

DOI:10.16781/j.0258-879x.2020.06.0653

· 论 著 ·

微纤维相关蛋白5调控上皮-间质转化相关基因促进膀胱癌细胞迁移和侵袭

颜轶麟¹, 黄正楠¹, 蔡金明¹, 唐鹏飞¹, 张芳¹, 臧丽娟², 沈兵^{1*}

1. 上海交通大学附属第一人民医院泌尿外科中心, 上海 200080

2. 上海交通大学附属第一人民医院病理科, 上海 200080

[摘要] **目的** 探讨微纤维相关蛋白5 (MFAP5) 在膀胱癌中的表达水平及其对膀胱癌细胞的生物学作用。

方法 收集上海交通大学附属第一人民医院确诊的膀胱癌患者手术切除标本, 通过免疫组织化学染色检测 MFAP5 的表达情况。分别从膀胱肿瘤组织和正常膀胱组织分离纯化得到肿瘤相关成纤维细胞 (CAF) 和正常成纤维细胞 (NF), 通过 qRT-PCR 检测 CAF、NF 及人膀胱癌细胞系 (T24、5637、UMUC3、J82) 中 MFAP5 mRNA 的相对表达量。通过美国癌症基因组图谱 (TCGA) 数据库及基因表达汇编 (GEO) 数据库 GSE13507 数据集中的膀胱癌表达谱数据, 分析 MFAP5 表达与膀胱癌进展和恶性程度的相关性。用重组人 MFAP5 蛋白处理膀胱癌细胞系 T24、5637, 检测其对细胞迁移和侵袭能力及迁移相关蛋白表达的影响。**结果** MFAP5 在膀胱癌组织中主要表达于肿瘤间质, 其表达水平与膀胱癌 T 分期和肿瘤分级有关 ($P < 0.05$), 并且 CAF 中 MFAP5 mRNA 相对表达量高于 NF、T24、5637、UMUC3、J82 细胞 ($P < 0.01$)。TCGA 和 GSE13507 数据库分析结果均显示, 高表达 MFAP5 的膀胱癌患者总生存期短于低表达患者 ($P < 0.05$)。基因集差异分析结果显示 MFAP5 表达水平随肿瘤恶性程度的升高而升高 ($P < 0.01$), 并与上皮-间质转化相关基因钙黏蛋白 2、Twist1、基质金属蛋白酶 9 (MMP9)、E 盒结合锌指蛋白 1 (ZEB1) 密切相关 ($P < 0.01$)。重组人 MFAP5 蛋白刺激能促进 T24、5637 细胞中包括 N-钙黏蛋白、MMP9、ZEB1、Twist 在内的上皮-间质转化相关蛋白表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 同时增强细胞的迁移和侵袭能力 ($P < 0.01$)。**结论** MFAP5 可能是预测膀胱癌发生侵袭进展的潜在分子标志物。

[关键词] 膀胱肿瘤; 微纤维相关蛋白 5; 上皮-间质转化; 肿瘤微环境

[中图分类号] R 737.14

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2020)06-0653-08

Microfibril-associated protein 5 regulates epithelial-mesenchymal transition-related genes to promote migration and invasion of bladder cancer cells

YAN Yi-lin¹, HUANG Zheng-nan¹, CAI Jin-ming¹, TANG Peng-fei¹, ZHANG Fang¹, ZANG Li-juan², SHEN Bing^{1*}

1. Department of Urology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China

2. Department of Pathology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of microfibril-associated protein 5 (MFAP5) in bladder cancer tissues and its biological effects on bladder cancer cells. **Methods** The surgical resection specimens of bladder cancer patients, who were diagnosed in Shanghai General Hospital of Shanghai Jiao Tong University, were collected, and the expression level of MFAP5 was detected using immunohistochemistry. The cancer-associated fibroblasts (CAFs) and normal fibroblasts (NFs) were isolated and purified from bladder tumor tissues and normal bladder tissues, respectively. The mRNA expression levels of MFAP5 in CAFs, NFs, and four kinds of human bladder tumor cell lines (T24, 5637, UMUC3 and J82) were detected using quantitative real-time polymerase chain reaction. The correlation of MFAP5 expression with the progression and malignancy of bladder cancer was analyzed using the bladder cancer expression profile data derived from the Cancer Genome Atlas (TCGA) database and the GSE13507 database of Gene Expression Omnibus (GEO). The T24 and 5637

[收稿日期] 2019-11-06 **[接受日期]** 2019-12-17

[基金项目] 吴阶平医学基金会临床科研专项 (320.6750.16051), 上海市松江区科学技术攻关项目 (17SJKJGG10), 上海市综合医院中西医结合专项 (ZHYY-ZXYJHZX-1-201705). Supported by Clinical Science Research Project of WU Jieping Medical Foundation (320.6750.16051), Science and Technology Project of Songjiang District of Shanghai (17SJKJGG10), and Shanghai Specialized Project for Integrated Traditional Chinese and Western Medicine in General Hospitals of Shanghai (ZHYY-ZXYJHZX-1-201705).

[作者简介] 颜轶麟, 硕士生. E-mail: 384264895@qq.com

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-52132031, E-mail: shenbingyishi@163.com

cells were treated with recombinant human MFAP5 protein to detect the effect on cell migration and invasion, as well as the expression of migration-associated proteins. **Results** MFAP5 was mainly expressed in the stroma of bladder cancer tissues, and its expression level was related to T stage and tumor grade of bladder cancer (both $P < 0.05$). The mRNA expression level of MFAP5 in CAFs was significantly higher than those in NFs, and T24, 5637, UMUC3 and J82 cells (all $P < 0.01$). The results of TCGA and GSE13507 database both showed that the overall survival of bladder cancer patients with high expression of MFAP5 was significantly shorter than that of patients with low expression of MFAP5 (both $P < 0.05$). Gene set variation analysis showed that the expression level of MFAP5 increased with the degree of tumor malignancy ($P < 0.01$), and its expression was closely related to expression of epithelial-mesenchymal transition-related genes such as cadherin 2, *Twist1*, matrix metalloproteinase 9 (*MMP9*), and zinc-finger E-box-binding protein 1 (*ZEB1*) (all $P < 0.01$). In T24 and 5637 cells, the stimulation of recombinant human MFAP5 protein could up-regulate the expression of epithelial-mesenchymal transition-related proteins, including N-cadherin, MMP9, ZEB1 and Twist, and enhance the migration and invasion abilities (all $P < 0.01$). **Conclusion** MFAP5 may be a potential molecular marker for predicting the invasion and progression of bladder cancer.

[Key words] urinary bladder neoplasms; microfibril-associated protein 5; epithelial-mesenchymal transition; tumor microenvironment

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2020, 41(6): 653-660]

膀胱癌为临床最常见的泌尿系统肿瘤之一, 统计数据显示 2018 年全球膀胱癌新增病例接近 55 万, 死亡人数达 20 万, 发病率和死亡率均呈上升趋势^[1]。根据肿瘤浸润深度, 膀胱癌可分为非肌层浸润性膀胱癌和肌层浸润性膀胱癌。其中非肌层浸润性膀胱癌约占 75%, 患者通常预后较好但容易复发; 肌层浸润性膀胱癌约占 25%, 尽管手术联合放射治疗、化学治疗技术不断发展, 但复发、转移率仍较高, 导致生存率较低^[2]。膀胱癌的侵袭、转移是影响膀胱癌患者预后和治疗效果的重要因素, 因此, 正确认识膀胱癌侵袭、转移的分子机制至关重要。

上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是肿瘤发生侵袭进展的重要阶段, 其特征是细胞的极性和黏附性降低、运动性增强, 上皮标志物 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 表达降低、间质标志物 N-钙黏蛋白 (N-cadherin) 表达升高^[3]。EMT 的激活涉及多种信号转导途径, 如 TGF- β 、NF- κ B、Notch、Wnt/ β -连环蛋白 (β -catenin) 等。锌指转录因子 Snail、Twist1/2 和 E 盒结合锌指蛋白 (zinc-finger E-box-binding protein, ZEB) 是调节肿瘤 EMT 的关键转录因子, 这些因子水平升高与患者预后不良有关^[4]。

肿瘤微环境是影响肿瘤进展一个重要因素, 其成分包括肿瘤相关成纤维细胞 (cancer associated fibroblast, CAF)^[5]、细胞外基质 (extracellular matrix, ECM)^[6]、淋巴细胞等, 其中 CAF 能够通过旁分泌形式分泌生长因子 TGF- β 和炎症因子 IL-6 促进肿瘤 EMT^[7]。然而, 其他蛋白质

如何影响该过程仍然不确定。微纤维相关蛋白 5 (microfibril-associated protein 5, MFAP5) 又称微纤维相关糖蛋白 2, 是 ECM 的一个组成部分, 其在心血管发育、成骨过程中发挥重要作用^[8]。近年有研究表明, MFAP5 在胰腺癌、肺癌、头颈癌中呈高表达^[9], 但 MFAP5 在这些肿瘤中的作用有待阐明。Mok 等^[10]研究发现, 在晚期卵巢浆液性乳头状腺癌中, MFAP5 高表达预示预后不良。其他研究还表明, MFAP5 通过黏附斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) /cAMP 反应元件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CREB) /肌钙蛋白 C 基因 1 (troponin C type 1, TNNC1) 信号转导通路介导卵巢癌细胞的运动和侵袭潜能, 表明它可能是卵巢癌治疗的一个新靶点^[11]。另外, MFAP5 还可促进肿瘤细胞化学治疗耐药及肿瘤血管新生^[12]。然而, 目前 MFAP5 在膀胱癌中的表达情况及其在膀胱癌发生、发展中扮演的角色尚未见报道。本研究检测 MFAP5 在膀胱癌组织中的表达水平, 并通过体外细胞实验探讨其在膀胱癌进展中的作用。

1 材料和方法

1.1 组织样本 50 例膀胱癌石蜡切片为 2007 年 8 月至 2015 年 8 月上海交通大学附属第一人民医院确诊的膀胱癌患者手术切除组织标本, 并收集每例患者基本信息及临床病理信息。本研究通过上海交通大学附属第一人民医院生物医学伦理委员会审批。

1.2 细胞培养与处理 从膀胱肿瘤组织分离纯化 CAF, 从正常膀胱组织分离纯化正常成纤维

细胞 (normal fibroblast, NF)。采用酶解法制备单细胞悬液, 均匀地接种于培养皿上, 原代细胞培养 5~7 d 后, 细胞汇合成单层, 用胰蛋白酶消化, 采用差时贴壁法经过 2~3 次贴壁选择后, 获得纯化的成纤维细胞, 取生长状态良好的第 3 代细胞, 采用蛋白质印迹法进行鉴定, NF 为 α 平滑肌肌动蛋白阴性, CAF 为 α 平滑肌肌动蛋白阳性。用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。人膀胱癌细胞系 T24、5637、UMUC3、J82 购自中国科学院上海细胞库, 用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液培养于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。细胞用无血清培养液饥饿处理 8 h 后, 更换新鲜无血清 RPMI 1640 培养液, 加入终浓度为 200 ng/mL、400 ng/mL 重组人 MFAP5 蛋白, 以加入等体积生理盐水为对照, 12 h 后进行细胞功能实验, 48 h 后提取细胞蛋白检测相关指标。

1.3 主要实验试剂 重组人 MFAP5 蛋白 (货号 4914-MG) 购自美国 R&D 公司; RNA 抽提试剂 TRIzol (货号 9108)、反转录试剂盒 (货号 RR047A) 购自日本 TaKaRa 公司; qRT-PCR 试剂盒 (货号 Q341-AA) 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; RIPA 蛋白裂解液 (货号 P0013B) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 免疫组织化学试剂盒 (货号 9706)、DAB 显色试剂盒 (货号 DAB-0031) 购自福州迈新生物技术开发有限公司; N-钙黏蛋白抗体 (货号 22018)、E-钙黏蛋白抗体 (货号 20874)、ZEB1 抗体 (货号 21544)、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 9 抗体 (货号 10375) 购自美国 Proteintech 公司, Twist1/2 抗体 (货号 GTX217310) 购自美国 GeneTex 公司, GAPDH 抗体 (货号 sc-32233) 购自美国 Santa Cruz 公司。

1.4 免疫组织化学染色 石蜡切片经二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化, 将其置于柠檬酸钠缓冲液中蒸煮 25 min 进行抗原修复。冷却至室温后, 按照 DAB 显色试剂盒说明书将组织除去内源性过氧化物酶活性、抗原封闭、一抗 4 °C 孵育过夜、二抗室温孵育 10 min 后, 以 DAB 进行化学染色并实时显微镜下观察, 根据颜色变化情况决定染色时间。封片后按染色强度进行评分: 0 分为无表达, 1 分为低表达, 2 分为中等表达, 3 分为高表达。

1.5 qRT-PCR 使用 TRIzol 法提取细胞总 RNA, 经反转录获得 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR, 以 β -actin 作为内参照。引物序列: MFAP5 上游引

物 5'-ACA CGA AGC TAT GAA AGA TGA GC-3', 下游引物 5'-AGT CGG AAG TAA TTG GAG CGA-3'; β -actin 上游引物 5'-CAT GTA CGT TGC TAT CCA GGC-3', 下游引物 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT-3'。通过 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算目的基因相对表达量。

1.6 蛋白质印迹法 用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 蛋白裂解液提取细胞总蛋白, BCA 法进行蛋白定量, 100 °C 煮沸 15 min, 然后于 -20 °C 保存。按每孔 20 μ g 蛋白量上样, 通过 SAS-PAGE 分离蛋白。湿转法转膜 90 min 后, 用含 5% 脱脂奶粉的吐温-磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline-Tween, PBST) 封闭 1 h, 随后更换为按合适稀释比配制好的相应抗体稀释液, 4 °C 过夜孵育。将膜用 PBST 漂洗 3 次后加入二抗稀释液室温孵育 1 h, 再用 PBST 洗膜 3 次, 随后使用 ECL 化学发光液进行显影、拍照。

1.7 Transwell 侵袭实验 取经过处理后的 T24、5637 细胞, 胰蛋白酶消化后用无血清细胞培养液重悬, 取 100 μ L 含有 1 \times 10⁵ 个细胞的无血清 RPMI 1640 培养液接种于带基质胶的 Transwell 上室, 下室中加入 600 μ L 含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养, T24 细胞培养 12 h, 5637 细胞培养 18 h。取出小室后用 PBS 漂洗 3 次, 加入 4% 多聚甲醛溶液固定细胞 15 min, 再用 PBS 漂洗 3 次, 用 0.1% 结晶紫染色 15 min。洗去结晶紫后在显微镜下观察并计数细胞。

1.8 划痕实验 将细胞接种于 6 孔板, 待细胞生长至完全融合后, 使用移液枪头沿每孔底部划痕, 后用 PBS 洗去脱落的细胞, 换上含 1% FBS 的 RPMI 1640 培养液, 于显微镜下观察、拍照并记录划痕宽度, 48 h 后观察划痕修复情况。

1.9 生物信息学分析 下载美国癌症基因组图谱 (the Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库 (<https://cancergenome.nih.gov>) 及基因表达汇编 (Gene Expression Omnibus, GEO) 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) GSE13507 数据集中的膀胱癌表达谱数据和对应临床资料, 将患者肿瘤样本 MFAP5 表达水平由低到高排列, 进行对比分析。

1.10 统计学处理 采用 GraphPad Prism 6 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析; 呈偏态分布的计量资料以中位数 (下四分位数, 上四分位数) 表示, 两组间

比较采用 Mann-Whitney *U* 检验; 计数资料以例数表示, 组间比较采用 χ^2 检验。采用 Pearson 相关分析确定不同基因表达的相关性, Kaplan-Meier 生存曲线与 log-rank 检验分析总体生存情况。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 膀胱癌组织和细胞中 MFAP5 的表达 石蜡切片免疫组织化学结果 (图 1) 显示, 在正常膀胱上皮组织和非肌层浸润性膀胱癌组织中, MFAP5 在间质组织中呈低表达状态; 而在肌层浸润性膀胱癌组织中, MFAP5 高表达于肿瘤间

质。肌层浸润性膀胱癌组织中 MFAP5 的染色评分 [(2.04 ± 0.15) 分, $n=20$] 高于非肌层浸润膀胱癌组织 [(1.20 ± 0.15) 分, $n=30$], 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。如表 1 所示, MFAP5 的表达水平与膀胱癌 T 分期和肿瘤分级有关 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)。qRT-PCR 检测结果显示, CAF 中 MFAP5 mRNA 相对表达量 (25.07 ± 1.34 , $n=3$) 高于 NF 及人膀胱癌细胞系 T24、5637、UMUC3、J82 (5.38 ± 0.04 、 1.14 ± 0.09 、 2.56 ± 0.10 、 0.60 ± 0.19 、 0.98 ± 0.12 , $n=3$), 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01)。

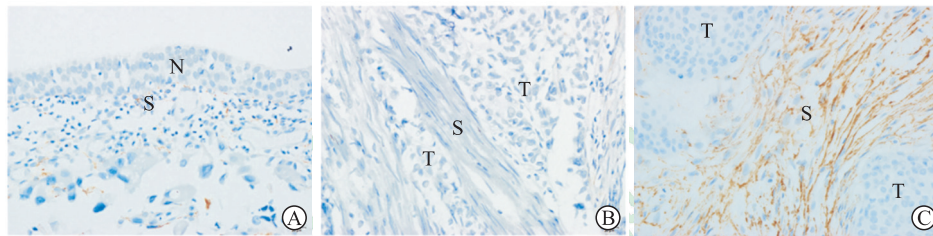


图 1 免疫组织化学染色检测各级别膀胱癌样本中 MFAP5 定位情况

Fig 1 Localization of MFAP5 in bladder cancer samples at each grade detected by immunohistochemistry staining

A: Normal bladder; B: Non-muscle invasive bladder cancer; C: Muscle invasive bladder cancer. MFAP5: Microfibril-associated protein 5; N: Normal urothelium; S: Stroma; T: Tumor. Original magnification: $\times 400$

表 1 MFAP5 表达与膀胱癌患者临床病理特征的关系

Tab 1 Correlation between MFAP5 expression and clinicopathological features of bladder cancer patients

Characteristic	N	MFAP5 expression		χ^2 value	P value
		High	Low		
Gender				0.936	0.333
Male	37	20	17		
Female	13	5	8		
Age (year)				1.299	0.254
≥ 65	28	16	12		
< 65	22	9	13		
T stage				6.750	0.009
Ta-1	30	10	20		
T2-4	20	15	5		
Tumor grade				4.160	0.041
Low	19	6	13		
High	31	19	12		
N stage				2.168	0.141
N0	41	18	23		
$\geq N1$	9	7	2		

MFAP5: Microfibril-associated protein 5

2.2 膀胱癌组织中 MFAP5 表达与临床病理特征的关系 TCGA 数据库膀胱癌组织全转录组测序结果显示, 相较于低级别 ($n=21$)、低分期 (I + II, $n=132$)、浅肌层浸润 (T2, $n=119$)、无淋巴结转移 (N0, $n=237$) 的膀胱癌组织样本, 高级别 ($n=384$)、高分期 (III + IV, $n=274$)、深肌层浸润 (T3~4, $n=252$)、伴淋巴结转移 ($\geq N1$, $n=129$) 的膀胱癌组织样本中 MFAP5 表达水平平均升高 [分别为 $0.909 (0.122, 3.757)$ vs $0.035 (0.008, 0.119)$ 、 $1.454 (0.203, 5.014)$ vs $0.129 (0.019, 1.105)$ 、 $1.557 (0.241, 5.170)$ vs $0.212 (0.020, 1.239)$ 、 $1.516 (0.120, 5.775)$ vs $0.669 (0.083, 3.006)$], 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01)。GSE13507 微阵列芯片分析结果也表明, MFAP5 在高级别 (7.63 ± 0.15 , $n=60$)、高侵袭性 (7.84 ± 0.17 , $n=62$)、伴淋巴结转移 (7.85 ± 0.33 , $n=16$)、肌层浸润 (7.86 ± 0.18 , $n=61$) 的膀胱癌组织中表达较高, 与低级别 (7.20 ± 0.07 , $n=105$)、低侵袭性 (7.06 ± 0.03 , $n=103$)、无淋

巴结转移 (7.29 ± 0.07 , $n=149$)、非肌层浸润 (7.06 ± 0.03 , $n=104$) 的膀胱癌组织相比差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。

2.3 膀胱癌组织中 MFAP5 表达与预后的关系 根据 TCGA 全转录组测序数据库中提取的膀胱癌样本中 MFAP5 表达水平, 按中位值 (54.735 5) 将患者分为 MFAP5 高表达组 ($n=203$) 和低表达组 ($n=202$), Kaplan-Meier 分析结果示, MFAP5

高表达组患者总生存期短于 MFAP5 低表达组患者, 差异有统计学意义 ($P=0.036 6$, 图 2A)。根据 GSE13507 微阵列芯片数据库膀胱癌样本中 MFAP5 表达水平, 按高表达:低表达=1:3 取界值为 7.21, MFAP5 高表达组 ($n=41$) 患者总生存期也短于 MFAP5 低表达组 ($n=124$) 患者, 差异有统计学意义 ($P=0.037 0$, 图 2B)。

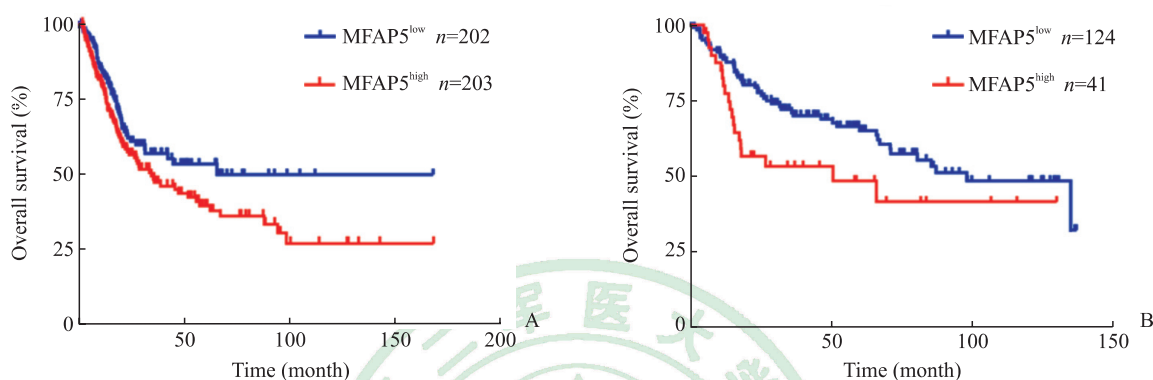


图 2 MFAP5 表达对膀胱癌患者总生存期的影响

Fig 2 Effect of MFAP5 expression on overall survival of bladder cancer patients

A: The bladder cancer patients with high-expression level of MFAP5 had a shorter overall survival (MFAP5 expression data were derived from whole transcriptome sequencing database of TCGA); B: The bladder cancer patients with high-expression level of MFAP5 had a shorter overall survival (MFAP5 expression data were derived from microarray database of GSE13507). MFAP5: Microfibril-associated protein 5; TCGA: The Cancer Genome Atlas

2.4 MFAP5 表达与 EMT 相关分子密切相关 运用基因集差异分析 (gene set variation analysis, GSVA) 方法分析 MFAP5 表达水平与膀胱癌转移密切相关的 EMT 基因集的相关性, 结果 (图 3A) 显示在 TCGA 膀胱癌测序数据库中, 2 个已有文献报道^[13-14]的 EMT 基因集均显著富集于 MFAP5 高表达组 ($r=0.685 8$ 、 $0.687 4$, P 均 < 0.01); 另外, EMT 相关基因钙黏蛋白 2、波形蛋白、Snail 家族转录抑制因子 1/2 (Snail family transcriptional repressor 1/2, *SNAIL1/2*)、*Twist1/2*、纤连蛋白 1、*MMP2/3/9*、*ZEB1/2* 在 MFAP5 高表达组患者样本中也呈高表达 (图 3B)。Pearson 相关分析结果显示, 在单基因水平 MFAP5 表达水平与 EMT 相关基因钙黏蛋白 2、*Twist1*、*MMP9*、*ZEB1* 存在强相关性 ($r=0.500 8$ 、 $0.683 4$ 、 $0.598 2$ 、 $0.511 4$, P 均 < 0.01 , $n=414$)。

2.5 MFAP5 对人膀胱癌细胞 EMT 相关蛋白表达的影响 蛋白质印迹法检测结果 (图 4、表 2) 显

示, 在 T24、5637 细胞中, 200 和 400 ng/mL 重组人 MFAP5 蛋白均可有效促进 N-钙黏蛋白、MMP9、ZEB1、Twist 的表达, 同时抑制 E-钙黏蛋白表达, 与对照组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.6 MFAP5 表达对人膀胱癌细胞迁移与侵袭的影响 划痕实验结果 (图 5A、5B) 显示, 在经过 200 和 400 ng/mL 重组人 MFAP5 蛋白刺激后, 膀胱癌细胞 T24、5637 的迁移能力均增强 (T24: 55.00 ± 1.53 、 65.57 ± 1.80 , 5637: 53.47 ± 1.58 、 65.17 ± 0.73), 与对照组 (0 ng/mL, 37.87 ± 2.08 、 35.5 ± 1.53) 相比差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01)。Transwell 侵袭实验结果 (图 5C、5D) 显示, 200 和 400 ng/mL 重组人 MFAP5 蛋白可以促进膀胱癌细胞 T24、5637 的侵袭能力 (T24: 147.70 ± 6.17 、 195.30 ± 6.49 , 5637: 63.67 ± 3.18 、 66.33 ± 2.40), 与对照组 (0 ng/mL, 79.00 ± 2.65 、 31.67 ± 1.45) 相比差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01)。

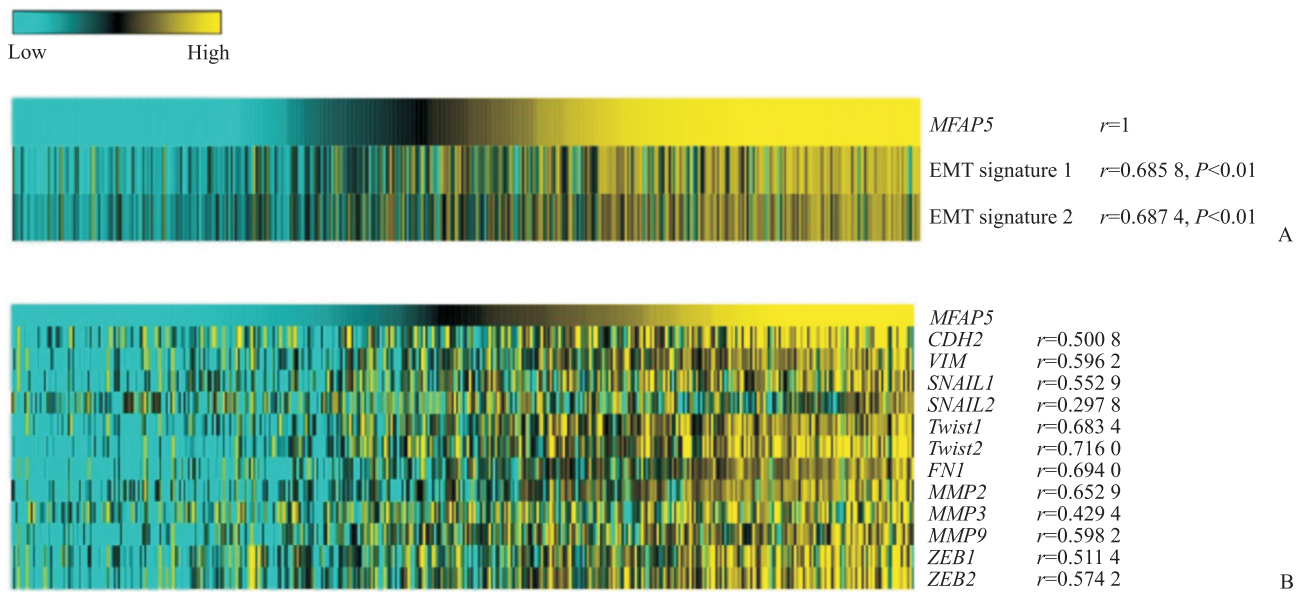


图3 MFAP5 表达水平与 EMT 相关分子密切相关

Fig 3 Expression level of MFAP5 is closely related to EMT-related molecules

A: Correlation of MFAP5 expression with two EMT signatures analyzed by GSVA was presented with heat map; B: Correlation of MFAP5 expression with EMT-associated markers was presented with heat map. MFAP5: Microfibril-associated protein 5; EMT: Epithelial-mesenchymal transition; CDH2: Cadherin 2; VIM: Vimentin; SNAIL: Snail family transcriptional repressor; FN1: Fibronectin 1; MMP: Matrix metalloproteinase; ZEB: Zinc-finger E-box-binding protein; GSVA: Gene set variation analysis

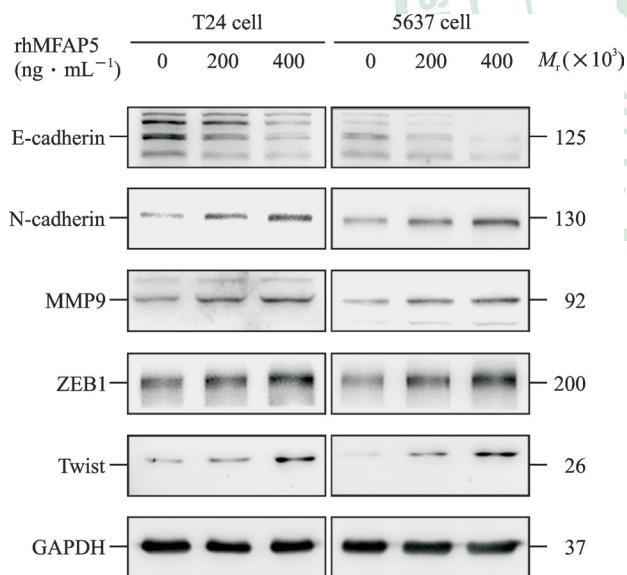


图4 蛋白质印迹法检测 rhMFAP5 对膀胱癌细胞中 EMT 相关蛋白表达的影响

Fig 4 Effects of rhMFAP5 on expression of EMT-related proteins in bladder cancer cells detected by Western blotting

rhMFAP5: Recombinant human microfibril-associated protein 5; EMT: Epithelial-mesenchymal transition; MMP9: Matrix metalloproteinase 9; ZEB1: Zinc-finger E-box-binding protein 1; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

表2 蛋白质印迹法检测 rhMFAP5 处理后膀胱癌细胞 EMT 相关蛋白表达定量结果

Tab 2 Quantitative results of EMT-related protein expression in bladder cancer cells treated with rhMFAP5 detected by Western blotting

Protein	rhMFAP5 (ng · mL ⁻¹)		
	0	200	400
T24 cell			
E-cadherin	0.980 ± 0.036	0.530 ± 0.091*	0.333 ± 0.026**
N-cadherin	1.023 ± 0.071	2.167 ± 0.144**	3.337 ± 0.180**
MMP9	0.997 ± 0.069	2.077 ± 0.100**	2.227 ± 0.087**
ZEB1	0.957 ± 0.048	1.330 ± 0.075*	1.973 ± 0.139**
Twist	1.043 ± 0.130	1.280 ± 0.024*	2.687 ± 0.118**
5637 cell			
E-cadherin	0.980 ± 0.034	0.597 ± 0.062*	0.533 ± 0.026**
N-cadherin	1.010 ± 0.086	2.097 ± 0.161**	3.203 ± 0.060**
MMP9	1.010 ± 0.054	2.050 ± 0.049**	2.227 ± 0.078**
ZEB1	0.967 ± 0.048	1.430 ± 0.065*	2.107 ± 0.107**
Twist	1.043 ± 0.130	1.380 ± 0.024*	2.520 ± 0.170**

rhMFAP5: Recombinant human microfibril-associated protein 5; EMT: Epithelial-mesenchymal transition; MMP9: Matrix metalloproteinase 9; ZEB1: Zinc-finger E-box-binding protein 1. *P < 0.05, **P < 0.01 vs 0 ng/mL rhMFAP5 group

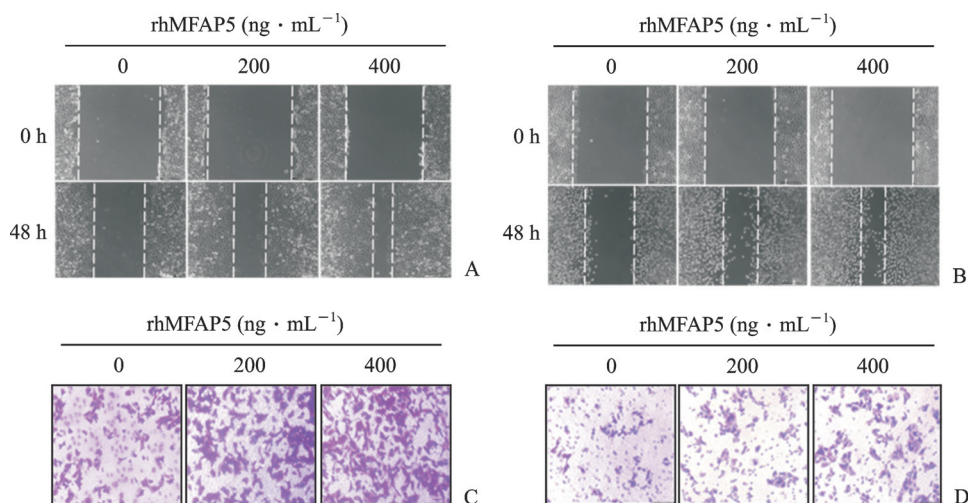


图 5 rhMFAP5 对膀胱癌细胞迁移、侵袭能力的影响

Fig 5 Effects of rhMFAP5 on migration and invasion of bladder cancer cells

A, B: The results of wound healing assay showed that the migration abilities of T24 (A) and 5637 (B) cells were increased after treatment with rhMFAP5; C, D: The results of Transwell assay showed that the invasion abilities of T24 (C) and 5637 (D) cells were increased after treatment with rhMFAP5. rhMFAP5: Recombinant human microfibril-associated protein 5. Original magnification: $\times 100$ (A, B), $\times 200$ (C, D)

3 讨论

迄今为止,人们对膀胱癌的遗传特征和生物学基础知之甚少,尚没有针对膀胱癌的靶向治疗措施,因此,现有研究越来越多地关注膀胱癌的病因、发病机制,尤其是侵袭和转移过程。随着对肿瘤细胞生长、增殖和凋亡分子机制的进一步研究,寻找膀胱癌靶向治疗的生物标志物已迫在眉睫。EMT的激活被认为可以启动侵袭、转移级联反应这一早期步骤,是肿瘤细胞迁移、侵袭过程中的重要一步^[15]。研究表明,膀胱癌的发展和进程涉及多种信号转导途径,如TGF- β 、丝裂原活化细胞外信号调节激酶/PI3K、整联蛋白(integrin)、Notch途径等^[16]。

MFAP5是一种由微纤维构成的基质糖蛋白,可调节内皮细胞的行为,还可通过激活或抑制Notch1的活性促进血管生成并与Notch1相互作用,具体取决于所涉及的细胞类型^[17]。MFAP5主要定位于弹性组织,如韧带、动脉和肺^[18]。然而,已有研究表明MFAP5也在某些肿瘤中高表达,并与肿瘤转移、耐药密切相关^[9-12]。Leung等^[11]研究发现,在卵巢癌中,肿瘤间质中成纤维细胞可以分泌MFAP5促进肿瘤细胞的侵袭和迁移。本研究通过免疫组织化学染色证明,在膀胱癌中MFAP5主要表达于间质组织,且主要表达于CAF中,其在肌层浸润性膀胱癌组织中的表达水平高于非肌层浸

润性膀胱癌组织。利用公开数据库TCGA与GEO数据进行生物信息学分析发现,相较于低级别、低分期(I+II)、浅肌层浸润(T2)、无淋巴结转移(N0)的膀胱癌组织样本,高级别、高分期(III+IV)、深肌层浸润(T3~4)、伴淋巴结转移($\geq N1$)的膀胱癌组织样本中MFAP5的表达水平较高,并且MFAP5高表达组患者总生存期短于MFAP5低表达组患者。因此,我们推测MFAP5在膀胱肿瘤的浸润、转移过程中可能扮演着重要角色。

Li等^[9]研究证实, MFAP5可以促进宫颈癌的侵袭、转移能力。为了深入探讨MFAP5在膀胱癌浸润、转移过程中的功能,本研究利用生物信息学分析发现,膀胱癌中MFAP5的上调与TNM分期和淋巴结转移有关,另外EMT基因集在MFAP5高表达的膀胱肿瘤组织中显著富集,并且MFAP5表达水平与包括钙黏蛋白2、ZEB1、MMP9等在内的EMT相关基因存在较强的正相关性。蛋白质印迹实验表明,经过重组人MFAP5蛋白刺激后的膀胱癌细胞促EMT指标N-钙黏蛋白、ZEB1、Twist、MMP9表达增加,同时抑制EMT过程的E-钙黏蛋白表达水平下降。划痕实验和Transwell侵袭实验结果显示,经重组人MFAP5蛋白刺激后膀胱癌细胞的迁移和侵袭呈剂量依赖性增高。

综上所述,本研究证实MFAP5在膀胱癌的侵

袭、转移过程中发挥着重要作用,其可刺激肿瘤细胞EMT相关蛋白表达进而促进细胞迁移、侵袭。这一发现有助于进一步理解肿瘤微环境促进肿瘤细胞侵袭、迁移的机制,并且MFAP5作为一个潜在的膀胱癌预后指标,为寻找膀胱癌新的治疗靶点提供了新的思路,但是仍需通过动物实验和临床研究进一步明确MFAP5在膀胱癌中的作用机制。

致谢 感谢上海交通大学附属第一人民医院病理科提供的检测方案支持;感谢南京大学模式动物研究所严俊课题组、中国科学院上海药物研究所黄锐敏课题组提供的技术支持。

[参考文献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, SIEGEL R L, TORRE L A, JEMAL A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68: 394-424.
- [2] DY G W, GORE J L, FOROUZANFAR M H, NAGHAVI M, FITZMAURICE C. Global burden of urologic cancers, 1990-2013[J]. *Eur Urol*, 2017, 71: 437-446.
- [3] LAMOUILLE S, XU J, DERYNCK R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15: 178-196.
- [4] SÁNCHEZ-TILLÓ E, LIU Y, DE BARRIOS O, SILES L, FANLO L, CUATRECASAS M, et al. EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69: 3429-3456.
- [5] AO Z, SHAH S H, MACHLIN L M, PARAJULI R, MILLER P C, RAWAL S, et al. Identification of cancer-associated fibroblasts in circulating blood from patients with metastatic breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2015, 75: 4681-4687.
- [6] SOOD D, TANG-SCHOMER M, POULI D, MIZZONI C, RAI A N, TAI A, et al. 3D extracellular matrix microenvironment in bioengineered tissue models of primary pediatric and adult brain tumors[J/OL]. *Nat Commun*, 2019, 10: 4529. doi: 10.1038/s41467-019-12420-1.
- [7] GUO S, DENG C X. Effect of stromal cells in tumor microenvironment on metastasis initiation[J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14: 2083-2093.
- [8] LEMAIRE R, BAYLE J, MECHAM R P, LAFYATIS R. Microfibril-associated MAGP-2 stimulates elastic fiber assembly[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 800-808.
- [9] LI Q, ZHANG Y, JIANG Q. MFAP5 suppression inhibits migration/invasion, regulates cell cycle and induces apoptosis via promoting ROS production in cervical cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 507(1/2/3/4): 51-58.
- [10] MOK S C, BONOME T, VATHIPADIEKAL V, BELL A, JOHNSON M E, WONG K K, et al. Gene signature predictive for outcome in advanced ovarian cancer identifies a survival factor: microfibril-associated glycoprotein 2[J]. *Cancer Cell*, 2009, 16: 521-532.
- [11] LEUNG C S, YEUNG T L, YIP K P, PRADEEP S, BALASUBRAMANIAN L, LIU J, et al. Calcium-dependent FAK/CREB/TNNC1 signaling mediates the effect of stromal MFAP5 on ovarian cancer metastatic potential[J/OL]. *Nat Commun*, 2014, 5: 5092. doi: 10.1038/ncomms6092.
- [12] LEUNG C S, YEUNG T L, YIP K P, WONG K K, HO S Y, MANGALA L S, et al. Cancer-associated fibroblasts regulate endothelial adhesion protein LPP to promote ovarian cancer chemoresistance[J]. *J Clin Invest*, 2018, 128: 589-606.
- [13] ROBERTSON A G, KIM J, AL-AHMADIE H, BELLMUNT J, GUO G, CHERNIACK A D, et al. Comprehensive molecular characterization of muscle-invasive bladder cancer[J/OL]. *Cell*, 2017, 171: 540-556.e25. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.007.
- [14] CHEN F, ZHANG Y, BOSSÉ D, LALANI A A, HAKIMI A A, HSIEH J J, et al. Pan-urologic cancer genomic subtypes that transcend tissue of origin[J/OL]. *Nat Commun*, 2017, 8: 199. doi: 10.1038/s41467-017-00289-x.
- [15] LI J, ZHOU B P. Activation of β -catenin and Akt pathways by Twist are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters[J/OL]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 49. doi: 10.1186/1471-2407-11-49.
- [16] JING Y, HAN Z, ZHANG S, LIU Y, WEI L. Epithelial-mesenchymal transition in tumor microenvironment[J/OL]. *Cell Biosci*, 2011, 1: 29. doi: 10.1186/2045-3701-1-29.
- [17] ALBIG A R, BECENTI D J, ROY T G, SCHIEMANN W P. Microfibril-associated glycoprotein-2 (MAGP-2) promotes angiogenic cell sprouting by blocking notch signaling in endothelial cells[J]. *Microvasc Res*, 2008, 76: 7-14.
- [18] GIBSON M A, LEAVESLEY D I, ASHMAN L K. Microfibril-associated glycoprotein-2 specifically interacts with a range of bovine and human cell types via $\alpha_v\beta_3$ integrin[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 13060-13065.