

沉默 MAT1 基因通过 SDF1 - CXCR4 信号通路抑制骨肉瘤细胞增殖与迁移

巨啸晨 舒 莉 周 玲 孙荣鑫

摘 要 目的 探讨沉默 MAT1 基因表达对骨肉瘤细胞增殖与迁移的影响,以及对 SDF1 - CXCR4 信号通路的作用。方法 qRT - PCR检测人成骨细胞 hFOB1.19 与骨肉瘤细胞株 Saos - 2、MG63、U2OS、143B 中 MAT1 mRNA 的表达水平。将对数生长期 143B 细胞分为空白对照组(不进行转染)、阴性对照组(转染阴性对照 siRNA - NC)和 siRNA - MAT1 组(转染 siRNA - MAT1),通过 CCK - 8、流式细胞术及 Transwell 小室法分别检测各组 143B 细胞增殖活力、细胞周期和迁移能力,Western blot 法检测各组 143B 细胞中 SDF1 和 CXCR4 蛋白表达情况。结果 与 hFOB1.19 细胞比较,骨肉瘤细胞株 Saos - 2、MG63、U2OS 中 MAT1 mRNA 的表达水平明显升高($P < 0.01$),143B 细胞中 MAT1 mRNA 的表达水平显著升高($P = 0.000$);siRNA - MAT1 组 143B 细胞中 MAT1 mRNA 的表达水平较空白对照组(Blank 组)和 siRNA - NC 组明显下降($P < 0.01$);与 Blank 组和 siRNA - NC 组比较,siRNA - MAT1 组 143B 细胞增殖力明显降低, G_1 期比例升高而 S 期比例降低,细胞迁移能力受到抑制,SDF1 和 CXCR4 蛋白表达水平也明显下降($P < 0.01$)。结论 沉默 FOSL2 基因的表达可抑制骨肉瘤细胞 143B 的增殖和迁移能力,机制可能与下调 SDF1 和 CXCR4 表达有关。

关键词 骨肉瘤细胞 143B 细胞 MAT1 基因 增殖 迁移 SDF1 - CXCR4

中图分类号 R681 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.05.020

Silencing MAT1 Gene Inhibits Proliferation and Migration of Osteosarcoma Cells via SDF1 - CXCR4 Signaling Pathway. Ju Xiaochen, Shu Li, Zhou Ling, et al. Department of Joint Surgery, The Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Xinjiang 830000, China

Abstract Objective To investigate the effect of silencing MAT1 gene expression on proliferation and migration of osteosarcoma cells and the effect of silencing MAT1 gene on SDF1 - CXCR4 signaling pathway. **Methods** qRT - PCR was used to detect the expression level of MAT1 mRNA in human osteoblast hFOB1.19 and osteosarcoma cell lines Saos - 2, MG63, U2OS and 143B. Logarithmic growth phase 143B cells were divided into blank control group (no transfection), negative control group (transfection negative control siRNA - NC) and siRNA - MAT1 group (transfection siRNA - MAT1). The proliferation, cell cycle and migration ability of 143B cells in each group were detected by CCK - 8, flow cytometry and Transwell chamber method. Western blot was used to detect the expression of SDF1 and CXCR4 in 143B cells. **Results** Compared with hFOB1.19 cells, the expression levels of MAT1 mRNA in osteosarcoma cell lines Saos - 2, MG63 and U2OS were significantly increased ($P < 0.01$), and the expression level of MAT1 mRNA in 143B cells was significantly increased ($P = 0.000$). The expression level of MAT1 mRNA in siRNA - MAT1 group was significantly lower than that in the blank control group (Blank group) and siRNA - NC group ($P < 0.01$). Compared with the Blank group and the siRNA - NC group, the proliferation of 143B cells in the siRNA - MAT1 group was significantly decreased, the proportion of G_1 phase was increased, the proportion of S phase was decreased, the cell migration ability was inhibited, and the expression levels of SDF1 and CXCR4 proteins were also significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** Silencing FOSL2 gene expression can inhibit the proliferation and migration of osteosarcoma cell line 143B, and the mechanism may be related to down - regulation of SDF1 and CXCR4 expression.

Key words Osteosarcoma cells; 143B cells; MAT1 gene; Proliferation; Migration; SDF1 - CXCR4

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是最常见的原发性恶

性骨肿瘤,起源于骨髓间充质干细胞,其特点是进展迅速且预后不良^[1,2]。OS 主要发生在儿童和青少年期,据报道,年龄 15 ~ 19 岁的发生率最高,为每年 800 万 ~ 1100 万,5 年生存率为 60% ~ 70%^[3,4]。一些患者在确诊时即可出现转移性病灶,另外还有一些无法辨别的亚临床症状的微小转移,致使该病的治

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2017D01C257)

作者单位:830000 乌鲁木齐,新疆医科大学第六附属医院关节科

通讯作者:孙荣鑫,电子信箱:yuxinsunjuan@163.com

疗效果不甚理想^[5,6]。目前,OS的主要治疗手段是手术并辅以放疗和化疗^[7,8]。近年来,尽管外科手术方法有所改善,但骨肉瘤患者的生存率并没有得到明显提高,复发和转移的概率仍然较大。因此,进一步探索OS发展的机制并寻找治疗骨肉瘤治疗的新方法是十分迫切的。

细胞周期蛋白依赖性激酶活化激酶(cyclin dependent kinase-activating kinase,CDK)通过调控细胞周期在细胞形成以及增殖过程中具有重要作用^[9]。CDK的磷酸化由CDK激活激酶(CAK)执行的,CAK是由CDK7、细胞周期蛋白H和辅助蛋白MAT1组成的三聚体复合物^[10]。其中,MAT1作为CAK的重要组成部分,在多数癌细胞中过度表达,并参与癌细胞的增殖、转移等生物学行为^[11]。有研究表明,MAT1的缺失会阻碍抑癌蛋白的磷酸化并诱导骨肉瘤细胞中的G₁阻滞,说明MAT1可能在骨肉瘤的发生、发展中起到了一定的作用^[12]。本研究通过RNAi技术沉默骨肉瘤细胞143B细胞中MAT1的表达,旨在探讨沉默MAT1表达后对143细胞增殖、迁移的影响,并揭示其潜在机制。

材料与方法

1. 主要试剂与材料:人骨肉瘤细胞株Saos-2、MG63、U2OS、143B与人成骨细胞hFOB1.19购自美国美国菌种保藏中心ATCC。本研究主要试剂包括TRIzol试剂与LipofectamineTM 2000购自美国Invitrogen公司,胎牛血清、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素、DMEM/F12培养基购自美国Gibco公司,RNase和PI试剂购自江苏凯基公司,TRIzol试剂、Prime Script™ RT reagent Kit试剂盒以及SYBR® Premix Ex TaqTM II试剂盒均购自日本TaKaRa公司,CCK-8试剂盒、RIPA裂解液与BCA蛋白测定试剂盒均购自美国Bio-Rad公司,Transwell小室购自美国Costar公司。

2. 细胞培养:将骨肉瘤细胞株Saos-2、MG63、U2OS、143B以及人成骨细胞hFOB1.19置于含有10%胎牛血清、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素的DMEM/F12培养基中,在5%CO₂、37℃的细胞恒温培养箱中进行常规培养。当细胞密度达到80%~90%时,加0.25%胰蛋白酶消化传代。本研究所有细胞均为生长良好的第3代对数生长期细胞。

3. qRT-PCR:使用TRIzol试剂从各细胞系(hBMSCs、hFOB1.19、Saos-2、MG63和U2OS)中提取总RNA。按照Prime Script™ RT Reagent Kit说明

书进行反转录操作获得cDNA。根据SYBR® Premix Ex TaqTM II说明并以GAPDH作为内参基因检测MAT1 mRNA的表达。扩增体系:上游引物1μl、下游引物1μl、cDNA 2μl、SYBR Premix Ex Taq II 12.5μl、无酶水补足25μl。扩增条件:95℃ 3min,95℃ 30s,60℃ 30s,58℃ 30s,40个循环。使用2^{-ΔΔCt}法来计算MAT1 mRNA的相对表达量。使用的引物由上海生工生物有限公司合成,具体序列如下:MAT1上游引物:5'-ACTGCCCTGAGTGTGTTACT-3',下游引物:5'-TGAAATATGTTGACCCAGCTCATCT-3';GAPDH上游引物:5'-TTTGCCTCGCCAGGTGAAGA-3',下游引物:5'-AGTTAAAAGCAGCCCTGGTGA-3'。

4. siRNA转染:将143B细胞以2×10⁵个/孔的密度接种于6孔板中进行培养,细胞密度达到70%左右时进行转染。细胞分为空白对照组(正常培养,不进行转染)、阴性对照组(转染阴性对照siRNA-NC)和siRNA-MAT1组(转染siRNA-MAT1),siRNA序列由上海生工生物有限公司设计并合成。根据Lipofectamine TM 2000说明书操作,分别将5μg siRNA与250μl OPTI-MEM、10μl脂质体与250μl OPTI-MEM轻柔混匀,室温孵育10min,然后将两种稀释物混合均匀,室温孵育20min。将混合后的转染试剂加入培养的细胞中,在37℃、5%CO₂细胞培养箱中孵育6h,弃原培养基,更换为DMEM新鲜培养基培养。

5. CCK-8测定:转染后48h,将各组143B细胞以1×10⁴个/孔的密度接种到96孔板中,在37℃、5%CO₂培养箱中继续培养孵育。使用CCK-8试剂盒检测细胞的增殖力,分别于24、48、72、96h时,每孔加10μl CCK-8溶液,再将培养板放在培养箱中培养2h,在酶标仪上450nm处检测各孔吸光光度值。

6. 流式细胞术:转染后48h,收集各组143B细胞用于细胞周期分析。使用PBS洗涤细胞,在4℃的75%乙醇中固定24h,去除乙醇,PBS洗涤重悬细胞,加10μl RNase在37℃下孵育10min,再加入5μl PI 37℃避光孵育30min,过300目筛网,使用流式细胞仪检测细胞周期。

7. Transwell小室:转染后48h,将各组143B细胞以2×10⁴个/孔的密度接种于Transwell小室的上室,并加100μl无血清培养基,下室中加入600μl含10%胎牛血清的培养基,放入37℃、5%CO₂细胞培养箱中孵育24h后取出小室,弃培养液,PBS洗涤,置于40g/L甲醛中固定20min,0.1%结晶紫染色30min,

PBS 再次洗涤,棉签擦拭掉上层未穿过基膜的细胞,封片后使用倒置显微镜观察拍照并计数。

8. Western blot 法检测:转染后 48h,使用 RIPA 裂解液抽提各组 143B 细胞总蛋白,BCA 蛋白测定试剂盒检测蛋白浓度。取 20 μ g 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,分离的蛋白切胶并转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2h,分别加入兔抗 SDF-1 (1:500)、兔抗 CXCR4 (1:500)、鼠抗 β -actin (1:1000)于 4℃ 孵育过夜,次日使用 PBS 洗涤 3 次,每次 10min,再用加 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (1:5000)室温孵育 2h,PBS 洗涤 3 次,每次 10min,在暗室用 ECL 发光液检测,用扫描仪扫描 X 线片,用 ProtParam 软件对灰度值进行分析,计算蛋白相对表达量。

9. 统计学方法:采用 SPSS 21.0 统计学软件对数据进行统计分析,实验数据均用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. MAT1 在骨肉瘤细胞中高表达:qRT-PCR 检测 MAT1 mRNA 在骨肉瘤细胞株 Saos-2、MG63、U2OS、143B 以及人成骨细胞 hFOB1.19 中的表达水平。与 hFOB1.19 细胞比较,Saos-2、MG63、U2OS 细胞中 MAT1 mRNA 的表达水平均明显升高($P < 0.01$),其中 143B 细胞中 MAT1 mRNA 的表达水平显著升高($P = 0.000$,图 1)。选择 143B 细胞进行后续实验。

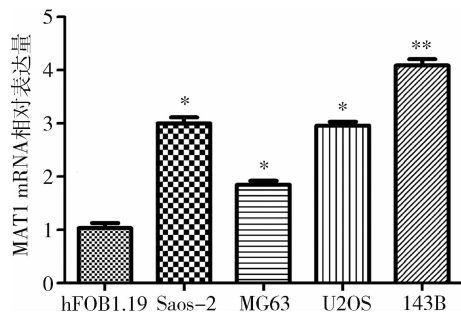


图 1 qRT-PCR 检测细胞 MAT1 mRNA 表达水平

与 hFOB1.19 细胞比较,* $P < 0.01$,** $P = 0.000$

2. 沉默 MAT1 对骨肉瘤细胞 143B 增殖的影响:qRT-PCR 检测转染后各组 143B 细胞中 MAT1 mRNA 的表达水平,与 Blank 组比较,siRNA-NC 组 MAT1 mRNA 的表达水平无显著变化,而 siRNA-MAT1 组 MAT1 mRNA 的表达水平较 Blank 组和 siRNA-NC 组明显下降($P < 0.01$,图 2),表明转染 siRNA

成功。CCK-8 检测在转染 143B 细胞后 24、48、72、96h 时细胞的增殖能力,转染 siRNA-MAT1 的细胞增殖活性较低,在 72h 时 siRNA-MAT1 组细胞增殖活力显著低于 Blank 组和 siRNA-NC 组($P < 0.01$,图 3)。利用流式细胞术检测转染后各组 143B 细胞的周期变化,Blank 组和 siRNA-NC 组中细胞 G_1 期比例分别为 48.22%、47.89%,S 期比例为 32.41%、30.67%。而 siRNA-MAT1 组细胞 G_1 期比例增加,达到 60.23%,S 期比例下降至 23.55% (图 4)。

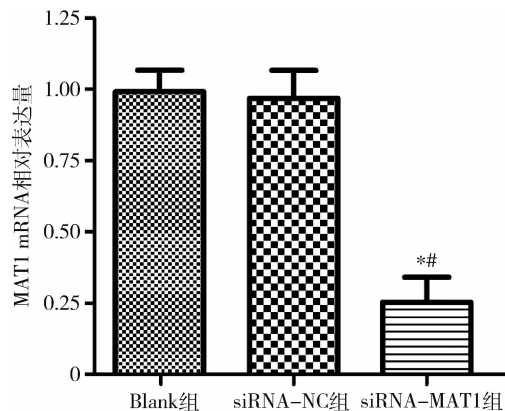


图 2 qRT-PCR 检测各组转染 143B 细胞 MAT1 mRNA 表达

与 Blank 组比较,* $P < 0.01$;与 siRNA-NC 组比较,** $P < 0.01$

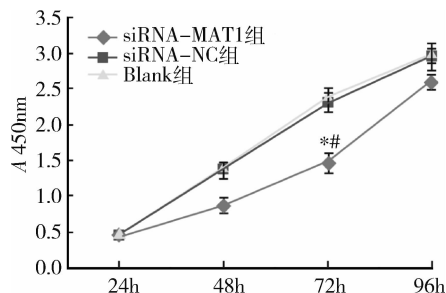


图 3 CCK-8 检测各组转染 143B 细胞增殖活力

与 Blank 组比较,* $P < 0.01$;与 siRNA-NC 组比较,** $P < 0.01$

3. 沉默 MAT1 对骨肉瘤细胞 143B 迁移的影响:通过 Transwell 小室法对转染后各组 143B 细胞的迁移能力进行分析,siRNA-MAT1 组 143B 细胞迁移的细胞数目明显低于对照组和 siRNA-NC 组($P < 0.01$),而 siRNA-NC 组较 Blank 组细胞迁移的细胞数目无显著变化(图 5)。

4. 沉默 MAT1 对骨肉瘤细胞 143B 中 SDF-1/CXCR4 信号通路的影响:Western blot 法检测转染后各组 143B 细胞中 SDF-1 与 CXCR4 蛋白表达情况,

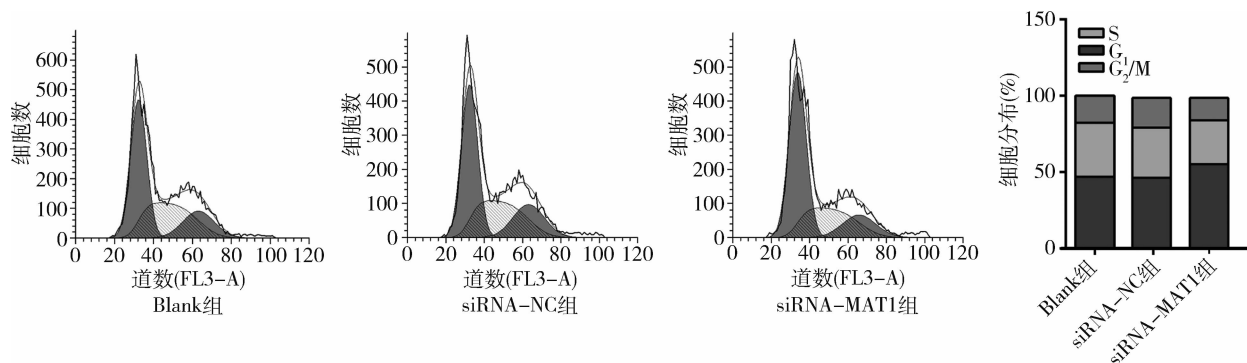


图 4 流式细胞术检测各组转染 143B 细胞周期变化

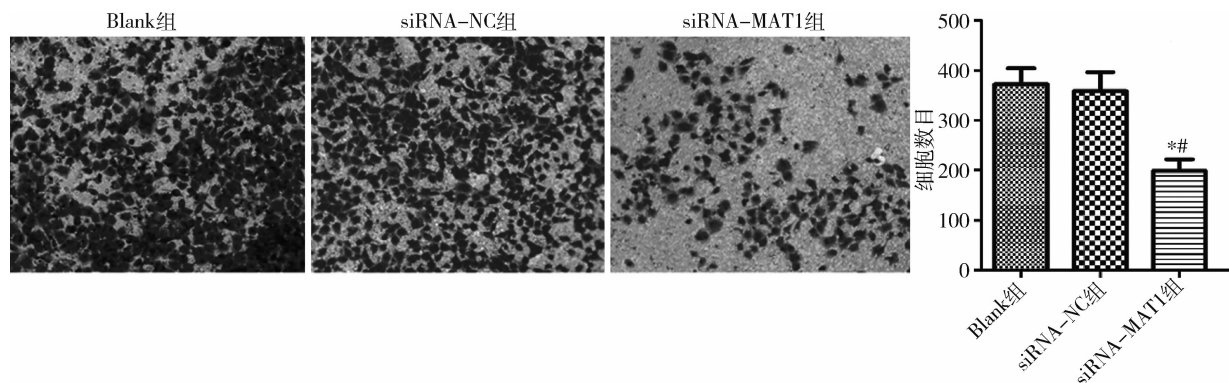


图 5 Transwell 小室法检测各组转染 143B 细胞迁移能力

与 Blank 组比较, * $P < 0.01$; 与 siRNA - NC 组比较, [#] $P < 0.01$

siRNA - NC 组 SDF - 1 和 CXCR4 蛋白表达水平较 Blank 组无显著变化, 而沉默 143B 细胞中 MAT1 的表达后, 细胞中 SDF - 1 与 CXCR4 蛋白表达相对于

Blank 组和 siRNA - NC 组细胞均显著降低 ($P < 0.01$), 详见图 6。

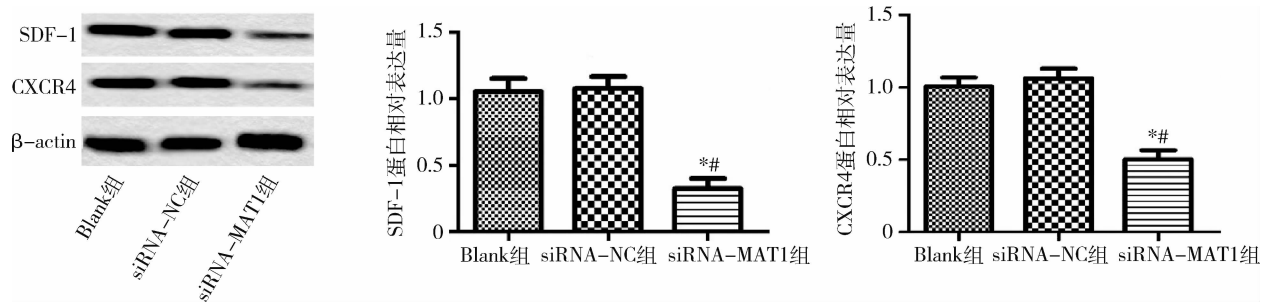


图 6 Western blot 法检测各组转染 143B 细胞 SDF - 1 与 CXCR4 蛋白表达

与 Blank 组比较, * $P < 0.01$; 与 siRNA - NC 组比较, [#] $P < 0.01$

讨 论

恶性肿瘤转移是导致 OS 患者治疗失败的主要原因^[13]。深入研究骨肉瘤的发病机制并寻找新型治疗方法, 这对提高 OS 临床治疗效果是至关重要的。而骨肉瘤的发病机制与许多基因的途径相关, 因此, 探讨骨肉瘤中相关基因改变的研究将有助于理解其转移的分子机制并确定潜在的治疗靶标。

MAT1 基因编码的蛋白质可以通过苏氨酸磷酸化来激活与细胞周期蛋白相关的激酶^[12]。已有研究发现, MAT1 在细胞增殖、分化和胚胎发育中起着至关重要的作用^[11,14]。例如, Liu 等^[15]通过用 siRNA 或重组腺病毒转染敲除 MAT1 后, 研究表明人胰腺癌的细胞增殖力明显降低并诱导了 G₀/G₁ 期的阻滞。Fejzo 等^[16]揭示了 ADRM1 的过表达增强了卵巢癌

ES2 细胞的增殖和迁移能力,而 MAT1 的表达也升高,这表明 MAT1 可能参与了肿瘤的转移。本研究 RT-PCR 检测结果显示, MAT1 在骨肉瘤细胞株 Saos-2、MG63、U2OS 以及 143B 中均高表达,这也提示 MAT1 可能与骨肉瘤的发生有关。RNAi 技术是分子生物学研究中干扰基因表达以及研究基因功能的基因调控手段,能够与靶基因在特定区域特异性结合起来切割 mRNA 使靶基因降解^[17]。本研究通过 RNAi 技术沉默骨肉瘤 143B 细胞中 MAT1 的表达检测其对 143B 增殖和迁移的影响。沉默 143B 细胞中 MAT1 的表达后,通过 CCK-8 检测发现在 24、48、72、96h 细胞增殖能力均受到抑制,流式细胞术结果显示细胞 G₁ 期比例增加而 S 期比例下降,Transwell 小室细胞迁移实验结果显示细胞迁移率明显下降。说明沉默 MAT1 表达能够抑制 143B 细胞增殖与迁移,并阻滞细胞周期进程。

基质细胞衍生因子-1 (SDF-1) 及其特异性趋化因子受体 4 (CXCR4) 在肺癌、大肠癌、乳腺癌及甲状腺癌等多种肿瘤实质细胞中广泛表达,并在恶性肿瘤细胞的增殖、分化、侵袭与迁移等过程中起着关键的调节作用^[18-21]。两者特异性结合发生空间构象改变,与此同时,通过活化与其偶联的 G 蛋白并激活多条信号转导通路,以产生相关联的生物学效应。Liao 等^[22]通过在体外和小鼠实验研究发现,AMD3100 通过抑制 JNK 和 Akt 通路降低了 CXCR4 介导的骨肉瘤转移。本研究结果证实,沉默 MAT1 表达也能够抑制骨肉瘤 143B 细胞中 SDF-1 与 CXCR4 蛋白表达。但其激活作用或共同参与这一过程的其他信号通路有待于进一步研究。

综上所述, MAT1 与骨肉瘤的发展进程关系密切,通过本研究表明沉默 MAT1 表达可以抑制骨肉瘤 143B 细胞的增殖与迁移、阻滞细胞周期进程,机制可能与下调 SDF-1 与 CXCR4 表达有关。

参考文献

- Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program[J]. *Cancer*, 2009, 115: 1531-1543
- Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons [J]. *Int J Cancer*, 2009, 125: 229-234
- Ritter J, Bielack SS. Osteosarcoma [J]. *Ann Oncol*, 2010, 21 (7): 320-325
- Gelderblom H, Jinks RC, Sydes M, *et al.* Survival after recurrent osteosarcoma: data from 3 European Osteosarcoma Intergroup (EOI) randomized controlled trials[J]. *Eur J Cancer*, 2011, 47: 895-902
- 郑冠群, 赵福友, 吴穷, 等. PD-1 及其配体在骨肉瘤免疫治疗中的研究进展 [J]. *中华全科医学*, 2016, 14(9): 1560-1562
- 蓝常贡, 唐毓金. 骨肉瘤易感性与相关基因多态性的研究进展 [J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(2): 304-307
- Yang J, Zhang W. New molecular insights into osteosarcoma targeted therapy [J]. *Curr Opin Oncol*, 2013, 25: 398-406
- Duchman KR, Gao Y, Miller BJ. Prognostic factors for survival in patients with high-grade osteosarcoma using the surveillance, epidemiology, and end results (SEER) program database [J]. *Cancer Epidemiol*, 2015, 39: 593-599
- Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases [J]. *Trends Biochem Sci*, 2005, 30: 630-641
- Fisher RP. Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118: 5171-5180
- 杨庆, 甘嘉亮, 张小龙, 等. MAT1 基因在癌症疾病中的作用与应用研究 [J]. *微创医学*, 2013, 6: 734-736, 705
- He QJ, Peng H, Collins SJ, *et al.* Retinoid-modulated MAT1 ubiquitination and CAK activity [J]. *FASEB J*, 2004, 18(12): 1734-1736
- Marina NM, Pratt CB, Rao BN, *et al.* Improved prognosis of children with osteosarcoma metastatic to the lung (s) at the time of diagnosis [J]. *Cancer*, 2015, 70(11): 2722-2727
- Zhang S, He Q, Peng H, *et al.* MAT1-modulated cyclin-dependent kinase-activating kinase activity cross-regulates neuroblastoma cell G1 arrest and neurite outgrowth [J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 2977-2983
- 刘建平, 袁世珍, 张世能. 小干扰 RNA 沉默 MAT1 基因治疗胰腺癌的实验研究 [J]. *中华医学杂志*, 2007, 87(38): 2719-2723
- Fejzo MS, Anderson L, Von-Euw EM, *et al.* Amplification target ADRM1: role as an oncogene and therapeutic target for ovarian cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14: 3094-3109
- Shen GM, Chen W, Li CZ, *et al.* RNAi targeting ecdysone receptor blocks the larva to adult development of *Tetranychus cinnabarinus* [J]. *Pestici Biochem Phys*, 2019, 159: 85-90
- 林剑彪, 黄国锋, 叶文斌, 等. SDF-1 α /CXCR4 信号通路在轴向应力刺激促进骨再生中的作用研究 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2019, 33(6): 689-697
- Zhou Y, Cao HB, Li WJ, *et al.* The CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 chemokine axis: oncogenic properties, molecular targeting, and synthetic and natural product CXCR4 inhibitors for cancer therapy [J]. *Chin J Nat Med*, 2018, 16(11): 801-810
- Zhang H, He B. SDF1/CXCR4 axis plays a role in angiogenesis during the degeneration of intervertebral discs [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(2): 1203-1211
- Kuo J, Jia L, Jitao Z, *et al.* SDF-1/CXCR4 axis facilitates myeloid-derived suppressor cells accumulation in osteosarcoma microenvironment and blunts the response to anti-PD-1 therapy [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 75: 105818
- Liao YX, Fu ZZ, Zhou CH, *et al.* AMD3100 reduces CXCR4-mediated survival and metastasis of osteosarcoma by inhibiting JNK and Akt, but not p38 or Erk1/2, pathways in in vitro and mouse experiments [J]. *Oncol Rep*, 2015, 34 (1): 33-42

(收稿日期: 2019-11-23)

(修回日期: 2019-12-06)