基础研究 文章编号:0253-3626(2009)08-1032-04

新基因 hepaCAM 对膀胱癌细胞体外生物学影响

王 磊[1],吴小候[1],罗春丽[2],蔡晓钟[2],吴绮思[3]
(1. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科;2. 重庆医科大学医学检验系;
3. 重庆医科大学临床医学 2003 级七年制临床二系,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究肝细胞粘附分子(Hepatocyte cell adhesion molecule,hepaCAM)对人类膀胱癌 T24 细胞体外生物学影响。方法:脂质体法转染 pEGFP-N2-hepaCAM 质粒入 T24 细胞,激光共聚焦显微镜检测其蛋白定位;筛选稳定表达细胞株;Western blot 检测蛋白表达。细胞粘附、基质胶侵袭实验及 MTT 实验研究该基因对细胞粘附力、活动力及增殖力的影响。结果:hepaCAM 在单个细胞中分布在细胞核周边区域;相互连接细胞中主要分布于细胞间相互接触区域。获得稳定表达 hepaCAM 基因的 T24 细胞。体外粘附实验、基质胶侵袭实验证明实验组细胞粘附力及活动力明显高于空白组及阴性对照组。MTT 法检测转染 hepaCAM 基因细胞增殖力明显低于空白组及阴性对照组。结论:hepaCAM 基因可显著抑制人类膀胱癌 T24 细胞恶性行为,可能是通过增强细胞 - 基质间粘附及抑制细胞增殖力从而影响肿瘤细胞的浸润和转移。

【关键词】膀胱移行细胞癌;hepaCAM 基因;细胞粘附
【中国图书分类法分类号】R737 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-03

The effect of hepaCAM gene on biological behavior of TCCB cell in vitro

WANG Lei, et al
(*Department of Urologic Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of transfection with wild hepaCAM gene on biological behavior of the transitional cell carcinoma of bladder in vitro. *Methods*: Human TCCB cell line T24 was transfected with pEGFP-N2-hepaCAM, mock plasmid pEGFP-N2 with lipofectamine. Laser confocal microscopy was used to detect the location of hepaCAM in cells. Western bolt was used to determine the expression of target of hepaCAM in stable cells. The cell adhesive and motility ability were tested by cell spreading assay and matrigel invasion assay. Cell proliferation ability was investigated by MTT assay。 *Results*: In well spread cells, hepaCAM localized on the perinuclear membrane, whereas in the cells which contacts, hepaCAM predominantly accumulated at the sites of cell-cell contacts on cell membrane. Cell clone with stable expression of hepaCAM, was acquired. In vitro experiments as cell spreading assays and matrigel invasion assays showed the cell adhesion and cell motility properties of hepaCAM group were apparently enhanced compared with the non-transfection or mock-vehicle groups. The MTT assay showed cell proliferation ability in the hepaCAM group was notably decreased when compared with the non-transfection or mock-vehicle groups. *Conclusion*:The hepaCAM gene can restrain malignant phenotypes of the human TCCB cells in vitro ,and may inhibit the TCCB invasion and metastasis by influencing the function of some adherence and proliferation factors.

【Key words】Bladder transitional cell carcinoma; HepaCAM gene; Cell adhesion molecule

膀胱移行细胞癌(Transitional cell carcinoma of bladder,TCCB)是泌尿外科最常见的肿瘤,病因及发病机制尚未完全明确。hepaCAM 基因是 2005 年 Shali Shen 等[1]发现的编码免疫球蛋白类细胞粘附分子的新基因,具有抑制肿瘤增殖的能力,正常表达在人类肝脏中,在原发性肝癌及多种肝癌细胞株中表达降低或缺失。前期研究中,我们采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测到人类正常膀胱组织中 hepaCAM 基因表达正常,而 TCCB 组织中表达出现降低或缺失,在 TCCB 细胞株 T24 及 BIU-87 中表达完全缺失。本实验将野生型 hepaCAM 基因通过真核表达载体导入该基因表达缺失的 TCCB 细胞株 T24 中,激光共聚焦显微镜检测转染后 hepaCAM

作者介绍:王 磊(1982-),男,硕士,
研究方向:泌尿系肿瘤的诊治。
通讯作者:吴小候,男,教授,E-mail:wuxiaohou@hotmail.com。

蛋白的细胞定位，对转染后 T24 细胞进行细胞粘附力、增殖力及活动力的研究。探讨 hepaCAM 在膀胱癌中可能的作用机制，也为 TCCB 的基因诊断及治疗提供更多的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

真核表达质粒 pEGFP-N2-hepaCAM 及阴性对照质粒 pEGFP-N2 由基因发现机构：新加坡国立大学沈莎莉实验室惠赠。实验组质粒全长约 6.0 kb，含 1.2 kb 的 hepaCAM cDNA 和筛选标志 neo 基因；T24 细胞株由重庆医科大学基础研究所提供。人工基质膜购自 Collaborative Research 公司；脂质体 LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司；兔抗 GFP 单克隆抗体购自碧云天公司；HRP 标记的二抗羊抗兔 IgG 及 HRP-DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥公司；Transwell 小室购自 Corning 公司；其他试剂购自 Sigma 公司。

1.2 细胞瞬时转染

取对数生长期细胞，按 1×10^5 个 / 孔密度接种于底部铺有盖玻片的 24 孔培养板。按脂质体说明书进行转染。24 h 蛋白表达明显时，4% 多聚甲醛固定、50% 甘油封片后，激光共聚焦显微镜下观察 hepaCAM 蛋白定位，转染阴性质粒细胞为阴性对照组。

1.3 稳定克隆的筛选

取对数生长期细胞，以 1×10^5 个/孔密度接种于 6 孔板，按说明书操作进行转染，36 h 后换含有 400 μg/ml G418 的培养基筛选，3 周后选出抗性克隆株继续培养。以未转染细胞为空白对照组，转染阴性质粒细胞为阴性对照组。

1.4 Western blot 鉴定蛋白

按试剂盒说明书提取总蛋白，测定样品蛋白浓度符合实验要求后，按比例与 5× 上样缓冲液混合，置 100℃沸水中煮 5 min。取等量蛋白样品及蛋白 Marker 上样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳后电转移，将凝胶转移至 PVDF 膜上，置于含 1% 脱脂奶粉的 TBST 中封闭过夜。PVDF 膜先后与 1:500 稀释的一抗溶液及 1:1 000 稀释的二抗溶液作用，HRP-DAB 底物显色试剂盒内的各溶液混合，滴于膜上，室温染色 10 min，显色后拍照。

1.5 细胞粘附实验

将 1×10^4 个细胞接种于覆盖有 200 μl（100 μg/ml）人工基质胶的 6 孔板中培养。接种 30 min、2 h 后，倒置显微镜下观察细胞形态学变化，未延展细胞为圆形，延展细胞有明显细胞突起。10 个随机区域进行粘附细胞百分率测定（>60 细胞 / 每区域），取均值。

1.6 细胞解离实验

覆盖有人工重构基质膜材料 Matrigel 的 6 孔板，接种 1×10^5 个细胞，过夜使其长成融合的单细胞层，室温下加入 400 μl 含有 1 mmol/L 的 EDTA 磷酸缓冲盐水，细胞解离程度在倒置显微镜下 5 和 15 min 时拍照，未解离细胞观察呈多边形，解离的细胞观察呈圆形。在 10 个随机的区域进行记数，计算解离细胞的百分比。

1.7 细胞迁移实验

人工基质膜稀释成 100 μg/ml 加入 transwell 小室的上室滤膜表面，用前湿润 30 min。小室外加入等比混合的 NIH3T3 上清液和完全培养液，小室内加入 1×10^5 个 /ml 的细胞 100 μl，培养液为含 1% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液。孵育 12 h，擦去上室膜面细胞，甲醇固定，HE 染色后封片。倒置显微镜下随机计数 5 个视野，取均值。

1.8 细胞生长曲线

对数生长期细胞制成悬液，以 1×10^4 个细胞接种于 96 孔培养板（200 μl/ 孔）后培养，以培养液为空白对照。连续检测 7 d，加入 5 mg/ml MTT 20 μl，培养 4 h 弃上清，加入 150 μl 二甲亚砜，震荡 10 min 后测定波长 492 nm 的吸收值，绘制细胞生长曲线。

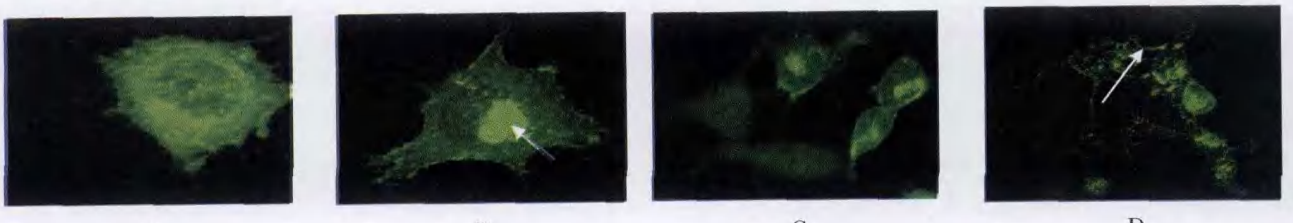
1.9 统计学分析

应用 SPSS13.0 统计软件进行分析，采用成组设计 t 检验进行统计分析，数据以均数 ± 标准差表示，$P\leq0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 hepaCAM 蛋白细胞定位

激光共聚焦显微镜显示：单个延展细胞上，hepaCAM 蛋白定位于核周区域及细胞突起表面（图 1B）；细胞相互连接时，hepaCAM 蛋白形成并指结构分布在细胞膜表面相互接触突起上，呈现出典型细



A B C D

A、C. 为转染阴性质粒组细胞；B、D. 为转染 hepaCAM 质粒组细胞

图 1 激光共聚焦显微镜下 hepaCAM 蛋白的细胞定位（×1 000）（白色箭头）

胞粘附分子特性(图 1D)。

2.2 稳定细胞筛选

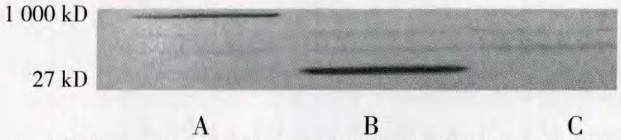
细胞转染后在 G418 筛选下大部分细胞死亡，14 d 后见剩余带荧光细胞呈岛状生长。继续抗性筛选，获得抗性克隆细胞，传代在维持浓度的 G418 中培养。

2.3 蛋白表达检测

通过抗 GFP(绿色荧光蛋白)抗体来检测蛋白表达显示：未转染组无特异蛋白表达条带，转染阴性质粒组及转染实验组细胞中，分别出现约 27 kD 及约 100 kD 的特异性条带。GFP 分子量为 27 kD，hepaCAM 蛋白分子量约为 75 kD(图 2)。

2.4 细胞粘附实验

实验组细胞粘附率明显高于其他两组，未转染组和转染阴性质粒组细胞间无明显差异(表 1)。



A. 为转染 hepaCAM 质粒组；B. 为转染阴性质粒组；C. 为未转染组

图 2 稳定转染细胞的蛋白表达检测

2.5 细胞解离实验

实验组细胞解离率明显低于其他两组，未转染组和转染阴性质粒组细胞间无明显差异(表 2)。

2.6 细胞迁移力影响

实验组细胞迁移力(102.30±16.06)高于其它两组($P<0.05$)，转染阴性质粒组(43.20±10.45)与未转染组(41.00±9.94)细胞间差异无统计学意义($P>0.05$)，图 3。

2.7 细胞增殖力影响

MTT 法检测细胞增殖：培养第 5 d，实验组细胞与其他两组相比，细胞增殖速度明显减慢，细胞增殖抑制率约为未转染组 7 倍左右($P<0.01$)，未转染组细胞及转染阴性质粒细胞组间无明显差异，提示 hepaCAM 基因对 T24 细胞的增殖具有显著抑制作用($P>0.05$ 图 4)。

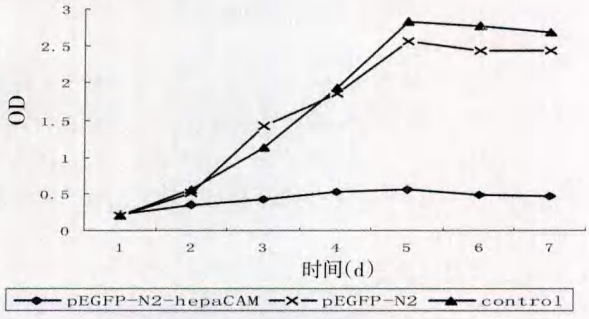
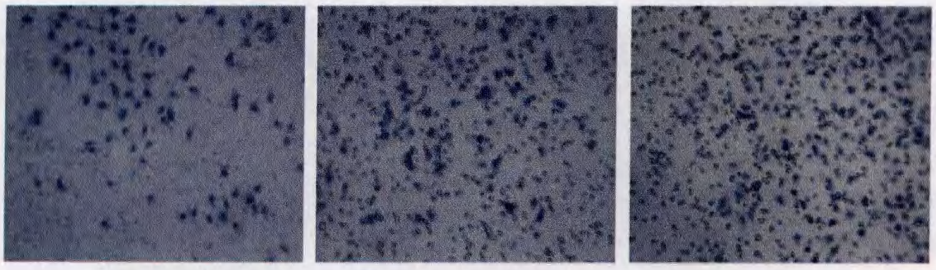


图 4 细胞生长曲线(7 d)



A. 为未转染组　　B. 为转染阴性质粒组　　C. 为转染 hepaCAM 质粒组

图 3 Transwell 小室迁移实验(×40)

表 1 细胞粘附率($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

时间	未转染组	转染空质粒组	转染 heapCAM 组
30 min	7.30 ± 2.56	6.75 ± 2.83#	57.40 ± 7.28*
2 h	21.89 ± 5.80	20.54 ± 7.52#	94.18 ± 2.44*

*:heapCAM 组与未转染组或质粒组比较，$P<0.05$；#:未转染组与空质粒组比较，$P>0.05$

表 2 细胞解离率($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

时间	未转染组	转染空质粒组	转染 heapCAM 组
5 min	49.07 ± 9.34	51.50 ± 4.62#	7.33 ± 4.88*
15 min	96.36 ± 1.27	97.64 ± 0.77#	9.38 ± 2.51*

*:heapCAM 组与未转染组或空质粒组比较，$P<0.05$；#:未转染组与空质粒组比较，$P>0.05$

3 讨 论

恶性肿瘤的一个重要生物学特征是对邻近组织的浸润及远处转移。目前研究认为,除肿瘤细胞周边新生血管形成外,细胞粘附能力改变是引起浸润和转移最重要的因素。细胞粘附分子的表达紊乱在肿瘤发生发展过程中起着关键作用,是肿瘤恶变的基本条件[2,3]。hepaCAM 基因是由 Shali Shen 等发现,基因定位人染色体 11q24,产物为含 416 个氨基酸残基的跨膜蛋白,蛋白结构具有典型细胞粘附分子特性。实验表明:hepaCAM 在正常肝组织及原发性肝癌中存在显著表达差异[4]。外源性 hepaCAM 基因重新表达在肝癌细胞株及乳腺癌细胞株后,具有介导细胞-基质间粘附、抑制肿瘤细胞增殖的能力,并且在信号传导及调控细胞增长过程中也可能发挥重要作用。更多研究发现:hepaCAM 是一种磷酸化糖蛋白,其细胞内区域虽对蛋白定位和二聚体形成无影响,但对 hepaCAM 基因发挥正常生物作用是必须的结构单位[5]。因此,正如 TSLC1 及 NCAM-1 基因一样[6,7],hepaCAM 基因可能是一种新的抑癌基因(Tumor-suppressor gene,TSG)。

由于 TCCB 与原发性肝细胞癌具有一定程度相似性,搜索表达序列标签发现:hepaCAM 基因广泛表达于人类多种组织及器官。推测 hepaCAM 基因有可能与 TCCB 的发展有关。前期我们采用逆转录聚合酶链反应对手术切除的 28 例人类正常膀胱组织及 34 例不同临床病理参数的 TCCB 标本进行 hepaCAM 基因表达检测,结果显示:TCCB 组织和正常膀胱粘膜中 hepaCAM 的半定量值为 0.099±0.085 和 0.301±0.043,两组间具有显著性差异($P<0.05$)。hepaCAM 基因在表浅性(T_a~T_1)和浸润性(T_2~T_4)TCCB 中的平均半定量值分别为 0.222±0.056 和 0.062±0.048,两者之间的差异有显著差异($P<0.05$);相比之下:hepaCAM mRNA 半定量值在不同性别,不同分期,初发及复发性肿瘤的半定量值统计学分析均无显著意义($P>0.05$),同时发现 hepaCAM 基因在 TCCB 细胞株 T24 及 BIU-87 中表达缺失。

为了更多研究该基因在人类肿瘤中作用,我们利用脂质体介导的基因转染方法,将含有野生型 hepaCAM 基因的真核表达质粒转染入该基因表达缺失的膀胱癌 T24 细胞中。激光共聚焦显微镜显示转染细胞中 hepaCAM 蛋白在 T24 细胞中的表达具有典型细胞粘附分子的特征:单个细胞上,主要表达在细胞核周边区域及细胞膜表面突起区域;相互连接的细胞中,主要定位在细胞间接触的细胞膜突起上。Western blot 显示:转染后的细胞稳定表达 hepaCAM 蛋白。细胞粘附及细胞解离实验证明:hepaCAM 基因具有明显介导 T24 细胞与细胞外基质的粘附作用。基质胶迁移实验证实转染 hepaCAM 基因的细胞迁移能力强于未转染组及转染阴性质粒组,这与 Mei Chung Moh 等[1,5]研究 hepaCAM 在肝癌细胞株 HepG2 细胞及乳腺癌细胞株 MCF7 细胞中结果不全相符,可能与不同组织来源的肿瘤细胞迁移能力不同相关,该方面的结果尚需更多的研究证实,而 MTT 实验显示:hepaCAM 基因能明显抑制 T24 细胞的增殖,这与 Mei Chung Moh 得到的结论相同。以上实验结果不仅证明了 hepaCAM 基因在人类 TCCB 中是一种抑癌基因,并且为研究其在人类肿瘤发生发展中,特别是在恶性肿瘤发展过程中的作用提供了更多的实验依据。hepaCAM 基因作为一种新的具有肿瘤抑制作用的细胞粘附分子,研究前景是值得期待的。

参 考 文 献

[1] Chung M M, Hoon L L, Shen S L. Cloning and characterrization of hepaCAM, a novel Ig-like cell adhesion molecule suppressed in human hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2005, 42(6): 833-841.

[2] Turley E A. Proteoglycans and cell adhesion. Their putative role during tumorigensis [J]. Cancer Metastasis Rev, 1984, 3(4): 325-339.

[3] Johnson J P. Cell adhesion molecules in neoplastic disease[J]. Int J Clin Lab Res, 1992, 22(2): 69-72.

[4] Moh M C, Lee L H, Yang X, et al. HEPN1, a novel gene that is frequently down-regulated in hepatocellular carcinoma, suppresses cell growth and induces apoptosis HepG2 cells[J]. J Hepatol, 2003, 39(4): 580-586.

[5] Moh M C, Zhang C, Luo C, et al. Structural and functional analyses of a novel Ig-like cell adhesion molecule, hepaCAM, in the human breast carcinoma MCF7 cells[J]. J Biol Chem, 2005, 280(29): 27366-27374.

[6] Masuda M, Yageta M, Fukuhara H, et al. The tumor suppressor protein TSLC1 is involved in cell-cell adhesion[J]. J Biol Chem, 2002, 277(34): 31014-31019.

[7] Krushel L A, Tai M H, Cunningham B A, et al. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) domains and intracellular signaling pathways involved in the inhibition of astrocyte proliferation[J]. Pro Natl Acad SCI USA, 1998, 95(5): 2592-2596.

(责任编辑:冉明会)