文章编号:1000-5404(2010)16-1745-05

论著

抑制黏着斑激酶经 Akt/NF-κB 信号通路逆转结肠癌多细胞耐药

陈玉英[1,2],向浏欣[2],潘 凤[1],蒋金妍[1],杨 黎[1],李建军[1],梁后杰[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院肿瘤科[1];400065 重庆,重庆邮电大学生物信息学院分子生物重点实验室[2])

【摘要】 目的 探讨抑制黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)在结肠癌 HT29 细胞中的表达能否逆转结肠癌多细胞耐药。**方法** 采用免疫细胞化学和 Western blot 检测单层细胞中 FAK、FAKp 的抑制情况,用 MTT 法检测单层细胞和多细胞球对 5-FU 敏感性的变化,采用流式细胞术检测抑制 FAK 对多细胞球 5-FU 诱导凋亡和自然凋亡的影响,免疫细胞化学检测单层细胞、Western blot 检测多细胞球中 FAK shRNA 干扰对 Akt、NF-κB、Bcl-2、Caspase-3 的影响。**结果** 靶向干扰 FAK 能显著抑制单层细胞 FAK、FAKp 蛋白表达。MTT 结果显示,FAK shRNA 干扰增强了单层细胞和多细胞球对 5-FU 的敏感性,特别是后者,且二者差异无统计学意义($P>0.05$)。流式细胞术结果显示,FAK shRNA 干扰能够使多细胞球的自发凋亡率和 5-FU 诱导凋亡率显著增加($P=0.001$,$P=0.000$),且两者之间差异显著($P=0.003$)。在单层和多细胞球细胞中,FAK shRNA 干扰后,Akt、NF-κB、Bcl-2 的水平明显下调,而 Caspase-3 水平上调。**结论** 抑制 FAK 表达能增强结肠癌多细胞球细胞对 5-FU 的敏感性,逆转其多细胞耐药性,其分子机制是通过 FAK/Akt/NF-κB 信号通路实现的。

【关键词】 黏着斑激酶;结肠癌;敏感性;信号通路;RNA 干扰
【中图法分类号】 R735.35;R329.26;R979-1 **【文献标志码】** A

Reversing multi-cellular resistance of colon carcinoma cells by suppressing focal adhesion kinase through FAK/Akt/NF-κB signaling pathway

Chen Yuying[1,2], Xiang Liuxin[2], Pan Feng[1], Jiang Jinyan[1], Yang Li[1], Li Jianjun[1], Liang Houjie[1] ([1]Department of Oncology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Key Laboratory of Molecular Biology, College of Bio-information, Chongqing University of Posts and Telecommunications, Chongqing, 400065, China)

【Abstract】 Objective To determine whether suppressing the expression of focal adhesion kinase (FAK) in colon carcinoma cell line HT29 will reverse colon carcinoma multicellular resistance. Methods The cells were divided into untreat HT29 cells, control shRNA cells, and FAK shRNA cells. The suppression of FAK and FAKp expression in monolayer culture cells of the above 3 groups were detected by immunocytochemistry and Western blotting analysis. Effects of suppressing FAK on the drug sensitivity to 5-FU of monolayer and multicellular spheroid culture cells were quantified by MTT assay. Effects of suppressing FAK on 5-FU-induced apoptosis and natural apoptosis of multicellular spheroids were determined by flow cytometry (FCM). Effects of FAK shRNA interference on protein expressions of Akt, NF-κB, Bcl-2, and Caspase-3 of monolayer culured cells were detected by immunocytochemistry, and their protein expressions in multicellular spheroid culture cells were detected by Western blotting. Results RNA interference targeting FAK markedly suppressed FAK and FAKp protein expressions in monolayer culture cells. MTT assay indicated that FAK shRNA interference enhanced the drug sensitivity to 5-FU of monolayer and multicellular spheroid culture cells evidently, especial the latter, but the difference between the 2 was not markedly ($P>0.05$). FCM manifested that FAK shRNA interference stimulated natural apoptosis and 5-FU-induced apoptosis markedly in multicellular spheroid cells ($P=0.001$, $P=0.000$), and the difference between the 2 was markedly ($P=0.003$). Following FAK shRNA treatment, Akt, NF-κB and Bcl-2 levels were obviously suppressed, but the Caspase-3 level was obviously upregulated both in monolayer and in multicellular spheroid cells. Conclusion Suppressing FAK enhances the drug sensitivity of colon carcinoma multicellular spheroid cells to 5-FU through a FAK/Akt/NF-κB signaling pathway, and reverses multicellular resistance at the same tme.

【基金项目】 重庆市自然科学基金(CSTC2007BB5444);重庆邮电大学博士基金(A2008-65)
【通信作者】 梁后杰,电话:(023)68754128,E-mail:lianghoujie@sina.com

[Key words] focal adhesion kinase; colon carcinoma; sensitivity; signaling pathway; RNA interference

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2007BB5444) and the Doctor Foundation of Chongqing University of Posts and Telecommunications (A2008-65). Corresponding author: Liang Houjie, Tel: 86-23-68754128, E-mail: lianghoujie@sina.com

黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)是介导细胞与细胞间、细胞与细胞外基质间信号转导的重要的胞内分子,具有调节细胞与细胞外基质(ECM)黏附的作用。FAK在多种肿瘤中高表达[1-4],有报道FAK在结肠癌组织中高表达[5],而在正常结肠组织中呈弱阳性或阴性,对黏附、迁移、侵袭和转移等生物学行为有重要作用[6-8]。FAK的过表达可以使保护肿瘤细胞免于过氧化氢、电离辐射、化疗药物等作用[9-11]。有报道认为抑制FAK的表达能抑制肿瘤生长[12],因此,FAK可能是非常好的肿瘤治疗靶点。我们已构建了抑制FAK表达的载体,初步发现抑制FAK表达能减弱细胞间的黏附,进而有效地阻止多细胞球体的聚集和形成[13]。本研究采用单层和多细胞球体2种细胞培养模型,探讨抑制FAK表达对结肠癌多细胞球的药物(5-FU)敏感性的影响,并初步探讨其分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株及培养

实验用3组细胞:未干扰的HT-29细胞(untreated组),稳定筛选后[13]的control shRNA细胞(control shRNA组),FAK shRNA细胞(FAK shRNA组)。常规培养于含10%小牛血清的DMEM高糖培养液中,置于37 ℃、5% CO_2孵箱中培养。传代用0.25%胰蛋白酶消化,取对数生长期细胞用以实验。

1.2 主要试剂

DMEM培养基、G418(美国Gibco),MTT(美国Amresco),SP-9000、SP-9002免疫组化染色试剂盒、DAB显色试剂盒(北京中杉生物),鼠抗人FAK单克隆抗体(美国Upstate),鼠抗人FAKpY397(美国BD),鼠抗人NF-κB p65、兔抗人Akt(美国Cell Signaling),β-actin、兔抗人Bcl-2、鼠抗人Caspase-3(美国Santa Cruz),化学发光试剂盒(美国Pierce),预染蛋白Marker(美国Fermentas),PVDF膜(美国Millipore)。

1.3 免疫细胞化学

检测单层细胞中与凋亡相关因子Akt、NF-κB、Caspase-3、Bcl-2的水平。将对数生长期的3组细胞接种于预先置有盖玻片的12孔板中,置于37 ℃、5% CO_2孵箱中培养2~3 d。待细胞铺满80%~90%时取出盖玻片,4%多聚甲醛固定,常规S-P法检测蛋白表达,以PBS代替一抗作为阴性对照。

1.4 Western blot检测蛋白表达

检测多细胞球中与凋亡相关因子FAK、磷酸化FAKpY397(FAKp)、Akt、NF-κB、Caspase-3、Bcl-2蛋白水平。以含1 mmol/L PMSF的细胞裂解液裂解细胞,分别提取3组细胞的总蛋白。取50 μg上样,经SDS-PAGE凝胶电泳,转膜,经特异性一抗、相应二抗孵育后,用化学发光法显色,同时检测β-actin蛋白表达作为上样量的标准。运用美国Quantity One对Akt、NF-κB的条带进行灰度分析。

1.5 MTT法检测抑制FAK表达对5-FU敏感性的影响

胰酶消化对数生长期的3组细胞,制备单细胞悬液,以6×10^3/孔细胞接种于96孔板,分别作单层和多细胞球体培养[13] 72 h。更换培养液,加入5-FU,使药物的终浓度为0、15.6、62.5、250.0、1 000.0 μg/ml,每个浓度设3个复孔。培养72 h,每孔加20 μl MTT液(5 mg/ml),37 ℃培养4 h,弃上清,加入150 μl DMSO液,振荡混匀后于酶标仪上测490 nm处光密度值[D(490)]。实验独立重复3次,据D(490)值分别计算细胞存活率和半数抑制浓度(IC_{50})值。

细胞存活率 = 药物组D(490)值/对照组D(490)值 × 100%

1.6 流式细胞术检测抑制FAK表达对多细胞球凋亡的影响

取对数生长期的3组细胞,胰酶消化制备单细胞悬液,按5×10^5/瓶接种于培养瓶做多细胞球培养72 h。更换培养液,每组加入200 μg/ml 5-FU进行凋亡诱导,同时加设不含5-FU的FAK shRNA组[FAK shRNA组(无5-FU)]。培养72 h,收集4组细胞,上机检测其凋亡率。

1.7 统计学处理

计量资料以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件进行分析,各组间比较用单因素方差分析。

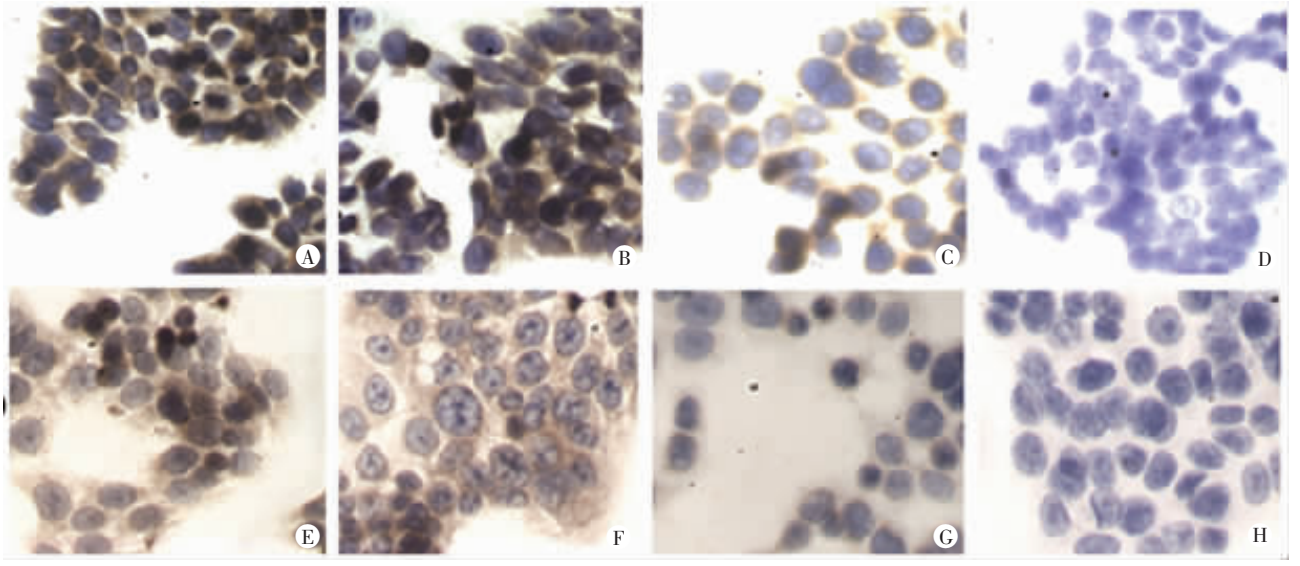
2 结果

2.1 FAK shRNA对单层细胞中FAK和FAKp的干扰作用

免疫细胞化学检测发现FAK shRNA组细胞中FAK和FAKp蛋白表达均降低(图1)。Western blot检测结果发现,FAK shRNA组细胞中FAK和FAKp蛋白表达也均降低,与免疫细胞化学一致(图2)。经灰度分析FAK表达与untreated组(4.92±0.52)相比,FAK shRNA组(0.98±0.23)FAK蛋白下调(79.90±5.44)%,其表达量被显著抑制($P<0.01$)。

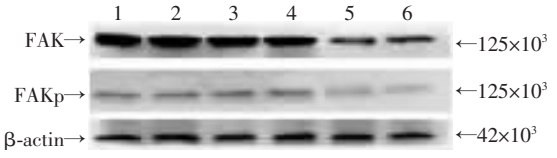
2.2 抑制FAK表达对单层和多细胞球细胞5-FU敏感性的影响

采用MTT法检测抑制FAK表达对单层和多细胞球细胞5-FU敏感性的影响,结果显示,在不同5-FU浓度处理后,细胞在多细胞球体培养时的细胞存活率较单层培养时大大增加,对5-FU敏感性大大降低,其IC_{50}明显增高,即多细胞球体较单层细胞对化疗药物5-FU耐药;抑制FAK表达后,即FAK shRNA组细胞无论是单层培养还是多细胞球培养,其细胞的存活率均显著降低,IC_{50}值明显降低;特别是FAK shRNA组多细胞球体培养细胞,其IC_{50}较单层培养细胞有更大幅度下降,并和单层培养FAK shRNA组细胞的IC_{50}接近,二者IC_{50}值无统计学差异($P=0.141$,表1)。



A ~ D：FAK 蛋白表达；E ~ H：FAKp 蛋白表达；A、E：untreated 组；B、F：control shRNA 组；C、G：FAK shRNA 组；D、H：阴性对照组

图 1　免疫细胞化学检测 FAK shRNA 对单层细胞中 FAK 和 FAKp 的干扰作用（S-P ×400）



1、2：untreated 组；3、4：control shRNA 组；5、6：FAK shRNA 组

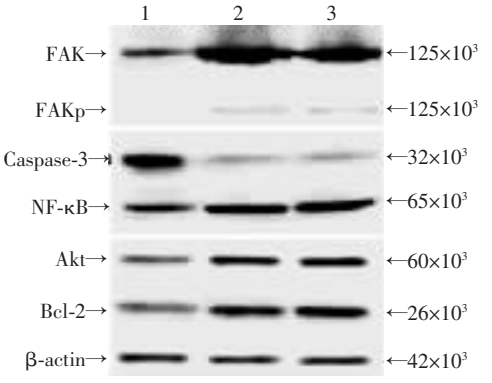
图 2　Western blot 检测 FAK shRNA 对单层细胞中 FAK 和 FAKp 的干扰作用

2.3　FAK shRNA 靶向干扰对多细胞球凋亡率的影响

流式细胞术检测结果显示：untreated 组、control shRNA 组、FAK shRNA 组、FAK shRNA 组（无 5-FU）的多细胞球凋亡率分别为（8.87 ± 0.57）%、（8.99 ± 0.55）%、（21.50 ± 2.62）%、（16.48 ± 1.18）%。抑制 FAK 表达后细胞的凋亡率明显增加，与 control shRNA 组相比，FAK shRNA 组的 5-FU 诱导凋亡率和无 5-FU 诱导的自然凋亡率均显著增加（$P = 0.000$，$P = 0.001$），且后两者之间差异有统计学意义（$P = 0.003$）。

2.4　干扰后凋亡相关因子的表达变化

采用 Western blot 检测多细胞球中凋亡相关因子的表达，发现抑制 FAK 表达后，FAK shRNA 组中 Akt、NF-κB、Bcl-2、FAKp 水平下调，而 Caspase-3 水平上调（图 3），结果与单层细胞的一致。经过条带灰度分析发现，与 control shRNA 组相比，FAK shRNA 组中的 Akt、NF-κB 水平下调显著（$P < 0.01$，图 4）。采用免疫细胞化学（S-P 法）检测单层细胞中凋亡相关因子的蛋白表达，发现在抑制 FAK 表达的 FAK shRNA 组中 Akt、NF-κB、Bcl-2 的水平下调，而 Caspase-3 水平上调（图 5）。



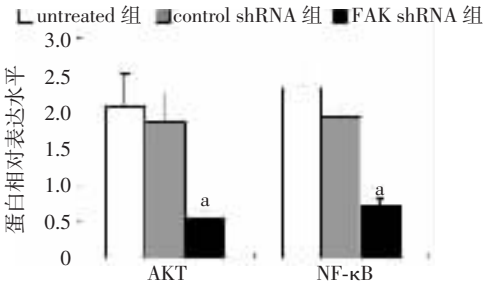
1：FAK shRNA 组；2：control shRNA 组；3：untreated 组

图 3　Western blot 检测多细胞球细胞 FAK shRNA 干扰后凋亡相关因子的表达变化

表 1　FAK shRNA 干扰对不同浓度 5-FU 处理的 HT29 细胞存活率的抑制作用（$\bar{x} \pm s$）

培养方法		不同浓度 5-FU 处理后的存活率（%）				IC_{50}（μg/ml）
		15.6 μg/ml	62.5 μg/ml	250.0 μg/ml	1 000.0 μg/ml	
单层培养细胞						
	untreated 组	64.00 ± 5.59	50.43 ± 5.12	35.54 ± 4.17	28.70 ± 4.15	66.21 ± 4.92
	control shRNA 组	62.20 ± 5.65	49.05 ± 3.89	34.81 ± 4.79	27.51 ± 4.37	61.82 ± 5.61
	FAK shRNA 组	39.99 ± 3.98[b]	30.02 ± 3.37[b]	21.94 ± 2.85[b]	19.99 ± 3.68[b]	4.21 ± 2.49[a]
多细胞球培养细胞						
	untreated 组	84.11 ± 5.64	61.82 ± 5.45	49.19 ± 4.51	34.29 ± 4.57	183.27 ± 4.66
	control shRNA 组	80.11 ± 5.83	58.18 ± 5.26	48.09 ± 4.36	35.33 ± 3.91	181.20 ± 5.21
	FAK shRNA 组	50.96 ± 4.91[b]	40.31 ± 4.89[b]	32.96 ± 3.42[b]	26.76 ± 4.05[b]	11.85 ± 2.29[a]

a：$P < 0.01$，b：$P < 0.05$，与相同培养方法 control shRNA 组比较



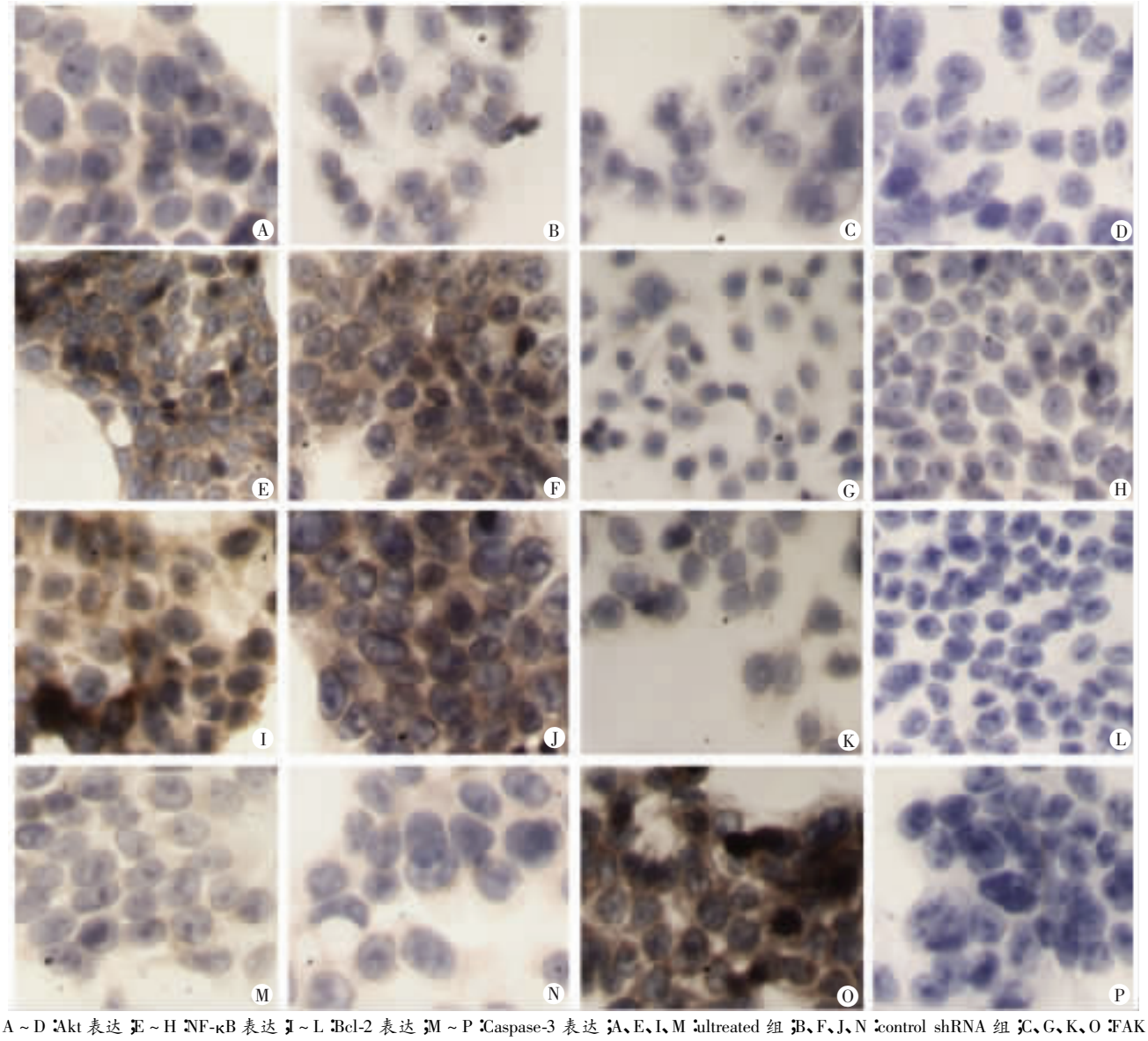
a：$P<0.01$，与 control shRNA 组比较

图4　Western blot 检测 FAK shRNA 干扰后凋亡相关因子的表达变化

3　讨论

肿瘤细胞在体外进行三维培养时会表现出较单层培养细胞明显增强的耐药性[14]，要杀死该细胞需要比单层培养时更高的药物浓度。这是因为肿瘤细胞经三维多细胞球（multicellular spheroids，MCSs）培养时，细胞-细胞之间或细胞-细胞外基质间建立不同程度的联系。目前把这种三维多细胞间相互协作而产生的耐药特性称为多细胞耐药性或群集耐药性（multicellular resistance，MCR）。

结直肠癌是临床常见的恶性实体瘤之一，肿瘤细胞对化疗药物耐受是影响疗效及预后的重要因素。要想克服其耐药，除了需要研究肿瘤细胞的个体耐药特性外，更应着重考虑其细胞间相互协作而产生的MCR。本研究将结肠癌 HT29 细胞分别做单层和多细胞球体培养，研究抑制 FAK 的表达对药物敏感性的影



A～D：Akt 表达；E～H：NF-κB 表达；I～L：Bcl-2 表达；M～P：Caspase-3 表达；A、E、I、M：ultreated 组；B、F、J、N：control shRNA 组；C、G、K、O：FAK shRNA 组；D、H、L、P：阴性对照组

图5　免疫细胞化学检测单层细胞 FAK shRNA 干扰后凋亡相关因子的表达变化　（S-P ×400）

响,发现细胞在做多细胞球体培养时的耐药性较单层培养细胞明显增强,与文献[14]报道结果一致。

FAK 是一种非受体型蛋白酪氨酸激酶,调节细胞间粘附的重要分子。我们前期研究发现,抑制 FAK 表达后,细胞-细胞间的粘附及协作减弱,细胞作悬浮培养时更多的是形成较小的细胞团或细胞簇,所以抑制 FAK 表达能有效地逆转多细胞球体的聚集和形成[13],我们推测这同时会增强其化疗敏感性。本研究利用干扰技术有效地抑制 FAK 表达,通过 MTT 法检测其对单层和 MCSs 敏感性的影响,结果发现:抑制 FAK 表达能增强单层和多细胞球培养细胞对 5-FU 的敏感性,特别是能更大程度地增强多细胞球体培养细胞的敏感性,并使之与单层细胞的敏感性相近,且与之无显著性差异,说明抑制 FAK 表达对结肠癌细胞不仅具有化疗增敏作用,而且能很好地逆转其 MCR。同时,本研究采用流式细胞术检测抑制 FAK 表达对 MCSs 细胞凋亡的影响,结果发现,抑制 FAK 表达不仅能促进 MCSs 细胞因药物诱导而产生的凋亡,而且能促进其自然凋亡,说明抑制 FAK 表达的化疗增敏作用机制之一是通过促进肿瘤细胞凋亡而实现的。

生存信号通路 PI3K/Akt/NF-κB 的异常活化可以使肿瘤细胞逃避凋亡,促进肿瘤发生。FAK 的活性导致 MAPK 级联和 PKB/Akt/NF-κB 通路的激活[15]。FAK 可诱导 PI3K/Akt 抗凋亡途径[16]。我们研究发现,在结直肠癌组织中,具有抗凋亡作用的 FAK、Akt、NF-κB 均高表达,且 Akt、NF-κB 表达与 FAK 表达有显著正相关性[5]。本研究发现,抑制 FAK 表达后的单层和 MCSs 细胞中 NF-κB、Akt 的表达均显著下调,说明 Akt、NF-κB 可能是 FAK 的下游分子,通过 FAK/Akt/NF-κB 信号参与 FAK 介导的生存信号通路,与 FAK 共同发挥了抑制肿瘤细胞凋亡的作用。同时,我们还发现,抑制 FAK 表达后单层和 MCSs 细胞中 Bcl-2 水平降低,而 Caspase-3 水平升高,说明抑制 FAK 表达促进凋亡的机制可能是通过抑制 Bcl-2,激活了凋亡执行分子 Caspase-3 酶的活性,从而促进细胞凋亡,增加细胞对药物的敏感性,逆转多细胞耐药。

总之,抑制 FAK 表达能增强结肠癌 MCSs 细胞对 5-FU 的敏感性,逆转其 MCR,其分子机制是通过 FAK/Akt/NF-κB 信号通路,下调 Akt、NF-κB、Bcl-2 的水平,激活 Caspase-3 的活性,促进细胞凋亡而实现的。上述结果共同显示,FAK 是结肠癌治疗的一个重要靶点,而抑制 FAK 功能可能是更加接近结肠癌本质的基因治疗策略。

参考文献:

[1] Madan R, Smolkin M B, Cocker R, *et al*. Focal adhesion proteins as markers of malignant transformation and prognostic indicators in breast carcinoma[J]. Hum Pathol, 2006, 37(1):9-15.

[2] Aponte M, Jiang W, Lakkis M, *et al*. Activation of platelet-activating factor receptor and pleiotropic effects on tyrosine phospho-EGFR/Src/FAK/paxillin in ovarian cancer[J]. Cancer Res, 2008, 68(14):5839-5848.

[3] Carelli S, Zadra G, Vaira V, *et al*. Up-regulation of focal adhesion kinase in non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2006, 53(3):263-271.

[4] Beierle E A, Massoll N A, Hartwich J, *et al*. Focal adhesion kinase expression in human neuroblastoma: immunohistochemical and real-time PCR analyses[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(11):3299-3305.

[5] 陈玉英, 陈克力, 潘凤, 等. 结直肠癌中 FAK、FAKpY397、Akt、NF-κB 表达及相关性研究[J]. 临床肿瘤学杂志, 2009, 14(3):199-202.

[6] Kaneda T, Sonoda Y, Ando K, *et al*. Mutation of Y925F in focal adhesion kinase (FAK) suppresses melanoma cell proliferation and metastasis[J]. Cancer Lett, 2008, 270(2):354-361.

[7] Lim S T, Chen X L, Lim Y, *et al*. Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation[J]. Mol Cell, 2008, 29(1):9-22.

[8] Canel M, Secades P, Garzon-Arango M, *et al*. Involvement of focal adhesion kinase in cellular invasion of head and neck squamous cell carcinomas *via* regulation of MMP-2 expression[J]. Br J Cancer, 2008, 98(7):1274-1284.

[9] Mian M F, Kang C, Lee S, *et al*. Cleavage of focal adhesion kinase is an early marker and modulator of oxidative stress-induced apoptosis[J]. Chem Biol Interact, 2008, 171(1):57-66.

[10] Kasahara T, Koguchi E, Funakoshi M, *et al*. Antiapoptotic action of focal adhesion kinase (FAK) against ionizing radiation[J]. Antioxid Redox Signal, 2002, 4(3):491-499.

[11] Casanova I, Bosch R, Lasa A, *et al*. A celecoxib derivative inhibits focal adhesion signaling and induces caspase-8-dependent apoptosis in human acute myeloid leukemia cells[J]. Int J Cancer, 2008, 123(1):217-226.

[12] Tsutsumi K, Kasaoka T, Park H M, *et al*. Tumor growth inhibition by synthetic and expressed siRNA targeting focal adhesion kinase[J]. Int J Oncol, 2008, 33(1):215-224.

[13] 陈玉英, 向浏欣, 杨黎, 等. FAK 靶向 RNAi 重组体的构建及其抗多细胞球体形成效应[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(17):1633-1636.

[14] Orlandi P, Barbara C, Bocci G, *et al*. Idarubicin and idarubicinol effects on breast cancer multicellular spheroids[J]. J Chemother, 2005, 17(6):663-667.

[15] Liu Z, Zhang H M, Yuan J, *et al*. Focal adhesion kinase mediates the interferon-gamma-inducible GTPase-induced phosphatidylinositol 3-kinase/Akt survival pathway and further initiates a positive feedback loop of NF-kappaB activation[J]. Cell Microbiol, 2008, 10(9):1787-1800.

[16] 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.

(收稿 2010-01-27 修回 2010-03-23)
(编辑 汪勤俭)