

醛缩酶 A 对膀胱癌 T24 细胞增殖和侵袭的影响

李建伟, 王芳, 蔡芳震

(福建医科大学附属第二医院泌尿外科, 福建 泉州 362001)

【摘要】目的 探索醛缩酶 A (ALDOA) 过表达和基因敲减对膀胱癌 T24 细胞生长和侵袭的影响, 为探讨泌尿系统肿瘤发病机制提供理论依据。**方法** 通过慢病毒感染构建稳定表达的 ALDOA 过表达和基因敲减膀胱癌 T24 细胞重组细胞株, 采用荧光定量 PCR (RT-PCR) 法检测重组细胞 ALDOAmRNA 的表达情况; 采用 CCK-8 法、细胞划痕实验、Transwell 小室实验检测重组 T24 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。**结果** RT-PCR 检测结果显示, 过表达组重组 T24 细胞 ALDOAmRNA 的相对表达量较对照组更高, 基因敲减组较对照组更低, 证实膀胱癌 T24 细胞重组细胞株构建成功; CCK-8 法检测重组细胞增殖结果显示: 在培养 72、96 h 时, 过表达组重组 T24 细胞生存率均较对照组更高; 在培养 96 h 时, 基因敲减组 T24 细胞生存率较对照组更低; 划痕愈合实验结果显示: 在培养 24 h 时, 过表达组重组 T24 细胞划痕愈合率较对照组更高; Transwell 小室细胞实验结果显示: 在培养 48 h 时, 过表达组重组 T24 细胞迁移数较对照组更多, 过表达组重组 T24 细胞侵袭数较对照组更多 (均 $P < 0.05$); 培养 24 h 时, 基因敲减组重组 T24 细胞划痕愈合率较对照组更低; 在培养 48 h 时, 基因敲减组重组 T24 细胞迁移数较对照组更少, 但差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。**结论** ALDOA 过表达可促进膀胱癌细胞增殖、迁移和侵袭, ALDOA 基因敲减可减少膀胱癌 T24 细胞增殖、迁移和侵袭。

【关键词】 醛缩酶 A; 基因敲减; 基因过表达; 膀胱癌 T24 细胞

【中图分类号】 R737.14

【文献标识码】 A

【文章编号】 2096-3718.2024.14.0029.04

DOI: 10.3969/j.issn.2096-3718.2024.14.010

膀胱癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤, 其发病原因尚不明确, 一般认为与经常接触致癌物质有关, 高复发率和早期转移是造成膀胱癌病死率高的主要原因^[1-2]。目前尚无有效治疗方法, 因此, 寻找新的治疗靶标和策略显得尤为迫切。有氧糖酵解是大多数肿瘤细胞主要的能量获取方式, 糖酵解过程多种催化酶在肿瘤组织中表达增加, 并促进肿瘤的发生发展^[3]。醛缩酶 A (ALDOA) 是糖酵解过程中关键酶之一, 可催化 1, 6-二磷酸果糖裂解 3 磷酸甘油醛和磷酸二酰甘油。有研究显示, ALDOA 在多种肿瘤组织中高表达, 并促进肿瘤细胞的增殖、迁移及侵袭^[4], 且 ALDOA 在膀胱癌组织中高表达, 与患者肿瘤组织低分化和较差预后密切相关^[5]。但有关 ALDOA 对膀胱癌细胞增殖和侵袭的影响尚不清楚。基于此, 本研究通过构建 ALDOA 过表达和基因敲减膀胱癌 T24 重组细胞株, 研究 ALDOA 差异性表达对膀胱癌细胞增殖、迁移、侵袭的影响, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验细胞 膀胱癌细胞株 T24 (中国科学院上海生物所细胞库)。

1.2 主要试剂与仪器 ALDOA 过表达和 shRNA 干扰慢病毒颗粒 (上海吉凯基因技术有限公司); 胎牛血

清 (美国 Gibco 公司); CCK-8 试剂盒、RIPA 裂解液和反转录试剂盒 (中国碧云天生物技术公司); Transwell 小室和 6 孔板 (美国 Corning 公司), Trizol RNA 提取试剂 (美国 Invitrogen 公司)。倒置显微镜 (尼康公司, 型号: ECLIPSE Ts2); 实时定量 PCR 扩增仪 (伯乐实验有限公司, 型号: CFX96 Deep Well); 酶标仪 [赛默飞世尔 (上海) 仪器有限公司, 型号: Multiskan FC]。

1.3 研究方法

1.3.1 醛缩酶 A 过表达和 shRNA 病毒转染人膀胱癌 T24 细胞株 T24 细胞用含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。感染前 1 d 取对数生长期的细胞, 将其铺板到 35 mm 培养皿, 使感染时细胞密度约达 80%, 24 h 后加入病毒稀释液: ALDOA 过表达组加入 pLV-ALDOA 慢病毒的病毒稀释液 1.7 mL, 病毒滴度为 1×10^6 TU/mL, 对照组加入空载质粒的病毒稀释液 1.7 mL。ALDOA 基因敲减组加入含 shRNA 慢病毒的病毒稀释液 1.7 mL, 病毒滴度为 1×10^6 TU/mL, 对照组加入空载质粒的病毒稀释液 1.7 mL。用病毒培养液替换原细胞培养基, 放入细胞培养箱中培养 24 h。第 2 天换液, 继续培养 24 h 后, 荧光显微镜观察, 估计慢病毒感染细胞的效率, 同时, 将细胞扩大培养后冻存。

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (编号: 2020J01206)

作者简介: 李建伟, 博士研究生, 主任医师, 研究方向: 泌尿肿瘤发病机制。

1.3.2 实时定量 PCR (RT-PCR) 检测重组 ALDOAmRNA 的表达 收集感染慢病毒的重组细胞, 按照说明书提取细胞中总 RNA, 检测浓度合格后反转录获得 cDNA, 以 cDNA 为模板, 按照以下条件进行 RT-PCR 反应, 目的基因引物: 醛缩酶 A-F:GTGGGCATCAAGGTAGACAAGGG; 醛缩酶 A-R: TGCTGGCAGATACTGGCATAACG。内参引物: GAPDH-R: CAAGGGCATCCTGGGCTACACT; GAPDH-R: CTCTCTCTTCTCTTGTGCTCTTGC。反应体系: cDNA 模板 1 μ L, 上游引物 0.8 μ L, 2SYGR 10 μ L, 加水补足 20 μ L, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环。溶解曲线: 65 $^{\circ}$ C 到 95 $^{\circ}$ C, 每 0.5 $^{\circ}$ C 保温 5 s。RT-PCR 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行定量分析并计算 ALDOA mRNA 相对表达量。均进行 3 次独立实验。

1.3.3 CCK-8 法检测重组细胞增殖 取对数生长期的过表达和基因敲减重组 T24 细胞, 胰酶消化, 离心去上清, 重悬后计数, 稀释至细胞密度 2×10^7 个/L, 加入 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 另设置只加培养液的对照孔。设置测定时间点为 0、24、48、72 和 96 h, 完全培养基培养后, 测定前 24 h 加入 CCK-8 试剂, 每孔 10 μ L, 混匀后置于培养箱 24 h, 酶标仪测定波长 450 nm 处各组的吸光度 (OD) 值, 并计算细胞生存率。细胞生存率 = (OD 实验组 - OD 对照组) / (OD 对照组 - OD 空白组) $\times 100\%$ 。均进行 3 次独立实验。

1.3.4 划痕愈合实验检测重组细胞迁移 取对数生长期的过表达和基因敲减重组 T24 细胞, 将细胞以 3×10^5 个/孔的密度接种于六孔板中, 细胞生长融合至 80%~90% 时, 用 10 μ L 枪头垂直划痕, PBS 清洗划下的细胞, 重复 2 次, 继续在培养箱中孵育, 分别在 0、24 h 用倒置显微镜观察拍照, 图片用 Image J 软件进行处理, 并计算划痕愈合率, 愈合率 = (0 h 划痕宽度 - 24 h 划痕宽度) / 0 h 划痕宽度 $\times 100\%$ 。均进行 3 次独立实验。

1.3.5 Transwell 小室实验检测重组细胞迁移和侵袭 取生长良好的过表达和基因敲减重组 T24 细胞, 加入无血清培养基 24 h, 取 2×10^4 个细胞与 200 μ L 无血清培养基加入上室, 用于检测细胞迁移; 取 5×10^4 个细胞与基质胶用无血清培养基稀释到 1 mg/L, 取 200 μ L 加入上室, 检测细胞侵袭。在下室加入 500 μ L 含 20% 胎牛血清的完全培养基, 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 48 h 后, 将小室上层未侵袭细胞除去, 用 4% 多聚甲醛溶液固定 15 min, 后用 0.1% 结晶紫染色处理 10 min, 经 PBS 洗涤并干燥后, 显微镜下随机取 5 个 ($\times 200$) 视野拍照, 图片用 Image J 软件进行处理; 计算细胞数。均进行 3 次独立实验。

1.4 观察指标 (1)通过 RT-PCR 检测观察 ALDOA 过表达组及基因敲减组重组细胞 mRNA 的表达水平。(2)通过

CCK-8 法检测 ALDOA 过表达组及基因敲减组重组细胞的生存率。(3)通过划痕愈合实验检测 ALDOA 过表达组及基因敲减组重组细胞划痕愈合率, 通过 Transwell 小室细胞实验检测 ALDOA 过表达组及基因敲减组重组细胞迁移数和侵袭数。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计学软件分析数据, 所有实验结果均重复 3 次取平均值, 计量数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达和敲减重组细胞 ALDOAmRNA 的表达水平 RT-PCR 检测结果显示, 过表达组重组细胞 ALDOAmRNA 的相对表达量为 [$(187.75 \pm 9.19)\%$] 高于对照组重组细胞 ALDOAmRNA 的相对表达量 [$(105.05 \pm 5.00)\%$], 差异有统计学意义 (t 值 = 10.725, $P < 0.05$), 见图 1; 基因敲减组重组细胞 ALDOAmRNA 的相对表达量为 [$(2.73 \pm 0.14)\%$] 较对照组更低, 差异有统计学意义 (t 值 = 13.812, $P < 0.05$), 见图 2。

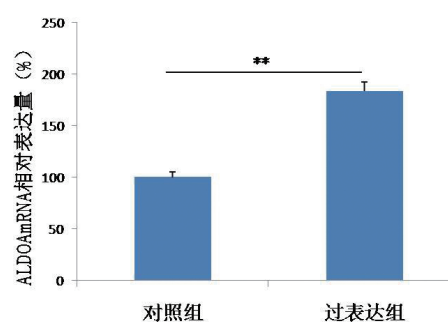


图 1 实时定量 PCR 法检测过表达组重组细胞 ALDOA mRNA 的相对表达量

注: 与对照组比, ** $P < 0.01$ 。

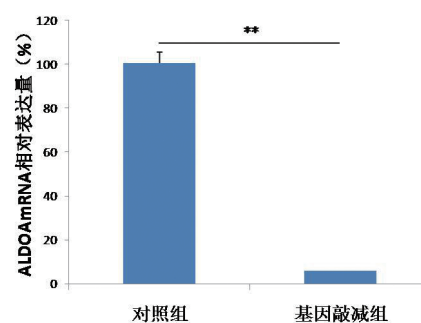


图 2 实时定量 PCR 法检测基因敲减组重组细胞 ALDOAmRNA 的相对表达量

注: 与对照组比, ** $P < 0.01$ 。

2.2 ALDOA 过表达和基因敲减重组细胞生存率检测结果 培养 72 h、96 h 时, 过表达组重组细胞生存率为 [$(119.37 \pm 5.97)\%$]、[$(154.71 \pm 7.74)\%$], 均高于对照组重组

细胞生存率 $[(72.48 \pm 3.62)\%]$ 、 $[(94.52 \pm 4.73)\%]$ ，差异均有统计学意义 (t 值 =11.627、12.047，均 $P < 0.05$)，见图 3；培养 96 h 时，基因敲减组细胞生存率为 $[(67.38 \pm 3.37)\%]$ ，低于对照组细胞生存率 $[(92.59 \pm 4.63)\%]$ ，差异有统计学意义 (t 值 =5.738, $P < 0.05$)，见图 4。

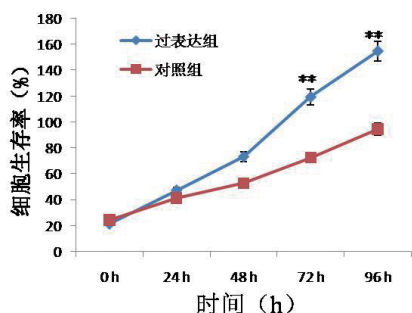


图 3 CCK-8 法检测 ALDOA 过表达组重组细胞生存率

注：与对照组比，** $P < 0.01$ 。

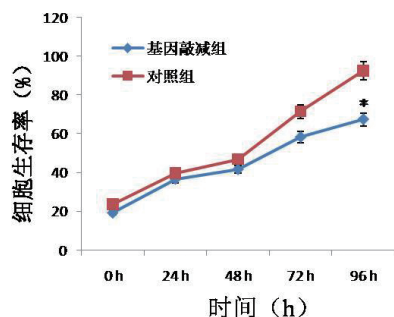


图 4 CCK-8 法检测 ALDOA 基因敲减组重组细胞生存率

注：与对照组比，* $P < 0.05$ 。

2.3 ALDOA 过表达和基因敲减对重组细胞迁移的影响 划痕愈合实验结果显示，培养 24 h 时，过表达组重组细胞划痕愈合率为 $[(79.38 \pm 3.97)\%]$ 高于对照组重组细胞划痕愈合率 $[(52.14 \pm 2.61)\%]$ ，差异有统计学意义 (t 值 =5.831, $P < 0.05$)；基因敲减组重组细胞划痕愈合率为 $[(41.57 \pm 2.08)\%]$ 与对照组比较，差异无统计学意义 (t 值 =3.627, $P > 0.05$)，见图 5。

2.4 ALDOA 过表达和基因敲减重组细胞迁移和侵袭的影响 Transwell 小室细胞实验结果显示，培养 48 h 时，过表达组重组细胞迁移数为 $[(120.51 \pm 6.07)$ 个] 多于对照组重组细胞迁移数 $[(85.36 \pm 4.32)$ 个]，差异有统计学意义 (t 值 =8.325, $P < 0.05$)；基因敲减组重组细胞迁移数为 $[(75.72 \pm 3.85)$ 个] 与对照组比较，差异无统计学意义 (t 值 =2.948, $P > 0.05$)，见图 6。在培养 48 h 时，过表达组重组细胞侵袭数为 $[(105.83 \pm 5.32)$ 个] 多于对照组重组细胞侵袭数 $[(72.43 \pm 3.64)$ 个]，差异有统计学意义 (t 值 =5.927, $P < 0.05$)；基因敲减组重组细胞侵袭数为 $[(61.75 \pm 3.16)$ 个] 与对照组比较，差异无统计学意义 (t 值 =3.529, $P > 0.05$)，见图 7。

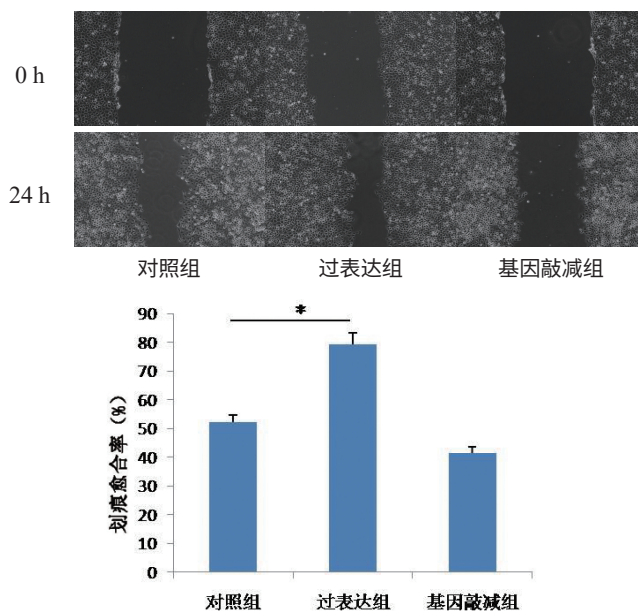


图 5 划痕愈合实验检测 ALDOA 过表达和基因敲减重组细胞划痕愈合率

注：与对照组比，* $P < 0.05$ 。

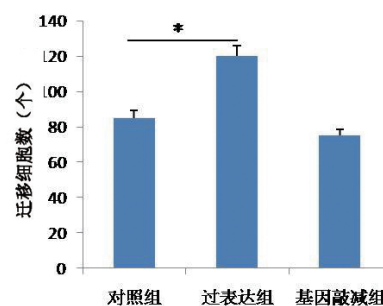
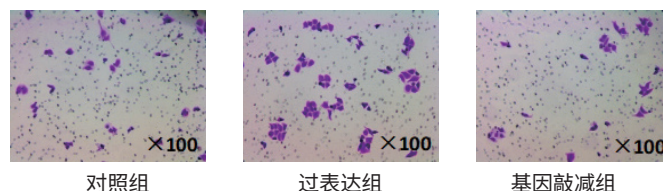


图 6 Transwell 小室实验检测 ALDOA 过表达和基因敲减重组细胞迁移数

注：与对照组比，* $P < 0.05$ 。

3 讨论

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一，其发病原因包括内在遗传因素和外在的环境因素，为研究 ALDOA 对膀胱癌细胞增殖和侵袭能力的影响，本研究首先构建了针对 ALDOA 的过表达和基因敲减 (shRNA 干扰) 的慢病毒载体，并筛选出能够稳定表达的 ALDOA 过表达和基因敲减膀胱癌 T24 重组细胞株。本研究结果中，RT-PCR 检测结果显示，过表达组重组细胞 ALDOAmRNA 的相对表达量高于对照组，基因敲减组较对照组更低，提

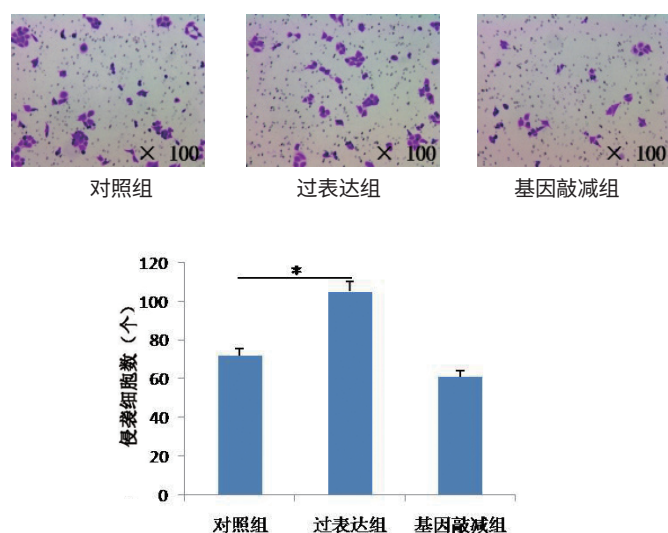


图 7 Transwell 小室实验检测 ALDOA 过表达和基因敲减重组细胞侵袭数

注：与对照组比，* $P<0.05$ 。

示 ALDOA 过表达和基因敲减膀胱癌 T24 重组细胞株构建成功。

本研究结果显示，在培养 72、96 h 时，过表达组重组细胞生存率均较对照组更高；在培养 96 h 时，基因敲减组细胞生存率较对照组更低；这提示过表达 ALDOA 可促进肿瘤生长，肿瘤细胞生存率更高，基因敲减 ALDOA 可延缓肿瘤生长，肿瘤细胞生存率更低，这与既往的研究^[6]结果相近。过表达 ALDOA 可以促进纤维肌动蛋白组装成微管，微管的生长在细胞周期胞质分裂过程中起到关键作用，随着微管的生长，完成复制的染色体被牵拉分离进入子细胞，进而促进细胞分裂增殖^[7]。

本研究结果显示，在培养 24 h 后，过表达组重组细胞划痕愈合率较对照组更高；在培养 48 h 后，过表达组重组细胞迁移数较对照组更多，过表达组重组细胞侵袭数较对照组更多；在培养 24 h 后，基因敲减组重组细胞划痕愈合率较对照组更低。这提示 ALDOA 过表达重组细胞侵袭和迁移能力明显增强，ALDOA 在肿瘤细胞获得转移能力的过程中起重要作用，这与 SAITO 等^[8]的研究结果相近。ALDOA 过表达可以明显降低肿瘤细胞上皮性标志物 N-cadherin 的表达，增加间质性标志物 N-cadherin 和 vimentin 的表达，增加胞质内 β -catenin 表达量，ALDOA 可以促进肿瘤细胞上皮-间质转化。上皮-间质转化是肿瘤细胞发生侵袭和转移生长的关键启动步骤之一^[9]；Wnt/ β -catenin 信号通路是诱导肿瘤细胞发生上皮-间质转化的主要信号通路， β -catenin 是该信号通路激活的关键信使分子^[10]。有研究认为 ALDOA 通过与胞质中破坏复合物中 GSK3 结合，使 β -catenin 无法磷酸化而避免被泛素化降解，在胞质内积累并移至细胞核，激活相关基因转

录，诱导肿瘤细胞发生上皮-间质转化，进而促进肿瘤细胞的侵袭和转移^[11]。但在膀胱癌中 ALDOA 是否参与此过程尚不清楚，需进一步研究证实。此外，ALDOA 基因敲减重组细胞的增殖会受到显著抑制，但对其侵袭和迁移无明显影响，这为利用 ALDOA 抑制剂靶向治疗膀胱癌提供了依据。

综上，本研究成功构建了稳定过表达 ALDOA 和基因敲减膀胱癌 T24 重组细胞株，ALDOA 过表达可显著增强膀胱癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力，为膀胱癌的靶向治疗提供了新的策略。

参考文献

- [1] 李辉章, 郑荣寿, 杜灵彬, 等. 中国膀胱癌流行现状与趋势分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2021, 43(3): 293-298.
- [2] 季新灿, 郭浩阳, 汪伟, 等. 1990—2019 年中国膀胱癌发病率趋势[J]. 济宁医学院学报, 2023, 46(2): 90-95.
- [3] XU D, SHAO F, BIAN X, et al. The evolving landscape of noncanonical functions of metabolic enzymes in cancer and other pathologies[J]. Cell Metab, 2021, 33(1): 33-50.
- [4] 叶天星, 张德宇, 梁迎春, 等. 醛缩酶 A 基因真核表达载体的构建及其生物学活性分析[J]. 军事医学, 2021, 45(2): 114-118, 123.
- [5] KUANG Q, LIANG Y, ZHOU Y, et al. The ALDOA metabolism pathway as a potential target for regulation of prostate cancer proliferation[J]. Onco Targets Ther, 2021, 14(5): 3353-3366.
- [6] LI J W, WANG F, GAO H Z, et al. ALDOLASE A regulates invasion of bladder cancer cells via e-cadherin-EGFR signaling[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(8): 1-12.
- [7] PAN C, LI B, SIMON M C. Moonlighting functions of metabolic enzymes and metabolites in cancer[J]. Mol Cell, 2021, 81(18): 3760-3774.
- [8] SAITO Y, TAKASAWA A, TAKASAWA K, et al. Aldolase A promotes epithelial-mesenchymal transition to increase malignant potentials of cervical adenocarcinoma[J]. Cancer Sci, 2020, 111(8): 3071-3081.
- [9] LI D, XIA L, HUANG P, et al. Heterogeneity and plasticity of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in cancer metastasis: Focusing on partial EMT and regulatory mechanisms[J]. Cell Prolif, 2023, 56(6): e13423.
- [10] YU F, YU C, LI F, et al. Wnt/ β -catenin signaling in cancers and targeted therapies[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 307-341.
- [11] BRUNNER J S, FINLEY L W S. Metabolic determinants of tumour initiation[J]. Nat Rev Endocrinol, 2022, 19(3): 134-150.