文章编号:1000-5404(2014)08-0745-05

论著

RanBP9的表达对骨肉瘤细胞增殖、凋亡及转移的影响

张 樨[1],吕杨帆[1],戴欢子[2],孟 刚[3],郭乔楠[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院病理科[1];400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所肾内科[2];400038 重庆,第三军医大学西南医院全军病理学研究所[3])

[摘要] **目的** 观察RanBP9(Ran-binding protein 9)在骨肉瘤细胞的表达情况和对骨肉瘤细胞增殖、凋亡及转移的影响,探讨RanBP9在骨肉瘤细胞生物学功能中发挥的作用。**方法** Real-time PCR、免疫荧光细胞染色和Western blot检测不同骨肉瘤细胞系中RanBP9的mRNA和蛋白表达水平;利用慢病毒建立稳定低表达RanBP9的SaOS2细胞模型并检测低表达RanBP9对骨肉瘤细胞SaOS2细胞增殖、克隆形成、凋亡及迁移、侵袭等细胞生物学功能的影响。**结果** RanBP9在MG63、SaOS2、U2OS 3个骨肉瘤细胞系中呈阳性表达,并且在低级别骨肉瘤细胞系MG63中的表达高于高级别细胞系SaOS2和U2OS($P<0.05$);稳定低表达RanBP9的SaOS2细胞(siRanBP9)的增殖、克隆形成、迁移、侵袭能力均较对照细胞siCON-SaOS2(siCON)增强,差异有统计学意义($P<0.05$),而凋亡率下降,有显著差异($P<0.05$)。**结论** 低表达RanBP9的骨肉瘤细胞的增殖和转移能力增强,凋亡率下降,RanBP9可能作为一个抑癌基因参与了骨肉瘤的发生与演进。

[关键词] RanBP9;骨肉瘤;增殖;凋亡;转移
[中图法分类号] R341;R730.23;R738.1 [文献标志码] A

Effect of RanBP9 expression on proliferation, apoptosis and metastasis in human osteosarcoma cells

Zhang Xi[1], Lyu Yangfan[1], Dai Huanzi[2], Meng Gang[3], Guo Qiaonan[1] ([1]Department of Pathology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]Department of Nephrology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; [3]Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect of Ran-binding protein 9 (RanBP9) expression on the proliferation, apoptosis and metastasis in human osteosarcoma cells, so as to discuss its biological functions in osteosarcoma cells. **Methods** Real-time PCR, immunofluorescence assay and Western blotting were used to examine RanBP9 mRNA and protein expression levels in osteosarcoma cell lines. Also we performed a series of biological tests using osteosarcoma SaOS2 cell line to study the effects of RanBP9 down-regulation on the proliferation, clone formation, apoptosis and metastasis in SaOS2 cells. **Results** We found that RanBP9 was highly expressed in human osteosarcoma cell lines and RanBP9 expression was significantly higher in MG63 cell line derived from low-grade osteosarcoma than in U2OS or SaOS2 cell lines derived from high-grade osteosarcoma ($P<0.05$). Immunofluorescence assay and Western blotting also showed the same results. Low expression of RanBP9 in SaOS2 cell line not only markedly increased cell vitality, growth and colony formation, but also stimulated migration and invasion ($P<0.05$) as compared with control cells (siCON-SaOS2). Consistently, down-regulated RanBP9 was associated with reduced basic apoptosis assayed by annexin APC-PI ($P<0.05$). **Conclusion** Low expression of RanBP9 reduces apoptosis and increases osteosarcoma cell proliferation as well as metastasis, suggesting that RanBP9 may be a tumor-suppressor involving in the occurence and development of osteosarcoma.

[**Key words**] RanBP9; osteosarcoma; proliferation; apoptosis; metastasis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81372864). Corresponding author: Guo Qiaonan, Tel:86-23-68755641, E-mail:qiaonan85@263.net

RanBP9,又名RanBPM(Ran-binding protein in microtubule organizing center),开始是作为Ran的结合蛋白而发现的,并因参与微管的成核现象[1]而命名,是一个全长为90×10^3的C端富于脯氨酸和谷氨酰胺

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81372864)
[通信作者] 郭乔楠,电话:(023)68755641,E-mail:qiaonan85@263.net
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140224.1722.004.html(2014-02-24)

的蛋白。早期研究发现它广泛表达于人类不同组织[2],并与大量功能上不相关的跨膜和胞内分子存在体内外相互作用[3]。进一步研究发现,RanBP9是在细胞内多个区域调节不同功能的多种蛋白复合体的关键组成部分,发挥支架蛋白的角色,随着对RanBP9功能研究的深入,发现它在调节细胞黏附、迁移和基因的转录方面也发挥作用[4-5]。同时发现在细胞凋亡过程中RanBP9在细胞内的分布存在着明显的改变[6],近来研究表明RanBP9能与肿瘤坏死因子受体家族的神经营养因子受体p75的死亡结构域相互作用,并能以凋亡前体蛋白的形式在细胞死亡途径中发挥调节作用[7-8],但有关RanBP9的功能至今仍有很多尚不清楚。本实验通过检测RanBP9在骨肉瘤细胞中的表达变化和下调RanBP9的表达对骨肉瘤细胞SaOS2细胞增殖、克隆形成、凋亡及迁移、侵袭等细胞生物学功能的影响,探讨RanBP9在骨肉瘤细胞生物学功能中发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

SaOS2、U2OS细胞株培养于含有10%胎牛血清(Gibco,美国)的DMEM培养基(Gibco,美国)中,MG63培养于含有10%胎牛血清的1640培养基(Gibco,美国)中,置于37 ℃、5% CO_2无菌恒温培养箱中培养。常规培养传代。MG63、SaOS2、U2OS细胞均来自美国菌种保藏中心(ATCC),由本实验室传代保种。

1.2 Real-time PCR检测骨肉瘤细胞RanBP9的mRNA含量

按RNAiso Plus(TaKaRa,大连)说明书提取骨肉瘤细胞RNA,用Smartspec3000核酸蛋白定量仪测定RNA浓度及$D(260)/D(280)$,按照PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa,大连)说明书,逆转录成cDNA。根据SYBR® Premix Ex Taq^{TM} Ⅱ (TaKaRa,大连)使用说明取0.8 μL cDNA,上游引物0.5 μL,下游引物0.5 μL,SYBR 5 μL,dH_2O 3.2 μL,制成10 μL Real-time PCR反应体系。引物序列(Invitrogen,上海):RanBP9上游:5′-CGCATCCAATACCAGCAGCC-3′, RanBP9下游:5′-GGCACAGTACCCATGGTGGA-3′;GAPDH上游:5′-CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC-3′, GAPDH下游:5′-GTAGAGGCAGGGATGATGTTCT-3′.反应条件为:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,60 ℃ 1 min,40个循环;65 ℃ 5 s, 95 ℃ 。Bio-Rad CFX96 Real-time System上机检测。

1.3 免疫荧光细胞染色检测RanBP9蛋白的表达

细胞爬片制备:0.25%胰酶(Sigma,美国)+0.02% EDTA(Sigma,美国)消化收集细胞,用培养基重悬调整浓度为3×10^5/mL,将无菌盖玻片放入24孔培养板中,细胞悬液滴入培养板孵育过夜。免疫荧光染色:弃去培养液,PBS(中杉金桥,北京)漂洗5 min×3次,4%多聚甲醛(博士德,武汉)固定20 min,PBS漂洗5 min×3次,0.1% TritonX-100(碧云天,江苏)透膜10 min, PBS漂洗5 min×3次,山羊血清工作液(碧云天,江苏)封闭,37 ℃,30 min。弃去封闭血清,RanBP9兔抗人多克隆抗体(1∶100稀释)(Abcam,美国),阴性对照用PBS代替一抗,4 ℃过夜。PBS漂洗5 min×3次,Cy3标记山羊抗兔IgG(1∶100稀释)(ABclonal,美国),37 ℃,30 min, PBS漂洗5 min×3次,Hochest33258(碧云天,江苏)衬染细胞核,37 ℃,10 min, PBS漂洗5 min×3次,抗荧光淬灭封片液封片(碧云天,江苏)。激光共聚焦显微镜下观察采集图像。

1.4 Western blot检测骨肉瘤细胞RanBP9蛋白的表达

收集细胞,RIPA裂解液(碧云天,江苏)裂解细胞,4 ℃离心后提取总蛋白。采用Pierce® BCA Protein Assay Kit(Pierce,美国)测定蛋白浓度。蛋白上样量为30 μg/孔,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(康为世纪,北京),转PVDF膜(Dupont,美国)2 h。转膜结束后,将膜放入脱脂奶粉中封闭(博士德,武汉),水平摇床上缓慢摇晃,室温封闭4 h。将膜放入稀释好的一抗RanBP9兔抗人多克隆抗体(1∶1 000稀释),内参兔抗人GAPDH单克隆抗体(1∶1 000稀释)(Cell Signal ,美国),4 ℃孵育过夜。次日TBST溶液洗膜10 min×3次。将膜放入按照1∶2 000稀释的二抗(Cell Signal ,美国)中,水平摇床缓慢摇晃,室温孵育2 h;用化学发光显色试剂盒(Pierce,美国)显色,Bio-Rad凝胶成像仪自动曝光成像。

1.5 下调表达RanBP9的SaOS2骨肉瘤细胞株的建立和鉴定

根据RanBP9干扰序列:si-h-RanBP9:5′-GGAAUUGGAUCCUGCGCAU-3′构建一个慢病毒vshRNA颗粒和阴性对照vshRNA颗粒(吉凯基因,上海)将上述两种慢病毒颗粒分别转入SaOS2细胞。在转入前先建立适合SaOS2细胞最优Puromycin(吉凯基因,上海)浓度为0.4 μg/mL和Polybrene(吉凯基因,上海)为5 μg/mL。第1天24孔板以5×10^4个/孔的密度铺板培养箱孵育过夜;第2天弃去旧培养基,加入Puromycin浓度为0.4 μg/mL的筛选培养基并加入病毒1 μL/孔,10 h后换成完全培养基培养箱孵育;病毒感染细胞72 h后,使用Puromycin筛选培养基替换旧的完全培养基,继续培养、传代扩增。通过Puromycin筛选获得了稳定低表达RanBP9的SaOS2细胞,将下调表达RanBP9的SaOS2细胞克隆命名为si RanBP9-SaOS2(简称为siRanBP9),其对照细胞为siCON-SaOS2(简称为siCON)。采用Real-time PCR和Western blot方法鉴定细胞内RanBP9的表达。

1.6 检测RanBP9的表达对骨肉瘤细胞增殖能力的影响

1.6.1 MTT检测细胞增殖速率 将siRanBP9和siCON按2000个/孔铺入96孔板,放进细胞培养箱中培养。从铺板后第2天开始,培养终止前4 h加入20 μL 5 mg/mL的MTT(北京鼎国,中国)于孔中,4 h后完全吸去培养液,加150 μL DMSO(上海国药,中国)溶解甲瓒结晶,振荡器振荡10 min,酶标仪490检测光密度值[$D(490)$]。连续检测5 d。

1.6.2 细胞克隆形成检测 将siRanBP9和siCON按400个/孔铺入6孔板连续培养14 d。实验终止时PBS洗涤细胞1次,每孔加入1 mL 4%多聚甲醛,固定细胞30 min。PBS洗涤细胞1次,每孔加入GIEMSA染液(chemicon,美国)500 μL,染细胞20 min,超纯水洗细胞数次,至洗净板上背景,晾干。拍照、克隆计数。

1.7 检测细胞转移能力

1.7.1 划痕实验 将siRanBP9和siCON按1×10^6个/孔铺

入 6 孔板,培养箱孵育过夜。第 2 天弃去培养基用无菌枪头沿培养板底部呈“一”划痕,PBS 洗涤后加入无血清培养基,显微镜下拍照记录划痕距离。24 h 后在显微镜下观察划痕距离拍照。

1.7.2 Transwell 实验检测细胞侵袭能力 加 100 μL 无血清培养基到小室(chemicon,美国)内,培养箱放置 1 h 后弃去培养基。将 siRanBP9 和 siCON 用无血清培养基稀释按 1×10^5 个/孔 100 μL 铺入到小室中。将小室转移入含 30% 胎牛血清 600 μL 的下室中。在培养箱中培养 24 h。倒扣小室于吸水纸上,用棉签轻轻移去非转移细胞,将小室浸泡在加有 400 μL GIEMSA 染液的 24 孔板中 20 min 后,超纯水冲洗数次,晾干。拍照、计数。

1.8 流式细胞仪检测细胞凋亡

收集 siRanBP9 和 siCON 将细胞密度调至 1×10^6 个/mL,于 4 ℃ 1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,用 200 μL 结合缓冲液重悬细胞,加入 3 μL Annexin V- APC 染色和 3 μL PI(ebioscience,上海),混匀后避光孵育 15 min,行流式细胞仪检测。流式细胞仪检测后获得四个象限的细胞直方图,左上象限代表细胞收集过程中出现的损伤细胞(An-PI +),左下象限代表正常细胞(An-PI-),右上象限代表晚期凋亡细胞和坏死细胞(An + PI +),右下象限代表早期凋亡细胞(An + PI-)。

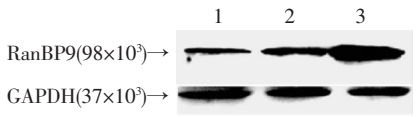
1.9 统计学分析

计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 进行独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 MG63、SaOS2、U2OS 骨肉瘤细胞系中 RanBP9 的 mRNA 含量和蛋白表达

RanBP9 在 MG63、SaOS2、U2OS 骨肉瘤细胞系中均呈阳性表达(图 1 ~ 2),并且 Real-time PCR 检测发现在低级别骨肉瘤细胞系 MG63 中的表达(2.02 ± 0.04)要高于高级别细胞系 SaOS2(1.60 ± 0.03)和 U2OS(1.00 ± 0.00)($P<0.05$)。Western blot 和免疫荧光染色结果同样如此,且 RanBP9 在骨肉瘤细胞中主要定位于细胞质。



1:SaOS2; 2:U2OS; 3: MG63

图 1 Western blot 检测 3 种骨肉瘤细胞系 RanBP9 蛋白表达

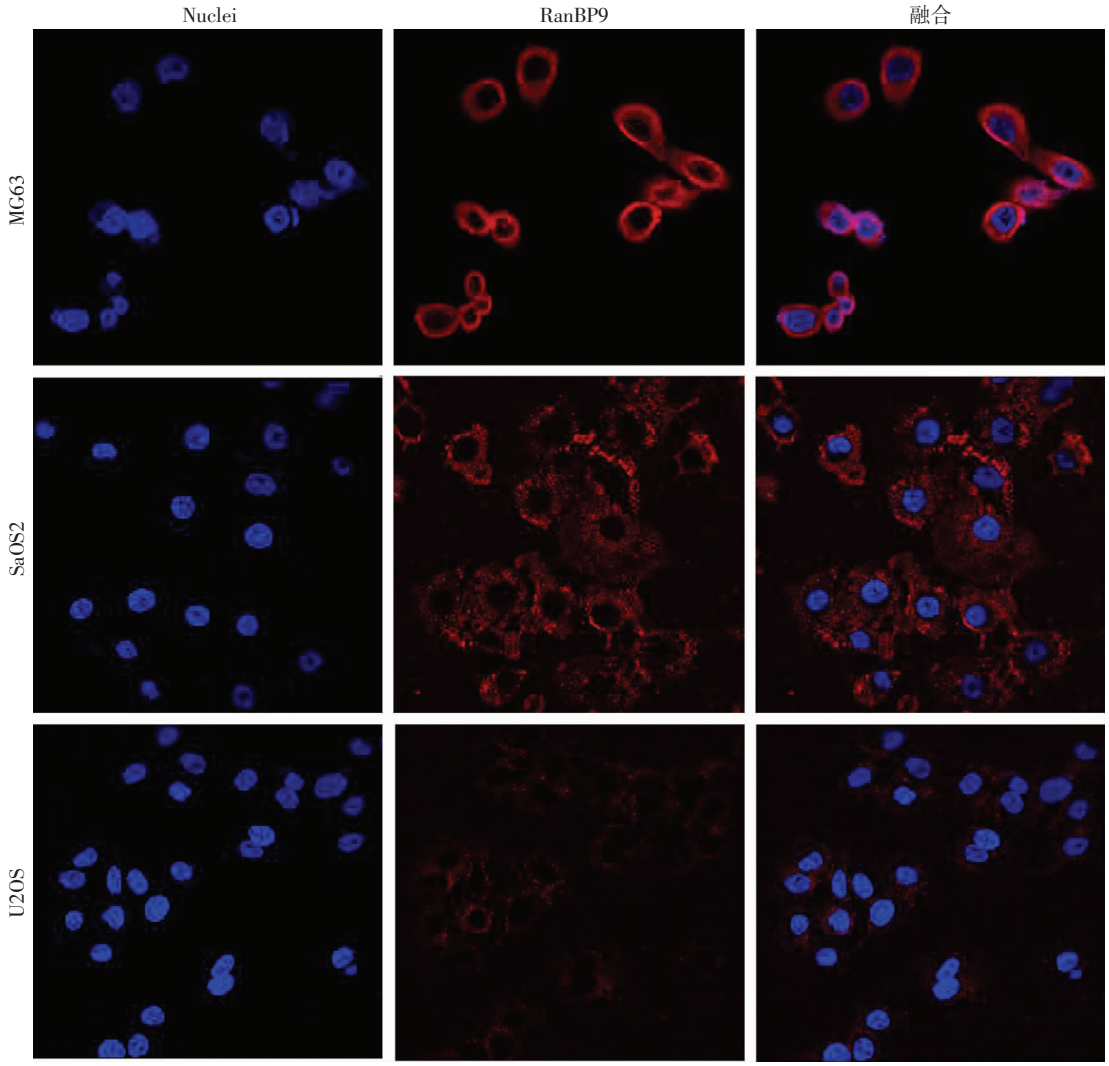
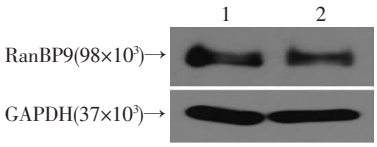


图 2 免疫荧光细胞染色检测 MG63、SaOS2、U2OS 骨肉瘤细胞系 RanBP9 蛋白表达 (激光共聚焦显微镜 ×400)

2.2 下调表达 RanBP9 的 SaOS2 骨肉瘤细胞株的鉴定

用 Real-time PCR 检测发现与对照细胞 siCON 相比，siRanBP9 中 RanBP9 的 mRNA 水平明显下降（0.43 ± 0.05），siRanBP9 中 RanBP9 蛋白水平也显著下调（$P<0.05$，图3）。



1：SiCON；2：SiRanBP9

图3 Western blot 检测 siRanBP9 和 siCON 细胞中 RanBP9 蛋白表达

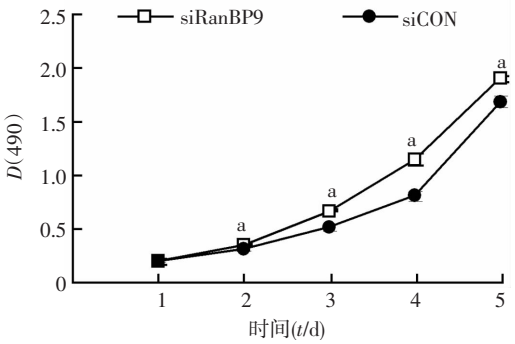
2.3 下调 RanBP9 的表达对骨肉瘤细胞增殖能力的影响

2.3.1 下调 RanBP9 的表达对骨肉瘤细胞增殖速率的影响

siRanBP9 细胞从检测第2天开始，增殖速率与对照组 siCON 相比显著上升（$P<0.05$，图4），说明降低 RanBP9 的表达后，骨肉瘤细胞增殖速率上升。

2.3.2 下调 RanBP9 的表达对骨肉瘤细胞克隆形成能力的影响

siRanBP9 细胞克隆数显著高于对照组 siCON（$P<0.05$），克隆形成数从（47 ± 5）升高到（105 ± 9）。说明降低 RanBP9 的表达后，骨肉瘤细胞自主生长的潜能增强。



a：$P<0.05$，与 siCON 组比较

图4 MTT 法检测 siRanBP9 和 siCON 细胞增殖速率差异

2.4 下调 RanBP9 的表达对骨肉瘤细胞迁移能力的影响

siRanBP9 细胞在 24 h 迁移距离明显大于对照组 siCON（图5），说明降低 RanBP9 的表达后，骨肉瘤细胞迁移能力增强。

2.5 下调 RanBP9 的表达对骨肉瘤细胞侵袭力的影响

Transwell 侵袭实验检测 siRanBP9 细胞侵袭率明显高于对照组 siCON（图6），结果显示，24 h 后 siRanBP9 细胞侵袭率为（5.43 ± 0.30），siCON 细胞侵袭率为（4.27 ± 0.45）（$P<0.05$）。说明降低 RanBP9 的表达后，骨肉瘤细胞侵袭能力增强。

2.6 下调 RanBP9 的表达对骨肉瘤细胞凋亡的影响

结果见图7。相对于对照组 siCON 细胞，低表达组 siRanBP9 细胞早期凋亡率（右下）和晚期凋亡率（右上）分别从1.54% 和1.37% 下降到了1.26% 和0.18%，平均总凋亡率由（2.67 ± 0.21）% 下降到（1.79 ± 0.31）%（$P<0.05$）。说明降低 RanBP9 的表达后，骨肉瘤细胞的凋亡率下降。

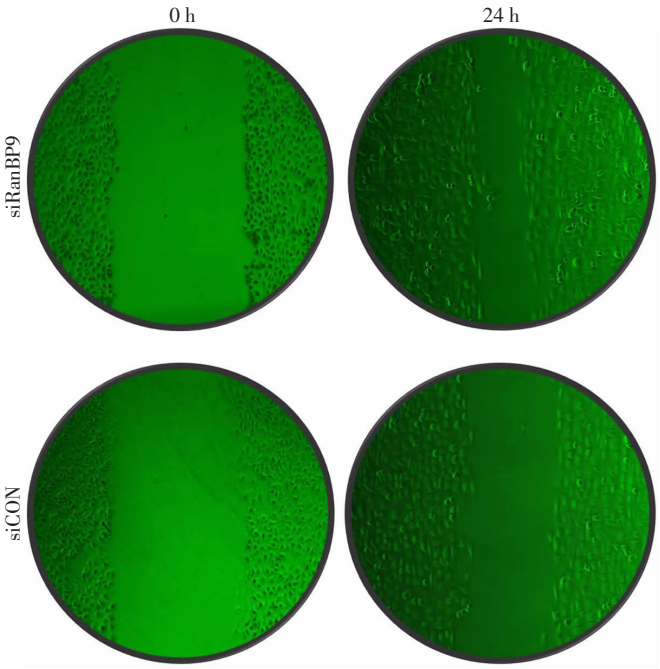
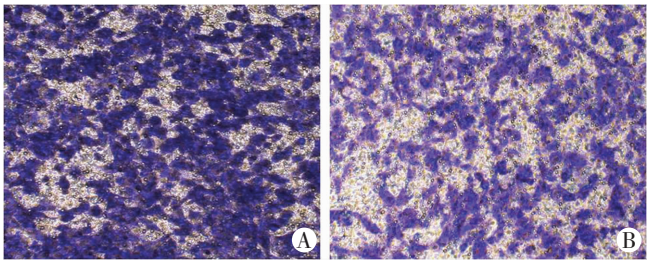
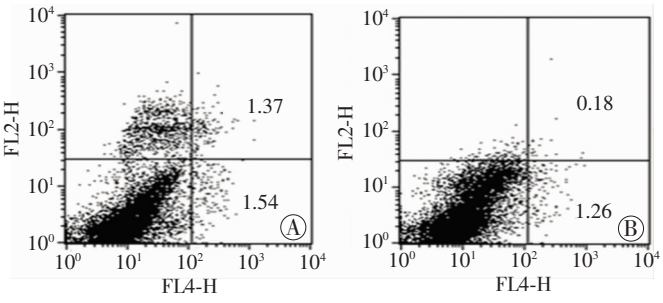


图5 RanBP9 的表达对 siRanBP9 和 siCON 骨肉瘤细胞迁移能力的影响 （倒置显微镜 ×40）



A：siRanBP9；B：siCON

图6 倒置显微镜观察 RanBP9 的表达对 siRanBP9 和 siCON 细胞侵袭能力的影响 （Giemsa ×100）



A：siCON；B：siRanBP9

图7 流式细胞仪检测 RanBP9 表达对 siRanBP9 和 siCON 细胞凋亡的影响

3 讨论

骨肉瘤是来源于间叶组织的最常见的原发性骨恶性肿瘤。好发于青少年，恶性程度高，生长快、转移早，

预后很差[9-11]。虽然近25年来骨肉瘤的治疗有了长足的发展,近80%患者能保留患肢,且5年生存率由20%左右提高到55%~75%[12],但仍有半数以上的患者死于骨肉瘤的转移和复发,使得骨肉瘤的治疗进入了一个平台期,期待突破性的进展。

骨肉瘤的发生和演进是一个复杂的多步骤过程,包括多种类型基因表达和功能的改变[13]。之前的研究提示RanBP9广泛表达于人类不同组织[2],与细胞黏附、迁移和基因的转录有关[4-5],同时RanBP9又能以凋亡前体蛋白的形式在细胞死亡途径中发挥调节作用[8],这为本实验提供了理论依据。我们用Real-time PCR、免疫荧光细胞染色和Western blot检测骨肉瘤细胞中RanBP9的mRNA和蛋白表达水平,结果表明RanBP9在骨肉瘤细胞中普遍高表达,并且不同骨肉瘤细胞中RanBP9的表达水平也不一样,在恶性程度较低的骨肉瘤细胞系中RanBP9的表达更高。为了进一步研究RanBP9的变化对骨肉瘤细胞生物学功能的影响,我们利用慢病毒建立并鉴定了稳定低表达RanBP9的SaOS2细胞模型,在稳定低表达RanBP9的SaOS2细胞模型上分别用MTT、细胞克隆形成检测出低表达RanBP9增强了骨肉瘤细胞的增殖能力;用Annexin V-APC流式细胞仪检测出低表达RanBP9降低了骨肉瘤细胞的凋亡。细胞增殖和凋亡都是生命的基本现象,是维持体内细胞数量动态平衡的基本措施,许多生理性的生长控制机制使机体组织处于稳态,处于稳态的组织中细胞的存活和死亡一定是平衡的,过多的生长和过少的死亡均可打破机体的稳态,最终导致癌症的发生[14]。本实验结果表明RanBP9的变化对骨肉瘤细胞增殖和凋亡都产生了影响,所以我们有理由相信RanBP9与骨肉瘤的发生相关。细胞划痕实验检测说明低表达RanBP9的骨肉瘤细胞的迁移能力增强,Transwell实验结果同样也表明低表达RanBP9的骨肉瘤细胞的侵袭能力增强,提示RanBP9的变化对骨肉瘤细胞的转移也产生了影响。

国内外关于RanBP9的研究多集中于正常组织或者上皮类型的肿瘤,在肉瘤中的研究几乎为零。本实验发现RanBP9在骨肉瘤细胞系中普遍高表达,而且RanBP9的表达对骨肉瘤细胞的生物学功能产生了影响,下调RanBP9的表达可使得骨肉瘤细胞增殖和转移能力增强,凋亡率降低。因而我们推测RanBP9可能作为一个抑癌基因参与了骨肉瘤的发生与演进。这可能为骨肉瘤的治疗提供了一个新的药物靶点。

参考文献:

[1] Nakamura M, Masuda H, Horii J, *et al*. When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to gamma-tubulin[J]. J Cell Biol, 1998, 143(4): 1041-1052.

[2] Poirier M B, Laflamme L, Langlois M F. Identification and characterization of RanBPM, a novel coactivator of thyroid hormone receptors[J]. J Mol Endocrinol, 2006, 36(2): 313-325.

[3] Bowman A L, Catino D H, Strong J C, *et al*. The rho-guanine nucleotide exchange factor domain of obscurin regulates assembly of titin at the Z-disk through interactions with Ran binding protein 9[J]. Mol Biol Cell, 2008, 19(9): 3782-3792.

[4] Suresh B, Ramakrishna S, Baek K H. Diverse roles of the scaffolding protein RanBPM[J]. Drug Discov Today, 2012, 17(7/8): 379-387.

[5] Suresh B, Ramakrishna S, Kim Y S, *et al*. Stability and function of mammmalian lethal giant larvae-1 oncoprotein are regulated by the scaffolding protein RanBPM[J]. J Biol Chem, 2010, 285(46): 35340-35349.

[6] Kramer S, Ozaki T, Miyazaki K, *et al*. Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with RanBPM in mammalian cultured cells[J]. Oncogene, 2005, 24(5): 938-944.

[7] Gong X, Ye W, Zhou H, *et al*. RanBPM is an acetylcholinesterase-interacting protein that translocates into the nucleus during apoptosis[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2009, 41(11): 883-891.

[8] Atabakhsh E, Bryce D M, Lefebvre K J, *et al*. RanBPM has proapoptotic activities that regulate cell death pathways in response to DNA damage[J]. Mol Cancer Res, 2009, 7(12): 1962-1972.

[9] Ta H T, Dass C R, Choong P F, *et al*. Osteosarcoma treatment: state of the art[J]. Cancer Metastasis Rev, 2009, 28(1/2): 247-263.

[10] Sampo M, Koivikko M, Taskinen M, *et al*. Incidence, epidemiology and treatment results of osteosarcoma in Finland - a nationwide population-based study[J]. Acta Oncol, 2011, 50(8): 1206-1214.

[11] Mirabello L, Troisi R J, Savage S A. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program[J]. Cancer, 2009, 115(7): 1531-1543.

[12] Jaffe N. Osteosarcoma: review of the past, impact on the future. The American experience[J]. Cancer Treat Res, 2009, 152: 239-262.

[13] Strauss S J, Ng T, Mendoza-Naranjo A, *et al*. Understanding micrometastatic disease and Anoikis resistance in ewing family of tumors and osteosarcoma[J]. Oncologist, 2010, 15(6): 627-635.

[14] Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death[J]. Science, 1998, 281(5381): 1317-1322.

(**收稿**:2014-01-02;**修回**:2014-01-24)

(编辑 汪勤俭)