

LPA 受体和胞内信号传导相关分子拮抗骨肉瘤细胞黏附和迁移能力

王清富¹ 朱立新² 秦爱萍² 陈铁峰¹ 李金盘¹ 吴北太¹ 余 晓¹ 赖忠安¹ 谢维雄¹

(1. 茂名市电白区人民医院 外一科 广东 茂名 525000; 2. 南方医科大学南方医院 血液科 广东 广州 510000)

【摘要】目的:探讨溶血磷脂酸(LPA)受体和胞内信号传导相关分子拮抗骨肉瘤细胞的黏附和迁移能力。方法:培养骨肉瘤细胞 Mg-63,传至第3代采用表面抗原鉴定,采用 Transwell 体外黏附和迁移实验检测骨肉瘤细胞 Mg-63 体外黏附和迁移能力的影响,并运用 LPA 受体及胞内信号传导趋化因子 SDF-1 α 、MCP-1 及其特异性阻断剂 AMD3100、SB203580 干预 Mg-63,以明确骨肉瘤细胞 Mg-63 体外黏附和迁移的相关机制。结果:Transwell 结果显示,第7天、14天,治疗组(LPA受体干预的 Mg-63 细胞)体外黏附和迁移能力与模型组(未经干预的细胞 Mg-63)、对照组(正常成骨细胞)相比不断加强,差异有统计学意义($F = 13.658 P < 0.05$; $F = 11.765 P < 0.05$)。治疗后第21天,治疗组体外黏附和迁移能力与模型组相比不断减弱,差异无统计学意义($\chi^2 = 0.085 P > 0.05$)。胞内信号传导趋化因子 SDF-1 α 、MCP-1 在不同时相均能促进骨肉瘤细胞 Mg-63 的黏附和迁移,差异有统计学意义($F = 10.163 P < 0.05$)。经 LPA 受体干预及特异性阻断剂 AMD3100、SB203580 处理不同时相后,黏附和迁移能力下降,差异有统计学意义($F = 12.016 P < 0.05$)。结论:LPA 具有促细胞骨架变化进而调节细胞黏附和迁移能力的作用,拮抗骨肉瘤黏附和迁移过程中存在不同时相的 Mg-63 细胞体外黏附和迁移,机制可能与 MCP-1 / CCR2、SDF-1 α / CXCR4 信号轴关系密切。

【关键词】骨肉瘤细胞;黏附;迁移;胞内信号传导;趋化因子

【中图分类号】R 738.1; R 338 **【文献标志码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2018.03.003

LPA receptor and intracellular signaling-related molecules antagonizing adhesion and migration ability of osteosarcoma cells

WANG Qingfu, ZHU Lixin, QIN Aiping, CHEN Tiefeng, LI Jinpan, WU Beitai, YU Xiao, LAI Zhong'an, XIE Weixiong

No. 1 Department of Surgery, People's Hospital of Dianbai District of Maoming City, Maoming 525000, China

【Abstract】Objective: To investigate the lysophosphatidic acid receptor (LPA) and intracellular signaling-related molecules in antagonizing the adhesion and migration ability of osteosarcoma cells. **Methods:** The osteosarcoma cell Mg-63 was cultured and passed to the third generation. The adhesion and migration ability of Mg-63 was assayed by Transwell using *in vitro* technique. The expression of LPA receptor and intracellular signal transduction of chemokines (SDF-1 α , MCP-1) and its specific blockers (AMD3100, SB203580) were used to investigate the mechanisms of adhesion and migration of osteosarcoma cells Mg-63 *in vitro*. **Results:** Transwell test showed that the adhesion and migration ability of Mg-63 cells *in vitro* was significantly higher than that in the model and control groups at day 7 and 14, and the difference was statistically significant ($F = 13.658 P < 0.05$; $F = 11.765 P < 0.05$). On the 21st day after treatment, the adhesion and migration ability of Mg-63 cells *in vitro* was weakened compared with the model group, yet the difference was not significant ($\chi^2 = 0.085 P > 0.05$). Intracellular signal transduction chemotactic factor SDF-1 α and MCP-1 promoted the adhesion and migration of osteosarcoma cell Mg-63 in different time phase, with statistical difference ($F = 10.163 P < 0.05$). After treatment with LPA receptor and specific blocker AMD3100 and SB203580 in diverse time phase, the adhesion and migration ability was decreased, and the difference was statistically significant ($F = 12.016 P < 0.05$). **Conclusion:** LPA has the effect of promoting cytoskeletal changes and regulating cell adhesion and migration ability, and antagonizing the adhesion and migration of Mg-63 *in vitro* during the adhesion and migration of osteosarcoma. The mechanism may be related to SDF-1 α / CXCR4, MCP-1 / CCR2 signal axis.

【Key words】 sarcoma cells; adhesion; migration; intracellular signal transduction; chemokines

骨肉瘤是儿童、青少年最常见的恶性骨肿瘤,目前对骨肉瘤的疗效已经有了显著提高,但仍有 30% 以上的患者呈现局部的侵袭性生长与转移情况^[1]。近二十年来虽然新辅助化疗和综合治疗不断发展,

但该病的病死率仍然居高不下。因此研究骨肉瘤转移以及侵袭的分子机制对治疗疾病和改善预后具有重要作用^[2]。溶血磷脂酸 (lyso-phosphotidic acid, LPA) 是目前已知体内结构最简单的水溶性甘油磷

基金项目:广东省省级科技计划项目(2014A020212378)

收稿日期:2017-06-21

作者简介:王清富(1975-),男,副主任医师,博士,(电话)18027762175,(电子信箱)wqf789546@163.com。

脂,具有调节细胞黏附和迁移能力,可促细胞骨架变化^[3]。基于LPA的受体具有调控肿瘤细胞黏附和迁移能力及LPA受体的基本功能,我们推断LPA受体亦可能与骨肉瘤细胞的治疗具有相关性,可能产生相关生物学效应^[3]。有哪些胞内信号传导趋化因子在介导肉瘤细胞向骨折部位定向黏附和迁移归巢过程中起关键作用,目前尚不清楚^[4]。而已有研究表明:基质细胞衍生因子-1(SDF-1)、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)在一定范围内影响黏附和迁移Mg-63的数量,即随其浓度增加而增加^[5]。随着研究的不断深入,胞内信号传导趋化因子及受体可能会成为肿瘤细胞黏附和迁移的重要靶标因子,本项目选择骨髓源性细胞Mg-63,探讨应用LPA受体和胞内信号传导相关分子对Mg-63黏附和迁移的影响,从而为治疗骨肉瘤提供新思路 and 理论依据。

1 材料和方法

1.1 细胞和主要材料 细胞:骨肉瘤细胞Mg-63、正常成骨细胞(中国科学院细胞库)。材料:胞内信号传导趋化因子SDF-1 α 、MCP-1(PeProtech,美国);SB203580、AMD3100(Sigma,美国);TaqMix(东盛生物公司,广州,中国);Transwell 24孔培养板(美国Corning公司,美国);MTT试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,北京,中国);LPA受体(PeProtech公司,美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 含10%胎牛血清及双抗培养Mg-63骨肉瘤细胞于DMEM培养基中,37℃ 5% CO₂传代培养。细胞密度70%以上进行传代,细胞消化后加入完全培养基,1000 r/min离心5 min,弃上清,计数接种。当细胞传至P3代进行细胞实验。

1.2.2 实验分组 实验分为3组,治疗组:运用LPA受体干预的Mg-63细胞;模型组:未经干预的Mg-63;对照组:正常成骨细胞。

1.2.3 Transwell体外检测黏附和迁移实验

1.2.3.1 骨肉瘤细胞Mg-63体外黏附和迁移情况 取P3代Mg-63于细胞铺板前1天,无血清培养12 h,培养液混悬成密度为 5×10^5 /mL细胞悬液。培养池Transwell置入24孔板中,加入500 μ L含10% FBS的DMEM培养液于下室内,上室内加入100 μ L细胞悬液(约 5×10^4 细胞)。置于5% CO₂, 37℃孵箱培养24 h后,用棉球小心擦去上室内细胞,PBS洗2次,4%多聚甲醛固定20~30 min,0.1%结晶紫染色30 min,去掉多余染料,显微镜下观察拍照。500 μ L十二烷基硫酸钠(SDS)溶解细胞。

取细胞裂解液100 μ L,加入培养板中,酶标仪检测吸光度。

1.2.3.2 LPA受体对骨肉瘤细胞Mg-63黏附和迁移能力的影响 100 mg/L LPA培养基100 μ L进行培养,加入500 μ L含10% FBS的DMEM培养液于下室内,100 μ L细胞悬液加入上室内。结晶紫染色拍照,570 nm测定吸光度。

1.2.3.3 SDF-1 α 、MCP-1对骨肉瘤细胞Mg-63黏附和迁移能力的影响 按照上述分组方法,收集3组P3代细胞,上室加入100 μ L细胞悬液,下室加入不同浓度的SDF-1 α 、MCP-1(0、1、10、100 μ g/L)^[6],置于5% CO₂, 37℃培养箱中孵育24 h。结晶紫染色拍照,570 nm测定吸光度。

1.2.3.4 AMD3100、SB203580对骨肉瘤细胞Mg-63黏附和迁移能力的影响 取3组P3代细胞在含特异性阻断剂AMD3100、SB203580(5 mg/L)的培养基中置于5% CO₂, 37℃培养箱中孵育30 min,再按上述1.2.3.1方法,收集细胞,上室加入100 μ L细胞悬液,下室加入最佳浓度(100 μ g/L)的SDF-1 α 、MCP-1,对照组不作任何处理,置于5% CO₂, 37℃培养箱中孵育24 h。结晶紫染色拍照,570 nm测定吸光度。

1.3 统计方法 采用SPSS 19.0对数据进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,LSD法进行两两比较,计数资料采用百分比表示,行 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPA受体对骨肉瘤细胞体外迁移的影响 Transwell结果显示,经前期预实验按照(0.000、0.001、0.010、0.050、0.100 g/L)的浓度梯度,应用LPA受体干预后不同作用时间与对照组相比较骨肉瘤细胞体外迁移能力加强,差异有统计学意义,见表1。

2.2 SDF-1 α 、MCP-1对骨肉瘤细胞Mg-63黏附和迁移能力的影响 Transwell体外黏附和迁移实验结果显示,3组Mg-63在胞内信号传导趋化因子SDF-1 α 、MCP-1诱导下,细胞黏附和迁移增多,且呈浓度依赖性,最佳浓度为100 μ g/L($F = 15.265, P < 0.05$)(图1)。治疗后第7天,治疗组Mg-63在SDF-1 α 、MCP-1诱导下与模型组、对照组相比,表现出较强的黏附和迁移能力($F = 13.658, P < 0.05$)。各组治疗后第14天,Mg-63黏附和迁移能力均有所下降,但在SDF-1 α 、MCP-1诱导下,治疗组与模型组、对照组相比,差异仍有统计学意义($F = 11.765, P < 0.05$)。模型组与对照组相比,在MCP-1诱导下两组

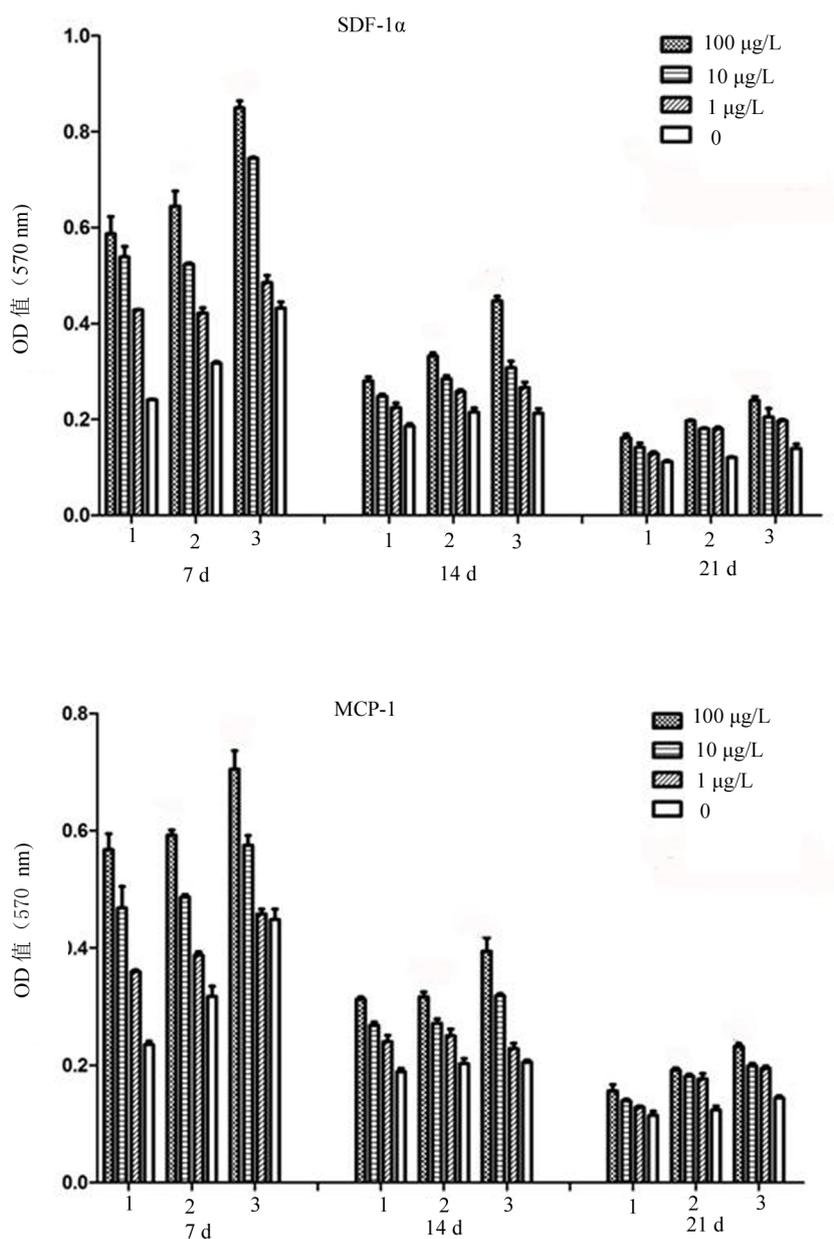
差异无统计学意义($\chi^2 = 0.053, P > 0.05$)。各组治疗后第 21 天 Mg-63 细胞的黏附和迁移能力下降,但在最佳浓度 SDF-1 α 、MCP-1 诱导下,治疗组与模型

组、对照组相比,差异有统计学意义($F = 9.382, P < 0.05$)。模型组在 SDF-1 α 诱导下,与对照组相比,差异无统计学意义($\chi^2 = 0.085, P > 0.05$)。

表 1 LPA 受体对骨肉细胞体外迁移的影响

给药浓度 /(g/L)	迁徙率/%					F	P
	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h		
0.000	5.45 ± 2.17	5.64 ± 2.49	6.35 ± 2.38	6.65 ± 3.11	5.42 ± 2.54	0.050	0.828
0.001	17.56 ± 5.64*	36.63 ± 8.93*	45.56 ± 9.92*	55.47 ± 7.85*	65.66 ± 11.49*	9.451	0.015
0.010	34.34 ± 10.29*	45.63 ± 11.67*	58.63 ± 10.83*	68.57 ± 10.55*	74.63 ± 10.52*	14.930	0.005
0.050	59.63 ± 17.52*	63.66 ± 15.26*	70.56 ± 12.42*	83.53 ± 9.62*	89.83 ± 7.84*	11.795	0.009
0.100	77.64 ± 19.21*	81.43 ± 16.59*	86.93 ± 10.49*	92.46 ± 5.47*	97.83 ± 1.23*	11.595	0.009
F	9.009	10.391	11.440	12.311	12.942		
P	0.017	0.012	0.010	0.008	0.007		

注:与对照组相比较,* $P < 0.05$ 。

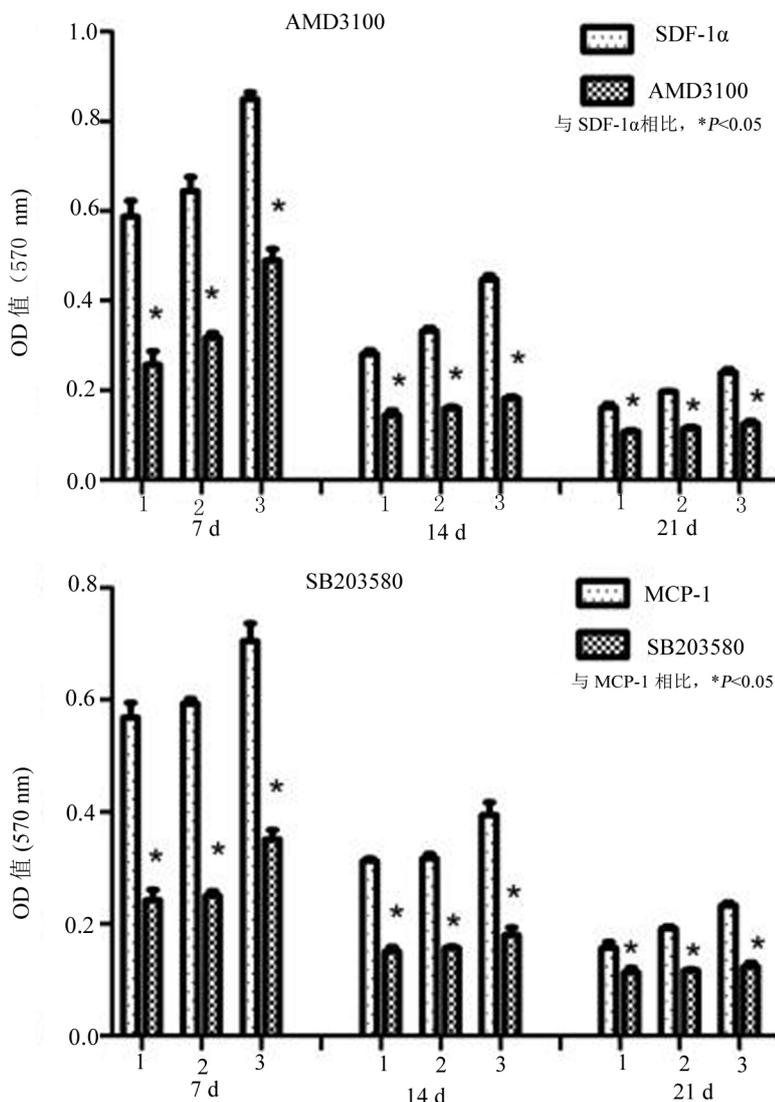


1. 对照组;2. 模型组;3. 治疗组。

图 1 胞内信号传导趋化因子 SDF-1 α 、MCP-1 对 Mg-63 黏附和迁移能力的影响

2.3 AMD3100、SB203580 对骨肉瘤细胞 Mg-63 黏附和迁移能力的影响 Transwell 体外黏附和迁移实验结果显示,不同时相 Mg-63 经 SDF-1 α 特异性受体阻断剂 AMD3100 处理后,Mg-63 黏附和迁移数量下降,与 SDF-1 α 组相比差异有统计学意义($F =$

10.163 $P < 0.05$) (图2)。同样,不同时相 Mg-63 经 MCP-1 特异性阻断剂 SB203580 处理后,Mg-63 黏附和迁移数量下降,与 MCP-1 组相比差异有统计学意义($F = 12.016 P < 0.05$)。



1. 对照组;2. 模型组;3. 治疗组。

图2 AMD3100、SB203580 对 Mg-63 骨肉瘤细胞黏附和迁移能力的影响

3 讨论

有研究表明,骨肉瘤患者中有 30% 以上出现复发和转移现象,肺转移为其死亡的主要原因之一^[7]。探讨骨肉瘤的转移以及侵袭的分子机制对改善骨肉瘤患者的预后具有重要价值和帮助,为治疗骨肉瘤尤其是防治其转移提供新的分子靶点,通过相关机制的研究为本病的治疗提供依据。LPA 受体被称为细胞间“多功能磷脂信使”,在多种组织和细胞中具有广泛的生物学功能^[8]。LPA 受体具有调节细胞黏附和迁移能力,促细胞骨架变化^[9]。研

究发现 LPA 受体在人类一些肿瘤中呈现异常表达,在恶性渗出液中显著升高,表明 LPA 受体在恶性肿瘤发生进展可能与肿瘤的侵袭和转移密切相关^[10]。LPA 受体对肿瘤发生发展受到多层次多方面影响,其主要通过相关受体、自身分泌、胞内相关因子等环节作用,从而影响肿瘤细胞的迁移和黏附以及凋亡和分化能力,进而促进肿瘤的发生发展、侵袭、转移。但具体信号传导、调控机制尚不明确。

本研究应用 LPA 受体和胞内信号传导相关分子拮抗骨肉瘤细胞黏附和迁移能力,Transwell 结果

显示第7、14天,Mg-63细胞与模型组、对照组相比,体外黏附和迁移能力加强。骨肉瘤细胞Mg-63治疗后第21天,体外黏附和迁移能力与模型组相比减弱。胞内信号传导趋化因子SDF-1 α 、MCP-1在不同时间段均能促进骨肉瘤细胞Mg-63的黏附和迁移,经LPA受体干预及特异性阻断剂AMD3100、SB203580处理不同时间段后,黏附和迁移能力下降。

研究发现LPA受体抑制SaOS-2骨肉瘤细胞和兔成骨细胞的凋亡,并且该效应能够被百日咳毒素、Wortmannin以及LY294002所抑制,进一步说明LPA受体介导的抗凋亡作用有Gi蛋白和PI-3激酶的参与^[11]。这些研究也初步表明骨肉瘤细胞表面存在LPA受体,并且LPA受体能够通过受体的介导对细胞的生物学行为如细胞凋亡产生影响。但是LPA受体对骨肉瘤细胞黏附和迁移能力影响的如何,未见相关报道^[12]。基于LPA受体的某些肿瘤细胞具有调控黏附和迁移能力、LPA受体的基本功能研究,我们推断LPA受体能够通过其受体调控,很可能对骨肉瘤细胞具备同样的生物学效应,影响骨肉瘤的侵袭和转移^[13]。不同的骨肉瘤细胞株具有不同的转移和侵袭能力,因此研究骨肉瘤细胞侵袭和转移的分子机制,尤其是LPA受体对骨肉瘤细胞的黏附和迁移能力的影响机制^[14],并进一步探讨LPA受体介导的细胞信号传导通路,寻找发挥关键作用的特异受体或可能的细胞内信号传导分子如VASF,然后借助相应的受体抑制剂或者小干扰RNA阻断该信号传导通路,以此为抗肿瘤治疗靶点,为临床治疗骨肉瘤及骨肉瘤的转移治疗提供依据。

【参考文献】

[1] FU J,ZHANG L,HE T *et al.* TWIST represses estrogen receptor- α expression by recruiting the NuRD protein complex in breast cancer cells[J]. *Int J Biol Sci* 2012 8(4):522-532.

[2] GAO Y,XUAN XY,ZHANG HY *et al.* Relationship between TWIST expressions and epithelial-mesenchymal transition of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cell Biol Int* 2012 23(6):488-496.

[3] YANG J,ECKERT MA. Targeting invadopodia to block breast cancer metastasis [J]. *Oncotarget* 2011 2(7):562-568.

[4] PINHOAV,ROOMAN I,REAL FX. p53-dependent regulation of growth, epithelial mesenchymal transition and stemness in normal pancreatic epithelial cells[J]. *Cell Cycle* 2011 10(8):1312-1321.

[5] WALLERAND H,ROBERT G,PASTICIER G *et al.* The epithelial-mesenchymal transition inducing factor TWIST is an attractive target in advanced and/or metastatic bladder and prostate cancers [J]. *Urol Oncol* 2010 28(5):473-479.

[6] 尚慧锋. MCP-1 对人脐静脉内皮细胞 CRL-1730 凋亡的影响及机制初探[D]. 遵义:遵义医学院,2008.

[7] CHANG LH,CHEN CH,HUANG DY *et al.* Thrombin induces expression of twist and cell motility via the hypoxia-inducible factor-1 α translational pathway in colorectal cancer cells[J]. *J Cell Physiol* 2011 226(4):1060-1068.

[8] 徐万鹏,冯传汉. 骨科肿瘤学[M]. 2版. 北京:人民军医出版社,2008:211.

[9] FRANCO HL,CASASNOVASJ,RODRIGUEZ-MEDINA JR *et al.* Redundant or separate entities roles of Twist1 and Twist2 as molecular switches during gene trans-cription[J]. *Nucleic Acids Res* 2011 39(4):1177-1186.

[10] NOWAK SJ,AIHARA H,GONZALEZ K *et al.* Akirin links twist-regulated transcription with the brahma chromatin remodeling complex during embryogenesis [J]. *PLoS Genetics* 2012 8(3):1-16.

[11] JERONIMO C,ESTELLERM. DNA methylation markers for prostate cancer with a stem cell twist [J]. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010 3(9):1053-1055.

[12] YIN G,ALVERO AB,CRAVERIO V *et al.* Constitutive proteasomal degradation of TWIST-1 in epithelial-ovarian cancer stem cells impacts differentiation and metastatic potential [J]. *Oncogene* 2012 20:10-30.

[13] DE MARCO P,RASO A,BERI S *et al.* A de novo balanced translocation t(7;12)(p21.2;p12.3) in a patient with Saethre-Chotzen-like phenotype down regulates TWIST and an osteoclastic protein-tyrosine phosphatase, PTP-oc [J]. *Eur J Med Genet* 2011 54(5):478-483.

[14] WARREN C,WALLACE W,CAMPBELL WJ. Splenic laceration with a twist:a lesson learnt from gastric volvulus [J]. *Ann R Coll Surg Engl* 2012 94(2):88-89.