

论著·基础研究

# KRAS4A<sup>G12C</sup>和KRAS4B<sup>G12C</sup>对人肺上皮细胞生长和运动的作用差异及机制研究

邹菁华<sup>1,2</sup>, 宫淼淼<sup>1,2</sup>, 沈 瑛<sup>1,2</sup>

1. 上海交通大学基础医学院药理学与化学生物学系, 上海 200025; 2. 上海市转化医学协同创新中心, 上海 200025

**[摘要]** **目的**·探究含有致癌突变KRAS<sup>G12C</sup>的2种剪接体KRAS4A<sup>G12C</sup>和KRAS4B<sup>G12C</sup>促进人正常肺支气管上皮细胞生长和运动的差异,并初步探讨其分子机制。**方法**·在人正常肺支气管上皮细胞BEAS-2B中通过慢病毒包装和感染构建KRAS4A<sup>G12C</sup>和KRAS4B<sup>G12C</sup>稳定过表达细胞株,蛋白质印迹法(Western blotting)检测模型是否构建成功,倒置相差显微镜观察细胞形态,实时动态细胞成像分析系统观察细胞增殖变化,细胞划痕及细胞迁移实验观察细胞运动的变化。机制探究上,使用RNA高通量测序方法(RNA-seq)对细胞全转录组水平进行测序,对测序结果进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析及基因集富集分析(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA),寻找差异基因及信号通路变化,实时荧光定量PCR进一步验证。2组间比较采用student's *t*检验, *P*<0.05时认为差异具有统计学意义。**结果**·KRAS4A<sup>G12C</sup>和KRAS4B<sup>G12C</sup>过表达均引起BEAS-2B细胞形态变化,有伪足状结构和细胞连接增加;BEAS-2B KRAS4B<sup>G12C</sup>细胞和BEAS-2B KRAS4A<sup>G12C</sup>细胞增殖能力均显著强于亲本BEAS-2B细胞;细胞划痕实验结果表明BEAS-2B KRAS4B<sup>G12C</sup>细胞伤愈合能力显著强于BEAS-2B KRAS4A<sup>G12C</sup>细胞(*P*=0.006),且显著强于BEAS-2B亲本细胞(*P*=0.000);Transwell实验结果表明BEAS-2B KRAS4B<sup>G12C</sup>细胞迁移能力显著强于BEAS-2B KRAS4A<sup>G12C</sup>细胞(*P*=0.048),且显著强于BEAS-2B亲本细胞(*P*=0.033);与BEAS-2B KRAS4A<sup>G12C</sup>细胞相比,BEAS-2B KRAS4B<sup>G12C</sup>细胞中细胞黏附分子相关信号通路显著上调(*P*=0.002);BEAS-2B KRAS4B<sup>G12C</sup>细胞紧密连接蛋白1(claudin 1, *CLDN1*)的mRNA水平显著高于BEAS-2B KRAS4A<sup>G12C</sup>细胞(*P*=0.000);BEAS-2B KRAS4B<sup>G12C</sup>细胞黏附分子3(cell adhesion molecule 3, *CADM3*)的mRNA水平显著高于BEAS-2B KRAS4A<sup>G12C</sup>细胞(*P*=0.000)。**结论**·该文首次报道了含有致癌突变KRAS<sup>G12C</sup>的2种剪接体KRAS4A<sup>G12C</sup>和KRAS4B<sup>G12C</sup>促进BEAS-2B细胞生长和运动能力的差异以及潜在的分子机制,即KRAS4A<sup>G12C</sup>和KRAS4B<sup>G12C</sup>均可促进人肺支气管上皮细胞BEAS-2B增殖,而且KRAS4B<sup>G12C</sup>促进肺上皮细胞BEAS-2B运动能力更强,可能与黏附相关基因*CLDN1*和*CADM3*表达水平更高相关,为KRAS特异性靶向抑制剂的研提供了实验依据和理论基础。

**[关键词]** KRAS蛋白;人;蛋白异构体;细胞黏附;细胞运动;肺癌

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2022.08.006 **[中图分类号]** R730.2 **[文献标志码]** A

## Effects and mechanisms of KRAS4A<sup>G12C</sup> and KRAS4B<sup>G12C</sup> in the proliferation and migration of human pulmonary epithelial cells

ZOU Jinghua<sup>1,2</sup>, GONG Miaomiao<sup>1,2</sup>, SHEN Ying<sup>1,2</sup>

1. Department of Pharmacology and Chemical Biology, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences, Shanghai 200025, China; 2. Shanghai Collaborative Innovation Center for Translational Medicine, Shanghai 200025, China

**[Abstract]** **Objective**·To explore how the two splice variants of oncogenic mutant KRAS<sup>G12C</sup>, KRAS4A<sup>G12C</sup> and KRAS4B<sup>G12C</sup>, promote the proliferation and migration of human pulmonary epithelial bronchial BEAS-2B cells. **Methods**·The two splice variants of oncogenic mutant KRAS<sup>G12C</sup>, KRAS4A<sup>G12C</sup> and KRAS4B<sup>G12C</sup>, were stably overexpressed in human normal pulmonary epithelial bronchial BEAS-2B cells by lentivirus packaging and infection system. Western blotting was used to verify whether the model was constructed successfully. Cell morphology was investigated by inverted phase-contrast microscopy. Cell proliferation was observed by the Incucyte Live Cell Analysis System. Cell migration was characterized by scratch wound assay and transwell

**[基金项目]** 国家自然科学基金(82073868, 81773748);上海市科学技术委员会基金(20S11900100);上海市高水平地方高校建设项目——药学科(P21010)。

**[作者简介]** 邹菁华(1997—),女,硕士生;电子信箱: zouzou@sjtu.edu.cn。

**[通信作者]** 沈 瑛,电子信箱: yshen0510@sjtu.edu.cn。

**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (82073868, 81773748); Fund of Shanghai Science and Technology Commission (20S11900100); Construction Project of High Level Local Universities in Shanghai—Pharmacy (P21010)。

**[Corresponding Author]** SHEN Ying, E-mail: yshen0510@sjtu.edu.cn。

**[网络首发]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2045.R.20220425.1121.002.html> (2022-04-26 10:05:51)。

assay. To investigate the mechanisms, RNA-sequencing (RNA-seq) was used to provide insight into the transcriptome of the indicated cells, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) were performed to identify differential genes and signaling pathways enriched in ranked gene lists, and quantitative real-time PCR (qPCR) was used to further verify different genes. Student's *t* test (*t* test) was used for comparison between the two groups. Statistical significance was accepted at a value of  $P < 0.05$ . **Results** Both overexpression of KRAS4A<sup>G12C</sup> and KRAS4B<sup>G12C</sup> induced morphological changes, including increased invasive pseudopodia structures and cell junctions of BEAS-2B cells. Compared with BEAS-2B cells, the cell proliferation was significantly enhanced in BEAS-2B KRAS4A<sup>G12C</sup> and BEAS-2B KRAS4B<sup>G12C</sup> cells. In addition, overexpression of KRAS4B<sup>G12C</sup> effectively promoted wound healing of BEAS-2B cells ( $P=0.000$ ) and BEAS-2B KRAS4A<sup>G12C</sup> cells ( $P=0.006$ ), as scratch wound assay characterized. And overexpression of KRAS4B<sup>G12C</sup> effectively promoted cell migration of BEAS-2B cells ( $P=0.033$ ) and BEAS-2B KRAS4A<sup>G12C</sup> cells ( $P=0.048$ ), as transwell assay characterized. Mechanically, compared with BEAS-2B KRAS4A<sup>G12C</sup> cells, cell adhesion molecules gene set was enriched and the mRNA levels of claudin 1 (*CLDN1*) ( $P=0.000$ ) and cell adhesion molecule 3 (*CADM3*) ( $P=0.000$ ) were up-regulated in BEAS-2B KRAS4B<sup>G12C</sup> cells. **Conclusion** This research first reports the differences between KRAS4A<sup>G12C</sup> and KRAS4B<sup>G12C</sup> in promoting BEAS-2B cells proliferation and migration, and the underlying mechanism. The oncogenic mutant KRAS4B<sup>G12C</sup> drives cell migration more significantly than KRAS4A<sup>G12C</sup> does, which may be related to the expression level of *CLDN1* and *CADM3*. Our study provides insights for the design of KRAS-specific targeting inhibitors and individualized therapy for non-small cell lung carcinoma patients harboring KRAS4A<sup>G12C</sup> and KRAS4B<sup>G12C</sup>.

**[Key words]** KRAS protein, human; protein isoform; cell adhesion; cell movement; lung neoplasm

肺癌的发病率和病死率都高居恶性肿瘤前列, 预计5年生存率仅为18%, 严重威胁着人类生命健康<sup>[1]</sup>。在疾病进展过程中, 肺癌原发部位的肿瘤细胞会通过局部浸润以及血管和淋巴管的远端转移而定植到其他部位生长, 称为肿瘤转移<sup>[2]</sup>。转移不仅是肿瘤耐药复发的主要原因, 更是患者常见的死因<sup>[3-4]</sup>。

大鼠肉瘤病毒 (rat sarcoma, *Ras*) 家族是肿瘤中突变频率最高的基因家族<sup>[5]</sup>, 其中鼠类肉瘤病毒癌基因 (kirsten rat sarcoma viral oncogene, *Kras*) 的恶性程度最高, 是肺癌 (30%)、结肠癌 (40%)、胰腺癌 (80%) 三大致命癌症的主要致癌驱动基因<sup>[6]</sup>。人类约13%的恶性肿瘤伴随 *KRAS* 基因突变<sup>[7]</sup>, 肺癌中 *KRAS* 主要突变亚型包括 *KRAS*<sup>G12C</sup>、*KRAS*<sup>G12D</sup>、*KRAS*<sup>G12V</sup>、*KRAS*<sup>Q61H</sup> 等, 其中 *KRAS*<sup>G12C</sup> 占比高达46%<sup>[8]</sup>。然而, 由于 *KRAS* 与鸟苷三磷酸 (guanosine triphosphate, GTP) 的高亲和力以及表面缺少可以与小分子紧密结合的疏水口袋, *KRAS* 一度被认为是不可成药的靶点<sup>[8-10]</sup>。近年来, *KRAS*<sup>G12C</sup> 共价抑制剂 AMG510 和 MRTX849 成功研发, 临床试验疗效显著, 给 *KRAS*<sup>G12C</sup> 突变患者带来新的希望, 然而长期使用均不可避免发生适应性或获得性耐药<sup>[11]</sup>。

*KRAS* 基因转录表达的过程中, 其第四外显子发生选择性剪切, 得到 KRAS4A 和 KRAS4B 这2种剪接形式的蛋白, 这2种蛋白在保守结构域 (1-165

残基) 具有高度同源性, 其中包括鸟苷二磷酸 (guanosine diphosphate, GDP) /GTP 结合区和效应因子结合区<sup>[12-13]</sup>, 在 C 端高度可变区 (hypervariable region, HVR, 166-188 或 189 残基) 存在差异, 这一区域在膜靶向性、蛋白-蛋白相互作用和信号转导方面起着重要作用<sup>[14]</sup>。*KRAS4A* 和 *KRAS4B* 在人类胚胎发育早期表达水平相当, 而在成体组织中差异表达<sup>[15]</sup>, 且均能编码致癌蛋白<sup>[16]</sup>。在肿瘤细胞中, *KRAS* 通常在第一或第二外显子的 12、13、61 密码子发生点突变, 蛋白构象发生改变, 从而处于异常激活状态, 促进癌症的发生发展<sup>[17-19]</sup>。有研究报道, *KRAS4A* 具有独特的双膜靶向结构, 能够特异性结合并激活己糖激酶 1 (hexokinase 1, HK1)<sup>[20]</sup>, 而 *KRAS4B* 通过 C 端高度可变区与钙调蛋白 (calmodulin, CaM) 结合, 有利于保持肿瘤细胞的干性状态<sup>[21]</sup>。在肺癌细胞系中, *KRAS4B* mRNA 水平显著高于 *KRAS4A* mRNA<sup>[16]</sup>。然而, 关于 *KRAS4A* 和 *KRAS4B* 在肺癌转化过程中的生物学差异尚未研究清楚。本研究将围绕 *KRAS4A* 和 *KRAS4B* 促进人肺支气管上皮细胞生长和运动的差异与分子机制进行深入探究, 构建人正常肺支气管上皮细胞 BEAS-2B *KRAS4A*<sup>G12C</sup> 和 *KRAS4B*<sup>G12C</sup> 过表达细胞株, 通过细胞增殖、细胞迁移、细胞黏附实验观察细胞表型差异, 全转录组 RNA-seq 方法检测差异基因及信号通路变化并用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR,

qPCR) 进一步验证, 通过探究不同剪接体致癌机制的差异, 为 KRAS 特异性靶向抑制剂的研究提供一定的实验依据和理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂及仪器

**1.1.1 细胞系** 人正常肺支气管上皮细胞系 BEAS-2B, 人胚肾上皮永生细胞系 293FT 均在上海交通大学基础医学院药理学与化学生物学系保存并使用。

**1.1.2 主要试剂** 0.25% 胰蛋白酶、磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS)、青霉素-链霉素 (双抗) 溶液及谷氨酰胺溶液购自上海源培生物科技股份有限公司, Takara RNA 提取试剂盒、PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) 试剂盒购自日本 Takara 公司, 转染专用减血清培养基、DMEM 高糖培养基、BCA 蛋白定量试剂盒、预染蛋白分子量 marker、Lipofectamine 3000 试剂、P3000 试剂及 ECL 显色液购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 胎牛血清购自美国 Gemini 公司, Ku86 抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司, Tubulin 抗体购自美国 Proteintech 公司, RAS 抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 及抗小鼠 IgG 购自美国 Cell Signaling Technology 公司, RIPA 裂解液、Western blotting 一抗稀释液及蛋白酶抑制剂购自上海碧云天公司。

**1.1.3 主要仪器** 生物安全柜、CO<sub>2</sub> 细胞培养箱购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 制冰机购自美国 Scotsman 公司, 蛋白电泳及转印系统、预制胶、多功能酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司, 实验用超纯水系统购自美国 Millipore 公司, Incucyte 活细胞动态实时成像仪购自美国 Essen 公司, Odyssey 双色红外成像系统购自美国 LI-COR 公司, 倒置相差显微镜购自日本 Nikon 公司, 磁力搅拌器购自德国 IKA 公司, 移液器、低温高速离心机购自德国 Eppendorf 公司。

### 1.2 研究方法

**1.2.1 细胞培养及传代** 配制 DMEM 高糖完全培养基 (含 1% 谷氨酰胺、1% 双抗溶液、10% 胎牛血清)。PBS 清洗细胞, 37 °C 预热的 0.25% 胰蛋白酶 (含 0.038% EDTA) 消化 1~2 min, 新鲜完全培养基终止消化。1:3 传代, 持续观察细胞状态。

**1.2.2 构建过表达 KRAS4A<sup>G12C</sup> 和 KRAS4B<sup>G12C</sup> 细胞系** 按比例配制转染专用减血清培养基、Lipo 3000 试剂、P3000 Enhancer Reagent、包装质粒、目的基因质粒混合物转染 293FT 细胞。收集 24 h 和 48 h 病毒。使用含病毒培养液和 Polybrene 感染 BEAS-2B 细胞, 1 μg/mL 嘌呤霉素筛选, 扩增、保种及后续实验。

**1.2.3 蛋白质印迹法检测** 蛋白质印迹法 (Western blotting) 检测模型的构建。配制 10% SDS-PAGE 胶, 电泳 2~3 h; 使用甲醇活化 PVDF 膜, 4 °C 恒流转膜 2~3 h; 5% 脱脂奶粉室温封闭 1~2 h; 一抗室温孵育过夜; 二抗室温孵育 1 h; ECL 显色液显影。

**1.2.4 划痕实验分析** 取对数生长期细胞 (20 000 个/孔) 接种, 待细胞汇合度达到 95% 时, 无菌划痕仪划痕, PBS 清洗 2 次, 换用新鲜培养基。使用 Incucyte 活细胞动态实时成像仪拍照并分析数据。

**1.2.5 Transwell 实验分析** 于上层小室中接种细胞, 50 000 个/孔, 上层小室和下层小室分别为基础培养基和完全培养基, 孵育 20 h。PBS 清洗 2 次, 4% 多聚甲醛固定 25 min, 结晶紫染色过夜。用棉签轻柔擦掉上室细胞, PBS 清洗 2 次, 于显微镜下观察及拍照。待液体蒸发后用 10% 冰醋酸萃取, 595 nm 波长下检测吸光度值进行定量分析。

**1.2.6 RNA-seq 检测** 提取 RNA 样品后送至武汉华大基因科技有限公司检测。

**1.2.7 基因集富集分析** 采用基因集富集分析 (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) 对 RNA-seq 数据进行分析做图, 具体操作步骤见文献<sup>[22]</sup>。其中标准化富集得分 (normalized enrichment score, NES) 绝对值大于 1, normal  $P < 0.05$  的通路下的基因集合是有意义的。

**1.2.8 RNA 提取及 qPCR 检测** 参照 Takara RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA, 经细胞裂解、DNA 清除、RNA 纯化、洗脱、DNA 酶消化、洗脱等步骤得到 50 μL RNA。使用 Nanodrop 检测 RNA 样品的 R 值及浓度。配制反转录体系: 4 μL 1.5×PrimeScript RT Master Mix+RNA 1 000 ng+无 RNA 酶水。参照仪器内反转录程序, 关键步骤为 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。

qPCR 反应体系配制: 6.4 μL 无 RNA 酶水+10 μL SYBR Premix Ex Taq II +0.8 μL PCR 上游引物 (10 μmol/L) +0.8 μL PCR 下游引物 (10 μmol/L) +2 μL cDNA。预变性条件为 95 °C 反应 30 s; 扩增条



件为 95 °C 反应 5 s, 60 °C 反应 34 s, 循环 40 次。引物序列见表 1。

表 1 qPCR 所用的引物序列

Tab 1 Sequences of primers for qPCR

Gene	Primer sequence(5'→3')
CLDN1	F:TCTTGCAGGTCTGGCTATTTTA
	R:TTGGGTAAGAGGTGTTTTTCG
CADM3	F:AGAGTGCCCTGATCTTCCCTTTCC
	R:GTGGTAGGTGCTGGAGGAGGAG
β-actin	F:CGGGAAATCGTGCGTGAC
	R:TGGAAGGTGGACAGCGAGG

Note: CLDN1—claudin 1; CADM3—cell adhesion molecule 3.

### 1.3 统计学方法

使用 GraphPad Prism 8 软件对数据进行统计分析及作图。定量结果采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 使用 student's *t* 检验进行组间比较。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

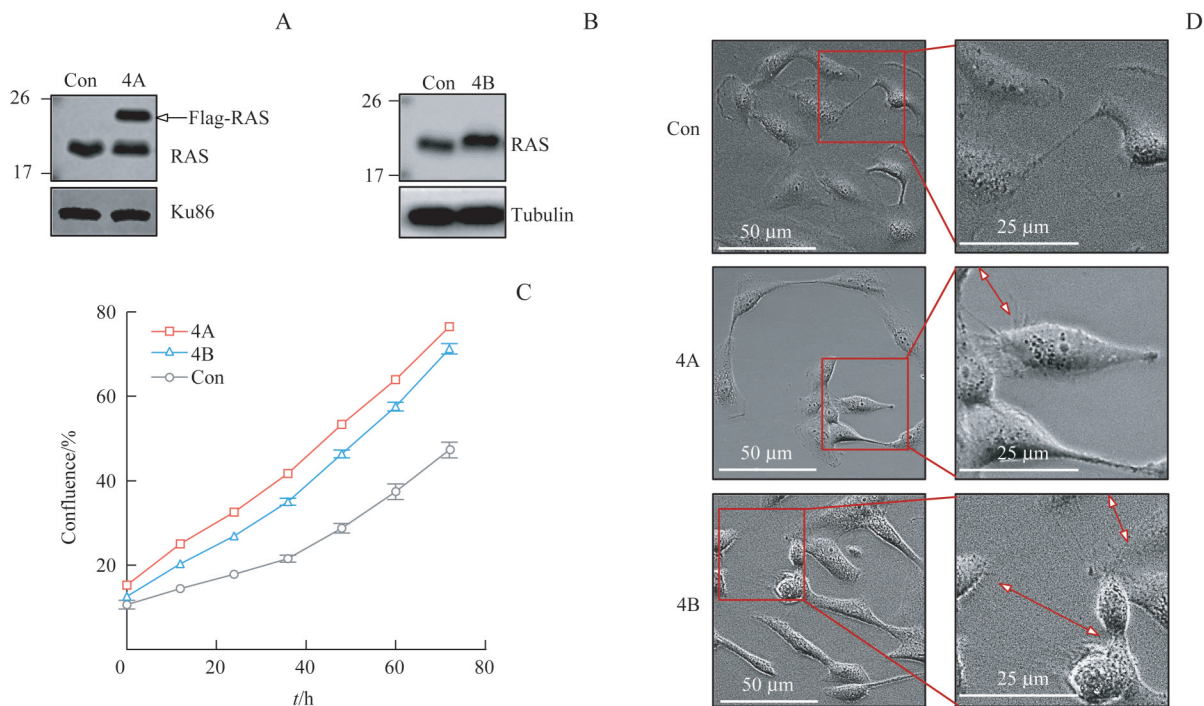
### 2.1 KRAS4A<sup>G12C</sup>和KRAS4B<sup>G12C</sup>过表达引起人正常肺支气管上皮细胞形态变化并增强其增殖能力

Western blotting 结果显示 BEAS-2B KRAS4A<sup>G12C</sup>

和 BEAS-2B KRAS4B<sup>G12C</sup> 稳定过表达细胞株构建成功 (图 1A、1B)。Incucyte 实时观测细胞增殖变化, 结果显示与亲本相比, BEAS-2B KRAS4A<sup>G12C</sup> 和 BEAS-2B KRAS4B<sup>G12C</sup> 细胞增殖能力增强 (图 1C)。为了探究 KRAS4A<sup>G12C</sup> 和 KRAS4B<sup>G12C</sup> 过表达对 BEAS-2B 细胞形态的影响, 于显微镜下观察细胞形态 (图 1D): BEAS-2B 对照组细胞整体形态偏圆, 细胞较薄, 立体结构不明显。BEAS-2B KRAS4A<sup>G12C</sup> 细胞趋向不规则形状生长, 有伪足状结构生成; BEAS-2B KRAS4B<sup>G12C</sup> 细胞立体结构明显, 形状变为长梭形, 细胞间连接增多, 有伪足状结构生成。这些结果提示 KRAS4A<sup>G12C</sup> 和 KRAS4B<sup>G12C</sup> 过表达促进 BEAS-2B 细胞增殖并引起形态改变。

### 2.2 KRAS4B<sup>G12C</sup>引起细胞运动能力增强效果强于 KRAS4A<sup>G12C</sup>

进一步探究 KRAS<sup>G12C</sup> 不同剪接体对人肺上皮细胞运动能力的影响。划痕实验结果显示 12 h 后, BEAS-2B KRAS4B<sup>G12C</sup> 细胞划痕区完全愈合, 而 BEAS-2B KRAS4A<sup>G12C</sup> 细胞与亲本细胞划痕区尚未愈合, 表明 BEAS-2B KRAS4B<sup>G12C</sup> 细胞运动能力显著强于 BEAS-



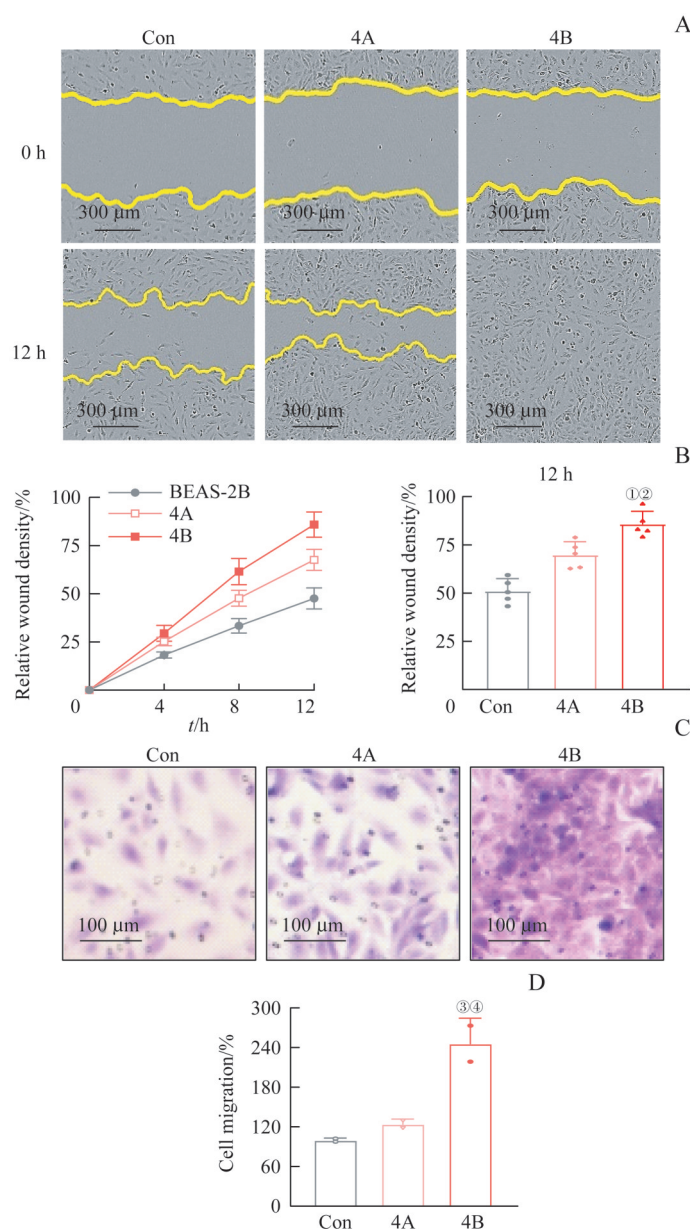
Note: A. Western blotting analysis of Flag-tagged KRAS4A<sup>G12C</sup> stably overexpressed in BEAS-2B cells. B. Western blotting analysis of KRAS4B<sup>G12C</sup> stably overexpressed in BEAS-2B cells. C. Proliferation rate of BEAS-2B cells increased after stable overexpression of KRAS4A<sup>G12C</sup> or KRAS4B<sup>G12C</sup>. D. Morphological changes of BEAS-2B cells. Ku86—Tubulin, as loading control; Con=BEAS-2B; 4A=BEAS-2B KRAS4A<sup>G12C</sup>; 4B=BEAS-2B KRAS4B<sup>G12C</sup>.

图 1 KRAS4A<sup>G12C</sup>和KRAS4B<sup>G12C</sup>过表达对肺上皮细胞形态及增殖的影响

Fig 1 Effects of KRAS4A<sup>G12C</sup> or KRAS4B<sup>G12C</sup> overexpression on pulmonary epithelial cells morphology and proliferation

2B KRAS4A<sup>G12C</sup> 细胞 ( $P=0.006$ ) 及 BEAS-2B 亲本细胞 ( $P=0.000$ , 图 2A、2B)。同样, Transwell 实验结果也证实 BEAS-2B KRAS4B<sup>G12C</sup> 细胞迁移能力显著强于 BEAS-2B KRAS4A<sup>G12C</sup> 细胞 ( $P=0.048$ ), 且显著强

于 BEAS-2B 亲本细胞 ( $P=0.033$ , 图 2C、2D)。这些结果说明过表达 KRAS4B<sup>G12C</sup> 引起人肺支气管上皮细胞运动能力增强效果强于 KRAS4A<sup>G12C</sup>。



**Note:** A/B. Mobility increasing of BEAS-2B cells induced by stably overexpressed KRAS4A<sup>G12C</sup> or KRAS4B<sup>G12C</sup> (real-time observation by Incucyte, scale bar=300  $\mu$ m). C/D. Migration increasing of BEAS-2B cells induced by stably overexpressed KRAS4A<sup>G12C</sup> or KRAS4B<sup>G12C</sup>. Con=BEAS-2B; 4A= BEAS-2B KRAS4A<sup>G12C</sup>; 4B=BEAS-2B KRAS4B<sup>G12C</sup>. ① $P=0.000$ , compared with the control group; ② $P=0.006$ , compared with the 4A group; ③ $P=0.033$ , compared with the control group; ④ $P=0.048$ , compared with the 4A group.

图2 KRAS4A<sup>G12C</sup>和KRAS4B<sup>G12C</sup>过表达对肺上皮细胞运动的影响

Fig 2 Effects of KRAS4A<sup>G12C</sup> or KRAS4B<sup>G12C</sup> overexpression on pulmonary epithelial cells migration

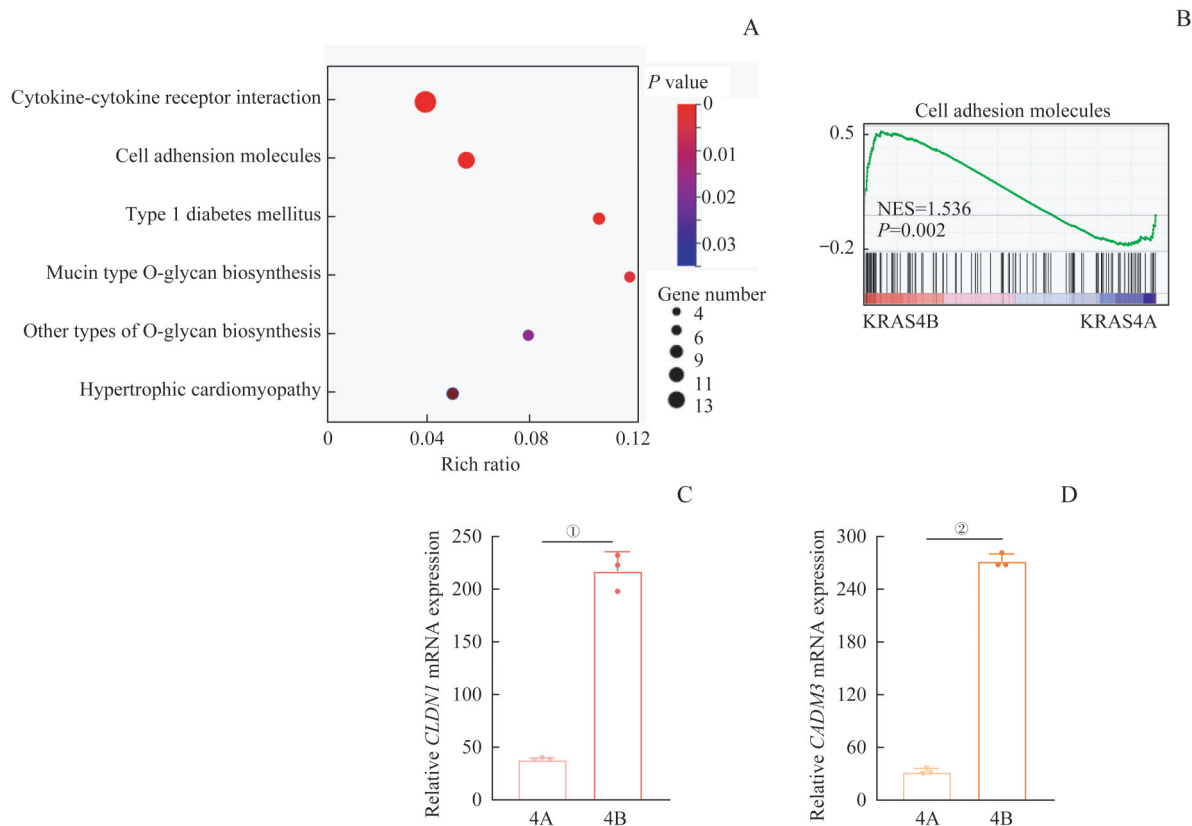
### 2.3 KRAS4B<sup>G12C</sup>过表达促进BEAS-2B细胞黏附相关基因CLDN1和CADM3表达上调

为了进一步探究过表达KRAS4B<sup>G12C</sup>促进人肺上皮细胞运动的分子机制, 我们对 BEAS-2B

KRAS4A<sup>G12C</sup>过表达细胞和 BEAS-2B KRAS4B<sup>G12C</sup>过表达细胞进行 RNA-seq 测序, 后对测序结果进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析及

GSEA, 寻找差异基因及信号通路变化。KEGG 分析的结果显示, 细胞黏附分子信号通路排名第二 ( $P=0.000$ , 图 3A)。GSEA 分析的结果显示, 与 BEAS-2B KRAS4A<sup>G12C</sup> 过表达细胞相比, BEAS-2B KRAS4B<sup>G12C</sup> 过表达细胞中的细胞黏附分子相关信号通路发生显著上调 ( $P=0.002$ , 图 3B)。使用 qPCR 对细胞黏附分子通路中关键基因 *CLDN1* 和 *CADM3*

的 mRNA 水平进行检测, 发现与 BEAS-2B KRAS4A<sup>G12C</sup> 过表达细胞相比, BEAS-2B KRAS4B<sup>G12C</sup> 过表达细胞中黏附相关基因 *CLDN1* 和 *CADM3* 的 mRNA 水平显著升高 ( $P=0.000$ , 图 3C、3D)。这些结果提示 KRAS4B<sup>G12C</sup> 促进黏附相关基因 *CLDN1* 和 *CADM3* 上调, 促进细胞运动。



**Note:** A/B. KEGG (A) and GSEA (B) analysis of the significantly differential genes between BEAS-2B KRAS4A<sup>G12C</sup> cells and BEAS-2B KRAS4B<sup>G12C</sup> cells. C. mRNA levels of *CLDN1* in BEAS-2B KRAS4A<sup>G12C</sup> cells and BEAS-2B KRAS4B<sup>G12C</sup> cells. D. mRNA levels of *CADM3* in BEAS-2B KRAS4A<sup>G12C</sup> cells and BEAS-2B KRAS4B<sup>G12C</sup> cells. 4A=BEAS-2B KRAS4A<sup>G12C</sup>; 4B=BEAS-2B KRAS4B<sup>G12C</sup>. ①  $P=0.000$ , compared with the 4A group; ②  $P=0.000$ , compared with the 4A group.

**图3** KRAS4A<sup>G12C</sup>和KRAS4B<sup>G12C</sup>过表达对黏附相关基因 *CLDN1* 和 *CADM3* 表达的影响

**Fig 3** Effects of KRAS4A<sup>G12C</sup> or KRAS4B<sup>G12C</sup> overexpression on the mRNA levels of *CLDN1* and *CADM3*

### 3 讨论

KRAS作为多种癌症中的主要致癌驱动基因, 30多年来一直被认为是不可成药的靶点。近年来, KRAS<sup>G12C</sup>特异性共价抑制剂 AMG510的上市给KRAS突变癌症患者带来了希望<sup>[23]</sup>。但KRAS基因不同剪接变体在驱动癌症进展方面的分子机制以及KRAS不同基因突变类型致癌分子机制均尚未研究清楚, 也增加了KRAS抑制剂研发的难度。最近有研究报道KRAS4A和KRAS4B在各种癌症细胞株中均广泛表

达, 肺癌和胰腺癌细胞中以KRAS4B表达为主, 而结肠癌和黑色素瘤细胞中KRAS4A和KRAS4B表达水平相当<sup>[16]</sup>。为了研究KRAS<sup>G12C</sup>不同剪接变体促进肺上皮细胞生长和运动的差异及其机制, 我们通过慢病毒感染在人正常肺支气管上皮细胞BEAS-2B中成功构建KRAS4A<sup>G12C</sup>和KRAS4B<sup>G12C</sup> (2种剪接体) 稳定过表达细胞株, 镜下观察发现KRAS4A<sup>G12C</sup>和KRAS4B<sup>G12C</sup>过表达均引起肺上皮细胞形态变化, 并且均可以促进细胞增殖。于是我们提出科学假设: 携带活化突变的KRAS4A<sup>G12C</sup>和KRAS4B<sup>G12C</sup> 2种剪接



体对肺上皮细胞的运动能力有何影响? 哪种恶性程度更高? 引起肺上皮细胞运动能力变化的分子机制如何?

为了解决这些问题, 我们使用划痕实验和Transwell实验模拟体内细胞迁移的过程, 结果显示过表达KRAS4B<sup>G12C</sup>引起肺上皮细胞运动能力增强效果强于过表达KRAS4A<sup>G12C</sup>。为了进一步探究KRAS4B<sup>G12C</sup>促进肺上皮细胞运动的分子机制, 我们使用RNA-seq方法对细胞全基因转录组进行测序并用GSEA进行基因集富集分析, 寻找差异基因及信号通路变化。结果显示与BEAS-2B KRAS4A<sup>G12C</sup>细胞相比, BEAS-2B KRAS4B<sup>G12C</sup>细胞中细胞黏附分子相关信号通路发生显著上调。使用qPCR对细胞中黏附相关基因CLDN1和CADM3的表达水平进一步验证发现, 与过表达KRAS4A<sup>G12C</sup>相比, 过表达KRAS4B<sup>G12C</sup>促进黏附相关基因CLDN1和CADM3表达上调。有文献报道, 结肠癌中CLDN1高表达, 诱导肿瘤细胞发生上皮间充质转化, 促进肿瘤转移<sup>[24]</sup>; RAS突变合并CLDN1表达上调与肺腺癌患者预后不良密切相关<sup>[25]</sup>; 结肠癌中CADM3高表达与患者预后不良相关<sup>[26]</sup>。综上, KRAS4B<sup>G12C</sup>促进细胞运动能力更强, 与CLDN1表达水平升高相关, 这也与肺癌细胞系中KRAS4B更高的表达水平相匹配。虽然KRAS4A<sup>G12C</sup>促进肺上皮细胞运动较弱, 但KRAS4A<sup>G12C</sup>同样可以促进肺上皮细胞增殖, 具有一定的致癌活性。因此我们认为, 针对KRAS突变肿瘤开发的治疗策略仍然需要考虑对KRAS 2种蛋白剪接体的抑制作用。

本研究在细胞实验中探究了KRAS4A<sup>G12C</sup>和KRAS4B<sup>G12C</sup>促进人肺上皮细胞BEAS-2B生长和运动的差异, 即初步证明人肺上皮细胞BEAS-2B有发生恶性转化的趋势, 关于是否发生恶性转化还需体内成瘤实验进一步深入探究。而KRAS4A<sup>G12C</sup>和KRAS4B<sup>G12C</sup> 2种剪接体之间的这种差异与其哪个功能区相关, 还需构建蛋白截断体及失活突变过表达细胞模型进一步深入探究。

综上, 本研究表明KRAS4A<sup>G12C</sup>和KRAS4B<sup>G12C</sup>均可促进人肺上皮细胞增殖, KRAS4B<sup>G12C</sup>促进肺上皮细胞运动能力更强, 并初步探究了相关分子机制。本研究进一步揭示了KRAS<sup>G12C</sup>不同剪接体在肺癌中生物学差异的分子机制, 为KRAS特异性靶向抑制剂的研

#### 利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

#### 作者贡献/Authors' Contributions

沈瑛和邹菁华参与实验设计; 沈瑛、邹菁华、宫森森参与论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意最终稿件的提交。

The study was designed by SHEN Ying and ZOU Jinghua. The manuscript was drafted and revised by SHEN Ying, ZOU Jinghua and GONG Miaomiao. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

•Received: 2022-01-10

•Accepted: 2022-03-08

•Published online: 2022-04-26

#### 参 · 考 · 文 · 献

- [1] TURNER M C, ANDERSEN Z J, BACCARELLI A, et al. Outdoor air pollution and cancer: an overview of the current evidence and public health recommendations[J]. CA A Cancer J Clin, 2020, 70(6): 460-479.
- [2] TSAY J C J, WU B G, SULAIMAN I, et al. Lower airway dysbiosis affects lung cancer progression[J]. Cancer Discov, 2021, 11(2): 293-307.
- [3] BIRKBAK N J, MCGRANAHAN N. Cancer genome evolutionary trajectories in metastasis[J]. Cancer Cell, 2020, 37(1): 8-19.
- [4] BERGERS G, FENDT S M. The metabolism of cancer cells during metastasis[J]. Nat Rev Cancer, 2021, 21(3): 162-180.
- [5] PRIOR I A, LEWIS P D, MATTOS C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer[J]. Cancer Res, 2012, 72(10): 2457-2467.
- [6] FERNÁNDEZ-MEDARDE A, SANTOS E. Ras in cancer and developmental diseases[J]. Genes Cancer, 2011, 2(3): 344-358.
- [7] AACR Project GENIE Consortium. AACR project GENIE: powering precision medicine through an international consortium[J]. Cancer Discov, 2017, 7(8): 818-831.
- [8] MOORE A R, ROSENBERG S C, MCCORMICK F, et al. RAS-targeted therapies: is the undruggable drugged? [J]. Nat Rev Drug Discov, 2020, 19(8): 533-552.
- [9] KESSLER D, GMACHL M, MANTOULIDIS A, et al. Drugging an undruggable pocket on KRAS[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(32): 15823-15829.
- [10] LI S Q, BALMAIN A, COUNTER C M. A model for RAS mutation patterns in cancers: finding the sweet spot[J]. Nat Rev Cancer, 2018, 18(12): 767-777.
- [11] ZHANG B Y, ZHANG Y, ZHANG J W, et al. Focal adhesion kinase (FAK) inhibition synergizes with KRAS G12C inhibitors in treating cancer through the regulation of the FAK-YAP signaling[J]. Adv Sci (Weinh), 2021, 8(16): e2100250.
- [12] VIGIL D, CHERFELS J, ROSSMAN K L, et al. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy?[J]. Nat

- Rev Cancer, 2010, 10(12): 842-857.
- [13] BOS J L, REHMANN H, WITTINGHOFFER A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins[J]. Cell, 2007, 129(5): 865-877.
- [14] AHEARN I M, HAIGIS K, BAR-SAGI D, et al. Regulating the regulator: post-translational modification of RAS[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011, 13(1): 39-51.
- [15] PELLIS S, DIVJAK M, ROMANOWSKI P, et al. Developmentally-regulated expression of murine K-ras isoforms[J]. Oncogene, 1997, 15(15): 1781-1786.
- [16] TSAI F D, LOPES M S, ZHOU M, et al. K-Ras4A splice variant is widely expressed in cancer and uses a hybrid membrane-targeting motif[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(3): 779-784.
- [17] SIMANSHU D K, NISSLEY D V, MCCORMICK F. RAS proteins and their regulators in human disease[J]. Cell, 2017, 170(1): 17-33.
- [18] SMITH M J, NEEL B G, IKURA M. NMR-based functional profiling of RASopathies and oncogenic RAS mutations[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(12): 4574-4579.
- [19] HANCOCK J F. Ras proteins: different signals from different locations[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(5): 373-384.
- [20] AMENDOLA C R, MAHAFFEY J P, PARKER S J, et al. KRAS4A directly regulates hexokinase 1[J]. Nature, 2019, 576(7787): 482-486.
- [21] WANG M T, HOLDERFIELD M, GALEAS J, et al. K-ras promotes tumorigenicity through suppression of non-canonical Wnt signaling[J]. Cell, 2015, 163(5): 1237-1251.
- [22] SUBRAMANIAN A, TAMAYO P, MOOTHA V K, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(43): 15545-15550.
- [23] LANMAN B A, ALLEN J R, ALLEN J G, et al. Discovery of a covalent inhibitor of KRASG12C (AMG 510) for the treatment of solid tumors[J]. J Med Chem, 2020, 63(1): 52-65.
- [24] DHAWAN P, SINGH A B, DEANE N G, et al. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer[J]. J Clin Invest, 2005, 115(7): 1765-1776.
- [25] SUN B S, YAO Y Q, PEI B X, et al. Claudin-1 correlates with poor prognosis in lung adenocarcinoma[J]. Thorac Cancer, 2016, 7(5): 556-563.
- [26] CHEN W Z, HUANG J F, XIONG J B, et al. Identification of a tumor microenvironment-related gene signature indicative of disease prognosis and treatment response in colon cancer[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 6290261.

[本文编辑] 徐 敏

## 学院介绍

### 上海-渥太华联合医学院

上海-渥太华联合医学院成立于2014年, 承担由上海交通大学与加拿大渥太华大学合作的临床医学专业本科教育项目。该项目为国内首个与北美高水平医学院校合作办学的临床医学本科人才培养项目, 项目结合北美和国内医学院校教育标准构建卓越医学创新人才国际化培养新模式。学院紧跟国际医学教育先进理念, 在国内率先构建以学生为中心纵向单循环器官系统整合的多元化教学与评估相结合国际医学教育课程体系, 尤其重视社会责任教育和早期实践教学。单元模块整合教学夯实专业医学基础和临床; 早期接触临床, 通过临床技能训练和早期床边教学培养医学生临床综合能力; 强化全科医学理念, 序贯医学人文社会课程提升职业道德素养; 独特的专业拓展选修课程体系注重学生个性发展, 全方位为学生职业胜任力的培养打下坚实基础; 并形成规范化教学评估体系和高标准的质量保障体系。学院拥有以上海交通大学医学院附属仁济医院为主体的各附属医院优质教学资源, 建立国际化师资教学团队和管理团队。390名教师获得加拿大渥太华大学“兼职教授”任命。

学院目前已招收包括港澳台和其他各省市学生7届, 已有3届毕业生, 港澳台生源占15%。国际化新课程体系培养学生更为扎实全面的专业知识、职业精神、领导力与医患沟通技能, 同时大幅度提高学生医学专业英语能力。特色海外游学项目拓展医学生国际化视野, 毕业生海内外就业升学率近100%, 国内升学的毕业生中近80%进入北京协和医学院、北京大学医学部、复旦大学上海医学院、上海交通大学医学院4所著名医学院校及其附属医院继续深造。共获得国家级、上海市级各级各类奖项150余项。

