

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00708

· 论 著 ·

## 吡柔比星通过 PLCε-Bcl-2 通路抑制膀胱癌细胞增殖

欧俐苹, 杜红飞, 吕长坤, 宋学东, 范砚茹, 罗春丽\*

重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆市重点实验室, 重庆 400016

**[摘要]** **目的** 探讨吡柔比星对膀胱癌细胞增殖的影响及其作用机制。 **方法** 膀胱癌细胞 T24 和 BIU-87 分别用 0.4、0.8、1.6、3.2 mg/L 的吡柔比星处理 24、48、72 h, 用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 检测细胞增殖, 流式细胞术检测细胞凋亡率, qRT-PCR、RT-PCR 检测磷脂酶 Cε (PLCε) mRNA 及凋亡调控基因 *Bcl-2* mRNA 的表达, 蛋白质印迹法检测 PLCε 蛋白的表达。将膀胱癌细胞分为空白组、吡柔比星处理组、Ad-shPLCε 处理组、吡柔比星联合 PLCε 干扰腺病毒载体 (Ad-shPLCε) 处理组, 检测并比较各组细胞增殖和 Bcl-2 蛋白的表达量。 **结果** 在膀胱癌细胞 T24、BIU-87 中, 吡柔比星对细胞的抑制率呈浓度、时间依赖性, 即随着药物浓度增加、处理时间延长, 细胞抑制率升高; 吡柔比星促进 T24 和 BIU-87 细胞凋亡, 并且抑制 PLCε 和 Bcl-2 表达。吡柔比星处理组、Ad-shPLCε 处理组、Ad-shPLCε 联合吡柔比星处理组均能抑制细胞增殖和 Bcl-2 表达, 且 Ad-shPLCε 联合吡柔比星处理组的抑制作用高于吡柔比星处理组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。 **结论** 吡柔比星能有效抑制膀胱癌细胞的增殖, 可能与其抑制 PLCε 癌基因及下游 *Bcl-2* 基因的表达有关。

**[关键词]** 吡柔比星; 磷脂酶 Cε; Bcl-2; 膀胱肿瘤; 细胞增殖

**[中图分类号]** R 979.14; R 737.14

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2014)07-0708-06

### Pirarubicin inhibits proliferation of bladder cancer cells through PLCε-Bcl-2 pathway

OU Li-ping, DU Hong-fei, LÜ Chang-kun, SONG Xue-dong, FAN Yan-ru, LUO Chun-li\*

College of Laboratory Medicine, Key Clinical Diagnosis Laboratory of the Ministry of Education, Key Laboratory of Chongqing Municipality, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of pirarubicin on proliferation of bladder cancer cells and the related mechanism. **Methods** After bladder cancer cell lines T24 and BIU-87 were treated with 0.4, 0.8, 1.6, and 3.2 mg/L pirarubicin for 24, 48, and 72 h, the cell proliferation was detected by MTT. Flow cytometry was used to examine the apoptosis of T24 and BIU-87 cells. qRT-PCR and RT-PCR were used to examine the mRNA expression of phospholipase Cε (PLCε), *Bcl-2* in T24 and BIU-87 cell lines; the protein expression of PLCε in pirarubicin-treated cells was determined by Western blotting analysis. Bladder cancer cells were designed as blank group, pirarubicin treatment group, Ad-shPLCε treatment group, and Ad-shPLCε plus pirarubicin treatment group; cell proliferation was observed and protein expression of Bcl-2 was examined and compared between different groups. **Results** Pirarubicin showed a dose- and time-dependent inhibitory effect against proliferation of T24 and BIU-87 cell lines. Moreover, pirarubicin promoted cell apoptosis in T24 and BIU-87 cells and suppressed the expression of PLCε and Bcl-2. Pirarubicin treatment group, Ad-shPLCε treatment group, and Ad-shPLCε plus pirarubicin treatment group all had suppressed cell proliferation and Bcl-2 expression, and pirarubicin plus Ad-shPLCε group exhibited significantly stronger inhibitory effects compared with pirarubicin treatment group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Pirarubicin can effectively inhibit cell proliferation of bladder cancer cells, which may be through suppressing the expression of PLCε and *Bcl-2*.

**[Key words]** pirarubicin; phospholipase C epsilon; Bcl-2; bladder neoplasms; cell proliferation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(7):708-713]

**[收稿日期]** 2013-12-02 **[接受日期]** 2014-03-18

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81072086), 重庆市教委科学技术研究项目(KJ110305). Supported by National Natural Science Foundation of China (81072086) and Scientific and Technological Research Program of Chongqing Municipal Education Committee(KJ110305).

**[作者简介]** 欧俐苹, 博士. E-mail: olp1979@163.com

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

膀胱癌是临床上最常见的泌尿系统恶性肿瘤之一,以男性多发<sup>[1-2]</sup>,其中70%~80%为浅表肿瘤<sup>[3]</sup>。浅表膀胱癌目前首选的治疗方法是经尿道肿瘤电切或膀胱肿瘤局部切除和膀胱内灌注药物化疗,常见的浅表性膀胱癌手术切除能取得良好的近期疗效,但复发率高达50%~70%<sup>[4]</sup>。而化疗药物如吡柔比星(pirarubicin)膀胱内灌注治疗或预防膀胱癌的复发在临床上已经取得肯定效果,并被广泛应用<sup>[5]</sup>。吡柔比星为蒽环类抗肿瘤抗生素,能快速进入癌细胞,分布于细胞核,阻抑核酸合成,使肿瘤细胞停止增殖直至死亡<sup>[6]</sup>。但吡柔比星抑制膀胱癌细胞增殖的分子机制还有待进一步阐明。

磷脂酶 C $\epsilon$ (phospholipase C  $\epsilon$ , PLC $\epsilon$ )具有促进肿瘤生长、增殖的作用,其在多种肿瘤组织中表达水平显著升高,沉默或抑制其表达可显示出显著的肿瘤抑制效应<sup>[7-9]</sup>。本研究拟以 PLC $\epsilon$  为切入点,探讨吡柔比星能否抑制 PLC $\epsilon$  在膀胱癌细胞中的表达,进而抑制膀胱肿瘤细胞增殖,为明确吡柔比星治疗膀胱癌的分子机制提供新的思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人膀胱癌细胞株 BIU-87 购自武汉大学细胞库, T24 为重庆医科大学传染病研究所惠赠,在 37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下培养于含有 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液中, RPMI 1640 培养液和新生牛血清购于 Gibco 公司。PLC $\epsilon$  干扰腺病毒载体(Ad-shPLC $\epsilon$ )为本课题组前期构建<sup>[10]</sup>并保存于-80℃。吡柔比星购于深圳万乐药业有限公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)试剂和二甲亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司; TRIzol RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒、qPCR 试剂盒为宝生物工程(大连)有限公司产品; PCR 引物由 Invitrogen 公司合成;细胞凋亡检测试剂盒由重庆医科大学生命科学院流式细胞实验室提供; RIPA 裂解液购自博迈德生物技术有限公司;羊抗人 PLC $\epsilon$  单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;兔抗人 Bcl-2 多克隆抗体购自美国 ImmunoWay 公司;  $\beta$ -actin、GAPDH 单克隆抗体及 HRP 标记的兔抗羊二抗、羊抗鼠二抗、羊抗兔二抗均购于北京中杉金桥生物技术有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒、ECL 显色试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。

### 1.2 吡柔比星对 T24 和 BIU-87 细胞生长及 PLC $\epsilon$ 、Bcl-2 表达的影响

#### 1.2.1 MTT 法检测 T24 和 BIU-87 细胞增殖

对数期生长的 T24 和 BIU-87 细胞,经 0.25% 胰蛋白酶消化制成细胞悬液,调整细胞密度为  $1 \times 10^5$  个/mL,接种于 96 孔板中,最后补充培养液至 200  $\mu$ L。分为对照组及 0.4、0.8、1.6、3.2 mg/L 吡柔比星处理组,每组设 6 个复孔,同时接种 3 个 96 孔板,37℃、5%CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养。分别给予不同处理后,于培养 24、48、72 h 后弃上清,每孔加入 20  $\mu$ L 的 MTT(5 g/L)继续培养 4 h 后,小心吸去上清,加入 DMSO 150  $\mu$ L,振荡孵育 10 min,用全自动酶标仪在 492 nm 处检测各孔的光密度(D 值)计算各组细胞生长抑制率,公式如下:抑制率(%) =  $[1 - (D_{\text{处理}} - D_{\text{调零}}) / (D_{\text{对照}} - D_{\text{调零}})] \times 100\%$ 。

#### 1.2.2 流式细胞术检测 T24 和 BIU-87 细胞凋亡

收集不同浓度(0.4、0.8、1.6、3.2 mg/L)吡柔比星处理 48、72 h 的 T24 和 BIU-87 细胞,磷酸二氢盐缓冲液(PBS)洗涤,300  $\times$  g 离心 10 min, RNase A (0.5 g/L) 37℃ 消化 30 min,加入 50 g/L 碘化丙啶(PI)染色,室温避光 15 min,用 FACSscan 分析细胞凋亡的变化。

#### 1.2.3 qRT-PCR 和 RT-PCR 方法检测 PLC $\epsilon$ 和 Bcl-2 mRNA 的表达

将细胞以  $1 \times 10^6$  个/孔的密度接种于 6 孔板中,待细胞生长融合度达到 80%~90%,用不同浓度(0.4、0.8、1.6、3.2 mg/L)的吡柔比星(PBS 配制)分别处理 T24 和 BIU-87 细胞,在不同时间点(24、48、72 h)采用 TRIzol 法抽提总 RNA,用反转录试剂盒将所抽提的 RNA 反转录为 cDNA。PLC $\epsilon$  上游引物 5'-CAT GGA AGG ATA AGC GTT-3',下游引物 5'-CCC AAG TCC CGT GTT AAG A-3',扩增产物为 395 bp; Bcl-2 上游引物 5'-TTG TGG CCT TCT TTG AGT TCG-3',下游引物 5'-CAC CTA CCC AGC CTC CGT TAT-5',扩增产物为 153 bp;  $\beta$ -actin 上游引物 5'-GGG ACC TGA CTG ACT ACC TC-3',下游引物 5'-CGT CAT ACT CCT GCT TGC TG-3',扩增产物为 534 bp。采用 qRT-PCR 方法检测 PLC $\epsilon$  mRNA 的表达,以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算其表达量;采用 RT-PCR 检测 Bcl-2 mRNA 的表达。PCR 反应条件:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 30 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 40 s,共 30 个循环;72℃ 继续延伸 5 min。采用 Quantity One 软件进行灰度分析,通过目的蛋白与内参的灰度比值计算 Bcl-2 mRNA 的相对表达量。

#### 1.2.4 蛋白质印迹法检测 PLC $\epsilon$ 、Bcl-2 蛋白的表达

T24 和 BIU-87 细胞分别用不同浓度(0.4、0.8、

1.6、3.2 mg/L)的吡柔比星处理 72 h,然后提取各组细胞的总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,经 SDS-PAGE 电泳后,电转移至 PVDF 膜,用 5%脱脂奶粉在室温下封闭 2 h;加入一抗,4℃孵育过夜;TBST 洗膜,加入 5%脱脂奶粉稀释的 HRP 标记的二抗,37℃孵育 1 h;TBST 洗膜,ECL 暗室化学发光显影。采用凝胶成像系统扫描图像,Quantity One 分析软件进行灰度定量分析,并将目的蛋白与内参  $\beta$ actin、GAPDH 的积分光密度的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.3 吡柔比星联合 Ad-shPLC $\epsilon$  处理对 T24 和 BIU-87 细胞生长及 Bcl-2 表达的影响 常规培养细胞,将细胞分为空白对照组、吡柔比星单独处理组、Ad-shPLC $\epsilon$  单独处理组及吡柔比星联合 Ad-shPLC $\epsilon$  处理组。待细胞密度达 60%~70%融合度,吡柔比星联合 Ad-shPLC $\epsilon$  处理组给予 Ad-shPLC $\epsilon$  处理 24 h,然后加入 1.6 mg/L 吡柔比星继续培养 24 h;吡柔比星单独处理组、Ad-shPLC $\epsilon$  单独处理组仅给予单一处理,空白对照组不作任何处理。采用 MTT 法检测细胞增殖,蛋白质印迹法检测 Bcl-2 蛋白的表达,方法同前。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间均数的比较采用单因素方差分析(ANOVA),两两比较采用 SNK 法。检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

### 2.1 吡柔比星对 T24 和 BIU-87 细胞增殖和凋亡的影响

影响 MTT 检测结果显示,吡柔比星能够抑制 T24 和 BIU-87 细胞的增殖,并呈现出一定的剂量和时间依赖性(图 1)。流式细胞术检测结果显示,吡柔比星处理 T24 和 BIU-87 细胞 48、72 h 后,明显增加了凋亡细胞数,且处理 72 h 时的凋亡细胞数明显高于 48 h 和空白组( $P < 0.05$ ,图 2)。

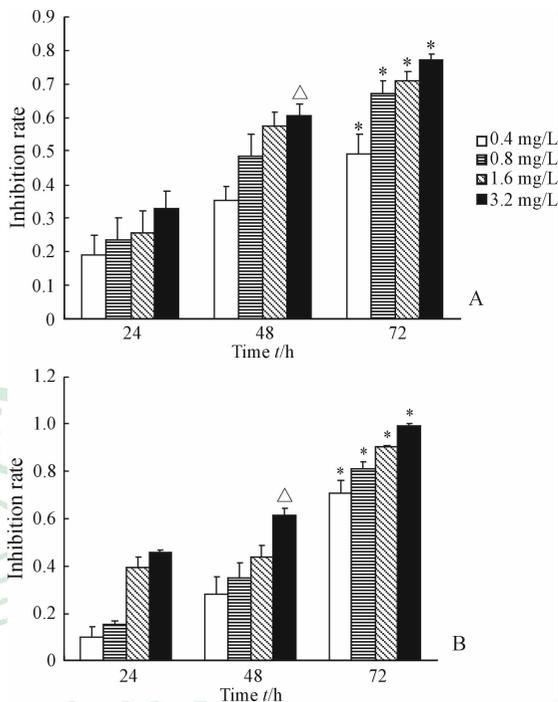


图 1 MTT 法检测不同浓度吡柔比星对 T24(A)和 BIU-87(B)细胞增殖的影响

Fig 1 Effect of pirarubicin on proliferation of T24(A) and BIU-87(B) cells as detected by MTT

\*  $P < 0.05$  vs 48 h,  $\Delta P < 0.05$  vs 1.6 mg/L;  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

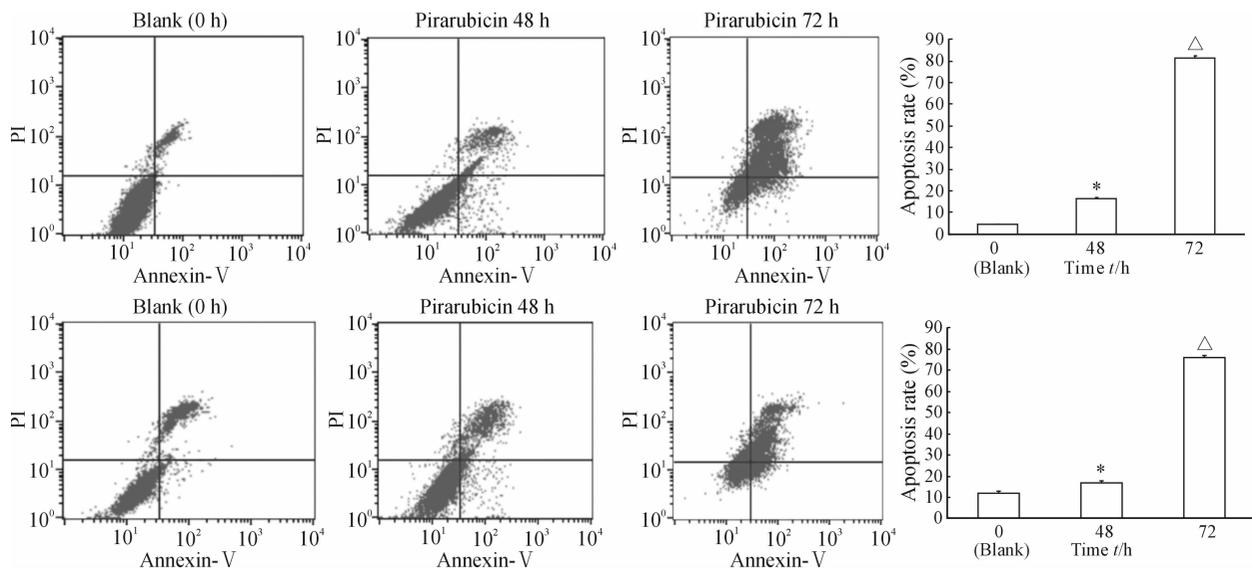


图 2 流式细胞术检测吡柔比星对 T24 (A)和 BIU-87(B)细胞凋亡的影响

Fig 2 Effect of pirarubicin on apoptosis of T24(A) and BIU-87(B) cells as detected by flow cytometry

\*  $P < 0.05$  vs blank,  $\Delta P < 0.05$  vs 48 h;  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.2 吡柔比星对 T24 和 BIU-87 细胞 PLC $\epsilon$ 、Bcl-2 表达的影响 qRT-PCR 和 RT-PCR 检测结果显示, T24 和 BIU-87 细胞经吡柔比星处理后, PLC $\epsilon$  和 Bcl-2 mRNA 的表达均明显受到抑制, 并呈现出

一定的剂量和时间依赖性(图 3、图 4)。蛋白质印迹结果显示, 不同浓度吡柔比星处理 T24、BIU-87 细胞 72 h 后, PLC $\epsilon$  的蛋白表达量明显降低, 并呈现一定的剂量依赖性(图 5)。

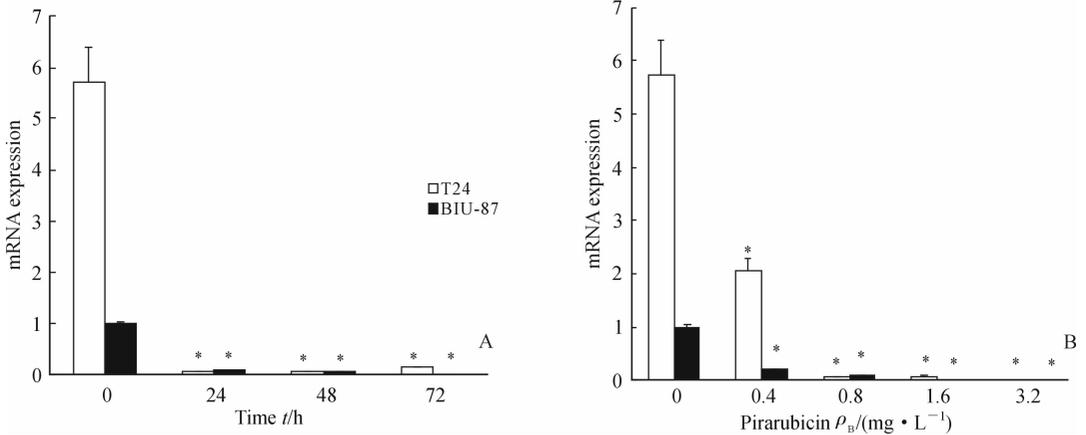


图 3 qRT-PCR 检测吡柔比星对 T24 和 BIU-87 细胞 PLC $\epsilon$  mRNA 表达的影响

Fig 3 Expression of PLC $\epsilon$  mRNA in T24 and BIU-87 cells after pirarubicin treatment as detected by qRT-PCR

A: The expression of PLC $\epsilon$  in BIU-87 and T24 cells treated with 1.6 mg/L pirarubicin for 24, 48, and 72 h; B: The expression of PLC $\epsilon$  in BIU-87 and T24 cells treated with the increasing dose of pirarubicin for 72 h. \*  $P < 0.05$  vs blank (0 h) group;  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

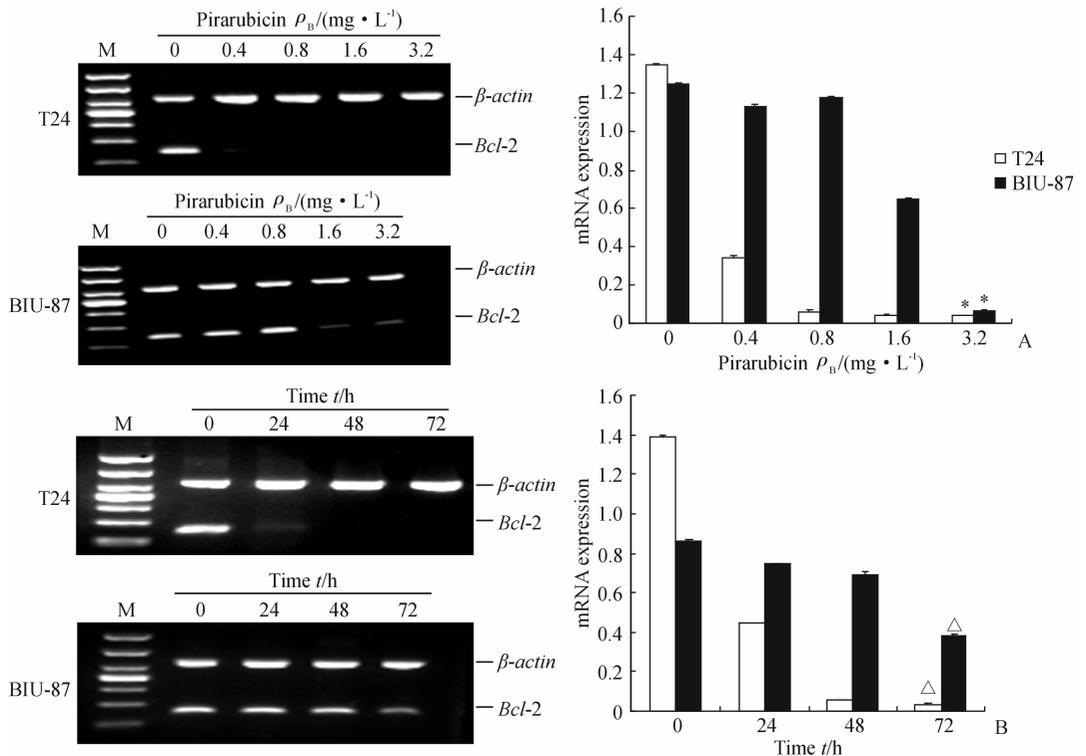


图 4 RT-PCR 检测吡柔比星对 T24 和 BIU-87 细胞 Bcl-2 mRNA 表达的影响

Fig 4 Expression of Bcl-2 mRNA in T24 and BIU-87 cells after pirarubicin treatment as detected by RT-PCR

A: The expression of Bcl-2 in T24 and BIU-87 cells treated with increasing dose of pirarubicin for 72 h; B: The expression of Bcl-2 in T24 and BIU-87 cells treated with 1.6 mg/L pirarubicin for 24, 48, and 72 h. \*  $P < 0.05$  vs 0, 0.4, 0.8 mg/L;  $\Delta P < 0.05$  vs 0, 24, 48 h.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.3 吡柔比星联合 Ad-shPLC $\epsilon$  处理对 T24 和 BIU-87 细胞的影响 MTT 结果显示, 吡柔比星单独处理、Ad-shPLC $\epsilon$  单独处理、Ad-shPLC $\epsilon$  联合吡

柔比星处理均能抑制细胞增殖, 且 Ad-shPLC $\epsilon$  联合吡柔比星处理组的抑制作用高于吡柔比星处理组, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ , 图 6)。

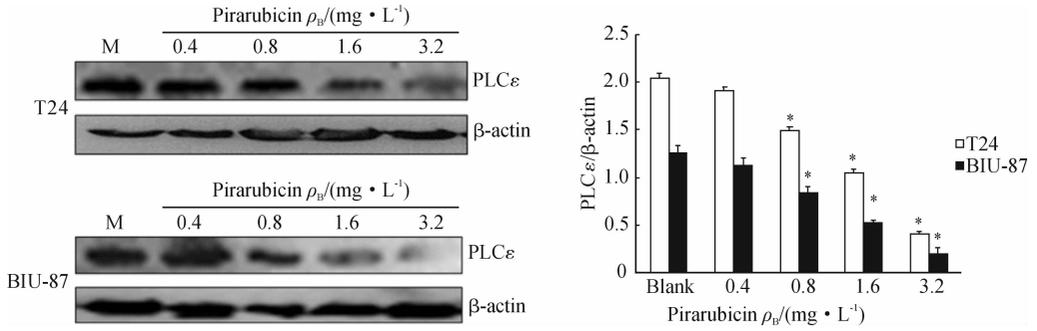


图 5 蛋白质印迹法检测吡柔比星对 T24 和 BIU-87 细胞 PLCε 蛋白表达的影响  
 Fig 5 Protein expression of PLCε in T24 and BIU-87 cells after pirarubicin treatment as detected by Western blotting analysis

\*  $P < 0.05$  vs blank group;  $n = 3, \bar{x} \pm s$

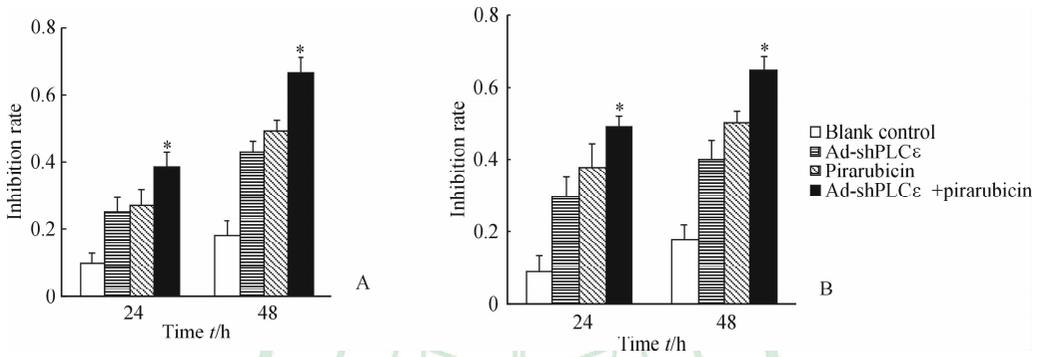


图 6 MTT 法检测吡柔比星联合 Ad-shPLCε 处理对 T24(A) 和 BIU-87(B) 细胞增殖的影响  
 Fig 6 Proliferation of T24(A) and BIU-87(B) cells after different treatments as detected by MTT

\*  $P < 0.05$  vs pirarubicin group;  $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.4 吡柔比星联合 Ad-shPLCε 处理对 Bcl-2 蛋白表达的影响 蛋白质印迹结果显示, 吡柔比星和 Ad-shPLCε 联合处理 T24 和 BIU-87 细胞后, Bcl-2 蛋白表达下调的程度高于 Ad-shPLCε 及吡柔比星单独处理组, 与吡柔比星单独处理组比较, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 7)。

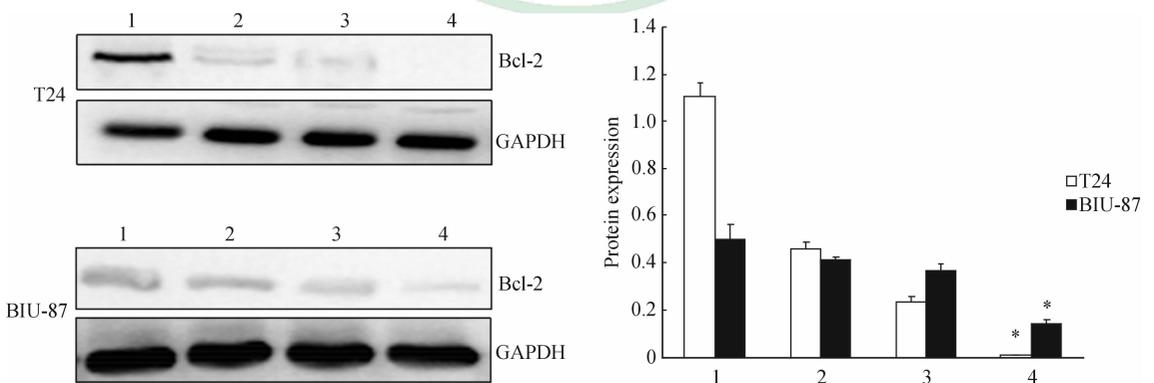


图 7 蛋白质印迹法检测吡柔比星联合 Ad-shPLCε 处理对 T24 和 BIU-87 细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响

Fig 7 Protein expression of Bcl-2 in T24 and BIU-87 cells after different treatments as detected by Western blotting analysis

1: Blank control; 2: Ad-shPLCε; 3: Pirarubicin; 4: Ad-shPLCε + pirarubicin. \*  $P < 0.05$  vs pirarubicin group;  $n = 3, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

PLCε 是 2001 年由 Song 等<sup>[7]</sup> 发现并鉴定的一种新型人源磷脂酰肌醇磷脂酶 C, 与新杆线虫 PLC210 有同源性并不同于所有哺乳动物中已知

PLC 同工酶, 其 C 端有 2 个 RA 结构域 (RA1 和 RA2), N 端有一个 RasGEF 结构域, 可通过 RA2 结构域与 H-Ras 的 GTP 结合而被激活。近几年的研究证实, PLCε 具有致癌基因的特性。研究发现 PLCε 在化学致癌物诱导形成的皮肤癌及炎症中发

挥重要作用<sup>[8,11]</sup>; PLC $\epsilon$  参与头颈部鳞状细胞癌的信号转导及骨架蛋白的调节<sup>[12]</sup>; 同时, 日本学者证实 PLC $\epsilon$  敲除小鼠中, 皮肤癌的生长受到明显抑制<sup>[13]</sup>。本课题组的前期研究显示: PLC $\epsilon$  在膀胱癌组织的表达明显高于癌旁组织, 且与肿瘤分期相关<sup>[14]</sup>; 在膀胱癌细胞中, PLC $\epsilon$  可通过 PLC $\epsilon$ -PKC $\alpha$  信号通路促进癌细胞的增殖<sup>[15-16]</sup>; 另外, 敲除 PLC $\epsilon$  可抑制膀胱癌细胞的侵袭、转移<sup>[17]</sup>。

目前, 对作用于 PLC $\epsilon$  的临床化疗药物研究较少。本研究从体外实验出发, 用不同浓度的吡柔比星处理膀胱癌 BIU-87 和 T24 细胞, 发现吡柔比星可以抑制体外高度及中度恶性膀胱癌细胞的增殖, 并可促使细胞凋亡; 探究其机制发现吡柔比星可使致癌基因 PLC $\epsilon$  的表达降低并抑制凋亡相关调节基因 *Bcl-2* 的表达。我们将吡柔比星联合 PLC $\epsilon$  的干扰腺病毒载体 (Ad-shPLC $\epsilon$ ) 处理膀胱癌细胞, 结果显示, 二者联合能够进一步增强对膀胱癌细胞的增殖及 Bcl-2 蛋白表达的抑制作用。然而, 吡柔比星对膀胱癌细胞的增殖抑制作用是否源于对 PLC $\epsilon$  基因的表达抑制进而抑制下游 *Bcl-2* 基因的表达, 或者是吡柔比星对下游 PLC $\epsilon$  及 Bcl-2 的共同抑制作用, 即 PLC $\epsilon$  和 Bcl-2 处于平行关系而非上、下游关系, 这些问题都需要进一步研究。

#### 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] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63: 11-30.

[2] 吴阶平. 吴阶平泌尿外科学 [M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1993: 453-457.

[3] Chamie K, Litwin M S, Bassett J C, Daskivich T J, Lai J, Hanley J M, et al. Recurrence of high-risk bladder cancer: a population-based analysis [J]. Cancer, 2013, 119: 3219-3227.

[4] 陈忠, 李家贵, 叶章群, 杨为民, 张旭, 曾晓勇. 联合灌注预防浅表性膀胱肿瘤术后复发的临床观察 [J]. 肿瘤防治研究, 2005, 32: 108-110.

[5] 魏辉, 梅骅. 表浅膀胱癌的膀胱灌注疗法 [J]. 临床泌尿外科杂志, 2003, 18: 565-566.

[6] Kawano H, Komaba S, Yamasaki T, Maeda M, Kimura Y, Maeda A, et al. New potential therapy for orthotopic bladder carcinoma by combining HVJ envelope with doxorubicin [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2008, 61: 973-978.

[7] Song C, Hu C D, Masago M, Kariyai K, Yamawaki-Kataoka Y, Shibatohe M, et al. Regulation of a novel human phospholipase C: PLC epsilon through membrane targeting by Ras [J]. J Biol Chem, 2001, 276: 2752-2757.

[8] Bai Y, Edamatsu H, Maeda S, Saito H, Suzuki N, Satoh T, et al. Crucial role of phospholipase C epsilon in chemical carcinogen-induced skin tumor development [J]. Cancer Res, 2004, 64: 8808-8810.

[9] Li M, Edamatsu H, Kitazawa R, Kitazawa S, Kataoka T. Phospholipase C epsilon promotes intestinal tumorigenesis of Apc (Min/+) mice through augmentation of inflammation and angiogenesis [J]. Carcinogenesis, 2009, 30: 1424-1432.

[10] 张彦懿, 欧俐苹, 刘琪, 陶佳, 吴小侯, 罗春丽. PLC $\epsilon$  基因 shRNA 重组腺病毒表达质粒的构建及鉴定 [J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26: 51-55.

[11] Ikuta S, Edamatsu H, Li M, Hu L, Kataoka T. Crucial role of phospholipase C epsilon in skin inflammation induced by tumor-promoting phorbol ester [J]. Cancer Res, 2008, 68: 64-72.

[12] Bourguignon L Y, Gilad E, Brightman A, Diedrich F, Singleton P. Hyaluronan-CD44 interaction with leukemia-associated RhoGEF and epidermal growth factor receptor promotes Rho/Ras co-activation, phospholipase C epsilon-Ca<sup>2+</sup> signaling, and cytoskeleton modification in head and neck squamous cell carcinoma cells [J]. J Biol Chem, 2006, 281: 14026-14040.

[13] Oka M, Edamatsu H, Kunisada M, Hu L, Takenaka N, Dien S, et al. Enhancement of ultraviolet B-induced skin tumor development in phospholipase C  $\epsilon$ -knockout mice is associated with decreased cell death [J]. Carcinogenesis, 2010, 31: 1897-1902.

[14] 郭永灿, 罗春丽, 蔡晓钟, 吴小侯, 蒲军. 磷脂酶 C $\epsilon$  基因在膀胱移行细胞癌中表达及其临床意义 [J]. 临床检验杂志, 2008, 26: 52-54.

[15] Ling Y, Chunli L, Xiaohou W, Qiaoling Z. Involvement of the PLC $\epsilon$ /PKC $\alpha$  pathway in human BIU-87 bladder cancer cell proliferation [J]. Cell Biol Int, 2011, 35: 1031-1036.

[16] Cheng H, Luo C, Wu X, Zhang Y, He Y, Wu Q, et al. shRNA targeting PLC $\epsilon$  inhibits bladder cancer cell growth *in vitro* and *in vivo* [J]. Urology, 2011, 78: 474.

[17] Ou L, Guo Y, Luo C, Wu X, Zhao Y, Cai X. RNA interference suppressing PLC $\epsilon$ 1 gene expression decreases invasive power of human bladder cancer T24 cell line [J]. Cancer Genet Cytogenet, 2010, 200: 110-119.