

经典 Wnt 通路的异常活化与食管癌放射抵抗的关系

黄晓智¹, 姚淑晖¹, 刘洋¹, 王立权², 宋晶晶³, 万彩玲⁴, 熊伟¹

1. 唐山市人民医院放化疗科, 河北 唐山 063001; 2. 唐山市人民医院耳鼻喉科, 河北 唐山 063001;
3. 唐山市人民医院心内科, 河北 唐山 063001; 4. 唐山市古冶区唐家庄卫生院, 河北 唐山 063000

摘要: **目的** 研究经典 Wnt 通路的异常活化与食管癌细胞放射抵抗性的关系, 探讨食管癌放射抵抗相关基因及其作用机制。**方法** 应用 Illumine-6_V3 人类全基因组 RNA 芯片筛选人类食管癌细胞株 TE13、KYSE170(亲代株)及其对应的抵抗株 TE13R、KYSE170R 在 6MV 的 X 射线照射前及照射后 24 h 的基因表达差异。利用 Illuminated Beadstudio Application 软件对芯片数据进行通路分析, 查找可能与放射抵抗相关的信号通路。应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)对相关通路基因进行验证。**结果** 食管癌细胞株在照射前及照射后 24 h, 分别发现有共性表达差异基因 460 个和 397 个。经过通路分析发现其中 4 个差异特别显著的基因分布在 Wnt 信号通路上, 即 CTNNB1、LEF1、FRAT1、TCF3 基因。RT-PCR 结果证实照射后 24 h(以目标基因值/内参值表示表达量), CTNNB1(1.33 ± 0.14)及 LEF1(1.16 ± 0.12)在放射抵抗细胞株 TE-13R 中的表达明显高于亲代株 TE-13 中 CTNNB1(0.86 ± 0.10)及 LEF1(0.84 ± 0.34)的表达(P 均 < 0.05)。**结论** 在食管癌放射抵抗形成过程中, 经典 Wnt 通路异常活化可能发挥重要作用。

关键词: 食管癌; 放射抵抗; 人类全基因组 RNA 芯片; 逆转录-聚合酶链反应; Wnt 通路

中图分类号: R-33 R 735.1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2016)04-0485-03

放射治疗是目前食管癌主要治疗手段之一, 而放射治疗后肿瘤的局部未控及局部复发是目前阻碍放疗疗效提高的瓶颈。增加放疗剂量不能改善局部控制率与生存期, 这表明在瘤体内可能存在着放射抵抗。这种放射抵抗除了肿瘤分期、肿瘤体积、乏氧、病理类型等因素外, 可能与肿瘤细胞相关基因的表达状态有关^[1-2]。因此探寻放射抵抗相关基因, 阐明其与放射抵抗的关系及调控机制具有重要意义。本课题旨在通过试验探寻与食管癌放射抵抗相关的基因, 并对其发挥放射抵抗作用的机制进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 细胞株获取与培养 人类食管鳞癌细胞株 KYSE170 及 TE13(亲代细胞株)经反复 X 线照射(总照射剂量达 60Gy), 逐步筛选建立为具有稳定放射抗性表型的人类食管癌放射抵抗细胞株 KYSE170R 及 TE13R, 经验证其放射抗性表型传 20 代后不变^[3-4]。

1.2 细胞的照射 给予接种于培养瓶中的细胞 6MV-X 射线照射, 照射剂量为 4Gy。为保证受照射细胞处于对数生长期, 细胞生长密度达到 70%~80% 时对细胞进行照射。

1.3 总 RNA 的提取 应用 Total RNA 提取试剂盒,

在照射前(0 h)及照射后 24 h 提取细胞的总 RNA。应用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度及纯度。

1.4 基因芯片结果 将上述 RNA 提取物进行基因芯片检测(上海生物芯片有限公司)。应用 Illumine-6_V3 人类全基因组芯片(包含 48 000 个探针)对上述细胞株在照射前(0 h)和照射后 24 h 的基因表达情况进行检测。应用 GeneSpring GX 10 软件对基因芯片结果进行分析, 表达 Illumina DifferScore ≥ 20 作为上调差异基因, Illumina DifferScore ≤ -20 作为下调差异基因。

1.5 基因芯片数据的通路(Pathway)分析 利用 Illuminated Beadstudio Application 软件, 根据文献、数据库和已知的通路分析结果, 对芯片数据进行分析。挑选最可能与放射抵抗相关的信号转导通路, 在该通路上寻找差异表达基因。

1.6 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)验证芯片结果 应用 AMV Reverse Transcription System 两步法试剂盒对差异基因 LEF1 在放射抵抗细胞株 TE-13R 及亲代细胞株 TE-13 中进行 RT-PCR 验证。其引物情况参见表 1。其扩增条件为: 95 °C 5 min \times 1 循环; (95 °C 30 s—55 °C 30 s—72 °C 1 min) \times 30 循环; 72 °C 10 min \times 1 循环; 4 °C ∞ 。 β -actin 作为内参。在含溴化乙锭琼脂糖凝胶中进行 RT-PCR 的产物电泳, 应用 Quantity One Imaging Program 程序对 RT-PCR 结果进行相对定量分析, 结果用目标基因与内

表 1 RT-PCR 引物序列表

基因名称	引物序列	产物长度
LEF1		
左	5' ccctccaactctcttcc 3'	204bp
右	5' ttgaaggatcatctctgc 3'	
CTNNB1		
左	5' gaaacggcttccagtgagc 3'	185bp
右	5' ctggccatccaccagagt 3'	
β -actin		
左	5' ctggagcagatggagaaa 3'	564bp
右	5' aaggaagctggaaagatc 3'	

参读数的比值表示,实验重复 3 次。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析。计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 基因芯片结果 应用 GeneSpring GX 10 软件对芯片结果行综合分析,发现照射前差异表达的基因有 460 个,照射后 24 h 差异表达的基因有 397 个。图 1 为基因芯片结果截图。

2.2 基因芯片数据的通路分析 基因芯片中可供分析的有 426 个通路,根据各个通路中的表达差异基因数目,以及前人研究结果和其他相关文献的关注点,我们挑选了可能跟放射抵抗产生相关的 Wnt 通路并对落在该通路上的差异基因 CTNNB1、LEF1、FRAT1、TCF3 基因进行进一步研究。

2.3 RT-PCR 结果 应用 RT-PCR 检验 CTNNB1 和 LEF1 基因在抵抗株 TE-13R 和亲代株 TE-13 中的表达差异。结果提示 LEF1 基因在 TE-13R 中表达确实高于 TE-13,如图 2。应用 Quantity One Imaging Pro-

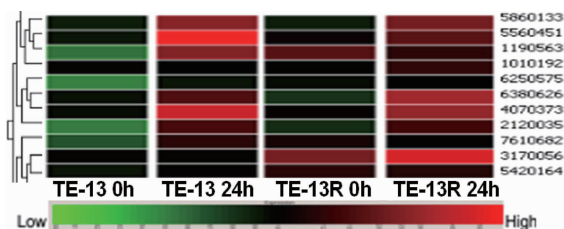
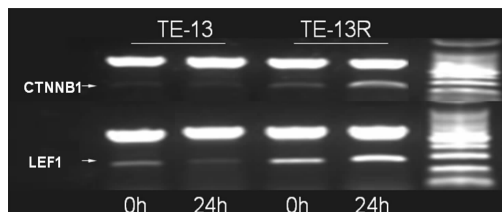


图 1 基因芯片结果截图



注:经 RT-PCR 后 CTNNB1 为 185bp 产物;LEF1 为 204bp 产物;在接受放射后 24 h CTNNB1 及 LEF1 在 TE13R 中表达高于 TE13。

图 2 在 TE-13/TE-13R 中 LEF1 及 CTNNB1 的 RT-PCR 检验结果图

表 2 TE-13/TE-13R 中 LEF1 及 CTNNB1 的表达差异

基因	$(\bar{x} \pm s)$			
	TE-13		TE-13R	
	0 h	24 h	0 h	24 h
CTNNB1	0.84 \pm 0.12	0.86 \pm 0.10	1.17 \pm 0.14	1.33 \pm 0.14 *
LEF1	0.85 \pm 0.14	0.84 \pm 0.34	0.90 \pm 0.10	1.16 \pm 0.12 *

注:实验重复 3 次,结果以目标基因与内参 Pixel 读数的比值表示;与 TE-13 照射 24 h 比较, * $P < 0.05$ 。

gram 分析程序对上述 RT-PCR 结果进行相对定量分析后,结果提示在 TE-13R 中,CTNNB1 及 LEF1 在照射后 24 h 较 TE-13 表达上调(P 均 < 0.05)。见表 2。

3 讨论

放射抵抗性是阻碍食管癌综合治疗疗效进一步提高的重要因素之一,只有彻底弄清食管癌放射抵抗的机制,才能逆转其放射抵抗,从而大大提高治疗的整体疗效。近年来一些学者应用具有高通量、高灵敏性、高并行性的基因芯片,发掘与食管癌细胞放射抵抗相关的基因,并取得一些成果^[5]。同时研究表明基因发挥放射抵抗作用,往往要通过多个复杂的基因信号传导通路实现^[6]。在本项研究中我们应用人类全基因组芯片筛选食管癌放射抵抗细胞及其亲代细胞系的基因表达差异,并对基因芯片数据进行整理,筛选出 426 条可供分析的信号通路。研究表明 Wnt 信号通路是调控细胞生长增殖的重要途径之一,该通路的异常激活可能与多种肿瘤的发生发展密切相关。而且由于肿瘤分布具有地域性差异,欧美国家对于此通路的研究多集中于结肠癌、前列腺癌及乳腺癌中^[7-9],对于该通路在食管癌中的研究相对较少。Wnt 通路已经被证实可能通过激活 β -catenin 上调 COX2 引起结直肠癌的放射抵抗^[10-11]。但对于 COX2 阴性的头颈部鳞癌放射抵抗细胞系,COX2 抑制剂或下调 β -catenin 都不能逆转放射抵抗^[12]。这说明 Wnt 通路参与放射抵抗的产生还有其他重要的分子调控机制。

经典的 Wnt 通路活化包括 Wnt 受体复合物被激活并抑制下游蛋白质复合物[其蛋白组成为 axin、糖原合成酶激酶-3 (GSK-3) 及腺瘤息肉病基因 (APC)]; axin/GSK-3/APC 复合体的存在可促进细胞内信号分子 β -catenin 降解;部分 β -catenin 进入细胞核内与 TCF/LEF 转录因子家族作用并促进一些特定基因的表达。其中的 β -catenin 入细胞核与转录因子复合物 TCF/LEF 结合更是开启 Wnt 通路的核心步骤,该步骤所涉及三个基因 CTNNB1 (β -catenin/连环蛋白/钙粘蛋白相关蛋白)、LEF1 (淋巴细胞结合增强因子)、TCF3 (transcription factor 3) 均为 Wnt 通路的

经典基因,其磷酸化及异常表达均提示经典 Wnt 通路的活化^[13]。FRAT1 是 T 细胞淋巴瘤的原癌基因,可通过封闭 GSK-3 抑制 β -catenin 的降解,并通过 β -catenin/TCF 复合物激活经典 Wnt 通路。经过芯片筛选,课题组发现食管癌放射抵抗细胞系异常高表达 Wnt 通路基因有 CTNNB1、LEF1、FRAT1、TCF3。RT-PCR 结果进一步证实,放射线照射确实引起 CTNNB1 及 LEF1 基因在放射抵抗的 TE-13R 细胞高表达。上述各基因均在食管癌细胞放射抵抗株中高表达,为经典的 Wnt 通路在食管癌中激活并参与其放射抵抗性作用的有力证据。

综上所述,食管癌细胞系放射抵抗性作用的形成可能是一系列的基因通过多个信号传导通路来完成的。其中经典的 Wnt 通路可能是参与这一过程的重要信号传导通路之一,其中 CTNNB1、LEF1、FRAT1 及 TCF3 更是作为经典 Wnt 通路的关键基因,具体地参与了放射抵抗性的形成。下一步的研究中,本课题组拟对上述基因进行 RNA 干扰,检测其上下游基因的表达变化,进一步明确其具体作用机制,为今后临床判断预后及基因干预治疗提供分子生物学依据。

参考文献

- [1] Chang L, Graham P, Hao J, et al. Proteomics discovery of radioresistant cancer biomarkers for radiotherapy [J]. *Cancer Lett*, 2015, 369 (2): 289 - 297.
- [2] Cordes N. Overexpression of hyperactive integrin-linked kinase leads to increased cellular radiosensitivity [J]. *Cancer Res*, 2004, 64 (16): 5683 - 5692.
- [3] Boonstra JJ, van MR, Beer DG, et al. Verification and unmasking of widely used human esophageal adenocarcinoma cell lines [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2010, 102 (4): 271 - 274.
- [4] Penning TM, Jin Y, Steckelbroeck S, et al. Structure-function of human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases: genes and proteins [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 215 (1/2): 63 - 72.
- [5] Guo WF, Lin RX, Huang J, et al. Identification of differentially expressed genes contributing to radioresistance in lung cancer cells using microarray analysis [J]. *Radiat Res*, 2005, 164 (1): 27 - 35.
- [5] Chang L, Graham PH, Ni J, et al. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in the treatment of prostate cancer radioresistance [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2015, 96 (3): 507 - 517.
- [6] Chen Y, Jiang T, Shi L, et al. hcrn81 promotes cell proliferation through Wnt signaling pathway in colorectal cancer [J]. *Med Oncol*, 2016, 33 (1): 3.
- [7] Li J, Karki A, Hodges KB, et al. Cotargeting Polo-Like Kinase 1 and the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Castration-Resistant Prostate Cancer [J]. *Mol Cell Biol*, 2015, 35 (24): 4185 - 4198.
- [8] Mariz K, Ingolf JB, Daniel H, et al. The Wnt inhibitor dickkopf-1: a link between breast cancer and bone metastases [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2015, 32 (8): 857-866.
- [9] Gassler N, Herr I, Keith M, et al. Wnt signaling and apoptosis after neoadjuvant short-term radiotherapy for rectal cancer [J]. *Int J Oncol*, 2004, 25 (6): 1543 - 1549.
- [10] Buchanan FG, DuBois RN. Connecting COX-2 and Wnt in cancer [J]. *Cancer Cell*, 2006, 9 (1): 6 - 8.
- [11] Chang HW, Roh JL, Jeong EJ, et al. Wnt signaling controls radiosensitivity via cyclooxygenase-2-mediated Ku expression in head and neck cancer [J]. *Int J Cancer*, 2008, 122 (1): 100 - 107.
- [12] Huang FI, Chen YL, Chang CN, et al. Hepatocyte growth factor activates Wnt pathway by transcriptional activation of LEF1 to facilitate tumor invasion [J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33 (6): 1142 - 1148.
- [13] Lacroix-Triki M, Geyer FC, Lambros MB, et al. β -catenin/Wnt signalling pathway in fibromatosis, metaplastic carcinomas and phyllodes tumours of the breast [J]. *Mod Pathol*, 2010, 23 (11): 1438 - 1448.

收稿日期: 2015 - 11 - 20 修回日期: 2015 - 12 - 16 编辑: 王娜娜