

【基础研究】

作者简介:金 雯(1982-),女,安徽泾县人,硕士,讲师,研究方向:肿瘤发病机制。

shRNA PXN group were significantly lower than those in the control group and shRNA PXN negative control group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the expression of PXN and FAK mRNA between the control group and shRNA PXN negative control group ($P > 0.05$). The levels of serum PXN and FAK of nude mice in the shRNA PXN group were significantly lower than those in the control group and shRNA PXN negative control group ($P < 0.05$); there was no difference in the levels of serum PXN and FAK between the control group and shRNA PXN negative control group ($P > 0.05$).

Conclusion Down-regulation of PXN expression can inhibit the growth of hepatocarcinoma in nude mice. The expression of FAK decreased with the decrease of PXN. Combined detection of PXN and FAK expression is expected to become a new target for hepatocellular carcinoma prevention and control.

Key words: paxillin; gene reduction; hepatocellular carcinoma; focal adhesion kinase

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是全球高发恶性肿瘤, 位居我国癌症致死率第 2 位。HCC 手术切除率低, 早期转移和术后复发率高, 术后 2 a 复发率高达 57.0% ~ 81.0%^[1]。桩蛋白 (paxillin, PXN) 作为整合素信号通路的一种接头蛋白^[2], 在肿瘤细胞铺展、转移、侵袭过程中起关键性作用。PXN 与黏着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 共同锚定于黏着斑 (focal adhesions, Fas), 可通过整合素信号通路募集多种信号蛋白实现对肿瘤细胞增殖、侵袭过程的影响。课题组前期利用短发夹 RNA (short hairpi, shRNA) 基因干扰技术成功下调 SMMC-7721 细胞 PXN 的表达, 并通过 Transwell 细胞侵袭实验与细胞凋亡实验观察 PXN 表达下调对肝癌细胞运动模式的影响, 结果发现, PXN 下调可以抑制肝癌细胞的生长^[3], 提示 PXN 对肝癌细胞的运动和铺展可能具有重要价值。本研究在前期研究的基础上, 将 PXN 表达不同的载体细胞注入裸鼠背部, 观察肝癌细胞在裸鼠体内的生长状况, 旨在为 HCC 的临床靶向治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物及细胞 6~8 周龄裸鼠 24 只, 购自中国科学院上海实验动物中心, 饲养于上海中医药大学无特定病原级动物房; 人肝癌细胞 SMMC-7721 由中国科学院细胞库提供。

1.2 主要试剂与仪器 RPMI (rswell park memorial institute)-1640、达尔伯克改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modification of Eagle's medium, DMEM)、磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS) (美国 Gibco 公司), 胎牛血清 (以色列 Biological Industries 公司), 青链霉素、0.5 g · L⁻¹ 胰蛋白酶细胞消化液、牛血清白蛋白、脂质体 2000 (Lipofectamine® 2000)、Opti-MEM® I Reduced Serum Medium (美国

Lifetechnologies 公司), 结晶紫 (上海国药集团化学试剂有限公司), Matrigel (美国 Corning 公司), Paxillin 抗体、Fak 抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (武汉博士德生物工程有限公司), IRDye 800CW goat anti-rabbit IgG (H + L) (美国 Licor Biosciences 公司); Thermo 3111 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), CX23 显微镜 (日本 Olympus 公司), YJ-840/YJ-1340 超净工作台 (苏州苏信净化设备厂), 移液器 (德国 Eppendorff 公司), Leica EG1150H 石蜡包埋机和 Leica RM2235 石蜡切片机 (德国 Leica Microsystems 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组与细胞移植 将 24 只裸鼠随机分为对照组、shRNA PXN 阴性对照组和 shRNA PXN 组, 每组 8 只。3 组裸鼠背部分别植入正常 SMMC-7721 细胞、转染 shRNA PXN 阴性对照空质粒 SMMC-7721 细胞和转染 shRNA PXN SMMC-7721 细胞, 于 7 周末采血并处死裸鼠, 取肿瘤组织称质量, 拍照记录肿瘤大小。

1.3.2 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测 3 组裸鼠血清 PXN 和 FAK 水平 按照试剂盒说明书, 将对照组、shRNA PXN 阴性对照组和 shRNA PXN 组血清加入 96 孔板, 向 96 孔板分别依次加入 50 μL 生物素标记抗体、80 μL 链霉亲和素-HRP 和底物 A、B, 震荡、混匀, 37 °C 避光温育后洗涤、震荡。取酶标板再加入 50 μL 终止液, 在 450 nm 波长处测定各孔的吸光度值, 根据标准曲线计算 PXN 和 FAK 水平。

1.3.3 免疫组织化学法检测 3 组裸鼠肿瘤组织中 PXN、FAK 蛋白表达 将肿瘤组织用体积分数 10% 甲醛固定, 石蜡包埋, 二甲苯脱蜡 3 次, 醇苯洗涤 1 次, 无水乙醇洗涤 2 次, 体积分数 95% 乙醇洗涤 2 次;

蒸馏水洗涤 1 次,1×PBS 清洗 3 次。体积分数 3% 过氧化氢封闭 15 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min;体积分数 10% 正常山羊血清封闭 30 min,加一抗,4℃ 孵育过夜;加二抗,37℃ 孵育 1 h;PBS 清洗 3 次,每次 5 min,二氨基联苯胺(diaminobenzidine,DAB)显色;乙醇脱水、二甲苯透明,中性树胶封片;镜下观察,拍照。应用 IPP 图像分析软件测定 PXN、FAK 蛋白的相对表达量。

1.3.4 反转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction,RT-PCR)检测 3 组裸鼠肿瘤组织中 PXN 和 FAK mRNA 表达 对照组、shRNA PXN 阴性对照组和 shRNA PXN 组肿瘤组织中加入 600 μL 裂解液,反复吹打使其充分裂解,室温放置 5 min;12 000 r·min⁻¹离心 2~5 min,取上清液,按照 RT-PCR 试剂盒说明书进行操作,收集离心后吸附柱中的 RNA 溶液,分光光度计定量 RNA 含量,提取 RNA 总量 10 μg,-80℃ 保存。配制 cDNA 反应体系,涡旋震荡、离心后 42℃ 孵育 30~50 min,85℃ 孵育 5 min。cDNA 置于-20℃ 保存。PCR 扩增程序:50℃ 2 min;95℃ 10 min;95℃ 15 s,60℃ 60 s,40 个循环;采用 2^{-ΔΔCt}法计算基因的相对表达量。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用最小显著性差异法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 3 组裸鼠肿瘤质量比较 肉眼观发现,shRNA PXN 组肿瘤体积明显小于对照组和 shRNA PXN 阴性对照组。对照组、shRNA PXN 阴性对照组和

shRNA PXN 组裸鼠肿瘤质量分别为(1.59 ± 0.50)、(1.41 ± 0.39)、(0.57 ± 0.18)g;shRNA PXN 组裸鼠肿瘤质量低于对照组和 shRNA PXN 阴性对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);对照组与 shRNA PXN 阴性对照组裸鼠肿瘤质量比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

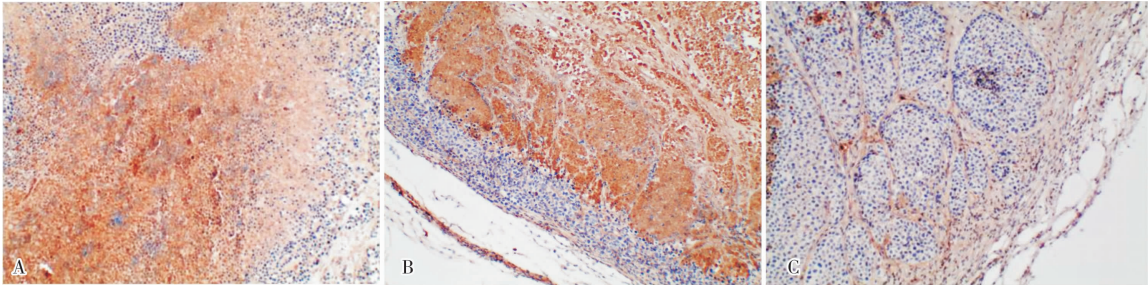
2.2 3 组裸鼠血清 PXN 和 FAK 水平比较 结果见表 1。shRNA PXN 组裸鼠血清 PXN 和 FAK 水平显著低于对照组和 shRNA PXN 阴性对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);对照组与 shRNA PXN 阴性对照组裸鼠血清 PXN 和 FAK 水平比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 3 组裸鼠血清中 PXN 和 FAK 水平比较
Tab.1 Comparison of the levels of serum PXN and FAK of nude mice among the three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PXN/(μg·L ⁻¹)	FAK/(ng·L ⁻¹)
对照组	8	46.94±1.61	104.40±3.96
shRNA PXN 阴性对照组	8	46.35±2.99	106.01±2.00
shRNA PXN 组	8	12.92±1.24 ^a	58.96±6.59 ^a
F		553.500	101.693
P		0.000	0.000

注:与对照组和 shRNA PXN 阴性对照组比较^a $P<0.05$ 。

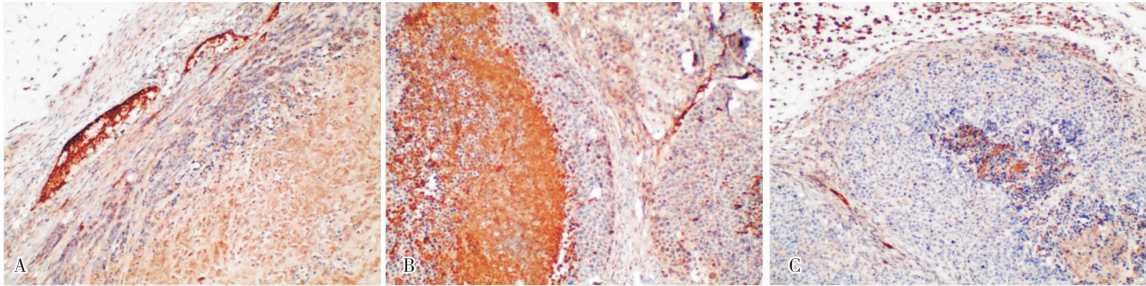
2.3 3 组裸鼠肿瘤组织中 PXN 和 FAK 蛋白表达比较 结果见图 1、图 2 和表 2。shRNA PXN 组裸鼠肿瘤细胞内棕黄色染色面积较小,对照组和 shRNA PXN 阴性对照组裸鼠肿瘤细胞棕黄色染色区域面积较大。shRNA PXN 组裸鼠肿瘤组织中 PXN 和 FAK 蛋白表达显著低于对照组和 shRNA PXN 阴性对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);对照组与 shRNA PXN 阴性对照组裸鼠肿瘤组织中 PXN 和 FAK 表达比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。



A:对照组;B:shRNA PXN 阴性对照组;C:shRNA PXN 组。

图 1 3 组裸鼠肿瘤组织中 PXN 蛋白表达(DAB 染色,×100)

Fig.1 Expression of PXN protein in tumor tissues of nude mice in the three groups (DAB staining, ×100)



A:对照组;B:shRNA PXN 阴性对照组;C:shRNA PXN 组。

图 2 3 组裸鼠肿瘤组织中 FAK 蛋白表达 (DAB 染色, ×100)

Fig.2 Expression of FAK protein in tumor tissues of nude mice in the three groups (DAB staining, ×100)

表 2 3 组裸鼠肿瘤组织中 PXN 和 FAK 蛋白表达比较

Tab.2 Comparison of the expression of PXN and FAK protein in tumor tissues of nude mice among the three groups

(x̄ ± s)			
组别	n	PXN 蛋白	FAK 蛋白
对照组	8	14 197.82 ± 1 035.19	10 864.96 ± 1 546.45
shRNA PXN 阴性对照组	8	16 158.64 ± 1 500.34	11 827.99 ± 1 700.16
shRNA PXN 组	8	1 218.00 ± 43.77 ^a	1 142.56 ± 97.94 ^a
F		178.465	59.423
P		0.000	0.000

注:与对照组和 shRNA PXN 阴性对照组比较^aP < 0.05。

2.4 3 组裸鼠肿瘤组织中 PXN 和 FAK mRNA 表达比较 结果见表 3。shRNA PXN 组裸鼠肿瘤组织中 PXN 和 FAK mRNA 表达显著低于对照组和 shRNA PXN 阴性对照组,差异有统计学意义 (P < 0.05);对照组和 shRNA PXN 阴性对照组裸鼠肿瘤组织中 PXN 和 FAK mRNA 表达比较差异均无统计学意义 (P > 0.05)。

表 3 3 组裸鼠肿瘤组织中 PXN 和 FAK mRNA 表达比较

Tab.3 Comparison of the expression of PXN and FAK mRNA in tumor tissues of nude mice among the three groups

(x̄ ± s)			
组别	n	PXN mRNA	FAK mRNA
对照组	8	0.553 ± 0.049	0.677 ± 0.014
shRNA PXN 阴性对照组	8	0.541 ± 0.013	0.694 ± 0.042
shRNA PXN 组	8	0.249 ± 0.016 ^a	0.279 ± 0.029 ^a
F		94.731	180.999
P		0.000	0.000

注:与对照组和 shRNA PXN 阴性对照组比较^aP < 0.05。

3 讨论

PXN 定位于 Fas,是受 FAK 影响的下游底物蛋白,可以和多种信号基因结合。PXN 和 FAK 在 Fas 的装配中发挥着重要作用,从而实现细胞的黏附、侵袭^[4]。FAK-Src 复合物介导细胞的黏附、侵袭运动往往需要通过 PXN 和下游信号激酶的相互作用来实现^[5]。在细胞迁移运动中,蛋白激酶参与调控肝

细胞生长因子诱导的胞外信号调节因子与 PXN 之间的相互作用^[6],上述研究提示,PXN 可以募集多种信号蛋白参与调控细胞运动。

PXN-FAK 通路在肿瘤细胞的铺展、黏附、迁移过程中起重要的作用,这一结论已被多项研究证实^[4,7]。研究发现,非绑定 PXN 的 FAK 突变体可以有效减少肿瘤黏附、转移和侵袭^[8],提示 PXN 表达沉默和 FAK 结构突变可以抑制肿瘤细胞铺展,为开发靶向 FAK 抑制剂提供了思路。有研究认为,PXN 高表达与 miR137 低表达对肿瘤预后不利,可以导致结直肠癌的早期转移^[9]。PXN 磷酸化可以促进神经细胞轴突再生^[10],说明 PXN 磷酸化对肿瘤细胞的异常增殖与细胞生理性增殖均具有重要调控功能。

课题组前期研究发现,shRNA 基因干扰技术可以成功介导靶基因沉默或下调,通过 shRNA 转染 SMMC-7721 肝癌细胞株可成功构建 PXN 表达下调的肿瘤细胞^[3]。本研究将 PXN 不同表达 SMMC-7721 肝癌细胞株植入裸鼠背部,通过建立动物模型观察肿瘤细胞在裸鼠体内的生长状况。研究结果显示,shRNA PXN 组裸鼠肿瘤体积肉眼观察小于对照组和 shRNA PXN 阴性对照组,瘤体质量显著低于对照组和 shRNA PXN 阴性对照组,且肿瘤组织中 PXN、FAK mRNA 和蛋白表达均显著低于对照组和 shRNA PXN 阴性对照组,提示 PXN 和 FAK 具有高度的正向协同作用,与有关研究结果高度一致^[11-12]。以上结果提示 PXN 表达下调可以明显抑制肝癌细胞在裸鼠体内的增殖。

综上所述,PXN 是整合素-FAK 信号通路的关键性结构蛋白,在肿瘤细胞迁移、侵袭过程中起重要作用。PXN 与肿瘤进展的机制已被广为研究,而涉及 HCC 相关的研究以及建立动物模型的前瞻性实验则较少,本研究通过建立动物模型发现,下调 PXN 表达可以显著抑制肿瘤体积增长和质量增加,

(下转第 233 页)

结果显示,其中诱导时间 16 h、大肠杆菌浓度(吸光度值) 0. 8、诱导温度 25 ℃、诱导剂浓度 0. 1 mmol · L⁻¹、乙酸浓度 0. 0 mmol · L⁻¹等为高效表达重组 HLIF 蛋白的最优条件。本研究成功在大肠杆菌表达了 HLIF,并探索出了适合表达的最佳诱导时间、大肠杆菌浓度、诱导温度、诱导剂浓度、乙酸浓度等条件,为进一步研究 HLIF 的生理功能奠定了基础。

参考文献:

[1] YAMAMORI T,FUKADA K,AEBERSOLD R,*et al.* The cholinergic neuronal differentiation factor from heart cells is identical to leukemia inhibitory factor [J]. *Science*, 1989, 246 (4936) : 1412-1416.

[2] PASQUIN S,SHARMA M,GAUCHAT J F,*et al.* Cytokines of the LIF/CNTF family and metabolism [J]. *Cytokine*, 2016, 8 (82) : 122-126.

[3] SUTHERLAND L, RUHE M, GATTEGNO-HO D, *et al.* LIF-dependent survival of embryonic stem cells is regulated by a novel palmitoylated Gab1 signalling protein [J]. *J Cell Sci*, 2018, 131 (18) : 178-183.

[4] SAM BROOK J, GREEN M R. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂,译. 北京:化学工业出版社,2008:89-92.

[5] NICOLA N A, BABON J J. Leukemia inhibitory factor (LIF) [J].

Cytokine Growth Factor, 2016, 26 (5) : 533-544.

[6] WILLIAM R L, HILTON D J, PEASE S, *et al.* Myeloid leukaemia inhibitory factor maintain the developmental potential of embryonic stem cell [J]. *Nature*, 1988, 336 (6200) : 684-687.

[7] MATHLOUTHI A, PENNACCHIETTI E, BIASE D, *et al.* Effect of temperature, pH and plasmids on *in vitro* biofilm formation in *Escherichia coli* [J]. *Acta Naturae*, 2018, 10 (4) : 129-132.

[8] 于平,陈凯飞,朱祺,等. 重组大肠杆菌生物合成 γ -氨基丁酸的发酵条件优化 [J]. 中国食品学报, 2018, 18 (6) : 112-120.

[9] HUMER D, SPADIUT O. Wanted: more monitoring and control during inclusion body processing [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2018, 34 (11) : 153-158.

[10] 何佳鲜,江雷雨,洪敏,等. 草莓 FaMYB5 基因原核表达的响应面优化 [J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36 (1) : 388-394.

[11] 王晓雯,郝雪艳,李小璐,等. 重组人白血病抑制因子在大肠杆菌中的表达及纯化 [J]. 湖北医药学院学报, 2017, 36 (3) : 214-220.

[12] 张彭湃,王松廷. 乳糖诱导剂促进 P450 BM-3 在大肠杆菌中可溶性表达的研究 [J]. 工业微生物, 2016, 46 (4) : 14-18.

[13] 戴琨,王腾飞,郝昭程,等. 乙酸对重组大肠杆菌 BL21 产酶的影响及作用机理研究 [J]. 生物技术通报, 2016, 31 (5) : 206-213.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:徐自超)

(上接第 227 页)

且肿瘤组织中 FAK 表达量随 PXN 的下调而减少,说明 PXN 和 FAK 之间在信号转导路径中可以相互作用,因此,联合检测 PXN 和 FAK 表达有望成为临床靶向诊治 HCC 的新途径。

参考文献:

[1] 吴孟超. 关于降低肝癌术后复发率之我见 [J]. 中国实用外科杂志, 2012, 22 (10) : 793- 795.

[2] LÓPEZ-COLOMÉ A M, LEE-RIVERA I, BENAVIDES-HIDALGO R, *et al.* Paxillin: a crossroad in pathological cell migration [J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10 (1) : 50.

[3] 王波,金雯,杨梅,等. shRNA 下调 Paxillin 表达对 SMMC-7721 肝癌细胞增殖、侵袭的影响 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2018, 34 (7) : 743-747.

[4] HU Y L, LU S, SZETO K W, *et al.* FAK and paxillin dynamics at focal adhesions in the protrusions of migrating cells [J]. *Sci Rep*, 2014, 4 : 6024.

[5] SCHALLER M D. Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein [J]. *Oncogene*, 2001, 20 (44) : 6459-6472.

[6] HU C T, CHENG C C, PAN S M, *et al.* PKC mediates fluctuant ERK-paxillin signaling for hepatocyte growth factor-induced migration of hepatoma cell HepG2 [J]. *Cell Signal*, 2013, 25 (6) :

1457-1467.

[7] KAWADA I, HASINA R, LENNON F E, *et al.* Paxillin mutations affect focal adhesions and lead to altered mitochondrial dynamics: relevance to lung cancer [J]. *Cancer Biol Ther*, 2013, 14 (7) : 679-691.

[8] DERAMAUDT T B, DUJARDIN D, NOULET F, *et al.* Altering FAK-paxillin irreduces adhesion, migration and invasion processes [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (3) : e92059.

[9] CHEN D L, WANG D S, WU W J, *et al.* Overexpression of paxillin induced by miR-137 suppression promotes tumor progression and metastasis in colorectal cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34 (4) : 803-811.

[10] KUBOYAMA T, LUO X, PARK K, *et al.* Paxillin phosphorylation counteracts proteoglycan-mediated inhibition of axon regeneration [J]. *Exp Neurol*, 2013, 248 (5) : 157-169.

[11] 庞霞,李晨磊,赵志华,等. 食管鳞状细胞癌组织中 FAK、Paxillin 和 MMP-9 蛋白的表达及临床意义 [J]. 重庆医学, 2011, 40 (14) : 1367-1369.

[12] CUI S, WANG J, WU Q, *et al.* Genistein inhibits the growth and regulates the migration and invasion abilities of melanoma cells via the FAK/paxillin and MAPK pathways [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (13) : 21674-21691.

(本文编辑:孟 月 英文编辑:孟 月)