

## 下调 Pygo2 抑制脑胶质瘤 U251 细胞增殖、侵袭及其 cyclin D1 的表达

陈玉英<sup>1,2</sup>, 王海东<sup>1</sup>, 王占祥<sup>1\*</sup>, 刘希尧<sup>1</sup>, 谭国伟<sup>1</sup>, 沈上杭<sup>1</sup>

1. 厦门大学附属第一医院神经外科, 厦门 361003

2. 重庆邮电大学生物信息学院生物技术教学部, 重庆 400065

**[摘要]** **目的** 构建 RNA 干扰(RNAi)重组体抑制 Pygo2 的表达,并探讨其对脑胶质瘤 U251 细胞增殖、侵袭的影响及其机制。**方法** 针对 Pygo2 cDNA 序列设计并合成一对特异性的含有短发卡的寡核苷酸序列及其阴性对照序列,经退火后插入 pSuper 中构建重组体。经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定和 DNA 测序后,用脂质体 2000 将其转染脑胶质瘤 U251 细胞,采用实时定量 PCR 和蛋白质印迹方法检测 Pygo2 shRNA 对 U251 细胞 Pygo2 mRNA 和蛋白表达的干扰效果,MTT 法检测细胞增殖,流式细胞术检测细胞周期分布,BrdU 掺入法检测 DNA 合成,Transwell 检测细胞侵袭。采用蛋白质印迹和免疫荧光法检测 Pygo2 shRNA 对 U251 细胞 cyclin D1、 $\beta$ -catenin 蛋白水平和亚细胞定位的影响。**结果** 双酶切和测序鉴定证实插入序列完全正确;Pygo2 shRNA 显著抑制了 U251 细胞 Pygo2 mRNA 和蛋白的表达;Pygo2 shRNA 抑制 U251 细胞 Pygo2 表达后,细胞增殖显著降低,细胞更多地阻滞在 G<sub>1</sub> 期,且 BrdU 掺入显著减少,侵袭细胞数显著减少。此外,抑制 Pygo2 表达可显著下调 U251 细胞 cyclin D1 的表达但不改变其亚细胞定位。U251 细胞  $\beta$ -catenin 表达及其亚细胞定位无明显改变。**结论** 成功构建了抑制 Pygo2 表达的重组载体。抑制 Pygo2 表达能有效地抑制脑胶质瘤 U251 细胞 DNA 合成,可能通过下调 Wnt 信号靶基因 cyclin D1 的表达,使细胞阻滞于 G<sub>1</sub> 期而抑制细胞增殖和侵袭。

**[关键词]** Pygo2; 胶质瘤; 细胞增殖; 短发夹 RNA

**[中图分类号]** R 730.264

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2011)02-0128-06

### Down-regulated Pygo2 expression suppresses proliferation, invasion, and cyclin D1 expression of glioblastoma U251 cells

CHEN Yu-ying<sup>1,2</sup>, WANG Hai-dong<sup>1</sup>, WANG Zhan-xiang<sup>1\*</sup>, LIU Xi-yao<sup>1</sup>, TAN Guo-wei<sup>1</sup>, SHEN Shang-hang<sup>1</sup>

1. Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, Fujian, China

2. Department of Biological Technology, College of Bio-information, Chongqing University of Posts and Telecommunications, Chongqing 400065, China

**[Abstract]** **Objective** To construct recombinant vectors for RNA interference(RNAi)targeting Pygo2, and to assess its influence on the proliferation, invasion of glioblastoma U251 cells and the related mechanism. **Methods** A pair of oligonucleotides containing short hairpin structure targeting Pygo2 cDNA sequences were designed and synthesized, and their negative control sequences were also synthesized. After annealed, they were inserted into pSuper vector to generate the recombinant plasmids. Then the recombinant plasmids were digested with *EcoR* I and *Hind* III for identification, and the sequence was assayed by DNA sequencing. The recombinant plasmids were transfected into cultured glioblastoma U251 cells using Lipofectamine™ 2000. The effect of Pygo2 shRNA on Pygo2 mRNA and protein in U251 cells was detected by real-time PCR and Western blotting analysis, respectively. MTT assay was used to detect the cell proliferation; cell cycle was analyzed by flow cytometry; Bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation analysis was used to examine DNA synthesis; and cell invasion assay was performed using Transwell chambers. The effect of Pygo2 shRNA on the protein level and subcellular location of cyclin D1 and  $\beta$ -catenin was detected by Western blotting analysis and immunofluorescent staining. **Results** The recombinant plasmids were completely coincided with the design by the restriction map and the sequence analysis. Pygo2 mRNA and protein expression was significantly suppressed by Pygo2 shRNA. Furthermore, the proliferation of cells in Pygo2 shRNA group was notably inhibited, cell cycle was arrested at the G<sub>1</sub> phase, and BrdU incorporation and migrating cells were significantly

**[收稿日期]** 2010-10-16

**[接受日期]** 2010-12-27

**[基金项目]** 厦门市科技局资助项目(3502z20089001),福建省自然科学基金面上项目(2009D002),中国博士后基金(20080440728),重庆市教委科技项目(KJ100504). Supported by Foundation of Science and Technology Bureau of Xiamen (3502z20089001), the Natural Science Foundation of Fujian (2009D002), China Postdoctoral Science Foundation (20080440728), and Science and Technology Project of Education Committee of Chongqing Municipality(KJ100504).

**[作者简介]** 陈玉英,博士,副教授. E-mail: eagle109@126.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0592-2139815, E-mail: wangzx@xmbrain.com

inhibited. In addition, Pygo2 knockdown significantly down-regulated cyclin D1 expression without altering the subcellular location, and the expression level and subcellular location of  $\beta$ -catenin had no noticeable changes. **Conclusion** The recombinant vectors for specific suppression of Pygo2 expression have been constructed successfully. Inhibition of Pygo2 expression can suppress cell proliferation and invasion of glioma U251 cells, decrease DNA synthesis, arrest cell cycle at the G<sub>1</sub> phase, and decrease expression of the Wnt target gene cyclin D1.

[Key words] Pygo2; glioma; cell proliferation; shRNA

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(2): 128-133]

胶质瘤多呈侵袭性生长, 手术难以完全切除, 且多数恶性胶质瘤细胞对放疗及化疗不敏感, 使临床治疗效果欠佳。恶性脑胶质瘤被认为是一系列多基因改变累及的结果。经典 Wnt 通路失调及核心成员异常表达是肿瘤发生及发展的重要原因<sup>[1-2]</sup>。Wnt 信号系统的激活与脑胶质瘤密切相关, 不同级别胶质瘤大都伴有 Wnt 信号激活<sup>[3]</sup>。Pygopus 是 Wnt 信号系统中重要的功能蛋白, Pygo2 是其效应基因<sup>[4-5]</sup>, 对 Wnt 信号的激活具有直接调控作用, 与多种恶性肿瘤发生密切相关<sup>[6-9]</sup>。Pygo2 在脑胶质瘤细胞和组织中高表达, 并随着肿瘤恶性程度的增高而增高, 提示 Pygo2 可能是脑胶质瘤基因治疗新的重要靶点。本研究主要应用 Pygo2 shRNA 抑制 Pygo2 在脑胶质瘤 U251 细胞中的表达, 观察其对脑胶质瘤细胞增殖、侵袭的影响, 并初步探讨其可能的作用机制。

## 1 材料和方法

1.1 细胞株、质粒及菌株 脑胶质瘤细胞系 U251 购于上海细胞研究所, *Escherichia coli* 感受态菌株 DH5 $\alpha$  (厦门大学生命科学院冻存), 质粒 pSuper basic 由厦门大学生命科学院李博安教授惠赠。

1.2 主要试剂及仪器 限制性内切酶 *EcoRI*、*BglIII*、*HindIII*, T<sub>4</sub> DNA 连接酶, SYBR-Green I 试剂盒均购自 TaKaRa 公司。2 000 bp DNA Ladder、脂质体转染试剂 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司, Pygo2 多克隆抗体购于美国 Santa Cruz 公司, 增强化学发光试剂盒 ECL 购于美国 Pierce 公司, Transwell 小室系美国 Costar 公司产品, PI、DAPI 为 Sigma 公司产品, FITC BrdU Flow Kit 为 BD 公司产品, 优质胎牛血清购自 Hyclone 公司, TRIzol 试剂盒购于 Invitrogen 公司, MTT 购于 Amresco 公司。实验所用试剂均为进口或国产分析纯试剂。Rotorgene 荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad 公司, 美国), 流式细胞仪 FACSscan (Becton Dickinson, 美国)。

1.3 载体序列设计合成 根据 GenBank 提供的 Pygo2 基因核苷酸序列 (NW\_925683), 同时考虑质粒 pSuper 酶切位点的要求, 设计了 1 对带有 *BglIII*、*HindIII* 酶切粘性末端终止识别序列和 9 bp Loop 环的短发

夹 RNA 干扰片段, 通过 BLAST 软件, 排除非特异性抑制其他基因片段的可能。Pygo2 shRNA 的正向序列: 5'-GAT CCC CTG TGA GGC CTC TTG TCA GAA ATT CAA GAG ATT TCT GAC AAG AGG CCT CAC ATT TTT A-3', 反向序列: 5'-AGC TTA AAA ATG TGA GGC CTC TTG TCA GAA ATC TCT TGA ATT TCT GAC AAG AGG CCT CAC AGG G-3'; 随机对照 scr shRNA 的正向序列: 5'-GAT CCC CGT GGT TTC ATC GCA TCT GCT TCA AGA GAG CAG ATG CGA TGA AAC CAC TTT TTA-3', 反向序列: 5'-AGC TTA AAA AGT GGT TTC ATC GCA TCT GCT CTC TTG AAG CAG ATG CGA TGA AAC CAC GGG-3'。序列由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.4 载体的构建 将合成的寡核苷酸退火形成双链; 真核表达载体 pSuper 经 *HindIII* 和 *BglII* 在 37°C 顺序酶切、纯化, 将上述载体和双链寡核苷酸用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接后, 转化大肠埃希 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 铺板、挑克隆, 重组克隆提取质粒、用 *HindIII* 和 *EcoRI* 进行双酶切酶切鉴定, 确定 PCR 产物已经插入质粒载体, 并由上海生工生物技术工程有限公司进行 DNA 序列测定。

1.5 胶质瘤 U251 细胞转染 将对数生长期的 U251 细胞按 (1~2) × 10<sup>5</sup>/孔接种于装有盖玻片的 6 孔细胞培养板中, 24 h 后按每孔含质粒 0.8  $\mu$ g (2.4  $\mu$ l) 脂质体分别转染 scr shRNA、Pygo2 shRNA、空白 (仅脂质体), 具体操作按照 Lipofectamine 2000 转染试剂盒说明书进行。培养 48 h 用于后续实验, 细胞即分成了 3 种 (组): 空白对照组、scr shRNA 组、Pygo2 shRNA 组。

1.6 实时定量 PCR 转染后 48 h 收获细胞, TRIzol 法提取细胞总 RNA, 利用 RT-PCR 试剂盒反转录得到 cDNA 模板, 采用实时 PCR 扩增得到靶基因。按下述条件进行循环: 94°C 5 s; 55°C 20 s; 72°C 20 s, 40 个循环。利用 SYBR Green 荧光染料定量检测 Pygo2 mRNA 在细胞中的表达情况, 重复 3 次, 同时做 GAPDH 内参对照, 于每次扩增的同时设置无 cDNA 的阴性对照, 结果以 Pygo2/GAPDH 相对

系数表示 Pygo2 的表达水平。人 Pygo2 和内参 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)引物由 Invitrogen 公司合成。Pygo2 引物为:正向,5'-CTC CAG ATG CCA ACA GCT TG-3';反向,5'-ACA GGC ACC ACA TGG GTA CA-3',片段长度 105 bp。内参 GAPDH 引物为:正向,5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3';反向,5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3',片段长度 87 bp。

1.7 蛋白质印迹检测 转染 48 h 后分别收集每组细胞并提取总蛋白。取总蛋白 50 μg,经十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)、转膜、Pygo2 一抗(1:1 000)、相应二抗(1:2 000)孵育后,用化学发光法显色分析 Pygo2 蛋白的表达情况,同时检测 β-actin 蛋白表达情况作为上样量标准。运用美国 Quantity-One 进行条带灰度分析,以 Pygo2/β-actin 表示 Pygo2 的相对表达水平。

1.8 MTT 实验 取对数生长期的 U251 细胞制备细胞悬液,以每孔 1×10<sup>3</sup> 细胞接种于 96 孔板培养 24 h,按上述方法转染,分别于转染后 1、2、3、4、5、6 d 采用酶联免疫试验检测光密度(D<sub>570</sub>)值。MTT 实验<sup>[10]</sup> 独立重复 3 次,根据 D<sub>570</sub> 值绘制细胞生存曲线。

1.9 BrdU 掺入、细胞染色、流式细胞术分析 转染后 47 h 取上述 3 组细胞,加入 10 ml/L BrdU(终浓度为 10 μmol/L)继续孵育,1 h 后收集细胞。洗涤细胞,加入表面染色抗体,置 4℃ 避光染色、固定、再固定等,加 BrdU-FITC 抗体以及胞内抗细胞因子抗体,室温避光反应,流式细胞仪进行检测并分析。具体操作按说明书进行。

1.10 细胞周期检测 转染后上述 3 组细胞,培养 72 h,用 0.25% 胰酶消化细胞,PBS 洗 2 次,800×g 离心 5 min,去上清液,PBS 洗涤细胞,75% 乙醇 4℃ 固定过夜,PI 室温避光染色(PI 50 μg/ml,RNase 20 μg/ml)15 min,上流式细胞仪检测。

1.11 细胞免疫荧光检测 转染后 48 h 的各组细胞,用 PBS 冲洗,冷丙酮固定 10 min,0.1% Triton 渗透破膜,10% 山羊血清封闭后,一抗 β-catenin 和 cyclin D1 (1:100) 4℃ 孵育过夜。次日 PBS 冲洗掉多余一抗,FITC 偶联的二抗(1:200)室温避光孵育 45 min,PBS 清洗,DAPI 染核 10 min,封片,荧光显微镜镜检并拍照。

1.12 体外侵袭实验 转染 48 h 后的各组细胞,用 PBS 漂洗 3 次,以常规方法制备 5×10<sup>5</sup>/ml 无血清单细胞悬液。采用带 Transwell 微孔膜的培养板,上室加入 100 μl 细胞悬液,并加入无血清培养液

200 μl。Transwell 培养板下室加入 300 μl 完全培养液,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h。取出小室,棉签擦净上室未穿膜细胞,冰乙醇固定,结晶紫染色 30 min。光镜下(×200) 随机取 5 个视野拍照并计数,取平均数。每组设 3 个复孔,实验独立重复 3 次。

1.13 统计学处理 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 13.0 统计软件分析,对多组间均数进行比较行单因素方差分析,检验水准(α)为 0.05。

## 2 结果

2.1 重组质粒双酶切和测序鉴定 经双酶切鉴定发现,重组质粒中已成功插入到 pSuper 载体的预计位点,测序结果显示插入片段 Pygo2 shRNA 及 scr shRNA 与设计序列完全相符,表明重组体构建成功。

2.2 Pygo2 shRNA 有效地抑制了 Pygo2 表达 实时 PCR 检测发现:与空白对照组相比,scr shRNA 组的 Pygo2 mRNA 水平无明显变化,而 Pygo2 shRNA 组的 Pygo2 mRNA 水平被显著抑制(P<0.05,图 1A)。同时,蛋白质印迹检测发现,scr shRNA 不影响 U251 细胞 Pygo2 蛋白表达,而 Pygo2 shRNA 使 Pygo2 蛋白下调约 75%,二者差异有统计学意义(P<0.05,图 1B),结果与实时定量 PCR 一致。

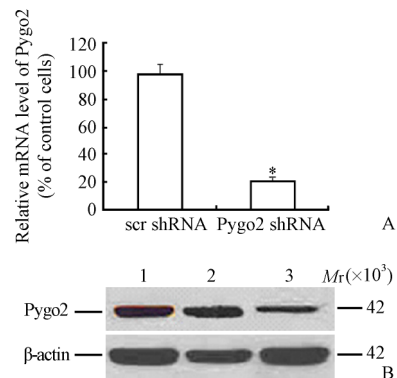


图 1 特异 Pygo2 shRNA 降低 U251 细胞的 Pygo2 表达  
Fig 1 Knockdown of Pygo2 expression by specific Pygo2 shRNA in glioblastoma U251 cells

A: Real-time PCR of Pygo2 and GAPDH mRNA expression levels in control, scr shRNA, and Pygo2 shRNA cells, with GAPDH mRNA expression as the loading control. \* P<0.05 vs scr shRNA group; n=3,  $\bar{x} \pm s$ . B: Representative Western blotting analysis of Pygo2 protein following treatment with scr shRNA or Pygo2 shRNA. 1: Control; 2: scr shRNA; 3: Pygo2 shRNA

2.3 Pygo2 shRNA 抑制细胞增殖 MTT 法检测结果发现:与空白对照组比较,Pygo2 shRNA 组细胞增殖活性被显著抑制,而 scr shRNA 组的细胞增殖活性未受明显影响(图 2)。

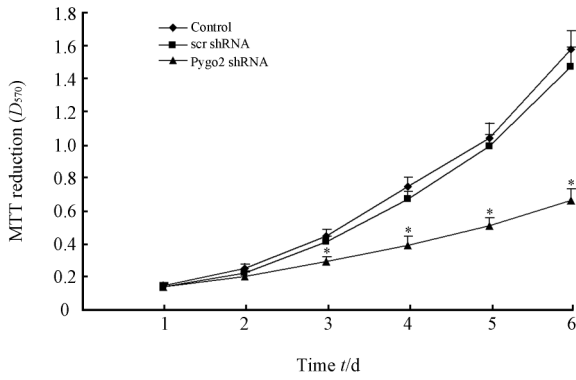


图 2 抑制 Pygo2 表达对 U251 细胞增殖的影响

Fig 2 Effect of Pygo2 suppression on U251 cell proliferation

\*  $P < 0.05$  vs Control group;  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

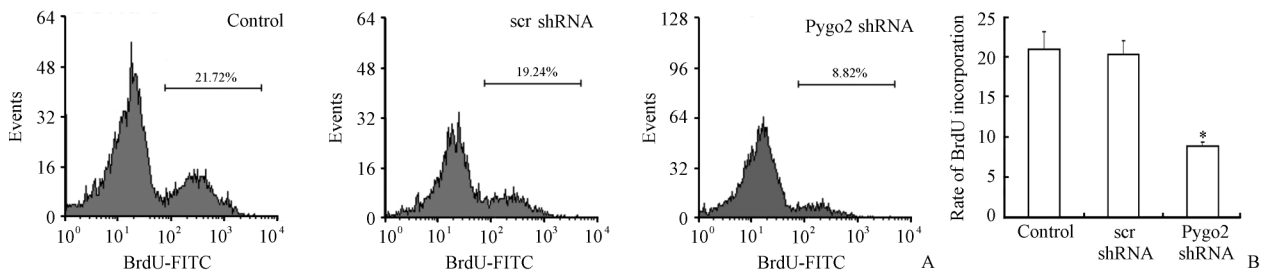


图 3 Pygo2 shRNA 对 U251 细胞 DNA 合成的影响

Fig 3 Effect of Pygo2 shRNA on DNA synthesis of U251 cells

A: Flow cytometric profiles of BrdU incorporation. B: Data represent  $\bar{x} \pm s_E$  from three independent experiments, \*  $P < 0.05$  vs Control group,  $n = 3$

表 1 Pygo2 shRNA 对 U251 细胞周期的影响

Tab 1 Effect of Pygo2 shRNA on cell cycle of U251 cells

(%,  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
Control	49.50 ± 0.66	33.13 ± 1.82	17.37 ± 2.00
scr shRNA	49.40 ± 1.51	33.67 ± 0.80	17.17 ± 0.65
Pygo2 shRNA	66.23 ± 0.93**	17.60 ± 0.75**	16.17 ± 0.46

\*\*  $P < 0.01$  vs scr shRNA group

2.6 Pygo2 shRNA 抑制 cyclin D1 水平 为了探讨 Pygo2 shRNA 抑制细胞增殖的机制,本研究采用蛋白质印迹法检测 U251 细胞 cyclin D1 和  $\beta$ -catenin 水平,结果发现,与 scr shRNA 组相比,Pygo2 shRNA 组的 cyclin D1 水平明显降低( $P < 0.05$ ),而  $\beta$ -catenin 水平无明显变化(图 4)。

2.7 抑制 Pygo2 表达对 cyclin D1 和  $\beta$ -catenin 表达及定位的影响 为了进一步研究 Pygo2 shRNA 对 cyclin D1 和  $\beta$ -catenin 的影响,我们采用免疫荧光检测其表达及细胞定位。结果发现: cyclin D1 在细胞核中表达,抑制 Pygo2 表达显著下调了 cyclin D1 表达但不改变其亚细胞定位(图 5A);  $\beta$ -catenin 在细胞核和细胞质中都有表达,且抑制 Pygo2 表达

2.4 Pygo2 shRNA 抑制细胞 DNA 合成 为了进一步探讨 Pygo2 shRNA 对细胞增殖的影响,本研究采用 BrdU 掺入检测 U251 细胞 DNA 合成情况(图 3A)。结果表明:空白对照组、scr shRNA 组、Pygo2 shRNA 组 BrdU 掺入率分别为(20.96% ± 2.19%)、(20.35% ± 1.73%)和(8.81% ± 0.56%)。与空白对照组相比,Pygo2 shRNA 组的 BrdU 掺入率明显降低( $P < 0.05$ ),而 scr shRNA 组 BrdU 掺入率无明显变化(图 3B)。

2.5 抑制 Pygo2 表达使细胞周期阻滞于 G<sub>1</sub> 期 流式细胞术检测细胞周期时相分布,结果发现(表 1):空白对照组和 scr shRNA 组细胞在 G<sub>1</sub> 期、S 期、G<sub>2</sub>/M 期所占比例接近,差异无统计学意义;而 Pygo2 shRNA 组细胞更多地处于 G<sub>1</sub> 期,S 期细胞明显减少,与 scr shRNA 组 G<sub>1</sub> 期、S 期相比差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。

不改变其表达水平和亚细胞定位(图 5B)。

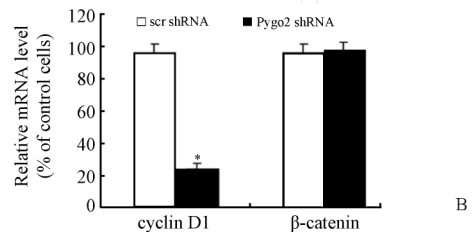
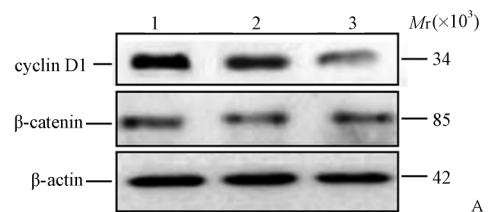


图 4 Pygo2 shRNA 对 U251 细胞 cyclin D1 和  $\beta$ -catenin 表达的影响

Fig 4 Effect of Pygo2 shRNA on expression of cyclin D1 and  $\beta$ -catenin of U251 cells

A: Protein expression of cyclin D1 and  $\beta$ -catenin in U251 cells was detected by Western blotting analysis following treatment with scr shRNA(2) or Pygo2 shRNA(3).  $\beta$ -actin was used as a loading control(1). B: Relative protein expression in U251 cells was quantified by densitometry. Values represent  $\bar{x} \pm s_E$  from three independent analyses. \*  $P < 0.05$  vs scr shRNA group

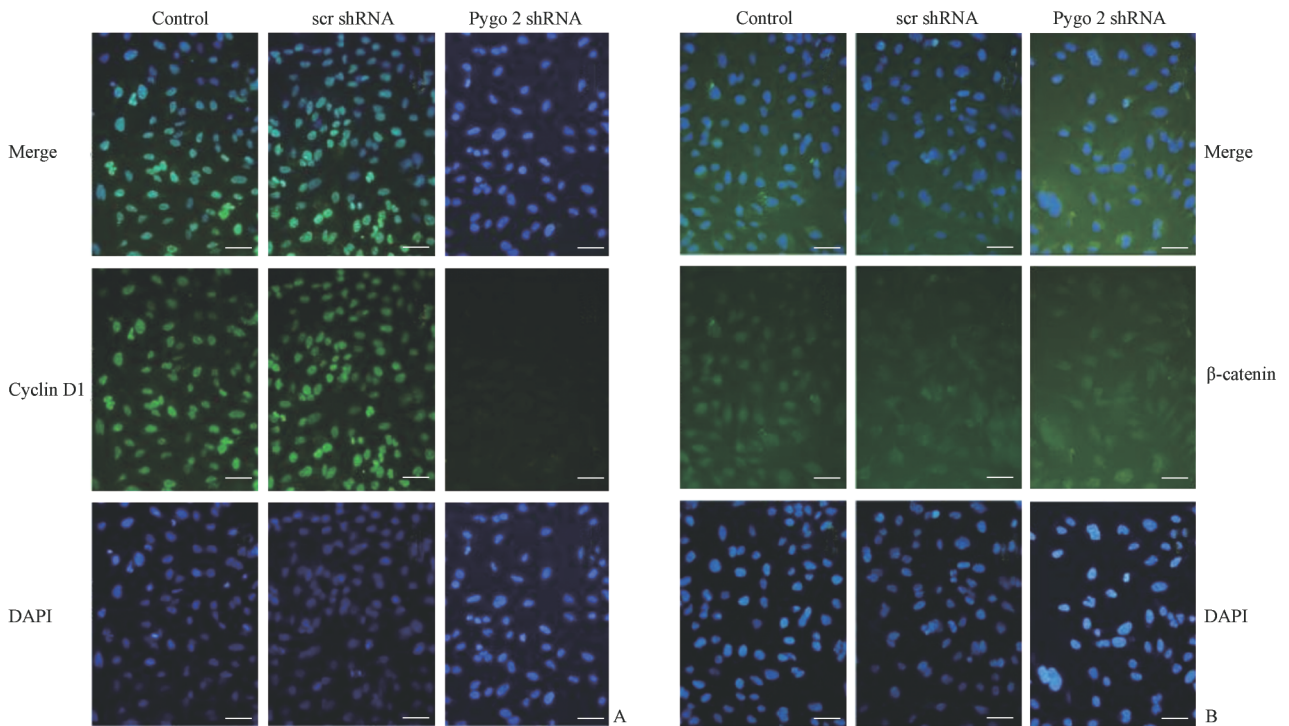


图5 Pygo2 shRNA对U251细胞cyclin D1(A)和β-catenin(B)表达及定位的影响

Fig 5 Effect of Pygo2 shRNA on expression and subcellular distribution of cyclin D1(A) and β-catenin(B) in U251 cells

At 48 h after transfection, cells were incubated with primary antibodies against cyclin D1 (A) and β-catenin (B), followed by FITC-labeled secondary antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI. Images were captured using a fluorescent microscope. Scale bar=50 μm

2.8 抑制 Pygo2 表达能抑制 U251 细胞侵袭 采用 Transwell 小室来检测 Pygo2 shRNA 抑制 Pygo2 表达对 U251 细胞侵袭性的影响,结果发现(图 6):空白对照组 (122.8 ± 8.6) 和 scr shRNA 组 (118.2 ± 6.5) 侵袭细胞数差异无统计学意义,而 Pygo2 shRNA 组 (31.4 ± 5.2) 较 scr shRNA 组侵袭细胞数减少 ( $P < 0.05$ )。

pygopus 主要的效应基因。Kuhnert 等<sup>[11]</sup>推测 Pygo2 作为 Wnt 信号新成员可能更多地参与了核内靶基因的转录。除了在 Wnt 通路中的功能之外, Pygo2 还在肿瘤发生和发育调控中单独起作用<sup>[12]</sup>。Thompson 等<sup>[6]</sup>通过对直肠癌细胞系进行 Pygo2 基因的 RNA 干扰及补救实验,证实 Pygo2 是 Wnt 信号中 T 细胞因子(T-cell factor, TCF)介导的癌基因转录过程中不可缺少的成分。

本研究将构建的抑制 Pygo2 表达的载体,通过脂质体转染脑胶质瘤 U251 细胞,经 RT-PCR 和蛋白质印迹检测,发现 Pygo2 shRNA 有效地抑制了 Pygo2 mRNA 和蛋白的表达。并且,Pygo2 shRNA 抑制 Pygo2 表达后,细胞的生长增殖显著降低,在 BrdU 掺入实验中发现其 DNA 合成显著减少,细胞周期更多地阻滞于 G<sub>1</sub> 期,且细胞侵袭性显著减弱,说明 Pygo2 在脑胶质瘤细胞生长增殖及侵袭中都起到非常重要的促进作用。

β-catenin、cyclin D1 是 Wnt/β-catenin 信号通路的重要组成部分,具有调节细胞增殖、抑制细胞分化及调控细胞周期等重要作用<sup>[13]</sup>。Cyclin D1 是 Wnt 信号通路的靶基因之一,是促进细胞周期从 G<sub>1</sub> 期到 S 期进程的主要蛋白;cyclin D1 在 G<sub>1</sub> 期的诱导作用是使生长因子转录激活<sup>[14]</sup>,其过度表达与肿瘤的发

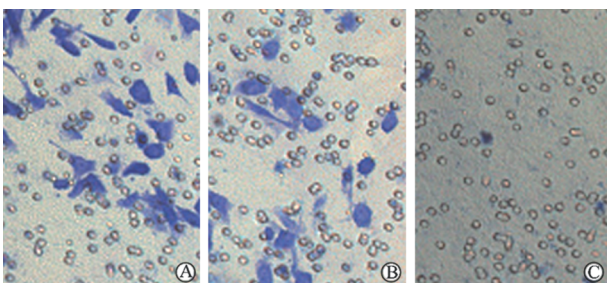


图6 下调 Pygo2 表达抑制细胞侵袭

Fig 6 Down-regulation of Pygo2 expression decreased cell invasion ability

A: Control group; B: scr shRNA group; C: Pygo2 shRNA group. Original magnification: ×200

### 3 讨论

胶质瘤与 Wnt 信号系统激活密切相关, Pygo-pus 是 Wnt 信号系统中重要功能蛋白,而 Pygo2 是

生密切相关<sup>[15]</sup>。Wnt 通路中未磷酸化的  $\beta$ -catenin 在胞质和胞核中积累,与 TCF、Bcl-9 和 Pygopus 相互作用<sup>[4,6]</sup>,随后启动细胞生长和增殖的靶基因转录,如 cyclin D1 和 c-myc。

本研究发现抑制 Pygo2 表达后,cyclin D1 水平也随之显著下调,但不影响其亚细胞定位,而抑制 Pygo2 表达对  $\beta$ -catenin 的表达及定位均没有影响。这说明 Pygo2 shRNA 抑制肿瘤细胞增殖可能是通过下调 Wnt 信号靶基因 cyclin D1 水平而实现的。

综上所述,Pygo2 是 Wnt 信号的下游重要功能蛋白,不依赖  $\beta$ -catenin 来调控 Wnt 信号下游靶基因的转录激活;抑制 Pygo2 表达后,能有效地阻断细胞周期由 G<sub>1</sub> 期向 S 期过渡,从而延缓细胞周期进程,抑制 DNA 合成和细胞生长增殖与侵袭。Pygo2 shRNA 抑制肿瘤细胞增殖的作用可能是通过下调 Wnt 信号靶基因 cyclin D1 表达实现的。这些结论对于胶质瘤生物基因治疗的基因靶向策略具有重要意义,同时也为胶质瘤的基因治疗以及新药的研发提供新的理论依据。

#### [参考文献]

- [1] Svedlund J, Aurén M, Sundström M, Dralle H, Akerström G, Björklund P, et al. Aberrant WNT/ $\beta$ -catenin signaling in parathyroid carcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2010, 9:294-300.
- [2] El Wakil A, Lalli E. The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in adrenocortical development and cancer[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2011, 332:32-37.
- [3] Sareddy G R, Panigrahi M, Challa S, Mahadevan A, Babu P P. Activation of Wnt/ $\beta$ -catenin/Tcf signaling pathway in human astrocytomas[J]. *Neurochem Int*, 2009, 55:307-317.
- [4] Kramps T, Peter O, Brunner E, Nellen D, Froesch B, Chatterjee S, et al. Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear  $\beta$ -catenin-TCF complex[J]. *Cell*, 2002, 109:47-60.
- [5] Li B, Mackay D R, Ma J, Dai X. Cloning and developmental expression of mouse pygopus 2, a putative Wnt signaling component[J]. *Genomics*, 2004, 84:398-405.
- [6] Thompson B, Townsley F, Rosin-Arbesfeld R, Musisi H, Bienz M. A new nuclear component of the Wnt signaling pathway [J]. *Nat Cell Biol*, 2002, 4:367-373.
- [7] Popadiuk C M, Xiong J, Wells M G, Andrews P G, Dankwa K, Hirasawa K, et al. Antisense suppression of pygopus2 results in growth arrest of epithelial ovarian cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12:2216-2223.
- [8] Andrews P G, Lake B B, Popadiuk C, Kao K R. Requirement of pygopus 2 in breast cancer[J]. *Int J Oncol*, 2007, 30:357-363.
- [9] De D, Chen A, Wu Z, Lv S, He G, Qi Y. Overexpression of Pygopus2 protects HeLa cells from vinblastine-induced apoptosis [J]. *Biol Chem*, 2009, 390:157-165.
- [10] 王洪鹏,王 驰,谭 毅,叶 琳,陈鸿雁. Kai1/CD82 对人喉癌 Hep-2 细胞株增殖能力的影响[J]. *第二军医大学学报*, 2010, 31:157-160.  
Wang H P, Wang C, Tan Y, Ye L, Chen H Y. Effect of metastasis suppressor gene Kai1/CD82 on proliferation of laryngocarcinoma Hep-2 cell line[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2010, 31:157-160.
- [11] Kuhnert F, Davis C R, Wang H T, Chu P, Lee M, Yuan J, et al. Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101:266-271.
- [12] Lake B B, Kao K R. Pygopus is required for embryonic brain patterning in *Xenopus* [J]. *Dev Biol*, 2003, 261:132-148.
- [13] Jung K H, Kim J K, Noh J H, Eun J W, Bae H J, Xie H J, et al. Targeted disruption of Nemo-like kinase inhibits tumor cell growth by simultaneous suppression of cyclin D1 and CDK2 in human hepatocellular carcinoma[J]. *J Cell Biochem*, 2010, 110:687-696.
- [14] Lange C, Huttner W B, Calegari F. Cdk4/cyclin D1 overexpression in neural stem cells shortens G<sub>1</sub>, delays neurogenesis, and promotes the generation and expansion of basal progenitors [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 5:320-331.
- [15] Hübner R, Schmöle A C, Liedmann A, Frech M J, Rolfs A, Luo J. Differentiation of human neural progenitor cells regulated by Wnt-3a[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 400:358-362.

[本文编辑] 徐 佳,贾泽军