

文章编号 1006-8147(2015)03-0212-05

论著

shRNA 干扰胸腺瘤细胞 Wnt4 基因后 JNK 基因表达下调

唐培源, 戚 斌, 陈 渊, 王元国, 张 鹏

(天津医科大学总医院心胸外科, 天津 300052)

摘要 目的: 研究 shRNA 干扰 Wnt4 基因对胸腺瘤细胞 JNK 基因表达的影响及 Wnt4 基因发挥作用可能依赖的信号通路。方法: 根据 shRNA 设计原则, 设计针对 Wnt4 基因的 4 个干扰靶点, 构建 Wnt4-shRNA 干扰质粒, 经鉴定片段成功插入后, 将空白质粒、TR001 质粒和重组的 4 个干扰质粒分别转染体外培养的胸腺瘤细胞。采用 RT-PCR 检测转染后 Wnt4 基因表达, 挑选对 Wnt4 基因抑制效果最好的干扰质粒进行后续实验。将胸腺瘤细胞分 3 组: 空白对照组; 转染 TR001 质粒组; 转染干扰质粒组。用 Lipofectamine™2000 转染, 采用 RT-PCR 及 Western blot 检测细胞 Wnt4 和 JNK 的 mRNA 及蛋白表达。结果: shRNA-Wnt4-3 质粒能显著抑制 Wnt4 基因表达, 抑制率为 52.37% ($P < 0.05$)。Wnt4 基因下调后胸腺瘤细胞内 JNK 基因表达也显著下调 ($P < 0.01$), 差异有统计学意义。结论: 采用 shRNA 干扰 Wnt4 基因后胸腺瘤细胞内 JNK 基因表达显著下调, 说明 Wnt4 基因与 JNK 基因的表达有相关性, Wnt4 基因可能依赖于非经典的 Wnt/JNK 信号通路发挥作用。

关键词 胸腺瘤; Wnt4; JNK; 干扰; shRNA

中图分类号 R736.3

文献标志码 A

Expression of JNK gene reduced by using shRNA interference Wnt4 gene in thymoma cells

TANG Pei-yuan, QI Bin, CHEN Yuan, WANG Yuan-guo, ZHANG Peng

(Department of Cardiothoracic Surgery, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

Abstract **Objective:** To explore the effect of Wnt4 gene on the expression of JNK gene and the signal pathway in thymoma cells. **Methods:** Four Wnt4-shRNA interference plasmids were constructed to target directly on Wnt4 gene. The blank plasmid, TR001 and recombinant plasmids were transfected into thymoma cells. The expression of Wnt4 was detected by RT-PCR while the best Wnt4 interference plasmid for subsequent experiments was selected. The thymoma cells were divided into three groups: control group, transfected TR001 plasmid, transfected interference plasmid. The expression of Wnt4 and JNK were detected by RT-PCR and Western blot. **Results:** Expression of Wnt4 could be significantly inhibited by shRNA-Wnt4-3 plasmid. The ratio of inhibition was 52.37% ($P < 0.05$). With down regulation of Wnt4, the expression of JNK were significantly down-regulated in thymoma cells ($P < 0.01$). **Conclusion:** After interfering Wnt4 gene by using shRNA, the expression of JNK gene is significantly reduced. This indicates that Wnt4 gene is correlated with the expression of JNK gene in thymoma cells. Which may depend on the non-canonical Wnt/JNK signaling pathway.

Key words Thymoma; Wnt4; JNK; interference; shRNA

胸腺瘤是纵隔最常见的肿瘤之一^[1]。临床上认为胸腺瘤属于低度恶性肿瘤或具有恶性倾向的肿瘤, 任何年龄均可发病, 但 21~40 岁间发病率较高, 在亚洲/太平洋岛民中具有最高的发病率^[2]。随着胸腺瘤发病率的增高, 国内外对胸腺瘤的重视程度也逐年上升, 但目前关于胸腺瘤的临床研究偏多, 基础研究甚少。同其他肿瘤一样, 胸腺瘤中也可能存在很多信号通路的激活与抑制, 从而影响着胸腺瘤的发生及生长。Wnt4 是 Wnts 中的一员, 通过旁分泌作用, 在整个胚胎发育、从原肠胚到轴线的形成、

细胞极性、分化和器官发育过程中起到关键性的作用^[3]。Wnt4 基因不仅在胚胎发育期存在, 在成年人的各个器官中都存在, 只不过是胚胎期与成年期转录的产物大小不同, 分别为 2.4 kb 和 1.5 kb^[4]。Heinonen 等^[5]研究发现 Wnt4 基因在胚胎胸腺及成人胸腺上皮细胞中均有不同程度的表达, 但是随着年龄的增长胸腺逐渐退化萎缩, 胸腺上皮细胞 Wnt4 的分泌也逐渐降低^[6]。很多肿瘤中也有 Wnt4 基因的表达, 其中对乳腺癌及垂体瘤的研究相对较多^[7-8]。Louis 等^[9]研究发现, 在功能性胸腺产生的 T 淋巴细胞中 Wnt4 通路激活依赖 JNK (JUN N-terminal kinase) 的非经典途径。笔者前期实验也证明在胸腺瘤中 Wnt4 基因过度表达, 由此推断胸腺瘤中也存在 Wnt 信号通路的激活, 并影响着下游基因。因此,

基金项目 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20121202110009)

作者简介 唐培源(1988-), 男, 硕士在读, 研究方向: 胸部肿瘤; 通信作者: 张鹏, E-mail: zhp_tjgh@163.com。

本实验利用 shRNA 干扰 Wnt4 基因后观察胸腺瘤细胞内 JNK 基因表达的情况,来说明胸腺瘤细胞中 Wnt4 信号通路可能依赖 JNK 介导的非经典途径发挥作用。

1 材料与方法

1.1 细胞来源及培养条件 人 AB 型胸腺瘤细胞系,源于 50 岁黄色人种男性同时合并 MG 患者胸腺瘤组织,由天津医科大学总医院心胸外科原代培养。在含 10% 胎牛血清、100 IU/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 高糖培养基中生长,并于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度下培养。

1.2 干扰质粒的构建及筛选 Wnt4 的 mRNA 序列引自 NCBI(gi:156630997),感受态细胞采用大肠杆菌 TransT1 菌种(晶赛生物工程有限公司,武汉),质粒采用 psi-H1,干扰质粒发卡结构序列:TCAAGAG,构建 4 种 Wnt4 基因 shRNA 干扰候选质粒(表 1),同时选取 HSHTR001 质粒作为空白质粒对照组,所有质粒均由广州复能基因有限公司合成。转染前一天细胞正常传代接种 12 孔培养板,生长至 50% 融合度无血清培养基同步化 12 h。将细胞分成 6 组($n=5$):(1)对照组,无干扰;(2)TR001 组,转染 HSHTR001 空白质粒;(3)Wnt4-shRNA-1 组,转染 HSH13446-1-CH1 干扰质粒;(4)Wnt4-shRNA-2 组,转染 HSH13446-2-CH2 干扰质粒;(5)Wnt4-shRNA-3 组,转染 HSH13446-3-CH3 干扰质粒;(6)Wnt4-shRNA-4 组,转染 HSH13446-4-CH4 干扰质粒。采用 Lipofectamine™2000(Invitrogen)各转染 8 μ g 质粒 DNA。具体操作方法严格按照 Lipofectamine™2000 说明书进行,转染 6 h 后更换含 10% FBS 的 DMEM 培养基继续培养。采用 RT-PCR 法,以 GAPDH 为内参照。按 Trizol(Invitrogen)说明书提取细胞总 RNA。用 1 μ g 总 RNA 进行逆转录及 PCR 反应,严格按照试剂盒说明书进行操作。根据 NCBI 的数据,设计 Wnt4 及 GAPDH 引物序列(北京奥科生物技术有限公司)(表 2)。PCR 25 μ L 反应体系:模板 DNA 1 μ L,上下游引物(10p)各 1 μ L,10 \times Easy Taq Buffer 2.5 μ L,Easy Taq 酶 0.3 μ L。PCR 参数设置 Wnt4/GAPDH:94 $^{\circ}$ C 3 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物于 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,电压 180 V,20 min。采用 Bio-RAD 公司凝胶系统摄影软件留存目的条带图像,并通过 Quantity One 图像分析软件获取目的条带灰度值。得出 Wnt4 mRNA 含量水平的相对值,比较同一细胞系中转染 5 种干扰质粒后 Wnt4 mRNA 的相对表达量。将所得阳性电泳条带回收送检测序。

表 1 Wnt4 基因 shRNA 干扰候选质粒

Tab 1 shRNA interference candidate plasmids of Wnt4

Clone Name	Symbol	Location	Length	Target Sequence
HSH013446-1-CH1(OS241017)	WNT4	1475	19	ggtggagtaacaaggagta
HSH013446-2-CH1(OS241018)	WNT4	1845	19	gaagaggaaacttaaccac
HSH013446-3-CH1(OS241019)	WNT4	2289	19	gcagacaaaccaagaatgc
HSH013446-4-CH1(OS241020)	WNT4	2973	19	aacgtccgagattcggaaat

1.3 Wnt4 及 JNK mRNA 表达的检测 干扰质粒的转染同前。将细胞分 3 组:(1)对照组,无干扰;(2)TR001 质粒组;(3)shRNA-Wnt4 干扰质粒组。转染后各组细胞按照分组培养 48 h 后进行后续实验检测。以 GAPDH 为内参照。提取各组细胞总 RNA,具体操作步骤同前。进行逆转录反应,具体操作步骤及反应体系同前。根据 NCBI 的数据,设计 Wnt4 及 JNK 引物序列(北京奥科生物技术有限公司)(表 2)。PCR 产物于 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统扫描成像并保存图像,Quantity one 软件对电泳条带进行分析。具体操作步骤及参数设定同前。

表 2 GAPDH、Wnt4、JNK 的引物序列

Tab 2 Primer sequences of GAPDH,Wnt4 and JNK

基因	上游引物序列	下游引物序列
GAPDH	5'-GAAGTGAAGTCGGAGTC-3'	5'-GGGTGGAATCATATTGGAAC-3'
Wnt4	5'-GCTCTGACAACATCGCCTAC-3'	5'-TCGCCAGACGCTCTTTAC-3'
JNK	5'-TTTGAGAACTCTCCCTGATG-3'	5'-ATTGATGTACGGGTGTTGGA-3'

1.4 Wnt4 及 JNK 蛋白表达的检测 采用 Western blot 方法,以 β -actin 为内参照检测 Wnt4 及 JNK 蛋白表达的变化。将转染 48 h 各组细胞用 PBS 清洗 2 次,加入预冷的 RIPA 裂解液并按 1:100 的比例加入 PMSF 裂解细胞收集蛋白,检测蛋白总浓度(BCA 法)。取 30 μ g 蛋白加入 5 \times 上样缓冲液,沸水变性,12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离。蛋白湿转至 NC 膜上。一抗[Wnt4 兔抗人多克隆抗体(1:100)、JNK 鼠抗人单克隆抗体(1:500)、 β -actin 兔抗人多克隆抗体(1:1 000)]、二抗[山羊抗兔/鼠单克隆抗体(1:8 000)]孵育后加入 ECL 显色剂,X 光胶片曝光、成像,Quantity one 软件进行分析。

1.5 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析(one-way ANOVA),对差异有统计学意义的再进行 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 SPSS17.0 统计学软件对数据进行处理。

2 结果

2.1 psi-H1-shRNA-Wnt4 干扰质粒的筛选及对 Wnt4 基因的抑制作用

2.1.1 psi-H1-shRNA-Wnt4 质粒对 Wnt4 基因表达的影响 半定量 RT-PCR 法测定靶基因 Wnt4 表达水平,结果见图 1、2。结果显示 Wnt4 的 mRNA 在各实验组的表达均低于空白对照组。各候选质粒组中 shRNA-Wnt4-1 组的相对表达量高于 TR001 组但差异无统计学意义。其余候选质粒组相对表达量均低于 TR001 组,shRNA-Wnt4-3 的 mRNA 相对表达量最低,且差异有统计学意义($P<0.01$)。采用 Quantity one 软件计算各条带的灰度值,统计分析表明各候选质粒对 Wnt4 的抑制率:shRNA-Wnt4-1,shRNA-Wnt4-2,shRNA-Wnt4-3,shRNA-Wnt4-4 分别为 15.50%,40.87%,52.37%($P<0.05$)和 34.89%[抑制率=(对照组值-实验组值)/对照组值 \times 100%]。

2.1.2 测序鉴定结果 选取阳性电泳条带的目的质粒(shRNA-Wnt4-3)送北京奥科鼎盛生物科技有限公司测序结果显示(图 3),目的基因完全插入,序列与设计序列完全一致。

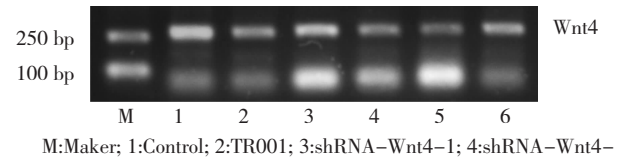
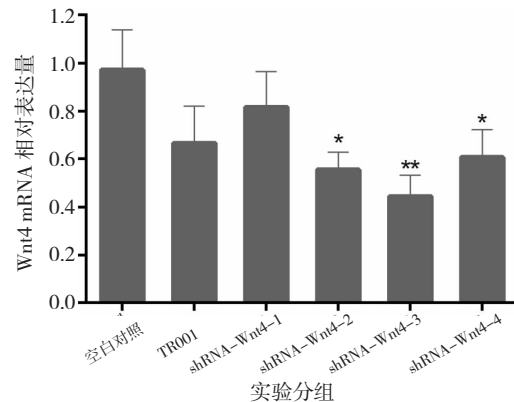


图 1 候选质粒转染后 Wnt4 mRNA 表达

Fig 1 Wnt4 mRNA expression after interfering by candidate plasmid



* $P<0.05$; ** $P<0.01$

图 2 候选质粒转染后 Wnt4 mRNA 相对表达量

Fig 2 Wnt4 mRNA relative expression after interfering by candidate plasmid

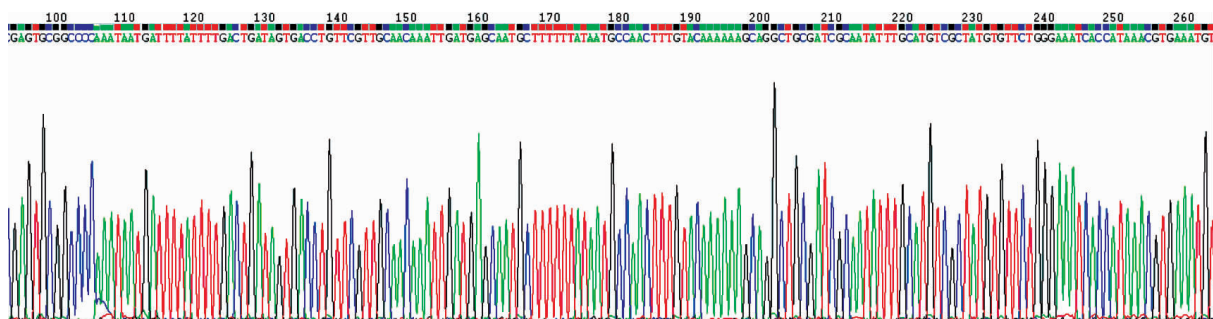


图 3 shRNA-Wnt4-3 质粒测序结果峰图

Fig 3 Sequencing graph of shRNA-Wnt4-3

2.1.3 psi-H1-shRNA-Wnt4 质粒对 Wnt4 蛋白表达的影响 Western blot 结果显示, β -actin 水平变化不大,Wnt4 蛋白在空白对照组和 TR001 组表达量相对较高,在 shRNA-Wnt4-3 组表达明显下调,与预测结果一致(图 4)。

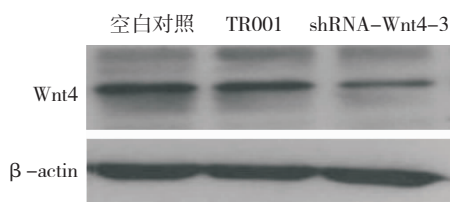


图 4 shRNA-Wnt4-3 质粒转染后 Wnt4 蛋白表达

Fig 4 Wnt4 protein expression after interfering by shRNA-Wnt4-3 plasmid

2.2 shRNA 干扰 Wnt4 基因后对 JNK 基因的抑制作用

2.2.1 shRNA 干扰 Wnt4 基因后对 JNK 基因表达的影响 半定量 RT-PCR 法检测 JNK 基因表达水平,结果显示 shRNA 干扰 Wnt4 基因后 JNK 基因表达量相对较低,而且变化规律与 Wnt4 表达水平一致,差异有统计学意义($P<0.01$)。与预测结果一致(图 5、6)。

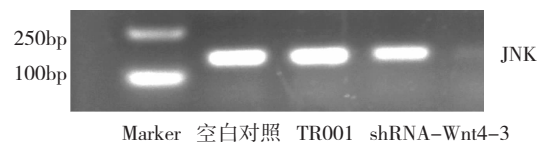
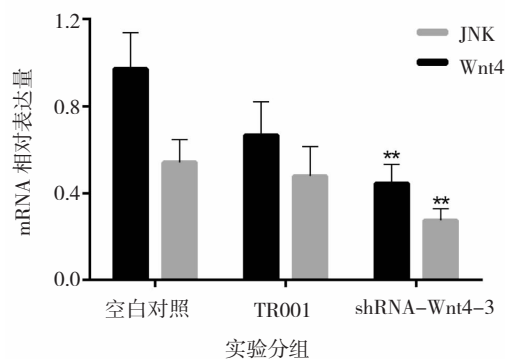


图 5 shRNA 干扰 Wnt4 后 JNK mRNA 表达

Fig 5 JNK mRNA expression after shRNA interfered Wnt4 gene



** $P < 0.01$

图6 质粒转染后 Wnt4 及 JNK mRNA 的相对表达

Fig 6 Wnt4 and JNK mRNA relative expression after interfering by plasmid

2.2.2 shRNA 干扰 Wnt4 基因后对 JNK 蛋白表达的影响 Western blot 结果显示, β -actin 的水平变化不大, JNK 蛋白在空白对照组和 TR001 组表达量相对较高, 在 shRNA-Wnt4-3 组表达明显下调且与 Wnt4 蛋白表达变化趋势一致(图 7)。

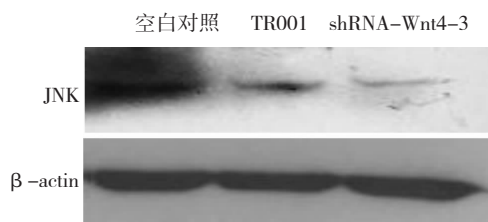


图7 干扰 Wnt4 基因后 JNK 蛋白表达

Fig 7 JNK protein expression after interfered Wnt4 gene

3 讨论

研究发现 Wnt 家族包括 19 个成员^[10], 其被分为两类: Wnt1 类(包括 Wnt1、Wnt2、Wnt3 等)和 Wnt5a 类(包括 Wnt4、Wnt5a 等), 这两类 Wnt 蛋白的不同功能可能反映了它们不同的信号转导机制。据报道与胸腺组织或胸腺发育相关的 Wnt 家族成员包括 Wnt1、Wnt4、Wnt5a 及 Wnt10b^[11-12]。有实验证明 Wnt 信号通路在胸腺瘤细胞中被发现, 大多都与胚胎胸腺的生长和成人胸腺上皮的维持有关, 其中 Wnt4 起到重要的作用^[5]。目前认为 Wnt4 基因在垂体瘤、乳腺癌、肾纤维化、肝纤维化等疾病中的异常表达是其致病的重要因素。我们前期实验也证明在胸腺瘤中 Wnt4 基因存在过度表达, 推断其可能通过异常激活或抑制某些信号通路来影响一系列生物学行为。因此可以采用抑制 Wnt4 基因表达的方法来探索其在胸腺瘤细胞中发挥作用的信号通路。本实验结果显示, 在胸腺瘤细胞, 用脂质体转入笔者构建的 shRNA-Wnt4-3 质粒后, 可以特异性地干扰 Wnt4 基因, 使其 mRNA 及蛋白的表达量明显降低, 达到抑制 Wnt4 基因的目的, 为进一步实验奠

定了基础。

Wnt 信号通路是一条进化上保守的信号传导途径, 从低等生物至高等哺乳动物都有高度同源性。Wnt 信号通路包括经典通路(Wnt/ β -catenin 信号通路)、Wnt/ Ca^{2+} 通路和 Wnt/JNK 通路即细胞极性通路(planar cell polarity pathway, PCP)^[13-14]。有研究表明 Wnt 信号通路与调控基因的表达、细胞行为、细胞极性和细胞黏附有关, 在肿瘤干细胞的维持中也起着重要的作用^[15]。目前关于 Wnt/JNK 信号通路的研究主要集中于 Wnt5a、Wnt7a 及 Wnt10b^[16-18]。对于 Wnt4/JNK 信号通路的研究相对较少。近期 Heinonen 等^[19]发现 Wnt4 能够通过 Wnt4/JNK 途径增强小鼠造血组细胞扩增。同时 Louis 等研究揭示在功能性胸腺产生的 T 淋巴细胞中 Wnt4 通路激活依赖 JNK 的非经典途径。笔者前期通过以 Wnt4、 β -catenin、JNK 这几个 Wnt 通路中的关键因子为研究对象, 在胸腺瘤细胞中通过干扰 Wnt4 基因后, 采用琼脂凝胶电泳发现 JNK 目的条带存在差异, 而 β -catenin 目的条带无明显变化。本实验结果显示, JNK 在转染 shRNA-Wnt4-3 质粒的胸腺瘤细胞中的 mRNA 以及蛋白的表达量均较对照组明显降低, 且与 Wnt4 mRNA 及蛋白的表达量变化趋势一致, 存在明显统计学差异。因此说明在胸腺瘤中, Wnt4 信号通路可能依赖 JNK 介导的非经典途径来发挥作用。

综上所述, 笔者认为在胸腺瘤中 Wnt4 基因与 JNK 基因的表达有相关性, Wnt4 基因可能依赖于非经典的 Wnt/JNK 信号通路发挥重要的作用。Wnt4 通路的激活导致胞浆内 JNK 积蓄的同时向细胞核及线粒体迁移, 并作用于其下游因子(c-jun、P53、TNF 等), 引起一系列生物学行为的改变。下一步, 笔者将研究抑制 Wnt4 信号通路对胸腺瘤细胞的影响及 Wnt4/JNK 信号通路的具体作用机制。

参考文献:

- [1] Singh G, Rumende C M, Amin Z. Thymoma: Diagnosis and treatment[J]. Acta Med Indones, 2011,43(1):74
- [2] Forquer J A. Thymic neoplasms[J]. Curr Probl Cancer, 2010,34(6):328
- [3] Pellegrino M, Maiorino R, Schonauer S. Wnt4 signaling in female gonadal development[J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2010,10(2):168
- [4] Hatzfeld M. The armadillo family of structural proteins[J]. Int Rev Cytol, 1999,186:179
- [5] Heinonen K M, Vanegas J R, Brochu S, et al. Wnt4 regulates thymic cellularity through the expansion of thymic epithelial cells and early thymic progenitors[J]. Blood, 2011,118(19):5163
- [6] Talaber G, Kvell K, Varcza Z, et al. Wnt -4 protects thymic epithelial cells against dexamethasone -induced senescence [J].

- Rejuvenation Res, 2011,14(3):241
- [7] Li W, Zhang Y, Zhang M, et al. Wnt4 is overexpressed in human pituitary adenomas and is associated with tumor invasion[J]. J Clin Neurosci, 2014,21(1):137
- [8] Benhaj K, Akcali K C, Ozturk M. Redundant expression of canonical wnt ligands in human breast cancer cell lines[J]. Oncol Rep, 2006,5(3):701
- [9] Louis I, Heinonen K M, Chagraoui J, et al. The signaling protein wnt4 enhances thymopoiesis and expands multipotent hematopoietic progenitors through beta-catenin-independent signaling[J]. Immunity, 2008,29(1):57
- [10] Dawson K, Aflaki M, Nattel S. Role of the wnt-frizzled system in cardiac pathophysiology: A rapidly developing, poorly understood area with enormous potential[J]. J Physiol, 2013,591(Pt 6):1409
- [11] Weerkamp F, Baert M R, Naber B A, et al. Wnt signaling in the thymus is regulated by differential expression of intracellular signaling molecules[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006,103(9):3322
- [12] Mulroy T, McMahon J A, Burakoff S J, et al. Wnt-1 and wnt-4 regulate thymic cellularity[J]. Eur J Immunol, 2002,32(4):967
- [13] Wallingford J B, Habas R. The developmental biology of dishevelled: An enigmatic protein governing cell fate and cell polarity[J]. Development, 2005,132(20):4421
- [14] Kuhl M, Geis K, Sheldahl L C, et al. Antagonistic regulation of convergent extension movements in xenopus by wnt/beta-catenin and wnt/ca2+ signaling[J]. Mech Dev, 2001,106(1/2):61
- [15] 李海英, 张力, 潘欢乐, 等. Wnt 信号通路在食管癌细胞放射抗拒性形成中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2012,28(9):1623
- [16] Yamamoto H, Oue N, Sato A, et al. Wnt5a signaling is involved in the aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase[J]. Oncogene, 2010,29(14):2036
- [17] Hanson M L, Brundage K M, Schafer R, et al. Prenatal cadmium exposure dysregulates sonic hedgehog and wnt/beta-catenin signaling in the thymus resulting in altered thymocyte development[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2010,242(2):136
- [18] Heasley L E, Winn R A. Analysis of wnt7a-stimulated jnk activity and cjun phosphorylation in non-small cell lung cancer cells[J]. Methods Mol Biol, 2008,468:187
- [19] Heinonen K M, Vanegas J R, Lew D, et al. Wnt4 enhances murine hematopoietic progenitor cell expansion through a planar cell polarity-like pathway[J]. PLoS One, 2011,6(4):e19279

(2014-12-04 收稿)

关于医学符号的使用

统计学符号不论用哪种字母,也不论大写或小写一律都用斜体。要注意区分拉丁字母和希腊字母。例如均数的符号是字母 \bar{x} , 卡方的符号是希腊字母 χ^2 , 自由度的符号是希腊文“ ν ”, 不是拉丁文“V”。样本的相关系数是英文“ r ”, 不能误为希腊文“ γ ”。

化学元素及核素在医学写作时一般多采用符号, 都是拉丁字母正体大写。离子态是在右上角用数字加“-”或“+”表示。例如 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 P^{3-} 等等, 不采用 Ca^{++} 、 P^{--} 、 Al^{+3} 、 O^{-2} 表示。核素的核子素(质量数)应写在元素符号的左上角, 例如 ^{131}I 、 ^{32}P 。表示激发状态的 m 写在右上角, 例如: $^{99}\text{Tc}^m$ 、 $^{133}\text{In}^m$ 。在科技论文和专著中不应写核素的中文名称, 即不能写成 131 碘、 133 铟 m 等。

近几年分子生物学发展很快, 并已渗透到许多学科, 大多数分子生物学名词术语的符号已有统一的确定形式, 要对符号的来源及其内涵有深刻的了解, 使用时不致发生错误, 例如: RNA 有 rRNA(ribosomal RNA)、tRNA(transfer RNA)、mRNA(messenger RNA)3 类。r、t、m 是表示类型的符号应小写, RNA 应大写。

(编辑部)