

· 论 著 ·

基因沉默 Delta N p63 对膀胱肿瘤生长抑制和 CDK4 的影响*

何云锋, 吴小候[△], 唐 伟, 王德林, 尹志康, 蒲 军, 陈 刚

(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科 400016)

摘要:目的 采用 RNA 干扰(RNAi)方法,研究当 Delta N p63 基因的表达沉默后,对人膀胱癌裸鼠皮下移植模型肿瘤的控制作用,并检测对细胞周期素依赖性激酶 4(CDK4)基因和蛋白表达的影响,进一步揭示 Delta N p63 基因在膀胱肿瘤中的作用机制。方法 首先构建 Delta N p63 基因特异性短发卡 RNA(shRNA)表达质粒,将表达质粒转染至裸鼠皮下移植模型肿瘤瘤体内,比较各组肿瘤体积,光镜下检测肿瘤组织病理学改变,RT-PCR 方法检测 CKD4 基因的表达变化,Western blot 和 SP 免疫组化检测 CKD4 蛋白表达变化。结果 质粒注射到肿瘤 8 周后,治疗组、对照组与生理盐水组比较,治疗组与生理盐水组瘤体体积比较差异有统计学意义($P < 0.01$),抑瘤率 74.62%。光镜结果显示治疗组肿瘤生长受到明显抑制,细胞核分裂象明显减少,可见坏死和凋亡肿瘤细胞、局部炎症细胞浸润。RT-PCR 结果显示治疗组 CKD4 基因表达降低,蛋白检测结果显示 CKD4 蛋白表达下降。结论 沉默 Delta N p63 表达后,可显著抑制人膀胱癌裸鼠肿瘤模型中肿瘤的生长,Delta N p63 可能通过抑制 CKD4 的表达而抑制肿瘤的细胞生长。

关键词:RNA 干扰;细胞周期蛋白依赖激酶 4;Delta N p63 基因

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.06.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)06-0521-03

Inhibitory effect of tumor growth and CKD4 expressing by silencing Delta N p63 gene on human transitional cell carcinoma of bladder*

He Yunfeng, Wu Xiaohou[△], Tang Wei, Wang Delin, Yin Zhikang, Pu Jun, Chen Gang

(Department of Urology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the inhibitory effect of tumor growth and ckd4 expressing by silencing Delta N p63 gene with short hairpin RNA on human transitional cell carcinoma of the bladder(TCCB) in xenograft nude mice through RNAi technique. **Methods** Human TCCB 5637 cells were transplanted into nude mice to establish xenograft tumors, Delta N p63 specific shRNA expression plasmid was transfected into the tumors, the tumor volume was observed, tumor morphology was observed with HE staining. The inhibitory effect of ckd4 gene was examined with semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), ckd4 protein was examined by the immunohistochemical staining assay and Western blot. **Results** Delta N p63 specific shRNA expression plasmid was transfected into the tumors. After 8 weeks, the tumor volume was significantly smaller in the treated group than in the control group and the normal saline group($P < 0.01$), the inhibition rate was 74.62% in the treated group. In the treated group the necrosis and decrease of karyokinesis were found under light microscope, inflammatory cells were also found, there was no such change in the control group and the normal saline group. Delta N p63-shRNA directly down-regulated the expression of ckd4 protein and mRNA. **Conclusion** The Delta N p63-shRNA expression plasmid can significantly inhibit the growth of TCCB in nude mice and also can inhibit the cellular proliferation of TCCB through inhibit ckd4.

Key words:RNA interference; cyclin-dependent kinase 4; Delta N p63 gene

Delta N p63 是 p63 基因的 2 个亚型之一,与 p63 基因的另外一个亚型 Ta p63 相反,Delta N p63 在膀胱肿瘤中是一个致癌基因,虽然目前关于 Delta N p63 基因在膀胱肿瘤中已经进行了大量的研究,但其具体作用机制仍不明确。已经有研究证实,Delta N p63 在上皮源性肿瘤(包括膀胱肿瘤)中是一个癌基因^[1-4],如果能够通过抑制 Delta N p63 的表达来达到抑制膀胱肿瘤的生长,则可为膀胱肿瘤的治疗提供一个新的途径。作者既往的研究已经证实,沉默 Delta N p63 基因的表达后,可以导致膀胱肿瘤细胞周期停滞在 G₀/G₁ 期,可以抑制细胞周期素 D₁ (cyclin D₁) 的表达^[5]。本文拟通过检测基因沉默 Δ Np63 的表达抑制后对 cyclin D1 下游因子细胞周期素依赖性激酶 4 (cyclin-dependent kinase 4, CDK4) 的影响,进而对 Delta N p63 在膀胱肿瘤中的机制进行进一步探讨。

1 材料与方

1.1 材料 BALB/c 裸鼠,4~6 周龄,雌性,体质量 18~20 g,

由重庆医科大学实验动物中心清洁级饲养间提供和代养;人膀胱移行细胞癌细胞株 5637 细胞购于中科院上海细胞所。Pgenesil-1 表达质粒购于武汉晶赛公司;转染试剂 in vivo-jet-PETM polypuls-transfection 购于 Invitrogen 公司;Delta N p63 鼠抗人单克隆抗体购于 Santa 公司,SP-9002 羊抗鼠 IgG 免疫组化试剂、ZLI-9032 DAB 显色试剂、CKD4 兔抗人多克隆抗体、羊抗兔 IgG 免疫组化试剂购于北京中杉金桥公司;RP-MI1640 培养基购于 Gibco 公司;胎牛血清购于 Gibco 公司。

1.2 方法

1.2.1 构建 Delta N p63 shRNA 表达质粒 Genebank 查阅到 Delta N p63 的全长序列,采用通用的短发卡 RNA (short hairpin, shRNA) 设计原理,设计 Delta N p63 靶序列为 AAT GCC CAG ACT CAA TTT AGT (19~40 bp),所构建质粒经酶切鉴定和测序鉴定证实序列准确无误^[5]。

1.2.2 建立人膀胱肿瘤裸鼠皮下肿瘤模型 10% 的胎牛血清

加 RPMI1640 培养 5637 细胞,取对数生长期的 5637 细胞,采用胰蛋白酶消化 5637 细胞,无血清 RPMI1640 重悬 5637 细胞为 1×10^7 /mL。在裸鼠右侧背部皮下接种 5637 细胞悬液 0.2 mL。密切观察接种部位肿瘤生长情况及裸鼠生存情况,肿瘤体积达到 60 mm³ 左右时进行实验分组,肿瘤体积计算方法 $V = 1/2ab^2$, a、b 分别为最大、最小直径,单位 mm^[5]。

1.2.3 Delta N p63 shRNA 表达质粒治疗 15 只成瘤裸鼠随机分为 3 组,每组 5 只,治疗组注射 Delta N p63 shRNA 表达质粒,对照组注射 control shRNA 表达质粒,生理盐水组注射与质粒同样体积生理盐水代替质粒。注射方法为肿瘤体内多点注射,50 μg 表达质粒或 50 μg 对照质粒或 25 μL 灭菌生理盐水加 400 μL 5% 琼脂糖加 10 μL 转染试剂。第 1 次注射后间隔 4 周再注射 1 次,第 1 次注射后第 8 周放血法处死裸鼠,常规检测裸鼠血常规和肝、肾功能,对各组裸鼠的心、肝、肾、脾等主要脏器进行常规病理学观察。给药期间每日观察各组裸鼠的精神、饮食、活动的一般情况;隔日测量裸鼠的体质量、肿瘤最大和最小直径,计算肿瘤体积。

抑瘤率 = (1 - Delta N p63-shRNA 组或 control-shRNA 组体积/生理盐水组体积) × 100%。

1.2.4 光镜下肿瘤病理改变 将部分肿瘤组织采用 4% 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋、切片,HE 染色后光镜下观察肿瘤组织的病理改变。

1.2.5 RT-PCR 提取肿瘤组织总 RNA 并按试剂盒说明逆转录为 cDNA,PCR 反应:CKD4 上游引物 5'-GTC CGT GTT CAC ATG ACT AAA G-3',下游引物 5'-GTG GTC GGA GTC TTC ATT GTG C-3',扩增片断 502 bp。以 GAPDH 作为内参照。反应条件为:94 °C 2 min 灭活逆转录酶,94 °C 变性 1 min,51 °C 退火 30 s 71.5 °C 延伸 1 min 共 34 个循环,最后 72 °C 再次延伸 7 min。取 5 μL PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶(含 EB 0.5 μg/mL)电泳,在 BIO-RAD 图像分析仪上观察并拍照。

1.2.6 免疫组化 将部分肿瘤组织用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋、切片。免疫组化采用链霉素-过氧化物酶(SP)法。光镜下 CKD4 阳性反应主要位于细胞核,表现为肿瘤细胞核内棕黄色均匀细颗粒,细胞质有少量阳性反应。

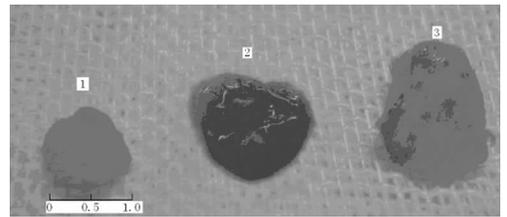
1.2.7 Western blot 将液氮冻存的肿瘤组织研磨,PBS 洗涤细胞,Western blot 检测 CKD4 蛋白的表达,一抗为 1:1 000 兔抗人 CDK4,二抗为 1:4 000 羊抗兔 IgG/HRP,化学发光检测,发光成像仪取像。图像用在 BIO-RAD 成像仪上成像分析系统分析,以对照蛋白的光强度为参照,其他相应蛋白光强度与之比较,计算减弱强度。

1.3 统计学处理 实验数据采用 $\bar{x} \pm s$,用 SPSS 11.5 统计学软件进行数据分析。采用多均数方差分析和平均值之间的多重比较 Turkey 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裸鼠肿瘤模型的一般情况和毒副作用 5637 细胞接种于裸鼠后 30 d 可见瘤体直径达成瘤标准,在治疗观察期内各组生长情况良好,15 只裸鼠共有瘤体 15 个形成,每只一个瘤体。饮食无特殊变化,精神状态较好,体质量无减轻,活动自如。血常规和肝、肾功能检测显示各组差异无统计学意义,各组裸鼠的心、肝、肾、脾等主要脏器光镜检查无特殊异常发现。

2.2 治疗组肿瘤生长抑制 注射质粒治疗 8 周后进行体积检测,治疗组肿瘤体积明显小于对照组和生理盐水组,差异有统计学意义($P < 0.01$);对照组和生理盐水组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 1、表 1。



1: 治疗组;2: 对照组;3: 生理盐水组。

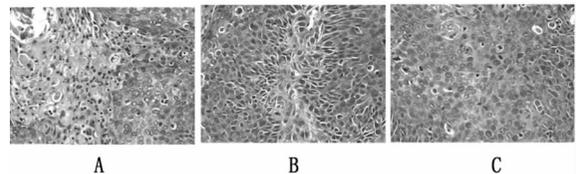
图 1 各组肿瘤体积大小

表 1 肿瘤体积大小和抑瘤率

组别	肿瘤体积($\bar{x} \pm s$, mm ³)	抑瘤率(%)
治疗组	207.55 ± 24.12*	74.62
对照组	786.07 ± 42.37	3.88
生理盐水	817.77 ± 31.51	0.00

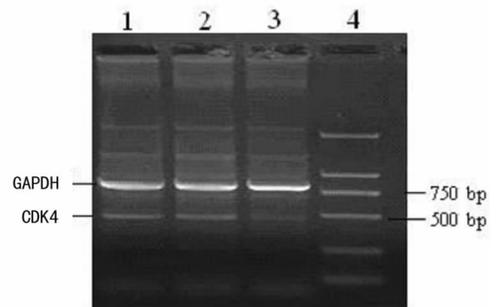
*: $P < 0.01$, 与对照组和生理盐水组比较。

2.3 光镜检查结果 光镜下可见对照组和生理盐水组肿瘤细胞生长形态良好,肿瘤细胞形态不规则,肿瘤细胞核分裂象较多。治疗组肿瘤细胞生长明显受到抑制,细胞核分裂象明显减少,可见肿瘤坏死区域,坏死区内细胞结构明显消失,可见细胞崩解碎片,见图 2。



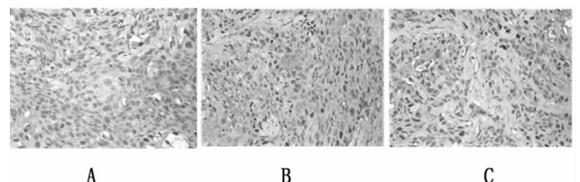
A: 治疗组;B: 对照组;C: 生理盐水组

图 2 光镜下肿瘤组织病理学改变(×400)



1: 对照组;2: 生理盐水组;3: 实验组;4: Marker。

图 3 RT-PCR 检测 CDK4 基因的表达



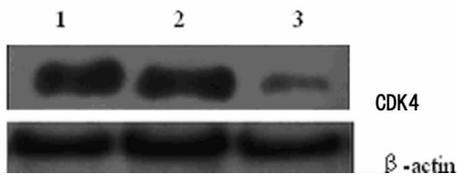
A: 治疗组;B: 对照组;C: 生理盐水组。

图 4 免疫组化检测 CDK4 蛋白的表达(×400)

2.4 RT-PCR 结果 与生理盐水组和对照组相比,治疗组的 CKD4 基因表达下降,生理盐水组和对照组之间没有明显差别,见图 3。

2.5 CKD4 蛋白的表达 免疫组化结果显示,与生理盐水组

和对照组相比,治疗组的 CKD4 蛋白阳性细胞数明显下降,生理盐水组和对照组之间没有明显差别(图 4)。Western blot 结果显示,与生理盐水组和对照组相比,治疗组的 CKD4 蛋白表达下降,生理盐水组和对照组之间没有明显差别,见图 5。



1:对照组;2:生理盐水组;3:治疗组。

图 5 Western blot 检测 cdk4 蛋白的表达

3 讨 论

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术已经广泛被用来特异性的沉默某种基因的表达,尤其是在肿瘤治疗的研究中 RNAi 已经成为一种不可或缺的手段^[6]。本实验采用的 Delta N p63 shRNA 表达质粒是通过体外构建方法得到,当 Delta N p63 shRNA 表达质粒转染至细胞内后,由细胞内启动子转录形成 shRNA 从而在体内产生 Delta N p63 特异性 siRNA,进而沉默 Delta N p63 基因的表达^[8],其特点是可以稳定表达,转染效率较高,适合于长时间的基因沉默研究^[9-11]。通过转染 Delta N p63 shRNA 表达质粒,在人膀胱膀胱移行细胞癌细胞 5637 细胞内就能够成功表达 Delta N p63 特异性的 shRNA,发挥 RNAi 作用来特异性沉默 Delta N p63 的表达。在前期的研究中已经证实其稳定表达并能够特异性沉默 Delta N p63 基因^[5]。

将人膀胱移行细胞癌细胞 5637 细胞接种到裸鼠皮下,7 d 后就可见肿瘤逐渐形成,30 d 后肿瘤体积达 60 mm³ 左右,达到成瘤标准。将 Delta N p63 shRNA 特异性表达质粒多点注射到肿瘤体内,在体内转染试剂 in vivo-jetPETM 的介导下质粒可进入肿瘤细胞内,进而表达 Delta N p63 特异性的 shRNA,从而特异性沉默 Delta N p63 的表达。作者观察到,当 Delta N p63 表达沉默后,治疗组肿瘤生长明显受到抑制,治疗组抑瘤率达到 74.62%,肿瘤抑制作用明显。对照组和生理盐水组肿瘤生长未受到抑制,说明阴性对照质粒和转染试剂对肿瘤无治疗作用。注射后裸鼠饮食无特殊变化,精神状态较好,体质量无减轻,活动自如。血常规和肝、肾功能检测显示各组差异无统计学意义,各组裸鼠的心、肝、肾、脾等主要脏器光镜检查无特殊异常发现。初步提示 Delta N p63 特异性的 shRNA 对裸鼠的近期毒副作用不明显。

光镜下治疗组肿瘤细胞生长明显受到抑制,细胞核分裂象明显减少,可见肿瘤坏死区域,坏死区内细胞结构明显消失,可见细胞崩解碎片。而对照组和生理盐水组肿瘤细胞生长形态良好,肿瘤细胞形态不规则,肿瘤细胞核分裂象较多。表明 Delta N p63 基因沉默后,可以抑制膀胱移行细胞癌肿瘤的增殖和促进细胞的凋亡,其机制可能与介导细胞周期的相关基因和蛋白有关。结合既往检测到 cyclin D1 蛋白表达下降和细胞周期的停滞^[5],作者推测当 Delta N p63 基因沉默后,可以影响膀胱移行细胞癌中与肿瘤细胞周期密切相关的某些重要基因,如 cyclin D1,进而影响其下游的 CDK4 基因和蛋白的表达改变,从而达到对肿瘤细胞周期的影响和肿瘤相关病理改变。

因此作者进一步检测了 Delta N p63 shRNA 表达质粒治疗裸鼠肿瘤模型后,cyclin D1 的下游分子 CKD4 基因和蛋白

的表达情况,拟进一步揭示 Delta N p63 shRNA 表达质粒治疗人膀胱移行细胞癌的作用机制。结果表明,当治疗组 Delta N p63 基因表达沉默后,RT-PCR 结果显示治疗组 CKD4 基因表达明显下降,免疫组化和 Western blot 检测结果显示治疗组 CKD4 蛋白的表达明显下降,对照组和生理盐水组无此改变。参考相关文献认为其机制可能为,Delta N p63 基因是 p53 家族的成员之一,在蛋白质结构上与 p53 具有同源性特征,因此 Delta N p63 能活化 p53 的某些靶基因来发挥作用,cyclin D1 就是这些靶基因之一,而 CKD4 又是 cyclin D1 的下游分子,因此当 Delta N p63 基因表达下降时就可以间接导致 CKD4 基因和蛋白抑制^[13-15]。

本研究结果表明,Delta N p63 特异性表达质粒转染肿瘤后,可以抑制人膀胱移行细胞癌肿瘤的生长,其可能的机制为 Delta N p63 影响了细胞周期中的 cyclin D1 和 CDK4 基因和蛋白的改变。

参考文献:

- [1] Karni-Schmidt O, Castillo-Martin M, HuaiShen T, et al. Distinct expression profiles of p63 variants during urothelial development and bladder cancer progression[J]. *Am J Pathol*, 2011; 178(3): 1350-1360.
- [2] Karni-Schmidt O, Castillo-Martin M, HuaiShen T, et al. Distinct expression profiles of p63 variants during urothelial development and bladder cancer progression[J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(3): 1350-1360.
- [3] 何云锋, 吴小候. p63 的功能及在膀胱肿瘤中的研究进展[J]. *重庆医学*, 2005, 34(6): 934-936.
- [4] Yoshio Y, Ishii K, Arase S, et al. Effect of transforming growth factor α overexpression on urogenital organ development in mouse[J]. *Differentiation*, 2010, 80(2/3): 82-88.
- [5] He YF, Wu XH, Tang W, et al. Impaired Delta Np63 expression is associated with poor tumor development in transitional cell carcinoma of the bladder[J]. *J Korean Med Sci*, 2008(23): 825-832.
- [6] Irwin MS, Kaelin WG. p53 family update: p73 and p63 develop their own identities[J]. *Cell Growth Differ*, 2001, 12(7): 337-349.
- [7] Sayan AE, D'Angelo B, Sayan BS, et al. p73 and p63 regulate the expression of fibroblast growth factor receptor 3[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 394(3): 824-828.
- [8] Buza N, Cohen PJ, Hui P, et al. Inverse p16 and p63 expression in small cell carcinoma and high-grade urothelial cell carcinoma of the urinary bladder[J]. *Int J Surg Pathol*, 2010, 18(2): 94-102.
- [9] Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(6): 457-467.
- [10] Fukushima H, Koga F, Kawakami S, et al. Loss of Delta Np63 alpha promotes invasion of urothelial carcinomas via N-cadherin/Src homology and collagen/extracellular signal-regulated kinase pathway[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(24): 9263-70.

磷酸化 eIF2 α 、CHOP 表达增加和细胞凋亡^[10]。HCV 感染的 SCID/Alb-uPA 鼠肝内, GRP78 和 Bax 表达增加, 肝细胞出现凋亡症状^[11]。GRP78 激活与肝细胞癌发生密切相关^[12]。在持续性感染 HCV 患者肝内, ATF-6、IRE1 和 PERK 激活, 活性氧和 NF- κ B 水平升高^[13-14], 显示在患者体内非折叠蛋白质反应和内质网超负荷反应被诱导。与 NS4B 在宫颈癌细胞 HeLa 的持续表达和肝细胞 Huh7 的过表达类似^[3-4]。本研究发现 NS4B 在肝细胞 HepG2 的持续表达也能诱导 XBP1 mRNA 剪接、GRP78 和 XBP1 启动子激活。这些结果揭示 NS4B 在 HCV 诱导的 UPR、HCV 复制及致癌作用中可能发挥重要作用。

蛋白质如一些病毒蛋白在内质网的过度积累会导致 Ca²⁺ 从内质网释放, 释放出来的 Ca²⁺ 进一步引起 NF- κ B 激活^[1]。表 2 显示 NS4B 在肝细胞 HepG2 的持续表达引起 NF- κ B 激活, 并且这种激活依赖 Ca²⁺ 信号, 说明 NS4B 肝细胞 HepG2 的持续表达也能激活内质网应激反应的 EOR 信号通路。NF- κ B 可启动众多基因转录, 直接参与多种人类疾病如炎症和癌症的形成发展^[15]。本研究发现 NS4B 激活肝细胞 NF- κ B 揭示 NS4B 可能在 HCV 感染引起的炎症与癌症中发挥一定作用。

参考文献:

- [1] Pahl HL. Signal transduction from the endoplasmic reticulum to the cell nucleus [J]. *Physiol Rev*, 1999, 79(3): 683-701.
- [2] Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease [J]. *J Hepatol*, 2011, 54(4): 795-809.
- [3] 郑义, 高博, 景维, 等. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS4B 诱导细胞非折叠蛋白反应 [J]. *中国病毒学*, 2005, 20(4): 374-378.
- [4] Zheng Y, Gao B, Ye L, et al. Hepatitis C virus non-structural protein NS4B can modulate an unfolded protein response [J]. *J Microbiol*, 2005, 43(6): 529-536.
- [5] Lemon SM, McKeating JA, Pietschmann T, et al. Development of novel therapies for hepatitis C [J]. *Antiviral Res*, 2010, 86(1): 79-92.
- [6] 熊舒珺, 吴晓玉, 孔令保. 丙型肝炎病毒 RNA 聚合酶在

HepG2 细胞的稳定表达及活性分析 [J]. *实用医学杂志*, 2010, 26(3): 355-388.

- [7] 孔令保, 吴晓玉, 李昆太, 等. 持续表达 HCV NS5B 的 Bel-7402 细胞系的构建与鉴定 [J]. *江西农业大学学报*, 2009, 31(4): 717-723.
- [8] Egger D, Wolk B, Gosert R, et al. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex [J]. *J Virol*, 2002, 76(12): 5974-5984.
- [9] Tardif KD, Mori K, Siddiqui A. Hepatitis C virus subgenomic replicons induce endoplasmic reticulum stress activating an intracellular signaling pathway [J]. *J Virol*, 2002, 76(15): 7453-7459.
- [10] Sekine-Osajima Y, Sakamoto N, Mishima K, et al. Development of plaque assays for hepatitis C virus-JFH1 strain and isolation of mutants with enhanced cytopathogenicity and replication capacity [J]. *Virology*, 2008, 371(1): 71-85.
- [11] Joyce MA, Walters KA, Lamb SE, et al. HCV induces oxidative and ER stress, and sensitizes infected cells to apoptosis in SCID/Alb-uPA mice [J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5(2): e1000291.
- [12] Maio M, Coral S, Fratta E, et al. Epigenetic targets for immune intervention in human malignancies [J]. *Oncogene*, 2003(22): 6484-6488.
- [13] Asselah T, Bièche I, Mansouri A, et al. In vivo hepatic endoplasmic reticulum stress in patients with chronic hepatitis C [J]. *J Pathol*, 2010, 221(3): 264-274.
- [14] Tai DI, Tsai SL, Chen YM, et al. Activation of nuclear factor kappaB in hepatitis C virus infection; implications for pathogenesis and hepatocarcinogenesis [J]. *Hepatology*, 2000, 31(3): 656-664.
- [15] Zhang Z, Rigas B. NF-kappaB, inflammation and pancreatic carcinogenesis; NF-kappaB as a chemoprevention target (review) [J]. *Int J Oncol*, 2006, 29(1): 185-192.

(收稿日期: 2011-03-07 修回日期: 2011-10-13)

(上接第 523 页)

- [11] 何云锋, 吴小候, 罗春丽, 等. Δ Np63 mRNA 在膀胱癌组织中的表达及意义 [J]. *重庆医学*, 2007, 36(14): 1350-1351.
- [12] Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(6): 457-467.
- [13] Yang D, Buchholz F, Huang Z, et al. Short RNA duplexes produced by hydrolysis with *Escherichia coli* RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(15): 9942-9947.

- [14] Tokar EJ, Diwan BA, Waalkes MP. Arsenic exposure transforms human epithelial stem/progenitor cells into a cancer stem-like phenotype [J]. *Environ Health Perspect*, 2010, 118(1): 108-115.
- [15] Castillo-Martin M, Domingo-Domenech J, Karni-Schmidt O, et al. Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis [J]. *Urol Oncol*, 2010, 28(4): 401-408.

(收稿日期: 2011-04-13 修回日期: 2011-08-10)