

RHPN2在骨肉瘤细胞中高表达并与较差的预后相关

刘智宇¹, 方锋助¹, 李京², 赵广跃¹, 臧全金², 张峰¹, 牒军¹

¹西安市人民医院(西安市第四医院)骨科病院, 陕西 西安 710004; ²西安交通大学第二附属医院骨科, 陕西 西安 710004

摘要:目的 筛选骨肉瘤细胞中异常表达的基因,探究RHPN2对骨肉瘤细胞体外增殖、凋亡和迁移能力以及对体内成瘤能力的影响。方法 采用GEO2R分析GSE70414数据集中骨肉瘤细胞与正常细胞的基因差异表达,RT-qPCR和Western blot实验检测人骨肉瘤细胞系MG-63、143B和SAOS2中RHPN2的表达情况。分别采用两种RHPN2-shRNA和对照组NC-shRNA转染143B细胞,CCK8实验、CFU实验、Annexin V-FITC/PI染色以及划痕试验分别检测RHPN2沉默对143B细胞增殖能力、凋亡和迁移能力的影响。采用143B细胞和RHPN2-shRNA转染的143B细胞原位注射构建裸鼠骨肉瘤原位瘤模型,并对肿瘤组织进行HE染色来验证RHPN2沉默对骨肉瘤细胞体内成瘤的影响。采用KM生存曲线分析RHPN2的表达与骨肉瘤患者生存预后的相关性。结果 RHPN2在骨肉瘤细胞系MG-63、143B和SAOS2中的表达明显上调($P<0.01$);RHPN2的沉默能够显著抑制骨肉瘤143B细胞的体外增殖和迁移,促进凋亡过程($P<0.01$),并且抑制143B细胞的体内成瘤能力;RHPN2高表达的骨肉瘤患者的总体生存率明显低于低表达患者($P<0.05$)。结论 RHPN2在骨肉瘤细胞中高表达,能够促进骨肉瘤细胞的增殖和迁移,抑制凋亡,并且与骨肉瘤患者较差的预后相关。

关键词:骨肉瘤;生信分析;RHPN2;增殖;预后

RHPN2 is highly expressed in osteosarcoma cells to promote cell proliferation and migration and inhibit apoptosis

LIU Zhiyu¹, FANG Fengzhu¹, LI Jing², ZHAO Guangyue¹, ZANG Quanjin², ZHANG Feng¹, DIE Jun¹

¹Orthopedic Hospital of Xi'an People's Hospital (Xi'an Fourth Hospital), Xi'an 710004, China; ²Department of Orthopedics, Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China

Abstract: Objective To screen for aberrantly expressed genes in osteosarcoma cells and investigate the role of RHPN2 in regulating the proliferation, apoptosis, migration and tumorigenic abilities of osteosarcoma cells. **Methods** We used GEO2R to analyze the differential gene expression profile between osteosarcoma cells and normal cells in the GSE70414 dataset. RT-qPCR and Western blotting were performed to detect RHPN2 expression in osteosarcoma cell lines MG-63, 143B and SAOS2. Two RHPN2-shRNA and a control NC-shRNA were designed to silence the expression of RHPN2 in 143B cells, and CCK8 assay, colony-forming assay, annexin V-FITC/PI staining and scratch assays were carried out to examine the changes in proliferation, apoptosis and migration of the cells. We also established nude mouse models bearing osteosarcoma xenografts derived 143B cells and RHPN2-shRNA-transfected 143B cells, and assessed the effect of RHPN2 silencing on osteosarcoma cell tumorigenesis using HE staining. Kaplan-Meier survival curves were used to analyze the correlation between RHPN2 expression and survival outcomes of patients with osteosarcoma. **Results** RHPN2 expression was significantly upregulated in osteosarcoma cell lines MG-63, 143B and SAOS2 ($P<0.01$). Silencing of RHPN2 significantly inhibited the proliferation and migration of 143B cells *in vitro*, promoted cell apoptosis ($P<0.01$), and suppressed tumorigenic capacity of the cells in nude mice. A high expression of RHPN2 was significantly correlated with a poor prognosis of patients with osteosarcoma ($P<0.05$). **Conclusion** RHPN2 is highly expressed in osteosarcoma cells to promote cell proliferation and migration and inhibits cell apoptosis. A high expression of RHPN2 is associated with a poorer prognosis of the patients with osteosarcoma.

Keywords: osteosarcoma; bioinformatics analysis; RHPN2; proliferation; prognosis

骨肉瘤是一种起源于间叶组织的最常见的原发性恶性骨肿瘤,在儿童和青少年中发病率最高^[1-3]。骨肉瘤好发于血运丰富的四肢长骨干骺端,如股骨远端和胫骨近端等^[4]。骨肉瘤的临床症状通常表现为局部肿胀和疼痛,偶尔伴有关节活动障碍,其具有较高的转移倾向,早期极易发生转移,尤其是肺部转移,并且病情发展迅速^[5,6]。骨肉瘤的治疗目前已从早期单纯的外科截肢手术发展为新辅助化疗联合保肢手术的综合治疗^[7,8]。

在这种联合治疗方式下,局限性骨肉瘤患者的5年生存率已从20%提高至60%~70%,但治疗效果的进一步提高在现阶段陷入了瓶颈,而转移性和复发性骨肉瘤患者的生存率仍然很低^[9,10]。因此深入探究骨肉瘤中复杂的发病、进展的细胞机制与分子信号机理仍迫在眉睫。

RHPN2基因位于染色体19q13上,编码Ras同源家族成员a结合蛋白(RhoA),调节肌动蛋白细胞骨架和囊泡运输^[11]。RHPN2是侵袭性胶质母细胞瘤中间充质转化的新驱动基因,其异常扩增与胶质瘤患者总体生存率显著降低有关^[12]。RHPN2在肺癌患者的肿瘤中过度表达,其赋予了肺癌细胞对谷氨酰胺缺失的抵抗力,RHPN2的异位过度表达通过Ser62处的磷酸化促进了

收稿日期:2022-04-18

基金项目:陕西省重点研发项目2020SF-194

作者简介:刘智宇,硕士,主治医师,E-mail: liu134_a@163.com

通信作者:方锋助,主治医师,E-mail: 342359481@qq.com

c-Myc蛋白的稳定性,并增加了c-Myc靶点谷氨酰胺合成酶(GS),且高水平的GS与肺腺癌患者的总体生存时间差显著相关^[13]。在胰腺导管腺癌的研究中,RHPN2同样在肿瘤组织和癌细胞中过度表达,抑制其表达后能够降低癌细胞的增殖并诱导其凋亡,且胰腺导管癌组织中RHPN2的高表达与患者的低总体生存率相关^[14]。此外,在卵巢癌^[15]、肝细胞癌^[16]以及前列腺癌^[17]的研究中均发现RHPN2的过表达能够影响癌细胞的生物学过程,并且和较差的预后相关。然而,RHPN2在骨肉瘤中的表达及作用情况尚不清楚。

GEO数据库是美国国立生物技术信息中心NCBI创建并维护的基因表达数据库,其收录了大量的肿瘤基因表达数据^[18-20],本研究基于GEO数据库中骨肉瘤相关的基因表达芯片数据,筛选骨肉瘤细胞较正常细胞中差异表达的基因,探究差异基因在癌细胞中发挥的生物学作用,并且验证差异基因与骨肉瘤患者生存预后的相关性,为临床治疗骨肉瘤确定新的分子靶点提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 细胞和主要试剂

HEK293T细胞、成骨细胞hFOB1.19和骨肉瘤细胞系MG-63、143B和SAOS2(美国模式培养物集存库);DMEM培养基,青链霉素,胰酶(Hyclone);胎牛血清(Gibco);pLKO.1 puro质粒,BSA(Sigma);Lipofectamine 2000转染试剂(ThermoFisher);RIPA裂解液,SDS配胶试剂盒,上样缓冲液,CCK8试剂盒,苏木素和伊红染色液(上海碧云天公司);Annexin V-FITC/PI双染发细胞凋亡检测试剂盒(上海七海复泰生物科技有限公司)。

1.2 细胞培养和转染

HEK293T细胞、成骨细胞hFOB1.19和骨肉瘤细胞系MG-63、143B和SAOS2用含10%胎牛血清和1%青链霉素的DMEM培养液培养。hFOB1.19细胞置于33.5℃、5%CO₂,HEK293T细胞和骨肉瘤细胞置于37℃、5%CO₂的培养箱中,每隔1d换1次液。构建两种靶向RHPN2(NM_033103.5)序列的shRNA,然后将目标shRNA(RHPN2-shRNA#1和RHPN2-shRNA#2)和一个乱码的shRNA(NC-shRNA)克隆进pLKO.1 puro质粒中并用PCR验证序列。按照生产厂家的说明书,使用Lipofectamine 2000转染试剂将含shRNA质粒、包装质粒和包膜质粒的混合物共转染HEK293T细胞来获得表达shRNA的慢病毒。转染48h后,收集含慢病毒的上清液。将处于对数生长期的143B细胞以1×10⁵/孔的密度接种于6孔板中,24h后弃去培养液,加入制备好的病毒转染液并置于恒温培养箱中培养12h,以获得稳

定转染的细胞。使用RT-qPCR验证RHPN2的基因敲除效率。shRNA序列如下:RHPN2-shRNA#1正义链:5'-CCGGGCCGGAGTAAATTGCAGA ACTCGAGTTCTGCAATTTACTCCGGCTTTTTG-3',反义链:5'-AATTCAAAAAGCCGGAGTAAATTGCAGAACTCGAGTTCTGCAATTTACTCCGGC-3';RHPN2-shRNA#2正义链:5'-CCGGGCTCGTCAAAATGATGCTTCTCGAGAAGCATCATTTTGACGAGCTTTTTG-3',反义链:5'-AATTCAAAAAGCTCGTCAAAATGATGCTTCTCGAGAAGCATCATTTTGACGAGC-3'。

1.3 生物信息学分析

检索GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中的GSE70414数据集,并进行GEO2R分析,以P<0.05筛选骨肉瘤细胞和正常细胞间差异表达的基因,根据筛选基因的差异倍数(Fold change, FC)的对数值(logFC)定义上调和下调基因,其中logFC>2为上调,logFC<-2为下调。使用TCGA数据库和TARGET数据库中骨肉瘤患者相关数据确定RHPN2的表达与骨肉瘤患者生存预后的相关性。

1.4 RT-qPCR

使用Trizol试剂从不同处理组的细胞中提取总RNA,按照说明书将RNA反转录为cDNA,采用SYBR Green法进行扩增和定量。以GAPDH作为内参,使用2^{-ΔΔCT}公式计算相对表达值。引物序列如下:RHPN2上游引物:5'-GGAGAGTGCCATAGATGCCTTTCAG-3',下游引物:5'-GCAGGGCTCATGTCGTAACCTTGG-3';GAPDH上游引物:5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3',下游引物:5'-CACGGTGCCATCAATACAGG-3'。

1.5 Western blot

使用RIPA裂解液从不同处理组的细胞中提取总蛋白,进行BCA蛋白定量。将等量的蛋白质与上样缓冲液混合后,在SDS聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离蛋白,然后转移到PVDF膜上。将膜置于5%BSA中封闭半小时后,分别用一抗和二抗孵育。孵育完成后,加入ECL发光液在化学发光系统中进行显影,并拍照分析。所用抗体:RHPN2抗体(1:1000),GAPDH抗体(1:2000),HRP标记的山羊抗兔IgG二抗(1:2000)。

1.6 CCK8实验

收集处于对数生长期的不同转染的143B细胞,调整细胞密度至1000/孔接种于96孔板中,然后放在二氧化碳恒温培养箱中培养。培养2d后弃去上清液,在每孔中加入含10% CCK8溶液的细胞培养液。孵育2h后,酶标仪检测每孔的吸光度A_{450nm}值。

1.7 集落形成(CFU)实验

收集处于对数生长期的不同转染的143B细胞,调整细胞密度至1500/孔接种于6孔板中,然后放在二氧

化碳恒温培养箱中培养。培养2~3周,待皿中出现肉眼可见的集落形成时,弃去培养上清液。用PBS缓冲液清洗3遍后,加入甲醇进行固定15 min,然后弃去甲醇。待皿中干燥后,加入Giemsa染液染色10 min,染色完成后用PBS缓冲液清洗。待皿中干燥,对皿中形成的集落进行拍照并计数。

1.8 划痕试验

收集处于对数生长期的不同转染的143B细胞,调整细胞密度至 2×10^5 /孔接种于24孔板中,然后放在二氧化碳恒温培养箱中培养。待细胞融合度达到90%左右时,用200 μ L枪头在孔中竖直画一条直线,然后用PBS缓冲液清洗3遍以除去划下的细胞碎片。在显微镜下观察,并拍照记录0 h的划痕情况。置于培养箱中继续培养48 h后,在显微镜下观察,并拍照记录48 h的划痕情况。按如下公式计算细胞划痕愈合率:划痕愈合率=(0 h划痕面积-48 h划痕面积)/0 h划痕面积 $\times 100\%$ 。

1.9 Annexin V-FITC/PI染色

将不同转染的143B细胞接种于6孔板中,待培养48 h后,收集细胞上清液及贴壁的细胞。离心弃去上清液后,加入400 μ L $1 \times$ Binding Buffer重悬细胞。加入5 μ L Annexin V-FITC,室温避光孵育15 min。然后加入10 μ L PI染色液,冰浴避光孵育5 min,然后在30 min内置于流式细胞仪中进行检测。

1.10 异种移植瘤实验和HE染色

本实验选用的6只4周龄的BALB/c雄性裸鼠购自西安交通大学医学部动物实验中心,并饲养于SPF动物房。把6只裸鼠随机分为143B组和RHPN2-shRNA组,每组各3只。将143B细胞和RHPN2-shRNA转染的143B细胞用PBS缓冲液制成细胞悬液,分别用1 mL注射器在两组裸鼠的左侧股旁肌肉内注射,每只裸鼠注射 1×10^6 细胞。随后每周测量1次瘤体的大小,在注射

后第8周时脱颈处死荷瘤裸鼠,终止实验。将瘤体取出制成组织切片进行后续染色。所有动物实验均通过西安交通大学医学部生物科研伦理审批(2021-1724)。

将骨肉瘤组织切片按如下顺序进行脱蜡:二甲苯10 min \rightarrow 二甲苯10 min \rightarrow 无水乙醇5 min \rightarrow 无水乙醇5 min \rightarrow 95%酒精5 min \rightarrow 95%酒精5 min \rightarrow 80%酒精5 min \rightarrow 70%酒精5 min \rightarrow 蒸馏水清洗。然后用苏木素染色4 min,经1%盐酸酒精分化数秒后用1%稀氨水返蓝30 s,随后用伊红染液染色2 min。最后经95%的酒精和无水乙醇各脱水5 min,用二甲苯透明20 min后封片。在显微镜下观察并拍照。

1.11 统计学分析

SPSS 22.0被用来进行统计学分析处理,符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差的形式表示。两组间差异比较采用 t 检验,Kaplan-Meier(KM)生存曲线用于分析RHPN2表达值与患者总体生存率之间的关系。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 生物信息学分析骨肉瘤细胞中异常表达的基因

基于GEO数据库中GSE70414数据集进行GEO2R分析显示,在骨肉瘤细胞与正常细胞样本差异最明显的20个基因中,有10个基因在骨肉瘤细胞中上调,10个基因在骨肉瘤细胞中下调(图1A)。RHPN2是骨肉瘤中明显上调的基因之一(图1B)。

2.2 RHPN2在骨肉瘤细胞系中表达情况

和GEO分析结果一致的是,RHPN2在骨肉瘤细胞中的表达明显高于成骨细胞,且在143B细胞中的表达最高($P < 0.01$,图2A)。为了分析RHPN2对骨肉瘤细胞的作用,采用两种shRNA转染143B细胞来对RHPN2进行基因沉默。PCR实验显示,对照组NC-shRNA转

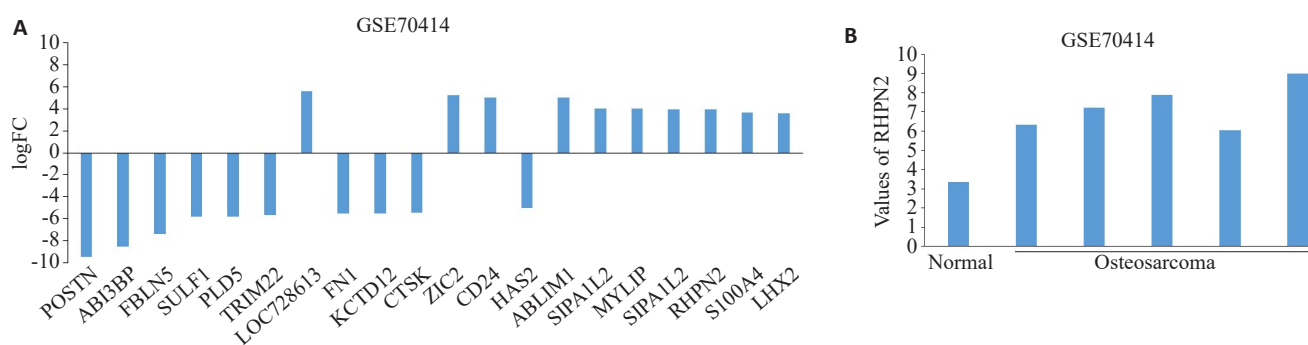


图1 GSE70414数据集中骨肉瘤细胞的差异表达基因分析

Fig.1 Analysis of differentially expressed genes in osteosarcoma cells in the GSE70414 dataset. A: The top 20 significant differentially expressed genes in osteosarcoma cells versus normal cell samples. B: Detection values of RHPN2 in normal and osteosarcoma cells in the GSE70414 dataset.

染的143B细胞中RHPN2的含量与未转染的143B细胞没有明显差异,而RHPN2-shRNA#1和RHPN2-shRNA#2转染的143B细胞中RHPN2的含量明显下调,且RHPN2-shRNA#2的沉默效率更为显著,于是在

后续实验中选用shRNA#2转染的143B细胞进行试验($P<0.01$,图2B)。Western blot实验结果显示RHPN2-shRNA同样在蛋白质水平抑制RHPN2的表达(图2C)。

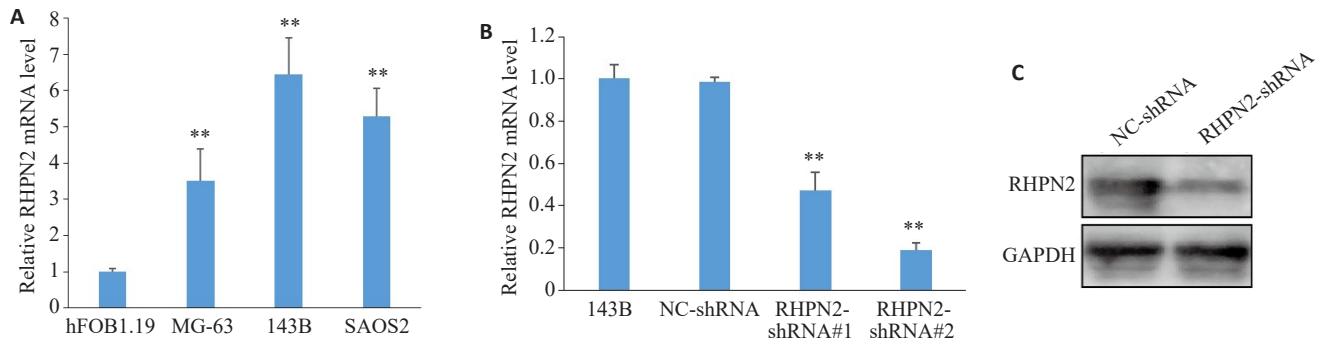


图2 骨肉瘤细胞系中RHPN2的基因表达情况

Fig.2 Expression of RHPN2 in osteosarcoma cell lines. A: Relative expression of RHPN2 in osteoblasts and osteosarcoma cells examined by RT-qPCR. ** $P<0.01$ vs hFO1.19. B: Efficiency of shRNA for RHPN2 gene silencing in 143B cells detected by PCR assay. ** $P<0.01$ vs 143B and NC-shRNA. C: Effect of shRNA on RHPN2 protein expression in 143B cells.

2.3 RHPN2对骨肉瘤细胞增殖、凋亡和迁移的影响

CCK8实验结果显示与未转染和NC-shRNA转染相比,RHPN2-shRNA转染能够明显抑制骨肉瘤细胞的增殖能力($P<0.01$,图3A),同样,CFU实验显示RHPN2-shRNA转染的143B细胞其克隆形成能力明显降低(图3B)。Annexin V-FITC/PI染色结果显示RHPN2-shRNA转染后,凋亡的143B细胞的比例显著增加(图3C)。与未转染和NC-shRNA转染相比,RHPN2-shRNA转染的143B细胞的划痕愈合能力明显受到抑制($P<0.01$,图3D)。

2.4 RHPN2对骨肉瘤体内成瘤能力的影响

图4结果显示,RHPN2-shRNA组的裸鼠骨肉瘤的大小要明显小于143B组。对骨肉瘤组织进行HE染色,结果显示,与143B组相比,RHPN2-shRNA组的骨肉瘤组织更加松散,空泡状成分增加,胞核数量明显减少。

2.5 RHPN2对骨肉瘤患者预后的影响

对TCGA数据库和TARGET数据库中骨肉瘤患者的生存预后情况和RHPN2的表达情况进行统计分析,绘制KM生存曲线。结果显示与低表达RHPN2的骨肉瘤患者相比,高表达RHPN2的骨肉瘤患者的预后生存率明显降低,RHPN2的高表达与骨肉瘤患者较差的预后相关(图5)。

3 讨论

骨肉瘤发生和转移过程中基因表达的异常是一个重要的因素,而这复杂的生物学过程中产生异常表达的基因必然不是单一的,因此分析和寻找影响骨肉瘤进展的新的分子标志物十分重要^[21,22],在过去几十年的研究

中,关于骨肉瘤中异常表达基因的探索脚步从未停止。Zhao等^[23]的研究发现MCT1在人骨肉瘤细胞系中的表达明显增加,通过shRNA转染或MCT1抑制剂靶向MCT1的治疗均能延缓骨肉瘤原位瘤的生长,抑制骨肉瘤的转移活性,提高人骨肉瘤细胞对化疗药物阿霉素的敏感性,并且MCT1的高表达被证明与骨肉瘤患者总体生存率较低相关。Yao等^[24]的研究表明骨肉瘤组织和细胞系中高表达的TRAF4能够异常增强骨肉瘤细胞的增殖和迁移侵袭能力,且该过程是通过Akt的磷酸化实现的。同样,ST6Gal-I^[25]和AHSA1^[26]也被发现在骨肉瘤细胞中较高表达,其表达与癌细胞的增殖、迁移和侵袭等恶性行为有关。相反,IDH1在骨肉瘤组织中的表达要明显低于邻近正常骨组织,其上调能够显著抑制骨肉瘤细胞系的体外增殖和迁移入侵活动,抑制体内肿瘤的生长和转移^[27]。Guan等^[28]发现FOXO1对成骨细胞的存活起重要作用,其在骨肉瘤中的表达普遍较低或缺失,而染色体畸变可能是FOXO1表达异质性的可能原因。当激活FOXO1的表达时骨肉瘤细胞的增殖和存活能力受到明显抑制。如上所述,骨肉瘤中异常表达的基因在逐步被挖掘,而这些基因都有可能成为骨肉瘤预后和治疗的标志物。

本研究首先对GEO数据库中包含骨肉瘤细胞和正常细胞基因表达数据的GSE70414数据集进行差异分析,筛选出癌细胞和正常细胞具有明显表达差异的基因,选取这些基因中差异最明显的前20个进行分析,其中有10个基因上调,10个基因下调。锌指转录因子ZIC2在骨肉瘤细胞中明显上调,既往已有研究表明,ZIC2通过抑制SHIP2的表达和激活PI3K/AKT信号通

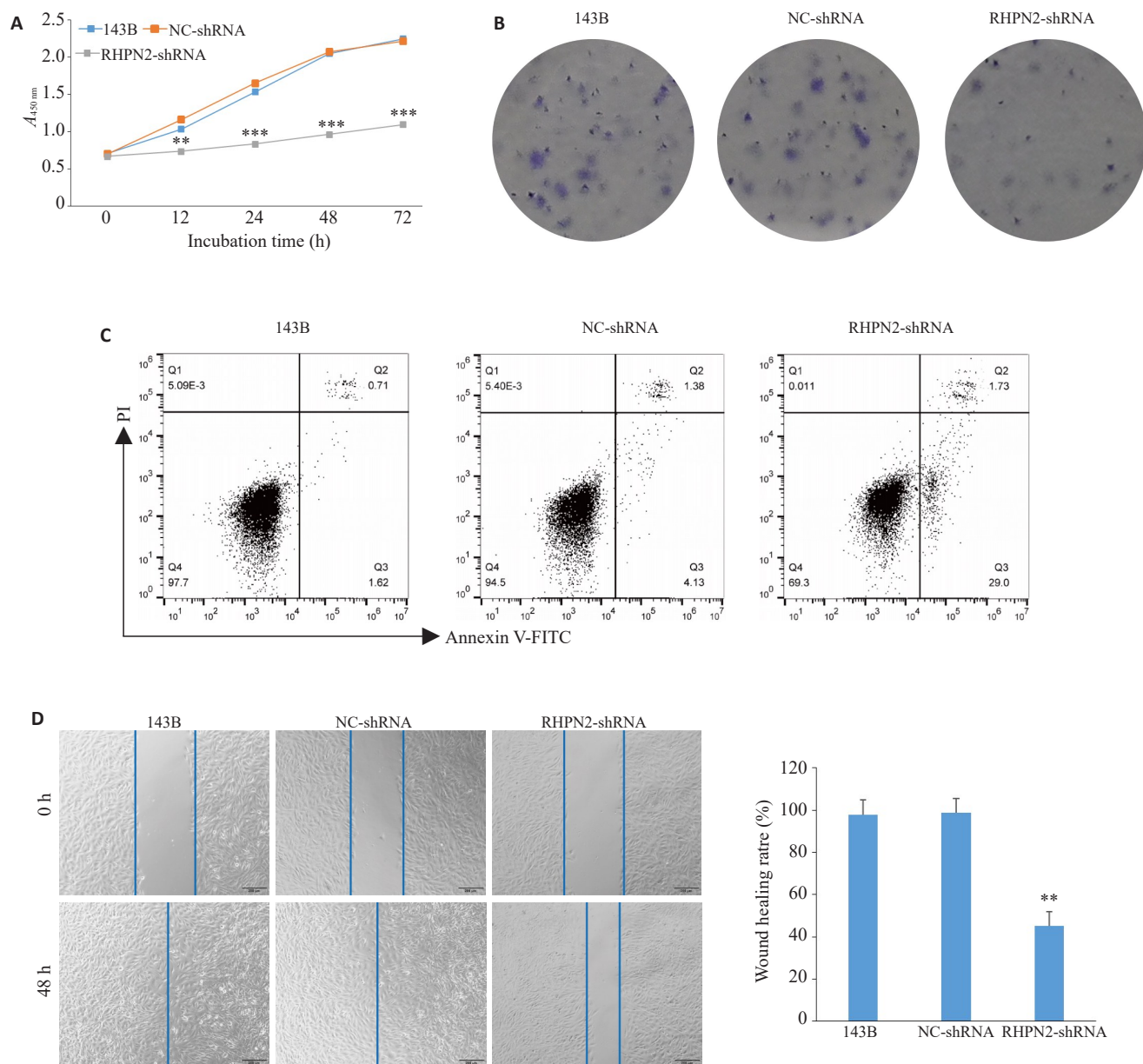


图3 沉默RHPN2基因对骨肉瘤细胞增殖、凋亡和迁移的影响

Fig.3 Effect of RHPN2 gene silencing on proliferation, apoptosis and migration of osteosarcoma cells. A: Detection of the effect of RHPN2-shRNA on proliferation of 143B cells by CCK8 assay. B: Effect of RHPN2-shRNA on colony-forming ability of 143B cells. C: Effect of RHPN2-shRNA on apoptosis of 143B cells analyzed by annexin V-FITC/PI staining. D: Effect of RHPN2-shRNA on the migration of 143B cells by wound healing assay. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.01$ vs 143B and NC-shRNA. Scale bar: 200 μ m.

路促进人骨肉瘤细胞的活力和侵袭^[29]。Song等^[30]的研究发现骨肉瘤中上调的转录因子LHX2通过mTOR促进骨肉瘤的发生并抑制自噬,且受miR-129-5p的负调节。RHPN2也是GSE70414数据集中骨肉瘤细胞明显上调的基因之一,鉴于其在既往多种肿瘤中都有高表达且能够加重肿瘤的恶性行为^[15,16],而在骨肉瘤中尚无明确研究,因此本实验对骨肉瘤中该基因的表达和作用进行了后续研究。首先通过PCR实验检测了RHPN2在几种骨肉瘤细胞系中的表达情况,发现与正常成骨细胞相比,RHPN2在骨肉瘤细胞系中的表达均明显上调。

为了探究RHPN2对骨肉瘤行为的影响,使用shRNA转染沉默143B细胞中RHPN2的表达。通过一系列的表型实验,我们发现RHPN2的沉默能够抑制骨肉瘤细胞的增殖能力和迁移能力,还能诱导骨肉瘤细胞的凋亡行为。和我们的研究结果一致的是,Yu等^[15]发现RHPN2能够通过激活STAT3信号传导促进卵巢癌中恶性细胞的增殖和迁移。Jiang等^[17]则发现人骨髓间充质干细胞衍生的外泌体中的miR-205通过抑制RHPN2来延缓前列腺癌的进展。本研究通过构建裸鼠的原位瘤模型发现,RHPN2沉默的143B细胞在小鼠体内的成瘤能力也

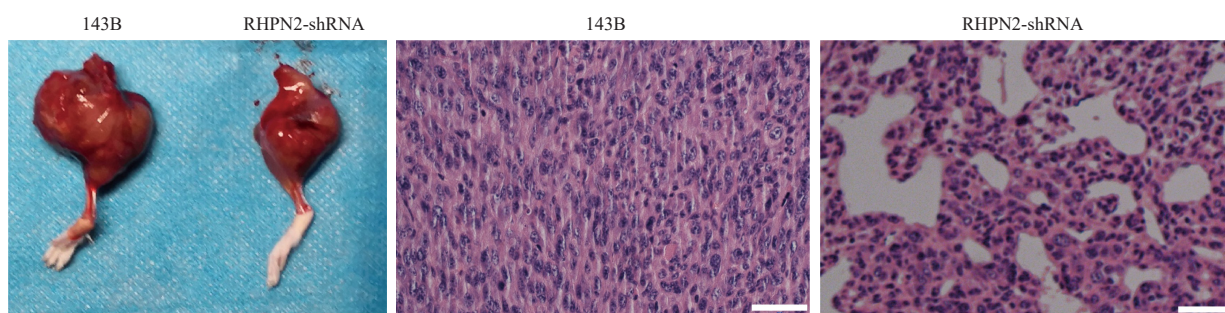


图4 沉默RHPN2基因对骨肉瘤细胞体内成瘤的影响

Fig.4 Effect of RHPN2 gene silencing on tumorigenesis of osteosarcoma cells in nude mice. A: Photographs of osteosarcomas in 143B group and RHPN2-shRNA group. B: HE staining of osteosarcoma tissues in 143B group and RHPN2-shRNA group (Scale bar: 50 μm).

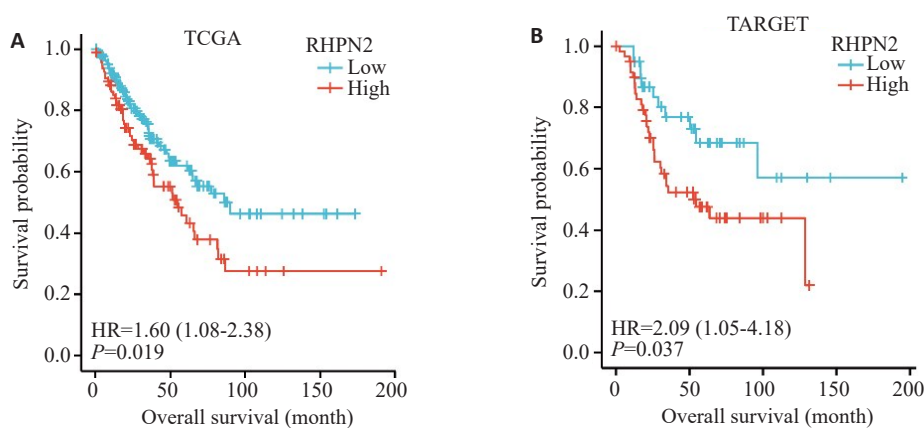


图5 生物信息学分析RHPN2对骨肉瘤患者预后的影响

Fig.5 Bioinformatic analysis of the effect of RHPN2 on prognosis of patients with osteosarcoma. A: Kaplan-Meier (KM) curves of the effect of RHPN2 expression on survival outcomes of osteosarcoma patients in the TCGA database. B: KM curves of the effect of RHPN2 expression on survival outcomes in osteosarcoma patients in the TARGET database.

明显受到抑制,具体表现为RHPN2沉默组的裸鼠骨肉瘤体积明显小于对照组,且瘤体结构松散,组织更加疏松,细胞数量减少。为了获得更多的临床数据,探究RHPN2在骨肉瘤患者中的预后影响情况,本实验对TCGA数据库和TARGET数据库中的骨肉瘤患者的RHPN2表达情况和临床信息进行挖掘,通过Cox回归分析并且绘制KM生存曲线,结果显示RHPN2高表达患者其总体生存率明显降低。以上结果说明,RHPN2很有可能作为骨肉瘤预测的分子标志物和潜在治疗靶点。

本研究筛选并证实了RHPN2在骨肉瘤细胞中的表达上调,首次发现RHPN2的沉默能够在体外抑制骨肉瘤细胞的增殖和迁移,诱导凋亡发生,并且RHPN2沉默的骨肉瘤细胞体内成瘤能力也受到明显抑制。此外,生物信息学分析显示RHPN2的高表达与骨肉瘤患者较差的生存预后相关。我们的研究丰富了对骨肉瘤发生过程中基因异常表达的认识,深入了解了RHPN2在骨

肉瘤中发挥的生物学作用,为RHPN2作为骨肉瘤治疗的潜在靶点提供了理论依据。然而RHPN2在骨肉瘤中过表达的上游分子机制及影响骨肉瘤增殖、凋亡和迁移过程的下游信号通路仍需进一步的探索与验证。

参考文献:

- [1] Whelan JS, Davis LE. Osteosarcoma, chondrosarcoma, and chordoma[J]. J Clin Oncol, 2018, 36(2): 188-93.
- [2] Belayneh R, Fourman MS, Bhogal S, et al. Update on osteosarcoma [J]. Curr Oncol Rep, 2021, 23(6): 71.
- [3] Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program[J]. Cancer, 2009, 115(7): 1531-43.
- [4] Lindsey BA, Markel JE, Kleinerman ES. Osteosarcoma overview [J]. Rheumatol Ther, 2017, 4(1): 25-43.
- [5] Nørregaard KS, Jürgensen HJ, Gårdsvoll H, et al. Osteosarcoma and metastasis associated bone degradation-A tale of osteoclast and

- malignant cell cooperativity[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13): 6865.
- [6] Sheng GH, Gao Y, Yang Y, et al. Osteosarcoma and metastasis[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 780264.
- [7] Biazzo A, de Paolis M. Multidisciplinary approach to osteosarcoma [J]. *Acta Orthop Belg*, 2016, 82(4): 690-8.
- [8] Qiu C, Liu TY, Luo D, et al. Novel therapeutic savior for osteosarcoma: the endorsement of ferroptosis [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 746030.
- [9] Anderson ME. Update on survival in osteosarcoma [J]. *Orthop Clin North Am*, 2016, 47(1): 283-92.
- [10] Jafari F, Javdansirat S, Sanaie S, et al. Osteosarcoma: a comprehensive review of management and treatment strategies[J]. *Ann Diagn Pathol*, 2020, 49: 151654.
- [11] Peck JW, Oberst M, Bouker KB, et al. The RhoA-binding protein, rhopilin-2, regulates actin cytoskeleton organization [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(46): 43924-32.
- [12] Danussi C, Akavia UD, Niola F, et al. RHPN2 drives mesenchymal transformation in malignant glioma by triggering RhoA activation [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(16): 5140-50.
- [13] Xiao DK, He JX, Guo ZH, et al. Rhophilin-2 upregulates glutamine synthetase by stabilizing c-myc protein and confers resistance to glutamine deprivation in lung cancer [J]. *Front Oncol*, 2021, 10: 571384.
- [14] Bo WT, Feng XL, Tang XL. Overexpression of rhophilin 2 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2021, 21(1): 76.
- [15] Yu FS, Qiao PP, Yin GJ, et al. RHPN2 promotes malignant cell behaviours in ovarian cancer by activating STAT3 signalling [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 11517-27.
- [16] Yuan B, Bo WT, Feng XL, et al. Overexpression of Rhophilin Rho GTPase-binding protein 2 promotes hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(6): 382.
- [17] Jiang SJ, Mo CQ, Guo SJ, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells-derived microRNA-205-containing exosomes impede the progression of prostate cancer through suppression of RHPN2 [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 495.
- [18] Rahman MH, Rana HK, Peng SL, et al. Bioinformatics and machine learning methodologies to identify the effects of central nervous system disorders on glioblastoma progression [J]. *Brief Bioinform*, 2021, 22(5): bbaa365.
- [19] Li WH, Ding ZY, Wang D, et al. Ten-gene signature reveals the significance of clinical prognosis and immuno-correlation of osteosarcoma and study on novel skeleton inhibitors regarding MMP9[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 377.
- [20] Xu CJ, Wang ZY, Zhang L, et al. Periostin promotes the proliferation and metastasis of osteosarcoma by increasing cell survival and activates the PI3K/Akt pathway[J]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22(1): 34.
- [21] Alfranca A, Martinez-Cruzado L, Tornin J, et al. Bone micro-environment signals in osteosarcoma development [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(16): 3097-113.
- [22] Shi DY, Wu FS, Mu SD, et al. LncRNA AFAP1-AS1 promotes tumorigenesis and epithelial-mesenchymal transition of osteosarcoma through RhoC/ROCK1/p38MAPK/ Twist1 signaling pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 375.
- [23] Zhao ZQ, Wu MS, Zou CY, et al. Downregulation of MCT1 inhibits tumor growth, metastasis and enhances chemotherapeutic efficacy in osteosarcoma through regulation of the NF- κ B pathway [J]. *Cancer Lett*, 2014, 342(1): 150-8.
- [24] Yao WT, Wang X, Cai QQ, et al. TRAF4 enhances osteosarcoma cell proliferation and invasion by Akt signaling pathway [J]. *Oncol Res*, 2014, 22(1): 21-8.
- [25] Meng QT, Ren CL, Wang LP, et al. Knockdown of ST6Gal-I inhibits the growth and invasion of osteosarcoma MG-63 cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 72: 172-8.
- [26] Shao JL, Wang L, Zhong C, et al. AHSA1 regulates proliferation, apoptosis, migration, and invasion of osteosarcoma [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 77: 45-51.
- [27] Hu X, Liu Y, Qin CX, et al. Up-regulated isocitrate dehydrogenase 1 suppresses proliferation, migration and invasion in osteosarcoma: *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Lett*, 2014, 346(1): 114-21.
- [28] Guan H, Tan P, Xie L, et al. FOXO1 inhibits osteosarcoma oncogenesis *via* Wnt/ β -catenin pathway suppression [J]. *Oncogenesis*, 2015, 4(9): e166.
- [29] Huang SH, Jin AM. ZIC2 promotes viability and invasion of human osteosarcoma cells by suppressing SHIP2 expression and activating PI3K/AKT pathways [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(2): 2248-57.
- [30] Song HH, Liu JM, Wu X, et al. LHX2 promotes malignancy and inhibits autophagy *via* mTOR in osteosarcoma and is negatively regulated by miR-129-5p [J]. *Aging*, 2019, 11(21): 9794-810.

(编辑:吴锦雅)