

## CKAP2L 在吉西他滨耐药膀胱癌细胞中的表达及作用\*

胡容琿<sup>1</sup>, 郭震<sup>2</sup>, 韩露露<sup>1</sup>, 张阳阳<sup>2</sup>, 刘晓东<sup>1</sup>, 王磊<sup>1,2△</sup>

1. 新乡医学院第四临床学院, 河南新乡 453000; 2. 河南省新乡市中心医院泌尿外科, 河南新乡 453000

**摘要:**目的 探讨细胞骨架相关蛋白 2 样(CKAP2L)在吉西他滨耐药膀胱癌细胞中的表达变化, 以及其对癌细胞生物学行为和药物敏感性的影响。方法 采用浓度梯度诱导法建立吉西他滨耐药膀胱癌细胞株 T24/GEM 和 5637/GEM, 利用小干扰 RNA 敲低各耐药细胞 CKAP2L 基因表达, 将 T24、5637 细胞分别分为: (1) T24、5637 组; (2) T24/GEM、5637/GEM 组; (3) NC-T24/GEM、NC-5637/GEM 组; (4) si-T24/GEM、si-5637/GEM 组。采用 CCK-8 实验检测各组细胞增殖率, 采用划痕实验评估各组细胞迁移能力。通过实时荧光定量 PCR 和 Western blotting 分别检测各组细胞 CKAP2L mRNA、蛋白表达情况。转染后的 T24/GEM、5637/GEM 细胞进行吉西他滨敏感性实验。结果 与 T24 组相比, T24/GEM 组 CKAP2L mRNA 及蛋白相对表达量均升高( $P < 0.05$ )。与 5637 组相比, 5637/GEM 组 CKAP2L mRNA 及蛋白相对表达量均升高( $P < 0.05$ )。48 h 时, si-T24/GEM 组细胞增殖率低于 T24 组、T24/GEM 组和 NC-T24/GEM 组( $P < 0.05$ ), si-5637/GEM 组细胞增殖率低于 5637 组、5637/GEM 组和 NC-5637/GEM 组( $P < 0.05$ )。si-T24/GEM 组细胞迁移率显著低于 T24 组、T24/GEM 组、NC-T24/GEM 组( $P < 0.001$ ), si-5637/GEM 组细胞迁移率显著低于 5637 组、5637/GEM 组、NC-5637/GEM 组( $P < 0.001$ )。在吉西他滨  $\geq 5 \mu\text{mol/L}$  时, si-T24/GEM 细胞的存活率均低于 NC-T24/GEM 细胞( $P < 0.05$ ); 在吉西他滨  $\geq 2.5 \mu\text{mol/L}$  时, si-5637/GEM 细胞的存活率均低于 NC-5637/GEM 细胞( $P < 0.05$ )。线性回归分析结果显示, NC-T24/GEM、si-T24/GEM、NC-5637/GEM、si-5637/GEM 细胞的存活率均随着吉西他滨浓度升高而呈线性下降( $P < 0.05$ ), si-T24/GEM 细胞( $R^2 = 0.91$ ,  $P < 0.05$ ,  $b = 1.71$ )的存活率下降速度明显快于 NC-T24/GEM 细胞( $R^2 = 0.75$ ,  $P < 0.05$ ,  $b = 0.38$ ), si-5637/GEM 细胞( $R^2 = 0.85$ ,  $P < 0.05$ ,  $b = 1.69$ )的存活率下降速度明显快于 NC-5637/GEM 细胞( $R^2 = 0.93$ ,  $P < 0.05$ ,  $b = 0.34$ )。结论 CKAP2L 在吉西他滨耐药膀胱癌 T24、5637 细胞中高表达, 促进细胞增殖与迁移并降低吉西他滨化疗敏感性。CKAP2L 可能是膀胱癌吉西他滨化疗耐药的重要调控分子及潜在治疗靶点。

关键词: 膀胱癌; 细胞骨架相关蛋白 2 样; 吉西他滨; 化疗耐药; 细胞增殖; 细胞迁移

中图分类号: R737.14; R446.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2025)22-3032-07

## Expression and role of CKAP2L in gemcitabine-resistant bladder cancer cells\*

HU Ronghui<sup>1</sup>, GUO Zhen<sup>2</sup>, HAN Lulu<sup>1</sup>, ZHANG Yangyang<sup>2</sup>, LIU Xiaodong<sup>1</sup>, WANG Lei<sup>1,2△</sup>

1. The Fourth Clinical College, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453000, China;

2. Department of Urology, Xinxiang Central Hospital, Xinxiang, Henan 453000, China

**Abstract: Objective** To investigate the expression changes of cytoskeleton-associated protein 2-like (CKAP2L) in gemcitabine-resistant bladder cancer cells and its effects on the biological behavior of cancer cells and drug sensitivity. **Methods** The gemcitabine-resistant bladder cancer cell lines T24/GEM and 5637/GEM were established by using the concentration gradient induction method, small interfering RNA was used to knock down CKAP2L gene expression in the respective resistant cells, and T24 and 5637 cells were divided into: (1) T24, 5637 groups; (2) T24/GEM, 5637/GEM groups; (3) NC-T24/GEM, NC-5637/GEM groups; (4) si-T24/GEM, si-5637/GEM groups. The cell proliferation rates were detected by the CCK-8 assay, and the cell migration ability was assessed by the scratch wound healing assay. The CKAP2L mRNA and protein expression levels were detected by the quantitative real-time PCR and Western blotting respectively. The gemcitabine sensitivity assays were performed on transfected T24/GEM and 5637/GEM cells. **Results** Compared with the T24 group, the relative mRNA and protein expression levels of CKAP2L in the T24/GEM group were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the 5637 group, the relative mRNA and protein ex-

\* 基金项目: 河南省科技攻关计划(联合共建)项目(LHGJ20240835); 河南省科技攻关项目(242102310136)。

作者简介: 胡容琿, 男, 在读硕士研究生, 主要从事泌尿外科及肿瘤方向的研究。△ 通信作者, E-mail: 4lc0222@xxmu.edu.cn。

引用格式: 胡容琿, 郭震, 韩露露, 等. CKAP2L 在吉西他滨耐药膀胱癌细胞中的表达及作用[J]. 检验医学与临床, 2025, 22(22): 3032-

pression levels of CKAP2L in the 5637/GEM group were significantly increased ( $P < 0.05$ ). At 48 h, the cell proliferation rate in the si-T24/GEM group was lower than that in the T24 group, T24/GEM group and NC-T24/GEM group ( $P < 0.05$ ), the cell proliferation rate in the si-5637/GEM group was lower than that in the 5637 group, 5637/GEM group and NC-5637/GEM group ( $P < 0.05$ ). The cell migration rate in the si-T24/GEM group was significantly lower than that in the T24 group, T24/GEM group and NC-T24/GEM group ( $P < 0.001$ ); the cell migration rate in the si-5637/GEM group was significantly lower than that in the 5637 group, 5637/GEM group and NC-5637/GEM group ( $P < 0.001$ ). At gemcitabine concentration  $\geq 5 \mu\text{mol/L}$ , the survival rate of si-T24/GEM cell was lower than that of NC-T24/GEM cell ( $P < 0.05$ ); at gemcitabine concentration  $\geq 2.5 \mu\text{mol/L}$ , the survival rate of si-5637/GEM cell was lower than that of NC-5637/GEM cell ( $P < 0.05$ ). The linear regression analysis results showed that the survival rates of cells in NC-T24/GEM, si-T24/GEM, NC-5637/GEM and si-5637/GEM cells were linearly decreased with the gemcitabine concentration increase ( $P < 0.05$ ), while the descent rate in survival rates of si-T24/GEM cell ( $R^2 = 0.91, P < 0.05, b = 1.71$ ) was significantly faster than that of NC-T24/GEM cell ( $R^2 = 0.75, P < 0.05, b = 0.38$ ), the descent rate in survival rates of si-5637/GEM cell ( $R^2 = 0.85, P < 0.05, b = 1.69$ ) was significantly faster than that of NC-5637/GEM cell ( $R^2 = 0.93, P < 0.05, b = 0.34$ ). **Conclusion** CKAP2L is highly expressed in gemcitabine-resistant bladder cancer T24 and 5637 cells, where it promotes the cell proliferation and migration and reduces the chemosensitivity to gemcitabine. CKAP2L may be an important regulatory molecule in gemcitabine chemoresistance in bladder cancer and a potential therapeutic target.

**Key words:** bladder cancer; cytoskeleton-associated protein 2-like; gemcitabine; chemotherapy resistance; cell proliferation; cell migration

膀胱癌作为一种常见的泌尿系统恶性肿瘤,其全球发病率和病死率正在迅速上升<sup>[1]</sup>,世界范围内膀胱癌发病率位居恶性肿瘤的第 10 位,男性恶性肿瘤的第 6 位,其中发达国家发病率显著高于发展中国家<sup>[2]</sup>。在膀胱癌的临床分型中,非肌层浸润性膀胱癌(NMIBC)约占初诊病例的 75%。NMIBC 患者在接受经尿道膀胱肿瘤电切术后,采用术后即刻灌注化疗可有效杀灭术中播散的肿瘤细胞及创面残留病灶,降低早期复发风险;对于中危及高危患者,术后早期(诱导)灌注联合维持灌注化疗可进一步减少肿瘤复发,但需根据风险分层制订个体化方案<sup>[3]</sup>。吉西他滨是一种抑制 DNA 合成的核苷类似物,作为膀胱灌注化疗的一线用药,可有效减少膀胱癌复发和延缓肿瘤进展<sup>[4]</sup>。但膀胱癌对吉西他滨的耐药是导致其灌注化疗和全身化疗失败的主要原因,影响患者预后<sup>[5]</sup>。细胞骨架相关蛋白 2 样(CKAP2L)是已知的细胞骨架相关蛋白 2 的类似物,CKAP2L 蛋白是细胞中心体的重要组成部分<sup>[6]</sup>。研究发现,CKAP2L 在食管鳞状细胞癌和肾透明细胞癌中表达上调<sup>[7-8]</sup>,但 CKAP2L 在膀胱癌中的表达及其与化疗耐药关系的报道较为少见。本研究基于前期吉西他滨化疗耐药复发性膀胱癌的基因测序结果<sup>[9]</sup>,拟通过构建吉西他滨耐药膀胱癌 T24 及 5637 细胞模型,并在细胞水平敲低 CKAP2L 表达,阐明 CKAP2L 在膀胱癌细胞耐药中的潜在生物学作用<sup>[10]</sup>。现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞来源** 人尿路上皮癌 T24 细胞系(货号:

SNL-038)和 5637 细胞系(货号:SNL-036)均购自武汉尚恩生物技术有限公司。

**1.2 药物、试剂与仪器** 吉西他滨(货号:T0251)购自上海陶术生物科技有限公司;胎牛血清、5A 培养基、RPMI-1640 培养基、磷酸盐缓冲液(PBS)、Trypsin-EDTA 消化液、Opti-MEM 无血清培养基均购自河南朗森生物科技有限公司;CCK-8 试剂(货号:HY-K0301)购自美国 MCE 公司;RNA 转染试剂 Advanced Transfection Reagent(货号:HY-K2017)购自郑州威佳生物科技有限公司;CKAP2L 特异性小干扰 RNA(st-h-CKAP2L\_001)及阴性对照质粒(siR NC #1)购自广州锐博生物科技有限公司;反转录试剂盒购自四川瓊尔美生物科技有限公司;RIPA 裂解液及蛋白酶抑制剂、BCA 蛋白定量试剂盒购自碧云天生物技术研究所;聚偏二氟乙烯(PVDF)膜购自美国 Millipore 公司;ECL 化学发光试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司;CKAP2L 抗体(货号:17143-1-AP)及 GAPDH 抗体(货号:60004-1-Ig)购自郑州天驰生物技术有限公司。NanoDrop 分光光度计购自美国赛默飞世尔科技公司;实时荧光定量 PCR 仪(型号:QuantStudio5)购自美国赛默飞世尔科技公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 耐药细胞株的建立与鉴定** T24、5637 细胞均在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的恒温培养箱中培养,T24 细胞使用含 10%胎牛血清的 5A 培养基,5637 细胞采用含相同成分的 RPMI-1640 培养基,2 种培养基均添加 1%青霉素-链霉素混合液。按浓度梯度诱导法构建耐

药细胞:在对数期生长的 T24、5637 细胞中加入 2  $\mu\text{mol/L}$  吉西他滨处理,继续培养 48 h 后,吸去培养液,PBS 洗涤,加入新鲜的 5A 或 RPMI-1640 培养基再培养 48 h。待细胞恢复生长后,传代,再次用 2  $\mu\text{mol/L}$  吉西他滨培养。重复上述操作并逐渐采用 5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  吉西他滨诱导,直至培养得到稳定的耐药细胞。通过 CCK-8 法检测细胞存活率,根据细胞半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ ),计算细胞耐药指数(RI,  $\text{RI} = \text{耐药细胞 } \text{IC}_{50} / \text{亲本细胞 } \text{IC}_{50}$ ),筛选获得稳定吉西他滨耐药株 T24/GEM 和 5637/GEM,均  $\text{RI} > 10$ ,后续用 2  $\mu\text{mol/L}$  吉西他滨长期培养保持耐药性。

**1.3.2 细胞分组与转染** 将 T24、5637 细胞分别分为:(1)亲代细胞 T24、5637 组;(2)T24/GEM、5637/GEM 组,为 1.3.1 构建的吉西他滨耐药细胞;(3)NC-T24/GEM、NC-5637/GEM 组,为各耐药细胞空转质粒组;(4)si-T24/GEM、si-5637/GEM 组,为各耐药细胞通过小干扰 RNA 敲低 CKAP2L 基因表达。经细胞计数后,每组以  $1 \times 10^5$  cells/孔接种 6 孔板,每组设 3 个平行孔。转染前 6 h 更换无血清培养基,按说明配制 NC-CKAP2L 质粒与 Advanced Transfection Reagent 复合物以及 st-h-CKAP2L 质粒与 Advanced Transfection Reagent 复合物,室温静置 15 min 后加入 6 孔板中,6 h 后换完全培养基继续培养 48 h 后进行后续实验。

**1.3.3 实时荧光定量 PCR 检测各组细胞 CKAP2L mRNA 表达** 提取各组细胞 RNA,使用 NanoDrop 分光光度计评估 RNA 的纯度和浓度,使用反转录试剂盒合成 cDNA,反转录条件为 37  $^{\circ}\text{C}$  15 min、85  $^{\circ}\text{C}$  5 s,随后以 cDNA 为模板,采用 SYBR Green 法在 QuantStudio5 实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增,反应体系 20  $\mu\text{L}$ 。扩增条件:50  $^{\circ}\text{C}$  15 min;95  $^{\circ}\text{C}$  30 s;然后 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s、60  $^{\circ}\text{C}$  30 s,循环 40 次;最后采集溶解曲线。以 GAPDH 为内参,引物由 NCBI 数据库设计,购自美国赛默飞世尔科技公司。CKAP2L 正向引物序列为 5'-GAGCCAAAACACCAAGCCTTA-3',反向引物序列为 5'-GGAGTTTAATGCTGATGGACCTT-3';GAPDH 正向引物序列为 5'-GAAGGTGAAGGTCG-GAGT-3',反向引物序列为 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算 CKAP2L mRNA 的相对表达量。每个样本设 3 个复孔,每组实验重复 3 次。

**1.3.4 采用 Western blotting 检测各组细胞 CKAP2L 蛋白表达** 收集各组细胞,用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液裂解,提取总蛋白。采用 BCA 法测定总蛋白浓度,取 30  $\mu\text{g}$  蛋白进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳后,转膜至 PVDF 膜。用 5% 脱脂奶粉室温下处理 1 h,加入 CK-

AP2L(1 : 5 000)和 GAPDH 一抗(1 : 5 000),4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,以 GAPDH 作为内参。TBST 缓冲液洗涤后,加入 HRP 标记的二抗(1 : 10 000),室温孵育 2 h。ECL 显色液显色后,用 ImageJ 软件分析目标蛋白的灰度值。实验重复 3 次。

**1.3.5 细胞增殖实验(CCK-8 法)** 将各组细胞接种到 96 孔板中( $5 \times 10^3$  个/孔)。细胞贴壁后,在 0 h 及 48 h 分别加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂,37  $^{\circ}\text{C}$  继续培养 3 h,采用酶标仪测定 450 nm 波长处吸光度(A)值。计算各组细胞增殖率。每组实验独立重复 3 次,每次设 3 个复孔。

**1.3.6 细胞划痕实验** 使用标记笔标记 6 孔板背面,按  $5 \times 10^5$  个/孔接种各组细胞,待细胞贴壁后,使用 200  $\mu\text{L}$  无菌枪头垂直于参考线划痕。PBS 洗涤去除脱落细胞,加入无血清培养基。于 0、48 h 在倒置显微镜( $\times 4$ )下拍照,使用 ImageJ 软件计算划痕面积,评估各组细胞的迁移能力。每组实验独立重复 3 次,每次设 3 个复孔。

**1.3.7 吉西他滨敏感性实验(CCK-8 法)** 为验证转染是否逆转吉西他滨耐药,对转染后的 T24/GEM、5637/GEM 细胞进行吉西他滨敏感性实验,采用 CCK-8 法检测转染后的细胞在不同浓度吉西他滨作用下的存活率。将转染后的细胞(NC-T24/GEM、si-T24/GEM、NC-5637/GEM、si-5637/GEM)分别接种到 96 孔板中( $6 \times 10^3$  个/孔),培养 24 h,待细胞贴壁后加入 0、2.5、5、10、20、40  $\mu\text{mol/L}$  吉西他滨,继续培养 24 h 后每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂,37  $^{\circ}\text{C}$  继续培养 2 h,采用酶标仪测定 450 nm 波长处 A 值。计算各细胞存活率。每组实验独立重复 3 次,每次设 3 个复孔。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS28.0 统计软件及 Graphpad Prism 9.0 软件进行数据处理。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,2 组间比较采用独立样本  $t$  检验,多组间比较采用单因素方差分析,方差不齐时采用 Welch 校正,进一步两两比较采用 LSD- $t$  检验,不同浓度吉西他滨处理细胞的存活率采用线性回归分析进行检验。检验水准  $\alpha = 0.05$ ,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 T24/GEM、5637/GEM 细胞转染后在不同浓度吉西他滨作用下的细胞存活率比较** 在吉西他滨  $\geq 5$   $\mu\text{mol/L}$  时,si-T24/GEM 细胞的存活率均低于 NC-T24/GEM 细胞 ( $P < 0.05$ );在吉西他滨  $\geq 2.5$   $\mu\text{mol/L}$  时,si-5637/GEM 细胞的存活率均低于 NC-5637/GEM 细胞 ( $P < 0.05$ )。线性回归分析结果显示,NC-T24/GEM、si-T24/GEM、NC-5637/GEM、si-5637/GEM 细胞的存活率均随着吉西他滨浓度升高

而呈线性下降 ( $P < 0.05$ ), si-T24/GEM 细胞 ( $R^2 = 0.91, t = -6.17, F = 38.09, P < 0.05, b = 1.71$ ) 的存活率下降速度明显快于 NC-T24/GEM 细胞 ( $R^2 = 0.75, t = -3.50, F = 12.25, P < 0.05, b = 0.38$ ), si-

5637/GEM 细胞 ( $R^2 = 0.85, t = -4.78, F = 22.86, P < 0.05, b = 1.69$ ) 的存活率下降速度明显快于 NC-5637/GEM 细胞 ( $R^2 = 0.93, t = -7.40, F = 57.44, P < 0.05, b = 0.34$ )。见表 1、2。

表 1 T24/GEM 细胞转染后在不同浓度吉西他滨作用下的细胞存活率比较 ( $n=3, \bar{x} \pm s, \%$ )

细胞	0 mol/L	2.5 $\mu$ mol/L	5 $\mu$ mol/L	10 $\mu$ mol/L	20 $\mu$ mol/L	40 $\mu$ mol/L	F	P
NC-T24/GEM	103.33 $\pm$ 3.46	94.73 $\pm$ 2.47	93.47 $\pm$ 1.30	91.23 $\pm$ 3.29	87.87 $\pm$ 3.13	83.87 $\pm$ 2.01	13.27	<0.001
si-T24/GEM	98.67 $\pm$ 2.92	91.77 $\pm$ 2.51	71.31 $\pm$ 4.20	64.46 $\pm$ 2.80	48.75 $\pm$ 2.90	25.98 $\pm$ 2.04	543.6	<0.001
t	1.78	1.45	8.73	10.73	15.88	35.02		
P	0.15	0.22	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001		

表 2 5637/GEM 细胞转染后在不同浓度吉西他滨作用下的细胞存活率比较 ( $n=3, \bar{x} \pm s, \%$ )

细胞	0 mol/L	2.5 $\mu$ mol/L	5 $\mu$ mol/L	10 $\mu$ mol/L	20 $\mu$ mol/L	40 $\mu$ mol/L	F	P
NC-5637/GEM	100.67 $\pm$ 1.47	97.10 $\pm$ 1.67	95.07 $\pm$ 0.19	94.45 $\pm$ 1.43	90.72 $\pm$ 0.76	85.46 $\pm$ 0.72	82.81	<0.001
si-5637/GEM	100.01 $\pm$ 2.17	92.06 $\pm$ 1.92	78.48 $\pm$ 1.80	57.88 $\pm$ 1.76	44.97 $\pm$ 1.86	30.16 $\pm$ 1.58	796.38	<0.001
t	0.44	3.43	15.88	27.93	39.44	55.16		
P	0.68	<0.05	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001		

**2.2 T24、5637 细胞各组增殖率比较** 与 0 h 相比, T24、T24/GEM、NC-T24/GEM 组 48 h 细胞增殖率均升高 ( $P < 0.05$ ), si-T24/GEM 组 48 h 细胞增殖率降低 ( $P < 0.05$ )。0 h 时, T24 细胞各组间细胞增殖率比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。48 h 时, T24/GEM 组细胞增殖率高于 T24 组 ( $P < 0.05$ ), NC-T24/GEM 组细胞增殖率低于 T24/GEM 组 ( $P < 0.05$ ), si-T24/GEM 组细胞增殖率低于 T24 组、T24/GEM 组和 NC-T24/GEM 组 ( $P < 0.05$ )。见表 3。与 0 h 相比, 5637、5637/GEM、NC-5637/GEM 组 48 h 细胞增殖率均升高 ( $P < 0.05$ ), si-5637/GEM 组 48 h 细胞增殖率降低 ( $P < 0.05$ )。0 h 时, 5637 细胞各组间细胞增殖率比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。48 h 时, 5637/GEM 组细胞增殖率高于 5637 组 ( $P < 0.05$ ), NC-5637/GEM 组细胞增殖率低于 5637/GEM 组 ( $P < 0.05$ ), si-5637/GEM 组细胞增殖率低于 5637 组、5637/GEM 组和 NC-5637/GEM 组 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

**2.3 T24、5637 细胞各组迁移率比较** T24 细胞系中, T24、T24/GEM、NC-T24/GEM、si-T24/GEM 组细胞迁移率分别为 (57.52 $\pm$ 0.96)%、(69.84 $\pm$ 1.36)%、(67.67 $\pm$ 2.17)%、(36.47 $\pm$ 1.79)%, 4 组间细胞迁移率比较, 差异有统计学意义 ( $F = 412.61, P < 0.001$ )。其中 T24/GEM 组、NC-T24/GEM 组的细胞迁移率均高于 T24 组 ( $P < 0.05$ ), 而 si-T24/GEM 组细胞迁移率显著低于其他各组 ( $P < 0.001$ )。见图 1。5637 细胞系中, 5637、5637/GEM、NC-5637/GEM、si-5637/GEM 组的细胞迁移率分别为

(54.23 $\pm$ 0.31)%、(63.12 $\pm$ 0.46)%、(60.20 $\pm$ 0.64)%、(39.75 $\pm$ 0.83)%, 4 组间细胞迁移率比较, 差异有统计学意义 ( $F = 538.92, P < 0.001$ )。其中 si-5637/GEM 组细胞迁移率显著低于 5637 组、5637/GEM 组、NC-5637/GEM 组 ( $P < 0.001$ )。见图 2。

表 3 T24 细胞各组不同时间点增殖率比较 ( $n=3, \bar{x} \pm s, \%$ )

组别	0 h	48 h	t	P
T24 组	100.30 $\pm$ 1.12	134.90 $\pm$ 3.91	14.73	<0.05
T24/GEM 组	101.12 $\pm$ 0.80	154.36 $\pm$ 5.91 <sup>a</sup>	15.46	<0.05
NC-T24/GEM 组	99.60 $\pm$ 1.68	152.64 $\pm$ 11.74 <sup>b</sup>	7.75	<0.05
si-T24/GEM 组	100.78 $\pm$ 1.16	64.93 $\pm$ 4.36 <sup>abc</sup>	-13.76	<0.05
F	2.62	165.56		
P	0.33	<0.001		

注: 与 T24 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 T24/GEM 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 NC-T24/GEM 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

表 4 5637 细胞各组不同时间点增殖率比较 ( $n=3, \bar{x} \pm s, \%$ )

组别	0 h	48 h	t	P
5637 组	93.79 $\pm$ 2.10	142.38 $\pm$ 3.62	20.21	<0.05
5637/GEM 组	92.11 $\pm$ 1.86	155.59 $\pm$ 2.78 <sup>a</sup>	32.90	<0.001
NC-5637/GEM 组	91.79 $\pm$ 4.03	151.80 $\pm$ 5.76 <sup>b</sup>	14.79	<0.05
si-5637/GEM 组	94.12 $\pm$ 3.21	67.67 $\pm$ 5.35 <sup>abc</sup>	-7.34	<0.05
F	2.12	352.76		
P	0.39	<0.001		

注: 与 5637 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 5637/GEM 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 NC-5637/GEM 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

**2.4 T24 细胞各组 CKAP2L mRNA 及蛋白相对表达量比较** 与 T24 组相比, T24/GEM 组 CKAP2L mRNA 及蛋白相对表达量均显著升高 ( $P < 0.05$ )。NC-T24/GEM 组 CKAP2L mRNA 和蛋白相对表达

量均低于 T24/GEM 组 ( $P < 0.05$ ), 而 si-T24/GEM 转染组 CKAP2L mRNA 和蛋白相对表达量均低于 T24/GEM 组和 NC-T24/GEM 组 ( $P < 0.05$ )。见表 5 和图 3。

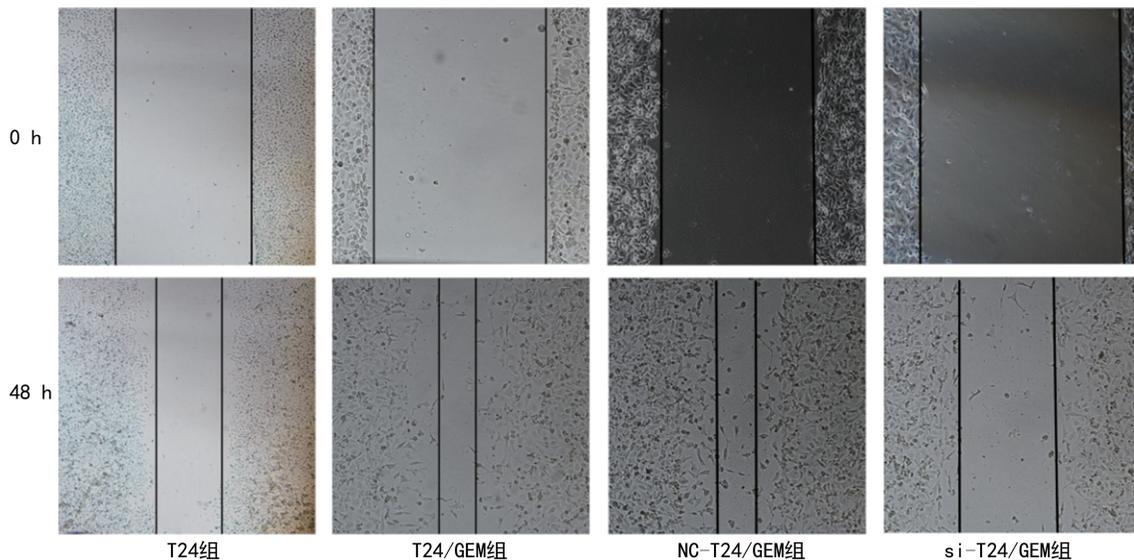


图 1 T24 细胞各组划痕实验

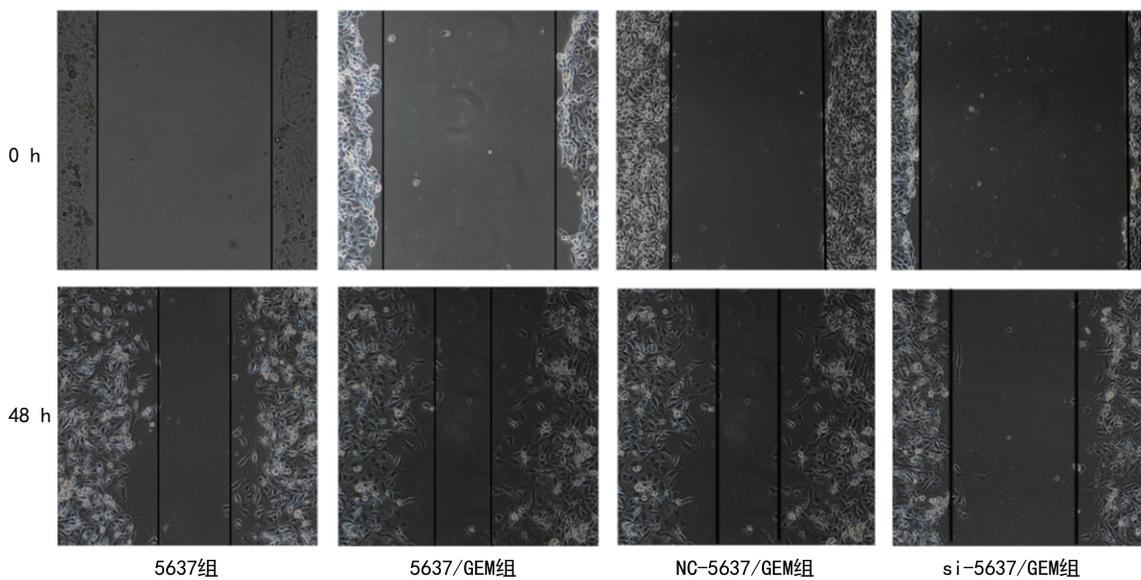


图 2 5637 细胞各组划痕实验

表 5 T24 细胞各组 CKAP2L mRNA 及蛋白相对表达量比较 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	mRNA	蛋白(/GAPDH)
T24 组	1.00 ± 0.00	0.98 ± 0.04
T24/GEM 组	10.86 ± 0.66 <sup>a</sup>	1.38 ± 0.08 <sup>a</sup>
NC-T24/GEM 组	7.55 ± 0.85 <sup>b</sup>	1.01 ± 0.01 <sup>b</sup>
si-T24/GEM 组	0.40 ± 0.01 <sup>bc</sup>	0.40 ± 0.06 <sup>bc</sup>
<i>F</i>	268.82	168.40
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注:与 T24 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 T24/GEM 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 NC-T24/GEM 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

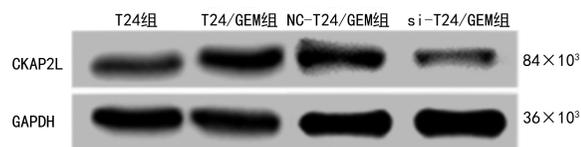


图 3 T24 细胞各组 CKAP2L 蛋白表达 Western blotting 图

**2.5 5637 细胞各组 CKAP2L mRNA 及蛋白相对表达量比较** 与 5637 组相比, 5637/GEM 组 CKAP2L mRNA 及蛋白相对表达量均升高 ( $P < 0.05$ )。NC-5637/GEM 组 CKAP2L mRNA 及蛋白相对表达量均低于 5637/GEM 组 ( $P < 0.05$ ), 而 si-5637/GEM 组

CKAP2L mRNA 及蛋白相对表达量均低于 5637/GEM 组和 NC-5637/GEM 组 ( $P < 0.05$ )。见表 6 和图 4。

表 6 5637 细胞各组 CKAP2L mRNA 及蛋白相对表达量比较 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	mRNA	蛋白(/GAPDH)
5637 组	1.00 ± 0.01	1.02 ± 0.10
5637/GEM 组	11.8 ± 0.83 <sup>a</sup>	1.46 ± 0.02 <sup>a</sup>
NC-5637/GEM 组	7.91 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.94 ± 0.03 <sup>b</sup>
si-5637/GEM 组	0.45 ± 0.01 <sup>bc</sup>	0.26 ± 0.04 <sup>bc</sup>
<i>F</i>	529.41	225.29
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注:与 5637 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 5637/GEM 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 NC-5637/GEM 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

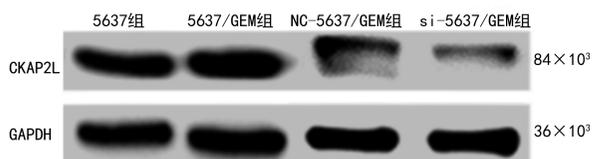


图 4 5637 细胞各组 CKAP2L 蛋白表达 Western blotting 图

### 3 讨论

膀胱癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤之一,其高发率和化疗耐药性严重影响患者的长期生存<sup>[11]</sup>,术后灌注化疗是预防复发的重要手段,其中吉西他滨作为一线药物被广泛应用于临床<sup>[12]</sup>。大部分膀胱癌患者经化疗后可以得到缓解或改善预后,但部分患者在接受吉西他滨膀胱灌注化疗后仍发生复发,提示化疗耐药是影响疗效和预后的主要因素<sup>[13-14]</sup>。既往耐药研究多集中于药物外排泵过表达、DNA 损伤修复增强及凋亡抑制等耐药机制<sup>[15]</sup>,但尚缺乏对细胞骨架相关分子在耐药形成中作用的系统研究。CKAP2L 在多种肿瘤中被证实可促进细胞增殖与侵袭,但其在膀胱癌吉西他滨耐药中的作用及机制尚不明确。

CKAP2L 又称 Radmis,编码一种有丝分裂纺锤体蛋白,参与调控细胞周期,并且在多种肿瘤的发生、发展中发挥潜在的重要作用<sup>[6]</sup>。CKAP2L 是微管相关蛋白 215 家族成员,该家族是一类微管相关蛋白,通过结合  $\alpha/\beta$ -微管蛋白异二聚体,动态调控微管成核与延伸过程,从而影响染色体分离和细胞质分裂<sup>[16]</sup>。已有研究显示,CKAP2L 的异常高表达与肺腺癌、乳腺癌、前列腺癌等多种肿瘤的发生、侵袭及药物抵抗密切相关<sup>[17-20]</sup>。CHEN 等<sup>[7]</sup>报道 CKAP2L 通过调控细胞周期促进食管鳞癌细胞增殖并介导化疗耐药;XIONG 等<sup>[17]</sup>发现 CKAP2L 过表达促进肺腺癌细胞侵袭并与不良预后相关;MONTEVERDE 等<sup>[21]</sup>进一步证实 CKAP2L 可与 RNA 聚合酶 II 相互作用,调控转录延伸过程,从而维持癌细胞在药物压力下的

存活。

在本研究中,细胞划痕实验与 CCK-8 细胞增殖实验结果显示,T24/GEM、5637/GEM 细胞的迁移率、增殖率均明显高于亲代细胞,而敲低 CKAP2L 基因的 si-T24/GEM、si-5637/GEM 细胞的迁移率及增殖率均显著下降。这提示 CKAP2L 不仅与化疗耐药相关,同时在维持耐药细胞的活性与迁移方面发挥促进作用<sup>[22]</sup>。CKAP2L 可能通过调控细胞骨架微管动态平衡、加速细胞周期进程及促进细胞有丝分裂,从而赋予肿瘤细胞较强的生长与迁移潜能;其高表达状态可能帮助耐药细胞在药物应激下维持稳态生长与能量代谢平衡,这为膀胱癌化疗后肿瘤复发提供了细胞学基础<sup>[23]</sup>。此外,本研究通过 CCK-8 法评估不同浓度吉西他滨作用下转染后的 T24/GEM、5637/GEM 细胞的存活率,结果显示,敲低 CKAP2L 基因的 si-T24/GEM、si-5637/GEM 细胞分别在  $\geq 5 \mu\text{mol/L}$ 、 $\geq 2.5 \mu\text{mol/L}$  吉西他滨作用下的存活率低于各自空转质粒的耐药细胞(NC-T24/GEM、NC-5637/GEM 细胞),且细胞存活率随着药物浓度升高而呈线性下降。CKAP2L 可能通过调控细胞周期进程、抑制药物诱导的凋亡或增强细胞应激存活能力,使耐药细胞在吉西他滨作用下仍能维持较高的存活率;而其表达下调后,这一稳态被打破,细胞对药物作用的抵抗力显著减弱,从而提高了细胞对吉西他滨的敏感性并部分逆转其耐药表型<sup>[24]</sup>。已有研究表明,CKAP2L 可激活蛋白激酶 B(AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、Janus 激酶(JAK)-信号转导与转录激活子(STAT)等信号通路<sup>[18,25]</sup>,从而促进抗凋亡及代谢适应,这可能是其介导膀胱癌吉西他滨耐药的重要分子基础。另一项研究发现,来源于肿瘤细胞的外泌体 circ\_0001583 可通过 miR-647/CKAP2L 通路促进胶质母细胞瘤细胞的增殖与迁移<sup>[26]</sup>。本研究结果显示,CKAP2L mRNA 及蛋白相对表达量在吉西他滨耐药膀胱癌细胞株(T24/GEM、5637/GEM)中显著上调,而在亲本细胞中 CKAP2L mRNA 及蛋白相对表达量较低。这一结果提示,CKAP2L 在膀胱癌耐药表型的维持中发挥了促进作用,可能是导致吉西他滨疗效下降的重要分子环节。以上表明,CKAP2L 高表达可能是膀胱癌细胞发生吉西他滨耐药的重要分子基础,而抑制其表达可恢复膀胱癌细胞的化疗敏感性,进一步支持 CKAP2L 在耐药形成中的核心调控作用。

综上所述,CKAP2L 在吉西他滨耐药膀胱癌 T24、5637 细胞中高表达,敲低 CAKP2L 基因后抑制了膀胱癌细胞的增殖和迁移,改善了膀胱癌对吉西他滨的敏感性,提示 CKAP2L 可能成为膀胱癌化疗增敏的潜在靶点。未来通过深入研究 CKAP2L 相关信号网络及调控机制,有望为膀胱癌吉西他滨耐药的逆转提供新的思路和策略<sup>[27]</sup>。

## 参考文献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2022[J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(1): 7-33.
- [2] LOBO N, AFFERRI L, MOSCHINI M, et al. Epidemiology, screening and prevention of bladder cancer[J]. *Eur Urol Oncol*, 2022, 5(6): 628-639.
- [3] OOSTERLINCK W, DECAESTECKER K. Update on early instillation of chemotherapy after transurethral resection of non-muscle-invasive bladder cancer[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2018, 18(5): 437-443.
- [4] KAWAHARA I, YOSHINO H, FUKUMOTO W, et al. Targeting metabolic reprogramming to overcome drug resistance in advanced bladder cancer: insights from gemcitabine- and cisplatin-resistant models [J]. *Mol Oncol*, 2024, 18(9): 2196-2211.
- [5] DU W Z, TU S, ZHANG W X, et al. UPP1 enhances bladder cancer progression and gemcitabine resistance through AKT[J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(4): 1389-1409.
- [6] KWON H, JOH J Y, HONG K. Human CKAP2L shows a cell cycle-dependent expression pattern and exhibits microtubule-stabilizing properties [J]. *FEBS Open Bio*, 2024, 14(9): 1526-1539.
- [7] CHEN W H, WANG Y, WANG L F, et al. CKAP2L promotes esophageal squamous cell carcinoma progression and drug-resistance by modulating cell cycle[J]. *J Oncol*, 2022, 2022: 2378253.
- [8] LIU Z, ZHANG J, SHEN D Y, et al. Prognostic significance of CKAP2L expression in patients with clear cell renal cell carcinoma[J]. *Front Genet*, 2022, 13: 873884.
- [9] 张阳阳, 王磊, 胡容琤, 等. 高通量测序分析吉西他滨化疗耐药复发性膀胱癌的核心基因[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2024, 39(10): 867-870.
- [10] HUANG C S, YU D S, JIANG S S, et al. Extracellular vesicle-mediated regulation of H3C14 contributes to gemcitabine resistance in bladder cancer[J]. *J Extracell Vesicles*, 2025, 14(11): e70179.
- [11] DYRSKJØT L, HANSEL D E, EFSTATHIOU J A, et al. Bladder cancer[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2023, 9(1): 58.
- [12] LOPEZ-BELTRAN A, COOKSON M S, GUERCIO B J, et al. Advances in diagnosis and treatment of bladder cancer[J]. *BMJ*, 2024, 384: e076743.
- [13] ROUMIGUIE M, BLACK P C. Sequential gemcitabine plus docetaxel is the standard second-line intravesical therapy for BCG-unresponsive non-muscle-invasive bladder cancer: pro [J]. *Eur Urol Focus*, 2022, 8(4): 1117-1120.
- [14] STEINBERG R L, PACKIAM V T, THOMAS L J, et al. Intravesical sequential gemcitabine and docetaxel versus bacillus calmette-guerin plus interferon in patients with recurrent non-muscle-invasive bladder cancer following a single induction course of BCG[J]. *Urol Oncol*, 2022, 40(1): 9. e1-9. e7.
- [15] 宁振, 王阿曼, 刘基巍, 等. 泛素特异性肽酶 10 在胰腺癌吉西他滨耐药中的作用及其机制研究[J]. *中华消化外科杂志*, 2016, 15(6): 591-599.
- [16] TSUCHIHARA K, LAPIN V, BAKAL C, et al. Ckap2 regulates aneuploidy, cell cycling and cell death in a p53-dependent manner[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(15): 6685-6691.
- [17] XIONG G S, LI L Y, CHEN X B, et al. Up-regulation of CKAP2L expression promotes lung adenocarcinoma invasion and is associated with poor prognosis[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 1171-1180.
- [18] CHEN F, CHEN L, JIN X M, et al. CKAP2L, transcriptionally inhibited by FOXP3, promotes breast carcinogenesis through the AKT/mTOR pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2022, 412(2): 113035.
- [19] LI Y F, TSAI W C, CHOU C H, et al. CKAP2L knock-down exerts antitumor effects by increasing miR-4496 in glioblastoma cell lines [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1): 197.
- [20] LI Q, YAN M, WANG C H, et al. CKAP2L, a crucial target of miR-326, promotes prostate cancer progression [J]. *BMC Cancer*, 2022, 22(1): 666.
- [21] MONTEVERDE T, SAHOO S, LA MONTAGNA M, et al. CKAP2L promotes non-small cell lung cancer progression through regulation of transcription elongation [J]. *Cancer Res*, 2021, 81(7): 1719-1731.
- [22] 杨欣宇, 杨阳, 王立娟. 罗哌卡因抑制膀胱癌 J82 细胞增殖、迁移及侵袭的分子机制研究[J]. *检验医学与临床*, 2024, 21(21): 3195-3200.
- [23] ZHANG Y, LIU S, WU C, et al. Exosomal circ\_0001583 drives glioblastoma cell advancement through the miR-647/CKAP2L pathway[J]. *Mol Neurobiol*, 2025, 62(8): 10687-10706.
- [24] LU B, LI H, DENG D, WANG Y. PLK1 inhibition enhances gemcitabine-induced apoptosis through PLK1-dependent ERK1/2-Bim and AKT1/Noxa signals in pancreatic cancer cells[J]. *Med Oncol*, 2025, 42(11): 508.
- [25] SHI Y Q, XIONG X Y, SUN Y, et al. IGF2BP2 promotes ovarian cancer growth and metastasis by upregulating CKAP2L protein expression in an m6A-dependent manner[J]. *FASEB J*, 2023, 37(10): e23183.
- [26] CUPRYCH-BELTER M, ŁUPICKA-SŁOWIK A, ANISI-EWICZ A, et al. Distinct adaptive strategies to cisplatin, vinblastine and gemcitabine in a panel of chemoresistant bladder cancer cell lines [J]. *Cancer Drug Resist*, 2025, 8: 49.
- [27] YANG E, JI L, ZHANG X, et al. Identification of a novel mesenchymal stem cell-related signature for predicting the prognosis and therapeutic responses of bladder cancer [J]. *Stem Cells Int*, 2024, 2024: 6064671.