

5-氮杂胞嘧啶核苷联合 hepaCAM 腺病毒通过抑制 p-AKT 诱导膀胱癌细胞 T24 凋亡

王晓荣¹, 杨 雪¹, 王 胤¹, 吴小候², 唐 敏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, 重庆市重点实验室, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究 5-氮杂胞嘧啶核苷(5-azacytidine, azac)联合肝细胞黏附分子(hepatocyte cell adhesion molecule, hepaCAM)腺病毒对膀胱癌细胞 T24 凋亡的影响及可能机制的探讨。**方法:**7 种不同因素分别处理培养的膀胱癌细胞 T24, hoechst 33258 染色检测各处理组细胞凋亡率, 流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测细胞早期凋亡率, RT-PCR 检测 hepaCAM 及 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, bcl-2)mRNA 的表达, Western blot 检测 hepaCAM、p-AKT、total-AKT、bcl-2 蛋白的表达。**结果:**hoechst 33258 显示, azac 联合 hepaCAM 腺病毒组细胞凋亡率为 $(45.21 \pm 0.06)\%$, 明显高于 hepaCAM 腺病毒组 $(15.60 \pm 0.02)\%$ 和 azac 组 $(26.30 \pm 0.02)\%$, 差异有统计学意义 ($P=0.003$, $P=0.008$); FCM 显示, azac 联合 hepaCAM 腺病毒组细胞早期凋亡率为 $(16.05 \pm 0.06)\%$, 明显高于 hepaCAM 腺病毒组 $(3.90 \pm 0.02)\%$ 和 azac 组 $(9.67 \pm 0.02)\%$, 差异有统计学意义 ($P=0.002$, $P=0.043$); RT-PCR 显示, 与单独 hepaCAM 腺病毒组和 azac 组相比, azac 与 hepaCAM 腺病毒联用可以上调 hepaCAM mRNA 的表达 ($P=0.004$, $P=0.000$), 下调 bcl-2 mRNA 的表达, 差异有统计学意义 ($P=0.026$, $P=0.030$); Western blot 显示, 与单独 hepaCAM 腺病毒组和 azac 组相比, azac 联合 hepaCAM 腺病毒组可上调 hepaCAM 蛋白的表达 ($P=0.003$, $P=0.003$), 同时下调 p-AKT ($P=0.001$, $P=0.005$) 和 bcl-2 ($P=0.000$, $P=0.002$) 蛋白的表达, 差异有统计学意义。**结论:**azac 联合 hepaCAM 腺病毒可能通过抑制 p-AKT 的磷酸化水平加速诱导 T24 细胞凋亡, 可为膀胱癌的治疗提供新的思路。

【关键词】5-氮杂胞嘧啶核苷; 肝细胞黏附分子; 膀胱癌细胞 T24; p-AKT; 细胞凋亡

【中图分类号】R737.14

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-04-12

作者介绍: 王晓荣, Email: XIAORONGWANG89@126.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/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000307.html>

SELDI-TOF-MS 的不断进步与完善必将在功能基因组时代发挥出巨大的潜能。

参 考 文 献

- [1] Takano M, Kikuchi Y, Asakawa T, et al. Identification of potential [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2010, 136(3): 475-481.
- [2] De Bock M, de Seny D, Meuwis MA, et al. Challenges for biomarker discovery in body fluids using SELDI-TOF-MS[J]. J Biomed Biotechnol, 2010, 2010: 906082.
- [3] Gomes AP, Imrie M, Gray RD, et al. SELDI-TOF biomarker signatures for cystic fibrosis, asthma and chronic obstructive pulmonary disease[J]. Clin Biochem, 2010, 43(1-2): 168-177.
- [4] 卜丽娜, 杨拴盈, 杜 洁, 等. 应用液体芯片-质谱技术筛选肺鳞癌患者血清标志蛋白[J]. 中华医学杂志, 2009, 89(24): 1662-1666.
- [5] 邱继刚, 樊 嘉, 刘银坤, 等. 肝癌门静脉癌栓相关小分子的比较蛋白质组学分析[J]. 中华实验外科杂志, 2009, 26(2): 181-183.
- [6] 盛新华, 范乃军, 高春芳. SELDI 蛋白质芯片技术在结直肠癌中的应用进展[J]. 中华实验外科杂志, 2008, 25(3): 405-406.
- [7] 魏 东, 蔡丰波, 王秀丽. 遗传性非息肉病性结直肠癌患者血清蛋白质谱的变化[J]. 中华实验外科杂志, 2009, 26(2): 154-155.
- [8] 田文栋, 曾宗渊, 于文斌, 等. 下咽鳞癌患者血清比较蛋白质组学研究[J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(6): 829-831.
- [9] 郝 强, 赵继懋, 杜林栋. 应用 SELDI-TOF-MS 技术筛选肾细胞癌患者血清标志物[J]. 中国癌症杂志, 2008, 18(8): 596-599.
- [10] 于 飞, 李 力, 王 琪, 等. β -淀粉样蛋白在卵巢癌组织中的表达及与临床关系研究[J]. 中国癌症防治杂志, 2009, 1(2): 109-113.
- [11] Arvidsson Y, Andersson E, Bergstrom A, et al. Amyloid precursor-like protein 1 is differentially upregulated in neuroendocrine tumours of the gastrointestinal tract[J]. Endocr Relat Cancer, 2008, 15(2): 569-581.
- [12] 张 强, 刘 勇, 任禹菲. SELDI-TOF-MS 检测正常肾细胞株与肾癌细胞株的差异表达蛋白[J]. 实用全科医学杂志, 2008, 6(4): 333-334.

(责任编辑: 关蕴良)

Inducing apoptosis of bladder cancer cell T24 by 5-azacytidine combined with adenovirus-hepaCAM via inhibiting p-AKT

Wang Xiaorong¹, Yang Xue¹, Wang Yin¹, Wu Xiaohou², Tang Min¹, Luo Chunli¹

(1. Key Laboratory of Clinical Diagnostics Founded by Ministry of Education, College of Laboratory, Chongqing Medical University; 2. Department of Urinary Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of 5-azacytidine (azac) combined with adenovirus-hepatocyte cell adhesion molecule (ad-hepaCAM) on the apoptosis of bladder cancer cells T24 and the possible mechanisms. **Methods:** Bladder cancer cells T24 were treated with seven different factors. Apoptosis rate of each treatment group was detected by the kits of hoechst 33258. Cell apoptotic ratio at early stage was detected by flow cytometry. The mRNA expression of hepaCAM and bcl-2 was measured by RT-PCR. The protein expression of hepaCAM, p-AKT, total-AKT and bcl-2 was measured by Western blot. **Results:** Higher apoptosis rate in azac combined with ad-hepaCAM group ($45.21 \pm 0.06\%$) than in adenovirus-hepaCAM group ($15.60 \pm 0.02\%$) and azac group ($26.30 \pm 0.02\%$) was observed based on hoechst 33258 ($P=0.003$, $P=0.008$). Higher apoptosis rate at early stage in azac combined with ad-hepaCAM group ($16.05 \pm 0.06\%$) than in adenovirus-hepaCAM group ($3.90 \pm 0.02\%$) and azac group ($9.67 \pm 0.02\%$) was observed based on FCM ($P=0.002$, $P=0.043$). Higher expression of hepaCAM mRNA ($P=0.004$, $P=0.000$) and lower expression of bcl-2 mRNA ($P=0.026$, $P=0.030$) in azac combined with ad-hepaCAM group than in adenovirus-hepaCAM group and azac group was observed based on RT-PCR. Higher expression of hepaCAM ($P=0.003$, $P=0.003$) and lower expression of p-AKT ($P=0.001$, $P=0.005$) and bcl-2 ($P=0.000$, $P=0.002$) in azac combined with ad-hepaCAM group than in adenovirus-hepaCAM group and azac group was observed based on Western blot. **Conclusion:** Azac combined with ad-hepaCAM can induce the apoptosis of T24 by inhibiting p-AKT, which may provide a new therapy for bladder cancer.

[Key words] 5-azacytidine; hepaCAM; bladder cancer cell T24; p-AKT; cell apoptosis

膀胱移行细胞癌 (transitional cell carcinoma of bladder, TCCB) 是泌尿系统肿瘤中新发病人数和死亡人数最多的肿瘤^[1], 75% 的 TCCB 为非肌肉侵袭性的, 具有高复发率; 而肌肉侵袭性 TCCB (25%) 预后不良, 经过 2 年治疗后, 50% 患者会发生肿瘤转移^[2]。尽管外科手术治疗, 膀胱内免疫、化学治疗以及一些新型化疗方法 (如酪氨酸激酶抑制剂、抗血管生成药物等) 应用于膀胱癌, 但患者的生存率并未提高^[3]。因而深入研究膀胱癌发生、发展机制对其早期诊断和治疗具有重要意义。近年来发现的抑癌基因肝细胞黏附分子 (hepatocyte cell adhesion molecule, hepaCAM) 在膀胱癌组织中表达明显减少或缺失, 其原因可能是与 hepaCAM 启动子高甲基化有关^[4]。研究证实, 去甲基化药物 5-氮杂胞嘧啶核苷 (5-azacytidine, azac) 可以逆转抑癌基因的甲基化, 使其重新表达^[5], 并诱导肿瘤细胞的凋亡。本研究采用去甲基化药物 azac 联合 hepaCAM 重组腺病毒作用于膀胱癌细胞 T24, 观察其对细胞凋亡的影响并探讨其可能的机制。

1 对象和方法

1.1 研究对象

人膀胱癌细胞 T24 由重庆医科大学传染病重点研究所惠赠, 在 37℃、5%CO₂ 饱和湿度条件下培养于含有 10% 新生

牛血清的 RPMI1640 培养基中。

1.2 主要试剂

表达绿色荧光蛋白腺病毒载体 (adenovirus vector of green fluorescent protein, Ad-GFP) 及表达 hepaCAM 蛋白重组腺病毒载体 (adenovirus vector of hepaCAM protein, Ad-hepaCAM) 由本课题组构建; azac 和二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) (Sigma 公司); RNA 提取试剂盒 Trizol 和 RT-PCR 试剂盒 (大连 Takara 公司); PCR 引物由 Invitrogen 公司提供; 细胞培养基 RPMI1640 和新生牛血清均购于 Gibco 公司; hoechst 33258 试剂盒购于碧云天生物技术研究所。细胞流式检测凋亡试剂由重庆医科大学生命科学院流式细胞实验室提供。

1.3 方法

1.3.1 不同组 hepaCAM 腺病毒感染和 azac 药物处理 膀胱癌细胞 T24 常规传代后, 待细胞生长融合度达到 80%, 弃去培养基, 加入 2 ml 无血清 RPMI1640 培养基, 之后按照以下不同处理方法作用细胞: 单独 DMSO 组 (D 组); Ad-GFP 单独作用组 (GFP 组); Ad-hepaCAM 单独感染组 (HEP 组); Ad-hepaCAM+DMSO 作用组 (HEP+D 组); azac 单独作用组 (A 组); azac+Ad-GFP 联合作用组 (A+GFP 组); azac+hepaCAM 联合作用组 (A+HEP 组)。之后置于 37℃、5%CO₂ 孵箱中孵育, 48 h 后, 处理细胞。

1.3.2 hoechst 33258 染色法检测细胞凋亡 将膀胱癌细胞 T24 接种于 6 孔板中爬片, 不同因素处理细胞 48 h 后, 正置荧光显微镜下观察细胞形态, 随后用预冷的 PBS 洗涤 1 次, 之后操作严格按照 hoechst 33258 染色法试剂盒说明书进行 (实验独立地重复 3 次), 随后于正置荧光显微镜下观察并照相。随机取 10 个高倍视野, 分别计算细胞总数和凋亡细胞数,

凋亡率=凋亡细胞数/细胞总数×100%。

1.3.3 流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测细胞凋亡率 将膀胱癌细胞 T24 接种于 6 孔板中,不同因素处理细胞 48 h 后,用预冷 PBS 洗涤 2 次,随后用胰酶消化后将细胞收集到离心管中,用 PBS 洗涤 2 次(实验独立地重复 3 次),送重庆医科大学生命科学院进行检测。

1.3.4 不同处理组 T24 细胞 hepaCAM 及 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, bcl-2)mRNA 的表达检测 不同处理组膀胱癌 T24 细胞,培养 48 h 后收集细胞,参照 RNAiso Plus 说明书提取细胞总 RNA,检测 RNA 的浓度和纯度,逆转录合成 cDNA,采用 RT-PCR 检测各处理组 T24 细胞中 hepaCAM 及 bcl-2 表达变化。反应条件为:94 ℃预变性 4 min;94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,共经历 30 个循环;之后 72 ℃延伸 10 min。运用 Quantity One(Bio-Rad, 美国)软件分析条带灰度值, mRNA 相对表达量=目的条带灰度值/内参条带灰度值。检测基因引物序列如下。hepaCAM, 上游:5'-TACTGTAGATGTGCCCCATTTCG-3', 下游:5'-CTTCTGTTTCAGGCGGTC-3'; bcl-2, 上游:5'-CTGGG-ATGCCTTTGTGGAAC-3', 下游:5'-GGCAGGCATGTTGAC-TTCAC-3'; β -actin; 上游:5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3', 下游:5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3' (实验独立地重复 3 次)。

1.3.5 不同处理组 T24 细胞 hepaCAM、p-AKT 及 bcl-2 蛋白表达检测 预冷的 PBS 溶液洗涤细胞 3 次,蛋白裂解液 RIPA 缓冲液(radio-immunoprecipitation assay, RIPA)及蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟化物(phenylmethyl sulfonyl fluoride, PMSF)(碧云天生物科技公司)(100:1 比例)混合液 4℃裂解细胞 30 min, 4 ℃, 12 000 g 离心 30 min, 取上清液, 采用 BCA 法(北京中杉金桥)测定蛋白浓度, 每泳道上样约 50 μ g, 经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulfate-polyacrylamide electrophoresis, SDS-PAGE)分离后, 电转移至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜, 5%脱脂奶粉(TBST 溶解)室温封闭 1 h; 依次加入 anti-hepaCAM(1:1 000)(武汉三鹰)一抗, bcl-2(1:1 000)(Immunoway, 美国), p-AKT(1:1 000)(santa, 美国), Total-AKT(1:1 000)(santa, 美国)和 GAPDH(1:1 000)(santa, 美国)一抗, 4 ℃孵育过夜; TBST 洗涤 10 min×3 次, 其次加入 HRP 标记的山羊抗小鼠或兔 IgG(1:1 000)(Bioworld, 美国), 室温下孵育 1 h; TBST 洗涤 10 min×3 次, 化学发光法显影。运用 Quantity One(Bio-Rad, 美国)软件分析条带灰度值, 蛋白相对表达量=目的条带灰度值/内参条带灰度值(实验独立重复 3 次)。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计学软件处理, 计量资料均采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 均通过正态性检验。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。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 hoechst 33258 染色观察各处理组 T24 细胞核的改变

不同因素处理 48 h 后, 细胞形态及数量发生明显改变

(图 1), 随后用 hoechst 33258 荧光染色结果, 见图 2; D 组、GFP 组、HEP 组、HEP+D 组、A 组、A+GFP 组和 A+HEP 组细胞凋亡率(%)分别为 3.50 ± 0.03 、 3.20 ± 0.00 、 15.60 ± 0.02 、 16.80 ± 0.02 、 26.30 ± 0.02 、 29.30 ± 0.02 和 45.21 ± 0.06 , 其中 HEP 组、HEP+D 组、A 组、A+GFP 组和 A+HEP 组的凋亡率明显高于 D 组和 GFP 组, 差别具有统计学意义($F=1126.539$, $P=0.000$), D 组和 GFP 组、HEP 组和 HEP+D 组、A 组和 A+GFP 组两两比较, 差异无统计学意义($P=0.550$ 、 $P=0.130$ 、 $P=0.053$)。A+HEP 组凋亡率高于 HEP+D 组和 A+GFP 组, 差异有统计学意义($P=0.003$, $P=0.008$)。即与单独 azac 处理和 hepaCAM 腺病毒处理相比, azac 与 hepaCAM 腺病毒联用可以明显促进膀胱癌细胞 T24 凋亡率增加。hoechst 是一种能够穿透细胞膜的蓝色荧光染料。在正置荧光显微镜下观察, 凋亡细胞核固缩呈致密浓染或呈块或颗粒状致密浓染(亮蓝色), 颜色略发白, 而未发生凋亡的细胞仅被淡染(淡蓝色)。

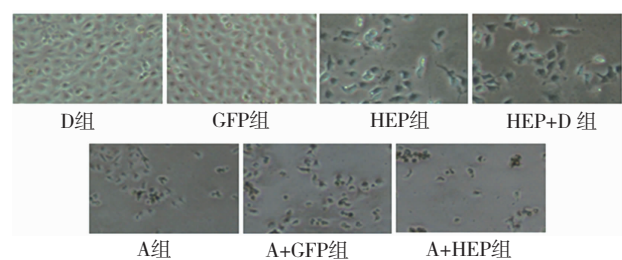


图 1 不同处理组膀胱癌细胞 T24 形态改变 (200 ×)

Fig.1 Morphological changes of bladder cancer cell T24 in different groups (200 ×)

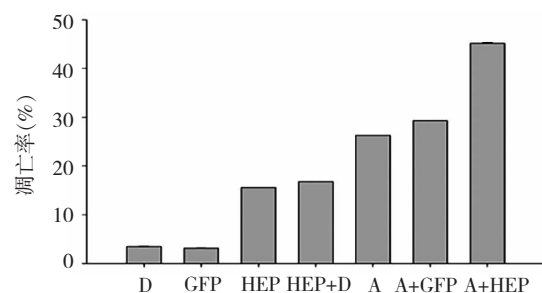
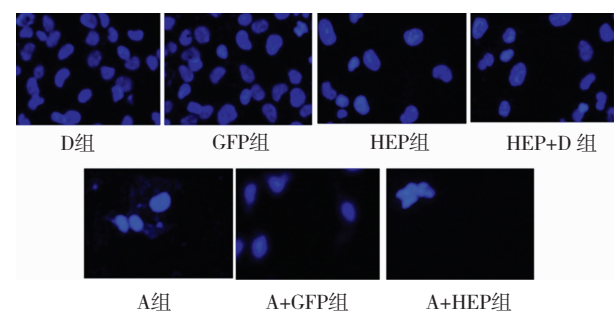


图 2 不同处理组 hoechst 33258 染色结果 (200 ×)

Fig.2 Staining results of hoechst 33258 in different groups (200 ×)

2.2 FCM 检测细胞早期凋亡率

不同因素处理 48 h 后, FCM 结果: D 组、GFP 组、HEP 组、HEP+D 组、A 组、A+GFP 组和 A+HEP 组细胞早期凋亡率(%)分别为 0.79 ± 0.03 、 0.53 ± 0.00 、 3.90 ± 0.02 、 5.54 ± 0.02 、

9.67 ± 0.02 、 11.51 ± 0.02 和 16.05 ± 0.06 , 其中 HEP 组、HEP+D 组、A 组、A+GFP 组和 A+HEP 组的早期凋亡率明显高于 D 组和 GFP 组, 差异有统计学意义 ($F=313.56, P=0.000$), D 组和 GFP 组、HEP 组和 HEP+D 组、A 组和 A+GFP 组两两比较, 差异无统计学意义 ($P=0.054, P=0.110, P=0.150$)。A+HEP 组早期凋亡率高于 HEP+D 组和 A+GFP 组, 差异有统计学意义 ($P=0.002, P=0.043$) (图 3)。即与单独 azac 处理和 hepaCAM 腺病毒处理相比, azac 与 hepaCAM 腺病毒联用可明显促使膀胱癌细胞 T24 早期凋亡率增加。

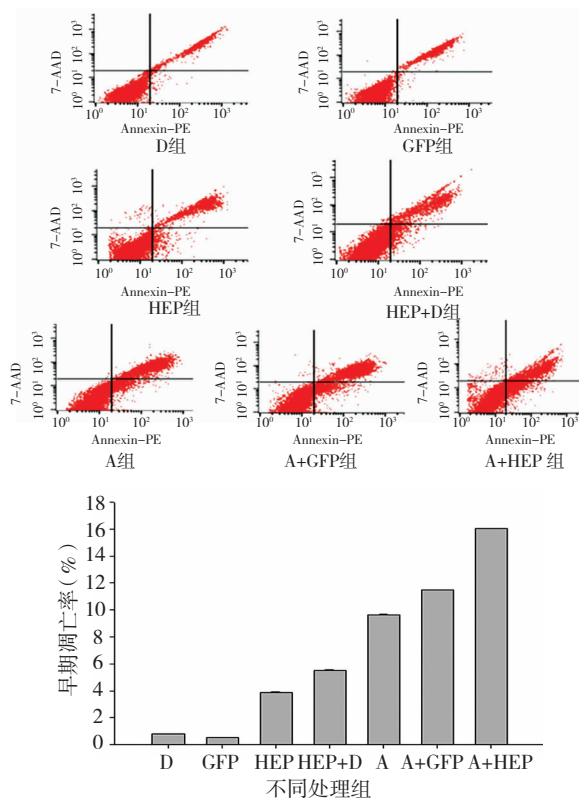


图 3 FCM 检测不同处理组膀胱癌细胞 T24 凋亡的情况

Fig.3 Apoptosis rate of bladder cancer cell T24 detected by FCM in different groups

2.3 RT-PCR 检测不同处理组 T24 细胞 hepaCAM 及 bcl-2 基因的表达

RT-PCR 检测结果显示: D 组、GFP 组、HEP 组、HEP+D 组、A 组、A+GFP 组和 A+HEP 组 hepaCAM mRNA 的表达水平分别为 0.03 ± 0.00 、 0.10 ± 0.02 、 1.17 ± 0.01 、 1.15 ± 0.02 、 0.56 ± 0.01 、 0.59 ± 0.01 和 1.62 ± 0.00 , 其中 HEP 组、HEP+D 组、A 组、A+GFP 组和 A+HEP 组的 hepaCAM mRNA 的表达水平明显高于 D 组和 GFP 组, 差异有统计学意义 ($F=40.826, P=0.000$), D 组和 GFP 组、HEP 组和 HEP+D 组、A 组和 A+GFP 组两两比较, 差异无统计学意义 ($P=0.584, P=0.881, P=0.822$)。A+HEP 组 hepaCAM mRNA 的表达水平高于 HEP+D 组和 A+GFP 组, 差异有统计学意义 ($P=0.004, P=0.000$) (图 4)。即与单独 azac 处理和 hepaCAM 腺病毒处理相比, azac 与 hepaCAM 腺病毒联用可以明显上调 hepaCAM mRNA 的表达, 差异具有统计学意义。

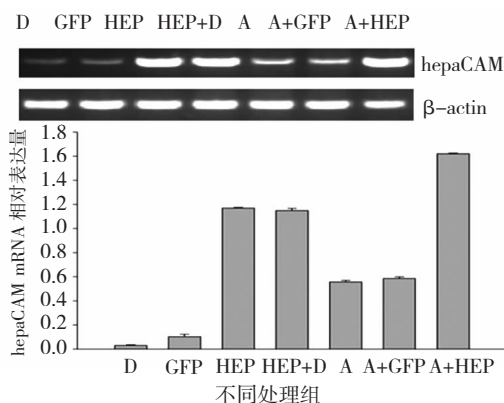


图 4 各处理组 hepaCAM mRNA 水平变化

Fig.4 Expression of hepaCAM detected by RT-PCR in different groups

对抗凋亡因子 bcl-2 的表达水平检测发现, D 组、GFP 组、HEP 组、HEP+D 组、A 组、A+GFP 组和 A+HEP 组 bcl-2 mRNA 的表达水平分别为 1.00 ± 0.03 、 1.10 ± 0.00 、 0.95 ± 0.02 、 0.93 ± 0.02 、 0.72 ± 0.01 、 0.69 ± 0.02 和 0.34 ± 0.00 , 其中 A+HEP 组的 bcl-2 mRNA 的表达水平明显低于 D 组、GFP 组、HEP 组、HEP+D 组、A 组和 A+GFP 组, 差异有统计学意义 ($F=325.64, P=0.000$), D 组和 GFP 组、HEP 组和 HEP+D 组、A 组和 A+GFP 组两两比较, 差异无统计学意义 ($P=0.650, P=0.910, P=0.750$)。A+HEP 组 bcl-2 mRNA 的表达水平低于 HEP+D 组和 A+GFP 组, 差异有统计学意义 ($P=0.026, P=0.030$) (图 5)。即与单独 azac 处理和 hepaCAM 腺病毒处理相比, azac 与 hepaCAM 腺病毒联用可以明显下调 bcl-2 mRNA 的表达, 且差异具有统计学意义。

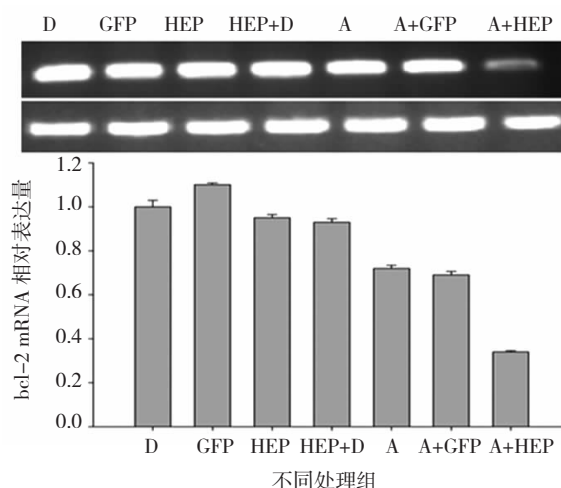


图 5 各处理组 bcl-2 mRNA 水平变化

Fig.5 Expression of bcl-2 detected by RT-PCR in different groups

2.4 Western blot 检测不同处理组 T24 细胞 hepaCAM、p-AKT 及抗凋亡因子 bcl-2 蛋白的表达

结果显示, HEP 组、HEP+D 组、A 组、A+GFP 组和 A+HEP 组的 hepaCAM 蛋白表达水平明显高于 D 组和 GFP 组, 差异有统计学意义 ($F=1586.074, P=0.000$), D 组和 GFP 组、

表 1 T24 细胞各处理组中 hepaCAM、p-AKT、bcl-2 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Tab.1 Protein expression of hepaCAM, p-AKT, bcl-2 in different groups ($\bar{x} \pm s, n=3$)

分组	hepaCAM	p-AKT	bcl-2
D组	0.347 0 $\pm$ 0.010 6	0.890 0 $\pm$ 0.110 0	1.623 3 $\pm$ 0.028 5
GFP组	0.436 4 $\pm$ 0.013 6	0.980 0 $\pm$ 0.178 0	1.683 3 $\pm$ 0.000 0
HEP组	1.702 8 $\pm$ 0.032 1 ^a	0.320 0 $\pm$ 0.014 5 ^a	0.756 7 $\pm$ 0.014 5 ^a
HEP+D组	2.226 8 $\pm$ 0.054 8 ^a	0.340 0 $\pm$ 0.015 3 ^a	0.560 0 $\pm$ 0.015 3 ^a
A组	1.412 3 $\pm$ 0.034 9 ^a	0.130 0 $\pm$ 0.014 5 ^a	0.983 3 $\pm$ 0.014 5 ^a
A+GFP组	1.915 3 $\pm$ 0.032 6 ^a	0.120 0 $\pm$ 0.230 0 ^a	0.880 0 $\pm$ 0.015 3 ^a
A+HEP组	3.977 4 $\pm$ 0.000 0 ^{ab}	0.020 0 $\pm$ 0.000 0 ^{ab}	0.180 0 $\pm$ 0.000 1 ^{ab}

注:a,与 D 组和 GFP 组相比, $P < 0.05$; b,与 HEP 组和 A 组相比 $P < 0.05$

HEP组和 HEP+D 组、A 组和 A+GFP 组两两比较,差异无统计学意义 ($P=0.153$ 、 $P=0.058$ 、 $P=0.05$)。A+HEP 组 hepaCAM 蛋白表达水平高于 HEP+D 组和 A+GFP 组,差异有统计学意义 ($P=0.003$ 、 $P=0.003$)。

检测 p-AKT 的蛋白表达发现:HEP 组、HEP+D 组、A 组、A+GFP 组和 A+HEP 组的 p-AKT 蛋白的表达水平明显低于 D 组和 GFP 组,差异有统计学意义 ($F=313.618$, $P=0.000$), D 组和 GFP 组、HEP 组和 HEP+D 组、A 组和 A+GFP 组两两比较,差异无统计学意义 ($P=0.053$ 、 $P=0.250$ 、 $P=0.117$)。A+HEP 组 p-AKT 蛋白的表达水平高于 HEP+D 组和 A+GFP 组,差异有统计学意义 ($P=0.001$ 、 $P=0.005$)。

通过检测抗凋亡因子 bcl-2 的蛋白水平,结果显示:HEP 组、HEP+D 组、A 组、A+GFP 组和 A+HEP 组的 bcl-2 蛋白的表达水平明显低于 D 组和 GFP 组,差异有统计学意义 ($F=1146.307$, $P=0.000$), D 组和 GFP 组、HEP 组和 HEP+D 组、A 组和 A+GFP 组两两比较,差异无统计学意义 ($P=0.975$ 、 $P=0.050$ 、 $P=0.157$)。A+HEP 组 bcl-2 蛋白的表达水平高于 HEP+D 组和 A+GFP 组,差异有统计学意义 ($P=0.000$ 、 $P=0.002$)。即与单独 azac 处理和 hepaCAM 腺病毒处理相比,azac 与 hepaCAM 腺病毒联用可以明显上调 hepaCAM 蛋白的表达,同时下调 p-AKT 和 bcl-2 蛋白的表达,且差异具有统计学意义(表 1、图 6)。

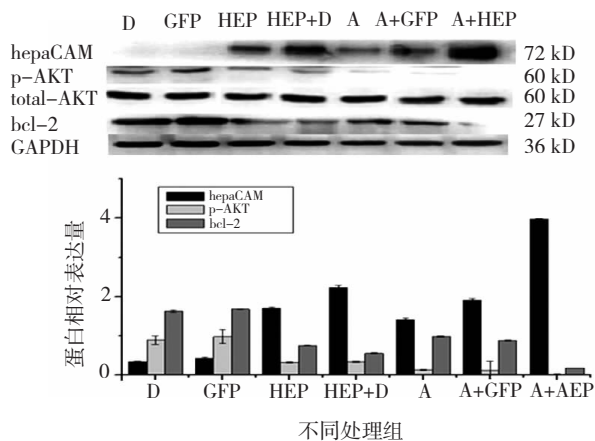


图 6 不同处理组 T24 细胞 hepaCAM、p-AKT 和抗凋亡因子 bcl-2 的蛋白表达

Fig.6 Expression of hepaCAM, p-AKT and bcl-2 detected by Western blot in different groups

3 讨论

hepaCAM 是近年来发现的候选抑癌基因和粘附分子,该基因定位于人类染色体 11q24 上,转录产物为 1 251 个 bp 的 mRNA,编码产物为含 416 个氨基酸、分子量约 46 kD,为一种跨膜蛋白,包含一段胞外区,一段跨膜区和一段胞内区,并且该蛋白中存在磷酸化和糖基化位点^[6]。研究证实其在人类正常膀胱组织上表达,而在膀胱癌组织中表达明显减少或缺失^[7],当野生型 hepaCAM 基因重新在缺失的肿瘤细胞中表达时,可明显抑制肿瘤细胞增殖、促进分化差的肿瘤细胞进行分化^[8-9]。肾癌中 hepaCAM 可通过调节 Caspase-3 凋亡通路而诱导肾癌 786-O 细胞的凋亡^[10]。

肿瘤中启动子区域异常高甲基化是抑癌基因沉默的机制之一,在膀胱癌研究发现抑癌基因 DAPK 启动子区域异常高甲基化致基因表达沉默可促使膀胱癌的发生发展^[11];卵巢癌中 IGFBP-3 的表达,促进了肿瘤的发生^[12];前列腺癌细胞中 S100A6 和 S100A2 基因启动子的高甲基化可导致该基因表达抑制,以促进前列腺癌的发生发展^[13]。且前期研究已发现膀胱癌细胞中 hepaCAM 表达降低或缺失可能与其启动子高甲基化有关^[4]。而 azac 是一种去甲基化药物,在很多其他肿瘤研究中,azac 可在一定程度上使抑癌基因重新表达并诱导肿瘤细胞凋亡。

细胞凋亡是控制过度增殖的一种正常细胞功能,肿瘤细胞具有多种抑制凋亡、延长其存活的能力。近年的研究表明,膀胱癌作为我国常见泌尿系统恶性肿瘤之一,其发生、发展与细胞增殖、分化、凋亡异常密切相关。有学者认为诱导膀胱癌细胞凋亡或许可以为治疗膀胱癌提供新的思路,其中 bcl-2 基因家族对细胞凋亡的调控倍受瞩目。

磷脂酰肌醇 3-激酶信号通路参与增殖、分化、凋亡和葡萄糖转运等多种细胞功能的调节。近年发现, PI3K 下游分子蛋白激酶 B(PKB 或 Akt)所组成的信号通路与人类肿瘤的发生发展密切相关。Akt 主要作用于抗凋亡通路, Akt 通过对其下游的靶蛋白进行磷酸化而发挥其抗凋亡的作用, 如 Akt 能通过磷酸化 bcl-2 家组成员 BAD 和蛋白水解酶 Caspase-9 而阻止凋亡; 且能磷酸化转录因子 Forkhead 家族成员 FKHR, 通过抑制 FKHR 的核转位以及 FKHR 的基因靶点 BIM 和 FAS 配体的激活而抑制凋亡^[14]; 目前以 PI3K-Akt 信号通路关键分子为靶点的治疗膀胱癌策略正在发展、逐渐成熟中。据报道, 抑制脂酸合酶可抑制 p-AKT 从而诱导膀胱癌细胞凋亡增多^[15]。吉西他滨联合组蛋白去乙酰化抑制剂 TSA 可通过下调 NF-KB/AKT 通路诱导膀胱癌细胞凋亡^[16]。甲基化酶抑制剂可逆转抑癌基因 HIN-1 的表达, 高表达 HIN-1 可通过抑制 p-AKT 诱导非小细胞肺癌细胞凋亡^[17]。为此本研究拟通过研究 azac 联合肝细胞黏附分子 hepaCAM 对膀胱癌细胞 T24 凋亡的调控及可能的分子机制, 为膀胱癌的治疗及临床应用带来新的手段。

研究表明, 与单独 azac 处理和 hepaCAM 腺病毒处理相比, azac 联合 hepaCAM 腺病毒可明显上调 hepaCAM 的表达, 下调 p-AKT 和 bcl-2 的表达, 同时明显增加膀胱癌细胞 T24 的凋亡率。即 azac 联合 hepaCAM 腺病毒可能通过抑制 p-AKT 诱导膀胱癌细胞 T24 凋亡增多, 此为膀胱癌的联合治疗开辟了新的路径, 也为寻求的膀胱癌的治疗靶点提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013[J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30.
- [2] Lee R, Droller MJ. The natural history of bladder cancer. Implications for therapy[J]. Urol Clin North Am, 2000, 27(1): 1-13.
- [3] Plissonnier ML, Fauconnet S, Bittard H, et al. The antidiabetic drug ciglitazone induces high grade bladder cancer cells apoptosis through the up-regulation of TRAIL[J]. Plos One, 2011, 6(12): e28354.
- [4] Tao J, Liu Q, Luo CL, et al. Identification of hypermethylation in hepatocyte cell adhesion molecule gene promoter region in bladder carcinoma[J]. Int J Med Sci, 2013, 10(13): 1860-1867.
- [5] Fandy TE. Development of DNA methyltransferase inhibitors for the treatment of neoplastic diseases[J]. Current Medicinal Chemistry, 2009, 16(17): 2075-2085.
- [6] Chung MM, Hoon LL, 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.
- [7] Xu B, He YF, Wu XH, 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.
- [8] Lee LH, Moh MC, Zhang T, et al. The Immunoglobulin-like cell adhesion molecule hepaCAM induces differentiation of human glioblastoma U373-MG cells[J]. J Cell Biochem, 2009, 107(6): 1129-1138.
- [9] 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.
- [10] 张巧琳, 罗春丽, 颜 令. HepaCAM 对肾癌 786-O 细胞 Caspase-3 活性和表达的影响[J]. 生物技术通报, 2010(11): 142-145.
- [11] Jarmalaite S, Jankevicius F, Kurgonaite K, et al. Promoter hypermethylation in tumour suppressor genes shows association with stage, grade and invasiveness of bladder cancer[J]. Oncology, 2008, 75(3-4): 145-151.
- [12] Torng PL, Lin CW, Chan MW, et al. Promoter methylation of IGF-BP-3 and p53 expression in ovarian endometrioid carcinoma[J]. Mol Cancer, 2009(8): 120.
- [13] Rehman I, Cross SS, Catto JW, et al. Promoter hypermethylation of calcium binding proteins S100A6 and S100A2 in human prostate cancer[J]. Prostate, 2005, 65(4): 322-330.
- [14] 孙晓杰, 黄常志. PI3K-Akt 信号通路与肿瘤[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(3): 306-311.
- [15] Jiang B, Li EH, Lu YY, et al. Inhibition of fatty-acid synthase suppresses P-AKT and induces apoptosis in bladder cancer[J]. Urology, 2012, 80(2): 484.e9-15.
- [16] Jeon HG, Yoon CY, Yu JH, et al. Induction of caspase mediated apoptosis and down-regulation of nuclear factor-B and Akt signaling are involved in the synergistic antitumor effect of gemcitabine and the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in human bladder cancer cells[J]. J Urol, 2011, 186(5): 2084-2093.
- [17] Yu Y, Yin D, Hoque MO, et al. AKT signaling pathway activated by HIN-1 methylation in non-small cell lung cancer[J]. Tumour Biol, 2012, 33(2): 307-314.

(责任编辑: 冉明会)