心、肺、泌尿疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001006

Rce1在膀胱癌的表达及其对T24细胞凋亡的影响

曾强锋[1]，黄亮亮[1]，王德林[1]，何　江[2]，吴文强[3]，何云锋[1]，李　英[4]，麦　力[5]，李建君[1]，刘俊男[1]

（1. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科，重庆 400016；2. 重庆医科大学附属大学城医院消化神经中心，重庆 401331；
3. 重庆市綦江区人民医院泌尿外科，重庆 401420；4. 重庆医科大学生命科学院，重庆 400016；
5. 重庆医科大学生物化学与分子生物学肿瘤研究中心，重庆 400016）

[摘　要] 目的：探讨Rce 1（Ras and a-factor converting enzyme 1）在膀胱癌组织及对应癌旁组织中的表达差异及其意义，探究慢病毒介导shRNA沉默Rce1基因对人膀胱癌细胞株T24细胞凋亡的影响。方法：采用qRT-PCR和Western blot技术检测Rce1在12例膀胱癌组织及对应癌旁组织中mRNA和蛋白表达情况，采用免疫组化技术检测76例膀胱癌组织及对应癌旁组织中Rce1表达情况，结合临床病理资料，分析Rce1表达与临床病理特征的关系。设计针对Rce1基因的shRNA慢病毒干扰载体感染T24细胞，经嘌呤霉素筛选后建立稳定感染细胞系，实时荧光定量PCR、Western blot分别检测感染后各组细胞Rce1 mRNA和蛋白表达水平，应用流式细胞仪检测T24细胞凋亡改变情况。结果：qRT-PCR和Western blot显示在12对癌及癌旁组织中Rce1差异性表达，差异有统计学意义（$P=0.00$）；78例癌组织中Rce1阳性表达率为70.5%（55/78），癌旁组织中阳性率为19.0%（4/21），组间差异有统计学意义（$P=0.000$）；统计学分析表明，Rce1表达量与肿瘤组织学分级、T分期和肿瘤是否远处转移存在相关关系（$P<0.05$）；Kaplan-Meier生存分析显示，Rce1阳性表达与病人术后生存时间呈负相关关系（$P=0.016$）。与空白对照组和阴性对照组相比，感染shRNA慢病毒干扰载体细胞组Rce1 mRNA和蛋白表达水平明显下调（$P=0.000$），细胞凋亡明显增加。结论：Rce1在膀胱癌组织中表达高于癌旁组织，Rce1在膀胱癌的发生发展中可能发挥重要作用，慢病毒介导shRNA沉默Rce1基因能有效下调Rce1在T24细胞中表达，并诱导细胞凋亡；Rce1有望成为膀胱癌临床诊治和预后的一个新指标。

[关键词] 膀胱癌；Rce1；免疫组化；生存分析

[中图分类号] R737.14　　[文献标志码] A　　[收稿日期] 2015-11-02

作者介绍：曾强锋，Email：1293831449@qq.com，
研究方向：泌尿系肿瘤的基因治疗。

通信作者：王德林，Email：dlwangws@sina.com。

基金项目：重庆市基础科学与前沿技术研究专项资助项目（编号：cstc2015jcyjB0228）；重庆市渝中区科技计划资助项目（编号：20150111）；重庆市卫生和计划生育委员会基金资助项目（编号：20143061）。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160623.1549.018.html（2016-06-23）

[9] Yamamura A，Guo Q，Yamamura H，et al. Enhanced Ca^{2+}-sensing receptor function in idiopathic pulmonary arterial hypertension[J]. Circ Res，2012，111（4）：469-481.

[10] Yamamura A，Yamamura H，Yuan JX. Enhanced Ca^{2+}-sensing receptor function in pulmonary hypertension[J]. Yakugaku Zasshi，2013，133（12）：1351-1359.

[11] Wang J，Weigand L，Lu W，et al. Hypoxia inducible factor 1 mediates hypoxia-induced TRPC expression and elevated intracellular Ca^{2+} in pulmonary arterial smooth muscle cells[J]. Circ Res，2006，98（12）：1528-1537.

[12] 彭公永，胡国平，周玉民，等. 常压慢性持续缺氧大鼠肺动脉高压模型的建立[J]. 广东医学，2011，32（5）：573-574.

[13] Bal E，Ilgin S，Atli O，et al. The effects of gender difference on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats[J]. Hum Exp Toxicol，2013，32（7）：766-774.

[14] Campian ME，Hardziyenka M，Michel MC，et al. How valid are animal models to evaluate treatments for pulmonary hypertension?[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol，2006，373（6）：391-400.

[15] Tofovic SP，Jones T，Petrusevska G. Dose-dependent therapeutic effects of 2-Methoxyestradiol on Monocrotaline-Induced pulmonary hypertension and vascular remodeling[J]. Prilozi，2010，31（1）：279-295.

[16] 马　凯，邢泉生，邢介龙，等. 不同剂量野百合碱诱导大鼠肺动脉高压模型的实验研究[J]. 现代生物医学进展，2013，13（21）：4005-4009.

责任编辑：张辉洁）

Expression of Rce1 in bladder cancer and its influence on the apoptosis of T24 cells

Zeng Qiangfeng[1], Huang Liangliang[1], Wang Delin[1], He Jiang[2], Wu Wenqiang[3], He Yunfeng[1], Li Ying[4], Mai Li[5], Li Jianjun[1], Liu Junnan[1]

(1. Department of Urology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; 2. Gastroenterology and Neurology Center, University-Town Hospital of Chongqing Medical University; 3. Department of Urology, Chongqing Qijiang People's Hospital; 4. College of Life Science, Chongqing Medical University; 5. Biochemistry & Molecular Biology Cancer Research Center, Chongqing Medical University)

[Abstract] ***Objective*** To investigate the expression and clinical significance of Ras and a-factor converting enzyme 1 (Rce1) in tissues of bladder urothelial carcinoma (UHC) and pericarcinoma (PC) and to explore the effect of lentivirus-mediated shRNA silencing Rce1 gene on apoptosis and cell cycle of human bladder cancer T24 cells. ***Methods*** Immunohistochemical staining for Rce1 expression was performed in bladder urothelial carcinoma (UCB) and adjacent pericarcinoma tissues, the methods of qRT-PCR and Western blot were utilized to investigate mRNA/protein expression of Rce1 in UCB. Rce1 (+) and Rce1 (-) patients were compared in terms of pTNM grade and differentiation grade. Lentiviral interference vectors of shRNA-Rce1 were constructed successfully and were transfected into T24 cells, then the T24 cells stably knockdown Rce1 gene expression were screened by puromycin. Expression of Rce1 mRNA and protein in T24 cells was detected by qRT-PCR and Western blot, respectively. Apoptosis of T24 cells was examined by flow cytometry. ***Results*** The expressions of Rce1 were highly up-regulated at both mRNA and protein level in carcinoma tissues when compared with those of adjacent ones through qRT-PCR and Western blot analysis. By IHC, positive expression of Rce1 was examined in 55/76 (70.5%) of UCBs and in 4/21 (19.0%) of paired pericarcinoma tissues. Positive expression of Rce1 was correlated with poorer differentiation, higher T classification and tumor metastasis ($P<0.05$). In Kaplan-Meier survival analysis, significant association between positive expression of Rce1 and shortened patients' survival was found ($P<0.001$). Compared with those in control group and negative control group, expressions of Rce1 mRNA and protein were significantly reduced after Rce1-shRNA lentiviral interference vectors being infected ($P=0.000$) and apoptosis was increased significantly ($P=0.000$). ***Conclusion*** The expression of Rce1 is significantly higher in UCBs when compared with that of pericarcinoma tissues, positive expression of Rce1 also correlated with prognosis of patients with UCB. Lentivirus-mediated shRNA silencing Rce1 gene can down regulate the expression of Rce1 gene, promote apoptosis in T24 cells. Rce1 may serve as a biomarker of diagnosis and prognosis in patients with UCB.

[Key words] bladder urothelial carcinoma; Rce1; immunohistochemistry; survival analysis

膀胱癌是泌尿系最常见的恶性肿瘤之一，美国最新统计显示，2014 年膀胱癌患者新增病例 74 690 例，死亡病例 15 580 例[1]，随着生活习惯改变，膀胱癌在我国的发病率逐年增加，为临床诊治提出了新课题。外科手术是膀胱癌最常见的治疗方法，低级别肿瘤一般行膀胱部分切除术或经尿道膀胱电切术，术后行选择性灌注化疗[2]；高级别膀胱癌通常行根治性膀胱切除术[3]。目前临床根据肿瘤 pTNM 分期（pathological tumor-node-metastasis，pTNM）和肿瘤分化程度来判断预后[4]，然而，临床上相同病理分级在术后往往呈现不同预后，预后价值很难达到临床诊治预期，寻找针对膀胱癌患者预后的分子标志物成为了研究热点。

Ras 蛋白和相关调节因子被认为是膀胱癌治疗的新靶点。然而，早期针对 RAS 基因靶向抑制药物的效果让人失望，让 Ras 基因的研究一度陷入了停滞状态。幸运的是，最近关于 RAS 调节酶的最新研究进展使 Ras 基因的研究重新找到了方向，被认为是 Ras 基因的新生"[5]。因此，Ras 相关调节酶将变成为 Ras 基因新的研究方向，它们可能被证明为肿瘤治疗药物的新靶点。有研究发现 Rce1 是-CaaX 蛋白修饰过程中的一个关键酶，Rce1 是一种跨内质网膜的蛋白水解酶，发挥水解-CaaX 蛋白末端 3 个氨基酸的生物学功能，经过水解的-CaaX 蛋白才能进行后续甲基化修饰[6]。最新研究发现 Rce1 不能归类于已知的 3 种膜内蛋白酶家族中，该研究认为 Rce1 是一种全新的膜内蛋白酶__谷氨酸膜内蛋白酶，其中 Rce1 为唯一已知的成员[18]。

有研究表明，沉默 Rce1 能够导致 RAS 蛋白质膜定位异常[7]，并有研究发现 Rce1 在髓内外增殖性疾病中发挥重要作用[8]。本研究通过收集膀胱癌组织及对应癌旁组织，应用 qRT-PCR 技术、Western

blot和免疫组化法并结合临床质料，探究 Rce1 在膀胱癌中表达情况及其意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 材料 人膀胱癌细胞系 T24 购自 ATCC 细胞库；收集重庆医科大学附属第一院泌尿外科 2014 年 2 月到 2015 年 3 月全膀胱切除术后膀胱癌标本及对应癌旁标本 12 例用于 Western blot 和 qRT-PCR 分析；所有病理标本为术前未经放化疗的初发病例，术后病理诊断明确；收集重庆医科大学附属第一院病理科 2009 年 12 月到 2012 年 6 月病理诊断明确的石蜡固定膀胱癌组织 78 例及经 HE 染色证实为正常组织的癌旁组织 21 例，作为对照。患者年龄最小 48，最大年龄 83，平均年龄 65。依据 pTNM 分期，Ta~T1 期 25 例，T2 期 37 例，T3 期 13 例，T4 期 5 例。对患者的随访时间从 12 月到 59 月不等，平均随访时间 38 个月。

1.1.2 试剂 PRMI1640 培养基、普通胎牛血清购自 Hyclone 公司，免疫组化及 Western blot 用多克隆兔抗人 Rce1 抗体购自 Santa Cruz 公司；提取 RNA 用 TRIZOL reagent、逆转录用 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 及 Sybr Green Ⅱ 购自宝生物工程（大连）有限公司；兔抗人 β-actin 抗体、HRP 标记羊抗兔 IgG、RIPA 蛋白裂解液凝、胶试剂盒等试剂均购自上海碧云天公司；电发光液 Western Bright Sirius HRP substrate 购自 advansta 公司；免疫组化试剂盒及 DAB 显色液购自北京中杉金桥生物公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 T24 细胞常规培养在含有 10%胎牛血清 RPMI1640 培养基，于 37 ℃、5%CO_2、饱和湿度孵育箱中培养，每 2~3 d，用 0.25%胰酶将贴壁生长的细胞消化后传代培养。

1.2.2 慢病毒干扰载体的构建 以人 Rce1 基因设计特异性 shRNA 序列和对应无意义阴性对照序列，合成表达 shRNA 的互补 DNA 单链，将各 DNA 单链退火形成带黏性末端的双链，链接到线性化的 pMAGIC7.1 载体后转化 DH5α 感受态细胞，提取质粒进行酶切鉴定并测序，再用 293T 细胞进行慢病毒包装，各组慢病毒重组干扰载体均含绿色荧光蛋白（green fluorescence protein，GFP）和嘌呤霉素抗性基因。慢病毒干扰载体由英杰生命科技有限公司进行测序鉴定、病毒包装和滴度检测。

1.2.3 嘌呤霉素筛选及细胞分组 确定嘌呤霉素的最佳筛选浓度，T24 细胞预先使用 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 μg/ml 嘌呤霉素作浓度梯度筛选，连续观察 5 d，以细胞全部死亡最低浓度为嘌呤霉素。将细胞分为空白对照组，阴性对照组和 Rce1-shRNA 组，根据病毒转染说明书分别转染阴性对照组和 Rce1-shRNA 组，48 h 后于荧光显微镜下观察沾染情况，待荧光表达后于嘌呤霉素嘌呤霉素筛选出稳定表达细胞株，进行后续功能试验。

1.2.4 免疫组化 采用链霉素抗生物素_过氧化物酶 2 步法：病理切片烘干→二甲苯脱蜡→按照酒精梯度水化→柠檬酸盐缓冲液抗原修复→过氧化氢孵育→山羊血清封闭，实验组和阴性对照组分别加一抗（1∶100 稀释）和 PBS 缓冲液 4 ℃过夜，山羊抗兔二抗 IgG-HRP 多聚体 37 ℃孵育 30 min，DAB 显色，苏木精复染，中性树脂封片。

1.2.5 结果判定 同一显微镜低倍镜观察全片，选择 5 个高倍视野，合并 5 个不同视野着色细胞的百分率和胞核、胞质的着色程度，取平均值。根据染色程度及染色细胞百分率进行分析评定：不着色计 0 分，着色淡计 1 分，着色较深计 2 分；大量深棕色颗粒计 3 分；视野着色百分率：阴性计 0 分，≤25%计 1 分，26%~50%计 2 分，≥51%计 3 分，以每张切片染色程度和染色细胞百分率得分相加为最后得分。0 分代表阴性（-），1~2 分代表弱阳性（+），3~4 分代表中等阳性（++），5~6 分代表强阳性（+++）。

1.2.6 Western blot 称量约 40 mg 组织在液氮下研磨充分→200 μl RIPA 裂解液→12 000 r/min 15 min 取上清液→BCA 法 OD 值测蛋白浓度→1/4 体积的 loading buffer100 ℃蛋白变性 5 min。制胶→蛋白上样（约 70 μg）→电泳→转膜→封闭→一抗 4 ℃过夜→二抗 37 ℃孵育 2 h→洗膜→ECL 显影，暗室下凝胶成像仪发光，以 RCE1 与 β-actin 条带灰度值比表示 Rce1 蛋白相对表达水平，实验重复 3 次。细胞蛋白实验步骤同前。

1.2.7 qRT-PCR 称量约 80 mg 组织于液氮下研磨充分→1 ml Trizol 裂解液→1/5Trizol 体积的氯仿→取上清液，加入等体积异丙醇→弃上清液，加入 1 ml 75%乙醇→弃去上清液，室温干燥 5 min，加入适量 DEPC 水溶解 RNA，于核酸浓度测定仪上测定 RNA 浓度，根据总量 1 000 ng 计算逆转录上样量，根据逆转录试剂盒操作说明将总 RNA 逆转录为 cDNA；根据 10 U 体系各组分比例，cDNA 2 μl，上下游引物各 0.4 μl（目的引物序列上游序列：5'-CTCTGGAGGGAACT-CACAGG-3'；下游序列：5'-GAATCATGGTCAGCA ACAGG-3'），ddH_2O 2.2 μl，Sybr Green Ⅱ 5 μl，充分混匀于 Bio-Rad CFX Manager 进行荧光定量，基因表达的倍增比例通过计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 求得，每次实验重复 3 次。细胞 qRT-PCR 实验步骤同前。

1.2.8 细胞凋亡的检测 取空白对照组组，阴性对照组及 Rce1-shRNA 组细胞。培养 72 h 后，各组细胞用 0.125%胰酶消化，PBS 清洗 2 次，离心去上清后上流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率。

1.3 统计学分析

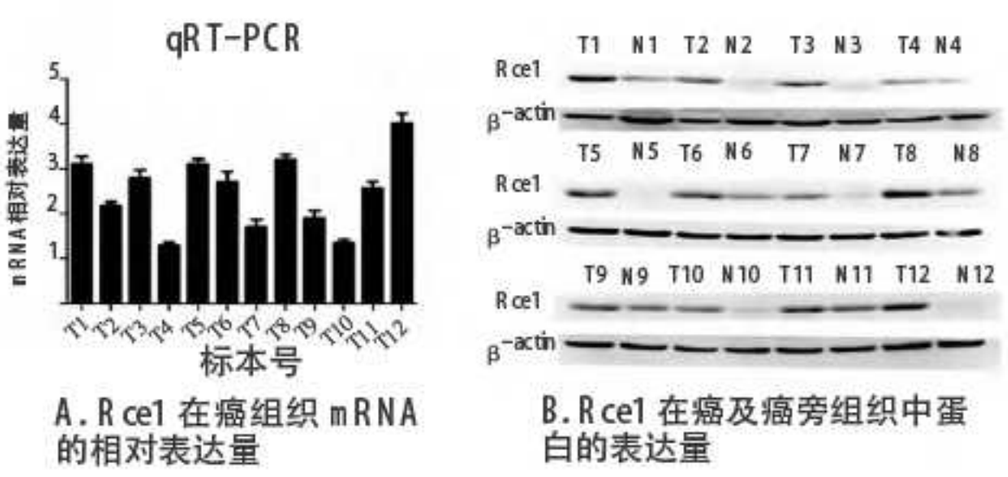
采用 SPSS 19.0 统计软件。实验数据为计量资料，用均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，两组间均数比较采用独立样本 t 检验，多样本均数比较用单因素方差分析，两两比较采用 LSD-t 法。卡方检验分析 Rce1 的表达量与临床病例特征的关系；应用单因素方差分析 Rce1 表达评分与组织分化程度、T 分期及肿瘤是否发生转移之间的关系；Kaplan-Meier 生存曲线用于生存曲线分析，log-rank 检验用于比较生存曲线之间的差异。检验水准 $\alpha=0.05$（双侧）。

2 结 果

2.1 Rce1 在癌及癌旁组织中 mRNA 水平和蛋白水平的表达

通过 qRT-PCR 检测发现，在癌组织中，Rce1 在 mRNA 水

平的表达明显上调，在 12 对标本中，癌组织相对于对应癌旁组织 Rce1 在 mRNA 水平表达最高上调 4 倍，平均表达上调 2.5 倍（图 1A）；Western blot 分析显示，Rce1 在癌组织中的蛋白灰度值比为（0.69±0.06），在癌旁组织中的蛋白灰度值比为（0.36±0.05）（图 1B），Rce1 在癌组织中的蛋白表达量明显高于癌旁组织，差异有统计学意义（t=13.491，P=0.000）。



A. Rce1 在癌组织 mRNA 的相对表达量　B. Rce1 在癌及癌旁组织中蛋白的表达量

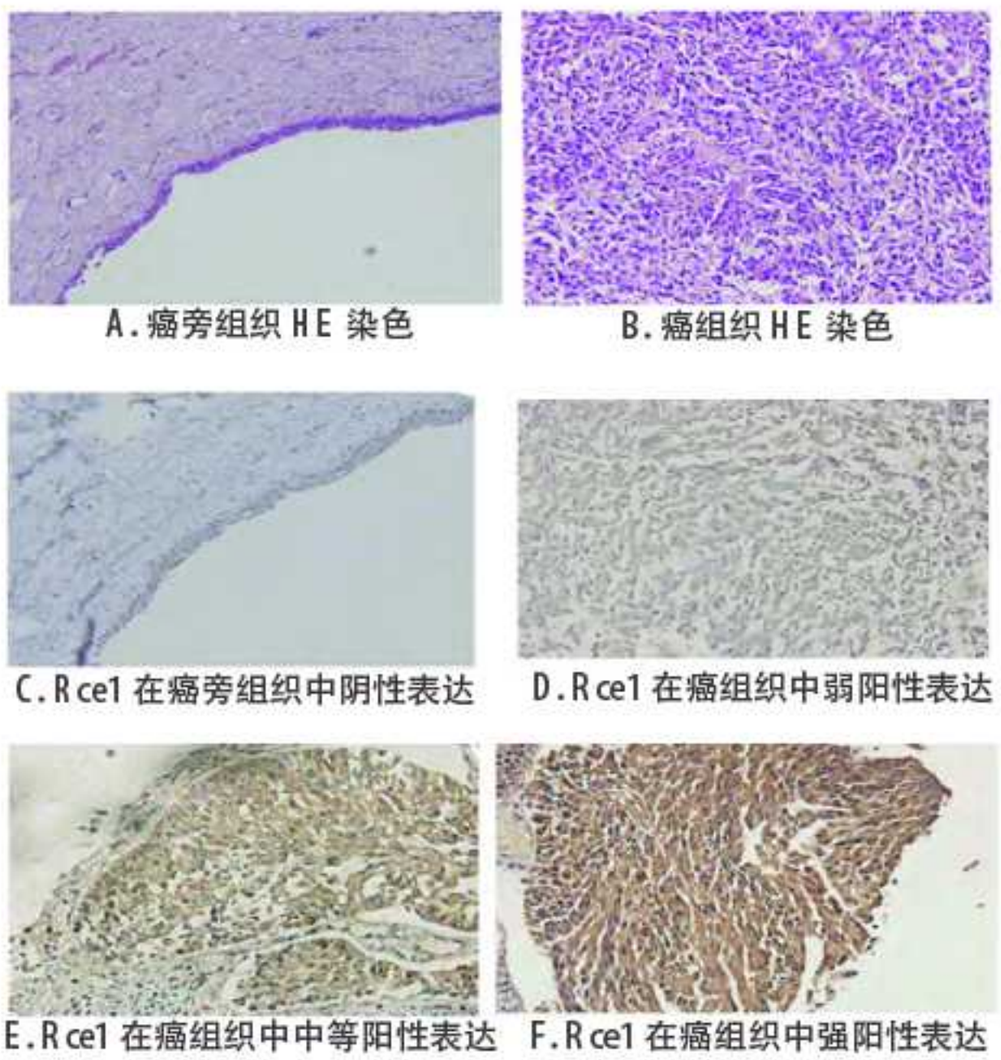
注：A 癌组织相对于对应癌旁组织中 Rce1 在 mRNA 水平的表达量（$\bar{x}\pm s$，n=3）；B Rce1 在癌及癌旁组织中蛋白水平的表达量（T 代表癌组织，N 代表癌旁组织）

图 1 Rce1 在膀胱癌组织及对应癌旁组织中的表达

Fig.1 Expression of Rce1 in UHC and corresponding tissue adjacent to carcinoma

2.2 免疫组化检测 Rce1 的亚细胞定位和蛋白表达水平

78 例癌组织中 Rce1 的阳性表达率为 70.5%（55/78），主要定位于细胞质，染色程度较深，强阳性 31 例，中等阳性 17 例，弱阳性 7 例（图 2D~F）；癌旁组织中 Rce1 阳性率为 19.0%（4/21），染色较钱，中等阳性 1 例，弱阳性 3 例（图 2C）；2 组间结果比较显示，Rce1 在癌组织中的表达明显高于癌旁组织，差异有统计学意义（χ^2=19.200，P=0.000，表 1）。



A. 癌旁组织 HE 染色　B. 癌组织 HE 染色

C. Rce1 在癌旁组织中阴性表达　D. Rce1 在癌组织中弱阳性表达

E. Rce1 在癌组织中中等阳性表达　F. Rce1 在癌组织中强阳性表达

图 2 免疫组化检测 Rce1 的表达

Fig.2 Expression of Rce1 examined by immunohistochemistry

表 1 Rce1 在不同组织中阳性表达（n=99）

Tab.1 Positive expression of Rce1 in different tissues（n=99）

分组	例数	Rce1蛋白 (+)	Rce1蛋白 (−)	阳性率	χ^2值	P值
癌组织	78	55	23	70.5%	19.20	0.00
癌旁组织	21	4	17	19.0%		

2.3 Rce1 的表达量与临床病理特征的关系

从表 2 可以看出 Rce1 在膀胱癌组织中阳性表达差异与肿瘤组织学分化程度、T 分期和肿瘤是否远处转移相关，差异有统计学意义（P<0.05），与患者年龄、性别和肿瘤直径无相关性（P>0.05）；Rce1 在膀胱癌组织学分级和临床分期中存在表达差异，差异有统计学意义（P<0.05），G2 和 G3 相对于 G1 表达评分更高，差异有统计学意义（P=0.038，P=0.000），G2 和 G3 表达差异无统计学意义（P=0.07），T2 期和 T3 期相对于 Ta~T1 表达评分更高，差异有统计学意义（P=0.020，P=0.010），T2 期和 T3 期表达差异无统计学意义（P=0.460）；有无远处转移肿瘤组织免疫组化评分差异也有统计学意义（P=0.045），有转移肿瘤组织中免疫组化评分高于无转移肿瘤组织（表 3）。

表 2 Rce1 在膀胱癌组织中的表达量与临床病理特征的关系（n=78）

Tab.2 Correlation between Rce1 expression and clinicopathological characteristics of bladder urothelial carcinoma（n=78）

临床病理特征	例数（n）	Rce1蛋白 (+)	Rce1蛋白 (−)	阳性率（%）	χ^2值	P值
年龄[a]					0.407	0.524
<65	45	33	12	73.3%		
≥65	33	22	11	66.7%		
性别					0.353	0.553
男性	17	11	6	64.7%		
女性	61	44	17	72.1%		
组织学分级					7.734	0.021
G1	25	13	12	52.0%		
G2	19	13	6	68.4		
G3	34	29	5	85.3%		
pT 分期					9.032	0.011
pT_a~T1	25	13	12	52.0%		
pT2	35	28	7	80.0%		
pT3~4	18	15	3	83.3%		
是否远处转移					4.373	0.037
是	12	12	0	100%		
否	66	43	23	65.2%		
肿瘤直径[b]					0.205	0.651
<2.9	41	28	13	68.3%		
≥2.9	37	27	10	73.0%		

注：a，患者平均年龄；b：肿瘤平均直径

表 3 膀胱癌组织中 Rce1 表达评分与病理特征的关系

（$\bar{x}\pm s$，n=78）

Tab.3 Correlation between clinical characteristics and the Rce1 expression score in bladder urothelial carcinoma（$\bar{x}\pm s$，n=78）

病理特征	切片评分	F 值	P 值
组织学分级		11.762	0.000
G1（n=25）	1.64±2.08		
G2（n=19）a	2.68±2.33		
G3（n=34）ab	4.26±1.94		
pT 分期		6.597	0.002
pT_a～T1（n=25）	1.75±2.17		
pT2（n=35）c	3.39±2.19		
PT3～T4（n=18）cd	4.17±2.48		
是否远处转移		4.152	0.045
是（n=12）	4.75±1.39		
否（n=66）	2.96±2.43		

注：a，与 G1 比较；b：与 G2 比较；c：与 pT_a～T1 比较；d：与 pT2 比较

2.4 Rce1 的表达量与患者术后生存时间的关系

采用 Kaplan-Meier 法，对病例随访资料进行生存分析显示，与 Rce1 表达阴性相比，Rce1 表达阳性病例明显预后不良（图 3），log-rank 检验显示差异有统计学意义（P=0.016）。

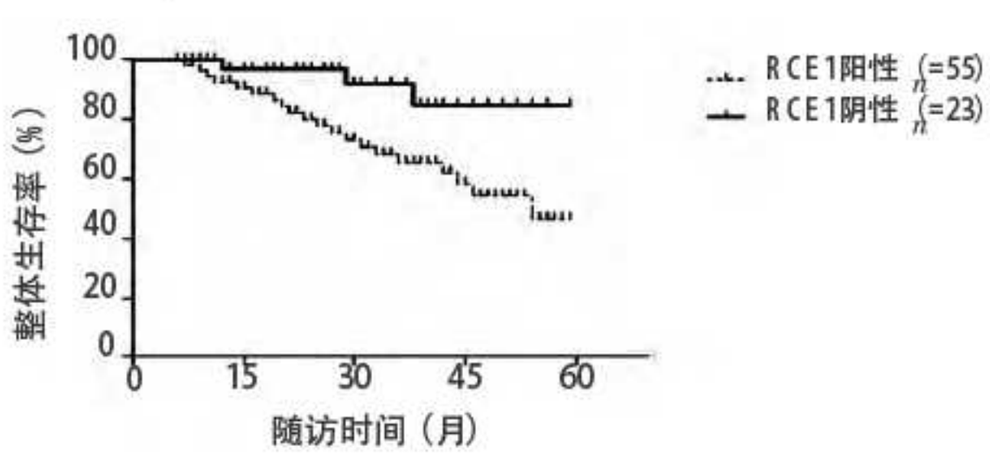


图 3 生存曲线

Fig.3 Survival analyses

2.5 经嘌呤霉素筛选后感染效率的观察

实验发现经嘌呤霉素浓度 2.0 μg/ml 为细胞培养 5 d 后全部死亡的最低浓度，证实其为最佳筛选浓。阴性对照组和 Rce1-shRNA 组病毒 72 h 后于 2.0 μg/ml 嘌呤霉素筛选，通过倒置荧光显微镜观察到各组均有绿色荧光蛋白表达（图 4），通过计算阴性对照组和 Rce1-shRNA 组感染率（感染率=荧光视野下细胞数/普通光视野下细胞数×100%）都在 95% 以上，表明感染成功。

2.6 慢病毒感染后各组 Rce1 mRNA 及蛋白表达情况

以 GAPDH 为内参基因，通过 qRT-PCR 检测发现，与空白对照和阴性对照组相比，Rce1-shRNA 组 mRNA 的表达明显下调，相对于空白对照的表达量为 0.20±0.07，与空白对照和阴性对照组的组间差异有统计学意义（F=0.000，P=0.000），空白对照组与阴性对照组表达无差异（F=0.140）（图 5）。分析 Western blot 结果，组间差异性有统计学意义（F=0.000，表 4），空白对照组与阴性对照组表达差异无统计学意义（F=0.800），Rce1-shRNA 组与空白对照组和阴性对照组的表达差异有统计学意义（F=0.000，P=0.000）。

表 4 各组不同蛋白的表达水平（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.4 Different protein expressions in different groups（$\bar{x}\pm s$，n=3）

分组	蛋白灰度值	F 值	P 值
空白对照组	0.44±0.02		
阴性对照组	0.43±0.02a	184.210	0.000
Rce1-shRNA 组	0.14±0.03ab		

注：a，与空白对照组比较；b：与阴性对照组比较

2.7 Rce1 基因沉默对 T24 细胞凋亡的影响

通过流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率，组间凋亡差异有统计学意义（F=0.010，表 5）；Rce1-shRNA 组与阴性对照组和

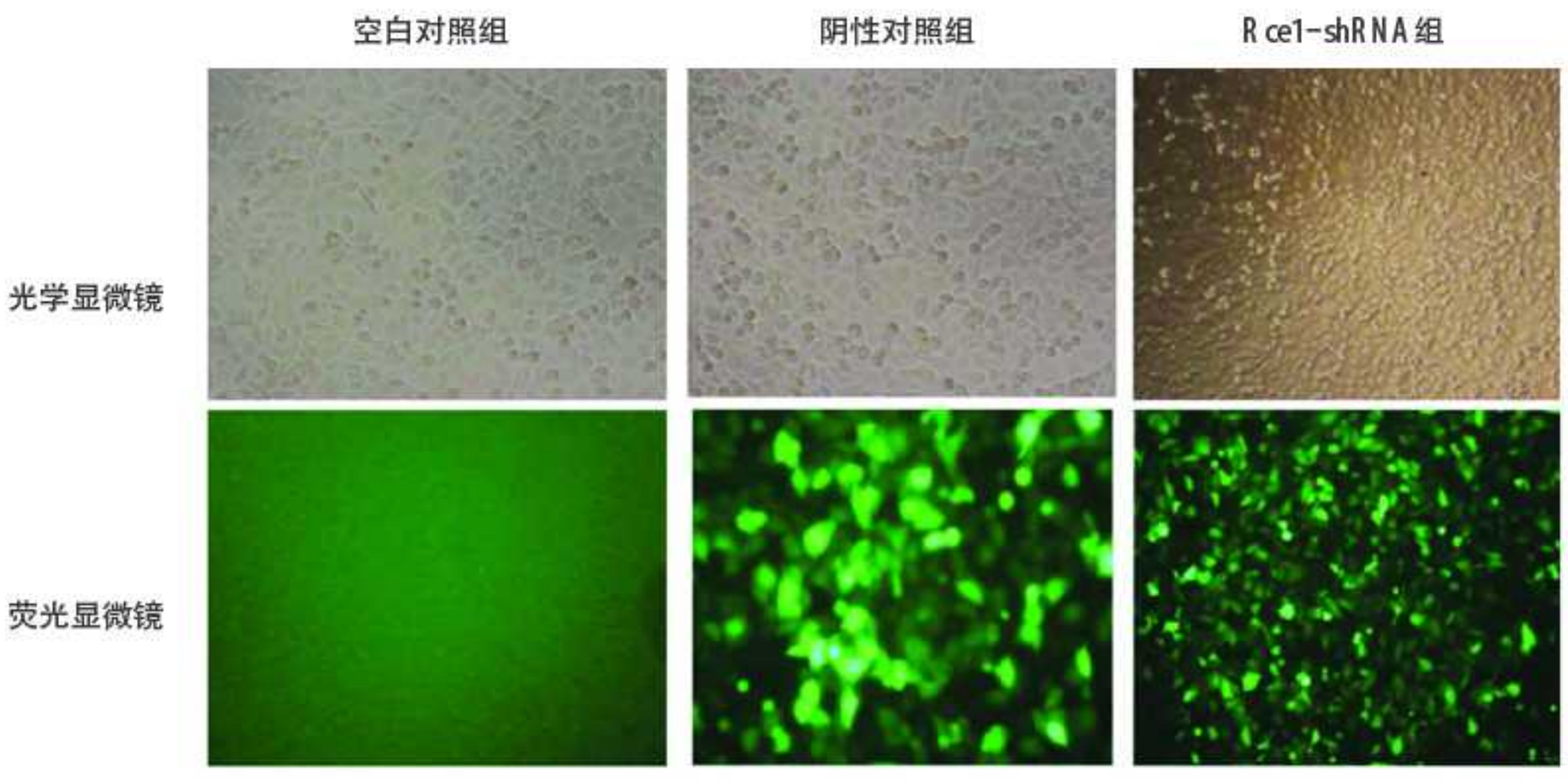


图 4 光学显微镜和荧光显微镜下 T24 细胞绿色荧光蛋白表达（100×）

Fig.4 Expressions of GFP in T24 cells observed under optical microscope and fluorescence microscope（100×）

空白对照组相比（图 6），差异有统计学意义（Rce1-shRNA 组 vs 阴性对照组：$P=0.002$；Rce1-shRNA 组 vs 空白对照组：$P=0.005$），阴性对照组与空白对照组的凋亡率无统计学差异（$P=0.460$）。

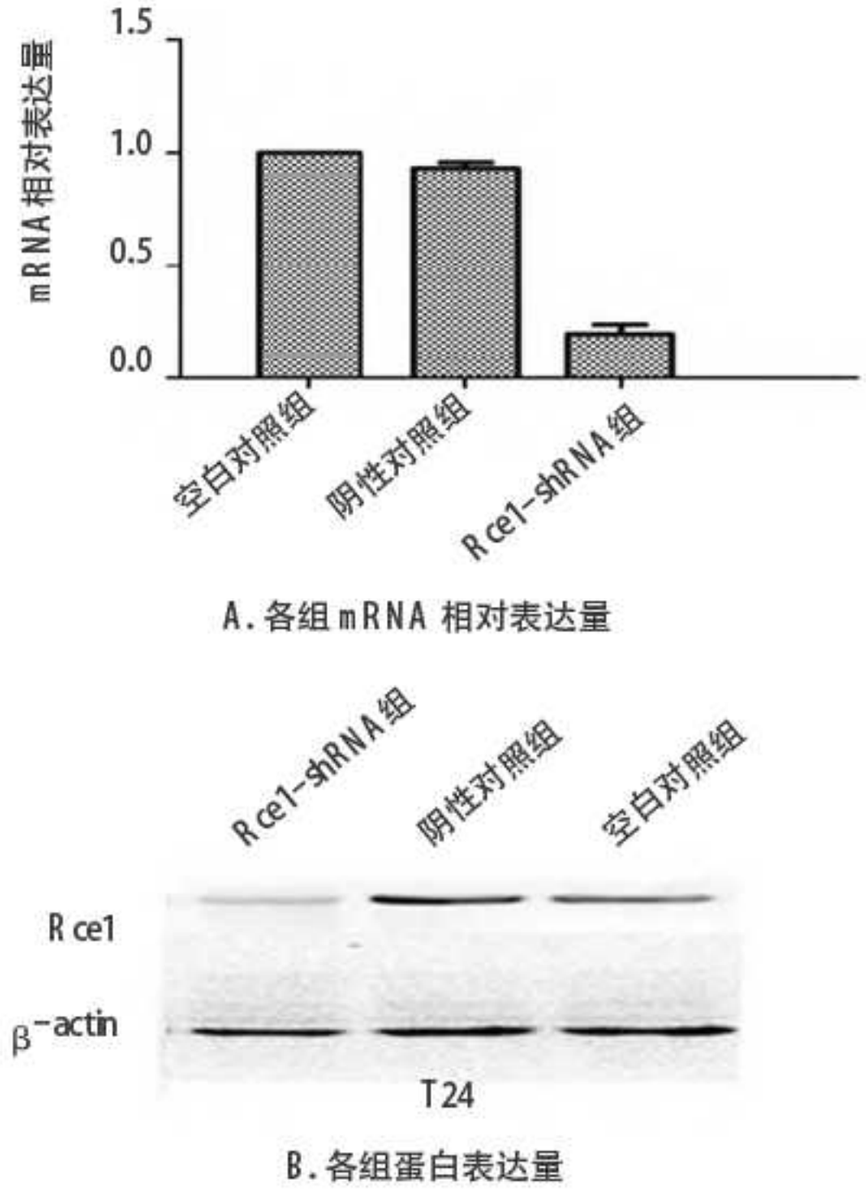


图 5　Rce1 在各组的 mRNA 及蛋白表达情况

Fig. 5　Rce1 mRNA and protein expression in each group

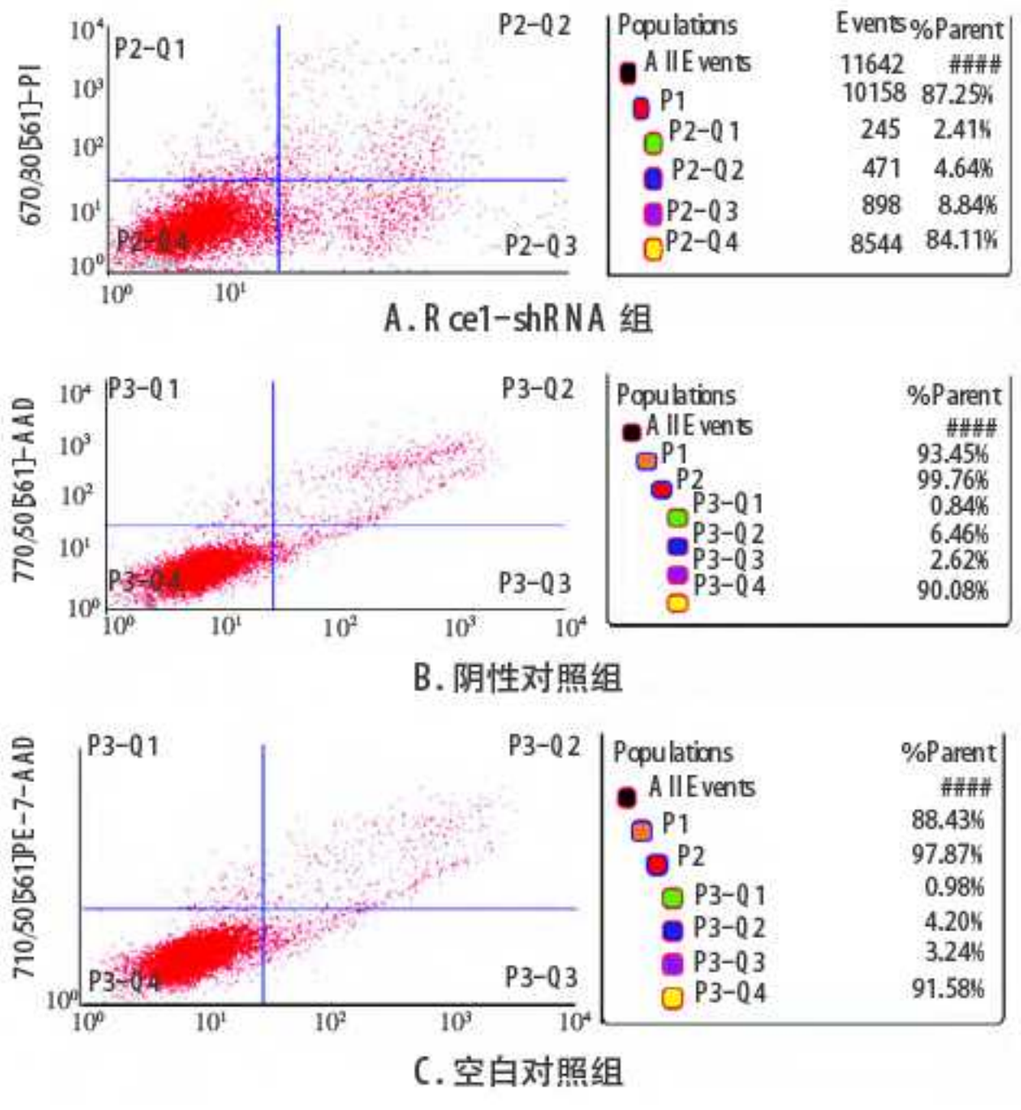


图 6　各组细胞凋亡率

Fig.6　Apoptosis rate of each group

表 5　FCM 检测各组 T24 细胞凋亡率（%，$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Tab.5　Apoptosis rate of T24 cells by FCM（%，$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

分组	凋亡率	F 值	P 值
空白对照组	6.93 ± 2.10		
阴性对照组	7.87 ± 1.12^{a}	15.060	0.010
Rce1-shRNA 组	12.93 ± 0.55^{ab}		

注：a，与空白对照组比较；b：与阴性对照组比较

3　讨　论

随着医学科学的持续进步，临床上依靠 pTNM 分期和组织学分级来判断膀胱癌患者的预后很难满足临床诊治的需要，制约了个体化治疗策略的实施，肿瘤标志物成为了可能解决这一问题的突破口，虽然现用的膀胱肿瘤标志物 BTA、NMP22、FISH、IMMUNOCYT 等能够对临床诊治和预后带来一定帮助，但这些标志物的筛选能否使患者受益在国际上还存在争议[9]，寻找新的特异性高和敏感性好的膀胱肿瘤标志物成为研究热点。

RAS 蛋白作为 -CaaX 蛋白的典型代表，其突变在多种人类肿瘤发生发展中发挥重要作用。文献报道 ras 基因在胰腺癌中的总突变率达到 97%，在直肠癌中达到 52%，在膀胱癌中的突变率占 11%[10]。目前对 RAS 蛋白的研究集中在 3 个方向：第 1 个方向为直接阻断 RAS 蛋白与 GTP 结合而失活；第 2 个方向为阻断下游 Raf，PI3K 等通路下游蛋白；第 3 个方向为合成途径，由于 RAS 蛋白表面结构平滑，与 GTP 结合紧密，下游通路网络复杂[11-12]，在这个几个方向的研究成果甚微，RAS 也成为了最难的药物靶向蛋白之一[13]。随着对 RAS 蛋白了解的深入，发现 RAS 蛋白需要一系列转录后修饰才能精确定位于质膜[14]，这为研究靶向药物带来了新希望，典型代表就是对法尼基化转移酶抑制剂的研究，法尼基化转移酶抑制剂在动物实验中能够有效的抑制 RAS 蛋白活性[15]，从而抑制肿瘤生长，然而在临床实验中法尼基化转移酶抑制剂却没有预期的效果[16]，可能原因是法尼基化转移酶抑制剂主要是集中于对 H-RAS 突变蛋白的抑制，K-RAS 和 N-RAS 的激活可以通过香叶酰化旁路激活，继续发挥生物学功能[17]。Rce1 作为法尼基化的后续关键酶，发挥水解 RAS 蛋白末端氨基酸的生物学功能，到目前为止还未发现这个加工过程的修饰旁路，避免了法尼基化转移酶抑制剂所遇研究难题[18]，因此，探讨 Rce1 在肿瘤

的表达及其意义有现实科研价值。

本研究首次通过 Western blot 对膀胱癌组织及对应癌旁组织中蛋白表达水平检测表明，Rce1 在膀胱癌组织中表达水平明显高于癌旁组织，qRT-PCR 分析显示 Rce1 在癌组织中 mRNA 表达明显上调，提示 Rce1 在 mRNA 和蛋白水平表达上调与膀胱癌可能存在相关性，Rce1 可能在肿瘤的发生、发展中发挥重要生物学功能。通过免疫组化对 78 例膀胱癌组织及 21 例癌旁组织研究发现，Rce1 在癌组织阳性表达率 (70.5%) 明显高于癌旁组织 (19.0%)，差异有统计学意义。结合临床病理资料分析表明，Rce1 表达量跟膀胱癌组织 T 分期，组织学分级和肿瘤是否远处转移有关，进一步提示 Rce1 与肿瘤的发生、发展密切相关；通过生存分析发现患者预后不良与 Rce1 表达阳性存在相关关系，提示 Rce1 在膀胱肿瘤患者中可能存在预后价值；为 Rce1 的预后研究提供理论依据。通过慢病毒介导 shRNA 能够有效沉默 T24 细胞中 Rce1 基因；与空白对照组和阴性对照组相比，Rce1 在 T24 沉默细胞中 mRNA 和蛋白表达水平明显下调，差异有统计学意义；通过对细胞凋亡率的检测发现，通过 shRNA 沉默 Rce1 的表达能够促进 T24 细胞的凋亡，为后续研究 Rce1 沉默促进细胞凋亡打下理论基础。

综上，本实验通过免疫组化法、Western blot 和 qRT-PCR 技术验证了膀胱癌组织中 Rce1 在 mRNA 和蛋白水平表达上调，提示 Rce1 可能在膀胱癌的发生、发展中发挥重要作用；结合临床病理资料分析，Rce1 表达上调与膀胱肿瘤患者的临床病理分期和预后都存在相关关系。通过细胞实验论证了慢病毒介导 shRNA 能够有效降低 Rce1 在 mRNA 和蛋白的表达水平，Rce1 低表达能够促进 T24 细胞凋亡。Rce1 可能成为膀胱癌患者药物治疗靶标并作为一个有效预后因子。但目前有关 Rce1 的基础和临床研究都还处于起步阶段，其在膀胱癌发生、发展中的具体作用机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Weinstein JN, Akbani R, Broom BM, et al. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma[J]. Nature, 2014, 507(7492): 315-322.

[2] Witjes JA, Palou J, Soloway M, et al. Current clinical practice gaps in the treatment of intermediate and high-risk non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) with emphasis on the use of bacillus Calmette-Guérin (BCG): results of an international individual patient data survey (IPDS)[J]. BJU Int, 2013, 112(6): 742-750.

[3] Said N, Sanchez-Carbayo M, Smith SC, et al. RhoGDI2 suppresses lung metastasis in mice by reducing tumor versican expression and macrophage infiltration[J]. J Clin Invest, 2012, 122(4): 1503-1518.

[4] Allory Y. Classification and natural history of bladder tumors[J]. Rev Prat, 2014, 64(10): 1365-1366.

[5] Vasan N, Boyer JL, Herbst RS. A RAS renaissance: emerging targeted therapies for KRAS-mutated non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(15): 3921-3930.

[6] Jaworski J, Govender U, McFarlane C, et al. A novel RCE1 isoform is required for H-Ras plasma membrane localization and is regulated by USP17[J]. Biochem J, 2014, 457(2): 289-300.

[7] Bergo MO, Ambroziak P, Gregory C, et al. Absence of the CAAX endoprotease Rce1: effects on cell growth and transformation[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(1): 171-181.

[8] Wahlstrom AM, Cutts BA, Karlsson C, et al. Rce1 deficiency accelerates the development of K-RAS-induced myeloproliferative disease[J]. Blood, 2007, 109(2): 763-768.

[9] Kamat AM, Hegarty PK, Gee JR, et al. International Consultation on Bladder Cancer 2012:Screening, diagnosis, and molecular markers[J]. Eur Urol, 2013, 63(1): 4-15.

[10] Cox AD, Fesik SW, Kimmelman AC, et al. Drugging the undruggable RAS: Mission possible?[J]. Nat Rev Drug Discov, 2014, 13(11): 828-851.

[11] Hubbard PA, Moody CL, Murali R. Allosteric modulation of Ras and the PI3K/AKT/mTOR pathway: emerging therapeutic opportunities [J]. Front Physiol, 2014, 5: 478.

[12] Györffy B, Schäfer R. Biomarkers downstream of RAS: a search for robust transcriptional targets[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2010, 10(8):858-868.

[13] Ledford H. Cancer: the Ras renaissance[J]. Nature, 2015, 520(7547): 278-280.

[14] Leung KF, Baron R, Ali BR, et al. Rab GTPases containing a CAAX motif are processed postgeranylgeranylation by proteolysis and methylation[J]. J Biol Chem, 2007, 282(2): 1487-1497.

[15] Shen Y, Qiang S, Ma S. The recent development of Farnesyltransferase inhibitors as anticancer and antimalarial agents[J]. Mini Rev Med Chem, 2015, 15(10): 837-857.

[16] Appels NM, Beijnen JH, Schellens JH. Development of farnesyl transferase inhibitors: a review[J]. Oncologist, 2005, 10(8): 565-578.

[17] Cox AD, Der CJ, Philips MR. Targeting RAS membrane association: back to the future for anti-RAS drug discovery?[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(8): 1819-1827.

[18] Manolaridis I, Kulkarni K, Dodd RB, et al. Mechanism of farnesylated CAAX protein processing by the intramembrane protease Rce1 [J]. Nature, 2013, 504(7479): 301-305.

责任编辑：冉明会)