

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002021

Wnt/ β -catenin/TCF-4 信号通路调节 livin 表达 在肾癌细胞增殖凋亡中的研究

雷雨声, 张俊勇, 田官强, 胡自力, 刘 川

(重庆医科大学附属第二医院泌尿外科, 重庆 400010)

【摘要】目的:研究人肾癌细胞系 786-0 中 Wnt/ β -catenin/TCF-4 通路与 livin 的关系, 探索 Wnt/ β -catenin/TCF-4 通路在肾癌细胞中的凋亡调节机制。**方法:**不同浓度吲哚美辛处理肾癌 786-0 细胞, CCK-8 法检测各组细胞活性; 流式细胞术检测各组细胞凋亡改变; 荧光定量 PCR 检测 β -catenin、TCF-4、caspase-3 及 livin 转录水平变化; Western blot 检测 β -catenin、caspase-3 及 livin 蛋白表达水平变化。**结果:**随吲哚美辛浓度增加, 细胞活力降低, 呈剂量-效应关系 ($P=0.000$)。流式结果显示伴随吲哚美辛浓度升高, 细胞凋亡逐渐增加, 25 $\mu\text{mol/L}$ 组、50 $\mu\text{mol/L}$ 组和 100 $\mu\text{mol/L}$ 组凋亡率分别为 $(32.07 \pm 1.01)\%$ 、 $(40.03 \pm 1.95)\%$ 和 $(72.33 \pm 0.02)\%$, 与对照组比较差异存在统计学意义 ($P=0.000$, $P=0.002$, $P=0.000$)。Real-time PCR 结果显示, β -catenin、TCF-4 和 livin 相对表达水平均呈下降趋势 ($P=0.002$, $P=0.000$, $P=0.000$), 而 caspase-3 相对表达呈明显上升趋势 ($P=0.001$)。Western blot 分析显示在 25 $\mu\text{mol/L}$ 组、50 $\mu\text{mol/L}$ 组和 100 $\mu\text{mol/L}$ 组中 β -catenin 相对表达量分别为 0.568 ± 0.020 ($P=0.001$)、 0.396 ± 0.030 ($P=0.000$)、 0.142 ± 0.038 ($P=0.000$); livin 相对表达量分别为 0.139 ± 0.016 ($P=0.005$)、 0.050 ± 0.006 ($P=0.000$)、 0.011 ± 0.001 ($P=0.000$); 而 caspase-3 相对表达量分别为 0.278 ± 0.035 ($P=0.046$)、 0.396 ± 0.071 ($P=0.000$)、 0.518 ± 0.015 ($P=0.000$)。**结论:**吲哚美辛介导的肾癌细胞中 β -catenin/TCF-4 降解可能导致 livin 的转录抑制和 caspase-3 表达水平的上调, 进而诱导肾癌细胞凋亡。

【关键词】Wnt/ β -catenin/TCF-4 通路; livin; 786-0 细胞; 细胞凋亡; 吲哚美辛; 肾癌

【中图分类号】R737.11

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-12-24

Role of the Wnt/ β -catenin/TCF-4 signaling pathway in the regulation of livin expression in proliferation and apoptosis of renal cancer cells

Lei Yusheng, Zhang Junyong, Tian Guanqiang, Hu Zili, Liu Chuan

(Department of Urinary Surgery, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the relationship between the Wnt/ β -catenin/TCF-4 pathway and livin expression in human renal cancer cell line 786-0, and to explore the apoptosis regulation mechanism of this pathway. **Methods:** 786-0 cells were treated with different concentrations of indomethacin. Cell viability was then determined by CCK-8 assay. Flow cytometry was used to determine apoptosis change. The transcriptional changes of β -catenin, TCF-4, caspase-3, and livin were measured by quantitative real-time PCR, while the expression levels of β -catenin, caspase-3, and livin were measured by Western blot. **Results:** With the increase in the concentration of indomethacin, the cell viability decreased in a dose-response manner ($P=0.000$). Flow cytometry showed that the apoptosis rate increased with the increase in the concentration of indomethacin. The apoptosis rates of the 25 $\mu\text{mol/L}$ group, 50 $\mu\text{mol/L}$ group, and 100 $\mu\text{mol/L}$ group were $(32.07 \pm 1.01)\%$, $(40.03 \pm 1.95)\%$, and $(72.33 \pm 0.02)\%$, respectively, all showing significant differences compared with those of the control group ($P=0.000$, 0.002 , and 0.000 , respectively). Real-time PCR showed that the relative expression levels of β -catenin, TCF-4, and livin decreased significantly ($P=0.002$, 0.000 , and 0.000 , respectively), while the level of caspase-3 increased significantly ($P=0.001$). Western blot revealed that, in the 25 $\mu\text{mol/L}$ group, 50 $\mu\text{mol/L}$ group, and 100 $\mu\text{mol/L}$ group, the relative expression levels of β -catenin were 0.568 ± 0.020 ($P=0.001$), 0.396 ± 0.030 ($P=0.000$), and 0.142 ± 0.038 ($P=0.000$), respectively; the levels of livin were 0.139 ± 0.016 ($P=0.005$), 0.050 ± 0.006 ($P=0.000$), and 0.011 ± 0.001 ($P=0.000$), respectively; and the levels of caspase-3 were 0.278 ± 0.035 ($P=0.046$), 0.396 ± 0.071 ($P=0.000$), and 0.518 ± 0.015 ($P=0.000$),

respectively. **Conclusion:** Indomethacin-mediated degradation of β -catenin/TCF-4 in renal cancer cells may lead to the transcriptional repression of livin and the up-regulation of caspase-3 expression, thereby inducing apoptosis of renal cancer cells.

【Key words】Wnt/ β -catenin/TCF-4 signaling pathway; livin; 786-0 cells; cell apoptosis; indomethacin; renal cancer

作者介绍:雷雨声, Email: 243932374@qq.com,

研究方向: 泌尿系肿瘤及结石的研究和治疗。

通信作者:刘 川, Email: liuchuan100@126.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (编号: 81803057); 重庆市科委资助项目 (编号: cstc2013jcyjA10080); 重庆市卫计委资助项目 (编号: 2011-2-164)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20190315.1622.006.html>

(2019-03-18)

Livin 是凋亡抑制蛋白(inhibitors of apoptosis proteins,IAPs)家族成员之一,在正常成人组织中均不表达,但在一些肿瘤如肾癌、淋巴瘤细胞系中呈高表达。研究发现 livin 高表达与肿瘤细胞凋亡障碍有关,但目前 livin 在肾癌中的表达调控机制尚不明确。Livin 含有 IAP 家族成员特有的 BIR 和 RING 指结构域,其锌指结构能与半胱天冬酶蛋白(caspase)结合,阻止 caspase 在细胞凋亡时执行蛋白切除功能,进而减少细胞凋亡^[1]。课题组前期研究发现,livin 反义寡核苷酸通过下调 caspase-3 表达可显著抑制肿瘤细胞增殖并诱导细胞凋亡^[2]。同时,研究报道 livin 与其家族成员 survivin 一样,在其启动子区域-1476/-1470 存在 TCF-4 的结合位点,理论上可与 TCF-4 结合,从而触发 livin 表达的变化^[3]。

Wnt/ β -catenin/TCF-4 信号通路在细胞分化、增殖和凋亡等生理过程中,以及在细胞癌变、肿瘤侵袭等病理过程中均发挥了重要调控作用,是肾癌细胞凋亡调控机制中最重要的信号通路之一^[4-6]。 β -catenin 是 Wnt 通路的枢纽蛋白,通过与 TCF 形成复合物,激活与肿瘤进展相关的基因转录^[7]。目前,人们主要关注 Wnt/ β -catenin 及其靶基因如 c-myc、COX-2、VEGF 和 c-Met 等在肿瘤发生发展中的作用,而 Wnt 通路与 livin 在肾癌中的关系还未见报道^[8]。吲哚美辛是一种经典的非甾体抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs,NSAIDs)。研究者推测 NSAIDs 抗肿瘤的主要机制包括 COX-2 依赖性和非依赖性机制^[9-10]。Wnt/ β -catenin 通路是 COX-2 非依赖性机制,在确定 NSAIDs 抗肿瘤作用中可能起重要作用^[11]。因此,本实验通过使用外源性吲哚美辛干预 Wnt/ β -catenin/TCF-4 通路^[12],观察细胞凋亡的改变,并在此基础上探讨 Wnt/ β -catenin/TCF-4 通路与 livin 的关系。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

人肾透明细胞腺癌细胞 786-0,购于上海中国科学院细

胞库。RPMI 1640 细胞培养基和胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)购自美国 Gibco 公司。吲哚美辛(indomethacin)为中国上海源叶生物科技公司产品;CCK-8 试剂盒购于美国 Sigma 公司,流式试剂盒购于美国 BD 公司; β -Catenin、Caspase-3 和 livin 一抗均购于美国 CST 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 细胞在含 10%胎牛血清的 RPMI1640 细胞培养基中,于 37℃,5% CO₂ 培养箱中常规培养。每 2~3 d 消化传代 1 次。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞存活率 取生长状态良好的 786-0 细胞,计数调整细胞浓度至 1×10^5 个/mL,以每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中。于 37℃,5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h 后换液,加入吲哚美辛,使其终浓度分别为 25、50、100 μ mol/L,并设立不加药的对照组和不含细胞的空白组。将 96 孔板移入培养箱中分别培养 12、24 和 48 h 后取出培养板,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,于培养箱内继续孵育 4 h,用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度值。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 取对数生长期细胞,接种于 6 孔板中培养,待细胞生长达到 70%融合后加入上述浓度梯度吲哚美辛继续培养 24 h,收集所有细胞,根据 Annexin V-PE/7-AAD 流式试剂盒说明,流式细胞仪检测 786-0 细胞凋亡。以加入吲哚美辛浓度 0 μ mol/L 组为对照组。以 PE 和 7-AAD 荧光作双参数点图,将细胞分为 4 个区,Q₁区:机械损伤细胞(Annexin V-PE-/7-AAD+);Q₂区:坏死或凋亡晚期细胞(Annexin V-PE+/7-AAD+);Q₃区:早期凋亡细胞(Annexin V-PE+/7-AAD-);Q₄区:活细胞(Annexin V-PE-/7-AAD-)。

1.2.4 荧光定量 PCR 检测 mRNA 表达 收集吲哚美辛处理 24 h 后的 786-0 细胞,用 TRIzol 抽提细胞总 RNA,逆转录为 cDNA,以其为模板进行 PCR 检测。特异性扩增引物见表 1。以人源 β -actin 为内参,分别检测各组细胞 β -catenin、TCF-4、caspase-3 及 livin mRNA 的表达。PCR 扩增条件为:94℃预变性 4 min,94℃变性 20 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共循环 35 次,72℃检测信号。反应结束后建立标准曲线,计算 CT 值。

1.2.5 Western blot 检测蛋白表达 收集吲哚美辛处理后的细胞,根据说明书操作分别提取总蛋白。取 50 μ g 细胞蛋白提取液,用 10%分离胶分离 caspase-3、livin 和内参蛋白,8%分离胶分离 β -catenin 蛋白,通过半干转膜仪将目的蛋白转移到 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶封闭液室温封闭 2 h,加入兔

表 1 PCR 引物列表

基因	上游序列(5'-3')	下游序列(5'-3')	扩增长度(bp)
β -catenin	CGTTTGGCTGAACCATCACA	CCTGGTCCTCGTCATTAGCA	127
livin	GGGACCCGTGGGAAGAAC	GGCACTTTCAGACTGGACCTC	110
caspase-3	AGAACTGGACTGTGGCATTGAG	GCACAAAGCGACTGGATGAA	165
TCF-4	GTCTGGGCTCAGGCTATGG	CAGGTCAGGGGAAGTCGC	167
β -actin	TGACGTGGACATCCGCAAAG	CTGGAAGGTGACAGCGAGG	205

抗人 β -catenin (1:1 000)、caspase-3 (1:1 000)、livin (1:500) 4 ℃ 孵育过夜。次日经 PBST 洗涤 3 次后加入山羊抗兔二抗 (1:2 000), 室温孵育 1.5 h, TBST 洗涤 4 次后用 ECL 进行显影, Labworks™ Analysis Software 软件分析其相对灰度。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件进行结果分析。数据采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 post-hoc LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 吡啶美辛抑制肾癌 786-0 细胞活力

镜下观察到, 在 25 $\mu\text{mol/L}$ 吡啶美辛干预 12~24 h 后, 细胞出现明显凋亡, 48 h 后细胞活力逐渐恢复 (图 1)。CCK-8 结果显示, 不同浓度吡啶美辛处理细胞后, 细胞活力较对照组明显降低, 且吡啶美辛浓度越高, 细胞活力越低。不同浓度组间有明显差异 ($F=578.407, P=0.000$), 不同时间细胞活力存在统计学差异 ($F=148.373, P=0.000$), 组间和时间点有交互作用 ($F=63.657, P=0.000$)。各时间点上, 组间比较采用 LSD-*t* 检验, 结果采用 Bonferroni 校正。12 h 时细胞活力各组间存在统计学差异 ($F=14.617, P=0.000$), 50 $\mu\text{mol/L}$ 组和 100 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组进行 LSD-*t* 检验, 组间差异有统计学意义 ($P=0.007, P=0.000$)。24 h 时细胞活力各组间存在统计学差异 ($F=$

605.959, $P=0.000$), 25 $\mu\text{mol/L}$ 组、50 $\mu\text{mol/L}$ 组和 100 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组进行 LSD-*t* 检验, 组间差异有统计学意义 ($P=0.001, P=0.000, P=0.000$)。48 h 时细胞活力各组间存在显著差异 ($F=1342.454, P=0.000$), 各处理组与对照组进行 LSD-*t* 组间差异均有统计学意义 ($P=0.000$)。据图 1 和表 2 结果, 在 24 h 时可观察到显著抑制效果, 因此选择 24 h 为后续检查点。

表 2 不同浓度吡啶美辛对 786-0 细胞活力的影响
(A 值, $\bar{x} \pm s, n=5$)

分组	12 h	24 h	48 h
对照组	1.487 $\pm$ 0.082	1.568 $\pm$ 0.041	1.667 $\pm$ 0.021
25 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.416 $\pm$ 0.070	1.473 $\pm$ 0.025 ^c	1.209 $\pm$ 0.032 ^b
50 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.322 $\pm$ 0.042 ^a	1.020 $\pm$ 0.041 ^{bd}	0.820 $\pm$ 0.038 ^{bd}
100 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.158 $\pm$ 0.120 ^{ab}	0.746 $\pm$ 0.031 ^{bf}	0.485 $\pm$ 0.031 ^{bf}

注: $F_{\text{组别}}=578.407, P_{\text{组别}}=0.000; F_{\text{时间}}=148.373, P_{\text{时间}}=0.000; F_{\text{组别} \times \text{时间}}=63.657, P_{\text{组别} \times \text{时间}}=0.000$; 与对照组比较, a: $P=0.007$; b: $P=0.000$; c: $P=0.001$; 与 25 $\mu\text{mol/L}$ 组比较: d: $P=0.000$; 与 50 $\mu\text{mol/L}$ 组比较: e: $P=0.006$; f: $P=0.000$

2.2 吡啶美辛诱导肾癌 786-0 细胞凋亡

在流式散点图中, 对照组 786-0 细胞主要分布在 Q_4 象限内, 细胞凋亡率为 (4.09 $\pm$ 0.37)%, 仅极少数分布在 Q_1 象限内, 表示机械性死亡细胞数量非常少 (<1%)。随着吡啶美辛浓度的增加, Q_2 和 Q_3 象限凋亡细胞数量逐渐增加, 25 $\mu\text{mol/L}$ 组凋亡率为 (32.07 $\pm$ 1.01)%, 而 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组在 Q_2 象限中的晚期凋亡细胞数量增加更加明显, 凋亡率分别为 (40.03 $\pm$ 1.95)% 和 (72.33 $\pm$ 0.02)%, 对照组与各组差异均存在统计学意义 ($P=0.000, P=0.002, P=0.000$) (图 2)。

2.3 荧光定量 PCR 检测 mRNA 表达结果

吡啶美辛干预 24 h 后, real-time PCR 结果显示 β -catenin、TCF-4 和 livin 的 mRNA 相对表达水平均呈下降趋势, 而 caspase-3 mRNA 相对表达呈明显上升趋势 (表 3)。 β -catenin mRNA 表达在各组间存在统计学差异 ($F=13.536, P=0.002$), 25 $\mu\text{mol/L}$ 组、50 $\mu\text{mol/L}$ 组、100 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组进行 LSD-*t* 检验, 组间差异有统计学意义 ($P=0.026, P=0.003, P=0.000$)。TCF-4 mRNA 表达各组间存在统计学差异 ($F=28.920, P=0.000$), 25 $\mu\text{mol/L}$ 组、50 $\mu\text{mol/L}$ 组、100 $\mu\text{mol/L}$ 组

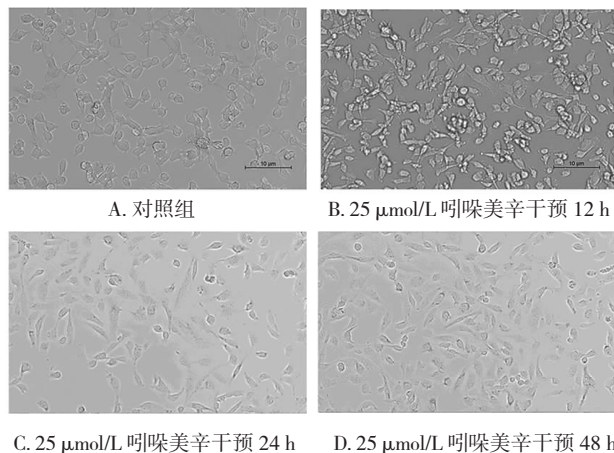


图 1 显微镜下观察 25 $\mu\text{mol/L}$ 吡啶美辛干预 12~48 h 后细胞形态

表 3 Real-time PCR 检测各组 β -catenin、livin、caspase-3、TCF-4 转录相对表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	β -catenin	TCF-4	caspase-3	livin
对照组	0.122 $\pm$ 0.026	0.016 $\pm$ 0.002	0.047 $\pm$ 0.013	0.137 $\pm$ 0.010
25 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.087 $\pm$ 0.011 ^a	0.013 $\pm$ 0.002 ^d	0.090 $\pm$ 0.076 ^e	0.109 $\pm$ 0.014 ^g
50 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.067 $\pm$ 0.011 ^b	0.008 $\pm$ 0.002 ^{ab}	0.138 $\pm$ 0.036 ^f	0.078 $\pm$ 0.012 ^{cm}
100 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.042 $\pm$ 0.009 ^{ab}	0.005 $\pm$ 0.001 ^{ab}	0.161 $\pm$ 0.018 ^k	0.056 $\pm$ 0.011 ^{cm}
<i>F</i> 值	13.536	28.920	16.872	27.321
<i>P</i> 值	0.002	0.000	0.001	0.000

注: 与对照组比较, a: $P=0.026$; b: $P=0.003$; c: $P=0.000$; d: $P=0.030$; e: $P=0.042$; f: $P=0.001$; g: $P=0.020$; 与 25 $\mu\text{mol/L}$ 组比较: h: $P=0.009$; i: $P=0.000$; j: $P=0.025$; k: $P=0.003$; m: $P=0.011$; n: $P=0.001$; 与 50 $\mu\text{mol/L}$ 组比较: o: $P=0.006$

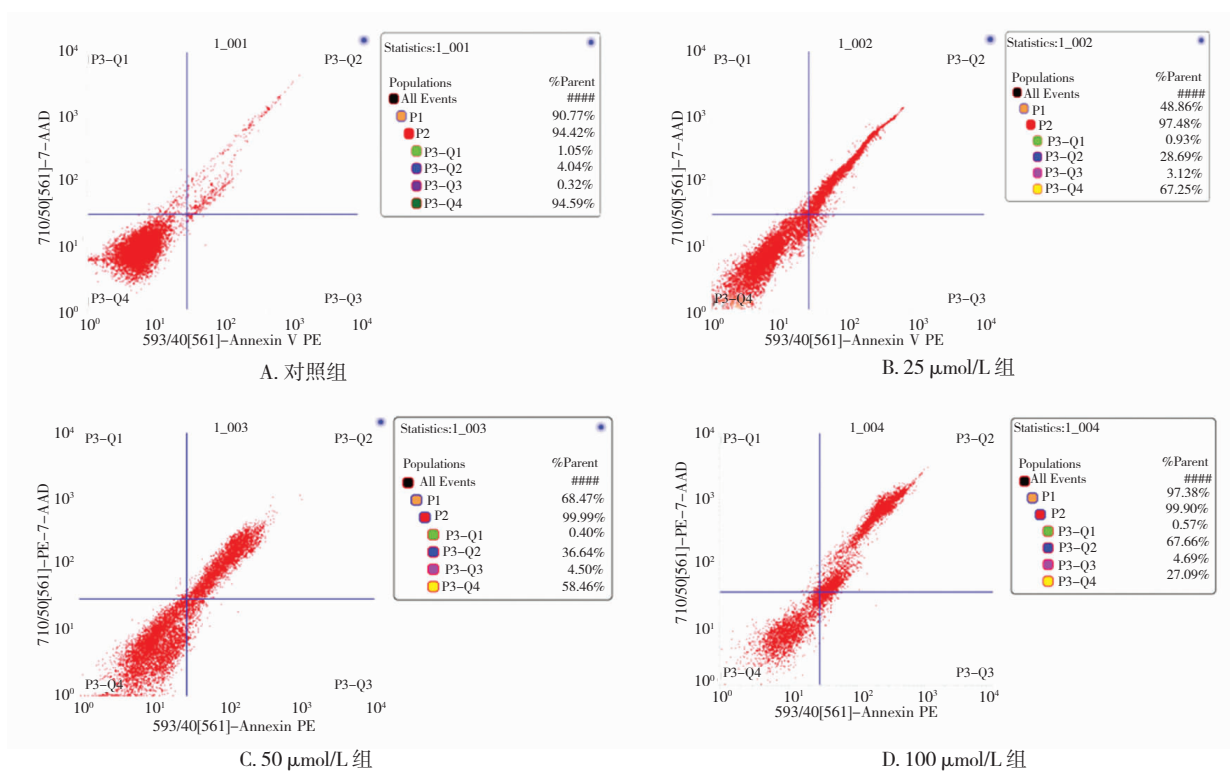


图2 流式细胞术检测各处理组细胞凋亡

与对照组进行 LSD-*t* 检验,组间差异有统计学意义($P=0.030$, $P=0.000$, $P=0.000$)。Caspase-3 mRNA 表达各组间存在统计学差异($F=16.872$, $P=0.000$), 25 $\mu\text{mol/L}$ 组、50 $\mu\text{mol/L}$ 组、100 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组进行 LSD-*t* 检验,组间差异有统计学意义($P=0.042$, $P=0.001$, $P=0.000$)。Livin mRNA 表达各组间存在统计学差异($F=27.321$, $P=0.000$), 25 $\mu\text{mol/L}$ 组、50 $\mu\text{mol/L}$ 组、100 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组进行 LSD-*t* 检验,组间差异有统计学意义($P=0.020$, $P=0.000$, $P=0.000$)。结果表明吡咯美辛可能通过抑制 β -catenin/TCF-4, 上调 caspase-3 的表达, 并下调 livin 在细胞凋亡中的转录表达。

2.4 Western blot 检测蛋白表达结果

免疫印迹结果显示对照组 livin 蛋白表达最低, β -catenin 和 caspase-3 蛋白表达最高。伴随吡咯美辛浓度增加, caspase-3 表达逐渐升高, 而 β -catenin 和 livin 的蛋白表达显著降低(图 3, 表 4)。 β -catenin 蛋白表达各组存在统计学差异($F=204.163$, $P=0.000$), 25 $\mu\text{mol/L}$ 组、50 $\mu\text{mol/L}$ 组、100 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组进行 LSD-*t* 检验, 组间差异有统计学意义($P=0.001$, $P=0.000$, $P=0.000$)。Livin 蛋白表达各组间存在统计学差异($F=120.828$, $P=0.000$), 25 $\mu\text{mol/L}$ 组、50 $\mu\text{mol/L}$ 组、100 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组进行 LSD-*t* 检验, 组间差异有统计学意义($P=0.005$, $P=0.000$, $P=0.000$)。Caspase-3 蛋白表达各组间存在统计学差异($F=33.546$, $P=0.000$), 25 $\mu\text{mol/L}$ 组、50 $\mu\text{mol/L}$ 组、100 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组进行 LSD-*t* 检验, 组间差异有统计学意义($P=0.046$, $P=0.000$, $P=0.000$)。这些结果表明吡咯美辛可能通过抑制 Wnt 通路, 下调 livin 蛋白的表达, 这与 PCR 中的结果一致。

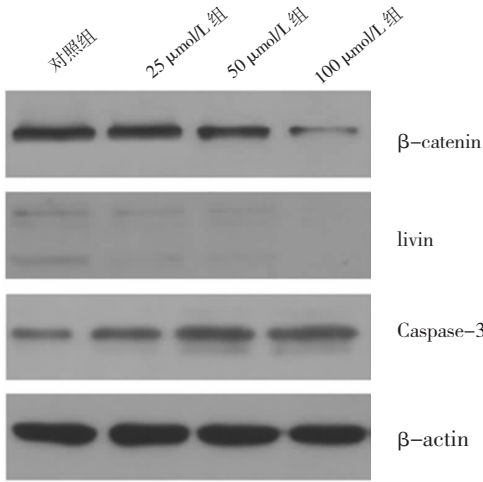


图3 吡咯美辛干预后 β -catenin、livin、caspase-3 蛋白电泳图

表4 各组处理后 β -catenin、livin、caspase-3 相对表达水平变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	β -catenin	livin	caspase-3
对照组	0.683 ± 0.023	0.177 ± 0.017	0.198 ± 0.021
25 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.568 ± 0.020^a	0.139 ± 0.016^c	0.278 ± 0.035^d
50 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.396 ± 0.030^{bc}	0.050 ± 0.006^{bc}	0.396 ± 0.071^{ef}
100 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.142 ± 0.038^{bcg}	0.011 ± 0.001^{beh}	0.518 ± 0.015^{hi}
<i>F</i> 值	204.163	120.828	33.546
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

注: 与对照组比较, a: $P=0.001$; b: $P=0.000$; c: $P=0.005$; d: $P=0.046$; 与 25 $\mu\text{mol/L}$ 组比较: e: $P=0.000$; f: $P=0.009$; 与 50 $\mu\text{mol/L}$ 组比较: g: $P=0.000$; h: $P=0.004$; i: $P=0.007$

3 讨论

凋亡抑制基因 livin 在细胞凋亡中具有关键作用,参与多种因素诱导的细胞凋亡。Livin 在正常成人组织中几乎不表达,但在膀胱癌^[13]、骨肉瘤^[14]、肾癌^[15]、乳腺癌^[16]、肺癌^[17]和直肠癌^[18]等组织中高表达。据报道,下调 livin 表达可增加肿瘤细胞凋亡率,抑制肿瘤的生长潜能,并提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[19-20]。目前, livin 已经在肾癌肿瘤组织及肿瘤细胞系中被检测到,靶向抑制 livin 可显著增强肾癌细胞对不同促凋亡刺激物如紫外线、化疗药物或足叶乙苷的敏感性^[21]。而在本课题组前期研究中发现, livin 反义寡核苷酸可以通过 caspase-3 途径显著抑制肿瘤细胞增殖并诱导细胞凋亡^[2]。这些发现强调了 livin 在细胞凋亡抵抗中的重要作用,对 livin 的研究可能为肾癌基因治疗开辟新的靶点。

Wnt 信号通路在肿瘤发生发展中的主要机制之一是通过激活 β -catenin/TCF 复合物抑制细胞凋亡^[22]。最近研究报道 Wnt/ β -catenin 信号通路的组成性激活促进了肾癌细胞的过度增殖^[23]。同时,高度激活 Wnt 通路的肾癌临床病例显示出更显著的临床特征,如更大的肿瘤直径、更多的血管浸润和更晚的疾病分期^[24-25]。尤其是内源性 Wnt 拮抗剂的功能丧失和 β -catenin 的过度激活与肾癌发生发展密切相关^[26]。另外,研究报道 Wnt 抑制因子 1(WIF1)在肾癌细胞系中的表达显著下调^[27-28]。更有趣的是,研究发现 Wnt 信号转导异常导致的 TCF-4 剪接异构体改变可以通过激活凋亡途径显著抑制肾癌进展^[29]。这些研究强调了 Wnt/ β -catenin/TCF-4 通路在肾癌发生发展中的重要作用。但目前 livin 与 Wnt/ β -catenin/TCF-4 通路的关系尚不清楚。Wang 等^[30]报道了在 Wnt/ β -catenin 信号通路中,通过激活关键因子 β -catenin 可以显著增加 livin 启动子活性,并且其活性可以被 TCF 显性负性突变体(dominant negative TCF, dnTCF)所阻断。Yuan 等^[3]在对肺癌的研究中将氯化锂(Wnt/ β -catenin 通路激活剂)处理肺癌细胞株 A549 和 103H 后发现,伴随 β -catenin 表达增强, livin 转录活性增加,认为在肺癌细胞中 Wnt/ β -catenin/TCF 信号通路可能调控 livin 的表达。更进一步的研究发现, livin 在其启动子区域-1476/-1470 存在 TCF-4 结合位点,理论上 TCF-4 可与 livin 结合,从而触发 livin 表达的变化。根据上述

发现,推测通过抑制 Wnt/ β -catenin/TCF-4 通路可能下调 livin 的表达,最终促进肾癌细胞凋亡。

在 Wnt 信号通路的抑制剂中,最常使用的是非甾体类抗炎药(如吲哚美辛),因其具有较强的抑制 β -catenin 表达和干扰 β -catenin/TCF 复合物转录活性的功能^[31]。据报道,吲哚美辛通过 COX-2 非依赖性机制抑制 Wnt/ β -catenin 信号传导^[9-10],并认为此机制在确定非甾体抗炎药的抗肿瘤作用中可能具有重要意义^[11]。Nagaraj 等^[32]在其研究中揭示了吲哚美辛在卵巢癌治疗中的辅助作用,并发现抗性卵巢癌细胞、卵巢癌干细胞和 β -catenin 的下调是由于吲哚美辛在顺铂耐药细胞中的驱动作用。Zheng 等^[33]研究显示,吲哚美辛可能通过 Wnt/ β -catenin 途径抑制视网膜母细胞瘤 Y79 细胞的增殖并诱导其凋亡。越来越多的研究显示,吲哚美辛具有潜在的抗肿瘤作用。

在本研究中,通过使用外源性吲哚美辛干预肾癌细胞系 786-0 细胞发现,伴随 β -catenin、TCF-4 表达水平降低,下调 livin 转录并上调 caspase-3 转录水平,最终导致肾癌细胞凋亡。免疫印迹结果与 real-time PCR 结果一致。这些结果提示吲哚美辛介导的肾癌细胞凋亡可能与 Wnt/ β -catenin/TCF-4 信号通路中 β -catenin/TCF-4 的降解有关,从而引起 livin 转录水平的抑制,继而显著增强 caspase-3 的活性,最终促进细胞凋亡。因此, Wnt/ β -catenin/TCF-4 通路调控肾癌细胞凋亡的可能机制如下:异常的 Wnt 信号激活 β -catenin/TCF-4 的表达,上调 livin 的转录,从而抑制 caspase-3 的活性或拮抗其功能。最后,细胞凋亡受到抑制,最终导致肾癌的发生和发展。但吲哚美辛对肾癌的潜在抗肿瘤作用及其机制仍需进一步研究。

综上所述, β -catenin/TCF-4 的降解可能导致 livin 的转录抑制和 caspase-3 表达的上调,进而诱导肾癌细胞的凋亡。此外,吲哚美辛通过抑制 Wnt/ β -catenin/TCF-4 通路表现出对肾癌的潜在抗肿瘤作用,可能是未来肾癌基因治疗的有效手段。

参考文献

- [1] Jaquith JB. Targeting the inhibitor of apoptosis protein BIR3 binding domains [J]. Pharm Pat Anal, 2014, 3(3): 297-312.
- [2] Liu C, Wu X, Luo C, et al. Antisense oligonucleotide targeting Livin induces apoptosis of human bladder cancer cell via a mechanism

- involving caspase 3[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29: 63.
- [3] Yuan D, Liu L, Gu D. Transcriptional regulation of livin by beta-catenin/TCF signaling in human lung cancer cell lines[J]. *Mol Cell Biochem*, 2007, 306(1-2): 171-178.
- [4] Cojocaru E, Lozaneanu L, Giusca SE, et al. Renal carcinogenesis—insights into signaling pathways[J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2015, 56(1): 15-19.
- [5] Tai D, Wells K, Arcaroli J, et al. Targeting the WNT signaling pathway in cancer therapeutics[J]. *Oncologist*, 2015, 20(10): 1189-1198.
- [6] Sareddy GR, Geeviman K, Panigrahi M, et al. Increased beta-catenin/Tcf signaling in pilocytic astrocytomas: a comparative study to distinguish pilocytic astrocytomas from low-grade diffuse astrocytomas[J]. *Neurochem Res*, 2012, 37(1): 96-104.
- [7] Rosenbluh J, Wang X, Hahn WC. Genomic insights into WNT/beta-catenin signaling [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2014, 35(2): 103-109.
- [8] Ying Y, Tao Q. Epigenetic disruption of the WNT/beta-catenin signaling pathway in human cancers[J]. *Epigenetics*, 2009, 4(5): 307-312.
- [9] Kassab SE, Khedr MA, Ali HI, et al. Discovery of new indomethacin-based analogs with potentially selective cyclooxygenase-2 inhibition and observed diminishing to PGE2 activities[J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 141: 306-321.
- [10] Sever B, Altintop MD, Kus G, et al. Indomethacin based new triazolothiadiazine derivatives: synthesis, evaluation of their anticancer effects on T98 human glioma cell line related to COX-2 inhibition and docking studies[J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 113: 179-186.
- [11] Kim HS, Sharma A, Ren WX, et al. COX-2 Inhibition mediated anti-angiogenic activatable prodrug potentiates cancer therapy in pre-clinical models[J]. *Biomaterials*, 2018, 185: 63-72.
- [12] Liu Z, Hu J, Huang Z, et al. Effect of indomethacin on BCR/ABL-Wnt/beta-catenin pathway in K562 cells[J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2015, 35(7): 998-1002.
- [13] Yin L, Liu S, Li C, et al. CYLD downregulates Livin and synergistically improves gemcitabine chemosensitivity and decreases migratory/invasive potential in bladder cancer; the effect is autophagy-associated[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(9): 12731-12742.
- [14] Li CJ, Cong Y, Liu XZ, et al. Research progress on the livin gene and osteosarcomas[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(20): 8577-8579.
- [15] Cheng T, Zhang JG, Cheng YH, et al. Relationship between PTEN and Livin expression and malignancy of renal cell carcinomas[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(6): 2681-2685.
- [16] Han Y, Zhang L, Wang W, et al. Livin promotes the progression and metastasis of breast cancer through the regulation of epithelial-mesenchymal transition via the p38/GSK3beta pathway[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(6): 3574-3582.
- [17] Liu GH, Wang WL, Wang C, et al. Livin modulates the apoptotic effects of vesicular stomatitis virus in lung adenocarcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2015, 47(5): 1775-1782.
- [18] Su QB, Wang LY, Wei GN, et al. Livin serves as a prognostic marker for mid-distal rectal cancer and a target of mid-distal rectal cancer treatment[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(6): 7759-7766.
- [19] Yoon TM, Kim SA, Lee DH, et al. Livin enhances chemoresistance in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(6): 3667-3673.
- [20] Wang Z, Liu S, Ding K, et al. Silencing Livin induces apoptotic and autophagic cell death, increasing chemotherapeutic sensitivity to cisplatin of renal carcinoma cells[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(11): 15133-15143.
- [21] Crnkovic-Mertens I, Wagener N, Semzow J, et al. Targeted inhibition of Livin resensitizes renal cancer cells towards apoptosis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64(9): 1137-1144.
- [22] Leal LF, Bueno AC, Gomes DC, et al. Inhibition of the Tcf/beta-catenin complex increases apoptosis and impairs adrenocortical tumor cell proliferation and adrenal steroidogenesis[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(40): 43016-43032.
- [23] Stewart DJ, Chang DW, Ye Y, et al. Wnt signaling pathway pharmacogenetics in non-small cell lung cancer[J]. *Pharmacogenomics J*, 2014, 14(6): 509-522.
- [24] Joosten SC, Smits KM, Aarts MJ, et al. Epigenetics in renal cell cancer: mechanisms and clinical applications[J]. *Nat Rev Urol*, 2018, 15(7): 430-451.
- [25] Gao ZH, Lu C, Wang MX, et al. Differential beta-catenin expression levels are associated with morphological features and prognosis of colorectal cancer[J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(5): 2069-2076.
- [26] VON Schulz-Hausmann SA, Schmeel LC, Schmeel FC, et al. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in renal cell carcinoma[J]. *Anti-cancer Res*, 2014, 34(8): 4101-4108.
- [27] Kawakami K, Hirata H, Yamamura S, et al. Functional significance of Wnt inhibitory factor-1 gene in kidney cancer[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(22): 8603-8610.
- [28] Kawamoto K, Hirata H, Kikuno N, et al. DNA methylation and histone modifications cause silencing of Wnt antagonist gene in human renal cell carcinoma cell lines[J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(3): 535-542.
- [29] Wallmen B, Schrempf M, Hecht A. Intrinsic properties of Tcf1 and Tcf4 splice variants determine cell-type-specific Wnt/beta-catenin target gene expression[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(19): 9455-9469.
- [30] Wang L, Zhang Q, Liu B, et al. Challenge and promise: roles for Livin in progression and therapy of cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(12): 3661-3669.
- [31] Dihlmann S, Siermann A, Von Knebel Doeberitz M. The non-steroidal anti-inflammatory drugs aspirin and indomethacin attenuate beta-catenin/TCF-4 signaling[J]. *Oncogene*, 2001, 20(5): 645-653.
- [32] Nagaraj AB, Wang QQ, Joseph P, et al. Using a novel computational drug-repositioning approach (DrugPredict) to rapidly identify potent drug candidates for cancer treatment[J]. *Oncogene*, 2018, 37(3): 403-414.
- [33] Zheng Q, Zhang Y, Ren Y, et al. Antiproliferative and apoptotic effects of indomethacin on human retinoblastoma cell line Y79 and the involvement of beta-catenin, nuclear factor-kappaB and Akt signaling pathways[J]. *Ophthalmic Res*, 2014, 51(2): 109-115.