10.16016/j.1000-5404.201410194

论著

PCDH10通过下调Wnt/β-catenin信号通路抑制多发性骨髓瘤细胞的增殖

许永会[1]，陈建斌[1]，袁海汀[1]，杨泽松[2]，李 珍[2]，李 颖[2]，汤为学[3]，黄宗干[1]（400016 重庆，重庆医科大学附属第一医院：血液科[1]，血液科实验室[2]，实验研究中心[3]）

［**摘要**］ **目的** 探讨原钙粘蛋白-10（procadherin-10，PCDH10）基因是否通过调控Wnt/β-catenin信号通路抑制多发性骨髓瘤细胞的增殖及其相关机制。**方法** 采用脂质体转染法将空载体pcDNA3.1（+）TP53质粒和pcDNA3.1（+）PCDH10质粒分别转染至人多发性骨髓瘤细胞KM3细胞中。实验分为对照组、空载体组、转染组。采用RT-PCR和Western blot检测3组细胞PCDH10基因的表达。RT-PCR检测不同浓度的LiCl（0、5、10、15、20 μmol/mL）处理KM3细胞48 h后β-catenin的表达，选取LiCl的最佳浓度分别作用于3组细胞。应用CCK-8法检测细胞增殖能力。采用流式细胞仪检测细胞周期。质粒双荧光素酶报告基因检测系统分析PCDH10转染前后对KM3细胞LEF/TCF基因的影响。实时荧光定量PCR（qRT-PCR）和Western blot检测β-catenin、c-Myc、Cyclind1基因mRNA、蛋白水平及β-catenin蛋白在细胞核内的表达。免疫荧光观察PCDH10对β-catenin核转位的影响。**结果** PCDH10基因转染后在细胞中获得稳定表达。CCK-8检测结果发现转染组细胞的增殖能力明显受抑（$P<0.05$），流式细胞仪检测结果显示转染组细胞周期阻滞于G_1期、增殖指数降低（$P<0.05$）；荧光素酶活性分析显示PCDH10显著抑制LEF/TCF基因活性（$P<0.05$）；qRT-PCR和Western blot结果显示，转染组细胞中β-catenin、c-Myc、Cyclind1表达明显降低（$P<0.05$），细胞核内β-catenin的蛋白表达量明显下调；免疫荧光观察到转染组细胞核内β-catenin荧光强度减弱。RT-PCR检测发现20 μmol/mL的LiCl为KM3细胞的最佳作用浓度，经LiCl处理3组细胞后，与对照组、空载体组比较，转染组细胞增殖能力及β-catenin、c-Myc、Cyclind1的表达也受到抑制（$P<0.05$）。**结论** PCDH10基因能抑制KM3细胞的增殖，其机制可能主要与下调LEF/TCF基因活性及抑制β-catenin核转位有关。

［**关键词**］ 原钙粘蛋白-10；Wnt/β-catenin信号通路；多发性骨髓瘤；细胞增殖
［**中图法分类号**］ R374.3；R730.23；R733.3 ［**文献标志码**］ A

PCDH10 inhibits cell proliferation of multiple myeloma through down-regulating Wnt/β-catenin signaling

Xu Yonghui[1], Chen Jianbin[1], Yuan Haiting[1], Yang Zesong[2], Li Zhen[2], Li Ying[2], Tang Weixue[3], Huang Zonggan[1]（[1]Departments of Hematology, [2]Laboratory of Hematology, [3]Central Laboratory, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China）

［**Abstract**］ **Objective** To explore whether the effect of procadherin-10（PCDH10）on inhibiting cell proliferation is related with Wnt signaling in multiple myeloma（MM）and the underlying mechanism. **Methods** Human MM cell line KM3 was stably transfected with pcDNA3.1（+）or pcDNA3.1（+）PCDH10 by lipofectamine2000. The expression of PCDH10 gene was confirmed by RT-PCR and Western blottig. Different concentrations（0, 5, 10, 15 μmol/mL and 20 μmol/mL）of LiCl was used to treat KM3 cells for 48 h, and then RT-PCR was adopted to determine the proper concentration of LiCl. CCK-8 assay was applied to examine the cell proliferation. Dual luciferase reporter assay was performed to assess the activity of LEF/TCF gene. Cell cycle was analyzed by flow cytometry. The expression of relative genes was detected by qPCR and Western blotting. **Results** The expression of PCDH10 gene was obviously increased after

［**基金项目**］ 重庆市卫生局医学科研计划重点项目（2011-1-032）；重庆市医学科研计划（2010-2-108）
［**通信作者**］ 陈建斌，E-mail：cqchenjianbin2007@126.com
［**优先出版**］ http://www.cnki.net/kcms/detail/j.1000-5404.201410194.html（2014-12-17）

transfection. It was observed that the proper concentration of LiCl was 20 μmol/mL. PCDH10 over-expression highly inhibited the cell proliferation, even when the cells were treated with LiCl ($P<0.05$). Dual luciferase reporter assay showed that the activity of LEF/TCF gene was significantly impaired by PCDH10 forced expression ($P<0.05$). Flow cytometry revealed that PCDH10 arrested cell cycle in G_1 phase ($P<0.05$), and the cells treated with LiCl showed the same trend ($P<0.05$). In addition, the expression of c-Myc and Cyclind1 were down-regulated at both mRNA and protein levels. The mRNA expression of β-catenin was not blocked evidently, buy the protein expression and nuclear accumulation of β-catenin were inhibited obviously even when the KM3 cells were treated with LiCl ($P<0.05$). **Conclusion** PCDH10 can inhibit cell proliferation through inhibiting Wnt/β-catenin signaling in MM.

[**Key words**] procadherin-10; Wnt/β-catenin signaling; multiple myeloma; cell proliferation

Supported by the Key Project of Medical Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2011-1-032) and the Project of Medical Scientific Research of Chongqing (2010-2-108). Corresponding author: Chen Jianbin, E-mail: cqchenjianbin2007@126.com

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是浆细胞的恶性克隆性肿瘤,以溶骨性骨损害、高钙血症、肾功能损害、继发性贫血、感染等病理变化为主要临床表现,其发病率居血液肿瘤的第2位[1-2]。目前尽管新药(如硼替佐米、雷利度胺)的应用、化疗方案及干细胞移植技术的改善使其治疗缓解率提高,由于其复发、耐药等原因,MM仍为不能完全治愈的恶性肿瘤[3-4]。因此,仍迫切需要MM的分子发病机制及相关治疗药物的研究。

原钙粘蛋白-10(procadherin-10, PCDH10)基因为近年新发现的抑癌基因,属δ2原钙粘蛋白家族,主要参与钙依赖性的细胞之间特异性的黏附、调节特异性细胞之间的相互识别及多种信号通路的传导[5]。研究发现PCDH10基因在胃癌、乳腺癌、膀胱癌、淋巴瘤及子宫内膜癌等肿瘤中均因启动子高度甲基化导致其表观遗传沉默[6-8]。已有研究发现PCDH10还可作为评估患者复发及预后的生化标志[9-11]。本课题组前期研究发现,PCDH10在MM中亦因其启动子甲基化而沉默,从而促进MM的增殖、侵袭及血管形成,去甲基化后能抑制细胞的增殖、迁移、血管新生[12-14]。此外,PCDHGC3、PCDHs及PCDH-P均为原钙粘蛋白家族成员,其生物学机制与Wnt/β-catenin信号通路有关[15-17],Wnt/β-catenin信号通路的异常激活广泛参与多种肿瘤细胞的增殖、侵袭及耐药等生物学行为,并在MM疾病的发生、发展过程中发挥了重要作用[2-3]。然而,PCDH10是否通过调控Wnt/β-catenin信号通路抑制MM细胞增殖尚不清楚。因此,本实验采用脂质体转染法过表达PCDH10基因,进一步探讨PCDH10基因在MM细胞中的作用及机制,为PCDH10基因在MM的临床治疗及预后判断的应用中提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

人多发性骨髓瘤细胞株KM3细胞由上海第二军医大学长征医院血液科侯健教授惠赠。pcDNA3.1(+)TP53质粒和pcDNA3.1-PCDH10质粒由香港中文大学陶谦教授惠赠。pTOPflash、pFOPflash、pRL-SV40质粒(Millipore公司),RPMI1640、胎牛血清(Gibco公司);DNA Marker500、Go-Taq DNA聚合酶(武汉博士德公司);Lipofectamine2000(Invitrogen公司);CCK-8试剂盒(Sigma公司);TRIzol、PCR试剂盒及PCR引物(TaKaRa公司);BCA试剂盒、蛋白裂解液、SDS-PAG凝胶试剂盒(碧云天公司);质粒提取试剂盒(Omega公司)β-actin、β-catenin、Cyclind1单克隆抗体(Cell Signaling Technology公司);c-Myc、TBP单克隆抗体(Abcam公司);山羊抗兔荧光二抗(Proteintech公司)。质粒双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Promega公司),倒置荧光显微镜(卡尔蔡司公司);流式细胞仪、37 ℃恒温培养箱。

1.2 细胞培养、转染及筛选稳定株

KM3细胞株于RPMI1640培养(含10% FBS),5% CO_2、37 ℃、饱和湿度下培养。取对数期细胞进行实验。实验分为对照组、空载体组和转染组。提取质粒后,按照Lipofectamine2000说明书将空质粒pcDNA3.1(+)TP53和质粒pcDNA3.1-PCDH10分别转入KM3细胞中。转染72 h后,用G418筛选稳定株。

1.3 LiCl最佳浓度的筛选

将KM3细胞用无血清的RPMI1640同步化培养12 h后,加不同浓度的LiCl(0、5、10、15及20 μmol/mL)刺激KM3细胞,48 h后RT-PCR测定β-catenin的表达,并选取LiCl最佳作用浓度。后续实验中均采用此浓度分别处理对照组、空载体组及转染组的KM3细胞。

1.4 PT-PCR、qRT-PCR检测β-catenin、c-Myc及Cyclind1基因mRNA的表达

按照TRIzol试剂盒说明书提取RNA,并参照逆转录试剂盒说明书将RNA逆转录成cDNA。用RT-PCR鉴定PCDH10及β-catenin的表达。qRT-PCR测定

β-catenin、Cyclind1 及 c-Myc 的 mRNA 表达。qRT-PCR 扩增总反应体系为 10 μL,反应条件为: 95 ℃ 预变性 2 min,1 个循环;95 ℃变性 30 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s;为 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 3 min。RT-PCR 扩增体系为 12.5 μL,反应条件同上,之后用产物进行琼脂糖凝胶电泳(2%)。RT-PCR 结果用 Quantity One 软件计算灰度值后再进行统计学分析,qRT-PCR 结果采用 Bio-Rad CFX Manager 3.0 软件计算出基因表达量后进行统计学分析。相关基因的引物序列见表 1。

表 1 相关基因引物序列与大小

基因	引物序列(5′→3′)	产物长度(bp)
PCDH10	上游:ACTGCTATCAGGTTGCCTG	219
	下游:GTCTGTCAACTAGATAGCTG	
β-catenin	上游:TGGTGACAGGGAAGACATCA	108
	下游:CCATAGTGAAGGCGAACTGC	
c-Myc	上游:GAGACAGATCAGCAACAACCGA	227
	下游:CTGCTTGGACGGACAGGATG	
Cyclind1	上游:TTCGTTGCCCTCTGTGCCA	196
	下游:GAAGCGTGTGAGGCGGTAGTAG	
β-actin	上游:CCACGAACTACCTTCAACTCC	132
	下游:GTGATCTCCTTCTGCATCCTGT	

1.5 Western blot 检测 β-catenin、c-Myc、Cyclind1 蛋白的表达

取不同处理组对数生长期细胞,按照总蛋白试剂盒及核蛋白提取试剂盒说明提取细胞蛋白及 BCA 法蛋白定量试剂盒说明分别提取总蛋白及细胞核蛋白并进行定量。SDS-PAGE 电泳分离蛋白,250 mA 恒流转膜,根据蛋白的分子量设定转膜时间。将膜于 5% BSA 溶液中封闭 2 h,加入一抗(PCDH10 1∶1 200、β-catenin 1∶800、c-Myc 1∶5 000、Cyclind1 1∶800、β-actin 1∶2 000、TBP 1∶5 000),4 ℃孵育过夜。加入二抗(1∶2 000),37 ℃孵育 90 min,将 ECL 显影液均匀滴加在膜上,暗示曝光显影。结果采用 Fusion 软件分析。

1.6 双荧光素酶报告基因系统检测 PCDH10 基因与 LEF/TCF 基因的关系

将 3 组细胞用无血清 1640 培养基培养 3 h 后,每孔细胞用 Lipofectamine 2000 共转染 pTOPFlash 或 pFOPFlash 和 pRL-SV40,每个剂量组各设 3 个复孔。以 pRL-SV40 作控制转染效率的内对照。48 h 后按双荧光素酶报告基因系统试剂盒说明书操作,立即用荧光检测仪作荧光定量测定。

1.7 流式细胞仪和 CCK-8 分别检测细胞周期、细胞增殖能力

收集 3 组细胞,细胞数达 1×10^6 个,PBS 清洗 3 遍,用 70% 的冰乙醇固定 5 h 后,用流式细胞仪检测细胞周期,Cell Quest 软件进行分析。将细胞接种到 96 孔板,同一培养条件分别培养 0、24、48、72 h 及 96 h,每孔加 10 μL CCK-8 溶液继续孵育 3 h,终止培养,选择 450 nm 波长,在酶联免疫监测仪上测定各孔光密度值[D(450)]。以时间为横坐标,光密度值为纵坐标,绘制生长曲线。实验重复 3 次。

1.8 免疫荧光检测 β-catenin 核转位

收集 3 组细胞,取细胞悬液 10 μL 滴于玻片上。4% 多聚甲醛固定 15 min,0.5% Triton X-100 透化 15 min,山羊血清封闭 30 min,孵育一抗 β-catenin (1∶100),4 ℃孵育过夜。次日复温 1 h, 孵育荧光二抗(1∶200),孵育约 90 min 后,PI 染核 5 min,PBS 清洗,风干后甘油封片。用荧光卡尔蔡司荧光显微镜(×400)观察 β-catenin 的表达。

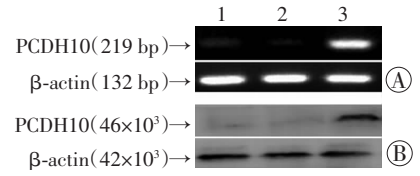
1.9 统计学分析

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 18.0 统计软件进行独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 转染后 KM3 细胞中 PCDH10 的表达

RT-PCR、Western blot 检测结果显示,PCDH10 转染后的 KM3 细胞在 mRNA 及蛋白水平均有 PCDH10 的稳定表达,对照组、空载体组细胞难以检测到 PCDH10 的表达(图 1)。



1:对照组;2:空载体组;3:转染组

图 1 RT-PCR(A)、Western blot(B)检测各组细胞 PCDH10 的表达

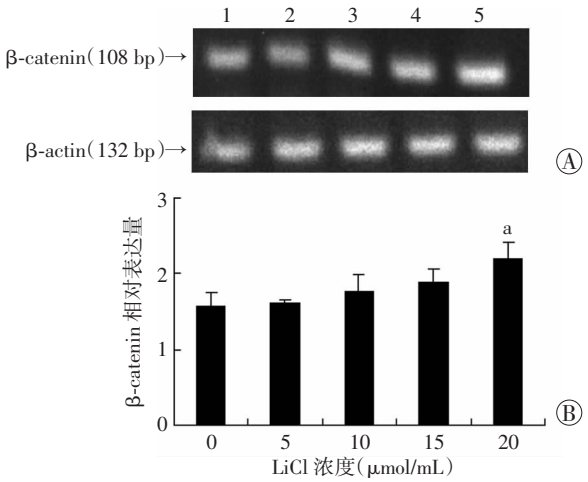
2.2 不同浓度 LiCl 处理 KM3 细胞后 β-catenin 的表达

RT-PCR 检测结果发现:用不同浓度 LiCl 处理 KM3 细胞 48 h 后,β-catenin 的表达随 LiCl 浓度增高逐渐增加,浓度达 20 μmo/mL 时,β-catenin 的表达量增加最明显,与 0 μmol/mL 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);浓度为 5、10、15 μmol/mL 时,与 0 μmol/mL 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。故选取 20 μmol/mL 作为 LiCl 对 KM3 细胞的作用浓度(图 2)。

2.3 PCDH10 对各组细胞增殖能力的影响

CCK-8 检测结果显示:未经 LiCl 处理的转染组细胞 48 h 开始增殖速度明显落后于对照组、空载体组,差异有统计学意义($P<0.05$); LiCl 处理后则于 24 h 时

开始差异有统计学意义($P<0.05$,图3)。

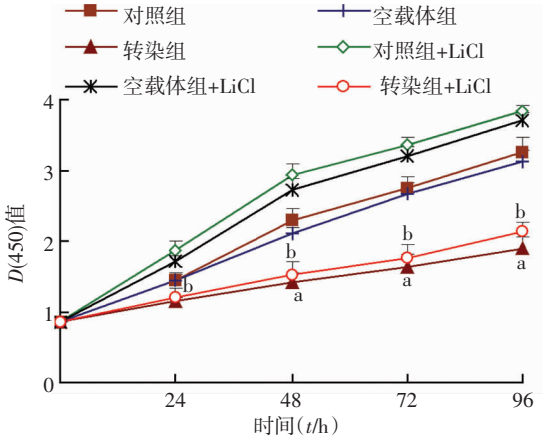


A: RT-PCR 检测 β-catenin 的表达 1~5:分别为 LiCl 0、5、10、15、20 μmol/mL;B: β-catenin 相对表达量统计分析 a:$P<0.05$,与 0 μmol/mL 组比较

图2 RT-PCR 检测不同浓度 LiCl 处理 KM3 细胞后细胞内 β-catenin 的表达

2.4 PCDH10 对各组细胞周期的影响

流式细胞仪检测发现:转染组与对照组、空载体组比较,G_1 期的细胞分布增加,增殖指数降低($P<0.05$)。经 LiCl 处理后,转染组与对照组、空载体组相比,G_1 期的细胞分布明显增加,增殖指数明显降低($P<0.05$,图4,表2)。



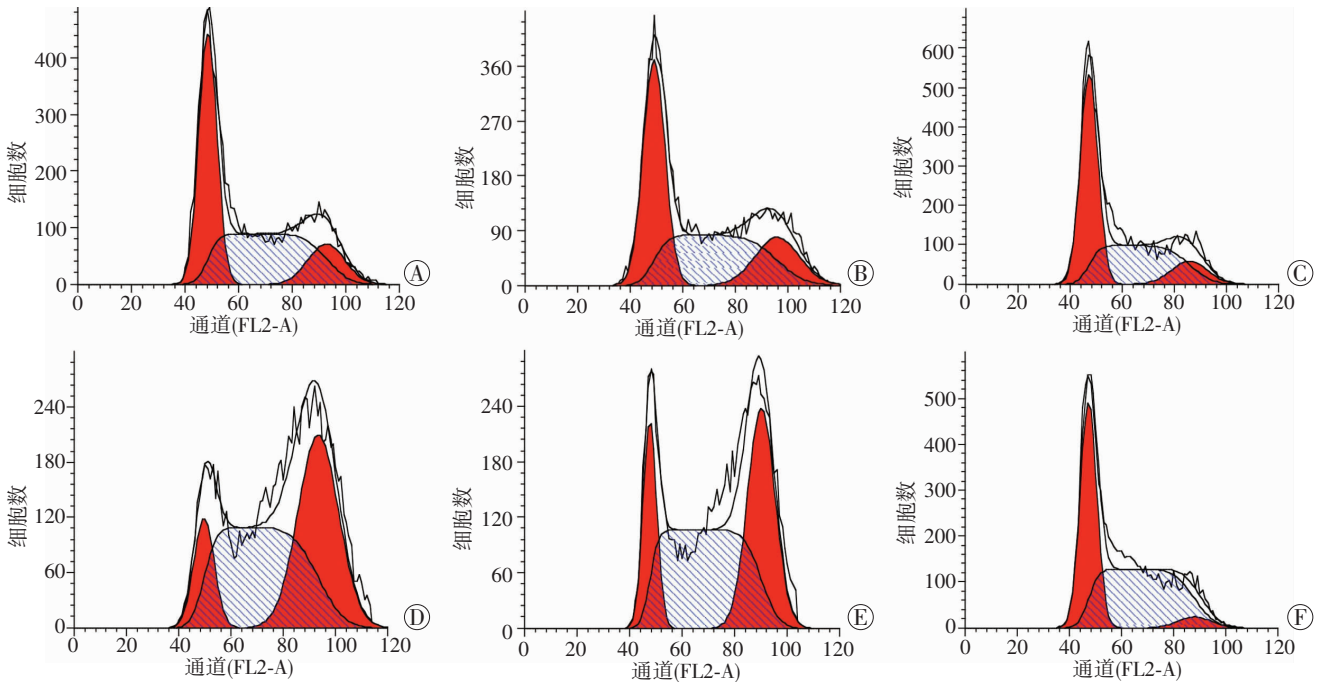
a: $P<0.05$,与对照组、空载体组比较;b: $P<0.05$,与对照组+LiCl、空载体组+LiCl 比较

图3 CCK-8 检测各组细胞增殖能力

表2 各组细胞周期分布($\bar{x}\pm s$)

组别	G_1期(%)	S期(%)	G_2期(%)	增殖指数
对照组	38.60±2.61	43.07±2.96	18.33±3.21	0.614±0.026
空载体组	41.28±3.25	42.80±3.23	15.92±2.13	0.587±0.032
转染组	51.09±2.14	40.11±2.48	8.80±2.19	0.489±0.021[a]
对照组+LiCl	12.91±4.43	50.52±2.47	36.56±3.88	0.854±0.043
空载体组+LiCl	15.11±1.67	51.80±2.82	33.08±2.64	0.826±0.017
转染组+LiCl	47.78±2.24	47.27±1.63	4.95±1.39	0.529±0.024[b]

a:$P<0.05$,与对照组、空载体组比较;b: $P<0.05$,与对照组+LiCl、空载体组+LiCl 比较

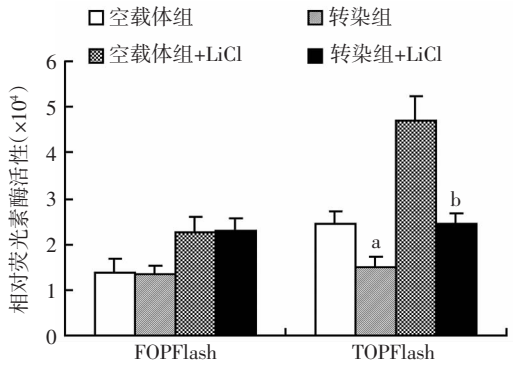


A~C:分别为未经 LiCl 处理的对照组、空载体组、转染组;D~E: 分别为经 LiCl 处理后的对照组、空载体组、转染组

图4 流式细胞仪检测 PCDH10 对细胞周期的影响

2.5 PCDH10 基因对 LEF/TCF 基因活性的影响

双荧光素酶法检测结果发现:与对照组、空载体组比较,转染组细胞中 pTOPFlash 活性(LEF/TCF 基因活性)显著下调($P<0.05$);LiCl 处理后,对照组、空载体组细胞 pTOPFlash 活性明显升高,而转染组细胞中 pTOPFlash 活性仍显著低于对照组、空载体组($P<0.05$)。而阴性对照 pFOPFlash 的表达在对照组、空载体组与转染组之间无明显差异($P>0.05$,图 5)。以上结果表明,PCDH10 基因可明显下调 LEF/TCF 基因的活性。



a: $P<0.05$,与空载体组比较; b: $P<0.05$,与空载体组 + LiCl 比较

图 5 双荧光素酶报告基因检测系统测定 PCDH10 对 Wnt 通路活性的影响

2.6 各组细胞 β-catenin、c-Myc 和 Cyclind1 的表达

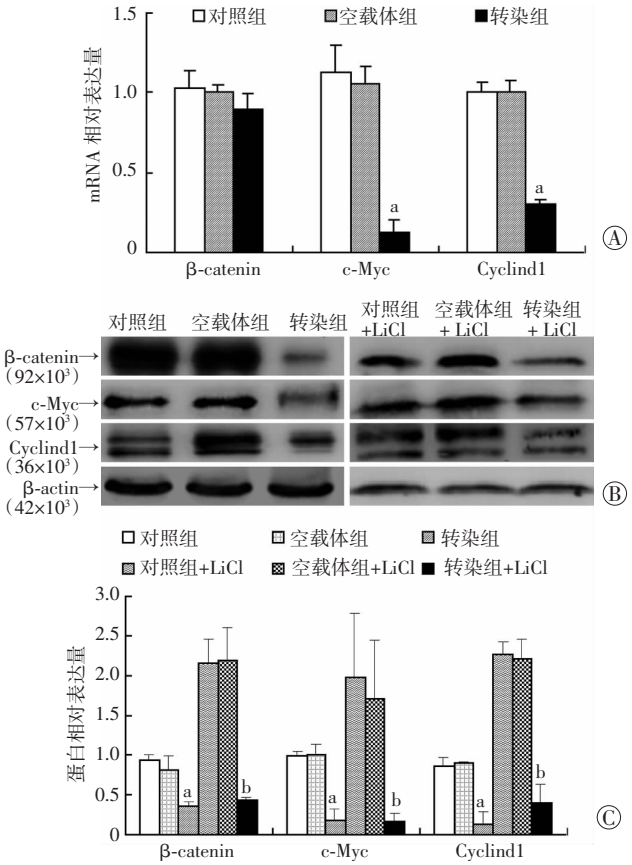
qRT-PCR 检测结果显示:与对照组、空载体组比较,转染组细胞中 c-Myc 和 Cyclind1 的 mRNA 表达水平明显降低($P<0.05$),β-catenin mRNA 表达水平无明显降低($P>0.05$,图 6A)。Western blot 结果显示:与对照组、空载体组比较,LiCl 刺激前,转染组的细胞中 β-catenin、c-Myc 和 Cyclind1 蛋白表达均明显减弱;LiCl 刺激后,c-Myc 的表达亦明显降低($P<0.05$),β-catenin、Cyclind1 的蛋白表达稍有增高,但仍低于对照组、空载体组($P<0.05$,图 6B、C)。

2.7 各组细胞核内 β-catenin 的表达

Western blot 检测结果发现:LiCl 处理前后,与对照组、空载体组比较,转染组细胞核内 β-catenin 的表达明显下调($P<0.05$,图 7)。

2.8 PCDH10 基因对 β-catenin 细胞内核转位的影响

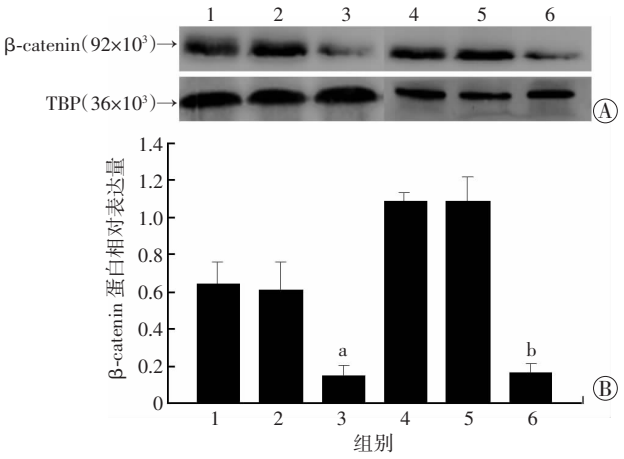
免疫荧光显微镜下观察,与对照组、空载体组相比,转染组的 β-catenin 荧光强度降低,主要分布于胞浆内,核内表达明显减少,而对照组、空载体组 β-catenin 主要分布于细胞核内。LiCl 处理后转染组 β-catenin 在细胞核内的表达仍明显低于对照组、空载体组,而对照组、空载体组 β-catenin 主要分布于细胞核内,荧光强度增高(图 8、9)。



a: $P<0.05$,与对照组、空载体组比较; b: $P<0.05$,与对照组 + LiCl、空载体组 + LiCl 比较

A: β-catenin、c-Myc 和 Cyclind1 mRNA 相对表达量分析; B: Western blot 检测 β-catenin、c-Myc 和 Cyclind1 蛋白的表达; C: 蛋白相对表达量统计分析

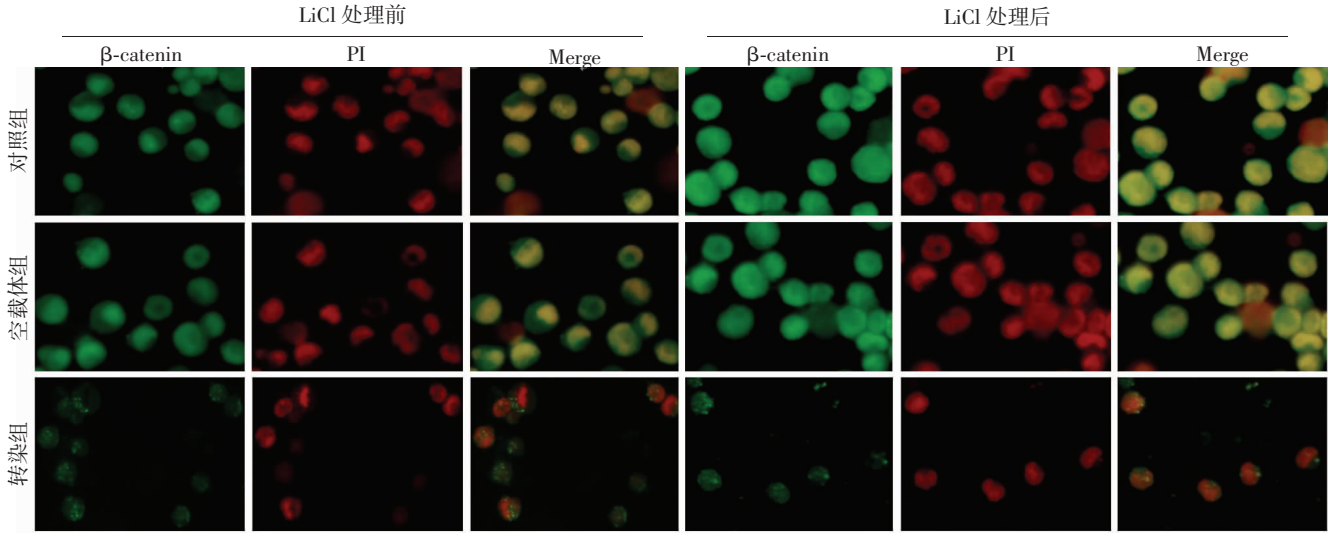
图 6 PCDH10 对 β-catenin、c-Myc 和 Cyclind1 表达的影响



1: 对照组; 2: 空载体组; 3: 转染组; 4: 对照组 + LiCl; 5: 空载体组 + LiCl; 6: 转染组 + LiCl

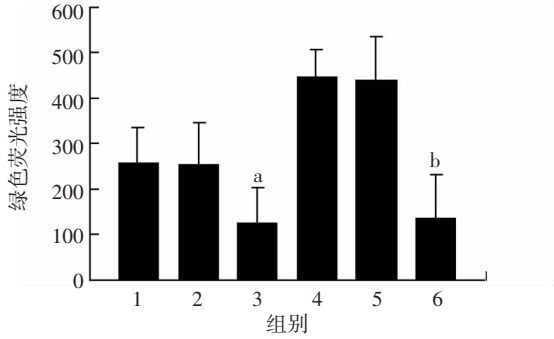
A: Western blot 检测 KM3 细胞核内 β-catenin 的表达; B: 蛋白相对表达量统计分析 a: $P<0.05$,与对照组、空载体组比较, b: $P<0.05$,与对照组 + LiCl、空载体组 + LiCl 比较

图 7 Western blot 检测 PCDH10 对 β-catenin 在细胞核内表达的影响



A：LiCl 处理前；B：LiCl 处理后

图 8　免疫荧光观察 PCDH10 对 KM3 细胞中 β-catenin 细胞核转位的影响　（×400）



1：对照组，2：空载体组，3：转染组，4：对照组＋LiCl，5：空载体组＋LiCl，6：转染组＋LiCl；a：$P<0.05$，与对照组、空载体组比较；b：$P<0.05$，与对照组＋LiCl、空载体组＋LiCl 比较

图 9　各组 KM3 细胞中 β-catenin 荧光强度分析

3　讨论

近年来，MM 发病率仍逐年增加，并有年轻化的势，虽然新的靶向治疗药物及移植技术的改善提高了 MM 的治疗效果，但由于复发、耐药及多种不良预后因素等原因导致 MM 仍为不可治愈的疾病。因此，有关 MM 的发病机制及分子靶向药物的研究具有重要意义。本课题组研究发现，PCDH10 的甲基化促进了 KM3 细胞的增殖、侵袭及血管形成等生物学行为，但 PCDH10 抑制 KM3 细胞增殖的机制尚未清楚。

Wnt/β-catenin 信号通路的活化关键在于 β-catenin 在细胞内大量累积，并从胞浆转入细胞核内从而与 LEF/TCF 基因结合激活下游靶基因 c-Myc 及 Cyclind1 的表达，靶基因的异常表达促进肿瘤的增殖[2-3]。本实验采用双荧光素酶报告基因检测系统分析发现 PCDH10 可以明显抑制 LEF/TCF 基因的活性，从而抑制 KM3 细胞 c-Myc 及 Cyclind1 的表达，进一步抑制 KM3 细胞的增殖能力，细胞周期阻滞于 G_1 期，增殖指数下降；LiCl 处理后，转染组细胞周期分布、周期蛋白 Cyclind1 及 c-Myc 的表达与未经 LiCl 处理的转染组细胞结果一致。LiCl 是 GSK-3β 的抑制剂，使胞浆内 β-catenin 磷酸化减少，游离 β-catenin 增多，从而导致 β-catenin 核内表达增加，与 LEF/TCF 的结合体增多，靶基因如 c-Myc 及 Cyclind1 的表达增强。由于 PCDH10 基因可以明显抑制 LEF/TCF 基因的活性，导致 β-catenin 与 LEF/TCF 的结合体减少，c-Myc 及 Cyclind1 的表达降低，KM3 细胞增殖减弱。

本实验发现，PCDH10 基因对 β-catenin mRNA 表达水平没有明显的抑制作用，但 Western blot 检测结果发现 PCDH10 基因的高表达可抑制 KM3 细胞内 β-catenin 蛋白的表达，其作用机制首先可能为 PCDH10 蛋白与 β-catenin 蛋白的结合，使胞浆内游离的 β-catenin 减少；其次，本课题组前期研究发现 PCDH10 基因可抑制 PI3K/AKT 活性[18]，由于 PI3K/AKT 活性下降可减少 AKT 对 GSK-3β 的抑制作用，进而导致 β-catenin 的磷酸化增加，游离 β-catenin 减少[19-20]。免疫荧光显微镜下可观察到，对照组细胞中 β-catenin 主要分布于细胞核内，而转染 PCDH10 基因后，β-catenin 核内表达减少，其机制可能与胞浆中游离的 β-catenin 减少有关。LiCl 处理后，对照组、空载体组细胞核内 β-catenin 明显增高，而转染组细胞中 β-catenin 增高不明显，结果表明，PCDH10 基因抑制 KM3 细胞增殖活性的主要机制与抑制核转录因子 LEF/TCF 基因的活性有关。

综上所述，PCDH10 基因可抑制 Wnt/β-catenin 信

号通路中的核转录因子 LEF/TCF 基因的表达及 β-catenin 在细胞浆内的累积,从而使得细胞核内 β-catenin 与 LEF/TCF 的结合体减少,降低靶基因 c-Myc 及 Cyclind1 的表达,抑制 KM3 细胞增殖。PCDH10 基因除了与 LEF/TCF 基因有关,是否还与其他基因有关,尚有待于进一步的研究。研究发现,在胃癌、结肠癌及前列腺癌中,检测 PCDH10 的表达可以判断肿瘤的预后[9-11],并且 PCDH10 蛋白在血浆中检测的敏感度较肿瘤组织高[21]。此外,c-Myc 是参与肿瘤耐药的重要分子,并能降低肿瘤对化疗药物的敏感性[22-23],本实验发现 PCDH10 能明显抑制 c-Myc 的表达,提示 PCDH10 的高表达具有降低肿瘤耐药及增强肿瘤药物敏感性的潜能。这些研究结果表明,PCDH10 基因在肿瘤的临床诊断、治疗及预后中有广泛的应用前景。PCDH10 基因能否降低肿瘤耐药及增加化疗药物的敏感性是本课题组下一步的研究内容。

参考文献:

[1] Hameed A, Brady J J, Dowling P, *et al*. Bone disease in multiple myeloma: pathophysiology and management [J]. Cancer Growth Metastasis, 2014, 7: 33-42.

[2] Ge X, Wang X. Role of Wnt canonical pathway in hematological malignancies[J]. J Hematol Oncol, 2010, 3: 33.

[3] Polakis P. Drugging Wnt signalling in cancer[J]. EMBO J, 2012, 31(12): 2737-2746.

[4] De-la-Puente P, Muz B, Azab F, *et al*. Molecularly targeted therapies in multiple myeloma [J]. Leuk Res Treatment, 2014, 2014: 976567.

[5] Redies C, Vanhalst K, Roy Fv. delta-Protocadherins: unique structures and functions[J]. Cell Mol Life Sci, 2005, 62(23): 2840-2852.

[6] Li Z, Chim J C, Yang M, *et al*. Role of PCDH10 and its hypermethylation in human gastric cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1823(2): 298-305.

[7] Narayan G, Xie D, Freddy A J, *et al*. PCDH10 promoter hypermethylation is frequent in most histologic subtypes of mature lymphoid malignancies and occurs early in lymphomagenesis[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2013, 52(11): 1030-1041.

[8] Zhong X, Zhu Y, Mao J, *et al*. Frequent epigenetic silencing of PCDH10 by methylationin human colorectal cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2013, 139(3): 485-490.

[9] Wang L, Xie P G, Lin Y L, *et al*. Aberrant methylation of PCDH10 predicts worse biochemical recurrence-free survival in patients with prostate cancer after radical prostatectomy [J]. Med Sci Monit, 2014, 20: 1363-1368.

[10] Yu J, Cheng Y Y, Tao Q, *et al*. Methylation of protocadherin 10, a novel tumor suppressor, is associated with poor prognosis in patients with gastric cancer[J]. Gastroenterology, 2009, 136(2): 640-651. e1.

[11] Deng J, Liang H, Ying G, *et al*. Clinical significance of the methylated cytosine-phosphate-guanine sites of protocadherin-10 promoter for evaluating the prognosis of gastric cancer [J]. J Am Coll Surg, 2014, 219(5): 904-913.

[12] Li Y, Yang Z S, Song J J, *et al*. Protocadherin-10 is involved in angiogenesis and methylation correlated with multiple myeloma[J]. Int J Mol Med, 2012, 29(4): 704-710.

[13] 李颖, 陈建斌, 宋君君, 等. 甲基化修饰致 PCDH10 基因在多发性骨髓瘤中沉默[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(9): 817-820.

[14] 李珍, 陈建斌, 彭曦, 等. PCDH10 基因促进多发性骨髓瘤细胞凋亡及机制研究[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(5): 437-441.

[15] Dallosso A R, Hancock A L, Szemes M, *et al*. Frequent long-range epigenetic silencing of protocadherin gene clusters on chromosome 5q31 in Wilms' tumor[J]. PLoS Genet, 2009, 5(11): e1000745.

[16] Yang X, Chen M W, Terry S, *et al*. A human- and male-specific protocadherin that acts through the wnt signaling pathway to induce neuroendocrine transdifferentiation of prostate cancer cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(12): 5263-5271.

[17] Zhao Y, Yang Y, Trovik J , *et al*. A novel wnt regulatory axis in endometrioid endometrial cancer[J]. Cancer Res, 2014, 74(18): 5103-5117.

[18] 彭曦, 陈建斌, 李珍, 等. PCDH10 基因在多发性骨髓瘤细胞中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(20): 2093-2097.

[19] Medina M, Garrido J J, Wandosell F G. Modulation of GSK-3 as a Therapeutic Strategy on Tau Pathologies [J]. Front Mol Neurosci, 2011, 4: 24.

[20] Kamarudin M N, Mohd-Raflee N A, Hussein S S, *et al*. (R)-(+)-α-Lipoic acid protected NG108-15 cells against H2O2-induced cell death through PI3K-Akt/GSK-3β pathway and suppression of NF-κβ-cytokines [J]. Drug Des Devel Ther, 2014, 8: 1765-1780.

[21] Danese E, Minicozzi A M, Benati M, *et al*. Epigenetic alteration: new insights moving from tissue to plasma: the example of PCDH10 promoter methylation in colorectal cancer [J]. Br J Cancer, 2013, 109(3): 807-813.

[22] Fauriat C, Olive D. AML drug resistance: c-Myc comes into play[J]. Blood, 2014, 123(23): 3528-3530.

[23] Xie C, Pan Y, Hao F, *et al*. C-Myc participates in β-catenin-mediated drug resistance in A549/DDP lung adenocarcinoma cells[J]. APMIS, 2014, 122(12): 1251-1258.

(**收稿**:2014-10-30;**修回**:2014-12-07)

(编辑 王 红)