DOI:10.16016/j.2097-0927.202212031

LRRC59 促进膀胱尿路上皮癌细胞增殖、侵袭及凋亡抑制

张 鹏,梁培禾 400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院泌尿外科

[摘要] **目的** 探讨富含亮氨酸重复序列蛋白 59(leucine-rich repeat-containing protein 59,LRRC59)在膀胱尿路上皮癌中的表达及其对肿瘤细胞增殖、凋亡及侵袭能力的影响。**方法** 收集重庆医科大学附属第二医院泌尿外科 2020 年 10 月至 2021 年 9 月膀胱尿路上皮癌患者组织标本 10 例,使用免疫组化技术分析膀胱癌组织及癌旁组织中 LRRC59 表达情况。用在线数据库(TIMER2.0、GEPIA2、Linked Omics)分析泛癌、膀胱癌及正常膀胱中 LRRC59 的表达情况并分析其预后,通过分析膀胱癌中具有关联性的基因进行通路富集分析。RT-qPCR 及 Western blot 检测膀胱尿路上皮癌细胞系 T24、5637、J82 和正常尿路上皮细胞系 SV-HUC-1 中 LRRC59 表达,以 SV-HUC-1 细胞作为对照。选择 T24 及 5637 细胞系,通过质粒转染 shRNA 下调 LRRC59 表达,以 shRNA-NC 作为对照组,shRNA-1、shRNA-2、shRNA-3 作为实验组。CCK8 和克隆形成实验检测细胞增殖能力,Transwell 和细胞划痕实验检测细胞迁移、侵袭能力,AnnexinV-FITC、碘化丙啶(PI)染色后流式细胞术检测细胞凋亡和周期,Western blot 检测上皮间质转化、凋亡及 p53 通路相关蛋白的表达。**结果** 免疫组化结果显示 LRRC59 在膀胱尿路上皮癌组织中的表达高于癌旁组织($P<0.05$);数据库检索显示 LRRC59 在膀胱癌患者中表达高于正常者($P<0.05$),且患者中高表达者预后更差($P<0.01$)。通路富集分析提示 *LRRC59* 相关基因主要富集在内质网蛋白质加工、细胞周期与 DNA 复制;敲低 LRRC59 的表达能抑制膀胱癌细胞的增殖,细胞发生 G1 期阻滞,凋亡率增加,促凋亡蛋白 Bax 表达增高,抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达下降;细胞迁移及侵袭能力下降。上皮-间质转化相关分子检测提示 Snail、Vimentin 蛋白表达下降,而 E-cadherin 蛋白表达增高($P<0.05$)。p53 通路蛋白检测提示 p53、p21 蛋白表达升高,而 Cyclin D1 蛋白表达下降($P<0.05$)。**结论** LRRC59 的表达促进膀胱尿路上皮癌细胞增殖、迁移和侵袭;LRRC59 可能是膀胱尿路上皮癌发生发展的关键生物标志物。

[关键词] 膀胱癌;LRRC59;增殖;凋亡;上皮间质转化
[中图法分类号] R341; R730.23; R737.14 [文献标志码] A

LRRC59 promotes proliferation, invasion and inhibition of apoptosis in bladder urothelial carcinoma cells

ZHAGN Peng, LIANG Peihe Department of Urology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression of leucine-rich repeat-containing protein 59 (LRRC59) in bladder urothelial carcinoma and its effect on proliferation, apoptosis and invasion of tumor cells. **Methods** Ten tissue samples were collected from the patients with bladder urothelial carcinoma hospitalized in our hospital from Oct. 2020 to Sep. 2021, and then the expression of LRRC59 in the tumor and adjacent non-cancerous tissues was measured with immunohistochemical assay. The expression of LRRC59

[基金项目] 重庆市中青年医学高端后备人才项目(第四批);重庆市基础科学与前沿技术专项面上项目(CSTC2017jcyjAX0435);重庆市留学人员回国创业创新支持计划(CX2019146)

[通信作者] 梁培禾,E-mail:302478@cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2022, 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/)

in pan-carcinoma, bladder cancer and normal bladder was also analyzed in Online databases TIMER, GEPIA and LinkedOmics, and its relationship with prognosis of these subjected patients was analyzed. Then pathway enrichment analysis was performed by analyzing the genes related to bladder cancer. LRRC59 expression in bladder urothelial carcinoma cell lines T24, 5637 and J82 and human bladder epithelial cell line SV-HUC-1 (as control) was detected by RT-qPCR and Western blotting. After the expression of LRRC59 in T24 and 5637 cells were knocked down by sh-RNA techniques (shRNA-1, shRNA-2 and shRNA-3 for knockdown, and shRNA-NC as blank control). Then cell proliferation was detected by CCK8 assay and colony formation assay, migration and invasion were observed by Transwell assay and cell scratch assay, and cell apoptosis and cycle were measured by flow cytometry after AnnexinV-FITC and Propidium Iodide (PI) staining. The expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) related proteins, apoptosis-related proteins and p53 pathway-related proteins were detected by Western blotting. **Results** The expression of LRRC59 was higher in bladder urothelial carcinoma tissues than adjacent non-cancerous tissues ($P<0.05$). Database analysis showed that LRRC59 expression was higher in the bladder cancer tissue than the normal tissues ($P<0.01$), and the patients with high LRRC59 expression had a worse prognosis ($P<0.01$). Pathway enrichment analysis suggested that LRRC59-related genes were mainly enriched in protein processing in endoplasmic reticulum, cell cycle and DNA replication. Knockdown of LRRC59 inhibited cell proliferation, arrested cell cycle at G1 phase and improved cell apoptosis, and also promoted the expression of Bax while decreased that of Bcl-2. And, cell migration and invasion abilities were decreased, as well as the expression levels of Snail, vimentin and cyclin D1 were decreased ($P<0.05$), while those of E-cadherin, p53 and p21 protein were enhanced ($P<0.05$). **Conclusion** LRRC59 promotes the proliferation, migration and invasion of bladder urothelial carcinoma cells, and it may be a key biomarker for development and progression of bladder urothelial carcinoma.

[**Key words**] bladder cancer; LRRC59; proliferation; apoptosis; epithelial-mesenchymal transition

Supported by the Project for High-Level Reserved Young and Middle-Aged Medical Talents of Chongqing (the 4th Batch), the General Program of Basic Science and Frontier Technology in Chongqing (CSTC2017jcyjAX0435) and the Entrepreneurship and Innovation Supporting Program for Overseas Returnees of Chongqing (CX2019146). Corresponding author: LIANG Peihe, E-mail: 302478@cqmu.edu.cn

膀胱癌(bladder cancer,BC)是泌尿系统最常见的恶性肿瘤,发病率及死亡率分别居于恶性肿瘤的第10位和第13位[1]。国际癌症研究机构(international agency for research on cancer, IARC)近日发布的2020年数据显示膀胱癌的发病和死亡呈持续上升趋势,目前在男性泌尿生殖系统肿瘤中仅次于前列腺癌,居于第2位[1-2]。虽然免疫检查点抑制剂等新药物在临床上日益广泛应用,但其预后仍未得到根本性的提高,5年生存率低[1-3]。因此寻找其诊疗的新靶点具有非常重要的意义。

富含亮氨酸重复序列蛋白59(leucine-rich repeat-containing protein 59,LRRC59)属Ⅱ型跨膜蛋白,为尾锚式的内质网膜蛋白,由面向内质网腔的小C末端结构域、富含亮氨酸的重复序列和面向细胞质的盘绕结构域构成[4-5]。目前研究显示,卵巢癌、食管癌和前列腺癌等多种恶性肿瘤中存在*LRRC59*的融合转录本[6-7],但其在膀胱尿路上皮癌中的研究上尚无文献报道。近期研究发现,蛋白磷酸酶2A抑制因子(cellular inhibitor of PP2A,CIP2A)在膀胱癌中的表达水平升高[8-9],并与肿瘤细胞的上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)有关[9];而以往的研究表明LRRC59是CIP2A的结合转运蛋白,介导了CIP2A的核内转移[10-11]。因此,可以推断LRRC59在膀胱尿路上皮癌的发生发展过程具有一定作用。

本研究旨在通过生物信息学、临床验证及细胞实验探讨*LRRC59*在膀胱尿路上皮癌中的表达模式,及其对肿瘤细胞增殖、EMT过程的调控作用;旨在验证其在肿瘤发生发展中的意义和对预后的预测作用,以期阐明膀胱尿路上皮癌发生及进展的新机制,明确LRRC59作为膀胱尿路上皮癌新的诊疗靶点的潜在价值。

1 材料与方法

1.1 组织标本及细胞分组

收集2020年10月至2021年9月在重庆医科大学附属第二医院接受手术治疗的10例膀胱尿路上皮癌患者组织切除标本。患者均为未接受过放疗、化疗或介入治疗的初诊患者;术后病理检查结果显示WHO2004分级高级别膀胱尿路上皮癌6例,低级别膀胱尿路上皮癌4例;癌旁组织作为对照组。

本研究经重庆医科大学附属第二医院伦理委员会批准(2022年科伦审第128号)。人正常尿路上皮细胞系SV-HUC-1细胞、人膀胱尿路上皮癌细胞系T24、5637和J82细胞均由重庆医科大学附属第二医院泌尿外科实验室储存,SV-HUC-1细胞作为正常细胞组,T24、5637和J82细胞作为肿瘤细胞组。

1.2 主要试剂

Hams F-12K培养基购自武汉塞维尔公司,RPMI1640培养基及胎牛血清购自美国Gibco公司;重庆葆光生物科技有限公司设计并合成3组不同序列的*LRRC*59干扰质粒和1个阴性对照质粒如下:shRNA-1:5′-CCTGGATCTGTCTTGTAATAA-3′;shRNA-2:5′-GTAATAAACTGACTACTCT-3′;shRNA-3:5′-GCAGTGTAAGCAGTGTGCAAA-3′;shRNA-NC:5′-CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCG-3′。

转染试剂Lipofectamine3000购自美国Invitrogen公司;RNA提取TRIzol试剂盒、RNA反转录试剂盒及定量检测试剂盒均购自日本TaKaRa公司;RT-qPCR引物由上海生工生物工程股份有限公司设计合成;CCK-8试剂盒购自重庆葆光生物科技有限公司;Transwell细胞小室购自美国康宁公司;结晶紫染液购自重庆葆光生物科技有限公司;细胞周期试剂盒购自武汉塞维尔公司;细胞凋亡试剂盒购自美国Invitrogen公司;兔抗人LRRC59多抗购自美国Abcam公司;兔抗人Bcl-2单抗、兔抗人Bax单抗、兔抗人GAPDH单抗、小鼠抗人β-tubulin单抗、兔抗人β-actin单抗、兔抗人p53多抗、兔抗人p21单抗、兔抗人Cyclin D1单抗购自美国Cell Signaling Technology公司;兔抗人E-cadherin单抗、兔抗人Vimentin单抗、兔抗人Snai1单抗购自美国Bioworld Technology公司。

1.3 在线数据库数据的应用

利用TIMER2.0在线数据库(http://timer.comp-genomics.org/)分析*LRRC*59在多种癌症中的表达谱[12]。利用GEPIA2在线数据库(http://gepia2.cancer-pku.cn/)分析*LRRC*59的表达与膀胱癌患者生存期的关系[13]。利用Linked Omics数据库(http://www.linkedomics.org/login.php)分析在膀胱癌中与*LRRC*59具有关联性的基因,并进行KEGG通路富集分析[14]。

1.4 细胞培养、转染及实验分组

SV-HUC-1细胞使用Hams F-12K培养基,T24、5637和J82细胞使用RPMI1640培养基(均含10%胎牛血清,1%青-链霉素),于37 ℃、5% CO_2条件下培养。待细胞处于对数生长期,经0.25%胰酶消化,调整细胞浓度至1×10^5/mL后,每孔1 mL接种至6孔板,再加入1 mL培养。待细胞生长至孔板面积70%~80%后,按照Lipofectamine3000说明书对T24和5637细胞分别进行shRNA-1、shRNA-2、shRNA-3、shRNA-NC质粒转染;shRNA-NC组作为对照组,shRNA-1组、shRNA-2组、shRNA-3组作为实验组。

1.5 总RNA提取、反转录和RT-qPCR检测

各组细胞转染后,按照TRIzol试剂盒说明书提取总RNA后进行反转录,并使用Bio-Rad公司仪器进行RT-qPCR;数据计算使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法,GAPDH作为内参。引物序列如下:*LRRC*59引物序列上游:5′-TGACTACTCTACCGTCGGATTT-3′,下游:5′-TTCAGGTCCAACCACTTCAGG-3′;GAPDH引物序列上游:5′-GGGAAACTGTGGCGTGAT-3′,下游:5′-GTGGTCGTTGAGGGCAAT-3′。

1.6 免疫组化检测

组织标本进行切片后,经烤片、二甲苯脱蜡、梯度酒精水化,再经柠檬酸盐修复液修复抗原,3%过氧化氢清除内源性过氧化物酶,5% BSA封闭,滴加一抗(LRRC59体抗,工作浓度1∶500)4 ℃湿盒过夜,经PBS漂洗后,滴加二抗(HRP标记山羊抗兔抗体,工作浓度1∶200)室温孵育30 min,PBS漂洗后,经DAB显色、苏木精复染、脱水透明及中性树脂封片后,进行显微镜观察。由2位独立的病理医师基于阳性细胞的染色强度(阴性0分,弱阳1分,中等阳2分,强阳3分)和染色面积(≤9%为0分,10%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~80%为3分,≥81%为4分)评分。染色评分=强度评分+面积评分,0~4分为低表达,5~7分为高表达。

1.7 Western blot检测

收集各组培养细胞,TPER裂解液提取蛋白,测定浓度后煮沸变性后进行SDS-PAGE凝胶电泳,200 mA电转1 h至0.45 μm PVDF膜,经5% BSA封闭1 h,一抗4 ℃孵育过夜(LRRC59抗体1∶2 000,β-tubulin抗体1∶2 000,β-actin抗体1∶2 000,Bcl-2抗体1∶800,Bax抗体1∶1 000,E-cadherin抗体1∶1 000,Vimentin抗体1∶1 000,Snail抗体1∶500,p53抗体1∶1 000,p21

抗体 1∶1 000,Cyclin D1 抗体 1∶500);TBST 漂洗后;再加入 HRP 标记二抗(山羊抗兔抗体 1∶2 000,山羊抗小鼠抗体 1∶2 000)室温孵育 1 h;TBST 漂洗后 ECL 化学发光剂显色,LI-COR 曝光仪显影照相,Image J 软件分析蛋白质印迹灰度。

1.8 CCK-8 实验

质粒转染 T24、5637 细胞 48 h 后,胰酶消化,1 000 r/min 离心 3 min,弃上清;加适量培养液重悬,调整细胞浓度至 10^4/mL,96 孔板,设置 3 复孔,每孔接种 200 μL,细胞贴壁后换入含有 10 μL CCK-8 的培养基共 100 μL 孵育 2 h,分别在接种后 0、24、48、72、96 h 使用酶标仪在 450 nm 处测定光密度[D(450)]值。

1.9 克隆形成实验

质粒转染 T24、5637 细胞 48 h 后,胰酶消化细胞离心,调整细胞密度为 600/孔接种到 6 孔板中,常规培养 7 d 后,结晶紫溶液染色,观察克隆形成情况。

1.10 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡

1.10.1 细胞周期实验 完成转染实验后,将细胞移入流式管内,预冷 PBS 重悬,1 000 r/min 离心 5 min,加入-20 ℃预冷的 75%乙醇,4 ℃过夜;PBS 漂洗,1 000 r/min 离心 5 min;加入 0.01% RNase 和 0.5%碘化丙锭(PI),4 ℃孵育 20 min,上机检测细胞周期。

1.10.2 细胞凋亡实验 细胞移入流式管内,PBS 重悬,800 r/min 离心 5 min,弃上清加入 Binding buffer 250 μL 重悬细胞,加入 Annexin V-FITC 10 μL,室温避光孵育 15 min,800 r/min 离心 5 min,弃上清;加入 Binding buffer 250 μL 重悬细胞,加入 0.5%PI 5 μL,上机检测细胞凋亡。使用 Modfit LT 软件分析细胞周期,使用 Flowjo 10 软件分析细胞凋亡。

1.11 划痕实验

将已转染的 T24、5637 细胞接种于 6 孔板中,每组 3 复孔,培养至融合度约 90%时,用 200 μL 移液器枪头划痕,PBS 洗去细胞碎片,更换无血清培养基,0、24 h 观察拍照,细胞迁移率=(初始划痕面积-终点时间面积)/初始划痕面积×100%。

1.12 Transwell 实验

将 Transwell 小室放入 24 孔板,小室下室提前加入 500 μL 完全培养基;将各组细胞用无血清培养基调整浓度至 2.5×10^5/mL,取 200 μL 加入小室上室,每组 3 复孔;常规培养 48 h 后,取出小室弃上室液,无水甲醇固定 15 min,棉签擦去上室内侧细胞,结晶紫染色 20 min,200 倍显微镜下随机选取 3 个视野观察并计数,评估细胞迁移能力。

1.13 统计学分析

采用 Prism GraphPad 8.0 软件进行统计学分析,所有实验都重复 3 次,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示;2 组间比较使用独立样本 t 检验,配对样本比较使用配对 t 检验,多组间比较使用多重 t 检验,$P<0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *LRRC59* 在泛癌中高表达及其与膀胱癌预后关联性的数据库分析

使用 TIMER2.0 数据库分析 *LRRC59* 在泛癌中的表达差异,结果显示 *LRRC59* 在膀胱癌、乳腺癌、胆管癌、结肠癌等多种肿瘤中表达升高($P<0.000\ 1$,图 1A)。

进一步使用 GEPIA2 在线工具进行的分析,通过膀胱癌和正常膀胱组织中 *LRRC59* 的 Log2(TPM+1)的平均值计算特征分数,选择表达的|Log2FC|截止值为 1,选择 P 值截止值为 0.05。与正常膀胱组织样本相比,膀胱癌中 *LRRC59* mRNA 表达高($P<0.05$,图 1B)。此外,*LRRC59* mRNA 高表达的膀胱癌患者生存率较低表达患者明显降低,提示 *LRRC59* mRNA 高表达与不良预后相关,可能有促进膀胱癌进展的作用($P<0.01$,图 1C)。

2.2 LRRC59 在临床膀胱癌组织和细胞中高表达

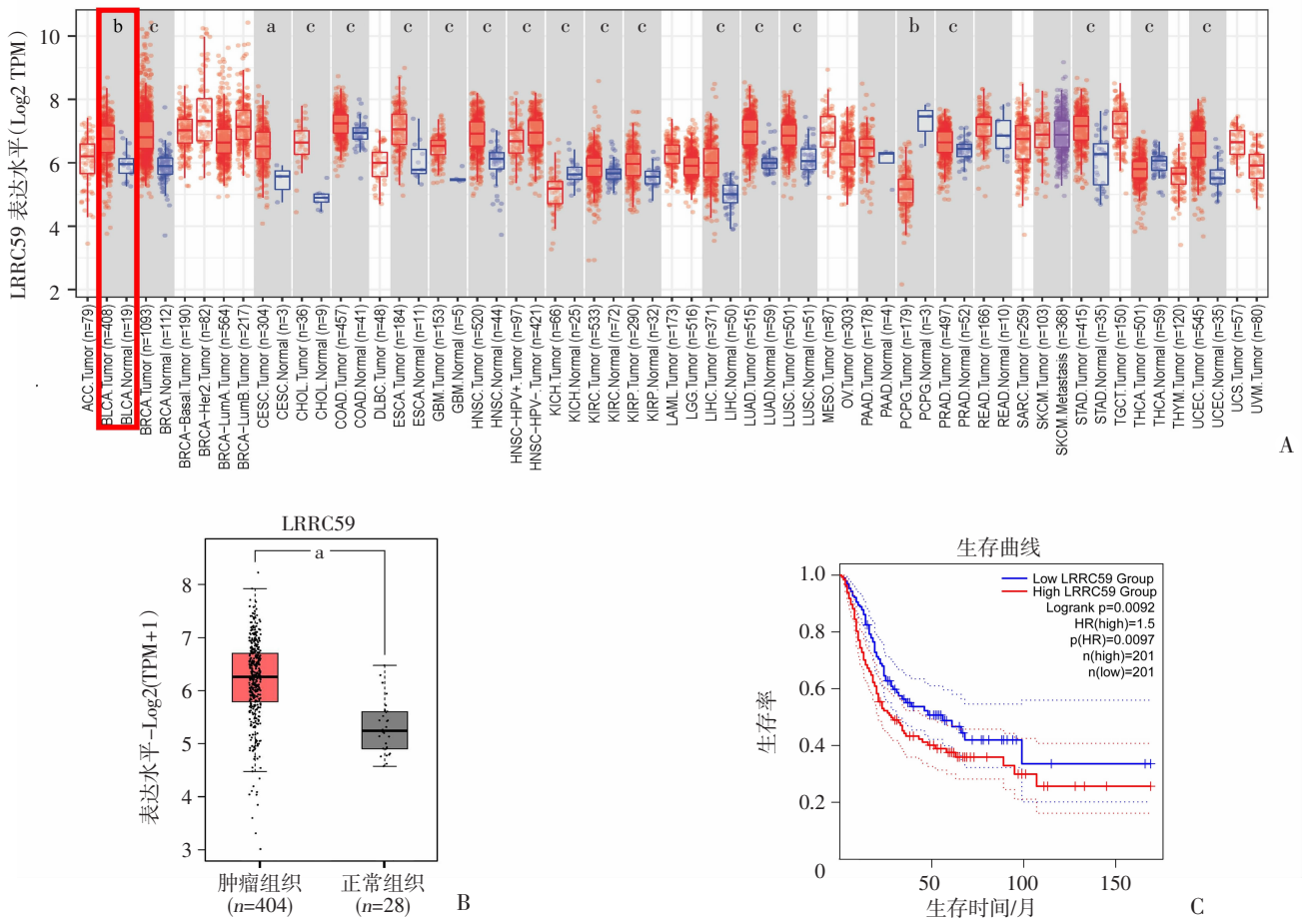
利用免疫组化检测临床标本,细胞表达 LRRC59 者被染为棕黄色主要表达于细胞质,少量表达于细胞核(图 2A)。LRRC59 在膀胱癌组织中的表达明显高于癌旁组织($P<0.05$,图 2),在高级别癌组织中的表达明显高于低级别癌组织($P<0.01$,图 2);提示 LRRC59 可能与膀胱癌发生和进展相关。

RT-qPCR 和 Western blot 检测结果显示:与 SV-HUC-1 细胞相比,T24、5637、J82 细胞的 LRRC59 表达均明显升高($P<0.05$,图 3),其中 T24 细胞表达量最高、5637 细胞次之($P<0.05$,图 3)。基于以上结果,选择 T24 细胞及 5637 细胞用以后续研究。

2.3 下调 LRRC59 表达能抑制膀胱癌细胞增殖能力

通过 RT-qPCR 和 Western blot 检测 shRNA 质粒干扰效果,结果显示:shRNA-1 和 shRNA-2 可显著降低 T24、5637 细胞中 LRRC59 的表达($P<0.05$,图 4A、B),其中 shRNA-1 效果最明显($P<0.01$,图 4A),选择 shRNA-1 进行后续实验。

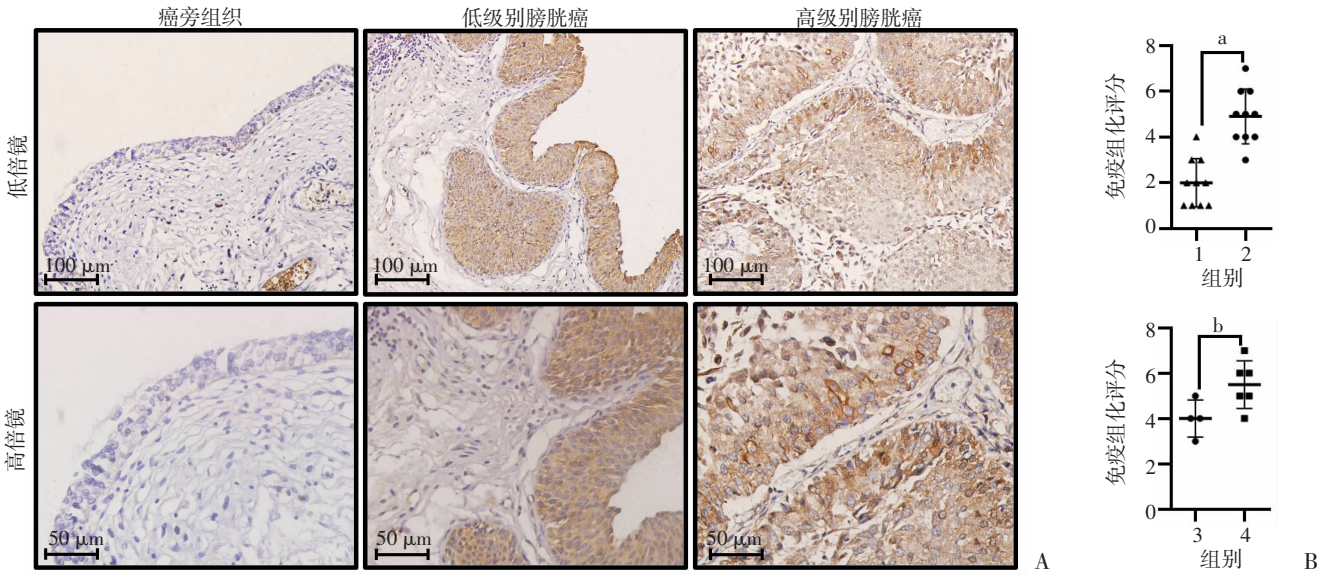
敲减膀胱癌细胞 LRRC59 表达后 CCK8 实验结果显示:较之 shRNA-NC 组,T24 和 5637 细胞的增殖能力均明显下降($P<0.01$,图 4C)。克隆形成实验显示:T24 和 5637 细胞的集落大小和数量均受到显著抑制($P<0.01$,图 4D)。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$

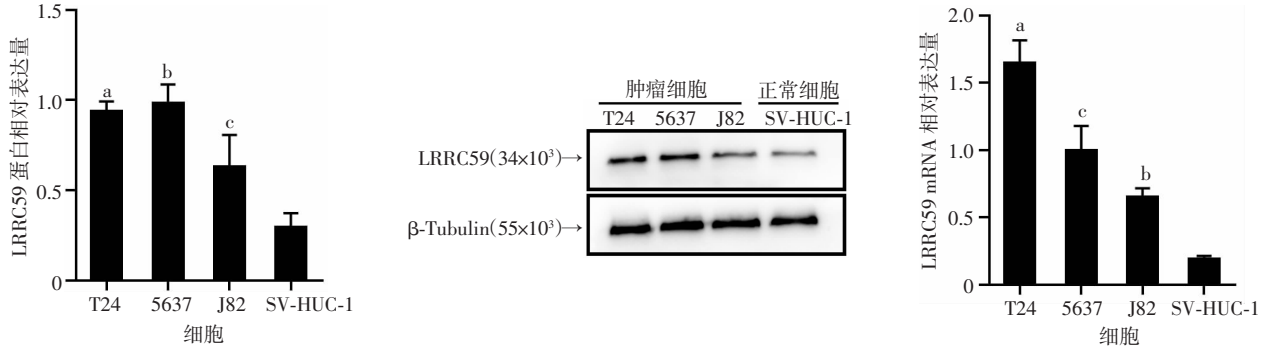
A:TIMER 数据库中 LRRC59 在泛癌中的表达;B:GEPIA2 数据库中 LRRC59 在膀胱癌组织中高表达;C:GEPIA2 数据库中 LRRC59 的生存分析

图 1 在线数据库分析 LRRC59 的表达及预后



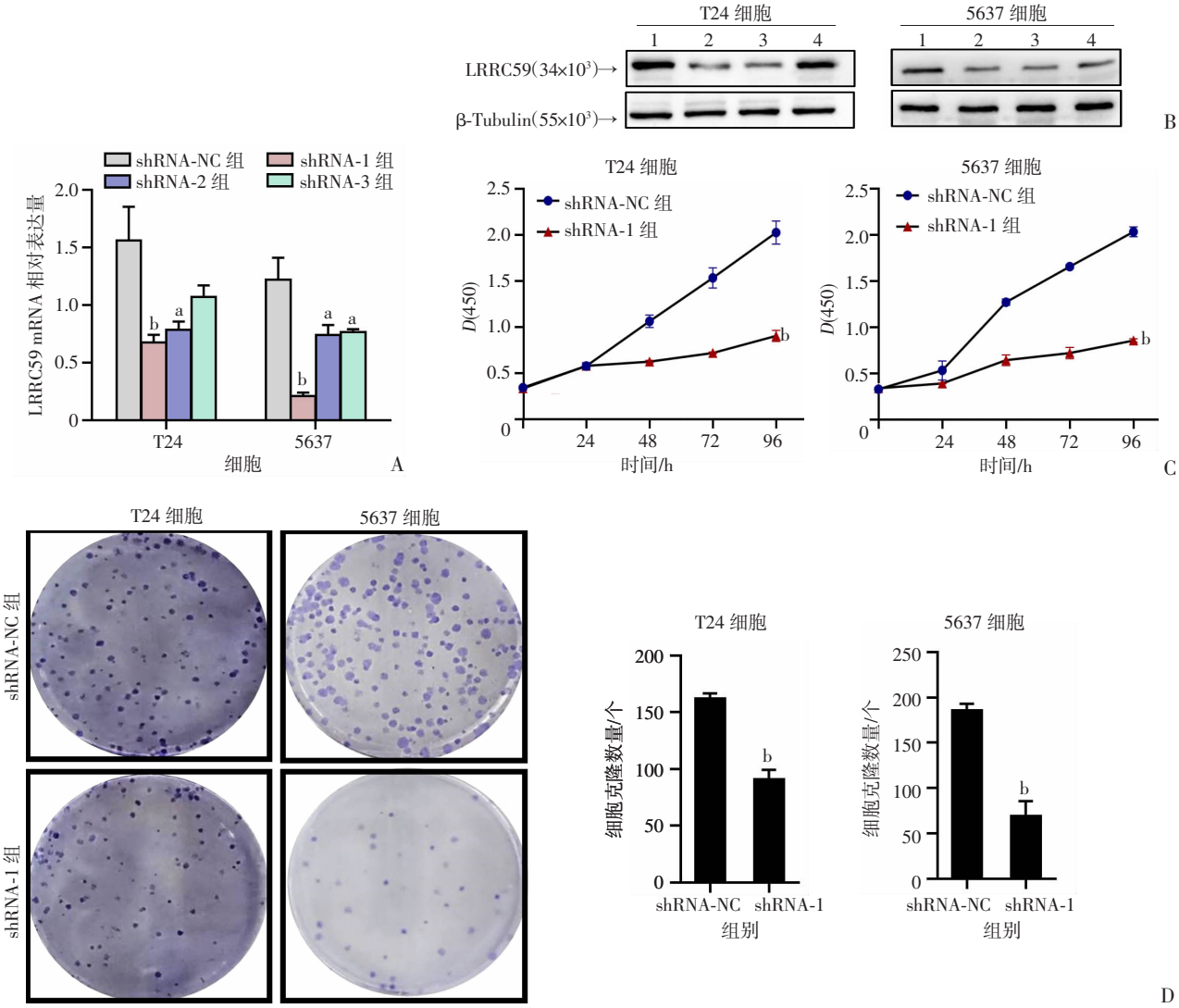
A:临床标本中 LRRC59 表达情况的免疫组化检测;B:临床标本中 LRRC59 表达情况的免疫组化评分($n=10,\bar{x}\pm s$) 1:癌旁组织,2:膀胱癌组织,3:低级别膀胱癌,4:高级别膀胱癌 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

图 2 LRRC59 在膀胱癌组织及细胞系中的表达水平



a:$P<0.001$,b:$P<0.01$,c:$P<0.05$,与 SV-HUC-1 细胞比较

图 3 Western blot 及 RT-qPCR 检测 LRRC59 在不同细胞系(T24、5637、J82、SV-HUC-1)中的表达 ($n=3,\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 shRNA-NC 组比较

A、B 分别为 RT-qPCR 和 Western blot 检测 shRNA 质粒的干扰效率 1:shRNA-NC 组;2:shRNA-1 组;3:shRNA-2 组;4:shRNA-3 组;C:CCK8 实验检测降低 LRRC59 表达对 T24、5637 细胞增殖的影响;D:克隆形成实验检测降低 LRRC59 表达对 T24、5637 细胞克隆形成的影响

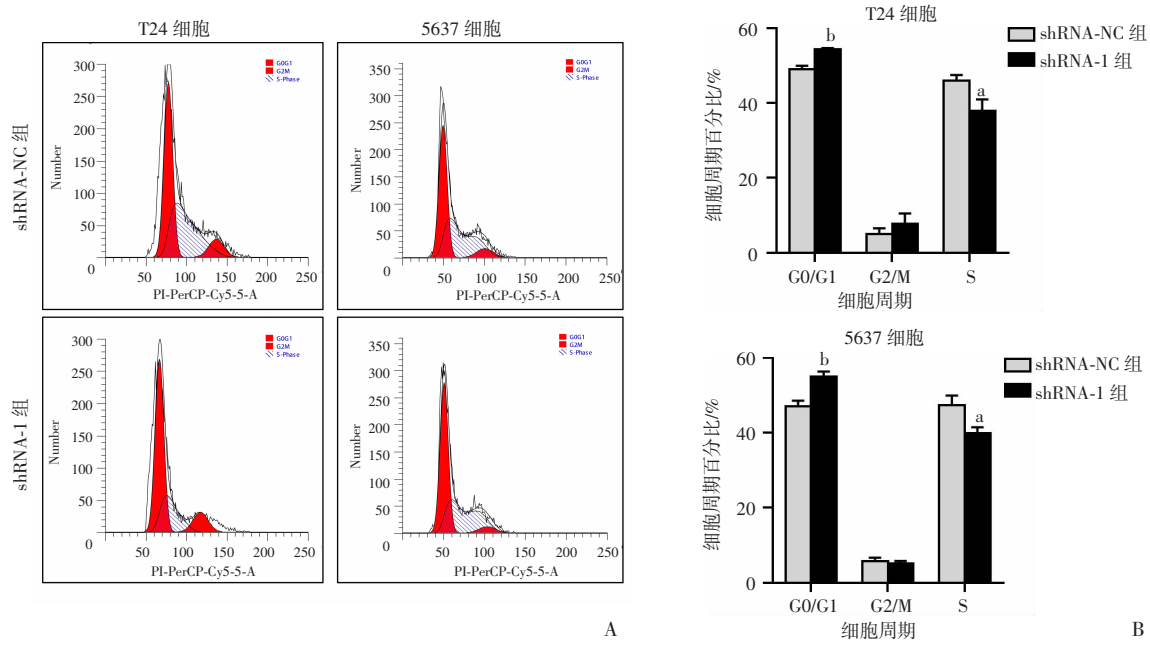
图 4 干扰效率的验证筛选及下调 LRRC59 表达对细胞增殖的影响 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

2.4　下调 LRRC59 表达膀胱癌细胞周期发生 G1/S 阻滞

利用流式细胞仪对 PI 染色的 T24 和 5637 细胞进行检测,与 shRNA-NC 组相比,shRNA-1 转染后,细胞 G1 期明显增加($P<0.01$,图 5),提示发生了 G1/S 阻滞。

2.5　下调 LRRC59 表达促进膀胱癌细胞凋亡

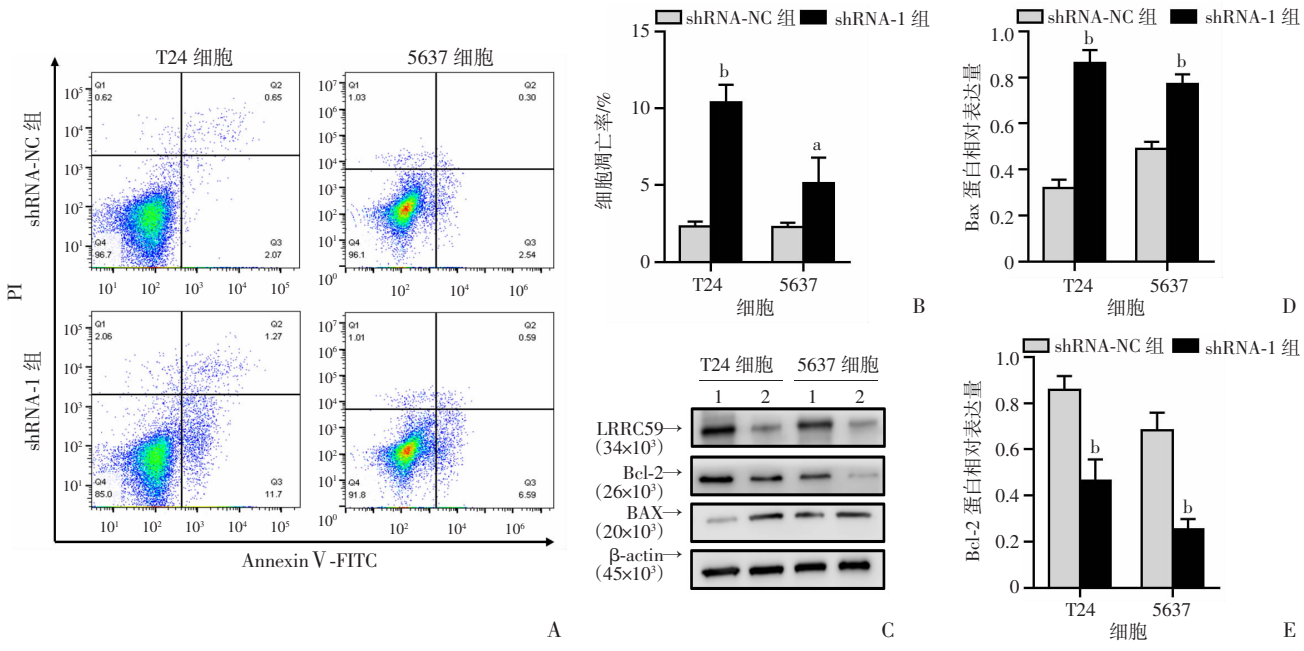
敲低 T24 和 5637 细胞 LRRC59 表达后,通过 Annexin Ⅴ-FITC 加 PI 双染进行流式细胞仪检测细胞凋亡比例。结果显示:shRNA-1 组较 shRNA-NC 组细胞凋亡率明显升高($P<0.05$,图 6A、B);Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 的表达,shRNA-1 组 T24 和 5637 均可见 Bax 表达升高,Bcl-2 表达降低($P<0.01$,图 6C~E)。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 shRNA-NC 组比较

A:流式细胞术检测敲低 LRRC59 对膀胱癌细胞周期的影响;B:细胞各周期占比

图 5　LRRC59 表达对膀胱癌细胞周期的影响　($n=3,\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 shRNA-NC 组比较

A、B:流式细胞仪检测膀胱癌细胞凋亡;C~E:Western blot 检测膀胱细胞凋亡相关蛋白表达水平　1:shRNA-NC 组;2:shRNA-1 组

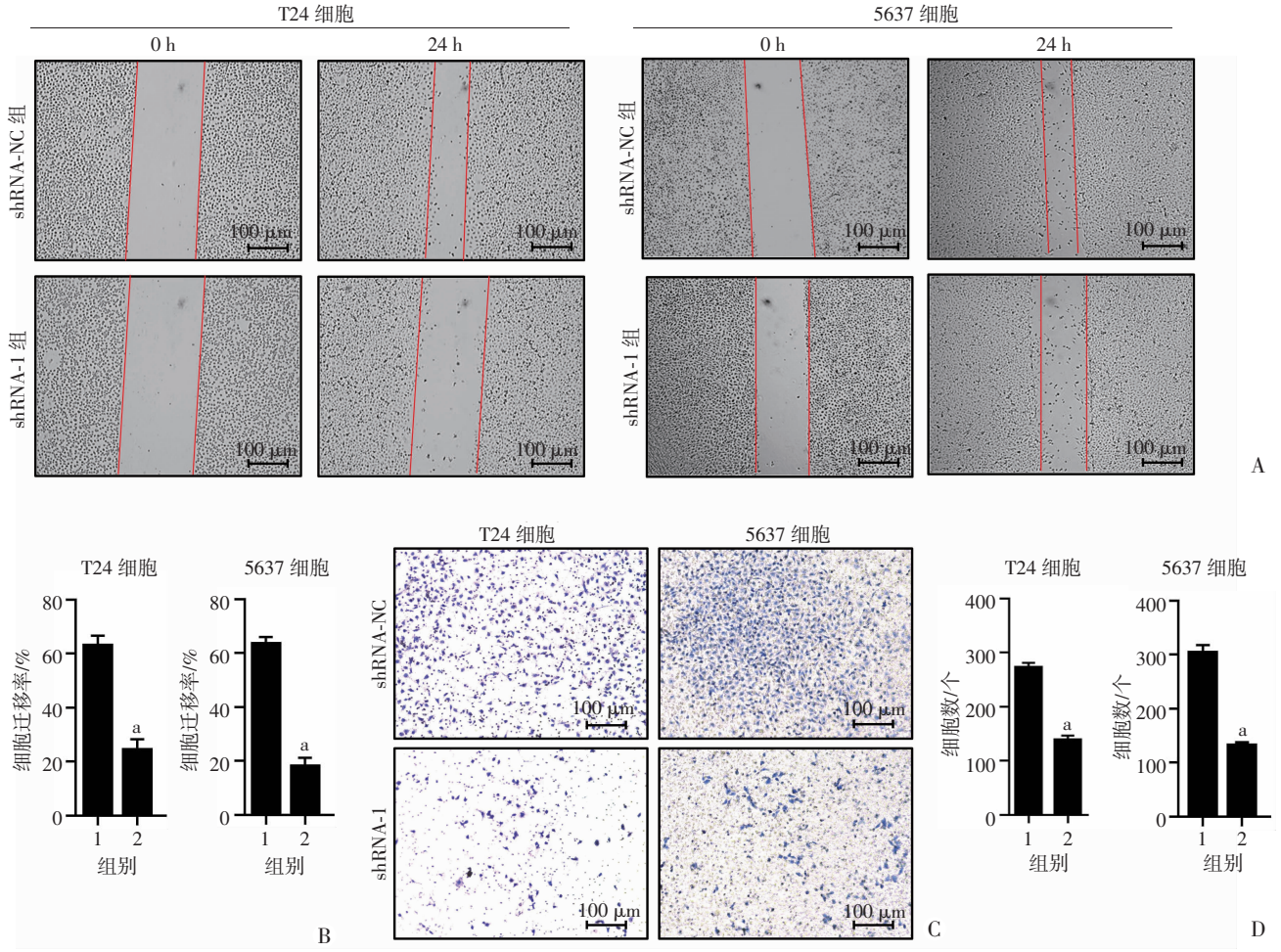
图 6　敲低 LRRC59 表达对膀胱癌细胞凋亡的影响　($n=3,\bar{x}\pm s$)

2.6　下调 LRRC59 表达抑制膀胱癌细胞迁移能力

干扰 T24 和 5637 细胞 LRRC59 的表达后,划痕实验显示其迁移率较 shRNA-NC 组明显降低($P<0.01$,图 7A、B)。Transwell 实验显示细胞迁移显著减少($P<0.01$,图 7C、D)。

2.7　敲低 LRRC59 表达可逆转膀胱癌细胞系的上皮-间质转化进程

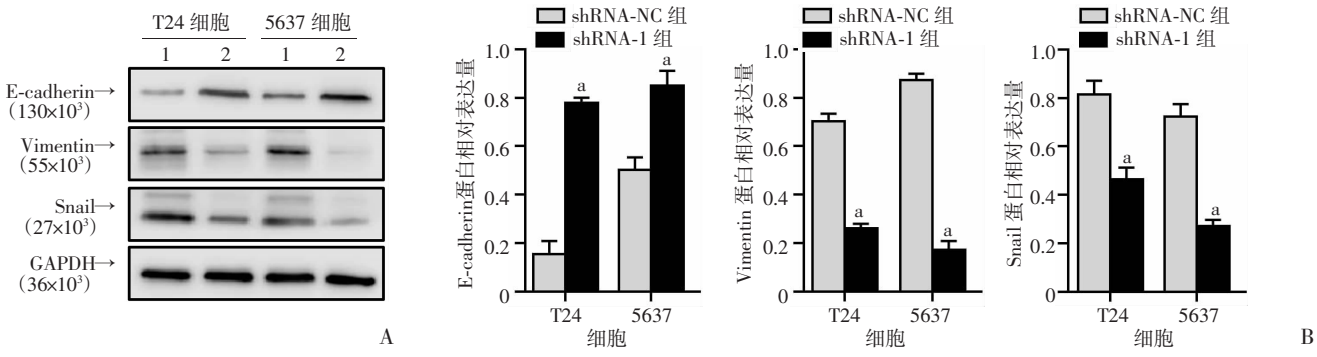
Western blot 检测结果显示:敲低 LRRC59 表达可上调 T24、5637 细胞 E-cadherin 表达,下调 Vimentin、Snail 表达($P<0.01$,图 8)。



a:$P<0.01$,与 shRNA-NC 组比较;1:shRNA-NC 组;2:shRNA-1 组

A:细胞划痕实验检测膀胱癌细胞迁移愈合能力;B:细胞划痕迁移率;C:Transwell 实验检测膀胱癌细胞迁移;D:迁移细胞数

图 7　敲低 LRRC59 表达对膀胱癌细胞迁移的影响($n=3,\bar{x}\pm s$)



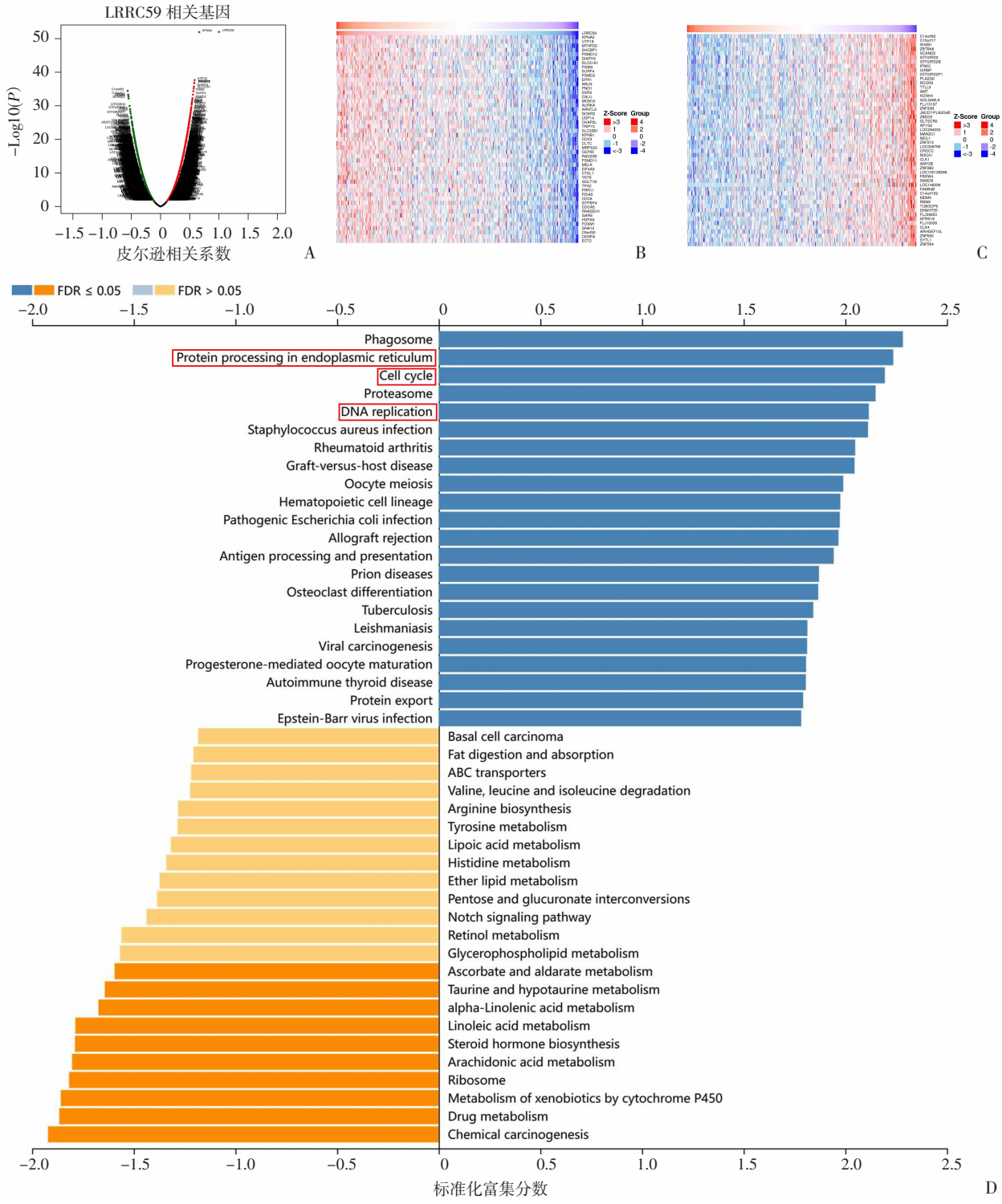
a:$P<0.01$,与 shRNA-NC 组比较

A:Western blot 检测敲低膀胱癌 LRRC59 表达对 EMT 相关蛋白表达的影响　1:shRNA-NC 组;2:shRNA-1 组;B:上皮间质转化相关蛋白灰度值统计分析

图 8　敲低 LRRC59 表达对膀胱癌细胞上皮间质转化行为的影响　($n=3,\bar{x}\pm s$)

2.8 膀胱癌中 *LRRC59* 的关联性表达及富集分析

使用 Linked Omics 数据库中 Link Finder 模块分析膀胱癌 TCGA 数据库中与 *LRRC59* 相关的基因以火山图(图 9A)、热图(图 9B、C)展示;再使用 Link Interpreter 模块对 *LRRC59* 及其相关基因进行 KEGG 通路富集分析,发现 *LRRC59* 及其相关基因参与了内质网蛋白质加工信号通路、细胞周期信号通路及 DNA 复制信号通路(图 9D)。

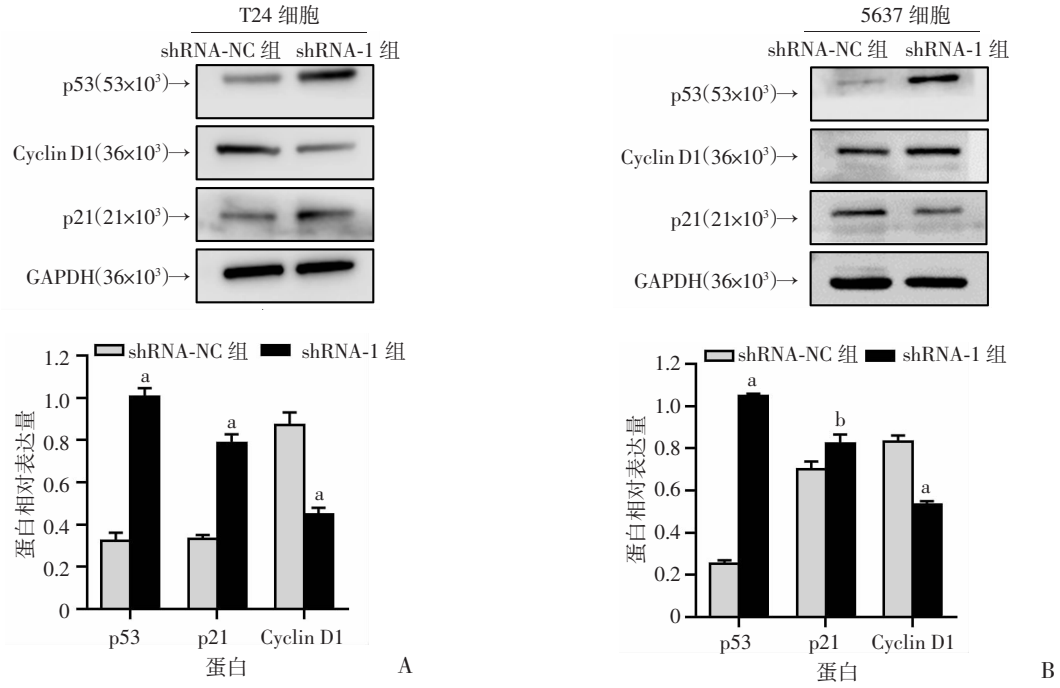


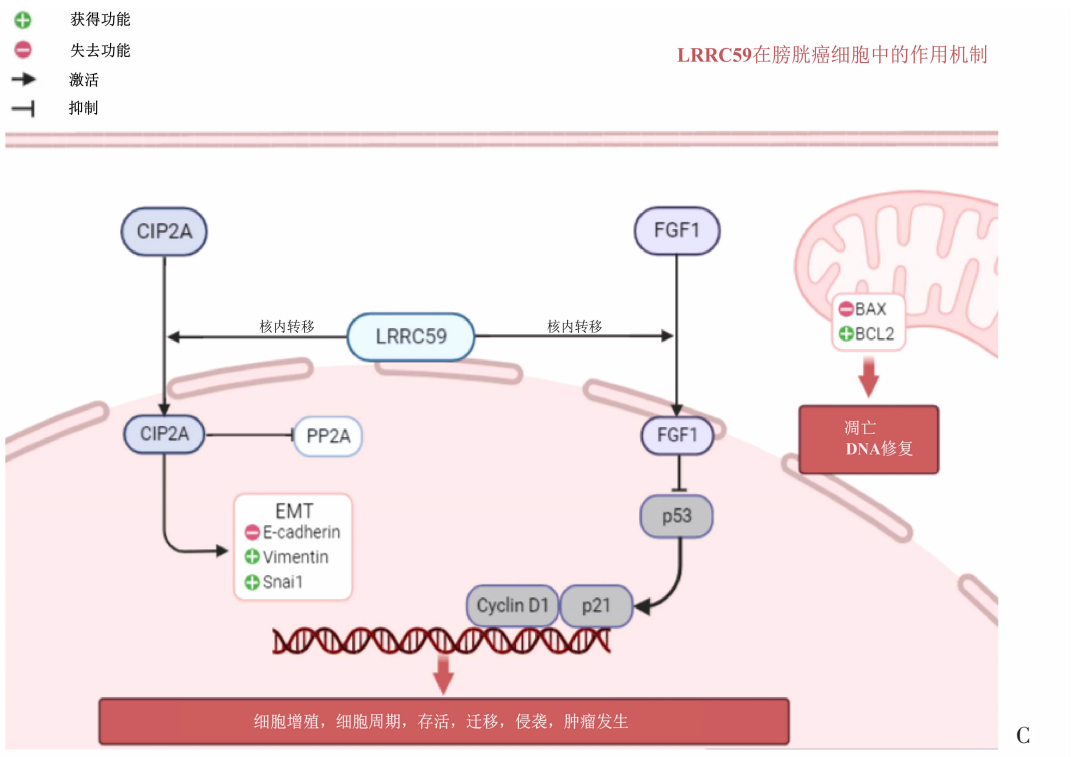
A:膀胱癌中 LRRC59 相关基因火山图 红点:示正相关基因,绿色:示负相关基因;B:热图展示前 50 与 LRRC59 表达正相关基因;C:热图展示前 50 与 LRRC59 表达负相关基因;D:LRRC59 在膀胱癌中相关基因的 KEGG 通路富集分析

图 9 Linked Omics 数据库中 LRRC59 相关基因性分析及富集分析

2.9　LRRC59 对 p53 通路的调节

结合通路富集分析结果,认为 LRRC59 可能涉及 p53 通路。Western blot 检测结果显示:2 种细胞下调 LRRC59 表达后,可见 p53、p21 蛋白表达上调,Cyclin D1 蛋白表达下调($P<0.01$,图 10)。





a:$P<0.001$,b:$P<0.05$,与 shRNA-NC 组比较

A、B:Western blot 检测敲低膀胱癌细胞 LRRC59 表达对 p53 通路蛋白表达的影响($n=3,\bar{x}\pm s$);C:LRRC59 在膀胱癌中的调控机制

图 10　膀胱癌中 LRRC59 对 p53 通路的调节机制

3 讨论

3.1 膀胱尿路上皮癌与 LRRC59

膀胱尿路上皮癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤,主要的生物学特征为侵袭性强和复发率高,发病率呈逐年上升趋势[15]。外科手术及吉西他滨和含铂类药物组成的化疗方案是膀胱尿路上皮癌基本的治疗方式[16],在此基础上,近年免疫检查点抑制剂的应用初步取得了令人兴奋的效果[17],但仍未从根本上改变患者的预后,主要原因在于膀胱尿路上皮癌发病机制不明,早期诊断和治疗困难[18-19],因此,有必要寻找膀胱癌新的诊疗靶点。LRRC59 是一种主要分布于内质网与核膜的跨膜蛋白,其 C 末端短区面向内质网管腔,4 个亮氨酸重复序列和盘绕结构域面向细胞质[4-5]。LRRC59 可以调控核酸敏感的 Toll 样受体从内质网转运至内体,在免疫应答中发挥了重要的作用[20]。新近还有研究显示,*LRRC*59 与肺腺癌的 TNM 分期、淋巴结转移、组织分化程度及预后不良有关[21]。尽管现有研究显示 *LRRC*59 与恶性肿瘤的发生发展有关,但其在膀胱尿路上皮癌中的意义尚少报道。

本研究首先利用生物信息学分析发现 *LRRC*59 在包括膀胱癌在内的多种恶性肿瘤中表达高于正常组织;进一步进行生存分析显示,膀胱癌患者中 *LRRC*59 高表达者生存期短,与预后不良有关。我们的实验则发现 *LRRC*59 在膀胱癌临床标本和细胞系中的表达均有上调,提示 *LRRC*59 在膀胱尿路上皮癌的发生发展过程中,可能发挥了肿瘤促进作用。对此,我们拟进一步纳入更大病例数量及随访数据加以确认。

3.2 LRRC59 对膀胱尿路上皮癌细胞增殖/凋亡的影响

在针对临床标本和培养细胞 LRRC59 表达进行检测后,进一步的实验结果显示,敲低 LRRC59 表达可显著抑制膀胱尿路上皮癌细胞的增殖,使其发生 G1/S 期阻滞,并诱导凋亡增加,提示 *LRRC*59 肿瘤促进作用的机制可能与肿瘤细胞增殖/凋亡平衡有关。尽管目前研究发现 LRRC59 蛋白在数种人类癌症中的表达增高[6, 20, 22],但其主要功能机制尚未明确。LRRC59 最初被鉴定为成纤维细胞生长因子 1(fibroblast growth factor 1,FGF1)的细胞内结合分子,是 FGF1 进入细胞核所必需的结构[23]。而 *FGF*1 则广泛参与了细胞的增殖、存活、迁移和侵袭调控[24];细胞内 FGF1 还可抑制 p53 依赖性凋亡和细胞生长阻滞[25]。已知 p53 通路是包括膀胱癌在内的肿瘤发展中最重要的通路之一,具有参与细胞损伤 DNA 修复、调节细胞周期及细胞凋亡等重要作用[26-28]。本研究结果显示,下调膀胱癌细胞 LRRC59 可导致 p53、p21 蛋白表达增高,Cyclin D1 蛋白表达下降,符合上述文献报道。因此,我们认为 *LRRC*59 影响膀胱尿路上皮癌细胞增殖、凋亡和周期变化的机制可能涉及 p53 通路。

3.3 LRRC59 对膀胱尿路上皮癌细胞 EMT 的影响

近年,LRRC59 作为一种潜在的癌基因受到了关注,有研究显示 LRRC59 参与 CIP2A 核内输入[10];而 CIP2A 在膀胱癌、鼻咽癌、胆管细胞癌、非小细胞肺癌等癌症中呈高表达状态[8],同时,有研究发现 CIP2A 可能参与了肿瘤细胞 EMT 过程的调控[9]。有研究证明 LRRC59 的上调与肺腺癌细胞系的转移能力相关,而其下调则明显抑制了细胞迁移[21]。EMT 在膀胱尿路上皮癌侵袭、转移中的作用已得到证实[9, 29-31],本研究观察到敲低膀胱尿路上皮癌细胞 *LRRC*59 表达后,其迁移能力明显减弱,EMT 相关指标中,间质特性标志蛋白 Vimentin、Snail 的表达下降,而上皮标志蛋白 E-cadherin 表达增高。因此,可以认为 LRRC59 对膀胱尿路上皮癌细胞 EMT 过程具有调控作用,进而影响了细胞迁移侵袭能力。

总之,本研究首先通过生物信息学分析、临床标本及培养细胞实验证明了 *LRRC*59 在膀胱尿路上皮癌中的表达升高,对肿瘤细胞具有促进增殖、抑制凋亡的作用,并可能通过调控 EMT 影响肿瘤细胞侵袭能力,与肿瘤预后不佳有关,其作用机制可能与 p53 信号通路的抑制有关。以上结果显示,*LRRC*59 有望成为膀胱尿路上皮癌诊疗新的靶标。本研究也存在一定局限性,并未直接证明 *LRRC*59 与 *FGF*1 和 *CIP2A* 在膀胱尿路上皮癌中的作用关系;*LRRC*59 的详细作用机制及其作为诊疗靶标的价值,有待今后进行包括动物模型在内的更多的研究加以证明。

参考文献:

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al*. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.

[2] ZHENG R S, ZHANG S W, ZENG H M, *et al*. Cancer

incidence and mortality in China, 2016[J]. J Natl Cancer Cent, 2022, 2(1): 1-9. DOI: 10.1016/j.jncc.2022.02.002.

[3] TEOH J Y C, HUANG J J, KO W Y K, *et al*. Global trends of bladder cancer incidence and mortality, and their associations with tobacco use and gross domestic product per capita[J]. Eur Urol, 2020, 78(6): 893-906. DOI: 10.1016/j.eururo.2020.09.006.

[4] SKJERPEN C S, WESCHE J, OLSNES S. Identification of ribosome-binding protein p34 as an intracellular protein that binds acidic fibroblast growth factor[J]. J Biol Chem, 2002, 277(26): 23864-23871. DOI: 10.1074/jbc.M112193200.

[5] BLENSKI M, KEHLENBACH R H. Targeting of LRRC59 to the endoplasmic reticulum and the inner nuclear membrane [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(2): 334. DOI: 10.3390/ijms20020334.

[6] LUO J H, MICHALOPOULOS G, YU Y P. Identification of recurrent fusion genes across multiple cancer types[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 1074. DOI: 10.1038/s41598-019-38550-6.

[7] YU Y P, DING Y, CHEN Z H, *et al*. Novel fusion transcripts associate with progressive prostate cancer[J]. Am J Pathol, 2014, 184(10): 2840-2849. DOI: 10.1038/S41598-019-38550-6.

[8] HUANG L P, SAVOLY D, SIDI A A, *et al*. CIP2A protein expression in high-grade, high-stage bladder cancer [J]. Cancer Med, 2012, 1(1): 76-81. DOI: 10.1002/cam4.15.

[9] PANG X, FU X, CHEN S, *et al*. Overexpression of CIP2A promotes bladder cancer progression by regulating EMT[J]. Clin Transl Oncol, 2016, 18(3): 289-295. DOI: 10.1007/s12094-015-1366-z.

[10] PALLAI R, BHASKAR A, BARNETT-BERNODAT N, *et al*. Leucine-rich repeat-containing protein 59 mediates nuclear import of cancerous inhibitor of PP2A in prostate cancer cells[J]. Tumour Biol, 2015, 36(8): 6383-6390. DOI: 10.1007/s13277-015-3326-1.

[11] PALLAI R, BHASKAR A, BARNETT-BERNODAT N, *et al*. Cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A promotes premature chromosome segregation and aneuploidy in prostate cancer cells through association with shugoshin[J]. Tumor Biol, 2015, 36(8): 6067-6074. DOI: 10.1007/s13277-015-3284-7.

[12] LI T W, FAN J Y, WANG B B, *et al*. TIMER: a web server for comprehensive analysis of tumor-infiltrating immune cells[J]. Cancer Res, 2017, 77(21): e108-e110. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0307.

[13] TANG Z F, KANG B X, LI C W, *et al*. GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(W1): W556-W560. DOI: 10.1093/nar/gkz430.

[14] VASAIKAR S V, STRAUB P, WANG J, *et al*. LinkedOmics: analyzing multi-omics data within and across 32 cancer types[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(D1): D956-D963. DOI: 10.1093/nar/gkx1090.

[15] ROUPRÊT M, BABJUK M, COMPÉRAT E, *et al*. European Association of Urology guidelines on upper urinary tract urothelial carcinoma: 2017 update[J]. Eur Urol, 2018, 73(1): 111-122. DOI: 10.1016/j.eururo.2017.07.036.

[16] BYUN S J, KIM J H, OH Y K, *et al*. Concurrent chemoradiotherapy improves survival outcome in muscle-invasive bladder cancer[J]. Radiat Oncol J, 2015, 33(4): 294-300. DOI: 10.3857/roj.2015.33.4.294.

[17] CHISM D D. Urothelial carcinoma of the bladder and the rise of immunotherapy[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2017, 15(10): 1277-1284. DOI: 10.6004/jnccn.2017.7036.

[18] SARI MOTLAGH R, MORI K, MIURA N, *et al*. The recurrence and progression risk after simultaneous endoscopic surgery of urothelial bladder tumour and benign prostatic hyperplasia: a systematic review and meta-analysis [J]. BJU Int, 2021, 127(2): 143-152. DOI: 10.1111/bju.15146.

[19] FERNÁNDEZ-CONEJO G, DE LA PEÑA E, HERNÁNDEZ V, *et al*. The value of tumour weight as a predictive factor for recurrence and progression in non-muscle invasive bladder cancer[J]. Scand J Urol, 2020, 54(1): 40-45. DOI: 10.1080/21681805.2019.1708968.

[20] TATEMATSU M, FUNAMI K, ISHII N, *et al*. LRRC59 regulates trafficking of nucleic acid-sensing TLRs from the endoplasmic reticulum via association with UNC93B1[J]. J Immunol, 2015, 195(10): 4933-4942. DOI: 10.4049/jimmunol.1501305.

[21] LI D, XING Y, TIAN T N, *et al*. Overexpression of LRRC59 is associated with poor prognosis and promotes cell proliferation and invasion in lung adenocarcinoma[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 6453-6463. DOI: 10.2147/OTT.S245336.

[22] KIM J, KANG J, KANG Y L, *et al*. Ketohexokinase-a acts as a nuclear protein kinase that mediates fructose-induced

metastasis in breast cancer[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 5436. DOI: 10.1038/s41467-020-19263-1.

[23] ZHEN Y, SØRENSEN V, SKJERPEN C S, *et al*. Nuclear import of exogenous FGF1 requires the ER-protein LRRC59 and the importins Kpnα1 and Kpnβ1[J]. Traffic, 2012, 13(5): 650-664. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2012.01341.x.

[24] TURNER N, GROSE R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10(2): 116-129. DOI: 10.1038/nrc2780.

[25] PIROU C, MONTAZER-TORBATI F, JAH N, *et al*. FGF1 protects neuroblastoma SH-SY5Y cells from p53-dependent apoptosis through an intracrine pathway regulated by FGF1 phosphorylation[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(8): e3023. DOI: 10.1038/cddis.2017.404.

[26] MAREI H E, ALTHANI A, AFIFI N, *et al*. p53 signaling in cancer progression and therapy[J]. Cancer Cell Int, 2021, 21(1): 703. DOI: 10.1186/s12935-021-02396-8.

[27] LEVINE A J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division[J]. Cell, 1997, 88(3): 323-331. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81871-1.

[28] SHI C L, SUN L, LIU S Z, *et al*. Overexpression of karyopherin subunit alpha 2 (KPNA2) predicts unfavorable prognosis and promotes bladder cancer tumorigenicity via the P53 pathway[J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e921087. DOI: 10.12659/MSM.921087.

[29] ISLAM S S, MOKHTARI R B, EL HOUT Y, *et al*. TGF-β1 induces EMT reprogramming of porcine bladder urothelial cells into collagen producing fibroblasts-like cells in a Smad2/Smad3-dependent manner[J]. J Cell Commun Signal, 2014, 8(1): 39-58. DOI: 10.1007/s12079-013-0216-4.

[30] MCCONKEY D J, CHOI W, MARQUIS L, *et al*. Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer[J]. Cancer Metastasis Rev, 2009, 28(3/4): 335-344. DOI: 10.1007/s10555-009-9194-7.

[31] YU Q C, ZHANG K J, WANG X S, *et al*. Expression of transcription factors snail, slug, and twist in human bladder carcinoma[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29(1): 119. DOI: 10.1186/1756-9966-29-119.

(收稿:2022-12-05;修回:2023-02-01)

(编辑 刘秋池)