

Bcl-w 对膀胱肿瘤细胞 5637 增殖、顺铂敏感性的影响

潘 麒,张连华,杨国良,薄隽杰

(上海交通大学医学院附属仁济医院,上海 200127)

摘 要: [目的] 探讨过表达的 Bcl-w 蛋白对膀胱肿瘤细胞 5637 的增殖能力、顺铂敏感性的影响。[方法] 采用质粒 pcDNA3.1(+) 构建 Bcl-w 过表达载体,转染 5637 细胞后用 Western blot 验证过表达效果,用 CCK-8、平板克隆形成实验、流式细胞仪检测 pcDNA3.1-Bcl-w 细胞和对照细胞的增殖和生存曲线、克隆形成能力、细胞周期。[结果] 成功构建 pcDNA3.1-Bcl-w 重组质粒并转染 5637 细胞。pcDNA3.1-Bcl-w 细胞增殖曲线在 24、48、72h 均高于对照组 (0.814 ± 0.022 vs 0.727 ± 0.017 , $P=0.006$; 1.259 ± 0.017 vs 1.078 ± 0.027 , $P=0.001$; 1.787 ± 0.024 vs 1.520 ± 0.021 , $P<0.001$), 差异具有统计学意义; 克隆形成能力高于对照组 (60.67 ± 6.03 vs 48.67 ± 6.11 , $P<0.001$), 差异具有统计学意义; 处于 G₀/G₁ 期的比例低于对照组 (50.76% vs 57.02%, $P<0.001$), 差异具有统计学意义; 在 30、50、70、90、110 $\mu\text{mol/L}$ 各浓度顺铂处理下生存曲线高于对照组 [(83.8% $\pm$ 1.7%) vs (93.9% $\pm$ 1.2%), $P<0.001$; (59.5% $\pm$ 0.7%) vs (72.5% $\pm$ 1.9%), $P=0.028$; (50.5% $\pm$ 2.2%) vs (57.2% $\pm$ 1.2%), $P=0.007$; (37.2% $\pm$ 0.7%) vs (45.7% $\pm$ 1.4%), $P<0.001$; (29.1% $\pm$ 0.5%) vs (33.2% $\pm$ 0.6%), $P<0.001$], 差异具有统计学意义。[结论] 高表达的 Bcl-w 增强了膀胱癌细胞 5637 的增殖能力,削弱了肿瘤细胞对化疗药物顺铂的敏感性。

主题词: 膀胱肿瘤; 5637 细胞; Bcl-w; 增殖; 顺铂

中图分类号: R737.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)07-0555-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.07.B006

The Effect of Bcl-w on Proliferation and Sensitivity to Cisplatin Chemotherapy of Bladder Cancer Cell Line 5637

PAN Qi, ZHANG Lian-hua, YANG Guo-liang, et al.

(Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200127, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of Bcl-w overexpression on proliferation and sensitivity to cisplatin chemotherapy of bladder cancer cell line 5637. [Methods] The plasmid pcDNA3.1(+) was used to restructure plasmid pcDNA3.1-Bcl-w. Western blot was performed to confirm the effect of pcDNA3.1-Bcl-w after 5637 cells were transfected. The growth curve, survival curve, colony formation ability and cell cycle of pcDNA3.1-Bcl-w cells and control cells were detected by CCK-8, plate colony formation assay and flow cytometry, respectively. [Results] Plasmid pcDNA3.1-Bcl-w was successfully constructed and transfected to 5637 cells. Compared with control cells, pcDNA3.1-Bcl-w cells had a higher growth curve at the point of 24h, 48h and 72h (0.814 ± 0.022 vs 0.727 ± 0.017 , $P=0.006$; 1.259 ± 0.017 vs 1.078 ± 0.027 , $P=0.001$; 1.787 ± 0.024 vs 1.520 ± 0.021 , $P<0.001$); formed more colonies (60.67 ± 6.03 vs 48.67 ± 6.11 , $P<0.001$); had a lower proportion of G₀/G₁ phase (50.76% vs 57.02%, $P<0.001$); had a higher survival curve at different cisplatin concentration [(83.8% $\pm$ 1.7%) vs (93.9% $\pm$ 1.2%), $P<0.001$ at 30 $\mu\text{mol/L}$; (59.5% $\pm$ 0.7%) vs (72.5% $\pm$ 1.9%), $P=0.028$ at 50 $\mu\text{mol/L}$; (50.5% $\pm$ 2.2%) vs (57.2% $\pm$ 1.2%), $P=0.007$ at 70 $\mu\text{mol/L}$; (37.2% $\pm$ 0.7%) vs (45.7% $\pm$ 1.4%), $P<0.001$ at 90 $\mu\text{mol/L}$; (29.1% $\pm$ 0.5%) vs (33.2% $\pm$ 0.6%), $P<0.001$ at 110 $\mu\text{mol/L}$]. [Conclusion] The overexpression of Bcl-w facilitates the proliferation of bladder cancer cells 5637 and weakens the sensitivity of cancer cells to cisplatin chemotherapy.

Subject words: bladder neoplasms; 5637 cell line; Bcl-w; proliferation; cisplatin

在我国,膀胱癌发病率居所有恶性肿瘤第 8 位、泌尿生殖系统恶性肿瘤第 1 位,并呈逐年上升趋势^[1]。

基金项目: 上海市科委基础研究项目(12ZR1417700)

通讯作者: 薄隽杰,主任医师,博士生导师;上海交通大学医学院附属仁济医院泌尿外科,上海市山东中路 145 号(200127);E-mail:bojuanjie@yeah.net

收稿日期: 2013-11-23; **修回日期:** 2014-02-03

尽管初发病例中约 70% 是非肌层浸润性膀胱癌,但是其中约 50% 会复发,20%~25% 的 T₁ 期膀胱癌患者会进展^[2]。膀胱灌注化疗是非肌层浸润性膀胱癌主要的辅助治疗方式,全身化疗是肌层浸润性膀胱癌、膀胱癌转移常用的治疗方法。然而,综合治疗后

膀胱癌的复发和进展依然是临床上棘手的问题。

Bcl-w 蛋白作为 Bcl-2 家族成员之一,是调节细胞凋亡信号通路的重要分子,在多种肿瘤组织中异常高表达,如乳腺癌、胃肠道肿瘤^[3-6]。近年来的研究还发现 Bcl-w 同样在肿瘤的侵袭和转移过程中发挥着重要的作用^[7-9]。我们先前的研究发现^[10]膀胱癌中普遍存在 microRNA203 水平的下调,并造成 Bcl-w 异常的高表达,外源性升高 microRNA203 的水平可以抑制肿瘤细胞的增殖。然而 Bcl-w 在膀胱肿瘤的发生发展中究竟起到了什么样的作用,目前还没有相关的研究报道。本研究中,我们通过构建 Bcl-w 真核表达载体转染膀胱肿瘤细胞系 5637,探究异常高表达的 Bcl-w 对膀胱肿瘤细胞增殖、细胞周期、化疗药物顺铂的敏感性的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株和细胞培养

人胚肾细胞 HEK293T、膀胱尿路上皮癌细胞 5637(购自中科院上海细胞库)均培养在含 100μg/ml 链霉素、100U/ml 青霉素和 10% 胎牛血清(FBS) DMEM 培养基中(购自 Gibco),于 37℃、5%CO₂ 条件下培养,隔天换液。待细胞达到 70%~90%汇合度时用 0.25%胰酶—EDTA 消化传代。

1.2 真核表达载体 pcDNA3.1-Bcl-w 的构建

采用 Trizol 法从 5637 细胞中提取 RNA(具体方法见 Invitrogen 产品说明书),用逆转录试剂盒(购自 Invitrogen)逆转录成 cDNA,以此为模板逆转录 PCR 扩增 Bcl-w 的 CDS 序列,在序列两端加酶切位点 *Hind* III (AAGCTT)、*Xba* I (TCTAGA),引物序列(由上海生工合成)正向:5'AAGCTTCCTGACCCGTGAGATCCCTA 3',反向:5'TCTAGAACTCCACTTCTTCAAGGGC 3'。PCR 反应采用 phusion 高保真 PCR 试剂盒(购自 Thermo Scientific),反应条件:为 95℃ 5min,95℃ 30s,58℃ 30s,72℃ 40s,35 个循环,72℃ 10min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后切胶、胶回收(Tiagen 胶回收试剂盒)。用限制性内切酶 *Hind* III、*Xba* I (购自 NEB)双酶切 pcDNA-3.1(+)(购自 Life Technology),酶切产物电泳胶回收后用 T4 连接酶(购自 NEB)与 Bcl-w 的 CDS 序列相连。转化感受态大肠埃希菌 DH-5α,铺板,16h 后挑单克隆,接种于

含氨苄西林的 LB 液体培养基,37℃振荡培养 16h。采用 Tiagen 质粒小抽试剂盒提取 DNA,重组的 pcDNA3.1-Bcl-w 经 *Hind* III、*Xba* I 双酶切后电泳鉴定产物大小,重组质粒送上海生工测序,测序结果经 blast 软件进行同源性比对。

1.3 细胞转染

将 5637 细胞按 200 000 个/孔铺板于 6 孔板中,24h 后细胞处于对数生长期,用 jetPRIME(购自 polyplus)转染质粒,具体方法参见说明书。转染后 6h 换液 1 次,培养 48h 后进行下一步处理。

1.4 Western blot

贴壁细胞弃去培养基后用 4℃ PBS 洗 2 次,用滤纸吸干后,每孔细胞加入 100μl 含 1%PMSF 的 RIPA 裂解液(购自碧云天),冰上静置 20min,将细胞刮下,充分吹打混匀,15 000r/min 4℃离心 15min。取上清液,经 BCA 试剂盒(购自碧云天)测定蛋白浓度。蛋白样品中加入 1/4 体积的 5X 上样缓冲溶液,95℃煮沸 10min。蛋白样本加样量为 30μg,12%SDS-PAGE 电泳,60V 30min,110V 60min。电泳后经湿转(BIO-RAD)将 PAGE 胶中蛋白转移至 PVDF 膜上,冰浴,200mA,1.5h。PVDF 膜用 5%脱脂牛奶室温封闭 2h,一抗(兔抗人 Bcl-w 单克隆抗体,购自 CST)4℃孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,HRP 标记的羊抗兔二抗(购自 Santa Cruz)室温孵育 2h,TBST 洗膜 3 次,加显影剂,用 ECL 超敏发光液显色、曝光。以 β-actin 为内参(鼠抗人一抗、兔抗鼠二抗均购自 Santa Cruz)。

1.5 CCK-8 检测细胞增殖和生存曲线

细胞增殖检测采用 CCK-8 试剂盒(购自 Dojindo),取对数生长期的细胞接种于 96 孔板,每孔接种 5000 或 10 000 个细胞,设置 5 个复孔。在待测时间点时,弃去每孔培养基,加入含 10%WST-8 的培养基,37℃、5%CO₂ 孵育 1h,在酶联免疫仪 450nm 波长处检测吸光度(A)。细胞生长抑制率=(药物组-空白组)/(对照组-空白组)×100%。

1.6 平板克隆形成实验

细胞接种至 6 孔板中,每孔 800 个,14d 后,用甲醛固定后用 0.4%的结晶紫染色,在显微镜下计数 50 个细胞以上的克隆数。

1.7 细胞周期检测

将贴壁细胞用胰酶消化后,PBS 洗 2 遍,配成

1×10⁶ 个/ml 的细胞悬液,取 1ml 细胞悬液作为待测样本,离心去上清后加入 70%冰乙醇,-20℃固定 1.5h,离心去上清后用 1ml PI 染液重悬细胞,室温避光 1h 后用流式细胞仪(BD Accuri C6)检测 DNA 含量,每个样本检测 10 000 个细胞,结果经 FlowJo 7.6.1 软件分析各细胞周期的比例。1ml PI 染液的配制:954μl PBS+16μl 1mg/ml PI+30μl 1mg/ml RNase。

1.8 统计学处理

采用 SPSS13.0 进行统计处理,计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$, 采用单因素方差分析和 *t* 检验进行统计学比较,以 *P*<0.05 作为检验水准。

2 结果

2.1 真核表达载体 pcDNA3.1-Bcl-w 的构建和鉴定

构建好的 pcDNA3.1-Bcl-w 经 *Hind* III、*Xba* I 双酶切后,得到和预想长度一致的外源性 Bcl-w 插入片段,长度约 0.8kb,测序结果显示 DNA 序列正确。将 pcDNA3.1-Bcl-w 和空载体 pcDNA3.1-vector 瞬时转染 HEK293T 细胞和 5637 细胞,48h 后提取蛋白进行 Western blot 检测,结果显示重组质粒 pcDNA3.1-Bcl-w 在上述两种细胞中明显高表达(Figure 1)。

2.2 Bcl-w 对膀胱肿瘤细胞增殖的影响

转染 pcDNA3.1-Bcl-w 的 5637 细胞增殖曲线在 24、48、72h 均高于对照组(分别是 0.814±0.022 vs 0.727±0.017, *P*=0.006; 1.259±0.017 vs 1.078±0.027, *P*=0.001; 1.787±0.024 vs 1.520±0.021, *P*<0.001), 差异具有统计学意义(Figure 2)。转染 pcDNA3.1-Bcl-w 的 5637 细胞在平板上形成更多的单克隆(60.67±6.03),明显高于对照组细胞(48.67±6.11),差异具有统计学意义(*P*<0.001)(Figure 3)。

2.3 Bcl-w 对膀胱肿瘤细胞细胞周期的影响

转染 pcDNA3.1-Bcl-w 的 5637 细胞处于 G₀/G₁ 期细胞的比例低于对照组细胞

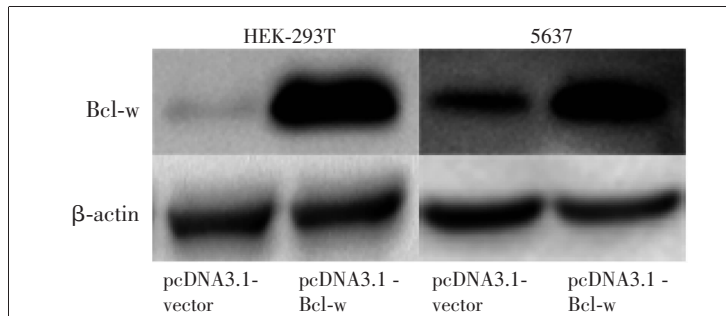


Figure 1 The plasmids pcDNA3.1-vector and pcDNA3.1-Bcl-w were transfected to the cell lines HEK-293T and 5637 respectively. Then the Bcl-w protein level was analyzed by Western blot.

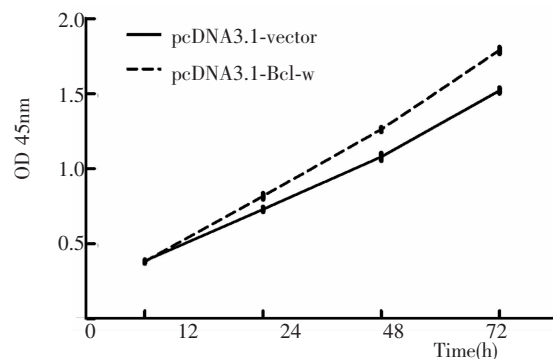


Figure 2 Growth curves detected by CCK-8 at points 12,24,48 and 72h after transfecting pcDNA3.1-vector and pcDNA3.1-Bcl-w into the 5637 cells respectively

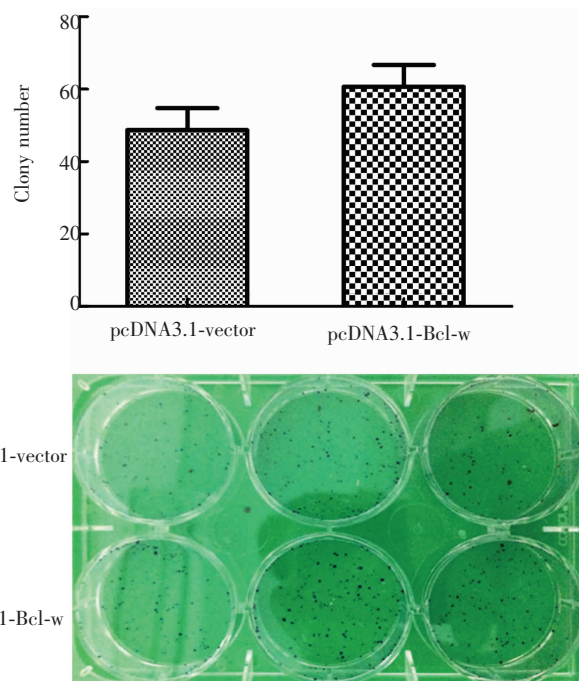


Figure 3 The colony formation ability of the two kinds of cells after transfecting pcDNA3.1-vector and pcDNA3.1-Bcl-w into the 5637 cells respectively

(50.76% vs 57.02%, $P<0.001$),差异具有统计学意义(Figure 4),提示 Bcl-w 促进 5637 细胞越过细胞周期 G₀/G₁ 期向 S 期和 G₂/M 期进展。

2.4 Bcl-w 增强膀胱肿瘤细胞对顺铂的耐药性

CCK-8 检测在顺铂 0、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 各浓度梯度处理 24h 后,根据 5637 细胞在 450nm 的 OD 值,制作生存曲线(Figure 5),得出半数致死浓度约为 70 $\mu\text{mol/L}$ 。

转染 pcDNA3.1-Bcl-w 的 5637 细胞在顺铂 30、50、70、90、110 $\mu\text{mol/L}$ 处理下生存曲线高于对照组,分别为(83.8% $\pm$ 1.7%) vs (93.9% $\pm$ 1.2%), $P<0.001$; (59.5% $\pm$ 0.7%) vs (72.5% $\pm$ 1.9%), $P=0.028$; (50.5% $\pm$ 2.2%) vs (57.2% $\pm$ 1.2%), $P=0.007$; (37.2% $\pm$ 0.7%) vs (45.7% $\pm$ 1.4%), $P<0.001$; (29.1% $\pm$ 0.5%) vs (33.2% $\pm$ 0.6%), $P<0.001$,差异均具有统计学意义(Figure 6),提示 Bcl-w

能够降低肿瘤细胞对顺铂化疗的敏感性。

3 讨论

Bcl-w 属于 Bcl-2 家族成员中抗凋亡蛋白的一类,1996 年由 Gibson 等人^[11]首次发现,基因位于人染色体 14q11,编码蛋白由 193 个氨基酸组成,和 Bcl-2 家族其他成员(Bcl-2、Bcl-XL、Mcl-1 等)之间具有高度同源性,包含同源结构域 1-4(BH1-4)和位于羧基端的跨膜结构域(TM),是 Bcl-w 发挥功能的结构基础。

在人肿瘤组织中,目前报道 Bcl-w 在胃肠道、乳腺恶性肿瘤组织中高表达^[3-6],其表达水平高低和肿瘤临床分期、分级相关。在结肠肿瘤病理标本中,结肠癌上皮细胞高表达 Bcl-w,而结肠腺瘤细胞不表达

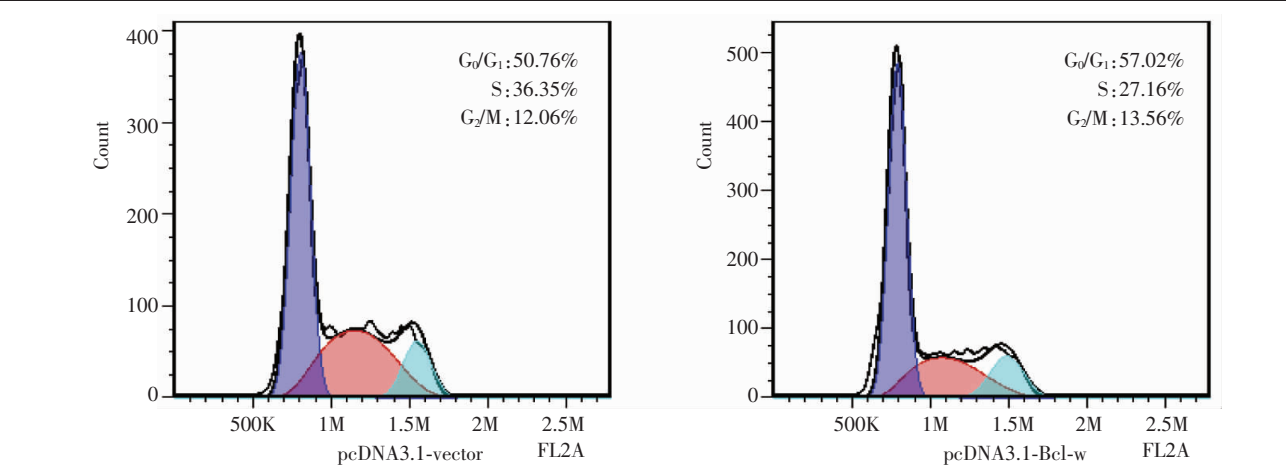


Figure 4 Cell cycle distribution of the two kinds of cells after transfecting pcDNA3.1-vector and pcDNA3.1-Bcl-w into the 5637 cells respectively

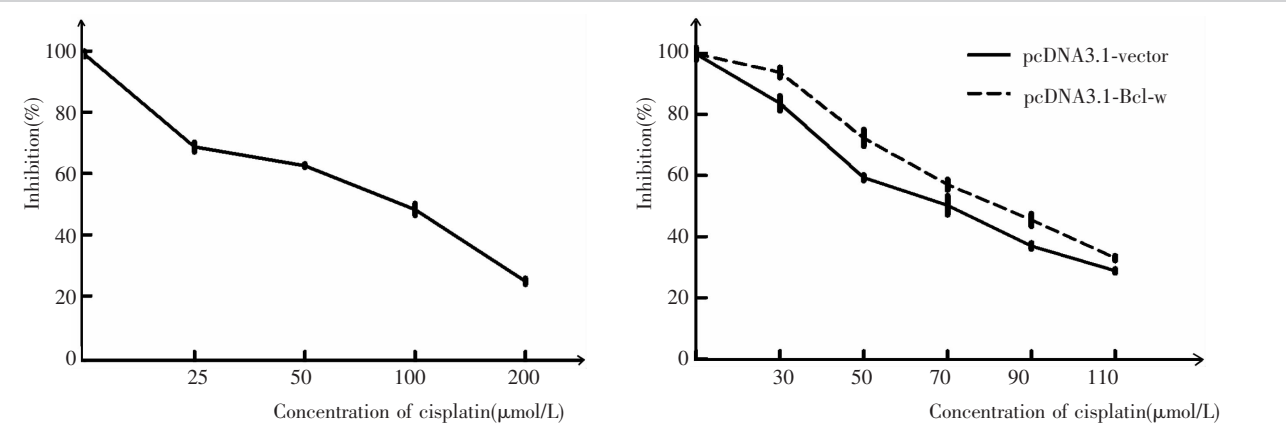


Figure 5 The survival curve of 5637 cells at different concentration of cisplatin

Figure 6 The survival curves of the two kinds of cells at different concentration of cisplatin after transfecting pcDNA3.1-vector and pcDNA3.1-Bcl-w into the 5637 cells respectively

Bcl-w,提示 Bcl-w 在结肠肿瘤的进展过程中起到一定作用^[6]。郭文娟等人^[4]用 siRNA 技术在小肠腺癌细胞系 HuTu-80 中下调 Bcl-w 的表达后,肿瘤细胞发生明显的细胞周期阻滞和凋亡。在 Lee 等人^[5]通过对胃癌细胞系 SUN-16 研究,发现 Bcl-w 能够抑制凋亡刺激信号激活的应激活化的蛋白激酶/c-Jun 氨基端激酶(SAPK/JNK)信号通路所介导的细胞凋亡。本研究发现,在转染 5637 细胞 pcDNA3.1-Bcl-w 过表达载体后,5637 细胞 Bcl-w 蛋白水平明显上调,伴随着更多的细胞由 G₀/G₁ 前进至 S、G₂/M 期,肿瘤细胞的增殖活性明显增强。

相对于正常尿路上皮组织和癌旁组织,膀胱肿瘤组织部分高表达抗凋亡蛋白 Bcl-XL^[12,13],Bcl-XL 表达水平与患者的预后尤其是放疗后的无瘤生存期密切相关,而 Bcl-2 的表达水平对患者预后评估价值不大^[14]。应用 RNA 干扰技术,抑制抗凋亡蛋白 Bcl-XL 等的表达,能够显著提高膀胱肿瘤细胞对放疗的敏感性,并且恢复原先已经产生耐药的细胞对化疗药物的敏感性^[15]。本研究用不同浓度的顺铂处理高表达 Bcl-w 的 5637 细胞,发现 Bcl-w 可以降低肿瘤细胞对化疗药物顺铂的敏感性,然而 Bcl-w 临床预后的提示价值还有待进一步研究来验证。

Bcl-w 异常高表达和上述各种肿瘤的恶性潜能密切相关,目前研究发现 Bcl-w 的上游调控机制包括转录因子在转录水平的调控、microRNA 在转录后水平的调控,并且这些上游的调控机制在特定的肿瘤中发生了异常^[10,16,17]。最近 Lapham 等^[16]在结肠癌中发现 Wnt 通路的活化可以通过下游的转录因子 β -catenin/TCF4 结合到 Bcl-w 启动子的特定结合区域激活 Bcl-w 的转录。我们先前的研究发现^[10]膀胱癌中普遍存在 microRNA203 水平的下调并造成 Bcl-w 异常的高表达。

综上所述,高表达的 Bcl-w 增强了膀胱癌细胞 5637 的增殖能力,削弱了肿瘤细胞对化疗药物顺铂的敏感性,从而赋予了膀胱肿瘤细胞更高的恶性潜能。各种针对 Bcl-w 的靶向药物可能在未来成为治疗膀胱肿瘤新的手段。

参考文献:

- [1] Ma JH. Tips on the diagnosis and treatment of bladder cancer [J]. Chinese Journal of Urology, 2011, 32 (4): 221-222.[马建辉. 膀胱癌诊治过程中值得注意的几个问题 [J]. 中华泌尿外科杂志, 2011, 32(4): 221-222.]
- [2] Ploeg M, Aben KKH, Kiemeny LA. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world [J]. World J Urol, 2009, 27(3): 289-293.
- [3] Zhong JH, Wang Y, Wang XC, et al. The mRNA and protein expression of bcl-w and its clinical value in breast cancer [J]. China Journal of Modern Medicine [J], 2013, 23 (16): 44-46.[衷敬华, 王勇, 王祥财, 等. 乳腺癌中 bcl-w 的 mRNA 和蛋白的表达及其临床意义 [J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(16): 44-46.]
- [4] Guo WJ, Jin Z, Wang AY. Expression of Bcl-w protein in human small intestinal adenocarcinoma and effect of Bcl-w siRNA on apoptosis in intestinal adenocarcinoma HuTu-80 cells [J]. Chinese Journal of Oncology, 2012, 34 (3): 182-186.[郭文娟, 金珠, 王爱英. Bcl-w 蛋白在小肠腺癌组织中的表达及其沉默后对小肠腺癌 HuTu-80 细胞凋亡的影响 [J]. 中华肿瘤杂志, 2012, 34(3): 182-186.]
- [5] Lee HW, Lee SS, Lee SJ, et al. Bcl-w is expressed in a majority of infiltrative gastric adenocarcinomas and suppresses the cancer cell death by blocking stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase activation [J]. Cancer Res, 2003, 63(5): 1093-100.
- [6] Wilson JW, Nostro MC, Balzi M, et al. Bcl-w expression in colorectal adenocarcinoma [J]. Br J Cancer, 2000, 82(1): 178-85.
- [7] Lee WS, Woo EY, Kwon J, et al. Bcl-w enhances mesenchymal changes and invasiveness of glioblastoma cells by inducing nuclear accumulation of β -catenin [J]. PLoS One, 2013, 8(6): e68030.
- [8] Bae IH, Yoon SH, Lee SB, et al. Signaling components involved in Bcl-w-induced migration of gastric cancer cells [J]. Cancer Lett, 2009, 277(1): 22-28.
- [9] Bae IH, Park MJ, Yoon SH, et al. Bcl-w promotes gastric cancer cell invasion by inducing matrix metalloproteinase-2 expression via phosphoinositide 3-kinase, Akt, and Sp1 [J]. Cancer Res, 2006, 66(10): 4991-4995.
- [10] Bo J, Yang G, Huo K, et al. microRNA-203 suppresses bladder cancer development by repressing bcl-w expression [J]. FEBS J, 2011, 278(5): 786-792.
- [11] Gibson L, Holmgren SP, Huang DC, et al. Bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival [J]. Oncogene, 1996, 13(4): 665-675.
- [12] Hameed DA, Abdel Raheem AM, Mosad E, et al. Bcl-XL and Bcl-2 expression in bilharzial squamous cell carcinoma of the urinary bladder; which protein is prognostic? [J]. Urology, 2008, 72(2): 374-378.
- [13] Korkolopoulou P, Lazaris A, Konstantinidou AE, et al. Differential expression of bcl-2 family proteins in bladder carcinomas. Relationship with apoptotic rate and survival [J]. Eur Urol, 2002, 41(3): 274-283.
- [14] Enache M, Simionescu C, Lascu LC. Ki67 and bcl-2 immunoeexpression in primitive urothelial bladder carcinoma [J]. Rom J Morphol Embryol, 2012, 53(3): 521-525.
- [15] Kunze D, Wuttig D, Fuessel S, et al. Multitarget siRNA inhibition of antiapoptotic genes (XIAP, BCL2, Bcl-X(L)) in bladder cancer cells [J]. Anticancer Res, 2008, 28 (4B): 2259-2263.
- [16] Lapham A, Adams JE, Paterson A, et al. The Bcl-w promoter is activated by beta-catenin/TCF4 in human colorectal carcinoma cells [J]. Gene, 2009, 432(1-2): 112-117.
- [17] Tran NL, McDonough WS, Savitch BA, et al. The tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)-fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14) signaling system regulates glioma cell survival via NF κ B pathway activation and Bcl-XL/Bcl-w expression [J]. J Biol Chem, 2005, 280(5): 3483-3492.