

溶血磷脂酸通过调控 PI3K/AKT 信号通路对骨肉瘤细胞黏附和迁移的作用

王清富¹, 朱立新², 秦爱萍², 陈铁峰¹, 李金盘¹, 吴北太¹, 余晓¹,
赖忠安¹, 谢维雄¹

(1. 茂名市电白区人民医院, 广东 茂名 525400; 2. 南方医科大学, 广东 广州 525400)

摘要: [目的] 研究溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid, LPA)在骨肉瘤细胞黏附和迁移中的作用及其相关分子机制。[方法] 通过黏附和划痕实验观察细胞黏附和迁移能力; q-PCR 和 Western blot 检测骨肉瘤细胞系(Mg-63, SaOS-2, HOS-8603)中溶血磷脂酸受体(lysophosphatidic acid receptor, LPAR)的表达, 分析 LPAR 的表达与肿瘤细胞迁移侵袭之间的关系; 黏附和划痕实验检测 LPA 处理后对骨肉瘤细胞黏附和迁移的影响; Western Blot 检测 LPA 对骨肉瘤细胞黏附和迁移相关信号通路蛋白的影响。[结果] 细胞黏附和迁移能力检测结果显示 Mg-63 细胞的黏附和迁移能力最强, SaOS-2 细胞黏附和迁移能力最弱。细胞中 LPAR 检测结果显示 Mg-63、SaOS-2、HOS-8603 三株细胞中 LPAR1、LPAR2、LPAR3 均有不同程度的表达, 其中 Mg-63 细胞中 LPAR1、LPAR2、LPAR3 表达均为最高。LPA 处理 SaOS-2 细胞后, 其黏附和迁移能力均明显下降; Western Blot 结果显示 LPA 处理后, SaOS-2 细胞中 PI3K、p-AKT、CD44 表达均明显上调。[结论] LPA 可能主要通过 PI3K/AKT 通路促进骨肉瘤细胞黏附和迁移。

关键词: 溶血磷脂酸; 骨肉瘤; 黏附; 迁移; PI3K/AKT 信号通路
中图分类号: R738.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)04-0320-05
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.04.B007

Lysophosphatidic Acid Promotes Adhesion and Migration of Osteosarcoma Cells through PI3K/AKT Signaling Pathway

WANG Qin-fu¹, ZHU Li-xin², QIN Ai-ping², CHEN Tie-feng¹, LI Jin-pan¹, WU Bei-dai¹,
YU Xiao¹, LAI Zhong-an¹, XIE Wei-xiong¹

(1. Dianbai People's Hospital, Maoming 525400, China; 2. Southern Medical University, Guangzhou 525400, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of lysophosphatidic acid (LPA) on the adhesion and migration of osteosarcoma cells and the related molecular mechanisms. [Methods] Osteosarcoma Mg-63, SaOS-2 and HOS-8603 cells were treated with LPA and the cell adhesion and migration were detected by adhesion and scratches assay. The expression of lysophospholipidic acid receptor (LPAR) mRNA and protein in osteosarcoma cells was detected by q-PCR and Western blot, respectively. The relationship between the expression of LPAR and cell migration was analyzed. The expression of proteins related to cell adhesion and migration was detected by Western blot. [Results] The adhesion and migration of Mg-63 cells were more marked than that of other two cell lines. The expression of LPAR1, LPAR2 and LPAR3 was all detected in Mg-63, SaOS-2 and HOS-8603 cells, and the expression in Mg-63 cells was the highest. After LPA treatment, the adhesion and migration of SaOS-2 cells decreased significantly. Western blot showed that the expression of PI3K, p-AKT, CD44 was significantly up-regulated after LPA treatment. [Conclusion] LPA promotes adhesion and migration of osteosarcoma cells, in which the PI3K/AKT signaling pathway is involved.

Subject words: LPA; osteosarcoma; adhesion; migration; PI3K/AKT pathway

骨肉瘤是最常见的原发性恶性骨肿瘤之一, 是

一种起源于间叶组织的恶性肿瘤, 以能产生骨样组织的梭形基质细胞为主要特征, 多发于 10~20 岁的青少年人群, 其具有发病率高, 转移率较高, 且发展迅速, 预后差等特点^[1,2]。目前骨肉瘤治疗多采用手术联合化疗方案, 但是预后较差, 患者 5 年生存率仅

基金项目: 广东省省级科技计划项目(2014A020212378)

通信作者: 王清富, 副主任医师, 博士; 茂名市电白区人民医院外一科, 广东省茂名市电白区水东镇上排路 3 号(525400); E-mail: wqf789546@163.com

收稿日期: 2017-06-12; **修回日期:** 2017-12-19

为 55%~68%^[3,4]。

溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid, LPA)是细胞内磷脂类生物合成的关键性前体,溶血磷脂的活性成分之一,是迄今为止发现的一种最小、结构最简单的磷脂^[5,6]。LPA作为一种重要的细胞间的磷脂类信使,在正常生理状态下可以激活G蛋白耦联受体,促进细胞有丝分裂、影响细胞形态等作用^[7]。近年来多项研究发现癌变组织中LPA的表达远高于正常组织,LPA在血清中的含量可作为卵巢癌、骨癌、子宫内膜癌以及宫颈癌等肿瘤诊断的早期标志或预后指标,也有报道称LPA参与了肿瘤发生的多个过程,而且能够直接影响肿瘤细胞的侵袭和转移能力^[8-10]。目前,LPA在骨肉瘤侵袭和转移过程中作用的相关研究仍少见报道,本文通过研究LPA与骨肉瘤黏附迁移的关系,揭示LPA在骨肉瘤侵袭和转移过程中的作用以及内在的分子机制,为骨肉瘤的早期诊断和分子治疗提供一定的指导意义。

1 材料与方法

1.1 试剂

骨肉瘤Mg-63、SaOS-2、HOS-8603细胞株,购自中科院上海细胞所;LPA购自北京基尼亚生物技术有限公司;DMEM培养基、FBS、0.25%Trypsin购自美国Hyclone公司;RT-qPCR试剂盒购自takara公司;LPAR1、LPAR2、LPAR3单抗购自美国Abcam公司;PI3K多抗、AKT多抗、p-AKT多抗、CD44多抗、鼠抗 β -actin单抗购自美国Proteintech公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔、羊抗鼠抗体购自北京中杉金桥公司。

1.2 仪器

倒置显微镜:日本Sony公司;CO₂细胞孵箱:美国Thermo Fisher公司;垂直电泳蛋白转印系统:北京六一;超净工作台:苏州安泰公司;凝胶成像系统:美国Bio-Rad公司。

1.3 方法

1.3.1 黏附实验

无血清培养基将Matrigel配置成0.04 μ g/ μ l,每孔50 μ l铺于96孔板中,于培养箱中30min使其凝固,用无血清的培养液100 μ l加入96孔板中洗去多余的Matrigel,按每孔 4×10^4 细胞接种到铺有Ma-

trigel胶的96孔板中,设置3次重复,于37℃、5%CO₂培养箱中培养2h,用PBS轻轻洗去未黏附细胞,每孔加入10 μ l CCK-8,继续培养4h,在酶标仪450nm处测定吸光值。

1.3.2 划痕实验

按每孔 4×10^6 细胞接种到6孔板中,于37℃、5%CO₂培养箱中培养过夜,待其良好贴壁,用枪头在细胞中央小心划痕,PBS清洗3次去除划下的细胞,加入2ml无血清培养基于37℃、5%CO₂培养箱中培养,24h后取样拍照。

1.3.3 q-PCR和Western Blot检测细胞中LPAR的表达

收集细胞,PBS吹打清洗2次,加入按每 1×10^6 个细胞1ml的体积加Trizol试剂提取RNA。根据RT-PCR试剂盒说明书操作,检测细胞中LPAR1、LPAR2、LPAR3的mRNA表达。

收集细胞,PBS吹打清洗2次,加入按每 1×10^6 个细胞1ml的量加RIPA细胞裂解液,高速低温离心取上清。BCA染色法测定蛋白质浓度,Western Blot检测细胞中LPAR1、LPAR2、LPAR3蛋白的表达,抗体稀释比例(LPARI、LPAR2、LPAR3:1:1000; β -actin:1:1000)。

1.3.4 LPA处理SaOS-2细胞

用去离子水溶解LPA,配制成的10mmol/L的储存液,4℃待用。取生长处于对数期的Mg-63、SaOS-2、HOS-8603细胞,铺设6孔板,标记为LPA处理和空白对照组两组,待细胞良好贴壁后进行处理。LPA处理组用10 μ mol/L的终浓度处理细胞,空白对照组添加等体积的培养基,处理24h后用胰酶消化细胞,计数,进行后续黏附和迁移实验。

1.3.5 Western Blot检测细胞内黏附和迁移相关蛋白表达

收集细胞,PBS吹打清洗2次,加入按每 1×10^6 个细胞1ml的量加RIPA细胞裂解液,高速低温离心取上清,BCA染色法测定蛋白质浓度,Western Blot检测细胞中蛋白的表达,抗体稀释比例(PI3K:1:1000;AKT:1:1000;p-AKT:1:2000;CD44:1:1000; β -actin:1:1000)。

1.4 统计学处理

实验所有数据均采用SPSS17.0软件进行统计学处理和Graphpad prism 5作图,计量资料比较采

用 *F* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 黏附实验检测结果

黏附实验检测结果显示骨肉瘤细胞 Mg-63、SaOS-2 和 HOS-8603 OD₄₅₀ 分别为 0.86±0.06、0.41±0.01、0.51±0.02, 三组细胞 OD₄₅₀ 比较差异有统计学意义, Mg-63 细胞的黏附能力明显高于 SaOS-2、HOS-8603 细胞 (*t*=22.194, 16.602, *P* 均<0.01), 见 Figure 1。划痕实验检测结果显示骨肉瘤细胞 Mg-63、SaOS-2、HOS-8603 中 Mg-63 细胞的迁移能力明显高于其他两株细胞(见 Figure 2)。

2.2 q-PCR 和 Western Blot 结果

骨肉瘤细胞 Mg-63 细胞中 LPAR1、LPAR2、LPAR3 的 mRNA 相对表达水平明显高于 SaOS-2、HOS-8603 细胞(*P*<0.05)。三株细胞中 LPAR1 的表达均高于 LPAR2、LPAR3 (见 Table 1、Figure 3)。

2.3 LPA 对细胞黏附和迁移能力的作用

选用黏附和迁移能力较弱的细胞 SaOS-2 进行 LPA 处理, 检测 LPA 处理前后细胞黏附和迁移能力的变化, 黏附实验结果显示, LPA 处理后 SaOS-2 细胞黏附能力明显上升 (见 Figure 4); 划痕实验结果显示 LPA 处理后 SaOS-2 细胞迁移能力明显上升 (见 Figure 5), LPA 促进骨肉瘤细胞 SaOS-2 的黏附和迁移。

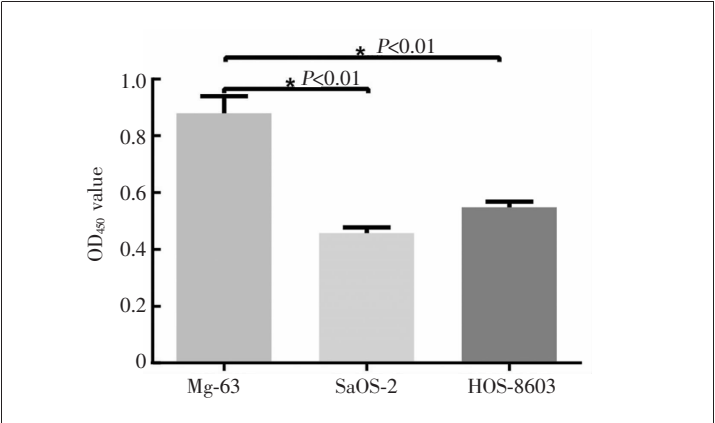


Figure 1 The result of adhesiveness of osteosarcoma cells

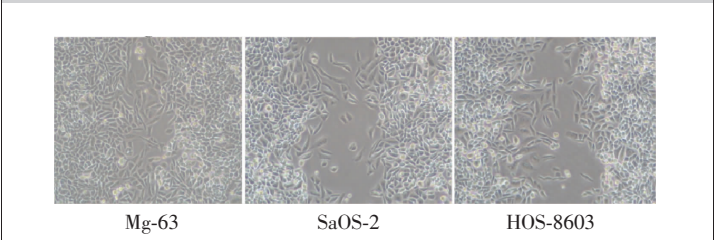


Figure 2 The results of scratch of osteo sarma cells

Table 1 Comparison of LPAR1, LPAR2 and LPAR3 mRNA expressions in osteosarcoma cells

Cell line	LPAR1	LPAR2	LPAR3
Mg-63	0.0182±0.031	0.0162±0.021	0.0174±0.005
SaOS-2	0.0116±0.012	0.0112±0.013	0.0104±0.004
HOS-8603	0.0123±0.010	0.0122±0.009	0.0117±0.003

2.4 黏附和迁移相关蛋白表达情况

Western Blot 检测黏附和迁移相关蛋白表达, 结果显示 LPA 处理后, SaOS-2 细胞中 PI3K、p-AKT、

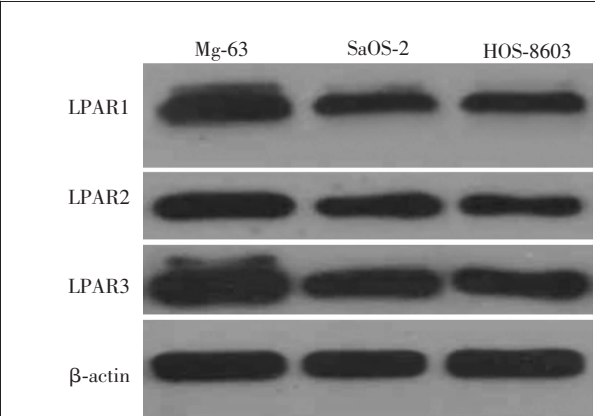


Figure 3 Expression of LPAR1, LPAR2 and LPAR3 protein in osteosarcoma cells

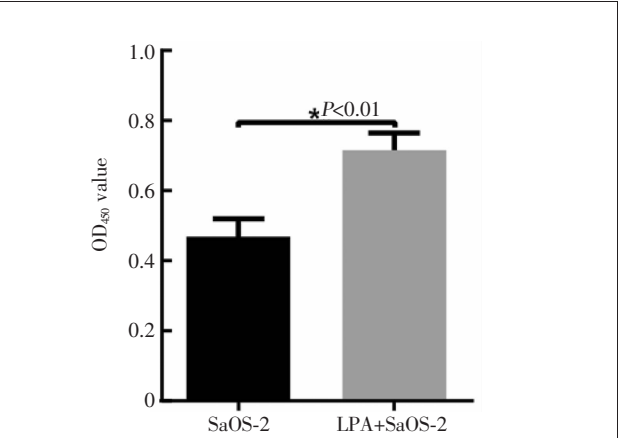
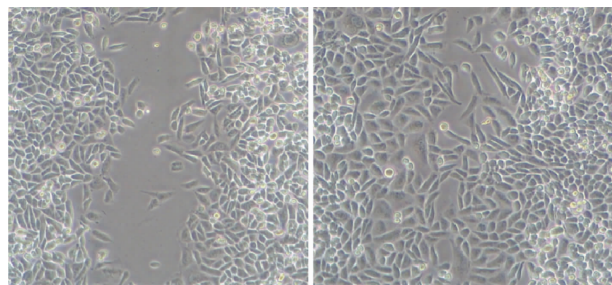


Figure 4 The result of adhesiveness of osteosarcoma cell SaOS-2 after LPA treatment



SaOS-2 LPA+SaOS-2

Figure 5 The results of scratch of osteosarcoma cell SaOS-2 after LPA treatment

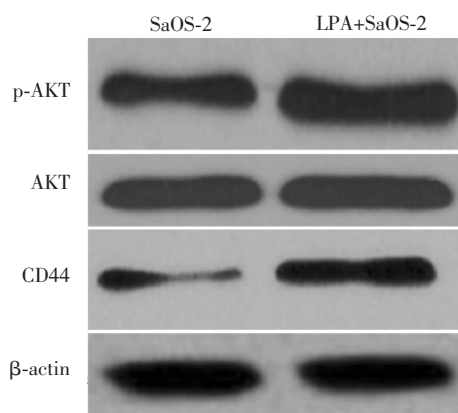


Figure 6 Related protein expressions for adhesion and migration

CD44 表达明显上调(见 Figure 6)。

3 讨论

肿瘤转移是一个涉及到多种内外因素的复杂过程,肿瘤的转移性是临床上肿瘤治疗的难题之一。肿瘤细胞黏附能力下降从原发灶脱离转移到全身,肿瘤细胞的黏附和迁移与细胞内基因的突变有密切关系,从基因层面上有效抑制肿瘤细胞的黏附和降低肿瘤细胞的迁移能力是从解决肿瘤问题的关键所在^[11,12]。本研究通过检测骨肉瘤细胞的黏附和迁移能力,结果显示 Mg-63 细胞的黏附和迁移能力最强,SaOS-2 细胞黏附和迁移能力最弱,这与马骁^[13]的研究结果一致。我们检测了骨肉瘤细胞 Mg-63、SaOS-2、HOS-8603 中 LPA 受体的表达,结果显示 Mg-63 细胞中 LPAR1-3 的表达明显高于其他细胞株,说明骨肉瘤细胞的黏附和迁移能力可能与 LPA 的作用相关。本研究选用黏附和迁移能力较弱的 SaOS-2 细胞进一步检测了 LPA 与骨肉瘤细胞黏附和迁移的关系,探讨 LPA 在骨肉瘤的转移进程中的作用,为骨肉瘤的临床诊断和分子治疗提供一定的指导意义。

临床研究发现 LPA 的存在大大加剧了肝癌、胃癌、子宫癌及胰腺癌等多种癌症的恶性化程度,研究表明 LPA 主要通过影响肿瘤细胞的黏附和迁移能力而促进肿瘤的发生发展^[14,15]。LPA 能够通过诱导 EGFR 的磷酸化而影响基质金属蛋白酶的表达,进而促进肿瘤细胞运动能力。另外,LPA 也能够通过促进肿瘤间质细胞分泌 TNF- α 、IL-8、IL-6 等趋化因子,

最终表现为促进肿瘤细胞的黏附和迁移能力^[15~17]。LPA 也可以通过磷酸化而激活细胞骨架蛋白肌动蛋白相关蛋白,引起肿瘤细胞运动能力的增强,同时通过改变肿瘤细胞骨架结构,调节细胞形态等方式来调控肿瘤细胞的迁移^[15]。本研究通过黏附和划痕实验检测了 LPA 处理后骨肉瘤细胞黏附和迁移能力的变化,结果表明 LPA 能够促进骨肉瘤细胞的黏附和迁移。

人 CD44 基因位于 11 号染色体,属于 I 型跨膜糖蛋白,在大多数真核细胞表面都有表达,在细胞的黏附、迁移及转移过程中起着重要的作用^[18,19]。大量研究表明,CD44 分子在恶性肿瘤细胞中高表达,而在良性或转移性低的肿瘤细胞中低表达,而且其表达水平的高低与患者预后情况密切相关^[20,21]。PI3K/AKT 信号通路是细胞内重要信号转导通路之一,通过影响下游多种效应分子的活化状态,在细胞内发挥黏附、迁移和增殖等关键作用,与人类多种肿瘤的发生发展密切相关^[22,23]。PI3K 在整合素介导的侵袭信号传递中是必要的分子,如在前列腺癌中 PI3K 可以介导整合素 $\alpha v \beta 3$ 驱动的侵袭,而在卵巢癌中,Akt2 过表达可以借助 IV 型胶原蛋白上调整合素 $\beta 1$ 进而使肿瘤细胞的侵袭和转移特性增强。目前已有学者研究通过调节 PI3K/Akt 信号通路抑制肉瘤耐药细胞的增殖,PI3K/Akt 逐渐成为肉瘤靶向治疗的研究热点。我们的研究发现 LPA 处理后 SaOS-2 细胞中黏附和迁移相关蛋白 CD44 的表达明显上调,进一步对 LPA 促进骨肉瘤细胞黏附和迁移的分子机制的探索发现,LPA 处理后 PI3K 和 p-AKT 的

表达均明显上调, LPA 可能主要通过 PI3K/AKT 通路来促进骨肉瘤细胞的黏附和迁移。

综上所述, LPA 主要通过 PI3K/AKT 信号通路调节黏附和迁移相关蛋白 CD44 的表达而影响骨肉瘤的黏附和迁移, 为骨肉瘤的基因治疗以及临床基因联合诊断的提供一定的指导意义。

参考文献:

- [1] Botter SM, Neri D, Fuchs B. Recent advances in osteosarcoma[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2014, 16(1): 15–23.
- [2] Hongtao HE, Jiangdong NI, Huang J. Molecular mechanisms of chemoresistance in osteosarcoma (Review) [J]. *Oncol Lett*, 2014, 7(5): 1352–1362.
- [3] Luetke A, Meyers PA, Lewis I, et al. Osteosarcoma treatment—where do we stand? A state of the art review [J]. *Cancer Treat Rev*, 2014, 40(4): 523–32.
- [4] Pan Q, Cui GF, Bi ZG. A Review of the osteosarcoma treatment [J]. *Medical Recapitulate*, 2014, 20 (17): 3138–3140. [潘琦, 崔国峰, 毕郑刚. 骨肉瘤治疗的研究进展[J]. *医学综述*, 2014, 20(17): 3138–3140.]
- [5] Pedraza C, Sánchez-López J, Castilla-Ortega E, et al. Fear extinction and acute stress reactivity reveal a role of LPA (1) receptor in regulating emotional-like behaviors [J]. *Brain Struct and Funct*, 2014, 219(5): 1659–1672.
- [6] Yung YC, Stoddard NC, Chun J. LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology [J]. *J Lipid Res*, 2014, 55(7): 1192–1214.
- [7] Lin CC, Li D, Li JW, et al. Effect of lysophosphatidic acid on cell migration and its relative molecular mechanisms [J]. *J Biomedical Eng*, 2016, 5(33): 1005–1010. [林川川, 李铎, 李佳文, 等. 溶血磷脂酸对细胞迁移的影响及相关分子机制 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2016, 5(33): 1005–1010.]
- [8] Deel MD, Li JJ, Crose LE, et al. A review: molecular aberrations within hippo signaling in bone and soft-tissue sarcomas [J]. *Front Oncol*, 2014, 5: 190.
- [9] Ward JD, Ha JH, Jayaraman M, et al. LPA-mediated migration of ovarian cancer cells involves translocation of Gαi2 to invadopodia and association with Src and β-pix [J]. *Cancer Lett*, 2015, 356(2): 382–391.
- [10] Liu YP, Wang YY, Qian WH, et al. Role of lysophosphatidic acid (LPA) in tumor metastasis [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2011, 27(8): 1044–1047. [刘玉萍, 王颖钰, 钱文慧, 等. 溶血磷脂酸(LPA)对肿瘤转移的作用研究[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27 (8) : 1044–1047.]
- [11] Laskov I, Drudi L, Beauchamp MC, et al. Anti-diabetic doses of metformin decrease proliferation markers in tumors of patients with endometrial cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2014, 134(3): 607–614.
- [12] Linkov F, Kokai L, Edwards R, et al. The role of adipose-derived stem cells in endometrial cancer proliferation [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2014, 74(244): 54–58.
- [13] Ma X. The expression proliferation and cell migration of CD44v2, CD44v5 and CD44v6 in osteosarcoma cell strain [D]. Jilin: Jilin University, 2016. [马骁. 骨肉瘤细胞 CD44v2、CD44v5 及 CD44v6 的表达及与细胞增殖、迁移的关系[D]. 吉林: 吉林大学, 2016.]
- [14] Hong HT, Schreurs O, Schenck K, et al. Lysophosphatidic acid regulates adhesion molecules and enhances migration of human oral keratinocytes [J]. *Eur J Oral Sci*, 2016, 124 (2): 164–171.
- [15] Araki M, Kitayoshi M, Dong Y, et al. Inhibitory effects of lysophosphatidic acid receptor-5 on cellular functions of sarcoma cells [J]. *Growth Factors*, 2014; 32(3–4): 117–122.
- [16] Brusevold IJ, Tveteraas IH, Aasrum M, et al. Role of LPAR3, PKC and EGFR in LPA-induced cell migration in oral squamous carcinoma cells [J]. *BMC Cancer*, 2014; 14 (1): 1–16.
- [17] Kim EK, Ha JM, Kim YW, et al. Inhibitory role of polyunsaturated fatty acids on lysophosphatidic acid-induced cancer cell migration and adhesion [J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(17): 2971–2977.
- [18] Bjorklund CC, Baladandayuthapani V, Lin HY, et al. Evidence of a role for CD44 and cell adhesion in mediating resistance to lenalidomide in multiple myeloma: therapeutic implications [J]. *Leukemia*, 2014, 28(2): 373–383.
- [19] Wang SH, Zhou JD, He QY, et al. MiR-199a inhibits the ability of proliferation and migration by regulating CD44-Ezrin signaling in cutaneous squamous cell carcinoma cells [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(10): 7131–7141.
- [20] Yu L, Wu Y, Gu S, et al. Prognostic role of CD44 expression in osteosarcoma: evidence from six studies [J]. *Diagn Pathol*, 2014, 9(1): 1–5.
- [21] Nam KS, Oh S, Lee KM, et al. CD44 regulates cell proliferation, migration, and invasion via modulation of c-Src transcription in human breast cancer cells [J]. *Cell Signal*, 2015, 27(9): 1882–1894.
- [22] Zhu BJ, Zhou XD. The study of PI3K/AKT pathway in lung cancer metastasis and drug resistance [J]. *Chin J Lung Cancer*, 2011, 14(8): 689–694. [祝冰晶, 周向东. PI3K/AKT 通路在肺癌转移和耐药中的研究 [J]. *中国肺癌杂志*, 2011, 14(8): 689–694.]
- [23] Yan W, Fu Y, Tian D, et al. PI3 kinase/Akt signaling mediates epithelial-mesenchymal transition in hypoxic hepatocellular carcinoma cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 382(3): 631–636.