

WIF-1、DKK 基因启动子甲基化对 COLO 320、HT-29 细胞株 β -catenin 磷酸化的影响

周 徽,胡光胜,曾 斌,廖爱军

(南华大学附属第一医院消化内科,湖南 衡阳 421001)

摘要: **目的** 探讨 Wnt 抑制性基因甲基化对结直肠癌细胞株 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响。 **方法** 使用甲基特异性 PCR 和逆转录实时定量 PCR 方法,分别检测结直肠癌细胞株 COLO 320、HT-29 及正常细胞株 CCD-18Co 中 WIF-1、DKK-1、DKK-3 的启动子 CpG 岛甲基化、mRNA 水平,和测定 β -catenin 蛋白磷酸化情况,并观察 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-dC)去甲基化对各指标的影响。 **结果** COLO 320 细胞的 DKK-1 及 DKK-3 mRNA 水平明显降低、甲基化程度高;HT-29 细胞的 DKK-3、WIF-1 mRNA 水平低、甲基化程度高;两个肿瘤细胞株的 β -catenin 蛋白总量均明显增高,且主要为非磷酸化的状态。5-aza-dC 可减少这些指标的改变。 **结论** 抑制性基因甲基化调节的 Wnt/ β -catenin 通路的异常激活,可能在结直肠癌的形成中有重要作用。在不同的肿瘤细胞株之间、不同 Wnt 抑制基因的甲基化程度存在差异;该领域的深入研究有助于开发出新的治疗药物。

关键词: Wnt/ β -catenin 信号通路; 甲基化; 结直肠癌; 表观遗传学

中图分类号:Q279 文献标识码:A

Hypermethylation of WIF-1 and DKK Gene Family on the β -catenin Phosphorylation in Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines COLO 320 and HT-29

ZHOU Hui, HU Guangsheng, ZENG Bin, et al

(Department of Digestion, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To reveal the the effect of methylated inhibitory genes on Wnt/ β -catenin pathway in colorectal adenocarcinoma cell lines. **Methods** With colorectal adenocarcinoma cell lines COLO 320, HT-29 and normal colorectal cell line cCCD-18Co, methylation status of CpG island in promotor of WIF-1, DKK-1 and DKK-3 genes were determined by methylation specific PCR (MSP), and mRNA levels of these genes were quantified by real-time RT-PCR, and phosphorylated β -catenin were semi-quantified by Western blot. Effect of DNA-demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) treatment were also evaluated. **Results** DKK-1 and DKK-3 mRNA decreased accompanied with hypermethylation status of the CpG islands in COLO 320, while DKK-3 and WIF-1 mRNA decreased accompanied with hypermethylation in HT-29. Total β -catenin increased significantly while phosphorylated β -catenin declined in both cell lines. 5-aza-dC ameliorated these aberrant parameters partially. **Conclusion** The aberrant activation of Wnt/ β -catenin pathway mediated by the hypermethylation of WIF-1 and DKKs genes may contribute to the oncogenesis of colorectal adenocarcinoma, while the methylation level of different Wnt inhibitory genes varied in colorectal cancer cell lines. Further research on this field will prompt the development of new therapies targeting the methylation process.

Key words: WNT/ β -catenin signaling pathway; hypermethylation; colorectal adenocarcinoma; epigenetics

Wnt 信号通路在多细胞生物中高度保守,在胚胎发育、内环境自稳和肿瘤发生等多种生物学过程中发挥着重要的调控作用。例如,经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路的异常激活是大多数结直肠癌的早期事件,其中约 80% 患者携带有导致 APC (adenomatous polyposis coli) 基因功能缺失的突变,5% 携带有引起 β -catenin 活化的突变^[1-2]。Wnt/ β -catenin 信号通路还是肿瘤维持和转移所必需的^[3]。

在 Wnt/ β -catenin 信号通路的上游,Wnt 拮抗物的失活与肿瘤的发生密切相关。Wnt 的拮抗物主要有两大类:能直接结合 Wnt 蛋白、抑制 Wnt/ β -catenin 通路活性的 WIF-1 (Wnt 抑制因子-1)、sFRP 家族等;以及能结合 Wnt 受体复合物中的低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 和 6 (LRP 5/LRP 6) 的 DKK (Dickkopf) 家族。已证明 WIF-1^[4]、sFRP^[5] 和 DKK^[6] 的表观遗传学改变以及表达异常与消化道肿瘤密切相关。本文则着重观察在不同结直肠癌细胞株中,WIF-1 与 DKK 基因启动子的甲基化、mRNA 及蛋白的水平,及其对 β -catenin 水平的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞系 结直肠腺癌细胞系 COLO 320、HT-29 均购自中国典型培养物保藏中心(湖北省武汉市);正常的结直肠细胞株 CCD-18Co (CRL-1459) 购自美国 ATCC。细胞培养基为 10% 胎牛血清的 DMEM。

1.2 去甲基化处理 收集对数增长期的培养细胞,使用 5 μ mol/L 的 5-氮杂-2'-脱氧胞嘧啶核苷 (5-aza-2'-deoxycytidine, 5-aza-dC, Sigma-Aldrich) 孵育 72 h 以进行去甲基化处理。处理结束后立即收集细胞提取 RNA 进行检测。

1.3 RNA 的提取、逆转录和 WIF-1、DKK 的实时荧光 RT-PCR 定量检测 每个样品使用约 10^6 个细胞,使用 QIAamp RNA mini kit (Qiagen) 按说明提取总 RNA;使用 SuperScript III 及随机引物进行逆转录;使用 TaqMan universal PCR master mix (Applied Biosystems),按说明书及参考文献[7],对以下基因进行实时荧光 RT-PCR 定量检测。DKK-1 (TaqMan Gene Expression Assay); DKK-3 (正向引物:5'-GTA AGT TTC CCC TCT GGC TTG-3',反向引物:5'-AAG CAC CAG ACT GTG AAG CCT-3',探针:FAM-5'-AGG TGT TGT GCA TTT GTT CAG CTC CC-3'-TAM-

RA); WIF-1 (正向引物:5'-TCC AAA CAC CTC AAA ATG CTA TC-3',反向引物:5'-GAA CCC ATC AGG ACA CTC GC-3',探针:FAM-5'-ACA AGC TGA GTG CCC AGG CGG-3'-TAMRA) 和内参 GAPDH (正向引物:5'-CCA CTC CTC CAC CTT TGA C-3',反向引物:5'-ACC CTG TTG CTG TAG CCA-3',探针:FAM-5'-TTG CCC TCA ACG ACC ACT TTG TC-3'-TAMRA)。使用 ABI 7500 进行检测,反应条件为:95 $^{\circ}$ C 10 min 和 35 个周期的 95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 60 s。每个样品测 3 个重复孔。数据分析时参考文献[8],计算靶基因与 GAPDH 参照基因 Ct 值的比值。

1.4 DNA 的提取和甲基化特异 PCR (MSP) 检测

采用 QIAamp DNA mini kit (Qiagen) 提取、纯化培养的肠癌细胞和正常细胞 CCD-18Co 的 DNA。按文献方法^[9]使用亚硫酸氢盐对 DNA 进行修饰并进行 MSP 检测。引物序列参考文献[6,9]分别为:

甲基化特异的引物:DKK-1: 5'-CGT TCG TTG GTA GTT TTT ATT TCG A-3' (正向); 5'-GCG ACT ACC TTT ATA CCG CGA A-3' (反向); DKK-3: 5'-CGG TTT TTT TTC GTT TTC GGG-3' (正向), 5'-CAA ACC GCT ACA TCT CCG CT-3' (反向); WIF-1: 5'-GGG CGT TTT ATT GGG CGT AT-3' (正向), 5'-AAA CCA ACA ATC AAC GAA C-3' (反向)。

非甲基化的特异引物为:DKK-1: 5'-TGT TTG TTG GTA GTT TTT ATT TTG A-3', 5'-ACC ACA ACT ACC TTT ATA CCA CAA A-3'; DKK-3: 5'-TTT TGG TTT TTT TTT GTT TTT GGG-3'; 5' - CCA AAC CAC TAC ATC TCC ACT-3'; WIF-1: 5'-GGG TGT TTT ATT GGG TGT AT-3' (forward), 5'-AAA CCA ACA ATC AAC AAA AC-3' (reverse)。主要步骤为:PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 12 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s,40 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。使用正常人外周血单个核细胞 (PBMC) 提取的 DNA 经 SssI 甲基化酶处理后作为甲基化分析的阳性对照,未经处理的作为非甲基化的阴性对照。甲基化 (M) 和非甲基化 (U) 特异 PCR 的产物电泳后,使用 TANON GIS 凝胶成像分析系统进行半定量分析,计算其光密度的相对比例。

1.5 β -catenin 的 Westernblot 检测 将 10^6 细胞直接以收集细胞加入裂解液裂解后收集上清,以 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度后,将蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离,并转移至 PVDF 膜 (Immobilon-P, Millipore) 上,采用 5% 脱脂奶粉室温封闭

3 h, 进行抗体标记。所用抗体为小鼠 anti- β -catenin (BD Transduction Laboratories)、小鼠 anti-Actin (Sigma)、兔多克隆抗人 DKK-1、DKK-3、WIF-1 (Abcam) 和兔抗人磷酸化 β -catenin (pS33/pS37/pT41) (Cell Signalling Technologies), 以及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG、兔抗小鼠 IgG (Abcam)。使用 ECL Western blotting 检测试剂 (Pierce) 进行显色及 VersaDoc MP4000 (Bio-rad) 进行分析。

1.6 统计分析 使用 IBM SPSS version 20.0 进行统计分析。组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同细胞株中 WIF-1、DKK-1、DKK-3 mRNA 表达的改变 根据不同靶基因对 GAPDH 基因的

比值, 以正常细胞 CCD-18Co 为参照, 计算出 COLO320 和 HT-29 不同基因的改变倍数。图 1 可以看出 COLO320 细胞的 DKK-1 和 DKK-3 mRNA 表达明显下降 ($P < 0.01$); 而 WIF-1 改变不明显。而 HT-29 细胞的 DKK-3 和 WIF-1 mRNA 水平明显下降 ($P < 0.01$), DKK-1 改变不明显。而经 5-aza-dC 干预后, 均有所回调, 但依然明显低于正常细胞。

2.2 不同细胞株中 WIF-1、DKK-1、DKK-3 启动子甲基化程度的检测 使用甲基化特异 PCR 以及非甲基化特异 PCR 进行检测发现, CCD-18Co 的 WIF-1、DKK-1、DKK-3 等 3 个基因启动子均处于非甲基化状态; COLO320 的 DKK-1 和 DKK-3 基因启动子处于高度甲基化、WIF-1 处于非甲基化状态; 而 HT-29 的 DKK-3 和 WIF-1 基因启动子处于高度甲基化, DKK-1 处于非甲基化状态。

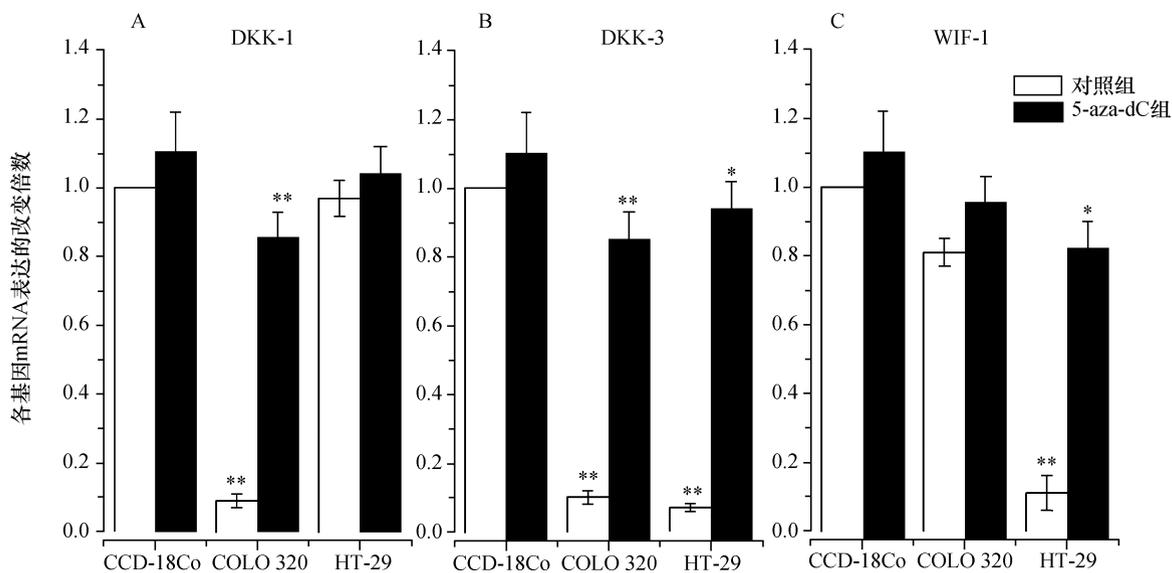


图 1 不同细胞株中 WIF-1、DKK-1、DKK-3 mRNA 表达的改变 注: 相对于未经 5-aza-dC 处理的 CCD-18Co 细胞株 (标化为“1”), DKK-1 (A)、DKK-3 (B) 和 WIF-1 (C) mRNA 在 COLO320、HT-29 细胞中表达的水平及经 5-aza-dC 处理后改变的倍数

经 5-aza-dC 干预后, CCD-18Co 的 3 个基因依然保持于非甲基化的状态; 而 COLO320 高甲基化的 DKK-1、DKK-3 均明显减弱, 并扩增出了部分未甲基化的条带。相似的, HT-29 高甲基化的 DKK-3 和 WIF-1 在 5-aza-dC 干预后, 也出现了 MSP 条带减弱、并扩增出了非甲基化的条带 (图 2)。

2.3 不同细胞株中 DKK-1、DKK-3 和 WIF-1 蛋白的表达 使用 Western Blot 对不同细胞株 DKK-

1、DKK-3 和 WIF-1 蛋白的表达水平进行分析, 研究发现, CCD-18Co 的 DKK-1、DKK-3 和 WIF-1 蛋白均处于较高表达水平, 5-aza-dC 处理后无明显改变。COLO 320 表达 DKK-1 和 WIF-1 微弱; 5-aza-dC 处理后 DKK-1 明显增强、WIF-1 也略有增加但依然处于极低水平。DKK-3 则始终有较高表达。而 HT-29 的 DKK-1 表达处于较高水平, DKK-3 和 WIF-1 表达微弱, 5-aza-dC 处理后略有增加 (图 3)。

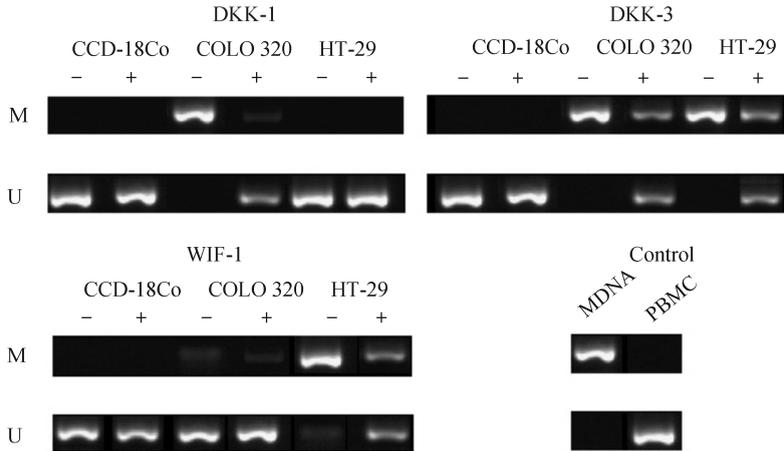


图2 不同细胞株中 WIF-1、DKK-1、DKK-3 基因甲基化的状态 注:M:甲基化特异 PCR。U:非甲基化特异 PCR。“+”为 5-aza-dC 处理组;“-”为未处理组。Control 为阳性对照(M. DNA:甲基化的 DNA)和阴性对照(PBMC:正常人 PBMC 提取的 DNA)

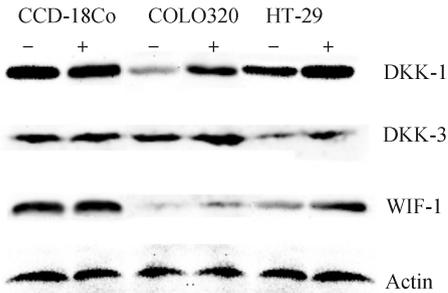


图3 不同细胞株中 DKK-1、DKK-3 和 WIF-1 蛋白的表达水平 注:“+”为 5-aza-dC 处理组;“-”为未处理组

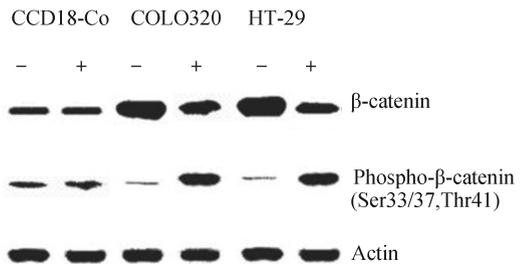


图4 不同细胞株中 β -catenin 和磷酸化- β -catenin 的水平 注:“+”为 5-aza-dC 处理组;“-”为未处理组

2.4 β -catenin 含量分析 Wnt/ β -catenin 的异常活化最终体现为 β -catenin 的磷酸化减少、以及随后的泛素化降解减少。而在本文中相对于 CCD-18Co 细胞,COLO320 和 HT-29 细胞都存在 β -catenin 总量增高、且 Ser33/37 和 Thr41 磷酸化 β -catenin 水平低的情况,提示非磷酸化的 β -catenin 增高。而经 5-aza-dC 干预后,COLO320 和 HT-29 细胞 β -catenin 总量均降低、磷酸化 β -catenin 含量升高(图 4)。

3 讨 论

Wnt 信号经典通路——Wnt/ β -catenin 通路在多个重要的生物学过程中发挥着重要的调控作用。Wnt/ β -catenin 通路主要为:在存在 Wnt 活化信号时,Wnt 结合至其受体 frizzled (Fzd) 和 LRP 5/LRP 6,阻止了 β -catenin 被 AXIN/ APC/ GSK3/ CK1 复合体磷酸化、进而被泛素化及蛋白酶体降解。因此,

β -catenin 在胞质中聚集、并转位进入细胞核,作为转录因子 TCF/LEF 家族的辅因子,导致多个 Wnt/ β -catenin 靶基因的转录,如 Axin2、Smad7、Cnd1/CyclinD 和 Myc 等。因此,如能影响 Wnt 抑制因子的表达,则可能在 Wnt/ β -catenin 通路上游抑制该通路的激活,产生包括抑制肿瘤生长、转移在内的广泛的调节作用。

基因的表现遗传学修饰是一种不依赖 DNA 序列改变的、可逆的基因表达调控过程。基因启动子甲基化等表现遗传学修饰与癌症的发生密切相关^[10-11]。本研究则进一步证实,在结直肠癌细胞株 COLO320 及 HT-29 中,Wnt 抑制基因的 mRNA 表达、基因启动子高度甲基化与相应的蛋白表达水平基本吻合。如 COLO320 的 DKK-1 和 DKK-3 mRNA 较低,其基因启动子也处于高甲基化状态,蛋白表达也相应较低。而 HT-29 中 DKK-3 和 WIF-1 的表达情况与之类似。同时,COLO320 和 HT-29 的 β -catenin 总量均有所增加、磷酸化的 β -catenin 减少。

本研究的结果说明,这两个结直肠癌细胞株中,均存在 Wnt 抑制基因的甲基化修饰异常、以及 Wnt/ β -catenin 通路异常活化。这一改变可能参与了结直肠癌的形成。因此,已有研究尝试以粪便检查 SFRP1 和 WIF-1 基因甲基化的程度来帮助筛查结肠癌^[12]。本研究还发现,在 COLO320、HT-29 这两个不同的结直肠癌细胞株中,不同 Wnt 抑制基因的甲基化和转录水平是存在差异的;而去甲基化处理可以部分下调 Wnt/ β -catenin 通路的异常活化。提示该通路可能成为新的结直肠癌的治疗靶点。

参考文献:

- [1] Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer [J]. *Nature*, 2012, 487(7407):330-337.
- [2] Humphries A, Wright NA. Colonic crypt organization and tumorigenesis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(6):415-424.
- [3] Scholer-Dahirel A, Schlabach MR, Loo A, et al. Maintenance of adenomatous polyposis coli (APC)-mutant colorectal cancer is dependent on Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(41):17135-17140.
- [4] 王玲,张煦,王连. 大肠癌中 WIF-1 和 Wnt2b 的表达及其临床意义 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2012, 28(06):613-615, 619.
- [5] 谭华斌,卢光新. 胃癌组织中 SnoN、Egr3 和 SFRP1 的表达情况及临床意义 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2014, 19(10):901-905.
- [6] 李春辉,潘理会,佟晓波,等. Wnt 信号通路的组件蛋白 DKK-1、 β -链接素及周期素 D1 蛋白表达与胃癌的相关性 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(05):1171-1173.
- [7] Ding Z, Qian YB, Zhu LX, et al. Promoter methylation and mRNA expression of DKK-3 and WIF-1 in hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(21):2595-2601.
- [8] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method [J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(6):1101-1108.
- [9] Mazieres J, He B, You L, et al. Wnt inhibitory factor-1 is silenced by promoter hypermethylation in human lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(14):4717-4720.
- [10] Yamamoto E, Suzuki H, Takamaru H, et al. Role of DNA methylation in the development of diffuse-type gastric cancer [J]. *Digestion*, 2011, 83(4):241-249.
- [11] Voorham QJ, Janssen J, Tijssen M, et al. Promoter methylation of Wnt-antagonists in polypoid and nonpolypoid colorectal adenomas [J]. *BMC Cancer*, 2013, 13(19):603.
- [12] 张虎,张平,江军,等. 粪便标本中 SFRP1 和 WIF-1 基因启动子甲基化在大肠癌早期筛查中的意义 [J]. *山东医药*, 2014, 54(33):54-56.

(此文编辑:蒋湘莲)