

研究简报

在肾癌细胞系 GRC-1 细胞周期不同阶段 Wnt-5A 基因的表达情况*

庄立岩 张志文¹⁾ 郭宏骞 李宏军 唐东起 苑学礼 刘漓波 丁义 郭应禄

(北京医科大学泌尿外科研究所, 北京 100034)

摘要 Wnt 基因所编码的蛋白质与许多生长因子一样具有分泌型生长因子的结构特点, 其家族成员 Wnt-5A 是许多恶性肿瘤的自分泌生长因子, 在肾细胞癌中表达显著升高. 为研究在细胞周期的不同阶段生长因子 Wnt-5A 在转录水平的表达情况, 我们采用胸腺嘧啶双阻断及高压笑气处理的方法, 使肾细胞癌细胞系 GRC-1 细胞同步化. 用半定量反转录多聚酶链反应对处于细胞周期不同阶段的细胞 cDNA 进行扩增, S 期与 G1, M 期 Wnt-5A mRNA 表达存在差异显著 ($P < 0.05$). 结果提示生长因子 Wnt-5A 在肾细胞癌的发生中具有潜在的作用, 在 S 期作用可能尤为显著.

关键词 Wnt-5A, 肾细胞癌, 细胞周期

学科分类号 Q735

Wnt 基因是一个不断扩大的原癌基因家族, 在从蠕虫至人类的众多物种中均有表达^[1]. 已有越来越多的证据证明该家族的成员不但在器官的形成和发育中, 而且在多种肿瘤的发生中起重要作用. Wnt-5A 作为该家族的成员, 不但在发育中的脑、睾丸、肾脏、肢体中表达, 而且在人类的乳腺癌、结直肠癌、肺癌、纤维腺瘤中表达显著增高^[2,3]. 我实验室的研究结果表明 Wnt-5A 在膀胱癌细胞系 (EJ, T24, BIU), 前列腺癌细胞系 (PC-3M), 肾细胞癌细胞系 (GRC-1, RCC949) 表达显著增高, 而在正常肾组织及细胞系中未见表达^[4]. 为研究 Wnt-5A 在肾细胞癌不同周期细胞中的表达情况, 对同步化的肾细胞癌细胞系 GRC-1, 采用半定量 RT-PCR 的方法进行检测.

1 材料和方法

组织、细胞及细胞同步化: 肾细胞癌细胞系 GRC-1 由我所建系, 来源于一个病理诊断为颗粒型肾癌的病入的手术标本. 采用胸腺嘧啶双阻断法使 GRC-1 细胞系同步化至 S 期, 而后用高压笑气将 S 期细胞同步化至 M 期及 G1 期^[5], 在相同条件下同步化三瓶 GRC-1 细胞. 正常人肾小管细胞系 HK-2 购自 ATCC (american type culture collection); 取肾癌手术全切肾脏的远离癌区正常肾组织原代培养并筛选纤维母细胞作为对照. 正常肾组

织来源于巨大肾囊肿患者切除之肾脏. 取正常肾脏组织约 100~200 mg, 立即置于液氮中, 直至提取 RNA.

RNA 提取及 RT-PCR: 将已消化并离心沉淀的细胞及组织匀浆用异硫氰酸胍氯仿酚一步法提取总 RNA, 根据 RNA 在 260 nm 和 280 nm 的吸光度的比值 (≥ 1.8) 和 1% 琼脂糖凝胶电泳 28 S 和 18 S RNA 条带比值 (≥ 2.0) 鉴定 RNA 纯度及完整性. 取 3 μ g 总 RNA 为模板, 在 25 μ l 反应体系中进行逆转录反应. 取逆转录产物 2 μ l 为模板在 50 μ l 体系中进行 PCR 扩增, 0.25 μ mol/L Wnt-5A 特异性上、下游引物 (+ GACCTGGTCTACATCGACCCC; - GCAGCACCAGTGGAACTTGCA) 及 1U Taq DNA 聚合酶 (Promega 公司, 美国), 扩增 35 个循环 (94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 62 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环结束后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min). 同样体积的逆转录产物作为模板在含有 β 肌动蛋白 (+ GTTTGAGACCTTCAACACCCC; - GTGGCCATCTCTCTTGGTCGAAGTC) 特异上下游引物的体系中进行上述同样方法扩增作为内参照.

结果分析 PCR 产物 12 μ l 在 1.5% 琼脂糖凝胶

* 国家自然科学基金资助 (39870841) 项目.

¹⁾ 北京医科大学生理学系, 北京 100083.

收稿日期: 1998-10-05, 修回日期: 1999-02-12

上电泳后用溴化乙锭染色, 采用 Gel Doc 1000 图象分析系统 (Bio-Rad 公司, 美国) 在 IBM 586 个人电脑上利用 Molecular Analyst 软件进行体积积分分析, 并与相应 β 肌动蛋白产物体积积分相比较, 得到相对吸光度单位。

PCR 产物的鉴定采用 Sequenase Kit (USB, 美国), 用 Sanger 双脱氧链终止法测序, 其具体方法见厂家说明书。

2 结 果

为了能够使 RT-PCR 成为一种检测细胞 mRNA 相对含量的一种方法, 我们首先测定了 PCR 反应的扩增动力学。本实验选用 3 μ g GRC-1 总 RNA 作为模板, 采用 35 个循环进行 PCR 扩增, 以保证定量的准确性。

首先, 我们应用 Wnt-5A 及 β 肌动蛋白特异性引物对正常肾组织, 原代培养的肾纤维母细胞, 正常肾小管上皮细胞系 HK-2, 肾细胞癌细胞系 GRC-1 以及在对 GRC-1 总 RNA 逆转录时未加入逆转录酶 AMV 的产物 (空白对照) 进行 PCR 扩增。在 GRC-1 及原代培养的肾纤维母细胞中扩增出一段 216 bp 的 PCR 产物, 经直接测序其结果与所发表的 Wnt-5A 序列一致。而在正常肾组织, HK-2 细胞系及空白对照中未见 Wnt-5A 的扩增 (图 1)。

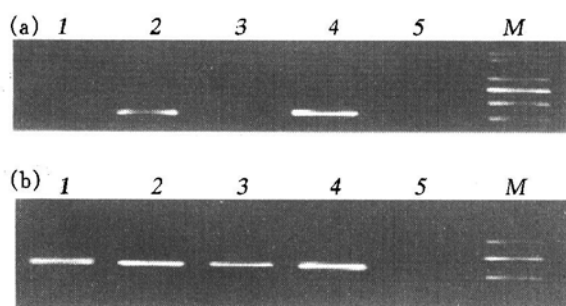


图 1 原癌基因 Wnt-5A 在不同细胞系的表达

1~5: 分别代表正常肾组织、原代培养的肾纤维母细胞、正常肾小管上皮细胞系 HK-2、肾细胞癌细胞系 GRC-1 以及在对 GRC-1 总 RNA 逆转录时未加入逆转录酶 AMV 的产物 (空白对照) 的扩增产物; M: DNA 标准由上至下代表 785, 685, 485, 385, 285, 185bp. (a) Wnt-5A; (b) β 肌动蛋白。

对 GRC-1 细胞系 G1, M, S 期细胞进行的半定量 RT-PCR 所测定的各期的 PCR 扩增产物电泳结果相对吸光度如图 2 所示, 经 *t* 检验, S 期与 G1, M 期差别显著。其中 S 期表达量最高, 而 G1 期最低。

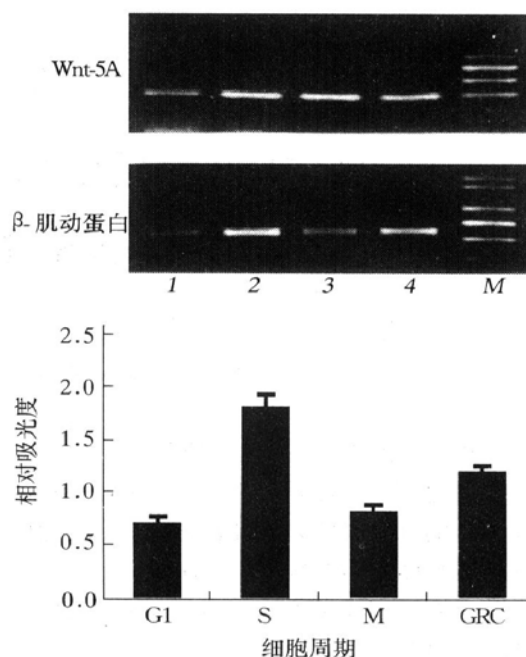


图 2 肾癌细胞系 GRC-1 在细胞周期中 Wnt-5A 表达的变化同步化至 G1, S, M 期的 GRC-1 细胞 Wnt-5A 的相对含量。1~4: 分别代表未同步化的 GRC-1 细胞、M、S、G1 期; M: DNA 分子质量标准。

3 讨 论

Wnt 编码一系列具有分泌生长因子特点的保守的蛋白质。这一家族的蛋白质能通过自分泌或旁分泌作用, 不仅在生物的发育中也在肿瘤的发生中起着关键的作用。人类 Wnt-5A cDNA 编码一种含有 365 个氨基酸残基的蛋白质, 与其他已报道的 Wnt-5A 蛋白相比较, 具有大于 93% 的同源性; 与小鼠 Wnt-5A 相比较同源性大于 99%; 同时与人类 Wnt-1、Wnt-2 基因亦具有相当大的同源性。因此, 它有可能具有其他 Wnt 家族成员的功能。越来越多的证据已经证明, Wnt-5A 在人类的多种恶性肿瘤的发生中具有潜在的作用^[2-4]。我们的前期实验表明 Wnt-5A 在泌尿系统恶性肿瘤中存在过度表达, 而在正常肾细胞及组织中未检测到表达^[4]。目前, Wnt 蛋白的信号传导通路也正在研究中^[6]。Wnt 与其受体 Frizzled 蛋白特异性结合, 激活细胞浆内的 DISHEVELLED (DSH) 蛋白。Frizzled 与 DSH 均为果蝇的体节极性基因所编码的蛋白质。目前已在许多物种发现 Frizzled 的同源基因, 而 DSH 在脊椎动物的同源基因尚未被发现。活化的 DSH 可抑制糖原合成酶激酶 3 (glycogen synthetase kinase3, GSK3) 的活性使细胞内游离的 β -环形蛋白 (β -catenin) 增加。 β -环形蛋白是细胞间黏附连

接的主要成分,也可与核内 LEF 或 TCF 转录调节因子相结合,使核内发生特异基因的表达。

目前应用的细胞同步化方法有许多种,我们采用的笑气与过量胸腺嘧啶双阻断方法同步细胞具有同步率高,方法简便等优点,唯一不方便的是需要特殊仪器。本方法可以有效地将 G2 与 M 期细胞分离开来, M 期细胞的同步化程度可高达 90% 以上^[5]。G2 期细胞同步化需要进行较复杂、费时的试验分析,本文未进行 G2 期细胞的同步化分析,留待以后完成。

我们实验所测定的该生长因子在不同细胞周期中的情况提示,在细胞周期中 Wnt-5A 生长因子基因的表达变化可能与该因子在不同时期作用不同有关,但究竟其作用机制如何尚需进一步研究。Aaronson 等^[7]的研究发现,目前已知的生长因子根据其在细胞周期中的作用可以分为“获能”(competence)性生长因子和“进展”(progression)性生长因子,前者可以使处于静止状态的细胞进入细胞周期的 G1 期,而後者的作用是使细胞 DNA 合成增加。Wnt-5A 基因在 S 期的高表达说明该生长因子可能属于“进展”性生长因子类。这可能有重要的临床应用价值,可以用来设计通过 Wnt-Frizzled 途径治疗肾脏恶性肿瘤的临床治疗方案如:可以按照细胞周期局部给以抗 Wnt-5A 治疗,也可以通过某些细胞因子或药物使肿瘤细胞达到特定的细胞周期(高表达 Wnt-5A)内给以局部应用 Wnt-5A 拮抗物(如其可溶性受体)来进行生物治疗恶性疾病。

参 考 文 献

- 1 Du S J, Parcell S M, Christian J L, *et al.* Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wildtype and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Mol Cell Biol*, 1995, **15** (10): 2625~ 2634
- 2 Iozzo R V, Eichstetter I, Danielson K G. Aberrant expression of the growth factor Wnt-5A in human malignancy. *Can Res*, 1995, **55** (8): 3495~ 3499
- 3 Vider B I, Zimmer A. Evidence for the involvement of Wnt2 in human colorectal cancer. *Oncogene*, 1996, **12** (1): 153~ 158
- 4 Zhuang L Y, Zhang Z W, Guo Y L. The aberrant expression of growth factor Wnt-5A in six urinary malignant cell lines. *Chinese Medical Journal*, 1999, **112** (3): 251~ 255
- 5 Rao P N. Mitotic synchrony in mammalian cells treated with nitrous oxide at high pressure. *Science*, 1986, **160**: 774~ 776
- 6 Moon R T, Brown J D, Torres M. WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development. *Trends Genet*, 1997, **13** (4): 157~ 162
- 7 Aaronson S A. Growth factors and cancer. *Science*, 1991, **254**: 1146~ 1152

Different Wnt-5A Gene Expression in Renal Cell Carcinoma GRC-1 Cell Line During Cell Cycles.

ZHUANG Li-Yan, ZHANG Zhi-Wen¹⁾, GUO Hong-Qian, LI Hong-Jun, TANG Dong-Qi, YUAN Xue-Li, LIU Li-Bo, DING Yi, GUO Ying-Lu (Urological Department of the First Teaching Hospital, Institute of Urology, Beijing Medical University, Beijing 100034, China; ¹⁾ Department of Physiology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China).

Abstract To investigate the gene expression of growth factor Wnt-5A in different phases during cell cycle at transcriptional level. To synchronize the renal cell carcinoma GRC-1 cell line was by double thymidine blocks and high-pressure N₂O gas methods. Using Semi-quantitative RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) to amplify the cDNAs of Wnt-5A in different phases. Result showed that the mRNA expression of growth factor Wnt-5A was detected in RCC GRC-1 cell line. In S phase, the highest level of Wnt-5A was observed, medial and lowest was in G1 and M phase, respectively. The differences between S and M stages were significant ($P < 0.05$). Therefore growth factor Wnt-5A has the potential effect on tumorigenesis, It contributes to all phases during cell cycle, but gives more influence to S phase during cell cycle.

Key words Wnt-5A, renal cell carcinoma, cell cycle