泌尿外科学专题 文章编号:0253-3626(2009)09-1157-05

HepaCAM 基因对人膀胱癌细胞增殖的抑制作用研究

杨 超[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,重庆 400016;2. 重庆医科大学检验系,重庆 400016;
3. 重庆医科大学 2004 级七年制,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究 hepaCAM 基因对人膀胱癌 T24 细胞增殖的影响。方法:运用脂质体转染方法,将 pEGFP-N2-hepaCAM 质粒转入 T24 细胞株,经 G418 筛选获得稳定表达的细胞株;RT-PCR 及 Western blot 方法检测目的基因和蛋白表达;MTT 法及克隆形成实验研究 hepaCAM 基因对 T24 细胞体外生长的作用; 流式细胞仪检测细胞周期分布;RT-PCR 技术测定周期调控蛋白 CyclinD1 的 mRNA 表达变化。结果:RT-PCR 和 Western blot 方法分别检测到 hepaCAM 的基因表达和蛋白表达,MTT 检测转染 hepaCAM 基因的细胞生长速度较对照组和空载体组明显减慢($P<0.01$),克隆形成率明显小于对照组和空载体组($P<0.01$)。细胞周期中 G_0/G_1 期比例明显增高($P<0.05$),而 S 期比例减少;CyclinD1 mRNA 表达明显下调($P<0.05$)。结论:HepaCAM 基因通过阻滞细胞于 G_0/G_1 期,减少 CyclinD1 mRNA 表达,抑制 T24 细胞的增殖。

【关键词】膀胱癌;hepaCAM 基因;T24 细胞;转染;抑癌基因

【中国图书分类法分类号】R737.14 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-01-15

The inhibitory effect of gene HepaCAM transfection on the proliferation in human bladder carcinoma cell line

YANG Chao, et al

(*Department of Urologic Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effect of gene hepaCAM transfection on the proliferation in human bladder carcinoma cell line. *Methods*: Plasmid pEGFP-N2-hepaCAM was transfected into T24 cells by Lipofectamine2000, and the T24 cell stably expressing hepaCAM gene was established by G418 selection. The expression of hepaCAM mRNA and protein was detected by RT-PCR and Western blot assays. The effects of hepaCAM on cell proliferation were measured by MTT and colony formation assays. The cell cycle progression were measured by flow cytometry. The expression of CyclinD1 mRNA was detected by RT-PCR. *Results*: Expression of hepaCAM gene and protein were proved by RT-PCR and Western blot assays. The MTT assay showed cell growth in the T24/hepaCAM-GFP group was significantly slow when compared with non-transfection and mock-vehicle groups whereas the rates of clonal formation were greatly decreased ($P<0.01$). Flow eytometric data showed that more positive clone cells were blocked into G_0/G_1 phase and fewer cells went into phase S($P<0.05$). The expression of CyclinD1 mRNA was lower than non-transfection and mock-vehicle groups. *Conclusion*: HepaCAM gene might suppress the proliferation of T24 cells through arresting cell cycle in the G_0/G_1 phase and inhibitting the expression of CyclinD1 mRNA.

【Key words】Transitional cell carcinoma of bladder;HepaCAM;T24 cell;Transfaction;Tumor suppressor gene

细胞粘附分子 (Cellular adhesion molecules, CAMs)是参与细胞和基质之间、细胞与细胞之间相互作用的膜表面受体。最新研究表明,细胞粘附分子作为信号级联受体对于细胞粘附、增殖、凋亡、迁移和分化起重要作用[1]。肝细胞粘附分子(Hepatocyte cell adhesion molecule, hepaCAM)是新发现的可编码免疫球蛋白类细胞粘附分子的新基因,具有抑制肝癌细胞增殖的能力。研究表明,hepaCAM 为人肝癌中的一种新抑癌基因[2]。

迄今,有关 hepaCAM 基因在人类其它肿瘤中的表达及意义研究很少,在膀胱癌中的作用国外未见报道。本实验室初步研究表明,hepaCAM 基因在人正常膀胱组织中高表达而在膀胱癌细胞中低表达。鉴于肿瘤组织的异常生物过程与细胞粘附分子的表达异常有关,细胞粘附分子的变化在肿瘤的发生

作者介绍:杨 超(1982-),男,硕士,
研究方向:泌尿系统肿瘤。

通讯作者:吴小候,男,教授,E-mail:wuxiaohou80@hotmail.com。

和发展中起着重要作用[3]。本课题组采用质粒载体介导外源 hepaCAM 基因转染人膀胱癌 T24 细胞的方法，研究 hepaCAM 基因对人膀胱癌细胞生长的作用，旨在为证实 hepaCAM 基因在人膀胱癌中是一种新的抑癌基因提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

真核表达质粒 pEGFP-N2-hepaCAM 及空载体质粒 pEGFP-N2 由新加坡国立沈莎莉实验室惠赠。T24 细胞株由重庆医科大学基础研究所提供。脂质体 Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司，小量组织/细胞总 RNA 抽提试剂盒购自上海华舜生物有限公司，TaKaRa RNA PCR Kit Ver.3.0 试剂盒购自大连宝生物公司，兔抗 GFP 单克隆抗体购自碧云天公司，HPR 标记的羊抗兔二抗购自武汉博士德公司。PCR 引物由上海生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人膀胱癌移行细胞株 T24 细胞培养于含有 10 %胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基，37℃、5 % CO_2、饱和湿度条件下培养。

1.2.2 细胞转染 将 T24 细胞以 1×10^6 个/孔的密度种于 6 孔板中，待其生长到 90%融合时，按脂质体 Lipofectamine2000 说明书进行转染。实验共分为 3 组：对照组 T24（未转染）、空载体组 T24/pEGFPN2（转染 pEGFP-N2）和实验组 T24/hepaCAM-GFP（转染 pEGFP-N2-hepaCAM）。

1.2.3 转染细胞的筛选及单克隆细胞的建立 转染 48 h 后用含 400 μg/ml G418 及 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基进行筛选，每 3 d 更换一次培养液。当细胞大量死亡时候，将 G418 浓度减半为 200 μg/ml 维持筛选。3 周后出现抗性克隆，然后用有限稀释法挑选单克隆细胞扩大培养。

1.2.4 单克隆细胞系的鉴定

1.2.4.1 RT-PCR 鉴定 hepaCAM mRNA（message RNA，mRNA）按柱式小量组织/细胞总 RNA 抽提试剂盒的说明操作，分别提取对照组、空载体组及实验组细胞的总 RNA，以 β-actin 为内参照，用 RT-PCR 法检测 hepaCAM 基因的 mRNA(461 bp)表达。引物 hepaCAM 上游序列：5'-TACTGTAGATGTGCCCATTTCG-3'，下游序列：5'-CTTCTGGTTTCAGGCGGTC-3'。

1.2.4.2 Western blot 鉴定蛋白 以细胞裂解液提取细胞总蛋白，Bradford 法测定蛋白浓度。以 50 μg 蛋白上样进行 SDS-PAGE 胶垂直电泳分离。电泳结束后，将蛋白转至 PVDF 膜，1%脱脂奶粉室温封闭 1 h 后，加 1∶500 稀释的一抗 4℃过夜；TBST 漂洗 3 次，每次 5 min；加入 1∶1 000 羊抗兔 IgG/HRP 室温孵育 1 h；TBST 洗 3 次，ECL 化学发光剂于暗室中曝光和显影。

1.2.5 MTT 实验 将生长状态良好的稳定转染细胞制成细胞悬液，按 1×10^4 个/孔密度接种于 96 孔板，接种并开始贴壁生长当天记为 0 h，每隔 24 h 为 1 个检测点，MTT 法连续测定 120 h 细胞增殖状况。测定时每孔加入 20 μl MTT(5 mg/ml)，继续孵育 4 h 后终止培养，小心吸取培养孔内液体，每孔加入 150 μl 的 DMSO，振荡 10 min，使紫色化合物充分溶解。选择 570 nm 波长，在酶标仪上测定各孔吸光度值。每孔重复 3 次，绘制细胞生长曲线。

1.2.6 板克隆形成实验 将稳定转染的单克隆细胞以 200 个/孔的细胞分散均匀的接种于 6 孔板中，每 5 d 换新鲜的培养液，于 37℃、5% CO_2 及饱和湿度条件下培养 3 周，出现肉眼克隆时中止培养，甲醇固定，Giemsa 染色，拍照计算克隆形成率。

1.2.7 细胞周期检测 将对照组、空载体组、实验组细胞离心弃上清，加入预冷 70%乙醇溶液中固定 18~24 h。将已固定的细胞悬液和等体积 PI 染液混合，4℃放置 20~30 min。测定前将样品用 300 目的尼龙膜过滤后加入 FCM 的样品室，以激发波长 488 nm 测定。

1.2.8 RT-PCR 检测 CyclinD1 mRNA 表达 mRNA 按柱式小量组织/细胞总 RNA 抽提试剂盒的说明操作，分别提取对照组、空载体组、实验组细胞的总 RNA，以 β-actin 为内参照，用 RT-PCR 法检测周期蛋白 CyclinD1 基因的 mRNA 表达。CyclinD1 引物(477 bp)的上游序列：5'-GAACAGAAGTGCGAGGAGGAG-3'，下游序列：5'-GCGGTAGTAGGACAGGAAGTTGT-3'。

1.2.9 统计学分析 计量资料以表示，采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析，两组间比较采用成组设计 t 检验，计数资料比较采用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 RT-PCR 鉴定 hepaCAM 基因表达

RT-PCR 结果显示实验组的 hepaCAM 的扩增条带明显亮于对照组和空载体组(图 1)，与内参基因 β-actin 的扩增片段相比，实验组的相对表达量明显增加($P<0.05$)，而对照组和空载体组的相对表达量无统计学意义的变化($P>0.05$)，见表 1。说明转染后建立的实验组单克隆细胞系能够特异性的表达 hepaCAM 基因。

2.2 Western blot 蛋白表达鉴定

通过抗 GFP 标签抗体，检测 pEGFP-N2-hepaCAM 融合蛋白在 T24 细胞中表达情况。Western blot 显示：对照组未见特异性条带，空载体组和实验组分别出现约 27 kD 及 102 kD 的特异性条带，GFP 相对分子量为 27 kD，hepaCAM 蛋白分子量约为 75 kD(图 2)。说明转染后细胞经过稳定筛选能够特异性的表达 GFP 蛋白及 hepaCAM 蛋白。

2.3 细胞增殖影响

MTT 法检测细胞增殖率的实验结果显示，96 h 实验组的细胞增殖率为 54.01%±12.06%，其增殖速度明显慢于对照组 161.67%±12.17%及空载体组 160.63%±13.95%（$P<0.01$），而对照组与空载体组间相比无明显差异（$P>0.05$）。提示 hepaCAM 基因对 T24 细胞的增殖具有明显的抑制能力（图 3）。

2.4 克隆形成实验

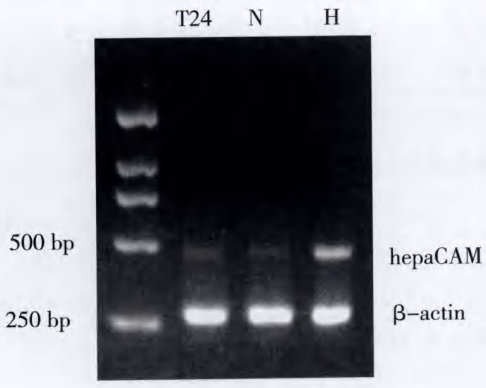
克隆形成实验的结果表明，实验组克隆形成率为 27.67%±4.53%，明显低于对照组 88.06%±7.69%和空载体组 86.83%±5.89%（$P<0.01$），而对照组与空载体组间相比无明显差异（$P>0.05$）。结果提示，hepaCAM 基因对 T24 细胞的增殖具有明显的抑制能力（图 4）。

2.5 细胞周期

细胞周期结果显示：与对照组和空载体组相比，实验组细胞 G_0/G_1 期细胞比例明显增加，而 S 期比例减少，差异有统计学意义（$P<0.05$，表 2）。

2.6 RT-PCR 检测 CyclinD1 mRNA 的表达

RT-PCR 结果显示实验组的 CyclinD1 的扩增条带明显暗于对照组和空载体组（图 5），与内参基因 β-actin 的扩增片段相比，实验组的相对表达量明显减少（$P<0.05$），而对照组和空载体组相对表达量无明显变化（$P>0.05$，表 3）。说明 hepaCAM 基因能减少 CyclinD1 mRNA 表达。



T24. 对照组；N. 空载体组；H. 实验组

图 1 RT-PCR 鉴定 hepaCAM 基因的 mRNA 表达

表 1 各组细胞 hepaCAM 基因 mRNA 表达水平（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

	mRNA 的表达（目的基因 mRNA/β-actin mRNA）		
	T24	N	H
hepaCAM	0.236±0.057	0.199±0.123	0.630±0.099*

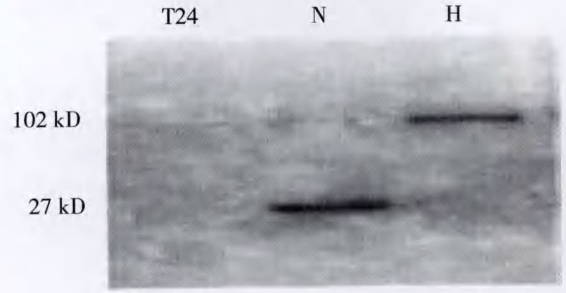
T24:对照组 N:空载体组 H:实验组

注：与对照组和空载体组相比，*$P<0.05$

3 讨 论

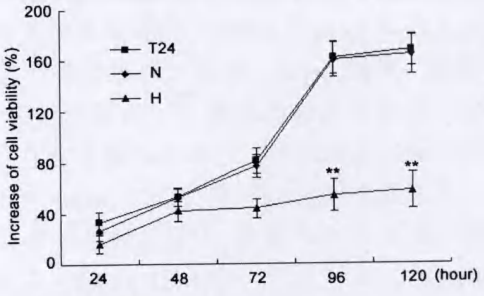
细胞粘附分子根据结构和功能上的特性主要分为 4 类：钙粘蛋白家族[4,5]、整合素家族[6]、选择素家族[7]、免疫球蛋白超家族[8]。研究表明：免疫球蛋白超家族类粘附分子多属于肿瘤抑制基因，可阻止肿瘤的生长和转移[4,9]。例如，神经细胞粘附分子（Neural cell adhesion molecule，NCAM）不仅参与神经发育、信号传导和轴突形成，而且在人胃癌、结肠癌、胰腺癌中低表达与预后不良密切相关[10]。另一种与肿瘤相关的免疫球蛋白超家族类粘附分子为癌胚抗原粘附分子 1（Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule-1，CEACAM1），研究表明，CEACAM1 在结肠癌和前列腺癌细胞中的表达缺失，而重新恢复其在结肠癌和前列腺癌中的表达后，癌细胞的生长将被显著抑制，CEACAM1 亦能降低裸鼠的成瘤率[11,12]。

HepaCAM 基因是在肝组织中鉴定的一种新的粘附分子，基因定位于人类染色体 11q24 区域，编码产物是由 416 个氨基酸组成的跨膜糖蛋白，结构表现出典型的免疫球蛋白类细胞粘附分子的特性：2 个细胞外 Ig 类区域，一个跨膜区域及一个细胞内尾。研究表明：hepaCAM 基因在人类肝脏组织中呈



T24. 对照组；N. 空载体组；H.实验组

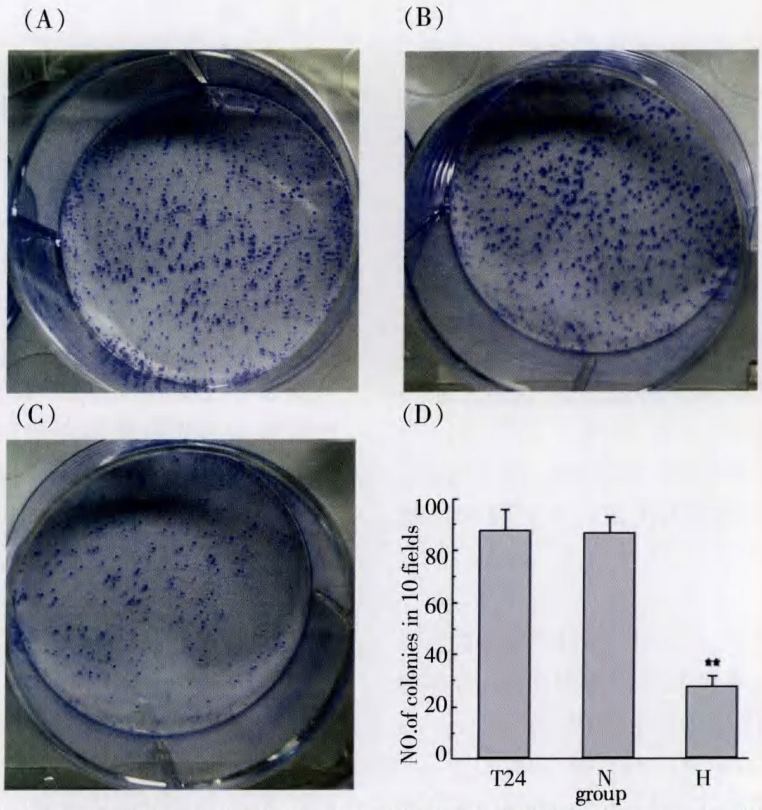
图 2 Western blot 鉴定转染后细胞蛋白表达



T24. 对照组；N. 空载体组；H. 实验组

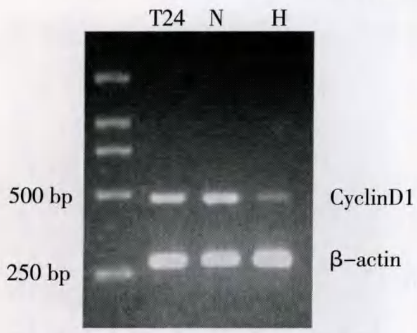
注：与对照组和空载体组相比，**$P<0.01$

图 3 各组细胞的生长曲线



(A)对照组(T24);(B)空载体组(N);(C)实验组(H);(D)各组的克隆形成率。**P<0.01 与对照组和空载体组相比。

图 4 各组细胞的克隆形成率



T24. 对照组;N. 空载体组;H. 实验组

图 5 RT-PCR 鉴定 CyclinD1 基因的 mRNA 表达

现均一高表达水平,而在原发性肝细胞癌中表达下降甚至缺失, 当外源野生型 hepaCAM 基因重新表达在人肝癌 HepG2 细胞时,能够显著抑制肿瘤细胞的增殖, 推断 hepaCAM 在人肝癌组织中是一种编码免疫球蛋白类细胞粘附分子的抑癌基因,在信号传导及调控细胞增殖过程中发挥着重要作用[2]。

本课题组在前期研究中发现,hepaCAM 基因在膀胱癌组织中表达降低,但表达降低并不代表其在膀胱癌中是抑癌基因。例如:CEACAM1 在结肠癌和前列腺癌中属于抑癌基因[13],而在黑色素细胞瘤中,CEACAM1-L 通过与整合蛋白 β3 的相互作用增加黑色素瘤细胞的迁移和侵袭力,增加肿瘤的恶性行

表 2 各组细胞周期分布(n=3,$\bar{x}\pm s$)

组 别	细胞周期分布(%)		
	G_0/G_1	S	G_2/M
对照组	54.32±9.45	21.95±3.54	23.73±5.60
空载体	52.90±10.35	17.30±4.50	29.80± 4.87
实验组	73.63±8.12*	6.32±1.60*	20.05±4.50

注:与对照组和空载体组相比,*P<0.05。

表 3 各组细胞 CyclinD1 基因 mRNA 表达水平(n=3,$\bar{x}\pm s$)

	mRNA 的表达(目的基因 mRNA/β-actin mRNA)		
	T24	N	H
CyclinD1	0.952±0.124	0.986±0.254	0.631±0.132*

T24:对照组 N:空载体组 H:实验组
注:与对照组和空载体组相比,*P<0.05。

为[14]。为了研究 hepaCAM 对膀胱癌细胞增殖的影响,我们采用质粒载体介导外源 hepaCAM 基因转染 hepaCAM 基因表达缺失的人膀胱癌 T24 细胞,G418 筛选获得稳定表达的单克隆细胞, 在 RT-PCR 和 Western blot 方法鉴定转染模型成功的基础上,通过 MTT 和克隆形成实验表明 hepaCAM 基因能明显抑制膀胱癌细胞的增殖, 证实 hepaCAM 在膀胱癌中是一种新的抑癌基因。此结果提示,hepaCAM 基因可能与粘附分子类的抑癌基因 TSCL1(Tumor sup-

pressor in lung cancer 1)一样,在人类诸多肿瘤的生长调控方面发挥重要作用[15]。

在进一步研究 hepaCAM 基因抑制膀胱癌 T24 细胞增殖机制中,我们发现 hepaCAM 基因通过影响膀胱癌细胞的周期进程,使膀胱癌细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期,从而抑制细胞生长。Shali Shen 等[16,17]的报道则发现,hepaCAM 基因可将人乳腺癌细胞阻滞于 G_2/M 期,并通过细胞周期 P53/P21 通路抑制细胞的增殖。两种细胞周期阻滞的不同,我们推测:可能是因为参与细胞调节的因子种类繁多,各通路并不是完全独立分开,而某些调节因子之间存在相互作用,这种相互作用构成了复杂的网络系统,再加上组织不同的肿瘤细胞独有的特性及表达的抗原不同,当某一调控通路为主时就会导致阻滞周期的不同。

为了进一步阐明 hepaCAM 基因诱导 G_0/G_1 期细胞周期阻滞的通路,我们选择了与 G_1 期相关的细胞周期蛋白 CyclinD1[18]。CyclinD1 在 G_1 期中属于正性调控因子,它与 CDK4 形成活化复合体,使 pRB 蛋白磷酸化,释放出转录因子 E2F,以启动驱动基因 TX 的转录表达,驱使细胞通过检测点,启动 DNA 的复制[19,20]。我们首次在基因水平证明:hepaCAM 能减少 CyclinD1 mRNA 表达,影响细胞的复制,最终导致细胞生长速度减慢。上述结果提示,在膀胱癌的预防和治疗中,Cyclin D1 基因将是一个值得期待的靶基因;另外,针对 Cyclin D1 的抑制剂也将可能为膀胱癌的治疗带来新的转机。当然,hepaCAM 对 Cyclin D1 的抑制作用还需要在蛋白水平及体内实验中进一步得到验证。目前,这部分实验正在进行中。

总之,hepaCAM 通过对细胞周期 G_0/G_1 期的的阻滞以及减少 CyclinD1 mRNA 表达抑制膀胱癌 T24 细胞的生长,表明 hepaCAM 在膀胱癌中是一种新的抑癌基因。另外,hepaCAM 在膀胱癌中对细胞增殖的作用机制有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Thomas GJ, Speight PM. Cell adhesion molecules and oral cancer[J]. Crit. Rev. Oral Biol. Med., 2001, 12(6):479-498.

[2] Chung Moh M, Hoon Lee L, Shali Shen. 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.

[3] Albelda SM. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis[J]. Lab. Invest, 1993, 68(1): 4-17.

[4] Rosales C, O'Brien V, Kornberg L, et al. Signal transduction by cell adhesion receptors[J]. Biochim Biophys Acta, 1995, 1242(1):77-98.

[5] Wesseling J, van der Valk SW, Hilkens J. A mechanism for inhibition of E-cadherin-mediated cell - cell adhesion by the membrane-associated mucin episialin/MUC1[J]. Mol Biol Cell, 1996, 7(4):565-577.

[6] Tedder TF, Steeber DA, Pizcueta P. L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites[J]. J Ex Med, 1995, 181(6): 2259-2264.

[7] Hynes RO. Targeted mutations in cell adhesion genes: what have we learned from them[J]? Dev Biol, 1996, 180(2):402-412.

[8] Williams AF, Barclay AN. The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition[J]. Annu Rev Immunol, 1988, 6:381-405.

[9] Edelman GM. Cell adhesion molecules in the regulation of animal form and tissue pattern[J]. Annu Rev Cell Biol, 1986, 2:81-116.

[10] Ronn LC, Berezin V, Bock E. The neural cell adhesion molecule in synaptic plasticity and ageing[J]. Int J Dev Neurosci, 2000, 18(2-3):193-199.

[11] Hsieh J T, Earley K, Pong R C, et al. Structural analysis of the C-CAM1 molecule for its tumor suppression function in human prostate cancer[J]. Prostate, 1999, 41(1):31-38.

[12] Kunath T, Ordonez-garcia C, Turbide C, et al. Inhibition of colonic tumor cell growth by biliary glycoprotein[J]. Oncogene, 1995, 11(11):2375-2382.

[13] Ebrahimnejad A, Streichert T, Nollan P. CEACAM1 enhances invasion and migration of melanocytic and melanoma cells[J]. Am J Pathol, 2004, 165(5):1781-1787.

[14] Brummer J, Ebrahimnejad A, Flayeh R, et al. cis Interaction of the cell adhesion molecule CEACAM1 with integrin beta(3) [J]. Am J Pathol, 2001, 159(2):537-546.

[15] Sussan TE, Pletcher MT, Murakami Y. Tumor suppressor in lung cancer 1 (TSLC1) alters tumorigenic growth properties and gene expression[J]. Mol Cancer, 2005, 4:28.

[16] Moh MC, 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.

[17] Moh M C, Zhang T, Lee L H, et al. Expression of hepaCAM is downregulated in cancers and induces senescence-like growth arrest via a p53/p21-dependent pathway in human breast cancer cells[J]. Carcinogenesis, 2008, 29(12):2298-2305.

[18] Deshpande A, Sicinski P, Hinds P W. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective[J]. Oncogene, 2005, 24(17):2909-2915.

[19] Harbour JW, Dean DC. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms[J]. Genes Dev, 2000, 14(19):2393-2409.

[20] 王 磊,吴绮思,罗春丽,等.hepaCAM 基因对膀胱癌细胞体外生物学的影响[J].第三军医大学学报,2008,30(21):2051-2054.

(责任编辑:关蕴良)