文章编号:1000-5404(2009)22-2199-03

论著

稳定过表达 Wnt5a 对 K562 细胞生物学性状的影响

牛长春[1],司维柯[1],李 军[1],赵 辰[2],丁 伟[1],李招权[1],潘 静[1],赵 宸[1] (第三军医大学:[1]医学检验系临床血液学教研室,[2]学员旅12队,重庆 400038)

摘 要:目的 构建稳定过表达 Wnt5a 的 K562 细胞株,并观察稳定过表达 Wnt5a 对 K562 细胞生物学性状的影响。**方法** 构建质粒 pSEB-Wnt5a;包装得到含有逆转录病毒的上清,感染 K562 细胞,筛选出感染成功的细胞;Western blot 检测蛋白的表达;细胞计数、瑞氏染色、透射电子显微镜观察对细胞生物学性状的影响。**结果** 成功构建了质粒 pSEB-Wnt5a;筛选得到了感染成功的细胞;感染 pSEB-Wnt5a 逆转录病毒的 K562 细胞 Wnt5a 蛋白表达水平明显高于感染空病毒载体的细胞;与 K562-vector 细胞相比,K562-Wnt5a 细胞的增殖被明显抑制,并出现了向成熟分化的形态学特征。**结论** 成功构建了稳定过表达 Wnt5a 的 K562 细胞株;稳定过表达 Wnt5a 抑制 K562 细胞增殖并可以促进其向成熟分化,提示 Wnt5a 在白血病发生中可能起到抑癌基因的作用。

关键词: Wnt5a;K562 细胞;逆转录病毒;细胞增殖
中图法分类号: R394.2;R730.23;R733.7 **文献标识码:** A

Effects of stable Wnt5a overexpression on biological characters of K562 cells

NIU Chang-chun[1], SI Wei-ke[1], LI Jun[1], ZHAO Chen[2], DING Wei[1], LI Zhao-quan[1], PAN Jing[1], ZHAO Chen[1] ([1]Department of Clinical Hematology, College of Medical Laboratory, [2]12th Student Team, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct the K562 cells that stably overexpresses Wnt5a protein, and to observe the effects of stable Wnt5a overexpression on the biological characters of K562 cells. **Methods** The plasmid vector pSEB-Wnt5a was constructed. K562 cells were infected by the retrovirus supernatant obtained through packaging, and the infected K562 cells were screened out. The expression of Wnt5a protein was examined with Western blot analysis. Cell counting, Wright's staining and transmission electron microscopy (TEM) were used to observe the effects of Wnt5a overexpression on the biological characters of K562 cells. **Results** The plasmid pSEB-Wnt5a was constructed successfully, and the K562 cells infected by pSEB-Wnt5a retrovirus were screened out. Expression of Wnt5a protein in the K562 cells infected by pSEB-Wnt5a retrovirus was significantly higher than that in K562-vector cells. Compared with K562-vector cells, the proliferation of K562-Wnt5a cells was inhibited obviously, and the differentiation phenotype of K562-Wnt5a cells appeared. **Conclusion** The K562 cells that stably overexpresses Wnt5a protein are constructed successfully. Stable Wnt5a overexpression inhibits the proliferation of K562 cells and induces the differentiation of K562 cells, and it implies that Wnt5a is an antitumor factor in the pathogenesis of leukemia.

Key words: Wnt5a; K562 cells; retroviridae; cell proliferation; cell differentiation

Wnt5a 蛋白是一种分泌型的糖蛋白,属于 Wnt 家族。Wnt5a 在不同类型的肿瘤中发挥着不同的作用,它能促使乳腺癌、黑色素瘤、胰腺癌等肿瘤生长甚至可促使肿瘤的侵袭[1],而在甲状腺肿瘤、结肠直肠癌等肿瘤中则可能发挥着抑制肿瘤的作用[2]。我们在前期研究中使用含有 Wnt5a 的条件培养液处理 K562 细胞,但是条件培养液的方法存在一些不利因素,如成分复杂、影响因素较多、制备繁琐等[3]。本研究通过逆转录病毒建立稳定过表达 Wnt5a 的 K562 细胞株,观察稳定过表达 Wnt5a 对 K562 细胞生物学性状的影响,为进一步研究 Wnt5a 在白血病中的作用与机制打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pAdtrack-Wnt5a、pSEB-flag、pCL-Ampho 由美国芝加哥大学何通川教授馈赠。工具酶、核酸回收纯化试剂盒、pyrobest

基金项目: 国家自然科学基金(30973386)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30973386)
作者简介: 牛长春,男,河南省林州市人,硕士研究生,技师,主要从事白血病发生机制方面的研究。电话:(023)68752311, E-mail: bright_star2000@sina.com
通信作者: 司维柯,电话:(023)68752312, E-mail: weikesi@yahoo.com.cn
收稿日期: 2009-04-14;**修回日期:** 2009-05-25

DNA 多聚酶购买自 TaKaRa 公司,脂质体 2000(Lipofectamine 2000)、灭瘟素(Blasticidin)购自 Invitrogen 公司,海美溴铵(Hexadimethrine bromide)购自 Sigma 公司,质粒普通纯化试剂盒与去内毒素纯化试剂盒购自 Omega 公司,RPMI1640、DMEM 培养基购自 Gibco 公司,小牛血清购自杭州四季青生物材料研究所,Wnt5a 基因插入序列引物由 Invitrogen 公司合成,DNA 标准购自天根生物,蛋白酶抑制剂 Cocktail(Roche 公司),Wnt5a 抗体(Santa Cruz),GAPDH 内参抗体(上海康成生物技术有限公司),HRP 标记羊抗兔二抗、增强化学发光显色试剂盒(Pierce 公司)。人白血病细胞株 K562 细胞、HEK293 细胞为本实验室保存,大肠杆菌 DH5α 感受态由本实验室制备。

1.2 方法

1.2.1 质粒的构建 以质粒 pAdtrack-Wnt5a 为模板,使用含有酶切位点的引物进行 PCR 扩增,Wnt5a 基因插入序列上游引物(包括 *Bgl* Ⅱ 酶切位点和 Kozak 序列)为:5′-GGAAGATCTGCCACCATGGCCATGAAGAAGCCCATTG-3′,下游引物(包括 *Sal* Ⅰ 酶切位点)5′-ACGCGTCGACCTATTTGCACACGAACTGATCCAC-3′,下划线部分为酶切位点。使用试剂盒回收 PCR 产物,对 pSEB-flag 和 PCR 回收产物进行酶切、纯化,T_4 连接酶进行连接,转化 DH5α 感受态细菌,涂含有抗生素氨苄西林的琼脂平板,筛选抗性细菌克隆,扩菌,提取质粒,进行酶切、测序鉴定。鉴定正确后,命名为 pSEB-Wnt5a。

1.2.2 逆转录病毒的包装 使用去内毒素质粒提取纯化试剂盒纯化质粒。将质粒 pCL-Ampho、pSEB-Wnt5a(或 pSEB-flag)与 Lipofectamine 2000 按比例混合后,加入到不含血清的 DMEM 培养基中,此培养基用于培养处于对数生长期的 HEK293 细胞,于 6 h 后更换为含有 10% 小牛血清的 DMEM 完全培养基,分别于 36、60、84、108 h 收集含有逆转录病毒的上清液,低速离心 5 min,去除细胞残渣,浓缩病毒,-80 ℃保存备用。

1.2.3 感染 K562 细胞 使用以上所得上清液置换培养处于对数生长期的 K562 细胞的培养液(添加海美溴铵最终浓度为 12 μg/ml),反复感染 4 次后,换为含有 10% 小牛血清的 RPMI1640 完全培养基,培养 24 h 后加入灭瘟素(最终浓度为 40 μg/ml),培养 6 d 后更换为含有 10% 小牛血清的 RPMI1640 完全培养基,未感染逆转录病毒的细胞已全部死亡,得到阳性的抗性细胞克隆。感染空病毒载体的 K562 细胞命名为 K562-vector 细胞(对照组),感染含 Wnt5a 逆转录病毒的 K562 细胞命名为 K562-Wnt5a 细胞(实验组)。

1.2.4 Western blot 鉴定 Wnt5a 蛋白表达 离心细胞,使用 cocktail 和细胞裂解液处理细胞得到蛋白溶液,SDS-PAGE 凝胶电泳,Bio-Rad 系统半干转至 PADF 膜,然后对膜进行漂洗,封闭,加入 Wnt5a 蛋白抗体,4 ℃过夜,漂洗,加入 HRP 标记的二抗,漂洗,加入显色液后使用美国 Bio-Rad 凝胶成像分析仪进行化学发光检测并采集图像。

1.2.5 台盼蓝活细胞染色计数检测细胞增殖 取处于对数生长期的 K562-vector 细胞和 K562-Wnt5a 细胞均按 1.6×10^5 个/孔接种于 24 孔板,每组均设 6 个复孔,连续培养 7 d,于第 3、5、7 天取细胞经台盼蓝染色后,用 Neubauer 计数板进行细胞计数,并计算平均值,以生长时间为横坐标,细胞数量($\times10^5$ 个)为纵坐标绘图。

1.2.6 检测细胞形态学变化 收集 K562 细胞离心 5 min,弃上清,用残留于管底的少量液体充分重悬细胞,涂片,晾干,进行瑞氏染色,染液需完全覆盖细胞涂片,染色 5 ~ 10 min,流水冲洗,晾干,油镜下观察细胞形态。同时收集 K562 细胞,离心 10 min(1 500 r/min),去上清,加入细胞固定液,进行电镜分析。

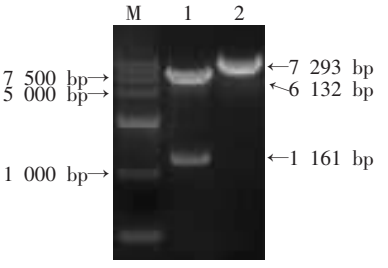
1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 pSEB-Wnt5a 重组质粒的鉴定

使用限制性内切酶 *Sal* Ⅰ 与 *Bgl* Ⅱ 进行酶切,使用双酶切的两条线性化条带应分别为 6 132 bp 和 1 161 bp,单酶切线性条带应为 7 293 bp。酶切结果见图 1。质粒送上海生工生物工程技术服务有限公司测序,与预期结果相符合。

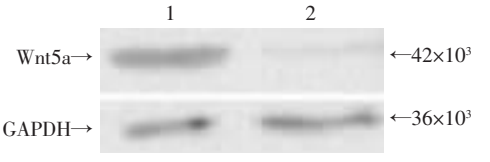


M: DNA 标准; 1:限制性内切酶 *Sal* Ⅰ 和 *Bgl* Ⅱ 双酶切重组质粒 pSEB-Wnt5a; 2:限制性内切酶 *Sal* Ⅰ 单酶切重组质粒 pSEB-Wnt5a

图 1 重组质粒 pSEB-Wnt5a 酶切与双酶切鉴定

2.2 Western blot 检测 Wnt5a 蛋白水平表达

感染 Wnt5a 逆转录病毒后,K562-Wnt5a 细胞 Wnt5a 蛋白表达水平明显高于对照组 K562-vector 细胞(图 2)。Quantity One 定量分析蛋白条带,计算 Wnt5a 与 GAPDH 相对光密度的比值,感染 Wnt5a 逆转录病毒组(1.32 ± 0.22)高于对照组(0.11 ± 0.05)($P<0.05$)。

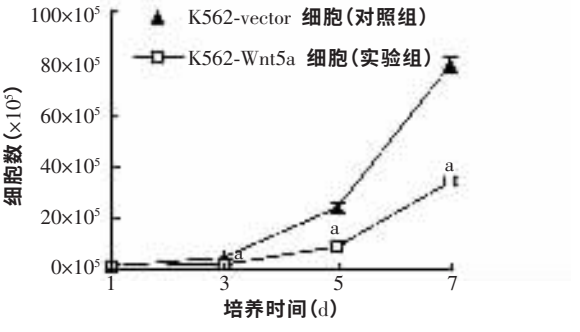


1:K562-Wnt5a 细胞; 2:K562-vector 细胞

图 2 Western blot 检测感染逆转录病毒 K562 细胞 Wnt5a 蛋白表达

2.3 K562-Wnt5a 细胞株增殖的改变

台盼蓝活细胞染色计数结果见图 3。随着细胞培养时间的延长,与对照组相比,实验组有明显抑制细胞增殖的现象($P<0.05$)。但是在有限的传代次数中观察传代能力没有减低。

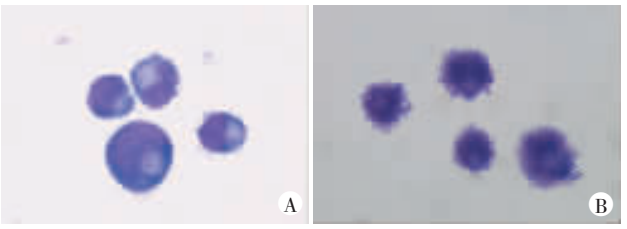


a: $P<0.05$, 与对照组比较

图 3 Wnt5a 对人白血病细胞株 K562 增殖的影响

2.4　瑞氏染色检测细胞形态学变化

细胞感染逆转录病毒后,经过 6 d 的药物筛选,发现约 30% 的 K562 细胞出现形态学改变。经瑞式染色,K562-Wnt5a 细胞与 K562-vector 细胞相比,形态变化明显,细胞大小不均,边缘整齐,出现了成熟分化的特征,如核浆比变小,细胞质染色变浅,出现非特异性颗粒,细胞核聚集向细胞的一侧(图 4)。

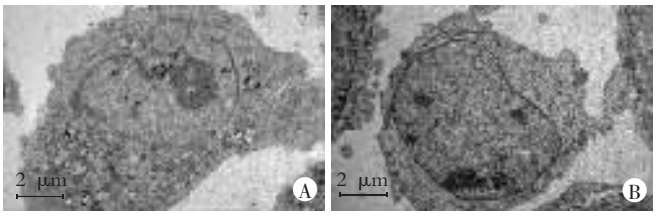


A: K562-Wnt5a 细胞; B: K562-vector 细胞

图 4　瑞氏染色观察 Wnt5a 对于 K562 细胞形态学的影响　(×1 000)

2.5　电子显微镜检测细胞形态学变化

电镜下,K562-Wnt5a 细胞与 K562-vector 细胞相比,形态变化显著,细胞核偏向一侧,常染色质较多,细胞质内细胞器发达,线粒体较多,有溶酶体出现(图 5),表明出现了成熟分化的表型。



A: K562-Wnt5a 细胞; B: K562-vector 细胞

图 5　透射电镜观察 Wnt5a 对 K562 细胞形态学的影响

3　讨论

近年来 Wnt5a 及其信号通路在血液干细胞、血液肿瘤的增殖与分化[3-7]中发挥的作用受到越来越多的重视。Wnt5a 在急性淋巴细胞白血病、髓系白血病患者的标本中均表达下调或缺失;在白血病细胞株 K562 细胞、HL-60 细胞中也表达下降[3,7];使用基因敲除技术得到的 Wnt5a 杂合子小鼠可自发生成 B 细胞淋巴瘤或慢性髓系白血病[4]。这些均表明 Wnt5a 表达的下调在白血病的发生中起着重要的促进作用。

在白血病的研究中,K562 细胞是一种常用的研究髓系白血病的细胞模型。在 K562 细胞中,Wnt5a 基因由于启动子的甲基化而表达水平下降[8]。在前期研究中我们采用重组腺病毒 AdWnt5a 感染 CHO 细胞,收集 Wnt5a 条件培养液,处理 K562 细胞,发现外源性 Wnt5a 可抑制 K562 细胞生长并可诱导其分化,但是使用条件培养液的方法存在很多缺点。为了进一步确定和研究 Wnt5a 与白血病发生的关系和机制,我们使用逆转录病毒作为载体,可以把外源的启动子和包括信号肽和功能区 Wnt5a 基因整合到细胞的基因组中,从而能够稳定的表达内源性 Wnt5a,便于 Wnt5a 蛋白功能的研究;另外,本实验室袁媛等[3]所用腺病毒中 Wnt5a 序列与我们所用的 Wnt5a 基因插入序列相同,并且在感染腺病毒的 CHO 细胞培养上清中检测到 Wnt5a 蛋白的表达,因此本实验只对 K562 细胞 Wnt5a 总蛋白表达水平进行检测,没有检测上清中蛋白的表达。我们成功的构建了稳定过表达 Wnt5a 的 K562 细胞株。以此细胞为模型,观察到稳定过表达 Wnt5a 对 K562 细胞生长的影响:稳定过表达 Wnt5a 抑制了 K562 细胞的生长速度,表明稳定过表达 Wnt5a 能够一定程度上调节白血病细胞增殖的失控;稳定过表达 Wnt5a 还促使 K562 细胞出现了核异型性降低等向成熟细胞分化的现象,表明过表达 Wnt5a 可以通过细胞信号传导途径削弱 K562 细胞的自我更新能力,重新启动细胞分化基因,从而激活 K562 细胞的潜在分化能力[9]。本研究表明 Wnt5a 表达上调可以抑制白血病细胞的生长,并可逆转白血病细胞向成熟方向分化。提示 Wnt5a 在白血病中可能是一种抑癌因子。

本研究结果为进一步研究白血病诊断和预后判断指标以及 Wnt5a 作为基因治疗靶点奠定了基础,对深入研究 Wnt5a 在白血病发生中的机制具有重要的理论意义。过表达 Wnt5a 促进 K562 细胞诱导分化的机制有待进一步的研究。

参考文献:

[1] Ripka S, Konig A, Buchholz M, *et al*. WNT5A-target of CUTL1 and potent modulator of tumor cell migration and invasion in pancreatic cancer[J]. Carcinogenesis, 2007, 28(6): 1178 - 1187.

[2] Ying J, Li H, Yu J, *et al*. WNT5A exhibits tumor-suppressive activity through antagonizing the Wnt/beta-catenin signaling, and is frequently methylated in colorectal cancer[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(1): 55 - 61.

[3] 袁　媛, 李招权, 司维柯, 等. Wnt5a 与髓细胞白血病发生关系的研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(21): 2056 - 2059.

[4] Liang H, Chen Q, Coles A H, *et al*. Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue[J]. Cancer Cell, 2003, 4(5): 349 - 360.

[5] Murdoch B, Chadwick K, Martin M, *et al*. Wnt-5A augments repopulating capacity and primitive hematopoietic development of human blood stem cells *in vivo*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(6): 3422 - 3427.

[6] Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Cordeu L, *et al*. WNT5A, a putative tumour suppressor of lymphoid malignancies, is inactivated by aberrant methylation in acute lymphoblastic leukaemia[J]. Eur J Cancer, 2007, 43(18): 2736 - 2746.

[7] 邓　刚, 司维柯, 潘　静, 等. Wnt5a 基因在淋巴细胞系恶性肿瘤中的表达分析[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(19): 1832 - 1835.

[8] Ying J, Li H, Chen Y W, *et al*. WNT5A is epigenetically silenced in hematologic malignancies and inhibits leukemia cell growth as a tumor suppressor[J]. Blood, 2007, 110(12): 4130 - 4132.

[9] Mikesch J H, Steffen B, Berdel W E, *et al*. The emerging role of Wnt signaling in the pathogenesis of acute myeloid leukemia[J]. Leukemia, 2007, 21(8): 1638 - 1647.

(编辑　汪勤俭)