

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2026.08.002

· 基础研究 ·

靶向HSP90 β 的单克隆抗体2G1对MG-63球形细胞骨肉瘤干细胞样特征的影响及其机制

周艳星¹, 左昌俊², 郑蕊³, 陈磊³, 杰永生³, 舒雄³, 周艳芳⁴, 詹翼⁵ (1. 广东医科大学 医学技术学院, 广东 东莞 523808; 2. 武汉中西医结合骨科医院暨武汉体育学院附属医院, 湖北 武汉 430079; 3. 首都医科大学北京积水潭医院 北京市创伤骨科研究所, 北京 100035; 4. 广东医科大学 基础医学院, 广东 东莞 523808; 5. 广东医科大学附属东莞第一医院, 广东 东莞 523808)

[摘要] **目的:**以MG-63球形细胞作为骨肉瘤干细胞(OSC)富集模型,探讨靶向细胞膜表面HSP90 β 的单抗2G1对其生物学特征的影响及其与Wnt信号相关蛋白变化的关系。**方法:**采用无血清悬浮培养人骨肉瘤MG-63细胞获得MG-63球形细胞。通过免疫荧光共定位和免疫共沉淀实验鉴定单克隆抗体2G1识别的靶抗原;采用流式细胞术检测MG-63亲本细胞和MG-63球形细胞膜表面HSP90 β 的表达水平;通过甲基纤维素成球实验、Transwell迁移和侵袭实验评价单抗2G1对MG-63球形细胞成球、迁移和侵袭能力的影响;采用裸鼠皮下移植瘤模型观察单抗2G1对MG-63球形细胞体内成瘤能力的影响;进一步结合转录组测序、京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析及WB检测,分析单抗2G1处理后相关分子通路及干细胞特性、上皮-间充质转化(EMT)、Wnt/ β -catenin信号通路相关蛋白表达变化。**结果:**免疫荧光共定位和免疫共沉淀结果显示,单抗2G1识别的靶抗原为HSP90 β 。流式细胞术结果显示,MG-63球形细胞膜表面HSP90 β 阳性表达细胞比例为 $(20.77 \pm 1.29)\%$,显著高于MG-63亲本细胞的 $(2.87 \pm 0.33)\%$ ($P < 0.001$)。与对照组相比,单抗2G1处理后MG-63球形细胞成球数由 82.67 ± 4.70 降至 42.67 ± 4.00 ,迁移细胞数由 117.00 ± 5.57 降至 78.33 ± 5.03 ,侵袭细胞数由 130.70 ± 5.03 降至 89.33 ± 5.03 (均 $P < 0.001$)。裸鼠移植瘤实验显示,单抗2G1组移植瘤生长受到抑制,瘤质量抑制率和瘤体积抑制率分别为 $(31.83 \pm 16.36)\%$ 和 $(22.00 \pm 15.48)\%$ 。转录组测序共筛选出698个差异表达基因,其中329个基因上调,369个基因下调;KEGG富集分析显示差异表达基因涉及Wnt信号通路。WB法检测结果显示,与对照组相比,单抗2G1组SOX2、OCT4、N-cadherin、p- β -catenin和c-Myc表达下调,E-cadherin表达上调 (均 $P < 0.001$)。**结论:**细胞膜表面HSP90 β 在MG-63球形细胞中高表达,靶向HSP90 β 的单抗2G1可抑制MG-63球形细胞的成球、迁移、侵袭及体内成瘤能力,并影响其干细胞标志物、EMT相关标志物及Wnt/ β -catenin信号通路蛋白的表达水平,提示HSP90 β 可能参与调控MG-63球形细胞的OSC样特征,可作为骨肉瘤靶向治疗的潜在研究靶点。

[关键词] 骨肉瘤干细胞(OSC);HSP90 β ;Wnt/ β -catenin信号通路;干细胞特性;功能性单抗

[中图分类号] R738.1;R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2026)08-0822-08

Effects and underlying mechanisms of HSP90 β -targeting monoclonal antibody 2G1 on osteosarcoma stem-like characteristics of MG-63 sphere cells

Zhou Yanxing¹, Zuo Changjun², Zheng Rui³, Chen Lei³, Jie Yongsheng³, Shu Xiong³, Zhou Yanfang⁴, Zhan Yi⁵ (1. School of Medical Technology, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, Guangdong, China; 2. Wuhan Orthopaedic Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine & Affiliated Hospital of Wuhan Sports University, Wuhan 430079, Hubei, China; 3. Beijing Institute of Traumatic Orthopaedics, Beijing Jishuitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100035, China; 4. School of Basic Medicine, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, Guangdong, China; 5. The First Affiliated Dongguan Hospital of Guangdong Medical University, Dongguan 523808, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of the HSP90 β -targeting monoclonal antibody 2G1 on the biological characteristics of MG-63 sphere cells, an osteosarcoma stem cell (OSC)-enriched model, and to explore its association with changes in Wnt signaling-related proteins. **Methods:** MG-63 sphere cells were generated from the human osteosarcoma cell line MG-63 by serum-free suspension culture. The target antigen recognized by monoclonal antibody 2G1 was identified by immunofluorescence co-localization

[基金项目] 2022年广东医科大学青年培育基金(2XK22029/2001);武汉市医学科研项目(WX21D51);2025年度广东医科大学临床+基础科技创新专项计划

[作者简介] 周艳星(1982—),男,医学硕士,实验师

[通信作者] 周艳芳;詹翼(扫码获取作者通信方式)



and co-immunoprecipitation assays. Flow cytometry was used to determine the expression of cell surface HSP90 β in parental MG-63 cells and MG-63 sphere cells. Methylcellulose sphere formation, Transwell migration, and invasion assays were performed to evaluate the effects of 2G1 on the sphere-forming, migratory, and invasive capacities of MG-63 sphere cells. A nude mouse subcutaneous xenograft model was established to assess the effect of 2G1 on the tumorigenic potential of MG-63 sphere cells *in vivo*. Transcriptome sequencing, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis, and Western blotting were further performed to investigate alterations in signaling pathways and the expression of proteins associated with stem-like characteristics, epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related markers, and the Wnt/ β -catenin signaling pathway following 2G1 treatment. **Results:** Immunofluorescence co-localization and co-immunoprecipitation demonstrated that HSP90 β was the target antigen recognized by monoclonal antibody 2G1. Flow cytometric analysis showed that the proportion of HSP90 β -positive cells on the cell surface was significantly higher in MG-63 sphere cells than in parental MG-63 cells [(20.77 $\pm$ 1.29)% vs (2.87 $\pm$ 0.33)%, P < 0.001]. Compared with the control group, 2G1 treatment significantly reduced the number of spheres formed (82.67 $\pm$ 4.70 vs 42.67 $\pm$ 4.00), migrated cells (117.00 $\pm$ 5.57 vs 78.33 $\pm$ 5.03), and invaded cells (130.70 $\pm$ 5.03 vs 89.33 $\pm$ 5.03) (all P < 0.001). In the nude mouse xenograft model, 2G1 treatment suppressed tumor growth, with tumor weight and tumor volume inhibition rates of (31.83 $\pm$ 16.36)% and (22.00 $\pm$ 15.48)%, respectively. Transcriptome sequencing identified 698 differentially expressed genes, including 329 upregulated and 369 downregulated genes. KEGG enrichment analysis indicated enrichment of differentially expressed genes in the Wnt signaling pathway. Western blotting analysis further demonstrated that the expression levels of SOX2, OCT4, N-cadherin, phosphorylated β -catenin (p- β -catenin), and c-Myc were significantly decreased, whereas E-cadherin expression was significantly increased following 2G1 treatment (all P < 0.001). **Conclusion:** Cell surface HSP90 β is highly expressed in MG-63 sphere cells. Targeting HSP90 β with monoclonal antibody 2G1 suppresses the sphere-forming, migratory, invasive, and tumorigenic capacities of MG-63 sphere cells and alters the expression levels of stem cell markers, EMT-related markers, and Wnt/ β -catenin signaling pathway proteins. These findings suggest that HSP90 β may contribute to the regulation of osteosarcoma stem-like characteristics in MG-63 sphere cells and may represent a potential therapeutic target for osteosarcoma.

[Key words] osteosarcoma stem cell (OSC); HSP90 β ; Wnt/ β -catenin signaling pathway; stem-like characteristics; functional monoclonal antibody

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(8): 822-829. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2026.08.002]

骨肉瘤是骨骼系统最常见的恶性肿瘤,占原发性恶性骨肿瘤的35%,好发于青少年长骨干骺端^[1]。新辅助化疗联合保肢手术自20世纪70年代起成为主流疗法,但转移性骨肉瘤患者生存率长期未见改善,亟需深入解析其复发与转移的分子机制^[2]。近年发现骨肉瘤干细胞(osteosarcoma stem cell, OSC)具有自我更新、多向分化和高致瘤性,是驱动肿瘤进展的关键亚群^[3-4],而MG-63球形细胞可作为OSC样特征的体外富集模型,模拟OSC的成球、侵袭及耐药行为。HSP90 β (NM_007355.4)作为胞质中主要的分子伴侣蛋白,参与调控肿瘤转化、侵袭、转移及血管生成^[5],在多种恶性肿瘤中表达上调且与不良预后相关^[6-8],但其在OSC中的调控作用尚不明晰,尤其涉及膜表面HSP90 β 的功能。因此,本研究在前期获得可特异性识别骨肉瘤细胞膜表面HSP90 β 的功能性单抗2G1^[9]的基础上,以MG-63球形细胞为OSC富集模型,评估HSP90 β 对OSC成球、侵袭及成瘤能力的调控效应,并基于Wnt/ β -catenin信号通路阐明其分子机制,以期为骨肉瘤精准靶向治疗提供新靶点与理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、实验材料与动物

人骨肉瘤MG-63细胞、EMEM培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)购自武汉普诺赛生命科技有限公司,HSP90 β 功能性抗体2G1为前期实验筛选获得。DMEM/F-12培养液购自美国HyClone公司,B27、bFGF、EGF、TRIzol试剂、BCA蛋白定量试剂盒均购自美国Invitrogen公司,基质胶和低黏附24孔板购自美国Corning公司,Transwell小室和PVDF膜购自美国Millipore公司,RIPA裂解液、蛋白酶抑制剂混合物、0.1%结晶紫溶液、中性树脂和4%多聚甲醛购自北京索莱宝科技有限公司,同型对照抗体、正常小鼠IgG、兔IgG、甲基纤维素、DAPI和Tween-20购自美国Sigma公司。HSP90 β 兔单抗(1:100用于流式细胞术,1:1 000用于WB实验)购自英国Abcam公司, β -actin、SOX2、OCT4、E-cadherin、N-cadherin、 β -catenin、p- β -catenin、c-Myc兔单抗(1:1 000)均购自美国CST公司,HRP标记的山羊抗兔二抗及HRP标记的山羊抗小鼠二抗(1:5 000)均购自美国Jackson公司。

4~5周龄雌性BALB/c裸鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司,饲养于SPF级动物房。所有动物实验经北京积水潭医院动物伦理委员会审批,批准号:积伦动审字第2023-04-04。

1.2 MG-63 亲本细胞和球形细胞的培养

人骨肉瘤 MG-63 细胞采用含 10% FBS 的 EMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中常规培养, 作为 MG-63 亲本细胞。实验所用细胞传代数控制在第 3~5 代。取对数生长期 MG-63 细胞, 消化后制备单细胞悬液, 以 2×10^4 个/mL 的密度接种于低黏附的 T75 培养瓶, 每瓶加入 15 mL 球形细胞培养基。球形细胞培养采用 DMEM/F-12(1:1) 无血清培养基, 培养基中补充 EGF 和 bFGF, 使其终浓度均为 20 ng/mL; B27 终浓度为 2%。细胞于 37 °C、5% CO₂ 条件下悬浮培养 11 d, 培养期间每隔 1 d 补液 1~2 mL, 并补充生长因子至原终浓度。培养结束后收集 MG-63 球形细胞用于后续实验。

1.3 流式细胞术检测 MG-63 亲本细胞和球形细胞膜表面 HSP90 β 的表达

MG-63 亲本细胞和球形细胞使用无血清培养液重悬, 1×10^6 个/管加入检测管, 各组分别加入 HSP90 β 抗体及同型对照, 于 37 °C、5% CO₂ 反应 1 h, 离心弃上清并洗 2 次后, 再加入 500 μ L PBS 重悬, 过筛网后使用流式细胞仪检测细胞膜表面 HSP90 β 的表达水平。

1.4 免疫共沉淀鉴定单抗 2G1 识别的 HSP90 β 抗原

Protein G 琼脂糖分别与 10 μ g 商业化 HSP90 β 抗体、纯化单抗 2G1 或相应阴性对照抗体预反应, 形成抗体-Protein G 琼脂糖复合物。随后收集 MG-63 球形细胞, 采用含蛋白酶抑制剂混合物的 200 μ L RIPA 裂解液裂解细胞, 离心后取上清作为总蛋白裂解液。将等量总蛋白裂解液分别加入上述抗体-Protein G 琼脂糖复合物中, 于 4 °C 反应过夜, 以免免疫沉淀目标蛋白。反应结束后离心收集琼脂糖珠, PBS 洗涤 3 次。免疫沉淀产物经 WB 法检测, 并分别使用单抗 2G1 或商业 HSP90 β 抗体进行验证, 以确认单抗 2G1 识别的抗原为 HSP90 β 。

1.5 HSP90 β 在 MG-63 球形细胞的免疫荧光定位

MG-63 球形细胞在 24 孔板中培养 48 h 后, 用无血清培养基洗涤 2 次。细胞与 HSP90 β 抗体(纯化单克隆抗体 2G1 或商业 HSP90 β 抗体)在室温下反应 1 h, 然后用含 1% BSA 的 PBS 洗涤。随后, 细胞用 4% 多聚甲醛固定 15 min 后用含 1% BSA 和 0.05% Tween-20 的 PBS 洗涤, 并与荧光二抗在室温下避光反应 30 min。使用 DAPI 进行核染色, 通过荧光显微镜进行观察。

1.6 无血清甲基纤维素成球实验检测单抗 2G1 对 MG-63 球形细胞成球能力

设对照组和单抗 2G1 组, MG-63 球形细胞分别经等浓度同型对照 IgG 或单抗 2G1(50 μ g/mL)处理

4 d 后用于成球实验。用无血清培养基重悬, 以每孔 5×10^2 个细胞接种于低黏附 24 孔板, 每孔加入 2 mL 含 1% 甲基纤维素的无血清培养基, 每组设 3 个复孔。于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 7~11 d 后观察, 并统计符合成球标准的细胞球数量(标准: 直径 $\geq 50 \mu$ m 且由 ≥ 50 个细胞构成的细胞球)。

1.7 Transwell 检测单抗 2G1 对 MG-63 球形细胞迁移和侵袭能力的影响

实验设对照组和单抗 2G1 组, MG-63 球形细胞分别经等浓度同型对照 IgG 或单抗 2G1(50 μ g/mL)处理 4 d 后, 用无血清培养基重悬。以 5×10^4 个/孔细胞加入 Transwell 上室(8 μ m 孔径), 下室加入 650 μ L 含 10% FBS 的完全培养基。侵袭实验中, 上室预先铺入经预冷无血清培养基按 1:8 稀释的 Matrigel 50 μ L(约 1 mg/mL 工作浓度, 37 °C 处理 30 min); 迁移实验中, 上室不加基质胶。细胞于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养 24 h 后取出小室, 用棉签轻轻擦去上室未迁移/侵袭的细胞, 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 0.1% 结晶紫室温染色 15 min, PBS 漂洗后中性树脂封片。于 200 $\times$ 显微镜下随机选取 5 个视野计数, 结果以迁移/侵袭细胞数的 $\bar{x} \pm s$ 表示, 相对迁移(侵袭)率 = 实验组迁移(侵袭)细胞数/对照组迁移(侵袭)细胞数 $\times 100\%$ 。

1.8 裸鼠皮下移植瘤实验检测单抗 2G1 对 MG-63 球形细胞体内成瘤能力的影响

按体质量随机将 BALB/c 裸鼠分为对照组和单抗 2G1 组, 每组 5 只。收集胰酶消化后的 MG-63 球形细胞, 以无血清培养基制备单细胞悬液, 调整细胞浓度至 5×10^7 /mL。每只裸鼠于前肢腋下皮下接种 0.2 mL 细胞悬液(即 1×10^7 个细胞/只)。接种后第 3 天起, 2G1 组腹腔注射单抗 2G1(10 mg/kg), 对照组腹腔注射等体积同型对照 IgG, 每 3 天给药 1 次, 连续给药 4 周。自接种后第 6 天起, 每 3 天用游标卡尺测量移植瘤长径(a)和短径(b), 按公式 $V = a \times b^2/2$ 计算移植瘤体积。于末次给药后 24 h(接种后第 30 天)处死裸鼠, 完整剥离移植瘤, 称量瘤质量, 计算各组平均瘤质量、标准差及 P 值。

1.9 转录组测序和数据分析

收集同型对照 IgG(50 μ g/mL)和单抗 2G1(50 μ g/mL)分别处理 4 d 后的 MG-63 球形细胞各 1×10^6 个, 使用 TRIzol 试剂裂解, 裂解液于 -80 °C 保存。RNA 测序由 Illumina NovaSeq 6000 平台完成。以 $|\log_2FC| \geq 1$ 且校正后 $P < 0.05$ 为筛选标准, 使用 R 包“DESeq2”进行差异表达基因鉴定, 使用 clusterProfiler 对差异基因进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,

KEGG)通路富集分析。

1.10 WB法检测不同组别MG-63细胞中相关蛋白的表达

根据实验目的,分别收集MG-63亲本细胞和MG-63球形细胞,用于检测HSP90 β 蛋白表达;另收集同型对照IgG组和单抗2G1组MG-63球形细胞,用于检测HSP90 β 、SOX2、OCT4、E-cadherin、N-cadherin、 β -catenin、p- β -catenin及c-Myc蛋白表达。各组细胞加入RIPA裂解液提取总蛋白,采用BCA法测定蛋白浓度。取等量蛋白样品,经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转移至PVDF膜。PVDF膜经5%脱脂奶粉室温封闭1 h,加入相应一抗,于4℃反应过夜。次日经TBST洗膜后,加入相应HRP标记二抗,室温反应1 h。再次洗膜后,采用ECL化学发光法显影。使用ImageJ软件分析蛋白条带灰度值,以 β -actin或GAPDH作为内参计算目的蛋白相对表达量。

1.11 统计学处理

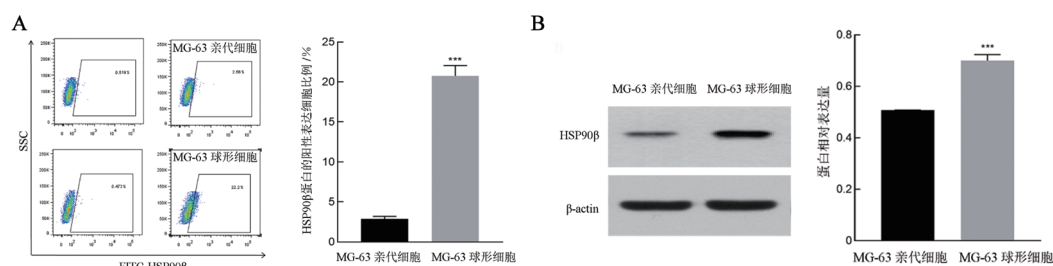
采用GraphPad Prism 9.5软件及R软件进行统计学分析。所有计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间连续变

量比较采用独立样本 t 检验。多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),并采用Tukey法进行事后多重比较。转录组测序数据采用DESeq2软件进行差异表达分析,并采用Benjamini-Hochberg方法校正多重检验错误率。所有统计检验均采用双侧检验,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MG-63球形细胞中膜蛋白HSP90 β 的表达情况

流式细胞术检测膜蛋白HSP90 β 在MG-63亲本细胞和MG-63球形细胞上的表达比例,结果(图1A, $P < 0.001$)显示,HSP90 β 在MG-63亲本细胞中表达比例为 $(2.87 \pm 0.33)\%$,在MG-63球形细胞表达比例为 $(20.77 \pm 1.29)\%$,MG-63球形细胞中HSP90 β 表达显著高于MG-63亲本细胞。WB检测结果(图1B, $P < 0.001$)显示,膜蛋白HSP90 β 在MG-63球形细胞中高表达,提示膜蛋白HSP90 β 在MG-63球形细胞中富集表达。



A:流式细胞分析HSP90 β 在MG-63亲本细胞和MG-63球形细胞中的表达情况;B:WB法检测MG-63亲本细胞和球形细胞中HSP90 β 表达的差异,与亲本细胞比较,*** $P < 0.001$ 。

图1 HSP90 β 在MG-63亲本细胞和MG-63球形细胞中的表达差异

2.2 单抗2G1识别MG-63球形细胞中的HSP90 β 抗原

使用商业HSP90 β 抗体与纯化的2G1抗体对MG-63球形细胞进行活细胞免疫荧光共定位和免疫沉淀实验。活细胞免疫荧光共定位结果(图2A)显示,单抗2G1标记的靶抗原(绿色荧光)与商业HSP90 β 抗体标记的抗原(红色荧光)高度重合,且两者均定位于细胞膜。免疫沉淀实验(图2B)显示,分子量为83 000~85 000的蛋白条带能够与单抗2G1或商业HSP90 β 抗体相互作用,表明HSP90 β 是单抗2G1可识别的MG-63球形细胞靶抗原。

2.3 单抗2G1对MG-63球形细胞体外生物学功能的影响

为探究单抗2G1对MG-63球形细胞体外生物学功能的影响,本研究分别检测其成球、迁移和侵袭能力。甲基纤维素成球实验结果(图3A, $P < 0.001$)显示,与对照组相比,单抗2G1组MG-63球形细胞的成

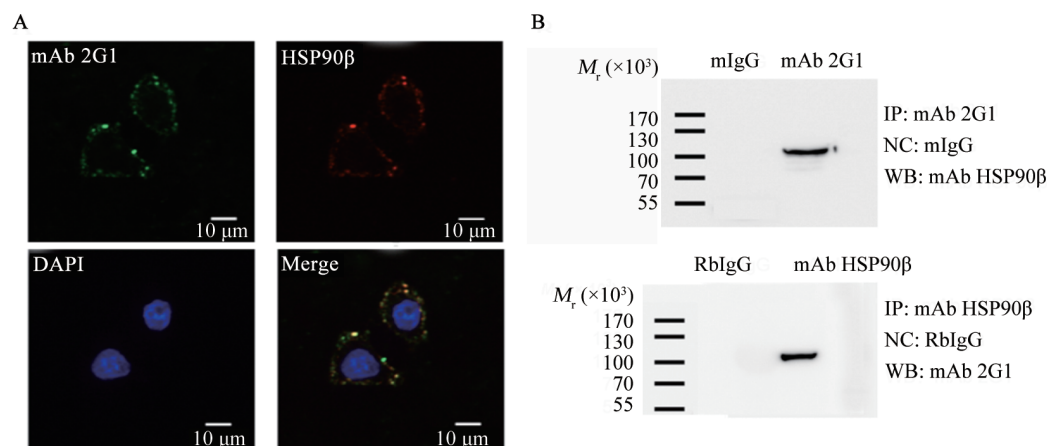
球数量明显减少,由 82.67 ± 4.70 降至 42.67 ± 4.00 。Transwell实验结果显示,单抗2G1处理后,MG-63球形细胞的迁移和侵袭能力均明显下降,其中迁移细胞数由对照组的 117.00 ± 5.57 降至 78.33 ± 5.03 (图3B, $P < 0.001$),侵袭细胞数由对照组的 130.70 ± 5.03 降至 89.33 ± 5.03 (图3C, $P < 0.001$)。上述结果提示,单抗2G1可抑制MG-63球形细胞的成球、迁移和侵袭能力。

2.4 单抗2G1处理后MG-63球形细胞HSP90 β 、干细胞特性相关蛋白及上皮-间充质转化(EMT)样标志物表达变化

为进一步评价单抗2G1对MG-63球形细胞OSC样特征相关分子表达的影响,在单抗2G1组和对照组的MG-63球形细胞中检测了SOX2和OCT4的表达。WB检测结果显示,SOX2和OCT4的表达在单抗2G1组中受到抑制。进一步采用WB法检测EMT相关

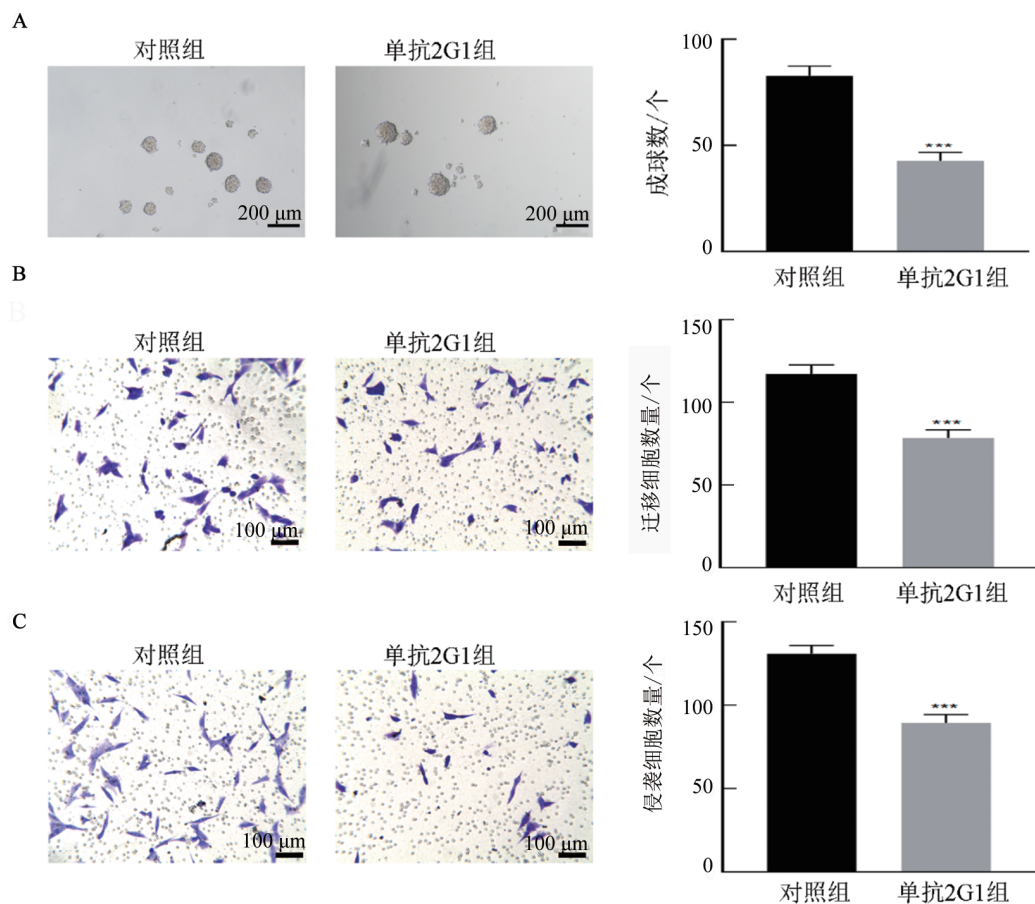
标志物,结果发现单抗2G1组中 EMT 相关标记物 E-cadherin 表达升高,而 N-cadherin 表达下降(图4, 均 $P < 0.001$),提示靶向 HSP90 β 可能影响 MG-63 球

形细胞的 EMT 样分子表型,并与其迁移、侵袭能力下降有关。



A:MG-63 球形细胞靶抗原的免疫荧光共定位(绿色荧光表示单抗2G1 标记信号,红色荧光表示 HSP90 β 抗体标记信号,蓝色荧光表示 DAPI 核染色,Merge 为合并图像);B:免疫沉淀联合 WB 法鉴定单抗2G1 结合的抗原。

图2 单抗2G1 识别靶抗原 HSP90 β 的定位与鉴定



A:单抗2G1 处理 MG-63 球形细胞后的无血清甲基纤维素成球实验;B:单抗2G1 处理 MG-63 球形细胞后的迁移实验;C:单抗2G1 处理 MG-63 球形细胞后的侵袭实验;与对照组比较,*** $P < 0.001$ 。

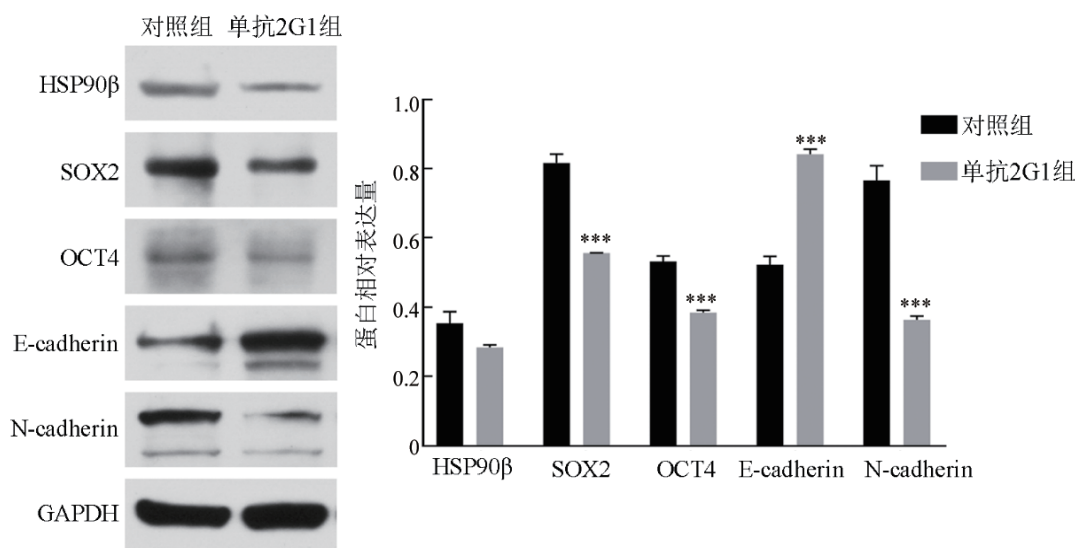
图3 单抗2G1 处理 MG-63 球形细胞后成球、迁移和侵袭能力的影响

2.5 单抗2G1 对 MG-63 球形细胞来源裸鼠移植瘤生长的影响

为进一步验证单抗2G1 对 MG-63 球形细胞体内成瘤能力的影响,本研究建立裸鼠皮下移植瘤模

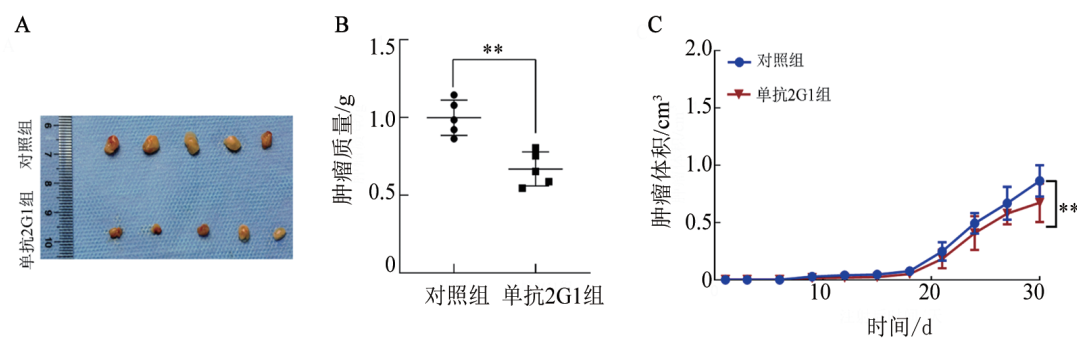
型。结果显示,与对照组相比,单抗2G1组裸鼠移植瘤生长受到明显抑制,表现为剥离后移植瘤体积较小、瘤质量显著降低(图5A、B, $P < 0.01$),且接种后第30天移植瘤体积低于对照组(图5C, $P < 0.01$)。单抗

2G1组移植瘤质量抑制率和体积抑制率分别为 $(31.83 \pm 16.36)\%$ 和 $(22.00 \pm 15.48)\%$ 。上述结果提示,靶向HSP90 β 的单抗2G1可抑制MG-63球形细胞来源移植瘤的体内生长能力。



WB法检测对照组和单抗2G1组MG-63球形细胞中干细胞特性相关蛋白HSP90 β 、SOX2、OCT4及EMT相关蛋白E-cadherin、N-cadherin的表达,与对照组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图4 单抗2G1处理后MG-63球形细胞干细胞特性相关蛋白及EMT相关蛋白表达的变化



A:对照组和单抗2G1组裸鼠移植瘤剥离后图像;B:对照组和单抗2G1组裸鼠移植瘤质量统计分析;C:对照组和单抗2G1组裸鼠移植瘤体积随接种后时间的变化曲线。与对照组比较,** $P < 0.01$ 。

图5 单抗2G1对MG-63球形细胞来源裸鼠移植瘤生长的影响

2.6 单抗2G1处理后MG-63球形细胞差异表达基因分析及Wnt/ β -catenin信号通路相关蛋白表达变化

采用转录组测序分析对照组与单抗2G1处理组MG-63球形细胞的基因表达谱差异。结果(图6A)显示,获得表达发生显著性变化的基因共698个,其中上调基因329个,下调的基因共369个。KEGG通路富集分析结果(图6B)显示,差异基因富集于Wnt信号通路。WB检测结果(图6C)显示,与对照组相比,单抗2G1组MG-63球形细胞中p- β -catenin和c-Myc表达量下降(均 $P < 0.001$)。上述结果提示,膜蛋白HSP90 β 可能是通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路进而影响OSC的成球、侵袭和迁移等生物学功能。

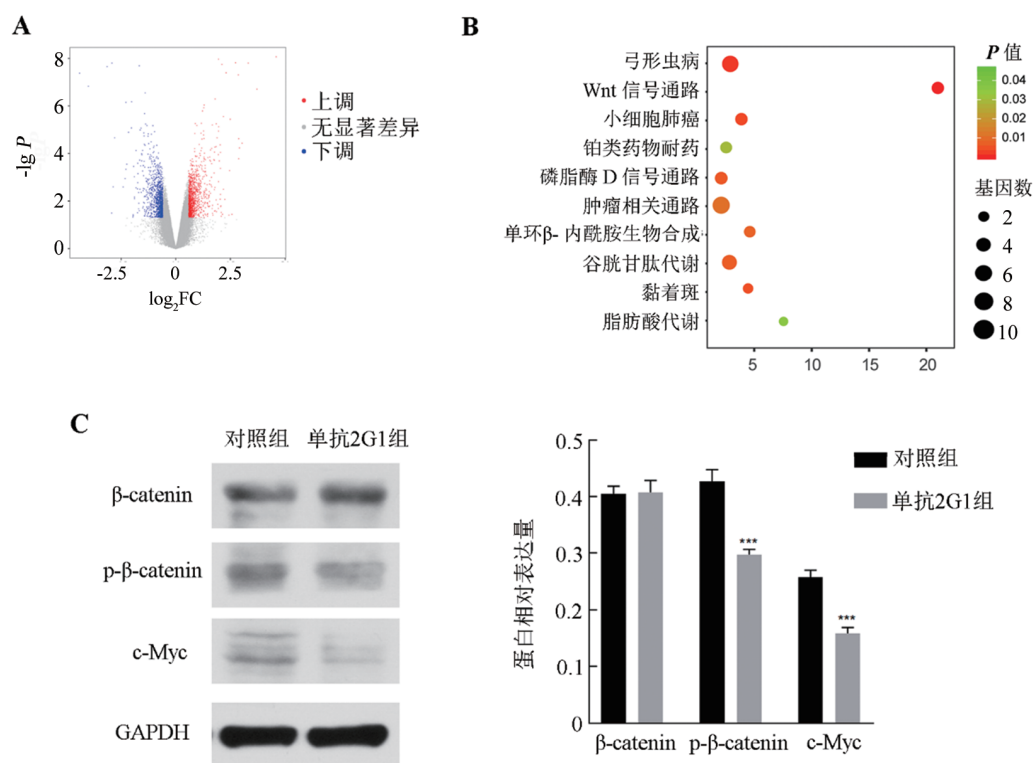
3 讨论

骨肉瘤是青少年中最常见的原发恶性骨肿瘤之一,尽管新辅助化疗联合保肢手术已成为标准疗法,但转移或复发患者的长期生存获益仍十分有限^[10-12]。OSC具有较强的成球能力、迁移侵袭能力及体内成瘤潜能,与肿瘤异质性、治疗抵抗及疾病复发密切相关。然而,由于患者来源原代OSC的获取和稳定培养存在一定困难,基于骨肉瘤细胞系构建的OSC富集模型已成为研究OSC特征的重要实验策略。本研究采用人骨肉瘤MG-63细胞经无血清悬浮培养获得MG-63球形细胞作为OSC富集模型,探究其关键调

控分子及潜在的治疗靶点。

HSP90 β 在多种恶性肿瘤中发挥重要作用,既往研究^[13-15]表明,HSP90家族在骨肉瘤细胞的增殖、侵袭和应激存活中扮演关键角色。本研究通过流式细胞术与WB检测发现,与MG-63亲本细胞相比,MG-63球形细胞表现出更高水平的膜表面HSP90 β 富集表

达。功能实验显示,单抗2G1干预后MG-63球形细胞的成球、迁移和侵袭能力均下降,提示膜表面HSP90 β 的表达上调可能与MG-63球形细胞OSC样表型的维持密切相关,可作为OSC相关生物学特性的潜在标志物与干预靶点。



A: 对照组与单抗2G1组的MG-63球形细胞的差异基因火山图; B: 差异表达基因的KEGG通路富集分析; C: WB法验证单抗2G1处理后MG-63球形细胞中Wnt/ β -catenin通路相关蛋白的表达。

图6 单抗2G1处理MG-63球形细胞对Wnt/ β -catenin信号通路相关蛋白表达的影响

功能实验表明,特异性靶向HSP90 β 的单抗2G1干预后,MG-63球形细胞的成球数量明显减少,迁移和侵袭能力受到抑制,且裸鼠皮下移植瘤的质量和体积显著降低。在分子机制层面,单抗2G1处理导致干细胞特性关键转录因子SOX2和OCT4表达下调,同时伴随EMT相关分子表型的改变,即E-cadherin表达上调而N-cadherin表达下调。考虑到骨肉瘤来源于间充质组织,上述变化表明HSP90 β 靶向干预影响了MG-63球形细胞的EMT样分子特征^[16]。上述结果提示,靶向膜表面HSP90 β 能够显著削弱MG-63球形细胞体外干细胞特性表型与体内成瘤能力。

为明确靶向HSP90 β 抑制OSC样特征的下游调控机制,本研究结合转录组测序和KEGG通路富集分析发现差异基因显著富集于Wnt信号通路。WB结果进一步证实,单抗2G1处理后p- β -catenin和下游靶蛋白c-Myc表达明显下降。Wnt/ β -catenin信号通路在骨肉瘤细胞增殖、迁移及干细胞特性维持中发

挥核心调控作用^[17-18], β -catenin的稳定积累可激活c-Myc等靶基因以驱动肿瘤干细胞特性^[19]。本研究结果提示,HSP90 β 靶向干预可能通过影响Wnt/ β -catenin通路相关蛋白表达来抑制OSC样特征。然而,本研究尚未开展 β -catenin核转位检测及通路拯救实验,HSP90 β 与Wnt/ β -catenin信号之间的直接调控关系仍需后续深入验证。

综上所述,膜表面HSP90 β 在MG-63球形细胞中呈富集表达,靶向HSP90 β 的单抗2G1可通过影响干细胞特性、EMT样分子表型及Wnt/ β -catenin通路相关蛋白表达,降低其成球与成瘤能力。但本研究主要基于MG-63细胞系富集模型,且缺乏直接的分子调控机制证据,未来将进一步采用患者来源类器官及原代OSC模型进行验证。此外,探索单抗2G1与肿瘤微环境免疫调节策略(如靶向巨噬细胞)^[20]、天然化合物(如梓醇)^[21]或能量代谢干预靶点的联合应用,以及深入解析Wnt/ β -catenin与其他通路(如

PI3K/AKT/mTOR)的交叉对话,将为克服骨肉瘤耐药与复发提供更具临床转化价值的协同方案。

[参 考 文 献]

- [1] Ottaviani G, Jaffe N. The epidemiology of osteosarcoma[M]// Pediatric and Adolescent Osteosarcoma. Boston, MA: Springer US, 2009: 3-13. DOI:10.1007/978-1-4419-0284-9_1.
- [2] Siclari V A, Qin L. Targeting the osteosarcoma cancer stem cell[J]. J Orthop Surg Res, 2010, 5: 78. DOI: 10.1186/1749-799X-5-78.
- [3] Jubelin C, Muñoz-Garcia J, Cochonneau D, et al. Biological evidence of cancer stem-like cells and recurrent disease in osteosarcoma[J]. Cancer Drug Resist, 2022, 5(1): 184-198. DOI: 10.20517/cdr.2021.130.
- [4] Liu B, Ma W, Jha R K, et al. Cancer stem cells in osteosarcoma: recent progress and perspective[J]. Acta Oncol, 2011, 50(8): 1142-1150. DOI: 10.3109/0284186X.2011.584553.
- [5] Jhaveri K, Ochiana S O, Dunphy M P S, et al. Heat shock protein 90 inhibitors in the treatment of cancer: current status and future directions[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2014, 23(5): 611-628. DOI: 10.1517/13543784.2014.902442.
- [6] Połosak K, Papierniak-Wyglądała A, Nałęcz K A. Regulation of SLC6A14 trafficking in breast cancer cells by heat shock protein HSP90 β [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 614: 41-46. DOI:10.1016/j.bbrc.2022.05.011.
- [7] Shang Z H, Fan Y P, Xi S Y, et al. Arenobufagin enhances T-cell anti-tumor immunity in colorectal cancer by modulating HSP90 β accessibility[J]. Phytomedicine, 2024, 128: 155497. DOI:10.1016/j.phymed.2024.155497.
- [8] Liao Y N, Liu Y, Yu C F, et al. HSP90 β impedes STUB1-induced ubiquitination of YTHDF2 to drive sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma[J]. Adv Sci, 2023, 10(27): 2302025. DOI: 10.1002/advs.202302025.
- [9] Cao K Y, Pan Y Z, Yu L, et al. Monoclonal antibodies targeting non-small cell lung cancer stem-like cells by multipotent cancer stem cell monoclonal antibody library[J]. Int J Oncol, 2017, 50(2): 587-596. DOI:10.3892/ijo.2016.3818.
- [10] Alaseem A, Alanezi M, Almhrij F, et al. Comparative outcomes of neoadjuvant chemotherapy versus upfront surgical resection in osteosarcoma: a systematic review and meta-analysis[J]. World J Surg Oncol, 2025, 23(1): 446. DOI:10.1186/s12957-025-04115-3.
- [11] Sun Y, Fan D Y, Jin T, et al. A retrospective study on the efficacy and safety of anlotinib combined with limb salvage therapy for osteosarcoma after chemotherapy failure[J]. Medicine, 2026, 105(21): e48632. DOI:10.1097/md.00000000000048632.
- [12] Meltzer P S, Helman L J. New horizons in the treatment of osteosarcoma[J]. N Engl J Med, 2021, 385(22): 2066-2076. DOI: 10.1056/nejmra2103423.
- [13] Wang Z, Guo Z X, Cao C W, et al. HSP90AB1-mediated ubiquitin-proteasome degradation of ITGBL1 promotes osteosarcoma progression by inhibiting endoplasmic reticulum stress-induced autophagy[J]. Adv Sci, 2026, 13(23): e15651. DOI: 10.1002/advs.202515651.
- [14] Yao Z P, Zhu H, Shen F, et al. Hsp90 regulates the tumorigenic function of tyrosine protein kinase in osteosarcoma[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2022, 49(3): 380-390. DOI:10.1111/1440-1681.13613.
- [15] Lallier M, Marchandet L, Moukengue B, et al. Molecular chaperones in osteosarcoma: diagnosis and therapeutic issues[J]. Cells, 2021, 10(4): 754. DOI:10.3390/cells10040754.
- [16] Zhang Y M, Pan R L, Li K, et al. HSPD1 supports osteosarcoma progression through stabilizing ATP5A1 and thus activation of AKT/mTOR signaling[J]. Int J Biol Sci, 2024, 20(13): 5162-5190. DOI:10.7150/ijbs.100015.
- [17] Ding Y, Chen Q. Wnt/ β -catenin signaling pathway: an attractive potential therapeutic target in osteosarcoma[J]. Front Oncol, 2025, 14: 1456959. DOI:10.3389/fonc.2024.1456959.
- [18] Perkins R S, Murray G, Suthon S, et al. WNT5B drives osteosarcoma stemness, chemoresistance and metastasis[J]. Clin Transl Med, 2024, 14(5): e1670. DOI:10.1002/ctm2.1670.
- [19] Hinton K, Ghafoor S, Landry T, et al. Active Beta-Catenin (ABC) promotes an invasive phenotype in pediatric osteosarcoma[J]. Genes Cancer, 2026, 17: 1-13. DOI:10.18632/genesandcancer.244.
- [20] Li Z D, Lin D, Wu L D, et al. Macrophage-centered immunotherapy for osteosarcoma: mechanisms, repolarization, and translational strategies[J]. World J Surg Oncol, 2026, 24(1): 165. DOI:10.1186/s12957-026-04288-5.
- [21] Wang L, Xue G B. Catalpol suppresses osteosarcoma cell proliferation through blocking epithelial-mesenchymal transition (EMT) and inducing apoptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 495(1): 27-34. DOI:10.1016/j.bbrc.2017.10.054.

[收稿日期] 2026-03-20

[修回日期] 2026-05-29

[本文编辑] 苏念