

p53 和顺铂对 *Wnt* 通路抑制剂 *FrpHE* 的表达作用

腊 蕾¹, 班 武², 任青青¹

(1. 南方医科大学 南方医院 药学部, 中国广东 广州 510515; 2. 广州军区总医院, 中国广东 广州 510010)

摘 要: 将携带 *p53* 基因的复制缺陷型腺病毒载体 *Adp53* 导入到 *p53* 完全缺失的人肝癌细胞株中, 培养人肿瘤细胞, 并分别加入 5 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂(Pt)作用 24 h, 以 RT-PCR 技术检测 *FrpHE* mRNA 的表达作用, 以流式细胞术检测 *Adp53* 的转基因情况和 $\beta\text{-catenin}$ 的改变为功能指标评价 *Wnt* 通路的变化. *FrpHE* mRNA 表达水平在转染 *Adp53* 和作用 Pt 24 h 后即有明显升高, 在人大肠癌细胞和人神经胶质瘤细胞中, 未见 *FrpHE* mRNA 表达. $\beta\text{-catenin}$ 表达水平逐渐下降. 提示外源性物质 *p53* 和顺铂能明显诱导 *FrpHE* 的表达, 进而产生抑制 *Wnt* 通路的作用.

关键词: *Adp53*; 顺铂; *FrpHE*; *Wnt* 通路; $\beta\text{-catenin}$

中图分类号: R394.6; Q756

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2011)05-0415-05

Regulation of *p53* and Cisplatin on Expression of *Wnt* Signaling Inhibitor *FrpHE*

LA Lei¹, BAN Wu², REN Qing-qing¹

(1. Department of Pharmacy, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China;

2. Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, Guangdong, China)

Abstract: Human hepatocarcinoma cells were transfected with a replication-defective adenovirus encoding (*Adp53*), human tumor cells were transfected with antitumor-drug cisplatin after 24 h, *Adp53* and $\beta\text{-catenin}$ expression was measured by fluorescence-activated cell sorting (FACS) and then *Wnt* signaling pathway inhibitor *FrpHE* expression was detected by RT-PCR. *FrpHE* mRNA was initially potentiated by *Adp53* and cisplatin after 24 h, no inhibitor *FrpHE* was expressed in Lovo and U251, $\beta\text{-catenin}$ expression levels was descent. Exogenous materials *p53* and cisplatin induced expression of *FrpHE* and suppress *Wnt* signaling pathway.

Key words: *Adp53*; cisplatin; *FrpHE*; *Wnt* signaling pathway; $\beta\text{-catenin}$

(*Life Science Research*, 2011, 15(5): 415-419)

Wnt 信号通路(*Wnt* 通路)是近年来肿瘤分子生物学领域研究的热点, 在胚胎发育、中枢神经系统形成中起关键作用, 研究发现, 其信号传导通路的各种分子成分及它们的结构和功能、活化与失活与肿瘤的发生密切相关^[1, 2]. 这种异常活化的 *Wnt* 通路, 有可能产生抑制肿瘤细胞生长的作用.

目前研究表明, *FrpHE* (Frizzled-related pro-

tein)是 *Wnt* 通路的抑制因子^[3, 4], 通过与 *Wnt* 蛋白结合, 形成复合物, 诱导快速内吞作用, 从而抑制 *Wnt* 信号通路. *FrpHE* 是由细胞内分泌的内源性蛋白质或生物活性物质, 它不但在机体内发挥主要功能, 而且其本身也肯定会受到许多细胞内外因素的调控. 例如, 在 *p53* 阳性细胞有 *Wnt* 通路抑制剂的大量表达^[5], 外源性 *p53* 可通过抑制 *Wnt*

收稿日期: 2011-06-23; 修回日期: 2011-08-31

基金项目: 广东省中医药局科研课题项目(2009428); 广东省医学科研基金资助项目(A2010371)

作者简介: 腊蕾 (1972-), 女, 山东泰安人, 南方医院药学部副主任药师, 博士, 主要从事药理学方面的研究, Tel: 020-61642170, Fax: 020-87701797, E-mail: lalei88@163.com.

信号通路可能会作为抗肿瘤作用的一个靶点, *Wnt* 信号通路很可能会作为抗肿瘤作用的一个靶点. 既然如此, 说明外源性物质对 *Wnt* 信号通路存在调节, 换言之, *Wnt* 信号通路是否为外源性物质的作用靶点呢? 阐明这个问题对于抑制剂和外源性物质在肿瘤治疗中所起的作用以及应用价值是非常有意义的, 因此, 本文选择了外源性物质抑癌基因 *p53* 和抗肿瘤药顺铂对 *Wnt* 通路抑制剂表达的影响进行研究, 以了解外源性物质是否通过抑制剂介导 *Wnt* 通路的调控.

1 材料与方法

1.1 材料

Hep3B 为第二军医大学郭亚军博士惠赠; *Adp53* 为深圳市赛百诺有限公司惠赠; 小鼠抗人 *p53* 抗体购自 Santa 公司; 羊抗小鼠 IgG-FITC 购自 Sigma 公司; Trizol 购自核酸蛋白分离液 Gibico 公司; AMV 酶、dNTP Mixture、Taq 酶、Oligo(dT)₁₈ 为大连宝生物工程有限公司产品.

1.2 HepG2、Hep3B、U251 和 Lovo 细胞培养

该细胞生长于 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养液, 细胞培养于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中.

1.3 *Adp53* 基因转染

基因转染前一天将细胞接种于 6 孔板中. 去除培养液, 将感染液(*Adp53*)加入细胞中, 浓度按需要调整, 总体积为每孔 0.5 mL. 摇匀后放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育, 每 15 min 摇晃 1 次, 1 h 后除去感染液, 加入培养液, 放入培养箱中培养.

1.4 流式细胞术

细胞感染 *Adp53*, 经顺铂作用后以胰酶消化

成单细胞悬液, PBS 洗涤两遍后以 2%多聚甲醛固定 30 min, 离心去上清后悬于 PBS+0.1% Triton-100+10%山羊血清的染色液中 30 min, 离心去上清后加入小鼠抗人 *p53*, 兔抗人 β -catenin 抗体后室温孵育 60 min, 洗涤 2 次后加入羊抗小鼠 LgG-FITC, 室温孵育 30 min 后洗两遍, 过 400 目尼龙网, 上机检测.

1.5 反转录 PCR

分别收集经转染后转染时间为 16、20、24、28、32、36、40 h 和转染剂量为 0.05、0.5、5、50 pfu/cell 的各个时间点的 Hep3B 细胞, 按 TRIZOL Reagent 使用说明进行抽提细胞总 RNA. *FrpHE* 引物序列^[6]: 上游引物 5'-CCGTGCTGCGCTTCTTCTTCTGTG-3', 下游引物 5'-GCGGGACTTGAGTTCGAGGGATGG-3' (461 bp); *GAPDH* 引物序列: 上游引物 5'-CACAGTCCATGCCATCACTGC-3' 下游引物 5'-GGTCTACATGGCAACTGTGAG-3' (609 bp)(上海博亚生物技术有限公司合成); RT-PCR 过程: 按产品说明书操作, 逆转录反应条件为 42 °C, 60 min. PCR 条件为: 94 °C 2 min 热启动, 94 °C 1 min 变性, 58 °C 1 min 退火, 72 °C 1 min 延伸, 反应 35 个循环.

2 结果

2.1 *Adp53* 的转染

将转染剂量为 0(空白)、5 pfu/cell 时应用流式细胞术观察 *Adp53* 的转基因情况, 从图 1 可看出, 空白组 *p53* 表达呈阴性, 未有荧光量显示, *Adp53* 转染 24 h 后 96%以上的细胞 *p53* 表达呈阳性, 平均荧光量增加了约 50 倍, 表明 *p53* 基因转染成功.

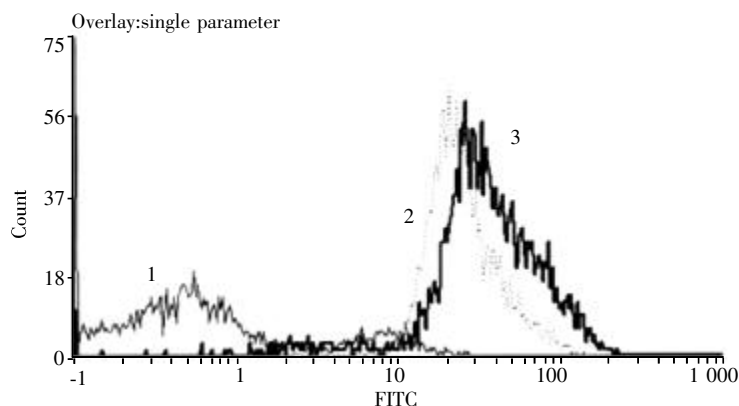


图 1 流式细胞术检测 *p53* 蛋白的表达

1: 对照组; 2: *Adp53* 转染 24 h; 3: *Adp53* 转染 48 h. 感染复数=5 pfu/cell.

Fig.1 *p53* protein expression was measured by fluorescence-activated cell sorting (FACS)

1: Control group; 2: 24 h after infection of *Adp53*; 3: 48 h after infection of *Adp53*. MOI=5 pfu/cell.

2.2 *Adp53* 诱导 *FrpHE* 表达的时效关系

为研究 *p53* 诱导 *FrpHE* 的时效关系, 我们观察了 *Adp53* 转染后不同时间 *FrpHE* 表达, 如图 2

所示, *FrpHE* 在 *p53* 转染后 20 h 起明显增加, 在 32 h 最高, 36、40 h 时逐渐回落, 但仍高于对照组水平.

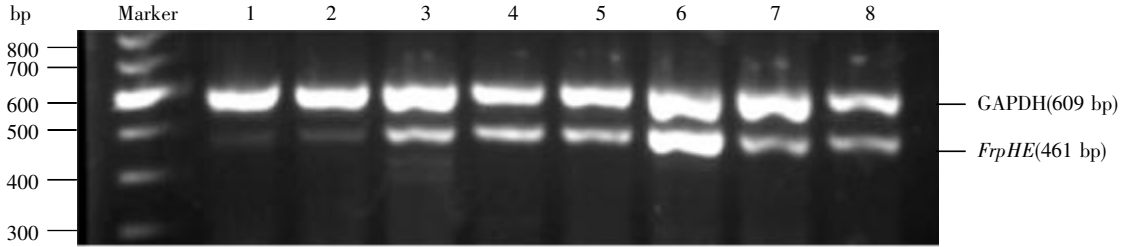


图 2 肝癌细胞中 *Adp53* 诱导 *FrpHE* 基因表达的时效关系
1: 对照组; 2: 16 h; 3: 20 h; 4: 24 h; 5: 28 h; 6: 32 h; 7: 36 h; 8: 40 h.

Fig.2 Time course of *FrpHE* gene expression in *Adp53* infected Hep3B cells

1: Control groups; 2: 16 h; 3: 20 h; 4: 24 h; 5: 28 h; 6: 32 h; 7: 36 h; 8: 40 h.

2.3 *Adp53* 诱导 *FrpHE* mRNA 表达的量效关系

为研究 *p53* 诱导 *FrpHE* mRNA 的量效关系, 我们观察了不同剂量 *Adp53* 转染后 *FrpHE* mRNA

的表达, 如图 3 所示, *FrpHE* mRNA 在 *Adp53* 转染剂量为 5 pfu/cell 时最强, 在 50 pfu/cell 时逐渐回落, 但仍高于对照水平.

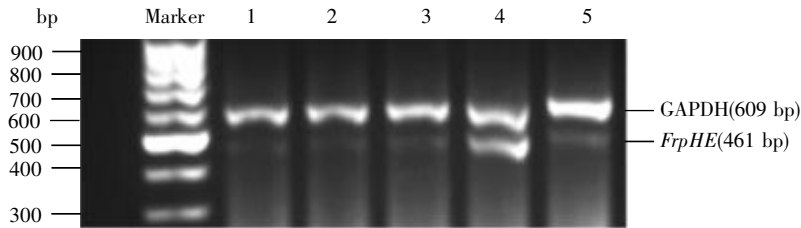


图 3 肝癌细胞中 *Adp53* 诱导 *FrpHE* 基因表达的量效关系
1: 对照组; 2: 0.05 pfu/cell; 3: 0.5 pfu/cell; 4: 5 pfu/cell; 5: 50 pfu/cell.

Fig.3 Dose-effect relationship between *Adp53* and *FrpHE* gene expression in *Adp53* infected Hep3B cells

1: Control group; 2: 0.05 pfu/cell; 3: 0.5 pfu/cell; 4: 5 pfu/cell; 5: 50 pfu/cell.

2.4 顺铂对肿瘤细胞 *FrpHE* mRNA 表达的影响

在人肿瘤细胞加入顺铂作用 24 h 后, *FrpHE* mRNA 的表达较未加药物的肿瘤细胞(对照组)明

显增加, 在人大肠癌细胞和人神经胶质瘤细胞中, 未见 *FrpHE* mRNA 表达, 见图 4.

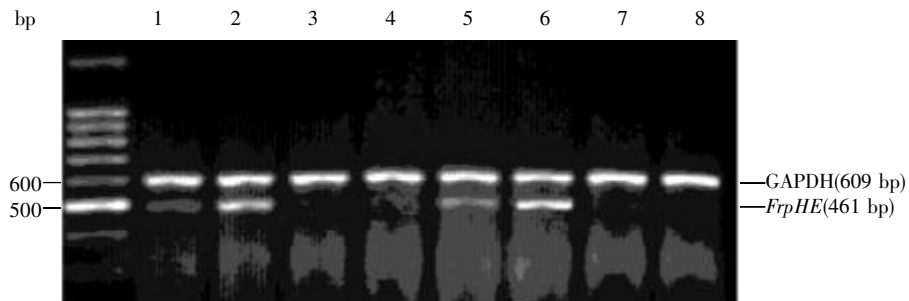


图 4 顺铂对肿瘤细胞中的 *FrpHE* 基因表达的影响

1: 人肝癌细胞 (对照组); 2: 人肝癌细胞 (野生型 *p53*, 顺铂); 3: 人大肠癌细胞 (对照组); 4: 人大肠癌细胞 (野生型 *p53*, 顺铂); 5: 人肝癌细胞 (对照组); 6: 人肝癌细胞(*p53* 缺失, 顺铂); 7: 人神经胶质瘤细胞 (对照组); 8: 人神经胶质瘤细胞(突变型 *p53*, 顺铂).

Fig.4 Expression of *FrpHE* by cisplatin in cancer cells

1: HepG2 (control groups); 2: HepG2 (wt *p53*, Pt); 3: Lovo (control groups); 4: Lovo (wt *p53*, Pt); 5: Hep3B (Control groups); 6: Hep3B(*p53* null, Pt); 7: U251 (Control groups); 8: U251 (mutant *p53*, Pt).

以上结果显示外源物质 *Adp53* 和抗肿瘤药顺铂的导入对 *Wnt* 通路抑制剂 *FrpHE* mRNA 表达具有上调作用, 为了进一步观察 *FrpHE* 上调后是否对 *Wnt* 通路产生抑制作用, 我们进一步观察了 *Wnt* 通路的关键因子 β -catenin 表达水平的变化。

2.5 外源性 *Adp53* 转染后 Hep3B (*p53* 缺失) β -catenin 表达的时效关系

为研究 β -catenin 表达的时效关系, 我们观察了肝癌细胞 Hep3B (*p53* 缺失)*Adp53* 转染后不同时间 β -catenin 的表达。采用流式细胞术检测, 结果显示, 在转染时间为 0、24、36、48、60 h 时, β -catenin 的表达水平 (阳性细胞数) 分别为: (82±7)%、(66±9)%、(39±5)%、(33±6)%、(21±3)%。可见, 随着转染时间的增加, β -catenin 的阳性细胞百分比强度和平均荧光量强度逐渐下降, 表明在 *p53* 诱导 *Wnt* 通路抑制剂 *FrpHE* 上调后, *Wnt* 通路受到抑制而引起 β -catenin 的下调 (经 χ^2 检验, $P < 0.05$)。

2.6 外源性 *p53* 转染 Hep3B(*p53* 缺失) β -catenin 表达的量效关系

采用流式细胞术检测, 结果显示, 当转染剂量分别为 0、0.5、5、50 (pfu/cell) 时, β -catenin 的阳性细胞百分比数和平均荧光量强度表达水平分别为 (89±6)%、(80±4)%、(66±9)%、(22±6)%。可见, 随着转染剂量的增加, β -catenin 的阳性细胞百分比强度和平均荧光量强度逐渐下降, 表明 *p53* 对 β -catenin 起下调作用(经 χ^2 检验, $P < 0.05$)。

2.7 人肝癌细胞 HepG2、人大肠癌细胞 Lovo、人神经胶质瘤细胞 U251、人肝癌细胞 Hep3B 中加入顺铂后 β -catenin 的表达

采用流式细胞术检测, 加药 24 h 后, 结果显示:

1) 在人肝癌细胞 (HepG2, wt *p53*) 中, β -catenin 的阳性细胞百分比强度为: 对照组 (71±9)%、顺铂组(46±7)%, 表达水平降低。

2) 在人大肠癌细胞 ((Lovo, wt *p53*) 中, β -catenin 的阳性细胞百分比强度为: 对照组 (39±5)%、顺铂组(11±7)%, 表达水平降低。

3) 在人神经胶质瘤细胞 (U251, mutant *p53*) 中, β -catenin 的阳性细胞百分比强度为: 对照组 (79±6)%、顺铂组(58±5)%, 表达水平降低。

4) 在人肝癌细胞 ((Hep3B, *p53* null) 中, β -catenin 的阳性细胞百分比强度为: 对照组 (85±9)%、顺铂组(62±8)%, 表达水平降低。

经 χ^2 检验, $P < 0.05$ 。

以上结果显示通过外源性 *p53* 和抗肿瘤药顺铂的导入, β -catenin 的表达下调, 而 β -catenin 这种变化在时间及剂量上与 *p53* 和抗肿瘤药顺铂诱导抑制剂 *FrpHE* 是相吻合的, 表明外源性 *p53* 和顺铂能诱导 *FrpHE* 的表达, 进而引起 *Wnt* 通路的抑制。

3 讨论

Wnt 通路包括细胞外因子 *Wnt*、跨膜受体、 β 连环蛋白(β -catenin)、降解复合物(Destruction complex)以及转录因子 T 细胞因子(T cell factor, TCF)等组成^[7]。正规的 *Wnt* 信号只有在卷曲蛋白和辅助受体低密度脂蛋白受体相关蛋白 (Low density lipoprotein receptor related protein, LRP) 均与 *Wnt* 结合时才能激活。该通路通过调节 TCF 家族的 DNA 蛋白结合转录性质来调控细胞的行为, 其核心是胞质内 β -catenin 稳定, 当 β -catenin 水平低下时, *Wnt* 通路关闭; 反之, *Wnt* 通路开启。

在没有 *Wnt* 信号刺激的情况下, 胞质内的 GSK-3 β 能与其它蛋白(如: APC、Axin 等)以复合物的形式磷酸化 β -catenin, 使 β -catenin 降解, β -catenin 处于低水平状态。在有 *Wnt* 信号刺激的情况下, 由细胞分泌的 *Wnt* 蛋白与细胞表面受体 FZD(frizzled protein receptor)和 LRP5/6 结合后, 即激活细胞内的信号传导, 不能磷酸化 β -catenin, 导致 β -catenin 积聚进入细胞核, 促进靶基因无限限制转录, 肿瘤细胞增殖^[8,9]。本研究结果显示, 加入外源性物质 *p53* 和顺铂后, 在肿瘤细胞中, 抑制剂 *FrpHE* mRNA 的表达水平下降(见图 2~4), *Wnt* 信号通路的关键调节因子 β -catenin 表达水平下降(见 2.5、2.6、2.7), 从而抑制 *Wnt* 通路, 提示 *FrpHE* 的表达机制非常复杂, 其本身会受到许多内外因素的影响, 例如: 它可能与受体竞争结合 *Wnt* 蛋白, 或直接与 *Wnt* 蛋白结合, 由此阻断了 *Wnt* 信号传导通路^[10]。抑癌基因 *p53* 能直接抑制或杀灭癌细胞, 顺铂通过直接抑制 DNA 复制抗肿瘤, 现有的实验说明抑癌基因 *p53* 和抗肿瘤药顺铂还可通过对抑制剂 *FrpHE* 的上调作用, 从而抑制 *Wnt* 通路, 抑制剂 *FrpHE* 可能是 *p53* 和顺铂抗肿瘤作用的一个靶点, 这很可能是 *p53* 和顺铂抗肿瘤作用的另外一种方式。因此, 通过对新作用环节的研究, 进一步探寻抗肿瘤的新靶点, 为研究抗肿瘤新药提供新靶点和新依据。

令人意外的是, 通过顺铂对抑制剂的诱导作用, 在人大肠癌细胞株 Lovo 及神经胶质瘤细胞 U251 中未见 *FrpHE* mRNA 的表达, 说明它们可能是 *FrpHE* 缺失型的肿瘤细胞株, 也许是抑制剂 *FrpHE* 本身或通过顺铂的介入在大肠癌中的表达水平很微弱或者根本就没有表达. 看来, 抑制剂在肿瘤细胞中的表达并不都是一致的, 存在着一定的差异, *FrpHE* 在肿瘤的发生过程可能是一个很关键的因素, 有待于我们进一步的探讨.

参考文献(References):

- [1] KARIM R, TSE G, PUTTI T. The significance of the *Wnt* pathway in the pathology of human cancers[J]. *Pathology*, 2004, 36(2): 120-128.
- [2] van NOORT M, MEEDLIIK J, van der ZEE R, *et al.* *Wnt* signaling controls the phosphorylation status of beta-catenin[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(20): 17901-17905.
- [3] ROTH W, WILD-BODE C, PLATTEN M, *et al.* Secreted frizzled-related proteins inhibit motility and promote growth of human malignant glioma cells[J]. *Oncogene*, 2001, 22(37): 4210-4220.
- [4] LEE H C, KIM M, WANDS J R. *Wnt*/Frizzled signaling in hepatocellular carcinoma[J]. *Front Biosci*, 2006, 5(11): 1901-1915.
- [5] WANG J, SHOU J, CHEN X. Dickkopf-1, an inhibitor of the *Wnt* signaling pathway, is induced by p53[J]. *Oncogene*, 2000, 19(14): 1843-1848.
- [6] KAO L C, TULAC S, LOBO B, *et al.* Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation[J]. *Endocrinology*, 2002, 143(6): 2119-2138.
- [7] GILES R H, van E S J H, CLEVERS H. Caught up in a *Wnt* storm: *Wnt* signaling in cancer[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003, 1653(1): 1-24.
- [8] MAO B, WU W, DAVIDSON G, *et al.* Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate *Wnt*/ β -catenin signaling[J]. *Nature*, 2002, 417(6889): 664-667.
- [9] TULAC S, NAYAK N R, KAO L C. Identification characterization and regulation of the canonical *Wnt* signaling pathway in human endometrium[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 2003, 88(8): 3860-3866.
- [10] KAWANO Y, KYPTA R. Secreted antagonist of the *Wnt* signaling pathway[J]. *Journal of Cell Science*, 2003, 116(Pt13): 2627-2634.