

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.01.004

## ADAM17-shRNA 在缺氧条件下对人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的影响\*

陈国福, 吴丽君, 张雪鹏<sup>△</sup>, 蔡 准, 孟祥潮

(华北理工大学附属医院肿瘤外科, 唐山 063000)

**[摘要]** **目的** 研究在缺氧环境下靶向针对解聚素-金属蛋白酶 17(ADAM17)的短发夹状 RNA(shRNA)对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响。**方法** 针对 ADAM17 设计 4 个特异性的 ADAM17-shRNA, 经电穿孔法转染 MCF-7 细胞。缺氧条件下培养细胞。试验分为:对照组(空白磷酸盐缓冲液)、无义序列组(转染无义序列 ADAM17-shRNA)和 shRNA 转染组(转染 ADAM17-shRNA, 选择沉默 ADAM17 基因效率最高的 shRNA 用于后续试验)。分别采用实时荧光定量 PCR、iCELLigence、流式细胞仪检测细胞 ADAM17 mRNA 的表达水平、细胞增殖活性和细胞周期变化。**结果** 4 个 shRNA 转染组对 MCF-7 细胞的 ADAM17 基因表达均有沉默作用, 与对照组及无义序列组相比, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ), 尤以 shRNA1219 抑制率最高( $F = 5.11$ ,  $P < 0.01$ )。shRNA 转染组的细胞生长速度和增殖活性较对照组和无义序列组显著降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。shRNA 转染组的绝大多数细胞停留在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期( $73.35 \pm 2.45$ ), 与对照组( $62.56 \pm 2.35$ )、无义序列组( $62.68 \pm 1.20$ )相比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 细胞周期进展明显延缓。**结论** ADAM17-shRNA 在缺氧条件下抑制乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖。

**[关键词]** RNA; 聚合酶链反应; 缺氧; 解聚素-金属蛋白酶 17; RNA 干扰; 增殖**[中图分类号]** R737.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)01-0029-04

## Effect of ADAM17-shRNA on proliferation of human breast cancer cell line MCF-7 in hypoxia\*

Chen Guofu, Wu Lijun, Zhang Xuepeng<sup>△</sup>, Cai Zhun, Meng Xiangchao

(Department of Surgical Oncology, Affiliated Hospital, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of shRNA targeting a disintegrin and metalloproteinases 17(ADAM17) on the proliferation of human breast cancer MCF-7 cells in hypoxia environment. **Methods** The four specific ADAM17-shRNA sequences aiming at ADAM17 were designed, transfected into MCF-7 cells by electroporation, and cultured in hypoxia environment. The experiment was divided into the control group (blank phosphate buffer solution, PBS), nonsense sequence group (transfected with ADAM17-shNC) and shRNA transfection group (transfected with ADAM17-shRNA, the highest silencing efficiency of shRNA was selected for following experiments). Real-time PCR was used to detect the expression of ADAM17 mRNA. The proliferation ability and cell cycle change of MCF-7 cells were detected by iCELLigence and flow cytometry (FCM), respectively. **Results** Compared with control group and nonsense sequence group, the four ADAM17-shRNA transfection groups all had the silence effect on ADAM17 gene expression ( $P < 0.05$ ), the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ), particularly shRNA1219 had the highest inhibitory rate ( $F = 5.11$ ,  $P < 0.01$ ). The cellular proliferation ability and cell growth speed in the shRNA transfection group were significantly decreased compared with the control group and nonsense sequence group ( $P < 0.05$ ). Most cells of shRNA transfection group remained in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase ( $73.35 \pm 2.45$ ), which in the control group and nonsense sequence group was ( $62.56 \pm 2.35$ ) and ( $62.68 \pm 1.20$ ) respectively, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The cell cycle progression was significantly delayed. **Conclusion** ADAM17-shRNA inhibits the proliferation of MCF-7 cells under hypoxic environment.

**[Key words]** RNA; polymerase chain reaction; hypoxia; depolymerization metalloproteinases 17; RNAi; proliferation

当今乳腺癌发病率呈逐年上升趋势, 成为威胁女性健康的重要恶性肿瘤。对乳腺癌的病因学及发病机制的研究成为热点。解聚素-金属蛋白酶 17(ADAM17)是解聚素-金属蛋白酶家族的重要成员之一。具有解聚素和金属蛋白酶的活性。近年来 ADAM17 在乳腺癌中的作用也越来越被关注。课题组前期研究提示 ADAM17 在乳腺癌的发生、发展的整个进程中起到了极其重要的作用<sup>[1]</sup>。然而肿瘤组织在快速增长过程中, 必然会造成局部组织缺氧, 缺氧对肿瘤的生长、增殖、凋亡、转移和侵袭等发挥重要且复杂的作用。研究已证实缺氧是乳腺癌等实体肿瘤物理微环境的基本特征之一<sup>[2]</sup>。本研究通过在

缺氧条件下利用 RNA 干扰技术靶向针对 ADAM17 基因的短发夹 RNA 对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响, 从而揭示缺氧条件下 ADAM17 与肿瘤细胞增殖的关系。

**1 材料与方法**

**1.1 材料** 人乳腺癌 MCF-7 细胞由华北理工大学医学实验中心提供; Trizol、M-MLV 逆转录试剂盒、Platinum SYBR PCR 试剂盒均由 Invitrogen 公司提供; ADAM17-shRNA 和 ADAM17-shNC 载体购于上海吉玛制药技术有限公司, 每个载体均包含绿色荧光蛋白 GFP 的表达框架, 根据绿色荧光蛋白的表达情况来确定转染效率。靶序列见表 1。

表 1 ADAM17 的不同靶序列

项目	shRNA	靶序列(5'-3')
ADAM17-shRNA	ADAM17ShRNA-1219	GGAACTCTTGGATTAGCTTAT
	ADAM17ShRNA-1508	GCGATCACGAGAACAATAAGA
	ADAM17ShRNA-1134	GCTAGAGCAATTTAGCTTTGA
	ADAM17ShRNA-297	GCTCTCAGACTACGATATTCT
ADAM17shNC	阴性对照	GTCTCCGAACGTGTACAGT

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 将人乳腺癌 MCF-7 细胞用含有 10% 胎牛血清, 1% 青链霉素的 DMEM 高糖培养基, 置于 37 °C 恒温, 冲入含 1% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、94% N<sub>2</sub> 的混合气体赛默 Thermo3131 三气水套式培养箱下行缺氧环境培养。

**1.2.2 电穿孔法转染** 收集细胞, 吸取 20 μL Opti-MEM I 悬浮细胞 1 × 10<sup>6</sup>, 每个电击杯中添加 5 μL 的 ADAM17-shRNA 表达载体, 加入质粒。充分混匀细胞, 上机操作。设置 CUY21 EDIT II 细胞电转化仪的输出电压(125 V)、脉冲宽度(10 ms)和电转时间(1 min), 电处理结束后, 加入完全培养液。试验分为对照组、shRNA 转染组和无义序列组, 同样采用电穿孔法转染对照组和无义序列组, 对照组加入与转染试剂和 ADAM17-shRNA 载体混合总量等量的磷酸盐缓冲液(PBS); 无义序列组加入等量的转染试剂和无义序列 ADAM17-shNC 载体。

**1.2.3 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测细胞的 ADAM17 基因表达** 转染成功后 12~24 h, 缺氧条件下培养 24~48 h 后, 收集各组细胞, 经 Trizol 试剂说明书一步法提取总 RNA, 测定总 RNA 的纯度和浓度符合试验要求后采用 M-MLV 逆转录试剂盒合成 cDNA, Platinum SYBR 试剂盒进行 PCR 扩增反应, 根据 ADAM17 引物序列: 上游 5'-ATC AAA CCC TTT CCT GCG-3', 下游 5'-CAA ACC CAT CCT CGT CCA-3', 扩增片段 154 bp; β-actin 内参引物序列: 上游 5'-GTC ACC TTC ACC GTT CCA GTT TT-3', 下游 5'-TTC TTT CCC ACA TTG CGT TGA TTC-3', 扩增片段 175 bp; 并通过

检测转染 ADAM17 mRNA 的表达情况, 筛选出抑制 ADAM17 mRNA 最高的 shRNA, 用于后续试验。对 Real-time PCR 的结果采用相对定量的方法进行数据分析。

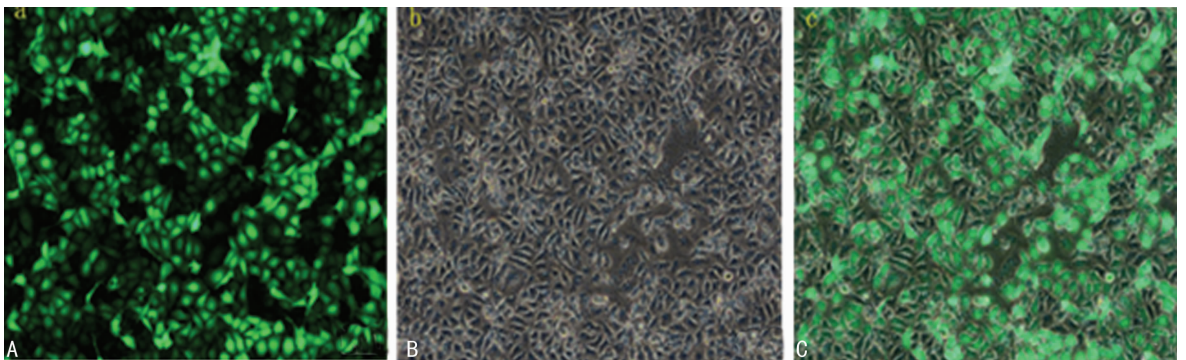
**1.2.4 iCELLigence 检测细胞的增殖曲线** 细胞成功转染后, 使用 iCELLigence 系统进行检测, 取出 E-Plate L8, 在孔中加入 300 μL 混合均匀的 3 组细胞悬液, 放到三气水套式培养箱中的 iCELLigence 上行缺氧培养。采用 iCELLigence 系统检测 MCF-7 细胞的生长和增殖过程, 系统传感器检测获得的细胞阻抗参数-细胞指数(CI), 应用 iCelligence DA Software 2.0 软件进行试验数据分析和图像处理。

**1.2.5 流式细胞技术仪分析细胞周期** 转染后, 缺氧条件下培养 24 h 后, 收集各组细胞悬液, 加入预冷的 70% 乙醇 2 mL 充分悬浮细胞, 置于 4 °C 固定细胞 24 h 以上。细胞固定好后, 加入浓度为 50 μg/mL 的碘化丙啶(PI) 500 μL, 常温下避光染色 30 min。用滤网过滤细胞悬液, 采用标准程序经流式细胞仪检测结果。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS20.0 统计软件对试验数据进行统计学处理。计量资料均采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验, 检验水准  $\alpha = 0.05$ , 以  $P < 0.05$  表示为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 shRNA 载体转染乳腺癌 MCF-7 细胞的效率评价** shRNA 表达载体转染后, 连续培养 48 h 后置于荧光倒置相差显微镜下观察细胞转染效率, 结果表明电穿孔转染法的效率高达 95% 以上, 见图 1。



A: 转染 shRNA 荧光图像; B: 转染 shRNA 明场图像; C: A 和 B 的叠加图像。

图 1 荧光倒置相差显微镜下观察电穿孔法转染效率(×100)

**2.2 ADAM17 mRNA 表达的水平** 无义序列组( $2^{-\Delta\Delta CT} = 0.97 \pm 0.14$ )与对照组比较, ADAM17 mRNA 的表达无明显变化, 两者差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与对照组及无义序列组相比, shRNA 转染组的 4 个序列中 ADAM17 mRNA 表达水平均(转染 shRNA-297,  $2^{-\Delta\Delta CT} = 0.76 \pm 0.08$ ; 转染 shRNA-1134,  $2^{-\Delta\Delta CT} = 0.59 \pm 0.15$ ; 转染 shRNA-1219,  $2^{-\Delta\Delta CT} =$

$0.52 \pm 0.09$ ; 转染 shRNA-1508,  $2^{-\Delta\Delta CT} = 0.52 \pm 0.21$ )明显降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 尤以 shRNA1219 抑制率最高( $F = 5.11, P < 0.01$ ), 用于后续试验。在缺氧条件下特异性的 ADAM17-shRNA 表达载体可显著地抑制 ADAM17 mRNA 的表达。

**2.3 细胞生长曲线和增殖活性** 经 iCelligence DA Software

1.0 软件处理分析后得到细胞生长曲线,并测得对照组、无义序列组和 shRNA 转染组的 CI 分别为 2.86、2.73 和 1.27。无义序列组和对照组的 MCF-7 细胞的生长速度和增殖活性无明显变化( $P>0.05$ );但与对照组与无义序列组相比较,shRNA 转染组的 MCF-7 细胞的生长速度减慢,增殖活性降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 2。

**2.4 细胞周期的变化** 流式细胞仪检测 shRNA 转染组处于  $G_0/G_1$  期的细胞比例显著高于无义序列组和对照组,处于 S 期和  $G_2/M$  期的细胞比例均显著低于无义序列组和对照组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ );对照组和无义序列组间差异无统

计学意义( $P>0.05$ ),见图 3、表 2。

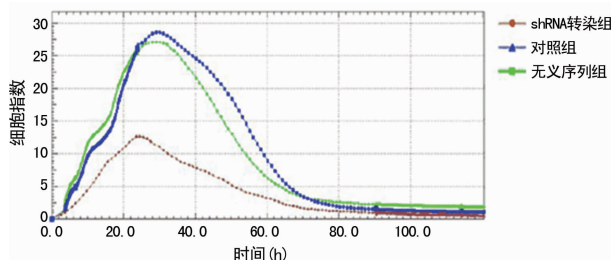
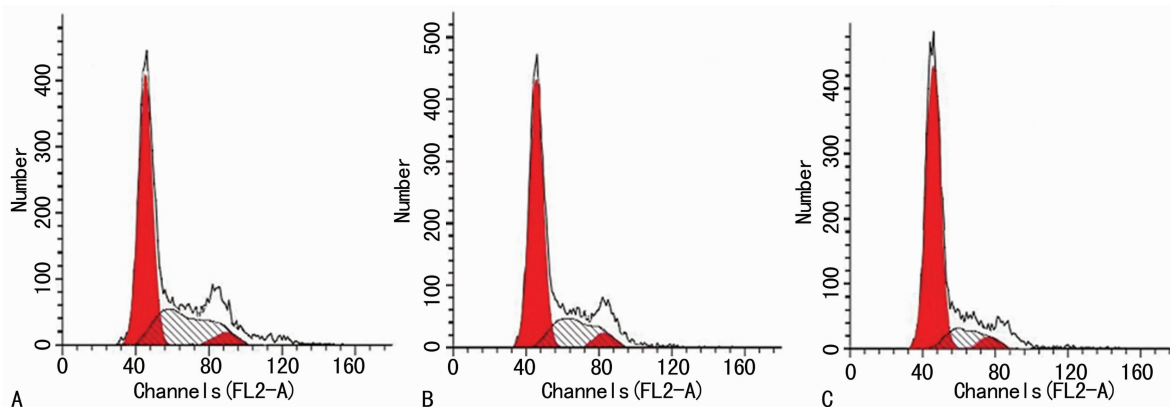


图 2 各组细胞的生长曲线



A:对照组;B:无义序列组;C:shRNA 转染组。

图 3 各组细胞的流式细胞周期图

表 2 各组细胞周期的各期的情况( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	$G_0/G_1$	S	$G_2/M$
对照组	3	62.56±2.35 <sup>a</sup>	26.45±1.38 <sup>a</sup>	11.52±2.88 <sup>a</sup>
无义序列组	3	62.68±1.20 <sup>a</sup>	26.51±2.08 <sup>a</sup>	9.62±2.05 <sup>a</sup>
shRNA 转染组	3	73.35±2.45	21.67±1.25	5.43±0.56

<sup>a</sup>: $P<0.05$ ,与 shRNA 转染组比较。

**3 讨论**

ADAM17 是解聚素-金属蛋白酶家族的重要成员之一,具有解聚素和金属蛋白酶的活性,ADAM17 发挥蛋白剪切酶样的作用,从而调节细胞的增殖、迁移运动等多种生物学行为<sup>[3-4]</sup>。目前研究发现 ADAM17 在乳腺癌的发生和发展的过程中扮演着很重要的角色。Giricz 等<sup>[5]</sup>研究发现 ADAM17 可以通过 EGFR-PI3K-AKT 信号通路途径,促进乳腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力。Sternlicht 等<sup>[6]</sup>报道 ADAM17 可通过激活双调蛋白来促进乳腺癌的发生和发展。原庆会等<sup>[7]</sup>发现乳腺癌组织中 ADAM17 mRNA 和蛋白水平与临床病理分期密切相关,ADAM17 蛋白水平与 TNM 分期呈正相关。Narita 等<sup>[8]</sup>研究发现 ADAM17 在乳腺癌组织中呈现高表达,并且随组织的恶性程度、临床分期的增加和淋巴结转移而表达增高。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)表现为双链 RNA 以序列特异性的方式来沉默内源性基因的表达。目前大多数 siRNA 表达载体被设计成能表达短发夹 RNA(shRNA),从而使得 shRNA 在细胞内表达,随后在体内加工生成 siRNA,进一步发挥基因沉默的作用。本研究首先针对 ADAM17 设计合成具有特异性的 ADAM17-shRNA,经电转染法转染乳腺癌 MCF-7 细胞,发现转染效率高达 90%以上。试验结果说明 shRNA 的 4 个转染组中 ADAM17 mRNA 的表达水平均明显降低( $P<$

0.05);shRNA 转染组的 MCF-7 细胞生长速度和增殖活性显著降低( $P<0.05$ );shRNA 转染组的细胞周期进展延缓。彭晓兵等<sup>[9]</sup>研究发现 ADAM17-shRNA 转染的 SD 大鼠 BMSC 对人乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖能力有显著的抑制作用。丁华等<sup>[10]</sup>发现转染 ADAM17-shRNA 的大鼠骨髓间充质干细胞对 MCF-7 细胞 ADAM17 mRNA 的表达有显著抑制作用,对细胞的体外侵袭能力也有明显抑制作用。说明靶向针对 ADAM17 基因的 shRNA 可以有效抑制 MCF-7 细胞 ADAM17mRNA 的表达,进而抑制细胞的增殖,延缓细胞周期的进展。

同时,肿瘤细胞的生长还需考虑肿瘤内部的缺氧微环境对肿瘤形成、进展和转移等的影响作用。恶性肿瘤快速增长,从而使它对氧的需求量增加;另外,一部分肿瘤组织逐渐远离具有丰富营养来源的血管而出现肿瘤血供不足,导致这一部分肿瘤组织缺氧坏死。赵婷婷等<sup>[11]</sup>发现缺氧降低乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖能力,增加其侵袭、转移能力,但并没有阐明其作用机制。杨雪飞等<sup>[12]</sup>研究发现缺氧可以导致人非小细胞肺癌 A549 系凋亡,但能增加存活细胞的侵袭能力。

目前模拟细胞缺氧环境主要有两种方式:化学缺氧法和物理缺氧法。本试验采用物理缺氧法,充入含 1%的  $O_2$ 、5%的  $CO_2$ 、94%的  $N_2$  的赛默 Thermo3131 三气水套式培养箱来模拟肿瘤细胞的体外缺氧微环境,更近似体内肿瘤缺氧微环境来研究缺氧对肿瘤细胞增殖的影响。本试验在缺氧条件下研究靶向针对 ADAM17 基因的 shRNA 对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响。结果同样说明 ADAM17-shRNA 在缺氧条件下对 MCF-7 细胞的 ADAM17 基因具有沉默作用,从而导致细胞的生长速度和增殖活性降低,细胞周期进展延缓,抑制了细胞增殖。同样与本研究结果相似,张博等<sup>[13]</sup>发现缺氧条件下通过上调 miRNA-21 多个信号通路靶基因,诱导乳腺癌细胞凋亡率

增加。王晗等<sup>[14]</sup>研究发现 RNA 干扰沉默缺氧诱导因子-1 $\alpha$  能够促进 MCF-7 凋亡,下调 VEGF 表达,推迟细胞周期。ADAM17 在乳腺癌的形成和发展的过程中起到重要的作用,因此以 ADAM17 作为治疗乳腺癌药物研究的一个靶点,在缺氧环境下利用 RNA 干扰技术的优势进行抗肿瘤药物的研究,是对现有乳腺癌基因靶向治疗起到重要的补充和完善作用。因此,该试验研究将能够进一步地为乳腺癌的靶向治疗领域提供新的研究方向。

## 参考文献

[1] 韩旭,杨星飞,张雪鹏,等. ADAM17 在乳腺癌组织中的表达及意义[J]. 现代中西医结合杂志,2010,19(20):2486-2488.

[2] 屈洪波. 低氧与肿瘤干细胞微环境的研究进展[J]. 肿瘤防治研究,2011,38(12):1451-1454.

[3] Benarroch EE. ADAM proteins, their ligands, and clinical implications[J]. *Neurology*,2012,78(12):914-920.

[4] Oikawa H, Maesawa C, Tatemichi Y, et al. A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) mediates epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II on hepatic stellate cells [J]. *Life Sci*,2014,97(2):137-144.

[5] Giricz O, Calvo V, Peterson EA, et al. TACE-dependent TGF $\alpha$  shedding drives triple-negative breast cancer cell invasion[J]. *Int J Cancer*,2013,133(11):2587-2595.

[6] Sternlicht MD, Sunnarborg SW. The ADAM17-amphiregulin-EGFR axis in mammary development and cancer[J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*,2008,13(2):181-194.

[7] 原庆会,何伟,王安群,等. 乳腺癌组织中 ADAM 家族的表达情况及其临床价值[J]. *中国医学装备* 2014,11(8):104-106

[8] Narita D, Seclaman E, Ursoniu S, et al. Increased expression of ADAM12 and ADAM17 genes in laser capture microdissected breast cancers and correlations with clinical and pathological characteristics [J]. *Acta Histochem*,2012,114(2):131-139.

[9] 彭晓兵,孙影,张雪鹏,等. 转染 ADAM17-shRNA 的骨髓间充质干细胞对 MCF-7 乳腺癌细胞增殖能力的影响[J]. *广东医学*,2015,36(19):2955-2958.

[10] 丁华,孙影,张雪鹏,等. 转染 ADAM17-shRNA 的大鼠骨髓间充质干细胞对 MCF-7 人乳腺癌细胞侵袭能力的影响[J]. *广东医学*,2014,35(14):2154-2156.

[11] 赵婷婷,邢鹏,金锋,等. 缺氧对人乳腺癌细胞系 MCF-7 生物学行为的影响[J]. *现代肿瘤医学*,2014,22(5):1015-1019.

[12] 杨雪飞,黄挺,毛晓韵,等. 缺氧对人非小细胞肺癌细胞系 A549 生物学行为的影响[J]. *浙江实用医学*,2013,18(1):15-16.

[13] 张博,张雪鹏,胡宝山,等. 缺氧对人乳腺癌 MCF-7 细胞 miRNA-21 表达的影响及与细胞增殖和凋亡的关系[J]. *肿瘤学杂志*,2014,20(4):265-269.

[14] 王晗,刘拥军,韩之波,等. RNA 干扰沉默缺氧诱导因子-1 $\alpha$  对人乳腺癌细胞功能的影响[J]. *中国医学科学院学报*,2006,28(5):670-674.

(收稿日期:2016-07-18 修回日期:2016-09-08)

(上接第 28 页)

and hypertrophy through a paracrine mechanism [J]. *Circ Res*,2011,109(3):272-280.

[5] Nishikimi T, Matsuoka H. Cardiac adrenomedullin: its role in cardiac hypertrophy and heart failure [J]. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*,2005,3(3):231-242.

[6] Barry SP, Davidson SM, Townsend PA. Molecular regulation of cardiac hypertrophy [J]. *Int J Biochem Cell Biol*,2008,40(10):2023-2039.

[7] Bell D, Mcdermott BJ. Intermedin (adrenomedullin-2): a novel counter-regulatory peptide in the cardiovascular and renal systems [J]. *Br J Pharmacol*,2008,153 Suppl 1: S247-262.

[8] Hong Y, Hay DL, Quirion R, et al. The pharmacology of adrenomedullin 2/intermedin [J]. *Br J Pharmacol*,2012,166(1):110-120.

[9] Chang CL, Roh J, Hsu SY. Intermedin, a novel calcitonin family peptide that exists in teleosts as well as in mammals: a comparison with other calcitonin/intermedin family peptides in vertebrates [J]. *Peptides*,2004,25(10):1633-1642.

[10] Tsuruda T, Jougasaki M, Boerrigter G, et al. Ventricular adrenomedullin is associated with myocyte hypertrophy in

human transplanted heart [J]. *Regul Pept*,2003,112(1/3):161-166.

[11] Chen H, Wang X, Tong M, et al. Intermedin suppresses pressure overload cardiac hypertrophy through activation of autophagy [J]. *PLoS One*,2013,8(5):e64757.

[12] Lu WW, Zhao L, Zhang JS, et al. Intermedin-1-53 protects against cardiac hypertrophy by inhibiting endoplasmic reticulum stress via activating AMP-activated protein kinase [J]. *J Hypertens*,2015,33(8):1676-1687.

[13] Takaki M. Cardiac mechanoenergetics for understanding isoproterenol-induced rat heart failure [J]. *Pathophysiology*,2012,19(3):163-170.

[14] Heather LC, Catchpole AF, Stuckey DJ, et al. Isoproterenol induces in vivo functional and metabolic abnormalities: similar to those found in the infarcted rat heart [J]. *J Physiol Pharmacol*,2009,60(3):31-39.

[15] Kato J, Tsuruda T, Kitamura K, et al. Adrenomedullin: a possible autocrine or paracrine hormone in the cardiac ventricles [J]. *Hypertens Res*,2003,26 Suppl: S113-119.

[16] Barwell J, Wootten D, Simms J, et al. RAMPs and CGRP receptors [J]. *Adv Exp Med Biol*,2012(744):13-24.

(收稿日期:2016-07-18 修回日期:2016-09-06)