

## Axin 基因的表达对神经胶质瘤细胞系 C6 生物学特性的影响

张丽英<sup>1</sup>, 李青<sup>1</sup>, 陈广生<sup>1</sup>, 叶菁<sup>1</sup>, 张丰<sup>1</sup>, 李繁衍<sup>1</sup>, 林圣彩<sup>2</sup>

### Biological effects of Axin gene expression in glioma C6 cells

ZHANG Li - ying<sup>1</sup>, LI Qing<sup>2</sup>, CHEN Guang - sheng<sup>1</sup>, YE Jing<sup>1</sup>, ZHANG Feng<sup>1</sup>, LI Fan - fan<sup>1</sup>,  
L N Sheng - cai<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; <sup>2</sup>School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361000, China

**【Abstract】 Objective:** To observe the effects of Axin gene expression on the biological characteristics of glioma cells **Methods:** The proliferation ability of transfected cells was examined by MTT assay, cell growth curve and colony formation assay. The change of cell cycle was analysed by flow cytometry (FCM). The apoptosis was measured by TUNEL staining. Immunostaining was used to detect the expression of Ki67, CyclinD1 and p53 in C6 cells and transfected cells. **Results:** The progression of the cell cycle was arrested in G1 phase after transfected with Axin plasmids; the cell viability, growing speed and colony formation ability were decreased significantly at the same time; the apoptotic rate increased, the expressions of Ki67 and CyclinD1 decreased, but the p53 level increased. **Conclusion:** Axin gene could inhibit C6 cell proliferation and arrest the transfected cells in G1 phase, and this biological effect might be depended on the increased expression of p53 and the decreased expression of CyclinD1. The molecular mechanism of Axin in cell proliferation needs more research.

**【Key words】** Axin gene; glioma cells; growth curve; cell cycle; apoptosis; p53

(Modern Oncology 2006, 14 (5): 0521 ~ 0524)

**【摘要】 目的:** 研究 Axin 基因对神经胶质瘤细胞 C6 生物学特性及相关蛋白的影响。**方法:** 采用噻唑蓝 (MTT) 比色法测定细胞生长曲线, 应用流式细胞仪 (FCM) 测定细胞周期的变化, 并用平板克隆形成实验对细胞克隆形成能力进行了检测。应用末端 TdT 酶标记技术 (TUNEL) 观察细胞凋亡及比率。采用免疫细胞化学染色法检测 Ki67、CyclinD1、p53 的表达。**结果:** 转染 Axin 基因使细胞周期在 G<sub>1</sub> 期阻滞; 细胞增殖能力和细胞克隆形成能力均显著降低; 细胞凋亡率增高; Ki67 及 CyclinD1 低表达, p53 高表达。**结论:** 转染 Axin 基因后胶质瘤细胞出现了一定的增殖抑制现象, 诱导细胞凋亡, Axin 基因可能通过上调 p53 基因表达和下调 CyclinD1 表达而抑制胶质瘤细胞的生长。

**【关键词】** Axin 基因; 胶质瘤细胞; 生长曲线; 细胞周期; 细胞凋亡; p53

**【中图分类号】** R 730.264

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1672 - 4992 - (2006) 05 - 0521 - 04

Axin (axis inhibition) 是 1997 年 Zeng L 等对天然突变系小鼠基因分析中首次发现的<sup>[1]</sup>。Axin 可调节体轴的形成<sup>[2]</sup>, 对细胞骨架蛋白的重新构建起着重要作用<sup>[3]</sup>, Axin 基因突变引起神经系统发育缺陷<sup>[4]</sup>。Axin 作为支架蛋白具有多个功能结构域, 可和多个蛋白相结合, 通过下调  $\beta$ -catenin 的水平抑制 Wnt 信号通路, 与 MEKK1/4 结合并通过 MEKK4/7 激活 JNK 通路<sup>[5]</sup>。后来研究发现 Axin 可直接与

p53 结合, 或通过与 HIPK2 (homeodomain - interacting protein kinase - 2) 结合使 p53 第 46 位丝氨酸磷酸化, 而提高 p53 靶基因的转录活性发挥其抑制细胞生长及促进凋亡的功能<sup>[6]</sup>。Axin 是最近发现的肿瘤抑制因子<sup>[7]</sup>, 可调控细胞增殖、凋亡和分化。本实验室研究发现 21% 人胶质瘤组织中 Axin 基因的第 10 个外显子共有 3 处 6 例样本发生了错义突变, 提示它与胶质瘤的发生发展有一定关系<sup>[8]</sup>。为进一步研究 Axin 基因和胶质瘤发生发展的关系, 我们已经成功稳定转染 Axin 基因于神经胶质瘤细胞系 C6 中<sup>[9]</sup>。本实验中我们检测了 Axin 基因的表达对胶质瘤生物学特性和相关蛋白的影响, 为下一步进行神经胶质瘤的基因治疗提供理论依据。

#### 1 材料与方法

##### 1.1 材料

兔抗 p53 抗体、鼠抗 CyclinD1 抗体 (Santa Cruz 公司), 兔抗 Ki67 抗体 (Neo Markers 公司), SABC 试剂盒 (博士德公司), TUNEL 检测试剂盒 (博士德公司), SP 免疫组化试剂盒 (北京中杉公司), MTT (AMRESCO 公司), DAB 显色液 (华美

**【收稿日期】** 2005 - 11 - 09

**【基金项目】** 国家杰出青年自然科学基金 (30125012); 军队医药卫生科研基金项目 (02ma04)

**【作者单位】** <sup>1</sup>第四军医大学附属西京医院病理科, 肿瘤生物学国家重点实验室, 陕西 西安 710032

<sup>2</sup>厦门大学生命科学院, 福建 厦门 361000

**【作者简介】** 张丽英 (1977 - ), 女, 河北人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤分子病理研究。

**【通讯作者】** 李青 (1955 - ), 女, 山东人, 教授, 博导, 主要从事肿瘤分子病理研究。

公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 真核表达载体的构建及转染<sup>[9]</sup>

1.2.2 噻唑蓝 (MTT) 比色法绘制细胞生长曲线 用 0.25% 胰蛋白酶消化未转染组、转染空载体组、转染 Axin 基因细胞组细胞,按每孔 600 个细胞接种于 96 孔培养板,37、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中孵育,每天取出一 96 孔板加 MTT 溶液 (5mg/m) 20 ul,37,继续孵育 4h 后,弃上清,每孔加入 150ul DMSO,振荡 10min,使结晶物充分溶解;测定 490nm 处 OD 值,绘制细胞生长曲线。

1.2.3 流式细胞仪 (FCM) 分析细胞周期 0.25% 胰蛋白酶消化收集未转染组、转染空载体组、转染 Axin 基因细胞组细胞,PI 染色,用流式细胞仪检测。

1.2.4 克隆形成实验 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,制备细胞悬液,按每孔 100 个细胞接种于六孔板中,37、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中静止培养 2~3W,克隆形成后用 Giemsa 染色 30min,计数直径 >1mm 的克隆。

1.2.5 TUNEL 法检测细胞凋亡率 采用 TUNEL 法检测未转染组、转染空载体组、转染 Axin 基因细胞组三组细胞的凋亡比率,以 PBS 替代 TUNEL 反应液作阴性对照。结果判断:光学显微镜下,凋亡细胞体积缩小,核固缩,染色质呈特异的棕黄、棕黑色。细胞凋亡率 (%) = (500 个细胞中凋亡细胞数 / 500) × 100%。

1.2.6 免疫细胞化学染色法检测 Ki67, cyclinD1, p53 的表达 制备细胞爬片,4% 多聚甲醛固定 20min;3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 去离子水孵育 10min,蒸馏水洗 2 次,PBS 浸泡 5min;用柠檬酸盐缓冲液进行微波修复 100,20min,让片子自然冷却;加 TritonX-100 反应 10min,PBS 冲洗 3 次,每次 5min;加山羊血清室温封闭 15min;分别滴加兔抗 Ki67 抗体、小鼠抗 CyclinD1 抗体、兔抗 p53 抗体,阴性对照用 PBS 代替一抗,设乳腺癌为阳性对照,4 过夜;次日取出复温约 40min,加生物素标记山羊抗兔 (小鼠) IgG,37 孵育 40min,PBS 洗 3 次,每次 5min;加辣根酶标记链霉卵白素工作液,37 孵育 40min,PBS 洗 3 次,每次 5min;DAB 显色,自来水冲洗 10min;常规脱水透明,封片。随机选择 10 个高倍视野,计数 1000 个肿瘤细胞,计算阳性细胞百分率。

### 1.3 统计学分析

数据检验采用 t 检验和 <sup>2</sup> 检验。所有结果经 SPSS 11.5 统计软件进行分析。

## 2 结果

### 2.1 MTT 实验表明 Axin 基因的表达抑制神经胶质瘤细胞的生长

转染 Axin 基因使细胞生长速度减慢 (图 1)。

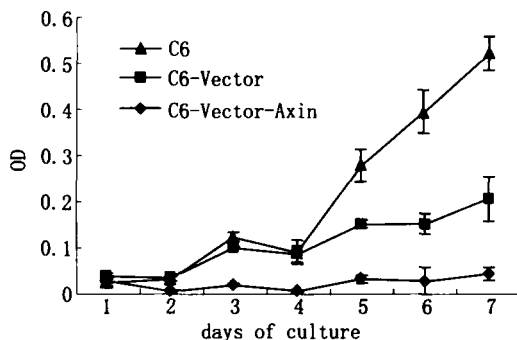


图 1 Axin 对神经胶质瘤细胞生长的影响

Fig 1 Effects of Axin expression on glioma cell growth

### 2.2 转染 Axin 后细胞周期出现阻滞

流式细胞仪分析发现外源性 Axin 的表达对胶质瘤细胞周期有显著影响,其中 G<sub>1</sub> 期明显被阻滞,S 期比率下降。(表 1)。

表 1 Axin 表达对 C6 细胞周期分布的影响 (流式细胞术) (%)

Table with 5 columns: 组别, G1, G2, S, G2/G1. Rows: C6-Vector-Axin, C6-Vector, C6.

### 2.3 Axin 基因的表达降低神经胶质瘤细胞的克隆形成

Axin 的表达使神经胶质瘤细胞克隆形成能力下降 70.2% (P < 0.01), 图 2。

### 2.4 Axin 基因的表达提高了胶质瘤细胞的凋亡率

转染空载体组,未转染组细胞的凋亡率分别为 10.79%、7.10%,转染 Axin 基因组凋亡细胞明显增多,凋亡率为 33.20%,与转染空载体组细胞的凋亡率比较有统计学意义 (P < 0.01), 见图 3。

### 2.5 免疫细胞化学染色法检测 Ki67, cyclinD1, p53 的表达

Ki67, cyclinD1, p53 阳性反应物均定位于细胞核 (图 4), Ki67 在转染 Axin 后的阳性表达率显著低于转染空载体组 (<sup>2</sup> = 131.75, P < 0.01), CyclinD1 在转染 Axin 后的阳性表达率显著低于转染空载体组 (<sup>2</sup> = 11.75, P < 0.01), p53 在转染 Axin 后的阳性表达率显著高于转染空载体组 (<sup>2</sup> = 133.83, P < 0.01)。

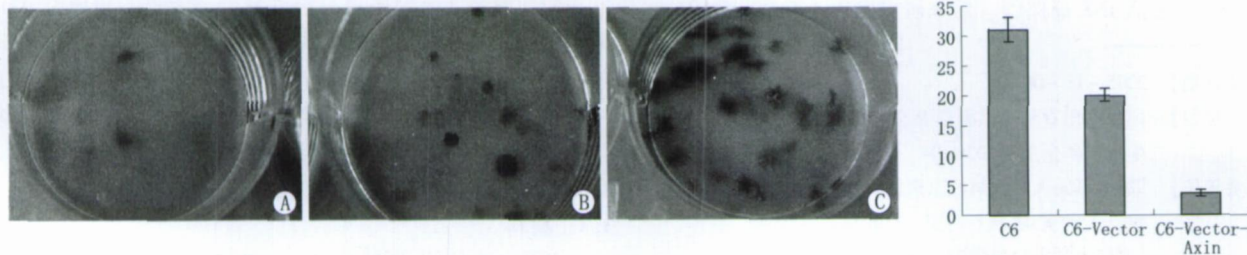


图 2 Axin 基因的表达对细胞克隆形成能力的影响 A: C6-Vector-Axin B: C6-Vector C: C6 Fig 2 Effects of Axin expression on cell cloning efficiency A: C6-Vector-Axin B: C6-Vector C: C6

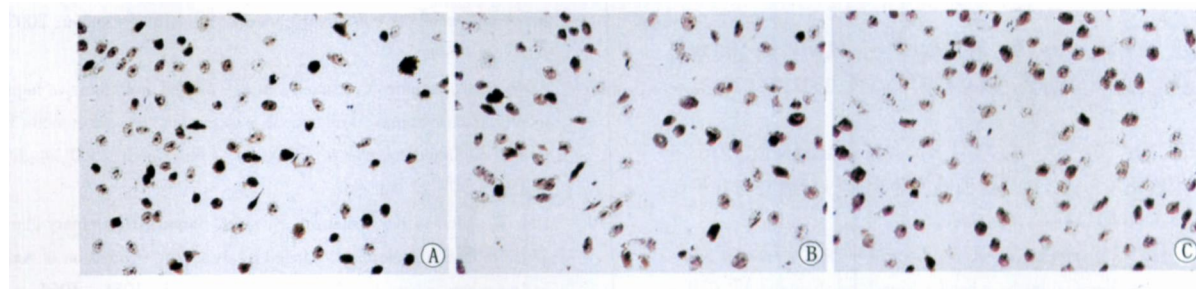


图 3 Axin 基因的表达对胶质瘤细胞凋亡的影响 A: C6 - Vector - Axin B: C6 - Vector C: C6

Fig 3 Effects of Axin expression on apoptosis A: C6 - Vector - Axin B: C6 - Vector C: C6

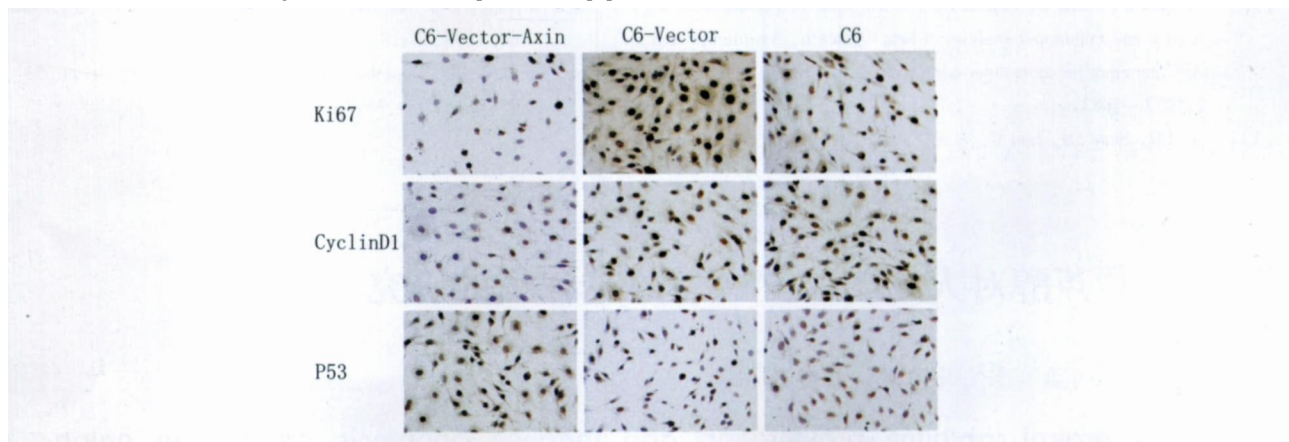


图 4 免疫细胞化学染色法检测 Ki67、cyclinD1、p53 的表达 (SP 法 ×200)

### 3 讨论

Axin 是小鼠 Fused (Fu) 基因编码的蛋白, 最初被鉴定为 Wnt 信号转导通路的抑制因子<sup>[1]</sup>, 可调控细胞增殖、凋亡和分化。在 Wnt 信号转导通路中, Axin 作为骨架蛋白与 APC/GSK-3/CKI 结合成复合物下调  $\beta$ -catenin 的表达<sup>[10]</sup>。更重要的是, 很多研究发现在肝细胞癌<sup>[11]</sup>、结直肠癌<sup>[12]</sup>等多种肿瘤中 Axin 基因发生突变, 将野生型的 Axin 转染到肿瘤细胞中可导致细胞死亡<sup>[13]</sup>。而且, Axin 过表达还可引起细胞凋亡<sup>[14]</sup>。表明 Axin 是一个肿瘤抑制因子<sup>[7]</sup>。本实验室在星型细胞瘤中检测到 Axin 基因的突变<sup>[8]</sup>, 表明其在包括胶质瘤在内的多种肿瘤的发生发展中起重要的作用。本研究目的是将外源性基因 Axin 稳定转染 C6 细胞系后, 观察其对 C6 生物学特性及相关蛋白的影响, 为下一步实验奠定基础, 同类研究未见相关报道。

在本实验中, 我们发现 Axin 的外源性表达可显著抑制 C6 细胞的增殖和克隆形成能力, 使 C6 细胞周期阻滞在 G<sub>1</sub> 期, S 期比例下降, 凋亡细胞增多。Ki67 是细胞增殖的一种标记, 其增殖指数的高低与许多肿瘤的分化程度及预后密切相关, 转染 Axin 基因后, Ki67 的阳性表达率下降, 进一步表明 Axin 高表达抑制神经胶质瘤细胞的增殖。

CyclinD1 为细胞周期相关癌基因, 可激活 CDK4/6 的蛋白激酶活性, 促使细胞从 G<sub>1</sub> 期顺利进入 S 期完成 DNA 复制。CyclinD1 的过度表达可使细胞持续增殖, 从而导致细胞失控性生长<sup>[15]</sup>。p53 基因是一种重要的抑癌基因。它在细胞周期调控, 抑制细胞生长, 诱导肿瘤细胞凋亡等方面有重要的作用<sup>[16]</sup>。最近有研究发现<sup>[6]</sup> Axin 不仅有独立的结构域直接与 p53 结合还可通过 HIPK2 与 p53 相结合。Axin 通过与 HIPK2 结合而使 p53 第 46 位丝氨酸磷酸化, 选择性的提高 p53 依赖的靶基因的转录活性, 通过激活下游靶基因 p21, 对 CDK 有广泛抑制作用。本实验中, 转染 Axin 于神经胶质

瘤细胞 C6 后, p53 基因的表达增高, CyclinD1 的表达下降, 胶质瘤细胞在 G<sub>1</sub> 期阻滞, 细胞增殖和克隆形成率降低, 可能与 p53 的高表达和 CyclinD1 的低表达相关。其发生机制可能是 Axin 通过上调 p53 基因而激活下游靶基因 p21 有关, p21 基因对 CDK 有广泛抑制作用, 使 CyclinD1 的表达降低, 不能激活 CDK4/6 的蛋白激酶, 导致高磷酸化的 RB 蛋白堆积, 使转录因子 E2F 不能活化, 最终引起 G<sub>1</sub> 期阻滞使肿瘤细胞的生长增殖能力降低。

总之, 本研究实验结果表明外源性 Axin 基因的表达可抑制胶质瘤细胞的增殖并可诱导其凋亡, 其发生机制可能与 p53 表达的上调, CyclinD1 表达的下调有关。

### 【参考文献】

- [1] Zeng L, Fagotto F, Zhang T, et al The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation[J]. Cell, 1997, 90: 181 ~ 192
- [2] S Salahshor, J R Woodgett The links between axin and carcinogenesis[J]. J Clin Pathol, 2005, 58: 225 ~ 236
- [3] Cowan CA, Henkemeyer M. The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals[J]. Nature, 2001, 413: 174 ~ 178
- [4] Christian JL, Moon RT. Interactions between Xwnt-8 and spermann organizer signaling pathways generate dorsoventral pattern in the embryonic mesoderm of Xenopus[J]. Genes Dev, 1993, 7: 13 ~ 28
- [5] Luo W, Ng WW, Lin SC, et al Axin utilizes distinct regions for competitive MEKK1 and MEKK4 binding and JNK activation[J]. J Biol Chem, 2003, 278: 37451 ~ 37458
- [6] Rui YN, Xu Z, Lin SC, et al Axin stimulates p53 functions by activation of HIPK2 kinase through multimeric complex formation [J]. EMBO J, 2004, 23: 4583 ~ 4594
- [7] Peifer M, Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis - a look outside the nucleus[J]. Science, 2000, 287: 1606 ~

1609.

[8] 邵秋杰,李青,金利华,等. 胶质瘤中 Axin基因点突变检测及表达研究[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2003, 2(4): 334 ~ 337.

[9] 张丽英,李青,陈广生,等. 真核表达载体 pRES2 - EGFP - Axin的构建及其在神经胶质瘤细胞内的表达[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2005, 21(4): 408 ~ 410.

[10] Liu C, Li Y, Semenov M, *et al* Control of beta - catenin phosphorylation/degradation by a dual - kinase mechanism[J]. Cell, 2002, 108: 837 ~ 847.

[11] Ishizaki Y, Ikeda S, Fujimori M, *et al* Immunohistochemical analysis and mutational analyses of beta - catenin, Axin family and APC genes in hepatocellular carcinomas[J]. Int J Oncol, 2004, 2: 1077 ~ 1083.

[12] Jin LH, Shao QJ, Luo W, *et al* Detection of point mutations of the Axin1 gene in colorectal cancers[J]. Int J Cancer, 2003, 107: 696 ~ 699.

[13] Satoh S, Nakamura Y, Kato T, *et al* AXN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus - mediated transfer of AXN1[J]. Nat Genet, 2000, 24: 245 ~ 250.

[14] Hsu W, Shakya R, Costantini F, *et al* Impaired mammary gland and lymphoid development caused by inducible expression of Axin in transgenic mice[J]. J Cell Biol, 2001, 155: 1055 ~ 1064.

[15] Youssef EM, Hasuma T, Morishima Y, *et al* Overexpression of cyclin D1 in rat esophageal carcinogenesis model[J]. Cancer Res, 1997, 88: 18 ~ 27.

[16] Attardi LD, Depinho RA. Conquering the complexity of p53[J]. Nat Genet, 2004, 36: 7 ~ 8.

## 白藜芦醇对人结肠癌 SW480瘤株作用的研究

刘 敏<sup>1</sup>,孟 勇<sup>2</sup>,马清涌<sup>3</sup>,刘衍晟<sup>4</sup>

### Resveratrol inhibites proliferation and induces apoptosis on human colon cancer SW480 cell line

LU Min<sup>1</sup>, MENG Yong<sup>2</sup>, MA Qing - yong<sup>3</sup>, LU Yan - cheng<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Shaanxi Tumor Hospital, Xi'an 710061 China; <sup>2</sup> Department of General Surgery, First Hospital of Shantou University, Shantou, 515041 China; <sup>3</sup> First Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, 710061 China; <sup>4</sup> Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061 China

**【Abstract】 Objective:** To evaluate the effect and mechanism of resveratrol in inhibiting proliferation and inducing apoptosis on human colon cancer cells **Methods:** The proliferation of human colon cancer line SW480 was measured by MTT assay. Cell cycle was measured using FACS **Results:** Resveratrol inhibited the proliferation and induced apoptosis on human colon cancer cell line SW480 (IC<sub>50</sub> = 80μmol/L) in a time - and dose - dependent manner based on flow cytometric analysis, correlated with the block of cell progression through S phases of the cell cycle **Conclusion:** Resveratrol plays an inhibitory effect and induces apoptosis on SW480 cells. These results provide support for the use of resveratrol in chemoprevention and cancer therapy trials

**【Key words】** resveratrol; colon cancer; apoptosis; cell cycle; SW 480 cell line

(Modern Oncology 2006, 14(5): 0524 ~ 0526)

**【摘要】 目的:** 研究白藜芦醇对人结肠癌细胞株 SW480生长和细胞周期的影响,并探讨其作用机制。**方法:** 采用光镜及电子显微镜观察用药前后细胞形态结构的改变;采用四唑盐(MTT)比色法检测细胞增殖,采用流式细胞术测定细胞周期。**结果:** 白藜芦醇呈时间和剂量依赖性抑制人结肠癌细胞株 SW480的生长并诱导凋亡, IC<sub>50</sub>为 80μmol/L;白藜芦醇使 SW480处于 S期细胞增多。**结论:** 白藜芦醇能有效的抑制人结肠癌细胞株 SW480的生长并诱导其凋亡;白藜芦醇对结肠癌可能是一种有效的化学治疗和化学预防药物。

**【关键词】** 白藜芦醇;结肠癌;凋亡;细胞周期; SW480细胞

**【中图分类号】** R 735. 3<sup>+</sup> 5

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1672 - 4992 - (2006) 05 - 0524 - 03

**【收稿日期】** 2005 - 09 - 28

**【基金项目】** 陕西省卫生厅科研基金资助(项目编号: 2004D10)

**【作者单位】** <sup>1</sup>陕西省肿瘤医院肿瘤研究室,陕西 西安 710061

<sup>2</sup>汕头大学医学院第一附属医院普外科,广东 汕头 515041

<sup>3</sup>西安交通大学第一医院普外科,陕西 西安 710061

<sup>4</sup>西安交通大学医学院电镜室,陕西 西安 710061

**【作者简介】** 刘敏(1954 - ),女,山东人,主任医师,主要从事病理诊断工作。