

## · 基础研究 ·

Wnt1 基因在乳腺癌细胞株 MCF-7/ADR 中的表达与  
多柔比星化疗抵抗关系的研究\*

张战民, 张晓华

(南昌大学第一附属医院肿瘤科, 南昌 330006)

**摘要:**目的 探讨 Wnt1 在乳腺癌细胞中的表达及其在多柔比星化疗抵抗中的作用。方法 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 Wnt1 基因在乳腺癌细胞中的表达;双链 siRNA 转染阻断 Wnt1 基因,RT-PCR 和免疫印迹法(Western blotting)检测基因沉默效果;细胞毒实验(MTT)法检测乳腺癌细胞的生长抑制率。结果 对照组、siRNA 干扰组、多柔比星处理组,Wnt1 沉默 MCF-7/ADR+ADM 组的细胞存活率分别为(100±5.2)%、(84.3±4.1)%、(68.7±4.7)%和(42.3±3.5)%,其他 3 组的细胞存活率与对照组比较,差异有统计学意义( $F=5.381, P<0.05$ )。Wnt1 沉默 MCF-7/ADR+ADM 组与其他 3 组比较细胞的存活率均降低,与对照组、siRNA 干扰组和多柔比星处理组比较,差异均有统计学意义( $P<0.01$ );Wnt1 在乳腺癌细胞呈高表达,siRNA 沉默 Wnt1 基因,可以显著下调 Wnt1 mRNA 和蛋白的表达。结论 Wnt1 基因在乳腺癌细胞呈高表达,沉默 Wnt1 基因下调 Wnt1 基因的转录和翻译,能显著增强乳腺癌细胞对多柔比星的敏感性,部分逆转其对多柔比星的耐药性。

**关键词:**多柔比星;Wnt1 基因;乳腺肿瘤细胞株 MCF-7/ADR;细胞抑制;蛋白表达

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.36.027

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)36-3868-03

Study on the expression for Wnt1 gene in breast cancer cell line MCF-7/ADR  
and the relationship of resistance for doxorubicin chemotherapy\*

Zhang Zhanmin, Zhang Xiaohua

(Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

**Abstract:** Objective To explore the expression for Wnt1 gene in breast cancer cell line MCF-7/ADR and the relationship of resistance for doxorubicin chemotherapy. **Methods** Test the expression for Wnt1 gene in breast cancer cell by RT-PCR; interrupt Wnt1 gene by siRNA transfection; test the effects of silent gene by RT PCR and western blot; and detect the growth inhibition rate of breast cancer cell by MTT. **Results** The cell livability for control group, siRNA interfere group, doxorubicin group and silent Wnt1 for MCF-7/ADR+ADM group were (100±5.2)%, (84.3±4.1)%, (68.7±4.7)% and (42.3±3.5)% respectively. Compare the cell livability of control group and the other three groups, there were significant statistical difference ( $F=5.381, P<0.05$ ). The cell livability for silent Wnt1 for MCF-7/ADR+ADM group was the lowest, there were significant statistical difference for the other three groups ( $P<0.01$ ). Wnt1 Gene was strongly expressed on breast cancer cell line MCF-7/ADR. Silent Wnt1 Gene can lower the expression of Wnt1 mRNA and protein significantly. **Conclusion** Wnt1 Gene was strongly expressed on breast cancer cell line MCF-7/ADR. Silent Wnt1 Gene can lower the expression of DNA transcription and replication for Wnt1 Gene. It can reinforce sensitivity of breast cancer cell to doxorubicin and partially reversed the resistance of MCF-7/ADR to doxorubicin.

**Key words:** doxorubicin; Wnt1 Gene; breast cancer cell line MCF-7/ADR; cell suppression; expression

Wnt 信号通路是一个复杂的蛋白质作用通路,其参与细胞的增殖、分化、代谢及凋亡,是细胞发育所必需的<sup>[1]</sup>,调节着细胞行为及细胞的相互作用,因此,此通路不仅在胚胎发育调控中起至关重要的作用,而且与肿瘤的发生和发展密切相关<sup>[2]</sup>。研究表明,Wnt 信号通路与多种肿瘤的的生长、复发和耐药有着密切的关系<sup>[3-4]</sup>。本研究通过沉默 Wnt1 基因的表达,观察乳腺癌细胞对多柔比星敏感性的变化,为寻找克服乳腺癌耐药性的新靶点提供依据,现将研究结果报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 人乳腺癌 MCF-7/ADR 细胞株由中国医学科学院血液学研究所提供,此细胞株的原代培养细胞供体均一,取材部位及组织类型稳定,为已鉴定细胞;PRMI 1640 培养基和胎牛血清购于美国 Gibco 公司,四甲基偶氮唑盐(MTT)、青霉素、链霉素、多柔比星为美国 Sigma 公司产品,总 RNA 提取试

剂盒采用美国 Promega 公司产品,逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒为日本 Takara 公司生产,Lipofectamine 2000 转染试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,Wnt1 siRNA 双链干扰序列由上海吉玛制药技术有限公司合成。

## 1.2 方法

**1.2.1 MCF-7/ADR 细胞在 Wnt1 基因沉默前后对多柔比星耐药性的比较**

**1.2.1.1 MCF-7/ADR 细胞的培养** 采用含 10% 胎牛血清,100 U/mL 青霉素,100 U/mL 链霉素,RPMI 1640 的完全培养基,在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 的饱和湿度条件下培养,每 2~3 d 换液并传代 1 次,采用 0.02% 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na<sub>2</sub>) 和 0.25% 胰蛋白酶的 1:1 混合液进行消化,且使多柔比星梯度诱导浓度最终维持在 1 μg/mL。

**1.2.1.2 细胞总 RNA 的提取及光密度值的测定** 培养出的

\* 基金项目:江西省卫生厅课题基金资助项目(20093044)。

MCF-7/ADR 细胞每(1~5)×10<sup>6</sup> 个细胞加 1 mL TRIzol 试剂, 吸管吹吸数次, 15~30 °C 孵育 5 min 后, 加 0.2 mL 氯仿, 摇匀 15 s, 15~30 °C 孵育 2~3 min, 4 °C 离心 15 min(离心半径 8 cm, 12 000 r/min)。上清液移入另一 EP 管内, 加入 0.5 mL 异丙醇, 4 °C 离心 10 min(离心半径 8 cm, 12 000 r/min), 加 75% 乙醇 1 mL, 震荡混匀, 4 °C 离心 5 min(离心半径 8 cm, 7 500 r/min), 吸去上清液, 晾干 5~10 min, 加入焦碳酸二乙酯(DEPC)水溶解, 55~60 °C 促溶 10 min。采用紫外分光光度计测定细胞总 RNA 在 260 nm 和 280 nm 处的吸光度(A)值, 计算 RNA 的含量和纯度。所有样品的 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 均介于 1.9~2.1 之间, 并根据 260 nm 吸光度定量。

**1.2.1.3 RT-PCR 的检测** 取 DEPC 处理过的细胞溶液 0.2 mL, 加入下列反应组分: 2.6 μg RNA、1 μL 随机引物(50 ng/μL)、1 μL 三磷酸脱氧核糖核苷(dNTP)10 mmol、4 μL 5×RT 缓冲液、1 μL 高效率逆转录酶(日本 ReverTra Ace 公司), DEPC 溶液补足至 20 μL, 室温放置 10 min, 37 °C 保温 30 min, 95 °C 5 min 使酶失活, 置于 4 °C 1~5 min, 完成 cDNA 的合成, 所得 cDNA 产物于 -20 °C 保存。于 0.2 mL PCR 反应管中加入下列反应组分: 2 μL cDNA、2.25 μL 10×PCR 缓冲液、0.5 μL dNTP(10 mmol)、25 pmol 上游 Wnt1 引物、25 pmol 下游 Wnt1 引物或 0.5 μL 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物、0.5 μL TaqDNA 聚合酶, 灭菌水补足至 25 μL。Wnt1 及 β-actin 的引物序列(表 1), 扩增反应条件: 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 扩增 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 终止反应, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 45 min。

表 1 引物序列

目的基因	引物序列
Wnt1 引物	正义: 5'-CAC GAC CTC GTC TAC TTC GAG-3'
	反义: 5'-ACA GAC ACT CGT GCA GTA CGC-3'
β-actin 引物	正义: 5'-ATC ATG TTT GAG ACC TTC AAC A-3'
	反义: 5'-CAT CTC TTG CTC GAA GTC CA-3'

**1.2.1.4 RNA 干扰实验** MCF-7/ADR 细胞接种于 6 孔板, 当细胞达到 50% 融合时, 按照 Lipofectamine 2000 转染试剂盒说明书进行基因转染实验。化学合成的靶向 Wnt1 亚基的 siRNA 双链干扰序列为: 5'-CCU CGU CUA CUU CGA GAA ATT-3'(正义链), 5'-UUU CUC GAA GUA GAC GAG GT-3'(反义链)。

**1.2.1.5 MCF-7/ADR 细胞的生长抑制实验** 将 MCF-7/ADR 细胞分为 4 组, (1) 对照组: 细胞中只采用培养基进行培养; (2) Wnt1 沉默组: MCF-7/ADR 细胞加 siRNA 干扰处理; (3) 多柔比星组: 用多柔比星处理 MCF-7/ADR 细胞; (4) Wnt1 沉默联合多柔比星组: Wnt1 沉默 MCF-7/ADR 后用多柔比星处理。将细胞制成单细胞悬液, 以每孔 2×10<sup>5</sup> 个细胞接种于 96 孔培养板中, 各组分设 3 个复孔, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的饱和湿度下培养 24 h, 细胞贴壁后加入终浓度为 20 μg/mL 的多柔比星, 继续培养 24 h, 每孔加入 0.5 mg/mL MTT 反应 4 h, 弃去培养基, 加入二甲基亚砜(DMSO)100 μL, 震荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 实验重复 3 次。选择 570 nm 波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔 A 值, 计算细胞生长抑制率, 比较 Wnt1 基因沉默前、后 MCF-7/ADR 细胞对多柔比星耐药性的变化。

细胞抑制率=[1-实验组 A 值/对照组 A 值]×100%。

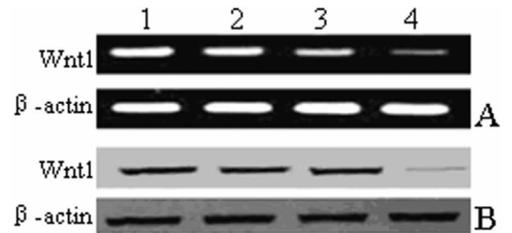
**1.2.2 免疫印迹法(Western blotting)检测蛋白的表达** 将各组细胞重悬, 分别收集 1×10<sup>6</sup> 个细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 1 次, 离心去除上清液, 加入细胞裂解液, 室温匀浆 1 min, 然后 4 °C 离心 15 min。取上清液作为样品。5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 离心 10 min(离心半径 8 cm, 12 000 r/min), 上清液即为细胞总蛋白。50 μg 细胞总蛋白行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 80~120 V 电泳 2 h, 80 V 转印 2 h; PBS 洗膜 10 min, 加入包被液封闭过夜; 再用 PBS 洗膜 3 次, 加入第一抗体(1:400)和 β-actin 鼠抗人单克隆抗体(1:400), 室温孵育 2 h; PBS 洗膜 2 次, 与第二抗体室温孵育 2 h; PBS 洗膜 2 次, 加入显色液显色 15 min, 显色的硝酸纤维素膜经 UPV 扫描仪扫描成像。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS11.0 软件进行统计分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用方差分析, 组间比较采用 *t* 检验, 以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

**2.1 Wnt1 基因沉默前后 MCF-7/ADR 细胞对多柔比星敏感性的变化** 对照组、Wnt1 沉默组、多柔比星组及 Wnt1 沉默联合多柔比星组的细胞存活率分别为(100.0±5.2)%、(84.3±4.1)%、(68.7±4.7)%和(42.3±3.5)%。其中, Wnt1 沉默组、多柔比星组及 Wnt1 沉默联合多柔比星组细胞的存活率与对照组比较, 差异有统计学意义(*F*=5.381, *P*<0.05), Wnt1 沉默联合多柔比星组细胞的存活率最低。

**2.2 Wnt1 基因沉默前后 MCF-7/ADR 细胞中 Wnt1 基因及蛋白质的表达** RT-PCR 检测结果显示, 空白对照组、脂质体对照组及阴性对照组 MCF-7/ADR 细胞中 Wnt1 mRNA 的扩增产物呈清晰条带; 用化学合成的双链 siRNA 沉默 Wnt1 基因, 转染 48 h 后收集细胞, MCF-7/ADR 细胞中 Wnt1 mRNA 的表达明显下调(图 1)。Western blotting 检测上述 4 组 Wnt1 蛋白的表达情况, 发现其与 Wnt1 基因 mRNA 表达的变化一致, 说明 siRNA 转染后抑制了 Wnt1 基因的转录过程, 同时也抑制了相应蛋白的翻译和表达, 见图 1。



1: 空白对照组; 2: 脂质体对照组; 3: 阴性对照组; 4: Wnt1 siRNA 转染组。

图 1 RT-PCR 检测转染后 MCF-7/ADR 细胞株中 Wnt1 mRNA 的表达

3 讨 论

肿瘤多药耐药(MDR)是临床恶性肿瘤化疗的主要障碍, 也是乳腺癌患者化疗失败、复发转移的主要原因<sup>[5]</sup>。MDR 发生机制复杂, 已有许多研究阐述了乳腺癌化疗耐药的机制, 如 P-糖蛋白(P-gp)<sup>[6]</sup>、多药耐药相关蛋白(MRP)<sup>[7]</sup>和乳腺癌耐药蛋白的过表达<sup>[8]</sup>, 导致肿瘤细胞内化疗药物的浓度降低以及谷胱甘肽 S 转移酶(GSTS)酶性解毒作用的增强等<sup>[9]</sup>。随着细胞技术的成熟, 细胞信号通路与肿瘤多药耐药的关系已成为 MDR 机制和逆转治疗研究的新亮点。

近年来的研究表明,Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的激活,参与了肿瘤的发生及其侵袭转移的过程,而且还与肿瘤干细胞的关系密切,是调控肿瘤干细胞增殖与分化的一个重要信号通路<sup>[10-11]</sup>。Milovanovic 等<sup>[12]</sup>在研究中用原位 RNA 杂交法检测了正常乳腺组织和恶性乳腺癌组织的 Wnt 配体 Wnt1、Wnt2、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7 和 Wnt10b 的表达情况,发现 Wnt1 和 Wnt6 在正常和恶性组织中均强烈表达,Wnt7b 在乳腺癌组织中下调。目前,认为,Wnt 通路致癌的关键是  $\beta$ -catenin 降解障碍致使胞浆内游离的  $\beta$ -catenin 聚集并与 Tcf/Lef 结合进入细胞核,激活下游靶基因 Cyclin D1、C-myc 的转录,导致肿瘤的发生。Cyclin D1 是调节细胞进入细胞周期中增生期的主要因子,已被证实为原癌基因,其过度表达和失调均可导致细胞周期调控异常而发生肿瘤<sup>[13-15]</sup>。鉴于 Wnt1 在小鼠乳腺癌中的作用和人类乳腺癌中的表达,本文检测了 Wnt1 基因的 mRNA 在乳腺癌多药耐药细胞株 MCF-7 细胞中的表达,经 RT-PCR 检测结果发现 Wnt1 在乳腺癌细胞呈高表达,使用化学合成的双链 siRNA 沉默 Wnt1 基因,可显著下调 Wnt1 mRNA 的表达,Wnt1 蛋白的表达也明显减弱,说明 siRNA 转染后抑制了 Wnt1 基因的转录过程,同时也抑制了相应蛋白的翻译和表达。本研究通过 MTT 试验发现,沉默后的 MCF-7/ADR 细胞对多柔比星的敏感性明显增强,表明沉默 Wnt1 基因可以部分逆转 MCF-7/ADR 细胞对多柔比星的耐药性。

综上所述,Wnt1 基因在乳腺癌细胞呈高表达,沉默 Wnt1 基因下调 Wnt1 基因的转录和翻译,能显著增强乳腺癌细胞对多柔比星的敏感性,部分逆转其对多柔比星的耐药性,说明 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路可能在乳腺癌多药耐药中具有重要作用,为寻求克服 MDR 开辟了新的方向。

#### 参考文献:

- [1] Nusse R. Wnt signaling in disease and in development[J]. *Cell*,2005,15(1):28-32.
- [2] Santos A,Bakker AD,Zandieh-Doulabi B,et al. Pulsating fluid flow modulates gene expression of proteins involved in Wnt signaling pathways in osteocytes [J]. *J Orthop Res*,2009,27(10):1280-1287.
- [3] Fodde R,Brabletz T. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior[J]. *Curr Opin Cell Bio*,2007,19(2):150-158.
- [4] 肖若芝,陈琰,王立琳,等. 索拉非尼通过抑制 WNT 信号通路诱导白血病细胞株 U937 凋亡[J]. *中国实验血液学杂志*,2011,19(2):353-357.
- [5] Putzke AP,Rothman JH. Repression of Wnt signaling by a Fer-type nonreceptor tyrosine kinase[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2010,107(37):16154-16159.
- [6] Steele BM,Harper MT,Macaulay IC,et al. Canonical Wnt signaling negatively regulates platelet function[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2009,106(47):19836-19841.
- [7] Watanabe K,Dai X. Winning WNT:race to Wnt signaling inhibitor[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2011,108(15):5929-5930.
- [8] Cselenyi CS,Jernigan KK,Tahinci E,et al. LRP6 transduces a canonical Wnt signal independently of Axin degradation by inhibiting GSK3's phosphorylation of  $\beta$ -catenin[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2008,105(23):8032-8037.
- [9] Cadigan KM,Nusse R. Wnt signaling;a common theme in animal development[J]. *Genes Deve*,1997,11(24):3286-3305.
- [10] Woodward WA,Chen MS,Behbod F,et al. WNT/ $\beta$ -catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2007,104(2):618-623.
- [11] Wang YZ,Krivtsov AV,Sinha AU,et al. The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway is required for the development of leukemia stem cells in AML[J]. *Science*,2010,327(5973):1650-1653.
- [12] Milovanovic T,Planutis K,Nguyen A,et al. Expression of Wnt genes and frizzled 1 and 2 receptors in normal breast epithelium and infiltrating breast carcinoma[J]. *Int J Oncol*,2004,25(5):1337-1342.
- [13] Bala S,Peltomäki P. CYCLIN D1 as a genetic modifier in hereditary nonpolyposis colorectal cancer[J]. *Cancer Res*,2001,61(16):6042-6045.
- [14] 柳华,彭芝兰. Wnt 信号传导通路 with 妇科肿瘤[J]. *现代妇产科进展*,2009,18(1):60-62.
- [15] Reya T,Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer[J]. *Nature*,2005,434(7035):843-850.

(收稿日期:2012-01-09 修回日期:2012-02-22)

(上接第 3867 页)

- [13] Jang J,Bae J. Carbon nanofiber/polypyrrole nanocable as toxic gas sensor [J]. *Sensor Actuat B-Chem*,2007,122(1):7-13.
- [14] Yang X,Li L. Polypyrrole nanofibers synthesized via reactive template approach and their NH<sub>3</sub> gas sensitivity [J]. *Synthetic Metals*,2010,160(11/12):1365-1367.
- [15] Ruangchuay L,Sirivat A,Schwank J. Electrical conductivity response of polypyrrole to acetone vapor: effect of

dopant anions and interaction mechanisms [J]. *Synthetic Met*,2004,140(1):15-21.

- [16] Fan L,Ge H,Zhang SY,et al. Optimization of sensitivity induced by surface conductivity and sorbed mass in surface acoustic wave gas sensors [J]. *Sensor Actuat B-Chem*,2012,161(1):114-123.

(收稿日期:2012-07-02 修回日期:2012-10-25)