维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)04－0413－04

Wnt/β－连环蛋白信号途径活性的分析系统的建立

冯 涛[1], 周 兰[2], 何通川[3]

(1.重庆医科大学基础医学院生物化学教研室;2.重庆医科大学生物医学工程系,重庆 400016
3.芝加哥大学医学中心分子肿瘤研究室,美国)

【摘 要】目的:建立 Wnt/β－连环蛋白信号途径功能活性的分析系统。方法:首先构建一个表达 β－连环蛋白－绿色荧光蛋白的融合蛋白的载体,pCMV－bcGFP;再用之转染 HEK293 细胞,用 G418 和 LiCl 筛选出稳定表达该融合蛋白的细胞,克隆建株并鉴定。结果:成功获得稳定表达该融合蛋白的细胞株,即 293－bc－GFP 细胞株;在荧光显微镜下以及蛋白质印迹分析证实:所获得的 293－bc－GFP 细胞株表达该融合蛋白的基础水平极低;用 Wnt1 和 LiCl 处理后可以明显地使该融合蛋白在细胞内的水平升高。结论:上述结果提示该分析系统是以 Wnt 依赖的方式、受 β－连环蛋白调节的。该分析系统可以用作一个功能报告系统,以鉴定肿瘤发生中导致 β－连环蛋白信号途径失调的潜在的上游因子,也同样可以用于筛选那些特异抑制人类肿瘤中 β－连环蛋白信号途径活性的潜在的抗癌分子。

【关键词】Wnt/β－连环蛋白信号途径;β－连环蛋白－绿色荧光蛋白;功能分析系统
【中国图书分类法分类号】Q781 【文献标识码】A 【收稿日期】2004－01－08

The development of a functional assay system of Wnt/β－catenin signal pathway

FENG Tao, et al

(Department of Biochemistry, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To develop a Wnt－dependent β－catenin－mediated functional assay system. *Methods*: To construct a vector, pCMV－bcGFP, which can express the β－catenin and green fluorescent protein(GFP) fusion protein; transfect HEK293 with the vector, select the cells with G418 and LiCl and establish the stable cell line, 293－bc－GFP by cloning. *Results*: 293－bc－GFP stable cell line was developed; the background expression of β－catenin－GFP fusion protein was detectable at a very low level in the cell line under fluorescent microscope and via Western blotting analysis; however, the fusion protein was showed to significantly increase in the presence of Wnt1 and lithium. *Conclusion*: Our results showed that the system is regulated by β－catenin in a Wnt－responsive fasion. Thus, it can be used as a functional reporter to identify potential upstream factors during tumorigenesis, as well as to screen for the potential anti－cancer agents that specifically inhibit β－catenin signaling in human tumors.

【Key words】Wnt/β－catenin signaling pathway; β－catenin and GFP fusion protein; Functional assay system

细胞信号转导的深入研究促使对细胞癌变机制有了新的认识。信号转导调节正常细胞的增殖、分化,其中一个或多个环节的异常也与肿瘤的发生发展密切相关,即肿瘤的发生原因之一是由于信号转导途径中错误的积累所致。研究这些错误发生的原因、过程和结果,对阐明肿瘤的发生机制具有重要的意义,并可以利用这些特异信号分子及其下游效应物来实施肿瘤靶向性治疗策略。根据信号转导途径设计的抗肿瘤药物,可以通过封闭特异的信号分子,纠正发生错误的信号传递途径,因此被认为将是最有效、最可能有突破性的肿瘤治疗策略之一[1]。

β－连环蛋白(β－catenin)是 Wnt/Wingless 信号途径的关键信号分子。Wnt 配体通过与 frizzled 受体以及低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 和 6(LRP5 和 LRP6)结合,引起 disheveled 蛋白(DVL)的磷酸化而启动该信号通路;继而磷酸化的 DVL 与 Axin 和肿瘤抑制基因 APC(adenomatous polyposis coli)共同阻止糖原合酶激酶(GSK－3β)对 β－连环蛋白的磷酸化。没有磷酸化的 β－连环蛋白则不被降解系统所识别,最终进入细胞核,并与转录因子 TCF4 结

作者介绍:冯 涛(1963－),男,副教授,硕士,
主要研究方向:生物化学及分子生物学
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30340039),
教育部春晖计划项目资助(03)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

合,从而激活下游靶基因(c-myc, cyclin D1)的表达[2]。

最初是在结直肠癌中发现该信号途径和肿瘤的发生有密切的关系。90%以上的结肠癌有该信号系统活性的增强[3,4]。随后,又在其它许多人类肿瘤中发现了β-连环蛋白的突变和胞浆游离β-连环蛋白水平升高;而且,致癌性突变的β-连环蛋白可以在转基因动物诱发肿瘤的形成;在致癌原和激活的癌基因诱导形成的肿瘤中,也能够检测到β-连环蛋白的突变[5~7]。这些资料提示,β-连环蛋白信号途径的激活在人类肿瘤的发生发展中起了重要作用。因此,阐明该途径激活的分子机制将有助于明了肿瘤发生发展的分子基础;同时,也可能从中发现抗癌治疗的作用靶点。

为此,我们建立了一个以绿色荧光蛋白为报告基因的高通量的分析系统,作为鉴定肿瘤发生发展过程中导致β-连环蛋白信号途径失调的因子的有力工具;同时,也可以用于筛选特异抑制β-连环蛋白信号的潜在抗癌药。因此该系统的建立,既有利于阐明β-连环蛋白信号途径失调的发生机制,具有理论意义;也有助于寻找作用于该信号系统的抗癌药物,具有一定的经济价值和实际意义。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及试剂

人胚胎肾细胞株 293(HEK293)和人结肠癌细胞株 HCT116 购自 ATCC(Manassas, VA, USA);HEK293 细胞培养在含 10% FBS(Mediatech, Herndon, VA, USA)、100U/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素的完全 DMEM 中;HCT116 细胞的培养用含 10% FBS、100U/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素的 McCoy's5A 培养基;培养条件为:5% CO_2 和 37℃。

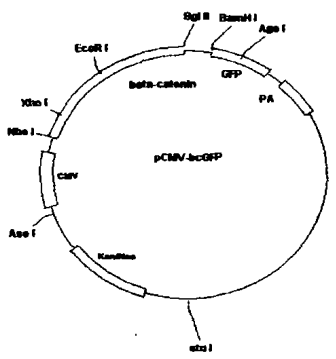


图 1 pCMV-bcGFP 结构示意图

1.2 构建表达β-连环蛋白-绿色荧光蛋白的融合蛋白的重组质粒

构建 pCMV-bcGFP:载体为 pEGFP-N1,用 Nhe I and *BamH* I 酶切备用;插入片段为人β-连环蛋白编码全长基因,来自 pCMV-WBCD,用 Nhe I and Bgl Ⅱ酶切获得。见 pCMV-bcGFP 结构示意图(图 1)。

1.3 细胞转染及稳定表达细胞株的筛选和克隆建株

将 HEK293 细胞种入 T25 培养瓶,过夜;用 Lipofectamine(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)促进质粒 pCMV-bcGFP(3ug DNA/T25)转入细胞,按说明书要求操作;24h 后,用胰酶消化将细胞收集起来,按有限稀释法再将细胞种入 96 孔板,用含 0.3μg/ml G418 的 DMEM 完全培养基进行选择性培养;待孔中有单个细胞克隆形成时(大约 2 周后),加入终浓度为 30mM 的氯化锂(LiCl),过夜;次日在荧光显微镜下,寻找表达 GFP 的单个克隆;将这些克隆的细胞分别按有限稀释法进行克隆,重复 3 次,以期得到稳定表达该融合蛋白的细胞株。

1.4 Wnt1 的条件培养液(Wnt1-conditioned medium, Wnt1-CM)及其对照培养液(GFP-CM)的制备

用 Ad5-Wnt1 病毒和 Ad5-GFP 病毒(腺病毒的制备参见文献[8])分别感染指数生长期的 HCT116 细胞株,6h 后换液并洗涤细胞,以移去病毒;加入新鲜的无血清培养液(10ml/T75 培养瓶),24h 后收集上清,离心、经过 0.2μm 滤膜过虑,-4℃存放备用。

1.5 Wnt1 对所建立细胞株的作用

将 293-bc-GFP 细胞种 24 孔板中,培养过夜;加入 Wnt1-CM 或者 GFP-CM(对照组),24h 后在荧光显微镜下观察 GFP 表达情况。

1.6 Western blotting 分析

将已经克隆建株的 293-bc-GFP 细胞种入 24 孔板中,加入终浓度为 30mmol/L 的 LiCl(用培养基配制),对照孔则加入等量的不含 LiCl 培养基。过夜后收集细胞裂解液,离心后的上清在 Laemmli 样品缓冲液中煮沸变性,然后加样到 4%~20% 梯度 SDS-PAGE(约 10μg 总蛋白质/道);电泳分离后,通过电印迹将蛋白质转移到 ImmobilonTM-P 膜上(Millipore, Bedford, MA, USA);该膜用 5% 的脱脂奶-TBST(10mmol/L Tris-HCl;pH 8.0;150mmol/L NaCl;0.05% Tween 20)在室温下封闭 1h;然后用一抗即抗β-连环蛋白的抗体(Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA)在室温中振荡作用 60min;充分洗涤后,加入二抗即结合有辣根过氧化物酶的抗鼠 IgG 抗体(Pierce Chemical, Rockford, IL, USA)。β-连环蛋白及其与 GFP 的融合蛋白的存在可以通过 SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit (Pierce Chemical)检测并用 Kodak 440CF Image Station 记录。

2 结 果

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.1 β-连环蛋白-GFP融合蛋白表达载体的构建

用常规的基因克隆方法,完成了该重组载体的构建,并通过酶切等方法进行了鉴定,其结构见图1。

2.2 293-bc-GFP细胞株的建立

HEK293细胞转染pCMV-bcGFP 2周后,从显微镜下选择只有一个克隆生长的孔,加入终浓度为30mmol/L的LiCl,过夜;次日在荧光显微镜下选择GFP表达强、活力好的细胞并收集之,用有限稀释法进行克隆化建株。重复3次后,获得单克隆化的293-bc-GFP细胞株:在荧光显微镜下,其背景极低,几乎不见GFP;当加入LiCl后,其GFP强度将明显增加。见图2。

2.3 蛋白质印迹分析的结果进一步确认了细胞株中该融合蛋白的表达

从图3可见,未加入LiCl的细胞中,有β-连环蛋白的本底和极少量的融合蛋白存在;加入LiCl后的细胞,融合蛋白的水平明显增加,同时β-连环蛋白本底也有增强。

2.4 为确定该系统的功能是Wnt1信号途径特异的,将该细胞株用Wnt1-CM和GFP-CM培养后,发现Wnt1-CM组的GFP强度明显增加,而对照组没有变化。见图4。

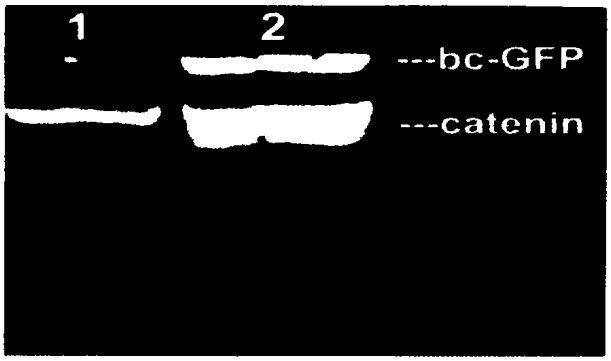


图2 293-bc-GFP细胞株对LiCl的反应

A、LiCl(-) B、LiCl(+)



图3 293-bc-GFP细胞株中的蛋白质印迹分析

1、LiCl(-) 2、LiCl(+)



图4 GFP的特异性表达

A、GFP-CM B、Wnt1-CM

3 讨 论

将人β-连环蛋白全长基因与绿色荧光蛋白的基因相融合,获得pCMV-bcGFP;该融合蛋白由

维普资讯 http://www.cqvip.com

CMV 启动子控制其表达；通过用 pCMV－bcGFP 转染 HEK293 细胞，获得稳定表达该融合蛋白的细胞株，293－bc－GFP。之所以选择 293 细胞株，是因为其中的 β－连环蛋白信号途径是完整无缺陷的，并且其中该途径的基础水平比较低，几乎可以忽略不计。pCMV－bcGFP 中含 Neo 抗性基因，因此，含 pCMV－bcGFP 载体并表达之的 293 细胞就能够在含 G418 的环境下生长，而没有该载体表达的 293 细胞则不能耐受 G418，因此不能存活下来。该细胞株被命名为 293－bc－GFP 细胞株。

该功能分析系统的工作原理：在正常情况下，胞内 β－连环蛋白极不稳定，很容易被它的降解系统所降解，所以胞内游离的 β－连环蛋白水平很低；同理，该系统中的 β－连环蛋白－GFP 融合蛋白也被迅速降解。因此，在荧光显微镜下细胞内几乎不见或仅有微弱的绿色荧光，即本底极低；当施加的因素中有增强 β－连环蛋白稳定性从而引起该信号途径活性增强的因子时，细胞内该融合蛋白水平便随之增高，绿色荧光也就从无到有、由弱变强，因此可以鉴定影响该途径的因子；同样，当用来筛选抑制 β－连环蛋白信号活性的药物时，可以先在系统中加入稳定该融合蛋白的因子(例如锂)，让 GFP 表达到可检测水平(荧光显微镜下可见绿色荧光)；然后加入被筛选的药物。如果绿色荧光减弱或消失，则表明该被测物有抑制 Wnt/β－连环蛋白信号途径活性的作用。

研究显示，该融合蛋白可有效地被锂稳定。已知，锂能够通过抑制 GSK3β 的激酶活性而模拟 Wnt 信号[9]。这是我们利用它选择所要建立的稳定表达该融合蛋白的细胞的机理；同时这也解释了为什么锂刺激后内源性 β－连环蛋白水平会增高(见图 3)。该蛋白印迹方法(化学发光法)的敏感性很高，所以对照组的细胞(未加 LiCl)尽管在荧光显微镜下几乎不见 GFP，但是在印迹时却可以看见微量融合蛋白的存在。

尽管已知锂可以激活 293－bc－GFP 细胞，但是它也可能作用于细胞内其它的过程。因此，我们又制备了 Wnt1－CM 来进一步确实该分析系统的特异性。当该细胞株接触 Wnt1－CM 后，其荧光强度明显增加。提示该细胞株内 bc－GFP 的表达特异地被 Wnt 信号调节。

因此，293－bc－GFP 可以作为 Wnt/β－连环蛋白信号途径功能的指示性细胞而用于剖析肿瘤中该信号途径失调的发生机制和筛选靶向该系统的抗癌药物，即：

1、鉴定人肿瘤中致 β－连环蛋白信号失调的潜在的上游因子。β－连环蛋白/TCF 复合物的转录活性是由游离的 β－连环蛋白的稳定性/半衰期来调节的；而后者又由 APC/Axin/GSK3β 进行负调节。β－连环蛋白的突变或其负调节因子的突变都将导致其稳定性增加。事实上，尽管我们知道 β－连环蛋白信号途径在肿瘤发生发展中起了重要作用，但是在除结直肠癌以外的其它众多的肿瘤中导致该信号途径失调的分子机制尚未阐明。因此，该功能报告系统可以用来鉴定导致 β－连环蛋白活性失调的上游因子。

2、作为功能性报告系统，它可以实现特异抑制人类肿瘤中 β－连环蛋白信号的潜在抗癌剂的高通量筛选。已知人类肿瘤中的 β－连环蛋白信号常常失调，因此可以发展特异靶向该信号途径的有效抗癌剂，包括一些复合物或小分子肽。

参 考 文 献

[1] Roger J. B. King Cancer Biology.

[2] Tetsu O, McCormick F. Beta－catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells[J]. Nature, 1999; 398:422.

[3] Mann B, Gelos M, Siedow A, et al. Target genes of beta－catenin Tcf signaling in human colorectal carcinomas[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999; 96:1603.

[4] He T.－C, Sparks AB, Rago C, et al. Identification of c－Myc as a target of the APC pathway[J]. Science, 1998; 281: 1509－1512.

[5] Voeller, H. J., Truica, C. I., et al. Beta－catenin mutations in human prostate cancer[J]. Cancer Res, 1998; 58:2520－2523.

[6] de La Coste A., Romagnolo B., Billuart P., et al. Somatic mutations of the beta－catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998; 95:8847－8851.

[7] Fukuchi T., Sakamoto M., Tsuda H., et al. Beta－catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium[J]. Cancer Res, 1998; 58:3526－3528.

[8] L. Zhou, N. An, W. Jiang, et al. Fluoresence－based functional assay for Wnt/Beta－catenin signaling activity[J]. BioTechniques, 2002; 33(5):1126－1135.

[9] Stambolic V., L. Ruel, J. R. Woodgett. Lithium inhibits GSK3 activity and minics wingless signalling in intact cells[J]. Curr. Bio. Curr. Biol, 1996; 6:1664－1668.