

基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000403

HepaCAM联合吡柔比星抑制膀胱癌 BIU-87 细胞的增殖

吕长坤¹, 万雪莲², 马菲菲², 杜红飞¹, 杨雪¹, 罗春丽¹

(1. 重庆医科大学检验医学院、临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016;

2. 商丘医学高等专科学校医学检验技术教研室, 商丘 476100)

【摘要】目的:研究肝细胞黏附分子(hepatocyte cell adhesion molecule, hepaCAM)联合吡柔比星(pirarubicin, THP)对膀胱癌细胞 BIU-87 的增殖影响。**方法:**将 BIU-87 细胞分为空白处理组、hepaCAM 过表达腺病毒(adenovirus-GFP-hepaCAM, Ad-GFP-hepaCAM)处理组、THP 处理组、Ad-GFP-hepaCAM 联合 THP 处理组。噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)检测细胞增殖, 流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测细胞周期, real-time PCR 检测细胞周期相关基因 cyclinD1, CDK2 的 mRNA 表达。将空白、空载腺病毒(adenovirus-GFP, Ad-GFP)、hepaCAM 过表达腺病毒(Ad-GFP-hepaCAM)处理的 BIU-87 细胞分别注射于裸鼠皮下, 观察裸鼠成瘤情况并记录瘤体体积, 4 周后处死裸鼠。切取各组瘤体组织, 组织切片行 HE 染色和免疫组化检测 hepaCAM 蛋白的表达。**结果:**Ad-GFP-hepaCAM 联合 THP 处理组, 与 THP 处理组比较, BIU-87 细胞增殖受到明显抑制($F=2.702, P=0.00$); 细胞周期明显阻滞于 G0/G1 期($F=10.989, P=0.000$); cyclinD1、CDK2 的 mRNA 表达明显下调($F=5.4299, P=0.000$)。Ad-GFP-hepaCAM 处理组的 BIU-87 细胞成瘤体积明显低于空白处理组($F=12.587, P=0.000$)。**结论:**hepaCAM 基因能够增强吡柔比星对膀胱癌 BIU-87 细胞的增殖抑制作用。

【关键词】HepaCAM; 吡柔比星; 膀胱癌; cyclinD1; CDK2**【中图分类号】**R73**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-02-18

Combined treatment of hepaCAM and pirarubicin inhibits the proliferation of bladder cancer BIU-87 cells

Lyu Changkun¹, Wan Xuelian², Ma Feifei², Du Hongfei¹, Yang Xue¹, Luo Chunli¹

(1. Key Laboratory of Diagnostic Medicine Founded by Ministry of Education, Institute of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University; 2. Department of Laboratory Medicine, Shangqiu Medical College)

【Abstract】Objective: to investigate the effects of combination treatment of hepaCAM and pirarubicin(THP) on the proliferation of BIU-87 cells. **Methods:** BIU-87 cells were designed as blank treatment group, adenovirus-GFP-hepaCAM treatment group(Ad-GFP-hepaCAM treatment group), THP treatment group, Ad-GFP-hepaCAM and THP combination treatment group. MTT was used to detect cell proliferation; cell cycle was evaluated by flow cytometry; the mRNA expressions of cyclinD1 and CDK2 were examined by real-time PCR. Cells that were designed as blank treatment group, Ad-GFP treatment group, Ad-GFP-hepaCAM treatment group were subcutaneously injected in nude mice. The volume of nude mice was evaluated. After 4 weeks, all mice were sacrificed, transplanted tumors were excised and tumor tissues were used to perform HE staining and immunohistochemistry was performed to examine hepaCAM expression. **Results:** Ad-GFP-hepaCAM combined with THP exhibited more intense inhibitory effects on proliferation of BIU-87 cells than THP alone($F=2.702, P=0.000$). Meanwhile, the cell in G0/G1 was significantly increased($F=10.989, P=0.000$) and mRNA levels of cyclinD1 and CDK2 were significantly lowered in Ad-GFP-hepaCAM and THP combination treatment group than in THP group($F=5.4299, P=0.000$). In addition, the volume of tumors induced by hepaCAM-expression BIU-87 cells was significantly decreased compared with that of blank treatment group($F=12.587, P=0.000$). **Conclusion:** HepaCAM could enhance the inhibitory effects of THP on the proliferation of bladder cancer BIU-87 cells.

【Key words】hepaCAM; pirarubicin; bladder cancer; cyclinD1; CDK2

作者介绍: 吕长坤, Email: 355196126@qq.com,

研究方向: 泌尿系统肿瘤的分子发生机制及干预措施。

通信作者: 罗春丽, Email: luochunli79@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81072086)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150209.1111.014.html>

(2014-10-30)

膀胱癌是临床上最常见的泌尿系统恶性肿瘤之一,其主要发生在男性^[1]。化疗药物吡柔比星(pirarubicin, THP)局部膀胱内灌注具有良好的降低肿瘤复发的作用。然而,基因治疗在膀胱癌中的运用报道甚少。

肝细胞黏附分子(hepatocyte cell adhesion molecule, hepaCAM)是 2005 年由 Shen 等研究者新发现的可编码免疫球蛋白类细胞黏附分子的新基因,具有抑制肝癌细胞增殖的能力^[2]。近年来,国内外大量研究表明,hepaCAM 为潜在的抑癌基因^[2-8]。然而,有关 hepaCAM 基因在膀胱肿瘤中的作用研究很少。

因此,本课题拟首先从体外实验研究 hepaCAM 联合化疗药物吡柔比星对膀胱癌细胞的增殖、周期的影响及其相关机制,再从体内实验进一步证实 hepaCAM 对异体种植膀胱癌肿瘤的生长影响,为膀胱癌的基因治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

BALB/c 裸鼠(为先天性 T 细胞免疫缺陷的遗传背景裸鼠),购自重庆医科大学动物中心,均为 4~6 周龄的雄鼠,体重 18~20 g,共 9 只。人膀胱癌细胞 BIU-87 细胞(购自武汉大学细胞库)。Ad-GFP-hepaCAM 过表达腺病毒载体为课题组前期构建并保存于-80℃。THP 粉末 10 mg 购于深圳迈乐有限公司;噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)试剂和二甲基亚砷(DMSO)(Sigma 公司);RNA 提取试剂盒 Trizol 和 RT-PCR 试剂盒,QPCR 试剂盒(大连宝生物工程);PCR 引物(Invitrogen 公司);细胞培养基 RPMI1640 和新生牛血清(Gibco 公司);细胞周期检测试剂盒(重庆医科大学生命科学学院流式细胞实验室提供);兔抗人多克隆抗体 hepaCAM 购自美国 Lifespan Biosciences 公司;免疫组化试剂盒和抗体稀释液购自北京中杉公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人膀胱癌细胞株 BIU-87 细胞培养于含有 10%新生牛血清 RPMI1640 的培养基,37℃,5%CO₂ 饱和湿度条件下培养。

1.2.2 MTT 法检测 BIU-87 细胞增殖 取对数期生长的 BIU-87 细胞,经 0.25%胰蛋白酶消化制成细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10^5 个/ml,接种于 96 孔板中,补充培养基至 200 μ l (每孔细胞数为 3 000 个/孔)。先于 24 h 内感染 Ad-GFP-hepaCAM 腺病毒,培养 12 h 后给予一定浓度 THP 处理。细胞分组为空白处理组、Ad-GFP-hepaCAM 处理组、THP 处理组(THP 浓度为 0.5 μ g/ml)、Ad-GFP-hepaCAM 联合 THP 处理组。每组设 6 个复孔,同时接种 3 个 96 孔板,37℃、5%CO₂ 恒温培养箱中培养分别于培养后 0、1、2、3、4 d,每孔加入 20 μ l

的 MTT(5 g/L)继续培养 4 h 后,小心吸尽上清,加入 DMSO 150 μ l,振荡孵育 10 min,全自动酶标仪(570 nm)检测各孔的吸光度(absorbance, A)值计算各组细胞生长抑制率,公式如下:细胞生长抑制率=[1-(A_{处理}-A_{调零})/(A_{对照}-A_{调零})] $\times$ 100%。

1.2.3 Real-time PCR 检测 cyclinD1、CDK2 的 mRNA 表达

将 BIU-87 细胞以 1×10^6 个/孔的密度接种于 6 孔板中。分空白处理组、Ad-GFP-hepaCAM 处理组、THP 处理组、Ad-GFP-hepaCAM 联合 THP 处理组。待细胞生长融合度达到 80%~90%,分别予以不同处理后提取总 RNA,用逆转录试剂盒将所提 RNA 逆转录为 cDNA,real-time PCR 检测 cyclinD1、CDK2 mRNA 的表达。cyclinD1、CDK2、 β -actin 引物序列:CyclinD1 上游引物是 5'-CCTGTCGCTGGAGCCCGTG-3',下游引物是 5'-TCCGCCTCTGGCATTITGG-3',扩增产物为 252 bp;CDK2 上游引物是 5'-AACACAGAGGGGGCCATCAAGC-3',下游引物是 5'-CAGGAGCTCGGTACCACAGGGTC-3',扩增产物为 407 bp; β -actin 上游引物是 5'-CTGAAGTACCCCATCGAG-CACGGCA-3',下游引物是 5'-GGATAGCACAGCCTGGATA-GCAACG-3',扩增产物为 225 bp。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期 常规种植细胞于 6 孔板中,细胞融合度达 60%~70%时感染 Ad-GFP-hepaCAM 病毒,感染 12 h 时给予一定浓度 THP 处理,细胞分组为空白处理组、Ad-GFP-hepaCAM 处理组、THP 处理组(THP 浓度为 0.5 μ g/ml)、Ad-GFP-hepaCAM 联合 THP 处理组,培养 48 h,收集 BIU-87 细胞,磷酸二氢盐缓冲液(PBS)洗涤,离心 1 000 r/min,10 min,RNase A(0.5 g/L)37℃消化 30 min,加入 PI(50 g/L)染色,室温避光 15 min,FACScan 分析细胞周期的变化。

1.2.5 裸鼠皮下成瘤 9 只 4~6 周龄裸鼠,随机分为 3 组,每组 3 只裸鼠。饲养于重庆医科大学动物中心。培养膀胱癌 BIU-87 细胞,待细胞融合度达 70%~80%时,分别感染 Ad-GFP 和 Ad-GFP-hepaCAM 病毒,72 h 后分别将空白处理组、Ad-GFP 处理组、Ad-GFP-hepaCAM 处理组的 BIU-87 细胞用胰酶消化、计数,重悬于 PBS 溶液中。取 100 μ l 重悬浮细胞于裸鼠下肢背外侧皮下接种(1×10^7 个细胞/只),每天观察成瘤情况并记录瘤体体积。4 周后处死裸鼠,取瘤体,并做组织切片。

1.2.6 H&E 染色和免疫组化检测 各组瘤体组织石蜡包埋切片及 H&E 染色(我校组织胚胎教研室协助完成)。免疫组化按照试剂盒说明书操作。

1.3 统计学处理

实验数据采用 SPSS 17.0 统计软件分析,结果均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 HepaCAM 联合吡柔比星对 BIU-87 细胞的增殖抑制作用

MTT 结果显示:THP 处理组、Ad-GFP-hepaCAM 处理组、Ad-GFP-hepaCAM 联合 THP 处理组均能抑制 BIU-87 细胞增殖,但 Ad-GFP-hepaCAM 联合 THP 处理组的抑制作用明

显高于单独因素 THP 处理组,差异具有统计学意义($F=2.702$, $P=0.000$,图 1,表1)。

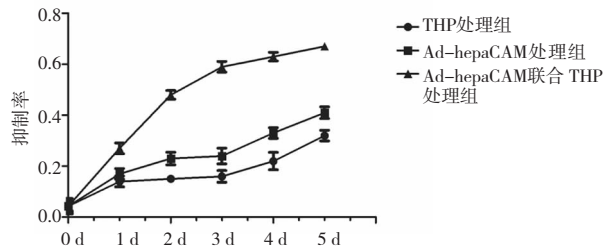


图 1 MTT 检测各处理因素对 BIU-87 细胞增殖的影响 ($n=3$)

Fig.1 Effect of each treatment factor on the proliferation of BIU-87 cells detected by MTT ($n=3$)

表 1 MTT 检测各组处理组的细胞抑制率 (第 5 天) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.1 Inhibition rate of each group detected by MTT

(the 5th d) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	细胞抑制率	P 值
THP处理组	0.363 ± 0.021	0.006 ^a
Ad-hepaCAM处理组	0.440 ± 0.014	0.000 ^b
Ad-hepaCAM联合 THP 处理组	0.703 ± 0.021^a	0.000 ^c

注:a,THP 处理组与 Ad-hepaCAM 处理组比较;b,Ad-hepaCAM 处理组与 Ad-hepaCAM 联合 THP 处理组比较;c,THP 处理组与 Ad-hepaCAM 联合处理组比较

2.2 流式细胞仪检测细胞周期

Ad-GFP-hepaCAM 联合 THP 处理组与 THP 处理组比较,细胞周期明显阻止于 G0/G1 期,差异有统计学意义($F=10.989$, $P=0.000$,图 2,表 2)。

2.3 Real-time PCR 检测细胞周期相关基因 CyclinD1、CDK2 mRNA 的表达

如图所示,Ad-GFP-hepaCAM 处理组、THP 处理组、Ad-

hepaCAM 联合 THP 处理组的 cyclinD1、CDK2 的 mRNA 表达量均低于空白组,且联合组较 THP 处理组的 cyclinD1、CDK2 的 mRNA 表达水平明显下调($F=5.4299$, $P=0.000$,图 3,表 3)。

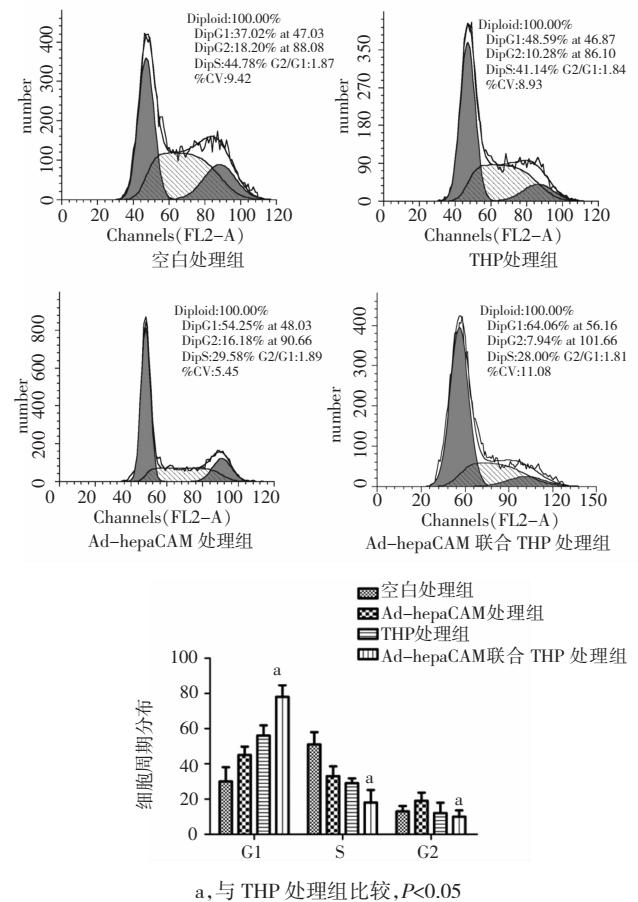


图 2 流式细胞仪检测 BIU-87 细胞周期 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.2 Cell cycle in BIU-87 cells detected by FCM ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表 2 流式细胞仪检测各组 BIU-87 细胞周期分布 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.2 Cell cycle distribution in BIU-87 cells detected by FCM ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	G0/G1	S	G2/M	P
空白处理组	30.60 ± 4.87	53.24 ± 8.43	16.15 ± 2.28	--
THP处理组	45.40 ± 3.47	34.62 ± 6.43	20.10 ± 9.72	0.004 ^a
Ad-hepaCAM处理组	57.03 ± 2.70	28.67 ± 0.92	14.29 ± 1.79	0.000 ^b
Ad-hepaCAM联合 THP 处理组	69.38 ± 3.69	20.55 ± 7.23	10.07 ± 1.91	0.000 ^c

注:a,Ad-hepaCAM 处理组 G0/G1 期与 THP 处理组 G0/G1 期比较;b,Ad-hepaCAM 处理组 G0/G1 期与 Ad-hepaCAM 联合 THP 处理组 G0/G1 期比较;c,THP 处理组 G0/G1 期与 Ad-hepaCAM 联合 THP 处理组 G0/G1 期比较

表 3 Real-time PCR 检测细胞周期相关基因 cyclinD1、CDK2 的表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.3 mRNA expression of CyclinD1 and CDK2 detected by real-time PCR ($\bar{x} \pm s, n=3$)

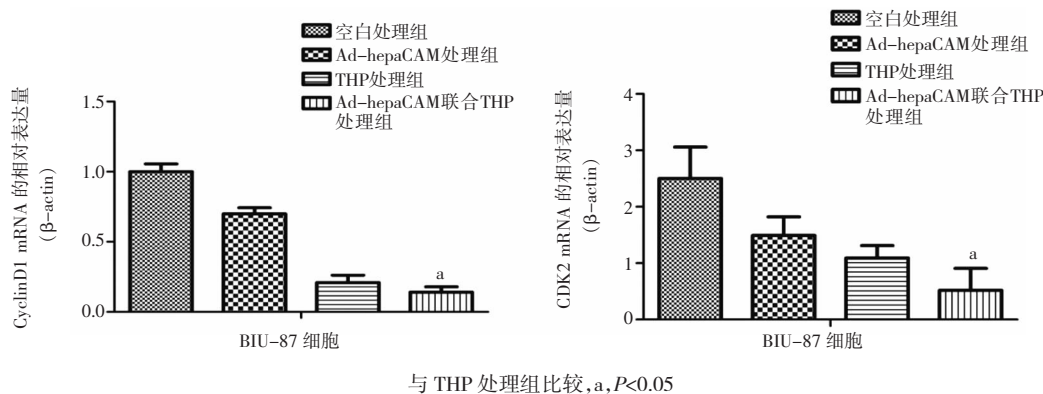
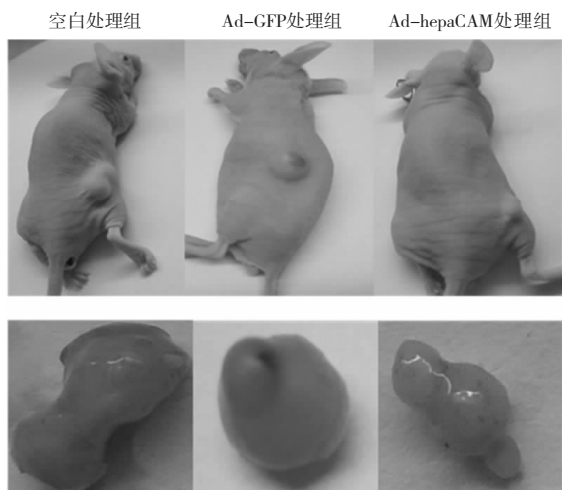
组别	CyclinD1 表达	P 值	CDK2 表达	P 值
Ad-hepaCAM处理组	0.740 ± 0.033	0.000 ^a	1.600 ± 0.027	0.000 ^a
THP处理组	0.380 ± 0.028	0.000 ^b	1.370 ± 0.016	0.001 ^b
Ad-hepaCAM联合 THP 处理组	0.120 ± 0.016	0.000 ^c	0.570 ± 0.054	0.000 ^c

注:a,Ad-hepaCAM 处理组与 Ad-hepaCAM 联合 THP 处理组比较; b,THP 处理组 Ad-hepaCAM 处理组比较;c,Ad-hepaCAM 联合 THP 处理组与 THP 处理组比较

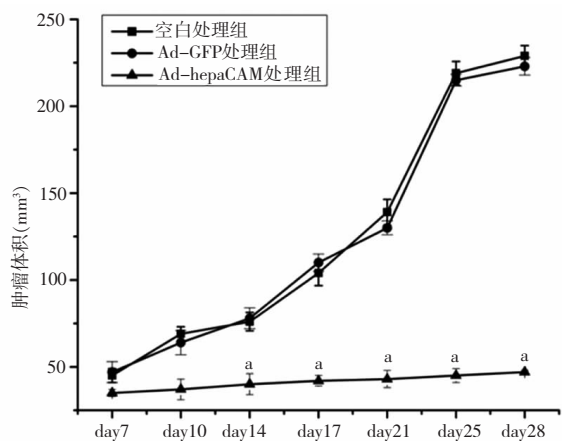
2.4 HepaCAM 抑制裸鼠皮下肿瘤的生长

裸鼠分别注射不同处理的 3 组 BIU-87 细胞 4 周后, HE 染色结果显示 3 组瘤体均为肿瘤组织(图 1C), 且感染 hep-aCAM 处理组肿瘤体积明显小于 Ad-GFP 处理组和空白处

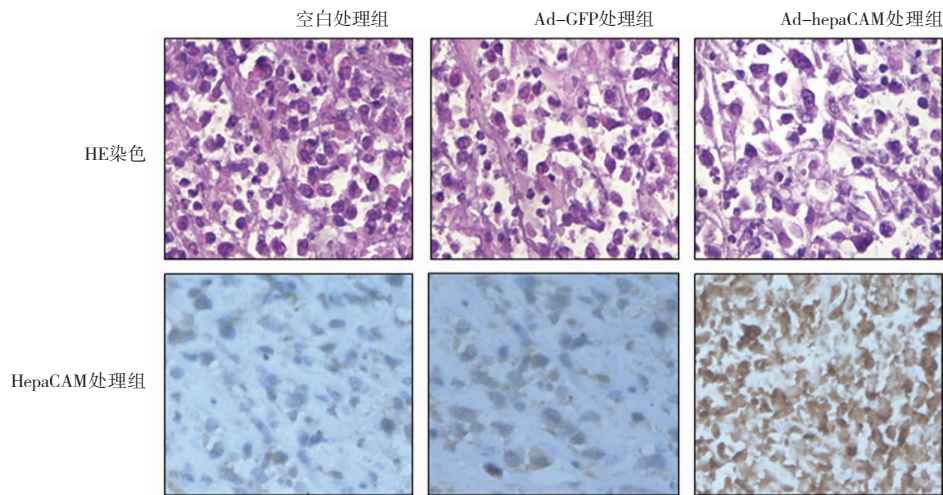
理组 ($F=12.587, P=0.000$) (图 4A、B); 免疫组化显示空白处理组、Ad-GFP 处理组 hep-aCAM 低表达, 而 hep-aCAM 感染组 hep-aCAM 表达上调(图 4C, 表 4)。

图 3 Real-time PCR 检测细胞周期相关基因 CyclinD1, CDK2 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig.3 mRNA expression of CyclinD1 and CDK2 detected by real-timePCR ($\bar{x} \pm s, n=3$)

A. 不同处理组裸鼠瘤体大小

a. Ad-hepaCAM 处理组的肿瘤体积与 Ad-GFP 处理组和空白处理组的肿瘤体积相比, 差异有统计学意义, $P < 0.05$

B. 不同处理组裸鼠瘤体生长曲线



C. 不同处理组裸鼠瘤体切片 HE 及免疫组化观察 (200 ×)

图 4 HepaCAM 对裸鼠膀胱肿瘤的生长影响

Fig.4 Effect of hep-aCAM on the growth of bladder tumor in vivo

表 4 肿瘤生长体积 (第 28 天) 比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Tab.4 Comprison of Growth volume of the tumor (the 28th d)
($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	肿瘤体积	P 值
空白处理组	221.100 $\pm$ 2.118	0.100 ^a
Ad-GFP处理组	224.500 $\pm$ 1.779	0.000 ^b
Ad-hepaCAM处理组	48.330 $\pm$ 1.247 ^c	0.000 ^c

注:a,空白处理组与 Ad-GFP 处理组比较;b,Ad-GFP 处理组与 Ad-hepaCAM 处理组比较;c,Ad-hepaCAM 处理组与空白处理组比较

3 讨 论

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一,在全身常见肿瘤中位居第 5 位^[9]。其中移行细胞癌最常见,约占膀胱癌的 90%以上,5%为鳞状细胞癌,2%为腺癌。目前,膀胱癌的治疗以手术和化疗为主,但复发率极高。研究表明单纯手术切除后,膀胱癌复发率高达 57%~75%,而化疗药物对膀胱癌细胞靶向杀伤性不强,毒副作用大,且容易产生不同程度的多药耐药^[10]。因此探索一种新的治疗方向—利用抑癌基因和化疗药物协同作用增强对肿瘤细胞的杀伤能力—综合性疗法是很有价值的。而重组腺病毒载体具有嗜上皮细胞性,致病性较低及携带几个基因的优点,因而,以腺病毒为载体的基因治疗是目前热门的治疗方法。

HepaCAM 为新发现的肝细胞黏附分子。课题组前期工作发现:hepaCAM 在膀胱癌组织和细胞呈低表达甚至不表达,利用过表达 hepaCAM 腺病毒载体,能够抑制膀胱癌细胞的增殖能力。大量研究已经证实 hepaCAM 为潜在的抑癌基因。本研究发现 Ad-GFP-hepaCAM 联合 THP 具有协同下调 cyclinD1 和 CDK2 的表达,明显阻滞膀胱癌细胞周期于 G0/G1 期,进而增强对膀胱癌 BIU-87 细胞增殖的抑制作用。揭示以腺病毒载体的 hepaCAM 基因联合 THP 可通过调节细胞周期的 G0/G1 期而更好的发

挥抑制膀胱癌肿瘤的作用。将感染腺病毒 Ad-GFP-hepaCAM 的膀胱癌细胞株 BIU-87 种植于裸鼠皮下,进一步从体内实验证实 hepaCAM 抑制膀胱癌肿瘤的生长。

综上所述,hepaCAM 基因可能是一种潜在的治疗基因,将为膀胱癌的治疗提供一个新的方向。

参 考 文 献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30.
- [2] Chung Moh M, Hoon Lee L, Shen S. Cloning and characterization of hepaCAM, a novel Ig-like cell adhesion molecule suppressed in human hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2005, 42(6): 833-841.
- [3] He Y, Wu X, Luo C, et al. Functional significance of the hepaCAM gene in bladder cancer[J]. BMC Cancer, 2010(10): 83.
- [4] Moh MC, Zhang T, Lee LH, et al. Expression of hepaCAM is down-regulated 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.
- [5] Pan C, Wu X, Luo C, et al. Exon 2 methylation inhibits hepaCAM expression in transitional cell carcinoma of the bladder[J]. Urol Int, 2010, 85(3): 347-354.
- [6] Xu B, He Y, Wu X, et al. Exploration of the Correlations Between Interferon- γ in Patient Serum and HEPACAM in Bladder Transitional Cell Carcinoma, and the Interferon- γ Mechanism Inhibiting BIU-87 Proliferation[J]. J Urol, 2012, 188(4): 1346-1353.
- [7] Zhang QL, Luo CL, Wu XH, et al. HepaCAM induces G1 phase arrest and promotes c-Myc degradation in human renal cell carcinoma[J]. J Cell Biochem, 2011, 112(10): 2910-2919.
- [8] Wang Q, Luo C, Wu X, et al. HepaCAM and p-mTOR are closely correlated in transitional cell carcinoma of bladder and expression of hepaCAM inhibits proliferation via an AMPK/mTOR-dependent pathway in human bladder cancer cells[J]. J Urol, 2013, 190(5): 1912-1918.
- [9] 陈 忠, 李家贵, 叶章群, 等. 联合灌注预防浅表性膀胱肿瘤术后复发的临床观察[J]. 肿瘤防治研究, 2005(32): 108-110.
- [10] 刘绍远, 张海滨, 杨 明. 膀胱癌术后复发及进展相关分子标志物研究进展[J]. 医学综述, 2011, 17(23): 3572-3574.

(责任编辑: 冉明会)