

· 论 著 ·

KIAA1456 基因过表达对骨肉瘤细胞增殖的影响

高鹏¹, 袁峰²

1. 徐州医科大学, 江苏 徐州 221000; 2. 徐州医科大学附属医院脊柱外科, 江苏 徐州 221000

摘要: **目的** 探讨人 tRNA 甲基转移酶 9 样蛋白 (hTRM9L) KIAA1456 基因过表达对骨肉瘤细胞株增殖的影响及其分子作用机制。**方法** 实验分为三组:空白对照组 (Ctrl 组),骨肉瘤 MG63 和 U2OS 细胞不作任何处理;阴性对照组 (Scrambled 组),骨肉瘤 MG63 和 U2OS 细胞转染空载质粒;实验处理组 (KIAA1456 组),将 pT3-myr-KIAA1456 过表达质粒转染至骨肉瘤 MG63 和 U2OS 细胞。利用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 及 Western blot 检测骨肉瘤细胞中 KIAA1456 mRNA 和蛋白表达水平,细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 及 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (EdU) 细胞增殖实验检测 KIAA1456 过表达对骨肉瘤细胞增殖能力的影响,流式细胞术分析骨肉瘤细胞周期的变化,Western blot 检测 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白细胞质及细胞核 β 链蛋白 (Cytoplasmic β -catenin、Nucleus β -catenin)、细胞周期蛋白-1 (Cyclin D1) 及 C-myc 的蛋白表达水平。**结果** 与 Ctrl 组和 Scrambled 组比较,(1) KIAA1456 组骨肉瘤 MG63 和 U2OS 细胞中 KIAA1456 mRNA 和蛋白表达水平增高 (P 均 < 0.01);(2) CCK-8 法检测 KIAA1456 组在 24、48、72、96 h OD 值均降低 ($P < 0.01$);(3) EdU 细胞增殖实验显示,KIAA1456 组细胞增殖率降低 ($P < 0.01$);(4) 流式细胞术显示,在 MG63 细胞和 U2OS 细胞中,KIAA1456 组 G_0/G_1 期细胞数量比例增多,而 S 期和 G_2/M 期细胞数量减少 ($P < 0.05, P < 0.01$);(5) Western blot 结果显示,KIAA1456 组 Wnt/ β -catenin 信号通路中相关蛋白 Nucleus β -catenin、Cyclin D1、C-myc 蛋白表达降低,Cytoplasmic β -catenin 蛋白表达增高 ($P < 0.01$)。**结论**

KIAA1456 过表达可显著抑制骨肉瘤 MG63 和 U2OS 细胞增殖并且使骨肉瘤细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期,其作用机制可能与抑制 β -catenin 核转位以及下调 Wnt/ β -catenin 信号通路下游靶基因 Cyclin D1、C-myc 的表达相关。

关键词: KIAA1456 基因; 骨肉瘤; 细胞增殖; 细胞周期; β -链蛋白; Wnt/ β -catenin 信号通路

中图分类号: R 738.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2018)08-1009-06

Effect of KIAA1456 gene overexpression on the proliferation of osteosarcoma cells

GAO Peng*, YUAN Feng

* Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221000, China

Corresponding author: YUAN Feng, E-mail: cnyuanfeng@hotmail.com

Abstract: Objective To investigate the effect of KIAA1456 gene, a human tRNA methyltransferase 9-like (hTRM9L), overexpression on the proliferation of osteosarcoma cell line and its molecular mechanism of action. **Methods** The experiment was divided into three groups: blank control group (Ctrl group), osteosarcoma MG63 and U2OS cells were without any treatment; negative control group (Scrambled group): osteosarcoma MG63 and U2OS cells transfected with empty plasmid; experimental treatment group (KIAA1456 group), the pT3-myr-KIAA1456 overexpression plasmid was transfected into osteosarcoma MG63 and U2OS cells. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot were used to respectively detect KIAA1456 mRNA and protein expressions in osteosarcoma cells. Cell counting kit-8 (CCK-8) and EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) cell proliferation assay were used to detect the proliferation ability of osteosarcoma cells. Flow cytometry was used to analyze the change of cell cycle. Western blot was used to detect the expressions of Wnt/ β -catenin signal pathway related proteins including cytoplasmic β -catenin, nucleus β -catenin, cell cycle protein D1 (cyclin D1) and C-myc proteins. **Results** Compared with Ctrl group and Scrambled group, KIAA1456 group showed: (1) The expression levels of KIAA1456 mRNA and protein in MG63 and U2OS cells increased significantly (all $P < 0.01$). (2) OD_{450} in 24-, 48-, 72-, 96-hours decreased significantly ($P < 0.01$). (3) Cell proliferation rate decreased significantly ($P < 0.01$). (4) The cells in G_0/G_1 phase increased and cells in G_2/M phase decreased ($P < 0.05, P <$

0.01). (5) The expression level of Cytoplasmic β -catenin protein increased significantly, while the expression levels of Nucleus β -catenin, Cyclin D1, C-myc proteins decrease significantly (all $P < 0.01$). **Conclusions** KIAA1456 overexpression can significantly inhibit the proliferation of osteosarcoma MG63 and U2OS cells, and the cell cycle is blocked in G_0/G_1 phase. The mechanism of its action may be related to the inhibition of nuclear translocation of β -catenin and down-regulation of expressions of downstream target genes Cyclin D1 and C-myc in Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words: KIAA1456 gene; Osteosarcoma; Cell proliferation; Cell cycle; β -catenin; Wnt/ β -catenin signaling pathway

骨肉瘤是骨骼系统最常见的恶性肿瘤,主要发生在儿童和青少年^[1-3]。好发于生长活跃、血供丰富的长骨干骺端^[4],其局部侵袭性所引发的早期肺转移和病理性骨折是导致高死亡率、致残率的重要原因。随着治疗模式的不断完善,患者5年生存率已提升至60%^[5],但伴有转移或复发的患者长期生存率仍相对较低^[6]。因此,深入探讨骨肉瘤的发病机制及其生物学进程为改善其预后的关键。人 tRNA 甲基转移酶 9 样蛋白 (human tRNA methyltransferase 9-like, hTRM9L) KIAA1456 基因定位于染色体 8p22-p23^[7],是催化 tRNA 碱基修饰的酶。由于其高度同源的 ALKBH8 编码蛋白和酵母菌 Trm9 所催化的摆动碱基修饰在肿瘤细胞氧压力调节和 DNA 损伤应答修复方面发挥重要作用^[7-8],因而推测 KIAA1456 也具有相似的功能。KIAA1456 能够抑制肿瘤的生长,并且 KIAA1456 低表达于各种癌组织,如乳腺癌、宫颈癌、膀胱癌、结肠癌等^[7]。由此可见,KIAA1456 是肿瘤抑制基因,可能成为肿瘤治疗的新靶点。但 KIAA1456 基因在骨肉瘤细胞中的作用至今仍不清楚。因此,本实验通过在骨肉瘤 MG63 和 U2OS 细胞中过表达 KIAA1456,研究 KIAA1456 的过表达对骨肉瘤细胞增殖的影响,并探讨这种调节作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 人骨肉瘤细胞株 MG63 和 U2OS (中科院上海生化和细胞生物研究所), pT3-myr-KIAA1456 质粒及对照质粒 (addgene, USA)、LipofectamineTM2000 转染试剂、Opti-MEM 培养基 (Invitrogen, USA), DMEM 培养基、胎牛血清 (Sigma, USA), CCK8 细胞增殖检测试剂盒、细胞核蛋白与胞浆蛋白抽提试剂盒 (上海碧云天), 5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷 (EdU) 细胞增殖试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (广州锐博), 细胞周期试剂盒 (南京凯基), KIAA1456、 β -链蛋白 (β -catenin)、细胞周期蛋白 1 (Cyclin D1)、C-myc、 β -actin 的一抗二抗 (Abcam, UK), Trizol (Takara, Japan), cDNA 合成试剂盒 (Bio-Rad, USA), 聚合酶链式反应 (PCR) 引物由上海生工合成。

1.2 研究方法

1.2.1 分组 实验分三组:(1)空白对照组 (Ctrl 组):骨肉瘤 MG63 和 U2OS 细胞不作任何处理;(2)阴性对照组 (Scrambled 组):骨肉瘤 MG63 和 U2OS 细胞转染空载质粒;(3)实验处理组 (KIAA1456 组):骨肉瘤 MG63 和 U2OS 细胞转染 pT3-myr-KIAA1456 过表达质粒。

1.2.2 细胞培养和转染 两株细胞均采用 DMEM 培养基 (含有 100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素、10% 胎牛血清) 进行培养。转染前将细胞接种于小皿中,待细胞生长至 80% 融合时准备转染,用 250 μ l Opti-MEM 培养基稀释 2 μ g 质粒,混合后室温下孵育 5 min,用 250 μ l Opti-MEM 培养液稀释 LipofectamineTM2000 转染试剂 10 μ l,混匀后室温下孵育 5 min;随后将二者混合均匀后,室温下孵育 20 min,加入 500 μ l 孵育好的转染复合物,轻柔摇动小皿,使皿内的液体混合均匀,将小皿放入 37 $^{\circ}$ C 含 5% CO_2 的细胞培养箱培养,4~6 h 后换液,吸出培养基,每孔加入 3 ml 的完全培养基 (含 10% 无支原体胎牛血清)。

1.2.3 转染细胞中 KIAA1456 mRNA 表达的检测 Trizol 法提取各组细胞总 RNA,采用 Nanodrop 2000 测定其浓度和纯度,使用逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA。所用引物见表 1。

表 1 PCR 引物序列

引物	序列 (5'→3')
KIAA1456	正向引物 CCG GAG GCC AAC TGA TGA TTT
	反向引物 CAG AAC AGC TAC ACT CAG AGC
GAPDH	正向引物 ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC
	反向引物 TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA

1.2.4 细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 细胞增殖实验检测 骨肉瘤 MG63 和 U2OS 增殖 将处于对数生长期的细胞以 3×10^3 个/孔接种于 96 孔板,每组设 6 个复孔,细胞贴壁后检测 1 次 OD_{450} ,随后每天固定时间检测 1 次 OD_{450} ,连续检测 4 d。检测前 2 h,每孔加入 CCK-8 溶液 10 μ l。常规孵育 2 h,振荡混匀,用酶标仪测定波长 450 nm 处的吸光度值。

1.2.5 EdU 细胞增殖实验检测 骨肉瘤 MG63 和 U2OS 增殖 将细胞以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,每孔加入 50 μ mol/L 的 EdU 100 μ l 培养基孵育

2 h, PBS 漂洗后, 采用 4% 多聚甲醛固定细胞, 室温孵育 30 min, 弃固定液, 每孔加入 2 mg/ml 的甘氨酸 50 μ l, 孵育 5 min 后, 每孔加入 100 μ l 的 Apollo[®] 染色反应液, 室温避光脱色摇床孵育 30 min, PBS 漂洗 2 次, 加入 0.5% Triton-X 100 μ l 透化 10 min, 脱色摇床 PBS 清洗 3 次, 弃渗透剂。然后每孔加入 100 μ l 烟酸己可碱 (Hoechst) 33342 反应液, 室温避光孵育 30 min, PBS 漂洗 3 次, 荧光显微镜拍照观察。EdU 作为胸腺嘧啶核苷类似物, 在细胞增殖期 (S 期) 代替胸腺嘧啶渗入正在复制的 DNA 分子中, 可快速检测细胞 DNA 复制活性。EdU 染色标记的红色荧光表示增殖的细胞数, 蓝色荧光为总细胞数, 计算两者叠加后细胞的比例来检测细胞增殖率。增殖率 = 增殖细胞数/总细胞数。

1.2.6 流式细胞术检测细胞周期分布 胰酶消化收集细胞, 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 洗涤后 1 000 r/min 离心 5 min, 重复 3 次。70% 预冷的乙醇固定细胞, 4 $^{\circ}$ C 过夜。1 500 r/min 离心 5 min, 弃去乙醇, PBS 漂洗 3 次。用 0.4 ml PBS 重悬细胞, 加入核糖核酸酶 A 3 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴消化 30 min; 加入碘化丙啶 50 μ l, 低温下避光孵育 30 min。流式细胞仪对各组细胞周期分布进行检测。

1.2.7 Western blot 检测蛋白表达水平 分别提取各组细胞的胞浆蛋白及胞核蛋白, 二喹啉甲酸 (BCA) 法测定蛋白浓度, 取等量样本进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 将蛋白转移至 PVDF 膜上, 电转后 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入用 Tris + Tween (TBST) 稀释至适当浓度的一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 加入二抗室温孵育 2 h 后, 用 TBST 缓冲液洗膜 3 次, 将膜蛋白与化学发光试剂充分接触。用 Tanon 6600 发光成像工作站进行图像采集分析, 光密度值通过 Image pro plus 6.0 软件分析。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件处理数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 骨肉瘤 MG63 细胞和 U2OS 细胞中 KIAA1456 的表达情况 qRT-PCR 结果显示, 与 Ctrl 组及 Scrambled 组比较, 转染 pT3-myr-KIAA1456 过表达质粒后, 骨肉瘤 MG63 和 U2OS 细胞中 KIAA1456 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.01$)。见表 2。Western blot 结果显示, 与 Ctrl 组及 Scrambled 组比较, 转染 pT3-myr-KIAA1456 过表达质粒后, 骨肉瘤 MG63 和 U2OS 细胞中 KIAA1456 的蛋白表达量明显增高 ($P < 0.01$)。见

表 3、图 1。

2.2 CCK8 检测过表达 KIAA1456 对骨肉瘤 MG63 和 U2OS 细胞增殖能力的影响 与 Ctrl 组和 Scrambled 组比, KIAA1456 组在 24、48、72、96 h 四个时间点的 OD 值降低 ($P < 0.01$)。提示 KIAA1456 过表达后明显抑制骨肉瘤细胞的增殖。见表 4、表 5、图 2。

2.3 EdU 细胞增殖实验检测 KIAA1456 过表达对骨肉瘤 MG63 和 U2OS 细胞增殖能力的影响 KIAA1456 组细胞增殖率明显低于 Ctrl 组和 Scrambled 组 ($P < 0.01$)。提示过表达 KIAA1456 后骨肉瘤 MG63 和 U2OS 细胞增殖能力下降。见表 6、图 3。

2.4 过表达 KIAA1456 对骨肉瘤 MG63 和 U2OS 细胞周期的影响 流式细胞术结果显示, 不论在 MG63 细胞还是在 U2OS 细胞中, 与 Ctrl 组及 Scrambled 组相比较, KIAA1456 组 G₀/G₁ 期 (DNA 合成前期) 细胞数量比例明显增多 ($P < 0.01$), 而 S 期 (DNA 合成期) 和 G₂/M 期 (DNA 合成后期) 细胞数量比例减少 ($P < 0.05$)。提示 KIAA1456 过表达后, 骨肉瘤 MG63 和 U2OS 细胞均被阻滞在细胞周期 G₀/G₁ 期。见表 7、图 4。

表 2 骨肉瘤细胞中 KIAA1456 mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	MG63 细胞	U2OS 细胞
Ctrl 组	1.000 \pm 0.040 *	1.003 \pm 0.067 *
Scrambled 组	0.987 \pm 0.051 *	1.017 \pm 0.090 *
KIAA1456 组	3.357 \pm 0.176	3.390 \pm 0.255

注: 与 KIAA1456 组比较, * $P < 0.01$ 。

表 3 骨肉瘤细胞中 KIAA1456 蛋白相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	MG63 细胞	U2OS 细胞
Ctrl 组	0.442 \pm 0.011 *	0.448 \pm 0.012 *
Scrambled 组	0.453 \pm 0.018 *	0.457 \pm 0.024 *
KIAA1456 组	0.983 \pm 0.025	0.980 \pm 0.032

注: 与 KIAA1456 组比较, * $P < 0.01$ 。

表 4 三组骨肉瘤 MG63 细胞在不同时点的 OD 值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	MG63 细胞 OD 值			
	24 h	48 h	72 h	96 h
Ctrl 组	0.240 \pm 0.004 *	0.398 \pm 0.009 *	0.634 \pm 0.015 *	0.785 \pm 0.030 *
Scrambled 组	0.246 \pm 0.003 *	0.412 \pm 0.011 *	0.655 \pm 0.014 *	0.807 \pm 0.020 *
KIAA1456 组	0.182 \pm 0.004	0.229 \pm 0.005	0.310 \pm 0.011	0.403 \pm 0.024

注: 与 KIAA1456 组比较, * $P < 0.01$ 。

表 5 三组骨肉瘤 U2OS 细胞在不同时点的 OD 值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	U2OS 细胞 OD 值			
	24 h	48 h	72 h	96 h
Ctrl 组	0.241 \pm 0.007 *	0.406 \pm 0.025 *	0.623 \pm 0.014 *	0.787 \pm 0.008 *
Scrambled 组	0.240 \pm 0.008 *	0.404 \pm 0.019 *	0.643 \pm 0.019 *	0.805 \pm 0.009 *
KIAA1456 组	0.181 \pm 0.003	0.235 \pm 0.012	0.307 \pm 0.018	0.397 \pm 0.014

注: 与 KIAA1456 组比较, * $P < 0.01$ 。

表 6 三组骨肉瘤细胞的细胞增殖率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	MG63 细胞	U2OS 细胞
Ctrl 组	62.231 ± 1.031 *	59.332 ± 0.691 *
Scrambled 组	61.465 ± 0.960 *	59.452 ± 3.630 *
KIAA1456 组	20.634 ± 0.608	15.929 ± 3.848

注:增殖率 = 增殖细胞数/总细胞数。与 KIAA1456 组比较, * $P < 0.01$ 。

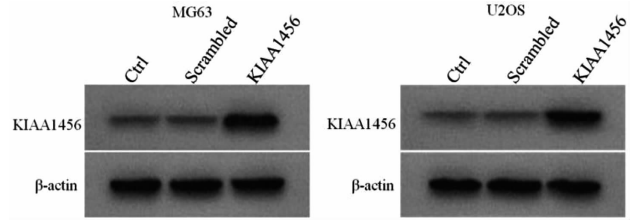


图 1 Western blot 检测骨肉瘤 MG63 和 U2OS 细胞中 KIAA1456 蛋白表达的电泳图

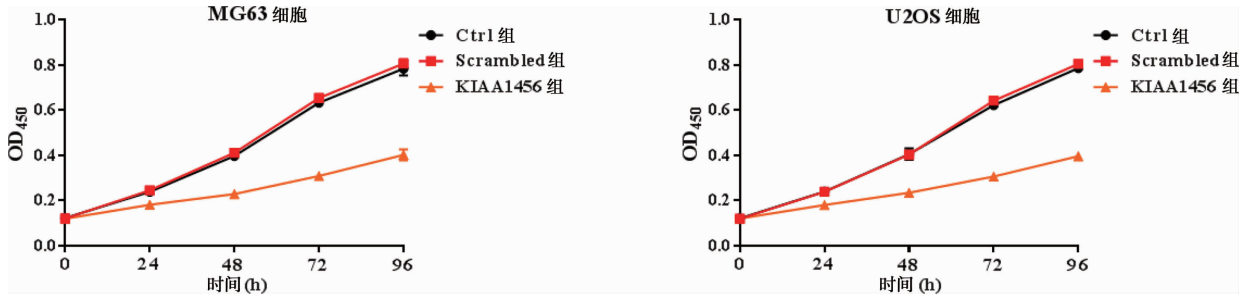
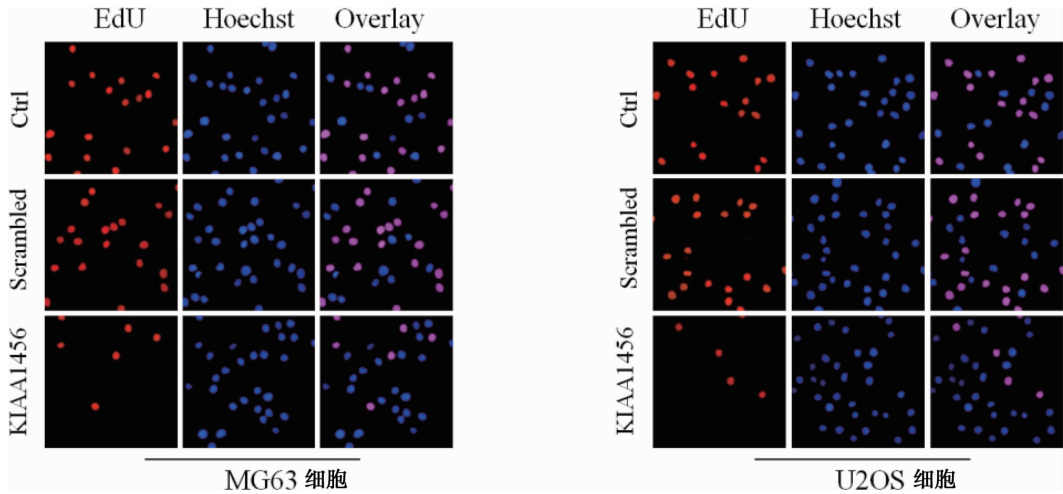


图 2 三组骨肉瘤 MG63 和 U2OS 细胞在不同时间点的 OD 值



注:红色 (EdU) 代表增殖的细胞数,蓝色 (Hoechst) 为总细胞数。

图 3 EdU 细胞增殖实验检测三组骨肉瘤 MG63 和 U2OS 细胞增殖能力

表 7 流式细胞术检测三组骨肉瘤 MG63 和 U2OS 细胞周期分布变化 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	MG63 细胞			U2OS 细胞		
	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
Ctrl 组	40.300 ± 0.700 **	25.127 ± 0.783 *	34.573 ± 0.435 *	41.100 ± 0.789 **	24.823 ± 0.297 *	34.077 ± 0.615 *
Scrambled 组	38.737 ± 0.337 **	25.960 ± 0.904 *	35.303 ± 1.198 *	39.820 ± 0.824 **	25.510 ± 0.875 *	34.670 ± 0.894 *
KIAA1456 组	51.080 ± 1.437	22.283 ± 1.253	26.637 ± 0.599	52.870 ± 0.456	18.170 ± 0.252	28.960 ± 0.588

注:与 KIAA1456 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表 8 Western blot 检测骨肉瘤细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	MG63 细胞				U2OS 细胞			
	Cytoplasmic β -catenin	Nucleus β -catenin	Cyclin D1	C-myc	Cytoplasmic β -catenin	Nucleus β -catenin	Cyclin D1	C-myc
Ctrl 组	43.027 ± 2.272 *	76.483 ± 3.482 *	23.350 ± 1.195 *	38.540 ± 3.123 *	43.297 ± 2.542 *	77.080 ± 2.467 *	23.507 ± 1.465 *	39.007 ± 3.300 *
Scrambled 组	42.233 ± 2.299 *	78.817 ± 3.540 *	24.493 ± 2.921 *	39.410 ± 3.687 *	42.150 ± 2.663 *	80.967 ± 5.369 *	25.640 ± 2.695 *	40.660 ± 3.439 *
KIAA1456 组	57.690 ± 2.168	43.797 ± 4.372	11.240 ± 1.265	22.070 ± 1.951	57.747 ± 2.810	44.637 ± 4.568	12.253 ± 0.673	22.987 ± 1.756

注:与 KIAA1456 组比较, * $P < 0.01$ 。

2.5 KIAA1456 对 Wnt/ β -catenin 信号通路中相关蛋白 Nucleus β -catenin、Cytoplasmic β -catenin、Cyclin D1、C-myc 的影响 Western blot 结果显示,与 Ctrl 组和 Scrambled 组相比,KIAA1456 组 Wnt/ β -catenin 信

号通路中相关蛋白 Nucleus β -catenin、Cyclin D1、C-myc 蛋白表达明显降低,Cytoplasmic β -catenin 蛋白表达量增高,差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01)。见表 8、图 5。

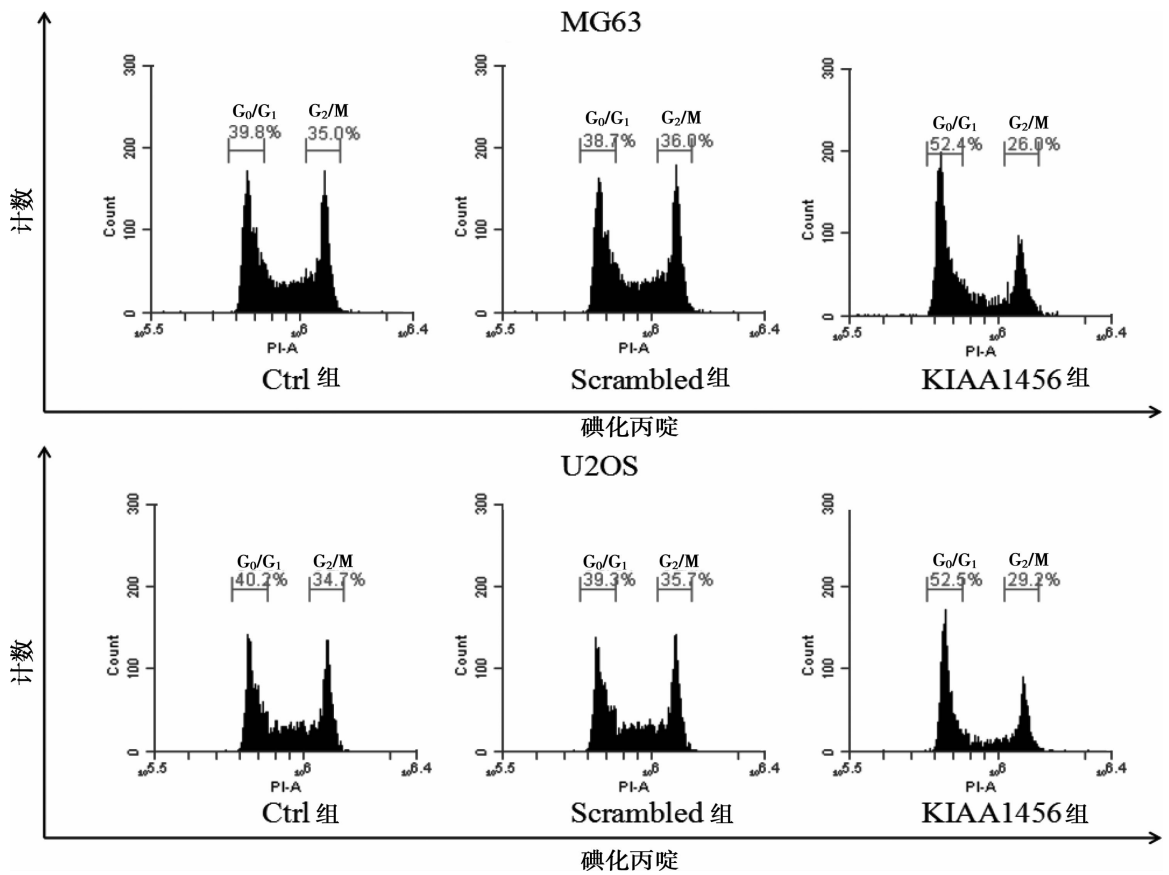


图 4 流式细胞术检测三组骨肉瘤 MG63 和 U2OS 细胞周期

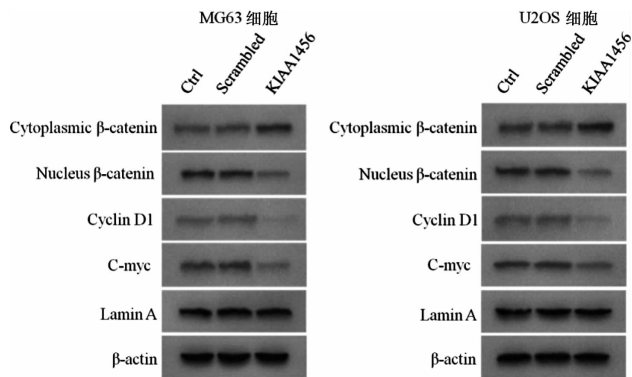


图 5 Western blot 检测骨肉瘤 MG63 和 U2OS 细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白的电泳图

3 讨论

KIAA1456 是编码 Trm9 的甲基转移酶,其表达低下甚至缺失会增加肿瘤的致癌性。相反,上调 KIAA1456 的表达可显著抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭^[9-10]。在结肠癌 SW620、HCT116 细胞中重新表达 KIAA1456 可抑制癌细胞的增殖^[7]。此外,KIAA1456 可通过上调与 pRB 和 p53 信号通路相关的转录抑制因子 LIN9 表达,抑制卵巢癌 HO8910PM 细胞的增殖。因此本文研究主要集中在过表达 KIAA1456 基因对骨肉瘤细胞增殖的影响,并进一步探讨其可能的分子机制。本研究结果表明,KIAA1456 过表达能显著抑制骨肉瘤细胞的增殖,并使骨肉瘤细胞周期阻滞

在 G₀/G₁ 期,与既往研究报道结果相一致^[7]。

Wnt/ β -catenin 信号通路的异常活化会引发下游靶基因的异常表达,进而造成细胞过度增殖^[11]。在不同的骨肉瘤细胞系中,Wnt/ β -catenin 信号通路中的多种配体、受体均呈高表达,而 Wnt/ β -catenin 信号抑制因子却表达低下^[12-14]。Haydon 等^[15]研究发现,在 47 例骨肉瘤患者的样本中,33 例(70.2%)患者样本的胞核和胞浆中均存在 β -catenin 积聚,而 β -catenin 是 Wnt/ β -catenin 信号通路的重要的激活因子。Iwaya 等^[16]研究同样发现,骨肉瘤 LM8 与 Dunn 细胞免疫组化结果均显示有 β -catenin 积聚现象。文献报道证实, β -catenin 表达上调能通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路影响下游靶基因,促进骨肉瘤细胞的增殖^[17]。抑制 Wnt/ β -catenin 信号途径的异常激活被证实能够抑制骨肉瘤细胞的增殖^[14,18-19]。因而推测 KIAA1456 可能是通过 Wnt/ β -catenin 信号通路介导其对骨肉瘤细胞增殖的抑制作用。

本文结果显示,Cytoplasmic β -catenin 蛋白表达量增高,Nucleus β -catenin、Cyclin D1、C-myc 蛋白表达量显著降低。作为 Wnt/ β -catenin 信号途径中的核心枢纽, β -catenin 的表达水平很大程度上决定 Wnt/ β -catenin 信号通路的活性^[20]。本文结果显示,KIAA1456 过表达后胞浆 β -catenin 蛋白表达量增高,核内 β -catenin 蛋白表达量显著降低,提示 β -catenin 的

质核分布发生改变,表明 KIAA1456 过表达阻碍了 β -catenin 的核转位,减少了 β -catenin 在核内的聚集。此外,Cyclin D1 和 C-myc 是作为异常 Wnt/ β -catenin 信号调控的关键下游靶基因,与细胞增殖关系密切。Cyclin D1 的过度激活可导致肿瘤细胞脱离细胞周期的监管,提前进入 S 期,导致细胞异常增殖,从而引起癌变^[21-22]。另外, β -catenin 可通过与转录因子 T 细胞因子/淋巴样细胞增强 - 结合蛋白因子 (TCF/LEF) 结合激活 C-myc,进而推动细胞周期进展,导致细胞癌变^[23]。本文结果发现,KIAA1456 过表达后 Cyclin D1 和 C-myc 蛋白表达量显著降低,从而进一步证实 KIAA1456 的过表达对 Wnt/ β -catenin 信号通路具有负性调节作用。结合 KIAA1456 过表达后细胞增殖能力明显下降这一现象,笔者推测 KIAA1456 的过表达通过抑制 β -catenin 核转位,下调 Wnt/ β -catenin 信号通路下游靶基因 Cyclin D1、C-myc 表达,从而抑制骨肉瘤细胞的增殖。

综上所述,KIAA1456 作为一个抑癌基因可能在骨肉瘤的增殖中发挥着重要的作用,提示 KIAA1456 可能成为骨肉瘤治疗的靶点。然而,由于 KIAA1456 在肿瘤进展中机制的复杂性,需要进行进一步深入的研究。

参考文献

- [1] Savage SA, Mirabello L, Wang Z, et al. Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for osteosarcoma[J]. *Nat Genet*, 2013, 45(7):799-803.
- [2] Moriarity BS, Otto GM, Rahrman EP, et al. A sleeping beauty forward genetic screen identifies new genes and pathways driving osteosarcoma development and metastasis[J]. *Nat Genet*, 2015, 47(6):615-624.
- [3] Xu G, Guo Y, Xu D, et al. TRIM14 regulates cell proliferation and invasion in osteosarcoma via promotion of the AKT signaling pathway[J]. *Sci Rep*, 2017, 7:42411.
- [4] Whelan J, Mc Tiernan A, Cooper N, et al. Incidence and survival of malignant bone sarcomas in England 1979-2007[J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(4):E508-E517.
- [5] Subbiah V, Kurzrock R. Phase I clinical trials for sarcomas: the cutting edge[J]. *Curr Opin Oncol*, 2011, 23(4):352-360.
- [6] Luetke A, Meyers PA, Lewis I, et al. Osteosarcoma treatment - where do we stand? A state of the art review[J]. *Cancer Treat Rev*, 2014, 40(4):523-532.
- [7] Begley U, Sosa MS, Avivar-Valderas A, et al. A human tRNA methyltransferase 9-like protein prevents tumour growth by regulating LIN9 and HIF1- α [J]. *EMBO Mol Med*, 2013, 5(3):366-383.
- [8] Chan CT, Dyavaiah M, DeMott MS, et al. A quantitative systems approach reveals dynamic control of tRNA modifications during cellular stress[J]. *PLoS Genet*, 2010, 6(12):e1001247.
- [9] Patil A, Chan CT, Dyavaiah M, et al. Translational infidelity-induced protein stress results from a deficiency in Trm9-catalyzed tRNA modifications[J]. *RNA Biol*, 2012, 9(7):990-1001.
- [10] Chen C, Huang B, Anderson JT, et al. Unexpected accumulation of mcm^5U and $mcm^5S^2(U)$ in a trm9 mutant suggests an additional step in the synthesis of mcm^5U and mcm^5S^2U [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6):e20783.
- [11] Fan K, Li N, Qi J, et al. Wnt/ β -catenin signaling induces the transcription of cystathionine- γ -lyase, a stimulator of tumor in colon cancer[J]. *Cell Signal*, 2014, 26(12):2801-2808.
- [12] Iozzo RV, Eichstetter I, Danielson KG. Aberrant expression of the growth factor Wnt-5A in human malignancy[J]. *Cancer Res*, 1995, 55(16):3495-3499.
- [13] Lu BJ, Wang YQ, Wei XJ, et al. Expression of WNT-5a and ROR2 correlates with disease severity in osteosarcoma[J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5(4):1033-1036.
- [14] Ma Y, Zhu B, Liu X, et al. Inhibition of oleandrin on the proliferation show and invasion of osteosarcoma cells in vitro by suppressing Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, 34:115.
- [15] Haydon RC, Deyrup A, Ishikawa A, et al. Cytoplasmic and/or nuclear accumulation of the beta-catenin protein is a frequent event in human osteosarcoma[J]. *Int J Cancer*, 2002, 102(4):338-342.
- [16] Iwaya K, Ogawa H, Kuroda M, et al. Cytoplasmic and/or nuclear staining of beta-catenin is associated with lung metastasis[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2003, 20(6):525-529.
- [17] Tian J, He H, Lei G. Wnt/ β -catenin pathway in bone cancers[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(10):9439-9445.
- [18] Cai Y, Cai T, Chen Y. Wnt pathway in osteosarcoma, from oncogenic to therapeutic[J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115(4):625-631.
- [19] Chen C, Zhao M, Tian A, et al. Aberrant activation of Wnt/ β -catenin signaling drives proliferation of bone sarcoma cells[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(19):17570-17583.
- [20] Deitrick J, Pruitt WM. Wnt/ β catenin-mediated signaling commonly altered in colorectal cancer[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2016, 144:49-68.
- [21] Krecicki T, Smigiel R, Fraczek M, et al. Studies of the cell cycle regulatory proteins P16, cyclin D1 and retinoblastoma protein in laryngeal carcinoma tissue[J]. *J Laryngol Otol*, 2004, 118(9):676-680.
- [22] Youssef EM, Hasuma T, Morishima Y, et al. Overexpression of cyclin D1 in rat esophageal carcinogenesis model[J]. *Jpn J Cancer Res*, 1997, 88(1):18-25.
- [23] Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1653(1):1-24.