

论著·基础研究

膜蛋白 NMHC II A 的表达对膀胱癌细胞侵袭和转移的影响*

熊丹,许晓清,阚丽娟,汤花梅,李育敏,张水兰,李芳勇,莫红梅,张秀明[△]

(深圳大学第三附属医院医学检验科,广东深圳 518001)

摘要:目的 近年来,非肌肉肌浆球蛋白重链 II A(NMHC II A)在肿瘤细胞中的作用备受关注。笔者团队前期研究发现高表达的 NMHC II A 可以作为预示膀胱癌患者不良预后的分子标志物,但其在膀胱癌发生发展过程中的作用尚不清楚。**方法** 采用实时荧光定量 PCR 和 western blot 分析膀胱癌细胞株中 NMHC II A 的表达情况,采用划痕实验检测细胞的迁移能力及 Transwell 侵袭实验检测细胞的侵袭能力。**结果** 沉默内源性 NMHC II A 表达后能降低膀胱癌细胞侵袭及转移能力。**结论** NMHC II A 可促进膀胱癌细胞侵袭及转移能力。

关键词: NMHC II A; 膀胱癌; 侵袭; 转移**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.11.001**中图法分类号:** R737.14**文章编号:** 1673-4130(2018)11-1281-05**文献标识码:** A**The effect of membrane protein NMHC II A on invasion and metastasis of bladder cancer cells***

XIONG Dan, XU Xiaoqing, KAN Lijuan, TANG Huamei, LI Yumin, ZHANG Shuilan,

LI Fangyong, MO Hongmei, ZHANG Xiuming[△]

(Department of Clinical Laboratory, the Third Affiliated Hospital of Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518001, China)

Abstract: Objective Non-muscle myosin heavy chain II A (NMHC II A) plays a significant role in tumor progression and metastasis. Our prior study showed that the expression of NMHC II A was much higher in human bladder cancer sample than that in adjacent tissue. The increased level of NMHC II A expression was correlated with worse prognosis. However, the role of NMHC II A is unknown in the invasion and metastasis of bladder cancer. **Methods** RT-PCR and western blotting were used to examine NMHC II A expression levels in normal bladder epithelial cells and bladder cancer cell lines. The migration and invasion ability of cells was tested by wound healing assay and Transwell invasion assay, respectively. **Results** Our study showed that knockdown of NMHC II A inhibited migration and invasion in bladder cancer cell line. **Conclusion** The study indicated that NMHC II A expression increased the invasion and metastasis ability of bladder cancer cell line in vitro.

Key words: non-muscle myosin heavy chain II A; bladder cancer; invasion; metastasis

膀胱癌是指发生在膀胱黏膜上的恶性肿瘤,是泌尿系统最常见的恶性肿瘤,在中国膀胱癌的发病率位于全身恶性肿瘤的第 9 位^[1]。虽然大多数患者均是浅表性膀胱肿瘤,但其中 50%~70% 患者术后会复发,并且 10%~30% 会进展为肌层浸润性疾病(伴区域淋巴结转移或远处转移)^[2-3]。膀胱癌术后易复发和转移是导致膀胱癌预后不佳的重要因素,目前,病理分级和临床分期对膀胱癌诊治有显著的预测效果,

并且肿瘤的数量和淋巴管浸润与手术后的复发进展相关,然而,膀胱癌的预后仍缺乏有效的生物标志物。

非肌肉肌浆球蛋白 II A(NM II A)是属于肌球蛋白 II 亚家族的一种肌动蛋白结合蛋白,由其重链和轻链的磷酸化调节^[4],主要参与调控细胞黏附,细胞迁移和组织架构^[5]。非肌肉肌浆球蛋白重链 II A(NMHC II A)是 NM II A 的一个亚基,由位于 22q11.2 染色体上的全长 1 960 个氨基酸的 MYH9

* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81502344);国家自然科学基金面上项目(81772921);上海市科委医学引导类科技项目(15411969200);深圳市卫生和计划生育委员会学科建设能力提升项目(SZJ2017018);深圳市医疗卫生三名工程(SZSM201601062)。

作者简介:熊丹,女,主管技师,主要从事肿瘤标志物的筛查和肿瘤发病机制的研究。△ 通信作者,E-mail: zxm0760@163.com。

本文引用格式:熊丹,许晓清,阚丽娟,等.膜蛋白 NMHC II A 的表达对膀胱癌细胞侵袭和转移的影响[J].国际检验医学杂志,2018,39(11):1281-1285.

基因编码^[6]。笔者团队前期研究发现膀胱癌组织中 NMHC II A 的表达显著高于癌旁组织,其表达水平与病理分级及淋巴结转移相关;并且高表达的 NMHC II A 可以作为预示膀胱癌患者不良预后的分子标志物^[7],但其在膀胱癌发生发展过程中的作用尚不清楚。本研究应用 siRNA 技术沉默 NMHC II A,观察其对膀胱癌细胞株侵袭和转移的影响,为膀胱癌个体化治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 原代培养来源于正常膀胱组织的细胞株 P01 由中山大学肿瘤防治中心 633 室馈赠,培养于 KSM 培养基中(美国 Life Technology 公司)。膀胱癌细胞株 BIU87、T24 和 J82 及乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 由本室保存,以含 10% 胎牛血清(美国 GIBCO 公司)及青/链霉素的 RPMI1640 或 DMEM 完全培养基(美国 GIBCO 公司),在 37 °C, 5% CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)中常规培养。

1.2 Lipofectamine RNAi MAX 转染 采用 Lipofectamine RNAi MAX(美国 Invitrogen 公司)转染试剂沉默膀胱癌细胞株 T24 和乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 中的 NMHC II A 的表达。双链 RNA 的负对照(si-NC),干扰 NMHC II A-1# 和 NMHC II A-2# 的序列均由上海吉玛公司合成(si-NMHC II A-1# 和 si-NMHC II A-1#);合成的小分子干扰 RNA 序列如下: si-NC Sense: 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UdT dT-3'; si-NMHC II A-1# Sense: 5'-CCU GCC CAU CUA CUC UGA AdT dT-3'; si-NMHC II A-2# Sense: 5'-GGA GCG UUA CUA CUC AGG GdT dT-3。用 RNAase-Free H₂O 稀释 siRNA, 10 μmol/L 的储存液;以 6 孔板转染为例,转染前一天消化细胞铺板 1.25 × 10⁵ 个/孔细胞。2 mL 的含 5% FBS 的无双抗 RPMI1640 培养基;将 10 μL 10 μmol/L 小分子 RNA 稀释于 200 μL opti-MEM 中,轻敲管壁混匀;将 5 μL Lipofectamine RNAi MAX 稀释于 200 μL opti-MEM 中,轻敲管壁混匀;RNAi MAX/siRNA 混合物室温放置 15 min;加入到细胞中,然后培养箱中培养 48 h 后一部分细胞收样检测 RNAi 的干扰效果,进一步进行功能研究。

1.3 RNA 提取及实时荧光定量 PCR 分别收集正常膀胱组织的细胞株 P01,膀胱癌细胞株 BIU87、T24 和 J82 及乳腺癌细胞株 MDA-MB-231,采用 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂提取细胞中 RNA。分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)检测 A260/A280 的比值以验证 RNA 纯度。各样本均取 2 μg 进行反转录,将逆转录产物 cDNA 进行实时荧光定量

PCR。NMHC II A 上游引物: 5'-CCA TCA CAG ACA CCG CCT ACA G-3', 下游引物为: 5'-CTT CTT GGT GTT CTC CGT CTT GC-3'。GAPDH 上游引物: 5'-CTC CTC CTG TTC GAC AGT CAG C-3', 下游引物为: 5'-CCC AAT ACG ACC AAA TCC GTT-3'。实时荧光定量 PCR 反应程序:(1) 50 °C 2 min;(2) 95 °C 预变性 10 min;(3) 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火与延伸 1 min, 40 个循环。ABI7500 荧光定量 PCR 仪上进行反应。相对定量实验采用 CT 值比较法,以 GAPDH 作为内参。

1.4 western blot 法检测蛋白的表达 提取细胞的总蛋白,采用 BCA(标准曲线)法定量蛋白后,准备浓度为 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶,进行电泳,通过电转膜法将蛋白转至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 或 4 °C 封闭过夜后,加入相应的一抗及二抗,ECL 显色、X 线光片压片,显影、定影。以 GAPDH 为内参照。一抗: anti-NMHC II A 兔多克隆抗体(英国 Abcam 公司),GAPDH 抗体(中国上海康成公司);二抗: 过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L) 和 过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG(H+L) 购于美国 Jackson Laboratory 公司。

1.5 划痕损伤修复实验 将进入对数生长期的细胞胰酶消化处理,离心,弃上清,以 10% 的胎牛血清的 DMEM 完全培养基重悬细胞,计数细胞并调整至所需细胞的浓度,接种单细胞悬液于 6 孔板中,每孔细胞数为 2.5 × 10⁵ 个;然后换无血清 DMEM 培养基,使细胞饥饿 24 h;细胞贴壁率达 100% 时,用 100 μL 无菌枪头在每个孔中长满的单层细胞上迅速而轻轻地划 1~2 道痕,1 × PBS 冲洗去掉脱落的细胞,换无血清的培养基继续培养。在显微镜下观察划痕修复的过程,分别取 0 h 和 24 h, 2 个时间点拍照记录,比较不同细胞划痕修复速度和方式的差异。使用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量各组细胞任意 3 个部位划痕宽度,计算各组的相对迁移率,以反映细胞运动迁移能力。

1.6 Transwell 侵袭实验 将 5.0 × 10⁴ 个对数期生长的细胞接种于 Matrigel 包被的 Transwell 小室中,小室内的培养基为无血清的 DMEM,体积 200 μL,然后于小室外即 24 孔板的孔内加入 500 μL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,以提供细胞侵袭运动的趋化因子,继续培养 24 h。自 24 孔板中取出 Transwell 小室,1 × PBS 轻轻冲洗 2 次,棉签轻轻拭去上室面细胞,经甲醛固定、结晶紫染色;显微镜下观察穿过 Matrigel 及微孔至滤膜反面的细胞,于 200 倍光学显微镜下计数 10 个视野的细胞,取平均值,以迁移细胞数目来表示肿瘤细胞的侵袭能力。

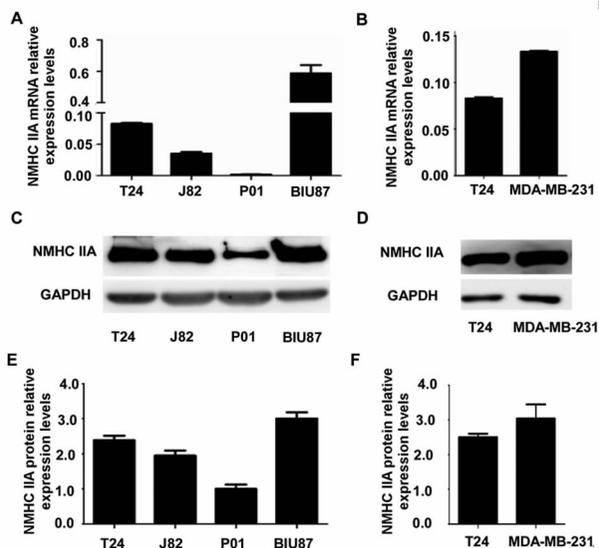
1.7 统计学处理 统计分析软件采用的是 SPSS 16.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) 和 GraphPad Prism5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)。将 western blot 的图片采集,并用 Image J 软件对图像进行灰度分析,每个实验重复 3 次取平均值,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。不同检测组或实验组之间均值的比较采用 Student *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NMHC II A 在膀胱癌细胞和乳腺癌细胞中的表达 在转录水平和翻译水平上检测来源于正常膀胱组织的原代培养细胞株 P01、膀胱癌细胞株 (T24、J82 和 BIU87) 和乳腺癌细胞株 (MDA-MB-231) 中 NMHC II A 的表达情况。实时荧光定量 PCR 结果显示,与来源于正常膀胱组织的原代培养细胞株 P01 相比,膀胱癌细胞株 T24、J82 和 BIU87 中 NMHC II A 的表达水平明显增高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 1A)。高转移的膀胱癌细胞株 BIU87 中 NMHC II A 的表达水平明显高于低转移膀胱癌细胞株 J82 中 NMHC II A 的表达,T24 的表达水平居中 (图 1A)。western blot 结果显示相同的趋势,以 P01 细胞株中 NMHC II A 的表达量 (1.0 ± 0.12) 做对照,NMHC II A 在膀胱癌细胞株 T24 和 BIU87 的表达量分别为 2.4 ± 0.12 和 3.0 ± 0.17 (图 1C、E)。另外在高转移乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 中 NMHC II A 在 RNA 和蛋白水平的表达也非常高,高于 T24 的表达水平 (图 1B、D、E)。表明高转移的细胞株中 NMHC II A 的 RNA 和蛋白水平上的表达都比较高。

2.2 SiRNA 沉默膀胱癌和乳腺癌细胞株内源性 NMHC II A 的表达 在膀胱癌细胞株 T24 中,实时荧光定量 PCR 检测发现,与 si-NC 相比,si-NMHC II A-1 # 和 si-NMHC II A-2 # 干扰效率基本一致,为 81%,T24/siNMHC II A-1 和 T24/siNMHC II A-2 细胞中 NMHC II A 的 RNA 水平表达明显降低 (图 2A); western blot 检测发现,与 T24/control siRNA (1.00 ± 0.05) 相比, T24/siNMHC II A-1 (0.55 ± 0.03) 和 T24/siNMHC II A-2 (0.59 ± 0.07) 细胞中 NMHC II A 蛋白表达量降低 40% 左右,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 2B、C)。在乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 中,实时荧光定量 PCR 检测发现,与 si-NC 相比,si-NMHC II A-1 # 和 si-NMHC II A-2 # 的干扰效率分别为 88% 和 85% (图 2A); western blot 检测发现,si-NC 对照组为 (1.00 ± 0.07), si-NMHC II A-1 # 的 NMHC II A 相对蛋白表达量为 (0.34 ± 0.03), si-NMHC II A-2 # 的 NMHC II A 相对蛋白表

达量为 (0.28 ± 0.02), 干扰效率达到 70% 左右 (图 2B、C)。这些结果表明 si-NMHC II A-1 # 和 si-NMHC II A-2 # 的干扰效率能满足后续的功能实验的研究。



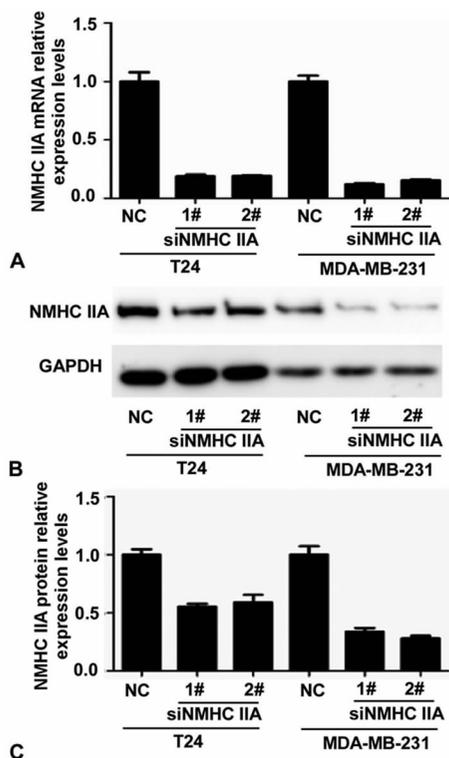
注:A、B 表示实时荧光定量 PCR 检测来源于正常膀胱组织的原代培养细胞与膀胱癌细胞 T24、J82 和 BIU87 及乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 中 NMHC II A 的表达情况;C、D 表示 western blot 分析上述细胞中 NMHC II A 的表达情况;E、F 表示 Image J 软件分析上述细胞中 NMHC II A 的相对蛋白表达情况

图 1 NMHC II A 在膀胱癌和乳腺癌细胞株中的表达情况

2.3 抑制内源性 NMHC II A 的表达降低膀胱癌和乳腺癌细胞体外迁移能力 采用划痕实验来检测抑制内源性 NMHC II A 的表达后细胞株的迁移能力。划痕实验表明,MDA-MB-231-si-NMHC II A-1 # 和 MDA-MB-231-si-NMHC II A-2 # 细胞的相对迁移率分别为 22.1% 和 30.7%,远低于对照的相对迁移率 (56.5%) (图 3A、C),且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照 T24-si-NC 的迁移率 56.1% 相比, T24-si-NMHC II A-1 # 和 T24-si-NMHC II A-2 # 细胞的相对迁移率分别为 30.1% 和 27.9% (图 3B、D),差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。这些表明 NMHC II A 蛋白的表达能促进膀胱癌细胞株 T24 和乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 的迁移。

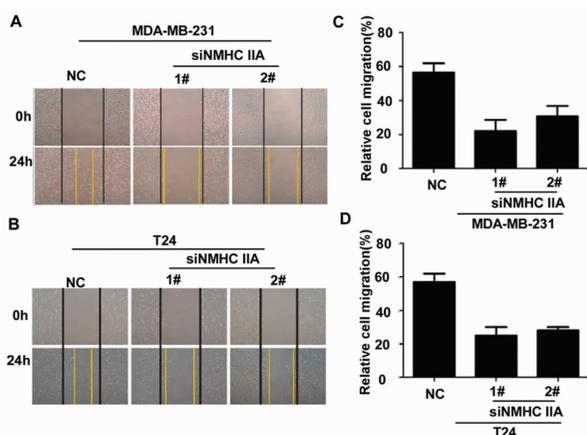
2.4 抑制内源性 NMHC II A 的表达降低膀胱癌和乳腺癌细胞体外侵袭能力 Transwell 侵袭实验显示,MDA-MB-231-si-NMHC II A-1 # 和 MDA-MB-231-si-NMHC II A-2 # 细胞株迁移至下室的细胞数目分别为 (92.50 ± 4.95)、(94.00 ± 7.07) 个细胞,分别显著少于 MDA-MB-231-si-NC (156.00 ± 8.49) 细胞的量 (图 4A、C),差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照 T24-si-NC (117.00 ± 12.73) 相比, T24-si-NMHC II A-1 # 和 T24-si-NMHC II A-2 # 细胞株迁

移至下室的细胞数目分别为(58.00±1.41、51.50±10.61)个细胞(图 4B、D),差异有统计学意义($P < 0.05$)。NMHC II A 干扰后 MDA-MB-231 细胞穿过侵袭小室微孔膜的能力降低了 1~2 倍(图 4A、C), T24 细胞的侵袭能力则降低了大约 2 倍(图 4B、D)。这些结果表明, NMHC II A 基因的存在对肿瘤细胞的侵袭非常重要。



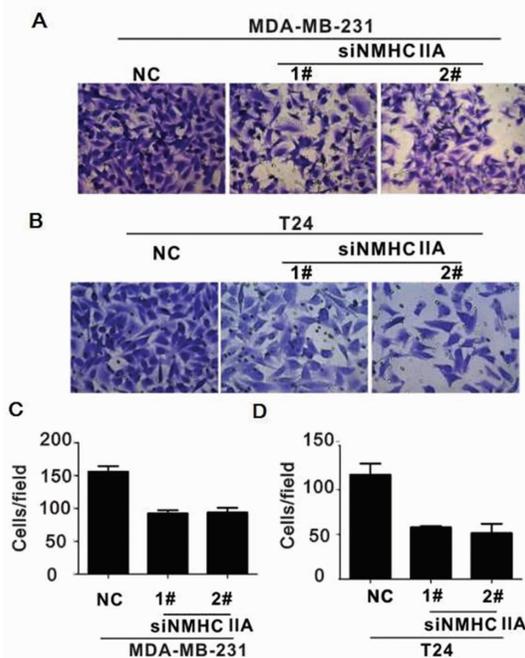
注:A 表示实时荧光定量 PCR 检测小分子 siRNA 干扰 NMHC II A 的情况;B 表示 western Blot 检测小分子 siRNA 干扰 NMHC II A 的情况;C 表示 Image J 软件分析小分子 siRNA 干扰 NMHC II A 的相对蛋白表达情况

图 2 实时荧光定量 PCR 和 western Blot 检测小分子 siRNA 干扰 NMHC II A 的情况



注:A、C 表示划痕实验验证 NMHC II A 对 MDA-MB-231 细胞迁移能力的影响,放大倍数 50×;B、D 表示划痕实验验证 NMHC II A 对 T24 细胞迁移能力的影响,放大倍数 50×

图 3 抑制内源性 NMHC II A 的表达降低膀胱癌和乳腺癌细胞体外迁移能力



注:A、C 表示 Transwell 实验验证 NMHC II A 对 MDA-MB-231 细胞侵袭能力的影响,放大倍数 200×;B、D 表示 Transwell 实验验证 NMHC II A 对 T24 细胞侵袭能力的影响,放大倍数 200×

图 4 抑制内源性 NMHC II A 的表达降低膀胱癌和乳腺癌细胞体外侵袭能力

3 讨论

膀胱癌是从诊断到治疗过程中花费费用最多的肿瘤之一,相同的临床病理阶段的膀胱癌患者采用膀胱根治术的治疗方案在生存率方面具有相当大的变异性^[2],因此,迫切需要发现更多的能够更好地为肿瘤诊断、治疗和预后判断的分子标志物和靶点。研究报道 NMHC II A 的表达可以作为 I 期肺腺癌和胃癌的不良预后指标^[8-9]。另一项研究表明 NMHC II A 在非小细胞肺癌中表现出更恶性的性质,并且 NMHC II A 的表达可以作为非小细胞肺癌的不良预后指标^[10]。笔者团队前期研究发现膀胱癌组织中 NMHC II A 的表达显著高于癌旁组织,其表达水平与病理分级及淋巴结转移相关,进一步发现高表达的 NMHC II A 可以作为预示膀胱癌患者不良预后的分子标志物^[7]。本研究发现在来源于正常膀胱组织的原代培养细胞株中 NMHC II A 的表达最低,相对低转移的 J82 表达较低,在具有高转移潜能的 BIU87 细胞中表达水平最高,T24 的表达水平居中,另外在高转移乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 的表达水平也非常高,更加证实了笔者团队前面的研究结果。

研究表明 NMHC II A 在肿瘤细胞浸润中发挥重要的作用,依赖表皮生长因子的 NMHC II A 磷酸化具有直接调节人类乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的运动性和趋化性的功能^[11],并且它是有助于乳腺癌侵袭和转移 SRF 基因的靶标^[12]。另一项研究表明 MicroR-

NA-647 的过表达能抑制胃癌细胞的侵袭和转移,该 MicroRNA 主要是通过靶向 SRF-MYH9 轴^[13]。本研究采用小分子 siRNA 沉默 T24 和 MDA-MB-231 中的 NMHC II A 的表达,发现沉默内源性 NMHC II A 的表达后能降低膀胱癌细胞和乳腺癌细胞侵袭及转移能力,说明这种分子与膀胱癌和乳腺癌的侵袭转移有关。这与文献报道 NMHC II A 是乳腺癌的候选癌基因,有助于乳腺癌侵袭转移的结论一致^[11]。文献报道 MYH9 通过与 Thy28 相互作用从而影响 PAX5 的表达^[14],通过 Myh9-Rac1-PAK1-Akt 信号轴发挥调控基因的功能^[15]。本研究发现抑制内源性 NMHC II A 的表达可以降低膀胱癌体外侵袭和转移能力,以此为基础,将进一步探索膀胱癌侵袭转移的分子机制和涉及到的相关信号通路。

结合目前的研究结果, NMHC II A 可能成为膀胱癌侵袭转移的一个临床指标,有望成为膀胱癌治疗的一个良好靶点,为膀胱癌的基因治疗提供可能,但其相关的分子机制及在膀胱癌治疗中的应用价值尚需进一步探讨。

参考文献

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66: 115-132.
- [2] TRENTA P, CALABRÒ F, CERBONE L, et al. Chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer [J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2016, 17(1): 6.
- [3] WOLDU S L, BAGRODIA A, LOTAN Y. Guideline of guidelines: non-muscle-invasive bladder cancer [J]. *BJU Int*, 2017, 119(3): 371-380.
- [4] VICENTE-MANZANARES M, MA X, ADELSTEIN R S, et al. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(11): 778-790.
- [5] AR II J, GOTO H, SUENAGA T, et al. Non-muscle myosin II A is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1 [J]. *Nature*, 2010, 467(7317): 859-862.
- [6] SIMONS M, WANG M, MCBRIDE O, et al. Human non-

muscle myosin heavy chains are encoded by two genes located on different chromosomes [J]. *Circ Res*, 1991, 69(2): 530-539.

- [7] XIONG D, YE Y L, CHEN M K, et al. Non-muscle myosin II is an independent predictor of overall survival for cystectomy candidates with early-stage bladder cancer [J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(5): 1625-1632.
- [8] LIU D, ZHANG L, SHEN Z, et al. Clinicopathological Significance of NM II A Overexpression in Human Gastric Cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(11): 15291-15304.
- [9] MAEDA J, HIRANO T, OGIWARA A, et al. Proteomic analysis of stage I primary lung adenocarcinoma aimed at individualisation of postoperative therapy [J]. *Br J Cancer*, 2008, 98(3): 596-603.
- [10] KATONO K, SATO Y, JIANG S X, et al. Prognostic significance of MYH9 expression in resected non-small cell lung cancer [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0121460.
- [11] DULYANINOVA N G, HOUSE R P, BETAPUDI V, et al. Myosin-II A heavy-chain phosphorylation regulates the motility of MDA-MB-231 carcinoma cells [J]. *Mol Biol Cell*, 2007, 18(8): 3144-3155.
- [12] MEDJKANE S, PEREZ-SANCHEZ C, GAGGIOLI C, et al. Myocardin-related transcription factors and SRF are required for cytoskeletal dynamics and experimental metastasis [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(3): 257-268.
- [13] YE G, HUANG K, YU J, et al. MicroRNA-647 Targets SRF-MYH9 Axis to Suppress Invasion and Metastasis of Gastric Cancer [J]. *Theranostics*, 2017, 7(13): 3338-3353.
- [14] FUJITA T, KITAURA F, FUJII H. A critical role of the Thy28-MYH9 axis in B cell-specific expression of the Pax5 gene in chicken B cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10(1): e0116579.
- [15] ZHAO B, QI Z, LI Y, et al. The non-muscle-myosin-II heavy chain Myh9 mediates colitis-induced epithelium injury by restricting Lgr⁵⁺ stem cells [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7166.

(收稿日期: 2018-01-12 修回日期: 2018-03-22)