

ISLR 通过活化 PI3K-AKT 通路促进上皮 - 间质转化影响骨肉瘤细胞恶性进展研究

李青山, 郭红生, 贾天阳 (邯郸市中心医院骨科, 河北邯郸 056001)

摘要: **目的** 研究含免疫球蛋白超家族亮氨酸丰富重复蛋白 (immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat protein, ISLR) 参与骨肉瘤细胞恶性进展的作用及其潜在调节机制。**方法** 通过实时定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测骨肉瘤组织和细胞中 ISLR mRNA 水平。通过转染 ISLR 短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 序列或阴性对照 shRNA (negative-control shRNA, NC shRNA) 序列至 U2OS 细胞, 后用磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K) 激活剂 740 Y-P 处理细胞。通过 CCK-8 法、Transwell 实验和流式细胞术分别检测细胞活力、侵袭能力和细胞凋亡率。蛋白印迹实验 (Western blot) 检测 ISLR 蛋白、上皮 - 间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 相关蛋白 [上皮钙黏蛋白 (epitheia-cadherin, E-cadherin)、神经钙黏蛋白 (nerve-cadherin, N-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin), Snail]、PI3K/蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 通路相关蛋白、细胞凋亡相关蛋白 [半胱天冬氨酸蛋白酶 3 (cysteiny aspartate-specific proteinase -3, Caspase-3), B 淋巴细胞瘤 -2 (B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X, Bax)] 和肿瘤增殖标志物 Ki67 蛋白表达。采用慢病毒转染的 U2OS 细胞注射裸鼠构建异种移植瘤模型, 监测肿瘤生长情况。**结果** 与癌旁组织 (1.01 ± 0.02) 相比, 骨肉瘤组织 (5.14 ± 1.63) 中 ISLR mRNA 水平显著上调, 差异具有统计学意义 ($t=-14.332, P<0.001$)。与正常人成骨细胞 hFOB1.19 (1.01 ± 0.01) 相比, 骨肉瘤细胞 MG63 (3.05 ± 0.57), U2OS (4.55 ± 0.79), HOS (2.46 ± 0.41), Saos-2 (2.62 ± 0.44) 和 143B (3.62 ± 0.51) 中 ISLR mRNA 相对表达均显著升高, 差异具有统计学意义 ($t=4.883, 8.473, 3.471, 3.854, 6.247$, 均 $P<0.05$)。与对照组和 NC shRNA 组比较沉默 ISLR 明显抑制了 U2OS 细胞增殖 ($t=6.593, 6.835$) 及侵袭 ($t=8.621, 8.448$), 促进细胞凋亡 ($t=25.505, 25.574$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$)。沉默 ISLR 明显促进 U2OS 细胞中 Caspase-3 活性 ($t=13.489, 13.366$) 及 Bax 蛋白 ($t=8.628, 8.524$) 表达, 抑制 Bcl-2 蛋白 ($t=10.948, 10.775$) 表达, 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$)。沉默 ISLR 显著促进 EMT 相关蛋白 E-cadherin ($t=15.168, 15.087$) 表达, 抑制 N-cadherin ($t=10.220, 10.058$), Vimentin ($t=8.303, 8.164$) 和 Snail ($t=9.211, 9.384$) 蛋白表达, 降低 PI3K/AKT 通路关键蛋白 PI3K 和 AKT 磷酸化水平 ($t=17.441, 14.452$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$)。740 Y-P 处理可逆转 ISLR 沉默对 U2OS 细胞的影响。裸鼠体内实验显示敲低 ISLR 显著抑制了肿瘤生长。**结论** ISLR 可能通过激活 PI3K/AKT 通路促进骨肉瘤 EMT 及细胞增殖、侵袭, 抑制细胞凋亡, 从而促进骨肉瘤进展。

关键词: 骨肉瘤; 细胞增殖; 上皮 - 间质转化; 含免疫球蛋白超家族亮氨酸丰富重复蛋白; PI3K/AKT 通路
中图分类号: R738.1; R730.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2024) 05-017-06

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2024.05.004

ISLR Promotes Epithelial-mesenchymal Transition Through Activating PI3K-AKT Pathway and Influences the Malignant Progression of Osteosarcoma Cells

LI Qingshan, GUO Hongsheng, JIA Tianyang (Department of Orthopedics, Handan Central Hospital, Hebei Handan 056001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role of immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat protein (ISLR) in the malignant progression of osteosarcoma cells and its potential regulatory mechanism. **Methods** ISLR mRNA levels in osteosarcoma tissues and cells were detected by quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR). U2OS cells were transfected with ISLR short hairpin RNA (shRNA) sequence or negative-control shRNA (NC shRNA) sequence, thus the cells were treated with phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) activator 740 Y-P. The cell viability, invasion ability and apoptosis rate were detected by CCK-8 assay, Transwell assay and flow cytometry, respectively. Western blot was used to detect the expressions of ISLR protein, epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related proteins [Epitheia-cadherin (E-cadherin), Nerve cadherin (N-cadherin), Vimentin, Snail], PI3K/protein kinase B (AKT) pathline-related proteins, apoptotic proteins [Cysteiny aspartate-specific proteinase-3 (Caspase-3), B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax)] and proliferation

基金项目: 河北省 2022 年度医学科学研究课题计划项目 (20220582)。

作者简介: 李青山 (1982-), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 骨关节, E-mail: LQs15630003868@126.com。

marker Ki67 protein. Lentivirus was used to transfect U2OS cells, and the cells were injected into nude mice to construct a xenograft tumor model, and tumor growth was monitored. **Results** ISLR mRNA level in osteosarcoma tissue (5.14 ± 1.63) was up-regulated compared with para-cancerous tissue (1.01 ± 0.02), and the difference was significant ($t=-14.332$, $P<0.001$). Compared with normal osteoblasts hFOB1.19 (1.01 ± 0.01), osteosarcoma cells MG63 (3.05 ± 0.57), U2OS (4.55 ± 0.79), HOS (2.46 ± 0.41), the relative expression of ISLR mRNA in Saos-2 (2.62 ± 0.44) and 143B (3.62 ± 0.51) were increased, and differences were significant ($t=4.883$, 8.473 , 3.471 , 3.854 , 6.247 , all $P<0.05$). Silencing ISLR inhibited the proliferation of U2OS cells ($t=6.593$, 6.835) and invasion ($t=8.621$, 8.448), but promoted cell apoptosis ($t=25.505$, 25.574), and the differences were significant (all $P<0.05$). Silencing ISLR promoted Caspase-3 activity in U2OS cells ($t=13.489$, 13.366) and Bax protein ($t=8.628$, 8.524), but inhibited Bcl-2 protein expression ($t=10.948$, 10.775), with significant differences (all $P<0.05$). Silencing ISLR promoted EMT-related protein E-cadherin ($t=15.168$, 15.087), inhibited N-cadherin ($t=10.220$, 10.058), Vimentin ($t=8.303$, 8.164) and Snail ($t=9.211$, 9.384), but reduced the phosphorylation levels of PI3K and AKT ($t=17.441$, 14.452), with significant differences (all $P<0.05$). Additionally, 740 Y-P treatment reversed the effect of silencing ISLR on U2OS cells. Experimental results in vivo showed that knockdown of ISLR significantly inhibited tumor growth. **Conclusion** ISLR could promote EMT, proliferation and invasion, but inhibit apoptosis of osteosarcoma cells by activating the PI3K/AKT pathway, there by promoting osteosarcoma progression.

Keywords: osteosarcoma; cell proliferation; epithelial-mesenchymal transition; immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat protein; PI3K/AKT pathway

骨肉瘤 (osteosarcoma) 是一种由间充质细胞系发展而来的骨肿瘤, 通常发生在青少年的长骨干骺端, 早期即可发生转移, 是导致儿童和青少年癌症相关死亡的主要原因^[1-3]。尽管骨肉瘤的治疗目前已取得了进展, 但由于其高转移特性, 患者预后仍不理想^[4]。因此, 研究骨肉瘤发生和发展机制, 开发新的治疗靶点具有重要意义。近年, 基因异常表达与癌症发生发展和癌症患者预后生存的关系已被证实^[5-6]。含免疫球蛋白超家族亮氨酸丰富重复蛋白 (immunoglobulin superfamily containing leucine rich repeat protein, ISLR) 是一种新发现的间充质干细胞标志物, 可参与病理性纤维化和癌症微环境^[7]。上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是调节肿瘤侵袭和迁移的关键因素, 癌细胞通过 EMT 展现出更好的迁移能力和较差的细胞间粘附, 使其获得间充质表型并侵入周围的间质^[8-9]。现有研究表明, ISLR 参与多种人类恶性肿瘤的发生发展, 如研究报道, ISLR 通过调控 EMT, 促进结肠癌的进展^[10]。ISLR 过表达促进了胃癌细胞的增殖、迁移、侵袭及 EMT^[11]。沉默 ISLR 可抑制非小细胞肺癌细胞的生物学行为及 EMT 和糖酵解, 延缓肿瘤进展^[12]。此外, 生物信息学分析显示 ISLR 在骨肉瘤组织中显著高表达, 与临床预后密切相关^[13-14]。然而, ISLR 参与调控骨肉瘤进展的机制尚不清楚, ISLR 是否可以调节 EMT 参与骨肉瘤的发生亦未可知。因此本研究观察分析了 ISLR 对骨肉瘤细胞 EMT 信号通路的影响及其可能的作用机制, 旨在为骨肉瘤的研究提供新的参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2021 年 7 月 ~ 2023 年 7 月邯

郸市中心医院收治的 32 例骨肉瘤患者, 手术采集患者配对肿瘤组织标本和相邻正常组织标本。纳入标准: ①经病理诊断为骨肉瘤; ②未接受过放疗和化疗; ③未并发其他恶性肿瘤、严重肝肾功能障碍和血液系统疾病。本研究经医院伦理委员会批准 (批号 20210013), 并取得所有患者及其家属签署的书面知情同意书。从上海细胞库获得正常人成骨细胞 hFOB1.19 和人骨肉瘤细胞 MG63, U2OS, HOS, Saos-2 和 143B, 所有细胞均经短串联重复序列 (short tandem repeat, STR) 鉴定。

1.2 主要仪器和试剂 DMEM 培养基、胎牛血清及 Trizol 试剂 (美国 Life Technologies 公司); Lipofectamine 3000TM (美国 Invitrogen 公司); PrimeScript 反转录试剂盒 (TaKaRa 公司); SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒 (德国 QIAGEN 公司); RIPA 裂解缓冲液, BCA 蛋白测定试剂盒 (上海碧云天生物); 免疫印迹检测蛋白一抗 (Abcam 公司); CCK-8 试剂盒及 FITC-Annexin V 试剂盒 (日本 Dojindo 公司); Caspase-3 测定试剂盒 [(中国) 南京生物]; sh-ISLR 序列及含 sh-ISLR 慢病毒载体 (LV-sh-ISLR) 由 GenePharma (上海) 公司制备; 凝胶成像分析系统 (Bio-Imaging Systems 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养及分组: 所有细胞均使用含 10g/dl 胎牛血清和 100 U/ml 青霉素 / 链霉素的 DMEM 培养液, 在 37℃, 5ml/dl 的 CO₂ 培养箱中培养, 待密度达到 90% 时, 进行传代。细胞分为 sh-ISLR 组和 NC shRNA 组, 按照 Lipofectamine 3000TM 试剂盒说明分别将 ISLR 短发夹 RNA (short hairpin RNA,

shRNA) 序列和阴性对照 shRNA (negative-control shRNA, NC shRNA) 序列分别转染至 U2OS 细胞中, 同时设置空白对照组 (Control 组, 不做任何处理), 培养 48h 后收集细胞进行试验。

1.3.2 qRT-PCR 检测 ISLR 相对表达: 使用 Trizol 试剂提取组织或细胞总 RNA, 分光光度计测定 RNA 浓度及纯度。使用 PrimeScript 试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA, 以此为模版构建 PCR 反应体系; 利用 SYBR Green 进行 PCR 扩增, 反应条件 95℃ 预变性 5min, 95℃ 变性 30s, 60℃ 退火 40s, 72℃ 延伸 60s, 共 40 个循环。引物序列: ISLR 正向引物: 5'-TGCGATGAGAGAGAAGTGCC-3', 反向引物: 5'-CTTACGAGAGCCACCTACAG-3'; 以 GAPDH 作为内参, 正向引物: 5'-GCCGAGCTCCACAGCTT-3', 反向引物: 5'-CGCAAACGTAATTTGCGCTT-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因相对表达水平。

1.3.3 Western blot 检测 Bax, Bcl-2, Ki67 及 EMT 相关蛋白和 PI3K-AKT 通路相关蛋白表达: 通过 RIPA 缓冲液提取总蛋白, BCA 试剂盒检测蛋白浓度。通过 SDS-PAGE 分离蛋白样品, 并转移到 PVDF 膜上, 用 5g/dl 脱脂牛奶室温封闭 1h, 加入待测蛋白一抗, 4℃ 孵育过夜; 用 TBST 清洗三次, 再次加入 IgG 抗体, 室温下孵育 1h, TBST 清洗三次, 采用 ECL 试剂盒在凝胶成像系统上进行可视化, 并用 Image J 软件进行蛋白条带灰度值分析。

1.3.4 CCK-8 法检测细胞活力: 取待测细胞以 5×10^3 个/孔的密度接种到 96 孔板中, 48 h 后, 将 10 μ l 的 CCK-8 溶液加入每孔, 37℃ 继续培养 2 h, 使用酶标仪在 450 nm 处测量每孔的光密度值。

1.3.5 流式细胞术检测细胞凋亡: 采用膜联蛋白 V+/碘化丙啶 (Annexin V/PI) - 流式细胞术检测细胞凋亡。取转染后密度为 5×10^5 细胞, 按照 FITC-Annexin V 试剂盒说明书用 Annexin V/P 染色细胞 15 min, 然后采用流式细胞术对标记的细胞进行分析。

1.3.6 Transwell 检测细胞侵袭能力: 将转染后的细胞接种于含 200 μ l 无血清培养液的 Transwell 上室中, 在下室加入含 10 g/dl 胎牛血清的培养液, 孵育 24h。对下室中的细胞进行 4ml/dl 多聚甲醛固定, 并用 0.1g/dl 结晶紫染色。随机选取 5 个视野拍照, 显微镜下计数。

1.3.7 Caspase-3 活性测定: 将细胞以 5×10^3 个细胞/孔接种在 96 孔板中, 在 37℃, 5ml/dl 的 CO₂ 培养箱中培养, 然后根据制造商说明使用 Caspase-3 活性测定试剂盒测定 Caspase-3 活性。

1.3.8 裸鼠体内实验: 从西安交通大学实验动物中心购得 20 只 8 周龄雌性裸鼠 (BALB/c), 随机

分为 NC shRNA 组和 sh-ISLR 组, 每组 10 只。将含 NC shRNA 或 sh-ISLR 的慢病毒载体稳定转染的 U2OS 细胞 (2×10^6) 悬液 0.2 ml 注射于裸鼠背部皮下及近腋窝部, 干预后 3 天开始观察瘤体生长情况, 利用游标卡尺测量并计算肿瘤体积, 每周测量记录一次。裸鼠成瘤第 28 天处死小鼠, 收获异种移植肿瘤, 测量瘤体重量。动物实验根据国家卫生研究所《实验动物护理和使用指南》中建议进行, 研究方案经本院动物实验伦理委员会批准。

1.4 统计学分析 使用 GraphPad Prism 7.0 进行数据可视化, 使用 SPSS.22.0 进行统计学分析。骨肉瘤组织标本和相邻正常组织标本中 ISLR 表达差异比较采用配对 *t* 检验; 裸鼠实验 NC shRNA 组和 sh-ISLR 组异种移植肿瘤体积及重量比较采用 Student-*t* 检验; 细胞实验多组间差异比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验。P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ISLR 在骨肉瘤组织和细胞中显著上调 qRT-PCR 检测显示, 与癌旁组织 (1.01 ± 0.02) 相比, 骨肉瘤组织 (5.14 ± 1.63) 中 ISLR mRNA 相对表达显著上调, 差异具有统计学意义 ($t=14.332$, $P<0.001$); 同时发现, 与正常人成骨细胞 hFOB1.19 (1.01 ± 0.01) 相比, 骨肉瘤细胞 MG63 (3.05 ± 0.57), U2OS (4.55 ± 0.79), HOS (2.46 ± 0.41), Saos-2 (2.62 ± 0.44) 和 143B (3.62 ± 0.51) 中 ISLR mRNA 相对表达均显著升高, 差异具有统计学意义 ($t=4.883$, 8.473, 3.471, 3.854, 6.247, 均 $P<0.05$), 选取水平升高最为显著的 U2OS 细胞用于后续研究。

2.2 沉默 ISLR 抑制骨肉瘤细胞增殖和侵袭 见表 1。与 Control 组和 NC shRNA 组相比, sh-ISLR 组 U2OS 细胞中 ISLR mRNA 表达明显降低, 差异具有统计学意义 ($t=28.238$, 28.238, 均 $P<0.05$), 提示沉默 ISLR 的细胞系构建成功。CCK-8 法及 Transwell 检测结果显示, 与 Control 组和 NC shRNA 组相比, sh-ISLR 组 U2OS 细胞增殖活力 ($t=6.593$, 6.835) 及细胞侵袭率 ($t=8.621$, 8.448) 显著降低, 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$)。

2.3 沉默 ISLR 抑制骨肉瘤细胞凋亡 见表 2。检测结果显示, 与 Control 组和 NC shRNA 组相比, sh-ISLR 组 U2OS 细胞凋亡率明显升高, 差异具有统计学意义 ($t=25.505$, 25.574, 均 $P<0.05$); 同时发现, 与 Control 组和 NC shRNA 组相比, sh-ISLR 组 U2OS 细胞中凋亡标志物 Caspase-3 活性 ($t=13.489$, 13.366) 及促凋亡蛋白 Bax 表达明显升高 ($t=8.628$, 8.524), 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达明显降低 ($t=10.948$, 10.775), 差异具有统计学意义 (均

$P<0.05$)。

表 1 沉默 ISLR 对骨肉瘤细胞中 ISLR 表达及细胞增殖、侵袭的影响 ($\bar{x}\pm s$)

项 目	Control 组	NC shRNA 组	sh-ISLR 组	<i>F</i>	<i>P</i>
ISLR mRNA	1.01 ± 0.02	1.00 ± 0.01	0.39 ± 0.04	540.429	<0.001
细胞活力	2.11 ± 0.25	2.15 ± 0.22	1.02 ± 0.11	30.080	<0.001
细胞侵袭率 (%)	41.32 ± 3.27	40.89 ± 3.16	19.95 ± 2.64	48.575	<0.001

表 2 沉默 ISLR 对细胞凋亡、Caspase-3 活性及凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$)

项 目	Control 组	NC shRNA 组	sh-ISLR 组	<i>F</i>	<i>P</i>
细胞凋亡率 (%)	5.13 ± 0.47	5.08 ± 0.53	23.46 ± 1.35	434.851	<0.001
Caspase-3 活性	1.01 ± 0.05	1.03 ± 0.04	3.21 ± 0.34	120.211	<0.001
Bax 蛋白	1.00 ± 0.02	1.02 ± 0.01	2.67 ± 0.41	49.037	<0.001
Bcl-2 蛋白	1.01 ± 0.01	1.00 ± 0.02	0.38 ± 0.12	78.664	<0.001

2.4 沉默 ISLR 抑制骨肉瘤细胞的 EMT 见表 3。检测结果显示,与 Control 组和 NC shRNA 组相比,sh-ISLR 组 U2OS 细胞中 E-cadherin ($t=15.168$, 15.087) 蛋白表达明显升高, N-cadherin 蛋白 ($t=$ 10.220, 10.058), Vimentin 蛋白 ($t=8.303$, 8.164) 和 Snail 蛋白 ($t=9.211$, 9.384) 表达明显降低,差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$)。

表 3 沉默 ISLR 对骨肉瘤细胞 EMT 相关蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$)

项 目	Control 组	NC shRNA 组	sh-ISLR 组	<i>F</i>	<i>P</i>
E-cadherin 蛋白	1.00 ± 0.02	1.01 ± 0.02	2.87 ± 0.26	152.557	<0.001
N-cadherin 蛋白	1.01 ± 0.01	1.00 ± 0.01	0.38 ± 0.13	68.544	<0.001
Snail 蛋白	1.01 ± 0.03	1.00 ± 0.01	0.41 ± 0.15	45.204	<0.001
Vimentin 蛋白	1.00 ± 0.01	1.01 ± 0.02	0.47 ± 0.12	57.644	<0.001

2.5 沉默 ISLR 阻断 PI3K-AKT 信号通路活化 见表 4。检测结果显示,与 NC shRNA 组相比,Sh-ISLR 组 U2OS 细胞中 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白表达明显降低 ($t=17.441$, 14.452), sh-ISLR+740 Y-P 组细胞中 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白表达较 sh-ISLR 组明显升高 ($t=14.311$, 12.492), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$)。此外, CCK-8 法和流式细胞术结果显示,与 Sh-ISLR 组相比, sh-ISLR+740 Y-P 组细胞增殖活力明显升高 ($t=6.145$), 细胞凋亡率明显降低 ($t=14.197$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$)。由此说明, ISLR 通过激活 PI3K-AKT 信号通路可促进骨肉瘤细胞增殖, 抑制细胞凋亡。

表 4 沉默 ISLR 对 PI3K-AKT 信号通路相关蛋白及细胞增殖活力和凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s$)

项 目	NC shRNA 组	sh-ISLR 组	sh-ISLR+740 Y-P 组	<i>F</i>	<i>P</i>
t-PI3K 蛋白	1.00 ± 0.01	1.04 ± 0.02	1.02 ± 0.03	2.751	0.156
p-PI3K 蛋白	1.01 ± 0.01	0.23 ± 0.05	0.87 ± 0.08	172.933	<0.001
t-AKT 蛋白	1.01 ± 0.02	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.03	0.214	0.813
p-AKT 蛋白	1.00 ± 0.01	0.41 ± 0.07	0.92 ± 0.05	122.920	<0.001
细胞活力	2.15 ± 0.22	1.02 ± 0.11	1.87 ± 0.16	36.199	<0.001
细胞凋亡率 (%)	5.08 ± 0.53	23.46 ± 1.35	10.69 ± 1.24	219.323	<0.001

2.6 敲低 ISLR 在体内抑制肿瘤生长 见表 5。通过慢病毒转染的 U2OS 细胞注射裸鼠构建异种移植瘤小鼠模型,成瘤率 100%。裸鼠体内实验结果显示,造模后 2 ~ 4 周, sh-ISLR 组大鼠体内肿瘤体积及重量明显小于 NC shRNA 组, 差异具有统计学意义 (均 $P<0.001$)。此外,检测小鼠肿瘤组织中 ISLR 蛋白和增殖标志物 Ki67 蛋白表达水平,结果显示 sh-ISLR 组小鼠肿瘤组织中 ISLR 和 Ki67 蛋白水平均较 NC shRNA 组显著降低, 差异具有统计学意义 ($t=31.709$, 41.012, 均 $P<0.001$), 表明敲低 ISLR 表达可抑制裸鼠体内肿瘤生长。

3 讨论

骨肉瘤是最常见的原发性骨恶性肿瘤, 目前新辅助化疗、手术切除和辅助化疗仍然是其主要治疗

方法，然而由于骨肉瘤的诊断较晚、早期转移和耐药特性，其五年生存率仍然很低^[4]。因此，探索骨肉瘤发病的分子机制对于疾病进展和寻找新的治疗策略至关重要。

高通量测序的快速发展极大地提高了对癌症相关分子机制的认识。ZUO 等^[11]人研究借助 TCGA 数据库的测序数据将 ISLR 鉴定为骨肉瘤的预后生物标志物。ZHANG 等^[12]人的研究通过对 GEO 和 TCGA 数据库中原发性骨肉瘤和转移性骨肉瘤的差异表达基因进行筛选，发现 ISLR 在高侵袭性骨肉瘤中的表达比原发性骨肉瘤更高，表明 ISLR 与

骨肉瘤的发生发展关系密切，但是 ISLR 参与调控骨肉瘤进展的机制尚不清楚。本研究经分析 ISLR 与骨肉瘤的关系，首先发现骨肉瘤组织和细胞中 ISLR 表达显著上调，与 SIDDESH 等^[11]人的报道一致。进一步基于细胞实验，通过转染 ISLR 短发夹 RNA（shRNA）序列构建沉默 ISLR 表达的骨肉瘤细胞系 U2OS，研究发现沉默 ISLR 表达可显著降低 U2OS 细胞增殖活力，抑制肿瘤细胞侵袭，诱导细胞快速凋亡，证实 ISLR 可调控骨肉瘤细胞的生物学行为。

表 5		不同裸鼠实验组肿瘤体积 / 质量及 ISLR, Ki67 蛋白表达			
项 目		NC shRNA 组	sh-ISLR 组	<i>t</i>	<i>P</i>
肿瘤体积 (mm ³)	第 1 周	152.04 ± 21.03	150.89 ± 20.76	0.123	0.903
	第 2 周	198.79 ± 20.15	159.63 ± 19.97	4.365	0.000
	第 3 周	259.57 ± 23.69	170.44 ± 20.48	9.001	<0.001
	第 4 周	376.35 ± 21.14	182.02 ± 20.03	20.878	<0.001
肿瘤重量 (g)		3.47 ± 0.56	2.07 ± 0.23	7.313	<0.001
ISLR 蛋白		1.01 ± 0.02	0.47 ± 0.05	31.709	<0.001
Ki67 蛋白		1.00 ± 0.02	0.42 ± 0.04	41.012	<0.001

骨肉瘤因较高的转移特性，患者总体预后较差。EMT 是肿瘤转移的关键机制，其抑制可能减轻肿瘤细胞转移。大量研究报道，结肠癌中过表达 ISLR 通过激活 EMT 信号通路促进肿瘤进展^[8]；胃癌中 ISLR 通过与 MGAT5 相互作用，促进胃癌细胞增殖、侵袭、迁移和 EMT，加快胃癌细胞的恶性进展^[10]；非小细胞肺癌细胞中，沉默 ISLR 可抑制肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭及 EMT，促进细胞凋亡^[9]。本研究发现，沉默 ISLR 后细胞侵袭能力显著降低，同时发现沉默 ISLR 显著促进 EMT 相关基因 E-cadherin 表达，抑制 N-cadherin, Vimentin 和 Snail 表达。上述结果表明，ISLR 在骨肉瘤 EMT 和细胞侵袭过程中发挥了关键作用。敲低 ISLR 可能是抑制骨肉瘤转移的有效方法，与 ISLR 在其他肿瘤中的研究结果相一致。此外，本研究还通过慢病毒转染的 U2OS 细胞注射裸鼠构建异种移植瘤小鼠动物模型进行验证，发现敲低 ISLR 表达显著抑制了裸鼠体内肿瘤生长，降低了增殖标志物 Ki67 蛋白表达水平，与体外细胞实验结果一致。

PI3K/AKT 通路是肿瘤发生最典型的失调途径之一，也是细胞增殖 \EMT 和代谢等基本生物功能的关键调节因子，由许多参与广泛生理过程的信号酶组成^[15-16]。目前 PI3K/AKT 途径已成为癌症治疗研究的主要靶点，相关研究也已证实 PI3K/AKT 通路在骨肉瘤的发生中发挥重要作用，如 SIDDESH

等^[11]研究显示 PI3K/AKT 信号传导在骨肉瘤的分子通路中显著富集。多篇研究报道 PI3K/AKT 信号传导在骨肉瘤中过度激活，导致了疾病的启动和发展^[17-19]。因此，本研究拟探讨 ISLR 是否通过调节 PI3K/AKT 信号传导在骨肉瘤中发挥作用。研究结果显示，沉默 ISLR 后 U2OS 细胞中 PI3K 和 AKT 磷酸化水平显著降低，即沉默 ISLR 阻断了 PI3K/AKT 信号通路传导。进一步通过转染 PI3K/AKT 信号通路关键蛋白 PI3K 的激活剂 740 Y-P 处理沉默 ISLR 表达的骨肉瘤细胞，逆转实验表明 740Y-P 干预可逆转 ISLR 沉默对骨肉瘤细胞增殖、凋亡的抑制 / 促进作用，激活 PI3K/AKT 信号通路。本研究结果表明，ISLR 通过调节 PI3K/AKT 信号传导在骨肉瘤中发挥作用，为骨肉瘤的研究及治疗提供了新的靶标及方向。本研究在异种移植瘤模型中进行了结论验证，但机体是一个极其复杂的大环境，疾病发生发展机制复杂，所以 ISLR 在骨肉瘤中的作用机制还有待更进一步的探究。

综上所述，ISLR 在骨肉瘤中高表达，并可通过控制 PI3K/AKT 信号通路传导促进 EMT 及细胞增殖和侵袭，抑制细胞凋亡，从而促进骨肉瘤进展。

参考文献：

[1] KATTEPUR A K, GULIA A, JONES R L, et al. Extraskelatal osteosarcomas: current update[J]. Future Oncology, 2021, 17(7): 825-835.

- antiviral immunity by suppressing the mitochondrial reactive oxygen species-NLRP3 axis and antiviral inflammation[J]. *iScience*, 2019, 16: 468-484.
- [22] 王香香, 凌江红, 王煜姣, 等. Pink1/Parkin 信号通路调控线粒体自噬的研究进展 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2022, 41(4): 919-926.
WANG Xiangxiang, LING Jianghong, WANG Yujiao, et al. Regulation of mitochondrial autophagy by PINK1/parkin signaling pathway[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2022, 41(4): 919-926.
- [23] LIN Qisheng, LI Shu, JIANG Na, et al. Inhibiting NLRP3 inflammasome attenuates apoptosis in contrast-induced acute kidney injury through the upregulation of HIF1A and BNIP3-mediated mitophagy[J]. *Autophagy*, 2021, 17(10): 2975-2990.
- [24] GAO Youguang, DAI Xingui, LI Yunfeng, et al. Role of parkin-mediated mitophagy in the protective effect of polydatin in sepsis-induced acute kidney injury[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2020, 18(1): 114.
收稿日期: 2023-10-23
修回日期: 2024-02-02
-
- (上接第21页)
- [2] NIRALA B K, YAMAMICHI T, YUSTEIN J T. Deciphering the signaling mechanisms of osteosarcoma tumorigenesis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(14): 11367.
- [3] LI Shizhe, ZHANG He, LIU Jinxin, et al. Targeted therapy for osteosarcoma: a review[J]. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2023, 149(9): 6785-6797.
- [4] SUN Yifeng, ZHANG Chunming, FANG Qiongxuan, et al. Abnormal signal pathways and tumor heterogeneity in osteosarcoma[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2023, 21(1): 99.
- [5] 罗凯, 段华彬, 罗明鼎, 等. HOXB3 促进骨肉瘤细胞增殖、克隆形成、迁移和抑制细胞凋亡的机制研究 [J]. *现代检验医学杂志*, 2022, 37(1): 136-140, 181.
LUO Kai, DUAN Huabin, LUO Mingding, et al. Mechanism of HOXB3 promoting proliferation, cloning formation, migration and inhibiting apoptosis of osteosarcoma cells [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2022, 37(1): 136-140, 181.
- [6] FEINBERG A P, LEVCHENKO A. Epigenetics as a mediator of plasticity in cancer[J]. *Science*, 2023, 379(6632): eaaw3835.
- [7] TAKAHASHI M, KOBAYASHI H, MIZUTANI Y, et al. Roles of the mesenchymal stromal/stem cell marker meflin/islr in cancer fibrosis [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 749924.
- [8] 陈偲, 李忠辉, 王颖. miR-198 通过靶向 ZEB2 调控 EMT 过程抑制肝癌细胞增殖和迁移的机制研究 [J]. *现代检验医学杂志*, 2022, 37(4): 23-29.
CHEN Si, LI Zhonghui, WANG Ying. Study on the mechanism of miR-198 inhibiting the proliferation and migration of hepatoma cells by regulating EMT process by targeting ZEB2 [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2022, 37(4): 23-29.
- [9] HINTON K, KIRK A, PAUL P, et al. Regulation of the epithelial to mesenchymal transition in osteosarcoma[J]. *Biomolecules*, 2023, 13(2): 398.
- [10] CHI Chunhua, LIU Tongming, YANG Shengnan, et al. ISLR affects colon cancer progression by regulating the epithelial-mesenchymal transition signaling pathway[J]. *Anti-Cancer Drugs*, 2022, 33(1): e670-e679.
- [11] ZUO Bin, HUANG Qiao, YU Wei, et al. ISLR interacts with MGAT5 to promote the malignant progression of human gastric cancer AGS cells[J]. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2023, 26(8): 960-965.
- [12] ZHANG Peng, LI Zhen, YANG Guangming. Silencing of ISLR inhibits tumour progression and glycolysis by inactivating the IL-6/JAK/STAT3 pathway in non-small cell lung cancer[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2021, 48(6): 222.
- [13] SOUTHEKAL S, SHAKYAWAR S K, BAJPAI P, et al. Molecular subtyping and survival analysis of osteosarcoma reveals prognostic biomarkers and key canonical pathways[J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15(7): 2134.
- [14] MA Teng, PENG Changliang, WU Dongjin, et al. Immune-based prognostic biomarkers associated with metastasis of osteosarcoma[J]. *General Physiology and Biophysics*, 2023, 42(1): 1-12.
- [15] VERMA K, JAISWAL R, PALIWAL S, et al. An insight into PI3k/Akt pathway and associated protein-protein interactions in metabolic syndrome: a recent update[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2023, 124(7): 923-942.
- [16] GLAVIANO A, FOO A S C, LAM H Y, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer[J]. *Molecular Cancer*, 2023, 22(1): 138.
- [17] XIANG Yubo, YANG Yingxin, LIU Jia, et al. Functional role of microRNA/PI3K/AKT axis in osteosarcoma[J]. *Frontiers in Oncology*, 2023, 13: 1219211.
- [18] WEI Zhun, XIA Kezhou, ZHENG Di, et al. RILP inhibits tumor progression in osteosarcoma via Grb10-mediated inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Molecular Medicine*, 2023, 29(1): 133.
- [19] ZHANG Zhenhao, JING Doudou, XUAN Baijun, et al. Cellular senescence-driven transcriptional reprogramming of the MAFB/NOTCH3 axis activates the PI3K/AKT pathway and promotes osteosarcoma progression[J]. *Genes Diseases*, 2024, 11(2): 952-963.
收稿日期: 2024-01-23
修回日期: 2024-03-04