

. 胶质瘤专题 .

FAK siRNA 重组质粒的构建及其对胶质瘤 U251 细胞增殖及侵袭能力的抑制作用

黄书岚 成于思 王 辉 汪超甲

【摘要】目的 探讨应用 RNA 干扰技术沉默黏着斑激酶(FAK)基因表达对人脑胶质瘤 U251 细胞增殖和侵袭能力的影响。**方法** 将构建成功的 FAK siRNA 重组质粒转染至 U251 细胞,合成与 FAK 基因序列无关的 siRNA 作为阴性对照,以野生型 U251 细胞作为空白对照组。运用 PCR 和免疫印迹法观察 FAK mRNA 和蛋白表达情况,实时细胞分析仪检测观察细胞增殖情况,Transwell 小室侵袭模型研究细胞侵袭能力。**结果** 重组质粒 pBSilence1.1-FAK 构建成功;与空白对照组和阴性对照组相比,干扰组细胞增殖减慢($P<0.05$);Transwell 小室体外侵袭结果显示,干扰组穿膜细胞数仅为 (17.1 ± 1.0) ,明显低于空白对照组 $(68.2\pm 4.5; P<0.05)$ 和阴性对照组 $(67.0\pm 2.3; P<0.05)$ 。**结论** 沉默 FAK 基因表达可有效抑制人胶质瘤 U251 细胞的增殖和侵袭能力。

【关键词】 胶质瘤; U251 细胞; 黏着斑激酶; 小干扰 RNA; 细胞增殖; 细胞侵袭

【文章编号】 1009-153X(2016)06-0336-05 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 789

Construction of siRNA recombinant plasmid targeting focal adhesion kinase gene and its effect on the proliferation and invasiveness of human glioma U251 cells

HUANG Shu-lan¹, CHENG Yu-si¹, WANG Hui², WANG Chao-jia². 1. Department of Neurosurgery, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China; 2. Department of Neurosurgery, Affiliated Taihe Hospital, Hubei Medicine College, Shiyan, 442000, China

【Abstract】Objective To explore the effect of silencing focal adhesion kinase (FAK) gene on the proliferation and invasiveness of human glioma U251 cells. **Methods** U251 cells were divided into 3 groups, i.e. blank group, negative control group and experiment group. The FAK small interference RNA (siRNA) recombinant plasmid was transfected into human glioma U251 cells in the experimental group. The expressions of FAK mRNA and protein were detected by real time PCR and Western-blot respectively, and the U251 cells proliferative and invasive capabilities were measured respectively by RT cell analyzer (RTCA) and Transwell chamber invasion assay. **Results** The pBSilence1.1-FAK recombinant plasmid was successfully constructed. RTCA results showed that U251 cell proliferative capability was significantly lower in the experimental group than those in the blank group and the negative control group ($P<0.05$). Transwell chamber invasion assay showed that the number of U251 cells of transwell chamber $[(17.137\pm 1.012)$ cells] was significantly fewer in the experimental group than those in the blank group $[(68.218\pm 4.547)$ cells] and the negative control group $[(67.034\pm 2.272)$ cells] ($P<0.05$). **Conclusion** Silencing FAK gene can significantly inhibit proliferation and invasiveness of human glioma U251 cells in vitro.

【Key words】 Glioma; U251 cells; Focal adhesion kinase; Small interference RNA; Proliferation; Invasiveness

黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)在细胞间及细胞与细胞外基质黏附中起关键作用,与细胞周期调控、细胞增殖、细胞凋亡、细胞侵袭及迁移等密切相关^[1]。胶质瘤 FAK 呈高表达,并与其转移、侵袭有关^[2,3]。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一种转录后基因沉默现象,通过靶基因的双链 RNA 特

异性降解同源 mRNA 分子并抑制目的蛋白表达,从而产生基因沉默效应。本研究运用 RNAi 技术抑制人胶质瘤 U251 细胞 FAK 基因的表达,观察其对 U251 细胞增殖和侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 人胶质瘤 U251 细胞由湖北医药学院附属太和医院生命科学研究所以惠赠,质粒 pBSilence1.1 [含 Neo、Kan 抗性基因及绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因]购于武汉巴菲尔公司。

1.2 方法

1.2.1 siRNA 序列设计及合成 在 GenBank 中查找人

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2016.06.006

基金项目:湖北省科技厅中青年人才项目(Q20092405)

作者单位:430060 武汉,武汉大学人民医院神经外科(黄书岚、成于思);442000 十堰,湖北医药学院附属太和医院神经外科(王 辉、汪超甲)

通讯作者:王 辉, E-mail: Sunny6910@163.com

FAK mRNA 序列,从 FAK 编码区中寻找符合设计原则及 pBSilence1.1 载体要求的靶序列,通过 BLAST 确定与其他相关基因无同源性。靶序列如下:Fak1 5'-CCCCAACTTGAATCACACA-3'; Fak2 5'-GTGCAATGGAGCGAGTATT-3'; Fak3 5'-GATCAAGTGGAACAGGAAA-3'。同时合成与 FAK 基因序列无关的 siRNA 作为阴性对照(NC)。以野生型 U251 细胞作为对照组(CON)。

1.2.2 重组质粒的构建 将合成的单链目的基因片段经退火成互补双链;酶切质粒 pBSilence1.1,回收线性质粒 DNA 大片段。用 T4 连接酶(日本 TAKARA 公司)将稀释后的退火片段连接到经酶切的线性载体 pBSilence1.1 中,构建重组质粒,分别命名为:pBSilence1.1-FAK1、pBSilence1.1-FAK2、pBSilence1.1-FAK3、pBSilence1.1-NC。将重组质粒转入 E.coli DH 5 α 感受态,卡那霉素(30 μ g/ml)筛选抗性克隆。小量扩增、酶切鉴定,并送测序。

1.2.3 转染 U251 细胞 将对数生长期 U251 细胞按每孔 5.0 $\times 10^5$ 接种于 6 孔板,常规培养 18~24 h 后,细胞汇合约 90%。将重组质粒与转染试剂 LipofectamineTM2000(美国 Invitrogen 公司)按照 4:10 的质量体积比混合(μ g/ μ l)后加到每孔,转染 6 h 后将培养液更换为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液。24 h 后荧光显微镜下观察 GFP 表达情况。

1.2.4 筛选稳转的细胞株 转染 48 h 后,采用 TRIzol 提取各组细胞总 RNA,进行实时荧光定量 PCR 检测。挑选出抑制效率最高的一组,加入 G418(终浓度 200 μ g/ml)筛选阳性克隆细胞扩大培养,用于后续试验。

1.2.5 PCR 检测 FAK mRNA 的表达 FAK 基因(扩增片段为 408 bp)引物序列为 5'-ACGGCACCATCCCTAACC-3',下游为 5'-TCTCACGCTGTCCGAAGT-3';内参 β -actin 基因(扩增片段为 222 bp)引物上游序列为 5'-GATGCAGAAGGAGATCACTG-3',下游为 5'-GGGTGTAACGCAACTAAGTC-3'。扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,按下述参数循环 35 次:94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,56 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min,16 $^{\circ}$ C 保存。以 FAK/ β -actin 的比值半定量分析 FAK mRNA 的表达水平。

1.2.6 免疫印迹法检测 FAK 蛋白表达 收集各组细胞,提取总蛋白。每孔依次加入等量样品,80 V、30 min,再 110 V、50 min 电泳,20 V、50 min 恒压转膜,5%脱脂奶室温封闭 2 h;加 FAK 一抗(1:1000;美国 Abcam 公司)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 漂洗 10 min \times 3 次,

AP 标记二抗[生工生物工程(上海)股份有限公司]室温杂交 2 h,TBST 漂洗 10 min \times 3 次,显色、拍照。以 FAK/ β -actin 表示 FAK 蛋白的相对表达水平。

1.2.7 实时细胞分析仪检测细胞增殖能力 按文献[4]所示,在无菌的 E-plate 中,每孔加入 50 μ l 含 10% 胎牛血清无双抗的 DMEM 培养液,放入分析仪中校正数据。取出 E-plate,每孔接种 5 $\times 10^3$ 细胞,终体积为 200 μ l,每组细胞设置 3 个复孔。将 E-plate 再次放入仪器静置 30 min 后开始检测,共检测 80 h,每隔 15 min 检测一次。分析仪将贴壁细胞产生的信号转化为细胞指数(cell index, CI),可反映细胞的增殖能力。CI 越大,细胞增殖能力越强。

1.2.8 Transwell 实验检测细胞侵袭能力 在 Transwell 小室(美国 BD Falcon 公司)内加入 100 μ l 的 Matrigel (200 μ g/ml),风干备用。取 200 μ l 细胞悬液(1×10^5 /ml)加入上室,500 μ l 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液加入下室,37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 培养。24 h 后取出 Transwell 小室,用棉签擦去 Matrigel 胶和上室内的细胞,95%乙醇固定细胞 5 min,2%结晶紫染色 20 min,剪下 Transwell 小室膜贴于载玻片上。倒置显微镜下观察,随机选取 5 个低倍视野计算穿膜细胞个数。

1.2.9 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析; $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定 将重组质粒进行酶切及测序,结果均证明 FAK 基因 siRNA 重组质粒表达载体构建成功,见图 1。

2.2 转染效果

2.2.1 荧光显微镜下观察 转染后 24 h, pBSilence

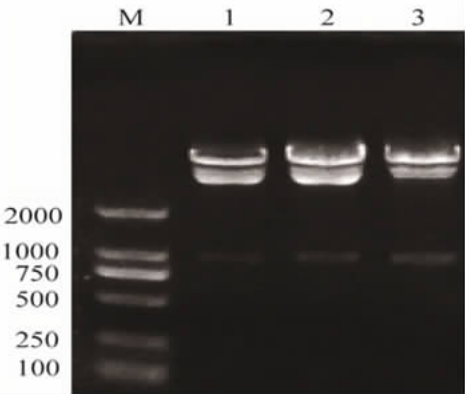


图1 重组质粒酶切后凝胶电泳图

M. Maker; 1. pBSilence1.1-Fak1; 2. pBSilence1.1-Fak2; 3. pBSilence1.1-Fak3

1.1- FAK1、pBSilence1.1-FAK2、pBSilence1.1-FAK3和pBSilence1.1-NC组均可见GFP的表达(图2),证实目的基因转染成功。

2.2.2 G418 筛选结果 pBSilence1.1-FAK3组抑制效率最高,见图3。pBSilence1.1-FAK3组、pBSilence1.1-NC组细胞经G418筛选14 d后,显微镜下观察表现见图4。

2.2.3 FAK mRNA 表达变化 pBSilence1.1- FAK3组较 CON 组 明显降低($P<0.05$), CON 组与pBSilence1.1-NC组无差异($P>0.05$),见图5。说明FAK siRNA能有效地抑制U251细胞中FAK mRNA的表达。

2.2.4 FAK 蛋白表达变化 pBSilence1.1-FAK3组FAK蛋白表达降低,与CON组和pBSilence1.1-NC组比较差异有统计学意义($P<0.05$),CON组和pBSilence1.1-NC组差异无统计学意义($P>0.05$),见图6。说明FAK siRNA能显著抑制U251细胞中FAK蛋白的表达。

2.3 沉默FAK基因表达对U251细胞增殖的影响 见图7,1 h内3组细胞CI无统计学差异($P>0.05$),之后CI出现差别,pBSilence1.1-FAK3组细胞较CON组和pBSilence1.1-NC组增殖明显减慢($P<0.05$)。由此可以看出,下调FAK的表达水平可有效抑制U251细胞的增殖能力。

2.4 沉默FAK基因表达对U251细胞侵袭的影响 pBSilence 1.1-FAK3组细胞侵袭能力较CON组和pBSilence 1.1-NC组明显下降($P<0.05$),见图8。

3 讨论

胶质瘤是颅内最常见的原发性肿瘤,主要来源于神经上皮,呈侵袭性生长,具有发病率高、病死率高、复发率高及治愈率低的特点^[5,6];治疗方法主要有手术联合放化疗等综合疗法,但疗效不佳^[7]。基因治疗是近年发展迅猛的肿瘤治疗新策略,已成为国内外研究的热点。FAK是多条信号转导通路的关键节点,调控细胞的生长、发育,参与肿瘤的发生、发展、迁移、侵袭和血管生成等生物学过程^[8-10]。研究表明,FAK在胶质瘤、前列腺癌、卵巢癌、甲状腺癌中均高表达^[11,12]。Gutenberg等^[3]发现FAK表达量与胶质瘤恶性程度呈正相关,且在肿瘤转移、侵袭过程中有重要作用。Haskell等^[13]研究表明恶性胶质瘤新生血管的FAK表达增高。Roberts等^[14]研究发现选择性FAK小分子抑制剂PF-562271可诱导肿瘤细胞凋亡,并能抑制肿瘤血管生成。

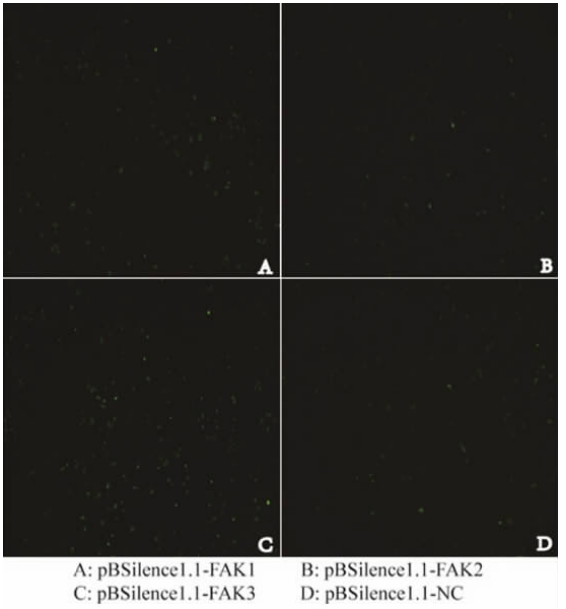


图2 各组细胞转染后24 h荧光显微镜下表现(×100)

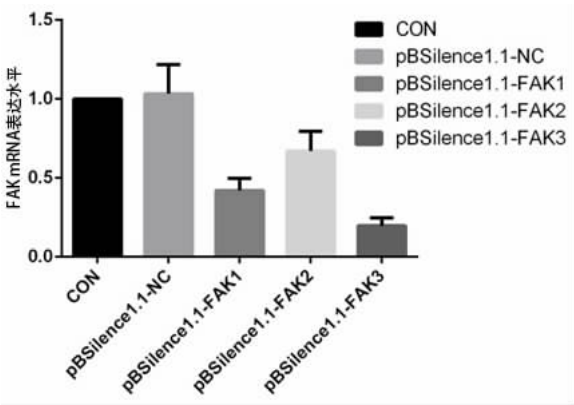


图3 各组细胞FAK mRNA表达变化

CON. 野生型U251细胞;FAK:黏着斑激酶

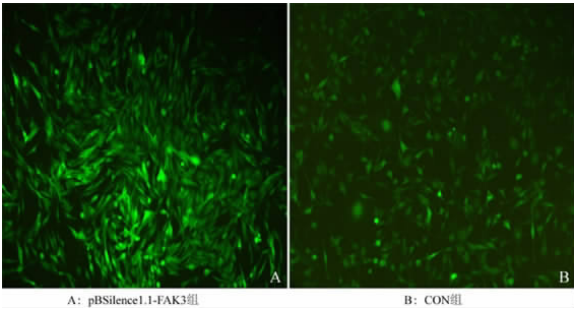


图4 经G418筛选后荧光显微镜下观察(×100)

CON. 野生型U251细胞

RNAi可以特异性抑制靶基因的表达,导致相应功能的缺失,现已广泛应用于基因功能研究和基因治疗等领域^[15]。体外RNAi实验表明,重组质粒的转染是决定RNA干扰效果的关键因素,与细胞种类及

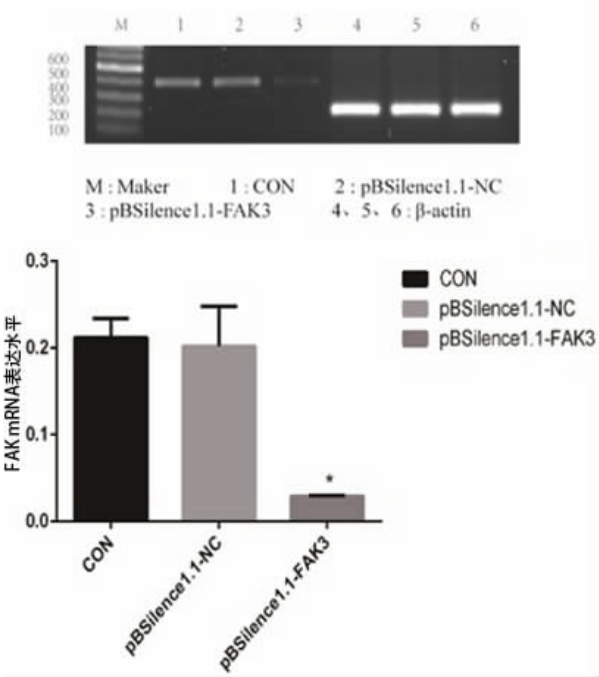


图5 G418 筛选后 U251 细胞 FAK mRNA 表达量变化
CON. 野生型 U251 细胞; 与 CON 组及 pBSilence1.1-NC 组比较, * $P < 0.05$

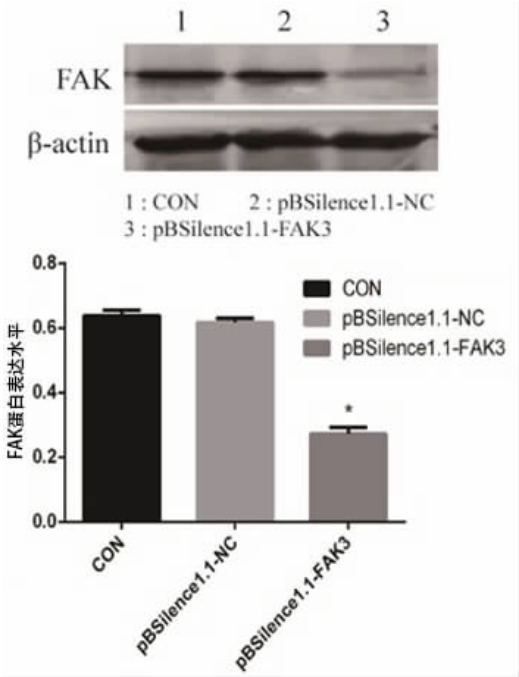


图6 G418 筛选后 U251 细胞 FAK 蛋白表达量变化
CON. 野生型 U251 细胞; 与 CON 组及 pBSilence1.1-NC 组比较, * $P < 0.05$

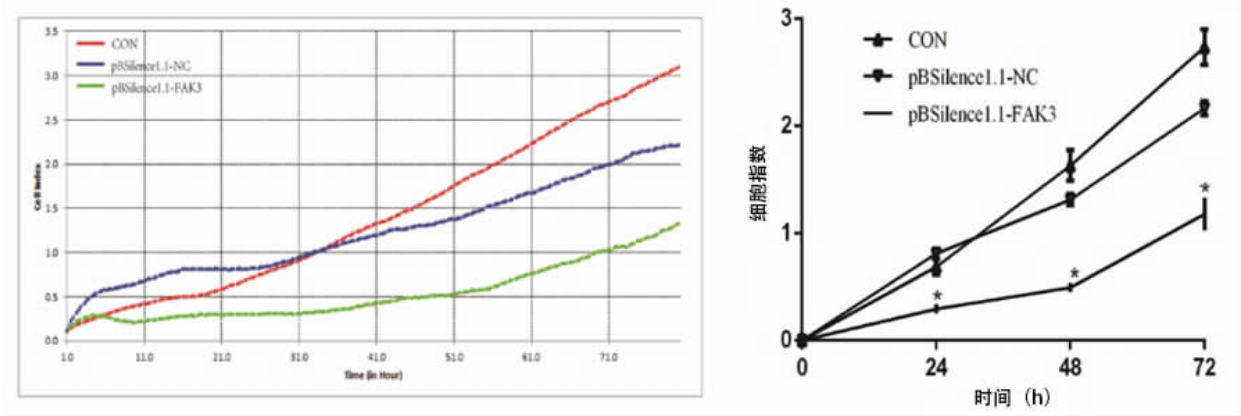


图7 沉默黏着斑激酶基因表达对 U251 细胞增殖的影响
与 CON 组及 pBSilence1.1-NC 组相应值比较, * $P < 0.05$

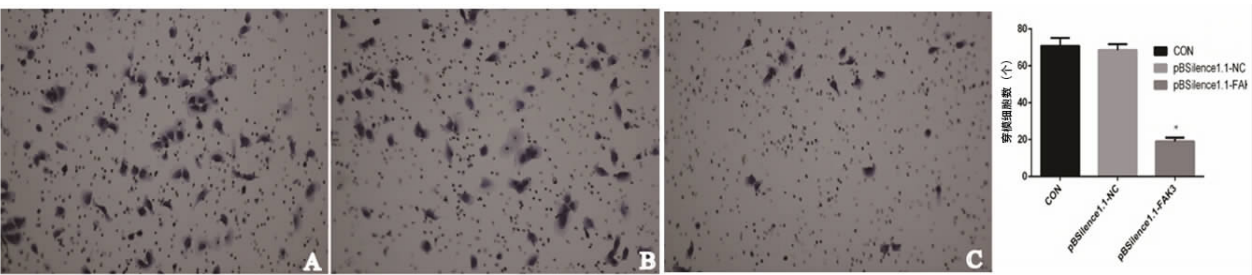


图8 沉默黏着斑激酶基因表达对 U251 细胞侵袭能力的影响($\times 100$)
与 CON 组及 pBSilence1.1-NC 组比较, * $P < 0.05$

状态、转染条件密切相关。所以,本实验通过优化转染条件,筛选单克隆细胞,建立稳定沉默 FAK 基因的 U251 细胞株,使其 siRNA 发挥最大的沉默效应,结果说明,靶向 siRNA 能够下调 FAK 基因的表达,并能有效抑制 U251 细胞的增殖、侵袭能力。FAK 沉默后,胶质瘤侵袭能力下降,可能与肿瘤细胞粘附作用、裂解酶分泌受到抑制有关^[16]。

综上所述,FAK 与胶质瘤发生、发展密切相关, RNA 干扰下调 FAK 的表达,可抑制胶质瘤增殖、侵袭。这为以 FAK 为靶点的胶质瘤基因治疗提供了理论依据,同时也为运用 RNAi 技术进行双基因甚至多基因的研究奠定实验和技术基础,但 siRNA 在体内对 FAK 基因沉默效应如何有待进一步研究。

【参考文献】

- [1] Yoon H, Choi YL, Song JY, *et al.* Targeted inhibition of FAK, PYK2 and BCL-XL synergistically enhances apoptosis in ovarian clear cell carcinoma cell lines [J]. PLOS ONE, 2014, 9(2): e885872.
- [2] Lee BY, Timpson P, Horvath LG, *et al.* FAK signaling in human cancer as a target for therapeutics [J]. Pharmacol Ther, 2015, 146: 132-149.
- [3] Gutenberg A, Br Ck W, Buchfelder M, *et al.* Expression of tyrosine kinases FAK and Pyk2 in 331 human astrocytomas [J]. Acta Neuropathol, 2004, 108(3): 224-230.
- [4] Song Y, Li L, Ou Y, *et al.* Identification of genomic alterations in oesophageal squamous cell cancer [J]. Nature, 2014, 509(7498): 91-95.
- [5] Zeng T, Cui D, Gao L. Glioma: an overview of current classifications, characteristics, molecular biology and target therapies [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2015, 20: 1104-1115.
- [6] Lombardi G, Della Puppa A, Di Stefano AL, *et al.* Gliomas [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 470523.
- [7] Wen PY, Reardon DA. Progress in glioma diagnosis, classification and treatment [J]. Nat Rev Neurol, 2016, 12(2): 69-70.
- [8] Schaller MD. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions [J]. J Cell Sci, 2010, 123(7): 1007-1013.
- [9] Zhao X, Guan J. Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2011, 63(8): 610-615.
- [10] Li YM, Hall WA. Cell surface receptors in malignant glioma [J]. Neurosurgery, 2011, 69(4): 980-994.
- [11] Sulzmaier FJ, Jean C, Schlaepfer DD. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications [J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(9): 598-610.
- [12] Eleniste PP, Bruzzaniti A. Focal adhesion kinases in adhesion structures and disease [J]. J Signal Transduct, 2012, 2012: 296450.
- [13] Haskell H, Natarajan M, Hecker TP, *et al.* Focal adhesion kinase is expressed in the angiogenic blood vessels of malignant astrocytic tumors in vivo and promotes capillary tube formation of brain microvascular endothelial cells [J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(6): 2157-2165.
- [14] Roberts WG, Ung E, Whalen P, *et al.* Antitumor activity and pharmacology of a selective focal adhesion kinase inhibitor, PF-562, 271 [J]. Cancer Res, 2008, 68(6): 1935-1944.
- [15] Okura H, Smith CA, Rutka JT. Gene therapy for malignant glioma [J]. Mol Cell Ther, 2014, 2: 21.
- [16] Tomakidi P, Schulz S, Proksch S, *et al.* Focal adhesion kinase (FAK) perspectives in mechanobiology: implications for cell behaviour [J]. Cell Tissue Res, 2014, 357(3): 515-526.

(2016-02-02 收稿, 2016-04-18 修回)