

heparanase 通过调控 EMT 促进人膀胱移行细胞癌细胞 T24 迁移及侵袭的作用研究

汪益泉 汪超军

摘 要 **目的** 探讨乙酰肝素酶(heparanase)是否通过上皮-间充质转化(EMT)影响膀胱移行细胞癌细胞的侵袭及迁移能力。**方法** 利用荧光定量 PCR 来检测人膀胱移行细胞癌细胞 T24、EJ、MGH-U1 以及 BIU-87 中 heparanase 的表达水平;设计并合成靶向 heparanase 的特异性 shRNA,通过脂质体转染法转染 heparanase 表达最高的膀胱移行细胞癌细胞 T24 以构建稳定低表达 heparanase 细胞株,通过 Western blot 法检测和定量 PCR 来验证 shRNA 的干扰效率;通过 transwell 法检测干扰后细胞的迁移及侵袭能力,Western blot 法检测 EMT 相关指标 E-cadherin 和 N-cadherin 以及其上游信号分子 Snail 和 WNT-5a 的变化。**结果** heparanase-shRNA 转染后,能够有效抑制 T24 细胞中 heparanase 的表达;Transwell 法结果显示,heparanase 干扰组细胞侵袭及迁移能力显著低于阴性对照组($P < 0.001$)。Western blot 法检测结果发现,heparanase 干扰组细胞的 E-cadherin 表达增加,N-cadherin 的表达降低;此外,heparanase 干扰组细胞的 Snail 以及 WNT-5a 表达较对照组显著下降。**结论** 运用 RNA 干扰技术能够有效沉默 T24 细胞的 heparanase 基因,并诱导其迁移侵袭能力的下降,其可能的机制是通过调节 EMT 的上游信号分子 Snail、WNT-5a 的表达来调控 EMT,从而影响膀胱移行细胞癌细胞的迁移及侵袭。提示 heparanases 可能在膀胱移行癌 T24 细胞的发生发展中起重要作用,抑制 heparanase 的表达可能成为一种治疗膀胱移行细胞癌的新方法。

关键词 heparanase 上皮-间充质转化 膀胱移行细胞癌

[中图分类号] R737 [文献标识码] A

Down-regulating of Heparanase Suppresses Invasion and Migration of Human Bladder Transitional Cell Carcinoma T24 via Inhibiting EMT. Wang Yiquan, Wang Chaojun. People's Hospital of Kaihua, Zhejiang 324300, China

Abstract **Objective** To investigate the effect of down-regulation of Heparanase on the invasion and migration of bladder transitional cell carcinoma cells T24. **Methods** shRNA targeting Heparanase was designed and synthesized, and then transfected into the T24 cells via Lipofectamine 2000 mediation. The migration ability and invasion ability of T24 was detected using transwell assay. Expression of E-cadherin, N-cadherin, WNT-5a and Snail was detected by using western blot. **Results** Heparanase-targeted shRNA could down-regulate the Heparanase expression of T24. Compared with control group, cell migration ability and invasion ability was significantly inhibited in shRNA interference group ($P < 0.01$). In addition, the expression of E-cadherin was increased, while that of N-cadherin, WNT-5a and Snail was decreased in shRNA interference group. **Conclusion** Down-regulation of heparanase can induce inhibition of invasion and migration in bladder transitional cell carcinoma cells T24 via regulating epithelial mesenchymal transitions(EMT). It could be regarded as a novel target for clinical diagnosis and gene therapy for bladder transitional cell carcinoma.

Key words Heparanase; EMT; Bladder transitional cell carcinoma

膀胱癌(bladder cancer)是泌尿系统中最常见的恶性肿瘤,其中 90% 以上是移行细胞癌(transitional cell carcinoma),目前膀胱癌有逐年增加的趋势,且早期诊断较为困难,约 5% 的患者在确诊时已发生转移,70% 左右的患者在治疗后复发^[1, 2]。因此,迫切需要寻找新的防治膀胱移行细胞癌转移及复发的有

效方法。随着分子生物学的飞速发展,分子靶向治疗已成为当今膀胱移行细胞癌防治研究的热点。乙酰肝素酶(heparanase)是至今为止发现的体内唯一能降解硫酸乙酰肝素蛋白多糖(HSPGs)的一种 β -D-葡萄糖醛酸糖苷酶。而 HSPGs 作为细胞外基质(ECM)的重要组成部分,其被降解后可促进肿瘤细胞的侵袭及转移^[3]。此外,上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在肿瘤转移中也发挥了重要作用^[4]。已有研究报道 heparanase 在膀胱癌中呈高表达并与预后相关,但其在膀胱癌的发生、发

基金项目:浙江省科技厅基金资助项目(Y201018597)

作者单位:324300 浙江省开化县人民医院外科(汪益泉);
310003 杭州,浙江大学医学院附属第一医院泌尿外科(汪超军)

通讯作者:汪超军,电子信箱:chaojunwang1@126.com

展中起着何种作用则尚未阐明。本研究拟利用特异性 shRNA 转染膀胱移行细胞癌离体细胞株 T24 以构建 heparanase 低表达的稳定细胞株,观察 heparanase 基因下调后对 T24 迁移及侵袭的影响以及 EMT 相关指标的表达变化,初步探讨 heparanase 基因在膀胱移行细胞癌细胞中的作用机制。

材料和方法

1. 细胞培养:人膀胱移行细胞癌细胞 T24、EJ、MGH - U1 以及 BIU - 87 购自于中科院上海细胞库。4 株细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 中,并置于 5% CO₂ 以及 37℃ 细胞培养箱内培养。

2. heparanase 特异性 shRNA 和转染:heparanase shRNA 购自美国 Santa Cruz 公司 (Cat. sc - 40686 - SH)。采用脂质体转染技术,具体操作流程参照英韦创津公司的 Lipofectamine2000 产品说明书。48h 后加入筛选抗生素 G418,浓度为 400μg/ml,维持培养 6 天后,G418 浓度改为 200μg/ml;细胞扩增后,提取蛋白和 RNA,进行 RT - PCR 和 Western blot 法鉴定。

3. 荧光定量 PCR:采用 TGuide RNA 提取试剂盒 (Tiangen 公司) 提取 RNA。反转录反应则采用 TAKARA 的 Prime-Script™ II Reverse Transcriptase 试剂盒。引物序列如下:heparanase 正义链:5' - GTTCTAATGCTCAGTTGCTCCT - 3', heparanase 反义链:5' - ACTGCGACCCATTGATGAAA - 3' (192bp); GAPDH 正义链:5' - AGGTGAAGGTCGGAGTCAAC - 3', GAPDH 反义链:5' - CGCTCCTGGAAGATGCTGAT - 3' (232bp)。实验重复 3 次。

4. Western blot 法检测:将约 1 × 10⁷ 个细胞加至蛋白裂解液,冰上静置 30min,低温离心 20min (转速 12000r/min),提取上清。应用 BCA 定量法计算蛋白的浓度。取 60μg 总蛋白跑胶 (恒压 100V)。电转膜 30min。含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1h。一抗 4℃ 冰箱过夜。二抗孵育 1h 后显影。heparanase、E - cadherin、N - cadherin、WNT - 5a、Snail 以及 GAPDH 抗体均购自美国 Santa cruz 公司。

5. Transwell 法检测细胞的迁移能力:首先将 Transwell 小室放进 24 孔板里,然后将稳定转染 heparanase 或阴性对照序列的细胞用胰蛋白酶消化,用不含胎牛血清的 RPMI - 1640 培养基洗涤细胞 3 次,随之将细胞重悬,每孔加入 100μl 细胞悬

液,在小室的下层加入 500μl 1% 胎牛血清的 RPMI - 1640 培养基,在培养箱中放置 24h。最后取出小室,弃掉培养基,使用棉签轻轻擦去小室内的残余细胞。甲醛固定并结晶紫染色。显微镜下观察,随机选取 8 个视野进行细胞计数。

6. Transwell 法检测细胞的侵袭能力:方法同上,但与迁移实验有所区别的是,在上室的聚碳酸酯膜之上还要铺上一层基质胶,用以模拟体内 ECM,细胞进入下室之前,必须先将基质胶降解。随机选取 8 个视野进行细胞计数。

7. 统计学方法:采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。Transwell 侵袭实验采用析因设计方差分析比较各组间差异;荧光定量 PCR 实验采用单因素方差分析 (one - way ANOVA) 比较各组间差异。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 膀胱移行细胞癌细胞中 heparanase 的表达:图 1 所示,4 株膀胱移行细胞癌细胞中,T24 的 heparanase 表达水平最高 (以此为参照),而 EJ、MGH - U1 和 BIU - 87 细胞的相对表达水平分别为 0.72 ± 0.04 、 0.34 ± 0.03 和 0.55 ± 0.05 。故选择 T24 作为研究对象以做下一步实验。

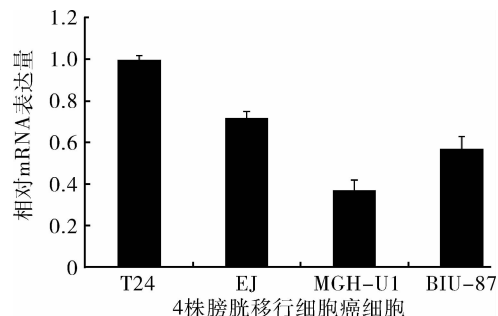


图 1 heparanase 在 4 株膀胱移行细胞癌细胞中的表达水平

2. shRNA 抑制 T24 细胞中 heparanase 的表达:图 2 所示,T24 细胞经特异性 shRNA 转染筛选后,Western blot 法和荧光定量 PCR 结果显示 heparanase 的蛋白水平及核酸水平表达均较 T24/Con 组显著下调 ($P < 0.01$),提示 heparanase 表达下调的 T24 细胞株构建成功,命名为 T24/shRNA 组,并用于下一步实验。

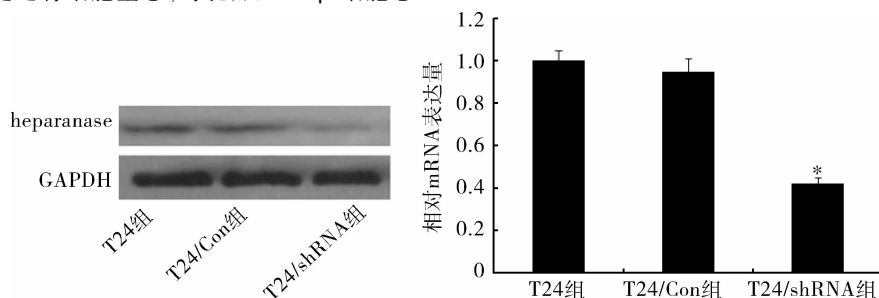


图 2 shRNA 显著抑制 T24 细胞的 heparanase 表达

与 T24/Con 组相比,* $P < 0.01$

3. heparanase 基因沉默后 T24 细胞的迁移能力变化:研究结果提示(图 3):T24 组、T24/Con 组和 T24/shRNA 组的穿膜细胞数分别为 105.00 ± 7.94 ,

107.33 ± 10.21 , 45.33 ± 8.50 。与 T24/Con 组相比, T24/shRNA 组细胞迁移能力受到显著抑制 ($P < 0.01$)。

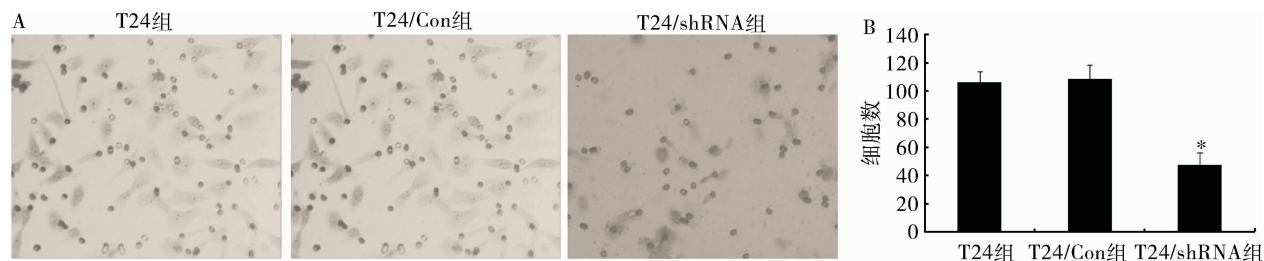


图 3 heparanase 对细胞体外迁移能力的影响

A. 显微镜下各组细胞的观察 ($\times 20$); B. 各组中侵袭细胞的数目比较。与 T24/Con 组比较, * $P < 0.01$

4. heparanase 下调后 T24 细胞的侵袭能力变化:研究结果提示(图 4), T24 组、T24/Con 组和 T24/shRNA 组的穿膜细胞数分别为 93.67 ± 8.62 ,

90.33 ± 12.22 , 35.67 ± 4.73 。与 T24/Con 组相比, T24/shRNA 组细胞侵袭能力受到显著抑制 ($P < 0.01$)。

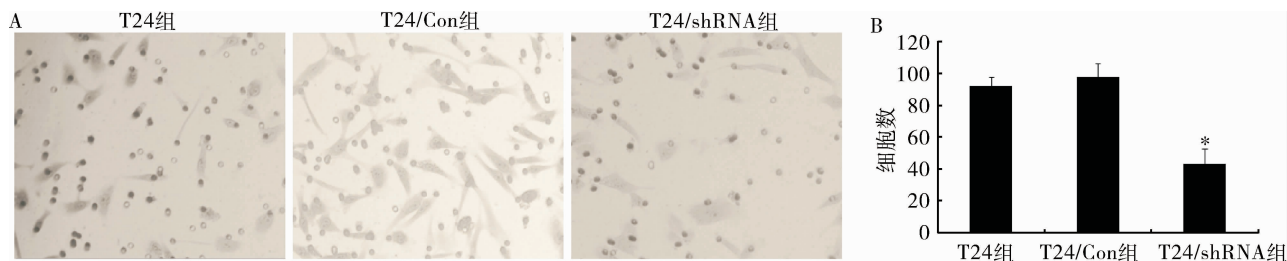


图 4 heparanase 对细胞体外侵袭能力的影响

A. 显微镜下各组细胞的观察 ($\times 20$); B. 各组中侵袭细胞的数目比较。与 T24/Con 组比较, * $P < 0.01$

5. heparanase 基因沉默后 T24 细胞的 E-cadherin、N-cadherin、Snail 以及 WNT-5a 表达情况:通过 Western blot 法检测发现(图 5), T24/shRNA 组的 E-cadherin 表达显著增加,而 N-cadherin 的表达显著降低;此外,heparanase 干扰组细胞的 Snail、WNT-5a 表达较对照组显著下降。结果提示 heparanase 可能通过调节 Snail 和 WNT-5a 两种上游信号因子来调控 EMT 的发生。

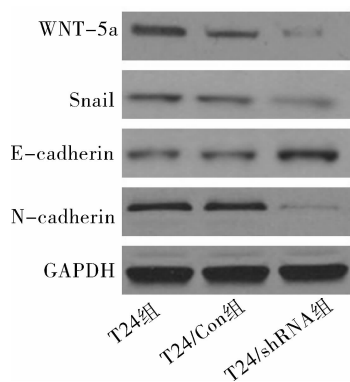


图 5 heparanase 基因敲除对 T24 细胞中 E-cadherin、N-cadherin、Snail 以及 WNT-5a 表达的影响

讨 论

膀胱移行细胞癌是一类恶性程度较高的肿瘤,容易发生局部浸润及远处转移^[5, 6]。heparanase 能通过降解细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白聚糖,参与细胞表面细胞外基质的降解和重塑,目前研究已证实,其在肝癌、多发性骨髓瘤、乳腺癌以及胃癌等多种肿瘤中高表达,并与预后密切相关^[7-12]。本研究结果表明,在膀胱移行细胞癌中,heparanase 是高表达的;成功构建 heparanase 低表达的细胞株后,发现该组细胞的迁移及侵袭能力较对照组显著下降 ($P < 0.01$)。因此推测 heparanase 基因是膀胱移行细胞癌的促转移相关基因。

EMT 作为上皮源性肿瘤发生、发展过程中的重要步骤,与肿瘤浸润及转移密切相关,其主要特征为上皮标志物 E-cadherin 表达的减少,间质标志物 N-cadherin 表达的增加^[13, 14]。Snail 是 E-cadherin 的主要调节因子,可通过与 Smad 相互作用蛋白 (SIP1) 竞争性结合 E-cadherin 蛋白启动子区的 E-

box 连接基序,抑制 E - cadherin 的表达,从而诱导 EMT 发生^[15]。已有研究表明,Snail 的表达在转录和转录后水平受到 PI₃K/AKT 通路的直接调控,而 heparanase 能直接活化 PI₃K/AKT 通路^[16, 17]。因此,我们推测 heparanase 是否通过调节 Snail 来调控 E - cadherin 的表达水平,从而推动 EMT 的发生。

本研究结果显示,膀胱移行细胞癌细胞在 heparanase 下调后,Snail 分子的表达水平较对照组显著降低,而 E - cadherin 表达显著增加,N - cadherin 表达则显著下降,提示了 heparanase 与膀胱移行细胞癌细胞 EMT 密切相关,其部分机制可能为 heparanase 通过对 Snail 因子的调控,从而影响 E - cadherin 的表达水平。然而,值得注意的是,EMT 的调节涉及多条信号通路,且这些信号通路之间可能还存在着相互作用(cross - over)。WNT 通路是目前研究得比较深入的与 EMT 密切相关的信号通路^[18]。为了进一步明确 heparanase 对 EMT 的调节作用,笔者还检测了 WNT 通路的关键调节因子 WNT - 5a 的表达,发现 heparanase 下调后,WNT - 5a 蛋白表达亦受到明显抑制,这提示了 heparanase 对 EMT 的调控可能也与 WNT 通路相关。

综上所述,本研究探讨了 heparanase 与 EMT 及膀胱移行细胞癌细胞迁移侵袭之间的相互关系,发现 heparanase 可通过调控 EMT 的发生影响膀胱移行细胞癌细胞的迁移及侵袭,其可能机制为调节 EMT 上游通路分子 Snail 及 WNT - 5a。这为进一步揭示 heparanase 基因与膀胱移行细胞癌的关系提供新的实验依据,为探讨膀胱移行细胞癌转移的分子机制提供新的思路。

参考文献

- Skeldon SC, Larry GS. Bladder cancer: a portal into mens health[J]. Urol Oncol, 2014, 45(3): 257 - 269
- Ghafari - Fard S, Nekooesh L, Motevaseli E. Bladder cancer biomarkers: review and update[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(6): 2395 - 2403
- Arvatz G, Shafat I, Levy - Adam F, *et al.* The heparanase system and tumor metastasis: is heparanase the seed and soil? [J]. Cancer Metastasis Rev, 2011, 30(2): 253 - 268
- Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial - mesenchymal transition[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(3): 178 - 196
- Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, *et al.* Ovarian cancer[J]. Lancet, 2014, 172(17): 1253 - 1266
- Desouza K, Chowdhury S, Hughes S. Prompt diagnosis key in bladder cancer[J]. Practitioner, 2014, 258(1767): 23 - 27, 3
- Xiong Z, Lu MH, Fan YH, *et al.* Downregulation of heparanase by RNA interference inhibits invasion and tumorigenesis of hepatocellular cancer cells in vitro and in vivo[J]. Int J Oncol, 2012, 40(5): 1601 - 1609
- Purushothaman A, Babitz SK, Sanderson RD. Heparanase enhances the insulin receptor signaling pathway to activate extracellular signal - regulated kinase in multiple myeloma[J]. J Biol Chem, 2012, 287(49): 41288 - 41296
- Ridgway LD, Wetzel MD, Ngo JA, *et al.* Heparanase - induced GEF - H1 signaling regulates the cytoskeletal dynamics of brain metastatic breast cancer cells[J]. Mol Cancer Res, 2012, 10(6): 689 - 702
- Zheng L, Jiang G, Mei H, *et al.* Small RNA interference - mediated gene silencing of heparanase abolishes the invasion, metastasis and angiogenesis of gastric cancer cells[J]. BMC Cancer, 2010, 10: 33
- Meirovitz A, Goldberg R, Binder A, *et al.* Heparanase in inflammation and inflammation - associated cancer [J]. FEBS J, 2013, 280(10): 2307 - 2319
- Hermano E, Lerner I, Elkin M. Heparanase enzyme in chronic inflammatory bowel disease and colon cancer[J]. Cell Mol Life Sci, 2012, 69(15): 2501 - 2513
- Tsai JH, Yang J. Epithelial - mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis[J]. Genes Dev, 2013, 27(20): 2192 - 2206
- Schramm HM. Should EMT of cancer cells be understood as epithelial - myeloid Transition? [J]. J Cancer, 2014, 5(2): 125 - 132
- Gheldof A, Berx G. Cadherins and epithelial - to - mesenchymal transition[J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2013, 116: 317 - 336
- Wu Y, Zhou BP. Snail: more than EMT[J]. Cell Adh Migr, 2010, 4(2): 199 - 203
- Riaz A, Ilan N, Vlodavsky I, *et al.* Characterization of heparanase - induced phosphatidylinositol 3 - kinase - AKT activation and its integrin dependence[J]. J Biol Chem, 2013, 288(17): 12366 - 12375
- Ramani VC, Purushothaman A, Stewart MD, *et al.* The heparanase/syndecan - 1 axis in cancer: mechanisms and therapies[J]. FEBS J, 2013, 280(10): 2294 - 2306

(收稿日期: 2014 - 05 - 12)

(修回日期: 2014 - 06 - 05)

欢迎订阅

欢迎赐稿