

分类号 R651

密级 公开

U D C 10384

编号 57035

厦 门 大 学

博 士 后 研 究 工 作 报 告

Pygo2 基因在脑胶质瘤中的表达、作用及机制研究

王 海 东

工作完成日期 2009 年 4 月 15 日

报告提交日期 2009 年 4 月 28 日

厦门大学

2009 年 4 月

Pygo2 基因在脑胶质瘤中的表达、作用及机制研究
Expression , Role and Mechanism Studies on
pygo2 gene in brain Glioma

王海东

流动站（一级学科）名称 厦门大学生命科学院

专 业（二级学科）名称 分子肿瘤学

研究工作起始时间 2007 年 3 月 1 日

研究工作期满时间 2009 年 3 月 30 日

厦 门 大 学

2009 年 4 月

厦门大学博士后研究工作报告著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用博士后研究工作报告的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交该报告的纸质版和电子版，有权将该报告用于非赢利目的的少量复制并允许该报告进入学校图书馆被查阅，有权将该报告的内容编入有关数据库进行检索，有权将博士后研究工作报告的标题和摘要汇编出版。保密的博士后研究工作报告在解密后适用本规定。

本研究报告属于： 1、保密（）， 2、不保密（）

纸本在 _____ 年解密后适用本授权书；

电子版在 _____ 年解密后适用本授权书。

作者签名： _____ 日期： _____ 年 月 日

导师签名： _____ 日期： _____ 年 月 日

提 要

目前对脑胶质瘤多采用手术切除、放疗和化疗等综合治疗，由于胶质瘤的侵袭生长、手术难以全切，而多数恶性胶质瘤细胞对放疗及化疗的抗性，使临床治疗罕有疗效，近 40 年来，治疗上无根本突破，积极开拓胶质瘤治疗的新策略是当前迫切需要研究的课题。随着近年对胶质瘤分子病理机制的认识不断深入，胶质瘤基因治疗正成为研究热点。

RNAi 技术体系的建立，为人类基因功能研究和疾病基因治疗开辟了一个革命性的新领域，人们对 RNAi 技术应用于恶性肿瘤的治疗给予厚望。

Wnt 信号通路控制多种细胞的命运，参与细胞的增殖、分化、凋亡等基本过程，在正常组织发育以及肿瘤形成中都起着非常重要的作用。wnt 信号系统的激活与各级别脑胶质瘤密切相关。pygopus 基因是近年新发现的 wnt 信号系统中重要功能蛋白，对 wnt 信号的激活具有直接调控作用。已有的研究表明 pygopus 与多种恶性肿瘤发生密切相关，我们通过免疫组化、荧光 PCR 技术、Western blot 等方法发现 pygopus 基因在脑胶质瘤中具有高表达，并随肿瘤级别增加而表达增高。

因此，我们构建了 pygopus 过表达质粒和 RNA 干扰质粒，采用基因过表达技术和 RNAi 技术，分别在胶质瘤细胞中过表达 pygopus 基因或敲除 pygopus 表达，通过测定细胞生长曲线，平板克隆形成实验，流式细胞术测定细胞周期等对肿瘤细胞的恶性生物学行为变化进行考察，评价 pygo2 表达上调或下调对肿瘤细胞恶性表型的影响，以明确 pygopus 在脑胶质瘤恶性改变中的作用，阐明 RNA 干扰 pygopus 表达对胶质瘤的治疗价值，最后，通过体内实验来进一步研究 pygopus 在胶质瘤形成以及 Wnt 信号中的作用，明确 RNA 干扰治疗的体内实验效果。

通过以上实验明确了 pygopus 是 wnt 信号的下游重要功能蛋白，不依赖 β -catenin 来调控 wnt 信号下游靶基因的转录激活，pygo2siRNA 抑制肿瘤细胞增殖的作用可能是通过降低 wnt 信号靶基因 cyclinD1 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。

英文缩写词表

英文缩写	英文全称	中文全称
Pygo2	Pygopus2	—————
RNAi	RNA Interference	RNA 干扰
RISC	RNA-Inducing Silence Complex	RNA 诱导沉默复合体
SABC	StreptAvidin-Biotin-enzyme Complex	链酶亲和素-生物素-酶复合物
IRS	Immunoreactivity Score	免疫反应评分
RealtimePCR	Realtime Polymerase Chain Reation	实时荧光 PCR
CT	Cycle Time	起始循环数
Wnt	Wingless/ int-1	无翅基因/小鼠乳腺癌基因
IHC	Immunohistochemistry	免疫组化
MTT	Methyl Thiazolyl Tetrazolium	噻唑兰
Western	Western Blotting	免疫印迹
ECL	Enhanced Chemical Luminescent	增强化学发光底物
HRP	Horse Radish Peroxidase	辣根过氧化物酶
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	DMEM 培养基
PI	Proliferation Index	增殖指数
FCM	Flowcytometry	流式细胞术
MRI	Magnetic Resonance Imaging	核磁共振成像

目 录

综述 RNA 干扰在脑胶质瘤领域研究进展.....	1
实验研究.....	9
第一部分 PYGO-2 在脑胶质瘤中的表达.....	9
材料与方法.....	9
结果.....	10
讨论.....	10
第二部分 PYGO-2 在脑胶质瘤细胞系中的表达.....	15
材料与方法.....	15
结果.....	16
讨论.....	16
第三部分 PYGO-2 过表达载体的构建及在 C6 细胞中表达.....	20
材料与方法.....	20
结果.....	21
讨论.....	22
第四部分 pSUPER-pygo2 真核表达载体的构建及活性鉴定.....	25
材料与方法.....	25
结果.....	27
讨论.....	28
第五部分 RNA 干扰真核表达载体 pSUPER.puro- Pygo2 的构建.....	32
材料与方法.....	32
结果.....	33
讨论.....	34
第六部分 RNAi 抑制 Pygopus2 表达对人脑胶质瘤细胞系 U251 增殖活性影响研究.....	39
材料与方法.....	39
结果.....	43
讨论.....	44
第七部分大鼠脑胶质瘤模型构建及 pygo2 RNA 干扰体内研究.....	53
攻读博士学位期间发表的学术论文及其他成果.....	58
博士后工作期间发表的学术论文及其他成果.....	59
中文摘要.....	1
英文摘要.....	4
致 谢.....	

Category

Review the progression of RNA interference research in glioma	1
Experiment study	9
Part 1 PYGO-2 expression in human glioma	9
Material and method	9
Result	10
Discussion	10
Part2 PYGO-2 expression in glioma cell lines	15
Material and method	15
Result	16
Discussion	16
Part3 pcDNA3.1-PYGO-2-flag construction and expression in C6 cell lines	20
Material and method	20
Result	21
Discussion	22
Part4 pSUPER-pygo2 eukaryotic expression vector construction and identification of its activity	25
Material and method	25
Result	27
Discussion	28
Part5 construction of eukaryotic expression vector pSUPER.puro- Pygo2 for RNA interference	32
Material and method	32
Result	33
Discussion	34
Part6 the effect on U251 proliferation activity by down-regulating pygo2 expression with RNAi technique	39
Material and method	39
Result	43
Discussion	44
Part7 SD rat glioma model construction and RNAi treatment in vivo	53
Research paper and other achievement for doctoral academic degree	58
Research paper and other achievement during postdoctoral period	59
Chinese digest	1
English digest	4
Thanks	

综 述

RNA 干扰在脑胶质瘤领域研究进展

从 2000 年起, Science 杂志已经连续 3 年将 RNA 方面的研究进展列入当年世界十大科技突破。RNAi 技术体系的建立, 为人类基因功能研究和疾病基因治疗开辟了一个革命性的新领域。因此, 人们对 RNAi 技术应用于恶性肿瘤的治疗给予厚望。脑胶质瘤是高度侵袭并具挑战性的中枢神经系统肿瘤, 目前的综合治疗效果有限, 因此急需一种全新的治疗方法。无疑, RNA 干扰治疗是目前的最佳选择。

1. RNA 干扰技术简介

RNA 干扰的机制

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 指体外人工合成的或体内的双链 RNA (dsRNA) 在细胞内特异性的将与之同源的 mRNA 降解成 21nt~23nt 的小片段, 使相应的基因沉默。由于 RNAi 作用于 RNA 水平, 故又称转录后基因沉默 (PTGS)^[1,2,3]。目前, 遗传学和生物化学的研究成果向我们揭示了 RNAi 的机制, 但其具体细节仍需进一步研究。根据对线虫、果蝇和拟南芥的研究结果, 提出了一种模型^[4, 5, 6]。由 RNA 病毒入侵, 转座子转录, 基因组中反向重复序列转录等所产生的 dsRNA 分子在细胞内被特定的蛋白复合物识别, 启动相关蛋白结合到 dsRNA 分子上, 其中 RdRP (RNA dependent RNA Polymerase) 对 dsRNA 进行复制, 产生足够数量的 dsRNA, 随后或同时, Dicer^[7] 核酸酶 (RNase III 核糖核酸酶家族成员) 或 Dicer 核酸酶同源物将 dsRNA 剪切成 21~23nt siRNA, 3' 端带有 2 个碱基突出的粘性末端, 5' 为磷酸基团, 这一结构对于 siRNA 行使其功能是至关重要的。剪切位点是特异性的, 一般在 U 处。然后, RNAi 特异性的核酸外切酶, 核酸内切酶 (RNase III 同源物), 解旋酶, 辅助识别同源序列蛋白和其它一些蛋白与 siRNA 结合成 RNA 诱导沉默复合体——RISC (RNA-inducing silence complex) 识别目标 mRNA, 其中的反义链与目标 mRNA 结合, 而正义链则被置换出来。继而, RISC 复合物中的 RNase III (可能是 Dicer) 在目标 mRNA 与 siRNA 结合区域的中间将之切断。这样的过程多次发生后, 一个完整的 mRNA 就被降解成多个 21~23nt 的小片段, 从而导致相应的基因表达沉默。人工合成的 siRNA 在果蝇、线虫和哺乳动物细胞中也可诱导特异的基因沉默。这表明 dsRNA 的加工过程和随后目的 mRNA 降解过程是可以分离的。siRNA 3' 端各有两个 2nt 碱基突出的黏性末端 (这一结构特征也证明了 siRNA 是由 RNase III 产生的), 这种结构对于 siRNA 的引发是必需的。体外、体内实验均表明平端的 siRNA 使 RNAi 作用大为减弱。这可能是由于黏性末端存在时, 单链结合蛋白与之结合, 避免了加工 dsRNA 的因子与之结

合。

RNA 干扰的生物学意义

RNAi 是生物普遍存在的 RNA 水平上调控基因表达的机制，其最核心的生物学意义在于监控异常的或者外源的遗传物质在机体内的水平，是一种原始的基因组对抗外来基因表达的保护机制[8, 9, 10]，同时 RNAi 也具有调控基因表达的作用。RNAi 的生物学意义包括很多方面，如防御病毒感染、维持基因组中转座子的稳定、清除异常的 RNA、参与基因表达调控等，这些都表明 RNAi 在生物体中起基因调控的作用。

RNA 干涉的应用

RNAi 提供了一种特异性抑制功能基因的简便方法，通过特异性的 siRNA 导入细胞或构建载体等方法，能产生类似基因敲除的效果，得以研究靶基因的功能。与传统的基因敲除和反义核酸技术相比更加简单高效，是目前研究基因功能的重要工具之一。Fraser^[11]等用此技术对线虫 2 号染色体上的基因表型进行研究，使已知表型基因数从原来的 70 个增加到 347 个。Novina^[12]等通过导入特异 siRNA，干扰 TCD4⁺的 CD4 分子的表达，阻止了 HIV 病毒的感染。在肿瘤治疗方面，Wilda^[13]等针对 Bcr/Abl 基因的融合点设计了特异的 siRNA，沉默该融合基因，使无限制生长的肿瘤细胞凋亡。

RNAi 的发现改变了人们对细胞基因调控的传统理解，提供了特异性阻断基因表达、评价基因功能的新策略，并以其高效、特异、省时和操作简单的优势在肿瘤研究领域占有一席之地，成为肿瘤研究中不可缺少的分子生物学工具。

2. RNA 干扰在胶质瘤领域的应用

自从 1999 年在人类乳腺癌细胞中第一次成功进行 RNAi 报道以来^[14]，一些肿瘤研究机构已经将肿瘤治疗靶点定位于和代谢、信号转导、细胞周期等相关的基因，并取得巨大成功。今天，可以查到有关胶质瘤 RNAi 治疗的文献将近 50 篇。可以理解的是大多数研究是针对细胞黏附、迁移、侵袭性等方面进行相关研究，另有一部分是和凋亡有关的通路以及和 EGFR 相关的信号转导方面。在另一些研究领域，胶质瘤代谢、肿瘤抑制因子/原癌基因、低氧效应、放射免疫标靶、生物活性脂诱导的信号、Akt/P κ B/PKC 通路等，都有被作为 RNAi 靶点进行研究。以下将分别做一综述。

细胞黏附与侵袭

受体酪氨酸磷酸化酶 ξ 是胶质瘤 RNAi 体外研究中第一个靶点[15]。同时几个研究小组通过下调基质金属蛋白酶和他们相关的蛋白、通路 [16] [17]，来抑制胶质瘤侵袭和迁移。其他被用做 RNAi 的是和肿瘤迁移相关的蛋白 MSAP [18]、酪氨酸激酶 PyK2[19]、Rho 家族中小 GTP 酶 Rac1 和 Rac3[20]、Eph 受体酪氨酸激酶[21]、CD155[22]、(即脊髓灰质炎病毒受体蛋白)、FPR (formyl peptide receptor, 甲酰多肽受体蛋白，这是在胶质瘤中表达并介导迁移和增殖能力的另一个 G 偶联蛋白)、血管生成因子

/VEGF 以及 G 蛋白偶联受体 Cxcr4[23] (通过敲低热休克同源蛋白 73 (Hsc73) 来抑制其活性)。

Bcl-2 蛋白家族等凋亡相关蛋白

该家族成员的作用是促进凋亡或抗凋亡, 因此, 在线粒体介导的凋亡过程中起重要作用。研究小组直接沉默转录蛋白或以转录下游效应蛋白来抑制凋亡通路, 第一个被沉默的靶点是 P32[24], 其为线粒体通道形成蛋白, 当沉默之后, 其通过其上游的凋亡诱导因子 HrK 的作用而促进凋亡。另一个研究是以 XIAP (chromosome-like inhibitor of apoptosis, 染色体样凋亡抑制因子) 为靶点的, 其为凋亡抑制家族的一员, 通过对其进行 RNA 干扰, 降低了胶质瘤对化疗药物神经酰胺 (CERAMIDE) 的抗性[25]。还有以 Bcl2 家族相关凋亡通路作为 RNA 干扰高效靶点的有 Bcl-X_L、Bcl-W、Apaf-1 和 Caspase3[26] [27]。这些蛋白的下调导致胶质瘤 Erucyl 磷酸胆碱的化疗敏感性增加, 能够诱导化疗耐药细胞系的凋亡[28]。同样, FAS 相关磷酸化酶 (FAP-1) 作为靶点, 通过 RNAi 增强了胶质瘤中 Fas 配体介导的细胞凋亡, 加强了胶质瘤对凋亡的敏感性[29]。还有 PI3/Akt 通路作为 RNAi 靶点, 促进了缺氧状态下神经母细胞瘤的凋亡[30]。这是通过缺氧和再供氧条件下进行实验的。另一个与胶质瘤凋亡有关通路的靶点是 Jak-Stat 通路中的 Stat3 蛋白[31]。

另一些在胶质瘤细胞体外或活体研究中具有重要作用的基因是 Notch 家族蛋白和其配体, 他们在细胞增殖和凋亡分化中起重要作用。在体外细胞水平, 预先敲低 Notch-1 后, 其配体蛋白 Delta-like-1 及 Jagged-1 能够增强凋亡、降低增殖, 并延长了小鼠原位移植瘤模型的生存期[32]。

EGF 受体为靶点

EGFR 在脑胶质瘤中高表达, 长期以来被认为是是在增殖和恶性表型中起重要作用的基因, 因此它是胶质瘤 RNAi 治疗的热门靶点。更有趣的是它是 RNA 干扰在体内敲低的第一个靶点[33]。Pardridge 和同事们通过制作脑胶质瘤原位移植瘤模型, 静脉输注含有靶向 EGFR 的 shRNA 表达载体的免疫脂质体。将脂质体标定在移植瘤上, 使用两个单克隆抗体配体。一个针对转铁蛋白受体蛋白, 另一个针对胰岛素受体蛋白。当前者将脂质体锚定在血脑屏障上, 后者将脂质体锚定在脑肿瘤细胞中。

其他的体外方法包括病毒介导的 EGFR 敲低, 靶点为在胶质瘤中常见的 EGFR 的突变异构体 EGFRvIII。该实验敲掉了 EGFR 的表达, 导致 Akt 表达降低[34], 因此, 促进了靶细胞的凋亡以及细胞周期的 G2M 期阻滞。因此特异性敲除 EGFR 的突变异构体在未来胶质瘤治疗策略中是可行的方法。

肿瘤抑制因子, 原癌基因和放射损毁

P53 是促进细胞周期阻滞、细胞凋亡的肿瘤抑制因子, 在表达野生型 P53 基因的胶质瘤中通过逆转录病毒表达 SiRNA, 然后进行 γ 射线放射治疗, 用来研究 γ 射线诱导细胞凋亡的方式[35]。另一研究通过成纤维细胞生长因子 (RFT, regulator of fibroblast growth factor-2) 来对其 G1/S 细胞周期阻滞作用进行研究, 将其过表达后, 能够诱导表达野生型 p53 基因胶质瘤的细胞凋亡, 而通过 RNAi 诱导的 P53 敲除可以抑制细胞凋亡, 说明 RFT 与 p53 通路能够共同促进细胞凋亡。

在另一个与放射诱导 DNA 损伤实验相似的研究中[36]，分别检测了 DNA 依赖的蛋白激酶催化亚单位 (DNA-PKcs) 和毛细血管异常扩张症蛋白 (ATM, ataxia telangiectasia mutated) 表达，两者对于双链 DNA 断裂和细胞周期阻滞起关键作用。RNAi 敲低 DNA-PKcs 表达后，同时检测 ATM 的表达变化，明确了 ATM 依赖的 DNA 损伤修复反应通路与 DNA-PKcs 通路的交叉作用[37]。

另一独立研究显示：在真核髓母细胞瘤细胞系中，有 STX2 基因 (orthodenticle, Drosophila, Homolog of 2., a homeobox gene, 同源框基因) 的高表达，约扩增 10 倍，作者认为在这些肿瘤中 STX2 可以被认为是原癌基因，因此对其进行 RNAi 后，显示髓母细胞瘤细胞系的生长受到抑制[38]。针对胶质瘤中另一原癌基因垂体瘤转化基因 (PTTG, pituitary tumor transforming gene) 进行研究，发现其具有高表达，通过 RNAi 将 PTTG 敲低后显示细胞增殖明显受到抑制[39]。

胶质瘤血管形成

只有一个体内研究报道这一胶质瘤中关键通路[40]，通过 shRNA 表达质粒介导，血管内皮生长因子 (VEGF, vascular endothelial growth factor) 表达被成功敲低，同时抑制了胶质瘤细胞的增殖。[41]

SiRNA 介导的针对胶质瘤免疫反应调控

在高度恶性胶质瘤如多形性胶质母细胞瘤中 NKG2D 表达是降低的[42]，它是使 CD8 阳性 T 细胞和自然杀伤细胞激活的免疫激活受体。而 (transforming growth factor- β , 转化生长因子 β) 是能够下调 NKG2D 表达的关键蛋白，Weller 和同事们以 TGF- β 为靶点进行 RNAi，结果显示这一方法使针对胶质瘤的免疫反应增强了，抑制了肿瘤细胞的迁移和侵袭[43]。另一与此相关但却是体内的研究显示，白细胞介素 (IL-13) 受体在胶质瘤中高表达，通过受体导向的细胞毒性治疗来研究是否介导抗肿瘤反应。通过 RNAi 敲低 IL-13 受体的表达，显示 IL-13 配体结合能力下降，伴随有 IL-13 介导的细胞毒性降低[44]。

代谢和缺氧诱导因子为靶点的 RNAi

两个研究机构报道了针对恶性胶质瘤的异常代谢表型的 RNAi 研究，其中一个研究通过抑制乳酸的外流来考察胶质瘤高度糖酵解的特性，在胶质瘤中单糖转运蛋白 (MCTs, monocarboxylate transporters) 是其中一种高表达的基因，siRNA 以单糖转运 MCTs 为靶点，引起了肿瘤细胞的加速凋亡和坏死[45]。

另一报道是在大鼠的胶质母细胞瘤细胞系中，以 leptin 为靶点，敲低其 mRNA 和蛋白水平表达后，引起细胞凋亡和坏死增加[46]。

在胶质瘤缺氧诱导因子为靶点的研究中[47]，在 SiRNA 敲低 HIF-2 α (在胶质瘤缺氧区高度表达) 后，作者发现 HIF-2 α 在抑制肿瘤生长的同时能够增加血管生成，其中可能的原因是增加了细胞的凋亡。因此，敲低 HIF-2 α 表达后，可以导致缺氧状态下胶质母细胞瘤细胞的凋亡减少，提示当 HIF 抑制因子作为抗肿瘤治疗方法时，可能会产生凋亡的降低。

胶质瘤中 RNAi 的其他通路和蛋白

RNA 干扰的靶点还包括 PKC 通路，G 蛋白偶联受体激活促有丝分裂蛋白，以及

生物合成酶等等。为寻找新的治疗方法,各个研究机构正针对多种胶质瘤细胞通路,包括信号转导,细胞周期,代谢和免疫调控等,进行 RNAi 研究。

总之,通过大量的实验室研究, RNAi 技术被认为是脑胶质瘤治疗的最有希望的临床治疗方法之一,但是对于任何新技术而言,无数的障碍需要克服,如肿瘤的靶点、RNAi 的全身应用、合成的 siRNA 的稳定性,在肿瘤内或肿瘤残腔内 shRNA 的长期稳定表达等等。但是随着 RNAi 体内应用研究的不断开展和深入,必将为这些靶点未来直接临床应用铺平道路。

参考文献

- 1.Fire A,Xu S,Mello CC,et al.Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in caenorhabditis elegans[J].Nature.1998,391:806-811.
- 2.Caplen NJ.A new approach to the inhibition of gene expression[J].Trend Biotechnol.2002,20(2):49-51.
- 3.Brummelkamp TR,Bernards R,Agami R.A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells[J].Science.2002,296:550-553.
- 4.Fire A.RNA-triggered gene silencing[J].Trends Genet.1999 Sep;15(9):358-363.
- 5.Bosher JM,Labouesse M.RNA interference:genetic wand and genetic watchdog[J].Nat Cell Biol.2000 Feb;2(2):E31-6.
- 6.Wianny F,Zernicka,Goetz M.Specific interference with gene function by double stranded RNA in early mouse development[J].Nature Cell Biol.2000,2:70-75.
- 7.Gregory H,Hannon.RNA interference[J].Nature.2002,418:244-251
- 8.Yu JY,DeRuiter SL,Turner DL.RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells[J].Proc Natl Acad Sci USA.2002,99(9):6047-52
- 9.Ruiz MT,Voinner O,Baulcombe DC.Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing[J].Plant Cel.1998,10:937-946
- 10.Waterhouse PW,Wang MB,Lough T.Gene silencing as an adaptive defence against viruses[J].Nature.2001,411:834-842
- 11.Fraser AG,Kamath RS,Zipperlen P,et al.Functional genomic analysis of C.elegans chromosomeII by systemic RNA interference[J].Nature,2000,408(6810):325-330.
- 12.Novina CD,Murray MF,Dykxhoorn DM,et al.siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection[J].Nat Med,2002,8(7):681-686
- 13.Wilda M,Fuchs U,Wossman W, et al.Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi)[J]Oncogene,2002,21(37):5716-5724
14. Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P., and Sharp, P.A. Targeted mRNA Degradation by Double-stranded RNA In Vitro. Genes Dev. 13, 3191-3197 (1999)
15. Muller, S., Kunkel, P., Lamszus, K., Ulbricht, U., Lorente, G. A., Nelson, A. M., von Schack, D., Chin, D. J., Lohr, S. C., Westphal, M., and Melcher, T. A Role for Receptor Tyrosine Phosphatase Zeta in Glioma Cell Migration. Oncogene 22, 6661-6668 (2003).

16. Lakka, S. S., Gondi, C. S., Yanamandra, N., Olivero, W. C., Dinh, D.H., Gujrati, M., and Rao, J. S. Inhibition of Cathepsin B and MMP-9 Gene Expression in Glioblastoma Cell Line Via RNA Interference Reduces Tumor Cell Invasion, Tumor Growth and Angiogenesis. *Oncogene* 23, 4681-4689 (2004).
17. Zhang, J., Sarkar, S., and Yong, V. W. The Chemokine Stromal Cell Derived Factor-1 (CXCL12) Promotes Glioma Invasiveness Through MT2-matrix Metalloproteinase. *Carcinogenesis* 26, 2069-2077 (2005).
18. Bornhauser, B. C. and Lindholm, D. MSAP Enhances Migration of C6 Glioma Cells Through Phosphorylation of the Myosin Regulatory Light Chain. *Cell Mol. Life Sci.* 62, 1260-1266 (2005)
19. Lipinski, C. A., Tran, N. L., Menashi, E., Rohl, C., Kloss, J., Bay, R. C., Berens, M. E., and Loftus, J. C. The Tyrosine Kinase pyk2 Promotes Migration and Invasion of Glioma Cells. *Neoplasia* 7, 435-445 (2005).
20. Chan, A. Y., Coniglio, S. J., Chuang, Y. Y., Michaelson, D., Knaus, U. G., Philips, M. R., and Symons, M. Roles of the Rac1 and Rac3 GTPases in Human Tumor Cell Invasion. *Oncogene* 24, 7821-7829 (2005).
21. Nakada, M., Niska, J. A., Tran, N. L., McDonough, W. S., and Berens, M. E. EphB2/R-Ras Signaling Regulates Glioma Cell Adhesion, Growth, and Invasion. *Am. J. Pathol.* 167, 565-576 (2005).
22. Sloan, K. E., Eustace, B. K., Stewart, J. K., Zehetmeier, C., Torella, C., Simeone, M., Roy, J. E., Unger, C., Louis, D. N., Ilag, L. L., and Jay, D. G. CD155/PVR Plays a Key Role in Cell Motility During Tumor Cell Invasion and Migration. *BMC. Cancer* 4, 73 (2004).
23. Ding, Y., Li, M., Zhang, J., Li, N., Xia, Z., Hu, Y., Wang, S., and Fan, G. H. The Heat Shock Cognate Protein 73 is a CXCR4 Binding Protein that Regulates the Receptor Endocytosis and the Receptor-mediated Chemotaxis. *Mol. Pharmacol.* (2005).
24. Gotoh, F., Kuchino, Y. and Kitanaka, C. Physical and Functional Interaction Between BH3-only Protein Hrk and Mitochondrial Pore-forming Protein p32. *Cell Death. Differ.* 11, 771-781 (2004).
25. Hatano, M., Mizuno, M., and Yoshida, J. Enhancement of C2-ceramide Antitumor Activity by Small Interfering RNA on X Chromosome-linked Inhibitor of Apoptosis Protein in Resistant Human Glioma Cells. *J. Neurosurg.* 101, 119-127 (2004).
26. Tran, N. L., McDonough, W. S., Savitch, B. A., Sawyer, T. F., Winkles, J. A., and Berens, M. E. The Tumor Necrosis Factor-like Weak Inducer of Apoptosis (TWEAK)-fibroblast Growth Factor-inducible 14 (Fn14) Signaling System Regulates Glioma Cell Survival Via NFkappaB Pathway Activation and BCL-XL/BCL-W Expression. *J. Biol. Chem.* 280, 3483-3492 (2005).
27. Kano, H., Arakawa, Y., Takahashi, J. A., Nozaki, K., Kawabata, Y., Takatsuka, K., Kageyama, R., Ueba, T., and Hashimoto, N. Overexpression of RFT Induces G1-S Arrest

- and Apoptosis Via p53/p21(Waf1) Pathway in Glioma Cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317, 902-908 (2004).
28. Kugler, W., Buchholz, F., Kohler, F., Eibl, H., Lakomek, M., and Erdlenbruch, B. Downregulation of Apaf-1 and Caspase-3 by RNA Interference in Human Glioma Cells: Consequences for Erucylphosphocholine-induced Apoptosis. *Apoptosis*. 10, 1163-1174 (2005).
29. Foehr, E. D., Lorente, G., Vincent, V., Nikolich, K., and Urfer, R. FAS Associated Phosphatase (FAP-1) Blocks Apoptosis of Astrocytomas Through Dephosphorylation of FAS. *J. Neurooncol.* 74, 241-248 (2005)
30. Liu, X. H., Yu, E. Z., Li, Y. Y., Rollwagen, F. M., and Kagan, E. RNA Interference Targeting Akt Promotes Apoptosis in Hypoxia-exposed Human Neuroblastoma Cells. *Brain Res.* (2006).
31. Konnikova, L., Kotecki, M., Kruger, M. M., and Cochran, B. H. Knockdown of STAT3 Expression by RNAi Induces Apoptosis in Astrocytoma Cells. *BMC. Cancer* 3, 23 (2003).
32. Purow, B. W., Haque, R. M., Noel, M. W., Su, Q., Burdick, M. J., Lee, J., Sundaresan, T., Pastorino, S., Park, J. K., Mikolaenko, I., Maric, D., Eberhart, C. G., and Fine, H. A. Expression of Notch-1 and Its Ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is Critical for Glioma Cell Survival and Proliferation. *Cancer Res.* 65, 2353-2363 (2005).
33. Kang, C. S., Pu, P. Y., Wang, G. X., Li, Y. H., Dong, L., and Wang, H. Inhibitory Effects of siRNA Targeting Epidermal Growth Factor Receptor on Proliferation and Invasion of Human Glioblastoma Cells. *Zhonghua Yi. Xue. Za Zhi.* 84, 1503-1508 (2004).
34. Kang, C. S., Pu, P. Y., Li, Y. H., Zhang, Z. Y., Qiu, M. Z., Huang, Q., and Wang, G. X. An In Vitro Study on the Suppressive Effect of Glioma Cell Growth Induced by Plasmid-based Small Interference RNA (siRNA) Targeting Human Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Neurooncol.* 74, 267-273 (2005).
35. Hara, S., Nakashima, S., Kiyono, T., Sawada, M., Yoshimura, S., Iwama, T., Banno, Y., Shinoda, J., and Sakai, N. p53-Independent Ceramide Formation in Human Glioma Cells During Gamma-radiation induced Apoptosis. *Cell Death. Differ.* 11, 853-861 (2004).
36. Okhrimenko, H., Lu, W., Xiang, C., Hamburger, N., Kazimirsky, G., and Brodie, C. Protein Kinase C-epsilon Regulates the Apoptosis and Survival of Glioma Cells. *Cancer Res.* 65, 7301-7309 (2005).
37. Peng, Y., Woods, R. G., Beamish, H., Ye, R., Lees-Miller, S. P., Lavin, M. F., and Bedford, J. S. Deficiency in the Catalytic Subunit of DNA dependent Protein Kinase Causes Down-regulation of ATM. *Cancer Res.* 65, 1670-1677 (2005).
38. Di, C., Liao, S., Adamson, D. C., Parrett, T. J., Roderick, D. K., Shi, Q., Lengauer, C., Cummins, J. M., Velculescu, V. E., Fults, D. W., McLendon, R. E., Bigner, D. D., and Yan, H. Identification of OTX2 as a Medulloblastoma Oncogene Whose Product can be Targeted by All-trans Retinoic Acid. *Cancer Res.* 65, 919-924 (2005)

39. Tfelt-Hansen, J., Yano, S., Bandyopadhyay, S., Carroll, R., Brown, E.M., and Chattopadhyay, N. Expression of Pituitary Tumor Transforming Gene (PTTG) and its Binding Protein in Human Astrocytes and Astrocytoma Cells: Function and Regulation of PTTG in U87 Astrocytoma Cells. *Endocrinology* 145, 4222-4231 (2004).
40. Jiang, X. B., Zhao, H. Y., Zhou, F., Liu, R. E., Zhang, F. C., and Zhao, J. S. Vascular Endothelial Growth Factor shRNA Mediated by pEGFP-H1 Vector Plasmid Effectively Inhibits Glioma Proliferation: An Experimental Study. *Zhonghua Yi. Xue. Za Zhi.* 85, 547-550 (2005).
41. Saydam, O., Glauser, D. L., Heid, I., Turkeri, G., Hilbe, M., Jacobs, A. H., Ackermann, M., and Fraefel, C. Herpes Simplex Virus 1 Amplicon Vector-mediated siRNA Targeting Epidermal Growth Factor Receptor Inhibits Growth of Human Glioma Cells In Vivo. *Mol. Ther.* 12, 803-812 (2005).
42. Wischhusen, J., Friese, M. A., Mittelbronn, M., Meyermann, R., and Weller, M. HLA-E Protects Glioma Cells from NKG2D-mediated Immune Responses In Vitro: Implications for Immune Escape In Vivo. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64, 523-528 (2005).
43. Friese, M. A., Wischhusen, J., Wick, W., Weiler, M., Eisele, G., Steinle, A., and Weller, M. RNA Interference Targeting Transforming Growth Factor-beta Enhances NKG2D-mediated Antiglioma Immune Response, Inhibits Glioma Cell Migration and Invasiveness, and Abrogates Tumorigenicity In Vivo. *Cancer Res.* 64, 7596-7603 (2004).
44. Kawakami, K., Kioi, M., Liu, Q., Kawakami, M., and Puri, R. K. Evidence that IL-13R α 2 Chain in Human Glioma Cells is Responsible for the Antitumor Activity Mediated by Receptor-directed Cytotoxin Therapy. *J. Immunother.* 28, 193-202 (2005).
45. Mathupala, S. P., Parajuli, P., and Sloan, A. E. Silencing of Monocarboxylate Transporters Via Small Interfering Ribonucleic Acid Inhibits Glycolysis and Induces Cell Death in Malignant Glioma: An In Vitro Study. *Neurosurgery* 55, 1410-1419 (2004).
46. Brown, R., Morash, B., Ur, E., and Wilkinson, M. RNAi-mediated Silencing of Leptin Gene Expression Increases Cell Death in C6 Glioblastoma Cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 139, 357-360 (2005).
47. Acker, T., Diez-Juan, A., Aragones, J., Tjwa, M., Brusselmans, K., Moons, L., Fukumura, D., Moreno-Murciano, M. P., Herbert, J. M., Burger, A., Riedel, J., Elvert, G., Flamme, I., Maxwell, P. H., Collen, D., Dewerchin, M., Jain, R. K., Plate, K. H., and Carmeliet, P. Genetic Evidence for a Tumor Suppressor Role of HIF-2 α . *Cancer Cell* 8, 131-141 (2005).

实验研究

第一部分 Wnt 信号新的调控因子 Pygo2 在人脑胶质瘤中的表达及意义

前言

近年来, Wnt信号通路成为脑胶质瘤发生学研究热点。Pygo2蛋白是Wnt信号系统新成员, 参与调控基因的转录, 与肿瘤发生密切相关^[1]。脑胶质瘤中Pygo2的表达研究国内外未见报道.本文采用免疫组化方法通过检测Pygo2蛋白在脑胶质瘤及正常脑组织中的差异表达, 分析其与脑胶质瘤发生发展的关系。

材料与方法

1. 组织标本: 80例脑胶质瘤取自吉林大学第一医院手术后证实为脑胶质瘤诊断的石蜡切片.病例包括男52例, 女28例;年龄35-76岁, 平均44岁.脑胶质瘤标本经病理组织学检查确诊, 按WHO2000年分类和分级标准, 包括I级 13例, II级26例, 包括原发型星形细胞瘤10例, 纤维型星形细胞瘤9例, 混合型少枝型星形细胞瘤7例, III级19例, 均为间变性星形细胞瘤, IV级22例, 包括胶质母细胞瘤8例, 髓母细胞瘤14例。5例正常脑组织标本做为对照。

2. 免疫组化SABC法: (1) 试剂: SABC试剂盒(武汉博士德公司)说明书进行操作, 抗人Pygo2多克隆抗体(美国Santa Cruz公司)稀释度为1 : 75,DAB显色。(2) 染色程序: 石蜡切片60℃干燥过夜, 常规脱蜡至水, 枸橼酸缓冲液(pH6.0)加热法修复抗原, 用PBS代替一抗作为阴性对照, 一抗4℃过夜, PBS洗5minx3次, 生物素标记二抗室温30min, PBS洗5minx3次, 辣根酶标记链酶卵白素室温30min, PBS洗5minx3次, DAB显色, 苏木素复染, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。

3. 结果判定

Pygo2 蛋白免疫组化阳性为胞核呈棕黄色染色在 200 倍显微镜下观察, 每例组织切片在免疫反应最强的区域选择 5-10 个视野, 使用目镜网格测微尺计数 1000 个细胞。以表达 Pygo2 蛋白的人乳腺癌组织(由厦门大学李博安教授馈赠)作为阳性对照, 用 PBS 代替一抗作为阴性对照。Pygo2 蛋白表达半定量分析法采用 Friedrich 等的免疫反应评分 (immunoreactivity score, IRS) 进行评定^[2], IRS 由阳性细胞的百分数 (percent of positive cells, PP) 计分与染色强度 (staining intensity, SI) 计分相乘所得。PP 计分如下: 0 分: <%, 1 分: 1%-25%, 2 分: 26%-50%, 3 分: 51%-75%, 4 分: >75%, SI 计分如下: 1 分: 弱染色, 2 分: 中等染色, 3 分: 强染色, SI 计分以多数细胞为准。IRS 范围 0-12 分, 0 分为阴性, 1-12 分为阳性。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库