

血清和糖皮质激素调节蛋白激酶 2 α 过表达 通过 Wnt/ β -Catenin 信号通路抑制 肝癌细胞株 BEL7402 增殖*

孙晓杰^{1)**}, 周启兵^{2)**}, 赵 玫²⁾, 李 坤¹⁾, 郭红艳¹⁾, 吴 琦¹⁾, 黄常志^{2)***}

(¹⁾ 齐齐哈尔医学院生物化学教研室, 齐齐哈尔 161006;

(²⁾ 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院肿瘤研究所病因室, 癌发生及预防分子机理北京市重点实验室,
分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021)

摘要 血清和糖皮质激素调节蛋白激酶(SGK)家族参与调节生长因子和激素的信号转导. 为了研究 SGK 家族成员 SGK2 α 在细胞中的功能, 构建了真核表达质粒 pEGFP-N1-SGK2 α 并瞬时转染 HEK293 细胞, 通过激光共聚焦显微镜观察发现融合蛋白 SGK2 α -GFP 主要定位于细胞浆, 免疫共沉淀实验发现 SGK2 α 与糖原合成激酶 3 β (GSK3 β)存在相互作用. 利用 PCDNA6-V5-HisB-SGK2 α 质粒转染肝癌 BEL7402 细胞, 建立稳定表达 SGK2 α 蛋白的细胞系, 通过细胞增殖实验发现, SGK2 α 的过表达使 BEL7402 细胞生长速度减慢、细胞倍增时间延长. 裸鼠成瘤实验发现, 与对照组细胞相比表达 SGK2 α 的 BEL7402 细胞在裸鼠中的成瘤能力明显降低. 免疫印迹实验证实, SGK2 α 的过表达不影响 GSK3 β 的表达, 但却使 β -catenin 和 Cyclin D1 的表达下调. 提示影响 Wnt/ β -catenin 信号通路关键分子的表达可能是外源性 SGK2 α 蛋白过表达抑制 BEL7402 细胞增殖的分子机制.

关键词 血清和糖皮质激素调节蛋白激酶 2 α , 肝癌, 细胞增殖, Wnt/ β -catenin 信号通路

学科分类号 Q291, R73

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00675

血清和糖皮质激素调节蛋白激酶 2 α (serum and glucocorticoid-regulated kinase, SGK2 α)是 1999 年发现的 SGK 家族成员, 与 PKB/AKT 等第二信使蛋白高度同源, 属于 Ser/Thr 蛋白激酶, 可通过 PDK1 磷酸化其活化环上的特异性 Thr 调节位点 Thr¹⁹³ 和 Thr²⁵⁷ 而被激活^[1]. 虽然 RNA 印迹结果显示, 除了在肝、肾和胰腺组织中有一定水平的表达外, SGK2 α 在其他哺乳动物组织中不表达, 但迄今为止人们对 SGK2 α 的生物学功能了解甚少. PKB/AKT 是磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)信号通路下游的关键分子, 通过促进细胞增殖存活基因或抑制前死亡基因的表达而参与细胞增殖和存活的调节^[2]. 由于在结构上 SGK2 α 与 PKB 高度相似, 尤其是其催化结构域与 PKB/AKT 具有高达 54% 的序列相同, 因此 SGK2 α 很可能也在细胞增殖存活信号转导及肿瘤形成中扮演重要的角色^[3]. 前期研究利用原核表达的 GST-SGK2 α 融合蛋白制备了抗 SGK2 α

多克隆抗体, 本文在此基础上研究 SGK2 α 蛋白的细胞内功能, 利用激光共聚焦显微镜观察其亚细胞定位, 通过基因转染研究其过表达对肝癌细胞生长增殖的影响, 并初步探讨其作用的分子机制, 为阐明 SGK2 α 的生物学功能奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和细胞. 本研究所用 pACG-2T-SGK2 α 质粒和重组质粒 PCDNA6-V5-HisB-SGK2 α 、

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2007CB914704)和黑龙江省教育厅(11531431)资助项目.

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

黄常志. Tel: 010-87788426, E-mail: huang8849@126.com

孙晓杰. Tel: 0452-2663151, E-mail: sunxj97@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-11-13, 接受日期: 2010-01-29

PCDNA3.1-GSK3 β 以及相应的空载体质粒由中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院肿瘤研究所病室提供. pACG-2T-SGK2 α 质粒含有人 SGK2 α cDNA 基因, 全长为 1.2 kb, 两端为 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点. HEK293 为腺病毒 E1 基因转化的人胚肾细胞系, 用含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养液在 5% CO₂、37℃ 条件下培养. BEL7402 为人肝癌细胞系, 用含 10%小牛血清的 RPMI 1640 在 5% CO₂、37℃ 条件下培养, 细胞由中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所病室提供.

1.1.2 主要试剂和抗体. RPMI-1640、高糖 DMEM 和 LipofectAMINE 购自 Gibco BRL 公司; *Xho* I 和 *Eco*R I 购自宝生物工程有限公司; Blasticidin S 购自 Invitrogen 公司; SGK2 α 多克隆抗体由中国医学科学院肿瘤医院病室制备; GSK3 β 、CyclinD1 和 β -catenin 抗体购自 Santa Cruz 公司; β -actin 单克隆抗体购自 Neo Marker 公司; 免疫共沉淀试剂盒购自 ROCHE 公司; λ DNA/*Hind*III 分子质量标准 and 蛋白质分子质量标准购自华美生物技术公司; HRP-IgG 和 ECL 化学发光试剂盒购自中山生物技术有限公司.

1.1.3 实验动物. BALB/c 免疫缺陷小鼠(合格证号: SYXK11-00-0012), 雄性, 4 周龄, 共 15 只, 购自中国协和医科大学动物研究所, 为 SPF 级动物, 并在该所饲养.

1.2 方法

1.2.1 pEGFP-N1-SGK2 α 重组质粒的构建. 根据 SGK2 α 的全长 cDNA 序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 并分别在上游引物和下游引物前加上限制性内切酶 *Xho* I 和 *Eco*R I 识别序列及接头. 通过 PCR 方法从 PACG-2T-SGK2 α 质粒中扩增 SGK2 α 基因. 上游引物序列为 5' CTGCTCGA-GATGAACTCTAGCCCAGCTGGGAC 3', 下游引物序列为 5' CGGAATTCTGCAATCCAAGATGTC-ATCATCC 3'. 纯化后的 PCR 产物经限制性内切酶 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切后与同样酶切的载体 pEGFP-N1 连接, 使 SGK2 α 与 GFP 基因的 3' 端融合构建重组质粒 pEGFP-N1-SGK2 α . 阳性菌株送至上海生工生物工程有限公司进行测序, 结果与 GenBank 比较. 同时提取质粒, 通过酶切法对重组质粒进行鉴定.

1.2.2 激光共聚焦显微镜观察 SGK2 α 的细胞内定位. 接种适量的 HEK293 细胞于 35 mm 培养皿中, 待细胞长到 40%~60%满时, 采用脂质体介导

用重组质粒 pEGFP-N1-SGK2 α 和空载体质粒 pEGFP-N1 分别转染细胞. 48 h 后将转染细胞用 PBS 洗 3 遍, 使用 Leica 公司的激光扫描共聚焦显微镜(TCS-NT)观察绿色荧光在细胞中的分布并照相(激发光波长 488 nm, 发射光波长 507 nm).

1.2.3 免疫共沉淀实验. 取生长状态良好的 HEK293 细胞按 1×10^6 接种于 100 ml 培养瓶中, 待细胞总面积达到 80%~90%满时, 瞬时共转染 PCDNA3.1-GSK3 β 和 PCDNA6-V5-HisB-SGK2 α 质粒. 48 h 后提取细胞总蛋白进行免疫共沉淀实验. 具体操作步骤按照试剂盒说明书进行: 在 1 mg 细胞总蛋白中加入 40 μ l 的抗 -SGK2 α 抗体于 4℃ 振摇 2 h. 再加入 50 μ l 均匀的 G 蛋白琼脂糖悬液, 于 4℃ 振摇过夜. 12 000 r/min 4℃ 离心 20 s 收集 Agrose- 蛋白复合物. 以 1 ml 洗脱液 1(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1% NP40, 0.5%脱氧胆酸钠)、洗脱液 2 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 500 mmol/L NaCl, 0.1% NP40, 0.05% 脱氧胆酸钠)和洗脱液 3 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 0.1% NP40, 0.05%脱氧胆酸钠)缓冲液分别洗琼脂珠 2 次, 4℃ 振摇 20 min, 12 000 r/min 离心 20 s, 收集沉淀的 Agrose 复合物. 加入 50 μ l 1 \times SDS-PAGE 上样缓冲液, 煮沸 6 min, 上样电泳. 电泳结束后将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上, 用 GSK3 β 抗体为一抗进行 Western blotting, 检测复合物中是否有 GSK3 β 的存在.

1.2.4 基因转染. 采用 LipofectAMINE 进行细胞转染, 具体操作按说明书进行. 生长良好的 BEL7402 细胞于转染前一天接种到 6 孔板中, 待细胞总面积达到 60%~80%, 取 2 μ g PCDNA6-V5-HisB-SGK2 α 质粒和空载体 PCDNA6-V5-HisB 质粒分别进行基因转染, 48 h 后用含 10 mg/L Blasticidin S 的 RPMI1640 培养液筛选抗性克隆, 建立稳定转染的细胞系, 通过 Western blot 方法对稳定转染细胞中的蛋白质表达进行鉴定, 细胞扩大培养后用于实验.

1.2.5 细胞增殖实验. 采用 MTT 法绘制细胞生长曲线. 取对数生长期的各组细胞, 用 0.25%的胰酶消化后计数, 按每孔 5×10^3 细胞数接种于 96 孔培养板, 每组设 4 个平行孔, 于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养. 每天取出一块培养板, 加 5 g/L 的 MTT 20 μ l 于各孔中, 每孔再补加 180 μ l 无血清培养液, 继续培养 2 h 后弃培养液, 各孔加 150 μ l DMSO, 于微量震荡器震荡 15 min 后用酶标仪测定波长

570 nm 的吸光度值, 取 4 个孔的平均值, 以时间为横坐标, A_{570} 值为纵坐标作图, 观察细胞的增殖情况, 根据公式 $Td=T \times [\lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)]$ 计算细胞倍增时间.

1.2.6 裸鼠成瘤实验. 取对数生长期的稳定转染细胞, 0.25%胰酶消化后, 常规细胞计数, 用适量的 1640 培养液调整细胞数为 1×10^7 只, 进行裸鼠右上臂皮下注射. 实验动物分 3 组, 每组 5 只裸鼠, 分别接种 SGK2 α 转染组、空载体转染组和亲本细胞组. 于接种后每隔 3 天观察一次肿瘤的大小, 50 天后处死动物, 剥离肿瘤, 测量并称重, 以接种转染空载体的细胞组和亲本细胞组为对照, 进行结果分析.

1.2.7 免疫印迹实验. 提取各组转染细胞总蛋白, 采用 Bradford 法进行蛋白质定量后进行 SDS-PAGE 及转膜. 将硝酸纤维素膜放入封闭液中, 室温封闭 2 h; 按 1 : 500 ~ 1 : 1 000 稀释一抗 GSK3 β 、 β -catenin 和 Cyclin D1, 4 $^{\circ}$ C 过夜; TTBS 漂洗 3 次, 每次 10 min; 再按 1 : 1 000 稀释二抗, 室温孵育 1 h; 用 TTBS 室温漂洗后进行 ECL 显色. 使用美国 Bio-Rad 公司的 GEL Doc 2000 数字成像系统及其图像分析软件 Multi-Analyst[®]/PC 对 Western blot 杂交带进行密度扫描分析.

2 结 果

2.1 重组质粒 pEGFP-N1-SGK2 α 的鉴定

重组质粒 pEGFP-N1-SGK2 α 经 DNA 测序结果表明, 所获克隆序列与理论序列完全一致. 经 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切后, 进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 结果可见 1.2 kb 的 DNA 带(图 1), 表明所获 SGK2 α 酶切片段的大小与预期相符.

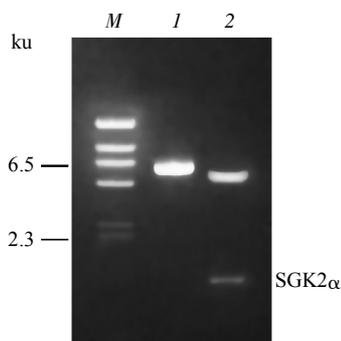


Fig. 1 Electrophoretic restriction endonuclease map of pEGFP-N1-SGK2 α

M: λ DNA/*Hind* III DNA marker; 1: pEGFP-N1-SGK2 α cut by *Eco*R I ; 2: pEGFP-N1-SGK2 α cut by *Eco*R I and *Xho* I .

2.2 SGK2 α 蛋白在 HEK293 细胞中的定位

pEGFP-N1-SGK2 α 和空载体 pEGFP-N1 分别转染 HEK293 细胞后, 在激光共聚焦显微镜下用 488 nm 波长的光作为激发光、在 507 nm 波长处观察发射的荧光, 结果发现, 空载体转染的细胞中荧光分布于整个细胞中, 而 pEGFP-N1-SGK2 α 重组体转染的细胞荧光主要均匀分布于细胞浆中, 细胞核中仅见到极少量的点状分布荧光(图 2). 表明融合蛋白 SGK2 α -GFP 主要定位于细胞浆.

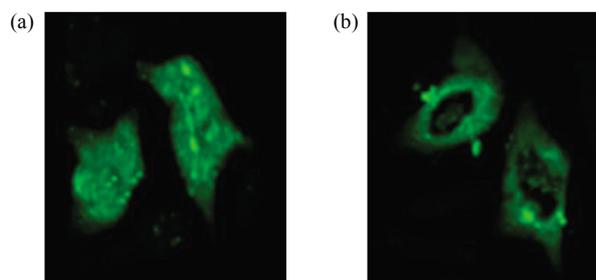


Fig. 2 The subcellular localization of SGK2 α in HEK293 cells

Laser scanning confocal microscope (200 \times) depicts green fluorescence in the cytoplasm of HEK293 cells after transfected with pEGFP-N1-SGK2 α plasmid (b), compared with green fluorescence in the whole cells after transfected with pEGFP-N1 plasmid (a).

2.3 SGK2 α 与 GSK3 β 存在相互作用

用 PCDNA3.1-GSK3 β 和 PCDNA6-V5-HisB-SGK2 α 瞬时共转染 HEK293 细胞, 以亲本细胞为对照, 蛋白质提取液分别用抗 GSK3 β 、SGK2 α 抗体做 Western blot 均检测到相应蛋白质的存在. 用抗 SGK2 α 的抗体沉淀蛋白质复合体, 再用抗 GSK3 β 抗体做 Western blot 检测到 GSK3 β 的存在, 提示 GSK3 β 与 SGK2 α 之间可能存在相互作用(图 3).

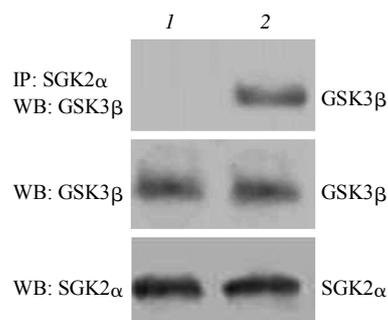


Fig. 3 Coimmunoprecipitation analysis of SGK2 α and GSK3 β interaction

1: HEK293 control cells; 2: HEK293 cells transiently transfected with PCDNA3.1-GSK3 β and PCDNA6-V5-HisB-SGK2 α plasmid.

2.4 转染细胞中 SGK2 α 蛋白表达的鉴定

重组质粒 PCDNA6-V5-HisB-SGK2 α 和空载体质粒 PCDNA6-V5-HA 分别转染 Bel7402 后, 经 Blasticidin S 筛选得到稳定转染的细胞系, 分别命名为 BEL7402-PCDNA6-SGK2 α 和 BEL7402-PCDNA6. 用抗 SGK2 α 抗体通过 Western blot 方法检测发现, SGK2 α 在转染细胞中能够有效地表达, 而亲本细胞和转染空载体的细胞中未检测到内源性 SGK2 α 的表达(图 4).

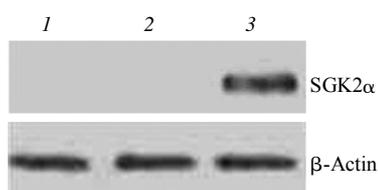


Fig. 4 Western blot analysis for SGK2 α protein expression in BEL7402 stable transfected cell line

1: BEL7402 parent cells; 2: BEL7402-PCDNA6 control cells; 3: BEL7402-PCDNA6-SGK2 α cells. The target band displayed very high density in the BEL7402-SGK2 α lane, compared with the BEL7402 and BEL7402-PCDNA6 lanes which displayed no bands. β -Actin was used as internal control.

2.5 SGK2 α 抑制肿瘤细胞的生长

为了研究 SGK2 α 的过表达对细胞增殖的影响, 我们通过 MTT 法绘制了各组转染细胞的生长曲线, 从图 5 可见, 与亲本细胞及转染空载体组细胞相比, 转染 SGK2 α 的细胞其生长速度明显缓慢. 经计算细胞倍增时间(T)BEL7402 组为 26.59 h,

BEL7402-PCDNA6 组为 25 h, 而 BEL7402-PCDNA6-SGK2 α 组为 29.94 h, 细胞倍增时间有所延长. 表明 SGK2 α 的过表达抑制了 BEL7402 细胞的生长增殖.

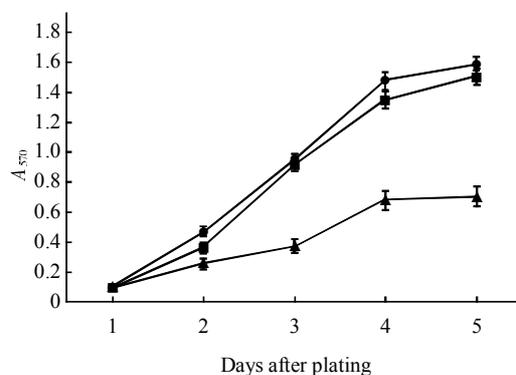


Fig. 5 Effect of exogenous SGK2 α overexpression on cell growth of BEL7402 cells

●—●: BEL7402; ■—■: BEL7402-PCDNA6; ▲—▲: BEL7402-PCDNA6-SGK2 α .

2.6 裸鼠成瘤实验

为了研究 SGK2 α 对肿瘤细胞体内增殖能力的影响, 我们进行了体内动物实验. 结果发现, 各组实验动物成瘤数不等, 其中转染空载体组有 4 只裸鼠成瘤, 肿瘤重量为(0.56 \pm 0.26) g; 亲本细胞组有 3 只裸鼠成瘤, 肿瘤重量为(0.66 \pm 0.18) g, 这两组之间肿瘤的大小和体积没有明显差异. 而转染 SGK2 α 基因组只有 1 只裸鼠成瘤, 且肿瘤重量仅为 0.12 g, 重量和体积明显小于对照组细胞所形成的肿瘤(表 1).

Table 1 Inhibitory effect of SGK2 α overexpression on tumor growth in nude mice

Group	Numbers of tumor	Tumor weight/g	
		$\bar{x} \pm s$	Range
BEL 7402	3/5	0.66 \pm 0.18	0.45~0.78
BEL 7402-PCDNA6	4/5	0.56 \pm 0.26	0.31~0.90
BEL 7402-PCDNA6-SGK2 α	1/5	0.12	0.12

2.7 SGK2 α 对 Wnt/ β -catenin 信号通路关键分子表达的影响

由于免疫共沉淀实验验证在 HEK293 细胞内 SGK2 α 与 GSK3 β 之间存在相互作用, 为了探讨 SGK2 α 影响细胞增殖的作用机制, 我们对转染细

胞中 Wnt 信号通路关键分子 GSK3 β 及其下游分子 β -catenin 以及 Cyclin D1 的表达进行了检测. 结果发现, SGK2 α 的表达并没有影响 GSK3 β 的表达, 但却使 β -catenin 和 Cyclin D1 的表达下调(图 6).

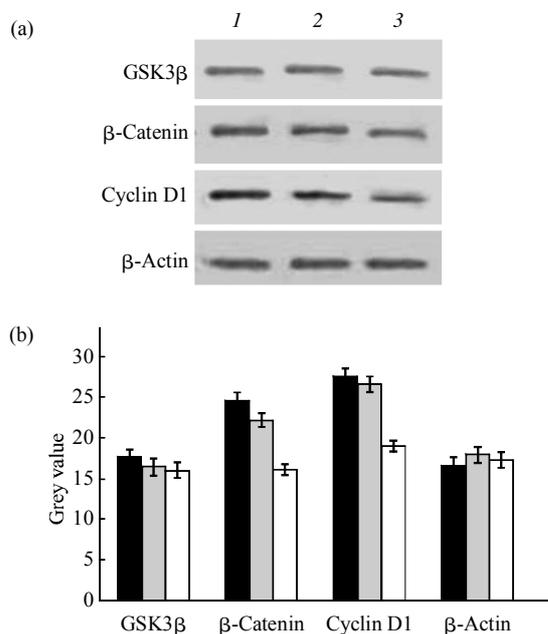


Fig. 6 Effect of exogenous SGK2 α overexpression on Wnt/ β -catenin signal pathway

1: BEL7402 parent cells; 2: BEL7402-PCDNA6 control cells; 3: BEL7402-PCDNA6-SGK2 α cells. (a) Overexpression of SGK2 α decreased the expression of β -catenin and Cyclin D1 but not affected the expression of GSK3 β in BEL7402 cells by Western blotting. (b) Grey value level of Wnt signal pathway protein expression, β -actin was used as internal control. ■: BEL7402; □: BEL7402-PCDNA6; ▨: BEL7402-PCDNA6-SGK2 α .

3 讨 论

血清和糖皮质激素调节蛋白激酶(SGK)是一种丝/苏氨酸蛋白激酶,除了参与离子通道、细胞增殖、细胞分化和存活的调节外,还参与细胞内多种信号转导通路^[4-5]。目前已发现哺乳类动物 SGK的异构酶有 SGK1、SGK2 和 SGK3 三种,SGK2 又分为 SGK2 α 和 SGK2 β ,在结构上,SGK2 α 包含 N 端、中间催化结构域和 C 端三个结构域,但对其生物学功能的研究却未见报道。蛋白质是细胞生命活动的执行者,细胞中蛋白质合成后通常需要被转运到特定区域才能发挥其生理功能。因此,确定蛋白质在细胞中的定位对了解其功能具有重要意义。由于绿色荧光蛋白(GFP)是目前检测体内基因表达及细胞内定位的理想标记,我们首先构建了重组质粒 pEGFP-N1-SGK2 α ,进而将该质粒和空载体质粒 pEGFP-N1 瞬时转染 HEK293 细胞,前者表达融

合蛋白 SGK2 α -GFP 而后者表达绿色荧光蛋白 GFP,通过激光共聚焦显微镜观察发现,前者的荧光信号主要均匀分布于细胞浆,而后者的荧光分布于整个细胞,说明 SGK2 α 蛋白主要定位于细胞浆。SGK 家族成员 SGK1 也主要定位于细胞浆^[6]。有的蛋白质在某些情况(例如和其他蛋白质相互作用)可以转运到其他区域发挥作用,有些蛋白质经过特殊的加工修饰(如磷酸化)后可部分转移到另一区域发挥作用^[7]。SGK2 α 是否也存在类似的由于条件改变而在其他区域定位的现象尚有待进一步的研究。

作为 Ser/Thr 蛋白激酶,SGK2 α 在生命活动中决不是孤立存在的,而是通过与其他蛋白质相互作用以执行其功能。如果能找到与其相互作用的蛋白质,尤其是发现其下游作用底物,将有助于我们了解其功能^[8-9]。鉴于 SGK2 α 在结构等方面与 PKB 存在着众多的相似性,我们推测一些在细胞增殖、存活中起重要作用的 PKB/AKT 下游作用底物(如:GSK3 β 、p21^{WAF-1}、BAD、CREB 等)很可能也是 SGK2 α 的下游底物。免疫共沉淀实验结果证实,在 HEK293 细胞中 SGK2 α 与 GSK3 β 之间确实存在着相互作用,这为进一步研究 SGK2 α 的功能提供了重要的线索。

为了研究外源 SGK2 α 基因的过表达对肿瘤细胞恶性行为的影响,我们建立了稳定表达 SGK2 α 的 BEL7402 人肝癌细胞系。通过 Western blot 方法对转染基因的蛋白质表达进行了鉴定,但未检测到细胞内源性 SGK2 α 蛋白的表达。在随后的细胞生长曲线中发现,转染 SGK2 α 基因的细胞其生长速度明显减慢,细胞倍增时间延长,该细胞在裸鼠中的成瘤能力也明显降低。提示外源 SGK2 α 基因的过表达在一定程度上能抑制 BEL7402 细胞的增殖能力。为了探讨 SGK2 α 以何种机制抑制肿瘤细胞的增殖,我们检测了 Wnt 信号通路关键分子 GSK3 β 及其下游信号分子 β -catenin 和 Cyclin D1 的表达。据报道,GSK3 β 不仅在代谢、转录调控、胚胎发育等生理过程中担任重要的角色,而且在哺乳动物肿瘤发生和发展中也起着重要的作用^[10]。 β -catenin 与转录因子 LEF-1 结合入核,直接调控 *cyclin D1*、*c-Myc* 等基因的表达^[11]。而 Cyclin D1 通过磷酸化作用抑制视网膜母细胞瘤蛋白 Rb 的活性从而促进细胞周期的进程^[12]。Western blot 结果显示,外源 SGK2 α 基因的过表达对 GSK3 β 的表达没有影响,但却使细胞中 β -catenin 和 Cyclin D1 的

表达水平降低. 其最终结果将导致细胞周期 G1 期阻滞, 细胞增殖被抑制, 这与上述体内和体外实验所观察到的结果相符合. 因此, 影响 Wnt/ β -catenin 信号通路关键分子的表达可能是 SGK2 α 抑制 BEL-7402 细胞增殖的主要分子机制.

PI3K 下游信号分子 PKB 通过与 GSK3 β 相互作用使 GSK3 β 磷酸化而抑制其活性. GSK3 β 活性的抑制可减少 β -catenin 的降解、增加 Cyclin D1 的表达, 从而促进细胞周期的进程^[10]. 免疫共沉淀实验证实, 与 PKB 一样 SGK2 α 与 GSK3 β 之间也存在相互作用, 因此推测 SGK2 α 可能也通过磷酸化作用而抑制 GSK3 β 的活性从而促进细胞周期的进程. 但在外源 SGK2 α 基因过表达对肿瘤细胞增殖影响的实验中我们得到的结果却是: 外源 SGK2 α 基因的过表达会在一定程度上抑制 BEL7402 肿瘤细胞的恶性增殖能力. 其机理可能的解释为: 外源 SGK2 α 基因在细胞浆中表达的蛋白质缺乏活性, 它与内源性有活性的 SGK2 α 蛋白竞争结合 GSK3 β 而抑制了内源性 SGK2 α 对 GSK3 β 的磷酸化, 从而使 GSK3 β 活性得以恢复. GSK3 β 通过磷酸化 β -catenin 上丝氨酸残基促使其泛素化降解, 使与 LEF-1 结合进入核内的 β -catenin 减少, 从而使 Cyclin D1 的表达下降, 导致细胞周期 G1 期阻滞. 与 SGK1 一样, SGK2 α 对细胞周期的促进作用需要其在细胞核与细胞浆内的穿梭. 而外源 SGK2 α 基因主要表达在细胞浆内, 这在蛋白质亚细胞定位实验中已证实. 细胞浆内高水平的 SGK2 α 可能会竞争性地结合一些在细胞周期进程中起重要作用的关键分子, 使其无法形成激活复合体. 另外它也可能通过阻碍这些活化的关键分子转运到其行使生理功能的区域, 从而抑制了细胞周期的进行. 但这些可能机制尚有待进一步的实验验证.

参 考 文 献

- [1] Webster M K, Goya L, Ge Y, *et al.* Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Mol Cell Biol*, 1993, **13**(4): 2031-2040
- [2] Vivanco I, Sawyers C L. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2002, **2**(7): 489-501
- [3] Waldegger S, Barth P, Raber G, *et al.* Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(9): 4440-4445
- [4] Zhang B H, Tang E D, Zhu T, *et al.* Serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK phosphorylates and negatively regulates B-Raf. *J Biol Chem*, 2001, **276**(34): 31620-31626
- [5] Zhang L, Cui R, Cheng X, *et al.* Antiapoptotic effect of serum and glucocorticoid-inducible protein kinase is mediated by novel mechanism activating I $\{\kappa\}$ B kinase. *Cancer Res*, 2005, **65**(2): 457-464
- [6] Klaus F, Palmada M, Lindner R, *et al.* Up-regulation of hypertonicity-activated myo-inositol transporter SMIT1 by the cell volume-sensitive protein kinase SGK1. *J Physiol*, 2008, **586**(6): 1539-1547
- [7] Juang Y T, Solomou E E, Rellahan B, *et al.* Phosphorylation and O-linked glycosylation of Elf-1 leads to its translocation to the nucleus and binding to the promoter of the TCR zeta-chain. *J Immunol*, 2002, **168**(6): 2865-2871
- [8] Chambers G, Lawrie L, Cash P, *et al.* Proteomics: a new approach to the study of disease. *J Pathol*, 2000, **192**(3): 280-288
- [9] Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 2000, **405**(6788): 837-846
- [10] Luo J. Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Lett*, 2009, **273**(2): 194-200
- [11] MacDonald B T, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*, 2009, **17**(1): 9-26
- [12] Arici D S, Tuncer E, Ozer H, *et al.* Expression of retinoblastoma and cyclin D1 in gastric carcinoma. *Neoplasma*, 2009, **56**(1): 63-67

Overexpression of Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 2 α Inhibits Proliferation of Liver Cancer Cell Line BEL7402 via Wnt/ β -Catenin Signal Pathway*

SUN Xiao-Jie^{1)**,**}, ZHOU Qi-Bing^{2)**}, ZHAO Mei²⁾, LI Shen¹⁾,
GUO Hong-Yan¹⁾, WU Qi¹⁾, HUANG Chang-Zhi^{2)***}

¹⁾ Department of Biochemistry, Qiqihar Medical College, Qiqihar 161006, China;

²⁾ The State Key Laboratory of Molecular Oncology; Departments of Etiology and Carcinogenesis and Pathology, Cancer Institute, Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

Abstract Members of the serum and glucocorticoid-regulated kinase (SGK) family are important mediators of growth factor and hormone signaling. To investigate the biological function of SGK family member SGK2 α , eukaryotic expression plasmid pEGFP-N1-SGK2 α was constructed and introduced into HEK293 cells by transient transfection. The subcellular localization of SGK2 α -GFP fusion protein was preferentially localized in the cytoplasm by laser scanning confocal microscope. The interaction of SGK2 α and glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) was confirmed by coimmunoprecipitation experiment. Stable BEL7402 cell line expressing SGK2 α proteins was generated by PCDNA6-V5-HisB-SGK2 α plasmid transfection. The growth of BEL7402 cells was suppressed and the cell doubling time was prolonged after SGK2 α gene transfection by cell proliferation experiment. Compared with the control cells, the tumorigenic capacity of BEL7402 cells was clearly decreased after SGK2 α gene expression by tumorigenicity assay. Overexpression of SGK2 α decreased the expression of β -catenin and Cyclin D1 but not affected the expression of GSK3 β in BEL7402 cells by Western blotting. These results suggest that overexpression of exogenous SGK2 α protein might inhibit tumor cell growth both *in vitro* and *in vivo* by decreasing the expression of Wnt/ β -catenin signal pathway molecules.

Key words serum and glucocorticoid-regulated kinase 2 α (SGK2 α), liver cancer, cell proliferation, Wnt/ β -catenin signal pathway

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00675

*This work was supported by grants from The National Basic Research Program of China (2007CB914704) and Foundation of Heilongjiang Educational Committee (11531431).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

HUANG Chang-Zhi. Tel: 86-10-87788426, E-mail: huang8849@126.com

SUN Xiao-Jie. Tel: 86-452-2663151, E-mail: sunxj97@yahoo.com.cn

Received: November 13, 2009 Accepted: January 29, 2010