

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.06.007

钙通道蛋白 Orai1 在骨肉瘤细胞转移中的作用研究 *

周珈右¹ 李一鸣² 何岚奇¹ 唐娟^{2△}

(1 空军军医大学基础医学院学员队 陕西 西安 710032;

2 空军军医大学细胞生物学教研室 / 细胞工程研究中心 肿瘤生物学重点实验室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:骨肉瘤是一种常见的恶性骨肿瘤,恶性程度高,往往在早期就会发生远隔器官的转移,从而导致骨肉瘤的预后非常差。Orai1 是一类定位于细胞膜,介导钙离子内流的受体依赖性钙通道蛋白。大量研究发现钙通道蛋白 Orai1 过表达于多种肿瘤细胞,并对维持肿瘤细胞粘附、侵袭、迁移等恶性表型有非常重要的作用。然而,钙通道蛋白 Orai1 是否参与了骨肉瘤的转移过程,目前未见相关报道。本研究的目的是探究钙通道蛋白 Orai1 是否在骨肉瘤转移过程中的发挥作用。**方法:**利用合成的靶向 Orai1 的小干扰 RNA(Orai1 siRNA)片段,转染至人骨肉瘤细胞系 Saos-2 细胞。在 Saos-2 细胞中抑制 Orai1 的表达。采用细胞黏附实验、细胞划痕实验和细胞 Transwell 实验检测骨肉瘤细胞的黏附、迁移及侵袭等肿瘤细胞转移能力;Western-blot 实验检测 Saos-2 细胞的中黏着斑激酶(FAK)和桩蛋白(Paxillin)的表达水平和磷酸化水平。**结果:**靶向 Orai1 siRNA 瞬时转染至骨肉瘤细胞系 Saos-2 细胞后, Saos-2 细胞中 Orai1 蛋白表达水平和 mRNA 转录水平均显著下降。并且,在 Saos-2 细胞中抑制 Orai1 表达后, Saos-2 细胞的黏附能力、迁移能力、及侵袭能力均显著下降。进一步研究发现,在 Saos-2 细胞中抑制 Orai1 表达后, Saos-2 细胞的 FAK 和 Paxillin 磷酸化水平明显下降。**结论:**Orai1 可以促进骨肉瘤细胞的黏附、迁移和侵袭,增加黏着斑的形成,从而促进骨肉瘤的转移。因此,深入研究钙通道蛋白 Orai1 调控骨肉瘤转移的分子机制,可为骨肉瘤转移的治疗提供新的新方向和新策略。

关键词:骨肉瘤;转移; Orai1**中图分类号:**R-33; R738.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)06-1033-06

The Effect of Orai1 on Metastasis Potential in Osteosarcoma Cells*

ZHOU Jia-you¹, LI Yi-ming², HE Lan-qi¹, TANG Juan^{2△}

(1 Cadet Team, School of Basic Medical, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 State Key Laboratory of Cancer Biology, Department of Cell Biology/ Cell Engineering Research Centre,
Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: Osteosarcoma is one of the most common skeletal cancers. It is a highly malignant tumor characterized by rapid progression, poor prognosis, and frequent tumor recurrence. Orai1 as calcium channels is widely expressed in various tumor cells, which play essential roles in regulating cell adhesion, migration and invasion. However, it remains unclear whether Orai1 is involved in the progression of osteosarcoma. Here, we investigated the functions of Orai1 in the metastatic processes of human osteosarcoma cells. **Methods:** In this study, RNA interference was used to downregulate the expressions of Orai1 in human osteosarcoma cells Saos-2. Cell adhere test was used in Orai1 siRNA transfected human Saos-2 osteosarcoma cells to test cells adhesion potential. Transwell test was used in Orai1 siRNA transfected human Saos-2 osteosarcoma cells to test cells invasion potential. Monolayer wound healing assay was carried out in Orai1 siRNA transfected human Saos-2 osteosarcoma cells to test cell migration potential. Western-blot was used to test the phosphorylation levels of FAK and paxillin. **Results:** Transfection of human osteosarcoma cells with siRNA targeting Orai1, led to significant decreases in Orai1 compared to cells transfected with the negative control siRNA. In Orai1 siRNA transfected human Saos-2 osteosarcoma cells, the numbers of attached cells, invaded cells and wound closure rate were significantly decreased compared to cells transfected with the negative control siRNA. Furthermore, phosphorylated FAK and Paxillin were markedly lowered in Orai1 siRNA transfected human Saos-2 osteosarcoma cells compared to cells transfected with the negative control siRNA. **Conclusion:** Orai1 may play important roles in the invasion and metastasis of human osteosarcoma cells and may promote the formation of focal adhesion. Orai1 may enhance metastasis potential of human osteosarcoma cells and may be a promoter of carcinogenesis. Thus, drug targets Orai1 may present a new method for preventing osteosarcoma metastasis in osteosarcoma treatments.

Key words: Osteosarcoma; Metastasis; Orai1**Chinese Library Classification (CLC):** R-33; R738.1 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2019)06-1033-06

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81472700);陕西省重点研发计划(2017KJXX-68);中国博士后科学基金特别资助项目(2017T100763)

作者简介:周珈右(1997-),本科,主要研究方向:临床医学, E-mail: 907165991@qq.com

△ 通讯作者:唐娟(1982-),博士,硕士生导师,副教授,主要研究方向:肿瘤细胞生物学, E-mail: tangjuan1@fmmu.edu.cn, 电话:13572476160

(收稿日期:2018-08-28 接受日期:2018-09-24)

前言

骨肉瘤是一种最常见恶性骨肿瘤。骨肉瘤恶性程度高,早期就容易发生远隔器官转移,尤其是肺转移,致残率和死亡率都很高,预后极差^[1-4]。目前尚未发现可明确预示或治疗骨肉瘤转移的特异性分子标志物。因此,深入探究在骨肉瘤的转移发挥关键作用的分子,探索能早期预测骨肉瘤转移的指标,鉴定可用于治疗骨肉瘤转移的关键分子靶点,对提高骨肉瘤患者的预后具有非常重大的临床意义。Orail 是最近发现和鉴定的介导钙离子进入细胞的钙通道蛋白。大量研究发现钙通道蛋白 Orail 过表达于多种肿瘤细胞,并对维持肿瘤细胞的恶性表型有重要作用^[5-7]。然而,钙通道蛋白 Orail 是否参与了骨肉瘤转移过程,目前未见相关报道。本研究旨在明确钙通道蛋白 Orail 在人骨肉瘤转移过程中的作用,鉴定 Orail 是否为治疗骨肉瘤转移的有效作用靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

RPMI1640 细胞培养液购自美国 GIBCO BRL 公司;Orail 干涉片段由上海生工公司合成。Real-time PCR 逆转录试剂盒购自美国 Abcam 公司;Real-time PCR 仪购自美国 BIO-RAD 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染 将 Saos-2 细胞计数(1×10^5 细胞/mL)后接种于 24 孔板,将 24 孔板置于饱和湿度条件、恒温 37℃ 及含 5% CO₂ 的细胞培养箱中。24 h 后取出 24 孔板,显微镜下观察细胞状态良好,用无血清培养基连续洗涤细胞 3 次,分别取 2 μ L (20 pmol) Orail siRNA 和 Control siRNA 溶于 98 μ L 无血清培养基,静置 10 min。然后再将脂质体 2 μ L 用移液器溶于 98 μ L 无血清培养基中静置 10 min 后,将这两种液体充分混匀后室温静置 25 min。然后将转染液加入培养有待转染细胞的孔中,每个孔补加培养基至 500 μ L 后,将培养板置于饱和湿度条件、恒温 37℃ 及含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。6h 后弃转染液,更换为含 10%新生牛血清的培养基,继续置于细胞培养箱中培养 18 h。

1.2.2 实时定量 PCR 用反转录试剂盒提取成 Saos-2 细胞的总 RNA 后反转录成 cDNA。用如下反应体系:2 μ g 模板 RNA、1 μ L Oligo dT primer、2 μ L dNTP mixture、1 μ L Ace 反转录酶、1 μ L RNase inhibitor、4 μ L 5 $\times$ RT buffer、10 μ L RNase-free 水。反应条件为:第一步 37℃ 30 min,第二步 84℃ 30 sec。反应产物 4℃ 保存。然后进行实时定量 PCR 反应。用如下反应体系:12.5 μ L RealMasterMix (SYBR I)、2 μ L 模板 cDNA、1 μ L 正向引物、1 μ L 反向引物、8.5 μ L RNase-free 水。反应条件为:第一步 94℃ 5 min; 第二步 94℃ 60 sec、57℃ 30 sec、72℃ 30 sec,共 30 个循环;第三步 72℃ 5 min;最后 4℃ 结束反应。用实时定量 PCR 仪的自带软件统计实验数据。

1.2.3 免疫印记实验 Saos-2 细胞转染 Orail siRNA 和 Control siRNA 后用细胞裂解液将其分别裂解,然后总蛋白定量两组细胞的裂解液,稀释至同一总蛋白浓度水平。将两组细胞裂解液进行 SDS 电泳约 120 min,SDS 电泳凝胶电泳后将蛋白转

至 PVDF 膜,时间约 90 min。取出电转后的 PVDF 膜,用 5%脱脂奶粉封闭约 30 min,洗涤 PVDF 膜 4 次后,PVDF 膜表面孵育相应蛋白的特异性抗体 2 h,洗膜 4 次后,加入相应 HRP 标记二抗孵育 1 h,洗涤 PVDF 膜 4 次后,进行化学发光。将实验结果拍照并进行定量分析。

1.2.4 细胞黏附实验 取一无菌 96 孔培养细胞板,每孔加入约 100 μ L 的 Matrigel 胶,置于 4℃ 冰箱。约 12 h 后吸出上清液。用含 5%山羊血清的封闭液室温封闭约 30 min。Saos-2 细胞转染 Orail siRNA 和 Control siRNA 后细胞计数。用移液器取 1×10^5 细胞接种于之前用 Matrigel 胶包被的孔中。将细胞培养板置于恒温培养箱中培养约 45 min 后,用移液器轻轻吸出上层培养液。用移液器取 100 μ L 含 0.2% 的 Cristal violet 溶液加入孔中,室温静置 15 min 染色。洗涤 2 次后将培养板静置培养板至其干燥。最后用移液器取 100 μ L 含 5%SDS 的乙醇滴入培养细胞的孔中,静置约 30 min 后,用酶标仪测定吸光值,并定量分析实验结果。

1.2.5 细胞划痕实验 Saos-2 细胞转染 Orail siRNA 和 Control siRNA 后细胞计数。取约 2×10^4 骨肉瘤细胞接种于 6 孔板中置于细胞培养箱中约 24 h。倒置显微镜下观察待细胞生长至完全融合后,用移液器头沿直尺在 6 孔板划痕,用细胞培养液洗涤细胞 6 孔板 3 次洗去悬浮的细胞后,每孔加入无血清培养基约 2 mL。即刻在倒置显微镜下拍照。然后将 6 孔板置于细胞培养箱中静置培养 24 h。24 h 后再次在倒置显微镜下拍照。分别测量 0 h 和 24 h 细胞划痕的宽度,然后计算细胞迁移率。每个独立实验重复 3 次。

1.2.6 细胞 Transwell 实验 取一无菌 24 孔细胞培养板,加入含 10%胎牛血清的细胞培养液板,加入含 10%胎牛血清的细胞培养液约 200 μ L。Saos-2 细胞转染 Orail siRNA 和 Control siRNA 后细胞计数。取约 2×10^4 骨肉瘤细胞接种于侵袭小室的上室,将侵袭小室置于 24 孔细胞培养板中,侵袭小室的下室的浸入细胞培养液中,然后将细胞培养板置于恒温细胞培养箱中。24h 后取出侵袭小室,去除侵袭小室上室中未穿过滤膜的细胞。取甲醛 200 μ L 固定滤膜上的细胞约 10 min。然后弃甲醛洗涤滤膜后取 200 μ L 苏木精-伊红染色滤膜上的细胞。小心切下滤膜置于载玻片上。倒置显微镜下任取 5-6 个视野观察并计数穿过侵袭小室滤膜的细胞。每个独立实验重复 3 次。

1.2.7 统计学分析 实验数据用 SPSS 13.0 软件进行 student-t 检验,实验结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 p 值小于 0.05 表示实验结果有统计学差异。

2 结果

2.1 靶向 Orail 的 siRNA 片段抑制骨肉瘤细胞 Orail 的表达与转录

我们将 Orail siRNA 和 Control siRNA 转染至 Saos-2 细胞中。然后我们采用 Western blot 和 Real Time-PCR 方法检测转染后 Saos-2 细胞中钙通道蛋白 Orail 的蛋白表达水平以及 Orail 的 mRNA 转录水平。结果表明,与转染 Control siRNA 对照组比较,转染 Orail siRNA 的 Saos-2 细胞中 Orail 的蛋白表达水平以及 Orail 的 mRNA 转录水平都明显下降,差异有统计学意义 ($p < 0.05$,图 1 和图 2)。

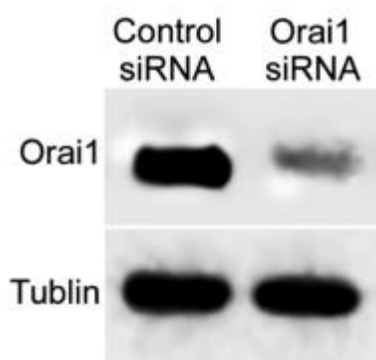


图1 Orai1 siRNA 对人骨肉瘤 Saos-2 细胞中 Orai1 蛋白表达的影响
Fig.1 Effect of Orai1 siRNA on the expression of Orai1 in human Saos-2 osteosarcoma cells

2.2 钙通道蛋白 Orai1 对骨肉瘤细胞黏附能力的影响

为明确钙通道蛋白 Orai1 的表达变化可否影响骨肉瘤细胞的粘附能力。我们将 Orai1 siRNA 和 Control siRNA 转染至 Saos-2 细胞后检测了 Saos-2 细胞的粘附能力。我们发现,与转染 Control siRNA 的对照组相比较,Saos-2 细胞转染 Orai1 siRNA 后细胞的黏附能力显著降低,差异有统计学意义 ($p < 0.05$, 图 3)。此结果提示降低钙通道蛋白 Orai1 后可显著抑制骨肉瘤细胞粘附能力。

2.3 钙通道蛋白 Orai1 对骨肉瘤细胞迁移能力的影响

为明确钙通道蛋白 Orai1 的表达变化可否影响骨肉瘤细

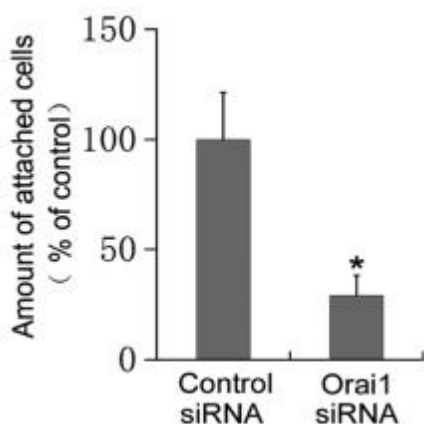


图3 Orai1 siRNA 对人骨肉瘤 Saos-2 细胞粘附能力的影响
Fig.3 Effect of Orai1 siRNA on adhesion ability of human Saos-2 osteosarcoma cells

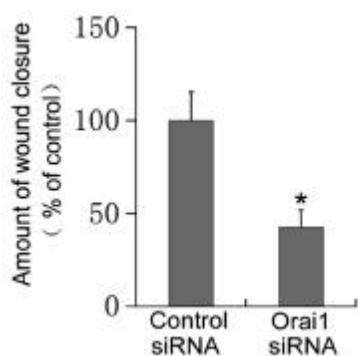


图4 Orai1 siRNA 对人骨肉瘤 Saos-2 细胞迁移能力的影响 (bar=100 μ m)

Fig.4 Effect of Orai1 siRNA on invasion ability of human Saos-2 osteosarcoma cells (bar=100 μ m)

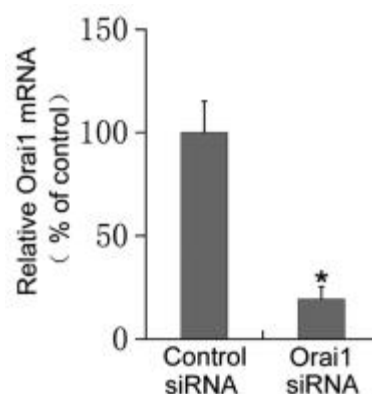


图2 Orai1 siRNA 对人骨肉瘤 Saos-2 细胞中 Orai1 mRNA 转录的影响
Fig.2 Effect of Orai1 siRNA on transcription of Orai1 in human Saos-2 osteosarcoma cells

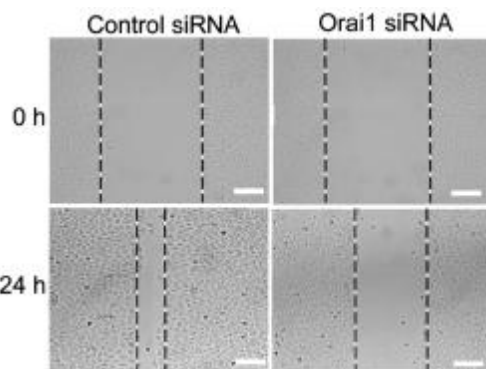
胞的迁移能力。我们将 Orai1 siRNA 和 Control siRNA 转染至 Saos-2 细胞后采用细胞划痕实验检测了 Saos-2 细胞的迁移能力。我们发现,与转染 Control siRNA 的对照组相比较,Saos-2 细胞转染 Orai1 siRNA 后细胞的迁移能力显著降低,差异有统计学意义 ($p < 0.05$, 图 4)。此结果提示:降低钙通道蛋白 Orai1 后可显著抑制骨肉瘤细胞的迁移能力。

2.4 钙通道蛋白 Orai1 对骨肉瘤细胞侵袭能力的影响

为明确钙通道蛋白 Orai1 的表达变化可否影响骨肉瘤细胞的侵袭能力。我们将 Orai1 siRNA 和 Control siRNA 转染至 Saos-2 细胞后采用细胞 Transwell 实验检测了 Saos-2 细胞的侵袭能力。我们发现,与转染 Control siRNA 的对照组相比较,Saos-2 细胞转染 Orai1 siRNA 后细胞的侵袭能力显著降低,差异有统计学意义 ($p < 0.05$, 图 5)。此结果提示:降低钙通道蛋白 Orai1 后可显著抑制骨肉瘤细胞的侵袭能力。

2.5 钙通道蛋白 Orai1 对骨肉瘤细胞黏着斑形成的影响

黏着斑激酶(Focal adhesion kinase, FAK)和桩蛋白(paxillin)是细胞黏着斑的主要组成部分。为明确钙通道蛋白 Orai1 的表达变化可否影响骨肉瘤细胞的黏着斑形成能力。我们将 Orai1 siRNA 和 Control siRNA 转染至 Saos-2 细胞后检测了 Saos-2 细胞的 FAK 和 Paxillin 的表达水平和磷酸化水平。我们发现,与转染 Control siRNA 的对照组相比较,Saos-2 细胞转染 Orai1 siRNA 后,细胞中 FAK 和 Paxillin 的表达无显著性变化 ($p < 0.05$, 图 6);然而,细胞中 FAK 和 Paxillin 的磷酸化水平均显著减低,差异有统计学意义 ($p < 0.05$, 图 6)。此



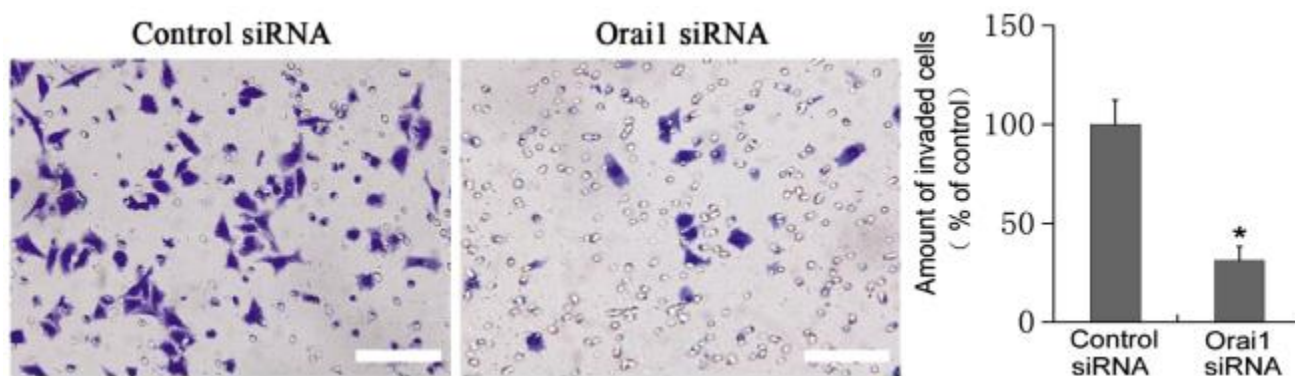
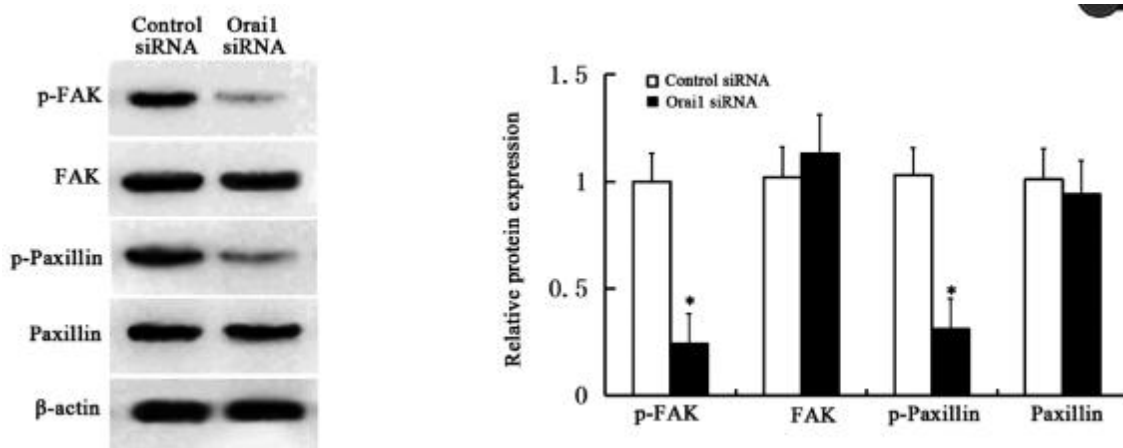
图5 Orai1 siRNA 对人骨肉瘤 Saos-2 细胞侵袭能力的影响(bar=100 μ m)Fig.5 Effect of Orai1 siRNA on migration ability of human Saos-2 osteosarcoma cells(bar=100 μ m)

图6 Orai1 siRNA 对人骨肉瘤 Saos-2 细胞黏着斑形成的影响

Fig.6 Effect of Orai1 siRNA on formation of focal adhesion of human Saos-2 osteosarcoma cells(bar=100 μ m)

结果提示:降低钙通道蛋白 Orai1 后可显著抑制骨肉瘤细胞的黏着斑的形成。

3 讨论

骨肉瘤多发生于 11-20 岁的青少年人群,发病部位多位于股骨远端和胫骨近端。早期发现的骨肉瘤以截肢治疗为主,然而截肢后仍百分之九十以上患者发生远隔器官的转移,从而导致骨肉瘤的预后非常差,5 年生存率不足百分之二十。据最新统计数据,约至少有百分之九十的骨肉瘤患者在发现骨肉瘤时已经发生了肺部微小病灶转移。并且,约百分之九十以上骨肉瘤患者,最终不是死于原发病灶,而是死于骨肉瘤转移所导致的远隔器官的衰竭^[1-4]。目前,骨肉瘤转移的早期发现与治疗仍是攻克骨肉瘤难点。因此,探索可早期干预骨肉瘤转移的分子靶点,将为攻克骨肉瘤提供新的方向。

细胞内的钙离子是一种负责信号转导的第二信使。然而细胞膜是半通透膜,钙离子不能自由进出。钙离子进入细胞内必须借助于细胞膜上的钙离子通道。因此,细胞膜上的钙离子通道是钙离子发挥第二信使作用的基础^[8-10]。大量研究证实细胞膜上的钙离子通道的异常与多种肿瘤的发生发展有关^[11-13]。Orai1 是一类定位于细胞膜介导钙离子内流的受体依赖性钙通道,它是一个四次跨膜蛋白^[14,15]。Orai1 是一种介导细胞外钙离子内流入细胞内的受体依赖性钙通道蛋白。表皮生长

因子、胰岛素样生长因子以及血小板衍生生长因子等这些细胞因子都可通过一些细胞信号转导通路激活受体依赖性钙通道。目前研究已发现 Orai1 介导受体依赖性钙离子内流的分子机制,具体如下。当某种细胞因子与其相应的受体结合后,可激活细胞内的磷脂酶 C。细胞内的磷脂酶 C 有激活磷酸酰肌醇激酶的活性。磷脂酶 C 水解磷脂酰肌醇 4,5 二磷酸产生三磷酸肌醇。三磷酸肌醇扩散至细胞内质网附近并与细胞内质网表面的三磷酸肌醇受体(IP3R)结合导致三磷酸肌醇受体构象改变而激活三磷酸肌醇受体。三磷酸肌醇受体激活后可介导内质网中的钙离子外流进入细胞浆内^[10-12]。STIM1 是定位于细胞内质网内的钙敏感蛋白,可在内质网中的钙离子外流、内质网钙离子浓度减低时被激活。当三磷酸肌醇受体激活后,内质网钙离子外流进入细胞浆,细胞内质网中的钙离子急剧减少。这时位于内质网膜上的 STIM1 会被激活。激活的 STIM1 会向细胞膜聚集并位于细胞膜上的 Orai1 结合。STIM1 与 Orai1 结合后引起 Orai1 的构象改变并形成四聚体形式的钙离子通道,介导细胞外的钙离子内流进入细胞内,完成受体依赖性钙离子内流^[16-20]。

大量研究发现钙通道蛋白 Orai1 过表达于多种肿瘤细胞,并对维持肿瘤细胞粘附、侵袭、迁移等恶性表型有非常重要的作用^[11-13]。有研究发现在黑色素瘤细胞中, Orai1 介导的钙离子信号通路可促进黑色素瘤细胞降解细胞外基质、从而促进黑色素瘤的侵袭和远隔器官的转移。另有研究发现在黑色素瘤细胞

中敲除 *Orail* 基因后,细胞中钙离子信号通路介导的 *CaMKI-I-Raf-1/2ERK* 信号通路的活性显著降低,并明显抑制了黑色素瘤细胞增殖。有研究发现在神经胶质瘤中,*Orail* 表达明显升高^[20-23]。在神经胶质瘤中抑制 *Orail* 能够显著减少受体依赖型钙离子内流并抑制细胞 *Pyk2* 的活性,从而抑制神经胶质瘤细胞侵袭和转移^[24-29]。然而,*Orail* 在骨肉瘤转移中的作用还未见报道。

肿瘤转移是一个涉及多个环节和多个步骤的复杂过程,肿瘤细胞黏附、迁移和侵袭能力与肿瘤的转移密切相关。肿瘤转移需要肿瘤细胞从原发灶向周围组织侵袭和迁移;需要肿瘤细胞突破基底膜和血管壁;需要肿瘤细胞黏附于靶器官。肿瘤细胞黏着斑的形成在肿瘤细胞黏附、迁移和侵袭过程中发挥重要作用。在肿瘤细胞转移过程中,细胞的前端向前伸出并合成粘着斑为细胞前部提供锚定点,进而牵引细胞向前移动,与此同时,细胞尾部粘着斑的去组装使细胞尾部回缩而完成转移过程^[26,27]。研究表明:*Orail* 作为细胞膜上的受体依赖性钙离子通道,可能通介导细胞外钙离子进入细胞内,从而增加钙离子作为第二信使的相关信号通路的活性。研究发现:钙离子可通过激活细胞内一些小 GTP 酶如 *Ras* 和 *Rac* 而激活 *FAK* 和 *paxillin*,从而加速细胞黏着斑的组装。细胞内钙离子通过加速细胞黏着斑的组装与去组装来促进肿瘤细胞的转移过程^[28-30]。粘着斑激酶(focal adhesion kinase, *FAK*)和桩蛋白(*paxillin*)在肿瘤细胞侵袭与迁移过程中发挥重要作用,它们不仅是细胞伪足的重要组成部分,也是介导肿瘤细胞转移的重要的信号通路调控分子。*FAK* 是定位于细胞质中的一种酪氨酸激酶,含羧基端、氨基端和激酶区这三个结构域。*FAK* 的羧基端有一聚焦粘附靶标的序列,这个序列可与 *paxillin* 结合而激活桩蛋白。研究表明,*FAK* 的活性与细胞迁移能力关系密切。在许多恶性肿瘤细胞中都发现了 *FAK* 的表达或者活性的异常。*FAK* 的表达或者活性的异常增高可显著增加肿瘤细胞的黏附、迁移、侵袭等能力。有研究发现,*FAK* 可促进肿瘤细胞分泌基质金属蛋白酶促进肿瘤细胞的侵袭^[31,32]。有研究发现,细胞内的钙离子可通过激活钙蛋白酶(*Calpain*)和钙调蛋白激酶调控 *FAK* 的磷酸化及去磷酸化,从而参与细胞黏着斑的组装与去组装来调控肿瘤细胞的转移^[33-35]。

本课题研究中,我们在骨肉瘤细胞中转染了靶向 *Orail* 的 siRNA 片段减低了骨肉瘤细胞 *Orail* 的表达。我们发现在骨肉瘤细胞降低 *Orail* 的表达后,骨肉瘤细胞黏附、迁移和侵袭等这些反映肿瘤转移能力指标均显著下降。进一步研究发现,在骨肉瘤细胞降低 *Orail* 的表达后,骨肉瘤细胞的 *FAK* 和 *paxillin* 磷酸化水平明显下降,提示黏着斑形成减少。

综上所述在骨肉瘤细胞钙通道蛋白 *Orail* 可以通过增加黏着斑的形成促进骨肉瘤细胞的黏附、迁移和侵袭,从而促进骨肉瘤的转移。因此,深入研究 *Orail* 参与调控骨肉瘤转移的分子机制,可为早期干预骨肉瘤的转移提供新的方向。

参考文献(References)

- [1] He JP, Hao Y, Wang XL, et al. Review of the molecular pathogenesis of osteosarcoma[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(15): 5967-5976
- [2] Mercatelli D, Bortolotti M, Bazzocchi A, et al. Immunoconjugates for Osteosarcoma Therapy: Preclinical Experiences and Future Perspectives[J]. *Bolognesi A, Polito L. Biomedicine*, 2018, 6(1), pii: E19
- [3] Tsiambas E, Fotiadis PP, Sioka C, et al. Novel molecular and metabolic aspects in osteosarcoma [J]. *J BUON*, 2017, 22 (6): 1595-1598
- [4] Jones KB, Salah Z, Del Mare S, et al. miRNA signatures associate with pathogenesis and progression of osteosarcoma [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(7): 1865-1877
- [5] Tanwar J, Motiani RK. Role of SOCE architects STIM and Orai proteins in Cell Death[J]. *Cell Calcium*, 2018, 6(9): 19-27
- [6] Dou Y, Xia J, Gao R, et al. Orai1 Plays a Crucial Role in Central Sensitization by Modulating Neuronal Excitability [J]. *J Neurosci*, 2018, 38(4): 887-900
- [7] Zhou Y, Meraner P, Kwon HT, et al. STIM1 gates the store-operated calcium channel ORAI1 in vitro[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 17(1): 112-116
- [8] Zeng B, Chen GL, Garcia-Vaz E, et al. ORAI channels are critical for receptor-mediated endocytosis of albumin [J]. *Nat Commun*, 2017, 8 (1): 1920
- [9] El Hachmane MF, Ermund A, Brännmark C, et al. Extracellular ATP activates store-operated Ca^{2+} entry in white adipocytes: functional evidence for STIM1 and ORAI1.[J]. *Biochem J*, 2018, 475 (3): 691-704
- [10] Uhlen P, Fritz N. Biochemistry of calcium oscillations [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396(1): 28-32
- [11] Zhu H, Zhang H, Jin F, et al. Elevated Orai1 expression mediates tumor-promoting intracellular Ca^{2+} oscillations in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(11): 3455-3471
- [12] Moccia F, Dragoni S, Poletto V, et al. Orai1 and transient receptor potential channels as novel molecular targets to impair tumor neovascularization in renal cell carcinoma and other malignancies[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2014, 14(2): 296-312
- [13] Gudlur A, Hogan PG. The STIM-Orai Pathway: Orai, the Pore-Forming Subunit of the CRAC Channel[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 99(3): 39-57
- [14] Choi S, Cui C, Luo Y, et al. Selective inhibitory effects of zinc on cell proliferation in esophageal squamous cell carcinoma through Orai1[J]. *Faseb J*, 2018, 32(1): 404-416
- [15] Zhou Y, Meraner P, Kwon HT, et al. STIM1 gates the store-operated calcium channel ORAI1 in vitro[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 17(1): 112-116
- [16] Zuccolo E, Laforenza U, Ferulli F, et al. Stim and Orai mediate constitutive Ca^{2+} entry and control endoplasmic reticulum Ca^{2+} refilling in primary cultures of colorectal carcinoma cells [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(57): 31098-31119
- [17] Wang W, Ren Y, Wang L, et al. Orai1 and Stim1 Mediate the Majority of Store-Operated Calcium Entry in Multiple Myeloma and Have Strong Implications for Adverse Prognosis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48(6): 2273-2285
- [18] Victoria L, Christoph R, Irene F, et al. STIM1 activation of Orai1 [J]. *Cell Calcium*, 2019, 77 (1): 29-38
- [19] Nam JH, Lee DU. Foeniculum vulgare extract and its constituent, trans-anethole, inhibit UV-induced melanogenesis via ORAI1 channel inhibition[J]. *J Dermatol Sci*, 2016, 84(3): 305-313

- [20] Umemura M, Baljinnyam E, Feske S, et al. Store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) regulates melanoma proliferation and cell migration[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): 89292
- [21] Wang Y, Bao X, Zhang Z, et al. FGF2 promotes metastasis of uveal melanoma cells via store-operated calcium entry [J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10(1): 5317-5328
- [22] Stanis H, Vultur A, Herlyn M, et al. The role of Orai-STIM calcium channels in melanocytes and melanoma [J]. *J Physiol*, 2016, 594(11): 2825-2835
- [23] Hooper R, Zhang X, Webster M, et al. Novel Protein Kinase C-Mediated Control of Orai1 Function in Invasive Melanoma[J]. *Mol Cell Biol*, 2015, 35(16): 2790-2798
- [24] Shi ZX, Rao W, Wang H, et al. Modeled microgravity suppressed invasion and migration of human glioblastoma U87 cells through downregulating store-operated calcium entry [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 457(3): 378-384
- [25] Zhu M, Chen L, Zhao P, et al. Store-operated Ca^{2+} entry regulates glioma cell migration and invasion via modulation of Pyk2 phosphorylation[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2014, 33(1): 98
- [26] Fonseca AV, Freund D, Bornhauser M. Polarization and migration of hematopoietic stem and progenitor cells rely on the RhoA/ROCK 1 pathway and an active reorganization of the microtubule network[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(41): 31661-31671
- [27] Park SJ, Kim YT, Jeon YJ. Antioxidant dieckol downregulates the Rac1/ROS signaling pathway and inhibits Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-family verprolin-homologous protein 2 (WAVE2)-mediated invasive migration of B16 mouse melanoma cells [J]. *Mol Cells*, 2012, 33(4): 363-369
- [28] Castillo-Lluya S, Tatham MH, Jones RC, et al. SUMOylation of the GTPase Rac1 is required for optimal cell migration [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(11): 1078-1085
- [29] Augustine MM, Fong Y. Epidemiology and Risk Factors of Biliary Tract and Primary Liver Tumors[J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2014, 23(2): 171-188
- [30] Nakamura F. FilGAP and its close relatives: a mediator of Rho-Rac antagonism that regulates cell morphology and migration[J]. *Biochem J*, 2013, 453(1): 17-25
- [31] Cao XY, Zhang XX, Yang MW, et al. Aberrant upregulation of KLK10 promotes metastasis via enhancement of EMT and FAK/SRC/ERK axis in PDAC [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 499(3): 584-593
- [32] Cheng Y, Gao XH, Li XJ, et al. Depression promotes prostate cancer invasion and metastasis via a sympathetic-cAMP-FAK signaling pathway[J]. *Oncogene*, 2018, 37(22): 2953-2966
- [33] Liu W, Ma K, Kwon SH, et al. The Abnormal Architecture of Healed Diabetic Ulcers Is the Result of FAK Degradation by Calpain 1 [J]. *J Invest Dermatol*, 2017, 137(5): 1155-1165
- [34] Shao H, Wang A, Lauffenburger D, et al. Tyro3-mediated phosphorylation of ACTN4 at tyrosines is FAK-dependent and decreases susceptibility to cleavage by m-Calpain [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 9(5): 73-84
- [35] Kerstein PC, Patel KM, Gomez TM. Calpain-Mediated Proteolysis of Talin and FAK Regulates Adhesion Dynamics Necessary for Axon Guidance[J]. *J Neurosci*, 2017, 37(6): 1568-1580

(上接第 1010 页)

- [21] Wang HH, Ma J, wang SP, et al. Magnetic anastomosis rings to create portacaval shunt in a canine model of portal hypertension [J]. *J Gastrointest Surg*, 2018.doi: 10.1007/s11605-018-3888-5[Epub ahead of print]
- [22] 严小鹏, 吕毅, 马佳, 等. 基于磁压榨技术的介入下肝外门腔分流器械的研制[J]. *中国医疗器械杂志*, 2013, 37(6): 421-422+436
- [23] Klima U, MacVaugh H, Bagaev E, et al. Magnetic Vascular Port in minimally invasive direct coronary artery bypass grafting [J]. *Circulation*, 2004, 110(11): 1155-60
- [24] Wang SP, Yan XP, Xue F, et al. Fast magnetic reconstruction of the portal vein with allogeneic blood vessels in canines [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2015, 14(3): 293-299
- [25] 严小鹏, 任冯刚, 刘雯雁, 等. 磁压榨技术联合内镜实施犬胃造瘘术[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2015, 18(8): 832-834
- [26] 严小鹏, 任冯刚, 刘雯雁, 等. 磁锚定技术联合磁压榨技术实现超微胃造瘘[J]. *中华实验外科杂志*, 2016, 33(2): 291-294
- [27] Uygun I, Okur MH, Arayici Y, et al. Magnetic compression ostomy for simple tube colostomy in rats-magnacolostomy [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2012, 21(3): 301-305
- [28] Uygun I, Okur MH, Cimen H, et al. Magnetic compression gastrostomy in the rat[J]. *Pediatr Surg Int*, 2012, 28(5): 529-532
- [29] 唐镇, 吴建勇, 陈溪. 不同镀膜钛铁硼磁体抗腐蚀性的体外实验研究[J]. *实用口腔医学杂志*, 2013, 29(2): 195-197
- [30] 曹晓明, 侯志明, 楚明. 镀氮化钛膜钛铁硼磁体细胞毒性的实验研究[J]. *上海口腔医学*, 2008, 17(2): 191-195
- [31] Liu XM, Yan XP, Zhang HK, et al. Magnetic anastomosis for biliojejunostomy: first prospective clinical trial [J]. *World J Surg*, 2018. doi: 10.1007/s00268-018-4710-y.[Epub ahead of print]
- [32] 严小鹏, 刘雯雁, 李涤尘, 等. 消化外科手术的内镜化途径: 磁吻合联合内镜[J]. *世界华人消化杂志*, 2014, 22(19): 2716-2721