DOI: 10.11844/cjcb.2026.11.0004
中国细胞生物学学报 Chinese Journal of Cell Biology 2026, 48(11): 2534–2548 CSTR: 32200.14.cjcb.2026.11.0004

DSN1调节CDK1/CCNB1/PLK1信号通路对骨肉瘤细胞增殖、转移和免疫逃逸的影响

高金宝[1] 赵维[2] 刘肖[3] 袁珑杰[4]*

([1]石家庄市第三医院手足外科, 石家庄 050000; [2]石家庄市第三医院关节外科, 石家庄 050000;
[3]石家庄市第三医院心内三科, 石家庄 050000; [4]石家庄市第三医院运动医学科, 石家庄 050000)

摘要 该文旨在探讨MIS12动粒复合体组分DSN1(DSN1 component of MIS12 kinetochore complex, DSN1)通过调控CDK1/CCNB1/PLK1信号通路对骨肉瘤(osteosarcoma, OS)细胞增殖、转移及免疫逃逸的影响。采用RT-qPCR、Western blot分别检测DSN1在人永生化正常成骨细胞(hFOB)及OS细胞系(MG63、Saos2、U2OS、HOS、143B)中的基因和蛋白表达水平。选取HOS细胞进行*DSN1*敲低实验, 将细胞分为: 对照组(NC)、对照慢病毒组(siNC)、DSN1敲低组(siDSN1)、siNC+CDK1激活剂TC11组(siNC+TC11)和DSN1敲低+CDK1激活剂TC11组(siDSN1+TC11); 采用MG63细胞进行*DSN1*过表达实验, 将细胞分为: 对照组(NC)、阴性对照慢病毒组(Vector)、DSN1过表达组(OE-DSN1)、Vector+CDK1抑制剂Ro-3306组(Vector+Ro)和DSN1过表达+CDK1抑制剂Ro-3306组(OE-DSN1+Ro)。通过CCK-8法、平板克隆实验及EdU染色评估细胞增殖能力; 划痕愈合实验和Transwell实验检测细胞迁移与侵袭能力; RT-qPCR及Western blot分别检测免疫逃逸相关分子PD-L1、B7-H3、CD47的基因和蛋白表达情况; 免疫共沉淀(co-immunoprecipitation, Co-IP)实验检测DSN1与CDK1、CCNB1、PLK1的蛋白相互作用; 培养$CD8^+$ T细胞, 将其分别以效靶比2:1、3:1、5:1与各组OS细胞共培养, 采用乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)释放实验检测$CD8^+$ T细胞杀伤活性(后续采用5:1效靶比), 并利用ELISA检测共培养上清中γ干扰素(interferon-γ, IFN-γ)、颗粒酶B(granzyme B, Gzm-B)及白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)的分泌水平; Western blot检测CDK1、CCNB1、PLK1蛋白表达水平。与hFOB细胞相比, 各OS细胞系中DSN1的基因和蛋白表达水平均显著升高(P<0.001)。在HOS细胞中, 敲低*DSN1*可显著抑制细胞增殖、迁移及侵袭(P<0.001), 下调PD-L1、B7-H3、CD47基因及蛋白表达水平(P<0.001), 促进LDH的释放及IFN-γ、Gzm-B的分泌, 抑制IL-10的分泌(P<0.001), 并下调CDK1、CCNB1、PLK1蛋白表达(P<0.001); TC11可部分逆转上述效应(P<0.05或P<0.01)。在MG63细胞中, 过表达*DSN1*显著促进细胞增殖、迁移及侵袭(P<0.01或P<0.001), 上调PD-L1、B7-H3、CD47基因及蛋白表达(P<0.001), 抑制LDH的释放及IFN-γ、Gzm-B的分泌, 促进IL-10的分泌(P<0.001), 并上调CDK1、CCNB1、PLK1蛋白表达(P<0.001); Ro-3306可部分逆转上述效应(P<0.05或P<0.01或P<0.001)。Co-IP结果显示, 在IP:DSN1复合物中可检测到CDK1、CCNB1及PLK1蛋白。DSN1在OS细胞中高表达, 其可与CDK1、CCNB1、PLK1相互作用, 可能通过激活CDK1/CCNB1/PLK1信号通路促进OS细胞的增殖、转移及免疫逃逸。

关键词 DSN1; 骨肉瘤; CDK1/CCNB1/PLK1信号通路; 细胞增殖; 细胞迁移; 免疫逃逸

收稿日期: 2026-09-10 接受日期: 2026-10-10
河北省2026年度医学科学研究课题计划(批准号: 20260978)资助的课题
*通信作者。E-mail: 544347168@qq.com
Received: September 10, 2026 Accepted: October 10, 2026
This work was supported by the Hebei Province's 2026 Medical Science Research Project (Grant No.20260978)
*Corresponding author. E-mail: 544347168@qq.com

The Effect of DSN1-Regulated CDK1/CCNB1/PLK1 Signaling Pathway on Proliferation, Metastasis and Immune Escape of Osteosarcoma Cells

GAO Jinbao[1], ZHAO Wei[2], LIU Xiao[3], YUAN Longjie[4]*

([1]*Department of Hand and Foot Surgery, the Third Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050000, China*;
[2]*Department of Joint Surgery, the Third Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050000, China*;
[3]*Department of Cardiology, Section Three, the Third Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050000, China*;
[4]*Department of Sports Medicine, the Third Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050000, China*)

Abstract This study aims to investigate the effect of DSN1 (DSN1 component of MIS12 kinetochore complex) on proliferation, metastasis and immune escape of OS (osteosarcoma) cells via regulating the CDK1/CCNB1/PLK1 signaling pathway. RT-qPCR and Western blot separately were performed to detect the mRNA and protein expression levels of DSN1 in hFOB (human fetal osteoblastic cell line) and OS cell lines (MG63, Saos2, U2OS, HOS, 143B). *DSN1* knockdown was conducted in HOS cells, which were divided into control group (NC), negative lentivirus control group (siNC), DSN1 knockdown group (siDSN1), siNC+CDK1 activator TC11 group (siNC+TC11), and DSN1 knockdown+CDK1 activator TC11 group (siDSN1+TC11). *DSN1* was overexpressed in MG63 cells, and cells were divided into negative control group (NC), empty vector lentivirus control group (Vector), DSN1 overexpression group (OE-DSN1), Vector+CDK1 inhibitor Ro-3306 group (Vector+Ro), and DSN1 overexpression+CDK1 inhibitor Ro-3306 group (OE-DSN1+Ro). CCK-8, colony formation assay and EdU staining were used to evaluate cell proliferative capacity. Wound-healing assay and Transwell assay were adopted to assess cell migration and invasion. RT-qPCR and Western blot separately were used to detect the mRNA and protein expression of immune escape-related molecules including PD-L1, B7-H3 and CD47. Co-IP (co-immunoprecipitation) assay was performed to verify the interaction between DSN1 and CDK1, CCNB1, PLK1. $CD8^+$ T cells were isolated and co-cultured with OS cells at effector-to-target (E:T) ratios of 2:1, 3:1 and 5:1. LDH (lactate dehydrogenase) release assay was used to determine $CD8^+$ T-cell cytotoxicity (the E:T ratio of 5:1 was applied in subsequent experiments). ELISA was used to measure the secretion levels of IFN-γ (interferon-γ), Gzm-B (granzyme B) and IL-10 (interleukin-10) in co-culture supernatants. Western blot was utilized to detect the protein levels of CDK1, CCNB1 and PLK1. Compared with hFOB cells, the mRNA and protein levels of DSN1 were significantly increased in all OS cell lines ($P<0.001$). In HOS cells, *DSN1* knockdown markedly suppressed cell proliferation, migration and invasion ($P<0.001$), down-regulated the mRNA and protein expression of PD-L1, B7-H3 and CD47 ($P<0.001$), elevated LDH release rate as well as the secretion of IFN-γ and Gzm-B, and reduced IL-10 level ($P<0.001$), accompanied by decreased protein expression of CDK1, CCNB1 and PLK1 ($P<0.001$). TC11 partially reversed the above phenotypes ($P<0.05$ or $P<0.01$). In MG63 cells, *DSN1* overexpression significantly promoted cell proliferation, migration and invasion ($P<0.01$ or $P<0.001$), up-regulated the mRNA and protein expression of PD-L1, B7-H3 and CD47 ($P<0.001$), decreased LDH release rate and the secretion of IFN-γ and Gzm-B, while increased IL-10 level ($P<0.001$), together with up-regulated CDK1, CCNB1 and PLK1 protein levels ($P<0.001$). Ro-3306 partially abrogated these effects ($P<0.05$ or $P<0.01$ or $P<0.001$). Co-IP results showed that CDK1, CCNB1 and PLK1 proteins could be detected in the IP:DSN1 complex. DSN1 is highly expressed in OS cells. DSN1 interacts with CDK1, CCNB1 and PLK1, and it may facilitate the proliferation, metastasis and immune escape of OS cells by activating the CDK1/CCNB1/PLK1 signaling pathway.

Keywords DSN1; osteosarcoma; CDK1/CCNB1/PLK1 signaling pathway; cell proliferation; cell migration; immune escape

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是骨骼系统最常见的原发性恶性肿瘤, 约占原发性骨恶性肿瘤的20%, 好发于青少年, 恶性程度高、侵袭性强, 易复发和转移[1]。肺是OS转移的主要靶器官, 临床上由于缺乏特异性诊断标志物, OS患者常在疾病晚期才得以确诊[2]。尽管外科手术联合化疗是目前公认的标准治疗方案, 但转移性OS患者的总体生存率仍仅约30%, 预后极差[3], 因此深入阐明OS发生发展的分子机制、寻找新的诊疗靶点具有重要的临床意义。

近年来, 越来越多的研究聚焦于细胞周期相关基因在OS恶性进展中的作用。MIS12动粒复合体组分DSN1(DSN1 component of MIS12 kinetochore complex, DSN1)是MIS12复合体的核心亚基之一, 与染色体的正确分离及细胞周期进程密切相关[4]。近年来泛癌研究证实, DSN1在多种恶性肿瘤中异常高表达, 与肿瘤细胞恶性增殖、侵袭转移及不良预后密切相关[5]。有研究发现, 在OS细胞中敲低*DSN1*可显著抑制克隆形成, 并下调细胞周期蛋白B1(cyclin B1, CCNB1)、细胞周期蛋白依赖性激酶2(cyclin dependent kinase 2, CDK2)、细胞分裂周期25C(cell division cycle 25C, CDC25C)等细胞周期及增殖相关蛋白的表达, 证明DSN1是OS细胞周期和凋亡的重要调控因子[6]。但其具体调控通路、分子机制及对肿瘤免疫微环境的影响尚未明确, 需要进一步研究。

细胞周期的有序进行有赖于多种激酶与周期蛋白的协同调控, 其中细胞周期蛋白依赖性激酶1(cyclin dependent kinase 1, CDK1)/CCNB1/极样激酶1(polo like kinase 1, PLK1)信号通路是驱动G_2/M期转换、维持有丝分裂正常进行的关键通路[7]。已有研究显示, 在结肠癌中抑制CDK1/CCNB1/PLK1信号通路能够显著抑制肿瘤细胞活性、移植瘤生长并促进细胞凋亡, 提示该通路是多种肿瘤共同的促癌靶点[8]。然而, DSN1是否通过调控CDK1/CCNB1/PLK1信号通路影响OS细胞的增殖、转移及免疫逃逸, 目前尚缺乏系统研究。基于此, 本研究拟探讨DSN1调节CDK1/CCNB1/PLK1信号通路对OS细胞增殖、转移和免疫逃逸的影响, 以期揭示DSN1参与OS恶性进展的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 人永生化正常成骨细胞(human fetal osteoblastic cell line, hFOB; 货号: SCSP-5464)与OS细胞系(MG63, 货号: SCSP-5437; U2OS, 货号: SCSP-5030; Saos2, 货号: SCSP-5057; HOS, 货号: SCSP-5380; 143B, 货号: SCSP-5396)均购自中国科学院上海细胞库。MG63、U2OS、Saos2、HOS和143B细胞均培养于含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中, 于37 ℃、5% CO_2、饱和湿度培养箱内培养; hFOB细胞培养温度设置为34 ℃, 其余培养条件均保持一致。

人外周血$CD8^+$ T细胞(货号: PRI-H-00121)购自上海中乔新舟生物科技有限公司。该细胞从健康人外周血中分离得到, 实验前, 使用抗CD3/CD28磁珠联合重组IL-2试剂对T细胞进行体外活化; 本研究中$CD8^+$ T细胞与OS细胞为不同个体来源, 存在异体反应背景, 所有共培养对照组均设置同等条件以排除异体反应干扰。$CD8^+$ T细胞在RPMI-1640培养基中培养, 培养基中含10%胎牛血清、青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 μg/mL)及IL-2等细胞因子, 置于37 ℃、5% CO_2、饱和湿度培养箱中培养。本研究通过石家庄市第三医院伦理委员会审批(批号: 2025伦理审批第034号)。

1.1.2 主要试剂与仪器 CDK1激活剂TC11(货号: HY-129478)、CDK1抑制剂Ro-3306(货号: HY-12529)均购自MedChemExpress公司; TransZol试剂盒(货号: ET101-01-V2)购自北京全式金生物技术股份有限公司; 反转录试剂盒(货号: G592)购自abm公司; 蛋白提取试剂盒(货号: R0010)购自北京索莱宝科技有限公司; BCA蛋白定量试剂盒(货号: P0009)购自上海碧云天生物技术有限公司; Universal Blue SYBR Green qPCR预混液(货号: G3326-15)购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 嘌呤霉素(货号: 727136ES)、4%多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA; 货号: 60536ES)以及CCK-8(货号: 40203ES60)、5-乙炔基-2′-脱氧尿苷(5-ethynyl-2′-deoxyuridine, EdU; 货号: 40276ES60)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH; 货号: 40209ES76)、γ干扰素(interferon-γ, IFN-γ; 货号: 97024ES)和白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10; 货号: 97063ES96)试剂盒均购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司; 颗粒酶B(granzyme B, Gzm-B; 货号: EK158)试剂盒购自杭州联科生物技术股份有限公司; DSN1(货号: 17742-1-AP)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH; 货号: 10494-1-AP)、

CDK1(货号: 10762-1-AP)、CCNB1(货号: 55004-1-AP)、PLK1(货号: 10305-1-AP)、程序性死亡配体1(programmed death-ligand 1, PD-L1; 货号: 66248-1-Ig)、B7同源物3(B7 homolog 3, B7-H3; 货号: 14453-1-AP)、白细胞分化抗原47(cluster of differentiation 47, CD47; 货号: 20305-1-AP)抗体均购自Proteintech公司。

主要仪器: 微量紫外–可见分光光度计(型号: NanoDrop One; ThermoFisher Scientific公司)、PCR仪(型号: CFX Connect; Bio-Rad公司)、红外荧光扫描成像系统(型号: Odyssey; LI-COR公司)、荧光显微镜(型号: IX71; Olympus公司)、正置生物显微镜(型号: CX23; Olympus公司)、酶标仪(型号: Synergy H1; BioTek公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染 敲低*DSN1*的siRNA慢病毒(siDSN1)及对照慢病毒(siNC)均购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司。*DSN1*过表达慢病毒(OE-DSN1)及其对应的阴性对照慢病毒(Vector)均由生工生物工程(上海)股份有限公司提供。细胞转染48 h后, 使用0.5 μg/mL嘌呤霉素处理OS细胞, 持续筛选2周, 获得稳定转染细胞株。

1.2.2 细胞分组 HOS细胞分组为5组。对照组(NC): 常规培养、不感染慢病毒, 作为基础对照; 对照慢病毒组(siNC): 感染阴性对照慢病毒; DSN1敲低组(siDSN1): 感染靶向*DSN1*的siRNA敲低慢病毒; siNC+CDK1激活剂TC11组(siNC+TC11): 感染阴性对照慢病毒后加入5 μmol/L CDK1激活剂TC11[9]处理; DSN1敲低+CDK1激活剂TC11组(siDSN1+TC11): 感染*DSN1*敲低慢病毒后加入5 μmol/L CDK1激活剂TC11处理。MG63细胞分组为5组。对照组(NC): 常规培养、不感染慢病毒, 作为基础对照; 阴性对照慢病毒组(Vector): 感染空载体阴性对照慢病毒; DSN1过表达组(OE-DSN1): 感染*DSN1*过表达慢病毒; Vector+CDK1抑制剂Ro-3306组(Vector+Ro): 感染空载体对照慢病毒后加入5 μmol/L CDK1抑制剂Ro-3306[10]处理; DSN1过表达+CDK1抑制剂Ro-3306组(OE-DSN1+Ro): 感染*DSN1*过表达慢病毒后加入5 μmol/L CDK1抑制剂Ro-3306处理。

1.2.3 RT-qPCR分析 收集处理好的细胞, 使用TransZol试剂盒提取总RNA。采用微量紫外–可见分光光度计检测RNA浓度与纯度; 使用反转录试剂盒将提取的总RNA反转录合成cDNA。采用Universal Blue SYBR Green qPCR预混液在PCR仪上进行RT-qPCR检测。反应体系(总体积20 μL): 10 μL Universal Blue SYBR Green qPCR预混液(2×), 上下游引物各0.5 μL(终浓度为0.25 μmol/L), 2 μL cDNA模板, 用无核酸酶水补足至20 μL。扩增程序: 95 ℃预变性10 min; 然后95 ℃变性15 s、60 ℃退火/延伸1 min, 共40个循环; 最后进行熔解曲线分析(95 ℃变性15 s, 65 ℃退火/延伸1 min, 0.3 ℃/s递增至95 ℃)。采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算基因相对表达水平。以*GAPDH*作为内参基因。引物序列见表1。

1.2.4 蛋白质免疫印迹(Western blot) 收集处理后的细胞, 置于冰上, 使用蛋白提取试剂盒提取总蛋白。使用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度后, 经10% SDS-PAGE凝胶分离各蛋白样品, 并将其转印至PVDF膜。以DSN1(1:1 000)、GAPDH(1:5 000)、CDK1(1:1 000)、CCNB1(1:1 000)、PLK1(1:1 000)、PD-L1(1:1 000)、B7-H3(1:1 000)、CD47(1:1 000)一抗于4 ℃与膜孵育过夜; 次日, 二抗(1:500)室温孵育1 h。采用Odyssey红外荧光扫描成像系统采集蛋白条带, 利用ImageJ软件分析条带灰度。以GAPDH为内参。

1.2.5 CCK-8细胞增殖实验 将细胞以4 000/孔的密度接种于96孔板中, 按照1.2.2细胞分组的方法处理细胞, 分别处理24 h、48 h、72 h后, 每孔加入10 μL CCK-8试剂, 于37 ℃、5% CO_2培养箱中避光继

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名 Gene name	上游引物序列(5′→3′) Upstream primer sequences (5′→3′)	下游引物序列(5′→3′) Downstream primer sequences (5′→3′)
DSN1	TGA TCA CCA GCT GGA GAG CA	GCT TGG CCA AGC GTG TAG AT
PD-L1	TGG CAT TTG CTG AAC GCA TTT	TGC AGC CAG GTC TAA TTG TTT T
B7-H3	GGT GCC CTT CTT CAA CGT CA	AGA TGG TGA GGG TGG TGA TG
CD47	TCG CTG ATG ATG ATG AGG ACT	CAG GCT GGT GAA GGT GAT GT
GAPDH	GGA GTC CAC TGG CGT CTT CA	GGT TCA CGC CCA TCA CAA AC

续孵育1~2 h, 采用酶标仪检测450 nm波长处的吸光度(*D*)值。

1.2.6 克隆形成实验 6孔板中每孔接种1 000个细胞, 药物处理细胞48 h后弃去含药培养基, 更换为完全培养基, 继续培养12 d, 其间每隔2~3 d更换一次新鲜培养基。培养结束后, 弃去培养基, 用PBS漂洗2次, 加入4% PFA并于室温固定15~30 min; 弃去固定液, PBS漂洗后, 加入0.1%结晶紫染色液室温染色15~30 min; 染色后用流水缓慢冲洗去除多余染液, 室温自然干燥; 干燥后在正置生物显微镜下观察并拍照, 利用ImageJ软件统计细胞克隆数。

1.2.7 EdU实验 细胞按1.2.2分组处理完成后, 弃去培养液, 向各孔中加入含10 μmol/L EdU的完全培养基(用完全培养基按比例稀释EdU储存液配制, 现配现用), 于培养箱(37 ℃、5% CO_2)中继续孵育2 h进行EdU标记; 孵育结束后弃去含EdU的培养基, PBS洗1~2次(每次约5 min)以除去未掺入DNA的EdU。随后加入4% PFA并于室温固定15 min。固定后用洗涤液浸洗3次, 每次5 min; 加入含0.5% Triton X-100的通透液室温作用15 min, 洗涤后加入反应混合液, 于25 ℃避光反应30 min; 反应后彻底清洗(含1% BSA的PBS洗3~4次, 每次5~10 min)以降低背景。最后用DAPI(1 μg/mL)复染细胞核以标记全部细胞, 在荧光显微镜下并拍照, 利用ImageJ软件统计EdU阳性细胞比例。

1.2.8 划痕愈合实验 将各组细胞接种于6孔板中, 待细胞长至约90%融合时, 用无菌枪头在孔底垂直划一条直线, 用PBS洗去脱落细胞; 随后更换为含1%胎牛血清的低血清培养基并加入相应药物处理。划痕后0 h于正置生物显微镜下拍照记录初始划痕宽度, 继续培养至48 h再次于同一位置拍照。利用ImageJ软件测量各时间点划痕面积, 按以下公式计算划痕愈合率: $H=[(S_0-S_{48})/S_0]\times100\%$, 其中$H$表示划痕愈合率, S_0表示0 h划痕面积, S_{48}表示48 h划痕面积。

1.2.9 Transwell迁移侵袭实验 将5×10^4个处理后的细胞重悬于无血清培养基, 接种于Transwell上室; 下室加入含10%胎牛血清的培养基。培养48 h后, 对迁移至小室下侧的细胞用4% PFA于室温固定15~20 min, 固定后以0.1%结晶紫室温染色15~30 min, 于正置生物显微镜下计数。侵袭实验操作流程与迁移实验一致, 区别为: 上室接种细胞数量调整为1×10^5个, 小室预先铺有基质胶。

1.2.10 LDH细胞毒性实验 将效应$CD8^+$ T细胞与靶OS细胞按照2:1、3:1、5:1效靶比, 在37 ℃无血清培养基中共培养24 h。加入LDH细胞毒性检测试剂盒中的反应工作液于室温(约25 ℃)避光孵育30 min; 取条件培养基与试剂盒中的终止液混匀, 使用酶标仪检测490 nm波长处的*D*值并计算LDH活性。

1.2.11 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 将$CD8^+$ T细胞与OS细胞以5:1比例共培养48 h, 收集培养上清, 于4 ℃、1 000 ×*g*条件下离心10 min, 离心后取上清用于ELISA检测。按照IFN-γ、IL-10和Gzm-B的ELISA试剂盒说明书进行检测, 使用酶标仪测定450 nm波长处的*D*值。

1.2.12 免疫共沉淀(co-immunoprecipitation, Co-IP) 制备OS细胞裂解液, 将其与针对DSN1的特异性抗体在4 ℃条件下旋转摇床孵育过夜, 使抗体与目标蛋白充分结合。取部分裂解液作为Input样本; 剩余裂解液分为两份, 分别加入DSN1特异性抗体及同物种IgG阴性对照抗体, 4 ℃旋转摇床孵育过夜, 使抗体与靶蛋白充分结合。随后加入Protein A/G琼脂糖珠, 4 ℃继续旋转孵育2~4 h形成蛋白–抗体–琼脂糖珠免疫复合物。4 ℃、3 000 ×*g*离心5 min收集琼脂糖珠复合物, 使用非变性洗涤缓冲液充分洗涤沉淀; 洗涤完成后加入SDS蛋白上样缓冲液, 煮沸使蛋白复合物变性。短暂室温、12 000 ×*g*离心30 s后收集上清, 采用Western blot检测样本中DSN1、CDK1、CCNB1、PLK1蛋白表达情况, 分析DSN1与CDK1/CCNB1/PLK1是否存在蛋白相互作用。

1.2.13 数据分析 统计分析与绘图均使用GraphPad Prism 7软件完成。采用Shapiro-Wilk检验评估数据正态性, Levene检验评估方差齐性。数据采用均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组比较时, 正态分布且方差齐性样本采用Student-*t*检验; 多组比较中, 满足正态分布且方差齐的数据采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 并以Tukey-HSD法进行事后多重比较; 不满足正态分布或方差齐性则使用非参数Kruskal-Wallis检验, 事后检验采用Dunn多重比较检验。所有统计学检验均为双侧检验, $P<0.05$表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 DSN1在OS细胞中的表达情况

RT-qPCR与Western blot结果显示, 与hFOB细胞

相比，各OS细胞系(MG63、Saos2、U2OS、HOS、143B)中DSN1的基因及蛋白表达水平均显著升高(P<0.001, 图1A和图1B)。

后续使用HOS细胞进行*DSN1*敲低实验，MG63细胞进行*DSN1*过表达实验。在HOS细胞中，与NC相比，siNC组DSN1的基因和蛋白表达水平无明显变化；与siNC组相比，siDSN1组DSN1的基因和蛋白表达水平均显著下调(P<0.001)；siNC+TC11组DSN1的基因和蛋白表达水平较siNC组无明显改变；siDSN1+TC11组DSN1的基因和蛋白表达水平较siDSN1组无统计学差异(图1C和图1D)。在MG63细胞中，与NC相比，Vector组DSN1的基因和蛋白表达水平无明显变化；OE-DSN1组DSN1的基因及蛋白水平较Vector组显著上调(P<0.001)；与Vector组相比，Vector+Ro组DSN1的基因及蛋白水平无明显变化；OE-DSN1+Ro组DSN1的基因及蛋白水平较OE-DSN1组无显著差异(图1E和图1F)。

2.2 DSN1对OS细胞增殖能力的影响

CCK-8结果表明，OS细胞D值随着时间的延长也升高，72 h时，在HOS细胞中，siDSN1组细胞D值显著低于siNC组(P<0.001)；与siNC组相比，siNC+TC11组细胞D值显著升高(P<0.05)；siDSN1+TC11组细胞D值较siDSN1组明显上升(P<0.01, 图2A)。72 h时，在MG63细胞中，OE-DSN1组细胞D值高于Vector组(P<0.001)；与Vector组相比，Vector+Ro组细胞D值降低(P<0.05)；OE-DSN1+Ro组细胞D值较OE-DSN1组显著下降(P<0.01, 图2A)。

平板克隆实验结果显示，HOS细胞中siDSN1组克隆数显著少于siNC组(P<0.01)；siNC+TC11组克隆数显著多于siNC组(P<0.05)；siDSN1+TC11组克隆数较siDSN1组显著增加(P<0.001, 图2B)。MG63细胞中OE-DSN1组克隆数明显多于Vector组(P<0.001)；Vector+Ro组克隆数少于Vector组(P<0.05)；OE-DSN1+Ro组克隆数较OE-DSN1组显著减少(P<0.01, 图2B)。EdU染色结果显示，在HOS细胞中，与siNC组相比，siDSN1组EdU阳性细胞比例明显下降(P<0.001)；siNC+TC11组EdU阳性细胞比例较siNC组升高(P<0.05)；siDSN1+TC11组EdU阳性细胞比例较siDSN1组显著升高(P<0.001, 图2C)。在MG63细胞中，OE-DSN1组EdU阳性细胞比例较Vector组明显升高(P<0.001)；Vector+Ro组EdU阳性细胞比例较Vector组降低(P<0.05)；OE-DSN1+Ro组EdU阳性细胞比例相较于OE-DSN1组明显降低(P<0.05, 图2D)。

2.3 DSN1对OS细胞迁移及侵袭能力的影响

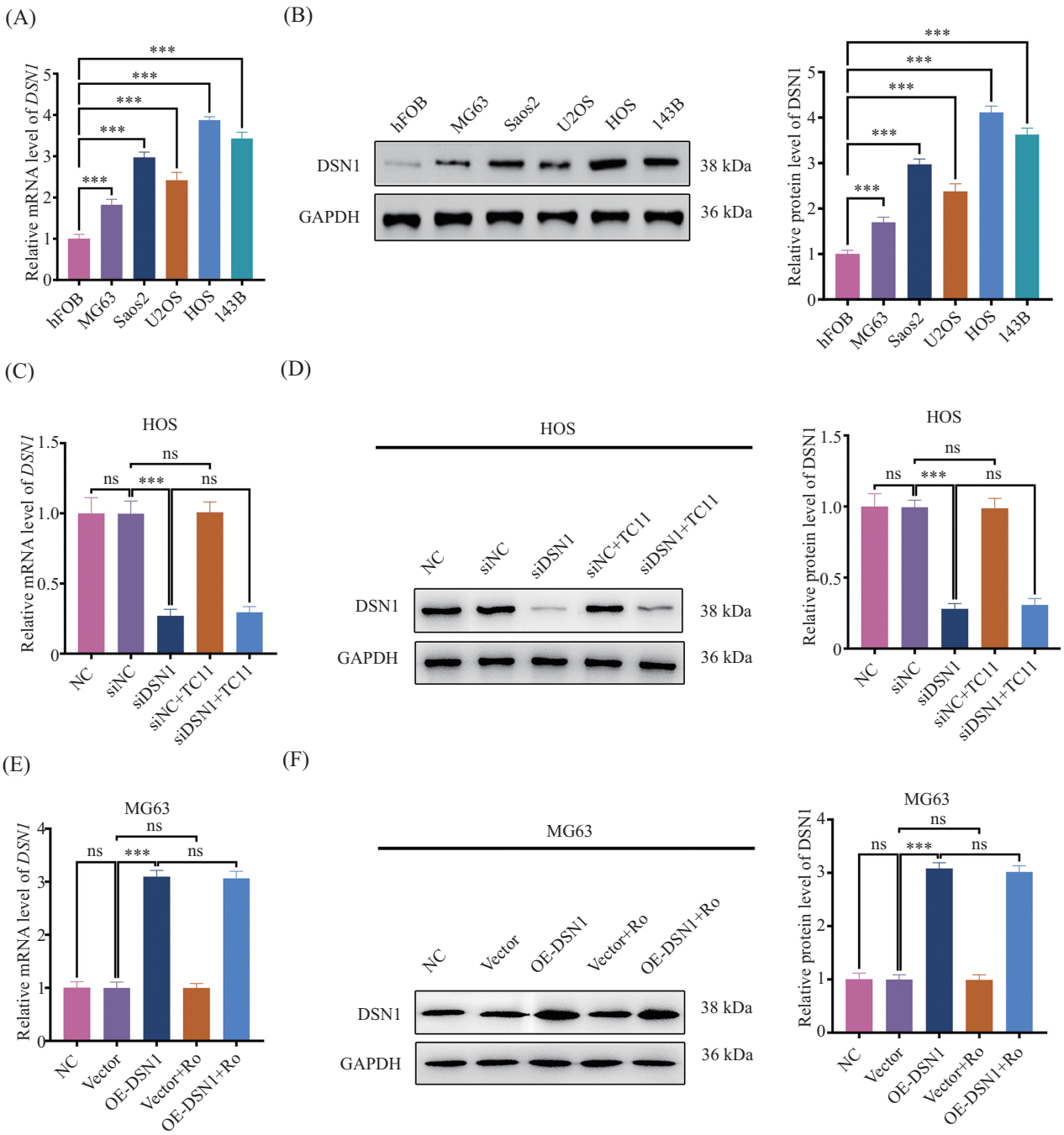
划痕愈合结果显示，在HOS细胞中，siDSN1组细胞伤口愈合率明显低于siNC组(P<0.001)；siNC+TC11组细胞伤口愈合率显著高于siNC组(P<0.05)；siDSN1+TC11组伤口愈合率较siDSN1组显著升高(P<0.001, 图3A)。在MG63细胞中，OE-DSN1组细胞伤口愈合率高于Vector组(P<0.01)；Vector+Ro组伤口愈合率低于Vector组(P<0.05)；OE-DSN1+Ro组伤口愈合率较OE-DSN1组明显降低(P<0.05, 图3B)。

Transwell迁移与侵袭染色结果显示，在HOS细胞中，siDSN1组迁移及侵袭细胞数较siNC组显著减少(P<0.001)；siNC+TC11组迁移及侵袭细胞数较siNC组显著增加(P<0.05)；siDSN1+TC11组迁移及侵袭细胞数相比于siDSN1组增加(P<0.01或P<0.001, 图3C和图3D)。在MG63细胞中，OE-DSN1组迁移、侵袭细胞数显著多于Vector组(P<0.01或P<0.001)；Vector+Ro组迁移、侵袭细胞数较Vector组显著减少(P<0.05)；OE-DSN1+Ro组穿过小室的迁移、侵袭细胞数较OE-DSN1组明显减少(P<0.05或P<0.01, 图3E和图3F)。

2.4 DSN1对OS细胞免疫逃逸相关分子表达的影响

RT-qPCR检测结果显示，在HOS细胞中，与siNC组相比，siDSN1组*PD-L1*、*B7-H3*、*CD47*的基因表达水平均显著下调(P<0.001)；与siNC组相比，siNC+TC11组*PD-L1*、*B7-H3*、*CD47*的基因表达水平均显著上调(P<0.05或P<0.01)；而siDSN1+TC11组*PD-L1*、*B7-H3*、*CD47*的基因水平较siDSN1组均显著升高(P<0.01或P<0.001, 图4A)。在MG63细胞中，与Vector组相比，OE-DSN1组*PD-L1*、*B7-H3*、*CD47*的基因表达水平均显著上调(P<0.001)；与Vector组相比，Vector+Ro组*PD-L1*、*B7-H3*、*CD47*的基因表达水平均明显下降(P<0.05或P<0.01)；与OE-DSN1组相比，OE-DSN1+Ro组*PD-L1*、*B7-H3*、*CD47*的基因表达水平均显著降低(P<0.01或P<0.001, 图4B)。

Western blot结果显示，PD-L1、B7-H3、CD47的蛋白表达变化趋势与RT-qPCR结果一致：在HOS细胞中，siDSN1组PD-L1、B7-H3、CD47水平较siNC组显著降低(P<0.001)；siNC+TC11组PD-L1、



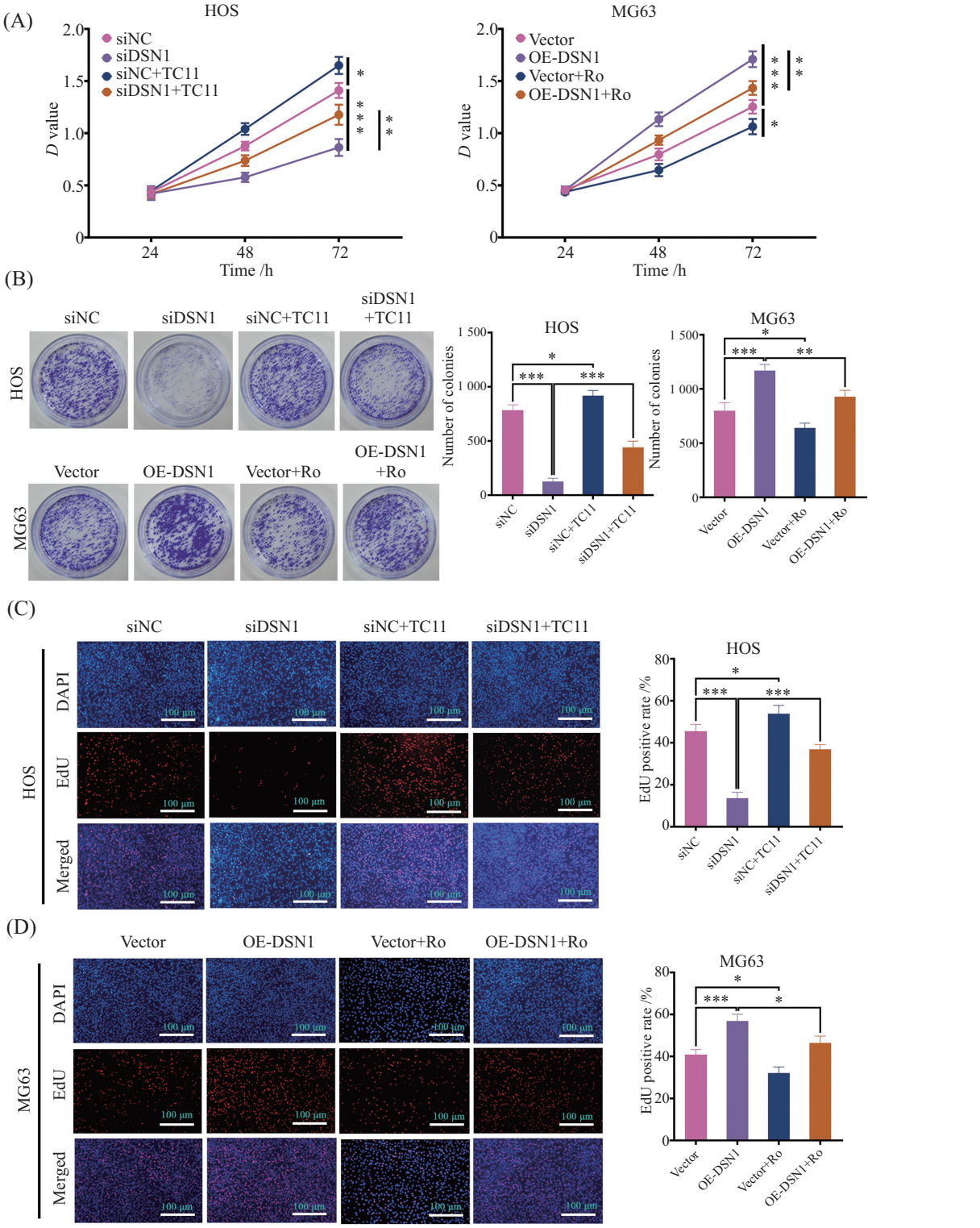
A: RT-qPCR检测OS细胞系(MG63、Saos2、U2OS、HOS、143B)中*DSN1*基因的表达情况; B: Western blot检测OS细胞系(MG63、Saos2、U2OS、HOS、143B)中DSN1蛋白表达水平; C: RT-qPCR检测HOS细胞中*DSN1*基因的表达情况; D: Western blot检测HOS细胞中DSN1蛋白表达水平; E: RT-qPCR检测MG63细胞中*DSN1*基因的表达情况; F: Western blot检测MG63细胞中DSN1蛋白表达水平。ns: 无显著差异; ***P<0.001。$\bar{x}\pm s$, n=3。

A: RT-qPCR was used to detect the mRNA expression of *DSN1* in OS cell lines (MG63, Saos2, U2OS, HOS and 143B); B: Western blot was used to determine the protein level of DSN1 in OS cell lines (MG63, Saos2, U2OS, HOS and 143B); C: RT-qPCR detection of *DSN1* mRNA expression in HOS cells; D: Western blot detection of DSN1 protein level in HOS cells; E: RT-qPCR detection of *DSN1* mRNA expression in MG63 cells; F: Western blot detection of DSN1 protein level in MG63 cells. ns: no significance; ***P<0.001. $\bar{x}\pm s$, n=3.

图1 DSN1在OS细胞中的表达情况

Fig.1 Expression of DSN1 in OS cell lines

B7-H3、CD47水平较siNC组显著升高(P<0.05或P<0.01); siDSN1+TC11组PD-L1、B7-H3、CD47水平较siDSN1组显著回升(P<0.001, 图4C和图4D)。在MG63细胞中, OE-DSN1组PD-L1、B7-H3、CD47水平较Vector组显著升高(P<0.001); Vector+Ro组PD-L1、B7-H3、CD47水平较Vector组显著降低(P<0.05

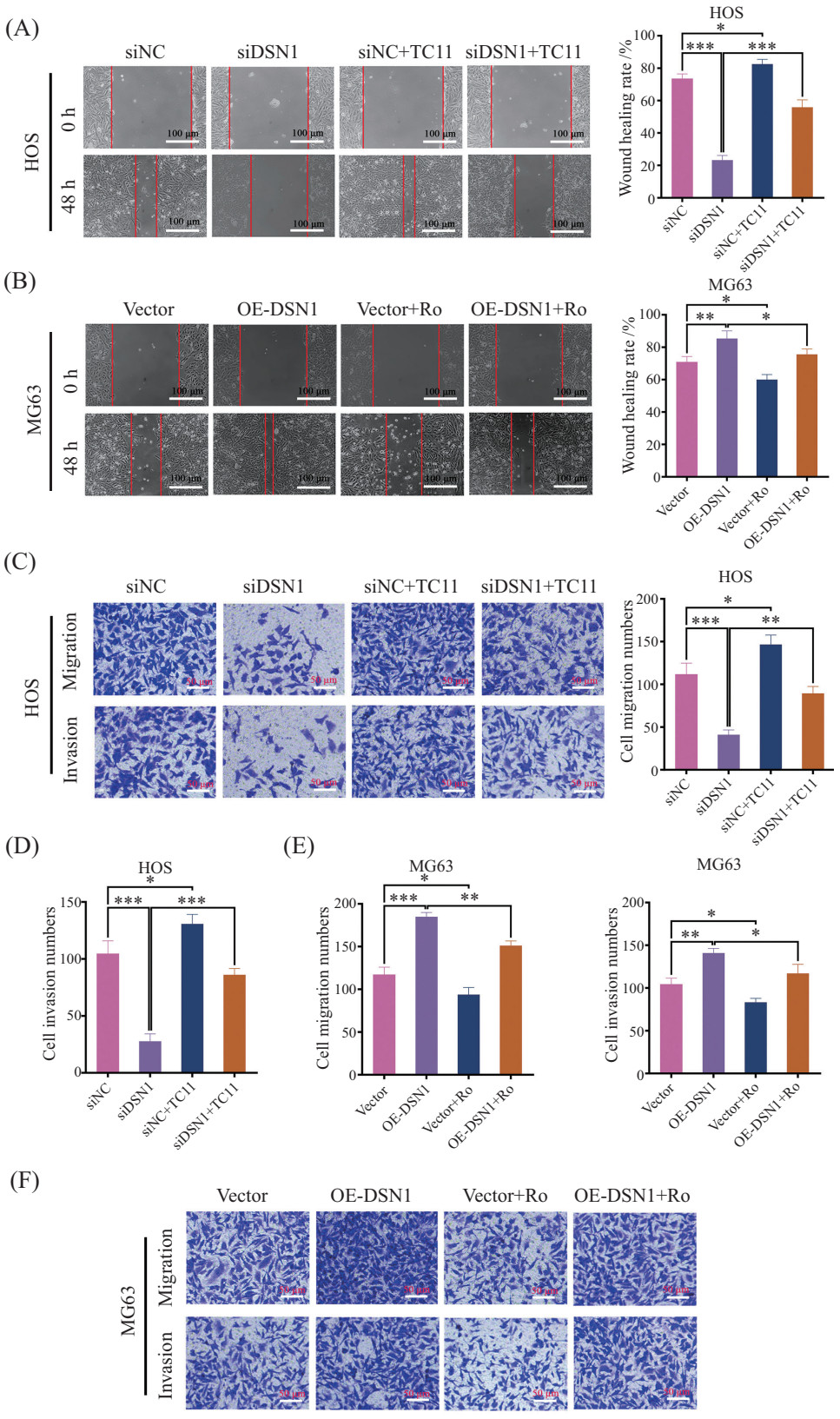


A: CCK-8法检测HOS和MG63细胞活力; B: HOS和MG63细胞克隆形成实验及克隆数统计; C: HOS细胞EdU实验(红色: EdU阳性细胞; 蓝色: 细胞核)及EdU阳性细胞比例统计; D: MG63细胞EdU实验(红色: EdU阳性细胞; 蓝色: 细胞核)及EdU阳性细胞比例统计。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。$\bar{x}\pm s$, n=3。

A: CCK-8 assay for cell viability in HOS and MG63 cells; B: colony formation assay and quantitative analysis of colony numbers in HOS and MG63 cells; C: EdU assay in HOS cells (red: EdU-positive cells; blue: cell nuclei) and quantitative analysis of the proportion of EdU-positive cells; D: EdU assay in MG63 cells (red: EdU-positive cells; blue: cell nuclei) and quantitative analysis of the proportion of EdU-positive cells. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. $\bar{x}\pm s$, n=3.

图2 DSN1对OS细胞增殖能力的影响

Fig.2 The effect of DSN1 on the proliferation of OS cells



A、B: HOS和MG63细胞划痕愈合实验及伤口愈合率分析; C~F: HOS和MG63细胞Transwell迁移侵袭实验及迁移、侵袭细胞数统计。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。$\bar{x}\pm s$, n=3。

A,B: wound healing assay and quantitative analysis of wound healing rate in HOS and MG63 cells; C-F: Transwell migration and invasion assays of HOS and MG63 cells, and quantification of migrated and invaded cell numbers. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. $\bar{x}\pm s$, n=3.

图3　DSN1对OS细胞迁移及侵袭能力的影响

Fig.3　The effects of DSN1 on migration and invasion of OS cells

或P<0.01或P<0.001); OE-DSN1+Ro组PD-L1、B7-H3、CD47水平较OE-DSN1组显著下降(P<0.01或P<0.001, 图4C和图4D)。

2.5 DSN1对CD8$^+$ T细胞免疫活性的影响

LDH释放实验结果显示, 在不同效靶比(CD8$^+$ T细胞:HOS或CD8$^+$ T细胞:MG63为2:1、3:1、5:1)条件下, HOS细胞中siDSN1组的LDH释放率显著高于siNC组(P<0.001); siNC+TC11组的LDH释放率显著低于siNC组(P<0.05或P<0.01); siDSN1+TC11组LDH释放率较siDSN1组明显下降(P<0.01或P<0.001, 图5A)。在MG63细胞中, 与Vector组相比, OE-DSN1组LDH释放率显著降低(P<0.001); Vector+Ro的LDH释放率显著高于Vector组(P<0.05或P<0.01); OE-DSN1+Ro组LDH释放率较OE-DSN1组回升(P<0.01或P<0.001, 图5A)。后续实验选用CD8$^+$ T细胞:HOS或CD8$^+$ T细胞:MG63为5:1的效靶比做实验, 是因为该比例下T细胞对OS细胞的杀伤效应最强、各干预组间LDH释放率差异最明显。

细胞因子检测结果表明, 在HOS共培养体系中, 与siNC组相比, siDSN1组IFN-γ、Gzm-B分泌水平升高, IL-10分泌水平降低(P<0.001); siNC+TC11组较siNC组IFN-γ、Gzm-B分泌水平降低, IL-10分泌水平升高(P<0.05); siDSN1+TC11组相较于siDSN1组, IFN-γ、Gzm-B分泌水平降低, IL-10分泌水平升高(P<0.01, 图5B)。在MG63共培养体系中, 与Vector组相比, OE-DSN1组IFN-γ、Gzm-B分泌水平显著降低, IL-10分泌水平升高(P<0.001); 与Vector组相比, Vector+Ro组IFN-γ、Gzm-B分泌水平显著升高, IL-10分泌水平降低(P<0.05); OE-DSN1+Ro组相较于OE-DSN1组, IFN-γ、Gzm-B分泌水平升高, IL-10分泌水平降低(P<0.01, 图5C)。

2.6 DSN1对OS细胞中CDK1/CCNB1/PLK1通路的影响

Western blot检测结果显示, 在HOS细胞中, 与siNC组相比, siDSN1组CDK1、CCNB1、PLK1蛋白表达水平明显降低(P<0.001); siNC+TC11组CDK1、CCNB1、PLK1蛋白表达水平较siNC组显著升高(P<0.05或P<0.01); siDSN1+TC11组较siDSN1组, CDK1、CCNB1、PLK1蛋白表达水平显著升高(P<0.01或P<0.001, 图6A和图6C)。在MG63细胞中, 相较于Vector组, OE-DSN1组CDK1、CCNB1、PLK1蛋白表达水平明显升高(P<0.001); Vector+Ro组CDK1、CCNB1、PLK1蛋白表达水平较Vector组显著降低(P<0.05或P<0.01); OE-DSN1+Ro组与OE-DSN1组相比, CDK1、CCNB1、PLK1蛋白表达水平显著下降(P<0.01或P<0.001, 图6B和图6D)。

2.7 DSN1与OS细胞中CDK1/CCNB1/PLK1通路相关分子的相互作用验证

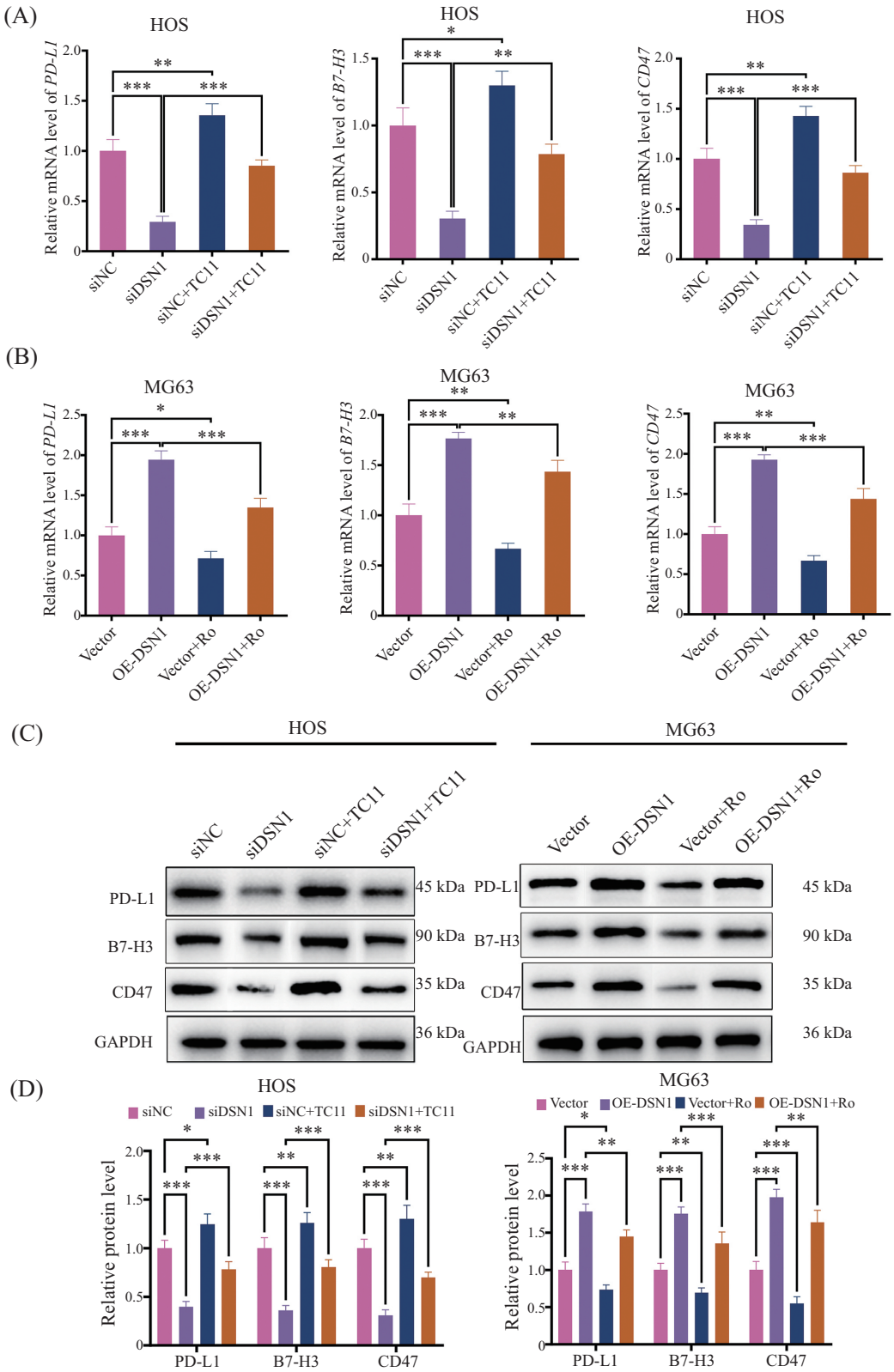
Co-IP检测HOS与MG63细胞中DSN1与CDK1、CCNB1、PLK1的蛋白相互作用, 结果显示, 在HOS及MG63两种OS细胞中, IgG对照组几乎未见明显条带; 而IP:DSN1复合物中均可检测到CDK1、CCNB1、PLK1蛋白, 提示DSN1与CDK1、CCNB1、PLK1在OS细胞内存在相互作用(图7A和图7B)。

3 讨论

OS是起源于骨的恶性间叶性肿瘤, 恶性程度高、早期易发生肺转移, 预后较差[11]。尽管手术联合新辅助化疗显著提高了患者的生存率, 但转移和复发仍是死亡主因[12]。染色体不稳定相关基因*DSN1*近年来被证实参与多种恶性肿瘤的发生发展[4,13]。本研究探讨了DSN1在OS中的表达及其通过CDK1/CCNB1/PLK1通路对细胞增殖、转移及免疫逃逸的影响。

本研究首先证实在多种OS细胞系中DSN1的基因及蛋白水平均显著高于正常成骨细胞hFOB, 且敲低或过表达*DSN1*可显著影响OS细胞的增殖、迁移、侵袭及免疫逃逸相关分子表达。既往生物信息学分析提示DSN1在OS组织中高表达, 体外实验证实DSN1可促进OS细胞增殖, 且主要参与细胞周期调控[6]。本研究从敲低与过表达两个维度进一步验证了上述结论, 并与之结果[14]类似。相关研究表明, DSN1在乳腺癌、结直肠癌、肝细胞癌和肉瘤等多种肿瘤中具有重要价值。在结直肠癌中, DSN1表达与淋巴结转移和Dukes分期呈正相关, 且富含丝氨酸/精氨酸的剪接因子9(serine/arginine-rich splicing factor 9, SRSF9)可通过m^{6}A相关机制稳定*DSN1* mRNA并促进结直肠癌进展[15]; 另有研究报道, DSN1在结直肠癌中显著上调表达且与较差总生存期相关, 敲低*DSN1*可抑制结直肠癌细胞迁移与侵袭并减少其体内转移[16]。上述结果与本研究在OS中的发现相吻合, 提示*DSN1*可能为多种上皮及间叶源性肿瘤共通的促癌基因。

本研究揭示, *DSN1*敲低可下调OS细胞中CDK1、CCNB1、PLK1蛋白表达, *DSN1*过表达则上调上述蛋白表达, 提示DSN1可能通过CDK1/CCNB1/PLK1

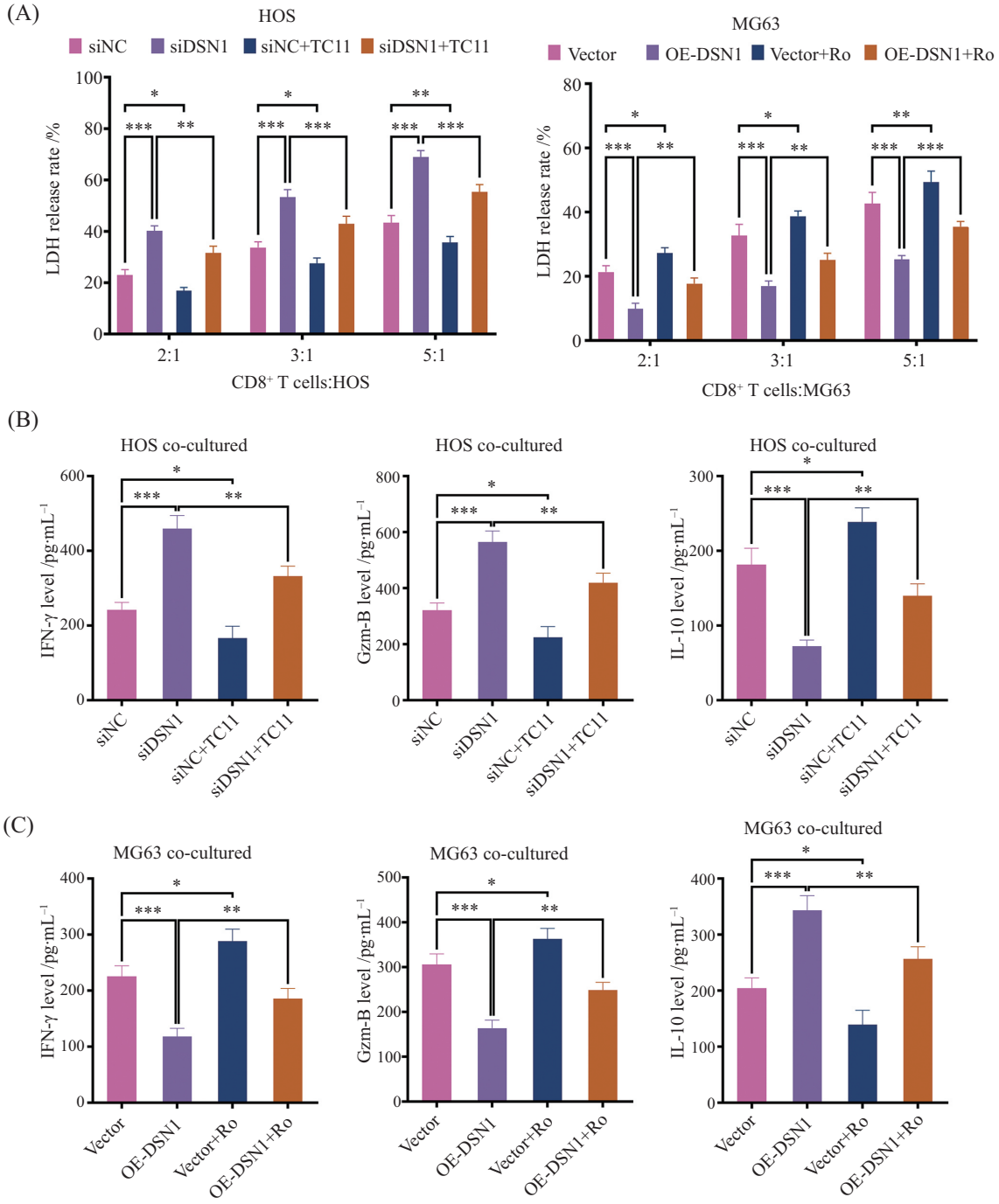


A、B: RT-qPCR分析HOS和MG63细胞中*PD-L1*、*B7-H3*、*CD47*的基因表达情况; C、D: Western blot分析HOS和MG63细胞中PD-L1、B7-H3、CD47的蛋白表达情况。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。$\bar{x}\pm s$, n=3。

A,B: RT-qPCR analysis of mRNA expression of *PD-L1*, *B7-H3* and *CD47* in HOS and MG63 cells; C,D: Western blot analysis of protein expression of PD-L1, B7-H3 and CD47 in HOS and MG63 cells. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. $\bar{x}\pm s$, n=3.

图4　DSN1对OS细胞免疫逃逸相关分子表达的影响

Fig.4　The effect of DSN1 on the expression of immune escape-related molecules in OS cells



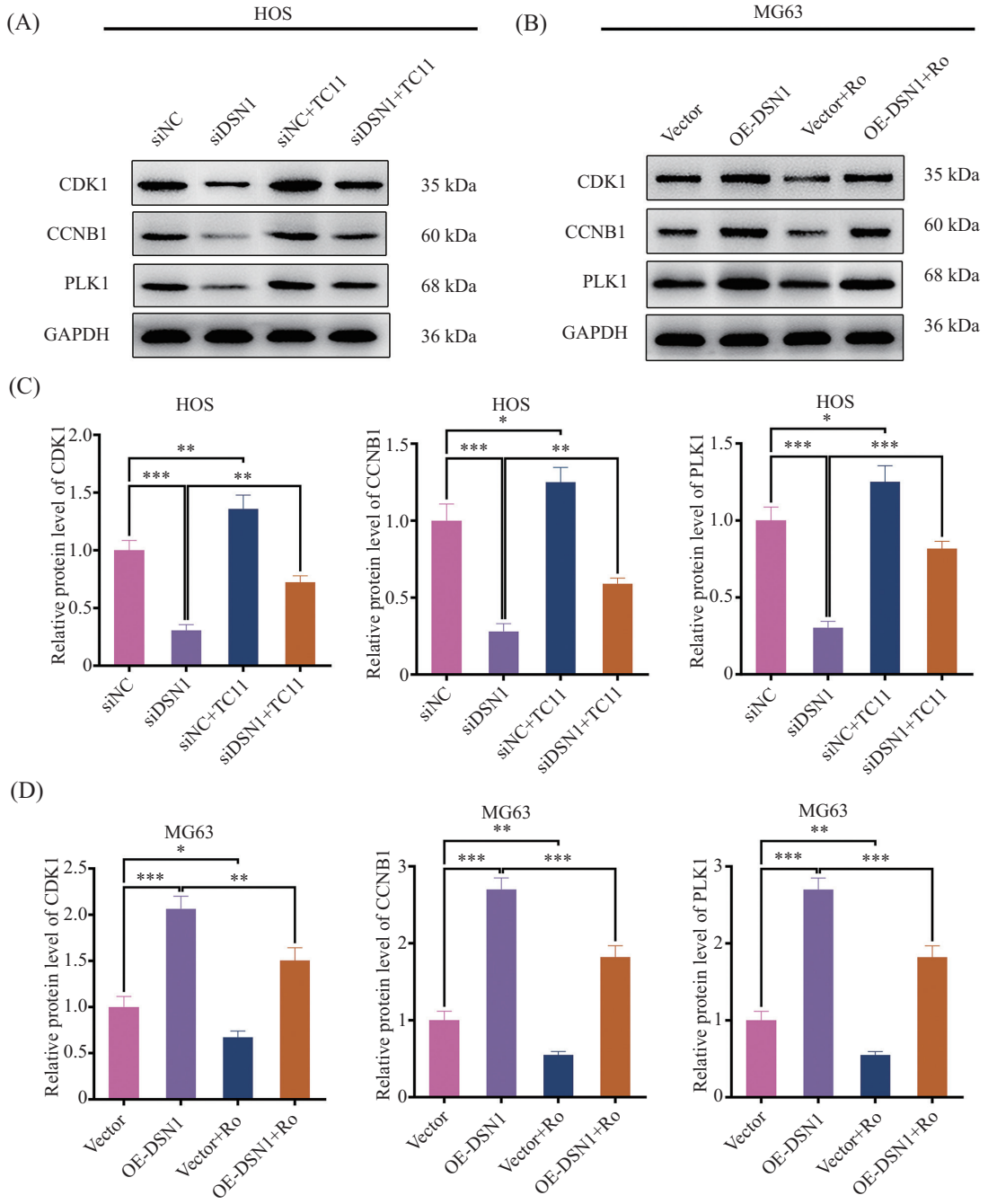
A: LDH释放实验; B、C: 共培养细胞中IFN-γ、Gzm-B、IL-10分泌情况。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。$\bar{x}\pm s$, n=3。

A: LDH release assay; B,C: secretion levels of IFN-γ, Gzm-B and IL-10 in co-cultured cells. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. $\bar{x}\pm s$, n=3.

图5 DSN1对CD8⁺ T细胞免疫活性的影响

Fig.5 The effect of DSN1 on the immune activity of CD8⁺ T cells

通路发挥促细胞增殖作用。Co-IP实验进一步从蛋白相互作用层面证实, DSN1可与CDK1、CCNB1、PLK1在OS细胞内发生结合, 提示DSN1与该通路相关分子之间存在物理相互作用。使用CDK1激活剂TC11可逆转*DSN1*敲低对CDK1、CCNB1、PLK1的抑制作用, CDK1抑制剂Ro-3306可阻断*DSN1*过表达的作用, 表明DSN1对OS恶性生物学行为的调控可能依赖于CDK1/CCNB1/PLK1通路的激活。CDK1与CCNB1结合调控G_2/M期转换, *PLK1*为该过程重要下游靶基因[17]。既往研究证实, CDK1可经磷酸化SPAT-1/BORA激活PLK1, 而PLK1又可通过CDC25激活CDK1, 二者形成正反馈, 这一正反馈对G_2/M检查



A~D: Western blot分析HOS和MG63细胞中CDK1、CCNB1、PLK1蛋白表达情况。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。$\bar{x}\pm s$, n=3。

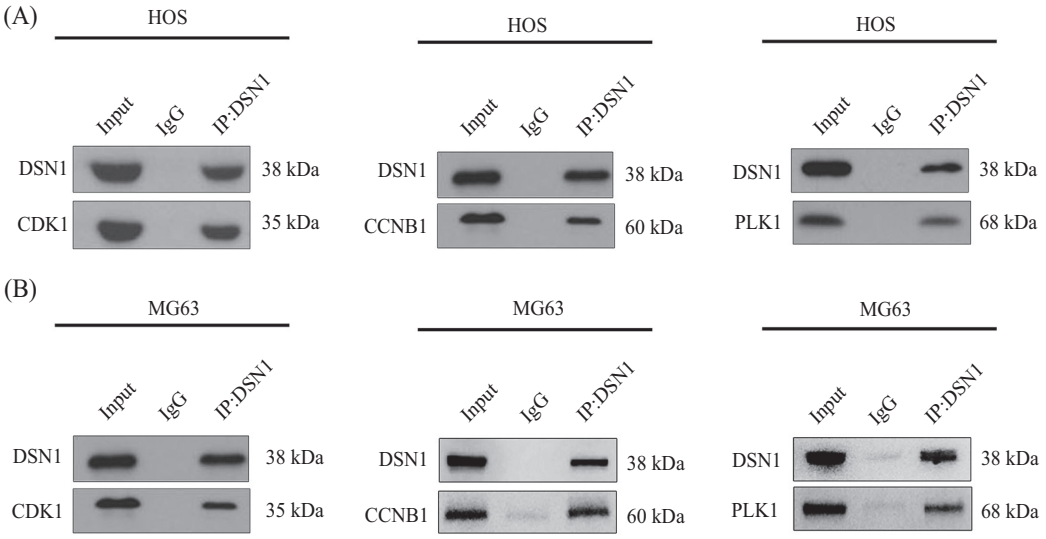
A-D: Western blot analysis of the protein expression of CDK1, CCNB1 and PLK1 in HOS and MG63 cells. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。$\bar{x}\pm s$, n=3.

图6　DSN1对OS细胞中CDK1/CCNB1/PLK1通路的影响

Fig.6　The effect of DSN1 on the CDK1/CCNB1/PLK1 pathway in OS cells

点恢复和有丝分裂至关重要[18-19]。本研究推测DSN1可能通过调控该通路上游事件影响细胞周期进程。Yi等[17]报道双氢青蒿素可通过靶向CDK1/CCNB1/PLK1信号通路抑制结直肠癌的发生与细胞周期进程; OS中*PLK1*过表达与预后不良相关, 敲低*PLK1*或使用抑制剂volasertib可抑制OS生长[20]。此外, 刘磊等[21]指出CCNB1高表达可促进OS细胞异常增殖与侵袭。上述证据支持CDK1/CCNB1/PLK1轴在OS增殖中的关键作用, 本研究将其与DSN1相联系, 为OS细胞周期失调机制提供了线索。

免疫逃逸是肿瘤恶性进展的重要环节。本研究观察到, 敲低*DSN1*可下调OS细胞免疫抑制分子PD-L1、B7-H3、CD47的基因及蛋白表达, 并恢复$CD8^+$ T细胞杀伤活性(LDH释放率升高, IFN-γ和Gzm-B



A、B: Co-IP检测HOS和MG63细胞中DSN1与CDK1、CCNB1、PLK1的蛋白相互作用。$\bar{x}\pm s$, n=3。

A,B: Co-IP assay was performed to detect the protein-protein interactions between DSN1 and CDK1, CCNB1, PLK1 in HOS and MG63 cells. $\bar{x}\pm s$, n=3.

图7 DSN1与OS细胞中CDK1/CCNB1/PLK1通路相关分子的相互作用验证

Fig.7 Verification of the interactions between DSN1 and CDK1/CCNB1/PLK1 pathway-related molecules in OS cells

分泌水平升高, IL-10分泌水平降低), 提示DSN1可能通过上调多种免疫检查点分子参与OS免疫逃逸。PD-L1是参与OS免疫逃逸的重要分子, OS中高表达的PD-L1可通过与PD-1结合抑制T细胞活性从而逃避免疫监视[22]; $CD8^+$ T细胞浸润密度与OS患者预后相关[23]。CD47作为先天免疫检查点在多种肿瘤表面过表达, 经与信号调节蛋白α(signal regulatory protein alpha, SIRPα)结合使肿瘤免于巨噬细胞吞噬, 为继PD-1/PD-L1后又一重要免疫逃逸机制及治疗靶点[24]。B7-H3在OS中亦有靶点价值, 有研究通过免疫组化分析发现OS样本中B7-H3表达水平最高[25]。本研究同时检测PD-L1、B7-H3、CD47三类分子并证实其均受DSN1调节, 提示DSN1可能从适应性免疫与先天性免疫两个层面参与OS的免疫逃逸, 这与DSN1可作为多种肿瘤免疫治疗潜在生物标志物的认识相一致[5]。

本研究仍存在一定局限性。其一, 本研究主要基于体外细胞实验, 尚未进行体内动物模型的验证, 无法在体内层面验证DSN1对OS细胞增殖转移以及肿瘤免疫微环境的调控效应; 其二, DSN1调控CDK1/CCNB1/PLK1信号通路与其免疫逃逸功能之间的直接分子联系尚需通过更精细的机制实验阐明; 其三, OS对免疫检查点抑制剂的耐药性仍是研究难点, DSN1是否参与其中亦值得探讨。此外, DSN1在OS患者组织中的表达及其与临床病理特征、预后的相关性尚待大样本临床验证。本研究中的$CD8^+$ T细胞共培养体系为异体来源细胞共培养, 存在一定异体反应背景, 后续可采用体内人源化免疫小鼠以规避该体系带来的潜在干扰。

综上, 本研究表明DSN1在OS细胞中高表达, 且可与CDK1、CCNB1、PLK1发生蛋白相互作用, 可能通过激活CDK1/CCNB1/PLK1信号通路促进OS细胞的增殖、迁移与侵袭, 并通过上调PD-L1、B7-H3、CD47等分子抑制$CD8^+$ T细胞功能而促进OS细胞的免疫逃逸; DSN1为OS诊断与治疗提供了实验依据。

参考文献 (References)

[1] Zheng S K, Luo M L, Huang H, et al. New insights into the role of mitophagy related gene affecting the metastasis of osteosarcoma through scRNA-seq and CRISPR-Cas9 genome editing [J]. Cell Communication and Signaling, 2024, 22(1): 592.

[2] Guo P, Li Y X, Huang J, et al. Therapeutic targeting of osteosarcoma and lung metastases in preclinical models using a CD24 antibody-drug conjugate [J]. Advanced Therapeutics, 2025, 8(6): 2400423.

[3] Duffaud F. Role of TKI for metastatic osteogenic sarcoma [J]. Current Treatment Options in Oncology, 2020, 21(8): 65.

[4] Zhou H R, Zhang M X, Lian J B, et al. DSN1 interaction with centromere-associated proteins promotes chromosomal instability in hepatocellular carcinoma [J]. Molecular Carcinogenesis,

2025, 64(2): 329-343.

[5] Xu D D, Zhang Y, Shen M Q, et al. A comprehensive analysis of the role of DSN1 in pan-cancer prognosis and immunotherapy [J]. Journal of Cancer, 2025, 16(8): 2449-2465.

[6] Li Q W, Liang J, Chen B. Identification of CDCA8, DSN1 and BIRC5 in regulating cell cycle and apoptosis in osteosarcoma using bioinformatics and cell biology [J]. Technology in Cancer Research & Treatment, 2020, 19: 1533033820965605.

[7] Yang W D, Wu X, Cai F H, et al. NFATc4 promotes lung adenocarcinoma progression via the CCNB1/CDK1 pathway and is a potential prognostic biomarker [J]. Cancer Science, 2025, 116(9): 2400-2412.

[8] 曹露, 李强, 王红丽. 艾司氯胺酮调节CDK1/CCNB1/PLK1信号通路对结肠癌细胞活性和移植瘤生长的影响[J]. 中国老年学杂志, 2026, 46(2): 347-352.

[9] Ichikawa D, Nakamura M, Murota W, et al. A phenylphthalimide derivative, TC11, induces apoptosis by degrading MCL1 in multiple myeloma cells [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2020, 521(1): 252-258.

[10] Huang Y, Fan Y L, Zhao Z Y, et al. Inhibition of CDK1 by RO-3306 exhibits anti-tumorigenic effects in ovarian cancer cells and a transgenic mouse model of ovarian cancer [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(15): 12375.

[11] Jian G G, Wang S, Wang X L, et al. Enhanced sequential osteosarcoma therapy using a 3D-printed bioceramic scaffold combined with 2D nanosheets via NIR-II photothermal-chemodynamic synergy [J]. Bioactive Materials, 2025, 50: 540-555.

[12] Lu Y B, Zhang J H, Chen Y T, et al. Novel immunotherapies for osteosarcoma [J]. Frontiers in Oncology, 2022, 12: 830546.

[13] Peng Q, Wen T Y, Liu D Y, et al. DSN1 is a prognostic biomarker and correlated with clinical characterize in breast cancer [J]. International Immunopharmacology, 2021, 101(Pt B): 107605.

[14] Pan J Y, Huang S H, Fu B D, et al. Bioinformatics and machine learning-based identification of cell cycle-related genes and molecular subtypes in endometrial cancer [PP/OL]. medRxiv (2024-11-28) [2026-09-09]. https://doi.org/10.1101/2024.11.27.24318050.

[15] Wang X Y, Lu X S, Wang P, et al. SRSF9 promotes colorectal cancer progression via stabilizing DSN1 mRNA in an m^6A-related manner [J]. Journal of Translational Medicine, 2022, 20(1): 198.

[16] Zhang C K, Yuan Z M, Hu H Q, et al. DSN1 promotes colorectal cancer metastasis by inhibiting FZR1-mediated ubiquitination of c-MYC [J]. Experimental Cell Research, 2026, 457(2): 114944.

[17] Yi Y C, Liang R, Chen X Y, et al. Dihydroartemisinin suppresses the tumorigenesis and cycle progression of colorectal cancer by targeting CDK1/CCNB1/PLK1 signaling [J]. Frontiers in Oncology, 2021, 11: 768879.

[18] Zhu M, Zhou S N, Zhang Y, Q et al. The cAMP-PKA signaling initiates mitosis by phosphorylating Bora [J]. Nature Communications, 2025, 16(1): 7898.

[19] El Dika M, Dudka D, Kloc M, et al. CDC6 as a key inhibitory regulator of CDK1 activation dynamics and the timing of mitotic entry and progression [J]. Biology, 2023, 12(6): 855.

[20] Wang R X, Wang D D, Bai X S, et al. Kinome-wide CRISPR-Cas9 knockout screens revealed PLK1 as a therapeutic target for osteosarcoma [J]. Cell Death Discovery, 2023, 9(1): 231.

[21] 刘磊, 刘夏丞, 高永昌. CCNB1、KIF23作为骨肉瘤的核心生物标志物的探索研究[J]. 临床医学进展, 2024, 14(5): 162-177.
Liu L, Liu X C, Gao Y C, et al. Exploration of CCNB1 and KIF23 as core biomarkers of osteosarcoma [J]. Advances in Clinical Medicine, 2024, 14(5): 162-177.

[22] 秦启顺, 王兴盛, 李楷, 等. 线粒体转移促进骨肉瘤细胞免疫逃逸: 机制与研究进展[J]. 协和医学杂志, 2025, 16(5): 1250-1259.
Qin Q S, Wang X S, Li K, et al. Mitochondrial transfer promotes immune escape in osteosarcoma cells: mechanisms and research advances [J]. Medical Journal of Peking Union Medical College Hospital, 2025, 16(5): 1250-1259.

[23] Chen Y, Yan W, Wang H Q, et al. The prognostic model established by the differential expression genes based on $CD8^+$ T cells to evaluate the prognosis and the response to immunotherapy in osteosarcoma [J]. Mediators of Inflammation, 2023, 2023: 6563609.

[24] 揭晓亮, 孔阳阳, 周光飚. CD47在肿瘤免疫逃逸中的作用及靶向治疗策略研究进展[J]. 四川大学学报(医学版), 2023, 54(3): 455-461.
Jie X L, Kong Y Y, Zhou G B, et al. Latest findings on the role of CD47 in tumor immune evasion and related targeted therapies [J]. Journal of Sichuan University (Medical Science Edition), 2023, 54(3): 455-461.

[25] Xie L, Chen C L, Liang X, et al. Expression and clinical significance of various checkpoint molecules in advanced osteosarcoma: possibilities for novel immunotherapy [J]. Orthopaedic Surgery, 2023, 15(3): 829-838.