

网络出版时间: 2022-11-28 18:07 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20221128.1714.013.html>

沉默 MFGE8 对骨肉瘤细胞 U2OS 增殖、 凋亡、侵袭及迁移的影响

李 阳¹, 阮铭喧¹, 王 震², 张香路², 黄 斐¹

摘要 目的 探讨乳脂肪球表皮生长因子 8 蛋白(MFGE8)在骨肉瘤细胞系中的表达及对骨肉瘤细胞(U2OS)增殖、凋亡、侵袭及迁移能力的影响。方法 利用 Western blot 方法检测 MFGE8 蛋白在正常成骨细胞及骨肉瘤细胞系中的表达; GEO 数据库分析 MFGE8 mRNA 表达与骨肉瘤患者预后的关系; 下调 MFGE8 后检测其对 U2OS 细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭的影响。结果 Western blot 方法显示 MFGE8 蛋白在骨肉瘤细胞中的表达高于正常成骨细胞, 且与骨肉瘤患者的预后呈负相关(均 $P < 0.05$); 与 sh-Ctrl(转染了空载组的 U2OS 细胞)组相比, sh-MFGE8(转染了 sh-MFGE8 的 U2OS 细胞)组 U2OS 细胞的愈合率及侵袭数均降低, 增殖抑制率和凋亡率均升高, 且差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论

MFGE8 在骨肉瘤细胞 U2OS 中高表达, 下调 MFGE8 可以抑制 U2OS 的增殖、侵袭及迁移, 诱导其凋亡。

关键词 骨肉瘤; MFGE8; 增殖; 凋亡; 侵袭; 迁移

中图分类号 R 738.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)12-1921-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.12.013

骨肉瘤是儿童与成年人中最常见的原发性恶性肿瘤之一^[1-2]。当今骨肉瘤的主要治疗方式为手术切除联合术后辅助化疗, 复发率较高且预后不良^[3-4]。目前, 骨肉瘤的发生发展机制仍不明确, 临床上也缺乏相关标志物的检测。因此, 明确骨肉瘤的发生发展机制, 寻找有效的分子靶点改善其预后具有重要的意义^[5]。

乳脂肪球表皮生长因子 8 蛋白(milk fat globule egr and factor VIII, MFGE8)是一种存在于多物种的亲脂性糖蛋白, 其氨基末端包含一段 RGD(精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸)整合蛋白序列, RGD 序列可以与整合素异二聚体相互作用, 从而使 MFGE8 参与肿瘤细胞间黏附、信号转导等过程^[6-7]。MFGE8 对骨肉瘤是否有影响目前尚无报道。该研究分析了 MFGE8 蛋白在骨肉瘤细胞系与对照组中的表达, 利用慢病毒转染干扰骨肉瘤细胞中的 MFGE8 蛋白, 观察其对骨肉瘤细胞生物学行为的影响。

2022-09-29 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: ¹安徽医科大学第二附属医院骨科, 合肥 230601

²安徽医科大学第四附属医院骨科, 合肥 230012

作者简介: 李 阳, 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:

huangfei@ahmu.edu.cn

high glucose. **Methods** Conditional immortalized mouse podocytes were used as the research object to construct podocyte injury model by high glucose stimulation. The podocytes were divided into normal (NG) group, hypertonic control (MG) group, high glucose injury (HG) group, low, medium and high dose sericin (LS, MS, HS) group. CCK-8 method was used to determine the viability of podocytes in each group; the morphological structure of podocytes in each group was observed by ordinary optical inverted microscope. The migration ability was detected by Transwell and cell scratch test. Western blot was used to detect the expression levels of EMT-related mesenchymal phenotype factors Snail, α -SMA, FSP-1, MMP-9 and epithelial phenotype factors Nephrin, E-cadherin, and WT-1 in podocytes of each group. **Results** Compared with NG group, HG group showed lower podocyte activity ($P < 0.01$), worse podocyte status and enhanced podocyte migration ability, up-regulated Snail, α -SMA, FSP-1 and MMP-9 protein expressions ($P < 0.01$), and down-regulated Nephrin, E-cadherin and WT-1 protein expressions ($P < 0.01$). Compared with HG group, the viability of podocytes in sericin group increased ($P < 0.05$), the state of podocytes was improved, the migration ability of podocytes was weakened, the expression of Snail, α -SMA, FSP-1 and MMP-9 was down-regulated ($P < 0.05$), and the expression of Nephrin, E-cadherin and WT-1 was up-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** Sericin can alleviate podocyte epithelial-mesenchymal transition induced by high glucose.

Key words sericin; diabetic kidney disease; podocyte; epithelial-mesenchymal transition

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 一般资料 从 Gene Expression Omnibus 数据库(GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 中选择 mRNA 表达水平的数据集(GSE16102)。数据集 GSE16102 包含 34 例骨肉瘤样本。

1.1.2 细胞系 使用的骨肉瘤细胞系(U2OS、MG63)和正常成骨细胞系(hFOB 1.19)均购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.1.3 主要试剂与仪器 McCoy's 5A 培养基(南京生航生物有限公司),胎牛血清(杭州四季青有限公司),Transwell 小室及 Matrigel 基质胶(美国 Corning 公司),CCK-8(日本同仁化学研究所),特超敏化学发光试剂盒及 Puromycin(广州 Biosharp 公司),MFGE8 抗体(美国 Santa Cruz 公司),Tubulin 抗体(美国 CST 公司),GAPDH 抗体与辣根过氧化物酶标记二抗(北京中杉金桥公司),Annexin V-APC 细胞凋亡检测试剂盒(上海贝博生物公司),慢病毒包装(上海吉凯有限公司),酶标仪(美国 PE 公司),全自动细胞计数仪(美国 Nexcelom 公司),化学发光图像分析系统(上海天能科技公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 骨肉瘤 U2OS 及 MG63 细胞用含 10% 的胎牛血清和 1% 双抗培养基,于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中常规培养,正常成骨细胞 hFOB 1.19 于 34 °C、5% CO₂ 的培养箱中特殊培养,分别取对数生长期的细胞进行后续实验。

1.2.2 慢病毒转染及稳转细胞株的筛选 按照上海吉凯公司提供的慢病毒使用手册。方法如下:首先取密度为 5×10^4 个/ml 的 U2OS 细胞在 6 孔板中进行接种。37 °C 培养 24 h 后,加入适量病毒液及增强液 [公式:病毒液体积 = (MOI × 细胞数目) / 病毒滴度]。37 °C 培养 16 h 后更换新鲜培养基继续培养 48 h。倒置荧光显微镜下观察感染效率达 80% 左右,且细胞生长状态良好的可以用于后续实验。慢病毒转染 72 h 后,将细胞继续培养于含 Puromycin (2.00 μl/ml) 的培养液中,筛选直到未转染 sh-Ctrl 组细胞全部死亡。转染病毒组剩下的细胞被认为全部是 sh-MFGE8 细胞,并进行 Western blot 验证。靶向干扰 MFGE8 的 shRNA 干扰序列为 F: 5'-TCCCACAAGAAGAACTTGT-3' 和 F: 5'-ACAGCCT-TAATGGACACGAA-3',对照组中干扰序列为 F: 5'-TTCTCCGAACGTGTCACCT-3'。

1.2.3 Western blot 检测 利用含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液在冰上裂解 Ctrl、sh-MFGE8 和 sh-Ctrl 慢病毒转染的 U2OS 细胞约 10 min,收集裂解液于 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min。收集上清液并使用 BCA 试剂盒检测蛋白水平。取约 30 μg 蛋白液在 10% SDS-PAGE 条件下浓缩并转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,加入一抗(1:300)并于 4 °C 条件下孵育过夜。TBST 缓慢洗涤 3 次(5 min/次),二抗室温孵育 1 h,再次使用 TBST 快速洗涤 3 次(10 min/次)并使用 ECL 发光液显影。

1.2.4 划痕实验 分别将 1×10^6 个/ml 的 sh-MFGE8 和 sh-Ctrl 慢病毒转染的 U2OS 细胞接种于 6 孔板中。24 h 后采用 200 μl 的枪头在培养皿底部水平划出划痕,用 PBS 洗涤 2 遍后用无血清的 McCoy's 5A 培养基继续培养,分别于 0、12 h 在光学显微镜下拍照。

1.2.5 Transwell 实验 将 Matrigel 基质胶与 McCoy's 5A 培养基 6:1 配比,随后在 Transwell 小室上层加入 100 μl 混合液于 37 °C 培养箱中凝固 3 h。分别制备 5×10^4 个/ml 的 sh-MFGE8 和 sh-Ctrl 慢病毒转染的 U2OS 细胞悬液。在小室上层加入 200 μl 细胞悬液,下层加入 500 μl 含 15% 胎牛血清的 McCoy's 5A 培养基,继续培养 48 h。取出小室,PBS 洗涤后于 4% 多聚甲醛溶液中室温固定约 20 min,PBS 洗涤后继续放入 1% 结晶紫染液中室温染色 15 min,PBS 洗涤室温干燥后用沾湿的棉棒轻轻擦去小室上层内膜上的 Matrigel 基质胶和细胞,最后显微镜下观察记录。

1.2.6 CCK-8 实验 首先制备约 7×10^4 个/ml 的 sh-MFGE8 和 sh-Ctrl 慢病毒转染的 U2OS 细胞悬液。在 96 孔板中接种 100 μl/孔细胞悬液,每组设置 3 个复孔。分别于 23、47、71、95 h 加入 CCK-8 溶液 10 μl/孔继续培养 1 h,采用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度值。

1.2.7 细胞凋亡实验 将 sh-MFGE8 和 sh-Ctrl 慢病毒转染的 U2OS 细胞 37 °C 培养箱中培养 72 h 后收集不含细胞的悬液。预冷的 PBS 洗涤 2 遍后用不含 EDTA 的胰酶消化细胞约 3 min。随后用收集的不含细胞的悬液终止消化。收集含细胞的悬液于 4 °C、1 000 r/min 离心 5 min。弃上清液后用 100 μl $1 \times$ Annexin V 结合液悬浮细胞。在细胞悬浮液中加入 5 μl Annexin V-APC 染色液,轻轻混匀后于 4 °C 避光条件下孵育 8 min。加入 5 μl PI 染色液后轻轻混匀于 4 °C 避光条件下孵育 2 min。最后加入

400 μ l $1 \times$ Annexin V 结合液,轻轻混匀。立即用流式细胞仪检测。

1.2.8 生物信息学分析 利用 R 软件的 GEOquery 包等,对 GSE16102 数据集进行数据提取。提取标准:① 临床信息完整;② 至少随访 6 个月。COX-PRESdb 是一个包含 11 个物种的共表达基因分析的在线数据库。筛选条件为:① 种属为 Homo sapiens;② 共表达基因的前 200 个。DAVID 数据库是一个许多基因或蛋白提供系统的生物功能注释信息的在线分析工具。R 软件进行数据可视化。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较使用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MFGE8 在骨肉瘤细胞系及 GSE42352 数据集中的表达情况 与正常成骨细胞 hFOB 1.19 比较,U2OS、MG63 细胞中 MFGE8 的蛋白表达量上升 (U2OS: $P < 0.001$, $t = 14.09$; MG63: $P < 0.01$, $t = 6.755$) (图 1A、B)。MFGE8 mRNA 的高表达与骨肉瘤患者的预后呈负相关且差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 1C)。

2.2 慢病毒介导的 Sh-MFGE8 转染骨肉瘤细胞并抑制 MFGE8 的表达 通过慢病毒转染,sh-Ctrl 和 sh-MFGE8 中均超过 80% 细胞 GFP 阳性表达,Ctrl 组中无 GFP 表达(图 2A)。如图 2B、C 所示,与 Ctrl 组、Sh-Ctrl 组比较,Sh-1 组中 MFGE8 的敲减率均达

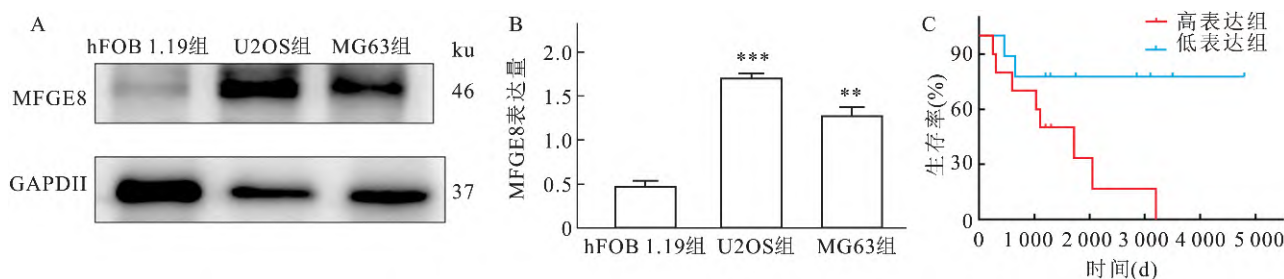


图1 MFGE8 的表达情况

A: Western blot 结果显示成骨细胞及骨肉瘤细胞系中 MFGE8 蛋白表达量; B: MFGE8 蛋白表达定量分析; C: GEO 数据库中 MFGE8 mRNA 在骨肉瘤中的表达与患者预后的关系; 与 hFOB 1.19 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

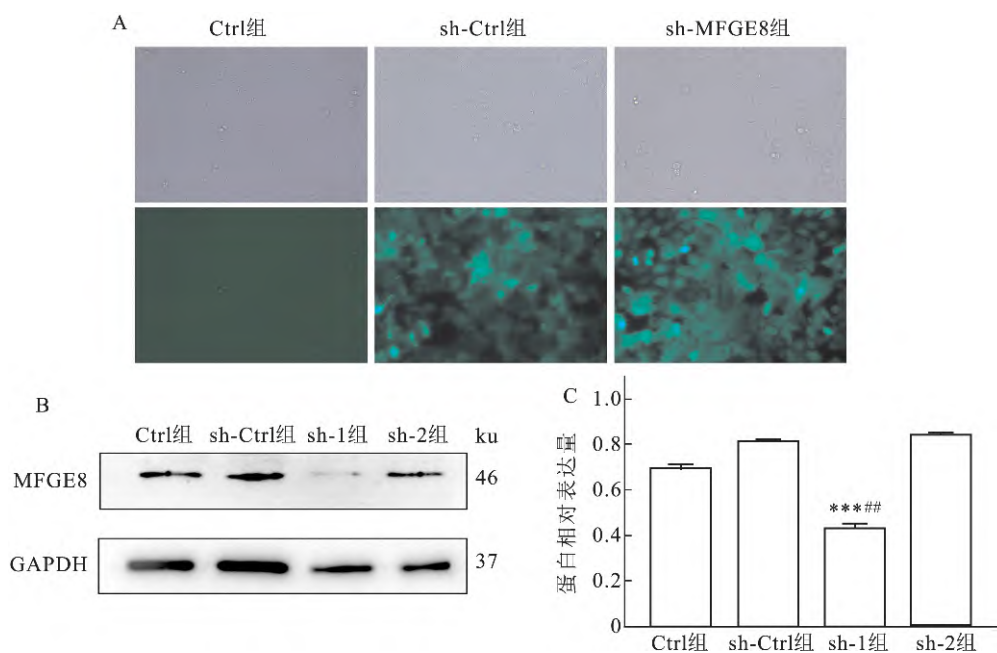


图2 MFGE8 的转染率及转染后的表达水平

A: 分别表示 Ctrl 组、sh-Ctrl 组、sh-MFGE8 组转染细胞后的明场图及荧光图 $\times 200$; B: Western blot 结果显示转染细胞后 Ctrl 组、sh-Ctrl 组、sh-1 组和 sh-2 组中 MFGE8 蛋白表达量; C: MFGE8 蛋白表达定量分析; 与 sh-Ctrl 组比较: *** $P < 0.001$; 与 Ctrl 组比较: ## $P < 0.01$

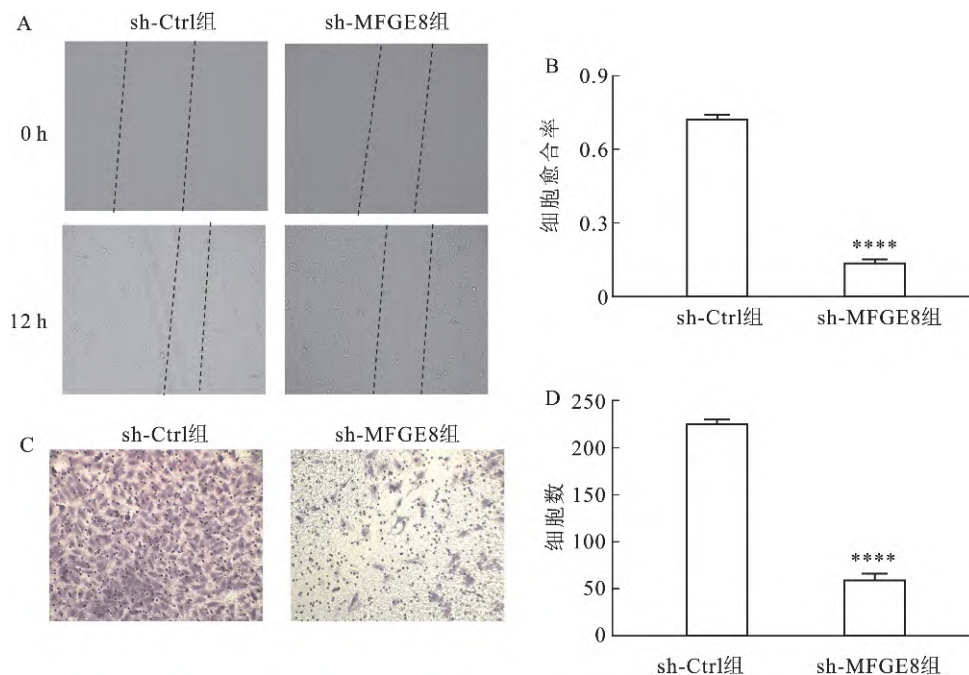


图3 MFGE8沉默后对U2OS细胞迁移及侵袭能力的影响

A: 两组细胞0、12 h划痕结果; B: 两组细胞愈合率定量分析; C: 两组细胞侵袭能力比较 $\times 200$; D: 两组细胞侵袭数定量分析; 与 sh-Ctrl 组比较: **** $P < 0.0001$

50%以上,差异有统计学意义(Ctrl组: $P < 0.01$, $t = 8.072$; sh-Ctrl组: $P < 0.001$, $t = 9.952$)。

2.3 敲低MFGE8对骨肉瘤U2OS迁移和侵袭的影响 侵袭及迁移力是骨肉瘤向远处转移的一个重要特征(图3A)。如图3B所示,与sh-Ctrl组相比,sh-MFGE8组中U2OS细胞的愈合面积减小且差异有统计学意义($P < 0.0001$, $t = 34.71$)。如图3C、D所示,在相同的培养条件下,sh-MFGE8组的U2OS细胞侵袭数较sh-Ctrl组减少($P < 0.0001$, $t = 22.25$)。

2.4 敲低MFGE8对骨肉瘤U2OS的增殖的影响

增殖是骨肉瘤细胞另外一个重要特性。该研究采用CCK-8实验分析了MFGE8敲低之后对骨肉瘤细胞U2OS的影响。如图4所示,在U2OS细胞中,随着时间的延长sh-MFGE8组细胞的增殖能力减弱。在不同的时间截点与sh-Ctrl组比较差异均有统计学意义(48 h: $P < 0.01$, $t = 8.381$; 72 h: $P < 0.0001$, $t = 26.4$; 96 h: $P < 0.0001$, $t = 17.68$)。

2.5 敲低MFGE8对骨肉瘤U2OS细胞凋亡的影响 该研究采用Annexin V-APC单染法分析敲低MFGE8后对骨肉瘤细胞U2OS凋亡的影响(图5A)。如图5B所示,与sh-Ctrl组相比,Sh-MFGE8组U2OS细胞的凋亡率增大且差异有统计学意义

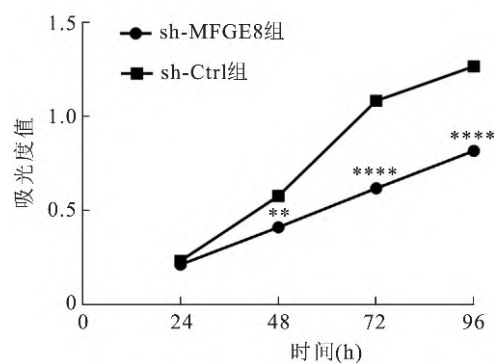


图4 MFGE8沉默后对U2OS细胞增殖能力的影响

与 sh-Ctrl 组比较: ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$

($P < 0.0001$, $t = 15.96$)。

2.6 MFGE8蛋白的KEGG富集分析 如图6所示,MFGE8蛋白富集于细胞外基质相互作用过程 (ECM-receptor interaction)、局灶性黏着斑激酶 (Focal adhesion) 通路、磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 (PI3K-AKT) 信号通路等。

3 讨论

骨肉瘤的发病机制仍然不明确,且复发率高,已经成为骨科肿瘤治疗过程中待解决的热点问题之一,分子靶向治疗的提出有望为骨肉瘤患者减轻痛

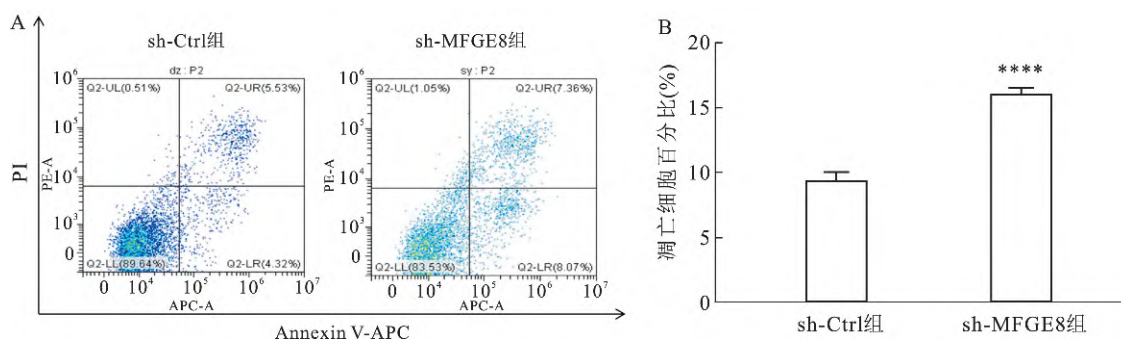


图5 MFGE8 沉默后对 U2OS 细胞凋亡的影响

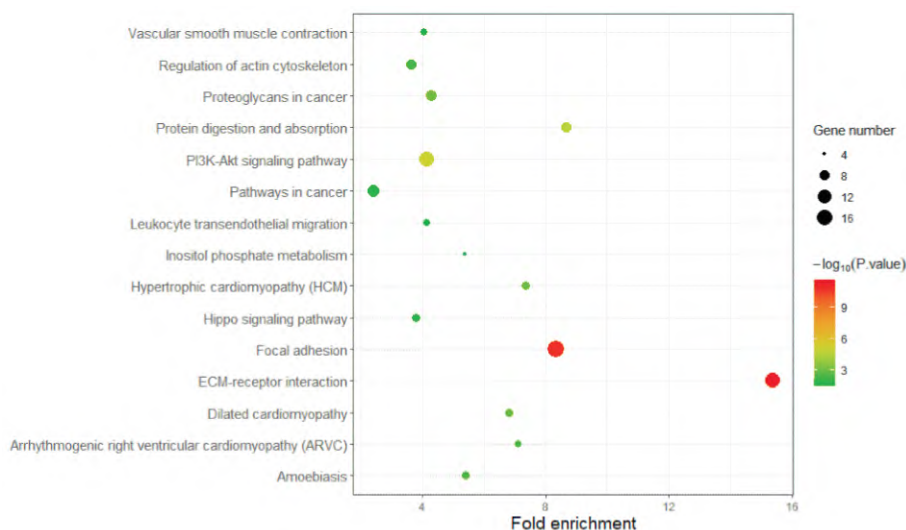
A: 各组凋亡流式细胞检测结果图; B: 凋亡细胞百分比; 与 sh-Ctrl 组比较: **** $P < 0.0001$ 

图6 MFGE8 蛋白的 KEGG 富集分析

苦^[8]。肿瘤的发生是由许多分子参与,涉及多个信号通路的复杂过程。研究^[9-11]表明整合素与肿瘤转移具有密切关系,且在多种肿瘤(骨肉瘤、肺癌等)中整合素表达异常。整合素是一种黏附分子受体,介导细胞与细胞之间信号传导,进而调控细胞转移、凋亡、增殖等过程。整合素可以识别并结合含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列(RGD)的配体蛋白:MFGE8等。整合素与配体结合触发下游信号通路,包括黏着斑激酶、磷脂酰肌醇3-激酶等^[11]。有研究^[12]表明MFGE8的RGD序列结合整合素受体,激活细胞周期蛋白的表达,从而促进乳腺癌细胞的转移。该课题组推测MFGE8可能也参与了骨肉瘤的发生发展。

该研究前期检测不同的骨肉瘤细胞系(U2OS、MG63)和正常成骨细胞hFOB 1.19中MFGE8蛋白的表达,结果显示,骨肉瘤细胞系中MFGE8蛋白表达较高,这提示MFGE8可能发挥促癌基因功能参与骨肉瘤发生发展。为了验证这一猜想,该实验选

择了MFGE8蛋白在骨肉瘤细胞系中表达较高的U2OS作为研究对象,通过慢病毒转染下调MFGE8的表达,利用Western blot实验检测敲减的有效性。MFGE8下调后,U2OS细胞不仅迁移及侵袭能力受到抑制,而且增殖抑制率及凋亡率上升。该研究表明MFGE8通过诱导U2OS细胞凋亡可能是导致骨肉瘤细胞的增殖受限的一个重要原因,这也与之前MFGE8在其他肿瘤里的研究一致^[13]。

该研究表明,ECM通路和骨肉瘤的发生发展有很大的联系。该研究利用生物信息学分析得出骨肉瘤细胞中MFGE8主要富集在ECM通路,而整合素是ECM的主要受体。该研究推测通过下调MFGE8,减少了RGD序列与整合素的结合,进而抑制了下游某种信号通路,最终抑制了骨肉瘤细胞的增殖、侵袭及迁移,诱导凋亡,这可能成为改善骨肉瘤患者预后的一个方法。然而通路功能过于繁杂且涉及多个分子水平,需进一步深入研究。该课题组将进一步研究以明确MFGE8在骨肉瘤发生发展中的

生物学机制,为临床治疗提供坚实的理论基础。

参考文献

- [1] Durfee R A, Mohammed M, Luu H H. Review of osteosarcoma and current management [J]. *Rheumatol Ther*, 2016, 3(2): 221–43.
- [2] Saraf A J, Fenger J M, Roberts R D. Osteosarcoma: accelerating progress makes for a hopeful future [J]. *Front Oncol*, 2018, 8: 4.
- [3] Rothzger E, Pfaff A L, Koks S. Innovative approaches for treatment of osteosarcoma [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2022, 247(4): 310–6.
- [4] 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.
- [5] Chen Y, Liu R, Wang W, et al. Advances in targeted therapy for osteosarcoma based on molecular classification [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 169: 105684.
- [6] Yamaguchi H, Takagi J, Miyamae T, et al. Milk fat globule EGF factor 8 in the serum of human patients of systemic lupus erythematosus [J]. *J Leukoc Biol*, 2008, 83(5): 1300–7.
- [7] Yamazaki M, Maruyama S, Abe T, et al. MFG-E8 expression for progression of oral squamous cell carcinoma and for self-clearance of apoptotic cells [J]. *Lab Invest*, 2014, 94(11): 1260–72.
- [8] Sheng G, Gao Y, Yang Y, et al. Osteosarcoma and Metastasis [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 780264.
- [9] Wang C, Wang T, Lv D, et al. Acquired resistance to EGFR TKIs mediated by TGFβ1/Integrin β3 signaling in EGFR-Mutant Lung Cancer [J]. *Mol Cancer Ther*, 2019, 18(12): 2357–67.
- [10] Shi K, Wang S L, Shen B, et al. Clinicopathological and prognostic values of fibronectin and integrin αvβ3 expression in primary osteosarcoma [J]. *World J Surg Oncol*, 2019, 17(1): 23.
- [11] Tsai H C, Lai Y Y, Hsu H C, et al. CCL4 Stimulates cell migration in human osteosarcoma via the mir-3927-3p/Integrin αvβ3 axis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(23): 12737.
- [12] Carrascosa C, Obula R G, Missiaglia E, et al. MFG-E8/lactadherin regulates cyclins D1/D3 expression and enhances the tumorigenic potential of mammary epithelial cells [J]. *Oncogene*, 2012, 31(12): 1521–32.
- [13] Wu J, Yang H, Cheng J, et al. Knockdown of milk-fat globule EGF factor-8 suppresses glioma progression in GL261 glioma cells by repressing microglial M2 polarization [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(11): 8679–90.

Effect of silencing MFGE8 on proliferation, apoptosis, invasion, and migration of osteosarcoma cells U2OS

Li Yang¹, Ruan Mingxuan¹, Wang Zhen², Zhang Xianglu², Huang Fei¹

(¹Dept of Orthopedics, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

²Dept of Orthopedics, The Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230012)

Abstract Objective To investigate the expression of milk fat globule epidermal growth factor 8 protein (MFGE8) in osteosarcoma cell lines and its effects on the proliferation, apoptosis, invasion and migration ability of osteosarcoma cells (U2OS). **Methods** The expression of MFGE8 protein in normal osteoblasts and osteosarcoma cell lines was examined by Western blot method. The relationship between MFGE8 mRNA expression and prognosis of osteosarcoma patients was analyzed by GEO database. The effects of down-regulation of MFGE8 on proliferation, apoptosis, migration and invasion of U2OS cells were examined. **Results** Western blot method showed that the expression of MFGE8 protein was higher in osteosarcoma cells than that in normal osteoblasts and its was negatively correlated with the prognosis of osteosarcoma patients (all $P < 0.05$); compared with sh-Ctrl (U2OS cells transfected with the null group) group, the U2OS cells in sh-MFGE8 (U2OS cells transfected with sh-MFGE8) group had decreased healing rate and invasion number while increased proliferation inhibition rate and apoptosis rate, and all differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** MFGE8 is highly expressed in U2OS of osteosarcoma cells, and down-regulation of MFGE8 can inhibit the proliferation, invasion and migration of U2OS and induce their apoptosis.

Key words osteosarcoma; MFGE8; proliferation; apoptosis; invasion; migration