

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.01151

• 研究简报 •

腺病毒介导的 *hepaCAM* 基因对膀胱癌细胞周期的影响

吕长坤^{1,2}, 刘琪³, 马菲菲², 罗春丽^{1*}, 徐新¹

1. 重庆医科大学检验医学院实验诊断学教研室, 重庆 400016

2. 商丘医学高等专科学校医学检验技术教研室, 商丘 476100

3. 重庆市涪陵中心医院检验科, 重庆 408000

[关键词] 膀胱肿瘤; *hepaCAM*; 细胞周期; 细胞周期蛋白 D1; 腺病毒

[中图分类号] R 737.14 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2013)10-1151-04

Effect of adenovirus-mediated *hepaCAM* gene expression on cell cycle of bladder cancer cell lines

LÜ Chang-kun^{1,2}, LIU Qi³, MA Fei-fei², LUO Chun-li^{1*}, XU Xin¹

1. Department of Laboratory Diagnosis, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Department of Laboratory Medicine, Shangqiu Medical College, Shangqiu 476100, Henan, China

3. Department of Clinical Laboratory, Fuling Central Hospital, Chongqing 408000, China

[Key words] urinary bladder neoplasms; *hepaCAM*; cell cycle; cyclinD1; adenovirus

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(10): 1151-1154]

膀胱移行细胞癌是泌尿系恶性肿瘤之一,其生物学特性复杂,易复发。肝细胞黏附分子(hepatocyte cell adhesion molecule, *hepaCAM*)由 Shen 课题组^[1]于 2005 年发现,具有抑制肿瘤生长的作用。本课题组的前期研究结果也表明,外源性 *hepaCAM* 基因导入肾癌细胞和膀胱癌细胞后,能有效抑制肿瘤的生长^[2-3]。本研究欲从分子水平分析 *hepaCAM* 基因对人膀胱移行上皮细胞癌细胞株生长抑制的作用,拟寻找一种新的基因治疗方法,并为今后的基础研究与临床治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人膀胱移行上皮细胞癌株 T24 由重庆医科大学基础医学院惠赠;人膀胱移行上皮细胞癌株 BIU-87 购于武汉大学细胞库;腺病毒骨架载体 pAdH5 和 pAdH5-*hepaCAM* 由重庆医科大学附属第一医院感染科惠赠;TRIzol、RT-qPCR、SYBR Green II 定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司;引物由 Invitrogen 公司合成;*hepaCAM* 多克隆抗体购于武汉三鹰生物技术有限公司;CyclinD1 单克隆抗体、HRP 标记的二抗山羊抗兔 IgG 及二抗山羊抗鼠 IgG 购于北京中杉金桥生物技术

有限公司。RPMI 1640 培养液为 Gibco 公司产品,胎牛血清为天津 TBD 公司产品。

1.2 细胞培养 人膀胱移行上皮细胞癌株 T24 和 BIU-87 培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,在 37℃、5% CO₂ 条件的培养箱中培养。

1.3 腺病毒感染与细胞分组 取对数生长期细胞,按 1×10⁵ 个/孔接种于 6 孔板,每孔加入 2 mL 培养液,待细胞长至 70%~80% 融合时,弃旧培养液,加入 500 μL 无血清培养液,再加入 4 μL -80℃ 保存的腺病毒液,2 h 后加入完全培养液。将细胞分为 3 组:空白组(未感染组)、空载体组(感染 pAdH5 组)及实验组(感染腺病毒 pAdH5-*hepaCAM* 组)。

1.4 RT-qPCR 检测外源性 *hepaCAM* mRNA 表达 腺病毒感染 48 h 后收集 3 组细胞,提取总 RNA,按 TaKaRa 反转录和 PCR 试剂盒说明书进行。引物序列: *hepaCAM* 上游 5'-AGC GGG AAA TCG TGC GTG-3', 下游 5'-CTT CTG GTT TCA GGC GGT C-3', 扩增片段长度 461 bp; *β-actin* 上游 5'-CTG AAG TAC CCC ATC GAG CAC GGC A-3', 下游 5'-GGA TAG CAC AGC CTG GAT AGC AAC G-3', 扩增片段长度 225 bp。PCR 反应条件为:95℃ 30 s;95℃ 10 s,

[收稿日期] 2013-03-11 [接受日期] 2013-06-17

[作者简介] 吕长坤, 硕士, 讲师. E-mail: 355196126@qq.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 023-68485223, E-mail: luochunli79@126.com

55℃ 20 s,72℃ 40 s,反应板读数,共39个循环;熔解曲线(65℃ 加热到95℃ 5 s,读板)。反应体系为:上游引物 0.8 μL,下游引物 0.8 μL,cDNA 2 μL,荧光反应试剂混合物 6.4 μL。用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析基因相对表达量。

1.5 蛋白质印迹分析检测 hepaCAM、CyclinD1 蛋白的表达 收集各组细胞,加入细胞裂解液,冰上裂解 30 min,4℃ 13 000×g 离心 30 min,吸取上清加上样缓冲液,100℃煮沸变性 5 min,BCA 法测定总蛋白浓度。各组分别取 120 μg 蛋白上样,经 12% SDS-PAGE 后转 PVDF 膜,4℃ 封闭过夜,分别加入 hepaCAM 一抗(1:1 000)和 CyclinD1 一抗(1:200),4℃ 过夜,TBST 洗膜 3 次后加入二抗(1:1 000),室温孵育 1~2 h,TBST 洗膜后进行 ECL 化学发光反应,显影拍照后用凝胶成像仪分析。目的蛋白与 β-actin 的灰度比值表示目的蛋白的相对表达量。

1.6 流式细胞术检测细胞周期分布 将膀胱癌细胞分为 3 组:实验组(感染腺病毒 pAdH5-hepaCAM 组)、空白组(未感染组)、空载体组(感染 pAdH5 组),达到相应处理时间(24 h 和 48 h)后,将各组细胞制成细胞悬液,用 PBS 洗涤 2 次后,加入 1 mL 预冷的 70% 乙醇,固定细胞 18~24 h。取固定后的细胞与等体积的 PI 染液混合,4℃ 放置 20~30 min;样本用 300 目尼龙膜过滤后放入流式细胞仪(FACSVantage SE, BD 公司)的样品室,以 488 nm 激发波长测定。

1.7 细胞免疫荧光分析 hepaCAM 的细胞定位 将 1×10^5 个细胞悬液接种于 24 孔板中,制作爬片,细胞分为 3 组:实验组(感染腺病毒 pAdH5-hepaCAM 组)、空白组(未感染组)、空载体组(感染 pAdH5 组)。48 h 后,用预冷 PBS 洗片 3 次,每次 5 min,4% 多聚甲醛固定细胞 20 min,预冷 PBS 洗片同前,0.1% Triton X-100 透膜 15 min,预冷 PBS 洗片同前,5% 正常山羊血清封闭 30~60 min,预冷 PBS 洗片同前,hepaCAM 一抗(1:25)4℃ 孵育过夜,预冷 PBS 洗片同前,荧光二抗(1:100)暗室室温孵育 30~60 min,预冷 PBS 洗片同前,DAPI 染液复染细胞核 2 min,预冷 PBS 洗片同前,70% 甘油封片,荧光显微镜下观察。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,若差异显著则采用 SNK 检验进行组间均数比较。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 HepaCAM 的 mRNA 与蛋白表达 RT-qPCR 结果显示,实验组 2 种细胞 hepaCAM mRNA(T24 细胞: 1.16 ± 0.09 ,BIU-87 细胞: 2.32 ± 0.23)表达均高于空

白组(2 种细胞中 mRNA 值均为 0)和空载体组(2 种细胞中 mRNA 值均为 0),差异有统计学意义($P < 0.05$)。蛋白质印迹分析结果(图 1)与 RT-qPCR 结果一致。

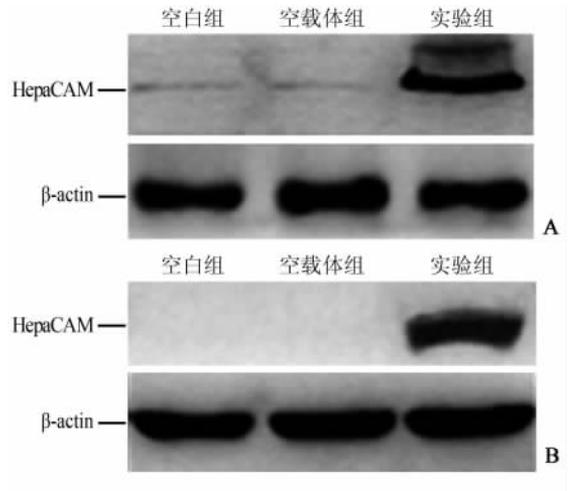


图 1 HepaCAM 的蛋白质印迹分析结果
A: T24 细胞; B: BIU-87 细胞

2.2 细胞免疫荧光分析 hepaCAM 的细胞定位结果 图 2 显示,hepaCAM 蛋白在单个细胞中主要分布于胞质、核周;当细胞紧密连接时,主要分布于细胞与细胞之间。HepaCAM 在空白组和空载体组细胞中不表达。

2.3 流式细胞术分析细胞周期的变化结果 图 3 显示,实验组 T24 细胞和 BIU-87 细胞阻滞于 G₀/G₁ 期,与空白组和空载体组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.4 蛋白质印迹法检测各组细胞 CyclinD1 的表达结果 图 4 显示,实验组 T24 细胞与 BIU-87 细胞中 cyclinD1 蛋白的表达低于空白组和空载体组。

3 讨论

Bischoff 等^[4]研究表明,修饰过的腺病毒可在人类肿瘤细胞内选择性复制。因此肿瘤增殖性腺病毒可直接杀死肿瘤细胞,这成为近年来新兴的抗肿瘤方法^[5]。已有大量研究报道利用缺陷型腺病毒用于恶性肿瘤的治疗,如徐瑞华等^[6]利用 E1B 缺失腺病毒治疗恶性肿瘤的 II 期临床试验;陈传本等^[7]和张珊文等^[8]分别利用重组人 p53 腺病毒注射液结合放射治疗鼻咽癌和头颈癌;阮冬梅^[9]利用重组人 p53 腺病毒治疗癌性腹水等等。另外陈猛等^[10]深入分析了溶瘤腺病毒治疗膀胱癌的研究进展,表明研究开发具有更好的特异性、靶向性和安全性的溶瘤腺病毒已取得了一定成果。本课题也将候选抑癌基因 hepaCAM 转入腺病毒中,在体外研究其杀肿瘤作用。

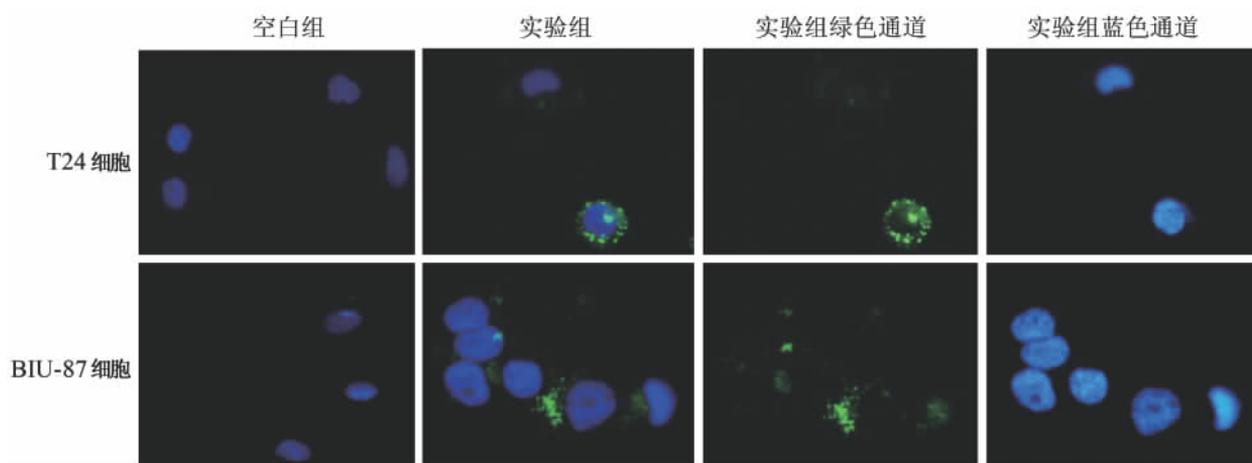


图 2 细胞免疫荧光分析各组细胞 *hepaCAM* 蛋白的分布

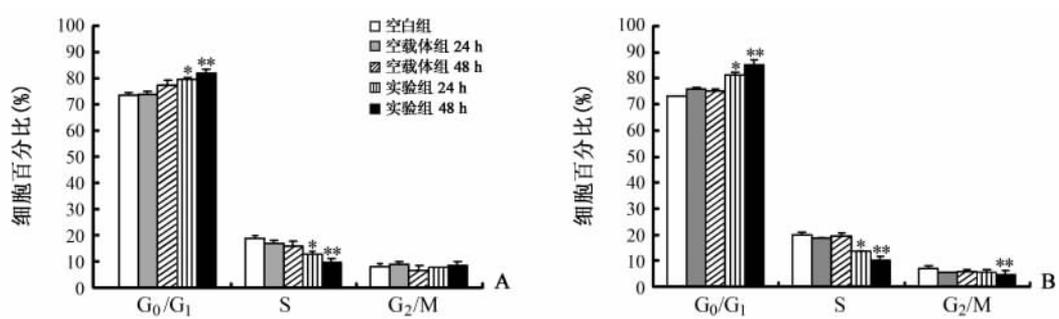


图 3 流式细胞术分析各组细胞的细胞周期分布

A: T24 细胞; B: BIU-87 细胞. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与空白组或处理相同时间的空载体组比较. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$

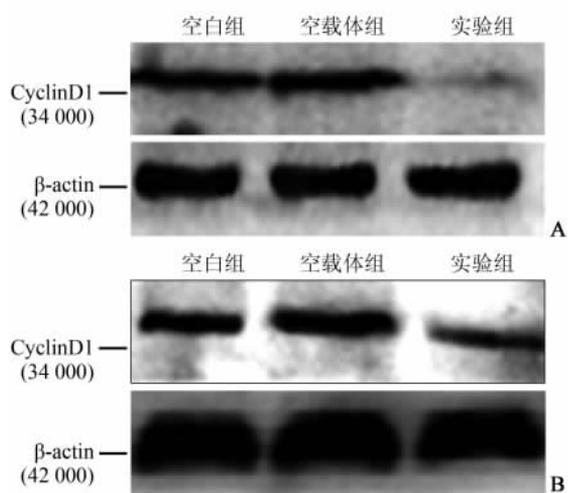


图 4 蛋白质印迹法检测
各组细胞 *CyclinD1* 蛋白的表达
A: T24 细胞; B: BIU-87 细胞

膀胱癌为泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一, 90% 以上为移行细胞癌^[11-12], 其生物学行为复杂, 临床表现隐匿, 早期诊断不易, 因此从基因和分子水平出发, 找出新的治疗方法是亟待解决的问题。

HepaCAM 因其结构特点, 归为免疫超家族成员,

作为候选抑癌基因, 国外研究发现其在正常组织中表达正常, 而在肿瘤组织中表达减少甚至缺失^[13-14]。本课题组前期研究也发现, 在膀胱癌组织中 *hepaCAM* 表达减少或缺失, 在癌旁组织中表达正常, 并对肿瘤细胞生长具有一定抑制作用^[3]。本研究着重从体外实验研究腺病毒介导的 *hepaCAM* 对膀胱癌细胞 T24 和 BIU-87 的细胞周期的影响, 找到 *hepaCAM* 抑制肿瘤细胞生长的作用方面。CyclinD1 在 G_1 期与 p21、CDK4 和 CDK6 形成复合物, 使细胞从 G_1 期进展到 S 期^[15-17], 这是正常细胞有丝分裂的过程, 然而当肿瘤发生发展时, 大量研究报道了 CyclinD1 在很多肿瘤中都明显升高, 如膀胱癌、肺癌、乳腺癌^[18-20]。在本研究中, CyclinD1 在实验组细胞中表达降低, 通过流式细胞术也同样检测到在实验组细胞中 G_1 期细胞多于空白组和空载体组细胞 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 说明 *hepaCAM* 有可能通过降低 CyclinD1 的表达使细胞周期停滞于 G_1 期, 从而使肿瘤细胞停止生长, 但 *hepaCAM* 是否也能影响 G_1 期其他蛋白而改变细胞 (如 p21、CDK4、CDK6) 生长, 这有待进一步的深入研究。

综上所述, 以携带 *hepaCAM* 基因的腺病毒为载体, 能有效抑制膀胱癌细胞的生长, 并发现其主要作用

于细胞的 G₁ 期而达到抑制效果,可为今后临床研究与治疗提供实验依据。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Chung Moh M, Hoon Lee L, Shen S. Cloning and characterization of hepaCAM, a novel Ig-like cell adhesion molecule suppressed in human hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2005, 42: 833-841.
- [2] Xun C, Luo C, Wu X, Zhang Q, Yan L, Shen S. Expression of hepaCAM and its effect on proliferation of tumor cells in renal cell carcinoma [J]. *Urology*, 2010, 75: 828-834.
- [3] He Y, Wu X, Luo C, Lin J. Functional significance of the *hepaCAM* gene in bladder cancer [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 83.
- [4] Bischoff J R, Kirn D H, Williams A, Heise C, Horn S, Muna M, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells [J]. *Science*, 1996, 274: 373-376.
- [5] 刘先军, 彭吉霞, 卢进昌, 熊畅, 刘玉全. 重组人 5 型腺病毒胸腔灌注治疗肺癌恶性胸腔积液 [J]. *临床肺科杂志*, 2010, 15: 1539-1540.
- [6] 徐瑞华, 袁中玉, 管忠震, 王华庆, 胡晓桦, 冯继峰, 等. 瘤内注射 E1B 缺失腺病毒治疗恶性肿瘤的 II 期临床研究 [J]. *中国癌症杂志*, 2004, 1: 12-14.
- [7] 陈传本, 潘建基, 徐鹭英. 重组人 p53 腺病毒注射液结合放射治疗鼻咽癌 II 期临床试验观察 [J]. *中华医学杂志*, 2003, 83: 2033-2035.
- [8] 张珊文, 肖绍文, 刘长清, 孙艳, 苏星, 李东明, 等. 重组人 p53 腺病毒注射液联合放射线治疗头颈鳞癌的 II 期临床试验 [J]. *中华医学杂志*, 2003, 83: 2023-2028.
- [9] 阮冬梅. 重组人 p53 腺病毒治疗癌性腹水的研究 [J]. *中外医学研究*, 2011, 9: 32-33.
- [10] 陈猛, 郝林, 韩从辉. 溶瘤腺病毒治疗膀胱癌进展 [J]. *医学综述*, 2011, 17: 2441-2444.
- [11] Ehdaie B, Smith S C, Theodorescu D. Personalized medicine in advanced urothelial cancer: when to treat, how to treat and who to treat [J]. *Can Urol Assoc J*, 2009, 3 (6 Suppl 4): S232-S236.
- [12] 文进, 李汉忠, 纪志刚, 严维刚, 石冰冰. 苹果酸舒尼替尼抑制膀胱癌 T24 细胞系的体外增殖 [J]. *基础医学与临床*, 2011, 31: 988-990.
- [13] Moh M C, Zhang C, Luo C, Lee L H, Shen S. Structural and functional analyses of a novel Ig-like cell adhesion molecule, hepaCAM, in the human breast carcinoma MCF7 cells [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 27366-27374.
- [14] Moh M C, Zhang T, Lee L H, Shen S. Expression of hepaCAM is downregulated in cancers and induces senescence-like growth arrest via a p53/p21-dependent pathway in human breast cancer cells [J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29: 2298-2305.
- [15] Rhind N, Russell P. Signaling pathways that regulate cell division [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4: a005942.
- [16] Chen T, Stephens P A, Middleton F K, Curtin N J. Targeting the S and G₂ checkpoint to treat cancer [J]. *Drug Discov Today*, 2012, 17(5-6): 194-202.
- [17] Alao J P. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention [J]. *Mol Cancer*, 2007, 6: 24.
- [18] Vermeulen K, Van Bockstaele D R, Berneman Z N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer [J]. *Cell Prolif*, 2003, 36: 131-149.
- [19] Knudsen K E, Diehl J A, Haiman C A, Knudsen E S. Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk [J]. *Oncogene*, 2006, 25: 1620-1628.
- [20] Sutherland R L, Musgrove E A. Cyclin D1 and mammary carcinoma: new insights from transgenic mouse models [J]. *Breast Cancer Res*, 2002, 4: 14-17.

[本文编辑] 商素芳