文章编号:1000-5404(2008)21-2051-04

论著

hepaCAM基因对膀胱癌细胞体外生物学的影响

王 磊,吴绮思,罗春丽,蔡晓钟,吴小候 (重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

摘 要:目的 研究野生型hepaCAM基因对人类膀胱癌T24细胞体外生物学影响。**方法** 脂质体法转染pEGFP-N2-hepaCAM质粒入T24细胞,激光共聚焦显微镜检测其蛋白定位;筛选稳定表达细胞株,Western blot检测蛋白表达。细胞黏附、基质胶侵袭实验及MTT实验研究该基因对细胞黏附力、活动力及增殖力的影响。**结果** hepaCAM在单个细胞中分布在细胞核周边区域,相互连接细胞中主要分布于细胞间相互接触区域。获得稳定表达hepaCAM基因的T24细胞。体外黏附实验、基质胶侵袭实验证明实验组细胞黏附力及活动力明显高于空白组及阴性对照组($P<0.01$)。MTT法检测转染hepaCAM基因细胞增殖力明显低于空白组及阴性对照组($P<0.01$)。**结论** hepaCAM基因可显著抑制人类膀胱癌T24细胞恶性行为,可能是通过增强细胞-基质间黏附及抑制细胞增殖力,从而对抗肿瘤细胞的浸润和转移。

关键词: 膀胱癌;移行细胞;HepaCAM蛋白;T24细胞
中图法分类号: R73-362; R730.23; R737.14 **文献标识码:** A

Effect of hepaCAM gene on biological behavior of TCCB cells *in vitro*

WANG Lei, WU Qi-si, LUO Chun-li, CAI Xiao-zhong, WU Xiao-hou (Department of Urologic Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of transfection of wild hepatocyte cell adhesion molecule (hepaCAM) on the biological behaviors of the T24 cells of transitional cell carcinoma of bladder (TCCB). Methods Human TCCB cell line T24 was transfected with pEGFP-N2-hepaCAM, mock plasmid pEGFP-N2 with lipofectamine. Laser confocal microscopy was used to observe the location of hepaCAM in cells. Western blotting was used to determine the expression of hepaCAM in stably transfected cells. The cell adhesive and motility ability were tested by cell spreading assay and matrigel invasion assay. Cell proliferation ability was investigated by MTT assay. Results In well spread cells, hepaCAM was localized on the perinuclear membrane, whereas in the cells contacting together, it predominantly accumulated at the sites of cell-cell contacts on cell membrane. Cell clones with stable expression of hepaCAM were acquired. Cell spreading assay and matrigel invasion assay showed the cell adhesion and cell motility properties of hepaCAM transfected cells were apparently enhanced compared those with no transfection or mock-vector cells. MTT assay showed cell proliferation ability in the hepaCAM group was notably decreased when compared with the non-transfection or mock-vector groups. Conclusion hepaCAM can restrain malignant phenotypes of the human TCCB cells *in vitro*, and may inhibit the TCCB invasion and metastasis by influencing the function of some adherence and proliferation factors.

Key words: transitional cell carcinoma of bladder; hepatocyte cell adhesion molecule; T24 cells

膀胱移行细胞癌(transitional cell carcinoma of bladder,TCCB)是泌尿外科最常见的肿瘤,病因及发病机制尚未完全明了。肝细胞黏附分子(hepatocyte cell adhesion molecule, hepaCAM)是2005年Chung-Moh等[1]发现的编码免疫球蛋白类细胞黏附分子的新基因,具有抑制肿瘤增殖的能力,正常表达在人类肝脏中,在原发性肝癌及多种肝癌细胞株中表达降低或缺失。在前期研究中,我们采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测到人类正常膀胱组织中有hepaCAM基因表达,而TCCB组织中表达出现降低或缺失,在TCCB细胞株T24及BIU-87中表达完全缺失。本实验将野生型hepaCAM基因通过真核表达载体导入该基因表达缺失的TCCB细胞株T24中,探讨hepaCAM基因在TCCB中的作用,为TCCB的基因诊断及治疗提供更多的实验依据。

作者简介:王 磊,男,河南省商丘市人,硕士,医师,主要从事泌尿系肿瘤诊断治疗方面的研究。电话:(023)68485223,E-mail:xbingyi@tom.com
通信作者:吴小候,电话:(023)68485223,E-mail:wuxiaohou80@hotmail.com
收稿日期:2008-03-26;修回日期:2008-05-20

1 材料与方法

1.1 材料

真核表达质粒 pEGFP-N2-hepaCAM 及阴性对照质粒 pEGFP-N2由基因发现者所在实验室新加坡国立大学沈莎莉实验室惠赠。实验组质粒全长约 6.0 kb,含 1.2 kb 的 hepaCAM cDNA和筛选标志 neo 基因,T24 细胞株由重庆医科大学基础研究所提供。人工基质膜购自 Collaborative Research 公司,脂质体 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司,兔抗 GFP 单克隆抗体购自碧云天公司,HRP 标记的二抗羊抗兔 IgG 及 HRP-DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥公司,Transwell 小室购自 Corning 公司,其他试剂购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人类膀胱移行细胞癌株 T24 细胞培养于 PRMI1640 培养基,常规加入 10% 胎牛血清,100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素置于 37℃,5% CO_2 培养箱中培养。

1.2.2 细胞瞬时转染及稳定克隆筛选 取对数生长期细胞,按 1×10^5/孔密度接种于底部铺有盖玻片的 24 孔培养板。按转染试剂说明书进行转染,24 h 蛋白表达明显,4% 多聚甲醛固定、50% 甘油封片,激光共聚焦显微镜下观察 hepaCAM 蛋白定位。同时取对数生长期细胞,以 1×10^5/孔密度接种于 6 孔板,按说明书操作进行转染,36 h 后换含有 400 μg/ml G418 的培养基进行筛选,3 周后选出抗性克隆株继续培养。以转染质粒 pEGFP-N2-hepaCAM 的细胞为实验组,未转染细胞为空白组,转染阴性质粒的细胞为阴性对照组。

1.2.3 Western blot 鉴定蛋白 按试剂盒说明书提取总蛋白,测定样品蛋白浓度符合实验要求后,按比例与 5× 上样缓冲液混合,置 100 ℃沸水中煮 5 min。取等量蛋白样品及蛋白标准上样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳后电转移,将凝胶转移至 PVDF 膜上,置于含 1% 脱脂奶粉的 TBST 中封闭过夜。PVDF 膜先后与 1∶500 稀释的兔抗 GFP 单克隆抗体溶液及 1∶1 000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG 溶液作用,HRP-DAB 底物显色试剂盒内的各溶液混合滴于膜上,室温染色 10 min,显色拍照。

1.2.4 细胞黏附实验 以每孔 1×10^5 个细胞的密度将筛选后 T24 细胞接种于覆盖有 200 μl(100 μg/ml)人工重构基质膜材料 Matrigel 的 6 孔板中培养。接种 30 min、2 h 倒置显微镜下观察细胞形态学变化,未黏附细胞为圆形,黏附细胞有明显细胞突起。10 个随机区域进行黏附细胞百分率测定(>60 细胞/区域),每组 3 个平行孔。

1.2.5 细胞解离实验 覆盖有人工重构基质膜材料 Matrigel 的 6 孔板,接种 1×10^5 个细胞,过夜使其长成融合的单细胞层,室温下加入 400 μl 含有 1 mmol/L 的 EDTA 磷酸缓冲盐水,细胞解离程度在倒置显微镜下 5、15 min 时拍照,未解离细胞观察呈多边形,解离的细胞观察呈圆形。10 个随机的区域进行计数,计算解离细胞百分比,每组 3 个平行孔。

1.2.6 基质胶侵袭实验 人工重构基质膜材料 Matrigel 用含 0.1% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基稀释成 100 μg/ml,加入 Transwell 小室上室滤膜表面(250 μl/孔),紫外线照射过夜。用前以 100 μl 无血清培养基 37° C 下湿润 30 min,下室加入 400 μl 按 1∶1混合的小鼠成纤维细胞系 NIH3T3 细胞上清液和含 10% 胎牛血清 RPMI1640 培养液,室内分别加入 1×10^5 ml^{-1} 的各组细胞 100 μl,培养液为 0.1% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液。孵育 12 h 后,棉签擦去未迁移细胞,滤膜用 4% 多聚甲醛固定 10 min,HE 染色封片。光镜下计数 10 个视野的细胞,每组平行设 3 个滤膜。

1.2.7 MTT 实验 将生长状态良好的稳定转染细胞制成细胞悬液,按 1×10^4/孔密度接种于 96 孔板,接种并开始贴壁生长,当天记为 0 d,每隔 24 h 为 1 个检测点,MTT 法连续测定 7 d 细胞增殖状况。测定时每孔加入 20 μl MTT(5 mg/ml),4 h 后弃去培养液,加入 150 μl 的 DMSO 溶解蓝紫色结晶,待其振荡充分溶解后每孔各取 100 μl 移至新的酶标板,于 570 nm 波长处测定吸光度值[D(570)],每孔重复 3 次,绘制细胞生长曲线。

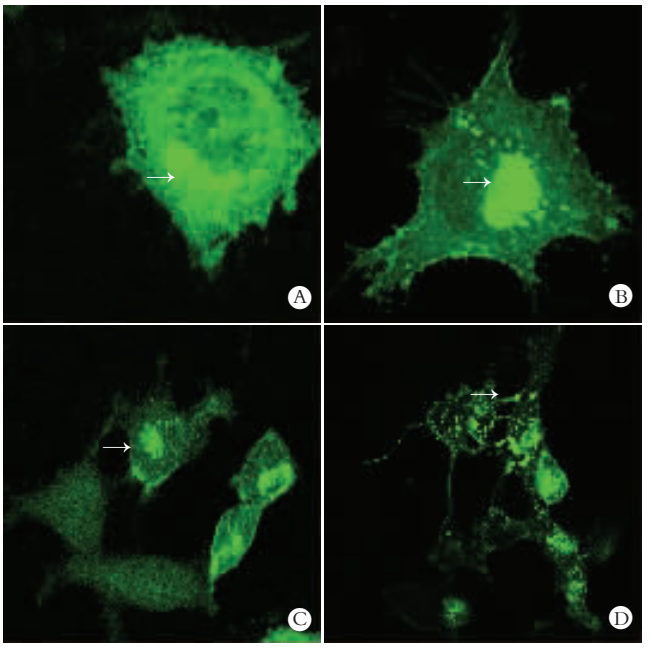
1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较行成组设计 t 检验;计数资料比较行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 hepaCAM 蛋白细胞定位及细胞克隆筛选

激光共聚焦显微镜显示:单个延展细胞上,hepaCAM 蛋白定位于核周区域及细胞突起表面(图 1B);细胞相互连接时,hepaCAM 蛋白形成并指结构分布在细胞膜表面相互接触突起上,呈现出典型细胞黏附分子特性(图 1D)。图 1A、C 显示为阴性对照组中绿色荧光蛋白(GFP)分布情况:单个细胞及联系细胞中,GFP 非特异性的广泛分布在整个细胞中。细胞转染后在 G418 筛选下大部分细胞死亡,14 d 后见剩余荧光细胞呈岛状生长,继续抗性筛选,获得抗性克隆细胞,传代在维持浓度的 G418 中培养用于后续实验。

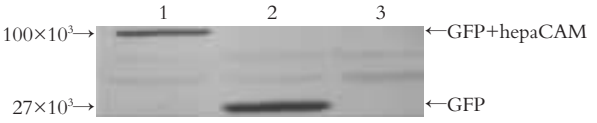


A、C:阴性对照组(GFP 单个细胞与联系细胞);B、D:实验组(hepaCAM 蛋白单个细胞与联系细胞)

图 1 激光共聚焦显微镜下 hepaCAM 蛋白的细胞定位
(箭头示,×1 000)

2.2　Western blot 蛋白表达检测

通过抗 GFP 抗体检测特异性蛋白表达情况：空白组无特异蛋白表达条带，阴性对照组及实验组细胞中分别出现 27×10^3 及约 100×10^3 的特异性条带（图 2）。因 GFP 相对分子质量为 27×10^3，hepaCAM 蛋白相对分子质量为 75×10^3，故说明转染后细胞经过稳定筛选能够特异性表达 GFP 蛋白及 GFP + hepaCAM 蛋白。



1：实验组；2：阴性对照组；3：空白组

图 2　Western blot 鉴定转染后细胞蛋白表达

2.3　细胞黏附实验

实验组细胞黏附率明显高于其他 2 组（$P<0.01$），空白组和阴性对照组间无明显差异（$P>0.05$，表 1），说明表达 hepaCAM蛋白的实验组细胞具有显著增强细胞-基质间黏附的能力。

表 1　不同时间各组细胞黏附率变化（%，$\bar{x}\pm s$）

时间	空白组	阴性对照组	实验组
30 min	7.30 ± 2.56[a]	6.75 ± 2.83[a]	57.40 ± 7.28
2 h	21.89 ± 5.80[a]	20.54 ± 7.52[a]	94.18 ± 2.44

a：$P<0.01$，与实验组比较

2.4　细胞解离实验

实验组细胞解离率明显低于其他 2 组（$P<0.01$），空白组和阴性对照组间无明显差异（$P>0.05$，表 2），表明表达 hepaCAM 蛋白的实验组细胞具有增强细胞-细胞间黏附的能力。

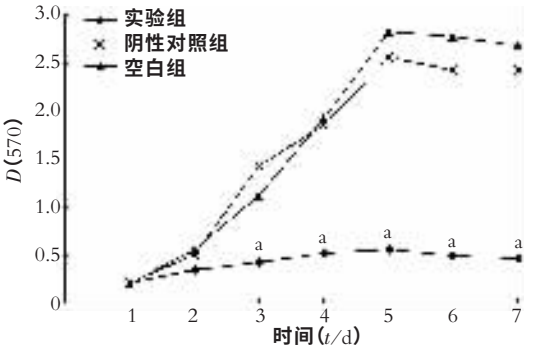
表 2　不同时间各组细胞解离率变化（%，$\bar{x}\pm s$）

时间	空白组	阴性对照组	实验组
5 min	49.07 ± 9.34[a]	51.50 ± 4.62[a]	7.33 ± 4.88
15 min	96.36 ± 1.27[a]	97.64 ± 0.77[a]	9.38 ± 2.51

a：$P<0.01$，与实验组比较

2.5　细胞增殖力影响

MTT 法检测细胞增殖力显示：实验组与空白组及阴性对照组相比，细胞增殖速度明显减慢（$P<0.01$），空白组与阴性对照组间相比无明显差异（$P>0.05$），提示 hepaCAM 基因对 T24 细胞的增殖具有一定的抑制能力（图 3）。



a：$P<0.01$，与阴性对照组、空白组比较

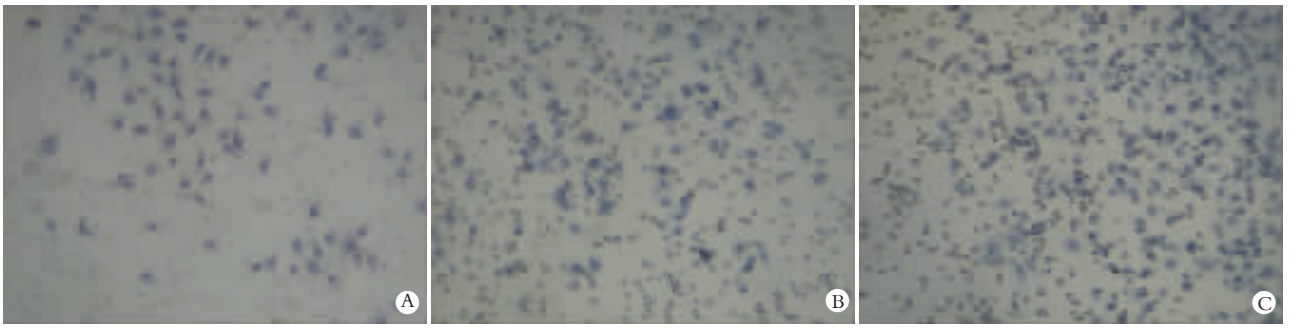
图 3　各组细胞 MTT 值变化曲线

2.6　细胞迁移力影响

实验组细胞迁移力［（102.30 ± 16.06）个］明显高于其他 2 组（$P<0.01$），阴性对照组［（43.20 ± 10.45）个］与空白组［（41.00 ± 9.94）个］间无显著性差异（$P>0.05$），说明表达 hepaCAM 蛋白的实验组细胞具有影响细胞活动力的能力（图 4）。

3　讨论

恶性肿瘤的一个重要生物学特征是对邻近组织的浸润及远处转移。目前研究认为，除肿瘤细胞周边新生血管形成外，细胞黏附能力改变是引起浸润和转移最重要的因素。细胞黏附分子的表达紊乱在肿瘤发生发展过程中起着关键作用，是肿瘤恶变的基本条件[2,3]。hepaCAM 基因是由 Shali Shen 等发现，基因定位人染色体 11q24，产物为含 416 个氨基酸残基的跨膜蛋白，蛋白结构具有典型细胞黏附分子特性。在人类脑、乳腺、肌肉、肺、视网膜、子宫等组织中均发现其转录产物，推测 hepaCAM 基因可能广泛表达于人类组织器官。实验表明：hepaCAM 在正常肝组织及原发性肝癌中存在显著表达差异[4]。外源性 hepaCAM 基因重新表达在肝癌细胞株 HepG2 及乳腺癌细胞株 MCF7 后，能介导细胞-基质间黏附、抑制肿瘤细胞增殖，并且在信号转导及调控细胞增长过程中也可能发挥重要作用。更多研究表明：hepaCAM 是一种磷酸化糖蛋白，其细胞内尾虽对 hepaCAM 蛋白的细胞定位及同源二聚体形



A：空白组；B：阴性对照组；C：实验组

图 4　各组细胞迁移力实验　（HE ×40）

成没有影响,但对 hepaCAM 基因发挥其正常生物作用是必需的结构区域[5],hepaCAM 基因可能像 TSLC1 及 NCAM-1 基因一样[6],是一种新的肿瘤抑制基因 TSG。

前期研究中我们采用 RT-PCR 对手术切除的 28 例人类正常膀胱组织及 34 例不同临床分级分期的 TCCB 标本进行 hepaCAM 基因表达分析,结果显示:TCCB 组织和正常膀胱黏膜中 hepaCAM mRNA 的表达具有显著性差异($P<0.01$),并且在表浅性(Ta ~ T1)和浸润性(T2 ~ T4)TCCB 中的表达也具有显著性差异($P<0.01$),并且发现 hepaCAM 基因在 TCCB 细胞株 T24 及BIU-87中表达完全缺失。为了进一步明确该基因在细胞肿瘤中作用,我们利用脂质体介导的基因转染方法,将含有野生型 hepaCAM 基因的真核表达质粒转染入该基因表达缺失的膀胱癌 T24 细胞中,通过激光共聚焦显微镜检测瞬时转染的 T24 细胞中 hepaCAM 蛋白细胞定位情况,证明了 hepaCAM 蛋白具有典型细胞黏附分子的特征。Western blot 检测到稳定筛选的细胞系中 GFP 蛋白及 hepaCAM 蛋白的稳定表达。通过细胞黏附及解离实验证明了 hepaCAM 基因具有明显增强 T24 细胞的细胞-基质及细胞-细胞间的黏附力;基质胶侵袭实验证实了 hepaCAM 基因可以增强 T24 细胞的迁移能力;而 MTT 实验显示:hepaCAM 基因能明显抑制 T24 细胞的增殖能力。以上实验表明:hepaCAM 基因在人类 TCCB 中是一种肿瘤抑制基因,可显著抑制人类膀胱癌 T24 细胞的恶性生物学行为,可能是通过增强细胞-基质间黏附及抑制细胞增殖力进而影响肿瘤细胞的侵袭转移能力,这不仅对膀胱癌细胞的侵袭转移机制进行了补充,对膀胱癌的预防、早期诊断、预后判断和提高疗效有重要意义,同时也为研究阻遏肿瘤恶性转变提供理论依据和切实可行的方法。

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(6): 833 - 841.

[2] Turley E A. Proteoglycans and cell adhesion. Their putative role during tumorigenesis[J]. Cancer Metastasis Rev, 1984, 3(4): 325 - 339.

[3] Johnson J P. Cell adhesion molecules in neoplastic disease[J]. Int J Clin Lab Res, 1992, 22(2): 69 - 72.

[4] Moh M C, Lee L H, Yang X, *et al*. HEPN1, a novel gene that is frequently down-regulated in hepatocellular carcinoma, suppresses cell growth and induces apoptosis HepG2 cells[J]. J Hepatol, 2003, 39(4): 580 - 586.

[5] Moh M C, Zhang C, Luo C, *et al*. 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(29): 27366 - 27374.

[6] Masuda M, Yageta M, Fukuhara H, *et al*. The tumor suppressor protein TSLC1 is involved in cell-cell adhesion[J]. J Biol Chem, 2002, 277(34): 31014 - 31019.

(编辑 龙 亮)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2008)21-2054-01

闭孔疝1例误诊分析

陈若飞 (重庆市酉阳人民医院普通外科,重庆 409800)

闭孔疝是少见的腹外疝,术前诊断率不高,多在肠梗阻的探查手术中发现,容易漏诊和误诊[1]。我院 2008 年 2 月收治 1 例误诊长达 10 余年,现结合有关文献对其误诊进行分析。

1 临床资料

患者,女性,79 岁,经产妇,2008 年 2 月入院。反复腹痛、右股前区疼痛 12 年,加重伴肛门停止排气排便 4 d。患者腹部疼痛为阵发性,牵扯至膝以上大腿内侧,咳嗽可诱发和加重疼痛,反复发作。腹痛缓解期间仍有右股前区疼痛,集中于大腿根部内侧,时轻时重。曾于多家医院诊断为"髋关节炎",行对症治疗症状无明显缓解。1 年前,再发伴肛门停止排气排便,于我院行肠梗阻剖腹探查,术中未探及病变疑为麻痹性肠梗阻减压后关腹,术后肠梗阻症状缓解,后仍有腹痛、右股前区疼痛。

入院时,一般情况稍差,体质量 32 kg,生命体征正常。腹部膨隆,右下腹压痛,右侧股三角区深压痛。腹部平片示不全性小肠梗阻,经肠梗阻基础治疗后肛门有排气,但仍有较频繁的肠绞痛发作,持续右大腿根部疼痛。考虑为不全性肠梗阻,入院第 3 天行探查,小肠粘连不明显,右侧闭孔见一约直径 1 cm 疝孔,疝囊内侧约 4 cm × 3 cm × 2 cm 腹膜外脂肪堆积,与外下方闭孔神经部分粘连,诊断为闭孔疝。术中分离闭孔神经周围粘连,切除堆积脂肪,重叠缝合腹膜于闭孔边缘修补闭孔疝。术后患者症状缓解,恢复良好,随访 5 个月无异常表现。

2 讨论

闭孔疝(obturator hernia)是少见的腹外疝,约占腹外疝的 0.05% ~ 0.14%,占机械性肠梗阻的 0.2% ~ 1.6%。高龄或瘦弱者较多,女性发病多于男性(6:1)。闭孔疝的疝块位置深,体

(下转 2061 页)

作者简介:陈若飞,男,重庆市酉阳县人,土家族,硕士,副主任医师,主要从事普外科方面的研究,发表论文 7 篇。电话:(023)75535228,E-mail:chenshao1974@sohu.com

收稿日期:2008-07-20;修回日期:2008-09-09