

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.12.003

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220530.1030.006.html\(2022-05-30\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220530.1030.006.html(2022-05-30))

定量沉默 c-Met 基因表达对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖和化疗敏感性的影响*

王金西¹, 郭晓娟², 程锦红¹, 张绍东¹, 焦保庭¹

(1. 河北省邯郸市第一医院普外外科 056002; 2. 河北省邯郸市中心医院病理科 056001)

[摘要] **目的** 探讨定量沉默 c-Met 基因表达对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖、表阿霉素化疗敏感性的影响及其可能机制。**方法** 设计 3 条针对 c-Met 基因不同位点短发夹 RNA (shRNA) 片段, 瞬时转染 MDA-MB-231 细胞, 挑选出沉默效率最佳的 shRNA, 并设定 scramble 为阴性对照组, MDA-MB-231 细胞为空白对照组。将沉默效率最佳的 TA-shRNA 连接到 PSD400 慢病毒载体中进行病毒包装, 收集病毒液并感染 MDA-MB-231 细胞, 利用嘌呤霉素筛选出稳定表达针对 c-Met 的 shRNA 细胞系 (PSD400-c-Met-shRNA-MDA-MB-231) 及阴性对照组细胞 (PSD400-scramble-MDA-MB-231)。利用多西环素 (DOX) 诱导稳定细胞系, Western blot 检测稳定细胞系 c-Met 蛋白表达水平, 噻唑蓝 (MTT) 法检测敲低 c-Met 后对稳定细胞系增殖的影响。将诱导的稳定细胞系加入不同浓度表阿霉素, MTT 法检测不同浓度表阿霉素作用对稳定细胞系存活率的改变, 计算出药物半数抑制浓度 (IC₅₀); 流式细胞技术检测细胞凋亡情况; Western blot 检测凋亡相关蛋白多聚二磷酸腺苷 (ADP)-核糖聚合酶 (PARP)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3 (caspase-3) 的表达。**结果** 稳定细胞系 PSD400-c-Met-shRNA-MDA-MB-231 经 DOX 诱导后细胞生长受到明显抑制, 且加入不同浓度表阿霉素处理细胞后, 细胞的存活率和 IC₅₀ 均明显降低 ($P < 0.05$); 同时 G₀/G₁ 期细胞百分比明显升高, S 期、G₂/M 期细胞百分比明显降低 ($P < 0.05$)。Western blot 检测凋亡相关蛋白 PARP 和 caspase-3 上调明显。**结论** 定量沉默 c-Met 基因可以抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖, 促进细胞凋亡, 并提高了 MDA-MB-231 细胞的化疗敏感性, 靶向 c-Met 基因可能是治疗乳腺癌的有效方法。

[关键词] 乳腺癌; MDA-MB-231 细胞; c-Met 基因; 短发夹 RNA; 表阿霉素; 化疗敏感性**[中图分类号]** R737.9**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2022)12-1993-06

Effect of quantitative silencing of c-Met gene expression on the proliferation and chemosensitivity of breast cancer cell line MDA-MB-231*

WANG Jinxi¹, GUO Xiaojuan², CHEN Jinhong¹, ZHANG Shaodong¹, JIAO Baoting¹

(1. The Fourth Department of General Surgery, Handan First Hospital, Handan, Hebei 056002, China;

2. Department of Pathology, Handan Central Hospital, Handan, Hebei 056001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of quantitative silencing of c-Met gene expression on the proliferation of human breast cancer cell line MDA-MB-231 and the chemosensitivity of epirubicin (EPI) and its possible mechanism. **Methods** Three short hairpin RNA (shRNA) fragments targeting different sites of the c-Met gene were designed and transiently transfected into MDA-MB-231 cells. The shRNA with the best silencing efficiency was selected, scramble was set as the negative control group, and MDA-MB-231 cells were set as the blank control group. The TA-shRNA with the best silencing efficiency was connected to the PSD400 lentiviral vector for virus packaging, the virus liquid was collected and infected with MDA-MB-231 cells, and puromycin was used to screen out the cell lines that stably express shRNA against c-Met (PSD400-c-Met-shRNA-MDA-MB-231) and the negative control cells (PSD400-scramble-MDA-MB-231). The stable cell lines were induced by doxycycline (DOX), the protein expression level of c-Met in stable cell lines was detected by Western blot, and the effect of knockdown of c-Met on the proliferation of stable cell lines was detected by thiazolyl

* 基金项目: 邯郸市科学技术研究与发展计划 (1723208066-1)。 作者简介: 王金西 (1982-), 主治医师, 硕士, 主要从事乳腺、甲状腺疾病研究。

blue (MTT) assay. The induced stable cell lines were added with different concentrations of epirubicin, the changes in the survival rate of stable cell lines caused by the effect of different concentrations of epirubicin were detected by MTT assay, and the median inhibitory concentration (IC_{50}) of the drug was calculated. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis. The expression levels of apoptosis-related proteins, adenosine diphosphate-ribose polymerase (ADP-PARP) and caspase-3, were detected by Western blot. **Results** The growth of stable cell line PSD400-c-Met-shRNA-MDA-MB-231 was significantly inhibited by DOX induction, and the cell viability and IC_{50} were significantly decreased after treated with different concentrations of epirubicin ($P < 0.05$). At the same time, the percentage of cells in G_0/G_1 phase was significantly increased, and the percentage of cells in S phase and G_2/M phase was significantly decreased ($P < 0.05$). The results of Western blot showed that apoptosis-related proteins, PARP and caspase-3, were significantly up-regulated. **Conclusion** Quantitative silencing of c-Met gene can inhibit the proliferation of MDA-MB-231 cells, promote cell apoptosis, and improve the chemosensitivity of MDA-MB-231 cells. Targeting c-Met gene may be an effective method for the treatment of breast cancer.

[Key words] breast cancer; MDA-MB-231 cell lines; c-Met gene; short hairpin RNA; epirubicin; chemosensitivity

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和病死率居高位,且发病率有逐年升高的趋势,逐渐成为影响女性健康的首位恶性肿瘤^[1]。化疗是临床治疗乳腺癌的主要手段之一,但随着化疗药物的长期应用,患者易对化疗药物产生抗药性,影响化疗的效果^[2]。这一现象严重影响了乳腺癌患者的生存质量及疾病预后^[3-4]。作为传统的化疗药物,表阿霉素被认为是治疗乳腺癌最常用和有效的药物。然而,如何提高癌细胞对表阿霉素药物的敏感性目前已成为一个重要的临床问题。c-Met 是一种原癌基因,属于酪氨酸激酶受体家族,其配体为肝细胞生长因子 (hepato-cyte growth factor, HGF)^[5], c-Met 与 HGF 结合形成同源二聚体,可使酪氨酸磷酸化并激活下游信号通路。c-Met 基因失调或活化与人类肿瘤的发生、发展有密切联系。过去的几十年中,多项研究证实 c-Met 在乳腺癌组织中过表达,与其相关的信号通路与乳腺癌的发展、预后密切相关^[6]。QUE 等^[7]研究发现,在骨髓瘤细胞中抑制 c-Met 的表达可以提高肿瘤细胞对阿霉素化疗的敏感性。严婧等^[8]研究报告,抑制 c-Met 信号通路可增加白血病细胞株对硼替佐米的化疗敏感性。因此,针对 c-Met 的靶向治疗可以为肿瘤耐药后的治疗提供新的策略及方法。

1 材料与方法

1.1 材料

乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株购于上海生命科学院细胞库,胎牛血清购于美国 Hyclone 公司, RPMI1640 培养基、DMEM 培养基购于迈晨科技(北京)有限公司,嘌呤霉素购于美国 Sigma 公司,鼠抗人 c-Met 单抗购于德国 CalBiochem 公司,噻唑蓝 (MTT) 及二甲基亚砜 (DMSO) 购于北京索莱宝生物技术有

限公司,鼠抗人 Cleaved 多聚二磷酸腺苷 (ADP)-核糖聚合酶 (PARP)、Cleaved 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3 (caspase-3) 一抗、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗兔二抗 IgG 均购于美国 Cell signaling 公司;兔抗人三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 单抗购于美国 Santa Cruz 公司。流式细胞检测试剂盒购于美国 Invitrogen 公司;表阿霉素购于美国 Sigma 公司。

1.2 方法

首先参考文献查找针对 c-Met 的短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA), TA 载体构建并筛选沉默效果最佳的 shRNA, 进行慢病毒包装, 收集病毒液感染 MDA-MB-231 细胞, 用嘌呤霉素筛选出稳定细胞系 PSD400-c-Met-shRNA-MDA-MB-231, 鉴定稳定细胞系^[9]。

1.2.1 细胞培养

MDA-MB-231 细胞 (空白对照)、PSD400-c-Met-shRNA-MDA-MB-231 细胞、PSD400-scramble-MDA-MB-231 细胞 (阴性对照) 均培养于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养, 每隔 2 d 更换培养基, 0.25% 的胰酶消化传代。

1.2.2 筛选最佳多西环素 (Doxycycline, DOX) 诱导浓度

选择对数增长期的 pSD400-c-Met-shRNA-MDA-MB-231 细胞接种于 6 孔板中, 5×10^5 /孔, 向培养基中加入 DOX 进行诱导, 终浓度分别调整为 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 μ g/mL。培养 72 h 后提取细胞蛋白, 进行 Western blot 检测, 根据 c-Met 蛋白表达水平筛选出最适合的 DOX 浓度。最终选择 0.4 μ g/mL。

1.2.3 细胞诱导

将对数生长期的 3 种细胞用 0.25% 胰酶消化,接种于 6 孔板中,每孔加入 5×10^5 个细胞、2 mL 培养基,设置复孔,加入 DOX,使终浓度为 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$,吹打均匀,诱导 48 h。

1.2.4 MTT 法检测适当敲除 c-Met 基因后对细胞增殖的影响

把 3 种细胞接种在 6 孔板中,每孔接种 4×10^5 个细胞,每种细胞分成两组即有 DOX 诱导组(+DOX)和无 DOX 诱导组(-DOX)。待细胞贴壁后加入 DOX(0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)进行诱导,诱导 3 d 后将细胞接种于 96 孔板中,每孔接种 1.5×10^3 个细胞。设置 6 个实验组(+DOX shRNA、+DOX scramble、+DOX MDA-MB-231、-DOX shRNA、-DOX scramble、-DOX MDA-MB-231),每组设 5 个复孔,6 个观察时间点。为防止边缘效应周边各孔加入 200 μL 的磷酸盐缓冲液(PBS)。各组细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养。分别于 12、24、48、72、96、120 h 时间点检测。检测时每孔加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL),在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱避光孵育 4 h,然后去掉 96 孔板中的培养基,每孔加入 150 μL DMSO,将 96 孔板振荡 10 min。用酶标仪检测 490 nm 波长下的吸光度(A_{490})值,并处理数据。

1.2.5 MTT 检测细胞对表阿霉素的化疗敏感性

将诱导的 3 种细胞及对照组细胞胰酶消化后接种于 96 孔板中,每孔按照 $2 \times 10^3/\text{mL}$ 接种,分别加入终浓度为 0、0.25、0.5、1、5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的表阿霉素药物,每个浓度设置 3 个复孔,并设置调零孔及空白对照孔。用 MTT 法检测 A_{490} 值。计算细胞存活率。使用 GraphPad Prism6.0 软件计算细胞的药物半数抑制浓度(IC_{50})并绘制细胞存活率曲线。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞周期分布

将诱导的 3 种细胞及对照组细胞胰酶消化后接种于 6 孔板中,每孔接种细胞 5×10^5 个,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 温箱孵育 24 h 后去掉原培养基,加入含表阿霉素药物的培养基,使终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,培养 48 h 后去掉原培养基,用无酶消化液[含 0.04% 乙二胺四乙酸(EDTA)]处理细胞制成细胞悬液,用 PBS 洗涤并重悬细胞,调整细胞密度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$,取 1 mL 单细胞悬液,离心去上清液,加入 1 mL 70% 的预冷乙醇,4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。染色前用 PBS 洗涤 2 次,加入 100 mg/L 核糖核酸酶 A(RNaseA),37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min。再加入 500 μL (50 mg/L)碘化丙啶(PI)染色液混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 30 min 后,转移至流式细胞仪进行检测,每组重复 3 次。流式细胞仪检测细胞周期,计算 G_0/G_1 期、S 期和 G_2/M 期细胞百分比。

1.2.7 Western blot 检测细胞中 PARP、caspase-3 表达

将 3 种细胞于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵育 24 h 后弃去原培养基,加入含终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 表阿霉素的培养基,培养 48 h 后收集各组细胞,提取细胞总蛋白,每组设 3 个复孔。经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、电转膜至甲醛预处理过的聚偏氟乙烯(PVDF)膜密封 2 h,洗膜并分别以鼠抗人 Cleaved PARP、Cleaved caspase-3 单克隆抗体作为一抗,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜,洗膜加入辣根过氧化物酶标记的二抗,于室温下孵育 2 h。再用电化学发光(ECL)显示,收集影像,以 GAPDH 作为内参,采用凝胶图像处理系统软件分析各组的条带灰度值。

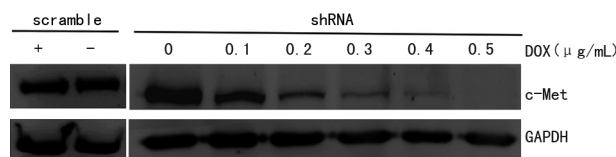
1.3 统计学处理

采用 SPSS16.0 统计软件进行统计分析,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据进行单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 筛选最佳 DOX 诱导浓度

将嘌呤霉素筛选出来的稳定细胞系 pSD400-c-Met-shRNA-MDA-MB-231 用不同浓度的 DOX 进行诱导,然后 Western blot 检测 c-Met 蛋白表达,结果显示 c-Met 蛋白表达水平随着 DOX 浓度增加逐渐降低,当 DOX 浓度在 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,c-Met 蛋白几乎不表达。为了避免因 c-Met 基因被完全敲除而导致细胞死亡,选择 DOX 浓度为 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$,见图 1。



shRNA: pSD400-c-Met-shRNA-MDA-MB-231 细胞组; scramble: pSD400-scramble-MDA-MB-231 细胞组。

图 1 Western blot 检测不同浓度 DOX 诱导 pSD400-c-Met-shRNA-MDA-MB-231 细胞后蛋白表达

2.2 适当沉默 c-Met 基因后对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

3 种细胞株接种在 96 孔板中并加入 DOX(浓度: 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)进行诱导,诱导时间分别为 12、24、48、72、96、120 h,在各时间点进行 MTT 检测,读取 A_{490} 值。由于可诱导 shRNA 是建立在四环素操纵子(TetO)系统基础上的慢病毒载体,稳定细胞系在常规培养时与一般细胞无明显差异,当培养基中加入 DOX 后,便可诱导稳定细胞系合成 shRNA,从而对目的基因进行定量沉默。实验结果显示, pSD400-c-Met-shRNA-MDA-MB-231 细胞株中经过 DOX 诱导的细胞(有 DOX 诱导组)c-Met 基因被适当沉默,细胞增殖受到抑制,随着时间的延长抑制越来越明显,与无 DOX 诱导组相比有明显差异($P < 0.05$);而阴性对照组及空白组细胞无论有无 DOX 诱导,细胞增殖无明显

显差异 ($P > 0.05$)。DOX 诱导后 pSD400-c-Met-shRNA-MDA-MB-231 细胞 c-Met 基因被适当沉默,

较 pSD400-scramble-MDA-MB-231 细胞增殖明显受到抑制 ($P < 0.05$), 见图 2。

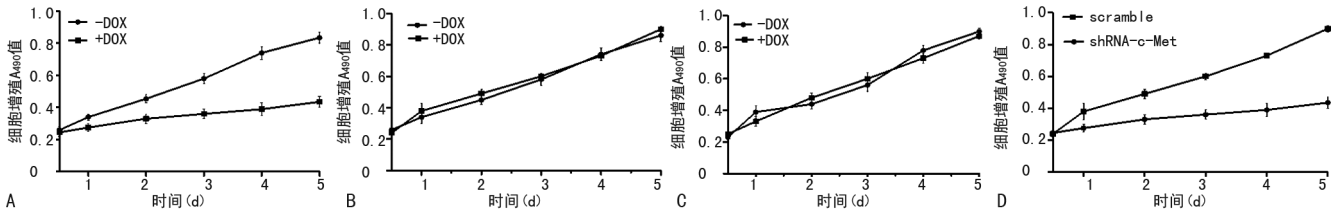


图 2 适当沉默 c-Met 后对细胞增殖的影响
A: 加/不加 DOX 适当沉默 c-Met 后对 pSD400-c-Met-shRNA-MDA-MB-231 细胞增殖的变化; B: 加/不加 DOX 对 pSD400-scramble-MDA-MB-231 细胞增殖的变化; C: 加/不加 DOX 对 MDA-MB-231 细胞增殖的变化; D: DOX 诱导后 pSD400-c-Met-shRNA-MDA-MB-231 细胞和 pSD400-scramble-MDA-MB-231 细胞增殖的变化; shRNA-c-Met: pSD400-c-Met-shRNA-MDA-MB-231 细胞; scramble: pSD400-scramble-MDA-MB-231 细胞。

2.3 适当沉默 c-Met 基因后 MDA-MB-231 细胞对表阿霉素的化疗敏感性检测

DOX 诱导细胞后, 给予不同浓度表阿霉素作用, 采用 MTT 法检测其对细胞存活率的影响。结果显示, 适当沉默 MDA-MB-231 细胞 c-Met 基因表达(有 DOX 诱导组), 其细胞存活率随着表阿霉素浓度的增加较无沉默 c-Met 细胞(无 DOX 诱导组)呈现明显降低的趋势, 阴性对照组及空白细胞组无明显差异。经过 DOX 诱导、表阿霉素处理后 pSD400-c-Met-shRNA-MDA-MB-231 细胞株 IC_{50} 为 $1.23 \mu\text{g}/\text{mL}$, 无 DOX 诱导组 IC_{50} 为 $4.92 \mu\text{g}/\text{mL}$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。pSD400-scramble-MDA-MB-231 细胞株中有 DOX 诱导组 IC_{50} 为 $5.56 \mu\text{g}/\text{mL}$, 无 DOX 诱导组 IC_{50} 为 $5.13 \mu\text{g}/\text{mL}$; MDA-MB-231 细胞株中有 DOX 诱导组 IC_{50} 为 $5.46 \mu\text{g}/\text{mL}$, 无 DOX 诱导组 IC_{50} 为 $5.68 \mu\text{g}/\text{mL}$; 两种细胞株有、无 DOX 诱导组 IC_{50} 比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 3。

2.4 适当沉默 c-Met 基因表达联合表阿霉素作用后对细胞凋亡的影响

3 种细胞经 DOX 诱导后, 加入 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 表阿霉素, 经 48 h 后利用流式细胞仪检测细胞的周期分布情

况。结果显示, pSD400-c-Met-shRNA-MDA-MB-231 细胞株经 DOX 诱导的细胞(有 DOX 诱导组) G_0/G_1 期细胞百分比为 $(53.7 \pm 1.42)\%$, S 期及 G_2/M 期细胞百分比降低, 分别为 $(38.1 \pm 1.13)\%$ 、 $(8.2 \pm 0.78)\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而未经 DOX 诱导的细胞(无 DOX 诱导组) G_0/G_1 期细胞百分比为 $(33.5 \pm 1.18)\%$ 。pSD400-scramble-MDA-MB-231 细胞株中有、无 DOX 诱导组 G_0/G_1 期细胞百分比 $[(32.2 \pm 1.26)\% \text{ vs. } 33.4 \pm 1.12\%]$ 和 MDA-MB-231 细胞株中有、无 DOX 诱导组 G_0/G_1 期细胞百分比 $[(32.7 \pm 1.31)\% \text{ vs. } (33.1 \pm 1.42\%)]$ 均无明显差异 ($P > 0.05$), 见图 4。

2.5 Western blot 检测细胞凋亡蛋白表达

适当敲除 MDA-MB-231 细胞 c-Met 基因后联合表阿霉素, Western blot 检测细胞中凋亡相关蛋白 PARP、caspase-3 的表达变化。结果显示, pSD400-c-Met-shRNA-MDA-MB-231 细胞株 Cleaved PARP、Cleaved caspase-3 表达水平增加明显, 而 pSD400-scramble-MDA-MB-231 细胞株无论有无 DOX 诱导, Cleaved PARP、Cleaved caspase-3 表达水平无明显差异, 见图 5。

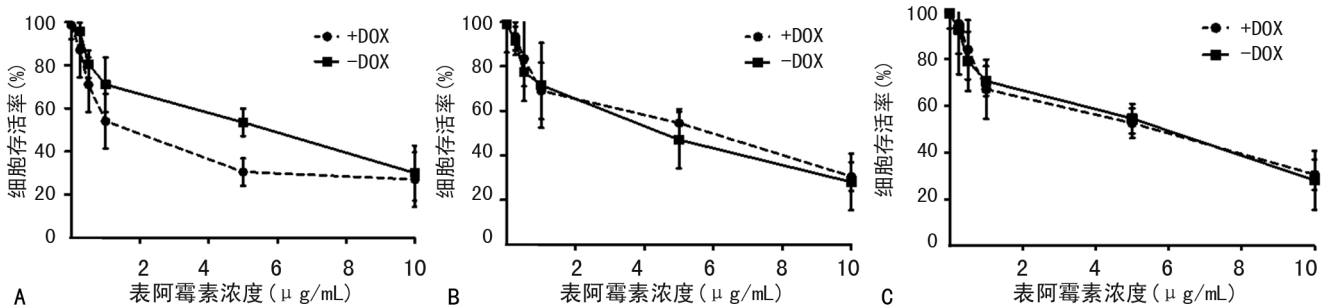
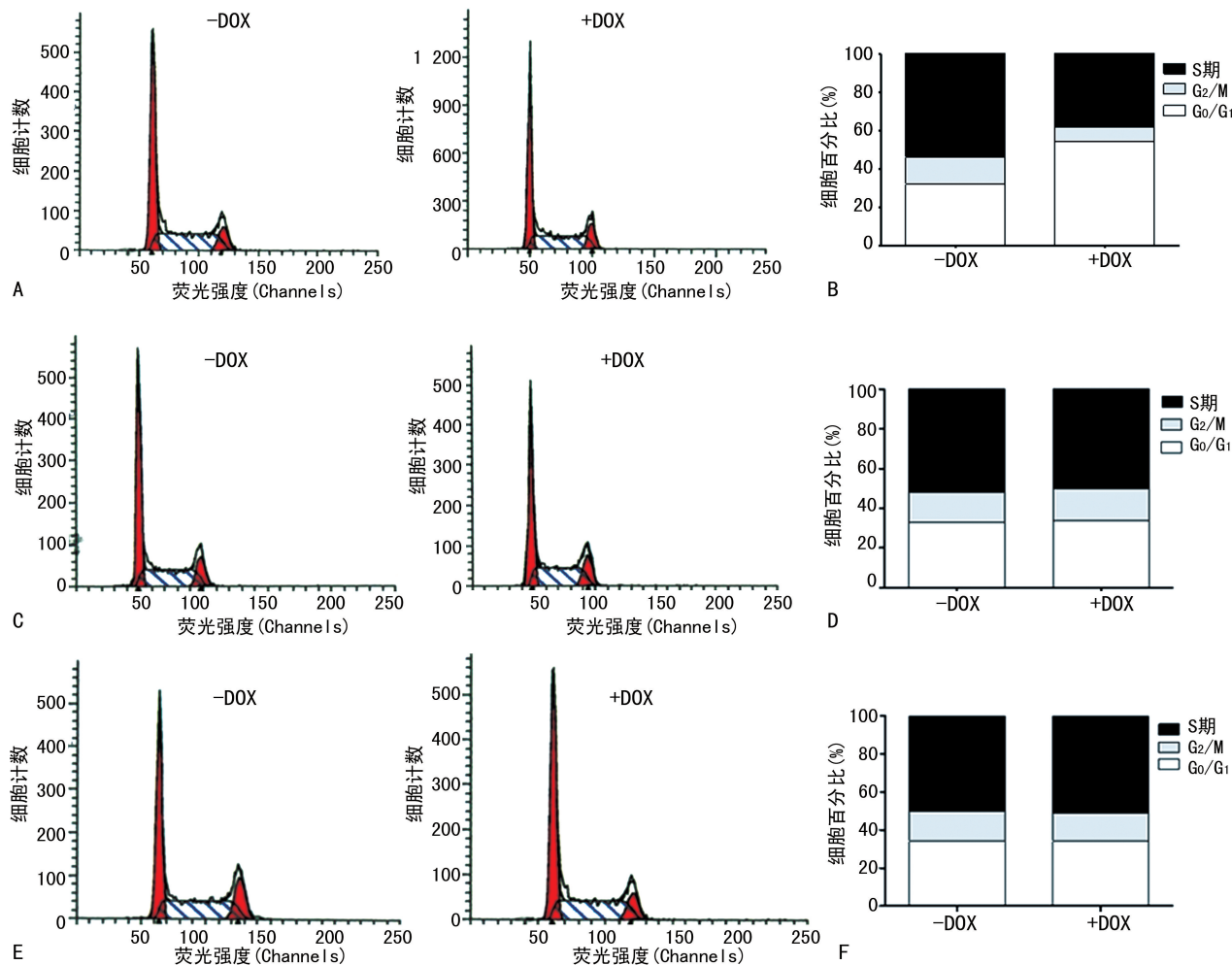


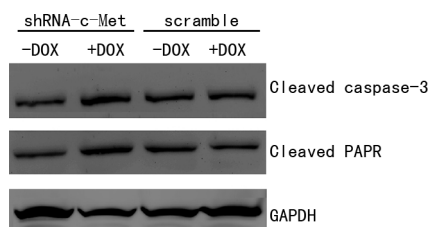
图 3 DOX 诱导 3 种细胞株后对表阿霉素化疗敏感性的检测
A: 加/不加 DOX 适当沉默 c-Met 后联合表阿霉素对 pSD400-c-Met-shRNA-MDA-MB-231 细胞存活率的影响; B: 加/不加 DOX 联合表阿霉素对 pSD400-scramble-MDA-MB-231 细胞存活率的影响; C: 加/不加 DOX 对 MDA-MB-231 细胞存活率的影响。

图 3 DOX 诱导 3 种细胞株后对表阿霉素化疗敏感性的检测



A: 加/不加 DOX 适当沉默 c-Met 后联合表阿霉素 pSD400-c-Met-shRNA-MDA-MB-231 细胞周期的变化; B: 加/不加 DOX 适当沉默 c-Met 后联合表阿霉素 pSD400-c-Met-shRNA-MDA-MB-231 细胞不同周期细胞百分比; C: 加/不加 DOX 联合表阿霉素 pSD400-scramble-MDA-MB-231 细胞周期的变化; D: 加/不加 DOX 联合表阿霉素 pSD400-scramble-MDA-MB-231 细胞不同周期细胞百分比; E: 加/不加 DOX MDA-MB-231 细胞周期的变化; F: 加/不加 DOX MDA-MB-231 细胞不同周期细胞百分比。

图 4 流式细胞仪检测定量沉默 c-Met 基因表达联合表阿霉素对 3 种细胞细胞周期的影响



shRNA-c-Met: pSD400-c-Met-shRNA-MDA-MB-231 细胞; scramble: pSD400-scramble-MDA-MB-231 细胞。

图 5 适当沉默 MDA-MB-231 细胞 c-Met 基因表达联合表阿霉素对凋亡蛋白的影响

3 讨论

化疗目前仍为乳腺癌主要的治疗方法,但癌细胞对化疗药物的耐药性是影响乳腺癌患者预后的主要障碍。表阿霉素由于抗肿瘤效果好且价格低廉,目前为乳腺癌化疗常用药物,但其严重的心脏毒性及骨髓抑制,使不少乳腺癌患者不能完成整个化疗疗程。如何增加乳腺癌细胞对表阿霉素的敏感性显得尤为重要。

c-Met 是一种原癌基因, HGF 是其配体,属于受体酪氨酸蛋白激酶家族成员^[10]。肿瘤的侵袭性、脉管浸润、淋巴结转移、远处转移、耐药性及预后与 c-Met 过度表达密不可分^[11]。因此, c-Met 可能是一个潜在的肿瘤治疗靶点,其抑制剂的研究现已成为肿瘤治疗领域的热点。过去很多年的研究中证实,乳腺癌组织中 c-Met 呈过表达,乳腺癌的发展及预后与 c-Met 相关的信号通路有密切关系^[12]。c-Met 抑制剂 SGX523 能明显抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖并诱导细胞凋亡,使细胞周期 G₀/G₁ 期阻滞,这一研究被冯炜红等^[13]证实,这为 c-Met 靶向治疗的临床转化提供了良好的实验及理论基础。

RNA 干扰(RNAi)是有效沉默或抑制目标基因表达的过程。RNAi 沉默机制是由小干扰 RNA(siRNA)或 shRNA 诱导实现靶 mRNA 的降解,或者通过微 RNA(miRNA)诱导特定 mRNA 翻译的抑制^[14]。目前 shRNA 慢病毒载体被广泛地用于 RNAi 研究

中,这得益于 shRNA 在宿主细胞中能高效、长期稳定地表达。本研究所采用的可诱导 shRNA 是建立在 TetO 系统基础上的诱导系统,它含有 TetO 序列,后者可以与四环素阻遏蛋白(TetR)结合并能阻止 TetO 的启动子启动 shRNA 的转录。四环素(Tet)或 DOX 可以与 TetR 结合,可使 TetR 的结构发生改变,最终导致 TetO 序列上的 TetR 脱落,使 shRNA 转录表达。

多项实验研究证实,在多种肿瘤细胞中 shRNA 对 c-Met 的沉默是有效的^[15-16]。本次研究成功构建针对 c-Met 的 shRNA 稳定细胞系,该细胞系常规培养时与阴性对照组无差别,不表达 shRNA,在加入 DOX 诱导后,稳定细胞系可表达 shRNA,从而导致稳定细胞 c-Met 蛋白表达水平降低,细胞增殖能力受到抑制。前期研究发现,如果完全敲除细胞 c-Met 基因后细胞会死亡,所以本研究选择可调控沉默 c-Met 基因的慢病毒载体系统进行后续实验。在实验中发现 DOX 浓度在 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时 c-Met 沉默率可达 80% 左右,所以最终选择 DOX 诱导浓度为 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。适当敲除 MDA-MB-231 细胞 c-Met 基因后加入表阿霉素联合作用,发现 MDA-MB-231 细胞的增殖明显受到抑制,同时促进了细胞的凋亡。乳腺癌细胞对表阿霉素作用的 IC_{50} 由 4.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 降至 1.23 $\mu\text{g}/\text{mL}$,细胞增殖活性明显降低,这与 QUE 等^[17]的研究结果一致。同时适当沉默 c-Met 基因与表阿霉素联合作用诱导细胞出现 G_1 期阻滞,从而抑制细胞的增殖。这些结果或许说明针对肿瘤细胞中特定的原癌基因,调控其在肿瘤细胞中的表达,对于有效提高化疗药物对肿瘤细胞的细胞毒性具有重要作用。

本次研究结果也表明,适当沉默 MDA-MB-231 细胞 c-Met 基因表达联合表阿霉素作用后,细胞中凋亡相关蛋白 PARP 和 caspase-3 表达水平增高。目前已经证实 caspase-3 及其底物 PARP 在细胞凋亡中起重要作用。当细胞 DNA 受损严重时可以激活 caspase-3,从而介导细胞凋亡,此时 PARP 被 caspase-3 裂解。裂解的 PARP 切断烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)合成时对三磷酸腺苷(ATP)的消耗,促使细胞凋亡的完成^[17]。PARP 常被用作细胞凋亡的指标。本研究中适当敲除 c-Met 后,MDA-MB-231 细胞上调 caspase-3 和 PARP 表达,结果表明 shRNA 对 c-Met 基因适当敲除联合表阿霉素引起 caspase 相关细胞凋亡,这可能是导致细胞活性下降的部分原因。这与 QUE 等^[17]研究结果一致,该研究显示 shRNA 靶向 c-Met 可诱发 U266 细胞 caspase 依赖性凋亡。本研究显示,在 pSD400-c-Met-shRNA-MDA-MB-231 细胞

(有 DOX 诱导组)中细胞增殖能力的下降与凋亡率的增加关系密切,并且细胞周期阻滞发生在 G_0/G_1 期。

肿瘤耐药性是导致乳腺癌患者治疗失败和死亡的重要原因。在本研究中,下调 c-Met 表达可以增加乳腺癌细胞 MDA-MB-231 对表阿霉素的敏感性,表明 c-Met 可能是乳腺癌的辅助化疗靶点。作者认为,除了 MDA-MB-231 细胞以外,本研究还应分析更多的乳腺癌细胞,以证实适当敲除 c-Met 基因对乳腺癌细胞增殖、侵袭的抑制作用,以及增加乳腺癌细胞对表阿霉素化疗敏感性的作用。此外,除了研究下调 c-Met 对表阿霉素的化疗敏感性外,还应分析其他化疗药物的化疗敏感性。因此,适当敲除 c-Met 基因产生的抗癌作用有待进一步研究。

参考文献

- [1] CHEN W,ZHENG R,BAADE P D,et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] SHARMA B, VARNEY M L, SAXENA S, et al. Induction of CXCR2 ligands, stem cell-like phenotype, and metastasis in chemotherapy-resistant breast cancer cells [J]. Cancer Lett, 2016, 372(2): 192-200.
- [3] MEHTA R S, BARLOW W E, ALBAIN K S, et al. Overall survival with fulvestrant plus anastrozole in metastatic breast cancer [J]. N Engl J Med, 2019, 380(13): 1226-1233.
- [4] XIANG S L, ROBERT T D, HOFFMAN A E, et al. Epigenetic inhibition of the tumor suppressor ARHI by light at night-induced circadian melatonin disruption mediates STAT3-driven paclitaxel resistance in breast cancer [J]. J Pineal Res, 2019, 67(2): 1-32.
- [5] 曹峰,曹磊,张建军,等. RNA 干扰沉默 c-Met 对喉鳞癌细胞生物学行为影响 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2020, 27(13): 1034-1039.
- [6] 刘海旺,张宏旭,刘燃,等. 肝细胞生长因子/酪氨酸蛋白激酶 MET 信号通路 with 乳腺癌侵袭转移的相关性分析 [J]. 安徽医药, 2021, 25(3): 516-519.
- [7] QUE W, CHEN J. Knockdown of c-Met inhibits cell proliferation and invasion and increases chemosensitivity to doxorubicin in human multiple myeloma U266 cells in vitro [J]. Mol Med Rep, 2011, 4(2): 343-349. (下转第 2003 页)

- to A β by inducing APP dimerization[J]. *Mol Biol Cell*, 2021, 32(3):247-259.
- [6] BEHL T, KAUR I, SEHGAL A, et al. The interplay of ABC transporters in A β translocation and cholesterol metabolism: implicating their roles in Alzheimer's disease[J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(4):1564-1582.
- [7] PAHNKE J, BASCUÑANA P, BRACKHAN M, et al. Strategies to gain novel Alzheimer's disease diagnostics and therapeutics using modulators of ABCA transporters[J]. *Free Neuro-pathol*, 2021, 2:33.
- [8] KOLDAMOVA R, FITZ N F, LEFTEROV I. ATP-binding cassette transporter A1: from metabolism to neurodegeneration[J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 72(Pt A):13-21.
- [9] NAVAS G M, LOPEZ-BLANCO R, CORREA J, et al. Liver X receptor activation with an intranasal polymer therapeutic prevents cognitive decline without altering lipid levels[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(3):4678-4687.
- [10] MARTENS N, SCHEPERS M, ZHAN N, et al. 24 (S)-Saringosterol prevents cognitive decline in a mouse model for Alzheimer's disease[J]. *Mar Drugs*, 2021, 19(4):190.
- [11] AOW J, HUANG T R, THINAKARAN G, et al. Enhanced cleavage of APP by co-expressed Bace1 alters the distribution of APP and its fragments in neuronal and non-neuronal cells[J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59(5):3073-3090.
- [12] ZHANG X L, ZHAO N, XU B, et al. Treadmill exercise inhibits amyloid- β generation in the hippocampus of APP/PS1 transgenic mice by reducing cholesterol-mediated lipid raft formation[J]. *Neuroreport*, 2019, 30(7):498-503.
- [13] THANOPOULOU K, FRAGKOULI A, STYLIANOPOULOU F, et al. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) regulates perivascular macrophages and modifies amyloid pathology in an Alzheimer mouse model[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(48):20816-20821.
- [14] RIDDELL D R, ZHOU H, COMERY T, et al. The LXR agonist TO901317 selectively lowers hippocampal A β 42 and improves memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2007, 34(4):621-628.
- [15] FITZ N F, CRONICAN A, PHAM T, et al. Liver X receptor agonist treatment ameliorates amyloid pathology and memory deficits caused by high-fat diet in APP23 mice[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(20):6862-6872.

(收稿日期:2021-12-28 修回日期:2022-03-08)

(上接第 1998 页)

- [8] 严婧,何志旭,栾佐,等. 抑制 c-Met 信号通路可增加白血病细胞株对硼替佐米的化疗敏感性[J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(10):3956-3962.
- [9] 王金西,郭晓娟,程锦红,等. 慢病毒介导的靶向 c-Met 可诱导 shRNA 稳定乳腺癌 MDA-MB-231 细胞系的构建及生物活性鉴定[J]. *生物技术通讯*, 2020, 31(4):392-398.
- [10] MIRANDA O, FAROOQUI M, SIEGFRIED J M. Status of agents targeting the HGF/c-Met axis in lung cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 10(9):280-297.
- [11] JONES G S, HOADLEY K A, OLSSON L T, et al. Hepatocyte growth factor pathway expression in breast cancer by race and subtype[J]. *Breast Cancer Res*, 2021, 23(1):80-90.
- [12] HO-YEN C M, JONES J L, KERMORGANT S. The clinical and functional significance of c-Met in breast cancer: a review[J]. *Breast Cancer Res*, 2015, 17(1):52-60.
- [13] 冯炜红,张斌,赵洪猛,等. c-Met 抑制剂 SGX523 诱导乳腺癌 MDA-MB-231 细胞系的凋亡[J]. *中国肿瘤临床*, 2012, 39(2):61-64.
- [14] O'KEEFE E P. siRNAs and shRNAs: tools for protein knockdown by gene silencing[J]. *Methods*, 2013, 3:197.
- [15] 马德健,曹珍,王贲士,等. 沉默肝细胞生长因子受体 c-Met 表达对结肠癌细胞生物学特性的影响[J]. *中华肿瘤杂志*, 2020, 42(5):362-368.
- [16] ZHANG Q, ZHANG H, NING T, et al. Exosome-delivered c-Met siRNA could reverse chemoresistance to cisplatin in gastric cancer[J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 4(15):2323-2335.
- [17] JIAO C, CHEN W, TAN X, et al. Ganoderma lucidum spore oil induces apoptosis of breast cancer cells in vitro and in vivo by activating caspase-3 and caspase-9[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 247:112256-112266.

(收稿日期:2021-11-22 修回日期:2022-03-18)