论著

文章编号:1000-5404(2010)12-1286-04

人 Dickkopf1 基因腺病毒载体的构建及感染黑色素瘤后 β-catenin 表达的研究

陈恒君,李 惠,陈 瑾,卢小娟 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院皮肤科)

[摘要] 目的 构建高表达外源性 Dickkopf1(DKK1)基因的重组腺病毒载体(Ad-DKK1);感染黑色素瘤细胞株后研究 Wnt 信号通路中主要信号分子 β-catenin 的表达变化。**方法** 利用 PCR 技术扩增目的基因 DKK1;应用分子克隆技术和 AdEasy 系统重组腺病毒技术,把目的基因亚克隆到穿梭质粒;经酶切和测序后,在 BJAdeasy 中同源重组;用 *Pac* Ⅰ 酶切过的重组腺病毒 DNA 在 HEK293 中包装并扩增;实验分为 5 组:Ad-DKK1 感染组、Ad-SimDKK1 感染组、Ad-GFP 感染组、Ad-RFP 感染组和空白细胞对照组。按照 MOI 值为 80 感染恶性黑色素瘤细胞株 A375,观察细胞形态;RT-PCR 法检测 DKK1、β-catenin 基因的表达,MTT 法检测细胞活力。**结果** 重组腺病毒 Ad-DKK1 经酶切鉴定与测序证实构建成功。感染 A375 细胞,感染率均大于 80%,感染后细胞形态无明显改变。Ad-DKK1 感染组 DKK1 的表达水平(1.638 ± 0.067)与其他 4 组(0.718 ± 0.086、1.424 ± 0.125、1.414 ± 0.089、1.423 ± 0.088)比较差异具有统计学意义($P < 0.05$),其 β-catenin 的表达水平(0.590 ± 0.011)与其他 4 组(0.895 ± 0.012,0.749 ± 0.024,0.754 ± 0.012,0.759 ± 0.014)比较差异具有显著统计学意义($P < 0.01$)。MTT 法检测细胞活力:Ad-DKK1 感染组(0.370 ± 0.014)与其他 4 组(0.412 ± 0.017、0.398 ± 0.006、0.395 ± 0.007、0.426 ± 0.016)比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 成功构建重组腺病毒 Ad-DKK1,经其感染的恶性黑色素瘤细胞中 DKK1 的表达明显增强,β-catenin 的表达显著降低,A375 的细胞活力受到抑制。

[关键词] DKK1 基因;腺病毒科;黑色素瘤;信号传导;Wnt 蛋白质类

[中图法分类号] R394-33; R394.3; R739.5 **[文献标志码]** A

Construction of Dickkopf1-expressing recombinant adenovirus and its effect on β-catenin expression in A375 cells

Chen Hengjun, Li Hui, Chen Jin, Lu Xiaojuan (Department of Dermatology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] Objective To construct a recombinant adenovirus vector expressing Dickkopf1 (DKK1) (Ad-DKK1) and study the expression of β-catenin in melanoma cells A375 after Ad-DKK1 infection. Methods DKK1 gene was amplified by PCR and subcloned to shuttle plasmid Adeasy by molecular cloning and adenovirus recombination technique, then converted in BJAdeasy cells. The recombinant adenovirus plasmid was generated. After cut by *Pac* Ⅰ enzyme, the recombinant adenovirus plasmid Ad-DKK1 was packaged and amplified in HEK293 cells. Ad-DKK1 effect group, Ad-SimDKK1 effect group, Ad-GFP effect group, Ad-RFP effect group and blank group were used to infect the A375 cells in multiplicity of infection (MOI) 80, and cell morphology was observed. The expression of DKK1 and β-catenin in A375 cells was detected by RT-PCR. Cell vitality was detected by MTT assay. Results Ad-DKK1 was proved to be recombined successfully by identification with restriction enzyme and sequencing. The infection was efficient (80%) in A375 cells. The expression of DKK1 had significant difference between Ad-DKK1 effect group (1.638 ± 0.067) and other 4 groups (0.718 ± 0.086, 1.424 ± 0.125, 1.414 ± 0.089 and 1.423 ± 0.088) ($P < 0.05$). The expression of β-catenin had significant difference between Ad-DKK1 effect group (0.590 ± 0.011) and the other 4 groups (0.895 ± 0.012, 0.749 ± 0.024, 0.754 ± 0.012 and 0.759 ± 0.014) ($P < 0.01$). MTT assay indicated that there was significance in cell vitality between Ad-DKK1 effect group (0.370 ± 0.014) and the other 4 groups (0.412 ± 0.017, 0.398 ± 0.006, 0.395 ± 0.007 and 0.426 ± 0.016) ($P < 0.05$). Conclusion DKK1-expressing recombinant adenovirus vector is established. Over-expression of DKK1 suppresses the expression of DKK1 and inhibits the expression of β-catenin and cell vitality in melanoma cells.

[Key words] DKK1 genes; adenovirus; melanoma; signal transduction; Wnt proteins

Supported by the National Nature Science Foundation of China (30901711) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5402).
Corresponding author: Chen Jin, Tel: 86-23-89012827, E-mail:1010cj@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金(30901711);重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5402)
[通信作者] 陈 瑾,电话:(023)89012827,E-mail:1010cj@163.com

Wnts 家族是重要的细胞外信号分子家族,在细胞发育和肿瘤发生过程中起着重要作用[1],其异常激活与多种肿瘤的发生、发展密切相关,Wnt 信号通路有经典的 Wnt-β-catenin-LEF/TCF[2-4]、细胞极性、Wnt/Ca^{2+}通路 3 条主要的分支。

Dickkopf1(DKK1)蛋白是 Wnt 信号经典通路的拮抗剂[5,6],其作用途径主要有与 Wnt 蛋白竞争性结合 LRP5/6 和通过 Kremen 受体与 LRP5/6 形成三聚体复合物[7]2 条。通过以上 2 条途径使 Wnt 蛋白不能进入胞内,阻断了 Wnt 经典信号通路的激活[8]。Wnt 经典通路受阻后导致其下游的 GSK-3 活力增强,GSK-3 激酶表达水平的稳定升高增加了 β-catenin 的磷酸化,靶向调节蛋白酶体相关蛋白的降解,这样就抑制了依赖 β-catenin 的一系列转录。最近研究[9-11]发现,DKK1 在多种肿瘤中表达异常,如胃癌、大肠癌中,DKK1 的表达明显降低或缺失,而在黑色素瘤中的研究甚少,因此,我们构建腺病毒 Ad-DKK1 载体,为研究 DKK1 在恶性黑色素瘤发生发展所起的作用提供工具,并为探讨黑色素瘤发病的分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

含有人 DKK1 基因的逆转录病毒 pSEB-DKK1 和屏蔽内源性 DKK1 的腺病毒载体(Ad-SimDKK1)由重庆医科大学附属第一医院皮肤科陈瑾构建;人恶性黑色素瘤细胞株 A375 细胞、含红色荧光蛋白腺病毒(Ad-RFP)、含绿色荧光蛋白腺病毒(Ad-GFP)均由由美国芝加哥大学皮肤科实验室惠赠;HEK293 细胞,腺病毒穿梭质粒 pADtrace-TO4,大肠杆菌 BJAdeasy(转化有腺病毒骨架质粒 pAdeasy-1 的大肠杆菌 BJ5183)由美国芝加哥大学分子肿瘤实验室惠赠;*Taq* DNA 聚合酶试剂盒(美国 Life technologeies 公司);限制性内切酶 *Kpn* Ⅰ、*Sal* Ⅰ、*Pac* Ⅰ、*Sfi* Ⅰ酶(美国 New England Biolabs 公司);PCR 引物由大连宝生物公司合成;RNA 提取试剂盒购买于大连宝生物公司,青/链霉素混合液、DMEM 培养基、胎牛血清(Hyclone 公司)。以上材料均由重庆医科大学临床检验诊断学实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 人源性 DKK1 序列的确定 利用 Nucleotide 数据库搜索人源性 DKK1 的序列,NM-012242,扩增 DKK1 全长 801 bp,并设计 DKK1 全长引物:上游:5′-CGGGGTACCATGGGCATGATGGCTCTGGGCGCAGCGG-3′;下游:5′-CGCGTCGACGTGTCTCTGACAAGTGTGAAGC-3′。其中上游引物添加了 *Kpn* Ⅰ酶切位点序列,下游添加了 *Sal* Ⅰ酶切位点序列。

1.2.2 Ad-DKK1 腺病毒载体的构建和制备 以 DKK1 逆转录病毒质粒为模板,PCR 扩增;穿梭质粒选用 pADtrace-TO4,经过 *Kpn* Ⅰ、*Sal* Ⅰ双酶切 pAdtrace-TO4 和目的基因 DKK1,酶切产物经胶回收分别得到 pADtrace-TO4 载体骨架和 DKK1 片段,将 DKK1 全长插入腺病毒穿梭质粒载体的 *Kpn* Ⅰ、*Sal* Ⅰ位点中。经过限制性内切酶酶切和测序,就得到携带有 DKK1 的阳性重组质粒。阳性重组质粒在大肠杆菌 BJADeasy 中同源重组,经 *Pac* Ⅰ酶切鉴定。

1.2.3 重组腺病毒的包装、收获及扩增 用 *Pac* Ⅰ酶切过的重组腺病毒 DNA 感染 HEK293 细胞,让腺病毒在 HEK293 细胞中进行包装。条件为:细胞融合度达 40% ~80%,先加入适量不含胎牛血清的 DMEM 培养基,37 ℃,50 ml/L CO_2孵箱中孵育;3 ~6 h 后,换成完全培养基,其中含有胎牛血清 100 ml/L,青霉素 10 000 U/L,链霉素 100 mg/L。分别在 7、14、20 d 观察荧光情况并采集图像。

14 ~20 d 后,待大部分细胞漂浮,即可收集。将细胞收集至 10 ml 离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃去培养基,加入 1.5 ml 胎牛血清,吹散细胞,干冰中冰冻 8 ~10 min,37 ℃水浴溶解,震荡;反复冻-融-震荡 4 次;收集含有病毒的上清。

在 HEK293 细胞中将重组腺病毒大量扩增,扩增 3 轮后纯化,得到高滴度的腺病毒 Ad-DKK1,于 -80 ℃保存待用。

1.2.4 观察细胞形态和荧光感染率 A375 细胞处于对数生长期,20% 密度传代。细胞密度为 30% ~40% 时,在培养基中加入高滴度的腺病毒。实验分 5 组:Ad-DKK1 感染组、Ad-SimDKK1 感染组、Ad-GFP 感染组、Ad-RFP 感染组和空白细胞对照组。检测腺病毒滴度后,按 MOI 值 80 感染各组细胞,在感染 24 h 时,荧光显微镜观察细胞内荧光蛋白的表达情况并采集光镜及荧光图片。

1.2.5 RT-PCR 检测细胞内 DKK1 表达的变化 分组同 1.2.4。感染 A375 后 24 h,分别提取各组 A375 细胞的总 RNA,逆转录为 cDNA,PCR 扩增并检测胞内 DKK1 表达总量的变化。引物为:上游 5′-cATTGACAACTACCAGCCGTAC-3′;下游 5′-GGGCAGCACATAGCGTGA-3′;目的条带 159 bp。PCR 条件为:95 ℃预变性 5 min,95 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,共 30 个循环,最后 72 ℃延伸 5 min。以人 β-actin 为内参,引物为:上游:5′-CACCACACCTTCTACAATGAGC-3′;下游引物:5′-GTGATCTCCTTCTGCATCCTGT-3′,扩增片段大小为 712 bp。反应参数设置:95 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s,57 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 45 s,共 35 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min,4 ℃保存。

1.2.6 RT-PCR 检测细胞内 β-catenin 表达的变化 分组同 1.2.4。感染 A375 后 24 h,分别提取各组 A375 细胞的总 RNA,逆转录为 cDNA,PCR 扩增并检测胞内 β-catenin 的表达情况。引物为上游:5′-AAATTCTTGGCTATTACGAC-3′;下游:5′-CATCCCTTCCTGTTTAGTT-3′目的条带 321 bp。PCR 条件为:95 ℃预变性 5 min,95 ℃变性 30 s,51 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,共 30 个循环,最后 72 ℃延伸 5 min。以人 β-actin 为内参,引物序列及反应条件同 1.2.5。

1.2.7 Ad-DKK1 腺病毒感染 A375 后细胞活力的检测 分组同 1.2.4。单细胞悬液 20% 密度铺 96 孔板;细胞铺满约 50% 时加入腺病毒原液;细胞铺满约 80% 时加 MTT 溶液(浓度为 0.01 mol/L,pH = 7.4);加 MTT 溶液后 4 h 在波长为 492 nm 下测 D(492)值,每组设 3 个复孔。

1.3 统计学处理

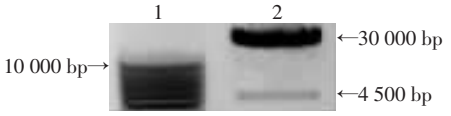
采用 SPSS 11.5 软件包处理实验数据,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 阳性重组质粒的双酶切鉴定

经过测序鉴定,Ad-DKK1 结果与 GenBank 中序列一致,方

向正确。重组成功的质粒双酶切鉴定结果显示30 000 bp和4 500 bp条带清晰可见(图1),与预期结果吻合,说明腺病毒Ad-DKK1构建成功。

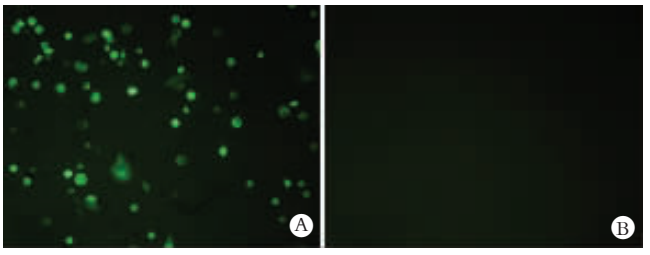


1:标准;2:携带有DKK1的阳性重组质粒

图1 重组质粒的双酶切鉴定

2.2 在HEK293细胞内的包装、收获及扩增

所构建质粒同源重组后感染HEK293细胞,分别在7、14、20 d观察荧光,荧光量随时间的增长逐渐增多,说明腺病毒包装成功且扩增。经过数次扩增、冻融,得到高滴度的腺病毒(图2)。

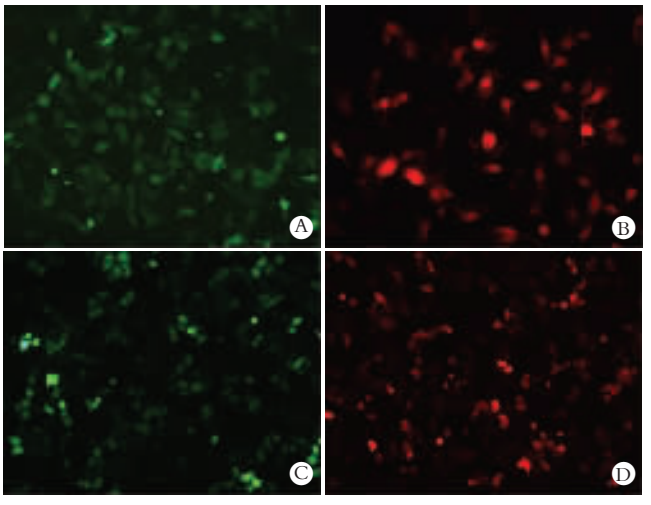


A:腺病毒在HEK293中包装;B:未包装腺病毒的HEK293细胞

图2 重组腺病毒DKK1在HEK293中包装后20 d的荧光观察 (×200)

2.3 腺病毒感染A375细胞

Ad-DKK1、Ad-SimDKK1、Ad-GFP、Ad-RFP均能感染A375,感染率高,并在其中表达荧光,且感染后细胞无大量漂浮,细胞形态规整,结构清晰,细胞核结构完整,未见细胞内空泡和自溶现象。说明在实验过程中病毒量适中,既能让细胞被腺病毒感染,同时又不影响细胞形态,有利于后期实验的进行(图3)。

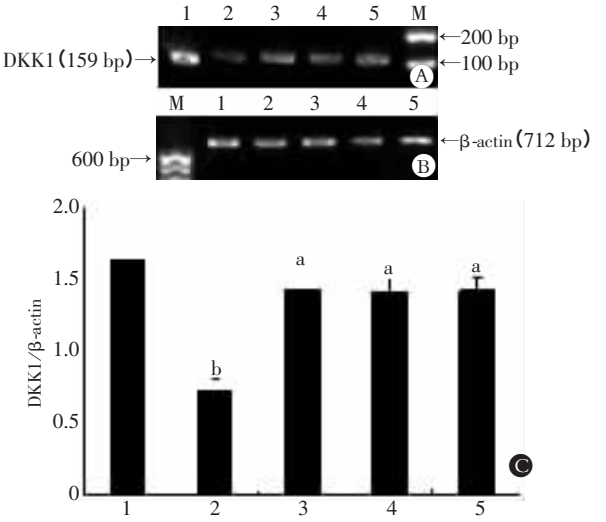


A:Ad-GFP感染组;B:Ad-RFP感染组;C:Ad-DKK1感染组;D:Ad-SimDKK1感染组

图3 荧光显微镜下观察各组细胞感染腺病毒情况 (×200)

2.4 RT-PCR检测A375细胞内DKK1表达总量的变化

细胞内DKK1的表达水平,Ad-DKK1感染组与Ad-GFP感染组、Ad-RFP感染组、空白细胞对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),与Ad-SimDKK1感染组比较差异有显著统计学意义($P<0.01$)。见图4。



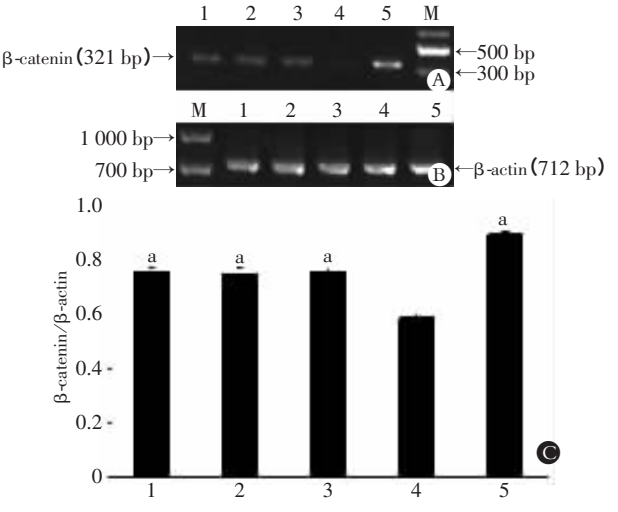
1:Ad-DKK1感染组;2:Ad-SimDKK1感染组;3:Ad-GFP感染组;4:Ad-RFP感染组;5:空白细胞对照组;M:标准

A、B:RT-PCR结果;C:半定量分析结果 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与Ad-DKK1感染组比较

图4 DKK1腺病毒干扰后A375细胞中DKK1基因的表达

2.5 RT-PCR检测腺病毒感染A375后β-catenin的表达

Ad-DKK1感染组中β-catenin的表达水平与其余4组比较差异有显著统计学意义($P<0.01$),见图5。



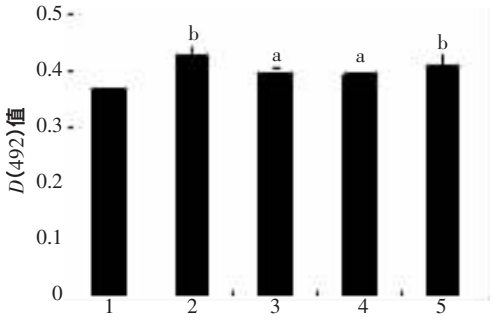
1:空白细胞对照组;2:Ad-GFP感染组;3:Ad-RFP感染组;4:Ad-DKK1感染组;5:Ad-SimDKK1感染组;M:标准

A、B:RT-PCR结果;C:半定量分析结果 a:$P<0.01$,与Ad-DKK1感染组比较

图5 DKK1腺病毒干扰后A375细胞中β-catenin的表达

2.6 Ad-DKK1腺病毒感染A375后细胞活力的检测

Ad-DKK1感染组与Ad-GFP感染组、Ad-RFP感染组比较差异有统计学意义($P<0.05$);与Ad-SimDKK1感染组、空白细胞对照组比较差异有显著统计学意义($P<0.01$)。见图6。



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与 Ad-DKK1 感染组比较
1: Ad-DKK1 感染组; 2: Ad-SimDKK1 感染组; 3: Ad-GFP 感染组; 4: Ad-RFP 感染组; 5: 空白细胞对照组

图 6　MTT 检测 DKK1 腺病毒干扰后 A375 细胞活力

3　讨论

Wnt 信号通路在细胞分化、增殖和肿瘤形成过程中起着举足轻重的作用,一些原癌基因,凋亡因子和细胞周期调控因子通过该途径激活。DKK1 是一种分泌性糖蛋白,具有高度保守性,在抑制 Wnt 信号经典通路上起着重要作用。研究发现,DKK1 对黑色素细胞的增殖及其功能调控有着至关重要的作用,其通过抑制 β-catenin,从而抑制黑色素细胞的生长及其功能[12]。在人类 9 株不同恶性黑色素瘤细胞株和 15 例标本中发现 DKK1 表达均下调或缺失[13]。可见 DKK1 在黑色素瘤的发病机制中扮演了重要的角色。因此本实验通过建立过高表达外源性 DKK1 腺病毒载体,感染恶性黑色素瘤细胞株,使其差异表达 DKK1 基因,从而深入研究 DKK1 在黑素瘤的发生、发展中的分子机制。

在构建差异表达 DKK1 的载体时,我们采用 He 等[14]构建的 Ad Easy 腺病毒载体系统。此系统与传统的重组腺病毒方法相比实验周期短、操作方便,重组效率高;重组腺病毒经扩增后感染效率高,感染范围广。实验中采用 pADtrace-TO4 为穿梭载体,可以直接通过观察绿色荧光表达来判断感染效率,观察直观,优于传统的病毒空斑筛选。

实验设计了 Ad-SimDKK1 感染组,能屏蔽内源性 DKK1 的表达,这样给我们的实验组(Ad-DKK1 感染组)形成很好的阳性对照;而且分别设计了 Ad-GFP 感染组和 Ad-RFP 感染组,排除了空载腺病毒对实验的干扰,提高了准确性。本实验构建的 Ad-DKK1 腺病毒载体使得目的细胞高表达外源性 DKK1,实验室保存的 Ad-simDKK1 可以屏蔽目的细胞内源性 DKK1 的表达,从而影响目的细胞内 DKK1 总量的变化。

β-catenin 作为 Wnt 信号经典通路的重要分子,其表达量的变化反应了 Wnt/β-catenin 通路的状况。相关文献报道,在结肠癌中诱导 DKK1 高表达可下调 Wnt/β-catenin 信号[11],间充质干细胞释放 DKK1 抑制乳腺癌细胞 Wnt/β-catenin[15]。因此,本实验通过检测 β-catenin 表达量的变化来验证实验中导入的 DKK1,对 Wnt 信号经典通路的影响。

本实验成功构建了 Ad-DKK1 腺病毒载体,并高效率感染 A375 细胞,对细胞形态无明显影响;检测 Wnt 信号经典通路下游的主要信号分子 β-catenin 表达,发现 DKK1 的高表达明显抑制 β-catenin 的表达,而干扰 DKK1 的表达使得 β-catenin 的表达明显增高,从而进一步证实了 DKK1 通过对 β-catenin 的表达下调,抑制经典 Wnt 信号通路的传导,从而推测 DKK1 可能通过对 Wnt 信号经典通路的抑制,而阻碍肿瘤的发生和发展。

参考文献:

[1] Verras M, Sun Z. Roles and regulation of Wnt signaling and beta-catenin in prostate cancer[J]. Cancer Lett, 2006, 237(1): 22 – 32.
[2] Karim R, Tse G, Putti T, *et al*. The significance of the Wnt pathway in the pathology of human cancers[J]. Pathology, 2004, 36(2): 120 – 128.
[3] Bienz M. beta-catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling[J]. Curr Biol, 2005, 15(2): R64 – R67.
[4] Lustig B, Behrens J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2003, 129(4): 199 – 221.
[5] Etheridge S L, Spencer G J, Heath D J, *et al*. Expression profiling and functional analysis of wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells, 2004, 22(5): 849 – 860.
[6] Fedi P, Bafico A, Nieto-Soria A, *et al*. Isolation and biochemical characterization of the human Dkk-1 homologue, a novel inhibitor of mammalian Wnt signaling[J]. J Biol Chem, 1999, 274(17): 19465 – 19472.
[7] Mikheev A M, Mikheeva S A, Rostomily R, *et al*. Dickkopf-1 activates cell death in MDA-MB435 melanoma cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 352(3): 675 – 680.
[8] Mao B, Wu W, Davidson G, *et al*. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling[J]. Nature, 2002, 417(6889): 664 – 667.
[9] Lee A Y, He B, You L, *et al*. Dickkopf-1 antagonizes Wnt signaling independent of beta-catenin in human mesothelioma[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 323(4): 1246 – 1250.
[10] Yang G, Zhang G, Pittelkow M R, *et al*. Expression profiling of UVB response in melanocytes identifies a set of p53-target genes[J]. J Invest Dermatol, 2006, 126(11): 2490 – 2506.
[11] Gonzalez-Sancho J M, Aguilera O, Garcia J M, *et al*. The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer[J]. Oncogene, 2005, 24(6): 1098 – 1103.
[12] Yamaguchi Y, Itami S, Watabe H, *et al*. Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: increased expression of dickkopf1 by palmoplantar fibroblasts inhibits melanocyte growth and differentiation[J]. J Cell Biol, 2004, 165(2): 275 – 285.
[13] Kuphal S, Lodermeyer S, Bataille F, *et al*. Expression of Dickkopf genes is strongly reduced in malignant melanoma[J]. Oncogene, 2006, 25(36): 5027 – 5036.
[14] He T C, Zhou S, da-costa L T, *et al*. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(5): 2509 – 2514.
[15] 乔玲, 徐治立, 谭旭, 等. 间充质干细胞释放 DKK-1 抑制乳腺癌细胞 Wnt/β-catenin 途径的实验研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2007, 34(7): 702 – 708.

(**收稿**:2009-12-29;**修回**:2010-03-24)
(编辑　汪勤俭)