

## APC 不同功能区域对结肠癌细胞株 HT-29 中 $\beta$ -连环蛋白表达的影响

吕梁<sup>1</sup>, 霍继荣<sup>1</sup>, 刘佳<sup>2</sup>, 武捷<sup>2</sup>, 王捷<sup>2</sup>

(1. 中南大学湘雅二医院消化内科, 长沙 430011; 2. 广州军区广州总医院医学实验科, 广州 510010)

**[摘要]** 目的:探讨含有 APC 蛋白不同功能区域的 pEGFP-N3-APC 重组质粒对结肠癌细胞株 HT-29 中  $\beta$ -连环蛋白表达的影响。方法:脂质体介导重组质粒 pEGFP-N3-APC1~5 转染 HT-29, 采用绿色荧光及 RT-PCR 验证重组质粒在细胞中的表达。以 Western 免疫印迹检测转染后 HT-29 细胞中  $\beta$ -连环蛋白的表达, 以 SPSS 13.0 软件分析电泳条带的灰度值。结果:重组质粒转染 HT-29 细胞后, 绿色荧光及 RT-PCR 结果显示 5 个 APC 蛋白不同功能区域多肽可在细胞中表达。Western 免疫印迹结果显示, 重组质粒 pEGFP-N3-APC1, pEGFP-N3-APC2 和 pEGFP-N3-APC3 对  $\beta$ -连环蛋白表达无影响, 而 pEGFP-N3-APC4 和 pEGFP-N3-APC5 均可降低结肠癌细胞株 HT-29 中  $\beta$ -连环蛋白的表达水平, 其中以 pEGFP-N3-APC5 的抑制程度最强。结论:含有 APC 蛋白中 15 氨基重复序列 + SAMP 重复序列的 APC5 基因片段可有效降低  $\beta$ -连环蛋白的表达, 同时又是相对长度较短的可用于基因治疗的最优片段。

**[关键词]** APC; 重组质粒; 转染;  $\beta$ -连环蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2010.02.009

## Effect of recombinant pEGFP-N3-APC vectors carrying various APC functional domains on the expression of $\beta$ -catenin in HT-29 cells

LÜ Liang<sup>1</sup>, HUO Jirong<sup>1</sup>, LIU Jia<sup>2</sup>, WU Jie<sup>2</sup>, WANG Jie<sup>2</sup>

(1. Department of Gastroenterology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 430011;

2. Experimental Medicine Section, Guangzhou General Hospital, Guangzhou

Military Command of Chinese PLA, Guangzhou 510010, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the effect of recombinant pEGFP-N3-APC vectors carrying various APC functional domains on the expression of  $\beta$ -catenin in human colorectal cancer cells HT-29. **Methods** The recombinant plasmids were transfected into HT-29 cells mediated by lipofectamine<sup>TM</sup> 2000, and detected by green fluorescence and RT-PCR. Western blot was applied to detect  $\beta$ -catenin expression level in HT-29 cells after transfection, and gray scales of electrophoresis strips were analyzed by SPSS 13.0. **Results** Green fluorescence and RT-PCR made clear that all 5 recombinant plasmids were successfully expressed in HT-29 cells. Western blot showed that  $\beta$ -catenin expression level in HT-29 cells was not affected after being transfected with pEGFP-N3-APC1,

收稿日期 (Date of reception) 2009-02-16

作者简介 (Biography) 吕梁, 医师, 主要从事消化道肿瘤的分子生物学研究。

通信作者 (Corresponding author) 霍继荣, E-mail: hjr198@hotmail.com

基金项目 (Foundation item) 湖南省科技厅课题 (2008JT3003)。 This work was supported by Project of Science and Technology Bureau of Hunan Province, P. R. China (2008JT3003).

pEGFP-N3-APC2 and pEGFP-N3-APC3, and was distinctly affected after being transfected with pEGFP-N3-APC4 and pEGFP-N3-APC5, especially the later one. **Conclusion** The selected APC5 gene fragment with 15-amino acid repeats and SAMP repeats, which is relatively short, can degrade  $\beta$ -catenin level in HT-29 cells and may be applied in the gene therapy.

**Key words:** adenomatous polyposis coli; recombinant expressive vector; transfection;  $\beta$ -catenin

分子生物学研究表明: $\beta$ -连环蛋白在结肠癌的发生过程中起着重要作用,作为 Wnt 信号通路的关键成员, $\beta$ -连环蛋白在细胞核中的异常聚集可导致  $\beta$ -连环蛋白与转录因子 TCF/LEF 结合,激活 Wnt 信号通路下游靶基因的转录,从而导致癌症的发生<sup>[1-2]</sup>。 $\beta$ -连环蛋白的异常聚集与 APC 基因突变密切相关,将野生型 APC 蛋白导入体内,替代突变 APC 基因表达的“截短型”APC 蛋白,可能成为抑制肿瘤细胞生长的一种有效手段<sup>[3-4]</sup>。对于这一领域,目前的主要手段是将全长 APC 蛋白导入,但因为全长的 APC 蛋白较大,作为探针不易转染。一旦构建出有效作用的目的基因,也可能在人体内无法行使其功能。

本研究小组根据 APC 蛋白结构,扩增了 5 条片段长度较短的 APC 基因功能区域片段,与真核表达载体 pEGFP-N3 连接,成功构建 pEGFP-N3-APC1~5 重组质粒<sup>[5]</sup>。本研究将构建成功的重组质粒转染结肠癌细胞株 HT-29,通过检测不同重组质粒对 HT-29 中  $\beta$ -连环蛋白表达的影响,筛选出可有效降低  $\beta$ -连环蛋白表达同时片段长度较短的片段,为结肠癌的基因治疗奠定一定的实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

含 APC 基因 cDNA 全长的质粒由美国 Ohio 州立大学 Joanna Gorden 教授馈赠,人结肠癌细胞株 HT-29 由中南大学湘雅二医院中心实验室沈宏伟老师惠赠。pEGFP-N3 载体由广州军区总医院医学实验科馈赠,转染试剂 Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000 购自美国 Invitrogen 公司,DNA Marker 15000 和 Marker 2000 购自日本 TaKaRa 公司,DMEM(高糖)培养基购自美国 GIBCO 公司,胎牛血清购自美国

Hyclone 公司,鼠抗人  $\beta$ -连环蛋白抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 重组质粒 pEGFP-N3-APC 的构建

设计引物分别扩增了 5 条含有 APC 功能区域的片段,将 PCR 扩增产物与空质粒 pEGFP-N3 双酶切后连接,成功构建 pEGFP-N3-APC 1~5 重组质粒<sup>[5]</sup>。

#### 1.2.2 细胞培养

按常规操作培养 HT-29 细胞,使用的培养基为高糖 DMEM(10% 胎牛血清,1% 青霉素-链霉素双抗)。

#### 1.2.3 细胞转染及稳定转染细胞株的筛选

按照 Invitrogen 公司提供的 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 转染 protocol 操作,实验共分 7 组,即转染重组质粒组(pEGFP-N3-APC1, pEGFP-N3-APC2, pEGFP-N3-APC3, pEGFP-N3-APC4, pEGFP-N3-APC5)、转染空质粒组、空白对照组(只加入等量脂质体)。转染 48 h 后,荧光显微镜下观察细胞内绿色荧光蛋白表达情况。采用有限稀释法进行稳定转染细胞株的筛选。在 6 孔板中铺细胞,待细胞长至融合度约为 80% 时做转染;转染 1 d 后消化,1:5 倍传代;加入带抗生素 G418 的培养基,培养 3 周(中途约隔 2~3 d 换 1 次培养基);收集细胞。将一部分细胞加入细胞冻存液,重悬细胞,分装于 2 mL 冻存管中,至 4 °C 30 min, -20 °C 30 min, -70 °C 过夜,第 2 天放入液氮中保存。一部分细胞留作下一步实验用。

#### 1.2.4 RT-PCR 测定 APC mRNA 的表达

TRIzol 一步法提取细胞总 RNA,并用设计的上下游引物(表 1),RT-PCR 检测 APC mRNA 的表达。PCR 扩增的条件为:94 °C 变性 5 min 后,按下述参数循环 30 次,94 °C 变性 60 s,55 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 60 s;最后 72 °C 延伸 5 min,4 °C

保存。以琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物并拍照保存。对应扩增的片段如图 1 所示,其中 APC1 ~ APC5 分别对应着 APC 蛋白密码子 6 ~ 767, 1 020 ~ 1 169, 1 262 ~ 2 033, 1 020 ~ 2 033, 1 020 ~ 1 698。

表 1 APC 引物序列

Tab. 1 APC RT-PCR primers

序号	引物序列
1	5'-CCGCTCGAGATGATGATCAGTTGTTAA-3'
2	5'-CGCGGATCCCTGAGCATCTAATTCT-3'
3	5'-CCGCTCGAGATGGAAGTATAGATACACCAA-3'
4	5'-CGCGGATCCCTCTTCATTATATTTTA-3'
5	5'-CCGCTCGAGATGATTGTGTAGAAGATACT-3'
6	5'-CGCGGATCCGTCATACTAAGAGAAG-3'
7	5'-CGCGGATCCATCTGTACTTCTGCCTT-3'

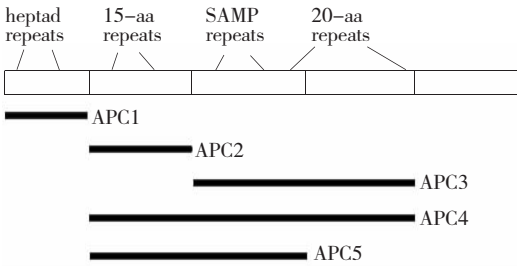


图 1 APC 片段扩增示意图。

Fig. 1 Sketch map of amplification of APC fragments.

#### 1.2.5 Western 免疫印迹检测不同载体对 HT-29 细胞中 $\beta$ -连环蛋白表达的影响

采用 Western 免疫印迹技术检测不同载体对 HT-29 细胞中  $\beta$ -连环蛋白表达的影响。SDS-PAGE 条件为基层胶电压 80 V, 分离胶 160 V, 电泳完毕采用考马斯亮蓝进行染色过夜, 而后脱色 3 ~ 4 h。采用半干转印仪将蛋白转至硝酸纤维素膜上, 15 mA 转印 70 min, 取出转印膜, 放入封闭液中, 37 °C 封闭 3 h, 将特异一抗用 2 % 酪蛋白进行 1:100 稀释, 放入转印膜 4 °C 过夜, PBS 洗 3 次, 每次 10 min, 特异酶标二抗用 PBS 进行 1:500 稀释, 放入转印膜, 37 °C 结合 2 h, PBS 洗 3 次, 每次 10 min, 使用 BeyoECL Plus (P0018) 等 ECL 类试剂来检测蛋白, 混合后与膜共孵育 1 min。曝光 3 ~ 10 min, 显影后清水漂洗, 再定影。

## 2 结 果

### 2.1 稳定转染 pEGFP-N3-APC 的 HT-29 细胞株的筛选

以重组质粒 pEGFP-N3-APC5 为例, 倒置显微镜下分别观察转染重组质粒 48 h, 7 d 和 21 d 后的 HT-29 细胞, G418 维持浓度为 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。发现转染 48 h 后的细胞生长旺盛, 融合生长; 而转染 7 d 后的细胞数量明显减少, 折光率减弱, 大部分脱落漂浮; 转染 21 d 后的 HT-29 细胞呈集落型生长, 形态明显变圆 (图 2)。

### 2.2 荧光显微镜下观察重组质粒在 HT-29 细胞中的表达

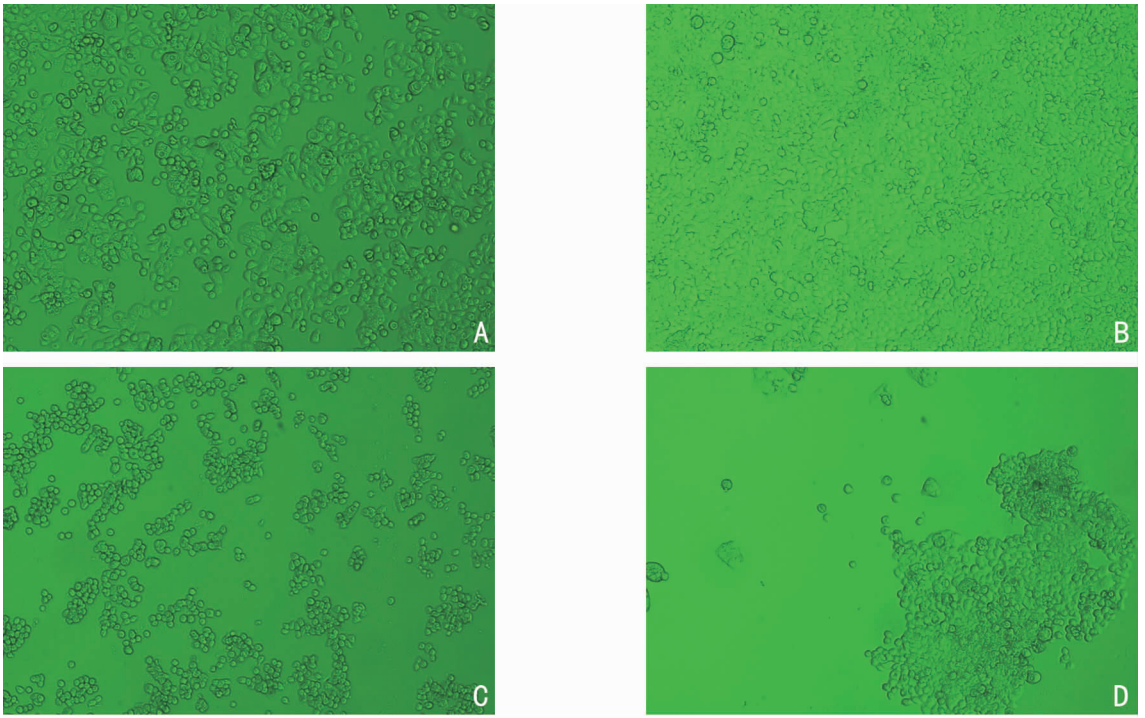
转染 48 h 后在荧光显微镜下观察, 可见 pEGFP-N3-APC 组细胞均能发出特异性的绿色荧光 (图 3)。实验结果表明: 构建的质粒转染细胞后, APC 和 GFP 融合蛋白表达良好。

### 2.3 RT-PCR 特异性扩增 APC 片段的的结果

RT-PCR 的结果表明: pEGFP-N3-APC 1 ~ 5 转染细胞中能够表达 APC 蛋白的特定功能区域的多肽 mRNA, 目的片段扩增的大小与预期设计相符, 内参 GAPDH 在图中大小为 450 bp, 其中 APC2 的目的基因与内参的片段重叠, pEGFP-N3 和空白对照组均未见明显的特异性扩增条带 (图 4)。这表明重组质粒 pEGFP-N3-APC 1 ~ 5 可以在 HT-29 细胞中表达。

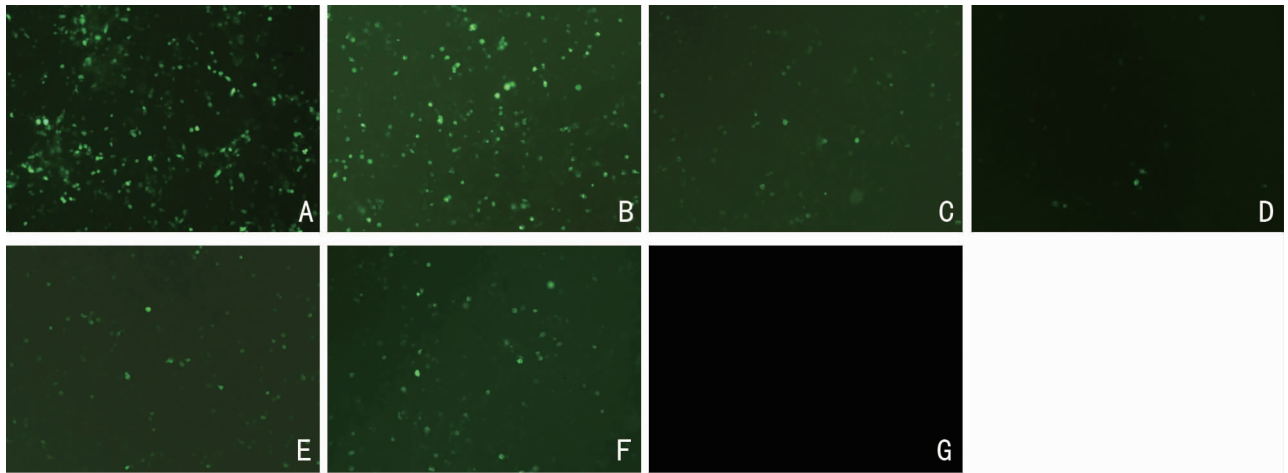
### 2.4 Western 免疫印迹检测重组质粒对 HT-29 中 $\beta$ -连环蛋白表达的影响

Western 免疫印迹分别检测 5 条重组质粒转染入 HT-29 细胞后, 对细胞内  $\beta$ -连环蛋白表达的影响, 以正常细胞做对照, 同时以  $\beta$ -肌动蛋白作内参。使用统计学软件 SPSS 13.0 对 Western 免疫印迹电泳条带的灰度值进行 one-way ANOVA 分析, 结果如图 5 所示。统计学分析显示: 前 4 组条带 (分别是正常细胞, 转染 pEGFP-N3-APC1, 转染 pEGFP-N3-APC2 和转染 pEGFP-N3-APC3 的细胞) 灰度值间的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 而后两组条带 (分别是转染 pEGFP-N3-APC4 和转染 pEGFP-N3-APC5 的细胞) 灰度值同前相比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。说明当重组质粒 pEGFP-N3-APC4 和 pEGFP-N3-APC5 转染入 HT-29 细胞后, 可明显降低细胞内  $\beta$ -连环蛋白的表达。



**图 2** HT-29 细胞电子显微镜下形态 ( $\times 100$ )。A: 未处理的 HT-29 细胞; B: pEGFP-N3-APC5 转染后 48 h; C: pEGFP-N3-APC5 转染后 7 d; D: pEGFP-N3-APC5 转染后 21 d。

**Fig. 2** HT-29 cells were observed by electronmicroscope after being transfected with pEGFP-N3-APC5. A: Untreated HT-29 cells; B: HT-29 cells transfected with pEGFP-N3-APC5 for 48 h; C: HT-29 cells transfected with pEGFP-N3-APC5 for 7 d; D: HT-29 cells transfected with pEGFP-N3-APC5 for 21 d.



**图 3** 转染 48 h 后 HT-29 细胞中绿色荧光蛋白的表达 ( $\times 100$ )。A: pEGFP-N3 空载体转染; B: pEGFP-N3-APC1 转染; C: pEGFP-N3-APC2 转染; D: pEGFP-N3-APC3 转染; E: pEGFP-N3-APC4 转染; F: pEGFP-N3-APC5 转染; G: 脂质体 Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000 转染。

**Fig. 3** Green fluorescence can be observed in HT-29 cells transfected for 48 h. A: HT-29 cells transfected with control pEGFP-N3; B: HT-29 cells transfected with pEGFP-N3-APC1; C: HT-29 cells transfected with pEGFP-N3-APC2; D: HT-29 cells transfected with pEGFP-N3-APC3; E: HT-29 cells transfected with pEGFP-N3-APC4; F: HT-29 cells transfected with pEGFP-N3-APC5; G: HT-29 cells transfected with Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000.

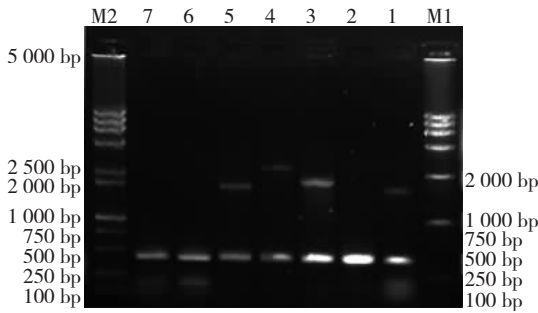


图4 RT-PCR 检测 APC 基因表达。M1:Marker 15000; M2: Marker 15000 和 Marker 2000 的混合物; 1:pEGFP-N3-APC1 转染; 2:pEGFP-N3-APC2 转染; 3:pEGFP-N3-APC3 转染; 4:pEGFP-N3-APC4 转染; 5:pEGFP-N3-APC5 转染; 6:空载体 pEGFP-N3 转染; 7:空脂质体 Lipofectamin™ 2000 转染。

Fig. 4 RT-PCR results of APC mRNA and internal control GAPDH in HT-29 cells. M1: Marker 15000; M2: Marker 15000 + Marker 2000; 1: pEGFP-N3-APC1 transfection; 2: pEGFP-N3-APC2 transfection; 3: pEGFP-N3-APC3 transfection; 4: pEGFP-N3-APC4 transfection; 5: pEGFP-N3-APC5 transfection; 6: pEGFP-N3 transfection; 7: Lipofectamin™ 2000 transfection.

### 3 讨 论

APC 基因突变导致其表达“截短型”APC 蛋白,引起 Wnt 信号通路中 APC 与  $\beta$ -连环蛋白形成的复合体解聚,使得  $\beta$ -连环蛋白稳定存在于细胞质中,并很快进入细胞核,激活下游靶基因 c-myc 和 survivin 等的转录<sup>[1-2]</sup>,导致癌症的发生。Nathke 等<sup>[3]</sup>发现将正常全长野生型 APC 蛋白导入存在 APC 蛋白截短或失活的结肠癌细胞中,可抑制这一过程。事实上,将 APC 基因或者部分功能性的 APC 基因片段导入结肠癌细胞中,能够部分逆转由于 APC 基因缺失造成的癌基因过度表达,从而抑制肿瘤细胞的生长。该方法或许能够成为基因治疗早中期结肠癌的有效方法。

在前面的研究中,根据 APC 蛋白结构及相关文献<sup>[6-8]</sup>,利用真核表达载体 pEGFP-N3,构建了 5 条 APC 基因特异性功能域片段 APC1~5。其中 APC1 为 heptad 重复序列,与卷曲螺旋结构域的形成和寡聚化作用有关;APC2 为 15 氨基重复序列,是  $\beta$ -连环蛋白的结合位点;APC3 为 20 氨基重复序列,可通过磷酸化调节作用与  $\beta$ -连环蛋白结合;APC4 为 15 氨基重复序列 + 20 氨基重复序列;APC5 为 15 氨基重复序列 + SAMP 重复序列,其中 SAMP 序列为 Axin 的结合位点。将 APC 片段插入真核表达载体 pEGFP-N3 中,亚克隆构建重组真核表达载体。

HT-29 细胞中表达的是截短型 APC 蛋白。实验中,将 pEGFP-N3-APC 1~5 通过脂质体介导法转染 HT-29 细胞,通过绿色荧光检测和 RT-PCR 验证,证实构建的重组质粒在细胞内均得到表达。Western 免疫印迹结果及灰度扫描统计学分析显示,与对照组相比,pEGFP-N3-APC1,pEGFP-N3-APC2 和 pEGFP-N3-APC3 对细胞内  $\beta$ -连环蛋白表达水平无明显影响,而 pEGFP-N3-APC4 和 pEGFP-N3-APC5 可明显降低细胞内的  $\beta$ -连环蛋白表达水平。这说明 APC 蛋白 5' 端的 heptad repeat and armadillo 结构 (pEGFP-N3-APC1) 对  $\beta$ -连环蛋白的表达无影响,而仅含有 15 氨基酸重复序列的 pEGFP-N3-APC2 和仅含有 20 氨基酸重复序列的 pEGFP-N3-APC3 也不能对  $\beta$ -连环蛋白的表达起到影响;15 氨基酸重复序列和 20 氨基酸重复序列一起作用 (pEGFP-N3-APC4) 可以降

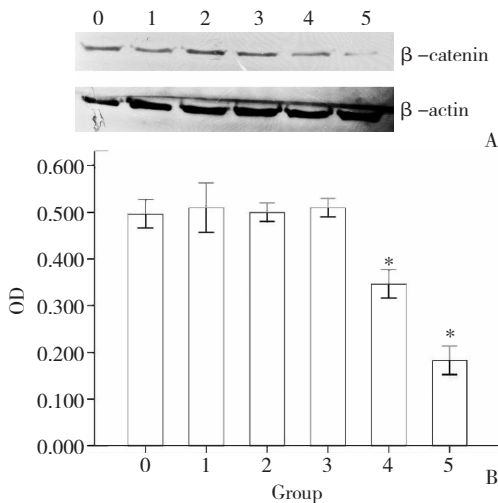


图5 HT-29 细胞中  $\beta$ -连环蛋白的表达。A: $\beta$ -连环蛋白和  $\beta$ -肌动蛋白(阴性对照)在 HT-29 细胞中表达的 Western 免疫印迹分析。0:未处理的 HT-29 细胞;1~5:为转染 pEGFP-N3-APC 1~5 的 HT-29 细胞;B:Western 免疫印迹电泳条带灰度值的统计学分析。与未处理的 HT-29 细胞比较,\* $P < 0.05$ 。

Fig. 5 Expression of  $\beta$ -catenin in HT-29 cells transfected with pEGFP-N3-APC 1~5. A: Expression of  $\beta$ -catenin and  $\beta$ -actin (positive control). 0: untreated cells; 1~5: HT-29 cells transfected with pEGFP-N3-APC 1~5; B: Statistic analysis of  $\beta$ -catenin expression gray-scanning. Compared with the untreated cells, \* $P < 0.05$ .

低  $\beta$ -连环蛋白的表达, 带有全长的 15 氨基酸重复序列和部分的 20 氨基酸重复序列 (pEGFP-N3-APC5) 同样可以降低  $\beta$ -连环蛋白的表达。

对于基因治疗而言, 在效率等同的前提下, 优选片段较短的基因。APC4 和 APC5 分别对应 APC 蛋白密码子 1 020 ~ 2 033 和 1 020 ~ 1 698, APC5 较 APC4 短。实验证明 APC5 就是本研究中寻找的 APC 基因片段, 该基因片段全长为 2 037 bp, 包含有 APC 结构里全长的 15 氨基酸重复序列和部分的 20 氨基酸重复序列, 可以有效降低表达截短型 APC 蛋白的结直肠癌细胞中  $\beta$ -连环蛋白的表达, 有望为结直肠癌的基因治疗提供新的思路。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Liu J, Stevens J, Rote C A, et al. Siah-1 mediates a novel  $\beta$ -catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein [ J ]. *Mol Cell*, 2001, 7 ( 5 ) : 927-936.
- [ 2 ] Xiao J H, Ghosn C, Hinchman C. Adenomatous polyposis coli ( APC ) -independent regulation of beta-catenin degradation via a retinoid X receptor-mediated pathway [ J ]. *J Biol Chem*, 2003, 278 ( 32 ) : 29954-29962.
- [ 3 ] Nathke I S, Adams C L, Polakis P, et al. The adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein localizes to plasma membrane sites involved in active cell migration [ J ]. *J Cell Biol*, 1996, 134 ( 1 ) : 165-179.
- [ 4 ] Mogensen M M, Tucker J B, Mackie J B, et al. The adenomatous polyposis coli protein unambiguously localizes to microtubule plus ends and is involved in establishing parallel arrays of microtubule bundles in highly polarized epithelial cells [ J ]. *J Cell Biol*, 2002, 157 ( 6 ) : 1041-1048.
- [ 5 ] 吕梁, 霍继荣, 刘斌, 等. 重组 pEGFP-N3-APC 质粒在结肠癌细胞株 HT-29 中的表达 [ J ]. *医学临床研究*, 2008, 7 ( 25 ) : 1153-1156.  
LÜ Liang, HUO Jirong, LIU Bin, et al. Expression of recombinant pEGFP-N3-APC vectors in HT-29 colorectal carcinoma cell line [ J ]. *Journal of Clinical Research*, 2008, 7 ( 25 ) : 1153-1156.
- [ 6 ] Takao S, Akiko I K, Takanori O, et al. Adenomatous polyposis coli ( APC ) plays multiple roles in the intestinal and colorectal epithelia [ J ]. *Med Mol Morphol*, 2007, 6 ( 40 ) : 68-81.
- [ 7 ] Oliver M S, Lan P T, Hanan L. The adenomatous polyposis coli ( APC ) tumour suppressor-genetics, function and disease [ J ]. *Mol Med Today*, 2000, 12 ( 6 ) : 462-469.
- [ 8 ] Sandra C M, Sarah J N, Julian H, et al. Assessment of endostatin gene therapy for familial adenomatous polyposis-related desmoid tumors [ J ]. *Cancer Res*, 2006, 66 ( 16 ) : 8233-8240.

( 本文编辑 傅希文 )