

## 膀胱癌 T24 细胞中 *RUNX3* 基因对 *Smad4* 表达的影响\*

刘 竞, 李利军, 邱明星<sup>△</sup>

四川省医学科学院·四川省人民医院 泌尿外科(成都 610072)

**【摘要】** 目的 观察 *RUNX3* 基因重组质粒转染人膀胱癌 T24 细胞后细胞增殖及凋亡的变化以及 *Smad4* mRNA 表达的变化,探讨 *RUNX3* 基因与转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )/*Smad* 信号通路在膀胱癌发生机制中的作用。**方法** 构建 pIRES-EGFP-*RUNX3* 质粒,将 T24 细胞分空白对照组(不转染)和空载体质粒组以及重组质粒组。空载体质粒组和重组质粒组细胞分别转染 pIRES-EGFP 和 pIRES-EGFP-*RUNX3*,转染 24 h 后采用荧光显微镜观察细胞形态的变化;流式细胞仪检测细胞凋亡情况;RT-PCR 检测各组细胞 *RUNX3*、*Smad4* 基因 mRNA 表达水平。**结果** 成功构建 pIRES-EGFP-*RUNX3* 重组质粒,显微镜观察发现转染组均出现细胞死亡,重组质粒组出现凋亡细胞;转染 24 h 后空白对照组凋亡率为(3.23±0.45)%,空载体质粒组为(8.98±1.62)%,重组质粒组为(43.61±2.69)%;*RUNX3* mRNA 仅重组质粒组有表达(2.79±0.36),重组质粒组 *Smad4* mRNA 较另两组表达上调( $P<0.05$ )。**结论** 转染 *RUNX3* 基因可上调膀胱癌 T24 细胞中 *Smad4* mRNA 的表达,且能抑制细胞增殖并促进其凋亡,抑癌基因 *RUNX3* 可能通过 TGF- $\beta$ /*Smad* 信号通路参与对膀胱肿瘤细胞增殖与凋亡的调控。

**【关键词】** *RUNX3* 转化生长因子- $\beta$  *Smad4* 膀胱肿瘤

**Effect of *RUNX3* on the Expression of *Smad4* in T24 Bladder Cancer Cell Line** LIU Jing, LI Li-jun, QIU Ming-xing<sup>△</sup>. Department of Urology, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China

<sup>△</sup> Corresponding author, E-mail: 1303624874@qq.com

**【Abstract】 Objective** To examine the effects of *RUNX3* on cell proliferation and apoptosis and the expression level of *Smad4* mRNA in the bladder cancer cell line of T24 by transfection with recombinant plasmid of pIRES-EGFP-*RUNX3*. **Methods** The recombinant plasmid of pIRES-EGFP-*RUNX3* was constructed successfully. Cultured T24 cells were divided into three groups, including control group, empty vector group, and recombinant plasmid group. The cells in empty vector group and recombinant plasmid group were respectively transfected by pIRES-EGFP and pIRES-EGFP-*RUNX3*. The cells were harvested at 24 h after the transfection, the variation of cell morphology was examined by fluorescence microscopy. The cell apoptosis was detected by flow cytometry. The expression level of *RUNX3* and *Smad4* mRNA was measured by RT-PCR. **Results** Cell death was observed in two transfection groups. At 24 h after transfection, the apoptosis rate was (3.23±0.45)% in control group, (8.98±1.62)% in empty vector group and (43.61±2.69)% in recombinant plasmid group. The expression level of *RUNX3* mRNA was 2.79±0.36, detected only in recombinant plasmid group, which was significantly up-regulated compared with the other two groups ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The expression level of *Smad4* mRNA was up-regulated by transfection with pIRES-EGFP-*RUNX3*, which also inhibited cell proliferation and promoted cell apoptosis. The tumor suppressor gene of *RUNX3* could regulate the bladder cancer cell proliferation and apoptosis by TGF- $\beta$ /*Smad* signaling pathway.

**【Key words】** *RUNX3* Transforming growth factor- $\beta$  *Smad4* Bladder cancer

膀胱癌是最常见的泌尿系统肿瘤,其发生发展涉及多个基因、多种信号通路,其中抑癌基因的突变、失活或丢失是一种重要机制。人 runt 相关转录因子(human runt related transcription factor, RUNX)家族成员 *RUNX3* 基因为抑癌基因,在多

种肿瘤中常处于失活状态,*Smad* 是接受转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )信号的通路特异型信号蛋白,抑癌基因 *RUNX3* 在膀胱癌组织中因甲基化失活,其对下游 TGF- $\beta$  信号通路 *Smad4* 表达的影响及其机制尚不清楚。本研究构建了 *RUNX3* 真核表达载体,在膀胱癌 T24 细胞中增加 *RUNX3* 基因的表达,观测了外源性 *RUNX3* 基因表达对 T24 细胞 *Smad4* 表达的影响,

\* 四川省卫生和计划生育委员会科研课题(No. 120134)资助

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: 1303624874@qq.com

讨论 *RUNX3* 基因与 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路在膀胱癌发生中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

pIRES-EGFP 质粒、SYBR Premix Ex Taq II、RNAiso Plus、PrimeScript RT reagent、RT-qPCR 试剂盒、DMEM 培养基(北京博奥森生物科技公司)、人膀胱癌 T24 细胞株、大肠杆菌 DH-5 $\alpha$ (中国科学院上海细胞生化研究所)。

### 1.2 方法

**1.2.1** pIRES-EGFP-RUNX3 重组质粒构建、鉴定 根据 GenBank 的 *RUNX3* 基因序列设计扩增引物,在引物末端分别添加 *Xho* I 与 *Eco*R I 两个限制性酶切位点,引物序列:上游引物 5'-GTAC CTCGAGATGCGTATTCCCGTAGACC-3', 含有 *Xho* I 酶切位点及 ATG 起始密码;下游引物为 3'-GCACACCGCCCGGGATGACTCTTAAGTCGA-5', 含有 *Eco*R I 酶切位点及终止密码。重组质粒 pIRES-EGFP-RUNX3 由成都里来生物科技有限公司合成、鉴定并纯化。

**1.2.2** 细胞分组转染 复苏 T24 细胞分为空白对照组、空载体质粒组以及重组质粒组。空白对照组不转染。空载体质粒组和重组质粒组分别转染空载体 pIRES-EGFP 和重组质粒 pIRES-EGFP-RUNX3。转染方法参照 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 试剂说明书进行。T24 细胞在质粒转染前用无血清培养基洗 2~3 次。分别取 10  $\mu$ g 重组质粒和空载体质粒与 20  $\mu$ L 脂质体混合,室温静止 30 min,分别加入相应的培养皿中,用无血清培养基培养 15 h 后换用含体积分数为 10% 血清的培养基继续培养。转染后 24 h,在倒置荧光显微镜下,用 470 nm 蓝光激发,观察绿色荧光蛋白表达情况,如果空载体质粒组和重组质粒组细胞有绿色荧光,表明 pIRES-EGFP 或者 pIRES-EGFP-RUNX3 已成功转染。

**1.2.3** 显微镜观察 常规 HE 染色并在转染后 24 h 及 48 h 普通显微镜观察后,倒置荧光显微镜下用 470 nm 蓝光激发,观察各组细胞形态变化。

**1.2.4** FCM 法检测细胞凋亡情况 收集各组转染 48 h 细胞,调整细胞浓度约  $5 \times 10^5$  L<sup>-1</sup>,加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 混匀后,加入 5  $\mu$ L PI 混匀,室温避光反应 5~15 min,用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。结果判定:Annexin V(-)/PI(-)为正常细胞,Annexin V(+)/PI(-)为细胞膜 PS 外翻、凋

亡细胞,Annexin V(+)/PI(+)为坏死细胞,总死亡细胞为凋亡细胞与坏死细胞之和。计算细胞凋亡率,即凋亡细胞数占总细胞数的百分比,重复实验 3 次,取平均值。

**1.2.5** RT-PCR 检测 *RUNX3* 及 Smad4 mRNA 表达水平 提取各组细胞总 RNA 行逆转录扩增 cDNA,20  $\mu$ L 反应体系,反应条件:37  $^{\circ}$ C 15 min; 85  $^{\circ}$ C 5 s; 4  $^{\circ}$ C 5 min。程序结束后瞬间进行 3 000 r/min 离心 1 min,置 -20  $^{\circ}$ C 保存。继续行实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time PCR),反应体系 20  $\mu$ L,反应条件:95  $^{\circ}$ C,30 s 热启动及预变性; 40 个循环的 95  $^{\circ}$ C 5 s 变性、55  $^{\circ}$ C 30 s 退火、72  $^{\circ}$ C 30 s 延伸。引物由上海生博医学生物工程科技有限公司设计合成,所用引物及碱基序列见表 1,参考既往实验研究摸索 RT-PCR 反应条件<sup>[1]</sup>。以 *GAPDH* 为内参,反应结束后,使用 Sequence Detection software version 1.2.3 软件分析 PCR 过程各检测样本的 Ct 值,通过  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算 *RUNX3* mRNA 的相对表达水平。

表 1 引物及碱基序列

Table 1 Sequences of four genes

Gene	Sequence	Product/ bp
<i>RUNX3</i>	5'- TGGCAGGCAATGACGA-3'	258
	3'- CAGGGAACGGCTTGGT-5'	
Smad4	5'- GACTGAGGTCTTTTACCGTTGG-3'	224
	3'-CTTCAAGCTCTGAGCCATGC-5'	
<i>GAPDH1</i>	5'- GGATTTGGTCGTATTGGGGC-3'	393
	3'-CACACTTGGTACTCTTCAT-5'	
<i>GAPDH2</i>	5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3'	269
	3'-ACAACCTCCAGAGTTTGTACTA-5'	

**1.2.6** 统计学方法 实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较采用单因素方差分析,方差齐者组间进行 LSD 检验,方差不齐者进行 Tamhane's T2 检验, $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒的鉴定结果

采用 *Xho* I 与 *Eco*R I 双酶切装有 *RUNX* 基因的 pIRES-EGFP-RUNX3 重组质粒,电泳结果与预期设计相符,初步确定目的基因插入了载体,进一步采用 DNA 测序仪进行基因测序鉴定,证实 pIRES-EGFP 载体插入的基因片段为 *RUNX3*。

### 2.2 转染情况及细胞形态的变化

显微镜下观察发现空载体质粒组以及重组质粒组在转染后 24 h 均可见细胞碎片。同时在重组质粒组可观察到凋亡细胞:细胞体积明显缩小,细胞核

体积缩小,核固缩,无核仁;部分凋亡细胞可见核碎裂,碎裂的核由胞膜包裹并突起于细胞表面形成凋亡小体。见图 1。

空载体质粒组以及重组质粒组均发现绿色荧光

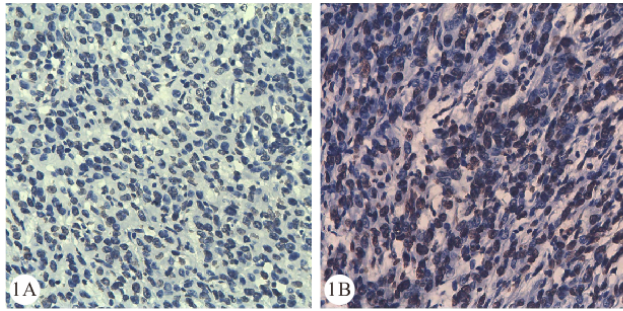


图 1 转染 24 h 后各组 T24 细胞凋亡情况。HE × 400  
Fig 1 The apoptosis of T24 cells at 24 h after transfection. HE × 400 after transfection under fluorescence microscopy. × 400

A: Empty vector group; B: Recombinant plasmid group

发现细胞死亡更多,已不适合继续观察。考虑转染的介质脂质体可能具有一定的毒性,且转染效率并未随时间的延长而增高,因此后继实验及检测均在转染后 24 h 进行。

### 2.3 转染后各组细胞凋亡情况

空白对照组凋亡率为(3.23±0.45)%,空载体质粒组为(8.98±1.62)%,重组质粒组为(43.61±2.69)%。重组质粒组与空载体质粒组、空白对照组凋亡率之间的差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),说明转染 RUNX3 基因后加速了膀胱癌 T24 细胞的凋亡。

### 2.4 各组细胞 RUNX3、Smad4 mRNA 表达水平

空白对照组和空载体质粒组细胞中均无 RUNX3 基因表达,重组质粒组细胞中有 RUNX3 基因表达。同时,与空载体质粒组比较,重组质粒组 T24 细胞中 Smad4 基因表达也升高( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 各组细胞 RUNX3、Smad4 mRNA 表达的比较

Group	n	RUNX3 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )	Smad4 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )
Blank control	20	0	0.66±0.32
Empty vector	20	0	0.69±0.46
Recombinant plasmid	20	2.79±0.36#*★	1.23±0.16#*★

#  $P < 0.01$ , vs. blank control group; ★  $P < 0.01$ , vs. empty vector group

## 3 讨论

研究发现 RUNX3 在多种肿瘤中常常处于失

活的状态<sup>[2]</sup>。通过对细胞信号转导的调控, RUNX3 基因能够对细胞增殖、凋亡以及分化等多种生物行为产生影响<sup>[3]</sup>。RUNX3 作为下游的一个转录因子,参与到 TGF-β 信号通路诱导生长抑制的过程中<sup>[3-4]</sup>,其表达的沉默或减弱可导致 TGF-β 信号途径紊乱,引发细胞凋亡障碍,导致肿瘤发生<sup>[5]</sup>。Sma 和 Mad 蛋白及其类似物统称为 Smad (small mothers against dpp), Smad 蛋白是 TGF-β 受体复合物下游的主要信号调节蛋白,存在于细胞浆中,在整个发育过程和几乎所有成熟组织中均有表达<sup>[6]</sup>,其功能是把 TGF-β 与其受体结合后产生的信号从胞质传导到细胞核内<sup>[7]</sup>。众多的研究提示, Smad 蛋白与人类肿瘤的发生与发展关系密切<sup>[8]</sup>。在这之中, Smad4 是其家族重要成员, Smad4 作为一种肿瘤抑制因子<sup>[9]</sup>,基因的突变或缺失均可导致其功能的失活;并且其肿瘤抑制活性可能不全部依赖于 Smad4 信号转导途径, Smad4 可作为独立的因子产生肿瘤抑制作用<sup>[10]</sup>。在将 TGF-β 信号从细胞表面受体转入细胞核内特异性靶点的过程中, RUNX3 扮演了重要的角色。当 TGF-β 与 Smad 结合形成复合物, RUNX3 能够与激活后的 Smad 复合物相互作用,共同调控靶基因的转录<sup>[8]</sup>。有研究指出, RUNX3 在 TGF-β 介导的上皮细胞增殖的负性调节中发挥至关重要的作用,其能够对细胞增殖、凋亡、恶变等多种细胞行为做出调控<sup>[11]</sup>。

转染 48 h 后 2 组的细胞绿色荧光无增多,同时

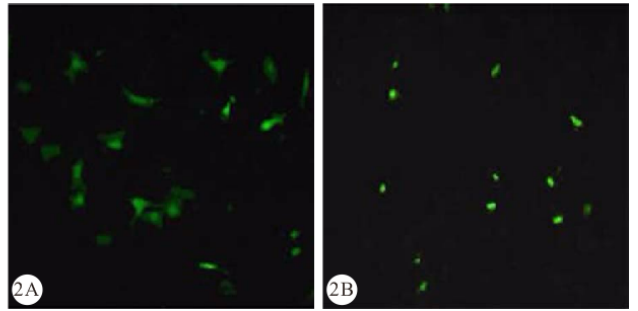


图 2 倒置荧光显微镜下观察转染 24 h 后各组 T24 细胞的绿色荧光表达。× 400  
Fig 2 The expression of green fluorescent protein of T24 cells at 24 h

与正常膀胱组织中的细胞不同, T24 膀胱癌细胞中的 RUNX3 基因表达缺失,而当对 T24 细胞转

染 *RUNX3* 基因后,其细胞凋亡活动增强<sup>[12]</sup>。范海涛等<sup>[13]</sup>通过对正常膀胱及膀胱癌的组织进行免疫组化检测,发现在正常膀胱组织中呈高表达的 Smad4 蛋白,在膀胱癌组织中则呈现低表达或无表达,因此研究人员推测膀胱细胞癌变的原因是由于 Smad4 基因变异所导致的细胞周期失调。彭克亮等<sup>[14]</sup>在其研究中进一步发现,Smad4 蛋白不仅在膀胱癌组织中呈现较低的阳性表达率,并且其阳性表达率的高低与肿瘤的病理分级和临床分期呈显著的负相关。

本研究通过构建 pIRES-EGFP-RUNX3 质粒,对 T24 膀胱癌细胞进行转染,成功使 T24 细胞中的 *RUNX3* mRNA 表达增加,并且发现随着 *RUNX3* mRNA 表达恢复,Smad4 mRNA 表达水平在转染后的 T24 细胞中明显增强,细胞的凋亡率也显著增加。因此我们推测,*RUNX3* 基因通过促进 Smad4 表达调控膀胱肿瘤细胞的增殖与凋亡。本实验从基因及蛋白水平研究膀胱癌细胞系中该信号通路的变化,为阐明膀胱癌的发病机制,以及膀胱癌的诊治及复发监测等提供了新靶点,但未研究膀胱肿瘤组织细胞中的表达变化,且膀胱癌的发病机制复杂,所涉及的基因和信号通路众多,因此进一步的深入研究尚待展开。

### 参 考 文 献

- [1] 刘 竞,李 康,邱明星. TGF- $\beta$ 1 对 VEGF 在膀胱肿瘤血管生成中的调节作用. 四川大学学报(医学版),2014,45(3):464-466.
- [2] ITO Y,MIYAZONO K. RUNX transcription factors as key targets of TGF-beta superfamily signaling. *Curr Opin Genet Dev*,2003,13(1):43-47.
- [3] BAE SC,CHOI JK. Tumor suppressor activity of *RUNX3*. *Oncogene*,2004,23(24):4336-4340.
- [4] WATANABE K,SUGAI M,NAMBU Y, *et al*. Requirement

for Runx proteins in IgA class switching acting downstream of TGF-beta 1 and retinoic acid signaling. *J Immunol*,2010,184(6):2785-2792.

- [5] FAINARU O,WOOLF E,LOTEM J, *et al*. *RUNX3* regulates mouse TGF- $\beta$ -mediated dendritic cell function and its absence results in airway inflammation. *EMBO J*,2004,23(4):969-979.
- [6] ZHU B,KYPRIANOU N. Transforming growth factor beta and prostate cancer. *Cancer Treat Res*,2005(126):157-173.
- [7] ATTISANO L,LEE-HOEFLICH ST. The Smads. *Genome Biol*,2001,2(8):REVIEWS3010[2015-11-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC138956/>.
- [8] NICOLÁS FJ, HILL CS. Attenuation of the TGF- $\beta$ -Smad signaling pathway in pancreatic tumor cells confers resistance to TGF- $\beta$ -induced growth arrest. *Oncogene*,2003,22(24):3698-3711.
- [9] LiN X, LIANG M, LIANG YY, *et al*. Activation of transforming growth factor-beta signaling by SUMO-1 modification of tumor suppressor Smad4/DPC4. *J Biol Chem*,2003,278(21):18714-18719.
- [10] TAKAKU K, OSHIMA M, MIYOSHI H, *et al*. Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both *Dpc4* (*Smad4*) and *Apc* genes. *Cell*,1998,92(5):645-656.
- [11] ZAIDI SK, SULLIVAN AJ, VAN WIJNEN AJ, *et al*. Integration of Runx and Smad regulatory signals at transcriptionally active subnuclear sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2002,99(12):8048-8053.
- [12] 温机灵,周祥福,温机智,等. 抑癌基因 *RUNX3* 在膀胱癌 T24 细胞株中的表达以及对凋亡的影响. 中华腔镜泌尿外科杂志(电子版),2008,2(4):51-55[2015-11-13]. <http://202.115.54.38/article/read.aspx?id=30415720>.
- [13] 范海涛,白利群,陈秀玲,等. 人膀胱癌中 TGF- $\beta$ 1 及其信号转导分子的表达及意义. *肿瘤*,2006,26(2):181-183.
- [14] 彭克亮. 膀胱移行细胞癌中 Smad4 的表达及其与血管生成的关系. 湖南:中南大学,2007:1-46.

(2016-01-08 收稿,2016-05-14 修回)

编辑 汤 洁