

肝细胞黏附分子对膀胱移行癌细胞基因表达谱的影响

王秋菊, 吕长坤, 陶 佳, 杜红飞, 范砚茹, 宋学东, 罗春丽

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

通信作者: 罗春丽 电话: 023-68485223, 电子邮件: luochunli79@126.com

摘要: **目的** 利用 Affymetrix 基因表达谱芯片探讨肝细胞黏附分子 (hepaCAM) 对膀胱移行癌细胞基因表达谱的影响及作用的分子机制。**方法** 运用 Affymetrix Human plus 2.0 全基因组芯片检测膀胱移行癌细胞株 EJ 细胞腺病毒-绿色荧光蛋白-hepaCAM 感染组与腺病毒-绿色荧光蛋白感染组的基因表达谱, 用 SAM 法进行差异基因分析、DAVID 软件进行基因本体论分析及 wikiPathway 分析, 并用 RT-PCR 和 Western blot 验证芯片结果。**结果** hepaCAM 能引起 EJ 细胞系基因表达谱的广泛变化, 表达差异超过 2 倍以上的基因共 2469 个, 其中上调基因 1602 个、下调基因 867 个。这些差异表达的基因功能主要涉及细胞周期、细胞增殖调节等方面。用 RT-PCR 对差异基因 DNA 修复蛋白, 肝脏激酶 B1 和细胞周期蛋白 D1 进行验证, 结果与基因芯片相符; 进一步在 3 细胞株中用 Western blot 佐证 DNA 修复蛋白、肝脏激酶 B1 变化与芯片结果一致。**结论** hepaCAM 能够诱导 EJ 细胞基因表达谱的广泛变化, 在基因水平通过多条通路作用于膀胱癌细胞。

关键词: 肝细胞黏附分子; 膀胱移行细胞癌; 基因表达谱芯片

中图分类号: R737.1 文献标志码: A 文章编号: 1000-503X(2013)02-0190-09

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2013.02.012

Influence of Hepatocyte Cell Adhesion Molecule on Gene Expression Profile of Human Bladder Transitional Cell Carcinoma Cell Line

WANG Qiu-ju, LÜ Chang-kun, TAO Jia, DU Hong-fei,
FAN Yan-ru, SONG Xue-dong, LUO Chun-li

Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education, Department of Laboratory Medical,
Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Corresponding author: LUO Chun-li Tel: 023-68485223, E-mail: luochunli79@126.com

ABSTRACT: Objective To investigate the changes of gene expression file in transitional cell carcinoma of bladder after hepatocyte cell adhesion molecule (hepaCAM) overexpression. **Methods** Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array was used to investigate the changes of gene expression profile between adenovirus-green fluorescent protein (GFP) -hepaCAM group and GFP group in transitional cell carcinoma of bladder EJ cells. Significant Analysis of Microarray (SAM) was used to screen the differentially expressed genes, DAVID software was used to conduct gene ontology analysis and wikiPathway analysis based on the differentially expressed genes. Reverse transcription-polymerase chain reaction and Western blot were applied to verify microarray data. **Results** Compared with the GFP group, a total of 2469 genes were up-regulated or down-regulated by more than 2 times in the GFP-hepaCAM group. Among these genes, 1602 genes were up-regulated and 867 were down-regulated. Most of the differentially expressed genes were involved in the function of cell proliferation and

cell cycle regulation. The mRNA expressions of nibrin, liver kinase B1, and cyclin D1 detected by reverse transcription-polymerase chain reaction in three different bladder cancer cell lines were consistent with the microarray data. The protein expressions of nibrin and liver kinase B1 in these three cell lines measured by Western blot were consistent with the mRNA expression. **Conclusions** HepaCAM can alter the gene expression profile of bladder cancer EJ cells. The well-known anti-tumor effect of hepaCAM may be mediated by regulating the gene expression via multiple pathways.

Key words: hepatocyte cell adhesion molecule; transitional cell carcinoma of bladder; gene expression profile chip

Acta Acad Med Sin, 2013, 35(2):190-198

膀胱移行细胞癌是泌尿系最常见的肿瘤,其发病率和死亡率均居泌尿系统肿瘤的首位。肝细胞黏附分子 (hepatocyte cell adhesion molecule, *hepaCAM*) 是近年发现的候选抑癌基因和黏附分子,研究表明 *hepaCAM* 基因在人类正常肝组织上表达,而在肝癌组织中表达明显减少或缺失^[1];随后进一步证实 *hepaCAM* 能抑制乳腺癌细胞的增殖,并能通过 P53/P21 途径促进癌细胞的凋亡^[2]。另有研究显示, *hepaCAM* 基因在人类正常膀胱和肾组织上表达,而在膀胱癌和肾癌组织中表达明显减少或缺失,并且在两膀胱癌细胞株中无表达,重新表达后能抑制这两种癌细胞的增殖; *hepaCAM* 定位于细胞核膜周围及细胞表面突出部位,在融合细胞中则定位于细胞与细胞接触区域; *hepaCAM* 能增强细胞的扩散,延迟细胞分离,增加伤口愈合及细胞的侵袭能力^[3-4];随后进一步证实 *hepaCAM* 能将肾癌细胞阻滞于 G₀/G₁ 期,通过下调 c-myc 的稳定性抑制肾癌的增殖^[5],但是 *hepaCAM* 影响这些功能的基因表达谱的变化尚未得到进一步的研究。因而,本研究采用基因芯片技术检测过表达 *hepaCAM* 后膀胱移行癌细胞株基因表达谱的变化,拟找出差异表达基因并运用 RT-PCR 和 Western blot 对部分差异基因进行验证并进行基因本体论 (gene ontology, GO) 与通路分析,探讨 *hepaCAM* 抑癌可能的作用途径和分子机制,为膀胱癌的防治提供新的思路和靶点。

材料和方法

材料 膀胱移行细胞癌 BIU-87 和 T24 细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,膀胱移行细胞癌 EJ 细胞株由重庆医科大学基础研究所惠赠; *hepaCAM* 腺病毒和绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 腺病毒由本实验室保存。二甲基亚砜 1640 及小牛血清购自 Gibco 公司; 优级胎牛血清购自天津灏洋生物公司; 总 RNA 提取试剂 Trizol 及

PCR 引物购自 Invitrogen 公司; 胰蛋白酶和二甲基亚砜购自美国 Sigma 公司; 逆转录试剂盒和 PCR 扩增试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; 兔抗人 DNA 修复蛋白 (nibrin, NBN) 多克隆抗体购自美国 Anbo 生物科技有限公司; 鼠抗人 β -actin、羊抗鼠 IgG/辣根过氧化物酶 (horse radish peroxidase, HRP) 标记二抗及羊抗鼠 IgG/HRP 标记二抗购自北京中杉金桥技术有限公司; 电化学发光化学发光试剂盒购自 Milipore 公司。Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array 表达谱芯片购自美国 Affymetrix 公司,该芯片包括人类全基因组 47 000 个转录本,包括了已报道的 38 500 个明晰的人类基因和表达序列标签,由先进通量 (上海) 生物技术有限公司提供技术服务。

细胞培养 膀胱移行细胞癌 T24、EJ 细胞株培养于含 10% 胎牛血清 (BIU-87 细胞株培养于含 10% 新生牛血清) 的 RPMI-1640 培养液中,置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件的培养箱中培养,常规换液传代。

腺病毒的感染 取对数生长期细胞适量接种于 35 cm² 预先加有 2 ml 无血清培养基的培养瓶中培养,待细胞汇合度达 80% 时加入适量绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) -*hepaCAM* 或者 GFP 腺病毒,设空白对照组、Ad-GFP 感染组、Ad-GFP-*hepaCAM* 感染组 3 个组,2 h 后加入 4 ml 有血清培养基,48 h 提取 RNA、蛋白用于后续实验。

总 RNA 的提取与质量检测 膀胱癌 EJ 细胞经腺病毒感染后,用 Trizol 法提取 Ad-GFP-*hepaCAM* 组和 Ad-GFP 组的总 RNA,并用 Nanodrop ND-1000 和安捷伦 2100 生物分析仪检测 RNA 的纯度和完整性。

基因芯片的杂交、扫描和分析 用 Affymetrix One-cycle cDNA Synthesis Kit 完成第一条 cDNA 和第二条 cDNA 的合成与纯化,用 Affymetrix GeneChip IVT Labeling Kit 完成对 cRNA 的合成与纯化,cRNA 片段化后用 GeneChip[®] Human Genome U133 Plus 2.0 Array

杂交 16 h, 然后用 Affymetrix fluidics station 450 进行洗脱和染色, 最后用 Affymetrix 3000 7G plus scanner 对芯片进行扫描; 用 AGCC 软件、affymetrix Expression Console 的 mas5 方法及 DAVID 软件进行数据分析。

RT-PCR 验证芯片结果 筛选出与增殖调控有关的 3 个差异显著基因 [NBN、细胞周期蛋白 D1、肝脏激酶 (liver kinase, LK) B1], 首先用 RT-PCR 进行验证。对 T24、EJ 和 BIU-87 3 株膀胱癌细胞实验组 (GFP-hepaCAM)、空载组 (GFP) 和空白组的总 RNA 进行逆转录, 再分别进行 PCR 扩增反应, 引物由 Invitrogen 公司合成, 各基因及 β -actin 引物序列和片段大小见表 1; PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 退火 30 s (退火温度: 细胞周期蛋白 D1: 66.8 °C, LKB1: 56.7 °C, NBN: 59.3 °C, β -actin: 55 °C), 72 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物利用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定, Quantity One 图像分析软件行灰度值分析。

Western blot 验证芯片结果 随机选取经 RT-PCR 验证过的基因 NBN 用 Western blot 验证其蛋白水平。对 T24、EJ 和 BIU-87 膀胱癌细胞用 Ad-hepaCAM 和 Ad-GFP 腺病毒感染 48 h 后的感染组和空载组及相应的空白对照组弃去培养基, 用预冷的 PBS 洗 3 次, 加入细胞裂解液冰上裂解 30 min, 每 10 分钟振荡 1 次, 转子半径 5 cm, 12 000 r/min、4 °C 离心 30 min, 小心吸取上清液至 1.5 ml EP 管中, 取少量用 BCA 法测定蛋白浓度。取 60 μ g 提取的蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后半干法转膜, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 3 h, 加入 1:1000

封闭液稀释的一抗 4 °C 孵育过夜, 0.1% 洗膜缓冲液洗膜 10 min \times 3 次, 加入 1:1000 封闭液稀释的二抗室温孵育 1 h, 0.1% 洗膜缓冲液洗膜 10 min \times 3 次后, 电化学发光检测各蛋白表达情况, 用 Quantity One 图像分析软件行灰度值测定。

统计学处理 所有数据均以均值 \pm 标准差表示, 应用 SPSS 16.0 进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

总 RNA 质量检验结果 提取的总 RNA 经 Nanodrop 2000C 检测, 吸光度 (absorbance, A) 260/A280 的比值在 1.8 ~ 2.1, A260/A230 的比值大于 1.8, RNA 完整性指数值大于 6.0; 总 RNA 经 Agilent 2100 Bioanalyzer 凝胶电泳检测, 显示无基因组 DNA 污染, 无 RNA 降解, 两样品总 RNA 28s/18s 峰值的面积比值均在 2:1 左右, 表明 RNA 的质量较好, 符合基因芯片杂交检验的要求。

基因表达谱芯片筛选出的差异基因 芯片杂交结果显示, Ad-GFP-hepaCAM 组与 Ad-GFP 组比较, 差异在 2 倍以上的基因共有 2469 个, 其中表达上调的有 1602 个, 表达下调的有 867 个。生物信息学分析这些差异基因主要分类为细胞增殖、细胞周期调控、细胞凋亡和转移、转录因子活性及信号转导等类别, 其中有关细胞增殖和细胞周期调控的差异基因表达最显著, 表 2 为部分细胞增殖调控的差异基因。

表 1 PCR 反应中各基因的引物序列
Table 1 Primers used in PCR reactions

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	产物 Product (bp)
hepaCAM	上游 Sense: TACTGTAGATGTGCCCATTTTCG 下游 Anti-sense: CTCTGGTTTCAGGCGGTC	461
细胞周期蛋白 D1 Cyclin D1	上游 Sense: CGATGCCAACCTCCTCAACGAC 下游 Anti-sense: CCAGCATCCAGGTGGCGACG	143
LKB1	上游 Sense: GAGCTGATGTCGGTGGGTATG 下游 Anti-sense: CACCTTGCCGTAAGAGCCT	144
NBN	上游 Sense: AGCAGCAGACCAACTCCATCAGAA 下游 Anti-sense: TCCACAATGAGGGTCTAGCAGGTT	159
β -actin 1	上游 Sense: ACGAGACCACCTTCAACTCCATC 下游 Anti-sense: TAGAAGCATTTCGGGTGGACGA	304
β -actin 2	上游 Sense: GGGACCTGACTGACTACCTC 下游 Anti-sense: CGTCATACTCCTGCTTGCTG	543

hepaCAM: 肝细胞黏附分子; LKB1: 肝脏激酶 B1; NBN: DNA 修复蛋白
hepaCAM: hepatocyte cell adhesion molecule; LKB1: liver kinase B1; NBN: nibrin

表 2 Ad-GFP-hepaCAM 组和 Ad-GFP 组部分细胞增殖调控的差异基因

Table 2 Differential gene for proliferation regulation in Ad-GFP-hepaCAM group and Ad-GFP group

基因位置 Unigene ID	比值 Ratio	基因名称 Gene symbol
Hs. 515005	3. 997	LKB1
Hs. 523852	-3. 525	CCND1
Hs. 121076	3. 359	CLK1
Hs. 436329	3. 336	SCRIB
Hs. 440382	3. 283	TRIM27
Hs. 492208	-3. 200	NBN
Hs. 699306	3. 080	TXLNA
Hs. 16355	3. 012	MYH10
Hs. 696032	2. 963	PPARD
Hs. 54457	2. 761	CD81
Hs. 118400	2. 689	FSCN1
Hs. 435981	2. 676	ERCC1
Hs. 584807	2. 658	TCF19
Hs. 569017	2. 630	SLC29A2
Hs. 19192	-2. 514	CDK2
Hs. 476018	-2. 483	CTNNB1
Hs. 591518	2. 479	KDM1
Hs. 437008	2. 290	EPHB4
Hs. 440320	-2. 273	GUL5
Hs. 709208	2. 263	GNB1
Hs. 508999	2. 226	PRKD1
Hs. 121076	-2. 222	PPIL3
Hs. 719294	2. 220	PIM2

GFP: 绿色荧光蛋白; -: 代表下调的基因

GFP: green fluorescent protein; -: represented the downregulated genes

基因本体论功能分析和通路分析 对筛选出的差异倍数在 2 倍以上的基因进行基因本体论分析, 可将这些差异表达的基因分为 3 大类: 生物学过程、细胞组分和分子功能。在生物学过程分类中 hepaCAM 主要参与细胞周期调控、细胞周期阻滞 (特别是 G1/S 期转变的阻滞) 以及对细胞增殖的负向调控等过程。从细胞组分分类中发现细胞内外黏着细胞器、胞内部分及核部分的差异基因表达显著。在分子功能分类中, 差异基因主要参与转录共激活活性、细胞黏附分子结合、ATP 结合、钙黏素结合、转录因子结合等功能 (表 3)。WikiPathway 分析显示这些差异基因主要集中在腺苷酸活化蛋白激酶、雷帕霉素靶蛋白、苏氨酸蛋白激酶、雄激素受体、肿瘤坏死因子 α /核因子 κ B 及 $\alpha_6\beta_4$ 整合素等信号通路 (表 4)。

RT-PCR 验证芯片结果 为了验证芯片结果的可靠性, 根据差异基因的表达倍数及其的 GO 分类筛选了 *NBN*、*LKB1* 和细胞周期蛋白 D1 基因用 RT-PCR 进行验证, 结果显示与空载组和空白组比较, 实验组 *NBN* 和细胞周期蛋白 D1 的 mRNA 表达水平显著下降 ($P < 0.05$), *LKB1* 的 mRNA 表达水平显著上调 ($P < 0.05$), 与基因芯片显示的结果一致 (图 1)。

表 3 Ad-GFP-hepaCAM 组和 Ad-GFP 组中部分差异表达显著基因的 GO 分类

Table 3 Selected gene ontology terms significantly overrepresented in Ad-GFP-hepaCAM and Ad-GFP groups

GO 位置 GO ID	GO 名称 GO name	改变数目 Number changed	Z 评分 Z score	P 值 P value
GO: 0000075	细胞周期关卡 Cell cycle checkpoint	38	3. 64	0
GO: 0000082	有丝分裂 G1 到 S 过渡期 G1/S transition of mitotic cell cycle	28	3. 48	0.0005
GO: 0007050	细胞周期调控 Regulation of cell cycle	26	3. 48	0
GO: 0051726	细胞周期阻滞调节 Regulation of cell cycle arrest	107	5. 45	0
GO: 0071156	内细胞团细胞增殖 Inner cell mass cell proliferation	40	3. 59	0.0005
GO: 0001833	负向调节细胞增殖 Negative regulation of cell proliferation	4	2. 96	0.0200
GO: 0008285	正向调节细胞增殖 Positive regulation of cell proliferation	63	2. 44	0.0335
GO: 0043227	膜相连膜上细胞器 Membrane-bounded organelle	1167	14. 07	0
GO: 0043231	膜相连膜内细胞器 Intracellular membrane-bounded organelle	1166	14. 06	0
GO: 0043229	细胞内细胞器 Intracellular organelle	1253	13. 91	0
GO: 0043226	细胞器 Organelle	1254	13. 88	0
GO: 0044428	核部分 Nuclear part	467	13. 46	0
GO: 0044424	细胞内部分 Intracellular part	1457	13. 10	0.0010
GO: 0003713	转录共激活剂 Transcription coactivator activity	58	6. 95	0
GO: 0005524	ATP 结合 ATP binding	218	5. 22	0
GO: 0045296	钙黏着蛋白绑定 Cadherin binding	8	4. 01	0
GO: 0008134	转录因子结合 Transcription factor binding	55	3. 91	0
GO: 0050839	细胞黏附分子结合 Cell adhesion molecule binding	12	3. 69	0.0015

GO: 基因本体论; 标准: 改变个数 >2, Z 评分 >1.96, $P < 0.05$

GO: gene ontology; criterion: number changed >2, Z score >1.96, and $P < 0.05$

表 4 wikiPathway 富集分析结果
Table 4 Results of wikiPathway analysis

通路 Pathway	改变数目 Number changed	Z 评分 Z score	P 值 P value
腺苷酸环化酶活化蛋白激酶通路 Adenylate cyclase activating protein kinase pathway signaling	32	5.17	0
雷帕霉素靶蛋白信号通路 Mammalian target of rapamycin signaling pathways	18	3.65	0
苏氨酸蛋白激酶通路 Threonine protein kinase pathway	17	3.34	0
雄激素受体信号通路 Androgen receptor signaling pathway	32	5.17	0
信使 RNA 修饰 mRNA processing	31	4.45	0
肿瘤坏死因子 α /核因子 κ B 信号通路 Tumor necrosis factor- α /nuclear factor- κ B signaling pathway	42	4.39	0
α 6- β 4 整合素信号通路 α 6- β 4 integrin signaling pathway	17	3.34	0.0010
凋亡 Apoptosis	27	3.24	0.0010
衰老与自体吞噬 Senescence and autophagy	22	3.16	0.0010
白介素-2 信号通路 Interleukin-2 signaling pathway	19	3.40	0.0015
DNA 损伤反应 (仅 ATM 依赖型) DNA damage response (only ATM dependent)	20	3.49	0.0020
白介素-9 信号通路 Interleukin-9 signaling pathway	9	3.66	0.0020
翻译因子 Translation factors	12	2.66	0.0035
FAS 通路和压力介导的热休克蛋白调节 FAS pathway and stress induction of heat shock protein regulation	10	2.88	0.0065
G13 信号通路 G13 signaling pathway	9	2.47	0.0065
心肌细胞肥大中的小 RNA MicroRNAs in cardiomyocyte hypertrophy	18	2.69	0.0065
DNA 损伤反应 DNA damage response	15	2.52	0.0090
表皮生长因子受体 1 信号通路 Epidermal growth factor receptor 1 signaling pathway	33	2.67	0.0135
P38 丝裂原激活蛋白激酶信号通路 P38 mitogen-activation protein kinase signaling pathway	8	2.34	0.0160
Wnt 信号通路 Wnt signaling pathway	21	2.31	0.0180
固醇调节元件结合蛋白信号通路 Sterol regulating element binding protein signaling pathway	7	2.69	0.0230
5-羟色胺受体 4/6/7 \rightarrow NR3C 信号通路 Serotonin receptor 4/6/7 \rightarrow NR3C signaling pathway	6	2.60	0.0285
白介素-7 信号通路 Interleukin-7 signaling pathway	10	2.08	0.0290
白介素-3 信号通路 Interleukin-3 signaling pathway	19	2.08	0.0375
丝裂原激活蛋白激酶信号通路 Mitogen-activation protein kinase signaling pathway	28	2.23	0.0375
转化生长因子- β 受体信号通路 Transforming growth factor- β receptor signaling pathway	27	2.05	0.0400

标准: 改变个数 >2, Z 评分 >1.96, $P < 0.05$

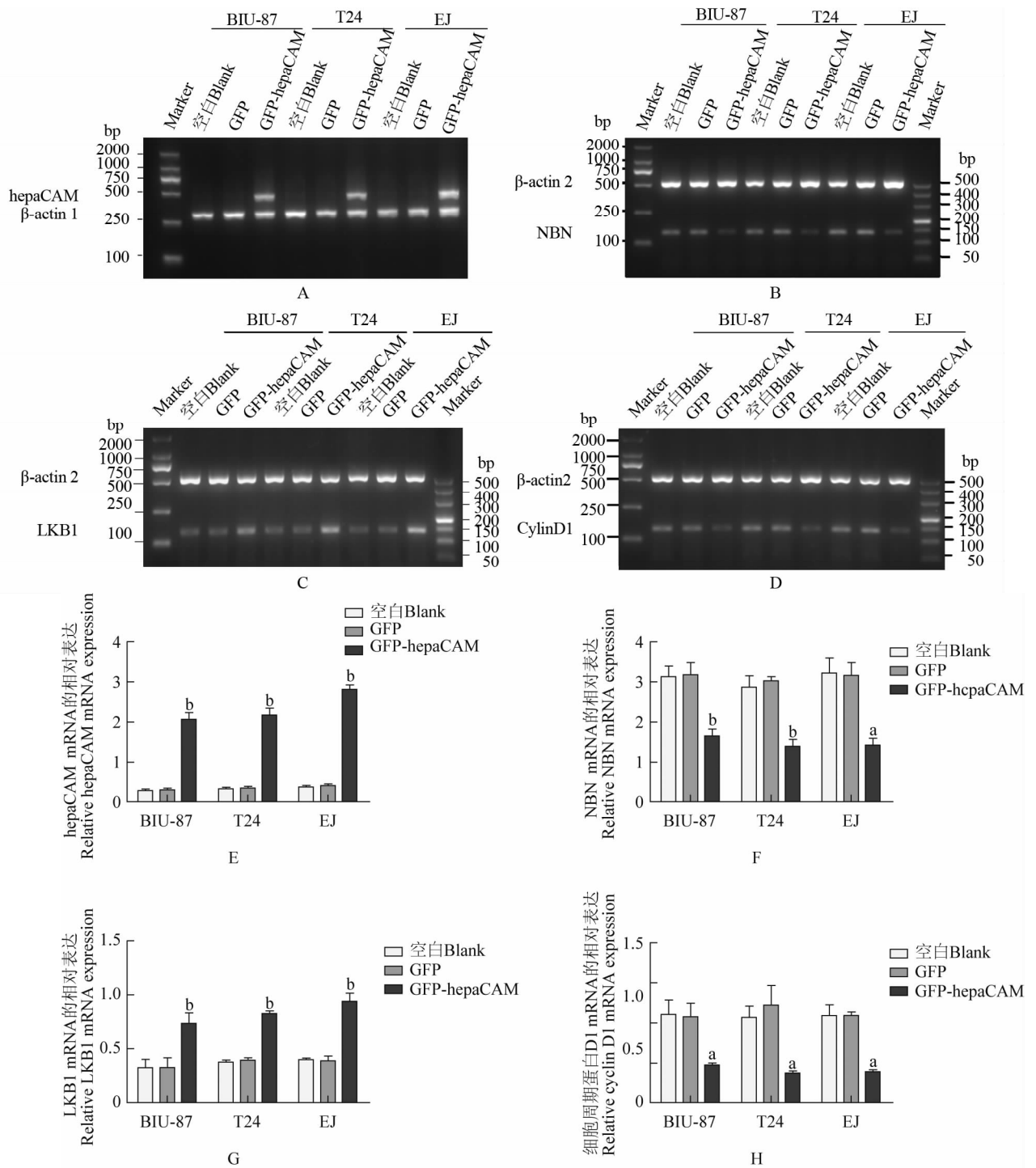
criterion: number changed >2, Z score >1.96, and $P < 0.05$

Western blot 验证芯片结果 经过对芯片结果的分析及对芯片 mRNA 水平的验证, 随机选取经 RT-PCR 验证的 NBN、LKB1 通过 Western blot 进行进一步的验证。结果显示, Ad-GFP-hepaCAM 组的 NBN 蛋白表达水平显著低于 Ad-GFP 组和空白组 ($P < 0.05$), 而 LKB1 的蛋白表达水平显著高于 Ad-GFP 组和空白组 ($P < 0.05$) (图 2)。

讨 论

hepaCAM 是 2005 年 Moh 等^[1]从肝脏中分离出来的一种新的免疫球蛋白类细胞黏附分子, 该基因定位

于人类染色体 11q24 上, 转录产物为 1251 bp 的 mRNA, 编码产物为含 416 个氨基酸、相对分子质量约 46 000 的糖蛋白, 并证实它具有抑癌基因的特性。另有研究表明细胞黏附分子可在多种肿瘤中作为抑癌基因发挥对抗肿瘤的作用, 如癌胚抗原细胞黏附分子 1 能通过半胱天冬酶 1 和半胱天冬酶 3 的激活促进结肠癌细胞的凋亡, 且它的长链癌胚抗原细胞黏附分子 1 长链能通过其 ITIM 区域抑制肺癌细胞的增殖^[6-7]。具有抑癌基因特性的黏附分子肺癌抑制因子 1 在高分级的胶质瘤组织中表达减少或缺失且重新表达能够抑制胶质瘤细胞的生长; 生存素调控的溶瘤细胞腺病毒介导的肺癌抑制因子 1 过表达能抑制肝癌细胞的增



与 GFP 感染组和空白组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

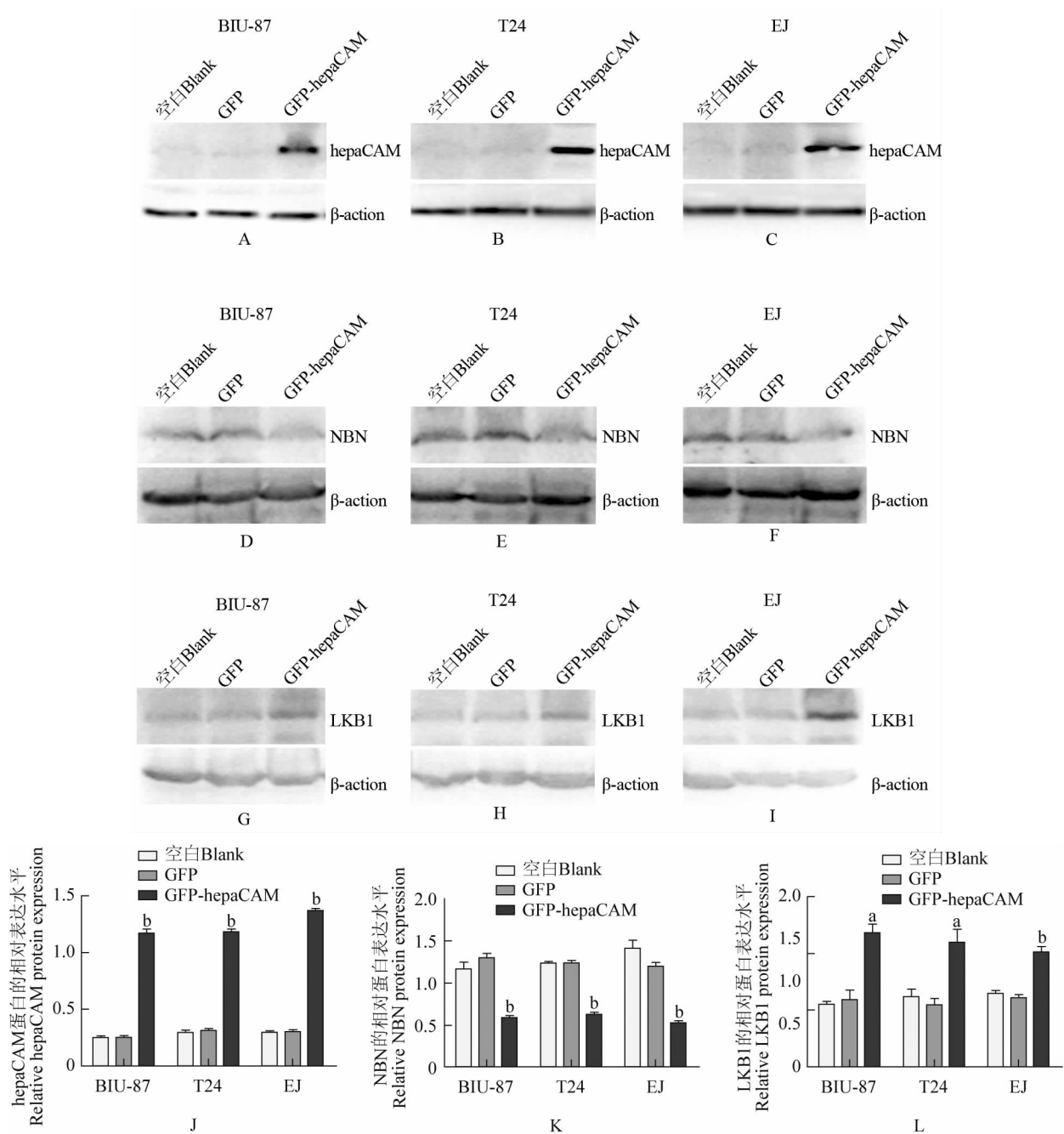
^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ compared with adenovirus-GFP group and blank group

A. hepaCAM; B. NBN; C. LKB1; D. 细胞周期蛋白 D1; E. hepaCAM 信使 RNA 在膀胱癌细胞株中的相对表达水平; F. NBN 信使 RNA 在膀胱癌细胞株中的相对表达水平; G. LKB1 在膀胱癌细胞中的相对表达水平; H. 细胞周期蛋白 D1 信使 RNA 在膀胱癌细胞中的相对表达水平

A. hepaCAM; B. NBN; C. LKB1; D. cyclin D1; E. relative mRNA expression of hepaCAM in the three groups in three bladder cancer cell lines; F. relative mRNA expression of NBN in the three groups in three bladder cancer cell lines; G. relative mRNA expression of LKB1 in the three groups in three bladder cancer cell lines; H. relative mRNA expression of cyclin D1 in the three groups in three bladder cancer cell lines

图 1 RT-PCR 检测 3 种膀胱癌细胞株中 hepaCAM、NBN、LKB1、细胞周期蛋白 D1 mRNA 的表达

Fig 1 Detection of mRNA expressions of hepaCAM, NBN, LKB1, and cyclin D1 in three bladder cancer cell lines by reverse transcription-polymerase chain reaction



与 GFP 感染组和空白组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ compared with adenovirus-GFP group and blank group

A-I. 分别表示 hepaCAM、NBN 和 LKB1 的蛋白水平在膀胱癌 BIU-87、T24 和 EJ 细胞中的表达; J~L. hepaCAM、NBN 和 LKB1 在细胞株中不同处理组中的表达水平

A-I. protein expressions of hepaCAM, NBN, and LKB1 in BIU-87, T24, and EJ cells, respectively; J-L. relative expressions of hepaCAM, NBN, and LKB1 in three bladder cancer cell lines in different groups

图 2 Western blot 检测膀胱癌细胞株不同组 hepaCAM、NBN 和 LKB1 蛋白表达的变化

Fig 2 Detection of protein expressions of hepaCAM, NBN, and LKB1 in the three bladder cancer cell lines in different groups by Western blot

殖^[8-9]。笔者前期工作显示 hepaCAM 在膀胱癌和肾癌组织中表达减少或缺失且重新表达 hepaCAM 能抑制这两种癌细胞的增殖^[3-4]。本研究表明过表达 hepaCAM

能引起膀胱癌细胞与增殖相关基因表达谱广泛的变化。

近年来, 基因表达谱芯片广泛应用于肿瘤的研究

中。有学者利用基因芯片检测抑癌基因在肿瘤细胞中过表达前后基因表达谱的变化,探讨抑癌基因的多作用靶点和分子机制。如 Simpson 等^[10]利用基因芯片研究过表达抑癌基因染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物基因前后基因表达谱的变化探讨染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物基因抑癌的具体分子机制。本研究运用基因芯片分析过表达 hepaCAM 前后膀胱癌 EJ 细胞基因表达谱的变化,旨在从整体水平研究 hepaCAM 作用的靶点和可能的抑癌机制。

基因芯片检测结果显示 hepaCAM 过表达于 EJ 细胞后能够引起该细胞系基因表达谱广泛的变化,这些差异基因的功能涉及多个方面,其中与细胞增殖和细胞周期调控有关的基因 (*LKB1*、细胞周期蛋白 D1、*CLK1*、*NBN*、*CDK2* 等) 差异最为显著。对这些差异基因的 GO 分析结果显示,这些差异基因主要参与的生物学过程为细胞增殖与细胞周期调控; 主要与细胞组分中与胞膜黏着的细胞器有关,这一点验证了其做为黏附分子的特性; 分子功能分析显示差异基因主要与转录共刺激因子活性及 ATP 结合功能相关,笔者挑选差异较为显著的与增殖有关基因 *LKB1*、细胞周期蛋白 D1 和 *NBN* 用 RT-PCR 进行验证,结果与基因芯片完全一致。基因芯片结果主要反应的是转录水平的变化,只有与生命活动的执行者蛋白质结合分析才能完整反应基因的改变过程,因而笔者随机挑选其中的 *NBN* 基因用 Western blot 在 3 株膀胱癌细胞中进行验证,结果显示其表达水平的变化与基因芯片的结果相符,进一步验证了芯片结果的准确性。

NBN 作为细胞周期检验点信号通路的感受器和调控器,在细胞浆中作为癌基因行使其功能, *c-myc* 癌基因能够使 *NBN* 表达增加,继而激活磷脂酰肌醇 3 激酶/AKT 信号通路,调节下游的 p-mTOR 等,从而促进癌细胞的增殖^[11]。*NBN* 在多种癌组织表达增加,并可以作为口腔鳞状细胞癌和头颈部鳞状细胞癌的一个独立的预后靶标^[12-13]。*LKB1* 的主要功能为调节细胞的极性、代谢、分化与增殖,可以激活包括腺苷酸活化蛋白激酶 α 1-2 在内的 14 个底物激酶, *LKB1* 通过微管和肌动蛋白的动力学变化调节细胞的极性, *LKB1* 的突变或缺失导致细胞极性蛋白的改变会引起肿瘤^[14-15]; *LKB1*/腺苷酸活化蛋白激酶信号通路是新的治疗白血病的靶标,能激活这条通路的二甲双胍,使得能激活这条通路的药物研究成为治疗白血病的研究热点^[16-17]。细胞周期蛋白 D1 在很多肿瘤中表达增加,其与 *CDK4* 和 *CDK6* 结合是 G1 期向 S 期转变的限速步

骤,限制细胞周期蛋白 D1 与 *CDK4* 复合物的核输出能导致肿瘤的形成; *LKB1* 能结合于细胞周期蛋白 D1 的启动子区而抑制细胞周期蛋白 D1 的表达,将细胞阻滞于 G1 期,以此来保持细胞的稳态,减少不必要的增殖^[18-19]。提示细胞周期蛋白 D1 可能作为 *LKB1* 的下游效应分子受到 *LKB1* 的调控,从而影响癌细胞的恶性增殖行为。

本研究对过表达 hepaCAM 对膀胱癌 EJ 细胞株差异基因的发现为研究 hepaCAM 对膀胱癌的抑癌机制提供了具体的线索,尤其是 *NBN*、*LKB1*、细胞周期蛋白 D1 基因的表达变化可能对膀胱癌的增殖发挥重要的调控作用。*hepaCAM* 作为抑癌基因抑制膀胱癌的进程可能是多基因多信号通路共同作用的结果,其具体的分子机制尚有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Moh MC, Lee LH, Shen SL. 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.
- [2] Moh MC, Zhang T, Lee LH, et al. Expression of hepaCAM is downregulated 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.
- [3] Xun CH, Luo CL, Wu XH, et al. Expression of hepaCAM and its effect on proliferation of tumor cells in renal cell carcinoma [J]. *Urology*, 2010, 75(4):828-834.
- [4] He YF, Wu XH, Luo CL, et al. Functional significance of the hepaCAM gene in bladder cancer [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10:83.
- [5] 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.
- [6] Singer BB, Scheffrahn I, Kammerer R, et al. Deregulation of the CEACAM expression pattern causes undifferentiated cell growth in human lung adenocarcinoma cells [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1):e8747.
- [7] Nittka S, Böhm C, Zentgraf H, et al. The CEACAM1-mediated apoptosis pathway is activated by CEA and triggers dual cleavage of CEACAM1 [J]. *Oncogene*, 2008, 27(26):3721-3728.
- [8] Houshmandi SS, Surace EI, Zhang HB, et al. Tumor suppressor in lung cancer-1 (TSLC1) functions as a glioma tumor suppressor [J]. *Neurology*, 2006, 67(10):1863-1866.

- [9] 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.
- [10] Simpson L, Li J, Liaw D, et al. PTEN expression causes feedback upregulation of insulin receptor substrate 2 [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(12):3947-3958.
- [11] Teng SC, Wu KJ, Tseng SF, et al. Importin KPNA2, NBS1, DNA repair and tumorigenesis [J]. *J Mol Histol*, 2006, 37(5-7):293-299.
- [12] Hsu DS, Chang SY, Liu CJ, et al. Identification of increased NBS1 expression as a prognostic marker of squamous cell carcinoma of the oral cavity [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(4):1029-1037.
- [13] Yang MH, Chiang WC, Chou TY, et al. Increased NBS1 expression is a marker of aggressive head and neck cancer and overexpression of NBS1 contributes to transformation [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(2):507-515.
- [14] Vaahtomeri K, Mäkelä TP. Molecular mechanisms of tumor suppression by LKB1 [J]. *FEBS Lett*, 2011, 585(7):944-951.
- [15] Martin BF, Perez MM. Epithelial cell polarity, stem cells and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 12(1):23-38.
- [16] Green AS, Chapuis N, Maciel TT, et al. The LKB1/AMPK signaling pathway has tumor suppressor activity in acute myeloid leukemia through the repression of mTOR-dependent oncogenic mRNA translation [J]. *Blood*, 2010, 116(20):4262-4273.
- [17] Grimaldi C, Chiarini F, Tabellini G, et al. AMP-dependent kinase/mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia: therapeutic implications [J]. *Leukemia*, 2012, 26(1):91-100.
- [18] Klein EA, Assoian RK. Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(Pt 23):3853-3857.
- [19] Kim JK, Diehl JA. Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer [J]. *J Cell Physiol*, 2009, 220(2):292-296.

(收稿日期: 2012-09-13)