

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.01.002

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190910.1631.008.html>(2019-09-11)

初级纤毛相关基因 KIF3A 通过调控 EMT 过程在口腔鳞状细胞癌中的作用机制研究*

玄云泽¹, 李书进¹, 金成日¹, 杨康鹄^{2△}

(1. 延边大学附属医院口腔科, 吉林延吉 133000; 2. 延边大学医学院细胞生物学与医学遗传学教研室, 吉林延吉 133000)

[摘要] **目的** 探讨驱动蛋白家族成员 3A(KIF3A)在口腔鳞状细胞癌上皮间充质转化(EMT)过程中的作用及其调控机制。**方法** 以人舌鳞癌细胞 Tca8113 作为研究对象分为 KIF3A-siRNA 转染组、阴性对照(NC)组、对照组。在荧光显微镜下观察 Tca8113 细胞的初级纤毛并计算其阳性检出率;采用 Western blot 和 PCR 检测各组 KIF3A、Snail、E-钙黏蛋白、波形蛋白及 mRNA 的相对表达水平;Transwell 实验观察 Tca8113 侵袭能力的变化;细胞划痕实验观察 Tca8113 迁移能力的变化。**结果** 与对照组比较,KIF3A-siRNA 转染组初级纤毛检出率明显降低($P < 0.05$);Western blot 和 PCR 检测结果显示 KIF3A-siRNA 转染组 KIF3A、Snail、波形蛋白及 mRNA 表达明显下调,而 E-钙黏蛋白表达明显上调($P < 0.05$);细胞侵袭及划痕实验结果显示,与对照组比较,KIF3A-siRNA 转染组 Tca8113 细胞侵袭、迁移能力明显降低($P < 0.05$)。**结论** 沉默初级纤毛相关基因 KIF3A 可能通过调控 Tca8113 的 EMT 过程来抑制其侵袭、迁移能力。

[关键词] 口腔肿瘤;癌,鳞状细胞;纤毛;上皮间充质转化;驱动蛋白家族成员 3A**[中图分类号]** R739.85**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2020)01-0007-06

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Study on the mechanism of primary cilia-related gene KIF3A in oral squamous cell carcinoma by regulating EMT process*

XUAN Yunze¹, LI Shujin¹, JIN Chengri¹, YANG Kangjuan^{2△}

(1. Department of Stomatology, Yanbian University Hospital, Yanji, Jilin 133000, China;

2. Department of Cell Biology and Medical Genetics, School of Medicine,

Yanbian University, Yanji, Jilin 133000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role and regulatory mechanism of KIF3A in the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process of oral squamous cell carcinoma. **Methods** Human tongue squamous cell carcinoma cells Tca8113 were divided into the KIF3A-siRNA transfection group the negative control (NC) group and the control group. The primary cilia of Tca8113 cells were observed under the fluorescence microscope and the positive detection rate was calculated. Protein and mRNA levels of KIF3A, Snail, E-cadherin and Vimentin in each group were detected by Western blot and PCR. The invasive ability of Tca8113 cells was observed by Transwell. The migration ability of Tca8113 cells was observed by wound healing assay. **Results** Compared with the control group, the detection rate of primary cilia in the KIF3A-siRNA transfection group significantly reduced ($P < 0.05$). The results of Western blot and qPCR showed that the protein and mRNA expressions of KIF3A, Snail and Vimentin in the KIF3A-siRNA transfection group significantly down-regulated, while the expression of E-cadherin significantly up-regulated ($P < 0.05$). Compared with the control group, the cell invasion and migration ability of Tca8113 cells in the KIF3A-siRNA transfection group significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** Silencing the primary cilia-related gene KIF3A may inhibit its invasion and migration ability by regulating the EMT process of Tca8113.

[Key words] mouth neoplasms; carcinoma, squamous cell; cilia; epithelial mesenchymal transition; kinesin family member 3A

口腔鳞状细胞癌(Oral squamous cell carcinoma, OSCC)是颌面部常见的恶性肿瘤,约占口腔恶性肿瘤的 90%^[1]。近年来尽管在治疗方面取得了一定的进步,但恶性度较高的 OSCC 因其强大的侵袭转移能力,5 年生存率仅为 40%~50%^[2]。因此,更好地了解 OSCC 侵袭和转移的机制,对于确定诊断和预后的新指标,以及在 OSCC 靶向治疗的发展中具有重要的意义。

初级纤毛是由细胞表面发出的一种非活动性纤毛状突起,分布于近乎所有的极性细胞和大多数非极性细胞表面。初级纤毛具有独特的天线样特性,使它们能够探测机械和感官信号,并将这些信号从细胞周围传递到内部^[3]。在多种肿瘤中,均可以观察到初级纤毛的丢失^[4],说明初级纤毛与肿瘤的发生、发展存在着密不可分的关系。阿里木江等^[5]于 OSCC 在内的多种肿瘤组织中发现 Gli、Snail 及间充质细胞标志物波形蛋白(Vimentin)呈高表达,而上皮细胞标志物 E-钙黏蛋白(E-cadherin)的表达下调,这提示着初级纤毛与肿瘤细胞的上皮间充质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)进程高度相关。

驱动蛋白家族成员 3A(kinesin family member 3A, KIF3A)是初级纤毛内运输系统(intraflagellar transport, IFT)中驱动蛋白 II 的亚基,属于正端导向的马达蛋白^[6],是初级纤毛维持和发挥正常功能所必需的^[7]。目前初级纤毛相关基因 KIF3A 在 OSCC 的 EMT 进程中的作用尚不清楚。本研究旨在探讨初级纤毛相关基因 KIF3A 在调控 OSCC 侵袭、迁移能力中的作用机制,为针对局部及远处转移的 OSCC 的治疗提供理论性依据,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞

人舌鳞癌细胞株 Tca8113 购自美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC),由延边大学附属医院中心实验室封存。

1.1.2 仪器与试剂

DMEM 高糖型培养基、OP-TI MEM 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、胰酶、磷酸盐缓冲液(PBS)均购自美国 Gibco 公司;抗 KIF3A、抗 Snail、抗 Vimentin、抗 E-cadherin、抗 Arl13b 抗体均购自美国 Abcam 公司;KIF3A-siRNA、LipofectamineTM 2000 Reagen 及引物均购自美国 Invitrogen 公司;RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒均购自美国 Promega 公司;山羊抗兔 IgG(H+L) Dylight 488 购自南京巴得得生物科技有限公司;碘化丙啶(propidium iodide, PI)购自美国 Sigma 公司;电转印系统、聚合酶链反应

扩增仪购自美国 Bio-Rad 公司;Alpha 化学电光凝胶成像系统 FluorChem HD2 购自美国 Protein Simple 公司;7300 Plus 实时荧光定量 PCR System 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;细胞成像多功能酶标仪 Cytation5 购自美国 BioTek 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与细胞转染

Tca8113 细胞置于 37 °C、5%CO₂、95%饱和湿度的恒温孵育箱中用含 10%FBS、青链霉素的 DMEM 高糖型培养基传代培养。在转染前 1 d,将 Tca8113 细胞分为对照组、阴性对照(negative control, NC)组、KIF3A-siRNA 转染组,接种到 6 孔板,待生长至 80% 时进行细胞转染。NC 组转染阴性对照 siRNA, KIF3A-siRNA 转染组转染 KIF3A-siRNA,对照组未进行转染。转染操作按照 LipofectamineTM 2000 Reagen 转染说明进行。Kif3a-siRNA 序列(5'-3'): UAA GGA AUG CUG AAG AAG ACG AGU C。

1.2.2 免疫荧光实验

待对照组、NC 组、KIF3A-siRNA 转染组细胞融合 70%~80% 时,用胰酶消化,按 2×10⁵ 个/mL 密度接种于载玻片上,并在 37 °C、5%CO₂ 培养箱中继续孵育 24 h;PBS 洗涤 3 次,4%多聚甲醛固定细胞 30 min;PBS 洗涤 3 次,0.1% Triton X-100 通透 15 min;PBS 洗涤 3 次,1%BSA 在室温下封闭 1 h;吸除封闭液后分别加入兔抗人 Arl13b 一抗(1:200),兔抗人 Snail 一抗(1:200)并将载玻片置于湿盒中,4 °C 冰箱孵育过夜。次日 PBS 洗涤 3 次,每次 10 min,避光下加入山羊抗兔荧光二抗(1:100)后置于避光湿盒中,室温孵育 1 h;PBS 洗涤 3 次,每次 10 min,避光下加入 PI 染核,室温孵育 15 min;PBS 洗涤 2 次后甘油封片,在荧光显微镜下观察 5 个视野计数并进行统计学分析。

1.2.3 Western blot 实验

转染 24 h 后收集对照组、NC 组、KIF3A-siRNA 转染组细胞并加入 RIPA 与 PMSF 混合液(100:1)冰上裂解细胞,提取细胞总蛋白,BCA 试剂盒测定总蛋白浓度。将各个标本行 10%~12%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳;转膜;室温下 5%脱脂奶粉封闭 1 h;TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入兔抗人 Kif3a 一抗(1:1 000)、兔抗人 Snail 一抗(1:1 000)、兔抗人 E-cadherin 一抗(1:1 000)、鼠抗人 Vimentin 一抗(1:1 000)后放置湿盒中 4 °C 冰箱孵育过夜;次日 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,分别加入山羊抗兔 IgG 二抗(1:5 000)、山羊抗鼠 IgG 二抗(1:5 000)后放置湿盒中室温孵育 1 h;TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入增强型化学发光剂(enhanced chemiluminescence, ECL)显色。以 β-actin 为内参,Flourchem HD2 软件分析蛋白条带灰度值。

1.2.4 实时荧光定量 PCR

转染 24 h 后收集对照组、KIF3A-siRNA 转染组细胞并通过 Trizol 法提取细胞中的总 RNA, 反转录为 cDNA, 按照反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 试剂盒的操作说明以 cDNA 为模板进行扩增。测定循环阈值 (Ct), 利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行统计。实验重复 3 次。引物序列, KIF3A-正向: 5'-AGA GCG TCA ACG AGG TGT TT-3'; KIF3A-反向: 5'-TAT TGA TCG GCA TCT TGG CCC-3'; Snail-正向: 5'-CGA GTG GTT CTT CTG CGC TA-3'; Snail-反向: 5'-CTG CTG GAA GGT AAA CTC TGG A-3'; E-cadherin-正向: 5'-GTC AGT TCA GAC TCC AGC CCG-3'; E-cadherin-反向: 5'-AAC GTG TAG CTC TCG GCG TC-3'; Vimentin-正向: 5'-CGG GAG AAA TTG CAG GAG GA-3'; Vimentin-反向: 5'-AAG GTC AAG ACG TGC CAG AG-3'; GAPDH-正向: 5'-TCA AGG CTG AGA ACG GGA AG-3'; GAPDH-反向: 5'-TGG ACT CCA CGA CGT ACT CA-3'。

1.2.5 Transwell 小室侵袭实验

Matrigel 基质胶 4 °C 过夜融化后与 DMEM 无血清培养基 1 : 2 进行混合备用; Transwell 上室加入 60 μ L 的混合液体, 放入 37 °C 恒温培养箱 2 h 固化; 分别收集对照组、NC 组及稳定转染 24 h 的 KIF3A-siRNA 转染组细胞, 制备密度为 5×10^4 个/mL 的细胞悬液, 取 200 μ L 滴于 Transwell 上室, 下室加入 800 μ L 含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 放置于恒温培养箱继续培养 48 h; 预冷 4% 多聚甲醛固定 30 min; 苏木素染色 15 min; 自来水洗 5 次, PBS 洗 2 次, 浸湿医用棉棒擦拭上室内基质胶; 小心取出聚碳酸酯膜, 风干后, 倒扣于载玻片, 中性树脂封片; 显微镜下观察

侵入下室的 Tca8113 细胞, 并选取 5 个视野进行细胞计数, 每组实验重复 3 次, 取平均值。

1.2.6 细胞划痕实验

在转染后的 72 h 之内, 胰酶消化对照组、KIF3A-siRNA 转染组的细胞, 并按 2×10^6 个/孔的密度接种于 6 孔板, 置于 37 °C, 5% CO₂ 恒温培养箱中培养细胞生长至 60%。在长满细胞的培养皿壁上用 200 μ L 的移液枪头垂直划出 1 条细痕, 并用 PBS 清洗被划出的细胞。分别培养 0、12、24、48 h 后在倒置显微镜下观察并用 Image J 软件测量各时间点愈合划痕面积, 并计算划痕愈合率, 划痕愈合率 = (1 - 划痕面积/最初划痕面积) \times 100%。实验重复 3 次, 取平均值。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism7.04 软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 多组间比较采用 Two-way ANOVA 方法分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 免疫荧光染色观察

Arl13b 蛋白主要集中在初级纤毛的轴突, 加入二抗 Dylight 488 标记呈绿色, 加入 PI 标记细胞核呈红色、Merge 后表现出 1 个突出于细胞表面, 微小而细长的纤毛形态, 符合初级纤毛的形态学特征。免疫荧光实验结果显示: 对照组每个视野中的初级纤毛阳性检出率为 37.06%, 而转染组每个视野中只有 7.39% 细胞可以观察到初级纤毛。与对照组比较, 人舌鳞癌 Tca8113 细胞中的初级纤毛阳性检出率明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 1。

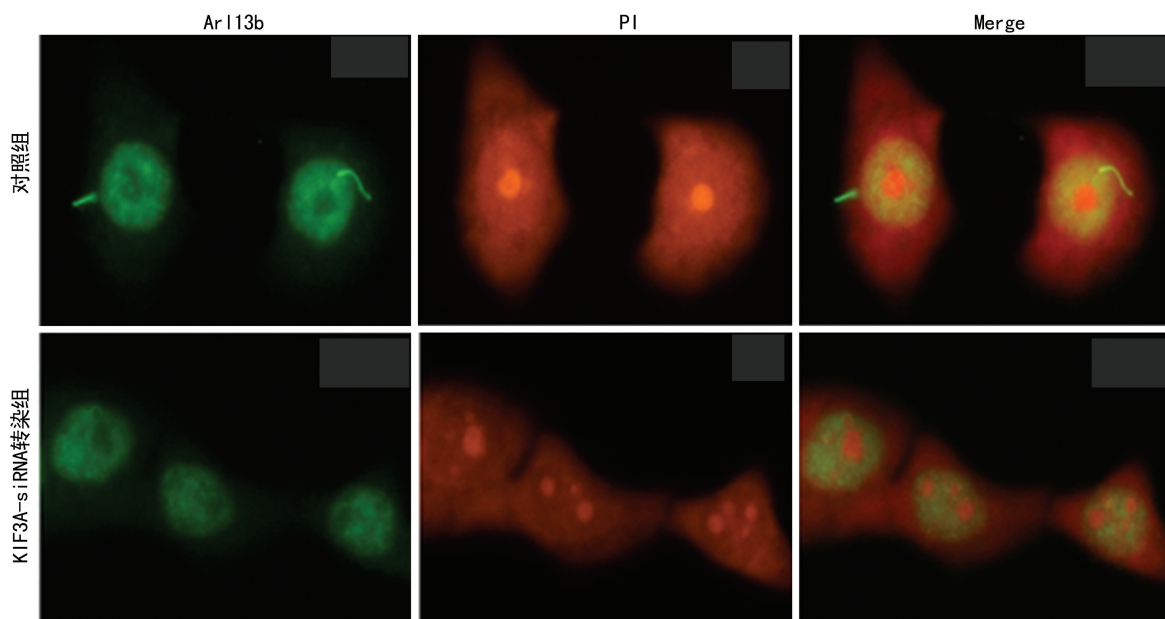


图 1 免疫荧光染色观察舌鳞癌 Tca8113 细胞表面初级纤毛

2.2 Western blot 检测转染效果及对 EMT 相关蛋白表达的影响

与对照组比较, KIF3A-siRNA 转染组 KIF3A、Snail、Vimentin 表达明显下调, E-cadherin 表达明显上调($P < 0.05$), 见图 2、3。

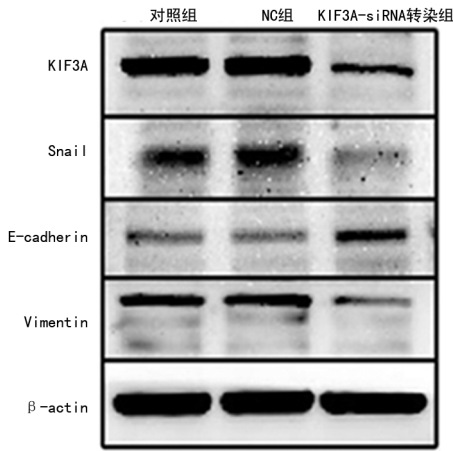


图 2 Western blot 检测转染效果

2.3 qPCR 法检测转染效果及对 EMT 相关分子表

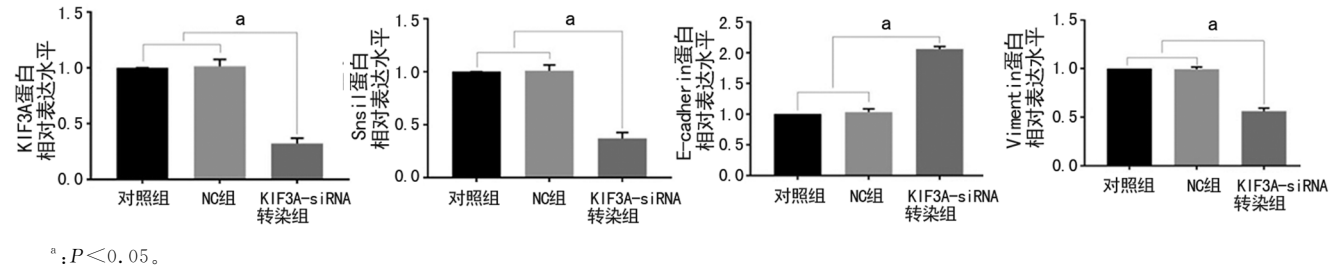


图 3 Western blot 检测 EMT 相关蛋白表达情况

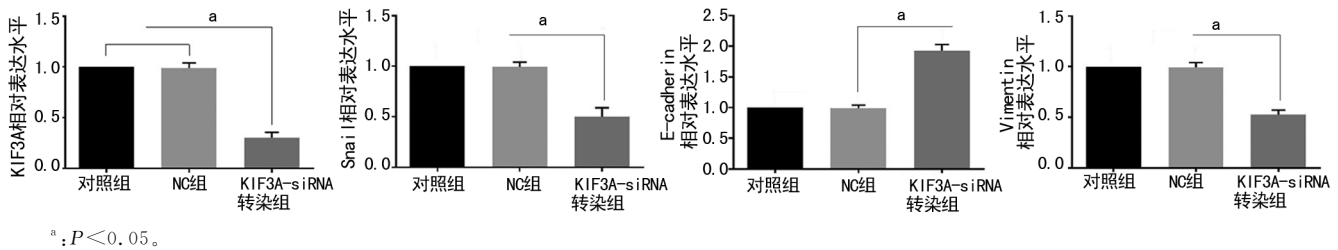
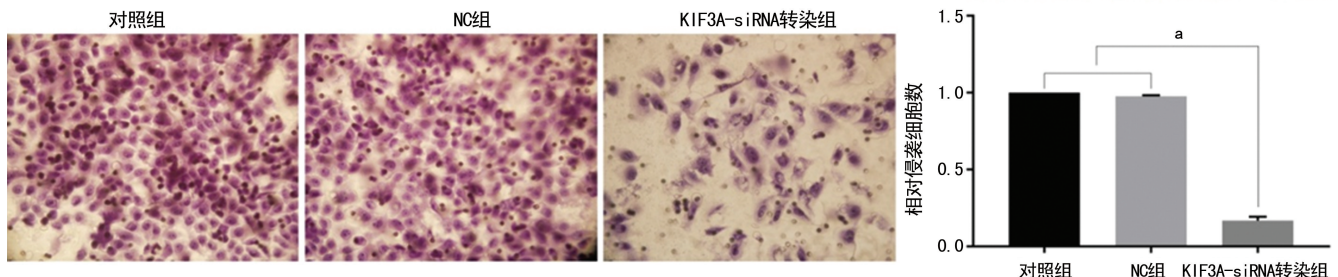


图 4 RT-qPCR 法检测转染效果及 EMT 相关分子表达的影响



$a: P < 0.05$.

图 5 沉默 KIF3A 基因后 Tca8113 细胞侵袭能力影响

达的影响

与对照组比较, KIF3A-siRNA 转染组中的 KIF3A、Snail、Vimentin 表达明显下调, E-cadherin 表达明显上调($P < 0.05$), 见图 4。

2.4 沉默 KIF3A 基因后对 Tca8113 细胞侵袭能力影响

与对照组及 NC 组比较, KIF3A-siRNA 转染组中自上室侵袭穿过基质胶进入下室的细胞数目明显减少, 侵袭能力显著降低, 3 组相对侵袭细胞数分别为 1.00 ± 0.07 、 0.94 ± 0.08 、 0.17 ± 0.06 , 差异有统计学意义($P < 0.05$); 而 NC 组的相对侵袭细胞数与对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 见图 5。

2.5 沉默 KIF3A 基因后 Tca8113 细胞迁移能力影响

划痕实验结果显示, 细胞培养 12 h 时, 各组划痕内细胞愈合面积比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 细胞培养 24、48 h 时, KIF3A-siRNA 转染组的划痕内细胞愈合面积明显小于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 6、7。

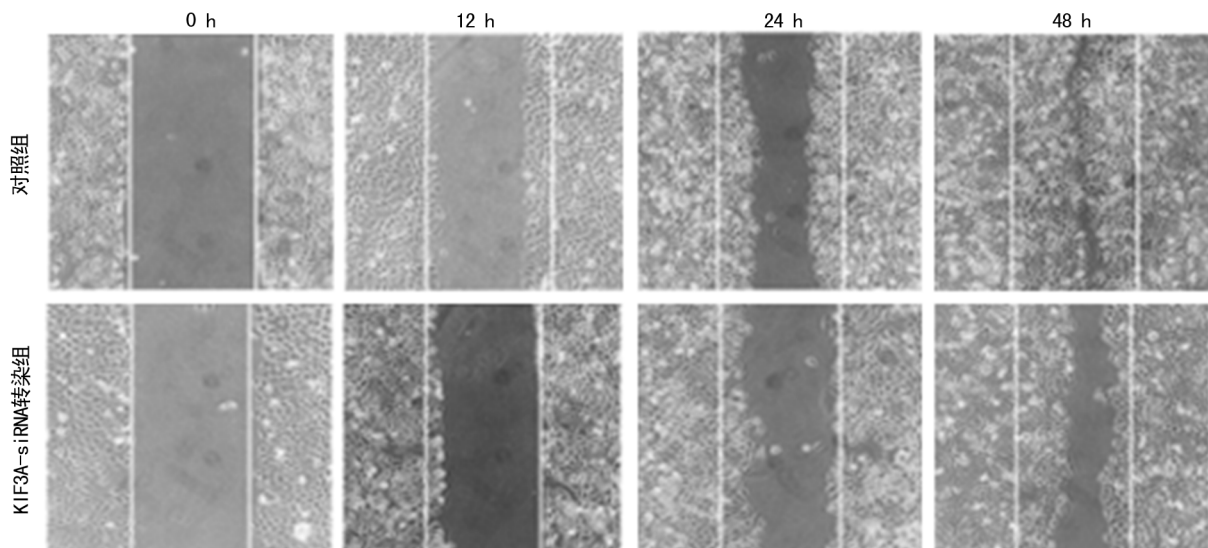
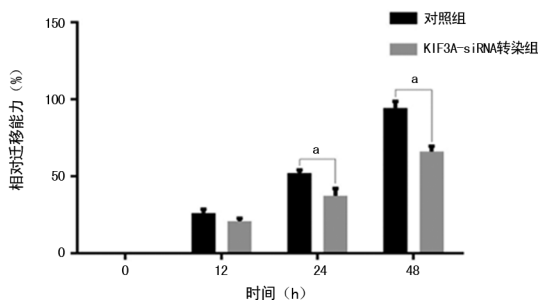


图 6 细胞划痕实验结果



^a: $P < 0.05$ 。

图 7 沉默 KIF3A 基因后 Tca8113 细胞迁移能力影响

3 讨 论

口腔癌是在全世界较为多见的癌症之一,约占所有癌症的 4%。而超过 90% 的病例在组织病理学上被分类为 OSCC^[8]。在过去的几十年里,即使是完善的手术治疗方案、增强性放射治疗方案或靶向化疗都未能提高 OSCC 患者的 5 年生存率,且有 10%~30% 的患者出现复发^[9]。因此,深入研究 OSCC 的侵袭、转移机制是减低其病死率和复发率必不可少的环节。

目前未见对 OSCC 是否存在初级纤毛相关报道,然而 KOWAL 等^[10]曾通过一种初级纤毛标记物 Arl13b 证实增殖中的 HeLa 细胞中存在初级纤毛。因此本研究同样使用 Arl13b 蛋白标记初级纤毛,在荧光显微镜下观察人舌鳞癌 Tca8113 细胞后发现, ARL13B 主要积聚于初级纤毛的轴突,呈现一个突出于细胞表面的细长纤毛样形状,符合初级纤毛的形态学特征,此结果与 KOWAL 等^[10]在不同类型肿瘤细胞中的发现的初级纤毛一致。

KIF3A 是一种 IFT 驱动蛋白 II 的分子马达,主要负责从纤毛底部到纤毛顶部的正向转运,被认为是初级纤毛的组装、维持及物质运输相关的关键因

子^[11]。XIA 等^[12]在乳腺癌组织中发现 KIF3A 表达水平显著高于癌旁组织。KIM 等^[13]发现, KIF3A 是非小细胞肺癌的肿瘤抑制因子成员之一。HOANG-MINH 等^[11]发现, KIF3A 基因表达中断导致胶质母细胞瘤中初级纤毛拆卸、加速肿瘤的发展,然而 KIF3A 在 OSCC 发生、发展中的作用尚未知晓。因此,本研究利用 siRNA 技术沉默 KIF3A 基因后,发现 Tca8113 细胞系中的初级纤毛的阳性检出率比对照组明显降低,同时 KIF3A 的蛋白及 mRNA 表达明显降低。这可能意味着 KIF3A 基因的沉默引起 Tca8113 细胞初级纤毛的丢失。

OSCC 的侵袭、迁移能力很强,是术后复发的主要原因之一。BARAKAT 等^[14]证实, KIF3A 的丢失对髓母细胞瘤的发生及向周围组织的扩散是不利的。LIU 等^[15]证明了 KIF3A 在前列腺癌的侵袭、迁移中起着至关重要的作用。为了探讨初级纤毛的丢失对 OSCC 的侵袭、迁移能力的影响,本课题组进行 Transwell 小室侵袭实验和细胞划痕实验,结果显示沉默初级纤毛相关基因 KIF3A 后人舌鳞癌 Tca8113 细胞的侵袭、迁移能力明显被抑制。很显然,本研究结果与其他研究者的结果相一致。

在胃癌组织中发现初级纤毛相关信号通路的转录因子 Gli、EMT 转录因子 Snail 及上皮细胞标志物 E-cadherin 的表达水平异常升高,这提示在恶性肿瘤的侵袭、转移过程中初级纤毛-Snail-EMT 之间的关系非常关键^[16]。本课题组使用 KIF3A-siRNA 处理 Tca8113 细胞 24 h 后, Snail 及间充质细胞标志物 Vimentin 的表达较对照组及 NC 组明显降低,而 E-cadherin 的表达升高。这可能意味着沉默 KIF3A 基因后 Tca8113 细胞的 EMT 明显被抑制。换句话说, KIF3A 可能通过调节 EMT 进程来抑制 OSCC 的侵袭、迁移能力。

本研究揭示了初级纤毛相关基因 KIF3A 在人舌鳞癌 Tca8113 细胞 EMT 进程中的作用,初步解释了沉默 KIF3A 后可能通过抑制 EMT 进程来影响 OSCC 的侵袭、迁移能力,为 OSCC 患者的靶向干预治疗提供了理论依据。

参考文献

- [1] 于世凤. 口腔组织病理学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社,2007:8.
- [2] XIE S, XU H, SHAN X F, et al. Clinicopathological and prognostic significance of survivin expression in patients with oral squamous cell carcinoma: evidence from a Meta-analysis[J]. PLoS One, 2015, 10(2):e0116517.
- [3] DERE R, PERKINS A L, BAWA-KHALFE T, et al. β -catenin links von Hippel-Lindau to auro-kinase A and loss of primary cilia in renal cell carcinoma [J]. J Am Soc Nephrol, 2015, 26(3):553-564.
- [4] YANG Y, ROINE N, MAKELA T P. CCRK depletion inhibits glioblastoma cell proliferation in a cilium-dependent manner[J]. EMBO Rep, 2013, 14(8):741-747.
- [5] 阿里木江, 吾守潘, 张志愿. 上皮-间充质转分化与转录因子 Snail、Slug、Twist 在口腔鳞状细胞癌发生、发展中的作用[J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2011, 9(6):521-525.
- [6] SHI S H, CHENG T, JAN L Y, et al. APC and GSK-3 β are involved in mPar3 targeting to the nascent axon and establishment of neuronal polarity[J]. Curr Biol, 2004, 14(22):2025-2032.
- [7] NIEWIADOMSKI P, NIEDZIOLKA S M, MARKIEWICZ L, et al. Gli proteins; regulation in development and cancer[J]. Cells, 2019, 8(2):E147.
- [8] OMURA K. Current status of oral cancer treatment strategies; surgical treatments for oral squamous cell carcinoma[J]. Int J Clin Oncol, 2014, 19(3):423-430.
- [9] TROELTZSCH M, HAIDARI S, BOSER S, et al. What factors are associated with regional recurrence after operative treatment of oral squamous cell carcinoma? [J]. J Oral Maxillofac Surg, 2018, 76(12):2650-2659.
- [10] KOWAL T J, FALK M M. Primary cilia found on HeLa and other cancer cells[J]. Cell Biol Int, 2015, 39:1341-1347.
- [11] HOANG-MINH L B, DELEYROLLE L P, SIEBZEHRUB D, et al. Disruption of KIF3A in patient-derived glioblastoma cells; effects on cilio-genesis, hedgehog sensitivity, and tumorigenesis [J]. Oncotarget, 2016, 7(6):7029-7043.
- [12] XIA P, CHU S, LIU G, et al. High expression of KIF3A is a potential new parameter for the diagnosis and prognosis of breast cancer[J]. Biomed Rep, 2018, 8(4):343-349.
- [13] KIM M, SUH Y A, OH J H, et al. KIF3A binds to beta-arrestin for suppressing Wnt/ β -catenin signalling independently of primary cilia in lung cancer[J]. Sci Rep, 2016, 6:32770.
- [14] BARAKAT M T, HUMKE E W, SCOTT M P. Kif3a is necessary for initiation and maintenance of medulloblastoma[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(6):1382-1392.
- [15] LIU Z, REBOWE R E, WANG Z, et al. KIF3a promotes proliferation and invasion via Wnt signaling in advanced prostate cancer[J]. Mol Cancer Res, 2014, 12(4):491-503.
- [16] WANG Z S, SHEN Y, LI X, et al. Significance and prognostic value of Gli-1 and Snail/E-cadherin expression in progressive gastric cancer [J]. Tumour Biol, 2014, 35(2):1357-1363.

(收稿日期:2019-02-22 修回日期:2019-05-06)