cosmic-CLP; ECACC; JCRB)	11, 12	10, 11	10, 12	12, 12	16, 18	9.3, 9.3	X, Y	8, 8	11, 12

*代表本文所用细胞系。/：不存在。数字代表STR检测的位点具有该序列重复的数目，其中AM为性别检测位点。

*represents the cell line used in this article. /: non-existent. The number represents the number of sites detected by STR that have repeats of the sequence, where AM is sex detection site.

以EGFR WT作为阴性对照，以EGFR L858R这一“经典突变”作为阳性对照进行后续实验。EGFR L858R是21号外显子单个氨基酸替换所导致的错义突变，在EGFR突变的NSCLC中占比约85%且对TKI类药物具有敏感性，是目前研究较多的EGFR突变形式^[25-28]。对比使用鼠源Ba/F3和NIH-3T3工程细胞系，我们避免了种属间差异造成的局限性，与从临床肿瘤组织中提取原代细胞进行实验相比，我们的细胞系构建方法简单且更易获取，避免样本来源不同造成的实验偏移。当然后续还需进行体内实验，并结合大量临床数据确保实验的可靠性。

我们的结果表明，EGFR A289V突变的胶质瘤细胞相对于EGFR L858R突变更具有侵袭性。EGFR蛋白是酪氨酸激酶受体ERBB家族的成员之一，主要通过配体结合从而激活下游的信号通路，其与肿瘤增殖、血管生成、侵袭转移及抑制凋亡有着密切的关系^[29-31]。配体的种类会影响下游信号通路的激活差异，EGF作为EGFR高亲和配体诱导对称同质二聚体的形成和瞬时信号的转导以促进细胞增殖，而表皮调节素(epiregulin, EREG)等弱亲和配体则诱导不对称异质二聚体的形成和持续信号的转导以促进细胞分化^[4]。GBM中EGFR ECD错义突变降低了其区分强弱配体的能力，不同的错义突变位点侧重不同的二聚体形成^[4,32-33]。有研究提示，EGFR A289V突变会引起EGFR ECD结构域II的异常，使其具有独立于配体的转导信号能力，从而

诱导更持久的自磷酸化^[8,11]。EGFR A289V突变引起GBM侵袭能力增强的具体分子生物学机制还有待进一步的研究。

我们进行的第三代TKI奥希替尼对比第一代厄洛替尼抑制实验结果表明，EGFR A289V突变的胶质瘤细胞对奥希替尼更为敏感。诚然我们的结果U87、U251两种细胞系对奥希替尼的表现并不完全一致，或许与U87与U251细胞本身EGFR表达量存在差异有关，其次两种细胞的来源也不同，亦或是存在我们不得而知的更为深层次的因素导致二者对EGFR TKI表现出不同的敏感性^[34-35]。但总体来看，U87稳转细胞系对两种药物的敏感性要强于U251稳转细胞系，这提示我们或许可以将U87细胞作为胶质瘤EGFR ECD点突变相关基础研究的细胞系。两种细胞系对药物反应的差异同时也表明了胶质瘤研究领域应更多地使用多种不同的细胞系，当然这也提示我们临床上进行分子分型精确检测的必要性，个体化的治疗才能为每位患者选择最合适的TKI。

目前关于奥希替尼应用于EGFR A289V突变有效性的证据还较为稀少，有体外研究表明，奥希替尼能抑制表达包括A289V在内的多种ECD突变亚型的Ba/F3细胞^[36]，还有应用mAb806单抗等药物有效抑制EGFR A289V突变U87细胞的临床前研究证据，亦有多例应用埃克替尼治疗EGFR A289V突变的NSCLC有效的报道^[8,37-38]。结合奥希替尼优秀的血脑浓度表现和我们的结果，此种TKI药物在EGFR A289V突

变的GBM领域具有进一步深入研究的意义^[39]。

参考文献 (References)

- [1] LEE E, YONG R L, PADDISON P, et al. Comparison of glioblastoma (GBM) molecular classification methods [J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 53: 201-11.
- [2] ALDAPE K, ZADEH G, MANSOURI S, et al. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers [J]. *Acta Neuropathol*, 2015, 129(6): 829-48.
- [3] SAADEH F S, MAHFOUZ R, ASSI H I. EGFR as a clinical marker in glioblastomas and other gliomas [J]. *Int J Biol Markers*, 2018, 33(1): 22-32.
- [4] HU C, LECHÉ C A 2ND, KIYATKIN A, et al. Glioblastoma mutations alter EGFR dimer structure to prevent ligand bias [J]. *Nature*, 2022, 602(7897): 518-22.
- [5] VIVANCO I, ROBINS H I, ROHLE D, et al. Differential sensitivity of glioma- versus lung cancer-specific EGFR mutations to EGFR kinase inhibitors [J]. *Cancer Discov*, 2012, 2(5): 458-71.
- [6] LEE J C, VIVANCO I, BEROUKHIM R, et al. Epidermal growth factor receptor activation in glioblastoma through novel missense mutations in the extracellular domain [J]. *PLoS Med*, 2006, 3(12): e485.
- [7] NISHIKAWA R, JI X D, HARMON R C, et al. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(16): 7727-31.
- [8] BINDER Z A, THORNE A H, BAKAS S, et al. Epidermal growth factor receptor extracellular domain mutations in glioblastoma present opportunities for clinical imaging and therapeutic development [J]. *Cancer Cell*, 2018, 34(1): 163-77, e167.
- [9] NAGANE M, COUFAL F, LIN H, et al. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis [J]. *Cancer Res*, 1996, 56(21): 5079-86.
- [10] ORELLANA L, THORNE A H, LEMA R, et al. Oncogenic mutations at the EGFR ectodomain structurally converge to remove a steric hindrance on a kinase-coupled cryptic epitope [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(20): 10009-18.
- [11] LIN B, ZIEBRO J, SMITHBERGER E, et al. EGFR, the lazarus target for precision oncology in glioblastoma [J]. *Neuro Oncol*, 2022, 24(12): 2035-62.
- [12] BRENNAN C W, VERHAAK R G, MCKENNA A, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma [J]. *Cell*, 2013, 155(2): 462-77.
- [13] INDA M M, BONAVIDA R, MUKASA A, et al. Tumor heterogeneity is an active process maintained by a mutant EGFR-induced cytokine circuit in glioblastoma [J]. *Genes Dev*, 2010, 24(16): 1731-45.
- [14] GAO J, AKSOY B A, DOGRUSOZ U, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal [J]. *Sci Signal*, 2013, 6(269): p11.
- [15] TATE J G, BAMFORD S, JUBB H C, et al. COSMIC: the catalogue of somatic mutations in cancer [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D941-7.
- [16] TIAN X, GU T, LEE M H, et al. Challenge and countermeasures for EGFR targeted therapy in non-small cell lung cancer [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2022, 1877(1): 188645.
- [17] LIM S M, SYN N L, CHO B C, et al. Acquired resistance to EGFR targeted therapy in non-small cell lung cancer: mechanisms and therapeutic strategies [J]. *Cancer Treat Rev*, 2018, 65: 1-10.
- [18] SORIA J C, MOK T S, CAPPUZZO F, et al. EGFR-mutated oncogene-addicted non-small cell lung cancer: current trends and future prospects [J]. *Cancer Treat Rev*, 2012, 38(5): 416-30.
- [19] FURNARI F B, CLOUGHESY T F, CAVENEY W K, et al. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor signalling networks in glioblastoma [J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(5): 302-10.
- [20] CASTELLANOS E, FELD E, HORN L. Driven by mutations: the predictive value of mutation subtype in EGFR-mutated non-small cell lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2017, 12(4): 612-23.
- [21] YASUDA H, KOBAYASHI S, COSTA D B. EGFR exon 20 insertion mutations in non-small-cell lung cancer: preclinical data and clinical implications [J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13(1): e23-31.
- [22] CSEREPES M, NELHÜBEL G A, MEILINGER-DOBRA M, et al. EGFR R521K polymorphism is not a major determinant of clinical cetuximab resistance in head and neck cancer [J]. *Cancers*, 2022, 14(10): 2407.
- [23] MARTINELLI M, UGOLINI G, SCAPOLI L, et al. The EGFR R521K polymorphism influences the risk to develop colorectal cancer [J]. *Cancer Biomark*, 2010, 8(2): 61-5.
- [24] WANG Y, ZHA L, LIAO D, et al. A meta-analysis on the relations between EGFR R521K polymorphism and risk of cancer [J]. *Int J Genomics*, 2014, 2014: 312102.
- [25] LYNCH T J, BELL D W, SORDELLA R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(21): 2129-39.
- [26] GAZDAR A F. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors [J]. *Oncogene*, 2009, 28(Suppl 1): S24-31.
- [27] 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): 1179-86.
- [28] HARRISON P T, VYSE S, HUANG P H. Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 61: 167-79.
- [29] BESSMAN N J, FREED D M, LEMMON M A. Putting together structures of epidermal growth factor receptors [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2014, 29: 95-101.
- [30] SHAO Q, ZHU W. Ligand binding effects on the activation of the EGFR extracellular domain [J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2019, 21(15): 8141-51.
- [31] WALKER F, ROTHACKER J, HENDERSON C, et al. Ligand binding induces a conformational change in epidermal growth factor receptor dimers [J]. *Growth Factors*, 2012, 30(6): 394-409.
- [32] VOLDBORG B R, DAMSTRUP L, SPANG-THOMSEN M, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR muta-

- tions, function and possible role in clinical trials [J]. *Ann Oncol*, 1997, 8(12): 1197-206.
- [33] SABBAAH D A, HAJJO R, SWEIDAN K. review on epidermal growth factor receptor (EGFR) structure, signaling pathways, interactions, and recent updates of EGFR inhibitors [J]. *Curr Top Med Chem*, 2020, 20(10): 815-34.
- [34] LI H, LEI B, XIANG W, et al. Differences in protein expression between the U251 and U87 cell lines [J]. *Turk Neurosurg*, 2017, 27(6): 894-903.
- [35] ALLEN M, BJERKE M, EDLUND H, et al. Origin of the U87MG glioma cell line: good news and bad news [J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(354): 354re3.
- [36] KOHSAKA S, NAGANO M, UENO T, et al. A method of high-throughput functional evaluation of EGFR gene variants of unknown significance in cancer [J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(416): eaan6566.
- [37] DAI L, SU X, LU L, et al. Nonsmall cell lung cancer with rare exon 7 p.A289V mutation in the EGFR gene responds to icotinib treatment: a case report [J]. *Medicine*, 2018, 97(51): e13809.
- [38] WANG W X, XU C, CHEN Y, et al. An EGFR extracellular domain mutation data in the East Asian non-small cell lung cancer populations and response to icotinib: a multicenter study [J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(15_suppl): e13000.
- [39] COLCLOUGH N, CHEN K, JOHNSTRÖM P, et al. Preclinical comparison of the blood-brain barrier permeability of osimertinib with other EGFR TKIs [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(1): 189-201.