论著

文章编号:1000-5404(2010)05-0490-04

HepaCAM 基因转染对膀胱癌 BIU-87 细胞株生长及血管内皮生长因子表达的影响

杨淑哲[1],罗春丽[1],吴小候[2],潘翠翠[1],蔡晓钟[1] (400016 重庆,重庆医科大学:医学检验系教育部重点实验室[1],附属第一医院泌尿外科[2])

[摘要] **目的** 探讨外源性肝细胞黏附分子(hepatocyte cell adhesion molecule,hepaCAM)转染对人膀胱癌 BIU-87 细胞株生长及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factors, VEGF)表达的影响。**方法** 使用脂质体 2000 转染法将携带野生型 hepaCAM 基因的质粒(pEGFPN2-hepaCAM)及空载质粒(pEGFPN2)转染人膀胱癌 BIU-87 细胞,建立稳定过表达 hepaCAM 基因的 BIU-87 细胞株。以转染空载质粒及未转染的 BIU-87 细胞株作为对照,采用 MTT 法检测各组细胞生长能力,逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 hepaCAM、VEGF mRNA 水平的变化,Western blot 检测 VEGF 蛋白水平的变化。**结果** MTT 实验示:hepaCAM 基因转染(实验组)BIU-87 细胞生长与空载体组和未处理组细胞比较明显受到抑制($P<0.05$);hepaCAM 基因在膀胱癌 BIU-87 细胞不表达,转染后 hepaCAM mRNA 明显增强($P<0.05$);实验组 VEGF mRNA 表达(0.527 ± 0.031)与未处理组(0.803 ± 0.042)、空载组(0.750 ± 0.040)比较明显下降($P<0.05$)。Western blot 结果示:实验组 BIU-87 细胞 VEGF 蛋白表达(0.057 ± 0.015)与未处理组(0.263 ± 0.032)和空载组(0.280 ± 0.036)比较明显下降($P<0.05$)。**结论** 转染野生型 hepaCAM 基因可明显抑制膀胱癌 BIU-87 细胞的生长能力,并下调 VEGF 基因及蛋白的表达, hepaCAM 基因可能是影响肿瘤的生长及侵袭转移的重要原因之一。

[关键词] 膀胱肿瘤;hepaCAM;血管内皮生长因子类;基因, 肿瘤抑制
[中图法分类号] R737.14;R394.2;R730.23 [文献标志码] A

Transfection of wild type hepaCAM gene inhibits cell growth and VEGF expression in BIU-87 cells

Yang Shuzhe[1], Luo Chunli[1], Wu Xiaohou[2], Pan Cuicui[1], Cai Xiaozhong[1] ([1]Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, [2]Department of Urinary Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of transfection of wild type hepatocyte cell adhesion molecule (hepaCAM) gene on the growth and metastasis of bladder cancer BIU-87 cells. **Methods** Plasmids pEGFPN2-hepaCAM and pEGFPN2 were respectively transfected into BIU-87 cells with Lipofectamine2000 to establish BIU-87 cells with stable over-expression of hepaCAM. MTT assay was used to observe the proliferation of hepaCAM transfection cells, pEGFPN2 transfection cells and untransfected cells. The mRNA expressions of hepaCAM and VEGF before and after the stable transfection were detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). The protein level of VEGF in the above cell groups was analyzed by Western blot analysis. **Results** MTT assay showed that the proliferation of BIU-87 cells transfected with wild type of hepaCAM was markedly inhibited compared with that of control groups ($P<0.05$). There was no expression of hepaCAM mRNA in BIU-87 cells, but the expression of hepaCAM mRNA of BIU-87 cells transfected with hepaCAM gene was markedly increased ($P<0.05$). The expression of VEGF mRNA (0.527 ± 0.031) in BIU-87 cells transfected with hepaCAM was markedly inhibited as compared with that of transfected with empty vector cells (0.750 ± 0.040) and untransfected cells (0.803 ± 0.042, $P<0.05$). The results of Western blotting showed the protein expression of VEGF in BIU-87 cells transfected with hepaCAM (0.057 ± 0.015) was markedly inhibited as compared with transfected with empty vector cells (0.280 ± 0.036) and untransfected cells (0.263 ± 0.032, $P<0.05$). **Conclusion** Transfection of hepaCAM gene significantly inhibits the cell proliferation, and VEGF expressions at mRNA and protein levels in BIU-87 cells. hepaCAM gene might play an important role in the proliferation, invasion and metastasis of bladder cancer.

[**Key words**] urinary bladder neoplasms; hepatocyte cell adhesion molecule; vascular endothelial growth factors; genes, tumor suppressor

Corresponding author: Luo Chunli, Tel: 86-23-68485223, E-mail: luochunli79@126.com

[通信作者] 罗春丽,电话:(023)68485223, E-mail:luochunli79@126.com

在我国,膀胱癌是泌尿生殖系最为常见的恶性肿瘤[1],占全部恶性肿瘤1%~2%,其发病率死亡率均居泌尿系首位[2],且有逐年增加的趋势。20%的初发患者会发生侵袭,即使经过治疗也会发生早期转移[3],因此遏制肿瘤细胞发生侵袭和转移是治疗膀胱癌的关键因素。肝细胞黏附分子(hepatocyte cell adhesion molecule,hepaCAM)基因是最近发现的一种免疫球蛋白超家族类细胞黏附分子,有研究[4]表明:hepaCAM通过增强细胞-基质黏附及抑制细胞增殖力近而影响肿瘤细胞的侵袭转移能力。本实验通过建立稳定表达野生型hepaCAM基因的BIU-87细胞株,观察hepaCAM对BIU-87细胞生长及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factors, VEGF)基因和蛋白表达的影响,探讨hepaCAM在膀胱癌发生、发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

BIU-87为本课题组保存株。pEGFPN2-hepaCAM质粒和pEGFPN2质粒为新加坡国立大学沈莎莉教授惠赠。RPMI1640为HyClone公司,新生小牛血清为杭州四季青生物工程材料有限公司。质粒小量提取试剂盒购自北京博迈德公司。脂质体转染试剂Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司。VEGF兔抗人多克隆抗体购自Abcam公司,兔抗人β-actin单克隆抗体、辣根过氧化物标记羊抗兔IgG抗体及化学发光试剂盒购自碧云天公司。Trizol、逆转录试剂盒、DNA Marker、*Taq*酶均购自TaKaRa生物技术有限公司,PCR引物由Invitrogen公司合成。MTT、胰酶、二甲基亚砜购自Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染筛选 待BIU-87细胞复苏后,置于含10%小牛血清1640培养基,于37 ℃、5% CO_2的培养箱中培养。BIU-87细胞常规培养至近融合状态,0.25%胰酶消化后吹打制成单细胞悬液,以2.5×10^6个/孔接种于6孔培养板,培养至80%融合时依照Lipofectamine 2000脂质体说明书进行hepaCAM基因和空载体转染。转染后继续培养24~48 h后,分别用含600 mg/L的G418培养液筛选BIU-87细胞。将细胞分为实验组(pEGFPN2-hepaCAM转染组)、空载组(pEGFPN2转染组)和未处理组3组。

1.2.2 RT-PCR检测hepaCAM基因转染后BIU-87细胞hepaCAM及VEGF基因的表达 采用Trizol试剂抽提不同处理组细胞的总RNA,并用分光光度法测定提取的RNA含量及纯度,取$D(260)/D(280)$值位于1.8~2.0之间的RNA,逆转录试剂盒逆转录为cDNA,存放于-20 ℃保存。hepaCAM正义链:5′-TACTGTAGATGTGCCCATTTCG-3′,反义链:5′-CTTCTGGTTTCAGGCGGTC-3′,产物长度461 bp;VEGF正义链:5′-TTGCTGCTCTACCTCCAC-3′,反义链:5′-AATGCTTTCTCCGCTCTG-3′,产物长度417 bp;β-actin正义链:5′-ACGAGACCATCAACTCCATC-3′,反义链:5′-TAGAAGCATTTGCGGTGGACGA-3′,产物长度309 bp。hepaCAM、VEGF和β-actin的PCR反应条件均为94 ℃预变性3 min;94 ℃变性30 s,55 ℃退火30 s,72 ℃延伸30 s,共35个循环;最后72 ℃延伸5 min。反应完成后取5 μl PCR产物,加少量溴乙锭染色,1.5%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪分析hepaCAM、VEGF与内参β-actin灰度比值。

1.2.3 MTT法检测hepaCAM基因转染后BIU-87细胞生长能力 取对数生长期3组细胞以1.5×10^3个/孔分别接种于96孔板,每个时段设5个复孔,实验重复3次。每天取出1板每孔加入200 μl培养基,每24小时后加入20 μl MTT(5 mg/ml),培养4 h后去上清,每空加150 μl二甲基亚砜,置摇床上低速振荡15 min,结晶物充分溶解。酶联免疫检测仪490 nm处测量各孔的光密度值[$D(490)$],每24小时检测1次,连续测定5 d。

1.2.4 Western blot检测hepaCAM基因转染后BIU-87细胞VEGF蛋白的表达 用预冷的蛋白裂解液及适量蛋白酶抑制剂裂解5×10^5个不同实验组细胞,提取细胞总蛋白。考马斯亮蓝法蛋白定量后保存于-20 ℃。SDS-PAGE凝胶变性电泳,转膜,最后分别加入VEGF抗体(1∶500)、β-actin抗体(1∶500),4 ℃过夜,加入生物素标记的二抗(1∶2 000),室温下反应2 h,化学发光法显色。Bio-Rad图像分析仪分析目的蛋白条带与相应的β-actin相对灰度比值,实验重复3次。

1.3 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件进行分析,不同组均值比较采用t检验。

2 结果

2.1 转染野生型hepaCAM基因对BIU-87细胞生长影响

MTT实验显示:与空载体组和未处理组细胞比较,hepaCAM基因转染组BIU-87细胞生长明显受到抑制($P<0.05$),而空载体转染组细胞与未处理组细胞相比无统计学差异($P>0.05$,表1)。

表1 各组细胞不同生长时间$D(490)$值的变化

组别	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
实验组	0.272±0.019^{ab}	0.363±0.072^{ab}	0.450±0.101^{ab}	0.740±0.192^{ab}	0.794±0.226^{ab}	0.834±0.244^{ab}
空载组	0.278±0.010	0.415±0.096	0.730±0.208	1.127±0.342	1.388±0.434	1.570±0.499
未处理组	0.269±0.015	0.412±0.094	0.724±0.206	1.133±0.344	1.389±0.437	1.599±0.507

a:$P<0.05$,与未处理组比较;b:$P<0.05$,与空载组比较

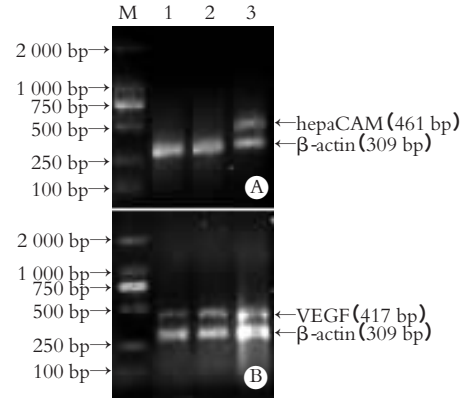
2.2 转染野生型hepaCAM基因对BIU-87细胞hepaCAM、VEGF mRNA表达的影响

RT-PCR结果显示:hepaCAM基因在膀胱癌BIU-87细胞不表达,转染后hepaCAM mRNA明显增强($P<0.05$),说明转染成功。实验组、未处理组及空载组VEGF mRNA的灰度值分别为(0.527±0.031)、(0.803±0.042)、(0.750±0.040)。与未处理组和空载组比较,实验组BIU-87细胞VEGF基因表达明显下降,且具有显著差异($P<0.05$)。见图1。

2.3 转染野生型hepaCAM基因对BIU-87细胞VEGF蛋白表达的影响

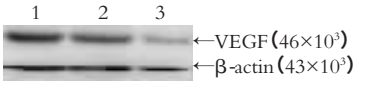
Western blot结果显示:实验组BIU-87细胞VEGF蛋白表

达为(0.057±0.015)。与未处理组(0.263±0.032)和空载组(0.280±0.036)比较,实验组 BIU-87 细胞 VEGF 蛋白表达明显下降,且具有显著差异($P<0.05$),空载组与未处理组间 VEGF 蛋白表达无明显差异($P>0.05$)。见图2。



1:未处理组;2:空载组;3:实验组;M:DNA 标准(DL 2 000)
A:hepaCAM mRNA 表达;B:VEGF mRNA 表达

图1 hepaCAM 基因转染对 BIU-87 细胞 hepaCAM、VEGF 基因表达影响



1:未处理组;2:空载组;3:实验组

图2 hepaCAM 基因对 BIU-87 细胞 VEGF 蛋白表达影响

3 讨论

HepaCAM 基因是 Chung-Moh 等[5]于2005年在人类肝脏组织中发现一种抑癌基因,该基因编码一种相对分子质量为 46×10^3 的细胞黏附分子,该黏附分子属于免疫球蛋白超家族。国内外研究[5-8]已证明:在肝癌、乳腺癌、肾癌及人胶质瘤细胞株中野生型 hepaCAM 基因表达与基质黏附能力改变有密切联系。以上研究结果提示 HepaCAM 表达异常与肿瘤的侵袭转移具有重要关系。本研究使用脂质体转染法将外源性 hepaCAM 基因转染入 BIU-87 细胞,发现 hepaCAM 基因重新在细胞内表达可下调细胞增殖能力,证实 hepaCAM 基因在膀胱癌细胞中具有抑制细胞生长的生物学功能,这种影响可为细胞侵袭转移提供了理论依据。

血管形成是肿瘤侵袭转移的必要条件[9],与肿瘤的恶性程度具有密切关系。血管调节因子是血管形成的主要效应分子[10],有研究[11]证实在膀胱肿瘤血管形成过程中 VEGF 是重要一类血管调节因子。其产生作用的具体机制有以下方面:细胞分泌的 VEGF 可与肿瘤细胞及血管内皮细胞表面的血管内皮生长因子受体结合,改变细胞内信号在传导通路中的传递,影响肿瘤细胞及血管内皮细胞增殖能力,近而可导致肿瘤细胞数目增多、体积增大以致细胞侵袭能力增强,新生血管的形成,为肿瘤细胞的生长提供充足的营养成分同时可以运出代谢产物;VEGF 可于血管内皮细胞酪氨酸激酶受体结合,改变血管通透性,为肿瘤细胞转移灶的形成提供条件[12]。本研究结果显示:在膀胱肿瘤细胞中,野生型 hepaCAM 转染可减少 VEGF 基因及蛋白的表达,提示 hepaCAM 基因通过影响 VEGF 的表达参与肿瘤的进程,该基因抑制膀胱癌细胞侵袭转移的机制可能是改变细胞 VEGF 的表达水平。HepaCAM 基因如何调控 VEGF 的表达,我们推测机制如下:HepaCAM 黏附分子数量和功能发生改变,影响肿瘤细胞之间的黏附能力,黏附的能力改变影响 VEGF 与其受体的结合效率,从而影响了细胞内的生物信号传递,进而改变肿瘤细胞生物学特征;HepaCAM 表达改变可影响细胞生长的微环境,微环境与肿瘤细胞细胞因子的分泌及 VEGF 表达的有重要关系[13]。此外,VEGF 转录调控是影响 VEGF 表达的另一个重要机制,目前研究[14]表明抑癌基因 P53、VHL 与 VEGF 的启动子调节有关。本实验结果提示一种可能:hepaCAM 的表达产物作用于 VEGF 的启动子,影响了 VEGF 的转录。

VEGF 是肿瘤治疗中的一个关键靶点,以 VEGF 为靶点的药物治疗在临床上取得了显著的效果[15]。且有研究[16]表明,VEGF 表达增多的患者生存率相对降低,提示 VEGF 在肿瘤治疗中的应用前景。基因治疗是继手术、免疫、药物及放射治疗之后的一种新型的治疗方法,它具有较高的特异性和较小的副作用等优点。本研究为基因治疗提供一个新的平台—hepaCAM 基因。可以通过基因治疗方法过表达 hepaCAM 基因,间接降低 VEGF 的表达,达到减低肿瘤恶性程度,减弱肿瘤侵袭转移能力,从而有效的治疗膀胱肿瘤。此外,本研究提示 hepaCAM 基因与 VEGF 的表达具有一定的联系,近而推测双靶点即 hepaCAM、VEGF 基因的联合基因治疗可能具有更佳、更有效的治疗效果。

参考文献:

[1] Tharakan S T, Inamoto T, Sung B, *et al*. Curcumin potentiates the antitumor effects of gemcitabine in an orthotopic model of human bladder cancer through suppression of proliferative and angiogenic biomarkers [J]. Biochem Pharmacol, 2010, 79(2): 218-228.

[2] 田军, 李长岭. 膀胱癌尿液生物学标记物的研究进展[J]. 现代泌尿外科杂志, 2008, 13(3): 239-240.

[3] 柳学春, 余菊玲, 高平, 等. 膀胱癌组织中 MMP-2 与 TIMP-2 的表达及相关性研究[J]. 数理医药学杂志, 2007, 20(6): 790-792.

[4] 王磊, 吴绮思, 罗春丽, 等. hepaCAM 基因对膀胱癌细胞体外生物学的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(21): 2051-2054.

[5] 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.
[6] 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.
[7] Lee L H, Moh M C, Zhang T, *et al*. The immunoglobulin-like cell adhesion molecule hepaCAM induces differentiation of human glioblastoma U373-MG cells[J]. J Cell Biochem, 2009, 107(6): 1129 - 1138.
[8] 荀春华, 罗春丽, 吴小候, 等. HepaCAM 基因转染对肾癌细胞侵袭活性的影响[J]. 肿瘤, 2008, 28(12): 1029 - 1033.
[9] Donmez G, Sullu Y, Baris S, *et al*. Vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and thrombospondin-1 (TSP-1) expression in urothelial carcinomas[J]. Pathol Res Pract, 2009, 205(12): 854 - 857.
[10] Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis[J]. Nat Med, 2000, 6(4): 389 - 395.
[11] Pasin E, Josephson D Y, Mitra A P, *et al*. Superficial bladder cancer: an update on etiology, molecular development, classification, and natural history[J]. Rev Urol, 2008, 10(1): 31 - 43.
[12] Katoh Y, Katoh M. Comparative integromics on VEGF family members[J]. Int J Oncol, 2006, 28(6): 1585 - 1589.
[13] Francavilla C, Maddaluno L, Cavallaro U. The functional role of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis[J]. Semin Cancer Biol, 2009, 19(5): 298 - 309.
[14] 陈治, 张利, 黄宗海. VEGF 基因表达调控机制的研究进展[J]. 国外医学: 生理病理科学与临床分册, 2000, 20(3): 190 - 192.
[15] Marty M, Pivot X. The potential of anti-vascular endothelial growth factor therapy in metastatic breast cancer: clinical experience with anti-angiogenic agents, focusing on bevacizumab[J]. Eur J Cancer, 2008, 44(7): 912 - 920.
[16] Slaton J W, Millikan R, Inoue K, *et al*. Correlation of metastasis related gene expression and relapse-free survival in patients with locally advanced bladder cancer treated with cystectomy and chemotherapy[J]. J Urol, 2004, 171(2 Pt 1): 570 - 574.

(**收稿**:2009-09-23;**修回**:2009-11-29)
(编辑 吴培红)

文章编号:1000-5404(2010)05-0493-01

个案与短篇

肺淋巴管平滑肌瘤病1例

刘丁瑗,陈 丽,戴晓天 (400038 重庆,第三军医大学西南医院呼吸内科)

[关键词] 肺;淋巴管肌瘤;病例报告
[中图法分类号] R734.2 **[文献标志码]** B

肺淋巴管平滑肌瘤病(pulmonary lymphangiomyomatosis, PLAM)是一种罕见的呈进行性发展的弥漫性肺间质疾病,其病因至今未明[1]。为提高对本病的认识,现报告经病理证实的1例PLAM。

1 临床资料

患者,女性,38岁,以"间断痰血6年,胸闷、气促6个月,加重1个月"于2009年7月2日入本院。既往反复多次出现双侧少量气胸。查体:双肺呼吸音稍粗,余(-)。实验室检查:血常规示WBC 3.7×10^9/L,余正常;血气分析示:$p(O_2)$ 51 mmHg、$p(CO_2)$ 33.4 mmHg。肺功能检查示中度混合性通气功能障碍,小气道功能明显减退,小气道阻力增高。胸部X线片(图1)示双肺呈网织结节状间质性浸润表现。胸部CT(图2)示双肺弥漫性分布大量薄壁囊腔,囊壁较光滑,囊腔大小不等,多在2~10 mm之间,囊内无液平,未见肿大淋巴结。纤维支气管镜检查正常。纤支镜活检病理示肺泡囊性变,部分肺泡壁平滑肌组织增生,间质伴淋巴细胞浸润;免疫组化示SMA、HMB-45均阳性(图3);结合临床表现、影像学特点、病理表现符合PLAM。后因呼吸困难进行性加重,氧合功能逐渐下降,放弃治疗出院。

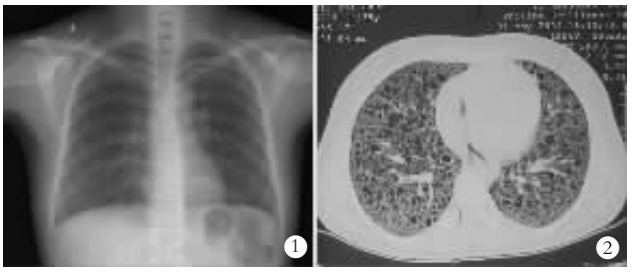
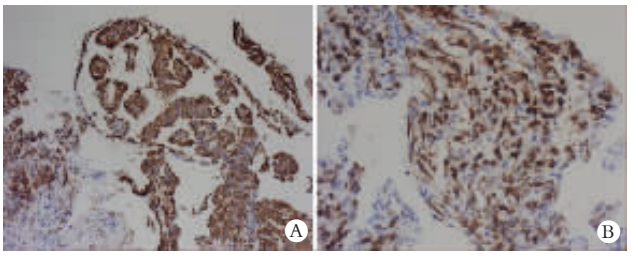


图1 肺淋巴管平滑肌瘤病患者X线片表现
图2 肺淋巴管平滑肌瘤病患者CT表现



A:SMA细胞质阳性(×200);B:HMB-45细胞质阳性(×100)
图3 肺淋巴管平滑肌瘤免疫组化观察 (S-P)

2 讨论

PLAM最早出现于Burell和Ross于1937年的尸检病例

(下转504页)

[通信作者] 戴晓天,E-mail: daixt1973@yahoo.com.cn