

HL-60细胞中ICAT基因沉默对Wnt信号通路及NSC67657诱导细胞分化的影响

王伟佳 陈康 王娟 黄云秀 张德才

【摘要】 目的 探讨 β -catenin相关蛋白1(ICAT)沉默对Wnt信号通路及甾醇类新药NSC67657诱导HL-60细胞单核系分化的影响。方法 NSC67657诱导HL-60细胞分化,流式细胞术检测细胞表面分化抗原CD14的表达,检测细胞分化程度;构建慢病毒LV-ICAT-RNAi载体,感染HL-60细胞,采用荧光实时定量PCR和Western blot技术检测感染前后ICAT基因和蛋白表达情况,判断干扰效果;采用免疫共沉淀技术检测 β -catenin与ICAT蛋白在细胞内的相互作用;采用Western blot技术分析NSC67657诱导非感染HL-60细胞(HL-60v组)和LV-ICAT-RNAi载体感染HL-60细胞(HL-60i组)前后Wnt/ β -catenin通路下游靶点Cyclin D1、TCF-1和c-Jun的表达情况;NSC67657分别作用HL-60v组和HL-60i组细胞24 h,采用瑞氏染色、透射电子显微镜、流式细胞术观察细胞分化情况。结果 10 μ mol/L NSC67657可以诱导HL-60细胞向单核系分化,连续诱导5 d后,CD14⁺细胞比例为(92.30 \pm 5.14)%;HL-60i细胞ICAT mRNA表达(0.07 \pm 0.01)明显低于HL-60v组(1.00 \pm 0.08)($P=0.002$)(平均敲减效率为93.2%),Western blot结果与PCR结果一致($P=0.001$);免疫共沉淀结果显示,ICAT与 β -catenin蛋白在细胞分化前后都存在相互作用,药物诱导细胞分化后两者相互作用条带吸光度明显增加。药物作用HL-60i细胞Wnt信号通路下游靶蛋白Cyclin D1、TCF-1和c-Jun表达明显高于HL-60v组,但低于非药物处理组。NSC67657作用HL-60i细胞CD14⁺细胞比例为(8.33 \pm 3.14)%,明显低于HL-60v组的(19.08 \pm 4.73)%,但仍高于非药物处理非感染HL-60细胞组(0.60 \pm 0.03)%($F=119.24, P=0.010$),细胞形态和超微结果符合细胞表面分化抗原检测结论。结论 ICAT蛋白参与了NSC67657诱导HL-60细胞的单核系分化,Wnt/ β -catenin信号通路可能起到桥梁作用。

【关键词】 HL-60细胞; β -catenin相关蛋白1; 分化; Wnt信号通路

基金项目:国家自然科学基金(81301492)

Effects of ICAT silencing in Wnt signaling pathway and NSC67657 induced cell differentiation of HL-60 cells Wang Weijia, Chen Kang, Wang Juan, Huang Yunxiu, Zhang Decai. Zhongshan People's Hospital, Guangzhou 528402, China.

Corresponding author: Wang Weijia, Email: wwj0760@163.com

【Abstract】 Objectives To investigate the effect of β -catenin interacting protein 1 (ICAT) silence in Wnt signaling pathway and sterol drug NSC67657 induced cell differentiation of HL60 cell. **Methods** HL-60 cells were treated with NSC67657, the cell surface antigen CD14 expression was detected by flow cytometry. Lentivirus LV-ICAT-RNAi vector was constructed and infected HL-60 cells. Then the ICAT gene and protein expression were analyzed using real-time qPCR and Western blot technique. Furthermore, Co-immunoprecipitation assay was used to confirm the interaction of β -catenin/ICAT proteins, and Western blot was employed to compare the expressions of Wnt signaling pathway downstream targets Cyclin D1, TCF-1 and c-Jun between Lentivirus LV-ICAT-RNAi vector infected HL-60 (HL-60i) cells and un-infected HL-60 (HL-60v) cells. The cellular differentiation of HL-60i and HL-60v cells treated with NSC67657 for 24 h was evaluated by Wright's staining, transmission electron microscopy and flow cytometry analysis. **Results** HL-60 cells could be induced to differentiate into monocytes by 10 μ mol/L NSC67657. The CD14 positive cells could reach to (92.30 \pm 5.14)% after NSC67657 treatment for 5d. The co-

immunoprecipitation assay demonstrated that ICAT protein did interact with β -catenin protein, and the absorbance of protein electrophoresis bands increased in differentiated cells. The expressions of Wnt signaling pathway downstream target proteins in HL-60i cells were higher than that in HL-60v cells when they were treated by 10 $\mu\text{mol/L}$ NSC67657, but lower than NSC67657 untreated cells. CD14 positive HL-60i cells were significantly lower than that of HL-60v cells [(8.33 \pm 3.14)% vs (19.08 \pm 4.73)%] when treated with NSC67657, but still higher than that of uninfected and untreated HL60 cells [(0.60 \pm 0.03)%] ($F=119.24$, $P=0.010$). The results of cellular morphology and ultrastructure observation were also in accord with that of cell surface antigen analysis. **Conclusions** ICAT does participate in HL-60 cells monocytic differentiation induced by NSC67657, and Wnt/ β -catenin signaling pathway might play a bridge role.

【Key words】 HL-60 cells; β -catenin interacting protein 1; Differentiation; Wnt signaling pathway

Fund program: National Natural Science Foundation of China(81301492)

美国癌症研究所(NCI)2006年报道了一个甾醇类新药(编号:NSC67657)可以高效诱导急性早幼粒细胞白血病细胞系HL-60细胞向单核系分化,但其作用机制尚不清楚^[1]。本课题组前期采用比较蛋白质组学技术对药物诱导HL-60细胞向单核系分化的差异表达蛋白进行筛选,并以HL-60细胞粒系分化为对照,得到单核系分化特异表达差异蛋白 β -catenin相关蛋白1(β -catenin interacting protein 1, ICAT)^[2]。ICAT蛋白是Wnt/ β -catenin信号通路重要调节因子,NSC67657是否通过ICAT影响Wnt信号通路,进而高效诱导HL-60细胞单核系分化还不能确定。本课题组前期还采用质粒电转染技术在HL-60细胞中外源性高表达ICAT蛋白,发现其可以显著影响HL-60细胞对药物作用的敏感性^[3]。本研究中,我们采用慢病毒LV-ICAT-RNAi载体沉默ICAT蛋白表达,分析ICAT蛋白在NSC67657诱导HL-60细胞单核系分化中的作用及其对Wnt信号通路的影响,现报道如下。

材料与方法

1. 细胞系与主要试剂:人急性早幼粒细胞白血病细胞系HL-60细胞购至中国科学院上海生命科学研究细胞库;NSC67657由NCI惠赠;IMDM培养液购自美国Hyclone公司;胎牛血清购自美国Gibco公司。瑞氏染液以及非特异性酯酶染液购自珠海贝索生物技术有限公司;FITC-CD14单抗为北京四正柏生物科技有限公司产品;Real-time qPCR试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司;兔抗人ICAT抗体、 β -catenin抗体购自美国Abcam公司;兔抗人 β -Tubulin、TCF-1、cyclin D1、c-Jun抗体购自美国Santa Cruz公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

2. NSC67657诱导HL-60细胞分化及验证:取对数生长期的HL-60细胞,用含10%胎牛血清的IMDM培养液调整细胞密度为 $1\times 10^5/\text{ml}$,加入10 $\mu\text{mol/L}$ 的NSC67657作用1~5 d后收集,PBS洗涤3次,调整细胞密度为 $1\times 10^6/\text{ml}$ 。采用FITC标记的抗CD14及对照抗体,上流式细胞仪检测CD14的表达情况。

3. 慢病毒LV-ICAT-RNAi载体构建及感染后验证:慢病毒载体(GV248, hU6-MCS-Ubiquitin-EGFP-IRES-puromycin)为上海吉凯基因化学技术有限公司产品,干扰目的序列为TCCGGAGGAGATGTACATT,慢病毒LV-ICAT-RNAi载体包装、浓缩及滴度确认由上海吉凯化学技术有限公司提供技术支持。将慢病毒LV-ICAT-RNAi载体感染HL-60细胞(为HL-60i组),设空载慢病毒载体感染的HL-60细胞(HL-60v组)和未感染的HL-60细胞(非感染组)。36 h后收集细胞,提取总RNA,采用荧光实时定量PCR检测ICAT干扰效率。引物序列:正义链:5'-GCGGCACCTTCTACTTCTG-3',反义链:5'-AGCAGCACTCGGACCTTCT-3'。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s共40个循环。利用阳性标准品制成的标准曲线进行定量分析。同样收集各组细胞,用细胞裂解液裂解,提取总蛋白,Bradford法进行蛋白定量。取60 μg 蛋白进行16% SDS-PAGE凝胶电泳,转膜、封闭及加入抗体孵育。化学发光法显色,于Bio-Rad凝胶仪上成像并进行分析。

4. 免疫共沉淀技术验证HL-60细胞中ICAT/ β -catenin二者相互作用:收集对数生长期未经药物处理的HL-60细胞(非处理组)和经过10 $\mu\text{mol/L}$ NSC67657诱导分化72 h的HL-60细胞(NSC67657处理组),加入细胞裂解液和细胞蛋白酶抑制剂

PMSF,待细胞充分裂解后加入8 μg 抗β-catenin抗体,低温孵育过夜,再取100 μl protein A 琼脂糖珠,将protein A 琼脂糖珠加入到上述细胞裂解液中,再次低温缓慢摇晃孵育2~4 h;免疫沉淀反应后,低温离心吸去上清后洗涤;最后加入2×SDS 上样缓冲液,沸水煮5 min,离心后取上清;采用抗ICAT抗体通过Western blot法确定结合蛋白。以非经药物处理结肠癌SW480细胞为阳性对照。

5. ICAT沉默对NSC67657诱导HL-60细胞单核系分化及Wnt信号通路的影响:采用慢病毒LV-ICAT-RNAi载体及空载体分别感染HL-60细胞24 h,离心收集,PBS洗涤,加入10 μmol/L NSC67657处理HL-60i与HL-60v组细胞24 h,离心弃上清,调整细胞密度收集细胞。以未经药物处理未感染的HL-60细胞为非药物处理组。采用光学显微镜、透射电子显微镜观察及流式细胞术检测CD14⁺细胞比例,分析3组细胞形态及细胞分化情况。提取细胞总蛋白,通过电泳、转膜、封闭、孵育二抗,化学发光法显色,于Bio-Rad凝胶仪上成像并进行密度扫描,分析Wnt/β-catenin信号通路下游靶点TCF-1、Cyclin D1和c-Jun蛋白的表达水平。

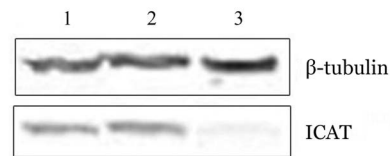
6. 统计学处理:每组设3个复孔,实验重复3次,通过SPSS 11.5软件进行统计分析。正态分布的数据以均数±标准差表示,两组均数间比较使用独立样本的*t*检验,多组间比较使用单因素方差分析,*P* < 0.05为差异具有统计学意义。

结 果

1. NSC67657可诱导HL-60细胞向单核系分化:采用10 μmol/L NSC67657作用HL-60细胞1~5 d,通过细胞表面分化抗原CD14的检测,发现细胞向单核系分化。作用第1~5天CD14⁺细胞比例分别为(18.43±4.46)%、(37.56±3.31)%、(44.71±5.06)%、(86.78±10.24)%、(92.30±5.14)%,随着作用

时间的延长而增加(*F* = 10.73, *P* = 0.010)。

2. 慢病毒LV-ICAT-RNAi载体感染对HL-60细胞ICAT基因和蛋白的表达的影响:采用慢病毒LV-ICAT-RNAi载体感染HL-60细胞36 h后,绿色荧光细胞超过85%(图1)。荧光实时定量PCR结果显示,HL-60i组ICAT基因相对表达量为0.07±0.01,明显低于HL-60v组的1.00±0.08(*t* = 21.24, *P* = 0.002),平均敲减率为93.2%。与基因表达结果一致,HL-60i组ICAT蛋白相对表达量为0.003±0.002,显著低于HL-60v组的0.55±0.18(*t* = 29.24, *P* = 0.001)(图2)。

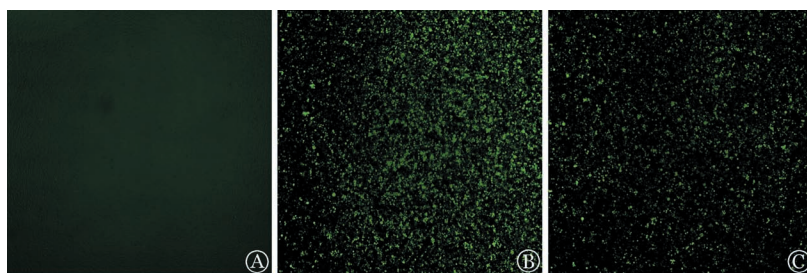


1:非感染HL-60细胞;2:空载慢病毒感染的HL-60细胞;3:慢病毒LV-ICAT-RNAi载体感染的HL-60细胞

图2 Western blot法检测慢病毒LV-ICAT-RNAi载体感染HL-60细胞36 h后ICAT蛋白表达情况

3. HL-60细胞内ICAT蛋白与β-catenin蛋白相互作用检测:我们采用β-catenin一抗包被琼脂糖珠,与之结合的ICAT蛋白被顺利检测,非药物处理组与NSC67657处理组上清中均检测到ICAT蛋白,提示实验样本有ICAT蛋白的表达。免疫共沉淀实验显示NSC67657处理组ICAT蛋白表达水平明显高于非药物处理组(*t* = 9.94, *P* = 0.010),不仅验证了β-catenin/ICAT蛋白存在相互作用,还提示药物处理后ICAT蛋白与β-catenin蛋白相互作用有增强的趋势,如图3所示。

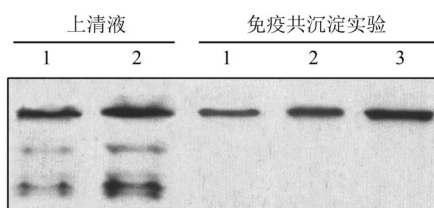
4. HL-60细胞中ICAT沉默对NSC67657诱导细胞分化所引起的Wnt/β-catenin信号通路下游靶蛋白表达的影响:在NSC67657作用下,HL-60i组细胞Wnt/β-catenin信号通路下游靶蛋白cyclin D1、



A:非感染的HL-60细胞;B:空载慢病毒载体感染的HL-60细胞;C:慢病毒LV-ICAT-RNAi载体感染的HL-60细胞

图1 慢病毒LV-ICAT-RNAi载体感染HL-60细胞荧光图

TCF-1、c-Jun 表达水平明显高于非感染组和 HL-60v 组,但低于非药物处理的 HL-60 细胞。药物作用的非感染组和 HL-60v 组靶蛋白表达差异均无统计学意义(P 值均为 0.010)(表 1)。



1: 未经药物处理的 HL-60 细胞; 2: NSC67657 诱导分化的 HL-60 细胞; 3: 非药物处理结肠癌 SW480 细胞

图 3 免疫共沉淀法分析 NSC67657 诱导 HL-60 细胞分化 ICAT/ β -catenin 相互作用

表 1 NSC67657 诱导 HL-60 细胞单核系分化时 ICAT 沉默后 Wnt 信号通路 cyclin D1、TCF-1 及 c-Jun 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	cyclin D1	TCF-1	c-Jun
NSC67657+HL-60i 细胞	0.74±0.09	0.68±0.04	0.39±0.06
NSC67657+HL-60v 细胞	0.38±0.06	0.58±0.09	0.21±0.01
NSC67657+HL-60 细胞	0.41±0.11 ^a	0.43±0.07 ^a	0.25±0.03 ^a
HL-60 细胞	0.89±0.10	0.90±0.12	0.49±0.02
F 值	38.64	42.13	33.37
P 值	0.010	0.010	0.010

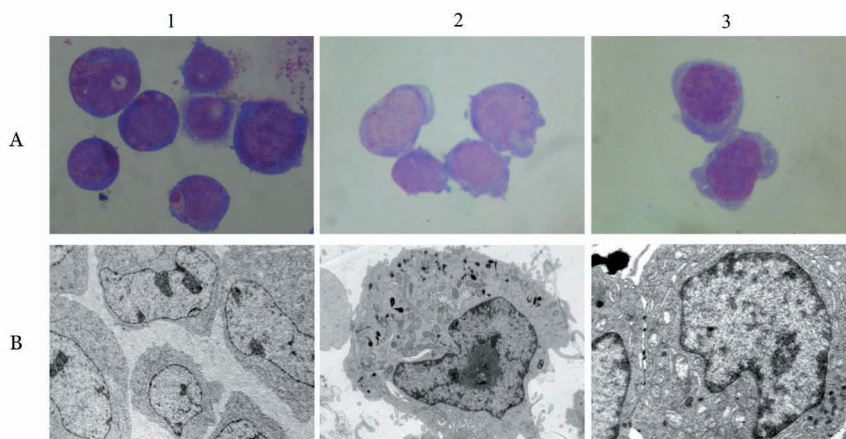
注: HL-60i 细胞: 慢病毒 LV-ICAT-RNAi 载体感染的 HL-60 细胞; HL-60v 细胞: 空载慢病毒感染的 HL-60 细胞。^a两两比较结果显示, 与 NSC67657+HL-60v 细胞组差异无统计学意义

5. ICAT 沉默对 NSC67657 诱导 HL-60 细胞单

核系分化的影响: 10 μ mol/L NSC67657 作用 HL-60i 组及 HL-60v 组 24 h 后, HL-60i 组、HL-60v 组及非药物处理组 CD14⁺ 细胞比例分别为 (8.33±3.14)%、(19.08±4.73)%、(0.60±0.03)%, 组间比较差异有统计学意义 ($F = 119.24, P = 0.010$), 进一步两两比较结果显示, HL-60i 组显著低于 HL-60v 组 ($P = 0.010$), 但高于非药物处理组 ($P = 0.010$), HL-60v 组显著高于非药物处理组 ($P = 0.001$)。细胞形态可见 NSC67657 处理 HL-60i 组细胞核染色质疏松, 核仁明显, 胞质深染且核浆比大, 较 HL-60v 细胞更为幼稚。超微结构观察中, HL-60v 细胞染色质较密集, 线粒体出现肿胀, 个别可见少许颗粒, 已进入分化早期阶段; 而 HL-60i 细胞线粒体、高尔基复合体发达, 多聚核糖体丰富, 染色质均匀, 核膜清晰且核仁明显, 增生仍处活跃状态(图 4)。

讨 论

NSC67657 是 2006 年由 NCI 首次报道的高效单核系分化诱导剂。我们在前期研究中发现 NSC67657 诱导 HL-60 细胞单核系分化中显著上调 ICAT 蛋白的表达^[4]。ICAT 作为 Wnt/ β -catenin 信号通路的重要调节因子, 可以竞争性结合 β -catenin 而抑制其与转录因子 TCF-4 结合, 从而影响 Wnt 信号通路下游癌基因的激活^[5-7], 建立了抗癌药物与肿瘤增殖抑制之间的联系, 但是否 NSC67657 通过 ICAT 蛋白影响 Wnt 信号通路尚不清楚。我们前期采用电转染技术, 在 HL-60 细胞中外源性高表达 ICAT 蛋白, 发现单独高表达 ICAT 不足以诱导 HL-60 细胞向单核系分化, 但能够影响其对药物的敏感性^[4]。本



1: 未经药物处理 HL-60 细胞; 2: NSC67657 处理的空载慢病毒感染的 HL-60 细胞; 3: NSC67657 处理的慢病毒 LV-ICAT-RNAi 载体感染的 HL-60 细胞

图 4 光学(A)和透射电子(B)显微镜观察 ICAT 沉默对 NSC67657 诱导 HL-60 细胞单核系分化的影响(光镜为瑞氏染色, $\times 1\ 000$)

研究我们采用ICAT沉默研究探讨ICAT蛋白是否参与NSC67657诱导HL-60细胞单核系分化。

在本研究中,我们建立了NSC67657诱导HL-60细胞单核系分化模型,并成功构建慢病毒LV-ICAT-RNAi载体,感染HL-60细胞后显著下调了ICAT基因和蛋白表达。并首次证实了HL-60细胞中确实存在ICAT与 β -catenin的相互结合,且在药物诱导下二者结合有增加趋势。鉴于ICAT蛋白在非药物处理HL-60细胞中处于低表达水平,且为了更好地展示ICAT蛋白在Wnt信号通路及药物诱导细胞分化中的作用,我们采用NSC67657作用ICAT沉默HL-60细胞,分析Wnt信号通路下游靶点的表达水平。在ICAT沉默HL-60细胞中,NSC67657作用后的Wnt下游靶蛋白TCF-1、cyclin D1和c-Jun表达明显高于HL-60v细胞,但仍低于非药物处理且非感染的HL-60细胞。以上说明两个问题:第一,由于ICAT蛋白表达抑制,NSC67657不能通过ICAT蛋白竞争性抑制 β -catenin/TCF-4的结合,从而下游靶蛋白表达均有升高趋势;第二,NSC67657可以抑制Wnt信号通路的激活,但ICAT并不是唯一途径,因为药物处理ICAT沉默的HL-60细胞,其Wnt通路下游靶蛋白表达较非药物作用细胞仍处于下降趋势。

不仅如此,本研究结果还显示ICAT沉默减缓了NSC67657诱导HL-60细胞的单核系分化,与前期研究ICAT外源性高表达能够显著上调药物作用效果形成鲜明对比,证实ICAT确实参与了NSC67657诱导HL-60细胞单核系分化进程。但其没有起到关键作用,因为就算抑制了ICAT蛋白,HL-60细胞仍有部分出现分化,只是分化效率大大减低。有趣的是,前期研究中课题组采用Wnt信号通路激活剂和抑制剂分别作用HL-60细胞后,发现单纯Wnt信号通路的激活和抑制仍影响HL-60细胞对NSC67657作用的敏感性,该现象与ICAT外源性高表达及沉默非常类似^[8],提示HL-60细胞对NSC67657作用敏感性方面,Wnt信号通路是非常

重要的。由于信号通路作用机制复杂,药物诱导HL-60细胞单核系分化是否有其他机制的协同作用尚不能确认,需要进一步探讨。但ICAT与Wnt/ β -catenin信号通路确实参与了NSC67657诱导的高效分化过程,提示二者可能成为今后的化疗药物靶点,在提高化疗药物疗效方面发挥作用。

参考文献

- [1] Harris ED, Glover CJ, Adelsberger JW, et al. A sterol mesylate activator of CEBP α signaling induces monocytic differentiation in human leukemia cells in vitro and in vivo [C]. Proc Amer Assoc Cancer Res, 2006, 47: Abstract #461.
- [2] 王伟佳,唐薇,毛小琴,等. 甲磺酸甾醇类药物诱导HL60细胞分化及其蛋白质组表达差异的研究[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(12):1634-1639. DOI: 10.3321/j.issn:1001-1978. 2008. 12.023.
- [3] 王伟佳,唐薇,邱宗荫. ICAT蛋白在HL60细胞向单核系分化前后表达差异的验证及其功能研究[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(1):57-61.
- [4] Wang W, Zhang X, Deng K, et al. ICAT as a potential enhancer of monocytic differentiation: implications from the comparative proteome analysis of the HL60 cell line stimulated by all-trans retinoic acid and NSC67657 [J]. Cell Biochem Funct, 2009, 27(6):329-337. DOI: 10.1002/cbf.1576.
- [5] Tago K, Nakamura T, Nishita M, et al. Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein [J]. Genes Dev, 2000, 14(14):1741-1749.
- [6] Tutter AV, Fryer CJ, Jones KA. Chromatin-specific regulation of LEF-1-beta-catenin transcription activation and inhibition in vitro [J]. Genes Dev, 2001, 15(24):3342-3354. DOI: 10.1101/gad.946501.
- [7] 张广森,王兆一. 吡啶美辛诱导HL-60细胞凋亡过程中伴有 β -catenin/c-myc信号转导途径的抑制[J]. 中华血液学杂志, 2003,24(12):629-631. DOI: 10.3760/j.issn:0253-2727.2003. 12.004.
- [8] 王伟佳,张秀明,张彦,等. 抑制和激活Wnt信号通路对甾醇类新药NSC67657诱导HL-60细胞单核系分化的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2016, 24(2):341-346.

(收稿日期:2017-02-01)

(本文编辑:刘爽)