

文章编号 1006-8147(2019)04-0373-05

论著

SOX6 在膀胱癌发生发展中的作用及相关机制

付真睿, 盛飞, 张昌文, 常泰浩, 陈仕洋, 乔宝民

(天津医科大学第二医院泌尿外科, 天津市泌尿外科研究所, 天津 300211)

摘要 目的: 研究 SOX6 在膀胱癌中的表达特征, 并探讨其在膀胱癌中发挥的生物学效应及相关机制。方法: 利用免疫组化检测膀胱癌组织和癌旁组织中的 SOX6 的表达, 蛋白印记(Western blot)及荧光实时定量 PCR(qRT-PCR)检测 SOX6 在膀胱癌细胞(T24, BIU-87, EJ, 5637)和正常膀胱上皮细胞(SV-HUC-1)中表达情况。通过 SOX6 高表达质粒和空载质粒分别转染膀胱癌细胞(EJ, 5637), 使用 Transwell 方法检测两组细胞的侵袭能力, 采用划痕实验检测迁移能力, Western blot 法检测 E-cadherin 和 Vimentin 的表达, 使用 CCK-8 实验检测两组细胞的增殖能力, 流式细胞术检测凋亡情况, 并研究对膀胱癌细胞的蛋白酶体活性的影响。结果: 与癌旁组织和正常膀胱上皮细胞相比, 膀胱癌组织和细胞中 SOX6 的表达显著下降, 在细胞 EJ 和 5637 尤其明显。与对照组对比, 转染 SOX6 高表达质粒的 EJ 和 5637 膀胱癌细胞的迁移、侵袭、增殖能力减弱, 凋亡增加, 上皮间质转化能力减弱, 同时蛋白酶体活性显著降低。结论: SOX6 在膀胱癌中作为抑癌基因发生作用, 通过降低蛋白酶体活性来抑制膀胱癌的发展。

关键词 膀胱癌; SOX6; 上皮间质转化; 20 s 蛋白酶体

中图分类号 R737.14

文献标志码 A

The characteristics of SOX6 in development of bladder cancer and relevant mechanism

FU Zhen-rui, SHENG Fei, ZHANG Chang-wen, CHANG Tai-hao, CHEN Shi-yang, QIAO Bao-min

(Department of Urology, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin Institute of Urology, Tianjin 300211, China)

Abstract Objective: To investigate the expression and biological effects of SOX6 in bladder cancer and its molecular mechanisms.

Methods: The expression of SOX6 in bladder cancer tissues and paracancerous tissues was detected by immunohistochemistry, western blot and real-time quantitative PCR (qRT-PCR) were used to explore the expression of SOX6 in bladder cancer cell lines (T24, BIU-87, EJ, 5637) and normal bladder epithelial cells (SV-HUC-1) was detected. SOX6 high expression plasmid and empty plasmid were transfected into bladder cancer cells (EJ, 5637), respectively. Transwell assay was used to detect the invasion, and scratch test was used to determine migration ability. Western blot was used to test the expression of E-cadherin and Vimentin. The proliferation of cells was validated by CCK-8 assay, and the apoptosis was detected by flow cytometry. Furthermore, the influence on proteasome was also studied in bladder cancer cell.

Results: Compared with paracancerous tissues and normal bladder epithelial cells, the expression of SOX6 in bladder cancer tissues and cells was significantly decreased, especially in cancer cell lines EJ and 5637. Compared with the control group, after overexpression of SOX6, the cell migration, invasion, and proliferation were lessened, the percentage apoptosis was increased, and epithelial-mesenchymal transition was reduced. Meanwhile, the activity of proteasome was also significantly decreased. **Conclusions:** SOX6 may function as a tumor suppressor gene in bladder cancer and may inhibit the development of bladder cancer by reducing proteasome activity.

Key words Bladder cancer; SOX6; Epithelial-mesenchymal transition; 20 s proteasome

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一, 美国癌症协会预估 2017 年膀胱癌新增病例 79 030 例, 死亡病例 16 870 例^[1], 尽管大多数的膀胱癌为非肌层浸润性的(70%~75%), 但它们会随着时间的推移而转移并最终发展为肌层浸润性疾病(25%~30%)^[2]。膀胱癌的治疗方法包括手术、化学疗法或放射疗法, 但生存益处仍然有限, 其发病率和死亡率在过去 10 年中逐渐增加^[3]。因此, 迫切需提高对膀胱癌的认识并发现可用于治疗膀胱癌更有效、高选择性的潜在治疗靶点。SOX6 为 SOX 基因家族 D 亚族的主要成员之一, SOX 家族蛋白作为转录因子

主要参与调控胚胎发育、性别决定、神经生长、血管生成、骨骼形成、干细胞形成等生长发育过程^[4-5], 近年来, 越来越多的研究表明 SOX6 的异常表达与许多肿瘤相关^[6-12]。蛋白酶体作为细胞蛋白质的一种降解途径, 很多疾病发生发展也与之直接相关。蛋白酶体作为新型抗肿瘤药物的一个重要靶标, 当蛋白酶体活性受到抑制后, 其相关受体蛋白的降解受到抑制^[13-15]。对 SOX6 通过蛋白酶体途径影响膀胱癌生长进程的机制研究将有助于提升笔者对膀胱癌的认识和治疗。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 人膀胱癌组织与癌旁组织获取于天津医科大学第二医院泌尿外科, 膀胱癌细胞系

作者简介 付真睿(1993-), 男, 硕士在读, 研究方向: 泌尿外科; 通信作者: 乔宝民, E-mail: qbm2000@163.com。

(T24、BIU-87、EJ、5637)和正常膀胱上皮细胞(SV-HUC-1)来自天津医科大学第二医院泌尿外科研究所。兔单抗 SOX6、兔单抗 E-cadherin、兔单抗 Vimentin、一抗兔单抗 GAPDH、二抗羊抗兔购于 proteintech 公司,SOX6 高表达质粒 pcDNA3.1-SOX6 和空载质粒购于广东复能基因公司。X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent 转染试剂购于美国 Roche 公司,CCK8 试剂盒、免疫组化试剂盒、多聚甲醛、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于 Solarbio 公司,Transwell 小室购于美国 Corning 公司,ECL 显影液、SYBR Green 预混液、蛋白 Marker 购于美国 Thermo Fisher 公司,细胞凋亡试剂盒、caspase3 试剂盒、RNA 反转录相关试剂购于康为世纪公司,Matrigel 基质胶购于美国 BD 公司,Trizol 试剂购于 Invitrogen 公司,20 s 蛋白酶体检测试剂盒购于 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染 人膀胱癌细胞系培养于含 10%FBS 的 RPMI 1640 培养液中,置于 37℃,5% CO₂ 饱和湿度条件下培养。每 2~3 d 更换培养液 1 次,待细胞生长融合率达到 80%左右时,用 0.25%胰蛋白酶消化,按 1:2 进行传代培养。取对数生长期,状态良好的膀胱癌细胞于 6 孔板中,待细胞长至 50%时按转染试剂说明书进行转染。

1.2.2 免疫组化 组织标本以 10%甲醛液固定 24 h,常规石蜡包埋,制备 4 μm 切片,贴附于涂有 APES 处理的载玻片上,85℃烤片 90 min,免疫组织化学染色:(1)石蜡切片脱蜡;(2)3% H₂O₂ 室温孵育 5~10 min,以清除内源性过氧化物酶的活性,蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5 min;(3)微波抗原修复;(4)5%~10%正常山羊血清封闭,室温孵育 10 min,倾去血清,分别滴加一抗工作液,37℃孵育 1~2 h,PBS 冲洗,5 min×3 次;(5)滴加生物素标记的二抗,37℃孵育 20~30 min,PBS 冲洗,5 min×3 次;(6)滴加辣根酶标记链酶卵白素,37℃孵育 20~30 min,PBS 冲洗,5 min×3 次;(7)DAB 显色;(8)自来水充分冲洗、复染、封片。用已知阳性标本作阳性对照,以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.2.3 Western blot 提取细胞总蛋白 用 BCA 法测定蛋白浓度,取 30~40 μg 总蛋白上样,经 SDS-PAGE 凝胶电泳后,转移至 PVDF 膜上。5%脱脂奶粉摇床上室温封闭 2 h,一抗 4℃孵育过夜,TBST 溶液洗 3 次,每次 15 min。HRP 标记的二抗按照 1:1 500 稀释,室温下孵育 1 h,使用 TBST 溶液洗 3 次,每次 15 min,滴加显色剂,置于曝光仪内显影。

1.2.4 荧光实时定量 PCR(qRT-PCR) 使用 Trizol 试剂法提取细胞 RNA,使用核酸定量分析仪测定 RNA 浓度,反转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,再使用荧光定量 PCR 分析仪对 cDNA 进行扩增检测,以 GAPDH 为内参,反应程序如下:94℃ 3 min(预变性),94℃ 30 s(变性),56℃ 30 s(退火),72℃ 60 s(延伸),72℃ 5 min(最后延伸),42~45 个循环。反应完成后软件分析结果(表 1)。

表 1 突变引物对

Tab 1 Mutation primers

基因	引物序列(5'-3')
Sox6	5'GGCGTCCCCCTACCCTGTCATCC3'
	5'TGCTGCACACGGCTCCTCAC3'
GAPDH	5'GGATTTGGTCTATTGGG3'
	5'GGAAGATGGTGATGGGATT3'

1.2.5 Transwell 实验 实验参照 Transwell 24 孔板(美国 Corning 公司)说明书操作。胰酶消化收集细胞,应用含 0.5%血清的培养基重悬细胞,接种细胞于铺好 Matrigel 基质胶的 Transwell 小室,使细胞数为 2×10⁴ 个/孔,下室加入 500 μL 含 10%血清的培养基。37℃培养箱中孵育 24 h 后,移去培养液,用乙醇棉签擦拭去除小室底膜内侧细胞,小心取出上室,用预冷的 50%甲醇固定 10 min,PBS 清洗 3 遍,结晶紫染色 10 min,于倒置荧光显微镜下观察 5 个视野的细胞数。

1.2.6 细胞划痕实验 处理后的单细胞悬液接种于 6 孔板内,待培养细胞至 90%,用 20 μL 移液枪头垂直划痕,无菌 PBS 冲洗悬浮细胞及碎片 2 次,培养 24 h 后,倒置显微镜观察划痕愈合情况。

1.2.7 细胞凋亡 实验细胞转染 48 h 后不含 EDTA 胰酶消化后,300 r/min,4℃离心 5 min 收集细胞,按照细胞凋亡试剂盒说明书加入结合缓冲液、Annexin V 和 PI,6 h 内在流式细胞仪上检测凋亡指数。

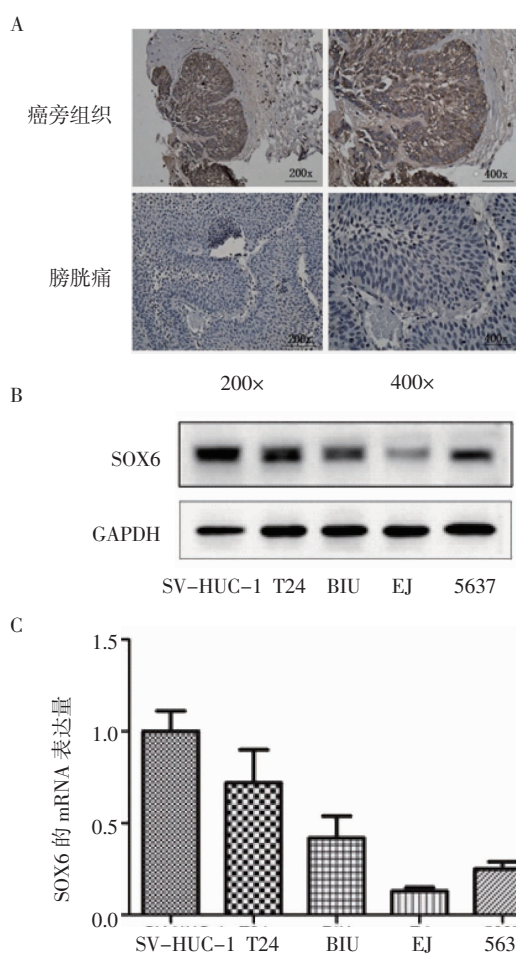
1.2.8 CCK-8 实验 96 孔板中加入 100 μL 细胞悬液,将培养板在培养箱中预培养 24 h,在 0、24、48、72 h 向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,将培养板在培养箱孵育 1~4 h,酶标仪读取待测样品和空白对照在 450 nm 处的 OD 值,将各待测样本的 OD 值记为测量值,空白对照的 OD 值记为空白值,则实际数值=测量值-空白值。

1.2.9 20 s 蛋白酶体活性检测实验 避光 96 孔板中加入 90 μL(8×10⁴)处理过的细胞,800 r/min 离心 2 min,按说明书加入相关试剂,37℃,5%CO₂ 过夜,在全波长多功能酶标仪上发射波长 490 nm 检测吸光度。

1.3 统计学方法 采用 GraphPad Prism 6 软件进行统计学分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 膀胱癌中 SOX6 表达水平 与癌旁组织相比膀胱癌组织中的染色强度显著减弱,可见 SOX6 蛋白表达在膀胱癌组织中明显降低。使用 Western blot 和 qRT-PCR 分别检测膀胱癌细胞和正常膀胱上皮细胞内 SOX6 蛋白水平与 mRNA 水平表达情况,结果显示膀胱癌细胞中 SOX6 的表达显著降低,在 EJ 和 5637 细胞尤其明显(图 1)。



A. SOX6 在癌旁组织和膀胱癌组织的表达(IHC,左侧 200 \times ,右侧 400 \times)
B,C. SOX6 在正常膀胱上皮细胞和膀胱癌细胞中蛋白水平和 mRNA 水平表达

图 1 SOX6 在组织和细胞器中的表达情况

Fig 1 The expression of SOX6 in tissues and cells

2.2 SOX6 抑制膀胱癌侵袭和迁移能力 Transwell 实验(图 2)和划痕实验(图 3)结果显示,与对照 vector 组相比,高表达 SOX6 后的 EJ 和 5637 细胞的侵袭能力显著下降。同时,上皮间质转化(EMT)的分子标记物 E-cadherin 蛋白表达升高,Vimentin 表达减低(图 4)。

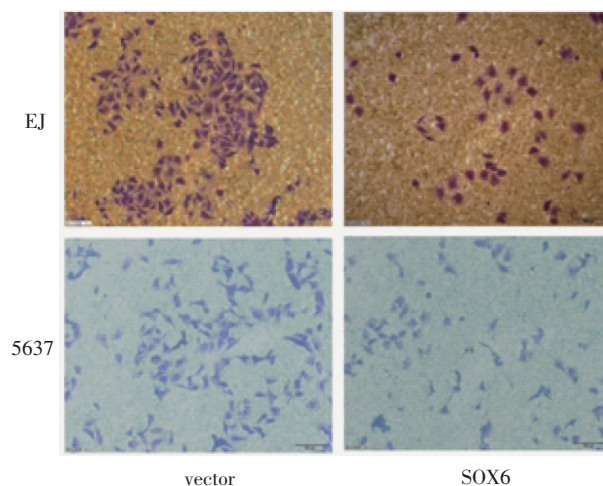


图 2 SOX6 表达增加对膀胱癌 EJ 和 5637 细胞的侵袭能力的影响(40 \times)
Fig 2 Effect of up-regulation SOX6 on invasion of EJ and 5637 (40 \times)

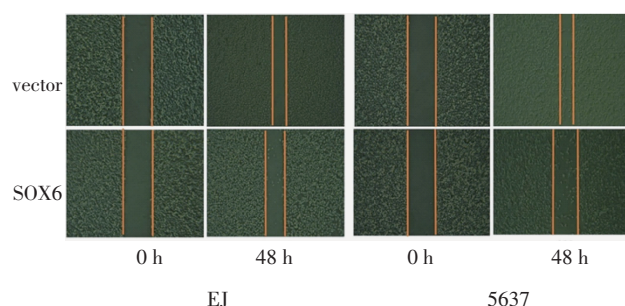


图 3 SOX6 表达增加对膀胱癌 EJ 和 5637 细胞的侵袭能力的影响(40 \times)
Fig 3 Effect of up-regulation SOX6 on migration of EJ and 5637 (40 \times)

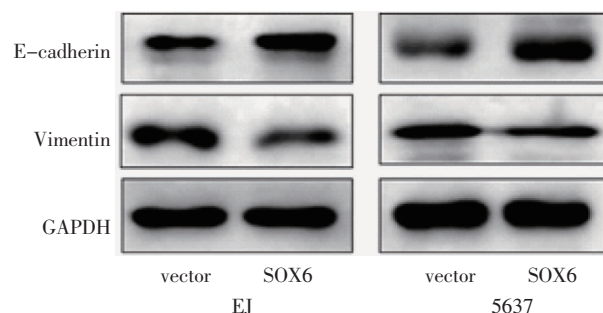
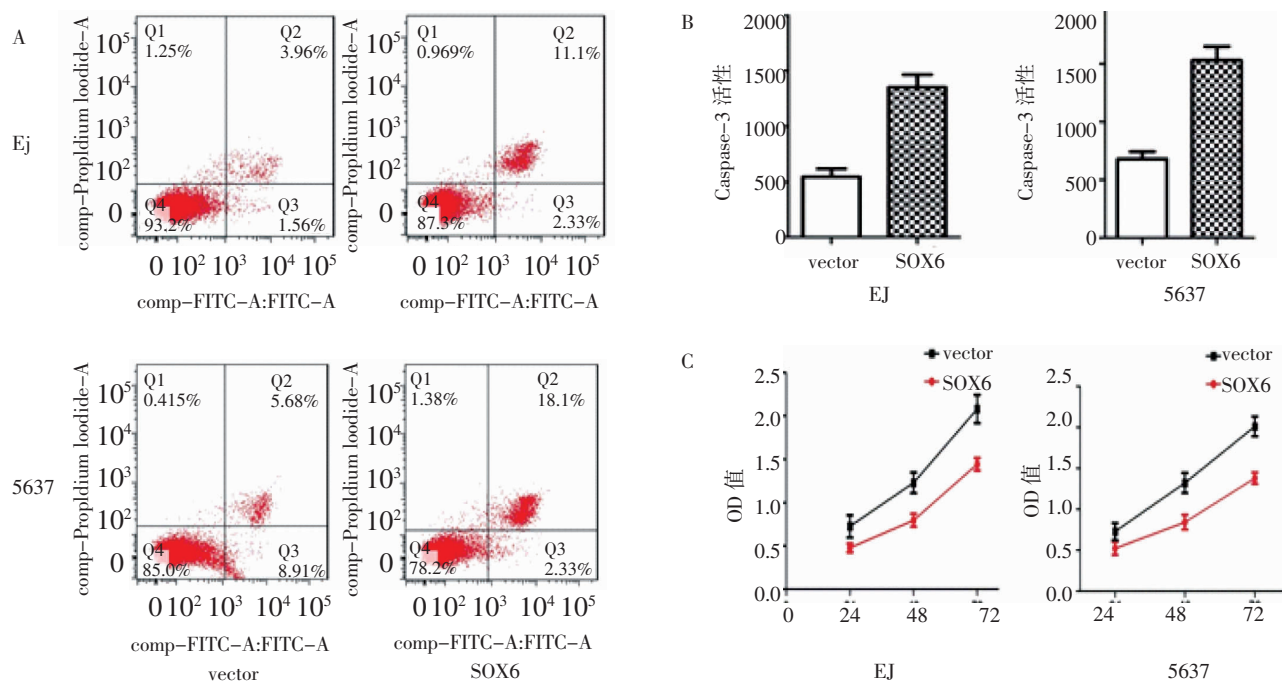


图 4 SOX6 表达增加对膀胱癌的上皮间质转化的影响
Fig 4 Influence of up-expression SOX6 on Epithelial-mesenchymal transition(EMT) of bladder cancer cells

2.3 SOX6 抑制膀胱癌的增殖和促进凋亡 CCK-8 实验和流式细胞术结果表明,与对照 vector 组相比,SOX6 表达增加后能够抑制膀胱癌细胞 EJ 和 5637 的增殖,并且能够促进膀胱癌的凋亡,同时细胞 caspase3 的活性显著增加(图 5)。

2.4 SOX6 能够通过蛋白酶体途径影响膀胱癌的进程 与正常膀胱上皮细胞相比膀胱癌细胞 EJ 与 5637 的 20 s 蛋白酶体的活性相对增加,在膀胱癌细胞中调高 SOX6 的表达量后,20 s 蛋白酶体的活性显著减低(图 6)。



A.流式细胞实验检测细胞凋亡比例;B.细胞 caspase3 活性;C.CCK-8 实验检测增殖能力

图 5 SOX6 表达增加对膀胱癌 EJ 和 5637 细胞的凋亡和增殖能力影响

Fig 5 Influence of up-expression SOX6 on apoptosis and proliferation of EJ and 5637

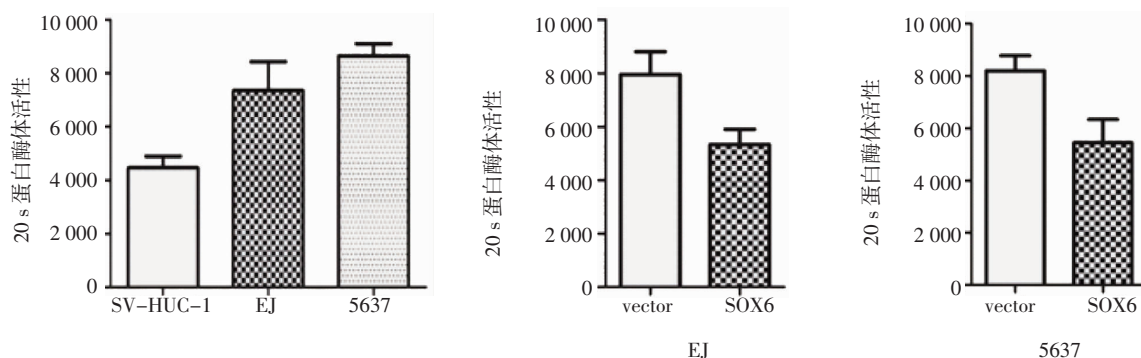


图 6 SOX6 表达增加对膀胱癌 EJ 和 5637 细胞的 20 s 蛋白酶体活性的影响

Fig 6 Influence of up-expression SOX6 on the activity of 20S proteasome of EJ and 5637

3 讨论

SOX6 作为多功能转录因子,主要调节组织分化并参与多种恶性肿瘤的发生发展。研究表明,SOX6 的表达量与食管癌的预后显著相关,通过上调 p53 和 p21WAF1/CIP1 抑制食管癌的致瘤能力^[8]。在胰腺癌中,SOX6 通过抑制上皮间质转化和 AKT 通路抑制肿瘤的增殖和侵袭^[9]。SOX6 的表达抑制卵巢癌的增殖、侵袭、移植瘤生长和血管生成^[6]。但是,SOX6 和膀胱癌的关系目前还不清楚。

近年来,对于蛋白酶体的研究日益渐增,蛋白酶体作为一个多亚基大分子复合物,具有多种催化功能,能选择性降解细胞内的蛋白质,是细胞新陈代谢的一个重要组成部分^[10]。相对于正常的细胞,肿瘤细胞对蛋白酶体抑制剂更加敏感,通过影响肿瘤

细胞的相关通路从而抑制肿瘤细胞,同时,多种肿瘤中的蛋白酶体处于高活性状态^[17]。因此,蛋白酶体逐渐成为抗肿瘤药物的一个靶点,当蛋白酶体活性被抑制时,肿瘤抑制蛋白 p53 的含量增加,促进细胞凋亡;免疫相关蛋白降解减少,免疫监视能力增加。

在本研究中,笔者发现了与膀胱的正常组织相比,膀胱癌中 SOX6 处于低表达状态,在体外实验中,通过增加 SOX6 的表达,发现膀胱癌的增殖、侵袭、迁移能力下降,凋亡增加。并进一步验证了蛋白酶体在膀胱癌中的活性情况,通过调高 SOX6,意外发现膀胱癌细胞中的蛋白酶体活性减低。SOX6 可能通过抑制蛋白酶体活性从而调节膀胱癌的肿瘤行为,在联合蛋白酶体抑制剂治疗膀胱癌方面有很好的前景。

参考文献:

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer Statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1): 7
- [2] Kamat A M, Hahn N M, Efstathiou J A, et al. Bladder cancer[J]. Lancet (London, England), 2016, 388(10061): 2796
- [3] Rose T L, Milowsky M I. Improving Systemic Chemotherapy for Bladder Cancer [J]. Curr Oncol Rep, 2016, 18(5): 27
- [4] Kamachi Y, Kondoh H. Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation[J]. Development (Cambridge, England), 2013, 140(20): 4129
- [5] Sarkar A, Hochedlinger K. The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate[J]. Cell stem cell, 2013, 12(1): 15
- [6] Li Y, Xiao M, Guo F. The role of Sox6 and Netrin-1 in ovarian cancer cell growth, invasiveness, and angiogenesis[J]. Tumour Biol, 2017, 39(5): 1010428317705508
- [7] Yu Y, Wang Z, Sun D, et al. miR-671 promotes prostate cancer cell proliferation by targeting tumor suppressor SOX6[J]. Eur J Pharmacol, 2018, 823: 65
- [8] Qin Y R, Tang H, Xie F, et al. Characterization of tumor - suppressive function of SOX6 in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(1): 46
- [9] Jiang W, Yuan Q, Jiang Y, et al. Identification of Sox6 as a regulator of pancreatic cancer development[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(3): 1864
- [10] 刘恩令,周玉秀,王立群,等. 过表达 SOX6 基因对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、凋亡的影响及其机制[J]. 山东医药, 2018, 58(20): 39
- [11] Wang Z, Li J, Li K, et al. SOX6 is downregulated in osteosarcoma and suppresses the migration, invasion and epithelial -mesenchymal transition via TWIST1 regulation [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(5): 6803
- [12] Li Y C, Li C F, Chen L B, et al. MicroRNA-766 targeting regulation of SOX6 expression promoted cell proliferation of human colorectal cancer [J]. Onco Targets Ther, 2015, 8: 2981
- [13] Elenich L A, Nandi D, Kent A E, et al. The complete primary structure of mouse 20S proteasomes[J]. Immunogenetics, 1999, 49(10): 835
- [14] Mittenberg A G, Moiseeva T N, Kuzyk V O, et al. Mass-spectrometric analysis of proteasomal subunits possessing endoribonuclease activity[J]. Tsitologiia, 2014, 56(4): 300
- [15] Li Y, Huang J, Sun J, et al. The transcription levels and prognostic values of seven proteasome alpha subunits in human cancers[J]. Onco-target, 2017, 8(3): 4501
- [16] Collins G A, Goldberg A L. The Logic of the 26S Proteasome[J]. Cell, 2017, 169(5): 792
- [17] Voutsadakis I A, Papandreou C N. The ubiquitin-proteasome system in prostate cancer and its transition to castration resistance[J]. Urol Oncol, 2012, 30(6): 752

(2018-10-12 收稿)

(上接第 368 页)

评价 NLR 对 RA 的诊断性能。其对比结果显示, ACCP 的敏感度与特异度均最高, 为诊断 RA 的最佳血清学指标。NLR 的 AUC、敏感度、特异度与 ACCP 和 RF 相比稍差, 与 CRP 相差不大, 但同样属于中等诊断价值, 因此均可用来诊断 RA。

综上所述, NLR 可被作为诊断 RA 的一种新的炎症指标, 对区分 RA 患者与健康人及评估 RA 患者的炎症程度有一定的预测价值。由于本实验所选取样本量相对较少, 且未对 RA 患者分型作细致研究, 需要日后积累相当量的 RA 患者标本做更广泛细致研究来正式确立 NLR 对 RA 的病情评估价值。

参考文献:

- [1] Phuan-Udom R, Lektrakul N, Katchamart W. The association between 10-year fracture risk by FRAX and osteoporotic fractures with disease activity in patients with rheumatoid arthritis[J]. Clin Rheumatol, 2018, 37(10): 2603
- [2] Thenganatt M A, Jankovic J. Parkinson disease subtypes[J]. JAMA Neurol, 2014, 71(4): 499
- [3] Yu L, Lv C Y, Yuan A H, et al. Significance of the preoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio in the prognosis of patients with gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(20): 6280
- [4] Wang X, Fan X, Ji S, et al. Prognostic value of neutrophil to lymphocyte ratio in heart failure patients[J]. Clin Chim Acta, 2018, 485: 44
- [5] Lattanzi S, Cagnetti C, Provinciali L, et al. Neutrophil-to-Lymphocyte ratio predicts the outcome of acute intracerebral hemorrhage[J]. Stroke, 2016, 47(6): 1654
- [6] Cheon Y H, Lee S G, Kim M, et al. The association of disease activity, pro-inflammatory cytokines, and neurotrophic factors with depression in patients with rheumatoid arthritis[J]. Brain Behav Immun, 2018, 73: 274
- [7] Huang X E, Auinger P, Eberly S, et al. Serum cholesterol and the progression of parkinson's disease: results from DATATOP[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e22854
- [8] Wang L Q, Wang Y E, Xia L P, et al. Elevated frequency of IL-37- and IL-18R alpha-positive T cells in the peripheral blood of rheumatoid arthritis patients[J]. Cytokine, 2018, 110: 291
- [9] Cecchi I, de la Rosa I A, Meneqatti E, et al. Neutrophils: novel key players in rheumatoid arthritis. current and future therapeutic targets[J]. Autoimmun Rev, 2018, pii: S1568-9972(18)30216-7. doi:10.1016/j.autrev.2018.06.006
- [10] 彭婉娟,李婷婷,汪维. 中性粒细胞与淋巴细胞计数比值对类风湿关节炎的预测价值分析[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(15): 2089
- [11] Acarturk G, Acay A, Demir K, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio in inflammatory bowel disease-as a new predictor of disease severity[J]. Bratisl Lek Listy, 2015, 116(4): 213
- [12] Mercan R, Bitik B, Tufan A, et al. The association between neutrophil/lymphocyte ratio and disease activity in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis[J]. J Clin Lab Anal, 2015, 30(5): 597

(2018-09-27 收稿)