基础研究 文章编号：0253-3626（2011）06-0809-05

siRNA干扰 wnt5a 表达对 Jurkat 细胞生长的影响及机制研究

顾晓艳，徐百华，沈亚莉，胡艳妮，李瑞燕，伍俞霓
（重庆医科大学附属儿童医院血液科、儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室，重庆 400014）

【摘 要】目的：干扰 wnt5a 在 Jurkat 细胞中的表达，探讨 wnt5a 对 Jurkat 细胞增殖、细胞周期、凋亡的作用及其机制。方法：采用大肠杆菌 BJ5183 内同源重组的方法构建特异性干扰 wnt5a 的腺病毒 Ad5-wnt5asi，感染 Jurkat 细胞。实验分为实验组（感染重组腺病毒的 Jurkat 细胞）、空载体组（感染腺病毒的 Jurkat 细胞）及空白对照组（Jurkat 细胞）。采用 MTT 法检测细胞增殖，流式细胞仪检测细胞周期及凋亡，RT-PCR 检测各组细胞 wnt5a、β-catenin、钙调蛋白依赖性激酶Ⅱ（Calmodulin dependent protein kinase Ⅱ，CaMKⅡ）、cyclinD1、c-myc、survivin mRNA 表达，Western blot 检测干扰前后 β-catenin、CaMKⅡ、cyclinD1 蛋白表达。结果：（1）实验组细胞增殖与空载体组及空白对照组相比显著增高（$P<0.05$）。（2）实验组与其他两组相比，G_1 期细胞比例显著降低，S 期细胞比例显著增多（$P<0.05$），G_2 期细胞比例无明显差异（$P>0.05$）。实验组与其他两组相比，细胞凋亡率显著降低（$P<0.05$）。（3）实验组细胞 wnt5a mRNA 表达降低（55.52±0.61）%，差异有统计学意义（$P<0.05$）。（4）实验组与其他两组相比，CaMKⅡ mRNA 表达明显降低，β-catenin、cyclinD1、c-myc、survivin 表达增高，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。（5）CaMKⅡ、β-catenin、cyclinD1 蛋白与 mRNA 表达变化一致。结论：靶向沉默 wnt5a 基因促进 Jurkat 细胞恶性增殖，抑制凋亡。作用机制可能为：下调 wnt5a 后，解除了非经典 wnt 信号通路对 β-catenin 的抑制，从而下游 cyclinD1、c-myc、survivin 靶基因上调，改变细胞周期并抑制凋亡，导致 Jurkat 细胞进一步增殖。

【关键词】wnt5a；Jurkat 细胞；RNAi；白血病
【中国图书分类法分类号】R733.71 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-02-12

Influence of siRNA interfering the expression of wnt5a on the growth of Jurkat cells and investigation on its mechanism

GU Xiao-yan, XU You-hua, SHEN Ya-li, HU Yan-ni, LI Rui-yan, WU Yu-ni
(*Department of Hematology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University; Chongqing, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorder*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the influence of siRNA targeting wnt5a on proliferation, apoptosis, and cell cycle of Jurkat cells and understand its mechanism. *Methods*: Targeting wnt5a siRNA recombinant adenovious vector Ad5-wnt5asi was constructed by homologous recombinated in E. coli BJ5183 and transfected into Jurkat cells. The cells were divided into experimental group (Jurkat cells infected with adenovirus), empty vector group (Jurkat cells infected with adenovirus), and blank control group (Jurkat cells). Cell proliferation were tested by MTT. Apoptosis rate and cell cycle were detected by flow cytometry. mRNA expression of wnt5a, β-catenin, Calmodulin dependent protein kinase Ⅱ (CaMKⅡ) cyclinD1, c-myc, and survivin were detected by RT-PCR. The protein level of β-catenin, CaMKⅡ, and cyclinD1 were tested by Western blot. *Results*: (1) cell proliferation in the experimental group was significantly higher than that in the empty vector group and control group, the difference being statistically significant ($P<0.05$). (2) The percentage of G_1 phase cells in the experimental group decreased, while S phase cells increased, as compared with other two groups, the difference being statistically significant ($P<0.05$), G_2 phase cells showed no significant difference ($P>0.05$). The apoptosis rate in the experimental group was significantly lower than those in other two groups ($P<0.05$). (3) The mRNA expression of wnt5a in the experimental group decreased by (55.52±0.61)%, as compared with that in the control group ($P<0.05$). (4) The mRNA expression of CaMKⅡ in the experimental group significantly reduced, while β-catenin, cyclinD1, c-myc, and survivin significantly increased compared with other two groups ($P<0.05$). (5) The change of the protein level of CaMKⅡ, β-catenin, cyclinD1 had the same trend to that expression of mRNA in three groups. *Conclusion*: Targeted gene silencing wnt5a promotes malignant proliferation and inhibits apoptosis of Jurkat cells. The mechanism may be that the inhibition of non-classical wnt signaling pathway on β-catenin is relieved by down-regulating wnt5a and the downstream target genes of cyclinD1, c-myc, and survivin are up-regulated with the increase of β-catenin, which changes cell cycle and inhibits apoptosis, then leads to further proliferation of Jurkat cells.

【Key words】wnt5a; Jurkat cells; RNAi; leukemia

作者介绍：顾晓艳（1984-），女，硕士，研究方向：血液肿瘤。
通信作者：徐百华，女，教授，Email: xuyouhua0504@163.com。
基金项目：重庆市卫生局资助项目（编号：渝卫科教[2008]45 号-2008-2-185）。

Wnt5a 是 wnt 蛋白信号家族成员之一，Wnt 信号通路在多种肿瘤发生、发展等过程中起着重要作用。但在不同组织中，其发挥的作用不一致。Wnt5a 既能通过 Wnt/Ca^{2+}途径，抑制经典的 Wnt/β-catenin 途径，从而抑制肿瘤生长；也能通过激活经典的 Wnt/β-catenin 通路促进肿瘤生长、侵袭、转移。Wnt5a 在恶性血液系统疾病中被认为是一种肿瘤抑制因子，但急性 T 淋巴细胞白血病细胞株 Jurkat 中 wnt5a 却相对高表达[1]，其作用及机制尚不清楚。本研究构建靶向沉默 wnt5a 的 siRNA 腺病毒表达载体，转染 Jurkat 细胞干扰 wnt5a 表达，检测该沉默体系对 Jurkat 细胞增殖的作用及 wnt 信号通路的影响，探讨 wnt5a 基因在急性 T 淋巴细胞性白血病中的作用及可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒、菌株及细胞 表达红色荧光蛋白的腺病毒穿梭质粒 pSES-HUS 由本实验室与美国芝加哥大学分子肿瘤实验室合作开发，腺病毒基因组骨架质粒 pAdEasy-1 由美国芝加哥大学分子肿瘤实验室 TONG-CHUAN HE 教授惠赠。BJ5183 及 DH5 α 菌株、腺病毒包装细胞 HEK293 细胞、人急性 T 淋巴细胞白血病细胞株 Jurkat 细胞均由本实验室保存。

1.1.2 主要仪器及试剂 PCR 仪、电泳仪、凝胶成像系统、半干电转仪均为 BIO-RAD 产品，siRNA 干扰片段由 TaKaRa 公司合成，*Sfi* Ⅰ、*Hind* Ⅲ限制性内切酶（TaKaRa 产品）、T4 连接酶（碧云天产品），*Pac* Ⅰ、*Pme* Ⅰ限制性内切酶（NEB 产品），质粒提取及纯化试剂盒购自 Omega 公司，RPMI1640、DMEM/F12 培养基、优质胎牛血清为 PAA 产品，总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、PCR Mix 酶均购自天根公司，引物由上海英俊公司合成。全蛋白提取试剂盒、ECL 化学发光检测试剂盒购自凯基公司，兔 β-catenin 单克隆抗体、兔 cyclinD1 单克隆抗体、兔 CAMKⅡ多克隆抗体、兔 β-actin 单克隆抗体均购自 Epitomics 公司，辣根过氧化物酶（HRP）标记的山羊抗兔 IgG 购自中杉金桥公司。

1.2 方法

1.2.1 Ad5-wnt5asi 重组腺病毒的构建、包装及扩增 参考文献中 siRNA 序列[2]，合成干扰片段，插入经 *Sfi* Ⅰ酶切的质粒 pSES-HUS，转导入感受态 DH5α，筛选阳性克隆，经 *Sfi* Ⅰ酶切进一步测序鉴定得到 pSES-wnt5asi。pSES-wnt5asi 质粒经 *Pme* Ⅰ酶切线性化后，与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 在 BJ5183 菌中同源重组，筛选阳性克隆，经 *Hind*Ⅲ、*Pac* Ⅰ酶切鉴定，命名为 pAd5-wnt5asi。质粒 pAd5-wnt5asi 转导入感受态 DH5α 扩增，经 *Pac* Ⅰ酶切线性化后，脂质体介导转染 293 细胞进行包装，25~30 d 收集细胞，反复冻融 3 次，收集病毒。在 HEK293 细胞中乒乓交互感染扩增 3 轮后，氯化铯（CsCl）梯度超速离心纯化，收获腺病毒 Ad5-wnt5asi，-80℃保存待用[3,4]。

1.2.2 Ad5-wnt5asi 病毒滴度的测定 以 5×10^5 个/孔接种 293 细胞于 6 孔板，待细胞密度约 80%后，倍比稀释（1:10^3~1:10^{10}）病毒上清分别感染细胞。48 h 后荧光显微镜下计算表达荧光阳性的细胞数，测定 Ad5-wnt5asi 病毒滴度（pfu/ml）。病毒滴度=（荧光阳性细胞数×病毒上清稀释倍数）/0.4。

1.2.3 Ad5-wnt5asi 转染 Jurkat 细胞 接种 Jurkat 细胞于 T25 培养瓶，病毒以转染效率较高、细胞活性较强的感染复数（Mutiplicity of infecion，MOI）（MOI≈200）感染细胞，实验分为实验组（感染腺病毒 Ad5-wnt5asi 的 Jurkat 细胞）、空载体组（感染空腺病毒的 Jurkat 细胞）及空白对照组（Jurkat 细胞）。

1.2.4 MTT 检测细胞增殖能力 Jurkat 细胞以 10^5 个/ml 密度接种于 96 孔板（共 3 组，每组设 5 个附孔，实验重复 3 次），总体积 200 μl，分别培养 0、1、3、5 d。向每孔加入 20 μl MTT 溶液，孵育 4 h，离心去培养液，每孔加入 100 μl DMSO，置摇床上低速震荡 10 min，酶联免疫检测各孔吸光度（OD）值，以时间、吸光度绘制细胞增殖曲线。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡率 重组腺病毒 Ad5-wnt5asi 感染 Jurkat 细胞 72 h 后，取各组细胞 1×10^6，PBS 洗 2 遍，将细胞悬液滴入 1 ml 70%预冷的乙醇中，4℃固定 24 h。PBS 洗涤去乙醇，0.5 ml PBS 重悬，加入碘化丙啶和 RNaseA，37℃温育 30 min，流式细胞仪测定细胞周期及凋亡率。

1.2.6 RT-PCR 检测各组细胞 wnt5a、β-catenin、钙调蛋白依赖性激酶Ⅱ（*Calmodulin dependent protein kinase* Ⅱ，CaMKⅡ）、cyclinD1、c-myc、survivin mRNA 水平 细胞总 RNA 提取及逆转录成 cDNA：均参照试剂盒说明书操作。PCR：各引物序列见表 1。反应条件：94℃预变性 3 min，94℃变性 30 s，58℃退火 30 s，72℃延伸 1 min，扩增 35 个循环，1.5%琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像系统照相分析，各 mRNA 表达水平按各基因与内参灰度比值确定。

表 1 各基因引物序列

引物名称	基因序列	扩增片段长（bp）
wnt5a	上游 5'-TGTGGTTTAATGGTGCCTGA-3'	253
	下游 5'-TTCGTCGTGCTCAAGGTATG-3'	
β-catenin	上游 5'-TGGTTGCCTTGCTCAACA-3'	125
	下游 5'-AGCTTGGGGTCCACCACT-3'	
CaMKⅡ	上游 5'-AAGATGTGCGACCCTGGAATG-3'	784
	下游 5'-TGTAGGCGATGCAGGCTGAC-3'	
c-myc	上游 5'-GCAGCTGCTTAGACGCTGGA-3'	300
	下游 5'-AGAAGGATATGACCGCAACG-3'	
cyclinD1	上游 5'-CCCTCGGTGTCCTACTTCAAA-3'	726
	下游 5'-CACCTCCTCCTCCTCCTCTTC-3'	
survivin	上游 5'-TCCACTGCCCCACTGAGAAC-3'	77
	下游 5'-TGGCTCCCAGCCTTCCA-3'	
β-actin	上游 5'-AAGATGACCCAGATCATGTTTGAGACC-3'	191
	下游 5'-GCCAGGTCCAGACGCAGGAT-3'	

1.2.7 Western blot 检测各组细胞 β-catenin、CaMK Ⅱ、cyclinD1 蛋白表达 分别取各组细胞 10^6 个，加入制备好的蛋白裂解液中，高速离心取上清即为全蛋白提取物。取 50 μg 各组标本总蛋白，10%SDS-PAGE 分离蛋白，转膜。封闭 90 min，洗膜后分别与兔抗人 β-catenin 单克隆抗体（1:2 000）、兔抗人 cyclinD1 单克隆抗体（1:5 000）、兔抗人 CaMK Ⅱ 多克隆抗体（1:5 000）、兔抗人 β-actin 单克隆抗体（1:5 000）4℃孵育过夜，洗膜后加入辣根过氧化物标记的山羊抗兔 IgG（1:2 000），室温孵育 2 h。ECL 发光试剂盒化学发光显色。蛋白相对含量以其条带灰度值/β-actin 条带灰度值表示。

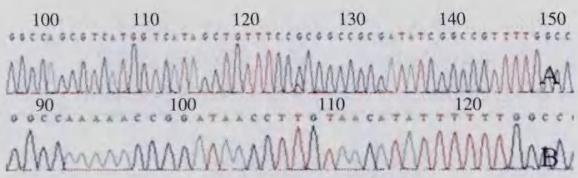
1.3 统计学分析

实验结果用$\bar{x}\pm s$表示，采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析，组间比较采用方差分析或秩和检验，并作两两比较。方差分析之后的两两比较为 LSD 法，秩和检验后两两比较为 Mann-Whitney U 检验。以 P 值<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 重组腺病毒 pAd5-wnt5asi 的鉴定、包装扩增及滴度测定

2.1.1 pSES-HUS 及 pSES-wnt5asi 测序鉴定 在 *Sfi* Ⅰ酶切位点（ggcc）间连接特异性 wnt5asiRNA 片段（见图 1），提示质粒 pSES-wnt5asi 构建成功。



A. 质粒 pSES-HUS *Sfi* Ⅰ酶切位点序列

B. 质粒 pSES-wnt5asi *Sfi* Ⅰ酶切位点序列

图 1 质粒 pSES-HUS 及 pSES-wnt5asi 测序图

2.1.2 *Hind* Ⅲ、*Pac* Ⅰ酶切鉴定重组腺病毒质粒 pAd5-wnt5asi *Hind* Ⅲ酶切 pAd5-wnt5asi 获得 6 个片段，同时 *Pac* Ⅰ酶切 pAd5-wnt5asi 获得约 4.5 kb 的小片段及大于 23 kb 的大片段（见图 2），提示重组腺病毒质粒 pAd5-wnt5asi 构建成功。



M. DNA Marker DL23000；1. pAd5-wnt5asi；2. pAd5-wnt5asi/*Hind* Ⅲ；3. pAd5-wnt5asi/*Pac* Ⅰ

图 2 *Hind* Ⅲ、*Pac* Ⅰ酶切鉴定 pAd5-wnt5asi 质粒

2.1.3 重组腺病毒包装扩增及滴度测定 重组腺病毒 pAd5-wnt5asi 在 HEK293 细胞包装 24 h 后观察红色荧光蛋白表达，且随着时间的延长细胞表达的红色荧光蛋白量也逐渐增加（见图 3）。CsCl 梯度超速离心纯化后测定 pAd5-wnt5asi 病毒滴度约为 3.5×10^{11} pfu/ml。

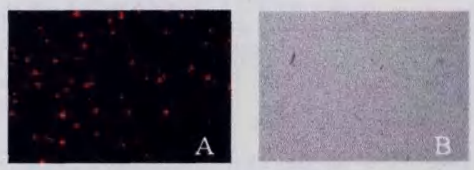


A. 293 细胞包装重组腺病毒第 1 天；B. 293 细胞包装重组腺病毒第 10 天；C. 293 细胞包装重组腺病毒第 25 天

图 3 重组腺病毒感染 HEK293 包装细胞

2.2 重组腺病毒感染 Jurkat 细胞

由图 4 荧光可见重组腺病毒 pAd5-wnt5asi 可有效感染 Jurkat 细胞，且细胞生长状态较好。



A. 重组腺病毒 pAd5-wnt5asi 感染 Jurkat 细胞 72 h 荧光镜下观；

B. 重组腺病毒 pAd5-wnt5asi 感染 Jurkat 细胞 72 h 平光镜下观

图 4 重组腺病毒感染 Jurkat 细胞（×100）

2.3 MTT 检测细胞增殖

实验组细胞生长较空载体组及空白对照组明显增快（P<0.05），而空载体组与空白对照组相比细胞增殖无明显差异。提示重组腺病毒 Ad5-wnt5asi 可促进 Jurkat 细胞进一步恶性增殖。

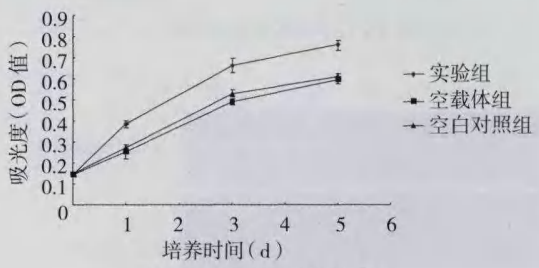


图 5 各组细胞增殖曲线

2.4 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡

实验组与空载体组及空白对照组相比，G_1 期细胞比例明显降低，S 期细胞比例明显增高（P<0.05）。G_2 期细胞比例差异无统计学意义（P>0.05）。实验组与空载体组及空白对照组相比，凋亡率明显降低（P<0.05）。

2.5 RT-PCR 检测 wnt5a、β-catenin、CaMK Ⅱ、cyclinD1、c-myc、survivin mRNA 表达

实验组细胞 wnt5a 的 mRNA 与空载体组及空白对照组相比，表达降低（55.52±0.61）%（P<0.05）。实验组与空载体组及空白对照组相比，CaMK Ⅱ mRNA 的表达明显降低，β-catenin、cyclinD1、c-myc、survivin 的表达明显增高，差异具有统计学意义（P<0.05）。

2.6 Western blot 检测 3 组 Jurkat 细胞 β-catenin、CaMK Ⅱ、cyclinD1 蛋白表达

实验组与空载体组及空白对照组相比，CaMK Ⅱ 蛋白表

表 2　各组细胞增殖情况检测（MTT法OD值）（n=6，$\bar{x}\pm s$）

分组	第 0 天	第 1 天	第 3 天	第 5 天
实验组	0.144 1 ± 0.002 6	0.382 1 ± 0.017 3#	0.661 6 ± 0.032 3#	0.757 6 ± 0.023 3#
空载体组	0.145 8 ± 0.002 7	0.252 3 ± 0.003 4	0.489 4 ± 0.015 2	0.597 8 ± 0.023 2
空白对照组	0.146 8 ± 0.003 4	0.270 2 ± 0.015 4	0.529 2 ± 0.016 3	0.609 8 ± 0.012 4

注：#，与空载体组及空白对照组比较，$P<0.05$

表 3　各组细胞细胞周期及凋亡情况（n=3，$\bar{x}\pm s$）

分组	G1期（%）	G2期（%）	S期（%）	凋亡率（%）
实验组	38.50 ± 1.16*	14.82 ± 2.59※	46.68 ± 1.63*	0.87 ± 0.07*
空载体组	53.39 ± 1.11	12.84 ± 0.72	33.76 ± 0.61	4.39 ± 0.83
空白对照组	53.60 ± 1.51	12.42 ± 1.36	34.05 ± 1.63	3.94 ± 0.73

注：*，与空载体组及空白对照组比较，$P<0.05$；※，与空载体组及空白对照组比较，$P>0.05$

表 4　各组细胞内各基因 PCR 产物相对灰度比值（n=3，$\bar{x}\pm s$）

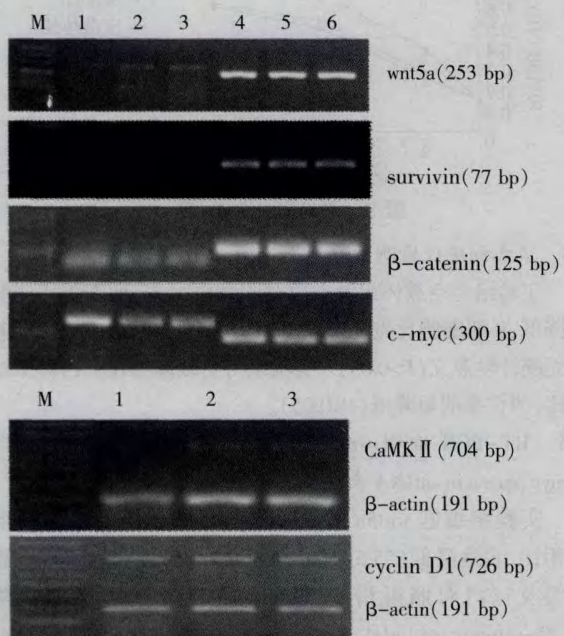
PCR产物	实验组	空载体组	空白对照组
wnt5a	0.065 6 ± 0.013 5a	0.147 1 ± 0.014 3	0.140 6 ± 0.017 2
CaMKⅡ	0.016 7 ± 0.002 8a	0.135 3 ± 0.005 3	0.112 3 ± 0.005 9
β-catenin	0.511 3 ± 0.055 6a	0.330 3 ± 0.038 6	0.358 1 ± 0.045 1
cyclinD1	0.298 1 ± 0.006 4a	0.244 6 ± 0.007 2	0.245 5 ± 0.003 3
c-myc	1.155 6 ± 0.065 2a	0.709 8 ± 0.011 3	0.731 6 ± 0.027 4
survivin	0.305 2 ± 0.008 4a	0.170 4 ± 0.007 0	0.191 9 ± 0.008 6

注：a，与空载体组及空白对照组比较，$P<0.05$

表 5　各组细胞 β-catenin、CaMKⅡ、cyclinD1 蛋白与内参 β-actin 相对灰度

分组	CaMKⅡ	β-catenin	cyclinD1
实验组	0.176 1 ± 0.005 4△	0.606 1 ± 0.014 7△	1.084 8 ± 0.070 7△
空载体组	0.443 9 ± 0.025 1	0.454 ± 0.024 2	0.806 4 ± 0.022 1
空白对照组	0.466 7 ± 0.005 2	0.451 1 ± 0.002 8	0.778 7 ± 0.047 1

注：△，与空载体组及空白对照组比较，$P<0.05$



M.marker DL500/DL1000；1.实验组；2.空载体组；3.空白对照组；4、5、6 分别为各组内参 β-actin（191 bp）

图 6　各组细胞内 Wnt5a、β-catenin、C-myc、survivin、cyclinD1、CaMKⅡ mRNA 表达情况

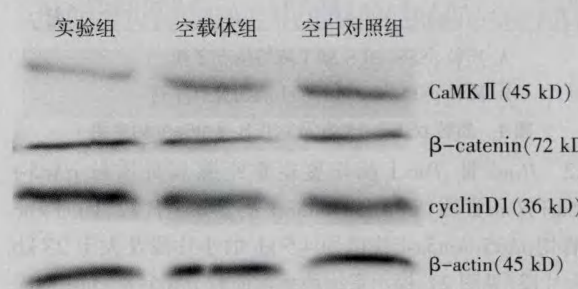


图 7　各组细胞内 CaMKⅡ、β-catenin、cyclinD1 及 β-actin 蛋白表达情况

达明显降低，β-catenin、cyclinD1 表达明显增高，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。

3　讨　论

Wnt5a 是 wnt 蛋白家族成员之一。Wnt 蛋白是一种调节细胞生长、发育和分化的分泌性疏水糖蛋白，以旁分泌的形式激活 wnt 信号通路在靶细胞内起作用。Wnt 信号通路参与多种组织器官发育过程，尤其是参与调节多种组织干细胞的自我更新能力，且与多种肿瘤的发生有关[5,6]。在血液系统恶性肿瘤中，wnt5a 被认为是一种肿瘤抑制因子。Ying J 等[7]研究显示，wnt5a 基因在多种血液系统恶性肿瘤如白血病、burkkit

淋巴瘤以及结节状淋巴瘤中表达沉默；并通过真核表达载体介导的方法将 wnt5a 基因直接转染 K562 细胞，其生长抑制，提示 wnt5a 可能是肿瘤抑制因子。在 T 细胞，$CD4^+$ ALL 和混合前 B/髓细胞 ALL，wnt5a 表达阳性，在 T 淋巴细胞白血病细胞株 Jurkat 中 wnt5a 也表达阳性，提示 wnt5a 对造血细胞的作用机制可能不同。

本课题组前期检测 Jurkat、K562、HL-60 3 种白血病细胞细胞株中wnt5a mRNA表达，发现仅Jurkat细胞表达wnt5a。本研究成功构建特异性 wnt5a 的 siRNA 腺病毒表达载体，转染 Jurkat 细胞干扰 wnt5a 表达，48 h wnt5a mRNA 表达下降(55.52±0.61)%。腺病毒 Ad5-wnt5asi 感染 Jurkat 细胞后，进一步促进了 Jurkat 细胞恶性增殖，提示 wnt5a 本身在 Jurkat 细胞内具有抗细胞恶性增殖的能力，在 Jurkat 细胞中，wnt5a 可能是抑癌基因。靶向沉默 Jurkat 细胞中 wnt5a 的表达后，Jurkat 细胞的凋亡率增加，同时 G_1 期的细胞减少，S 期的细胞比例明显增多，加速了细胞周期。提示 wnt5a 能通过调控细胞周期，抑制凋亡，从而抑制 Jurkat 细胞的恶性增殖。Roman-Gomez J 等在对 307 例 ALL 病例和 6 个 ALL 源性细胞系研究中发现，所有 ALL 细胞系和 43%ALL 病例中存在wnt5a 过度甲基化，且 wnt5a 甲基化与 wnt5a mRNA 表达降低成负相关，这种表现在脱甲基剂 5-Aza-2 脱氧胞苷作用后恢复[8]，提示 wnt5a 在 Jurkat 细胞中的相对高表达是 wnt5a 的部分甲基化，wnt5a 在 Jurkat 细胞中可能仍发挥部分抑癌基因的作用。

Wnt 信号通路主要有经典的 Wnt/β-catenin 信号通路及非经典 Wnt/Ca^{2+}信号通路及 Wnt/Jnk 信号通路。wnt5a 至少有 2 条传导途径：wnt5a 能活化经典的 Wnt/β-catenin 通路，调控下游基因 c-myc、cyclinD1、survivin 等，从而调节细胞生长；活化非经典的 Wnt/Ca^{2+}通路，Wnt5a 与 FZD 结合，通过 G 蛋白活化 PLC 和激发细胞间 Ca^{2+}释放，从而活化蛋白激酶 C 和 CaMKⅡ，调控经典信号通路或活化钙敏感的转录因子NFAT[9]。本研究通过特异性干扰 wnt5a 表达，发现 Wnt/Ca^{2+}信号通路中的关键因子 CaMKⅡmRNA 及蛋白表达均下降，非经典通路下调，而 β-catenin mRNA 及蛋白表达均增加。wnt5a 沉默后，通过下调非经典的 Wnt/Ca^{2+}信号通路，减弱了对经典的 wnt/β-catenin 通路的抑制，提示 wnt5a 在 Jurkat 细胞中可能通过激活非经典通路，抑制经典通路，发挥其抑癌基因的作用。wnt5a 激活非经典的 wnt 信号通路后对于经典的 β-catenin 通路的调节机制尚不清楚。在非洲爪蟾及小鼠胚胎中非经典的 wnt 信号通路可抑制经典的 wnt 信号通路，其机制可能是 wnt5a 诱导 E3 泛素化连接酶复合体，介导 β-catenin 降解；在 wnt5a 缺陷的小鼠中存在 β-catenin 的下降[10-12]；然而在胚胎肝细胞中 wnt5a 的缺失并不影响 β-catenin 的水平[13]；wnt5a 同样也能通过钙依赖性激酶介导抑制 β-catenin 的稳定性[14]。

Wnt 信号通路下游的靶基因包括 survivin、c-myc、cyclinD1、c-jun 等。c-myc 是常见的核内癌基因，在调控细胞增殖、凋亡、分化中起重要作用，目前已经在血液系统的恶性肿瘤中发现其普遍高表达。survivin 是一种结构独特的凋亡抑制基因，具有调控细胞周期及抑制凋亡的双重作用[15]。在本研究中 wnt 信号通路下游靶基因 survivin、c-myc mRNA 在 wnt5a 干扰后均增高，提示在 wnt5a 表达下降后，Jurkat 细胞细胞周期的改变及凋亡的抑制与此有关。cyclinD1 为细胞周期素，参与细胞周期调节。本研究中，cyclinD1 在 mRNA 及蛋白水平都增高，cyclinD1 的过表达使细胞周期中 G_1/S 期检测点功能低下，使癌基因失去调控而进入 S 期复制，不能启动凋亡途径而凋亡，使细胞周期及癌基因的复制加速。在甲状旁腺瘤、乳腺癌、头颈部鳞癌等大部分肿瘤中存在 cyclinD1 的过表达[16]。

Wnt 信号通路在 wnt5a 特异性干扰后发生了一系列的变化，尤其是下游多个癌基因的水平增高，提示在该信号通路中，调控上游关键因子如 wnt5a、CaMKⅡ、β-catenin 等，通过复杂的信号网络系统，可能能同时调控多个癌基因，更有效地抑制肿瘤的恶性增殖。故继续进一步探究其各组分及相互作用机制，开发该通路特定靶点有效增强剂或拮抗剂，无疑将对抗肿瘤药物的发展产生巨大的影响，有望开拓肿瘤治疗的一个新局面。

参 考 文 献

[1] 李招权，司维柯，潘 静，等.Wnt5a 基因在血液病及白血病细胞株中的表达[J].中国实验血液学杂志，2007，15(5)：927-930.

[2] Tamimi Y，Ekuere U，Laughton N，et al.WNT5A is regulated by PAX2 and may be involved in blastemal predominant Wilms tumorigenesis [J].Neoplasia，2008，10(12)：1470-1480.

[3] 郭玉霞，罗 庆，徐酉华.耐药相关新基因 HA117 的克隆及重组腺病毒制备[J].重庆医科大学学报，2008，33(6)：641-644.

[4] 冯 涛，何通川，宋文鑫.HBX 基因重组腺病毒载体的构建[J].重庆医科大学学报，2004，29(3)：273-278.

[5] Reya T，Clevers H.Wnt signalling in stem cells and cancer[J].Nature，2005，434(7035)：843-850.

[6] Nemeth M J，Topol L，Anderson S M，et al.Wnt5a inhibits canonical Wnt signaling in hematopoietic stem cells and enhances repopulation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2007，104(39)：15436-15441.

[7] 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.

[8] 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.

[9] Kuhl M.The WNT/calcium pathway：biochemical mediators，tools and future requirements[J].Front Biosci，2004，9：967-974.

[10] Mikels A J，Nusse R.Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context[J].PLoS Biol，2006，4(4)：570-582.

[11] Torres M A，Yang-Snyder J A，Purcell S M，et al.Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early Xenopus development

基础研究 文章编号:0253-3626(2011)07-0814-04

镉对大鼠睾丸支持细胞波形蛋白、E-钙黏蛋白表达及血睾屏障的影响

廖晓岗,石之虎,邹 聪,毛胜艳,范京川
(重庆医科大学生命科学研究院,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨镉(Cadmium)对大鼠睾丸支持细胞波形蛋白、E-钙黏蛋白表达和血睾屏障的影响。方法:21 只 6 周龄雄性 SD 大鼠随机分为单纯镉组(0.1%氯化镉腹腔内注射,1 mg/(kg·bw),每周连续注射 5 d,处理后 1、2、3、4 周取材)和对照组(腹腔内注射等量生理盐水);镧示踪组和镉加镧组(镉剂量同上,1 周取材),各实验组及对照组均为 3 只动物。取睾丸作光镜免疫组化和图像分析、血睾屏障超微结构及镧示踪观察。结果:波形蛋白阳性产物主要在支持细胞近基室腔的胞浆中表达,并向曲细精管管腔呈辐射状延伸;E-钙黏蛋白阳性产物主要定位于生精上皮近腔室的支持细胞和部分生精细胞胞浆中。镉处理后两种蛋白阳性产物表达的平均光密度值明显降低,支持细胞胞质特化区和紧密连接破坏。镉加镧处理组硝酸镧透过支持细胞紧密连接间隙。结论:镉减弱大鼠睾丸支持细胞波形蛋白和 E-钙黏蛋白的表达,造成支持细胞血睾屏障的损伤。

【关键词】镉;支持细胞;硝酸镧;波形蛋白;E-钙黏蛋白
【中国图书分类法分类号】R322.64 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-12-21

Effect of the cadmium on the expression of vimentin & E-cadherin in sertoli cell and the ultrastructure of blood-testis barrier in rats

LIAO Xiao-gang, SHI Zhi-hu, ZOU Cong, MAO Sheng-yan, FAN Jing-chuan
(*Institute of Life Science, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of the cadmium(Cd)on the expression of vimentin(V)& E-cadherin(E-cad)in Sertoli cell(Sc)and the ultrastructure of blood-testis barrier(BTB)in rats. *Methods*: 21 SD male rats were randomly divided into Cd group (rats of different interval from 1 w to 4 w time were intraperitoneally injected with 0.1% $CdCl_2$, 1 mg/(kg·bw), 5 days a week)and control group(rats were intraperitoneally injected with equal dosage of normal saline); lanthanum nitrate(La)tracing group and Cd+La group. The testes were respectively studied by light, electron microscope and immunohistochemistry of V & E-cad and by semi-quanitatively image analysis. *Results*: The positive product of V was expressed in cytoplasm of Sc, and elongated radially to lumens in seminiferous tubules. But, the positive product of E-cad was localized mainly in cytoplasm of Sc and some spermatogenic cells. After Cd treatment, the average optical density(AOD) of V and E-cad were decreased obviously; the ultrastructure damage of BTB and ectoplasmic specializations(Es)in Sc were observed. The La-tracing showed that tight junction(TJ)of Sc was infiltrated by La in Cd+La group. *Conclusion*: Cd decreases the expression of V and E-cad in Sc and damages BTB of Sc in rats.

【Key words】cadmium; sertoli cells; lanthanum nitrate; vimentin; E-cadherin

作者介绍:廖晓岗(1958-),男,副教授,硕士,
研究方向:生殖生物学与细胞超微病理学。

基金项目:重庆医科大学校级课题基金资助项目(编号:XBYB2008058)。

[J].J Cell Biol, 1996, 133(5): 1123-1137.

[12] Topol L, Jiang X, Choi H, et al.Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation[J].J Cell Biol, 2003, 162(5): 899-908.

[13] 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.

[14] Ishitani T, Kishida S, Hyodo-Miura J, et al.The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling[J].Mol Cell Biol, 2003, 23(1): 131-139.

[15] Ambrosini G, Adida C, Altieri D C.A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J].Nat Med, 1997, 3(8): 917-921.

[16] Tetsu O, McCormick F.Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells[J].Nature, 1999, 398(6726): 422-426.

(责任编辑:冉明会)