论著

文章编号:1000-5404(2014)14-1460-07

下调血管生成素对人膀胱癌T24细胞增殖、凋亡的影响

舒 静,田文琳,李 林,刘玉林,陈俊霞 (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院细胞生物学与遗传学教研室,分子医学与肿瘤研究中心)

[摘要] **目的** 构建人血管生成素(angiogenin,ANG)基因siRNA干扰质粒,检测其对膀胱癌T24细胞增殖、凋亡的影响。**方法** 将针对人ANG基因siRNA表达质粒和无同源性的对照质粒稳定转染T24细胞后经G418筛选出阳性克隆。根据转染质粒不同分为3组:T24组(未转染组)、T24-NC组(转染阴性对照质粒组)、T24-siANG组(转染干扰质粒组)。通过RT-PCR检测T24细胞中ANG的mRNA表达水平,Western blot检测ANG蛋白的表达;MTT法检测细胞增殖活力;流式细胞术、TUNEL及Hochest 33342检测细胞凋亡;Western blot检测凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax及Caspase-3的表达;构建BALB/c裸鼠[4~6周龄,体质量(20±3)g]移植瘤模型,组织HE染色和免疫荧光CD31检测微血管变化;组织免疫化学方法检测移植瘤中ANG、Bax、Caspase-3、Bcl-2的表达。**结果** 酶切和测序结果证明重组质粒构建成功;T24-siANG组ANG的mRNA水平及蛋白表达水平显著降低($P<0.05$);T24-siANG组细胞增殖活力明显下降($P<0.05$);流式细胞仪检测结果显示:与T24-NC组和T24细胞组相比,T24-siANG组细胞的凋亡率明显升高($P<0.01$);TUNEL检测结果显示:T24-siANG组出现大量凋亡细胞;Hochest检测结果显示:T24-siANG组出现典型的凋亡形态特征如染色质凝集、核碎裂和明亮的蓝色荧光等;Western blot结果显示,在T24-siANG组中,Bcl-2的表达明显降低($P<0.01$),而Bax和激活的Caspase-3的表达明显升高($P<0.05$);组织HE染色和组织免疫荧光显示:T24-siANG组肿瘤微血管生成较T24与T24-NC组明显减少($P<0.01$);组织免疫化学结果也表明:T24-siANG组ANG、Bcl-2蛋白显著降低,而Bax、活化的Caspase-3蛋白明显升高。**结论** 成功构建的干扰质粒通过降低ANG的表达、抑制膀胱癌T24细胞的增殖、调节凋亡关键蛋白的表达,从而促进膀胱癌T24细胞的凋亡。

[关键词] 血管生成素;膀胱癌;增殖;凋亡

[中图法分类号] R394-33;R730.23;R737.14 [文献标志码] A

Effect of down-regulating human angiogenin on proliferation and apoptosis in human bladder cancer T24 cells

Shu Jing, Tian Wenlin, Li Lin, Liu Yulin, Chen Junxia (Department of Cell Biology and Genetics, Molecular Medicine and Cancer Research Center, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of angiogenin (ANG) down-regulation on the proliferation and apoptosis in human bladder cancer T24 cells. **Methods** An ANG-targeting siRNA vector and a non-homologous negative control were designed to transfect human bladder cancer T24 cells with Lipofectamine 2000, and the positive clones were screened by G418 and then named as T24-siANG and T24-NC, respectively. T24 cells without transfection were named as control (T24 group). The expression of ANG at mRNA and protein levels was detected by RT-PCR and Western blotting. Cell proliferative activity was determined by MTT assay. Cell apoptosis was evaluated by TUNEL kit, Hochest (33342) and flow cytometry. The expression of caspase-3, Bax and Bcl-2 was determined by Western blotting. The tumor cells of the 3 groups of cells at 2×10^6 were respectively injected into the back of BALB/c nude mice (4 to 6 weekes, 20±3 g) to establish the xenograft models. The changes of micro-blood vessels in tumor tissue and the expression of CD31 were detected by immunofluorescence and HE staining. Immunohistochemical assay was used to detect

[基金项目] 国家自然科学基金(81372203)

[通信作者] 陈俊霞,电话:(023)68485806,E-mail:chjunxia@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140424.1042.010.html(2014-04-24)

the expression of ANG, Bax, Bcl-2 and caspase-3 in the tumors. **Results** Enzyme digestion and DNA sequencing verified the vectors was correctly constructed. The ANG expression at mRNA and protein levels was significantly decreased in the T24-siANG group ($P < 0.05$), and the cell proliferative activity reduced markedly ($P < 0.05$). Flow cytometry showed that the apoptotic rate was obviously higher in the T24-siANG cells than in the T24-NC cells and the T24 cells ($P < 0.01$). The number of TUNEL-positive cells was significantly higher in the T24-siANG cells than in the T24 cells and the T24-NC cells. The results of Hochest demonstrated that T24-siANG cells appeared typical apoptotic morphology features such as chromatin condensation, nuclear fragmentation and brighter blue fluorescence. However, the control cells did not have such apoptotic characteristics. BALB/c nude mice injected with the T24-siANG cells showed lower density of tumor microvessel and lower CD31 expression than those with the control cells ($P < 0.01$). Immunohistochemical assay results proved that the expression of Bcl-2 was significantly decreased in the T24-siANG cells as compared to that in the T24 and T24-NC cells ($P < 0.01$), but the expression of caspase-3 and Bax was stably increased ($P < 0.05$). **Conclusion** The plasmid expressing ANG-targeting siRNA down-regulates ANG expression and inhibits the proliferation of T24 cells significantly, and thus induces apoptosis in bladder cancer T24 cells by regulating apoptosis-related proteins caspase-3, Bax and Bcl-2.

[**Key words**] angiogenin; bladder cancer; proliferation; apoptosis

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81372203). Corresponding author: Chen Junxia, Tel: 86-23-68485806, E-mail: chjunxia@126.com

血管生成素(angiogenin, ANG)是1985年由美国哈佛大学医学院Fett等首次从人结肠腺癌HT-29细胞系培养基的上清中分离纯化的小分子蛋白质。ANG是一种多功能的重要碱性分泌蛋白,与胰核糖核酸酶(pancreatic ribonuclease)的序列有35%的同源性,能激活胞外蛋白酶系统及介导细胞粘附、活化信号转导通路,促进rRNA转录和核转移[1]。研究表明[2],ANG的表达和活性在前列腺癌、肺癌等多种恶性肿瘤中均有升高。为了进一步探讨ANG的功能,本实验通过RNA干扰技术下调膀胱癌T24细胞ANG的表达,并探讨ANG表达下调对凋亡关键蛋白(Bcl-2、Bax及Caspase-3)表达及细胞增殖、凋亡的影响,为膀胱癌的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及动物

RPMI1640培养基、标准胎牛血清购于天津灏洋(TBD)公司;质粒抽提纯化试剂盒、TRIzol试剂盒、反转录试剂盒、2×*Taq*Mix、*Sal* Ⅰ等购于大连宝生物公司;转染试剂盒Lipofectamine 2000购于Invitrogen公司;TUNEL凋亡检测试剂盒、Hochest33342试剂购自Biyotime生物技术公司;ANG抗体(兔抗人)购自美国Santa Cruz公司;Bcl-2、Bax、Casepase-3、β-actin购自美国Bioworld公司;人膀胱癌细胞株T24、质粒pGenesil-1来自本实验保存。BALB/c裸鼠32只,4~6周龄,体质量(20±3)g,购于北京大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 T24-siANG干扰质粒的构建与鉴定 根据GenBank提供人ANG基因的cDNA序列(NM_001097577),应用Ambion在线软件设计出小干扰RNA(siRNA)和1条与任何基因均无同源性的阴性对照组序列分别命名为T24-siANG$_1$、T24-siANG$_2$。T24-siANG$_1$正义链:5′-GATCCGGAATGGAAACCCTCACAGATTCAAGAGATCTGTGAGGGTTTCCATTCTTTTTTGTCGACA-3′,反义链:5′-AGCTTGTCGACAAAAAAGAATGGAAACCCTCACAGATCTCTTGAATCTGTGAGGGTTTCCATTCCG-3′;T24-siANG$_2$阴性对照正义链:5′-GATCCGCGCAGAAAACGAGACACGAGATTCAAGAGATCTCGTGTCTCGTTTTCTGCGTTTTTTGTCGACA-3′,反义链:5′-AGCTTGTCGACAAAAAAACGCAGAAAACGAGACACGAGATCTCTTGAATCTCGTGTCTCGTTTTCTGCGCG-3′。然后分别在上游5′和3′端引入*Bam*HⅠ和*Hind*Ⅲ酶切位点,且为了便于鉴定,同时在*Hind*Ⅲ前加入*Sal*Ⅰ的酶切位点。引物均由上海生工有限公司合成。DNA模板单链退火后,经*Bam*HⅠ和*Hind*Ⅲ双酶切的空载体pGenesil-1连接,转化至DH2α扩增,提取重组质粒单酶切*Sal*Ⅰ鉴定,阳性克隆送上海生工生物工程技术公司测序并命名为pGenesil-1 siRNA-1、pGenesil-1 siRNA-2阴性对照。

1.2.2 人膀胱癌T24细胞培养、转染

1.2.2.1 细胞培养 用含10%的标准胎牛血清培养基培养(37 ℃、5% CO_2)T24细胞。

1.2.2.2 细胞转染与分组 取对数期细胞接种于6孔板中培养,细胞数量达70%~80%用Lipofectamine 2000分别转染不同的质粒到细胞。根据转染质粒不同分别命名为T24细胞组(未转染组)、T24-NC组(转染阴性对照质粒组)、T24-siANG

组(转染干扰质粒组)。

1.2.3 筛选稳定转染ANG的细胞株 阴性对照质粒、干扰质粒转染24 h后传代,48 h后用400 μg/mL G418筛选,14 d后采用有限稀释法挑选绿色荧光团接种于24孔板培养和96孔板。10~14 d后消化单克隆细胞团、扩大培养。

1.2.4 各组细胞ANG基因表达的检测

1.2.4.1 RT-PCR检测细胞ANG的mRNA表达水平 TRIzol试剂盒提取各组细胞总mRNA,RT-PCR试剂盒检测各组细胞ANG的表达量。ANG基因上游引物:5′-CAGCACTATGATGCCAAACCAC-3′,下游引物:5′-GAAATGGAAGGCAAGGACAGC-3′;GAPDH基因上游引物:5′-GCTGTCCCTGTCGCCTCTG-3′,下游引物:5′-TGCCGATGGTGATGACCTGG-3′。反应条件:95 ℃预变形5 min,95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 90 s,30个循环。PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳检测后、凝胶成像仪显影,Quantity One分析ANG与β-actin相对强度比值。

1.2.4.2 Western blot检测ANG蛋白的表达 提取各组稳定转染细胞的总蛋白,经SDS-PAGE凝胶电泳,湿转至PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭2 h,一抗4 ℃孵育过夜(ANG 1∶100,β-actin 1∶2 000);HRP标记的羊抗兔(1∶2 000)二抗常温孵育2 h,ECL发光显色并进行ANG与β-actin相对强度的比值分析。

1.2.5 MTT检测T24细胞的增殖 将对数期各组细胞,以2×10^3/孔接种于96孔培养板,每组设8个复孔进行常规培养,分别于培养24、48、72、96、120 h后,加MTT溶液20 μL/孔并继续培养4 h,去除培养基,加150 μL DMSO/孔,酶联免疫检测仪检测490 nm波长下各孔光密度值[D(490)]。细胞生长抑制率=[1-实验组D(490)值/对照组D(490)值]×100%。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡 取对数生长期各组稳定转染的细胞,胰酶消化,PBS洗3次,70%乙醇4 ℃固定2 h,流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.7 TUNEL检测细胞凋亡 取对数生长期的各组细胞,每孔2×10^6细胞接种于放有盖玻片的6孔板,细胞融合度达70%,PBS洗3次,4%多聚甲醛固定1 h,0.1% Triton X-100通透5 min;每组加入50 μL TUNEL检测液,37 ℃避光孵育1 h,PBS洗3次,甘油封片后荧光显微镜观察拍照。

1.2.8 Hochest33342检测细胞凋亡 各组以2×10^6细胞接种于放有盖玻片的6孔板中,细胞融合度达70%,PBS洗3次,4%多聚甲醛固定1 h,PBS洗3次,每个样品孔加入150 μL按比例稀释后的Hochest检测液,37 ℃避光孵育30 min,PBS洗3次,甘油封片后荧光显微镜观察拍照。

1.2.9 Western blot检测细胞Bcl-2、Bax及Caspase-3蛋白的表达 蛋白裂解液提取各组细胞总蛋白,12% SDS-PAGE凝胶电泳,常规湿法转膜,5%脱脂奶粉封闭2 h,一抗4 ℃孵育过夜[Bcl-2,Bax,Caspase-3(1∶150),β-actin(1∶2 000)];HRP标记的羊抗兔(1∶2 000)二抗常温孵育2 h,ECL发光显色并进行ANG与β-actin相对强度的比值分析。

1.2.10 动物水平检测下调ANG对T24细胞凋亡蛋白的影响

1.2.10.1 动物移植瘤模型 收集对数期细胞,用无血培养基制备2×10^7/mL细胞悬液,分别皮下注射BALB/c裸鼠0.1 mL,每组8只。记录各组肿瘤形成时间,6周后处死裸鼠,取肿瘤组织并固定于4%多聚甲醛溶液中。

1.2.10.2 HE染色 10%甲醛溶液固定肿瘤组织,5 μm切片,二甲苯、梯度乙醇脱蜡至水,自来水冲洗,二甲苯和纯酒精(1∶1)混合液中浸泡5 min,经梯度酒精浸泡各5 min,苏木精染色3 min,1%盐酸酒精分色数秒,流水冲洗,蒸馏水清洗3次,伊红染色3 min,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察并拍照。

1.2.10.3 组织免疫荧光检测血管CD31 肿瘤组织经冰冻切片后,4%多聚甲醛溶液固定15 min,PBS洗3次,0.1% Triton X-100通透10 min,PBS洗3次,0.03%双氧水封闭内源性过氧化物酶20 min,1% BSA封闭30 min,一抗兔抗人(CD31;1∶100)4 ℃孵育过夜,PBS洗3次,滴加Fluorescein标记的羊抗兔二抗,37 ℃孵育30 min,PBS洗3次,50%甘油封片,荧光显微镜观察拍片。

1.2.10.4 免疫组织化学观察各组移植瘤中ANG、Bax、Caspase-3及Bcl-2的表达 取固定于4%多聚甲醛溶液的肿瘤组织,石蜡包埋,5 μm切片,二甲苯、梯度乙醇脱蜡至水,自来水冲洗,PBS洗3次,3%过氧化氢灭活过氧化物酶,PBS洗3次,枸橼酸钠修复抗原,PBS洗3次,5%羊血清封闭,一抗(ANG 1∶50,Caspase-3 1∶200,Bax及Bcl-2均1∶100)4 ℃孵育过夜,PBS洗3次,滴加生物素化山羊抗兔,37 ℃孵育30 min,PBS洗3次,滴加链霉素抗生素-过氧化物酶溶液37 ℃孵育20 min,PBS洗3次,DAB显色,复染,晾干,中性树脂封片,观察拍片。

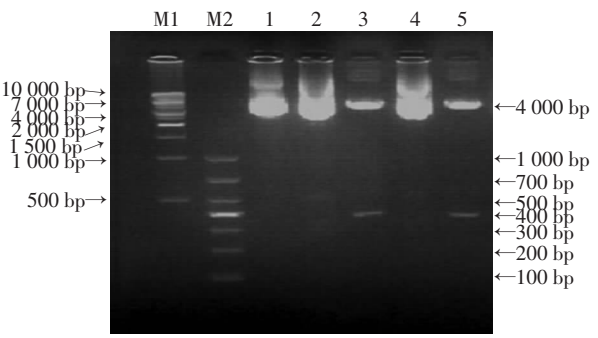
1.3 统计学分析

采用SPSS 11.5统计软件进行分析,实验数据以$\bar{x}\pm s$表示,配对组间比较采用t检验、多组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 ANG基因siRNA重组质粒酶切和测序鉴定

重组质粒被*Sal* Ⅰ单酶切为400 bp与4 400 bp左右的2个片段,证明人ANG基因已成功插入到载体中;测序结果显示,重组质粒的目的序列与设计的寡核苷酸序列一致,表明重组质粒鉴定正确。见图1。

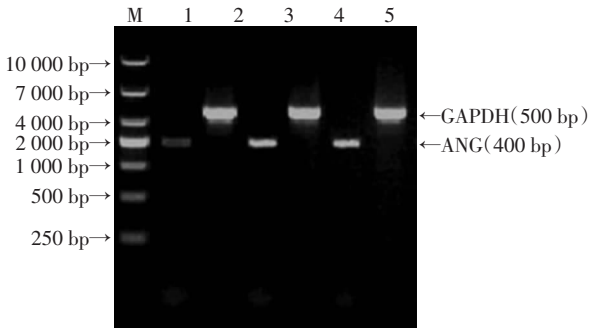


M1:标准(10 000 bp);M2:标准(1 000 bp);1:pGenesil-1质粒;2:pGenesil-1 siRNA-1质粒;3:pGenesil-1 siRNA-1质粒酶切;4:pGenesil-1 siRNA-2阴性对照质粒;5:pGenesil-1 siRNA-2阴性对照质粒酶切

图1 重组质粒单酶切鉴定结果

2.2 ANG siRNA 在各组 T24 细胞中的表达

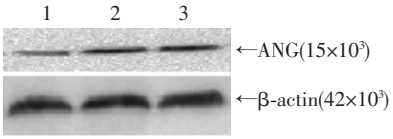
2.2.1 T24 细胞 ANG mRNA 的表达水平 与 T24-NC 组(0.75 ± 0.04)和 T24 组(0.71 ± 0.06)相比,T24-siANG 组(0.44 ± 0.07)细胞的 ANG mRNA 表达分别降低了 41% 和 38%,差异有统计学意义($P < 0.05$),而对照组间无明显差异($P > 0.05$)。见图 2。



M:标准(1 000 bp);1、2:T24-siANG 组;3、4:T24-NC 组;5、6:T24 组;1、3、5:ANG mRNA;2、4、6:GAPDH mRNA

图 2 RT-PCR 检测各组细胞 ANG mRNA 的表达

2.2.2 T24 细胞 ANG 蛋白表达 与 T24-NC 组和 T24 组相比,T24-siANG 组的 ANG 蛋白表达降低了 45% 和 49%,差异有统计学意义($P < 0.01$),而两对照组间无明显差异($P > 0.05$)。见图 3。



1:T24-siANG 组;2:T24-NC 组;3:T24 组

图 3 Western blot 检测各组细胞 ANG 蛋白的表达

2.3 各组细胞增殖活力的变化

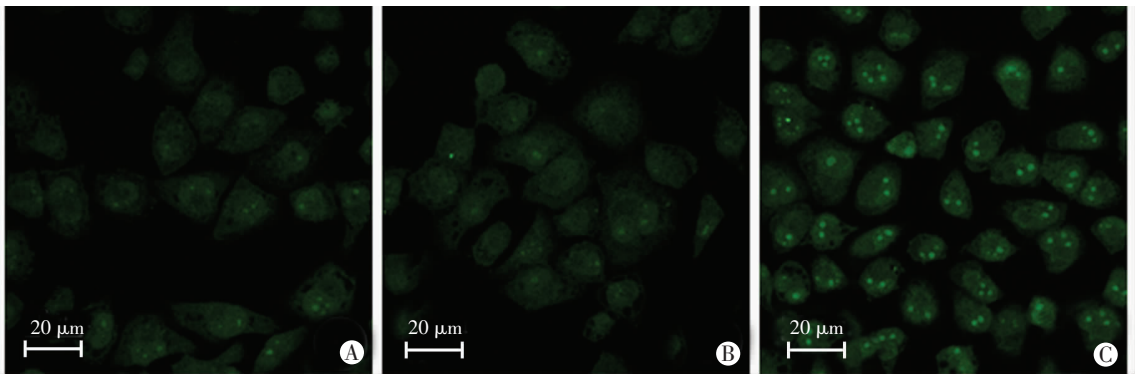
T24-siANG 细胞组的 $D(490)$ 值于接种后第 2 天开始显著低于 T24-NC 组和 T24 组($P < 0.05$),接种 48、72、96、120 h,T24-siANG 组细胞抑制率分别是 18%、27%、36%、42%,而对照组间无明显差异($P > 0.05$)。

2.4 各组细胞凋亡检测结果

2.4.1 流式细胞仪检测细胞凋亡 T24-siANG 组有(30.23 ± 15.81)% 的凋亡细胞($P < 0.01$),而 T24-NC 组和 T24 细胞组仅有(5.44 ± 3.09)% 和(3.96 ± 1.58)% 的凋亡细胞,且两对照间无统计学差异($P > 0.05$)。

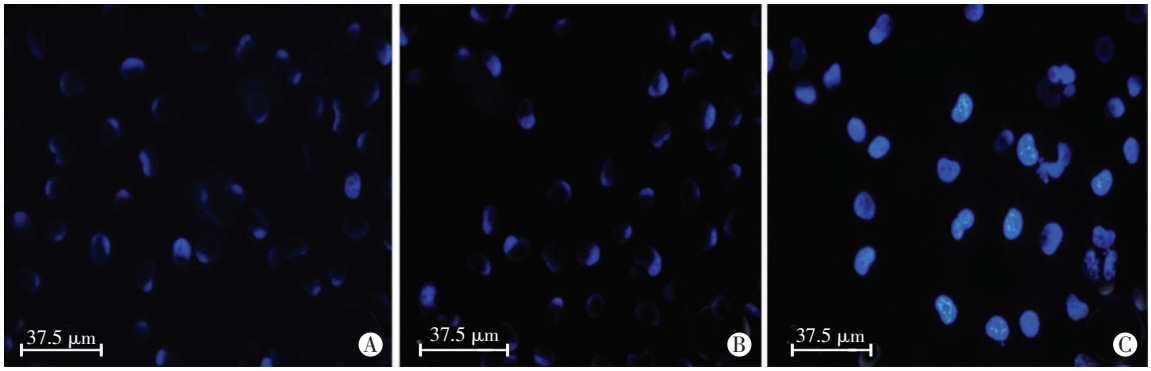
2.4.2 TUNEL 检测细胞凋亡 T24-siANG 细胞组出现大量带高亮荧光的凋亡细胞,而 T24、T24-NC 组仅有少量凋亡细胞。见图 4。

2.4.3 Hochest33342 检测细胞凋亡 T24-siANG 组出现典型的凋亡形态特征,如染色质凝集、核碎裂和明亮的蓝色荧光,而 T24-NC 组和 T24 组没有发现明显凋亡特征。见图 5。



A:T24 组;B:T24-NC 组;C:T24-siANG 组

图 4 TUNEL 检测各组细胞凋亡



A:T24 组;B:T24-NC 组;C:T24-siANG 组

图 5 Hochest33342 检测各组细胞凋亡

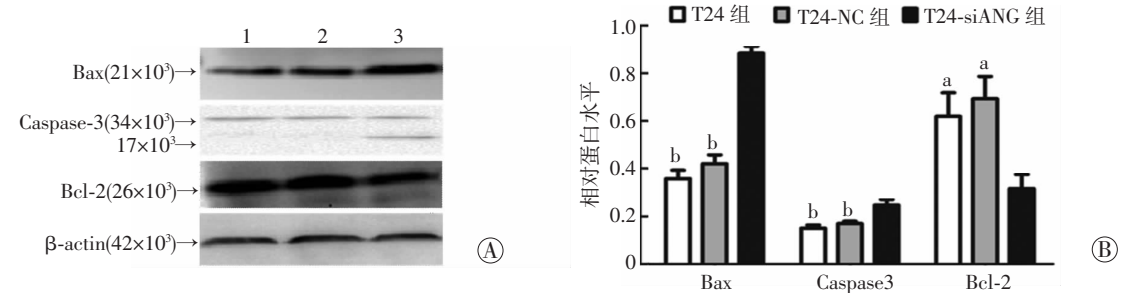
2.4.4　各组细胞中 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 蛋白的表达　T24-siANG 组 Bax、Caspase-3 蛋白的表达，分别与 T24-NC 组和 T24 组相比，升高了 46% 和 51%（$P<0.01$），37% 和 32%（$P<0.05$）；T24-siANG 组 Bcl-2 蛋白表达分别与 T24-NC 组和 T24 组相比，降低了 38% 和 41%（$P<0.05$），而两对照间均无统计学差异（$P>0.05$）。见图 6。

2.4.5　ANG 基因表达下调对肿瘤微血管生成的影响　与 T24-NC 组（12.6 ± 2.8）相比，T24-siANG 组（3.4 ± 1.2）肿瘤血管生成显著减少（$P<0.01$）。见图 7。

2.4.6　免疫组化检测移植瘤中 ANG、Bax、Caspase-3 及 Bcl-2 蛋白表达　与 T24-NC 组和 T24 组相比，T24-siANG 组 ANG 蛋白表达明显降低，凋亡标志性蛋白 Bcl-2 表达显著降低，而 Bax、Caspase-3 蛋白明显升高，与 Western blot 结果一致。见图 8。

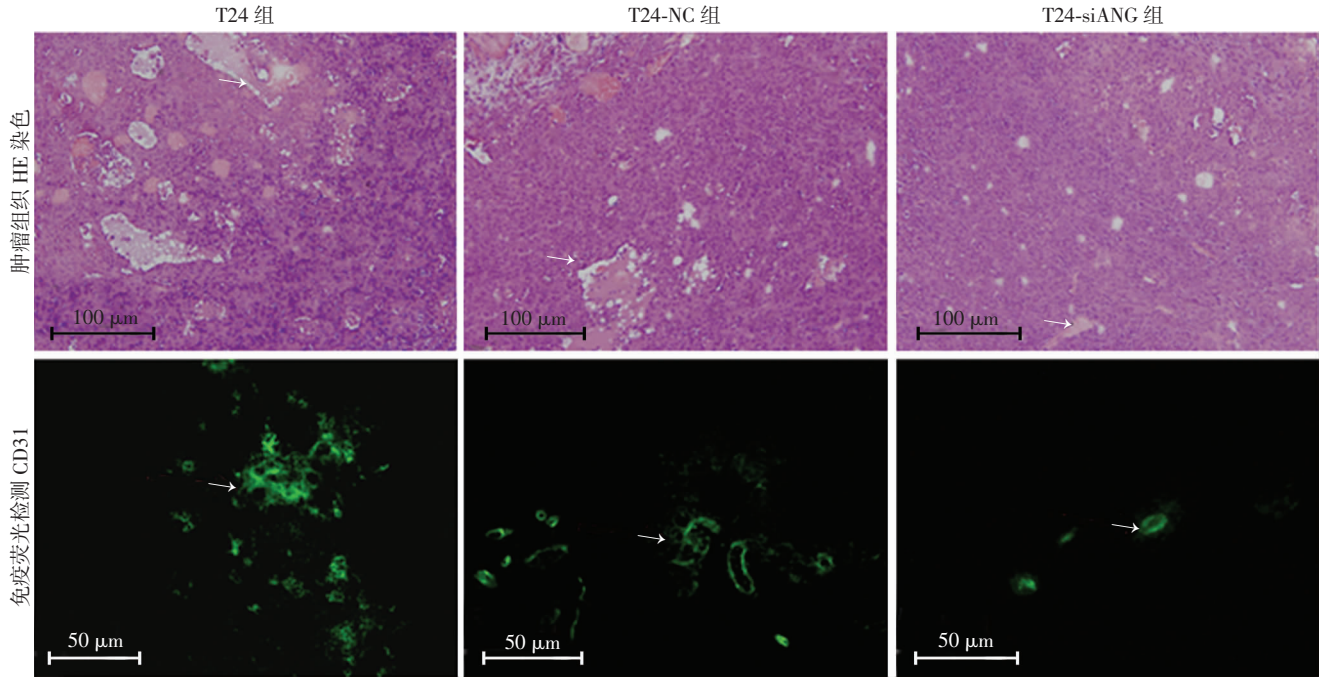
3　讨论

ANG 是一种促进新生血管内皮细胞生长的单链碱性蛋白，由 123 个氨基酸残基组成，属于核糖核酸酶超家族成员，具有弱 Rnase 活性，相对分子质量约为 14.4×10^3，在体内外均具有强烈诱发血管生成的活性。研究发现[3-4]在不同类型的肿瘤细胞中血管生成素高表达，不仅与肿瘤的发生、发展、恶化密切相关，而且对血管内皮细胞迁移、增殖和血管的形成有广泛的影响。Gao 等[5-7]研究发现，ANG 可直接提高癌症细胞（Hela 细胞、PC-3 细胞）的扩散，对血管的生成和肿瘤的扩散起双重作用。体外实验[8]证实：



A：Western blot 检测结果　1：T24 组；2：T24-NC 组；3：T24-siANG 组；B：半定量分析（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）　a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 T24-siANG 组比较

图 6　Western blot 检测各组细胞 Bax、Caspase-3 和 Bcl-2 蛋白的表达



↑：示肿瘤微血管

图 7　ANG 基因表达下调对肿瘤微血管生成的影响

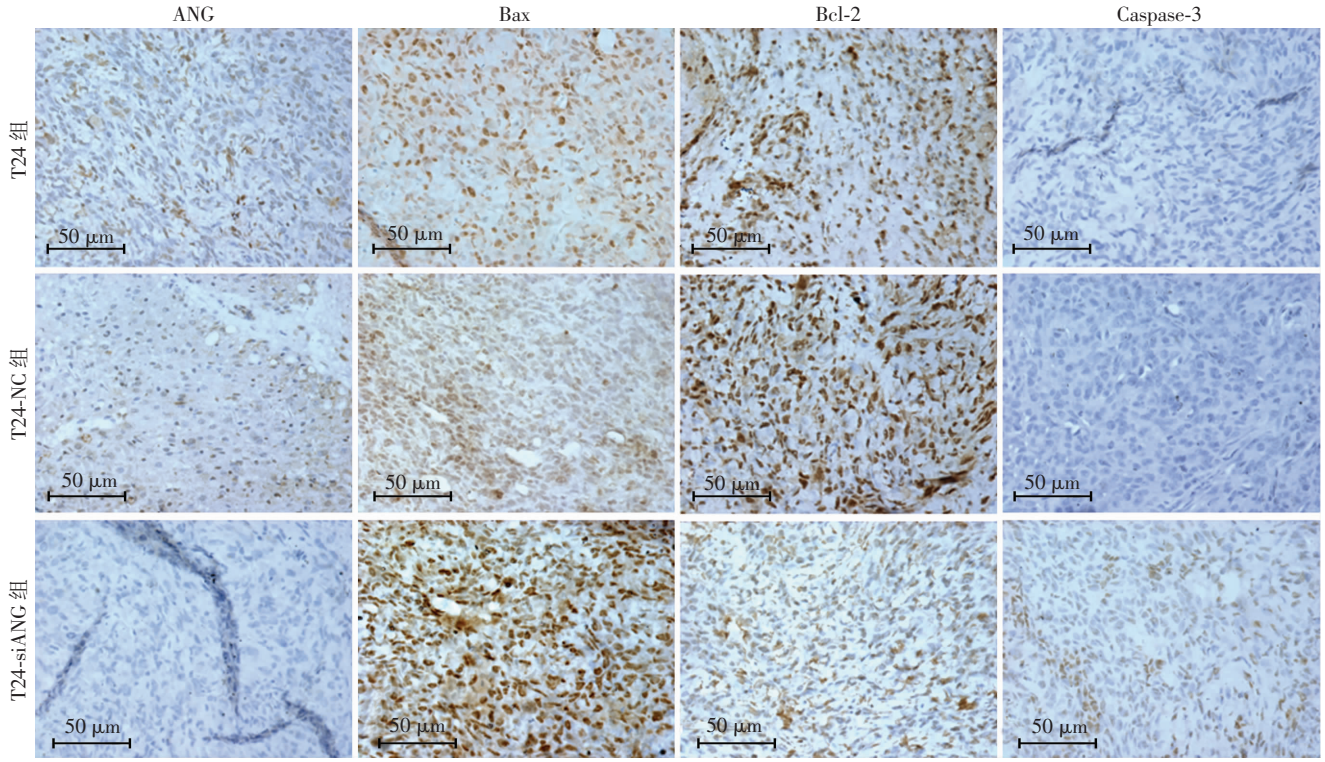


图 8　免疫组织化学(二步法)观察 CD31 移植瘤中 ANG、Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白的表达

血管生成素可促进平滑肌细胞和血管内皮细胞的增殖、管腔形成。本研究通过 RNA 干扰技术,有效抑制 ANG 的 mRNA 和蛋白的表达,发现沉默 ANG 表达可抑制细胞增殖活力,调节凋亡相关蛋白的表达,从而诱导 T24 细胞凋亡。流式细胞术和 TUNEL 检测结果显示:T24-siANG 组细胞有大量的凋亡细胞,而 T24-NC 组和 T24 细胞组仅有少量的凋亡细胞;Hochest 检测结果显示:T24-siANG 组出现典型的凋亡形态特征,而 T24-NC 组和 T24 组没有发现明显凋亡特征。

恶性肿瘤细胞的生长是异常增殖的结果,细胞的增殖和血管密度与肿瘤的生长密切相关,血管生成是肿瘤生长和转移的必要条件,而检测肿瘤血管微血管密度一般采用 CD31、CD34 等泛血管内皮细胞标记物[9]。CD31 属于黏附分子免疫球蛋白超家族的主要成员,主要在血管内皮细胞和血小板上表达。血小板与肿瘤细胞相互作用后释放的活性物质,可激活肿瘤细胞与血管内皮细胞的结合,促使 CD31 黏附于肿瘤细胞和血管内皮细胞,在肿瘤的血管形成和转移中发挥重要作用[10]。本实验将 siRNA ANG T24 细胞及对照组细胞皮下注射到 BALB/c 裸鼠中,观察肿瘤微血管密度的变化以及 CD31 在肿瘤组织中表达的变化。实验结果显示,ANG siRNA 不仅明显抑制了肿瘤细胞血管内皮细胞生长增殖,而且显著降低了 CD31 的表达,这可能进一步提示 siRNA ANG 抑制了肿瘤血管的生成,阻碍膀胱癌 T24 细胞的转移潜能,从而诱导细胞凋亡。同时大量实验表明,ANG 与 CD31 表达呈正相关,CD31 表达的高低与肿瘤分级、浸润和转移密切相关,抑制 ANG 的表达能够降低血管微血管的形成以及多种类型的肿瘤细胞转移潜能[11]。

细胞凋亡是为了维持内环境的稳定,涉及多基因参与与控制,引起细胞自主有序死亡的过程,主要以 Bcl-2 家族调控介导的凋亡起主要作用,根据 Bcl-2 家族蛋白在细胞的作用划分为两类:一类为抗凋亡蛋白(如 Bcl-2、Bcl-xl);另一类为促凋亡蛋白(如 Bax、Bid)。文献[12-14]报道,Bcl-2 蛋白不仅与 Bax 结合形成异源二聚体阻断细胞色素 C 的释放,还引起细胞核谷胱甘肽的聚集和核内氧化还原平衡的改变,从而降低 Caspase-3 的活性,抑制下游 Caspase-3 的激活,达到有效抑制细胞凋亡的作用。此外研究发现[15-16],异常表达的 Bcl-2 可以使过度增生区及癌变区的细胞生命延长;而 Bax 蛋白通过与线粒体膜直接结合,释放细胞色素 C,促进细胞凋亡。Walensky 等[17]研究发现:当下调 Bax 基因表达时,会导致细胞生存时间延长,促使突变的积累,有利于肿瘤的生长、转移及侵袭。本研究发现 ANG 表达被沉默后,抑制 Bcl-2 的表达,使 Bax 表达显著升高,从而诱导细胞凋亡。

Caspase-3 属于 ICE 蛋白酶家族,即含半谷氨酸的天冬氨酸特异水解酶。一方面,在正常细胞中 Caspase-3 以无活性的 Caspase-3 酶原(pro-Caspase-3)的形式存在,只有当细胞发生凋亡时,才具有活性[18];另一方面 Caspase-3 还可水解 Bcl-2,诱导细胞凋亡。研究发现[19-21]:细胞凋亡过程实际是 Caspase 不可逆有限水解底物的级联放大反应的过程,如同凝血因子一样"瀑布式"层层激活;而启动后的 Caspase 即可开启细胞的死亡程序,以异源活化方式水解下游蛋白(如 Caspase-3,6)并放大凋亡信号,促进细胞凋亡。本研究结果显示,敲除 ANG 基因可使活化的 Caspase-3 表达显著升高,促进细胞凋亡。肿瘤的异种移植模型表明,ANG 表达下调降低了肿瘤组织中 Bcl-2 表达,而增高了 Bax、Caspase-3 表达,这可能进一步提示 siRNA ANG 促进了膀胱癌 T24 细胞的凋亡。

综上所述,体内外实验证明:ANG 基因与膀胱癌细胞的生长、增殖及血管的形成有着密切的联系。下调 ANG 的表达,可抑制膀胱癌 T24 细胞的增殖活力和微血管生成,调节凋亡关键蛋白(Bcl-2、Bax 及 Caspase-3)的表达,从而诱导细胞凋亡。为进一步研究 ANG 的生物学功能和其调节细胞增殖和凋亡的分子机制提供实验依据。

参考文献:

[1] Xu Z, Monti D M, Hu G. Angiogenin activates human umbilical artery smooth muscle cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 285(4): 909-914.

[2] Nilsson U W, Abrahamsson A, Dabrosin C. Angiogenin regulation by estradiol in breast tissue: tamoxifen inhibits angiogenin nuclear translocation and antiangiogenin therapy reduces breast cancer growth *in vivo*[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(14): 3659-3669.

[3] Yoshioka N, Wang L, Kishimoto K, *et al*. A therapeutic target for prostate cancer based on angiogenin-stimulated angiogenesis and cancer cell proliferation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(39): 14519-14524.

[4] Kim H M, Kang D K, Kim H Y, *et al*. Angiogenin-induced protein kinase B/Akt activation is necessary for angiogenesis but is independent of nuclear translocation of angiogenin in HUVE cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 352(2): 509-513.

[5] Gao X, Xu Z. Mechanisms of action of angiogenin[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2008, 40(7): 619-624.

[6] Tsuji T, Sun Y, Kishimoto K, *et al*. Angiogenin is translocated to the nucleus of HeLa cells and is involved in ribosomal RNA transcription and cell proliferation[J]. Cancer Res, 2005, 65(4): 1352-1360.

[7] Li S, Hu G F. Angiogenin-mediated rRNA transcription in cancer and neurodegeneration[J]. Int J Biochem Mol Biol, 2010, 1(1): 26-35.

[8] Kulka M, Fukuishi N, Metcalfe D D. Human mast cells synthesize and release angiogenin, a member of the ribonuclease A (RNase A) superfamily[J]. J Leukoc Biol, 2009, 86(5): 1217-1226.

[9] Jacobs B L, Lee C T, Montie J E. Bladder cancer in 2010: how far have we come? [J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(4): 244-272.

[10] Bazzoni G. Pathobiology of junctional adhesion molecules[J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 15(5): 1221-1234.

[11] Ramani P, Headford A, Sowa-Avugrah E, *et al*. Angiogenin expression in human kidneys and Wilms´tumours: relationship with hypoxia and angiogenic factors[J]. Int J Exp Pathol, 2013, 94(2): 115-125.

[12] Hartman M L, Czyz M. Anti-apoptotic proteins on guard of melanoma cell survival[J]. Cancer Lett, 2013, 331(1): 24-34.

[13] Ashkenazi A, Dixit V M. Death receptors: signaling and modulation[J]. Science, 1998, 281(5381): 1305-1308.

[14] Vandaele L, Goossens K, Peelman L, *et al*. mRNA expression of Bcl-2, Bax, caspase-3 and -7 cannot be used as a marker for apoptosis in bovine blastocysts[J]. Animal Reprod Sci, 2008, 106(1/2): 168-173.

[15] Tomek M, Akiyama T, Dass C R. Role of Bcl-2 in tumour cell survival and implications for pharmacotherapy[J]. J Pharm Pharmacol, 2012, 64(12): 1695-1702.

[16] Kuwana T, Mackey M R, Perkins G, *et al*. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane[J]. Cell, 2002, 111(3): 331-342.

[17] Walensky L D, Gavathiotis E. BAX unleashed: the biochemical transformation of an inactive cytosolic monomer into a toxic mitochondrial pore[J]. Trends Biochem Sci, 2011, 36(12): 642-652.

[18] 高娟, 康炜, 陈俊霞, 等. siRNA 沉默整合素连接激酶对人膀胱癌细胞凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(21): 2154-2157.

[19] Tiwari M, Lopez-Cruzan M, Morgan W W, *et al*. Loss of caspase-2-dependent apoptosis induces autophagy after mitochondrial oxidative stress in primary cultures of young adult cortical neurons[J]. J Biol Chem, 2011, 286(10): 8493-8506.

[20] Kim B M, Hong S H. Sequential caspase-2 and caspase-8 activation is essential for saikosaponin a-induced apoptosis of human colon carcinoma cell lines[J]. Apoptosis, 2011, 16(2): 184-197.

[21] Tatsukawa H, Sano T, Fukaya Y, *et al*. Dual induction of caspase 3- and transglutaminase-dependent apoptosis by acyclic retinoid in hepatocellular carcinoma cells[J]. Mol Cancer, 2011, 10: 4.

(**收稿**:2013-12-24;**修回**:2014-02-18)

(编辑 张 维)