基础研究 文章编号：0253-3626（2011）04-0426-03

ΔNp63 基因对 TCCB 5637 细胞侵袭作用的影响

敖 鹏[1]，吴小候[1]，罗春丽[2]，陈 刚[1]，何云峰[1]
（1. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科；2. 重庆医科大学基础医学院检验系，重庆 400016）

【摘 要】目的：研究 ΔNp63 基因对 TCCB 5637 细胞侵袭功能的影响。方法：针对 ΔNp63 基因的不同靶点设计并化学合成具有阳性转染率的 siRNA，用脂质体法转染 TCCB 5637 细胞，并根据转染的方式将实验分组为：空白对照组、空载体组、阴性质粒组和干扰质粒组；采用实时荧光定量 PCR、Western blot 检测各组中 ΔNp63 的 mRNA、蛋白的表达；采用激光共聚焦显微镜对转染干扰质粒前后的 ΔNp63 蛋白进行定位；采用细胞计数法及 MTT 法来检测 ΔNp63 基因对 TCCB 5637 细胞侵袭能力和异质粘附能力的影响。结果：ΔNp63 蛋白定位于 TCCB 5637 细胞的细胞核区域；与空白对照组比较，空载体组和阴性质粒组 TCCB 5637 细胞中 ΔNp63 的 mRNA、蛋白的表达水平无明显变化（$P>0.05$）；平均细胞穿越数和异质粘附性无明显变化（$P>0.05$）；而干扰质粒组 TCCB5637 细胞中 ΔNp63 的 mRNA、蛋白的表达水平明显降低（$P<0.05$），平均细胞穿越数明显增加（$P<0.05$），异质粘附性明显下降（$P<0.05$）。结论：ΔNp63 基因能明显促进 TCCB 5637 细胞的侵袭能力。

【关键词】肿瘤；ΔNp63；siRNA；侵袭
【中国图书分类法分类号】R737.14 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-02-21

Effect of ΔNp63 on invasion in TCCB 5637 cells

JING Peng, et al
(*Department of Urological Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effects of ΔNp63 on invasion in TCCB 5637 cells in vitro. *Methods*: siRNA were designed according to different targets on ΔNp63 gene were transfected into TCCB 5637 cells by lipidosome method.The TCCB 5637 cells were divided into control group (without transfection), vector group (without transfection but added lipo2000), negative plasmid group (with transfection of siRNA negative) and the interference plasmid (with transfection of effective siRNA). The stable colonies were obtained by G418 screening. Laser confocal microscopy was used to detect the location of ΔNp63 in the 5637 cells; The expression level of ΔNp63 was assayed by real-time PCR and Western blot. The invasion of cell was detected by Transwell. The change of cell adhesion was analyzed by cell adhesion assay. *Results*: The ΔNp63 proteins were localized on the perinuclear region; The expression of ΔNp63 was obviously decreased in the interference plasmid group; in which cell adhesion was decrease as well as the invasion increased significantly.Statistics analysis shows the interference plasmid group has significant difference compared with other groups. *Conclusion*: The ΔNp63 gene can significantly increased the function of invasion in TCCB 5637 cells.

【Key words】tumor; ΔNp63; siRNA; invasion

p63基因是 p53 基因家族的一员，具有两个亚型，其中的 ΔNp63 基因是 p63 基因位于外显子 3 和 4 之间的外显子 3' 开始转录的没有反式激活区的异构体，位于染色体 3q27-3q29 区[1,2]。ΔNp63 在上皮源性肿瘤（包括膀胱肿瘤）中促进肿瘤的发生[3-5]。近期研究显示，ΔNp63 基因具有影响肿瘤细胞的侵袭、转移能力的作用[6-8]。在我们的前期研究中，证实 ΔNp63 在膀胱肿瘤组织中表达增高并抑制膀胱肿瘤细胞的凋亡[9,10]。为进一步研究 ΔNp63 在膀胱肿瘤中侵袭、转移的机制，本研究拟从体外水平来研究 ΔNp63 基因对膀胱肿瘤细胞侵袭功能的影响。

作者介绍：敖 鹏（1981-），男，硕士，
研究方向：泌尿系统肿瘤与肾移植。
通信作者：吴小候，男，教授，Email：wuxiaohou80@hotmail.com。

1 材料与方法

1.1 主要材料

TCCB 细胞株 5637 购于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；pGeneSil-1 质粒购于武汉晶赛公司；RPMI 1640 购于武汉博士德生物公司；标准胎牛血清购于天津 TBD 公司；质粒提取试剂盒购于 OMEGA 公司；lipofectamine™2000 购于 Invitrogen 公司；鼠抗人 ΔNp63 抗体及 FITC 荧光二抗购于 santa cruz 公司；小鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体及兔抗小鼠 IgG-HRP 二抗购于南京金思特公司；10×SDS-PAGE 电泳缓冲液、SDS- PAGE 凝胶配制试剂盒购于上海宝曼生物公司；PVDF 膜及化学发光试剂盒购于 Milli-

pore公司；Real-time PCR 内参 β-actin 购于 TaKaRa 公司；DEPC 购于 Sigma；Transwell 细胞培养小室购自 Corning 公司。其他试剂如：MTT，G418，DMSO 等均购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与质粒转染 5637 细胞培养在 RPMI1640 培养液中（包含 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml链霉素），置于 37℃含 5%CO_2 的培养箱中培养，常规换液传代。ΔNp63 干扰质粒按本课题组前期描述构建[10]。转染前常规消化收集细胞，将细胞接种于 6 孔板，待细胞生长至密度为 60%~80%时，用 lipofectamine™ 2000 转染试剂转染干扰质粒，转染 24 h 后于倒置荧光显微镜观察细胞表达绿色荧光蛋白的情况。用于筛选的转染细胞在 36 h 后换为含 400 μg/ml G418 的新鲜 RPMI1640 完全培养液筛选 3 周，得到稳定表达干扰质粒的肿瘤细胞培养、传代。

1.2.2 ΔNp63 蛋白定位实验 将正常培养的 5637 细胞用胰酶消化 800 r/min 离心，吸去上清，沉淀用 2 ml PRMI1640 培养液重悬，每孔加等量（5×10^5 个）细胞到预先铺有盖玻片的 24 孔培养板中，置 37℃孵箱培养。待细胞生长到占盖玻片底约 70%~80%时，PBS 冲洗 3 遍，4%的多聚甲醛固定 15 min，PBS 再次冲洗 3 遍，加入鼠抗人 ΔNp63 一抗（1:200），培养过夜，吸出培养液后用无菌 PBS 冲洗 2 遍，加入 FITC 标记的兔抗鼠荧光二抗，室温下避光孵化 1 h，PBS 重新冲洗 2 遍。50%甘油（甘油:PBS=1:1）封片，共聚焦显微镜下观察蛋白定位。

1.2.3 Real-time PCR 检测 ΔNp63 的 mRNA 表达水平 细胞接种于 6 孔板，分为未转染组、空载体组、阴性对照组和干扰组。转染后 48 h 消化收集 1×10^6 个细胞，按试剂盒说明书提取各组细胞总 RNA，并逆转录为 cDNA，应用 Real-time PCR 检测 ΔNp63 的 mRNA 表达水平。以 β-actin 作为内参，其上游引物为：5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3'，下游引物：5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3'。依据 ΔNp63 的cDNA 序列设计引物，其上游引物为：5'-TGCCCAGACTCAATTTAGT-GAG-3'，下游引物：5'-TCTGGATGGGGCATGTCTTTGC-3'。引物由 Shine Gene 公司合成。反应条件：94℃ 4 min，94℃ 20 s，60℃ 30s，72℃ 30 s 循环 35 次，72℃检测信号。根据绘制的标准曲线计算 ΔNp63 的相对表达量。

1.2.4 Western blot 检测 ΔNp63 蛋白表达 细胞分组同前，常规的消化收集 1×10^6 个细胞，用细胞裂解液提取细胞总蛋白，蛋白样品经变性，10%SDS-PAGE 电泳，将蛋白转移至硝酸纤维素膜，用含 5%脱脂奶室温封闭 1 h 后，分别加 1:200 稀释的小鼠抗人 ΔNp63 多克隆抗体和 1:3 000 稀释的小鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体，4℃孵育过夜。次日 TBST 漂洗 3 次后，加 1:5 000 稀释的兔抗小鼠 IgG-HRP 二抗，室温先孵育 2 h，化学发光剂曝光、显影。然后用 UVP 凝胶图像处理系统 labworks4.6 软件分析条带灰度值。

1.2.5 Transwell 侵袭实验[6] 预先用 30 μg Matrigel 胶处理 Transwell 小室。在侵袭小室的上部分别加入用 siRNA 干扰质粒、阴性对照质粒和空载体处理过的 100 μl 细胞（10^5 个），600 μl的10% FBS 液加入侵袭小室的下部，在 37℃孵化 24 h。取出上室，用棉签擦去膜上室表面的细胞，4%多聚甲醛固定膜下室面的细胞 15 min，10%PBS 清洗，用台盼蓝染色。最后，光镜下观察滤膜下表面的细胞，记数穿透的肿瘤细胞数（各 4 个视野）。

1.2.6 异质粘附实验 依据文献报告的方法[11]，通过 MTT 检测肿瘤细胞的异质粘附能力。每组设 4 个复孔，将 1×10^5 个/ml 的细胞加入预先铺上Ⅳ胶原的 96 孔板中，在 5% CO_2 的培养箱中 37℃培养，动态观察细胞贴壁情况，培养 3 h 后，使用 PBS 清洗 3 次以去除未粘附的细胞。加入浓度为 5 mg/ml 的 MTT 20 μl，在室温下孵育 10 min，去除 MTT 并在每孔中加入 200 μl 的 DMSO，用 Biol Rad-酶联免疫检测仪检测 570 nm 处的吸光度，每组重复检测 4 次。

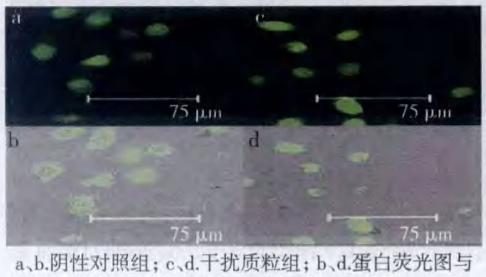
1.3 统计学分析

应用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析。两组间比较采用成组设计 t 检验，结果以均数±标准差表示，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ΔNp63 蛋白的定位

激光共聚焦显微镜显示 ΔNp63 蛋白在 5637 细胞中主要定位于细胞核的区域。当稳定转染 ΔNp63 干扰质粒后，ΔNp63 蛋白在 5637 细胞中的表达降低，结果见图 1。



a、b.阴性对照组；c、d.干扰质粒组；b、d.蛋白荧光图与微分干涉图的重合图

图 1 ΔNp63 蛋白在 5637 细胞中的定位情况

2.2 ΔNp63-siRNA 对 TCCB 5637 细胞的 ΔNp63 mRNA 表达水平的影响

Real-time PCR 结果显示，在内参 mRNA 表达基本一致的条件下，与空白对照组相比，空载体组和阴性质粒组细胞 ΔNp63 的 mRNA 表达水平无明显变化（$P>0.05$）；干扰质粒组细胞中 ΔNp63 的 mRNA 表达水平明显降低（$P<0.05$），结果见表 1。

2.3 ΔNp63-siRNA 对 TCCB 5637 细胞的 ΔNp63 蛋白表达水平的影响

经 Western blot 检测结果显示，干扰质粒组细胞 ΔNp63蛋白表达水平明显低于空白对照组、空载体和阴性质粒组；经半定量分析显示，干扰质粒组细胞 ΔNp63 蛋白表达水平明显低于空白对照组（$P<0.05$），而空载体和阴性质粒组与空白对照组细胞间无明显差异（$P>0.05$）。结果见如下图 2。

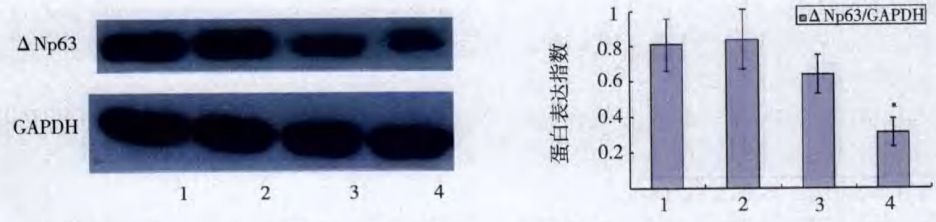
2.4 ΔNp63 基因对 TCCB 5637 细胞侵袭能力的影响

Transwell 法检测细胞侵袭能力显示，4 组细胞都能穿过

表 1　Real-time PCR 中，ΔNp63-siRNA 对 TCCB 5637 细胞的 ΔNp63 mRNA 表达水平的影响（$\bar{x} \pm s$）

分组	β-actin 平均 Ct 值	ΔNp63 平均 Ct 值	Delta Ct 值	Delta Delta Ct 值	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
正常细胞组	20.677 8 ± 0.318 2	23.527 3 ± 0.259 2	2.849 5 ± 0.473 9	-	-
空载体组	20.717 3 ± 0.092 6	22.138 4 ± 0.161 5	1.410 4 ± 0.219 0	-1.419 1	2.639 0
阴性质粒组	20.930 2 ± 0.303 3	22.165 0 ± 0.289 8	1.234 8 ± 0.484 3	-1.614 7	3.031 4
干扰质粒组	22.216 2 ± 0.314 5	22.844 7 ± 0.317 9	0.630 4 ± 0.513 2	-2.219 1	4.594 8

注：Delta Ct 值 =Ct ΔNp63（各组）-Ct β-actin；Delta Delta Ct 值 =Delta Ct（处理组）- Delta Ct 值（正常细胞组），表达倍差 $=2^{-\Delta\Delta Ct}$



1.空白对照组；2.空载体组；3.阴性质粒组；4.干扰质粒组；经单因素方差分析，两两比较：与对照组相比，*P<0.05

图 2　ΔNp63-siRNA 对 TCCB5637 细胞的 ΔNp63 蛋白表达水平的影响

铺有 Matrigel 基质胶的滤膜，各组穿过滤膜的细胞数分别为（10.4 ± 1.2）个、（11.5 ± 1.3）个、（9.3 ± 1.7）个、（6.5 ± 1.3）个，质粒干扰组穿过细胞数明显减少。统计学分析显示，与空白对照组相比，质粒干扰组每视野的平均细胞穿透数明显减少（P<0.05）；而空载体和阴性质粒组的平均细胞穿透数无明显差异（P>0.05）。结果见表 2。

表 2　ΔNp63 基因对 TCCB5637 细胞侵袭能力的影响（$\bar{x} \pm s$）

分组	重复次数	平均细胞穿透数
干扰质粒组	4	6.5 ± 1.3*
阴性质粒组	4	9.3 ± 1.7
空载体组	4	11.5 ± 1.3

注：*分别与阴性质粒组和空载体组比较（P<0.05）

2.5　ΔNp63 基因对 TCCB5637 细胞粘附性的影响

细胞粘附性实验显示，干扰质粒组细胞的粘附性明显低于空白对照组（P<0.05），而空载体和阴性质粒组细胞的粘附性与空白对照组间无明显差异（P>0.05）。结果见表 3。

表 3　ΔNp63 基因对 TCCB5637 细胞粘附性的影响（$\bar{x} \pm s$）

分组	样本量	平均 A 值（570 nm）
干扰质粒组	4	0.295 ± 0.083*
阴性质粒组	4	0.412 ± 0.071
空载体组	4	0.460 ± 0.018

注：*分别与阴性质粒组和空载体组比较（P<0.05）

3　讨　论

ΔNp63 是 p63 基因的两个亚型之一，同属于 p53 家族，在结构上与 p53 具有高度的相似性，是 p53 经典调节机制中的从属基因，对其作用机制的研究主要集中在细胞周期调节上[12~14]。而近年研究发现，ΔNp63 能通过对侵袭、转移功能从而促进肿瘤的发展[7,8]。在我们的前期研究中显示 ΔNp63 基因在膀胱肿瘤中高表达，表明 ΔNp63 在膀胱肿瘤的发展过程中与肿瘤发生、发展呈正相关，同时对 5637 细胞检测发现 ΔNp63 对细胞周期有抑制作用[9,10]。

RNA 干扰（RNA interference，RNAi）技术是利用小的双链 RNA，高效特异性的阻断特定基因表达，诱使细胞表现出特定基因表型缺失的技术[15]。载体介导的细胞内表达 siRNA 的方法，是在哺乳动物细胞中特异性抑制基因表达的技术，现广泛应用于基因功能的研究[16]。本研究针对人源 ΔNp63 基因设计并化学合成 siRNA，用脂质体法转染到 TCCB5637 细胞中。然后应用 Real-time PCR 和 Western blot 检测 ΔNp63 的表达水平发现，质粒干扰组细胞 ΔNp63 的表达水平明显降低，这就证实已成功干扰 TCCB5637 细胞中 ΔNp63 基因。

肿瘤细胞的侵袭、转移是一个多步骤过程，其中，肿瘤细胞的侵袭运动能力和与基底膜的粘附能力对于肿瘤细胞侵袭、转移有着重要的指导意义。基底膜是阻止癌细胞侵袭、迁移的天然屏障，是以Ⅳ型胶原为主的三维网络结构[18]，在本实验中，我们利用 MTT 法来检测膀胱肿瘤细胞对Ⅳ型胶原的粘附性，以在 570 nm 处的吸光度来反映肿瘤细胞对基底膜的粘附性，结果显示 ΔNp63 干扰质粒稳定转染的 5637 细胞异质粘附性降低。这一方法与传统的显微计数方法比较减少了主观因素对结果的影响，具有更高的可信度。同时，我们对稳定转染干扰质粒的 5637 细胞做 transwell 侵袭实验来探讨在 ΔNp63 表达降低的情况下，膀胱肿瘤细胞侵袭能力的改变；结果显示，稳定转染 ΔNp63 干扰质粒的肿瘤细胞在体外与阴性质粒组和空载体组比较，穿透侵袭能力明显减弱。而我们通过激光共聚焦显微镜观察到 ΔNp63 定位在肿瘤细胞核，并被干扰质粒有效地抑制，这一结果与 Di Como CJ[19]等的研究一致。

通过上述实验研究证实，ΔNp63 基因明显增加肿瘤细胞的侵袭能力，从而进一步促进肿瘤的发生发展。其作用机制可能是通过对某些细胞间或者细胞与基质间的粘附分子的调节而实现的，相关的调控基因及相应的作用机制有待于进一步实验研究。本研究为 ΔNp63 基因功能的认识注入了新视角，也为进一步的机制研究做准备。

基础研究 文章编号：0253-3626（2011）04-0429-04

电针刺激对肥胖大鼠脂肪组织 C 反应蛋白、白细胞介素 -6 表达的影响

刘祖丽[1]，唐成林[2]，余 敏[1]，侯懿烜[1]，邹 婕[1]，刘仁建[1]

（1. 重庆医科大学中医药学院针灸推拿科；2. 重庆医科大学科研处基金科，重庆 400016）

【摘 要】目的：观察不同强度电针刺激对单纯性肥胖大鼠脂肪组织 C 反应蛋白（C-reactive protein，CRP）、白细胞介素-6（Interleukin-6，IL-6）蛋白表达的影响。方法：选用 SD 雄性大鼠，随机分为对照组、模型组、2 V 电针组、1 V 电针组，对照组用普通鼠饲料喂养，其余各组均用高脂饲料喂养。针刺大鼠“足三里”和“三阴交”穴，采用不同强度电针治疗 14 d 后，比较治疗前后各组大鼠体重指数（Lee's 指数），用酶联免疫吸附法检测肥胖大鼠附睾脂肪组织 CRP 的含量，用蛋白质印迹技术检测肥胖大鼠附睾脂肪组织 IL-6 蛋白表达。结果：2 电针组肥胖大鼠 Lee's 指数较模型组显著降低（$P<0.01$），电针组脂肪组织中CRP 的含量及 IL-6 的表达较模型组显著降低（$P<0.01$），2 V 电针组与 1 V 电针组比较，也有显著差异（$P<0.01$，$P<0.05$）。结论：电针能有效减轻肥胖大鼠体重，降低肥胖大鼠脂肪组织 CRP 的含量和 IL-6 的表达，改善肥胖大鼠机体的炎症反应状态，且 2 V 电针组效果优于 1 V 电针组。

作者介绍：刘祖丽（1982-），女，硕士，研究方向：针灸减肥机理。

通信作者：唐成林，男，副教授，Email：CYTCL996@163.com。

基金项目：重庆市卫生局资助项目（编号：07-2-63）；重庆市九龙坡区科委资助项目（编号：06370302）。

参 考 文 献

[1] Senoo M，Seki N，Ohira M.A second p53-related protein，p73L，with high homology to p73[J].Biochem Biophys Res Commun，1998，248（3）：603-607.

[2] Yang A，Kaghad M，Wang Y.p63，a p53 homolog at 3q27-29，encodes multiple products with transactivating，death-inducing，and dominant-negative activities[J].Molecular Cell，1998，2（3）：305-316.

[3] Orit K S，Mireia C M，Tian H S，et al.Distinct expression profiles of p63 variants during urothelial development and bladder cancer progression [J].The American Journal of Pathology，2011，178（3）：1350-1360.

[4] Dohn M，zhang S，Chen X.p63 alpha and DeltaNp63alpha can induce cell cyclearrest and poptosis and differentially regulate p53 target genes[J]. Oncogene，2001，20（25）：3193-3205.

[5] Robert P.Dellavalle，Patrick Walsh，Angela Marchbank，et al.CUSP/p63 expression in basal cell carcinoma[J].Experimental Dermatology，2002，11（3）：203-208.

[6] Barbieri C E，Tang L J，Brown K A，et al.Loss of p63 leads to increased cell migration and up-regulation of genes involved in invasion and metastasis[J].Cancer Res，2006，66（15）：7589-7597.

[7] Higashikawa K，Yoneda S，Tobiume K，et al.Snail-induced down-regulation of DeltaNp63alpha acquires invasive phenotype of human squamous cell carcinoma[J].Cancer Res，2007，67（19）：9207-9213.

[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] He Y F，Wu X H，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，2008，23：825-832.

[10] 何云峰，吴小候，罗春丽，等.ΔNp63 shRNA 表达质粒的构建及在膀胱癌中的作用[J].中华肿瘤杂志，2006，28（11）：820-825.

[11] 刘 莉，李祖国，杨之光，等.抑癌基因 KAI1 对大肠癌细胞生物学行为的影响[J].第一军医大学学报，2003，23（6）：587-590.

[12] Senoo M，Pinto F，Crum C P，et al.p63 is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia[J].Cell，2007，129（3）：523-536.

[13] Jacobs，W B，Govoni G，Ho.D，et al.P63 is an essential proapoptotic protein during neural development[J].Neuron，2005，5（48）：743-756.

[14] Flores E R，Sengupta S，Miller J B，et al.Tumor predis-posetion in mice mutant for p63 and p73：evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family[J].Cancer Cell，2005，7（4）：363-373.

[15] Fire A，Xu S，Montgomery M K，et al.Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenochabditis elegans[J].Nature，1998，391（6669）：806-811.

[16] Elbashir S M，Harborth J，Lendeckel W，et al.Duplexes of 21 nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cell[J]. Nature，2001，411（6836）：494-498.

[18] swisshelm K，Macek R，Kubbies M. Role of claudins in tumorigenesis [J].ADV Drug Deliv Rev，2005，57（6）：919-928.

[19] Di Como C J，Urist M J，Babayan I，et al.p63 expression profiles in human normal and tumor tissues[J].Clin Cancer Res，2002，8（2）：494-501.

（责任编辑：关蕴良）