

RT-PCR Array技术筛选膀胱癌癌症 相关信号通路基因的表达变化

杨珂¹, 傅斌^{1,2}, 王义兵¹, 王共先^{1,2}, 李军华¹, 刘仁升¹, 齐雪亮¹, 黄亮¹

1. 南昌大学第一附属医院泌尿外科, 江西 南昌 330006;
2. 江西省泌尿外科研究所, 江西 南昌 330006

[摘要] 背景与目的: 膀胱癌是泌尿外科最常见肿瘤疾病, 其发病机制至今尚未完全明了。本研究旨在观察正常膀胱组织与膀胱癌组织众多肿瘤相关信号通路关键基因的表达情况, 为后续进一步深入研究膀胱癌复发与转移提供证据。方法: 收集27例膀胱癌患者标本, 液氮保存, 冰冻切片法分离膀胱癌组织与正常膀胱组织, 用德国QIAGEN公司Cancer Pathway Finder PCR Array板筛选与癌症相关信号通路中的84个基因在膀胱癌组织和正常膀胱组织中的表达情况。结果: 与正常膀胱组织相比, 膀胱癌组织中上调基因8个, 下调基因19个。本研究选择影响上皮细胞间质化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的信号通路作为研究方向, 其中*GSC*、*KRT14*和*DSP*上调, *SNAI2*和*SNAI3*下调。因此, 选定*GSC*、*KRT14*、*DSP*、*SNAI2*和*SNAI3*作为兴趣基因, 并对其进行多样本荧光定量qRT-PCR验证。结果表明: *GSC*在膀胱癌组织中上调, 但与正常膀胱组织表达相比, 差异无统计学意义($P>0.05$)。 *KRT14*和*DSP*在膀胱癌中表达高于正常组织($P<0.05$), *SNAI2*和*SNAI3*在膀胱癌中表达低于正常膀胱组织($P<0.05$), 且*SNAI3*表达差异最为明显。结论: 基因*KRT14*、*DSP*及*SNAI3*可能与膀胱癌发生、发展及转移有密切关系, 可能成为基因治疗膀胱癌的重要靶点。

[关键词] RT-PCR Array; 膀胱癌; 信号通路

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2015.07.003

中图分类号: R737.14 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2015)07-0505-06

The expression changes of cancer-related pathways genes screened by RT-PCR Array in bladder cancer YANG Ke¹, FU Bin^{1,2}, WANG Yibing¹, WANG Gongxian^{1,2}, LI Junhua, LIU Rensheng¹, QI Xueliang¹, HUANG Liang¹ (1. Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang Jiangxi 330006, China; 2. Jiangxi Institute of Urology, Nanchang Jiangxi 330006, China)

Correspondence to: FU Bin E-mail: fubinncu@gmail.com

[Abstract] **Background and purpose:** Bladder cancer is the most common urological tumor, and its pathogenesis is still not fully understood. The study was aimed to observe the expressions of key genes in many tumor-associated signaling pathways in normal bladder tissue and bladder carcinoma, and to provide further evidence for the subsequent study of bladder cancer recurrence and metastasis. **Methods:** Twenty-seven cases of bladder cancer specimens were collected, and normal bladder tissues and bladder cancer tissues were distinguished by frozen section. Then, the expressions of 84 genes of cancer-related signaling pathways in bladder cancer tissues and normal bladder tissues were screened by Cancer Pathway Finder PCR Array produced by QIAGEN company. **Results:** Compared with the normal bladder tissues, the bladder carcinoma tissues had 8 up-regulated genes and 19 down-regulated genes. In this study, the impact of epithelial-mesenchymal transition (EMT) signaling pathway was selected as a research direction in which the *GSC*, *KRT14*, *DSP* were up-regulated, *SNAI2*, *SNAI3* were down-regulated. Therefore *GSC*, *KRT14*, *DSP*, *SNAI2* and *SNAI3* were chosen as target genes, and verified by qRT-PCR in many examples. The result showed that the expressions of *GSC* gene in bladder cancer tissues were up-regulated, but with no statistical significance; *KRT14*, *DSP* expressions in bladder cancer were higher than those in normal bladder tissues ($P<0.05$); *SNAI2*, *SNAI3* expressions in bladder cancer were lower than those in normal bladder tissues ($P<0.05$), and *SNAI3* showed the most obvious expression differences. **Conclusion:** *KRT14*, *DSP*

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81160272); 江西省自然科学基金资助项目(2008GZY0039);
江西省青年科学家培养资助项目(2010JX02761)。

通信作者: 傅斌 E-mail: fubinncu@gmail.com

and *SNAI3* may play an important role in bladder cancer's occurrence, development and metastasis.

[**Key words**] RT-PCR Array; Bladder cancer; Pathway

近年来,随着分子生物学的发展,现代医学对膀胱肿瘤的认识已从整体水平发展到细胞、分子水平。其中有关信号通路与膀胱癌生物学行为的研究已经成为热点并取得了一定的成果。因此,研究与膀胱癌相关信号通路的关键基因的mRNA的表达对研究膀胱癌具有重要意义。

本研究应用德国Qiagen公司Human Cancer Pathway Finder PCR Array板,阵列配置84个基因代表参与影响肿瘤的9种不同的生物信号通路表达,包括:细胞凋亡、细胞周期、DNA损伤修复、细胞衰老、端粒维持、新陈代谢、血管生成、细胞缺氧及上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),并通过qRT-PCR验证,探究其通过对信号通路的影响与膀胱癌发生、发展的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本收集

在符合临床研究伦理道德标准的情况下,收集2014年3月—5月南昌大学第一附属医院泌尿外科经病理诊断为膀胱癌组织标本及其周围正常组织各27例,纳入本实验膀胱癌标准为:分期 T_{2-4a} , N_{0-x} , M_0 ,手术方式为膀胱根治性切除的患者,通过前期实验发现根治性手术对标本影响较小,可以更为完整地提取总RNA。收取膀胱癌组织和癌旁5 cm以上的正常组织,在保障病理学检测所需标本的前提下,尽量提供足量的肿瘤和癌旁正常组织,一般不少于200 mg或 10^7 个细胞^[1]。液氮速冻保存。

1.1.2 实验仪器

液氮罐(上海金凤五金塑胶有限公司), -80 °C冰箱(德国Siemens公司), -20 °C冰箱(中国青岛海尔股份有限公司),电子天平(瑞士Mettler Toledo公司),分光光度计(美国Thermo公司),

荧光定量PCR仪(美国Applied Biosystems公司), 高速离心机(德国Eppendorf公司), 移液器(德国Eppendorf公司)。

1.1.3 实验试剂

QIAzol(德国Qiagen公司), RNeasy Mini Kit试剂盒(德国Qiagen公司), Rt2 First Strand试剂盒(德国Qiagen公司), PrimeScript RT reagent Kit(宝生物工程(大连)有限公司), SYBR[®] PrimeScript[™] RT-PCR Kit (宝生物工程(大连)有限公司), SNAI3、GSC、KRT14、DSP、SNAI2和 β -actin引物(北京全式金生物技术有限公司),其他试剂:氯仿、异丙醇、溴化乙锭、TBE电泳缓冲液(50 \times)、琼脂糖等。

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取

在实验前应准备好DEPC水处理好的研钵及枪头,并戴好口罩、帽子,避免RNA酶污染。采用冰冻切片,用HE染色的方法来定性膀胱癌组织及正常膀胱组织,取两组不多于100 mg组织(尽量保持组织处于冷冻状态),用研钵磨碎至粉末状,加入QIAzol Lysis Reagent 1 mL混匀。采用RNeasy Mini Kit试剂盒提取总RNA。

1.2.2 RNA浓度和质量检测

用分光光度仪分析RNA浓度和纯度,将溶解于无核酶水中的RNA置于冰盒中,并用2 μ L无核酶水作对照基线,取2 μ L RNA溶解液,测浓度。合格的RNA样本应该满足 $D_{260} : D_{230}$ 比值大于1.7, $D_{260} : D_{280}$ 比值在1.8和2.0之间, D_{260} 测出的浓度必须 $>40 \mu$ g/mL。RNA琼脂糖凝胶电泳测RNA的完整性,制作1%琼脂糖凝胶,将RNA进行电泳。

1.2.3 cDNA合成

使用RT First Strand Kit合成cDNA,解冻RT First Strand Kit的试剂。用简短离心15 s,使管中的试剂沉至管底。保持在42 °C 15 min,然后放入95 °C保持5 min。将反应物中加入91 μ L无RNA酶水,用加样枪混匀。

1.2.4 荧光定量PCR反应

简短离心10~15 s把RT SYBR Green Mastermix试管中试剂沉至管底。可在室温下进行。在96孔板中加入PCR反应混合物，每孔25 μ L。每一步骤使用新的加样枪头，避免孔间污染。透光黏性密封膜密封96孔板。在室温下离心去除气泡。设定Applied Biosystems，把Cancer Pathway Finder PCR Array板放在实时PCR仪中。开始PCR实验。

1.2.5 标本验证

按表1设计合成引物，实时荧光定量PCR验证，将所收集的膀胱癌患者组织及正常组织，以及膀胱癌细胞株5637、J83和T24，使用上文所述方法提取RNA，并使用PrimeScript RT Reagent Kit逆转录成cDNA，并使用SYBR[®] PrimeScript[™] RT-PCR Kit进行实时荧光定量PCR。

1.3 统计学处理

采用SPSS 21.0 统计软件对实验结果的数据进行统计分析，计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，各组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

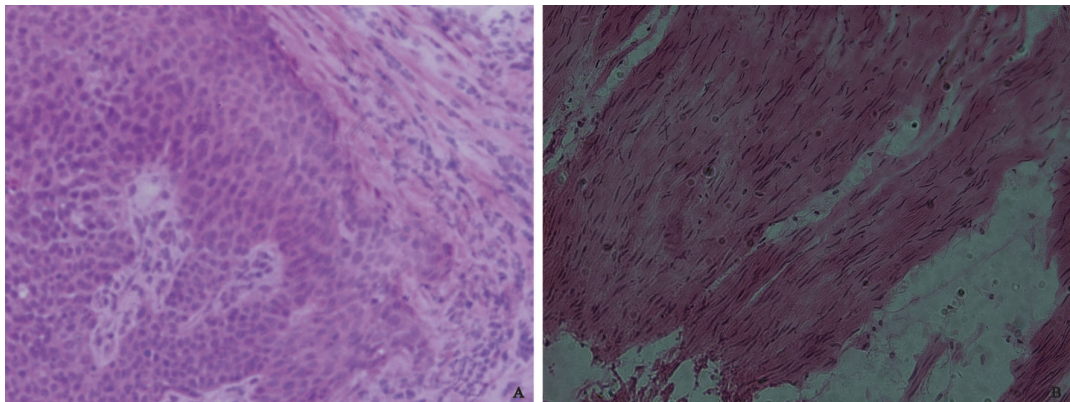
2 结 果

2.1 冰冻切片

对膀胱癌组织和正常膀胱组织做冰冻切片，HE染色结果见图1。

2.2 RNA质量检测

所有样品用紫外分光光度计法测定 D_{260} 和 D_{280} ， $D_{260} : D_{230} > 1.9$ ， $D_{260} : D_{280}$ 值均在1.8~2.0之间。并取5 μ L总RNA溶液经甲醇变性琼脂糖凝胶电泳鉴定总RNA完整性，在紫外线下可见18 s及28 s两条明亮清晰的条带(图2)。



(Frozen section, $\times 200$)

图1 膀胱癌组织和正常膀胱组织冰冻切片

Fig. 1 Bladder cancer tissues and normal bladder tissue

A: Bladder cancer tissue. B: Normal bladder tissue.

表1 qRT-PCR引物序列及反应条件

Tab. 1 The primer sequence and reaction condition of qRT-PCR

Gene	Sequence (5'→3')	Product size/bp	Annealing temperature/°C
SNAI2	F: TGTGACAAGGAATATGTGAGCC	203	60.0
	R: TGAGCCCTCAGATTGACCTG		
SNAI3	F: ACTGCGACAAGGAGTACACC	220	61.5
	R: GAGTGCCTTTCAGATGGG		
KRT14	F: GGTGCTTATATGACCAAGGTGG	173	60.4
	R: ATGCTGTCCAGGTCGAGACT		
DSP	F: TTTGGGCAGTAGCATGGGC	199	62.7
	R: CCATCTTGGGTATTCTCTTGCCT		
GSC	F: CCAGTATCCTGACGTGAGTACG	113	61.6
	R: GCTTCTGGTGTGCGCATTGG		
β -actin	F: CATGTACGTTGCTATCCAGGC	250	60.6
	R: CTCCTTAATGTCACGCACGAT		

F: Forward; R: Reverse.

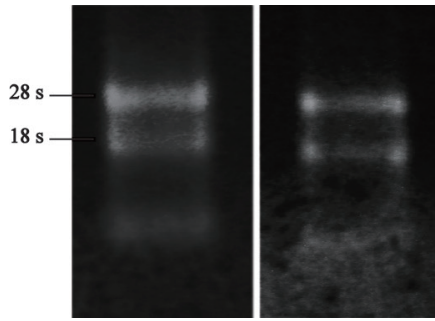


图2 膀胱癌组织和正常组织总RNA电泳图

Fig. 2 Total RNA agarose gel electrophoresis of bladder cancer tissues and normal bladder tissue

2.3 RT-PCR Array数据分析结果

所提取总RNA使用Rt2 First Strand试剂盒逆转成cDNA, 并行qRT-PCR反应, 获得了所有通路84个关键基因及内参基因的Ct值, 并对其作 $lg2^{-\Delta Ct}$, 同时对数据应用GraphPad Prism 6进行统计学分析(图3)。当膀胱癌和正常组织表达差异越小时数据越靠近一、三象限等分线, 因此越偏离等分线则表达差异越大。据此, 得到显著上调基因8个, 显著下调基因19个。本研究选择影响EMT的信号通路作为研究方向, 可见GSC、KRT14和DSP基因上调, SNAI2、SNAI3基因下调(图4)。

2.4 qRT-PCR验证结果

对筛选出的兴趣基因: GSC、KRT14、DSP、SNAI2、SNAI3基因, 进行多病例验证, 以及在3种膀胱癌细胞株5637、J83及T24上进行验证, 验证RT-PCR Array中得出的结果是否可靠。对上述多次qRT-PCR所得数据进行分析(图5)。上调基因中, GSC在验证的癌组织与肿瘤细胞株中表达均低于正常组织, 但差异无统计学意义, 该结果与Human Cancer Pathway Finder PCR Array实验结果不一致; 而KRT14、DSP基因在膀胱癌中

表达显著高于正常组织($P < 0.05$), 下调基因SNAI2、SNAI3在膀胱癌中表达显著低于正常组织($P < 0.05$), 且以SNAI3表达差异最显著。

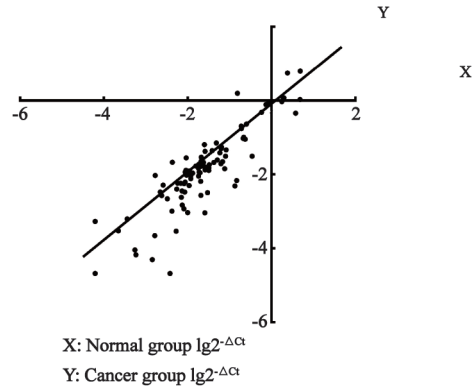


图3 膀胱癌组织与正常膀胱组织行Human Cancer Pathway Finder PCR Array所得 ΔCt 值的分布

Fig. 3 Distribution of ΔCt values of bladder cancer tissues and normal bladder tissues resulted from Human Cancer Pathway Finder PCR Array

X: $lg2^{-\Delta Ct}$ values of normal bladder tissues; Y: $lg2^{-\Delta Ct}$ values of bladder cancer tissues.

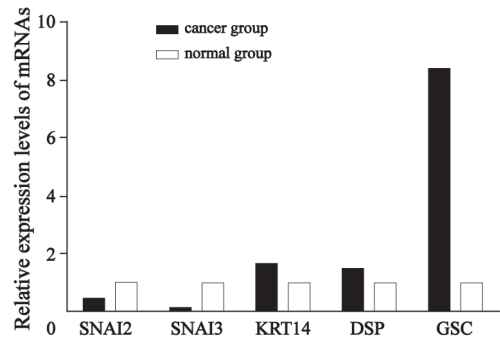


图4 根据RT-PCR Array检测筛选基因的mRNA表达水平
Fig. 4 mRNA relative expression of genes that was screened in bladder cancer by RT-PCR Array

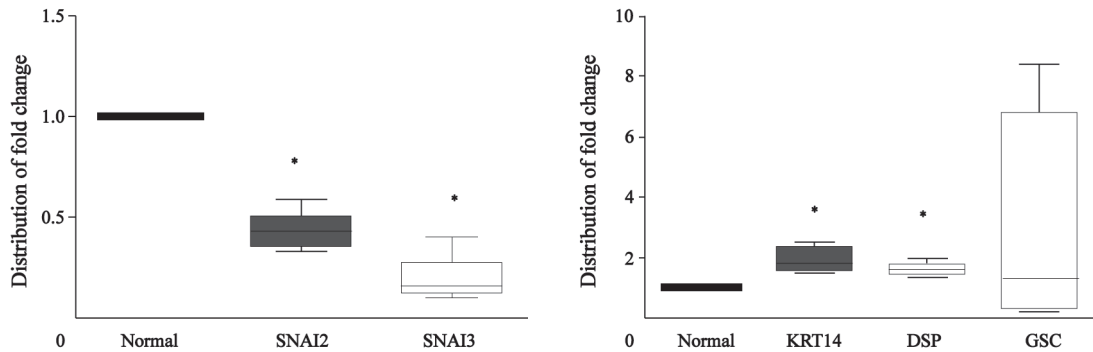


图5 对所选基因在多样本和膀胱细胞株中进行qRT-PCR验证所得的mRNA表达水平分布情况

Fig. 5 The distribution of $2^{-\Delta\Delta Ct}$ of the screened genes by repeating qRT-PCR

*: $P < 0.05$, compared with the normal group.

3 讨 论

膀胱肿瘤是严重威胁人类健康的重要疾病之一^[2],也是泌尿外科最常见肿瘤^[3-4],因此,在基因水平上研究膀胱癌发病具有重要意义。本研究从影响肿瘤的9个方面信号通路中筛选出可能与膀胱癌相关的关键基因作为兴趣基因,来探究膀胱癌发生、发展的机制,并希望通过本研究为膀胱癌的预防及治疗提供新思路。通过RT-PCR Array技术筛选出具有表达差异的影响EMT信号通路的基因作为兴趣基因:*GSC*、*KRT14*、*DSP*、*SNAI2*、*SNAI3*基因,经多样本qRT-PCR验证:*KRT14*、*DSP*基因在膀胱癌中表达显著高于正常组织($P < 0.05$),*SNAI2*、*SNAI3*基因在膀胱癌中表达显著低于正常组织($P < 0.05$),其中以*SNAI3*基因膀胱癌组织和正常膀胱组织表达差异最大。

*KRT14*属于角蛋白编码家族,其对上皮组织早期发育有重要影响^[5],此外*KRT14*还可能参与维持细胞增殖潜力,并可以调节Notch-1依赖性细胞分化^[6],Notch信号通路通过对EMT的诱导而影响肿瘤已经得到广泛证实^[7-8]。本研究中*KRT14*在膀胱癌组织中表达高于正常组织,*KRT14*在膀胱癌发生、发展中可能通过上述通路发挥作用。*DSP*可以抑制Wnt/ β -catenin信号通路^[9],而Wnt/ β -catenin信号通路在人类众多肿瘤中起到重要作用已经得到广泛证

实^[10],与此同时Wnt/ β -catenin信号通路还能通过影响EMT进程来影响肿瘤发生^[11],其在膀胱癌中表达高于正常组织,因此,其可能通过上述作用影响膀胱癌发生进程。*SNAI3*作为转录因子参与E-cadherin的转录^[12],而E-cadherin的缺失是发生EMT的主要标志^[13-14],*SNAI3*表达的抑制而促使正常膀胱黏膜上皮E-cadherin的缺失而发生EMT,因此,*SNAI3*可能通过影响EMT来影响膀胱组织癌变进程。本研究qRT-PCR验证显示(图4),在膀胱癌组织中*SNAI3*的表达受到抑制而明显低于正常组织,可以推断*SNAI3*的表达对维持正常膀胱组织对抗EMT有重要意义,*SNAI3*表达的缺失可能诱导EMT的发生。

本研究通过对大量基因进行筛选及验证,推测*KRT14*、*DSP*和*SNAI3*基因可能与膀胱癌发生、发展及转移有密切关系,并值得采用进一步的体内或体外实验方法对其作用机制深入研究,可能为基因治疗膀胱癌提供重要靶点。

[参 考 文 献]

- [1] 杨宗泽,吴正谷,谭维维,等.肿瘤组织标本库的创建与管理[J].华西医学,2012,26(5):767-770.
- [2] MILLAN-RODRIGUEZ F, CHÉCHILE-TONIOLO G, SALVADOR-BAYARRI J, et al. Multivariate analysis of the prognostic factors of primary superficial bladder cancer [J]. J Urol, 2000, 163(1): 73-78.
- [3] CASTELAO J E, GAGO-DOMINGUEZ M, YUAN J M, et al. Phenobarbital use and bladder cancer risk [J]. Eur J

- Epidemiol, 2003, 18(7): 659-664.
- [4] 韩苏军, 张思维, 陈万青, 等. 中国膀胱癌发病现状及流行趋势分析 [J] . 癌症进展, 2013, 11(1): 89-95.
- [5] NOBUSAWA A, SANO T, NEGISHI A, et al. Immunohistochemical staining patterns of cytokeratins 13, 14, and 17 in oral epithelial dysplasia including orthokeratotic dysplasia [J] . Pathol Int, 2014, 64(1): 20-27.
- [6] ALAM H, SEHGAL L, KUNDU S T, et al. Novel function of keratins 5 and 14 in proliferation and differentiation of stratified epithelial cells [J] . Mol Biol Cell, 2011, 22(21): 4068-4078.
- [7] ESPINOZA I, MIELE L. Deadly crosstalk: Notch signaling at the intersection of EMT and cancer stem cells [J] . Cancer Lett, 2013, 341(1): 41-45.
- [8] KANG J, KIM E, KIM W, et al. Rhamnetin and circilol induce radiosensitization and inhibition of epithelial-mesenchymal transition (EMT) by miR-34a-mediated suppression of Notch-1 expression in non-small cell lung cancer cell lines [J] . J Biol Chem, 2013, 288(38): 27343-2757.
- [9] YANG L, CHEN Y, CUI T, et al. Desmoplakin acts as a tumor suppressor by inhibition of the Wnt/beta-catenin signaling pathway in human lung cancer [J] . Carcinogenesis, 2012, 33(10): 1863-1870.
- [10] ZENG X C, LIU F Q, YAN R, et al. Downregulation of miR-610 promotes proliferation and tumorigenicity and activates Wnt/beta-catenin signaling in human hepatocellular carcinoma [J] . Mol Cancer, 2014, 13(1): 261.
- [11] GUO J, FU Z, WEI J, et al. PRRX1 promotes epithelial-mesenchymal transition through the Wnt/beta-catenin pathway in gastric cancer [J] . Med Oncol, 2015, 32(1): 393.
- [12] CANO A, PÉREZ-MORENO M A, RODRIGO I, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression [J] . Nat Cell Biol, 2000, 2(2): 76-83.
- [13] LIU Y, XIN Y, YE F, et al. Taz-tead1 links cell-cell contact to zeb1 expression, proliferation, and dedifferentiation in retinal pigment epithelial cells [J] . Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(7): 3372-3378.
- [14] JANG M J, BAEK S H, KIM J H. UCH-L1 promotes cancer metastasis in prostate cancer cells through EMT induction [J] . Cancer Lett, 2011, 302(2): 128-135.

(收稿日期: 2014-12-26 修回日期: 2015-02-11)

2015 AACR “癌症研究新视野” 大会 将于上海举行

继首届“癌症研究新视野”大会在2014年成功举办后, 美国癌症研究学会(AACR)又将于2015年11月12~15日在上海举办第二届“癌症研究新视野”大会。本次大会将围绕“如何利用癌症研究成果造福患者”这一主题, 重点介绍癌症研究各个领域最新和最振奋人心的研究成果, 为来自全世界各地的研究人员提供宝贵的交流机会, 加强学术科研合作。

此次会议将推动癌症科学和医学的发展, 搭建富有活力的平台, 帮助在国际层面上建立全新的合作关系。4天的会议将吸引来自多个学科的研究人员的参与和互动, 学科范围将覆盖整个癌症研究领域——从基础研究到转化医学, 再到临床医学。大会将邀请到数十名国内外专家发表主题演讲, 充分体现高参与性、高互动性及多学科的特点。会上, 我们还将展示第106届AACR全球年会上的精彩内容(2015年4月18~22日, 美国宾夕法尼亚州费城)。精彩不容错过!

届时, 将有来自全球各地的1 200多位专家学者共聚于此, 其研究领域包括了实验性治疗法、分子靶向治疗、化学、分子生物学、遗传与表观遗传学、免疫学与免疫疗法、肿瘤生物学以及临床与转化研究等。我们期待您的加入!

会议时间: 2015年11月12~15日

会议地点: 上海宝华万豪酒店

会议网站: <http://www.aacr.com.cn>

论文投稿截止日期: 2015年8月10日

注册参会咨询热线: registration@aacr.com.cn, 021-23123581