

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001561

细胞粘附分子-1 抑制膀胱癌细胞侵袭转移的机制研究

刘 莉, 杨永姣, 陈业刚, 张 新, 徐亚威, 刘晓强

(天津医科大学第二医院泌尿外科、天津市泌尿外科研究所, 天津 300211)

【摘要】目的:探讨细胞粘附分子-1(cell adhesion molecule-1, CADM1)过表达和干扰前后对人膀胱癌 T24 细胞恶性行为的影响及其机制。**方法:**利用前期构建的 Ad-CADM1-T24、Ad-GFP1-T24、Ad-sh1-T24、Ad-GFP2-T24 稳转细胞株,以 T24 细胞作为对照,Western blot 检测细胞周期相关蛋白 p27、cyclinD1、cyclinE1、CDK2,上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关蛋白 E-cadherin、 β -catenin、Vimentin,凋亡相关蛋白 caspase-3、bcl-2、bax 的表达情况;MTT 法检测细胞增殖能力;Transwell 侵袭实验检测细胞侵袭能力。**结果:**Western blot 结果显示 Ad-CADM1-T24 细胞与其他细胞相比,凋亡相关蛋白 caspase-3、bax 表达量升高,bcl-2 表达量降低;细胞周期相关蛋白 p27 表达量明显上调,cyclinD1、CDK2、cyclinE1 表达量明显下调;EMT 相关蛋白 E-cadherin、 β -catenin 表达量明显上调,Vimentin 表达量明显下调;MTT 结果显示 Ad-CADM1-T24 细胞与其他细胞相比,细胞增殖明显受到抑制,差异具有统计学意义($P<0.05$);Transwell 侵袭实验结果显示,Ad-CADM1-T24 细胞与其他细胞相比,24 h 细胞穿膜数量明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**CADM1 过表达可明显抑制膀胱癌细胞的侵袭转移,其机制可能与抑制细胞增殖和 EMT 及促进细胞凋亡有关。

【关键词】细胞粘附分子-1;膀胱癌;细胞增殖;细胞侵袭

【中图分类号】R619

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-03-07

Mechanism of cell adhesion molecule-1 inhibits the invasion and metastasis of bladder cancer cells

Liu Li, Yang Yongjiao, Chen Yegang, Zhang Xin, Xu Yawei, Liu Xiaoqiang

(Department of Urology, the Second Hospital of Tianjin Medical University; Tianjin Institute of Urology)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of over or low expression of cell adhesion molecule-1 (CADM1) on the malignant behavior of human bladder cancer T24 cells. **Methods:** The stable expression cells of Ad-CADM1-T24, Ad-GFP1-T24, Ad-sh1-T24, Ad-GFP2-T24 were established before and were used in this study, and T24 cell was used as control. Western blot was used to detect the cell cycle-related protein p27, cyclinD1, cyclinE1, CDK2; and EMT-related protein E-cadherin, β -catenin, Vimentin; and apoptosis-related protein caspase-3, bcl-2, bax. MTT was used to detect the cell reproductive capacity; and Transwell invasion was used to detect cell invasion ability. **Results:** Compared with other cells, in Ad-CADM1-T24 cell line, Western blot results showed that the expressions of apoptosis-related protein caspase-3 and bax were increased, while those of bcl-2 were decreased; the expressions of cell cycle-related protein p27 were increased, while those of cyclinD1, CDK2 and cyclinE1 were decreased; the expressions of EMT-related protein E-cadherin and β -catenin were increased, while those of Vimentin were decreased. And the results of MTT showed that the cell proliferation was significantly inhibited in Ad-CADM1-T24 cell line, with statistically significant differences ($P<0.05$). And the results of Transwell invasion showed that the number of cell membranes was significantly reduced in 24 h in Ad-CADM1-T24 cell line, with statistically significant differences ($P<0.05$). **Conclusion:** Overexpression of CADM1 can significantly inhibit the invasion and metastasis of bladder cancer cells, the mechanism may be associated with inhibition of cell proliferation and EMT and promoting apoptosis.

【Key words】cell adhesion molecule-1; bladder cancer; cell proliferation; cell invasion

作者简介: 刘 莉, Email: 18622208373@163.com,

研究方向: 泌尿系统肿瘤基础研究。

通信作者: 刘晓强, Email: xiaoqiangliu1@163.com。

基金项目: 天津市科委自然科学基金重点资助项目(编号: 16JCZDJC34600)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180329.1655.030.html>
(2018-03-30)

膀胱癌是我国泌尿系统最常见的肿瘤,其中90%是尿路上皮癌,已经明确膀胱癌的发生发展与吸烟、环境污染等因素有关^[1-2]。非肌层浸润性尿路上皮癌术后复发率高达50%~70%,其中10%~20%易进展为肌层浸润性膀胱癌,而肌层浸润性膀胱癌的5年生存率不及50%。膀胱癌的发生发展与细胞DNA的改变、编码调节细胞生长、DNA修复或凋亡的蛋白抑制基因失活及某些基因的超甲基化有关。

细胞粘附分子-1 (cell adhesion molecule-1, CADM1) 是2001年由Kuramochi等^[3]在人类非小细胞肺癌中发现的一种抑癌基因,最早称为肺癌肿瘤抑制因子-1 (tumor suppressor in lung cancer-1, TSLC1), 具有参与细胞间粘附、参与细胞运动和信号转导、介导免疫监视、抑制上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)、调节细胞周期进展和诱导凋亡等功能。近年来,在一系列人类肿瘤如食管癌^[4]、黑色素瘤^[5]、肝癌^[6-7]、卵巢癌^[8]、乳腺癌^[9]、肺癌^[10]、喉鳞癌^[11]、结肠癌^[12]、舌癌^[13]中研究发现, CADM1在肿瘤组织或细胞系中呈低表达或缺失,且其低表达与较早发生侵袭、转移和较差预后密切相关,上调CADM1表达可明显抑制肿瘤细胞增殖,降低肿瘤细胞侵袭、迁移能力。

本课题组前期研究发现,膀胱尿路上皮癌组织中CADM1蛋白表达量降低,导致其失活的主要原因是启动子甲基化^[14],且其低表达与患者临床进展及低生存率密切相关^[15]。因此需进一步探讨CADM1对膀胱癌恶性行为的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

胎牛血清 (FBS)、DMEM培养基购自Invitrogen公司, p27、cyclinD1、cyclinE1、CDK2、E-cadherin、 β -catenin、Vimentin、caspase-3、bcl-2、bax抗体、辣根酶标记羊抗兔IgG均购自英国Abcam公司, MTT购自Sigma公司, Transwell侵袭小室购自BD biosciences公司。EL800酶联免疫检测仪购自美国Bio-Tek公司。

1.2 细胞系

人膀胱癌T24细胞系及Ad-CADM1-T24、Ad-GFP1-T24、Ad-sh1-T24、Ad-GFP2-T24稳转细胞系为前期构建^[16]。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 上述5种细胞放置于37℃、体积分数为5%的CO₂培养箱中,用含10% FBS的DMEM培养基培养,每1~2 d换1次新鲜培养基,细胞铺满约95%时,用0.25%胰蛋白酶消化传代。

1.3.2 Western blot 检测细胞周期等蛋白表达 按照RIPA裂解液说明书提取细胞蛋白,测定蛋白浓度,加入5×蛋白上样缓冲液混匀,沸水浴5 min,降至室温后点样,进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳。上层5%浓度浓缩胶,电压80 V,下层10%浓度分离胶,电压120 V。溴酚蓝跑至凝胶底端即可终止电泳,半干转至PVDF膜,在含有5%脱脂奶粉的TBST溶液中室温封闭2 h后,将膜孵育一抗,4℃摇动过夜,用TBST洗涤3次,每次10 min,加入二抗溶液中,室温反应2 h, TBST洗涤3次,每次10 min。最后化学发光法显影。

1.3.3 MTT法检测细胞增殖能力 将Ad-CADM1-T24、Ad-GFP1-T24、Ad-sh1-T24、Ad-GFP2-T24和T24五株细胞消化制成细胞悬液,以1×10³/孔的密度接种至4个96孔板,每株细胞10孔,每孔接种200 μL;将96孔板于37℃、5% CO₂培养箱中培养;分别在24、48、72和96 h后,取出1个培养板,每孔加入30 μL MTT (5 mg/mL), 37℃孵育4 h,加入100 μL DMSO,震荡15 min;在酶标仪上测出490 nm吸光度 (absorbance, A) 值。以时间 (d) 为横轴,吸光度 (A) 为纵轴绘制细胞生长曲线。细胞生长用抑制百分比表示,计算公式如下:细胞生长=[(对照组细胞A值-实验组细胞A值)/对照组细胞A值]×100%。

1.3.4 Transwell 侵袭实验检测细胞侵袭能力 37℃温育Transwell小室和细胞培养试剂;待细胞生长至对数期,0.25%胰酶消化细胞,PBS和无血清培养基先后洗涤1次,之后无血清培养基悬浮细胞呈单细胞悬液,计数,调整细胞浓度为2×10⁵个/mL;在下室加入800 μL含10% FBS的DMEM培养基,上室加入150 μL细胞悬液,每株细胞4个孔,继续在培养箱中培养24 h;用镊子将小室取出并吸干上室液体,移到加入800 μL甲醇的孔中,室温固定30 min;取出小室,吸干上室固定液,移到加入800 μL结晶紫染液的孔中,室温染色25 min;清水冲洗浸泡数次,取出小室,吸去上室液体,用湿棉棒小心擦去上室底部膜表面上的细胞;用小镊子小心揭下膜,底面朝上晾干,移至载玻片上用中性树胶封片;显微镜下取6个随机视野,截取图像并统计结果。

1.4 统计学方法

采用SPSS 16.0统计软件对所有的实验数据进行统计学分析。计量资料数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异比较采用方差分析或t检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 CADM1 过表达后可促进细胞凋亡并可抑制 EMT

Western blot 结果显示,Ad-CADM1-T24与Ad-GFP1-T24、Ad-sh1-T24、Ad-GFP2-T24及T24相比,凋亡相关蛋白caspase-3、bax表达量升高,bcl-2表达量降低,bcl-2/bax比值降低,促进肿瘤细胞凋亡 (图1);细胞周期相关蛋白p27表达量明显上调,cyclinD1、CDK2、cyclinE1表达量明显下调 (图2);EMT相关蛋白E-cadherin、 β -catenin表达量显著上调,Vimentin表达量明显下调,上调CADM1表达可抑制膀胱癌T24细胞上皮-间充质相互转化 (图3)。

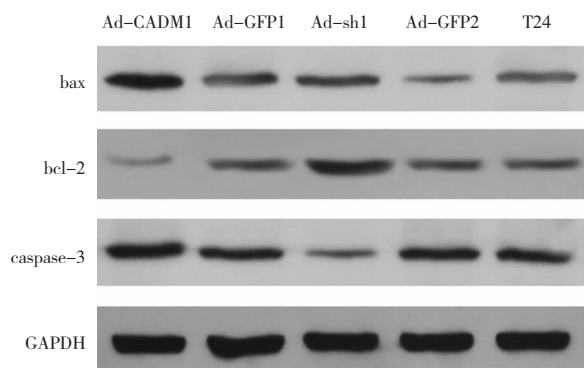


图 1 CADM1 过表达和干扰前后凋亡相关蛋白表达情况

Fig.1 Expression of apoptosis-related protein before and after CADM1 over and low expression

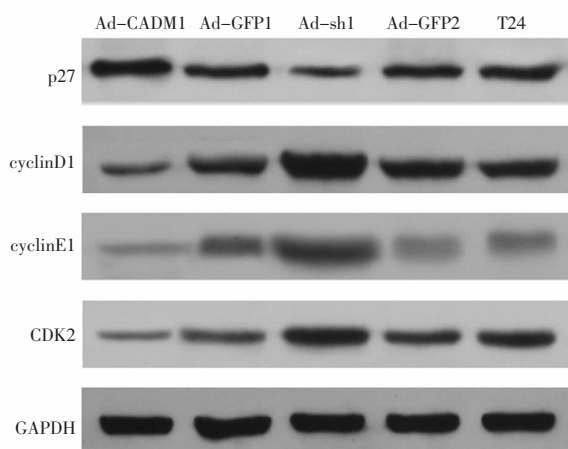


图 2 CADM1 过表达和干扰前后细胞周期相关蛋白表达情况

Fig.2 Expression of cell cycle-related protein before and after CADM1 over and low expression

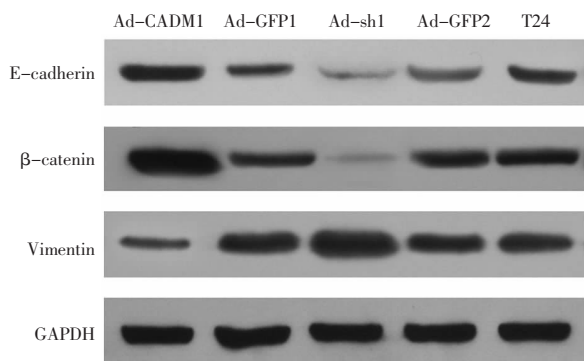


图 3 CADM1 过表达和干扰前后 EMT 相关蛋白表达情况

Fig.3 Expression of EMT-related protein before and after CADM1 over and low expression

2.2 CADM1 过表达后可明显抑制细胞增殖

MTT 结果显示稳定过表达 CADM1 (Ad-CADM1-T24) 的细胞株增殖明显受到抑制, Ad-CADM1-T24 与 Ad-GFP1-T24、Ad-sh1-T24、Ad-GFP2-T24 和 T24 相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 4)。结果表明 CADM1 能够明显抑制高侵袭潜能膀胱癌细胞的增殖。

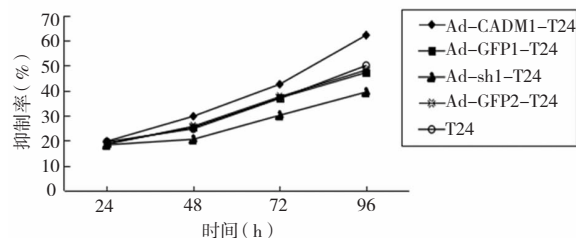


图 4 MTT 法检测各组细胞增殖能力

Fig.4 Cell proliferation was detected by MTT assay

2.3 CADM1 过表达后可明显抑制细胞侵袭能力

Ad-CADM1-T24、Ad-GFP1-T24、Ad-sh1-T24、Ad-GFP2-T24 和 T24 细胞株 24 h 细胞穿膜数量分别为 (29.54 ± 7.66) 、 (65.57 ± 10.02) 、 (75.61 ± 12.53) 、 (61.32 ± 15.43) 和 (59.54 ± 14.58) 。Ad-GFP1-T24、Ad-GFP2-T24 和 T24 三组比较未见差异。而 Ad-CADM1-T24 与 Ad-GFP1-T24 和 T24 相比, Ad-sh1-T24 与 Ad-GFP2-T24 和 T24 相比, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 说明 CADM1 过表达后其侵袭能力受到较大抑制, 而干扰 CADM1 表达可增强肿瘤细胞的侵袭能力。

3 讨论

膀胱尿路上皮癌是我国泌尿系统最常见的肿瘤^[1-2], 膀胱癌术后易复发、恶性程度逐渐增加及化疗效果欠佳一直是临床治疗的难题。因此, 有必要对膀胱癌的发病机制作更深入的研究, 同时寻找针对膀胱癌的分子标记物, 以更好地对膀胱癌的早期诊断、术后复发监测、治疗提供帮助。

CADM1 作为一种抑癌基因, 在多种肿瘤中表达降低甚至缺失, 而 CADM1 过表达后可促进肿瘤细胞的凋亡、抑制肿瘤细胞的增殖并降低其侵袭能力。Lu 等^[1]研究发现, 在喉癌组织中 TSLC1 mRNA 和蛋白表达明显降低, 并且与 TNM 分期和淋巴结转移相关; TSLC1 过表达后可抑制肿瘤细胞 Hep-2 的增殖并降低其侵袭能力。Qin 等^[17]通过构建携带 TSLC1 基因的质粒 pCI-TSLC1 并转染人肝癌细胞系 HepG2, 发现转染 TSLC1 组可降低细胞的增殖和迁移能力。He 等^[6]通过构建携带 TSLC1 基因的溶瘤腺病毒载体 (SD55-TSLC1) 感染肝癌 Huh7 细胞, 并将其注射到裸鼠皮下, 发现携带 TSLC1 基因的肝癌 Huh7 细胞可抑制肿瘤的生长, 其机制可能是通过调控凋亡相关蛋白如 caspase-3、caspase-8 及 poly 等的活性实现的。

本研究发现, Ad-CADM1-T24 与 Ad-GFP1-T24、Ad-sh1-T24、Ad-GFP2-T24 及 T24 相比, 凋亡相关蛋白 caspase-3、bax 表达量升高, bcl-2 表达量降低, bcl-2/bax 比值降低, 促进肿瘤细胞凋亡。应用

MTT法检测细胞的增殖水平发现 CADM1 过表达后细胞增殖明显受到抑制。结果表明 CADM1 能够明显抑制高侵袭潜能膀胱癌细胞的增殖。体外侵袭实验结果显示, CADM1 过表达后细胞侵袭能力受到明显抑制, 而干扰 CADM1 表达可增强肿瘤细胞的侵袭能力。

上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是指上皮细胞通过特定程序转化为具有间质表型的生物学过程。EMT 在胚胎发育、组织重建、慢性炎症中起重要作用, 且与肿瘤的侵袭转移有密切关系。失去上皮细胞样标记物如 E-cadherin 等, 获得间质细胞的标记物如 Vimentin、smooth inuscle actin 等是 EMT 过程的特征。研究报道, 多种基因通过调控 EMT 而影响膀胱癌的进展, 如致癌基因 CAV-1 可促进膀胱癌转移和 EMT, 伴随 E-cadherin 表达降低及 N-cadherin 和 Vimentin 表达升高, 敲除 CAV-1 基因后可抑制膀胱癌细胞株侵袭转移和 EMT^[18]。本研究发现, Ad-CADM1-T24 与 Ad-GFP1-T24、Ad-sh1-T24、Ad-GFP2-T24 及 T24 相比, EMT 相关蛋白 E-cadherin、 β -catenin 表达量明显上调, Vimentin 表达量明显下调, 上调 CADM1 表达可抑制膀胱癌 T24 细胞上皮-间充质转化, 而干扰 CADM1 表达之后可促进膀胱癌 T24 细胞上皮-间充质转化。

综上所述, CADM1 在膀胱癌的发展过程中可能扮演重要的角色, 与肿瘤细胞增殖、侵袭、凋亡相关, 上调 CADM1 表达可降低肿瘤细胞的增殖、侵袭能力, 并可抑制上皮-间充质转化及促进凋亡。CADM1 发挥抑癌作用的机制可能是通过抑制 EMT 和调控与细胞周期、凋亡相关的蛋白表达实现的。以上实验结果为膀胱癌的发生发展机制的探讨和治疗措施的优化提供了新的思路, 这些工作将为最终开展基因治疗和开发特异性分子靶向药物奠定研究基础。因此, 有必要对 CADM1 发挥抑癌效应的具体分子机制做更深一步的研究。

参 考 文 献

- [1] van Roekel EH, Cheng KK, James ND, et al. Smoking is associated with lower age, higher grade, higher stage, and larger size of malignant bladder tumors at diagnosis[J]. Int J Cancer, 2013, 133(2):446-454.
- [2] Kiriluk KJ, Prasad SM, Patel AR, et al. Bladder cancer risk from occupational and environmental exposures[J]. Urol Oncol, 2012, 30(2):199-211.
- [3] Kuramochi M, Fukuhara H, Nobukuni T, et al. TSLC1 is a tumor suppressor gene in human non-small-cell lung cancer[J]. Nat Genet, 2001, 27(4):427-430.
- [4] Liang QL, Chen GQ, Liu QL, et al. Tumor suppressor TSLC1 inhibits growth, proliferation, invasiveness and angiogenesis in nude mice xenografted tumor of Eca109 cells[J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(6):1507-1515.
- [5] You Y, Zhang J, Li Y, et al. CADM1/TSLC1 inhibits melanoma cell line A375 invasion through the suppression of matrix metalloproteinases[J]. Mol Med Rep, 2014, 10(5):2621-2626.
- [6] He G, Lei W, Wang S, et al. Overexpression of tumor suppressor TSLC1 by a survivin-regulated oncolytic adenovirus significantly inhibits hepatocellular carcinoma growth[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(4):657-670.
- [7] Zhang W, Xie HY, Ding SM, et al. CADM1 regulates the G1/S transition and represses tumorigenicity through the Rb-E2F pathway in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2016, 15(3):289-296.
- [8] Yang G, He W, Cai M, et al. Loss/down-regulation of tumor suppressor in lung cancer 1 expression is associated with tumor progression and is a biomarker of poor prognosis in ovarian carcinoma[J]. Int J Gynecol Cancer, 2011, 21(3):486-493.
- [9] Takahashi Y, Iwai M, Kawai T, et al. Aberrant expression of tumor suppressors CADM1 and 4.1B in invasive lesions of primary breast cancer[J]. Breast Cancer, 2012, 19(3):242-252.
- [10] Lei W, Liu HB, Wang SB, et al. Tumor suppressor in lung cancer-1(TSLC1) mediated by dual-regulated oncolytic adenovirus exerts specific antitumor actions in a mouse model[J]. Acta Pharmacol Sin, 2013, 34(4):531-540.
- [11] Lu B, Di W, Wang H, et al. Tumor suppressor TSLC1 is implicated in cell proliferation, invasion and apoptosis in laryngeal squamous cell carcinoma by regulating Akt signaling pathway[J]. Tumour Biol, 2012, 33(6):2007-2017.
- [12] Zhang J, Ning J, Geng J, et al. Down-regulation of tumor suppressor in lung cancer 1(TSLC1) expression correlates with poor prognosis in patients with colon cancer[J]. J Mol Histol, 2012, 43(6):715-721.
- [13] Zheng G, Li N, Jia X, et al. Mycn-mediated miR-21 overexpression enhances chemo-resistance via targeting CADM1 in tongue cancer[J]. J Mol Med (Berl), 2016, 94(10):1129-1141.
- [14] 杨永姣, 刘莉, 陈业刚, 等. 膀胱癌组织中肺腺癌抑制物 1 基因启动子甲基化状态和蛋白表达及其临床意义[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(23):35-39.
- [15] Chen YG, Yang YJ, Liu L, et al. Tumor suppressor in lung cancer-1(TSLC1) is a prognostic predictor for the recurrence and progression of non-muscle-invasive bladder cancer[J]. Urol Int, 2016, 96(2):142-147.
- [16] 刘莉, 杨永姣, 陈业刚, 等. 过表达及沉默细胞黏附分子-1 基因膀胱癌细胞株的构建[J]. 山东医药, 2016, 56(7):20-23.
- [17] Qin L, Zhu W, Xu T, et al. Effect of TSLC1 gene on proliferation, invasion and apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2007, 27(5):535-537.
- [18] Liang W, Hao Z, Han JL, et al. CAV-1 contributes to bladder cancer progression by inducing epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Urol Oncol, 2014, 32(6):855-863.

(责任编辑:冉明会)