

FASTKD4 在骨肉瘤组织中表达及对骨肉瘤细胞增殖和凋亡的影响

张香路,王震,常俊,马广文,黄斐

摘要 目的 探讨 FASTKD4 在骨肉瘤组织中表达及其对骨肉瘤细胞增殖和凋亡的影响。方法 通过免疫组化和 qPCR 的方法检测 FASTKD4 在骨肉瘤及癌旁组织中的表达情况,同时还通过 qPCR 检测 FASTKD4 在不同骨肉瘤细胞中的表达情况,根据结果选择 Saos-2 细胞作为研究对象,细胞转染 FASTKD4 小干扰 RNA (shFASTKD4 组) 及对照阴性序列 (shCtrl 组)。qPCR 和 Western blot 检测转染后细胞中 FASTKD4 mRNA 和蛋白表达水平。高内涵筛选和 CCK-8 检测细胞增殖,基质胶成球实验检测细胞克隆形成能力,流式细胞仪检测细胞凋亡。结果 免疫组化和 qPCR 结果显示 FASTKD4 在骨肉瘤组织中表达水平高于癌旁组织 ($P < 0.05$),与 shCtrl 组比较,shFASTKD4 组骨肉瘤增殖能力受到抑制 ($P < 0.05$),且 shFASTKD4 组骨肉瘤细胞形成的克隆球直径小于 shCtrl 组 ($P < 0.05$)。shFASTKD4 组骨肉瘤细胞凋亡率高于 shCtrl 组 ($P < 0.05$)。结论 FASTKD4 在骨肉瘤组织中高表达,沉默 FASTKD4 可以抑制骨肉瘤细胞增殖和克隆能力,并促进肿瘤细胞凋亡,进一步研究显示 FASTKD4 敲除使 PI3K/AKT 信号通路失活。

关键词 骨肉瘤;FASTKD4;癌旁组织;Saos-2

中图分类号 R 738.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)03-0355-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.03.004

骨肉瘤是恶性程度最高的肿瘤之一,好发于儿童和青少年,目前以手术治疗和化学治疗为主,复发率较高,预后往往不佳^[1-3]。过去三十年来,骨肉瘤患者的预后并未改变,凸显了临床对新研究、新方法的需求^[4]。肿瘤的发生、发展涉及多个基因、多个环节的调控异常,寻找有效的靶基因治疗骨肉瘤可能会有效的改善其预后^[5-6]。

Fas 活化激酶结构域蛋白 4 (fast kinase domain-containing protein4, FASTKD4) 也被称为细胞周期进

程修复蛋白 2 (cell cycle progression restoration protein 2, CPR2) 和转化生长因子 β 调节蛋白 4 (transforming growth factor beta regulator 4, TBRG4), 是一种线粒体蛋白,广泛分布在整个线粒体基质中,能够调节线粒体中 RNA 的表达^[7]。FASTKD4 在之前的研究报道中较少,2014 年 Wolf et al^[8] 首次通过 MittoString 测试发现 FASTKD4 是一种新的线粒体蛋白。随后 2017 年 Boehm et al^[7] 证实 FASTKD4 对线粒体能量代谢有着重要的调节作用,这也是首次证实 FASTKD4 可以通过影响线粒体,从而进一步干预肿瘤的发生发展。但是 FASTKD4 对骨肉瘤是否有影响,目前尚无研究。为了明确 FASTKD4 在骨肉瘤中的作用,该研究拟检测 FASTKD4 在骨肉瘤组织和骨肉瘤细胞中的表达,并通过小干扰 RNA 沉默骨肉瘤细胞中的 FASTKD4,观察其对骨肉瘤细胞生物学的影响。

1 材料与方法

1.1 标本的采集 收集 2017—2019 年安徽医科大学第四附属医院 30 例骨肉瘤患者的股骨远端骨肉瘤标本。通过免疫组化和 qPCR 检测骨肉瘤组织和癌旁组织中 FASTKD4 的表达。

1.2 细胞系 骨肉瘤细胞系 Saos-2、HOS 和成骨细胞株均购自中国科学院上海细胞库。使用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青-链霉素的 RPMI-1640 培养基,并在 37 °C、5% CO₂ 的环境中进行细胞培养。

1.3 免疫组化 将骨肉瘤组织和癌旁组织切片进行福尔马林固定和石蜡包埋后,切片 (5 μ m) 进行免疫组化。用抗 FASTKD4 的一抗 (兔抗,浓度 1:1 000, CST) 4 °C 孵育过夜,重复洗涤后再用二抗孵育 30 min。最后切片用 DAPI 染色,并用苏木精复染。

1.4 shFASTKD4 慢病毒的构建与转染 为了有效阻止 FASTKD4 的表达,本研究构建了靶向干扰 FASTKD4 的小干扰 RNA small interfering RNA (shRNA) 慢病毒载体。方法如下:靶向干扰 FASTKD4 的 shRNA 的干扰序列为 GTTCTTCAGCCTGG-

2021-08-29 接收

基金项目:安徽高校自然科学研究重点项目(编号:KJ2020A0187)

作者单位:安徽医科大学第四附属医院骨科,合肥 230012

作者简介:张香路,男,硕士研究生;

黄斐,男,副主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:

huangfei3738@126.com

TACAT。被用于对照组的,加扰(scrambled) shRNA (shCtrl)的干扰序列为 TTCTCCGAACGTGTACCGT。相关茎环结构的 DNA oligo (oligonucleotides) 被合成,并被植入 pGV115-GFP 慢病毒载体(上海吉凯基因医学科技股份有限公司)。通过这个慢病毒表达系统来构建 shFASTKD4 和 scrambled shRNA。为了进行慢病毒转染,用 6 孔板培养 Saos-2 细胞,并根据 MOI 加入 shFASTKD4 和 shCtrl 慢病毒。转染后 72 h 左右,荧光显微镜观察绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的表达情况。转染 120 h 后,收集细胞进行 qPCR 和 Western blot 检测敲减效率。

1.4.1 RNA 提取和 qPCR 检测 按照说明书的方法,使用 Trizol 裂解肿瘤组织、癌旁组织和肿瘤细胞并收集 RNA。每个样本取 2.0 μg RNA 在 M-MLV 逆转录酶和 oligo dT 作用下合成 cDNA。使用 SYBR Green Premix Ex Taq 试剂进行 qPCR 实验,并在 ABI 7500 QPCR 仪进行检测。使用 GAPDH 做为内参。FASTKD4 的正向引物为 5'-CAGCTCACCTGGTA-AAGCGAT-3', 反向引物为 5'-GGGAGTAGAT-GCTCGTTCCTTC-3' (194 bp); GAPDH 的正向引物为 5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3', 反向引物为 5'-CACCTGTTGCTGTAGCCAAA-3' (121 bp), 参考 GAPDH 的表达结果标准化 FASTKD4 的表达结果。用 DNA 相对拷贝数和相对表达量 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 表示 FASTKD4 基因的相对表达量。

1.4.2 Western blot 检测 为了检测 Saos-2 细胞中 FASTKD4 的敲减效率,采用 Western blot 的方法检测细胞中 FASTKD4 蛋白的表达水平。Saos-2 细胞被转染 shFASTKD4 和 shCtrl 慢病毒后培养 72 h,然后用 PBS 洗涤,并用预冷的 lysis buffer 进行裂解。细胞裂解液在 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,并用 BCA 试剂盒检测蛋白水平。40 mg 的蛋白被 8% ~ 12% 的 SDS-PAGE 溶解后转移到 PVDF 膜上,然后用 TBTS 配制的 5% 的脱脂牛奶封闭 PVDF 膜 1 h,一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBTS 液洗涤 3 次后,二抗孵育室温孵育 1 h,使用 ECL 法显影。

1.4.3 细胞增殖实验 通过高内涵筛选的方法检测 shFASTKD4 和 shCtrl 慢病毒转染的 Saos-2 细胞的增殖。将处于对数生长期并转染 shFASTKD4 和 shCtrl 慢病毒的 Saos-2 细胞按 2×10^3 个/孔种植到 96 孔板中。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 环境中培养 4 d,且每天用高内涵细胞分析仪 Cellomics ArrayScan VTI (Thermo) 检测读板一次并定量细胞数量,连续检测读板 4 d,实验重复 3 次。

除了高内涵筛选的方法,本研究还采用 CCK-8 试剂盒来检测 shFASTKD4 和 shCtrl 慢病毒转染的 Saos-2 细胞的增殖。按 2×10^3 个/孔将细胞种植到 96 孔板中,连续培养 4 d。每天在每孔加入 10 μl CCK-8 溶液 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h,酶标仪 ELx800 Absorbance Microplate Reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) 选择 490 nm 检测 OD 值,连续检测 4 d。所有实验重复 3 次。

1.4.4 细胞克隆形成实验 将处于对数生长期的 shFASTKD4 和 shCtrl 慢病毒转染的 Saos-2 细胞与基质胶混匀后, 1×10^3 个/孔将细胞种植到 24 孔板中,使用含有 20 ng/ml EGF、10 ng/ml b-FGF、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 胰岛素和 0.4% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液培养 12 d,并在 1、6、12 d 时进行荧光拍照,每组实验重复 3 次。并用荧光图像分析软件 (PhenoRipper) 测量克隆球直径。

1.4.5 细胞凋亡检测 采用 Annexin V-APC 凋亡试剂盒检测细胞凋亡。将 shFASTKD4 和 shCtrl 慢病毒转染的 Saos-2 细胞培养 48 h 后,收集细胞,并用 PBS 洗涤,用细胞染色液调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$,每 100 μl 细胞悬液加入 10 μl Annexin V-APC 染色,室温避光 15 min。使用 FACS Calibur 流式细胞仪检测细胞凋亡,每组实验重复 3 次。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据比较采用独立样本 *t* 检验或单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FASTKD4 在骨肉瘤组织和骨肉瘤细胞系中的表达分析 采用免疫组化和 qPCR 的方法检测 FASTKD4 在骨肿瘤组织中的表达情况,结果见图 1A、B, FASTKD4 在骨肉瘤组织中呈高表达,而在癌旁组织中呈低表达, qPCR 的结果也表明 FASTKD4 mRNA 在骨肉瘤组织中表达水平要高于癌旁组织,两组之间差异有统计学意义 (图 1C, $t = 10.86$, $P < 0.05$)。同时 FASTKD4 mRNA 在骨肉瘤细胞系 Saos-2 中表达最高,与 HOS 及成骨细胞比较差异有统计学意义 (图 1D, $t = 19.72$, $P < 0.05$)。因此选择 Saos-2 骨肉瘤细胞系进行后续实验。

2.2 慢病毒介导的 shRNA 转染骨肿瘤细胞抑制 FASTKD4 的表达 为了评估慢病毒的敲减效率, Saos-2 细胞被分别转染 shFASTKD4 和 shCtrl 慢病毒载体。如图 2A ~ D 所示,转染 72 h 后, shFASTKD4

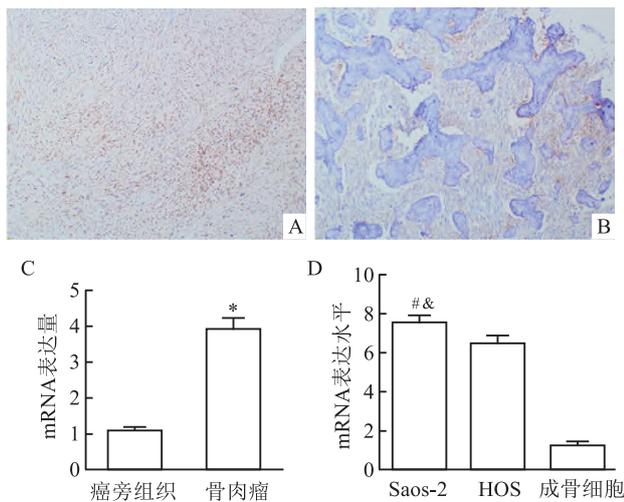


图1 FASTKD4在骨肉瘤及癌旁组织中的表达

A:免疫组化显示FASTKD4在骨肉瘤组织中表达水平 $\times 100$; B:免疫组化显示FASTKD4在癌旁组织中表达水平 $\times 100$; C:qPCR显示骨肉瘤组织和癌旁组织中FASTKD4 mRNA表达水平,与癌旁组织比较;* $P < 0.05$; D:qPCR显示不同骨肉瘤细胞中FASTKD4 mRNA表达水平,与HOS比较;# $P < 0.05$,与成骨细胞比较; & $P < 0.05$

和shCtrl组中超过80%的细胞GFP表达阳性。随后,本研究用qPCR和Western blot的方法验证FASTKD4的表达情况。如图2E所示,与shCtrl组比较,shFASTKD4组中FASTKD4 mRNA的表达下降61%,两组之间差异有统计学意义($t = 12.45, P < 0.05$)。Western blot结果(图2F)与qPCR一致,同样显示shFASTKD4组FASTKD4的蛋白表达水平低于shCtrl组。因此慢病毒介导的shRNA转染有效的抑制了FASTKD4 mRNA和蛋白的表达。

2.3 FASTKD4敲除抑制骨肉瘤细胞增殖 增殖是肿瘤细胞的一个重要特性,本研究通过高内涵筛选和CCK-8实验分析了FASTKD4敲除后对骨肉瘤细胞增殖的影响。在高内涵检测实验中,转染shFASTKD4和shCtrl的Saos-2细胞,被培养在96孔板中,并且通过CellomicsArrayScan VTI连续观察细胞4 d生长情况(图3A)。如图3B所示,与shCtrl组比较,shFASTKD4组中细胞增殖能力受到抑制。培养到第4天时,shCtrl组细胞增殖3.05倍,而shFASTKD4组中细胞增殖1.73倍,两者之间差异有统计学意义($t = 4.68, P < 0.05$)。课题组同时还用CCK-8实验检测了FASTKD4敲除对骨肉瘤细胞增殖能力的影响。如图3C所示,CCK8结果同样显示了shFASTKD4组中细胞增殖能力低于shCtrl组,两组之间差异有统计学意义($t = 4.72, P < 0.05$)。

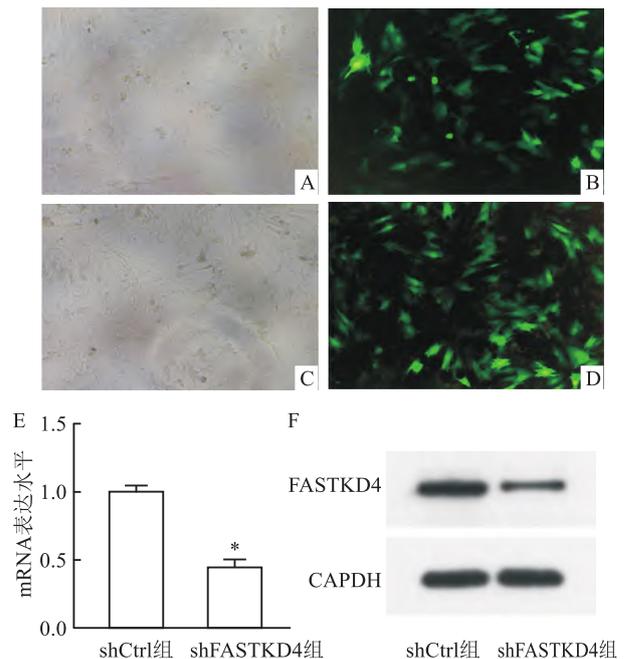


图2 FASTKD4转染效率及转染后细胞中表达水平

A、B: shCtrl组转染细胞后光镜图及荧光图 $\times 200$; C、D: shFASTKD4组转染细胞后光镜图及荧光图 $\times 200$; E:qPCR检测细胞中FASTKD4 mRNA表达水平,与shCtrl组比较;* $P < 0.05$; F: Western blot检测细胞中FASTKD4蛋白表达水平

2.4 FASTKD4敲除抑制骨肉瘤细胞克隆能力

本研究通过基质胶成球实验测定模拟体内三维情况下肿瘤细胞的克隆和成瘤能力。肿瘤细胞被接种在24孔板中,并在1、6、12 d时进行荧光拍照(图4A)。如图4B所示,在培养12 d shFASTKD4组中肿瘤细胞形成的克隆球直径小于shCtrl组,两组之间差异有统计学意义($t = 14.87, P < 0.05$),表明FASTKD4敲除后抑制了肿瘤细胞的克隆形成能力。

2.5 FASTKD4敲除诱导骨肿瘤细胞凋亡 为了分析FASTKD4敲除对骨肿瘤细胞凋亡的影响,本实验采用Annexin V-APC单染法流式细胞仪检测细胞凋亡(图5A)。检测结果显示shCtrl组和shFASTKD4组细胞凋亡百分比分别为(2.36 ± 0.11)%和(8.41 ± 1.31)%(图5B),两组之间差异有统计学意义($t = 7.97, P < 0.05$)。这表明FASTKD4敲除可以诱导骨肿瘤细胞的凋亡。

2.6 FASTKD4的敲除使骨肉瘤细胞中PI3K/AKT信号通路失活 为了进一步探讨FASTKD4在骨肉瘤中发生的分子机制,本课题组研究了PI3K/AKT信号通路,这是骨肉瘤中最常见的异常信号通路之一。通过Western blot检测FASTKD4敲低对Saos-2细胞中p-PI3K、PI3K、p-AKT和AKT表达的

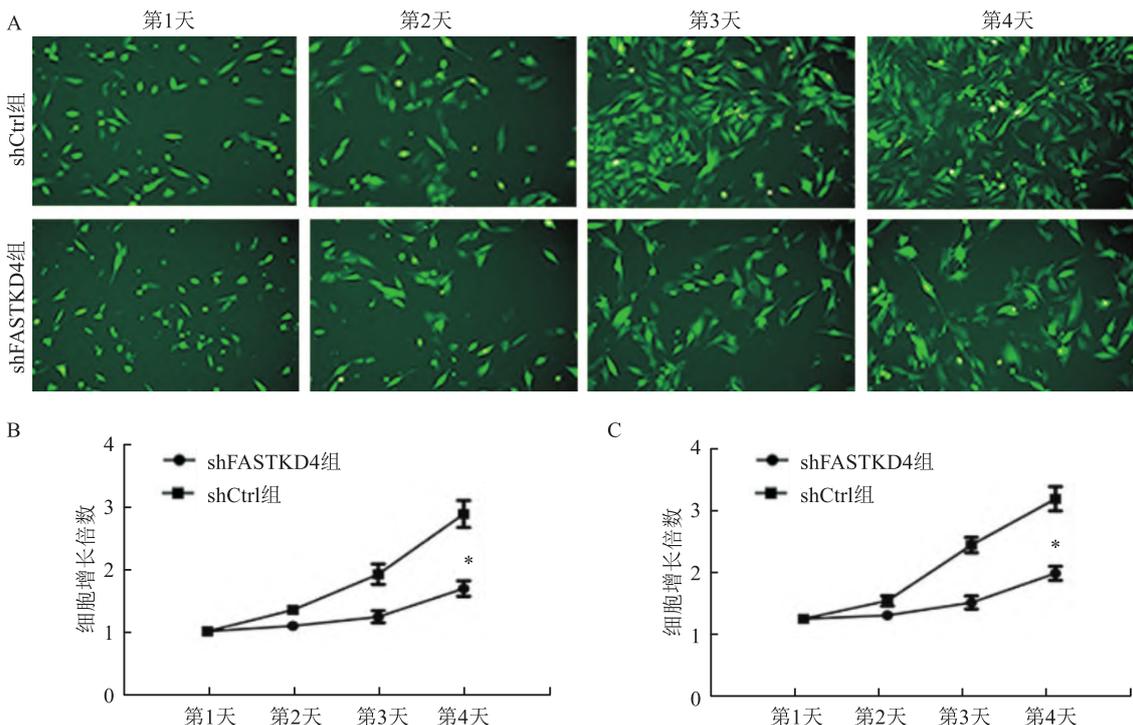


图3 FASTKD4 沉默后骨肉瘤细胞增殖能力检测

A:高内涵检测细胞生长荧光图;B:高内涵检测细胞增长倍数;C:CCK-8 检测细胞增长倍数;与 shCtrl 组比较: * P < 0.05

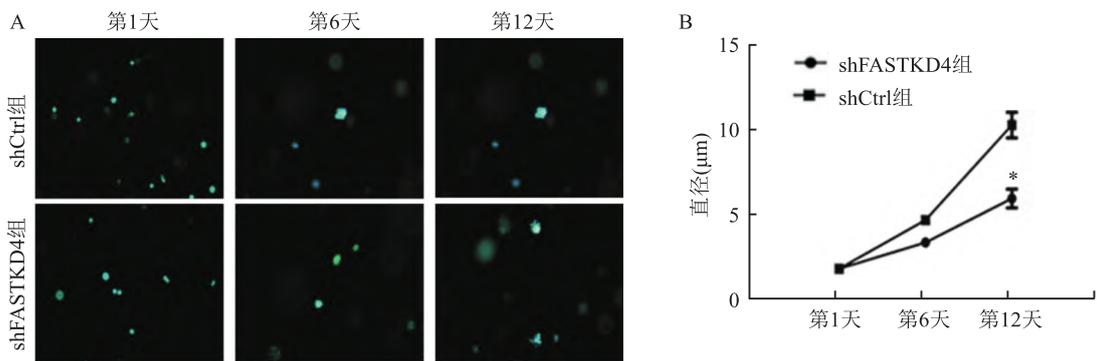


图4 FASTKD4 沉默后骨肉瘤细胞克隆形成能力检测

A:基质胶克隆形成荧光图;B:克隆球直径对比;与 shCtrl 组比较: * P < 0.05

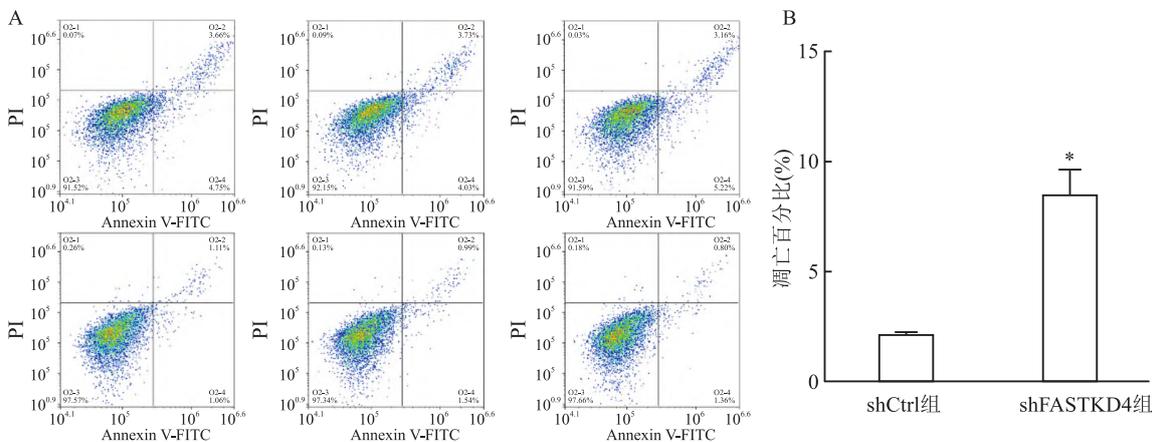


图5 FASTKD4 沉默后骨肉瘤细胞凋亡检测

A:凋亡流式细胞图;B:凋亡百分比;与 shCtrl 组比较: * P < 0.05

影响。如图 6A、B 所示,与 shCtrl 组比较,敲除 FASTKD4 下调了 shFASTKD4 组中 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白的表达,两组之间差异有统计学意义 ($t = 26.42, 24.98$, 均 $P < 0.05$),但在总的 PI3K 和 AKT 水平上未观察到明显差异。这些数据进一步说明,敲除 FASTKD4 使 PI3K/AKT 信号通路失活。

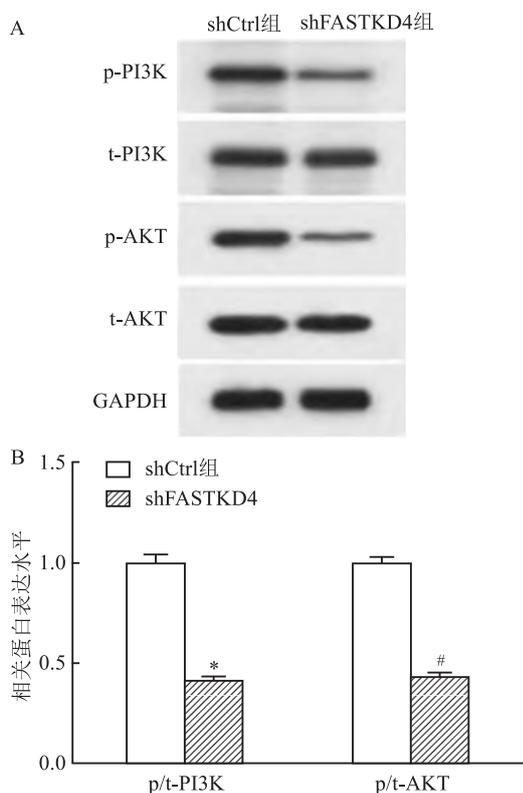


图 6 Western blot 检测 Saos-2 细胞中 FASTKD4 沉默对 PI3K/AKT 信号通路的影响

A: Western blot 检测 Saos-2 细胞中 p-PI3K、t-PI3K、p-AKT 和 t-AKT 相关蛋白的表达水平; B: Western blot 检测敲除 FASTKD4 相关蛋白定量分析; 在 PI3K 信号通路中,与 shCtrl 组比较: * $P < 0.05$; 在 AKT 信号通路中,与 shCtrl 组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

随着分子靶向治疗技术的发展以及对骨肉瘤发生、发展机制研究的深入,目前骨肉瘤的分子靶向治疗是临床研究的一个热点^[9]。

肿瘤的发生、发展与肿瘤细胞的快速增殖和凋亡有关。作为与代谢和凋亡两大癌症标志相关的细胞器,线粒体正受到越来越多的关注。研究^[7]表明肿瘤中抑癌基因的突变和癌基因的表达是通过作用线粒体来执行逃避凋亡和改变细胞代谢,进而促进癌细胞的生长。FASTKD4 是线粒体基因中的一种,被认为是细胞周期相关基因,受到 IL-2 和 JAK3 的

负调控。虽然 FASTKD4 与骨肉瘤之间的直接关系,目前尚无报道,但 FASTKD4 也已经被证实与多种肿瘤的发生有关,有研究^[10]表明 FASTKD4 在肺癌组织中高表达,敲除 FASTKD4 后可以下调 CAV1 和 RRM2,上调 DDIT3 来抑制肺癌细胞的增殖并促进凋亡。还有研究^[11]发现 FASTKD4 在鳞状细胞癌中发挥着重要作用,下调 FASTKD4 后,可以下调 CAV-1 并引起氧自由基的蓄积,同时抑制线粒体介导的凋亡反应。这也证实 FASTKD4 可以通过影响线粒体,在肿瘤的发生发展中发挥作用。因此本课题组推测 FASTKD4 可能也参与骨肉瘤的发生、发展。

本研究的结果表明在 FASTKD4 在骨肿瘤组织中表达显著高于癌旁组织。在细胞实验中,选择了 FASTKD4 在骨肿瘤细胞中表达最高的 Saos-2 作为研究对象,通过细胞转染小干扰 RNA 沉默 FASTKD4 的表达,qPCR 和 Western blot 的结果证实了小干扰 RNA 沉默 FASTKD4 的有效性。FASTKD4 沉默后的 Saos-2 细胞增殖的数量和克隆球直径均小于对照组,而凋亡细胞的百分比高于对照组。这些结果表明 FASTKD4 沉默可以有效的抑制 Saos-2 细胞的增殖和克隆能力的形成,并促进 Saos-2 细胞的凋亡。本研究认为 FASTKD4 促进 Saos-2 细胞凋亡可能是导致细胞增殖受限的一个重要原因,这也与之前 FASTKD4 在其他肿瘤研究中的报道一致。

本研究评估了敲除 FASTKD4 对骨肉瘤细胞中 PI3K/AKT 信号通路的影响。结果显示,敲除 FASTKD4 可抑制 p-PI3K 和 p-AKT 的表达水平,但在总的 PI3K 和 AKT 水平上未观察到明显差异,因此本研究推测 FASTKD4 基因表达下调是通过 PI3K-AKT 信号通路抑制骨肉瘤细胞的增殖、转移和诱导细胞凋亡,进而抑制 FASTKD4 表达,这可能成为改善骨肉瘤预后的一个可行方法。然而,FASTKD4 在骨肉瘤进展中的潜在抑瘤机制涉及多个分子水平,需要进一步研究。下一步本课题组将进一步研究 FASTKD4 在骨肉瘤其他细胞中作用的分子机制,为临床治疗提供坚实的理论基础。

参考文献

- [1] Fernandes I, Melo-Alvim C, Lopes-Bras R, et al. Osteosarcoma pathogenesis leads the way to new target treatments[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(2): 813.
- [2] Saraf A J, Fenger J M, Roberts R D. Osteosarcoma: Accelerating progress makes for a hopeful future[J]. Front Oncol, 2018, 8(1): 4.
- [3] 邢江浩,郝吉庆. 骨肉瘤外泌体中 miRNA 促侵袭及血管化机

- 制研究[J]. 安徽医科大学学报,2021,56(9):1396-400.
- [4] Smrke A, Anderson P M, Gulia A, et al. Future directions in the treatment of osteosarcoma[J]. *Cells*,2021,10(1):172.
- [5] Wu C C, Livingston J A. Genomics and the immune landscape of osteosarcoma[J]. *Adv Exp Med Biol*,2020,1258(1):21-36.
- [6] Sayles L C, Breese M R, Koehne A L, et al. Genome-informed targeted therapy for osteosarcoma[J]. *Cancer Discov*,2019,9(1):46-63.
- [7] Boehm E, Zaganelli S, Maundrell K, et al. FASTKD1 and FASTKD4 have opposite effects on expression of specific mitochondrial RNAs, depending upon their endonuclease-like RAP domain[J]. *Nucleic Acids Res*,2017,45(10):6135-46.
- [8] Wolf A R, Mootha V K. Functional genomic analysis of human mitochondrial RNA processing[J]. *Cell Rep*,2014,7(3):918-31.
- [9] Yu D, Zhang S, Feng A, et al. Methotrexate, doxorubicin, and cisplatin regimen is still the preferred option for osteosarcoma chemotherapy: A meta-analysis and clinical observation[J]. *Medicine (Baltimore)*,2019,98(19):e15582.
- [10] Wang A, Zhao C, Liu X, et al. Knockdown of TBRC4 affects tumorigenesis in human H1299 lung cancer cells by regulating DDIT3, CAV1 and RRM2[J]. *Oncol Lett*,2018,15(1):121-8.
- [11] Wang J, Luo Q, Liu M, et al. TBRC4 silencing promotes progression of squamous cell carcinoma via regulation of CAV-1 expression and ROS formation[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*,2020,66(2):157-64.

The expression of FASTKD4 in osteosarcoma and its effect on proliferation and apoptosis of osteosarcoma cells

Zhang Xianglu, Wang Zhen, Chang Jun, Ma Guangwen, Huang Fei

(Dept of Orthopedics, The Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230012)

Abstract Objective To investigate the effect of the expression of FASTKD4 in osteosarcoma and its effect on proliferation and apoptosis of osteosarcoma cells. **Methods** The levels of FASTKD4 mRNA were detected by qPCR, and protein was detected by immunohistochemistry in osteosarcoma and paracancerous tissues. The levels of FASTKD4 RNA were detected by qPCR in different osteosarcoma cells, and the osteosarcoma cell Saos-2 was used as the research object. Saos-2 cells were transfected with FASTKD4 small interfering RNA (shFASTKD4 group) and negative control (shCtrl group). qPCR and Western blot were used to detect the FASTKD4 mRNA and protein in transfected Saos-2 cells. The proliferation of transfected Saos-2 cells were detected by multiparametric high-content screening and CCK-8. The colony formation ability and apoptosis of transfected Saos-2 cells were detected by clone formation assay and flow cytometry. **Results** The results of qPCR and immunohistochemistry showed the expression of the FASTKD4 in osteosarcoma tissues was higher than that in paracancerous tissues ($P < 0.05$). The proliferation and colony formation ability of shFASTKD4 group were suppressed when compared with shCtrl group ($P < 0.05$). The percentage of apoptosis in shFASTKD4 group was higher than that in shCtrl group ($P < 0.05$). **Conclusion** This study confirmed that FASTKD4 was highly expressed in osteosarcoma tissues, and silencing of FASTKD4 could inhibit proliferation, colony formation of osteosarcoma cell and induce the apoptosis of osteosarcoma cell, We also found that FASTKD4 Knockdown inactivated PI3K/AKT Signaling pathway in osteosarcoma cells.

Key words osteosarcoma; fast kinase domain-containing protein4; paracancerous tissues; Saos-2