

· 论著 ·

调控HER4-PI3K/Akt轴对骨肉瘤恶性生物学行为和干性表达的影响

马 琨 张 川*

河南省洛阳正骨医院病理科 (河南 郑州 450002)

【摘要】目的 探讨HER4基因操控对骨肉瘤细胞的恶性生物学特征和干细胞样特点的影响以及可能的机制。**方法** 用Qrt-PCR、western blotting方法分析HER4 mRNA以及蛋白水平。MTT法和集落形成法被用来评价MG-63细胞活性和增殖能力。短发夹RNA (shRNA)干扰预处理、菌落形成、迁移、侵袭和western blotting实验确定HER-4调节骨肉瘤细胞增殖和侵袭/迁移的机制。采用球形形成实验和CD133+细胞群检测HER-4诱导的干细胞样特征。**结果** HER4在骨肉瘤细胞中过表达。Sh-HER4表现出明显的细胞活力、集落形成和侵袭/迁移抑制能力。此外, HER4的敲除显著降低了CD133阳性细胞的球形大小和比例, 以及干细胞标志物的表达。从机制上看, HER4通过失活PI3K/AKT通路促进骨肉瘤进展。**结论** 综上所述, 这些结果表明HER4是骨肉瘤进展和干细胞调节的一个新靶点, 可能对开发治疗骨肉瘤的方法有价值。

【关键词】 HER4; 骨肉瘤; 入侵; 迁移; 具备干细胞特性; PI3K/Akt轴

【中图分类号】 R246.5

【文献标识码】 A

【基金项目】 洛阳市2020年度医疗卫生领域指导性科技计划项目(2040006A)

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2024.4.040

Effect of Mediating HER4/ PI3K/AKT Axis on Proliferation and Stemness Features of Osteosarcoma Cells

MA Kun, ZHANG chuan*

Department of Pathology, Luoyang Orthopaedic Hospital of Henan Province & Orthopaedic Hospital of Henan Province, Zhengzhou 450002, Henan Province, China

Abstract: Objective To investigate the role of HER4 in malignant proliferation and stemness features of osteosarcoma MG-63 cells. **Methods** Knockdown of HER4 in osteosarcoma cell lines was performed using sh RNA- HER4 (sh-HER4). Reverse transcription-polymerase chain reaction (Qrt-PCR) and Western blotting were employed to detect shRNA interference efficiency. The clone formation assay and MTT assay were used to investigate the proliferation of osteosarcoma MG-63 cells. The flow cytometry analysis was used to detect the ratio of CD133 positive cells. Mammosphere-formation analysis was used to determine self-renewal ability. Apoptosis and stemness-related proteins were detected by western blotting. **Results** HER4 is highly expressed in osteosarcoma cell lines ($P < 0.05$). Sh-HER4 blocked clone formation, cell viability, invasive cell numbers and wound healing. Sh-HER4 also downregulated spheroids numbers, CD133 positive cell ratios and downregulated Nanog, Sox-2, Oct3/4 levels. ($P < 0.05$). **Conclusion** These results suggest a novel role of HER4 in osteosarcoma progression indicating its potential as a therapeutic target for this disease.

Keywords: HER4; Osteosarcoma; Invasion; Migration; Stemness Features; PI3K/AKT Axis

骨肉瘤是最常见的多发于儿童和青少年的原发性恶性骨肿瘤^[1], 特点是梭形基质细胞直接形成骨组织。虽然辅助化疗和新辅助化疗在过去十年已经被引入, 但大多数(50-60%)的骨肉瘤患者在诊断时已经进展或转移^[2]。确定可靠和有效的骨肉瘤预后生物标志物是临床研究的迫切挑战和目标。

HER4是ErbB家族中广泛表达的唯一成员。在50-70%的肺癌^[3]、结肠癌^[4]和乳腺癌^[5]中发现了高水平的EGFR, 并被认为是可以促进细胞生命活动。有研究探讨了HER4水平与骨肉瘤^[6]进展的关系。然而, 到目前为止, 还没有关于HER4过活化对这类癌症的肿瘤发生和疾病侵袭性影响的全面系统研究。

本研究的目的是研究HER4是否代表了一个有前途的预防转移的新治疗靶点和一个潜在的骨肉瘤患者预后生物标志物。此外, 还研究了HER4基因敲除在细胞增殖、侵袭/迁移、EMT和干性调控中的生物学作用, 以及这些作用的分子基础, 为骨肉瘤靶向治疗提供新方向。

1 材料和方法

1.1 细胞培养 将MG-63细胞置于含10%胎牛血清, 1%青霉素, 1%链霉素的DMEM/F12培养基中, 于常温5%二氧化碳饱和度的箱中进行孵育, 以0.25%胰酶消化传代。

1.2 体外生长试验 采用MTT法测定体外培养的骨肉瘤细胞的生

长情况。将各因子作用后的MG-63细胞消化计数, 以 1×10^4 /mL的浓度在96孔板上进行培养。在37°C, 5%二氧化碳浓度的培养箱中温育, 在450 nm处用酶标仪测定。

1.3 构建 RNA干扰的慢病毒载体 常规种植U2OS/MG-63细胞到6孔板内, 37°C、5%CO₂的培养箱中过夜。根据Lipofectamine 2000转染说明书, 经转染24 h后更换新鲜的培养液, 嘌呤霉素筛选。HER4shRNA序列: HER4-#1 sense 5'-GATCCGCATTGGCACAGGATCATT GATT CAAGAGATCAATGAT CTTGT GCCAATGC TTTTGTG-3', antisense 5'-AATTCAAAAAAG CATTGG CACAGGATCATTGATCTCTT GAATCAATGATCCT GTGCCAATGCG-3'; HER4 #2 sense 5'-GATCCGGTCTCTGACAA CTGTAC AAAGTTCAAGA GACTTTG TACAGTT GTCAG GAC CTTTTTGTG-3', antisense 5'-AATTC AAAAA AGTCTCTGACAACGTG ACA AAGTC TCTTGAACCTTT GTA CAGTTG TCAGGACC G-3'; sh-control sense 5'-GATCCCGCAAACC CATGATT TACATTCAAGAGA TGTA AATCATGGGATGGGAT TTGCTT TTTA-3, antisense 5'-AGCTTAAAAGCAAATCC CATGATT TACATCTCT TGAATGTAAATCATGGG ATTT GC-3'。以上序列由上海吉玛公司构建合成。取对数生长期细胞, 用Lipofectamin TM2000试剂盒依据说明书进行。

【第一作者】 马 琨, 女, 主治医师, 主要研究方向: 骨肉瘤的基础研究。E-mail: makun0315@126.com

【通讯作者】 张 川, 男, 副主任医师, 主要研究方向: 骨肉瘤的研究。E-mail: 1614519832@qq.com

1.4 实时荧光定量PCR 按照逆转录仪的说明,使用 Trizol 试剂进行实时荧光定量 PCR。RNA反转录成 cDNA序列。参考该试剂盒的操作方法和反应条件用 GAPDH做内标物,用 2- $\Delta\Delta$ CT方法计算 mRNA的相对表达量;每组实验重复进行3次: HER4 forward: 5'-TTTCAAGGGTGCCAGTTTCG-3', HER4 reverse: 5'-GGGAGGCCAGCATCGTGTA-3';GAPDH上游引物序列:5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3',下游引物序列:5'-TGGTGAAGACGCCAGTGA-3'。

1.5 悬浮成球实验 在添加20 ng/mL人EGF、20 ng/mL人bFGF等的无血清DMEM/F12培养基赋予肿瘤细胞。经过1-2周培养,用显微镜对肿瘤球细胞数目观察并计算。

1.6 流式细胞术检测肿瘤干细胞表面标志物 待各处理组对数期细胞用0.25%胰蛋白酶消化,调整为 1×10^4 /mL的单细胞悬液。按照说明书分别添加抗体后常温孵育,用流式细胞仪测定。

1.7 Transwell侵袭实验 将各组处于对数生长期的细胞重悬后计数,调整为 1×10^4 /mL的浓度,Transwell小室分别接种100 μ L/孔。设置3个独立的复孔/组,在恒温培养箱培养24 h后取出Transwell小室,用常温PBS磷酸盐缓冲液将小室的内外壁冲洗3次,然后将适量甲醇和结晶紫倒入到未使用的24孔板,将小室置于24孔板中固定10 min,取出小室后漂洗两次,染色5 min;对穿膜的细胞计数,随机选取5个视野,求平均值。

1.8 划痕实验 选取处于对数生长期的MG-63细胞置入含有培养基的6孔板,在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂饱和度的培养箱中进行孵育。IPP软件测量划痕宽度,迁移指数以0h作为基准,SPSS19.0软件进行数据分析及作图。

1.9 Western blot 收集各组细胞,添加RIPA细胞裂解液,4 $^{\circ}$ C高速离心,取适量的总蛋白煮沸变性。以100 g/L的分离胶和50 g/L的浓缩胶进行电泳,每孔上样30 μ g蛋白样品。把凝胶放在缓冲液中室温检测显影。浸泡25 min后转膜。转膜结束后,将PVDF膜放在脱脂奶粉中室温封闭,加入特异性一抗HER-4、E-cadherin、Vimentin、GAPDH、CD133、OCT-4、Nanog、p-PI3K、p-AKT、caspase-3、 α -SMA、SOX2室温反应90 min,4 $^{\circ}$ C孵育过夜;加二抗(1:3000稀释)室温孵育60min,用ECL发光检测显影,凝胶成像系统拍照。

1.10 统计学处理 采用SPSS 21.0分析。单因素方差分析用于各组之间,t检验用于组间两两比较,检验水准 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 HER4在骨肉瘤细胞系中高表达 如图所示,与正常人成骨hFOB1.19细胞比较,骨肉瘤U2OS、MG-63、HOS及Saos2细胞系中的HER4 mRNA和蛋白印记水平表达均有不同程度的显著上调($P < 0.05$);在MG-63细胞系中上调最显著,因此后续实验采用MG-63细胞进行。

2.2 HER4基因的下调抑制了细胞增殖 促进了骨肉瘤的侵袭/迁移和EMT为了阐明HER4在骨肉瘤发展中的角色,sh-HER4#1、sh-HER4#2或sh-control分别转染MG-63细胞,并用于下调HER4的水平。

与sh-con组比较,sh-HER4#1、sh-HER4#2不同程度地降低MG-63细胞活力($P < 0.05$)。同时进行菌落形成实验以评估细胞增殖(图2AB)。HER4敲除抑制了集落形成($P < 0.05$),说明HER4表达能促进骨肉瘤MG-63细胞的活力。

侵袭和迁移在肿瘤进展过程中发挥着至关重要的作用。为确定HER-4是否与骨肉瘤细胞的迁移/侵袭相关,分别采用Transwell分析和创面闭合分析。如图2C-2F所示,sh-HER4#1、sh-HER4#2显著下调MG-63细胞的侵袭潜能($P < 0.05$)。同样,与对照相比,HER-4基因敲除显著抑制细胞迁移(图2HI)。

EMT是一个动态的生物学过程,最终导致转移和干细胞维持。与侵袭/迁移实验的结果一致,HER4沉默降低了MG-63细胞中基质金属蛋白酶2(MMP2)、 α -SMA和波形蛋白的水平,而E-cadherin的水平升高。

2.3 HER4增加骨肉瘤细胞的干细胞特性和CD133+亚群 HER4

敲除减少了超低附着板上球体的数量和体积(图3A、3B)。值得注意的是,HER4基因敲除也降低了细胞CD133+亚群(图3C、3D),并降低了干细胞标志物SOX2、NANOG和Oct4的表达。

2.4 PI3K/AKT通路促进了HER4介导的MG-63细胞的调控入侵/迁移 如图4A和4B所示,HER4下调显著降低了p-PI3K和p-AKT S473的表达。这一发现提示PI3K/mTOR信号通路可能参与了HER4介导的骨肉瘤进展的调节。我们加入了同样能有效抑制AKT S473磷酸化的特异性抑制剂LY294002,进一步研究PI3K/mTOR信号通路的作用。我们的结果证实,与sh-control组相比,sh-HER4明显降低细胞侵袭能力。值得一提的是,LY294002预处理降低了LY294002+sh-HER4组的侵袭能力。同样,LY294002显著加剧了sh-HER4抑制的MG-63细胞的迁移数量。LY294002+sh-HER4组球形体积更小,CD133阳性细胞比例减少。综上所述,这些发现表明HER4通过PI3K/mTOR通路调控骨肉瘤的发生和干性特征。

3 讨论

ErbB家族成员,包括HER4,过度活化促进骨肉瘤的发生发展,与预后差^[7]有关。然而,很少有研究探讨HER4对骨肉瘤进展的影响。

在本研究中,我们展示了与人成骨细胞hFOB1.19相比,HER4的蛋白和mRNA水平都明显增高。

虽然一些研究表明,敲除HER4可抑制骨肉瘤细胞的增殖和锚定非依赖性生长,但尚不清楚HER4是否调节了这些细胞的侵袭/迁移。如图2A-C所示,sh-HER4#1、#2不同程度抑制MG-63细胞的增殖和集落形成。Shi等人发现ETS同源因子通过调节HER2-4^[8]促进侵袭/迁移。在本研究中,sh-HER4降低了侵袭细胞的数量(图2F、2G),延缓了创面闭合(图2H、2I),同时减弱了EMT表型(图2J、2K)。这是首次证明HER4在骨肉瘤中促进细胞侵袭/迁移和EMT的证据。此外,EMT与癌细胞^[9]获得干细胞样特性有关。Wang等人报道,在前列腺癌细胞^[10]中,ErbB信号通路促进EMT和癌症干细胞样特征。Parris等发现过表达erbB-2可促进乳腺癌细胞^[11]的干性。与上述研究结果一致的是,我们观察到HER4敲除导致了更小的球体大小、CD133+比例的降低以及干性标记的表达降低(图3)。

据报道PI3K/AKT通路参与调节骨肉瘤的细胞增殖、侵袭/迁移和肿瘤发生^[12-14]。此外,PI3K/AKT通路在肝癌、肺癌和乳腺癌以及慢性髓系白血病中促进干细胞的维持^[15-17]。在本研究中,HER4基因敲除使p-PI3K和p-AKT表达下调。这些发现表明HER4有可能通过PI3K/AKT通路调控骨肉瘤的发展。使用特异性PI3K抑制剂LY294002预处理可增强sh-HER4诱导的PI3K/AKT通路的失活,放大sh-HER4的抑制增殖、侵袭和伤口闭合能力,进一步减少cd133阳性细胞的球形大小和数量。结果表明,HER4通过PI3K/AKT通路介导骨肉瘤细胞的增殖、侵袭/迁移和干细胞性的维持。

总之,我们的研究首次提供了强有力的证据,证明HER4通过PI3K-Akt信号通路增强侵袭/迁移和干性特征,从而促进骨肉瘤的发生和发展。然而,根据本研究的发现,HER4是骨肉瘤潜在的生物标志物和治疗靶点。

参考文献

- [1] Ottaviani G, Jaffe N. The epidemiology of osteosarcoma[J]. Cancer Treat Res, 2009, 152: 3-13.
- [2] PosthumaDeBoer J, Witlox MA, Kaspers GJ, et al. Molecular alterations as target for therapy in metastatic osteosarcoma: a review of literature[J]. Clin Exp Metastasis, 2011, 28(5): 493-503.
- [3] Harrison PT, Vyse S, Huang PH. Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2020, 61: 167-179.
- [4] Serrano PE, Carter DN, Li C, et al. Adjuvant chemotherapy with or without biologics including antiangiogenics and monoclonal antibodies targeting EGFR and EpCAM in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. J Surg Res, 2019, 239: 14-21.

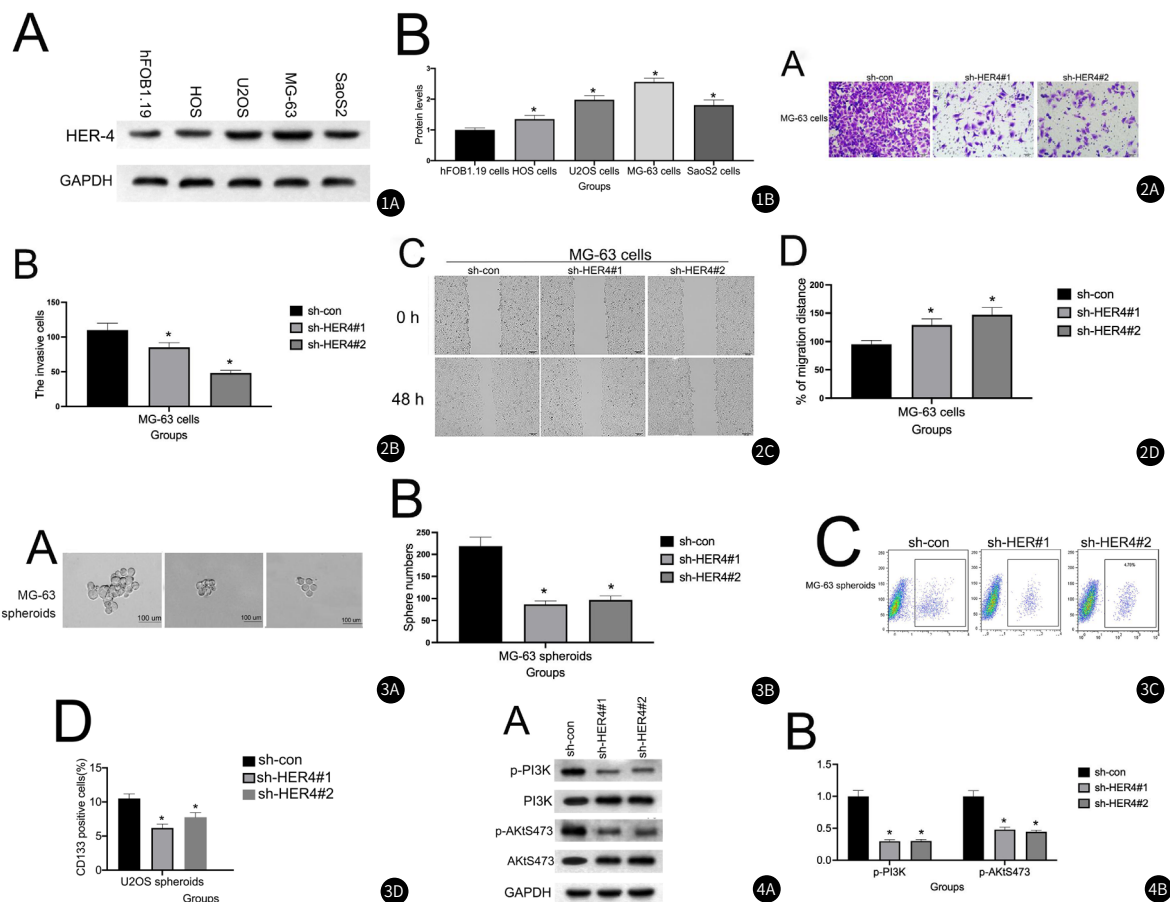


图1 HER-4在骨肉瘤细胞系中的表达。图1A和图1B: Western blot检测骨肉瘤各细胞系的HER-4蛋白水平; * $P < 0.05$ 与成骨hFOB1.19细胞相比。**图2** sh-HER4抑制细胞增殖和侵袭/迁移。(图2A~图2B) HER4基因的下调降低MG-63细胞的侵袭能力(放大倍数: $200\times$)。(CD) sh-HER4延缓MG-63细胞创面闭合。数据用三次独立实验的平均值 $\pm$ 标准差表示。*与sh对照组比较 $P < 0.05$ 。**图3** sh-HER4阻断骨肉瘤细胞的干性, 富集骨肉瘤细胞的CD133+亚群。(图3A~图3B) 转染sh-HER4后MG-63细胞球形缩小。细胞中形成的球的代表性显微照片。比例尺: $100\ \mu\text{m}$ 。(图3C~图3D) 流式细胞术分析球形细胞中CD133+细胞的百分比。*与sh对照组比较 $P < 0.05$ 。**图4** HER4在PI3K/mTOR信号通路中的作用。(图4A~图4B) western blotting检测磷酸化PI3K (p-PI3K)、p-AKT蛋白表达。*与sh-control组比较 $P < 0.05$ 。

- [5] Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer [J]. *Mol Oncol*, 2018, 12 (1): 3-20.
- [6] Yokokawa M, Morita KI, Oikawa Y, et al. Co-expression of EGFR and MET has a synergistic effect on the prognosis of patients with oral squamous cell carcinoma [J]. *J Oral Pathol Med*, 2020, 49 (1): 235-242.
- [7] Huang Z, Wang SL, Chen H, et al. Clinicopathological and prognostic values of ErbB receptor family amplification in primary osteosarcoma [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2019, 79 (8): 601-612.
- [8] Teng Y, Pi W, Wang Y, et al. WASF3 provides the conduit to facilitate invasion and metastasis in breast cancer cells through HER2/HER3 signaling [J]. *Oncogene*, 2016, 35 (35): 4633-4640.
- [9] Romano S, Tufano M, D'Arrigo P, et al. Cell stemness, epithelial-to-mesenchymal transition, and immunoevasion: intertwined aspects in cancer metastasis [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 60: 181-190.
- [10] Wang M, Ren D, Guo W, et al. N-cadherin promotes epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like traits via ErbB signaling in prostate cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2016, 48 (2): 595-606.
- [11] Parris AB, Zhao Q, Howard EW, et al. Buforin inhibits the stemness of erbB-2-overexpressing breast cancer cells and premalignant mammary tissues of MMTV-erbB-2 transgenic mice [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36 (1): 28-40.
- [12] Yu C, Zhang B, Li YL, et al. SIX1 reduces the expression of PTEN via activating PI3K/AKT signal to promote cell proliferation and tumorigenesis in osteosarcoma [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 105: 10-17.
- [13] Li C, Xu B, Miu X, et al. Inhibition of miRNA-21 attenuates the

- proliferation and metastasis of human osteosarcoma by upregulating PTEN [J]. *Exper Ther Med*, 2018, 15 (1): 1036-1040.
- [14] Zhu Y, Tang H, Zhang L, et al. Suppression of miR-21-3p enhances TRAIL-mediated apoptosis in liver cancer stem cells by suppressing the PI3K/Akt/Bad cascade via regulating PTEN [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 955-968.
- [15] Li B, Zhang J, Su Y, et al. Overexpression of PTEN may increase the effect of pemetrexed on A549 cells via inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway and carbohydrate metabolism [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20 (4): 3793-3801.
- [16] Liu L, Meng T, Zheng X, et al. Transgelin-2 promotes paclitaxel resistance, migration and invasion of breast cancer by directly interacting with PTEN and activating PI3K/Akt/ GSK-3 β pathway [J]. *Mol Cancer Ther*, 2019, 18 (12): 2457-2468.
- [17] Li L, Qi Y, Ma X, et al. TRIM22 knockdown suppresses chronic myeloid leukemia via inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Cell Biol Int*, 2018, 42 (9): 1192-1199.

(收稿日期: 2023-05-25)
(校对编辑: 韩敏求)