

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.08.008  
文章编号: 1005-8982 (2022) 08-0039-07

实验研究·论著

## EZH2抑制剂对膀胱癌T24细胞上皮间质转化的影响及其机制研究\*

陈翔, 何天基, 冉俊武, 王伟, 姚远, 周毅, 石海林

(柳州市人民医院 泌尿外科, 广西 柳州 545000)

**摘要:** **目的** 探讨 Zeste 基因增强子同源物 2 (EZH2) 抑制剂对膀胱癌 T24 细胞上皮间质转化 (EMT) 的影响及其作用机制。**方法** 取对数生长期 T24 细胞, 随机分为空白组、GSK126 低剂量组、GSK126 中剂量组、GSK126 高剂量组, 每组设置 5 个复孔, 分别用终浓度为 0  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$ 、20  $\mu\text{mol/L}$ 、40  $\mu\text{mol/L}$  的 GSK126 细胞培养基培养。采用 MTT 法检测培养 24 h、48 h、72 h 细胞增殖能力, Transwell 法和划痕实验检测培养 48 h 细胞侵袭和迁移能力, qRT-PCR 和 Western blotting 检测培养 48 h 细胞中上皮间质标志物 E-cadherin、Vimentin、 $\beta$ -catenin 及 EZH2 mRNA 和蛋白相对表达量。**结果** 空白组及 GSK126 低、中、高剂量组细胞培养 24 h、48 h、72 h 的增殖能力比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间细胞增殖能力有差异 ( $F=15.498, P=0.000$ ); ②4 组细胞增殖能力有差异 ( $F=5.162, P=0.013$ ); ③4 组细胞增殖能力变化趋势有差异 ( $F=12.314, P=0.000$ )。与空白组比较, GSK126 低、中、高剂量组穿膜细胞数、迁移率, 以及 EZH2、Vimentin、 $\beta$ -catenin mRNA 和蛋白相对表达量均降低 ( $P<0.05$ ), 且随 GSK126 剂量升高而降低 ( $P<0.05$ )。与空白组比较, GSK126 低、中、高剂量组 E-cadherin mRNA 和蛋白相对表达量均升高 ( $P<0.05$ ), 且随 GSK126 剂量升高而升高 ( $P<0.05$ )。与空白组比较, GSK126 低、中、高剂量组 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 蛋白相对表达量均降低 ( $P<0.05$ ), 且随 GSK126 剂量升高而降低 ( $P<0.05$ )。**结论** EZH2 抑制剂可有效抑制膀胱癌 T24 细胞 EMT, 其调控机制可能与抑制 JAK2/STAT3 信号通路中 JAK2 和 STAT3 蛋白磷酸化有关。

**关键词:** 膀胱癌; Zeste 基因增强子同源物 2; 上皮间质转化; 侵袭; 迁移

**中图分类号:** R692.3

**文献标识码:** A

## Effect of EZH2 inhibitor on epithelial-mesenchymal transition of T24 bladder cancer cells and its mechanism\*

Xiang Chen, Tian-ji He, Jun-wu Ran, Wei Wang, Yuan Yao, Yi Zhou, Hai-lin Shi  
(Department of Urology, Liuzhou people's Hospital, Liuzhou, Guangxi 545000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect and mechanism of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) inhibitor on the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of T24 bladder cancer cells. **Methods** T24 cells in the log phase were randomly divided into blank group, low-dose GSK126 group, medium-dose GSK126 group, and high-dose GSK126 group in quintuplicate, with the final concentrations of GSK126 being 0  $\mu\text{mol/L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$ , 20  $\mu\text{mol/L}$ , and 40  $\mu\text{mol/L}$ , respectively in the cell culture medium. MTT assay was used to detect the proliferation ability of cells cultured for 24 h, 48 h, and 72 h. Transwell assay and scratch assay were performed to evaluate the invasion and migration ability of cells cultured for 48 hours. The mRNA and protein expressions of biomarkers for EMT including E-cadherin, vimentin and  $\beta$ -catenin as well as those of EZH2 were determined by qRT-PCR and Western

收稿日期: 2021-11-28

\* 基金项目: 广西壮族自治区自然科学基金 (No: 2020GXNSFAA238002)

[通信作者] 王伟, E-mail: wangweilzcn@126.com; Tel: 15807727183

blotting, respectively. **Results** The repeated measures analysis of variance was performed to compared the proliferation ability of cells in blank group, low-dose GSK126 group, medium-dose GSK126 group, and high-dose GSK126 group after 24 h, 48 h and 72 h of culture. The results showed that the proliferation ability of cells was different among distinct time points ( $F=15.498, P=0.000$ ) and among distinct groups ( $F=5.162, P=0.013$ ), and that the change trend of proliferation ability of cells was different among the groups ( $F=12.314, P=0.000$ ). Compared with the blank group, the number of cells passing the porous membranes, the migration rate, and the mRNA and protein expressions of EZH2, vimentin and  $\beta$ -catenin were lower in low-dose GSK126 group, medium-dose GSK126 group, and high-dose GSK126 group and decreased as the dose of GSK126 increased ( $P < 0.05$ ). In contrast, the mRNA and protein expressions of E-cadherin were higher in low-dose GSK126 group, medium-dose GSK126 group, and high-dose GSK126 group than those in the blank group, and increased with the increase of the dose of GSK126 ( $P < 0.05$ ). Besides, the relative protein expressions of p-JAK2/JAK2 and p-STAT3/STAT3 were lower in low-dose GSK126 group, medium-dose GSK126 group, and high-dose GSK126 group compared with the blank group, and decreased as the dose of GSK126 increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** EZH2 inhibitor can effectively suppress the EMT of T24 bladder cancer cells, and the underlying mechanism may be related to the blockade of JAK2 and STAT3 phosphorylation in the JAK2/STAT3 signaling pathway.

**Keywords:** bladder cancer; enhancer of zeste homolog 2; epithelial-mesenchymal transition; invasion; migration

膀胱癌是泌尿系统常见恶性肿瘤，发病率居男性恶性肿瘤前列，且发病率和病死率逐年升高<sup>[1]</sup>。膀胱癌细胞主要为尿路上皮细胞，有研究显示，上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)是上皮来源恶性肿瘤细胞侵袭及转移的主要原因之一，与病情进展关系密切<sup>[2]</sup>。Zeste基因增强子同源物 2(enhancer of zeste homolog 2, EZH2)是多梳蛋白抑制复合物家族成员之一，可催化组蛋白 H3 的甲基化过程，参与调控多种靶基因沉默。有研究显示，EZH2 与膀胱癌、前列腺癌等多种恶性肿瘤的发生、发展关系密切<sup>[3-4]</sup>。GSK126 是一种新型的 EZH2 抑制剂，可抑制肿瘤细胞中 EZH2 高表达状态。目前，关于 GSK126 对膀胱癌细胞 EMT 过程的调控报道较少，本研究旨在探究其对膀胱癌 T24 细胞 EMT 过程的影响及可能机制，为膀胱癌的治疗提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系

人膀胱癌细胞系 T24 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心，置于含 100 u/mL 青霉素、100 mg/L 青霉素的 RPMI 1640 培养基，在 37℃、5% 二氧化碳及饱和湿度条件下培养。

### 1.2 主要试剂及仪器

EZH2 抑制剂 GSK126、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)(美国 Sigma 公司), Matrigel 基质胶

(美国 Corning 公司), RPMI 1640 培养基、胎牛血清(武汉普诺赛生命科技有限公司), 实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司), 兔抗人 EZH2、 $\beta$ -catenin 单抗、小鼠抗人 E-cadherin、Vimentin、非受体酪氨酸蛋白激酶 2(JAK2)、磷酸化 JAK2(p-JAK2)、信号转导及转录活化因子 3(STAT3)、磷酸化 STAT3(p-STAT3)单抗(美国 Abcam 公司), 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的 IgG 相应二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

Transwell 小室(美国 Corning Incorporated 公司), 7300 qRT-PCR 仪(美国 ABI 公司), 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 药物配置** 将 GSK126 溶于 DMSO 中获得浓度为 2 000  $\mu\text{mol/L}$  的母液，置于 -20℃ 冰箱冷冻保存备用，实验前用 RPMI 1640 培养基稀释至终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ 、20  $\mu\text{mol/L}$ 、40  $\mu\text{mol/L}$  的 GSK126 溶液。

**1.3.2 分组及干预方法** 取对数生长期的 T24 细胞，胰蛋白酶消化，调整细胞密度为  $1.5 \times 10^5$  个/mL，重新接种于 96 孔板，随机分为空白组、GSK126 低剂量组、GSK126 中剂量组、GSK126 高剂量组，每组设 5 个复孔，贴壁生长后，吸去培养基，分别用终浓度为 0  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$ 、20  $\mu\text{mol/L}$ 、40  $\mu\text{mol/L}$  的 GSK126 细胞培养基继续培养。

**1.3.3 MTT法检测细胞增殖能力** 取4组干预24 h、48 h、72 h的T24细胞,每孔加入5 g/L新鲜制备的MTT溶液,继续培养4 h,吸去培养基,每孔加入DMSO 150  $\mu$ L,充分混匀溶解结晶,用酶标仪检测290 nm波长处的吸光度(Absorbance, A)值, A值越大代表细胞密度越高,增殖能力越强。

**1.3.4 Transwell法检测细胞侵袭能力** 取4组干预24 h的T24细胞,胰蛋白酶消化,RPMI 1640培养基重悬,调整细胞密度为 $2.0 \times 10^5$ 个/mL备用。RPMI 1640培养基与Matrigel基质胶按1:6稀释,包被Transwell小室滤膜,置于24孔板,上层加入各组细胞悬液 $2.0 \times 10^5$ 个/mL,下层加入含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基,继续培养48 h,无菌棉签擦除滤膜上层细胞,结晶紫染色,随机取5个视野,计数穿膜细胞数<sup>[5]</sup>。

**1.3.5 划痕实验检测细胞迁移能力** 取4组T24细胞接种至24孔板,待细胞融合为单层细胞后,用无菌枪头在培养板上划直线,培养液冲洗划痕使其边缘整齐,拍照测量初始划痕宽度,各组加入相应浓度含药培养基后同条件继续培养48 h,再次拍照测量划痕宽度,计算细胞迁移率,细胞迁移率%=[(初始划痕宽度-48 h划痕宽度)/初始划痕宽度]  $\times$  100%。

**1.3.6 qRT-PCR检测EZH2、E-cadherin、Vimentin、 $\beta$ -catenin mRNA的表达** 收集各组GSK126干预48 h细胞,采用TRIzol法提取细胞总RNA,琼脂糖凝胶电泳鉴定,酶标仪测定RNA浓度,逆转录成cDNA,进行qRT-PCR反应。按照试剂盒说明书设定20  $\mu$ L反应体系:SYBR Premix Ex Taq 10.5  $\mu$ L,10  $\mu$ mol/L正反向引物各1.0  $\mu$ L,cDNA 2  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 5.5  $\mu$ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C变性15 s,28 $^{\circ}$ C退火45 s,72 $^{\circ}$ C延伸60 s,共38个循环。以 $\beta$ -actin为内参对照,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因相对表达量。引物序列见表1。

**1.3.7 Western blotting检测EZH2、EMT和JAK2/STAT3信号通路相关蛋白的表达** 收集各组GSK126干预48 h细胞,转移至离心管,加入500  $\mu$ L细胞裂解液,冰上裂解25 min,12 000 r/min离心15 min,离心半径10 cm,取上清液沸水水浴10 min,BCA法测定总蛋白,取50  $\mu$ g蛋白进行恒定电流的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转仪转分离胶至硝酸纤维素膜,加入封闭液室温封闭2 h,加入EZH2(1:

表1 qRT-PCR引物序列

基因	引物序列	引物长度/bp
EZH2	正向: 5'-TGCTAGTATCGTGATGC-3'	730
	反向: 5'-CCTGATGCTGATGCTAA-3'	
E-cadherin	正向: 5'-ATAGCTGGGCTAGTGCTAG-3'	1 094
	反向: 5'-CTGATCGTAGCCACTGCTC-3'	
Vimentin	正向: 5'-CGTAGGCTGATGCTGATCGTA-3'	503
	反向: 5'-CATGTGATGCTGTGATGGCTC-3'	
$\beta$ -catenin	正向: 5'-ACTGATGTGATGCTGTG-3'	839
	反向: 5'-GATGCTGATGCTGTGCA-3'	
$\beta$ -actin	正向: 5'-ACTAGCTGTAGGGCTAGTCCG-3'	386
	反向: 5'-CGTGGCTGATGTCTGACTG-3'	

200)、E-cadherin (1:200)、Vimentin (1:400)、 $\beta$ -catenin (1:200)、p-JAK2 (1:400)、JAK2 (1:400)、p-STAT3 (1:200)、STAT3一抗(1:200),4 $^{\circ}$ C过夜,TBST充分洗涤,加入1:2 000稀释相应二抗,室温孵育4 h,TBST再次洗涤,化学发光法显影。采用Image J图像分析软件分析蛋白条带灰度值,计算目的蛋白与内参 $\beta$ -actin灰度值的比值,即为该蛋白相对表达量。

## 1.4 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 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,比较采用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析,进一步两两比较用SNK- $q$ 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组细胞增殖能力比较

空白组及GSK126低、中、高剂量组细胞培养24 h、48 h、72 h的增殖能力比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间细胞增殖能力有差异( $F = 15.498, P = 0.000$ );②4组细胞增殖能力有差异( $F = 5.162, P = 0.013$ );③4组细胞增殖能力变化趋势有差异( $F = 12.314, P = 0.000$ )。进一步两两比较结果:细胞培养24 h,GSK126中、高剂量组细胞增殖能力低于空白组( $P < 0.05$ ),且GSK126高剂量组低于GSK126中剂量组( $P < 0.05$ );细胞培养48 h和72 h,GSK126低、中、高剂量组细胞增殖能力低于空白组( $P < 0.05$ ),且随GSK126剂量升高而降低( $P < 0.05$ );随着时间延长,各组细胞增殖能力均增强( $P < 0.05$ )。见表2。

表 2 各组细胞增殖能力比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	24 h	48 h	72 h
空白组	0.314 ± 0.041	0.571 ± 0.062 <sup>①</sup>	0.950 ± 0.072 <sup>①②</sup>
GSK126 低剂量组	0.301 ± 0.038	0.511 ± 0.060 <sup>①③</sup>	0.701 ± 0.067 <sup>①②③</sup>
GSK126 中剂量组	0.294 ± 0.042 <sup>③</sup>	0.494 ± 0.054 <sup>①③④</sup>	0.621 ± 0.060 <sup>①②③④</sup>
GSK126 高剂量组	0.280 ± 0.035 <sup>③④</sup>	0.350 ± 0.052 <sup>①③④⑤</sup>	0.422 ± 0.056 <sup>①②③④⑤</sup>

注：①与 24 h 比较,  $P < 0.05$ ; ②与 48 h 比较,  $P < 0.05$ ; ③与空白组比较,  $P < 0.05$ ; ④与 GSK126 低剂量组比较,  $P < 0.05$ ; ⑤与 GSK126 中剂量组比较,  $P < 0.05$ 。

### 2.2 各组细胞侵袭和迁移能力比较

空白组及 GSK126 低、中、高剂量组穿膜细胞数、迁移率比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 79.685$  和  $52.3001$ , 均  $P = 0.000$ )。进一步两两比较结果: 与空白组比较, GSK126 低、中、高剂量组穿膜细胞数、迁移率均降低 ( $P < 0.05$ ), 且随 GSK126 剂量升高而降低 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

### 2.3 各组 EZH2、E-cadherin、Vimentin、 $\beta$ -catenin mRNA 相对表达量比较

空白组及 GSK126 低、中、高剂量组 EZH2、E-cadherin、Vimentin、 $\beta$ -catenin mRNA 相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 198.091$ 、 $95.147$ 、 $85.140$  和  $60.217$ , 均  $P = 0.000$ )。进一步两两比较结果: 与空白组比较, GSK126 低、中、高剂量组 EZH2、Vimentin、 $\beta$ -catenin mRNA 相对表达量均降低

表 3 各组穿膜细胞数、迁移率比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	穿膜细胞数/(个/HP)	迁移率/%
空白组	120.40 ± 11.37	85.49 ± 9.20
GSK126 低剂量组	94.20 ± 10.26 <sup>①</sup>	62.31 ± 9.11 <sup>①</sup>
GSK126 中剂量组	53.80 ± 10.20 <sup>①②</sup>	43.20 ± 8.54 <sup>①②</sup>
GSK126 高剂量组	31.60 ± 9.51 <sup>①②③</sup>	36.87 ± 6.21 <sup>①②③</sup>
F 值	79.685	52.301
P 值	0.000	0.000

注：①与空白组比较,  $P < 0.05$ ; ②与 GSK126 低剂量组比较,  $P < 0.05$ ; ③与 GSK126 中剂量组比较,  $P < 0.05$ 。

( $P < 0.05$ ), 且随 GSK126 剂量升高而降低 ( $P < 0.05$ ); 与空白组比较, GSK126 低、中、高剂量组 E-cadherin mRNA 相对表达量均升高 ( $P < 0.05$ ), 且随 GSK126 剂量升高而升高 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

表 4 各组 EZH2、E-cadherin、Vimentin、 $\beta$ -catenin mRNA 相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	EZH2	Vimentin	E-cadherin	$\beta$ -catenin
空白组	2.05 ± 0.13	1.05 ± 0.07	0.78 ± 0.08	1.89 ± 0.13
GSK126 低剂量组	1.64 ± 0.10 <sup>①</sup>	0.84 ± 0.07 <sup>①</sup>	0.91 ± 0.09 <sup>①</sup>	1.56 ± 0.12 <sup>①</sup>
GSK126 中剂量组	1.02 ± 0.11 <sup>①②</sup>	0.62 ± 0.06 <sup>①②</sup>	1.20 ± 0.11 <sup>①②</sup>	1.12 ± 0.10 <sup>①②</sup>
GSK126 高剂量组	0.53 ± 0.08 <sup>①②③</sup>	0.35 ± 0.05 <sup>①②③</sup>	1.54 ± 0.10 <sup>①②③</sup>	0.91 ± 0.11 <sup>①②③</sup>
F 值	198.091	95.147	85.140	60.217
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注：①与空白组比较,  $P < 0.05$ ; ②与 GSK126 低剂量组比较,  $P < 0.05$ ; ③与 GSK126 中剂量组比较,  $P < 0.05$ 。

### 2.4 各组 EZH2、EMT 相关蛋白相对表达量比较

空白组及 GSK126 低、中、高剂量组 EZH2、E-cadherin、Vimentin、 $\beta$ -catenin 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 532.016$ 、 $107.842$ 、 $253.016$  和  $305.871$ , 均  $P = 0.000$ )。进一步两两比较结果: 与空白组比较, GSK126 低、中、高剂量组 EZH2、Vimentin、 $\beta$ -catenin 蛋白相对表达量均降

低 ( $P < 0.05$ ), 且随 GSK126 剂量升高而降低 ( $P < 0.05$ ); 与空白组比较, GSK126 低、中、高剂量组 E-cadherin 蛋白相对表达量升高 ( $P < 0.05$ ), 且随 GSK126 剂量升高而升高 ( $P < 0.05$ )。见表 5 和图 1。

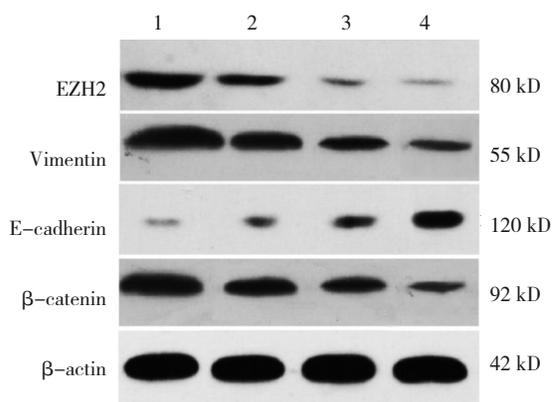
### 2.5 各组 JAK2/STAT3 信号通路相关蛋白相对表达量比较

空白组及 GSK126 低、中、高剂量组 p-JAK2/

表 5 各组 EZH2、EMT 相关蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	EZH2	Vimentin	E-cadherin	$\beta$ -catenin
空白组	0.85 ± 0.07	1.87 ± 0.12	0.15 ± 0.04	1.21 ± 0.10
GSK126 低剂量组	0.42 ± 0.04 <sup>①</sup>	0.95 ± 0.08 <sup>①</sup>	0.26 ± 0.05 <sup>①</sup>	0.91 ± 0.07 <sup>①</sup>
GSK126 中剂量组	0.16 ± 0.04 <sup>①②</sup>	0.62 ± 0.07 <sup>①②</sup>	0.42 ± 0.06 <sup>①②</sup>	0.70 ± 0.08 <sup>①②</sup>
GSK126 高剂量组	0.07 ± 0.02 <sup>①②③</sup>	0.37 ± 0.06 <sup>①②③</sup>	0.79 ± 0.07 <sup>①②③</sup>	0.34 ± 0.05 <sup>①②③</sup>
F 值	532.006	107.842	253.016	305.871
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①与空白组比较,  $P < 0.05$ ; ②与 GSK126 低剂量组比较,  $P < 0.05$ ; ③与 GSK126 中剂量组比较,  $P < 0.05$ 。



1: 空白组; 2: GSK126 低剂量组; 3: GSK126 中剂量组; 4: GSK126 高剂量组。

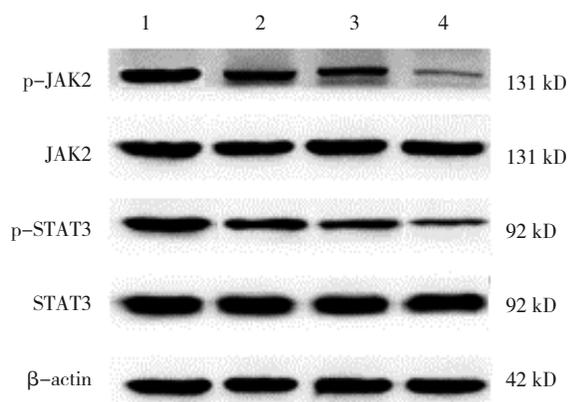
图 1 各组 EZH2、EMT 相关蛋白的表达

JAK2、p-STAT3/STAT3 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 159.007$  和  $217.835$ , 均  $P = 0.000$ )。进一步两两比较结果: 与空白组比较, GSK126 低、中、高剂量组 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 蛋白相对表达量均降低 ( $P < 0.05$ ), 且随 GSK126 剂量升高而降低 ( $P < 0.05$ )。见表 6 和图 2。

表 6 各组 JAK2/STAT3 信号通路相关蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	p-JAK2/JAK2	p-STAT3/STAT3
空白组	0.95 ± 0.07	0.91 ± 0.12
GSK126 低剂量组	0.61 ± 0.05 <sup>①</sup>	0.75 ± 0.08 <sup>①</sup>
GSK126 中剂量组	0.43 ± 0.04 <sup>①②</sup>	0.46 ± 0.07 <sup>①②</sup>
GSK126 高剂量组	0.15 ± 0.03 <sup>①②③</sup>	0.22 ± 0.05 <sup>①②③</sup>
F 值	159.007	217.835
P 值	0.000	0.000

注: ①与空白组比较,  $P < 0.05$ ; ②与 GSK126 低剂量组比较,  $P < 0.05$ ; ③与 GSK126 中剂量组比较,  $P < 0.05$ 。



1: 空白组; 2: GSK126 低剂量组; 3: GSK126 中剂量组; 4: GSK126 高剂量组。

图 2 各组 JAK2/STAT3 信号通路相关蛋白的表达

### 3 讨论

近年来, 随着铂类化疗药物的普及、分子靶向药物的应用, 膀胱癌患者总体生存率得到显著提高, 精准靶向治疗成为热点研究领域<sup>[6-7]</sup>。但临床调查结果显示, 膀胱癌术后复发转移风险较高, 术后 12 个月内复发率为 10% ~ 60%, 预后生存期短<sup>[8]</sup>。膀胱癌属于尿路上皮细胞癌, 病死率高。病灶转移和复发是导致膀胱癌患者死亡的重要原因。近年来研究显示, 膀胱癌 EMT 过程是复发转移的关键环节, 膀胱上皮细胞在内外因素诱导下向间质细胞转化, 该过程中细胞间黏附作用降低, 癌细胞向远端侵袭和转移能力增强, 最终导致病灶复发和转移<sup>[9]</sup>。表观遗传在膀胱癌发生、发展中发挥重要作用, EZH2 基因是调控表观遗传的主要因子之一, 参与组蛋白甲基化、EMT 等过程<sup>[10-11]</sup>。因此, 抑制 EZH2 基因表达能抑制膀胱癌 EMT 过程, 从而为膀胱癌的治疗提供新的研究方向。

EZH2 基因定位于人 7 号染色体, 编码 746 个氨

氨酸,与果蝇E(z)蛋白的同源性为60.5%<sup>[12]</sup>。EZH2参与调控多种恶性肿瘤的进展。既往研究显示,EZH2在结直肠正常黏膜组织、良性病变及腺癌中的阳性表达率依次升高,说明EZH2参与结直肠癌变过程<sup>[13]</sup>。另有研究表明,EZH2在肌层浸润性膀胱癌患者病灶中高表达,且与淋巴结转移关系密切,提示EZH2可能参与膀胱癌EMT过程,但仍需证据支持<sup>[14]</sup>。本研究首先通过检测EZH2抑制剂GSK126对膀胱癌活性的影响,结果显示,细胞培养24 h,GSK126中、高剂量组细胞增殖能力均低于空白组;与空白组比较,GSK126低、中、高剂量组细胞培养48 h、72 h的细胞增殖能力及培养24 h的穿膜细胞数、迁移率均降低,且具有剂量依赖性,提示抑制EZH2可有效抑制T24细胞增殖、侵袭和迁移能力,EZH2与膀胱癌细胞活性密切相关。此外,本研究通过检测EMT相关基因和蛋白的表达,结果发现,GSK126各剂量组Vimentin、 $\beta$ -catenin mRNA和蛋白相对表达量均低于空白组,E-cadherin mRNA和蛋白相对表达量高于空白组,且均具有剂量依赖性,进一步证实抑制EZH2可能抑制T24细胞EMT过程。Vimentin属于细胞骨架蛋白,广泛分布于内皮细胞、淋巴细胞等间质细胞,是细胞EMT的重要因子。有研究证实,Vimentin参与肝癌细胞、肺泡上皮细胞等多种细胞EMT过程<sup>[15-16]</sup>。 $\beta$ -catenin是诱导EMT的重要信号通路,未活化的 $\beta$ -catenin与E-cadherin结合,可维持上皮细胞形态及细胞间的黏附作用,当E-cadherin表达被抑制, $\beta$ -catenin转入细胞质,在细胞质中不断累积,达到一定水平后转入细胞核,促进侵袭、迁移等靶基因的表达<sup>[17-18]</sup>。

此外,本研究发现,与空白组比较,GSK126低、中、高剂量组p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3蛋白相对表达量均降低,且随GSK126剂量升高而降低,提示EZH2抑制剂可能通过抑制JAK2/STAT3信号通路中JAK2和STAT3蛋白磷酸化,抑制膀胱癌T24细胞EMT,且具有剂量依赖性。JAK2/STAT3信号通路是细胞因子转导的关键通路,JAK2可通过激活下游STAT级联反应,调控癌细胞增殖、迁移等过程。既往有研究显示,抑制JAK2/STAT3信号通路相关蛋白磷酸化可抑制胰腺癌<sup>[19]</sup>、肾细胞癌<sup>[20]</sup>的增殖和迁移,抑制肿瘤恶性生物学行为过程。因此,抑制特异性EZH2表达能抑制膀胱癌EMT过程,可能与抑制

JAK2/STAT3信号通路有关。

综上所述,本研究应用不同浓度EZH2抑制剂均可抑制膀胱癌T24细胞增殖、侵袭及迁移能力,且可有效抑制膀胱癌T24细胞EMT过程,其调控机制可能与抑制JAK2/STAT3信号通路中JAK2和STAT3蛋白磷酸化有关,可为临床膀胱癌精准治疗提供更多思路。

#### 参考文献:

- [1] 贺宇彤,李道娟,梁迪,等. 2014年中国膀胱癌发病和死亡分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2018, 40(9): 647-652.
- [2] MONTEIRO-REIS S, LOBO J, HENRIQUE R, et al. Epigenetic mechanisms influencing epithelial to mesenchymal transition in bladder cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(2): 297-316.
- [3] RAMAKRISHNAN S, GRANGER V, RAK M, et al. Inhibition of EZH2 induces NK cell-mediated differentiation and death in muscle-invasive bladder cancer[J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(10): 2100-2114.
- [4] BAI Y, ZHANG Z, CHENG L, et al. Inhibition of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) overcomes enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(25): 9911-9923.
- [5] KRAMER N, WALZL A, UNGER C, et al. In vitro cell migration and invasion assays[J]. *Mutat Res*, 2013, 752(1): 10-24.
- [6] SU H W, JIANG H T, TAO T, et al. Hope and challenge: precision medicine in bladder cancer[J]. *Cancer Med*, 2019, 8(4): 1806-1816.
- [7] PATEL V G, OH W K, GALSKEY M D. Treatment of muscle-invasive and advanced bladder cancer in 2020[J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(5): 404-423.
- [8] 白志鹏,唐以众. TURBT联合表柔比星与羟喜树碱膀胱灌注对浅表性膀胱癌患者术后复发率及生活质量的影响[J]. 解放军医药杂志, 2019, 31(4): 40-43.
- [9] CAO R, YUAN L S, MA B, et al. An EMT-related gene signature for the prognosis of human bladder cancer[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(1): 605-617.
- [10] CHEN X, ZHANG J T, RUAN W M, et al. Urine DNA methylation assay enables early detection and recurrence monitoring for bladder cancer[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(12): 6278-6289.
- [11] CHEN X, XIE R H, GU P, et al. Long noncoding RNA LBCS inhibits self-renewal and chemoresistance of bladder cancer stem cells through epigenetic silencing of SOX2[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(4): 1389-1403.
- [12] GULATI N, BÉGUELIN W, GIULINO-ROTH L. Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) inhibitors[J]. *Leuk Lymphoma*, 2018, 59(7): 1574-1585.
- [13] 胡晓舒,常方方,徐小艳,等. EZH2、p53、Ki-67在结直肠腺癌及腺瘤组织中的表达及相关性探讨[J]. 实用医学杂志,

- 2019, 35(1): 104-108.
- [14] 葛天宇, 黄晓雪, 黄丽凤, 等. 以生物信息学为基础的 EZH2 及 Ki-67 在肌层浸润性膀胱癌中的相关性病理分析[J]. 临床泌尿外科杂志, 2020, 35(10): 812-816.
- [15] 徐安健, 李艳萌, 乌娜娜, 等. PHP14 通过与 Vimentin 相互作用影响 TGF- $\beta$  诱导的肝细胞 AML-12 上皮-间质转化[J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41(2): 1-6.
- [16] 刘涛, 魏海龙, 李伟, 等. 积雪草苷对 TGF- $\beta$ 1 诱导的肺泡上皮细胞增殖和 Vimentin 蛋白表达影响[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(1): 25-29.
- [17] MOUSSA R A, KHALIL E Z I, ALI A I. Prognostic role of epithelial-mesenchymal transition markers "E-Cadherin,  $\beta$  - Catenin, ZEB1, ZEB2 and p63" in bladder carcinoma[J]. World J Oncol, 2019, 10(6): 199-217.
- [18] SANZ RESSEL B L, MASSONE A R, BARBEITO C G. Aberrant expression of E-cadherin/ $\beta$ -catenin during epidermal tumorigenesis in dogs[J]. J Comp Pathol, 2020, 176(5): 1-9.
- [19] CHU P, WANG S S, ZHU X X, et al. Selaginellin B induces apoptosis and autophagy in pancreatic cancer cells via the JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. Am J Transl Res, 2020, 12(11): 7127-7143.
- [20] XU Z Y, WU D, FU D, et al. Nobiletin inhibits viability of human renal carcinoma cells via the JAK2/STAT3 and PI3K/Akt pathway[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2020, 66(5): 199-203.

(童颖丹 编辑)

**本文引用格式:** 陈翔, 何天基, 冉俊武, 等. EZH2 抑制剂对膀胱癌 T24 细胞上皮间质转化的影响及其机制研究[J]. 中国现代医学杂志, 2022, 32(8): 39-45.

**Cite this article as:** CHEN X, HE T J, RAN J W, et al. Effect of EZH2 inhibitor on epithelial-mesenchymal transition of T24 bladder cancer cells and its mechanism[J]. China Journal of Modern Medicine, 2022, 32(8): 39-45.