

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.36.003

过表达核糖核酸酶抑制因子对膀胱癌移植瘤侵袭转移及上皮细胞间质转化的影响^{*}

舒 静¹,姜 源¹,姚 雪²,陈俊霞³

(1. 泸州医学院附属医院检验科,四川泸州 646000;2. 重庆市卫生信息中心《重庆医学》编辑部 401120;
3. 重庆医科大学基础医学院细胞生物学与遗传学教研室分子医学与肿瘤研究中心 400016)

[摘要] **目的** 研究过表达核糖核酸酶抑制因子(RI)对膀胱癌移植瘤侵袭转移及上皮细胞间质转化(EMT)的影响。**方法** 将 RI 过表达质粒(pIRES2-EGFP-RI)和阴性对照质粒(pIRES2-EGFP)稳定转染膀胱癌 T24 细胞,稳定表达细胞株分别命名为: T24-RI 组、T24 vector 组、T24 组。将各组 T24 细胞分别接种至 BALB/C 裸鼠左腋下,观察移植瘤的生长、微血管密度及肺组织转移灶的变化;进一步分析 RI、MMP-2、MMP-9、EMT 相关蛋白(E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Snail、Slug、Twist 蛋白)在肿瘤组织中的表达水平。**结果** T24-RI 组较 T24 组与 T24 vector 组,瘤体质量显著降低($P<0.01$),抑瘤率分别为 26.67%和 38.85%;与对照组比较,T24-RI 组瘤组织微血管密度明显减少,肺组织未见明显转移灶,同时 CD31 在瘤组织中表达减少;免疫组织化学染色显示:T24-RI 组瘤组织中 RI、E-cadherin 蛋白的表达明显升高,而 MMP-2、MMP-9、N-cadherin、Vimentin、Snail、Slug、Twist 蛋白表达明显降低。**结论** 过表达 RI 可能通过调节侵袭转移 EMT 关键蛋白的表达,显著抑制了膀胱癌移植瘤生长、侵袭和转移的潜能。

[关键词] 过表达核糖核酸酶抑制因子;T24 细胞;移植瘤;肿瘤侵袭转移;上皮细胞介质转化
[中图分类号] R394.2;R73-37;R737.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)36-5057-04

Over-expression of human ribonuclease inhibitor suppresses invasion and migration of transplanted bladder cancer^{*}

Shu Jing¹,Jiang Yuan¹,Yao Xue²,Chen Junxia³

(1. Department of Clinical Laboratory,Affiliated Hospital of Luzhou Medical College,Luzhou,Sichuan 646000,China;
2. Editorial Department of Chongqing Medicine Journal,Chongqing Health Information Center,Chongqing 401120,China;
3. Department of Cell Biology and Genetics/Molecular Medicine and Cancer Research Center,College of Basic Medical Science,Chongqing Medical University,Chongqing 400016,China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of over-expression of human ribonuclease inhibitor suppresses invasion and migration of transplanted bladder cancer. **Methods** The T24 cells were stably transfected with pIRES2-EGFP-RI and pIRES2-EGFP plasmid respectively. Using the cell transfected with pIRES2-EGFP and untransfected cell as controls, and the positive clones were screened by G418,respectively;Tumor cells of the three groups at 2×10^6 were respectively injected into the back of BALB/C nude mice to establish the xenograft models. Change of micro-blood vessels in tumor tissue and expression of CD31 were detected by Immunohisto-chemical and HE staining. Immunohisto-chemical assay was used to detect the expression of RI,MMP-2,MMP-9,E-cadherin,N-cadherin,Vimentin,Snail,Slug,Twist in the tumors. **Results** Animal experiment showed that the T24-RI cells group significantly inhibited the growth of bladder cancer compared with the other two control groups. Compared with the T24 and T24 vector cells groups,the microvessel density in tumor tissue of T24-RI group was notably reduced and the expressions of MMP-2,MMP-9,N-cadherin,Vimentin,Snail,Slug,Twist significantly were decreased simultaneously,while the expressions of RI and E-cadherin were increased. **Conclusion** up-regulation RI can inhibit the growth of transplanted bladder cancer in nude mice by decreasing the expression of invasion protein and EMT protein.

[Key words] ribonuclease inhibitor;T24 cell;transplanted tumor;neoplasm invasiveness and metastasis;epithelial-mesenchymal transition

膀胱癌是泌尿系统中常见的多发性肿瘤,位居世界恶性肿瘤的第 5 位。肿瘤侵袭转移是一个癌细胞与宿主细胞及基质相互作用的连续过程,即脱落、侵袭、循环、增殖形成肿瘤的转移灶。上皮间质转化^[1](epithelial-mesenchymal transition, EMT)是多细胞胚胎发育与器官形成中的基础过程,是胚胎发育中形态发生过程的主要部分,在 EMT 过程中上皮细胞获得间质细胞的特征——细胞间黏附减弱、运动性增强、细胞间基质降解等。近年来研究发现^[2],EMT 在肿瘤发生、发展与转移

过程中起着重要的作用,EMT 使没有侵袭、迁移能力的细胞获得浸润能力并最终转移到其他组织和器官,并再次通过间质上皮转化定植形成转移灶。上皮标志物(E-cadherin)的下调与间质标志物(N-cadherin)的上调是 EMT 的主要特征之一。此外,锌指转录因子(Slug、Snail)也是 EMT 主要调节因子,通过与靶基因启动子结合,诱导 EMT 的发生,促使肿瘤细胞发生侵袭与转移^[3];而碱性螺旋环转录因子(Twist)通过抑制细胞凋亡与分化,诱导细胞上皮间质化转变,其高表达与肿瘤的转

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81172424,81372203)。 作者简介:舒静(1986—),技师,硕士,主要从事临床检验及肿瘤相关研究。

移与预后相关^[4]。因此,本文通过构建裸鼠移植瘤模型,观察移植瘤的生长、微血管形成等,并检测移植瘤组织中侵袭转移、EMT 相关分子蛋白的表达,研究核糖核酸抑制因子(ribonuclease inhibitor,RI)基因对膀胱癌 T24 细胞侵袭转移的影响,并初步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及动物 人膀胱癌细胞株 T24、pIRES2-EGFP、pIRES2-EGFP-RI 质粒以及一抗(兔抗人 RI)由重庆医科大学细胞生物学及遗传学教研室保存;BALB/C 裸鼠 5~6 周龄,(20±3)g,购自北京大学动物实验中心;兔抗人 CD31 抗体购自美国 Santa Cruz Biotech 公司;Dylight 488 标记的二抗(山羊抗兔 IgG)购自北京鼎国公司;兔抗 E-cadherin、N-cadherin、MMP-2、MMP-9、Vimentin、Snail、Slug、Twist 一抗购于 Bio-world 公司;免疫组织化学染色试剂盒、DAB 染色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 T24 细胞培养、转染及鉴定 用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基培养于 37℃、5% CO₂ 培养 T24 细胞,取对数生长期细胞以每孔 2×10⁶ 细胞接种至 6 孔板中,待细胞融合度达 70%,采用 Lipofectamine 2000 转染 T24 细胞。转染 48 h 后用 G418 筛选,15 d 后采用有限稀释法获取单克隆细胞团。

1.2.2 裸鼠移植瘤模型 取 0.1 mL 含有 2×10⁵/mL 的各组对数期细胞,PBS 制备细胞悬液后分别接种于裸鼠左腋下,每组 8 只。记录各组小鼠成瘤时间,21 d 后处死小鼠,称重并计算抑瘤率。抑瘤率=(对照组肿瘤质量-实验组肿瘤质量)/对照组肿瘤质量×100%。

1.2.3 HE 染色 4%多聚甲醛固定组织标本、5 μm 石蜡包埋切片、二甲苯脱蜡水化后苏木精染色 4~5 min、饱和碳酸锂分色 5 s,冲洗后伊红复染 2 min,梯度乙醇分别脱水 1 s,二甲苯透明后封片,在显微镜下对 5 个不同视野的高密度微血管区域进行计数。

1.2.4 免疫组织化学染色和免疫荧光分析 4%甲醛固定肿瘤组织、5 μm 石蜡包埋切片、二甲苯脱蜡水化及抗原修复、3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶及 5%血清封闭,一抗孵育[RI(1:250 稀释)、Vimentin(1:150 稀释)、E-cadherin、N-

cadherin、MMP-2、MMP-9、Snail、Slug、Twist(1:200 稀释)]于 4℃冰箱中过夜;PBS 清洗 5 min/次×3 次,加入二抗生物素化羊抗兔 IgG 于 37℃湿盒并孵育 30 min,加入辣根酶标记链酶卵白素溶液,37℃孵育 10~20 min,滴加 DAB 溶液,苏木精复染及封片,显微镜下观察拍片。组织免疫荧光:10 μm 冰冻切片,10%甲醛固定 25 min,2% Triton 通透 10 min,BSA 封闭 25 min,一抗 CD31(1:100 稀释)于 4℃孵育过夜,PBS 洗 3 遍,加入二抗羊抗兔 Dylight 488 的 IgG(1:50)37℃避光孵育 2 h,PBS 洗 3 遍,抗荧光淬灭剂封片。荧光显微镜下拍照,并分析瘤组织切片的荧光强度。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 11.5 软件进行统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,配对组间比较采用 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

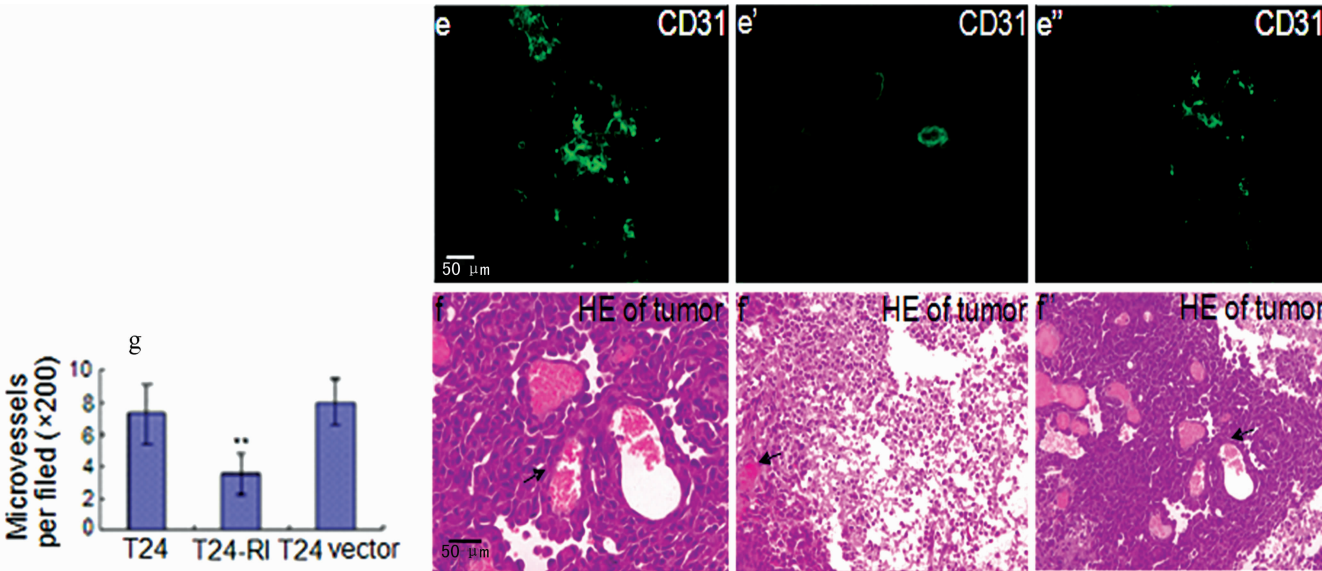
2 结果

2.1 过表达 RI 对 T24 裸鼠移植瘤生长的影响 裸鼠移植瘤生长结果:T24-RI[(0.080 833±0.072)g]组较 T24[(0.282 7±0.083)g]与 T24-Vector[(0.273 5±0.174)g]组,瘤体质量显著降低(*P*<0.05),抑瘤率分别为 26.67%和 38.85%。

2.2 过表达 RI 对 T24 裸鼠移植瘤微血管的影响 裸鼠瘤组织 HE 染色结果(图 1)显示,与两对照组比较,T24-RI 组移植瘤微血管明显少于两对照组(*P*<0.01)。此外,组织免疫荧光结果也呈现相同趋势(图 1-e),CD31 抗体在 T24-RI 组中呈现弱阳性,而 T24 组及 T24 vector 组呈强阳性。表明过表达 RI 基因抑制了肿瘤细胞的增殖及微血管的形成从而抑制肿瘤的生长。

2.3 过表达 RI 对 T24 裸鼠移植瘤肺部转移的影响 与两对照组比较,T24-RI 组肺组织未见转移灶,而两对照组在血管周围均可见明显的细胞团-细胞核增大、核染色加深且核质比例失调,表明已发生体内转移(图 2)。

2.4 过表达 RI 对 T24 裸鼠移植瘤组织中侵袭转移相关蛋白表达的影响 移植瘤组织免疫组织化学染色结果显示,与 T24 vector 组和 T24 组比较,T24-RI 组 RI、E-cadherin 蛋白表达明显增加,而 N-cadherin、MMP-2、MMP-9、Vimentin、Snail、Slug、Twist 蛋白表达明显降低(图 3)。表明过表达的 RI 可以在裸鼠移植瘤组织中抑制侵袭转移关键蛋白的表达。



** :*P*<0.01;e,f: T24 组;e',f': T24-RI 组;e'',f'': T24 vector 组。

图 1 各组移植瘤组织 HE 染色和免疫荧光 CD31 的微血管密度分析

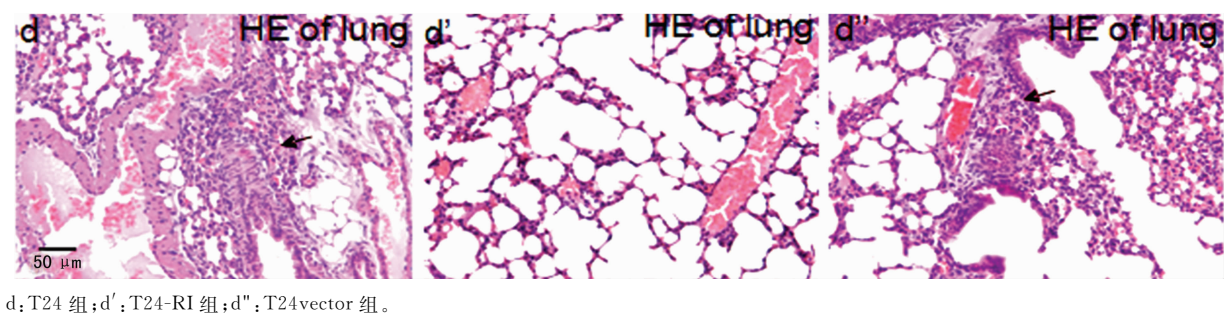
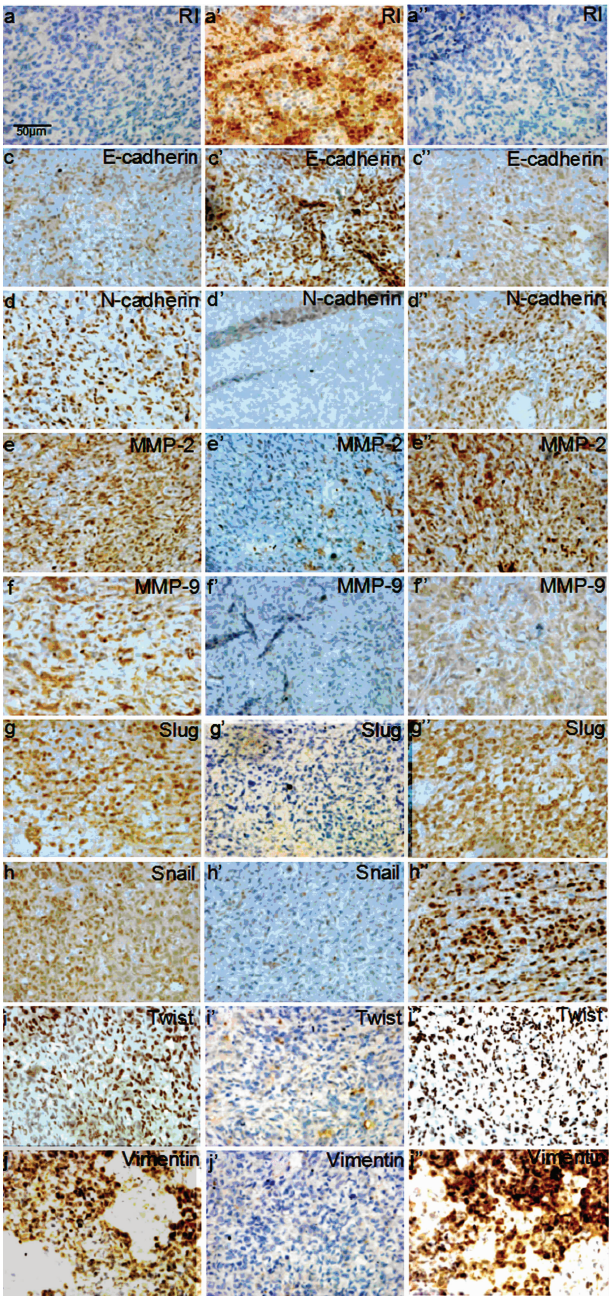


图2 HE染色观察裸鼠瘤肺组织转移(×200)



a,c~f: T24组; a',c'~f': T24-RI组; a'',c''~f'': T24 vector组。
图3 免疫组织化学染色观察各组移植瘤组织中 RI、E-cadherin 等蛋白的表达(×200)

3 讨 论

人核糖核酸酶抑制因子是一个分子量为 50 kD 的胞浆内酸性糖蛋白,在核酸及蛋白质代谢中发挥重要的作用。RI 是核糖核酸酶 A(ribonuclease A, RNaseA)的抑制剂,能与中性

和碱性 RNase A 以等比的化学计量密切结合,从而抑制其酶活性。进一步研究表明^[5],RI 是一个多功能的蛋白调节分子,可通过对 RNase A 的抑制引起 RNA 库的改变,进而影响蛋白质的合成速率;还可以与血管生长因子(angiotensin factors)以及成纤维生长因子(b-FGF)紧密结合,抑制血管及新生血管的生成。此外,RI 包含 7 个串联的亮氨酸残基重复片段(leucine-rich repeat, LRRs)结构,其合成的蛋白质更展示了丰富的功能,如参与调节细胞周期、细胞黏附、RNA 剪切、信号传导以及抑制酶活性等。RI 定位于 11 号染色体的短臂末端(11p15.5),与 ras 和胰岛素生长因子(IGF-2)基因邻近,此部位与生长调控和肿瘤的发生密切相关。因此,作者推测 RI 基因可能还存在尚未发现的生物学功能。作者前期研究证实,RI 在多种肿瘤细胞中表达下调,如人胃癌细胞系(bgc-823)、人前列腺癌细胞系(DU-145)和人乳腺癌细胞系(MCF-7)等,采用甲基化抑制剂处理后 RI 的表达恢复^[6];新近实验研究显示^[7-8],RI 不仅可在体外抑制膀胱癌细胞的增殖和迁移、改变细胞黏附、调节细胞周期、诱导细胞凋亡以及抑制血管生成外,还可在体内显著抑制小鼠黑色素瘤的生长和转移。然而,这些研究未能全面阐明 RI 的功能及其抑癌的分子机制。RI 的表达水平与裸鼠移植瘤的生长、侵袭转移以及 EMT 发生的关系尚不清楚。为了进一步了解 RI 的功能以及探讨 RI 与肿瘤发生、侵袭、转移的关系,本文通过研究过表达 RI 对裸鼠移植瘤生长、侵袭、转移及 EMT 发生的影响,为探讨其相关分子机制提供理论基础。

本研究结果显示,过表达的 RI 显著抑制了膀胱癌移植瘤的生长,与其他两对照组比较,有较低的瘤重,更长的成瘤潜伏期及其抑瘤率分别为 26.67%和 38.85%。肿瘤的生长转移与微血管的生成密切相关,CD31 是血小板内皮细胞黏附分子 1,与血管内皮细胞特异性结合,参与肿瘤细胞生长、侵袭与转移,是临床广泛应用的血管标记物^[9]。为进一步分析 RI 对膀胱癌移植瘤血管生成的影响,本实验通过检测肺部转移情况,微血管计数以及 CD31 血管内皮细胞标志物的表达,结果显示, T24-RI 组肺组织未见明显转移灶,而两对照组在血管周围均可见细胞核增大、核染色加深且核质比例失调的细胞团,表明已发生肺部转移;裸鼠瘤组织 HE 染色及组织免疫荧光染色结果也证实 T24-RI 组较对照组,有更低的肿瘤微血管密度。因此,RI 基因的表达可能与膀胱癌移植瘤的生长和转移有关,RI 具有明显抗肿瘤效应可能与其抑制血管生成作用相关。

本研究初步探讨上调的 RI 对膀胱癌移植瘤侵袭、转移及 EMT 的作用机制,研究结果发现,RI 上调可抑制转移相关蛋白的表达,如 MMP-2、MMP-9 是降解 IV 型胶原纤维最重要的酶,高表达时会促进细胞外基质降解,导致肿瘤发生侵袭和转移^[7]。Gao 等^[10]研究显示,异常表达的 MMP-2、MMP-9 与非浸润性膀胱癌 BIU-87 转移密切相关。本研究发现,RI 上调降

低了 MMP-2、MMP-9 的表达,阻止细胞外基质的降解,从而抑制了膀胱癌 T24 细胞侵袭转移的潜能。EMT 是上皮细胞与细胞外基质相互作用中失去细胞极性获得迁移与侵袭的能力,并具有间质化细胞特性的生物学过程。EMT 的发生与上皮细胞标记物的减少和间质化标记物的增加密切相关。E-cadherin 是一种钙依赖性跨膜蛋白,广泛参与同型细胞间的黏附,细胞骨架的稳定,它的异常表达被认为与 EMT 的发生密切相关^[11]。N-cadherin 是钙黏附素家族中的神经钙黏蛋白,其异常表达与肿瘤的侵袭与转移密切相关^[12]。Le 等^[13]研究报道,如在乳腺癌患者中 E-cadherin 蛋白表达明显降低,而 Vimentin 表达增高,表明乳腺癌患者中也存在向 EMT 转化的现象。而本实验免疫组织化学染色结果显示,T24-RI 组与两对照组比较,上皮细胞标志物 E-cadherin 表达显著升高,而间质化标志物 Vimentin 和 N-cadherin 表达明显降低。结果提示,RI 基因可能通过调节 EMT 关键蛋白的表达水平,增加了细胞之间的黏附力,阻止肿瘤细胞向远处转移,从而降低了移植瘤侵袭和转移的能力。此外,研究表明,肿瘤的发生与一系列转录因子调节密切相关,转录因子可能直接或间接识别其基因序列(E-bax)并结合抑制转录和表达,从而导致上皮细胞向间质化转化的发生^[14]。Fendrich 等^[15]已发现转录因子(Slug、ZEB1、Twist 及 E12/E47 等)的异常表达可以促使肿瘤细胞向 EMT 转化的发生,使肿瘤细胞获得运动、迁移的能力以及肿瘤细胞之间黏附力降低,为恶性肿瘤发展与恶化提供重要的条件。本研究结果证实,过表达的 RI 通过降低相关转录因子(Snail、Slug、Twist)蛋白表达的表达,阻止上皮细胞向间质化转变,显著抑制裸鼠移植瘤的生长与转移,从而抑制肿瘤转移的潜能。

综上所述,RI 基因与细胞的增殖、黏附、迁移、转移、侵袭的能力以及 EMT 的发生密切相关,高表达的 RI 能显著抑制膀胱癌移植瘤侵袭转移的能力。这些发现能为进一步探讨 RI 的功能及机制提供理论依据,同时也可能作为治疗肿瘤新的靶点。

参考文献

- [1] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3): 178-196.
- [2] Steinestel K, Eder S, Schrader AJ, et al. Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition[J]. *Clin Transl Med*, 2014, 3: 17.
- [3] Wang Y, Shi J, Chai K, et al. The role of snail in EMT and tumorigenesis[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013, 13(9): 963-972.
- [4] Kwilas AR, Ardiani A, Dirmeier U, et al. A poxviral-based cancer vaccine the transcription factor twist inhibits primary tumor growth and metastases in a model of metastatic breast cancer and improves survival in a spontaneous prostate cancer model[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(29): 28194-28210.
- [5] Chen JX, Fu PF, Wang T, et al. Effects of DNA methylation inhibitor on down-regulation of ribonuclease inhibitor expression in cancer cell lines[J]. *Ai Zheng*, 2004, 23(11): 1249-1256.
- [6] Lomax JE, Bianchetti CM, Chang AA, et al. Functional evolution of ribonuclease inhibitor: insights from birds and reptiles[J]. *J Mol Biol*, 2014, 426(17): 3041-3056.
- [7] Zhu J, Pan XY, Zhang Z, et al. Downregulation of integrin-linked kinase inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis in bladder cancer cells[J]. *Cell Signal*, 2012, 24(6): 1323-1332.
- [8] Li L, Pan XY, Shu J, et al. Ribonuclease inhibitor up-regulation inhibits the growth and induces apoptosis in murine melanoma cells through repression of angiogenin and ILK/PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Biochimie*, 2014, 103(1): 89-100.
- [9] 卜岚, 马毓梅, 史淑芬, 等. CD31、CD105 和 PTEN 在宫颈癌中的表达及其临床病理意义[J]. *中国妇幼保健*, 2015, 30(9): 1446-1449.
- [10] Gao J, Zhu J, Li HY, et al. Small interfering RNA targeting integrin-linked kinase inhibited the growth and induced apoptosis in human bladder cancer cells[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(9): 1294-1304.
- [11] Lecuit T, Yap AS. E-cadherin junctions as active mechanical integrators in tissue dynamics[J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(5): 533-539.
- [12] 祝迎锋, 吴继锋, 马伟, 等. TGF- β 1 Snail E-cadherin 及 N-cadherin 在胃癌中的表达及意义[J]. *中国肿瘤临床*, 2007, 34(24): 1400-1404.
- [13] Le MT, Hamar P, Guo CY, et al. miR-200-containing extracellular vesicles promote breast cancer cell metastasis[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(12): 5109-5128.
- [14] 潘湘阳. 核糖核酸酶抑制因子过表达对黑色素瘤细胞生长、凋亡、侵袭和转移的影响及分子机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学学位论文, 2012.
- [15] Fendrich V, Maschuw K, Waldmann J, et al. Epithelial-mesenchymal transition is a critical step in tumorigenesis of pancreatic neuroendocrine tumors[J]. *Cancers (Basel)*, 2012, 4(1): 281-294.

(收稿日期: 2015-06-15 修回日期: 2015-08-24)

《重庆医学》开通微信公众平台

《重庆医学》已开通微信公众平台(微信号: ChongqingMedicine),《重庆医学》将以微信平台渠道向广大读者发送终审会动态报道、各期杂志目录、主编推荐文章、学术会议、《重庆医学》最新资讯等消息。欢迎广大读者免费订阅。读者可以点击手机微信右上角的“+”,在“添加朋友”中输入微信号“Chongqing Medicine”,或在“添加朋友”中的“查找公众号”一栏输入“重庆医学”,添加关注。