

# ADAM9 基因干涉对非小细胞肺癌细胞 A549 体外和体内增殖的影响

张康,赵佳明,苏超

(绍兴文理学院附属医院心胸外科,浙江绍兴 312000)

**[摘要]** **目的** 研究非小细胞肺癌经 ADAM9 基因干涉后对非小细胞肺癌细胞 A549 体外、体内增殖的影响进行分析。**方法** 选用 24 只成年裸鼠建立移植瘤模型并将 A549 接种于动物皮下,待纳入的 24 只裸鼠体内瘤增长至 4 mm 后进行分组;体内瘤成形后将 24 只裸鼠分为对照组、ADAM9 组、顺铂组、联合组。对照组给予生理盐水进行干预,ADAM9 组给予每次 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ADAM9 进行干预,顺铂组每次给予 20  $\text{mg}/\text{kg}$  顺铂进行干预,联合组每次同时给予 ADAM9 组和顺铂组物质进行干预;4 组裸鼠每周给药 2 次,体内瘤大小每周测量 1 次,共计测量 7 周。**结果** ADAM9 组与对照组比较发现其生存曲线明显下降( $P < 0.05$ ),而顺铂组与联合组比较生存曲线明显平稳( $P < 0.05$ );顺铂组体内肿瘤质量明显较 ADAM9 组小( $P < 0.05$ ),联合组干涉 7 周后体内肿瘤质量明显较顺铂组高,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 体外研究发现 ADAM9 能有效促进 A549 增殖和保护作用;而体内数据发现 ADAM9 能促进瘤体增大,但顺铂组对 A549 具有明显抑制的效果,证实顺铂与 ADAM9 对 A549 增殖无明显影响。

**[关键词]** 癌,非小细胞肺;顺铂;去整合素金属蛋白酶 9;裸鼠;癌细胞增殖

**[中图法分类号]** R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)08-1224-04

## Effects of ADAM9 gene interference on proliferation of non-small cell lung cancer cells A549 in vitro and in vivo

ZHANG Kang, ZHAO Jiaming, SU Chao

(Department of Cardiothoracic Surgery, Affiliated Hospital of Shaoxing College of Arts and Sciences, Shaoxing, Zhejiang 312000, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the effect of ADAMP gene intervention to non-small cell lung cancer (NSCLC) on the proliferation of NSCLC A549 cells in vitro and in vivo. **Methods** Twenty-four adult nude mice were used to establish the transplanted tumor model and A549 was inoculated under the skin of the animals. The in vivo tumor in the 24 nude mice to be included was increased to 4 mm and then the grouping was conducted; after in vivo tumor forming, 24 nude mice were divided into the control group which was given the normal saline, the ADAM9 group which was given 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ADAM9 each time for conducting the intervention, the cisplatin group was given 20  $\text{mg}/\text{kg}$  cisplatin each time for conducting the intervention, and the combination group was simultaneously given the substance of ADAM9 group and cisplatin group each time for conducting the intervention; the nude mice in 4 groups were given the medication twice a week, and the tumor size in vivo was measured once a week for a total of 7 weeks. **Results** Compared with the control group, the ADAM9 group found that the survival curve of in vivo xenograft tumors in animal was decreased significantly ( $P < 0.05$ ), while which in the nude mice xenograft in vivo of the cisplatin group and the combination group was significantly stable ( $P < 0.05$ ); the tumor in the cisplatin group was significantly smaller than that in the ADAM9 group ( $P < 0.05$ ), and the tumor weight after 6-week intervention in the combination group was significantly higher than that of the cisplatin group, and the difference was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The in vitro study found that ADAM9 can effectively promote the proliferation and protection effect of A549; the in vivo data found that ADAM9 can promote tumor growth, but the cisplatin group has a significant inhibitory effect on A549, confirming that cisplatin and ADAM9 have no significant effect on A549 proliferation.

**[Key words]** non-small cell lung cancer; cisplatin; disintegrin metalloproteinase 9; nude mice; cancer cell proliferation

近年来,肺癌的发病率呈逐年上涨趋势,自 2004—2014 年肺癌患者数量高达 120 万/年,其病死率高达 91.6%,严重威胁人类生命健康,成为世界卫生组织高度重视的热门话题<sup>[1]</sup>。研究表明,通过抑制 ADAM9 基因表达水平能够有效改善前列腺患者上皮细胞表型,并能有效改善前列腺患者对放疗和化疗的敏感性,强化治疗效果<sup>[2]</sup>。ADAM9 基因的表达可能参与了非小细胞肺癌的发病机制,ADAM9 在细胞与细胞、细胞与细胞间质间相互作用,同时参与了 EGFR 配体 NRG1b 从前膜结合的前体细胞释放到细胞外介质中的过程,并发挥关键作用<sup>[3]</sup>。本实验旨在探讨 ADAM9 基因水平的表达对 A549 体内外影响,为非小细胞肺癌发病机制的研究提供有效的科学依据,为临床非小细胞肺癌的治疗提供全新的科学依据。

## 1 材料与方法

由上海斯莱克公司购进 24 只,平均年龄(5.32±0.16)岁,平均体质量为(19.65±3.25)g 的成年裸鼠。实验动物的饲养选择无特定病原体(SPF)环境,其饲养方法及动物饲养材料均按照实验动物管理与保护的相关规定进行操作。各实验用裸鼠一般情况比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。

### 1.1 试剂与仪器

仪器:HB-2 型倒置显微镜购自日本 Olympus 公司、128ce 酶标仪购自奥地利 Clinibio 公司;试剂:顺铂溶液购自江苏豪森药业股份有限公司、无水乙醇购自济南世纪通达化工有限公司、二甲基亚砜(DMSO, NO. D4540)和四甲基偶氮唑蓝(MTT, NO. M2128)由美国 Sigma 公司提供、原位末端标记法(TUNEL)试剂盒(NO. SK-8005)购自美国 Roche 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 试剂配制

顺铂及人 ADAM9 实验用溶液需现配现用,按照所需浓度用相应的生理盐水进行稀释;75%乙醇溶液的配制,采用双蒸水作为稀释液,向 125 mL 无水乙醇中加入 375 mL 双蒸水得到 500 mL 75%的乙醇溶液。试剂配制过程中应注意操作规范,防止试剂污染对实验结果产生影响。

#### 1.2.2 不同浓度 ADAM9 对 A549 增值的影响

对传代培养的 A549 进行洗涤、离心、收集。然后用 4 mL 10%胎牛血清 F-12K 培养液进行重悬,对细胞进行计数,调整细胞浓度为  $2 \times 10^6$ /mL,加入 96 孔板中培养;在终止培养前 4 h 向一块细胞板,96 个孔中加入 25  $\mu$ L MTT,重新放回原环境培养直至培养终止,MTT 最终浓度为 0.5 mg/mL;细胞培养结束后检测其光密度值(OD)并进行记录。

#### 1.2.3 实验分组

观察裸鼠移植瘤生长,对其肿瘤直径进行测量,待裸鼠肿瘤平均直径达 4 mm 后对裸鼠进行随机分组,每组 6 只。对照组:该组裸鼠为空白对照组,为排除液体体积对实验结果产生影响,该组裸鼠给予同干预组等体积生理盐水(2 次/周);ADAM9 组:该组裸鼠给予 ADAM9(40  $\mu$ g/kg, 2 次/周),同时给予与顺铂等体积的生理盐水,避免因液体体积对实验结果产生影响;顺铂组:该组裸鼠给予顺铂溶液(2.5 mg/kg, 2 次/周),同时给予与 ADAM9 等体积的生理盐水,避免因液体体积对实验结果产生影响;联合组:该组裸鼠给予 ADAM9(40  $\mu$ g/kg, 2 次/周),同时给予顺铂溶液(2.5 mg/kg, 2 次/周)。

#### 1.2.4 结果观察

每周测量 4 组裸鼠瘤体大小并绘制生长曲线,体积=短径<sup>2</sup>×长径/2。裸鼠移植瘤长径、短径的测量采用游标卡尺进行。裸鼠进行 7 周干预后,进行麻醉致死,致死后裸鼠立即进行解剖分离瘤体,并称量瘤体质量。记录不同组别裸鼠体内移植瘤的质量,以备实验结束后对各组裸鼠实验结果进行分析。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件进行处理,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示;组间比较采用  $t$  检验,多组间多重比较采用方差分析;计数资料采用百分比表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验,多组间多重分析采用秩和检验。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ADAM9 基因干涉对 A549 增值的影响

OD 值显示干预 7 周中 ADAM9 可有效促进 A549 的体外增殖,见图 1。

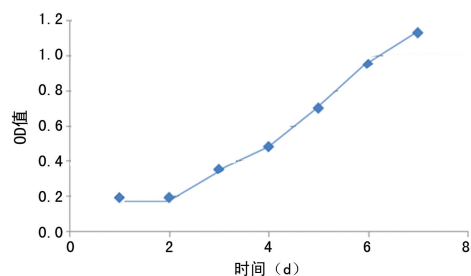


图 1 细胞生长曲线图

### 2.2 非小细胞肺癌动物模型的建立

24 只裸鼠接种 A549 细胞后成瘤时间为 8~10 d,瘤体平均直径为 4 mm 时是接种癌症细胞的第 15 天,瘤体形态见图 2;4 组裸鼠均存活至实验结束,无意外死亡。

### 2.3 移植瘤生长曲线描述

观察发现对照组移植瘤生长曲线陡直;ADAM9 组自给药 2 周后移植瘤增长明显较对照组快;顺铂组在使用药物后第 1 周瘤体生长速度较快,但第 2 周后瘤体生长速度明显下降,且第 3、4、5、6、7 周瘤体生长

速度明显较其他 3 组同时时间点慢;联合组裸鼠瘤体生长明显较为缓慢,且与对照组及 ADAM9 组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );联合组第 3 周后瘤体生长速度明显高于顺铂组( $P < 0.05$ ),见图 3。

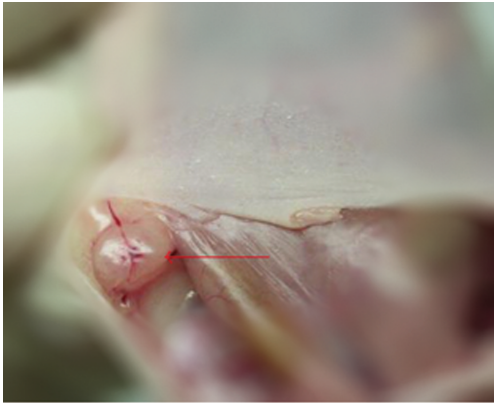


图 2 裸鼠皮下移植瘤图示

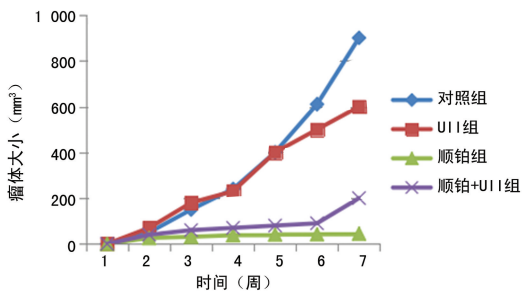


图 3 4 组裸鼠移植瘤生长速度

#### 2.4 裸鼠解剖及瘤体称重

麻醉处死 4 组裸鼠,并将瘤体进行分离;ADAM9 组移植瘤质量为 $(1.034 8 \pm 0.201 3)$ g 明显较对照组 $(0.758 2 \pm 0.245 8)$ g 高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );联合组移植瘤质量为 $(0.564 7 \pm 0.134 2)$ g 较对照组和 ADAM9 组轻,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而顺铂组与联合组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),但 4 组裸鼠均未出现瘤体转移。4 组经方差分析显示顺铂组  $SS = 1.181, \nu = 1, MS = 1.181$  ( $F = 30.214, P = 0.000$ )与 ADAM9 组  $SS = 0.372, \nu = 1, MS = 0.372$  ( $F = 9.416, P = 0.005$ )主效应差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),但两组交互作用为  $SS = 0.004, \nu = 1, MS = 0.004$  ( $F = 0.068, P = 0.789$ )差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图 4、5。

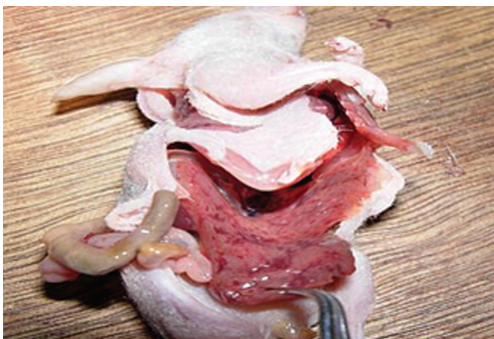


图 4 裸鼠解剖图示

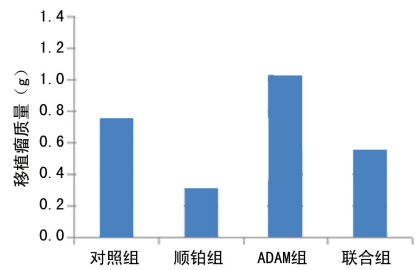


图 5 裸鼠移植瘤质量

### 3 讨论

近年来,非小细胞肺癌占肺癌的 80%,已成为影响人类生命的主要肺部疾病,给患者的生命带来极大威胁。以往人们认为引起肺癌的主要原因是吸烟,对此也做了大量的临床研究证实,吸烟对肺癌的发生具有一定影响<sup>[4-5]</sup>。随着医学的进步,学者们的不断探索发现,许多蛋白对于促进肺上皮细胞的增殖及致癌性具有密切关系,对肺癌的研究提升到了蛋白质水平。对于肿瘤患者的治疗也在不断的改进并取得越来越优异的成绩。如对肺癌发生机制有影响的蛋白质被逐步发现,并成为研究热点<sup>[6-8]</sup>。

ADAM9 是 ADAMs 家族的一员。ADAMs 是一种具有蛋白水解功能和细胞黏附功能的跨膜蛋白,目前已经发现 40 多个成员,其中有 21 种在人体内起到相应的作用,ADAM9 便是其中一种,其主要结构是跨膜蛋白的胞外区<sup>[9-10]</sup>。ADAM9 不仅能够促进乳腺肿瘤体外侵袭能力,还会降低前列腺癌患者对放化疗的敏感性,干扰肿瘤患者的临床效果<sup>[11]</sup>。

通过前期预实验对 ADAM9 实验用浓度进行确定,分别将 10、40、80  $\mu\text{g}/\text{kg}$  设置为 ADAM9 低、中、高浓度进行检测,10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ADAM9 浓度组与对照组比较,移植瘤重量差异无统计学意义( $P > 0.05$ );40、80  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ADAM9 浓度组与对照组移植瘤重量比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),但两浓度组裸鼠移植瘤质量比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。根据以上实验结果,本研究选用 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ADAM9 浓度作为本实验用浓度<sup>[12]</sup>。

顺铂组与联合组比较,移植瘤质量差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),且 ADAM9 组裸鼠移植瘤质量高于对照组,而顺铂组裸鼠移植瘤质量明显低于对照组,说明 ADAM9 能够促进 A549 在体内的增殖。实验显示对照组移植瘤生长曲线陡直,说明裸鼠内 A549 可正常生长,且 ADAM9 组自给药 2 周后移植瘤增长明显快于对照组,证实 AMAD9 可有效促进 A549 移植瘤在裸鼠体内的生长。相关文献表明,顺铂能够促进 A549 的凋亡,与本实验顺铂组裸鼠移植瘤生长情况相符,但 ADAM9 不能抑制顺铂对 A549 凋亡的调节作用<sup>[13]</sup>。而 ADAM9 调节 A549 体内外增殖的具体机制目前尚不明确,因此课题组需要继续研究。本实



验发现顺铂组可有效抑制体内移植瘤的生长速度,并缓解非小细胞肺癌的恶化速度,且 ADAM9 不能影响顺铂抑制肿瘤细胞的调节作用。针对联合组与顺铂组对照结果引出联想,联合组 ADAM9 不能抑制顺铂对 A549 凋亡影响的原因可能有,实验中样本较少,可能存在个体差异,对于两者同时注射的相关影响因素多种多样。目前还不明确两者对肿瘤细胞影响的具体机制,可能也会影响两者对 A549 增殖及凋亡的影响,还有待临床研究的大力探索与求证<sup>[14-15]</sup>。

综上所述,ADAM9 在 A549 中表达的具体机制及途径目前还不明确,是今后该课题组研究的重要内容;实验也表明 ADAM9 和顺铂对 A549 凋亡的调节没有显著影响,具体作用机制还有待进一步的临床研究发现。

## 参考文献

- [1] 唐小东,杨晓平,张小康,等. ADAM9 基因干涉对非小细胞肺癌细胞(A549)体外及体内增殖的影响[J]. 现代肿瘤医学,2015,23(12):1651-1655.
- [2] 郭晓彤,魏优蕾,雷加吉,等. 藤黄酸对非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡及 Bcl-2、Bax、P53 基因表达的影响[J]. 中国老年学杂志,2018,38(4):911-914.
- [3] 任勇,何威,齐曼丽,等. siRNA 沉默 TEM8 基因对非小细胞肺癌 A549 细胞增殖和侵袭能力的影响[J]. 临床与实验病理学杂志,2016,32(11):1231-1235.
- [4] IMOTO I,IZUMI H,YOKOI S,et al. Frequent silencing of the candidate tumor suppressor PC-DH20 by epigenetic mechanism in non-small-cell lung cancers[J]. *Cancer Res*,2006,66(9):4617-4626.
- [5] STEINER P,JOYNES C,BASSI R,et al. Tumor growth inhibition with cetuximab and chemotherapy in non-small cell lung cancer xenografts expressing wild-type and mutated epidermal growth factor receptor[J]. *Clin Cancer Res*,2007,13(5):1540-1551.
- [6] CHANG L,GONG F,CUI Y. RNAi-mediated A disintegrin and metalloproteinase 9 gene silencing inhibits the tumor growth of non-small lung cancer in vitro and in vivo[J]. *Mol Med Rep*,2015,12(1):1197.
- [7] 王玲,邹潇,刘辉国. Testin 在非小细胞肺癌组织和细胞株中的表达及其对癌细胞恶性生物学行为的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2017,24(9):984-989.
- [8] 刘迪,龙谦,罗猛,等. CTTN 基因沉默对非小细胞肺癌 A549 细胞侵袭能力的影响[J]. 山东医药,2018,58(4):29-31.
- [9] 孙艳婷,陈思成,李汪,等. PGRN 基因沉默对人非小细胞肺癌 A549 细胞增殖及迁移的影响[J]. 中国病理生理杂志,2018,34(4):585-591.
- [10] KOSSMANN C M,ANNEREAU M,THOMAS-SCHOEMANN A,et al. ADAM9 expression promotes an aggressive lung adenocarcinoma phenotype[J]. *J Int Oncol*,2017,39(7):1010428317716077.
- [11] CHANG J H,LAI S L,CHEN W S,et al. Quercetin suppresses the metastatic ability of lung cancer through inhibiting Snail-dependent Akt activation and Snail-independent ADAM9 expression pathways[J]. *BBA-Mol Cell Res*,2017,1864(10):S0167488917301696.
- [12] 蒋庚西,李春光,赵铁军,等. 沉默 Yes 相关蛋白 1 对人非小细胞肺癌细胞增殖和侵袭的影响[J]. 第二军医大学学报,2017,38(8):1004-1008.
- [13] 王良梅,司进,周萍,等. HIF-1 $\alpha$  siRNA 对非小细胞肺癌 A549 细胞 TIMP1、MMP1 表达的影响[J]. 中华全科医学,2018,16(3):339-342.
- [14] 郑亮,刘爽,元倩,等. 干扰 Mig-6 基因表达对非小细胞肺癌 EGFR 信号通路的影响[J]. 东南大学学报(医学版),2017,36(3):416-421.
- [15] 刘恒铄,牟艳玲,王燕,等. 靶向沉默 Notch1 基因对人非小细胞肺癌干细胞增殖和凋亡的影响[J]. 国际肿瘤学杂志,2019,46(2):65-71.

(收稿日期:2019-09-08 修回日期:2020-01-19)