

• 基础研究 •

血管生成素-2 在大鼠骨肉瘤细胞中的表达及调控的研究

福建医科大学省立临床医学院 福建省立医院骨一科 (福州 350001) 郭徽灵 胡世平 汤发强 吴 宏 郑建章

【摘要】 目的 观察血管生成素-2 (Ang-2) 在大鼠骨肉瘤建模中不同时期的表达及其对骨肉瘤细胞的调控作用。方法 20 只大鼠股骨下段注射 MG63 骨肉瘤细胞, 成瘤后分为 5、10、15、20 d 组, 5 只股骨下段注射等量生理盐水的大鼠为对照组。测定各组大鼠血清 Ang-2 含量, 并对成瘤行免疫组化染色证实。构建敲减 Ang-2 基因表达的 shRNA 慢病毒载体, 转染至培养的 MG63 骨肉瘤细胞中, 观察对骨肉瘤细胞周期及凋亡的影响。结果 实验组血清 Ang-2 在 4 个不同阶段均较对照组明显升高, 其中 10 d 组上升幅度最大 (P 值均 <0.05); 免疫组化染色发现, 成瘤 10 d 组 Ang-2 表达阳性细胞数最高, 且与血清测定结果相符; 抑制 Ang-2 表达使骨肉瘤细胞分裂阻滞在 G_1 期, 并增加细胞凋亡 ($P < 0.05$)。结论 Ang-2 与骨肉瘤发生发展关系密切, 可能成为骨肉瘤早期诊断及潜在治疗的一个新的参考指标。

【关键词】 血管生成素-2; 骨肉瘤; 大鼠模型; 细胞调控

【中图分类号】 R738.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2021)02-0135-04

Study on the expression and regulation of angiopoietin-2 in rat osteosarcoma cells GUO Huiling, HU Shiping, TANG Faqiang, WU Hong, ZHENG Jianzhang. The first Department of Orthopaedics, Fujian Provincial Hospital, Provincial Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350001, China

【Abstract】 **Objective** To observe the expression of angiogenin-2 (Ang-2) at different stages in rat osteosarcoma modeling and its regulation effect on osteosarcoma cells. **Methods** MG63 osteosarcoma cells were injected into the lower femoral segment of 20 rats, and after tumor formation, the rats were divided into 5, 10, 15, and 20 days groups. Five rats were injected with the same amount of normal saline in the lower femoral segment as the control group. The serum Ang-2 content in each group was determined and confirmed by immunohistochemical staining. ShRNA lentivirus vector with ang-2 gene knockdown was constructed and transfected into cultured MG63 osteosarcoma cells to observe the effects on cell cycle and apoptosis of osteosarcoma cells. **Results** The serum Ang-2 level in the experimental group was significantly higher than that in the control group at four different stages, with the maximum increase in the 10-days group (all $P < 0.05$). Immunohistochemical staining showed that the number of positive ang-2 cells was the highest in the 10-days tumorigenicity group, which was consistent with the serum test results. Inhibition of Ang-2 expression blocked cell division in the G_1 phase and increased apoptosis ($P < 0.05$). **Conclusion** Ang-2 is closely related to the occurrence and development of osteosarcoma, and may become a new reference index for early diagnosis and potential treatment of osteosarcoma.

【Key words】 angiopoietin-2; osteosarcoma; rat model; cell regulation

骨肉瘤是一种恶性程度极高的骨组织来源的原发性肿瘤, 其发病早、进展迅速, 死亡率与致残率均居高不下。尽管近年来医疗水平快速增长, 但骨肉瘤的 5 年总体生存率依然令人绝望^[1]。肿瘤的发生和发展与血管的形成有着密不可分的联系, 国内外学者认为, 血管生成素, 特别是血管生成素-2 (angiopoietin-2, Ang-2) 与肿瘤的发生发展密切相关^[2]。为进一步了解 Ang-2 与骨肉瘤之间的关系, 笔者构建骨肉瘤大鼠模型, 观察 Ang-2 在大鼠骨肉瘤建模不同时期的表达及其对骨肉瘤细胞的调控作用, 旨在为骨肉瘤的诊断及潜在治疗提供实验室依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株和动物: MG63 (人骨肉瘤细胞) 细胞购于湖南丰晖生物; SPF 级雄性 BALB/c 裸鼠 25 只, 体质量 20~22 g [上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 许可证号:

SCXK (沪) 2017-0005], 喂养于严格消毒的无菌层流动物房内, 环境温度 24~26 °C, 空气湿度 40%~60%, 饲料和水经过严格消毒后进食。

1.2 试剂和仪器: 1) 主要试剂: DMEM 基础培养基, 青霉素-链霉素混合液 (Hyclone), 胎牛血清, 胰蛋白酶, Opti-MEM 培养基 (Gibco), Lipofectamine™ 3000, 转染试剂 (Invitrogen), Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒, 细胞周期检测试剂盒 (南京凯基), RNAiso Plus (TaKaRa), 小鼠血管生成素 2 (Ang-2) 检测试剂盒 (江莱生物)。2) 主要仪器: CO₂ 培养箱及烘箱 (美国 Thermo 公司), 超净工作台 (苏州净化设备有限公司), 荧光倒置显微镜 (日本 NIKON), 移液器 (德国 Eppendorf), 离心机 (中国白洋), 流式细胞仪 (美国 BD 公司), 酶标仪 (美国 BIO-RAD 公司)。

1.3 方法

1.3.1 移植瘤动物模型建立及分组：MG63 细胞于 DMEM 高糖完全培养基，置 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养，经消化、离心、重置后按比例传代或接种。实验组 20 只，取对数生长期 MG63 细胞悬液 10⁶/mL，按 0.1 mL/只接种于裸鼠股骨下段髓腔内，制备裸鼠移植瘤模型；对照组 5 只同部位注射 0.1 mL 生理盐水。瘤体接种后观察大鼠生存状态，分别于接种后 5、10、15、20 d 随机取出 5 只大鼠分组，经眼眶后静脉丛取少量血液，制备血清样本；同时收集对照组血清样本。实验组大鼠采血后处死，切开皮下并剥离股骨，将股骨下段迅速切成小块，置于 4% 多聚甲醛固定，用于 HE 染色及免疫组化分析。

1.3.2 Ang-2 的 ELISA 检测和免疫组化分析：1) 血液样本 3 000 rpm 离心 20 min，取上清液于 -80℃ 保存。实验前将血清及 ELISA 试剂盒从冷环境取出在室温平衡后，参照说明书要求操作，最终在 450 nm 波长处测定 A 值。2) 固定液中取出的组织置于包埋盒中，进行梯度脱水、浸蜡、包埋、切片、烘烤、脱蜡至水备用。取部分制作好的玻片先后置于苏木素及伊红溶液染色、晾干、封片，用显微镜采集图像；另一部分玻片进行抗原修复，用 Ang-2 抗体（稀释比例 1:200）4℃ 过夜、滴加生物素标记山羊抗小鼠 IgG，37℃ 下孵育 30 min 后行 DAB 显色。在显微镜下观察并随机取 5 个视野拍照（×400），以出现棕黄色颗粒作为阳性表达的判断标准。结果采用 Image J 软件对每张图片中的阳性细胞数进行统计分析。

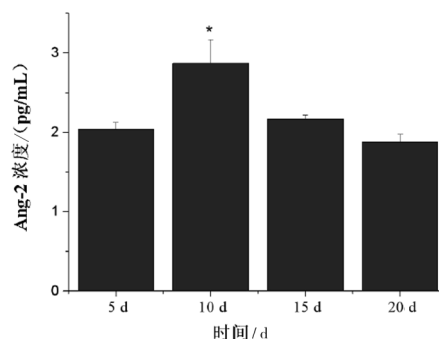
1.3.3 敲减 Ang-2 基因表达的 shRNA 慢病毒穿梭载体构建：设计合成特异性敲低 Ang-2 基因的特异性 shRNA，选择 BshT1 和 EcoRI 作为酶切位点，然后将引物离心至 Ep 管底，退火互搭后进行 T4 酶连接，转化后挑取 2 个菌落，摇菌后送测序。将测序比对正确的克隆，后将质粒进行扩增、提取。再取对数生长期的 MG63 骨肉瘤细胞，用含 EDTA 的胰酶消化重悬细胞并接种于 6 孔板上，汇合度至 80%~90% 时进行转染。

1.3.4 流式检测细胞周期及细胞凋亡：1) 细胞周期检测：细胞转染后设立干扰组，同时设置未敲减 Ang-2 基因 shRNA 转染的为对照组及未任何处置的空载组。消化收集细胞，并根据样本数量，计算所需染色工作液体积；临用前将 RNase A: PI 工作液按 1:9 体积配制成染色工作液。收集并调整细胞浓度为 1×10⁶/mL，取 1 mL 单细胞悬液，离心去上清后加入冷乙醇 500 μL 固定，PBS 洗去固定液，加入 500 μL 染色工作液，室温避光 30~60 min 后上机检测细胞周期。2) 细胞凋亡检测：细胞转染后不含 EDTA 的胰酶消化收集，PBS 洗涤 2 次，收集 (1~5) × 10⁵ 细胞，然后加入 5 μL Annexin V-FITC 及 Propidium Iodide 混匀，室温、避光反应 5~15 min，在 1 h 内用流式细胞仪观察和检测细胞凋亡。

1.4 统计学方法：采用 SPSS 22.0 统计软件对实验数据进行分析。结果以均数±标准差表示，多组数据之间比较采用单因素方差 (ANOVA) 分析，两组数据之间比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠血清 Ang-2 水平：实验组 Ang-2 在 4 个不同阶段较对照组（测定值为 0）均明显升高，差异有统计学意义；血清 Ang-2 在 5、10 d 时的水平逐渐升高，10 d 时达到顶峰，与其他时段相比的差异均有统计学意义（图 1）。



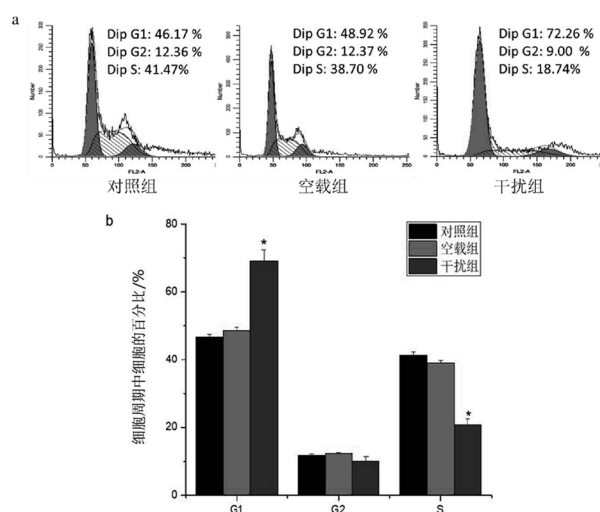
注：与其他时间段相比，* *P* < 0.05。

图 1 ELISA 检测血清 Ang-2 水平的变化情况

2.2 瘤组织 HE 染色：瘤组织在 5 d 时组织中细胞浆较多，细胞核浸润胞浆；10 d 时瘤细胞排列密集，细胞胞浆较少，核染色质聚集深染；15 d 和 20 d 时部分细胞核聚集成团，胞浆增多（图 2，封四）。

2.3 瘤组织免疫组化染色：在 10 d 时，组织中 Ang-2 的阳性细胞数最高；在 15 d 和 20 d 时，组织 Ang-2 的阳性细胞数逐渐降低。（见图 3，封四）。

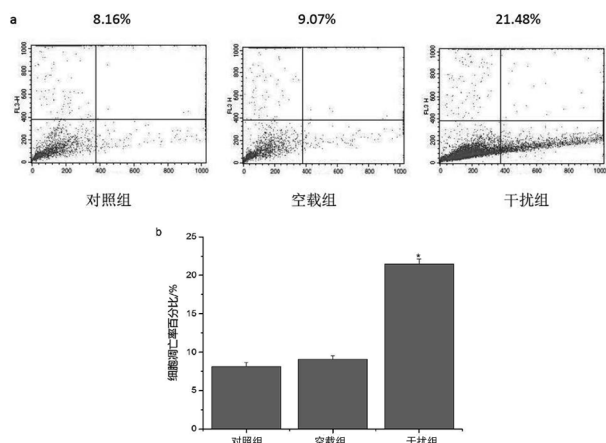
2.4 流式检测细胞周期：与对照组相比，Ang-2 基因干扰组 S 期细胞数减少，G₁ 期细胞数增加（*P* < 0.05）。结果提示细胞被阻滞在 G₁ 期，干扰 Ang-2 基因可调控细胞周期。见图 4。



注：a 为细胞周期采用流式细胞仪 PI/RNase A 染色的图谱；b 为各组各细胞周期细胞的百分比结果，与对照组相比，* *P* < 0.05。

图 4 Ang-2 基因对细胞周期的影响

2.5 流式检测细胞凋亡：与对照组相比，Ang-2 基因干扰组细胞凋亡数目显著升高 ($P < 0.05$)。结果提示干扰 Ang-2 基因可提高细胞凋亡比例。见图 5。



注：a 为细胞凋亡采用流式细胞仪 PI/RNase A 染色的图谱；b 为各组细胞凋亡率的百分比，与对照组相比，* $P < 0.05$ 。

图 5 Ang-2 基因对细胞凋亡的影响

3 讨论

骨肉瘤多发生于儿童以及青少年的长骨干骺端，以股骨下端及胫骨上端为甚^[3-4]。发病年龄的高峰主要集中于 25 岁之前，是青少年第三大常见的原发性恶性肿瘤，仅次于白血病和淋巴瘤^[5]。在临床上，绝大多数骨肉瘤患者是由于出现静息痛或发现肢体局部包块而就诊，但此时骨肉瘤常常已经进展到了中晚期，且其恶性度高，进展迅速，早期即可发生远处转移，尤以肺部转移为甚，极易错过早期的绝佳治疗时机。故早期难以发现和诊断是骨肉瘤诊治所面临的最大难题之一。

近年来，有研究者将血清碱性磷酸酶 (ALP) 用于骨肉瘤的诊断，且被认为与肿瘤大小呈正相关^[6]。但因儿童在生长发育期会出现生理性 ALP 增高，其活性可超过正常人的 1~2 倍，而青少年进食脂肪含量高的食物后，也会出现 ALP 增高。而骨肉瘤又多发于儿童和青少年，这限制了 ALP 的诊断价值和意义。本研究发现，大鼠血清 Ang-2 含量在其骨肉瘤成瘤的早期就明显升高，与对照组比较的差异有统计学意义，且 Ang-2 蛋白在瘤组织中也呈高表达状态。这表明 Ang-2 对骨肉瘤的诊断有意义，对早期发现有一定的价值。有学者对不同分期的骨肉瘤患者血清进行 Ang-2 含量测定，发现 Ang-2 表达升高，且与骨肉瘤临床分期呈正相关，故建议 Ang-2 也可用于骨肉瘤临床分期及预后的评估，这与本研究相符^[2]。但有学者研究发现，在胶质瘤、血管肉瘤、乳腺癌、胃癌和非小细胞肺癌等组织中 Ang-2 均呈高表达，故 Ang-2 对骨肉瘤诊断的特异性不容乐观^[7-8]。

肿瘤的发生发展都与血管的形成有着密不可分的联系。肿瘤组织的生长离不开新生血管提供营养，多种因素在血管新生方面起调控作用。有研究表明，Ang-2 在肿瘤血管形成发展中起到了重要的作用^[9-10]。骨肉瘤发病早，进展迅速，

早期便可出现血行转移，这也是骨肉瘤致死的重要原因，而血行转移的关键因素便是新生血管的形成。那 Ang-2 与骨肉瘤细胞生长关系如何呢？有学者报道，其通过上调 Ang-2 表达，发现能够促进骨肉瘤的血管新生，从而促进骨肉瘤的发生发展^[11]。另有学者报道，Ang-2 可有效调节血管生成，且在骨肉瘤患者出现淋巴转移或血行转移后，其含量明显升高^[12]。这说明血管新生和骨肉瘤生长有密切的相互作用。一方面，骨肉瘤的迅速生长和细胞的代谢加速，导致了血管新生；另一方面，血管新生也加速了骨肉瘤的生长。本研究通过敲减 Ang-2 基因表达，并转染至 MG-63 骨肉瘤细胞中，发现细胞分裂会被阻滞在 G₁ 期，并会加速细胞凋亡。这为骨肉瘤的潜在治疗方法提供了实验室依据。

综上所述，在骨肉瘤大鼠的血清中，Ang-2 的含量早期即可明显升高，且抑制 Ang-2 的基因表达，可促进骨肉瘤细胞凋亡。提示，Ang-2 检测可能作为骨肉瘤的早期诊断及潜在治疗的一个新的参考指标。

参考文献

- [1] Friebele J C, Peck J, Pan X, et al. Osteosarcoma: a meta-analysis and review of the literature [J]. Am J Orthop, 2015, 44 (12): 547-553.
- [2] Yang J, Zhang W. New molecular insights into osteosarcoma targeted therapy [J]. Curr Opin Oncol, 2013, 25 (4): 398-406.
- [3] Mirabello L, Troisi R J, Savage S A. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle age and elderly persons [J]. Int J Cancer, 2009, 125 (1): 229-234.
- [4] Murphey M D. World health organization classification of bone and soft tissue tumors: modifications and implications for radiologists [J]. Semin Musculoskelet Radiol, 2007, 11 (3): 201-214.
- [5] Cho W H, Song W S, Jeon D G, et al. Differential presentations, clinical courses, and survivals of osteosarcomas of the proximal humerus over other extremity locations [J]. Ann Surg Oncol, 2010, 17 (3): 702-708.
- [6] Limmahakhun S, Pothacharoen P, Theera-Umpon N, et al. Relationships between serum biomarker levels and clinical presentation of human osteosarcomas [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2011, 12 (7): 1717-1722.
- [7] 刘源源, 王生伟. 非小细胞肺癌患者血清中 VEGF 和 Ang-2 的表达和临床意义 [J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23 (19): 2774-2777.
- [8] Bajpai J, Sharma M, Sreenivas V, et al. VEGF expression as a prognostic marker in osteosarcoma [J]. Pediatr Blood Cancer, 2018, 53 (6): 1035-1039.
- [9] 符策岗, 赵红卫, 刘扬, 等. 骨肉瘤动物模型新进展 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23 (2): 216-220.
- [10] Anderson M E. Update on survival in osteosarcoma [J]. Orthop Clin North Am, 2016, 47 (1): 283-292.
- [11] Wang L H, Tsai H C, Cheng Y C, et al. CTGF promotes osteosarcoma angiogenesis by regulating miR-543/angiopoietin-2 signaling [J]. Cancer Lett, 2017, 391: 28-37.

[12] Tsutsui S, Inoue H, Yasuda K, et al. Angiopoietin-2 expression in invasive ductal carcinoma of the osteosarcoma: Its rela-

tionship to the VEGF expression and microvessel density [J]. Breast Cancer Res Treat, 2018, 98 (3): 261-266.

• 基础研究 •

基于 DNA 纳米枝构建可视化比色传感器用于骨肉瘤相关 miRNA 检测

厦门大学附属福州第二医院骨科研究所 (福州 350009) 吴冬枝 何文慧 张 韬¹

【摘要】 目的 通过 DNA 纳米枝和 DNA 双链-SYBR Green I (SG) 复合物构建可视化比色传感器, 并将其应用于骨肉瘤标志物 miR-135b-5p 的检测。**方法** 通过目标 miR-135b-5p 启动 X 探针聚合生成 DNA 纳米枝, 接着, 通过 SG 嵌入 DNA 纳米枝形成大量 DNA 双链-SG 复合物催化氧化显色底物构建可视化比色传感器。**结果** 成功构建了一种基于 DNA 纳米枝的可视化比色传感器, 其吸光度与 miR-135b-5p 浓度的对数值在 50 pM~1 M 范围内成正比, 检测限 (S/N=3) 为 4.98 pM, 具有较高的灵敏度和选择性。已成功应用骨肉瘤细胞 143B 和小鼠胚胎成纤维细胞 3T3 细胞内 miR-135b-5p 的检测。**结论** 基于 DNA 纳米枝成功构建一种可视化比色传感器, 可能用于骨肉瘤患者的早期筛查和预后监测。

【关键词】 miR-135b-5p; DNA 纳米枝; DNA 双链-SG 复合物; 骨肉瘤

【中图分类号】 R738 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2021)02-0138-03

骨肉瘤多发于儿童和青少年, 致死致残率高, 严重威胁患者的生命, 而早诊断早治疗可有效降低骨肉瘤患者的死亡率, 提高患者的生存率和生活质量^[1]。可视化比色传感器通过肉眼观察溶液颜色变化即可实现对目标物的检测, 具有直观、简单、方便等优点, 在肿瘤标志物的快速检测方面具有独特的优势。本研究基于 DNA 纳米枝和 DNA 双链-SYBR Green I (SG) 核酸染料复合物构建可视化生物传感器用于骨肉瘤相关标志物 miR-135b-5p 的检测。该传感器通过目标 miR-135b-5p 加入后启动两 X 探针的聚合生成具有大量 DNA 双链的 DNA 纳米枝实现信号的放大, 然后, 利用 SG 嵌入 DNA 双链中形成 SG-DNA 双链复合物在光诱导下催化氧化 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 实现对微量 miRNA 的可视化检测。旨在为后续小型便携骨肉瘤早期诊断试剂盒

的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料: 1) 试剂: 链霉亲和素修饰磁珠 (MB, 挪威 Dynal Biotech ASA 公司); TMB (东京化成工业株式会社); 三羟甲基氨基甲烷 (Tris, Sigma-Aldrich 公司); 柠檬酸、柠檬酸钠和 EDTA·Na₂ (麦克林公司); HCl、NaCl (国药集团); BSA 和 10 000×SG 核酸染料 (北京索莱宝公司); RNAex Pro RNA 提取试剂盒 (艾克瑞生物公司)。DNA 和 miRNA 由上海生工生物工程有限公司合成 (表 1)。2) 仪器: 可见光光源为氙灯光源 (300 W, 上海比朗仪器制造有限公司), 装有可见光滤光片 ($\lambda \geq 400$ nm)。所有紫外-可见吸收光谱和吸光度均于 iD3 多功能酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司) 上采集。

表 1 所有探针的碱基序列

序列名称	相关碱基序列
微小 RNA-135b-5p (miR-135b-5p)	5'-UAUGGCUUUUCAUCCUAUGUGA-3'
单碱基错配序列 (SM)	5'-UAUGGCUUCUCAUCCUAUGUGA-3' (下划线部分为错配碱基)
微小 RNA-135b-3p (miR-135b-3p)	5'-AUGUAGGGCUAAAAGCCAUGGG-3'
微小 RNA-21 (miR-21)	5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3'
捕获探针 (C)	5'-biotin-AAAAAAAAAATCACATAGGAAT-3'
单链探针 1 (DNA1)	5'-GAAAAGCCATAGCTCATCCATGCCTAGACTGGCGATAAGTAGCCAGC-3'
单链探针 2 (DNA2)	5'-GAAAAGCCATAGCTCAGCAAGCGTTATGCGTCTAGGCATGGATGAGC-3'
单链探针 3 (DNA3)	5'-GAAAAGCCATAGCTCTGGTATGCATGTCGGCATAACGCTTGCTGAGC-3'
单链探针 4 (DNA4)	5'-GAAAAGCCATAGCTGGCTACTTATCGCCACGACATGCATACCCAGAGC-3'
单链探针 5 (DNA5)	5'-CGACCGATGAATAGCGGTCAGATCCGTACCTACTCGTCACATAGGAAT-3'
单链探针 6 (DNA6)	5'-CGAGTAGGTACGGATCTGCGTATTGCGAACGACTCGTCACATAGGAAT-3'
单链探针 7 (DNA7)	5'-CGAGTCGTTTCGAATACGGCTGTACGTATGGTCTCGTCACATAGGAAT-3'
单链探针 8 (DNA8)	5'-CGAGACCATACGTACAGCACCAGCTATTCATCGGTCGTCACATAGGAAT-3'

基金项目: 福州市卫生计生中青年科学研究项目 (2018-S-wq10); 福州市卫生计生创新平台建设项目 (2017-S-wp1)

¹ 通信作者, 副研究员, 肿瘤细胞与分子生物学研究方向; Email: james155@foxmail.com