

结直肠癌组织中突变型 Axin2 对 Wnt 信号转导系统的调控及其机制

王凤玮¹, 温玲², 朱思伟¹, 姚 嫱³, 蔡玉梅¹, 马 刚⁴

Mechanism of Wnt Signaling Pathway Regulation

by a Truncated Mutant of Axin2 in Colorectal Cancer

WANG Feng-Wei¹, WEN Ling², ZHU Si-Wei¹, YAO Qiang³, CAI Yu-Mei¹, MA Gang⁴

1. 天津市人民医院

放疗科,

天津 300130

2. 张家港市中医院

妇产科,

江苏 张家港 215600

3. 天津市人民医院

肿瘤科,

天津 300130

4. 天津市人民医院

肛肠科,

天津 300130

1. Department of Radiation

Oncology,

Tianjin People's Hospital,

Tianjin, 300130,

P. R. China

2. Department of Gynecology and

Obstetrics,

Zhangjiagang Traditional Chinese

Medicine Hospital,

Zhangjiagang, Jiangsu, 215600,

P. R. China

3. Department of Oncology,

Tianjin People's Hospital,

Tianjin, 300130,

P. R. China

4. Department of Colorectal

Diseases,

Tianjin People's Hospital,

Tianjin, 300130,

P. R. China

通讯作者: 王凤玮

Correspondence to: WANG Feng-Wei

Tel: 86-22-87729590

E-mail: wfengwei2004@tom.com

收稿日期: 2007-04-24

修回日期: 2007-08-31

[ABSTRACT] BACKGROUND & OBJECTIVE: Axin2 gene which negatively regulates the Wnt signaling pathway was cloned recently. A truncated mutation of Axin2 (mtAxin2) is the most common mutation pattern in colorectal cancer (CRC) and could enhance the luciferase activity of T-cell factor (TCF). This study was to explore the mechanism of Wnt signaling pathway regulation by mtAxin2 in CRC. METHODS: The expression of β -catenin in a mtAxin2-positive and a mtAxin2-negative CRC specimens was detected by immunohistochemistry. Plasmids containing wild-type or mutated Axin2 (pCMV-Flag-wtAxin2 and pCMV-Flag-mtAxin2) were constructed and co-transfected into 293 cells. The interactions of wtAxin2 and mtAxin2 with core components in Wnt signaling pathway was tested by co-immunoprecipitation (IP) and Western blot. TNT T3/T7 *in vitro* transcription and translation system were used to produce mtAxin2 and wtAxin2 proteins to verify the homodimerization of mtAxin2. Firefly and Renilla activities of mtAxin2 were detected with dual-luciferase report assay. Retinoid X receptor (RXR) and ecodyson receptor (ECR) plasmids were prepared for the experiment of restoration of TCF activity of mtAxin2. RESULTS: Immunohistochemistry showed that β -catenin accumulated in the nuclei of mtAxin2-positive CRC cells and in cytoplasm of mtAxin2-negative CRC cells. Western blot showed that mtAxin2 bound to GSK-3 β , APC, β -catenin, DVL-1 and PP2A as wtAxin2 did. After co-transfection of wtAxin2 and mtAxin2 in 293 cells, mtAxin2 competitively bound to β -catenin. TNT T3/T7 experiment showed that wtAxin2 formed oligomers or dimers with Flag-wtAxin2, but not with Flag-mtAxin2. TCF activity in 293 cells was increased after transfection of pCMV-mtAxin2-RXR, but reduced after transfection of pCMV-mtAxin2-ECR or co-transfection of pCMV-mtAxin2-RXR and pCMV-mtAxin2-ECR, indicating the fusion of mtAxin2 and RXR formed dimers and restored its inhibitory effect on TCF activity. CONCLUSION: Because of loss of DIX domain, mtAxin2 can not form dimers, disturbs the degradation of β -catenin, and leads to the nuclear accumulation of β -catenin and activation of Wnt signaling pathway.

KEYWORDS: Axin2; Mutation; Wnt signaling pathway; Colorectal neoplasm

[摘 要] 背景与目的: Axin2 是近期发现的 Wnt 信号转导系统的新基因, 其在结直肠癌中最主要的突变形式为羧基端缺失突变 (mutant -type Axin2, mtAxin2)。本研究目的在于探索 mtAxin2 对 Wnt 信号转导系统的调控作用及其相关机制。方法: 采用免疫组化的方法检测大肠癌组织中 β -catenin 的表达; 构建 pCMV-Flag-wtAxin2 和 pCMV-Flag-mtAxin2 质粒转染 293 细胞, 采用免疫沉淀 (co-immunoprecipitation, IP) 和 Western 印迹杂交研究 mtAxin2 与 Wnt 信号转导系统中其它关键蛋白的作

用;应用 TNT T3/T7 体外转录翻译系统体外合成 mtAxin2 蛋白,用于 mtAxin2 的体外聚合实验;使用 Dual-Luciferase 报告检测系统检测 Firefly 和 Renilla 荧光酶活性;构建视网膜受体 (retinoid receptor, RR) 与蜕皮素受体 (ecdysone receptor, ECR) 质粒,用于恢复 mtAxin2 的 DIX 功能区对 mtAxin2 功能影响的研究。结果:免疫组化检测显示在有 Axin 突变的结直肠癌标本中 β -catenin 蛋白在核内积聚,而无 Axin 突变者在胞浆内。Western 印迹杂交显示 mtAxin2 仍具有与 GSK-3 β 、APC、 β -catenin、DVL-1 和 PP2A 形成复合体的功能。将 Flag-wtAxin2 和 Flag-mtAxin2 共转染 293 细胞后,mtAxin2 与 wtAxin2 可竞争性地与 β -catenin 结合。在 TNT T3/T7 体外转录翻译实验中,wtAxin2 与 Flag-wtAxin2 结合,而与 Flag-mtAxin2 不结合,mtAxin2 不能形成二聚体或多聚体。pCMV-Flag-mtAxin2-RXR 质粒转染 293 细胞后可降低 T 细胞转录因子报告基因 (T-cell factor, TCF) 活性,pCMV-Flag-mtAxin2-ECR 质粒转染后 TCF 活性升高;pCMV-Flag-mtAxin2-RXR 和 pCMV-Flag-mtAxin2-ECR 共转染,TCF 活性也下降,显示 mtAxin2 与 RXR 融合后,融合蛋白可形成二聚体,恢复了 Axin2 的功能,致 TCF 报告基因的活性下降。结论:因为缺失 DIX 区,mtAxin2 不能形成二聚体,干扰了 β -catenin 的降解,引起 β -catenin 在核内的积聚进而激活 Wnt 信号转导系统。

关键词: Axin2; 突变; Wnt 信号; 信号转导系统; 结直肠肿瘤

中图分类号: R735.3*5, R735.3*7 文献标识码: A

文章编号: 1000-467X(2007)10-1041-06

Wnt 信号转导系统在组织发育和肿瘤发生过程中起重要作用。该系统的激活可引起 β -catenin 在胞浆中的积聚,进而进入胞核,与 TCF/LEF 转录因子结合,激活下游基因的表达。在没有激活的情况下, β -catenin 与 GSK-3 β 、Axin、APC、DVL-1 和 PP2A 相结合, β -catenin 被磷酸化,进而被蛋白水解酶所降解。Wnt 信号被激活时,GSK3 β 的活性被 DVL 所抑制,引起 β -catenin 的积聚。

人们发现在多种肿瘤中有 Wnt 信号系统的异常^[1-3]。APC 突变主要发生于结直肠癌中,一种为 Axin 结合区的丢失,一种为 20 个氨基酸重复序列的缺失,二者均导致 β -catenin 水平的升高。 β -catenin 的氨基端的丝氨酸和酪氨酸的突变导致 β -catenin 不能被 GSK-3 β 磷酸化,无法降解,进而引起 β -catenin 的积聚。在肝癌和髓母细胞瘤中 Axin1 可发生突变,导致 β -catenin 的结合位置丢失,进而引起 β -catenin 的积聚;而且这种情况可发生于 β -catenin 和 APC 均正常的情况。以上结果均提示 Wnt 信号转导系统在肿瘤发生发展中起重要作用。

Axin2 是新近克隆的基因,是鼠 Conductin 和大鼠 Axil 的等位基因^[4]。鼠 Conductin 存在于胞浆中,是 Wnt 信号转导系统的负性调控因子,可引起 β -catenin 的降解。将鼠的 Conductin 转染结肠癌细胞中可导致 β -catenin 水平下降,在非洲爪蟾的胚胎中可抑制内源性轴向形成^[5,6]。Axin2 保留了 Conductin、Axil 和 Axin1 中的重要功能区,提示 Axin2 可能作为一种构架蛋白 (结构蛋白),其作用可能与 Conductin 相似。因为 APC/ β -catenin 复合物突变往往多见于结直肠癌,人们推测 Axin2 突变也应主要发生于结直肠癌中。Liu 等^[7]在 105 例结直肠癌中发现 13 例突变,其中 11 例为框移突变 (frameshift, 发生于第 7 外显子),40 例卵巢子宫内膜样腺癌中也发现 2 例 Axin2 突变 (frameshift)。因而框移突变是 Axin2 中最主要的突变形式,且 mtAxin2 转染人纤维母细胞后可增加 TCF 活性,在核内出现 β -catenin 的积聚。

目前 APC、 β -catenin 和 Axin1 如何调控 β -catenin 水平已比较清楚,其突变是多种肿瘤发生的原因之一。但 Axin2 调控 β -catenin 的机制、Axin2 突变 (mtAxin2) 如何引起 β -catenin 在细胞核内积聚、TCF 活性增加的机制均不清楚。本研究根据 mtAxin2 蛋白功能区结构的改变,探索其调控 Wnt 信号转导系统的机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系和抗体

本实验所使用抗体包括抗一 Flag M5 抗体 (Sigma 公司产品)、抗一 HA (Sigma 公司产品)、抗 c-myc 抗体 (Roche 公司产品)、抗 APC、 β -catenin、GSK3 β 、PP2A 和 DVL-1 抗体 (Santa Cruz 公司产品)、抗 41/45 磷酸化 β -catenin 抗体 (BD 公司产品)。人胚肾细胞 HEK293 购自 ATCC,使用 DMEM 培养基,加 10% 小牛血清,100 u/ml 青霉素 100 mg/ml 链霉素。

1.2 质粒构建

野生型 (wild-type, wt) Axin2 质粒 pcDNA3.1/Myc-His-WtAxin2 中的 Axin2 使用 Boehringer Mannheim's Expand(tm) 长底物 PCR 系统扩增而来, Cla I 酶切后,用 Klenow 多聚酶修饰为平末端,然后克隆到 PUC18 的 Sma I 酶切位点上,用 BamH I - Kpn I 酶切后的片段连接到用 BamH I - Kpn I 酶切后的 pcDNA3.1-His(-) 载体上 (Invitrogen)。含突变型 Axin2 质粒 pcDNA3.1-His-mtAxin2 也采用类似

的方式构建。以 pcDNA3.1/myc-His-wtAxin2 或 mtAxin2 为模板,应用 PCR 方法扩增两端分别带 BamH I 和 Hind III 酶切位点的产物,用 BamH I 和 Hind III 酶切后克隆到经 Hind III 和 BamH I 消化的 pCMV-Flag 载体上,构建成 pCMV-Flag-wtAxin2 和 pCMV-Flag-mtAxin2 质粒。以 pVgRXR (invitrogen) 为模板用 PCR 方法分别扩增出视黄酸 X 受体 (RXR) 和蜕皮素受体 (ECR) 片段,分别将其融合到 pcDNA3.1/His-mtAxin2 中,构建成 pcDNA3.1/His-mtAxin2-RR 及 pcDNA3.1/His-mtAxin2-EcR 质粒。

1.3 荧光酶活性检测

所有的活性检测实验均在 6 孔板中进行,每个样本均重复实验 3 次。每个培养孔加 1×10^3 个 293 细胞,24 h 后用 2 mg wtAxin2, 0.5mg pTOPFLASH (或 pFOPFLASH)、和 50 ng pRL-TK-Renilla 荧光酶 (内对照),使用 Fugone 6 脂质体转染体系 (Roche 公司) 转染。48 h 后,裂解并收集细胞,使用 Dual-Luciferase Report Assay System (Promega) 检测 firefly 和 Renilla 荧光酶活性。

1.4 免疫沉淀及 Western 印迹杂交

细胞收集并悬浮于 NTEN 缓冲液中 (150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl pH7.4, 1 mmol/L EDTA, 0.5% NP-40, 1 mmol/L Na_3VO_4 及蛋白水解酶抑制剂),置冰上 30 s,于 4℃ 下以 14 000 r/min 离心 20 s,收集血清并贮存于 -70℃ 冰箱中。使用 DC 蛋白检测试剂盒 (Bio-Rad 公司产品) 检测蛋白浓度。用含 1 mg 细胞蛋白的细胞裂解物加上 2 mg 抗体于 4℃ 孵育 1 h,然后加 A/G 蛋白凝胶 (Bio-Rad 公司产品) 柔和搅拌 4℃ 过夜。NTEN 缓冲液清洗后,溶解于 SDS-PAGE 上样液中,100℃ 煮沸 5 min 后,转移至 PVDF 膜上 (Bio-Rad 公司产品),然后行蛋白杂交,使用超氧化物歧化酶标定的抗鼠或抗兔 IgG (Molecular Probes 公司),使用 ECL 蛋白杂交检测系统 (Roche 公司产品) 曝光显影。

1.5 TNT T3/T7 体外转录翻译和免疫共沉淀实验

含 Axin2 质粒 pcDNA3.1/His/myc 和 pCMV-Flag 用 TNT T3/T7 联合线粒体转录翻译系统 (promega 公司) 体外转录翻译 Axin2 蛋白。将 12.5 μl 的 ^{35}S 标记的 c-myc-wtAxin2 细胞裂解液分别与 12.5 μl 带 Flag 的 wtAxin2、mtAxin2 和空载体裂解液混合,混匀后于 4℃ 孵育 1 h,加入 200 ml NTEN 缓冲液,5 mg 抗 Flag 抗体及 2.5 mg 蛋白 A/G 葡

聚糖凝胶。于 4℃ 孵育过夜后,用 NTEN 缓冲液冲洗,体外翻译的 Axin2 是否结合于免疫球蛋白上,通过 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离并自显影。

1.6 免疫组化

实验所采用的 2 例标本取自天津市人民医院 2004 年 5 月至 2005 年 5 月手术切除的直肠癌组织,患者均为男性,分别为 60 岁和 64 岁 (其中 64 岁患者 Axin2 突变),术后病理均为腺癌, Dukes' B2,术前未行放、化疗。将经 6% 甲醛固定、石蜡包埋的标本脱蜡、水化处理和抗原复原处理后,用 β -catenin 抗体 (E5, Santa Cruz) 1:500 稀释后 4℃ 孵育过夜, PBS 液冲洗后,于 37℃ 加二抗孵育 1 h,用过氧化物酶系统显色,显微镜下观察。阳性对照采用胆管标本;阴性对照标本不加 β -catenin 抗体。

2 结果

2.1 mtAxin2 可引起 β -catenin 在细胞核内的积聚

免疫组化检测显示 Axin2 突变和无 Axin2 突变的结直肠癌标本中均有 β -catenin 的表达,在有 Axin2 突变的标本中 β -catenin 更稳定,且在细胞核内的积聚呈黄褐色深染颗粒;无 Axin2 突变的标本中 β -catenin 位于胞浆内,染色较淡 (图 1)。提示 Axin2 在结直肠肿瘤中的突变影响了 Wnt 信号转导系统的关键基因 β -catenin,激活 Wnt 信号转导系统。

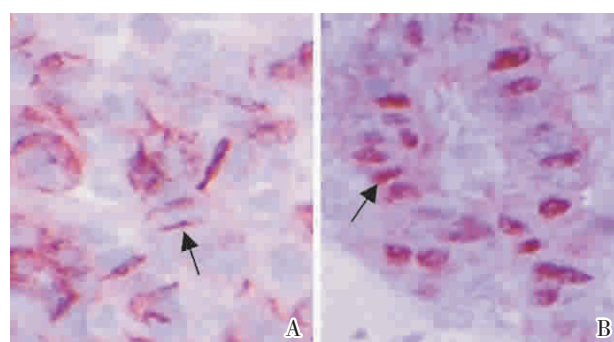


图 1 β -catenin 在结直肠癌标本中的表达 (SP $\times 400$)

Figure 1 Expression of β -catenin in colorectal carcinoma (CRC) (SP $\times 400$)

A: β -catenin is expressed in cytoplasm in the CRC specimen without Axin2 mutation.

B: β -catenin is expressed in nuclei in the CRC specimen with Axin2 mutation.

2.2 mtAxin2 可与 GSK3 β 、APC、 β -catenin、DVL-1 和 PP2A 结合

将 pCMV-Flag-wtAxin2、pCMV-Flag-mtAxin2 或

pCMV-Flag 空载体分别转染 293 细胞,裂解物分别用抗 GSK3 β 、APC、 β -catenin、DVL-1 及 PP2A 的抗体免疫沉淀,然后行蛋白杂交,结果显示 mtAxin2 在细胞内可以与 GSK-3 β 、APC、 β -catenin、DVL-1 和 PP2A 结合,形成复合体,空载体作为阴性对照(图 2)。提示 mtAxin2 在 APC/ β -catenin 复合体中发挥骨架蛋白的作用,仍然具有与 Wnt 信号转导系统中关键蛋白聚合的功能,但是和 wtAxin2 的作用相反。



图 2 mtAxin2 和 wtAxin2 转染 293 细胞后与 β -catenin、APC、GSK-3 β 、DVL-2 和 PP2A 蛋白的结合
Figure 2 The interactions of mtAxin2 and wt-Axin2 with β -catenin, APC, GSK-3 β , DVL-2 and PP2A proteins detected by co-immunoprecipitation (Co-IP) and Western blot

Lanes 1, 4, 7, 10 and 13: 293 cells transfected with empty vector; lanes 2, 5, 8, 11 and 14: 293 cells transfected with pFlag-wtAxin2; lanes 3, 6, 9, 12 and 15: 293 cells transfected with pFlag-mtAxin2. Lanes 1-3: 293 cells immunoprecipitated with anti- β -catenin antibody; lanes 4-6: 293 cells immunoprecipitated with anti-APC antibody; lanes 7-9: 293 cells immunoprecipitated with anti-GSK-3 β antibody; lanes 10-12: 293 cells immunoprecipitated with anti-DVL-2 antibody; lanes 13-15: 293 cells immunoprecipitated with anti-PP2A antibody. Lanes 1-15: Western blotting with anti-Flag antibody.

2.3 mtAxin2 与 wtAxin2 可竞争性地与 APC/ β -catenin 复合体结合

将 pcDNA3.1/c-myc- β -catenin、pCMV-Flag-wtAxin2 及 pCMV-Flag-mtAxin2 共转染 293 细胞(图 3A),细胞裂解物用抗 c-myc 抗体行免疫共沉淀,用抗 Flag M5 抗体行 Western blot。结果显示,随着 pCMV-Flag-mtAxin2 转染量的增加,与 c-myc- β -catenin 结合的 Flag-mtAxin2 量也相应增加,但是 Flag-wtAxin2 与 c-myc- β -catenin 结合的量却随之减少,显示 mtAxin2 和 wtAxin2 竞争性地与 β -catenin 相结合(图 3A)。总裂解产物分别使用抗 Flag 抗体和抗 β -actin 抗体行蛋白杂交以观察外源性 Flag-wtAxin2、Flag-mtAxin2 和内源性对照 β -actin 的表达水平,Flag-wtAxin2 和 β -actin 蛋白水平较一致,Flag-mtAxin2 水平随转染量的增加逐渐增加(图 3B)。可见虽然 Flag-wtAxin2 在各样本中表达水平一致,但随着 mtAxin2 表达逐渐增加,其结

合到 β -catenin 上的量逐渐减少。而 mtAxin2 与 wtAxin2 与 Wnt 信号转导系统中关键蛋白竞争性结合的结果,对于 wtAxin2 而言引起 β -catenin 水平的下降,对 mtAxin2 而言引起 β -catenin 水平的上升,提示与 mtAxin2 结合的 β -catenin 可能不能磷酸化并进而被降解。

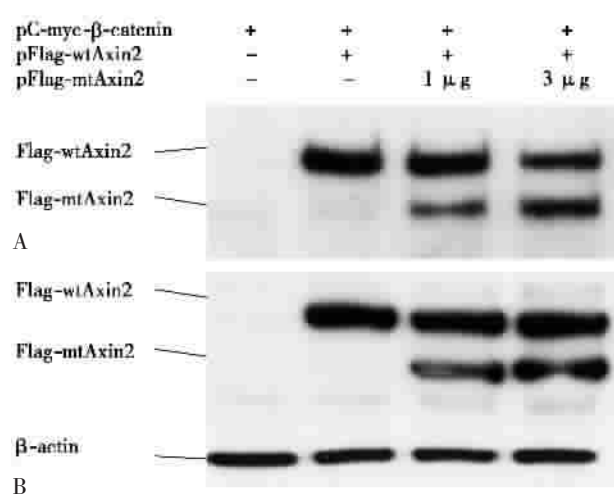


图 3 pC-myc- β -catenin、pFlag-wtAxin2 和 pFlag-mtAxin2 共转染 293 细胞后 wtAxin2、mtAxin2 与 β -catenin 竞争性聚合
Figure 3 Competitive binding of wtAxin2 and mtAxin2 with β -catenin after co-transfection of pC-myc- β -catenin, pFlag-wtAxin2 and pFlag-mtAxin2 detected by Western blot
A: Western blotting of co-transfected 293 cells with anti-Flag antibody after IP with anti-c-myc antibody
B: Expression of wtAxin2, mtAxin2 and β -actin in whole cell lysates.

2.4 DIX 功能区缺失对 Axin2 形成多聚体的影响

为研究 mtAxin2 中 DIX 功能区缺失对多聚体形成的影响,进行了体外转录翻译实验,其产物有 Flag-wtAxin2、Flag-mtAxin2、Flag-空载体(作为对照)及 35 S 标记的 c-myc-wtAxin2。 35 S 标记的 c-myc-wtAxin2 分别与 Flag-wtAxin2、Flag-mtAxin2 及空载体混合,用抗 Flag 抗体行蛋白共沉淀,行凝胶电泳并自显影。结果显示 35 S 标记的 c-myc-wtAxin2 可与 Flag-wtAxin2 结合,而与 Flag-mtAxin2 及 Flag 均不结合(图 4A); 35 S 标记的 c-myc-wtAxin2 用抗 c-myc 抗体行 Western 印迹杂交,显示其表达正常,而空载体阴性对照无表达(图 4B);用抗 Flag 抗体行 Western 印迹杂交,显示 Flag-wtAxin2 和 Flag-mtAxin2 表达正常。以上结果显示 DIX 功能区的缺失导致 Axin2 不能形成二聚体或多聚体。

2.5 DIX 功能区对 mtAxin2 调控 Wnt 信号转导系统的影响

实验发现一对受体蛋白,RXR 和 EcR。因为

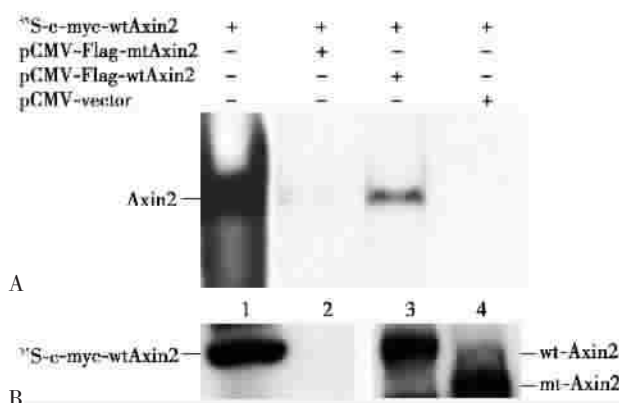


图4 mtAxin2 与 wtAxin2 之间的聚合实验结果

Figure 4 Binding assay between mtAxin2 and wtAxin2

A: Autoradiography of Axin2 after IP with anti-Flag antibody;

³⁵S-c-myc-wtAxin2 serves as a positive control.

B: Expression of Axin2 in 293 cells after transfection detected by Western blot.

Lane 1: 293 cells transfected with ³⁵S-c-myc-wtAxin2 as positive control; lane 2: 293 cells transfected with empty vector as negative control; lane 3: 293 cells transfected with pCMV-Flag-wtAxin2; lane 4: 293 cells transfected with pCMV-Flag-mtAxin2.

RXR可形成二聚体,ECR不能形成二聚体,而RXR与ECR之间又可形成二聚体,因而尝试分别构建了pCMV-Flag-mtAxin2-RXR和pCMV-Flag-mtAxin2-ECR质粒。分别将空载体、wtAxin2、mtAxin2、mtAxin2-RXR、mtAxin2-ECR和mtAxin2-RXR/mtAxin2-ECR质粒转染293细胞后,TCF活性分别为1、0.56、1.66、0.60、1.60和0.49。结果显示pCMV-Flag-mtAxin2-RXR发挥了wtAxin2的功能;而pCMV-Flag-mtAxin2-ECR却与pCMV-Flag-mtAxin2无区别,TCF活性均升高,仍然发挥着mtAxin2作用;而pCMV-Flag-mtAxin2-RXR和pCMV-Flag-mtAxin2-ECR共转染后,也可抑制TCF的活性。可见DIX功能区是Axin2基因形成二聚体(或多聚体)的关键,mtAxin2因缺少DIX功能区不能形成二聚体,尽管它仍然可以和APC、GSK3 β 、 β -catenin结合,却不能引起 β -catenin降解。在含mtAxin2的肿瘤细胞中,mtAxin2可与wtAxin2竞争性地与 β -catenin结合,阻止 β -catenin的降解,引起 β -catenin的积聚,进而增加了TCF活性。

3 讨论

Wnt信号转导系统控制着脊椎类生物的生长

和发育,其中 β -catenin水平是决定细胞改变、转化的关键。 β -catenin、APC及Axin1的突变,均导致 β -catenin的聚集,其机制均已研究清楚。

Axin2突变情况检测发现Axin2最明显的突变形式——mtAxin2,是因增加了一个核苷酸而导致翻译框架移动产生了一个终止密码,导致羟基端DIX功能区缺失,进而引起结直肠癌中 β -catenin的积聚,且可增加TCF荧光活性。以上结果充分说明mtAxin2干扰了 β -catenin的降解过程,但其机制却不清楚。Axin和Axin2的功能区研究均提示二者在Wnt转导系统中发挥框架蛋白的作用。我们的研究显示mtAxin2与wtAxin2一样,可与 β -catenin、GSK3 β 、APC、DVL-1和PP2A这些Wnt信号转导系统的关键蛋白结合,但mtAxin2与wtAxin2二者呈竞争性地与以上成分相结合,但二者对 β -catenin水平影响却相反,wtAxin2可使 β -catenin水平降低,而mtAxin2可使 β -catenin水平上升。如果在细胞中出现一个等位基因的突变,在细胞中即会出现mtAxin2与wtAxin2二者共存的现象。mtAxin2突变蛋白在细胞内的积聚可以造成wtAxin2不能很好地发挥其本身结构蛋白的桥梁作用,使得GSK3 β 不能在空间构象上接近 β -catenin,进而不能引起 β -catenin的磷酸化和降解,引起 β -catenin在胞浆内的积聚。在Wnt信号转导系统中 β -catenin、GSK3 β 、Axin、APC和AXIN2在多种肿瘤中都可发生突变^[8,9],尤其在大肠癌中尤为明显,显示出Wnt信号转导系统在肿瘤形成中的重要作用,值得进一步深入研究。

由于mtAxin2缺失了DIX功能区,而该功能区与二聚体的形成密切相关,而根据Kishida等^[10]的研究,二聚体的形成又是Axin和DVL正常功能所必需的。正如我们的结果显示在体外转录翻译系统中Flag-wtAxin2、Flag-mtAxin2、³⁵S标记的c-myc-wtAxin2表达均正常,但是wtAxin2可与Flag-wtAxin2结合,而与Flag-mtAxin2及Flag均不结合。mtAxin2并不是通过干扰wtAxin2本身的结构引起 β -catenin水平的下降,其自身及wtAxin2相互之间不能形成多聚体。在mtAxin2加上一可形成二聚体的融合蛋白,则恢复了wtAxin2功能,显示mtAxin2引起 β -catenin积聚的机制在于其自身聚合功能的丧失,不能引起 β -catenin降解所必需的空间构象。从另一方面也反映了Axin2在 β -catenin的调控中起桥梁的作用,与Axin1相似,只是Axin2的桥梁作用本身不能引起 β -catenin的磷酸化降

解,Axin2 的二聚体形式,将该复合物多种成分相互接触或引起三维构型的改变,才能激活该信号转导系统。

最近的研究显示,在 S 晚期、G₂/M 期中发现 β -catenin 的积聚,并进而引起 G₂ 期捕获及凋亡;Wnt 信号转导系统异常往往伴有有丝分裂、细胞周期捕获、细胞凋亡和染色体的不稳定性^[11,12]。因而有必要观察 mtAxin2 对细胞生物学的影响。以上的结果显示 Wnt 信号转导系统是细胞生长的关键,mtAxin2 发挥了癌基因的作用。

致谢:感谢 Mayo Clinic 的 WG Liu 和 XY Dong 对本试验的方法提供建议。

[参 考 文 献]

- [1] Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling [J]. Cell, 2000,103(2):311-320.
- [2] Fearnhead N S, Britton M P, Bodmer W F. The ABC of APC [J]. Human Mol Genet, 2001,10(7):721-733.
- [3] Taniguchi K, Roberts L R, Aderca I, et al. Mutational spectrum of β -catenin, AXIN1, and Axin2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas [J]. Oncogene, 2002,21(31):4863-4871.
- [4] Mai M, Qian C, Yokomizo A, et al. Cloning of the human homolog of conductin (AXIN2), a gene mapping to chromosome 17q23-q24 [J]. Genomics, 1999,55(3):341-344.
- [5] Behrens J, Jerchow B A, Wurtele M, et al. Functional interaction of an Axin homolog, conductin, with β -catenin, APC, and GSK3 [J]. Science,1998,280(5363):596-599.
- [6] Yamamoto H, Kishida S, Uochi T, et al. Axil, a member of the Axin family, interacts with both glycogen synthase kinase 3 β and β -catenin and inhibits axis formation of Xenopus embryos [J]. Mol Cell Biol, 1998,18(5):2867-2875.
- [7] Liu W G, Dong X, Mai M, et al. Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating β -catenin/TCF signaling [J]. Nat Genet, 2000,26(2):146-147.
- [8] Koch A, Hrychuk A, Hartmann W, et al. Mutation of the Wnt antagonist Axin2 result in TCF-dependent transcription in medulloblastomas [J]. Int J Cancer, 2007,121(2):284-291.
- [9] Segditsas S, Tomlinson I. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway [J]. Oncogene, 2006,25(57):7531-7537.
- [10] Kishida S, Yamamoto H, Hino S, et al. DIX domains of Dvl and Axin are necessary for protein interaction and their ability to regulate β -catenin stability [J]. Mol Cell Biol, 1999,19(6):4414-4422.
- [11] Hadjihannas M V, Behrens J. CIN by Wnt: growth pathways, mitotic control and chromosomal instability in cancer [J]. Cell Cycle, 2006,5(18):2077-2081.
- [12] Hadjihannas M V, Bruckner M, Jerchow B, et al. Aberrant Wnt/ β -catenin signaling can induce chromosomal instability in colon cancer [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006,103(28):10747-10752.

[编辑及校对:杨允贵]

欢迎订阅《肿瘤研究与临床》杂志

《肿瘤研究与临床》是由中华人民共和国卫生部主管,中华医学会、山西省肿瘤研究所、山西省肿瘤医院主办的肿瘤学专业学术期刊,是中华医学会系列杂志之一,被美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)等国际著名检索期刊及国内各大检索数据库收录,为中国科技核心期刊、中国生物医学核心期刊、中国肿瘤学类核心期刊。主要栏目:专论、基础研究、临床研究、技术改进、调查报告、讲座、综述、短篇及个案报告、消息等。

《肿瘤研究与临床》为月刊,大 16 开,72 页,随文插印彩图,每月 28 日出版。每期定价 6.00 元,全年 72.00 元。本刊刊号 ISSN 1006-9801 CN11-5355/R 邮发代号:22-137,国外发行代号 M04755(中国图书贸易总公司),全国各地邮局(所)均可订阅。如邮局订阅延误,可直接汇款至编辑部补订。

联系地址:山西省太原市职工新街 3 号 邮编:030013

联系电话:0351-4650389、4650386 传真:0351-4651415

E-mail: zlyjylc@163.com, zlyjylc@sina.com 网址: http://www.zlyjylc.com.cn