

果糖-1,6-二磷酸酶1(FBP1)过表达对骨肉瘤细胞恶性逆转并向成骨分化的影响

谢圣男¹ 康权² 张遥¹ 陈洁¹ 罗庆^{1*}

(¹重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所; 儿童发育疾病研究教育部重点实验室; 国家儿童健康与疾病临床医学研究中心(重庆); 儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地; 儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014;

²重庆医科大学附属儿童医院肝胆外科, 重庆 400014)

摘要 该研究探讨FBP1对人骨肉瘤MG63细胞恶性生物学行为即增殖、凋亡、迁移及成骨分化的调控作用。采用脂质体转染法将FBP1过表达重组质粒转染至人骨肉瘤MG63细胞中, 并通过qRT-PCR和Western blot法检测FBP1的mRNA和蛋白表达水平, 以验证FBP1基因过表达效果。通过CCK-8、结晶紫染色、活细胞计数法检测细胞增殖; AnnexinV-FITC双染法和DAPI染色法检测细胞凋亡, 并通过Western blot技术检测凋亡相关蛋白的表达; 应用细胞划痕实验、Transwell检测细胞的迁移能力; 通过流式细胞术检测细胞周期; ALP染色和茜素红S染色检测细胞的早期及晚期成骨分化作用。结果表明, 过表达FBP1后增殖细胞数明显降低($P<0.01$)、凋亡率明显增高($P<0.01$)、划痕实验愈合率明显降低($P<0.01$)、Transwell实验细胞穿膜数也明显减少($P<0.01$); 成骨诱导MG63细胞后ALP染色、茜素红染色阳性, 钙盐结节明显增多; 但3个组的细胞周期并无明显差异。综上所述, 过表达FBP1可抑制人骨肉瘤MG63细胞增殖, 抑制迁移, 促进其凋亡, 并同时促进MG63细胞的早期和晚期成骨分化, 且其增殖并非通过细胞周期调节。

关键词 骨肉瘤; FBP1; 增殖; 凋亡; 成骨分化

The Effects of Over-Expression of Fructose-1,6-Bisphosphatase 1 Gene on Reversing Malignant Biological Behavior and Inducing Osteogenic Differentiation of Osteosarcoma Cells

XIE Shengnan¹, KANG Quan², ZHANG Yao¹, CHEN Jie¹, LUO Qing^{1*}

(¹Department of Pediatric Research Institute; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; National Clinical Research Center for Child Health and Disorders (Chongqing); China International Science and Technology Cooperation base of Child development and Critical Disorders; Children's Hospital of Chongqing Medical University; Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing 400014, China; ²Department of Hepatology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract The aim of the research is to investigate the effects of over-expressed FBP1 (fructose-1,6-bisphosphatase 1) gene on proliferation, apoptosis and migration of human osteosarcoma cell line (MG63). After the recombinant plasmid carrying FBP1 gene were transfected by liposome into MG63 cells, the expression levels of FBP1 mRNA and protein were detected by qRT-PCR and Western blot to verify the over-expression of FBP1

收稿日期: 2019-08-08

接受日期: 2019-09-03

国家自然科学基金(批准号: 81172545)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13452336031, E-mail: 352934430@qq.com

Received: August 8, 2019

Accepted: September 3, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81172545)

*Corresponding author. Tel: +86-13452336031, E-mail: 352934430@qq.com

网络出版时间: 2020-01-07 13:33:34

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20200107.1333.008.html>

gene. The cell proliferation ability of MG63 cells was detected by CCK-8 assay, Trypan blue counting method and crystal violet staining. The apoptosis rates was detected by FCM and DAPI staining. Then the apoptosis-associated proteins Bcl-2 and Bax were detected by Western blot. Wound-Healing assay and transwell assay were used to detect the migration. The cell cycle was detected by Flow Cytometry. ALP staining and Alizarin red staining were used to detect the osteogenic differentiation. This study indicates that over-expressed FBP1 gene can suppress the proliferation and migration of osteosarcoma MG63 cells and enhance apoptosis significantly, in the meanwhile, early and late osteogenic differentiation were enhanced. And the proliferation was not regulated by the cell cycle.

Keywords osteosarcoma; FBP1; proliferation; apoptosis; osteogenic differentiation

骨肉瘤是最常见的原发性骨恶性肿瘤,是高度恶性的间叶组织肿瘤,好发于10~20岁的青少年^[1]。新辅助化疗支持下的联合保肢手术是现在的主要治疗方式,其治疗效果有所提升,但是对于恶性程度较高的骨肉瘤患者,其治疗效果仍不佳^[2]。本课题组一直致力于发育异常与肿瘤发生的研究,我们发现,骨肉瘤的发生模式具有相当的代表性。目前骨肉瘤的病因尚未完全阐明,因此研究和控制骨肉瘤的发生和发展具有重要意义,并有可能为临床提供新的治疗策略。

研究发现,糖代谢异常在肿瘤发生和发展中起到不可或缺的作用,许多重要的靶分子成为了人们的关注热点。果糖-1,6-二磷酸酶1(fructose-1,6-bisphosphatase 1, FBP1)是糖异生过程中的一种调节酶^[3]。它在糖代谢^[4,5]、细胞分化^[6]、肿瘤发生发展^[7]、自噬^[8]中均发挥重要作用。近年来研究表明,FBP1的表达与肝癌^[9]、非小细胞肺癌^[10]、卵巢癌^[11]、乳腺癌^[12]以及胆管癌^[13]的发生、发展有着密切联系。但是,FBP1对骨肉瘤细胞的恶性生物学行为转归的影响尚未有报道。

本实验采用低表达FBP1的骨肉瘤细胞株MG63为研究对象,通过转染FBP1过表达重组质粒使FBP1基因高表达,以研究FBP1过表达对骨肉瘤细胞株MG63恶性生物学行为的影响,我们发现,在MG63细胞中过表达FBP1,抑制骨肉瘤细胞增殖、迁移并促进其凋亡,而且促进其成骨分化,这为骨肉瘤的临

床治疗提供了新的实验依据。

1 材料及方法

1.1 材料

骨肉瘤细胞株MG63、FBP1过表达重组质粒及空质粒载体由本实验室保存;胎牛血清购自北京四季青生物科技有限公司;DMEM高糖培养基购自美国Gibco公司;胰蛋白酶购自上海碧云天生物技术有限公司;质粒提取试剂盒购自Omega Bio-Tek公司;脂质体细胞转染试剂Lipofect AMINE 2000购自美国Invitrogen公司;反转录试剂盒和SYBR荧光染料购自日本TaKaRa公司;全蛋白提取试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司;CCK-8试剂购自日本同仁化学研究所;DAPI染料购自北京雷根生物技术有限公司;结晶紫染液以及Hoechst 33342购自上海碧云天生物技术有限公司;兔抗人FBP1、Runx2、OPN单克隆抗体购自美国Abcam公司,Bax、Bcl-2、p-Bcl-2单克隆抗体均购自Santa Cruz公司;山羊抗兔及山羊抗鼠二抗均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;一抗稀释液及封闭液购自上海碧云天生物技术有限公司;PVDF膜购自美国Millipore公司;Annexin V-FITC/碘化丙啶(propidium iodide, PI)细胞凋亡检测试剂盒购自美国BD公司;实时荧光定量聚合酶链式反应引物购自北京六合华大基因科技股份有限公司,引物序列见表1。

表1 实时荧光定量聚合酶链式反应引物序列

Table 1 Primer sequence of qRT-PCR

基因 Gene	引物序列 Primer sequence
<i>β-actin</i>	F: 5'-TGA CGT GGA CAT CCG CAA AG-3' R: 5'-CTG GAA GGT GGA CAG CGA GG-3'
<i>FBP1</i>	F: 5'-ATG GCA TTG CTG GTT CTA C-3' R: 5'-CCA CTA TGA TGG CGT GTT TAT-3'

1.2 细胞培养

将MG63细胞用含有10%胎牛血清及适量青/链霉素的DMEM高糖培养基,置于37℃、体积分数为5% CO₂的孵育箱中培养,待细胞贴壁生长至80%~90%的融合度时用胰蛋白酶消化细胞并传代,取对数生长期的细胞进行后续实验。

1.3 细菌扩增

将含有过表达FBP1质粒的大肠杆菌加入到液体LB中,再加入适量工作浓度(1:1 000)下的抗生素,放入摇床(37℃、180 r/min)中摇菌,14~16 h。

1.4 质粒转染及实验分组

收集处于对数生长期的MG63细胞,以适当密度接种细胞于10 cm培养皿中。当细胞密度为70%~80%时,将8 μg的FBP1重组质粒和阴性对照质粒分别转染至MG63细胞中,24 h后,提取细胞总RNA,用于后续的qRT-PCR检测;48 h后,提取细胞总蛋白,用于后续的水平表达的蛋白检测。

实验分3组。(1)空白对照组;(2)阴性对照组:转染空载体阴性质粒;(3)FBP1过表达组:转染FBP1过表达质粒。

1.5 实时荧光定量 PCR 法检测FBP1 mRNA的表达

转染24 h后,提取各组MG63细胞中总RNA并反转录成cDNA。通过qRT-PCR,检测各组细胞中FBP1 mRNA的表达水平。

1.6 蛋白质印迹法检测FBP1以及凋亡相关蛋白的表达

转染48 h后,提取各组MG63细胞中总蛋白,通过BCA法测定蛋白浓度。首先配制10% SDS-PAGE以分离目的蛋白;220 mV定压条件下35~45 min电泳分离蛋白,将分离后的蛋白用半干转移法转移至PVDF膜上;用封闭液封闭15 min;用1% TBST洗膜3次,每次5~10 min;然后加入一抗[兔抗人FBP1、OPN、RUNX2、Bcl-2、p-Bcl-2单克隆抗体和鼠抗人Bax、β-actin单克隆抗体(内参照)(1:1 000)],4℃反应过夜;回收一抗后,继续用TBST洗膜3次,每次10 min;随后分别加入二抗[山羊抗兔IgG和山羊抗小鼠IgG(体积稀释比例均为1:2 000)],室温反应1 h;用1% TBST洗膜3次,每次10 min;最后ECL发光显影。采用ImageJ软件分析各组蛋白条带灰度值,目的蛋白的相对表达水平通过目的蛋白与β-actin的比值来表示。

1.7 结晶紫染色法、CCK-8法检测细胞的增殖能力

1.7.1 结晶紫染色法 所有组处理24 h后,PBS冲洗3次后用4%多聚甲醛固定,再次用PBS轻柔冲洗并吸干后加入结晶紫染料,室温避光孵育20~30 min,最后PBS洗涤2~3次即可进行观察和拍照。

1.7.2 CCK-8法 取对数生长期的MG63细胞按 4×10^3 /孔接种于96孔板,置于37℃、5% CO₂的孵箱中培养。每组均设置5个复孔,于质粒转染0 h、24 h、48 h、72 h后,每孔加入10 μL CCK-8,继续在孵箱中孵育3 h,用酶标仪检测450 nm波长处各孔的光密度值(D_{450})。

1.8 DAPI 染色法、Hoechst染色法及流式细胞凋亡术检测细胞的凋亡

1.8.1 DAPI 染色法 细胞处理24 h后进行检测,PBS洗3~5次,用4%多聚甲醛固定30 min,再用PBS洗3~5次,每次3~5 min,再加入DAPI染料,室温避光孵育20 min,最后PBS洗涤2~3次,荧光显微镜下观察和拍照。

1.8.2 FCM法 用不含EDTA的胰蛋白酶溶液分别消化空白组、阴性对照组及质粒转染48 h后的各组MG63细胞,离心并收集细胞沉淀,PBS洗涤3次后将其稀释为 $1 \times$ 结合缓冲液重悬细胞,再分别加入5 μL FITC Annexin V和5 μL PI轻轻震荡细胞,室温下避光孵育15 min,最后再加入400 μL $1 \times$ 结合缓冲液振荡混匀,并通过流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.9 划痕法、Transwell检测细胞迁移能力

1.9.1 划痕法 将细胞接种于提前画好标记线的6孔培养板中,长到70%~80%时进行转染。待质粒转染24 h后用200 μL的Tip头垂直标记线均匀用力划痕(每组划痕宽度保持一致),PBS洗2~3次,加入基础培养基2 mL/孔,在0、24 h、48 h后镜下观察细胞划痕愈合情况。划痕愈合率=(0 h划痕宽度-48 h划痕宽度)/0 h划痕宽度 $\times 100\%$

1.9.2 Transwell实验 Transwell迁移实验上室加入100 μL各处理组的无血清细胞悬液,使得细胞密度为 1×10^5 /mL,下室加入500 μL含20%血清的培养基,48 h后弃去上室培养基,PBS冲洗2~3次后加入4%多聚甲醛固定30 min。继续用PBS洗2次,加入适量结晶紫染色液,染色20 min。最后PBS轻洗2~3次,用湿棉签轻拭去上室细胞,显微镜下观察拍照。

1.10 流式细胞术检测细胞周期

弃去旧培养基,加入胰酶(不含EDTA)消化细胞,

收集细胞悬液, 1 000 r/min离心5 min。用预冷PBS洗涤细胞2次, 离心同上。加入预冷75%乙醇, 4 °C固定24 h。2 800 r/min离心3 min后收集细胞, PBS洗涤细胞后离心。37 °C开盖水化0.5 h, 加入500 μ L细胞周期试剂, 混匀, 室温避光放置30~60 min。最后流式细胞仪检测细胞周期分布情况。

1.11 碱性磷酸酶、茜素红S染色法检测细胞成骨分化能力

1.11.1 ALP染色法 每组细胞经过含4% FBS、10 mmol/L β -磷酸甘油、0.1 μ mol/L 地塞米松、0.1 g/mL VitC的成骨培养基处理7天后, 每孔加入500 μ L 4%多聚甲醛避光固定30~60 min。PBS洗2次, 每孔加入200 μ L碱性磷酸酶显色缓冲液, 室温避光染色2 h后弃去染色液, 最后PBS冲洗3次后风干, 于镜下拍照。

1.11.2 茜素红S染色法 细胞分组处理21天后, 去除旧成骨培养液, 用PBS洗涤2~3次, 每孔加入500 μ L 4%多聚甲醛避光固定30~60 min。PBS洗2次, 每孔加入200 μ L茜素红染液, 室温避光染色3 h。

1.12 统计学分析

采用 SPSS 20.0和GraphPad Prism 6统计学软件

对所有数据进行统计学分析。文中涉及到的实验均重复3次, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

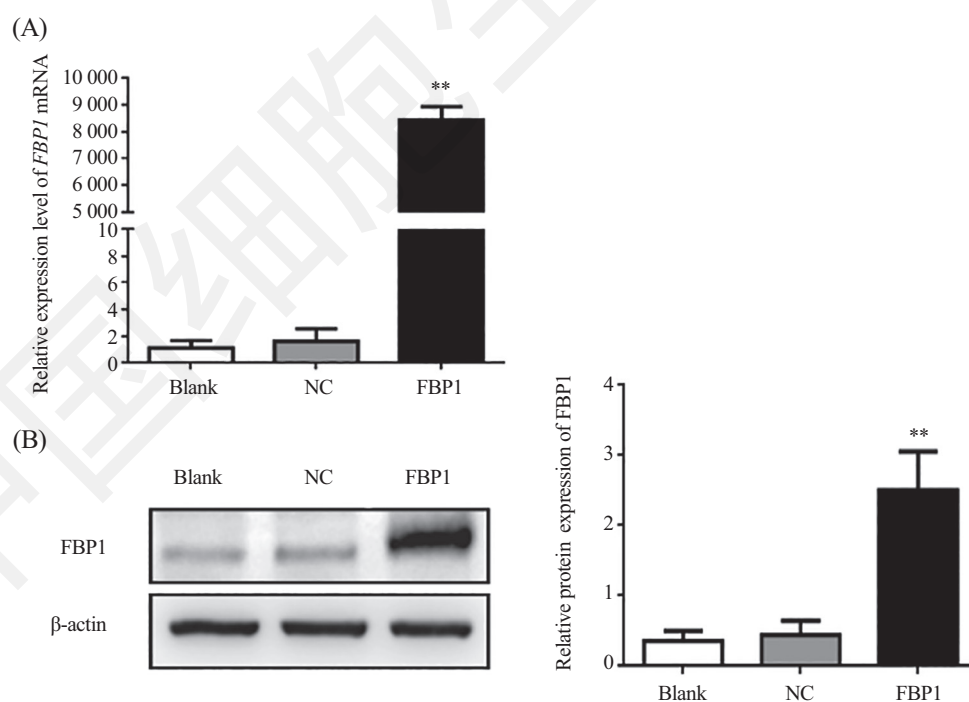
2 结果

2.1 FBP1过表达上调MG63细胞中FBP1的表达

实时荧光定量PCR检测结果(图1A)显示, 与空白对照组和阴性对照组相比, FBP1过表达组中MG63细胞的 $FBP1$ mRNA表达水平明显升高($P < 0.01$)。Western blot检测结果(图1B)显示, 在FBP1过表达组中, MG63细胞的FBP1蛋白表达水平也明显升高($P < 0.01$)。这些结果表明, 转染FBP1过表达质粒明显上调MG63细胞中FBP1 mRNA和蛋白的表达水平。

2.2 FBP1过表达可抑制骨肉瘤MG63细胞增殖

活细胞计数及结晶紫染色结果(图2A和图2B)显示, 过表达FBP1组MG63细胞数较空白对照与阴性对照组细胞数显著降低($P < 0.05$); CCK-8结果(图2C)显示, 在0、24 h时各处理组间 D 值无明显差异, 在48 h、72 h时, 过表达FBP1组的 D 值明显小于

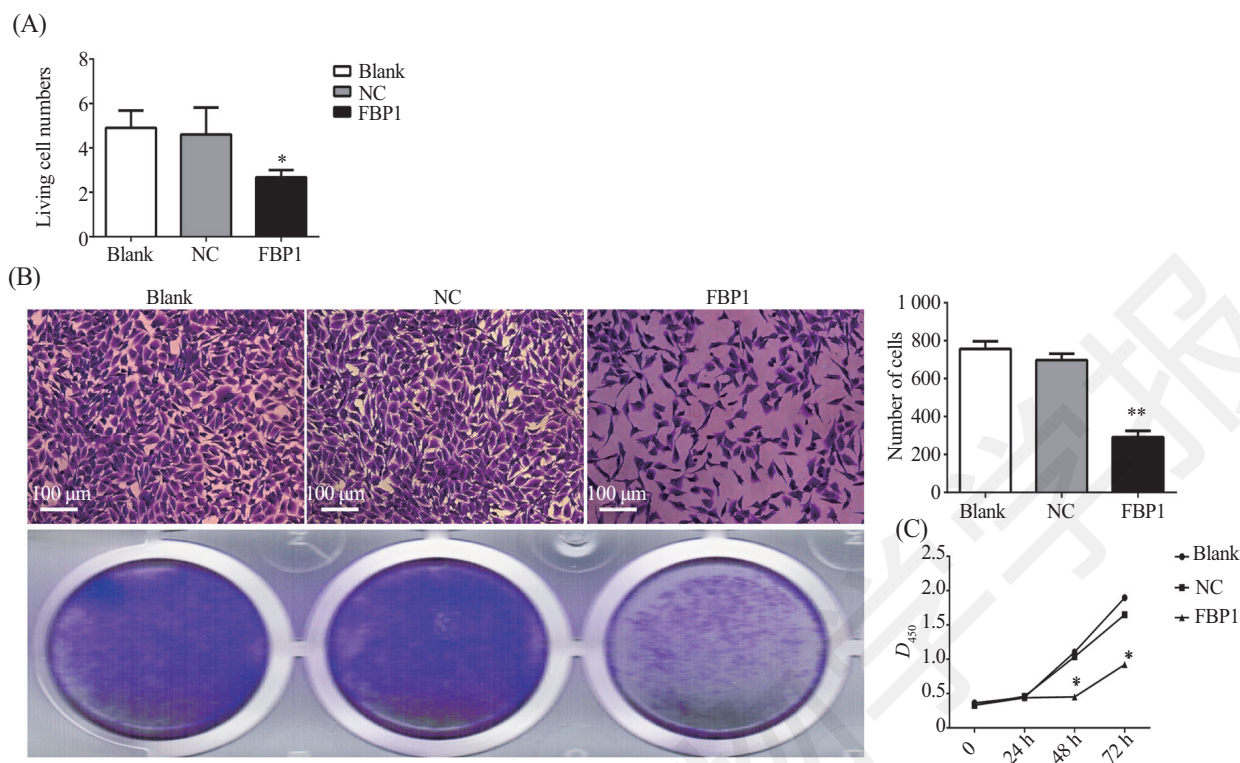


A: 实时荧光定量PCR检测转染FBP1过表达质粒后人骨肉瘤细胞MG63细胞中 $FBP1$ mRNA水平变化; B: 蛋白质印迹法检测FBP1的蛋白表达水平变化; ** $P < 0.01$, 与空白对照组和阴性对照组比较; $n = 3$ 。

A: the mRNA expression of $FBP1$ was detected by qRT-PCR; B: the protein expression of FBP1 was detected by Western blot; ** $P < 0.01$ vs the Blank and NC groups; $n = 3$.

图1 转染FBP1过表达质粒后人骨肉瘤细胞MG63细胞中 FBP1 mRNA和蛋白表达水平变化

Fig.1 The mRNA and protein expression of FBP1 in the MG63 cells transfected with over-expressed FBP1



A: 活细胞计数; B: 结晶紫染色; C: CCK-8实验; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与空白对照组和阴性对照组比较; $n = 3$ 。

A: living cell counting; B: crystal violet staining; C: CCK-8 assay; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the Blank and NC groups; $n = 3$.

图2 过表达FBP1对骨肉瘤MG63细胞增殖的影响

Fig.2 The effect of proliferation of MG63 cells transfected with over-expressed FBP1

其它两组($P < 0.05$)。这一结果显示, 过表达FBP1能够抑制骨肉瘤MG63细胞增殖。

2.3 FBP1过表达可促进骨肉瘤MG63细胞凋亡

流式细胞术实验结果(图3A)显示, 与空白对照组和阴性对照组相比较, FBP1过表达组的MG63细胞凋亡率明显增高($P < 0.01$); 而空白对照组与阴性对照组相比较无统计学差异。DAPI染色(图3B)提示, FBP1过表达组发生凋亡的细胞数明显高于空白对照与阴性对照组, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。Western blot结果(图3C)显示, 过表达FBP1组较空白对照组和阴性对照组, 促凋亡基因*Bax*表达量增高, 抑凋亡基因*Bcl-2*表达降低, *p-Bcl-2*表达增高。这些结果提示, 过表达FBP1能促进骨肉瘤MG63细胞的凋亡。

2.4 FBP1过表达可抑制骨肉瘤MG63细胞迁移能力

划痕实验结果(图4A)显示, 过表达FBP1组划痕愈合率明显低于空白对照组和阴性对照组。这一结果提示, 过表达FBP1能够抑制MG63细胞的迁移能力。Transwell(图4B)结果显示, FBP1过表达组的穿膜细胞数明显少于空白对照组和阴性对照组。

这一结果也同样证明, 过表达FBP1能够抑制骨肉瘤MG63细胞迁移能力。

2.5 FBP1过表达对骨肉瘤MG63细胞周期的影响

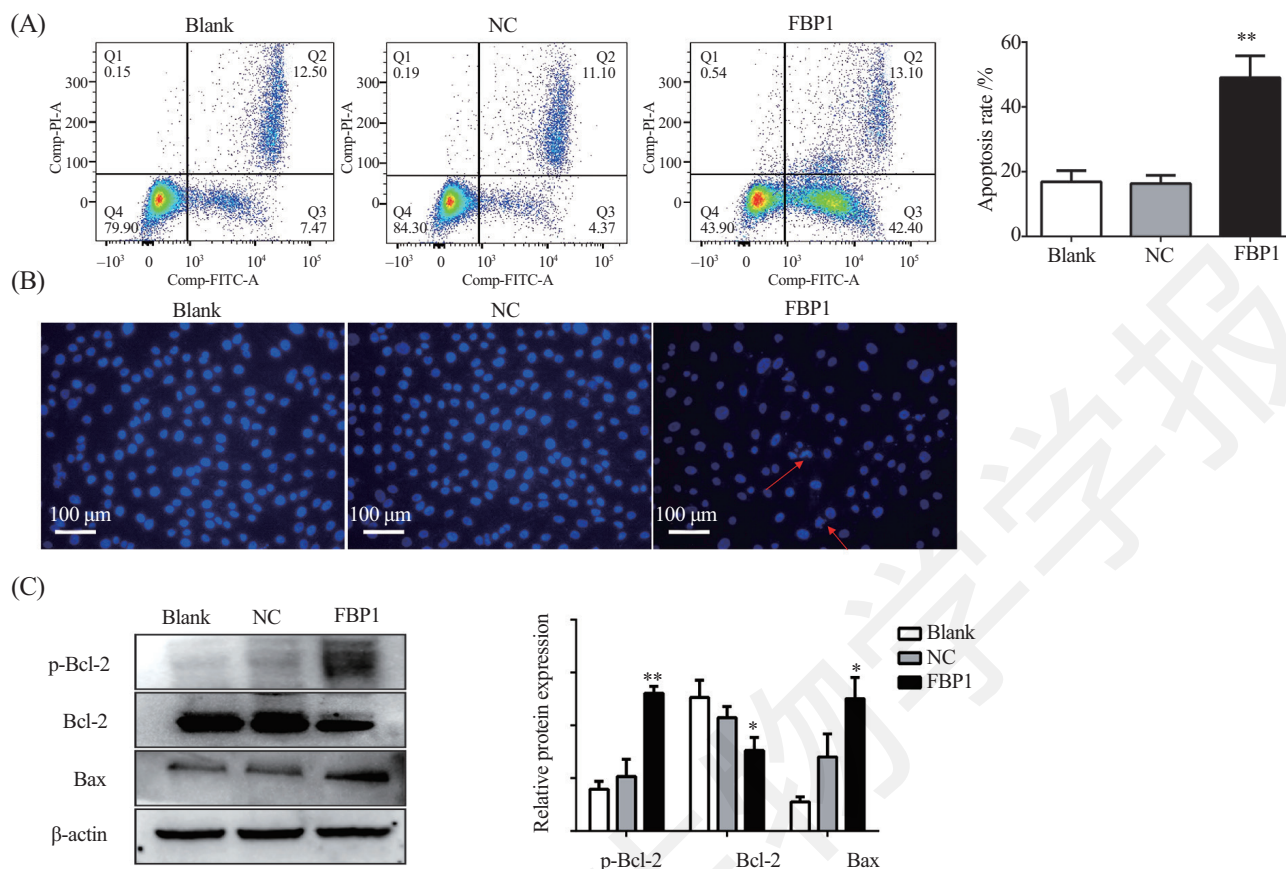
流式细胞周期实验结果(图5)显示, 过表达FBP1组中S期与空白对照组和阴性对照组无明显差异。这一结果提示, 过表达FBP1对增殖的影响不是通过细胞周期调节的。

2.6 FBP1过表达可诱导骨肉瘤MG63细胞成骨分化能力

碱性磷酸酶染色结果(图6A)显示, 过表达FBP1组染色较空白对照与阴性对照组细胞数更为明显; 茜素红染色结果(图6B)显示, 图中红色片状染色为钙盐沉积, FBP1处理组与空白对照组和阴性对照组相比钙盐沉积明显增多。这一结果显示, 过表达FBP1能够促进骨肉瘤MG63细胞的成骨分化。

3 讨论

骨肉瘤的治疗方法多种多样, 如术前化疗、广泛的外科切除、切除肿瘤的仔细病理定位、根据肿瘤坏死的百分比进行术后化疗等^[14]。遗憾的是, 高



A: 流式凋亡检测; B: DAPI染色, 红色箭头为凋亡细胞; C: 蛋白印迹法; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与空白对照组和阴性对照组比较; $n = 3$ 。

A: flow cytometry; B: DAPI staining, red arrows are apoptotic cell; C: Western blot; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the Blank and NC groups; $n = 3$ 。

图3 过表达FBPI对人骨肉瘤MG63细胞凋亡的影响

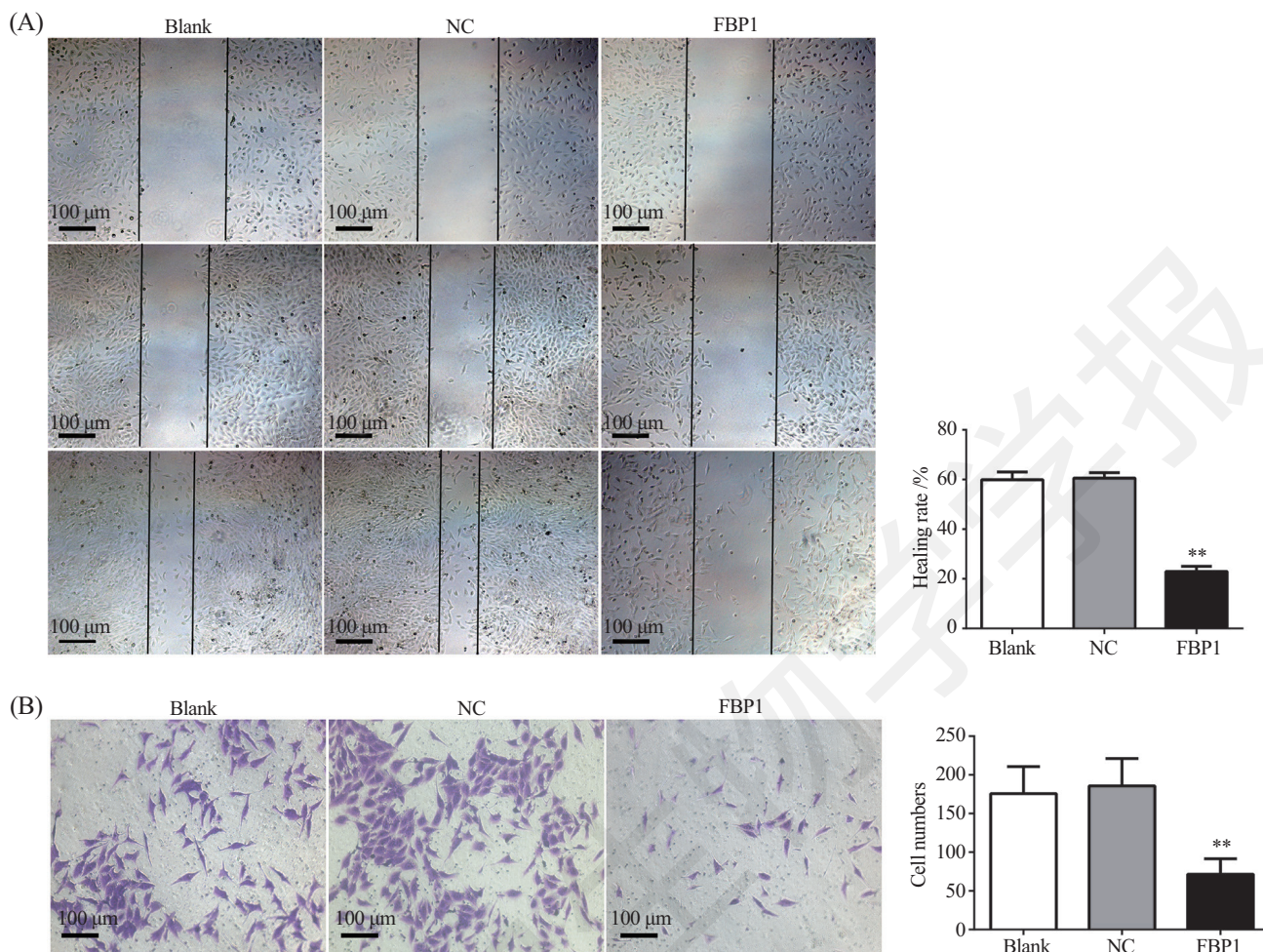
Fig.3 The effect of apoptosis of MG63 cells transfected with over-expressed FBPI

级别骨肉瘤的特点是易转移, 通常预后较差^[15]。大量国内外文献表明, 骨肉瘤的发生和发展涉及到多种因素, 但是目前骨肉瘤患者的5年生存率与其它肿瘤相比较仍较低^[16-17]。本课题组前期实验结果认为, 骨肉瘤属于一种分化异常的疾病。其起源于骨髓间充质干细胞, 是正常成骨分化过程异常中断而形成的恶性增生物^[18-19]。在异常调控发生过程中, 如能找到控制间充质干细胞最终分化为骨肉瘤而非正常成骨细胞的关键信号通路或基因, 进而探寻其调控方式, 必将更深层地揭示骨肉瘤的发生机制; 同时通过靶向性逆转或调控这些失控的基因, 为骨肉瘤治疗带来新希望。

FBPI是糖异生中的一种限速调节酶, 能催化果糖1,6-二磷酸酯水解为果糖。果糖-1,6-二磷酸酶1的缺失导致糖酵解增加, 增强“瓦博格效应”, 使肿瘤细胞增殖能力增强^[20]。在多种肿瘤中, FBPI的表达通常是被下调的, 这可能与糖酵解增强有关。研究

发现, FBPI的低表达与预后不良有关, 并有助于肺癌细胞的生长和侵袭^[21]; 在胆管癌中, 过表达FBPI抑制了胆管癌细胞的增殖和转移^[13]; 在乳腺癌中, FBPI的表达能够抑制乳腺癌的生长, 且FBPI的缺失导致了上皮细胞-间充质转化, 使其由管腔样向基底样乳腺癌转化^[22]。

本研究探讨了FBPI在抑制骨肉瘤增殖和迁移能力、促进其凋亡, 并诱导其成骨分化过程中的影响。FBPI基因过表达能够使细胞的增殖受到抑制, 但细胞周期的结果显示, 三个组之间无统计学差异, 考虑细胞增殖并不是通过对细胞周期的调控, 而可能是通过调控细胞的凋亡。蛋白质印迹法检测结果表明, 过表达FBPI基因后抗凋亡相关基因Bcl-2蛋白表达下调, p-Bcl-2表达上调, 凋亡相关基因Bax表达上调; 促凋亡基因Bax接收到凋亡信号后, 作用于线粒体并破坏线粒体的膜结构, 最终导致凋亡的发生^[23]。Bcl-2主要分布于细胞内线粒体、内质网



A: 划痕实验; B: transwell迁移实验; ** $P < 0.01$, 与空白对照组和阴性对照组比较; $n = 3$ 。

A: wound-healing assay; B: transwell assay without matrigel; ** $P < 0.01$ vs the Blank and NC groups; $n = 3$ 。

图4 过表达FBP1对人骨肉瘤MG63细胞迁移的影响

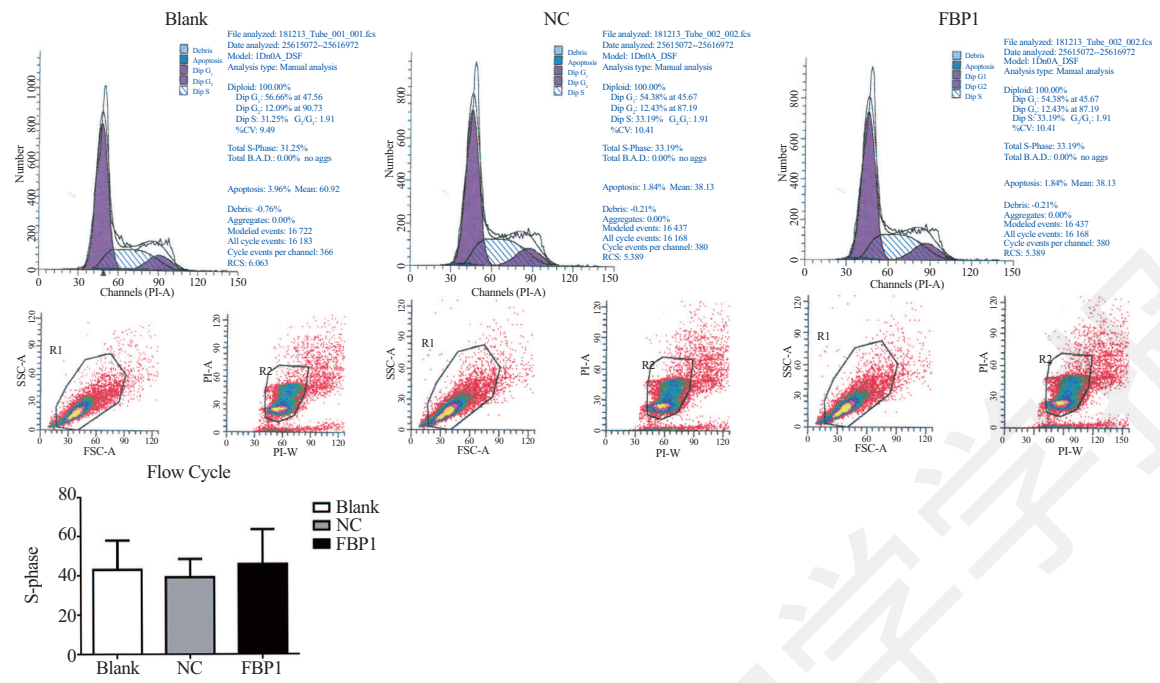
Fig.4 The effect of migration of MG63 cells transfected with over-expressed FBP1

和细胞核的膜上,具有抑制细胞凋亡的作用^[24]。据文献报道,在肝细胞癌细胞系中过表达FBP1后,可以抑制肝癌细胞的上皮-间质转化从而抑制肝癌细胞的增殖和转移^[25];本实验中FBP1过表达后, MG63细胞的迁移受到明显抑制,这与此观点相符;也有研究报道, FBP1可以通过改变葡萄糖代谢和调节 Wnt/ β -catenin信号通路来抑制乳腺癌进展^[3]。Wnt/ β -catenin信号通路被公认为参与肿瘤发生^[26]。在骨肉瘤中, FBP1是否通过调控此通路进而对骨肉瘤恶性生物学行为产生影响,还是多个通路交互作用还有待进一步地研究。

课题组前期研究发现,正常的骨分化是一个受到精确调控的过程。如果受到精确调控的该分化过程被扰乱或失控,则有可能表现为骨肉瘤的发生。这种失控发生的阶段越早,则发生的骨肉瘤表现为

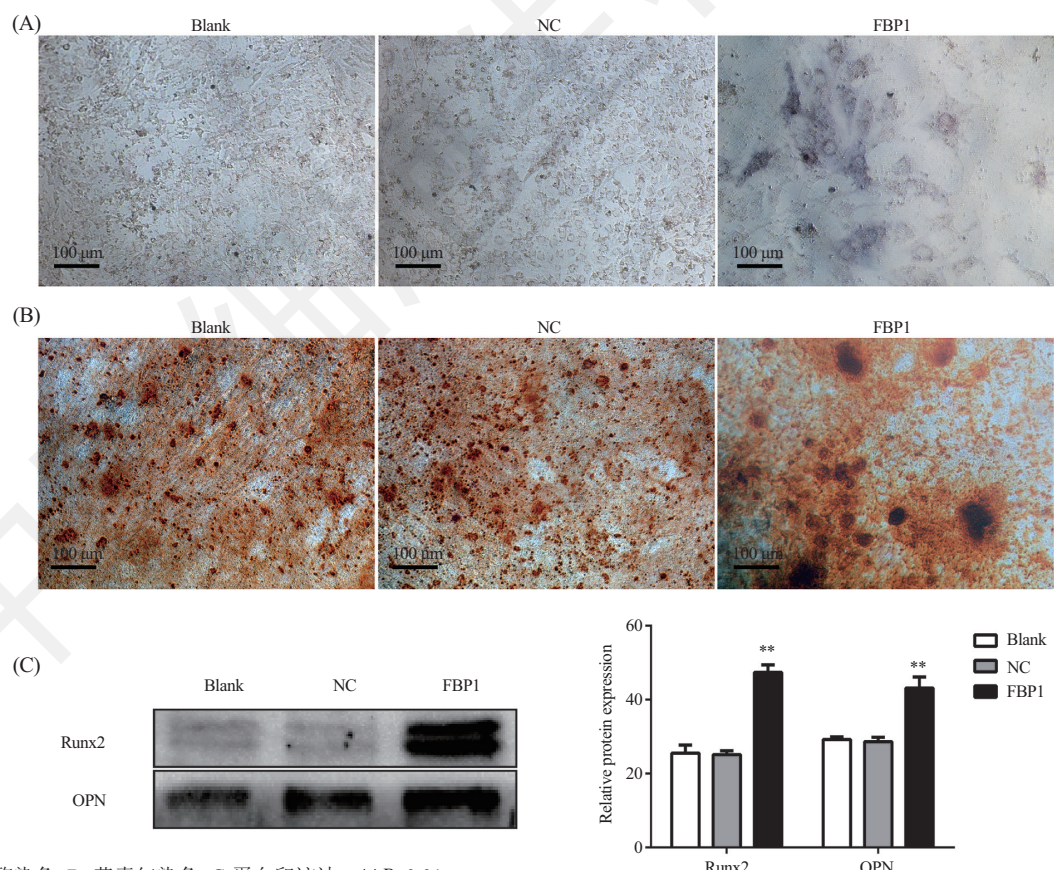
分化越低、侵袭性越强、恶性程度越高。MG63对应的是骨母细胞阶段,其恶性程度处于中间水平且 FBP1在MG63细胞中低表达。所以选用MG63细胞作为实验细胞,能够更好地观察各检测指标。同时,在本实验中碱性磷酸酶染色和茜素红染色实验以及Western blot证明,过表达FBP1后成骨相关基因 *OPN*、*Runx2*表达均被上调,诱导MG63细胞向成骨分化的能力增强,进一步证明,骨肉瘤是一种类似白血病的分化疾病。在本实验中,我们观察到过表达 FBP1后,骨肉瘤细胞的分化能力增强、抗凋亡能力减弱,从而凋亡增加,最终都使骨肉瘤恶性程度降低。我们期望能够在抑制肿瘤细胞无限增殖的同时,使其分化成正常的成骨细胞。

综上所述,本研究首次证实, FBP1过表达能够显著逆转骨肉瘤MG63细胞的恶性生物学行为,并诱



流式细胞周期; $n=3$ 。
Flow cytometry; $n=3$ 。

图5 过表达FBP1对人骨肉瘤MG63细胞周期的影响
Fig.5 The effect of cell cycle of MG63 cells transfected with over-expressed FBP1



A: 碱性磷酸酶染色; B: 茜素红染色; C: 蛋白印迹法。 ** $P<0.01$ 。
A: ALP staining; B: alizarin red staining; C: Western blot. ** $P<0.01$ 。

图6 过表达FBP1对人骨肉瘤MG63细胞成骨分化的影响
Fig.6 The effect of osteogenic differentiation of MG63 cells transfected with over-expressed FBP1

导成骨分化, 这提示可以通过干预逆转其恶性表型诱导其正常分化, 以达到治疗骨肉瘤的目的。这为骨肉瘤的发病机制提供了新的研究方向, 并有可能成为临床治疗的潜在靶点。但FBP1抑制恶性生物学行为及促进成骨分化的具体作用机制需要更深入地研究探讨。下一步我们将在体内动物实验中进行研究和验证, 并将对其可能的作用机制进行更加深入的研究。

参考文献 (References)

- 1 Suehara Y, Alex D, Bowman A, Middha S, Zehir A, Chakravarty D, *et al.* Clinical genomic sequencing of pediatric and adult osteosarcoma reveals distinct molecular subsets with potentially targetable alterations. *Clin Cancer Res* 2019; 25(21): 6346-56.
- 2 Jerez S, Araya H, Hevia D, Irrázaval CE, Thaler R, van Wijnen AJ, *et al.* Extracellular vesicles from osteosarcoma cell lines contain miRNAs associated with cell adhesion and apoptosis. *Gene* 2019; 710: 246-57.
- 3 Li K, Ying M, Feng D, Du J, Chen S, Dan B, *et al.* Fructose-1,6-bisphosphatase is a novel regulator of Wnt/ β -Catenin pathway in breast cancer. *Biomed Pharmacother* 2016; 84: 1144-9.
- 4 Li Q, Wei P, Wu J, Zhang M, Li G, Li Y, *et al.* The FOXC1/FBP1 signaling axis promotes colorectal cancer proliferation by enhancing the Warburg effect. *Oncogene* 2019; 38(4): 483-96.
- 5 Lee H, Kwon A, Kim HS, Lee JS. Fructose-1,6-bisphosphatase deficiency presented with complex febrile convulsion. *Neuro Endocrinol Lett* 2019; 39(8): 533-6.
- 6 Yao L, Cao J, Sun H, Guo A, Li A, Ben Z, *et al.* FBP1 and p27kip1 expression after sciatic nerve injury: implications for Schwann cells proliferation and differentiation. *J Cell Biochem* 2014; 115(1): 130-40.
- 7 Grasmann G, Smolle E, Olschewski H, Leithner K. Gluconeogenesis in cancer cells-Repurposing of a starvation-induced metabolic pathway. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2019; 1872(1): 24-36.
- 8 Liu Y, Jiang Y, Wang N, Jin Q, Ji F, Zhong C, *et al.* Invalidation of mitophagy by FBP1-mediated repression promotes apoptosis in breast cancer. *Tumour Biol* 2017; 39(6): 1010428317708779.
- 9 Zhang D, Li Z, Li T, Luo D, Feng X, Liu Y, *et al.* miR-517a promotes Warburg effect in HCC by directly targeting FBP1. *Onco Targets Ther* 2018; 11: 8025-32.
- 10 Sheng H, Ying L, Zheng L, Zhang D, Zhu C, Wu J, *et al.* Down expression of FBP1 is a negative prognostic factor for non-small-cell lung cancer. *Cancer Invest* 2015; 33(5): 197-204.
- 11 Xiong X, Zhang J, Hua X, Cao W, Qin S, Dai L, *et al.* FBP1 promotes ovarian cancer development through the acceleration of cell cycle transition and metastasis. *Oncol Lett* 2018; 16(2): 1682-8.
- 12 Shi L, Zhao C, Pu H, Zhang Q. FBP1 expression is associated with basal-like breast carcinoma. *Oncol Lett* 2017; 13(5): 3046-56.
- 13 Zhao W, Yang S, Chen J, Zhao J, Dong J. Forced overexpression of FBP1 inhibits proliferation and metastasis in cholangiocarcinoma cells via Wnt/ β -catenin pathway. *Life Sci* 2018; 210: 224-34.
- 14 Yang Z, Li X, Han W, Lu X, Jin S, Yang W, *et al.* Galangin suppresses human osteosarcoma cells: an exploration of its underlying mechanism. *Oncol Rep* 2017; 37(1): 435-441.
- 15 Moore DD, Luu HH. Osteosarcoma. *Cancer Treat Res*. 2014; 162: 65-92.
- 16 Perkins SM, Shinohara ET, DeWees T, Frangoul H. Outcome for children with metastatic solid tumors over the last four decades. *PLoS One* 2014; 9(7): e100396.
- 17 Kager L, Tamamyan G, Bielack S. Novel insights and therapeutic interventions for pediatric osteosarcoma. *Future Oncol* 2017; 13(4): 357-68.
- 18 仇超, 康权, 迭小红, 罗光金, 吕凤香, 肖程, 等. Id1基因对骨肉瘤细胞恶性逆转向成骨分化的影响. 第三军医大学学报 (Qiu Chao, Kang Quan, Die Xiaohong, Luo Guangjin, Lü Fengxiang, Xiao Cheng, *et al.* Effect of Id1 gene on reversing malignant biological behaviors and inducing osteogenic differentiation of human osteosarcoma cells. *Journal of Third Military Medical University*) 2016; 38(4): 344-9.
- 19 董姿杏, 仇超, 康权, 吕凤香, 赵天鑫, 罗庆. 靶向抑制Id1基因调控Wnt信号通路促进骨肉瘤MG63细胞凋亡. 肿瘤 (Dong Zixing, Qiu Chao, Kang Quan, Lü Fengxiang, Zhao Tianxin, Luo Qing. Interference of Id1 gene expression promotes apoptosis of osteosarcoma MG63 cells by regulating Wnt signaling pathway. *Tumor*) 2017; (9): 909-16.
- 20 Jin X, Pan Y, Wang L, Ma T, Zhang L, Tang AH, *et al.* Fructose-1,6-bisphosphatase inhibits ERK activation and bypasses gemcitabine resistance in pancreatic cancer by blocking IQGAP1-MAPK interaction. *Cancer Res* 2017; 77(16): 4328-41.
- 21 Zhang J, Wang J, Xing H, Li Q, Zhao Q, Li J. Down-regulation of FBP1 by ZEB1-mediated repression confers to growth and invasion in lung cancer cells. *Mol Cell Biochem* 2016; 411(1/2): 331-40.
- 22 Dong C, Yuan T, Wu Y, Wang Y, Fan TW, Miriyala S, *et al.* Loss of FBP1 by Snail-mediated repression provides metabolic advantages in basal-like breast cancer. *Cancer Cell* 2013; 23(3): 316-31.
- 23 Tan KO, Fu NY, Sukumaran SK, Chan SL, Kang JH, Poon KL, *et al.* MAP-1 is a mitochondrial effector of Bax. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(41): 14623-8.
- 24 Campos E, Pinto R. Targeted therapy with a selective BCL-2 inhibitor in older patients with acute myeloid leukemia. *Hematol Transfus Cell Ther* 2019; 41(2): 169-77.
- 25 Liu GM, Li Q, Zhang PF, Shen SL, Xie WX, Chen B, *et al.* Restoration of FBP1 suppressed Snail-induced epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis* 2018; 9(11): 1132.
- 26 Guan H, Zhu T, Wu S, Liu S, Liu B, Wu J, *et al.* Long noncoding RNA LINC00673-v4 promotes aggressiveness of lung adenocarcinoma via activating WNT/ β -catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019; 116(28): 14019-28.