

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.25.002

CCM 联合 HCPT 对人膀胱癌 BIU-87 细胞 YAP、TEAD1 表达及生物学功能的影响*

何江¹, 曹建佳², 陈柯宏², 王德林^{2△}, 盛夏², 李文宾², 黄亮亮²

(1. 重庆医科大学附属大学城医院消化神经中心 401331;

2. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科 400016)

[摘要] **目的** 探讨姜黄素(CCM)联合羟基喜树碱(HCPT)对人膀胱癌 BIU-87 细胞中 YAP、TEAD1 表达及凋亡的作用。**方法** CCM 和 HCPT 分别单独与联合用药处理膀胱癌 BIU-87 细胞。免疫组织化学检测膀胱癌组织及癌旁组织中 YAP 和 TEAD1 表达情况,流式细胞仪检测细胞凋亡情况;RT-PCR 和 Western blot 检测 YAP 及 TEAD1 基因的 mRNA 和蛋白的表达变化。**结果** YAP 和 TEAD1 在膀胱癌组织及癌旁组织中均有阳性表达,差异有统计学意义($P < 0.05$)。流式细胞仪检测结果显示 CCM 和 HCPT 均可有效诱导膀胱癌细胞 BIU-87 的凋亡。CCM 组和 HCPT 组 BIU-87 细胞中 YAP 及 TEAD1 mRNA 和蛋白表达显著降低($P < 0.05$),联合用药组 YAP 及 TEAD1 mRNA 和蛋白表达更低($P < 0.05$)。**结论** CCM 和 HCPT 联合用药抗癌机制可能是通过抑制 Hippo 信号通路中 YAP 癌基因表达,下调 TEAD1,并诱导膀胱癌细胞凋亡产生。

[关键词] 姜黄素;膀胱肿瘤;羟基喜树碱;YAP;TEAD1**[中图分类号]** R737.14**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)25-3462-04

Effects of curcumin combined with hydroxycamptothecin on the expression of YAP, TEAD1 gene and biological function in human bladder cancer cell line BIU-87*

He Jiang¹, Cao Jianjia², Chen Kehong², Wang Delin^{2△}, Sheng Xia², Li Wenbin², Huang Liangliang²

(1. Gastroenterology and Neurology Center, University-Town Hospital, Chongqing Medical University,

Chongqing 401331, China; 2. Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of curcumin (CCM) combined with hydroxycamptothecin (HCPT) on YAP, TEAD1 and apoptosis in human bladder cancer cell line BIU-87. **Methods** CCM and HCPT were separately treatment and combined treatment of bladder cancer BIU-87 cells. Immunohistochemical(IHC) method was used to detect expression of YAP and TEAD1 in bladder cancer and tissue adjacent to carcinoma; Apoptosis rate of the human bladder cancer cell BIU-87 was detected by flow cytometry(FCM) instruments after CCM and HCPT were administered alone or in combination; Detection of YAP, TEAD1 gene mRNA and protein expression changes was depended on RT-PCR and Western blot. **Results** The results showed that YAP and TEAD1 had positive expressions in bladder cancer and tissue adjacent to carcinoma ($P < 0.05$), the difference had obvious significance. The results of detection by FCM showed that CCM and HCPT both induced apoptosis of bladder cancer cell BIU-87 effectively. The mRNA and protein expression of YAP and TEAD1 in human bladder cancer cell BIU-8 significantly reduced in both CCM group and HCPT group, and mRNA and protein expression of YAP and TEAD1 was lower in the combination group ($P < 0.05$). **Conclusion** CCM and HCPT combination anti-cancer mechanism may be through inhibiting the Hippo signaling pathway in YAP cancer gene expression, cut TEAD1, and induce bladder cancer cell apoptosis.

[Key words] curcumin; urinary bladder neoplasms; hydroxycamptothecin; YAP; TEAD1

膀胱癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤之一,发病率占90%~95%,居全球恶性肿瘤的第9位^[1]。治疗主要以早期手术或联合膀胱灌注化疗、晚期姑息化疗为主,但目前化疗机制尚不清楚,化疗缓解率较低,因此,寻找抑制膀胱癌生长的药物及探讨其抑癌机制成为当务之急。

姜黄素(CCM)为姜黄的重要活性物质之一,具有多种药物价值,如抗炎、抗突变、抗肿瘤^[2-4]。喜树碱中提取出的羟基喜树碱(HCPT)为抗癌作用最强的化合物,具有抗癌特性独特,高效低毒,抗癌谱面广,与多种抗肿瘤药无交叉耐药等特点,并对某些具有耐药性的肿瘤仍具有抗癌性。新发现的 Hippo 信号通路异常调控与人类肿瘤密不可分^[5], YAP 是

Hippo 信号通路中下游的关键因子之一, YAP 不能直接调控转录,需结合共转录因子 TEAD1 影响细胞增殖和凋亡^[6]。目前姜黄素与羟基喜树碱联合用药对膀胱癌 BIU-87 细胞的研究报道较少,因此,本研究将探讨姜黄素与羟基喜树碱联合对人膀胱癌 BIU-87 细胞中癌基因 YAP、下游转录因子 TEAD1 增殖和凋亡的影响,旨在为临床化疗提供新的方法,并阐明其抑癌机制。

1 材料与方法

1.1 组织学资料 标本为重庆医科大学附属第一医院泌尿外科 2009 年 2 月至 2012 年 6 月 36 例患者手术切取的膀胱癌组织及癌旁组织(切取距肿瘤组织大于 3 cm 的正常膀胱黏膜为

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30972999)。 作者简介:何江(1974—),主治医师,硕士,主要从事泌尿系肿瘤基础和临床方面的研究。 △ 通讯作者, E-mail: dlwangws@sina.com。

癌旁组织)。男 25 例,女 11 例,平均年龄 57.3 岁,均为无放疗治疗史的初发病例。膀胱癌组织病理类型:乳头状膀胱癌 27 例,浸润性膀胱癌 9 例。

1.2 实验材料 BIU-87 细胞获赠于重庆医科大学附属第一医院泌尿外科王德林教授;CCM、二甲基亚砜(DMSO)均为美国 Sigma 公司生产;HCPT 由重庆医科大学药理学实验室曹维国副教授惠赠;CCK-8 试剂盒购自重庆海韵生物公司;胎牛血清购自 Gibco 公司;RPMI1640 培养基购自 Hyclone 公司。YAP、TEAD1 及 GAPDH 引物由博培生物工程技术有限公司合成;总 RNA 提取试剂 RNAiso、逆转录试剂盒及 Tap 酶购自 Takara 大连宝生物工程有限公司;兔抗人 YAP、TEAD1 抗体购自 Santa Cruz 公司;兔抗人 β -actin 抗体、HRP 标记羊抗兔 IgG、RIPA 蛋白裂解液等试剂均购自四正柏生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养及药物处理 BIU-87 用含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,在 5% CO_2 37 °C 饱和湿度的环境下培养,待细胞生长密度约至 90% 时,用 0.25% 的胰酶将培养瓶中的细胞消化、传代。实验分为 4 组:对照组(未加药)、CCM 组(CCM 10 $\mu\text{mol/L}$)、HCPT 组(HCPT 1 $\mu\text{g/mL}$)和联合用药组(CCM 10 $\mu\text{mol/L}$ + HCPT 1 $\mu\text{g/mL}$)。

1.3.2 免疫组织化学 标本首先用 4% 多聚甲醛固定,再经梯度乙醇和二甲苯脱水,石蜡包埋后连续切片,厚度为 3~4 μm ,选择链霉素抗生物素-过氧化物酶三步法进行 YAP、TEAD1 表达水平检测。具体步骤:石蜡切片脱蜡,70%~100% 梯度乙醇脱水,枸橼酸缓冲液高温修复 3 次,冷却至室温,洗片 3 min \times 3 次;3% H_2O_2 室温孵育 20 min,洗片,5% 山羊血清 37 °C 封闭 30 min,倾去不洗;滴加一抗工作液,4 °C 过夜,洗片,加二抗工作液,37 °C 孵育 30 min,洗片,滴加少许辣根酶标记的链霉卵白素工作液,37 °C 孵育 30 min,洗片;DAB 显色,自来水充分冲洗,复染,脱水,透明,封片。结果以细胞核和(或)细胞质中棕黄色出现为阳性染色;细胞中胞质棕黄色范围大于 50%,胞核棕黄色范围大于 10% 和胞质胞核中均有棕黄色反应 3 种情况为高表达(++);单纯胞质棕黄色范围小于 50%,胞核棕黄色范围小于 10% 为低表达(+);胞核和胞质棕黄色范围均小于 10% 的为不表达(-)^[7]。

1.3.3 细胞凋亡率检测 待培养瓶细胞密度为 90% 左右时,弃掉培养液,0.25% 胰酶适度消化,吹打均匀,接种 2×10^5 /mL 于培养瓶。在前期预实验中发现在 CCM 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 、HCPT 浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 时抑制膀胱癌 BIU-87 细胞效率较高。各组培养 24 h 后,用胰酶消化细胞成单细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^6 /mL。磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 2 次,均匀

吹打成细胞悬液转移到 1.5 mL 的 EP 管中,分别加入 AnnexinV 和 PI,室温避光孵育 15 min 后,FCM 测定凋亡率。实验重复 3 次。

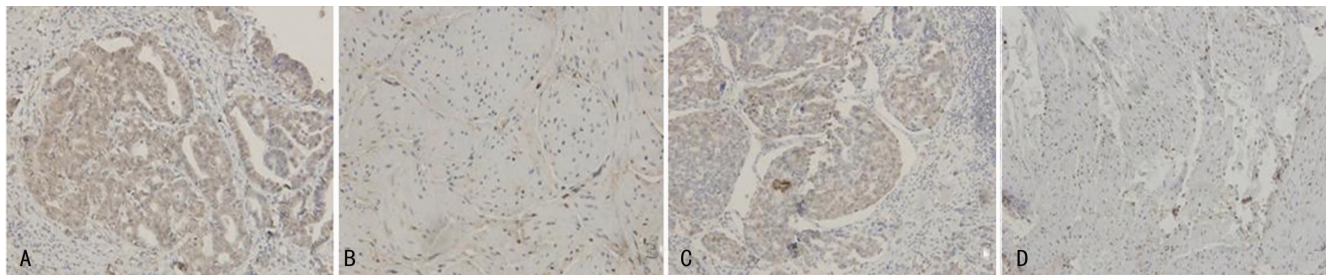
1.3.4 RT-PCR 检测 YAP 及 TEAD1 的 mRNA 收集上述各组细胞,用 RNAiso 按说明书提取各组约 10^6 个细胞总 RNA,用紫外线分光光度计检测纯度和浓度后,将 RNA 浓度调成一致并取等量模板,将逆转录试剂盒反转录为 cDNA,并进行 PCR 反应。YAP 上游引物:5'-TGA ACA AAC GTC CAG CAA GAT AC-3',下游引物:5'-CAG CCC CCA AAA TGA ACA GTA G-3',165 bp;GAPDH 内参上游引物:5'-ACC ACC ATG GAG AAG GCT GG-3',下游引物:5'-CTC AGT GTA GCC CAG GAT GC-3',500 bp;TEAD1 上游引物:5'-TGA ATC AGT GGA CAT TCG TCA-3',下游引物:5'-GCC ATT CTC AAA CCT TGC ATA-3',280 bp。扩增基因条件:95 °C 5 min,95 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 30 s,共 30 个循环,72 °C 5 min。PCR 产物经 3% 琼脂糖凝胶进行电泳,以 YAP 或 TEAD1 与内参 GAPDH 片段的条带光密度(OD)作半定量值比较作为 YAP 或 TEAD1 mRNA 相对表达水平,实验重复 3 次。

1.3.5 Western blot 检测 YAP 及 TEAD1 的蛋白表达 提取各处理组细胞总蛋白,BCA 法进行蛋白定量。每孔上样 60 μg 在 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)进行电泳分离后,将含有目的蛋白的凝胶条带转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,转膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入一抗(1:200 稀释)于 4 °C 冰箱中过夜。TBST 洗膜 10 min,共 3 次,然后加 HRP 标记的二抗(1:5 000)稀释,37 °C 2 h,再次用 TBST 洗膜 10 min,共 3 次,放置于凝胶成像仪中免疫印迹化学发光(ECL)显影,暗室下曝光,以 YAP 或 TEAD1 与内参 β -actin 条带密度比值表示 YAP 或 TEAD1 相对蛋白表达量,实验重复 3 次。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件,计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两组间比较采用 *t* 检验,多组均数比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

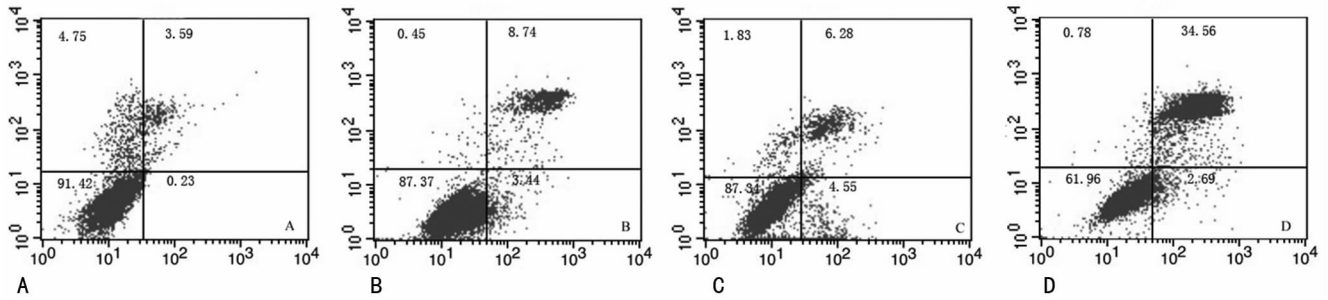
2 结 果

2.1 免疫组织化学检测 YAP、TEAD1 在膀胱癌和癌旁组织中表达 36 例膀胱癌组织中 YAP 的阳性率为 83.3% (30/36),棕黄色样阳性表达见于胞核和胞质,染色深;癌旁组织的阳性率为 13.9% (5/36),染色浅,表达多为胞质内,YAP 在膀胱癌和癌旁组织中的表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$);TEAD1 的阳性表达率为 63.9% (23/36),主要位于胞核,染色明显且深,癌旁组织的阳性表达率为 13.9% (3/36),染色较浅,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1、表 1。



A: YAP 在膀胱癌组织的表达;B: YAP 在癌旁组织的表达;C: TEAD1 在膀胱癌组织的表达;D: TEAD1 在癌旁组织的表达。

图 1 免疫组织化学检测 YAP、TEAD1 在膀胱癌和癌旁组织中表达($\times 400$)



A:对照组;B:CCM组;C:HCPT组;D:联合用药组。

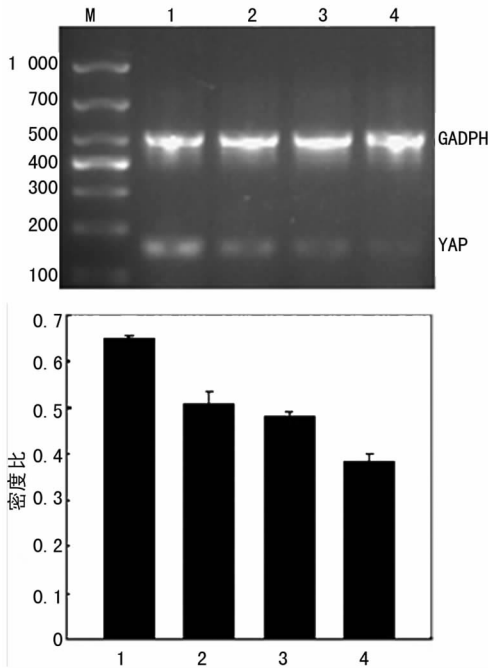
图 2 流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况

表 1 YAP 与 TEAD1 在膀胱癌和癌旁组织中表达

病理类型	n	YAP 表达情况(n)			阳性率 (%)	TEAD1 表达情况(n)			阳性率 (%)
		-	+	++		-	+	++	
膀胱癌组织	36	6	11	19	83.30	13	9	14	63.90
癌旁组织	36	31	4	1	13.90	33	3	0	8.33
合计	72	37	15	20	48.60	46	12	14	36.10

2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡率 细胞凋亡率:对照组 (3.82±0.11)%, CCM 组 (12.18±0.33)%, HCPT 组 (10.83±0.14)%,联合用药组(37.25±1.88)%。各组细胞凋亡率均明显高于对照组,差异有统计学意义(P<0.05),联合用药组显著高于其他组(P<0.05)。见图 2。

2.3 RT-PCR 检测 YAP、TEAD1 mRNA 表达水平 CCM 组、HCPT 组及联合用药组中 YAP、TEAD1 mRNA 表达均显著低于对照组,差异有统计学意义(P<0.05);联合用药组中 YAP、TEAD1 mRNA 表达显著低于 CCM 组、HCPT 组,差异有统计学意义(P<0.05)。见图 3、4。

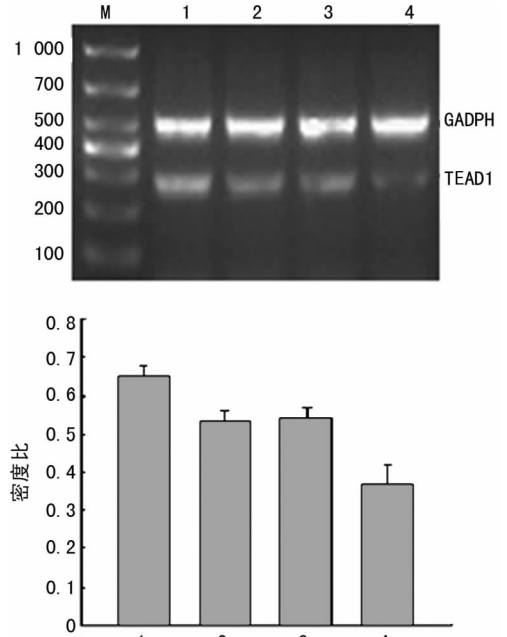


1:对照组;2:CCM组;3:HCPT组;4:联合用药组。

图 3 各组 YAP mRNA 表达变化

2.4 Western blot 检测 YAP、TEAD1 蛋白表达水平 与对照组相比,其余 3 组 YAP 和 TEAD1 蛋白表达均下降,差异有统计学意义(P<0.05),联合用药组比单独用药组下降更明显

(P<0.05)。见图 5。



1:对照组;2:CCM组;3:HCPT组;4:联合用药组。

图 4 各组 TEAD1 mRNA 表达变化

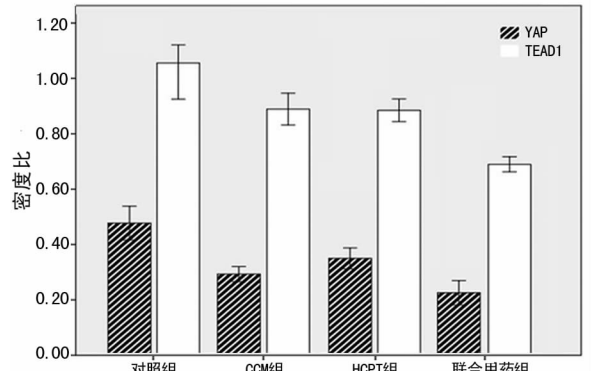
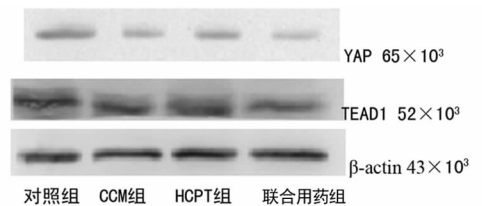


图 5 各组 YAP、TEAD1 蛋白表达变化

3 讨论

膀胱癌发病率高居泌尿系恶性肿瘤首位,其发生的具体机制不明。Hippo 信号通路可能参与膀胱癌的发生和发展。Li

等^[8]用免疫组织化学法检测发现 YAP 在膀胱癌组织中主要表达于细胞核和细胞质,不同病例表达强度也不同,阳性表达率高达 86.8%,在癌组织及正常组织中的表达差异有统计学意义,提示 YAP 在移行上皮细胞肿瘤中发挥致癌作用。本研究通过免疫组织化学法发现 YAP 和 TEAD1 在膀胱癌及癌旁组织中分别为高表达和低表达,说明 YAP 和 TEAD1 在膀胱癌中具有肿瘤特异性,其可能参与了膀胱癌细胞的增殖调控作用。

目前膀胱癌主要治疗方法仍依靠手术切除,对于保留膀胱的患者,术后灌注化疗是一种可预防肿瘤复发的有效、可靠手段^[9]。临床上,CCM 治疗肿瘤主要通过干扰肿瘤细胞增殖和促进肿瘤细胞凋亡来实现,这在以前有类似报道。Chauhan 等^[10]研究发现,长期食用姜黄的地区,其大肠癌及尿路上皮细胞癌的患病率显著低于其他地区。HCPT 是发现的喜树碱衍生物,具有抗癌活性高、毒性低等价值,是临床上用于膀胱癌化疗的重要药物。羟基喜树碱影响生物体内 Top I 的活性能力,此酶在调节超螺旋、连锁、去连锁等一系列包括核酸解节作用方面发挥作用,作用于 DNA 拓扑结构,引起相关细胞走向死亡。凋亡与基因的激活、表达和调控等有关,所以说是生物清除危害机体细胞的主要手段,在生物发育成长、免疫系统成熟、稳定组织及衰老中发挥关键作用^[11]。中药是目前研究肿瘤机制及治疗的热点,开发抑制增殖、促肿瘤细胞凋亡的中药是未来研究方向。研究表明,化疗药物通过诱导细胞凋亡这一抗癌机制将会被认为是控制癌症生长及增殖的最佳途径^[12-13]。本实验发现 CCM 和 HCPT 诱导膀胱癌细胞凋亡的可能机制,为膀胱癌的联合用药方案提供了可行性实验研究依据。

本实验结果显示,单药组及联合用药组均可诱导膀胱癌 BIU-87 细胞凋亡,联合用药组细胞凋亡率显著高于单药组($P < 0.05$),说明 CCM 和 HCPT 联合用药方案对膀胱癌可产生更好的疗效。在 RT-PCR 与 Western blot 检测中观察到单药组和联合用药组,YAP、TEAD1 表达量均下降明显($P < 0.05$)。CCM 和 HCPT 都干扰了 YAP、TEAD1 的表达,而联合用药作用更明显。其机制可能为药物通过作用癌基因 YAP,进而干扰下调 TEAD1 的表达来实现抑制膀胱癌细胞的增殖,促进其凋亡。

综上所述,Hippo 信号通路中 YAP 和 TEAD1 表达与膀胱癌发生、发展密切相关,可能成为肿瘤新的生物标志物之一,为膀胱癌基因靶向治疗提供实验依据,指明新的方向。CCM 和 HCPT 均能诱导膀胱癌 BIU-87 细胞凋亡,两药联用具有叠加效应,其机制可能为通过抑制 YAP 进而阻断 TEAD1 的表达来抑制膀胱癌细胞增殖,诱导其凋亡。至于 CCM 和 HCPT 如何抑制 Hippo 信号通路核心因子 YAP,以及对下游产生连锁的一系列影响,从而诱导膀胱癌凋亡,以后将进一步去深究证实。

参考文献

- [1] Oudard S. Progress in emerging therapies for advanced prostate cancer[J]. *Cancer Treat Rev*,2013,39(3):275-289.
- [2] Gota VS, Maru GB, Soni TG, et al. Safety and pharmacokinetics of a solid lipid volcurcumin particle formulation in osteosarcoma patients and healthyunteers[J]. *Agric Food Chem*,2010,58(4):2095-2099.
- [3] Walters DK, Muff R, Langsam B, et al. Cytotoxic effects of curcumin on osteosarcoma cell lines[J]. *Invest New Drugs*,2008,26(4):289-297.
- [4] Epstein J, Sanderson IR, Macdonald TT, et al. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies[J]. *Br J Nutr*,2010,10(3):1545-1557.
- [5] Zhao B, Lei QY, Guan KL. The Hippo-YAP pathway: new connections between regulation of organ size and cancer [J]. *Curr Opin Cell Biol*,2008,20(6):638-646.
- [6] Kessler CA, Bachurski CJ, Schroeder J, et al. TEAD1 inhibits prolactin gene expression in cultured human uterine decidual cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*,2008,295(1):32-38.
- [7] Steinhardt AA, Gayyed MF, Klein AP, et al. Expression of Yes-associated protein in common solid tumors [J]. *Hum Pathol*,2008,39(11):1582-1589.
- [8] Li N, Xiao H, Zheng HX, et al. The expression of Yes-associated protein in urothelial tumors of bladder and its clinical significance [J]. *Shanxi Med Univ*,2011,42(5):383-386.
- [9] Clark PE, Agarwal N, Biagioli MC, et al. Bladder cancer [J]. *J Natl Compr Canc Netw*,2013,11(4):446-475.
- [10] Chauhan DP. Chemotherapeutic potential of curcumin for colorectal cancer [J]. *Curr Pharm Des*,2002,8(19):1695-1706.
- [11] Nitiss JL. Investigating the biological functions of DNA topo-isomerases in eukaryotic cells [J]. *J Biochim Biophys Acta*,1998,1400(1/2/3):63-81.
- [12] Fishel ML, Newell DR, Griffin RJ, et al. Effect of cell cycle inhibition on Cisplatin-induced cytotoxicity [J]. *J Pharmacol Exp Ther*,2005,312(1):206-213.
- [13] McKnight JJ, Gray SB, O'Kane HF, et al. Apoptosis and chemotherapy for bladder cancer [J]. *J Urol*,2005,173(3):683-690.

(收稿日期:2016-03-20 修回日期:2016-06-08)

《重庆医学》对临床研究论文医学伦理学要求

凡投本刊的临床研究论文(主体是以人为研究对象),作者应说明其遵循的程序是否符合负责人体试验的委员会(单位性的、地区性的或国家性的)所制订的伦理学标准,并提供(上传)该委员会的批准文件复印件及受试对象或其亲属的知情同意书复印件。

《重庆医学》编辑部