

组织蛋白酶 S 对人骨肉瘤细胞增殖、迁移、侵袭的影响及其机制

纪海茹¹,孔令伟²,曹胜²,吕家兴¹,李佳欣¹,刘春雨¹,金宇²

摘要 目的 探讨组织蛋白酶 S (Cat S) 对人骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其潜在调控机制。方法 以正常成骨细胞(hFOB)和人骨肉瘤细胞(SAOS2 和 MG63)作为研究对象,将 Cat S 小干扰 RNA (si-Cat S) 和阴性对照序列 (si-NC) 转染至 SAOS2 和 MG63 细胞中以改变 Cat S 在人骨肉瘤细胞中的表达。将实验细胞分为 4 组:hFOB 组 (hFOB 细胞)、Control 组 (未转染的 SAOS2 或 MG63 细胞)、si-NC 组 (转染了 si-NC 的 SAOS2 或 MG63 细胞) 和 si-Cat S 组 (转染了 si-Cat S 的 SAOS2 或 MG63 细胞)。RT-PCR 和 Western blot 法检测 Cat S 在 SAOS2 和 MG63 细胞中的表达;CCK-8 和克隆形成实验检测敲低 Cat S 对 SAOS2 和 MG63 细胞增殖活性的影响;划痕和 Transwell 实验分别检测敲低 Cat S 对 SAOS2 和 MG63 细胞迁移和侵袭能力的影响;Western blot 实验检测敲低 SAOS2 对 SAOS2 细胞凋亡相关蛋白 (Bcl-2、Bax 和 Caspase-3) 和 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白 (LRP5、 β -catenin、C-myc 和 Cyclin D1) 的影响。结果 与 hFOB 组比较,Cat S 在 SAOS2 组和 MG63 组中的表达上调 ($P < 0.001$)。此外,与 si-NC 组比较,si-Cat S 组细胞的增殖、迁移和侵袭能力均受到抑制 ($P < 0.001$)。Western blot 结果显示:与 si-NC 组比较,si-Cat S 组细胞的 Bcl-2 表达下调,而 Bax 和 Caspase-3 表达上调 ($P < 0.001$)。同时,与 si-NC 组比较,si-Cat S 组 LRP5、 β -catenin、C-myc 和 Cyclin D1 的表达均下调 ($P < 0.001$)。结论 siRNA 敲低 Cat S 可以通过调控 Wnt/ β -catenin 通路来抑制人骨肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭并诱导细胞凋亡,预示了 Cat S 可能是骨肉瘤治疗的潜在靶点之一。**关键词** 骨肉瘤;组织蛋白酶 S;siRNA;增殖;Wnt/ β -catenin 中图分类号 R 738.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)09-1459-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.022

骨肉瘤作为最常见的原发性恶性骨肿瘤,常伴有突变和转移,患者预后极差。虽然化疗和手术可

以让骨肉瘤患者生存率有所提高,但转移性或复发性骨肉瘤患者的存活率仍然很低,患者 5 年总体生存率不到 20%^[1]。由于肿瘤的恶性进展依赖于肿瘤相关分子的调控,因此寻找与骨肉瘤恶性表型和临床预后相关的新型标记物尤为重要。组织蛋白酶 S (cathepsin S, Cat S) 作为半胱氨酸蛋白酶家族的主要成员,可通过调控结缔组织和基底膜的溶解和重塑,影响机体炎症和免疫反应,并最终促进肿瘤生长^[2]。近年来文献报道^[3-4],Cat S 在肝细胞癌等多种癌症中高表达,并对肿瘤细胞的恶性表型例如增殖和侵袭发挥促进作用。然而,尚未有研究报道 Cat S 在骨肉瘤中的具体作用。该研究旨在探讨 Cat S 对人骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其潜在分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与耗材 人正常成骨细胞(hFOB)和人骨肉瘤细胞(SAOS2 和 MG63)购自中国科学院上海细胞研究所;DMEM 培养基(货号:170217083240)、10%胎牛血清(货号:SH30070.03E)、1%链霉素/青霉素(货号:SV30010)和胰蛋白酶(货号:SH30042.01)购自美国 Hyclone 公司;TRIzol RNA 裂解液(货号:GS101-01)、RIPA 蛋白裂解液(货号:T15196)和 BCA 蛋白定量试剂盒(货号:KL80816-500)购自北京全式金生物有限公司;Transwell 小室(货号:3413)和 Matrigel 基质胶(货号:HYC021M01)购自美国 Corning 公司;Cat S 特异性 siRNA 干扰序列 (si-Cat S) 和阴性对照序列 (si-NC) 合成自美国 Qiagen 公司;cDNA 逆转录试剂盒和快速定量 SYBR[®] Green RT-PCR 试剂盒购自美国 Sigma 公司;CCK-8 细胞活性检测试剂盒和 Lipofectamine[™]2000 转染试剂盒购自上海碧云天生物科技发展有限公司;一抗:Bcl-2、Bax、LRP5、 β -catenin、C-myc、Cyclin D1 和 GAPDH 购自美国 Cell Signaling 公司;二抗:辣根过氧化物酶标记的兔抗羊 IgG 购自美国 Abcam 公司;PCR 引物由上海吉玛制药技术有限公司合成;其他常见分子生物学相关试剂与耗材购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

2021-11-20 接收

基金项目:河北省高等学校自然科学研究青年基金项目(编号:QN2020107);河北省医学科学研究课题计划项目(编号:20200378,20200352)

作者单位:¹承德医学院病理教研室,承德 067000

²承德医学院附属医院创伤外科,承德 067000

作者简介:纪海茹,女,讲师;

金宇,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:wezo7820@21cn.com

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将正常人成骨细胞(hFOB)和人骨肉瘤细胞(SAOS2和MG63)用含有10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的DMEM完全培养基进行培养。所有细胞均放置在5%的CO₂培养箱中培养,温度控制在37℃,相对湿度为95%。细胞每3d更换一次培养基,待细胞融合度达到80%以上时进行传代培养。取3代以后的对数期细胞用于后续实验研究。

1.2.2 细胞转染与分组 将对数期的人骨肉瘤细胞SAOS2及MG63按照 3×10^5 个/孔的密度接种到6孔板中,待细胞融合度达到80%并贴壁生长时,按照Lipofectamine™2000转染试剂盒操作说明书将si-Cat S和si-NC转染至SAOS2和MG63细胞中。经过48h的转染,采用RT-PCR检测转染效率。本研究中的实验细胞共分为4组:hFOB组(hFOB细胞)、Control组(未转染的SAOS2或MG63细胞)、si-NC组(转染了si-NC的SAOS2或MG63细胞)和si-Cat S组(转染了si-Cat S的SAOS2或MG63细胞)。siRNA-Cat S和阴性对照序列分别为5'-CTA-CAAAGCCACGGATGAA-3'和5'-TTCGCGACAAAA-CAGACGA-3'。

1.2.3 CCK-8法和克隆形成实验检测人骨肉瘤细胞SAOS2和MG63的增殖活性 CCK-8实验:将转染后的SAOS2和MG63细胞按照 3×10^3 个/ml的密度接种到96孔板中,设置3个重复孔,加入DMEM完全培养基100 μl/孔。这些细胞在37℃和5%CO₂培养箱中分别培养0、24、48和72h后,每孔加入10 μl的CCK-8溶液继续孵育1h。通过酶标仪检测各组细胞在450 nm波长处的光密度值。克隆形成实验:将转染后的SAOS2和MG63细胞按照900个/孔的密度接种到6孔板中,常规培养14d后形成自然集落。培养结束后,用磷酸盐缓冲溶液冲洗细胞3次后,在室温下用0.2%的结晶紫染色30 min。染色结束后在倒置光学显微镜下对菌落进行拍照和计数分析。

1.2.4 划痕实验检测人骨肉瘤细胞SAOS2和MG63的迁移能力 将转染后的SAOS2和MG63细胞按照 1×10^4 个/孔的密度接种到24孔板中常规培养24h。等细胞融合度达到90%以上时,用200 μl的无菌移液管尖端垂直于孔板表面轻轻划过,然后用磷酸盐缓冲溶液冲洗划痕处3次。在倒置光学显微镜下观察创面形成后0和24h的愈合情况,测量细胞的迁移距离并计算迁移率。

1.2.5 Transwell实验检测人骨肉瘤细胞SAOS2和MG63的侵袭能力 将转染后的SAOS2和MG63细胞按照 5×10^4 个/ml的密度制成细胞悬液。将100 μl的无血清细胞悬液加入已铺好Matrigel胶的Transwell上室,下室加入600 μl的含10%胎牛血清的DMEM完全培养基。细胞在37℃和5%CO₂的培养箱中培养24h。培养结束后先用4%的多聚甲醛对上室细胞固定10 min后再在室温下用0.5%结晶紫染色15 min。染色后的细胞在倒置光学显微镜下拍照并计数分析。

1.2.6 RT-PCR法检测人骨肉瘤细胞SAOS2和MG63中的mRNA表达 用TRIzol RNA提取液从转染后的SAOS2和MG63细胞中分离和提取全部RNA。以cDNA逆转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA。为了评估Cat S mRNA水平,严格按照快速定量SYBR® Green RT-PCR试剂盒操作说明进行RT-PCR检测。RT-PCR反应条件为:95℃预变性5 min,95℃变性40次每次10 s,60℃退火延伸30 s,共计45个循环。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算Cat S的相对含量,并以GAPDH作为内参。PCR引物序列包含2部分,Cat S引物序列F:5'-GCCTGATTCTGTGGACTGG-3',R:5'-GATGTACTGGAAAGCCGTTGT-5'; GAPDH引物序列F:5'-GGAGTCCACTGGCGTCTTC-3',R:5'-GCTGATGATCTTGAGGCTGTTG-3'。

1.2.7 Western blot法检测人骨肉瘤细胞中相关蛋白的表达 用RIPA细胞裂解液从转染后的SAOS2细胞中提取全部蛋白质样品。通过BCA蛋白定量试剂盒检测提取蛋白的浓度。蛋白变性后每孔上样量为20 μg,经12% SDS-PAGE分离后转移到PVDF膜上。用5%的脱脂奶粉封闭液对PVDF膜进行封闭2 h,然后与一抗在4℃下共孵育2 h。培养结束后,用TBST洗膜3次后,二抗继续孵育1 h。最后,通过增强的ECL化学发光成像系统显示蛋白条带并采用Image J软件对蛋白进行定量分析。

1.3 统计学处理 使用Graphpad Prism8软件对本研究所有数据进行统计分析。计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间数据比较采用 t 检验,3组及以上的数据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 Cat S在人骨肉瘤细胞SAOS2和MG63中的表达 通过RT-PCR和Western blot法检测了Cat S在正常人成骨细胞(hFOB)和人骨肉瘤细胞(SAOS2

和 MG63) 中的表达。如图 1A 所示, Cat S 在正常细胞 hFOB 中的表达为低于人骨肉瘤细胞 SAOS2 和 MG63 中的蛋白表达 ($t = 17.35, P < 0.001$), 差异有统计学意义。同时, 如图 1B 所示, Western blot 结果显示, 三组内参 GAPDH 的表达相近, 相比较正常细胞 hFOB, Cat S 在人骨肉瘤细胞 SAOS2 和 MG63 中的 mRNA 表达水平上调 ($t = 17.18, P < 0.001$), 差异有统计学意义。上述结果提示了 Cat S 的异常表达可能与骨肉瘤的发生发展有关。

2.2 siRNA 沉默 Cat S 基因对人骨肉瘤细胞 SAOS2 和 MG63 增殖活性的影响 为了研究 Cat S 在人骨肉瘤细胞生长过程中的作用, 通过 siRNA 干扰降低 Cat S 在 SAOS2 和 MG63 中的表达。如图 2A 所示, 与 si-NC 组比较, si-Cat S 组中 Cat S 的表达下调 ($P < 0.001$)。接下来, 通过 CCK-8 和克隆形成实验检测了敲低 Cat S 对 SAOS2 和 MG63 细胞增殖活性的影响。如图 2B 所示, 与 si-NC 组比较, si-Cat S 组中 SAOS2 和 MG63 细胞的增殖活性明显降低 ($t = 9.12, P < 0.001$), 差异有统计学意义。如图 2C 所示, 与 si-NC 组比较, si-Cat S 组中 SAOS2 和 MG63 细胞集落数目明显减少 ($t = 9.38, P < 0.001$), 差异有统计学意义。以上结果显示, 敲低 Cat S 能有效抑制 SAOS2 和 MG63 细胞的增殖活性。

2.3 siRNA 沉默 Cat S 基因对人骨肉瘤细胞 SAOS2 和 MG63 迁移和侵袭能力的影响 通过划

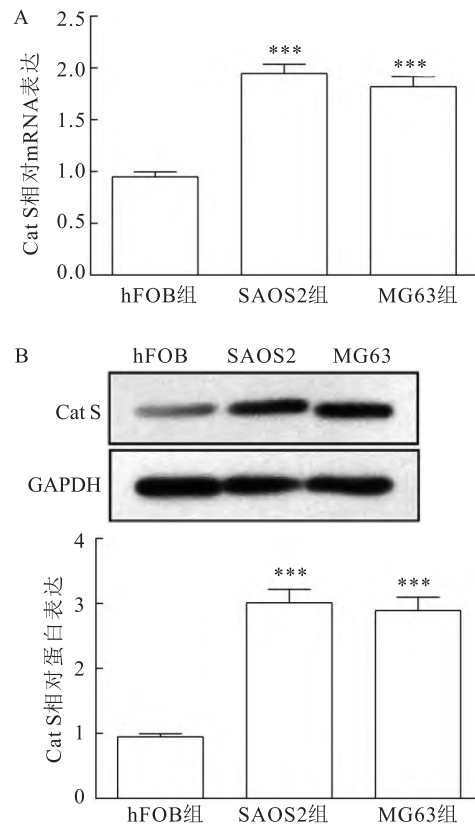


图 1 Cat S 蛋白在正常人成骨细胞 hFOB 和人骨肉瘤细胞 SAOS2 及 MG63 中的表达水平
A: RT-PCR 检测结果; B: Western blot 法检测结果; 与 hFOB 组比较: *** $P < 0.001$

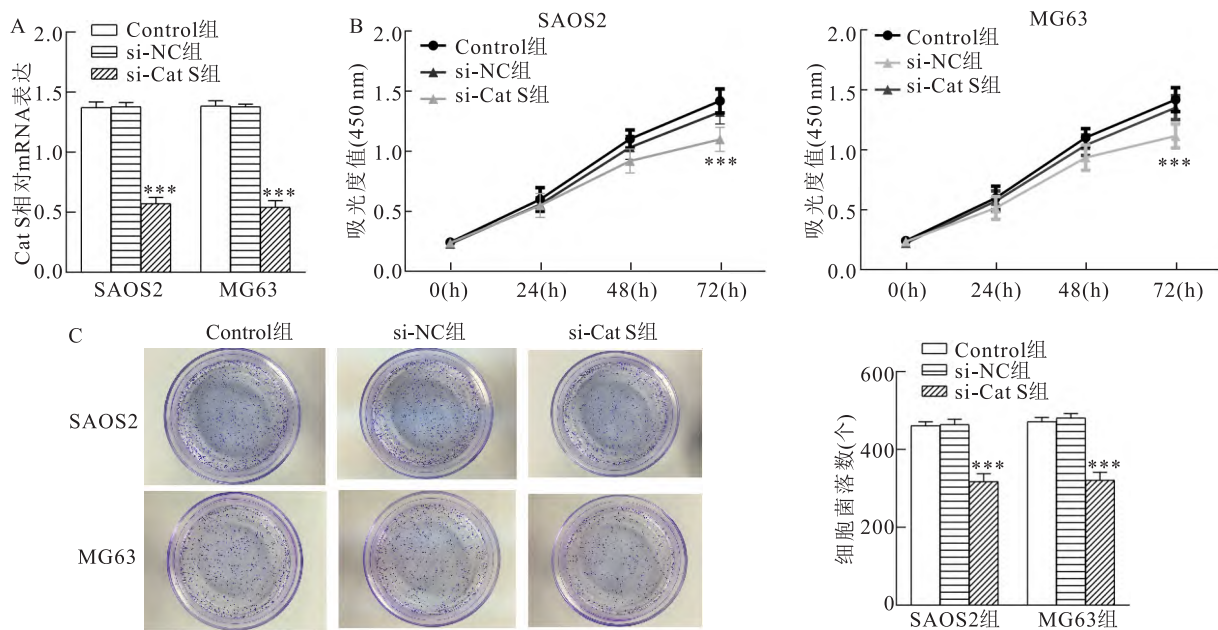


图 2 siRNA 沉默 Cat S 基因对人骨肉瘤细胞 SAOS2 和 MG63 增殖活性的影响

A: RT-PCR 检测 si-Cat S 和 si-NC 的转染效率; B: 敲低 Cat S 对 SAOS2 和 MG63 细胞增殖能力的影响; C: 敲低 Cat S 对 SAOS2 和 MG63 细胞集落形成能力的影响; 与 si-NC 组比较: *** $P < 0.001$

痕实验和 Transwell 实验检测敲低 Cat S 对 SAOS2 和 MG63 细胞迁移和侵袭能力的影响。如图 3A 所示,与 si-NC 组比较,si-Cat S 组中 SAOS2 和 MG63 细胞的迁移能力受到抑制,差异有统计学意义($F = 16.52, P < 0.001$)。如图 3B 所示,与 si-NC 组比较,si-Cat S 组中 SAOS2 和 MG63 细胞的侵袭能力受到抑制,差异有统计学意义($F = 12.19, P < 0.001$)。

2.4 siRNA 沉默 Cat S 基因对骨肉瘤 SAOS2 细胞凋亡的影响 Western blot 实验用于检测敲低 Cat S 对 SAOS2 细胞凋亡的影响。如图 4 所示,与 si-NC 组比较,si-Cat S 组抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调,而促进促凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 的表达上调($t =$

$9.12, P < 0.001$),差异有统计学意义。以上结果显示,敲低 Cat S 能诱导 SAOS2 和 MG63 细胞凋亡。

2.5 siRNA 沉默 Cat S 基因对骨肉瘤 SAOS2 细胞 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白表达的影响 Western blot 实验检测了 Cat S 对人骨肉瘤细胞 Wnt/ β -catenin 通路的调控作用。如图 5 所示,与 si-NC 组比较,si-Cat S 组细胞中 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白 LRP5、 β -catenin、C-myc 和 Cyclin D1 的表达下调($t = 17.32, P < 0.001$),差异有统计学意义。综合上述结果表明,Cat S 能在人骨肉瘤细胞中发挥促癌作用加剧癌细胞的生长,其机制可能与 Wnt/ β -catenin 通路的激活有关。

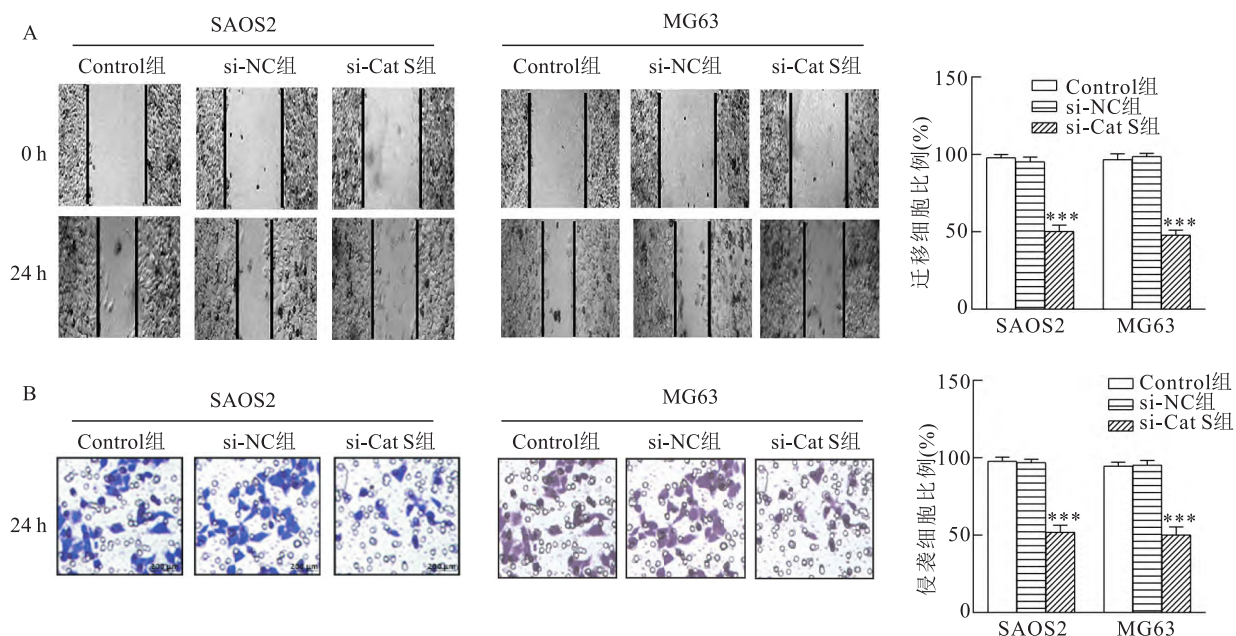


图3 siRNA 沉默 Cat S 基因对人骨肉瘤细胞 SAOS2 和 MG63 迁移和侵袭能力的影响

A:敲低 Cat S 对 SAOS2 和 MG63 细胞迁移能力的影响;B:敲低 Cat S 对 SAOS2 和 MG63 细胞侵袭能力的影响;与 si-NC 组比较:*** $P < 0.001$

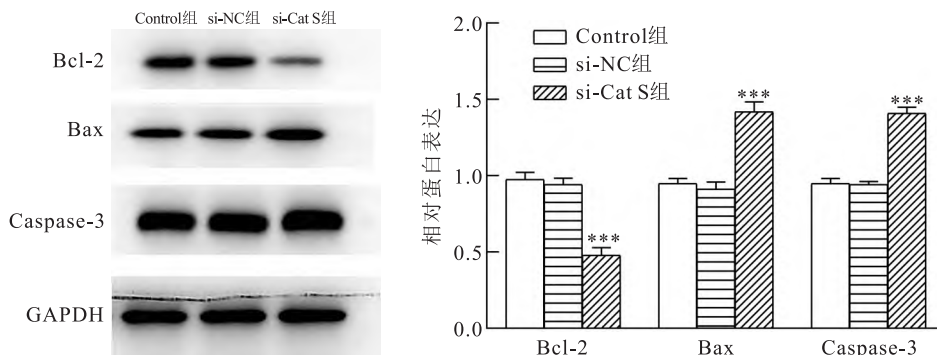


图4 siRNA 沉默 Cat S 基因对骨肉瘤 SAOS2 细胞凋亡的影响

与 si-NC 组比较:*** $P < 0.001$

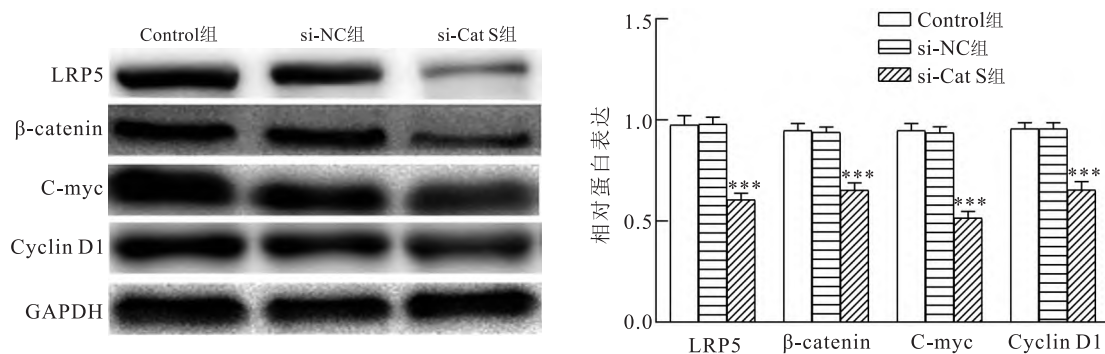


图5 siRNA 沉默 Cat S 基因对骨肉瘤 SAOS2 细胞 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白表达的影响
与 si-NC 组比较: *** $P < 0.001$

3 讨论

Cat S 作为一种溶酶体酶有前体和成熟型两种形式,其被激活后首先会被分泌到细胞表面,然后再进入到细胞外环境中发挥作用^[5]。有报道^[6]称 Cat S 已被证实包括肝细胞癌、脑癌和结肠癌等在内的一系列人类肿瘤类型中表达失控,同时 Cat S 表达的上调能诱导肿瘤的生长、侵袭、转移和血管生成。如,Cat S 在肝癌细胞 MHCC97-H 中高表达,且抑制 Cat S 的表达可以有效抑制肝癌细胞增殖,迁移和血管生成^[7]。在胃癌中,Cat S 在 16 个胃癌细胞系和 115 个胃癌临床样本中高表达,且沉默 Cat S 可以有效抑制体外胃癌细胞的迁移和侵袭^[8]。此外,Cat S 还可以通过水解血脑屏障中的 JAM-B 蛋白促进肿瘤细胞渗入大脑,而抑制 Cat S 的表达可明显减少脑转移^[9]。因此,Cat S 被普遍认为是肿瘤治疗的新的潜在靶点。本研究发现 Cat S 在人骨肉瘤细胞 SAOS2 和 MG63 中高表达,敲低 Cat S 基因可以有效抑制人骨肉瘤细胞 SAOS2 和 MG63 的增殖、迁移和侵袭,并促进凋亡,提示了 Cat S 与骨肉瘤的发生发展密切相关并发挥着促癌作用。

Wnt/ β -catenin 信号通路已被诸多研究表明在癌症及骨质疏松等疾病过程中发挥了重要作用^[10]。作为 Wnt/ β -catenin 信号通路的关键调控因子, β -catenin 的异常表达通常会导致细胞不能通过磷酸化和泛素化将其降解而致使 β -catenin 积累。随后,过量的 β -catenin 会进入细胞核内并激活对细胞分裂和生长至关重要的 c-Myc 和 Cyclin D1 并最终诱导细胞增殖生长。因此, β -catenin、c-Myc 和 Cyclin D1 的异常表达通常与 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活有关,而这些关键蛋白也常被用作药物靶点来筛选可用于癌症治疗的小分子。在骨肉瘤中,FOXO1

转录因子可以通过降低 β -catenin 的表达抑制人骨肉瘤细胞的活性进而阻止肿瘤的生长^[11]。c-Myc 作为一种多效性转录因子也已被证明在人骨肉瘤细胞中可以通过激活 MEK-ERK 通路促进癌细胞的迁移侵袭^[12]。Cyclin D1 是细胞周期进程的中心调节器,相比较正常细胞,Cyclin D1 在人骨肉瘤细胞中的表达水平升高,并且过表达 Cyclin D1 可以有效促进人骨肉瘤细胞的生长^[13]。除上述 3 种 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白外,本研究还检测了 LRP5 的表达情况。LRP5 是一种具有单次跨膜蛋白结构的低密度脂蛋白受体相关蛋白,同时也是 Wnt/ β -catenin 通路介导的信号传导的共受体。临床研究已证实 LRP5 在骨肉瘤临床样本中表达升高,且 LRP5 的表达与骨肉瘤患者的不良预后呈正相关,提示了 LRP5 可作为诊断骨肉瘤进展的潜在生物标志物^[14]。同时组织蛋白酶家族与 Wnt/ β -catenin 通路的调控密切相关。例如,Basu et al^[15]已报道了 Cat D 过表达通过增强 Wnt/ β -catenin 通路促进了直肠癌细胞的过度增殖和转移。在本研究中,敲低 Cat S 基因可以下调 LRP5、 β -catenin、C-myc 和 Cyclin D1 的表达,提示了 Cat S 低表达可能通过抑制 Wnt/ β -catenin 通路参与了人骨肉瘤细胞的生长的过程。

综上所述,本研究表明 Cat S 在人骨肉瘤细胞 SAOS2 和 MG63 中呈高表达。敲低 Cat S 基因可以通过下调 Wnt/ β -catenin 通路来抑制人骨肉瘤细胞 SAOS2 和 MG63 的增殖、迁移和侵袭并诱导凋亡。这些结果已经初步表明了 Cat S 可能是骨肉瘤分子靶向治疗的潜在靶点。后续研究将会通过加入 Wnt/ β -catenin 通路激活剂来进一步验证 Cat S 对人骨肉瘤细胞增殖生长的调控作用,同时有关 Cat S 在骨肉瘤中的体内和临床研究也将一并展开。

参考文献

- [1] Daw N, Chou A J, Jaffe N, et al. Recurrent osteosarcoma with a single pulmonary metastasis: a multi-institutional review [J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(2): 278–82.
- [2] Small D, Burden R, Jaworski J, et al. Cathepsin S from both tumor and tumor-associated cells promote cancer growth and neovascularization [J]. *Int J Cancer*, 2013, 133(9): 2102–12.
- [3] Xu J, Li D, Ke Z, et al. Cathepsin S is aberrantly overexpressed in human hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Med Rep*, 2009, 2(5): 713–8.
- [4] Gormley J, Hegarty S, O'grady A, et al. The role of Cathepsin S as a marker of prognosis and predictor of chemotherapy benefit in adjuvant CRC: a pilot study [J]. *Br J Cancer*, 2011, 105(10): 1487–94.
- [5] Wang B, Sun J, Kitamoto S, et al. Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(9): 6020–9.
- [6] Zhang L, Wang H, Xu J. Cathepsin S as a cancer target [J]. *Neoplasma*, 2015, 62(1): 16–26.
- [7] Fan Q, Wang X, Zhang H, et al. Silencing cathepsin S gene expression inhibits growth, invasion and angiogenesis of human hepatocellular carcinoma *in vitro* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 425(4): 703–10.
- [8] Yixuan Y, Kiat L, Yee C L, et al. Cathepsin S mediates gastric cancer cell migration and invasion via a putative network of metastasis-associated proteins [J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(9): 4767–78.
- [9] Sevenich L, Bowman R, Mason S, et al. Analysis of tumour-and stroma-supplied proteolytic networks reveals a brain-metastasis-promoting role for cathepsin S [J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(9): 876–88.
- [10] Fang F, Van Cleave A, Helmuth R, et al. Targeting the Wnt/ β -catenin pathway in human osteosarcoma cells [J]. *Oncotarget*, 2018, doi:10.18632/oncotarget.26377.
- [11] Guan H, Tan P, Xie L, et al. FOXO1 inhibits osteosarcoma oncogenesis via Wnt/ β -catenin pathway suppression [J]. *Oncogenesis*, 2015, 4(9): e166.
- [12] Han G, Wang Y, Bi W. c-Myc overexpression promotes osteosarcoma cell invasion via activation of MEK-ERK pathway [J]. *Oncol Res*, 2012, 20(4): 149–56.
- [13] Duan G, Zhang C, Xu C, et al. Knockdown of MALAT1 inhibits osteosarcoma progression via regulating the miR 34a/cyclin D1 axis [J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(1): 17–28.
- [14] Hoang B, Kubo T, Healey J, et al. Expression of LDL receptor-related protein 5 (LRP5) as a novel marker for disease progression in high-grade osteosarcoma [J]. *Int J Cancer*, 2004, 109(1): 106–11.
- [15] Basu S, Cheriyaundath S, Gavert N, et al. Increased expression of cathepsin D is required for L1-mediated colon cancer progression [J]. *Oncotarget*, 2019, 10(50): 5217.

Effect and mechanism of cathepsin S on proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells

Ji Hairu¹, Kong Lingwei², Cao Sheng², Lü Jiaying¹, Li Jiaying¹, Liu Chunyu¹, Jin Yu²

(¹Dept of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000;

²Dept of Trauma Surgery, Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000)

Abstract Objective To investigate the effects of cathepsin S (Cat S) on proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells and its potential regulatory mechanism. **Methods** Normal osteoblasts (hFOB) and osteosarcoma cells (SAOS2 and MG63) were selected as the subjects of this study. Cat S small interfering (si) RNA (si-Cat S) and negative control sequence (si-NC) were transfected into SAOS2 and MG63 cells to modulate the expression of Cat S in osteosarcoma cells. The experimental cells were randomly divided into four groups: hFOB group (hFOB cells), Control group (untransfected SAOS2 or MG63 cells), si-NC group (SAOS2 or MG63 cells transfected with si-NC) and si-Cat S group (SAOS2 or MG63 cells transfected with si-Cat S). The expression of Cat S in SAOS2 and MG63 cells was detected by RT-PCR and Western blot. Effect of Cat S knockdown on the proliferation of SAOS2 and MG63 cells was assessed by CCK-8 and clone formation assays. And effects of Cat S knockdown on the migration and invasion of SAOS2 and MG63 cells were determined by wound-healing and Transwell assays, respectively. Western blot assay was performed to measure the effects of SAOS2 knockdown on the expressions of apoptosis-related proteins (Bcl-2, Bax and Caspase-3) and Wnt/ β -catenin pathway related proteins (LRP5, β -catenin, C-myc and Cyclin D1) in SAOS2 cells. **Results** Compared with hFOB group, the expression of Cat S in SAOS2 group and MG63 group was upregulated ($P < 0.001$). In addition, compared with si-NC group, the proliferation, migration

利用活细胞工作站构建 巨噬细胞吞噬子宫内膜癌细胞的体外模型

檀学文,陈维乐,陈义昭,方亦龙,蒋海峰,许振,涂佳杰,魏伟

摘要 **目的** 利用活细胞工作站观察巨噬细胞吞噬子宫内膜癌细胞的过程及流式细胞术检测巨噬细胞吞噬肿瘤细胞对 T 细胞的活化。**方法** 将 Ishikawa 细胞与 THP-1 诱导的巨噬细胞分别用 CFSE 荧光探针和 CD11b 标记,混合接种于成像皿,实时记录 120 min 内巨噬细胞对 Ishikawa 细胞的吞噬,流式细胞术检测巨噬细胞与 Ishikawa 细胞共培养后对 T 细胞活化的影响。**结果** 共培养的 2 种细胞相互接触后 Ishikawa 细胞的绿色荧光被巨噬细胞摄取,且巨噬细胞能连续吞噬多个 Ishikawa 细胞。吞噬了 Ishikawa 细胞的巨噬细胞能诱导细胞毒性 T 细胞分化。**结论** 成功利用活细胞工作站构建巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的体外模型,为检测巨噬细胞及 T 细胞对肿瘤细胞双重杀伤作用提供可行的实验方法。**关键词** 活细胞工作站;巨噬细胞;Ishikawa 细胞;吞噬;细胞毒性 T 细胞

中图分类号 R 730.3;R 730.51;R 737.33;R 331

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)09-1465-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.023

巨噬细胞是固有免疫系统中的重要细胞,与肿瘤发病密切相关^[1-2]。活细胞工作站及其自带的培养系统,能模拟活细胞的生活环境,是一种体外研究细胞行为的重要方法^[3-5]。目前流式细胞术被广泛

用于检测最终的细胞吞噬比例,但不能体现动态吞噬过程^[6]。巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的过程是肿瘤微环境中一种复杂的相互作用^[7],利用活细胞工作站直接记录巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的动态过程有助于进一步研究这一复杂过程,并且能够继续探讨巨噬细胞吞噬肿瘤细胞后对 CD8⁺ IFN γ ⁺ 细胞毒性 T 细胞激活的影响。该研究利用活细胞工作站,建立了巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的体外模型,这为深入研究巨噬细胞吞噬肿瘤细胞的动态过程提供了一种可靠的实验方法,同时研究巨噬细胞吞噬肿瘤细胞后增强 T 细胞的抗原提呈作用,证实其能活化细胞毒性 T 细胞对肿瘤的杀伤作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人源单核细胞系 THP-1 和人源子宫内膜癌细胞系 Ishikawa 购自武汉普诺赛公司。

1.2 试剂与仪器 DMEM 无酚红高糖培养基、RPMI 1640 培养基、MEM 培养基、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)、胎牛血清购自以色列 BI 公司;胰蛋白酶、青-链霉素溶液购自上海碧云天生物技术有限公司;非必需氨基酸购自美国 Gibco 公司;荧光染料 CFSE 购自上海贝博生物科技有限公司;Brilliant Violet 421 anti-human CD11b、Brilliant Violet 421 anti-human CD8、PE/Cy7 anti-human IFN γ 、PE anti-human CD3 购自美国 Biolegend 公司;ProLongTM Live Antifade Reagent 购自美国 ThermoFisher 公司;人源淋巴细胞分离液购自北京达科为生物技术有限公司;玻璃底成像皿购自北京兰杰

2021-12-03 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:31900616)

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所,抗炎免疫药物教育部重点实验室,抗炎免疫药物安徽省协同创新中心,安徽医科大学类风湿关节炎研究中心,合肥 230032

作者简介:檀学文,男,硕士研究生;

涂佳杰,男,博士,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: tujiajie@ahmu.edu.cn;

魏伟,男,博士,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

and invasion of cells in si-Cat S group were reduced ($P < 0.001$). Results of Western blot showed that compared with si-NC group, the expression of Bcl-2 in si-Cat S group was downregulated, while the expression of Bax and Caspase-3 were upregulated ($P < 0.001$). Meanwhile, compared with si-NC group, the expression of LRP5, β -catenin, C-myc and Cyclin D1 in si-Cat S group was downregulated ($P < 0.001$). **Conclusion** Cat S siRNA knock-down can inhibit the proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells and induce apoptosis by regulating Wnt/ β -catenin pathway, indicating that Cat S may be one of the potential targets for the treatment of osteosarcoma.

Key words osteosarcoma; cathepsin S; small interfering RNA; proliferation; Wnt/ β -catenin