

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.02.001

WTX 基因对结肠癌细胞增殖和凋亡的作用*

曹梦园¹, 白 洋², 许 颖^{3△}(1. 吉林省医学期刊社, 长春 130021; 2. 吉林大学第一医院超声科, 长春 130021;
3. 吉林大学第一医院肾内科, 长春 130021)

[摘要] **目的** WTX 基因转染结肠癌 Lovo 细胞株, 分析 WTX 基因对结肠癌细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 将结肠癌 Lovo 细胞株分为 WTX 基因转染组和对照组, WTX 基因转染组给予 WTX 质粒转染, 对照组给予空载质粒转染。观察 WTX 基因转染组和对照组 WTX 基因的表达情况, 两组 Lovo 细胞株结肠癌细胞的增殖情况、凋亡情况及细胞周期变化。**结果** WTX 基因转染组结肠癌细胞 WTX 蛋白表达明显高于对照组 ($P < 0.05$); WTX 基因转染组结肠癌转染后 4、7 d 光密度值均明显低于对照组 ($P < 0.05$); WTX 基因转染组 G_1 期细胞比例明显高于对照组 ($P < 0.05$), WTX 基因转染组 G_2 期和 S 期细胞比例明显低于对照组 ($P < 0.05$)。**结论** WTX 基因抑制结肠癌细胞的增殖, 影响结肠癌细胞周期, 对结肠癌细胞凋亡没有影响。

[关键词] 结肠肿瘤; 基因; 流式细胞术; 细胞凋亡; WTX 基因; 结肠癌 Lovo 细胞株; 细胞增殖**[中图分类号]** R656.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)02-0145-03

Effect of WTX gene on colon cancer cell proliferation and apoptosis*

Cao Mengyuan¹, Bai Yang², Xu Ying^{3△}

(1. Medical Journal of Jilin Province, Changchun, Jilin 130021, China; 2. Department of Ultrasound, First Hospital, Jilin University, Changchun, Jilin 130021, China; 3. Department of Nephrology, First Hospital, Jilin University, Changchun, Jilin 130021, China)

[Abstract] **Objective** To use WTX gene for transfecting into Lovo colon cancer cell line, and to analyze the impact of WTX gene on colon cancer cell proliferation and apoptosis. **Methods** Lovo colon cancer cell line was divided into the WTX gene transfection group and control group. The WTX gene transfection group was given WTX plasmid transfection, while the control group received empty vector transfection. The expression of WTX gene in the WTX gene transfection group and control group was observed. The proliferation, apoptosis and cell cycle change of Lovo colon cancer cells in two groups were also observed. **Results** The WTX protein expression in the WTX gene transfection group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$); the OD values on 4, 7 d after transfection in the WTX gene transfection group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$); the G_1 phase cells proportion in the WTX gene transfection group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$), the G_2 and S phase cells proportion in the WTX gene transfection group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** WTX gene inhibits the proliferation of colon cancer cells, affects colon cancer cells cycle, has no effect on apoptosis of colon cancer cells.

[Key words] colonic neoplasms; genes; flow cytometry; apoptosis; WTX gene; colon cancer Lovo cell line; cell proliferation

结肠癌的发生是一个多阶段、多步骤的比较复杂的过程, 近年来其发病率和病死率有上升趋势^[1], 目前结肠癌的治疗效果欠佳, 预后比较差, 主要的治疗方法是手术切除、放化疗和生物治疗等的综合治疗^[2]。结肠癌发生的分子机制主要有 DNA 损伤修复基因的功能异常, 抑癌基因的缺失突变, 癌基因激活, 凋亡机制异常等, 多种癌基因的激活和过度表达及多种抑癌基因的缺失和突变在结肠癌的发展过程中发挥重要作用^[3]。WTX 基因和肿瘤的发生、发展, 以及肿瘤的增殖凋亡有一定关系, 对肿瘤有抑制作用^[4]。Wnt 通路和结肠癌的发生、发展关系密切, WTX 是 Wnt 通路的负向调节因子^[5-6]。因此, WTX 基因可能和结肠癌的发病有一定关系。本研究通过 WTX 基因转染结肠癌 Lovo 细胞株, 探讨 WTX 基因对结肠癌细胞增殖和凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 结肠癌细胞株 Lovo 结肠癌细胞株购自昆明动物所细胞库。

1.1.2 主要试剂和仪器 质粒(美国 Fermentas 公司), 质粒小提试剂盒(美国 Fermentas 公司), DMEM 培养基(美国 Fermentas 公司), 胎牛血清(四季青生物工程材料有限公司), 胰酶(美国 Fermentas 公司), 磷酸盐缓冲液(PBS, 美国 Fermentas 公司)等; 电泳仪(美国 BD 公司), 流式细胞仪(美国 BD 公司), 培养箱(美国 BD 公司)等。

1.2 方法

1.2.1 实验方法 (1) 分组: 分为 WTX 基因转染组和对照组, WTX 基因转染组给予 WTX 质粒转染, 对照组给予空载质

* 基金项目: 吉林省科技发展计划项目(2013052218JH)。 作者简介: 曹梦园(1979—), 副编审, 硕士, 主要从事老年病学方面研究。 △ 通信作者, E-mail: mcccxy@163.com。

粒转染。(2)质粒提取:将 PLV. E3d. null-EF1A>IRES/eGFP 空载质粒和 PLV. E3d. null-EF1A>WTX>IRES/eGFP WTX 质粒在培养皿中划线,过夜培养,挑选单克隆菌落移入离心管中,摇床摇菌,用 EndoFree Plasmid Maxi Kit 试剂盒提取质粒。(3)细胞转染:将转染前传代培养生长良好的结肠癌细胞株 Lovo 加入培养液重悬细胞,然后加入 12 孔板孔中(每孔含细胞 3×10^5),细胞培养 6 h,质粒 DNA 加入 Attractene Transfection Reagent 形成转染复合物,将转染复合物加入细胞中转染细胞 2~3 d。(4)观察转染结果:空载质粒浓度 2 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,WTX 质粒浓度 1 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$,符合转染要求,空载质粒 72 h 后转染率 68%,WTX 质粒 72 h 后转染率 37%。

1.2.2 观察指标 两组 WTX 基因的表达情况,两组 Lovo 细胞株结肠癌细胞的增殖情况、凋亡情况及细胞周期变化。(1) WTX 蛋白表达的测定:采用 Western blot 法检测两组 WTX 蛋白的表达情况。(2)增殖情况:将转染细胞加入 CCK-8 溶液,孵育 4 h 染色,在酶标仪上测定第 1、4、7 天 450 nm 波长的光密度(optical density,OD)值。(3)凋亡情况测定:采用流式细胞仪测定转染后 1、4、7 d 两组细胞的早期凋亡、晚期凋亡和总凋亡情况。(4)生长周期测定:采用流式细胞仪测定细胞生长周期情况,检测结果用细胞周期拟合软件进行分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组 WTX 基因的表达情况 Western blot 结果显示: WTX 基因转染组结肠癌细胞 WTX 蛋白表达明显高于对照组 ($P < 0.05$),过表达 WTX 基因结肠癌细胞株成功建立,见图 1、表 1。

2.2 两组结肠癌细胞的增殖情况 CCK8 染色检测结果:

WTX 基因转染组结肠癌转染后 4、7 d OD 值均明显低于对照组 ($P < 0.05$),WTX 基因转染组结肠癌转染后 1 d OD 值和对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 2。

2.3 两组结肠癌细胞的凋亡情况 流式细胞仪法检测结果: WTX 基因转染组转染后 1、4、7 d 结肠癌细胞的早期凋亡率、晚期凋亡率与总凋亡率和对照组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 3。

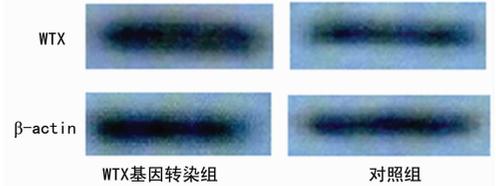


图 1 两组 WTX 蛋白电泳图

表 1 两组 WTX 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	β -actin 灰度值	WTX 灰度值
WTX 基因转染组	54.32 \pm 11.02	70.02 \pm 12.42
对照组	55.17 \pm 10.38	40.21 \pm 6.34
<i>t</i>	0.374	7.342
<i>P</i>	0.967	0.000

表 2 两组结肠癌细胞的 OD 值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	转染后 1 d	转染后 4 d	转染后 7 d
WTX 基因转染组	0.25 \pm 0.01	0.53 \pm 0.07	0.51 \pm 0.12
对照组	0.32 \pm 0.02	1.54 \pm 0.10	1.56 \pm 0.14
<i>t</i>	1.431	7.014	7.201
<i>P</i>	0.201	0.000	0.000

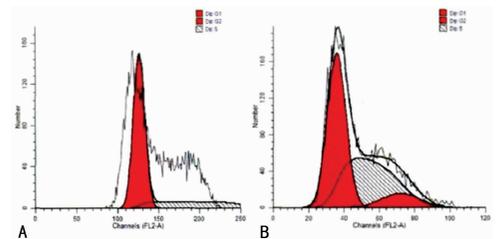
表 3 转染后 1、4、7 d 两组结肠癌细胞的凋亡情况 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	转染后 1 d			转染后 4 d			转染后 7 d		
	早期凋亡	晚期凋亡	总凋亡	早期凋亡	晚期凋亡	总凋亡	早期凋亡	晚期凋亡	总凋亡
WTX 基因转染组	0.73 \pm 0.12	0.53 \pm 0.05	1.24 \pm 0.07	3.85 \pm 0.52	20.83 \pm 3.43	24.68 \pm 3.54	5.32 \pm 0.64	25.51 \pm 4.12	30.83 \pm 3.14
对照组	0.72 \pm 0.10	0.54 \pm 0.07	1.26 \pm 0.05	3.87 \pm 0.56	20.91 \pm 3.28	24.78 \pm 3.65	5.36 \pm 0.59	25.49 \pm 4.35	30.85 \pm 3.52
<i>t</i>	0.472	0.527	0.758	0.412	0.624	0.603	0.536	0.574	0.361
<i>P</i>	0.943	0.974	0.902	0.978	0.963	0.974	0.937	0.973	0.982

2.4 两组结肠癌细胞周期比较 流式细胞仪检测结果发现: WTX 基因转染组 G₁ 期细胞比例明显高于对照组 ($P < 0.05$), WTX 基因转染组 G₂ 期和 S 期细胞比例明显低于对照组 ($P < 0.05$),见表 4、图 2。

表 4 两组结肠癌细胞周期比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	G ₁ 期 (%)	G ₂ 期 (%)	S 期 (%)
WTX 基因转染组	79.42 \pm 0.78	0.02 \pm 0.01	22.04 \pm 0.71
对照组	47.74 \pm 0.62	9.04 \pm 0.31	43.52 \pm 0.88
<i>t</i>	7.243	11.203	8.167
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000



A: WTX 基因转染组; B: 对照组。

图 2 两组细胞周期图

3 讨 论

WTX 位于 X 染色体上,是一种对肿瘤具有抑制作用的基因,WTX 基因蛋白存在于细胞质和细胞膜内。因 WTX 基因

位置比较特殊,使其抑癌作用具有独特性。Wnt/ β -catenin 信号通路比较保守,能够调节细胞的分化增殖和凋亡,在细胞稳态、胚胎发育和多种疾病的发病过程中发挥重要作用^[7]。 β -catenin 是 Wnt 信号通路的关键因子,是粘连素家族成员,位于细胞质、细胞膜和细胞核中,参与细胞之间的黏附,正向调节 Wnt 通路, β -catenin 在细胞核内累积及在细胞质中降解失去平衡等会激活靶基因转录,引起肿瘤的发生^[8]。WTX 和 β -catenin 关系密切,能够与 β -catenin 形成复合物,形成的复合物对 β -catenin 蛋白降解和泛素化,对 Wnt/ β -catenin 信号通路有负向调节作用^[9-10]。WTX 还可以抑制核因子 E2 相关因子 2 (NRF2) 的泛素化,WTX 缺失引起 NRF2 迅速降解和泛素化,降低其对细胞的毒性反应。WTX 还影响 P53 的活性及其对癌症的抑制作用。因此 WTX 既可以影响 P53 的抑癌通路,又可以影响 Wnt/ β -catenin 的致癌通路^[11]。

在 Wilms 瘤患者中存在有 WTX 基因突变,在胃癌、肝癌等其他恶性肿瘤中,很少发现 WTX 基因突变,考虑 WTX 和其他恶性肿瘤的关系可能与其表达缺失有关^[12-13]。在结肠癌中,WTX 基因突变对 β -catenin 降解复合物的功能有一定影响,同时与肿瘤的增殖凋亡和生长发育有关,对肿瘤有抑制作用。WTX 缩短突变能够增加 β -catenin 的表达,Wnt/ β -catenin 信号通路在结肠癌的发生、发展过程中发挥重要作用,Wnt/ β -catenin 信号通路异常激活能够引起结肠癌的发生^[14-15],WTX 是 Wnt/ β -catenin 信号通路的负向调节因子,在结肠癌的发生中可能也发挥重要作用。本研究通过 WTX 基因转染结肠癌 Lovo 细胞株,分析 WTX 基因对结肠癌细胞增殖和凋亡的影响。结果发现,WTX 基因转染组结肠癌细胞与对照组细胞比较,WTX 蛋白表达升高,细胞增殖 OD 值降低, G_1 期细胞比例升高, G_2 期和 S 期细胞比例降低。可见,WTX 基因对结肠癌 Lovo 细胞的凋亡没有影响,WTX 基因明显抑制结肠癌细胞的增殖,WTX 基因对结肠癌细胞生长的影响可能是通过抑制结肠癌细胞的增殖实现的,WTX 基因影响结肠癌细胞的生长周期,结肠癌细胞主要被 WTX 基因阻滞在 G_1 期,很少有细胞进入 S 期,表明 WTX 基因通过将结肠癌细胞阻滞于 DNA 合成期,从而发挥其抑癌作用的。

参考文献

- [1] Li SK, Martin A. Mismatch repair and colon cancer: mechanisms and therapies explored[J]. Trends Mol Med, 2016, 22(4):274-289.
- [2] Brown JC, Troxel AB, Ky B, et al. A randomized phase II dose-response exercise trial among colon cancer survivors: purpose, study design, methods, and recruitment results[J]. Contemp Clin Trials, 2016(47):366-375.
- [3] Muoz de Escalona M, Sáez-Fernández E, Prados JC, et al. Magnetic solid lipid nanoparticles in hyperthermia against colon cancer[J]. Int J Pharm, 2016, 504(1/2):11-19.
- [4] Liu Y, Liu S. Berberine inhibits Wilms' tumor cell progression through upregulation of Wilms' tumor gene on the X chromosome[J]. Mol Med Rep, 2013, 8(5):1537-1541.
- [5] Liu X, Wang Q, Niu H, et al. Promoter methylation of Wilms' tumor gene on the X-chromosome in gastric cancer[J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2013, 33(3):318-321.
- [6] Camp ND, James RG, Dawson DW, et al. Wilms tumor gene on X chromosome (WTX) inhibits degradation of NRF2 protein through competitive binding to KEAP1 protein[J]. J Biol Chem, 2012, 287(9):6539-6550.
- [7] Park J, Jeong S. Wnt activated β -catenin and YAP proteins enhance the expression of non-coding RNA component of RNase MRP in colon cancer cells[J]. Oncotarget, 2015, 6(33):34658-34668.
- [8] Qi L, Song W, Liu Z, et al. Wnt3a promotes the vasculogenic mimicry formation of colon cancer via Wnt/ β -Catenin signaling[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(8):18564-18579.
- [9] Kim MK, Min DJ, Rabin M, et al. Functional characterization of Wilms tumor-suppressor WTX and tumor-associated mutants[J]. Oncogene, 2011, 30(7):832-842.
- [10] Scheel SK, Porzner M, Pfeiffer S, et al. Mutations in the WTX-gene are found in some high-grade microsatellite instable (MSI-H) colorectal cancers[J]. BMC Cancer, 2010(10):413.
- [11] QingLing Z, LiNa Y, Li L, et al. LMP1 antagonizes WNT/ β -catenin signalling through inhibition of WTX and promotes nasopharyngeal dysplasia but not tumourigenesis in LMP1 (B95-8) transgenic mice[J]. J Pathol, 2011, 223(5):574-583.
- [12] 覃创, 陈嘉勇, 梁道明. WTX 基因在肿瘤中的研究进展[J]. 重庆医学, 2012, 41(5):502-504.
- [13] 覃创. WTX 基因在胃癌组织中转录水平的表达[D]. 昆明:昆明医科大学, 2012.
- [14] Leem SH, Li XJ, Park MH, et al. Genome-wide transcriptome analysis reveals inactivation of Wnt/ β -catenin by 3, 3'-diindolylmethane inhibiting proliferation of colon cancer cells[J]. Int J Oncol, 2015, 47(3):918-926.
- [15] Yun SI, Kim HH, Yoon JH, et al. Ubiquitin specific protease 4 positively regulates the WNT/ β -catenin signaling in colorectal cancer[J]. Mol Oncol, 2015, 9(9):1834-1851.

(收稿日期:2016-07-19 修回日期:2016-09-18)