

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00626

## Wnt5a 表达沉默抑制肺鳞癌细胞 SK-MES-1 迁移及侵袭

王卫星,毛燕君,杨继金\*

第二军医大学长海医院影像科介入病房,上海 200433

**[摘要]** 目的:探讨抑制肺鳞癌细胞中 Wnt5a 表达对细胞增殖、迁移和侵袭等生物学特性的影响。方法:构建表达针对 Wnt5a 的 siRNA 的重组质粒 pH1-siRNA<sup>Wnt5a</sup>,转染肺鳞癌细胞 SK-MES-1 后筛选建立稳定表达细胞株。通过 MTT、细胞周期以及 Transwell 检测,观察抑制 Wnt5a 表达对癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的变化。结果:Western 印迹测定表明肺鳞癌细胞 SK-MES-1<sup>Wnt5a</sup> 低表达 Wnt5a 蛋白 (13.6%)。转基因细胞增殖指数略低于对照细胞株 [(28.3±3.8)% vs (30.5±5.2)%]。转基因细胞的相对迁移率和侵袭率分别为对照组的 (47.3±9.2)% 和 (39.7±11.7)%。结论:Wnt5a 低表达显著抑制肺鳞癌细胞 SK-MES-1 的迁移和侵袭能力,Wnt5a 可能是肺鳞癌基因治疗的潜在靶标。

**[关键词]** Wnt5a;RNA 干扰;肺肿瘤;鳞状细胞肿瘤;细胞迁移;肿瘤侵袭

**[中图分类号]** R 734.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)06-0626-04

### Silence of Wnt5a gene inhibits migration and invasion of lung squamous carcinoma cells

WANG Wei-xing, MAO Yan-jun, YANG Ji-jin\*

Department of Radiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To study the influence of Wnt5a gene silence on the proliferation, migration and invasion of lung squamous carcinoma cells. **Methods:** A recombinant plasmid pH1-siRNA<sup>Wnt5a</sup> was constructed and used to deliver small interference RNA (siRNA) targeting Wnt5a in SK-MES-1 cells; the transfected cells were screened to establish a stable transgenic cell line. MTT, cell cycle and Transwell assays were employed to evaluate the effect of Wnt5a gene silence on the proliferation, migration and invasion of lung squamous carcinoma cells. **Results:** Western blotting assay revealed that Wnt5a was lowly expressed in SK-MES-1<sup>Wnt5a</sup> (13.6%). The proliferation index (PI) of transgenic cell line was slightly lower than that of the control cell line [(28.3±3.8)% vs [30.5±5.2]%). The migration and invasion capabilities of SK-MES-1<sup>Wnt5a</sup> cells were (47.3±9.2)% and (39.7±11.7)% of the control cells, respectively. **Conclusion:** Low Wnt5a expression can significantly inhibit the migration and invasion capabilities of SK-MES-1 cells, indicating that Wnt5a might be a potential target for gene therapy of lung squamous carcinoma.

**[KEY WORDS]** Wnt5a; RNA interference; lung neoplasms; squamous cell neoplasms; cell migration; neoplasm invasiveness

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(6): 626-629]

Wnt 信号途径不仅在胚胎发育过程中发挥重要作用,其非正常活化被认为是肿瘤发生的诱因之一<sup>[1]</sup>。Wnt5a 作为 Wnt 蛋白家族的一员,在前列腺癌、乳腺癌和胃癌等肿瘤中表达明显上调<sup>[2-3]</sup>,其高表达增加了黑色素瘤、乳腺癌和胃癌细胞的转移和侵袭能力<sup>[4-5]</sup>。但是 Wnt5a 的相关研究尚处于起步阶段,其不同细胞中的功能和作用机制仍未有定论。肺鳞癌细胞 SK-MES-1 也高表达 Wnt5a 蛋白,其在肺鳞癌迁移及侵袭中的作用值得进一步探讨。为此,本研究通过 RNAi 技术<sup>[6]</sup>建立稳定低表达 Wnt5a 的转基因

细胞 SK-MES-1<sup>Wnt5a</sup>,通过绘制转基因细胞的细胞增殖曲线,测定细胞周期和将细胞接种于 Transwell 小室外培养,与正常表达 Wnt5a 以及吡喹美辛(indomethacin)抑制 Wnt 信号通路的 SK-MES-1 细胞比较,观察其增殖、迁移和侵袭能力的变化,初步探讨 Wnt5a 表达水平变化与肺鳞癌细胞相关生物学特性的关系及其作为肺鳞癌基因治疗靶标的可行性。

### 1 材料和方法

#### 1.1 转基因细胞株 SK-MES-1<sup>Wnt5a</sup> 的建立

**[收稿日期]** 2008-04-15 **[接受日期]** 2008-05-06

**[基金项目]** 上海市科委重点项目(071409011)。Supported by Key Program of Shanghai Science and Technology Committee(071409011)。

**[作者简介]** 王卫星,硕士,主治医师。

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-25070715, E-mail:xxwkdaily@163.com

1.1.1 重组质粒 pH1-siRNA<sup>Wnt5a</sup> 构建 针对 Wnt5a 的 RNAi 位点<sup>[3]</sup>, 设计 Oligo DNA 正义链 5'-gatccc aaacagaggtgttatccac ttcaagaga gtggataacacacctgttt tttttt-3' 及反义链 5'-agct aaaaaa aaacagaggtgttatccac tctcttgaa gtggataacacctgttt gg-3' (由上海生工生物工程技术有限公司合成)。5' 和 3' 黏端分别与 BamH I 和 Hind III 酶切后黏端一致, 退火形成双链 DNA, 与 BamH I /Hind III 顺序酶切重组质粒 pH1-siRNA (购自 Biomyx 公司) 连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑选阳性克隆测序鉴定, 确认获得重组质粒 pH1-siRNA<sup>Wnt5a</sup>。采用 Plasmid Purification Midi Kit (购自 Qiagen 公司) 抽提高纯度重组质粒用于细胞转染。

1.1.2 转基因细胞株 SK-MES-1<sup>Wnt5a-</sup> 建立 10  $\mu$ g 重组质粒 pH1-siRNA<sup>Wnt5a</sup> 采用脂质体转染法转染 SK-MES-1 细胞, 72 h 后, 加 G418 至终浓度 200  $\mu$ g/ml。每 3~5 d 更换 1 次筛选培养基。筛选 10~14 d 后, 收获抗性细胞克隆, 用培养基稀释细胞到 1 个/10  $\mu$ l。在 96 孔板中加入培养基 150  $\mu$ l/孔, 再加入细胞悬液 10  $\mu$ l/孔。待细胞克隆生长后持续传代培养获得转基因细胞株 SK-MES-1<sup>Wnt5a-</sup>。以同样方法将质粒 pH1-siRNA 转染 SK-MES-1 细胞, 筛选获得转基因细胞株 SK-MES-1<sup>H1</sup> 作为对照。

1.1.3 Western 印迹法检测 Wnt5a 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达 分别收集 SK-MES-1<sup>H1</sup> 和 SK-MES-1<sup>Wnt5a-</sup> 细胞, 5% SDS 裂解细胞, 细胞裂解上清液经 SDS-PAGE 蛋白电泳, 转至硝酸纤维素膜上, 加小鼠抗人 Wnt5a 和  $\beta$ -catenin 单抗 (购自 DAKO 公司) 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 洗膜后加羊抗小鼠 IgG-HRP 抗体 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 免疫荧光显色, 以  $\beta$ -actin 为内参照, 检测 2 株细胞 Wnt5a 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达量。

1.2 肺鳞癌细胞 SK-MES-1<sup>Wnt5a-</sup> 及 SK-MES-1<sup>H1</sup> 体外实验生物学特性比较

1.2.1 细胞增殖曲线 实验分为 3 组: SK-MES-1<sup>Wnt5a-</sup>、SK-MES-1<sup>H1</sup> 和 SK-MES-1<sup>H1</sup> + 0.1 mmol/L 吡哆美辛。每孔  $1 \times 10^3$  细胞接种 96 孔培养板, 每 2 d 更换 DMEM 培养液。分别于第 1、3、5、7、9、11 日应用 MTT 法测定细胞数, 每次测定 3 孔, 取其平均值, 以培养日数为横坐标, 平均细胞数为纵坐标, 描绘细胞生长曲线。

1.2.2 细胞周期检测 分别收集 SK-MES-1<sup>Wnt5a-</sup>、SK-MES-1<sup>H1</sup> 和 SK-MES-1<sup>H1</sup> (0.1 mmol/L 吡哆美辛) 的对数生长中期细胞, 离心收集  $1 \times 10^6$  个细胞, 完全吸弃上清液, 加 1 ml 含 PI 的 DNA 低渗染色缓冲液重悬细胞, 4 $^{\circ}$ C 避光放置 30 min, FACSCalibur

流式细胞仪 (BD 公司) 测定细胞周期。每组细胞重复测定 3 次, 计算细胞的增殖指数 (proliferation index, PI):  $PI = (S + G_2) / (S + G_2 + G_1)$ 。

1.2.3 细胞迁移能力检测 Transwell 小室 (购自 BD 公司) 经无血清 DMEM 培养基于培养箱中平衡 1 h 后, 上室加入 100  $\mu$ l 用无血清 DMEM 稀释的  $5 \times 10^4$  /孔的细胞, 下室加入 0.6 ml 添加 20% FCS 的 DMEM, 置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中 37 $^{\circ}$ C 作用 8 h, 弃去孔中培养基, 用 90% 乙醇常温固定 30 min, 0.1% 结晶紫常温染色 10 min, 清水漂净, 轻擦除去未迁移细胞, 加入 10% 乙酸 100  $\mu$ l 抽提 10 min, 于 600 nm 处测定光密度 (D) 值, 每组细胞重复测定 3 孔。以 SK-MES-1<sup>H1</sup> 为标准计算 SK-MES-1<sup>Wnt5a-</sup> 及 SK-MES-1<sup>H1</sup> (0.1 mmol/L 吡哆美辛) 相对迁移率。

1.2.4 细胞侵袭能力检测 50 mg/L Matrigel (购自 BD 公司) 以 1:8 稀释后包被 Transwell 小室底部膜的上室面, 4 $^{\circ}$ C 静置 1 h。加无血清 DMEM 培养基于培养箱中平衡 1 h 后, 上室加入 100  $\mu$ l 用无血清 DMEM 稀释的  $5 \times 10^4$  /孔的肿瘤细胞, 下室加入 0.6 ml 添加 20% FCS 的 DMEM, 置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中 37 $^{\circ}$ C 作用 8 h, 弃去孔中培养基, 用 90% 乙醇常温固定 30 min, 0.1% 结晶紫常温染色 10 min, 清水漂净, 轻擦除去未迁移细胞, 加入 10% 乙酸 100  $\mu$ l 抽提 10 min, 于 600 nm 处测定 D 值, 每组细胞重复测定 3 孔。以 SK-MES-1<sup>H1</sup> 为标准计算 SK-MES-1<sup>Wnt5a-</sup> 及 SK-MES-1<sup>H1</sup> (0.1 mmol/L 吡哆美辛) 相对侵袭率。

1.3 统计学处理 所有数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示, 使用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析, 用 *t* 检验分析各组间差异。

## 2 结果

2.1 重组质粒 pH1-siRNA<sup>Wnt5a</sup> 构建 经测序确认, 表达针对 Wnt5a 的序列已正确接入到 H1 启动子的 3' 末端, 成功构建重组质粒 pH1-siRNA<sup>Wnt5a</sup> (图 1)。

2.2 转基因细胞的获得 SK-MES-1 转染 pH1-siRNA<sup>Wnt5a</sup> 和 pH1-siRNA 后, G418 筛选 10 周并进行单克隆化培养, 获得转基因细胞 SK-MES-1<sup>Wnt5a-</sup> 和 SK-MES-1<sup>H1</sup> (图 2)。

2.3 Western 印迹检测结果 经灰度扫描, 在对照  $\beta$ -actin 蛋白表达量基本不变的情况下, Wnt5a 在 SK-MES-1<sup>Wnt5a-</sup> 细胞中的表达量为 SK-MES-1<sup>H1</sup> 的 13.6%, Wnt5a 表达水平显著降低,  $\beta$ -catenin 在 SK-MES-1<sup>Wnt5a-</sup> 细胞中的表达量为 SK-MES-1<sup>H1</sup> 的 97.3%,  $\beta$ -catenin 表达水平未见显著变化 (图 3)。

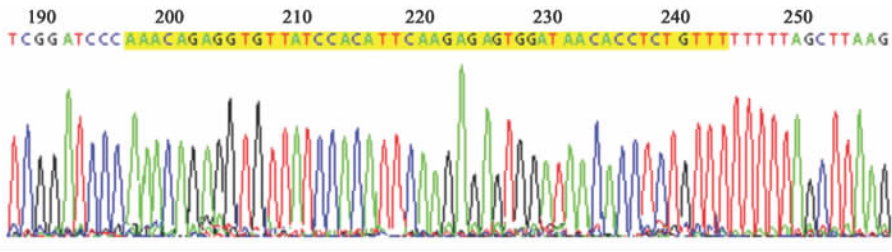


图 1 pHI-siRNA<sup>Wnt5a-</sup> 测序图  
 Fig 1 Sequence of pHI-siRNA<sup>Wnt5a-</sup>

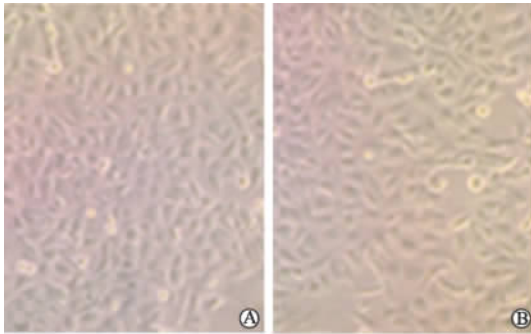


图 2 正常及转基因肺鳞癌细胞  
 Fig 2 Transgenic and non-transgenic lung squamous carcinoma cells  
 A: SK-MES-1; B: SK-MES-1<sup>Wnt5a-</sup>

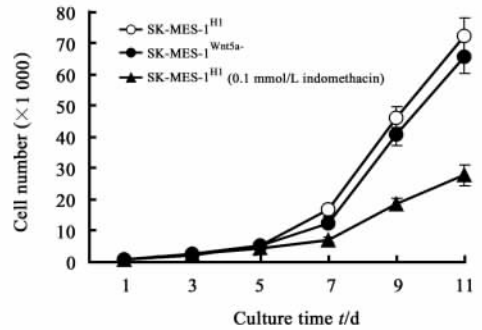


图 4 肺鳞癌细胞生长曲线  
 Fig 4 Growth curve of lung squamous carcinoma cells  
 n = 3,  $\bar{x} \pm s$

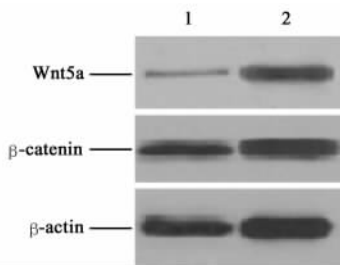


图 3 Western 印迹法检测 Wnt5a 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达  
 Fig 3 Western blotting analysis of Wnt5a and  $\beta$ -catenin expression  
 1: SK-MES-1<sup>Wnt5a-</sup>; 2: SK-MES-1<sup>HI</sup>

2.4 细胞生长曲线 SK-MES-1<sup>Wnt5a-</sup> 细胞在各个时间点的细胞数均略少于 SK-MES-1<sup>HI</sup> 细胞,但 2 组差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),而以 0.1 mmol/L 吲哚美辛处理的 SK-MES-1<sup>HI</sup> 细胞增殖被显著抑制(图 4)。

2.5 细胞周期分析 SK-MES-1<sup>Wnt5a-</sup> 细胞、SK-MES-1<sup>HI</sup> 细胞和 SK-MES-1<sup>HI</sup> (吲哚美辛) 细胞的增殖指数分别为  $(28.3 \pm 3.8)\%$ 、 $(30.5 \pm 5.2)\%$  和  $(12.2 \pm 2.3)\%$ , SK-MES-1<sup>Wnt5a-</sup> 增殖指数略低于 SK-MES-1<sup>HI</sup>,但 2 组细胞增殖指数差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),SK-MES-1<sup>HI</sup> (吲哚美辛) 的增殖指数显著低于其余 2 组细胞。

2.6 细胞迁移能力检测 以 SK-MES-1<sup>HI</sup> 细胞的迁移能力为 100%,SK-MES-1<sup>Wnt5a-</sup> 细胞和 SK-MES-1<sup>HI</sup> (吲哚美辛) 细胞的相对迁移率分别为  $(47.3 \pm 9.2)\%$  和  $(21.8 \pm 7.5)\%$ ,均显著降低 ( $P < 0.01$ )。

2.7 细胞侵袭能力检测 以 SK-MES-1<sup>HI</sup> 细胞的侵袭能力为 100%,SK-MES-1<sup>Wnt5a-</sup> 细胞和 SK-MES-1<sup>HI</sup> (吲哚美辛) 细胞的相对迁移率分别为  $(39.7 \pm 11.7)\%$  和  $(16.3 \pm 5.9)\%$ ,均显著降低( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

肺癌是我国死亡率最高的恶性肿瘤之一,其侵袭和转移是导致临床治疗效果不佳的主要原因,寻找检测有关肿瘤转移的相关基因作为基因治疗的靶标是目前肿瘤基因治疗的重要课题。Wnt 信号途径是参与调控胚胎发育过程的重要途径之一,同时其非正常活化被认为是诱导肿瘤发生的重要因素之一<sup>[1]</sup>。通过不同信号分子间的相互作用,Wnt 蛋白触发调节细胞生长、迁移、分化及发育等多方面的复杂信号级联反应<sup>[7]</sup>。Wnt 信号转导存在多种路径:经典的 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路、非经典的 Wnt 通路以及 Wnt/ $Ca^{2+}$ 、Wnt/PCP 等途径,因此 Wnt 途径是一种多环节、多作用位点的开放式途径。

Wnt5a 是 Wnt 蛋白家族成员之一,其基因定位于染色体 3p14-p21 区域。Wnt5a 蛋白具有与 Wnt1 蛋白相同的“信号序列”(CKCHGVSGSC)和共同的保守区域:由 24 个半胱氨酸残基,4 个天冬酰胺连接的寡糖和酪氨酸硫酸化位点<sup>[8]</sup>,其能够以自分泌或旁分泌两种不同形式作为细胞生长和分化信号,结合到跨膜受体 Frizzled(Frz),激活下游靶基因,介导特定的生物学反应。

Kimura 等<sup>[9]</sup>的研究则进一步表明 Wnt5a 在肺的远端形态发生中发挥重要作用:Wnt5a 靶向断裂的突变型小鼠肺发育异常,表现为不同程度的气管平截、远侧呼吸道过度膨胀,肺上皮细胞和间质细胞过度增殖,肺间质增厚,肺成熟受到抑制。但是 Wnt5a 在肺癌中的相关研究尚处于起步阶段,其在肺鳞癌中的功能和作用机制仍未有定论。

虽然 Wnt5a 基因在肿瘤细胞的增殖、分化及侵袭与转移过程中也起着重要的作用,但其功能在不同类型的肿瘤细胞中截然相反。Kremenevskaja 等<sup>[10]</sup>对甲状腺癌细胞的研究显示,Wnt5a 具有肿瘤抑制效应。该效应可能因  $\beta$ -catenin 转位、C-myc 癌基因抑制以及通过增加细胞内  $Ca^{2+}$  释放,经由 CaMKII 途径促进  $\beta$ -catenin 磷酸化,从而加速其降解。但 Topol 等<sup>[11]</sup>研究认为,Wnt5a 促进  $\beta$ -catenin 的降解,是以一种 GSK-3 $\beta$  和  $\beta$ -TrCP 非依赖的泛素连接酶(Siah2)-APC 依赖方式抑制肿瘤的形成。进一步的研究证实,Wnt5a 降解  $\beta$ -catenin 也不需要 CaMKII 或 NF-AT 活性。不过这些结论只能解释 Wnt-5a 具有肿瘤抑制基因的作用,而无法解释其在另一些肿瘤如黑素瘤、乳腺癌<sup>[4-5]</sup>等所表现的癌基因样的活性。

本研究建立了针对 Wnt5a 的稳定表达 siRNA 转基因肺鳞癌细胞株 SK-MES-1<sup>Wnt5a<sup>-</sup></sup>,经检测其 Wnt5a 蛋白量仅为正常肺鳞癌细胞株 SK-MES-1 的 13%。非类固醇类抗炎药物(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)能够抑制 Wnt 通路过度激活,从而抑制肿瘤细胞增殖<sup>[12]</sup>,本实验以吲哚美辛处理 SK-MES-1 作为阳性对照。通过比较转基因肺鳞癌细胞和正常细胞肺鳞癌细胞的生长曲线和增殖指数发现,SK-MES-1<sup>Wnt5a<sup>-</sup></sup> 增殖活性略低于 SK-MES-1,但 2 株细胞的增殖活性差异并无统计学意义。SK-MES-1<sup>Wnt5a<sup>-</sup></sup> 细胞接种于 Transwell 小室进行体外细胞培养结果显示其迁移和侵袭活性显著低于 SK-MES-1 细胞,同时吲哚美辛处理组细胞的增殖、迁移和侵袭活性均显著低于 SK-MES-1 细胞。以上实验结果提示 Wnt5a 的低表达并不能抑制肺鳞癌细胞的增殖,但能够显著降低肺鳞癌细胞的迁移和侵

袭能力,对于侵袭能力强、易发生转移的恶性肿瘤而言,Wnt5a 是一个潜在的肿瘤基因治疗靶点。为了进一步探讨 Wnt5a 高表达抑制肺鳞癌细胞迁移和侵袭能力的机制,我们比较了 2 株细胞的  $\beta$ -catenin 蛋白表达,结果发现其表达在 2 株细胞中无显著差异,提示 Wnt5a 可能通过稳定  $\beta$ -catenin 蛋白,活化 Wnt 经典通路中  $\beta$ -catenin 下游的靶基因,从而激活  $\beta$ -catenin 通路,促进肿瘤细胞迁移和侵袭。

总之,在本实验中我们成功构建了 Wnt5a 表达沉默的转基因细胞株 SK-MES-1<sup>Wnt5a<sup>-</sup></sup>,研究结果提示 Wnt5a 表达与肺鳞癌细胞 SK-MES-1 的迁移和侵袭能力相关,Wnt5a 表达沉默可显著抑制 SK-MES-1 的迁移和侵袭能力,为通过基因治疗防止肿瘤转移和侵袭提供了新思路。

### [参考文献]

- [1] Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer[J]. Nature, 2005, 434: 843-850.
- [2] Lozzo R V, Eichstetter I, Danielson K G. Aberrant expression of the growth factor Wnt-5A in human malignancy[J]. Cancer Res, 1995, 55: 3495-3499.
- [3] Kurayoshi M, Oue N, Yamamoto H, Kishida M, Inoue A, Asahara T, et al. Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion[J]. Cancer Res, 2006, 66: 10439-10448.
- [4] Weeraratna A T, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M, et al. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma[J]. Cancer Cell, 2002, 1: 279-288.
- [5] Pukrop T, Klemm F, Hagemann T, Gradl D, Schulz M, Siemes S, et al. Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103: 5454-5459.
- [6] Pirolo K F, Chang E H. Targeted delivery of small interfering RNA: approaching effective cancer therapies[J]. Cancer Res, 2008, 68: 1247-1250.
- [7] Nusse R. Wnt signaling in disease and in development[J]. Cell Res, 2005, 15: 28-32.
- [8] Clark C C, Cohen I, Eichstetter I, Cannizzaro L A, McPherson J D, Wasmuth J J, et al. Molecular cloning of the human proto-oncogene Wnt-5A and mapping of the gene (WNT5A) to chromosome 3p14-p21[J]. Genomics, 1993, 18: 249-260.
- [9] Kimura J, Deutsch G H. Key mechanisms of early lung development[J]. Pediatr Dev Pathol, 2007, 10: 335-347.
- [10] Kremenevskaja N, von Wasielewski R, Rao A S, Schöfl C, Andersson T, Brabant G. Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma[J]. Oncogene, 2005, 24: 2144-2154.
- [11] Topol L, Jiang X, Choi H, Garrett-Beal L, Carolan P J, Yang Y. Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation[J]. J Cell Biol, 2003, 162: 899-908.
- [12] Kapitanovic S, Cacev T, Antica M, Kralj M, Cavric G, Pavelic K, et al. Effect of indomethacin on E-cadherin and beta-catenin expression in HT-29 colon cancer cells[J]. Exp Mol Pathol, 2006, 80: 91-96.