文章编号:1000-5404(2010)18-1945-04

论著

ITGB4BP 对 Wnt/β-catenin 信号通路活性的下调作用

赖庆梧[1,2],彭 旭[2],谭江琳[2],张小容[2],胡小红[2],张 毅[1],罗高兴[2],吴 军[2] (510006 广州,华南理工大学生物科学与工程学院[1];400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,疾病蛋白质组学重庆市市级重点实验室[2])

【摘要】 **目的** 探讨 β4 整合素结合蛋白 ITGB4BP 对 Wnt/β-catenin 信号通路的影响。**方法** 将对照组空载体 pCMV-3B 质粒和实验组 pCMV-ITGB4BP 质粒分别转染至 HEK293 细胞中,用 Western blot 和激光共聚焦技术检测细胞中 β-catenin 含量的变化,用含 TCF/LEF 启动子的荧光素酶 TOPFlash 质粒和内参 pRL-TK 质粒共转染对照组和实验组的 HEK293 细胞,用荧光素酶活性分析法检测 ITGB4BP 转染后 HEK293 细胞 TCF/LEF 活性的变化。设不转染质粒组为正常组,对照组和实验组均分别设未加 LiCl 组和加 LiCl 组。**结果** Western blot 检测结果:与正常组或对照组比较,实验组细胞 β-catenin 表达显著减少($P<0.05$)。加 LiCl 之后,β-catenin 的表达显著增强($P<0.05$),与未加有 LiCl 的正常组或对照组比较,加 LiCl 的实验组细胞内 β-catenin 仍有较高的表达,但差异无显著性。激光共聚焦技术观察:实验组 β-catenin(绿色荧光)表达较对照组降低。加 LiCl 之后,β-catenin(绿色荧光)表达增强,与未加 LiCl 的对照组相比,加 LiCl 的实验组仍有较强的荧光强度。荧光素酶活性分析法检测:实验组的荧光素酶活性较对照组显著降低($P<0.05$)。LiCl 作用之后,Wnt/β-catenin 信号通路活性明显增强($P<0.05$),与未加 LiCl 的对照组相比,加 LiCl 的实验组仍有较强的荧光素酶活性($P<0.05$)。**结论** ITGB4BP 可以下调 Wnt/β-catenin 信号通路的活性。

【关键词】 β4 整合素结合蛋白;Wnt/β-catenin 信号通路;氯化锂
【中图法分类号】 R394-33;R341;R394.3 **【文献标志码】** A

ITGB4BP downregulates activity of Wnt/β-catenin signaling pathway in HEK293 cells

Lai Qingwu[1,2], Peng Xu[2], Tan Jianglin[2], Zhang Xiaorong[2], Hu Xiaohong[2], Zhang Yi[1], Luo Gaoxing[2], Wu Jun[2] ([1]School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong Province, 510006; [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burn Research, Chongqing Key laboratory of Proteomics of Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of integrin beta 4 binding protein (ITGB4BP) on the Wnt/β-catenin signaling pathway. **Methods** Human embryonic kidney cell line HEK293 was transfected with blank vector plasmid pCMV-3B as the control group and plasmid pCMV-ITGB4BP as the experiment group, respectively. β-catenin expression was checked by Western blot analysis and laser confocal microscopy. After the 2 groups were cotransfected with plasmid TOPFlash containing promoter TCF/LEF and plasmid pRL-TK as the internal control, the TCF/LEF activity was analyzed by luciferase activity assay. The group transfected with no other plasmid was set as the normal group. Both the control group and the experiment group were treated with LiCl (40 mmol/L) or not in 32 h after transfection. **Results** Western blotting showed that, as compared with the normal group and the control group, β-catenin level was decreased significantly in the experiment group ($P<0.05$), but the level was increased significantly after treatment with LiCl ($P<0.05$). As compared with the normal group and the control group without treated with LiCl, β-catenin level was still highly expressed in the experiment group treated with LiCl, but not increased significantly. Laser confocal microscopy showed that the expression of β-catenin (flagged with green fluorescence) was decreased compared with the control group. After treatment with LiCl, the expression of β-catenin was increased. As compared with the control group without treated with LiCl, the fluorescence intensity of β-catenin was strengthened in the experiment group trea-

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(30672174,30973116);创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室自主研究课题(SKLZZ200808,SKLZZ200820)
【通信作者】 吴 军,E-mail:junwupro@126.com
罗高兴,E-mail:logxw@yahoo.com

ted with LiCl. Luciferase activity assay showed that, as compared with the control group, the TCF/LEF activity was reduced significantly ($P<0.05$) in the experiment group. After treatment with LiCl, the activity of Wnt/β-catenin signaling pathway was strengthened significantly ($P<0.05$). As compared with the control group without treated with LiCl, the activity of luciferase was strengthened in the experiment group treated with LiCl ($P<0.05$). **Conclusion** ITGB4BP can downregulate the activity of Wnt/β-catenin signaling pathway.

[Key words] integrin beta 4 binding protein; Wnt/β-catenin signaling pathway; lithium chloride

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China(30672174,30973116) and the Self-research Programs of the State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury(SKLZZ200808,SKLZZ200820). Corresponding author: Wu Jun, E-mail: junwupro@126.com; Luo Gaoxing, E-mail: logxw@yahoo.com

增生性瘢痕(hypertrophic scar, HTS)是由于皮肤受热力或者其他因素损伤后,胶原纤维和其他细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积所致[1]。ECM的过度沉积导致纤维化的形成,常常给患者美观和功能方面造成严重损害。Wnt信号通路参与调控细胞的分化、癌变、凋亡等生理病变过程[2]。近年研究[3]表明,Wnt信号通路的异常活化与皮肤纤维化的发生与进展关系密切。ITGB4BP又名$p27^{BBP}$、真核启动因子6(eIF6),能与整合素亚单位β4(ITGB4)胞浆区发生相互作用[4]。本课题组前期研究[5]表明,ITGB4BP可以调控皮肤成纤维细胞的胞外基质生成,为深入研究其机制,本研究探讨了ITGB4BP对Wnt/β-catenin信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人胚胎肾细胞株HEK293和pCMV-3B质粒由第三军医大学西南医院全军烧伤研究所移植免疫组保存;pCMV-ITGB4BP质粒由我室前期实验构建;TOPFlash质粒及pRL-TK质粒购置美国Promega公司。

质粒提取试剂盒购自Promega公司,各种限制性内切酶购自美国NEB、MBI公司,T_4 DNA连接酶购自日本TaKaRa公司,脂质体Lipofectamine™ 2000转染试剂盒购自美国Invitrogen公司,达尔伯克改良伊氏培养基(DMEM)及新生牛血清(FBS)购自美国HyClone公司,Dual-Luciferase Reporter Assay System购自Promega公司,鼠抗人β-catenin单克隆抗体、羊抗鼠IgG购自Santa Cruz公司,FITC-羊抗鼠IgG购置北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 设定不转染质粒组为正常组,转染pCMV-ITGB4BP质粒组为实验组,转染pCMV-3B质粒组为对照组。

1.2.2 Western blot检测β-catenin的表达[6] 用DMEM培养基调整HEK293细胞密度为1×10^5/ml,以每孔2 ml接种至6孔板中。常规培养,待细胞融合度达到80%~90%时,按照Lipofectamine™ 2000说明书,将pCMV-3B质粒和pCMV-ITGB4BP质粒分别转染HEK293细胞。为探讨LiCl对ITGB4BP作用的影响,在转染细胞32 h后,加入终浓度为40 mmol/L的LiCl浓液。继续培养细胞16 h后收集细胞。

SDS上样缓冲液裂解细胞后,用紫外分光光度计进行蛋白定量。测得浓度后,各取30 μg上样,进行SDS-PAGE/Western blot,一抗为鼠抗人β-catenin单克隆抗体(1∶100)、二抗为FITC-羊抗鼠IgG(1∶100),最后加入化学发光试剂显色,于Bio-Rad凝胶成像仪显影。用Quantity One软件分析谱带灰度值,β-catenin蛋白的表达结果用β-catenin值与β-actin值的相对比值表示。

1.2.3 激光共聚焦技术观察β-catenin在细胞内的表达情况[7] 将清洁消毒的盖玻片放入6孔板细胞培养孔中,同上进行细胞接种与转染。

转染48 h后细胞爬片用温(37 ℃)PBS轻柔洗3遍;每孔加1 ml 4%多聚甲醛,室温固定15 min;去掉多聚甲醛,PBS轻柔洗3遍;每孔加0.3% Triton X-100 1 ml,室温30 min;去掉Triton,PBS轻柔洗3遍;每孔加1 ml 5% BSA,室温封闭30 min;将爬片捞起置于湿盒,对应好顺序,每孔爬片加100 μl鼠抗人β-catenin抗体(1∶100稀释);将湿盒放于4 ℃过夜;将爬片重新放回6孔板,PBS轻柔洗3遍;避光每孔爬片加100 μl FITC-山羊抗小鼠IgG,室温放置1 h;将爬片重新放回6孔板,PBS轻柔洗3遍;每孔加入100 μl DAPI(1∶1 000稀释);避光5 min;PBS轻柔洗3遍;在载玻片上加一小滴封片剂,将盖玻片反扣于载玻片上,激光共聚焦观察。FITC是标记在二抗上的绿色荧光染料,DAPI是染核仁的蓝色荧光染料。

1.2.4 荧光素酶报告系统检测ITGB4BP对Wnt/β-catenin信号通路的影响[8] 用DMEM培养基调整HEK293细胞密度为1×10^5/ml,以每孔500 μl接种至24孔板中,常规培养。待细胞融合度达到80%~90%时,按照Lipofectamine™2000说明书,将pCMV-3B质粒和pCMV-ITGB4BP质粒分别转染HEK293细胞。同时将TOPFlash质粒和pRL-TK质粒共转染至对照组和实验组。为探讨LiCl对ITGB4BP作用的影响,在转染细胞32 h后,加入终浓度为40 mmol/L的LiCl浓液。

转染48 h后细胞用温PBS轻柔洗2次,最后一次吸尽残留液体;每孔加入200 μl配制好的被动裂解液(PLB,1∶4配制);用移液器反复吹打至充分裂解,放于摇床室温摇动15 min以上;将裂解后悬液转移至1.5 ml EP管中,4 ℃ 12 000 r/min离心3 min;吸上清10 μl至对应干净1.5 ml EP管中,4 ℃ 12 000 r/min离心1 min;配制LAR和STOP液体,荧光素酶活性检测仪检测Luc和Rel值。用TOPFlash萤火虫荧光素酶活性/pRL-TK海肾荧光素酶活性的相对比值(Ratio)来说明T细胞因子/淋巴细胞增强因子(T cell factor/lymphoidenhancer factor,TCF/LEF)转录活性的强弱。

1.3 统计学分析

实验重复 3 次。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 16.0 统计软件行单因素方差分析。

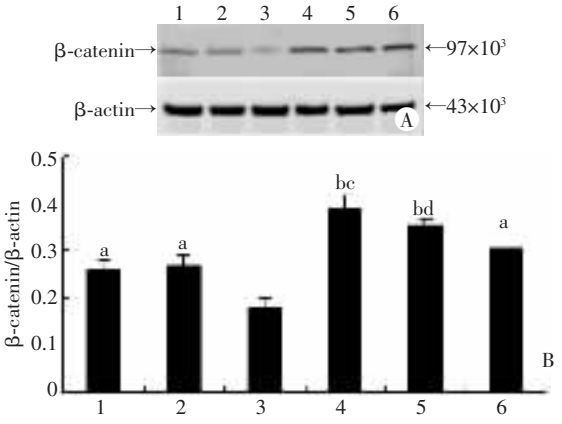
2 结果

2.1 Western blot 检测 ITGB4BP 对细胞内 β-catenin 水平的影响

如图 1 所示，pCMV-ITGB4BP 质粒转染细胞 48 h 之后，与正常组或对照组相比，实验组细胞内 β-catenin 的表达显著减少（$P<0.05$）。加 LiCl 之后，实验组 β-catenin 的表达显著增强（$P<0.05$），但与加 LiCl 的正常组或对照组相比，加 LiCl 的实验组细胞内 β-catenin 的表达显著减少（$P<0.05$），与未加有 LiCl 的正常组或对照组相比，加 LiCl 的实验组细胞内 β-catenin 仍有较高的表达，但无显著差异。

2.2 激光共聚焦技术观察 β-catenin 在细胞内的表达

转染 pCMV-ITGB4BP 后，实验组 β-catenin（绿色荧光）表达较对照组降低。加 LiCl 之后，对照组和实验组较未加 LiCl 对照组、实验组 β-catenin（绿色荧光）表达增强，但与加 LiCl 的对照组相比，加 LiCl 的实验组的荧光强度明显降低，与未加 LiCl 的对照组相比，加 LiCl 的实验组仍有较强的荧光强度。见图 2。



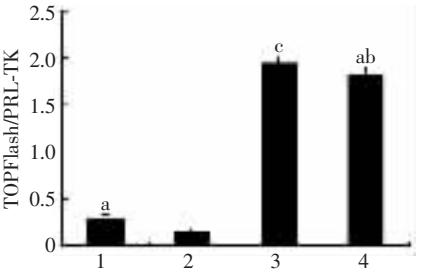
1：正常组；2：对照组；3：实验组；4：加 LiCl 的正常组；5：加 LiCl 的对照组；6：加 LiCl 的实验组

A：Western blot 结果；B：半定量分析结果　a：$P<0.05$，与实验组比较；b：$P<0.05$，与加 LiCl 的实验组比较；c：$P<0.05$，与正常组比较；d：$P<0.05$，与对照组比较

图 1　Western blot 检测 pCMV-ITGB4BP 质粒转染 HEK293 细胞 48 h 后 β-catenin 的变化

2.3 ITGB4BP 对 TCF/LEF 转录活性（Wnt/β-catenin 信号通路活性）的影响

如图 3 所示，转染 pCMV-ITGB4BP 后，实验组的相对比值较转染 pCMV-3B 对照组显著降低（$P<0.05$）。LiCl 作用之后，Wnt/β-catenin 信号通路活性明显增强（$P<0.05$），但与加 LiCl 的对照组相比，加 LiCl 的实验组的相对比值显著降低（$P<0.05$），与未加 LiCl 的对照组相比，加 LiCl 的实验组仍有较强的荧光素酶活性（$P<0.05$）。



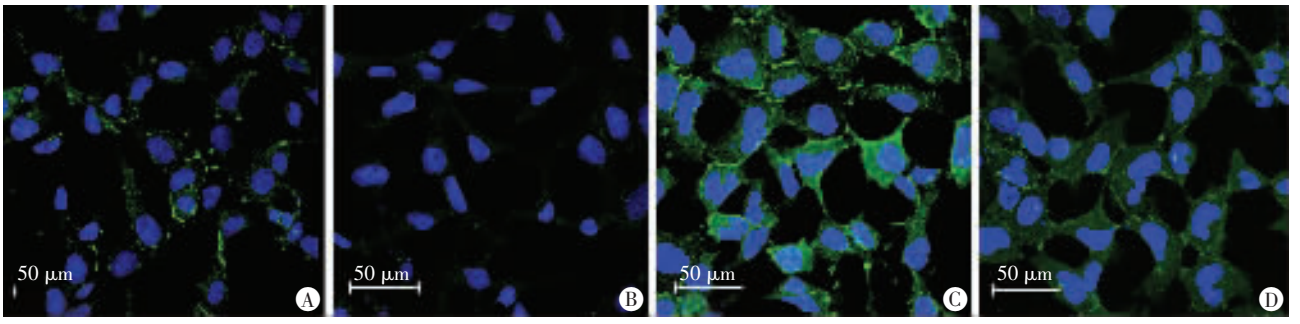
1：对照组；2：实验组；3：加 LiCl 的对照组；4：加 LiCl 的实验组

a：$P<0.05$，与实验组比较；b：$P<0.05$，与加 LiCl 的对照组比较；c：$P<0.05$，与对照组比较

图 3　ITGB4BP 对 HEK293 细胞 TCF/LEF 转录活性的影响

3 讨论

ITGB4BP 普遍表达于上皮、成纤维细胞和肌肉纤维等多种细胞的细胞质和细胞核中，不过其表达水平在新生上皮细胞如癌细胞中为最高[9,10]。在含有 ITGB4 的上皮细胞，ITGB4BP 主要表达于细胞质，并且与 ITGB4 类似富含于半桥粒中，调节中间丝细胞骨架的形成。相反，在缺乏 ITGB4 的细胞内，ITGB4BP 则作为一种核基质蛋白主要表达于胞核，参与核糖体 60S 亚基的装配[11]。Wnt/β-catenin 信号通路参与调控了器官发育，细胞增殖和迁移，细胞分化以及细胞极性，β-catenin 是该通路的关键分子。Wnt 蛋白与 Wnt 配体结合后，启动下游的分子信号通路，促使细胞质内游离 β-catenin 进入核内，与 TCF/LEF 结合，进而启动下游靶基因的表达[12]。本实验中，我们构建了含 TCF/LEF 启动子的萤火虫荧光素酶 TOPFlash 质粒，含



A：对照组；B：实验组；C：加 LiCl 的对照组；D：加 LiCl 的实验组

图 2　激光共聚焦显微镜下观察细胞内 β-catenin 的表达

有海肾荧光素酶基因的质粒 pRL-TK 质粒作为内参，检测 2 种荧光素酶的活性，用 TOPFlash 萤火虫荧光素酶活性/pRL-TK 海肾荧光素酶活性的相对比值(Ratio)，来说明 TCF/LEF 转录活性的强弱，比值越大说明 Wnt/β-catenin 信号通路活性越强。

人胚肾 HEK293 细胞，是一个比较常见的表达研究外源基因的细胞株，与成纤维细胞相比具有较高的转染效率。Ji 等[4] 在果蝇模型中发现在翅翼表达 ITGB4BP 可以调控 Wnt/Wg(wingless)信号通路，导致与无翅型的产生，又在酵母双杂交系统中验证了 ITGB4BP 与 β-catenin 的相互作用，发现 ITGB4BP 抑制了 β-catenin 蛋白的合成。本实验中，我们采用 Western blot、激光共聚焦技术和荧光素酶系统 3 种分析方法，分别从 β-catenin 蛋白水平、细胞定位分布及对 TCF/LEF 转录活性探讨 ITGB4BP 对人源性细胞 HEK293 内 Wnt/β-catenin 信号通路的影响，发现 ITGB4BP 可以显著降低细胞内 β-catenin 的水平、减弱 β-catenin 显示的荧光强度以及显著降低 TCF/LEF 转录活性，3 个结果一致表明 ITGB4BP 可抑制 Wnt/β-catenin信号通路的活性。

Clement-Lacroix 等[13] 在小鼠模型中研究表明 LiCl 可以通过抑制 GSK-3β 的活性，抑制 β-catenin 的降解，进而激活 Wnt 信号通路。本实验为探讨 ITGB4BP 对 LiCl 激活 Wnt/β-catenin 信号通路的影响，在细胞转染质粒 32 h 后，加入一定量的 LiCl，16 h 后观察β-catenin 表达的水平。加 LiCl 后，β-catenin 的表达显著增强，说明 LiCl 可以激活人源性 HEK293 细胞内 Wnt 信号通路，但其转染有 ITGB4BP 质粒的实验组，β-catenin 的表达显著降低，表明 ITGB4BP 能抑制 LiCl 对 β-catenin 的激活，但与未加 LiCl 的对照组相比，加 LiCl 的实验组细胞内仍有较强的 β-catenin 表达，说明 ITGB4BP 能部分抑制 LiCl 对 Wnt/β-catenin 信号通路的激活。

Bayle 等[1] 在皮肤纤维化模型小鼠中发现 Wnt2、Wnt9、Wnt10b 和 Wnt11 基因表达上调，Sato[14] 利用免疫组织化学技术发现人皮肤增生性瘢痕和瘢痕疙瘩组织中 β-catenin 的表达水平上升，表明 Wnt/β-catenin 通路可能参与增生性瘢痕和瘢痕疙瘩的发生。本实验以具有较高转染效率的人源性细胞 HEK293 为细胞模型，发现 ITGB4BP 可以下调 Wnt/β-catenin 信号通路的活性，下一步我们将建立高效转染成纤维细胞的方法，探讨 ITGB4BP 对成纤维细胞 Wnt/β-catenin 信号通路的影响，进而研究 ITGB4BP 抑制皮肤纤维化可能的作用机制。

参考文献：

[1] Bayle J, Fitch J, Jacobsen K, *et al*. Increased expression of Wnt2 and SFRP4 in Tsk mouse skin: role of Wnt signaling in altered dermal fibrillin deposition and systemic sclerosis [J]. J Invest Dermatol, 2008, 128(4): 871-881.

[2] Yamagami T, Molotkov A, Zhou C J. Canonical Wnt signaling activity during synovial joint development [J]. J Mol Histol, 2009, 40(4): 311-316.

[3] Wang J, Jiao H, Stewart T L, *et al*. Improvement in postburn hypertrophic scar after treatment with IFN-alpha2b is associated with decreased fibrocytes [J]. J Interferon Cytokine Res, 2007, 27(11): 921-930.

[4] Ji Y, Shah S, Soanes K, *et al*. Eukaryotic initiation factor 6 selectively regulates Wnt signaling and beta-catenin protein synthesis [J]. Oncogene, 2008, 27(6): 755-762.

[5] 谭江琳，彭旭，袁顺宗，等. β4 整合素结合蛋白调控成纤维细胞胞外基质生成的实验研究[J]. 创伤外科杂志，2009，11(5)：397-401.

[6] Arnsdorf E J, Tummala P, Jacobs C R. Non-canonical Wnt signaling and N-cadherin related beta-catenin signaling play a role in mechanically induced osteogenic cell fate [J]. PLoS One, 2009, 4(4): e5388.

[7] Carter O, Bailey G S, Dashwood R H. The dietary phytochemical chlorophyllin alters E-cadherin and beta-catenin expression in human colon cancer cells [J]. J Nutr, 2004, 134(12 Suppl): 3441s-3444s.

[8] Yang L, Yamasaki K, Shirakata Y, *et al*. Bone morphogenetic protein-2 modulates Wnt and frizzled expression and enhances the canonical pathway of Wnt signaling in normal keratinocytes [J]. J Dermatol Sci, 2006, 42(2): 111-119.

[9] Biffo S, Sanvito F, Costa S, *et al*. Isolation of a novel beta4 integrin-binding protein (p27(BBP)) highly expressed in epithelial cells [J]. J Biol Chem, 1997, 272(48): 30314-30321.

[10] Sanvito F, Vivoli F, Gambini S, *et al*. Expression of a highly conserved protein, p27BBP, during the progression of human colorectal cancer [J]. Cancer Res, 2000, 60(3): 510-516.

[11] Sanvito F, Piatti S, Villa A, *et al*. The beta4 integrin interactor p27 (BBP/eIF6) is an essential nuclear matrix protein involved in 60S ribosomal subunit assembly [J]. J Cell Biol, 1999, 144(5): 823-837.

[12] Kolligs F T, Bommer G, Goke B. Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis [J]. Digestion, 2002, 66(3): 131-144.

[13] Clement-Lacroix P, Ai M, Morvan F, *et al*. Lrp5-independent activation of Wnt signaling by lithium chloride increases bone formation and bone mass in mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(48): 17406-17411.

[14] Sato M. Upregulation of the Wnt/beta-catenin pathway induced by transforming growth factor-beta in hypertrophic scars and keloids [J]. Acta Derm Venereol, 2006, 86(4): 300-307.

(收稿：2010-03-14 修回：2010-04-10)

(编辑　吴培红)