

钙黏蛋白 13 表达下调与膀胱癌生长的关联性研究

林英立, 李艳丽, 梁杰, 赵炎, 程宝

基金项目: 徐州市医学青年后备人才项目(编号:2014007); 江苏大学临床科技发展基金项目(编号:JLY20160064); 江苏省青年医学重点人才项目(编号:QNRC2016395); 江苏省卫健委科研课题(编号:Z2017015); 江苏省第五期“333工程”科研资助立项项目(编号:BRA2017296); 徐州市科技计划项目(编号:KC17200)

作者单位: 221005 江苏, 徐州市肿瘤医院(江苏大学附属徐州医院)泌尿外科(林英立, 梁杰, 赵炎, 程宝), 科教科(李艳丽)
作者简介: 林英立(1980-), 男, 医学博士, 副教授, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 泌尿系肿瘤的临床与基础研究。E-mail: xzlyymw@163.com

[摘要] **目的** 探讨钙黏蛋白 13(cadherin-13, CDH13)表达下调与膀胱癌生长关联性及其对磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)/磷酸化蛋白激酶 B(phosphorylated protein kinase B, p-Akt)信号通路的影响。**方法** 应用膀胱癌 5637 细胞建立裸鼠成瘤模型, 比较不同时间点正常对照组(以 $1 \times$ PBS 处理 5637 细胞, $n = 7$)、阴性对照组(以 shRNA 质粒转染 5637 细胞, $n = 7$)和实验组(以 CDH13 shRNA 质粒转染 5637 细胞, $n = 7$)的肿瘤体积。采用 Western blot 法检测肿瘤组织中 CDH13、PI3K 及 p-Akt 蛋白的表达情况, 并比较这三种蛋白在三组间的表达差异。**结果** 在实验期间, 三组裸鼠的肿瘤体积均呈增长趋势, 实验组肿瘤体积增大最快, 三组变化幅度差异有统计学意义($P < 0.05$)。在第 10 天、第 13 天和第 16 天, 实验组裸鼠肿瘤体积显著大于阴性对照组和正常对照组($P < 0.05$), 而阴性对照组肿瘤体积显著大于正常对照组($P < 0.05$)。Western blot 实验结果显示, 实验组 CDH13 蛋白表达水平显著低于阴性对照组和正常对照组($P < 0.05$), 而 PI3K 与 p-Akt 蛋白的表达水平则显著高于阴性对照组和正常对照组($P < 0.05$)。**结论** CDH13 表达下调可能通过 PI3K/p-Akt 信号通路促进膀胱癌的发生。

[关键词] 膀胱癌; 钙黏蛋白 13; 磷脂酰肌醇 3 激酶/磷酸化蛋白激酶 B 信号通路

[中图分类号] R 694 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2020)04-0359-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2020.04.09

Study on the correlation between down-regulation of cadherin-13 expression and bladder cancer growth LIN

Ying-li, LI Yan-li, LIANG Jie, et al. Department of Urology, Xuzhou Cancer Hospital(Xuzhou Hospital Affiliated to Jiangsu University), Jiangsu 221005, China

[Abstract] **Objective** To investigate the correlation between down-regulation of cadherin-13(CDH13) expression and the growth of bladder cancer, and its effects on phosphatidylinositol 3 kinase(PI3K)/phosphorylated protein kinase B(p-Akt) signal pathways. **Methods** Nude mouse tumor formation models were established using bladder cancer 5637 cells, and tumor volume was compared among the normal control group(5637 cells treated with $1 \times$ PBS, $n = 7$), the negative control group(transfected 5637 cells with shRNA plasmid, $n = 7$) and the experimental group(transfected 5637 cells with CDH13 shRNA plasmid, $n = 7$) at different time points. Western blot was used to detect the expressions of CDH13, PI3K and p-Akt proteins in the tumor tissues, and the expressions of the three proteins were compared among the three groups. **Results** During the experimental period, the tumor volume showed an increasing trend in the nude mice of the three groups, and the tumor volume of the experimental group increased fastest, and the change magnitude was statistically significant among the three groups($P < 0.05$). On the 10th day, the 13th day, and the 16th day, the tumor volume of the nude mice in the experimental group was significantly larger than that in the negative control group and the normal control group($P < 0.05$), while the tumor volume of the negative control group was significantly larger than that of the normal control group($P < 0.05$). Western blot results showed that the level of CDH13 expression in the experimental group was significantly lower than that in the negative control group and the normal control group($P < 0.05$), while the expression levels of PI3K and p-Akt proteins in the experi-

mental group were significantly higher than those in the negative control group and the normal control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Down-regulation of CDH13 expression may promote the occurrence of bladder cancer through the PI3K / p-Akt signaling pathways.

[**Key words**] Bladder cancer; Cadherin-13 (CDH13); Phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/phosphorylated protein kinase B (p-Akt) signal pathways

近年来,膀胱癌已成为男性泌尿生殖系统常见的恶性肿瘤,其具有多中心发生和易复发等特点^[1]。目前膀胱癌的发病率呈逐年上升的趋势,严重危害人们的健康^[2]。癌基因的激活以及抑癌基因的失活在肿瘤的发生、发展中起到重要的作用。钙黏蛋白-13 (cadherin-13, CDH13) 是钙黏蛋白家族的一员,其作为一种抑癌基因能够调节细胞黏附、增殖和迁移。有研究^[3,4]发现 CDH13 在多种肿瘤组织中表达下调甚至缺失,提示其与肿瘤细胞的生物学行为存在密切的关联。我们的前期研究^[5,6]结果也表明,抑制 CDH13 蛋白表达可促进膀胱癌细胞的增殖、迁移和侵袭。磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)/磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated protein kinase B, p-Akt) 信号通路参与细胞增殖、凋亡和生长,与肿瘤的发生、发展密切相关^[7]。但是,在膀胱癌中 PI3K/p-Akt 信号通路的作用以及调节机制尚未阐明。鉴此,本研究旨在通过动物实验探讨 CDH13 表达下调对肿瘤生长的影响,以及 CDH13 与 PI3K/p-Akt 信号通路的联系。

1 材料与方法

1.1 实验材料 BALB/c-nu 裸鼠购自中国人民解放军军事医学科学实验动物中心;人膀胱癌 5637 细胞株购自中国科学院细胞库;CDH13 shRNA 质粒和 shRNA 质粒购自 Santa Cruz 公司。兔抗人 CDH13 多克隆抗体 (生产货号:sc-7940) 和兔抗人 β -Actin 单克隆抗体 (生产货号:sc-47778) 购自 Santa Cruz 公司;兔抗人 PI3K 多克隆抗体 (生产货号:#4255) 和兔抗人 p-Akt 多克隆抗体 (生产货号:#9271) 购自 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 裸鼠成瘤模型的构建^[8] 将膀胱癌 5637 细胞置于含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 RPMI1640 培养基 (完全培养基) 中进行培养,培养箱环境设置为 37 °C, 5% CO₂, 并定时观察细胞生长状态。待细胞密度长至 80% ~ 85% 时进行转染实验,阴性对照组转染 shRNA 质粒,实验组转染 CDH13 shRNA 质粒,正常对照组不进行质粒转染 [以 1 × 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 进行空白处理]。将质粒溶于 50 μ l opti-mem 无血清培养基中,同时将 2 μ l lipofectamine2000 溶于 50 μ l opti-mem

无血清培养基中,分别混匀后静置 5 min,之后将两者混匀孵育 20 min。在此期间将原有细胞培养基更换为不含 FBS 的培养基,之后将混合物缓慢加入到细胞中,“十字”混匀。将细胞放入培养箱中培养 4 ~ 6 h,更换完全培养基后继续培养。待细胞密度长至 80% 左右时,用胰酶消化细胞并进行细胞计数,向每个 EP 管转移包含 4 × 10⁶ 个细胞的细胞悬液,备用。取 21 只裸鼠随机分为阴性对照组、实验组和正常对照组,每组 7 只,将每组裸鼠做好标记。取 EP 管中与之相对应的细胞悬液,5 000 rpm 离心 5 min,弃上清,加入 80 μ l 无血清的 DMEM 培养基 (总体积约 100 μ l),轻轻吹打混匀,然后用 1 ml 注射器吸取细胞悬液,排空气泡,注射于对应组别的裸鼠左侧腋下皮下组织中。肿瘤出现后 (大约注射 10 d 后),每 3 d 观察一次注射部位的肿瘤生长情况,并测量裸鼠皮下肿瘤大小,观察 6 周后处死裸鼠,取出肿瘤,测量肿瘤体积。

1.3 Western blot 法检测蛋白表达 取肿瘤组织加入 200 μ l 裂解液进行研磨,将组织研磨至无肉眼可见碎片,收集组织混悬液至 EP 管中,共获组织混悬液 600 μ l。将装有组织混悬液的 EP 管放置在冰上裂解孵育 1 h,后以 20 000 g 条件离心 30 min,取上清即为总蛋白, -80 °C 保存备用。取 32 μ l 总蛋白样品,加入 1/3 体积的 4 × 上样缓冲液,混匀沸水浴 5 min,离心,取上清液即为检测样本。取样品进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离,根据目的蛋白分子量大小裁胶进行湿转,将蛋白转移至 NC 膜上。湿转结束后,将 NC 膜置于 3% 的 BSA 封闭液中,室温封闭 1.5 h,加入一抗工作液,室温孵育 30 min,后置于 4 °C 孵育过夜。次日复温 30 min,用洗脱缓冲液清洗 NC 膜 3 min × 5 次,洗去非特异结合的一抗,之后加入相应的二抗工作液,室温孵育 2 h 后用洗脱缓冲液清洗 NC 膜 3 min × 5 次,洗去非特异结合的二抗,最后采用化学发光法在紫外/可见光凝胶成像系统 (美国 UVP) 中显染观察,以相对灰度值 (即实验组灰度值/Actin 灰度值) 记录数据。

1.4 统计学方法 应用 SPSS19.0 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,组间比较采用单因素方差分析,重复测量资料的组间比

较采用重复测量方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组裸鼠肿瘤体积在不同时间点的比较

在实验期间,三组裸鼠的肿瘤体积均呈增长趋势,实验

表1 三组裸鼠肿瘤体积在不同时间点的比较 $[(\bar{x} \pm s), \text{mm}^3]$

组别	例数	第1天	第4天	第7天	第10天	第13天	第16天
实验组	7	167.44 ± 54.34	378.02 ± 130.57	926.96 ± 241.71	1558.12 ± 250.07 ^{*#}	2148.41 ± 281.53 ^{*#}	3246.69 ± 407.54 ^{*#}
阴性对照组	7	121.08 ± 44.48	271.213 ± 96.227	643.91 ± 207.32	1042.81 ± 207.32 [*]	1364.43 ± 330.02 [*]	2159.71 ± 374.35 [*]
正常对照组	7	126.61 ± 37.45	289.131 ± 93.084	606.39 ± 122.51	936.01 ± 283.35	1275.23 ± 351.20	1909.07 ± 351.41

注: $F_{\text{时间}} = 831.900, P_{\text{时间}} = 0.000; F_{\text{组间}} = 26.460, P_{\text{组间}} = 0.000; F_{\text{组间} \times \text{时间}} = 13.190, P_{\text{组间} \times \text{时间}} = 0.000;$ 与同时时间点正常对照组比较, $* P < 0.05;$ 与同时时间点阴性对照组比较, $\# P < 0.05$

2.2 三组肿瘤组织中 CDH13、PI3K 和 p-Akt 蛋白表达水平比较

Western blot 实验结果显示,三组间 CDH13、PI3K 及 p-Akt 蛋白的表达差异有统计学意义($P < 0.05$)。实验组 CDH13 蛋白表达水平显著低于阴性对照组和正常对照组($P < 0.05$),而 PI3K 与 p-Akt 蛋白的表达水平则显著高于阴性对照组和正常对照组($P < 0.05$)。阴性对照组和正常对照组间 CDH13、PI3K 及 p-Akt 蛋白的表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1,表 2。

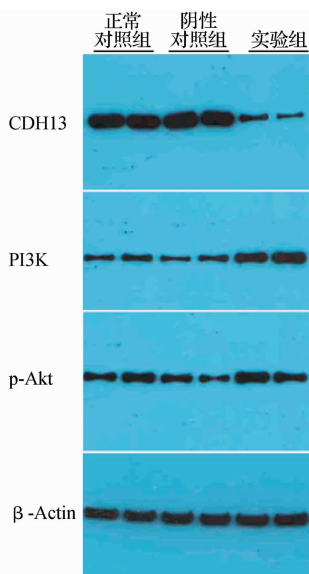


图1 Western blot 法检测目标蛋白的实验结果图

表2 三组肿瘤组织中 CDH13、PI3K 和 p-Akt 蛋白表达水平比较 $[(\bar{x} \pm s), \text{相对灰度值}]$

组别	例数	CDH13	PI3K	p-Akt
实验组	7	0.39 ± 0.18 ^{*#}	1.98 ± 0.43 ^{*#}	1.78 ± 0.38 ^{*#}
阴性对照组	7	1.18 ± 0.33	1.13 ± 0.43	1.04 ± 0.34
正常对照组	7	1.26 ± 0.26	1.05 ± 0.31	0.98 ± 0.34
F	-	19.829	12.457	11.074
P	-	0.000	0.000	0.001

注:与正常对照组比较, $* P < 0.05;$ 与阴性对照组比较, $\# P < 0.05$

组肿瘤体积增大最快,三组变化幅度差异有统计学意义($P < 0.05$)。在第 10 天、第 13 天和第 16 天,实验组裸鼠肿瘤体积显著大于阴性对照组和正常对照组($P < 0.05$),而阴性对照组肿瘤体积显著大于正常对照组($P < 0.05$)。见表 1。

3 讨论

3.1 膀胱癌是泌尿生殖系统最常见的恶性肿瘤,具有多中心发生和易复发等特点。肿瘤的发生、发展是多因素、多步骤和多阶段的遗传变异积累的过程,癌基因的失活在肿瘤的发生、发展中起重要作用^[9]。CDH13 属于钙黏素家族里的一员,参与维持细胞识别、迁移和细胞间的信号转导。CDH13 是一种抑癌基因,其在正常细胞表面有着广泛分布,而在肺癌、宫颈癌和乳腺癌等很多种的恶性肿瘤中则表达下调,与肿瘤的预后具有关联性^[10,11]。我们前期研究^[5,6]发现,膀胱癌组织中 CDH13 基因的启动子因发生甲基化而致其表达下调,进而促进膀胱癌的生长、分化及浸润,与膀胱癌的恶性生物学行为密切相关。本实验在膀胱癌 5637 细胞建立的裸鼠成瘤模型中,探究 CDH13 表达下调后对肿瘤生长的影响,结果显示,CDH13 表达下调可促进肿瘤的生长。

3.2 PI3K/p-Akt 信号通路是具有酶活性的细胞内信号转导通路。PI3K 本身具有丝氨酸/苏氨酸激酶的活性,同时有磷脂酰肌醇激酶的活性,参与调节细胞增殖、分化、凋亡及葡萄糖转运等生物功能^[12]。活化的 PI3K 所产生的磷脂酰肌醇-3、4、5-三磷酸(PIP3)可以诱导 Akt 转位到细胞膜上,从而促进 Akt 的激活,并催化其发生磷酸化,参与细胞功能的调节^[13]。因此,当激活 PI3K/p-Akt 信号通路时,p-Akt 蛋白表达水平将升高。Calderaro 等^[14]在探究 PI3K/p-Akt 信号通路与膀胱癌的相关性时发现,在膀胱癌组织中 p-Akt 蛋白的表达水平明显高于正常尿路上皮。而 Zhu 等^[15]的研究则发现 PI3K/p-Akt 信号通路受到抑制时,p-Akt 蛋白的表达水平则显著下降。有研究^[16~19]表明,乳腺癌、胃癌、肾癌、大肠癌、肝癌等都与 PI3K/p-Akt 信号通路有密切的关系,而且 PI3K/p-Akt 信号通路中上下游分子的改变均可能对肿瘤的发生

和发展产生影响。Adachi 等^[20]的研究发现,在胆囊癌组织中 CDH13 的表达降低,Akt 与 p-Akt 蛋白的表达升高,而当胆囊癌组织中 CDH13 蛋白的表达水平回升正常后,Akt 和 p-Akt 蛋白的表达则被抑制,进而抑制了 Akt 的活化,这提示在胆囊癌中 CDH13 可能通过 PI3K/p-Akt 信号通路调节肿瘤的生物行为。本研究结果也提示,CDH13 蛋白表达下降可通过 PI3K/p-Akt 信号通路调节膀胱癌细胞的生长。

综上所述,本研究成功建立了 CDH13 低表达的裸鼠膀胱癌模型,并验证了 CDH13 表达下调可能通过 PI3K/p-Akt 信号通路促进膀胱癌组织的生长,为膀胱癌的治疗提供了新的思路。

参考文献

- 1 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019,69(1): 7-34.
- 2 Babjuk M, Burger M, Compérat EM, et al. European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (TaT1 and Carcinoma In Situ) - 2019 Update[J]. Eur Urol, 2019,76(5): 639-657.
- 3 Xia L, Zhang W, Gao L. Clinical and prognostic effects of CDKN2A, CDKN2B and CDH13 promoter methylation in ovarian cancer; a study using meta-analysis and TCGA data [J]. Biomarkers, 2019,24(7):700-711.
- 4 Botezatu A, Iancu IV, Plesa A, et al. Methylation of tumour suppressor genes associated with thyroid cancer[J]. Cancer Biomark, 2019, 25(1): 53-65.
- 5 Lin Y, Sun G, Liu X, et al. Clinical significance of T-cadherin tissue expression in patients with bladder transitional cell carcinoma [J]. Urol Int, 2011, 86(3): 340-345.
- 6 林英立,管同郁,戚景光,等. siRNA 抑制 CDH13 表达对膀胱癌 5637 细胞增殖和侵袭的影响[J]. 国际泌尿系统杂志,2014,34(2):147-150.
- 7 Pignon G, le Goux C, Bieche I. Recent advances in bladder urothelial carcinogenesis[J]. Bull Cancer, 2015, 102(12): 1020-1035.
- 8 叶园英,黄煜,颜莉莉,等. 人子宫内膜癌裸鼠皮下移植瘤模型的建立[J]. 山东医药,2016,56(35):28-30.

- 9 Solomon JP, Hansel DE. Morphologic and Molecular Characteristics of Bladder Cancer[J]. Surg Pathol Clin, 2015, 8(4): 663-676.
- 10 Wei B, Shi H, Lu X, et al. Association between the expression of T-cadherin and vascular endothelial growth factor and the prognosis of patients with gastric cancer[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(2): 2075-2081.
- 11 Yang J, Niu H, Huang Y, et al. A Systematic Analysis of the Relationship of CDH13 Promoter Methylation and Breast Cancer Risk and Prognosis[J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0149185.
- 12 Park C, Cha HJ, Lee H, et al. Induction of G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis by Genistein in Human Bladder Cancer T24 Cells through Inhibition of the ROS-Dependent PI3k/Akt Signal Transduction Pathway[J]. Antioxidants(Basel), 2019, 8(9): pii: E327.
- 13 Bartholomeusz C, Gonzalez-Angulo AM. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer therapy [J]. Expert Opin Ther Targets, 2012, 16(1): 121-130.
- 14 Calderaro J, Rebouissou S, de Koning L, et al. PI3K/AKT pathway activation in bladder carcinogenesis[J]. Int J Cancer, 2014, 134(8): 1776-1784.
- 15 Zhu Y, Mao Y, Chen H, et al. Apigenin promotes apoptosis, inhibits invasion and induces cell cycle arrest of T24 human bladder cancer cells[J]. Cancer Cell Int, 2013, 13(1): 54.
- 16 Wang Z, Gao S, Han D, et al. LSD1 Activates PI3K/AKT Signaling Through Regulating p85 Expression in Prostate Cancer Cells [J]. Front Oncol, 2019, 9: 721.
- 17 Sharma V, Sharma AK, Punj V, et al. Recent nanotechnological interventions targeting PI3K/Akt/mTOR pathway: A focus on breast cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2019, 59: 133-146.
- 18 李丽丽,陈显峰,黄琦涛,等. EGCG 通过 PTEN-PI3K/AKT 途径抑制 SCL-1 细胞增殖及其机制的研究[J]. 中国临床新医学, 2016,9(7):584-587.
- 19 Tan X, Chen S, Wu J, et al. PI3K/AKT-mediated upregulation of WDR5 promotes colorectal cancer metastasis by directly targeting ZNF407[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(3): e2686.
- 20 Adachi Y, Takeuchi T, Nagayama T, et al. T-cadherin modulates tumor-associated molecules in gallbladder cancer cells[J]. Cancer Invest, 2010, 28(2): 120-126.

[收稿日期 2019-11-22][本文编辑 余军 吕文娟]