文章编号:1000-5404(2011)02-0141-04

论著

△Np63 基因沉默对膀胱癌细胞增殖和凋亡的影响及分子机制

张 翱[1],张家模[1],吴小候[2],何云锋[2] (402160 重庆 永川,重庆医科大学附属永川医院泌尿外科[1];400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院泌尿外科[2])

【摘要】 目的 探讨癌基因△Np63 对膀胱癌细胞增殖和凋亡的影响,并初步探讨其可能的分子机制。**方法** 通过将△Np63 特异性短发夹 RNA(△Np63-shRNA)和非特异性短发夹 RNA(Control-shRNA)转染膀胱移行细胞癌(transitional cell carcinoma of bladder, TCCB)5637 细胞,用半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和 Western blot 分别检测△Np63、$p27^{kip1}$、$p57^{kip2}$ mRNA 和蛋白的表达水平,WST-1 法检测细胞增殖活性,利用流式细胞术(FCM)检测细胞周期分布,TUNEL 法检测细胞凋亡情况。**结果** 特异性的△Np63-shRNA 能够有效地沉默△Np63 并上调 $p27^{kip1}$ 和 $p57^{kip2}$ 的基因和蛋白水平,转染△Np63-shRNA 的 5637 细胞的增殖能力明显受到抑制($P<0.05$),且明显促进了细胞的凋亡($P<0.05$)。**结论** 靶向△Np63 基因的 shRNA 片段可以有效的抑制人膀胱癌 5637 细胞的增殖并促进其凋亡,其可能的机制是通过上调 $p27^{kip1}$ 和 $p57^{kip2}$ 的表达实现的。

【关键词】 △Np63;膀胱癌;基因沉默;$p27^{kip1}$;$p57^{kip2}$
【中图法分类号】 R73-362;R730.23;R737.14 **【文献标志码】** A

Silencing △Np63 suppresses proliferation and improves apoptosis in transitional cell carcinoma of the bladder *in vitro* by upregulating $p27^{kip1}$ and $p57^{kip2}$

Zhang Xuan[1], Zhang Jiamo[1], Wu Xiaohou[2], He Yunfeng[2] ([1]Department of Urology, Yongchuan Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 402160; [2]Department of Urology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【Abstract】 Objective To investigate the influence of △Np63 gene on the proliferation and apoptosis of transitional cell carcinoma of bladder (TCCB) 5637 cells, and explore its underlying molecular mechanism. Methods TCCB 5637 cells were transfected with △Np63-shRNA or control-shRNA expression vector. mRNA and protein levels of △Np63, $p27^{kip1}$ and $p57^{kip2}$ were measured by RT-PCR and Western bolt analysis, respectively. The cell proliferation was assessed by WST-1 assay, the change in cell cycle was evaluated by flow cytometry, and cell apoptosis was detected by TUNEL. Results The specific shRNA targeted to △Np63 gene downregulated the expression of △Np63 and upregulated the expressions of $p27^{kip1}$ and $p57^{kip2}$ at mRNA and protein levels. The proliferation of 5637 cells was markedly inhibited and the apoptosis of 5637 cells was increased after transfection eith △Np63-shRNA ($P<0.05$). Conclusion △Np63-shRNA effectively inhibits the expression of △Np63, and suppresses cell growth and improves cell apoptosis by upregulating the expressions of $p27^{kip1}$ and $p57^{kip2}$.

【Key words】 △Np63; bladder neoplasm; gene silence; $p27^{kip1}$; $p57^{kip2}$

Supported by the Project of Chongqing Municipal Health Bureau (072032). Corresponding author: Wu Xiaohou, Tel: 86-23-89011122, E-mail: wuxiaohou80@hotmail.com

p63 是新发现的抑癌基因 p53 家族成员之一,主要包括转录激活(transcription activation p63,TAp63)和△Np63 两种亚型[1]。研究发现,△Np63 在人膀胱癌、肺癌、鼻咽癌和食道鳞状细胞癌中高表达[2-3]。与经典的抑癌基因 p53 不同,△Np63 被认为在膀胱癌的形成和发展中起到癌基因的作用,但其具体作用的机制尚不完全清楚。本实验通过 RNA 干扰技术沉默△Np63 基因后,观察其对细胞的增殖和凋亡的影响,并初步探讨其可能的机制和途径。

【基金项目】 重庆市卫生局计划项目(072032)
【通信作者】 吴小候,电话:(023)89011122,E-mail:wuxiaohou80@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 材料

膀胱移行细胞癌(transitional cell carcinoma of the bladder, TCCB)细胞株5637(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所),含△Np63-shRNA和非特异性shRNA(Control-shRNA)的pGenesil-1质粒表达载体由本室构建[4],Lipofectamine 2000(Invitrogen公司),RPMI1640培养基(Gibco公司),胎牛血清(杭州四季青公司),引物合成(上海华舜公司),逆转录PCR试剂盒(TaKaRa公司),△Np63、Cyclin D_1、CDK4、$p27^{kip1}$、$p57^{kip2}$—抗和辣根过氧化物酶标记二抗(Santa Cruz公司),BeyoECL荧光检测试剂(碧云天生物技术研究所),TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(北京中衫生物公司)BIO-RAD图像分析仪,Quantity One分析软件。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染 5637细胞用含10%胎牛血清的RPMI1640培养液,在37 ℃,5% CO_2孵育箱中常规培养。待其生长至80% ~90%汇合度时,分别将△Np63-shRNA和Control-shRNA质粒与脂质体Lipofectamine 2000按照1∶2转染5637细胞(方法参照产品说明书),37 ℃转染2 h后,改用常规培养。同时设立空白对照孔。分别在转染后24、48 h和72 h荧光显微镜观察荧光的表达。

1.2.2 RT-PCR方法检测 在细胞转染48 h后收集细胞,按Trizol试剂说明书操作提取细胞总RNA,取2 μl进行PCR反应,反应体系为25 μl,反应条件:94 ℃ 2 min;94 ℃变性1 min;53 ℃退火30 s;72 ℃延伸1 min 35个循环,最后72 ℃再次延伸7 min。产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳,在Bio-Rad图像分析仪拍照并进行条带灰度分析。PCR中△Np63、$p27^{kip1}$、$p57^{kip2}$和β-actin的引物见表1。

表1 RT-PCR引物

基因	引物序列(5′→3′)	PCR产物长度(bp)
△Np63	上游 TGCCCAGACTCAATTTAGTGAG	335
	下游 TCTGGATGGGGCATGTCTTTGC	
$p27^{kip1}$	上游 ATGTCAAACGTGCGAGTGTC	270
	下游 TCTGTAGTAGAACTCGGGCAA	
$p57^{kip2}$	上游 TCGCTGCCCGCGTTTGCGCA	289
	下游 CCGAGTCGCTGTCCACTTCGG	
β-actin	上游 CTACAATGAGCTGCGTGTGGC	240
	下游 CAGGTCCAGACGCAGGATGGC	

1.2.3 水溶性四氮唑(WST-1)检测细胞增殖 分别取△Np63-shRNA组、Control-shRNA组和对照组细胞,调整细胞数为1×10^4/ml,取200 μl接种于96孔细胞培养板中。分别于培养24、48、72 h后加入20 μl WST-1试剂继续培养4 h,然后用酶标仪检测450 nm波长各孔的光密度值[D(450)],每组设立3个复合孔。计算增殖抑制率。

增殖抑制率 = [1 − shRNA组D(450)值/对照组D(450)值)] ×100%

1.2.4 细胞周期检测 转染48 h后,收集△Np63-shRNA组、Control-shRNA组和对照组细胞,PBS洗2次,75%的乙醇4 ℃固定过夜,加入100 μg/ml RNase酶,10 mg/L碘化乙啶(Propidium iodide, PI)染色后,4 ℃避光反应20 min,在激发光488 mm、检测光610 mm下用流式细胞仪(FACS)检测细胞周期。

1.2.5 TUNEL法检测细胞凋亡 转染48 h后,分别收集△Np63-shRNA组、Control-shRNA组和对照组细胞进行细胞爬片,做TUNEL染色(方法参照产品说明书)检测细胞凋亡,凋亡细胞细胞核呈棕黄色,每张爬片在高倍镜下随机观察5个视野,凋亡率=凋亡细胞数/细胞总数×100%。

1.2.6 Western blot分析 细胞转染48 h后收集各组细胞,加入细胞裂解液,细胞裂解物经过超声破碎处理后,4 ℃ 16 000×g离心15 min,收集上清液,采用Brandford法检测蛋白浓度。30 μg上清液经10% SDS-PAGE凝胶电泳分离后将蛋白转移到PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温封闭后,分别用△Np63、$p27^{kip1}$、$p57^{kip2}$、Cyclin D_1、CDK4和β-actin作为一抗,辣根过氧化物酶标记的抗体作为二抗,用ECL化学发光法检测拍照。

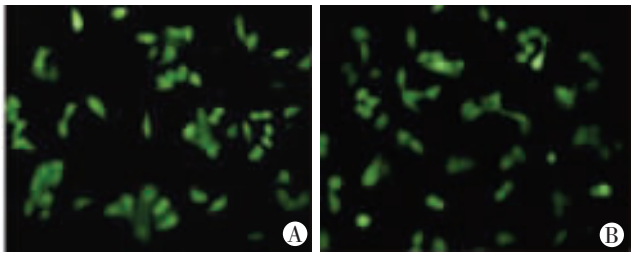
1.3 统计学分析

计量数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 17.0统计软件进行单因素方差分析及SNK-q检验。

2 结果

2.1 △Np63-shRNA转染5637细胞

△Np63-shRNA质粒和Control-shRNA质粒转染6 h后在荧光显微镜下可见有荧光表达。随着时间的延长,荧光强度逐渐增强。在转染48 h时,转染率分别为(38.3±2.3)%和(37.7±3.6)%,荧光强度达到峰值(图1)。荧光持续时间较长,在2个月时仍有荧光表达。说明质粒成功转染5637细胞。

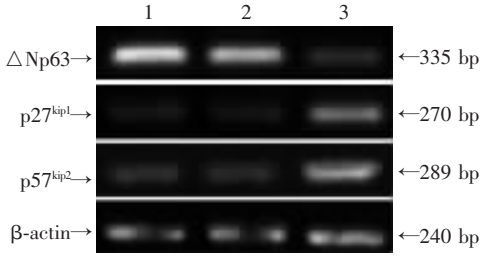


A:△Np63-shRNA质粒;B:Control-shRNA质粒

图1 荧光显微镜观察shRNA转染48 h的5637细胞 (×200)

2.2 △Np63基因沉默对细胞周期相关mRNA的影响

5637细胞经△Np63-shRNA转染48 h后,RT-PCR检测表明转染后△Np63 mRNA较Control-shRNA组和对照组明显降低,$p27^{kip1}$和$p57^{kip2}$的mRNA较Control-shRNA组和对照组明显增加,差异均有统计学意义($P<0.05$),Control-shRNA组和对照组间无明显差别。见图2。



1:对照组;2:Control-shRNA组;3:△Np63-shRNA组

图2 RT-PCR检测5637细胞中△Np63、$p27^{kip1}$和$p57^{kip2}$ mRNA的表达

2.3 △Np63 基因沉默对细胞增殖的抑制效应

△Np63-shRNA 对 5637 细胞增殖有明显的抑制作用，呈现明显的时间依耐性，△Np63-shRNA 转染细胞在 24 h 后出现明显的生长抑制，48 h 后抑制作用明显增强，差异具有统计学意义（$P<0.05$），但 Control-shRNA 质粒对 5637 细胞没有生长抑制作用（表 2）。

表 2 △Np63-shRNA 对肿瘤细胞的增殖影响（%）

组别	24 h	48 h	72 h
Control-shRNA 组	0 ± 0.4	0.3 ± 0.3	0.4 ± 0.5
△Np63-shRNA 组	12.3 ± 5.8[a]	42.7 ± 6.7[ab]	51.9 ± 7.1[a]

a：$P<0.05$，与对照组（0）和 Control-shRNA 组比较；b：$P<0.05$，与 24 h 和 72 h 比较

2.4 △Np63 基因沉默对细胞增殖周期的影响

流式细胞术检测检测显示（表 3），△Np63-shRNA 转染肿瘤细胞 48 h 后，G_0/G_1 期细胞比例增加，S 和 G_2/M 期细胞比例相应下降，差异有统计学意义（$P<0.05$），Control-shRNA 和对照组细胞的细胞周期分布差异无统计学意义。表明△Np63-shRNA 能调控 5637 细胞阻滞于 G_0/G_1 期，并减少其 S 和 G_2/M 期细胞。

表 3 △Np63-shRNA 转染 48 h 后对肿瘤细胞周期的影响（%）

组别	G_0/G_1	S	G_2/M
对照组	59.18 ± 1.58	21.16 ± 1.64	19.26 ± 0.93
Control-shRNA 组	58.34 ± 2.14	19.87 ± 1.35	21.39 ± 2.27
△Np63-shRNA 组	74.36 ± 3.69[a]	10.56 ± 2.31[a]	14.62 ± 2.17[a]

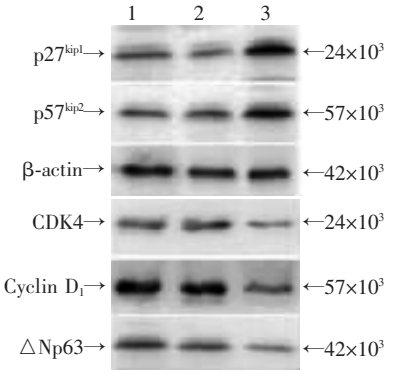
a：$P<0.05$，与对照组和 Control-shRNA 组比较

2.5 △Np63 基因沉默对细胞凋亡的影响

TUNEL 检测显示，△Np63-shRNA、Control-shRNA 组和对照组的凋亡率分别为（19.34 ± 5.1）%、（8.39 ± 2.32）%、（7.95 ± 3.41）%，△Np63-shRNA 的凋亡细胞明显增加，差异有显著性（$P<0.05$），而 Control-shRNA 组和对照组细胞凋亡率差异无统计学意义（$P>0.05$）。

2.6 △Np63 基因沉默对细胞周期相关蛋白的影响

转染 48 h 后，△Np63-shRNA 组中 △Np63、Cyclin D_1 和 CDK4 蛋白的表达较 Control-shRNA 组和对照组明显减少，同时△Np63-shRNA 组中 $p27^{kip1}$ 和 $p57^{kip2}$ 蛋白的表达较 Control-shRNA 组和对照组明显增加（图 3），差异均具有统计学意义（$P<0.01$）。



1：对照组 2：Control-shRNA 组 3：△Np63-shRNA 组

图 3 Western bolt 检测△Np63-shRNA 转染 48 h 后对蛋白的影响

3 讨论

p63 是肿瘤抑制蛋白 p53 家族成员之一，其序列和功能与 p53 有很高的同源性，N 端激活区（TA）有 22% 一致，DNA 结合区（DBD）有 60% 一致，低聚化区 C 端有 37% 一致[1]。高度的相似性使 p63 蛋白在体内外均可以同 p53DNA 结合区结合[5]，能够通过调节 p53 基因调节细胞周期和细胞凋亡。由于启动子和剪切子的不同，p63 可以编码两类 6 种产物，分别命名为 TAp63α、TAp63β、TAp63γ、△Np63α、△Np63β 和 △Np63γ。缺乏酸性 N 端反式激活区的△Np63 可与 p53 作用于相同的下游靶基因，且亲和力强于野生型 p53，竞争性抑制 p53 诱导细胞周期阻滞及细胞凋亡的功能，对抗 TAp63 和 p53 基因的功能[6]。包括膀胱癌在内的大量肿瘤的发生和发展与△Np63 基因的高表达或超表达呈明显的正相关。Park 等[7] 发现 4 种膀胱癌细胞系中有 2 种高表达 ΔNp63，同时又发现 ΔNp63 在 47 例原发膀胱癌中异常高度表达率为 63.8%。Fukushima 等[8] 研究发现，ΔNp63 亚型对膀胱癌的发展具有加速作用及同时使其具有较强的侵袭性。本实验采用 RNA 干扰技术沉默 5637 细胞中△Np63 基因，并观察其对细胞的生物学的影响，发现△Np63-shRNA 能够明显沉默△Np63 mRNA 和蛋白，转染肿瘤细胞的增殖率较 Control-shRNA 组和对照组明显减弱，与△Np63 是致癌基因并且促进肿瘤细胞的增殖和诱导肿瘤的发生的观点一致。

细胞周期进程是由一系列调控因子有序的聚合和激活而实现的精确调控，其正常与否与细胞的生长、分化、衰老和癌变密切相关。目前认为，细胞周期进程调控紊乱是导致肿瘤发生和发展的直接原因。参与细胞周期调控的主要分子有细胞周期蛋白（Cyclin），细胞周期蛋白依赖性激酶（Cyclin dependent kinases，CDKs）和 CDK 抑制蛋白（Cyclin dependent kinase inhibitors，CDKI）。其中 CDKI 通过与细胞周期蛋白、CDK 或细胞周期蛋白-CDK 复合物的结合，负调控 CDK 活性，导致细胞周期停止，阻断细胞的增殖过程，从而抑制肿瘤的发生。CDKI 分为两大类[9]：一类为 INK4，包括 p16、p15、p18 和 p19，能特异性抑制 CyclinD-CDK4/CDK6 的磷酸化激酶活性；另一类为 Cip/Kip，包括 $p21^{Cip1/waf1}$、$p27^{kip1}$、$p57^{kip2}$ 等，能广泛作用于各种 Cyclin-CDK 复合物。因此，CDKI 被认为是潜在的肿瘤抑制因子或抑癌基因。

研究发现，$p27^{kip1}$ 和 $p57^{kip2}$ mRNA 的减少与肿瘤

的发生发展密切相关[10]。$p27^{kip1}$与$p21^{Cip1/waf1}$均属于有丝分裂抑制因子,在调节细胞周期中起负调节作用,可抑制细胞增殖,主要抑制 CyclinE-CDK2 和细胞 CyclinD-CDK4 等 G_1 期激酶复合物,$p27^{kip1}$可以抑制 CDK4 Thr172 和 CDK2 Thr160 的磷酸化,阻止 CDK 活化激酶(CDK-activiting kinse,CAK)与 CDK4 的结合;同时$p27^{kip1}$可以与 Cyclin-CDK 复合物结合,改变空间构象,从而抑制其活性,阻止细胞周期由 G_1 期向 S 期转换。$p57^{kip2}$是细胞周期负性调控因子,与 p21、p27 功能相似,$p57^{kip2}$蛋白与 Cyclin-CDK 复合物结合,阻止细胞增殖,从而使细胞周期停滞在 G_1 期,它的结合是 Cyclin 依赖的,主要抑制 CyclinE-CDK2,CyclinA-CDK2 和 CyclinD-CDK2 等 G_1 期和 S 期激酶复合物,使细胞不能通过 G_1 期[11]。研究发现,$p57^{kip2}$可以诱导肿瘤细胞凋亡[12]。

本研究发现,通过 RNA 干扰技术沉默△Np63 基因后,$p27^{kip1}$和 $p57^{kip2}$蛋白和 mRNA 的表达量明显增加,且细胞出现增长抑制和凋亡。说明△Np63 可以下调 $p27^{kip1}$和 $p57^{kip2}$,过度表达的可能是通过抑制 $p27^{kip1}$和 $p57^{kip2}$的表达促进细胞增殖。我们推测△Np63 的机制可能有:首先,研究发现,△Np63 可以竞争性的触发 p53 下游基因 $p21^{Cip1/waf1}$,拮抗 p53 的调节作用,因此,△Np63 沉默后,通过上调 $p21^{Cip1/waf1}$的表达,从而抑制 Cyclin D_1表达,导致 CDK4、CDK6 不能显出丝氨酸或苏氨酸蛋白激酶的活性和 Rb 蛋白不能被磷酸化,失去了细胞通过 G_1/S 调控点的调控[13-14];其次,△Np63 能够识别 $p57^{kip2}$的启动子,从而能调节其 mRNA和蛋白的表达[15],△Np63 也可能以 $p21^{Cip1/waf1}$同样的方式下调 5637 细胞中 $p27^{kip1}$和 $p57^{kip2}$的表达,也能对细胞周期产生促进作用;第三,ΔNp63 可以诱导某些凋亡抑制蛋白下调和凋亡蛋白的产生表达从而产生肿瘤抑制作用,ΔNp63 的表达增加导致胰岛素样生长因子结合蛋白3(IGFBP-3)表达下降,对肿瘤生长产生促进作用[16],同时下调对肿瘤细胞凋亡作用的 $p57^{kip2}$[12],因此,可以通过沉默 ΔNp63 基因诱导肿瘤细胞凋亡。由此可见,△Np63 与膀胱癌的发生密切相关,通过 RNA 干扰技术沉默△Np63 为膀胱癌的治疗提供了新的思路。

参考文献:

[1] Barbieri C E, Pietenpol J A. p63 and epithelial biology[J]. Exp Cell Res, 2006, 312(6): 695-706.

[2] Fang W Y, Liu T F, Xie W B, *et al*. Reexploring the possible roles of some genes associated with nasopharyngeal carcinoma using microarray-based detection[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2005, 37(8): 541-546.

[3] Thurfjell N, Coates P J, Uusitalo T, *et al*. Complex p63 mRNA isoform expression patterns in squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. Int J Oncol, 2004, 25(1): 27-35.

[4] He Y, Wu X, Tang W, *et al*. Impaired delta NP63 expression is associated with poor tumor development in transitional cell carcinoma of the bladder[J]. J Korean Med Sci, 2008, 23(5): 825-832.

[5] Westfall M D, Mays D J, Sniezek J C, *et al*. The Delta Np63 alpha phosphoprotein binds the p21 and 14-3-3 sigma promoters *in vivo* and has transcriptional repressor activity that is reduced by Hay-Wells syndrome-derived mutations[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(7): 2264-2276.

[6] Moll U M, Slade N. p63 and p73: roles in development and tumor formation[J]. Mol Cancer Res, 2004, 2(7): 371-386.

[7] Park B J, Lee S J, Kim J I, *et al*. Frequent alteration of p63 expression in human primary bladder carcinomas[J]. Cancer Res, 2000, 60(13): 3370-3374.

[8] Fukushima H, Koga F, Kawakami S, *et al*. Loss of DeltaNp63alpha promotes invasion of urothelial carcinomas *via* N-cadherin/Src homology and collagen/extracellular signal-regulated kinase pathway[J]. Cancer Res, 2009, 69(24): 9263-9270.

[9] Maddika S, Ande S R, Panigrahi S, *et al*. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy[J]. Drug Resist Updat, 2007, 10(1/2): 13-29.

[10] Pateras I S, Apostolopoulou K, Koutsami M, *et al*. Downregulation of the KIP family members p27(KIP1) and p57(KIP2) by SKP2 and the role of methylation in p57(KIP2) inactivation in nonsmall cell lung cancer[J]. Int J Cancer, 2006, 119(11): 2546-2556.

[11] Rosenberg, E, Demopoulos R I, Zeleniuch-Jacquotte A, *et al*. Expression of cell cycle regulators p57(kip2), cyclin D1, and cyclin E in epithelial ovarian tumors and survival[J]. Hum Pathol, 2001, 32(8): 808-813.

[12] Vlachos P, Nyman U, Hajji N, *et al*. The cell cycle inhibitor p57(Kip2) promotes cell death *via* the mitochondrial apoptotic pathway[J]. Cell Death Differ, 2007, 14(8): 1497-1507.

[13] Monica S M, George F. Regulation of the cell cycle [M]//Mendelson J, Howley P M, Isreal M A, *et al*, eds. The molecular basis of cancer. 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2001: 10-17.

[14] 何云锋, 吴小候, 唐伟, 等. 人膀胱癌荷瘤鼠中 shRNA 沉默 ΔNp63 基因对肿瘤的抑制和 cyclin D1 表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(1): 46-50.

[15] Beretta C, Chiarelli A, Testoni B, *et al*. Regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p57Kip2 expression by p63[J]. Cell Cycle, 2005, 4(11): 1625-1631.

[16] Barbieri C E, Perez C A, Johnson K N, *et al*. IGFBP-3 is a direct target of transcriptional regulation by DeltaNp63alpha in squamous epithelium[J]. Cancer Res, 2005, 65(6): 2314-2320.

(收稿:2010-08-09 修回:2010-10-01)

(编辑 汪勤俭)