

抑制 COL6A1 基因表达对膀胱癌 T24 细胞增殖和侵袭能力的影响

杨荣权¹ 廖泽明¹ 蔡勇¹ 王超¹

[摘要] 目的:研究小干扰 RNA 抑制 COL6A1 基因表达对膀胱癌 T24 细胞增殖和侵袭能力的影响。方法:设计合成靶向 COL6A1 基因的 siRNA,采用阳离子脂质体试剂瞬时转染膀胱癌细胞株 T24,利用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测 RNA 干扰后 COL6A1 基因的沉默效果,评价 siRNA 设计的合理性及 RNA 干扰抑制 COL6A1 表达的有效性,分别在 RNA 干扰后第 1、2、3 天应用噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞增殖状态,并绘制生长曲线,应用 Transwell 法检测各组膀胱癌侵袭能力。结果:靶向 COL6A1 的 siRNA 成功抑制了膀胱癌细胞株 T24 中 COL6A1 mRNA 及蛋白表达,COL6A1-siRNA 组蛋白相对表达量为阴性对照组的 14.1%,mRNA 相对表达量为空白对照组的 20.5%;MTT 比色法显示 COL6A1-siRNA 组细胞增殖能力显著减弱($P < 0.05$),在第 1、2、3 天后重复检测,分别达到了空白对照组的 75.6%、58.2% 和 49.4%;Transwell 细胞迁移实验显示 COL6A1-siRNA 组细胞迁移能力明显减弱($P < 0.05$),穿膜细胞数为空白对照组的 45.3%。结论:利用 siRNA 技术能有效降低 COL6A1 基因的表达,同时有效抑制 T24 细胞的体外增殖和侵袭的能力。

[关键词] 膀胱癌;COL6A1;增殖;侵袭;RNA 干扰

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2019.06.009

[中图分类号] R737.14 **[文献标志码]** A

Effect of down-regulated COL6A1 on proliferation and invasion of bladder carcinoma T24 cells

YANG Rongquan LIAO Zeming CAI Yong WANG Chao

(Department of Urology, First People's Hospital of Jingmen, Jingmen, Hubei, 448000, China)

Corresponding author: YANG Rongquan, E-mail: yrq120@sina.cn

Abstract Objective: To examine the influence of COL6A1 on proliferation and invasion of bladder carcinoma cell. **Method:** The expression of COL6A1 gene was knocked down using RNA interference (RNAi) in the bladder carcinoma cell T24. The transcription level of COL6A1 was tested by RT-PCR. The expression of COL6A1 protein was examined by Western blotting. The cell proliferation was detected by MTT. The cell's invasion ability was performed on Matrigel transwell assay. **Result:** The results showed that the level of COL6A1 mRNA and protein expression were significantly reduced after RNAi with 20.5% of control group on mRNA expression and 14.1% of control group on protein expression. MTT assay showed that the proliferation of T24 cell was decreased due to RNA interference, with OD values reaching 75.6%, 58.2% and 49.4% of control group at 1 d, 2 d and 3 d respectively. Transwell assay showed that invasion abilities of T24 cells were reduced obviously due to COL6A1 RNAi ($P < 0.05$), the transmembrane cells were 54.3% of control group. **Conclusion:** Our findings revealed that down-regulated COL6A1 could inhibit abilities of proliferation and invasion in T24 cells. COL6A1 can serve as a potential target for gene therapy of human bladder carcinoma.

Key words bladder carcinoma; COL6A1; proliferation; invasion; RNA interference

膀胱癌增殖、侵袭和转移的分子机制是当今有关肿瘤发生、发展和治疗研究的热点之一。COL6A1 属于胶原蛋白家族,其重要作用为维持组织的完整性,编码了胶原蛋白 VI 的 $\alpha 1$ 链,是微丝蛋白的组分之一,有数项研究表明 COL6A1 在细胞中存在锚定效应,广泛参与了细胞的增殖、分化和组胚发育^[1,2]。另外 COL6A1 基因在如前列腺癌、

乳腺癌等肿瘤细胞增殖和进展中作用突出,肿瘤组织中的 COL6A1 转录水平和组织中胶原 VI 的水平明显高于正常组织,研究表明 COL6A1 基因在人类多种上皮肿瘤中发挥成瘤作用^[3~5]。虽然近期有研究发现 COL6A1 在膀胱癌与正常膀胱上皮组织转录水平存在差异,但 COL6A1 对膀胱癌增殖侵袭的影响尚缺乏体外实验证实^[6],因此,本研究旨在观察和探讨抑制 COL6A1 的表达对膀胱癌细胞增殖和侵袭的影响。现报告如下。

¹荆门市第一人民医院泌尿外科(湖北荆门,448000)
通信作者:杨荣权,E-mail:yrq120@sina.cn

1 材料与方 法

1.1 一般材料

膀胱癌人永生化尿路上皮细胞 SV-HUC-1 与 EJ、T24 和 BIU87 细胞株(北京中原公司), COL6A1 过表达的重组慢病毒颗粒(上海 Genechem 公司合成), 0.25% 胰蛋白酶、F12K 培养基、RPMI-1640 培养基、胎牛血清(Jibco 公司), LipofectamineTM2000(美国英杰公司), 总 RNA 提取试剂、实时荧光定量 PCR 试剂盒、逆转录试剂盒(武汉 Boster 公司), 荧光实时定量 PCR 引物(武汉迈进有限公司设计合成), Transwell 小室(美国 Corning 公司), MTT(上海 Promega 公司)。

1.2 细胞培养

用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养膀胱癌 T24、EJ 和 BIU 细胞株, 使用含 10% 胎牛血清的 F12K 培养基培养尿路上皮 SV-HUC-1 细胞, 所有细胞系在体积分数 5% CO₂、37℃ 的培养箱中常规培养, 用 0.25% 的胰蛋白酶每隔 2~3 d 进行消化、传代并取对数期细胞。

本实验将 2 条 siRNA 转入细胞, 选出对 COL6A1 表达抑制最有效的一条用于细胞增殖和侵袭实验。取对数生长期 T24 细胞, 用 RPMI-1640 培养液悬浮, 然后以 2×10⁵ 个/孔的密度分别接种于 6 孔板中。用 Opti-MEM 预混 Lipofectamine2000 后静置 5 min, 加入 Opti-MEM 稀释后的 negative-siRNA 和 COL6A1-siRNA 并混匀, 室温静置 20 min。在含 T24 细胞的 6 孔板中按分组加入混合物, 置于体积分数 5% CO₂、37℃ 的培养箱中培养, 48 h 后收集培养细胞进行后续实验。

1.3 实时定量 PCR (qRT-PCR) T24 细胞中 COL6A1 的表达

收集处于对数生长期的 3 组细胞, 操作步骤如下: ①提取总 RNA 时按 TRIzol 试剂说明, RNA 的纯度和浓度用紫外分光光度计检测, RNA 的完整性用 1% 的琼脂糖变性凝胶电泳检测; ②逆转录的 cDNA 的反应条件如下: 70℃ 10 min、冰浴 2 min、42℃ 60 min、70℃ 10 min; ③qRT-PCR 反应参数设置: 95℃ 20 s, 95℃ 5 s, 60℃ 20 s, 72℃ 5 s, 共 40 个循环, 每个样品做 3 个平行管, 每次实验至少重复 3 次; 数据分析用 2^{-ΔΔCt} 法。由定量 PCR 仪器 OpticonMonitor™ Analysis software 软件自动完成数据分析。

1.4 蛋白质免疫印迹法检测 COL6A1 蛋白表达

取 3 组生长良好的细胞, 测细胞总蛋白浓度, 灌制 SDS 聚丙烯酰胺凝胶; 取 1×SDS 凝胶加样缓冲液与 40 μg 的等量蛋白质样品按 1:1 混合, 置于 10℃ 环境中加热 3 min 使蛋白质变性, 然后进行

SDS-PAGE 胶电泳分离, 以 15 V 转膜电压转移至 PVDF 膜; 对照蛋白质 Marker 将所需片断剪下, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h; 加一抗, 4℃ 孵育 12 h 过夜, PBS 洗膜 3 次, 每次 10 min; 二抗, 在 37℃ 孵育 2 h, PBS 洗膜 3 次, 每次 10 min; 辣根过氧化物酶 ECL 法显色。

表 1 siRNA 序列(有义链)和目的基因引物

基因及 siRNA	siRNA 序列与目的基因引物
COL6A1-siRNA1	5'-GGUGAAGUCCUUCACUAAG-3'
COL6A1-siRNA2	5'-GCCACGUCUAAGUAUCAUU-3'
negative-siRNA	5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'
COL6A1	F:5'-TCAAGAGCCTGCAGTGGATG-3' R:5'-TGGACACTTCTTGTCTATGCAG-3'
β-actin	F:5'-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3' R:5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3'

1.5 噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞增殖

取生长良好的各组细胞, 以 5×10⁴/孔接种于 96 孔板。分别于接种后的第 1、2、3 天每组细胞取 5 个孔, 每孔加入 20 μl MTT 溶液, 然后在 37℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱中继续培养 4 h 后弃掉各孔内的培养基, 每孔加入二甲基亚砜(DMSO) 200 μl, 低速振荡 10 min 使结晶充分溶解, 酶标仪检测 490 nm 波长的吸光度, 每组设 5 个复孔, 实验均重复 3 次。

1.6 Transwell 小室迁移实验

取对数期生长的 3 组细胞并将密度调整为 2.5×10⁵/ml, 向 Transwell 上室中加入 400 μl 细胞悬液, 在下室的 24 孔板内加入含 20% FBS 的 RPMI-1640 培养基 600 μl, 24 h 后将小室取出, 湿棉签擦去上室细胞, PBS 液洗 3 次, 用 -20℃ 预冷的甲醇固定细胞 10 min, 摒弃甲醇, PBS 液洗 3 次后自然风干, 结晶紫染色后于光镜下观察, 随机选取中央及四周 5 个视野, 计算穿膜细胞数并求平均值, 以穿膜细胞的数目代表 T24 细胞的体外迁移能力。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用 *t* 检验, 计数资料采用 % 表示, 比较采用卡方检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 支人膀胱癌细胞系中 COL6A1 基因的表达

荧光定量 PCR 实验结果显示 3 支膀胱癌细胞

系的 COL6A1 的 mRNA 水平较 SV-HUC-1 细胞显著升高 ($P < 0.05$), 其中以 T24 细胞的 mRNA 表达量最高(图 1), 两两比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。因此本实验选用 T24 细胞作为 COL6A1 抑制实验。

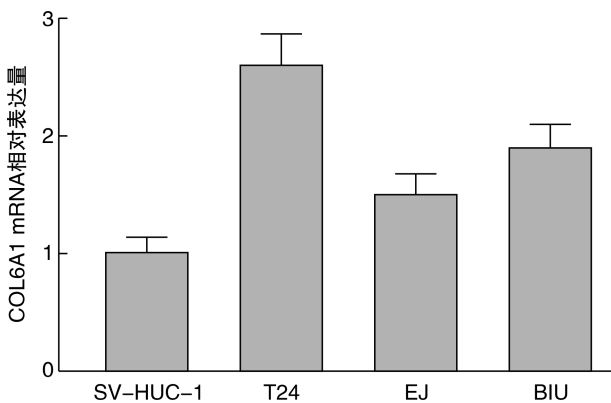


图 1 T24、EJ 和 BIU 3 支膀胱癌细胞系与 SV-HUC-1 细胞中 COL6A1 mRNA 的表达

2.2 COL6A1 基因抑制降低膀胱癌 T24 细胞 COL6A1 mRNA 水平的表达

荧光定量 PCR 实验结果显示在 COL6A1-siRNA 组细胞中, COL6A1 mRNA 的表达较空白对照组、阴性对照组显著升高 ($P < 0.001$)。而空白对照组和阴性对照组 COL6A1 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2。结果表明, 其中以 COL6A1-siRNA2 组抑制效果最佳, 其 mRNA 相对表达量为空白对照组的 20.5%, 说明利用 siRNA 沉默技术可以成功使 COL6A1 基因 mRNA 的表达降低。

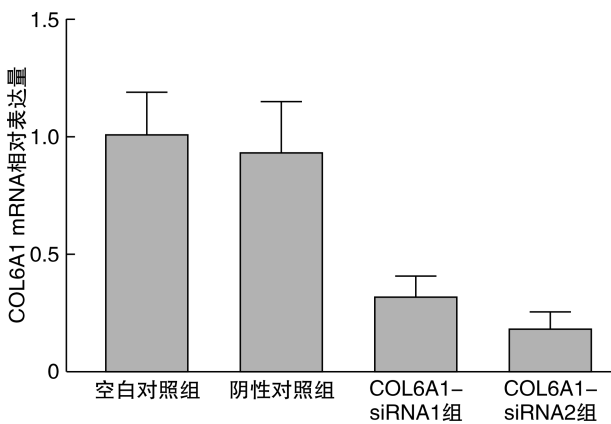
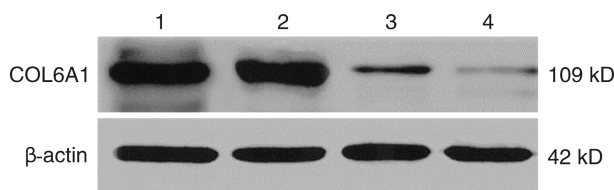


图 2 RNA 干扰使 COL6A1 基因 mRNA 低表达的效果

2.3 COL6A1 抑制对膀胱癌 T24 细胞 COL6A1 蛋白表达的影响

Western-blot 结果显示, 经灰度值比较, 与阴性对照组和空白对照组比较, COL6A1-siRNA 组

COL6A1 蛋白表达显著降低, COL6A1-siRNA2 组蛋白表达量最低为阴性对照组的 14.1%, 阴性对照组和空白对照组比较差异则无统计学意义(图 3)。



1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: COL6A1-siRNA1 组; 4: COL6A1-siRNA2 组。

图 3 RNA 干扰使 COL6A1 基因蛋白低表达的效果

2.4 COL6A1 低表达对膀胱癌 T24 细胞增殖的影响

MTT 结果显示(图 4), 与阴性对照组和空白对照组比较, 在各个时间点, COL6A1-siRNA 组细胞增殖能力明显降低 ($P < 0.05$), 在第 1、2、3 天后重复检测, 分别达到了同期空白对照组的 75.6%、58.2% 和 49.4%。

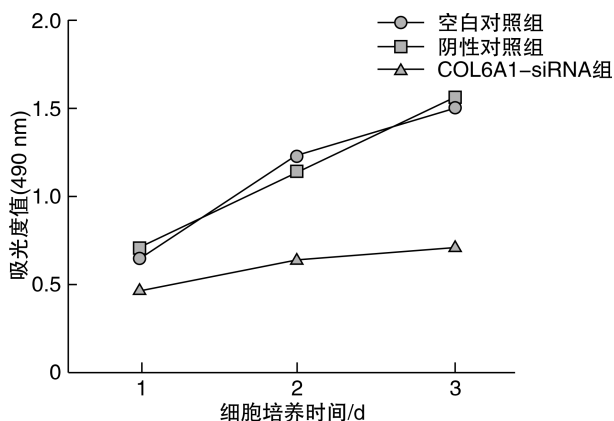


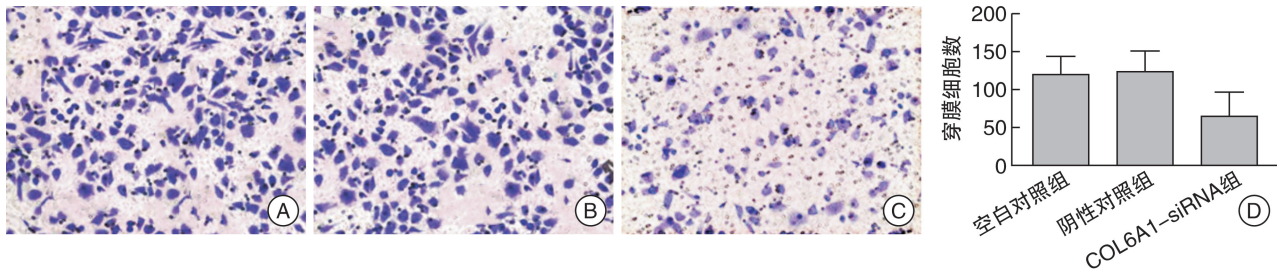
图 4 MTT 实验各组细胞增殖曲线

2.5 COL6A1 低表达对 T24 细胞侵袭的影响

与空白对照组和阴性对照组比较, COL6A1-siRNA 转染组的穿膜细胞数显著减少, 为空白对照组的 54.3% ($P < 0.05$), 而阴性对照组和空白对照组穿膜细胞数比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 5。

3 讨论

通过体外细胞生物学和分子生物学的研究方法, 在本研究中, 我们利用特异性 siRNA 也明显抑制了 T24 细胞的 COL6A1 的表达, 并且通过进一步的研究发现对 COL6A1 表达的抑制可以显著降低膀胱癌 T24 细胞的增殖活性和侵袭能力, 由此可以推断, COL6A1 的表达确实与膀胱癌的发展转移侵袭能力密切相关。



A:空白对照组;B:阴性对照组;C:COL6A1-siRNA 组;D:三组穿膜细胞数。

图 5 Transwell 侵袭实验各组细胞穿膜细胞数

细胞外基质为控制细胞增殖与凋亡提供了必不可少的信号传导,在肿瘤的微环境中,它通常是排列紊乱的,并直接促进肿瘤的增殖和迁移,从而加速肿瘤进展,并且还可以间接影响其他细胞微环境组分,达到肿瘤进展的目的,胶原蛋白 VI 是细胞外基质的重要组成部分之一,并且对其他局部的细胞外基质产生重要作用,它可以形成串珠样结实的微丝网络,并借此与其他细胞外基质分子相互作用^[7,8]。胶原蛋白 VI 包含了 3 条主要的多肽链($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$),其中 $\alpha 1$ 链由 COL6A1 基因编码,COL6A1 属于胶原蛋白家族,其重要作用是维持组织的完整性,COL6A1 基因定位于 21 号染色体 q22.3,并与控制细胞凋亡、增殖、血管化、纤维化、炎症发生等多重信号传导通路密切相关。COL6A1 基因的突变,可以影响 $\alpha 1$ 链在氨基酸水平上的蛋白构造,有研究发现与某些胶原蛋白 VI 肌病有关,如肌无力和痉挛性关节变形^[9]。

最近有研究表明 COL6A1 在肿瘤组织中有特异性的表达,与肿瘤进展相关,并影响着肿瘤患者的预后。Fujita 等^[9]发现 COL6A1 基因在正常的神经胶质和不同分级的神经胶质瘤中表达有差异。Voiles 等^[10]的研究表明 COL6A1 在肺部肿瘤中过表达,并且可能有促进肿瘤进展的作用。Hou 等^[11]的研究表明 COL6A1 在宫颈癌组织中的表达水平高于正常组织,并且认为其与肿瘤形成有关,影响患者的远期预后。已经有人证实 VI 型胶原蛋白参与了肿瘤转移过程,VI 型胶原蛋白可促进肿瘤细胞黏附和扩散,从而以自分泌方式增强肿瘤细胞的扩展、渗透和侵袭^[12]。Chiu 等^[13]采用定量分泌蛋白质组分析方法揭示了过量表达的 COL6A1 增强了肺癌细胞的转移能力,而降低该基因则抑制了癌细胞的转移。Wan 等^[14]发现在两组肾透明细胞癌患者中,COL6A1 表达上调者预后较差。Turtoi 等^[15]回顾性分析了 300 多例神经胶质瘤患者的公共基因表达数据集,证明了患者预后差与 COL6A1 高表达显著相关。

总之,上述研究揭示了 COL6A1 在预测除膀胱癌外其他系统与器官肿瘤预后有效的作用,并且

COL6A1 可以成为衡量肿瘤进展的标志物。通过体外实验本研究证实 COL6A1 表达与膀胱癌细胞的生物学功能影响,分子靶向治疗作为膀胱癌治疗的可行手段被逐渐应用,本研究也为治疗膀胱癌提供了可能的新靶点^[16],也为进一步进行 COL6A1 与膀胱癌预后关系的研究提供实验基础。

[参考文献]

- 1 Tsukahara S, Miyazawa N, Akagawa H, et al. COL6A1, the candidate gene for ossification of the posterior longitudinal ligament, is associated with diffuse idiopathic skeletal hyperostosis in Japanese [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2005, 30(20): 2321-2324.
- 2 Lamandé S R, Bateman J F. Collagen VI disorders: Insights on form and function in the extracellular matrix and beyond [J]. Matrix Biol, 2018, 71-72: 348-367.
- 3 Frka K, Facchinello N, Del Vecchio C, et al. Lentiviral-mediated RNAi in vivo silencing of Col6a1, a gene with complex tissue specific expression pattern [J]. J Biotechnol, 2009, 141(1-2): 8-17.
- 4 Zhu Y P, Wan F N, Shen Y J, et al. Reactive stroma component COL6A1 is upregulated in castration-resistant prostate cancer and promotes tumor growth [J]. Oncotarget, 2015, 6(16): 14488-14496.
- 5 Park J, Scherer P E. Adipocyte-derived endotrophin promotes malignant tumor progression [J]. J Clin Invest, 2012, 122(11): 4243.
- 6 Wu Z, Wang S, Jiang F, et al. Mass spectrometric detection combined with bioinformatic analysis identified possible protein markers and key pathways associated with bladder cancer [J]. Gene, 2017, 626: 407-413.
- 7 Irwin W A, Bergamin N, Sabatelli P, et al. Mitochondrial dysfunction and apoptosis in myopathic mice with collagen VI deficiency [J]. Nat Genet, 2003, 35(4): 367-371.
- 8 Lu P, Weaver V M, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression [J]. J Cell Biol, 2012, 196(4): 395-406.
- 9 Fujita A, Sato J R, Festa F, et al. Identification of COL6A1 as a differentially expressed gene in human astrocytomas [J]. Gen Mol Res, 2008, 7(2): 371-378.

- 16 Divrik R T, Sahin A F, Yildirim U, et al. Impact of routine second transurethral resection on the long-term outcome of patients with newly diagnosed pT₁ urothelial carcinoma with respect to recurrence, progression rate, and disease-specific survival: a prospective randomised clinical trial[J]. *Eur Urol*, 2010, 58(2):185-190.
- 17 Herr H W, Donat S M. Quality control in transurethral resection of bladder tumours[J]. *BJU Int*, 2008, 102(9 Pt B):1242-1246.
- 18 Adiyat K T, Katkooi D, Soloway C T, et al. "Complete transurethral resection of bladder tumor": are the guidelines being followed? [J]. *Urology*, 2010, 75(2):365-367.
- 19 Richterstetter M, Wullich B, Amann K, et al. The value of extended transurethral resection of bladder tumour (TURBT) in the treatment of bladder cancer[J]. *BJU Int*, 2012, 110(2 Pt 2):E76-E79.
- 20 Saito S. Transurethral en bloc resection of bladder tumours[J]. *J Urol*, 2000, 166(6):2148-2150.
- 21 杨晓峰, 张晓静, 杨华, 等. 剥脱式经尿道膀胱肿瘤切除术[J]. *中华腔镜泌尿外科杂志*, 2013, 7(3):17-20.
- 22 Hakenberg O W, Linne C, Manseck A, et al. Bladder wall thickness in normal adults and men with mild lower urinary tract symptoms and benign prostatic enlargement[J]. *Neurourol Urodyn*, 2000, 19(5):585-593.
- 23 Heney N M, Ahmed S, Flanagan M J, et al. Superficial bladder cancer: progression and recurrence[J]. *J Urol*, 1983, 130(6):1083-1086.
- 24 Yaman O, Baltaci S, Arikan N, et al. Staging with computed tomography, transrectal ultrasonography and transurethral resection of bladder tumour: comparison with final pathological stage in invasive bladder carcinoma[J]. *Br J Urol*, 1996, 78(2):197-200.
- 25 Cumberbatch M G K, Foerster B, Catto J W F, et al. Repeat transurethral resection in non-muscle-invasive bladder cancer: A systematic review [J]. *Eur Urol*, 2018, 73(6):925-933.
- 26 Kawada T, Ebihara K, Suzuki T, et al. A new technique for transurethral resection of bladder tumours: rotational tumour resection using a new arched electrode[J]. *J Urol*, 1997, 157(6):2225-2226.

(收稿日期:2017-11-22)

(上接第 452 页)

- 10 Voiles L, Lewis D E, Han L, et al. Overexpression of type VI collagen in neoplastic lung tissues[J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(5):1897-904.
- 11 Hou T, Tong C, Kazobinka G, et al. Expression of COL6A1 predicts prognosis in cervical cancer patients [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(6):2838-2844.
- 12 Chen P, Cescon M, Bonaldo P. Collagen VI in cancer and its biological mechanisms[J]. *Trends Mol Med*, 2013, 19(7):410-4177.
- 13 Chiu K H, Chang Y H, Wu Y S, et al. Quantitative Secretome Analysis Reveals that COL6A1 is a Metastasis-Associated Protein Using Stacking Gel-Aided Purification Combined with iTRAQ Labeling[J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(3):1110-1125.
- 14 Wan F, Wang H, Shen Y, et al. Upregulation of COL6A1 is predictive of poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma patients[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(29):27378-27387.
- 15 Turtoi A, Blomme A, Bianchi E, et al. Accessibilome of human glioblastoma: collagen-VI-alpha-1 is a new target and a marker of poor outcome [J]. *J Proteome Res*, 2014, 13(12):5660-5669.
- 16 蔡忠林, 闫雯, 周川, 等. 膀胱相关生物分子在增强腺病毒介导基因治疗与病毒治疗膀胱癌靶向性中的应用 [J]. *临床泌尿外科杂志*, 2017, 32(4):310-314.

(收稿日期:2017-12-18)