论著

文章编号:1000-5404(2009)06-0526-04

靶向 FAK 的 siRNA 对喉癌细胞增殖及侵袭能力的抑制作用

张潜英,叶 琳,余晓燕,沈 娜,邓 碧,吴晓松,陈鸿雁 (重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科,重庆 400016)

摘 要:目的 运用 RNA 干扰(RNA interference,RNAi)技术阻断喉癌 Hep-2 细胞株中 FAK 基因的表达,探讨 FAK 基因沉默后对 Hep-2 细胞株产生的影响。**方法** 针对 FAK 基因,构建 2 条干扰重组质粒 FAK-pGenesil-CH1 和 FAK-pGenesil-CH2,1 条阴性对照重组质粒 FAK-pGenesil-HK;在脂质体的介导下转染喉癌 Hep-2 细胞株,用 RT-PCR 和 Western blot 分析 FAK mRNA 及蛋白的表达;MTT 法、流式细胞技术及体外侵袭实验测定干扰重组质粒对 Hep-2 细胞株的增殖、侵袭能力的影响。**结果** 重组质粒能有效地阻断 Hep-2 细胞株中 FAK 基因在 mRNA 和蛋白水平上的表达($P<0.05$);重组质粒转染 Hep-2 细胞后,细胞增殖抑制率分别为 58.34%、52.78%,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$);干扰组 G_0~G_1期细胞增多,S 期细胞数量明显减少($P<0.05$);FAK-pGenesil-CH1、FAK-pGenesil-CH2 作用 Hep-2 细胞株 48 h 后,Hep-2 细胞穿过 Matrigel 膜的个数分别为(56.0±6.7)、(51.0±5.1),与阴性对照组(152.0±9.4)、正常对照组(139.0±8.1)比较有统计学差异($P<0.05$)。**结论** 干扰重组质粒能有效地抑制转染 Hep-2 细胞株的 FAK mRNA 及蛋白的表达,并能抑制 Hep-2 细胞株的增殖及侵袭能力。

关键词: FAK;siRNA; Hep-2 细胞株;增殖;侵袭

中图法分类号: R73-37;R730.54;R739.65 **文献标识码:** A

Effect of focal adhesion kinase gene silencing on proliferation and invasion of Hep-2 cells

ZHANG Qian-ying, YE Lin, YU Xiao-yan, SHEN Na, DENG Bi, WU Xiao-song, CHEN Hong-yan (Department of Otolaryngology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To observe the effects of RNAi-mediated focal adhesion kinase (FAK) gene silencing on laryngeal carcinoma Hep-2 cells. **Methods** Recombinant plasmids generating short hairpin RNA were constructed, including two interferential sequences FAK-pGenesil-CH1, FAK-pGenesil-CH2 and one negative control sequence FAK-pGenesil-HK. Hep-2 cells were transfected with recombinant plasmids. FAK mRNA and protein were analyzed respectively by RT-PCR and Western blotting. Cell proliferation, cell cycle and invasion of Hep-2 cells were observed by MTT assay, flow cytometry and transwell invasion assay, respectively. **Results** Recombinant plasmids of FAK-pGenesil-CH1 and FAK-pGenesil-CH2 downregulated the expressions of FAK mRNA and protein ($P<0.05$). The proliferation inhibition ratio in Hep-2 cells reached 58.34% and 52.78% 48 h after transfection of recombinant plasmids of FAK-pGenesil-CH1 and FAK-pGenesil-CH2, while that was 8.34% in the control ($P<0.05$). More cells arrested in G_0/G_1 phase in the transfected groups than controls. The number of FAK-pGenesil-CH1 transfected Hep-2 cells, and FAK-pGenesil-CH2 transfected Hep-2 cells through Matrigel membrane was (56.0±6.7) and (51.0±5.1), respectively, significantly less than that in control groups ($P<0.05$). **Conclusion** The constructed recombinant plasmids of FAK-pGenesil-CH1 and FAK-pGenesil-CH2 can suppress the expression of FAK mRNA and protein in Hep-2 cells, and inhibit the cloning and invasion of Hep-2 cells.

Key words: FAK; RNA interference; Hep-2 cell line; invasion; proliferation

黏着斑激酶(focal adhesion kinase,FAK)是一个多功能的非受体酪氨酸激酶,它在细胞间及细胞与细胞外基质黏附中起关键作用,同时与胚胎发育,细胞生存、周期调控、增殖、凋亡、侵袭及血管生成等密切相关[1,2]。大量研究证明,FAK 的高表达与肿瘤的转移、

基金项目: 重庆市卫生局资助项目(07-1-021)
Supported by the Chongqing Bureau of Public Health (07-1-021)

作者简介: 张潜英,女,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事头颈肿瘤方面的研究。E-mail:65659475@qq.com

通信作者: 陈鸿雁,电话:(023)89012758,E-mail:cchhyy787@sohu.com

收稿日期: 2008-06-11;**修回日期:** 2008-09-01

侵袭有关[3]。因此,作为多条信号通路的上游分子,FAK 可能是肿瘤转移、侵袭治疗的一个重要靶点,而抑制 FAK 的功能则有望成为肿瘤基因治疗的新热点。本研究组依据 RNA 干扰原理,用靶向于 FAK 基因的 shRNA 重组质粒载体转染至喉癌 Hep-2 细胞,以了解阻断 FAK 基因表达对 Hep-2 细胞株增殖及侵袭能力的影响。

1　材料与方法

1.1　材料和试剂

人喉癌 Hep-2 细胞株(购自上海中科院细胞库)。干扰重组质粒 2 条,FAK-pGenesil-CH1 正义链:5′-GATCCCCACCTGGGCCAGTATTATTTCAAGACGATAATACTGGCCCAGGTGGTTTTTTGTCGACA-3′,反义链:5′-AGCTTGTCGACAAAAAACCACCTGGGCCAGTATTATCGTCTTGAAATAATACTGGCCCAGGTGGG-3′;FAK-pGenesil-CH2 正义链:5′-GATCCGGGCATCATTCAGAAGATATTCAAGACGTATCTTCTGAATGATGCCCTTTTTTGTCGACA-3′,反义链:5′-AGCTTGTCGACAAAAAAGGGCATCATTCAGAAGATACGTCTTGAATATCTTCTGAATGATGCCCG-3′;阴性对照组质粒 FAK-pGenesil-HK 正义链:5′-GATCCGACTTCATAAGGCGCATGCTTCAAGACGGCATGCGCCTTATGAAGTCTTTTTTGTCGACA-3′,反义链:5′-AGCTTGTCGACAAAAAAGACTTCATAAGGCGCATGCCGTCTTGAAGCATGCGCCCTTATGAAGTCG-3′(均由本课题组构建并测序正确)。Matrigel(美国 BD 公司),Transwell 细胞小室(美国 Corning 公司),FAK、β-actin 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,转染试剂采用 Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司),甲基噻唑基四唑(美国 Sigma 公司),DAB、二抗(辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG,北京中杉公司)。

1.2　实验分组

正常对照组:Lipofectamine™2000 + 转染液;阴性对照组:FAK-pGenesil-HK + Lipofectamine™2000 + 转染液;干扰组 1:FAK-pGenesil-CH1 + Lipofectamine™2000 + 转染液;干扰组 2:FAK-pGenesil-CH2 + Lipofectamine™2000 + 转染液。转染液:不含抗生素和血清的 RPMI1640 培养液。

1.3　重组质粒转染 Hep-2 细胞

将 Hep-2 细胞按每孔 1×10^5 接种于 6 孔培养板,培养液(含 10% 小牛血清,100 U/ml 青霉素,100 U/ml 链霉素)37 ℃、5% CO_2 培养至 90% 左右,更换无抗生素、无血清的培养液继续培养 6 h,用去内毒素的各重组质粒转染 Hep-2 细胞。质粒用量为 2 μg/孔,脂质体用量为 5 μl/孔。转染后 6 h 将培养液更换为含 10% 小牛血清培养液。

1.4　RT-PCR 检测 FAK mRNA 表达水平

经检测,转染 48 h 转染效率最高。故取转染后 48 h 的细胞为观察对象,提取总 RNA 并定量,用 DNA 酶处理总 RNA 以去除 DNA 污染,各实验组取同等量的 RNA 反转录后进行 PCR。FAK 引物正义链:5′-ACGGCACCATCCCTAACC-3′,反义链:5′-TCTCACGCTGTCCGAAGT-3′,产物长度 408 bp;内参照 GAPDH 引物正义链:5′-GGAGTGGGTGTCGCTGTTGA-3′,反义链:5′-TGGACCTGACCTGCCGTCTA-3′,产物长度 149 bp。PCR 产物经琼脂糖电泳后,用 Quantity One 软件进行灰度值分析。

1.5　Western blot 检测 FAK 蛋白表达

转染后 48 h 提取细胞总蛋白并定量,调整蛋白浓度至相同水平进行 SDS-PAGE 电泳。电泳完毕后,DNA 标准条带进行考马斯亮蓝染色,余下的胶按操作说明装入电转印仪,250 mA 恒流 1 h 左右,先取出相对分子质量较小段,剩余的继续 250 mA 恒流转膜。电转完毕加 5% 脱脂奶粉封闭,加 1/500 PBS 稀释的 β-actin、FAK 抗体 4 ℃过夜。PBS-Tween 洗涤,加 1∶300 稀释的二抗室温 60 min,PBS-Tween 洗涤后 DAB 显色 30 min。用 Quantity One 软件分析结果。

1.6　MTT 检测细胞增殖抑制率

取对数生长细胞接种于 96 孔板中,待细胞融合达 80% 以上时按试剂说明进行转染,转染 6 h 换含血清及抗生素的培养液,再分别培养 24、48、72 h。每组设定 5 个复孔。到相应终止时间,弃原培养液,每孔加入无血清培养液 90 μl,再加入甲基噻唑基四唑(5 mg/ml)10 μl,放入 37 ℃、5% CO_2 孵箱中孵育 4 h。去上清,每孔加入 DMSO 100 μl,振荡 10 min。酶联免疫检测仪检测 570 nm 波长处光密度值[$D(570)$],计算细胞生长抑制率(IR)。

IR(%) = [1 − 实验组 $D(570)$ 均值/对照组 $D(570)$ 均值] × 100%

1.7　细胞周期的检测

转染后 48 h,消化各孔 Hep-2 细胞,冷 PBS 洗涤,调整细胞数为 1×10^6/ml,流式细胞仪检测细胞周期,计数 2×10^4 个细胞。

1.8　Transwell 侵袭实验

转染后 48 h,消化各孔 Hep-2 细胞,冷 PBS 洗涤,调整细胞数为 1×10^5/ml。取细胞悬液 200 μl 加入 Transwell 小室。24 孔板下室加入 500 μl 含 10% FBS 的培养液,37 ℃、5% CO_2 条件下培养细胞 24 h。取出 Transwell 小室,用棉签擦去 Matrigel 胶和上室内的细胞,少量 PBS 洗 3 次,95% 乙醇固定细胞 15 min,0.4% 台盼蓝染色,揭下 Transwell 小室膜反面贴于载玻片上,计数。使用正置显微镜进行观察,200 倍光镜 5 个视野计数穿膜细胞个数,并计算平均每个视野的穿膜细胞数。

1.9　统计学方法

使用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组资料比较采用 χ^2 检验及 t 检验,多组间差异比较采用方差分析。

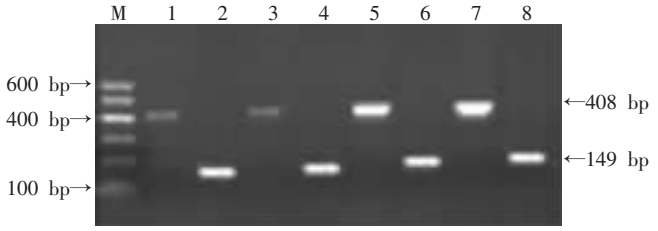
2　结果

2.1　RT-PCR 结果

转染 48 h 提取细胞 RNA,总 RNA 提取鉴定。检测 FAK mRNA 的表达,结果表明:正常对照组与阴性对照组比较无统计学意义($P>0.05$),而干扰组 1 和干扰组 2 转染后 FAK mRNA 的表达明显减少,与正常对照组与阴性对照组比较有统计学意义($P<0.05$,图 1、表 1)。

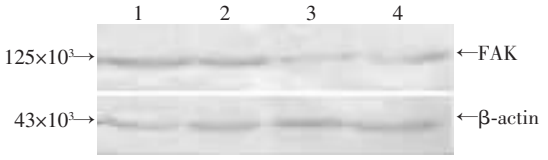
2.2　Western blot 检测 FAK 蛋白

转染 FAK-pGenesil-CH1、FAK-pGenesil-CH2 重组质粒 FAK 蛋白抑制率与转染 FAK-pGenesil-HK 质粒比较,差异有统计学意义($P<0.05$,图 2、表 1)。



M:DNA 标准;1、3、5、7:干扰组 2、干扰组 1、阴性对照组、正常对照组 FAK mRNA;2、4、6、8:GAPDH

图 1 RT-PCR 检测重组质粒干扰后 FAK mRNA 表达



1:正常对照组;2:阴性对照组;3:干扰组 1;4:干扰组 2

图 2 Western blot 检测 FAK 蛋白的表达

表 1 FAK mRNA 及蛋白表达抑制率

组别	FAK mRNA		FAK 蛋白	
	FAK/GAPDH	抑制率(%)	FAK/β-actin	抑制率(%)
正常对照组	1.37 ± 0.08	–	1.27 ± 0.09	–
阴性对照组	1.14 ± 0.09	16.79	1.24 ± 0.08	2.37
干扰组 1	0.39 ± 0.02[a]	71.54[a]	0.74 ± 0.05[a]	41.74[a]
干扰组 2	0.44 ± 0.03[a]	67.89[a]	0.77 ± 0.04[a]	39.38[a]

a:$P<0.05$,与阴性对照组比较

2.3 MTT 结果

MTT 实验结果表明,Hep-2 细胞转染 24、48、72 h 后,干扰组 1 细胞的增殖抑制率分别为 38.06%、58.34%、43.21%,干扰组 2 细胞的增殖抑制率分别为 42.86%、52.78%、49.03%,干扰组与阴性对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$,表 2)。

表 2 重组质粒在不同时间对 Hep-2 细胞生长的影响

组别	D(570)			IR(%)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
正常对照组	0.63 ± 0.07	1.08 ± 0.11	2.06 ± 0.09	--	--	--
阴性对照组	0.58 ± 0.03	0.99 ± 0.05	1.94 ± 0.10	7.39	8.34	5.83
干扰组 1	0.39 ± 0.06	0.45 ± 0.03	1.17 ± 0.05	38.06[a]	58.34[a]	43.21[a]
干扰组 2	0.36 ± 0.04	0.51 ± 0.02	1.05 ± 0.03	42.86[a]	52.78[a]	49.03[a]

a:$P<0.05$,与阴性对照组比较

2.4 流式细胞仪检测细胞周期分布

从图 3、表 3 中可见,与正常对照组和阴性对照相比,干扰组 $G_0\sim G_1$ 期细胞增多,S 期细胞数量明显减少($P<0.05$),将更多的细胞阻滞在 G_0/G_1 期($P<0.05$)。在转染了干扰组 1、干扰组 2 质粒的细胞中,增殖指数分别为 25.28% 和 25.67%,与正常对照组细胞相比有统计学差异($P<0.05$)。这些结果提示:表达 FAK 的 siRNA 重组质粒的转染抑制了细胞增殖,使细胞生长停滞于 $G_0\sim G_1$ 期,抑制了细胞 G_1 到 S 期分化。

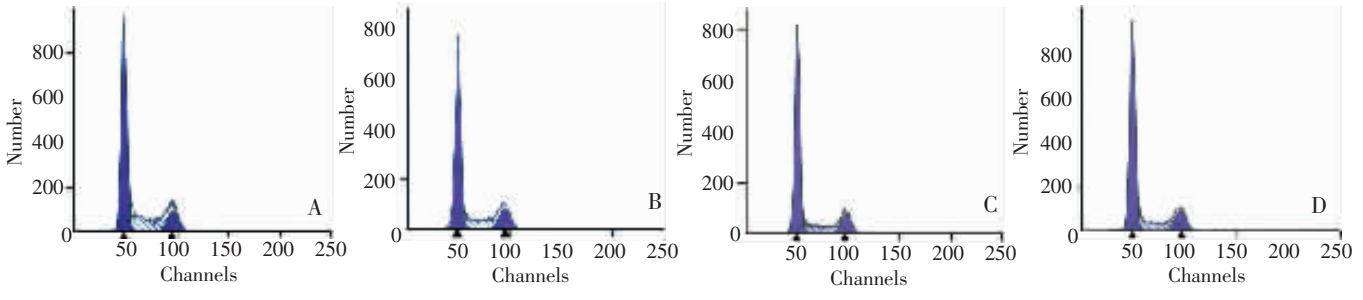
表 3 重组质粒转染后细胞周期的分布(%)

组别	$G_0\sim G_1$ 期	$G_2\sim M$ 期	S 期	PI
正常对照组	61.25	12.25	26.50	38.75
阴性对照组	63.56	14.81	21.63	36.44
干扰组 1	74.18	10.81	15.01	25.28[a]
干扰组 2	74.33	12.26	13.41	25.67[a]

a:$P<0.05$,与正常对照组比较

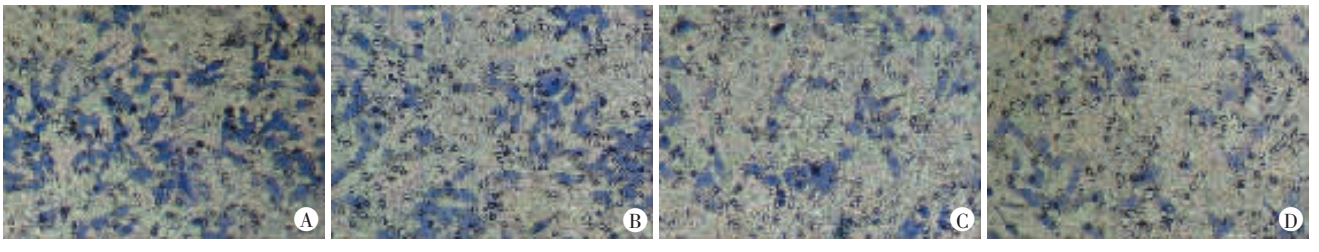
2.5 细胞侵袭能力

在 Transwell 侵袭实验中,干扰组穿膜细胞数明显少于对照组(图 4)。转染后干扰组 1、干扰组 2 质粒穿膜细胞数分别为(56.0 ± 6.7)和(51.0 ± 5.1),与正常对照组(152.0 ± 9.4)、阴性对照组(139.0 ± 8.1)比较有统计学差异($P<0.05$),正常对照组与阴性对照组比较无统计学差异($P>0.05$)。



A:正常对照组; B:阴性对照组; C:干扰组 1; D:干扰组 2

图 3 转染 48 h 后流式细胞术检测 Hep-2 细胞周期



A:正常对照组;B:阴性对照组;C:干扰组 1;D:干扰组 2

图 4 正置荧光显微镜下观察重组质粒转染后对 Hep-2 细胞侵袭力的影响 (×400)

3　讨论

1992 年,Hanks 等及 Schaller 等[4]分别在 v-Src 转染的鸡胚细胞及正常细胞中发现了一个在整合素富集的细胞黏附区高度磷酸化、相对分子质量为 125 × 10^3、与细胞黏附关系密切的蛋白,命名为 FAK。尽管 FAK 没有定义为癌基因,但是 FAK 在多种组织起源的肿瘤中表达量增高已有报道[5]。研究表明,FAK 具有促进肿瘤细胞增殖的作用,这种作用主要通过调控细胞周期实现。细胞周期主要受 3 大类因子的调节:细胞周期素(cyclin)、周期素依赖性激酶(cyclin dependent kinase,CDK)以及这些激酶特定的调节因子。目前认为,3 条以 FAK 为中心的信号转导通路与细胞周期调控密切相关,其共同的终末环节是在转录水平上诱导 cyclin D1 和 CDK 的高表达,抑制 p27 活性,促进肿瘤细胞 DNA 合成和加快 G_1/S 期的转换。Yamamoto 等[6]应用 FAK 转染 HL260 细胞并以 PI3-K 抑制剂 LY294002 干预,发现 FAK 的过表达可以通过 PKC 和 FAK-PI3-K-Akt 通路上调周期素 D_3 和 CDK_4 的表达促细胞增殖。Lin 等[7]研究 FAK-P130cas-Crk-JNK-C-Jun 通路的各个突变体对整合素诱导的细胞周期有影响,发现上述通路的各突变体均抑制正常鼠的成纤维细胞 NIH3T3 进入 S 期。在 Zhao 等[8]的研究中,利用 FAK 突变体与内源性 FAK 竞争结合黏着斑处的信号分子(如 Src),可引起细胞外信号调节激酶 ERK 活性降低,使细胞周期停滞于 G_1 期,揭示了 FAK-Ras-Raf-ERK 通路在调节细胞周期中的作用。以上 3 条以 FAK 为中心的信号转导通路,除了单独参与细胞周期的调控外,还会通过串流(cross talk)的方式,在终末通路上产生以 Raf-ERK 为代表的级联放大效应参与调控细胞周期。本研究中分别运用 MTT 法与流式细胞技术,研究 FAK shRNA 对人喉癌 Hep-2 细胞增殖的影响,结果与 Wu 等[9]利用 FAK 反义寡核苷酸抑制神经胶质细胞瘤增殖结果相似。本实验结果提示,FAK 基因的抑制可能影响 Hep-2 细胞内 DNA 的复制和合成,抑制细胞的正常分裂,抑制细胞进入 S 期,从而使细胞在 G_1期堆积,最终结果是抑制肿瘤细胞的增殖。

肿瘤细胞侵袭邻近组织的能力在肿瘤的演进过程中具有重要意义。众所周知,在肿瘤侵袭过程中需要降解肿瘤周围组织以便其向血液循环中播散。已有研究显示 FAK 可以通过调控蛋白裂解酶途径降解肿瘤周围基质,使肿瘤细胞达到侵袭作用[10]。体外侵袭模型是以肿瘤细胞穿透基底膜为前提的、检验肿瘤侵袭能力强弱的一种实验方法。我们选用该模型,以此研究喉癌 Hep-2 细胞株转染 FAK shRNA 前后的侵袭能力的变化。结果提示转染了 FAK-pGenesil-CH1、FAK-pGenesil-CH2 重组质粒的细胞穿膜细胞数与细胞对照组、质粒对照组的穿膜细胞数比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);细胞对照组与质粒对照组比较无统计学差异($P > 0.05$),由此得知,抑制 FAK 基因表达后,Hep-2 细胞的侵袭能力下降。

综上所述,FAK 的表达与喉癌细胞的增殖、侵袭能力密切相关,利用 RNAi 技术能够降低 FAK 基因的表达,并能有效抑制喉癌 Hep-2 细胞株的增殖及侵袭能力。这将为以后 RNA 干扰技术应用于喉癌的治疗提供新的理论依据。FAK 基因有望成为防治喉癌侵袭及转移的一个新的靶位点。

参考文献:

[1] McLean G W, Carragher N O, Avizienyte E, *et al*. The role of focal-adhesion kinase in cancer-a new therapeutic opportunity[J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(7): 505 – 515.

[2] Mitra S K, Hanson D A, Schlaepfer D D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, 6 (1): 56 – 68.

[3] Sood A K, Coffin J E, Schneider G B, *et al*. Biological significance of focal adhesion kinase in ovarian cancer: role in migration and invasion [J]. Am J Pathol, 2004, 165(4): 1087 – 1095.

[4] Schaller M D, Borgman C A, Cobb B S, *et al*. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89(11): 5192 – 5196.

[5] Hecker T P, Gladson C L. Focal adhesion kinase in cancer[J]. Front Biosci, 2003, 8: s705 – s714.

[6] Yamamoto D, Sonoda Y, Hasegawa M, *et al*. FAK overexpression upregulates cyclin D3 and enhances cell proliferation via the PKC and PI3-kinase-Akt pathways[J]. Cell Signal, 2003, 15(6): 575 – 583.

[7] Lin C L, Zhang Z X, Xu Y J, *et al*. Focal adhesion kinase antisense oligodeoxynucleotides inhibit human pulmonary artery smooth muscle cells proliferation and promote human pulmonary artery smooth muscle cells apoptosis[J]. Chin Med J (Engl), 2005, 118(1): 20 – 26.

[8] Zhao J, Pestell R, Guan J L. Transcriptional activation cyclin D1 promoter by FAK contributes to cell cycle progression[J]. Mol Biol Cell, 2001, 12(12): 4066 – 4077.

[9] Wu Z M, Yuan X H, Jiang P C, *et al* . Antisense oligonucleodes targeting the focal adhesion kinase inhibit proliferation, induce apoptosis and cooperate with cytotoxic drugs in human glioma cells[J]. J Neurooncol, 2006, 77(2): 117 – 123.

[10] Wang H B, Dembo M, Hanks S K, *et al*. Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(20): 11295 – 11300.

(编辑　张　维)