

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.03.008

NOK 在骨肉瘤细胞系 MG63 EMT 过程中的作用 *

王兆宁 郑立峰 陈 岩 王 宝 王 可 王居正[△]

(解放军第二二二医院骨科 吉林 吉林 132011)

摘要 目的: 通过对比和检测人正常成骨细胞系 hFOB1.19 以及骨肉瘤细胞系 MG63 中 NOK 以及 EMT 标志性分子 E-cadherin、Vimentin 的 mRNA 和蛋白表达量,并观察 NOK 对骨肉瘤细胞系 MG63 中 EMT 标志性分子 E-cadherin 及 Vimentin 的 mRNA 和蛋白表达量的影响,探讨 NOK 在骨肉瘤细胞系 MG63 EMT 过程中的作用。**方法:** qRT-PCR、Western blot 法检测人正常成骨细胞系 hFOB1.19 以及骨肉瘤细胞系 MG63 中 NOK、E-cadherin、Vimentin 的 mRNA 和蛋白表达量;构建慢病毒并干扰骨肉瘤细胞系 MG63 中 NOK 表达,qRT-PCR、Western blot 法检测干扰 NOK 前后 EMT 标志性分子 E-cadherin 及 Vimentin 的 mRNA 和蛋白表达。**结果:** 相比于人正常成骨细胞系,NOK、Vimentin 的 mRNA 和蛋白在骨肉瘤细胞系 MG63 中高表达,E-cadherin 的 mRNA 和蛋白在骨肉瘤细胞系 MG63 中低表达。慢病毒干扰骨肉瘤细胞中 NOK 表达后,E-cadherin 的 mRNA 和蛋白表达升高,Vimentin 的 mRNA 和蛋白表达降低。**结论:** NOK 具有促进骨肉瘤细胞系 MG63 发生 EMT 过程。

关键词: NOK;骨肉瘤;EMT

中图分类号: R-33;R738 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2018)03-438-04

The Roles of NOK in the EMT Process of Osteosarcoma*

WANG Zhao-ning, ZHENG Li-feng, CHEN Yan, WANG Bao, WANG Ke, WANG Ju-zheng[△]

(Department of Orthopaedics, The People's liberation army 222 Hospital, Jilin, Jinlin, 132011, China)

ABSTRACT Objective: Through comparing and testing the mRNA and protein expressions of NOK and EMT related molecules E-cadherin and Vimentin in normal ossification cell lines hFOB1.19 and osteosarcoma cell lines MG63, and observing the influence of NOK on the expression of E-cadherin and Vimentin in osteosarcoma, and then the role and mechanism of NOK in the EMT process of osteosarcoma will be explored. **Methods:** qRT-PCR and Western blot analysis were used to detect the NOK, E-cadherin and Vimentin mRNA and protein expression; and then build slow virus and RNA interference NOK expression in osteosarcoma cell lines MG63, and observe the E-cadherin and Vimentin mRNA and protein expression before or after lentivirus vectors for NOK RNA interfering through qRT-PCR and Western blot. **Results:** Comparing with normal ossification cell lines, the mRNA and protein of NOK and Vimentin are high expressed and E-cadherin mRNA and protein expression are lower in osteosarcoma cell line MG63. Lentivirus vectors interfering NOK could increase E-cadherin mRNA and protein expression, and reduce Vimentin mRNA and protein expression. **Conclusion:** NOK could promote the EMT process in osteosarcoma cell line MG63.

Key words: NOK; Osteosarcoma; EMT

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R738 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)03-438-04

前言

上皮间质转化(EMT)是由上皮细胞转化为间充质细胞的过程,首次被发现于人体晶体状上皮细胞中^[1]。EMT 现象是普遍存在于机体内的生理及病理的现象,目前在伤口的愈合、胚胎发育及肿瘤的转移等多种过程发挥非常关键的作用^[2],其中参与胚胎发育过程的主要为 I 型 EMT,而在伤口愈合等过程发挥作用的主要为 II 型 EMT,而参与肿瘤转移等过程主要为 III 型的 EMT。另有研究表明,EMT 现象存在于多种肿瘤的病情进展中。因而 III 型的 EMT 被认为是肿瘤转移的起始和关键步骤。由此说明,EMT 在人的健康扮演重要的角色。虽然已有研

究发现某些致癌基因的过表达或抑癌基因突变导致 EMT 现象的发生^[3-12],但是,EMT 现象的发生是否还与其它癌基因相关值得深入探究。

NOK 是一种新的酪氨酸蛋白激酶,其在肿瘤组织中的阳性表达率特别高^[13-15]。因而,NOK 可能是一种新的与癌症相关的基因。前期有学者报道称 NOK 与肿瘤转移密切相关^[16],有研究发现 NOK 可以和 GSK-3 β 形成免疫复合物并促进其磷酸化^[17]。而磷酸化后的 GSK-3 β 能抑制 E-cadherin 的表达,促使 EMT 现象发生^[18]。综上所述,NOK 可能参与 EMT 发生过程。众所周知,骨肉瘤是一种原发的恶性程度很高的肿瘤,至今其发病机制还不明确。本研究拟通过观察 NOK 对骨肉瘤细胞系

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81572252)

作者简介:王兆宁(1965-),本科,研究方向:从事骨科方面研究,E-mail:wangzhaoning1215@126.com

[△] 通讯作者:王居正,研究方向:NOK 基因与肿瘤相关性,E-mail:wangjz@126.com

(收稿日期:2017-08-28 接受日期:2017-09-22)

MG63 中 EMT 关键分子 E-cadherin 及 Vimentin 的 mRNA 和蛋白表达量的影响,探讨其在骨肉瘤 EMT 过程中的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株

骨肉瘤细胞系 MG63、人正常成骨细胞系 hFOB1.19 购于美国 ATCC 中心。

1.2 试剂

RPMI 1640 培养液(Hyclone),胎牛血清(四季青),胰酶(碧云天),荧光定量用 SYBR 试剂盒(Takara),NOK、E-cadherin、Vimentin 抗体(Abcam)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液于 37℃、5%CO₂ 的孵箱中培养细胞系。

1.3.2 荧光定量 PCR 检测 mRNA 表达 采用 Trizol 法提取细胞系总的 mRNA,测定其纯度及浓度后,反转录成 cDNA。每个样本重复 3 个复孔,总计制备 70 μL 的 PCR 反应体系:2 × SYBR mix buffer 35 μL、上游引物 10 μM、下游引物 10 μM、模板 cDNA 0.05-0.1 μg、补水至 25 μL。上机检测并设置反应条件:95℃ 10 min;95℃ 15 s,60℃ 30 s,72℃ 50 s 循环 40 次。

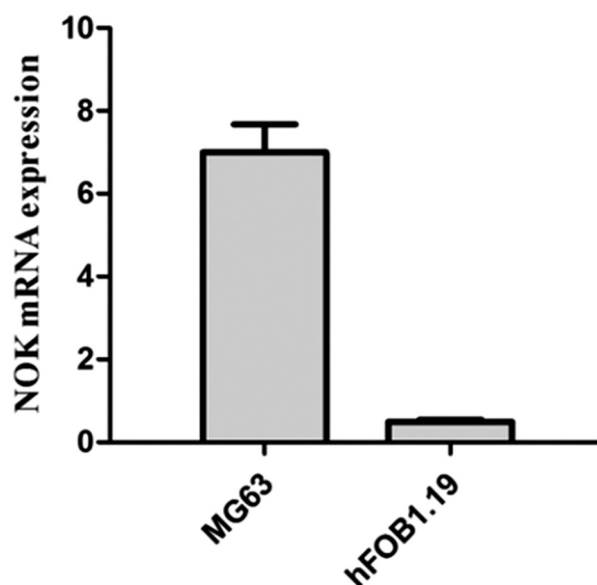


图1 qRT-PCR 法检测 NOK 的 mRNA 在 MG63 细胞系中的表达

Fig.1 Detected NOK expression in MG63 cells through qRT-PCR

2.2 EMT 标志性分子 E-cadherin、Vimentin 的 mRNA 和蛋白在骨肉瘤细胞系中的表达

EMT 现象存在于多种肿瘤的发展过程,为了探究 EMT 现象是否也存在于骨肉瘤细胞系 MG63 中,我们检测了 EMT 标志性分子 E-cadherin 及 Vimentin 的 mRNA 和蛋白在骨肉瘤细胞系中的表达。从结果可知,E-cadherin 的 mRNA 和蛋白在 MG63 细胞系中的表达低于对照组细胞系,而 Vimentin 的 mRNA 和蛋白在 MG63 细胞系中的表达显著高于对照组细胞系。由此说明,EMT 现象存在于骨肉瘤细胞系中(见图 3)。

2.3 NOK 促进骨肉瘤细胞发生 EMT 过程

慢病毒干扰 NOK 表达后,qRT-PCR 及 Western blot 法检

结果通过 2^{-ΔΔCT} 相对定量法进行分析。

1.3.3 Western blot 检测蛋白表达 细胞沉淀经裂解后,制备成蛋白样品,BCA 法测定蛋白样品浓度,之后行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。蛋白上样量为每个泳道 20-40 μg。电泳结束后切胶并转膜,4℃孵育一抗过夜。室温复温二抗室温孵育 30 min。TBST 漂洗后结合化学发光试剂并显影。

1.3.4 慢病毒下调 NOK 表达 设计 3-4 套干扰 NOK 基因的 siRNA 序列,制备 siRNA 对应双链模板,并装载载体,转化、扩增;去内毒素提取质粒,包装具有干扰 NOK 基因的慢病毒。利用干扰 NOK 基因的慢病毒直接感染骨肉瘤 MG63 细胞系,显微镜下观察慢病毒载体在细胞中的表达。

2 结果

2.1 NOK mRNA 和蛋白在骨肉瘤细胞系中的表达

通过 qRT-PCR、Western blot 法检测 NOK 的 mRNA 和蛋白在骨肉瘤细胞系 MG63 中的表达,初步观察 NOK 的 mRNA 和蛋白在骨肉瘤细胞中的作用。结果发现,与人正常成骨细胞系 hFOB1.19 (对照组)相比,NOK 的 mRNA 和蛋白在骨肉瘤 MG63 细胞系中均有较高的表达(见图 1、图 2)。

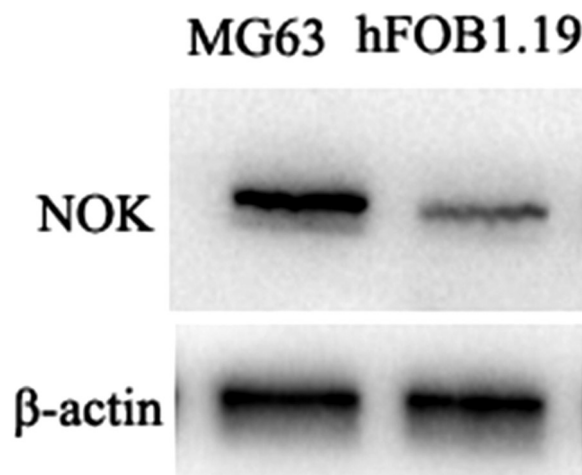


图2 Western blot 法检测 NOK 蛋白在 MG63 细胞系中的表达

Fig.2 Detected NOK expression in MG63 cells through Western blot

测下游 EMT 标志性分子 E-cadherin 及 Vimentin 的 mRNA 和蛋白。研究结果发现,与慢病毒干扰前相比,慢病毒干扰后 E-cadherin 的 mRNA 和蛋白表达有所增高,而 Vimentin 的 mRNA 和蛋白的表达则有所降低(见图 5、图 6)。

3 讨论

骨肉瘤是恶性程度较高的骨肿瘤,其发病率约占原发性骨恶性肿瘤的前三位,严重威胁患者的生命。该病早期症状表现为疼痛且其症状不明显,因而不被患者重视。等临床确诊时可能已经发生病变,只能采取化疗/放疗及手术切除的综合治疗方式。切除体内肿瘤组织后如何能控制肿瘤细胞在体内的转移是提高患者生存率的关键。目前临床上除了传统的巩固性化疗控制外,还存在针对某些靶向分子的药物疗法,该治疗方式是改善患者术后生活质量、提高生存率的方向。

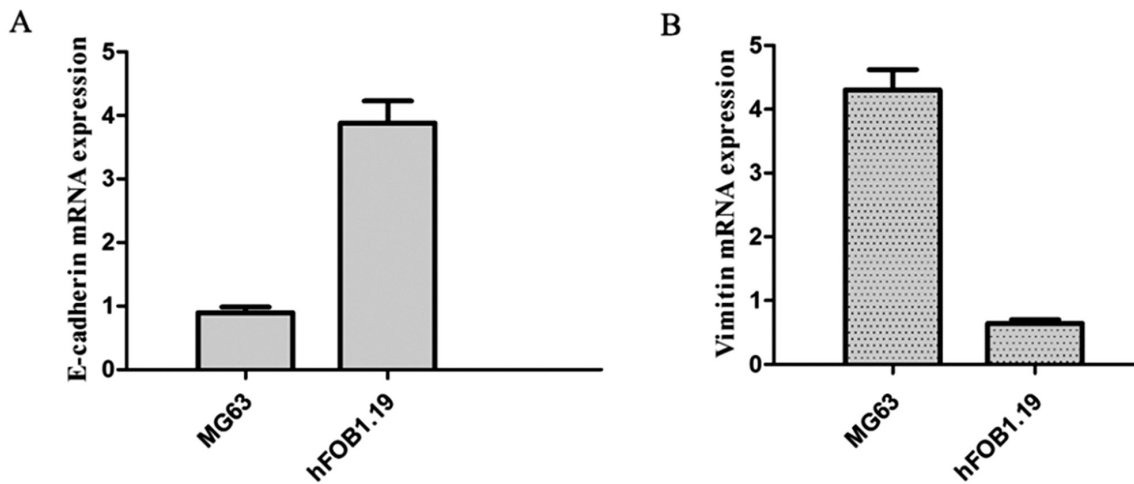


图3 E-cadherin、Vimentin 的 mRNA 在 MG63 细胞系中的表达
Fig.3 E-cadherin, Vimentin mRNA expression in MG63 cells
A: E-cadherin; B: Vimentin

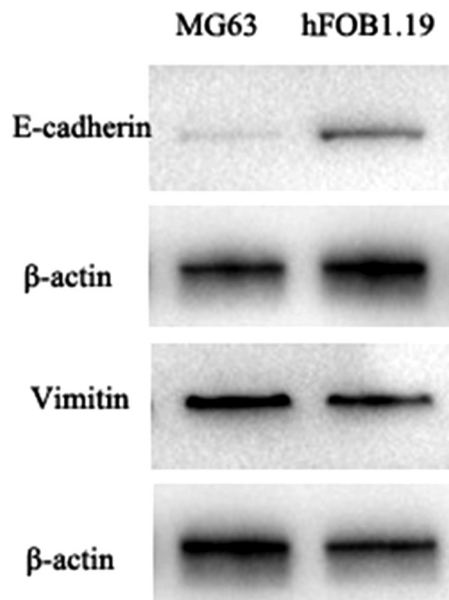


图4 E-cadherin、Vimentin 蛋白在 MG63 细胞系中的表达
Fig.4 E-cadherin, Vimentin protein expression in MG63 cells

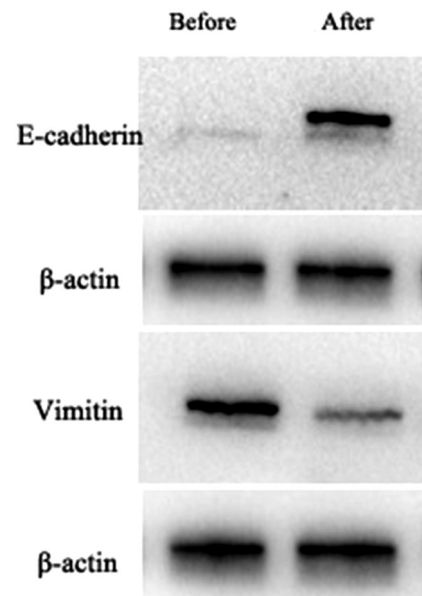


图6 慢病毒干扰前后 E-cadherin、Vimentin 蛋白表达
Fig.6 E-cadherin, Vimentin protein expression before or after interfer

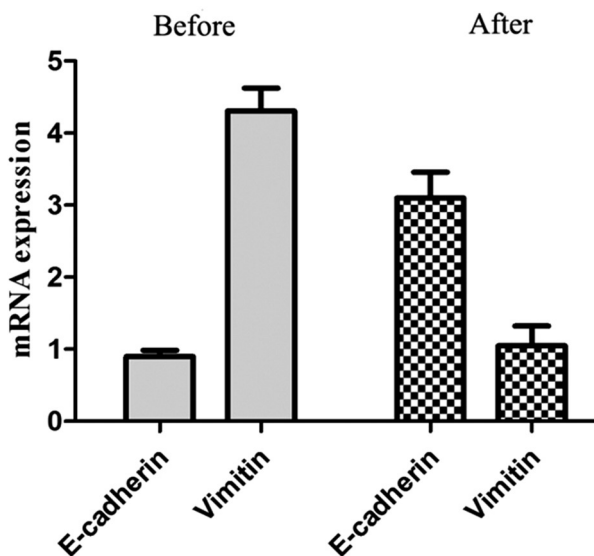


图5 慢病毒干扰前后 E-cadherin、Vimentin 的 mRNA 表达
Fig.5 E-cadherin, Vimentin mRNA expression before or after interfer

EMT 是 1982 年由 Greenburg 等人首次在人晶状体上皮细胞中发现的机体内一种普遍的生理及病理现象,即上皮细胞在特定的条件下向间充质细胞转化的过程^[1]。EMT 在胚胎发育、伤口愈合、器官纤维化和肿瘤转移等过程中均扮演着重要角色^[2]。癌症相关的 EMT 过程不仅是简单的促进细胞的迁移和侵袭能力,而是一个复杂的重新编码的过程,包括表观遗传学改变、细胞骨架的重新改造、蛋白表达的变化、细胞粘附能力的丢失、细胞极性消失、侵袭和转移能力增加、代谢和分化过程的改变等。该过程通过分化上皮细胞来逆转分化状态,不仅表达了干细胞标记物,而且还获得了干细胞样的功能^[3]。EMT 主要分为三个类型, I 型 EMT 是指在胚胎中,原始的上皮细胞会向间质细胞转化,以创造新的器官主要影响原肠胚和神经嵴的形成; II 型 EMT 是指分化上皮细胞在间质中转化为新的成纤维细胞,参与创伤修复、组织或器官再生、纤维化; III 型 EMT 在上皮性癌的发生和转移过程中发挥作用^[4]。由此可见,EMT 过程

贯穿人的生老病死,对人类的健康具有重要影响。EMT 因其可能作为肿瘤转移的开始而备受关注,是目前学者们研究肿瘤转移的重要方向,有可能是未来控制肿瘤转移的靶点^[20]。

NOK 是一种新的蛋白酪氨酸激酶,在多种肿瘤组织中都有较高的表达^[21]。前期研究结果显示,NOK 在某些肿瘤中可以促进 EMT 现象^[21],但是在骨肉瘤细胞中是否也是如此并未见报道。本次研究主要通过 qRT-PCR、Western blot 法检测骨肉瘤细胞 MG63 中 NOK、EMT 标志性分子 E-cadherin 及 Vimentin 的 mRNA 和蛋白表达,慢病毒干扰 NOK 后检测 EMT 标志性分子 E-cadherin 及 Vimentin 的 mRNA 和蛋白表达,目的是为了探讨 NOK 在骨肉瘤细胞系 MG63 发生 EMT 过程的作用。研究结果发现,骨肉瘤细胞系 MG63 中 NOK、Vimentin 的 mRNA 和蛋白高表达,E-cadherin 的 mRNA 和蛋白低表达。慢病毒干扰 NOK 后,E-cadherin 的 mRNA 和蛋白表达升高,Vimentin 的 mRNA 和蛋白表达降低。由此说明,下调 NOK 表达阻断了 EMT 进程,反之则认为 NOK 可以促进骨肉瘤的 EMT 进程。

本实验通过严谨的实验设计和精确地实验证实了 NOK 对骨肉瘤的 EMT 过程具有促进作用,拓展了骨肉瘤转移机制的研究范围。同时,也提示 NOK 可以作为骨肉瘤治疗的目标靶点,为进一步的临床实验打下了基础。

参考文献(References)

- [1] Greenburg G, E D Hay. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells [J]. *J Cell Biol*, 1982, 95(1): 333-339
- [2] Li L, W Li. Epithelial-mesenchymal transition in human cancer: comprehensive reprogramming of metabolism, epigenetics, and differentiation[J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 150: 33-46
- [3] Lin X, R Sun, X Zhao, et al. C-myc overexpression drives melanoma metastasis by promoting vasculogenic mimicry via c-myc/snail/Bax signaling[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2017, 95(1): 53-67
- [4] Yu W, Y Ma, S Shankar, et al. Role of SATB2 in human pancreatic cancer: Implications in transformation and a promising biomarker[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(36): 57783-57797
- [5] Zhang P, Y Sun, L Ma. ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance[J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(4): 481-487
- [6] Sun Q, X Yao, Y Ning, et al. Overexpression of response gene to complement 32 (RGC32) promotes cell invasion and induces epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells via the NF-kappaB signaling pathway[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(5): 2995-3002
- [7] Wang W P, Y Sun, Q Lu, et al. Gankyrin promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis in NSCLC through forming a closed circle with IL-6/ STAT3 and TGF-beta/SMAD3 signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(4): 5909-5923
- [8] Zheng H, Y Kang. Multilayer control of the EMT master regulators[J]. *Oncogene*, 2014, 33(14): 1755-1763
- [9] De Craene B, G Berx. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(2): 97-110
- [10] Cho K B, M K Cho, W Y Lee, et al. Overexpression of c-myc induces epithelial mesenchymal transition in mammary epithelial cells [J]. *Cancer Lett*, 2010, 293(2): 230-239
- [11] Muqbil I, J Wu, A Aboukameel, et al. Snail nuclear transport: the gateways regulating epithelial-to-mesenchymal transition? [J]. *Semin Cancer Biol*, 2014, 27: 39-45
- [12] Atmaca A, R W Wirtz, D Werner, et al. SNAI2/SLUG and estrogen receptor mRNA expression are inversely correlated and prognostic of patient outcome in metastatic non-small cell lung cancer [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 300
- [13] Orang A V, R Safaralizadeh, M A Hosseinpour Feizi, et al. Diagnostic Relevance of Overexpressed Serine Threonine Tyrosine Kinase/Novel Oncogene with Kinase Domain (STYK1/NOK) mRNA in Colorectal Cancer [J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2014, 15(16): 6685-6689
- [14] Chung S, K Tamura, M Furihata, et al. Overexpression of the potential kinase serine/ threonine/tyrosine kinase 1 (STYK 1) in castration-resistant prostate cancer[J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(11): 2109-2114
- [15] Moriai R, D Kobayashi, T Amachika, et al. Diagnostic relevance of overexpressed NOK mRNA in breast cancer[J]. *Anticancer Res*, 2006, 26(6C): 4969-4973
- [16] Liu L. A Novel Protein Tyrosine Kinase NOK that Shares Homology with Platelet-Derived Growth Factor_Fibroblast Growth Factor Receptors Induces Tumorigenesis and Metastasis in Nude Mice[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(10): 3491-3499
- [17] Li J, Wu F, Sheng F, et al. NOK/STYK1 interacts with GSK-3beta and mediates Ser9 phosphorylation through activated Akt[J]. *FEBS letters*, 2012, 586(21): 3787-3792
- [18] Zhou BP, Deng J, Xia W, et al. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition[J]. *Nature cell biology*, 2004, 6(10): 931-940
- [19] Li M, F Luan, Y Zhao, et al. Epithelial-mesenchymal transition: An emerging target in tissue fibrosis [J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2015, 241(1): 1-13
- [20] Denlinger CE, Ikonomidis JS, Reed CE, et al. Epithelial to mesenchymal transition: the doorway to metastasis in human lung cancers [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2010, 140(3): 505-513
- [21] Chen P, Li WM, Lu Q, et al. Clinicopathologic features and prognostic implications of NOK/STYK1 protein expression in non-small cell lung cancer [J]. *BMC cancer*, 2014, 14: 402