

Pygo2 过表达促进大鼠胶质瘤 C6 细胞增殖

陈玉英^{1,2}, 王海东¹, 王占祥¹, 谭国伟¹, 刘希尧¹, 沈上杭¹

(1. 厦门大学附属第一医院神经外科, 福建 厦门 361003; 2. 重庆邮电大学生物信息学院, 重庆 400065)

摘要 目的 通过构建过表达 *Pygo2* 的重组体上调 *Pygo2* 表达, 探讨其在大鼠胶质瘤 C6 细胞增殖中的作用及机制。方法 重组体经 *EcoR I* 和 *Hind III* 双酶切鉴定和 DNA 测序后, 用脂质体 2000 将其转染大鼠胶质瘤 C6 细胞, 采用 Western blot 检测外源 *Pygo2* 蛋白表达, 应用克隆形成实验和 MTT 法检测细胞增殖, 流式细胞术检测细胞周期, 采用 Western blot 检测过表达 *Pygo2* 对 C6 细胞中 cyclinD1、 β -catenin 水平的影响, 并采用细胞免疫荧光法检测其对 C6 细胞中 cyclinD1、 β -catenin 亚细胞定位的影响。结果 双酶切和测序鉴定结果证实插入序列正确, 重组体能有效上调 *Pygo2* 表达。将重组体转染 C6 细胞上调 *Pygo2* 表达后, 细胞的生长增殖被显著促进, 克隆形成显著增多, 细胞周期进程从 G₁ 期至 S 期转变显著增强, 且 cyclinD1 水平随之增高, 亚定位无改变, β -catenin 水平和亚细胞定位无明显改变。结论 成功构建了过表达 *Pygo2* 的重组体, 过表达 *Pygo2* 通过增高 cyclinD1 水平, 促进细胞从 G₁ 期进入 S 期, 从而促进大鼠胶质瘤 C6 细胞增殖。

关键词 *Pygo2*; 胶质瘤; 细胞增殖; cyclinD1

中图分类号 R739.41 文献标志码 A 文章编号 0258-4646(2012)05-0413-05

网络出版地址 <http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1227.R.20120524.1555.027.html>

Over-expression of *Pygo2* Promotes C6 Cells Proliferation of Glioma

CHEN Yu-ying^{1,2}, WANG Hai-dong¹, WANG Zhan-xiang¹, TAN Guo-wei¹, LIU Xi-yao¹, SHEN Shang-hang¹

(1. Department of Neurosurgery, First Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361003, China; 2. College of Bio-information, Chongqing University of Posts and Telecommunications, Chongqing 400065, China)

Abstract Objective To up-regulate expression of *Pygo2* (Pygo2) by construction of the recombinant vectors of over-expression of *Pygo2* protein, and to explore the role and mechanism of over-expression of *Pygo2* in C6 cells proliferation of glioma. **Methods** The recombinant plasmids were digested with *EcoR I* and *Hind III* to execute the restriction endonuclease identification, then the sequence analysis was assayed by DNA sequencing. The recombinant plasmids were transfected into cultured glioblastoma C6 cells using lipofectamine™ 2000. The exogenous *Pygo2* protein level of C6 cells was detected by Western blot analysis. Colony forming assay and MTT assay were used to detect the cell proliferation, and cell cycle analysis was performed by flow cytometry analysis. The effect of *Pygo2* over-expression on the level of cyclinD1 and β -catenin of C6 cells was detected by Western blot analysis and the expression and subcellular location of cyclinD1 and β -catenin of C6 cells were further quantified by immunofluorescent staining. **Results** The recombinant plasmids were completely coincided with the designs by the restriction map and the sequence analysis, which up-regulated *Pygo2* expression of C6 cells efficiently. After *Pygo2* expression were up-regulated by transfected C6 cells with the recombinant plasmids, cell proliferation was promoted and colony forming was increased significantly, cell cycle progression from G₁ to S transition was enhanced notably. Furthermore, the expression level of cyclinD1 was significantly increased without change of subcellular location, and the expression level and subcellular location of β -catenin were not changed obviously. **Conclusion** The recombinant vectors of *Pygo2* over-expression were constructed successfully. Over-expression of *Pygo2* promotes the growth of glioma cells by an increased expression of cyclinD1 to improve G₁/S transition.

Key words *Pygo2*; glioma; cell proliferation; cyclinD1

脑胶质瘤是一种最常见的难治性颅内肿瘤。我

们在前期研究中发现, *Pygo2* (Pygo) 2 在脑胶质瘤组织中高表达, 而在正常脑组织中呈阴性表达^[1], 因此推测 *Pygo2* 可能是胶质瘤临床治疗的非常有潜力的新靶点。另外, *Pygo2* 在多种脑胶质瘤细胞系中均有较高表达, 在大鼠胶质瘤 C6 细胞中表达最低^[1], 因此本研究拟构建能过表达 *Pygo2* 的重组体, 并转染 C6 细胞使其过表达外源 *Pygo2*, 从细胞水平探讨过表达 *Pygo2* 在胶质瘤细胞增殖及细胞周期中

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目(cstc2011jjA10110), 重庆市教委科技基金资助项目(KJ100504), 福建省自然科学基金资助项目(2009D002)

作者简介: 陈玉英(1972-), 女, 副教授, 博士。

通讯作者: 王占祥, E-mail: wangzx@xmbrain.com

收稿日期: 2011-11-21

网络出版时间: 2012-05-24 15:55

的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株及细胞株 含 flag 标签的 pcDNA3.1 质粒 (pcDNA-flag) 由厦门大学李博安教授馈赠, *E. coli* DH5 α 感受态菌株 (厦大学生命科学院冻存) 胶质瘤细胞系 C6 细胞购于上海细胞研究所。

1.2.2 主要试剂和仪器 Pygo2 多克隆抗体、anti- β -catenin、anti-cyclinD1 购自美国 Santa Cruz 公司, Anti-flag 多克隆抗体购自美国 Upstate 公司。质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自德国 Qiagen 公司, Hind I 、EcoR I 、T $_4$ DNA 连接酶购自日本 TaKaRa 公司, LB 培养基、TRizol reagent、脂质体转染试剂 LipofectamineTM 2000 购自美国 Invitrogen 公司。PI、DAPI 购自美国 Sigma 公司, ECL 试剂盒购自美国 Pierce 公司, MTT 购自美国 Amresco 公司, 胎牛血清购自美国 Hyclone 公司, DMEM 培养基、SuperScript 反转录试剂盒购自美国 Gibco 公司, 实验所用试剂均为进口或国产分析纯试剂。流式细胞仪 FACScan 为美国 BD 公司产品, PCR 仪为美国 Bio-Rad 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒构建 检索 GenBank 获得 Pygo2 基因 (NM_001106447) 序列, 设计 Pygo2 基因引物, 分别含有 Hind I 和 EcoR I 酶切位点。引物由上海生物工程技术有限公司合成。用 TRIzol 提取总 RNA (按试剂说明书操作) 后, 用反转录试剂盒反转录获得 cDNA, 行 PCR 扩增。Pygo2 上游引物 5'CCCAA GCTTATGGCCGCTCGGCCGCC3'; 下游引物 5'CCGGAATTCCATCGCACAGTCACCCATCG3'。PCR 反应体系为 50 μL : 10 \times PCR 缓冲液 5 μL , 10 mmol/L dNTP 混合物 1 μL , cDNA 模板 4 μL , 上、下游引物各 1 μL , 聚合酶 1 μL , 灭菌水 38 μL 。PCR 反应条件 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 35 个循环, 68 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 70 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。将 PCR 产物连接到质粒 pcDNA-flag 中, 获得重组体 pcDNA-flag-Pygo2 转化 *E. coli* DH5 α 感受态菌株。在平板中挑取含氨苄青霉素抗性的克隆, 在含氨苄青霉素的 LB 培养液中摇菌扩增, 提取质粒, 行双酶切鉴定和测序鉴定。

1.2.2 胶质瘤 C6 细胞转染 C6 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 置于湿度 100%、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO $_2$ 培养箱中培养, 2~3 d 传代。取对数生长

期细胞制成单细胞悬液, 接种于 6 孔板 (1 \times 10 5 /孔~2 \times 10 5 /孔)。采用 LipofectinTM 2000 进行转染。转染后, 将细胞分成 3 组: C6/Pygo2 组 (转染 pcDNA-flag-Pygo2)、C6/Flag 组 (转染 pcDNA-Flag) 和 C6 组 (转染脂质体)。

1.2.3 Western blot 收集转染 48 h 后的上述 3 组细胞, 应用一抗 [Pygo2 (1:1 000)、 β -catenin (1:2 000)、cyclinD1 (1:1 000)、 β -actin (1:2 000)] 及相应二抗 (1:2 000) 行 Western blot 检测。ECL 试剂盒显色, 凝胶成像仪下照相, 运用 Quantity One 图像分析软件分析。以 β -actin 作内参。

1.2.4 MTT 法检测细胞增殖: 取对数生长期 C6 细胞制成单细胞悬液, 调整细胞密度以 1 \times 10 3 /孔接种于 96 孔板中, 培养 24 h, 按上述方法转染得到 3 组实验细胞, 每组设 3 个复孔。分别于转染后 1、2、3、4、5 d, 每日同一时间从培养箱中取出细胞, 以只加培养液无细胞的孔为空白对照孔, 每孔加 5 mg/mL MTT 20 μL , 继续孵育 4 h, 小心吸弃上清, 加入 DM-SO 150 μL , 震荡 10 min 以充分溶解结晶, 采用酶联免疫检测波长 570 nm 处测吸光度 (OD $_{570}$) 值。独立实验重复 3 次。根据 OD $_{570}$ 值绘制细胞生长增殖曲线。

1.2.5 克隆形成实验: 取转染 48 h 后生长良好的 3 组细胞接种于 6 孔板中 (200 个/孔), 每组设 3 个复孔。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO $_2$ 及饱和湿度的环境下静置培养 10 d, 当出现肉眼可见的克隆时终止培养。弃上清, 用 PBS 小心浸洗 2 次。甲醇室温固定 15 min, Giemsa 染色 30 min, 缓慢洗去染色液, 空气干燥。显微镜下计数克隆数, 计算克隆形成率。独立实验重复 3 次。

1.2.6 细胞周期分析: 收集转染后 72 h 的 3 组细胞, PBS 洗 3 遍, 75% 乙醇固定 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 测定前离心去除固定液, PBS 洗涤, 加入 RNA 酶工作液和 PI 室温避光染色孵育 15~30 min, 用 FACScan 流式细胞仪检测分析 DNA 含量, 分析 G $_1$ 、S 和 G $_2$ /M 期细胞所占的比例。实验重复 3 次。

1.2.7 细胞免疫荧光检测 制备转染后 48 h 的各组细胞爬片, 加 95% 乙醇 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 15 min, PBS 洗涤; 3% 过氧化氢室温孵育 30 min, PBS 洗涤; 血清室温封闭 1 h; 分别加一抗 [β -catenin (1:100)、cyclinD1 (1:100)] 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS 洗涤; 分别加耦联 FITC 的相应二抗 (1:200), 室温避光孵育约 45 min 至 1 h, DAPI 染核 10 min, 封片, 荧光显微镜镜检并拍照。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较用单因素方差分析 (One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 双酶切和测序鉴定重组体

双酶切鉴定和测序鉴定结果表明, 构建的重组体 pcDNA-flag-Pygo2 插入片段序列与在 GenBank 中检索到的大鼠 Pygo2 序列完全一样, 表明重组体构建成功。

2.2 Western blot 检测重组体对 C6 细胞外源 Pygo2 蛋白表达的影响

采用 Western blot 检测结果发现 3 组细胞均表达 42 kDa 内源 Pygo2 蛋白条带, 其灰度无显著差异。值得注意的是, C6/Pygo2 组还表达一大小约 43 kDa 的外源蛋白条带, 与 Pygo2 和 Flag 融合蛋白条带相一致, 而 C6/Flag 组和 C6 组未出现此外源融合条带, 说明将重组体转染 C6 细胞成功地表达了外源 Pygo2 蛋白, 且有效地过表达了 Pygo2。见图 1。

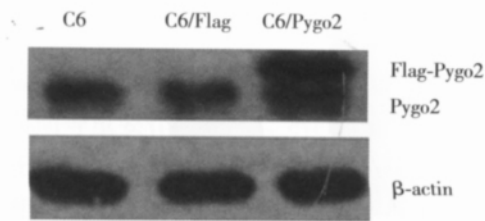


图 1 重组体对 C6 细胞外源 Pygo2 蛋白表达的影响

Fig.1 Effect of the recombinant plasmids on exogenous Pygo2 protein expression of C6 cells

2.3 过表达 Pygo2 对细胞生长增殖及克隆形成的影响

应用 MTT 法分析过表达 Pygo2 对细胞生长增殖的影响, 结果显示: 与 C6 组相比, C6/Pygo2 组(过表达 Pygo2)的增殖力在第 3、4、5 天时显著增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 C6/Flag 组细胞的生长增殖未见明显变化。见图 2。

采用 Giemsa 染色检测过表达 Pygo2 对 C6 细胞克隆形成的影响, 结果发现: C6 组、C6/Flag 组细胞克隆形成率分别为 $(37.9 \pm 6.5)\%$ 、 $(38.7 \pm 7.1)\%$, 二者无统计学差异, 而 C6/Pygo2 组细胞的克隆形成率 $[(63.8 \pm 8.3)\%]$ 较 C6 组显著增加 ($P < 0.05$)。

2.4 过表达 Pygo2 对细胞周期的影响

采用流式细胞术检测过表达 Pygo2 对细胞周期

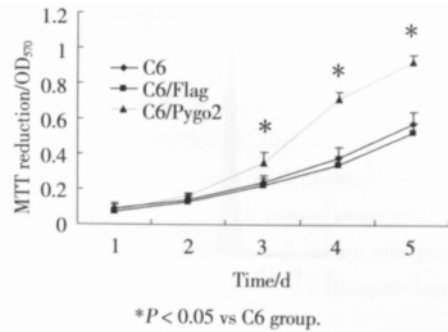


图 2 过表达 Pygo2 对细胞增殖的影响

Fig.2 Effect of over-expression of Pygo2 on cell proliferation

的影响, 结果显示: 与 C6 组相比, C6/Flag 组处于 G₁ 期、S 期的细胞百分比无统计学差异 ($P > 0.05$), 而 C6/Pygo2 组的 G₁ 期细胞百分比明显减少, S 期细胞百分比显著增多, 均具有统计学差异 ($P < 0.05$)。此外, 3 组处于 G₂/M 期的细胞百分比无统计学差异 ($P > 0.05$)。见图 3。

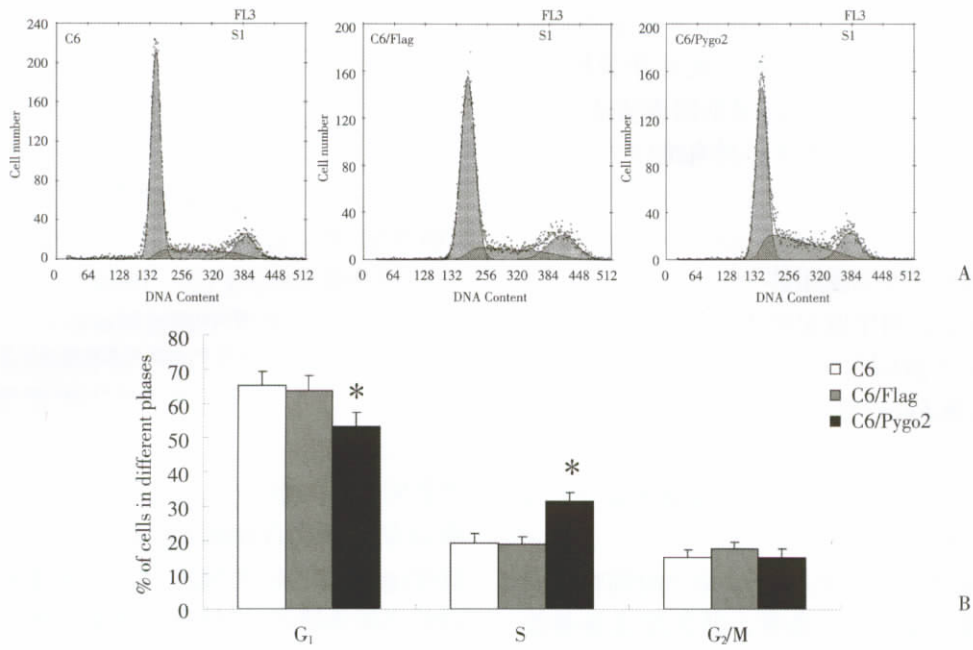
2.5 过表达 Pygo2 对 C6 细胞中 cyclinD1 和 β-catenin 蛋白表达及亚细胞定位的影响

采用 Western blot 检测过表达 Pygo2 对 cyclinD1、β-catenin 蛋白表达的影响, 结果显示: 与 C6 组相比, C6/Flag 组中 cyclinD1 和 β-catenin 的蛋白水平无明显变化, 而 C6/Pygo2 组(过表达 Pygo2)中的 cyclinD1 蛋白水平明显增高 ($P < 0.05$), 但 β-catenin 蛋白水平无明显变化。见图 4。

细胞免疫荧光检测过表达 Pygo2 对 β-catenin、cyclinD1 蛋白表达及亚细胞定位的结果显示: β-catenin 在细胞核和胞质中均有表达, cyclinD1 在细胞核中表达。与 C6 组相比, C6/Flag 组中 2 种蛋白表达及亚细胞定位均无明显变化(图 5), 而 C6/Pygo2 组(过表达 Pygo2)中, cyclinD1 表达荧光明显增强, 亚细胞定位无改变(图 5B), β-catenin 的蛋白表达和亚细胞定位均无明显改变(图 5A)。

3 讨论

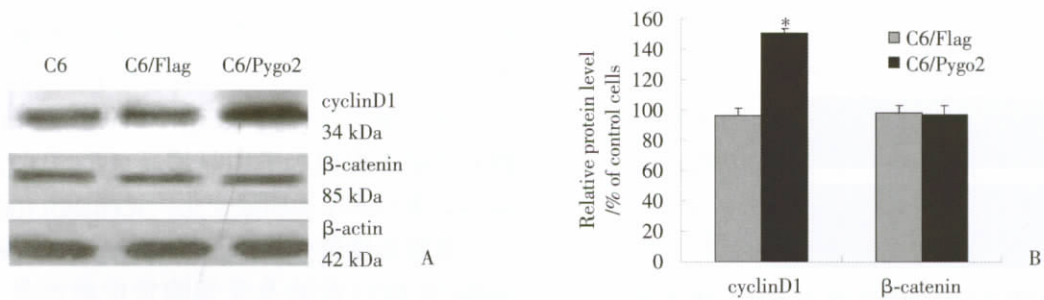
Wnt 信号转导通路在生物发育、细胞转运及细胞凋亡等生命过程中起重要作用, 其异常活化与肿瘤的发生、发展密切相关^[2]。Pygo 是 Wnt 信号通路中新发现的功能蛋白, 具有转录激活功能, 承担重要的细胞调控作用^[3]。目前发现, 人和鼠都存在 Pygo1 和 Pygo2 基因, Pygo2 是主要的效应基因^[4], 对于恶性肿瘤细胞的生长是必不可少的成分^[5]。本研究通过构建过表达 Pygo2 的重组体 pcDNA-flag-Pygo2 并将其转染入胶质瘤 C6 细胞, 成功地在该细胞中过



A, cells were collected and analysed for DNA content by propidium iodide staining and flow cytometry; B, percent of cell population at different stages is quantified according to the corresponding DNA histogram. Data were represented as means \pm SE of three independent experiments. * $P < 0.05$ vs C6 cells.

图 3 Pygo2 过表达对细胞周期的影响

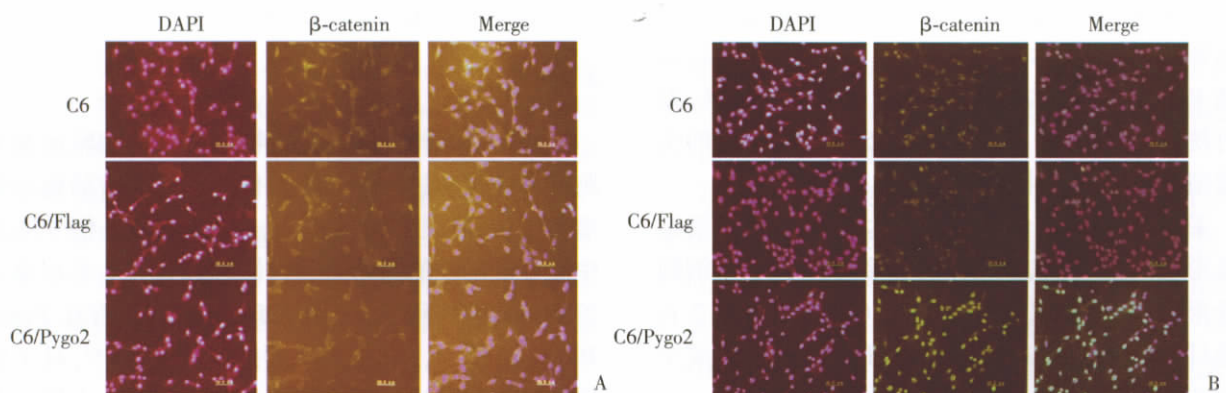
Fig.3 Effect of Pygo2 over-expression on cell cycle



A, the protein levels of cyclin D1 and β -catenin in C6 cells treated with control Flag or Flag-Pygo2 were detected by Western blot with specific antibodies. The expression of β -actin was used as a loading control; B, relative protein levels in C6 cells were quantified by densitometry. Values are means \pm SE of three independent determinations. * $P < 0.05$ vs control C6 cells.

图 4 Pygo2 过表达对 cyclinD1 和 β -catenin 表达的影响

Fig.4 Effect of Pygo2 over-expression on expressions of cyclinD1 and β -catenin



The images of β -catenin (A) and cyclinD1 (B) were captured by a fluorescence microscope. Scale bar = 50 μ m.

图 5 Pygo2 过表达对 cyclinD1 和 β -catenin 表达及定位的影响

Fig.5 Effect of Pygo2 over-expression on expressions and subcellular distribution of cyclinD1 and β -catenin

表达 Pygo2, 并发现过表达 Pygo2 后 C6 细胞生长增殖显著增强, C6 细胞克隆形成显著增加, G₁ 期细胞显著减少, S 期细胞显著增多, 即过表达 Pygo2 能通过促进细胞从 G₁ 期进入 S 期从而促进细胞增殖。以上研究结果均提示 Pygo2 在脑胶质瘤中具有促进细胞增殖的作用。

Wnt 信号通路的异常激活在多种肿瘤的发生中起决定性作用^[6,7]。该通路的激活有赖于细胞内一系列信号分子的相互作用, 其中起关键作用的是 β -catenin/Arm。该信号通路中任何可促进活性 β -catenin 形成的因素均可引起细胞过度增殖而引发肿瘤^[8]。 β -catenin 水平也可用于提示肿瘤治疗的疗效及预后^[9]。而 Pygo2 是 Wnt 信号通路异常激活起重要关联作用的染色质重塑因子^[10]。Pygo2 可通过 PHD 与 BCL-9、 β -catenin/LEF 结合引起 Wnt 应答式转录^[5,11]。本研究采用 Western blot 和细胞免疫荧光检测过表达 Pygo2 对 β -catenin 蛋白水平的影响及细胞定位的改变, 发现过表达 Pygo2 对其蛋白表达水平及亚细胞定位均无明显影响, 说明过表达 Pygo2 促进细胞增殖未通过使 β -catenin 保留在细胞核内这一途径, 其细胞调控机制有待于进一步研究。

cyclinD1 是促进细胞周期从 G₁ 期进入 S 期的主要蛋白, 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^[12,13]。cyclinD1 是 Wnt 信号通路的靶基因之一, 它的过高表达与肿瘤的发生进展密切相关^[14]。为探讨过表达 Pygo2 促进 C6 细胞增殖、加速细胞周期进程的机制, 本研究检测了过表达 Pygo2 对 cyclinD1 蛋白水平和亚细胞定位的影响, 发现过表达 Pygo2 能上调 cyclinD1 蛋白水平, 但其亚细胞定位未发生变化, 说明过表达 Pygo2 促进细胞增殖的机制可能是通过上调 cyclinD1 水平, 促进细胞由 G₁ 期进入 S 期, 从而促进瘤细胞生长增殖。

总之, 本研究通过构建重组体 pcDNA-flag-Pygo2 并在 C6 细胞中成功过表达外源 Pygo2, 发现过表达 Pygo2 具有促进 C6 细胞增殖的作用, 其机制是通过上调 cyclinD1 水平进而促进细胞从 G₁ 期进入 S 期而实现的。

参考文献:

- [1] 王海东, 陈玉英, 王占祥, 等. Pygo2 在脑胶质瘤细胞和组织的表达及临床意义[J]. 中国肿瘤临床, 2011, 38(2): 75-78.
- [2] Matono H, Tamiya S, Yokoyama R, et al. Abnormalities of the Wnt/ β -catenin signalling pathway induce tumour progression in sporadic desmoid tumours: correlation between β -catenin widespread nuclear expression and VEGF overexpression [J]. Histopathology, 2011, 59(3): 368-375.
- [3] Jonckheere N, Mayes E, Shih HP. Analysis of mPygo2 mutant mice suggests a requirement for mesenchymal Wnt signaling in pancreatic growth and differentiation[J]. Dev Biol, 2008, 318(2): 224-235.
- [4] Li B, Mackay DR, Ma J, et al. Cloning and developmental expression of mouse pygopus 2, a putative Wnt signaling component [J]. Genomics, 2004, 84(2): 398-405.
- [5] Chen J, Luo Q, Yuan Y, et al. Pygo2 associates with MLL2 histone methyltransferase and GCN5 histone acetyltransferase complexes to augment Wnt target gene expression and breast cancer stem-like cell expansion[J]. Mol Cell Biol, 2010, 30(24): 5621-5635.
- [6] Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer [J]. Nature, 2005, 434(7035): 843-850.
- [7] de Sousa EM, Vermeulen L, Richel D, et al. Targeting Wnt signaling in colon cancer stem cells[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(4): 647-653.
- [8] Zhang N, Wei P, Gong A, et al. FoxM1 Promotes β -catenin nuclear localization and controls Wnt target-gene expression and glioma tumorigenesis [J]. Cancer Cell, 2011, 20(4): 427-442.
- [9] 邹外一, 许多荣, 苏畅, 等. 动态观察慢性髓性白血病患者 β -catenin 变化与细胞遗传学疗效的关系 [J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(8): 1868-1870.
- [10] Horsley V. Epigenetics, Wnt signaling and stem cells: the Pygo2 connection [J]. J Cell Biol, 2009, 185(5): 761-763.
- [11] Andrews PG, Kennedy MW, Popadiuk CM, et al. Oncogenic activation of the human Pygopus2 promoter by E74-like factor-1 [J]. Mol Cancer Res, 2008, 6(2): 259-266.
- [12] Fatima I, Chandra V, Saxena R, et al. 2,3-Diaryl-2H-1-benzopyran derivatives interfere with classical and non-classical estrogen receptor signaling pathways, inhibit Akt activation and induce apoptosis in human endometrial cancer cells [J]. Mol Cell Endocrinol, 2012, 348(1): 198-210.
- [13] 何艳姣, 乔超, 刘朝霞, 等. 乳腺癌中 β -catenin、cyclinD1、c-myc 表达及意义[J]. 首都医科大学学报, 2011, 32(4): 549-552.
- [14] Hayakawa Y, Hirata Y, Nakagawa H, et al. Apoptosis signal-regulating kinase 1 and cyclin D1 compose a positive feedback loop contributing to tumor growth in gastric cancer [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(2): 780-785.

(编辑 王又冬)