论著

文章编号:1000-5404(2014)24-2476-05

TCF4N剪接异构体在食管癌细胞中的表达研究

罗 超[1],何 刚[2],官兴颖[2],唐 敏[1],刘 双[1],甘生敏[1],李 娟[1],彭志平[1],章 波[2] (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院放射医学教研室[1]; 400038 重庆,第三军医大学基础医学部医学遗传学教研室[2])

[摘要] **目的** 证实食管癌中TCF4N剪接异构体的存在,并初步探讨其功能。**方法** 采用RT-PCR方法扩增,并PCR产物测序鉴定。克隆TCF4N剪接异构体并构建真核表达载体,将其转染EC109细胞高效表达,检测其对细胞生物学特性的影响。**结果** 在癌细胞株中,TCF4N剪接异构体被证实存在。对比食管癌组织与癌旁组织发现TCF4N异构体在癌组织中表达显著降低($P<0.05$)。成功构建了TCF4N表达载体,在EC109细胞中获得高效表达。功能分析显示:增强TCF4N表达可抑制EC109细胞的增殖,影响细胞周期的分布,并抑制TCF4的转录活性。**结论** 在人食管癌中具有抑制功能的TCF4N剪接异构体与食管癌的发生有一定关联。

[关键词] TCF4;剪接异构体;食管癌;转录活性

[中图法分类号] R394-33;R394.2;R735.1 [文献标志码] A

Identification of T cell factor 4N isoform in esophageal cancer cell line EC109

Luo Chao[1], He Gang[2], Guan Xingying[2], Tang Min[1], Liu Shuang[1], Gan Shengmin[1], Li Juan[1], Peng Zhiping[1], Zhang Bo[2] ([1]Department of Radiation Medicine, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To identify the existence and to explore the function of T cell factor 4N (TCF4N) splicing isoform in human esophageal cancer cell EC109. **Methods** RT-PCR technology was applied to amplify the specific exon of TCF4N and the product was further sequenced. The coding region of TCF4N was amplified and further ligated to the eukaryotic expression vector. The recombinant vector, which was verified by sequencing, was then transfected into the EC109 cells to detect its roles. **Results** The TCF4N splicing isoform existed in human esophageal cancer cell line, as well as esophageal tissues. Compared with that of the adjacent tissues, TCF4N was down-regulated in the esophageal cancer tissues. The TCF4N expression vector was successfully constructed, and effectively expressed in the EC109 cells. Functional analysis showed high level expression of TCF4N led to inhibition of cell growth, cell cycle redistribution and attenuation of TCF4 transcription activity. **Conclusion** The TCF4N splicing isoform is an authentic expressed isoform in human esophageal cancer cells, and is relative to tumorigenesis of esophageal cancer.

[**Key words**] T cell factor 4N; splicing isoform; esophageal cancer; transcription activity

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011BB5022). Corresponding authors: Peng Zhiping, Tel: 86-23-68485007, E-mail: pengzhiping@cqmu.edu.cn; Zhang Bo, Tel: 86-23-68753670, E-mail: bo_zhang@yahoo.com

T细胞因子4 (T cell factor 4, TCF4)属TCF/LEF蛋白家族,在正常组织发育和分化过程中,接受β-catenin的信号,启动下游信号通路,从而促进细胞增殖与分化[1]。对TCF4的研究表明该蛋白参与了Wnt信号通路。Wnt/β-catenin的异常活化导致β-catenin转位入核,与TCF4形成复合物启动下游基因活化。由于TCF4在Wnt信号通路靶基因转录过程中起着分子开关作用,其在肿瘤发生、发展中的作用愈加受到广泛关注[2-4]。

对TCF4 mRNA剪接形式的研究发现:TCF4存在多种不同的成熟mRNA,但是这些剪接体的详细功能

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2011BB5022)

[通信作者] 彭志平,电话:(023)68485007,E-mail:pengzhiping@cqmu.edu.cn
章 波,电话:(023)68753670, E-mail:bo_zhang@yahoo.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141106.1108.004.html(2014-11-06)

还不甚明确[5-7]。其选择性剪接出现在3个区域:第一个区域是第4外显子,其长度为69 bp,编码23个氨基酸,功能未阐明。有人分析认为其具有转录抑制作用。但该外显子存在与否不引起整个mRNA的阅读框移位。第二区域是外显子7~9,即在外显子7末端可增加12bp,外显子9前可增加15 bp,均不影响整个阅读框的改变。这个区域还可以出现另外一种剪接体,即第8外显子后转录终止,形成TCF4N异构体[8]。第三区域为外显子13~16,可出现不同的组合形式,由于阅读框的改变从而编码具有不同C末端的蛋白质。其中,TCF4N为截短型异构体,只具有N端结构域,可与β-catenin结合。这种剪接体已经在小鼠中被证实存在,而在人类细胞中还少见报道。因此,本研究采用RT-PCR方法证实了食管癌细胞中存在该异构体,并对其功能进行了初步的探讨。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

表达载体pEZ-M11(上海吉凯基因技术公司);限制性内切酶*Msp* Ⅴ、*Xho* Ⅰ,DNA Ladder,*Taq* polymerase,T_4 DNA ligase,SanPrep柱式质粒小量抽提试剂盒,SanPrep柱式PCR产物纯化试剂盒(上海生工);TRIzol、转染试剂脂质体(Roche公司);RT-PCR试剂盒(Bio-Rad公司);荧光素酶报告质粒TOP和pRL-TK(Addgene);双荧光素酶测定试剂盒(Promega);Flag抗体(碧云天)。

1.2 方法

1.2.1 组织样本和细胞株来源 组织样本来自于2012年12月至2013年7月在第三军医大学西南医院胸心外科行外科切除术,并经病理学确诊的食管癌原位肿瘤组织及其癌旁组织(距离癌组织>5 cm)。依照美国癌症联合委员会(AJCC)制订的第7版(2009年)食管癌国际TNM分期标准进行临床分期,均为Ⅱ期。年龄46~70岁,平均61.6岁。所有患者均签署知情同意书。人食管癌细胞株EC109、KYSE150和KYSE450购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心(www.cellbank.org.cn)。

1.2.2 总RNA提取 以EC109细胞和手术切除的食管癌样品为对象,采用TRIzol提取总RNA备用。

1.2.3 TCF4N的表达检测 根据小鼠TCF4N剪接异构体序列并结合人基因组序列设计引物,TCF4N-F1:5′CCCCGTATTACCCACTATCGC, TCF4N-R1: 5′ GGCCCCGGTTCTTGGAACTCA。按照试剂说明书将500 ng总RNA逆转为cDNA模板,然后进行PCR检测。反应条件为:95 ℃ 2 min;95 ℃ 10 s,62 ℃ 10 s,72 ℃ 30 s(32个循环)。对于定量PCR检测,设立3个复孔,反应条件相同。以GAPDH基因为参照,根据各组的Ct值,采用公式$2^{-\Delta\Delta Ct}$计算各组之间TCF4N mRNA表达水平的差异。

1.2.4 TCF4N的表达载体的构建 为扩增TCF4N的编码区,根据小鼠TCF4N剪接异构体序列并结合人基因组序列设计引物,TCF4N-F2: 5′-AGTTCGAACCATGCCGCAGCTGAACGGCGG,TCF4N-R2:5′-CACTCGAGGCCCCGGTTCTTGGAACTCA。将PCR产物纯化后经过*Msp* Ⅴ和*Xho* Ⅰ双酶切,然后将其连接到载体pEZ-M11中,转化大肠杆菌,PCR筛选重组子,并进行序列测定,重组载体命名为pEZ-TCF4N。

1.2.5 EC109细胞的转染 根据脂质体的说明书将重组质粒载体pEZ-TCF4N和对照空载体转染EC109细胞,分别于转染后24 h和48 h收集细胞提取RNA和细胞蛋白质样品进行检测。

1.2.6 细胞周期的测定 EC109细胞进行转染后24 h进行血清饥饿12 h,然后加入含血清的完全培养基继续培养24 h。收集细胞,70%乙醇固定后流式细胞仪测定细胞周期。

1.2.7 细胞增殖测定 EC109细胞种植于96孔板,2×10^4个细胞/孔。将重组质粒载体pEZ-TCF4N和对照空载体转染分别于24 h和48 h后采用MTT法测定各孔吸光值,以空载体为1计算各组相对值。

1.2.8 荧光素酶的测定 EC109细胞种植于96孔板,然后分组进行转染:①重组质粒组pEZ-TCF4N+TOP+pRL-TK;②空载体组pEZ-M11+TOP+pRL-TK。转染后48 h按照试剂说明书测定荧光素酶活性。

1.2.9 免疫印迹检测TCF4N的表达 各组细胞的总蛋白样品经10% SDS-PAGE分离后转印至PVDF膜上;封闭后一抗4 ℃孵育过夜,洗膜后室温孵育二抗1 h,洗膜,ECL法进行,行胶片曝光。

1.3 统计学方法

采用SPSS 20.0软件进行统计学分析,实验数据以$\bar{x}\pm s$表示,多组间比较用单因素方差分析。

2 结果

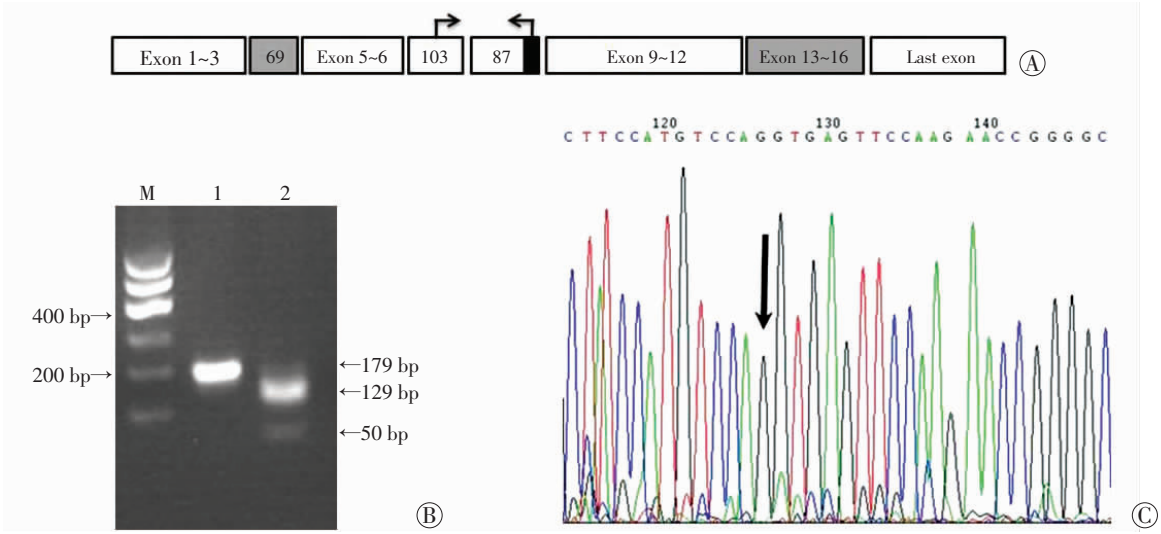
2.1 食管癌细胞EC109中TCF4N的表达检测

在小鼠中,TCF4N异构体转录终止于第8外显子后(图1A)。为了确定TCF4N剪接异构体在EC109细胞中的存在,首先采用定性RT-PCR方法扩增,结果显示可以扩增获得与预期大小一致的产物。由于该PCR产物含有1个*Alu* Ⅰ酶切位点,产物的酶切结果符合预期(图1B)。进一步将RT-PCR产物纯化后测序显示:TCF4N异构体在EC109细胞中存在(图1C)。

2.2 TCF4N在食管癌细胞株与组织中的定量检测

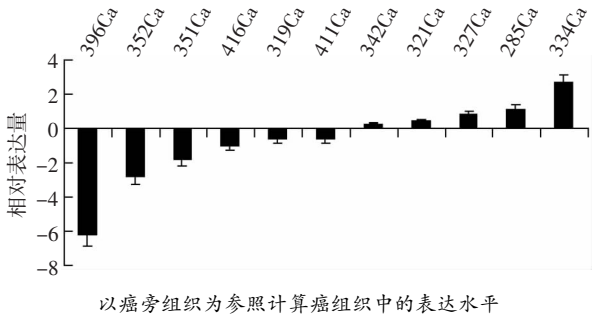
为了证实TCF4N异构体在食管癌细胞株中表达的普遍性,选择了另外2株细胞KYSE450和EC9706作为研究对象。定量RT-PCR检测结果显示:3株细胞系均可以表达TCF4N,且各个细胞系的表达水平有一定差异,与EC109(1.00±0.04)、KYSE450细胞(1.74±0.16)相比,EC9706细胞中的表达水平(2.19±0.18)最高。

同时,采用定量RT-PCR方法检测了手术切除的食管癌组织与其对应的癌旁组织中的表达情况。在其中6对样品中,癌组织表达水平较癌旁组织显著降低,而在另外4对组织中,TCF4N表达水平在癌组织中增加(图2)。将癌组织与癌旁组织混合后进行比较发现:TCF4N在癌组织中的表达水平较癌旁组织显著降低[对照的(52±13)%]。



A:TCF4 的基因组结构,黑色方框代表 TCF4N 异构体特有区域;B:RT-PCR 检测 TCF4N 异构体;M:标准;1:RT-PCR 产物(179 bp);2:产物经 *Alu* Ⅰ 酶切(50 bp+129 bp);C:RT-PCR 产物的序列测定,箭头示正常第 8 外显子末端

图 1 TCF4N 异构体在 EC109 细胞中的表达检测



以癌旁组织为参照计算癌组织中的表达水平

图 2 TCF4N 异构体在食管癌细胞株与组织中的定量检测

2.3 TCF4N 的表达载体构建

为了确定 TCF4N 异构体的功能,拟进一步构建其表达载体。根据载体的多克隆位点信息,在上游引物添加 *Nsp* Ⅴ 酶切位点,下游引物添加 *Xho* Ⅰ 酶切位点。RT-PCR 扩增后获得单一条带(图 3A)。将该产物纯化后酶切处理,然后与载体 pEZ-M11 连接,并转化大肠杆菌,获得了相应的转化子。经菌落 PCR 初步鉴定后的阳性克隆提取质粒 DNA,测序显示成功获得了重组载体 pEZ-TCF4N(图 3B)。

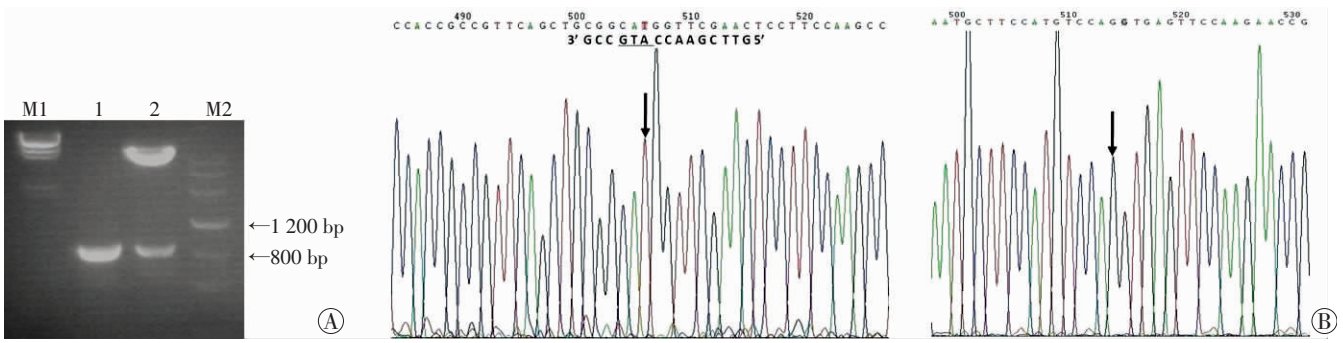
2.4 TCF4N 在 EC109 细胞中的高效表达

为了确定 TCF4N 的有效表达,将重组载体与空载体转染 EC109 细胞,48 h 后提取细胞总 RNA 进行定量 RT-PCR 检测,结果显示在转染后的细胞中 TCF4N 的表达水平(1 390.7±126.0)与空载体组(1.0±0.1)相比,得到极大的增加。同时,由于该载体可在目的蛋白 N 端添加 Flag 标签,因此采用 Flag 抗体进行免疫印迹检测显示:转染重组载体后的 EC109 细胞可有效表达 TCF4N 蛋白(图 4)。

2.5 TCF4N 抑制细胞增殖与转录活性的影响

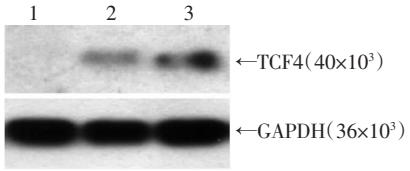
为了确定 TCF4N 的功能,首先采用 MTT 方法检测其对细胞增殖的影响。结果显示:转染重组载体 pEZ-TCF4N 后,EC109 细胞的增殖减慢,48 h 后两者差异显著(图 5A)。细胞周期测定显示转染 pEZ-TCF4N 后细胞 S 期数量减少,这与细胞增殖结果一致(图 5B)。

TCF4 是一种转录辅助因子,可与特定的 DNA 序列结合从而增强靶基因的转录。TOP 报告质粒上具有其特定的结合序列,被广泛运用于测定 TCF4 转录激活效应。对 TCF4N 转录效应测定结果显示:TCF4N 抑制报告质粒 TOP 的荧光素酶活性,提示其具有转录抑制效应[对照的(57±0.08)%]。



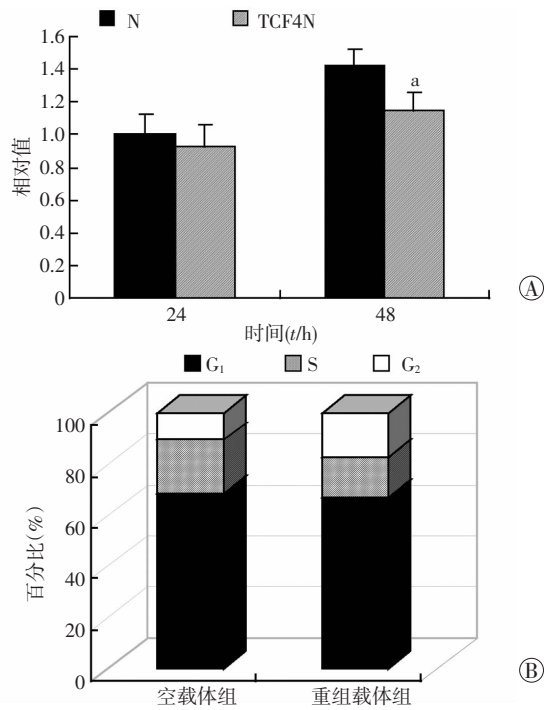
A:RT-PCR 扩增及重组质粒酶切鉴定;M1:λ DNA 标准;1: RT-PCR 产物(845 bp);2: 重组质粒的双酶切鉴定;M2: DNA 标准;B:重组质粒的序列测定,箭头示为起始密码子和终止密码子位置

图 3 TCF4N 的表达载体构建



1：空载体；2：重组载体转染 24 h；3：重组载体转染 48 h

图 4　免疫印迹检测重组载体在 EC109 细胞中的高效表达



A：MTT 法测定细胞增殖　a：$P<0.05$，与 N 组比较；B：细胞周期分布测定

图 5　MTT 法检测 TCF4N 的生物学效应

3　讨论

TCF4 在正常组织发育和分化过程中，接受 β-catenin 的信号，启动下游信号通路，从而促进细胞增殖与分化。在细胞内外各种因素的调控下，Wnt 通路精确地调节着动物的生长和发育。当其活化过度时，便会导致机体发育异常或者形成肿瘤。由于 TCF4 在 Wnt 信号通路靶基因转录过程中起着“分子开关”作用，其在肿瘤发生、发展中的作用愈加受到广泛关注。

研究表明：在包括食管癌在内的多种肿瘤中均发现 β-catenin/TCF4 复合体在肿瘤组织中异常活化，表达上调[9]。这提示异常活化的 TCF4 转录活性及其靶基因的表达增加是肿瘤发生的原因之一。食管癌中 hPTTG、STAT3 表达增加就是由于异常活化的 β-catenin/TCF4 所致[10-11]。然而也存在相反的报道。Tang 等[12]发现：TCF4 可抑制结肠癌细胞生长，该基因突变导致转录调节功能减弱，细胞生长潜能增加；而当该基因被抑制时，结直肠癌细胞会加快生长。作者分析认为促癌基因 TCF4 应为抑癌基因。这一发现与之前的一项研究结果类似：抑制 TCF4 增强 CD24 的表达[4]。这些相反结论的研究提示 TCF4 的功能复制。随着 TCF4 基因选择性剪接体的发现，这种促癌和抑癌的功能矛盾得到了部分解释。对 TCF4 mRNA 选择性剪接的研究发现[13]：TCF4 存在多种不同形式的成熟mRNA，所编码蛋白质的功能也各不相同，甚至可能相反。

在众多的选择性剪接体中，TCF4N 所编码蛋白只具有 N-端结构域，可与 β-catenin 结合而缺少 DNA 结合结构域，因此不具有转录激活作用，推测其功能类似于 Wnt 通路的负显性突变。然而，该剪接体在人类细胞中的存在却少见报道。我们采用 RT-PCR 方法证实了 TCF4N 剪接体在食管癌细胞株中的存在，且在不同类型的细胞中的表达水平有差异（图 1）。对比手术切除的食管癌组织和癌旁组织，TCF4N 在癌组织中表达降低（图 3）。我们分析认为：TCF4N 由于缺少 DNA 结合结构域，与正常结构的 TCF4 分子竞争结合上游信号 β-catenin 从而具有抑制转录活性功能。在食管癌中，β-catenin/TCF4 信号通路是激活状态，与抑制功能的 TCF4N 减少相一致。而在不同细胞类型中，TCF4N 的表达水平与其抑制功能密切相关，因而在不同类型细胞中对 TCF4 基因影响程度不同，导致对 TCF4 功能研究所得结论不一致。

为了探索其生物学功能，我们利用基因克隆技术将 TCF4N 编码区连接到载体 pEZ-M11 中，并高效表达于 EC109 细胞。在 mRNA 和蛋白水平的检测显示表达是非常有效的（图 4）。在正常 EC109 细胞中，TCF4 蛋白表现为 TCF4E 和 TCF4M 这两种异构体。由于 TCF4N 蛋白质分子量较之更小，因此 pEZ-TCF4N 质粒转染后免疫印迹检测时可见 3 条带。增强 TCF4N 的表达可以抑制 EC109 细胞的生长，随着时间的增加，其效果更加显著。这证明了 TCF4N 的抑制效应。另外，我们对细胞周期也对此进行了检测，其结果显示 S 期细胞减少，印证了 TCF4N 对细胞增殖的影响。文献[1]报道，TCF/LEF 启动子的转录活性依赖 β-catenin。在 TOP 报告质粒上有 6 个串联的 TCF4 结合位点，因而可以作为 TCF4 转录活性检测的手段。我们的结果显示高表达 TCF4N 抑制了 TOP 报告质粒转录活性。这提示 TCF4N 是通过竞争结合 β-catenin 而起作用，这与其分子结构特征密切相关。值得注意的是：尽管高表达 TCF4N 可引起一些生物学效应，对 TCF4 靶基因 CyclinD1 和 MMP7 的检测发现，高表达 TCF4N 不引起这两个靶基因表达改变。这提示食管癌细胞中 TCF4 功能复杂。

总之，本研究证实了 TCF4N 剪接异构体在食管癌细胞的存在，并初步证实了 TCF4N 对细胞增殖和转录活性的抑制作用，与食管癌的发生存在关联。该研究

对深入探讨TCF4基因功能会带来一些新的线索。随着研究的深入,TCF4N在肿瘤中的作用和应用将会取得新的进展。

参考文献:

[1] Cadigan K M. TCFs and Wnt/β-catenin signaling: more than one way to throw the switch[J]. Curr Top Dev Biol, 2012, 98: 1-34.

[2] Tiemessen M M, Staal F J. Wnt signaling in leukemias and myeloma: T-cell factors are in control[J]. Future Oncol, 2013, 9(11): 1757-1772.

[3] Chen J, Yuan T, Liu M, *et al*. Association between TCF7L2 gene polymorphism and cancer risk: a meta-analysis[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e71730.

[4] Shulewitz M, Soloviev I, Wu T, *et al*. Repressor roles for TCF-4 and Sfrp1 in Wnt signaling in breast cancer[J]. Oncogene, 2006, 25(31): 4361-4369.

[5] Howng S L, Huang F H, Hwang S L, *et al*. Differential expression and splicing isoform analysis of human Tcf-4 transcription factor in brain tumors[J]. Int J Oncol, 2004, 25(6): 1685-1692.

[6] Shiina H, Igawa M, Breault J, *et al*. The human T-cell factor-4 gene splicing isoforms, Wnt signal pathway, and apoptosis in renal cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(6): 2121-2132.

[7] Weise A, Bruser K, Elfert S, *et al*. Alternative splicing of Tcf7l2 transcripts generates protein variants with differential promoter-binding and transcriptional activation properties at Wnt/beta-catenin targets[J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(6): 1964-1981.

[8] Kennell J A, O'Leary E E, Gummow B M, *et al*. T-cell factor 4N (TCF-4N), a novel isoform of mouse TCF-4, synergizes with beta-catenin to coactivate C/EBPalpha and steroidogenic factor 1 transcription factors[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(15): 5366-5375.

[9] Berry W L, Kim T D, Janknecht R. Stimulation of β-catenin and colon cancer cell growth by the KDM4B histone demethylase[J]. Int J Oncol, 2014, 44(4): 1341-1348.

[10] Yan S, Zhou C, Zhang W, *et al*. beta-Catenin/TCF pathway upregulates STAT3 expression in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Lett, 2008, 271(1): 85-97.

[11] Zhou C, Liu S, Zhou X, *et al*. Overexpression of human pituitary tumor transfor ming gene (hPTTG), is regulated by beta-catenin / TCF pathway in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. Int J Cancer, 2005, 113(6): 891-898.

[12] Tang W, Dodge M, Gundapaneni D, *et al*. A genome-wide RNAi screen for Wnt/beta-catenin pathway components identifies unexpected roles for TCF transcription factors in cancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(28): 9697-9702.

[13] Ravindranath A, O'Connell A, Johnston P G, *et al*. The role of LEF/TCF factors in neoplastic transformation[J]. Curr Mol Med, 2008, 8(1): 38-50.

(**收稿**:2014-09-01;**修回**:2014-10-15)

(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2014)24-2480-01

肺吸虫致感染性颅内动脉瘤1例

吴宣萱,梁 平,周渝冬,李禄生,翟 瑄 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院神经外科,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室,重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地)

[**关键词**] 肺吸虫;感染性颅内动脉瘤

[**中图法分类号**] R532.2;R743 [**文献标志码**] B

1 临床资料

患儿,男性,6岁8个月,因头痛伴频繁呕吐3 d入院。以头痛和呕吐为主要表现,左额部明显,呈阵发性,频繁呕吐,伴有发热,有食用生水、小龙虾和河蟹病史。入院查体:体温38.5 ℃,意识清楚,呈嗜睡状,语言明确,双侧瞳孔等大同圆3 mm,四肢肌力Ⅴ级,肌张力正常,双侧Babinski征(-),全身无包块。辅助检查:血液分析:白细胞9.08×10^9/L,嗜酸性粒细胞百分比0.23,嗜酸性粒细胞计数2.6×10^9/L;肺吸虫抗体(+);腰穿抽取脑脊液呈微红,潘式试验(±),白细胞5×10^6/L。胸片提示:心肺未见异常。心脏彩超提示:未见异常。头部CT提示:左侧额颞顶叶呈团片状混杂密度影,周围可见低密度水肿带,增强后未见强化。CTA:左侧大脑中动脉M3段可见一囊性扩张,大小约3.5 mm×3.5 mm(图1)。全脑血管造影(DSA)提示:左侧大脑中动脉末端可见一扩张梭形动脉瘤,直径约4 mm(图2)。诊断:肺吸虫脑病,感染性颅内动脉瘤。给予降颅压、营养神经等治疗。同时口服吡喹酮0.5 g,每日2次,服用3 d,停4 d,连续服用4周。4周后复查:症状消失,复查血液分析:白细胞6.24×10^9/L,嗜酸性粒细胞百分比0.03,嗜酸性粒细胞计数0.4×10^9/L;肺吸虫抗体(-)。3年后复查头部MRA提示:左额叶软化灶,左侧大脑中动脉M3段一分支处可见瘤样扩张,直径约3.6 mm。嘱患儿密切随访。

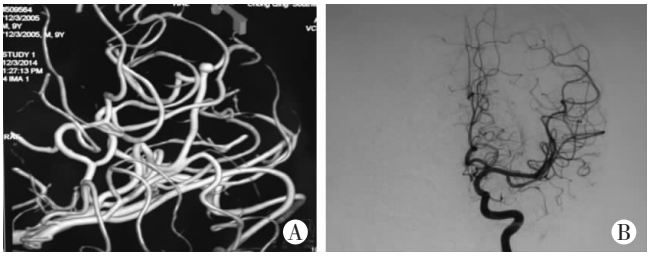


图1 肺吸虫致感染性颅内动脉瘤患儿CTA表现

图2 肺吸虫致感染性颅内动脉瘤患儿DSA表现

[**基金项目**] 国家临床重点专科项目(国卫办医函[2013]544);重庆市卫生局医学科研计划项目(2009-2-264)

[**通信作者**] 翟 瑄,电话:(023)63621980,E-mail:zhaixuan@163.com

[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141126.0815.001.html(2014-11-26)

(下转2484页)