

膀胱癌中唾液酸酶 Neu1 的异常表达 对 Toll 样受体的影响 *

翟延红¹⁾ 刘昌梅¹⁾ 郭 辉²⁾ 杨刚龙¹⁾ 关 锋^{1)**}

(¹⁾ 江南大学糖化学与生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122; (²⁾ 江南大学医学院, 无锡 214122)

摘要 哺乳动物细胞内的某些蛋白质或脂类可以被糖基化修饰, 而糖链末端往往存在唾液酸化的现象, 催化添加唾液酸的酶为糖基转移酶(sialyltransferase, ST), 而去除唾液酸的为唾液酸酶(sialidase, SA 或称为 neuraminidase, NEU). 本实验检测了人膀胱正常上皮细胞 HCV29、非浸润性膀胱癌细胞 KK47 和浸润性膀胱癌细胞 YTS-1 中唾液酸的表达, 发现恶性肿瘤细胞中唾液酸的含量高于正常细胞; 进一步分析唾液酸酶和唾液酸转移酶的表达, 发现唾液酸酶 Neu1 在正常细胞中表达最高, 在良性肿瘤细胞中次之, 在恶性肿瘤细胞中表达最低, 推测在膀胱癌中 Neu1 对唾液酸的异常表达起着主要作用. 同时, 膀胱癌细胞中 Toll 样受体 1, 2, 3, 4 (toll-like receptors, TLRs) 表达趋势也与 Neu1 一致. 利用 TGF- β 处理 HCV29, 使之发生上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT), 细胞中 Neu1 和 TLR3 表达明显减少; 将 Neu1 基因沉默后, TLR3 表达也明显减少. 此外, 在 YTS-1 细胞中过表达 Neu1, TLR3 表达增高且激活了下游 NF- κ B 通路. 这一结果说明膀胱癌中 Neu1 与 TLR3 的表达有着密切的关系, 这为膀胱癌的分子机理研究提供了工作基础.

关键词 唾液酸, 唾液酸酶, 膀胱癌, Toll 样受体

学科分类号 Q7

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0318

唾液酸(sialic acid, sia)是一种九碳糖, 常见于 N-聚糖、O-聚糖和糖鞘脂的末端^[1], 目前已知的唾液酸有 50 多种天然衍生物, 其核心结构主要为 N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)、N-羟乙酰基神经氨酸(Neu5Gc)和 5-位去氨基的 KDN(2-keto-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid)(图 1)^[2]. 唾液酸的结构多样性有利于抗体及多种内源或外源性唾液酸结合凝集素的识别. 唾液酸通常以短链残基的形式连接在糖蛋白、糖脂等糖缀合物的末端, 如以

α -2, 3 键连接到半乳糖(Gal)上, α -2, 6 键连接到 Gal 或 N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)上, α -2, 8 键连接到其他唾液酸上. 有报道显示, 在肿瘤的形成、发展和转移的过程中, 往往伴随着细胞表面唾液酸含量、连接方式和类型的显著变化^[3].

生物体内与唾液酸相关的酶主要有唾液酸转移酶(sialyltransferase, ST)和唾液酸酶(sialidase, SA; 或称神经氨酸酶, neuraminidase, NEU), 它们在生物体内多个生理过程中发挥着重要作用. NEU 广泛存在于病毒、细菌和哺乳动物细胞中, 可以断裂糖缀合物末端与唾液酸残基相连接的糖苷键, 从而水解唾液酸糖缀合物^[4]. 目前发现, 在哺乳动

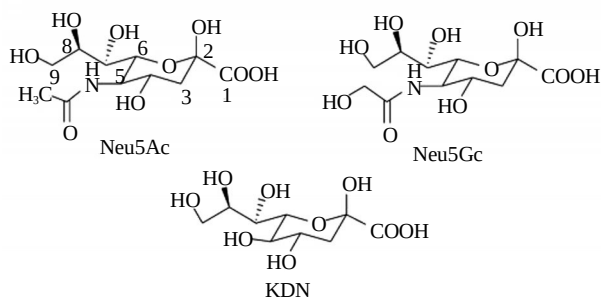


Fig. 1 The core structure of sialic acid^[2]

* 国家自然科学基金青年科学基金(81402115)和江苏省自然科学基金(BK20140172)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0510-85918126, E-mail: fengguan@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2015-10-12, 接受日期: 2015-11-20

物体内有 4 种唾液酸酶 Neu1、Neu2、Neu3 和 Neu4^[5], 前三者分别位于溶酶体、细胞液和质膜上, Neu4 则在溶酶体、线粒体和细胞内膜上均有分布. 其中 Neu1 在人体内的各组织中含量较高, 与炎症反应、癌症、阿尔茨海默病和糖尿病等多种疾病密切相关^[6-10].

Neu1 催化水解的底物具有多样性, 如 TLRs (toll-like receptors)、Lamp1 (lysosomal-associated membrane protein 1) 和胰岛素受体等^[11-12]. 而其中 TLRs 是参与非特异性免疫的一类重要的蛋白质分子, 也是连接非特异性免疫和特异性免疫的桥梁. TLRs 介导的信号转导通路主要分为 MyD88 依赖途径和 MyD88 非依赖途径, 除了 TLR3, 所有的 TLRs 均利用 MyD88 依赖途径进而激活 NF- κ B, 诱导炎症前细胞因子的表达^[13]. 据报道, Neu1 与 TLRs 的表达及其下游信号通路的调控相关^[14-15].

上皮间质转化过程 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是肿瘤细胞转移中一个重要过程, 指上皮细胞通过特定程序转化为具有间质表型的细胞, 从而获得显著的迁移和侵袭能力. 已知在多种细胞模型中, 通过添加转化生长因子 (TGF- β) 可以诱导正常上皮细胞发生 EMT^[16].

本文选取 3 株具有代表性的人膀胱正常上皮细胞及膀胱癌细胞, 分析 3 者唾液酸的表达情况, 以及唾液酸转移酶和唾液酸酶的表达差异, 并初步研究了 Neu1 与 TLRs 的表达相关性, 为进一步深入探索唾液酸酶在膀胱癌发生和发展中的作用提供理论基础.

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人膀胱正常上皮细胞株 HCV29, 人膀胱肌层非浸润性肿瘤细胞株 KK47 和人膀胱浸润性肿瘤细胞株 YTS-1 为美国华盛顿大学 Hakomori 教授馈赠. 3 株细胞均使用含 10% 胎牛血清 (FBS)、100 mg/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI 1640 培养基 (Gibco BRL, USA) 培养, 培养条件为 37℃, 5% CO₂.

1.2 细胞稳定转染

在 12 孔板接种细胞, 细胞融合度达 70%~90% 时转染, 按照 Lipofectamine 2000 (Life, USA) 的说明书, 将人源 pcDNA3.1(+)/Neu1 重组质粒转染到 YTS-1 细胞中, 无血清培养转染 6 h 后换为含 10% FBS 的培养基进行培养, 24 h 后用 500 mg/L

G418 抗生素筛选 2 周, 挑取细胞单克隆, 在添加含 500 mg/L G418 抗生素的培养基中扩大培养. 提取总蛋白, 利用蛋白质印迹法进行筛选, 得到稳定过表达 Neu1 的永久转染细胞株 (YTS-1/Neu1).

1.3 实时荧光定量 PCR

用 RNA 提取试剂盒 (Cwbiotech, China) 从 HCV29、KK47、YTS-1 细胞中提取总 RNA, 并反转录成 cDNA. 根据 Genbank 序列, 按照实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 的引物要求设计引物序列, 实验中所涉及的基因及其引物序列如表 1 所示. 使用 UltraSYBR Mixture 试剂盒 (Cwbiotech, China) 进行 PCR, 条件为: 95℃ 预变性 10 min; 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火、延伸 1 min, 共 40 个循环. 在荧光定量 PCR 检测系统中进行荧光扩增, 测定溶解曲线. 根据 C_t 值, 使用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算目的基因相对内参基因 *actin* 表达的倍性关系.

1.4 蛋白质印迹

用预冷的 T-per 蛋白裂解液 (Thermo Scientific) 提取细胞蛋白 (提取磷酸化蛋白时加入磷酸酶抑制剂 钼酸钠、氟化钠), 用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒 (Beyotime Biotechnology, China) 测定浓度后进行电泳, 然后通过半干法转膜系统 (Bio-Rad, USA) 将蛋白转印于 PVDF 膜上, 将膜放置于 5% 脱脂奶粉中 37℃ 封闭 2 h, 一抗 4℃ 孵育过夜. TBST 漂洗 5 次, 每次 5 min, 再将膜与辣根过氧化物酶 HRP 标记的二抗 (Beyotime Biotechnology, China) 室温孵育 1 h; TBST 漂洗 5 次, 每次 5 min. 采用 Pro-Light HRP 化学发光检测试剂 (Tiangen, China) 显色, 用 ChemiDoc™ XRS+ 成像系统进行图像采集及定量分析. 一抗 Neu1 购于 Santa Cruz, USA, TLR3 及 I κ B、磷酸化的 I κ B、NF κ B、磷酸化的 NF κ B 购于 Cell signaling Technology, Inc (China).

1.5 凝集素细胞染色

以 2×10⁴ 个 / 孔接种细胞于 24 孔板中并制作细胞爬片. 培养 12~36 h 后用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤 2 遍, 4% 多聚甲醛固定 15 min; 用 PBS 洗 3 遍, 加入 0.1% Triton X-100 溶液通透细胞 10 min; 再用 PBS 洗 3 遍, 5% 牛血清蛋白 (BSA) 溶液 4℃ 封闭过夜. 然后用 Cy3 标记好的浓度为 0.7 mg/L 接骨木凝集素 (*Sambucus nigra*, SNA) 和 槐木凝集素 (*Maackia amurensis* II, MAL-II) 室温下避光孵育 3 h, PBS 洗 3 遍, 5 mg·L⁻¹ 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI)

Table 1 Primers used in this study			
Gene	Primer(5'→3')	Gene	Primer(5'→3')
NEU1	F:CATGATCATCGCTGAGGAGAT	ST6GAL2	F:ACGCTGCTGATTGACTCTTCT
	R:TCTCCCTGGATATTGGCACT		R:CACATACTGGCACTCATCTAA
NEU2	F:CATACAAGGGGCATGGGTT	ST6GALNAC2	F:CCAAGTCATCGCCTCCAC
	R:AGAGGAGACTACGACGCACC		R:TCAGAATGCCTCCGTTGC
NEU3	F:CTTCCATCAGTGGCTTCAGG	ST6GALNAC3	F:GATACCATTCTCCTACACATACAG
	R:TTCCACGAGGAGAGATGAGG		R:AAGGTCACAGTCCAGTTGC
NEU4	F:AAGAGCACTGTCCGTGAAGG	ST6GALNAC4	F:GAGGATCATGGTGAACCAGC
	R:TTGTCTCTGCTCTGGGTCAG		R:TACTGCGACCAGATCTTCCA
ST3GAL1	F:GGTGGGTACACAACCAGCTT	ST6GALNAC5	F:AGTCCCTGCAGTGCATTTTC
	R:TGGACGGTCACTCAGCCTAT		R:GAGAGCAGCACCCAGCA
ST3GAL2	F:AGGGTACATGAAATGGTGGG	ST6GALNAC6	F:GACAATCACACACTGGTGGC
	R:GACGGGCACAACCTTCATCAT		R:CGACCTGTCAACCTCAAGAAG
ST3GAL3	F:GAGTCATCCAGGAACATGGG	TLR1	F:GTGCCCAATATGCCTTTGT
	R:ACGCAAACCTTTTCAGAGGGA		R:CAGCTCTTCTGTTTTTGTGGC
ST3GAL4	F:GGGACTTGCTGACCATGTTT	TLR2	F:CAAATGACGGTACATCCACG
	R:AGTCGCAAGGTCGCTGAG		R:GGGTAAATCTGAGAGCTGCG
ST3GAL5	F:GCACGGATTAGAACTGGG	TLR3	F:ATGCACACAGCATCCCAAAG
	R:CGCCCTCTGGATAAGTCAT		R:AGGAAAGGCTAGCAGTCATCC
ST3GAL6	F:AATTGCTGGGGCCTCTCT	TLR4	F:CCCCATCTTCAATTGTCTGG
	R:GCTGCGGGTTTGCACTG		R:GAGCTTTAATCCCCTGAGGC
ST6GAL1	F:AGGCCCATTTTCTCAGGAT		
	R:GAGCCCAGCTGAAATGGAC		

染色 10 min, 最后将爬片倒扣在滴有 Glycergel 固封剂的载玻片上, 晾干后于 4℃ 条件下避光保存. 用 ECLIPSE Ti-U 倒置荧光显微镜在 10×60 倍下观察.

1.6 免疫荧光技术

细胞爬片制备如 1.5 所述, 爬片封闭后用一抗孵育过夜, PBS 洗 5 min×5 次, 然后用 FITC 标记的二抗室温避光孵育 1 h, PBS 洗 5 min × 5 次. 用 5 mg/L-1DAPI 室温避光静置 10 min, PBS 洗 5 min×3 次. 将玻片倒扣在滴有 Glycergel 固封剂的载玻片上, 用 ECLIPSE Ti-U 倒置荧光显微镜在 10×60 倍下观察拍照.

1.7 基因沉默

在 6 孔板中接种细胞, 90%融合度时转染, 按照 Lipofectamine2000 的说明书, 将 NEU1 的 2 对 siRNA 和 scramble siRNA 转染到 HCV29 细胞中, 48 h 后提取总蛋白, 利用蛋白质印迹法进行检验.

2 结果与分析

2.1 膀胱癌细胞系中唾液酸含量的检测

凝集素是一类能与糖结合的蛋白质, 其中

SNA 和 MAL- II 分别是特异性识别 α2-6 和 α2-3 唾液酸连接形式的凝集素. 唾液酸含量越高, 其结合的凝集素越多, 对应的荧光信号越强. 根据凝集素染色的结果, 发现从 HCV29、KK47 到 YTS-1 其染色亮度依次增强(图 2), 表明这 3 株细胞中的唾液酸含量也逐渐升高.

2.2 膀胱癌细胞系中唾液酸酶、唾液酸转移酶转录水平的检测

基于上述结果, 本实验进一步分析唾液酸酶和催化 α2-3 和 α2-6 连接的唾液酸转移酶在 3 株细胞中的转录水平变化(图 3). 对 HCV29、KK47 和 YTS-1 细胞的 qRT-PCR 结果分析发现, 所检测的唾液酸转移酶在 KK47 和 YTS-1 中的转录水平均高于 HCV29, 唾液酸酶 NEU2、NEU3、NEU4 基因在 KK47 中的转录水平高于其他 2 株细胞, 且在 YTS-1 中的转录水平最低, NEU1 在 HCV29、KK47 和 YTS-1 中的转录水平依次降低, 与 3 株细胞的唾液酸表达水平呈显著的负相关性.

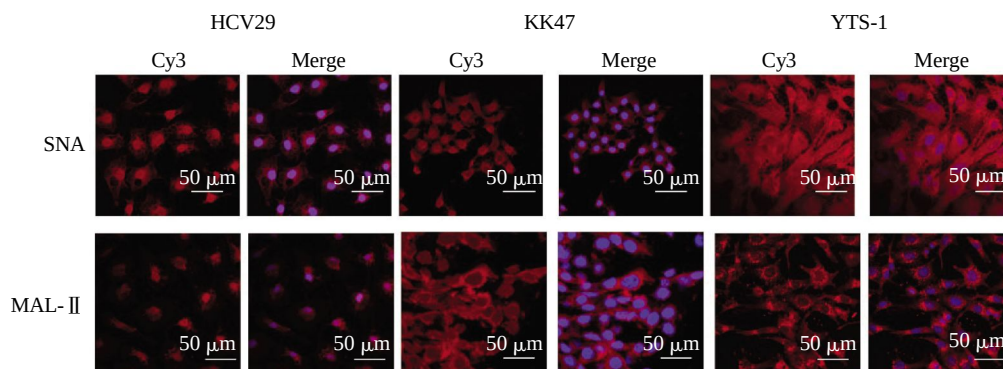


Fig. 2 MAL-II-Cy3 and SNA-Cy3 staining of HCV29, KK47 and YTS-1

Cell nuclei were stained with DAPI, and Sialic acids were stained with Cy3-conjugated lectin. Scale bar: 50 μm .

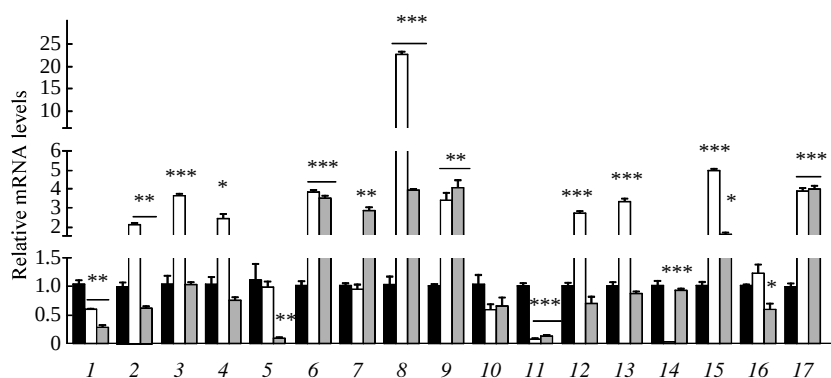


Fig. 3 Expression of sialidases and sialyltransferases in HCV29, KK47 and YTS-1 by real-time PCR analysis

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. 1: *NEU1*; 2: *NEU2*; 3: *NEU3*; 4: *NEU4*; 5: *ST3GAL1*; 6: *ST3GAL2*; 7: *ST3GAL3*; 8: *ST3GAL4*; 9: *ST3GAL5*; 10: *ST3GAL6*; 11: *ST6GAL1*; 12: *ST6GAL2*; 13: *ST6GALNAC2*; 14: *ST6GALNAC3*; 15: *ST6GALNAC4*; 16: *ST6GALNAC5*; 17: *ST6GALNAC6*. ■: HCV29; □: KK47; ▒: YTS-1.

2.3 膀胱癌细胞系中 Neu1 的表达水平变化

本实验进一步在蛋白质水平上检测了这 3 株细胞中 Neu1 的表达变化. 蛋白质印迹结果显示, 与

基因转录水平一致, Neu1 蛋白在 HCV29、KK47 和 YTS-1 中表达呈依次降低的趋势(图 4a). 细胞免疫荧光实验再次证实了这一结论(图 4b).

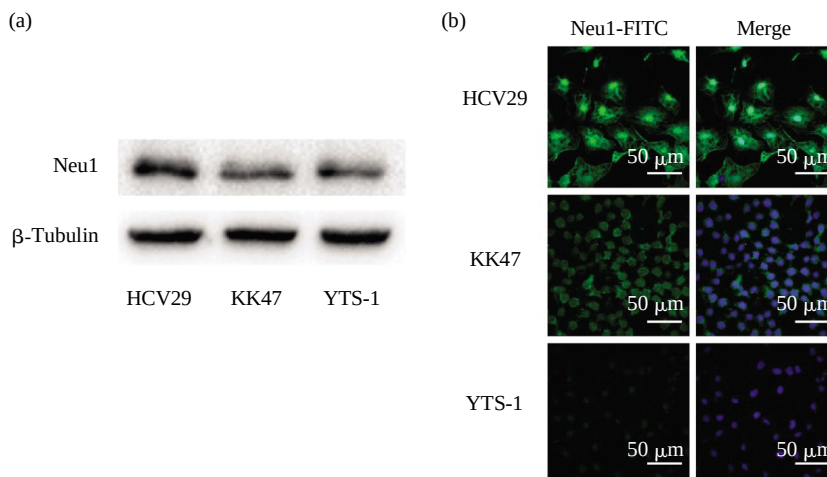


Fig. 4 Expression of Neu1 in HCV29, KK47 and YTS-1 cells

(a) Western blotting analysis of Neu1. (b) Immunofluorescence staining analysis of Neu1. Cell nuclei were stained with DAPI, and Neu1 was stained with FITC.

2.4 膀胱癌细胞系中 Toll 样受体表达水平的变化

多项研究显示, Neu1 与 TLRs 的表达及其下游信号通路的调控有一定的关系^[14-15], 如 TLR4 可通过 G 蛋白偶联受体和金属基质蛋白酶 9(MMP9) 依赖的机制激活细胞表面 Neu1 的表达^[6-7].

本实验分别检测了上述细胞中 *TLR1*、*TLR2*、*TLR3* 和 *TLR4* 基因表达, 结果发现 *TLR2*、*3*、*4* 在 3 株细胞中的表达均高于 *TLR1*, 且 4 种 TLRs 基因在 HCV29 中的转录水平最高, KK47 中其次, YTS-1 中最低(图 5), 这一变化趋势与 Neu1 在 3 株细胞中的变化趋势一致。

2.5 EMT 过程中 Neu1 与 TLRs 表达的相关性分析

用 TGF- β 处理 HCV29 细胞 48 h, 使之发生 EMT, 建立 EMT 细胞模型. 通过 qRT-PCR 分析 Neu1 和 TLRs 的转录水平变化发现, HCV29 细胞发生 EMT 后, *NEU1* 基因转录水平降低, *TLR3* 也相应减少(图 6a). 而在 Neu1 表达相对较高的 HCV29 细胞中, 对 *NEU1* 基因表达进行瞬间干扰后检测了 Toll 样受体的转录水平变化, 发现其表

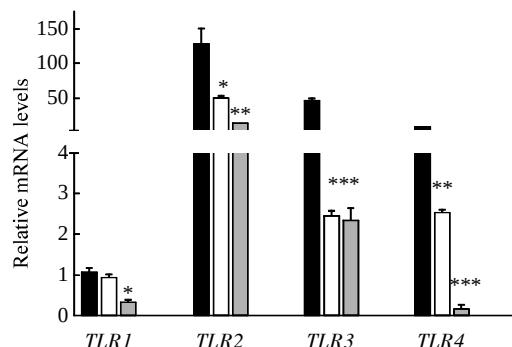


Fig. 5 Expression of TLRs in HCV29, KK47 and YTS-1 cells

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. ■: HCV29; □: KK47; ▒: YTS-1.

达降低(图 6b). 同样, HCV29 细胞发生 EMT 过程后在蛋白质水平上 Neu1 和 TLR3 的表达也均降低(图 6c). 因此, 推测唾液酸酶 Neu1 和与 TLR3 的表达可能存在相关性。

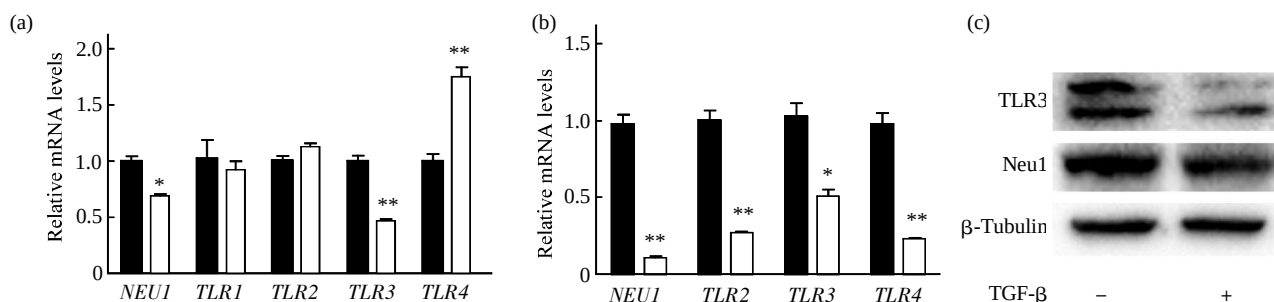


Fig. 6 The relative expression of Neu1 and TLRs

(a) Expression of Neu1 and TLRs genes in EMT process in HCV29 cells. (b) mRNA levels of *NEU1* and *TLR2*, *3*, *4* after *Neu1* gene silencing in HCV29. (c) Western blotting analysis of TLR3 and Neu1 after EMT on HCV29. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. ■: Control; □: TGF- β treated.

2.6 Neu1 与 TLR3 及其下游通路之间的关系

为了进一步验证 Neu1 和 TLR3 之间的相关性, 本实验通过基因沉默技术对 HCV29 细胞中 *NEU1* 基因表达进行瞬时干扰, 同时构建过表达 *NEU1* 的 YTS-1 稳定转染细胞. 经蛋白质印迹检测发现 TLR3 的表达变化与 Neu1 一致: 在 HCV29 中沉默 Neu1 的表达时, TLR3 表达下降; 而在 YTS-1 中过表达 Neu1, TLR3 表达也随之升高(图 7a, b).

TLR3 能专一性识别双链 RNA, 通过依赖 MyD88 信号通路和非依赖 MyD88 信号通路来激活

NF- κ B 信号通路. NF- κ B 主要存在于细胞质中, 并与抑制性的 I κ B 蛋白形成复合物, 而当 NF- κ B 被激活后, I κ B 发生磷酸化, NF- κ B 被释放, 并发生磷酸化入核, 调控下游基因的转录. 因此本实验进一步对 TLR3 下游 NF- κ B 通路进行了检测. 结果发现在 YTS-1/Neu1 细胞中, TLR3 表达水平升高, 磷酸化 I κ B 被激活, 磷酸化 NF- κ B 表达也升高. 由此推测, 在 YTS-1/Neu1 细胞中, Neu1 的过表达能通过 TLR3 激活 NF- κ B 信号通路(图 7b), 进而发挥其调控作用。

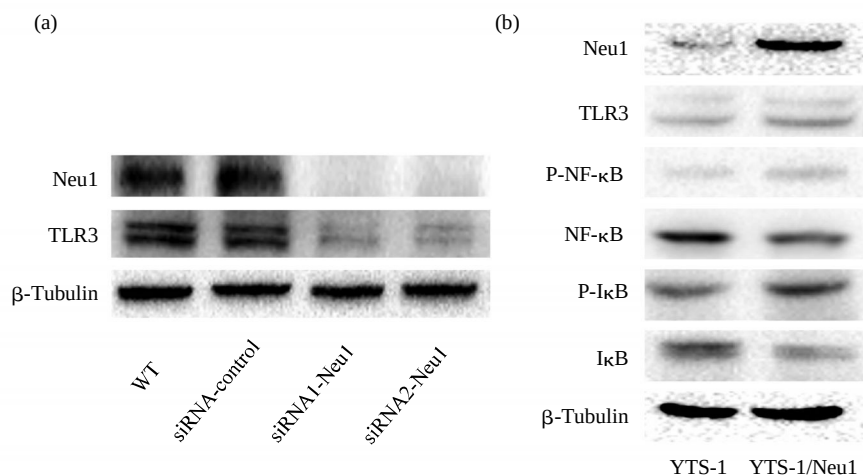


Fig. 7 Expression of TLR3 and related pathway in NEU1-silenced HCV29 cells and NEU1-over expressed YTS-1 cells

(a) Neu1 and TLR3 assessed by Western blotting in HCV29 cells (WT), siRNA control and NEU1 siRNA-transfected HCV29 cells. (b) TLR3 and related signaling pathway in YTS-1/Neu1 cells.

3 讨 论

近年来,越来越多的研究发现生物体内异常唾液酸表达与恶性肿瘤的形成、发展和转移存在密切的关系。已有报道表明, α 2, 3- 唾液酸在肝癌、胃癌组织中的表达上调^[17-18]; α 2, 6- 唾液酸也被证实存在肝癌、乳腺癌、结肠癌、子宫颈癌、白血病等恶性肿瘤中高表达^[17, 19]。此外, 唾液酸的高表达与肿瘤细胞的恶化、侵袭、迁移有关^[20-21]。有报道也表明, 唾液酸转移酶(ST6Gal I)能提高人胃癌细胞(SGC7901)增殖和迁移能力^[22]以及侵袭能力^[23]。而唾液酸酶 Neu1 作为主要切除末端 α 2, 3- 和 α 2, 6- 唾液酸的唾液酸酶, 可能在癌症、炎症反应、阿尔茨海默病和糖尿病等多种疾病中发挥重要功能。

TLRs 是宿主细胞识别各种微生物致病成分的主要受体, 参与非特异性免疫(天然免疫), NF- κ B 位于 TLR 下游信号通路, 当细胞受到生物应激刺激后激活 NF- κ B 使其磷酸化入核调节炎症相关细胞因子的表达, 启动免疫。而其中 TLR3 能专一识别双链 RNA, 通过依赖 MyD88 信号通路和非依赖 MyD88 信号通路来激活 NF- κ B 和 MAPK 信号通路, 引起细胞因子如 IL-6、IL-12 和 TNF- α 的释放, 上调 APC 细胞表面 CD80、CD86 等共刺激分子并最终激活特异性免疫系统^[24]。

本实验发现, 伴随膀胱癌恶性程度的增高, 唾液酸的表达增加且 Neu1 的表达下调, 而 Neu1 与 TLR3 的表达水平成正相关, 由此推测 Neu1 可通过 TLR3 进而激活 NF- κ B 信号通路。进一步可通过其他临床样本如膀胱癌组织、血清等加以验证, 以确定唾液酸、唾液酸转移酶及 Neu1 表达与膀胱癌形成、发展和转移的相关性。在今后的工作中可以在 Neu1 表达较低的多株恶性膀胱癌细胞及原代细胞中构建稳定转染细胞株, 来验证 Neu1 对 TLR3-NF- κ B 信号通路的正向调节作用, 同时对表达量相对较高的特异的唾液酸转移酶进行抑制, 并进一步检测过表达 Neu1 细胞中 NF- κ B 通路下游基因的激活情况, 并通过细胞凋亡、炎症反应等实验, 以确定 Neu1 与肿瘤发生发展及诊疗之间的相关性, 为膀胱癌的诊断和治疗奠定分子基础。

参 考 文 献

- [1] Varki A, Lowe J B. Biological roles of glycans [M] //Varki A, Cummings R D, Esko J D, *et al.* Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor (NY). 2009
- [2] 王亚娟, 邢国文. 唾液酸酶和唾液酸糖基转移酶的结构、功能与催化反应研究进展. 有机化学, 2011, **31**(8): 1157-1168
Wang Y J, Xing G W. Chinese Journal of Organic Chemistry, 2011, **31**(8): 1157-1168
- [3] Chou H-H, Takematsu H, Diaz S, *et al.* A mutation in human

- CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the Homo-Pan divergence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(20): 11751–11756
- [4] Corfield T. Bacterial sialidases-roles in pathogenicity and nutrition. *Glycobiology*, 1992, **2**(6): 509–521
- [5] Monti E, Preti A, Venerando B, *et al.* Recent development in mammalian sialidase molecular biology. *Neurochemical Research*, 2002, **27**(7–8): 649–663
- [6] Abdulkhalek S, Amith S R, Franchuk S L, *et al.* Neu1 sialidase and matrix metalloproteinase-9 cross-talk is essential for Toll-like receptor activation and cellular signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, **286**(42): 36532–36549
- [7] Amith S R, Jayanth P, Franchuk S, *et al.* Neu1 desialylation of sialyl alpha-2, 3-linked beta-galactosyl residues of TOLL-like receptor 4 is essential for receptor activation and cellular signaling. *Cellular Signalling*, 2010, **22**(2): 314–324
- [8] Annunziata I, Patterson A, Helton D, *et al.* Lysosomal NEU1 deficiency affects amyloid precursor protein levels and amyloid-beta secretion *via* deregulated lysosomal exocytosis. *Nature Communications*, 2013, **4**: 2734
- [9] Dridi L, Seyrantepe V, Fougerat A, *et al.* Positive regulation of insulin signaling by neuraminidase 1. *Diabetes*, 2013, **62**(7): 2338–2346
- [10] Uemura T, Shiozaki K, Yamaguchi K, *et al.* Contribution of sialidase NEU1 to suppression of metastasis of human colon cancer cells through desialylation of integrin beta4. *Oncogene*, 2009, **28**(9): 1218–1229
- [11] D'azzo A, Hoogeveen A, Reuser A, *et al.* Molecular defect in combined beta-galactosidase and neuraminidase deficiency in man. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, **79**(15): 4535–4539
- [12] Galjart N J, Gillemans N, Harris A, *et al.* Expression of cDNA encoding the human protective protein associated with lysosomal β -galactosidase and neuraminidase: homology to yeast proteases. *Cell*, 1988, **54**(6): 755–764
- [13] 常晓彤, 肇晓峰, 王振辉. Toll 样受体信号转导途径研究进展. *生理科学进展*, 2011, **42**(5): 340–346
Chang X T, Nian X F, Wang Z H. Progress in Physiological Sciences, 2011, **42**(5): 340–346
- [14] Chen G Y, Brown N K, Wu W, *et al.* Broad and direct interaction between TLR and Siglec families of pattern recognition receptors and its regulation by Neu1. *eLife*, 2014, **3**: e04066
- [15] Abdulkhalek S, Szewczuk M R. Neu1 sialidase and matrix metalloproteinase-9 cross-talk regulates nucleic acid-induced endosomal TOLL-like receptor-7 and -9 activation, cellular signaling and pro-inflammatory responses. *Cellular Signalling*, 2013, **25**(11): 2093–2105
- [16] Valcourt U, Kowanetz M, Niimi H, *et al.* TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, **16**(4): 1987–2002
- [17] 龚祖元, 廖彩仙, 王 宇, 等. 肝细胞癌细胞膜表面唾液酸含量的变化. *南方医科大学学报*, 2010, **30**(10): 2323–2326
Gong Z Y, Liao C X, Wang Y, *et al.* *Journal of Southern Medical University*, 2010, **30**(10): 2323–2326
- [18] 王凤玲, 崔淑香, 解砚英, 等. 胃癌细胞表面 $\alpha 2, 3$ 唾液酸糖链结构的检测及意义. *中国肿瘤临床*, 2008, **35**(24): 1403–1406
Wang F L, Cui S X, Xie Y Y, *et al.* *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2008, **35**(24): 1403–1406
- [19] Varki A. Sialic acids in human health and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 2008, **14**(8): 351–360
- [20] Fuster M M, Esko J D. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nature Reviews Cancer*, 2005, **5** (7): 526–542
- [21] Lin S, Kemmner W, Grigull S, *et al.* Cell surface alpha 2,6 sialylation affects adhesion of breast carcinoma cells. *Experimental Cell Research*, 2002, **276**(1): 101–110
- [22] 诸梦露, 刘婷婷, 彭晓丹, 等. ST6Gal I 调控胃癌细胞 SGC7901 增殖迁移能力的初步研究. *温州医科大学学报*, 2015, **45**(4): 235
Zhu M L, Liu T T, Peng X D, *et al.* *Journal of Wenzhou Medical University*, 2015, **45**(4): 235–239
- [23] Zhao Y, Li Y, Ma H, *et al.* Modification of sialylation mediates the invasive properties and chemosensitivity of human hepatocellular carcinoma. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2014, **13**(2): 520–536
- [24] 金 丹, 吕凤林. TLR3 免疫识别 dsRNA 病毒的分子机制. *病毒学报*, 2005, **21**(2): 155–159
Jin D, Lv F L. *Chinese Journal of Virology*, 2005, **21**(2): 155–159

Effect of The Abnormal Expression of Sialidase Neu1 in Bladder Cancer on Toll Like Receptors*

ZHAI Yan-Hong¹⁾, LIU Chang-Mei¹⁾, GUO Hui²⁾, YANG Gang-Long¹⁾, GUAN Feng^{1)**}

¹⁾ Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry & Biotechnology Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

²⁾ Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract Sialyltransferase (ST) and sialidase (SA) are the main enzymes responsible for the addition or removal of sialic acids to the terminal of glycan on glycoprotein or glycolipids. In our study, the expression of sialic acids, sialidases and sialyltransferases in normal bladder epithelial cell line HCV29, and two bladder cancer cell lines KK47 and YTS-1 were detected. Our results showed YTS-1 cells, the highly invasive cell line, expressed higher level of sialic acids than other two cell lines. However, the level of Neu1 in YTS-1 cells was the lowest among all the cell lines. The expression of Toll like receptors TLR1,2,3,4 was consistent with neu1 expression in these three cell lines. When normal bladder cell HCV29 underwent TGF- β induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) process, expression of Neu1 and TLR3 were significantly decreased. When Neu1 expression was inhibited in HCV29 cell line, the level of TLR3 was also reduced. Overexpression of Neu1 in YTS-1 cells resulted in TLR3 increase accompanied with the activation of NF- κ B signaling pathway. Our results indicated that Neu1 shared closed relationship with the expression of TLRs in bladder cancer cells, which may potentially provide therapeutic candidates in treating bladder cancer.

Key words sialic acid, sialidase, bladder cancer, Toll like receptors

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0318

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation for Young Scientists of China (81402115) and The Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (BK20140172).

**Corresponding author.

Tel: 86-510-85918126, E-mail: fengguan@jiangnan.edu.cn

Received: October 12, 2015 Accepted: November 20, 2015