文章编号:1000-5404(2011)18-1947-04

论著

# 特异性 ILK siRNA 对膀胱癌移植瘤生长及 p-Akt、p-GSK3β 表达的影响

高 娟,朱 军,潘湘阳,李红彦,陈俊霞 (400016 重庆,重庆医科大学细胞生物学与遗传学教研室,重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心)

[摘要] **目的** 探讨应用整合素连接激酶(integrin-linked kinase, ILK)特异 siRNA 沉默 ILK 基因的表达对膀胱癌裸鼠移植瘤生长及p-Akt、p-GSK3β 表达的影响。**方法** 实验分3组:BIU-87 细胞组(正常 BIU-87 细胞)、BIU-87-NC 组(转染阴性对照质粒的 BIU-87 细胞)、BIU-87 siRNA(转染干扰质粒的 BIU-87 细胞)。将 ILK 特异性 siRNA 转染人膀胱癌 BIU-87 细胞,筛选稳定表达 ILK siRNA 的 BIU-87 细胞,将其注入裸鼠皮下,检测裸鼠移植瘤的大小和质量,HE 染色观察移植瘤组织的形态学变化,利用免疫组化技术检测移植瘤组织中微血管的变化及 p-Akt 和 p-GSK3β 的表达。**结果** BIU-87 siRNA 组较 BIU-87 与 BIU-87-NC 组,瘤体质量显著降低($P<0.01$),抑瘤率分别为 64.73% 和 66.73%。BIU-87 siRNA 组癌细胞较 BIU-87 与 BIU-87-NC 组体积减小,核浆比例明显缩小,细胞核染色较浅,核分裂相显著减少,BIU-87 siRNA 组微血管较 BIU-87 与 BIU-87-NC 组明显减少甚至无血管出现,BIU-87 siRNA 组 p-Akt 和 p-GSK3β 的表达呈弱阳性反应。**结论** 特异性 ILK siRNA 能抑制膀胱癌裸鼠移植瘤的生长,并通过降低 p-Akt 和 p-GSK3β 的表达抑制膀胱癌裸鼠移植瘤的增殖。

[关键词] 整合素连接激酶;膀胱癌;移植瘤; 生长
[中图法分类号] R73-362;R730.23;R737.14 [文献标志码] A

# Effect of specific integrin-linked kinase siRNA on growth of transplanted bladder cancer and expression of p-Akt and p-GSK3β

Gao Juan, Zhu Jun, Pan Xiangyang, Li Hongyan, Chen Junxia (Department of Cell Biology and Genetics, Center of Molecule Medicine and Tumor, Chongqing Medical University, Chongqing ,400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of specific integrin-linked kinase (ILK) siRNA on expression of p-Akt and p-GSK3β and growth of transplanted bladder cancer tumor xenografts. **Methods** Specific ILK siRNA was transfected into human bladder cancer BIU-87 cells. BIU-87 cells stably expressing ILK siRNA were selected and subcutaneously injected into nude mice. Size and weight of the transplanted bladder tumor in nude mice were measured. Morphology of tumor tissue was observed with H&E staining. Change of micro-blood vessels in tumor tissue and expression of p-Akt and p-GSK3β were detected by immunohistochemistry. **Results** The weight of tumor was significantly lighter in mice with BIU-87 siRNA than in those with normal and negative control BIU-87 cells ($P<0.01$) with a tumor inhibitory rate of 64.73% and 66.73%, respectively. The volume of cancer cells, the ratio of nuclear plasma, the staining of nuclei, and karyokinesis were significantly less in mice with BIU-87 siRNA than in those with normal and negative control BIU-87 cells. Less micro-blood vessels were observed in mice with BIU-87 siRNA than in those with normal and negative control BIU-87 cells or no blood vessels were found in mice with BIU-87 siRNA. The p-Akt and p-GSK3β were weakly expressed in mice with BIU-87 siRNA. **Conclusion** Specific ILK siRNA can inhibit the growth of transplanted bladder cancer in nude mice by decreasing the expression of p-Akt and p-GSK3β.

[**Key words**] integrin-linked kinase; bladder cancer; transplanted tumor; growth

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81071719) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5273). Corresponding author: Chen Junxia, Tel: 86-23-68485806, E-mail: chjunxia@126.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81071719);重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5273)
[通信作者] 陈俊霞,电话(023)68485806,E-mail: chjunxia@126.com

膀胱癌是泌尿系统中发病率最高的肿瘤,约占所有恶性肿瘤的20%。探明膀胱癌生长、增殖的关键靶基因和分子为其安全有效地诊断、治疗,提高患者的生存率和生活质量具有重要的意义[1]。整合素连接激酶(intergrin-linked kinase, ILK)是一个59×10³的细胞内信号蛋白,它在胞内的两个靶向催化位点是蛋白激酶B和糖原合成酶激酶-3。ILK协调细胞外基质和生长因子的信号转导,调控细胞的生长、分化、黏附、迁移、侵袭[2]及组织的纤维化等[3]。研究显示,ILK与结肠癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、神经胶质瘤等的发生、分化及侵袭转移密切相关[4]。RNA干扰(RNA interference,RNAi)技术有很强的转录后基因沉默效果,能特异高效地抑制靶基因的表达,已经广泛用于基因治疗研究[5]。本课题应用RNA干扰技术沉默ILK基因,利用特异性ILK siRNA表达质粒,筛选稳定转染的膀胱癌BIU-87细胞,将其皮下注射到BALB/c裸鼠,研究特异性ILK siRNA表达质粒对膀胱癌移植瘤生长及p-Akt、p-GSK3表达的影响,并进一步探讨ILK、p-Akt,p-GSK3参与肿瘤生长的可能作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

ILK siRNA表达质粒、BIU-87细胞为本实验室保存。雄性BALB/c裸鼠,24只,4~6周龄,体质量(20±3)g,SPF级,购自北京大学实验动物中心。鼠抗人ILK抗体购自Santa Cruz公司,兔抗人CD31、p-Akt、p-GSK3β抗体购自Bioworld公司,Fluorescein标记山羊抗兔IgG、S-P免疫组化染色试剂盒、DAB染色试剂盒均购自北京中杉公司,其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 BIU-87细胞培养及干扰质粒转染 BIU-87细胞用含10%胎牛血清的RPMI1640培养基37 ℃、5% $CO_2$常规培养。取对数生长期的细胞按2×10⁵/孔接种至6孔板,待细胞生长至融合度80%左右时,采用脂质体Lipofeetamine 2000转染细胞,转染48 h。2.0 mg/ml G418筛选2周,更换1.0 mg/ml G418的培养基维持培养2、4周后获得稳定表达细胞株。实验分为BIU-87细胞组(正常BIU-87细胞)、BIU-87-NC组(转染阴性对照质粒的BIU-87细胞)、BIU-87 siRNA(转染干扰质粒的BIU-87细胞)。

1.2.2 裸鼠移植瘤模型 胰酶消化对数生长期的各组细胞,PBS洗涤3次,制备成0.2 ml含有2×10⁶细胞的悬液。24只裸鼠按随机数字表法分成3组,分别将上述细胞悬液接种至裸鼠背部皮下,观察各组细胞在裸鼠体内的成瘤率、肿瘤大小及生长速度,30 d后处死裸鼠,称取肿瘤质量并计算抑瘤率。

抑瘤率=[1-平均瘤质量(BIU-87 siRNA组或BIU-87-NC组)]/平均瘤质量(BIU-87组)×100%

1.2.3 HE染色 10%甲醛溶液固定肿瘤组织,5 μm厚石蜡切片,二甲苯脱蜡,二甲苯和纯酒精(1∶1)混合液中浸泡5 min,经梯度酒精浸泡各5 min,苏木精染色2~5 min,1%盐酸酒精分色数秒,流水冲洗,蒸馏水清洗3次,伊红染色2~5 min,梯度酒精脱水。二甲苯透明2次,中性树胶封片,显微镜下观察并拍照。

1.2.4 免疫组织化学分析 10%甲醛溶液固定肿瘤组织,5 μm厚石蜡切片,常规脱蜡,置TBS液微波修复20 min后自然冷却,3% $H_2O_2$消除内源性过氧化物酶10 min,正常山羊血清室温孵育20 min;分别滴加兔抗人CD31、p-Akt、p-GSK3β抗体(1∶300)4 ℃过夜,生物素标记的二抗37 ℃孵育20 min,辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素工作液37 ℃孵育20 min,DAB显色3~10 min,流水冲洗,苏木精复染2 min,梯度乙醇脱水,常规封片,显微镜下观察并拍照。

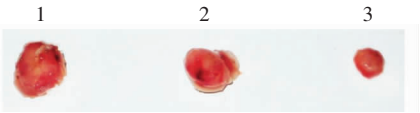
### 1.3 统计学分析

应用SPSS 18.0统计软件,数据以$\bar{x}\pm s$表示,多组数据的比较采用一维方差分析。

## 2 结果

### 2.1 ILK siRNA对BIU-87裸鼠移植瘤生长的影响

3组细胞均于接种后3 d开始成瘤,30 d后处死裸鼠,取出瘤体并称质量。BIU-87 siRNA组[(0.050±0.005)g]较BIU-87组[(0.141±0.022)g]与BIU-87-NC组[(0.150±0.012)g],瘤体质量显著降低($P<0.01$),抑瘤率分别为64.73%和66.73%。BIU-87组与BIU-87-NC组相比,瘤体质量无显著性差异($P>0.05$)。见图1。




1:BIU-87组;2:BIU-87-NC组;3:BIU-87 siRNA组

**图1 3组裸鼠移植瘤大体观察**

### 2.2 肿瘤组织病理观察

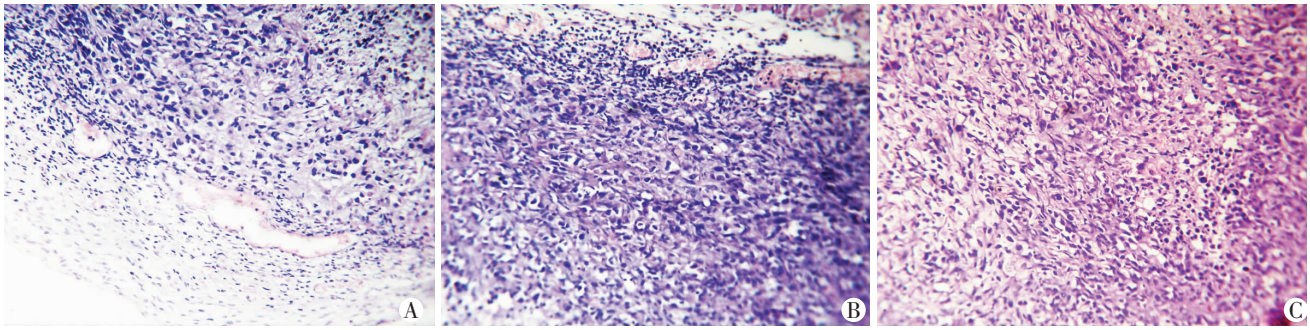
HE染色显示BIU-87、BIU-87-NC组癌细胞体积大且大小不均,核质比例大,细胞核深染,核分裂相多见;而BIU-87 siRNA组癌细胞较前2组体积减小,核浆比例明显缩小,细胞核染色较浅,核分裂相显著减少。见图2。

### 2.3 免疫组化检测ILK siRNA对裸鼠移植瘤微血管的影响

BIU-87、BIU-87-NC组CD31阳性细胞(棕黄色染色)多见并有密集分布,BIU-87 siRNA组微血管较前2组明显减少甚至无血管出现(图3)。

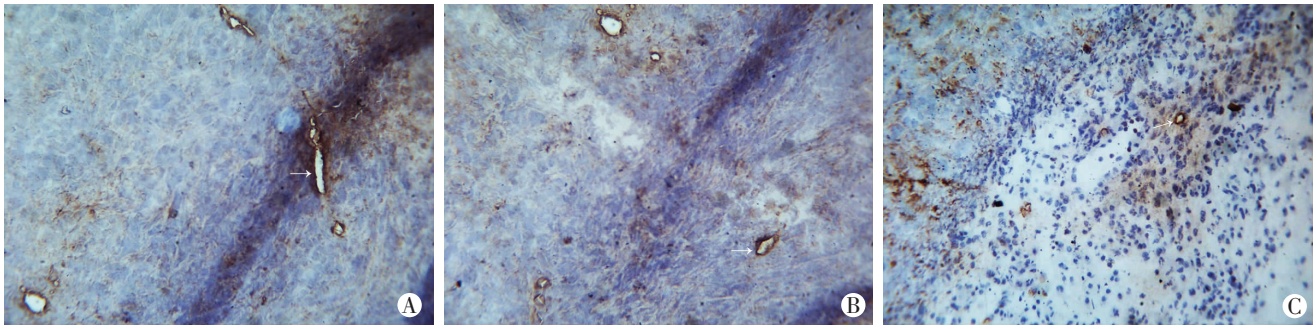
### 2.4 免疫组化检测p-Akt和p-GSK3β蛋白的表达

p-Akt和p-GSK3β蛋白均位于细胞质,BIU-87和BIU-87-NC组均呈强阳性反应,BIU-87 siRNA组呈弱阳性反应(图4)。表明ILK siRNA可以在裸鼠移植瘤组织中抑制p-Akt和p-GSK3β蛋白的表达。




A:BIU-87 组;B:BIU-87-NC 组;C:BIU-87 siRNA 组

**图 2 HE 染色观察 ILK siRNA 对裸鼠移植瘤组织形态的影响** (×200)




↑:移植瘤微血管;A:BIU-87 组;B:BIU-87-NC 组;C:BIU-87 siRNA 组

**图 3 免疫组化检测 ILK siRNA 对裸鼠移植瘤微血管的影响** (S-P ×200)

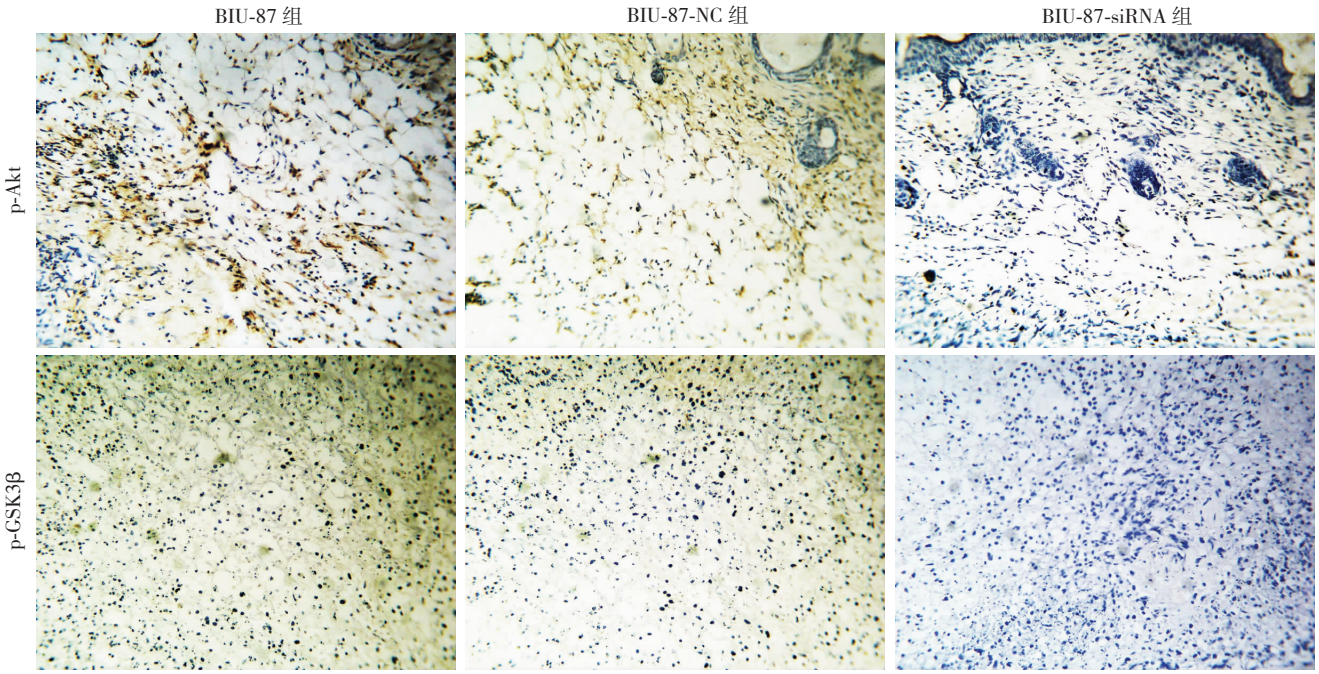



**图 4 免疫组化检测肿瘤组织中 p-Akt 和 p-GSK3β 蛋白的表达** (S-P ×200)

## 3 讨论

整合素连接激酶(ILK)是一种多功能的细胞内信号蛋白,能协调细胞外基质和生长因子的信号转导,调控细胞的生长、增殖、分化、黏附、迁移、侵袭和血管生成[4,6]。在一些肿瘤中,ILK 的表达和活性均有增高。激活的 ILK 可以通过调控许多信号通路来调节细胞增殖及存活[7-8]。实验证实,ILK 在正常组织中表达有限,但在人类神经源性肿瘤、胃癌、前列腺癌、卵巢肿瘤、黑色素瘤、结肠癌、肺癌中,ILK 表达明显增高且表

达量与肿瘤的恶性程度及转移显著相关[9]，并且在乳腺癌细胞、黑色素瘤和急性髓细胞性白血病干细胞中，运用ILK siRNA或小分子抑制剂可以抑制其增殖并诱导其凋亡[2,10-11]。

膀胱癌是泌尿系统中最常见的恶性肿瘤之一。前期研究显示特异性ILK siRNA可以抑制人非侵袭性膀胱癌BIU-87细胞的增殖并诱导其凋亡，还可以通过改变细胞特性，引起迁移侵袭能力的不降[12]。本实验在体内通过siRNA沉默ILK基因的表达，观察对膀胱肿瘤生长的影响。结果表明，BIU-87 siRNA组移植瘤生长较对照组明显减慢，肿瘤抑制率为64.73%和66.73%，BIU-87 siRNA组较对照组瘤体积减小，HE染色可见BIU-87 siRNA组癌细胞体积明显减小，核浆比例明显缩小，细胞核染色较浅，核分裂相显著减少，微血管密度降低。血管生成是肿瘤生长和转移所必需的，且细胞增殖和血管密度与肿瘤的生长密切相关，实体瘤的生长依靠血管生成的诱导来提供充足的氧气和营养物质，以促进细胞增殖和避免坏死[13]。本研究证实ILK siRNA能明显降低ILK基因及其蛋白的表达，引起肿瘤细胞增殖抑制和血管生成减少，从而抑制膀胱癌裸鼠移植瘤的生长。ILK能磷酸化PKB/Akt，从而激活PKB传导通路，抑制上皮细胞的凋亡。研究表明，p-Akt在肺癌等大多数肿瘤组织中都有高表达[14]。ILK同时能使其下游的关键靶点GSK-3磷酸化，从而对其产生抑制作用，促使细胞由$G_1$期向S期过渡[15]。本研究通过沉默ILK基因的表达，免疫组化法检测膀胱癌裸鼠移植瘤组织中p-Akt和p-GSK3β蛋白的表达，结果表明BIU-87 siRNA组p-Akt和p-GSK3β蛋白的表达较对照组明显降低，证实ILK siRNA可能通过降低p-Akt和p-GSK3β的表达来抑制肿瘤细胞增殖，从而抑制膀胱癌裸鼠移植瘤的生长。进一步提示ILK在膀胱癌进展中起重要的促进作用，p-Akt和p-GSK3β可能是ILK的下游靶分子，其具体作用机制还有待进一步研究。

## 参考文献：


[1] Hadaschik B A, Zhang K, So A I, *et al*. Oncolytic vesicular stomatitis viruses are potent agents for intravesical treatment of high-risk bladder cancer[J]. Cancer Res, 2008, 68 (12): 4506-4510.

[2] Wong R P, Ng P, Dedhar S, *et al*. The role of integrin-linked kinase in melanoma cell migration, invasion, and tumor growth [J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6 (6): 1692-1700.

[3] 陈秋，张璟，敖绪军. 整合数连接激酶在骨间质纤维化组织中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报，2005，27(22)：2262-2265.

[4] D'Abaco G M, Kaye A H. Integrin-linked kinase: a potential therapeutic target for the treatment of glioma[J]. J Clin Neurosci, 2008, 15 (10): 1079-1084.

[5] 程洪林，吴小候，罗春丽，等. 沉默PLCε基因对人膀胱癌裸鼠移植瘤中Bcl-2及Bax蛋白表达水平的影响[J]. 肿瘤，2010，30(5)：376-380.

[6] McDonald P C, Oloumi A, Mills J, *et al*. Rictor and integrin-linked kinase interact and regulate Akt phosphorylation and cancer cell survival [J]. Cancer Res, 2008, 68(6): 1618-1624.

[7] Yu J, Shi R, Zhang D, *et al*. Expression of integrin-linked kinase in lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma: correlation with E-cadherin expression, tumor microvessel density and clinical outcome [J]. Virchows Arch, 2011, 458(1): 99-107.

[8] Troussard A A, McDonald P C, Wederell E D, *et al*. Preferential dependence of breast cancer cells versus normal cells on integrin-linked kinase for protein kinase B/Akt activation and cell survival[J]. Cancer Res, 2006, 66(1): 393-403.

[9] 刘伟，宋少伟，马刚，等. 整合素连接激酶在胰腺癌中的表达及意义[J]. 中华胰腺病杂志，2010，10(1)：31-33.

[10] Wong R P, Ng P, Dedhar S, *et al*. The role of integrin-linked kinase in melanoma cell migration, invasion, and tumor growth [J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(6): 1692-1700.

[11] El-Touny L H, Banerjee P P. Akt GSK-3 pathway as a target in genistein-induced inhibition of TRAMP prostate cancer progression toward a poorly differentiated phenotype [J]. Carcinogenesis, 2007, 28(8): 1710-1717.

[12] 朱军，高娟，李红彦，等. 特异性ILK-siRNA对膀胱癌EJ细胞侵袭和迁移的影响[J]. 第三军医大学学报，2011，33(4)：360-364.

[13] Muramatsu M, Yamamoto S, Osawa T, *et al*. Vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling promotes mobilization of macrophage lineage cells from bone marrow and stimulates solid tumor growth[J]. Cancer Res, 2010, 70(20): 8211-8221.

[14] 刘红，张茂林，王静，等. 肺癌组织中Ak-12、p-AKt蛋白的表达[J]. 郑州大学学报:医学版，2007，42(4)：674-676.

[15] Persad S, Dedhar S. The role of integrin-linked kinase (ILK) in cancer progression [J]. Cancer Metastasis Rev, 2003, 22 (4): 375-384.


（收稿：2011-04-24；修回：2011-05-13）

（编辑　汪勤俭）