

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.07.005

文章编号: 1005-8982 (2019) 07-0024-06

沉默 ADAM17 对 HT29 人结肠癌细胞体外侵袭能力的影响及机制探究

张琪¹, 杨光华¹, 黄志强¹, 葛志鹏¹, 刘少鹏¹, 田炜², 张国志¹, 王长友¹

(1. 华北理工大学附属医院, 河北 唐山 063000; 2. 华北理工大学 医学实验中心, 河北 唐山 063000)

摘要: **目的** 探究沉默解聚素-金属蛋白酶 17 (ADAM17) 对 HT29 人结肠癌细胞体外侵袭能力的影响及机制。**方法** HT29 人结肠癌细胞经慢病毒转染处理后沉默 ADAM17 蛋白的表达, 实时聚合酶链反应 (real-time PCR) 检测 ADAM17 mRNA 的表达, 单层细胞划痕损伤修复实验检测细胞迁移能力的变化, Transwell 体外侵袭实验检测细胞侵袭能力的改变, Western blotting 检测转染后 MMP-9 蛋白及 ERK 表达情况。**结果** 经慢病毒转染处理后 HT29 细胞的 ADAM17 表达被抑制 ($P < 0.05$)。与空白对照组比较, 沉默 ADAM17 的表达后, 转染组细胞的迁移和侵袭能力被抑制 ($P < 0.05$); 沉默 ADAM17 后, 细胞基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 表达水平下调, 磷酸化细胞外调节蛋白激酶 (p-ERK1/2) 表达水平下降 ($P < 0.05$), 但细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** ADAM17 可能通过抑制 ERK 通路激活下调 MMP-9 的表达, 从而影响细胞迁移、侵袭能力。

关键词: 结肠肿瘤; 解聚素-金属蛋白酶 17; 转染; 小干扰 RNA; 侵袭; 细胞外调节蛋白激酶

中图分类号: R735.3

文献标识码: A

Effect of silencing ADAM17 on invasion ability of HT29 human colon cancer cells

Qi Zhang¹, Guang-hua Yang¹, Zhi-qiang Huang¹, Zhi-peng Ge¹, Shao-peng Liu¹,
Wei Tian², Guo-zhi Zhang¹, Chang-you Wang¹

(1. North China University of Science and Technology Affiliated Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China; 2. Medical Research Center, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To observe the effects of ADAM17 on the invasion of human colon cancer cell lines HT29. **Methods** The expression of ADAM17 protein was silenced by slow virus transfection. Silencing of ADAM17 was confirmed by real-time PCR and Western blot. Cell migration was measured by wound healing assay. The expression of MMP-9 and ERK was detected by Western blotting. **Results** The expression of ADAM17 protein in HT29 cells was significantly inhibited through silencing technology ($P < 0.05$). Migration and invasion capability were greatly inhibited with silence of ADAM17 when compared with control group ($P < 0.05$). Silencing ADAM17 induced decreased expression of MMP-9 and p-ERK1/2 compared with control group ($P < 0.05$). No obvious difference in expression level of ERK was identified compared with control group ($P > 0.05$). **Conclusions** ADAM17 may promote cell migration and invasion by inhibiting ERK pathway mediated expression of MMP-9.

Keywords: colon cancer; ADAM17; transfection; siRNA; invasion; ERK

收稿日期: 2018-09-05

[通信作者] 王长友, E-mail: fhhj-2004@163.com

结肠癌是一种常见的消化道恶性肿瘤,我国结肠癌的发病率呈上升且年轻化发展趋势^[1-2]。肿瘤坏死因子 α 转换酶,又称解聚素-金属蛋白酶17(adisintegrin and metalloprotease 17, ADAM17)^[3],有着水解剪切酶类作用,在肿瘤的发生、发展起着重要作用,且对肿瘤患者的生存预后有一定的提示意义^[4-5]。恶性侵袭和转移是肿瘤细胞恶性病因的原因之一。因此,本研究通过抑制HT29人结肠癌细胞ADAM17的表达,探讨其对HT29人结肠癌细胞体外侵袭的影响作用及可能机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

HT29人结肠癌细胞株(购自中国科学院干细胞库),DMEM培养基、胎牛血清、胰酶(美国Gibco公司),Trizol、Go Script™逆转录试剂盒、real-time PCR试剂盒(美国Invitrogen公司),Transwell小室、Matrigel胶(美国BD公司),抗体ADAM17(美国Abcom公司),磷酸化细胞外调节蛋白激酶(phosphorylation extracellular regulated protein kinases, p-ERK)、细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)、基质金属蛋白酶-9(matri metalloproteinase-9, MMP-9)及 β -actin抗体(美国Sigma公司),HR标记山羊抗兔IgG二抗、DAB显影液(上海碧云天生物技术研究所),BCA蛋白浓度测定试剂盒、RIPA裂解液、PMSF、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(北京索莱宝科技有限公司),酶标仪、湿转系统(上海Bio-Rad公司)。

1.2 细胞培养及慢病毒转染

HT29细胞用含10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养基,在5%二氧化碳CO₂,37.0℃条件孵育箱中培养。ADAM17小干扰RNA(ADAM17-shRNA)由上海吉玛公司合成,序列如下:转染组,5'-GCATCATGTATCTGAACAACG-3';无意义序列组,5'-TTCTCCG AACGTGTCACGT-3'。

HT-29细胞的转染组(ADAM17-shRNA)和无意义序列组(nonsense shRNA)根据使用说明书在进行转染时加入5 μ g/ml聚凝胺(Polybrene)。空白对照组加入等量的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS),转染后48h荧光显微镜下观察转染效率。

1.3 慢病毒沉默ADAM17表达的检测

根据病毒转染说明书,细胞转染后48h,收集

各组细胞,Trizol法提取RNA。通过Go Script™逆转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA。然后进行实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)。引物序列设计如下:ADAM17正向引物:5'-ATCAAACCTTTCCTGCG-3',反向引物:5'-CAAACCCATCCTCGTCCA-3';GAPDH正向引物:5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3',反向引物:5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3。

PCR仪器进行以下循环:95℃变性2min,45℃退火30s,60℃延伸60s,共40个循环。根据qRT-PCR体系参照GAPDH做为内参的表达水平来检测HT29结肠癌细胞的ADAM17 mRNA表达水平。每组设2个副孔,平行实验3次。采用相对定量法(CT法)分析所得数据,ADAM17 shRNA转染后细胞mRNA相对表达量 $=2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.4 细胞迁移能力检测

利用单层细胞划痕损伤修复实验检测细胞迁移能力,细胞转染后48h,HT29细胞在对数生长阶段制备成单细胞悬液,按照转染组、无意义序列组和空白对照组以每孔 1×10^5 个接种于6孔板上,培养12h使形成单层细胞。用200 μ l移液枪枪头在单层细胞上水平划出一道痕迹,用PBS清洗3次,加入含有10%FBS的DMEM培养基37℃培养24h。吸去培养液,用PBS清洗3次后,在倒置显微镜下观察并拍照记录。Image J软件分析迁移面积。实验均重复进行3次。

1.5 Transwell体外侵袭实验

通过观察穿过Matrigel胶的细胞数量检测不同处理对于结肠癌细胞侵袭能力的影响。HT29细胞在对数生长阶段用不含有FBS的培养基饥饿培养12h,以同步化细胞,然后制备成细胞悬液。将Matrigel胶与DMEM按照1:8稀释,取出70 μ l覆盖在Transwell小室底部膜的上室面,置于37℃下30min,使Matrigel聚合成凝胶。按照空白对照组,无意义序列组和转染组以每孔 1×10^4 个,体积为200 μ l的细胞悬液接种于Transwell小室的上室。下室加入750 μ l含FBS的DMEM培养基。培养箱中培养24h。去掉上室的Matrigel胶,4%甲醛固定液中30min,苏木精-伊红染色1min后PBS冲洗3次,显微镜下随机选取3个视野进行细胞计数。重复进行3次独立操作加以验证。

1.6 Western blotting检测相关蛋白表达

取转染后48h各组细胞,RIPA裂解液裂解,离心收集蛋白。BCA法定量总蛋白,加入等体积2 \times 蛋

白上样缓冲液后 100℃变性 5 min, 置入 -80℃冰箱冷冻保存备用。进行 SDS-PAGE 蛋白电泳, 再分别进行转膜 (90 V, 90 min), 10% 脱脂奶封闭, 一抗孵育过夜 (1 : 1 000), 二抗 (1 : 1 000) 37℃孵育 2 h, 上机荧光显色。Image J 软件分析灰度值。相关蛋白表达量计算 = (所测蛋白灰度值 / 内参灰度值) × 100%。

1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用方差分析, 两两比较采用 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 HT29 人结肠癌细胞情况

转染效率为 90% 以上的感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 值为 100, 体外转染 48 h, 荧光显微镜下观察, 根据荧光强度和荧光数判断转染情况, 可见转染效率 90% 以上。见图 1。

2.2 转染细胞后 ADAM17 的表达情况

空白对照组 mRNA 表达量分析系统设定恒定为 1, 转染组相对表达量为 (0.104 ± 0.013), 无意义序列组为 (1.003 ± 0.036), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 1\ 649.515$, $P = 0.000$), 转染组 ADAM17 mRNA 的表达被抑制且低于空白对照组和无意义序列

组 ($P < 0.05$)。空白对照组和无意义序列组 ADAM17 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。Western blotting 结果同样证实慢病毒转染后 ADAM17 表达被抑制。见图 2。

2.3 单层细胞划痕损伤修复情况

24 h 后, 空白对照组 (0.646 ± 0.022)、无意义序列组 (0.671 ± 0.027) 和转染组 (0.986 ± 0.032) 的划痕间距相对比, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 10.176$, $P = 0.012$), 沉默 ADAM17 后 HT29 细胞的迁移速度均慢于空白对照组和无意义序列组的细胞 ($P < 0.05$), 空白对照组和无意义序列组的细胞迁移能力差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3。

2.4 转染 ADAM17 后细胞体外侵袭能力变化情况

空白对照组和无意义序列组可观察到穿过 Matrigel 胶到达下室的肿瘤细胞多于转染组。各组的侵袭细胞数分别为 (151.004 ± 5.025)、(147.113 ± 6.333) 及 (52.002 ± 5.196) 个 / 视野。经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 136.936$, $P = 0.000$), 与空白对照组比较, 无意义序列组到达下室的细胞数量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。但与空白对照组和无意义序列组比较, 转染组细胞到达下室的 HT29 人结肠癌细胞数量减少很多, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4。

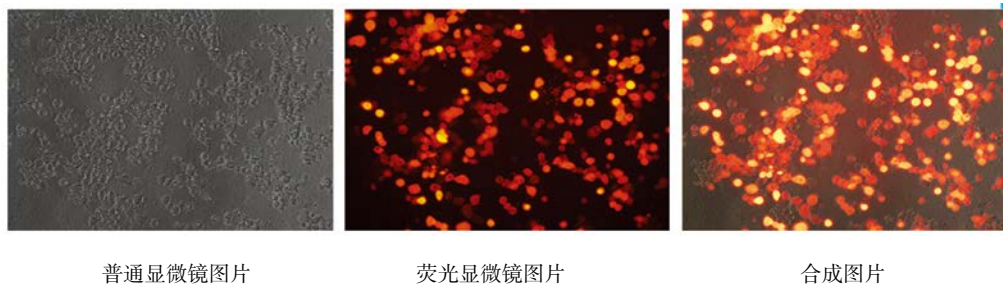
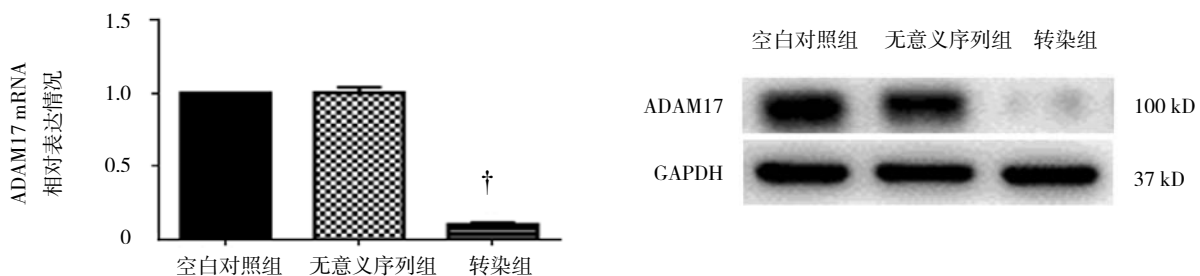


图 1 ADAM17 慢病毒转染 HT29 人结肠癌细胞 48 h 后的转染情况 (× 200)



† 与空白对照组比较, $P < 0.05$

图 2 转染后各组 ADAM17 mRNA 及 ADAM17 蛋白表达情况

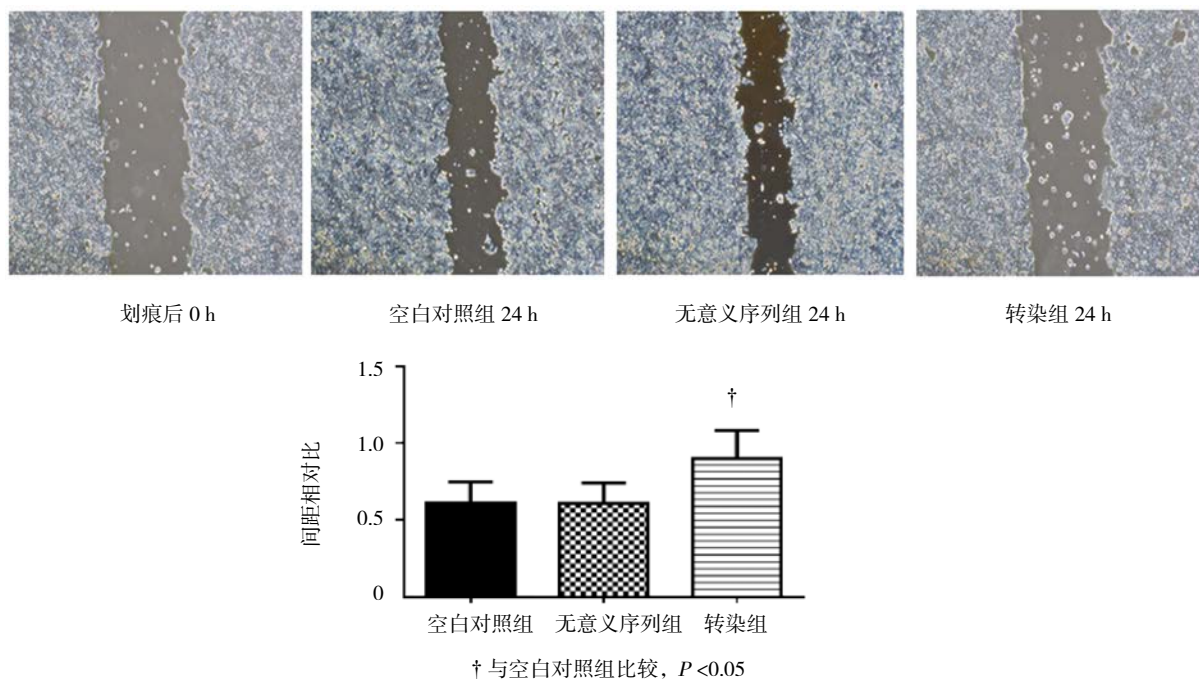


图 3 沉默 ADAM17 后 HT29 人结肠癌细胞迁移能力变化情况 (×100)

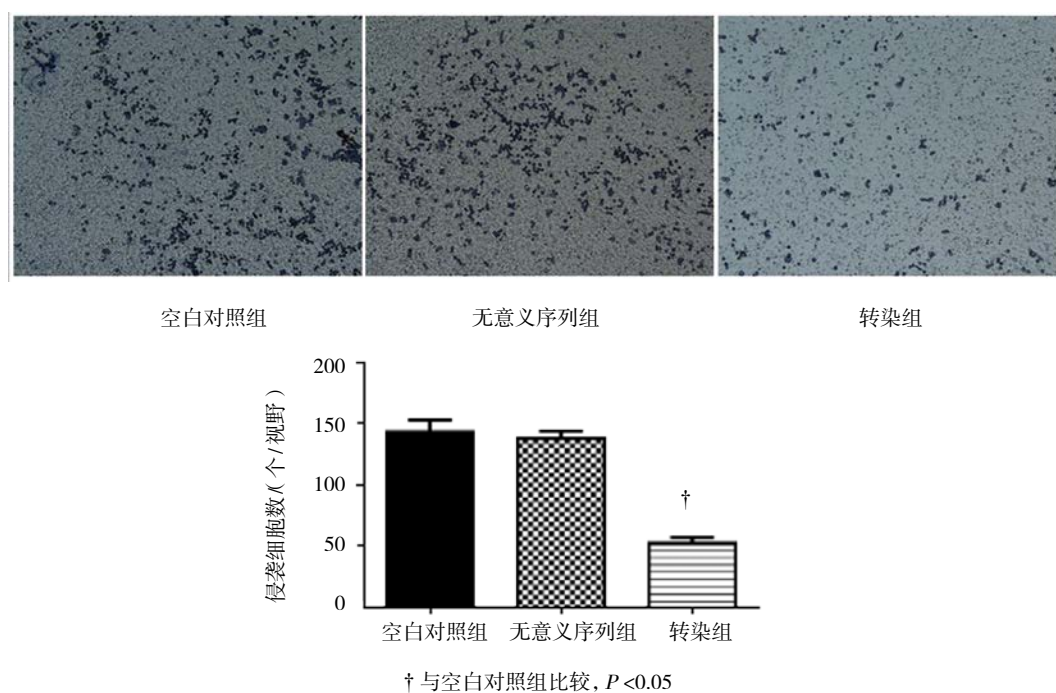


图 4 沉默 ADAM17 后 HT29 人结肠癌细胞侵袭能力变化情况 (×100)

2.5 沉默 ADAM17 后 MMP-9, ERK 表达情况

沉默 ADAM17 蛋白表达后, 空白对照组、无意义序列组、转染组 MMP-9 的表达分别为 (0.903 ± 0.104) 、 (0.878 ± 0.121) 及 (0.151 ± 0.102) , 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 47.172$, $P = 0.000$), 进一步检测 ERK1/2 通路, 结果显示, p-ERK1/2 表达同样发生下调, 空白对照组、无意义序列组、转染组

p-ERK1/2 的表达分别为 (0.656 ± 0.141) 、 (0.647 ± 0.133) 和 (0.333 ± 0.102) , 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 6.130$, $P = 0.035$)。沉默 ADAM17 后, 转染组 MMP9 和 p-ERK1/2 的表达均低于空白对照组和无意义序列组 ($P < 0.05$), 空白对照组和无意义序列组的 MMP9 和 p-ERK1/2 的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 5。

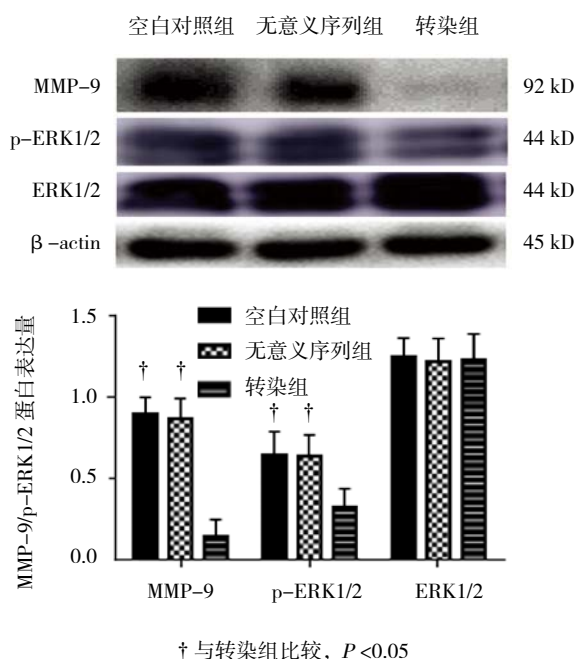


图 5 沉默 ADAM17 后 MMP-9 和 ERK1/2 蛋白的表达

3 讨论

结肠癌是一种由遗传、饮食、环境、习惯等多因素共同作用的肠道恶性肿瘤^[6]，近年来，由于饮食结构的改变，膳食纤维等摄入减少，结肠癌在我国的发病率也呈逐年上升趋势^[1]。由于缺乏相关预防保健知识，我国大多数结肠癌患者在发现时已处于疾病中晚期。目前，对结肠癌的治疗依然是以手术切除为主，辅以同步放化疗及靶向治疗和生物治疗。但是人们现在的目光越来越集中在基于特定基因或功能蛋白的靶向治疗上^[7]。

ADAM17 是一种具有蛋白水解，活化配体，释放生物活性因子功能的前体蛋白^[8]。研究报道指出，ADAM17 在胃癌，乳腺癌等多种恶性肿瘤中呈异常高表达状态^[5,9]。同样，也有报道指出，ADAM17 在结肠癌组织中也呈异常高表达状态，并且，这种高表达状态与患者出现肿瘤转移，复发及预后密切相关^[10-11]。有研究报道指出，ADAM17 可以通过激活 EGFR/MEK/ERK 通路调控细胞生物学行为^[12]。

不断发生的远处转移和局部组织侵袭是肿瘤恶性病因的原因之一，也是肿瘤患者治疗失败甚至死亡的原因之一。因此，阻止肿瘤的远处复发转移和局部继续浸润是目前许多肿瘤药物的研究重点。肿瘤细胞的迁移侵袭能力的前提条件是对细胞外基质的降解，MMP-9 被证实在多种恶性肿瘤中呈高表达状态，与患

者预后呈负相关^[13]。并且 MMP-9 的高表达与肿瘤细胞的迁移和侵袭能力呈正相关^[14-15]。MMP-9 可以通过降解细胞外基质使细胞穿透^[16]。同时，MMP-9 的活化依赖于 ERK 信号通路的激活^[17]。在本实验中，在沉默 ADAM17 的表达后，MMP-9 的表达被下调，说明沉默 ADAM17 可以通过下调 MMP-9 的表达，从而影响 HT29 人结肠癌细胞的迁移侵袭能力。

ERK 是决定细胞命运的关键基因，包括 ERK1 和 ERK2，在受激活磷酸化后，可以调节细胞的代谢和功能，并产生相应的生物学效应^[18]。p-ERK1/2 可以作用于多种细胞内因子最终促使癌基因的表达。各种外界的不同刺激以及不同强度的刺激都可以促使 ERK1/2 不同程度的激活，在细胞迁移和黏附中发挥重要作用，从而增强细胞的运动和黏附能力^[19]，促使细胞在细胞外基质中移动^[20-21]。在本实验中，进一步检测 ERK 信号通路发现，沉默 ADAM17 后，p-ERK1/2 的表达被下调，说明沉默 ADAM17 可以降低 ERK1/2 信号通路的激活。

本研究结果显示，ADAM17 能够通过 ERK 信号转导通路调控 MMP-9 的表达，进而影响细胞的迁移侵袭能力，实现对 HT29 人结肠癌细胞增殖迁移侵袭调控的作用，但 ERK 通路可能不是其调控肿瘤细胞迁移侵袭的唯一信号通路，其对细胞行为功能的响和具体作用机制需后续实验进一步探究。

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] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1): 7-30.
- [3] MULLOOLY M, MCGOWAN P M, CROWN J, et al. The ADAMs family of proteases as targets for the treatment of cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2016, 17(8): 870-880.
- [4] 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.
- [5] XU M, ZHOU H, ZHANG C, et al. ADAM17 promotes epithelial-mesenchymal transition via TGF-beta/Smad pathway in gastric carcinoma cells[J]. Int J Oncol, 2016, 49(6): 2520-2528.
- [6] VARGAS A J, THOMPSON P A. Diet and nutrient factors in colorectal cancer risk[J]. Nutr Clin Pract, 2012, 27(5): 613-623.
- [7] CHENG C J, BAHAL R, BABAR I A, et al. MicroRNA silencing for cancer therapy targeted to the tumour microenvironment[J]. Nature, 2015, 518(7537): 107-110.

- [8] OIKAWA H, MAESAWA C, TATEMACHI 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.
- [9] SHEN H, LI L, ZHOU S, et al. The role of ADAM17 in tumorigenesis and progression of breast cancer[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(12): 1-12.
- [10] RIOS-DORIA J, SABOL D, CHESEBROUGH J, et al. A monoclonal antibody to ADAM17 inhibits tumor growth by inhibiting EGFR and non-EGFR-mediated pathways[J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14(7): 1637-1649.
- [11] 方文胜. 去整合素—金属蛋白酶 17 在结直肠腺瘤和癌中的表达及临床意义 [D]. 天津: 天津医科大学, 2012.
- [12] XIAO L J, LIN P, LIN F, et al. ADAM17 targets MMP-2 and MMP-9 via EGFR-MEK-ERK pathway activation to promote prostate cancer cell invasion[J]. *Int J Oncol*, 2012, 40(5): 1714-1724.
- [13] 郑红芳, 丁厚中, 李巧星, 等. 肾癌组织中 HMGB1、MMP9 的表达与临床分期、预后的相关性研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2016, 26(22): 28-33.
- [14] WANG J R, GAN W J, LI X M, et al. Orphan nuclear receptor Nur77 promotes colorectal cancer invasion and metastasis by regulating MMP-9 and E-cadherin[J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(11): 2474-2484.
- [15] MERDAD A, KARIM S, SCHULTEN H J, et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer: MMP-9 as a potential biomarker for cancer invasion and metastasis[J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(3): 1355-1366.
- [16] GILKES D M, SEMENZA G L, WIRTZ D. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(6): 430-439.
- [17] AKTER H, PARK M, KWON O S, et al. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by neurotensin promotes cell invasion and migration through ERK pathway in gastric cancer[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(8): 6053-6062.
- [18] YE Q, CAI W, ZHENG Y, et al. ERK and AKT signaling cooperate to translationally regulate survivin expression for metastatic progression of colorectal cancer[J]. *Oncogene*, 2014, 33(14): 1828-1839.
- [19] XIAN J, SHAO H, CHEN X, et al. Nucleophosmin mutants promote adhesion, migration and invasion of human leukemia THP-1 cells through MMPs up-regulation via Ras/ERK MAPK signaling[J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12(2): 144-155.
- [20] DENG W, SUI H, WANG Q, et al. A Chinese herbal formula, Yi-Qi-Fu-Sheng, inhibits migration/invasion of colorectal cancer by down-regulating MMP-2/9 via inhibiting the activation of ERK/MAPK signaling pathways[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2013, 13(1): 65.
- [21] KIM H C, KIM Y S, OH H W, et al. Collagen triple helix repeat containing 1 (CTHRC1) acts via ERK-dependent induction of MMP9 to promote invasion of colorectal cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(2): 519-529.

(王荣兵 编辑)