

HepaCAM通过Wnt/ β -catenin信号通路抑制膀胱癌细胞T24的增殖

万雪莲 马菲菲 马红莹 吕长坤*

(商丘医学高等专科学校医学检验技术教研室, 商丘 476100)

摘要 该研究探讨了肝细胞黏附分子(hepatocyte cell adhesion molecule, HepaCAM)对膀胱癌细胞T24增殖的影响及其对Wnt/ β -catenin信号通路的调控作用。T24细胞做空白处理、空载腺病毒(Ad-GFP)处理和HepaCAM过表达腺病毒(Ad-GFP-HepaCAM)处理, CCK-8法检测HepaCAM对细胞增殖的影响, qRT-PCR和Western blot法检测HepaCAM对 β -catenin、c-Myc和cyclinD1的mRNA和蛋白表达水平的影响。采用Wnt/ β -catenin信号通路激活剂LiCl处理T24细胞, MTT法检测细胞增殖能力, Western blot检测GSK3 β (try216)磷酸化水平及 β -catenin、c-Myc和cyclinD1蛋白水平, 克隆形成试验检测细胞的克隆形成能力。结果显示, 过表达HepaCAM后, 能够抑制T24细胞的生长, 下调 β -catenin、c-Myc及cyclinD1的mRNA和蛋白的表达水平。5, 10, 20 μ mol/L的LiCl作用细胞2 h后, 均可促进T24细胞的增殖。10 μ mol/L的LiCl作用2 h后能够降低GSK3 β 的磷酸化水平, 促进Wnt信号通路的活化。10 μ mol/L的LiCl与Ad-GFP-HepaCAM联合处理细胞后, 能够逆转HepaCAM对 β -catenin、c-Myc及cyclinD1蛋白水平和细胞增殖的抑制作用。该研究表明, HepaCAM可通过Wnt/ β -catenin信号通路抑制膀胱癌细胞T24的增殖。

关键词 HepaCAM; Wnt/ β -catenin; 膀胱癌细胞; T24

HepaCAM Inhibited Proliferation through a Wnt/ β -catenin Pathway in Human Bladder Cancer Cell T24

Wan Xuelian, Ma Feifei, Ma Hongying, Lü Changkun*

(Department of Laboratory Medicine, Shangqiu Medical College, Shangqiu 476100, China)

Abstract To investigate the effect of HepaCAM on proliferation and Wnt/ β -catenin pathway in bladder cancer cells, T24 cells were done with blank treatment, Ad-GFP treatment and Ad-GFP-HepaCAM treatment, respectively. Then, CCK-8 assay was used to measure the effect of HepaCAM on the ability of cellular proliferation, the effects of HepaCAM on protein and mRNA expressions of β -catenin, c-Myc and cyclinD1 were evaluated by Western blot and qRT-PCR. In addition, T24 cells were treated with Wnt/ β -catenin activator LiCl. MTT was used to detect cell growth, the phosphorylation level of GSK3 β (try216) and the protein level of β -catenin, c-Myc and cyclinD1 were examined by Western blot, and the ability of cell colony was assessed by colony formation assay. Our research indicated that overexpression of HepaCAM could suppress cell growth and down-regulate the expression of β -catenin, c-Myc and cyclinD1 at mRNA and protein levels. Meanwhile, after T24 cells were treated with 5, 10, 20 μ mol/L of LiCl for 2 h, cells proliferation was promoted and 10 μ mol/L of LiCl could decrease the phosphorylation level of GSK3 β , leading to activation of Wnt/ β -catenin pathway. Moreover, combination treatment of 10 μ mol/

收稿日期: 2014-10-14 接受日期: 2015-02-14

*通讯作者。Tel: 0370-3270706, E-mail: lvliang566@163.com

Received: October 14, 2014 Accepted: February 14, 2015

*Corresponding author. Tel: +86-370-3270706, E-mail: lvliang566@163.com

网络出版时间: 2015-05-05 18:04

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150505.1804.004.html>

L of LiCl and Ad-GFP-HepaCAM could reverse the inhibition effect of HepaCAM on protein expression levels of β -catenin, c-Myc and cyclinD1 as well as cells growth. In conclusion, our study showed that expression of HepaCAM suppressed proliferation through a Wnt/ β -catenin signaling pathway in bladder cancer cell T24.

Keywords HepaCAM; Wnt/ β -catenin; bladder cancer cells; T24

膀胱癌是泌尿道最常见的恶性肿瘤,其主要发生于男性。据Siegel等^[1]统计,美国2013年有140 430例新增病例及29 790死亡病例^[1]。另外,肿瘤的发生与基因的改变密切相关,主要是癌基因和抑癌基因的改变。因此,研究膀胱癌肿瘤中基因的改变及产生效应的分子机制将有助于探明膀胱癌的病理发病机制。

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^[2]。研究证实, *HepaCAM*低表达于多种肿瘤组织,如乳腺癌、膀胱癌等^[3-4];另外,在膀胱癌细胞中过表达*HepaCAM*基因,能够抑制癌细胞增殖能力^[5],但是对于其涉及的分子机制尚未完全阐明。

Wnt信号参与细胞增殖、分化和干细胞自我更新能力的调节,其中,异常活化的经典Wnt/ β -catenin信号参与多种肿瘤的病理过程(包括膀胱癌),能够促进肿瘤细胞增殖、抑制凋亡、促进迁移和侵袭^[6-7]。因此,本课题拟从体外实验进一步研究*HepaCAM*对膀胱癌肿瘤细胞的生长影响并探究其对Wnt/ β -catenin信号通路的调节作用,旨在探明膀胱癌的病理发病机制,进一步为膀胱癌的治疗提供一个新的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人膀胱癌细胞T24细胞购自武汉大学细胞库。Ad-GFP空载病毒、Ad-GFP-HepaCAM过表达腺病毒载体为前期构建并保存于-80 °C。CCK-8试剂购自碧云天生物技术有限公司; LiCl、MTT试剂购自Sigma公司; RNA提取试剂盒Trizol、RT-PCR试剂盒和qPCR试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司; PCR引物购自Invitrogen公司; 细胞培养基RPMI1640和小牛血清购自Gibco公司; 兔抗人多克隆抗体 β -catenin、GSK3 β (try216)购自美国Cell Signaling Technology公司; 鼠抗人c-Myc、兔抗人cyclinD1和GAPDH抗体购自美国Santa Cruz Biotechnology公司。

1.2 细胞培养和病毒感染

膀胱癌细胞株T24培养于含10%小牛血清的RPMI1640培养基中,置于37 °C、5% CO₂的培养箱中培养。待细胞融合度达70%~80%时,分别加入适量Ad-GFP及Ad-GFP-HepaCAM腺病毒,设立空白组(Blank组)、Ad-GFP空载组(Ad-GFP组)和Ad-GFP-HepaCAM感染组(Ad-GFP-HepaCAM组),置于37 °C、5% CO₂的培养箱中培养,48, 72 h后分别提取RNA和蛋白,用于后续试验。

1.3 CCK-8检测细胞增殖

常规培养T24细胞,取对数生长期的细胞,经0.25%胰蛋白酶消化制成细胞悬液,调整细胞密度,接种于96孔板中(每孔500个细胞)并补充培养液至100 μ L,于37 °C、5% CO₂恒温培养箱中培养12 h后,分别予以空白处理、Ad-GFP处理和Ad-GFP-HepaCAM处理,每组设6个复孔,同时接种3个96孔板。分别于处理后24, 48, 72, 96 h,每孔加入10 μ L的CCK-8溶液(空白孔也加入),于37 °C孵箱内孵育2 h后再用酶标仪测吸光度(D_{450})。根据各孔吸光度绘制细胞生长曲线。

1.4 qRT-PCR检测 β -catenin、c-Myc和cyclinD1的mRNA表达水平

采用TRIzol法抽提总RNA,用反转录试剂盒将所抽提的RNA反转录为cDNA,以cDNA为模板,qPCR检测 β -catenin、c-Myc和cyclinD1的mRNA表达水平。每组设置3个复孔,以 β -actin作为内参,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因表达。引物序列见表1,反应条件为:首先,95 °C预变性30 s;然后,95 °C 10 s,56 °C 20 s,72 °C 40 s,+Plate Read,39个循环;最后,Melt curve 65 °C~95 °C 5 s,+Plate Read。

1.5 Western blot检测蛋白表达水平

采用常规方法提取细胞总蛋白,并用BCA法测定蛋白浓度,经SDS-PAGE电泳后,湿转移至PVDF膜,用5%脱脂奶粉在室温下封闭2 h;加入一抗,4 °C孵育过夜;TBST洗膜,加入5%脱脂奶粉稀释的HRP标记的二抗,37 °C孵育1 h;TBST洗膜,ECL暗室化学发光显影。Quantity One分析软件进行灰度定量

表1 引物序列及PCR反应条件

Table 1 Primer sequences and PCR condition

基因名	引物系列	退火温度(°C)	循环数	产物长度(bp)
Gene name	Primer sequences	T _m (°C)	Cycles	Product length (bp)
<i>β-catenin</i>	F: 5'-GCT TGG AAT GAG ACT GCT GA-3' R: 5'-CTG GCC ATA TCC ACC AGA GT-3'	57.5	30	114
<i>c-Myc</i>	F: 5'-CCT ACC CTC TCA ACG ACA GC-3' R: 5'-CTC TGA CCT TTT GCA AGG AG-3'	56	34	248
<i>cyclinD1</i>	F: 5'-CCT GTC GCT GGA GCC CGT G-3' R: 5'-TCC GCC TCT GGC ATT TTG G-3'	56	34	252
<i>β-actin</i>	F: 5'-TGA CGT GGA CAT CCG CAA AG-3' R: 5'-CTG GAA GGT GGA CAG CGA GG-3'	56	34	205

分析,并将目的蛋白与内参GAPDH的积分光密度的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.6 MTT法检测LiCl对细胞增殖能力的影响

取对数期生长的T24细胞,经0.25%胰蛋白酶消化后制成细胞悬液,调整细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$,接种于96孔板中(2 000/孔),补充培养液至200 μL 。细胞分为空白处理组及5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ 的LiCl处理组,每组设6个复孔,同时接种3个96孔板,于37 °C、5% CO₂的恒温培养箱中培养。培养后2 h弃上清,每孔加入20 μL MTT(5 g/L)继续培养4 h后,小心吸去上清,加入DMSO 150 μL ,振荡孵育10 min,用全自动酶标仪在492 nm处检测各孔的光密度(D值),绘制细胞的生长曲线。

1.7 克隆形成实验检测细胞的增殖能力

取对数生长期的T24细胞,接种于6孔板中,细胞密度为400/孔。培养24 h后,先予以空白处理、Ad-GFP处理和Ad-GFP-HepaCAM处理各24 h,后给予10 $\mu\text{mol/L}$ LiCl处理,每组设置3个复孔,于37°C、5% CO₂的恒温培养箱中培养15 d。之后用甲醇固定,0.1%结晶紫染色。于显微镜下克隆计数,以100个细胞及以上作为1个克隆,比较各处理组克隆数的差异。

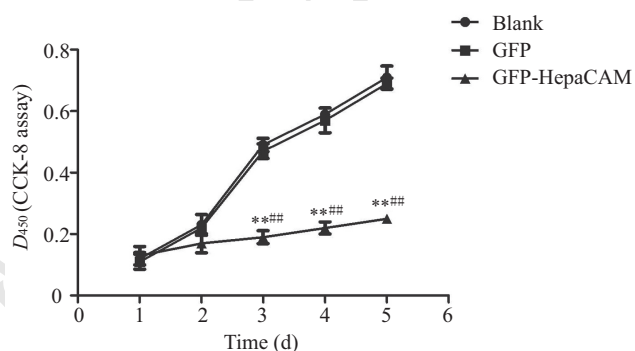
1.8 统计分析

采用SPSS 17.0统计软件进行统计学分析,结果以平均值 \pm 标准误表示,组间均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),两两比较采用SNK法, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HepaCAM基因对T24细胞增殖的影响

如图1所示,CCK-8的结果表明,与空白组和空载组比较,T24细胞过表达HepaCAM基因后,能



** $P < 0.01$, ## $P < 0.01$, HepaCAM组分别与空白组、空载组比较。

** $P < 0.01$, ## $P < 0.01$, HepaCAM group vs blank group and GFP group, respectively.

图1 CCK-8检测HepaCAM对T24细胞的增殖影响

Fig.1 The effect of HepaCAM on the proliferation of T24 cells by CCK-8 assay

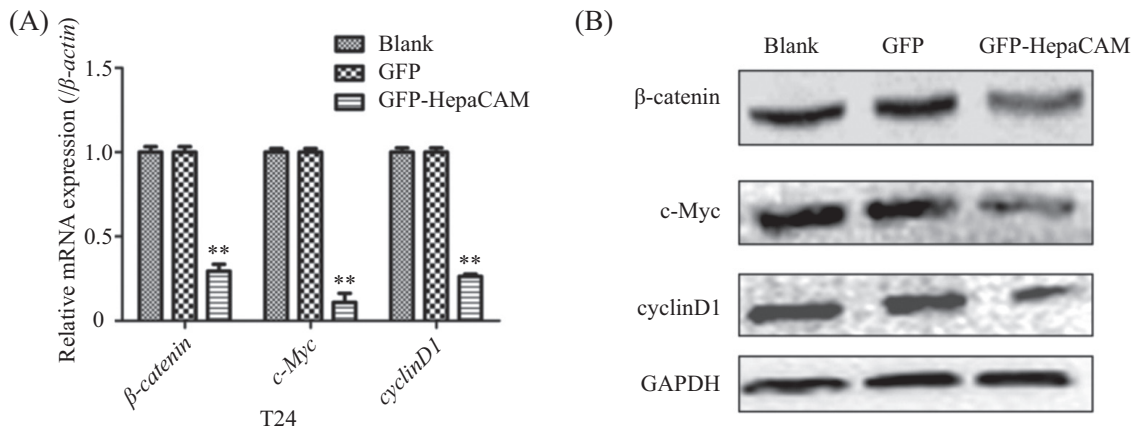
够明显抑制T24的增殖能力,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。空白组与空载组比较则无统计学差异。

2.2 HepaCAM对 β -catenin、c-Myc和cyclinD1的mRNA和蛋白表达水平的影响

qRT-PCR和Western blot的结果显示,过表达HepaCAM后,能够在mRNA和蛋白水平下调 β -catenin及下游靶分子c-Myc和cyclinD1的表达,与空白组、空载组之间的差异具有统计学意义($P < 0.01$)(图2A和图2B)。

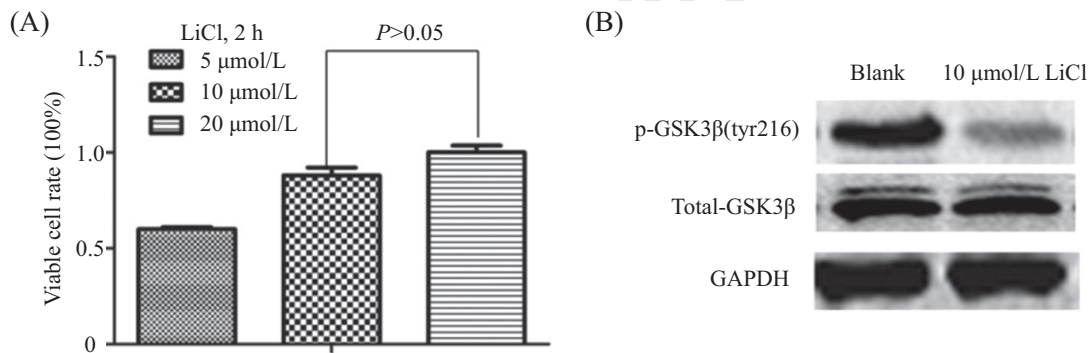
2.3 LiCl对T24细胞生长能力及GSK3 β 磷酸化水平的影响

如图3所示,5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ LiCl处理T24细胞后,均能促进细胞的生长,且20 $\mu\text{mol/L}$ 作用浓度时,细胞的生长能力与10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的差异不大($P > 0.05$)。因此,选用10 $\mu\text{mol/L}$ LiCl处理T24细胞2 h时促增殖作用最佳。同时,Western blot结果显示,与空白组比较,10 $\mu\text{mol/L}$ LiCl处理T24细胞2 h能够降低GSK3 β 磷酸化水平,有统计学差异($P < 0.05$)。



A: β -catenin、c-Myc和cyclinD1的mRNA表达水平, $**P < 0.01$, 与空白组比较; B: β -catenin、c-Myc和cyclinD1的蛋白表达水平, GAPDH为内参。
A: the mRNA expression levels of β -catenin, c-Myc and cyclinD1, $**P < 0.01$ vs Blank group; B: the protein expression levels of β -catenin, c-Myc and cyclinD1. GAPDH was used as a control.

图2 Western blot和qRT-PCR检测HepaCAM对 β -catenin、c-Myc和cyclinD1的mRNA和蛋白表达的影响
Fig.2 Effects of HepaCAM on the mRNA and protein expression levels of β -catenin, c-Myc and cyclinD1 tested by Western blot and qRT-PCR



A: T24细胞的生长能力; B: 磷酸化GSK3 β (tyr216)和总GSK3 β 的蛋白表达水平, GAPDH作为内参。
A: the growth ability of T24 cells; B: the protein levels of p-GSK3 β (tyr216) and total-GSK3 β . GAPDH was used as a control.

图3 MTT检测LiCl对T24细胞生长能力及GSK3 β 磷酸化水平的影响

Fig.3 The effects of LiCl on the proliferation ability and phosphorylation GSK3 β of T24 cells

2.4 HepaCAM联合LiCl处理对 β -catenin、c-Myc和cyclinD1蛋白表达的影响

如图4所示, Western blot结果表明, 与Ad-GFP-HepaCAM处理组比较, Ad-GFP-HepaCAM联合LiCl (10 μ mol/L, 下同)处理能够逆转HepaCAM对 β -catenin及下游靶分子c-Myc和cyclinD1表达的抑制作用, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 HepaCAM联合LiCl处理对T24细胞克隆能力的影响

如图5所示, 克隆形成实验结果显示, 与单独Ad-GFP-HepaCAM处理组比较, Ad-GFP-HepaCAM联合LiCl处理能够逆转HepaCAM对T24细胞克隆形成能力的抑制作用, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

HepaCAM为新发现的免疫球蛋白超家族, 能够调节细胞的黏附、增殖、凋亡、迁移和分化。研究证实, HepaCAM低表达于多种肿瘤, 如乳腺癌^[3]、肝癌^[2]、膀胱癌^[4]等。进一步研究发现, 在乳腺癌中, HepaCAM可通过P53/P21依赖的方式诱导细胞的凋亡^[3]; 在膀胱癌中, HepaCAM的启动子区存在高甲基化^[8]; 另外, 5-氮-2-脱氧胞苷(5-aza-CdR)或干扰素- γ 能够诱导HepaCAM的再表达, 进而抑制肿瘤细胞的增殖^[9]。以上研究表明, HepaCAM为潜在的致癌基因。另有报道, 在肾癌中, HepaCAM能够诱导细胞阻滞于G₁期及促进c-Myc的降解; HepaCAM能够下调AMPK/mTOR下游靶分子c-Myc和cyclinD1的表

达, 通过依赖AMPK/mTOR通路的方式抑制膀胱癌细胞的增殖^[5]。

经典Wnt/ β -catenin信号通路参与多种肿瘤恶性生物学行为的调节, 经证实其异常活化于膀胱癌, 且参与膀胱癌的病理过程^[7]。同时, β -catenin为Wnt/ β -catenin信号的关键分子, 其能够通过入核与LEF/TCF转录因子结合, 从而启动下游靶分子c-Myc和cyclinD1等的表达。因此, 我们猜想, *HepaCAM*是否能够调节 β -catenin及下游增殖相关靶分子c-Myc和cyclinD1的表达, 进而调节膀胱癌细胞的增殖。

本课题通过Ad-GFP-*HepaCAM*腺病毒感染过表达T24细胞中的*HepaCAM*基因, 进一步证实

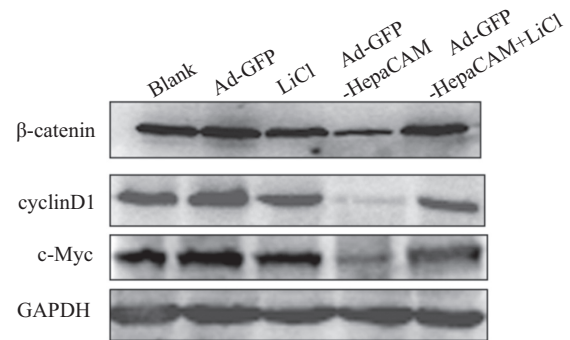
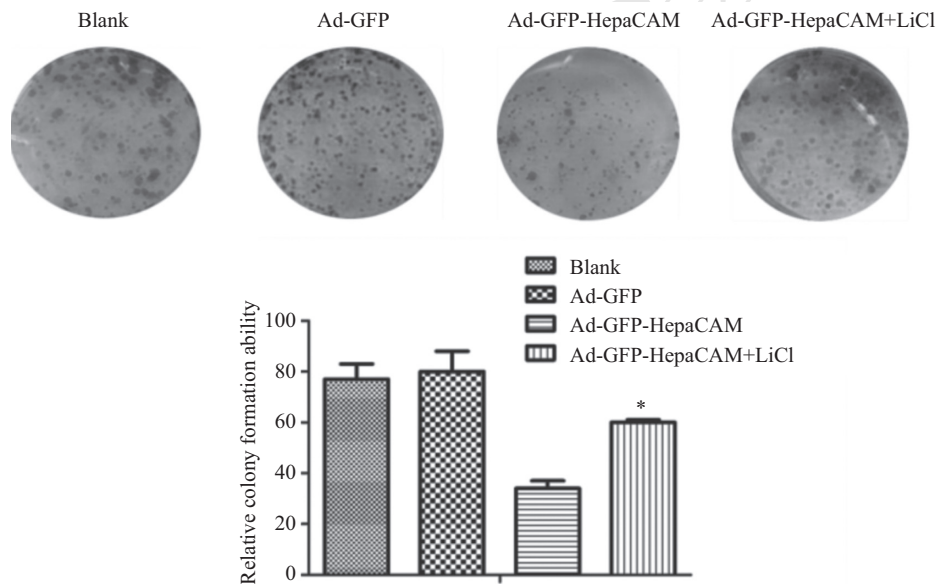


图4 Western blot检测不同处理后 β -catenin、c-Myc和cyclinD1的蛋白表达水平

Fig.4 The protein levels of β -catenin, c-Myc and cyclinD1 tested by Western blot after different treatment



* $P < 0.05$, Ad-GFP-HepaCAM联合LiCl组与Ad-GFP-HepaCAM组比较。

* $P < 0.05$, Ad-GFP-HepaCAM+LiCl group vs Ad-GFP-HepaCAM group.

图5 克隆形成实验检测T24细胞的增殖能力

Fig.5 The proliferation ability of T24 cells tested by colony-formation assay

*HepaCAM*能够抑制癌细胞的增殖能力, 同课题组前期的结果一致。同时, 过表达*HepaCAM*能够下调 β -catenin、c-Myc和cyclinD1的mRNA和蛋白的表达水平。另外, 我们采用Wnt通路的特异性激活剂LiCl联合Ad-GFP-*HepaCAM*病毒处理细胞, 结果证实, Ad-GFP-*HepaCAM*联合LiCl能够逆转Ad-GFP-*HepaCAM*对 β -catenin、c-Myc和cyclinD1的表达及细胞增殖的抑制作用。以上研究表明, *HepaCAM*可通过Wnt/ β -catenin信号通路抑制膀胱癌细胞的增殖。另外, 研究证实, *HepaCAM*可通过依赖AMPK/mTOR方式抑制膀胱癌细胞的增殖, 那么两条信号

通路Wnt/ β -catenin和AMPK/mTOR之间是否通过*HepaCAM*介导存在相互的关系需要进一步探究。

综上所述, 该研究首次揭示了*HepaCAM*对Wnt/ β -catenin信号通路的调节作用, 通过Wnt/ β -catenin通路调节膀胱癌细胞的增殖, 进一步探明了膀胱癌的病理发病机制, 为膀胱癌的治疗提供了新的靶点。

参考文献 (References)

- 1 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics 2013. *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 sup-

- pressed in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005; 42(6): 833-41.
- 3 Moh MC, Zhang T, Lee LH, Shen S. Expression of HepaCAM is downregulated in cancers and induces senescence-like growth arrest via a p53/p21-dependent pathway in human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 2008; 29(12): 2298-305.
 - 4 He Y, Wu X, Luo C, Wang L, Lin J. Functional significance of the HepaCAM gene in bladder cancer. *BMC Cancer* 2010; 10: 83.
 - 5 Wang Q, Luo C, Wu X, Du H, Song X, Fan Y. 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 Urol* 2013; 190(5): 1912-8.
 - 6 Karim RZ, Tse GM, Putti TC, Scolyer RA, Lee S. The significance of the Wnt pathway in the pathology of human cancers. *Pathology* 2004; 36(2): 120-8.
 - 7 Urakami S, Shiina H, Enokida H, Kawakami T, Tokizane T, Ogishima T, *et al.* Epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 plays an important role in bladder cancer through aberrant canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Clin Cancer Res* 2006; 12(2): 383-91.
 - 8 Pan C, Wu X, Luo C, Yang S, Pu J, Wang C, Shen S. Exon 2 methylation inhibits HepaCAM expression in transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol Int* 2010; 85(3): 347-54.
 - 9 Xu B, He Y, Wu X, Luo C, Liu A, Zhang J. 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 Urol* 2012; 188(4): 1346-53.