

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.03.007

· 临床研究 ·

CTHRC1通过活化FAK-ERK1/2信号通路促进膀胱癌 5637 细胞迁移和侵袭

印胡滨^{a,b}, 何卫阳^a, 周翔^{a,b}, 苟欣^a (重庆医科大学附属第一医院 a. 泌尿外科; b. 分子肿瘤与表观遗传学重庆市重点实验室, 重庆 400016)

[摘要] **目的:** 探讨胶原三螺旋重复蛋白 1 (CTHRC1) 在膀胱癌组织和细胞中的表达及其对膀胱癌 5637 细胞迁移和侵袭的影响及其机制。**方法:** 利用 TCGA 和 Arrayexpress 数据库中膀胱癌基因表达数据, 分析 CTHRC1 转录和翻译水平。收集 2014 年 9 月至 2020 年 12 月重庆医科大学附属第一医院手术切除的 144 例膀胱癌组织和 25 例全膀胱切除的癌旁组织标本, 以及人膀胱癌细胞 RT4、5637、T24、UMUC-3、TCCSUP 和输尿管上皮永生化细胞 SV-HUC-1。采用免疫组织化学染色法、qPCR 法和 WB 法检测膀胱癌组织和细胞中 CTHRC1 的表达水平, 通过 Kaplan-Meier 曲线分析 CTHRC1 表达对总生存期 (OS) 的影响。运用 RNAi 技术, 敲降 5637 细胞 CTHRC1 表达后, 通过细胞划痕实验和 Transwell 实验检测 CTHRC1 表达下调对 5637 细胞迁移和侵袭的影响。利用基因集富集分析 (GSEA) 预测 CTHRC1 相关的潜在信号通路, WB 法检测敲降 CTHRC1 表达对 FAK-ERK1/2 通路相关蛋白表达的影响。**结果:** CTHRC1 的转录和翻译水平在肌层浸润性膀胱癌 (MIBC) 组织和细胞中表达显著上调 (均 $P < 0.05$), CTHRC1 高表达组患者 5 年 OS 较表达患者缩短 ($P < 0.05$)。干扰 CTHRC1 表达后, 膀胱癌 5637 细胞迁移及侵袭能力均显著降低 (均 $P < 0.01$)。GSEA 预测显示, CTHRC1 高表达组主要富集在黏着斑激酶 (FAK)、肌动蛋白细胞骨架调节、FAK 和 ERK1/2 信号通路。WB 法实验结果表明, 重组 CTHRC1 蛋白促进膀胱癌 5637 细胞 FAK-ERK1/2 信号通路活化 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:** CTHRC1 在 MIBC 中表达上调, 且与膀胱癌患者不良预后密切相关; CTHRC1 促进膀胱癌细胞迁移和侵袭, 该过程可能与 FAK-ERK1/2 信号通路的激活有关。

[关键词] 胶原三螺旋重复蛋白 1; 膀胱癌; 5637 细胞; 迁移; 侵袭; FAK-ERK1/2 信号通路; 预后

[中图分类号] R737.14; R730.23; R730.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)03-0209-09

CTHRC1 promotes the migration and invasion of bladder cancer 5637 cells through activating the FAK-ERK1/2 signaling pathway

YIN Hubin^{a,b}, HE Weiyang^a, ZHOU Xiang^{a,b}, GOU Xin^a (a. Department of Urology; b. Chongqing Key Laboratory of Molecular Oncology and Epigenetics, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of collagen triple helix repeat containing-1 (CTHRC1) in bladder cancer tissues and cells and its effect on the migration and invasion of bladder cancer 5637 cells as well as the related mechanisms. **Methods:** By referring to the bladder cancer gene expression data in TCGA and Arrayexpress databases, CTHRC1 transcriptional and translational levels were analyzed. 144 cases of bladder cancer tissues and 25 cases of para-cancerous tissues resected in the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University from September 2014 to December 2020 were collected for this study; in addition, human bladder cancer cells (RT4, 5637, T24, UMUC-3 and TCCSUP) and immortalized human ureteral epithelial SV-HUC-1 cells were also collected. The expression levels of CTHRC1 in human bladder cancer tissues and cell lines were detected by immunohistochemistry staining, qPCR and WB. The Kaplan-Meier curve was used to analyze the effect of CTHRC1 expression on overall survival (OS). CTHRC1 expression in 5637 cells was interfered using RNAi technology, and then the effects of CTHRC1 knockdown on migration and invasion of bladder cancer 5637 cells were detected by scratch and Transwell assays. Gene set enrichment analysis (GSEA) was used to predict potential signaling pathways associated with CTHRC1. WB was utilized to detect the effect of CTHRC1 knockdown on the expression of FAK-ERK1/2 pathway related proteins. **Results:** The transcriptional and translational levels of CTHRC1 were significantly up-regulated in muscle-invasive bladder cancer tissues and cells (all $P < 0.05$), and the 5-year OS was significantly shorter in the patients with high CTHRC1 expression as compared with those with low expression ($P < 0.05$). The migration and invasion of bladder cancer 5637 cells were reduced following CTHRC1 knockdown (all $P < 0.01$). GSEA showed that the CTHRC1 high-expression

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81874092)

[作者简介] 印胡滨 (1990—), 男, 博士生, 住院医师, 主要从事肿瘤微环境与膀胱癌进展的机制研究, E-mail: dr-yin-cqmu@qq.com

[通信作者] 苟欣, E-mail: gouxincq@163.com

group was mainly enriched in focal adhesion kinase (FAK), regulation of actin cytoskeleton, and FAK-ERK1/2 signaling pathways. WB assay showed that recombinant CTHRC1 protein promoted the activation of FAK-ERK1/2 signaling pathway in bladder cancer 5637 cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** CTHRC1 expression is up-regulated in invasive bladder cancer and closely related to the poor prognosis of bladder cancer patients. CTHRC1 enhances the invasion and metastasis of bladder cancer cells, which may be associated with the activation of the FAK-ERK1/2 signaling pathway.

[Key words] collagen triple helix repeat containing-1 (CTHRC1); bladder cancer; 5637 cell; migration; invasion; FAK-ERK1/2 signaling pathway; prognosis

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(3): 209-217. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.03.007]

细胞外基质蛋白是肿瘤微环境的主要成分之一,可分为结构性和非结构性细胞外基质蛋白。结构性细胞外基质蛋白为肿瘤生长提供物理支架、储存与维持肿瘤微环境稳定所必须的生长因子(如HGF、FGF和PDGF等),增强细胞外基质中各类细胞与肿瘤细胞之间的相互作用^[1]。非结构性基质蛋白具有诸多生物学活性,在慢性炎症、肿瘤生长和转移中发挥重要作用,如OPN、SPARC、VCAN、MMP和CXC型趋化因子等^[2-7]。近年来细胞外基质蛋白在炎症反应和肿瘤进展中有重要功能。有研究结果^[8]发现,胶原三螺旋重复蛋白1(collagen triple helix repeat containing-1, CTHRC1)在许多人实体瘤中普遍表达上调,并且与肿瘤恶性侵袭性的特征和不良预后密切相关。但CTHRC1在膀胱癌中的表达及其生物学作用目前尚不清楚。因此,本研究利用癌症基因组图谱(TCGA)数据库中的测序数据和ArrayExpress数据库资料联合分析CTHRC1在不同类型膀胱癌组织中的表达水平,通过免疫组化和qPCR法检测CTHRC1在不同类型膀胱癌组织和细胞中的表达,运用RNAi技术体外敲降CTHRC1表达后探究其对膀胱癌细胞迁移和侵袭的影响及潜在分子机制,旨在为膀胱癌的诊断和治疗提供新的生物标志物和治疗靶点。

1 资料与方法

1.1 数据收集

本研究遵循TCGA的访问规则和发布指南,从TCGA数据库(<https://gdc-portal.nci.nih.gov/>)下载有完整的RNA-sequence数据的405例膀胱癌和19例膀胱正常组织进行基因表达量分析;从TCGA数据库下载膀胱癌患者的mRNA测序表达谱和临床数据纳入标准:(1)诊断为肌层浸润性膀胱癌(muscle-invasive bladder cancer, MIBC);(2)有完整的RNA-sequence数据;(3)附带详细的临床病理数据,包括病理分期、总生存期(OS)和相应的随访时间信息等。本研究共纳入362例膀胱癌标本。

从ArrayExpress数据库(www.ebi.ac.uk/arrayexpress/)下载E-MTAB-1940和E-MTAB-1803的mRNA表达谱

矩阵文件。AffymetrixHG-U133 Plus 2.0平台上操作的E-MTAB-1803、E-MTAB-1940芯片中包含4例正常膀胱组织、42例Ta期和41例T1期膀胱癌组织,该平台上操作的E-MTAB-1803芯片包含79例MIBC组织。采用RMA(robust multichip average)算法对原始芯片数据进行归一化处理,并转换为Log2模式。使用Affymetrix注释文件对探针进行注释。

1.2 组织标本来源及随访

收集2014年9月至2020年12月重庆医科大学附属第一医院泌尿外科手术切除并经病理确诊的144例膀胱癌组织标本,同时选取25例全膀胱切除的癌旁组织标本作为对照。获取标本后,将其冷冻并保存在-80℃冰箱中备用。所有组织标本的收集和使用均得到医院伦理委员会的批准(批准号:201802),均告知患者并签署知情同意书。

随访调查患者死亡时间及原因,以及发生远处转移的时间,观察患者OS。随访从第一次明确诊断开始,直至全因死亡或发生远处转移或末次随访时间;发现患者死亡或转移,随访即终止。随访截止时间为2021年1月31日,共随访55例患者,记为CQMU队列。

1.3 细胞及主要试剂

人膀胱癌细胞RT4、5637、T24、UMUC-3和TCCSUP,以及人输尿管上皮永生化细胞SV-HUC-1均购自美国ATCC细胞库。

RPMI 1640、胰蛋白酶、Transwell小室购自美国康宁公司,TRIzol试剂、PCR引物、PVDF膜、Lipofectamine 2000、OPTI-MEM培养基等购自美国Invitrogen公司,逆转录试剂盒、SYBR荧光染料购自日本TaKaRa公司,F-12K完全培养基、McCoy's 5A完全培养基、MEM完全培养基、胎牛血清(FBS)等购自上海中乔新舟公司,免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥公司,siRNA购自上海吉玛公司,化学发光试剂购自美国Millipore公司,人工基膜(matrigel胶)购自美国BD Biosciences公司,CTHRC1抗体(ab85739)购自美国Abcam公司, β -actin抗体(60008-1-Ig)购自武汉三鹰公司,磷酸化黏着斑激酶(phospho-FAK, p-FAK)(Tyr397)抗体(#8556)、FAK(Tyr925)抗体

(#3284)、FAK 抗体(#13009)、p44/42 MAPK 抗体(#4370)、p44/42 MAPK 抗体(#4695)、山羊抗兔二抗(#7074)、山羊抗鼠二抗(#7076)均购自美国 Cell Signalling Technology 公司。

1.4 细胞培养、转染与分组

膀胱癌 RT4 细胞采用 McCoy's 5A 完全培养基培养, T24、5637 和 TCCSUP 细胞用含 10% FBS 和 1% 青霉素/链霉素的 RPMI 1640 培养基培养, UMUC-3 细胞在 10% FBS 和 1% 青霉素/链霉素的 MEM 完全培养基培养; SV-HUC-1 细胞采用 F-12K 完全培养基培养。待细胞汇合度达 80%~90% 时进行传代或冻存处理(-80 °C 或液氮)。

利用 siRNA 干扰技术敲低 CTHRC1 表达, 设计了 4 条靶向 CTHRC1 的 siRNA, 分别是 si-CTHRC1-353 (si-353)、si-CTHRC1-512 (si-512)、si-CTHRC1-647 (si-647) 和 si-CTHRC1-718 (si-718), 将 4 条 siRNA 及其阴性对照 (si-NC) 质粒转染至 5637 细胞, 实验分为空白对照、si-NC、si-353、si-512、si-647 和 si-718 组。引物序列: si-353 为 5'-GCCAAUGGCAUUCG GGUATT-3'; si-512 为 5'-CGGAGUGUACAUUUACAAATT-3'; si-647 为 5'-CCUCUCCCAUUGAAGCUATT-3'; si-718 为 5'-TCGCACTTCTTCTGTGGAATTCA-3'; si-NC 为 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'。

1.5 qPCR 法检测膀胱癌组织和细胞中 CTHRC1 mRNA 的表达

用 TRIzol 试剂提取组织和细胞中总 RNA, 并逆转录为 cDNA。根据 SYBR PrimeScript RT-PCR 试剂盒说明书进行相应操作, 使用 Bio-Rad PCR 仪进行反应。CTHRC1 引物序列: 上游为 5'-CAATGGCAT TCCGGGTACAC-3', 下游为 5'-GTACACTCCGCA ATTTTCCCAA-3'; β -actin 引物序列: 上游为 5'-CAT GTACGTTGCTATCCAGGC-3', 下游为 5'-CTCCTT AATGTCACGCACGAT-3'。反应条件: 预变性 95 °C 2 min; 变性 95 °C 5 s, 退火 60 °C 30 s, 延伸 72 °C 30 s, 共 40 个循环, 计算各组 CT 值。以 β -actin 作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因 mRNA 的相对表达量。

1.6 免疫组织化学染色法检测膀胱癌组织中 CTHRC1 蛋白的表达

将石蜡切片标本依次进行脱蜡、水化、抗原修复、去除内源性过氧化物酶、封闭后, 加入抗-CTHRC1 (1:200) 抗体, 4 °C 过夜。次日, 滴加通用二抗, 37 °C 处理 15 min 后, 加入 100 μ L 辣根过氧化物酶 (HRP), 37 °C 处理 15 min, DAB 显色, 苏木精复染、脱水、透明后, 使用中性树脂封片。在光学显微镜 ($\times 100$) 下, 每张切片随机选取 5 个视野, 观察和计数阳性细胞数。结果评分判定: (1) 按染色强度评分:

无色为 0 分, 弱阳性为 1 分, 阳性为 2 分, 强阳性为 3 分; (2) 按阳性细胞百分比评分: 阳性细胞 $\leq 5\%$ 为 0 分, $5\% \sim \leq 25\%$ 为 1 分, $25\% \sim \leq 50\%$ 为 2 分, $50\% \sim \leq 75\%$ 为 3 分, $> 75\%$ 为 4 分。统计分数, 最终以染色强度 $\times$ 阳性细胞百分比 = 每视野评分, 取平均值, 并根据 CTHRC1 蛋白的免疫组化评分将膀胱癌患者分为高表达组 (≥ 4 分) 和低表达组 (< 4 分)。

1.7 WB 法检测膀胱癌细胞 CTHRC1、FAK-ERK1/2 信号通路相关蛋白的表达

提取各组细胞总蛋白, 根据 BCA 法计算蛋白浓度, 加入 40 μ g 蛋白样本, 进行 SDS-PAGE, 将蛋白质转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶常温封闭 1.5 h。加入 CTHRC1 抗体 (1:1 000)、Phospho-FAK (Tyr397) 抗体 (1:1 000)、Phospho-FAK (Tyr925) 抗体 (1:1 000)、FAK 抗体 (1:1 000)、phospho-p44/42 MAPK 抗体 (1:1 000)、p44/42 MAPK 抗体 (1:1 000)、 β -actin 抗体 (1:1 000), 4 °C 摇床上过夜。TBST 缓冲液洗涤 3 次, 5 min/次, 加入 HRP 标记的山羊抗兔或山羊抗鼠二抗 (均为 1:3 000), 室温下摇床上处理 1 h, TBST 缓冲液洗涤后, 采用化学发光法显影。以 ImageJ 软件统计分析蛋白条带的灰度值。

1.8 Transwell 实验检测膀胱癌 5637 细胞的迁移和侵袭能力

细胞迁移实验: 取对数生长期细胞, 消化、离心, 用无血清培养基重悬并计算细胞密度, 使用无血清培养基调整细胞密度为 8×10^5 个/mL。Transwell 上小室中加入 100 μ L 细胞悬液, 下小室中加入 700 μ L 含 10% FBS 的完全培养基, 置入 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。取出小室, 清洗后, 用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 0.5% 结晶紫染色 15 min, 清洗、风干。

细胞侵袭实验: 除使用预铺 matrigel 胶的 Transwell 上小室外, 其余操作方法同迁移实验。

1.9 细胞划痕愈合实验检测膀胱癌 5637 细胞的迁移

取对数生长期各组细胞, 消化、离心、重悬后, 将细胞密度为 1×10^6 个/mL 接种在 6 孔板内, 待细胞汇合度达 100% 时, 用 10 μ L 枪头垂直于 6 孔板划竖线, PBS 洗涤, 去掉脱落的细胞。分别在 0、24 h 时观察细胞划痕愈合情况, 并拍照, 计算细胞划痕愈合率 [愈合百分比 = (0 h 面积 - 24 h 面积) / 0 h 面积 $\times 100\%$]。

1.10 基因集富集分析 (GSEA)

为鉴定 CTHRC1 相关的生物学功能和通路, 使用 TCGA 数据集进行 GSEA。根据表达中位数分为 CTHRC1 高表达组和低表达组, 并用 Broad Institute 的 GSEA 软件 3.0 执行。从 Molecular Signatures Database (<http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>) 中获得代表特定生物学过程的经典途径基因集 (c2.all。

v6.0.symbols.gmt)。每种分析均进行了1 000次基因组排列,以获得标准化富集得分(normalized enrichment score, NES),用于对每种表型中富集的途径进行分类。当 $P<0.05$ 和错误发现率(false discovery rate, FDR) <0.2 时为差异有统计学意义。

1.11 统计学处理

所有实验均独立重复3次。采用IBM SPSS 19.0和Graphpad Prism 5.0软件进行数据统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间数据比较采用 t 检验,多组间数据比较采用单因素方差分析;用Kaplan-Meier分析生存曲线,用Log-Rank检验分析CTHRC1与膀胱癌患者临床预后的关系,以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CTHRC1在MIBC中表达上调

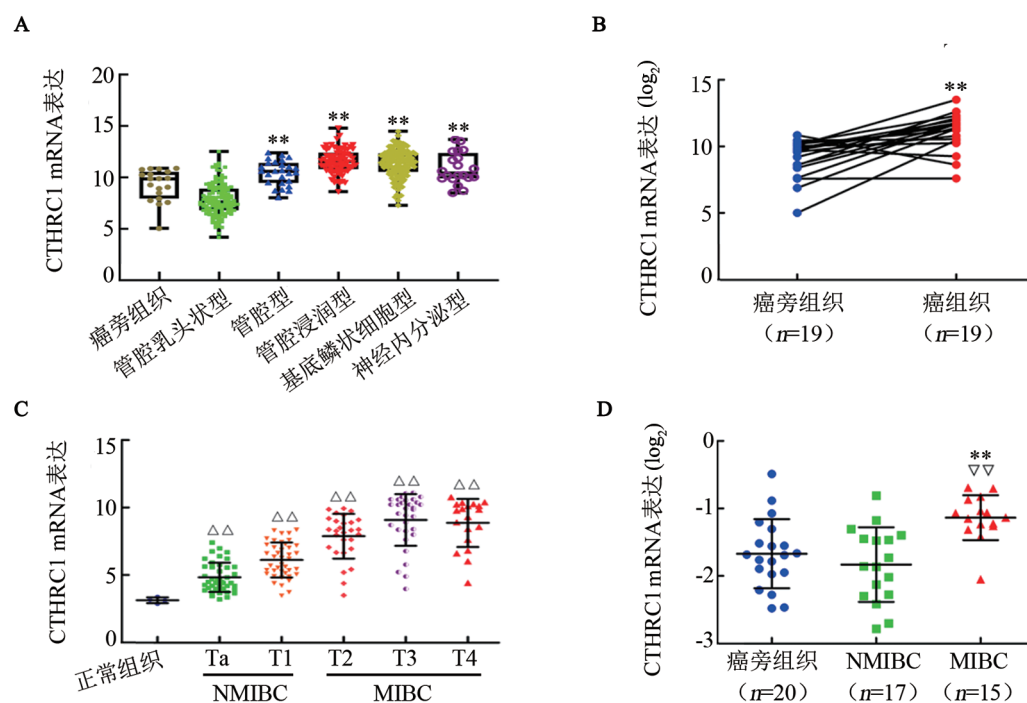
通过TCGA下载的405例膀胱癌和19例膀胱癌旁组织标本,参照2017年TCGA的分类标准,将膀胱癌分为管腔乳头状型、管腔型、管腔浸润型、基底鳞状细胞型和神经内分泌型5型。分析结果提示,CTHRC1 mRNA在恶性程度较高的神经内分泌型、基底鳞状细胞型、管腔浸润型和管腔型中的表达水平显著高于癌旁组织(均 $P<0.01$),而在恶性程度较低的管腔乳头状型中的表达水平较低(图1A)。

分析TCGA来源的19例膀胱癌组织和癌旁组织,结果发现CTHRC1 mRNA在膀胱癌组织中表达显著升高($P<0.01$,图1B)。

分析ArrayExpress数据库来源的E-MTAB-1803和E-MTAB-1940芯片数据,结果发现CTHRC1 mRNA在MIBC(T2~T4)和非MIBC(NMIBC, Ta、T1期)中的表达水平显著高于正常组织($P<0.05$,图1C)。qPCR法检测结果(图1D)显示,CTHRC1 mRNA在癌旁组织和NMIBC中表达显著低于MIBC($P<0.01$),而癌旁组织与NMIBC之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

免疫组织化学染色结果(图2)显示,CTHRC1蛋白在MIBC组织中的表达强度明显高于癌旁组织和NMIBC组织(均 $P<0.05$),CTHRC1高表达在3组中占比分别是73.15%(79/108)、32.00%(8/25)和38.89%(14/36)。

qPCR法检测结果(图3A)显示,与SV-HUC-1细胞相比,膀胱癌细胞中CTHRC1 mRNA表达水平上调,其中以5637细胞中表达水平最高($P<0.01$),而RT4和UMUC-3细胞中表达水平较低。WB法检测结果(图3B)与qPCR法检测结果基本一致($P<0.01$),CTHRC1蛋白在5637细胞中呈高表达状态,因此选择5637细胞进行后续实验研究。



与癌旁组织比较,** $P<0.01$;与正常组织比较, $\Delta\Delta P<0.01$;与NMIBC组比较, $\nabla\nabla P<0.01$

A:CTHRC1在各种分子亚型组织中的表达;B:TCGA队列膀胱癌及癌旁组织中CTHRC1的表达;C:ArrayExpress数据集中4例正常尿路上皮、83例NMIBC和79例MIBC组织中CTHRC1的表达;D:qPCR法检测NMIBC和MIBC组织中CTHRC1的表达

图1 CTHRC1在膀胱癌及癌旁组织中的表达

2.2 CTHRC1表达与膀胱癌患者预后的关系

根据前述免疫组化结果,随访了其中55例患者(CQMU队列),Kaplan-Meier生存曲线结果(图4)显示,CTHRC1高表达组患者OS率显著低于低表达组患者($P<0.01$)。通过分析TCGA队列和2个GEO队

列的临床数据发现相似的结果,在TCGA和GSE13507队列中CTHRC1高表达的膀胱癌患者OS较低表达患者缩短(均 $P<0.05$);在GSE31684队列中高CTHRC1表达组无复发生存率(RFS)较低表达组更差($P<0.05$)。

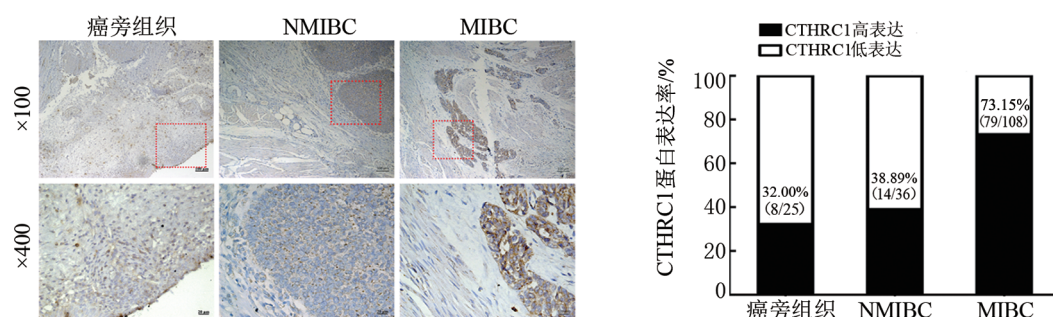
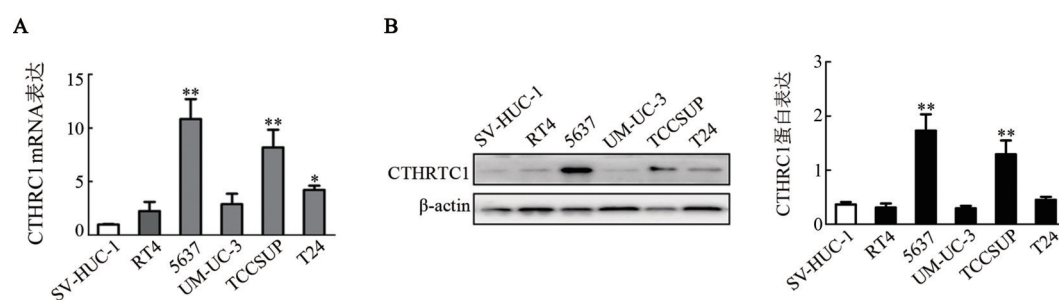


图2 CTHRC1蛋白在癌旁组织、NMIBC及MIBC组织中的表达(免疫组化S-P染色法)



与SV-HUC-1细胞比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

图3 CTHRC1 mRNA(A)和蛋白(B)在正常尿路上皮细胞SV-HUC-1和膀胱癌细胞中的表达

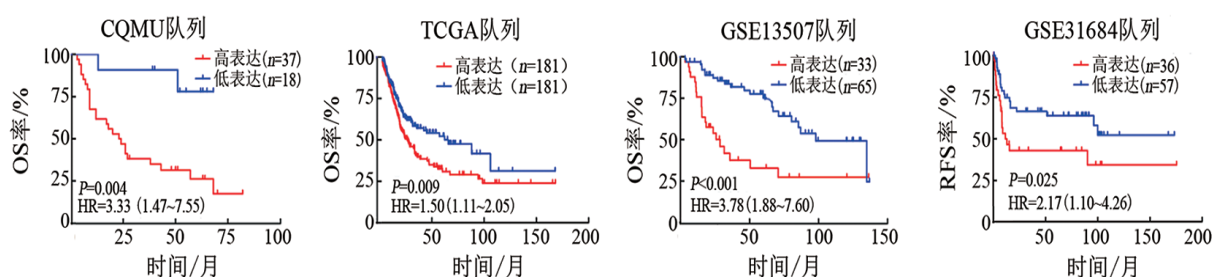


图4 CTHRC1表达对膀胱癌患者OS和RFS的影响

2.3 干扰CTHRC1表达可显著下调膀胱癌5637细胞中CTHRC1 mRNA和蛋白的表达

使用4条siRNA和si-NC瞬时转染膀胱癌5637细胞,于转染后48、72 h时收集细胞,qPCR法和WB法检测结果(图5A、B)显示,与Ctrl组和si-NC组比较,4条siRNA均能显著下调5637细胞中CTHRC1 mRNA和蛋白的表达水平(均 $P<0.01$),其中si-512和si-718片段在细胞中的干扰效率均大于75%,故选择si-512和si-718片段进行后续功能研究。

2.4 敲低CTHRC1表达可显著抑制膀胱癌5637细

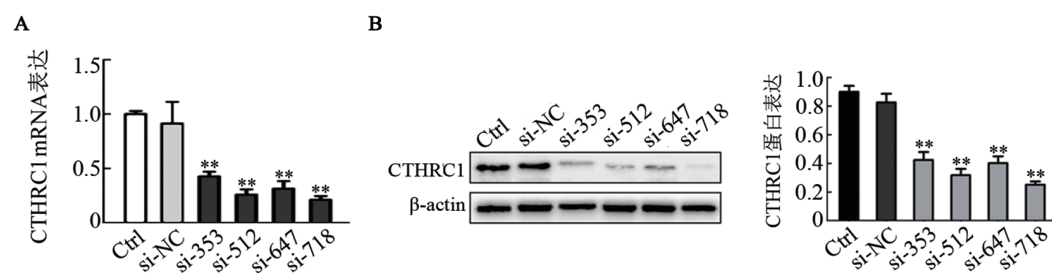
胞的迁移和侵袭能力

GSEA分析结果(图6A)显示,膀胱癌、泛癌侵袭和细胞迁移等基因集显著富集到CTHRC1高表达组中,提示CTHRC1可能与细胞迁移和侵袭表型相关。细胞划痕愈合实验结果(图6B)显示,与si-NC组相比,敲低CTHRC1表达后,5637细胞的划痕愈合率显著下降($P<0.01$)。Transwell实验结果(图6C)显示,与si-NC相比,敲低CTHRC1表达后的5637细胞迁移和侵袭能力均显著降低(均 $P<0.01$)。结果表明,敲低CTHRC1表达后的膀胱癌5637细胞迁移和侵袭能力均显著降低。

2.5 敲低CTHRC1表达可显著抑制FAK-ERK1/2信号通路活性

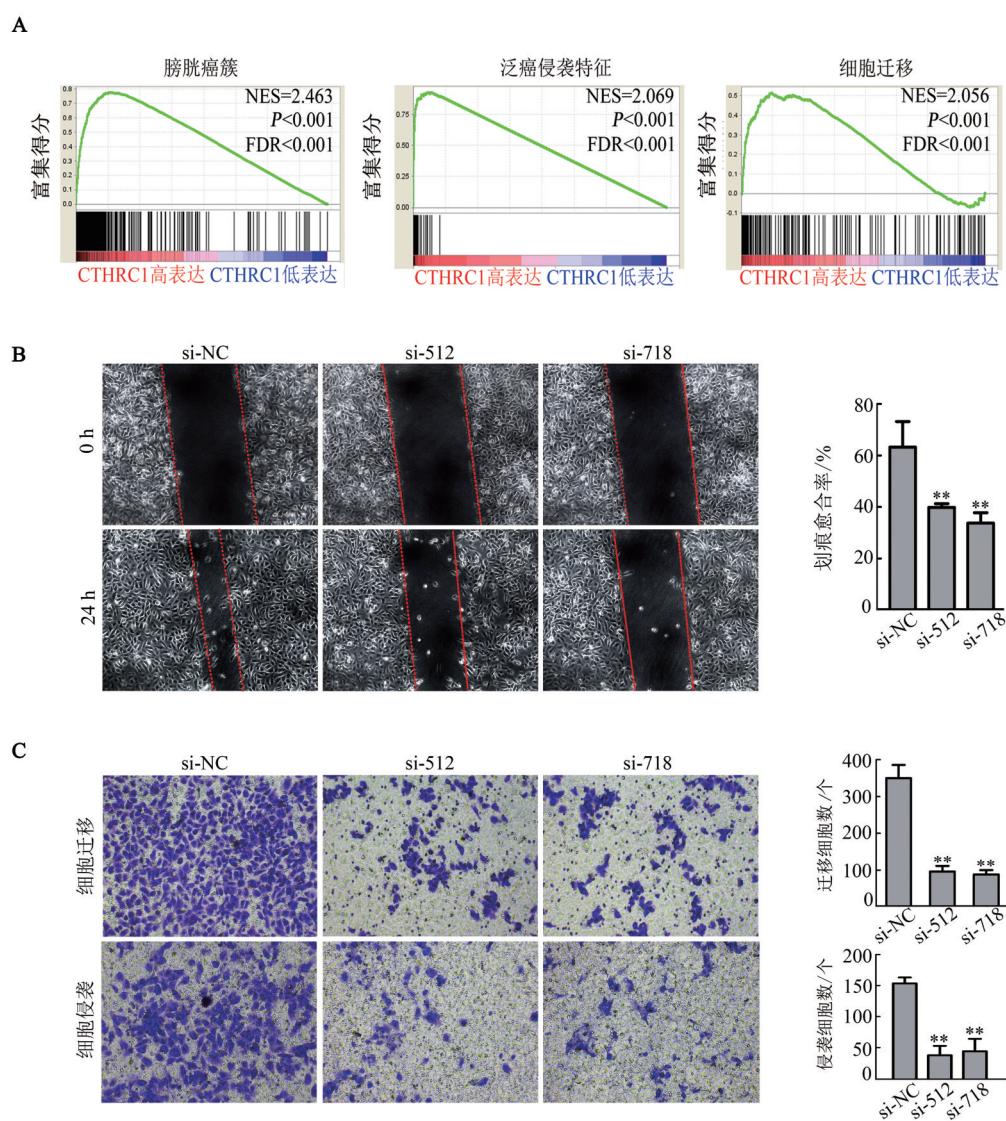
基于TCGA测序数据进行基因集富集分析结果(图7)发现,FAK、肌动蛋白细胞骨架调节、FAK通

路,以及丝裂原活化蛋白激酶等通路显著富集到CTHRC1高表达组(均 $P<0.01$)。分析结果表明,膀胱癌中CTHRC1高表达可能与细胞FAK、细胞黏附和细胞骨架变化有关。



与Ctrl组或si-NC组比较,** $P<0.01$

图5 qPCR法(A)和WB法(B)检测RNAi对CTHRC1的干扰效率



与si-NC组比较,** $P<0.01$

A:GSEA分析CTHRC1表达与膀胱癌侵袭、迁移相关基因的关系;B:伤口愈合实验检测敲低CTHRC1对5637细胞迁移的影响; C:Transwell实验检测敲低CTHRC1基因对5637细胞迁移和侵袭的影响($\times 100$)

图6 干扰CTHRC1表达对5637细胞迁移和侵袭的影响

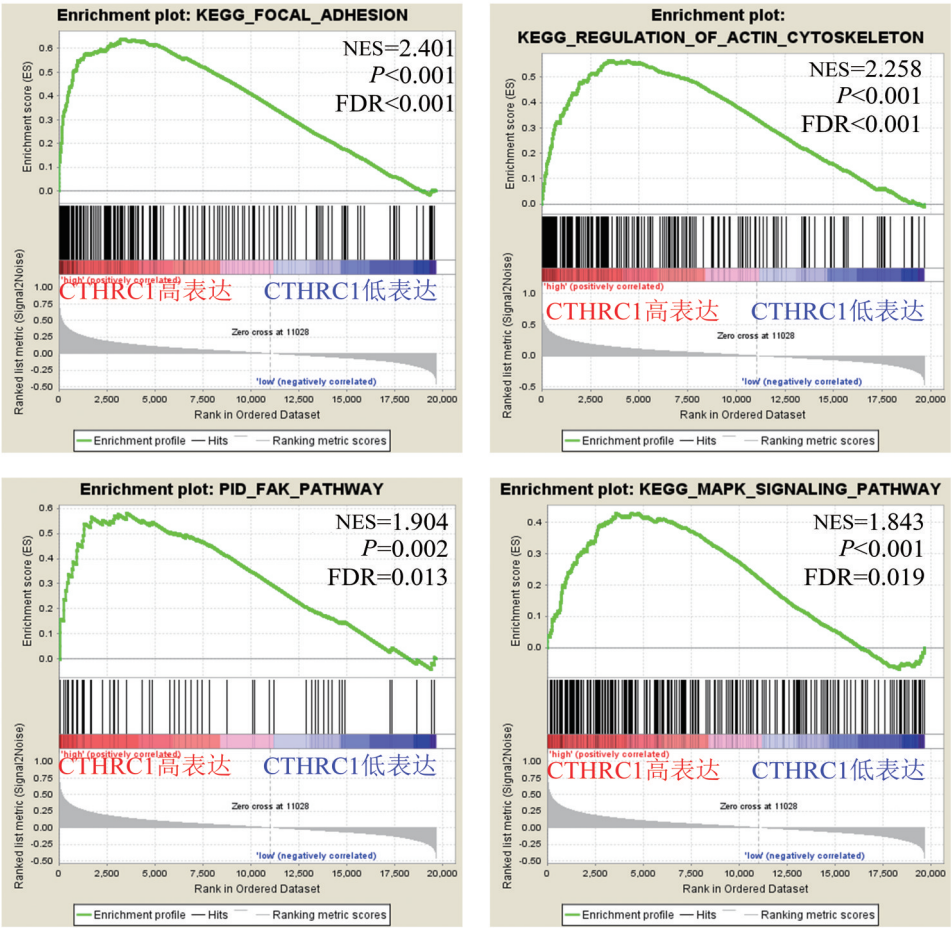
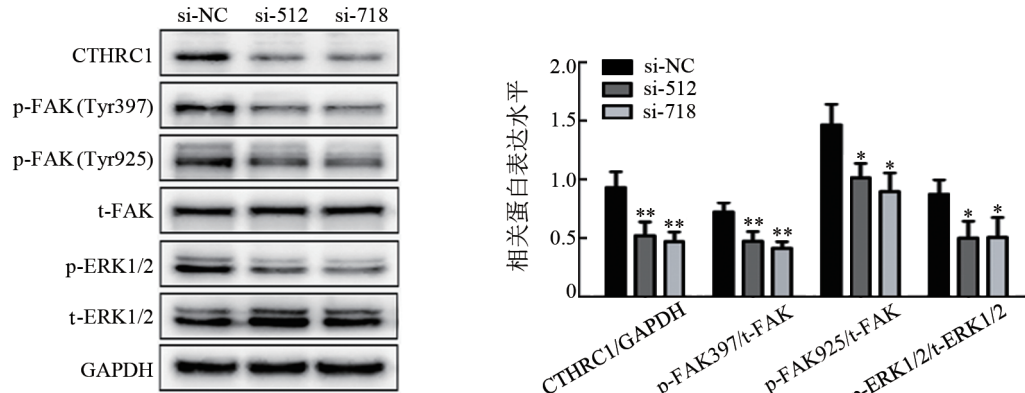


图7 GSEA分析富集在CTHRC1高表达组中的基因集和信号通路

根据文献^[9]报道以及 GSEA 分析结果,研究 CTHRC1 是否参与调控 FAK 通路。WB 法检测 FAK 信号通路中的关键蛋白的表达变化,结果发现,敲低 CTHRC1 表达后 5637 细胞黏附通路主要分子 p-FAK

(Tyr-397/925)、p-ERK1/2 等蛋白磷酸化水平显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$,图8)。结果证实,CTHRC1 基因参与调控 FAK-ERK1/2 信号通路的活性。



与 si-NC 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图8 干扰CTHRC1表达对FAK-ERK1/2信号通路相关蛋白表达的影响

3 讨论

NMIBC 患者接受经尿道膀胱肿瘤切除术治疗后

仍有 60% 以上会发生复发,其中约 10%~20% 的病例会进展为 MIBC。NMIBC 患者 5 年 OS 率较高(大于 80%),当其进展为 MIBC 时,5 年 OS 率降低至 60% 左

右^[10]。术后监测手段包括膀胱镜检查或尿液细胞学检查,但对于乳头状肿瘤和扁平原位癌病变仍有漏诊风险^[11]。目前尚无除尿液细胞学检查以外的高效无创的标准检测手段。因此,在膀胱癌逐渐进展至浸润表型的过程中,探索相应的生物标志物及其潜在的分子机制势在必行。

既往研究结果^[8]表明,CTHRC1 转录和蛋白水平在多种实体瘤中均呈普遍高表达状态。本研究首先利用 TCGA 测序数据分析 CTHRC1 在癌旁组织和不同分子分型膀胱癌之间的表达水平。分析 ArrayExpress 数据库来源的芯片数据发现,CTHRC1 在正常膀胱黏膜组织和 NMIBC 组织中表达较低,而在 MIBC 组织中表达明显上调。进一步实验发现,CTHRC1 无论是在膀胱癌组织还是细胞系中均呈高表达状态。此外,CTHRC1 与膀胱癌患者预后密切相关,Kaplan-Meier 生存曲线显示 CTHRC1 高表达组患者 OS 明显低于 CTHRC1 低表达组患者。研究结果提示,CTHRC1 在膀胱癌中高表达,且可作为判断膀胱癌预后的生物标志物。

CTHRC1 高表达促进肿瘤细胞恶性生物学行为,增强其增殖、迁移和侵袭能力。随后,对 CTHRC1 在膀胱癌细胞中发挥的生物学功能进行了研究。通过 RNA 干扰实验,发现敲低 CTHRC1 表达可显著抑制膀胱癌 5637 细胞的迁移和侵袭能力。CTHRC1 增强非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)细胞的侵袭和转移,该过程由 MMP7 和 MMP9 介导,具体机制为 CTHRC1 通过 AP-1/c-Jun 上调 MMP7 表达,以及通过 NF- κ B 和 AP-1 上调 MMP9 表达^[12]。也有研究结果^[13]表明,CTHRC1 通过诱导 β -catenin 核转位,增强 β -catenin/TCF 转录活性以及增加 GSK-3 β Ser-9 位点磷酸化水平来以促进 NSCLC 细胞的侵袭性,Wnt/ β -catenin 抑制剂 DKK1 可降低 CTHRC1 介导的 β -catenin/TCF 转录活性,以及逆转 CTHRC1 诱导的细胞增殖和迁移。在结直肠癌细胞中,CTHRC1 通过稳定 TGF- β 受体与配体的结合,持续激活 TGF- β 信号通路,从而促进小鼠 MC38 和 CT26 细胞肝转移^[14]。以上研究与本研究结果有相似之处,即 CTHRC1 可增强肿瘤细胞恶性进展相关的生物学行为。

FAK 是一种非受体酪氨酸激酶,是肿瘤微环境中细胞信号转导的多功能调节因子,在整联蛋白黏附位点提供信号转导和支架功能,参与这些黏附位点的转换调节,这是控制细胞迁移的关键过程。在发育期间和各种肿瘤中,FAK 通过激酶依赖性和非依赖性机制促进细胞迁移、存活和增殖^[15-16]。促进 FAK 活化的机制与整联蛋白受体在细胞与细胞外基质蛋白结合后聚类和 FAK 二聚化相关,这会导致

FAK Y397 位点自动磷酸化、Src 家族激酶与磷酸化位点的结合、FAK 结构域激活环(Y576/577)的 Src 介导的磷酸化,以及活化的 FAK-Src 复合物的形成。肿瘤细胞侵入周围微环境是肿瘤进展的关键步骤,这需要通过黏着斑和细胞骨架动力学的改变以及 MMP 活性的改变来转变为运动表型,以促进肿瘤细胞向细胞外基质侵袭^[17]。本研究通过 GSEA 分析发现,FAK 和 ERK1/2 等与细胞黏附、黏着斑和细胞骨架变化相关的基因集显著富集在 CTHRC1 高表达组。黏着斑将细胞骨架肌动蛋白和整合素受体连接并与细胞外基质建立联系,通过黏附作用、分子组合的改变和信号转化来驱动细胞迁移,这提示 FAK 介导的黏着斑和细胞骨架动力学变化可能与 CTHRC1 调控的膀胱癌细胞运动表型的改变密切相关。FAK 的显性负性形式抑制 MMP2 的表达和活性,而反义介导的 FAK 缺失也降低了肿瘤细胞中 MMP 的表达,这意味着 FAK 对维持 MMP 降解肿瘤基质的功能和活性是必要的^[18]。FAK 促进了 v-Src 转化的成纤维细胞中 SRC-CAS-CRK-DOCK180 复合物的装配,导致 RAC1 和 JNK 活化,并促使 MMP2 和 MMP9 表达增加^[19]。因此,FAK 通过不同的途径调节细胞运动和侵袭,即促进迁移过程中黏着斑和周围肌动蛋白结构的动态调节,以及 MMP 介导的基质降解。本研究发现,CTHRC1 可促进 FAK Tyr397/925 位点发生磷酸化,伴随下游 ERK1/2 信号通路活化。FAK 在 Y397 位点上的磷酸化有助于滋养层细胞的迁移和侵袭^[20],这与本研究的结果较为一致,提示 CTHRC1 通过调控 p-FAK 和 p-ERK1/2 以影响膀胱癌细胞的迁移与侵袭。

综上所述,本研究通过分析数据库膀胱癌临床标本和数据,发现 CTHRC1 在 MIBC 组织中表达上调,且 CTHRC1 高表达组患者预后不良;体外功能实验和机制研究结果提示,CTHRC1 参与调控膀胱癌细胞的迁移与侵袭表型,该过程受 FAK-ERK1/2 信号通路介导,提示 CTHRC1 在膀胱癌恶性进展中发挥重要的调控作用,有望成为新的膀胱癌诊断的生物标志物和治疗靶点。

[参考文献]

- [1] GERARDUZZI C, HARTMANN U, LEASK A, *et al.* The matrix revolution: matricellular proteins and restructuring of the cancer microenvironment[J]. *Cancer Res*, 2020, 80(13): 2705-2717. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2098.
- [2] POPOVA N V, JÜCKER M. The functional role of extracellular matrix proteins in cancer[J/OL]. *Cancers*, 2022, 14(1): 238[2021-08-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35008401/>. DOI:10.3390/cancers14010238.
- [3] AMILCA-SEBA K, SABBABH M, LARSEN A K, *et al.* Osteopontin

- as a regulator of colorectal cancer progression and its clinical applications[J/OL]. *Cancers* (Basel), 2021, 13(15): 3793[2021-08-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8345080/>. DOI:10.3390/cancers13153793.
- [4] BAO J M, DANG Q, LIN C J, *et al.* SPARC is a key mediator of TGF- β -induced renal cancer metastasis[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(3): 1926-1938. DOI:10.1002/jcp.29975.
- [5] YEUNG T L, LEUNG C S, WONG K K, *et al.* TGF- β modulates ovarian cancer invasion by upregulating CAF-derived versican in the tumor microenvironment[J/OL]. *Cancer Res*, 2013, 73(16): 5016-5028 [2021-08-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3745588/>. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-13-0023.
- [6] PEZESHKIAN Z, NOBILI S, PEYRAVIAN N, *et al.* Insights into the role of matrix metalloproteinases in precancerous conditions and in colorectal cancer[J/OL]. *Cancers* (Basel), 2021, 13(24): 6226[2021-08-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8699154/>. DOI: 10.3390/cancers13246226.
- [7] 薛昭君, 贾原, 张俊萍. 肿瘤微环境中 CXC 型趋化因子及其受体的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27(7): 715-724. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2020.07.001.
- [8] MEI D, ZHU Y, ZHANG L L, *et al.* The role of CTHRC1 in regulation of multiple signaling and tumor progression and metastasis[J/OL]. *Mediators Inflamm*, 2020, 2020: 9578701[2021-08-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7441421/>. DOI:10.1155/2020/9578701.
- [9] PARK E H, KIM S, JO J Y, *et al.* Collagen triple helix repeat containing-1 promotes pancreatic cancer progression by regulating migration and adhesion of tumor cells[J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(3): 694-702. DOI:10.1093/carcin/bgs378.
- [10] YIN H B, HE W Y, LI Y H, *et al.* Loss of DUSP2 predicts a poor prognosis in patients with bladder cancer[J/OL]. *Hum Pathol*, 2019, 85: 152-161[2021-08-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30458195/>. DOI:10.1016/j.humpath.2018.11.007.
- [11] SIMON M, BOSSET P O, ROUANNE M, *et al.* Multiple recurrences and risk of disease progression in patients with primary low-grade (TaG1) non-muscle-invasive bladder cancer and with low and intermediate EORTC-risk score[J/OL]. *PLoS One*, 2019, 14(2): e0211721[2021-08-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6392242/>. DOI:10.1371/journal.pone.0211721.
- [12] HE W L, ZHANG H, WANG Y F, *et al.* CTHRC1 induces non-small cell lung cancer (NSCLC) invasion through upregulating MMP-7/MMP-9[J/OL]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 400[2021-08-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5891957/>. DOI:10.1186/s12885-018-4317-6.
- [13] KE Z F, HE W L, LAI Y H, *et al.* Overexpression of collagen triple helix repeat containing 1 (CTHRC1) is associated with tumour aggressiveness and poor prognosis in human non-small cell lung cancer[J/OL]. *Oncotarget*, 2014, 5(19): 9410-9424[2021-08-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4253443/>. DOI: 10.18632/oncotarget.2421.
- [14] ZHANG X L, HU L P, YANG Q, *et al.* CTHRC1 promotes liver metastasis by reshaping infiltrated macrophages through physical interactions with TGF- β receptors in colorectal cancer[J]. *Oncogene*, 2021, 40(23): 3959-3973. DOI:10.1038/s41388-021-01827-0.
- [15] NASER R, ALDEHAIMAN A, DÍAZ-GALICIA E, *et al.* Endogenous control mechanisms of FAK and PYK₂ and their relevance to cancer development[J/OL]. *Cancers* (Basel), 2018, 10(6): E196[2021-08-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6025627/>. DOI: 10.3390/cancers10060196.
- [16] XU S S, XU H X, WANG W Q, *et al.* The role of collagen in cancer: from bench to bedside[J/OL]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 309[2021-08-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6744664/>. DOI:10.1186/s12967-019-2058-1.
- [17] SULZMAIER F J, JEAN C, SCHLAEPFER D D. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications[J/OL]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(9): 598-610[2021-08-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4365862/>. DOI:10.1038/nrc3792.
- [18] JANG B, JUNG H, CHOI S, *et al.* Syndecan-2 cytoplasmic domain up-regulates matrix metalloproteinase-7 expression via the protein kinase C γ -mediated FAK-ERK signaling pathway in colon cancer [J/OL]. *J Biol Chem*, 2017, 292(39): 16321-16332[2021-08-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5625061/>. DOI: 10.1074/jbc.M117.793752.
- [19] HSIA D A, MITRA S K, HAUCK C R, *et al.* Differential regulation of cell motility and invasion by FAK[J]. *J Cell Biol*, 2003, 160(5): 753-767. DOI:10.1083/jcb.200212114.
- [20] ILIĆ D, GENBACEV O, JIN F, *et al.* Plasma membrane-associated pY397FAK is a marker of cytotrophoblast invasion *in vivo* and *in vitro*[J/OL]. *Am J Pathol*, 2001, 159(1): 93-108[2021-08-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1850415/>. DOI:10.1016/S0002-9440(10)61677-X.

[收稿日期] 2021-08-04

[修回日期] 2022-02-06

[本文编辑] 党瑞山