

[文章编号] 1671-587X(2024)02-0346-09

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240207

## TPX2基因沉默对膀胱癌耐药细胞株 T24/DDP 顺铂化疗敏感性的增强作用及其机制

张 鹰<sup>1</sup>, 蒋先训<sup>1</sup>, 万朝辉<sup>2</sup>

(1. 南华大学衡阳医学院附属第二医院重症医学科, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学衡阳医学院附属第二医院急诊科, 湖南 衡阳 421001)

**[摘要]** **目的:** 探讨爪蟾驱动蛋白样蛋白2靶蛋白(TPX2)基因沉默对膀胱癌耐药细胞株T24/顺铂(DDP)的化疗敏感性的影响,并阐明其作用机制。**方法:** 采用DDP浓度梯度刺激法建立DDP耐药细胞株T24/DDP,将细胞分为T24细胞组和T24/DDP细胞组。MTT法检测各组细胞增殖活性,并根据半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)值计算耐药指数(RI);实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)法和Western blotting法检测细胞中TPX2 mRNA及蛋白表达水平。通过小干扰RNA(siRNA)沉默T24/DDP细胞中TPX2基因表达,再将细胞分为空白对照组、阴性对照干扰(si-NC)组、TPX2沉默(si-TPX2)组、si-NC+DDP(2 mg·L<sup>-1</sup> DDP)组和si-TPX2+DDP(2 mg·L<sup>-1</sup> DDP)组。RT-qPCR法和Western blotting法检测转染后细胞中TPX2 mRNA及蛋白表达水平,MTT法检测各组细胞增殖活性,流式细胞术检测各组凋亡细胞率和细胞周期G<sub>2</sub>/M期百分率,Transwell小室实验检测各组迁移细胞数和侵袭细胞数,Western blotting法检测各组细胞中Wnt/β-连环蛋白(β-catenin)信号通路相关蛋白β-catenin、P-糖蛋白(P-gp)、锌指蛋白转录因子1(Snail1)和Survivin蛋白表达水平。**结果:** 成功建立膀胱癌DDP耐药细胞株T24/DDP,RI值为8.76。与T24细胞组比较,T24/DDP细胞组中TPX2 mRNA和蛋白表达水平明显升高(P<0.01)。与空白对照组和si-NC组比较,si-TPX2组T24/DDP细胞中TPX2 mRNA和蛋白表达水平明显降低(P<0.01),且DDP的IC<sub>50</sub>值明显降低(P<0.01)。与si-NC组比较,si-TPX2组T24/DDP细胞凋亡率和细胞周期G<sub>2</sub>/M期百分率明显升高(P<0.01),迁移细胞数和侵袭细胞数明显降低(P<0.01),T24/DDP细胞中β-catenin、P-gp、Snail1和Survivin蛋白表达水平明显降低(P<0.01);与si-NC+DDP组比较,si-TPX2+DDP组T24/DDP细胞凋亡率和细胞周期G<sub>2</sub>/M期百分率明显升高(P<0.01),迁移细胞数和侵袭细胞数明显降低(P<0.01),T24/DDP细胞中β-catenin、P-gp、Snail1和Survivin蛋白表达水平明显降低(P<0.01)。**结论:** TPX2基因沉默通过抑制Wnt/β-catenin信号通路增强膀胱癌耐药细胞株T24/DDP对DDP的化疗敏感性。

**[关键词]** 爪蟾驱动蛋白样蛋白2靶蛋白;膀胱肿瘤;顺铂;化疗敏感性;Wnt/β-catenin信号通路

**[中图分类号]** R737.14 **[文献标志码]** A

## Enhancement effect of TPX2 gene silencing on chemosensitivity of bladder cancer cell line T24/DDP to cisplatin and its mechanism

ZHANG Ying<sup>1</sup>, JIANG Xianxun<sup>1</sup>, WAN Zhaohui<sup>2</sup>

(1. Department of Critical Medicine, Second Affiliated Hospital, Hengyang Medical College, University

**[收稿日期]** 2023-03-23

**[基金项目]** 湖南省卫健委一般指导科研项目(D202304058812, 202213014836)

**[作者简介]** 张 鹰(1987-),男,湖南省衡阳市人,医学硕士,主治医师,主要从事重症医学相关方面的研究。

**[通信作者]** 蒋先训,主治医师(E-mail:hygtc7985@163.com)

of South China, Hengyang 421001, China; 2. Department of Emergency, Second Affiliated Hospital, Hengyang Medical College, University of South China, Hengyang 421001, China)

**ABSTRACT Objective:** To discuss the effect of gene silencing of targeting protein for *Xenopus* kinesin like protein 2 (TPX2) on the chemosensitivity of the resistant bladder cancer cell line T24/cisplatin (DDP), and to clarify the mechanism. **Methods:** The DDP-resistant cell line T24/DDP was established by DDP concentration gradient induction method, and the cells were divided into T24 cell group and T24/DDP cell group. MTT method was used to detect the proliferation activities of the cells in various groups; the resistance index (RI) was calculated based on the half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) value; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting methods were used to detect the expression levels of TPX2 mRNA and protein in the cells in various groups; small interfering RNA (siRNA) was used to silence the TPX2 gene expression in the T24/DDP cells. The cells were divided into blank control group, negative control siRNA (si-NC) group, TPX2 silenced (si-TPX2) group, si-NC+DDP ( $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  DDP) group, and si-TPX2+DDP ( $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  DDP) group. RT-qPCR and Western blotting methods were used to detect the expression levels of TPX2 mRNA and protein in the cells in various groups; MTT method was used to detect the proliferation activity of the cells in various groups; flow cytometry was used to detect the apoptotic rates of the cells and percentages of the cells at  $G_2/M$  phase in various groups; Transwell chamber assay was used to detect the numbers of migration and invasion cells; Western blotting method was used to detect the expression levels of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway-related proteins such as  $\beta$ -catenin, P-glycoprotein (P-gp), zinc finger protein transcription factor 1 (Snail1), and Survivin proteins in the cells in various groups. **Results:** The resistant bladder cancer cell line T24/DDP was successfully established with the RI value of 8.76. Compared with T24 cell group, the expression levels of TPX2 mRNA and protein in the T24/DDP cells were significantly increased ( $P<0.01$ ). Compared with blank control group and si-NC group, the expression levels of TPX2 mRNA and protein in the T24/DDP cells in si-TPX2 group were significantly decreased ( $P<0.01$ ), and the  $IC_{50}$  value of DDP was significantly decreased ( $P<0.01$ ). Compared with si-NC group, the apoptotic rate of the cells and the percentage of the cells at  $G_2/M$  phase in si-TPX2 group was significantly increased ( $P<0.01$ ), and the numbers of migration and invasion cells were significantly decreased ( $P<0.01$ ), and the expression levels of  $\beta$ -catenin, P-gp, Snail1, and Survivin proteins in the T24/DDP cells were also significantly decreased ( $P<0.01$ ). Compared with si-NC+DDP group, the apoptotic rate of the cells and percentage of the cells at  $G_2/M$  phase in si-TPX2+DDP group were significantly increased ( $P<0.01$ ), and the numbers of migration and invasion cells were significantly decreased ( $P<0.01$ ), and the expression levels of  $\beta$ -catenin, P-gp, Snail1, and Survivin proteins in the T24/DDP cells were significantly decreased ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** Gene silencing of TPX2 enhances the chemosensitivity of the resistant bladder cancer cell line T24/DDP to DDP by inhibiting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway.

**KEYWORDS** Targeting protein for *Xenopus* kinesinlike protein 2; Bladder neoplasm; Cisplatin; Chemotherapy sensitivity; Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway

膀胱癌是全球第九大常见肿瘤和第二大常见泌尿系统肿瘤, 全球每年有超过 50 万例新增确诊膀胱癌病例和 20 万例膀胱癌死亡病例<sup>[1-3]</sup>。顺铂 (cisplatin, DDP) 化疗作为晚期膀胱癌患者的一线治疗方案, 可以延长膀胱癌患者的生存期<sup>[4-5]</sup>。然而, 化疗耐药导致 DDP 一线化疗的有效率不超过 50%, 成为膀胱癌切除术后癌症治疗失败的主要原

因, 也是癌症转移和复发的关键因素之一<sup>[6-7]</sup>。因此, 增强耐药膀胱癌细胞对 DDP 的化疗敏感性, 对改善膀胱癌患者的预后具有重要意义。爪蟾驱动蛋白样蛋白 2 靶蛋白 (targeting protein for *Xenopus* kinesinlike protein 2, TPX2) 是一种微管相关蛋白, 可驱动蛋白爪蟾驱动蛋白样蛋白 2 (*Xenopus* kinesin-like protein 2, Xklp2) 导向有丝分裂纺锤

极,其在组成纺锤体的微管形成中起至关重要的作用<sup>[8]</sup>。研究<sup>[9-10]</sup>显示:TPX2在膀胱癌中呈高表达,其过表达与不良预后和转移有关联。在食管鳞状细胞癌细胞中LINC00337上调TPX2可以增强细胞对DDP的耐药性<sup>[11]</sup>。然而,在膀胱癌中TPX2基因的表达对其DDP耐药性的影响鲜有报道。本研究探讨沉默TPX2基因对膀胱癌耐药细胞株T24/DDP的DDP化疗敏感性的影响及其可能的作用机制,旨在为DDP耐药性膀胱癌的治疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞、主要试剂和仪器** 人膀胱癌细胞系T24购自中国典型培养物保藏中心细胞库;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和RPMI-1640培养基购自美国Gibco公司,DDP、MTT试剂和Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,反转录试剂盒和实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)试剂盒购自日本TaKaRa公司, Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000购自美国Thermo Fisher公司, TPX2抗体、 $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)抗体、锌指蛋白转录因子1(zinc finger protein transcription factor 1, Snail1)抗体和Survivin抗体均购自美国Cell Signaling Technology公司, P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)抗体购自美国Abcam公司, GAPDH抗体、辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)标记的羊抗小鼠、兔IgG二抗购自武汉博士德生物工程有限公司;超净工作台(型号:Hfsafe-1500)购自苏州净化设备有限公司, CO<sub>2</sub>恒温培养箱(型号:3111)购自美国Thermo Fisher Scientific公司,倒置显微镜(型号:BM2100)购自南京江南永新光有限公司,多功能酶标仪(型号:SYNERGY)购自美国BioTek公司,流式细胞仪(型号:Accuri C6)购自美国BD公司,显影仪(型号:5200)购自上海天能生命科学有限公司。

**1.2 细胞培养及耐药细胞株的建立** 复苏T24细胞,采用含10% FBS的RPMI-1640培养基培养,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>的培养箱。根据参考文献<sup>[12]</sup>,采用DDP浓度梯度刺激法建立膀胱癌DDP耐药细胞株T24/DDP,即以0.05 mg·L<sup>-1</sup> DDP作为起始浓度处理细胞,并逐步提高培养基中DDP的浓度,在每个浓度细胞稳定生长后再提升DDP

浓度,最终建立稳定膀胱癌DDP耐药细胞株T24/DDP。

**1.3 细胞转染及分组** 取对数生长期T24/DDP细胞,以每孔 $2 \times 10^5$ 个细胞的密度接种于6孔细胞培养板中培养,待细胞融合度至70%时,将细胞分为空白对照组、阴性对照干扰(si-NC)组和TPX2沉默(si-TPX2)组。按照Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000试剂盒说明书进行转染操作,细胞转染24 h后,采用RT-qPCR法和Western blotting法检测转染后细胞中TPX2 mRNA及蛋白表达以验证转染效果。再将转染后的细胞分为si-NC组、si-TPX2组、si-NC+DDP组和si-TPX2+DDP组,其中si-NC+DDP组和si-TPX2+DDP组使用含终浓度为2 mg·L<sup>-1</sup> DDP的培养基培养24 h。

**1.4 MTT法检测细胞增殖活性** 取对数生长期T24细胞和T24/DDP细胞及转染后的各组T24/DDP细胞,以每孔 $1 \times 10^4$ 个细胞的密度接种至96孔细胞培养板中,待细胞融合度至70%时,加入不同浓度(0、0.25、0.50、1.00、2.50、5.00、10.00、20.00和40.00 mg·L<sup>-1</sup>) DDP培养24 h。提前4 h每孔加入20  $\mu$ L MTT,培养4 h后弃掉液体,每孔加入150  $\mu$ L DMSO震荡,酶标仪读取490 nm波长处的各孔吸光度(A)值,设置只加培养基的空白孔调零。细胞增殖活性以各组A值表示,计算半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)值和耐药指数(resistance index, RI), RI=T24/DDP细胞IC<sub>50</sub>值/亲本细胞IC<sub>50</sub>值。

**1.5 RT-qPCR法检测各组细胞中TPX2 mRNA表达水平** 采用TRIzol法提取T24细胞和T24/DDP细胞或转染后的各组T24/DDP细胞中总RNA,采用分光光度计进行定量,然后使用反转录试剂盒将RNA逆转录合成cDNA,依据RT-qPCR试剂盒说明进行PCR扩增反应。引物序列:TPX2上游引物,5'-ATGGAAGTGGAGGGCTTTTTC-3',下游引物5'-TGTTGTCAACTGGTTTCAAAGGT-3'; GAPDH上游引物,5'-GGAGCGAGATC-CCTCCAAAAT-3',下游引物5'-GGCTGTTG-TCATACTTCTCATGG-3'。反应条件:95℃预变性5 min,95℃变性5 s、60℃退火30 s和72℃延伸30 s,进行40个循环。以GAPDH为内参,采用2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法计算TPX2 mRNA表达水平。

**1.6 Annexin V-FITC-FITC/PI法检测各组细胞凋亡率** 按照“1.3”中进行分组, 2 mg·L<sup>-1</sup> DDP处理 24 h后收获细胞。取 1×10<sup>5</sup>个细胞, 离心洗涤后用 100 μL 缓冲液重悬, 然后加入 2 μL Annexin V-FITC 和 1 μL PI 避光孵育 20 min, 置于流式细胞仪检测细胞凋亡率。细胞凋亡率=凋亡细胞数/细胞总数×100%。

**1.7 流式细胞术检测不同细胞周期各组细胞百分率** 按照“1.3”中进行分组, 2 mg·L<sup>-1</sup> DDP处理 24 h后收获细胞。取 1×10<sup>5</sup>个细胞, 离心洗涤后用 70% 冷乙醇固定过夜, PBS 缓冲液漂洗 2 次, 加入 100 mg·L<sup>-1</sup> PI 避光孵育 30 min, 置于流式细胞仪检测分析各组细胞百分率。G<sub>2</sub>/M 期细胞百分率=G<sub>2</sub>/M 期细胞数/细胞总数×100%。

**1.8 Transwell 小室实验检测各组迁移细胞数和侵袭细胞数** 细胞迁移实验: 按照“1.3”中进行分组, 2 mg·L<sup>-1</sup> DDP 处理 24 h 后收获细胞; 用不含 FBS 的 RPMI-1640 培养基将细胞浓度调整为每毫升 1×10<sup>5</sup> 个细胞的悬液; Transwell 小室上室加入 200 μL 细胞悬液, 下室加入 500 μL 含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基, 培养箱孵育 24 h; 无菌棉球除去膜上层细胞, 多聚甲醛固定, 结晶紫染色, 显微镜观察统计侵入细胞数量。细胞侵袭实验需提前将用无血清 RPMI-1640 培养基稀释的 Matrigel 胶 (1 g·L<sup>-1</sup>) 涂覆于上室底部, 后续步骤同上述迁移实验。显微镜下随机选取 5 个视野进行拍照, 计算每个视野细胞数, 以细胞数代表细胞迁移和侵袭能力。

**1.9 Western blotting 法检测各组细胞中 TPX2、β-catenin、P-gp、Snail1 和 Survivin 蛋白表达水平** 收集细胞, 采用 RIPA 裂解法提取各组细胞中总蛋白, 用分光光度计进行定量。各组取等量蛋白通过 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质, 并转到 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加一抗 TPX2 (1: 800)、GAPDH (1: 1 000)、β-catenin (1: 1 000)、P-gp (1: 1 000)、Snail1 (1: 1 000) 和 Survivin (1: 800), 4 °C 过夜。然后加二抗 (1: 8 000) 室温孵育 2 h, 采用化学发光法进行显影。采用 Image J 软件进行定量, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/GAPDH 蛋白条带灰度值。

**1.10 统计学分析** 采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学分析。各组细胞增殖活性, 细胞凋亡率,

G<sub>2</sub>/M 期细胞百分率, 迁移细胞数, 侵袭细胞数及 T24/DDP 细胞中 TPX2、β-catenin、P-gp、Snail1 和 Survivin 蛋白表达水平均符合正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验, 2 组间样本均数比较采用两独立样本 *t* 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

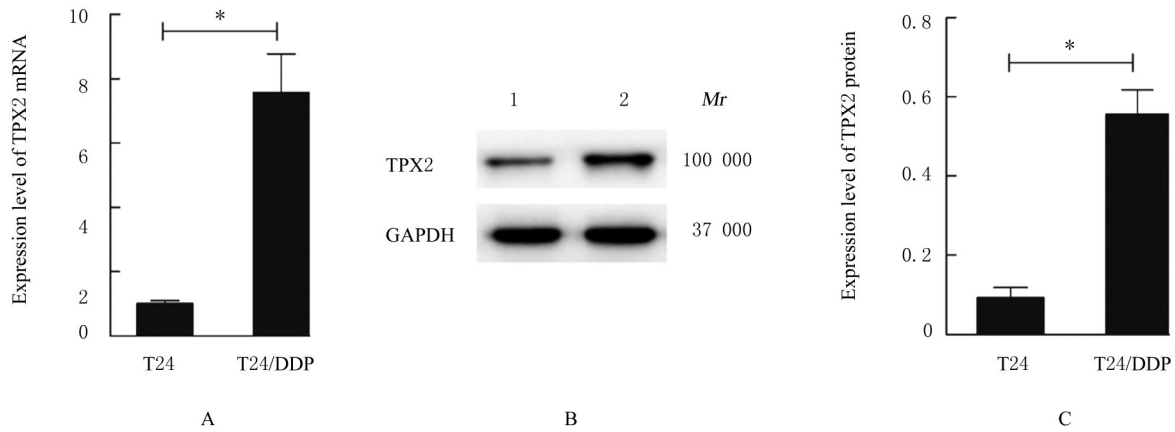
### 2.1 T24/DDP 细胞药敏性鉴定及 T24 细胞和 T24/DDP 细胞中 TPX2 mRNA 及蛋白表达水平

MTT 法检测结果显示: 不同浓度 DDP 作用 24 h, 亲本 T24 细胞的 IC<sub>50</sub> 值为 (1.30±0.14) mg·L<sup>-1</sup>, 而耐药细胞株 T24/DDP 细胞的 IC<sub>50</sub> 值为 (11.39±1.95) mg·L<sup>-1</sup>, RI 值为 8.76, 提示 T24/DDP 细胞对 DDP 耐药。RT-qPCR 法检测结果显示: 与 T24 细胞比较, T24/DDP 细胞中 TPX2 mRNA 表达水平明显升高 (*P*<0.01)。Western blotting 法检测结果显示: 与 T24 细胞比较, T24/DDP 细胞中 TPX2 蛋白表达水平明显升高 (*P*<0.01)。见图 1。

### 2.2 各组 T24/DDP 细胞中 TPX2 mRNA 和蛋白表达水平及 IC<sub>50</sub> 值

转染 siRNA 后, RT-qPCR 法检测结果显示: 与空白对照组和 si-NC 组比较, si-TPX2 组 T24/DDP 细胞中 TPX2 mRNA 表达水平明显降低 (*P*<0.001)。Western blotting 法检测结果显示: 与空白对照组和 si-NC 组比较, si-TPX2 组 T24/DDP 细胞中 TPX2 蛋白表达水平明显降低 (*P*<0.001)。见图 2。MTT 法检测结果显示: 不同浓度 DDP 作用 24 h, 与空白对照组和 si-NC 组比较, si-TPX2 组 T24/DDP 细胞增殖活性均明显降低 (*P*<0.05)。见图 3。空白对照组细胞 IC<sub>50</sub> 值为 (11.23±1.42) mg·L<sup>-1</sup>, si-NC 组细胞 IC<sub>50</sub> 值为 (11.47±1.51) mg·L<sup>-1</sup>, si-TPX2 组细胞 IC<sub>50</sub> 值为 (8.00±0.23) mg·L<sup>-1</sup>, 其中 si-TPX2 组细胞 IC<sub>50</sub> 值较空白对照组和 si-NC 组明显降低 (*P*<0.05)。

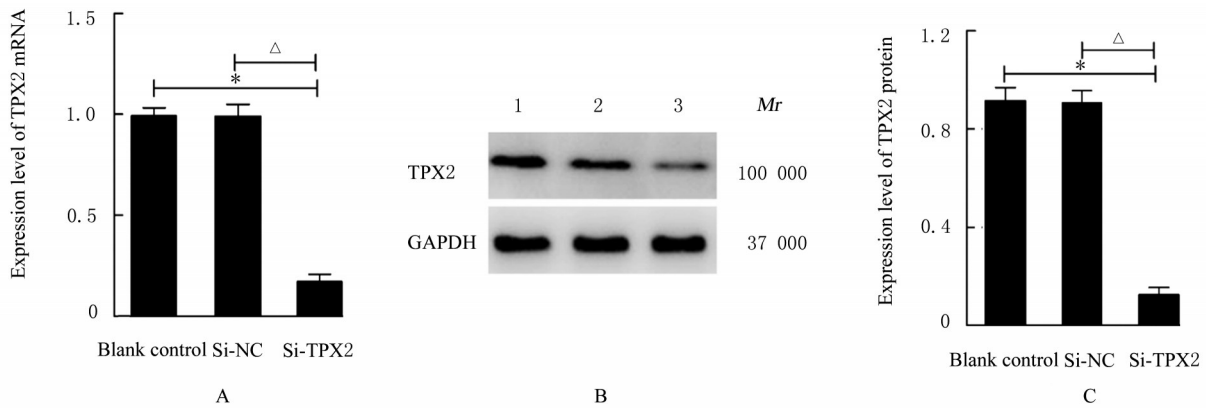
**2.3 各组 T24/DDP 细胞的细胞凋亡率** si-NC+DDP 组和 si-TPX2+DDP 组使用含终浓度为 2 mg·L<sup>-1</sup> DDP 的培养基培养 24 h。流式细胞术检测结果显示: 与 si-NC 组 (7.52%±0.34%) 比较, si-TPX2 组 T24/DDP 细胞凋亡率 (15.38%±0.69%) 均明显升高 (*P*<0.01); 与 si-NC+DDP 组 (12.08%±0.76%) 比较, si-TPX2+DDP 组 T24/DDP 细胞凋亡率 (35.24%±2.69%) 明显升



A, C: Histograms; B: Electrophoregram. Lane 1: T24 cells; Lane 2: T24/DDP cells. \* $P < 0.01$  compared with T24 cells.

图1 T24细胞和T24/DDP细胞中TPX2 mRNA及蛋白表达水平

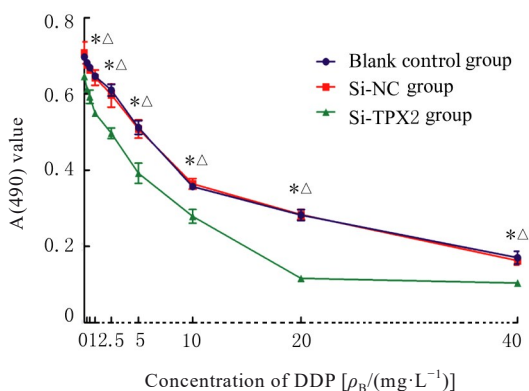
Fig. 1 Expression levels of TPX2 mRNA and protein in T24 cells and T24/DDP cells



A, C: Histograms; B: Electrophoregram. Lane 1: Blank control group; Lane 2: Si-NC group; Lane 3: Si-TPX2 group. \* $P < 0.001$  vs blank control group;  $\Delta P < 0.001$  vs si-NC group.

图2 各组T24/DDP细胞中TPX2 mRNA和蛋白表达水平

Fig. 2 Expression levels of TPX2 mRNA and protein in T24/DDP cells in various groups



\* $P < 0.01$  compared with blank control group;  $\Delta P < 0.01$  compared with si-NC group.

图3 各组T24/DDP细胞增殖活性

Fig. 3 Proliferation activities of T24/DDP cells in various groups

高 ( $P < 0.01$ )。见图4。

2.4 各组T24/DDP细胞G<sub>2</sub>/M期百分率 流式细胞术检测结果显示:与si-NC组(19.44%±1.41%)比较,si-TPX2组T24/DDP细胞G<sub>2</sub>/M期百分率(32.62%±1.13%)明显升高( $P < 0.01$ );与si-NC+DDP组(26.93%±1.23%)比较,si-TPX2+DDP组T24/DDP细胞G<sub>2</sub>/M期百分率(43.38%±0.73%)明显升高( $P < 0.01$ )。见图5和6。

2.5 各组T24/DDP细胞迁移细胞数和侵袭细胞数 Transwell小室实验检测结果显示:与si-NC组比较,si-TPX2组、si-NC+DDP组和si-TPX2+DDP组T24/DDP迁移细胞数和侵袭细胞数明显降低( $P < 0.01$ );与si-NC+DDP组比较,

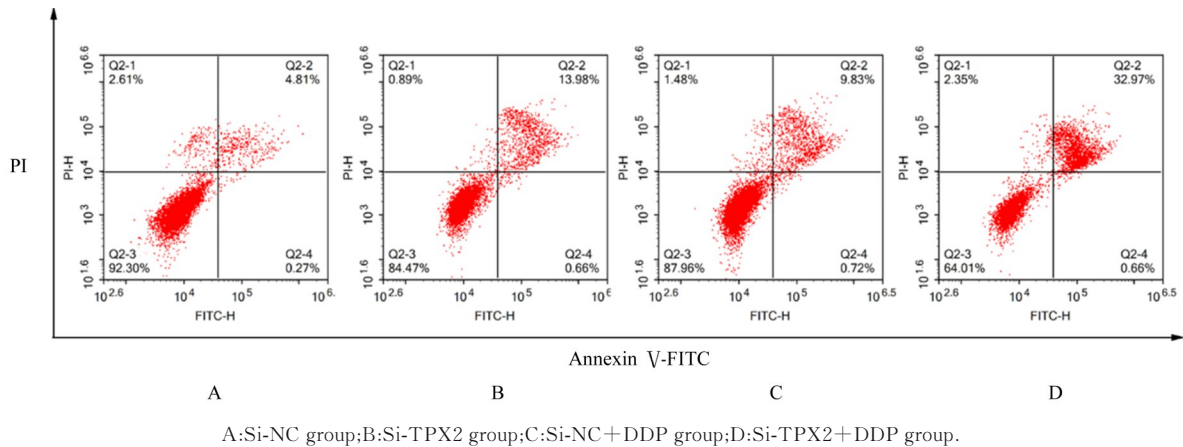
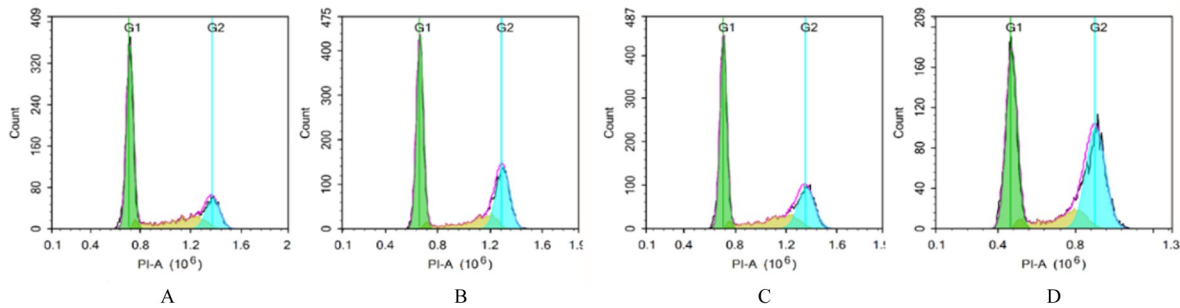


图 4 各组 T24/DDP 细胞凋亡率

Fig. 4 Apoptotic rates of T24/DDP cells in various groups



A: Si-NC group; B: Si-TPX2 group; C: Si-NC+DDP group; D: Si-TPX2+DDP group.

图 5 流式细胞术检测各组 T24/DDP 细胞周期

Fig. 5 Cell cycles of T24/DDP cells in various groups

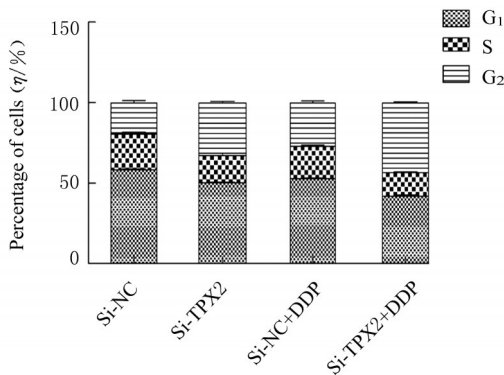


图 6 各组 T24/DDP 细胞不同周期细胞百分率

Fig. 6 Percentages of T24/DDP cells at different cell cycles in various groups

si-TPX2+DDP 组 T24/DDP 迁移细胞数和侵袭细胞数明显降低 ( $P < 0.01$ )。见图 7~10。

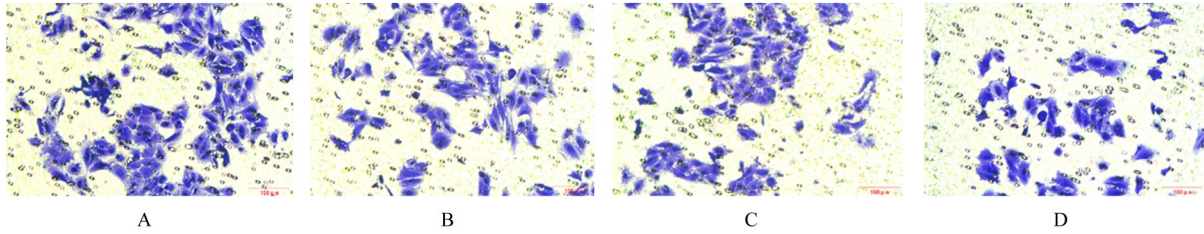
**2.6 各组 T24/DDP 细胞中  $\beta$ -catenin、P-gp、Snail1 和 Survivin 蛋白表达水平** Western blotting 法检测结果显示：与 si-NC 组比较，si-TPX2 组和 si-NC+DDP 组 T24/DDP 细胞中  $\beta$ -catenin、P-gp、Snail1 和

Survivin 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ )；与 si-NC+DDP 组比较，si-TPX2+DDP 组 T24/DDP 细胞中  $\beta$ -catenin、P-gp、Snail1 和 Survivin 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ )。见图 11。

### 3 讨论

膀胱癌是第二大常见泌尿系统肿瘤，严重影响患者的生存质量<sup>[1-2]</sup>。DDP 作为最有效的抗癌药物之一，其通过在 DNA 中产生链间和链内交联来发挥其细胞毒性作用，已被广泛应用于膀胱癌的治疗<sup>[13]</sup>。然而，化疗耐药的产生严重影响 DDP 的化疗效果，导致膀胱癌的转移和复发<sup>[6]</sup>。因此，增强膀胱癌细胞对 DDP 的化疗敏感性，对改善膀胱癌患者的预后具有重要的意义。

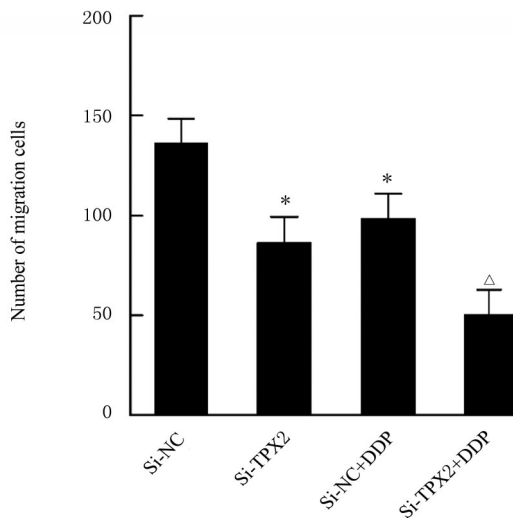
TPX2 是一种微管相关蛋白，负责在有丝分裂过程中驱动蛋白 Xklp2 定位到微管末端，与有丝分裂纺锤体发育和功能密切相关，其在膀胱癌、肝癌、结肠癌、胰腺癌、卵巢癌和乳腺癌等肿瘤中过表达，与不良预后有关联<sup>[8, 14]</sup>。研究<sup>[11]</sup>显示：



A:Si-NC group;B:Si-TPX2 group;C:Si-NC+DDP group;D:Si-TPX2+DDP group.

图7 各组 T24/DDP 细胞迁移情况(结晶紫, ×200)

Fig. 7 Migration of T24/DDP cells in various groups(Crystal violet, ×200)



\* $P < 0.01$  compared with si-NC group;  $\triangle P < 0.01$  compared with si-NC+DDP group.

图8 各组 T24/DDP 细胞迁移细胞数

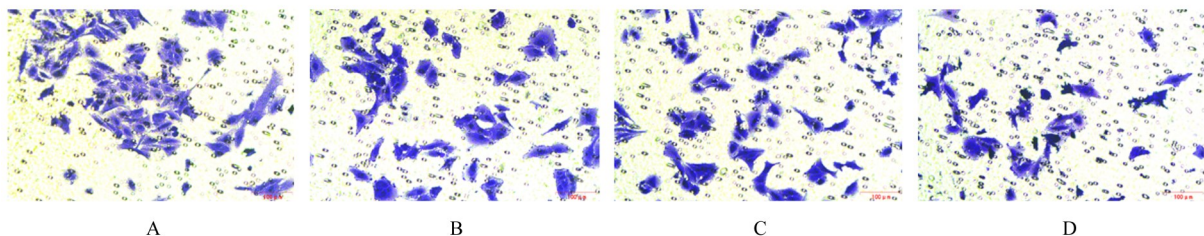
Fig. 8 Numbers of migration T24/DDP cells in various groups

在食管鳞状细胞癌细胞中, TPX2 表达情况与 DDP 耐药性有关联, LINC00337 上调 TPX2 后可增强细胞对 DDP 的耐药性。然而, 在膀胱癌细胞中 TPX2 基因的表达对其 DDP 耐药性的影响有待进一步研究。本研究旨在探讨沉默 TPX2 基因对膀胱癌耐药细胞株 T24/DDP 的 DDP 化疗敏感性的影响及作用

机制。

本研究通过浓度梯度法刺激法建立 DDP 耐药细胞株 T24/DDP, 结果显示: T24/DDP 细胞中 TPX2 mRNA 和蛋白表达水平均明显升高, 提示 T24/DDP 细胞 DDP 耐药性可能与 TPX2 表达情况有关。进一步研究发现: 干扰 TPX2 基因表达可抑制 T24/DDP 细胞增殖活性, 诱导细胞发生凋亡和细胞周期 G<sub>2</sub>/M 期阻滞, 降低细胞迁移和侵袭能力。选择 2 mg·L<sup>-1</sup> DDP 处理转染后 T24/DDP 细胞, 可诱导 T24/DDP 细胞发生凋亡和细胞周期 G<sub>2</sub>/M 期阻滞, 并降低细胞迁移和侵袭能力; 而同时沉默 TPX2 基因可以进一步促进 T24/DDP 细胞凋亡, 导致细胞周期阻滞, 抑制细胞的迁移和侵袭。本研究结果表明干扰 TPX2 基因表达可以增强 T24/DDP 细胞对 DDP 的化疗敏感性。

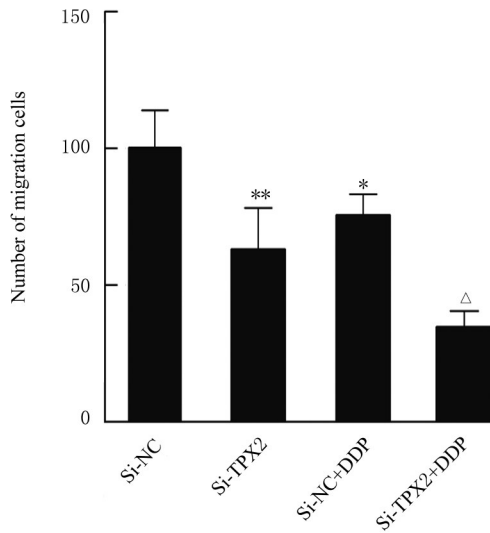
Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路通过影响肿瘤细胞生长、发育、代谢和干细胞维持在癌症中发挥重要作用, 其中  $\beta$ -catenin 是关键的下游效应物, 并且该通路在调控肿瘤细胞 DDP 耐药过程中发挥重要作用<sup>[15-16]</sup>。在胃癌细胞中, 人参皂苷 Rg3 通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路活性增强细胞对 DDP 的敏感性<sup>[17]</sup>; 在鼻咽癌细胞中, 褪黑素通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路可以逆转细胞 DDP 化疗耐药<sup>[18]</sup>; 在非小细胞肺癌细胞中, miRNA-32 和



A:Si-NC group;B:Si-TPX2 group;C:Si-NC+DDP group;D:Si-TPX2+DDP group.

图9 各组 T24/DDP 细胞侵袭情况(结晶紫, ×200)

Fig. 9 Invasion of T24/DDP cells in various groups(Crystal violet, ×200)



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with si-NC group;  $\Delta P < 0.01$  compared with si-NC+DDP group.

图 10 各组 T24/DDP 细胞侵袭细胞数

Fig. 10 Numbers of invasion T24/DDP cells in various groups

miRNA-548a 可以通过靶向轴突导向受体蛋白 1 (roundabout 1, ROBO1) 抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 轴的激活从而促进细胞对 DDP 的药物敏感性<sup>[19]</sup>; 在肺癌细胞中, 矿尘诱导基因 (mineral dust-induced gene, MDIG) 通过激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路调节 ABC 转运蛋白 (ATP-binding cassette transporter, ABC transporter) 表达, 促进 DDP 耐药<sup>[15]</sup>。研究<sup>[20]</sup>显示: 慢病毒介导的 TPX2 基因沉默可通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路来抑制肝癌细胞增殖和诱导细胞凋亡。本研究结果显示: 沉默

TPX2 基因或采用  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  DDP 处理均可降低 T24/DDP 细胞中  $\beta$ -catenin、P-gp、Snail1 和 Survivin 等蛋白表达水平; 而采用  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  DDP 处理沉默 TPX2 基因表达的 T24/DDP 细胞, 细胞中  $\beta$ -catenin、P-gp、Snail1 和 Survivin 蛋白表达水平进一步降低。结果表明: 沉默 TPX2 基因通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路来增强膀胱癌耐药细胞株 T24/DDP 对 DDP 的化疗敏感性。

综上所述, 干扰 TPX2 基因表达通过抑 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路, 促进细胞凋亡和细胞周期阻滞, 从而增强膀胱癌耐药细胞株 T24/DDP 对 DDP 的化疗敏感性, 可为 DDP 耐药的膀胱癌提供理论依据。本研究局限性是未在动物水平验证结论。本课题组将进一步在动物水平验证结论, 排除干扰 TPX2 基因对膀胱癌耐药性的影响。

利益冲突声明:

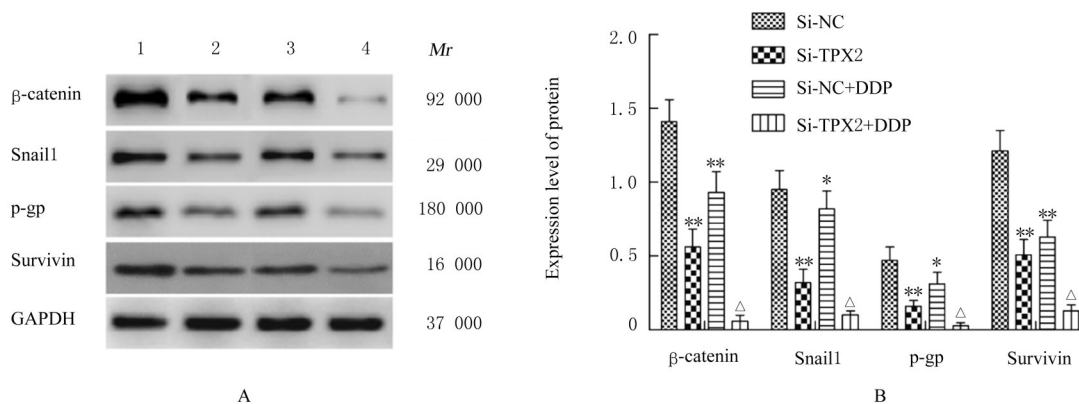
所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

张鹰负责实验实施和文章撰写, 蒋先训参与实验设计及部分实验实施, 万朝辉参与文章修改、审校和统计学分析。

[参考文献]

[1] ZHENG W, ZHAO Y, WANG T, et al. Identification of hub genes associated with bladder cancer using bioinformatic analyses [J]. Transl Cancer Res, 2022, 11(5):1330-1343.  
 [2] SHEN P, HE X, LAN L, et al. Identification of cell division cycle 20 as a candidate biomarker and potential



Lane 1: Si-NC group; Lane 2: Si-TPX2 group; Lane 3: Si-NC+DDP group; Lane 4: Si-TPX2+DDP group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with si-NC group;  $\Delta P < 0.01$  compared with si-NC+DDP group.

图 11 各组 T24/DDP 细胞中  $\beta$ -catenin、P-gp、Snail1 和 Survivin 蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 11 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of  $\beta$ -catenin, P-gp, Snail1, and Survivin proteins in T24/DDP cells in various groups

- therapeutic target in bladder cancer using bioinformatics analysis[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(7):BSR20194429.
- [3] DOBRUCH J, OSZCZUDLOWSKI M. Bladder cancer: current challenges and future directions [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2021, 57(8):749.
- [4] REN D, LI L, WANG S, et al. The c-MYC transcription factor conduces to resistance to cisplatin by regulating MMS19 in bladder cancer cells [J]. *Tissue Cell*, 2023, 82:102096.
- [5] CHEN J, LI Y, LI Z, et al. LncRNA MST1P2/miR-133b axis affects the chemoresistance of bladder cancer to cisplatin-based therapy via Sirt1/p53 signaling[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2020, 34(4):e22452.
- [6] CHEN MK, ZHOU JH, WANG P, et al. BMI1 activates P-glycoprotein via transcription repression of miR-3682-3p and enhances chemoresistance of bladder cancer cell [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(14):18310-18330.
- [7] LIU T, ZHANG Z, WANG C, et al. BRD4 promotes the migration and invasion of bladder cancer cells through the Sonic hedgehog signaling pathway and enhances cisplatin resistance[J]. *Biochem Cell Biol*, 2022, 100(2):179-187.
- [8] SHAO T, JIANG X, BAO G, et al. Comprehensive analysis of the oncogenic role of targeting protein for Xklp2 (TPX2) in human malignancies[J]. *Dis Markers*, 2022, 2022:7571066.
- [9] YAN X, GUO Z X, LIU X P, et al. Four novel biomarkers for bladder cancer identified by weighted gene coexpression network analysis[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10):19073-19087.
- [10] YAN L, LI Q, YANG J, et al. TPX2-p53-GLIPR1 regulatory circuitry in cell proliferation, invasion, and tumor growth of bladder cancer [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(2):1791-1803.
- [11] YANG C, SHEN S, ZHENG X, et al. Long non-coding RNA LINC00337 induces autophagy and chemoresistance to cisplatin in esophageal squamous cell carcinoma cells via upregulation of TPX2 by recruiting E2F4[J]. *FASEB J*, 2020, 34(5):6055-6069.
- [12] 王 鹏, 陈明坤, 陈子坚, 等. 膀胱癌T24细胞顺铂与吉西他滨多药耐药细胞株的建立及其生物学特征[J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(4):716-718.
- [13] ALI R, AOUIDA M, ALHAJI S A, et al. Can cisplatin therapy be improved? Pathways that can be targeted[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(13):7241.
- [14] MENG X, CAO J, ZHENG H, et al. TPX2 promotes ovarian tumorigenesis by interacting with Lamin A/C and affecting its stability[J]. *Cancer Med*, 2023, 12(8):9738-9748.
- [15] WANG Q, GENG F, ZHOU H, et al. MDIG promotes cisplatin resistance of lung adenocarcinoma by regulating ABC transporter expression via activation of the WNT/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(4):4294-4307.
- [16] 田宇佳, 魏 铭, 赵 辉. Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路在肿瘤干细胞中的作用研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2022, 47(8):831-837.
- [17] MENG Z Q, ZHANG R, WU X W, et al. Ginsenoside Rg3 regulates cisplatin resistance in gastric cancer by Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, 2022, 44(3):366-376.
- [18] ZHANG J, XIE T, ZHONG X, et al. Melatonin reverses nasopharyngeal carcinoma cisplatin chemoresistance by inhibiting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(6):5423-5438.
- [19] ZHENG J, LI X, CAI C, et al. MicroRNA-32 and MicroRNA-548a promote the drug sensitivity of non-small cell lung cancer cells to cisplatin by targeting ROBO1 and inhibiting the activation of Wnt/ $\beta$ -catenin axis[J]. *Cancer Manag Res*, 2021, 13:3005-3016.
- [20] DING L, ZHANG S, CHEN S, et al. Effect and mechanism of lentivirus-mediated silencing of TPX2 gene on proliferation and apoptosis of human hepatoma cells[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(5):8352-8358.