



Western blot method. The activity of H8 cells were detected by methyl thiazolyl tetrazolium method. The invasion ability of H8 cells was detected by Transwell test, and the migration ability of H8 cells was detected by scratch test. The expression of Ki-67 protein in H8 cells was detected by immunohistochemistry. **Results** The relative expression of ILK mRNA and protein in H8 cells of ILK gene silencing group was significantly lower than that of the negative control group and blank group ( $P < 0.05$ ), and there was no significant difference in the relative expression of ILK mRNA and protein in H8 cells between the negative control group and the blank group ( $P > 0.05$ ). The activity of H8 cells in the ILK gene silencing group were significantly lower than those in the blank group and the negative control group ( $P < 0.05$ ), and there was no significant difference in the activity of H8 cells between the blank group and the negative control group ( $P > 0.05$ ). The positive expression rate of Ki-67 protein in H8 cells of the blank group, negative control group and ILK gene silencing group was  $(20.01 \pm 0.31)\%$ ,  $(21.01 \pm 0.11)\%$  and  $(12.01 \pm 0.01)\%$ , respectively. The positive expression rate of Ki-67 protein in H8 cells of the ILK gene silencing group was significantly lower than that of the negative control group and the blank group ( $P < 0.05$ ), and there was no significant difference in the positive expression rate of Ki-67 protein in H8 cells between the negative control group and the blank group ( $P > 0.05$ ). The number of transmembrane cells in the blank group, the negative control group and the ILK gene silencing group was  $28.13 \pm 2.44$ ,  $30.24 \pm 2.15$  and  $18.52 \pm 2.25$ , respectively. The number of transmembrane cells in the ILK gene silencing group was significantly less than that in the blank control group and the negative control group ( $P < 0.05$ ), and there was no significant difference in the number of transmembrane cells between the blank group and the negative control group ( $P > 0.05$ ). The migration rate of H8 cells in the blank group, negative control group and ILK gene silencing group was  $(15.51 \pm 4.88)\%$ ,  $(15.11 \pm 5.21)\%$  and  $(6.91 \pm 5.12)\%$ , respectively. The migration rate of H8 cells in the ILK gene silencing group was significantly lower than that in the negative control group and the blank group ( $P < 0.05$ ), and there was no significant difference in the migration rate of H8 cells between the negative control group and the blank group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** ILK is involved in the regulation of proliferation, migration and invasion of cervical squamous epithelial cells, which may play an important role in the occurrence and development of cervical cancer. Silencing ILK gene can inhibit the proliferation, migration and invasion of H8 cells, ILK is expected to be a new target of targeted therapy for cervical cancer.

**Key words:** integrin-linked kinase; cervical squamous epithelial cells; cervical cancer; small interfering RNA; targeted silencing; cell proliferation; cell invasion

宫颈癌为女性常见的恶性肿瘤,其发病率仅次于乳腺癌,世界卫生组织统计数据显示,全球每年宫颈癌新发病例约 52 万人,其中亚洲女性约 25 万人,发展中国家宫颈癌发病率高于欧美发达国家<sup>[1]</sup>。我国女性宫颈癌发生率较高,呈现年轻化趋势,严重影响患者的生活质量,威胁患者的生命安全<sup>[2]</sup>。因此,做好宫颈癌的预防和治疗及降低其发生率和病死率是目前的主要目标。随着社会和医学的发展,癌症治疗观念正在发生根本性的改变,靶向治疗已成为肿瘤研究的热点,其可应用靶向技术针对已明确的致癌位点向肿瘤区域精确递送药物,在不会波及周围正常组织细胞的情况下使肿瘤细胞特异性死亡。研究显示,整合素连接激酶(integrin-linked kinase, ILK)与细胞凋亡、迁移及黏附等密切相关<sup>[3-4]</sup>。ILK 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的一种,由 452 个氨基酸残基构成,主要存在于细胞质内。本研究旨在观察小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)靶向沉默 ILK 对永生化人宫颈鳞状上皮细胞(H8 细胞)生物学行为的影响,以期为宫颈癌的

靶向治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞、试剂与仪器** 永生化人宫颈鳞状上皮细胞(H8 细胞)购自中国医学科学院基础医学院细胞中心,低温液氮保存;放射免疫沉淀测定(radioimmunoprecipitation assay, RIPA),四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、总 RNA 提取试剂 TRIzol 购自北京索莱宝科技有限公司, Ki-67—抗购自英国 Abcam 公司,免疫组织化学二抗检测试剂盒、二氨基丁酸(diamino-butyrac acid, DAB)显示剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司, ILK—抗购自美国 CST 公司,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自杭州四季青生物工程材料有限公司,链霉素-青霉素溶液购自美国 Hyclone 公司,裂解液购自美国 Sigma 公司, ILK 的 siRNA 序列由苏州吉玛基因股份有限公司设计合成;聚偏氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜购自美国 Millipore 公司;Transwell 小室购自美国 Corning 公司, CO<sub>2</sub> 细胞培养箱购自美国

Thermo 公司,酶标仪购自美国 Biotek 公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养** H8 细胞使用含体积分数 10% FBS、青霉素  $100\text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$ 、链霉素  $100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的达尔伯克改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) 置于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱内稳定培养。

**1.2.2 细胞转染** 设计高效的靶向沉默 ILK 的 siRNA,构建 ILK-siRNA 脂质体和无关对照质粒。取对数生长期 H8 细胞,按照每孔  $2 \times 10^5$  个细胞接种于 6 孔板中进行转染。细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,常规培养传代。将待转染的 H8 细胞分为 ILK 基因沉默组、阴性对照组和空白组,ILK 基因沉默组细胞转染特异性干扰序列 (ILK 的 siRNA 序列为 5'-TTGCTGCCTTCATGTAG-TA-3'),阴性对照组细胞转染非特异性序列,空白组细胞不转染任何序列,按照转染试剂盒说明书进行操作。每组设 2 个复孔,实验重复 3 次。转染后继续培养 48 h,完成后续实验。

**1.2.3 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR) 法检测 H8 细胞中 ILK mRNA 相对表达量** 收集转染 48 h 后的 H8 细胞,洗涤,加入 TRIzol 试剂,裂解后移至无 RNA 酶小型的离心管 (eppendorf, EP) 内,离心后吸取上清液,加入溴甲酚紫 ( $1\text{ mL}$  上清液加入  $100\text{ }\mu\text{L}$  溴甲酚紫),剧烈振荡并静置后离心,吸出上层液体至新的无 RNA 酶 EP 管内,加入异丙醇轻柔颠倒至沉淀出现,离心后使用体积分数 75% 乙醇清洗沉淀,清洗后干燥,每管加入适量无 RNA 酶水,溶解 RNA,在  $260\text{ nm}$  波长下测定 H8 细胞浓度。配制 DNA 消化反应体系进行消化,再配置后续反转录反应体系进行反应,最后收集 cDNA,以 cDNA 为模板进行扩增,以  $\beta$ -actin 为内参。每个样本设 3 个复孔。ILK 上游引物序列为 5'-GACGACATTTTCACTCAGTGCC-3',下游引物序列为 5'-ACGGTTCATTACATTGATCCGTG-3'; $\beta$ -actin 上游引物序列为 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3',下游引物序列为 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算 ILK mRNA 相对表达量。

**1.2.4 Western blot 法检测 H8 细胞中 ILK 蛋白相对表达量** 收集转染 48 h 后的 H8 细胞,加入 RIPA 裂解液充分裂解,离心后吸取上清液,用二喹啉甲酸法测定上清蛋白浓度,加入上样缓冲液,蛋白变性。每个样品上样量为  $5 \sim 10\text{ }\mu\text{g}$ ,用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶分离样品中蛋白质,电泳中 2.5 h 后将凝胶中蛋白湿转至 PVDF 膜上。牛奶室

温封闭 1 h 或  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  过夜,加入一抗 ( $1:2\text{ }000$ ) 室温孵育  $1 \sim 2\text{ h}$ ,二抗 ( $1:100\text{ }000$ ) 室温孵育  $1.5\text{ h}$ ,采用电化学发光试剂盒显影。采用美国 UVP 凝胶成像系统分析目的蛋白条带灰度值,以  $\beta$ -actin 为内参,以目的蛋白条带灰度值与  $\beta$ -actin 条带灰度值的比值表示 ILK 蛋白相对表达量。

**1.2.5 MTT 法检测 H8 细胞活力** 取 3 组转染 48 h 后 H8 细胞,更换为含 FBS 的培养液继续培养 24 h,观察其增殖情况,每孔加入  $5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT,2 h 后终止培养,吸出孔内液体,加入二甲亚砜,使用酶标仪于  $490\text{ nm}$  波长处测各孔吸光度值,另外设置空白对照孔,不添加 MTT 及二甲亚砜,采用等量的蒸馏水代替。细胞活力 = 实验孔吸光度值/空白孔吸光度值。

**1.2.6 Transwell 实验检测 H8 细胞侵袭能力** ILK 基因沉默组和阴性对照组使用  $30\text{ }\mu\text{g}$  Matrigel 胶预处理 Transwell 小室,在小室上部加入 H8 细胞悬液,下室内加入含体积分数 30% FBS 的培养基。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养箱内培养 24 h 后取出上室,当 Giemsa 染色液浸润至膜的下表面时进行细胞染色,转移细胞  $3 \sim 5\text{ min}$ ,将小室浸泡冲洗数次,空气中晾干,显微镜拍照,计数穿过过滤膜的细胞数。

**1.2.7 划痕实验检测细胞迁移能力** 取 3 组转染 48 h 后 H8 细胞,以每孔  $1 \times 10^6$  个细胞的密度接种于 6 孔板中,置于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中培养,待细胞长到融合成单层状态时,更换为辣椒碱终浓度为  $10$ 、 $25$  和  $50\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的工作液培养 24 h,同时设无辣椒碱对照组。用无菌的  $10\text{ }\mu\text{L}$  移液器枪头在底部划线,吸弃细胞培养液,加入  $2\text{ mL}$  无血清 RPMI-1640 培养液,分别在培养 0、24 h 时用倒置显微镜进行拍照,拍摄 0、24 h 的图像,应用 Image J 软件测量划痕愈合情况。细胞迁移能力 (划痕愈合率) =  $(0\text{ h 划痕宽度} - 24\text{ h 划痕宽度}) / 0\text{ h 划痕宽度} \times 100\%$ 。

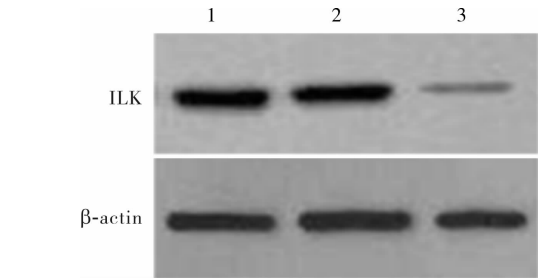
**1.2.8 免疫组织化学法检测 H8 细胞内 Ki-67 蛋白表达** 收集转染后 48 h 后的 H8 细胞,爬片,磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 浸洗后加入  $40\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  多聚甲醛固定过夜;体积分数 10% 山羊血清 (含体积分数 0.4% TritonX-100) 封闭 1 h。孵育条件:一抗 Ki-67 ( $1:300$ )  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  过夜,二抗  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min。链霉菌抗生素蛋白-过氧化物酶连接法反应后 DAB 显色,苏木精复染,PBS 返蓝,脱水、透明和封片,光镜下观察。每张爬片随机选取 5 个视野,高倍 ( $\times 200$ ) 下计数 Ki-67 蛋白阳性表达细胞数和总细胞数,Ki-67 蛋白主要表达在细胞核,细胞核呈棕褐色为阳性细胞;Ki-67 蛋白阳性表达率 = Ki-67 蛋白阳性表达细胞数/总细胞数  $\times 100\%$ 。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,两两比较采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组 H8 细胞中 ILK mRNA 和蛋白表达比较

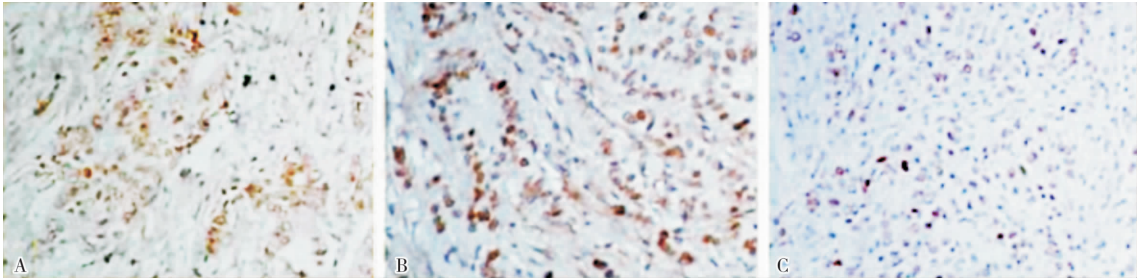
结果见图 1 和表 1。ILK 基因沉默组 H8 细胞中 ILK mRNA 和蛋白相对表达量显著低于阴性对照组和空白组,差异有统计学意义( $t = 7.238, 7.692, P < 0.05$ );阴性对照组与空白组 H8 细胞中 ILK mRNA 和蛋白相对表达量比较差异无统计学意义( $t = 1.438, P > 0.05$ )。



1:空白组;2:阴性对照组;3:ILK 基因沉默组。

图 1 3 组 H8 细胞中 ILK 蛋白表达 (Western blot)

Fig.1 Expression of ILK protein in H8 cells in the three groups (Western blot)



A:空白组;B:阴性对照组;C:ILK 基因沉默组。

图 2 3 组 H8 细胞中 Ki-67 蛋白表达 (免疫组织化学染色, ×200)

Fig.2 Expression of Ki-67 protein in H8 cells of the three groups (immunohistochemical staining, ×200)

**2.4 3 组 H8 细胞侵袭能力比较** 空白组、阴性对照组和 ILK 基因沉默组穿膜细胞数分别为  $28.13 \pm 2.44$ 、 $30.24 \pm 2.15$ 、 $18.52 \pm 2.25$ ;ILK 基因沉默组穿膜细胞数显著少于空白组和阴性对照组,差异有统计学意义( $t = 8.341, 7.229, P < 0.05$ );空白组与阴性对照组穿膜细胞数比较差异无统计学意义( $t = 2.143, P > 0.05$ )。

**2.5 3 组 H8 细胞迁移能力比较** 空白组、阴性对照组和 ILK 基因沉默组 H8 细胞迁移率分别为  $(15.51 \pm 4.88)\%$ 、 $(15.11 \pm 5.21)\%$ 、 $(6.91 \pm 5.12)\%$ ;ILK 基因沉默组 H8 细胞迁移率显著低于阴性对照组和空白组,差异有统计学意义( $t = 8.693, 8.405, P < 0.05$ );阴性对照组与空白组 H8 细胞迁移率比较差异无统计学意义( $t = 2.155, P > 0.05$ )。

表 1 3 组 H8 细胞中 ILK mRNA 和蛋白相对表达量比较  
Tab.1 Comparison of relative expression of ILK mRNA and protein in H8 cells among the three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	ILK mRNA	ILK 蛋白
空白组	3	$0.619 \pm 0.017$	$0.794 \pm 0.014$
阴性对照组	3	$0.648 \pm 0.014$	$0.841 \pm 0.016$
ILK 基因沉默组	3	$0.315 \pm 0.004^a$	$0.0412 \pm 0.007^a$

注:与空白组和阴性对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

**2.2 3 组 H8 细胞活力比较** 空白组、阴性对照组和 ILK 基因沉默组 H8 细胞活力分别为  $0.584 \pm 0.102$ 、 $0.612 \pm 0.112$ 、 $0.314 \pm 0.134$ ;ILK 基因沉默组 H8 细胞活力显著低于空白组和阴性对照组,差异有统计学意义( $t = 6.352, 7.132, P < 0.05$ );空白组与阴性对照组 H8 细胞活力比较差异无统计学意义( $t = 3.869, P > 0.05$ )。

**2.3 3 组 H8 细胞 Ki-67 蛋白阳性表达率比较** 结果见图 2。空白组、阴性对照组和 ILK 基因沉默组 H8 细胞 Ki-67 蛋白阳性表达率分别为  $(20.01 \pm 0.31)\%$ 、 $(21.01 \pm 0.11)\%$ 、 $(12.01 \pm 0.01)\%$ ;ILK 基因沉默组 H8 细胞 Ki-67 蛋白阳性表达率显著低于阴性对照组和空白组,差异有统计学意义( $t = 8.264, 7.902, P < 0.05$ );阴性对照组与空白组 H8 细胞 Ki-67 蛋白阳性表达率比较差异无统计学意义( $t = 3.726, P > 0.05$ )。

3 讨论

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤之一,近年来,虽然宫颈癌的诊断和治疗有了很大的进展,但宫颈癌患者的总体疗效并不理想,患者病死率较高,术后 5 a 生存率较低,严重影响患者的生活质量及生命安全。因此,早诊断、早治疗是改善宫颈癌患者预后的关键。有效切断肿瘤侵袭及转移途径有望提高患者的生存率,延长患者的生存期;因此,探索宫颈癌侵袭和转移的机制以及寻找临床治疗的分子靶点具有重要的临床意义。ILK 是一种重要的细胞内信号分子,其定位于黏着斑,为细胞蛋白骨架与细胞外基质之间相互作用的重要部位,能够参与多种信号传导通路,

调节细胞的生长及增殖,在肿瘤的发生和发展中起着关键的作用。朱向阳等<sup>[5]</sup>研究发现,宫颈癌组织中 ILK 表达显著高于宫颈上皮瘤变组织,但 ILK 在宫颈癌发生机制中的作用机制尚不明确。因此,本研究选用宫颈鳞状上皮细胞(H8 细胞),靶向沉默其 ILK 基因表达,观察 H8 细胞生物学行为的改变,为研究开发新的药物提供新的治疗靶点。

Ki-67 是在细胞 G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub> 和 M 期出现的核抗原,主要表达于肿瘤细胞核,其半衰期短,可以准确反映细胞的增殖活性,其在宫颈癌中的过度表达预示宫颈癌细胞增殖活跃,更易发生间质浸润,与肿瘤的预后密切相关。本研究设计合成 ILK 的 siRNA,对 H8 细胞进行转染,结果显示,ILK 基因沉默组 H8 细胞中 ILK mRNA 和蛋白相对表达量显著低于阴性对照组和空白组,表明 si-RNA 靶向沉默 ILK 基因能够显著下调 Ki-67 mRNA 及蛋白的表达,抑制宫颈癌的发展,也提示 ILK 可能参与了 H8 细胞生物学行为过程。

ILK 主要存在于黏着斑,且在细胞外基质中广泛表达,主要参与丝氨酸/苏氨酸激酶介导细胞内外的信号传导,还与细胞质内整合素  $\beta_1$  和  $\beta_3$  亚基之间进行相互作用,将细胞外基质与肌动蛋白骨架相联系,连接细胞外基质与细胞内的组成成分,从而调控细胞增殖、转移、侵袭等。有研究发现,ILK 表达与结直肠癌的恶性程度和预后等有关,下调 ILK 表达可以抑制肿瘤细胞生长<sup>[9]</sup>。本研究结果显示,ILK 基因沉默组 H8 细胞活力及增殖指数显著低于空白组和阴性对照组,表明 ILK 表达与子宫颈上皮瘤变的发生有关,siRNA 靶向沉默 ILK 基因能够明显抑制宫颈鳞状上皮细胞的增殖及活性。

ILK 基因沉默组穿膜细胞数显著少于空白组和阴性对照组,ILK 基因沉默组 H8 细胞迁移率显著低于阴性对照组和空白组,表明下调 ILK 表达可以显著降低 H8 细胞的侵袭、迁移能力,抑制宫颈癌发生和发展。ILK 可能通过作用于下游蛋白参与肿瘤细胞侵袭和新生血管生成等,从而促进宫颈癌的发展。史娟等<sup>[11]</sup>研究发现,下调 ILK 表达可抑制宫颈癌细胞糖酵解和细胞增殖,促进细胞凋亡。ILK 可与整合素  $\beta_1$ 、 $\beta_3$  亚基结合,参与整合素、生长因子、

Wnt 及 转化生长因子- $\beta$ /Smad 等多种信号传导途径,在调节细胞黏附、凋亡、转移、生长、细胞周期、肿瘤形成等过程中起重要作用<sup>[12]</sup>。

综上所述,ILK 参与调控宫颈鳞状上皮细胞的增殖、迁移及侵袭,可能在宫颈癌的发生、发展中发挥重要作用;沉默 ILK 基因表达可以抑制 H8 细胞的增殖、迁移和侵袭能力,ILK 有望成为宫颈癌靶向治疗的新靶点。

参考文献:

[1] TORRE L A,BRAY F,SIEGEL R L,*et al.* Global cancer statistics;2012[J]. *CA Cancer J Clin*,2015,65(2):87-108.

[2] 应倩,夏庆民,郑荣寿,等. 中国 2009 年宫颈癌发病与死亡分析[J]. 中国肿瘤,2013,22(8):612-616.

[3] 叶蕾,罗燕鸿,孔丹莉,等. 子宫颈癌靶向治疗方法及其作用机制研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2016,23(3):441-445.

[4] 季承博,刘友东,顾琦晟,等. 整合素连接激酶在胃癌细胞中的表达及其抑制剂对胃癌细胞生长的影响[J]. 中华实验外科杂志,2019,36(6):1036-1038.

[5] 朱向阳,王香花. ILK 在宫颈癌组织中的表达及宫颈癌细胞侵袭能力的影响[J]. 中国妇幼保健研究,2016,27(1):87-89.

[6] 郭会敏,范毛川,华方方,等. 脂联素对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞增殖及侵袭和转移能力的影响[J]. 新乡医学院学报,2018,35(7):51-54.

[7] 李胜水,张凤梅,李秀清,等. ILK 和 E-Cad 蛋白表达与食管鳞癌浸润转移的关系[J]. 现代肿瘤医学,2015,23(6):808-811.

[8] CHOU C C,CHUANG H C,SALUNKE S B,*et al.* A novel HIF-1 $\alpha$ -integrin-linked kinase regulatory loop that facilitates hypoxia-induced HIF-1 $\alpha$  expression and epithelial-mesenchymal transition in cancer cells [J]. *Oncotarget*,2015,6(10):8271-8285.

[9] YAN Z,YIN H,WANG R,*et al.* Overexpression of integrin-linked kinase (ILK) promotes migration and invasion of colorectal cancer cells by inducing epithelial-mesenchymal transition via NF- $\kappa$ B signaling[J]. *Acta Histochem*,2014,116(3):527-533.

[10] 刘晶,李义飞,冯艳萍,等. 宫颈癌组织 ILK 和 MMP9 表达临床意义分析[J]. 中华肿瘤防治杂志,2014,21(2):135-138.

[11] 史娟,樊霞. 下调整合素连接激酶对宫颈癌细胞糖酵解及增殖、凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报,2018,40(18):1668-1673.

[12] 白长焕,孔令甲,申肖华,等. 整合素连接激酶(ILK)在肾脏疾病中的研究进展[J]. 中国现代应用药学,2018,35(8):1265-1268.

( 本文编辑:徐自超 )