

抑制Notch信号通路联合沉默 $Id1$ 对骨肉瘤恶性生物学行为及成骨分化的影响

陈洁 张瑶 谢圣男 周红 罗庆*

(重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所, 国家儿童健康与疾病临床医学研究中心(重庆), 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 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)

摘要 该研究探讨了抑制Notch信号通路联合沉默 $Id1$ 对人骨肉瘤细胞MG63的恶性生物学行为及成骨分化的影响。采用Notch信号通路抑制剂DAPT、沉默 $Id1$ 重组腺病毒分别或联合处理MG63细胞, 采用Western blot检测分组处理MG63细胞后Notch1、Jagged1、 $Id1$ 蛋白的表达; CCK8检测分组处理后MG63增殖能力; 流式细胞术检测分组处理后MG63细胞凋亡水平; 划痕实验和Transwell检测分组处理后MG63细胞迁移和侵袭能力; 碱性磷酸酶、茜素红染色分别检测分组处理后MG63细胞早期、晚期成骨分化能力。结果表明, DAPT处理MG63细胞后, Notch1、Jagged1蛋白表达下调($P<0.05$), 可有效抑制MG63细胞中Notch信号通路活性; 抑制MG63细胞中Notch信号通路后 $Id1$ 蛋白水平表达下降, 抑制MG63细胞中Notch信号通路联合沉默 $Id1$ 后 $Id1$ 蛋白表达水平最低($P<0.05$); 抑制MG63细胞中Notch信号通路后细胞增殖、迁移、侵袭能力下降, 凋亡水平增加和早期成骨分化能力减弱($P<0.05$); 抑制MG63细胞中Notch信号通路联合沉默 $Id1$ 后细胞增殖、迁移、侵袭能力进一步减弱, 凋亡水平最高, 早期、晚期成骨分化能力增强($P<0.05$)。综上所述, 抑制Notch信号通路可减弱MG63细胞恶性; 抑制Notch信号通路联合沉默 $Id1$ 后可进一步减弱MG63细胞恶性, 促进其成骨分化。

关键词 骨肉瘤; Notch信号通路; $Id1$

Effects of Inhibiting Notch Signaling Pathway Combined with Silencing $Id1$ on the Malignant Biological Behavior and Osteogenic Differentiation in Osteosarcoma

CHEN Jie, ZHANG Yao, XIE Shengnan, ZHOU Hong, LUO Qing*

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

Abstract The aim of the research is to study effect of inhibiting Notch signaling pathway combined with silencing $Id1$ on biological behavior and osteogenic differentiation of human osteosarcoma cell MG63. MG63 cells were treated with the Notch signaling pathway inhibitor DAPT and silencing $Id1$ alone or jointly. The expression of

收稿日期: 2020-11-17 接受日期: 2021-02-02

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: November 17, 2020

Accepted: February 2, 2021

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

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5502>

Notch1, Jagged1, Id1 in each group was detected by Western blot. CCK8 was used to detect the proliferation ability of MG63 cells in different groups. Flow cytometry was used to detect the apoptosis level of MG63 cells in different groups. Scratch test and Transwell were used to detect the migration and invasion abilities of MG63 cells in different groups. Alkaline phosphatase and Alizarin red staining were used to detect the early and late-stage osteogenic differentiation abilities of MG63 cells in different groups, respectively. The results indicate that DAPT can inhibit the Notch signaling pathway with the down-regulated expression of Notch1 and Jagged1 ($P<0.05$). The Id1 expression decreased after inhibiting the Notch signaling pathway of MG63 cells, and the Id1 expression level was lowest after inhibiting the Notch signaling pathway combined with silencing *Id1* of MG63 cells ($P<0.05$). The proliferation, migration, invasion ability and the early-stage osteogenic differentiation ability decreased, but the apoptosis level increased after inhibiting the Notch signaling pathway of MG63 cells ($P<0.05$). After inhibiting the Notch signaling pathway combined with silencing *Id1* of MG63 cells, the proliferation, migration and invasion ability decreased further, but the osteogenic differentiation ability increased, meanwhile the apoptosis level was the highest ($P<0.05$). To sum up, inhibiting the Notch signaling pathway can weaken MG63 cells malignancy. While, inhibiting the Notch signaling pathway combined with silencing *Id1* can further weaken the malignancy of MG63 cells. It can also promote MG63 osteogenic differentiation.

Keywords osteosarcoma; Notch signaling pathway; Id1

骨肉瘤(osteosarcoma)是青少年常见的恶性肿瘤,好发于长骨骨骺端,转移性强,侵袭性高,严重影响青少年生命健康^[1-2]。随着外科手术联合新辅助化疗的治疗方案广泛使用,非转移性骨肉瘤长期预后有所改善,但其5年生存率仅为60%~70%^[3-5]。骨肉瘤对化疗药物不敏感、易耐药及易复发是该病治疗效果不佳的主要原因。这也成为临床上亟待解决的问题^[6],迫切需要研究者深入探究骨肉瘤的生物学特性和发病机制,从而促进骨肉瘤临床治疗的进步。

经典Notch信号通路在进化上高度保守,调节从海胆到人等多种生物的发育,影响细胞正常形态发生的多个过程。研究发现,骨肉瘤的发生发展与Notch信号通路异常表达有关。研究者发现,Notch信号通路在骨肉瘤中异常高表达,调控该通路可影响骨肉瘤增殖、凋亡、迁移、成骨分化及血管形成^[7-9]。

分化抑制因子1(inhibitor 1 of differentiation 1, Id1)参与调控肿瘤的发生发展。本课题组前期研究发现,与正常成骨细胞以及骨髓间充质干细胞相比,骨肉瘤中Id1处于异常高表达水平,且与骨肉瘤恶性程度呈正相关,抑制其表达可逆转骨肉瘤恶性生物学行为,促进其早期成骨分化从而诱导骨肉瘤向正常成骨分化^[10]。

*Id1*基因与Notch信号通路的异常表达贯穿于肿瘤的发生、发展,可影响肿瘤分期、分级及预后。

但是抑制Notch信号通路与沉默*Id1*联合作用在疾病发生发展中的作用研究甚少,尤其是针对骨肉瘤,经查阅文献未发现开展抑制Notch信号通路与沉默*Id1*两者联合对骨肉瘤治疗的研究,因此本课题拟将抑制Notch信号通路联合沉默*Id1*在骨肉瘤中的表达,研究两者对骨肉瘤的恶性生物学行为及成骨分化的影响,从骨肉瘤发病机制切入,逐渐深入分子水平探讨,以期揭示抑制Notch信号通路联合沉默*Id1*在青少年骨肉瘤发生、发展中的作用,为临床治疗骨肉瘤提供新的思路与方案。

1 材料与方法

1.1 细胞及试剂

实验所用细胞包括:人骨肉瘤细胞株MG63和用于病毒扩增的293T细胞。空病毒载体、*AdsiId1*(靶向沉默*Id1*基因)重组腺病毒由美国芝加哥大学分子肿瘤实验室何通川教授惠赠。DMEM高糖培养液购自美国Gibco公司;胎牛血清购自北京四季青生物科技有限公司;全蛋白提取试剂盒、BCA蛋白浓度检测试剂盒、胰蛋白酶、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液、结晶紫染色液、碱性磷酸酶检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;CCK8检测试剂盒购自日本同仁化学研究所;茜素红染色试剂盒购买自北京索莱宝科技有限公司;SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、SDS-PAGE电泳液以及蛋白质印迹转膜液均购

自美国Bio-Rad公司; 提取RNA和逆转录试剂盒购自日本TaKaRa公司; 兔抗人Notch1、Jagged1多克隆抗体购自成都正能生物技术有限公司; 兔抗人Id1单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司; 鼠抗人 β -actin单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG和山羊抗小鼠IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司; PVDF膜购自美国Millipore公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 采用DMEM培养基(含10% FBS、100 U/mL青霉素和链霉素), 置于37 °C、5% CO₂的孵箱中培养293T细胞和MG63细胞, 待细胞贴壁生长至融合70%~80%时进行下一步实验。

1.2.2 重组腺病毒的扩增及最佳感染效价的筛选 当293T细胞生长至融合70%~80%时, 加入Adsi*Id1*、AdRFP病毒原液进行病毒扩增, 72 h后于荧光显微镜下观察到大量明亮荧光表达, 细胞变圆, 约50%无法贴壁, 收集细胞, 80 °C冷冻4~6 h, 37 °C水浴溶解并振荡处理1 min, 如此反复冻融3次, 4 °C、15 000 r/min离心15 min, 取上清液(含病毒)加入293T细胞反复感染3次, 获得高滴度相关重组腺病毒。

检测病毒滴度: 将293T细胞以1×10⁵个/孔的密度接种于96孔板中, 6~8 h后将得到的病毒原液按1:10²~1:10¹⁰倍稀释后加入96孔板, 设置3个复孔, 24 h后于荧光显微镜下观察荧光表达阳性细胞数, 按照公式计算病毒滴度(病毒滴度=阳性细胞数×病毒稀释倍数/0.1)。

将对数生长期的MG63细胞以1×10⁵个/孔的密度接种于24孔板中, 待细胞贴壁时加入不同重组腺病毒的感染; 共设2组细胞, 分别加入0.2、0.4、0.6、0.8、1.0和1.2 μ L重组腺病毒, 每组3个复孔; 分别在24、48和72 h时观察记录细胞中荧光表达情况及细胞生长状态; 以感染率>70%, 且不影响细胞状态为最佳感染滴度。

1.2.3 重组腺病毒感染骨肉瘤细胞MG63 MG63细胞生长至融合70%~80%时, 分别加入相应最佳感染浓度的腺病毒, 于48、72 h后观察并记录各组细

胞荧光表达情况。实验分组如下: (1) 空白对照组即无任何处理的MG63细胞; (2) 空载病毒组, 空载体腺病毒感染MG63细胞; (3) DMSO组, 辅助DAPT溶解的溶剂处理MG63细胞; (4) Adsi*Id1*组, 沉默*Id1*重组腺病毒感染MG63细胞, Adsi*Id1*干扰序列见表1; (5) DAPT组, Notch信号通路抑制剂处理MG63细胞; (6) DAPT+Adsi*Id1*组, DAPT联合沉默*Id1*重组腺病毒感染MG63细胞。

1.2.4 蛋白质印迹法检测蛋白的表达差异 将MG63细胞接种于10 cm培养皿中培养, 分组处理同1.2.3节, 分组处理细胞72 h后, 用全蛋白提取试剂盒提取各组细胞蛋白, 选用分离胶浓度为10%的SDS-PAGE分离Notch1、Jagged1、Id1蛋白, 以 β -actin为内参, 200 V条件下电泳40 min分离蛋白, 将分离后的蛋白用半干转移法转移至PVDF膜上, 采用BCA封闭液封闭15 min, 加入一抗[兔抗人Id1、Notch1、Jagged1和鼠抗人 β -actin单克隆抗体(内参)](稀释比例均为1:1 000)] 4 °C孵育一抗过夜, TBST洗膜5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(稀释比例均为1:2 000)], 室温孵育二抗1.5 h, TBST洗膜5次, 每次10 min, 最后上机显影。采用Image Lab软件分析各组蛋白条带体积值, 以目的蛋白与内参 β -actin的比值表示目的蛋白的相对表达水平。

1.2.5 CCK8法检测分组处理后MG63增殖能力 将MG63细胞以5 000个/孔的密度接种于96孔板中, 待生长至融合70%~80%时, 分组处理同1.2.3节, 每组设3个复孔, 感染MG63细胞24、48、72 h后, 加入CCK8试剂上机检测每孔吸光度(*D*)值。

1.2.6 流式细胞术检测分组处理后MG63凋亡能力 将MG63细胞接种于10 cm培养皿培养, 待生长至融合70%~80%时, 分组处理同1.2.3节, 每组设3个复孔, 感染MG63细胞48 h后, 不弃掉原有培养基, PBS润洗3次, 将细胞消化下来, 分别加DAPI和FITC-Annexin V染色15 min, 上流式仪检测。

1.2.7 划痕实验检测分组处理后MG63迁移能力 提

表1 沉默*Id1*基因序列
Table 1 Gene sequence of silencing *Id1*

名称 Name	序列 Sequence
<i>Id1</i> siRNA top	5'-TCG AAG CTG TTC GCT GAA GGC GGT TCG CCG CCT TCA GCG AAC AGC TTT TG-3'
<i>Id1</i> siRNA bottom	5'-CTA GCA AAA GCT GTT CGC TGA AGG CGG CGA ACC GCC TTC AGC GAA CAG CT-3'

前将MG63接种于6孔板中,待生长至融合70%~80%时,处理方式如1.2.3节,每组设3个复孔,用1 mL枪头沿着直尺均匀用力划痕,各组划痕宽度相同,PBS润洗2~3次,加无血清高糖培养基,分别在24、48 h时于40倍显微镜下拍照并记录各组划痕愈合情况。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%。

1.2.8 Transwell小室侵袭实验 提前1天将基质胶置于4℃过夜溶解,200 μ L枪头和小室均提前1 h置于4℃冰箱降温,取出全新1.5 mL EP管,置于冰砖上,将基质胶与DMEM按照1:8的比例稀释混匀后取50 μ L加入小室,敞开放于超净台风干1 h,置于细胞培养箱4~6 h后取出,加入100 μ L DMEM后继续置于细胞培养箱水化基质胶1 h,吸出上清,每个小室加入100 μ L DMEM含有同等数量的MG63细胞,分组处理如1.2.3节,每组设3个复孔,处理48 h后,弃掉原培养基,PBS润洗3次,300 μ L/孔结晶紫染色30 min,PBS再次润洗3次,于100倍显微镜下拍照记录。

1.2.9 ALP碱性磷酸酶染色、茜素红染色检测早期、晚期成骨分化 将MG63接种于24孔板培养,待融合至70%左右时,分组处理如1.2.3节,每组设3个复孔,感染MG63细胞48 h后,弃掉原培养基,每孔加1 mL 4%成骨诱导培养基,分别诱导分化7天、21天后,加入ALP检测试剂染色检测早期成骨分化,加入茜素红检测试剂染色检测晚期成骨分化,于100倍显微镜下拍照记录。

1.2.10 统计学方法 采用SPSS 20.0和Graph Pad Prism 8统计学软件行统计学分析。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,方差齐采用LSD检验,方差不齐采用Tamhane's T_2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DAPT抑制MG63细胞Notch信号通路活性及Id1的表达

蛋白质印迹法检测显示,DAPT组MG63细胞中Notch1、Jagged1蛋白表达水平明显低于对照(图1A, $P<0.05$)。AdsiId1组、DAPT组、DAPT+AdsiId1组MG63细胞中Id1的蛋白表达水平明显低于对照组(图1B, $P<0.05$),其中DAPT+AdsiId1组Id1蛋白表达最低,差异具有统计学意义。以上结果提示,DAPT可有效抑制MG63细胞中的Notch信号通路以及Id1的表

达。

2.2 抑制Notch信号通路联合沉默Id1抑制MG63细胞增殖

CCK8结果显示,6组不同浓度DAPT(分别为6.25 μ mol/L、12.5 μ mol/L、25 μ mol/L、50 μ mol/L、100 μ mol/L、200 μ mol/L)分别处理MG63细胞3、24、48、72 h,各组D值明显低于对照组,差异具有统计学意义(图2A, $P<0.05$),其中48 h时 IC_{50} 为(44.75 $\pm$ 4.54) μ mol/L,72 h时 IC_{50} 为(42.18 $\pm$ 3.82) μ mol/L。为方便后续实验进行,以50 μ mol/L DAPT处理MG63细胞48 h为最佳浓度时间。AdsiId1组、DAPT组、DAPT+AdsiId1组MG63的增殖能力在24、48、72 h均明显低于对照组,其中以DAPT+AdsiId1组增殖能力最弱,差异具有统计学意义(图2B, $P<0.05$)。以上结果提示,抑制Notch信号通路可抑制骨肉瘤细胞MG63增殖,在抑制Notch信号通路的基础上联合沉默Id1可进一步抑制骨肉瘤细胞MG63增殖。

2.3 抑制Notch信号通路联合沉默Id1促进MG63细胞凋亡

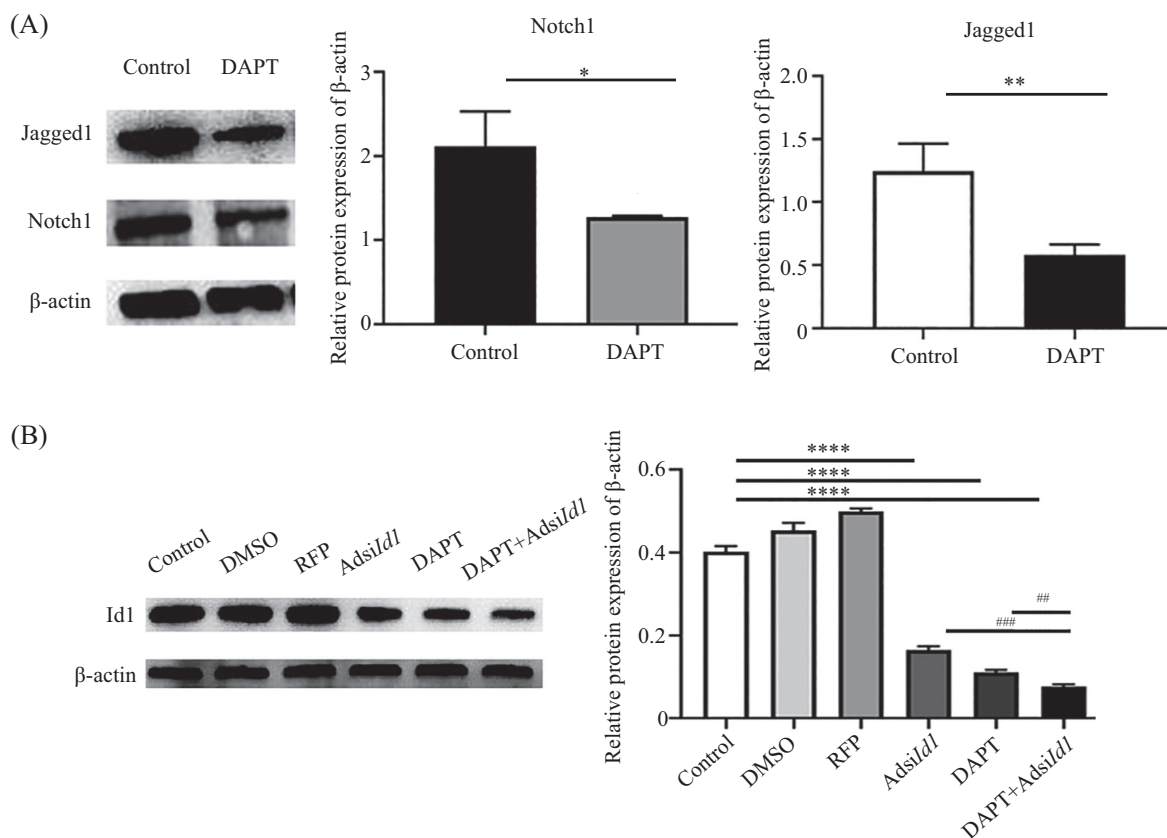
流式细胞术检测结果显示,分组处理MG63细胞48 h后AdsiId1组、DAPT组、DAPT+AdsiId1组凋亡率分别为(15.44% $\pm$ 1.54%)、(17.11% $\pm$ 0.79%)、(24.52% $\pm$ 1.75%),均明显高于对照组(5.97% $\pm$ 0.30%),其中DAPT+AdsiId1组凋亡率最大,差异具有统计学意义(图3, $P<0.05$)。以上结果提示,抑制Notch信号通路可促进骨肉瘤细胞MG63凋亡,在抑制Notch信号通路的基础上联合沉默Id1可进一步促进骨肉瘤细胞MG63凋亡。

2.4 抑制Notch信号通路联合沉默Id1抑制MG63细胞迁移

划痕实验结果显示,分组处理MG63细胞48 h后AdsiId1组、DAPT组、DAPT+AdsiId1组伤口愈合率分别为(55.74% $\pm$ 2.60%)、(44.65% $\pm$ 0.85%)、(18.98% $\pm$ 2.89%),明显低于对照组(76.06% $\pm$ 3.35%),其中DAPT+AdsiId1组伤口愈合率最小,差异具有统计学意义(图4, $P<0.05$)。以上结果提示,抑制Notch信号通路可抑制骨肉瘤细胞MG63迁移,在抑制Notch信号通路的基础上联合沉默Id1可进一步抑制骨肉瘤细胞MG63迁移。

2.5 抑制Notch信号通路联合沉默Id1抑制MG63细胞侵袭

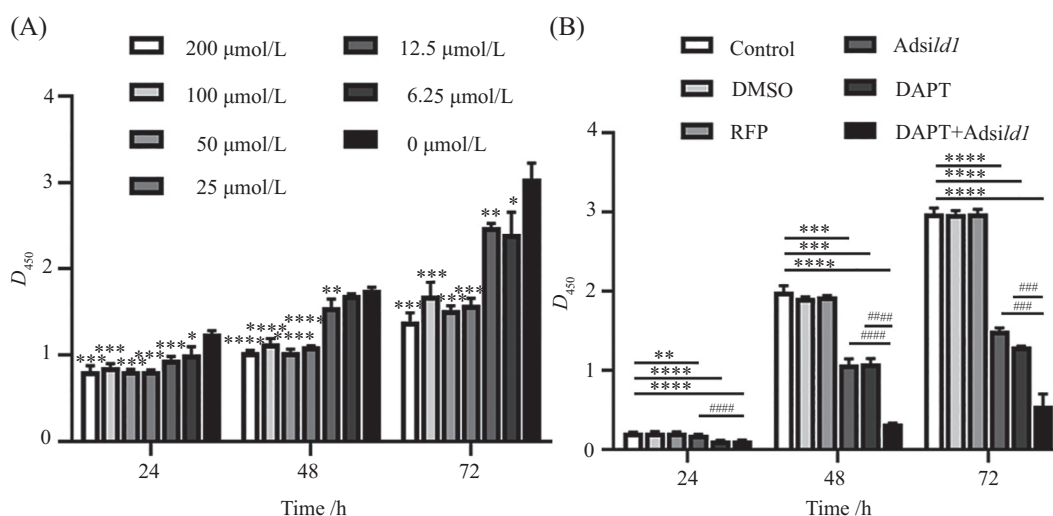
Transwell侵袭结果如所示,分组处理MG63



A: Western blot检测Notch1、Jagged1的表达; B: Western blot检测Id1蛋白的表达; * P <0.05, ** P <0.01, **** P <0.000 1; # P <0.01, ### P <0.001; n =3。
A: Western blot was used to detect the expression of Notch1 and Jagged1; B: Western blot was used to detect the expression of Id1 in MG63 with different treatments. * P <0.05, ** P <0.01, **** P <0.000 1; # P <0.01, ### P <0.001; n =3.

图1 Western blot检测Notch1、Jagged1和Id1蛋白的表达

Fig.1 Western blot was used to detect the protein expression of Notch1, Jagged1 and Id1

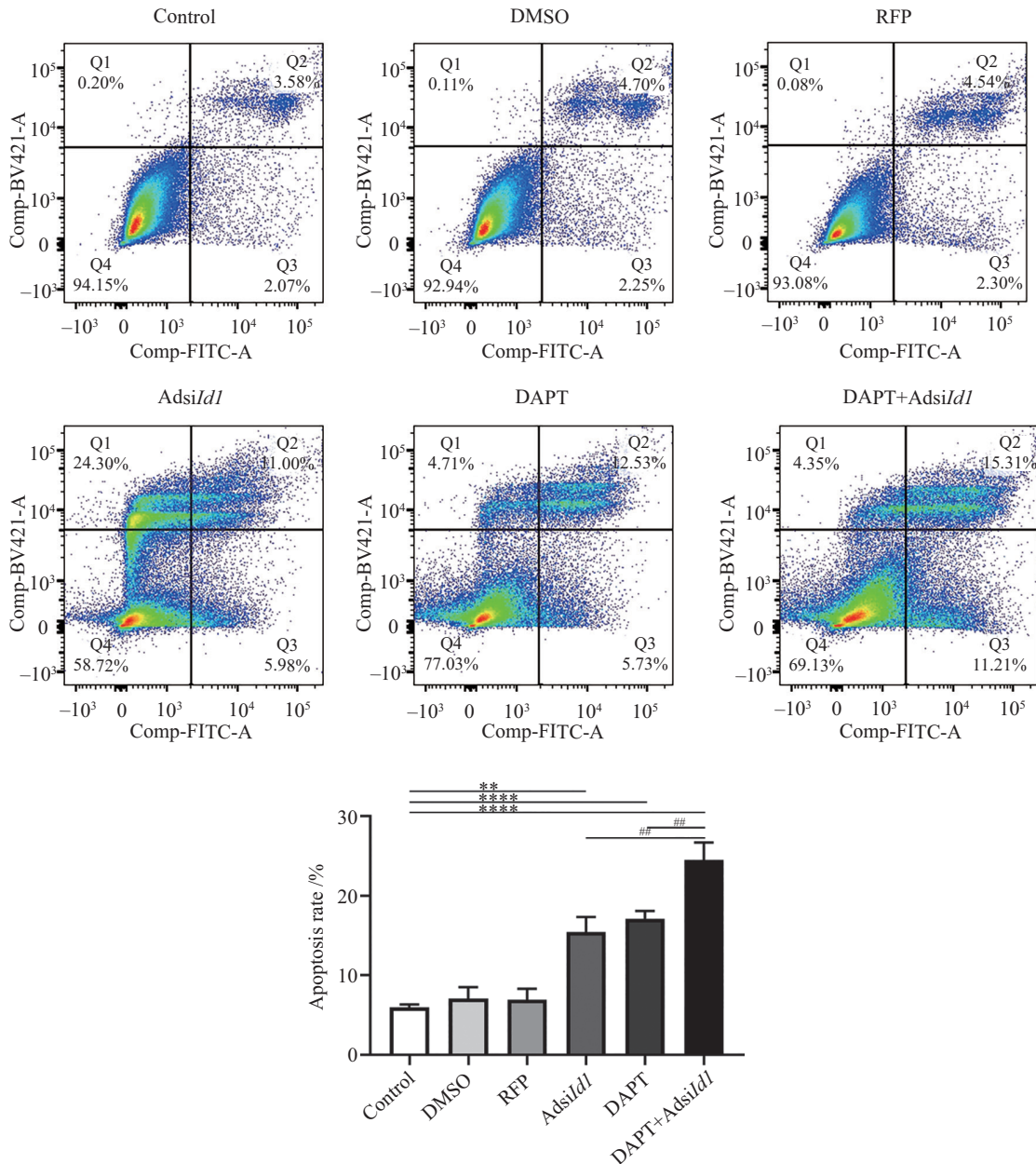


A: 不同浓度DAPT对MG63细胞增殖的影响; B: 沉默*Id1*、抑制Notch信号通路(DAPT)及抑制Notch信号通路联合沉默*Id1*处理MG63细胞后增殖能力的变化。* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, **** P <0.000 1, 与对照组比较; ### P <0.001, #### P <0.000 1; n =3。

A: the effect of different concentrations of DAPT on MG63 cell proliferation; B: the change of proliferation ability of MG63 after silencing *Id1*, inhibiting Notch signaling pathway (DAPT) and inhibiting Notch signaling pathway combined with silencing *Id1*. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, **** P <0.000 1 compared with the Control group; ### P <0.001, #### P <0.000 1; n =3.

图2 CCK8检测MG63细胞增殖能力

Fig.2 The proliferation ability of MG63 cells was detected by CCK8



沉默*Id1*、抑制Notch信号通路及抑制Notch信号通路联合沉默*Id1*处理MG63细胞后凋亡水平的变化。** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$; # $P < 0.01$, $n = 3$ 。
The changes of apoptosis level of MG63 after silencing *Id1*, inhibiting Notch signaling pathway and inhibiting Notch signaling pathway combined with silencing *Id1*. ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$; # $P < 0.01$; $n = 3$.

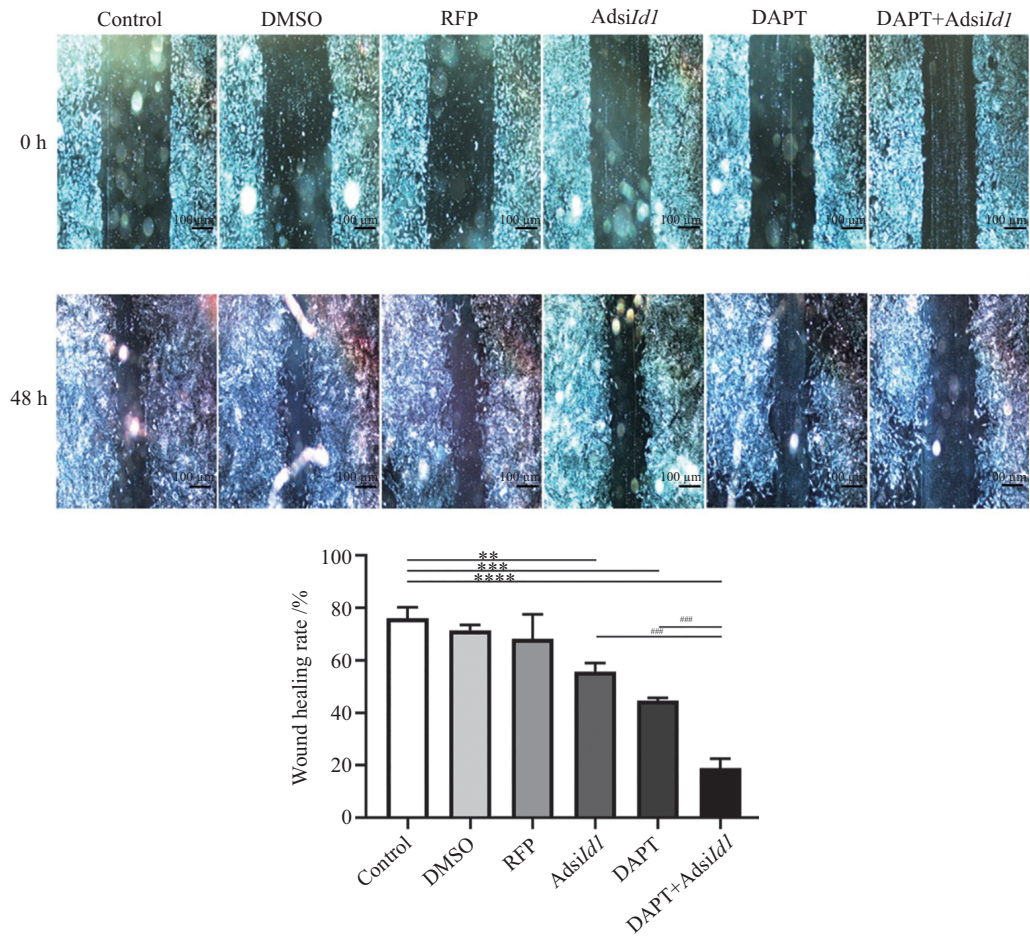
图3 流式细胞术检测MG63细胞凋亡水平

Fig.3 The apoptosis level of MG63 cells was detected by Flow cytometry

细胞48 h后 Adsi*Id1*组、DAPT组、DAPT+Adsi*Id1*组 D_{570} 分别为 (0.600 ± 0.005) 、 (0.680 ± 0.060) 、 (0.140 ± 0.006) 明显少于对照组 (1.590 ± 0.008) , 其中 DAPT+Adsi*Id1*组 D_{570} 最小, 差异具有统计学意义(图5, $P < 0.05$)。以上结果提示, 仅抑制Notch信号通路可抑制骨肉瘤细胞MG63侵袭, 在抑制Notch信号通路的基础上联合沉默*Id1*可进一步抑制骨肉瘤细胞MG63侵袭。

2.6 抑制Notch信号通路联合沉默*Id1*促进MG63成骨分化

碱性磷酸酶染色结果所示, 分组处理MG63细胞48 h, 分别诱导各组细胞成骨分化7天、21天后 Adsi*Id1*组、DAPT+Adsi*Id1*组碱性磷酸酶明显高于对照组, 其中以DAPT+Adsi*Id1*组碱性磷酸酶含量最高但DAPT组明显低于对照组, 差异有统计学意义(图6A和图6C, $P < 0.05$); 茜素红染色结果所示, Adsi-



沉默*Id1*、抑制Notch信号通路及抑制Notch信号通路联合沉默*Id1*处理MG63后迁移能力的变化。^{**} $P<0.01$, ^{***} $P<0.001$, ^{****} $P<0.0001$; ^{###} $P<0.001$; $n=3$ 。
The changes of migration ability of MG63 after silencing *Id1*, inhibiting Notch signaling pathway and inhibiting Notch signaling pathway combined with silencing *Id1*. ^{**} $P<0.01$, ^{***} $P<0.001$, ^{****} $P<0.0001$; ^{###} $P<0.001$; $n=3$.

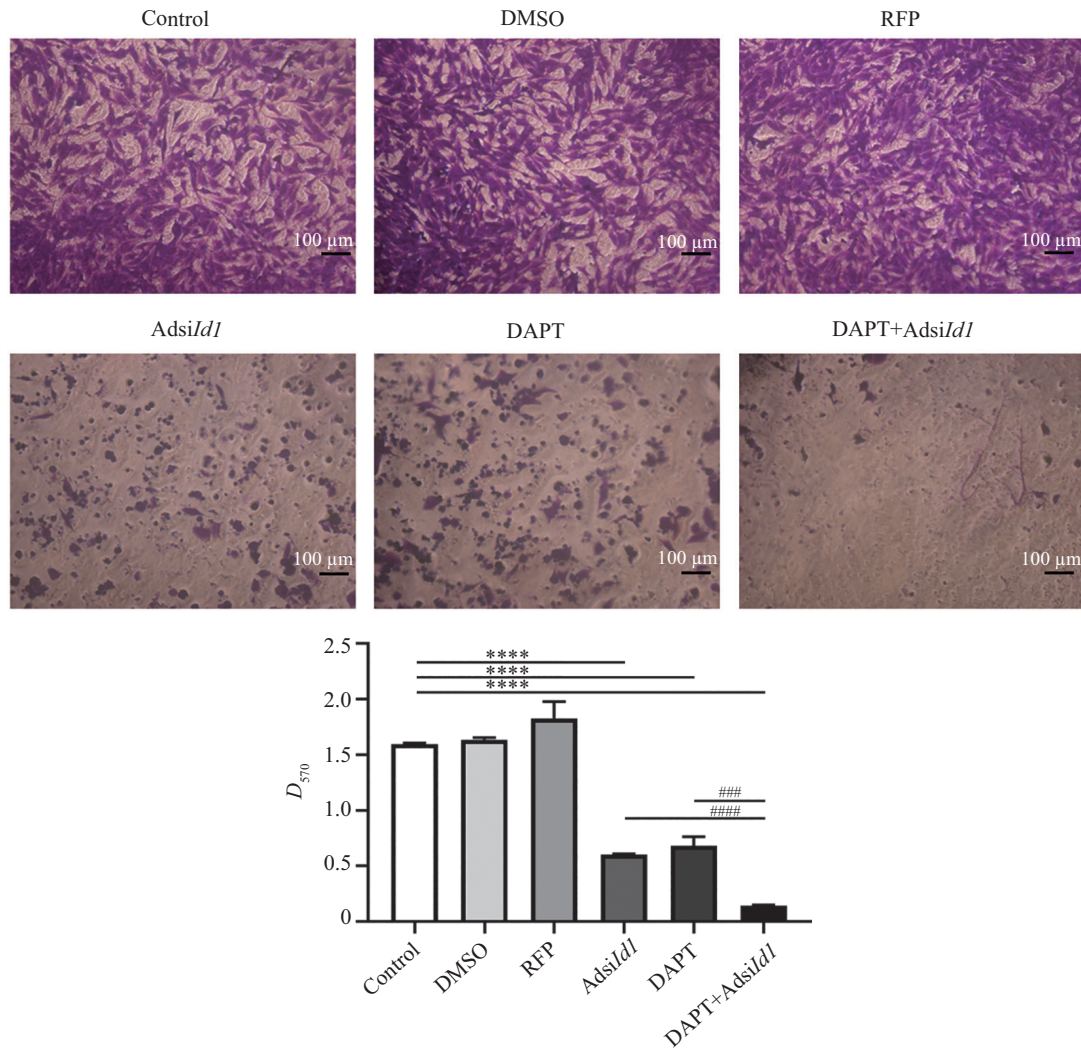
图4 划痕实验检测MG63细胞迁移能力
Fig.4 The migration ability of MG63 cells was detected by Scratch test

*Id1*组、DAPT组茜素红染色结果与对照组相比无明显差异,但DAPT+Adsi*Id1*组明显高于对照组,差异有统计学意义(图7B和图7D, $P<0.0001$)。以上结果提示,抑制Notch信号通路可抑制骨肉瘤细胞MG63早期成骨分化但对其晚期成骨分化无影响,在抑制Notch信号通路的基础上联合沉默*Id1*可促进骨肉瘤细胞MG63成骨分化。

3 讨论

近年来随着新辅助化疗的推广,骨肉瘤的治疗效果有所改善,但是5年生存率仍然维持在65%~70%,骨肉瘤的复发、转移及耐药性成为制约骨肉瘤治愈的难题,这源于我们对骨肉瘤发病机制认识不足,因此研究骨肉瘤的新疗法成为当务之急,受到医学研究者的高度关注。查阅研究文献发现,信号通路在

骨肉瘤的发生、迁移、侵袭和分化中至关重要,信号通路中的关键基因发生突变易导致正常细胞分化发育中断、异常增殖形成肿瘤,因此,对信号通路在疾病发生过程中起到的作用进行深入研究,可以为临床疾病治疗的研究指明新方向。越来越多的证据表明,多种信号通路的异常与骨肉瘤发生有关,包括Notch、Wnt、PI3K/AKT、Hedgehog等。研究发现,Notch信号通路表达水平高低与骨肉瘤侵袭和转移性有关,抑制Notch通路表达导致骨肉瘤转移性降低,增殖能力下降,影响骨肉瘤患者的生存^[1];采用Wnt/ β -catenin信号通路抑制剂可时间和剂量依赖性抑制骨肉瘤细胞U2OS、SaOS-2增殖;抑制骨肉瘤中AKT/m-TOR信号通路活性可降低其增殖和侵袭性。经典Notch信号通路通过相邻细胞间的配体-受体结合,Notch受体在肿瘤坏死因子 α 转换酶和 γ 分



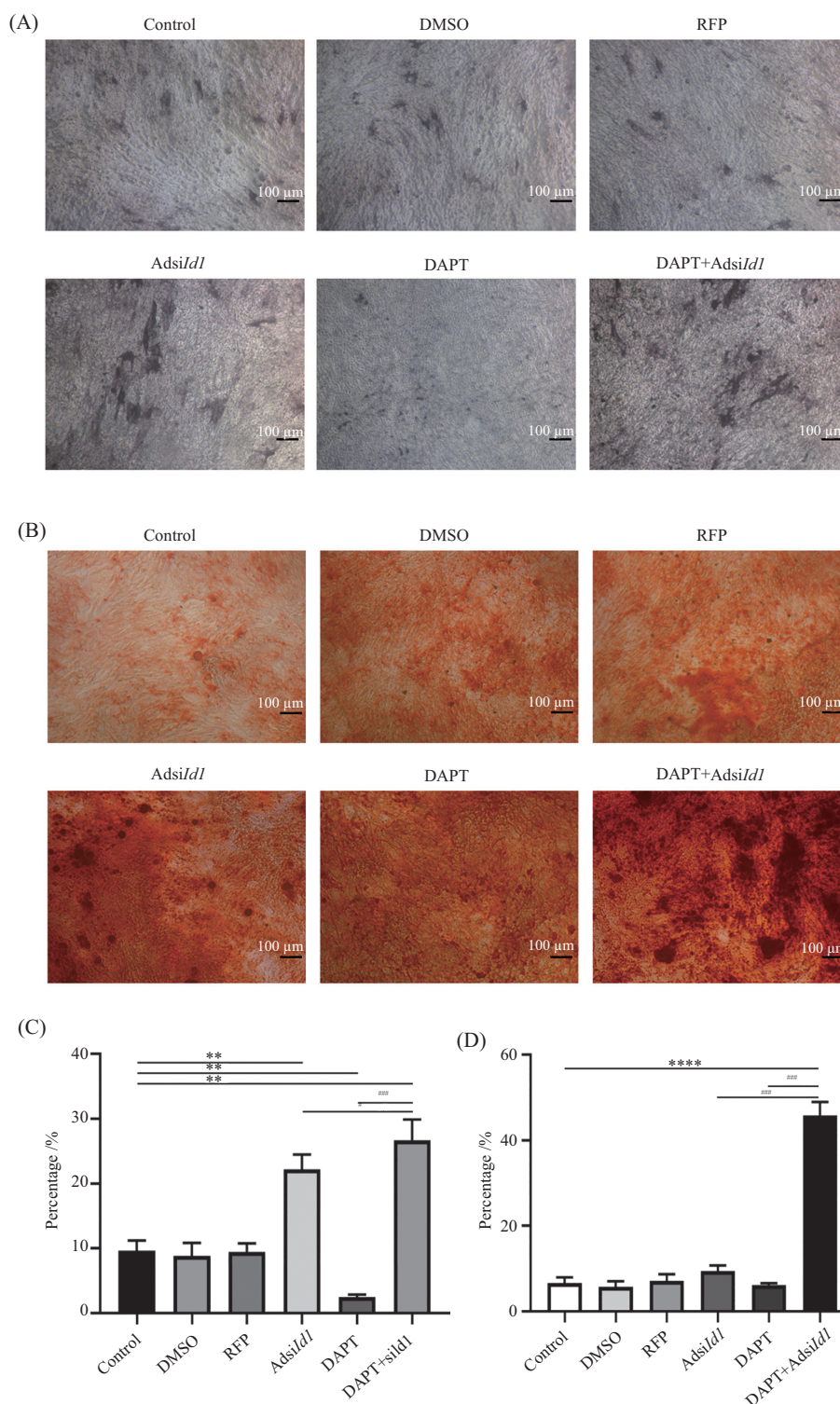
沉默*Id1*、抑制Notch信号通路及抑制Notch信号通路联合沉默*Id1*处理MG63后侵袭能力的变化。**** $P < 0.0001$; ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$; $n = 3$ 。
The changes of invasion ability of MG63 after silencing *Id1*, inhibiting Notch signaling pathway and inhibiting Notch signaling pathway combined with silencing *Id1*; **** $P < 0.0001$; ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$; $n = 3$.

图5 Transwell检测MG63细胞侵袭能力

Fig.5 The invasion ability of MG63 cells was detected by Transwell

泌酶等的作用下, 释放胞内区域(Notch intracellular domain, NICD), 进入细胞核与DNA结合蛋白结合形成转录活化复合物, 激活*HES*、*HEY*等下游靶基因^[12]。Notch信号通路广泛参与正常发育的精确调控, 调控细胞增殖、分化、凋亡, 在调节机体内稳态中起重要作用^[13-14]。目前发现, 多种人类疾病发病与Notch信号通路的异常有关, 比如免疫缺陷、造血恶性肿瘤、造血障碍疾病等。本研究选用经典Notch信号通路抑制剂DAPT特异性剪切Notch信号通路关键酶 γ 分泌酶从而抑制Notch信号通路。本研究结果提示, DAPT可抑制MG63增殖、迁移、侵袭, 促进其凋亡, 减轻其恶性程度, 这与其他研究结果相似, 如DAPT可减弱滑膜肉瘤^[15]、结直肠癌^[16]恶性生物学行为。

1990年, BENEZRA等^[17]首先从cDNA文库中将*Id1*克隆出来, 为HLH(helix-loop-helix)转录因子家族的成员之一, 可抑制bHLH转录因子家族与DNA结合, 促进细胞增殖、调节细胞周期、抑制分化^[18]。本课题组前期研究发现, 沉默*Id1*通过抑制Wnt通路活性可进一步减弱其恶性生物学行为^[19], 由此可知调控信号通路与靶基因可有效抑制骨肉瘤生长。在前期研究以及预实验的提示下, 本研究选择抑制Notch信号通路联合沉默*Id1*对骨肉瘤的影响作为研究方向, 发现抑制MG63中Notch信号通路后*Id1*蛋白表达下调, 可减弱其恶性生物学行为, 在此基础上联合沉默*Id1*后, 可进一步减弱其恶性生物学行为。由此推测, 抑制Notch信号通路后MG63细胞恶性程度



A、C: 沉默*Id1*、抑制Notch信号通路及抑制Notch信号通路联合沉默*Id1*处理MG63细胞后早期成骨分化能力的变化; B、D: 沉默*Id1*、抑制Notch信号通路及抑制Notch信号通路联合沉默*Id1*处理MG63细胞后晚期成骨分化能力的变化。** $P<0.01$, **** $P<0.0001$; # $P<0.05$, ### $P<0.001$, #### $P<0.0001$; $n=3$ 。

A,C: the change of the early-stage osteogenic differentiation ability of MG63 after silencing *Id1*, inhibiting Notch signaling pathway and inhibiting Notch signaling pathway combined with silencing *Id1*; B,D: the changes of the late-stage osteogenic differentiation ability of MG63 after silencing *Id1*, inhibiting Notch signaling pathway and inhibiting Notch signaling pathway combined with silencing *Id1*; ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$; # $P<0.05$, ### $P<0.001$, #### $P<0.0001$; $n=3$ 。

图6 碱性磷酸酶染色、茜素红染色分别检测MG63细胞的早期及晚期成骨分化
Fig.6 The early-and late-stage osteogenic differentiation of MG63 cells was detected by Alkaline phosphatase staining and Alizarin red staining

下降可能与Id1表达下调有关。

本课题组与其他国外研究一致认为,骨肉瘤是因骨髓间充质干细胞分化异常中断而形成的,而分化异常通常与基因和信号通路的异常表达有关。本研究发现,抑制Notch信号通路后可抑制骨肉瘤细胞MG63成骨分化。经查阅文献发现,其他研究也得出类似结果,如ANGARO等^[9]研究者发现,DAPT可抑制MG63成骨分化。由此推测,调控Notch信号通路不单通过Id1的改变也通过其他信号通路以及靶基因的改变而影响骨肉瘤成骨分化。前期研究发现,沉默Id1联合过表达BMP9以及沉默Id1联合抑制AKT/m-TOR信号通路后碱性磷酸酶及钙含量增加,骨桥蛋白表达增加,促进骨肉瘤细胞早晚期成骨分化^[20-21]。提示通过联合调控信号通路与靶基因的表达可遏制骨肉瘤异常成骨分化,诱导其向正常成骨分化。在前期研究提示下,本研究选择抑制MG63中Notch通路的同时沉默Id1,发现其可促进骨肉瘤细胞MG63向正常成骨分化,促使异常中断的成骨分化重新发生。

本研究结果揭示了Notch信号通路对骨肉瘤恶性生物学行为和成骨分化的影响,并初步探究了通过联合调控Notch信号通路与Id1可诱导骨肉瘤细胞向正常成骨细胞方向分化的可行性,提示靶向调控Notch信号通路和Id1等关键基因或通路的表达可以实现人骨肉瘤细胞恶性逆转并向正常成骨分化。下一步我们将进一步通过体内体外实验深入研究调控Notch联合Id1信号影响骨肉瘤细胞MG63恶性生物学行为及成骨分化的具体分子生物学机制,以期通过此研究进一步丰富和完善骨肉瘤的发生发展机理,为临床治疗骨肉瘤提供新的思路与方案。

参考文献 (References)

- [1] JWVD A, TAADM F, JV F, et al. Biology and pathogenesis of human osteosarcoma [J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(2): 1099-6.
- [2] MISAGHI A, GOLDIN A, AWAD M, et al. Osteosarcoma: a comprehensive review [J]. *SICOT J*, 2018, 4: 12.
- [3] FRANCESCHINI N, LAM S W. What's new in bone forming tumours of the skeleton [J]. *Virchows Arch*, 2020, 476(1): 147-7.
- [4] LUETKE A, MEYERS P, LEWIS L, et al. Osteosarcoma treatment: where do we stand? A state of the art review [J]. *Cancer Treat Rev*, 2014, 40(4): 523-2.
- [5] DANIELE M, MASSIMO B, ALBERTO B, et al. Immunocombinates for osteosarcoma therapy: preclinical experiences and future perspectives [J]. *Biomedicines*, 2018, 6(1): 19.
- [6] SARA R, DANIELA I. Chemotherapy induces stemness in osteosarcoma cells through activation of Wnt/beta-catenin signaling [J]. *Cancer Lett*, 2016, 370(2): 286-5.
- [7] YU L, XIA K, GAO T, et al. The Notch pathway promotes osteosarcoma progression through activation of ephrin reverse signaling [J]. *Mol Cancer Res*, 2019, 17(12): 2383-4.
- [8] QIN J, WANG R, ZHAO C, et al. Notch signaling regulates osteosarcoma proliferation and migration through Erk phosphorylation [J]. *Tissue and Cell*, 2019, 59: 51-1.
- [9] ANGARO A, PELLATI A, BAGHERI L, et al. Characterization of Notch signaling during osteogenic differentiation in human osteosarcoma cell line MG63 [J]. *J Cell Physiol*, 2016: 231(12): 2652-63.
- [10] 仇超, 康权, 罗庆, 等. Id1基因对人骨肉瘤细胞恶性逆转向成骨分化的影响[J]. 第三军医大学学报(QIU C, KANG Q, LUO Q, et al. Effect of Id1 Gene on malignant retrograde osteogenic differentiation of human osteosarcoma cells [J]. *Journal of the Third Military Medical University*), 2016, 38(4): 344-9.
- [11] ANGULO P, KAUSHIK G, SUBRAMANIAM D, et al. Natural compounds targeting major cell signaling pathways: a novel paradigm for osteosarcoma therapy [J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 10.
- [12] SIEBEL C, LENDAHL U. Notch signaling in development, tissue homeostasis, and disease [J]. *Physiol Rev*, 2017, 97(4): 1235-4.
- [13] LOBRY C, OH P, MANSOUR M R, et al. Notch signaling: switching an oncogene to a tumor suppressor [J]. *Blood*, 2014, 123(16): 2451-9.
- [14] HERRICK D B, LIN B, PETERSON J, et al. Notch1 maintains dormancy of olfactory horizontal basal cells, a reserve neural stem cell [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(28): E5589-8.
- [15] 高天, 余铃, 李舒, 等. Notch信号通路促进滑膜肉瘤细胞SW982增殖和侵袭的研究[J]. 中国医科大学学报(GAO T, YU L, LI S, et al. The Notch signal pathway promotes the proliferation and invasion of synovial sarcoma cell SW982 [J]. *Journal of China Medical University*), 2019, 48(3): 210-5.
- [16] 赵小芳, 王红. DAPT对结肠癌细胞株HT-29增殖及乙醛脱氢酶1、Notch信号通路受体和配体表达的影响[J]. 山东医药(ZHAO X H, WANG H. Effects of DAPT on the proliferation of colon cancer cell line HT-29 and the expression of acetaldehyde dehydrogenase 1, Notch signaling pathway receptor and ligand [J]. *Shang Dong Medicine*), 2017, 57(15): 5-8.
- [17] BENEZRA R, DAVIS R L, LOCKSHON D, et al. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins [J]. *Cell*, 1990, 61(1): 49.
- [18] NORTON JD. ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis [J]. *J Cell Sci*, 2000, 113(22): 3897-5.
- [19] 董姿杏, 仇超, 罗庆. 靶向沉默Id1基因调控Wnt信号通路促进骨肉瘤MG63细胞凋亡[J]. 肿瘤(DONG Z X, QIU C, LUO Q. Targeted silencing of Id1 regulates Wnt signaling pathway and promotes apoptosis of osteosarcoma MG63 cells [J]. *Cancer*), 2017, 37(9): 909-16.
- [20] 董姿杏, 靶向沉默Id1联合BMP9对骨肉瘤细胞成骨分化作用及相关机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2018.
- [21] 张遥. 靶向沉默Id1通过AKT/mTOR信号通路介导的自噬对骨肉瘤细胞MG63恶性生物学行为及成骨分化的影响[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2019.