

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.014.001
文章编号: 1005-8982 (2018) 014-0001-06

基础研究 · 论著

ADAM17-shRNA 对 MCF-7 乳腺癌细胞 裸鼠移植瘤的抑制作用研究*

张笑博¹, 孟祥潮¹, 张雪鹏¹, 孙影², 贾文婷¹

(1. 华北理工大学附属医院 肿瘤外科, 河北 唐山 063000; 2. 华北理工大学基础医学院
病理科, 河北 唐山 063210)

摘要: 目的 观察转染解聚素-金属蛋白酶 17-短发夹 RNA (ADAM17-shRNA) 的 MCF-7 乳腺癌细胞在裸鼠体内的生长效果并探索其作用机制。**方法** 将 30 只裸鼠随机分为转染组 (接种转染 ADAM17-shRNA 的 MCF-7 乳腺癌细胞)、空载体组 (接种转染 shNC 的 MCF-7 乳腺癌细胞) 及对照组 (接种正常 MCF-7 细胞)。分别在各组裸鼠右侧腋部皮下种植细胞悬液 0.2 ml/只, 观察各组荷瘤裸鼠的生长状态、饮食及体重变化。第 28 天处死裸鼠并取出移植瘤。采用 HE 染色观察组织学形态; Western blot 检测肿瘤局部 ADAM17、磷酸化表皮细胞生长因子受体 (p-EGFR)、表皮细胞生长因子受体 (EGFR)、磷酸化的蛋白激酶 B (p-Akt)、蛋白激酶 B (Akt)、磷酸化的细胞外调节蛋白激酶 (p-ERK) 及细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 的表达。**结果** 对照组、空载体组及转染组移植瘤最终体积分别为 (639.821 ± 15.429)、(643.350 ± 15.543) 和 (240.233 ± 10.536) mm³, 3 组不同时间点瘤体体积比较有差异 ($P < 0.05$); 不同组别瘤体体积比较有差异 ($P < 0.05$)。HE 染色结果显示, 移植瘤组织呈乳腺浸润性导管癌特征, 对照组与空载体组无明显差异, 转染组较对照组、空载体组坏死多。转染组肿瘤组织中 ADAM17、EGFR、p-EGFR、Akt、p-Akt、ERK 及 p-ERK 的蛋白表达水平低于对照组和空载体组 ($P < 0.05$)。**结论** ADAM17-shRNA 可有效抑制 MCF-7 乳腺癌细胞裸鼠移植瘤的生长。EGFR-PI3K-Akt 和 EGFR-MEK-ERK 信号传导通路参与 ADAM17-shRNA 的抑制作用。

关键词: 解聚素-金属蛋白酶 17; 乳腺癌; RNA 干扰; 基因治疗
中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A

In vivo study on MCF-7 cells transfected with ADAM17-shRNA implanted in nude mice*

Xiao-bo Zhang¹, Xiang-chao Meng¹, Xue-peng Zhang¹, Ying Sun², Wen-ting Jia¹

(1. Department of Surgical Oncology, the Affiliated Hospital, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China; 2. Department of Pathology, Basic Medical College, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063210, China)

Abstract: Objective To explore the effect of ADAM17-shRNA on implanted tumor of MCF-7 breast cancer cells in nude mice. **Methods** Thirty nude mice were randomly divided into transfection group (MCF-7-ADAM17-shRNA), vector group (MCF-7-shNC) and control group (MCF-7). Three groups of cell suspension were injected subcutaneously in the right side of the footpath of the corresponding nude mice. The general condition of the nude mice was observed every day. When the tumor nodules were measured, the tumor sizes were measured every 4 days. All nude mice were sacrificed by cervical dislocation on the 28th day after implantation. The morphological structures were observed after HE staining, and the expressions of ADAM17, p-EGFR, EGFR, p-AKT, AKT,

收稿日期: 2017-02-28

* 基金项目: 河北省唐山市科学技术研究与发展计划项目 (No: 14130256B)

[通信作者] 张雪鹏, E-mail: syzxp@sina.com

p-ERK and ERK in three groups were assayed by Western blot. **Results** The tumor sizes of the control group, the vector group and the transfection group were $(639.821 \pm 15.429) \text{ mm}^3$, $(643.350 \pm 15.543) \text{ mm}^3$ and $(240.233 \pm 10.536) \text{ mm}^3$ respectively. There were differences in tumor volume among different time points in the three groups ($P < 0.05$). There were differences in tumor volume among the transfection group, the control group and the vector group ($P < 0.05$). Compared with the transfection group, the necrosis areas in the vector and control groups were larger. The data of Western blot showed that the expressions of ADAM17, p-EGFR, EGFR, p-AKT, AKT, p-ERK and ERK in the transfection group were significantly lower than those in the control and vector groups ($P < 0.05$). **Conclusions** ADAM17-shRNA can effectively inhibit the growth of transplanted tumor of human breast cancer MCF-7 cells in nude mice. EGFR-PI3K-AKT and EGFR-MEK-ERK signaling pathways are involved in the process.

Keywords: ADAM17; breast cancer; RNAi; gene therapy

解聚素-金属蛋白酶 17 (a disintegrin and metalloproteinase 17, ADAM17) 作为一种膜蛋白,可剪切活化肿瘤坏死因子- α ^[1-3]。其剪切活化多种表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 的配体来激活 EGFR 及下游通路,促进肿瘤细胞的侵袭、转移^[4-6]。RNA 干扰是将 siRNA 或短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 载体转入靶细胞,高效沉默目的基因,从而实现该基因功能的缺失^[7]。本实验利用慢病毒介导 ADAM17-shRNA 转染 MCF-7 乳腺癌细胞,然后种植于裸小鼠皮下,观察 ADAM17-shRNA 对乳腺癌生物学行为的影响并探究其作用机制,为以 ADAM17 为靶点的新药开发提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

30 只 BALB/c-nu/nu 裸鼠,4 周龄,雌性,体重约 16 ~ 20 g,由北京华阜康生物科技有限公司提供。人乳腺癌 MCF-7 细胞系购于中国医学科学院天津血液研究所,兔抗鼠 ADAM17、EGFR、蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) (又称 Akt) 及细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 由英国 Abcam 公司提供,携带红色荧光的 ADAM17-shRNA 慢病毒和携带红色荧光的 ADAM17-shNC 慢病毒由上海吉玛制药技术有限公司设计合成。

1.2 培养 MCF-7 细胞

将乳腺癌细胞置于含 10% 胎牛血清和 1% 抗生素 (青霉素、链霉素) 的 DMEM 高糖培养基中,在 37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 饱和湿度培养箱中无菌培养。

1.3 ADAM17-shRNA 转染 MCF-7 细胞

取生长至 60% 融合的乳腺癌细胞,用携带红色

荧光蛋白且感染复数约为 100 的 ADAM17-shRNA 慢病毒转染,转染试剂为 Lipofectamine 2000,根据说明书操作。24 h 后换液,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中继续培养。3 d 后荧光显微镜下观察转染效率,拍片,3 次平行实验。

1.4 肿瘤细胞的种植与组织处理

将 30 只裸鼠随机分为转染组 (接种转染 ADAM17-shRNA 的乳腺癌 MCF-7 细胞)、空载体组 (接种转染 shNC 的乳腺癌 MCF-7 细胞) 及对照组 (接种正常乳腺癌 MCF-7 细胞),每组 10 只。3 组细胞分别制成密度为 5×10^5 个/ml 的单细胞悬液,裸鼠腹腔内注射雌激素 3 d 后,称重,麻醉。将现制的 3 组细胞悬液以 0.2 ml/只,分别种植在各组裸鼠右侧腋部皮下,SPF 环境中继续饲养。12 d 后接种部位出现明显质地较硬的肿瘤结节,1 次/4 d,测量肿瘤最长径及其与之垂直方向的最大横径并计算瘤结节体积和抑瘤率。

移植后第 28 天处死裸鼠,取出移植瘤,绘制肿瘤生长曲线。将瘤体组织分成 2 份,一份用 4% 低聚甲醛固定、包埋及切片,行苏木精-伊红染色法 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色。另一份于 -80℃ 冰箱保存,待后续实验使用。

1.5 HE 染色

将固定好的肿瘤组织依次经过石蜡包埋、切片,常规行 HE 染色,分别于 100 和 400 倍光学显微镜下观察移植瘤组织的形态变化。

1.6 Western blot 检测

Western blot 检测 ADAM17、EGFR、Akt 及 ERK 蛋白的表达,将 3 组瘤体分别用预冷的磷酸盐缓冲液清洗 3 次后,称取 100 mg 左右肿瘤组织,置于 5 ml EP 管中,滴加 1 ml 预冷的组织裂解液 (含 2% 蛋白酶抑制剂),4℃ 冰上裂解 1 h。用眼科剪将移植瘤组

织剪碎,组织悬液 4℃, 12 000 r/min, 离心 10 min。考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,煮沸变性,各组取 30 μg 样本加入泳道,配制 5% 浓缩胶和 10% 分离胶,进行 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。在 4℃ 冰浴条件下,90 V 电压电泳至出现红色 Marker,调电压至 120 V,随后电转至聚偏氟乙烯膜。以 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后,滴加一抗 anti-ADAM17、anti-EGFR、anti-phosphorylatedEGFR、anti-Akt、anti-phosphorylated Akt、anti-ERK、anti-phosphorylated ERK 及 β-actin,比例均为 1 : 1 000,4℃ 孵育过夜。TBST 清洗,滴加辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h,增强化学发光剂显色,凝胶成像系统扫描条带,Image J 软件分析光密度值。

1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,比较用单因素或重复测量设计的方差分析,两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ADAM17-shRNA 转染率

将携带红色荧光且感染复数为 100 的慢病毒转染 MCF-7 乳腺癌细胞 72 h,置于荧光显微镜下,根据转染细胞的最强荧光判断转染率,可见荧光率 >80%,

证明慢病毒介导的 ADAM17-shRNA 成功转染 MCF-7 细胞。见图 1。

2.2 各组裸鼠体内抑瘤效果

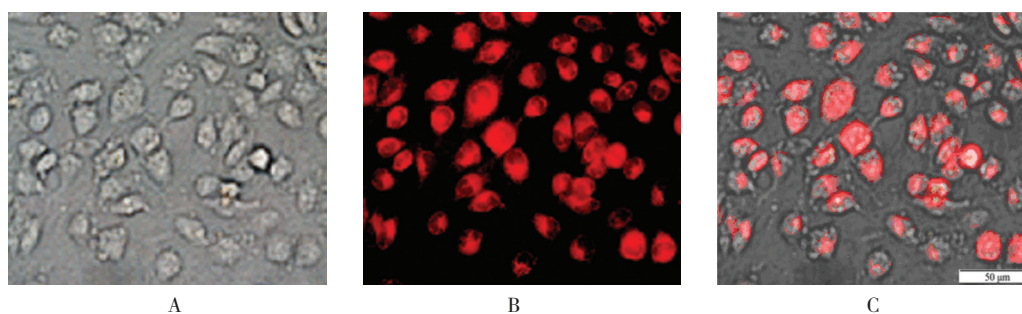
根据各组移植瘤平均体积,绘制肿瘤生长曲线。3 组裸鼠成瘤后 12、16、20、24 和 28 d 的瘤体体积比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点的瘤体体积比较,差异有统计学意义 ($F=8452.421, P=0.000$);②3 组裸鼠的瘤体体积比较,差异有统计学意义 ($F=934.321, P=0.000$),转染组较对照组、空载体组瘤体体积生长缓慢,相对抑瘤效果较好;③3 组裸鼠的肿瘤体积变化趋势比较,差异有统计学意义 ($F=768.389, P=0.000$)。见表 1 和图 2、3。

2.3 移植瘤组织的形态学变化

HE 染色结果显示,移植瘤组织呈乳腺浸润性导管癌特征:实质与间质分界清楚,癌细胞呈巢状、梁索状及腺管状分布,异型性明显,染色质凝集呈粗颗粒状,核仁增大,并可见多数核分裂相;对照组与空载体组无明显差异;转染组较对照组、空载体组坏死多。见图 4。

2.4 3 组裸鼠 ADAM17、EGFR、p-EGFR、Akt、p-Akt、ERK 及 p-ERK 蛋白表达水平

3 组裸鼠的 ADAM17、EGFR、p-EGFR、Akt、p-Akt、ERK 及 p-ERK 蛋白表达水平比较,采用单因素方差分析,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),转染组肿瘤组织中 ADAM17、EGFR、p-EGFR、Akt、p-Akt、ERK 及 p-ERK

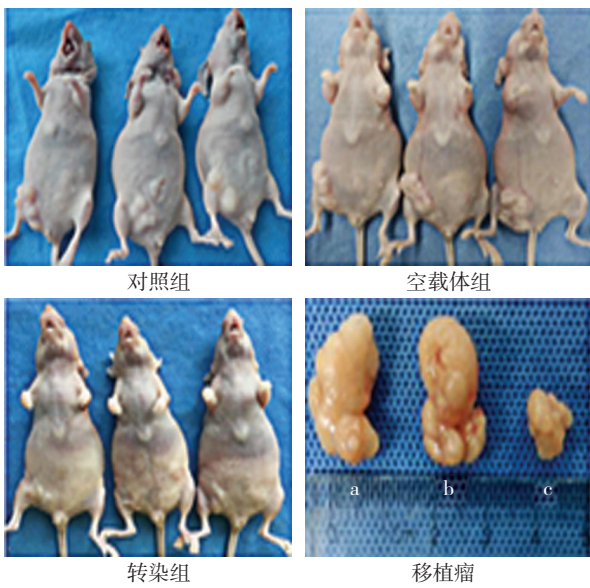


A: ADAM17-shRNA 转染后的透光图; B: ADAM17-shRNA 转染后的荧光图; C: A 和 B 的叠加图

图 1 MCF-7 细胞转染效果 (荧光显微镜 × 400)

表 1 3 组裸鼠不同时间点肿瘤体积比较 ($n=10, \text{mm}^3, \bar{x} \pm s$)

组别	12 d	16 d	20 d	24 d	28 d
对照组	148.331 ± 11.008	190.837 ± 13.346	282.412 ± 15.648	473.118 ± 16.700	639.821 ± 15.429
空载体组	146.931 ± 11.417	191.581 ± 15.490	283.675 ± 19.734	479.950 ± 21.359	643.350 ± 15.543
转染组	72.743 ± 8.702	108.668 ± 9.567	147.156 ± 14.015	194.037 ± 14.842	240.233 ± 10.536



a: 对照组; b: 空载体组; c: 转染组

图 2 处死后的荷瘤裸鼠及其肿瘤

的蛋白表达水平与对照组和空载体组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 转染组低于对照组和空载体组见表 2 和图 5。

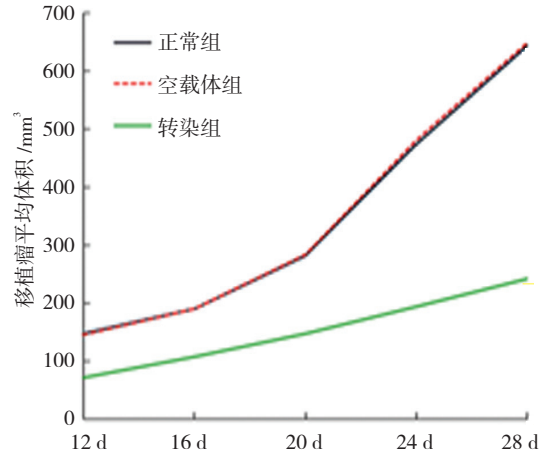
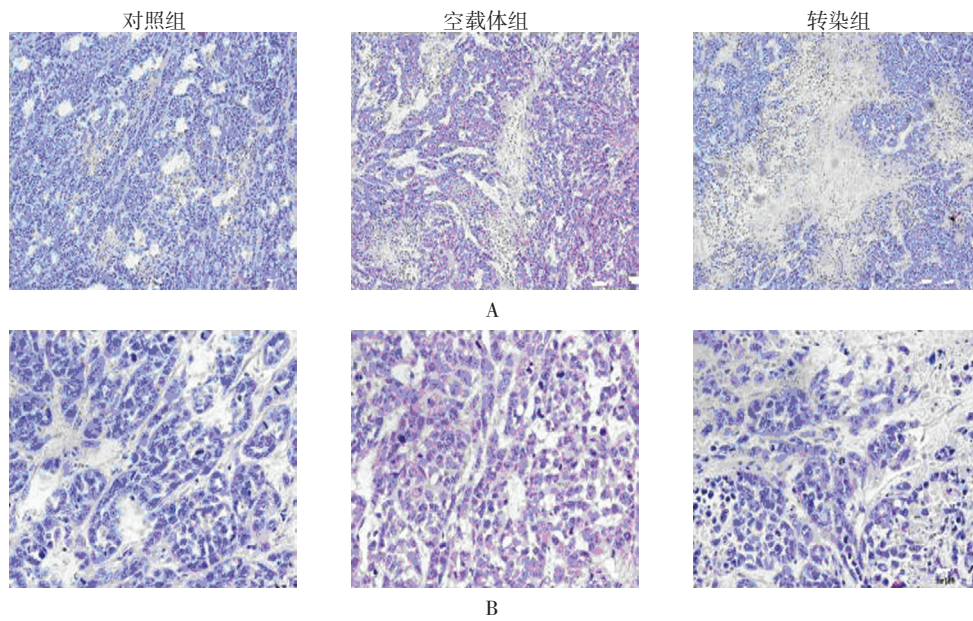


图 3 3 组裸鼠不同时间点的肿瘤体积变化趋势



A: ($\times 100$); B: ($\times 400$)

图 4 移植瘤组织的形态学变化 (HE 染色)

表 2 3 组裸鼠 ADAM17、EGFR、p-EGFR、Akt、p-Akt、ERK 及 p-ERK 蛋白表达水平比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	ADAM17	EGFR	p-EGFR	Akt	p-Akt	ERK	p-ERK
对照组	0.57 ± 0.03	0.92 ± 0.10	0.46 ± 0.07	0.63 ± 0.06	0.61 ± 0.04	1.18 ± 0.04	0.81 ± 0.38
空载体组	0.64 ± 0.05	0.98 ± 0.13	0.48 ± 0.03	0.69 ± 0.05	0.67 ± 0.03	1.25 ± 0.21	0.83 ± 0.89
转染组	0.18 ± 0.02	0.34 ± 0.05	0.33 ± 0.05	0.21 ± 0.05	0.26 ± 0.05	0.36 ± 0.10	0.40 ± 0.69
F 值	90.049	39.210	8.230	65.090	53.360	35.330	39.150
P 值	0.001	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000

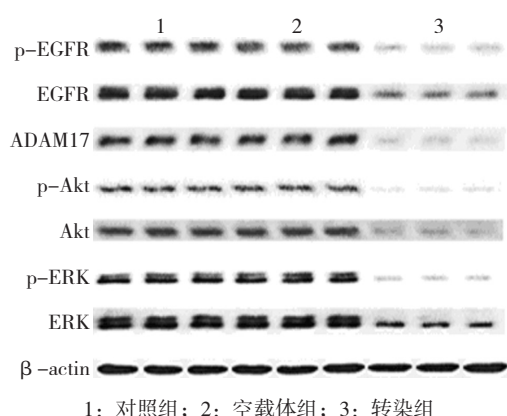


图 5 3 组裸鼠肿瘤组织中 p-EGFR、EGFR、ADAM17、p-Akt、Akt、p-ERK 及 ERK 蛋白的表达

3 讨论

乳腺癌是全球女性最常见的恶性肿瘤之一。近年来, 乳腺癌发病日趋年轻化, 已严重影响年轻女性的身心健康, 在女性恶性肿瘤死因中居首位^[8-9]。据统计, 2008 年全球新发女性乳腺癌患者 140 万, 占全部女性恶性肿瘤发病率的 24.1%^[10]。尽管外科手术、放化疗技术水平逐渐提高, 但并没有改善乳腺癌患者预后。其中肿瘤细胞高度侵袭是乳腺癌患者的主要死因, 因此, 靶向治疗受到极大关注。

ADAM 其重要功能是水解细胞膜上的肿瘤坏死因子, 故又称为肿瘤坏死因子 α 前体转换酶^[11]。ADAM17 具有多个功能结构域, 这些结构有水解蛋白、释放活性因子功能^[12]。其与 ADAMs 家族其他成员一样, 可以剪切多种 EGFR 配体, 进而激活 EGFR 等相关信号传导通道, 影响肿瘤细胞的增殖、侵袭及转移^[13]。RNA 干扰是双链 RNA 所导致的特异性序列转录后基因沉默, 已成为沉默目的基因表达的有效手段^[14]。蔡准等^[15]在细胞水平研究发现, 转染 ADAM17-shRNA 的人 MCF-7 乳腺癌细胞中 ADAM17 mRNA 和 ADAM17 蛋白表达水平下降, 机制与其对 ADAM17 基因有沉默作用有关。陈国福等^[16]利用 shRNA 干扰沉默人乳腺癌 MCF-7 细胞中 ADAM17, 发现实验组的 MCF-7 细胞进入 S 期和 G₂/M 期的比例低于对照组和干扰组。刘永存等^[17]采用免疫组织化学、Western blot 检测法发现, 通过抑制 ADAM17 的表达可以进一步沉默 Hep G2 的血管内皮细胞生长因子受体 2 蛋白的表达水平。研究发现, ADAM17 在多种恶性肿瘤组织, 如胃癌、乳腺癌及脑胶质瘤中高表达, 与肿瘤的增殖、侵袭及转移等密切相关。本课题组前期研究发现, 利用 siRNA 沉

默 ADAM17 表达后, 在细胞和动物水平可有效抑制乳腺癌的增殖、转移及侵袭, 同时将 ADAM17-siRNA 注射到 MCF-7 裸鼠移植瘤周围, 肿瘤的生长受到抑制^[1,18-20]。因为 shRNA 比 siRNA 作用更稳定、高效且特异性更强, 本课题组在细胞水平也证实 ADAM17-shRNA 可有效抑制乳腺癌的生长和侵袭^[19-20]。本研究针对 ADAM17 基因设计合成特异性慢病毒介导的 ADAM17-shRNA, 并将其成功转入 MCF-7 细胞, 然后将其种植于裸鼠皮下, 发现转染 ADAM17-shRNA 的 MCF-7 细胞在裸鼠体内的生长受到抑制。

多项体外研究证明, ADAM17 活化 EGFR 后, 激活 EGFR-PI3K-Akt 和 / 或 EGFR-MEK-ERK 信号传导通道, 进一步影响肿瘤细胞的增殖、侵袭及迁移^[8,13-17]。ZHENG 等^[21]证明, ADAM17 通过活化 EGFR-PI3K-Akt 促进胶质瘤细胞的增殖和侵袭。GIRICZ 等^[22]证明, ADAM17 通过激活 EGFR-PI3K-Akt 信号通路促进乳腺癌细胞的增殖和转移。THOMPSON 等^[23]研究发现, MEK-ERK 通路在肿瘤形成及发展过程中起重要作用。但目前动物水平验证 ADAM17 作用机制的报道少见。本研究利用转染 ADAM17-shRNA 的 MCF-7 乳腺癌裸鼠移植瘤模型, 发现伴随着 ADAM17 蛋白在转染组肿瘤组织中的表达下降, 转染组肿瘤组织中 EGFR、p-EGFR、Akt、p-Akt、ERK 及 p-ERK 的蛋白表达水平低于对照组和空载体组。说明 ADAM17-EGFR-PI3K-Akt 和 ADAM17-EGFR-MEK-ERK 2 条信号传导通路均参与 ADAM17-shRNA 的作用过程。

参考文献:

- [1] MENG X, HU B, HOSSAIN M M, et al. ADAM17-siRNA inhibits MCF-7 breast cancer through EGFR-PI3K-AKT activation[J]. Int J Oncol 2016, 49(2): 682-690.
- [2] 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.
- [3] 刘爽, 马荣. ADAM17 在恶性肿瘤中的研究及其进展 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(17): 3386-3389.
- [4] FENG Y, TSAI Y H, XIAO W, et al. Loss of ADAM17-Mediated tumor necrosis factor alpha signaling in intestinal cells attenuates mucosal atrophy in a mouse model of parenteral nutrition[J]. Molecular & Cellular Biology, 2015, 35(21): 3604-3621.
- [5] LI X, MARETZKY T, WESKAMP G, et al. iRhoms 1 and 2 are essential upstream regulators of ADAM17-dependent EGFR signaling[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(19): 6080-6085.
- [6] 张艳, 乔炜超, 孙影, 等. FoxM1 和 ADAM17 在乳腺癌中的表

- 达及其临床意义 [J]. 中国医药导报, 2016, 13(20): 92-95.
- [7] 王婷, 高玉珍, 沈明志, 等. 条件性 RNA 干扰技术研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(3): 547-550.
- [8] DAVIS N M, SOKOLOSZY M, STADELMAN K, et al. Deregulation of the EGFR/PI3K/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in breast cancer: possibilities for therapeutic intervention[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(13): 4603-4650.
- [9] BODAI B I, TUSO P. Breast cancer survivorship: a comprehensive review of long-term medical issues and lifestyle recommendations[J]. *Perm J*, 2015, 19(2): 48-79.
- [10] 唐志柳, 白洁, 顾丽娜, 等. 2000 ~ 2010 年我国前列腺癌和乳腺癌流行状况的系统性综述 [J]. 中国肿瘤, 2013, 22(4): 260-265.
- [11] MORENO-CACERES J, MAINEZ J, MAYORAL R, et al. Caveolin-1-dependent activation of the metalloprotease TACE/ADAM17 by TGF- β in hepatocytes requires activation of Src and the NADPH oxidase NOX1[J]. *Febs Journal*, 2016, 283(7): 1300-1310.
- [12] QIAN M, SHEN X, WANG H. The distinct role of ADAM17 in APP proteolysis and microglial activation related to alzheimer's disease[J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2016, 36(4):471-482.
- [13] FENG Y, DAI X, LI X, et al. EGF signalling pathway regulates colon cancer stem cell proliferation and apoptosis[J]. *Cell Proliferation*, 2012, 45(5): 413-419.
- [14] 徐俊, 毛颖, 苗荻, 等. RNA 干扰技术的研究进展 [J]. 生物技术世界, 2012, 13(03): 15-17.
- [15] 蔡准, 吴丽君, 张雪鹏, 等. ADAM17-shRNA 对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响及机制 [J]. 山东医药, 2017, (04): 21-24.
- [16] 陈国福, 吴丽君, 张雪鹏, 等. shRNA 沉默 ADAM17 基因对人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的影响 [J]. 大连医科大学学报, 2016(6): 542-545.
- [17] 刘永存, 伍丽萍, 李锋, 等. ADAM17 基因沉默对肝癌细胞 HepG2 的 VEGFR2 自分泌表达的影响 [J]. 现代肿瘤医学, 2016(19): 3020-3024.
- [18] 陈国福, 吴丽君, 张雪鹏, 等. 缺氧条件下沉默解聚素 - 金属蛋白酶 17 基因对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(15): 22-27.
- [19] 蔡准, 张媛媛, 张雪鹏, 等. 缺氧条件下 ADAM17-shRNA 对人乳腺癌 MCF-7 细胞侵袭、迁移的影响 [J]. 山东医药, 2016, 56(18): 5-7.
- [20] 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.
- [21] ZHENG X, JIANG F, KATAKOWSKI M, et al. ADAM17 promotes glioma cell malignant phenotype[J]. *Molecular Carcinogenesis*, 2012, 51(2): 150-164.
- [22] GIRICZ O, CALVO V, PETERSON E A, et al. TACE-dependent TGF- α shedding drives triple-negative breast cancer cell invasion[J]. *International Journal of Cancer*, 2013, 133(11): 2587-2595.
- [23] THOMPSON K N, WHIPPLE R A, YOON J R, et al. The combinatorial activation of the PI3K and Ras/MAPK pathways is sufficient for aggressive tumor formation, while individual pathway activation supports cell persistence[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(34): 35231-35246.

(李科 编辑)