论著

文章编号:1000-5404(2014)19-1996-05

沉默整合素连接激酶基因对TCA8113舌癌细胞移植瘤生长的影响

幸 宇[1,2],齐 进[3],邓世雄[1],陈俊霞[2] (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院:法医生物信息学研究室[1],细胞生物学及遗传学教研室,分子医学与肿瘤研究中心[2];400015 重庆,重庆医科大学附属口腔医院牙体牙髓科[3])

[摘要] **目的** 研究沉默TCA8113舌癌细胞整合素连接激酶(integrin-linked kinase,ILK)基因的表达,对其下游底物Akt和GSK3β磷酸化状态及对移植瘤生长和自发性转移的影响。**方法** 通过Lipofectamine 2000介导将特异性siILK表达载体和无同源性的对照载体,稳定转染人舌鳞癌TCA8113细胞,分为TCA8113组、TCA8113 vector组和TCA8113 siILK组,将3组细胞分别注入裸鼠皮下构建移植瘤模型,5周后检测瘤质量,对裸鼠肺及瘤组织形态学行常规病理学检查,使用免疫荧光技术检测体外和体内癌细胞p-Akt和p-GSK3β等的表达,并观察瘤组织内血管生成情况。**结果** TCA8113组、TCA8113 vector组肺组织均发生自发性转移瘤,TCA8113 siILK组肺组织未发现自发性转移瘤;TCA8113 siILK组移植瘤细胞形态较其他2组体积减小,核分裂象较少,核浆比例缩小;TCA8113 siILK组在体内和体外实验中的p-Akt和p-GSK3β表达较其他2组均明显下降($P<0.05$);TCA8113 siILK组移植瘤质量较其他2组显著降低($P<0.05$),抑瘤率分别为84%和92%;TCA8113 siILK组移植瘤血管生成较其他2组也明显减少($P<0.05$)。**结论** 沉默TCA8113舌癌细胞ILK表达可抑制其下游信号传导分子Akt和GSK3β的磷酸化,并抑制移植瘤血管生成,从而抑制移植瘤的生长。

[关键词] 整合素连接激酶;人舌鳞癌细胞;移植瘤生长;微血管

[中图法分类号] R394.3; R730.23; R739.86 [文献标志码] A

Effect of integrin-linked kinase silencing on xenograft tumor growth of human tongue cancer cell line TCA8113 in nude mice

Xing Yu[1,2], Qi Jin[3], Deng Shixiong[1], Chen Junxia[2] ([1]Laboratory of Forensic Medicine and Biomedical Information, [2]Department of Cell Biology and Genetics, Molecular Medicine and Cancer Research Center, Collage of Basic Medical Science, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [3]Department of Endodonitics, the Stomatological Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects of silencing integrin-linked kinase (ILK) in human tongue cancer TCA8113 cells on the expression of its downstream signal molecules p-Akt and p-GSK3β and on the growth and spontaneous metastasis of tumor xenografts. **Methods** Target cells were constructed by transfecting specific siILK plasmid and a non-homologous vector negative control into TCA8113 cells, TCA8113 vector and TCA8113 siILK cells, respectively. Three groups were injected separately into nude mice subcutaneously to construct xenograft tumor model. Nude mice were sacrificed in 5 weeks later. Weight of the xenograft tumors was measured in these nude mice. Tumors and lungs underwent routine pathological examination. Changes in the expression of p-Akt, p-GSK3β and micro-blood vessels in tumor tissue were detected by immunofluorescence assay and laser scanning confocal microscopy. **Results** Spontaneous lung metastasis tumors were found both in TCA8113 and TCA8113 vector group, while there was no such finding in the lungs of TCA8113 siILK group. Xenograft tumor cells in TCA8113 siILK group were smaller and had less mitotic figures and karyoplasmic scale compared to the other 2 groups. The expression of p-Akt and p-GSK3β *in vitro* and *in vivo* were obviously inhibited in TCA8113 siILK group compared with the other groups ($P<0.05$). The mean tumor mass was obviously smaller in TCA8113 siILK group than the TCA8113 and TCA8113 vector groups with a tumor inhibitory rate of 84% and 92%, respectively ($P<0.05$). Micro-blood vessel formation

[基金项目] 国家自然科学基金(81172424);重庆医科大学基础医学院院办课题(0800280016)

[通信作者] 陈俊霞,E-mail:chjunxia@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130619.1518.009.html(2013-06-19)

was also reduced in TCA8113 siILK group compared to the other groups ($P<0.05$). **Conclusion** Silencing ILK inhibits the growth of TCA8113 human tongue cancer tumor xenograft through inhibiting the expressions of p-Akt and p-GSK3β as well as blood vessel formation.

[**Key words**] integrin-linked kinase; human tongue squamous cancer cells; xenograft tumor growth; micro-blood vessel

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81172424) and the Project of College of Basic Medical Sciences of Chongqing Medical University (0800280016). Corresponding author: Chen Junxia, E-mail: chjunxia@126.com

整合素连接激酶(integrin-linked kinase,ILK)是一种细胞内信号蛋白,结构相当保守,相对分子质量5.9×10^4。ILK通过激活一系列的信号转导通路,介导细胞应答反应,并起到关键性作用[1-2]。ILK除参与细胞存活、分化、生长和细胞周期等外,还与肿瘤的血管生成、瘤细胞粘着、侵袭和迁移、细胞运动与收缩等过程密切相关[3-5]。

舌癌是最为常见的口腔恶性肿瘤,男性多于女性,多数为鳞状细胞癌,近年来舌癌的发病率不断增长,并呈现年轻化趋势,且预防效果及早期确诊差,愈后差,易转移,5年生存率仅50%左右[6-7]。TCA8113人舌鳞状癌细胞在早期即具有恶性形态[8],前期我们报道了抑制ILK表达对TCA8113舌癌细胞在体外的增殖、转移和侵袭等方面可以产生抑制作用[9]。在此基础上,我们建立裸鼠TCA8113舌癌细胞移植瘤模型,进一步研究ILK沉默后,对其下游信号转导分子Akt、GSK3β及其磷酸化状态,以及对移植瘤生长、病理形态、微血管形成情况等方面的影响,并探讨其可能参与肿瘤细胞生长的机制,以期为舌癌的治疗寻找新手段和思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及实验动物 TCA8113人舌鳞癌细胞购自武汉博士德生物工程有限公司。SPF级BALB/c裸鼠(24只)购自北京大学实验动物中心,4~6周龄,雌雄不限,体质量(20±3)g。

1.1.2 质粒及试剂 ILK siRNA表达质粒为重庆医科大学细胞生物学及遗传学教研室构建及保存[10]。Lipofectamine 2000脂质体试剂购自Invitrogen公司,RPMI1640培养基及G418购自Gibco-BRL公司,胎牛血清购自HyClone公司,鼠抗人ILK单克隆抗体购自Santa Cruz公司,兔抗人CD31、p-Akt、Akt、p-GSK3β、GSK3β抗体购自Bioworld公司,FITC包被的羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、转染和筛选 细胞培养、转染和筛选方法见前期报道[9]。TCA8113细胞在37 ℃,5% CO_2饱和湿度孵育箱中,用含5%胎牛血清的RPMI1640培养基进行常规培养。接种对数生长期细胞2×10^5/孔至6孔板,当细胞生长达孔面积70%左右时,用脂质体Lipofectamine 2000将ILK siRNA表达质粒及阴性对照质粒分别转染细胞,同时以未转染细胞为正常组。48 h后加入G418 0.3 mg/mL维持2周,其后6周浓度减半培养,获得稳定表达质粒的细胞株,分别命名为TCA8113细胞组(未转染质粒的正常TCA8113细胞),TCA8113 vector细胞组(转染阴性对照质粒的TCA8113细胞),TCA8113 siILK细胞组(转染ILK siRNA质粒的TCA8113细胞)。

1.2.2 裸鼠移植瘤及自发转移模型 将3组细胞分别制备成浓度为2×10^7/mL的悬液。将裸鼠以随机数字表法分成3组,每组8只,分别将前述3组细胞悬液0.1 mL接种至裸鼠背部皮下,观察各组裸鼠的成瘤率、肿瘤体积,5周后处死裸鼠,称取肿瘤质量,并对裸鼠内脏器官进行常规病理学检查,并由2名工作8年以上的病理科医生分别复核认定。抑瘤率=(1-平均瘤质量$_{TCA8113\ siILK组}$/平均瘤质量$_{TCA8113组或TCA8113\ vector组}$)×100%。

1.2.3 移植瘤HE染色及CD31、p-Akt和p-GSK3β表达的免疫荧光检查 10%多聚甲醛溶液固定肿瘤组织及肺组织。常规脱水、石蜡包埋,制成5 μm厚组织切片,二甲苯和梯度酒精常规脱蜡到水,苏木精染色4 min,1%盐酸酒精分色15 s,流水冲洗,蒸馏水清洗3次,伊红染色5 min,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察并拍照。瘤组织切片于高倍镜下随机选取10个视野对微血管数目进行计数并取平均值。

瘤组织切片以PBS(含3% BSA)37 ℃封闭30 min,分别以CD31、p-Akt和p-GSK3β抗体(均按1∶100稀释)4℃孵育过夜,PBS清洗5 min×3次,FITC包被的羊抗兔二抗(1∶100稀释)于37 ℃避光孵育1 h,PBS清洗5 min×3次,50%甘油封片。激光共聚集显微镜(Leica TCS-SP2,德国)观察并拍照。

1.2.4 瘤细胞中Akt、p-Akt、GSK3β和p-GSK3β表达的免疫荧光检查 接种各组细胞于预先放置盖玻片的6孔板内制作细胞爬片。待细胞生长为单层时(达孔面积70%~80%以上),80%冰丙酮固定10 min后进行免疫荧光检查,步骤同1.2.3,Akt、p-Akt、GSK3β和p-GSK3β抗体浓度均为1∶100。

1.2.5 Western blot检测ILK表达 常规提取细胞总蛋白,5%浓缩胶上样40 μg/孔,60V电泳,当蛋白质进入10% SDS-PAGE凝胶时改为100 V电泳1 h,常规湿法转膜,5%脱脂奶粉封闭1.5~2 h,ILK鼠单抗(1∶300稀释)4 ℃孵育12 h,HRP标记的羊抗鼠IgG(1∶1 000稀释)37 ℃孵育2 h,ECL化学发光显色,Bio-Rad凝胶成像仪观察照相,Quantity One图像分析。

1.3 统计学分析

应用SPSS 18.0统计软件,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,多组之间的比较采用方差分析。

2 结果

2.1 ILK siRNA 对移植瘤生长的影响

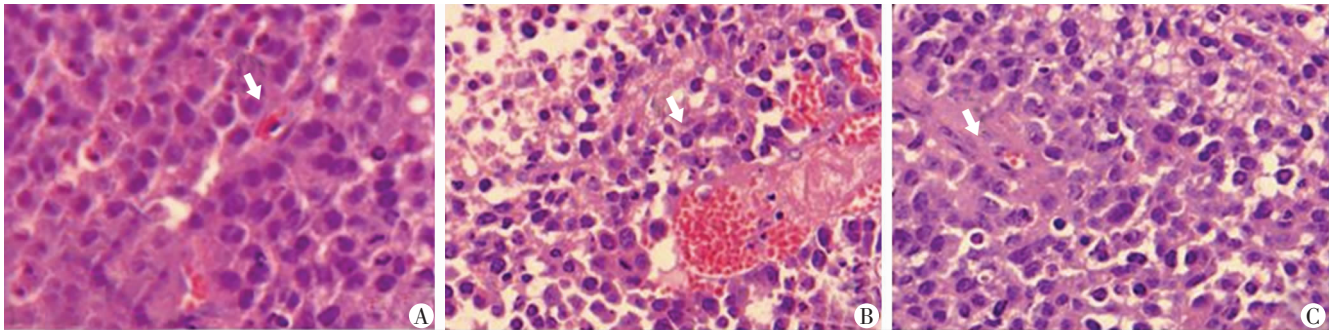
TCA8113 组和 TCA8113 vector 组裸鼠于接种后 3 d 开始成瘤，TCA8113 siILK 组于接种后 6 d 开始成瘤，3 只未成瘤。5 周后处死裸鼠，取出瘤体并称质量。TCA8113 siILK 组[(0.18 ± 0.04)g]较 TCA8113 组[(1.19 ± 0.91)g]与 TCA8113 vector 组[(2.38 ± 1.23)g]瘤体质量显著降低($P < 0.01$)，抑瘤率分别为 84% 和 92%。TCA8113 组与 TCA8113 vector 组相比，瘤体质量无统计学差异($P > 0.05$)。

2.2 移植瘤组织学观察及瘤体微血管的改变

光学显微镜下对瘤组织观察(图 1)，TCA8113 组和 TCA8113 vector 组移植瘤组织内可见坏死及出血灶，癌细胞体积大而不均匀，核分裂象较多，核浆比例增大，而 TCA8113 siILK 组癌细胞较前 2 组体积减小，核分裂象减少，核浆比例缩小。光学显微镜下对瘤组织 HE 切片观察，TCA8113 siILK 组瘤组织内微血管计数[(6.8 ± 1.0)/视野]较 TCA8113 组[(12.3 ± 1.5)/视野]和 TCA8113 vector 组[(14.3 ± 1.5)/视野]明显减少。免疫荧光检查(图 2)显示 TCA8113 siILK 组瘤组织内 CD31 阳性细胞明显较 TCA8113 组和 TCA8113 vector 组减少($P < 0.05$)，与 HE 染色结果一致。

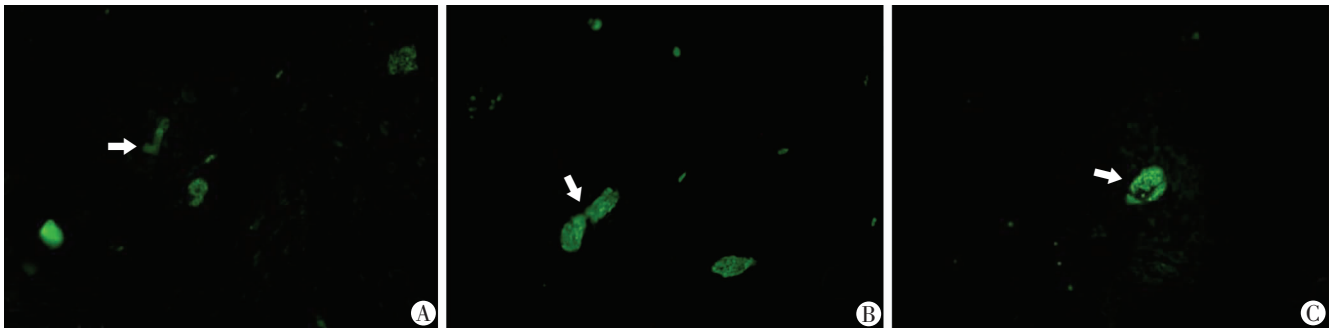
2.3 ILK siRNA 对移植瘤自发性转移影响

对裸鼠内脏器官的常规病理学检查发现，TCA8113 组和 TCA8113 vector 组裸鼠肺组织内均可见自发性转移瘤细胞巢生成，而 TCA8113 siILK 组裸鼠肺组织内未发现自发性转移瘤细胞巢，其余器官内未发现自发性转移瘤(图 3)。



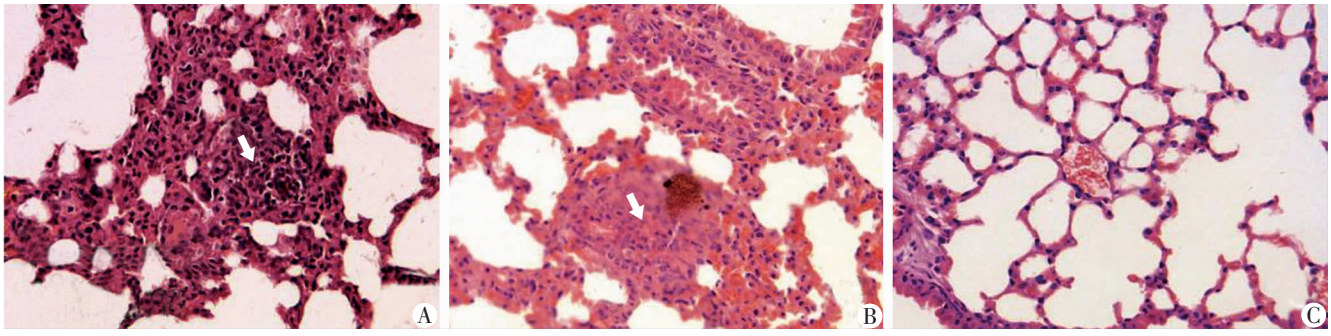
A：TCA8113 组；B：TCA8113 vector 组；C：TCA8113 siILK 组 ↑：示微血管

图 1 移植瘤组织学病理变化 (HE ×400)



A：TCA8113 组；B：TCA8113 vector 组；C：TCA8113 siILK 组 ↑：示 CD31 阳性细胞

图 2 免疫荧光观察移植瘤组织微血管变化 (×200)



A：TCA8113 组；B：TCA8113 vector 组；C：TCA8113 siILK 组 ↑：示转移瘤

图 3 肺内自发性转移瘤组织病理学变化 (HE ×100)

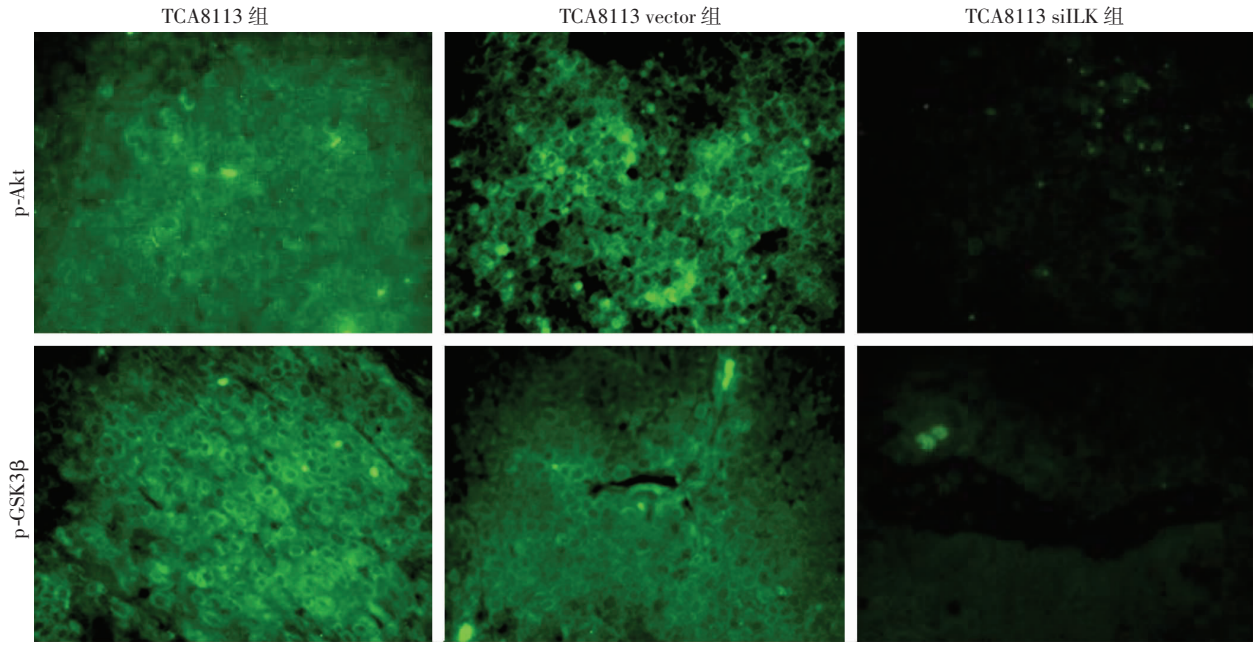


图 4　免疫荧光观察移植瘤 p-Akt 和 p-GSK3β 的表达　（×200）

2.4　ILK siRNA 对 TCA8113 移植瘤及细胞 Akt 和 GSK3β 表达的影响

移植瘤组织切片 TCA8113 siILK 组的 p-Akt 和 p-GSK3β 的荧光信号明显减弱（图 4）；体外实验结果与体内实验相似，TCA8113 siILK 组与 TCA8113 组和 TCA8113 vector 组的细胞相比，Akt 和 GSK3β 在细胞质中的荧光信号无明显改变，而 p-Akt 和 p-GSK3β 的荧光信号则明显减弱（图 5）；在体外和体内实验中，前述各指标在 TCA8113 组和 TCA8113 vector 组之间则无明显差异。提示沉默 ILK 基因后 p-Akt 和 p-GSK3β 表达下降。

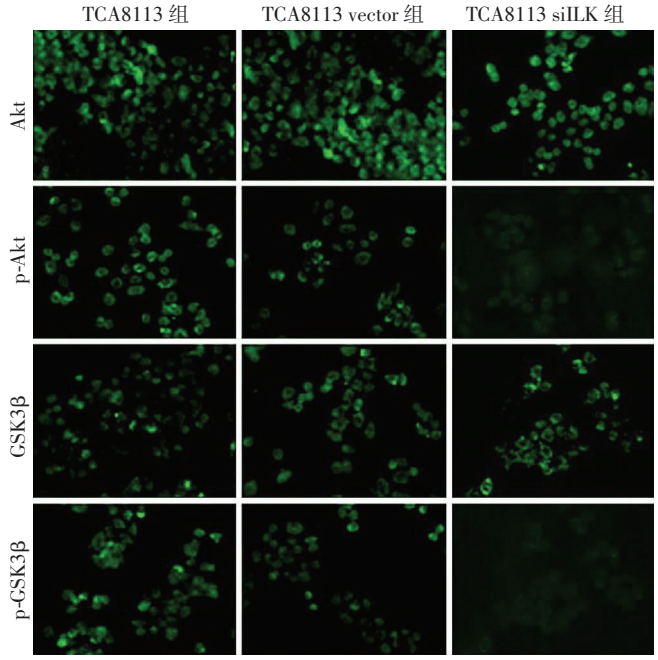
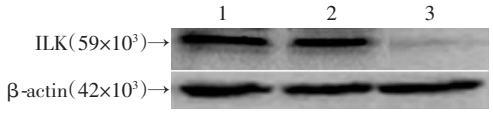


图 5　免疫荧光观察各组细胞 Akt、GSK3β、p-Akt 和 p-GSK3β 的表达　（×400）

2.5　Western blot 检测细胞 ILK 的表达

Western blot 检测结果显示，ILK 蛋白的表达水平 TCA8113 siILK 组分别为 TCA8113 组和 TCA8113 vector 组的 90% 和 89%，表达明显下降（$F=257.752$，$P<0.01$）；2 个对照组间表达水平相近，差异无统计学意义（$F=3.569$，$P>0.05$，图 6）。



1：TCA8113 组；2：TCA8113 vector 组；3：TCA8113 siILK 组

图 6　Western blot 检测细胞 ILK 蛋白的表达

3　讨论

在由整合素与细胞外基质（extracellular matrix，ECM）相互作用而引发细胞应答反应中，ILK 通过其丝氨酸/苏氨酸激酶活性来介导细胞内外的信号转导。除了参与某些基本的细胞生理过程外，ILK 还与多种肿瘤的发生和转移相关。近年来研究表明，ILK 的表达和活性在人类多种恶性肿瘤中均明显升高[11]。当 ILK 的活性受到抑制时，对诸如消化道肿瘤、乳腺癌和膀胱癌等肿瘤细胞的生长、迁移、侵袭和血管生成可产生抑制作用[12-13]。文献[14]报道认为 ILK 对肿瘤细胞的调控机制存在细胞特异性，而抑制 ILK 对口腔肿瘤的影响目前罕有报道。在前期研究[9]中我们发现，在体外实验中抑制 ILK 表达对 TCA8113 舌癌细胞的生长、细胞周期、迁移和侵袭能力产生抑制作用。本研

究旨在观察体内实验中抑制 ILK 表达后,TCA8113 舌癌细胞移植瘤的生物学特性和病理特征的改变情况。由于肿瘤的生长和转移必需依赖于血管的生成来提供充足的养分和氧气,本实验证实对 ILK 的表达抑制可对肿瘤细胞的生长及血管生成产生抑制作用。当 ILK 的表达受到抑制时,TCA8113 siILK 组移植瘤成瘤时间较 TCA8113 组和 TCA8113 vector 组延长,成瘤后瘤体质量也较之明显减少,病理学检查发现 TCA8113 siILK 组移植瘤细胞体积减小,核分裂象较少,核浆比例缩小;同时,肿瘤的血管生成也明显减少,且 TCA8113 siILK 组肿瘤的自发性转移受到明显抑制。

Akt 和 GSK3β 是 ILK 的直接下游底物,ILK 通过其磷酸化酶活性对 Akt 和 GSK3β 进行磷酸化,当抑制 ILK 活性时,Akt 和 GSK3β 的磷酸化也相应受到抑制,即 Akt 的活性被抑制而 GSK3β 的失活被阻止。研究认为 GSK3β 对维持细胞的"上皮化状态"有重要作用[15],由于 GSK3β 可被 ILK 和 Akt 磷酸化而失活,从而激活 Akt/GSK3β/Snail 通路,该通路的激活可介导上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)。研究证实抑制 ILK 活性对乳腺癌细胞的 EMT 现象起到了逆转作用[16]。本研究发现抑制 ILK 表达对 TCA8113 舌癌细胞的 Akt 和 GSK3β 表达没有明显的影响,但两者的磷酸化在体内和体外实验中均受到明显的抑制,进一步证实了前述发现,并提示 ILK 可能通过抑制 Akt 和 GSK3β 来影响 TCA8113 舌癌细胞移植瘤的生物学特性和病理特征。另外,由于 ILK 的下游信号通路十分复杂,本课题组将进一步检验抑制 ILK 对其他信号传导通路的影响,以期更详细和深入地阐明抑制 ILK 对舌癌细胞生长、侵袭、转移等方面的调控机制。

综上所述,本研究发现抑制 ILK 表达后,TCA8113 舌癌细胞中 Akt 和 GSK3β 的磷酸化在体内及体外实验中均被抑制,移植瘤的生长、血管生成和自发性转移受到明显抑制,进一步证实了前期研究的发现,提示 ILK 有望成为抗肿瘤治疗的靶基因。

参考文献:

[1] Qin J, Wu C. ILK: a pseudokinase in the center stage of cell-matrix adhesion and signaling[J]. Curr Opin Cell Biol, 2012, 24(5): 607-613.

[2] Wickstrom S A, Lange A, Montanez E, *et al*. The ILK/PINCH/parvin complex: the kinase is dead, long live the pseudokinase![J]. EMBO J, 2010, 29(2): 281-291.

[3] Zervas C G, Psarra E, Williams V, *et al*. A central multifunctional role of integrin-linked kinase at muscle attachment sites[J]. J Cell Sci, 2011, 124(Pt 8): 1316-1327.

[4] Xie J, Lu W, Gu R, *et al*. The impairment of ILK related angiogenesis involved in cardiac maladaptation after infarction[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e24115.

[5] Chan J, Ko F C, Yeung Y S, *et al*. Integrin-linked kinase overexpression and its oncogenic role in promoting tumorigenicity of hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One, 2011, 6(2): e16984.

[6] Bello I O, Soini Y, Salo T. Prognostic evaluation of oral tongue cancer: means, markers and perspectives (Ⅱ)[J]. Oral Oncol, 2010, 46(9): 636-643.

[7] 欧阳紫兰,邱丽华,王婷,等. 建立兔舌癌颈淋巴结转移模型的多普勒超声动态监测[J]. 重庆医科大学学报, 2013, 38(9): 1002-1005.

[8] 何荣根,徐秀祺,周晓健,等. 人舌鳞状细胞癌 Tca8113 细胞系的建立及其生物学特性[J]. 肿瘤, 1983, 3(3): 97-100.

[9] 幸宇,邓世雄,陈俊霞. 沉默整合素连接激酶基因抑制 TCA8113 舌癌细胞生长和侵袭[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(15): 1552-1557.

[10] 幸宇,邓世雄,陈俊霞. RNA 干扰整合素连接激酶基因表达对人舌鳞癌 Tb 细胞生长、迁移和侵袭能力的影响[J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(7): 916-922.

[11] Papanikolaou S, Bravou V, Gyftopoulos K, *et al*. ILK expression in human basal cell carcinoma correlates with epithelial-mesenchymal transition markers and tumour invasion[J]. Histopathology, 2010, 56(6): 799-809.

[12] Watzka S B, Posch F, Pass H I, *et al*. Detection of integrin-linked kinase in the serum of patients with malignant pleural mesothelioma[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2011, 142(2): 384-389.

[13] Kalra J, Warburton C, Fang K, *et al*. QLT0267, a small molecule inhibitor targeting integrin-linked kinase (ILK), and docetaxel can combine to produce synergistic interactions linked to enhanced cytotoxicity, reductions in p-AKT levels, altered F-actin architecture and improved treatment outcomes in an orthotopic breast cancer model[J]. Breast Cancer Res, 2009, 11(3): R25.

[14] Sakai T, Li S, Docheva D, *et al*. Integrin-linked kinase (ILK) is required for polarizing the epiblast, cell adhesion, and controlling actin accumulation[J]. Genes Dev, 2003, 17(7): 926-940.

[15] Doble B W, Woodgett J R. Role of glycogen synthase kinase-3 in cell fate and epithelial-mesenchymal transitions[J]. Cells Tissues Organs, 2007, 185(1/3): 73-84.

[16] Serrano I, McDonald P C, Lock F E, *et al*. Role of the integrin-linked kinase (ILK)/Rictor complex in TGFbeta-1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT)[J]. Oncogene, 2013, 32(1): 50-60.

(**收稿**:2014-03-17;**修回**:2014-04-14)

(编辑 张 维)