DOI:10.16016/j.1000-5404.202103137

核糖核苷酸还原酶调节亚基 M2 对膀胱癌细胞增殖和侵袭的影响

李海斌,高 森 100029 北京,北京中医药大学第三附属医院泌尿外科

[摘要] **目的** 探讨核糖核苷酸还原酶调节亚基 M2(ribonucleotide reductase regulatory subunit M2,RRM2)在膀胱癌细胞中的生物学功能及其机制。**方法** 采用 TCGA 及 Oncomine 数据库分析膀胱癌患者 RRM2 的表达,生存分析采用 K-M Plot 在线分析网站。收集 2019 年 6 月至 2020 年 12 月在本院泌尿外科手术患者的膀胱癌组织和癌旁组织,通过 qRT-PCR 检测其 RRM2 的表达情况。采用膀胱癌细胞系(5637、T24、Ej、BIU-87)进行细胞实验;选取高表达 RRM2 的细胞进行沉默实验,采用 CCK-8、Transwell 检测 RRM2 对膀胱癌细胞增殖、侵袭的影响,Western blot 检测 wnt/β-catenin 信号通路相关蛋白的表达。**结果** RRM2 在膀胱癌患者中表达升高(差异表达倍数 $Log_2FC=4.546$, $P<0.01$),高表达的 RRM2 与患者不良预后及较差的总体生存率相关。体外细胞实验显示,与 5637 和 T24 细胞相比,siRNA 转染沉默 RRM2 后 72、96 h 显著抑制膀胱癌细胞的增殖($P<0.01$);并显著减弱膀胱癌细胞的侵袭能力($P<0.01$)。沉默 RRM2 后,总 β-catenin 表达水平显著降低,Wnt/β-catenin 信号通路的下游蛋白,包括在肿瘤进展中起重要作用的细胞周期蛋白 D1 和 c-Myc 也显著降低。**结论** RRM2 可促进膀胱癌细胞的增殖和侵袭,可能靶向 wnt/β-catenin 通路发挥促癌作用。

[关键词] 膀胱肿瘤;核糖核苷酸还原酶调节亚基 M2;细胞增殖;细胞侵袭

[中图法分类号] R345;R730.23;R737.14 [文献标志码] A

Effect of RRM2 on proliferation and invasion of bladder cancer cells

LI Haibin, GAO Sen Department of Urology, the Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the biological function and mechanism of ribonucleotide reductase regulatory subunit M2 (RRM2) in bladder cancer cells. **Methods** The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Oncomine databases were used to analyze the expression of RRM2 in patients with bladder cancer, and the K-M Plot online analysis was used for survival analysis. The bladder cancer tissues and adjacent tissues from the patients undergoing urological surgery in our hospital from June 2019 to December 2020 were collected and detected for the expression of RRM2 by qRT-PCR. CCK-8 and Transwell assays were employed to evaluate the effects of RRM2 on proliferation and invasion in bladder cancer cell lines (5637, T24, Ej and BIU-87 cells). Then the effect of RRM2 silence was determined with CCK-8 and Transwell assays in the cells with higher expression of RRM2, and the expression levels of Wnt/β-catenin signaling pathway related proteins were measured with Western blotting. **Results** The expression of RRM2 was increased in patients with bladder cancer (differential expression multiple $Log_2FC=4.546$, $P<0.01$), and the patients with high expression of RRM2 were associated with poor prognosis and poor overall survival. *In vitro* cell experiments showed that RRM2 silence significantly inhibited the proliferation and reduced the invasion of bladder cancer RRM2 cells in 72 and 96 h after siRNA transfection when compared with the 5637 and T24 cells ($P<0.01$). The silence

[通信作者] 李海斌,E-mail:hairpinlee@163.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

also significantly decreased the expression levels of total β-catenin and Wnt/β-catenin downstream proteins cyclin D1 and c-myc, which played important roles in tumor progression. **Conclusion** RRM2 can promote the proliferation and invasion of bladder cancer cells, and may target the Wnt/β-catenin pathway to promote bladder cancer.

[**Key words**] bladder cancer; ribonucleotide reductase regulates subunit M2; cell proliferation; cell invasion

Corresponding author: LI Haibin, E-mail: hairpinlee@163.com

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤,总体上排名第九。据统计,男性膀胱癌的发病率是女性的3倍[1]。膀胱癌分为肌层浸润性膀胱癌(muscleinvasive bladder cancer,MIBC)和非肌层浸润性膀胱癌(non-muscleinvasive bladder cancer,NMIBC)。NMIBC占新病例的70%~80%,并经尿道膀胱肿瘤切除术(transurethral resection of bladder tumor,TURBT)进行治疗。但是,NMIBC患者治疗后复发率很高,需要多次复查,因此给患者的生活带来不便。膀胱镜检查仍是诊断膀胱癌和检测复发的金标准[2]。但仍然有大约30%的复发性肿瘤最终会发展成MIBC。这类患者通常采用以手术为主的综合治疗,涉及放疗、化疗及生物治疗等方法[3]。尽管治疗效果取得了进步,但目前还没有有效的治疗方法来阻止膀胱癌的发展[4]。因此,迫切需要阐明膀胱癌发生发展的分子机制,以开发出对该疾病的早期诊断和治疗的方法。

核糖核苷酸还原酶调节亚基M2(ribonucleotide reductase regulatory subunit M2,RRM2)是编码核糖核苷酸还原酶的两个不同亚基之一。有研究表明,RRM2能够促进胶质母细胞瘤[5]、前列腺癌[6]及乳腺癌[7]等肿瘤的进展。但是在膀胱癌中的作用尚不明确。因此,本研究观察RRM2在膀胱癌中的表达,探讨其对膀胱癌细胞的增殖和侵袭等生物学的作用,并初步探索其可能的调控机制,以期为阐明膀胱癌的发生机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

收集2019年6月至2020年12月在本院泌尿外科行手术治疗、病理诊断为膀胱癌患者的膀胱癌组织和癌旁组织。人膀胱上皮永生化细胞SV-HUC-1,人膀胱癌细胞T24、5637、Ej、BIU-8购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心;胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)、RPMI1640培养基、F-12K培养基、胰蛋白酶购自美国Gibco公司;Total RNA提取试剂盒、反转录试剂盒(RT-PCR)、Real-time PCR试剂盒购自天根公司;Lipofectamine 2000转染试剂盒购自美国Invitrogen公司;引物购自上海吉玛制药技术有限公司;抗RRM2抗体(ab57653)和抗GAPDH抗体(ab205719)购自英国Abcam公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;Real-time PCR仪购自意大利Applied Biosystems公司;CCK-8试剂盒购自Dojindo公司;Transwell小室购自Corning公司。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学预测 采用肿瘤基因图谱(TCGA)数据库(http://cancergenome.nih.gov/)及Oncomine数据库(https://www.oncomine.org/)分析RRM2表达。参考文献[8]用K-M Plot在线分析网站(https://kmplot.com/analysis/)进行生存分析。

1.2.2 细胞培养 采用5种膀胱癌细胞系:5637、T24,Ej、BIU-87和正常的人膀胱上皮永生化细胞(SV-HUC-1)。其中,5637、T24、Ej和BIU-87培养基包括RPMI 1640、10%胎牛血清和1%链霉素青霉素。SV-HUC-1培养方法包括:F-12K、10%的胎牛血清和1%的链霉素青霉素。以上均在37℃,5%CO_2的培养箱中培养。

1.2.3 细胞转染 合成靶向RRM2的3个siRNA进行转染并检测其沉默效率。siRNA序列及对照序列(Blank)由吉凯基因合成,序列见表1。将细胞接种到6孔板中至70%~90%汇合度。siRNA和Lipofectamine™ 3000混匀后加入细胞中继续孵育一段时间进行后续实验。设置空白对照组(Blank)和阴性对照组(NC)。

表1 RRM2 siRNA序列信息

基因	序列(5'-3')
siRRM2-1	CCAUCGAGUACCAUGAUAUTT
siRRM2-2	GGAGCGAUUUAGCCAAGAATT
siRRM2-3	GCACUCUAAUGAAGCAAUATT
Blank	GCAAGCTGACCCTGAAGTT

1.2.4 总 RNA 和 cDNA 合成 根据制造商的方案使用 TRIzol 试剂从细胞中分离总 RNA。然后,使用逆转录试剂盒 20 μL 含有 1 μg RNA 的体系中合成 cDNA。将反应混合物在 37 ℃下孵育 5 min,在 95 ℃下加热 30 min,然后在冰上冷却。

1.2.5 实时定量逆转录 PCR(qRT-PCR)检测 使用 SYBR Premix *Taq* Ⅱ以 GAPDH 作为内部参照进行 qRT-PCR 。引物序列设计如下:RRM2 正向 5′-GTGGAGCGATTTAGCCAAGAA-3′;反向 5′-CACAAGGCATCGTTTCAATGG-3′。GAPDH 正向 5′-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3′;反向 5′-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3′。每种 20 μL 反应混合物均包含引物 0.5 μmol/L,10 μL SYBR Premix,7 μL RNase 水和 2 μL cDNA。使用 Real-time PCR 仪进行扩增,初始变性在 95 ℃进行 30 s;随后进行 40 个循环,分别是 95 ℃ 5 s,60 ℃ 34 s 和 72 ℃ 30 s。所有反应重复 3 次。使用△△Ct 方法对基因表达进行定量。

1.2.6 Western blot 检测 使用 RIPA 裂解缓冲液和蛋白酶抑制剂混合物提取细胞蛋白,并使用碧云天 BCA 蛋白测定试剂盒测量浓度。将蛋白质样品(20 μg)在 10%的凝胶上进行 SDS-PAGE,然后转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。用 5%脱脂牛奶在 50 mmol/L Tris-HCl,50 mmol/L NaCl 和 0.1%Tween-20(TBST)中封闭膜 1 h,用鼠抗 RRM2 抗体(1∶4 000)在 4 ℃过夜,然后与辣根过氧化物酶偶联的山羊抗鼠免疫球蛋白 G(IgG,1∶8 000)在 TBST 中于室温孵育 1 h 后显影。

1.2.7 CCK-8 检测细胞增殖测定 将细胞按 4 000/孔接种在 96 孔板中。培养 24 h 后,将 CCK-8 试剂在不同时间点添加到平板中,然后在 37 ℃孵育 2 h。采用酶标仪测量波长 450 nm 处的光密度值[*D*(450)]。

1.2.8 Transwell 实验检测细胞侵袭 使用孔径为 8 μm 的 Transwell 室(Corning 公司),在上部室中预先涂上 Matrigel 基底膜基质(BD Biosciences 公司),将 40 000 个细胞接种在无血清培养基中的上腔中,并向下腔中添加 500 μL 补充有 10%FBS 的培养基。将细胞在 37 ℃下孵育 24 h 或 48 h 后,将孔置于 100%甲醇中以固定细胞,然后使用棉签小心地清除保留在腔室上侧的细胞。将已侵袭的细胞用台盼蓝染色,然后用 PBS 洗涤小室。使用奥林巴斯显微镜对 5 个独立视野拍摄照片。

1.2.9 组织芯片制作及染色 标本经过 2 位病理学专家确诊后,10%福尔马林固定,常规石蜡包埋后打孔标记,制成组织芯片。采用二步法免疫组化染色。

1.3 统计学分析

取 3 次独立重复实验结果,采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析。数据以 $\bar{x}\pm s$ 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。采用双侧检验,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RRM2 在膀胱癌患者中的表达及对生存的影响

肿瘤基因图谱(TCGA)数据分析结果显示,RRM2 在膀胱癌患者中有表达升高的趋势(差异表达倍数 Log_2Fold Change=4.546,$P<0.01$,图 1A)。采用 Oncomine 数据库进一步分析显示,膀胱癌组织中 RRM2 mRNA 表达水平显著高于膀胱正常组织($n=157$,Fold Change=5.388,$P<0.001$,图 1B)。K-M Plot 网站生存分析显示,RRM2 高表达的患者总体生存率(overall survival,OS)较差(图 1C)。进一步检测 10 例临床膀胱癌样本及配对癌旁组织中 RRM2 的表达。结果显示,RRM2 mRNA 在膀胱癌组织中的表达显著高于癌旁组织($P<0.01$,图 1D);组织芯片结果显示,在膀胱癌组织中 RRM2 蛋白表达也高于癌旁组织(图 1E)。

2.2 膀胱癌细胞系中 RRM2 mRNA 表达增高

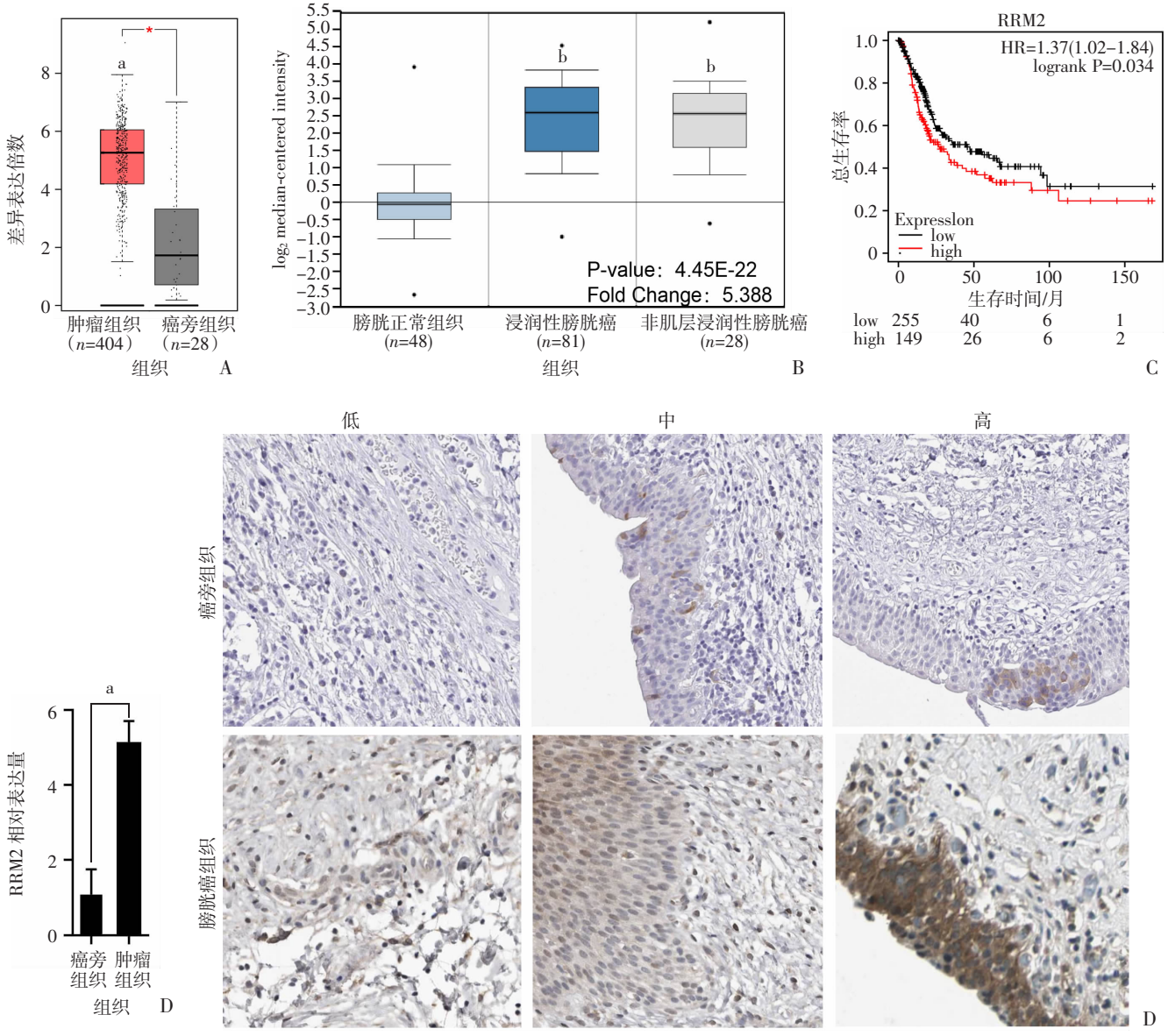
通过 RT-qPCR 检测 RRM2 在人膀胱上皮永生化细胞(SV-HUC-1)和膀胱癌细胞系(5637、T24、Ej、BIU-87)中的差异表达情况。结果显示,与 SV-HUC-1 相比,5637 和 T24 细胞系中 RRM2 表达升高($P<0.05$,图 2A),而在 Ej 和 BIU-87 细胞系中,RRM2 的表达相对较低。因此挑选高表达 RRM2 的 5637 和 T24 细胞进行沉默实验。

2.3 下调 RRM2 抑制膀胱癌细胞增殖和侵袭

siRNA 沉默 5637 细胞后采用 qRT-PCR 和 Western blot 评估其转染效率,选择效果最优的 siRRM2-2 作为沉默组(siRRM2)进行后续实验。结果显示,与空白对照组(Blank)和阴性对照组(NC)比较,沉默后 siRRM2 组细胞中 RRM2 的表达水平降低(图 2B、C)。CCK-8 实验结果显示,与 5637 和 T24 细胞比较,siRNA 转染后 72、96 h 显著抑制了膀胱癌细胞的增殖($P<0.01$,图 2D)。Transwell 实验结果显示,与 5637 和 T24 细胞比较,siRNA 转染后膀胱癌细胞的迁移能力显著减弱($P<0.01$,图 2E)。

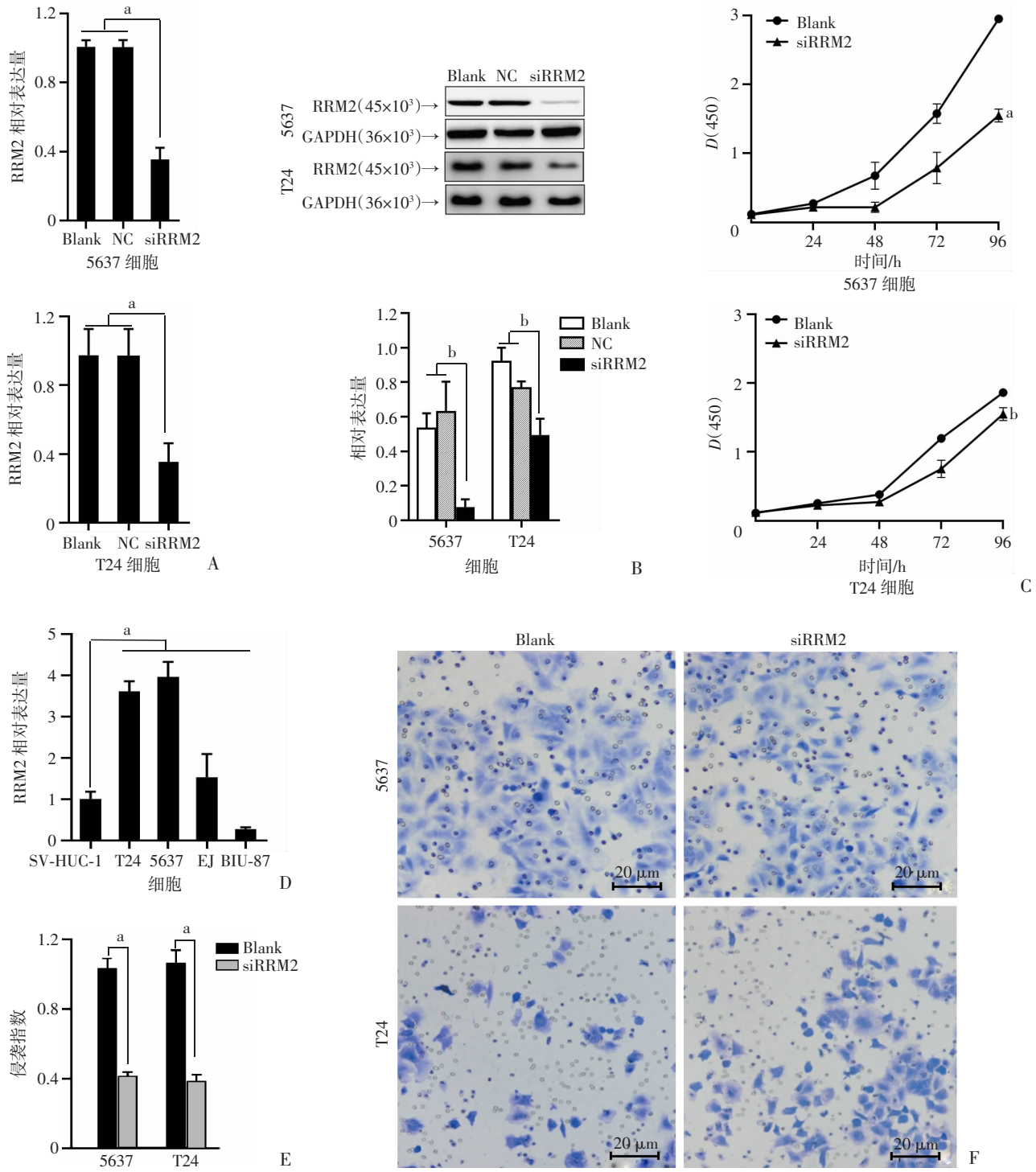
2.4　RRM2 沉默显著降低 wnt/β-catenin 信号通路相关蛋白表达

为了探究膀胱癌中 RRM2 是否通过 wnt/β-catenin 信号通路影响膀胱癌细胞的增殖、迁移和侵袭。在 5637 及 siRNA 转染的细胞中检测相关蛋白表达情况，结果发现沉默 RRM2 后，总 β-catenin 表达水平显著降低。同时，与对照组相比，RRM2 沉默后，Wnt /β-catenin 信号通路的下游蛋白，包括在肿瘤进展中起重要作用的细胞周期蛋白 D1 和 c-Myc 也显著降低（图 3）。表明抑制 Wnt /β-catenin 通路可能是 RRM2 沉默诱导膀胱癌细胞进展的潜在分子机制之一。



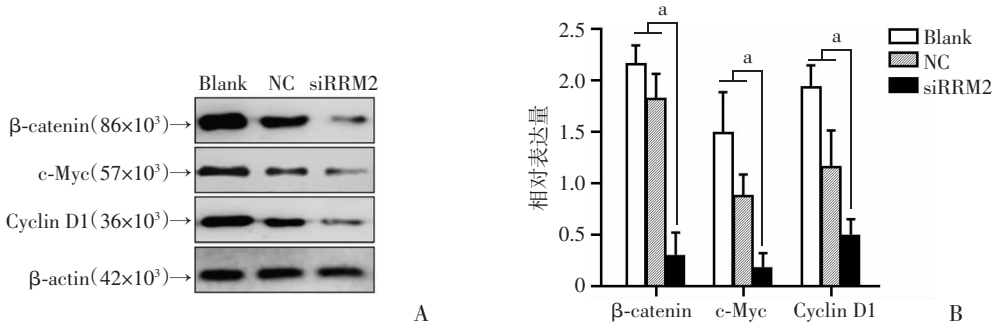
a:$P<0.01$，与癌旁组织比较；b:$P<0.01$，与正常组织比较. A:TCGA 数据库分析；B:Oncomine 数据库分析；C:不同 RRM2 表达水平膀胱癌患者生存分析；D:10 例膀胱癌患者癌组织及癌旁组织中 RRM2 mRNA 的表达；E:RRM2 蛋白在膀胱癌患者中的表达（×100）

图 1　RRM2 在膀胱癌组织中的表达及 OS 分析



A、B:siRNA 沉默 RRM2 mRNA 及蛋白的表达水平 a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与对照组(Blank 和 NC)比较 C:CCK-8 检测 RRM2 表达降低对膀胱癌细胞增殖的影响 a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与 Blank 组比较;D:膀胱癌细胞系中 RRM2 的表达情况 a:$P<0.05$,与 SV-HUC-1 细胞比较;E: RRM2 表达降低膀胱癌细胞侵袭指数的变化;F:Transwell 检测 RRM2 表达降低对膀胱癌细胞侵袭的影响 a:$P<0.01$,与 Blank 组比较

图 2 沉默 RRM2 对膀胱癌细胞增殖和侵袭的影响



A:Western blot 检测结果;B:半定量分析, a:$P<0.05$,与对照组(Blank 和 NC)比较

图 3 沉默 RRM2 抑制 Wnt/β-catenin 信号相关蛋白的表达

3 讨论

膀胱癌由于早期预后不良和复发的问题,仍然是临床上的主要挑战。膀胱癌的癌变涉及多个致癌基因和多个抑癌基因的变化。因此,许多分子标志物可用于提供可信的方法来改善癌症的预后和治疗。但是,目前在应用方面却不尽如人意。

RRM2 是致癌基因,不仅在膀胱癌中过表达,还在各种类型的肿瘤细胞中也过表达,例如乳腺癌、人类胶质母细胞瘤、前列腺癌等[5-6,9-10]。本研究通过在线网站分析发现 RRM2 在膀胱癌中表达升高,并且与预后不良相关。通过 qPCR 在膀胱癌临床样本及细胞系中进行了验证。结果显示,与 SV-HUC-1 细胞比较,5637 和 T24 细胞高表达 RRM2,而在 Ej 和 BIU-87 细胞中,RRM2 的表达相对较低。本研究发现在不同类型的膀胱癌细胞中,RRM2 的表达情况不同,与文献[11]报道相同致癌基因在不同细胞中作用不同,甚至可以抑癌相符。

有证据表明,RRM2 在癌症进展中的作用。LI 等[5]研究表明,高表达 RRM2 促进胶质母细胞瘤细胞的增殖,迁移和侵袭,但抑制细胞凋亡。SUN 等[12]研究发现 RRM2 在人神经胶质瘤组织中表达水平增加,沉默 RRM2 抑制神经胶质瘤细胞的迁移及增殖。RRM2 可能通过促进细胞的侵袭、迁移和 VEGF 表达,成为促进乳腺癌转移的促转移因子[13]。然而,关于其在膀胱癌中的表达模式及生物学功能的作用知之甚少。在这项研究中,我们确定了 RRM2 在膀胱癌组织中的表达升高,低表达 RRM2 可抑制膀胱癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

Wnt 信号通路在各种生物学过程的调控中起着重要作用,包括细胞分化、细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡。REN 等[14]研究发现,促进 wnt/β-catenin 通路后,miR-454-3p 在转移性乳腺癌中扩增和表达增高,并且与乳腺癌患者的总体生存率和无复发生存率相关。YUE 等[15]研究结果显示,由低氧神经胶质瘤细胞特征性表达和分泌的 exo-miR-301a 是 Wnt/β-catenin 通路的有效调节剂,然后通过靶向抗癌基因 TCEAL7 降低放射敏感性。REN 等[16]研究发现经巨噬细胞条件处理的胰腺癌细胞的差异表达基因与 wnt/β-catenin 途径相关。因此,我们认为,RRM2 上述表型可能也是通过靶向 Wnt/β-catenin 通路所实现。本研究结果表明,在膀胱癌细胞中,wnt/β-catenin 信号通路相关蛋白表达水平降低。同样证明了在膀胱癌中 RRM2 可能通过 wnt/β-catenin 信号通路促进膀胱癌细胞的发展。

总之,本研究整合了来自 TCGA 及 Oncomine 数据库的数据,通过一系列的体外实验以揭示 RRM2 对膀胱癌细胞增殖和侵袭的影响,提示 RRM2 可能是膀胱癌的预后指标。但本研究也有一些不足,例如纳入的临床样本比较有限,需要更多的临床样本进行验证;其次对机制的探索不够充分,需要更多的实验来进一步明确机制。

参考文献:

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1): 5-29. DOI: 10.3322/caac.21254.

[2] KARAKIEWICZ P I, BENAYOUN S, ZIPPE C, *et al*. Institutional variability in the accuracy of urinary cytology for predicting recurrence of transitional cell carcinoma of the bladder [J]. BJU Int, 2006, 97(5): 997-1001. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2006.06036.x.

[3] CLARK P E, AGARWAL N, BIAGIOLI M C, *et al*. Bladder cancer [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2013, 11(4): 446-475.

[4] BOLENZ C, LOTAN Y. Molecular biomarkers for urothelial carcinoma of the bladder: challenges in clinical use[J]. Nat Clin Pract Urol, 2008, 5(12): 676-685. DOI: 10.1038/ncpuro1259.

[5] LI C, ZHENG J, CHEN S, *et al*. RRM2 promotes the progression of human glioblastoma[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(10): 6759-6767. DOI: 10.1002/jcp.26529.

[6] MAZZU Y Z, ARMENIA J, CHAKRABORTY G, *et al*. A novel mechanism driving poor-prognosis prostate cancer: overexpression of the DNA repair gene, ribonucleotide reductase small subunit M2 (RRM2)[J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(14): 4480-4492. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-4046.

[7] QUAN D L, CHEN K, ZHANG J R, *et al*. Identification of lncRNA NEAT1/miR-21/RRM2 axis as a novel biomarker in breast cancer[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(4): 3372-3381. DOI: 10.1002/jcp.29225.

[8] SANCHEZ-CARBAYO M, SOCCI N D, LOZANO J, *et al*. Defining molecular profiles of poor outcome in patients with invasive bladder cancer using oligonucleotide microarrays[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(5): 778-789. DOI: 10.1200/JCO.2005.03.2375.

[9] MORIKAWA T, MAEDA D, KUME H, *et al*. Ribonucleotide reductase M2 subunit is a novel diagnostic marker and a potential therapeutic target in bladder cancer[J]. Histopathology, 2010, 57(6): 885-892. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2010.03725.x.

[10] CHEN W X, YANG L G, XU L Y, *et al*. Bioinformatics analysis revealing prognostic significance ofRRM2 gene in breast cancer[J]. Biosci Rep, 2019, 39(4): BSR20182062. DOI: 10.1042/BSR20182062.

[11] SACK L M, DAVOLI T, LI M Z, *et al*. Profound tissue specificity in proliferation control underlies cancer drivers and aneuploidy patterns[J]. Cell, 2018, 173(2): 499-514.e23. DOI: 10.1016/j.cell.2018.02.037.

[12] SUN H, YANG B, ZHANG H, *et al*. RRM2 is a potential prognostic biomarker with functional significance in glioma[J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(3): 533-543. DOI: 10.7150/ijbs.30114.

[13] ZHUANG S J, LI L, ZANG Y W, *et al*. RRM2 elicits the metastatic potential of breast cancer cells by regulating cell invasion, migration and VEGF expression via the PI3K/AKT signaling[J]. Oncol Lett, 2020, 19(4): 3349-3355. DOI: 10.3892/ol.2020.11428.

[14] REN L L, CHEN H, SONG J W, *et al*. MiR-454-3p-mediated wnt/β-catenin signaling antagonists suppression promotes breast cancer metastasis[J]. Theranostics, 2019, 9(2): 449-465. DOI: 10.7150/thno.29055.

[15] YUE X, LAN F, XIA T. Hypoxicglioma cell-secreted exosomal miR-301a activates wnt/β-catenin signaling and promotes radiation resistance by targeting TCEAL7[J]. Mol Ther, 2019, 27(11): 1939-1949. DOI: 10.1016/j.ymthe.2019.07.011.

[16] REN R, YU J, ZHANG Y, *et al*. Inflammation promotes progression of pancreatic cancer through WNT/β-catenin pathway-dependent manner[J]. Pancreas, 2019, 48(8): 1003-1014. DOI: 10.1097/MPA.0000000000001386.

(收稿:2021-03-16;修回:2021-06-16)

(编辑 汪勤俭)