

网络出版时间: 2020-6-29 11:26 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kems/detail/34.1065.R.20200629.1110.006.html>

## 干扰 VIRMA 基因对胃癌细胞迁移的影响和机制研究

代聪聪 吴立胜 缪冉 朱志强

**摘要** 目的 观察和分析干扰 VIRMA 基因对胃癌细胞迁移能力的影响,并初步探究其机制。方法 慢病毒转染干扰 MGC803 和 SGC7901 胃癌细胞中 VIRMA 基因的表达; 使用 CCK-8 法检测胃癌细胞的增殖能力; 细胞划痕实验和 Transwell 小室实验检测各组胃癌细胞的迁移能力; 实时荧光定量 PCR 和蛋白质印迹法检测 VIRMA 及 FN1 的 mRNA 及蛋白表达相关情况。结果 在胃癌细胞中 VIRMA 基因表达被慢病毒抑制后,其 mRNA 量及蛋白表达有所下降 ( $P < 0.05$ ); CCK-8 法结果显示干扰 VIRMA 基因使胃癌细胞的增殖能力受到了抑制 ( $P < 0.05$ ); 干扰组胃癌细胞的 24 h 划痕愈合距离变少,穿膜细胞数相比于对照组也减少 ( $P < 0.05$ ); 干扰 VIRMA 基因后 FN1 的表达量下降 ( $P < 0.05$ )。结论 慢病毒介导的抑制 VIRMA 表达,可以抑制胃癌 MGC803 及 SGC7901 细胞的迁移能力,其机制可能和调控 FN1 的表达水平有关。

2020-03-10 接收

基金项目: 安徽省公益性技术应用研究联动计划项目(编号: 16040804013)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院普通外科,合肥 230001

作者简介: 代聪聪 男 硕士研究生;

吴立胜 男 副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,  
wlsheng1210@163.com

关键词 VIRMA; 胃癌; 细胞迁移; FN1; CCK-8

中图分类号 R 735.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)07-1013-06  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.07.006

胃癌是人类世界癌症医学中最艰难的挑战之一,其发病率在东亚最高,且其致死率也排在恶性癌症的前列。胃癌是中国最为常见的癌症之一,仅次于肺癌。伴随着医疗行业整体的不停进步,胃癌的诊断方法及治疗手段得到很大程度的提升,但胃癌的局部复发和远处转移依然影响着患者的生存预后,胃癌病人现阶段的 5 年生存率仍不能达到比较满意的水平<sup>[1-2]</sup>。因此,探索影响胃癌转移机制的生物新靶点对于提高胃癌患者生存预后有重大意义。

6-甲基腺苷(N6-methyladenosine, m6A)属于真核生物 mRNA 转录后修饰中含量最为丰富的一种方式,对调节 mRNA 剪接、翻译和稳定性等方面有着非常重要的影响。m6A 动态调控蛋白包含甲基转移酶(Writers),去甲基化酶(Erasers)及读取基因(Readers)这三类<sup>[3]</sup>。甲基转移酶被发现是一种可以催化甲基化过程的多因子复合物,是由 METTL3、

## Establishment of a TaqMan-based real-time PCR method of spotted fever group rickettsiae

Luo Wanrong, Liu Boyu, Chen Zhen, et al

(Dept of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To establish a TaqMan real-time fluorescent quantitative PCR of spotted fever group rickettsiae(SFGR). **Methods** According to the *ompA* gene sequence of *Rickettsia japonica*, the specific primers and probes were designed to develop the TaqMan-based Real-time PCR method. The specificity, sensitivity and repeatability of the established method were verified. The established TaqMan real-time PCR method was used to detect SPGR infection in 80 clinic blood samples collected in Anhui Province and compared with the nested PCR. **Results**

The real-time quantitative PCR method for detecting SPGR was successfully established. The cyclic threshold of the standard curve and the template copy number showed a good linear relationship ( $r > 0.99$ ). This method had strong specificity, high sensitivity and good repeatability in the detection of the spotted heat rickettsial nucleic acid samples. **Conclusion** This study establishes a real-time quantitative PCR assay based on TaqMan probe to detect SPGR, which provides a rapid and effective technical means for rapid diagnosis in clinical laboratories.

**Key words** spotted fever group rickettsiae; *ompA*; TaqMan probe; real-time fluorescent quantitative PCR

METTL14、WTAP、VIRMA、RBM15 和 ZC3H13 蛋白组成的<sup>[4]</sup>。已有研究<sup>[4-9]</sup>表明, m6A 相关蛋白以不同的角色影响肿瘤的发生和发展, 如乳腺癌、急性髓性白血病、胆管癌、肝细胞癌和膀胱癌等。VIRMA 作为近年来发现的 m6A 甲基转移酶的重要组成部分, 尚不清楚其在胃癌的发生和发展进程中的具体作用。该研究构建 VIRMA 干扰胃癌细胞株, 探究其对胃癌细胞迁移功能的影响并对其机制进行初步探究。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞来源及细胞培养

人胃癌 MGC803 和 SGC7901 细胞株从中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所购入。胃癌细胞 MGC803 和 SGC7901 细胞株在有 1% 链霉素 - 青霉素混合物( 美国 Gibco 公司) 和 10% 胎牛血清( 美国 Gibco 公司) 的 1640 培养基( 美国 Gibco 公司) 中进行培养, 在温度 37 °C、CO<sub>2</sub> 体积为 5% 的细胞培养箱( 美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 中进行培养。

### 1.2 细胞转染

用含 10% 胎牛血清的 1640 培养液培养人胃癌 MGC803 和 SGC7901 细胞至细胞融合度为 60% ~ 70%, 然后按照相关制造商的说明书( 上海 Obio 公司), 用 VIRMA 干扰慢病毒和 pLKD-CMV-G & PR-U6 阴性对照载体感染细胞, 感染细胞 24 h 后使用新鲜培养液继续培养。然后用内含 10% 胎牛血清和 8 μg/ml 嘌呤霉素的 1640 培养液培养筛选 2 周, 扩增筛选后的细胞株将稳定转染的干扰组和对照组胃癌细胞分别命名为 shVIRMA 组和 shRNA-NC 组。

### 1.3 实时荧光定量 PCR

对培育的胃癌细胞中使用 TRIzol 试剂( 美国 Invitrogen 公司) 萃取细胞中总的 RNA, 用 Primescript RT 试剂( 日本 TaKaRa 公司) 逆转录合成 cDNA。用 ChamQ SYBR qPCR Master Mix 试剂盒( 南京诺唯赞生物公司) 进行 qRT-PCR 的 mRNA 检测和分析。应用于 qRT-PCR 的引物序列: VIRMA 上游序列: 5'-GAGTAAGAGCCCATAAGCA GT-3', 下游序列: 5'-TAGCACCAGACCATCAGTA TTCAC-3'; FN1 上游序列: 5'-AGGAAGCCGAGGTT TTAACTG-3', 下游序列: 5'-AGGACGCTCATAAAGTG TCACC-3'; β-actin 上游序列: 5'-AGCGAGGATC CCCCAAAGTT-3', 下游序列: 5'-GGGCACGAAGG CTCATCATT-3'。PCR 实验的化学反应的总体积为 10 μl: Mix 5 μl、Rox 0.2 μl、上游和下游引物各 0.2 μl、ddH<sub>2</sub>O 3.4 μl、cDNA 1 μl。PCR 实验的化学反

应的扩增条件: 95 °C 控温开始进行预变性 30 s; 95 °C 控温进行变性 5 s; 60 °C 进行控制温度 30 s, 共扩增循环 40 次。参照选取 β-actin, 实验设置 3 个副孔, 选取  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法去计算 mRNA 表达量的相对变化。实验操作均遵循试剂制造商的说明书。

**1.4 蛋白质印迹实验** 挑选生长增殖情况处于优良的胃癌细胞, 遵循试剂说明书加入裂解缓冲液及蛋白酶抑制剂( 上海碧云天公司), 置于冰上 15 min 后刮取细胞裂解物, 4 °C 的温度下使用 13 000 r/min 的转速进行离心 12 min, 抽取离心后的部分上层液体并按照 BCA 蛋白质测定试剂盒( 上海碧云天公司) 的说明指导定量蛋白质的浓度, 后加入蛋白上样缓冲液水浴煮沸变性 6 min, 保存在 -80 °C 冰箱。制作浓度为 13% 的( SDS-PAGE) 凝胶用于电泳, 蛋白上样后电泳, 使用湿转法转膜, 脱脂牛奶封闭。清洗, 分别放入相对应一抗抗体中 4 °C 过夜。次日洗膜, 分别放入相对应二抗抗体常温置于摇床上孵育 1 h。随后洗膜, 加入显色液, 曝光及观察结果。

**1.5 CCK-8 实验** 挑选生长增殖情况处于优良的胃癌细胞, 制备成细胞密度为 16 000/ml 的含血清细胞悬液, 在 96 孔板的每个小孔中滴入 100 μl 的细胞悬液然后放置于培养箱中培育, 每组细胞设置 3 个副孔。每隔 24 h, 滴入含有 10% CCK-8 的不含血清的 1640 培养基, 在培养箱中放置培养 1 h, 然后应用酶标仪对实验对象读取其在 450 nm 的数据并分析。

### 1.6 Transwell 实验

**1.6.1 细胞迁移实验** 挑选生长增殖情况处于优良的胃癌细胞, 应用胰酶消化离心后重新悬浮并吹打均匀下层积淀的细胞时应用不含有血清的培养基, 校准细胞悬浮液的密度为  $2 \times 10^5$ /ml。使用移液枪以 200 μl 的体积将细胞悬浮液滴入 Transwell 小室上室, 在小室下室以 650 μl 的体积加入含有 10% 胎牛血清的培养基, 放在培养箱中继续培育。24 h 后从细胞培养箱中拿出 Transwell 小室, 吸除上室培养液并应用 PBS 仔细清洗 3 次, 然后加入 95% 乙醇来固定, 待 35 min 后吸除乙醇, 自然情况下风干小室。应用 0.1% 结晶紫试剂对细胞染色 35 min, 后应用 PBS 仔细清洗 3 遍。100 倍光学显微镜下拍照及记数。

**1.6.2 细胞侵袭实验** 将 Matrigel 基质胶( 美国 BD 公司) 和无血清 1640 培养基按照 1 : 15 的溶液比例进行稀释混合后, 加入到 Transwell 小室的上层小室内, 在 37 °C 培养箱中放置 2 h 待其成形为凝胶, 后续实验步骤与细胞迁移实验相同。

**1.7 细胞划痕实验** 挑选生长增殖情况处于优良的胃癌细胞,按照每孔 $2 \times 10^5$ 个细胞的数量铺在6孔板中,随后将新鲜的含有10%血清的液体培养基加入6孔板,等候细胞增殖到生长融合度超过75%时,以100 μl移液枪头为工具在直尺的辅助下划十字直线于培养板上,应用PBS仔细清洗3次,换入不含血清的液体培养基,应用显微镜对划线结果进行拍照,后放回培养箱中继续培育。24 h后仔细吸除旧培养基,应用PBS清洗3次,40倍光学显微镜下查看并拍照,然后进行测量及统计。

**1.8 统计学处理** 此研究的所有实验独立重复3次。采用SPSS 21.0及Graph Prism 6.0软件做数据统计分析实验的相关结果及绘制相关图片,定量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间的均数比较使用Student-t检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 慢病毒转染成功抑制 VIRMA mRNA 表达** 使用 pLKD-CMV-G & PR-U6 阴性对照载体和 VIRMA 干扰慢病毒感染胃癌 MGC803 和 SGC7901 细胞,实时荧光定量 PCR 法检测 shRNA-NC 组和 sh-VIRMA 组细胞中 VIRMA mRNA 的表达水平。相较于 shRNA-NC 组,shVIRMA 组细胞中 VIRMA mRNA 的表达水平降低,差异有统计学意义( $t = 10.52, 15.54, P < 0.05$ )。见图 1。

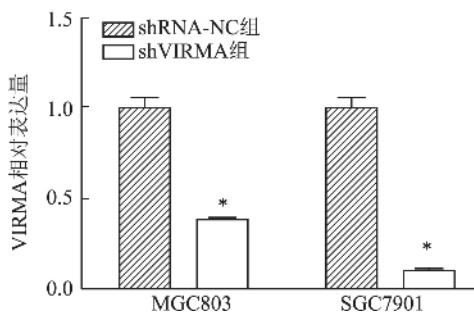


图 1 实时荧光定量 PCR 检测 VIRMA mRNA 表达水平  
与 shRNA-NC 组比较: \*  $P < 0.05$

**2.2 慢病毒转染成功抑制 VIRMA 蛋白表达** 使用蛋白质印迹法检测 shRNA-NC 组和 shVIRMA 组细胞中 VIRMA 蛋白的表达水平。结果显示 shVIRMA 组细胞中 VIRMA 蛋白相对表达量低于 shRNA-NC 组。荧光定量 PCR 实验的检测结论与蛋白质表达结论相一致,表明慢病毒在胃癌细胞中成功降低了 VIRMA 基因的表达,可在后续实验中使用。差异有统计学意义( $t = 50.75, 47.27, P < 0.05$ )。见图 2。

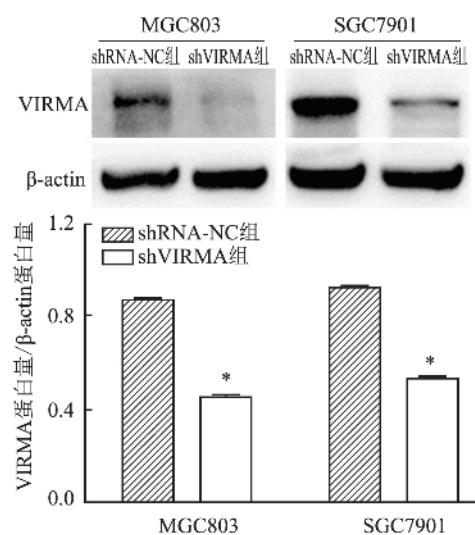


图 2 蛋白质印迹法检测 VIRMA 蛋白表达水平  
与 shRNA-NC 组比较: \*  $P < 0.05$

**2.3 干扰 VIRMA 抑制胃癌细胞的增值** 使用 CCK-8 法检测 shRNA-NC 组和 shVIRMA 组的胃癌细胞增殖情况。结果显示 shVIRMA 组胃癌细胞的生长能力弱于 shRNA-NC 组胃癌细胞,差异有统计学意义( $t = 4.424, t = 16.14, t = 3.359, t = 5.934, P < 0.05$ )。见图 3。

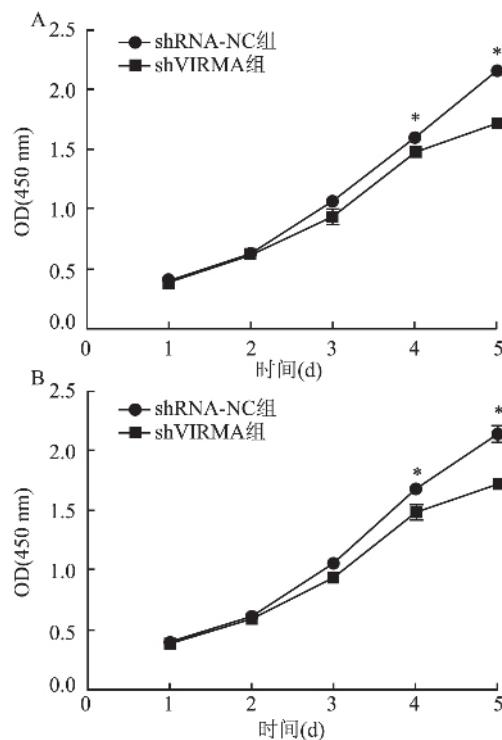


图 3 CCK-8 法检测细胞增殖能力  
A: MGC803; B: SGC7901; 与 shVIRMA 组比较: \*  $P < 0.05$

**2.4 干扰 VIRMA 抑制胃癌细胞的迁移** 对胃癌 MGC803 和 SGC7901 细胞分别进行 Transwell 细胞

实验。24 h 后 shRNA-NC 组胃癌细胞迁移和侵袭个数多于 shVIRMA 组, 差异有统计学意义( $t = 15.42, 42.68$ ;  $t = 22.48, 14.59$ ,  $P < 0.05$ )。见图 4。

## 2.5 干扰 VIRMA 抑制胃癌细胞的划痕愈合能力

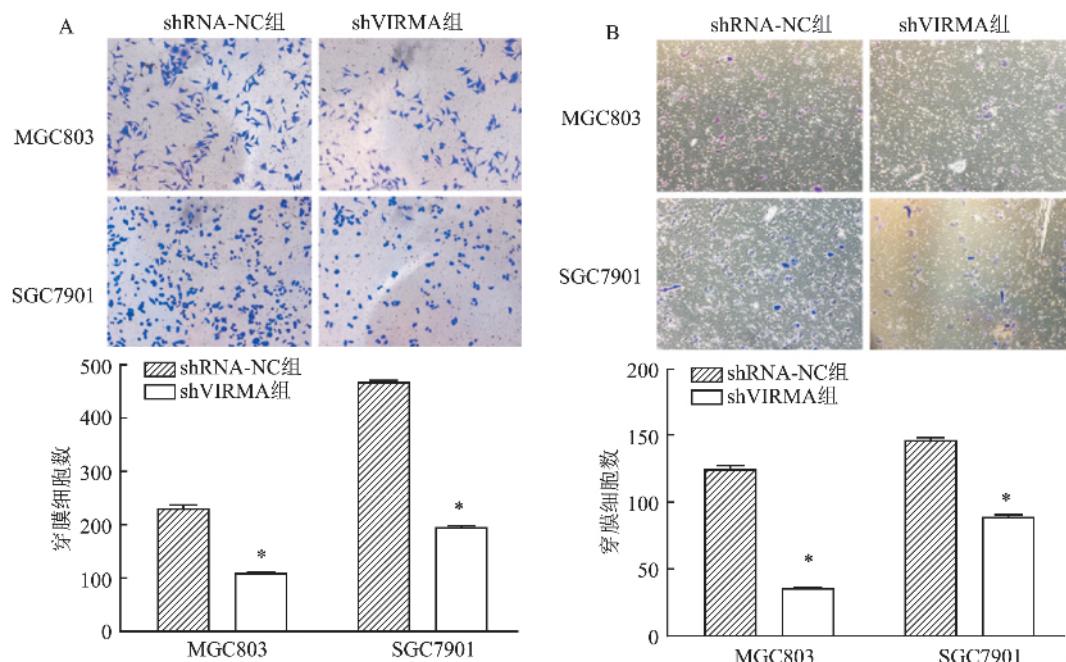


图 4 Transwell 实验检测胃癌细胞迁移和侵袭能力

A: 迁移实验  $\times 100$ ; B: 侵袭实验  $\times 40$ ; 与 shRNA-NC 组比较: \*  $P < 0.05$

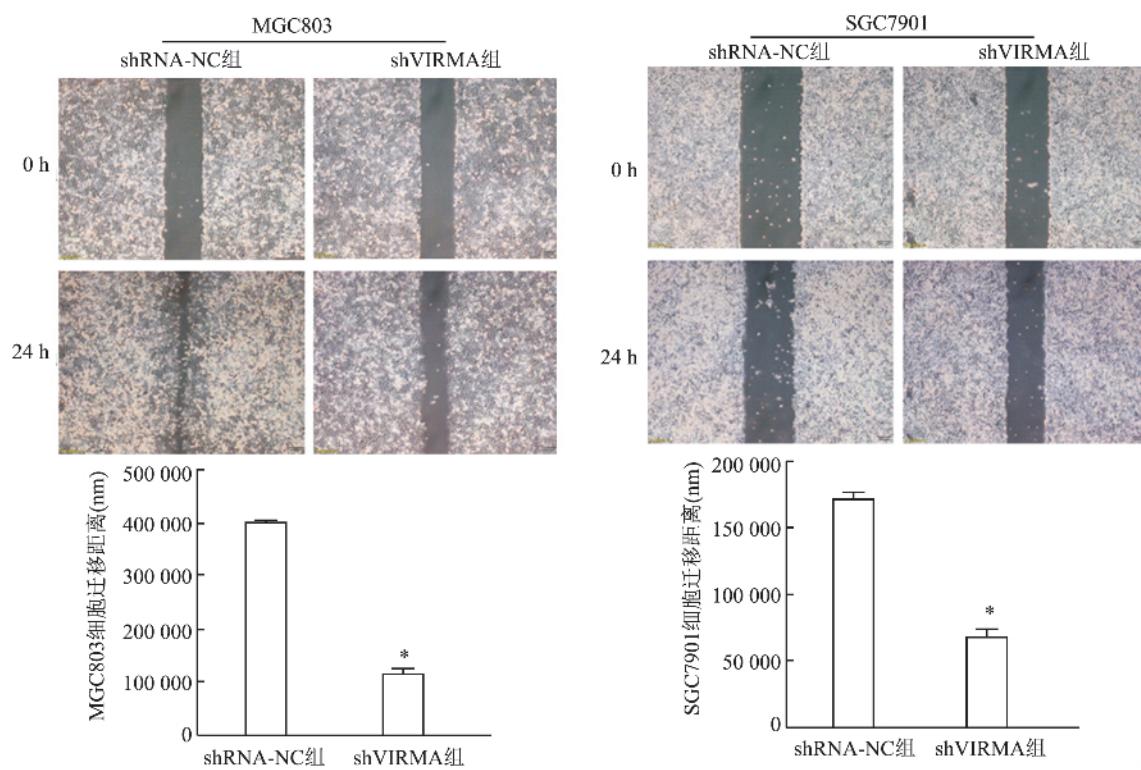


图 5 划痕实验检测细胞迁移能力

与 shRNA-NC 组比较: \*  $P < 0.05$

划痕实验进一步检测及分析抑制 VIRMA 基因表达对胃癌细胞的迁移潜能的影响。24 h 后 shVIRMA 组划痕愈合率较 shRNA-NC 组低, 差异有统计学意义( $t = 30.28$ ;  $t = 12.43$ ,  $P < 0.05$ )。见图 5。

**2.6 干扰 VIRMA 影响 FN1 的 mRNA 和蛋白表达** 蛋白质印迹法和实时荧光定量 PCR 法检查干扰 VIRMA 基因后,胃癌细胞中 FN1 基因的表达变动程度。结果显示,shVIRMA 组和 shRNA-NC 组对比,FN1 的 mRNA 和蛋白表达量均受到了抑制的影响,差异有统计学意义( $t = 5.731, 4.224; t = 32.42, 49.17 P < 0.05$ )。见图 6。

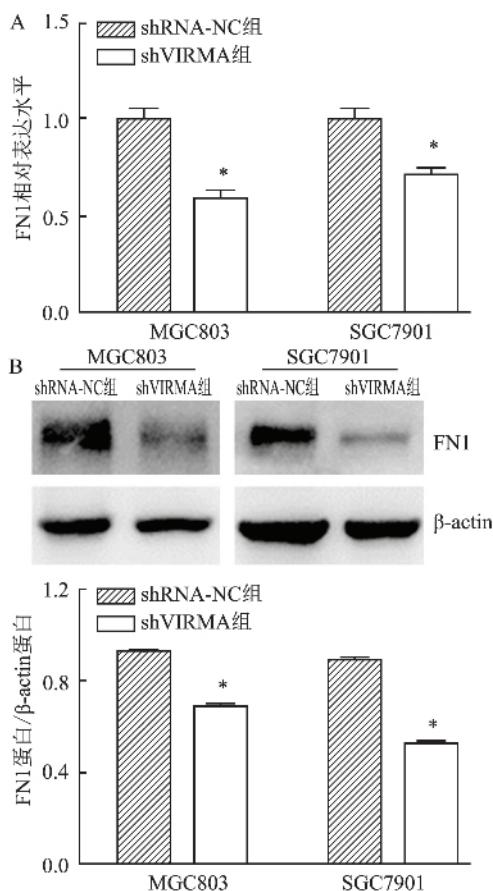


图 6 胃癌细胞中 FN1 mRNA 和蛋白相对表达水平

A: FN1 mRNA 表达; B: FN1 蛋白表达,与 shRNA-NC 组比较: \*  $P < 0.05$

### 3 讨论

RNA 甲基化已在 mRNA、miRNA、lncRNA、rRNA 和 snRNA 等多种 RNA 中发现,m6A 甲基化在真核细胞中为含量最为丰富的 mRNA 化学修饰。先前的研究<sup>[4-5]</sup>表明 m6A 修饰有许多动态蛋白参与调控,其中甲基转移酶是由多个蛋白组成的复杂物质,由 METTL3、METTL14、WTAP、RBM15、VIRMA 及 ZC3H13 几个主要成分构成。最近研究<sup>[6-10]</sup>表明,m6A 相关蛋白与不同类型的癌症细胞的发生和发展进程有一定的关系,如 METTL3 是急性髓性白血

病生长的必须基因,是基于染色质的这一途径用于维持急性髓性白血病所需要的调节剂,METTL3 基因表达的降低将导致癌症细胞周期出现停滞,白血病细胞分化受阻。m6A 甲基化修饰对于胶质母细胞瘤干细胞(glioblastoma stem cells, GSC)肿瘤发生及自我更新进程至关重要,METTL14 或 METTL3 基因的表达减少可以促进人 GSC 细胞的增殖。然而,GSC 的增殖会因为 RNA 脱甲基酶 FTO 的降低或者 METTL3 的过量表达而受到抑制。WTAP 过表达可以对胆管癌细胞的迁移和侵袭产生积极作用,干扰 WTAP 基因则降低胆管癌的侵袭和转移<sup>[11]</sup>。ZC3H13 通过调节 K-ras 和 ERK 信号的表达,在抑制结直肠癌中侵袭和增殖中发挥着重要作用<sup>[12]</sup>。VIRMA 作为 m6A 甲基转移酶复合物中的重要一员,但 VIRMA 在胃癌转移中的作用仍未见相关研究。

为探究 VIRMA 对胃癌转移的影响,使用慢病毒分别转染胃癌 MGC803 和 SGC7901 细胞,建立胃癌 VIRMA 干扰细胞株。结果表明,慢病毒干扰组的 VIRMA mRNA 和蛋白表达均较对照组降低,根据 Transwell 小室实验结果及细胞划痕实验的测试结果,发现胃癌的划痕愈合和迁移能力较实验对照组均受到了抑制。因此,降低 VIRMA 基因的表达水平可以使胃癌的转移能力受到抑制。

癌细胞与细胞外基质的相互作用包括增殖、存活、侵袭和转移等都对癌细胞至关重要,而 FN1 在细胞外基质中含量丰富。FN1 作为一种从属于细胞外基质结构的糖蛋白,在多种类型的已知癌症中表达比正常组织高,例如肛门癌、乳腺癌、头颈部鳞癌和卵巢癌。功能试验表明,FN1 参与细胞增殖、胚胎发育、伤口愈合、血小板聚集宿主防御、凝血、EMT、转移等生物学过程。已有研究<sup>[13-15]</sup>报道 FN1 在一些肿瘤的转移中发挥比较重要作用。如 FN1 的表达降低则抑制肺癌的迁移能力,诱导细胞凋亡。FN1 也是皮肤鳞状细胞癌、脑胶质母细胞瘤和喉部鳞状细胞癌等疾病进展和转移的关键介质。有研究证明通过激活 MMP2/MMP9 通路,FN1 表达的增加可以对胃癌细胞的迁移和侵袭能力产生积极效应。FN1 也被认为是胃癌的潜在预后生物标志物。为了探讨 VIRMA 参与胃癌转移过程的相关分子机制,本研究选取了参与细胞运动和基质侵袭转移的基因 FN1 作为靶基因。

本研究显示,VIRMA 基因受到干扰后,降低了胃癌细胞株 MGC803 和 SGC7901 的体外迁移能力,

FN1 基因的 mRNA 量和蛋白表达量也受到了降低的影响。这表明敲低 VIRMA 基因可以降低胃癌细胞的转移潜能,可能与细胞外基质糖蛋白分子 FN1 有关。综上所述 本研究表明敲低甲基转移酶 VIRMA 可抑制胃癌细胞的转移能力,其机制可能与抑制细胞外基质糖蛋白分子 FN1 的表达相关。

## 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] Chen W , Zheng R , Baade P D , et al. Cancer statistics in China , 2015 [J]. CA Cancer J Clin , 2016 , 66(2) : 115 – 32.
- [3] Roundtree I A , Evans M E , Pan T , et al. Dynamic RNA modifications in gene expression regulation [J]. Cell , 2017 , 169(7) : 1187 – 200.
- [4] Zhao B S , Roundtree I A , He C: Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications [J]. Nat Rev Mol Cell Biol , 2017 , 18(1) : 31 – 42.
- [5] Zhu W , Wang J Z , Xu Z , et al. Detection of N6methyladenosine modification residues ( Review ) [J]. Int J Mol Med , 2019 , 43 (6) : 2267 – 78.
- [6] Cui Q , Shi H , Ye P , et al. m(6) A RNA methylation regulates the self-renewal and tumorigenesis of glioblastoma stem cells [J]. Cell Rep , 2017 , 18(11) : 2622 – 34.
- [7] Vu L P , Pickering B F , Cheng Y , et al. The N(6)-methyladenosine ( m(6) A ) -forming enzyme METTL3 controls myeloid differentiation of normal hematopoietic and leukemia cells [J]. Nat Med , 2017 , 23(11) : 1369 – 76.
- [8] Deng X , Su R , Feng X , et al. Role of N(6)-methyladenosine modification in cancer [J]. Curr Opin Genet Dev , 2018 , 48: 1 – 7.
- [9] Chen X Y , Zhang J , Zhu J S. The role of m(6) A RNA methylation in human cancer [J]. Mol Cancer , 2019 , 18(1) : 103.
- [10] Barbieri I , Tzelepis K , Pandolfini L , et al. Promoter-bound METTL3 maintains myeloid leukaemia by m6A-dependent translation control [J]. Nature , 2017 , 552(7683) : 126 – 31.
- [11] Jo H J , Shim H E , Han M E , et al. WTAP regulates migration and invasion of cholangiocarcinoma cells [J]. J Gastroenterol , 2013 , 48(11) : 1271 – 82.
- [12] Zhu D , Zhou J , Zhao J , et al. ZC3H13 suppresses colorectal cancer proliferation and invasion via inactivating Ras-ERK signaling [J]. J Cell Physiol , 2019 , 234(6) : 8899 – 907.
- [13] Morita Y , Hata K , Nakanishi M , et al. Cellular fibronectin 1 promotes VEGF-C expression , lymphangiogenesis and lymph node metastasis associated with human oral squamous cell carcinoma [J]. Clin Exp Metastasis , 2015 , 32(7) : 739 – 53.
- [14] Xu T P , Huang M D , Xia R , et al. Decreased expression of the long non-coding RNA FENDRR is associated with poor prognosis in gastric cancer and FENDRR regulates gastric cancer cell metastasis by affecting fibronectin1 expression [J]. J Hematol Oncol , 2014 , 7: 63.
- [15] Jiang K , Liu H , Xie D , et al. Differentially expressed genes AS-PN , COL1A1 , FN1 , VCAN and MUC5AC are potential prognostic biomarkers for gastric cancer [J]. Oncol Lett , 2019 , 17(3) : 3191 – 202.

## Effect of interfering VIRMA on migration of gastric cancer cells and its mechanism

Dai Congcong , Wu Lisheng , Miao Ran , et al

(Dept of General Surgery , The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230001)

**Abstract Objective** To observe and analyze the effect of interfering VIRMA gene on the migration ability of gastric cancer cells , and preliminarily explore the mechanism. **Methods** The MGC803 and SGC7901 gastric cancer cells were transfected with lentivirus to interfere the expression of VIRMA. The cell proliferation in each group was detected by CCK-8. The migration ability of cells was detected by wound healing assay and Transwell assay. The changes of VIRMA and FN1 expression were detected by qRT-PCR and Western blot. **Results** qRT-PCR and Western blot showed that lentivirus effectively affected VIRMA gene expression in gastric cancer cells ( $P < 0.05$ ) . Interfering VIRMA gene inhibited the proliferation of gastric cancer cells effectively ( $P < 0.05$ ) . The 24 h wound healing distance of gastric cancer cells in the interference group was less , and the number of transmembrane cells was also less than that of the control group ( $P < 0.05$ ) . After interfering with VIRMA gene , the expression of FN1 decreased ( $P < 0.05$ ) . **Conclusion** Lentivious-mediated knockdown of VIRMA can inhibit the migration ability of gastric cancer MGC803 and SGC7901 cells , and the mechanism may be related to the regulation of FN1 expression.

**Key words** VIRMA; gastric cancer; cell migration; FN1; CCK-8