

# 蛋白激酶 N1 对脑胶质瘤生物学行为的影响

郝玉冰 张安玲 王虎 王广秀 高照 贾志凡

**【摘要】** 目的 探讨蛋白激酶 N1(PKN1)在胶质瘤组织中的表达变化及其对胶质瘤细胞生物学行为的影响。方法 检索 GEPIA 数据库验证 *PKN1* 基因表达情况,Western blotting 法检测胶质瘤细胞系 LN229、U87 和 A172 的 PKN1 蛋白表达量。采用无意义序列(siRNA-NC 组)和 PKN1 小干扰 RNA 序列(siRNA-PKN1 组)转染 A172 细胞,并通过 CCK-8 实验、流式细胞术、细胞划痕实验和 Transwell 实验检测肿瘤细胞增殖能力、凋亡率、迁移能力和侵袭能力。结果 经检索 GEPIA 数据库发现胶质母细胞瘤组织(163 例)PKN1 mRNA 表达量高于正常脑组织(207 例, $P < 0.05$ )。Western blotting 检测显示,A172 细胞 PKN1 蛋白相对表达量高于 U87 细胞( $t = 3.096, P = 0.036$ )和 LN229 细胞( $t = 8.994, P = 0.000$ )。敲低 *PKN1* 基因表达第 3~6 天 siRNA-PKN1 组 A172 细胞增殖能力低于 siRNA-NC 组( $t = 3.275, P = 0.031; t = 5.949, P = 0.004; t = 10.430, P = 0.000; t = 6.645, P = 0.003$ );两组 A172 细胞划痕愈合率随时间推移具有不同程度增加( $F = 249.993, P = 0.000$ ),敲低 *PKN1* 基因表达后,A172 细胞划痕愈合率( $F = 97.811, P = 0.000$ )和细胞穿膜数目( $t = 5.840, P = 0.004$ )均低于 siRNA-NC 组,而 A172 细胞凋亡率高于 siRNA-NC 组( $t = 5.461, P = 0.006$ )。结论 胶质瘤 PKN1 mRNA 表达量高于正常脑组织,敲低 *PKN1* 基因表达可抑制肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭,同时诱导肿瘤细胞凋亡。

**【关键词】** 神经胶质瘤; 蛋白激酶类; 细胞增殖; 细胞凋亡; 细胞运动; 肿瘤浸润; 免疫印迹法; 流式细胞术

## Effect of protein kinase N1 on the biological behavior of human glioma

HAO Yu-bing<sup>1</sup>, ZHANG An-ling<sup>1</sup>, WANG Hu<sup>2</sup>, WANG Guang-xiu<sup>1</sup>, GAO Zhao<sup>2</sup>, JIA Zhi-fan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Neuro-Oncology, Institute of Neurology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

<sup>2</sup>Department of Neurosurgery, Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin 300350, China

Corresponding author: JIA Zhi-fan (Email: jiazhfan@163.com)

**【Abstract】 Objective** To study the expression of protein kinase N1 (PKN1) in glioma and its influence on the biological behavior of glioma cells. **Methods** The expression of *PKN1* gene was verified via GEPIA database, and LN229, U87 and A172 gliomas cells were detected by Western blotting. A172 cells were transfected with negative control sequence (siRNA-NC group) and PKN1 small interference RNA (siRNA) sequence (siRNA-PKN1 group). CCK-8 assay, flow cytometry, scratch assay and Transwell assay were applied to detect proliferation, apoptosis rate, migration ability and invasion ability, respectively. **Results** Analysis of GEPIA database showed that the expression of PKN1 mRNA in glioblastoma tissues (163 cases) was significantly higher than that in nontumorous brain tissues (207 cases,  $P < 0.05$ ). Western blotting showed that the relative expression of PKN1 protein in A172 cells was higher than that in U87 cells ( $t = 3.096, P = 0.036$ ) and LN229 cells ( $t = 8.994, P = 0.000$ ). The proliferation ability of A172 cells in siRNA-PKN1 group was lower than that in siRNA-NC group at day 3-6 after *PKN1* gene was knocked down ( $t = 3.275, P = 0.031; t = 5.949, P = 0.004; t = 10.430, P = 0.000; t = 6.645, P = 0.003$ ). The scratch healing rate of A172 cells in both groups increased in different degree over time ( $F = 249.993, P = 0.000$ ). After *PKN1* gene was knocked down, both the scratch healing rate ( $F = 97.811, P = 0.000$ ) and the invasion cells number ( $t = 5.840, P = 0.004$ ) of A172 cells were lower than that of siRNA-NC group, while the

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2020.12.009

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:30872985);国家自然科学基金青年科学基金资助项目(项目编号:81101915)

作者单位:300052 天津医科大学总医院神经病学研究所神经肿瘤实验室(郝玉冰,张安玲,王广秀,贾志凡); 300350 天津市环湖医院神经外科(王虎,高照)

通讯作者:贾志凡,Email:jiazhfan@163.com

apoptosis rate of A172 cells was higher than that of siRNA-NC group ( $t = 5.461, P = 0.006$ ). **Conclusions** The expression of PKN1 mRNA in glioma was higher than that in nontumorous brain tissue, and knockdown of *PKN1* gene could inhibit the proliferation, migration and invasion of tumor cells, and induce the apoptosis of tumor cells.

**【Key words】** Glioma; Protein kinases; Cell proliferation; Apoptosis; Cell movement; Neoplasm invasiveness; Immunoblotting; Flow cytometry

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30872985) and the National Natural Science Foundation of China for Young Scientist (No. 81101915).

**Conflicts of interest:** none declared

脑胶质瘤是一种由多基因、多因素诱发的原发性中枢神经系统肿瘤,在遗传学、组织学和临床特征方面存在异质性。胶质母细胞瘤(GBM)是原发性恶性胶质瘤中最为常见的类型,具有较强的侵袭性和增殖能力,患者预后差、病死率高<sup>[1-3]</sup>。胶质瘤的侵袭特性和某些基因如O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(*MGMT*)引起的耐药性使现有治疗方法难以达到临床治愈效果<sup>[4]</sup>,因此从基因水平寻找新的治疗靶点是当前研究的重点。蛋白激酶N1(PKN1)是一种丝氨酸/苏氨酸激酶(AKT),与乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、膀胱癌等多种肿瘤的发生与发展密切相关<sup>[5-7]</sup>,*PKN1*基因可在雄激素的参与下调节前列腺癌细胞增殖、细胞集落形成<sup>[7-8]</sup>,并参与宫颈癌细胞肌动蛋白骨架形成和肿瘤细胞增殖<sup>[9]</sup>。动物实验显示,PKN1蛋白广泛表达于大鼠脑组织,对多巴胺能、5-羟色胺能和胆碱能神经元的生物学行为有一定影响<sup>[10]</sup>,同时,*PKN1*基因还在小脑平行纤维形成、轴突生长与突触分化平衡的调节过程中发挥重要作用<sup>[11]</sup>。然而,目前关于PKN1在中枢神经系统肿瘤中的作用较少受到关注,本研究采用GEPIA数据库检索*PKN1*基因在正常脑组织和胶质瘤组织中的表达情况,通过干扰RNA敲低胶质瘤细胞系A172细胞株*PKN1*基因表达观察肿瘤细胞生物学行为的改变,以期为胶质瘤基因治疗提供理论依据。

## 材料与方法

### 一、实验材料

1. *PKN1* 基因数据来源 登录 GEPIA 数据库 (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) 检索 *PKN1* 基因,获得 *PKN1* 基因在正常脑组织和胶质瘤组织中的表达分布图并可直接使用,在“Expression DIY”功能区选择“Boxplot”,自动生成正常脑组织和胶质瘤 *PKN1* 基因表达箱式图。

2. 细胞系来源 胶质瘤细胞系 LN229、U87 和

A172 细胞株由天津医科大学总医院神经病学研究所神经肿瘤实验室提供;PKN1 小干扰 RNA(siRNA)载体为腺病毒,购于中国上海吉玛制药技术有限公司。上述胶质瘤细胞株和腺病毒均置于-80℃冰箱保存备用。

3. 试剂与仪器 (1)主要试剂:RIPA 工作液[RIPA 与苯甲基磺酰氟(PMSF)体积比为 100 :1]和 Western blotting 检测试剂盒购自上海索莱宝生物技术公司;DMEM 高糖培养基和胎牛血清(FBS)由美国 Gibco 公司提供;细胞培养箱为德国 Heraeus 公司产品;转染剂 Entranster-R4000 购自中国 Engreen 公司。PKN1 siRNA 由上海吉玛制药技术有限公司提供,包括无意义 siRNA (siRNA-NC: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3')和 siRNA-PKN1 (5'-AAGGGCACGGGAAGTGGAGTT-3')。I 抗工作液(PKN1 与质量分数为 5%脱脂牛奶体积之比为 1 :1000)和 II 抗工作液[甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)与磷酸盐缓冲液(PBS)的体积之比为 1 :10000]为美国 Santa Cruz 公司产品;增强型化学发光液购自美国 Millipore 公司;CCK-8 检测试剂盒为日本同仁公司产品;Annexin V-异硫氰酸荧光素(FITC)/碘化丙啶(PI)凋亡检测试剂盒由上海爱必信生物科技公司提供;胰酶细胞消化液、焦碳酸二乙酯处理(DEPC)管、DEPC 水和 Transwell 小室均为美国 Corning 公司产品;Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司。(2)主要仪器:L500 型小型离心机由中国湘仪公司提供;5417R 型 4℃高速离心机为中国香港基因有限公司产品;6Box iChemi XT 凝胶成像系统购自美国 Syngene 公司;IX81 型光学倒置相差显微镜由日本 Olympus 公司提供;PowerPac 电泳仪由美国 Bio-Rad 公司生产;SN258642 型酶标仪购自美国 BioTek 公司。

### 二、研究方法

1. 细胞培养 胶质瘤细胞系 LN229、U87 和

A172 置 37 °C 水浴锅复苏 5 min, 离心半径 10 cm、800 r/min 离心 5 min, 去上层冻存液; 加入含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基充分混匀, 转移至新的细胞培养皿摇匀, 置 37 °C、含 5% 二氧化碳 (CO<sub>2</sub>) 恒温箱培养, 隔夜更换培养基。细胞达 75% ~ 90% 融合时消化处理传代, 传至第 3 代时用于细胞转染实验。

2. 干扰 RNA 敲低胶质瘤细胞系 A172 细胞 *PKN1* 基因表达实验 实验前 24 h 将胶质瘤细胞系 A172 细胞铺种于 6 孔板, 细胞数为 200 × 10<sup>3</sup> 个/孔, 细胞融合达 60% ~ 70% 时转染携带 siRNA 序列腺病毒, 于首次转染验证性实验中加入空白对照组, 以排除腺病毒对 A172 细胞的影响。敲低实验分为 siRNA-NC 组 (对照组) 和 siRNA-PKN1 组 (实验组), 两组各有 2 支 200 μl DEPC 管, 每管均加入无血清 DMEM 培养液 50 μl, 其中一管滴加转染剂 Entranster-R4000 5 μl, 另一管则滴加 siRNA 工作液 (1 OD 的 siRNA 粉末以 125 μl DEPC 水溶解) 5 μl, 于室温静置 5 min, 每组两管充分混匀, 于室温静置 15 min, 更换为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 然后分别加入转染工作液, 摇匀, 置于 37 °C、含 5% 二氧化碳的培养箱中, 6 ~ 8 h 后更换培养液, 培养 48 h 备用。

3. Western blotting 法检测 *PKN1* 蛋白表达变化 分别检测 LN229、U87、A172 胶质瘤细胞和敲低 *PKN1* 基因后 A172 细胞 *PKN1* 蛋白表达量。肿瘤细胞去除培养基后以 4 °C 预冷 PBS 1 ml 洗涤 2 次, 滴加 RIPA 工作液 (RIPA 与 PMSF 体积之比为 100 : 1) 150 ~ 200 μl/孔, 并充分铺匀培养皿底部, 置于冰上裂解 30 min, 收集细胞裂解液, 于 4 °C、离心半径为 10 cm、2000 r/min 离心 10 min, 取上清蛋白质原液, 酶标仪测定蛋白质原液光密度 (OD) 值并计算总蛋白含量 (总蛋白含量 = 1.494 × OD - 0.283), 滴加适量 4 × 蛋白上样缓冲液 (缓冲液与蛋白原液体积比为 1 : 3), 水浴煮沸 5 min, 分装于 1.50 ml EP 管中 (150 μl/管), 置 -80 °C 保存备用。将备用细胞蛋白液行 SDS-PAGE, 蛋白质移至 PVDF 膜, 37 °C、质量分数为 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 根据蛋白质相对分子质量剪膜, 滴加 I 抗工作液 (*PKN1* 与 5% 脱脂牛奶体积之比为 1 : 1000), 4 °C 过夜, 恢复至室温, 滴加 II 抗工作液 (GAPDH 与 PBS 体积比为 1 : 10000), 室温下摇床慢摇 1 h, 滴加 1 ml 增强型化学发光液, 于曝光仪上检测目的蛋白印迹, Image J 软件测定电泳

条带灰度值, 以 GAPDH 为内参照物, 计算目的蛋白相对表达量。

4. 敲低 *PKN1* 基因表达观察胶质瘤细胞生物学行为变化 通过干扰 RNA 敲低胶质瘤细胞系 A172 细胞株 *PKN1* 基因表达, 观察肿瘤细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭能力。(1) CCK-8 实验检测细胞增殖能力: 将处于对数生长期的 A172 细胞接种于 6 孔板并使细胞数达 200 × 10<sup>3</sup> 个/孔, 隔夜, 确保每孔细胞融合达 60% ~ 75% 再行 siRNA 转染, 置于 37 °C、含 5% 二氧化碳培养箱培养 48 h。将 siRNA-NC 组和 siRNA-PKN1 组 A172 细胞接种于 96 孔板, 细胞数为 2 × 10<sup>3</sup> 个/孔, 待细胞完全贴壁后行 CCK-8 实验。肿瘤细胞去培养基, 滴加 100 μl 无血清 DMEM 培养液, 再滴加 10 μl CCK-8 试剂, 置 37 °C、含 5% 二氧化碳的培养箱培养 1 h, 酶标仪上于 450 nm 波长测定 OD 值, 连续检测 6 d。(2) 流式细胞术检测细胞凋亡变化: 采用胰酶细胞消化液消化处理 siRNA-NC 组和 siRNA-PKN1 组 A172 细胞, Binding Buffer 试剂 (凋亡检测试剂盒) 使细胞重悬于 1.50 ml EP 管, 细胞数为 50 × 10<sup>3</sup> 个/管, 滴加 Annexin V-FITC 5 μl/管, 室温静置 10 min, 滴加 5 μl PI, 室温静置 5 min, 流式细胞仪上检测肿瘤细胞凋亡程度, 并计算细胞凋亡率 (右上象限和右下象限细胞所占比例)。(3) 细胞划痕实验检测细胞迁移能力: 将 siRNA-NC 组和 siRNA-PKN1 组 A172 细胞接种于 6 孔板, 细胞数为 250 × 10<sup>3</sup> 个/孔, 37 °C、含 5% 二氧化碳培养箱中培养过夜, 使细胞融合达 75% ~ 80%; 再以 200 μl 无菌枪头尖部在 6 孔板中划“十”字, 去培养基, 加入无血清 DMEM 培养液, 以首次划痕拍照计为 0 h, 此后每 12 小时拍照 1 次, 记录划痕面积并计算划痕愈合率 [划痕愈合率 (%) = (0 h 划痕面积 - 测量时划痕面积) / 0 h 划痕面积 × 100%], 后者即为肿瘤细胞迁移能力。(4) Transwell 实验检测细胞侵袭能力: 将 Transwell 小室置于 24 孔板, 小室中铺 Matrigel 基质胶 60 μl, 使无血清 DMEM 培养基与 Matrigel 基质胶体积之比达 3 : 1, 置于 37 °C、含 5% 二氧化碳的培养箱中培养 30 min, 待 Matrigel 基质胶凝集, 上室滴加无血清 DMEM 培养基 200 μl, 其中包含转染的 A172 细胞 (siRNA-NC 组和 siRNA-PKN1 组细胞数各 30 × 10<sup>3</sup> 个), 下室滴加含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基, 置于 37 °C、含 5% 二氧化碳培养箱培养 24 h, 取出小室, 蒸馏水清洗, 以体积分数为 4% 多聚甲醛溶液固定 20 min, 蒸馏水清洗, 以体积分数为 0.4% 结晶紫



染色 20 min, 于光学显微镜( $\times 100$ )下选择任意 4 个视野, 计数细胞穿膜数目, 取平均值, 即为肿瘤细胞侵袭能力。

5. 统计分析方法 采用 GraphPad PRISM 6.0 软件进行数据处理与统计分析。呈正态分布的计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 采用两独立样本的  $t$  检验或单因素方差分析, 两两比较行 LSD- $t$  检验; siRNA-NC 组与 siRNA-PKN1 组 A172 细胞不同观察时间点划痕愈合率的比较采用重复测量设计的方差分析, 两两比较行 LSD- $t$  检验。以  $P \leq 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 结 果

经检索 GEPIA 数据库发现, PKN1 mRNA 在多种肿瘤组织中的表达量均高于正常组织, 其中, 胶质母细胞瘤 PKN1 mRNA 表达量高于正常脑组织, 详见图 1。

Western blotting 法检测显示, 不同胶质瘤细胞系 PKN1 蛋白相对表达量差异具有统计学意义( $P = 0.002$ , 表 1), 其中 A172 细胞 PKN1 蛋白相对表达量高于 U87 细胞( $t = 3.096, P = 0.036$ )和 LN229 细胞( $t = 8.994, P = 0.000$ ), 而 U87 细胞与 LN229 细胞之间 PKN1 蛋白相对表达量差异无统计学意义( $t = 2.511, P = 0.066$ ; 图 2)。敲低 PKN1 基因表达后, A172 细胞 PKN1 蛋白相对表达量低于空白对照组( $t = 48.010, P = 0.000$ )和 siRNA-NC 组( $t = 43.770, P = 0.000$ ), 而 siRNA-NC 组与空白对照组之间差异无统计学意义( $t = 0.888, P = 0.425$ ; 图 3, 表 2)。

敲低 PKN1 表达第 1 和 2 天, siRNA-PKN1 组与 siRNA-NC 组胶质瘤细胞增殖能力差异无统计学意义(均  $P > 0.05$ ); 第 3 ~ 6 天, siRNA-PKN1 组胶质瘤细胞增殖能力低于 siRNA-NC 组且差异具有统计学意义( $P = 0.031, 0.004, 0.000, 0.003$ ; 表 3)。

敲低 PKN1 基因表达后发现, A172 细胞凋亡率为 23.90% ~ 28.20%、平均为  $(26.66 \pm 1.39)\%$ , 而 siRNA-NC 组 A172 细胞凋亡率为 16.33% ~ 19.01%、平均  $(17.90 \pm 0.81)\%$ , 组间差异具有统计学意义( $t = 5.461, P = 0.006$ ; 图 4)。

随着时间推移, siRNA-NC 组和 siRNA-PKN1 组 A172 细胞划痕愈合率逐渐增加( $P = 0.000$ ), 其中, 12 h( $P = 0.001, 0.000$ )和 36 h( $P = 0.000, 0.000$ ) A172 细胞划痕愈合率高于 0 h, 36 h 划痕愈合率亦高于 12 h( $P = 0.001, 0.017$ ); 而敲低 PKN1 基因表达后,

A172 细胞划痕愈合率低于 siRNA-NC 组( $P = 0.000$ ; 图 5; 表 4 ~ 6)。

敲低 PKN1 基因表达后, siRNA-PKN1 组 A172 细胞的穿膜数目为 17 ~ 18 个、平均为  $(17.330 \pm 0.577)$  个, 而 siRNA-NC 组 A172 细胞的穿膜数目为 26 ~ 33 个、平均  $(29.330 \pm 3.512)$  个, 组间差异具有统计学意义( $t = 5.840, P = 0.004$ ; 图 6)。

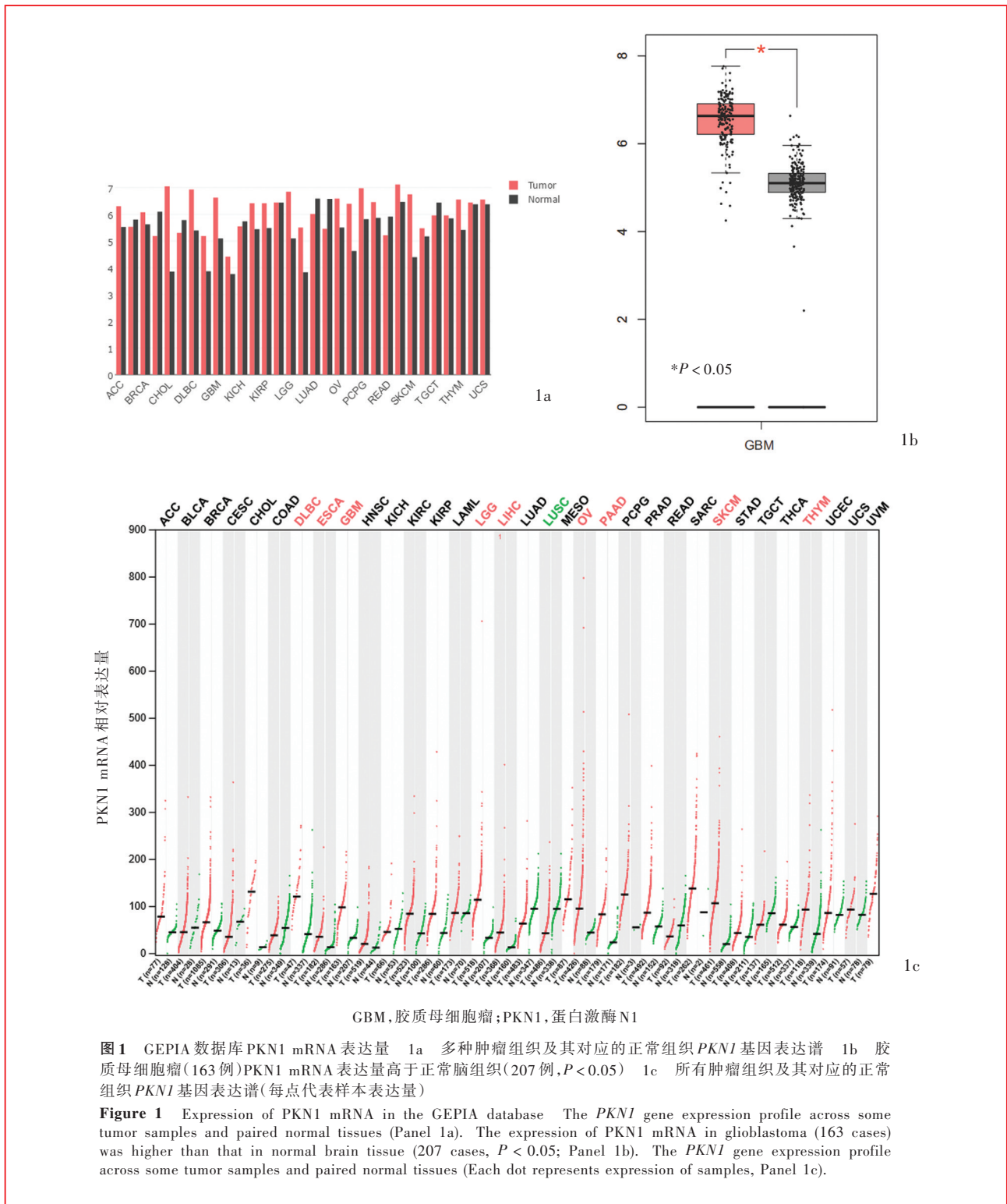
## 讨 论

胶质瘤是颅内常见的原发性恶性肿瘤之一, 其发生与发展由多基因、多因素所引起, 并且肿瘤的侵袭性和相关基因诱发的耐药性使治疗愈发困难, 患者生存率较低。PKN1 基因可参与多种肿瘤的发生与发展, 例如可以通过 PKN1-WDR5-KAT8 和 PKN1-H3T11P-WDR5-H3K4me3 信号转导通路调节前列腺癌细胞的增殖<sup>[7-8]</sup>, 亦可以与 GTP 酶 Rho 结合从而发挥相应的生物学功能<sup>[12-13]</sup>。

GEPIA 数据库涵盖大量基因数据, 可从中寻找到许多基因的差异体和相似体, 也可检索到某一基因在正常组织及其相应肿瘤组织中的相对表达量, 以及该基因相对表达量与肿瘤级别的相关性, 从而预测该基因与肿瘤之间的关系。通过检索 GEPIA 数据库可以发现, PKN1 mRNA 在胶质瘤、前列腺癌、卵巢癌等多种肿瘤组织中的表达量明显高于其所对应的正常组织, 提示 PKN1 可能为胶质瘤相关基因, 但该基因在胶质瘤恶性进展中的作用目前尚不明确。

对多个胶质瘤细胞系(U87、LN229 和 A172) PKN1 蛋白表达量的分析显示, 以胶质瘤 A172 细胞 PKN1 蛋白相对表达量最高, 因此, 后续研究可采用 RNA 干扰(RNAi)技术敲除 A172 细胞 PKN1 基因, 以观察该基因对 A172 细胞生物学行为的影响。

细胞增殖能力可直接反映肿瘤细胞活力, 本研究 CCK-8 实验显示, 敲低 PKN1 基因表达后第 3 天, A172 细胞增殖能力明显受到抑制, 并可以持续至第 6 天, 表明下调胶质瘤细胞 PKN1 基因表达可抑制肿瘤细胞增殖。细胞凋亡是基因调控的细胞程序性死亡形式<sup>[14]</sup>, 肿瘤细胞凋亡受到抑制, 可促进肿瘤生长, 也可使肿瘤细胞发生耐药<sup>[15]</sup>。本研究流式细胞术检测显示, 敲低 PKN1 基因表达后, A172 细胞凋亡率增加, 表明下调胶质瘤细胞 PKN1 基因表达可诱导肿瘤细胞凋亡, 进而抑制胶质瘤进展。迁移和侵袭能力是肿瘤细胞的另一生物学特性, 与肿瘤恶



**图1** GEPIA数据库PKN1 mRNA表达量 1a 多种肿瘤组织及其对应的正常组织PKN1基因表达谱 1b 胶质母细胞瘤(163例)PKN1 mRNA表达量高于正常脑组织(207例,  $P < 0.05$ ) 1c 所有肿瘤组织及其对应的正常组织PKN1基因表达谱(每点代表样本表达量)

**Figure 1** Expression of PKN1 mRNA in the GEPIA database The PKN1 gene expression profile across some tumor samples and paired normal tissues (Panel 1a). The expression of PKN1 mRNA in glioblastoma (163 cases) was higher than that in normal brain tissue (207 cases,  $P < 0.05$ ; Panel 1b). The PKN1 gene expression profile across some tumor samples and paired normal tissues (Each dot represents expression of samples, Panel 1c).

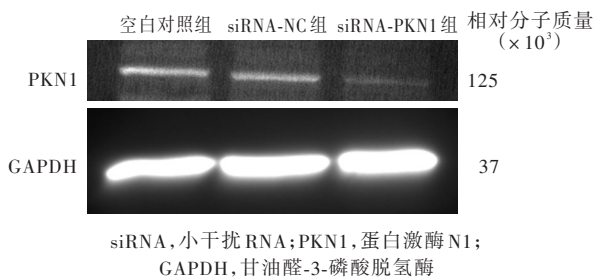
性程度和预后直接相关,本研究采用细胞划痕实验检测肿瘤细胞迁移能力,其结果显示,siRNA-PKN1组和siRNA-NC组A172细胞划痕愈合率随时间推移具有不同程度增加,而敲低PKN1基因表达后A172细胞划痕愈合率降低且低于siRNA-NC组,表明下

调胶质瘤细胞PKN1基因表达可以抑制胶质瘤细胞迁移;与此同时,Transwell实验显示,敲低PKN1基因表达后,A172细胞穿过Matrigel基质胶的数目明显减少,表明下调胶质瘤细胞PKN1基因表达可抑制胶质瘤细胞的侵袭性。

**表 1** 不同胶质瘤细胞系 PKN1 蛋白相对表达量的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 1.** Relative expression of PKN1 in glioma cell lines ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	PKN1 蛋白相对表达量
A172 细胞	3	0.95 ± 0.09
U87 细胞	3	0.69 ± 0.12
LN229 细胞	3	0.51 ± 0.01
<i>F</i> 值		20.180
<i>P</i> 值		0.002



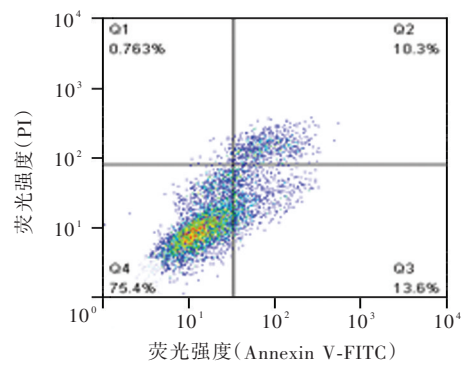
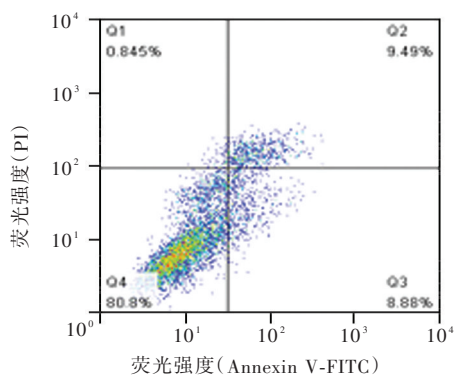
**图 3** Western blotting 法检测显示, 转染 siRNA-PKN1 后 A172 细胞 PKN1 蛋白相对表达量降低

**Figure 3** Western blotting showed the expression of PKN1 in A172 cells after siRNA-PKN1 transfection was reduced.

**表 3** siRNA-PKN1 组与 siRNA-NC 组 A172 细胞增殖能力的比较 ( $\bar{x} \pm s, OD_{450nm}$ )

**Table 3.** The proliferation ability of A172 cells between siRNA-PKN1 group and siRNA-NC group ( $\bar{x} \pm s, OD_{450nm}$ )

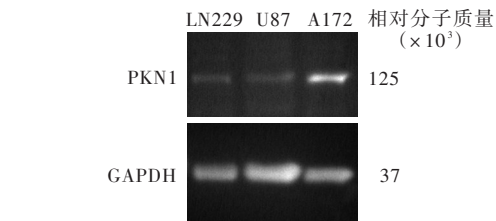
组别	例数	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天
siRNA-NC 组	3	0.38 ± 0.01	0.39 ± 0.01	0.63 ± 0.03	0.72 ± 0.02	0.81 ± 0.03	0.83 ± 0.05
siRNA-PKN1 组	3	0.37 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.51 ± 0.02	0.53 ± 0.03	0.48 ± 0.01	0.46 ± 0.02
<i>t</i> 值		0.889	1.040	3.275	5.949	10.430	6.645
<i>P</i> 值		0.424	0.357	0.031	0.004	0.000	0.003



FITC, 异硫氰酸荧光素; PI, 碘化丙啶

**图 4** 流式细胞术显示, 转染 siRNA-PKN1 后 A172 细胞凋亡率增加 4a siRNA-NC 组 4b siRNA-PKN1 组

**Figure 4** Flow cytometry showed the cell apoptosis of A172 cells was increased after siRNA-PKN1 transfection. siRNA-NC group (Panel 4a). siRNA-PKN1 group (Panel 4b).



PKN1, 蛋白激酶 N1; GAPDH, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

**图 2** Western blotting 法检测显示, A172 细胞 PKN1 蛋白相对表达量高于 U87 和 LN229 细胞

**Figure 2** Western blotting showed the PKN1 protein expression in A172 cells was higher than that in U87 and LN229 cells.

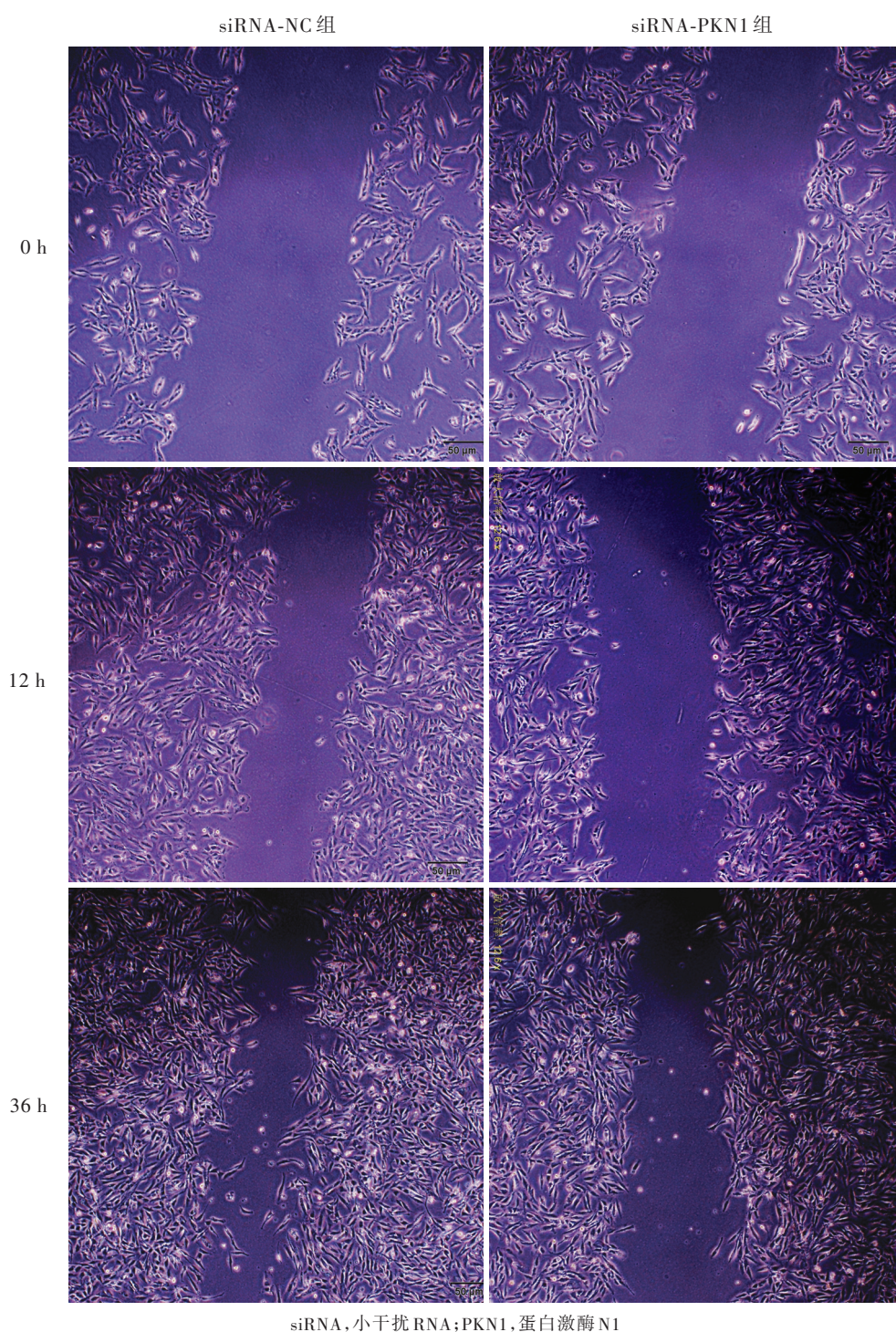
**表 2** 不同组别 A172 细胞 PKN1 蛋白相对表达量的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 2.** Relative expression of PKN1 in blank group, siRNA-NC group and siRNA-PKN1 group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	PKN1 蛋白相对表达量
空白对照组	3	0.70 ± 0.01
siRNA-NC 组	3	0.69 ± 0.01
siRNA-PKN1 组	3	0.24 ± 0.01
<i>F</i> 值		1351.000
<i>P</i> 值		0.000

siRNA, small interference RNA, 小干扰 RNA; PKN1, protein kinase N1, 蛋白激酶 N1。The same for Table 3 and 4





siRNA, 小干扰 RNA; PKN1, 蛋白激酶 N1

图 5 细胞划痕实验结果显示, siRNA-PKN1 组 A172 细胞划痕的愈合能力明显低于 siRNA-NC 组 HE 染色 × 100

Figure 5 Scratch healing test showed the scratch healing ability of siRNA-PKN1 group was significantly weaker than that of siRNA-NC group. HE staining × 100

综上所述,胶质瘤 PKN1 mRNA 表达量高于正常脑组织,敲低 PKN1 基因表达可抑制肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭,进而抑制胶质瘤细胞的恶性生物

学行为,同时诱导肿瘤细胞凋亡,进而抑制胶质瘤进展。本研究仅对 PKN1 基因在正常脑组织和胶质瘤组织中的表达变化,以及敲除 PKN1 基因对胶质



**表 4** siRNA-PKN1 组与 siRNA-NC 组不同观察时间点 A172 细胞划痕愈合率的比较( $\bar{x} \pm s, \%$ )

**Table 4.** The scratch healing rate of A172 cells at different time points between siRNA - PKN1 group and siRNA-NC group ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	例数	0 h(1)	12 h(2)	36 h(3)
siRNA-NC 组	3	0.00 ± 0.00	11.42 ± 5.66	48.25 ± 1.49
siRNA-PKN1 组	3	0.00 ± 0.00	11.40 ± 0.36	29.24 ± 0.85

**表 5** siRNA-PKN1 组与 siRNA-NC 组不同观察时间点 A172 细胞划痕愈合率重复测量设计的方差分析

**Table 5.** Repeated measurement design analysis of variance of the scratch healing rate of siRNA - PKN1 group and siRNA-NC group at different time points in A172 cells

变异来源	SS	df	MS	F 值	P 值
处理因素	288.000	1	288.000	97.811	0.000
测量时间	4222.111	2	2111.056	249.993	0.000
处理因素 × 测量时间	507.000	2	253.500	30.020	0.000
组间误差	4222.111	2	211.056		
组内误差	847.333	15	58.289		

**表 6** 同一处理组不同观察时间点 A172 细胞划痕愈合率的两两比较

**Table 6.** Pairwise comparison of the scratch healing rate of A172 cells at the different time points in the same treatment group

组内两两比	siRNA-NC 组		siRNA-PKN1 组	
	t 值	P 值	t 值	P 值
(1) (2)	10.390	0.001	26.000	0.000
(1) (3)	21.220	0.000	12.490	0.000
(2) (3)	10.550	0.001	3.965	0.017

瘤细胞生物学行为的影响进行了初步探讨, *PKN1* 基因影响胶质瘤生物学行为的具体分子机制和相关信号转导通路, 以及对患者预后和生存影响尚待进一步深入研究, 以为胶质瘤的诊断与治疗提供新的靶标。

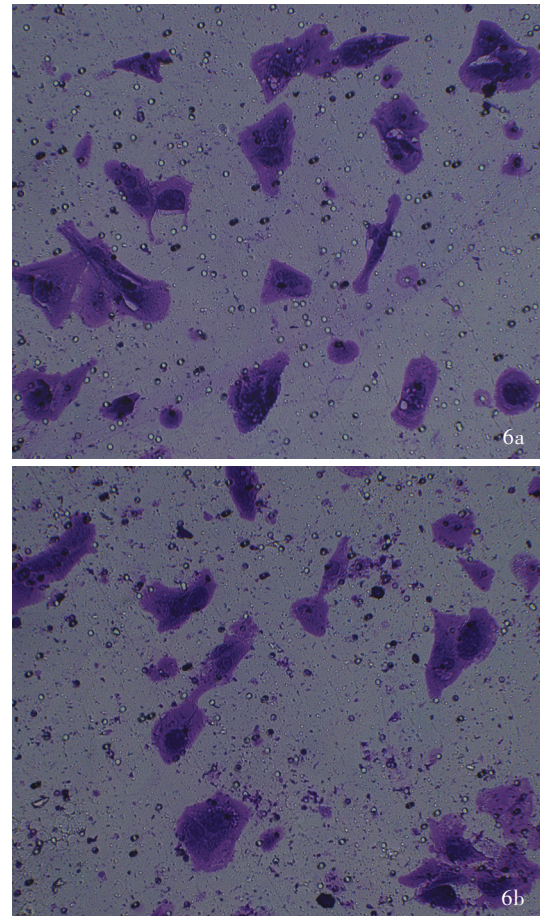
利益冲突 无

### 参 考 文 献

[1] Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005–2009[J]. *Neuro Oncol*, 2012, 14 Suppl 5:v1-49.

[2] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system[J]. *Acta Neuropathol*, 2007, 114:97-109.

[3] Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary [J]. *Acta*



**图 6** 光学显微镜观察显示, 敲低 *PKN1* 基因表达后 A172 细胞穿膜数目减少 结晶紫染色 ×100 6a siRNA-NC 组 6b siRNA-PKN1 组

**Figure 6** Optical microscopy showed the number of A172 cells passing through the membrane decreased after *PKN1* gene was knocked down Crystal violet staining ×100 siRNA-NC group (Panel 6a). siRNA-PKN1 group (Panel 6b).

*Neuropathol*, 2016, 131:803-820.

[4] Weller M, Wick W, Aldape K, Brada M, Berger M, Pfister SM, Nishikawa R, Rosenthal M, Wen PY, Stupp R, Reifenberger G. Glioma[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2015, 1:15017.

[5] Metzger E, Yin N, Wissmann M, Kunowska N, Fischer K, Friedrichs N, Patnaik D, Higgins JM, Potier N, Scheidtmann KH, Buettner R, Schüle R. Phosphorylation of histone H3 at threonine 11 establishes a novel chromatin mark for transcriptional regulation[J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10:53-60.

[6] Metzger E, Imhof A, Patel D, Kahl P, Hoffmeyer K, Friedrichs N, Müller JM, Greschik H, Kirfel J, Ji S, Kunowska N, Beisenherz - Huss C, Günther T, Buettner R, Schüle R. Phosphorylation of histone H3T6 by PKCbeta( I ) controls demethylation at histone H3K4[J]. *Nature*, 2010, 464:792-796.

[7] Kim JY, Yu J, Abdulkadir SA, Chakravarti D. KAT8 regulates androgen signaling in prostate cancer cells[J]. *Mol Endocrinol*, 2016, 30:925-936.

[8] Zhao X, Su J, Wang F, Liu D, Ding J, Yang Y, Conaway JW, Conaway RC, Cao L, Wu D, Wu M, Cai Y, Jin J. Crosstalk between NSL histone acetyltransferase and MLL/SET



complexes: NSL complex functions in promoting histone H3K4 di-methylation activity by MLL/SET complexes[J]. *PLoS Genet*, 2013, 9:e1003940.

[9] Gao Q, Kumar A, Srinivasan S, Singh L, Mukai H, Ono Y, Wazer DE, Band V. PKN binds and phosphorylates human papillomavirus E6 oncoprotein [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 14824-14830.

[10] Hashimoto T, Mukai H, Kawamata T, Taniguchi T, Ono Y, Tanaka C. Localization of PKN mRNA in the rat brain [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1998, 59:143-153.

[11] zurNedden S, Eith R, Schwarzer C, Zanetti L, Seitter H, Fresser F, Koschak A, Cameron AJ, Parker PJ, Baier G, Baier - Bitterlich G. Protein kinase N1 critically regulates cerebellar development and long-term function [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128:2076-2088.

[12] Quétiér I, Marshall JJ, Spencer - Dene B, Lachmann S, Casamassima A, Franco C, Escuin S, Worrall JT, Baskaran P, Rajeev V, Howell M, Copp AJ, Stamp G, Rosewell I, Cutillas P, Gerhardt H, Parker PJ, Cameron AJ. Knockout of the PKN family of Rho effector kinases reveals a non-redundant role for PKN2 in developmental mesoderm expansion [J]. *Cell Rep*, 2016, 14:440-448.

[13] Taylor SS, Radzio-Andzelm E. Three protein kinase structures define a common motif [J]. *Structure*, 1994, 2:345-355.

[14] Fuchs Y, Steller H. Programmed cell death in animal development and disease [J]. *Cell*, 2011, 147:742-758.

[15] Pistritto G, Triscioglio D, Ceci C, Garufi A, D’Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies [J]. *Aging (Albany NY)*, 2016, 8:603-619.

(收稿日期:2020-12-12)

(本文编辑:彭一帆)

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2020.12.016

· 读者 · 作者 · 编者 ·

### 更正:脑库与神经病学建设

### Erratum to Brain bank in neurology history and development

由于作者本人疏忽,出现神经病理学家姓名书写错误。特申请将我刊2020年第20卷第10期“脑库与神经病学建设”<sup>[1]</sup>一文第918页左栏倒数第3行“如北京协和医院(原北平大学医院)徐英魁教授”改为“如北京协和医院(原北平大学医院)许英魁教授”。特此更正。

#### 参考文献

[1] Cao LX, Huang Y, Cai ZY, Chan P, Chen SD, Fan DS, Fang BY, Guo YJ, Han Y, Huang HP, Ji WJ, Li HY, Liu K, Pei Z, Peng DT, Shi FD, Sui Y, Tang BS, Wang F, Wang W, Wang ZX, Wu AH, Xu Y, Yang DD, Zhang GF, Zhang LW, Zhang ZT, Zhao W, Zhao XQ, Wang YJ. Brain bank in neurology history and development [J]. *Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi*, 2020, 20:914-923. [曹凌晓, 黄越, 蔡志友, 陈彪, 陈生弟, 樊东升, 方伯言, 郭燕军, 韩瓌, 黄华品, 纪文军, 李红燕, 刘坤, 裴中, 彭丹涛, 施福东, 隋轶, 唐北沙, 王枫, 王雯, 王朝霞, 吴安华, 徐运, 杨东东, 张国富, 张力伟, 张振涛, 赵伟, 赵性泉, 王拥军. 脑库与神经病学建设 [J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2020, 20:914-923.]

首都医科大学附属北京天坛医院神经病学中心 国家神经系统疾病临床医学研究中心 曹凌晓 黄越