DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.04.005
第26卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 4
2004年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2004

文章编号:1000-5404(2004)04-0291-03

论著

E-cadherin基因转染对膀胱癌细胞生长及浸润能力的影响

潘进洪,金锡御,宋 波,熊恩庆 (第三军医大学西南医院全军泌尿外科中心,重庆 400038)

提 要:目的 利用转基因技术,观察E-cadherin(ECD)对膀胱癌生长和浸润转移能力的影响。方法 将细胞间粘附分子ECD真核表达载体转染具有高浸润转移能力的膀胱癌细胞系Ts3L,测定细胞的生长曲线、克隆形成能力、体外浸润能力及细胞的周期分布。结果 ECD基因转染后的膀胱癌细胞生长速度明显减慢,达35.7%;凋亡细胞比例明显增加,超高倍体细胞比例明显减少;Ts3L/ECD细胞克隆形成能力显著降低($P<0.01$);Ts3L/ECD细胞的浸润能力明显低于其母代及对照细胞。结论 ECD对肿瘤的生长和浸润转移都有显著的抑制作用,是一个重要的肿瘤生长和浸润转移的抑制因子。

关键词:膀胱移行细胞癌;生长;浸润;转基因
中图法分类号:R394.2;R73-351;R737.14 文献标识码:A

Effects of E-cadherin gene transfection on bladder cancer cell growth and invasion

PAN Jin-hong, JIN Xi-yu, SONG Bo, XIONG En-qing (Urinary Surgery Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of E-cadherin (ECD) on bladder cancer cell growth and invasion using gene transfection technique. Methods Human E-cadherin gene was transfected into a highly invasive and metastatic bladder cancer cell line Ts3L. Cell growth curves, clone formation rate, *in vitro* tumor cell infiltrating ability, and cell cycle distribution were determined, respectively. Results Speed of bladder cancer cell growth decreased significantly to 35.7% after ECD gene transfection. Apoptotic cell rate in ECD transfected cells was markedly higher than that of the control cells. The percentage of superploid cells in Ts3L/ECD cells was significantly reduced than that in the control cells. Clone formation rate of ECD transfected cells, detected by soft agarose gel clone formation test, was significantly decreased as compared with that of the control cells ($P<0.01$). *In vitro* tumor cell infiltrating ability was markedly suppressed in Ts3L/ECD cells, as compared with that of its parental and control cells ($P<0.01$). Conclusion ECD might play an important role in the inhibition of bladder cancer cell growth and invasion. It is an important inhibitory factor for tumor growth and invasion of bladder cancer.

Key words: transitional cell carcinoma of bladder; growth; infiltration; gene transfection

E-cadherin (ECD)是上皮细胞间粘附的主要分子,与肿瘤转移的发生有密切关系,ECD表达的缺失使上皮细胞间粘附力降低,有利于肿瘤细胞从原发肿瘤块上的脱落,增加移动性和提高浸润能力。为深入研究细胞间粘附与肿瘤细胞浸润转移的关系,本研究将细胞间粘附分子ECD真核表达载体转染具有高浸润转移能力的膀胱癌细胞系,观察ECD对膀胱癌生长和浸润转移能力的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人ECD基因转染的膀胱癌细胞Ts3L/ECD,系将人全长ECD cDNA转入膀胱癌细胞系Ts3L,经G418筛选所得的具有ECD表达的膀胱癌细胞;Ts3L/pLX细胞为空载体转染细胞;对照细胞为Ts3L,3种细胞均由本中心自行构建[1],Ts3L细胞系由T24细胞经反复筛选后所得的具有高浸润转移能力的细胞亚系[1];MTT:购自Sigma公司;细胞培养及其它常规试剂均购自本校分子遗传教研室。

1.2 实验方法

1.2.1 生长曲线测定 对数生长期细胞,0.1%胰酶/EDTA消化,台盼蓝染色计数活细胞,调整细胞浓度为2×10^4/100 μl,接种于96孔板,每孔细胞悬液100 μl;37 ℃常规培养;每天取3孔分别用MTT法测细胞数,计算均值,连续7 d,绘制细胞的生长曲线。

1.2.2 克隆形成实验 对数生长期细胞,消化制备单细胞悬液,台盼蓝染色计数活细胞,调节浓度为10^3/ml,再根据实验要求作梯度倍比稀释。3个细胞株,每个分25、50、100 3个细胞浓度,每个浓度为3孔,37 ℃常规培养,2~3周观察结果。软琼脂克隆形成实验为体外成瘤实验,平时贴壁生长的细胞悬浮在

作者简介:潘进洪(1967-),男,云南省罗平县人,博士,主治医师,讲师,主要从事膀胱癌的基础和临床方面的研究。电话:(023)68754186

收稿日期:2002-08-20;修回日期:2003-11-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

软琼脂培养基中培养2周后，于倒置显微镜下观察，凡＞50个细胞的集落为克隆形成。

1.2.3 细胞体外浸润能力测定：①Chamber制备及Matrigel铺底，参考文献[1]，Chamber底部预铺0.1%明胶，使穿膜后的细胞粘附在膜底部，有利于穿膜细胞的计数。②细胞固定及计数。穿膜后，用棉签擦去正面的细胞，反面细胞用丙酮固定，HE染色，计数。每种细胞均为两组，计数5个高倍视野，计数后取平均值。

1.2.4 流式细胞仪测定细胞周期分布 对数生长期细胞消化计数，离心沉淀后加入1 ml 70%的乙醇固定，适量PI染色液混匀，置4 ℃避光染色30 min，流式细胞仪测每种细胞在G_1、S、G_2+M等各周期时相中的比例，观察细胞的增殖状态。

1.3 统计学处理

两组间均数比较用双样本t检验。

2 结果

2.1 ECD基因转染对细胞生长及细胞周期的影响

2.1.1 ECD基因转染对细胞生长的影响

Ts3L/ECD细胞的增殖速度较Ts3L/pLX和Ts3L细胞明显减慢，为35.7%，而Ts3L/pLX细胞和Ts3L细胞之间的增殖速度没有显著差异(P＞0.05)，见图1。

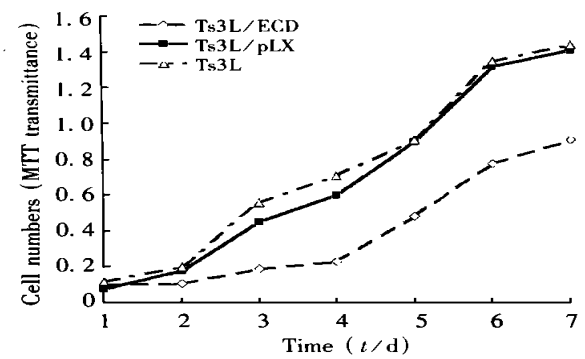


图1 细胞生长曲线图

Fig 1 Growth curves of Ts3L/ECD, Ts3L/PLX and Ts3L cells

2.1.2 ECD基因转染对细胞周期分布的影响 流式细胞仪检查发现，Ts3L/ECD细胞中调亡细胞比例明显高于Ts3L/pLX和Ts3L细胞；而超高倍体细胞的比例则明显低于Ts3L/pLX和Ts3L细胞；Ts3L/ECD细胞中，G_0/G_1期细胞所占比例较Ts3L/pLX和Ts3L细胞稍高；3种细胞的S期和G_2/M期细胞所占比例没有明显差异，见表1、图2。

表1 流式细胞仪检测细胞分裂周期

Tab 1 Cell division cycle detected by flow cytometry

	Apoptosis	G_0/G_1	S	G_2/M	SP(%)
Ts3L/ECD	16.85	29.85	8.22	16.11	29.34
Ts3L/pLX	5.54	20.45	9.74	19.45	45.36
Ts3L	3.2	18.66	10.77	14.71	53.22

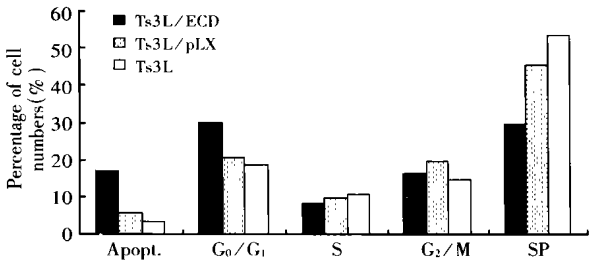


图2 流式细胞仪检测细胞周期分布

Fig 2 Cell cycle distribution detected by flow cytometry

2.2 转基因细胞体外浸润转移能力的改变

2.2.1 克隆形成能力 软琼脂克隆形成说明细胞丧失了贴壁生长的依赖性，这种特性与恶性肿瘤的浸润转移能力有极大关系。本实验观察结果显示，在软琼脂培养基中培养2周后Ts3L/ECD细胞的平均克隆形成率为：(6±2)%细胞，Ts3L/pLX为：(23.3±5.51)%细胞，Ts3L为(26.3±5.86)%细胞。Ts3L/ECD细胞的克隆形成能力明显低于Ts3L/pLX和Ts3L细胞(P＜0.01)。

2.2.2 体外细胞浸润能力 发现3种细胞的平均穿膜细胞数分别为(194±22.65)，(327±31.10)，(352±33.15)。统计处理显示Ts3L/ECD的穿膜能力明显低于其母代及对照细胞(P＜0.01)。

3 讨论

浸润转移是恶性肿瘤的主要特点，也是患者死亡的主要原因，因而对肿瘤转移相关因子及其抑制因子的研究是肿瘤研究的一个热点问题。近年发现一些肿瘤转移抑制基因，ECD就是其中之一。ECD是一种120×10^3的膜蛋白，位于上皮细胞膜上，它通过其胞内的连接蛋白Catenins与细胞骨架蛋白Actin相结合，发挥其介导细胞间粘附的作用[2]。

ECD是介导上皮细胞间粘附的主要粘附分子，其功能的正常发挥对维持上皮组织的形态有重要作用。ECD的低表达与人类多数肿瘤的浸润转移有很密切的关系。ECD与肿瘤转移的关系是多方面的，主要表现在：①ECD表达降低，则细胞间粘附力下降，肿瘤细胞易于从肿瘤团块上脱落下来，进入浸润转移进程[3]。②ECD的异常表达可以影响细胞的移动性。研究表明，MSV病毒转染MCDK细胞后，ECD表达降低而自分泌移动生长因子受体(AMDFr)升高，细胞移动性增强[4]。肿瘤在移动和粘附两个环节上都发生了有利于肿瘤浸润转移的变化，增强肿瘤转移潜能。③ECD的降低还可刺激某些蛋白酶表达，如uPA和MMP2，后者是肿瘤转移过程中蛋白水解的主要酶类[5,6]，肿瘤细胞在易于从肿瘤团表面脱离的同时，具有了水解周围基质的能力，更利于肿瘤的浸润转移。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

膀胱癌是泌尿外科最常见的恶性肿瘤, Syrigos 等[7] 对 67 例膀胱癌的 ECD 表达测定发现, 肿瘤分级越高, ECD 的表达率越低, 且低分级与高分级之间有显著差异; Otto 等[8] 对 100 例膀胱移行细胞癌患者进行 ECD 蛋白表达研究并经过两年的随防发现: 在 63 例 ECD 低表达患者中, 有 39(62%)例出现肿瘤进展或死亡; 37 例表达正常的患者中 36 例无瘤存活, 提示 ECD 的低表达与肿瘤的进展有明显的相关性。

本研究利用 Ts3L 细胞无 ECD 表达的特点, 转入人 ECD 基因观察其对膀胱癌生长及浸润转移的影响。发现 ECD 基因转染后, 细胞的软琼脂克隆形成能力和体外浸润能力均明显降低, 证明 ECD 所介导的细胞间粘附是膀胱移行细胞癌浸润转移的一个重要的抑制因素。

ECD 除介导上皮细胞间粘附外, 近年研究还发现 ECD 与细胞的生长有密切关系, Croix 等研究发现, ECD 的表达可以使培养细胞的增殖速度减慢, 该作者还发现 Rb 基因激活和细胞周期依赖性激酶抑制物 P27 升高与 ECD 介导的细胞生长抑制有关, 提高 P27 的浓度可以抑制由 ECD 抗体导入所引起的细胞增殖作用; 对神经系统内 cadherin 的研究显示, 当 ECD 过表达时细胞从 G_1 期进入 S 期受阻, 从而抑制细胞生长[9]。

本研究显示膀胱癌细胞转染 ECD 基因后, 细胞生长速度明显减慢, 流式细胞测定发现, 转基因组中调亡细胞比例明显高于对照组, 而超高倍体细胞的比例则明显降低。提示 ECD 可能参与了细胞周期的调控, 通过增加细胞凋亡, 促进肿瘤细胞分化减少超高倍体细胞比例, 从而抑制肿瘤细胞的生长。

本研究表明 ECD 在肿瘤的生长和浸润转移中都具有重要作用, 是一个抑制肿瘤生长和浸润转移的重要因子, 深入研究 ECD 在细胞生长和肿瘤浸润转移中的作用, 对了解恶性肿瘤浸润转移的机理有重要意义; 如何恢复 ECD 所介导的细胞间粘附功能可能成为肿瘤治疗研究的一个新的研究课题。

参考文献:

[1] 潘进洪, 金锡御, 宋　波, 等. 膀胱癌细胞-基底膜粘附力与肿瘤浸润转移关系初步研究[J]. 肿瘤防治杂志, 2002, 9(6): 577－579.

[2] Shapiro L, Fannon A M, Kwong P D, *et al*. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins[J]. Nature, 1995, 374(6520): 327－337.

[3] Jiang W G. E-cadherin and its associated protein catenins, cancer invasion and metastasis[J]. Br J Surg, 1996, 83(4): 437－446.

[4] Simard D, Nabi I R. Inverse relation of autocrine motility factor receptor and E-cadherin expression following MDCK epithelial cell transformation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 219(1): 122－127.

[5] Miyaki M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, *et al*. Increased cell-substratum adhesion and decreased gelatinase secretion and cell growth, induced by E-cadherin transfection of human colon carcinoma cells[J]. Oncogene, 1995, 11(12): 2547－2552.

[6] Yonemura Y, Nojima N, Kaji M, *et al*. E-cadherin and urokinase-type plasminogen activator tissue status in gastric carcinoma[J]. Cancer, 1995, 76(6): 941－953.

[7] Syrigos K N, Krausz T, Waxman J, *et al*. E-cadherin expression in bladder cancer using formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: correlation with histopathological grade, tumor stage and survival[J]. Int J Cancer, 1995, 64(6): 367－370.

[8] Otto T, Bex A, Schmidt U, *et al*. Improved prognosis assessment for patients with bladder carcinoma[J]. Am J Pathol, 1997, 150(6): 1919－1923.

[9] Levenberg S, Yarden A, Kam Z, *et al*. p27 is involved in N-cadherin-mediated contact inhibition of cell growth and S-phase entry[J]. Oncogene, 1999, 18(4): 869－876.

（编辑　汪勤俭）

《首届全国药学服务与研究学术研讨会》征文通知

为了使药学服务理念更加深入人心, 药学服务的工作在全国各级各类医院、社会药房, 以至社区里全面展开、不断深入、规范和提高, 以便为人民群众的身体健康提供更好的药学服务, 促进药学专业的加速发展, 定于今年召开“首届全国药学服务与研究学术研讨会”, 特邀与药学事业密切相关的政府主管部门领导、专家教授与会报告, 请医院、高校、科研院所、制药企业、药物营销企业以及相关部门的医药科技工作者踊跃参加。

时　　间: 2004 年 10 月

地　　点: 上海

主办单位: 第二军医大学《药学服务与研究》杂志社

内　　容: 临床药师的职责与培养, 临床药师的工作经验及体会; 医师如何开展药学服务; 药物治疗学和临床药学工作; 药物利用和药物经济学研究; 药学信息服务; 药学教育; 全国药学服务现状调查; 药学服务如何与心理咨询相结合; 制药企业及药品营销企业能否开展、如何开展药学服务; 护师进行药学服务的体会; 国外药学服务的概况; 国外药学服务的成功经验介绍等。

收费标准: 会务费 600 元; 会议论文将以《首届药学服务与研究学术研讨会论文集》的方式公开出版(有正式书号), 每篇入选论文收费 250 元(包括发表费和论文证书)。食宿、差旅费自理。

截稿日期: 论文请在 2004 年 7 月 30 日前寄到《药学服务与研究》杂志社, 地址: 上海市长海路 174 号; 邮编: 200433; 电话: (021)65519829, (021)25074639; 传真: (021)65519829; E-mail: PharmCR@yaoxue.net

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net