

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.22.002

βig-h3 调控间充质样运动促进骨肉瘤的转移的研究 *

郭云山 郭 浩 朱金文 胡慧敏 王晓东 郝定均^Δ

(西安交通大学医学院附属红会医院 陕西 西安 710054)

摘要 目的:明确转化生长因子 β 诱导基因 - 克隆 3 (TGF-β-induced gene-human clone 3, βig-h3) 在调控骨肉瘤细胞间充质样运动中的作用。**方法:**将骨肉瘤 Saos-2 细胞转染 βig-h3 真核表达质粒(βig-h3 Vector)和空载体(Control Vector)以增加 βig-h3 的表达后,应用侵袭实验、黏附实验、划痕实验和明胶酶谱实验检测 βig-h3 过表达对骨肉瘤细胞的侵袭能力、黏附能力、迁移能力以及基质金属蛋白酶分泌能力的影响;Western-blot 实验检测 Saos-2 细胞的中黏着斑激酶(FAK)和桩蛋白(Paxillin)以及介导间充质样运动关键分子 Rac1 和 WAVE2 的表达水平和磷酸化水平。**结果:**骨肉瘤 Saos-2 细胞转染 βig-h3 真核表达质粒 24 小时后,细胞中 βig-h3 的蛋白和 mRNA 水平显著增加($P<0.05$)。βig-h3 过表达的骨肉瘤 Saos-2 细胞的侵袭、黏附、迁移及基质金属蛋白酶分泌能力、细胞伪足的重要成分黏着斑激酶(FAK)和桩蛋白(Paxillin)活性以及介导间充质样运动关键分子 Rac1 和 WAVE2 磷酸化水平均较空载体转染组均显著增加($P<0.05$)。**结论:**βig-h3 可能通过激活 Rac1-WAVE2 信号通路,促进骨肉瘤细胞侵袭、黏附、迁移、伪足形成以及基质金属蛋白酶的分泌,介导骨肉瘤细胞的间充质样运动,从而促进骨肉瘤转移。

关键词:βig-h3; 间充质样运动; 骨肉瘤; 转移

中图分类号:R-33; R738.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)22-4207-06

βig-h3 Promotes the Metastasis of Osteosarcoma by Regulating the Mesenchymal Mode Movement*

GUO Yun-shan, GUO Hao, ZHU Jin-wen, HU Hui-min, WANG Xiao-dong, HAO Ding-jun^Δ

(Xi'an Jiao Tong University-affiliated Hong Hui Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710054, China)

ABSTRACT Objective: To identify the role of transforming growth factor β-inducible gene-clone 3 (βig-h3) in the regulation of mesenchymal mode movement of osteosarcoma cells. **Methods:** In this study, βig-h3 eukaryotic expression plasmid (βig-h3 Vector) and empty carrier (Control Vector) were used to upregulate the expressions of βig-h3 in human osteosarcoma cells Saos-2. Cell invasion test, cell adhere test, monolayer wound healing assay and gelatin enzyme spectrum were used to test cells potential of invasion, adhesion, migration and MMPs secretion. Western-blot was used to test the phosphorylation levels of focal adhesion kinase (FAK) and pile protein (Paxillin), which were the important constituents of cell pseudo-foot and the phosphorylation levels of Rac1 and WAVE2, which were the key regulatory molecular of mesenchymal mode movement. **Results:** After transfection of βig-h3 eukaryotic expression plasmid (βig-h3 vector), We found that the protein and mRNA of βig-h3 were significant increased in Saos-2 cells ($P<0.05$). Moreover, we found that the numbers of attached cells, invaded cells, wound closure rate and MMPs secretion were significantly increased after transfection of βig-h3 eukaryotic expression plasmid (βig-h3 vector) ($P<0.05$). Furthermore, phosphorylated FAK, phosphorylated Paxillin, phosphorylated Rac1 and phosphorylated WAVE2 were markedly increased after transfection of βig-h3 eukaryotic expression plasmid (βig-h3 vector) ($P<0.05$). **Conclusion:** By activating the Rac1-wave2 signaling pathway, βig-h3 may regulate the mesenchymal mode movement and promotes the invasion, adhesion, migration, MMPs secretion and pseudo-foot formation in osteosarcoma cells, and thus promoting the metastasis of osteosarcoma.

Key words: βig-h3; Mesenchymal mode movement; Osteosarcoma; Metastasis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R738.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)22-4207-06

前言

肿瘤细胞转移是骨肉瘤最主要的恶性表型,是导致骨肉瘤患者预后不良的主要因素^[1-6]。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。

* 基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (81502330); 陕西省自然科学基金青年项目 (2016JQ8040); 中国博士后科学基金特别资助项目 (2017T100763); 中国博士后科学基金面上项目(2016M600805)

作者简介:郭云山(1983-),男,博士后,主要研究方向:骨外科学,E-mail: 183869503@qq.com

^Δ 通讯作者:郝定均(1959-),男,博士生导师,教授,主要研究方向:骨外科学,E-mail: haodingjun@126.com,电话:029-62818377

(收稿日期:2018-08-08 接受日期:2018-08-30)

间充质样运动是肿瘤细胞的最基本的运动形式,在肿瘤细胞局部侵袭过程中发挥重要作用^[7-9]。肿瘤细胞间充质样运动的特点是有蛋白水解酶和伪足参与,细胞侵袭、黏附、迁移能力强。转化生长因子 β 诱导基因-克隆3(TGF- β -induced gene-human clone 3, β ig-h3)是一种细胞外基质蛋白,在多种肿瘤细胞和组织表达异常,但在肿瘤进展中作为肿瘤抑制因子还是肿瘤促进因子,因肿瘤类型不同而具有显著的差异^[10-17]。我们既往的研究显示 β ig-h3 可促进骨肉瘤细胞转移^[18]。然而, β ig-h3 是否参与了骨肉瘤细胞间充质样运动目前未见相关报道。本研究旨在明确 β ig-h3 在骨肉瘤细胞间充质样运动中的作用,鉴定 β ig-h3 是否可作为治疗骨肉瘤转移的有效靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

β ig-h3 真核表达质粒(β ig-h3 Vector)由空军军医大学细胞工程研究中心构建。RPMI1640 细胞培养液购自美国 GIBCO BRL 公司;引物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 °C 及含 5 % CO₂ 的细胞培养箱中。24 小时后取出 24 孔板,显微镜下观察细胞状态良好,洗涤细胞 3 次,分别取 2 μ L (20 pmol) β ig-h3 真核表达质粒(β ig-h3 Vector)和空载体(Control Vector)溶于 98 μ L 无血清培养基,静置 10 分钟。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 分钟后,将这两种液体充分混匀后室温静置 25 分钟。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 °C 及含 5 % CO₂ 的细胞培养箱中培养。6 小时后弃转染液,更换为含血清的培养基,继续置于细胞培养箱中培养 18 小时。

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 °C, 30 min, 第二步 84 °C 30 sec。反应产物 4 °C 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 °C 5 min; 第二步 94 °C 60 sec、57 °C 30 sec、72 °C 30 sec, 共 30 个循环; 第三步 72 °C 5 min; 最后 4 °C 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 β ig-h3 真核表达质粒(β ig-h3 Vector)和空载体(Control Vector)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 分钟,SDS 电泳凝胶电泳后将蛋白转至 PVDF 膜,时间约 90 分钟。取出电转后的 PVDF 膜,用 5 % 脱脂奶粉封闭约 30 分钟,洗涤 PVDF 膜 4 次后, PVDF 膜表面孵育相应蛋白的特异性抗体 2

小时,洗膜 4 次后,加入相应 HRP 标记二抗孵育 1 小时,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 °C 冰箱。约 12 小时后吸出上清液。用含 5 % 山羊血清的封闭液室温封闭 30 分钟。Saos-2 细胞转染 β ig-h3 真核表达质粒(β ig-h3 Vector)和空载体(Control Vector)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 分钟后,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 分钟染色。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 分钟后,用酶标仪测定吸光值,并定量分析实验结果。

1.2.5 细胞迁移实验 Saos-2 细胞转染 β ig-h3 真核表达质粒(β ig-h3 Vector)和空载体(Control Vector)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 小时。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 小时。24 小时后,再次在倒置显微镜下拍照。分别测量 0 小时和 24 小时细胞划痕的宽度,然后计算细胞迁移率。每个独立实验重复 3 次。

1.2.6 细胞侵袭实验 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 β ig-h3 真核表达质粒(β ig-h3 Vector)和空载体(Control Vector)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。24 小时后取出侵袭小室,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 分钟。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 明胶酶谱实验 Saos-2 细胞转染 β ig-h3 真核表达质粒(β ig-h3 Vector)和空载体(Control Vector)后在无血清培养基培养 24 h 后收集上清液,然后调整使样品的蛋白总量使其处于同一水平。将样品与上样缓冲液充分混合后上样,然后进行 SDS 电泳。在 100 伏电压下电泳约 90 分钟。电泳结束后,将凝胶取下在洗脱液中洗脱 2 次后置于孵育液中。在 37 °C 条件下孵育 24 h 后用考马斯亮蓝染色液染色。染色 3 h 后用脱色液脱色 2 h。用凝胶成像系统拍照,并用软件统计条带的面积和灰度值,每个独立实验重复 3 次,数据进行统计学分析。

1.3 统计学分析

实验结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间用 SPSS 13.0 软件进行 student-t 检验,以 $P < 0.05$ 表示结果有统计学差异。

2 结果

2.1 β ig-h3 真核表达质粒促进骨肉瘤细胞 β ig-h3 的表达与转录

我们将 β ig-h3 真核表达质粒 (β ig-h3 Vector) 和空载体 (Control Vector) 转染至 Saos-2 细胞中, 然后采用 Western blot 和 Real Time-PCR 方法检测转染后 Saos-2 细胞中 β ig-h3 的蛋白以及 mRNA 的表达。结果显示: 相较于对照组, 转染 β ig-h3

真核表达质粒(β ig-h3 Vector)的 Saos-2 细胞中 β ig-h3 的蛋白以及 mRNA 表达都明显增加, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图 1 和图 2)。

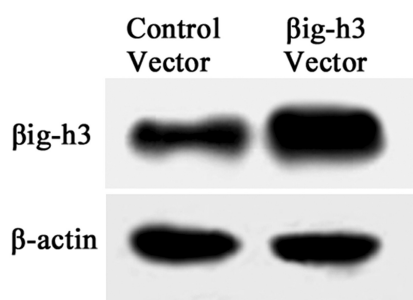


图 1 细胞转染 β ig-h3 真核表达质粒后, Saos-2 细胞中 β ig-h3 的蛋白表达

Fig.1 The protein expression of β ig-h3 in Saos-2 cells transfected by β ig-h3 Vector

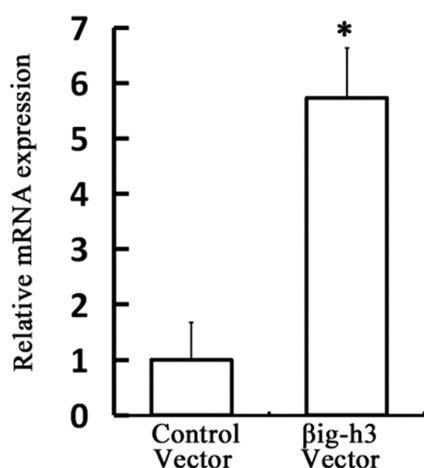
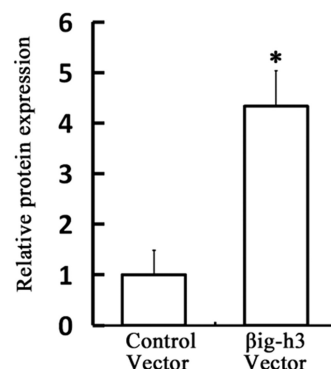


图 2 细胞转染 β ig-h3 真核表达质粒后, Saos-2 细胞中 β ig-h3 的 mRNA 表达

Fig.2 The mRNA expression of β ig-h3 in Saos-2 cells transfected by β ig-h3 Vector

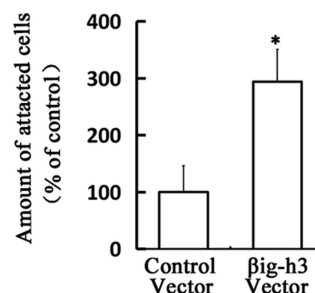
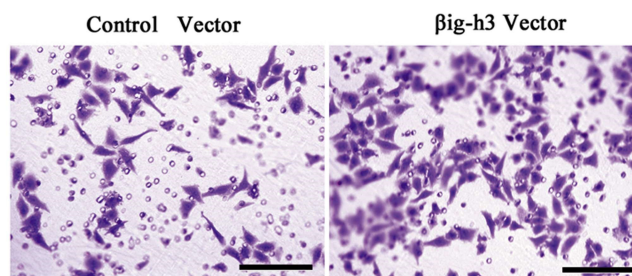


图 3 转染 β ig-h3 真核表达质粒对 Saos-2 细胞侵袭能力的影响
(bar=100 μ m)

Fig.3 The effect of β ig-h3 Vector transfection on the invasion ability of Saos-2 cells(bar=100 μ m)

2.2 β ig-h3 对骨肉瘤细胞侵袭能力的影响

为明确 β ig-h3 的表达变化可否影响骨肉瘤细胞的侵袭能力。我们将 β ig-h3 真核表达质粒 (β ig-h3 Vector) 和空载体 (Control Vector) 转染至 Saos-2 细胞后检测了 Saos-2 细胞的侵袭能力。结果显示: 相较于对照组, 细胞转染 β ig-h3 真核表达质粒(β ig-h3 Vector)的 Saos-2 细胞的侵袭能力显著增加, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图 3), 提示过表达 β ig-h3 后可显著增强骨肉瘤细胞的侵袭能力。

2.3 β ig-h3 对骨肉瘤细胞黏附能力的影响

为明确 β ig-h3 的表达变化可否影响骨肉瘤细胞的黏附能力。我们将 β ig-h3 真核表达质粒 (β ig-h3 Vector) 和空载体 (Control Vector) 转染至 Saos-2 细胞后, 检测了 Saos-2 细胞的黏附能力。结果显示: 相较于对照组, Saos-2 细胞转染 β ig-h3 真核表达质粒(β ig-h3 Vector)后细胞的黏附能力显著增加, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图 4), 提示过表达 β ig-h3 后可显著增强骨肉瘤细胞的黏附能力。

2.4 β ig-h3 对骨肉瘤细胞迁移能力的影响

为明确 β ig-h3 的表达变化可否影响骨肉瘤细胞的迁移能力。我们将 β ig-h3 真核表达质粒 (β ig-h3 Vector) 和空载体 (Control Vector) 转染至 Saos-2 细胞后检测了其迁移能力。结果显示: 相较于对照组, Saos-2 细胞转染 β ig-h3 真核表达质粒 (β ig-h3 Vector)后细胞的迁移能力显著增加, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图 5), 提示过表达 β ig-h3 后可显著增强骨肉瘤细胞的迁移能力。

2.5 β ig-h3 对骨肉瘤细胞基质金属蛋白酶分泌能力的影响

为明确 β ig-h3 的表达变化可否影响骨肉瘤细胞的基质金属蛋白酶分泌能力。我们将 β ig-h3 真核表达质粒(β ig-h3 Vector)和空载体 (Control Vector) 转染至 Saos-2 细胞后检测了其基质金属蛋白酶分泌能力。结果显示: 相较于对照组, 转染 β ig-h3

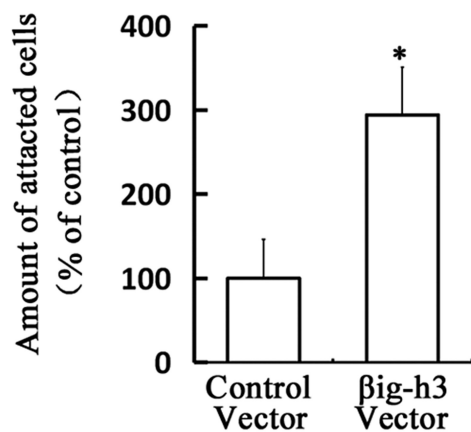


图4 转染 βig-h3 真核表达质粒对 Saos-2 细胞侵袭能力的影响

Fig.4 The effect of βig-h3 Vector transfection on the adhesion ability of Saos-2 cells

真核表达质粒(βig-h3 Vector)后 Saos-2 细胞分泌的 MMP-2 和 MMP-9 均显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$,图 6),提示过表达 βig-h3 后可显著增强骨肉瘤细胞的基质金属蛋白酶分泌能力。

2.6 βig-h3 对骨肉瘤细胞伪足形成能力的影响

黏着斑激酶(FAK)和桩蛋白(paxillin)是细胞伪足的主要组成部分^[19-21]。为明确 βig-h3 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 βig-h3 真核表达质粒(βig-h3 Vector)和空载体(Control Vector)转染至 Saos-2 细胞后检测了其黏着斑激酶(FAK)和桩蛋白(Paxillin)的表达水平和磷酸化水平。结果显示:相较于对照组,Saos-2 细胞转染 βig-h3 真核表达质粒(βig-h3 Vector)后,黏着斑激酶(FAK)和桩蛋白(Paxillin)的表达无显著性变化($P>0.05$,图 7);然而,细胞中黏着斑激酶(FAK)和桩蛋白(Paxillin)的磷酸化水平均显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$,图 7)。此结果提示过表达 βig-h3 后可显著促进骨肉瘤细胞的伪足形成。

2.7 βig-h3 对骨肉瘤细胞伪足形成能力的影响

在肿瘤细胞间充质样运动过程中,Rac1 和 WAVE 信号通路的激活至关重要。IP3 通过与 WAVE2 氮端 IP3 结合位点结合而使 WAVE2 定位在细胞膜上,并通过结合 Rac1 鸟嘌呤核苷酸交换因子促进 Rac1 的激活^[22-25]。活化的 Rac1 和定位在细胞膜上的 WAVE2 可一起激活 Arp2/3 复合体,进而启动细胞骨架的聚合,促进细胞伪足的形成,介导细胞运动^[26-29]。为了明

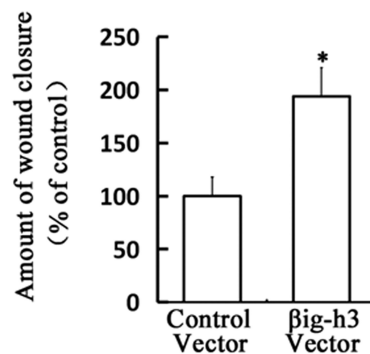
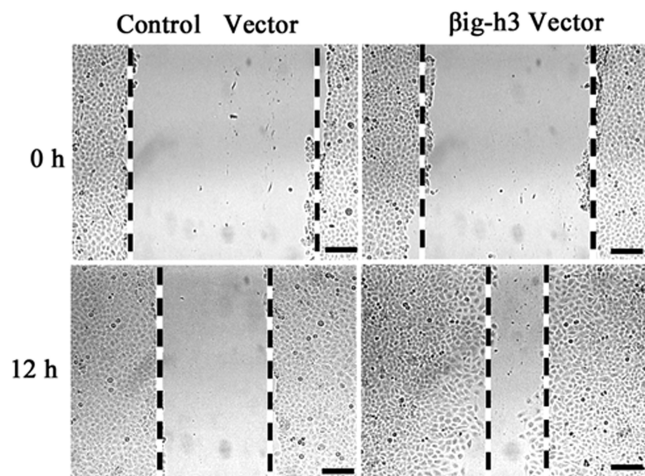


图5 转染 βig-h3 真核表达质粒对 Saos-2 细胞侵袭能力的影响

(bar=100 μm)

Fig.5 The effect of βig-h3 Vector transfection on the migration ability of Saos-2 cells(bar=100 μm)

确 βig-h3 可否调控骨肉瘤细胞的间充质样运动运动,我们在骨肉瘤 Saos-2 转染 βig-h3 真核表达质粒 (βig-h3 Vector) 增加 βig-h3 表达后,检测间充质样运动关键信号分子 Rac1、WAVE2 表达及磷酸化水平。结果显示:相较于对照组,Saos-2 细胞转染 βig-h3 真核表达质粒(βig-h3 Vector)后,细胞间充质样运动关键信号分子 Rac1 和 WAVE2 表达的无显著性变化($P>0.05$,图 8);然而,细胞中 Rac1 和 WAVE2 的磷酸化水平均显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$,图 8)。此结果提示:过表达 βig-h3 后可显著促进骨肉瘤细胞的间充质样运动关键信号分子 Rac1 和 WAVE2 的激活。βig-h3 可通过激活 Rac1-WAVE2 信号通路介导骨肉瘤细胞的间充质样运动,从而

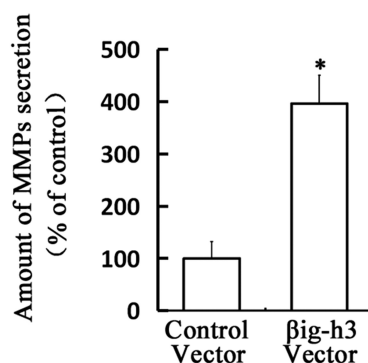
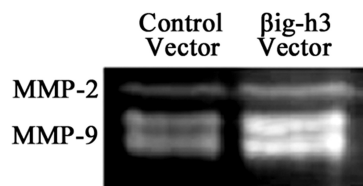


图6 转染 βig-h3 真核表达质粒对 Saos-2 细胞分泌基质金属蛋白酶(MMP-2 和 MMP-9)能力的影响

Fig.6 The effect of βig-h3 Vector transfection on the MMPs secretion ability of Saos-2 cells

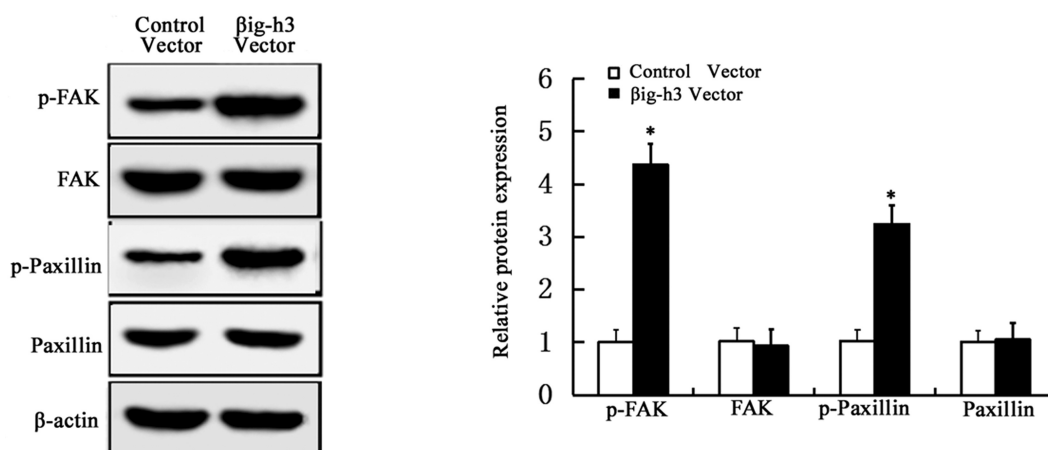


图7 转染 βig-h3 真核表达质粒对 Saos-2 细胞 FAK 与 Paxillin 的活性的影响

Fig.7 The effect of βig-h3 Vector transfection on the activity and expression of FAK and Paxillin of Saos-2 cells

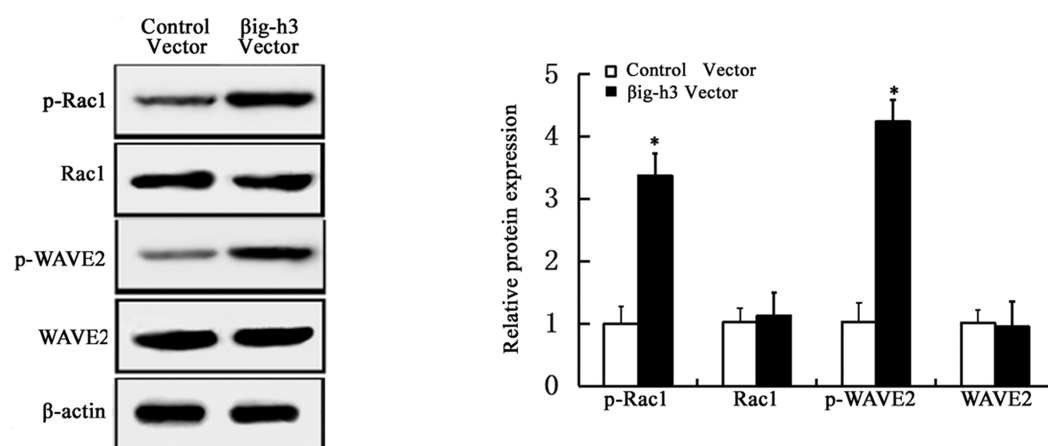


图8 转染 βig-h3 真核表达质粒对 Saos-2 细胞 Rac1 与 WAVE2 的活性的影响

Fig.8 The effect of βig-h3 Vector transfection on the activity and expression of Rac1 and WAVE2 of Saos-2 cells

促进骨肉瘤转移。

3 讨论

肿瘤细胞转移是骨肉瘤最主要的恶性表型,是导致骨肉瘤患者预后不良的主要因素。据最新统计数据显示,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,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^[1-6]。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。

βig-h3 是一种细胞外基质蛋白, 包含 4 个 FAS 内部重复结构域、1 个 N- 末端信号肽和 1 个 C- 末端 RGD (精氨酸 - 甘氨酸 - 天冬氨酸)基序。大量研究结果表明 βig-h3 分子在多种肿瘤细胞和组织表达异常,但其在肿瘤进展中作为肿瘤抑制因子还是肿瘤促进因子, 却因肿瘤类型不同而发生显著的差异^[10-17]。我们前期的研究发现 βig-h3 在骨肉瘤细胞与 Integrin α2β1 不仅在细胞膜上存在共定位,还存在免疫共沉淀。βig-h3 能通过与 Integrin α2β1 相互作用,激活 PI3K 信号通路,从而促进骨肉瘤转移^[18]。

肿瘤转移是一个涉及多个环节和多个步骤的复杂过程,细

胞运动在肿瘤转移过程中发挥着非常重要的作用。肿瘤细胞从原发灶向周围组织侵袭扩散、肿瘤细胞突破基底膜和血管壁迁入血液循环,肿瘤细胞渗出血管捕获和粘附靶器官等一系列连续过程都离不开细胞运动^[30-33]。然而 βig-h3 是否通过调控细胞运动从而促进骨肉瘤转移,目前国内外尚未见报道。

细胞间充质样运动又称为动力依赖型迁移,是肿瘤细胞最基本的运动形式。细胞间充质样运动的步骤是在细胞运动的前端,局部细胞膜向前伸出形成伪足,伪足黏附到基底膜后细胞骨架收缩,引起细胞位置的整体向前移动,然后细胞尾部脱黏附并回缩,细胞整体向前滑动。间充质样运动的特点是细胞侵袭、黏附、迁移能力强,有蛋白水解酶和伪足参与,主要在肿瘤细胞局部侵袭过程中发挥作用^[7-9]。本研究中,我们在 Saos-2 细胞中转染 βig-h3 真核表达质粒(βig-h3 Vector)增加 βig-h3 表达后,Saos-2 细胞的侵袭、黏附、迁移能力及基质金属蛋白酶的分泌能力均显著增强。FAK 和 Paxillin 是细胞伪足的主要组成部分^[19-21]。细胞伪足的形成在细胞间充质样运动中发挥重要作用。本研究中,Saos-2 细胞中转染 βig-h3 真核表达质粒(βig-h3 Vector)增加 βig-h3 表达后,Saos-2 细胞的细胞伪足重要组成部分的 FAK 和 Paxillin 的活性均显著增加,提示 βig-h3 可促进骨肉瘤细胞的伪足形成。以上的实验结果证实了在骨肉瘤细胞增加 βig-h3 表达后,细胞出现了侵袭、黏附、迁移能力增强、

MMP-2 和 MMP-9 的分泌能力增强、细胞的伪足形成能力增强等细胞间充质样运动的特点,提示 β ig-h3 可促进骨肉瘤细胞的间充质样运动。

介导间充质样运动的主要信号通路是 Rac1-WAVE2 信号通路。Rac1 分子活化后诱导肌动蛋白在细胞前缘聚合,促使细胞形成伪足。细胞伪足的形成产生了细胞向前运动的驱动力,并使细胞极化伸长,形成长梭形的状态。WAVE2 是 Rac1 下游重要的效应分子,Rac1 通过激活 WAVE2 诱导细胞伪足形成和分泌基质金属蛋白酶^[22-25]。本研究中,我们在人骨肉瘤 Saos-2 中转染 β ig-h3 真核表达质粒(β ig-h3 Vector)增加 β ig-h3 表达后,介导间充质样运动的关键信号分子 Rac1 和 WAVE2 的活性均显著增加,提示 β ig-h3 可激活介导间充质样运动的主要信号通路是 Rac1-WAVE2 信号通路, β ig-h3 可调控骨肉瘤细胞的间充质样运动。有文献报道 Integrin β 1 下游效应分子 PI3K 活化后的产物 IP3 在细胞膜上的聚集。IP3 通过与 WAVE2 氮端 IP3 结合位点结合而使 WAVE2 定位在细胞膜上,并通过结合 Rac1 鸟嘌呤核苷酸交换因子促进 Rac1 的激活。活化的 Rac1 和定位在细胞膜上的 WAVE2 可一起激活 Arp2/3 复合体,进而启动细胞骨架的聚合,促进细胞伪足的形成,介导细胞运动^[26-29]。 β ig-h3 中的 RGD 基序可与多种 Integrin 识别。我们之前的研究结果发现在骨肉瘤 Saos-2 细胞, β ig-h3 与 Integrin α 2 β 1 不仅在细胞膜上存在共定位,还存在免疫共沉淀。 β ig-h3 可通过 Integrin α 2 β 1 激活下游 PI3K 信号通路,促进骨肉瘤转移^[8]。因此, β ig-h3 可能是通过与 Integrin α 2 β 1 的相互作用,激活下游 PI3K 信号通路,从而激活介导间充质样运动的主要信号通路 Rac1-WAVE2,调控骨肉瘤的间充质样运动。

综上所述, β ig-h3 通过激活 Rac1-WAVE2 信号通路,介导骨肉瘤细胞的间充质样运动,促进骨肉瘤转移。然而, β ig-h3 调控骨肉瘤细胞运动的具体分子机制,还待进一步深入研究。因此,深入探讨 β ig-h3 参与调控骨肉瘤细胞运动的分子机制,从而更全面的认识骨肉瘤转移过程,有助于揭示骨肉瘤转移的调控机制,可为骨肉瘤转移的临床诊治提供新的线索和靶点。

参考文献(References)

- [1] Ahmed G, Zamzam M, Kamel A, et al. Effect of timing of pulmonary metastasis occurrence on the outcome of metastasectomy in osteosarcoma patients [J]. J Pediatr Surg, 2018, S0022-3468 (18): 30394-4
- [2] Mercatelli D, Bortolotti M, Bazzocchi A, et al. Immunoconjugates for Osteosarcoma Therapy: Preclinical Experiences and Future Perspectives. Bolognesi A, Polito L[J]. 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] 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
- [5] Li G, Li L, Sun Q, et al. MicroRNA-3200-5p Promotes Osteosarcoma Cell Invasion via Suppression of BRMS1 [J]. Mol Cells, 2018, 41(6): 523-531
- [6] Li B, Wang Z, Wu H, et al. Epigenetic Regulation of CXCL12 Plays a Critical Role in Mediating Tumor Progression and the Immune Response In Osteosarcoma[J]. Cancer Res, 2018, 78(14): 3938-3953
- [7] Margheri F, Luciani C, Taddei ML, et al. The receptor for urokinase-plasminogen activator (uPAR) controls plasticity of cancer cell movement in mesenchymal and amoeboid migration style [J]. Oncotarget, 2014, 5(6): 1538-1553
- [8] 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
- [9] Huang XG, Chen YZ, Zhang ZT, et al. Rac1 modulates the vitreous-induced plasticity of mesenchymal movement in retinal pigment epithelial cells[J]. Clin Exp Ophthalmol, 2013, 41(8): 779-87
- [10] Ween MP, Oehler MK, Ricciardelli C. Transforming growth Factor-Beta-Induced Protein (TGFB1) (β ig-H3): a matrix protein with dual functions in ovarian cancer[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(8): 10461-10477
- [11] Schwanekamp JA, Lorts A, Sargent MA, et al. TGFB1 functions similar to periostin but is uniquely dispensable during cardiac injury [J]. PLoS One, 2017, 12(7): e0181945
- [12] Li Z, Miao Z, Jin G, et al. β ig-h3 supports gastric cancer cell adhesion, migration and proliferation in peritoneal carcinomatosis[J]. Mol Med Rep, 2012, 6(3): 558-564
- [13] Zhang J, Li Z. β -inducible gene-h3 promotes human breast carcinoma cell metastasis by activating the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway [J]. Exp Ther Med, 2018, 15 (3): 2910-2916
- [14] Tumbarello DA, Andrews MR, Brenton JD. SPARC Regulates Transforming Growth Factor Beta Induced (TGFB1) Extracellular Matrix Deposition and Paclitaxel Response in Ovarian Cancer Cells [J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0162698
- [15] Zhang J, Li Z. β -inducible gene-h3 promotes human breast carcinoma cell metastasis by activating the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway [J]. Exp Ther Med, 2018, 15 (3): 2910-2916
- [16] Allaman-Pillet N, Oberson A, Schorderet DF. β ig-h3 silencing increases retinoblastoma tumor growth in the murine SV40-TAg-Rb model[J]. Oncotarget, 2017, 8(9): 15490-15506
- [17] Chen WY, Tsai YC, Yeh HL, et al. Loss of SPDEF and gain of TGFB1 activity after androgen deprivation therapy promote EMT and bone metastasis of prostate cancer[J]. Sci Signal, 2017, 10(492): pii: eaam6826
- [18] Guo YS, Zhao R, Ma J, et al. β ig-h3 promotes human osteosarcoma cells metastasis by interacting with Integrin α 2 β 1 and activating PI3K signaling pathway[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e90220
- [19] Zhang Y, Peng X, Zheng Q. Ropivacaine inhibits the migration of esophageal cancer cells via sodium-channel-independent but prenylation-dependent inhibition of Rac1/JNK/paxillin/FAK [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 501(4): 1074-1079
- [20] Dubois F, Alpha K, Turner CE. Paxillin regulates cell polarization and anterograde vesicle trafficking during cell migration[J]. Mol Biol Cell, 2017, 28(26): 3815-3831
- [21] 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

- Pressure or Porto-systemic Gradient Really A Harbinger of Poor Outcomes After Living Donor Liver Transplantation?[J]. *J Clin Exp Hepatol*, 2017, 7(3): 235-246
- [19] Wang L, He F, Yue Z, et al. Techniques and long-term effects of transjugular intrahepatic portosystemic shunt on liver cirrhosis-related thrombotic total occlusion of main portal vein[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10868
- [20] Krautbauer S, Rein-Fischboeck L, Haberl EM, et al. Circulating fibroblast growth factor 21 in patients with liver cirrhosis[J]. *Clin Exp Med*, 2018, 18(1): 63-69
- [21] Wang J, Lu W, Li J, et al. Hemodynamic effects of renin-angiotensin-aldosterone inhibitor and β -blocker combination therapy vs. β -blocker monotherapy for portal hypertension in cirrhosis: A meta-analysis[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(5): 1977-1985
- [22] Nakagawa A, Atsukawa M, Tsubota A, et al. Usefulness of portal vein pressure for predicting the effects of tolvaptan in cirrhotic patients[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(21): 5104-5113
- [23] Gu LH, Fang H, Li FH, et al. Preoperative hepatic hemodynamics in the prediction of early portal vein thrombosis after liver transplantation in pediatric patients with biliary atresia [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2015, 14(4): 380-385
- [24] Qi X, Li H, Liu X, et al. Novel insights into the development of portal vein thrombosis in cirrhosis patients [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, 9(11): 1421-1432
- [25] Yang S, He C, Fan X, et al. Early prophylactic anticoagulation via transjugular intrahepatic route for portal vein thrombosis after splenectomy in cirrhotic portal hypertension[J]. *J Vasc Interv Radiol*, 2015, 26(7): 1009-1017
- [26] Abdel-Razik A, Mousa N, Elhelaly R, et al. De-novo portal vein thrombosis in liver cirrhosis: risk factors and correlation with the Model for End-stage Liver Disease scoring system [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2015, 27(5): 585-592
- [27] Franzoni Lde C, de Carvalho FC, Garzon RG, et al. Embolization of splenorenal shunt associated to portal vein thrombosis and hepatic encephalopathy [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20 (42): 15910-15915
- [28] Zahr Eldeen F, Al Sebayel M. Passing loop technique for portal inflow modulation in liver recipients with partial portal vein thrombosis: a case report [J]. *Exp Clin Transplant*, 2014, 12(4): 374-376
- [29] Yabuta M, Shibata T, Shibata T, et al. Long-term outcome of percutaneous transhepatic balloon angioplasty for portal vein stenosis after pediatric living donor liver transplantation: a single institute's experience[J]. *J Vasc Interv Radiol*, 2014, 25(9): 1406-1412
- [30] Moon DB, Lee SG, Ahn CS, et al. Restoration of portal flow using a pericholedochal varix in adult living donor liver transplantation for patients with total portosplenomesenteric thrombosis [J]. *Liver Transpl*, 2014, 20(5): 612-615

(上接第 4212 页)

- [22] Wang J, Feng Y, Chen X, et al. SH3BP1-induced Rac-Wave2 pathway activation regulates cervical cancer cell migration, invasion, and chemoresistance to cisplatin [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(2): 1733-1745
- [23] Yamamoto K, Maruyama K, Himori N, et al. The novel Rho kinase (ROCK) inhibitor K-115: a new candidate drug for neuroprotective treatment in glaucoma [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(11): 7126-7136
- [24] Deng Q, Tian YX, Liang J. Mangiferin inhibits cell migration and invasion through Rac1/WAVE2 signalling in breast cancer [J]. *Cytotechnology*, 2018, 70(2): 593-601
- [25] Mizoguchi T, Ikeda S, Watanabe S, et al. Mib1 contributes to persistent directional cell migration by regulating the Ctnnd1-Rac1 pathway[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(44): E9280-E9289
- [26] Qu H, Sun H, Wang X. Neogenin-1 promotes cell proliferation, motility, and adhesion by up-regulation of zinc finger e-box binding homeobox 1 Via activating the Rac1/PI3K/AKT pathway in gastric cancer Cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48(4): 1457-1467
- [27] Xiao Y, Li Y, Tao H, et al. Integrin $\alpha 5$ down-regulation by miR-205 suppresses triple negative breast cancer stemness and metastasis by inhibiting the Src/Vav2/Rac1 pathway [J]. *Cancer Lett*, 2018, 433: 199-209
- [28] Wang Y, Hu L, Ji P, et al. Erratum to: MIIP remodels Rac1-mediated cytoskeleton structure in suppression of endometrial cancer metastasis [J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 163
- [29] Jansen S, Gosens R, Wieland T, et al. Paving the Rho in cancer metastasis: Rho GTPases and beyond[J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 183: 1-21
- [30] Bradbury P, Fabry B, O'Neill GM. Occupy tissue: the movement in cancer metastasis[J]. *Cell Adh Migr*, 2012, 6(5): 424-432
- [31] Lo HC, Zhang XH. EMT in metastasis: finding the right balance[J]. *Dev Cell*, 2018, 45(6): 663-665
- [32] Gao R, Yu Y, Inoue A, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP-K) promotes tumor metastasis by induction of genes involved in extracellular matrix, cell movement, and angiogenesis[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(21): 15046-15056
- [33] Flamini MI, Uzair ID, Pennacchio GE, et al. Thyroid Hormone Controls Breast Cancer Cell Movement via Integrin $\alpha V/\beta 3$ /SRC/FAK/PI3-Kinases[J]. *Horm Cancer*, 2017, 8(1): 16-27