DOI:10.16016/j.1000-5404.202006005

昼夜节律分子 BMAL1 通过调节免疫细胞毒性促进骨肉瘤的预后

袁金玲[1],陈新建[2],廖 凯[3],彭虹艳[4],李梨平[4],张树菊[4] 410000 长沙,中南大学湘雅三医院检验科[1];510062 广州,南部战区空军医院血管内科[2];410000 长沙,长沙血液中心[3];410007 长沙,湖南省儿童医院儿科医学研究所[4]

[**摘要**] **目的** 探讨核心节律分子在骨肉瘤预后中的作用及可能机制。**方法** 在骨肉瘤细胞中过表达节律基因 BMAL1,qRT-PCR 检测 BMAL1 基因的表达;克隆形成实验和 Transwell 实验检测细胞的克隆形成和侵袭能力;骨肉瘤细胞与外周血单个核淋巴细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMCs)体外共培养后,钙黄素染色法检测 PBMCs 对骨肉瘤细胞的直接杀伤作用,流式细胞术检测 PBMCs 中 $CD8^+$ T 和 NK 细胞脱颗粒(CD107a 蛋白表达)的影响。**结果** BMAL1 mRNA 高表达的骨肉瘤患者的生存时间明显高于低表达组($P<0.000\ 1$)。BMAL1 过表达对 U2OS 细胞的侵袭和克隆形成无显著影响,但相较于对照组而言,过表达 BMAL1 的 U2OS 在体外与外周血单核血细胞(PBMCs)共培养 4 h,其细胞死亡明显增加[PBMCs∶U2OS 细胞为 5∶1时,对照组和 BMAL1 组分别为(73.33±0.67)%和(81.00±0.58)%,$P<0.01$;PBMCs∶U2OS 细胞为 10∶1时,对照组和 BMAL1 组分别为(76.67±0.33)%和(82.67±1.86)%,$P<0.01$]。过表达 BMAL1 的骨肉瘤细胞组与 PBMCs 共培养后,T 细胞和 NK 细胞 CD107a 表达差异无统计学意义(E∶T=5∶1,$CD3^+$ $CD56^-$ T 细胞,$P=0.46$;$CD3^-$ $CD56^+$ NK 细胞,$P=0.96$;E∶T=10∶1,$CD3^+$ $CD56^-$ T 细胞,$P=0.93$;$CD3^-CD56^+$ NK 细胞,$P=0.21$)。**结论** 骨肉瘤细胞 BMAL1 表达水平与骨肉瘤患者预后呈正相关,其机制主要是通过增加免疫细胞对其免疫监视作用,而非通过影响骨肉瘤细胞的克隆形成能力和侵袭。

[**关键词**] 骨肉瘤;昼夜节律;BMAL1;骨肉瘤预后;细胞毒性

[**中图法分类号**] R394.3;R730.23;R738.1 [**文献标志码**] A

Circadian rhythms molecule BMAL1 promotes the prognosis of osteosarcoma *via* regulating immune cell cytotoxicity

YUAN Jinling[1], CHEN Xinjian[2], LIAO Kai[3], PENG Hongyan[4], LI Liping[4], ZHANG Shuju[4] [1]Department of Clinical Laboratory, the Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan Province, 410000; [2]Department of Cardiovascular Diseases, Airforce Hospital of Southern Theater Command, Guangzhou, Guangdong Province, 510062; [3]Changsha Blood Center, Changsha, Hunan Province, 410000; [4]Hunan Children's Research Institute, Hunan Provincial Children's Hospital, Changsha, Hunan Province, 410007, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role and possible mechanism of the core rhythm molecule BMAL1 in the prognosis of osteosarcoma (OS). **Methods** After BMAL1 was overexpressed in U2OS cells by Lipofectamine3000, the expression of BMAL1 was detected with qRT-PCR, and the clone formation and invasion ability of the overexpressed cells were observed with clonogenic assay and Transwell assay. Then, the BMAL1 overexpressed U2OS cells or the cells with control vector transfection were cocultured with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), the direct killing effects of PBMCs on U2OS cells was observed with Calcein AM staining, and the CD107a expression by $CD8^+$ T and NK cells was measured with flow cytometry.

[**基金项目**] 国家自然科学基金青年科学基金(81900055);湖南省自然科学基金(2020JJ5283);湖南省卫健委基金(B2019021);湖南省儿童医院基金(2019ZSJ)

[**通信作者**] 张树菊,E-mail:zhangshuju22@126.com

Results The OS patients with higher BMAL1 mRNA level had significantly longer survival time when compared with those with lower expression ($P<0.001$). BMAL1 overexpression had no obvious effects on the invasion and clone formation of U2OS cells. However, cell death was significantly increased in BMAL1 overexpressed U2OS cells than the control vector transfected U2OS cells when co-cultured with PBMCs *in vitro* [PBMCs∶U2OS cells=5∶1, (81.00±0.58)% *vs* (73.33±0.67)%, $P<0.01$; PBMCs∶U2OS cells=10∶1, (82.67±1.86)% *vs* (76.67±0.33)%, $P<0.01$]. There was no significant difference in the expression level of CD107a between T cells and NK cells in the BMAL1 overexpressed U2OS cells than the control vector transfected U2OS cells when co-cultured with PBMCs (E∶T=5∶1, $CD3^+$ $CD56^-$ T cells, $P=0.46$, $CD3^-$ $CD56^+$ NK cells, $P=0.96$; E∶T=10∶1, $CD3^+$ $CD56^-$ T cells, $P=0.93$; $CD3^-CD56^+$ NK cells, $P=0.21$). **Conclusion** The expression level of BMAL1 is positively correlated with the prognosis of OS patients, which might be mainly due to the enhanced immunological surveillance, but not by affecting the ability of invasion and clone formation of OS cells.

[**Key words**] osteosarcoma; circadian rhythms; BMAL1; osteosarcoma prognosis; cytotoxicity

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars Young Scholars of China (81900055), the Natural Science Foundation of Hunan Provence (2020JJ5283), the Health Commission Foundation of Hunan Province (B2019021), and the Foundation of Hunan Children's Hospital (2019ZSJ).
Corresponding author: ZHANG Shuju, E-mail: zhangshuju22@126.com.

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是青少年和儿童原发恶性骨肿瘤中发病率最高的肿瘤[1]。骨肉瘤在疾病的早期便很容易发生早期转移,转移和复发是骨肉瘤预后不良和生存率低的主要原因[2]。目前其总体5年生存率约为70%[3],外科手术和化疗是骨肉瘤的主要治疗方法[4]。通过完全手术切除和药物化疗相结合,高达70%的骨肉瘤和局限性四肢肿瘤患者可以成为长期幸存者[5]。然而,约20%的骨肉瘤患者会发生复发和远处转移[6],且转移性或复发性骨肉瘤的患者通常对化疗无反应,导致5年生存率仅有20%[7]。这表明骨肉瘤的异质性需要进行进一步的机制研究。

免疫逃逸是肿瘤转移的关键步骤。在小鼠模型中,细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4)和程序性死亡配体1(programmed death-ligand 1, PD-L1)的联合阻断可阻止免疫逃逸并可以完全抑制骨肉瘤的转移[8]。然而,免疫疗法在临床试验中的一致性反应仍然较差,这表明了进一步研究骨肉瘤中恶性肿瘤的生物学、异质性和肿瘤微环境的必要性[9]。

几乎所有生命都存在昼夜节律。如BMAL1、RORα、PER1、PER2、CRY1、CRY2和CLOCK等节律基因,可控制细胞内昼夜节律的振荡。越来越多的研究证实,昼夜节律紊乱可导致各种人类失调和疾病,例如失眠、肥胖、精神疾病、心血管疾病、糖尿病、肿瘤等[10-11]。许多研究表明轮班工作造成的身体节律紊乱会增加患乳腺癌、前列腺癌、子宫内膜癌和结肠癌等癌症的风险[12]。因此,国际癌症研究机构将夜班工作列为癌症的独立危险因素。然而,昼夜节律在骨肉瘤中的作用和机制尚少见报道。

昼夜节律已经成为优化免疫反应的关键因素,由免疫细胞的内在节律性调节与外部环境之间的相互作用所介导。昼夜节律的破坏可以导致自然杀伤(natural killer, NK)细胞效应分子功能的降低。例如,在大鼠中,节律紊乱使得与NK细胞毒性相关的分子穿孔素和颗粒酶B以及干扰素-γ(interferon-γ, IFN-γ)的表达降低[13]。最近,有研究表明多种肿瘤中昼夜节律的核心基因与癌症之间的关系,发现昼夜节律的核心负调节因子(PER1、PER2、PER3、CRY1和CRY2)在许多肿瘤中表达均下调[14]。这些核心昼夜节律负调节分子的表达降低与癌症患者的预后和T细胞衰竭以及免疫抑制分子(包括PD-L1和CTLA-4)的整体上调显著相关[14]。然而,昼夜节律核心分子的表达与骨肉瘤患者的预后以及免疫应答之间的关系仍是未知的。因此,本研究分析了TARGET Data Matrix公共数据库(https://ocg.cancer.gov/programs/ target/data-matrix)中85个骨肉瘤样本数据集之间核心节律分子的表达水平与骨肉瘤预后之间的关系,并从肿瘤细胞侵袭和免疫监视方面进一步探讨了相关的节律分子影响骨肉瘤预后的潜在机制。结果发现异位表达的BMAL1对骨肉瘤细胞系U2OS细胞的增殖、侵袭和克隆形成能力无显著影响。但异位表达BMAL1的U2OS细胞与外周血单个核淋巴细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMCs)共培养时,其被PBMCs直接杀伤的细胞明显增加,这表明BMAL1高表达可以增加免疫细胞对骨

肉瘤细胞的免疫监视。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人骨肉瘤细胞系 U2OS 细胞购自中国科学院细胞库(中国上海)。U2OS 细胞的培养条件为 37 ℃和 5% CO_2 的无菌环境中,DMEM 培养基(含 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素)。

1.1.2 试剂 DMEM 培养基、RPMI1640 培养基、Opti-MEM 和胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司(赛默飞,美国马萨诸塞州沃尔瑟姆)。CD3-PeCy7(25-0038-42)和 CD56-APC(9017-0567-120)抗体购自 eBioscience 公司(美国加利福尼亚州圣地亚哥)。抗 CD107a-PE(555801)抗体购自 BD Biosciences 公司(美国加利福尼亚州圣地亚哥),Ficoll-Paque Plus 购自 GE 公司(美国马萨诸塞州波士顿)。Calcein AM、Golgi stop 和 Golgi plug 购自 BD Bioscience 公司(美国加利福尼亚州圣地亚哥)。Matrigel 和 Lipofectamine3000 购自 Invitrogen 公司(美国加利福尼亚州卡尔斯巴德)。

1.2 方法

1.2.1 昼夜节律分子表达水平与骨肉瘤患者预后的相关性分析 首先下载 TARGET Data Matrix 公共数据库(隶属于美国国立卫生研究院的权威数据库)中 85 例骨肉瘤样本的临床注释和基因表达数据,并使用 Survminer 和生存力分析 R 软件包(版本 3.3.3)分析骨肉瘤生存率与核心昼夜节律分子表达水平之间的关联。使用 Survminer 软件包确定用于将患者分为低风险和高风险组的核心昼夜节律分子表达水平的最佳 cut-off 值。使用单变量 Cox 比例风险回归模型分析生存概率与 BMAL1、ARNTL2、RORα、PER1、PER2、CRY1、CRY2、CLOCK、GPER1、NR1D1 和 NR1D2 表达水平之间的关联。检验水准 $\alpha=0.05$[15]。

1.2.2 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 使用 TRIzol 根据说明书从 BMAL1 或载体 DNA 转染的 U2OS 细胞中提取总 RNA。使用 Prime Script™1st Strand cDNA Synthesis Kit(日本,宝生物)将 2 μg 总 RNA 反转录。使用 TB Green Premix *Ex Taq*(日本,宝生物)和 Light-Cycler-480(瑞士,罗氏)荧光定量 PCR 仪检测 mRNA 表达水平。将 Actin mRNA 设置为对照,引物序列如下:ACTIN 正义链:5′-GGCATGGGTCAGAAGGATT-3,反义链:5′-TGGTGCCAGATTTTCTCCA-3′;BMAL1 正义链:5′-CCAAGAAAGTATGGACACAGACAAA-3′,反义链:5′-GC-ATTCTTGATCCTTCCTTGGT-3′。

1.2.3 PBMCs 的分离和培养 通过 Ficoll-Paque 梯度离心(400×*g*,在室温下 20 min)从健康捐献者白细胞中(中国湖南省长沙血液中心)新鲜分离出 PBMCs。将分离的人 PBMCs 放在添加有 10% FBS,50 U/mL 青霉素和 50 μg/mL 链霉素的 RPMI1640 培养基中,并置于 5% CO_2 中于 37 ℃静息培养 210 min。

1.2.4 细胞转染 U2OS 细胞接种后贴壁过夜,在其融合度达到 70%时按照 Lipofectamine3000 说明书配制转染体系,质粒与转染试剂的比例为每 100 ng 质粒中加入 0.15 μL lipo3000,0.2 μL P3000,于转染 48 h 后收取细胞经 qPCR 检测转染效率,并进行后续实验。

1.2.5 侵袭实验 U2OS 细胞内 BMAL1 或载体 DNA 转染 48 h 后,用胰蛋白酶-EDTA 消化后收取细胞,使用侵袭小室(康宁,美国)进行基质胶侵袭能力检测。将 Matrigel(200 μg/mL)加入上室,37 ℃包被 2 h。然后,将 100 μL 用无血清 DMEM 重悬的 2×10^5 个 U2OS 细胞接种到上室中,而下腔室中则加入 600 μL 含 15% FBS 的 DMEM。在 37 ℃下孵育 24 h 后,用棉签擦拭小室上表面的未侵袭细胞,将小室下表面上的侵袭细胞固定并用吉姆萨染色。通过计数每孔 5 个显微镜视野下的细胞来确定细胞的侵袭性,侵袭程度表示为每个显微镜视野中的平均细胞数[16]。

1.2.6 平板克隆形成实验 U2OS 细胞内 BMAL1 或载体 DNA 转染 48 h 后,用胰蛋白酶-EDTA 消化并收取细胞。将细胞以每孔 500 个细胞接种到 6 孔板中。2 周后,将细胞固定并用吉姆萨染色。通过计数每孔的克隆数来确定克隆形成能力[16]。

1.2.7 通过 Calcien AM 素释放进行细胞毒性测定 Calcien AM 是一种活细胞荧光染料,可以标记活细胞而不损害细胞的正常功能。裂解标记的活细胞后,Calcien AM 释放到细胞外[17]。通过检测培养基上清中 Calcien AM 的荧光强度,可以计算出细胞死亡的比例。BMAL1 或载体 DNA 转染 48 h 后,将 U2OS 细胞(靶细胞)重悬在含有 2% FBS 的 RPMI1640 中,为 1×10^6 个/mL,并与 1 μmol/L Calcein AM 在避光条件下,37 ℃孵育 30 min。将细胞洗涤 2 次后,重悬于 RPMI1640 完全培养基中。将 100 μL 靶细胞添加到 96 孔 V 型平板中,按不同的效应细胞∶靶细胞(E∶T)比例加入 PBMCs(效应细胞)。同时将终浓度为 0.2% 的 Triton X-100 裂解缓冲液添加到靶细胞中作为阳性对照,并设置阴性对照空。将 96 孔板 150×*g* 离心 5 min,37 ℃的 5% CO_2 中孵育 4 h 后,以 500×*g* 离心 5 min,将 75 μL 上清液转移至平底的黑色 96 孔板中,并通过荧光酶标仪(PerkinElmer,美国)在 490/515 nm 处测量上清液的光密度值[*D*(490/515)]。使用下式

计算细胞毒性:细胞毒性=(样品的荧光强度-自发荧光强度)/(阳性对照的荧光强度-自发荧光强度)×100%[17]。

1.2.8　流式细胞术分析 T 细胞和 NK 细胞中 CD107a 的表达　CD107a 是 NK 细胞和活化的 $CD8^+$ T 细胞脱颗粒的标志物[18]。用 BMAL1 或载体 DNA 转染 48 h 后,收集 U2OS 细胞并在显微镜下计数。然后将细胞与新鲜分离的人 PBMCs 以 10∶1和 5∶1的比例共孵育,并在共培养开始时添加 CD107a 抗体、Golgi-stop 和 Golgi-plug。共培养 6 h 后,收集细胞,用 CD3 和 CD56 抗体标记,并使用 BD Fortessa Ⅱ(BD 生物科学,美国)对 CD107a 表达进行流式细胞分析,每管收取 10 000 个细胞。将 $CD3^+$ $CD56^-$细胞视为 T 细胞,而将 $CD3^-CD56^+$细胞视为 NK 细胞。3 次独立重复实验后,用 FlowJo 软件(10.0 版)对数据进行了分析。

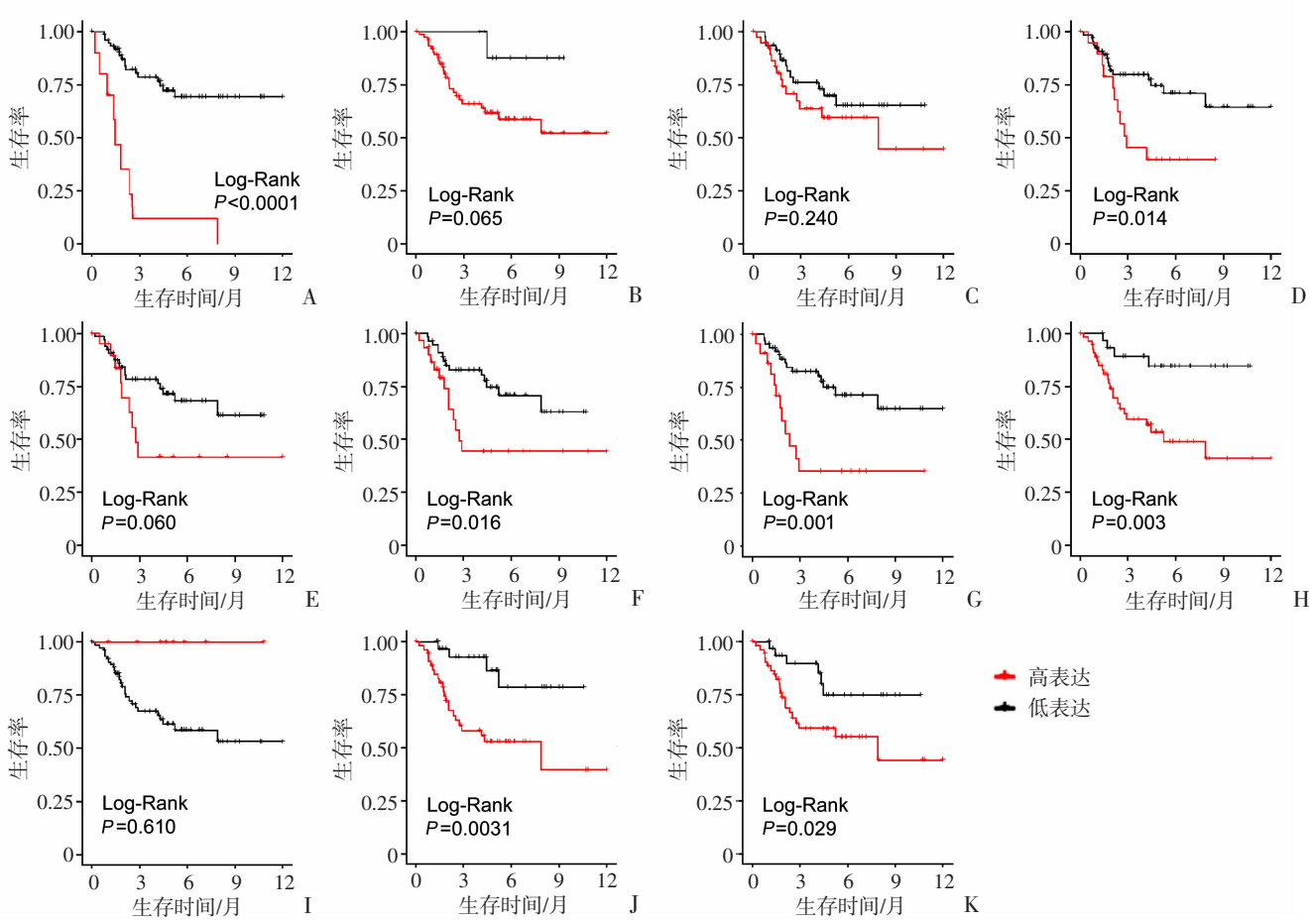
1.3　统计学分析

采用 Prism 8.01(美国加利福尼亚州拉荷亚的 GraphPad Software Inc.)软件进行统计分析。Kaplan-Meier 曲线用于评估 BMAL1 表达对总体存活率的影响,*P* 值从对数秩检验获得。两组之间的统计学显著性差异通过单因素方差分析和非配对的 *t* 检验确定。检验水准 $\alpha=0.05$。

2　结果

2.1　BMAL1 的表达水平与骨肉瘤患者预后的关系

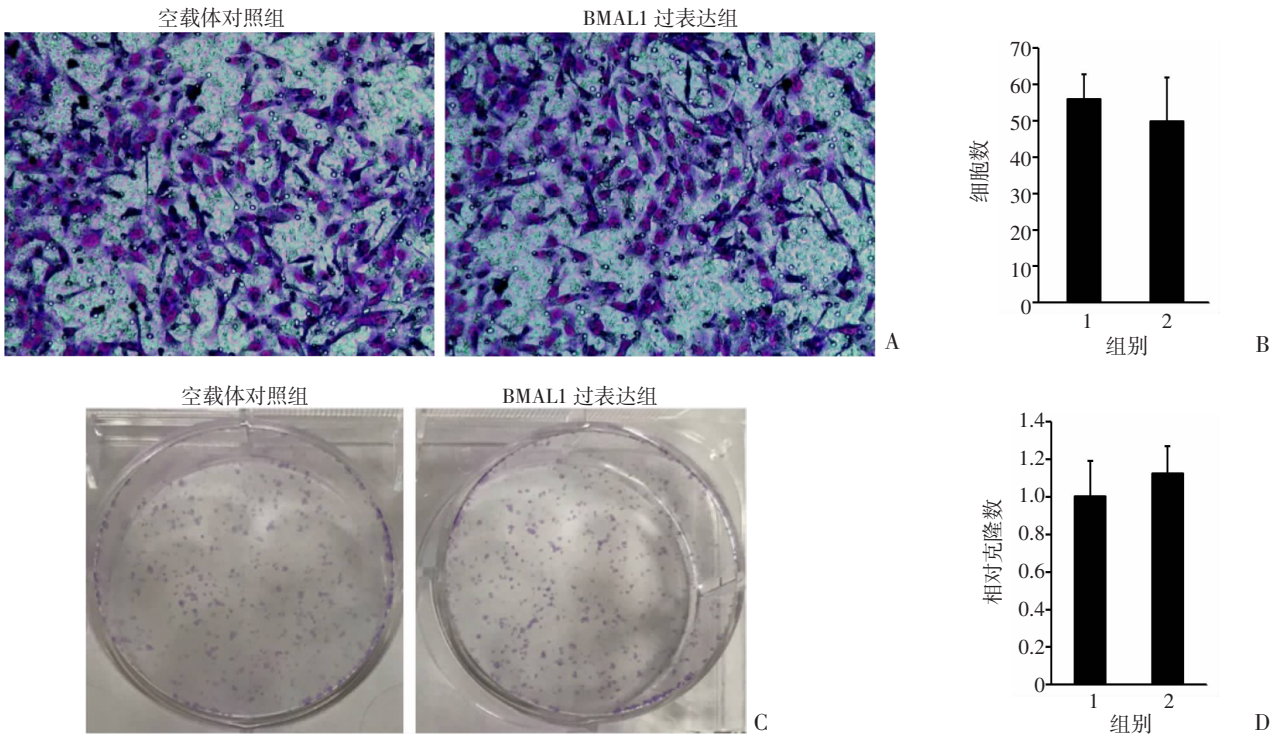
从 TARGET 数据公共数据库中下载了 85 例骨肉瘤样本的 mRNA 表达和生存率数据集。通过使用单变量 Cox 比例风险回归模型,分析 BMAL1、ARNTL2、RORα、PER1、PER2、CRY1、CRY2、CLOCK、GPER1、NR1D1 和 NR1D2 的表达水平与骨肉瘤患者生存率之间的关系。数据显示,高表达 BMAL1(*P*<0.000 1)、PER1(*P*=0.014)、CRY1(*P*=0.016)、CRY2(*P*=0.000 92)、CLOCK(*P*=0.003)、NR1D1(*P*=0.003 1)和 NR1D2(*P*=0.029)基因的骨肉瘤患者生存率高于低表达这些基因的骨肉瘤患者(图 1)。表明节律基因可能是骨肉瘤的肿瘤抑制因子,其中 BMAL1 是差异最显著的基因。



A:BMAL1;B:ARNTL2;C:RORα;D:PER1;E:PER2;F:CRY1;G:CRY2;H:CLOCK;I:GPER1;J:NR1D1;K:NR1D2

红线和黑线分别代表具有高表达和低表达基因的患者

图 1　Kaplan-Meier 生存分析骨肉瘤患者中节律分子表达水平与预后之间的关系



A~B:BMAL1 对 U2OS 细胞侵袭能力的影响(×100)与统计分析结果;C~D:BMAL1 对 U2OS 细胞克隆形成能力的影响与统计分析结果
1:空载体对照组;2:BMAL1 过表达组

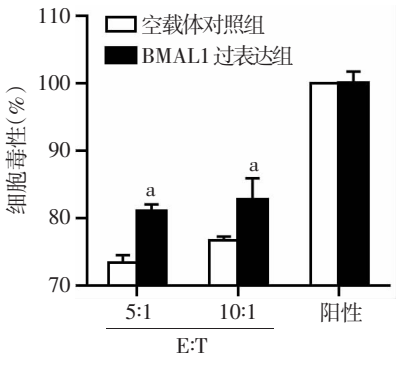
图 2 BMAL1 对 U2OS 细胞侵袭和集落形成能力的影响

2.2 BMAL1 过表达对骨肉瘤细胞系 U2OS 细胞侵袭和克隆形成能力的影响

上述数据表明 BMAL1 mRNA 表达与骨肉瘤患者预后呈正相关,接下来探讨 BMAL1 在骨肉瘤细胞侵袭和转移中的直接作用。首先,通过侵袭试验和平板克隆形成试验分别检测了 BMAL1 过表达的 U2OS 细胞侵袭能力和克隆形成能力。与空载体 DNA 组相比,BMAL1 过表达组 U2OS 细胞中 BMAL1 mRNA 显著增加了约 400 倍,但是 BMAL1 过表达组的 U2OS 细胞和空载体 DNA 对照组之间的侵袭能力差异无统计学意义[(55.93±6.92) *vs* (49.80±12.09),$P=0.35$,图 2A、B]。在平板克隆形成实验中,BMAL1 过表达组和空载体对照组之间的克隆计数差异也无统计学意义[(1.00±0.19) *vs* (1.12±0.15),$P=0.43$,图 2C、D]。这些数据表明,节律分子 BMAL1 过表达并不影响骨肉瘤细胞的侵袭和克隆形成能力。

2.3 BMAL1 过表达促进 PBMCs 对 U2OS 细胞的杀伤作用

为进一步探讨 BMAL1 mRNA 表达较高的骨肉瘤患者预后较好的可能机制,接下来从免疫识别和监视的角度探讨了骨肉瘤细胞中 BMAL1 表达是否会影响免疫细胞对 U2OS 细胞的直接杀伤能力。用 Calcien AM 标记并洗涤后,将 BAML1 过表达的细胞与具有不同比例的 PBMCs 共培养 4 h。结果显示,与空载体对照组相比,BMAL1 过表达组的 U2OS 细胞在效应细胞(PBMCs):靶细胞(U2OS)(E:T)比例为 5:1 时被 PBMCs 杀伤的比例显著增加[空载体对照组:(73.33±0.67) *vs* BAML1 过表达组:(81.00±0.58),$P=0.01$];而 E:T 为10:1亦是同样的趋势[空载体对照组:(76.67±0.33) *vs* BAML1 过表达组:(82.67±1.86),$P<0.05$,图 3]。



a: $P<0.05$,与空载体对照组比较

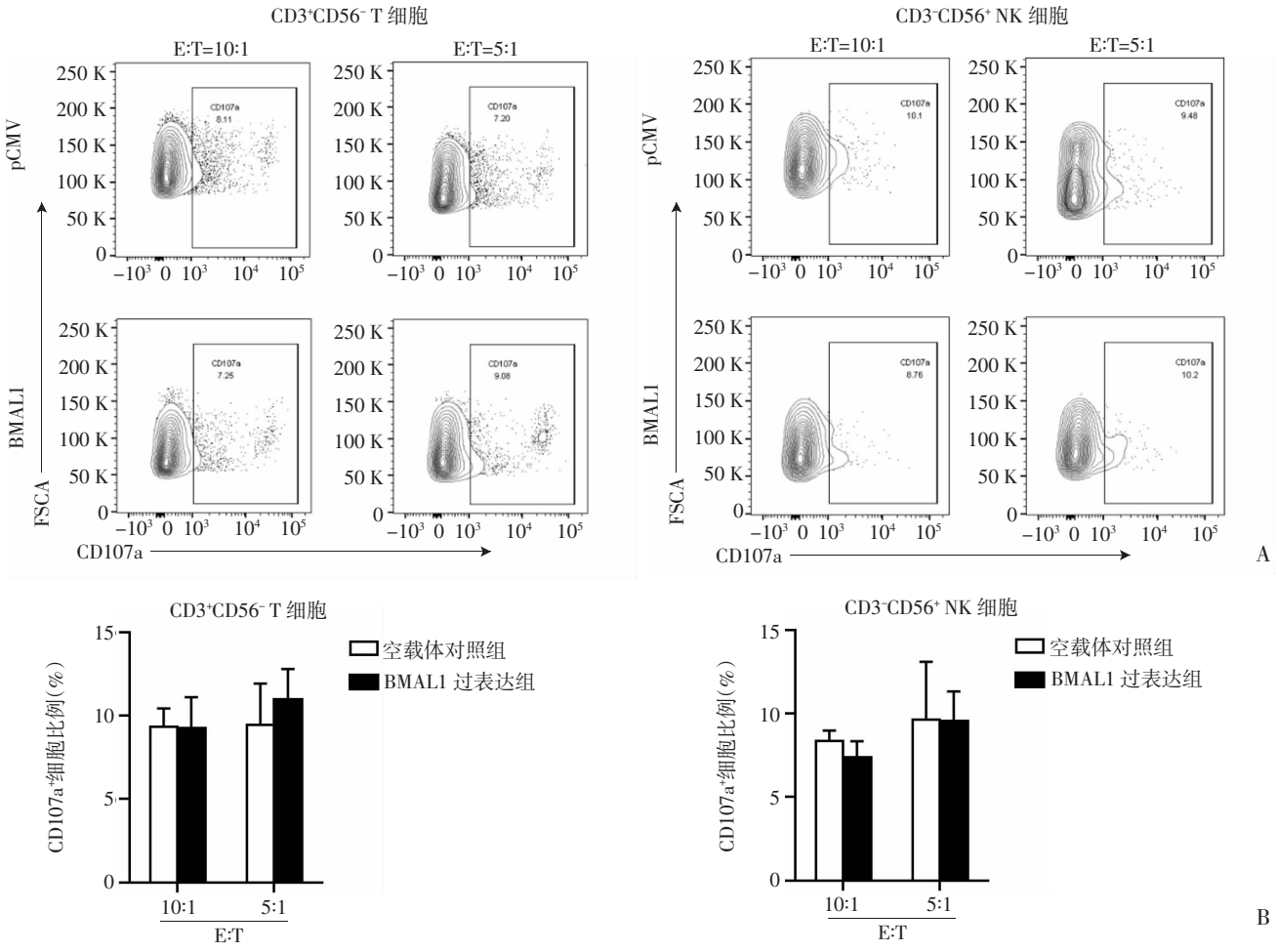
图 3 BMAL1 增强 PBMCs 对 U2OS 细胞的杀伤作用

2.4 PBMCs 对 BMAL1 过表达的 U2OS 细胞杀伤增加不依赖 T 细胞和 NK 细胞的脱颗粒作用

由于 $CD8^+$ T 细胞和 NK 细胞是主要的免疫细胞亚群,对肿瘤细胞具有直接的细胞毒性作用。因此检测 PBMCs 与 U2OS 细胞共培养 6 h 后,PBMCs 中 T 细胞和 NK 细胞脱颗粒水平(CD107a 表达)。数据显示,与空载体对照组细胞相比,BAML1 过表达组的 U2OS 细胞与 PBMCs 共培养 6 h 后,在 E:T 比为5:1 时,$CD3^+$ $CD56^-$ T 细胞和 $CD3^-$ $CD56^+$ NK 细胞表面 CD107a 表达差异无统计学意义[$CD3^+$ $CD56^-$T 细胞:空载体对照组(9.46±0.64) *vs* BMAL1 组(10.93±1.08),P=0.46;$CD3^-$ $CD56^+$ NK 细胞:空载体对照组(9.63±2.00) *vs* BMAL1 过表达组(9.51±1.05),P=0.96]。而 E:T 比为10:1时,两种细胞表面 CD107a 表达差异也无统计学意义[$CD3^+$ $CD56^-$T 细胞:空载体对照组(9.32±0.64) *vs* BMAL1 过表达组(9.21±1.10),P=0.93;$CD3^-$ $CD56^+$ NK 细胞:空载体对照组(8.35±0.36) *vs* BMAL1 过表达组(7.33±0.59),P=0.21,图 4]。结果显示 T 细胞和 NK 细胞脱颗粒不是增强过表达 BMAL1 的骨肉瘤细胞杀伤的主要原因。

3 讨论

昼夜节律紊乱已成为多种癌症发展的重要危险因素。GERY 等[19]报道,肺癌和乳腺癌患者的 PER1 表达水平分别比正常组织低 70% 和 46%。此外,在肝细胞癌和乳腺癌中有多个节律分子的表达降低(BMAL1、PER1、PER2、CRY1 和 RORα)[19]。本研究发现具有较高 BMAL1、PER1、CRY1、CRY2、CLOCK、NR1D1 和 NR1D2 表达水平的骨肉瘤患者表现出更好的生存率。进一步研究表明,BMAL1 高表达改善了骨肉瘤细胞的重组和杀伤细胞对其直接细胞毒性。这可能是节律基因 BMAL1 高表达改善骨肉瘤患者生存的主要原因。



A~B:流式细胞术检测 $CD3^+$ $CD56^-$ T 细胞和 $CD3^-$ $CD56^+$ NK 细胞中 $CD107a^+$细胞比例和统计分析结果

图 4 BMAL1 过表达的 U2OS 细胞不通过 T 细胞和 NK 细胞脱颗粒作用

多项研究证实核心昼夜节律分子参与肿瘤的发展和治疗反应的临床证据。研究表明,与野生型小鼠相比,Per2 基因敲除小鼠的唾液腺增生、淋巴瘤、血管肉瘤和畸胎瘤的发生率增加了。这可能是由于敲除 Per2 可以促进 c-myc 的表达,从而在细胞 DNA 受损的条件下促进细胞周期从 G_0 期过渡到 G_1 期,促进肿瘤发生[14]。节律分子 BMAL1 的过度表达抑制了结肠癌细胞的增殖和克隆形成[20]。然而,我们发现 BMAL1 的过表达并没有影响骨肉瘤细胞的侵袭和克隆形成,这表明不同的昼夜节律基因在各种肿瘤中的作用也不尽相同[21-22]。

免疫监视是一个复杂的生物学过程,是肿瘤细胞与特定效应细胞之间的动态平衡。肿瘤细胞可以通过表达免疫抑制性配体以逃避它们对免疫系统的识别和杀伤,还可通过分泌细胞因子以下调免疫激活表面标志物,从而抑制免疫系统对其免疫监视作用[13]。本研究发现 U2OS 细胞过表达 BMAL1 后增强了含有各种杀伤细胞的 PBMC 对其直接杀伤力。但是,当与 BMAL1 过表达的 U2OS 细胞共培养时,我们没有观察到 PBMC 中两个主要杀伤细胞亚群 T 细胞和 NK 细胞脱粒现象的增加。一方面这可能是因为 T 细胞和 NK 细胞可能使用其他方式杀伤骨肉瘤细胞。例如,细胞毒性 T 细胞和 NK 细胞使用 CD95L 或 TNF 相关的凋亡诱导配体(TRAIL)将其各自的死亡受体 CD95/Fas 和 TRAIL-R1-R2 结合在靶细胞表面,从而激活死亡受体活化诱导靶细胞凋亡[23]。另一方面,我们也不能排除其他类型免疫细胞的作用,如巨噬细胞等吞噬细胞对肿瘤细胞亦具有重要的杀伤作用。例如,PAHL 等[24]报道巨噬细胞的极化可以抑制骨肉瘤的生长。

在肿瘤微环境中,免疫细胞昼夜节律分子的高表达是导致骨肉瘤患者生存率提高的重要原因。昼夜节律参与免疫系统的许多生理功能,昼夜节律的变化,例如时钟基因突变或时差反应,可能导致免疫系统疾病[25]。NOBIS 等[26]报道,$CD8^+$ T 细胞在中午时对小鼠的树突状细胞表现出最强的抗原呈递反应。当使用 BMAL1 缺陷型树突状细胞刺激 BMAL1 敲除的 T 细胞时,$CD8^+$ T 细胞对树突状细胞抗原递呈反应的节律性消失。当昼夜节律时钟基因 Per2 被敲除后,NK 细胞中颗粒酶 B 和穿孔素的蛋白水平降低。因此,免疫细胞在调节骨肉瘤预后中的内在作用值得进一步深入研究。

总之,昼夜节律基因 BMAL1 与骨肉瘤患者的预后呈正相关,这可能是由于杀伤细胞对具有高表达 BMAL1 的骨肉瘤细胞的免疫监视作用增强。进一步研究骨肉瘤中 BMAL1 介导的免疫细胞杀伤力增强的详细机制,将有助于提出新的免疫疗法策略,以改善骨肉瘤患者的生存和预后。

参考文献:

[1] BIERMANN J S, ADKINS D R, AGULNIK M, *et al*. Bone cancer[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2013, 11(6): 688-723. DOI: 10.6004/jnccn.2013.0088.

[2] NG A J, MUTSAERS A J, BAKER E K, *et al*. Genetically engineered mouse models and human osteosarcoma[J]. Clin Sarcoma Res, 2012, 2(1): 1-14. DOI: 10.1186/2045-3329-2-19.

[3] ALLISON D C, CARNEY S, AHLMANN E R, *et al*. A meta-analysis of osteosarcoma outcomes in the modern medical era[J]. Sarcoma, 2012, 2012: 704872. DOI: 10.1155/2012/704872.

[4] LONGHI A, ERRANI C, DE PAOLIS M, *et al*. Primary bone osteosarcoma in the pediatric age: state of the art[J]. Cancer Treat Rev, 2006, 32(6): 423-436. DOI: 10.1016/j.ctrv.2006.05.005.

[5] KAGER L, ZOUBEK A, POTSCHGER U, *et al*. Primary metastatic osteosarcoma: presentation and outcome of patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols[J]. J Clin Oncol, 2003, 21(10): 2011-2018. DOI: 10.1200/JCO.2003.08.132.

[6] KAGER L, TAMAMYAN G, BIELACK S. Novel insights and therapeutic interventions for pediatric osteosarcoma[J]. Futur Oncol, 2017, 13(4): 357-368. DOI: 10.2217/fon-2016-0261.

[7] JONES K B. Osteosarcoma genesis: modeling cancer initiation in the mouse[J]. Sarcoma, 2011, 2011: 694136. DOI: 10.1155/2011/694136.

[8] LUSSIER D M, JOHNSON J L, HINGORANI P, *et al*. Combination immunotherapy with α-CTLA-4 and α-PD-L1 antibody blockade prevents immune escape and leads to complete control of metastatic osteosarcoma[J]. J Immunother Cancer, 2015, 3: 21. DOI: 10.1186/s40425-015-0067-z. eCollection 2015.

[9] HEYMANN M F, SCHIAVONE K, HEYMANN D. Bone sarcomas in the immunotherapy era[J]. Br J Pharmacol, 2020, 23. DOI: 10.1111/bph.14999.

[10] BASS J, LAZAR M A. Circadian time signatures of fitness and disease[J]. Science, 2016, 354(6315): 994-999. DOI: 10.1126/science.aah4965.

[11] PANDA S. Circadian physiology of metabolism[J]. Sci-

ence, 2016, 354(6315): 1008-1015. DOI: 10.1126/science.aah4967.

[12] FU L, PELICANO H, LIU J S, *et al*. The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo[J]. Cell,2002,111(1): 41-50. DOI: 10.1016/s0092-8674(02)00961-3.

[13] LOGAN R W, ZHANG C Q, MURUGAN S, *et al*. Chronic shift-lag alters the circadian clock of NK cells and promotes lung cancer growth in rats[J]. J Immunol, 2012, 188(6): 2583-2591. DOI: 10.4049/jimmunol.1102715.

[14] WU Y C, TAO B R, ZHANG T Y, *et al*. Pan-cancer analysis reveals disrupted circadian clock associates with T cell exhaustion[J]. Front Immunol, 2019, 10: 2451. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02451.

[15] KIM E, JUNG S, PARK W S, *et al*. Upregulation of SLC2A3 gene and prognosis in colorectal carcinoma: analysis of TCGA data[J]. BMC Cancer,2019 ,19(1): 302. DOI: 10.1186/s12885-019-5475-x.

[16] ZHANG S J, ZHANG J M, DENG Z Y,*et al*. Circadian clock components RORα and BMAL1 mediate the anti-proliferative effect of MLN4924 in osteosarcoma cells[J]. Oncotarget, 2016,7(40): 66087-66099. DOI: 10.18632/oncotarget.11807.

[17] GATTI R, BELLETTI S, ORLANDINI G, *et al*. Comparison of annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy[J]. J Histochem Cytochem, 1998, 46(8): 895-900. DOI: 10.1177/002215549804600804.

[18] AKTAS E, KUCUKSEZER U C, BILGIC S, *et al*. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity[J]. Cell Immunol, 2009;254(2): 149-154. DOI: 10.1016/j.cellimm.2008.08.007.

[19] GERY S, KOMATSU N, BALDJYAN L, *et al*. The circadian gene per1 plays an important role in cell growth and DNA damage control in human cancer cells[J]. Mol Cell, 2006, 22(3): 375-382. DOI: 10.1016/j.molcel.2006.03.038.

[20] ZENG Z L, LUO H Y, YANG J, *et al*. Overexpression of the circadian clock gene BMAL1 increases sensitivity to oxaliplatin in colorectal cancer[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(4): 1042-1052. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0171.

[21] ZHANG F, SUN H, ZHANG S, *et al*. Overexpression of PER3 inhibits self-renewal capability and chemoresistance of colorectal cancer stem-like cells via inhibition of notch and β-catenin signaling[J]. Oncol Res, 2017, 25(5): 709-719. DOI: 10.3727/096504016X14772331883976.

[22] PURAM R V, KOWALCZYK M S, DE BOER C G, *et al*. Core circadian clock genes regulate leukemia stem cells in AML[J]. Cell, 2016, 165(2): 303-316. DOI: 10.1016/j.cell.2016.03.015.

[23] XIA W K, LIU Z L, SHEN D, *et al*. Prognostic performance of pre-treatment NLR and PLR in patients suffering from osteosarcoma[J]. World J Surg Oncol, 2016, 14(1): 1-8. DOI: 10.1186/s12957-016-0889-2.

[24] PAHL J H, KWAPPENBERG K M, VARYPATAKI E M, *et al*. Macrophages inhibit human osteosarcoma cell growth after activation with the bacterial cell wall derivative liposomal muramyl tripeptide in combination with interferon-γ[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2014, 33(1): 27. DOI: 10.1186/1756-9966-33-27.

[25] LABRECQUE N, CERMAKIAN N. Circadian clocks in the immune system[J]. J Biol Rhythms, 2015, 30(4): 277-290. DOI: 10.1177/0748730415577723.

[26] NOBIS C C, DUBEAU LARAMÉE G, KERVEZEE L, *et al*. The circadian clock of CD8 T cells modulates their early response to vaccination and the rhythmicity of related signaling pathways[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(40): 20077-20086. DOI: 10.1073/pnas.1905080116.

(**收稿**:2020-06-01;**修回**:2020-08-12)

(编辑 王 红)