

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.06.006

· 临床研究 ·

## 整合素连接激酶在食管鳞状细胞癌组织中的表达及其对 KYSE-150 细胞增殖、凋亡及裸鼠移植瘤生长的影响

马晓丽<sup>1</sup>, 高艳<sup>1</sup>, 魏瑜<sup>1</sup>, 曹雷雨<sup>1</sup>, 张周华<sup>2</sup>, 张莉<sup>1</sup>(1. 新疆医科大学第一附属医院 综合内四科, 新疆 乌鲁木齐 830054; 2. 新疆医科大学 第一临床医学院, 新疆 乌鲁木齐 830054)

**[摘要]** **目的:** 分析整合素连接激酶(ILK)基因在食管鳞状细胞癌(ESCC)组织中的表达水平及其与患者临床病理特征之间的关系, 探讨其对 KYSE-150 细胞增殖、凋亡和裸鼠皮下移植瘤生长的影响。 **方法:** 选取 2012 年 1 月至 2014 年 12 月手术切除并经病理证实的 75 例 ESCC 患者的癌组织和其配对的癌旁组织标本, 用组织芯片技术及免疫组织化学染色法检测 ESCC 组织和癌旁组织中 ILK 的表达情况; qPCR 法检测 ESCC 细胞 ECA109、TE-1、EC9706、KYSE-150 中 ILK mRNA 的表达, 选用 ILK 表达最高的 KYSE-150 细胞进行后续细胞功能学研究。使用 ILK 干扰慢病毒感染 KYSE-150 细胞下调 ILK 的表达, qPCR 和 WB 法检测 ILK 基因敲降效率; MTT 实验、克隆形成实验和 FACS 检测干扰 ILK 表达对 KYSE-150 细胞增殖能力和凋亡水平的影响; 裸鼠皮下成瘤实验检测干扰 ILK 对 KYSE-150 细胞移植瘤生长的影响。 **结果:** ESCC 组织中 ILK 蛋白阳性表达率高于癌旁组织 ( $P < 0.05$ ), 且 ILK 高表达与淋巴结转移有关联 ( $P < 0.05$ )。ILK 干扰慢病毒感染的 KYSE-150 细胞中 ILK mRNA 表达明显受到抑制 ( $P < 0.05$ ), ILK 蛋白水平表达下调, 以上结果提示 ILK 敲降成功。与感染阴性对照病毒的 KYSE-150 细胞相比, ILK 干扰慢病毒感染的 KYSE-150 细胞的增殖能力、克隆形成数均显著降低 (均  $P < 0.05$ ), 但细胞凋亡率升高 ( $P < 0.05$ )。与对照组相比, 干预组裸鼠移植瘤生长缓慢, 移植瘤的质量及体积均较小 (均  $P < 0.05$ )。 **结论:** ESCC 组织中 ILK 的表达高于癌旁组织, 且 ILK 高表达与患者发生淋巴结转移有关联; 抑制 ILK 基因可导致 KYSE-150 细胞增殖能力降低, 促进细胞凋亡而抑制裸鼠移植瘤生长。

**[关键词]** 食管鳞状细胞癌; KYSE-150 细胞; 整合素连接激酶; siRNA; 增殖; 凋亡; 裸鼠

**[中图分类号]** R735.1; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)06-0549-08

## Expression of integrin-linked kinase in esophageal squamous cell carcinoma tissues and its effect on proliferation and apoptosis of KYSE-150 cells and the growth of xenografts in nude mice

MA Xiaoli<sup>1</sup>, GAO Yan<sup>1</sup>, WEI Yu<sup>1</sup>, CAO Lei<sup>1</sup>, ZHANG Zhouhua<sup>2</sup>, ZHANG Li<sup>1</sup>(1. The Fourth Department of General Internal Medicine, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang, China; 2. The First Clinical Medical College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang, China)

**[Abstract]** **Objective:** To analyze the expression level of integrin-linked kinase (ILK) gene in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) tissues and its relationship with the clinicopathological characteristics of patients, and to explore its effect on KYSE-150 cell proliferation, apoptosis and the growth of subcutaneous xenograft tumor in nude mice. **Methods:** The cancer tissues and paired para-cancerous tissues of 75 patients with ESCC who had surgical resection and confirmed by pathological examination from January 2012 to December 2014 were selected. Tissue chip technology and immunohistochemical staining were used to detect the expression of ILK in ESCC tissues and para-cancerous tissues; qPCR was used to detect the ILK expression in ESCC cell ECA109, TE-1, EC9706 and KYSE-150, and the KYSE-150 cells with the highest ILK expression was selected for subsequent cell functional studies. The KYSE-150 cells were transfected with ILK interference lentivirus to down-regulate the expression of ILK, and the knockdown efficiency was verified by qPCR and WB methods; the effects of interfering ILK expression on the proliferation and apoptosis of KYSE-150 cells were detected by MTT assay, clone formation assay and FACS; subcutaneous tumorigenesis assay in nude mice was used to detect the effect of interfering ILK on the growth of KYSE-150 cells transplanted tumors. **Results:** The positive rate of ILK protein in ESCC tissues was higher than that in para-cancerous tissues ( $P < 0.05$ ), and the high expression of ILK was associated with

**[基金项目]** 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(No.2020D01C258)

**[作者简介]** 马晓丽(1987—), 女, 博士, 主治医师, 主要从事恶性肿瘤的临床与基础研究, E-mail: 543360291@qq.com

**[通信作者]** 张莉, E-mail: 18799131188@163.com

lymph node metastasis ( $P<0.05$ ). The mRNA expression of ILK in shILK-infected KYSE-150 cells was significantly inhibited ( $P<0.05$ ) and the expression of ILK protein was significantly down-regulated in the shILK group, which indicated the successful knockdown of ILK. Compared with the cells transfected with shCtrl, the proliferation ability and colony formation number of KYSE-150 cells in the shILK group were significantly reduced (both  $P<0.05$ ), but the apoptosis rate was significantly increased ( $P<0.05$ ). Compared with the NC group, the growth of transplanted tumors in the nude mice of the KD group was slower, and the weight and volume of the tumor were smaller (both  $P<0.05$ ). **Conclusion:** The expression of ILK in ESCC tissues is higher than that in para-cancerous tissues, and the high ILK expression is associated with lymph node metastasis. Silencing ILK gene can inhibit the proliferation but promote the apoptosis of KYSE-150 cells and inhibit tumorigenesis in nude mice.

**[Key words]** esophageal squamous cell carcinoma (ESCC); KYSE-150 cell; integrin-linked kinase (ILK); siRNA; proliferation; apoptosis; nude mice

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(6): 549-556. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.06.006]

目前,食管癌为全球高发恶性肿瘤之一。根据全球肿瘤数据(Globocan 2012)分析<sup>[1]</sup>显示,2012年全球食管癌的发病率位居第八位。2015年,有数据<sup>[2-3]</sup>显示,食管癌发病率和病死率均居第四位。由于食管癌患者早期临床表现不明显,且缺乏有效的早期筛查及诊断方法,大部分食管癌患者确诊时已为中晚期,无手术机会,五年生存率较低。对于食管癌的治疗,临床上仍采用放疗、化疗等综合治疗<sup>[4]</sup>,治疗手段比较单一,缺乏有效的靶向及免疫治疗手段。在中国,食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)占食管癌病例数的90%以上。整合素连接激酶(integrin-linked kinase, ILK)是HANNIGAN等<sup>[5]</sup>于1996年发现的一种丝氨酸/甲硫氨酸蛋白激酶。既往研究<sup>[6]</sup>发现,ILK是整合素和生长因子受体介导的信号转导途径中的重要信号蛋白,在调节细胞黏附、凋亡、增殖、迁移、细胞周期、肿瘤形成及胚胎发育等过程中起着重要作用。ILK参与了肿瘤的发生和发展,在一些恶性肿瘤中表达上调,如结肠癌<sup>[7-8]</sup>、胶质瘤<sup>[9-11]</sup>等。但目前关于ILK在ESCC方面的研究甚少,本研究将探讨ILK的异常表达对ESCC细胞生物学行为的影响,进一步深入研究ILK在肿瘤中发挥的作用,从而为ESCC的精准诊疗提供实验基础。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象的一般资料

检测ILK所用的150点组织芯片(目录号为HEso-Squ150CS-02)购自上海芯超生物科技有限公司。组织芯片中ESCC和配对的癌旁组织标本,选取2012年1月至2014年12月手术切除并经病理证实的75例ESCC患者。纳入患者术前均未接受放化疗及其他抗肿瘤辅助治疗,病理明确诊断为ESCC。收集患者的病理资料,包括年龄、性别、病理诊断、病理分级、T分期、淋巴结转移情况、远处转移情况和TNM分期(AJCC第7版)等临床病理资料。75例ESCC组

织芯片在免疫组织化学染色中无脱落,组织芯片排列整齐、背景清洁。

### 1.2 细胞、实验动物及主要试剂

ESCC细胞EC9706、ECA109、TE-1、KYSE-150购自上海吉凯基因化学技术有限公司细胞保存中心。裸鼠(4周龄BALB/c)购自上海灵畅生物科技有限公司[动物合格证号:SCXK(沪)2018-0003]。DMEM培养基、青-链霉素、胎牛血清、胰蛋白酶均购自生工生物工程(上海)股份有限公司,TRIzol试剂盒购自上海普飞公司,qPCR试剂盒和逆转录试剂盒均购自广州锐博公司,MTT试剂盒购自美国Genview公司,凋亡试剂盒购自美国eBioscience公司,流式细胞分析仪(Canto II)购自美国BD公司,WB检测试剂购自上海鼎国生物技术有限公司,酶类试剂购自美国NEB公司,WB所用一抗ILK兔抗人抗体购自英国Abcam公司,内参 $\beta$ -actin抗体购自美国Santa Cruz公司,兔二抗、鼠二抗均购自美国CST公司,BCA蛋白定量试剂盒、ECL发光剂均购自美国Thermo公司。

### 1.3 免疫组织化学染色法检测ESCC组织中ILK蛋白的表达

脱蜡前将组织芯片在60℃恒温箱中烘烤30 min,二甲苯脱蜡、无水乙醇水合、PBS冲洗3次(5 min/次)。抗原用乙二胺四乙酸抗原修复液修复,过氧化氢溶液室温封存30 min,加入牛血清蛋白于37℃封闭30 min,PBS洗涤,加入稀释型抗ILK兔抗人多克隆抗体,4℃过夜。次日,洗去残液,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,37℃反应30 min,用DAB显色剂洗涤,苏木素复染,经脱水、透明、封片处理后在显微镜下观察。ILK表达情况主要依据抗体的细胞质、细胞膜染色强度和染色阳性率来评价,其中染色强度评分标准为0分(阴性)、1分(淡黄色)、2分(棕黄色)、3分(棕褐色),染色阳性率评分标准为0分(阴性)、1分(<25%)、2分(25%~<50%)、3分(50%~<75%)、4分( $\geq 75%$ )。染色分数=染色强度评分 $\times$ 染色阳性率评分,以0~3分为低表达,4~12分为高表达。

#### 1.4 慢病毒载体构建

利用 Chromas 靶序列分析软件设计针对目的基因的干扰序列, 针对 ILK 的干扰序列为 5'-CGAAGC TCAACGAGAATCA-3'。随后合成具有干扰序列的单链 DNA 寡核苷酸(购自南京金斯瑞生物科技公司), 将其在最终浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$  的退火缓冲液中溶解。消化 GV115 载体(购自上海吉凯基因公司)并将其线性化, 连接双链寡核苷酸与线性化载体, 将连接产物转化大肠杆菌感受态细胞。采用聚合酶链反应鉴定阳性克隆(TaKaRa 公司, 货号 R001A), 进行保存和测序, 选择测序结果与靶序列完全一致的克隆用于质粒抽提。随后, 将质粒包装成病毒(由上海吉凯基因公司完成), 阴性对照病毒滴度为  $5 \times 10^8$  TU/mL, 目的基因干扰病毒 LV-ILK-RNAi 滴度为  $4 \times 10^8$  TU/mL。

#### 1.5 细胞培养与干扰慢病毒感染

所有细胞在含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100  $\mu\text{g/mL}$  链霉素的 RPMI 1640 培养基中置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵箱中培养, 取对数生长期 KYSE-150 细胞接种于 6 孔板中, 待细胞汇合度达 20% 左右, 将阴性对照和 LV-ILK-RNAi 病毒以  $\text{MOI}=20$  加入到 KYSE-150 细胞中。将细胞分组处理: shILK 组细胞感染目的基因干扰慢病毒、shCtrl 组细胞感染阴性对照病毒。感染 16 h 后更换新鲜培养基, 在感染 72 h 后, 荧光显微镜下观察报告基因 GFP 的表达情况。

#### 1.6 WB 法检测 KYSE-150 细胞中 ILK 基因的敲降效率

收集 2 组细胞 (shCtrl 和 shILK), RIPA 裂解液裂解细胞, 离心后取上清液用 BCA 法测定蛋白浓度。进一步行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 利用湿转法把蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 聚偏氟乙烯薄膜用 5% 脱脂奶粉液封闭, 室温封闭 1 h。PBS 清洗 3 次, 5 min/次。加入一抗 ILK 抗体(稀释比 1:500)和  $\beta$ -actin 抗体(稀释比 1:5 000) 4  $^{\circ}\text{C}$  反应过夜。次日, 用 PBS 清洗多余抗体 3 次, 5 min/次。加入对应二抗(稀释比 1:10 000), 室温反应 1.5 h。用 PBS 清洗多余抗体 3 次, 每次 5 min。随后加入发光底物, 反应 30 s, ECL 法结合 X 光片显影, 使用 ImageJ 软件统计目标蛋白质的积分光密度值, 并和  $\beta$ -actin 进行比较, 统计目标蛋白质的表达丰度。

#### 1.7 qPCR 法检测敲降 ILK 对 KYSE-150 细胞中 ILK mRNA 表达的影响

收取各组细胞样品, 使用 TRIzol 试剂裂解并抽提总 RNA。利用 PrimeScript RT 试剂盒在标准条件下产生随机引物, 将 500 ng 的总 RNA 反转录为 10  $\mu\text{L}$  的最终体积。反应条件是 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s, 59.2  $^{\circ}\text{C}$  退火与延伸 30 s, 共 35 个循环。结

果用 GAPDH 的表达量标准化。用 ILK 和 GAPDH 的引物进行 qPCR, ILK 基因的上游引物序列: 5'-GAC GACATTTTCACTCAGTGC-3', 下游引物序列: 5'-ACGGTTCATTACATTGATCCGTG-3'; GAPDH 上游引物序列: 5'-TGA CTTCAACAGCGACACCCA-3', 下游引物序列: 5'-CACCTGTTGCTGTAGCCAAA-3'。采用 ABI7500 平台对 qPCR 的相关信息进行分析( $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法)。

#### 1.8 MTT 法检测敲降 ILK 对 KYSE-150 细胞增殖的影响

取各组对数生长期的细胞, 稀释成单细胞悬液, 每孔 100  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔板 ( $2 \times 10^3$  细胞/孔), 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。分别在细胞贴壁后 0、24、48、72、96 和 120 h 向每孔加入 MTT 液 20  $\mu\text{L}$  至其终浓度为 5 mg/mL, 继续培养 4 h。去掉上清液, 加入二甲基亚砜 150  $\mu\text{L}$ , 震荡 2~5 min, 使结晶物充分溶解, 在酶标仪上测定 490 nm 波长下的光密度 ( $D$ ) 值, 以  $D$  值代表细胞增殖水平。以时间为横坐标,  $D$  值为纵坐标, 绘制细胞生长曲线。

#### 1.9 细胞克隆形成实验检测敲降 ILK 对 KYSE-50 细胞克隆形成能力的影响

取处于对数生长期的 KYSE-150 细胞用胰蛋白酶消化制成单细胞悬液接种于 6 孔板培养板上, 细胞接种密度为  $4 \times 10^3$  个/孔, 每组设 3 个复孔。37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 2 周, 间隔 3 d 更换培养液 1 次。用 4% 多聚甲醛固定 30~60 min 后, 用结晶紫染色 10~20 min。晾干、拍照、计算细胞克隆数及形成率, 克隆形成率 = 克隆数/接种细胞数  $\times 100\%$ 。进行 3 次独立的重复实验。

#### 1.10 FACS 检测敲降 ILK 对 KYSE-150 细胞凋亡的影响

取对数生长期的 shCtrl 组及 shILK 组细胞, 用胰蛋白酶进行消化, 完全培养基进行重悬, 制备成细胞悬液。与上清细胞收集同一 5 mL 离心管中, 1 000  $\times g$  离心 5 min, 弃上清, 以 4  $^{\circ}\text{C}$  预冷的 D-Hanks 液洗涤细胞沉淀。结合缓冲液洗涤细胞沉淀, 加入 10  $\mu\text{L}$  Annexin V -APC 染色进行上机检测细胞凋亡。利用 guava InCyte 软件对结果进行分析。

#### 1.11 裸鼠体内成瘤实验检验敲降 ILK 对 KYSE-150 移植瘤生长的影响

将 4 周龄雌性 BALB/c 小鼠随机分成对照组 (NC 组) 和干预组 (KD 组), 每组 10 只。制备 KYSE-150 细胞后 (细胞接种量为  $2 \times 10^6$  个, 悬于 200  $\mu\text{L}$  PBS 中), 注射到动物皮下。观察成瘤情况, 每 4 d 用游标卡尺测量瘤块最长和最短直径, 计算肿瘤体积, 肿瘤体积 = (瘤体长径  $\times$  瘤体短径<sup>2</sup>)/2。皮下注射 28 d 后或



根据实际成瘤情况及动物福利伦理规定,用过量的2%戊巴比妥钠对实验动物实施安乐死,再进行颈椎脱臼确认死亡,剥离移植瘤,计算移植瘤体积。将取出的肿瘤称量瘤质量,并放于多聚甲醛中固定,液氮冷冻后于-80℃保存。

### 1.12 统计学处理

采用SPSS 22.0统计软件对所得结果进行处理,用Prism GraphPad 9.0软件绘图。以 $\chi^2$ 检验分析ILK的表达水平及其与临床病理特征的关系,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 的形式表示,计数资料以频数和百分比的形式表示;两组间的差异比较采用独立样本t检验,多组间比较采用方差分析。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ILK蛋白在ESCC组织中呈高表达

免疫组化染色结果(图1)显示,ESCC组织中

ILK染色多为阳性,其在ESCC组织中的表达水平高于癌旁组织[93.3%(70/75) vs 29.3%(22/75),  $\chi^2=64.768, P<0.05$ ]。

### 2.2 ILK表达与ESCC患者特征的关系

$\chi^2$ 检验结果(表1)显示,ILK高表达与淋巴结转移有关联( $P=0.001$ ),而ILK高、低表达组患者的年龄( $P=0.645$ )、性别( $P=0.588$ )、T分期( $P=0.898$ )、远处转移( $P=0.536$ )、分化程度( $P=0.966$ )、临床分期( $P=0.791$ )等患者特征间的差异均无统计学意义。

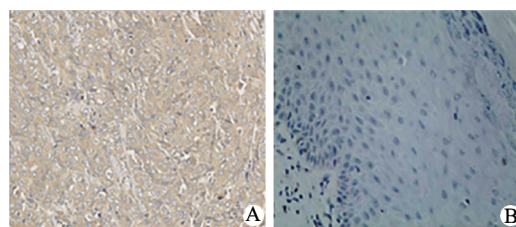


图1 ILK蛋白在ESCC组织(A)和癌旁组织(B)中的表达( $\times 200$ )

表1 ILK表达与ESCC患者临床参数的关系( $N=75$ )

因素	例数	ILK表达 [n(%)]		$\chi^2$	P
		高表达	低表达		
年龄/岁				0.688	0.645
<60	28	27(96.43)	1(3.57)		
$\geq 60$	47	43(91.49)	4(8.51)		
性别				0.294	0.588
男	53	50(94.34)	3(5.66)		
女	22	20(90.90)	2(9.09)		
T分期				0.016	0.898
T1~T2	28	26(92.86)	2(7.14)		
T3~T4	47	44(93.62)	3(6.38)		
淋巴结转移				24.49	0.001
无	5	2(40)	3(60)		
有	70	68(97.14)	2(2.86)		
远处转移				0.383	0.536
无	70	65(92.86)	5(7.14)		
有	5	5(100)	0(0)		
分化程度				0.07	0.966
高	17	16(94.12)	1(5.88)		
中	32	30(93.75)	2(6.25)		
低	26	24(92.31)	2(7.69)		
临床分期				1.042	0.791
I	7	7(100)	0(0)		
II	27	25(92.59)	2(7.41)		
III	36	33(91.67)	3(8.33)		
IV	5	5(100)	0(0)		

### 2.3 ILK mRNA 在 KYSE150 细胞中呈现高表达

qPCR 实验结果(图2)显示:ESCC 细胞 ECA109、TE-1、EC9706、KYSE150 中 ILK mRNA 的表达水平分别为(1.15±0.58)、(6.06±0.41)、(36.23±23.52)和(995.14±53.42)。以 KYSE-150 细胞的 ILK mRNA 表达水平最高,因此选用 KYSE-150 细胞进行后续的实验研究。

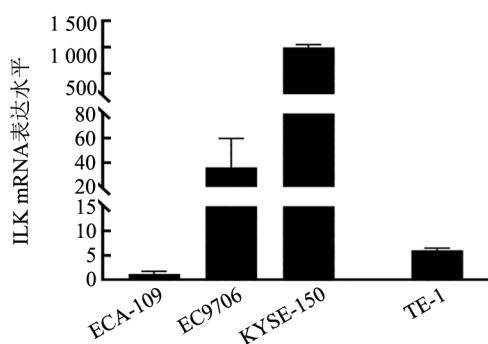


图2 ESCC 细胞中 ILK mRNA 的表达水平

### 2.4 敲降 ILK 基因抑制 KYSE-150 细胞的增殖能力

使用 ILK 干扰慢病毒感染 KYSE-150 细胞,显微镜观察显示,未见细胞有肉眼可见的形态学变化。荧光显微镜观察报告基因 GFP 的表达情况(图3),荧光率即

为阳性感染率。慢病毒感染 KYSE-150 细胞 3 d 后,两组细胞均可见绿色荧光表达,感染效率均在 90% 以上。

qPCR 实验结果(图4A)显示,shCtrl 组 KYSE-150 细胞中 ILK mRNA 的表达量约为 shILK 组的 12.8 倍( $P<0.05$ )。WB 法检测结果(图4B)显示,shILK 组 KYSE-150 细胞中 ILK 蛋白表达水平明显下调( $P<0.05$ ),提示 ILK 敲降成功。MTT 法检测结果(图4C)显示,shILK 组 KYSE-150 细胞的增殖能力显著低于 shCtrl 组(均  $P<0.01$ )。克隆形成实验结果(图4D)显示,shILK 组细胞克隆形成率低于 shCtrl 组( $P<0.05$ )。上述结果表明,敲降 ILK 的表达可抑制 KYSE-150 细胞的增殖能力。

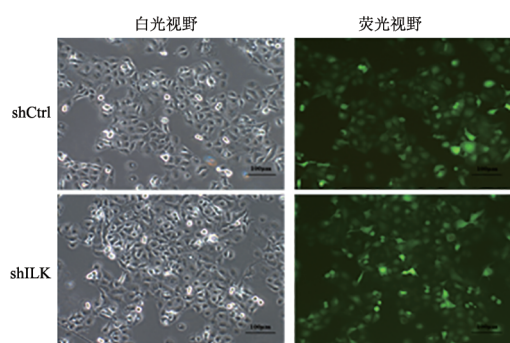
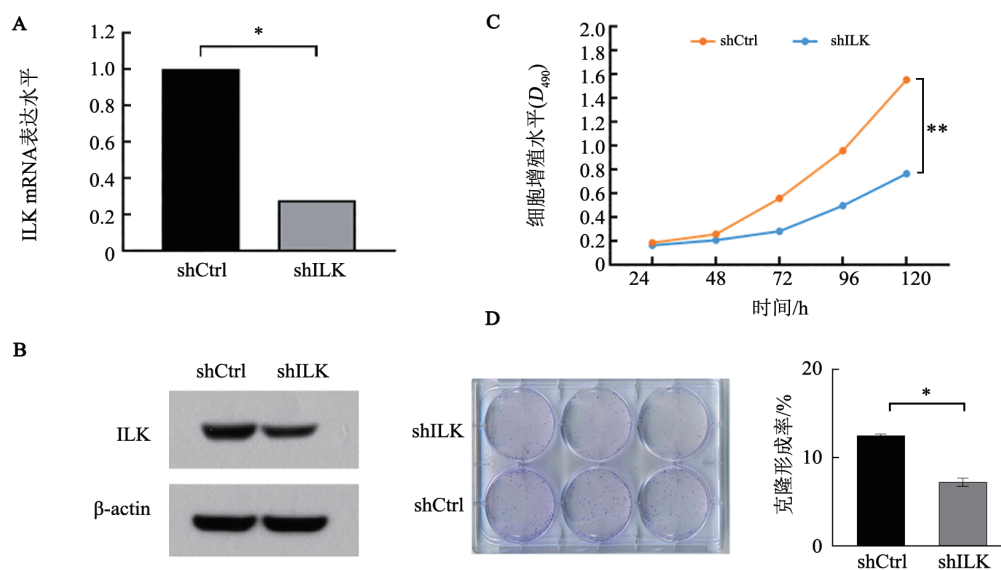


图3 KYSE-150 细胞的有效感染状态(×100)



\* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$

图4 ILK 基因敲降对 KYSE-150 细胞 ILK 表达(A、B)及其增殖能力(C、D)的影响

### 2.5 敲降 ILK 基因促进 KYSE-150 细胞凋亡

细胞凋亡检测结果(图5)显示,shILK 组 KYSE-150 细胞的凋亡率高于 shCtrl 组( $P<0.05$ )。结果表明,敲降 ILK 基因的表达可促进 KYSE-150 细胞凋亡。

### 2.6 敲降 ILK 基因抑制 KYSE-150 细胞裸鼠移植瘤的生长

裸鼠皮下成瘤实验结果(图6)显示,KD 组的裸鼠移植瘤体积及质量均低于 NC 组( $P<0.05$ )。表明敲降 ILK 基因的表达明显减缓了皮下移植瘤的形成速度,肿瘤体积也明显减小。实验结果表明,敲降 ILK 基因可抑制裸鼠 KYSE-150 细胞移植瘤的生长,提示 ILK 可能参与了 ESCC 的发生与发展过程。

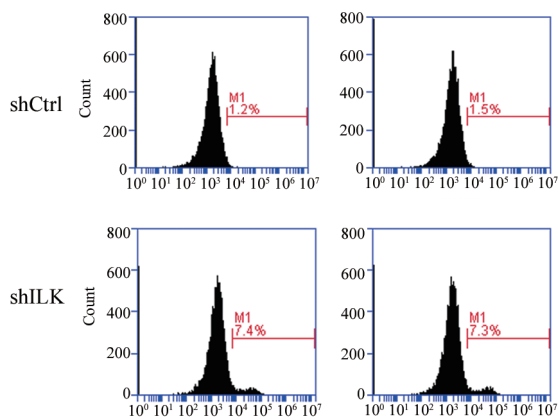


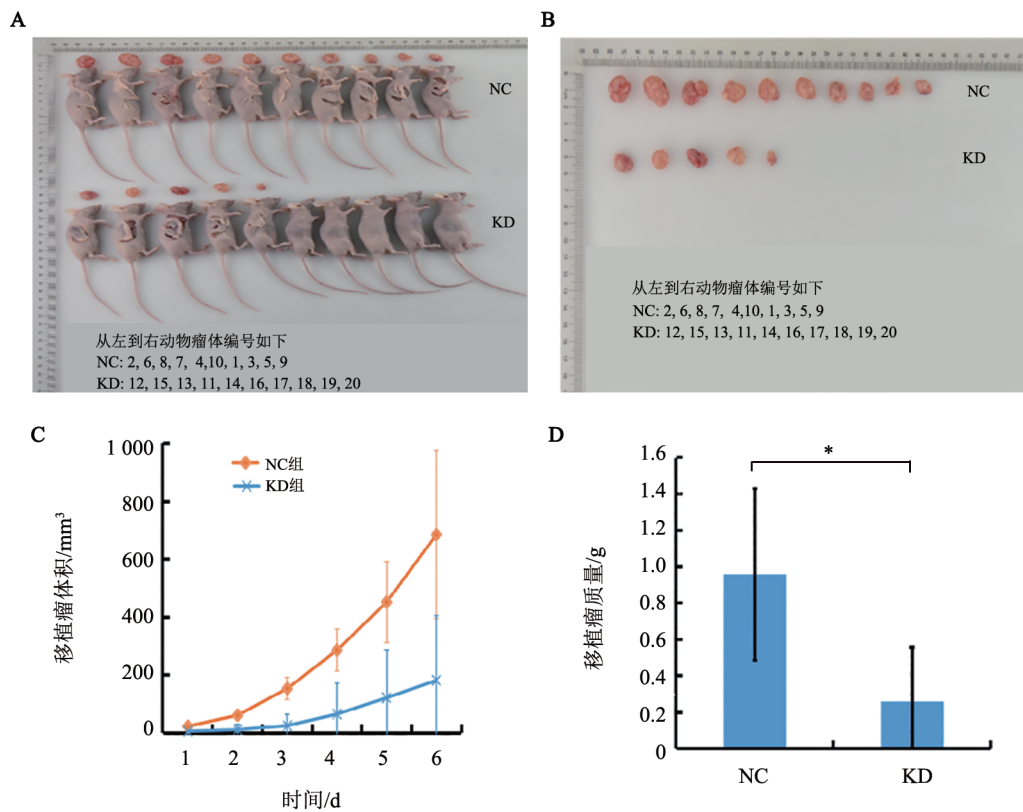
图5 敲降ILK基因对KYSE150细胞凋亡的影响

### 3 讨论

ILK是一种细胞内信号蛋白,具有Ser/Thr蛋白

激酶活性,参与调节多种信号转导通路,包括AKT、GSK-3 $\beta$ 、NF- $\kappa$ B、Erk等信号通路<sup>[5,12]</sup>。ILK由452个氨基酸残基组成,相对分子质量为59 000,位于人染色体11P15.5~15.4,基因全长8.8 kb,含有13个外显子和12个内含子。ILK在调节细胞黏附、凋亡、迁移、生长、细胞周期、肿瘤形成及浸润和转移、上皮间质转化等过程中起重要作用<sup>[13]</sup>。

ILK参与恶性肿瘤形成,动物实验<sup>[14]</sup>表明ILK高表达可导致裸鼠乳腺癌的形成。有研究结果<sup>[15]</sup>发现,ILK可能是结肠炎症及肿瘤发生中的分子驱动因子和介质,通过调节结肠炎小鼠模型的炎症反应,从而促进结肠炎相关肿瘤的生长。亦有研究发现,ILK在一些恶性肿瘤中过表达,如乳腺癌<sup>[16]</sup>、卵巢癌<sup>[17]</sup>、结直肠癌<sup>[18]</sup>、膀胱癌<sup>[19]</sup>等,提示ILK在肿瘤的发生及进展中起着十分重要的作用。



\* $P < 0.05$

A: 裸鼠移植瘤模型的建立; B: 经解剖剥离的裸鼠移植瘤标本; C: NC组与KD组裸鼠移植瘤体积比较; D: NC组与KD组裸鼠移植瘤质量比较

图6 敲降ILK基因对KYSE-150细胞裸鼠移植瘤生长的影响

ILK主要通过参与肿瘤细胞的迁移和黏附、细胞外基质降解以及肿瘤血管生成等促进肿瘤浸润和迁移。PERL等<sup>[20]</sup>报道了高表达ILK能诱导E-钙黏蛋白的表达减少,降低细胞之间及细胞与基质之间的黏附性,从而促进肿瘤的侵袭和转移。DRIVER等<sup>[21]</sup>利用qPCR技术研究南非起源的5个人类ESCC

细胞中ILK的表达情况及其亚型,分析生长因子对ILK表达的影响,结果提示EGF和TGF- $\beta$ 1可调节ESCC细胞中ILK的表达。此外,有研究<sup>[22]</sup>报道,ILK抑制剂QLT0267通过阻止Akt和下游靶标GSK-3 $\beta$ 的磷酸化,可有效阻碍神经胶质瘤细胞中ILK/Akt级联的信号传导,进一步遏制神经胶质瘤细胞生长,说

明ILK可能成为未来肿瘤基因治疗的一个靶点。

本研究首先采用免疫组织化学染色法检测ESCC组织中ILK的表达情况,结果表明ILK蛋白在ESCC组织中的表达水平高于癌旁组织( $P<0.05$ ),且ILK高表达与淋巴结转移有关联( $P<0.05$ ),提示ILK可能参与ESCC发生、发展的过程。其次,从细胞水平通过MTT实验、克隆形成实验发现,敲降ILK表达后,KYSE-150细胞增殖能力、克隆形成能力减弱。表明ILK基因可能促进KYSE-150细胞增殖,由此推测ILK基因异常表达可能是增加ESCC恶性程度的一个重要因素。细胞凋亡与许多疾病尤其是肿瘤的发生、发展和转归有着密切的关系。通过FACS检测抑制ILK基因表达对KYSE-150细胞凋亡的影响,结果发现敲降ILK基因表达后,相对于对照组,细胞凋亡率升高,故ILK抑制KYSE-150细胞凋亡,可能是促进细胞增殖的一个重要原因。在动物实验中,成功建立KYSE-150细胞皮下成瘤裸鼠模型,结果发现相对于对照组而言,ILK干扰组裸鼠瘤体显著偏小,而且生长较为缓慢。结果表明,敲降ILK基因可抑制裸鼠KYSE-150细胞移植瘤的生长,提示ILK可能参与了ESCC的发病过程。

综上所述,本研究从组织水平、细胞水平和动物模型三个层面揭示了ILK基因敲降可阻碍KYSE-150细胞增殖及裸鼠皮下移植瘤的生长,促进细胞凋亡,为ESCC的早期临床诊断和精准诊疗提供了新策略和新靶点。但目前关于ILK与其上下游基因的关系及其调控机制尚不清楚,且相关信号通路在ESCC中的深入研究还有待完成。后续本课题组将更进一步研究ILK在食管癌发生发展过程中的作用和机制,为ESCC治疗发现新靶点和新机制提供实验基础。

#### [参 考 文 献]

- [1] SOERJOMATARAM I, LORTET-TIEULENT J, PARKIN D M, *et al.* Global burden of cancer in 2008: a systematic analysis of disability-adjusted life-years in 12 world regions[J/OL]. *Lancet*, 2012, 380(9856): 1840[2022-01-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23079588/>. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60919-2.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, *et al.* Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [3] JUNJIE H, ANASTASIOS K, WOJCIECH M, *et al.* Global burden, risk factors, and trends of esophageal cancer: an analysis of cancer registries from 48 Countries[J/OL]. *Cancers*, 2021, 13(1): 141[2022-01-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33466239/>. DOI: 10.3390/cancers13010141.
- [4] DOI T, PIHA-PAUL S A, JALAL S I, *et al.* Safety and antitumor activity of the anti-programmed death-1 antibody pembrolizumab in patients with advanced esophageal carcinoma[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(1): 61-67. DOI: 10.1200/JCO.2017.74.9846.
- [5] HANNIGANGE, LEUNG-HAGESTEIJNC, FITZ-GIBBON L, *et al.* Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase[J]. *Nature*, 1996, 379(6560): 91-96. DOI: 10.1038/379091a0.
- [6] GÓRSKA A, MAZUR A J. Integrin-linked kinase (ILK): the known vs. the unknown and perspectives[J/OL]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(2): 100 [2022-01-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35089438/>. DOI: 10.1007/s00018-021-04104-1.
- [7] SHEN H, MA J L, ZHANG Y, *et al.* Integrin-linked kinase overexpression promotes epithelial-mesenchymal transition via nuclear factor- $\kappa$ B signaling in colorectal cancer cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(15): 3969-3977. DOI: 10.3748/wjg.v22.i15.3969.
- [8] TSOUMAS D, NIKOU S, GIANNOPOULOU E, *et al.* ILK expression in colorectal cancer is associated with EMT, cancer stem cell markers and chemoresistance[J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2018, 15(2): 127-141. DOI: 10.21873/cgp.20071.
- [9] LOUCA M, ZARAVINOS A, STYLIANOPOULOS T, *et al.* ILK silencing inhibits migration and invasion of more invasive glioblastoma cells by downregulating ROCK1 and Fascin-1[J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 471(1/2): 143-153. DOI:10.1007/s11010-020-03774-y.
- [10] WANG Q, SANG W, XUE J, *et al.* The Expression and prognostic value of ILK and YAP1 in glioma[J/OL]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2022, 30(3): e21-e29[2022-01-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35262527/>. DOI: 10.1097/PAL.0000000000000984.
- [11] LOUCA M, ZARAVINOS A, STYLIANOPOULOS T, *et al.* ILK silencing inhibits migration and invasion of more invasive glioblastoma cells by downregulating ROCK1 and Fascin-1[J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 471(1/2): 143-153. DOI:10.1007/s11010-020-03774-y.
- [12] YANG J, HOU Y, ZHOU M, *et al.* Twist induces epithelial-mesenchymal transition and cell motility in breast cancer via ITGB1-FAK/ILK signaling axis and its associated downstream network[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 71:62-71. DOI: 10.1016/j.biocel.2015.12.004.
- [13] AYSE N K, SIYANGI H, LEAN A. Integrin-linked kinase tunes cell-cell and cell-matrix adhesions to regulate the switch between apoptosis and EMT downstream of TGF $\beta$ 1[J]. *Mol Biol Cell*, 2021, 32(5): 402-412. DOI:10.1091/mbc.E20-02-0092.
- [14] PONTIER S M, HUCK L, WHITE D E, *et al.* Integrin-linked kinase has a critical role in ErbB2 mammary tumor progression: implications for human breast cancer[J]. *Oncogene*, 2010, 29(23): 3374-3385. DOI: 10.1038/onc.2010.86.
- [15] SALEH A, AFSAR U, AHMED R, *et al.* A potential role for integrin-linked kinase in colorectal cancer growth and progression via regulating senescence and immunity[J/OL]. *Front Genet*, 2021, 12:638558[2022-01-22] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8216764/>. DOI:10.3389/fgene.2021.638558.
- [16] TSIRTSAKI K, GKRETSI V. The focal adhesion protein integrin-linked kinase (ILK) as an important player in breast cancer pathogenesis[J]. *Cell Adh Migr*, 2020, 14(1): 204-213. DOI: 10.1080/19336918.2020.1829263.



- [17] KILIÇASLAN S M S, İNCESU Z .Effects of integrin-linked kinase on protein kinase b, glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , and  $\beta$ -catenin molecules in ovarian cancer cells[J]. Iran J Basic Med Sci, 2021, 24 (11): 1500-1508. DOI: 10.22038/IJBMS.2021.58716.13042.
- [18] CHADLA P, ARBI M, NIKOU S , *et al.* Integrin-linked-kinase overexpression is implicated in mechanisms of genomic instability in human colorectal cancer[J]. Dig Dis Sci,2021, 66(5): 1510-1523. DOI:10.1007/s10620-020-06364-6.
- [19] ZHUANG X, LV M, ZHONG Z, *et al.* Interplay between integrin-linked kinase and ribonuclease inhibitor affects growth and metastasis of bladder cancer through signaling ILK pathways [J/OL]. J Exp Clin Cancer Res, 2016, 35(1): 130[2022-01-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27576342/>. DOI: 10.1186/s13046-016-0408-x.
- [20] PERL A K, WILGENBUS P, DAHL U, *et al.* A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma[J]. Nature, 1998, 392(6672): 190-193. DOI: 10.1038/32433.
- [21] DRIVER G A, VEALE R B. Modulation of integrin-linked kinase (ILK) expression in human oesophageal squamous cell carcinoma cell lines by the EGF and TGF $\beta$ 1 growth factors[J/OL]. Cancer Cell Int, 2006, 6: 12[2022-01-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16643659/>. DOI: 10.1186/1475-2867-6-12.
- [22] YAU C Y F, WHEELER J J, SUTTON K L, *et al.* Inhibition of integrin-linked kinase by a selective small molecule inhibitor, QLT0254, inhibits the PI3K/PKB/mTOR, Stat3, and FKHR pathways and tumor growth, and enhances gemcitabine-induced apoptosis in human orthotopic primary pancreatic cancer xenografts [J]. Cancer Res, 2005, 65(4): 1497-1504. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2940.

[收稿日期] 2022-01-22

[修回日期] 2022-06-03

[本文编辑] 郁晓路,黄静怡