

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.18.001

文章编号: 1005-8982 (2018) 18-0001-06

基础研究 · 论著

核糖核酸酶抑制因子与整合素连接激酶对膀胱癌上皮-间质转化与转移的影响*

舒静¹, 姜源¹, 庄翔², 陈俊霞²

(1. 西南医科大学附属医院 检验部, 四川 泸州 646000; 2. 重庆医科大学
细胞生物学与遗传学教研室, 重庆 400016)

摘要: **目的** 研究核糖核酸酶抑制因子 (RI) 与整合素连接激酶 (ILK) 相互作用对膀胱癌上皮-间质转化 (EMT) 与转移的影响。**方法** 构建过表达 RI 或 ILK 的膀胱癌 EJ 细胞系, 免疫荧光检测 RI 与 ILK 在 EJ 细胞中的表达及共定位, 倒置相差显微镜下观察细胞形态, Western blot 检测细胞中 RI、ILK 及 EMT 标志物的表达, 复制膀胱癌裸鼠移植瘤模型, 免疫组织化学分析瘤组织中 RI、ILK 及 EMT 标志物的表达, HE 染色观察裸鼠肺转移。**结果** EJ 细胞中 RI 与 ILK 存在共定位的现象, RI 与 ILK 存在相互作用。Western blot 结果显示, EJ-RI 组 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 表达高于 EJ 组 ($P < 0.05$), EJ-ILK 组基质金属蛋白酶 2 (MMP2)、基质金属蛋白酶 9 (MMP9)、N-钙黏蛋白 (N-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin)、扭转蛋白 (Twist)、核转录因子 (Snail) 与重组人 S100 钙结合蛋白 A4 (S100A4) 表达高于 EJ 组 ($P < 0.05$)。过表达 RI 抑制膀胱癌体内外 EMT 及移植瘤自发性肺转移, 而过表达 ILK 促进 EMT 发生及膀胱癌转移。**结论** RI 与 ILK 相互作用调节膀胱癌 EMT 与转移。

关键词: 核糖核酸酶抑制因子; 整合素连接激酶; 膀胱癌; 上皮-间质转化

中图分类号: R730.23

文献标识码: A

Crosstalk between RI and ILK regulating EMT and metastasis of bladder cancer*

Jing Shu¹, Yuan Jiang¹, Xiang Zhuang², Jun-Xia Chen²

(1. Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Department of Cell Biology and Genetics, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To investigate the regulative effect of crosstalk between ribonuclease inhibitor (RI) and integrin-linked kinase (ILK) on epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis of bladder cancer. **Methods** Bladder cancer cell lines with overexpression of RI or ILK were constructed. Western blot was performed to analyze the expressions of RI, ILK and EMT markers. Immunofluorescence assay was performed to identify co-localization of RI and ILK. Cell morphology was observed under phase contrast microscope. The model of bladder cancer xenografts in nude mice was established. HE staining of lung tissues was conducted to evaluate pulmonary metastasis of bladder cancer. **Results** The co-localization and interaction of RI and ILK were observed and verified in EJ cells. Western blot showed that the expression of E-cadherin was significantly increased in EJ-RI cells compared with that in EJ cells. Expression levels of MMP-2, MMP-9, N-cadherin, Vimentin, Twist, Snail and S100A4 in EJ-

收稿日期: 2017-10-12

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81672536, 81372203)

ILK cells were dramatically upregulated when compared with EJ cells. Overexpression of RI suppressed EMT and metastasis both *in vitro* and *in vivo*. Overexpression of ILK promoted EMT and metastasis both *in vitro* and *in vivo*.

Conclusion Crosstalk between RI and ILK regulates EMT and metastasis of bladder cancer.

Keyword: ribonuclease inhibitor; integrin-linked kinase; bladder cancer; epithelial-mesenchymal transition

膀胱癌是常见的泌尿系统恶性肿瘤,目前膀胱癌的治疗尚无有效靶点,膀胱癌发生发展的关键环节与分子机制有待阐明^[1]。核糖核酸酶抑制因子(ribonuclease inhibitor, RI)是胞浆内1个由460个氨基酸组成的酸性蛋白^[2]。笔者前期运用GST pull down与Co-IP等证明RI与整合素连接激酶(integrin-linked kinase, ILK)在体内外的直接结合^[3]。ILK是1个丝氨酸/苏氨酸激酶家族的成员,它可以靶向多条信号通路促进细胞恶性转化及上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[4]。本研究通过探讨RI与ILK相互作用对膀胱癌EMT与转移的作用,为RI作为膀胱癌诊断与治疗新的靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人膀胱癌EJ细胞系(中国科学院上海细胞库),无特定病原体(SPF)级BALB/c裸鼠(本校实验动物中心),胎牛血清、RPMI 1640(Gibco公司),Lipofectamine™ 2000(Invitrogen公司),过表达载体pCMV-3×flag-ILK与pCMV-3×flag、慢病毒LV5-RI homo与LV5-NC(本实验室保存),兔抗人RI多克隆抗体(本实验室保存),兔抗人E-钙黏蛋白(E-cadherin)、基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase 2, MMP-2)、基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)、N钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、扭转蛋白(Twist)、核转录因子(Snail)、重组人S100钙离子结合蛋白A4(S100A4)、信号转导蛋白Smad2(Smad2)与β-actin、鼠抗人ILK(Bioworld公司),荧光二抗(中杉金桥公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、转染与慢病毒感染 含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基于37℃、5%二氧化碳CO₂孵箱中培养EJ细胞。按照说明书,用Lipofectamine™ 2000分别转染pCMV-3×flag-ILK或pCMV-3×flag至EJ细胞,48 h后,以0.4 g/L的G418筛选14 d,细胞收获后分别命名为EJ-ILK或EJ-FLAG。另以感染复

数(MOI)=20的慢病毒LV5-RI homo或LV5-NC感染EJ细胞,48 h后,以0.2 g/L的嘌呤霉素筛选细胞收获后分别命名为EJ-RI或EJ-LV5。

1.2.2 免疫荧光检测细胞 细胞爬片后,或冷冻组织切片后,80%冷丙酮固定10 min,37℃下3%BSA封闭30 min,随后4℃下1:100稀释的一抗孵育过夜,37℃下荧光二抗孵育2 h,除ILK使用488标记的羊抗鼠二抗,其余均用Cy3标记的羊抗兔二抗。于Leica激光共聚焦显微镜下进行图片获取。

1.2.3 细胞形态观察 稳转细胞系于倒置相差显微镜下观察形态。

1.2.4 Western blot 分析蛋白表达 总细胞蛋白裂解后以30 μg每孔上样,经10%SDS-PAGE电泳后转移至PVDF膜,封闭2 h后,4℃下1:500稀释的一抗孵育过夜,再以1:2 000稀释的HRP标记的二抗37℃下孵育2 h,ECL发光显色,并用Quantity One软件进行定量分析。

1.2.5 裸鼠移植瘤模型复制 收集对数期细胞制备悬浊液,以2×10⁶个/只接种于4周龄雄性BALB/c裸鼠背上,每组10只,30 d后处死裸鼠,获取移植瘤及肺组织,移植瘤组织液氮冷冻后,切片,免疫荧光标记,并于激光共聚焦显微镜下观察,肺组织固定,包埋,切片,HE染色后进行病理学检查。

1.3 统计学方法

数据分析采用SPSS 22.0统计软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用方差分析,两两比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RI与ILK在EJ稳转细胞系中的表达

构建稳定过表达RI的EJ细胞(EJ-RI)、稳定过表达ILK的EJ细胞(EJ-ILK)、稳定感染空载LV5的EJ细胞(EJ-LV5)、与稳定转染空载FLAG的EJ细胞(EJ-FLAG)。EJ-RI细胞RI蛋白荧光强于各对照组,而EJ-ILK细胞ILK蛋白荧光强于各对照组(见图1)。

2.2 RI 与 ILK 共定位

运用免疫荧光技术, Alexa 594 标记 RI 蛋白 (红色), Alexa 488 标记 ILK 蛋白 (绿色), Dapi 染核 (蓝色), 激光共聚焦扫描观察 EJ 细胞中 RI 与 ILK 的表达, RI 与 ILK 胞质胞核均有表达, 两者融合之后可呈黄色, 存在共定位的现象, 两者存在相互作用。见图 2。

2.3 稳转细胞系细胞形态

倒置相差显微镜下观察各稳转细胞形态, EJ-RI 细胞、EJ-LV5 细胞、EJ-FLAG 细胞与 EJ 细胞均呈现上皮型细胞形态, 而 EJ-ILK 细胞呈明显梭形、纺

锤形, 具有间质型细胞特点。见图 3。

2.4 EMT 标志物在各稳转细胞系中的表达

Western blot 结果显示, EJ-RI 组与 EJ 组比较, E-cadherin 表达水平升高 ($P < 0.05$), 而 EJ-ILK 组与 EJ 组比较, 间质标志物 MMP-2、MMP-9、N-cadherin、Vimentin、Twist、Snail 与 S100A4 表达水平升高 ($P < 0.05$)。见图 4 和附表。

2.5 裸鼠移植瘤中 RI、ILK 与 EMT 标志物表达

复制裸鼠移植瘤模型, 移植瘤切片免疫荧光检测相关蛋白表达。EJ-RI 组高度表达 RI 与上皮标志

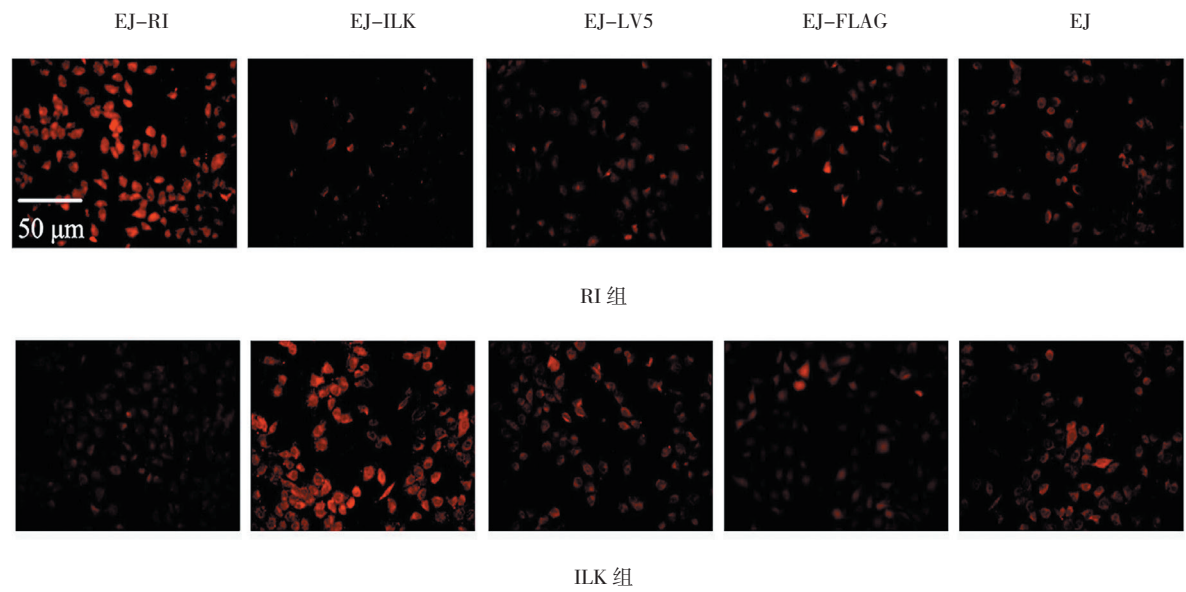


图 1 RI 与 ILK 在 EJ 细胞中表达 (免疫荧光)

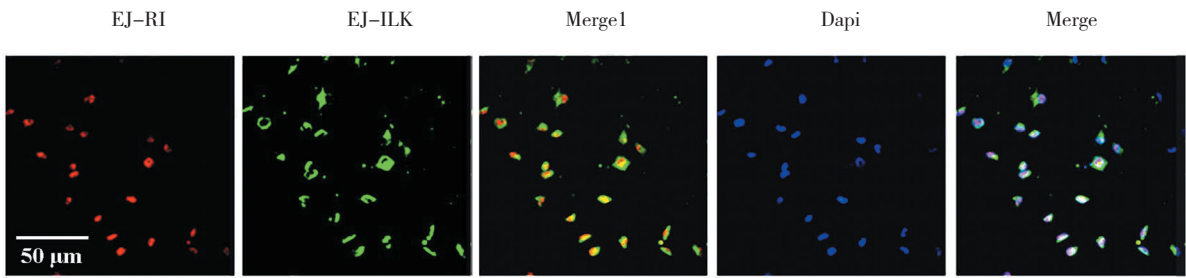


图 2 RI 与 ILK 在 EJ 细胞中的共定位 (免疫荧光)

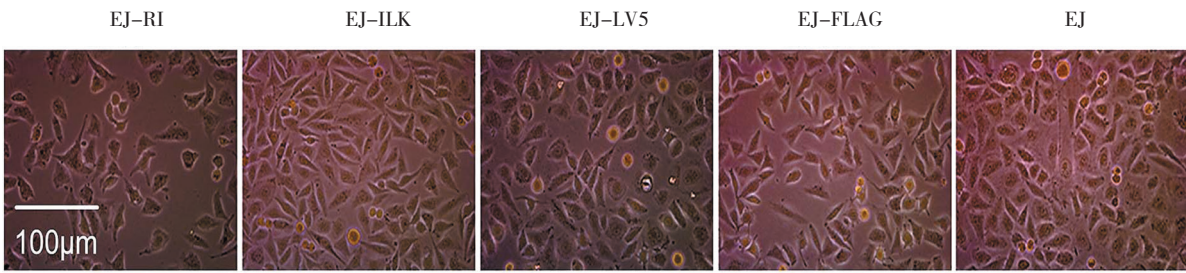
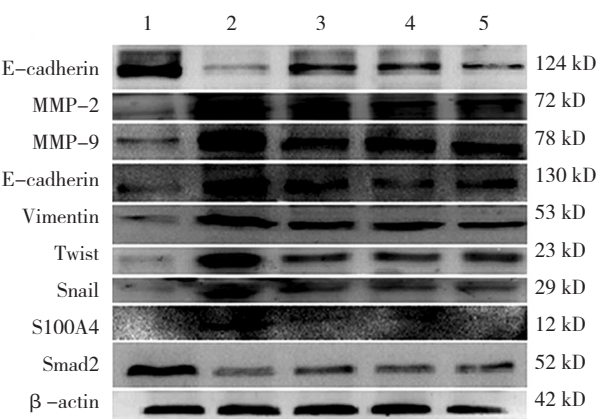


图 3 观察细胞形态 (倒置相差显微镜)



1: EJ-RI; 2: EJ-ILK; 3: EJ-LV5; 4: EJ-FLAG; 5: EJ

图 4 EMT 标志物检测结果 (Western blot)

物 E-cadherin, EJ-ILK 组高度表达 ILK 与间质标志物 MMP-2、MMP-9 和 Vimentin。见图 5。

2.6 裸鼠自发性肺转移

HE 染色裸鼠肺切片, EJ-RI 组与对照相比观察到自发性肺转移减少, EJ-ILK 组与对照比较肺转移结节增多。见图 6。

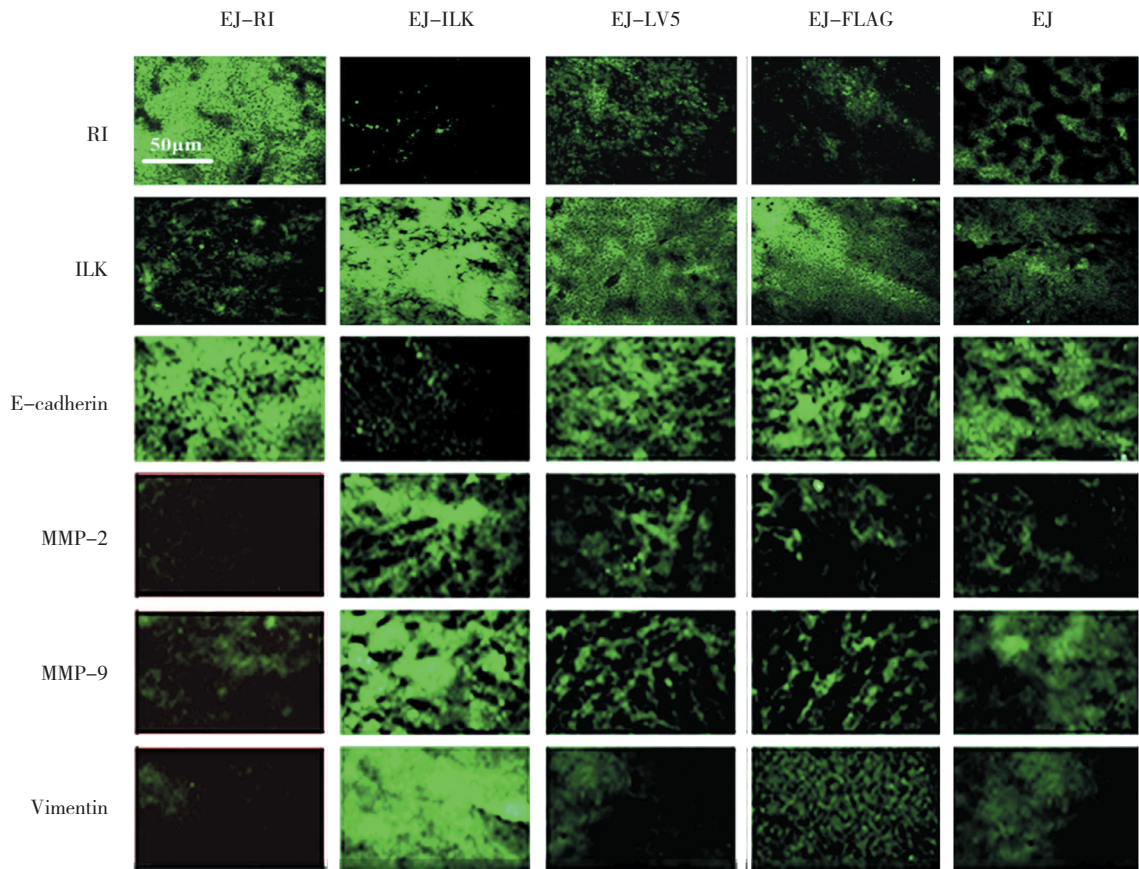


图 5 移植瘤 RI、ILK 与 EMT 标志物的表达 (免疫荧光)

附表 各组蛋白 EMT 标志物比较

组别	E-cadherin	MMP-2	MMP-9	N-cadherin
EJ	0.219 ± 0.077	0.710 ± 0.0233	1.378 ± 0.598	0.510 ± 0.0225
EJ-RI	1.733 ± 0.230 [†]	0.139 ± 0.033 [†]	0.143 ± 0.010 [†]	0.312 ± 0.023 [†]
EJ-ILK	0.140 ± 0.026	2.012 ± 0.210 [†]	3.783 ± 0.229 [†]	2.129 ± 0.157 [†]
F 值	122.313	180.629	75.313	348.733
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

续附表

组别	Vimentin	Twist	Snail	S100A4	Smad2
EJ	0.811 ± 0.0262	0.499 ± 0.023	0.303 ± 0.014	0.125 ± 0.020	0.181 ± 0.016
EJ-RI	0.104 ± 0.017 [†]	0.074 ± 0.014 [†]	0.023 ± 0.012 [†]	0.020 ± 0.002 [†]	0.675 ± 0.094 [†]
EJ-ILK	1.780 ± 0.224 [†]	2.055 ± 0.174 [†]	0.650 ± 0.094 [†]	0.638 ± 0.134 [†]	0.203 ± 0.020
F 值	124.929	316.509	96.734	53.528	74.649
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: † 与 EJ 组比较, $P < 0.05$

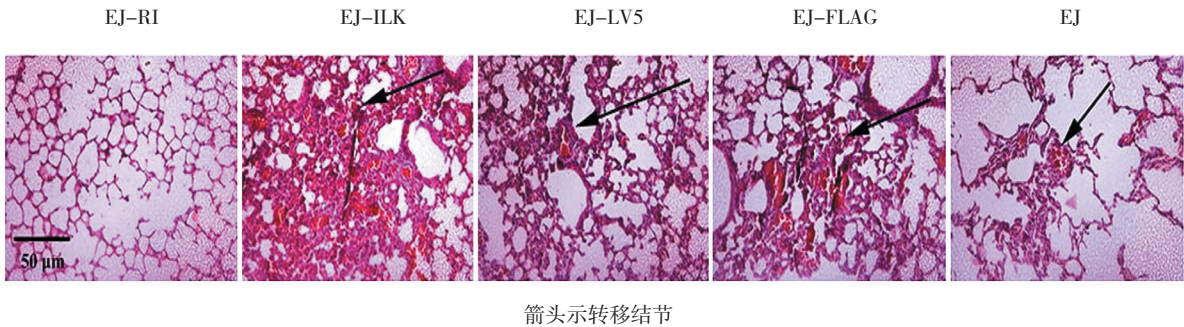


图 6 裸鼠肺病理切片图 (HE)

3 讨论

RI 具有抑制核糖核酸酶 A (RNaseA) 的活性, 可以调节 mRNA、rRNA 等的含量^[5]。既往研究表明, RI 能与具有低 RNaseA 活性的血管生成素 (angiogenin, ANG) 发生直接结合, 通过相互作用抑制 ANG 的活性, 负性调节 ANG 介导的 rRNA 的转录和核糖体的生成, 并抑制肿瘤血管生成^[6-8]。此外, 研究还发现 RI 二级结构中具有 LRR 模体, LRR 模体包含 2 段平行排列的 α -螺旋, 其中存在每隔 7 个规律性排列的亮氨酸残基, LRR 模体为 RI 与其他蛋白质发生相互作用提供了有效的平台^[2]。

ILK 是 1 个丝氨酸/苏氨酸激酶家族的成员, 其位于细胞黏着斑上, 可以靶向催化蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/AKT) 并活化下游的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)^[9-10]。ILK 作为协调细胞外基质和生长因子的信号转导多功能效应器, 在调控细胞的生长、分化、黏附、迁移、侵袭、血管生成及 EMT 等基本过程中起核心的作用^[11]。EMT 是肿瘤发生转移过程中的重要启动步骤, EMT 过程中上皮细胞获得间质细胞的特点, 减弱细胞间黏附, 破坏细胞极性, 获得侵袭、迁移与浸润能力的细胞, 有利于肿瘤细胞转移到其他组织和器官, 并在远处形成

转移灶^[12]。近年来研究发现, ILK 能通过直接或间接作用促进 EMT 的发生; ILK 的表达与 EMT 标志物 E-cadherin、N-cadherin、Snail 及 B-Catenin 等的表达密切相关^[4]。ILK 在多种肿瘤侵袭转移中高表达, 其有望成为肿瘤治疗中 1 个重要的干预靶点。

人类 RI 与 ILK 基因具有高度同源性, 两者均定位于 11 号染色体短臂 1 区 5 带。前期研究发现 RI 与 ILK 蛋白在体内体外均能直接结合^[3]。本研究亦发现, RI 与 ILK 蛋白在膀胱癌 EJ 细胞中存在共定位现象, 也提示两者存在直接结合与相互作用。本研究运用免疫荧光分析构建的稳转细胞系中 RI 与 ILK 的表达, 上调 RI 抑制 ILK 的表达, 而上调 ILK 显示出相反的结果。此外, 本研究还发现, 过表达 ILK 后膀胱癌细胞呈间质型形态, 体内体外实验均显示上调 ILK 后膀胱癌的上皮标志物的表达降低, 而间质标志物的表达增高, 且过表达 ILK 的移植瘤呈现更强的自发性肺转移能力。而过表达 RI 抑制体内体外 EMT 的发生, 降低膀胱癌肺转移的能力。本结果均提示 RI 与 ILK 的相互作用表现为互相拮抗。本研究通过探讨 RI 与 ILK 相互作用发现其对膀胱癌 EMT 与转移的作用, 并揭示潜在的分子机制, 为 RI 作为膀胱癌诊断与治疗新的靶点提供理论依据。

参 考 文 献:

- [1] KAMAT A M, HAHN N M, EFSTATHIOU J A, et al. Bladder cancer[J]. *Lancet*, 2016, 388(10061): 2796-2810.
- [2] SHAPIRO R. Cytoplasmic ribonuclease inhibitor[J]. *Methods Enzymol*, 2001, 341(341): 611-628.
- [3] 庄翔, 张潞渝, 吕梦欣, 等. 核糖核酸酶抑制因子与整合素连接激酶的相互作用以及对体外血管生成的影响 [J]. *基础医学与临床*, 2016, 36(8): 1074-1079.
- [4] PAPANIKOLAOU S, BRAVOU V, GYFTOPOULOS K, et al. ILK expression in human basal cell carcinoma correlates with epithelial-mesenchymal transition markers and tumour invasion[J]. *Histopathology*, 2010, 56(6): 799-809.
- [5] SABBIONI S, BARBANTI-BRODANO G, CROCE C M, et al. A gene at 11p15 involved in rhabdomyosarcoma and rhabdoid tumor development[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(20): 4493-4497.
- [6] 李林, 舒静, 刘玉林, 等. 核糖核酸酶抑制因子与血管生成素的相互作用 [J]. *第三军医大学学报*, 2014, 36(14): 1454-1458.
- [7] PIZZO E, SARCINELLI C, SHENG J, et al. Ribonuclease/angiogenin inhibitor 1 regulates stress-induced subcellular localization of angiogenin to control growth and survival[J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(Pt 18): 4308-4319.
- [8] FURIA A, MOSCATO M, CALÌ G, et al. The ribonuclease/angiogenin inhibitor is also present in mitochondria and nuclei[J]. *FEBS Lett*, 2011, 585(4): 613-617.
- [9] PONTIER S M, HUCK L, WHITE D E, et al. Integrin-linked kinase has a critical role in ErbB2 mammary tumor progression: implications for human breast cancer[J]. *Oncogene*, 2010, 29(22): 3374-3385.
- [10] TROUSSARD A A, MCDONALD P C, WEDERELL E D, et al. Preferential dependence of breast cancer cells versus normal cells on integrin-linked kinase for protein kinase B/Akt activation and cell survival[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(1): 393-403.
- [11] BUITENHUIS M, VAN DER LINDEN E, ULFMAN L H, et al. Protein kinase B (PKB/c-akt) regulates homing of hematopoietic progenitors through modulation of their adhesive and migratory properties[J]. *Blood*, 2010, 116(13): 2373-2384.
- [12] MEDICI D, HAY E D, OLSEN B R. Snail and slug promote snail and slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3[J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(11): 4875-4887.

(王荣兵 编辑)