

SPON1 表达对骨肉瘤细胞侵袭、转移能力的影响

陈 勇, 姜 泳

(大连市第二人民医院, 辽宁 大连 116011)

摘要: [目的] 探讨 SPON1 表达对骨肉瘤细胞侵袭、转移能力的影响。[方法] 骨肉瘤细胞株 KHOS 分为对照组、空白转染组和 si-SPON1 组, 其中空白转染组转染 siRNA, si-SPON1 组转染 siRNA-SPON1, 采用 MTT 法检测各组细胞增殖, 采用 Tranwell 细胞侵袭和细胞划痕实验检测细胞侵袭和迁移能力, Western blot 检测 SPON1 蛋白以及 FAK/Src 信号通路蛋白表达。[结果] si-SPON1 组 SPON1 蛋白相对表达量为 0.212 ± 0.087 , 明显低于对照组和空白转染组 ($P < 0.05$); 对照组、空白转染组和 si-SPON1 组转染 12h、24h、48h 和 72h 吸光度 A 值比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); si-SPON1 组细胞迁移率和侵袭细胞数分别为 $14.08\% \pm 3.11\%$ 和 75.64 ± 24.20 个, 明显低于对照组和空白转染组 ($P < 0.05$); si-SPON1 组 p-FAK 和 p-Src 相对表达量分别为 0.354 ± 0.100 和 0.310 ± 0.101 , 均低于对照组和空白转染组 ($P < 0.05$); 对照组、空白转染组和 si-SPON1 组 FAK 和 Src 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。[结论] 抑制 SPON1 蛋白表达, 可降低骨肉瘤 KHOS 细胞迁移和侵袭能力, 其机制可能与 FAK/Src 信号通路有关。

关键词: SPON1; 骨肉瘤; 迁移; 侵袭

中图分类号: R738.1 文献标识码: A 文章编号: 1671-170X(2019)10-0882-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.10.B006

Effect of SPON1 Expression on Invasion and Metastasis of Osteosarcoma Cells

CHEN Yong, JIANG Yong

(The Second People's Hospital of Dalian, Dalian 116011, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of SPON1 expression on invasion and metastasis of osteosarcoma cells. [Methods] The osteosarcoma KHOS cells were divided into control group, blank transfection group and si-SPON1 group, the blank transfection group was transfected into siRNA, and the si-SPON1 group was transfected into siRNA-SPON1. The cell proliferation was detected by MTT, and invasion and migration of cells were detected by Tranwell and scratch test, the expression of SPON1 protein and FAK/Src signaling protein was detected by Western blot. [Results] The relative expression of SPON1 protein in si-SPON1 group was 0.212 ± 0.087 , which were significantly lower than that in control group and blank transfection group ($P < 0.05$). There were no significant differences in the absorbance A value at 12h, 24h, 48h and 72h after transfection among three groups ($P > 0.05$). The cell migration rate and the number of invasive cells in the si-SPON1 group were $14.08\% \pm 3.11\%$ and 75.64 ± 24.20 , which were significantly lower than those in the control group and the blank transfection group ($P < 0.05$). The relative expression of p-FAK and p-Src in si-SPON1 group were 0.354 ± 0.100 and 0.310 ± 0.101 , which were significantly lower than those in control group and blank transfection group ($P < 0.05$). There were no significant differences in the relative expression of FAK and Src among three groups ($P > 0.05$). [Conclusion] Inhibition of SPON1 protein expression can inhibit the migration and invasion of osteosarcoma KHOS cells, which may be related to FAK/Src signaling pathway.

Subject words: SPON1; osteosarcoma; migration; invasion

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是一种骨恶性肿瘤, 发病者多为儿童和青少年^[1]。恶性程度高、侵袭性和转移性强, 约 10%~20% 的患者在确诊时即可出现转移

性病灶, 如: 肺转移、骨转移等^[2], 还有一些无法辨别的亚临床症状的微小转移, 致使该病的治疗效果不甚理想^[3]。但由于该病发生转移和复发的概率极大, 治疗效果不理想, 5 年生存率只有 55% 左右, 而出现

收稿日期: 2018-07-26; 修回日期: 2018-09-19

转移性和复发性骨肉瘤的患者生存率更低^[4]。

底板反应蛋白(SPON1)是从脊椎动物的胚胎底板分离得到的一种细胞外基质糖蛋白。最初的研究^[5]发现用重组 SPON1 蛋白能促进神经细胞黏附和神经元生长,还能促进血管平滑肌细胞增殖并且抑制血管生成。研究发现 SPON1 基因和蛋白在转移性强的骨肉瘤肿瘤组织中高度表达,说明其在骨肉瘤转移中可能起重要作用,因此本文通过研究 SPON1 对骨肉瘤细胞侵袭、转移能力的影响,探索骨肉瘤的相关病理机制,为临床提供治疗依据。

1 材料与方法

1.1 细胞来源

骨肉瘤细胞株 KHOS 来自中国科学院细胞库。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

在 37℃、5%CO₂ 条件下,在含有 10%胎牛血清和 100U/ml 青霉素和链霉素的 RPMI-1640 培养基中培养骨肉瘤 KHOS 细胞^[6]。根据细胞生长情况更换新鲜的培养基,当细胞密度达到 80%~90%左右时,吸掉培养液,用 PBS 洗涤 3 次,加入适当的胰蛋白酶消化 1~2min,细胞都变圆后加入胎牛血清培养基终止消化,用吸管反复吹打混匀,然后吸出、离心、弃上清,加入 10ml 含有 10%血清的培养基,轻轻吹打混匀,继续培养。

1.2.2 细胞转染

首先体外合成靶向 SPON1 的 siRNA-SPON1 和 si RNA,然后将适量 siRNAs 和 Lipofectamine2000 脂质体分别用 Opti.MEM 培养基稀释均匀,室温孵育 5~10min,随即将两种稀释物混合均匀置室温下 20min,使形成 Lipofectamine 2000 脂质体-si RNA 复合物^[7]。转染前 1d,将骨肉瘤细胞 KHOS 接种于 6 孔板上,每孔 5×10⁵ 个,用只含血清的 Opti.MEM 培养基进行培养,在细胞融合达到 60%左右进行转染,转染时用不含抗生素和血清的 Opti.MEM 培养基替换,然后加入 siRNA 脂质体复合物,使 si RNAs 浓度达到 100nmol/L。在 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养孵育 4h,然后每孔用只含血清的 Opti.MEM 培养基替换。

1.2.3 MTT 细胞增殖实验

将转染细胞接种于 96 孔板,每孔 1000 个细胞,体积 200μl,在 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 6d,每 2d 更换一次培养基。每天相同时间取出,加入 MTT 溶液(5mg/ml)5μl/孔,继续培养,4h 后取出 96 孔板,弃上清液,加入 150μl DMSO/孔,振荡 10min,溶解结晶物。实验结束时用酶标仪检测各孔在 570nm 波段的吸光度值(OD 值)。

1.2.4 Transwell 细胞侵袭试验

用胰酶对细胞进行消化,然后离心、去培养液、PBS 洗涤,用含 0.05% BSA 的不含血清的 RPMI1640 培养基使细胞重新悬浮,然后取 100μl 细胞混悬液接种到 Transwell 小室的上室,700μl 含 2% FBS 的 RPMI1640 培养基置于下室,在 5%CO₂、37℃ 培养箱中培养 16h。取出上室并弃去液体,未穿过膜的细胞用蘸有 PBS 的棉签擦去,用 4%多聚甲醛固定,0.1%结晶紫染色 20min,PBS 洗涤 3 次,然后显微镜下计数。

1.2.5 细胞划痕实验

用 marker 笔在 6 孔板背后均匀的划出横线,间隔 0.5cm,横穿过孔,每孔至少穿过 5 条线,在孔中加入约 5×10⁵ 个细胞。第二天用枪头垂直于背后的横线划痕。用 PBS 洗细胞 3 次,去除划下的细胞,加入无血清培养基。放入 37 度 5%CO₂ 培养箱,培养。按 0、6、12、24h 取样,拍照。

1.2.6 Western blot 检测 FAK/Src 信号通路蛋白

提取目的蛋白,然后用 BCA 法进行蛋白定量、配胶灌胶、上样,然后进行电泳电转操作,封闭 2h,孵育一抗、二抗,最后显影。

1.3 统计学处理

统计分析采用 SPSS19.0 软件,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较使用方差分析,两两比较采用 SNK 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞 SPON1 蛋白表达情况

si-SPON1 组 SPON1 蛋白相对表达量明显低于对照组和空白转染组($P < 0.05$),见 Table 1 和 Figure 1。

2.2 各组细胞增殖情况比较

对照组、空白转染组和 si-SPON1 组转染 12h、

Table 1 Comparison of SPON1 protein expression in cells of each group($\bar{x}\pm s$,n=6)

Groups	The relative expression of SPON1 protein	F	P
Control group	0.902±0.101	8.795	<0.001
Blank transfection group	0.897±0.113		
Si-SPON1 group	0.212±0.087		

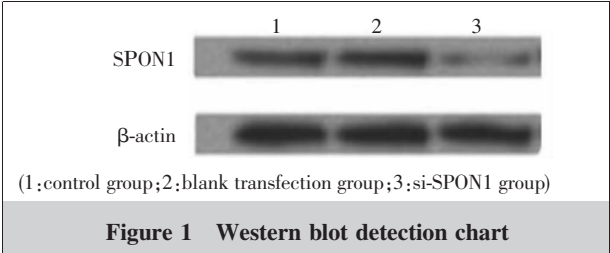
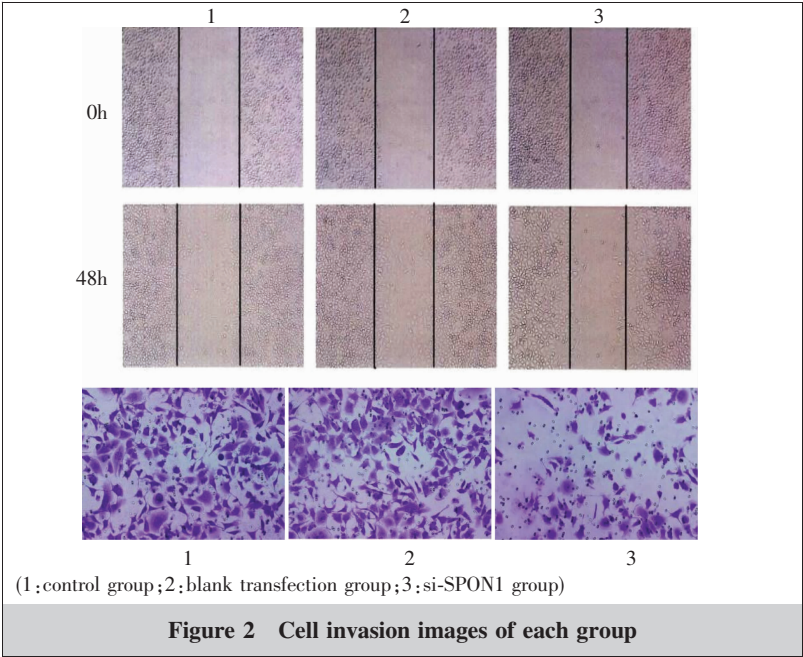


Table 2 Comparison of absorbance A values of cells transfected at 12h, 24h,48h and 72h in each group($\bar{x}\pm s$,n=6)

Groups	12h	24h	48h	72h
Control group	0.341±0.089	0.457±0.101	0.684±0.122	0.755±0.136
Blank transfection group	0.343±0.097	0.460±0.108	0.680±0.120	0.752±0.140
Si-SPON1group	0.340±0.091	0.455±0.106	0.681±0.118	0.753±0.138
F	0.846	0.955	1.012	1.106
P	0.761	0.655	0.521	0.501

Table 3 Comparison of the cell migration rate and the number of invasive cells among 3 group($\bar{x}\pm s$,n=6)

Groups	The cell migration rate(%)	The number of invasive cells
Control group	35.46±2.64	250.16±86.94
Blank transfection group	34.10±3.80	245.82±90.15
Si-SPON1group	14.08±3.11	75.64±24.20
F	26.465	84.654
P	<0.001	<0.001



24h、48h 和 72h 吸光度 A 值比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 见 Table 2。

2.3 各组细胞迁移和侵袭情况比较

si-SPON1 组细胞迁移率和侵袭细胞数明显低于对照组和空白转染组 ($P<0.05$), 见 Table 3、Figure 2。

2.4 各组 FAK/Src 信号通路蛋白表达比较

si-SPON1 组 p-FAK 和 p-Src 水平明显低于对照组和空白转染组 ($P<0.05$); 对照组、空白转染组和 si-SPON1 组 FAK 和 Src 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见 Table 4 和 Figure 3。

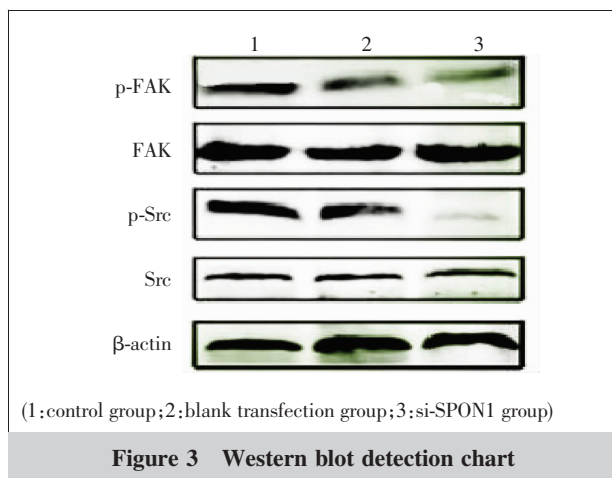
3 讨论

骨肉瘤也称成骨肉瘤, 是常见恶性肿瘤, 发病人群多为未成年人。骨肉瘤组织学特点是间充质干细胞或成骨细胞分化障碍, 能够直接生成骨或者骨样组织。因该肿瘤具有易恶化、高侵袭性、高转移性的特点, 所以患者在发病早期就会发生转移性病灶^[8]。大多数原发性骨肉瘤的发病机制不详, 有研究^[9]表明原发性骨肉瘤患者体内基因与正常人体内基因明显不同, 其原因可能与这些基因失去调控有关, 但具体机制不清楚。因此, 找到骨肉瘤与正常组织间的表达不同的基因及蛋白十分有必要, 有助于明确骨肉瘤发生、发展与转移的分子机制, 为抑制骨肉瘤发生和转移提供临床依据。

SPON1 蛋白是一种从脊椎动物的胚胎底板分离出来的细胞外基质糖蛋白, 具有分泌性和特异性, 相对分子量大约 9×10^4 ^[10]。在神经系统中的海马神经元上有与 SPON1 结合的相应受体, 当 SPON1 与这些受体结合后能促进神经元生长与黏着, 还能促进脊髓和感觉神经元的轴突和连接处的生长; 转化生长因子- β 可以介导 SPON1 调节软骨组织中物质和能量的交换, 诱导软骨退化; 此外, SPON1 还能促进血管平滑肌细胞增殖并且抑制血管生

Table 4 Comparison of protein expression in FAK/Src signaling pathway in each group

Groups	The relative expression of FAK protein	The relative expression of p-FAK protein	The relative expression of Src protein	The relative expression of p-Src protein
Control group	1.215±0.154	1.141±0.160	0.356±0.101	1.154±0.160
Blank transfection group	1.197±0.146	1.100±0.146	0.358±0.106	1.130±0.152
Si-SPON1 group	1.210±0.144	0.354±0.100	0.355±0.103	0.310±0.101
<i>F</i>	1.241	7.846	1.011	6.164
<i>P</i>	0.412	<0.001	0.520	<0.001



成。有研究表明,SPON1还能在一些肿瘤组织中表达,肿瘤细胞的侵袭和转移可能与其蛋白质的表达水平有关^[11]。

RNAi(RNA干扰技术)是在现代分子生物学研究中干扰基因表达、研究基因功能的重要的基因调控工具^[12]。siRNA是一种由21~25核苷酸构成的小RNA分子,它与体外一些酶结合形成RNA诱导的沉默复合体(RISC)后,与靶基因编码区或UTR进行特异性结合,通过切割mRNA使靶基因降解,从而抑制相应靶基因的表达。本文根据siRNA设计原则,合成靶向SPON1的siRNA-SPON1和siRNA,根据Western blot实验结果显示,siRNA-SPON1序列的干扰效果不错,转染细胞后特异性沉默了SPON1基因的表达,si-SPON1组SPON1蛋白相对表达量明显低于对照组和空白转染组($P<0.05$),MTT细胞增殖实验结果显示,3组的吸光度值无统计学差异,说明特异性沉默SPON1并不会影响细胞的增殖传代情况,也进一步说明促进骨肉瘤细胞增殖的因子可能不是SPON1蛋白;Transwell细胞侵袭试验结果显示,si-SPON1组细胞迁移率和侵袭细胞数明显低于对照组和空白转染组($P<0.05$),说明SPON1蛋白能够促进骨肉瘤细胞的侵袭和迁移,由此我们可以猜测,在调控骨肉瘤细胞发生转移的各种调节因子中

可能有SPON1蛋白的存在;着斑激酶(focal adhesion kinase,FAK)是一种存在细胞质中的酪氨酸激酶^[13]。研究^[13-14]表明FAK在多种不同组织起源的肿瘤中都有一定程度的表达,而且肿瘤的恶化水平和侵袭转移能力与FAK的表达程度有关。Src蛋白几乎在所有细胞类型中表达,当Src激酶激活后,能够调节细胞内物质运输、促进细胞增殖与分化、增加细胞的黏附力等,突变型的Src蛋白能激活生成肿瘤血管,加快肿瘤细胞长大和迁移的速度^[14]。Western blot实验结果显示,si-SPON1组p-FAK和p-Src明显低于对照组和空白转染组,但是对照组、空白转染组和si-SPON1组FAK和Src蛋白相对表达量比较差异无统计学意义($P>0.05$),说明SPON1蛋白与FAK和Src的磷酸化相关联,SPON1沉默时,FAK信号通路的激活减少,降低了FAK和Src磷酸化蛋白的表达,从而降低了骨肉瘤细胞的侵袭转移能力^[15]。

综上所述,SPON1蛋白能够影响骨肉瘤细胞的侵袭和转移能力,抑制SPON1蛋白表达,可降低骨肉瘤KHOS细胞迁移和侵袭能力,其机制可能与FAK/Src信号通路有关。

参考文献:

- [1] Ye KS. Effects of *ARHI* gene on the biological behavior of osteosarcoma cells and its related mechanisms [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2016. [叶凯山. *ARHI*基因对骨肉瘤细胞生物学行为的影响及其相关机制研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2016.]
- [2] Zheng GQ, Zhao FY, Wu Q, et al. Research progress of PD-1 and its ligands in the immunotherapy of osteosarcoma [J]. Chinese Journal of General Medicine, 2016, 14(9): 1560-1562. [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.]
- [3] Li Y, Yi H, Li JM, et al. Relationship between expression of twist and clinicopathological features and metastasis of osteosarcoma [J]. Journal of Practical Cancer, 2016, 31

- (4):548-551.[李艳,伊航,李锦明,等. Twist 表达与骨肉瘤临床病理特征及其转移的关系 [J]. 实用癌症杂志, 2016,31(4):548-551.]
- [4] Nong F, Lan CG, Tang YJ. Research progress on susceptibility to osteosarcoma and related gene polymorphism [J]. Modern Oncology Medicine, 2017, 25 (2): 304-307.[农峰, 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.]
- [5] Chang HP. Effect of floor reaction protein (SPON1) on osteosarcoma metastasis and its mechanism[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2016.[常和平. 底板反应蛋白 (SPON1)对骨肉瘤转移的影响及机制研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2016.]
- [6] Yao JJ. Effects of Glycyrrhizin and Bcl-2 on apoptosis inhibition of gastric cancer SGC7901 cell proliferation [D]. Xinxiang: Xinxiang Medical College, 2016.[姚俊杰. 甘草次酸影响自噬及 Bcl-2 抗凋亡抑制胃癌 SGC7901 细胞增殖[D]. 新乡: 新乡医学院, 2016.]
- [7] Guan HY. Inhibitory effects of miR-192 targeted TCF7 gene on proliferation and invasion of osteosarcoma cells [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2016. [关红亚. miR-192 靶向 TCF7 基因对骨肉瘤细胞增殖和侵袭的抑制作用[D]. 郑州: 郑州大学, 2016.]
- [8] Feng HL. Effects of leptin and SIRT1 on proliferation and metastasis of osteosarcoma cells and its mechanism [D]. Shijiazhuang: Hebei Normal University, 2016.[冯和林. 瘦素和 SIRT1 对骨肉瘤细胞增殖、转移的影响及机制研究[D]. 石家庄: 河北师范大学, 2016.]
- [9] Xia H, Yang YY, Sun YH, et al. Changes of expression of *GPR56* gene in osteosarcoma and its effect on proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells [J]. Shandong Medicine, 2017, 57 (32): 36-38.[夏海, 杨瑜瑜, 孙英华, 等. *GPR56* 基因在骨肉瘤组织中的表达变化及其对骨肉瘤细胞增殖、迁移、侵袭能力的影响[J]. 山东医药, 2017, 57(32):36-38.]
- [10] Liu Z, Dai X, Tao W, et al. APOE influences working memory in non-demented elderly through an interaction with SPON1 rs2618516[J]. Hum Brain Mapp, 2018, 12(6): 189-192.
- [11] Yang HC, Chu SK, Huang CL, et al. Genome-wide pharmacogenomic study on methadone maintenance treatment identifies SNP rs17180299 and multiple haplotypes on CYP2B6, SPON1, and GSG1L associated with plasma Concentrations of methadone R- and S-enantiomers in heroin-dependent patients[J]. Plos Genetics, 2016, 12(3): 345-350.
- [12] Fan B, Li HX, Wu YM, et al. Small molecule interfering RNA inhibits the expression of TNC gene and reverses Taxol resistance in ovarian cancer [J]. Progress in Cancer, 2017, 15 (7): 749-753.[樊蓓, 李红霞, 吴玉梅, 等. 小分子干扰 RNA 抑制 TNC 基因的表达并逆转卵巢癌紫杉醇耐药[J]. 癌症进展, 2017, 15(7):749-753.]
- [13] Zhao MN, Chen GY. Research progress of FAK in malignant tumors [J]. Journal of Practical Oncology, 2016, 30 (2): 162-166.[赵美娜, 陈公琰. FAK 在恶性肿瘤中的研究进展[J]. 实用肿瘤学杂志, 2016, 30(2): 162-166.]
- [14] Zhou JS, Huang HY, Ye H. Effects of SRC and Fak on the E-cadherin and integrin mediated tandem and tumor infiltration and metastasis [J]. Hainan Medical Science, 2016, 27 (1): 93-96.[周俭珊, 黄海燕, 叶红. Src、FAK 对 E-cadherin 和 integrin 介导的串联以及肿瘤浸润、转移的影响[J]. 海南医学, 2016, 27(1):93-96.]
- [15] Chen ZX. FAK signaling pathway of 2,3-indolequinone inhibiting invasion and metastasis of human neuroblastoma [D]. Qingdao: Qingdao University, 2016.[陈志祥. 2,3-吲哚醌抑制人神经母细胞瘤侵袭和转移的 FAK 信号通路研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2016.]