网络出版时间:2018 - 11 - 5 15:37 网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20181105.0926.006.html

沉默精子相关抗原 9 对膀胱癌细胞的影响

邢家伟[1],许长宝[1],赵兴华[1],赵永立[1],吕 远[1],王红丹[2]

摘要 **目的** 探究精子相关抗原 9(SPAG9)在膀胱癌细胞中的表达量以及与细胞增殖、凋亡、侵袭、迁移的关系和作用机制。**方法** 以人膀胱上皮细胞 SV-HUC-1 为对照,实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)和 Western blot 法检测 SPAG9 在膀胱癌 T24、J28、RT4 细胞系的表达量;转染 siRNA 沉默膀胱癌 T24 细胞中 SPAG9 基因的表达,细胞分为对照组、转染无义组、siRNA-SPAG9 组,MTT 实验检测干扰 SPAG9 基因表达对细胞增殖的影响,流式细胞术检测细胞的凋亡率,Transwell 法检测细胞的迁移、侵袭能力;Western blot 检测增殖细胞核抗原(PCNA)、细胞核相关抗原 Ki-67(Ki-67)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的蛋白水平。**结果** 与正常上皮细胞 SV-HUC-1 比较,SPAG9 在膀胱癌 T24、J28、RT4 细胞中的表达量显著上调,其中以 T24 细胞最为明显;与对照组比较,siRNA-SPAG9 组细胞中 SPAG9 的表达量显著降低($P<0.05$)。沉默 SPAG9 表达显著抑制细胞的增殖($P<0.05$),促进其凋亡($P<0.05$),抑制细胞的侵袭、迁移能力($P<0.05$),显著下调 PCNA、Ki-67、Bcl-2、MMP-2、MMP-9 的蛋白水平($P<0.05$),显著上调 Bax 蛋白表达量($P<0.05$)。**结论** SPAG9 在膀胱癌细胞中高表达;沉默 SPAG9 可能通过调控细胞恶性表型相关蛋白的表达,参与膀胱癌细胞生物学特性的调节过程,为膀胱癌的治疗提供新的靶点。

关键词 精子相关抗原 9;PCNA;MMP-2;膀胱癌
中图分类号 R 737
文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2018)12 - 1846 - 06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2018.12.006

膀胱癌是一种恶性肿瘤,部分患者可通过手术治疗的方法得以控制,但目前对于膀胱癌患者预后复发率高、转移率高的问题依然缺少高效的控制方法[1]。研究[2]表明,精子相关抗原 9(sperm associated antigen 9,SPAG9)在正常机体曲细精管的精子中特异性表达。研究[3-5]显示,在乳腺癌、宫颈癌、肺癌等组织或血清中表达量均异常,表明 SPAG9 参与肿瘤的发生、发展。但 SPAG9 在膀胱癌细胞中的表达量以及具体作用机制的相关研究较为少见。该

2018 - 07 - 26 接收
基金项目:国家自然科学基金(编号:81501336)
作者单位:[1] 郑州大学第二附属医院泌尿外科,郑州 450000
[2] 郑州大学人民医院,郑州 450000
作者简介:邢家伟,男,住院医师;
许长宝,男,博士,主任医师,责任作者,E-mail:xuesn00@163.com

Effect of L-02 cells' supernatant liquid on α-SMA expressions in HSC cells stimulated by TGF-β1

Zhong Yujuan, Wu Dan, Huang Guangling, et al
(*Experimental Teaching Center, School of Basic Medicine, Guilin Medicail University, Guilin* 541000)

Abstract ***Objective*** To observe the effect of human normal liver cell (LO2) cells' supernatant liquid on the mRNA and protin expressions of α-smooth muscle actin(α-SMA) in human hepatic stellate cell(HSC-LX-2) cells stimulated by transforming growth factor-β1(TGF-β1) *in vitro*. ***Methods*** HSC-LX2 cells and L-02 cells were cultured *in vitro* and divided into the blank group, model group, original L-02 cells' supernatant group, 1/2 supernatant group and 1/4 supernatant group. After being incubated with each concentration of the L-02 cells' supernatant liquid for 72 h, the mRNA expression of α-SMA was assayed by RT-PCR and the protein expression of α-SMA was assayed by Western blot. ***Results*** There was a significant inhibitory effect on the expression of α-SMA mRNA and α-SMA protein on the original L-02 cells' supernatant group and the 1/2 supernatant group($P<0.01$, $P<0.05$). ***Conclusion*** LO2 cells' supernatant liquid can inhibit the activation and proliferation of HSC-LX-2 cells.

Key words human hepatic stellate cell; α-smooth muscle actin; transforming growth factor-β1

研究通过检测 SPAG9 在膀胱癌细胞中的表达状况，分析沉默 SPAG9 在膀胱癌的发生发展中的作用，为其膀胱癌的诊断和临床治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人膀胱癌细胞系 T24、J28、RT4 以及人膀胱上皮细胞 SV-HUC-1 均购自美国模式菌种收集中心(ATCC)。

1.1.2 实验主要试剂及仪器 McCoy's 5A 培养基、DMEM 培养基、F12K 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司；TRIzol、反转录试剂盒购自大连 TaKaRa 公司；β 肌动蛋白(β-actin)抗体、SPAG9 抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司；膜联蛋白 V-FITC(Annexin V-FITC)凋亡检测试剂盒、Matrigel 胶购自美国 BD 公司；噻唑蓝(MTT)试剂盒、二甲基亚砜(dimethyl sulphoxide，DMSO)、Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司；Transwell 小室购自美国 Millipore 公司；B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/lewkmia-2，Bcl-2)抗体、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein，Bax)抗体购自美国 Sigma 公司；增殖细胞核抗原(poliferating cell nucler antigen，PCNA)抗体、细胞核相关抗原 Ki-67(nuclear associated antigen Ki67，Ki-67)抗体购自 Cellular Signaling Technology 公司；基质金属蛋白酶-2(matrixmetalloprotease 2，MMP-2)抗体、基质金属蛋白酶-9(matrixmetalloprotease 9，MMP-9)抗体购自武汉博士德公司；荧光定量 PCR 仪(LightCycler® 480)购自美国 Roche 公司；凝胶成像系统(Syngene G:BOX)购自英国 SynGene 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养 膀胱癌 T24、J28 细胞置于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中，RT4 细胞置于含 10% 胎牛血清的 McCoy's 5A 培养基中，膀胱上皮细胞 SV-HUC-1 置于 F12K 培养基中，均放入 37 ℃、5% CO_2 的细胞培养箱中，收集对数期细胞进行后续实验。

1.2.2 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测细胞中 SPAG9 mRNA 的表达量 SPAG9 引物在 Primer 5.0 软件中进行设计并由上海生工合成，见表 1。每孔细胞中加入 1 ml TRIzol 并置于冰上 5 min，提取细胞中总 RNA。吸取 5 μg 细胞总 RNA，65 ℃变性 10 min，冰浴 2 min，根据反转录试剂盒说明书合成 cDNA，保存于 -20 ℃。根据 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒所示，以 cDNA 为模板，以 β-actin 为参照反应条件为 94 ℃、4 min，94 ℃、30 s，56 ℃、30 s，72 ℃、30 s，40 个循环。实验重复 3 次，$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 SPAG9 的相对表达量。

表 1 引物序列

基因	引物序列(5′-3′)
β-actin	F: CCTCGCCTTTGCCGATC
	R: GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC
SPAG9	F: ATGTCCATAATTATATGGAACATTTA
	R: TAAGTTGATGACCCATTATTAACCA

1.2.3 Western blot 法检测 SPAG9 蛋白的表达水平 弃去培养基，加入蛋白裂解液，冰浴 5 min，离心，收集上清液，吸取 2 μl 进行浓度测定，其余蛋白样品与适量 5 × 上样缓冲液混合均匀，煮沸 5 min；配置适宜浓度的分离胶，吸取 40 μg 蛋白样品加入上样孔中，恒压为 80 V，电泳至蛋白质进入分离胶，调整为恒压 120 V，电泳至蛋白迁移至分离胶底部；恒定电流 300 mA 转膜 150 min；将 PVDF 膜浸泡与 5% 的奶粉溶液中，室温孵育 2 h；加入一抗工作液，4 ℃孵育过夜，TBST 漂洗 3 次，每次 10 min，加入二抗，37 ℃孵育 2 h，TBST 漂洗 3 次，每次 10 min，避光，加入 ECL 发光液，凝胶成像仪中检测，分析蛋白质灰度值。

1.2.4 细胞的转染 以膀胱癌 T24 细胞作为后续实验研究对象，稳定传代后进行转染。将膀胱癌 T24 细胞分为 3 组：对照组、转染无义组、siRNA-SPAG9 组。转染前 24 h，每孔接种 3×10^5 个细胞，转染前 6 h 更换为无血清培养基。分别将 siRNA 和 Lipofectamine 2000 溶于无血清培养基中，然后混合均匀，室温孵育 10 min，形成复合物；每孔细胞中加入上述复合物，37 ℃培养 6 h，更换为完全培养基继续培养。qRT-PCR 和 Western blot 检测转染后细胞中 SPAG9 的表达量。

1.2.5 MTT 检测细胞的增殖 以每孔 5×10^3 个接种，转染，培养箱中培养 48 h 后，每孔加入 20 μl MTT，37 ℃培养 4 h，弃去上清液，每孔加入 100 μl DMSO，避光振荡 20 min，检测细胞在 490 nm 的吸光值($A_{490\ nm}$)。

1.2.6 流式细胞术检测凋亡率 取转染后 48 h 细胞，无菌磷酸盐缓冲液清洗，调整细胞浓度为 1×10^5/ml，加入 100 μl 1 × 缓冲液，每孔加入 5 μl Annexin V-FITC 混匀，室温孵育 15 min，每孔加入 5 μl 碘化丙啶(propidium iodide，PI)，流式细胞仪检测

凋亡的细胞，计算细胞总的凋亡率。

1.2.7 细胞的迁移、侵袭实验 收集各组细胞，计数，调整为 1×10^5 个/ml；将 Transwell 小室置于 24 孔细胞培养板中，吸取 200 μl 细胞悬液加入上层上室内，下室加入 600 μl 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基，37 ℃培养 24 h；弃去上层培养基，擦去上层细胞、Matrigel 胶，4% 多聚甲醛固定 15 min，0.1% 结晶紫染色 20 min，显微镜下随机取 5 个区域拍照、计数，每孔设置 5 个复孔，实验重复 3 次，取平均值。在侵袭实验过程中，按 1∶8 的比例将 Matrigel 胶与无血清 DMEM 培养基混匀，取 80 μl 均匀覆盖在小室膜中，其余实验步骤同迁移实验。

1.2.8 Western blot 检测细胞恶性表型相关蛋白的水平 根据 1.2.3 所示，检测各组细胞中 Bcl-2、Bax、PCAN、Ki-67、MMP-2、MMP-9 蛋白的水平。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 22.0 软件进行统计处理，结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组数据间的比较采用单因素方差分析，组间两两比较使用 SNK-q 检验，以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SPAG9 在膀胱癌以及正常上皮细胞中的表达量 SV-HUC-1 细胞和膀胱癌 T24 细胞、J28 细胞、RT4 细胞的 SPAG9 mRNA 和蛋白的表达量整体比较差异具有统计学意义（$F=63.639$，$P=0.000$；$F=73.581$，$P=0.000$）。SPAG9 mRNA 的表达量分别为（1.000 ± 0.023）、（6.589 ± 0.741）、（4.865 ± 0.520）、（4.573 ± 0.467），蛋白的表达量分别为（0.158 ± 0.012）、（0.769 ± 0.068）、（0.524 ± 0.053）、（0.489 ± 0.052）；结果如图 1 所示，qRT-PCR 实验结果表明，与膀胱上皮 SV-HUC-1 细胞比较，SPAG9 mRNA 在膀胱癌 T24、J28、RT4 细胞中的相对表达量显著增加（$P<0.05$）；与 T24 细胞比较，SPAG9 mRNA 在 J28、RT4 细胞中的表达量显著降低（$P<0.05$）。Western blot 实验结果亦显示，SPAG9 蛋白在膀胱癌 T24、J28、RT4 细胞中的相对表达量较 SV-HUC-1 细胞显著增加（$P<0.05$）；与 T24 细胞比较，SPAG9 蛋白在 J28、RT4 细胞中的表达量显著降低（$P<0.05$）。

2.2 转染后 T24 细胞中 SPAG9 的表达量 结果如图 2 所示，对照组、转染无义组、siRNA-SPAG9 组细胞中 SPAG9 mRNA、蛋白质水平整体比较差异具有统计学意义（$F=271.950$，$P=0.000$；$F=92.969$，$P=0.000$）。对照组、转染无义组、siRNA-SPAG9 组细胞中 SPAG9 mRNA 的表达量分别为（1.003 ± 0.024）、（1.000 ± 0.016）、（0.427 ± 0.053），SPAG9 蛋白水平分别为（0.813 ± 0.074）、（0.798 ± 0.062）、（0.254 ± 0.023）。转染后，T24 细胞中 SPAG9 mRNA 和蛋白的表达量较对照组显著降低，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。

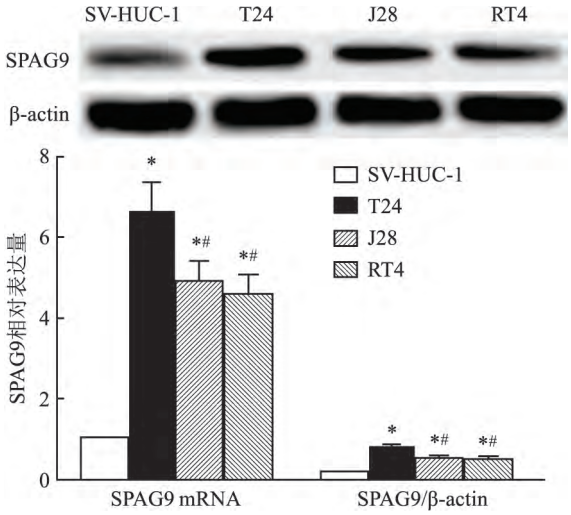

图 1 SPAG9 在膀胱癌以及正常上皮细胞中的表达量

与 SV-HUC-1 细胞比较：* $P<0.05$；与 T24 细胞比较：# $P<0.05$

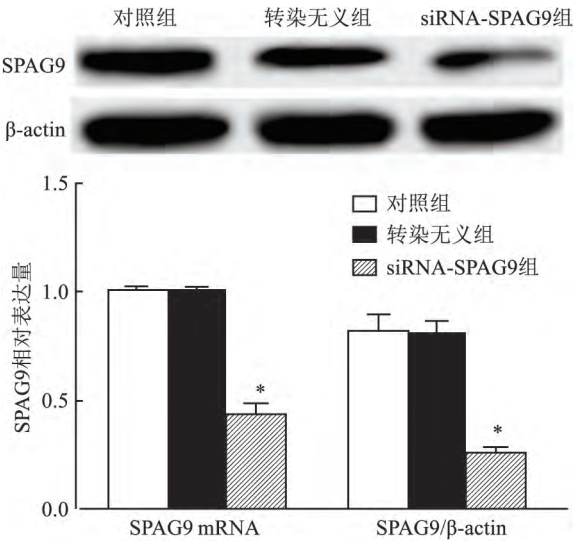

图 2 转染后 T24 细胞中 SPAG9 的表达量

与对照组比较：* $P<0.05$

2.3 沉默 SPAG9 对膀胱癌细胞增殖的影响 结果如图 3 所示，对照组、转染无义组、siRNA-SPAG9 组细胞在 490 nm 波长下的吸光值分别为（1.236 ± 0.214）、（1.258 ± 0.223）、（0.567 ± 0.053）。3 组细胞在 490 nm 波长下的吸光值整体比较差异具有统

计学意义($F=14.118$,$P=0.005$);转染后,T24 细胞的增殖较对照组显著降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 沉默 SPAG9 对膀胱癌细胞凋亡的影响 结果如图 4 所示,对照组、转染无义组、siRNA-SPAG9 组细胞的凋亡率分别为(6.521±0.784)%、(5.872±0.736)%、(17.489±2.553)%。3 组细胞的凋亡率整体比较差异具有统计学意义($F=49.974$,$P=0.000$);转染 siRNA-SPAG9 后,T24 细胞的凋亡率较对照组显著增加,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

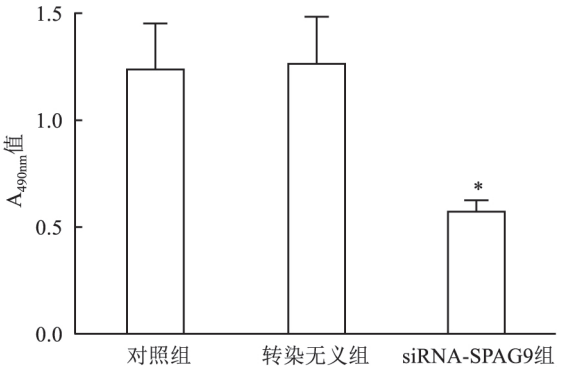

图 3 沉默 SPAG9 对膀胱癌细胞增殖的影响

与对照组比较:* $P<0.05$

2.5 沉默 SPAG9 对膀胱癌细胞侵袭、迁移的影响 结果如图 5 所示,对照组、转染无义组、siRNA-SPAG9 组迁移细胞数分别为(369.587±23.786)个、(374.586±25.598)个、(153.226±12.147)个;侵袭细胞数分别为(169.557±18.456)个、(158.236±16.745)个、(82.451±9.227)个。3 组的迁移细胞和侵袭细胞数分别整体比较差异具有统计学意义($F=105.040$,$P=0.000$;$F=28.589$,$P=0.001$);转染 siRNA-SPAG9 后,T24 细胞的侵袭、迁移能力较对照组显著降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.6 沉默 SPAG9 对膀胱癌细胞恶性表型相关蛋白水平的影响 结果如图 6、表 2 所示,以 β-actin 为参照,对照组、转染无义组、siRNA-SPAG9 组细胞恶性表型相关蛋白具有显著变化。与对照组比较,siRNA-SPAG9 组细胞中 PCAN、Ki67、Bcl-2 蛋白的表达量显著降低,差异具有统计学意义($P<0.05$),Bax 蛋白显著上调($P<0.05$),MMP-2、MMP-9 蛋白显著下调($P<0.05$)。

3 讨论

据统计,在我国,膀胱癌的发病率居泌尿系统肿瘤的首位,其中男性的发病率高于女性[6]。膀胱癌术后易发生转移,5 年存活率较低,预后较差,治疗费用较高,给患者以及社会带来了沉重的经济负担。目前,寻找膀胱癌治疗的分子靶向标志物,使其服务于膀胱癌的诊断以及临床治疗具有重要的意义。SPAG9 是目前新发现的肿瘤睾丸抗原之一,调控肿瘤癌基因的水平以及细胞的扩增等。早期人们认为 SPAG9 只特异性表达于睾丸组织中,不表达于正常组织,调控精卵结合的过程。但近年来的研究[7-9]显示,SPAG9 在肿瘤组织或者血清中发挥较强的免疫原性作用。SPAG9 通过与多种细胞因子以及蛋白结合,从而激活细胞中的信号通路,调控人体多种生理过程,与机体某些疾病和肿瘤的演进密切相关,因此 SPAG9 可能是肿瘤生物治疗的潜在靶点[10-13]。以人膀胱上皮细胞 SV-HUC-1 和膀胱癌 T24、J28、RT4 细胞系作为体外实验的研究对象,qRT-PCR 和 Western blot 检测结果显示,SPAG9 在膀胱癌 T24、J28、RT4 细胞系中的表达量显著高于膀胱上皮细胞 SV-HUC-1,提示 SPAG9 在膀胱癌的差异表达与膀胱癌细胞的恶化过程密切相关。

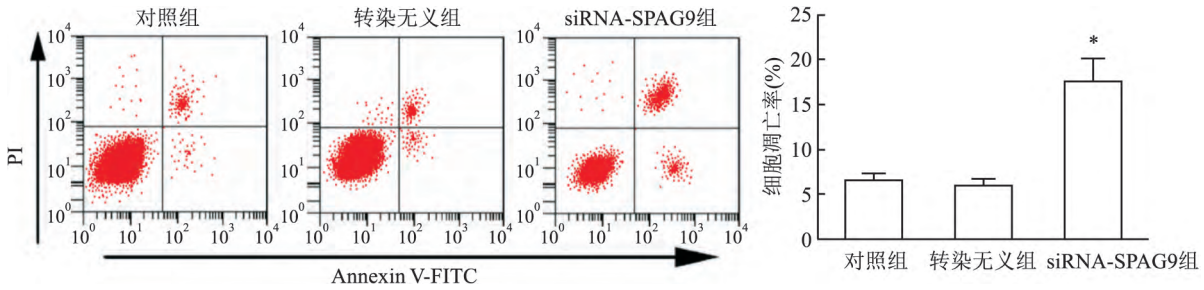

图 4 沉默 SPAG9 对膀胱癌细胞凋亡的影响

与对照组比较:* $P<0.05$

表 2 沉默 SPAG9 对膀胱癌细胞恶性表型相关蛋白水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

蛋白	对照组	转染无义组	siRNA-SPAG9 组	*F* 值	*P* 值
PCAN	0.541 ± 0.047	0.568 ± 0.050	0.236 ± 0.018*	60.792	0.010
Ki-67	0.478 ± 0.039	0.486 ± 0.043	0.216 ± 0.025*	53.170	0.012
Bcl-2	0.685 ± 0.063	0.679 ± 0.058	0.241 ± 0.032*	69.825	0.015
Bax	0.257 ± 0.021	0.263 ± 0.027	0.692 ± 0.057*	126.715	0.008
MMP-2	0.258 ± 0.026	0.274 ± 0.023	0.124 ± 0.017*	40.876	0.018
MMP-9	0.341 ± 0.03	0.336 ± 0.035	0.154 ± 0.012*	42.698	0.009

与对照组比较: * $P < 0.05$

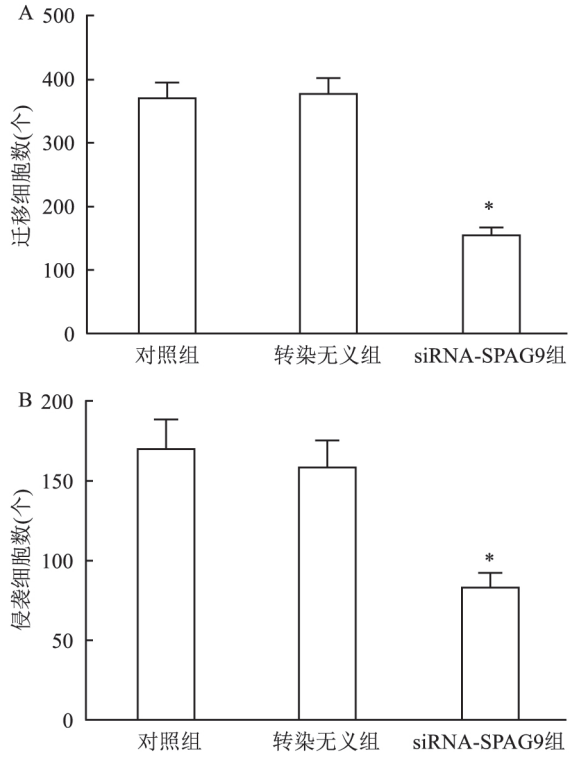

图 5 沉默 SPAG9 对膀胱癌细胞侵袭、迁移的影响

A: 迁移细胞数; B: 侵袭细胞数; 与对照组比较: * $P < 0.05$

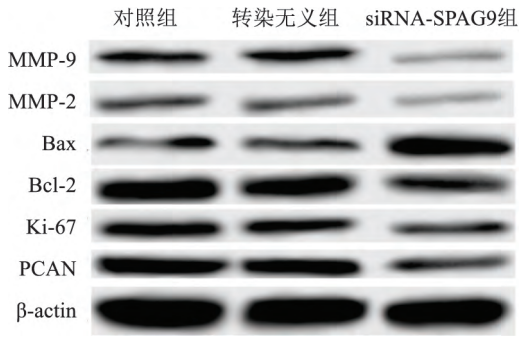

图 6 沉默 SPAG9 对膀胱癌细胞恶性表型相关蛋白水平的影响

大量研究显示,探究肿瘤转移、浸润的机制,寻找合适的分子靶点,对提高肿瘤患者的 5 年生存率以及改善预后不良、降低治疗费用具有重要的意义。肿瘤细胞的过度增殖是恶性肿瘤发生、发展的重要生物学特征。肿瘤细胞的增殖涉及多种信号因子或者相关信号通路的激活,促进细胞的增殖。SPAG9 在多种肿瘤的恶性发展中发挥重要作用。应用 siRNA 技术,沉默膀胱癌 T24 细胞中 SPAG9 的表达后,T24 细胞的增殖受到明显抑制,凋亡率显著增加,细胞的侵袭、迁移能力显著降低,表明 SPAG9 在膀胱癌细胞的恶性生物学特性中发挥重要作用。

大量研究[14]表明,SPAG9 与多种肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭、迁移密切相关。SPAG9 在肺癌组织以及血清中的表达量异常,可作为肺癌诊断的分子标志物。SPAG9 可通过降低 MMP-9、激活相关信号通路,从而调节肺癌的转移能力; 在前列腺癌中,SPAG9 可通过调节细胞周期相关蛋白 Cyclin D1、Cyclin E 水平,从而对肿瘤细胞产生明显的抗肿瘤作用[15]。为了研究 SPAG9 对膀胱癌细胞生物学特性的作用机制,对细胞增殖、细胞凋亡以及侵袭迁移相关蛋白 PCAN、Ki-67、Bcl-2、Bax、MMP-2、MMP-9 等进行了检测,分析沉默 SPAG9 后,上述蛋白水平的变化。结果显示,下调膀胱癌细胞中 SPAG9 基因的表达量,细胞增殖相关蛋白 PCAN、Ki-67 的表达量降低; 与对照组比较,细胞抗凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白的表达量显著降低,促凋亡蛋白 Bax 的水平明显增加; 细胞侵袭、迁移相关蛋白 MMP-2、MMP-9 的表达量较对照组显著下调,表明 SPAG9 可能通过调控细胞恶性表型相关蛋白,从而激活更多的信号转导通路来发挥其抗肿瘤的作用。

综上所述,研究显示,SPAG9 在膀胱癌细胞中的表达量上调,表明 SPAG9 与膀胱癌的发生、发展有关; 沉默 SPAG9 可通过调节细胞恶性表型相关蛋白的表达量,抑制膀胱癌细胞的增殖,促进其凋亡,降低细胞的侵袭、迁移能力,可作为膀胱癌诊断和预后评估的生物学标志以及分子靶向治疗的潜在靶点。

参考文献

[1] Lerner S P, McConkey D J, Hoadley K A, et al. Bladder cancer molecular taxonomy: summary from a consensus meeting [J]. Bladder Cancer, 2016, 2(1): 37-47.

[2] 叶倩, 饶金, 李辉斌, 等. 宫颈上皮内瘤变中精子相关抗原9的表达及意义 [J]. 中国计划生育学杂志, 2013, 21(12): 803-6.

[3] 潘皆慰. SPAG9在宫颈腺癌中的表达及其临床价值研究 [J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(10): 2042-3.

[4] 徐秀平, 王亚男, 董学君. 精子相关抗原9(SPAG9)在乳腺癌中的表达及其临床意义 [J]. 医学研究杂志, 2016, 45(11): 78-81.

[5] Ren B, Luo S, Xu F, et al. The expression of DAMP proteins HSP70 and cancer-testis antigen SPAG9 in peripheral blood of patients with HCC and lung cancer [J]. Cell Stress Chaperones, 2017, 22(2): 237-44.

[6] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-32.

[7] Miao Z F, Wang Z N, Zhao T T, et al. Overexpression of SPAG9 in human gastric cancer is correlated with poor prognosis [J]. Virchows Arch, 2015, 467(5): 525-33.

[8] Ren B, Zou G, Xu F, et al. Serum levels of anti-sperm-associated antigen 9 antibody are elevated in patients with hepatocellular carcinoma [J]. Oncology Lett, 2017, 14(6): 7608-14.

[9] Wang X, Jiang F, Song H, et al. MicroRNA-200a-3p suppresses tumor proliferation and induces apoptosis by targeting SPAG9 in renal cell carcinoma [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 470(3): 620-6.

[10] Tavakoli Koudehi A, Mahjoubi B, Mirzaei R, et al. AKAP4, SPAG9 and NY-ESO-1 in Iranian colorectal cancer patients as probable diagnostic and prognostic biomarkers [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2018, 19(2): 463-9.

[11] Sun H F, Wang W D, Feng L. Effect of SPAG9 on migration, invasion and prognosis of prostate cancer [J]. Int J Clin Exp Patho, 2017, 10(9): 9468-74.

[12] Yang X, Zhou W, Liu S. SPAG9 controls the cell motility, invasion and angiogenesis of human osteosarcoma cells [J]. Exp Ther Med, 2016, 11(2): 637-44.

[13] Li C, Bai Y, Yan L, et al. SPAG9 may be a potential prognostic marker of endometrial hyperplasia and grade 1 endometrioid adenocarcinoma treated with progestin [J]. Gynecol Obstet Invest, 2016, 81(3): 267-74.

[14] Ren B, Wei X, Zou G, et al. Cancer testis antigen SPAG9 is a promising marker for the diagnosis and treatment of lung cancer [J]. Oncol Rep, 2016, 35(5): 2599-605.

[15] Li H, Peng Y, Niu H, et al. SPAG9 is overexpressed in human prostate cancer and promotes cancer cell proliferation [J]. Tumour Biol, 2014, 35(7): 6949-54.

Effect of silencing sperm associated antigen 9 on bladder cancer cells

Xing Jiawei, Xu Changbao, Zhao Xinghua, et al

(*Dept of Urology, The Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou* 450000)

Abstract ***Objective*** To investigate the expression of sperm associated antigen 9 (SPAG9) in bladder cancer cells and its relationship between cell proliferation, apoptosis, invasion, and migration, as well as its mechanism. ***Methods*** Using human bladder epithelial cells SV-HUC-1 as control, the expression of SPAG9 in bladder cancer T24, J28, and RT4 cell lines was detected by qRT-PCR and Western blot. siRNA was transfected into T24 cells to silence the expression of SPAG9 gene. The cells were divided into control group, non-transfected group and siRNA-SPAG9 group. The proliferation of cells was measured by MTT assay and the apoptotic rate was analyzed by flow cytometry. The migration and invasion of cell were detected by Transwell assay. The protein levels of PCNA, Ki-67, Bcl-2, Bax, MMP-2, MMP-9 were examined by Western blot. ***Results*** Compared with SV-HUC-1, the expression of SPAG9 in bladder cancer T24, J28, and RT4 cells were significantly up-regulated, with T24 cells being the most obvious. Compared with the control group, the expression level of SPAG9 in siRNA-SPAG9 group cells was significantly decreased ($P<0.05$). Silencing of SPAG9 had the significantly effects on inhibiting cell proliferation ($P<0.05$), promoting apoptosis ($P<0.05$), inhibiting cell invasion and migration ($P<0.05$), significantly down-regulated PCNA, Ki-67, Bcl-2, MMP-2, and MMP-9 protein expression ($P<0.05$), and increased the expression of Bax protein ($P<0.05$). ***Conclusion*** SPAG9 is up-regulated in bladder cancer cells; and silence of SPAG9 may be involved in the regulation of the biological characteristics of bladder cancer cells by regulating the expression of malignant phenotype-associated proteins, providing a new target for the treatment of bladder cancer.

Key words SPAG9; PCNA; MMP-2; bladder cancer