

论著

文章编号:1000-5404(2012)21-2154-04

siRNA 沉默整合素连接激酶对人膀胱癌细胞凋亡的影响

高娟¹, 康炜¹, 陈俊霞², 朱军², 潘湘阳² (710077 西安, 西安医学院附属医院检验科¹; 400016 重庆, 重庆医科大学基础医学院细胞生物学与遗传学教研室, 分子医学与肿瘤研究中心²)

[摘要] **目的** 探讨应用整合素连接激酶(integrin-linked kinase, ILK)特异性 siRNA 沉默 *ILK* 基因的表达对人膀胱癌细胞凋亡的影响。**方法** 将构建好的针对 *ILK* 基因的 1 个特异性 siRNA 表达质粒和 1 个非同源性的阴性对照质粒, 在脂质体介导下稳定转染人膀胱癌 BIU-87 细胞, 并将实验分为 BIU-87 si ILK、BIU-87 vector 及 BIU-87 细胞 3 组, 运用 TUNEL 凋亡检测试剂盒和流式细胞术检测 BIU-87 细胞的凋亡, 进一步运用 Western blot 检测 siRNA ILK 对凋亡相关蛋白 Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 的影响。**结果** TUNEL 检测结果显示, BIU-87 si ILK 组出现大量凋亡细胞, 而 BIU-87 细胞组和 BIU-87 vector 组仅有少量凋亡细胞出现。流式细胞仪检测结果显示, BIU-87 si ILK 组细胞大约有 $(75.70 \pm 2.00)\%$ 的凋亡细胞, 而 BIU-87 vector 组和 BIU-87 细胞组仅有 $(0.88 \pm 0.10)\%$ 和 $(1.66 \pm 0.90)\%$ 的凋亡细胞, Western blot 结果显示, 在 BIU-87 si ILK 组中, Bcl-2 的表达明显降低 ($P < 0.05$), 而 Bax 和 Caspase-3 的表达明显升高 ($P < 0.01$)。**结论** siRNA ILK 可能通过调节凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 的表达诱导膀胱癌 BIU-87 细胞凋亡的发生。

[关键词] 整合素连接激酶; 膀胱癌; 凋亡

[中图分类号] R394.2; R730.23; R737.14

[文献标志码] A

Integrin-linked kinase siRNA induces apoptosis in human bladder cancer BIU-87 cells

Gao Juan¹, Kang Wei¹, Chen Junxia², Zhu Jun², Pan Xiangyang² (¹Department of Medical Laboratory, Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an, Shaanxi Province, 710077; ²Department of Cell Biology and Genetics, Molecule Medical and Tumor Research Center, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To determine the effects of integrin-linked kinase (ILK) siRNA on the apoptosis of human bladder cancer BIU-87 cells. **Methods** Two siRNA vectors specific to ILK gene and one non-homologous negative control vector were designed and constructed, then stably transfected into bladder cancer BIU-87 cells *via* Lipofectamine 2000, and were named as BIU-87 si ILK and BIU-87 vector. Cell apoptosis was assessed by TUNEL kit and flow cytometry. The expression of Caspase-3, Bax and Bcl-2 were assessed by Western blotting. **Results** The number of TUNEL-positive cells was significantly increased in the BIU-87 si ILK cells when compared with BIU-87 cells and BIU-87 vector cells. Flow cytometry showed that $(75.70 \pm 2.00)\%$ of counted cells became apoptotic in BIU-87 si ILK cells, however, about only $(0.88 \pm 0.10)\%$ and $(1.66 \pm 0.90)\%$ of counted cell became apoptotic in BIU-87 vector cells and BIU-87 cells groups respectively. The expression of Bcl-2 was significantly reduced in BIU-87 si ILK cells compared with BIU-87 vector and BIU-87 cells ($P < 0.05$), and that of Caspase-3 and Bax protein was stably increased ($P < 0.01$). **Conclusion** The siRNA ILK induces apoptosis in bladder cancer BIU-87 cells by regulating apoptosis-related proteins Caspase-3, Bax and Bcl-2.

[Key words] integrin linked kinase; bladder cancer; apoptosis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81071719) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5273). Corresponding author: Gao Juan, E-mail: gaojuanmeic@163.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] 高娟, E-mail: gaojuanmeic@163.com

膀胱癌是常见的泌尿生殖系统恶性肿瘤,具有晚期恶化和易复发的特点。根据美国癌症学会统计,膀胱癌是世界上主要死亡原因之一^[1]。整合素连接激酶(integrin-linked kinase, ILK)是一个 59×10^3 的细胞内信号蛋白。它能与整合素 $\beta 1$ 和 $\beta 1$ 亚单位相互作用连接整合素和肌动蛋白细胞骨架,被整合素或生长因子以依赖于PI-3K的方式激活,进而作用于下游的PKB(protein kinaseB)和GSK3(glycogen synthase kinase3),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、增殖和凋亡等^[2-3]。Mark等^[4]研究发现,siRNA沉默ILK的表达后引起Caspase-3所介导的细胞凋亡,并且降低了AKT的磷酸化,在胰腺癌细胞增殖和凋亡中有明确的作用。本研究运用特异性ILK siRNA表达质粒,筛选稳定转染的膀胱癌BIU-87细胞,研究特异性ILK siRNA表达质粒对膀胱癌BIU-87细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

siRNA ILK干扰质粒由本课题组前期实验构建,人膀胱癌BIU-87细胞由本实验室保存;RPMI1640培养基购自HyClone公司;一步法TUNEL凋亡检测试剂盒购自Biyotime生物技术公司;兔抗人单克隆抗体Bcl-2和Bax购自Bioworld公司;鼠抗人单克隆抗体Caspase-3及兔抗人 β -actin单克隆抗体购自Santa Cruz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培养基在37℃、5%CO₂环境下常规培养,当细胞汇合度达80%以上进行传代培养。取对数生长期的细胞按 2×10^5 /孔接种至6孔板中,待细胞生长至融合度80%左右时,采用脂质体Lipofectamine 2000将特异性siRNA表达质粒和1个非同源性的阴性对照质粒转染细胞,由于干扰质粒带有报告基因EGFP,其可以发出绿色荧光,因此转染后48h左右,荧光显微镜下可以观察到绿色荧光。以2.0 mg/ml浓度的G418筛选2周后,更换含1.0 mg/ml G418的培养基维

持培养2周,4周后获得稳定表达细胞株。实验组分别命名为BIU-87细胞组(无任何处理),BIU-87 si ILK组(干扰质粒组),BIU-87 vector组(阴性对照组)。

1.2.2 TUNEL检测细胞凋亡 取对数生长期的各组稳定转染细胞,以每孔 2×10^5 细胞接种于放有盖玻片的6孔培养板中,待细胞生长至汇合度70%左右,PBS洗3次;4%多聚甲醛固定0.5~1h;滴加0.1% Triton X-100,冰浴2min;每个样品滴加50 μ l TUNEL检测液,37℃避光孵育60min,PBS洗3次;甘油封片后荧光显微镜下观察并拍照,实验重复3次。

1.2.3 流式细胞术分析细胞周期及凋亡 取对数生长期的各组稳定转染细胞,胰酶消化后,PBS洗涤3次,用70%乙醇4℃固定4h以上,运用流式细胞仪检测细胞凋亡,实验重复3次。

1.2.4 Western blot检测ILK siRNA对凋亡相关蛋白的影响

提取各组稳定转染细胞总蛋白,经SDS-PAGE凝胶电泳后,电转至PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭2h,Bcl-2、Bax、Caspase-3(1:300稀释)、 β -actin(1:1000稀释)一抗孵育,4℃过夜;HRP标记的羊抗兔和羊抗鼠IgG二抗(1:2000稀释),37℃孵育1h;增强化学发光显色系统显色,实验重复3次。

1.3 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用SPSS 18.0统计软件进行t检验。

2 结果

2.1 各组细胞凋亡检测结果

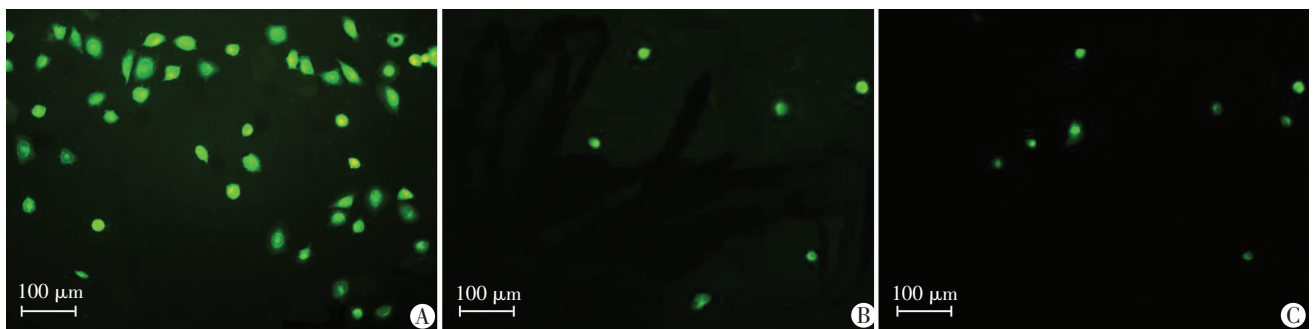
TUNEL检测结果显示(图1),BIU-87 si ILK组出现大量带有荧光的细胞(即凋亡细胞),而BIU-87细胞组和BIU-87 vector组仅有少量凋亡细胞出现。

2.2 各组细胞凋亡分析

流式细胞仪检测细胞凋亡结果显示(图2),BIU-87 si ILK细胞有(75.70 \pm 2.00)%的凋亡细胞,而BIU-87 vector组和BIU-87细胞组仅有(0.88 \pm 0.10)%和(1.66 \pm 0.90)%的凋亡细胞。

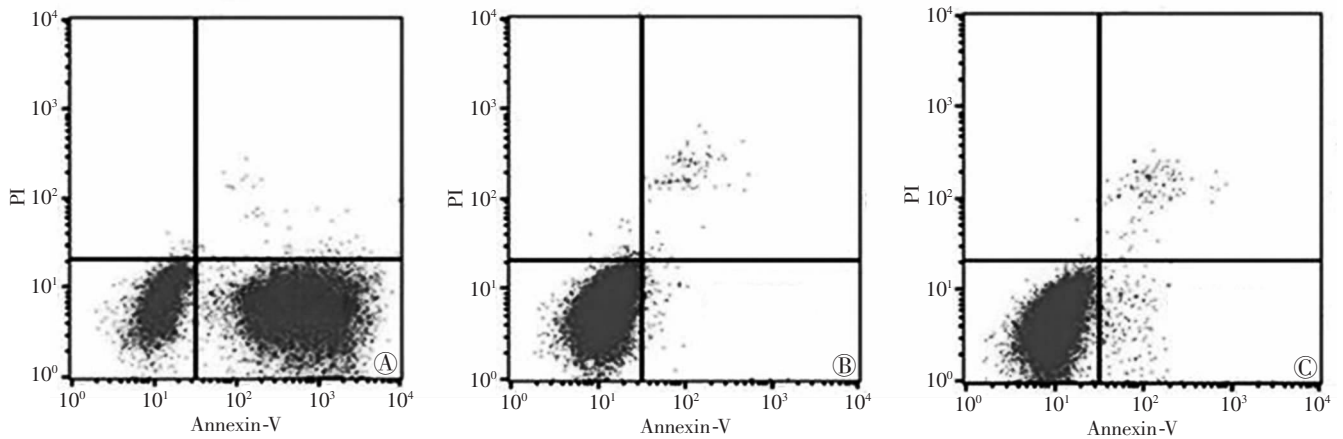
2.3 细胞凋亡相关蛋白的表达水平

Western blot结果显示,在BIU-87 si ILK组中,Bcl-2的表达明显降低,而Bax和Caspase-3的表达明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),见图3。



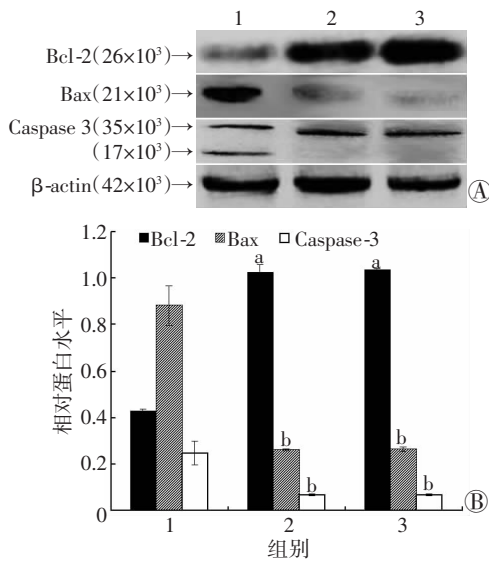
A: BIU-87 si ILK组; B: BIU-87 vector组; C: BIU-87细胞组

图1 TUNEL检测siRNA ILK对各组细胞凋亡的影响



A:BIU-87 si ILK 组;B:BIU-87 vector 组;C:BIU-87 细胞组

图2 流式细胞术检测各组细胞的凋亡



1: BIU-87 si ILK 组; 2: BIU-87 vector 组; 3: BIU-87 细胞组

A:各组凋亡相关蛋白的表达;B:各组凋亡相关蛋白的半定量分析

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与 BIU-87 siILK 组比较

图3 ILK siRNA 对各组凋亡相关蛋白的影响

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^[5-6]。在一些肿瘤中,ILK的表达和活性均有增高。激活ILK的表达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,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siRNA ILK或小分子抑制剂可以抑制其增殖并诱导其凋亡^[9-11]。然而,目前没有关于下调ILK的表达是否会影响膀胱癌细胞的生长及凋亡的研究,它也会因此成为一个极大的兴趣,并应进一步阐明。

我们前期实验显示特异性ILK siRNA通过调节

Akt、*GSK3* 和 β -catenin 的表达抑制体内外膀胱癌 BIU-87 细胞的增殖^[12-13]。本实验通过 siRNA 沉默 *ILK* 基因的表达检测其对 BIU-87 细胞凋亡的影响。本研究通过 TUNEL 及流式细胞术检测证实,ILK siRNA 可以诱导 BIU-87 细胞的凋亡。同时,一些凋亡相关蛋白的表达也发生了显著改变,例如,在 BIU-87 si ILK 组中, Bcl-2 的表达明显减少,而 Bax 的表达显著增高。Caspase-3 属于 ICE 蛋白酶家族,正常情况下,细胞质中 Caspase-3 以无活性的相对分子质量约为 35×10^3 的 Caspase-3 酶原(pro-Caspase-3)形式存在,只有当细胞发生凋亡时,才变为有活性的 Caspase-3 (约 17×10^3)^[14]。本研究显示 ILK siRNA 促进了 procaspase-3 的激活,并使激活性 procaspase-3 的表达增高。前期研究证实 *Akt* 有通过磷酸化具有凋亡效应的蛋白来抗凋亡的能力,如 Bcl-2 家族成员 *Bad*^[15]。

综上所述,在体内外,ILK 与膀胱癌细胞的生长、增殖和凋亡密切相关,ILK siRNA 通过调节关键蛋白的表达,如 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3,在细胞凋亡中发挥重要的作用。另外,ILK siRNA 并不是促进 Caspase-3 的生成,而可能是促进其活化,或者促使已活化的 Caspase-3 发挥水解作用,达到促凋亡的目的。这些发现显示,ILK 基因有望成为一个新的治疗靶点,为膀胱癌的临床诊断和治疗打下分子基础。进一步研究需要证实 ILK 的生物学功能和其调节细胞增殖和凋亡的确切分子机制。

参考文献:

[1] Castillo-Martin M, Domingo-Domenech J, Karmi-Schmidt O, et al. Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis[J]. Urol Oncol, 2010, 28(4): 401-408.
[2] Younes M N, Yigitbasi O G, Yazici Y D, et al. Effects of the integrin-linked kinase inhibitor QLT0267 on squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2007, 133

- (1): 15-23.
- [3] Han S, Sun X, Ritzenthaler J D, *et al.* Fish oil inhibits human lung carcinoma cell growth by suppressing integrin-linked kinase[J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(1): 108-117.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [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] 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.
- [10] Muranyi A L, Dedhar S, Hogge D E. Targeting integrin linked kinase and FMS-like tyrosine kinase-3 is cytotoxic to acute myeloid leukemia stem cells but spares normal progenitors[J]. *Leuk Res*, 2010, 34(10): 1358-1365.
- [11] El-Toumy 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] 高娟, 朱军, 潘湘阳, 等. 整合素连接激酶基因沉默对膀胱癌 BIU-87 细胞增殖能力的影响及其机制[J]. *中国生物制品学杂志*, 2011, 24(7): 785-790.
- [13] 高娟, 朱军, 潘湘阳, 等. 特异性 ILK siRNA 对膀胱癌移植瘤生长及 p-Akt、p-GSK3 β 表达的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2011, 33(18): 1947-1950.
- [14] 管维, 周四维, 向松涛, 等. 膀胱移行细胞癌中凋亡相关蛋白 survivin 及 caspase3 的表达及相关性[J]. *现代泌尿外科杂志*, 2009, 14(5): 327-330.
- [15] Botella-Estrada R, Malet G, Revert F, *et al.* Antitumor effect of B16 melanoma cells genetically modified with the angiogenesis inhibitor masin[J]. *Cancer Gene Ther*, 2001, 8(4): 278-284.

(收稿:2012-06-04;修回:2012-07-26)

(编辑 张 维)

文章编号:1000-5404(2012)21-2157-01

个案与短篇

体外膜肺氧合成功救治暴发性心肌炎并超长心脏停搏 1 例

田 进, 刘全中, 吴朝晖, 刘朝晖, 廖贤平 (510507 广州, 武警广东省总队医院 ICU)

[关键词] 暴发性心肌炎; 心脏骤停; 超长心肺复苏; 体外膜肺氧合; 主动脉球囊反搏; 血液滤过

[中图分类号] R459.7 [文献标志码] B

1 临床资料

患者女性, 54 岁。因“咽痛、咳嗽 20 余天, 呕吐 2 d, 胸闷气促 8 h”于 2011 年 1 月 26 日 8:20 入院。患者于 20 余天前感冒后出现咽痛、咳嗽, 2 d 前出现呕吐、头晕, 于 8 h 前呕吐加重, 并心前区闷痛、气促, 考虑“急性心梗, 病毒性心肌炎”收入心内科。入院查体: 脉搏 132/min, 血压 79/48 mmHg, 烦躁, 双肺呼吸音粗, 可闻及细湿性啰音, 心界左侧扩大, 心率 145/min, 心律不齐, 心音强弱不等, 各瓣膜区未闻及杂音。心电图示: 房颤、频发室早, ST V1-4 弓背向上抬高 0.2~0.4 mV。心肌酶谱: Tnl 34.5 ng/ml, CK-MB 119.5 U/L, CK 1 121.5 U/L。初步诊断: ①急性心梗, 心源性休克; ②病毒性心肌炎待排。入院后患者多次出现室颤, 予以电除颤等抢救, 急送介入室, 冠脉造影仅见左前降支近端狭窄 20%~30%, 透视下见心肌收缩无力, 心脏搏动减弱。造影结束时患者再次出现室颤及心室停搏, 深昏迷、血压测不出, 立即予

以心肺复苏、临时心脏起搏等抢救。约 40 min 后, 患者心跳恢复为起搏心律, 无脉搏, 有创动脉血压 45~80/20~35 mmHg, 遂予以体外膜肺氧合(ECMO)辅助循环并转入 ICU。

转入 ICU 后继续抗休克、抗心律失常以及 ECMO 维持循环, 予以抗病毒、免疫调节、心肾脑等重要脏器功能支持治疗, 血压维持在 60~80/50~70 mmHg, 起搏心律、阵发性室上速及室颤交替出现。心脏彩超示: 心脏搏动微弱。患者逐渐出现尿少、水肿, 至 27 日血肌酐升至 220.8 μ mol/L, 考虑急性肾功能不全, 予以床旁血液滤过治疗。28 日 8:00 左右恢复为自主窦性心律, 约 90~110/min, 可触及微弱脉搏, 血压 70~100/50~75 mmHg, 但出现无尿、右下肢淤肿、肌红蛋白 162 700.1 ng/ml, 考虑骨筋膜室综合征、横纹肌溶解综合征、急性肾衰竭, 予以右下肢切开减压术, 无好转, 于 29 日行截肢术。术后患者血压可维持在 90~120/60~80 mmHg, 肌红蛋白逐渐降至正常, 31 日心脏彩超示“心脏搏动较前好转, 射血分数 42%”, 遂撤除体外膜肺氧合器, 予以主动脉球囊反搏辅助循环。2 月 4 日患者完全清醒, 7 日成功撤除呼吸机; 11 日成功撤除主动脉球囊反搏; 17 日小便量恢复正常, 于 2 月 22 日完全停止血液滤过治疗, 转回心内科至康复出院。

[通信作者] 田 进, 电话: (020)61627003, E-mail: wujingtianjin@126.com

(下转 2175 页)