



· 论 著 ·

NDRG2通过抑制Bcl-2表达增加膀胱癌细胞对顺铂的敏感性

李瑞晓¹, 唐启胜¹, 马善金¹, 张 波¹, 李雪莲², 张志明¹

1. 空军军医大学唐都医院泌尿外科, 陕西 西安 710038 ;
2. 西安市中医医院外科, 陕西 西安 710002

[摘要] 背景与目的: N-Myc下游调节基因2 (N-Myc down stream-regulated gene 2, *NDRG2*) 是一种新发现的抑癌基因, 在细胞增殖和凋亡中发挥着重要作用, 膀胱癌的化疗耐药是临床治疗失败的主要原因之一。阐明*NDRG2*蛋白在膀胱癌中的表达及顺铂 (cisplatin, CDDP) 抗性形成的机制。方法: 将膀胱癌T24细胞通过CDDP浓度递增的方式连续传代, 持续6个月, 获得CDDP抗性T24/CR细胞株; 通过质粒转染方式使得T24/CR中*NDRG2*过表达, 采用MTT法测定细胞活力, 采用凋亡和transwell侵袭实验等比较*NDRG2*过表达对T24细胞CDDP抗性的影响, 随后用Bcl-2-siRNA瞬时转染敲低T24细胞中*NDRG2*的表达, 并通过蛋白质印迹法 (Western blot) 检测两者之间的表达变化, 从而了解两者之间的相关性, 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 检测*NDRG2* mRNA的表达。结果: *NDRG2*的表达水平在CDDP抗性膀胱癌细胞中显著下调。外源性*NDRG2*过表达, 增强了CDDP的敏感性并且在CDDP存在下抑制膀胱癌细胞的活力和侵袭。下调*NDRG2*的表达对Bcl-2的表达无明显影响, 而下调Bcl-2的表达可有效解除*NDRG2*低表达对膀胱癌细胞活力和凋亡的影响, 并恢复CDDP对膀胱癌细胞的敏感性。结论: *NDRG2*/Bcl-2的失衡可能是晚期膀胱癌中CDDP抗性形成的关键机制, *NDRG2*有望成为CDDP抗性或难治性膀胱癌治疗的新靶点。

[关键词] 顺铂; N-Myc下游调节基因2; 耐药; Bcl-2

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2021.04.004

中图分类号: R737.14 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2021)04-0263-06

NDRG2 increases bladder cancer cell sensitivity to cisplatin by inhibiting Bcl-2 expression LI Ruixiao¹, TANG Qisheng¹, MA Shanjin¹, ZHANG Bo¹, LI Xuelian², ZHANG Zhiming¹ (1. Department of Urology, Tangdu Hospital, the Air Force Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China; 2. Department of Surgery, Xi'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China)

Correspondence to: ZHANG Zhiming E-mail: 523467519@qq.com

[Abstract] **Background and purpose:** N-Myc down stream-regulated gene 2 (*NDRG2*) is a new type of tumor suppressor gene, which plays an important role in cell proliferation and apoptosis. The chemotherapy resistance of bladder cancer is the main cause for the failure of clinical treatment; therefore, this study aimed to clarify the expression of *NDRG2* and its potential role in the pathogenesis of cisplatin (CDDP) resistance in bladder cancer cells. **Methods:** Bladder cancer T24 cells were continuously passaged by increasing the CDDP concentration for 6 months to obtain CDDP-resistant T24/CR cell lines. Lentiviral transfection was used to achieve high expression of *NDRG2* in T24/CR. Cell viability was measured by MTT, apoptosis and transwell invasion assay were performed. The effect of *NDRG2* overexpression on T24 cell resistance to CDDP was compared. Bcl-2-siRNA transient transfection was used to knock down the expression of *NDRG2* in T24 cells, and then the expression in different groups was detected by Western blot. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR) was used to detect the expression level of *NDRG2* mRNA. **Results:** The expression level of *NDRG2* was significantly down-regulated in CDDP-resistant bladder cancer cells. Exogenous overexpression of *NDRG2* enhanced the sensitivity to CDDP and inhibited the viability and invasion of bladder cancer cells in the presence of CDDP. Knockdown of *NDRG2* expression had no significant effect on the expression of Bcl-2. Knockdown of Bcl-2 could effectively eliminate the effect of low *NDRG2* expression on the viability and apoptosis of bladder cancer cells, and could restore the sensitivity to CDDP in bladder cancer cells. **Conclusion:** The unbalance of *NDRG2*/Bcl-2 maybe the key

基金项目: 国家自然科学基金 (81872077)。
通信作者: 张志明 E-mail: 523467519@qq.com

mechanism of CDDP resistance in advanced bladder cancer. Enhanced expression of NDRG2 might be used as a candidate for the treatment of CDDP-resistant or refractory bladder cancer.

[Key words] Cisplatin; N-Myc down stream-regulated gene 2; Resistance; Bcl-2

目前, 晚期膀胱癌的治疗主要是基于顺铂 (cisplatin, CDDP) 的辅助治疗, 在根治性膀胱切除术前/后或晚期辅以CDDP为主的化疗是目前的主要治疗手段^[1]。然而, 由于对化疗药物的耐药性产生, CDDP的疗效有限, 化疗有效率约为50%。Bcl-2在与抗癌药物 (如CDDP) 诱导的DNA损伤相关的细胞凋亡中起关键作用, Bcl-2的过表达赋予了细胞多药耐药性, 并且临床数据已将Bcl-2表达水平与CDDP耐药和复发性疾病联系起来^[2]。N-Myc下游调节基因2 (N-Myc down stream-regulated gene 2, NDRG2) 是一种新发现的p53诱导基因, 被认为参与DNA损伤诱导的p53相关凋亡途径并在抑制增殖中发挥作用。我们的前期研究发现, NDRG2基因的过表达可在体内/外抑制膀胱肿瘤的增殖及侵袭能力^[11]。鉴于先前的研究, 关于NDRG2基因在膀胱癌耐药机制的研究比较少, 因此本研究旨在探讨NDRG2是否通过与Bcl-2相互作用而影响膀胱癌细胞耐药的形成, 为临床治疗晚期膀胱癌提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

人膀胱癌细胞系T24购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, 并在含有10%胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的DMEM中于37℃、CO₂体积分数为5%的温箱中培养。为了培育出抗CDDP的亚型, 将T24细胞于含有CDDP (浓度递增: 0.1~1.0 μg/mL) 的培养基中连续传代, 持续6个月。最终将CDDP抗性细胞株于含有1 μg/mL CDDP的培养基中培养。

1.2 基因修饰和转染

将编码全长NDRG2的cDNA亚克隆到pcDNA3.1载体 (美国Invitrogen公司) 中, 通过转染构建NDRG2基因过表达T24细胞株, 同时采用小干扰RNA (siRNA) 技术构建NDRG2及Bcl-2基因沉默细胞株。根据制造商的说明书, 使

用Lipofectamine™2000 (美国Invitrogen公司) 用相应的分子克隆载体转染目的细胞。

1.3 蛋白质印迹法 (Western blot) 检测

将膀胱癌细胞溶解于蛋白裂解液 [宝生物工程 (大连) 有限公司] 提取目的细胞的总蛋白。通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离细胞裂解物并转移至硝酸纤维素膜。选取NDRG2、Bcl-2、多药耐药蛋白一抗 (美国Santa公司) 与NC膜温育过夜, 然后在与目的蛋白匹配的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗中温育。用计算机-荧光扫描仪系统对膜进行扫描, 进行数据分析。

1.4 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR)

严格按照提取试剂盒 (美国Invitrogen公司) 操作说明进行, 使用TRIzol试剂从膀胱癌细胞中提取总RNA。将提取的RNA在紫外分光光度计下检测, 读取260 nm处的吸光度 ($D_{260\text{ nm}}$) 值以及 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 比值, 按照美国Invitrogen公司反转录系统将RNA反转录合成cDNA。每个PCR程序: 35个循环 (对于NDRG2基因), 94℃ 30 s, 52℃ 40 s, 72℃ 40 s; 共25个循环 (对于Bcl-2基因), 在94℃ 30 s, 62℃ 30 s和72℃ 30 s, 然后72℃, 延伸10 min。通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各组mRNA表达量并进行比较, 最后进行数据分析。

1.5 细胞毒性测定

MTT法分析CDDP对膀胱癌细胞生长的影响。调整细胞浓度 1×10^4 个/mL以200 μL等分接种到96孔板中。加入不同浓度的CDDP在37℃下温育72 h后, 向每个孔中加入20 μL的MTT溶液 (5 mg/mL), 并将96孔板在37℃下再温育4 h。然后除去培养基并用150 μL 100% DMSO代替, 搅拌溶解5~10 min。使用多孔扫描分光光度计在

490 nm处测量 D 值。细胞活力表示为未处理细胞的百分比。每种实验条件重复3次。

1.6 检测细胞凋亡

将膀胱癌细胞用CDDP（所需浓度）处理24 h。用荧光素异硫氰酸酯标记的膜联蛋白V和碘化丙锭染色凋亡细胞。使用荧光细胞分选仪测量凋亡细胞。

1.7 Transwell小室检测

采用transwell小室检测确定细胞的侵袭能力。将目的细胞培养48 h后收集细胞。将细胞（ 2×10^4 个细胞/孔）重悬于200 μ L无血清培养基中，并置于上室中。底部腔室覆盖有500 μ L RPMI-1640和20%FBS。温育36 h后，将膜固定并分别使用4%多聚甲醛和结晶紫染色。然后在光学显微镜下计数侵袭的细胞。所有实验均包括3个独立的重复。

1.8 统计学处理

选用统计学软件SPSS 19.0进行数据分析，数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。通过使用单向ANOVA及组间 χ^2 检验来进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CDDP不同浓度处理下T24、T24/CR细胞中NDRG2蛋白的表达情况

通过浓度递增的方式用CDDP处理膀胱癌T24细胞，然后通过分光光度法评估不同浓度CDDP处理T24细胞和CDDP抗性细胞（表示为

T24/CR）的活力状态以及NDRG2蛋白的表达水平。结果发现，在浓度 $< 1 \mu\text{g/mL}$ 时，T24/CR细胞具有继续生长的抗性（图1A）。Western blot结果显示，与亲代T24细胞相比，T24/CR细胞中NDRG2的表达水平显著下调（图1B）。此外，低浓度CDDP处理T24细胞，发现其以时间依赖性方式刺激NDRG2表达（图1C）。

2.2 NDRG2蛋白过表达增强了T24细胞中CDDP的敏感性

将外源性NDRG2基因转染至T24/CR细胞中并使其稳定过表达（图2A）。通过MTT及凋亡检测证实，实验组中T24/CR细胞的增殖受到显著抑制，凋亡比例增加（图2B、C）；在细胞侵袭实验中，实验组T24/CR细胞的侵袭受到显著抑制（图3）。这些研究结果表明，NDRG2蛋白的过表达可增强CDDP抗T24细胞的敏感性。

2.3 过表达NDRG2抑制T24/CR细胞中Bcl-2的表达

为了进一步说明NDRG2蛋白在CDDP诱导的细胞凋亡中的作用，通过Western blot检测T24/CR细胞中Bcl-2的表达。与T24/CR细胞相比，过表达实验组T24/CR细胞中，Bcl-2的表达受到抑制，P-糖蛋白和多药耐药蛋白的表达未受明显影响（图4），通过shRNA转染使NDRG2在T24细胞中低/不表达。随后用Bcl-2-siRNA瞬时转染下调了NDRG2在T24细胞中的表达，并使Bcl-2表达上调，结果显示对NDRG2的表达没有影响（图5A），表明NDRG2可能作用于Bcl-2信号转导的上游。



图1 CDDP耐药的产生影响NDRG2蛋白的表达

Fig. 1 The development of CDDP resistance affects the expression of NDRG2

A: At a concentration of $< 1 \mu\text{g/mL}$, T24/CR cells were resistant to continued growth. B, C: The expression of NDRG2 in T24/CR cells was significantly down-regulated

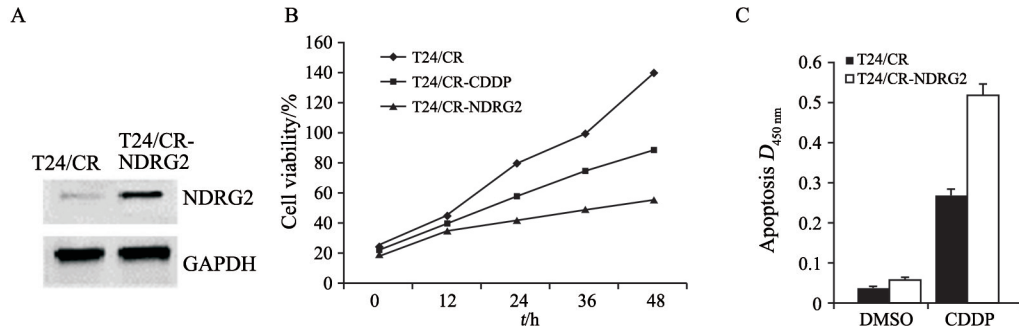


图2 NDRG2过表达可以影响T24/CR细胞的活力及凋亡水平

Fig. 2 Overexpression of NDRG2 could affect the viability and apoptosis of T24/CR cells

The reproduction of T24/CR cells was significantly inhibited, and the proportion of apoptosis increased. A: The expression of NDRG2. B: Cell viability in different groups. C: Apoptosis detection

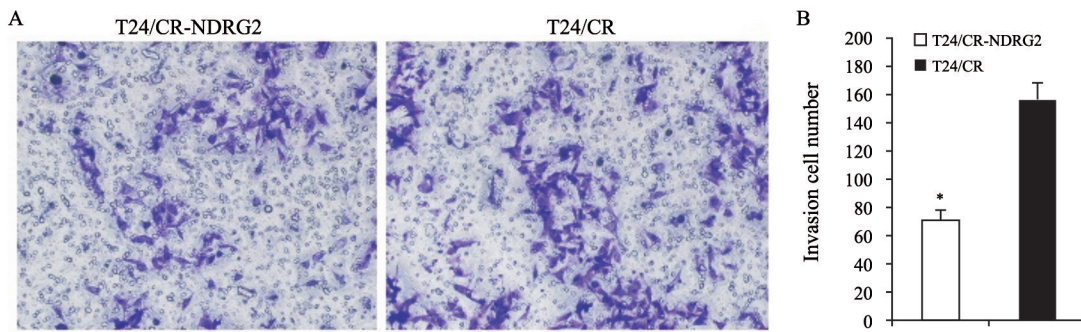


图3 NDRG2过表达可抑制T24/CR耐CDDP细胞侵袭能力

Fig. 3 Overexpression of NDRG2 could inhibit resistance to cisplatin in T24/CR cells

A, B: The T24/CR cells invasion was significantly suppressed. *: $P < 0.05$, compared with the two groups

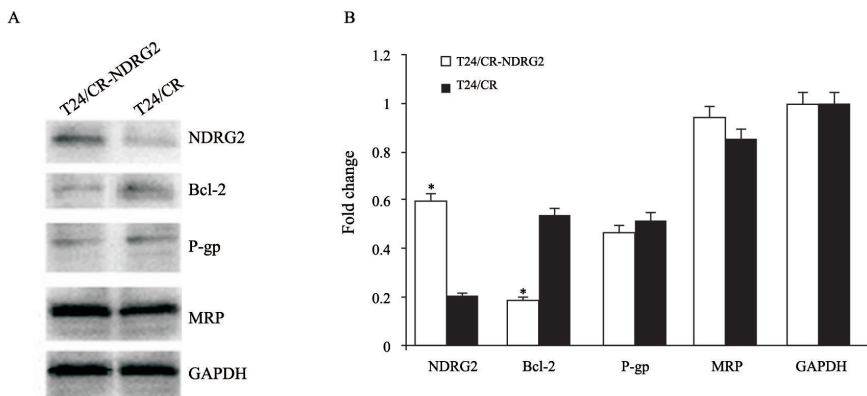


图4 NDRG2过表达可抑制T24耐CDDP细胞中Bcl-2的表达

Fig. 4 Overexpression of NDRG2 could inhibit the expression of Bcl-2 in T24/CR cells

A, B: Compared with T24/CR cells, in the overexpression experimental group T24/CR cells, Bcl-2 was inhibited, and the expressions of P-gp and MRP resistance protein were not significantly affected. *: $P < 0.05$, compared with the two groups

2.4 Bcl-2基因的抑制修复了NDRG2基因的缺陷, 恢复膀胱癌细胞对CDDP的敏感性

我们研究了NDRG2对Bcl-2基因的激活是否通过改变T24细胞活力和细胞凋亡而引起CDDP抗性。用0.5 μg/mL CDDP温育24 h导致T24细胞活力显著降低和诱导细胞凋亡, 而NDRG2的表达抑制

导致T24细胞活力增强和凋亡减弱而引起明显的CDDP抗性。更重要的是, 下调Bcl-2的表达可有效解除NDRG2低表达对T24细胞活力和凋亡的影响, 并恢复CDDP对T24细胞的敏感性(图5B、C); 反过来, 增加NDRG2的表达, 可增强CDDP诱导T24细胞凋亡的敏感性。

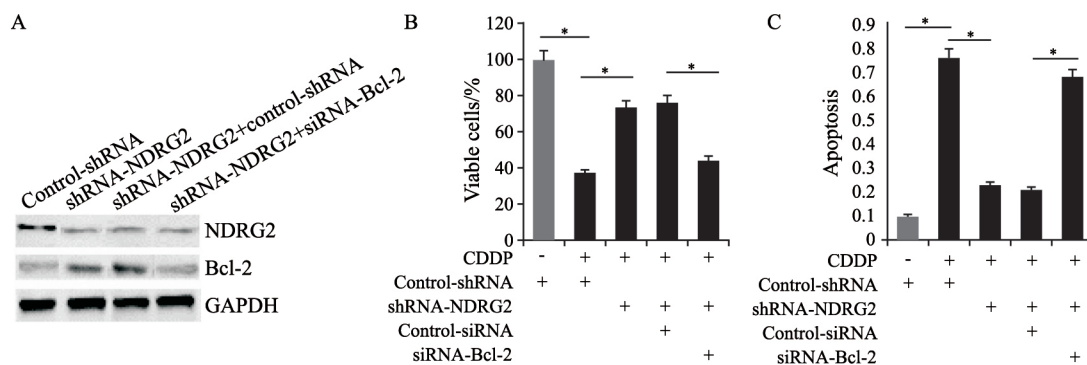


图5 NDRG2调节Bcl-2的表达

Fig. 5 NDRG2 regulated the expression of Bcl-2

Knockdown of *Bcl-2* gene could effectively relieve the effect of low expression of NDRG2 (A) on the viability (B) and apoptosis (C) of T24 cells, and restore the sensitivity of CDDP to T24 cells. *: $P < 0.05$, compared with the two groups

3 讨 论

铂类药物，特别是CDDP，被广泛用于治疗多种实体恶性肿瘤，包括膀胱癌。然而，一些肿瘤患者在治疗前或治疗过程中会出现对CDDP的耐药性。CDDP的耐药率高也是肿瘤患者化疗失败的主要原因。虽然最近提出了CDDP耐药的靶前、靶上、靶后和脱靶机制学说^[3]，但CDDP耐药的分子机制仍不完全清楚。

Bcl-2在线粒体凋亡中起关键作用，Bcl-2的表达可以预测接受放疗的晚期膀胱癌患者的存活率^[12]，Bcl-2蛋白表达的上调可能是膀胱癌细胞出现CDDP耐药的机制之一，通过下调Bcl-2的表达有助于逆转膀胱癌细胞对CDDP耐药性^[13]。NDRG2对细胞功能的调节有两种相反报道，NDRG2在局灶性脑缺血中表现出抗细胞凋亡功能^[4]，并且在乳腺癌细胞中具有一定的放射抗性^[5]。相反，它在尿路上皮癌^[6]、乳腺癌细胞^[7]、肝癌^[8]中表现出促凋亡的功能。研究^[12]发现，敲除NDRG2基因可抑制Bcl-2的表达，从而增加宫颈癌HeLa细胞CDDP敏感性。我们的前期研究已经证实，NDRG2在膀胱癌中发挥着重要的作用，NDRG2在膀胱癌组织中低表达，并且与患者生存呈负相关，体内/外实验证实，过表达NDRG2可抑制膀胱癌细胞的增殖及侵袭能力^[11]。因此，本研究旨在探讨NDRG2可否增加膀胱癌细胞对CDDP的敏感性，

从而改善膀胱癌患者的预后和生存率。本研究表明，过表达NDRG2可显著抑制Bcl-2的表达，NDRG2可能通过抑制Bcl-2的表达而诱导膀胱癌细胞的凋亡。NDRG2在转录后水平调节Bcl-2表达。已有研究^[9]表明，Bcl-2可被胃癌细胞中的microRNA（如miR-15b和miR-16）靶向和调节。这些microRNA与Bcl-2 mRNA的3'非翻译区结合，抑制Bcl-2蛋白的翻译而不改变mRNA表达。Bcl-2的上调是某些肿瘤对放化疗产生耐药的原因之一^[10]。然而，目前对化疗反应中控制Bcl表达的转录后或翻译后调控机制知之甚少。

本研究发现，上调NDRG2的表达后，T24/CR耐药细胞的凋亡比例增加，且侵袭性受到抑制，同时Bcl-2的表达受到抑制。是否NDRG2的表达调节了Bcl-2的表达，我们进一步进行了验证，通过siRNA技术使NDRG2在T24细胞中低/不表达。更重要的是，下调Bcl-2的表达可有效解除NDRG2低表达对T24细胞活力和凋亡的影响，并恢复CDDP对T24细胞的敏感性；反过来，增加NDRG2的表达，可增强CDDP诱导T24细胞凋亡的敏感性。

研究表明，NDRG2与CDDP的敏感性增加有关，而细胞的耐药与诱导细胞凋亡的Bcl-2有关，本研究证实NDRG2可调控Bcl-2的表达从而增加膀胱癌CDDP敏感性。这些数据可以帮助我们更好地了解CDDP耐药的分子机制以及NDRG2在肿瘤发展中的确切作用。

(下转334页)