

- factors in fracture healing [J]. Prog Clin Biol Res, 1991 (365): 391-416.
- [3] 张衣北, 陈安民, 郭风劲, 等. Notch1 信号系统对骨髓干细胞增殖与分化调控作用的初步观察 [J]. 中华医学杂志, 2005, 85 (48): 3430-3434.
- [4] Zanotti S, Canalis E. Notch signaling in skeletal health and disease [J]. Eur J Endocrinol, 2013, 168 (6): 95-103.
- [5] Regan J, Long F. Notch signaling and bone remodeling [J]. Curr Osteoporos Rep, 2013, 11 (2): 126-129.
- [6] Bai S, Kopan R, Zou W, et al. Notch1 regulates osteoclastogenesis directly in osteoclast precursors and indirectly via osteoblast lineage cells [J]. J Biol Chem, 2008, 283 (10): 6509-6518.
- [7] Dong Y F, Jesse A M, Kohn A, et al. RBPjkappa-dependent Notch signaling regulates mesenchymal progenitor cell proliferation and differentiation during skeletal development [J]. Development, 2010, 137 (9): 1461-1471.
- [8] Hilton M J, Tu X, Wu X, et al. Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation [J]. Nat Med, 2008, 14 (3): 306-314.
- [9] Weber J M, Forsythe S R, Christianson C A, et al. Parathyroid hormone stimulates expression of the Notch ligand Jagged1 in osteoblastic cells [J]. Bone, 2006, 39 (3): 485-493.
- [10] Maillard I, Fang T, Pear W S. Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway [J]. Annu Rev Immunol, 2005, 23 (1): 945-974.
- [11] Lawal R A, Zhou X, Batey K, et al. The Notch ligand Jagged1 regulates the osteoblastic lineage by maintaining the osteoprogenitor pool [J]. J Bone Miner Res, 2017, 32 (6): 1320-1331.

• 基础研究 •

shRNA 沉默 c-myc 基因对 MG-63 骨肉瘤细胞 c-myc/PD-L1 轴的影响

厦门大学附属福州第二医院骨科 (福州 300007) 林东泽

【摘要】 目的 探讨 c-myc 与程序性死亡受体 1 (PD-1) /细胞程序性死亡-配体 1 (PD-L1) 基因在骨肉瘤细胞中的作用机制。方法 构建 c-myc 基因的 shRNA 表达载体并转染到 c-myc/PD-L1 高表达的 MG-63 骨肉瘤细胞中, 采用 Real-time PCR 及 Western blot 法检测不同组细胞 c-myc、PD-1、PD-L1 mRNA 和蛋白的表达。结果 沉默 c-myc 基因后 MG-63 骨肉瘤细胞中的 PD-1 蛋白表达量显著下降, c-myc、PD-L1 mRNA 和蛋白的表达量均呈现下降的趋势, 与阴性对照组和空白对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 沉默 c-myc 基因能够有效阻断 PD-1/PD-L1 信号通路。

【关键词】 c-myc; PD-L1; PD-1; 骨肉瘤

【中图分类号】 R3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2022)05-0133-03

骨肉瘤 (osteosarcoma) 是起源于骨的恶性肿瘤, 其发病率高、预后差、5 年生存率低, 给家庭、社会、国家带来了沉重的经济负担和精神伤害^[1]。c-myc (又称 myc) 是一个被广泛研究的原癌基因, 在人类所有肿瘤中, 30% 的患者存在 c-myc 基因过表达, 其编码的转录因子 c-myc 蛋白, 调控着数千个与细胞生长、增殖、分化以及代谢相关的基因^[2]。在许多肿瘤组织学中, c-myc 基因已被证明是肿瘤起始和维持所必需的, 有 c-myc 对整联素关联蛋白 (CD47) 和程序性死亡配体-1 (PD-L1) 表达的调节在 myc 驱动的肿瘤发生的起始和维持中具有直接作用^[3]。基于此, 本研究通过构建 c-myc 基因的 shRNA 表达载体并转染到 c-myc/PD-L1 高表达的 MG-63 骨肉瘤细胞中, 观察 MG-63 骨肉瘤细胞 c-myc、PD-1、PD-L1 mRNA 和蛋白的表达情况, 研究 c-myc 基因在骨肉瘤发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器: c-myc/PD-L1 高表达 MG-63 骨肉瘤细胞系 (福州市第二医院骨科研究所保存); pGenesil-1 质粒 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司]; lipofectamine

TM2000 转染试剂盒、TRAP 活性染色试剂盒、DMEM 培养基 (美国 sigma 公司); 质粒纯化试剂盒 (上海玉博生物科技有限公司)、胎牛血清 (美国 Invitrogen 公司); 恒温细胞培养箱 (上海岛韩实业有限公司); Western blot 电泳仪 (北京君意东方电泳设备有限公司); Western blot 相关试剂 (美国 Amresco 公司); Real-time PCR 相关试剂 (大连宝生物有限公司); ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪 (美国应用生物系统公司); Image pro Plus 7.0 图像分析系统 (美国 Media Cybernetics 公司); 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法:

1.2.1 c-myc 基因的 shRNA 载体的构建及鉴定: 根据 c-myc (GenBank 编号 NM-002467) mRNA 序列中可能的干扰位点, 由华大基因公司设计合成 1 条 shRNA 片段, 5' 端开始为 19 个核苷酸的正义链, 中间以 9 bp 的茎环 UUCAAGACG 分割反向重复序列, 形成发夹环状结构, 命名为 pC-myc 质粒, 其目的基因序列为 C-myc: AAGCCACAGCATACATCCTGT。同时, 设计合成一段与人基因不同源的 shRNA 片段作为阴性对照 pHK 质粒, 经 Blast Search 检索

确认合成的片段与 c-myc 以外的人类已知基因序列无同源性。选择携带增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 基因的真核表达质粒载体 pGenesil-1。T4 连接酶将 shRNA 片段定向克隆至事先已用核酸内切酶 BamH I 和 EcoR I 双酶切过的表达载体 pGenesil-1, 获得 shRNA c-myc 的重组表达载体及阴性对照重组载体 (pHK)。取 DH5a 感受态细胞置于冰浴中, 待完全化冻后轻轻混匀, 注意动作应轻缓, 以防止细胞破裂。分别取 10 μ L c-myc shRNA 及 pHK 加入到含有 100 μ L DH5a 感受态细胞悬液的离心管中, 轻轻混匀后置于冰浴 30 min。随后将离心管转移至 42 $^{\circ}$ C 水浴中热激 90 s, 然后快速转移至冰浴中冷却 2 min。随后往离心管中加入 600 μ L 不含抗生素的 LB 培养基, 轻轻混匀后置于 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中振荡培养 1 h, 使菌体复苏并表达质粒上的抗生素抗性基因。取上述制好的 DH5a 感受态细胞悬液均匀涂布于含氨苄青霉素抗性的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱培养 24 h, 随后分别从不同培养皿上挑取单克隆菌落接种于含 Amp 抗性的 10 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床培养 24 h, 用质粒纯化试剂盒提取质粒, 送华大基因公司进行测序鉴定, 结果表明插入片段的序列大小, 位点和方向与设计的片段完全一致, 表明成功构建 shRNA c-myc 的重组表达载体及阴性对照重组载体 (pHK)。

1.2.2 c-myc/PD-L1 高表达 MG-63 骨肉瘤细胞的分组及表达载体的转染: 收集处于对数生长期的 c-myc/PD-L1 高表达 MG-63 骨肉瘤细胞, 分为 c-myc 沉默组 (pC-MYC 细胞组)、阴性对照组 (pHK 细胞组)、空白对照组 (c-myc/PD-L1 高表达 MG-63 骨肉瘤细胞组)。按照组别分别转染 shRNA c-myc、pHK 及未做处理的 c-myc/PD-L1 高表达 MG-63 骨肉瘤细胞。转染方法、剂量及转染程序均按照转染试剂盒操作说明书进行。培养得到稳定的转染细胞系后, 收集细胞, 提取蛋白, 采用 Real-time PCR 及 Western blot 分别检测 c-myc、PD-1、PD-L1 mRNA 及蛋白的相对表达量。

1.2.3 Real-time PCR 检测不同组细胞 c-myc、PD-1、PD-L1 的 mRNA 的表达: 样品扩增条件如下。逆转录 1 个循环, 50 $^{\circ}$ C, 40 min; 预变性 1 个循环, 95 $^{\circ}$ C, 6 min; 95 $^{\circ}$ C, 30 s 变性后以 57 $^{\circ}$ C 退火延伸 50 个循环, 在 57 $^{\circ}$ C 时采集荧光信号。引物序列 (由华大基因公司合成) 如下: c-myc 上游引物 5'-AATCCAGCGGTGATAGCTT-3', 下游引物 5'-ATTCAATCATGCCTACGCT-3'; PD-1 上游引物 5'-CAGGAACCTTACG-3', 下游引物 5'-AATCATAGCCAT-3'; PD-L1 上游引物 5'-GATGCATTGATCCACAATG-3', 下游引物 5'-TCAATGCCGTACCTGCATA-3'。反应在 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪上进行, 每组实验重复 3 次。

1.2.4 Western blot 检测不同组细胞 c-myc 及 PD-L1 的蛋白表达: 收集不同组转染后细胞, 加入 200 μ L 细胞裂解液, 冰浴 30 min, 收集细胞碎片及裂解产物并转移至 1.5 mL Eppendorf 管中。随后转入高速冷冻离心机中, 15 000 rpm、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min 后吸取上清液, 采用 BCA 试剂盒测定蛋白总量。行 SDS-PAGE 电泳后采用电转膜法将蛋白转移至 PVDF 膜上, 经洗膜和封闭后依次加入一抗 Anti-p-c-myc、Anti-p-PD-1、Anti-p-PD-L1, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 按 1:5 000 稀

释比例加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 继续室温孵育 1 h, 经历 TBST 3 次漂洗后采用 ECL 化学发光法检测并拍摄图像进行半定量分析。

1.3 统计学方法: 使用 SPSS 20.0 统计学软件对结果进行分析。结果以均数 \pm 标准差表示, 组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为结果有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组细胞 c-myc、PD-1、PD-L1 的 mRNA 表达: 结果见图 1 和表 1, 与阴性对照组和空白对照组相比, c-myc 沉默组的 PD-1 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), c-myc、PD-L1 mRNA 表达水平显著下降 ($P < 0.05$), 阴性对照组和空白对照组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

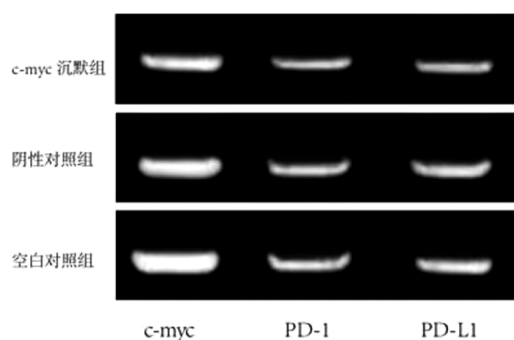


图 1 不同组 c-myc、PD-1、PD-L1 的 mRNA 的相对表达

表 1 不同组 c-myc、PD-1、PD-L1 的 mRNA 的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	c-myc	PD-1	PD-L1
c-myc 沉默组	1.387 \pm 0.138*#	2.035 \pm 0.112	1.262 \pm 0.104*#
阴性对照组	1.853 \pm 0.112	1.934 \pm 0.138	1.934 \pm 0.138
空白对照组	1.985 \pm 0.172	2.044 \pm 0.215	2.044 \pm 0.215

注: 与阴性对照组比较, * $P < 0.05$; 与空白对照组比较, # $P < 0.05$ 。

2.2 不同组细胞 c-myc、PD-1、PD-L1 的蛋白表达: 结果见图 2 和表 2, 与阴性对照组和空白对照组相比, c-myc 沉默组的 c-myc、PD-1、PD-L1 蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.05$), 阴性对照组和空白对照组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

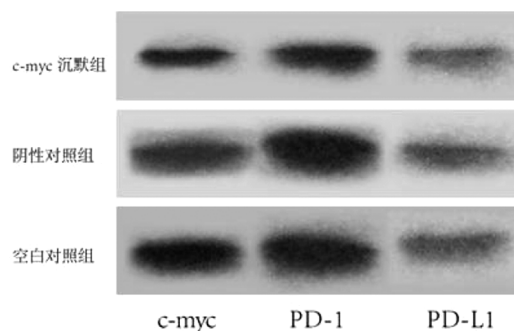


图 2 不同组 c-myc、PD-1、PD-L1 的蛋白相对表达

表 2 不同组 c-myc 及 PD-L1 的蛋白相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	c-myc	PD-1	PD-L1
c-myc 沉默组	0.897±0.037*#	1.368±0.224*#	1.053±0.219*#
阴性对照组	1.953±0.120	2.116±0.153	1.957±0.144
空白对照组	1.985±0.172	2.264±0.215	2.043±0.203

注：与阴性对照组比较，* $P < 0.05$ ；与空白对照组比较，# $P < 0.05$ 。

3 讨论

骨肉瘤 (osteosarcoma) 作为一种起源于骨的恶性肿瘤，多年来其发病率在原发性骨恶性肿瘤中居高不下。近 30 年，医学工作者开展了大量的临床实验以探索骨肉瘤治疗的新方法，但无论是增大化疗的密度以提高化疗的反应性，还是对化疗反应不佳的患者更改化疗方案，都没有显著提高患者的总生存率，所以 MAP (甲氨喋呤、多柔比星、顺铂) 的治疗方案沿用至今^[4-5]。其主要原因在于未能全面了解骨肉瘤细胞的发生、增殖、发育、转移与凋亡中各条信号通路所起的作用及作用机制，因此对于改善骨肉瘤的产生、发展及改善预后缺少基础性理论依据^[6]。

在肿瘤的演变过程中，癌细胞通常会经历一个免疫编辑的过程，从而允许肿瘤细胞通过建立免疫抑制环境和/或避免免疫细胞的识别来躲避免疫监视机制^[7]。PD-1、PD-L1 作为重要的免疫检查点，在肿瘤免疫逃避过程中具有重要作用，其与受体 PD-1 的结合可传递抑制信号，抑制 T 细胞的活化与增殖，同时肿瘤表面的 PD-L1 能降低 CD8⁺ T 细胞的细胞毒性作用。因此，PD-1/PD-L1 通路被认为是有效的肿瘤治疗靶点，其阻断 PD-1/PD-L1 通路，在黑色素瘤、肺癌等肿瘤中已经取得了显著的临床疗效^[8]。有研究表明 c-myc 对 CD47 和 PD-L1 表达的调节在 myc 驱动的肿瘤发生的起始和维持中具有直接作用，其进一步还发现 c-myc 直接绑定于小鼠 T 细胞 PD-L1 基因启动子上；而在骨肉瘤 U2OS 细胞中，c-myc 基因致癌水平可与 PD-L1 的启动子结合，而低水平的 c-myc 基因表达则无法结合 PD-L1 启动子，抑制 myc 迅速导致 CD47 和 PD-L1 的 mRNA 和蛋白质表达下降，这提示了该机制发生于转录调控水平^[9]。Casey 等^[10]也发现 c-myc 可通过结合肿瘤细胞中的 CD47/PD-L1 启动子区促进其表达，进而调节肿瘤免疫微环境和抗肿瘤反应，因此可以推断 c-myc 的过度表达可能是肿瘤细胞上调免疫检查点调节剂表达，从而逃避免疫监视的一种普遍机制。

本研究通过构建 c-myc 基因的 shRNA 表达载体并转染到 c-myc/PD-L1 高表达的 MG-63 骨肉瘤细胞中，观察 MG-63 骨肉瘤细胞 c-myc、PD-L1 mRNA 和蛋白的表达情况，结果表明沉默 c-myc 基因后 MG-63 骨肉瘤细胞中的 c-myc、PD-L1 的 mRNA 和蛋白的表达量均呈现下降的趋势，与阴性对照组和空白对照组相比差异有统计学意义，说明沉默 c-myc 基因能够有效阻断 PD-1/PD-L1 信号通路。2021 年黄杰中和陈敬恒等^[11]检测了骨肉瘤患者与骨良性瘤患者组织内

的 c-myc 蛋白及凋亡抑制因子 [B 淋巴细胞瘤-2 基因 (Bcl-2)、核因子 κ B (NF- κ B)、TNF 受体超族 (Fas) 及 Livin]、凋亡促进因子 [半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶-3 (Caspase-3)、Caspase-8 及兔抗人单克隆抗体 (Bax)] 的表达情况，结果表明骨肉瘤组织 c-myc 蛋白显著高于对照组，这与本研究结果是一致的。Zheng 等^[12]使用 PD-1 和抗 PD-L1 阻断疗法来治疗骨肉瘤小鼠模型，结果表明相较于采用生理盐水注射的对照组，实验组的骨肉瘤人源小鼠模型更不容易发生肺转移。因此，我们接下来将继续研究 c-myc、PD-1/PD-L1 信号通路与骨肉瘤细胞增殖、凋亡、迁移以及侵袭能力的关系，以期能阐明 c-myc 调控 PD-L1 的具体分子生物学机制。

参考文献

- [1] Smith M A. Outcomes for children and adolescents with cancer: challenges for the twenty-first century [J]. J Clin Oncol, 2010, 28 (15): 2625-2634.
- [2] McKeown M R, Bradner J E. Therapeutic strategies to inhibit MYC [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2014, 4 (10): 12-18.
- [3] 翁克贵, 蒋勇, 王颖. 干扰 c-myc 基因表达增强胰腺癌细胞对吉西他滨和卡铂的敏感性 [J]. 肿瘤药学, 2017, 7 (3): 273-277.
- [4] 赵迎春, 冯娥, 田云云. 骨肉瘤的免疫检查点及其抑制剂应用的研究进展 [J]. 广西医学, 2020, 42 (7): 891-894.
- [5] 林泽鑫, 林欣. 免疫检测点抑制剂及其生物标志物在晚期实体肿瘤中的研究进展 [J]. 中国实用医药, 2019, 14 (2): 190-193.
- [6] 周灵, 谢琳, 廖治丹, 等. 骨肉瘤转移机制研究进展 [J]. 中华转移性肿瘤杂志, 2019, 2 (3): 55-59.
- [7] Wang O, Yang F, Liu Y, et al. C-MYC-induced upregulation of lncRNA SNHG12 regulates cell proliferation, apoptosis and migration in triple-negative breast cancer [J]. Am J Transl Res, 2017, 9 (2): 533-545.
- [8] 施锦涛, 张凯, 张芮浩, 等. PD-1/PD-L1 轴与骨肉瘤治疗研究进展 [J]. 解放军医学杂志, 2021, 46 (1): 89-94.
- [9] Shimizu T, Fuchimoto Y, Fukuda K, et al. The effect of immune checkpoint inhibitors on lung metastases of osteosarcoma [J]. J Pediatr Surg, 2017, 52 (12): 2047-2050.
- [10] Casey S C, Tong L, Li Y, et al. MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1 [J]. Science, 2016, 352 (6282): 227-231.
- [11] 黄杰中, 陈敬恒. c-myc 蛋白及凋亡抑制、促进因子在骨肉瘤中的检测价值探究 [J]. 中国医学创新, 2021, 18 (9): 138-142.
- [12] Zheng B, Ren T, Huang Y, et al. PD-1 axis expression in musculoskeletal tumors and antitumor effect of nivolumab in osteosarcoma model of humanized mouse [J]. J Hematol Oncol, 2018, 11 (1): 16.