

# p53-/RB1-诱导 AR 与启动子相关应答元件的多位点结合促进膀胱癌细胞转移侵袭的机制研究

陈建<sup>1</sup> 丁明星<sup>2</sup> 楼国新<sup>1</sup> 王栋<sup>1</sup>

(1.横店文荣医院 浙江金华 322118; 2.金华职业学院 浙江金华 321017)

**【摘要】**目的 研究p53-/RB1-诱导AR与启动子相关应答元件的多位点结合促进膀胱癌细胞转移侵袭的机制。方法 建立p53/RB1缺陷型膀胱癌细胞模型以及动物模型,研究p53/RB1缺陷促AR泛素化降解机制,分析AR在膀胱癌细胞EMT中的作用。实验分组:(1)T24细胞系对照慢病毒稳转株;(2)shRNA p53慢病毒稳转株;(3)shRNA RB1慢病毒稳转株。分析shRNA p53、shRNA RB1、对照慢病毒稳转株、CCK8检测数据、流式凋亡检测数据、划痕实验迁移数据、Transwell侵袭检测实验、Western Blot检测灰度值、免疫组化结果、T24稳转株构建。结果 shRNA p53组和shRNA RB1组的Cytokeratin1表达量高于对照组(P<0.05)。RB1 shRNA沉默效果都很好;P53 shRNA715效果最好。结论 p53/RB1基因在膀胱癌的转移过程中起到至关重要的作用,p53/RB1缺陷是通过抑制AR蛋白泛素化降解进而增强其与核内AR响应元件的结合,诱导了膀胱癌上皮-间充质转化的发生最终促进膀胱癌侵袭转移。

**【关键词】**膀胱癌;细胞;转移侵袭;p53-/RB1-诱导AR;启动子相关应答元件;多位点结合;机制

**【中图分类号】**R737

The Mechanism of P53-/RB1- Inducing AR Multi site Binding with Promoter Related Response Elements to Promote the Metastasis and Invasion of bladder cancer Cells

Chen Jian<sup>1</sup> Ding Mingxing<sup>2</sup> Lou Guoxin<sup>1</sup> Wang Dong<sup>1</sup>

(1. Hengdian Wenrong Hospital, Jinhua, Zhejiang 322118; 2. Jinhua Vocational College, Jinhua, Zhejiang 321017)

**[Abstract]** Objective To investigate the mechanism of p53-/RB1- induced AR multi site binding with promoter related response elements to promote the metastasis and invasion of bladder cancer cells. Methods The p53/RB1 deficient bladder cancer cell model and animal model were established. The mechanism of p53/RB1 deficient promoting AR ubiquitination degradation was studied, and the role of AR in EMT of bladder cancer cells was analyzed. Experimental grouping: (1) T24 cell line control lentivirus stable transformation strain;(2)ShRNA p53 lentivirus stable transformant strain;(3)ShRNA RB1 lentivirus stable transformant strain. Analyze shRNA p53, shRNA RB1, control lentivirus stable transformation strain, CCK8 detection data, flow cytometry apoptosis detection data, scratch assay migration data, Transwell invasion detection experiment, Western Blot gray value detection, immunohistochemical results, and T24 stable transformation strain construction. The expression levels of Cytokeratin1 in the shRNA p53 group and shRNA RB1 group were higher than those in the control group (P<0.05). The silencing effect of RB1 shRNA is very good; P53 shRNA715 has the best effect. Conclusion p53/RB1 gene plays an important role in the process of bladder cancer metastasis. The p53/RB1 defect is to inhibit the ubiquitination degradation of AR protein and then enhance its binding to AR response elements in the nucleus, which induces the epithelial mesenchymal transformation of bladder cancer and ultimately promotes the invasion and metastasis of bladder cancer.

**[Key words]** bladder cancer; Cells; Transfer invasion; P53-/RB1 induced AR; promoter related response elements; Multi point combination; mechanism

有数据指出,全球2020年新增膀胱癌患者57万例,其发病率在男性肿瘤中排名第六,死亡率排名第十,在中国男性泌尿系统肿瘤发病率排第二,仅次于前列腺癌,发病形式非常严峻。根据不同的临床阶段及预后效果将膀胱尿路上皮细胞癌分为两大类,肌层浸润性上皮癌(MIBC)以及非肌层浸润性上皮癌(NMIBC),在临床上约80%的膀胱癌患者被诊断为NMIBC,5年生存率大于85%具有良好的预期寿命。NMIBC一线治疗为经尿道膀胱肿瘤切除术,此时肿瘤仅限于粘膜和粘膜下层,并未侵犯肌层。同时,对于那些具有复发可能性的患者,通常会给予卡介苗灌注治疗。但在癌症的治疗研究中,尤其是晚期肿瘤的治疗一直是世界级研究难题,MIBC患者不接受治疗的5年生存率低于15%<sup>[1]</sup>。对于MIBC,膀胱切除术通常作为一线治疗的手段。《膀胱癌诊

断治疗指南(2019版)》中指出,先辅助化疗后行根治性膀胱切除+盆腔淋巴结清扫术是MIBC的标准治疗,这有效提高术后生存率。

由于p53、RB1基因高频突变的广泛性,结合膀胱癌存在的性二态性表明,p53及RB1可能与AR之间存在分子相关性<sup>[2]</sup>。而本研究前期试验结果也证明,沉默p53或RB1基因会导致AR蛋白水平显著上升。类固醇受体的半衰期相对较短,ER对于信号的调节主要依赖于配体依赖蛋白酶体介导的降解过程。而与ER不同的是,AR的蛋白调节机制并不依赖于类固醇配体,但基于本研究前期试验表明,p53或RB1基因缺陷条件下其泛素化过程被抑制或破坏,从而引起AR蛋白水平显著上升。本研究拟构建p53/RB1缺陷型细胞系及动物模型,通过质谱、PCR等手段明确其互作的泛素连

接酶,免疫印迹法检测 AR 的磷酸化位点,明确 p53/RB1 对 AR 泛素化的调节机制;并通过表型实验及分子学检测手段明确 p53/RB1 缺陷在 AR 信号调节及其引发的 EMT 相关过程的分子机制,为膀胱癌的研究与治疗提供新的思路及理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

主要仪器包括 Heal force 公司生产的 HF-1200LC 型生物安全柜、HF90 型 CO<sub>2</sub> 培养箱、neofuge 15R 型冷冻离心机,PerkinElmer/envision 公司生产的 PerkinElmer/envision 型全功能微孔板检测仪,olympus 公司生产的 IX71 型倒置相差显微镜,美标公司生产的 HH-US-A 型电热恒温水浴锅;主要试剂包括 Life 公司生产的 C10010500BT PBS, Hyclone 公司生产的 SH30084.03 胎牛血清、SH30809.01B RPMI-1640,东仁化学公司生产的 CK04 CCK-8 检测试剂盒。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 p53/RB1 缺陷型膀胱癌细胞模型的构建

针对 RB1 及 P53 基因,各设计 2 条 shRNA,PCR 扩增、随后进行酶切回收,然后转化到 Stbl3 感受态中,于氨苄平板中进行单克隆挑选。使用辅助质粒 psPAX2 和 pMD2.G 进行病毒包装,T24 培养于细胞瓶中添加含病毒的细胞培养液 5mL,并添加适量 polybrene(终浓度为 10ug/mL)制备对照 Luci 稳转细胞系、shRB1-Luci 稳转细胞系和 shP53-Luci 稳转细胞系。感染 48h 后,添加 Puromycin(终浓度为 40ug/mL)进行筛选,培养 2 周后,取部分细胞提取 RNA,进行 RB1、p53 和 Actin 基因表达检测。

#### 1.2.2 p53/RB1 缺陷促 AR 泛素化降解机制

##### 1.2.2.1 p53/RB1 缺陷对 AR 蛋白水平及泛素化的影响

提取 p53/RB1 缺陷型细胞系及正常细胞系蛋白随后进行 western blot 检测细胞 RB1、P53、AR、E-cadherin 等蛋白的表达以及 AR 的磷酸化位点。对构建的含有 FLAG-ubiquitin 及 HA-AR 的 293T 细胞进行免疫共沉淀,并进行 western blot 验证 AR 的泛素化。

##### 1.2.2.2 p53/RB1 缺陷促 AR 泛素化的机制

利用免疫共沉淀、质谱检测其相互作用的 E3 连接酶。制备 DNA-Lipofectamine 2000 复合物,构建含有 FLAG-ubiquitin、HA-AR 以及 HIS 标签的 E3 连接酶的重组细胞,随后利用免疫共沉淀以及 western blot 验证 AR 与 E3 及泛素的相互作用。荧光定量 PCR 验证 E3 连接酶 RNA 转录水平将  $\beta$ -actin 作为内参对其他目的基因的 mRNA 表达进行定量分析。

### 1.2.3 AR 在膀胱癌细胞 EMT 中的作用

#### 1.2.3.1 p53/RB1 缺陷及 AR 过表达对转移侵袭能力的影响

通过 transwell 与划痕试验检测膀胱癌细胞模型的迁移、侵袭能力,每孔接种  $4 \times 10^5$  细胞,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养过夜。分别在 0h、8h、16h、24h、48h 时利用倒置显微镜观察拍照,记录细胞迁移及侵袭情况。

#### 1.2.3.2 p53/RB1 缺陷及 AR 过表达对细胞骨架的影响

将细胞 ( $4 \times 10^4$ ) 接种于 24 孔板(铺满爬片)中,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中放置,培养过夜。加入含有药物的对应培养基 ( $5 \mu\text{M}$ ),干预 24h 后预冷 PBS 清洗 3 次,晾干后加入 4%多聚甲醛固定 30min,PBS 清洗 3 次,每次 5min,免疫荧光封闭液封闭 1h,PBS 继续清洗 3 次,每次 5min。

#### 1.2.3.3 AR 影响膀胱癌细胞 EMT 的分子作用机制

转录组检测 p53/RB1 缺陷细胞系中 EMT 相关蛋白的 mRNA 水平,western blot 验证蛋白表达水平。利用双荧光素酶报告基因,在 AR 过表达细胞系中对已经筛选到的候选基因进行启动子活性的检测。利用染色质共沉淀技术,检测 ARE 与 AR 的相互作用方式。

### 1.2.4 实验分组

(1) T24 细胞系对照慢病毒稳转株;(2) shRNA p53 慢病毒稳转株;(3) shRNA RB1 慢病毒稳转株。

### 1.3 观察指标

#### 1.3.1 shRNA p53、shRNA RB1、对照慢病毒稳转株;

#### 1.3.2 CCK8 检测数据

5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 培养相应时间;酶标仪测 OD450;

#### 1.3.3 流式凋亡检测数据

收集细胞,1000rpm\*5min,尽去上清;PBS 洗一次,1000rpm\*5min,尽去上清;加入 100  $\mu\text{l}$  Annex Binding Buffer 重悬细胞;加入 5  $\mu\text{l}$  Annex FITC,加入 5  $\mu\text{l}$  PI,室温避光 15min;上机前补加 150  $\mu\text{l}$  Annex Binding Buffer;上机检测;

#### 1.3.4 划痕实验迁移数据;

#### 1.3.5 Transwell 侵袭检测实验;

#### 1.3.6 Western Blot 检测灰度值;

#### 1.3.7 免疫组化结果;

#### 1.3.8 T24 稳转株构建。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS28.0,采用成组 t、 $\chi^2$  检验计量、计数资料。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

2.1 shRNA p53、shRNA RB1、对照慢病毒稳转株分析见图 1、图 2、图 3。





图 1 shRNA p53 慢病毒稳转株

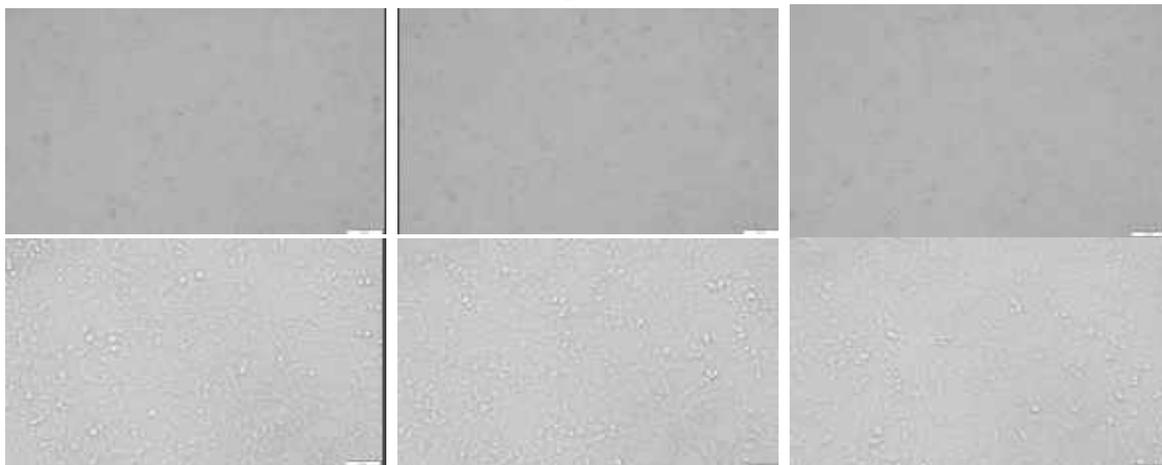


图 2 shRNA RB1 慢病毒稳转株

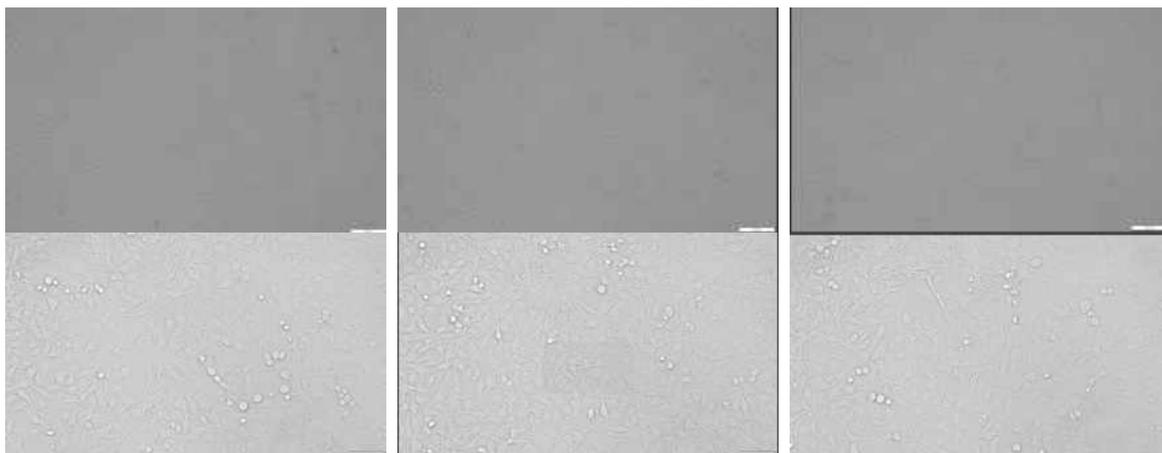


图 3 对照慢病毒稳转株

2.2 CCK8 检测数据分析 见表 1。

表 1 CCK8 检测数据分析

组别	CCK8										
空白	0.2529	0.2496	0.2492								
48h	OD450			OD450-空白			平均	cellviability			平均
shRNARB1	1.8613	1.7893	1.7739	1.6107	1.5387	1.5233	1.5576	123.53%	118.00%	116.82%	119.45%
shRNAp53	1.8174	2.0467	1.9288	1.5668	1.7961	1.6782	1.6804	120.16%	137.74%	128.70%	128.87%
T24	1.6296	1.4234	1.6106	1.3790	1.1728	1.3600	1.3040	105.76%	89.94%	104.30%	100.00%

2.3 流式凋亡检测数据分析 见表 2。

表 2 流式凋亡检测数据分析

实验分组	凋亡百分比 (%)			
	UR (晚期)	LR (早期)	Total	AVERAGE
shRNA RB1	3.47	1.26	4.73	6.143
	5.25	1.58	6.83	
	4.70	2.17	6.87	

	3.98	1.36	5.34	
shRNA p53	3.04	1.26	4.30	4.797
	3.55	1.20	4.75	
	6.62	2.02	8.64	
T24	7.39	1.68	9.07	9.110
	7.37	2.25	9.62	

2.4 划痕实验迁移数据分析 见表3。

表3 划痕实验迁移数据分析【距离 (um)】

	0h	平均	24h	48h	72h
shRNA RB1	337.647	350.588	347.059	345.098	307.059
shRNA p53	334.118	325.882	340	333.333	284.706
T24	420	414.118	407.059	413.726	378.824

表3 (续) 划痕实验迁移数据分析【相对迁移距离 (%)】

	0h	24h	48h	72h
shRNA RB1	2.16%	-1.59%	-0.57%	11.02%
shRNA p53	-0.24%	2.24%	-2.00%	14.59%
T24	-1.52%	-0.09%	1.61%	8.44%

2.5 Transwell 侵袭检测实验分析 见表4。

表4 Transwell 侵袭检测实验分析

	Invasive cell number	平均	% of control
shRNA RB1	456	419	467
shRNA p53	564	593	600
T24	279	335	238

2.6 Western Blot 检测灰度值分析 见图4。

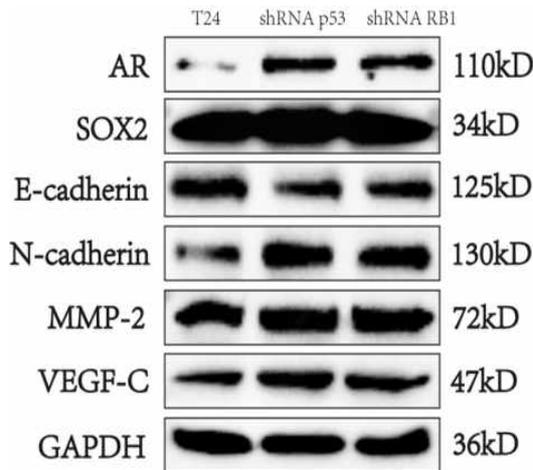


图4 Western Blot 检测灰度值

2.7 免疫组化结果分析

shRNA p53组和shRNA RB1组的Cytokeratin1表达量高于对照组 (P<0.05)。见图5。



图5 免疫组化结果分析

2.8 T24 稳转株构建分析

RB1 shRNA 沉默效果都很好;P53 shRNA715效果最好。见图6。

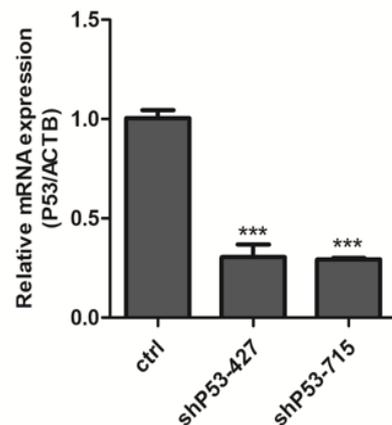
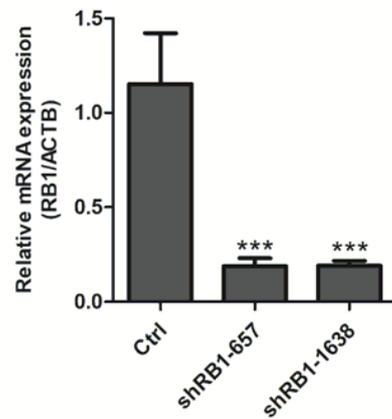


图6 T24 稳转株构建

### 3 讨论

目前膀胱尿路上皮癌的常规治疗大多集中在手术与化疗,虽然早期治疗预后较好,但晚期膀胱尿路上皮癌的治疗数十年来都毫无进展。膀胱癌中 25% 的患者具有非乳突样肿瘤性质,而其中约有 50% 的患者在行根治性膀胱切除+盆腔淋巴结清扫术后仍然出现了远处转移,从而失去了手术机会,因此主要以全身系统性治疗为主,同时联合局部治疗使患者最大获益<sup>[3]</sup>。尽管目前有多种组合化疗方案,但是对于整体的生存状况并没有明显提高,中位生存期只有 12-15 个月,甚至会造成肾衰竭等严重后果<sup>[4]</sup>。因此,目前针对具有肌肉浸润以及转移特征的膀胱肿瘤,依然缺乏有效的治疗手段。

研究表明,在非乳突样肿瘤中,p53 及 RB1 的突变频率相比于乳突样肿瘤高得多<sup>[5]</sup>。研究人员已在 ER 阳性原发性和转移性乳腺癌、以及基因工程改造后的肺小细胞癌中的观察到分子差异<sup>[6]</sup>,发现了 p53/RB1 突变促进肿瘤转移扩散的新证据。这个过程可能与 Ezh2、Sox2 以及 PTEN 的过表达相关。此外,p53/RB1 的基因突变可能增强 E2F 的转录活性,导致细胞周期失控,从而促进肿瘤的进展。因此,p53 以及 RB1 在晚期膀胱癌进展中具有重要作用。

吸烟以及职业暴露被认为是导致膀胱癌的主要原因。但是在临床实际中,在同样的吸烟情况下,男性的膀胱癌发病率是女性的 3-4 倍。这表明在膀胱癌的发病过程中,男性和女性存在性二态性的潜在机制。在一项小鼠实验研究中,通过构建雄激素受体(AR)缺陷小鼠,研究人员证实了雄激素受体对于膀胱癌成瘤的重要性,并深入研究 P53-PCNA

信号轴的肿瘤抑制作用<sup>[7]</sup>。这解释了男性为何具有更高的膀胱癌发病率。有研究表明,蛋白酶体 MG132 能够增加 HepG2 和 LNCaP 细胞的内源性 AR 蛋白水平,且泛素蛋白酶体降解的标志性基序 PEST 已在 AR 的铰链区被鉴定<sup>[8]</sup>。而最近已经鉴定出了 Mdm2 是 AR 泛素蛋白酶体降解的 E3 连接酶,Ser213 和 Ser791 位点的磷酸化对于 Mdm2 介导的 AR 泛素化降解具有重要作用。

AR 表达的异常往往与肿瘤的预后相关。研究表明,雄激素能通过 Snail 激活诱导前列腺肿瘤上皮细胞的上皮-间充质转化(EMT)模式,并导致前列腺癌细胞迁移和侵袭潜能的显著变化。AR 可以与转录因子的启动子区域结合,增强其转录活性,导致细胞骨架重构。细胞发生 EMT 后会促进肿瘤转移侵袭。最新研究表明,AR 可以通过与调控因子启动子多位点的结合方式,对胰腺癌和膀胱癌的血管新生产生不同的调控机制。而在膀胱癌中,AR 也可能存在类似的调节机制,在 p53/RB1 缺陷条件下,因降解途径被阻断而富集的 AR 与 E-cadherin 抑制性位点或者与转录因子结合入核后,随后与靶基因的启动子区域雄激素响应元件(ARE)多位点结合,从而增强 EMT 的进程。故此做出以下假设:p53/RB1 缺陷通过抑制 AR 泛素化降解,增强其与核内 AR 响应元件的结合,诱导了膀胱癌细胞 EMT 的发生。本研究结果表明,shRNA p53 组和 shRNA RB1 组的 Cytokeratin1 表达量高于对照组。RB1 shRNA 沉默效果都很好;P53 shRNA715 效果最好。

综上所述,p53/RB1 基因在膀胱癌的转移过程中起到至关重要的作用,p53/RB1 缺陷是通过抑制 AR 蛋白泛素化降解进而增强其与核内 AR 响应元件的结合,诱导了膀胱癌上皮-间充质转化的发生最终促进膀胱癌侵袭转移。

### 参考文献:

- [1]刘沅浩,曾佑苗,骆永博,等.核苷酸切除修复蛋白介导磷脂酰肌醇激酶磷酸化抑制膀胱癌侵袭转移的机制[J].中华实验外科杂志,2025,42(4):670-673.
  - [2]廖林辉,陈华平,范国斌,等.lncRNA NNT-AS1 对膀胱癌细胞增殖、转移及肿瘤干细胞干性的影响与机制研究[J].局解手术学杂志,2023,32(2):106-114.
  - [3]杨阳,魏晓松,易成智,等.蛋白激酶 C 受体 1 对膀胱癌细胞增殖和转移的影响及其机制[J].中华实验外科杂志,2023,40(5):888-891.
  - [4]符仕宝,陈宁,何书明,等.膀胱癌细胞外泌体诱导中性粒细胞外诱捕网形成对肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭的研究[J].中国免疫学杂志,2025,41(2):351-356.
  - [5]刘志聪,刘戴胤,龙钧天,等.外泌体 lncRNA CIAT1 促进膀胱癌集体侵袭的机制[J].实用医学杂志,2025,41(9):1299-1308.
  - [6]曲强,孙英杰,吴腾飞,等.五味子乙素抑制膀胱癌细胞增殖和侵袭转移及对 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的调节作用[J].解剖科学进展,2023,29(3):257-259,263.
  - [7]王昊雨,高文喜,廖正明,等.单宁酸抑制膀胱癌细胞增殖及迁移侵袭作用的实验研究[J].中国中西医结合外科杂志,2024,30(6):787-791.
  - [8]徐涛,柳琦,刘辉勇,等.FADS1 对膀胱癌细胞增殖的影响及其机制研究[J].现代泌尿生殖肿瘤杂志,2024,16(6):359-364. 2023 年金华市科技计划重点项目(项目名称:p53-/RB1-诱导 AR 与启动子相关应答元件的多位点结合促进膀胱癌细胞转移侵袭的机制研究 编号 2023-3-032)。
- 作者简介:陈建(1977-)男,汉族,籍贯:湖南株洲,本科学历,研究方向:泌尿外科肿瘤临床及研究。