

# 敲低*Ski*基因对骨肉瘤U-2OS细胞 增殖和迁移的影响

寇江力<sup>1,2#</sup> 赵鑫<sup>1,2#</sup> 王兴文<sup>1,2</sup> 汪静<sup>2</sup> 王拴科<sup>1</sup> 张海鸿<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>兰州大学第二医院骨科, 兰州 730030;

<sup>2</sup>甘肃省骨关节疾病研究重点实验室, 兰州 730030)

**摘要** 该文研究了敲低*Ski*基因对骨肉瘤U-2OS细胞增殖和迁移的影响。该研究成功构建了*Ski*基因敲低表达的骨肉瘤U-2OS细胞系。Western blot结果显示, *Ski*-siRNA转染后骨肉瘤U-2OS细胞*Ski*蛋白表达水平明显降低( $P<0.05$ )。CCK-8结果表明, 敲低*Ski*基因组在12、24、48 h细胞增殖活力明显降低( $P<0.05$ )。与对照组相比, *Ski*-siRNA组细胞周期G<sub>1</sub>期细胞比例明显增高, 而S期和G<sub>2</sub>期细胞比例均显著降低( $P<0.05$ )。细胞划痕实验显示, *Ski*-siRNA处理组细胞在12、24、48 h的划痕愈合率均低于siRNA对照组, 且均具有统计学意义( $P<0.05$ )。此外, *Ski*-siRNA处理组中PCNA、cyclin D1、MMP-2和MMP-9蛋白质水平均显著降低( $P<0.05$ )。上述结果表明, 敲低*Ski*基因能显著抑制骨肉瘤U-2OS细胞的增殖和迁移能力, 提示*Ski*基因有望成为骨肉瘤治疗的新靶点。

**关键词** 骨肉瘤; *Ski*; siRNA; 增殖; 迁移

## Knockdown of *Ski* Gene Expression Influence the Proliferation and Migration Abilities of Osteosarcoma U-2OS Cells

Kou Jiangli<sup>1,2#</sup>, Zhao Xin<sup>1,2#</sup>, Wang Xingwen<sup>1,2</sup>, Wang Jing<sup>2</sup>, Wang Shuanke<sup>1</sup>, Zhang Haihong<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Orthopedics, Second Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730030, China;

<sup>2</sup>Key Laboratory of Orthopedics of Gansu Province, Lanzhou 730030, China)

**Abstract** The effect of *Ski* gene expression on the proliferation and migration of human osteosarcoma U-2OS cells *in vitro* was studied in this paper. The *Ski* gene-knockdown U-2OS cell line was successfully constructed. The protein level of *Ski* in U-2OS cells was significantly decreased after transfection with *Ski*-siRNA ( $P<0.05$ ). The proliferation vitalities of U-2OS cells at 12, 24 and 48 h after *Ski* gene-knockdown were decreased than those in the blank and negative groups ( $P<0.05$ ). At the same time, the cells percentage of G<sub>1</sub> phase was increased after *Ski* gene-knockdown, while S and G<sub>2</sub> phases were significantly decreased ( $P<0.05$ ). In wound healing assay, the wound healing rate of *Ski*-siRNA group was significantly lower than that of the negative control siRNA group in 12, 24, 48 h ( $P<0.05$ ). Furthermore, the protein levels of PCNA, cyclin D1, MMP-2 and MMP-9 were also decreased in *Ski*-siRNA group ( $P<0.05$ ). These results indicated that knockdown of *Ski* gene by siRNA significantly decreased the proliferation and migration abilities of human osteosarcoma U-2OS cells. They indicated that *Ski* gene might

收稿日期: 2017-09-26 接受日期: 2017-11-09

甘肃省基础研究创新群体项目(批准号: 1308RJA004)资助的课题

\*共同第一作者

\*通讯作者。Tel: 13919343669, E-mail: zhanghaih1968@163.com

Received: September 26, 2017 Accepted: November 9, 2017

This work was supported by the Basic Research Innovation Group Project of Gansu Province (Grant No.1308RJA004)

#These authors contributed equally to this work

\*Corresponding author. Tel: +86-13919343669, E-mail: zhanghaih1968@163.com

网络出版时间: 2018-01-08 12:45:08

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180108.1245.002.html>

become a new potential targeting gene in the therapy for human osteosarcoma disease.

**Keywords** osteosarcoma; Ski; small interfering RNA; proliferation; migration

骨肉瘤起源于间叶组织,是骨关节系统最常见的恶性肿瘤,其治愈率较低,对青少年健康的危害较高,在早期易发生肺部转移<sup>[1]</sup>,死亡率较高<sup>[2-3]</sup>。近年来,随着外科手术的发展和新辅助联合化疗的广泛应用,患者5年生存率得到显著提高<sup>[4-5]</sup>,但发生转移的患者5年生存率仍较低<sup>[6]</sup>。因此,深入探讨骨肉瘤发生转移机制、寻找新的治疗靶点进而延长已发生转移患者生存期是目前亟需解决的问题。

Ski在不同物种中广泛参与并调节多种细胞的增殖及分化等过程,在生物进化过程中高度保守,参与多种信号通路,且与肿瘤的发生发展、增殖、分化等密切相关<sup>[7-8]</sup>。已有研究表明,Ski在多种肿瘤组织中呈高表达状态,Ski的激活或异常表达与肿瘤的发生发展密切相关<sup>[9-11]</sup>。有关Ski对骨肉瘤细胞增殖和迁移影响的研究在国内外尚无相关报道。本实验构建针对Ski基因的特异性小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA),采用脂质体法将其转入骨肉瘤U-2OS细胞以敲低Ski基因表达,进而检测敲低Ski基因后骨肉瘤细胞增殖和迁移能力的变化,以初步探讨Ski基因在骨肉瘤细胞生物学功能中发挥的作用,为进一步研究Ski基因与骨肉瘤的发病机制及治疗提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞和主要试剂

骨肉瘤U-2OS细胞购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。DMEM高糖培养基、青霉素、链霉素和胰蛋白酶均购自美国HyClone公司。胎牛血清购自德国PAN-Biotech GmbH公司。化学合成Ski-siRNA(货号: HSS185684)、携带绿色荧光的阴性对照siRNA(control siRNA)(货号: 12935200)和siRNA转染试剂(siRNA Lipofectamine<sup>®</sup> RNAi MAX Reagent)均购自美国Thermo Fisher公司。RIPA裂解液和BCA蛋白质定量检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。兔抗人Ski多克隆抗体和小鼠抗人cyclin D1多克隆抗体均购自美国Santa Cruz公司。兔抗人PCNA多克隆抗体购自Proteintech公司。兔抗人MMP-2、MMP-9多克隆抗体购自美国Cell Signaling Technology公司。小鼠抗人 $\beta$ -actin单

克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠或抗兔IgG(二抗)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。CCK8试剂盒购自日本同仁化学公司。PVDF膜、超敏化学发光试剂ECL均购自美国Millopore公司。Matrigel购自美国BD公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 骨肉瘤U-2OS细胞用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 mg/mL链霉素的DMEM高糖培养基,置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中进行培养。然后,取处于对数生长期的细胞进行后续实验。

**1.2.2 免疫荧光检测** 将已消毒的5 mm盖玻片置于35 mm的培养皿中,按 $1 \times 10^5$ /mL的细胞密度将细胞接种于盖玻片上进行细胞爬片,待细胞贴壁牢固后,PBS洗涤爬片细胞,4%多聚甲醛固定30 min,PBS洗涤3遍,Triton X-100通透20 min,PBS洗涤3遍,滴加山羊封闭血清,37 °C下封闭30 min,然后吸净封闭液,勿洗,加入Ski(兔抗人)多克隆抗体(1:100),玻片置于湿盒中,于4 °C冰箱中孵育过夜。PBS洗涤3遍,避光加入FITC-二抗工作液(1:300),37 °C温箱中避光孵育90 min,PBS洗涤3遍。甘油封片。荧光显微镜下观察并照相,FITC发出绿色荧光,该荧光为Ski阳性表达位置。

**1.2.3 siRNA转染** 实验分为3组,Ski-siRNA转染组(采用siRNA Lipofectamine<sup>®</sup> RNAi MAX Reagent将Ski-siRNA转入U-2OS细胞)、阴性对照组[采用siRNA Lipofectamine<sup>®</sup> RNAi MAX Reagent将阴性对照siRNA(negative control-siRNA, NC-siRNA)转入U-2OS细胞]和空白对照组(仅加入siRNA Lipofectamine<sup>®</sup> RNAi MAX Reagent)。Ski-siRNA正义链的序列为: 5'-GCC CUG AUU CGA GAC AGC UUC UAC U-3',反义链的序列为: 5'-AGU AGA AGC UGU CUC GAA UCA GGG C-3'; NC-siRNA正义链的序列为: 5'-UUG UGG CCU GUU AGC UUC AGA GCG A-3',反义链的序列为: 5'-UCG CUC UGA AGC UAA CAG GCC ACA A-3'。

取对数生长期的细胞接种于6孔板中,待细胞密度为80%时,采用Lipofectamine<sup>®</sup> RNAi MAX Reagent进行siRNA转染,具体步骤依照siRNA转

染试剂盒说明书提供的方法进行,待细胞转染48 h后,于倒置光学显微镜下观察细胞形态学的变化,随后提取细胞总蛋白,采用Western blot法检测敲低效果。siRNA转染效率的检测:将6 mL的FITC-control-siRNA(终浓度为100 nmol/L)与8 mL的siRNA Lipofectamine® RNAi MAX Reagent混匀后转染骨肉瘤U-2OS细胞,12 h后在荧光显微镜下观察并计数出现绿色荧光的细胞数。转染效率=荧光细胞数/细胞总数×100%。

**1.2.4 Western blot检测相关蛋白质水平** 收集转染48 h后的*Ski*-siRNA转染组、NC-siRNA转染组和空白对照组的U-2OS细胞,用预冷的PBS清洗细胞2遍,用RIPA裂解液提取细胞总蛋白,BCA试剂盒测定总蛋白浓度。提取的蛋白质行10% SDS-PAGE电泳(浓缩胶90 V,分离胶120 V),将电泳分离好的蛋白电转至甲醇浸透好的PVDF膜上,采用5%脱脂奶粉室温封闭2 h, TBST(10 mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.5% Tween 20)洗涤(10 min×3遍),加一抗[兔抗人*Ski*多克隆抗体(1:100)、兔抗人MMP-2多克隆抗体(1:1 000)、兔抗人MMP-9多克隆抗体(1:1 000)、小鼠抗人 $\beta$ -actin单克隆抗体(1:5 000)],4 °C冰箱中反应过夜。TBST洗膜(方法同前)。加二抗[辣根过氧化物标记的山羊抗兔或抗小鼠IgG(1:5 000)],室温下反应2 h。TBST洗膜3遍(方法同前)。滴加ECL发光液,在GE凝胶成像系统中测量各目的条带的灰度值,以目的蛋白的灰度值与内参 $\beta$ -actin蛋白条带的灰度值之比反应目的蛋白质水平。

**1.2.5 CCK-8法检测细胞增殖活力** 取对数生长期骨肉瘤U-2OS细胞,调整细胞密度为 $1 \times 10^4$ /mL的均匀单细胞悬液,并接种于96孔板内,每孔细胞悬液量为100  $\mu$ L。实验分组同前,细胞培养至贴壁后,根据前述转染方法转染各组细胞并继续培养,每组分别在12、24、48 h检测细胞增殖活力,各组均设5个复孔,96孔板周围加PBS液100  $\mu$ L,保持湿度。按照说明书向培养板中加入CCK-8试剂,CO<sub>2</sub>培养箱中反应2 h,在酶联免疫检测仪上测量对应孔中细胞在450 nm波长处的吸光度(*D*)值。根据吸光度值绘制细胞生长曲线。

**1.2.6 流式细胞术分析细胞周期** 流式细胞术检测敲低*Ski*基因后骨肉瘤细胞周期的变化。具体操作步骤按如下方法进行。PBS洗涤*Ski*-siRNA转染组、NC-siRNA转染组及空白对照组的U-2OS细

胞,0.25%胰蛋白酶消化细胞,PBS吹打制成细胞悬液,收集的细胞1 000 r/min离心5 min,弃上清,预冷PBS洗涤2遍;离心后再加1 mL PBS使细胞重悬,边振荡边滴入预冷的75%乙醇中,-20 °C过夜。重复洗涤和离心收集细胞2遍,再以预冷1 mL PBS使细胞重悬,各组样品分别加入190  $\mu$ L EDTA和10  $\mu$ L RNase(10 mg/mL),室温反应5 min,再加入PI染液,置于4 °C避光反应10 min后目筛过滤到上样管。上机检测细胞周期各阶段的细胞数,结果采用细胞周期拟合软件ModFit分析,计算个周期所占比例。

**1.2.7 细胞划痕实验检测细胞迁移能力** 细胞划痕实验是检测细胞运动特性的方法之一,观察在转染*Ski*-siRNA后骨肉瘤U-2OS细胞迁移特性的改变。常规消化呈指数生长的骨肉瘤U-2OS细胞,以 $5 \times 10^5$ /孔接种至6孔板中,按前述转染方法将细胞分为转染*Ski*-siRNA组和对照组。待细胞贴壁密度达到80%时,将6孔板放置在预先设计好的划痕模版(模版上均匀划6条横线,线间距离1 cm)上,借助直尺,采用200  $\mu$ L移液器头在板底依照模版在对应孔中划直线,用PBS漂洗2遍以除去划下的悬浮细胞,继续培养相应时间(12、24、48 h)后在倒置光学显微镜下观察各组细胞迁移情况。用Image Pro Plus 6.0软件测各个时间点细胞未覆盖的面积。划痕愈合率=[1-(各时间点划痕面积/开始的划痕面积)]×100%。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS 21.0软件对实验结果进行统计分析。每组数据来自3次独立的实验,计数资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用单因素方差分析各组间差异的显著性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 *Ski*在骨肉瘤U-2OS细胞中的表达

骨肉瘤U-2OS细胞在3 h时开始贴壁生长,呈长梭形。免疫荧光染色显示,*Ski*为绿色荧光,主要分布于细胞核中,胞质中也有少量分布(图1)。

### 2.2 转染后细胞形态的观察

正常骨肉瘤U-2OS细胞贴壁生长,细胞轮廓清晰,胞体多数呈长梭形或不规则状,细胞核清晰可见,呈圆形或椭圆形,细胞膜完整(图2A),生长旺盛。转染*Ski*-siRNA 48 h后,可见U-2OS细胞体积较转染前有所增大,细胞集落减少,未贴壁细胞增多,细胞碎片增多(图2B)。



采用FITC-control-siRNA检测转染效率,结果显示,将6 mL FITC-control-siRNA经8 mL的siRNA Lipofectamine<sup>®</sup> RNAi MAX Reagent转染至U-2OS细胞48 h后,可在荧光显微镜下观察到细胞中的绿色荧光,根据转染效率(%)=同一视野荧光显微镜下成功转染细胞数/相同视野下的细胞总数 $\times$ 100%,结果显示,转染效率为(80.78 $\pm$ 3.98)% (图2C)。

### 2.3 *Ski*-siRNA组的Ski蛋白质水平明显降低

根据Western blot检测结果(图3)计算各组目的蛋白质Ski与内参 $\beta$ -actin条带灰度值的平均比值,得出*Ski*-siRNA转染组细胞中Ski蛋白质水平为(0.167 $\pm$ 0.044),明显低于NC-siRNA组(0.724 $\pm$ 0.060) ( $P=0.0002$ ,  $P<0.001$ ),而NC-siRNA组(0.724 $\pm$ 0.060)与空白对照组(0.801 $\pm$ 0.065)相比则差异无统计学意义( $P=0.147$ ,  $P>0.05$ )。因此,*Ski*-siRNA成功转染U-2OS细胞并显著抑制Ski表达。

### 2.4 敲低*Ski*基因后对U-2OS细胞增殖活力的影响

为探索敲低*Ski*基因是否对骨肉瘤U-2OS细胞

增殖活力产生影响,采用CCK-8法检测各组细胞的增殖活力。以各组分别在12、24、48 h的450 nm处的吸光度 $D$ 值为纵坐标,时间为横坐标绘制细胞增殖曲线(图4)。结果发现,*Ski*-siRNA组细胞的增殖活力明显低于空白对照组和阴性对照组( $P<0.05$ ),说明敲低*Ski*基因后骨肉瘤U-2OS细胞的增殖活力被显著抑制。

### 2.5 敲低*Ski*基因后对U-2OS细胞周期的影响

流式细胞术分析发现(图5),实验组*Ski*-siRNA组细胞G<sub>1</sub>期细胞百分比为(80.64 $\pm$ 1.04)%, S期所占百分比为(11.24 $\pm$ 1.53)%, G<sub>2</sub>期所占百分比为(8.23 $\pm$ 1.75)%;而空白对照组Mock中各时相细胞所占比例分别为: G<sub>1</sub>期(64.41 $\pm$ 4.53)%, S期(23.20 $\pm$ 3.26)%, G<sub>2</sub>期(12.41 $\pm$ 1.31)%;阴性对照组中: G<sub>1</sub>期(65.69 $\pm$ 3.09)%, S期(22.87 $\pm$ 1.69)%, G<sub>2</sub>期(13.41 $\pm$ 1.79)%。统计分析结果显示,实验组G<sub>1</sub>期所占比例明显高于空白对照组和阴性对照组,而S期和G<sub>2</sub>期所占比例显著降低。结果明确提示,敲低*Ski*基因表达后骨肉瘤U-2OS细

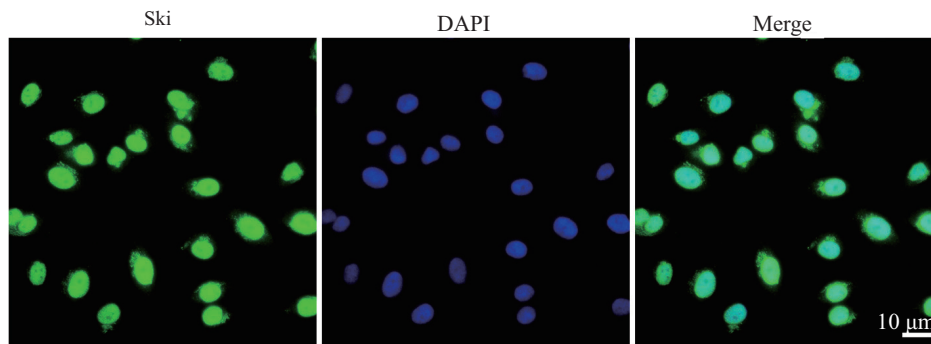
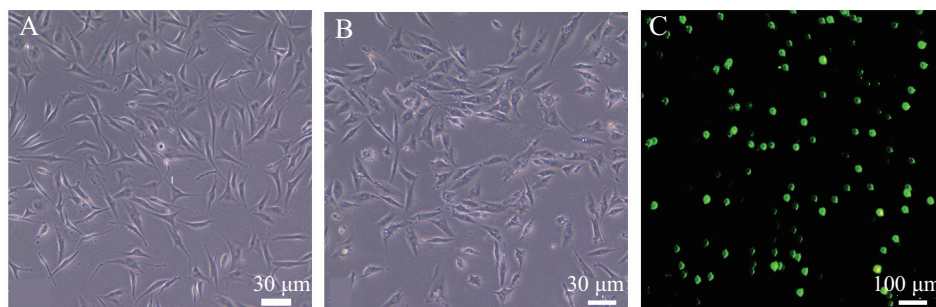


图1 免疫荧光染色检测Ski在骨肉瘤U-2OS细胞中表达

Fig.1 The expression of Ski in U-2OS cells detected by immunofluorescent staining



A: 骨肉瘤U-2OS细胞形态; B: *Ski*-siRNA转染U-2OS细胞后细胞形态; C: FITC-control-siRNA转染U-2OS的转染效率。

A: the morphology of osteosarcoma U-2OS cells; B: the morphology of osteosarcoma U-2OS cells after transfection with the *Ski*-siRNA; C: the transfection rate of U-2OS cells after the transfection with FITC-control-siRNA.

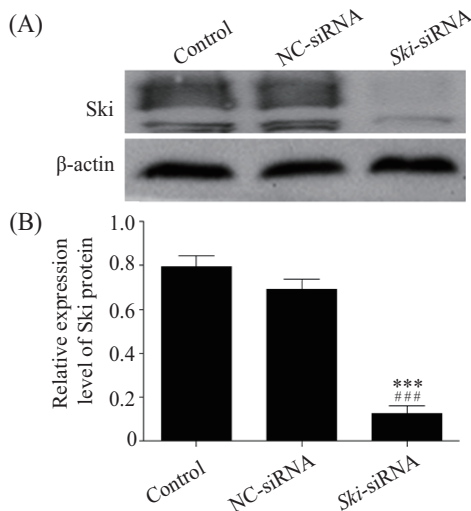
图2 *Ski*-siRNA转入骨肉瘤U-2OS细胞后细胞形态的变化和细胞转染效率

Fig.2 The morphological changes of osteosarcoma U-2OS cells after transfection with the *Ski*-siRNA and the transfection efficiency

胞周期进程明显受阻滞。

## 2.6 敲低*Ski*基因后对细胞迁移能力的影响

细胞划痕实验结果(图6)显示, *Ski*-siRNA组和NC-siRNA组细胞培养12 h后细胞划痕愈合率

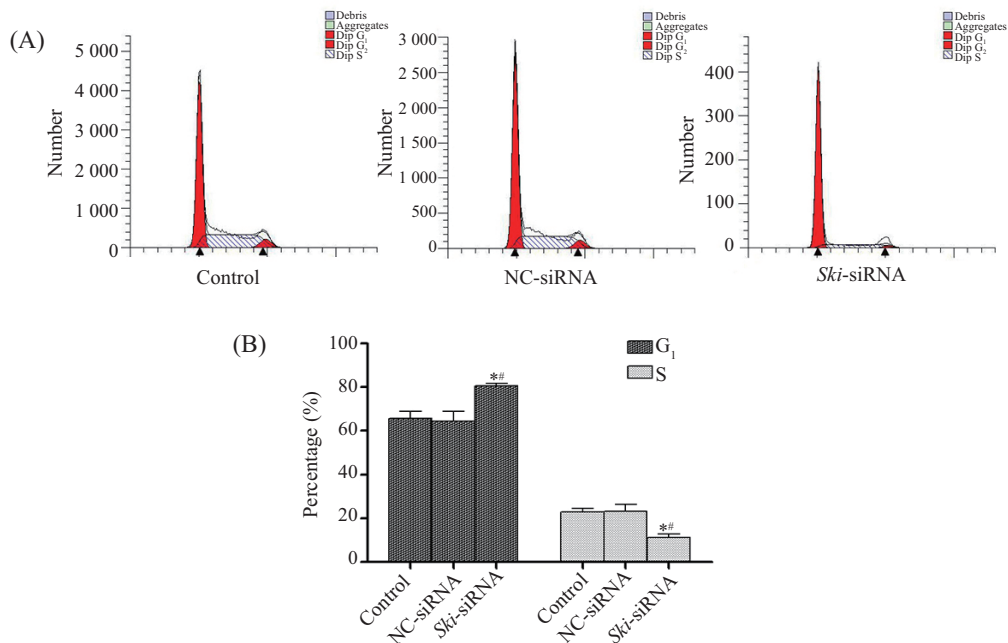


A: Western blot检测*Ski*蛋白质水平; B: 蛋白灰度相对分析; \*\*\* $P<0.001$ , 与对照组比较; ### $P<0.001$ , 与NC-siRNA组比较。

A: determination of *Ski* protein levels detected by Western blot; B: relative protein levels of *Ski* analysed by densitometry. \*\*\* $P<0.001$  vs the control group, ### $P<0.05$  vs the NC-siRNA group.

图3 骨肉瘤U-2OS细胞中*Ski*蛋白质水平

Fig.3 The level of *Ski* protein in osteosarcoma U-2OS cells



A: 对照组、NC-siRNA组和*Ski*-siRNA组流式细胞术检测细胞周期细胞比例情况; B: 统计分析各组细胞周期比例情况。\* $P<0.05$ , 与对照组比较; # $P<0.05$ , 与NC-siRNA组比较。

A: flow cytometry were used to evaluate the cell cycle of U-2OS; B: statistical analysis cell cycle rate of all groups. \* $P<0.05$  vs the control group, # $P<0.05$  vs the NC-siRNA group.

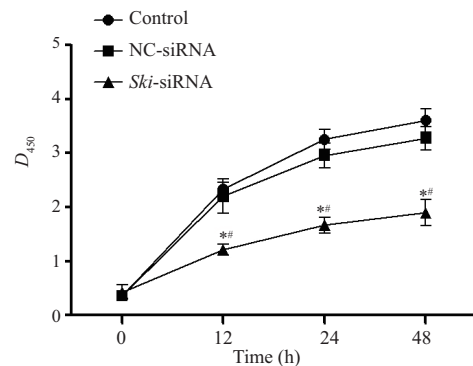
图5 *Ski*-siRNA对U-2OS细胞周期的影响

Fig.5 The effect of *Ski* gene on U-2OS cells cycle after transfection with *Ski*-siRNA

分别为(20.57±3.4)%和(39.47±7.82)%( $F=14.666$ ,  $P=0.019$ ,  $P<0.05$ ); 24 h后细胞划痕愈合率分别为(48.27±4.19)%和(87.17±7.01)%( $F=68.197$ ,  $P=0.001$ ,  $P<0.01$ ); 48 h后细胞划痕愈合率分别为(67.90±9.85)%和(98.5±2.54)%( $F=27.212$ ,  $P=0.006$ ,  $P<0.01$ )。

## 2.7 敲低*Ski*基因对细胞中相关蛋白质水平的影响

Western blot检测结果(图7A~图7C)显示, 与空白对照组和NC-siRNA转染组相比, *Ski*-siRNA组细胞中

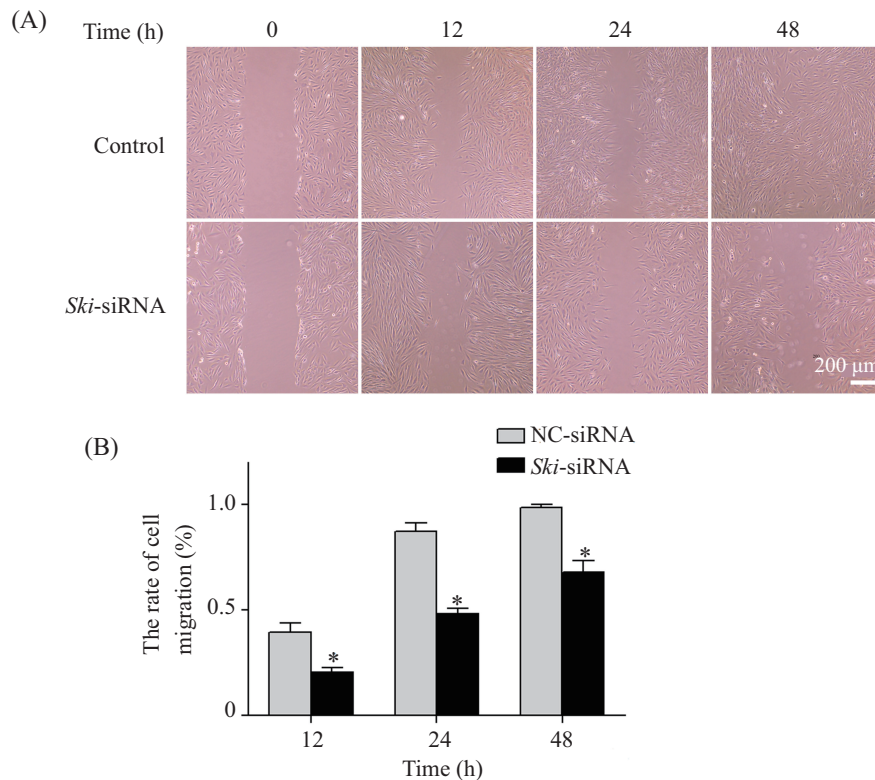


\* $P<0.05$ , 与对照组比较; # $P<0.05$ , 与NC-siRNA组比较。

\* $P<0.05$  vs the control group, # $P<0.05$  vs the NC-siRNA group.

图4 CCK-8实验检测*Ski*-siRNA对U-2OS细胞增殖的影响

Fig.4 The effect of *Ski*-siRNA on cell proliferation of U-2OS by CCK-8 assay



A: 细胞划痕实验; B: 统计分析各组细胞迁移速率;  $n=3$ ,  $*P<0.05$ , 与NC-siRNA组比较。

A: wound-healing assay; B: statistical analysis the rate of cell migration;  $n=3$ ,  $*P<0.05$  vs NC-siRNA group.

图6 *Ski*-siRNA对骨肉瘤U-2OS细胞迁移能力的影响

Fig.6 The effects of *Ski*-siRNA on migration abilities of osteosarcoma U-2OS cells

PCNA和cyclin D1蛋白质水平明显降低( $P<0.05$ ); 鉴于细胞划痕实验明确提示, *Ski*与骨肉瘤U-2OS迁移特性有关系, 我们进一步通过Western blot法检测敲低*Ski*基因后MMP-2和MMP-9蛋白质水平情况, 结果显示, *Ski*-siRNA转染组细胞中MMP-2和MMP-9蛋白质水平明显下调( $P<0.05$ ), 而空白对照组和阴性对照组比较各蛋白质水平差异无统计学意义( $P>0.05$ )(图7D~图7F)。

### 3 讨论

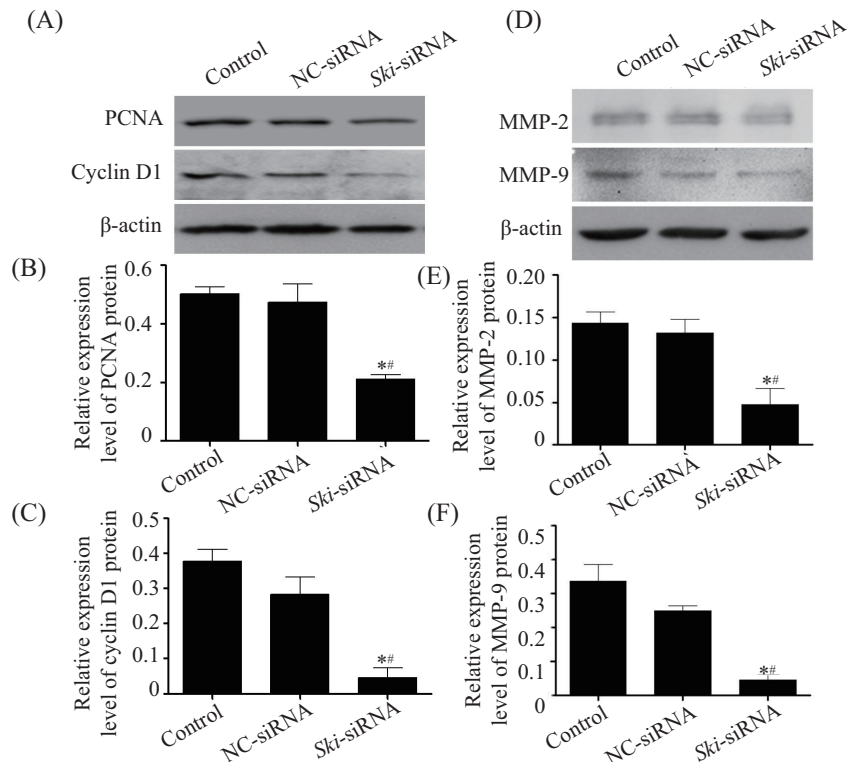
骨肉瘤是最常见的原发性恶性骨肿瘤, 好发于血运丰富的干骺端<sup>[12-13]</sup>, 恶性程度高、生长快, 且早期症状不明显, 诊断较为困难, 患者发现时多处于中晚期, 而中晚期患者中40%已出现远处转移<sup>[14]</sup>, 同时13%~27%的患者在初次就诊时就已出现转移, 转移成为患者死亡的主要原因<sup>[15]</sup>。因此, 骨肉瘤生长和转移机制的研究对于骨肉瘤的有效治疗至关重要。

*Ski*基因是Stavnezer等<sup>[16]</sup>于1986年首次在感染了病毒Bratislava77的鸡胚细胞中发现的。研究表

明, *Ski*与多种细胞的增殖、分化、转化及肿瘤发生发展相关<sup>[17]</sup>。目前已证实, *Ski*分子在多种肿瘤组织中呈高表达状态, 如食管癌<sup>[18]</sup>、直肠癌<sup>[19]</sup>、胃癌<sup>[20]</sup>、胰腺癌<sup>[20]</sup>、血管瘤<sup>[21]</sup>、黑色素瘤<sup>[22]</sup>和白血病<sup>[10]</sup>等。本研究首次证实体外培养的骨肉瘤U-2OS细胞内存在*Ski*表达, 分布于细胞核和细胞质, 推测在骨肉瘤U-2OS细胞生物学功能方面可能起到一定的作用。

为此, 本研究利用脂质体转染法将*Ski*-siRNA转染至骨肉瘤U-2OS细胞中抑制*Ski*基因的表达, 初步探讨敲低*Ski*基因表达对骨肉瘤U-2OS细胞增殖和迁移特性的影响。本研究敲低*Ski*基因后, 蛋白质免疫印迹实验结果显示, 转染*Ski*-siRNA后成功抑制骨肉瘤U-2OS细胞中*Ski*蛋白质水平; 对敲低*Ski*基因后的U-2OS细胞行CCK-8增殖活力实验研究显示, 敲低*Ski*基因表达后, 与NC-siRNA组和空白对照组相比, *Ski*-siRNA转染组细胞增殖活力被显著抑制。为进一步验证*Ski*对U-2OS增殖活力的影响, 我们采用流式细胞术分析各组细胞周期所占百分比进行监测并统计, 本研究结果显示, 敲低*Ski*基因后G<sub>1</sub>期所占百





A、D: Western blot检测PCNA、cyclin D1、MMP-2和MMP-9蛋白质水平; B、C、E、F: 蛋白质灰度相对分析。\* $P < 0.05$ , 与对照组比较; <sup>#</sup> $P < 0.05$ , 与NC-siRNA组比较。

A、D: determination of PCNA, cyclin D1, MMP-2 and MMP-9 proteins level by Western blot; B,C,E,F: relative proteins level detected by densitometry. \* $P < 0.05$  vs the control group, <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs the NC-siRNA group.

图7 Western blot检测敲低*Ski*基因对PCNA、cyclin D1、MMP-2、MMP-9蛋白质水平的影响  
Fig.7 Protein levels of PCNA, cyclin D1, MMP-2 and MMP-9 analyzed by Western blot

分比明显增高,同时S期所占百分比显著降低。从而进一步证明,*Ski*在促进骨肉瘤U-2OS细胞增殖特性方面起到重要调控作用。

对*Ski*基因敲低后的骨肉瘤U-2OS细胞迁移功能方面的研究显示,敲低*Ski*基因表达后,与NC-siRNA组和空白对照组相比,*Ski*-siRNA转染组细胞迁移能力被显著抑制。这证明,*Ski*在促进骨肉瘤U-2OS细胞迁移能力起到重要调控作用。

细胞增殖和迁移是肿瘤发生发展和转移的关键生物学行为,属于一个极其复杂的病理过程,与患者病情发展和预后有着密切的关系,深入探讨肿瘤生长和转移的机制对患者预后至关重要<sup>[14]</sup>。PCNA和cyclin D1均属于细胞增殖相关蛋白质<sup>[14]</sup>,本研究结果发现在敲低*Ski*基因后,PCNA和cyclin D1水平均明显降低。结合CCK-8细胞增殖活力检测结果和细胞周期实验结果,明确*Ski*与骨肉瘤U-2OS细胞增殖之间的存在确切联系。此外,降解基底膜和细胞外基质是恶性肿瘤细胞发生侵袭和转移的重要前提,目前已明确,MMP-2和MMP-9可降解基底膜和

细胞外基质,被认为在骨肉瘤细胞侵袭和转移过程中扮演重要的角色<sup>[14]</sup>。在本研究结果中,敲低骨肉瘤U-2OS细胞中的*Ski*基因后,MMP-2和MMP-9蛋白表达均明显受限,提示*Ski*可通过MMP-2和MMP-9参与骨肉瘤U-2OS细胞的转移过程。

综上所述,采用*Ski*-siRNA可以成功敲低骨肉瘤U-2OS细胞中*Ski*基因的表达,敲低*Ski*基因后的骨肉瘤U-2OS细胞的增殖和迁移能力均降低。这一结果可能为临床治疗骨肉瘤的转移提供新的干预靶点。本课题组将继续深入研究*Ski*分子具体调控机制,为骨肉瘤的分子靶向治疗提供更加科学的理论依据。

## 参考文献 (References)

- 1 Qiu Z, Liao Q. Progress of osteosarcoma therapy. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2010; 24(12): 1469-75.
- 2 Mortus JR, Zhang Y, Hughes DP. Developmental pathways hijacked by osteosarcoma. *Adv Exp Med Biol* 2014; 804: 93-118.
- 3 Bielack S, Jürgens H, Jundt G, Kevric M, Kühne T, Reichardt P, *et al*. Osteosarcoma: the COSS experience. *Cancer Treat Res* 2009; 152: 289-308.
- 4 Faisham WI, Mat SAZ, Alsaigh LN, Nor AMZ, Kamarul

- IM, Biswal BM, *et al.* Prognostic factors and survival rate of osteosarcoma: A single-institution study. *Asia Pac J Clin Oncol* 2017; 13(2): e104-110.
- 5 Hattinger CM, Fanelli M, Tavanti E, Vella S, Ferrari S, Picci P, *et al.* Advances in emerging drugs for osteosarcoma. *Expert Opin Emerg Drugs* 2015; 20(3): 495-514.
- 6 Farfalli GL, Albergo JI, Lobos PA, Smith DE, Streitenberger PD, Pallotta RMG, *et al.* Osteosarcoma lung metastases. Survival after chemotherapy and surgery. *Medicina (B Aires)* 2015; 75(2): 87-90.
- 7 Bonnon C, Atanasoski S. c-Ski in health and disease. *Cell Tissue Res* 2012; 347(1): 51-64.
- 8 刘霞. c-ski原癌基因及其生物学活性. 国外医学(肿瘤学分册) (Liu Xia. The proto-oncogene of c-ski and its biological activity. *Foreign medical:oncology*) 2004; 12(31): 85-9.
- 9 Song L, Chen X, Gao S, Zhang C, Qu C, Wang P, *et al.* Ski modulate the characteristics of pancreatic cancer stem cells via regulating sonic hedgehog signaling pathway. *Tumour Biol* 2016; 35: 1-12.
- 10 Ritter M, Kattmann D, Teichler S, Hartmann O, Samuelsson MK, Burchert A, *et al.* Inhibition of retinoic acid receptor signaling by Ski in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2006; 20(3): 437-43.
- 11 Buess M, Terracciano L, Reuter J, Ballabeni P, Boulay JL, Laffer U, *et al.* Amplification of SKI is a prognostic marker in early colorectal cancer. *Neoplasia* 2004; 6(3): 207-12.
- 12 Cao CM, Yang FX, Wang PL, Yang QX, Sun XR. Clinico-pathologic significance of S100A4 expression in osteosarcoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014; 18(6): 833-9.
- 13 Li Y, Zeng C, Tu M, Jiang W, Dai Z, Hu Y, *et al.* MicroRNA-200b acts as a tumor suppressor in osteosarcoma via targeting ZEB1. *Oncotargets Ther* 2016; 9: 3101-11.
- 14 Ottaviani G, Jaffe N. The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res* 2009; 152: 3-13.
- 15 Namløs HM, Kresse SH, Müller CR, Henriksen J, Holdhus R, Sæter G, *et al.* Global gene expression profiling of human osteosarcomas reveals metastasis-associated chemokine pattern. *Sarcoma* 2012; 2012: 639038.
- 16 Stavnezer E, Barkas AE, Brennan LA, Brodeur D, Li Y. Transforming sloan-kettering viruses generated from the cloned v-ski oncogene by *in vitro* and *in vivo* recombinations. *J Virol* 1986; 57(3): 1073-83.
- 17 Sun Y, Liu X, Ng-Eaton E, Lodish HF, Weinberg RA. SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor beta signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(22): 12442-7.
- 18 Fukuchi M, Nakajima M, Fukai Y, Miyazaki T, Masuda N, Sohma M, *et al.* Increased expression of c-Ski as a co-repressor in transforming growth factor-beta signaling correlates with progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2004; 108(6): 818-24.
- 19 Bravou V, Antonacopoulou A, Papadaki H, Floratou K, Stavropoulos M, Episkopou V, *et al.* TGF-beta repressors SnoN and Ski are implicated in human colorectal carcinogenesis. *Cell Oncol* 2009; 31(1): 41-51.
- 20 Takahata M, Inoue Y, Tsuda H, Imoto I, Koinuma D, Hayashi M, *et al.* SKI and MEL1 cooperate to inhibit transforming growth factor-beta signal in gastric cancer cells. *J Biol Chem* 2009; 284(5): 3334-44.
- 21 O TM, Tan M, Tarango M, Fink L, Mihm M, Ma Y, *et al.* Differential expression of SKI oncogene protein in hemangiomas. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2009; 141(2): 213-8.
- 22 Boone B, Haspelslagh M, Brochez L. Clinical significance of the expression of c-Ski and SnoN, possible mediators in TGF-beta resistance, in primary cutaneous melanoma. *J Dermatol Sci* 2009; 53(1): 26-33.