

论著·基础研究

人源 ADAM17 基因干扰表达载体的构建与鉴定*

张春利,蔡徐山[△],宦宇,齐结华,王晓青,王东江
(上海市嘉定区妇幼保健院检验科,上海 201821)

摘要:目的 构建靶向人去整合素-金属蛋白酶 17(ADAM17)基因短发夹 RNA(shRNA)的表达载体,并在人胰腺癌细胞株(PANC1)中鉴定其干扰效率。方法 设计并合成 ADAM17 基因的 shRNA 片段,连接到经 Age I 和 EcoR I 消化过的 pLKO.1-puro 载体中,构建干扰表达载体 pLKO.1-puro ADAM17 shRNA,测序鉴定;用干扰载体 pLKO.1-puro ADAM17 shRNA 转染 PANC1 细胞,荧光定量聚合酶链式反应(q-PCR)和 Western blot 法检测干扰质粒的干扰效率;CCK-8 法检测其对 PANC1 细胞增殖的影响。结果 测序结果显示,成功构建了靶向人 ADAM17 基因 shRNA 的表达载体,且该干扰载体可将 PANC1 细胞中 ADAM17 的相对表达量下调 65% 以上,并能显著抑制 PANC1 细胞增殖。结论 成功构建了 ADAM17 基因干扰质粒。

关键词:靶向人去整合素-金属蛋白酶 17 基因; 短发夹 RNA; 载体构建

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.09.004

中图法分类号:Q782

文章编号:1673-4130(2019)09-1037-04

文献标识码:A

Construction and identification of human ADAM17 gene RNA interference vector*

ZHANG Chunli, CAI Xushan[△], HUAN Yu, QI Jiehua, WANG Xiaoqing, WANG Dongjiang

(Department of Clinical Laboratory, Maternal and Child Health Hospital of Jiading District, Shanghai 201821, China)

Abstract: Objective To build human disintegrin domain and metalloproteinase17(ADAM17) short hairpin RNA (shRNA) gene expression vector, and to identify its interference efficiency in human pancreatic cancer cell line PANC1. **Methods** ADAM17 shRNA gene fragments was designed and compounded and connected to pLKO.1-puro vector which was double digested by Age I and EcoR I. Interference expression vector pLKO.1 Puro ADAM17 shRNA was constructed and sequenced. PANC1 cells were transfected with interference vector pLKO.1 Puro ADAM17 shRNA. The interference efficiency of interfering plasmids was detected by fluorescence quantitative PCR (q-PCR) and Western blot assay. CCK-8 assay was used to detect its effect on the proliferation of PANC1 cells. **Results** The sequencing results showed that shRNA expression vector targeting human ADAM17 gene was successfully constructed, and the interference vector could down-regulate the relative expression of ADAM17 in PANC1 cells by more than 65%, and significantly inhibit the proliferation of PANC1 cells. **Conclusion** ADAM17 gene interference plasmid vector was constructed successfully.

Key words: human disintegrin domain and metalloproteinase17; short hairpin RNA; vector construction

去整合素金属蛋白酶 17(ADAM17)是去整合素金属蛋白酶家族(ADAMs)的重要成员之一。ADAMs 是近年来发现的一类具有金属蛋白酶活性的细胞膜表面糖蛋白,迄今为止已发现有 40 多个成员,这些成员大多含有金属蛋白酶结构域,它们参与了多种生物学功能,包括生育、黏附、迁移、炎症、蛋白水解、细胞传导以及肿瘤的发生发展等^[1],目前研究较多的是 ADAM10、ADAM17。ADAM17 的前体结构域能

与锌催化位点相结合,只有当其前体结构域被蛋白酶水解后,ADAM17 才具有酶催化活性,从而参与多种蛋白的水解^[2]。ADAM17 的一个重要功能是能剪切细胞膜上没有活性的肿瘤坏死因子-α(TNF-α),并与相应受体结合,激活下游信号通路,参与一系列生物学过程,所以 ADAM17 又称为肿瘤坏死因子 α 转换酶(TACE)^[3]。已有研究表明,ADAM17 在多种肿瘤中表达水平明显升高,并在肿瘤的发生发展中发挥重

* 基金项目:上海市嘉定区卫计委基金资助项目(2017-QN-06)。

作者简介:张春利,女,检验师,主要从事细胞生物学和分子生物学方面的研究。 △ 通信作者,E-mail:cail39149@126.com。

本文引用格式:张春利,蔡徐山,宦宇,等.人源 ADAM17 基因干扰表达载体的构建与鉴定[J].国际检验医学杂志,2019,40(9):1037-1040.

要的促进作用,因此有必要对 ADAM17 进行深入的研究。

RNA 干扰(RNAi)是一种由双链 RNA 所诱导的转录后基因表达沉默现象,通过 RNAi 途径,特异地降解其目的基因,从而抑制该目的基因的表达^[4]。RNAi 技术对靶基因的沉默具有高效、特异、设计简便、操作方便等特点。近年来在基因功能研究及相应的后续基因治疗中已有较广泛的应用。本研究旨在构建能够有效靶向人源 ADAM17 基因的 shRNA 表达质粒,从而为后续研究做准备。

1 材料与方法

1.1 材料来源 人胰腺癌细胞株(PANC1)、感受态细胞 stbl3、pLKO.1-puro 载体由江苏大学医学院提供。高糖 DMEM 溶液购自 Wisent 公司;PBS 溶液购自 Hyclone 公司;胰蛋白酶粉购自生兴公司;胎牛血清 FBS 购自 Gibco 公司;DMSO 购自 Sigma 公司;转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Promega 公司;限制性内切酶 EcoR I 和 Age I 购于 NEB 公司;逆转录试剂盒、预染蛋白质 Marker、DNA 相对分子质量 Marker DL2000、DL15 000 购自 Thermo 公司;2×Green PCR Mix、2×SYBR Green Mix 购自 TransGen 公司;PVDF 膜购自 BIO-RAD 公司;兔抗人 ADAM17 抗体购自 Cell Signaling 公司;鼠抗人 GAPDH 抗体购自 Santa Cruz 公司;羊抗兔、羊抗鼠二抗购于 Santa Cruz 公司;dsDNA oligos 由生工(上海)股份有限公司合成;30%丙烯酰胺购于苏州圣康科技公司;T4 连接酶购自 takara;Trizol、柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒、柱式 DNA 胶回收试剂盒购于生工(上海)股份有限公司;DNA 测序由生工(上海)股份有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 ADAM17 干扰表达载体的构建 根据 Sigma 公司提供的 ADAM17 干扰序列 5'-CCG GCC CAT GAA GAA CAC GTG TAA ACT CGA GTT TAC ACG TGT TCT TCA TGG GTT TTT G-3', 5'-AAT TCA AAA ACC CAT GAA GAA CAC GTG TAA ACT CGA GTT TAC ACG TGT TCT TCA TGG G-3', 以干扰与人的任何基因序列均无同源关系的 eGFP 为阴性对照,序列为 5'-CCG GTA CAA CAG CCA CAA CGT CTA TCT CGA GAT AGA CGT TGT GGC TGT ATT TTT-3', 5'-AAT TAA AAA TAC AAC AGC CAC AAC GTC TAT CTC GAG ATA GAC GTT GTG GCT GTT GTA-3', 送至生工(上海)股份有限公司合成。将 ADAM17 基因 shRNA 的正链、反链退火形成双链 DNA。该 DNA 片段含有限制性内切酶 Age I 和 EcoR I 所能识别的黏性末端;将该退火双链 DNA 与 pLKO.1 载体经 Age I 和 EcoR I 双酶切后胶回收的产物在 T4 连接酶的作用下进行连接,将连接好的产物转化到感

受态细胞 Stbl3 中,并涂于含有氨苄青霉素的培养板上进行筛选培养。挑取单克隆菌落进行扩增,用菌液 PCR 鉴定,并提取质粒送往生工基因测序鉴定。

1.2.2 转染 PANC1 细胞 将 PANC1 细胞培养至对数生长期,并接种到 6 孔板中。每孔加入约 2 μL 无抗生素培养基,培养细胞至融合度约为 70%~80% 时,参照 Lipofectamine 2000 说明书的方法将 ADAM17 shRNA 及阴性对照组 eGFP shRNA 分别转染至 PANC1 细胞中,5~6 h 后更换为完全培养基,继续培养。

1.2.3 q-PCR 检测重组载体干扰效果 将上述转染细胞培养 48 h, Trizol 法提取总 RNA, 逆转录得到 cDNA, 再根据 TransGen qPCR(SYBR)试剂盒的说明书来扩增。ADAM17 上游引物序列: 5'-AGA GCT GAC CCA GAT CCC AT-3', 下游引物序列: 5'-TAC TCT CTT CCC CTC TGC CC-3'。GAPDH 上游引物序列: 5'-TGG GGA AGG TGA AGG TCG G-3', 下游引物序列: 5'-CTG GAA GAT GGT GAT GGG A-3'。以 GAPDH 为内参, 以 $2^{\Delta\Delta Ct}$ 法分别计算并比较干扰组和对照组 ADAM17 mRNA 的表达水平。

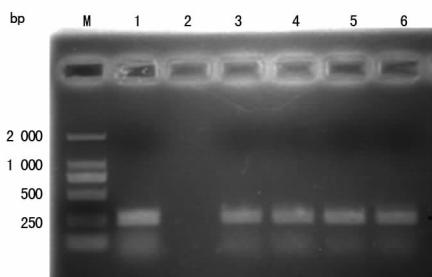
1.2.4 Western blot 检测重组载体干扰效果 收集转染 48 h 后的干扰组和对照组 PANC1 细胞, 用细胞裂解液提取各组总蛋白, 进行 10% SDS-PAGE 电泳, 将蛋白转移至 PVDF 膜上后, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 再用抗人 ADAM17 的兔源抗体(1:1 000, 3% BSA) 4 °C 孵育过夜, 以 β-tubulin 为内参。次日, TBST 洗膜 5 min, 并重复 3 次, 加入 HRP(辣根过氧化物酶)标记的山羊抗兔 IgG(二抗, 1:5 000), 室温反应 1 h; TBST 洗膜后, 用 ECL 试剂进行显影并检测。

1.2.5 CCK-8 法检测所构建质粒对 PANC1 细胞增殖能力的影响 将转染 12 h 后的各组细胞以 1×10^3 /孔的浓度接种于 96 孔板, 并设置空白对照组(无细胞), 分别于 24、48、72 h 加入 10 μL CCK-8 溶液, 避光孵育 2 h 后, 用酶标仪 490 nm 波长测量各孔的吸光度。重复实验 3 次后取平均值, 以时间为横坐标、吸光度为纵坐标绘制生长曲线。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 进行统计分析。实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本均数相比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 靶向 ADAM17 基因干扰表达载体的构建 菌液经 PCR 扩增后, 所得产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 结果显示, 产物 1、3、4、5、6 均有目的条带(图 1), 将这 5 个菌液培养扩增并提取质粒后测序, 测序结果完全正确(图 2)。



注:M 为 DNA 2 000 bp marker; 1、2、3、4、5、6 为不同菌落

图 1 菌液 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图谱

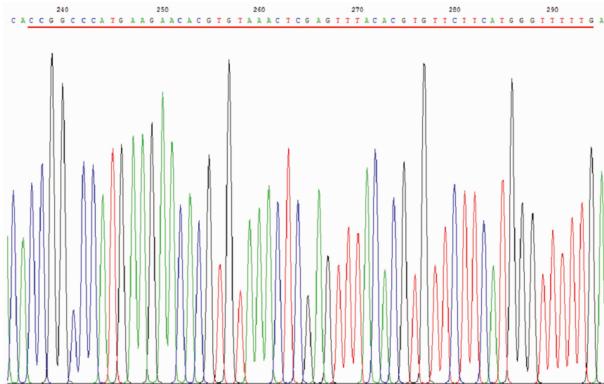


图 2 重组质粒 pLKO.1-puro ADAM17 shRNA 的测序图谱

2.2 荧光定量 PCR 检测 pLKO.1-puro ADAM17 shRNA 干扰效果 为了明确 ADAM17 在转染后被干扰的效果,本研究用 qPCR 检测转染后不同组的 mRNA 表达水平。如图 3 所示,与对照组相比较,转染 ADAM17 干扰载体的 PANC1 细胞,ADAM17 mRNA 表达水平下调了 65% 以上,差异有统计学意义($P<0.05$)。

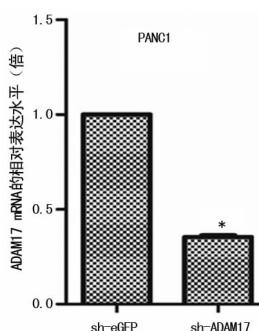
注: * $P<0.05$, 与 sh-eGFP 组比较

图 3 q-PCR 评估 shRNA 干扰效果

2.3 Western Blot 检测 pLKO.1-puro ADAM17 shRNA 干扰效果 Western Blot 检测结果显示(图 4),与对照组相比较,转染 ADAM17 干扰载体的 PANC1 细胞,ADAM17 蛋白的表达水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$),这说明所构建质粒对 ADAM17 蛋白的表达有明显的抑制作用,因此可用于后续实验。

2.4 CCK-8 实验检测 pLKO.1-puro ADAM17 shRNA 对 PANC1 细胞增殖的影响 为分析 pLKO.1-puro ADAM17 shRNA 对 PANC1 细胞增殖速率的

影响,分别在质粒转染后的 24、48、72 h 检测 96 孔板中各组细胞吸光度,分析其增殖情况。与对照组相比,干扰组细胞增殖速率明显降低(图 5),差异有统计学意义($P<0.05$)。

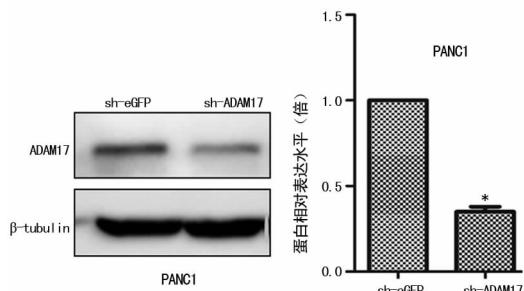
注: * $P<0.05$, 与 sh-eGFP 组比较

图 4 Western Blot 评估 shRNA 干扰效果

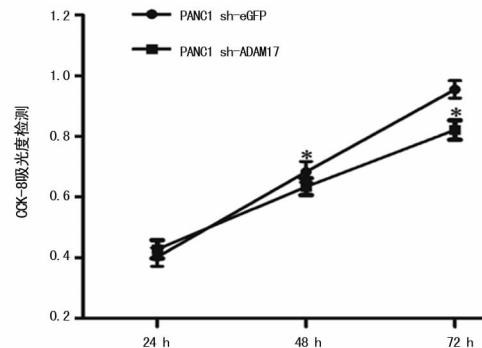
注: * $P<0.05$, 与 sh-eGFP 组比较

图 5 pLKO.1-puro ADAM17 shRNA 对 PANC1 细胞增殖的影响

3 讨 论

去整合素-金属蛋白酶家族(ADAMs)是一类锌依赖性的跨膜糖蛋白,它们有 5 个基本功能:蛋白水解、生物活性因子释放、附着、融合和细胞内信号转导,因此,它们在生物发育和生存中的作用是复杂的、多方面的^[5-6]。其中,ADAM17 和肿瘤的关系已成为研究的热点,越来越多的研究表明,ADAM17 在人类多种肿瘤中呈现高表达,而在正常细胞中表达很少,具有一定的肿瘤细胞特异度,并促进肿瘤转移、侵袭。Oh ST 等通过免疫组化发现,ADAM17 在皮肤鳞状细胞癌中的表达水平升高,且随分化程度越来越低,ADAM17 的表达水平越来越高^[7];在肝癌中,ADAM17 通过 EGFR/PI3K/Akt 通路介导了化疗抵抗^[8];CHEN 等^[9]的研究结果表明,miR-338-3p 在胃癌中的表达水平降低,而过表达 miR-338-3p 后,胃癌细胞的增殖、迁移、侵袭能力均被抑制,但 ADAM17 可以逆转 miR-338-3p 的这些作用,促进胃癌细胞增殖、迁移、侵袭;表皮生长因子受体(EGFR)是原癌基因 c-erbB1 编码的糖蛋白,属于 I 型跨膜酪氨酸激酶生长因子受体,在许多人类实体肿瘤中有表达或过度表达,与肿瘤的形成和发展有关,而 ADAM17 可水解释放 EGFR 的多种配体^[10-11],HUANG 等^[12]的研究

表明,ADAM17 通过活化 EGFR 的多种配体,促进了头颈鳞状细胞癌的增殖、迁移;在肾癌细胞中,Mi-croRNA-145 的降低使 ADAM17 表达水平升高,从而导致了肾癌的恶性进展^[13]。综上所述,ADAM17 在肿瘤的发生、发展中有一定的促进作用,有可能成为预测恶性肿瘤是否转移及预后的重要标志物。

RNAi 是一种抑制基因表达的技术,通过小干扰 RNA(siRNA),降解同源 mRNA,从而沉默特定基因表达^[14-15]。其中,siRNA 可通过体外转录或用化学方法合成,但化学合成 siRNA 成本较高、不能持续抑制基因表达、且易于污染,体外转录法得到的 siRNA 量有限,而 shRNA 可以解决这些问题,shRNA 是在编码 siRNA 正、反链之间添加一段不互补的碱基序列,使 RNA 折叠成发卡结构形成 loop 环,与相应的载体连接构成质粒后,转染进入细胞,经胞质中的核酸酶切割成 siRNA,siRNA 解链后再与 RNA 诱导的沉默复合物(RISC)相结合,识别与其序列互补配对的同源 mRNA,降解 mRNA 从而沉默目的基因^[16]。该方法无需直接操作 RNA,且作用效果更好,有更加广泛的应用前景。

本研究成功构建了人 ADAM17 基因干扰表达载体,在菌液 PCR 结果中,产物 2 没有目的条带,这可能是由于操作过程中不够严谨而出现杂菌污染,但其余 5 个产物均在相应位置有条带,且提取质粒后,测序结果完全正确。用该质粒转染人胰腺癌细胞 PANC1,有效地下调了 PANC1 细胞中 ADAM17 mRNA 和蛋白水平的表达,同时,转染后细胞的增殖能力明显被抑制。

4 结 论

本研究将靶向 ADAM17 的 shRNA 连接到了 pLKO.1-puro 载体中,测序成功后,瞬时转染至胰腺癌细胞 PANC1,显著降低了实验组细胞中 ADAM17 的 mRNA 和蛋白表达水平,说明该质粒构建成功;实验组细胞增殖速率显著降低,说明该质粒可在体外培养的肿瘤细胞中发挥作用,为进一步研究 ADAM17 在肿瘤发生、发展过程中的作用及机制奠定了基础。

参考文献

- [1] SAFTIG P, REISS K. The "a disintegrin and metalloproteases" Adam10 and Adam17: novel drug targets with therapeutic potential[J]. Eur J Cell Biol, 2011, 90(6/7): 527-535.
- [2] DREYMUeller D, UHLIG S, LUDWIG A. ADAM-family metalloproteinases in lung inflammation: potential therapeutic targets[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015, 308(4): 325-343.
- [3] MOSS M L, JIN S L, MILLA M E, et al. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha[J]. Nature, 1997, 385(6618): 733-736.
- [4] YANG Y J, ZHAO P S, ZHANG T, et al. Small interfering RNAs targeting the rabies virus nucleoprotein gene [J]. Virus Res, 2012, 169(1): 169-174.
- [5] WEBER S, SAFTIG P. Ectodomain shedding and ADAMs in development [J]. Development, 2012, 139(20): 3693-3709.
- [6] GOOZ M. ADAM-17: the enzyme that does it all[J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2010, 45(2): 146-169.
- [7] OH S T, STARK A, REICHRATH J. The disintegrin-metalloproteinases Adam10 and Adam17 are upregulated in cutaneous squamous cell carcinomas[J]. Dermatoendocrinol, 2016, 8(1): e1228499.
- [8] WANG X J, FENG C W, LI M. Adam17 mediates hypoxia-induced drug resistance in hepatocellular carcinoma cells through activation of EGFR/PI3K/Akt pathway[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 380(1/2): 57-66.
- [9] CHEN J T, YAO K H, HUA L, et al. MiR-338-3p inhibits the proliferation and migration of gastric cancer cells by targeting Adam17[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(9): 10922-10928.
- [10] 张景华,王保信,汪萍,等.乳腺癌组织中 HSG 和 EGFR 的表达及其与临床病理特征的关系[J].实用癌症杂志,2013,28(1):24-27.
- [11] HOSUR V, FARLEY M L, BURZENSKI L M, et al. Adam17 is essential for ectodomain shedding of the EGF-receptor ligand amphiregulin[J]. FEBS Open Bio, 2018, 8(4): 702-710.
- [12] HUANG Y C, BENAICH N, TAPE C, et al. Targeting the sheddase activity of Adam17 by an anti-ADAM17 antibody D1 (A12) inhibits head and neck squamous cell carcinoma cell proliferation and motility via blockage of bradykinin induced HERs transactivation[J]. Int J Biol Sci, 2014, 10(7): 702-714.
- [13] DOBERSTEIN K, STEINMEYER N, HARTMETZ A K, et al. MicroRNA-145 targets the metalloprotease Adam17 and is suppressed in renal cell carcinoma patients [J]. Neoplasia, 2013, 15(2): 218-230.
- [14] GHOSH A K, MAU T, O'BRIEN M, et al. Impaired autophagy activity is linked to elevated ER-stress and inflammation in aging adipose tissue[J]. Aging, 2016, 8(10): 2525-2537.
- [15] 张培培. RNA 干扰抑制 JMJD3 基因表达对肝癌细胞生长、增殖和侵袭的影响[J]. 国际检验医学杂志,2017,38(10):1333-1335.
- [16] HUTSON T H, FOSTER E, MOON L D, et al. Lentiviral vector-mediated RNA silencing in the central nervous system[J]. Hum Gene Ther Methods, 2014, 25(1): 14-32.

(收稿日期:2018-09-20 修回日期:2018-11-08)