

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.20.001

RNAi 沉默 FAK 基因表达对人舌鳞癌细胞 CAL-27 凋亡和侵袭的影响^{*}

陈 凯,廖晓颖,吴妹娟,康成容,潘 宣[△]
(广东药科大学附属第一医院口腔科 510080)

[摘要] **目的** 应用 RNA 干扰技术将 FAK 基因表达沉默后,观察人舌鳞癌细胞株 CAL-27 凋亡和侵袭能力的变化。**方法** 使用 RNAi 技术构建 3 对 FAK siRNA 后,瞬时转染细胞。运用实时定量聚合酶链反应(qPCR)法检测 FAK mRNA 的表达情况,筛选出沉默效率最佳的 siRNA 用于后续实验。运用蛋白免疫印迹法(Western blot)法检测细胞 FAK 蛋白的表达情况,流式细胞仪观察细胞的凋亡情况,Transwell 侵袭实验观察细胞体外侵袭能力的变化。**结果** qPCR 实验结果显示转染 siRNA-1 组、siRNA-2 组、siRNA-3 组 FAK mRNA 表达水平明显低于阴性对照组和空白对照组($P<0.01$),其中以 siRNA-3 沉默效率最高;Western blot 结果显示转染组细胞 FAK 蛋白表达水平明显低于阴性对照组和空白对照组($P<0.05$);流式细胞仪检测结果显示转染组细胞凋亡率明显高于阴性对照组和空白对照组($P<0.01$);Transwell 法实验结果显示转染组细胞穿膜的数量明显低于阴性对照组和空白对照组($P<0.05$)。**结论** 沉默 FAK 基因表达可诱导舌鳞癌细胞 CAL-27 的凋亡,有效抑制其侵袭能力。

[关键词] 舌鳞癌细胞株;黏着斑激酶;RNA 干扰;凋亡;侵袭
[中图法分类号] R246.83 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)20-2645-04

Effects of FAK gene silencing by RNA interference on the apoptosis and invasion of human tongue squamous cell carcinoma cell lines CAL-27^{*}

CHEN Kai, LIAO Xiaoying, WU Meijuan, KANG Chengrong, PAN Xuan[△]

(Department of stomatology, the First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the impacts of FAK gene silencing on the invasion and apoptosis of human tongue squamous cell carcinoma cell lines CAL-27. **Methods** Three pairs of FAK siRNA were constructed by the siRNA interference technology, then transiently transfected cells. The expression of FAK mRNA was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR), selected the most efficient silencing siRNA for follow-up experiments. The expression of FAK protein was detected by Western blot the cell apoptosis was measured by using flow cytometry, the change of cell invasion ability was detected by using Transwell insert. **Results** The relative levels of FAK mRNA in the siRNA-1 group, the siRNA-2 group and the siRNA-3 group were lower than that in the negative control group and the blank control group ($P<0.01$). Among them, siRNA-3 was the most efficient. The relative level of FAK protein in the transfected group was lower than that in the negative control group and the blank control group ($P<0.05$). The apoptosis rate in the transfected group was higher, compared with the negative control group and the blank control group ($P<0.01$). Transwell insert invasion assay showed that the number of transmembrane cells in the transfected group was less than those in the negative control group and the blank control group ($P<0.05$). **Conclusion** FAK gene silencing can effectively induce the apoptosis and inhibit the invasion of human tongue squamous cell carcinoma cell lines CAL-27.

[Key words] tongue squamous cell carcinoma; focal adhesion kinase; RNA interference; apoptosis; invasion

舌鳞状细胞癌是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤之一,同时也是最常见的口腔癌。由于其恶性程度高,浸润性强,易发生转移,所以关于舌鳞癌的基础研究和临床治疗一直以来都是口腔颌面外科及头颈外科的研究重点。黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)是一种非受体型蛋白酪氨酸激酶,已有的研究

^{*} 基金项目:广东省科技发展专项基金项目(2016A020215154);广东省医学科研基金项目(C2015031);广东省省级科技计划项目(2016ZC0177)。 作者简介:陈凯(1982—),主治医师,硕士,主要从事口腔医学研究。 [△] 通信作者, E-mail: 603200275@qq.com。

表 1 设计的 FAK siRNA 序列

基因名称	正义链	反义链
siRNA-1	5'-GGGCAUCAUUCAGAAGAUATT-3'	5'-UAUCUUCUGAAUGAUGCCCTT-3'
siRNA-2	5'-GAACCUCGCAGUCAUUUAUTT-3'	5'-AUAAAUGACUGCGAGGUUCTT-3'
siRNA-3	5'-CAGGUGAAGAGCGAUUAUATT-3'	5'-UAUAAUCGCUCUUCACCUGTT-3'
siRNA-NC	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'	5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'

表 2 设计的引物序列

基因名称	上游	下游
FAK	5'-TGTGGGTAAACCAGATCCTGC-3'	5'-CTGAAGCTTGACACCTCGT-3'
GAPDH	5'-TCATGAAGTGTGACGTGGACATC-3'	5'-CAGGAGGAGCAATGATCTTGATCT-3'

表明 FAK 在多种肿瘤组织中均存在着表达的上调，而且在一定程度上，其表达水平与肿瘤的恶化程度密切相关^[1]。目前，有关 FAK 与舌鳞癌之间相关性的研究仍然较少，有必要进行更深入的研究。本实验采用 RNA 干扰(RNAi)技术研究 FAK 基因表达水平对人舌鳞癌细胞凋亡和侵袭等细胞生物学行为的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 舌鳞癌细胞株 CAL-27 来自中山大学附属孙逸仙纪念医院口腔科李劲松教授的惠赠。RNA 提取试剂盒购于美国 Tiangen 公司；Opti-MEM 购于美国 Gibco 公司；Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent 试剂盒购于美国 Life Technologies 公司；胎牛血清购于杭州四季青公司；GoScript 反转录系统购于美国 Promega 公司；实时定量聚合酶链反应(qPCR)试剂盒购于美国 Promega 公司；兔抗人 FAK 单克隆抗体购于英国 Abcam 公司；matrigel 基底胶购于美国 BD 公司；Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒购于南京凯基生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 FAK SsiRNA 的设计及合成 根据 GenBank 数据库提供的人 FAK 基因序列，遵从在线 siRNA 设计的相关原则，设计了 1 对 siRNA-NC 作为阴性对照序列和 3 对实验 siRNA 序列：siRNA-1、siRNA-2、siRNA-3(表 1)。所有序列经 BLAST 分析确定特异性后，由广州赛哲生物科技股份有限公司合成、纯化。

1.2.2 引物的设计及合成 设计 FAK 的引物及内参 GAPDH 引物各 1 对(表 2)，由广州赛哲生物科技股份有限公司合成。

1.2.3 细胞培养、转染及分组 复苏保存于液氮中的舌鳞癌细胞株，接种于 10%胎牛血清的 DMEM 细胞培养基后。待实验细胞贴壁后，胰蛋白酶消化，接种到六孔板，继续放于培养箱培养，待细胞密度生长到 65%左右时，即可开始进入转染阶段。所有细胞的转染步骤均严格遵从 Lipofectamine™2000 Transfection Reagent 试剂盒的说明书执行。转染时不含 P/S 的完全培养基换液，转染 4~8 h 后换成正常

培养基继续培养。实验分组设转染组、阴性对照组和空白对照组。使用 FAK siRNA 对转染组细胞进行转染；使用无意义序列(siRNA-NC)siRNA 对阴性对照组细胞进行转染；空白对照组细胞不转染任何 RNA。

1.2.4 qPCR 检测 FAK mRNA 的表达及 siRNA 筛选 (1)取对数生长期的细胞，PBS 洗涤，加入 TRIzol 试剂，细胞充分裂解后，加入氯仿，充分混匀，室温放置 5 min。离心后待溶液分层，吸取含 RNA 的上清液加入等体积的异丙醇混匀，室温放置 10 min。离心后弃上清，加入 75%乙醇洗涤沉淀，离心后用吸出剩余液体，干燥 2~3 min 后，溶解沉淀，确定所获取的 RNA 的纯度及浓度。(2)通过使用 GoScript 反转录系统试剂盒，进行反转录反应，从而获取 cDNA；根据 qPCR 试剂盒说明书，建立 qPCR 反应体系。(3)选择沉默效率最佳的 siRNA 用于后续实验。

1.2.5 Western blot 法检测 FAK 蛋白的表达 在细胞中加入 RIPA 裂解液，冰浴裂解后 6 000 r/min 离心 5 min，收集上清液。称取 100 mg 的 BSA 制备标准蛋白溶液，Bradford 法测定蛋白浓度。严格按照 Wes 12~230×10³ Rabbit Master kit 及 Wes 12~230×10³ Master kit with split Buffer 试剂盒说明书的步骤进行加样操作。一抗、二抗均孵育 30 min，使用 Proteinsimple Wes 仪器对样品进行检测，得出实验结果。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡情况 细胞接种于 6 孔板，第 2 天进行 siRNA 转染；转染后 6 h 换新鲜培养基，37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养；转染后 48 h 收集各孔内上清液，贴壁细胞胰酶消化后用相应的上清液重悬收集；离心，PBS 洗涤细胞，Binding Buffer 重悬细胞，加入 Annexin V-FITC 及碘化丙啶(PI)试剂，混匀，室温避光染色 5~15 min，1 h 内流式细胞仪检测结果。

1.2.7 Transwell 小室法检测细胞侵袭力 细胞经胰蛋白酶消化、离心后，重悬细胞，配制细胞悬液；预先在 Transwell 小室的上室上表面涂布已稀释的 matrigel 基底胶，冰上风干。将配置好的 100 μL 细胞悬

液加入上室,将含有 10% FBS 的 DMEM 培养液 500 μ L加入下室;在培养箱中放置 20 h 后,结晶紫色染色固定;清水冲洗,拭去上室上表面的细胞;倒置显微镜下观察、拍照和计数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行实验数据的统计学分析和处理。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 沉默 FAK 基因对 CAL-27 细胞 FAK mRNA 表达的影响 qPCR 检测空白对照组、阴性对照组及 siRNA-1 组、siRNA-2 组、siRNA-3 3 个转染组,FAK mRNA 相对表达水平分别为 $1.000\ 0\pm0.037\ 6$ 、 $1.097\ 4\pm0.022\ 0$ 、 $0.513\ 6\pm0.034\ 3$ 、 $0.328\ 6\pm0.016\ 2$ 、 $0.233\ 2\pm0.001\ 6$ 。3 个转染组中 FAK mRNA 的表达水平明显下降,低于空白对照组和阴性对照组,差异有统计学意义($F_{\text{siRNA-1}}=286.42, P_{\text{siRNA-1}}<0.01$; $F_{\text{siRNA-2}}=729.99, P_{\text{siRNA-2}}<0.01$; $F_{\text{siRNA-3}}=1\ 060.91, P_{\text{siRNA-3}}<0.01$),见图 1。其中,转染 siRNA-3 组的沉默效率最高。

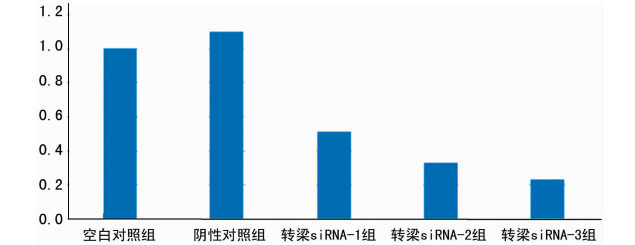


图 1 各组细胞 FAK mRNA 表达变化

2.2 沉默 FAK 基因对 CAL-27 细胞 FAK 蛋白表达的影响 Western blot 检测空白对照组、阴性对照组和转染组中 FAK 蛋白的相对表达量分别为 $0.010\ 59\pm0.003\ 18$ 、 $0.008\ 58\pm0.001\ 67$ 和 $0.004\ 47\pm0.001\ 25$ 。转染组中 FAK 蛋白的表达量明显低于空白对照组和阴性对照组,差异有统计学意义($F=6.04, P<0.05$)(图 2、3)。沉默 FAK 基因,舌鳞癌细胞 FAK 蛋白的表达量明显降低。

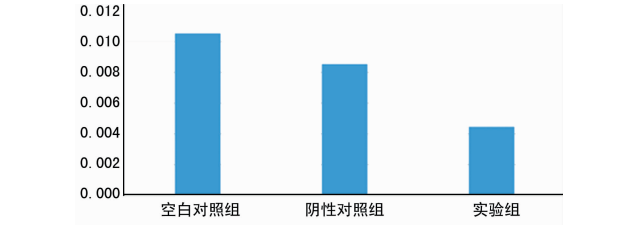


图 2 各组细胞 FAK 蛋白表达变化

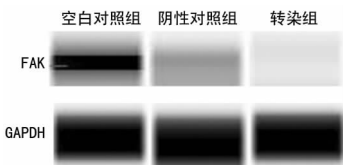


图 3 各组细胞 FAK 蛋白表达情况

2.3 沉默 FAK 基因对 CAL-27 细胞凋亡的影响 流式细胞仪检测结果显示空白对照组、阴性对照组和转染组的凋亡率分别为 $(3.98\pm0.54)\%$ 、 $(3.21\pm0.94)\%$ 和 $(6.34\pm0.91)\%$,转染组细胞凋亡率明显高于阴性对照组和空白对照组,差异有统计学意义($F=11.89, P<0.01$),见图 4、5。FAK 基因表达沉默后,舌鳞癌细胞的凋亡率显著提升。

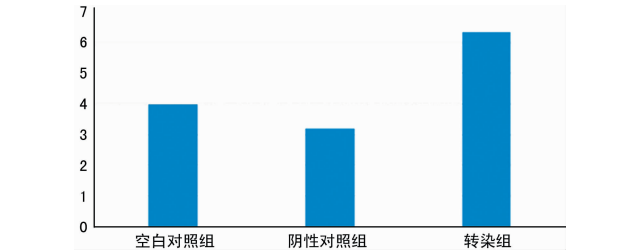
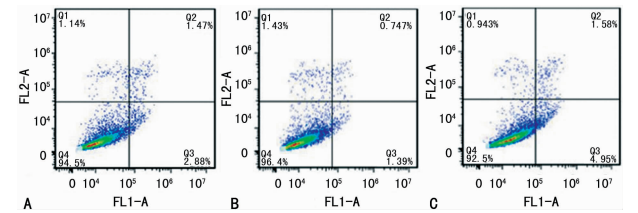


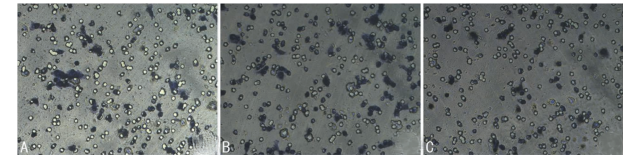
图 4 沉默 FAK 基因对 CAL-27 细胞凋亡的影响



A:空白对照组;B:阴性对照组;C:转染组

图 5 各组细胞凋亡情况

2.4 沉默 FAK 基因对 CAL-27 细胞侵袭能力的影响 Transwell 法细胞体外侵袭实验显示,空白对照组、阴性对照组、转染组中细胞穿过上室 Matrigel 和聚碳酸酯膜的细胞数分别为 (41.27 ± 4.11) 个、 (42.60 ± 4.06) 个和 (32.70 ± 3.19) 个,转染组穿膜细胞的个数明显少于阴性对照组和空白对照组,差异有统计学意义($F=5.93, P<0.05$),见图 6。



A:空白对照组;B:阴性对照组;C:转染组

图 6 沉默 FAK 基因对 CAL-27 细胞侵袭能力的影响(Transwell $\times 200$)

3 讨 论

人体内多种转录因子(如核因子 κ B、p53 蛋白及 T 细胞特异性转录因子-1 等)的结合位点均包含于 FAK 的核心启动子中,FAK 受这些转录分子的调控,成为多种信号通路的“交通枢纽中心”^[2]。FAK 通过这些信号通路广泛参与了肿瘤发生、发展过程中的多个环节;作用涉及了肿瘤细胞的迁移、黏附、侵袭、增殖及凋亡等多种生物学行为;其既可作为单一因素对肿瘤产生影响,也可以与其他因素联合发挥作用^[3-4]。在正常的舌体上皮细胞中,FAK 的表达呈阴性或弱阳性^[5],这对维持舌上皮细胞正常的生理活动是必不可少的;但在舌鳞癌相关的细胞中,FAK 的表

达明显升高,这从侧面提示 FAK 可能是影响肿瘤发生、发展进程的关键因素之一。

RNA 干扰技术是近年发展起来的一种可以利用双链 RNA,高效、特异性地降解细胞内同源信使 RNA,从而使靶基因表达沉默的新技术,现已被广泛运用于基因功能研究和肿瘤的基因治疗领域^[6]。本实验采用特异性的 FAK siRNA 重组质粒对舌鳞癌细胞进行转染。所设计的 3 种 FAK siRNA 均能使 FAK mRNA 的表达水平明显降低,沉默效应在转染后 48 h 时达到了最高值。但本实验中的 3 个干扰质粒对靶基因的抑制效应不同,其中以 FAK siRNA-3 沉默效果最好。考虑这种现象可能与位置效应有关,3 种干扰质粒分别作用于同一基因的不同靶点,从而产生了不同干扰效果。因此,有必要对干扰序列进行筛选优化,以求达到更为理想的应用效果。Western blot 检测显示 FAK siRNA 转染舌鳞癌细胞后抑制了 FAK 蛋白的表达,而对照组细胞则没有上述的抑制现象,这也同时证明了 FAK siRNA 的特异性。

肿瘤的发生、发展与细胞的存活和凋亡失调有着密切关系。在本实验中,通过流式细胞仪技术检测发现,沉默 FAK 基因能诱导舌鳞癌细胞的凋亡。已有的研究表明,FAK 主要通过以下 3 条途径介导细胞的生存和凋亡:(1)通过 PI3K-PKB 信号通路,FAK 可以最终灭活一系列细胞凋亡相关蛋白(如 Bad、GSK3 等),提供细胞生存所需的信号^[7]。(2)通过 Src-Ras-JNK 信号通路,不需要外界提供生长因子,细胞外基质与 FAK 介导的细胞生存信号可以直接得到激活^[8]。(3)通过 FAK-p53 通路,FAK 能与 p53 结合,引起 p53 多聚泛素化,p53 被细胞内蛋白酶降解,凋亡蛋白的信号被阻断,促使细胞周期停滞,阻止了细胞的凋亡^[9]。目前有关 FAK 基因沉默诱导舌鳞癌细胞凋亡的确切的分子机制尚不十分清楚,仍有待进一步研究。

侵袭性是舌鳞癌恶性程度的主要指标之一,与舌鳞癌患者预后密切相关。在本实验中,通过 Transwell 法检测发现沉默 FAK 基因能有效抑制舌鳞癌细胞的侵袭能力。癌细胞侵袭能力的变化很大程度上取决于肿瘤细胞黏附性、运动能力及基质水解酶活性的改变^[10]。FAK 可以促使肿瘤细胞形成片状或刺状伪足,让细胞在形态学上发生改变,具备侵袭性的表型,进而调节细胞的运动^[11-12]。已有的体内实验也表明,FAK 的过表达可以使肿瘤细胞更易侵犯周围组织,加速转移^[1]。此外,通过 FAK-pl30CAS 信号通路,FAK 还可以活化下游分子基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9。在肿瘤侵袭和转移的过程中,构成组织学屏障的基底膜(BM)和细胞外基质(ECM),有阻止、限制肿瘤细胞侵袭和转移的功能^[13]。作为基质金属蛋白酶 MMPs 家族成员的 MMP-2 和 MMP-9,能有效降解细胞外基质和基底膜中各种胶原纤维

和蛋白,破坏组织学屏障,促进肿瘤细胞的侵袭和转移^[14-15]。

综上所述,沉默 FAK 基因可诱导舌鳞癌细胞 CAL-27 的凋亡,有效抑制其侵袭能力,提示 FAK 有望成为抑制舌鳞癌生长和转移的新靶点,但具体的作用机制仍需进一步地研究。

参考文献

- [1] 李玲妹,曹文枫. FAK 与肿瘤关系的研究进展[J]. 中国肿瘤临床,2015,42(2):116-119.
- [2] GOLUBOVSKAYA V M. FAK and nanog cross talk with p53 in cancer stem cells[J]. Anticancer Agents Med Chem,2013,13(4):576-580.
- [3] QUADRI S K. Cross talk between focal adhesion kinase and cadherins:role in regulating endothelial barrier function[J]. Microvasc Res,2012,83(1):3-11.
- [4] 杨艳丽,李鹏鸽,葛玉婷,等. 黏着斑激酶与肿瘤发生、发展及预后的关系[J]. 中国细胞生物学学报,2011,33(1):55-58.
- [5] 黄晓峰,胡勤刚,陈湘华. 基质金属蛋白酶-9、黏着斑激酶的表达与舌鳞状细胞癌淋巴结转移的关系研究[J]. 口腔医学,2007,27(7):353-355.
- [6] 田瑞敏,鄢佳程,王含彦,等. RNA 干扰技术在肿瘤基因治疗中的研究现状[J]. 重庆医学,2013,42(7):811-814.
- [7] 刘伟,杭春玖,薛同敏,等. 黏着斑激酶与肝癌侵袭、转移的研究进展[J/CD]. 中华普通外科学文献(电子版),2015,9(2):155-158.
- [8] 许吕宏,方建培,Yi L,等. FAK 基因沉默诱导白血病细胞凋亡[J]. 中国病理生理杂志,2010,26(7):1352-1355.
- [9] 梅梅,易杰,张疆甄. 黏着斑激酶在整合素信号转导中的研究进展[J]. 重庆医学,2014,43(10):1265-1268.
- [10] 阿力亚,胡文杰,彭宝岗,等. 黏着斑激酶表达下调对肝癌细胞黏附迁移侵袭行为的影响[J/CD]. 中华普通外科学文献(电子版),2016,10(2):93-98.
- [11] CHAN K T, CORTESIO C L, HUTTENLOCHER A. FAK alters invadopodia and focal adhesion composition and dynamics to regulate breast cancer invasion[J]. J Cell Biol,2009,185(2):357-370.
- [12] PROVENZANO P P, KEELY P J. The role of focal adhesion kinase in tumor initiation and progression[J]. Cell Adh Migr,2009,3(4):347-350.
- [13] 陈明康,李小红,董靖. 蛋白水解酶在癌细胞迁移中的作用[J]. 基因组学与应用生物学,2016,35(7):1653-1655.
- [14] LIU J, PING W, ZU Y, et al. Correlations of lysyl oxidase with MMP-2/MMP-9 expression and its prognostic value in non-small cell lung cancer[J]. Int J Clin Exp Pathol,2014,7(9):6040-6047.
- [15] HEGARTY P K. Editorial: MMP-2 and MMP-9 in lymph-node-positive bladder cancer[J]. J Clin Pathol,2012,65(5):470-471.