

分类号:

密级:

UDC:

学号: T10411201601077

南昌大学专业学位博士研究生

学位论文

FASN 激活 pERK1/2/Bcl-xl 通路介导细胞

“失巢凋亡抵抗”促进骨肉瘤转移

Cell anoikis resistance mediated by FASN promote OS metastasis
via activating pERK1/2 signaling pathway

钟 幸

培养单位(院、系): 江西省肿瘤医院

指导教师姓名、职称: 李金高 教授 主任医师

专业学位种类: 临床医学博士

专业领域名称: 肿瘤学

论文答辩日期: 2019 年 5 月

答辩委员会主席:

申良万

评阅人:

盲 审

2019 年 5 月

摘要

研究背景与目的:

骨肉瘤(osteosarcoma)是最常见的骨恶性肿瘤,肺转移是其致死的重要原因。研究表明,细胞失巢凋亡抵抗是促进肿瘤转移的重要因素,但是,失巢凋亡抵抗促进骨肉瘤肺转移的机制尚不明确。我们前期实验研究显示,FASN在骨肉瘤合并肺转移患者中高表达。在本研究中,我们探索FASN在骨肉瘤失巢凋亡抵抗促进肺转移的作用及其分子机制。

研究方法:

1、骨肉瘤细胞(143B、MG-63、Saos-2)与正常成骨细胞(hFOB1.19)抗失巢凋亡能力的研究:采用台盼蓝细胞染色检测细胞失巢状态下的存活率,采用克隆形成实验检测细胞失巢后克隆形成能力,采用流式细胞术检测细胞失巢凋亡率,比较骨肉瘤及正常成骨细胞的失巢凋亡抵抗能力。

2、FASN在骨肉瘤细胞抗失巢凋亡中的作用:在骨肉瘤细胞(143B、MG-63、Saos-2)与正常成骨细胞(hFOB1.19)中,采用Western-blot、qPCR、ICC检测FASN及pERK1/2、Bcl-xl表达水平。探索FASN/pERK1/2/Bcl-xl分子信号通路在骨肉瘤细胞失巢凋亡中的作用。

3、改变FASN表达,验证FASN在失巢凋亡抵抗中的作用及机制:在FASN高表达细胞中下调FASN表达,在FASN低表达细胞中,上调FASN表达,检测细胞迁移、克隆形成率、细胞失巢凋亡率验证FASN促进失巢凋亡抵抗。Western-blot检测FASN/pERK1/2/Bcl-xl表达水平。我们对FASN-overexpression组进行了信号通路阻断试验。FASN-overexpression和control细胞中,使用MEK抑制剂GDC-0973阻断p-ERK1/2表达,检测下游BCL-xl表达及失巢凋亡率。

4、建立失巢凋亡抵抗细胞株进一步验证FASN参与失巢凋亡抵抗:采用反复多次悬浮-贴壁的方法建立失巢凋亡抵抗细胞株143B-AR。检测143B-AR细胞失巢凋亡抵抗能力及FASN/pERK1/2/Bcl-xl表达水平。

5、体内实验。裸鼠皮下成瘤后进行原位移植,比较143B-AR和143B细胞成瘤能力。活体注射下调FASN的慢病毒观察抑制FASN对成瘤能力及肺转移的

影响。

研究结果:

1、骨肉瘤细胞抗失巢凋亡能力明显高于正常成骨细胞: 悬浮培养后骨肉瘤细胞 143B、MG-63 失巢存活率、克隆形成数目显著高于非肿瘤细胞 hFOB 1.19, 而细胞凋亡率显著低于 hFOB 1.19。

2、FASN 的表达水平与失巢凋亡抵抗呈正相关。FASN 在 143B、MG-63 细胞中高表达, 在 Saos-2、hFOB1.19 细胞中低表达。在蛋白水平上, FASN 与 pERK1/2/Bcl-xl 的表达水平一致。

3、下调 FASN 降低 143B、MG-63 细胞失巢存活率及迁移能力, 增加失巢凋亡率, 抑制 pERK1/2/Bcl-xl 通路。上调 FASN 增加 Saos-2、hFOB1.19 细胞失巢凋亡存活率及迁移能力, 激活 pERK1/2/Bcl-xl 通路。并且, 阻断 pERK 无法完全逆转上调 FASN 所致的失巢凋亡抵抗作用。

4、143B-AR 细胞具有失巢凋亡抵抗能力。与 143B 细胞相比, 143B-AR 细胞具有更高失巢存活率及迁移能力, 失巢凋亡率更低, FASN/pERK1/2/Bcl-xl 通路激活。抑制 FASN 可降低其失巢凋亡抵抗能力。

5、体内实验验证 FASN 促进骨肉瘤细胞成瘤及转移。143B-AR 细胞具有更强的体内成瘤能力, 下调 FASN 抑制 143B-AR 细胞肺转移。

结论:

本研究中, 我们明确了 FASN 在介导失巢凋亡抵抗促进骨肉瘤细胞肺转移明确中的作用, 初步探索了骨肉瘤肺转移相关的分子机制, 为今后骨肉瘤临床治疗提供新的治疗靶点。

关键词: 失巢凋亡抵抗, FASN, 骨肉瘤, pERK1/2, Bcl-xl。

ABSTRACT

Background:

Osteosarcoma is the most common primary malignant bone tumour, predominantly affecting children and adolescents. The pulmonary metastasis of osteosarcoma (OS) occurs commonly, which resulted from anoikis resistant (AR) of tumor cells as reported by previous studies, but the exact roles of AR in osteosarcoma were not fully studied. Our previous investigations showed fatty acid synthase (FASN) was relating to clinical features of patients with OS. In this study, we aim to explore the functions of FASN in the AR OS cells in vitro and in vivo and study the downstream effectors of FASN.

Methods:

1. Detect the anoikis resistant abilities between osteosarcoma cell lines(143B、MG-63、Saos-2) and non-tumor cell line(hFOB1.19) by anoikis assay, colony formation and flow cytometry apoptosis assay.
2. Explore the role of FASN in anoikis resistance. We used Western-blot、qPCR、ICC to evaluate the expression of FASN and the FASN/pERK1/2/Bcl-xl signaling pathway in AR between osteosarcoma cell line (143B、MG-63、Saos-2) and non-tumor cell line(hFOB1.19).
3. Down and up-regulated FASN expression to comfirm the function of FASN and the involved mechanisms. We constructed shRNA lentivirus to down-regulate FASN in FASN-overexpression cell lines, constructed over-expression lentivirus to up-regulate FASN in FASN-lowexpression cell lines to study functions of FASN in AR. We used Western-blot to detect the expression of FASN/pERK1/2/Bcl-xl signaling pathway after down- and up-regulating FASN. Furtherly, we use pERK inhibitor to stop pERK1/2/Bcl-xl signaling pathway to observe the AR ability.
4. Established AR cell model to further study FASN promote AR. We use repeated suspended-attached cell culture model to isolate the anoikis resistant cell line 143B-AR. Then we detect the anoikis resistance and the expression of FASN/pERK1/2/Bcl-xl signaling pathway to comfirm the function of FASN in AR.

5. Confirmed FASN enhanced metastasis in vivo. The tumors were orthotopically transplanted into the nude mice, we observe the tumorigenicity and in 143B and 143BAR group. Then we injected lentivirus into tumors to observe the the tumorous size ,weight and lung metastasis in shR-FASN and control group.

Results:

1. Osteosarcoma cells exhibit anoikis resistant ability. As compared with non-tumor cell hFOB 1.19, 143B and MG-63 cell show higher survival rate and colony number, but low apoptotic rate in suspended culture.

2. The expression FASN was higher in osteosarcoma, and in positively related with AR ability and pERK1/2/Bcl-xl. In 143B and MG-63 cells, FASN were over-expressed, pERK1/2/Bcl-xl were activated. Whilest in Saos-2 and hFOB1.19 cells, FASN were low-expressed, pERK1/2/Bcl-xl were suppressed.

3. Lost and gain functional experiments revealed FASN promote anoikis resistance. In 143B and MG-63 cells, lost function of FASN reduced cell survival rate and migration, induced apoptosis, suppressed the pERK1/2/Bcl-xl pathway. In Saos-2 and hFOB1.19 cells, gain function of FASN increased cell survival rate and migration, suppressed apoptosis, activated the pERK1/2/Bcl-xl pathway. Additionally, blocking pERK1/2 cannot completely reverse the effect of FASN overexpression.

4. 143-AR cell line was anoikis resistant. 143BAR cell showed higher survival rate, migration ability and lower apoptotic rate than 143B cell in suspension. The FASN/pERK1/2/Bcl-xl pathway was activated. Down-regulation of FASN suppressed anokis resistance in 143B-AR cell.

5. FASN promote tumorigenicity and metastasis in vivo. The result showed that anoikis resistant 143B-AR cell formed tumor rapidly. Inhibition of FASN decreased the tumorigenicity and pulmonary metastasis of OS.

Conclusion: We showed that anoikis resistant and FASN as two interactional factors facilitated the progress of osteosarcoma. FASN may become the therapeutic target that assisting clinical treatment in future years.

Key words: Anoikis resistant, FASN, osteosarcoma, pERK1/2, Bcl-xl.

目 录

第 1 章 前言	1
1.1 肿瘤转移与失巢凋亡抵抗	1
1.2 FASN 与失巢凋亡抵抗	2
1.3 失巢凋亡抵抗与 pERK/BCL-x1 信号通路	3
1.3.1 AKT 信号通路	4
1.3.2 ERK 信号通路	4
1.3.3 JUN 氨基末端激酶(JNK)通路	5
第 2 章 材料与方法	7
2.1 实验材料	7
2.1.1 主要实验仪器设备	7
2.1.2 主要实验试剂	7
2.1.3 细胞株	8
2.2 实验方法	9
2.2.1 细胞培养	9
2.2.2 集落形成试验检测细胞抗失巢凋亡能力	9
2.2.3 实时荧光定量 PCR 检测 FASNmRNA 水平的表达状况	10
2.2.4 Western-blot 检测 FASN、pERK1/2、c-caspase3、BCL-x1 蛋白水平 的表达状况	12
2.2.5 FASN 基因 RNA 下调/上调载体的构建及效果测定	14
2.2.6 细胞迁移实验	15
2.2.7 细胞免疫荧光	16
2.2.8 体内成瘤实验	17
2.2.8 Microarray	18

2.2.9 统计学分析方法.....	18
第3章 结 果	19
3.1 骨肉瘤细胞（143B、MG-63、Saos-2）与正常成骨细胞（hFOB1.19）细胞抗失巢凋亡能力的研究	19
3.1.1 悬浮培养 143B、MG-63、Saos-2、hFOB1.19 细胞，骨肉瘤细胞失巢后细胞存活率高于正常成骨细胞.....	19
3.1.2 悬浮培养 143B、MG-63、Saos-2、hFOB1.19 细胞，骨肉瘤细胞失巢后再贴壁细胞克隆形成数目高于正常成骨细胞.....	20
3.1.3 悬浮培养 143B、MG-63、Saos-2、hFOB1.19 细胞，骨肉瘤细胞失巢凋亡率低于正常成骨细胞.....	21
3.1.4 悬浮培养 143B、MG-63、Saos-2、hFOB1.19 细胞，检测促凋亡蛋白 c-Caspases3 表达量	22
3.2. 初步探索 FASN 在骨肉瘤细胞抗失巢凋亡中的作用	23
3.2.1 检测 FASN 在 143B、MG-63、Saos-2、hFOB1.19 细胞中的表达水平.....	23
3.2.2 初步探索 FASN 在抗失巢凋亡的作用及机制.....	24
3.3 下调 FASN 表达，抑制细胞失巢凋亡抵抗	26
3.3.1 构建 FASN-silence 细胞株	26
3.3.2 下调 FASN 抑制失巢凋亡抵抗.....	28
3.4 上调 FASN 表达，促进细胞失巢凋亡抵抗。	29
3.4.1 构建 FASN-overexpression 细胞株	29
3.4.2 上调 FASN 促进失巢凋亡抵抗.....	30
3.5 FASN 激活 p-ERK1/2/Bcl-xl 信号通路介导失巢凋亡抵抗	32
3.5.1 FASN 对 p-ERK1/2/Bcl-xl 信号通路的影响	32
3.5.2 进一步探索 FASN 对 p-ERK1/2/Bcl-xl 信号通路的影响	32
3.6 143B-AR 细胞 FASN/ERK1/2/Bcl-xL 信号通路高表达.....	34

3.6.1 建立失巢凋亡抵抗细胞株 143B-AR	34
3.6.2 143B-AR 细胞比 143B 细胞具有更强的失巢凋亡抵抗能力	35
3.6.3 143B-AR 高表达 FASN/ERK1/2/Bcl-xL, 介导失巢凋亡抵抗	36
3.7 体内验证 FASN 介导失巢凋亡抵抗促进骨肉瘤肺转移	37
3.7.1 143B-AR 细胞具有更强的体内成瘤能力	37
3.7.2 下调 FASN 抑制 143B-AR 细胞肺转移	38
3.8 实验结果小结	40
第 4 章 讨 论	41
4.1 骨肉瘤细胞具有失巢凋亡抵抗能力	41
4.2 FASN 与失巢凋亡抵抗的关系	42
4.3 FASN 参与失巢凋亡抵抗的机制	44
4.4 MicroRNA 与骨肉瘤	45
第 5 章 结 论	48
第 6 章 问题与展望	49
致 谢	51
参考文献	52
攻读博士学位期间的研究成果	62

中英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
OS	Osteosarcoma	骨肉瘤
FASN	Fatty Acid Synthase,	脂肪酸合成酶
AR	Anoikis Resistant	失巢凋亡抵抗
ECM	Extracellular matrix	细胞外基质
EMT	Epithelial-mesenchymal transition	上皮间质转化
ROS	Reactive oxygen species	活性氧
ERK1/2	Extracellular signal regulated kinase1/2	细胞外信号调节激酶
pERK1/2	phosphorylated-Extracellular signal regulated kinases1/2	磷酸化细胞外信号调节激酶
MEK	Mitogen-activated-Extracellular signal regulated kinase	丝裂原活化的细胞外信号调节激酶
ICC	Immunocytochemistry	免疫荧光化学
WB	Western-blot	免疫印迹试验
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
rpm	revolutions per minute	每分钟转数
mRNA	Message RNA	信使 RNA
shRNA	short hairpin RNA	短发夹 RNA
MiRNA	MircoRNA	小 RNA
siRNA	Small interfering RNA	小干扰 RNA
LV	Lentivirus	慢病毒
ORF	Open Reading Frame	开放读码框
PE	Plating efficiency	贴壁率
Puro	Puromycin	嘌呤霉素
Hygro	Hygromycin	潮霉素
DISC	Death-inducing signaling complex	死亡诱导信号复合体

第 1 章 前言

骨肉瘤（osteosarcoma）是最常见的骨恶性肿瘤，好发于青少年。骨肉瘤发生率低，只占所有恶性肿瘤 1%左右，但是，在青少年人群中，约其占恶性肿瘤的 5-10%^[1-3]，在青少年恶性肿瘤死亡率中排名第 6 位^[4]。骨肉瘤来源于间叶组织，具有高度侵袭性及转移性，其中，肺转移是死亡的重要原因。骨肉瘤合并肺转移患者，即使经过积极放、化疗，5 年总生存（5-year OS, overall survival）仍不到 20%^[5]。

骨肉瘤来源于间叶组织，具有高度侵袭性及转移性，大约有 50%患者在初始诊断时便伴有肿瘤细胞的远处转移，尤其是肺转移，肺转移是死亡的重要原因^[5-8]。临床上，早期局限期骨肉瘤经积极治疗后，5 年生存率可达 55-80%^[9-10]，然而，合并肺转移的骨肉瘤患者预后极差，即使经过积极化、放疗，5 年总生存（5-year OS, overall survival）仍不到 20%。虽然肿瘤免疫靶向治疗日新月异，而在骨肉瘤治疗中却进展寥寥。因此，我们迫切需要深入探索骨肉瘤侵袭转移机制，发现关键性分子靶点，指导临床治疗，改善骨肉瘤患者的预后及长期生存^[11-16]。

1.1 肿瘤转移与失巢凋亡抵抗

肿瘤的转移是一个多因素、多步骤的过程。肿瘤转移包括脱离、侵袭、迁移、粘附 4 个步骤，即原发部位的肿瘤细胞脱离原发病灶，侵袭穿越基底膜并向周围间质呈浸润性生长，穿越局部毛细血管或淋巴管壁进入管腔，与血小板聚集或形成小瘤栓，随着血液或淋巴液迁移至远处靶器官毛细血管床，与该部位血管或淋巴管内皮细胞发生黏附，穿越管壁和基底膜进入周围间质，在远处靶器官不断增殖形成肿瘤细胞转移灶。影响肿瘤细胞侵袭和转移主要因素包括：受肿瘤转移基因与肿瘤转移抑制基因、肿瘤血管生成、细胞外基质降解、细胞黏附、肿瘤微环境等因素影响^[17-18]。

作为肿瘤转移的屏障，细胞脱离邻近细胞或者细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)后将发生凋亡，这种细胞死亡方式称为“失巢凋亡”(Anoikis)。失巢

凋亡对人体正常发育和组织稳态非常重要，是宿主清除循环肿瘤细胞的重要机制，因为它可以防止脱落的细胞重新附着到不合适的细胞外基质上，避免生长发育不正常而致癌。而抗失巢凋亡能力(Anoikis resistance)是肿瘤细胞形成有效转移的一个重要前提^[19-21]。正常上皮细胞或不具备转移性质的实体瘤细胞从原位脱落进入血液循环后就会引发失巢凋亡，失巢凋亡的意义在于防止这些脱落的细胞种植并生长于其他不适宜的地方。而肿瘤细胞，尤其是一些容易发生远距离转移的恶性肿瘤细胞，具有极强的抗失巢凋亡特性，便于转移侵袭。近年来许多关于凋亡和失巢凋亡抵抗的分子和细胞机制的研究进展，包括内源性和外源性凋亡途径、上皮-间质转化、生长因子受体、能量代谢、活性氧、膜微区和脂质筏等。研究发现肿瘤细胞能通过多种方式抵抗失巢凋亡，比如肿瘤细胞高表达某些分子，如 Ras、Raf、NF- κ B 等，激活促存活信号通路；高表达抗凋亡蛋白、低表达促凋亡蛋白，抑制细胞凋亡细胞改变整合蛋白的表达模式，使之能够接收新环境的生存信号^[19-21]；活性氧(Reactive oxygen species, ROS)通过不依赖配体的方式激活生长因子受体，从而逃逸凋亡^[22-25]；上皮间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)激活^[26-29]等。这些方式导致细胞存活信号激活和凋亡途径抑制，最终使肿瘤细胞抗失巢凋亡，促进转移。“Cai Q 等发现“失巢凋亡抵抗”是侵袭性卵巢癌细胞的重要特征^[20]，并且肿瘤细胞的这种“失巢凋亡抵抗”是肿瘤转移的重要早期事件和先决条件，被认为是转移一系列步骤中首要的关键步骤。Akekawatchai 等发现失巢凋亡抵抗促进乳腺癌细胞转移^[30]。“失巢凋亡”现象最初发现存在于上皮和内皮细胞中，但研究表明“失巢凋亡抵抗”现象不仅存在于上皮组织源性恶性肿瘤^[31-34]，在骨肉瘤细胞也同样存在“失巢凋亡抵抗”现象^[35-41]。但是，骨肉瘤细胞“失巢凋亡抵抗”的分子机制还有待于进一步阐明。

1.2 FASN 与失巢凋亡抵抗

脂肪酸合成酶(Fatty Acid Synthase, FASN)，是一种与脂肪酸代谢相关的蛋白-引起了学者的高度关注。脂肪酸合成酶是一种具有多功能的代谢酶，在正常生理情况下具有 7 种酶的活性，其功能之一可作为细胞脂肪合成的关键酶，在脂肪代谢过程中起重要作用。近来许多研究表明，FASN 在多种肿瘤中异常表达，且与肿瘤的发生、发展、转移及预后密切相关^[42-45]，抑制 FASN 能显著地抑制

恶性肿瘤的增殖、侵袭转移^[46-53]。因此，FASN 被认为是潜在致癌基因及肿瘤治疗的新靶点。最近，本课题组发现，在 136 例骨肉瘤患者病理组织中发现，FASN 蛋白在骨肉瘤细胞中呈高表达，阳性率为 63.2%，并且 FASN 在存在肺转移患者组织中表达量明显高于无肺转移者（86.4% vs 52.2%， $p<0.01$ ），这提示 FASN 可能与骨肉瘤肺转移相关^[54]。接着，我们对 FASN 在骨肉瘤侵袭转移中的作用进行了一系列的研究，研究表明 FASN 参与了骨肉瘤侵袭转移过程，其机制与其调控 HER2 的活性，进而激活 PI3K/Akt 信号通路，上调 MMP-2、MMP-9 等表达有关。然而，值得注意的是，我们实验还发现 HER2/PI3K/Akt 通路的抑制并不能完全逆转 FASN 所介导的骨肉瘤侵袭转移^[55]，提示 FASN 介导骨肉瘤侵袭转移可能还涉及其他方面的机制。因此，寻找 FASN 介导骨肉瘤侵袭转移的其他机制显得十分必要和重要。FASN 作为细胞脂肪酸合成的关键酶，其代谢最终产物棕榈酸参与脂筏合成。研究显示，脂筏在质膜中的定位对 AKT 及 ERK 的激活非常重要，转移性肿瘤细胞可能具有调控脂筏定位以逃避失巢凋亡的机制，尚待进一步研究^[56,57]。研究证据显示，失巢凋亡抵抗（AR）是肿瘤侵袭转移过程中的重要早期事件和先决条件，我们推测 FASN 所介导的骨肉瘤侵袭转移可能也与其调控肿瘤细胞“失巢凋亡抵抗”有关。在预实验中，我们将悬浮培养 14 天重新贴壁的 143B 细胞中 FASN 表达水平显著地高于贴壁培养的 143B 细胞，并且下调 FASN 表达水平能显著地诱导骨肉瘤细胞“失巢凋亡”，这强烈的提示 FASN 在骨肉瘤细胞中的高表达可能介导细胞“失巢凋亡抵抗”进而促进骨肉瘤细胞转移。但 FASN 是否直接通过调控肿瘤细胞“失巢凋亡抵抗”参与骨肉瘤侵袭转移，有待于从多水平、多角度进一步明确。假定 FASN 通过调控肿瘤细胞“失巢凋亡抵抗”参与骨肉瘤侵袭转移，那么在骨肉瘤侵袭转移过程中，FASN 又是通过调控哪些信号通路及哪些效应分子来实现肿瘤细胞抵抗“失巢凋亡”，值得我们深入研究和探讨。

1.3 失巢凋亡抵抗与 pERK/BCL-xl 信号通路

随着对细胞失巢凋亡深入研究，失巢凋亡抵抗的分子机制被逐步揭示。目前研究显示，多种激酶/磷酸酶相关信号分子在肿瘤失巢凋亡信号传导过程中起关键性的调节作用。主要的信号通路包括：Raf/ERK; PI3K/AKT 及 JUN 氨基末端激酶途径。

1.3.1 AKT 信号通路

丝氨酸/苏氨酸激酶 AKT(又称作蛋白激酶 B 或 PKB)作为一种原癌基因,是因为它在调控各种不同细胞功能(包括代谢、生长、增殖、存活、转录以及蛋白质合成)方面发挥重要作用。磷酸化磷脂酰肌醇三激酶 (PI3K)、受体酪氨酸激酶、细胞生长因子可作为级联放大因子激活 AKT 信号。PI3K/AKT 通路在细胞存活中起着至关重要的作用,是调控细胞增殖、分化、代谢的重要途径之一。当肿瘤细胞脱离 ECM 后,肿瘤细胞内激活的生长因子,如 EGFR 可激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制细胞凋亡,促进失巢凋亡抵抗。研究显示,上皮性肿瘤细胞发生间质转化时,PI3K/AKT 信号通路激活,使肿瘤细胞获得失巢凋亡抵抗能力^[58]。

1.3.2 ERK 信号通路

细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK) 主要包括 ERK1 和 ERK2 两个高度同源的亚型,其活性形式是磷酸化 ERK(phosphorylated ERK)。ERK1/2 主要参与 Ras /Raf /MEK /ERK 信号通路促进细胞增殖、抑制细胞凋亡。该途径的基因发生异常,可导致 Ras /Raf /ERK 信号通路异常活化,进而影响正常细胞的凋亡、分化,促进其向恶性转化及异常增殖,产生肿瘤。近年来的研究明, Ras /Raf /MEK /ERK 信号通路与肿瘤发生、发展及肿瘤转移密切相关。ERK1/2 信号通路是介导肿瘤细胞失巢凋亡抵抗的重要途径之一^[58-63]。上皮性肿瘤细胞发生间质转化时, Ras/ERK 信号通路也同样被激活,使肿瘤细胞获得失巢凋亡抵抗能力^[64,65]。肿瘤细胞 EGF 受体的过表达通过抑制细胞中 Bim 的表达,维持了悬浮细胞中 ERK 的活化,阻断了失巢凋亡。Puig Teresa 等研究发现 FASN 抑制剂能显著地抑制乳腺癌细胞中 ERK1/2 信号通路的活性而诱导细胞凋亡^[66]。在雌激素诱导的 CCL39 成纤维细胞中发现,活化的 Raf 能有效抑制失巢凋亡^[67]。miRNA-200b 可通过激活 pERK/pAKT 促进乳腺癌细胞失巢凋亡抵抗^[68]。在 DLBCL 中, FASN 的表达与 MAPK/ERK 信号通路正相关,抑制 MAPK/ERK 信号通路可促进 DLBCL 细胞凋亡^[69]。PKC、整联蛋白激活 ERK1/2 信号通路有助于卵巢癌细胞逃避失巢凋亡^[70]。

Bcl-xl 最早是从禽类的互补 DNA(cDNA)文库中被鉴定出来的,属于 Bcl-2 家族 I 类成员,具有抑制细胞凋亡的作用。BCL-xl 是 Bcl-2 蛋白家族重要成员,

Bcl-xl 蛋白是体内重要的抗凋亡蛋白, 参与细胞抗凋亡过程。在正常细胞中, Bcl-xl 分布于胞质和膜上, 在凋亡信号作用下, Bcl-xl 转位到线粒体外膜和其他细胞器膜上, 与其他促凋亡蛋白如 Bad 结合或形成离子通道, 维持线粒体外膜的完整性, 抑制细胞凋亡[71]。Bcl-xl 和 Bcl-2 在不同的细胞类型和不同的死亡信号作用过程中, 两者发挥的作用并不完全相同[72]。在肿瘤细胞中, 抑制 Bcl-xl 可以抑制细胞凋亡及坏死[73,74]。Bcl-xl 基因的表达主要在转录水平进行调节, 研究显示, 调控 BCL-xl 表达的主要途径有: MEK/ERK、PI3K/Akt、NF- κ B/STATs、c-JUN 氨基末端激酶通路等。同时, 肿瘤细胞激活的 Ras/MAPK/ERK、PI3K/AKT 等分子信号通路可通过介导 BCL-2 家族成员, 包括 BCL-2、BCL-xl 表达, 抑制促凋亡蛋白 (Caspase-3、caspase-8、Bim、Bid 等) 表达, 实现凋亡抑制^[75-78]。Jazirehi. et al 在研究中发现, 抑制 MEK/ERK 和 PI3K/Akt 途径可以抑制 Bcl-xl 的转录, 增强非霍奇金 B 细胞淋巴瘤对利妥昔单抗治疗的敏感性, 促进淋巴瘤细胞凋亡^[78]。此外, 我们预实验发现: RNAi 沉默 FASN 在骨肉瘤细胞 143B 细胞中表达, 细胞“失巢凋亡抵抗”能力显著降低, 并且 p-ERK1/2 及 BCL-xl 表达水平显著降低, 这反向提示 FASN 在骨肉瘤中的过度表达可能通过激活 ERK1/2 信号通路介导抗凋亡蛋白/促凋亡蛋白过表达, 从而介导肿瘤细胞“失巢凋亡抵抗”实现肿瘤转移。

1.3.3 JUN 氨基末端激酶(JNK)通路

JNK 信号通路是 MAPK 中重要的通路之一, 它位于胞质, 包含双磷酸化功能区(由三种氨基酸 Thr、pro 和 Tyr 组成)与 c-junN 端的活化区结合并使其第 63、73 位丝氨酸残基磷酸化, JNK 的活化是通过其氨基末端残基磷酸化实现的。上皮细胞脱离细胞外基质后可迅速激活 JNK 介导细胞凋亡。JNK 凋亡信号成员包括 Bim 和 BMF, 是 BCL-2 家族中 BH3-only 的成员。Roger 等研究显示, JNK 促进细胞失巢凋亡, JNK 通过激活 BIM 及磷酸化 BMF 介导 BAK/BAX-依赖的细胞凋亡途径介导上皮细胞失巢凋亡抵抗, 抑制 JNK 的活性能抑制细胞失巢凋亡抵抗^[80]。肿瘤细胞中激活的 ERK 也能降低 JUN 氨基末端激酶的活性。

综上所述, 我们推测: (1) FASN 可能通过介导细胞“失巢凋亡抵抗”促进骨肉瘤转移过程; (2) FASN 介导细胞“失巢凋亡抵抗”的机制可能与其激活 ERK1/2 信号通路, 从而促进凋亡抑制蛋白 Bcl-xl 的转录表达有关。为此, 本研究拟以

人骨肉瘤组织、细胞株及裸鼠为研究对象,探索以下问题:(1)在前期证实 FASN 过度表达促进骨肉瘤侵袭转移的基础上,进一步采用肿瘤分子生物学方法、技术从体内、外证实骨肉瘤细胞 FASN 高表达可介导细胞“失巢凋亡抵抗”促进转移。(2)从体内、外改变 FASN 表达水平对 ERK1/2/BCL-xl 通路相关因子的改变情况,寻找 FASN 介导细胞“失巢凋亡抵抗”促进骨肉瘤细胞转移的分子机制。(3)寻找参与上游调控 FASN 表达促进失巢凋亡抵抗的相关 mircoRNA,将为骨肉瘤转移的防治提供新的策略。

第 2 章 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 主要实验仪器设备

仪器名称	公司
Real-time PCR 仪	美国 Bio-Rad 公司
Western-bolt 电泳系统	美国 Bio-Rad 公司
凝胶成像系统	美国 Bio-Rad 公司
琼脂糖凝胶电泳系统	美国 Bio-Rad 公司
恒温细胞培养箱	美国 Thermo 公司
高速离心机	美国 Thermo 公司
低温高速离心机	美国 Thermo 公司
漩涡混合器	德国 IKA 公司
恒温摇床	哈尔滨东联电子 HZQ-Q
恒温水浴箱	上海智诚分析仪器制造有限公司
摇床	上海智诚分析仪器制造有限公司
生物安全柜	美国 Thermo 公司
倒置荧光显微镜	日本 Nikon 公司
倒置相差显微镜	日本 Nikon 公司
超纯水系统	Millipore 公司
MYECL Imager	Thermo Fisher Scientific
流式细胞仪	美国 Beckman 公司

2.1.2 主要实验试剂

试剂名称	公司
DMEM 培养基	美国 Invitrogen 公司

EMEM 培养基	美国 Invitrogen 公司
McCOY'S 5A 培养基	美国 Invitrogen 公司
DMEM/F12 培养基	美国 Invitrogen 公司
胎牛血清	澳洲 Gibco 公司
氨苄青霉素	美国 Sigma 公司
DMSO	美国 Sigma 公司
胰蛋白酶	美国 Sigma 公司
Costar® Ultra Low Attachment 六孔板	美国 Corning 公司
小鼠抗-FASN单抗(ab22759)	美国Abcam公司
小鼠抗-BCL-xl单抗[E18] (ab32370)	美国Abcam公司
小鼠抗-β-actin单抗	美国Abcam公司
小鼠抗-capase3单抗 (9662)	美国Cell Signaling Technology公司
小鼠抗-pERK1/2 (Thr202/Tyr204) 单抗(#9101S)	美国Cell Signaling Technology公司
兔抗鼠二抗	美国Abcam公司
Alexa Fluor 488羊抗兔IgG (ab150077)	美国Abcam公司
PVDF 膜	美国Millipore公司
TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit	美国Bio-Rad公司
mRNA提取试剂	美国Invitrogen公司
RT-PCR 逆转录试剂盒	美国Invitrogen公司
Sosofast定量PCR荧光染料	美国Bio-Rad公司
FITC-Annexin V/PI凋亡试剂盒	美国Biolegend公司
PE-Annexin V/7-AAD凋亡试剂盒	美国Biolegend公司
PI/RNAase	美国Sigma公司
Triton X-100	美国Sigma公司

2.1.3 细胞株

143B: 人骨肉瘤细胞, 购买于美国 ATCC 细胞库。MG-63: 人骨肉瘤细胞株, 来自香港大学骨创伤与矫形外科实验室。Saos-2: 人骨肉瘤细胞株, 来自香港大学骨创伤与矫形外科实验室。hFOB1.19: 人成骨细胞株, 购买于美国 ATCC 细胞

库。

2.2 实验方法

2.2.1 细胞培养

(1) 复苏及传代

准备一个洁净烧杯，内盛 2/3 杯 37℃ 的温水。从液氮罐中迅速取出冻存管后投入烧杯中，摇晃使其迅速溶解。将冻存管内的细胞悬液转移到预先装有 5ml 完全培养液（143B 细胞培养液为含 10% 胎牛血清的 DMEM，MG-63 细胞培养液为含 10% 胎牛血清的 EMEM，Saos-2 细胞培养液为含 10% 胎牛血清的 McCoy's 5A）的离心管中，在室温下，1000rpm 离心 10min，弃上清，加入 5ml 完全培养液轻轻吹打混匀，转入 25cm² 细胞培养瓶里，于 37℃，含 5%CO₂ 的饱和湿度细胞培养箱中培养过夜。弃去瓶内的旧培养液，加 5ml 新培养液，于孵箱内继续培养。待细胞生长覆盖 70~80% 瓶底面积时，用于实验操作或传代。

(2) 细胞悬浮培养处理

本实验中，将贴壁生长对数期骨肉瘤细胞（143B，MG-63）及非肿瘤对照成骨细胞（hFOB1.19），胰酶消化后，转移至低粘附（low-attachment）培养瓶中进行悬浮培养，悬浮培养基血清浓度为 20%，隔天换液，连续悬浮培养 14 天后重新贴壁，筛选出存活的细胞克隆，并贴壁扩大培养，再继续悬浮 14 天后重新贴壁筛选存活克隆。如此反复 3 个循环，建立抗失巢凋亡细胞系模型，命名为 143B-AR（Anoikis Resistant）细胞。

2.2.2 集落形成试验检测细胞抗失巢凋亡能力

(1) 集落形成试验

取对数生长期 143B、MG-63、Saos-2、hFOB1.19 细胞各一瓶，用 0.25% 胰酶消化完全后，加入 5ml 完全培养液终止消化，反复轻轻吹打制成单细胞悬液后，按 1×10^5 /孔接种在低粘附 24 孔板中培养，设 3 孔平行样，悬浮培养 7 天后将细胞悬液接种至普通 24 孔板中，继续培养 5 天后，弃培养液，甲醇固定细胞 10min，结晶紫染液染色 30min 后，计数每孔细胞形成的集落数（显微镜下计数 >50

个细胞为1个克隆),使用 ImageJ pro 软件进行数据分析。

(2) 细胞存活率试验

取对数生长期 143B、MG-63、Saos-2、hFOB1.19 细胞各一瓶,用 0.25%胰酶消化完全后,加入 5ml 完全培养液终止消化,反复轻轻吹打制成单细胞悬液后,按 5×10^4 /孔接种在低粘附 24 孔板中进行悬浮培养,设 3 孔平行样,在第 2, 4, 6 天后将细胞悬液用台盼蓝染色计数,计数每孔细胞存活的细胞数及细胞存活率。

(3) 流式细胞仪检测细胞凋亡率

取对数生长期 143B、MG-63、Saos-2、hFOB1.19 细胞各一瓶,用 0.25%胰酶消化完全后,加入 5ml 完全培养液终止消化,反复轻轻吹打制成单细胞悬液后,按 1×10^6 /孔接种在低粘附 6 孔板中进行悬浮培养,设 3 孔平行样,悬浮培养 48h 后进行细胞凋亡检测:

1) 收样: 预先用离心管收集培养瓶内的悬浮细胞液,用 0.25%不含 EDTA 的胰酶消化悬浮细胞团后加入离心管,后加入 5ml 完全培养液终止消化,轻轻吹打制成单细胞悬液;

2) 离心: 1000rpm/min ,5min, Cell Staining Buffer 洗 2 次; 取 100ul 细胞悬液加入流式管中;

3) 染色: 加入 100 μ l Binding Buffer 和 FITC 标记的 5 μ l Annexin V-FITC/Annexin V-PE, 加入 10ul PI/7AAD, 室温避光 30min; 检测前加入 400 μ l Binding Buffer;

4) 上机: 1h 内上机检测细胞凋亡。

5) 分析: 使用 FlowJoV10 软件进行数据分析。

2.2.3 实时荧光定量 PCR 检测 FASN mRNA 水平的表达状况

(1) FASN 基因的实时荧光定量 PCR 引物

采用 ABI Primer Express 3.0 软件设计实时荧光定量 PCR 引物, T_m 值为 60℃ 左右, PCR 引物长度在 21-25bp, 扩增片断在 150-200bp 之间, 由上海生工生物科技有限公司设计并合成了针对 FASN、GAPDH 的实时荧光定量 PCR 引物, 并在 NCBI 中进行了 blast 比对。引物序列如下:

引物名称	序列 (5'-3')
GAPDH (homo sapiens) Forward	ATTGTCAGCAATGCATCCTG
GAPDH (homo sapiens) Reverse	ATGGACTGTGGTCATGAGCC
FASN (homo sapiens) Forward	CAACTCACGCTCCGGAAA
FASN (homo sapiens) Reverse	TGTGGATGCTGTCAAGGG

(2) 实时荧光定量 PCR 检测 Rad51 mRNA 水平的表达状况

1) 细胞总 RNA 的提取

提取 RNA 的用品 (EP 管、吸头、水等均为去 RNNase 的用品), 提取试剂均于 180℃ 高温干热灭菌、去 RNase。细胞总 RNA 提取

a) 培养细胞: 收获细胞 1×10^7 , 移入 1.5ml 离心管中, 加入 1ml Trizol, 混匀, 室温静置 5min。

b) 加入 0.2ml 氯仿, 振荡 15s, 静置 2min。

c) 4℃ 离心, 12000g×15min, 取上清。

d) 加入 0.5ml 异丙醇, 将管中液体轻轻混匀, 室温静置 10min。

e) 4℃ 离心, 12000g×10min, 弃上清。

f) 加入 1ml 75%乙醇, 轻轻洗涤沉淀。4℃, 7500g×5min, 弃上清。

g) 晾干, 加入适量的 RNNase free H₂O 溶解 (65℃ 促溶 10-15min)

2) 两步法 cDNA 逆转录合成 (20μl 体系)

a) 配制 RNA/引物混合物:

总 RNA 5μg

Oligo(dT)20 (50μM) 1μl

RNase free H₂O 补足 12μl

} 离心, 70℃ 水浴 10min 后
迅速冰上放置 2min;

b) 配置 cDNA 合成混合物:

上述模版 RNA 溶液 12μl

5×M-MLV buffer 4μl

RTase M-MLV(200U/μl) 1μl

dNTP Mixure 2μl

RNase Inhibitor(40U/μl) 1μl

} 离心, 42℃ 1h, 95℃ 10min
后冰上冷却

3) Real-time PCR 扩增体系为:

Ssofast 染料	5 μ l	} 离心, 95℃ 3min, 95℃ 15s, 60℃ 复性、扩增 30s, 读板。 再循环扩增 39 次
H ₂ O	3 μ l	
上游引物 (10 μ M)	0.5 μ l	
下游引物 (10 μ M)	0.5 μ l	
cDNA	1 μ l	

4) 数据分析作图

按照目前普遍采用的计算基因相对表达量的方法 (2- $\Delta\Delta C_t$ 法) 分析 Rad51 mRNA 水平的变化。(C_t 为热循环仪检测到反应体系中荧光信号的强度值, $\Delta\Delta C_t = (C_{t, \text{目的基因}} - C_{t, \text{GAPDH}})_{\text{实验组}} - (C_{t, \text{目的基因}} - C_{t, \text{GAPDH}})_{\text{对照}}$, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示的是实验组目的基因相对于对照组的表达倍数)。

2.2.4 Western-blot 检测 FASN、pERK1/2、c-caspase3、BCL-xl 蛋白水平的表达状况

(1) 细胞总蛋白的提取

- 1) 收获生长对数期细胞, 用预冷 PBS 洗 2-3 遍;
- 2) 加入 100 μ l 细胞裂解液 RIPA 裂解液(含 PMSF 蛋白酶抑制剂), 5min 后用细胞刮匙收集细胞裂解液至 EP 管中;
- 3) 4℃, 12000rpm/min 离心 5min, 获得细胞蛋白沉淀;

(2) 标准曲线的制作

- 1) 取 6 支试管, 按下表加入试剂, 摇匀, 并放置 5min 左右, 以 0 号管为空白对照, 在 595nm 下比色测定吸光度绘制标准曲线。

表 2-1 各试管中试剂加入量

Table 2-1 The content added into each test tube

试剂	试管					
	0	1	2	3	4	5
标准蛋白(mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水(mL)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
考马斯亮蓝试剂(ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
蛋白质含量(μ g)	0	20	40	60	80	100

- 2) 吸取 1.0 ml 蛋白质样品加入 5 mL 考马斯亮蓝试剂, 混合摇匀, 2 min

后用分光光度计测量 595nm 下蛋白质吸收值。根据标准曲线计算待测样品的浓度：

$$\text{蛋白质含量(mg/g)} = C \times VT \times N / (W \times VS \times 1000)$$

C: 从标准曲线上查得蛋白质的质量, μg

VT: 样品提取液总体积, ml

V: 显色时取样品液量, ml

W: 样品重, g N: 稀释倍数

标准(100 $\mu\text{g/ml}$)牛血清蛋白溶液:

称取牛血清蛋白 25 mg, 加水溶解并定容至 100 ml。吸取上述溶液 40 ml 用蒸馏水稀释至 100 ml。考马斯亮蓝 G-250 溶液: 称取 100 mg 考马斯亮蓝 G-250, 溶于 50 ml 95%的乙醇中, 加入 100 ml 85%(w/v)的磷酸, 再用蒸馏水定容到 1 L, 过滤置于棕色瓶中保存。

(3) Western- Blot 蛋白凝胶电泳

- 1) 清洗制胶板平板, 安装垂直型电泳制胶板;
 - 2) 配制和灌注分离胶 (12%), 用水封胶 20 分钟后, 灌注浓缩胶 (4%); 插入梳子, 凝固半小时以上。
 - 3) 待胶凝固后, 拔出梳子, 加入电泳缓冲 Buffer。
 - 4) 样品处理: 每个孔总上样量为 21 μl , 每个样品与相应体积的 4 $\times$ loading buffer 混匀, 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5min, 瞬时离心, 备用;
 - 5) 上样: 加上样缓冲液, 将处理好的样品和 Marker 加入到上样孔中;
 - 6) 电泳: 浓缩胶电泳所用电压为 45V (35min), 分离胶为 110V(135min);
 - 7) 溴酚蓝指示剂电泳到分离胶底部时 (距底部 1 cm 左右) , 停止电泳;
 - 8) 转膜: 按照“滤纸—PVDF 膜—凝胶—滤纸”的顺序, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 转移缓冲液中, 将分离蛋白转印至 PVDF 膜上 (210mA, 2h);
 - 9) 封闭、加一抗: 转印好的 PVDF 膜置于 5% (5ml) BSA, 室温摇床缓慢振摇 1h 后, 加一抗 (1: 1000~5000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床缓慢振摇过夜。
 - 10) 加二抗: 用 TTBS 洗 PVDF 膜, 用 5%脱脂奶粉配制 1: 5000 的二抗, 摇床于室温缓慢振摇 1h。
 - 11) 曝光: 用 TTBS 洗 PVDF 膜, 加发光液, 于 MYECL Imager 曝光。
 - 12) 试剂配方:
- 10% SDS: 称 10 g SDS 用双蒸水溶解, 定容到 100 ml, 室温放置。

10% 过硫酸铵（1 ml）：称 0.1g 过硫酸铵溶于 1 ml 双蒸水中，在 4℃ 冰箱中可保存 3-4 个星期。

分离胶缓冲液：1.5 M pH 8.8 Tris.HCl

浓缩胶缓冲液：0.5 M pH 6.8 Tris.HCl

电泳缓冲液：pH8.3 1000 mL，25 mmol/L Tris 3.03 g，250 mmol/L 甘氨酸 18.77 g，0.1% SDS，1 g 定容至 1 L

转移缓冲液：pH8.3 1000 mL，25 mmol/L Tris 3.03 g，192 mmol/L 甘氨酸 14.41 g

2.2.5 FASN 基因 RNA 下调/上调载体的构建及效果测定

(1) LV-shRNA-Rad51 干扰载体的构建

从 NCBI 公共数据库中下载 FASN 的参考基因序列（shRNA1,shRNA2,shRNA3），构建表达 shRNA 慢病毒载体，vector pLV-EGFP:T2A:Puro-EF1A.由上海吉玛基技术公司设计、合成、包装完成，并测序鉴定。

FASN 干扰载体序列：

阳性序列（sh-FASN）：

shFASN1:GGTATGCGACGGGAAAGTATCCTCGAGGATACTTTCCCGTCG CATACC,

shFASN2:ACATGGTCCTGAGCAGCTTTGCTCGAGCAAAGCTGCTCAGG ACCATGT,

shFASN3:CCTGCGTGGCCTTTGAAATGTCTCGAGACATTTCAAAGGCCA CGCAGG

阴性对照序列（NC）：5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'

FASN 上调载体序列：

因 FASN 基因序列太长，无法将整个基因序列插入慢病毒载体中。因此，我们克隆了整个 FASN 的 ORF 序列(NCBI Ref Seq: BC007909)，并插入 pLVX-mCMV-mCherry-SV40-Hygro 慢病毒载体。

(2) 慢病毒转染细胞

1) 接种：取对数生长期细胞消化、计数后，接种至六孔板中，每孔 10^5 个

细胞，待细胞融合度为 30%-50%时用于转染。

2) 转染：将阳性病毒载体（shRNA-FASN）和阴性对照载体（NC）按照 MOI=100 稀释于新鲜培养基 2.5ml，加入六孔板，24h 后换液，孵箱内继续培养 72h。注：MOI=感染时病毒数量/细胞数量，慢病毒载体滴度约 1×10^9 TU/ml。

3) 观察转染效率：倒置荧光显微镜下观察荧光，待慢病毒感染目的细胞的效率达 80~90%以上时，可进行扩大培养及用作实验。

1) 4) 使用 Puromycin、Hygromycin 进行抗性筛选，建立稳定转染细胞株。

(3) 干扰效果检测

将成功转染了阳性、阴性对照病毒载体细胞采用 Western-Blot 及 ICC 技术检测 FASN 蛋白、mRNA 表达状况。

(4) siRNA 转染

1) 细胞接种：取对数生长期细胞消化、计数后，接种至 24 孔板中，每孔 5×10^3 个细胞，待细胞融合度为 30%-50%时用于转染。每孔 500 μ l 培养基（不可加抗生素）。

2) siRNA-RFect 混合物准备：1.6pmolsiRNA 用 50 μ l 无血清培养基稀释。2.2 μ lRFect 用 50 μ l 无血清培养基稀释。轻轻混匀，室温孵育 5min。

3) 室温孵育 5min 后，将 siRNA 稀释液与 Hipertext 稀释液混合（总体积 100 μ l）。轻轻混匀，室温孵育 20min。

4) 将混合物加到培养的细胞内（完全培养基培养）：将 100 μ l 混合物加入培养孔内，培养孔内含有 0.5ml 培养的细胞。轻轻晃动培养板，混匀。放入细胞培养箱培养 18-72h，检测基因抑制效果及其功能性检测。

2.2.6 细胞迁移实验

(1) Transwell 细胞迁移实验

1) 制备细胞悬液：先让细胞撤血清饥饿 12-24h，消化细胞，终止消化后离心弃去培养液，（用 PBS 洗 1—2 遍），用含 BSA 的无血清培养基重悬。调整细胞密度至 5×10^5 /ml。

2) 上室：加入细胞悬液 100 μ l，下室：加入含血清培养基 600 μ l。

3) 培养细胞：将 Transwell 板放入 37℃、5%CO₂ 培养箱继续培养 24h。

4) 细胞固定、染色：取出小室，吸入小室内和培养板中的培养液，用棉签

小心擦去小室内面的细胞，下室加入 PBS，轻轻震荡小室，然后下室加入甲醇固定细胞 10min，结晶紫染液染色 30min 后，轻轻冲洗小室，再次用棉签擦拭小室内侧面多余的染液。

5) 封片：用手术刀片轻轻将小室膜切下，贴在载玻片上，在 100×倒置显微镜下随机取 5-10 个视野，计数、拍照，使用 ImageJ pro 软件进行数据分析。

(2) 细胞划痕实验：

1) 准备：所有能灭菌的器械都要灭菌，直尺和 marker 笔在操作前紫外照射 30min（超净台内）

2) 先用 marker 笔在 6 孔板背后，用直尺比着，均匀得划横线，大约每隔 0.5~1cm 一道，横穿过孔。每孔至少穿过 5 条线。

3) 在 6 孔板加入约 5×10^5 细胞/孔，过夜能铺满。

4) 第二天用 20ul 枪头比着直尺，尽量垂至于背后的横线划痕，枪头要垂直，不能倾斜。

5) 用 PBS 洗细胞 2 次，去处划下的细胞，加入无血清培养基。

6) 放入 37℃、5%CO₂ 培养箱，培养。按 72h 取样，拍照。

2.2.7 细胞免疫荧光

1) 制备单细胞悬液：对数生长期细胞各一瓶，用 0.25%胰酶消化完全后，加入 5ml 完全培养液终止消化，反复轻轻吹打制成单细胞悬液后。

2) 接种细胞：将细胞悬液按 1×10^4 细胞/孔数量加入 ibidi 12 孔玻片中，放入 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 24h。

3) 细胞固定：PBS 洗 2 遍，加入多聚甲醛 1ml，室温固定 20 分钟。

4) 穿孔：向孔内加入 0.5%Triton X-100(PBS 配制)室温通透 20min，使细胞膜通透。

5) 封闭：除去 Triton X-100，PBS 清洗后，5%BSA 封闭 2 小时。

6) 加一抗：一抗浓度为 1：500，4℃湿盒内孵育过夜。。

7) 加荧光二抗：吸去一抗，PBST 清洗后，加入二抗，浓度为 1：200，室温避光孵育 1 小时。

8) 复核染色：吸去二抗，PBST 清洗后，加入 DAPI，室温避光孵育 10min。

9) 荧光显微镜观察：用吸水纸吸干爬片上的液体，用含抗荧光淬灭剂的封

片液封片，然后在荧光显微镜下观察采集图像。

2.2.8 体内成瘤实验

(1) 细胞悬液皮下成瘤：取对数生长期上述细胞，胰酶消化后，PBS 清洗两遍除去残余培养基，用无血清 DMEM 调整细胞浓度为 $10^7/\text{ml}$ ，使用 1ml 注射器注射入裸鼠右腋后部，注射液体量为 150ul，注射细胞量为 1.5×10^6 个/只，2 周后拍摄活体成像验证荧光素酶转染效率。

(2) 组织块原位移植：

1) 待皮下瘤体生长至 1cm 直径时，超净台中将裸鼠脱颈处死摘取皮下瘤，将瘤体组织剪成 1mm 直径的组织块置于无血清 DMEM 中。

2) 2.5%阿弗丁 (150ul/10g) 麻醉裸鼠，待裸鼠痛觉消失后，常规消毒局部皮肤，用眼科剪在裸鼠左后肢胫骨上端作一 1cm 的纵切口。

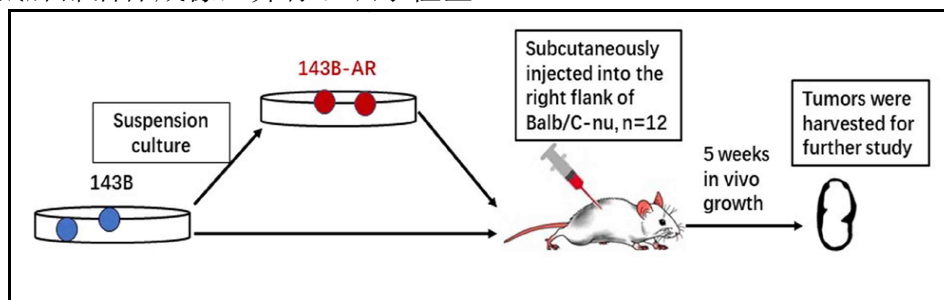
3) 暴露胫骨近端外侧，掀起 $1.5\text{mm} \times 1.5\text{mm}$ 大小的骨皮质，将瘤体组织植入骨髓腔，0.5cm 直径骨蜡覆盖，缝合筋膜及皮肤，同样方法移植 30 只裸鼠。

4) 置于热台待其苏醒，放回动物房，半小时观察一次。

(3) 慢病毒感染瘤体：待瘤体生长至 100mm^3 大小时 (2 周左右)，对裸鼠按体重大小进行编号，参照随机数表将裸鼠随机分为 2 组 (NC、shRNA-FASN, $N=6$)，分别在瘤内注射 10^8PFUs 慢病毒，液体量为 100ul。

(4) 观察测量：每 7 天测量一次裸鼠瘤体大小 (使用游标卡尺，体积公式为： $V=L \times H^2/2$)，绘制生长曲线。移植后 5 周脱颈处死裸鼠 (若出现恶液质、感染、坏死则提前结束实验)，剥离瘤体并称重，保存于 -80°C 冰箱，后续行 WB、qPCR 检测；

(5) 观察肺部转移情况：使用 Night OWL LB 983 (Berthold) 活体成像仪进行裸鼠肺部活体成像，并行组织学检查。



2.2.9 Microarray

(1) 取生长对数期 1×10^7 以下细胞: 143B、143B-AR 以及 143B control/FASN silence、143B-AR control/FASN silence 6 种细胞不同处理方式的细胞。

(2) 使用 RNeasy Mini Kit (Qiagen)按说明书步骤提取总 RNA 并进行 RNA 含量定量。

(3) 将 143B、143B-AR 以及 143B control/FASN silence、143B-AR control/FASN silence 6 种细胞的总 RNA 送至华大基因进行 microarray 以及数据分析。

2.2.10 统计学分析方法

实验中的计量资料用均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示; 用 SPSS15.0 统计学软件进行统计分析; 实验组和对照组采用配对 t 检验分析, 其余实验样本间均数比较采用单因素方差分析, $p<0.05$ 有统计学意义。

第3章 结果

在骨肉瘤细胞株中, 143B 为高增殖性、高侵袭细胞株, MG63 为高增殖、低侵袭细胞株, Saos-2 为低增殖、低侵袭肿瘤细胞株, 即在细胞增殖侵袭能力水平, $143B > MG-63 > Saos-2$ 。本研究中, 我们选取了增殖侵袭能力不同的 3 种骨肉瘤细胞株 143B、MG-63、Saos-2 和 1 种非肿瘤细胞(正常成骨细胞)hFOB 1.19 进行本课题研究。正常状态的骨肉瘤细胞株 143B、MG-63、Saos-2 和非肿瘤细胞 hFOB 1.19 均贴壁生长的细胞, 当处于悬浮培养时, 部分细胞可因激活失巢凋亡程序导致细胞死亡。因此本研究在细胞悬浮状态下探索细胞抗失巢凋亡能力。

3.1 骨肉瘤细胞(143B、MG-63、Saos-2)与正常成骨细胞(hFOB1.19)细胞抗失巢凋亡能力的研究

3.1.1 悬浮培养 143B、MG-63、Saos-2、hFOB1.19 细胞, 骨肉瘤细胞失巢后细胞存活率高于正常成骨细胞。

本为了探索细胞抗失巢凋亡能力, 我们将 4 种贴壁生长的细胞种植在低贴壁的培养板中进行悬浮培养, 在第 2, 4, 6 天用台盼蓝染色计数存活细胞数目。

结果显示(图 1A): 随着悬浮培养时间延长, 4 种细胞存活率均逐步下降。但是, 骨肉瘤细胞 143B 和 MG-63 存活率显著高于非肿瘤细胞 hFOB 1.19, 细胞在悬浮培养第 6 天时, 143B 细胞存活率仍有 0.53 ± 0.05 , MG-63 细胞存活率为 0.48 ± 0.08 , 显著高于 hFOB 1.19 (0.15 ± 0.09)。这一结果提示, 与正常细胞 hFOB 1.19 相比, 肿瘤细胞 143B、MG63 能耐受悬浮培养, 具有抗失巢凋亡能力。值得注意的是, 在骨肉瘤细胞中, Saos-2 细胞悬浮 6 天后的细胞存活率仅为 0.23 ± 0.05 , 明显低于 143B 和 MG63 细胞。

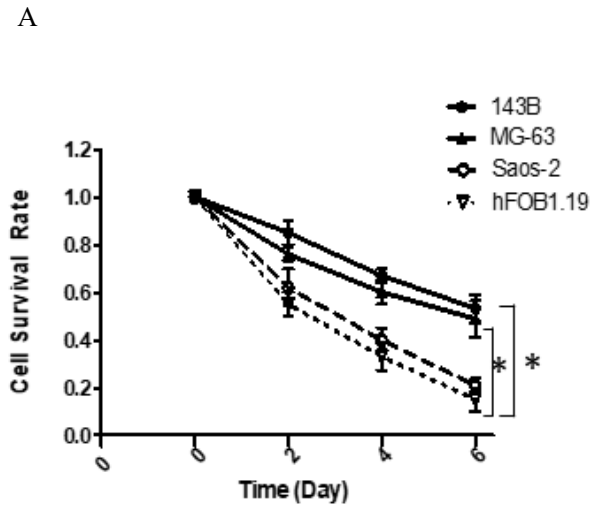


图 1A 4 种细胞悬浮 0、2、4、6 天的细胞存活率。

Figure 1A The survival rate of four cell lines in suspended culture at 0,2,4,6 days.

*: $p < 0.05$, 两组间比较, 差异具有统计学意义。

3.1.2 悬浮培养 143B、MG-63、Saos-2、hFOB1.19 细胞, 骨肉瘤细胞失巢后再贴壁细胞克隆形成数目高于正常成骨细胞。

我们将骨肉瘤细胞株 143B、MG-63、Saos-2 和非肿瘤细胞 (正常成骨细胞) hFOB 1.19 稀释成 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 种植在低贴壁的培养板中进行悬浮培养, 悬浮培养 7 天后, 转移至正常培养板中培养, 贴壁培养 5 天后固定染色, 计数克隆形成数目 (图 1B)。

结果显示(图 1B&C): 在显微镜下, 悬浮培养细胞易形成细胞团簇, MG-63 和 143B 悬浮细胞形成成片大条索状及球形的细胞团簇, 而 hFOB 1.19 只形成少量细胞团簇。贴壁后的克隆形成实验显示, 肿瘤细胞 143B (322 ± 9)、MG-63 (192 ± 5)、Saos-2 (65 ± 5) 细胞克隆形成数目要明显高于 hFOB1.19 (43 ± 3), 以 143B 和 MG-63 更为显著。这一结果提示, 肿瘤细胞 143B 和 MG-63 比正常细胞具有更强抗失巢凋亡能力和增殖能力。

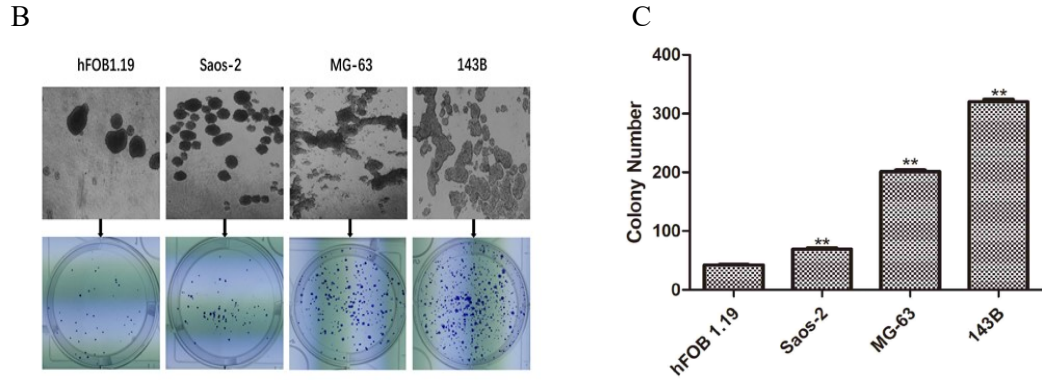


图 1B&C 4 种细胞悬浮培养 7 天后贴壁细胞克隆形成率。

Figure1B&C The colony formation rate of four cell lines after suspended culture for 7 days.

**： $p < 0.01$ ，两组间比较，差异具有显著统计学意义。

3.1.3 悬浮培养 143B、MG-63、Saos-2、hFOB1.19 细胞，骨肉瘤细胞失巢凋亡率低于正常成骨细胞。

我们将骨肉瘤细胞株 143B、MG-63、Saos-2 和非肿瘤细胞（正常成骨细胞）hFOB 1.19 在低贴壁的培养板中进行悬浮培养，悬浮培养 48h 后，使用流式细胞仪检测细胞凋亡率（图 1D&E）。

结果显示(图 1D&E)：悬浮培养 48h 后，肿瘤细胞 143B(13.33 ± 0.88)、MG-63(27.67 ± 1.45) 凋亡率明显低于 hFOB1.19(41.33 ± 1.856) 和 Saos-2($38.67 \pm 1.8 \pm 56$)。这一结果进一步提示，肿瘤细胞 143B 和 MG-63 具有很强抗失巢凋亡能力。

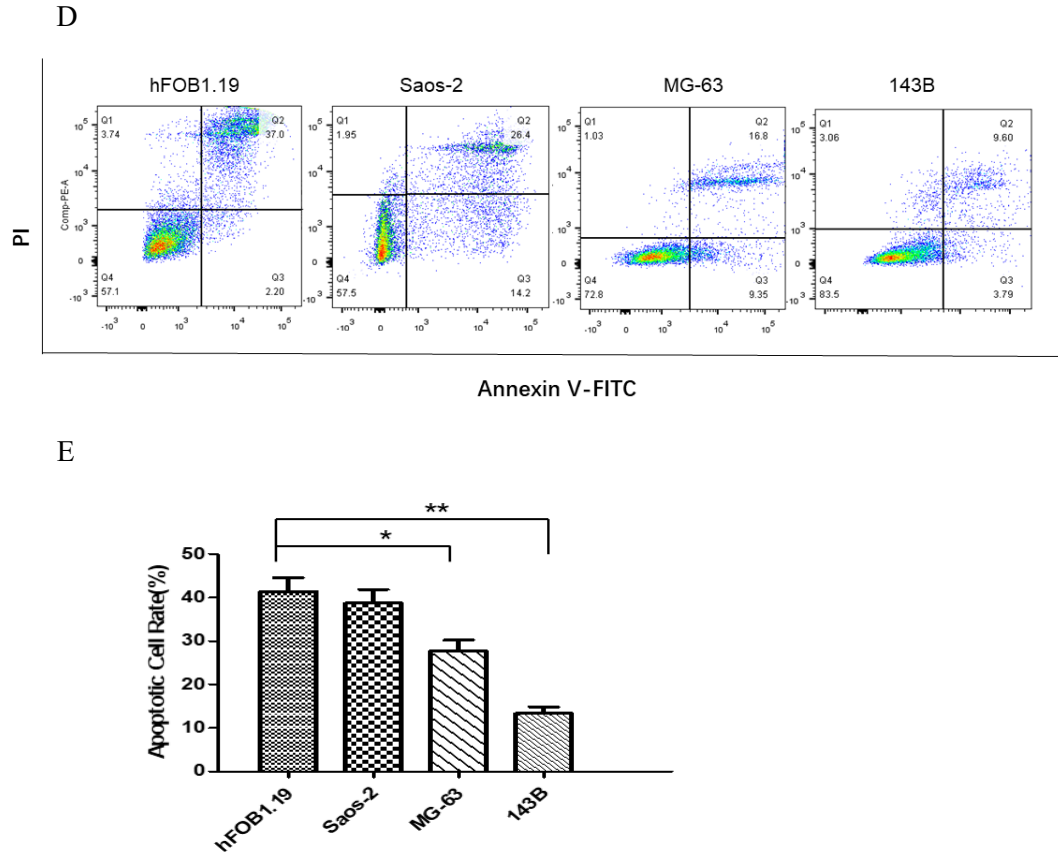


图 1D&E 4 种细胞悬浮培养 48h 检测细胞凋亡率

Figure1D&E The apoptotic rate of four cell lines after suspended culture for 48h.

*: $p < 0.05$, 两组间比较, 差异具有统计学意义。

**: $p < 0.01$, 两组间比较, 差异具有显著统计学意义。

3.1.4 悬浮培养 143B、MG-63、Saos-2、hFOB1.19 细胞, 检测促凋亡蛋白 c-Caspases3 表达量。

我们将骨肉瘤细胞株 143B、MG-63、Saos-2 和非肿瘤细胞 (正常成骨细胞) hFOB 1.19 分别种植普通培养板/低贴壁的培养板中进行贴壁/悬浮培养, 培养 48h 后, western-blot 检测贴壁和悬浮状态下各细胞 c-Caspases3 表达量 (图 1F)。

结果显示(图 1F): 贴壁培养状态下, 4 种细胞中 c-Caspases3 表达量均低。悬浮培养状态下, 非肿瘤细胞 hFOB1.19 中 c-Caspases3 表达量最高, 肿瘤细胞中, Saos-2 表达最高, 其次为 MG-63, 143B 细胞表达量最低。这提示, 高增殖

性肿瘤细胞(143B、MG-63 细胞)抗失巢凋亡能力强,而低增殖性肿瘤细胞 Saos-2 和非肿瘤细胞 hFOB1.19 抗失巢凋亡能力差。

F

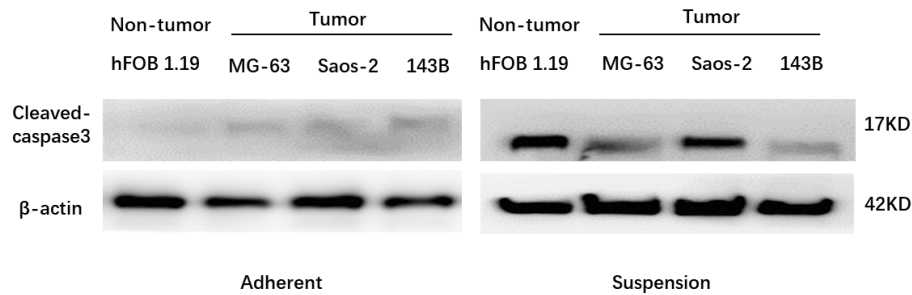


图 1F 4 种细胞贴壁/悬浮培养 48h 检测 c-Caspases3 蛋白表达量

Figure1F The expression of cleaved-Caspases3 of four cell lines after adherent/suspended culture for 48h.

第 1 部分 小结:

针对骨肉瘤细胞 (143B、MG-63、Saos-2) 与正常成骨细胞 (hFOB1.19) 细胞抗失巢凋亡能力的研究, 结果提示:

- ① 骨肉瘤细胞比正常非肿瘤细胞具有更强的失巢凋亡抵抗能力;
- ② 骨肉瘤细胞中失巢凋亡抵抗能力存在差异: 143B > MG-63 > Saos-2。

3.2. 初步探索 FASN 在骨肉瘤细胞抗失巢凋亡中的作用

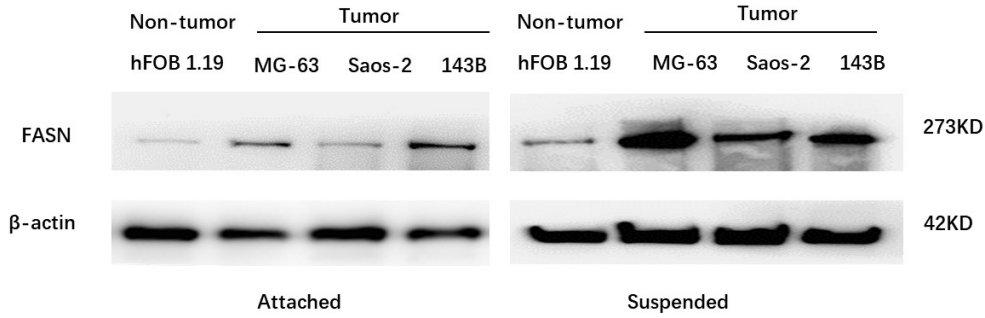
3.2.1 检测 FASN 在 143B、MG-63、Saos-2、hFOB1.19 细胞中的表达水平。

我们将骨肉瘤细胞株 143B、MG-63、Saos-2 和非肿瘤细胞 (正常成骨细胞) hFOB 1.19 种植在贴壁培养板和低贴壁的培养板中, 分别进行贴壁和悬浮培养, 48h 后, western-blot、ICC 检测 FASN 表达量(图 2A&B)。

结果显示(图 2A&B): 贴壁培养和悬浮状态下, 143B、MG-63、Saos-2 肿瘤

细胞中 FASN 蛋白表达量明显高于非肿瘤细胞 hFOB1.19。同时，我们发现悬浮培养状态下，肿瘤细胞中 FASN 表达量明显升高。这提示：1、FASN 的表达与肿瘤相关。2、细胞失巢状态激活 FASN 表达，参与抗失巢凋亡过程。

A



B

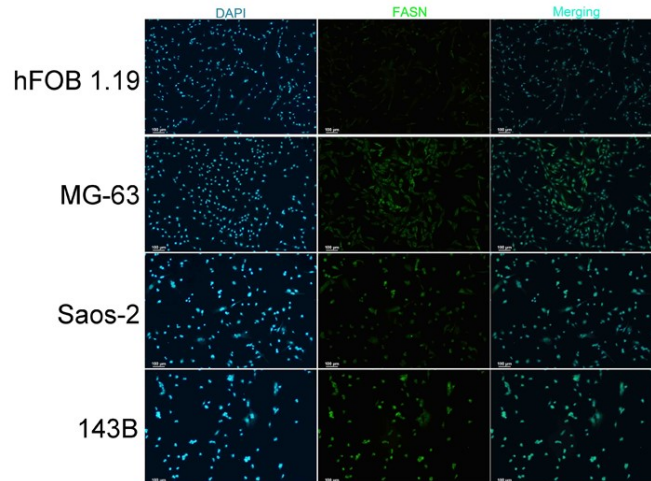


图 2A&B FASN 在骨肉瘤细胞中高表达。(A) Western-blot 检测 4 种细胞贴壁/悬浮培养 48h 后 FASN 蛋白表达量 (B) ICC 检测 4 种细胞贴壁培养 48h 后 FASN 蛋白表达量

FigureA&B (A) Detect the expression of FASN of four cell lines after attached/suspended culture for 48h by WB. (B) Detect the expression of FASN of four cell lines after attached culture for 48h by ICC.

3.2.2 初步探索 FASN 在抗失巢凋亡的作用及机制。

(1) 我们将骨肉瘤细胞株 143B、MG-63、Saos-2 和非肿瘤细胞（正常成

骨细胞) hFOB 1.19 悬浮培养 48h 后, western-blot 筛查参与肿瘤细胞抗凋亡通路的相关蛋白 (pERK1/2, pNF-kB, Bcl-2, BCL-xl, XIAP 等), 寻找与 FASN 蛋白变化一致的抗蛋白进行研究。

结果显示(图 2C): 在悬浮状态下, 细胞 FASN 蛋白的表达量与 pERK1/2、BCL-xl 变化一致。这提示, FASN 可能通过 pERK1/2/BCL-xl 信号通路参与抗失巢凋亡。

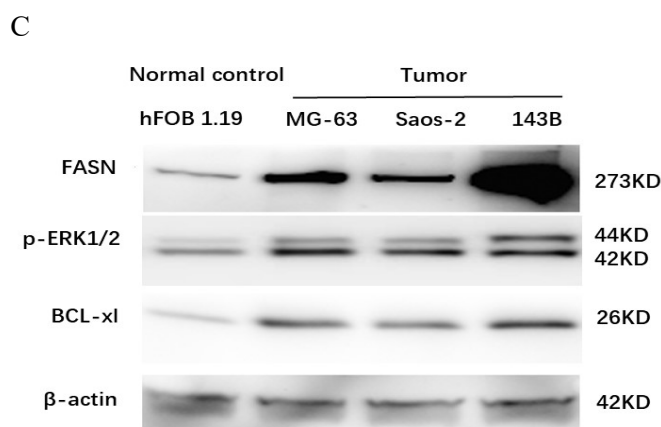


图 2C 4 种细胞悬浮培养 48h 检测 FASN/pERK1/2/BCL-xl 蛋白表达量

Figure2C The expression of FASN/pERK1/2/BCL-xl of four cell lines after attached/suspended culture for 48h.

(2) 我们使用 siRNA-FASN 转染 143B、MG-63 细胞, 在第 2, 4, 6 天用台盼蓝染色计数存活细胞数目。

结果显示(图 2D): 在 143B、MG-63 细胞中, siFASN 组悬浮细胞存活率显著高于 control 组。在悬浮第 2 天时, 在 143B 细胞中, si-FASN 组细胞存活率仍有 0.58 ± 0.05 , 而 control 组存活率有 0.91 ± 0.07 。MG-63 细胞中, si-FASN 组存活率为 0.66 ± 0.10 , 而 control 组存活率 0.8 ± 0.17 。在悬浮第 6 天时, 在 143B 细胞中, si-FASN 组细胞存活率仍有 0.36 ± 0.04 , 而 control 组存活率有 0.61 ± 0.10 。MG-63 细胞中, si-FASN 组存活率为 0.33 ± 0.03 , 而 control 组存活率 0.48 ± 0.02 。这一结果初步提示, 抑制 FASN 可促进骨肉瘤细胞失巢凋亡。

(3) 我们使用 siRNA-FASN 转染 143B、MG-63 细胞, western-blot 检测 pERK1/2。

结果显示(图 2E): 在 143B、MG-63 细胞中, 转染 siFASN 组细胞 pERK1/2 蛋白表达明显受抑制。这一结果初步提示, 抑制 FASN 可能抑制 pERK1/2 相关

信号通路。

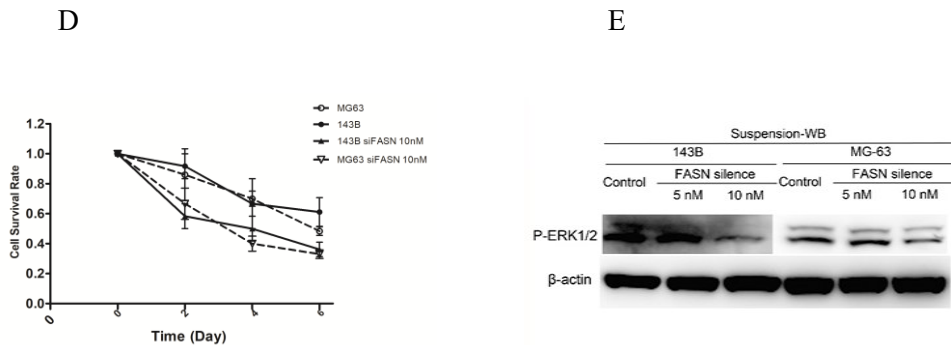


图 2D&E 转染 siRNA-FASN 后细胞失巢存活率(C)及 pERK1/2 表达水平(D)。

Figure 2D&E 143B and MG-63 were transfected with siFASN and suspended. The cell survival rate (C) and pERK1/2 expression level(D) were detected by anoikis assay and Western-blot.

第 2 部分小结:

初步探索 FASN 在抗失巢凋亡的作用及机制:

- ① 与正常非肿瘤细胞相比, 骨肉瘤细胞中 FASN 高表达;
- ② 骨肉瘤细胞中 FASN 表达水平存在差异: 143B > MG-63 > Saos-2, 与失巢凋亡抵抗能力呈正相关;
- ③ 抑制 FASN 可降低细胞失巢凋亡抵抗能力;
- ④ FASN 促进失巢凋亡抵抗可能与 pERK1/2 介导细胞抗凋亡信号通路相关。

3.3 下调 FASN 表达, 抑制细胞失巢凋亡抵抗。

我们构建了下调 FASN 慢病毒(FASN-shRNA1、shRNA 2、shRNA 3), 在 143B 细胞中筛选下调 FASN 表达最好的 shRNA 序列。在 FASN 高表达细胞株 143B、MG-63, 转染慢病毒 ((FASN-shRNA), 下调 FASN 表达, 进行功能验证。

3.3.1 构建 FASN-silence 细胞株。

我们构建了下调 FASN 的 3 个 shRNA 序列 shRNA1、shRNA2、shRNA3 插入到慢病毒载体 pLV-EGFP:T2A:Puro-EF1A。143B 细胞中转染慢病毒 control、

shRNA1、shRNA2、shRNA3, western-blot 显示 shRNA3 下调 FASN 表达效果最好 (图 3A)。后续使用 shRNA3/control 慢病毒转染 143B 细胞及 MG-63 细胞, Puro 进行抗性筛选, 筛选出稳定转染 shRNA3/control 的细胞 143B FASN-silence/control、MG-63 FASN-silence/control (图 3B)。143B FASN-silence、MG-63 FASN-silence 细胞中 mRNA (图 3C) 及 FASN 蛋白 (图 3D&E)。

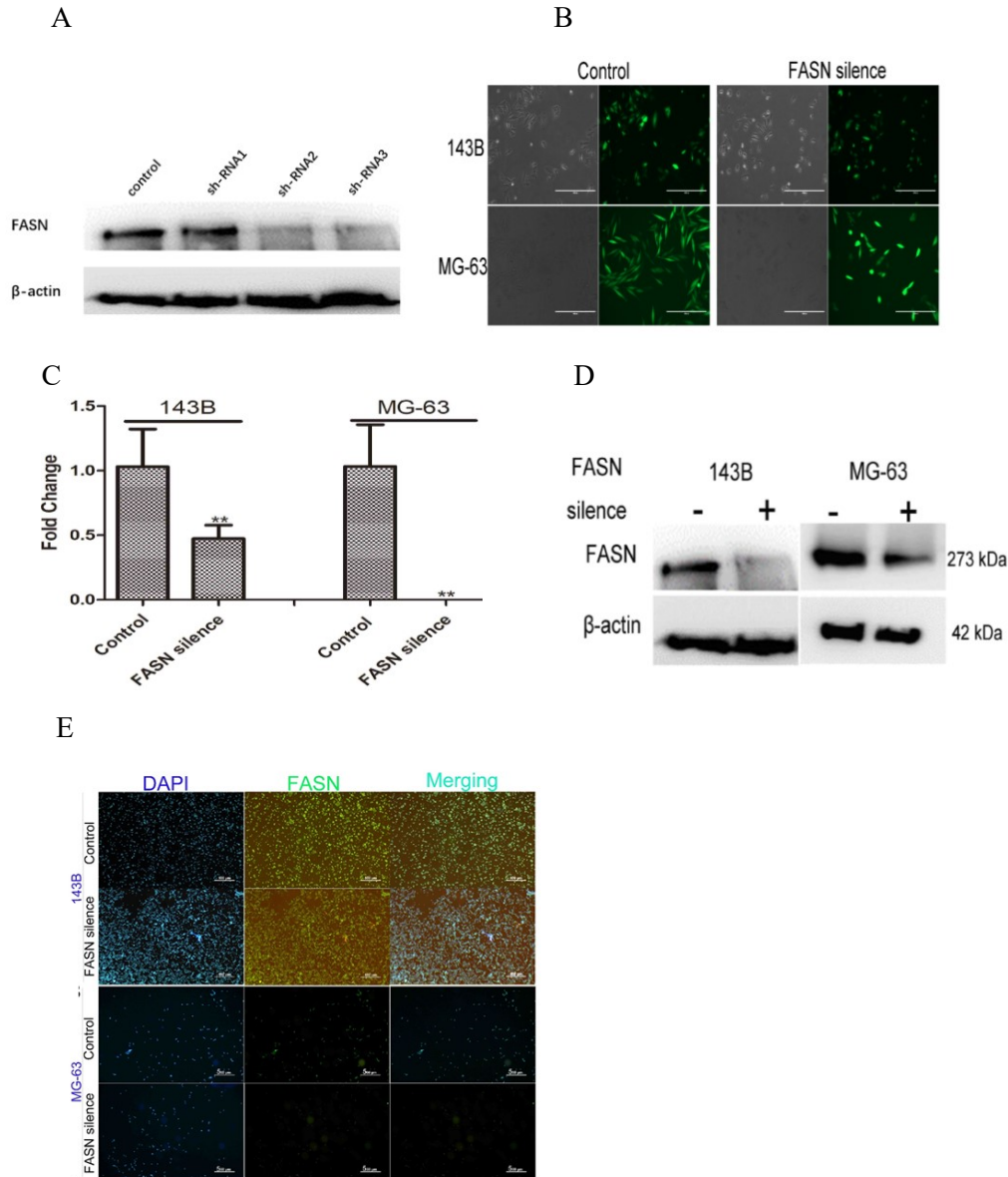


图 3A-E 构建稳定下调 FASN 表达的 143B、MG-63 细胞株。(A) Western-blot 检测 3 种不同序列 shRNA 抑制 FASN 表达的效果。(B) 稳定转染 shRNA3、control 的 143B、MG-63 细胞的荧光图像。(C) qPCR 验证 FASN mRNA 水平受抑。(D) Western-blot 验证 FASN 蛋白水

平受抑。(E) ICC 验证 FASN 蛋白水平受抑。

Figure 3A-E Establish stable FASN down-regulated 143B, MG-63 cell line. (A) Detect the FASN inhibitory effects of three different shRNA sequences by WB. (B) The photography of the cell lines that stable transfected with shRNA3 and control. (C) Confirm the inhibitory effects of FASN mRNA in stable transfected cell line by qPCR. (D) Confirm the inhibitory effects of FASN protein in stable transfected cell line by WB. (E) Confirm the inhibitory effects of FASN protein in stable transfected cell line by ICC.

**： $p < 0.01$ ，两组间比较，差异具有显著统计学意义。

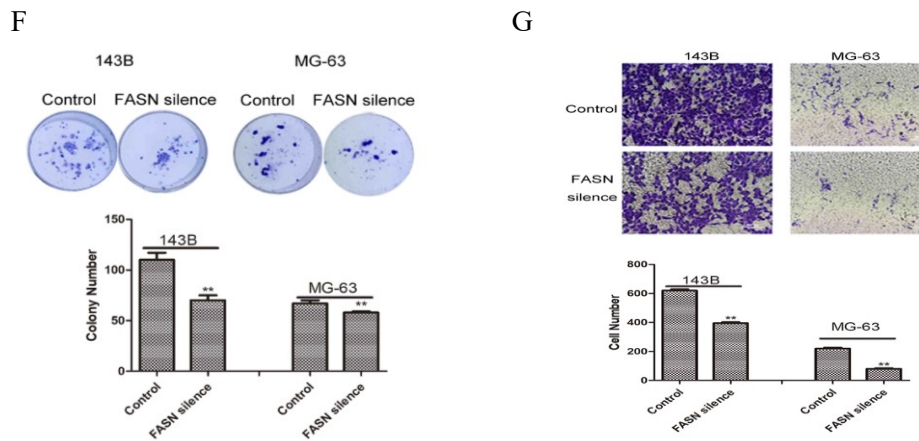
3.3.2 下调 FASN 抑制失巢凋亡抵抗

(1) 悬浮后克隆形成实验 (图 3F)，肿瘤细胞 143B 细胞中，FASN silence 组 (71 ± 3) 的克隆形成数目显著低于 control 组 (108 ± 6)。同样，在 MG-63 细胞中，结果也是一致的 (52 ± 3 vs. 66 ± 2)。

(2) 细胞侵袭实验 (图 3G)，肿瘤细胞 143B 细胞中，FASN silence 组穿透细胞数 (386 ± 14) 要显著低于 control 组 (621 ± 18)。同样，在 MG-63 细胞中，结果也是一致的 (64 ± 11 vs. 209 ± 4)。

(3) 细胞凋亡率检测 (图 3H)，在 143B 细胞中，FASN silence 组在悬浮培养 48h 的凋亡率为 $57.43 \pm 3.87(\%)$ ，显著高于 control 组细胞 $12.96 \pm 0.41(\%)$ 。同样，在 MG-63 细胞中，FASN silence 组失巢凋亡率为 $38.97 \pm 0.22(\%)$ ，显著高于 control 组 $21.54 \pm 2.31(\%)$ 。

这些结果提示，下调 FASN 可抑制肿瘤细胞增殖、迁移，抑制失巢凋亡抵抗。



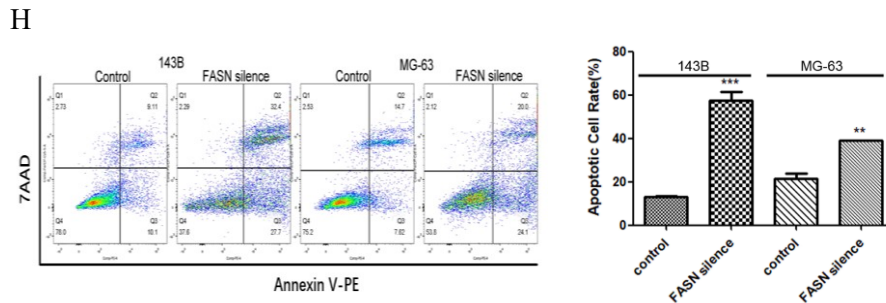


图3 F-H 下调 FASN 表达抑制细胞失巢凋亡抵抗能力。(F) 比较 FASN silence 组和 control 组悬浮 7d 后贴壁的克隆形成数目。(G) 比较 FASN silence 组和 control 组细胞迁移能力。(H) 比较 FASN silence 组和 control 组细胞悬浮 48h 后细胞凋亡率。

Figure3 F-H Down-regulation of FASN inhibited anoikis resistance abilities. (F) Representative pictures of colonies of cells and quantitation of cell colony numbers between FASN silence and control group in 143B and MG-63 cells.

(G) Transwell cell migration assay of FASN silence and control group in 143B and MG-63 cells.

(H) Apoptotic rate were detected by fluorescence-activated cell sorting-based Annexin V double staining after suspension for two days.

**： $p < 0.01$ ，两组间比较，差异具有显著统计学意义。

第3部分小结：

下调 FASN 表达，验证 FASN 在失巢凋亡中的作用。

- ① 成功构建稳定下调 FASN 表达的 FASN-silence 143B、MG-63 细胞株；
- ② 下调 FASN 抑制 143B、MG-63 失巢凋亡抵抗能力。

3.4 上调 FASN 表达，促进细胞失巢凋亡抵抗。

我们构建了 FASN 开放读码框序列 (FASN-overexpression)，在 FASN 低表达细胞株 Saos-2 和 hFOB 1.19，转染慢病毒 (FASN-overexpression)，上调 FASN 表达，进行功能验证。

3.4.1 构建 FASN-overexpression 细胞株

我们克隆了整段 FASN 开放读码框 (NCBI Ref Seq: BC007909) 插入到慢病毒载体 pLVX-mCMV-mCherry-SV40-Hygro。hFOB1.19 和 Saos-2 细胞中转染 over-expression/control 病毒，Hygro 进行抗性筛选稳定转染细胞株，筛选并建立

稳定转染 overexpression/control 的细胞(图 4A)。在 hFOB1.19 和 Saos-2 细胞中, FASN-overexpression 组中 mRNA (图 4B) 及蛋白 (图 4C&D) 的表达上调。

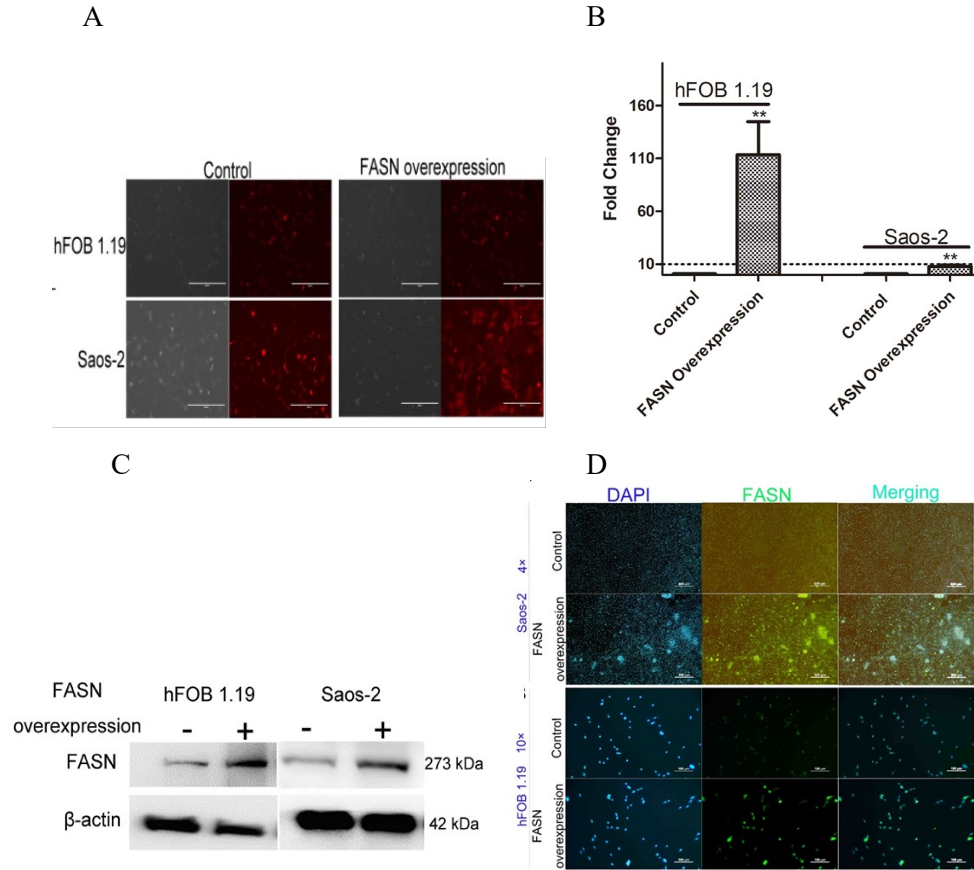


图 4A-D 构建稳定上调 FASN 表达的 hFOB1.19、Saos-2 细胞株。(A)稳定转染 FASN-overexpression、control 的 hFOB1.19、Saos-2 细胞的荧光图像。(B) qPCR 验证 FASN mRNA 水平上调。(C) Western-blot 验证 FASN 蛋白水平上调。(D) ICC 验证 FASN 蛋白水平上调。

Figure 4A-D Establish stable FASN up-regulated hFOB1.19, Saos-2 cell line. (A) The photography of the cell lines that stable transfected with overexpression and control. (B) Confirm the enhanced effects of FASN mRNA in stable transfected cell line by qPCR. (C) Confirm the enhanced effects of FASN protein in stable transfected cell line by WB. (D) Confirm the enhanced effects of FASN protein in stable transfected cell line by ICC.

**： $p < 0.01$ ，两组间比较，差异具有显著统计学意义。

3.4.2 上调 FASN 促进失巢凋亡抵抗。

(1) 悬浮后克隆形成实验(图 3E)，在 hFOB1.19 细胞中, FASN overexpression

组克隆形成数 (32 ± 2), 显著高于 control 组 (11 ± 1)。同样, 在 Saos-2 细胞中, 结果也是一致的 (12 ± 2 vs. 6 ± 1)。

(2) 细胞侵袭实验 (图 3F), 在 hFOB1.19 细胞中, FASN overexpression 组穿透膜细胞数为 123 ± 11 , control 组穿透膜的细胞数为 119 ± 15 , 两者无显著性差异。在 Saos-2 细胞中, FASN overexpression 组穿透膜细胞数为 948 ± 41 , 明显高于 control 组 595 ± 30 , 具有显著性差异。

(3) 细胞凋亡率检测 (图 3G), 在 hFOB1.19 细胞中, FASN overexpression 组细胞失巢凋亡率为 $35.3 \pm 0.65(\%)$, 显著低于 FASN control 组 $40.4 \pm 0.77(\%)$ 。Saos-2 细胞中, FASN overexpression 组凋亡率为 $42 \pm 2.2(\%)$, 显著低于 FASN control 组 $69.7 \pm 7.7(\%)$ 。

这些结果提示, 上调 FASN 可促进肿瘤细胞增殖、迁移, 增强失巢凋亡抵抗能力。

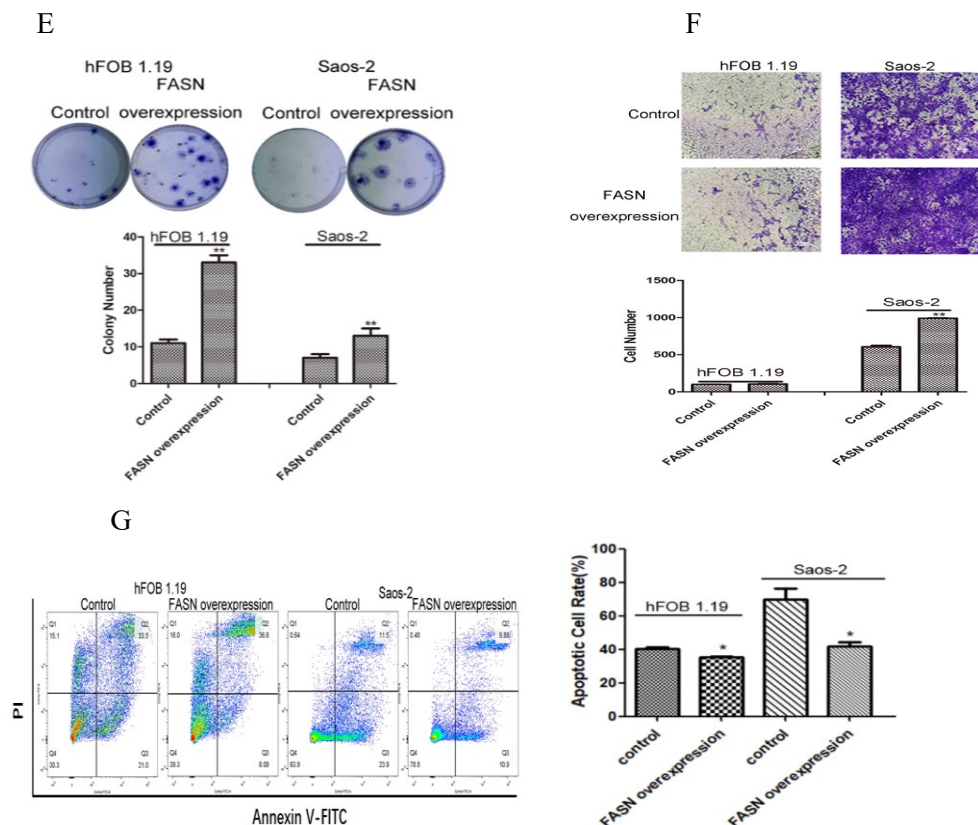


图 4 E-G 上调 FASN 表达增强细胞失巢凋亡抵抗能力。(E) 比较 FASN over-expression 组和 control 组悬浮 7d 后贴壁的克隆形成数目。(F) 比较 FASN over-expression 组和 control 组细胞迁移能力。(G) 比较 FASN over-expression 组和 control 组细胞悬浮 48h 后细胞凋亡率。

Figure4 E-G Up-regulation of FASN promote anoikis resistance abilities. (E) Representative pictures of colonies of cells and quantitation of cell colony numbers between FASN overexpression and control group in hFOB1.19、Saos-2 cells.(F) Transwell cell migration assay of FASN overexpression and control group in hFOB1.19、Saos-2 cells. (G) Apoptotic rate were detected by fluorescence-activated cell sorting-based Annexin V double staining after suspension for two days.

*: $p < 0.05$, 两组间比较, 差异具有显著统计学意义。

第 4 部分小结:

上调 FASN 表达, 验证 FASN 在失巢凋亡中的作用。

① 成功构建稳定上调 FASN 表达的 FASN-overexpression hFOB1.19、Saos-2 细胞株;

② 上调 FASN 促进 hFOB1.19、Saos-2 失巢凋亡抵抗能力。

3.5 FASN 激活 p-ERK1/2/Bcl-xl 信号通路介导失巢凋亡抵抗。

3.5.1 FASN 对 p-ERK1/2/Bcl-xl 信号通路的影响。

将 143B FASN-silence/control 及 MG63FASN-silence/control 细胞悬浮培养 48h 表达后, WB 结果显示 p-ERK1/2、Bcl-xl 蛋白表达明显下降(图 5A, 左)。将 hFOB1.19 FASN-overexpression/control 及 Saos-2 FASN-overexpression/control 细胞悬浮培养 48h 表达后, WB 结果显示 p-ERK1/2、Bcl-xl 蛋白表达明显增加(图 5A, 右)。这一结果提示, FASN 可能通过 p-ERK1/2/Bcl-xl 信号通路参与肿瘤细胞失巢凋亡抵抗。

3.5.2 进一步探索 FASN 对 p-ERK1/2/Bcl-xl 信号通路的影响。

为了进一步证实 FASN 与 p-ERK1/2/Bcl-xl 信号通路的作用关系, 我们对 FASN-overexpression 组进行了信号通路阻断-恢复试验(图 5B)。在 FASN-overexpression 和 control 细胞中, 使用 MEK 抑制剂 GDC-0973 阻断 p-ERK1/2 表达, 检测下游 BCL-xl 表达及失巢凋亡率, 验证。在 1uM、10uM 浓度下, pERK1 及其下游 BCL-xl 表达明显受抑制。FASN-overexpression+GDC-0973 组细胞失巢凋亡率明显高于 FASN-overexpression 组, 但仍低于

control+ GDC-0973 组细胞，这一结果提示，阻断 pERK1/2 表达，可促进细胞失巢凋亡，但不能完全逆转 FASN-overexpression 所致的失巢凋亡抵抗效应，这进一步验证在上调 FASN 可激活 p-ERK1/2/Bcl-xL 信号通路促进失巢凋亡抵抗。

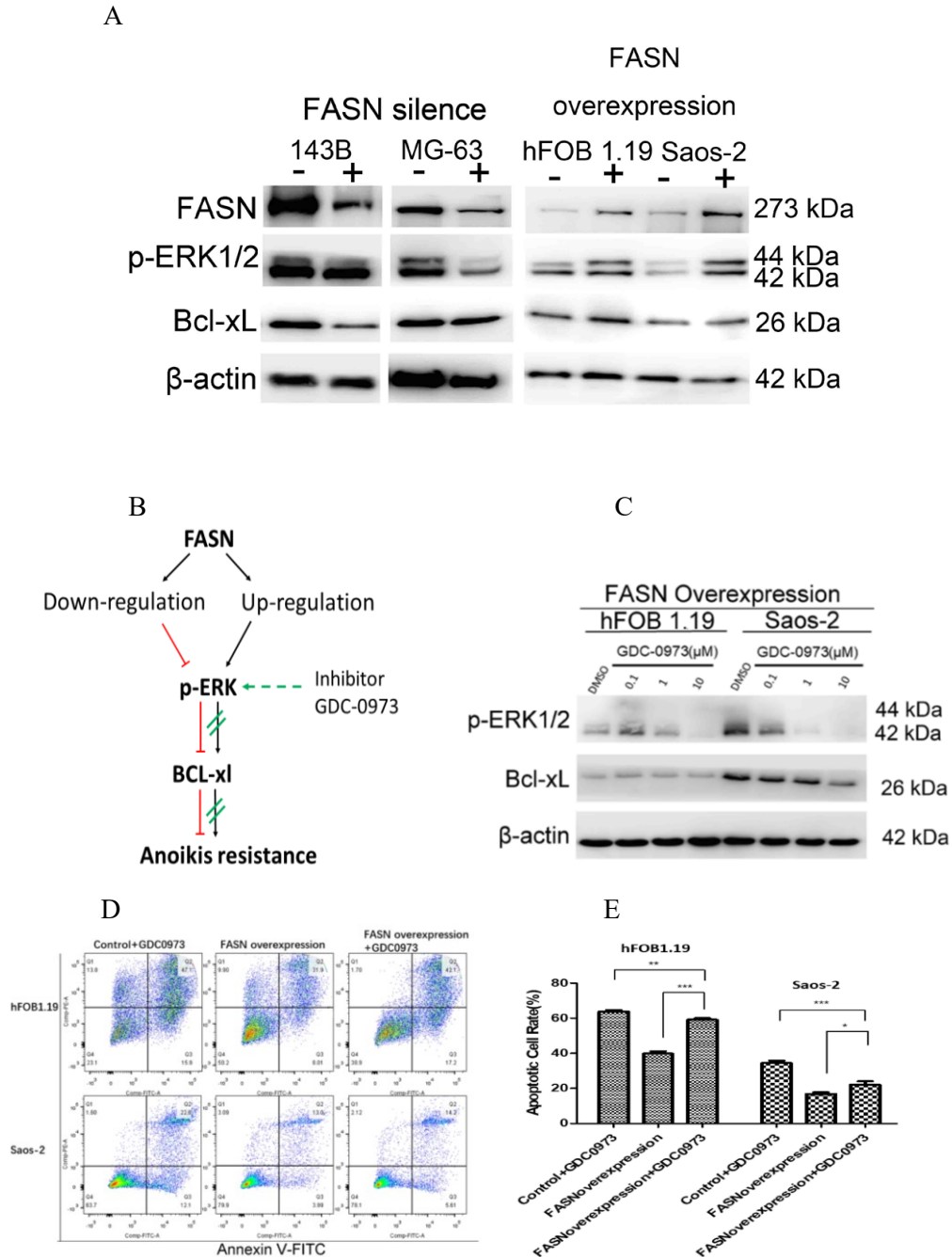


图5 FASN 激活 ERK1/2/Bcl-xL 信号通路介导失巢凋亡抵抗。(A) FASN 下调及上调细胞中 FASN、ERK1/2、Bcl-xL 的表达水平。(B) FASN、ERK1/2、Bcl-xL 信号通路示意图。(C)不同浓度 MEK 抑制剂 GDC-0973 处理 FASN-overexpression 细胞,p-ERK1/2 和 Bcl-xL

的变化情况。(D&E) GDC-0973 (10 μ M) 处理 FASN-overexpression 细胞后, 在 hFOB1.19 和 Saos-2 细胞中, 双染法检测 FASN control+GDC0973、FASN-overexpression、FASN-overexpression+ GDC0973 三组凋亡率差异。

Figure 5 FASN promote cell anoikis resistance via ERK1/2/Bcl-xL in suspended cells. (A) Expression of FASN, p-ERK1/2 and Bcl-xL in stable cell lines silencing and overexpressing FASN. (B) Flow chart of summary of the relationships of FASN, p-ERK1/2 and Bcl-xL. (C) Expression of p-ERK1/2 and Bcl-xL after the stable cell lines overexpressing FASN were treated with different concentration of MEK inhibitor GDC-0973. (D&E) Apoptotic indexes of cells treated with GDC-0973 (10 μ M) were detected by Annexin V double staining in FASN overexpression hFOB 1.19 and Saos-2 cells compared with their controls.

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, 两组间比较, 差异具有显著统计学意义。

第5部分小结:

本部分研究 FASN 对 p-ERK1/2/Bcl-xl 信号通路的影响。

① 下调/上调 FASN 可抑制/激活 p-ERK1/2/Bcl-xl 信号通路介导失巢凋亡抵抗。

② 阻断 pERK1/2 表达, 可促进细胞失巢凋亡, 但不能完全逆 FASN-overexpression 所致的失巢凋亡抵抗效应。

3.6 143B-AR 细胞 FASN/ERK1/2/Bcl-xL 信号通路高表达。

3.6.1 建立失巢凋亡抵抗细胞株 143B-AR。

如图 6A, 将贴壁生长对数期骨肉瘤细胞 143B 在低粘附 (low-attachment) 培养瓶中进行悬浮培养 14 天后重新贴壁, 筛选出存活的细胞克隆, 并贴壁扩大培养, 再继续悬浮 14 天后重新贴壁筛选存活克隆。如此反复 3 个循环, 建立抗失巢凋亡细胞系模型, 命名为 143B-AR (Anoikis Resistant) 细胞。

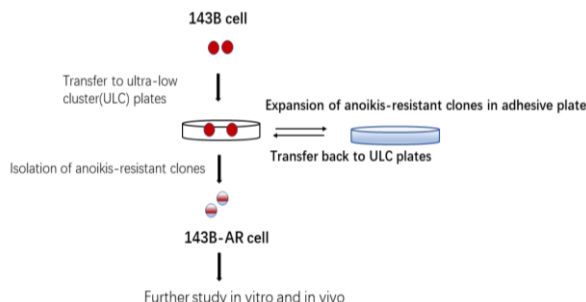


图6A 建立巢凋亡抵抗细胞株143B-AR 流程图。

Figure 6A Flow chart of generation of 143B-AR cells.

3.6.2 143B-AR 细胞比 143B 细胞具有更强的失巢凋亡抵抗能力。

(1) 悬浮后克隆形成试验 (图 6B), 143B-AR 组克隆形成数 (606 ± 10), 显著高于 143B 组 (187 ± 6)。

(2) 悬浮后细胞存活率 (图 6C), 143B-AR 存活率显著高于 143B 细胞, 细胞在悬浮培养第 6 天时, 143B-AR 细胞存活率仍有 0.77 ± 0.05 , 高于 143B 细胞 (0.52 ± 0.01)。

(3) 细胞划痕试验 (图 6D), 在单层贴壁细胞划痕 72h 后, 143B-AR 组细胞迁移程度明显高于 143B。

(4) 细胞侵袭实验 (图 6E&F), 143B-AR 组穿透膜细胞数目 (220 ± 18), 显著高于 143B 组 (184 ± 7)。具有显著性差异。

这些结果提示, AR 细胞具有更强细胞增殖、迁移及失巢凋亡抵抗能力。

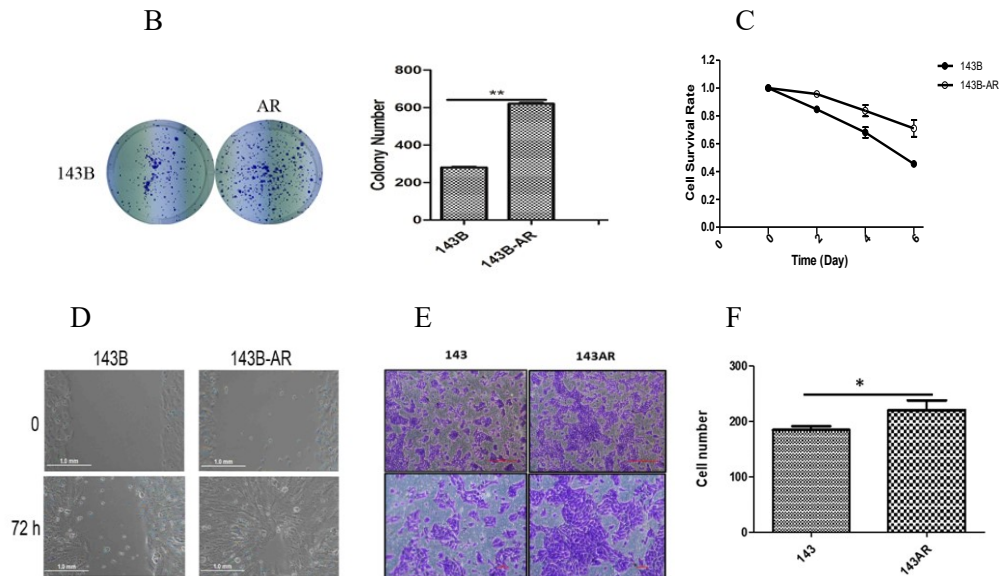


图 6B-F 143B-AR 细胞比 143B 细胞具有更强的失巢凋亡抵抗能力。(B) 比较 143B-AR 组和 143B 组悬浮 7d 后贴壁的克隆形成数目。(C) 比较 143B-AR 组和 143B 组细胞悬浮 0、2、4、6 天的细胞存活率 (D) 细胞划痕试验比较 143B-AR 组和 143B 组细胞迁移能力。(E&F) Transwell 迁移试验比较 143B-AR 组和 143B 组细胞迁移能力。

Figure 6B-F (B) Representative pictures of colonies and colony numbers of 143B, 143B-AR

cells. (C) Cell survival rate of 143B and 143B-AR after suspension for 0, 2, 4 and 6 days. (D) Wound healing assay of 143B and 143B-AR cells. (E&F) Transwell migration assay of 143B and 143B-AR cells.

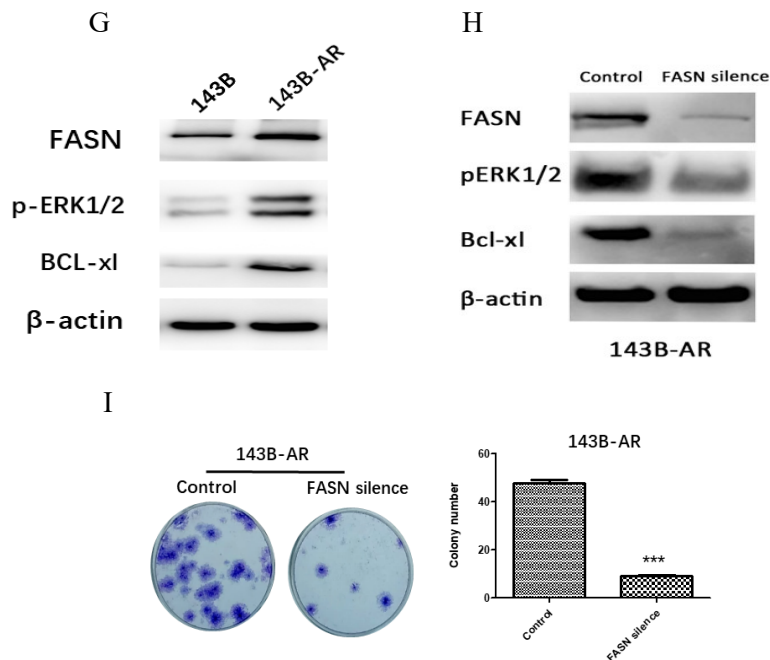
3.6.3 143B-AR 高表达 FASN/ERK1/2/Bcl-xL，介导失巢凋亡抵抗。

(1) 143B-AR 高表达 FASN/ERK1/2/Bcl-xL。

我们将骨肉瘤细胞株 143B-AR 和 143B 悬浮培养 48h 后，western-blot 检测 FASN、pERK1/2、BCL-xl，结果显示(图 6G)：在悬浮状态下，在 143B-AR 细胞中，FASN、pERK1/2、BCL-xl 蛋白表达水平高于 143B 细胞。这提示，143B-AR 细胞具有更强的失巢凋亡抵抗能力可能与高表达 FASN/ERK1/2/Bcl-xL 相关。

(2) 下调 FASN，抑制 143B-AR 细胞失巢凋亡抵抗。

我们将骨肉瘤细胞株 143B-AR 转染 shRNA3-FASN，在悬浮状态下 FASN-silence 组 FASN、pERK1/2、BCL-xl 明显下调(图 6H)。在 143B-AR 细胞中，FASN-silence 组悬浮后克隆形成数目明显减少(图 6I)；失巢凋亡率明显增加(图 6J)。



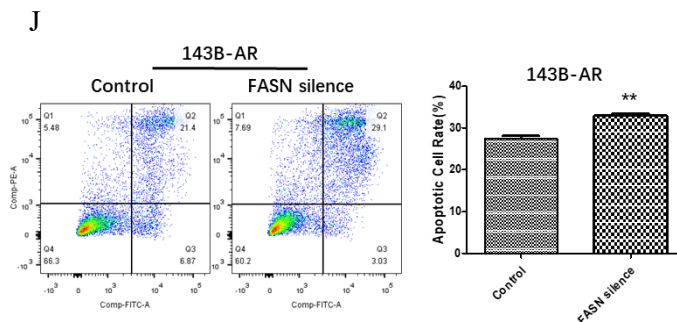


图 6G-J (G) 143B 和 143B-AR 细胞中 FASN、p-ERK1/2、Bcl-xL 蛋白表达水平。(H) 143B-AR 细胞中, 比较 control 和 FASN-silence 组中 FASN、p-ERK1/2、Bcl-xL 蛋白表达水平。(I) 143B-AR 细胞中, 比较 control 和 FASN-silence 组中悬浮 7d 后克隆形成数目。(J) 143B-AR 细胞中, 比较 control 和 FASN-silence 组中悬浮 48h 后失巢凋亡率。

Figure 6G-J (G) Relative expression levels of FASN, p-ERK1/2 and Bcl-xL in 143B and 143B-AR cells; (H) Relative expression levels of FASN, p-ERK1/2 and Bcl-xL in 143B-AR cells after transfected with shFASN. (I) Representative pictures of colonies and colony numbers between control and FASN-silence group in 143B-AR cells. (J) Apoptotic rate after suspended culture for 48h between control and FASN-silence group in 143B-AR cells.

: $p < 0.01$, *: $p < 0.001$, 两组间比较, 差异具有显著统计学意义。

第 6 部分小结:

本部分实验在 AR 细胞中进一步验证 FASN/p-ERK1/2/Bcl-xL 信号通路介导细胞失巢凋亡抵抗。

- ① 成功建立失巢凋亡抵抗细胞株 143B-AR;
- ② 143B-AR 细胞 FASN/ERK1/2/Bcl-xL 信号通路高表达;
- ③ 下调 FASN 抑制 FASN/ERK1/2/Bcl-xL 促进失巢凋亡。

3.7 体内验证 FASN 介导失巢凋亡抵抗促进骨肉瘤肺转移。

3.7.1 143B-AR 细胞具有更强的体内成瘤能力。

如图 7A, 我们将 143B 和 143B-AR 细胞在注入裸鼠体内皮下成瘤, 观察 5 周, 测量瘤体大小及瘤体重量。如图 B、C, 143B-AR 细胞体内成瘤体积和瘤体重量明显高于 143B 细胞, 5 周时, 143B-AR 细胞瘤体大小为 $1.75 \pm 0.03 \text{ cm}^3$, 重量为 $1.8 \pm 0.45 \text{ g}$ 。

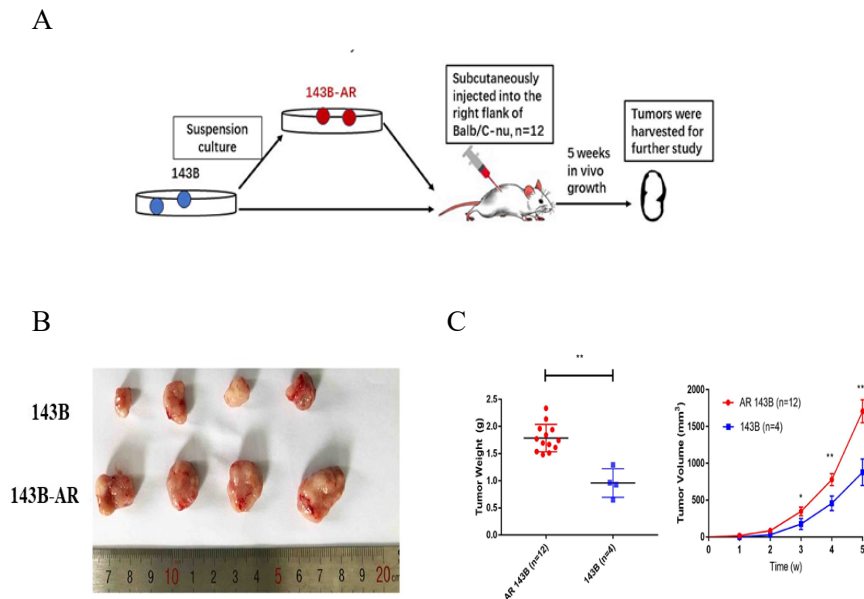


图 7A-C 143B-AR 细胞具有更强的体内成瘤能力。(A) 裸鼠皮下成瘤试验流程图。(B) 143B 和 143B-AR 细胞体内成瘤瘤体。(C) 143B 和 143B-AR 细胞体内成瘤瘤体重量及成瘤体积曲线图。瘤体重量及体积大小用均值 $\pm$ 标准差表示, $n=3/\text{组}$ 。

Figure 7A-C (A) Flow chart of studying the AR effects in vivo. (B) Representative examples of tumors formed in nude mice injected with 143B and 143B-AR cells. (C) Tumor weight and growth curves were summarized and compared in the chart. The average tumor volume/weight was expressed as the mean $\pm$ SD of mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n = 3/\text{group}$.

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, 两组间比较, 差异具有显著统计学意义。

3.7.2 下调 FASN 抑制 143B-AR 细胞肺转移。

如图 7D, 待皮下瘤体生长至 1cm 直径时, 取下瘤体组织, 将组织块原位移植胫骨上端 (图 7E)。待瘤体生长至 100mm^3 大小时 (2 周左右), 在瘤内注射 10^8 PFUs 慢病毒 control 及 shFASN (液体量为 $100\mu\text{l}$)。结果显示: 注射 shFASN 组裸鼠瘤体重量及体积明显小于 control 组 (图 7F-H)。肺部活体成像结果显示 shFASN 组出现肺转移、转移病灶数量明显小于 control 组。这一结果提示: 下调 FASN 抑制 143B-AR 细胞肺转移。进一步证实, FASN 参与骨肉瘤细胞肺转移。结合之前体外试验结果, 我们认为: FASN 可能介导失巢凋亡抵抗促进骨肉瘤细胞肺转移。

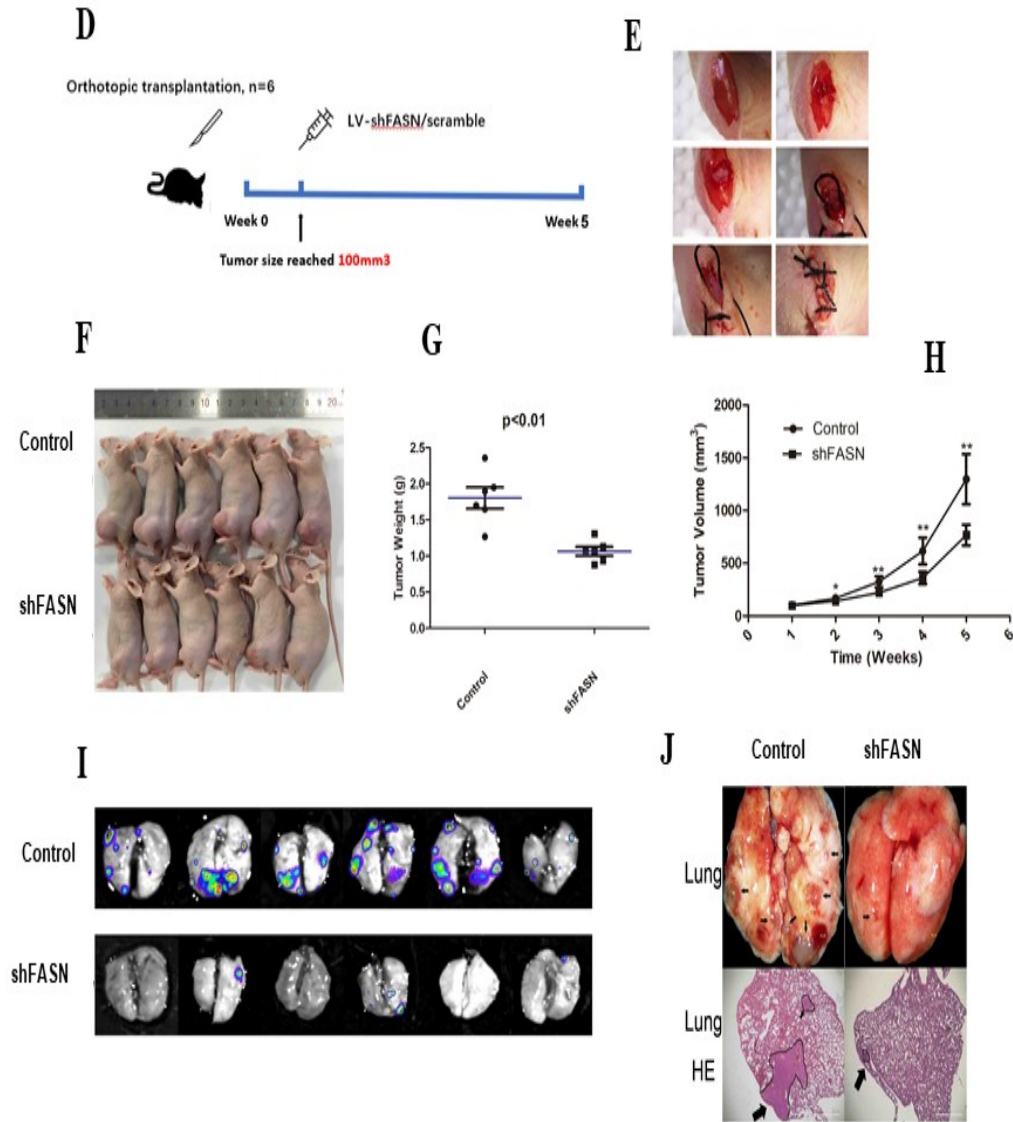


图 7D-J 下调 FASN 抑制 143B-AR 细胞肺转移。(D)研究骨肉瘤细胞肺转移体内流程图。(E)瘤体组织块原位移植过程。(F) 143B-AR 体内成瘤后分别注射慢病毒 control 及 shFASN 后瘤体大小比较。(G) 注射慢病毒 control 及 shFASN 两组裸鼠瘤体重量散点图。(H) 注射慢病毒 control 及 shFASN 两组裸鼠成瘤体积分曲线图。(I) 注射慢病毒 control 及 shFASN 两组裸鼠肺活体成像观察肺转移灶。(J) 注射慢病毒 control 及 shFASN 两组裸鼠肺活检及 HE 染色。瘤体重量及体积大小用均值±标准差表示，n=3/组。

Figure 7D-J Inhibition of FASN suppressed the lung metastasis of osteosarcoma. (D) Flow chart of procedures of the study of the lung metastases of osteosarcoma in vivo. (E) Surgery steps of orthotopic transplantation. (F) The tumor size of mice treated with shFASNs and controls.

Representative examples of tumors formed in nude mice injected with the indicated cells. (G) Tumor growth curves were summarized in the line chart. (H) Tumor weight was summarized in the chart. (I) Number of tumor foci in lung of shFASN lentivirus treated group and their control scramble group. (J) Tumor foci in lung and HE staining of the tumor. Arrows indicated the tumors.

The average tumor volume/weight was expressed as the mean $\pm$ SD of six mice.

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, 两组间比较, 差异具有显著统计学意义。

第 7 部分小结:

本部分实验在体内验证 FASN 介导失巢凋亡抵抗促进骨肉瘤肺转移。

- ① 143B-AR 细胞具有更强的体内成瘤能力。
- ② 下调 FASN 抑制 143B-AR 细胞肺转移。

3.8 实验结果小结

本研究中, 我们选用骨肉瘤细胞株 143B、MG-63、Saos-2 和非肿瘤细胞株 (正常成骨细胞) hFOB 1.19 进行失巢凋亡抵抗与 FASN 相关性及其机制的研究, 综合以上体外、体内实验结果, 我们循序渐进, 证实以下几个问题:

- (1) 骨肉瘤细胞具有失巢凋亡抵抗的能力, 其中, 143B 细胞失巢凋亡抵抗能力最强, 失巢凋亡抵抗与细胞增殖、侵袭能力有一定相关性;
- (2) FASN 在骨肉瘤细胞 143B、MG-63 细胞中高表达, 在 Saos-2 和非肿瘤细胞 hFOB 1.19 中低表达;
- (3) 上调/下调 FASN 表达水平可促进/抑制骨肉瘤细胞失巢凋亡抵抗;
- (4) FASN 激活 pERK1/2/BCL-x1 信号通路介导骨肉瘤失巢凋亡抵抗促进骨肉瘤肺转移。

第4章 讨论

4.1 骨肉瘤细胞具有失巢凋亡抵抗能力。

转移是肿瘤发展过程中的关键因素，也是肿瘤治疗失败的原因之一。主要的肿瘤转移研究集中在称为第一微环境的原发性肿瘤发生部位，以及称为第二微环境的转移器官。然而，目前研究对第三个微环境循环系统——“转移微环境”的重视不够^[82-83]。尽管多种研究已经表明^[84-86]，肿瘤细胞转移与逃逸因脱离原发病灶介导的细胞凋亡（失巢凋亡）有必然的联系^[87-88]，然而这其中的机制仍不清楚。大量证据表明，肿瘤细胞释放循环系统中是肿瘤发展过程的早期事件，甚至早于原发病灶。Cao L 等研究提示，处于失巢状态的肝癌细胞可以抵抗 TRAIL 介导的细胞凋亡促进肝癌细胞转移^[89]。

失巢凋亡是宿主清除循环肿瘤细胞的重要机制，而抗失巢凋亡能力(Anoikis resistance)是肿瘤细胞形成有效转移的一个重要前提，许多肿瘤细胞具有失巢凋亡抵抗能力。Cai Q 等研究提示，失巢凋亡抵抗是卵巢癌侵袭性的重要表型之一，卵巢癌腹水中的癌细胞具有失巢凋亡抵抗能力，其在体内具有更高的侵袭和成瘤能力^[20]。Akekawatchai 等研究提示，细胞内介质分子可介导失巢凋亡抵抗促进乳腺癌细胞转移^[30]。失巢凋亡抵抗不仅在上皮性肿瘤中存在，在骨肉瘤细胞中同样存在。因此我们推测，骨肉瘤细胞肺转移可能与失巢凋亡抵抗相关。

许多研究显示，贴壁细胞在悬浮培养状态时可诱导细胞失巢凋亡，因此，悬浮培养可作为体外研究细胞“失巢凋亡”模型^[20,63,89]。我们比较了琼脂糖平铺、Poly-HEMA、低粘附（low-attachment）培养瓶 3 种方法，对贴壁细胞进行悬浮培养，结果显示，使用低粘附培养瓶悬浮培养细胞方便、有效、贴壁率极低、污染率低，更适合本研究使用，因此我们选用低粘附培养瓶进行细胞悬浮培养。本研究显示，悬浮培养骨肉瘤细胞 143B、MG-63、Saos-2 比正常成骨细胞 hFOB1.19 具有更强的失巢凋亡抵抗能力。图 1B 在倒置显微镜下我们观察到骨肉瘤细胞 143B、MG-63 细胞在悬浮培养时形成巨大的细胞团簇，而正常细胞 hFOB1.19 形成的细胞团簇很小，这与 Lin D 等研究结果相似^[90]，这提示肿瘤细胞在不利环境中会加强细胞间的联系——抱团，有助于细胞在不利环境中存活。我们的研

究结果图 1A 显示, 悬浮的骨肉瘤细胞 143B、MG-63 的细胞存活率、克隆形成明显高于正常成骨细胞 hFOB1.19, 失巢凋亡率明显低于 hFOB1.19 细胞。这提示, 相比于正常成骨细胞, 骨肉瘤细胞具有失巢凋亡抵抗能力, 并且失巢后再次贴壁时, 肿瘤细胞仍保留克隆形成能力 (图 1B&C)。图 1A-E 结果显示, 四种细胞失巢凋亡抵抗能力由高到低依次未: 143B、MG-63、Saos-2、hFOB1.19。Caspase-3 是凋亡途径末端执行蛋白, cleaved-caspase3 是 caspase-3 断裂片段, 其表达水平与细胞凋亡率一致, 可用于作为细胞凋亡的检测指标。图 1F 结果显示, 四种细胞在贴壁培养时细胞内 cleaved-caspase3 表达水平很低, 说明凋亡很少。但是, 在悬浮培养 (失巢) 时, cleaved-caspase3 表达水平明显增加, 尤其是 hFOB1.19、Saos-2 细胞, 四种细胞失巢时 cleaved-caspase3 由高到低依次未: hFOB1.19、Saos-2、MG-63、143B, cleaved-caspase3 表达水平这与细胞失巢凋亡抵抗能力呈负相关, 这与 Girnius 等结果一致^[80]。然而, 我们可以看到, 同为骨肉瘤细胞, Saos-2 细胞悬浮后存活率及克隆形成均明显低于 143B、MG-63 细胞, 这可能与 Saos-2 细胞本身低侵袭性质相关。Stratford 等研究显示^[91], Saos-2 细胞属于低增殖的骨肉瘤细胞, 其增殖、侵袭、转移能力较弱, 然而, 143B 细胞属于高增殖的骨肉瘤细胞, 其增殖、侵袭、转移能力非常强, 因此, 不同骨肉瘤细胞株种, 其失巢凋亡抵抗能力与细胞增殖、侵袭、转移能力有一定相关性。

我们根据 Douma 等^[92]的方法, 将 143B 细胞悬浮培养 2 周后贴壁, 筛选存活克隆后扩大培养, 在继续悬浮 2 周, 再次筛选存活克隆, 如此反复多次, 成功建立失巢凋亡抵抗细胞模型 143B-AR 细胞 (图 6A)。进一步研究结果显示, 143B-AR 细胞失巢后细胞存活率及克隆形成能力均高于亲代 143B 细胞, 提示 143B-AR 细胞具有更强的失巢凋亡抵抗能力 (图 6B&C)。从细胞划痕及迁移试验的结果提示 (图 6D-F), 143B-AR 细胞比 143B 细胞具有更强的迁移能力, 这提示 143B-AR 细胞可能具有更强的转移能力。体内成瘤试验也验证这一点, 143B-AR 细胞的成瘤能力、成瘤速度均高于 143B (图 7B&C)。这些结果进一步验证, 肿瘤细胞具有失巢凋亡抵抗能力, 失巢凋亡抵抗与肿瘤细胞本身侵袭能力密切相关。

4.2 FASN 与失巢凋亡抵抗的关系

许多研究显示,细胞代谢紊乱是肿瘤形成的早期关键事件,代谢紊乱包括糖酵解增加,高乳酸产生,脂肪从头合成增加等,这些代谢性事件与相应的细胞代谢酶密切相关。脂肪酸合成酶(Fatty Acid Synthase, FASN),是一种与脂肪酸代谢相关的蛋白-引起了学者的高度关注。FASN 是脂肪酸合成酶,是哺乳动物内源性脂肪合成的关键酶。脂肪合成有两种途径,一种是从头合成,利用内源性的 CoA 和丙二酸单酰 CoA 重复加成,90%肿瘤细胞是这个途径。另外一种是使用游离脂肪酸合成,90%正常细胞是这个途径。由于肿瘤细胞快速增殖,肿瘤细胞需要大量从头合成的脂肪用于构建细胞膜,因此 FASN 是肿瘤细胞重要的代谢酶。近来许多研究表明, FASN 在多种肿瘤中异常表达,且与肿瘤的发生、发展、转移及预后密切相关,抑制 FASN 可阻断肿瘤细胞内大部分脂肪合成代谢途径,从而达到抑制肿瘤细胞增殖,促进细胞凋亡作用^[93]。目前研究显示, FASN 抑制剂除了可以抑制脂肪合成的,还具有抗肿瘤疗效。FASN 抑制剂在乳腺癌^[48,53,94]、淋巴瘤^[95-96]、结肠癌^[97]、肺癌^[98]等肿瘤中具有协同化疗药物达到抗肿瘤疗效。Walter 等提出,胰腺癌患者血清 FASN 含量升高,是潜在监测病情的指标之一^[99-100]。Danilova 等研究显示, FASN 和 CD36 表达水平可作为预测 DLBCL 患者的预后的指标^[101]。有研究显示, FASN 高表达的肿瘤患者肿瘤复发及死亡率更高^[102-104]。FASN 是一种细胞代谢酶, FASN 高表达有助于肿瘤细胞存活在不良环境中,如低氧、低 PH、营养缺氧等^[105]。因此,我们推测:当肿瘤细胞处于失巢状态下,可能激活 FASN 表达,帮助肿瘤细胞“渡过难关”。我们前期研究结果显示,对 136 例骨肉瘤患者病理切片进行 IHC 检测发现, FASN 蛋白在骨肉瘤细胞中高表达(63.2%), FASN 在存在肺转移患者组织中表达量明显高于无肺转移者(86.4% vs 52.2%, $p<0.01$),这一结果高度提示 FASN 可能与骨肉瘤肺转移相关^[106]。Western-blot 和细胞免疫荧光 ICC 显示(图 2A&B), FASN 在四种细胞中的表达量: 143B>MG-63>Saos-2> hFOB1.19。FASN 在细胞中表达水平与抗失巢凋亡能力呈正相关,提示 FASN 可能介导肿瘤细胞失巢凋亡抵抗。进一步研究显示,在 143B 和 MG-63 细胞中,下调 FASN 表达后,悬浮细胞存活率及克隆形成率明显下降,失巢凋亡率上升(图 3F-H)。而在 Saos-2、hFOB1.19 细胞中,上调 FASN 表达后,悬浮细胞存活率及克隆形成率明显上升,失巢凋亡率下降(图 4E-G)。在裸鼠体内成瘤试验结果显示,瘤体注射 shFASN 病毒后,瘤体明显缩小,肺转移灶减少(图 7F-J)。从体外及体内实验,我们证实, FASN 参与骨肉瘤细胞失巢凋亡抵抗,促进骨肉瘤肺转移。

在构建上调 FASN 序列时, 由于 FASN mRNA 全长 8.4kb, 全长克隆难度大, 插入慢病毒载体更是无法实现, 因此鲜有文献报道。有研究提出^[107], 上调 NF- κ B 转录因子可间接上调 FASN 表达, 但这只是间接的上调作用, 且不具有特异性。本研究中, 我们查阅相关文献发现人 FASN cDNA 的开放读码框(ORF), 我们克隆了包涵整段全长 ORF 的质粒 (NCBI Ref Seq: BC007909), 插入 pLVX-mCMV-mCherry-SV40-Hygro 慢病毒载体中构建 FASN-overexpression 慢病毒。实验证明, 在 hFOB1.19 及 Saos-2 细胞中转染 FASN-overexpression 慢病毒后, 细胞中 FASN 的表达水平明显上调, 细胞抗失巢凋亡能力增强。但是, 由于转染的只是 FASN 的 ORF, 并不是全长的 FASN, 过表达的 FASN 片段是否具有完整的 FASN 的功能仍不能完全确定。因此, 我们构建了 143B-AR 细胞, 143B-AR 细胞中 FASN 是明显高于 143B 细胞的, 这也是一个上调 FASN 表达的细胞模型。如图 6、7 结果显示, 143B-AR 具有较细胞更强的失巢凋亡抵抗能力及体内成瘤能力。这一结果从另一个侧面验证 FASN 促进骨肉瘤细胞失巢凋亡抵抗。

4.3 FASN 参与失巢凋亡抵抗的机制

细胞失巢凋亡途径包括内源性和外源性途径。当正常细胞脱离基质时, 细胞启动内源性 (线粒体凋亡) 和外源性途径 (激活死亡受体/配体介导凋亡), 诱导细胞发生失巢凋亡。在内源性细胞凋亡途径中, caspase 的激活是关键, 在线粒体外膜上形成促凋亡蛋白寡聚物的形成, 促使线粒体膜通透性改变, 导致细胞色素 c 释放, 细胞色素 c 与 caspase-9、凋亡蛋白酶激活因子形成凋亡小体, 进一步激活效应分子 caspase-3, 诱导细胞凋亡^[108,109]。外源性凋亡途径始于凋亡信号激活胞外死亡配体如 Fas 配体 (FasL)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α), 招募并激活 Fas 相关死亡域 (FADD), 并募集 caspase-8, 从而形成死亡诱导信号复合体 (Death-inducing signaling complex, DISC), caspase-8 能独立地激活效应分子 caspase-3 和 caspase-7, 诱导细胞凋亡^[107-109]。

肿瘤细胞因为自身的特性, 在失去与细胞外基质粘附的情况下仍然可存活和迁移, 因此这类肿瘤细胞相较于正常细胞对失巢凋亡抵抗, 其根本机制是激活存活信号以及抑制凋亡途径。肿瘤细胞在脱离细胞基质时, 致癌基因 (如 EGFR、P53 等) 等, 上调细胞生长信号通路, 如 PI3K/AKT/mTOR、MAPK/Ras/Raf/ERK, 可抑制外源性 (死亡受体/配体) 途径, 从而抑制细胞失巢凋亡。ERK1/2 主要

参与 Ras /Raf /MEK /ERK 信号通路促进细胞增殖、抑制细胞凋亡。BCL-xl 是 BCL-2 抗凋亡家族蛋白之一。研究显示,激活的 ERK1/2 上调抗凋亡蛋白 BCL-xl 是介导肿瘤细胞抗凋亡的一条重要途径。ERK1/2 信号通路是诱发肿瘤细胞“失巢凋亡抵抗”的重要途径^[77,78]。最近, Puig Teresa 等研究发现, FASN 抑制剂能显著地抑制乳腺癌细胞中 ERK1/2 信号通路的活性而诱导细胞凋亡^[110]。我们前期研究发现 FASN 抑制剂 cerulenin 能显著地抑制骨肉瘤细胞中 Bcl-xl 蛋白的表达。我们猜测,当肿瘤细胞处于悬浮状态时, FASN 处于被激活状态,从而可能激活与 pERK1/2、BCL-xl。本研究显示,当肿瘤细胞处于悬浮状态时, FASN、pERK1/2、BCL-xl 是高表达的, FASN 的表达水平与 pERK1/2、BCL-xl 呈正相关(图 2C)。当下调或者上调 FASN 可相应改变 pERK1/2、BCL-xl 表达水平(图 5A&B)。这提示 pERK1/2、BCL-xl 可能是 FASN 的下游因子。Jaiswal 等研究显示^[111], MEK 抑制剂可以用于阻断 ERK1/2 的磷酸化,因此,我们使用 MEK 抑制剂 GDC-0973 阻断 pERK1/2 表达, 随时浓度递增, 抑制 BCL-xl 的抑制作用愈显著, 这提示, BCL-xl 是 pERK1/2 下游因子(图 5C)。总结而言, 激活的 FASN/ pERK1/2/BCLxl 可能是骨肉瘤细胞失巢凋亡抵抗的一条重要通路。但是 Malin 等研究显示, α B-crystallin 通过抑制 ERK 信号通路参与肿瘤失巢凋亡抵抗, 促进肺癌细胞转移^[63], 这与我们研究结果并不吻合, 这可能与不同肿瘤类型相关。为了进一步明确, 我们进行了该信号通路阻断-恢复实验。结果显示, 使用 MEK 抑制剂 GDC-0973 阻断 pERK1/2 表达后, hFOB1.19 和 Saos-2 细胞失巢凋亡率: control+GDC-0973> overexpression+GDC-0973 组>overexpression 组, 提示阻断 pERK1/2 可以部分逆转因 FASN 上调细胞导致失巢凋亡抵抗, 但不能完全逆转, 因此 pERK1/2/BCLxl 为 FASN 介导失巢凋亡抵抗作用机制的一部分, FASN 还可能通过其他途径介导失巢凋亡抵抗, 这与我们前期试验结果吻合^[112], 值得我们后续研究进一步探索明确。后续实验中, 我们将把裸鼠肺转移结节进行 IHC 检测及 Western-blot 检测组织中 FASN/pERK1/2、BCL-xl 表达水平, 进一步在分子学水平上验证 FASN 促进肺转移的作用。

4.4 MicroRNA 与骨肉瘤

MiRNA 为内源性小片段非编码 RNA, 长约 20-24 核苷酸的非编码 RNA。程度的 miRNAs 整合入 RISC(RNA induced silencing complex)后形成 miRISC 复

合体。生物学信息学表明,每个 miRNA 能作用于超过 200 个靶基因,通过调控细胞内各靶基因的转录过程,广泛参与了细胞生长、发育、增殖、周期调控、凋亡等生物过程。从 2002 年开始,越来越多证据显示,miRNA 可在转录后水平上调控抑癌基因、癌基因,或者分子信号通路因子,在肿瘤发生、发展过程中发挥作用,miRNA 与肿瘤发生、发展密切相关^[113]。例如,miR-221/222 与乳腺癌化疗耐药相关^[114],激活 PTEN 促进成瘤,导致前列腺癌去雄激素治疗抵抗^[115-116],促进恶性胶质瘤侵袭^[117]。miRNA-375 激活 β -catenin 及 Wnt 信号通路抑制肿瘤发生^[118]。miRNA-182-PDK4 轴可调控肺癌的发生、发展,抑制 FASN 可抑制 microRNA-182 介导的肿瘤增殖^[119]。

miRNA 与失巢凋亡抵抗密切相关。研究显示,miRNA-200 可通过促进乳腺癌上皮细胞 EMT,激活 pERK 和 pAKT 表达,促进失巢凋亡抵抗^[68]。miR-141 介导 KLF12/Sp1/survivin 促进卵巢癌细胞失巢凋亡抵抗^[120]。

miRNA 在骨肉瘤增殖、侵袭、转移中同样具有重要作用。Stratford 等研究显示^[91],miRNA 在骨肉瘤细胞中异质性很大,miRNA 的表达水平与骨肉瘤细胞增殖、侵袭、转移能力密切相关,如 miR-199b-5p、mir-100-3p 的下调与成瘤能力相关,miR-155-5p 的上调与克隆形成率相关,miR-135b-5p、miR-146a-5p 的上调与肿瘤侵袭、转移相关。miR-27a 和 miR-181c 高表达与骨肉瘤转移密切相关^[121]。miR-1 和 miR133b 的低表达促进骨肉瘤细胞增殖^[122]。前期研究显示,miRNA-424 可激活 FASN 表达促进骨肉瘤增殖、侵袭。miRNA-195 可抑制 FASN 表达而抑制骨肉瘤的侵袭、转移。因此,我们目前正在 143B、143BAR、143B FASN-silence 细胞中进行 miRNA array,寻找调控 FASN 促进失巢凋亡抵抗的相关 miRNA。

目前研究认为,肺转移是骨肉瘤发生、发展过程中早期事件,肺转移是骨肉瘤致死的重要原因之一。目前,传统化疗仍是骨肉瘤肺转移的首选治疗。在肿瘤精准治疗时代,靶向治疗在骨肉瘤研究中却进展缓慢,很大程度由于骨肉瘤本身分子遗传特征相关,其特异性靶点少,靶点研究难以突破瓶颈。因此,亟待需要更多的基础及临床研究探索新靶点,让患者获益。本研究探索了 FASN 与骨肉瘤肺转移的相关性及分子机制,初步证实了 FASN 可以介导失巢凋亡抵抗促进骨肉瘤肺转移这一研究结果。本研究的意义在于 FASN 可能成为抑制骨肉瘤肺转移的新靶点,今后我们将尝试 FASN 将抑制剂与化疗联合治疗骨肉瘤肺转移的系列研究,探索 FASN 是否可能成为骨肉瘤临床治疗的新手段。近年来,随着越来越

越多新的靶点及 miRNA 被发现,骨肉瘤中的研究取得了较大的进展,我们希望在骨肉瘤中寻找到特异性更强的靶基因及 miRNA,为今后的治疗提供新手段。

第 5 章 结 论

本研究中，我们进行脂肪酸合成酶（FASN）与骨肉瘤肺转移相关性及其机制的研究，综合以上体外、体内实验结果，我们得出以下结论：

- （1）骨肉瘤细胞具有失巢凋亡抵抗的能力；
- （2）FASN 促进骨肉瘤失巢凋亡抵抗；
- （3）FASN 激活 pERK1/2/BCL-x1 信号通路介导骨肉瘤失巢凋亡抵抗促进骨肉瘤肺转移。

第6章 问题与展望

本研究目的为探索脂肪酸合成酶 FASN 在骨肉瘤细胞失巢凋亡抵抗、骨肉瘤肺转移的作用及机制,经过体外、体内实验研究,我们证实了 FASN 激活 pERK1/2/BCL-xl 信号通路介导细胞“失巢凋亡抵抗”促进骨肉瘤转移,这是在骨肉瘤基础研究领域中首次揭示 FASN 介导失巢凋亡抵抗促进骨肉瘤肺转移的分子机制,因此本研究具有创新性。

但本研究仍存在一些问題:

首先,我们在选用的细胞株存在一定局限性,143B 细胞侵袭性及成瘤能力强,而 MG-63、Saos-2 细胞,其本身特性成瘤能力太差,我们在裸鼠体内实验中未能在成瘤,导致最终体内实验仅有 143B/143AR 细胞,因此本研究结果是否能其他骨肉瘤细胞中重复有待验证;

第二,本研究中 pERK/BCL-xl 信号通路研究中,我们未能进行 FASN 下游信号通路分子进行蛋白质/基因组学检测,而是结合文献、大量预实验结果,筛选出了 FASN 介导 pERK/BCL-xl 信号通路促进失巢凋亡抵抗,有一定的盲目性。因时间关系,裸鼠肺转移病灶未进行 pERK/BCL-xl 通路表达水平检测,这是后续实验需要完成的。

第三,本研究中我们实验设计对 143B、143AR 及其相应的 FASN-silence 组细胞进行 microarray,寻找调控 FASN、介导失巢凋亡抵抗的 miRNA,目前已有部分结果,但未进行细胞验证及相关功能研究。因此从整个研究的完整性上存在缺陷。

第四,本研究未进行细胞增殖相关指标检测。虽然凋亡实验结果可以验证失巢凋亡抵抗能力,与细胞增殖无关。但在研究 4 种细胞失巢后存活率及克隆形成率实验中不能完全排外细胞增殖因素干扰结果的可能性,在实验设计的严谨性上存在一定缺陷。

最后,在构建上调 FASN 序列时,由于 FASN mRNA 全长 8.4kb,全长克隆难度大,插入慢病毒载体是无法实现的。于是我们克隆了包涵整段全长 OFR 的质粒(NCBI Ref Seq: BC007909),插入 pLVX-mCMV-mCherry-SV40-Hygro 慢病毒载体中构建 FASN-overexpression 慢病毒。虽然实验 FASN 的表达水平明显上

调,但是,由于转染的只是 FASN 的 ORF,并不是全长的 FASN,过表达的 FASN 片段是否具有完整的 FASN 的功能仍不能完全确定。这是属于分子生物学技术上的障碍。

展望:本研究揭示了 FASN 激活 pERK1/2/BCL-xl 信号通路介导骨肉瘤失巢凋亡抵抗促进骨肉瘤肺转移这一理论,FASN 可能成为抑制骨肉瘤肺转移的新靶点。今后的研究方向:

(1) 继续对裸鼠肺转移病灶进行 FASN/pERK/BCL-xl 通路表达水平检测,在体内验证 FASN/pERK/BCL-xl 通路在骨肉瘤肺转移中的作用;

(2) 继续完成 miRNA array,筛选调控 FASN、介导失巢凋亡抵抗的 miRNA 并进行细胞验证及相关功能研究;我们希望能在骨肉瘤中寻找特异性 miRNA,为今后的治疗提供新手段。

(3) 我们将尝试 FASN 将抑制剂与化疗联合治疗骨肉瘤肺转移的系列研究,探索 FASN 是否可能成为骨肉瘤临床治疗的新手段,成为骨肉瘤临床治疗中新的、特异性更强靶点。

致 谢

首先要感谢李金高导师及刘志礼老师对我的博士学习期间对我的关心、帮助和指导。通过三年学习和研究，我获益良多。导师们严谨、科学的治学态度、诲人不倦的高尚师德、精湛的医术、平易近人的品格给我留下深刻的印象，激励着我在今后临床工作中不断进步。本论文从选题到完成，都是在导师们的指导下完成的，倾注了导师大量的心血。在此，谨向导师们表示崇高的敬意和衷心的感谢！

感谢香港大学李嘉诚医学院的老师同学对我的支持与帮助；

感谢科室领导、同事对我工作和学习所给与的支持和帮助；

感谢我的家人对我的工作和学习充分理解和支持；

衷心感谢各位答辩委员在百忙之中垂阅论文并参加我的答辩！

参考文献

- [1] Mirabello, L., Yu, K., Berndt, S. I., Burdett, L., Wang, Z., & Chowdhury, S., et al. (2011). A comprehensive candidate gene approach identifies genetic variation associated with osteosarcoma. *Bmc Cancer*, 11(1), 209-209.
- [2] Longhi, A., Errani, C., De, P. M., Mercuri, M., & Bacci, G. (2006). Primary bone osteosarcoma in the pediatric age: state of the art. *Cancer Treatment Reviews*, 32(6), 423-436.
- [3] Berg H V D, Schreuder W H, Lange J D. Osteosarcoma: A Comparison of Jaw versus Nonjaw Localizations and Review of the Literature[J]. *Sarcoma*, 2013, (2013-7-15), 2013, 2013(3):316123.
- [4] Ta, H. T., Dass, C. R., Choong, P. F., & Dunstan, D. E. (2009). Osteosarcoma treatment: state of the art. *Cancer & Metastasis Reviews*, 28(2), 247-263..
- [5] Mialou, V., Philip, T., Kalifa, C., Perol, D., Gentet, J. C., & Marec-Berard, P., et al. (2010). Metastatic osteosarcoma at diagnosis: prognostic factors and long-term outcome--the french pediatric experience. *Cancer*, 104(5), 1100-1109.
- [6] Niswander LM, Kim SY. Stratifying osteosarcoma: minimizing and maximizing therapy. *Curr Oncol Rep*. 2010;12(4):266-270.
- [7] Ren, L., Mendoza, A., Zhu, J., Briggs, J. W., Halsey, C., & Hong, E. S., et al. (2015). Characterization of the metastatic phenotype of a panel of established osteosarcoma cells. *Oncotarget*, 6(30), 29469-81.
- [8] Hegyi M, Semsei A F, Jakab Z, et al. Good prognosis of localized osteosarcoma in young patients treated with limb-salvage surgery and chemotherapy.[J]. *Pediatric Blood & Cancer*, 2012, 58(4):654-654.
- [9] Munajat I, Zulmi W, Norazman MZ, Wan Faisham WI. Tumour volume and lung metastasis in patients with osteosarcoma. *J Orthop Surg (Hong Kong)*. 2008; 16(2):182-185.
- [10] Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med*. 2006;12(8):895-904
- [11] Schaefer, I. M. , Cote, G. M. , & Hornick, J. L. . (2017). Contemporary sarcoma diagnosis, genetics, and genomics. *Journal of Clinical Oncology Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 36(2), JCO2017749374.
- [12] Iwamoto Y, Tanaka K, Isu K, et al: Multiinstitutional phase II study of neoadjuvant chemotherapy for OS (NECO study) in Japan: NECO-93J and NECO-95J. *J Orthop Sci* 14: 397-404, 2009.
- [13] Meyers PA, Schwartz CL, Krailo M, et al: OS: A randomized, prospective trial of the

- addition of ifosfamide and/or muramyl tripeptide to cisplatin, doxorubicin, and high-dose methotrexate. *J Clin Oncol* 23: 2004-2011, 2005.
- [14] Jawad MU, Cheung MC, et al: Osteosarcoma: improvement in survival limited to high-grade patients only. *J Cancer Res Clin Oncol* 137: 597-607, 2011.
- [15] Hegyi M, Semsei AF, Jakab Z, et al: Good prognosis of localized OS in young patients treated with limb-salvage surgery and chemotherapy. *Pediatr Blood Cancer* 57: 415-422, 2011.
- [16] Stokkel MP, Linthorst MF, Borm JJ, et al: A reassessment of bone scintigraphy and commonly tested pretreatment biochemical parameters in newly diagnosed osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 128: 393-399, 2002.
- [17] Kim Y N , Koo K H , Sung J Y , et al. Anoikis Resistance: An Essential Prerequisite for Tumor Metastasis[J]. *International Journal of Cell Biology*, 2012, 2012:1-11.
- [18] Glinsky V V , Glinsky G V , Glinskii O V , et al. Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium[J]. *Cancer Research*, 2004, 22(1):1.
- [19] Frisch S M, Screaton R A. Anoikis mechanisms[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2001, 13(5):555-562.
- [20] Cai, Q. , Yan, L. , & Xu, Y. . (2015). Anoikis resistance is a critical feature of highly aggressive ovarian cancer cells. *Oncogene*, 34(25), 3315-3324.
- [21] Haemmerle, M. , Taylor, M. L. , Gutschner, T. , Pradeep, S. , Cho, M. S. , & Sheng, J. , et al. (2017). Platelets reduce anoikis and promote metastasis by activating yap1 signaling. *Nature Communications*, 8(1), 310.
- [22] Kim, H., Park, E. K., Koo, K. H., Park, B. K., & Kim, Y. N. (2012). Abstract 2059: nadph oxidase 4 induced ros regulates anoikis resistance through activation of src and egfr. *Cancer Research*, 72(8 Supplement), 2059-2059.
- [23] Kamarajugadda, S., Cai, Q., Chen, H., Nayak, S., Zhu, J., & He, M., et al. (2013). Manganese superoxide dismutase promotes anoikis resistance and tumor metastasis. *Cell Death & Disease*, 4(2), e504.
- [24] Cai, J., Niu, X., Chen, Y., Hu, Q., Shi, G., & Wu, H., et al. (2008). Emodin-induced generation of reactive oxygen species inhibits rhoa activation to sensitize gastric carcinoma cells to anoikis. *Neoplasia*, 10(1), 41,IN19-51,IN19.
- [25] Paoli, P., Giannoni, E., & Chiarugi, P. (2013). Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression ☆. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1833(12), 3481-3498.
- [26] Preedakorn, C., Virote, S., & Pithi, C. (2013). Epithelial-mesenchymal transition mediates anoikis resistance and enhances invasion in pleural effusion-derived human lung cancer cells. *Oncology Letters*, 5(3), 1043-1047.
- [27] Jun, S. Y., Cho, H. S., Lee, J. J., Ahn, J. H., Yoon, J. Y., & Lee, J. H., et al. (2015). Abstract 1446: induction of epithelial-to-mesenchymal transition (emt) by sl-15 knockdown contributes to anoikis resistance in human colorectal cancer metastases. *Cancer Research*,

- 75(15 Supplement), 1446-1446.
- [28] Peyre, L., Zucchini-pascal, N., De, S. G., & Rahmani, R. (2012). Effects of endosulfan on hepatoma cell adhesion: epithelial-mesenchymal transition and anoikis resistance. *Toxicology*, 300(1-2), 19-30.
- [29] Howe, E. N., Cochrane, D. R., & Richer, J. K. (2011). Targets of mir-200c mediate suppression of cell motility and anoikis resistance. *Breast Cancer Research Bcr*, 13(2), R45.
- [30] Akekawatchai C , Roytrakul S , Kittisenachai S , et al. Protein Profiles Associated with Anoikis Resistance of Metastatic MDA-MB-231 Breast Cancer Cells[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(2):581-590.
- [31] van de Ven RA, Tenhagen M, Meuleman W, van Riel JJ, Schackmann RC, Derksen PW. Nuclear p120-catenin contributes to anoikis resistance of Lobular Breast Cancer through Kaiso-dependent Wnt11 expression. *Dis Model Mech*. 2015. pii:dmm.018648.
- [32] Xiao YC, Yang ZB, Cheng XS, Fang XB, Shen T, Xia CF, Liu P, Qian HH, Sun B, Yin ZF, Li YF. CXCL8, overexpressed in colorectal cancer, enhances the resistance of colorectal cancer cells to anoikis. *Cancer Lett*. 2015;361(1):22-32.
- [33] Derouet MF, Liu G, Darling GE. MiR-145 expression accelerates esophageal adenocarcinoma progression by enhancing cell invasion and anoikis resistance. *PLoS One*. 2014;9(12):e115589.
- [34] Zhang, L., Wang, X., & Chen, P. (2013). Mir-204 down regulates sirt1 and reverts sirt1-induced epithelial-mesenchymal transition, anoikis resistance and invasion in gastric cancer cells. *Bmc Cancer*, 13(1), 290-290.
- [35] Liu B, Qu L, Yang Z, Tao H. Cyclooxygenase-2 inhibitors induce anoikis in osteosarcoma via PI3K/AKT pathway. *Med Hypotheses*. 2012;79(1):98-100.
- [36] Strauss SJ, Ng T, Mendoza-Naranjo A, Whelan J, Sorensen PH. Understanding micrometastatic disease and Anoikis resistance in ewing family of tumors and osteosarcoma. *Oncologist*. 2010;15(6):627-635.
- [37] Zhu L, McManus MM, Hughes DP. Understanding the Biology of Bone Sarcoma from Early Initiating Events through Late Events in Metastasis and Disease Progression. *Front Oncol*. 2013;3:230
- [38] Wang, Y., Wang, H., Zhou, R., Zhong, W., Lu, S., & Ma, Z., et al. (2017). Baicalin inhibits human osteosarcoma cells invasion, metastasis, and anoikis resistance by suppressing the transforming growth factor- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Anti-cancer drugs*, 28(6), 581
- [39] Du, L. et al. CXCR1/Akt signaling activation induced by mesenchymal stem cell-derived IL-8 promotes osteosarcoma cell anoikis resistance and pulmonary metastasis. *Cell Death Dis* 9, 714, doi:10.1038/s41419-018-0745-0 (2018).
- [40] Strauss, S. J., Ng, T., Mendoza-Naranjo, A., Whelan, J. & Sorensen, P. H. Understanding micrometastatic disease and Anoikis resistance in ewing family of tumors and osteosarcoma. *Oncologist* 15, 627-635, doi:10.1634/theoncologist.2010-0093(2010).

- [41] Jaiswal, R. K., Kumar, P., Kumar, M. & Yadava, P. K. hTERT promotes tumor progression by enhancing TSPAN13 expression in osteosarcoma cells. *Mol Carcinog* 57, 1038-1054, doi:10.1002/mc.22824 (2018).
- [42] Miyai K, Iwaya K, Asano T, Tamai S, Matsubara O, Tsuda H. Fatty acid synthase overexpression in adult testicular germ cell tumors: potential role in the progression of non-seminomatous germ cell tumors. *Virchows Arch.* 2014; 464(2):221-228.
- [43] Yoshii Y, Furukawa T, Oyama N, Hasegawa Y, Kiyono Y, Nishii R, Waki A, Tsuji AB, Sogawa C, Wakizaka H, Fukumura T, Yoshii H, Fujibayashi Y, Lewis JS, Saga T. Fatty acid synthase is a key target in multiple essential tumor functions of prostate cancer: uptake of radiolabeled acetate as a predictor of the targeted therapy outcome. *PLoS One.* 2013; 8(5):e64570.
- [44] Hess, D. & Igal, R. A. Genistein downregulates de novo lipid synthesis and impairs cell proliferation in human lung cancer cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 236, 707-713, doi:10.1258/ebm.2011.010265 (2011).
- [45] Fatty acid synthase: a metabolic enzyme and candidate oncogene in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 101, 519-532, doi:10.1093/jnci/djp030 (2009).
- [46] Grube S, Dünisch P, Freitag D, Klausnitzer M, Sakr Y, Walter J, Kalff R, Ewald C. Overexpression of fatty acid synthase in human gliomas correlates with the WHO tumor grade and inhibition with Orlistat reduces cell viability and triggers apoptosis. *J Neurooncol.* 2014; 118(2):277-287.
- [47] Wen, S. , Niu, Y. , Lee, S. O. , Yeh, S. , Shang, Z. , & Gao, H. , et al. (2016). Targeting fatty acid synthase with asc-j9 suppresses proliferation and invasion of prostate cancer cells. *Molecular Carcinogenesis*, n/a-n/a.
- [48] Menendez, J. A. , & Lupu, R. . (2017). Fatty acid synthase (fasn) as a therapeutic target in breast cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 14728222.2017.1381087.
- [49] Hopperton KE, Duncan RE, Bazinet RP, Archer MC. Fatty acid synthase plays a role in cancer metabolism beyond providing fatty acids for phospholipid synthesis or sustaining elevations in glycolytic activity. *Exp Cell Res.* 2014; 320(2): 302-310.
- [50] Cai Y, Wang J, Zhang L, Wu D, Yu D, Tian X, Liu J, Jiang X, Shen Y, Zhang L, Ren M, Huang P. Expressions of fatty acid synthase and HER2 are correlated with poor prognosis of ovarian cancer. *Med Oncol.* 2015;32(1):391
- [51] Veigel D, Wagner R, Stübiger G, Wuczkowski M, Filipits M, Horvat R, Benhamú B, López-Rodríguez ML, Leisser A, Valent P, Grusch M, Hegardt FG, García J, Serra D, Auersperg N, Colomer R, Grunt TW. Fatty acid synthase is a metabolic marker of cell proliferation rather than malignancy in ovarian cancer and its precursor cells. *Int J Cancer.* 2015;136(9):2078-2090
- [52] Fako VE, Wu X, Pflug B, Liu JY, Zhang JT. Repositioning proton pump inhibitors as anticancer drugs by targeting the thioesterase domain of human Fatty Acid synthase. *J Med Chem.* 2015;58(2):778-784.

- [53] Khan A, Aljarbou AN, Aldebasi YH, Faisal SM, Khan MA. Resveratrol suppresses the proliferation of breast cancer cells by inhibiting fatty acid synthase signaling pathway. *Cancer Epidemiol.* 2014;38(6):765-772
- [54] LIU ZHI L I , Gao W , Fen P A , et al. Fatty acid synthase expression in osteosarcoma and its correlation with pulmonary metastasis[J]. *Oncology Letters*, 2012, 4(5):878-882.
- [55] Chen, Ruan, Long, Peng, Zhou, & Liu, et al. (2017). Blocking fatty acid synthase inhibits tumor progression of human osteosarcoma by regulating the human epidermal growth factor receptor 2/phosphoinositide 3kinase/protein kinase b signaling pathway in xenograft models. *Experimental & Therapeutic Medicine*, 13(5), 2411.
- [56] Lee SH, Koo KH, Park JW, Kim HJ, Ye SK, Park JB, Park BK, Kim YN. HIF-1 is induced via EGFR activation and mediates resistance to anoikis-like cell death under lipid rafts/caveolae-disrupting stress. *Carcinogenesis*. 2009; 30(12):1997-2004.
- [57] Lee, S. H., Park, J. W., Ye, S. K., Park, J. B., Park, B. K., & Kim, Y. N. (2008). Lipid rafts/caveolae disruption induces hif-1 α expression via egfr activation for anoikis regulation. *Cancer Research*.
- [58] Paula, D. S. M. A. , de Araújo Lopes, Silvana, Pernambuco Filho, P. C. A. , Nader, H. B. , & Lopes, C. C. . (2017). Acquisition of anoikis resistance promotes alterations in the ras/erk and pi3k/akt signaling pathways and matrix remodeling in endothelial cells. *Apoptosis*.
- [59] Ma, B., Sen, T., Asnaghi, L., Valapala, M., Yang, F., & Hose, S., et al. (2011). β 3/a1-crystallin controls anoikis-mediated cell death in astrocytes by modulating pi3k/akt/mtor and erk survival pathways through the pkd/bit1-signaling axis. *Cell Death & Disease*, 2(10), e217.
- [60] Liu, B., Qu, L., Yang, Z., & Tao, H. (2012). Cyclooxygenase-2 inhibitors induce anoikis in osteosarcoma via pi3k/akt pathway. *Medical Hypotheses*, 79(1), 98-100.
- [61] Liu, B., Yan, S., Qu, L., & Zhu, J. (2017). Celecoxib enhances anticancer effect of cisplatin and induces anoikis in osteosarcoma via pi3k/akt pathway. *Cancer Cell International*, 17(1), 1.
- [62] Akiyama, T., & Choong PFDass, C. R. (2010). Rank-fc inhibits malignancy via inhibiting erk activation and evoking caspase-3-mediated anoikis in human osteosarcoma cells. *Clinical & Experimental Metastasis*, 27(4), 207-215.
- [63] Malin, D., Strekalova, E., Petrovic, V., Rajanala, H., Sharma, B., & Ugolkov, A., et al. (2015). Erk-regulated α b-crystallin induction by matrix detachment inhibits anoikis and promotes lung metastasis in vivo. *Oncogene*, 34(45), 5626-5634.
- [64] Collins, N. L., Reginato, M. J., ‡ Jessica K. Paulus, Sgroi, D. C., Labaer, J., & Brugge, A. J. S. (2005). G1/s cell cycle arrest provides anoikis resistance through erk-mediated bim suppression. *Molecular & Cellular Biology*, 25(12), 5282-5291.
- [65] Carduner, L., Picot, C. R., Leroydudal, J., Blay, L., Kellouche, S., & Carreiras, F. (2014). Cell cycle arrest or survival signaling through α v integrins, activation of pkc and erk1/2 lead to anoikis resistance of ovarian cancer spheroids. *Experimental Cell Research*, 320(2),

- 329-342.
- [66] Puig T, Aguilar H, Cufí S, Oliveras G, Turrado C, Ortega-Gutiérrez S, Benhamú B, López-Rodríguez ML, Urruticoechea A, Colomer R. A novel inhibitor of fatty acid synthase shows activity against HER2+ breast cancer xenografts and is active in anti-HER2 drug-resistant cell lines. *Breast Cancer Res.* 2011; 13(6):R131
- [67] †, M. L. G., Chambard, J. C., Grall, D., & Obberghen-Schilling, E. V. (2003). Adhesion-dependent control of akt/protein kinase b occurs at multiple levels. *Journal of Cellular Physiology*, 196(1), 98–104.
- [68] 张绪森. (2013). miRNA-200b 影响失巢凋亡的机制及其表达的自我调节. (Doctoral dissertation, 北京协和医学院).
- [69] Lansigan F, Davis W L, Kinlaw W B, et al. Targeting The Interactions Of Fatty Acid Metabolism With PI3K/mTOR and MAPK As a Novel Therapeutic Strategy In Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL)[J]. *Blood*, 2013, 122(21):5133-5133.
- [70] Carduner L, Picot CR, Leroy-Dudal J, Blay L, Kellouche S, Carreiras F. Cell cycle arrest or survival signaling through αv integrins, activation of PKC and ERK1/2 lead to anoikis resistance of ovarian cancer spheroids. *Exp Cell Res.* 2014;320(2):329-342.
- [71] 郭文娟, & 王爱英. (2008). 凋亡抑制基因 bcl-xl 的研究进展. *世界华人消化杂志*, 16(25), 2871-2876.
- [72] Gabriel B, Sureau F, Casselyn M, Teissie J, Petit PX. Retroactive pathway involving mitochondria in electroloaded cytochrome c-induced apoptosis. Protective properties of Bcl-2 and Bcl-XL. *Exp Cell Res* 2003; 289: 195-210.
- [73] Fujimura S, Suzumiya J, Yamada Y, Kuroki M, Ono J. Downregulation of Bcl-xL and activation of caspases during retinoic acid-induced apoptosis in an adult T-cell leukemia cell line. *Hematol J* 2003; 4:328-335
- [74] Zheng X, Wang Y, Wei H, Ling B, Sun R, Tian Z. Bcl-xL is associated with the anti-apoptotic effect of IL-15 on the survival of CD56(dim).
- [75] Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B., & Korsmeyer, S. J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for bcl-xl and bcl-2, displaces bax and promotes cell death. *Cell*, 80(2), 285-91.
- [76] Cheng, E. H., Levine, B., Boise, L. H., Thompson, C. B., & Hardwick, J. M. (1996). Bax-independent inhibition of apoptosis by bcl-xl. *Nature*, 379(6565), 554-556.
- [77] Zhang, Z., Zheng, Y., Zhu, R., Zhu, Y., Yao, W., & Liu, W., et al. (2014). The erk/eif4f/bcl-xl pathway mediates sgp-2 induced osteosarcoma cells apoptosis in vitro and in vivo. *Cancer Letters*, 352(2), 203-213.
- [78] Jazirehi, A. R., Vega, M. I., Chatterjee, D., Goodglick, L., & Bonavida, B. (2004). Inhibition of the raf-mek1/2-erk1/2 signaling pathway, bcl-xl down-regulation, and chemosensitization of non-hodgkin's lymphoma b cells by rituximab. *Cancer Research*, 64(19), 7117.
- [79] Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2013, 1833(12):3481-3498.

- [80] Girnius N , Davis R J . JNK Promotes Epithelial Cell Anoikis by Transcriptional and Post-translational Regulation of BH3-Only Proteins[J]. Cell Reports, 2017, 21(7):1910-1921.
- [81] Deng, T., & Karin, M. (1994). C-fos transcriptional activity stimulated by h-ras-activated protein kinase distinct from jnk and erk. Nature, 371(6493), 171-175.
- [82] Liotta L A, Kohn E C. The microenvironment of the tumour-host interface.[J]. Nature, 2001,
- [83] R.D. Loberg, Y. Fridman, B.A. Pienta, E.T. Keller, L.K. McCauley, R.S. Taichman, K.J. Pienta, Detection and isolation of circulating tumor cells in urologic cancers: a review, Neoplasia 6 (2004) 302–309
- [84] C.D. Simpson, K. Anyiwe, A.D. Schimmer, Anoikis resistance and tumor metastasis, Cancer Lett. 272 (2008) 177–185.
- [85] S.M. Frisch, Evidence for a function of death-receptor-related, death-domain-containing proteins in anoikis, Curr. Biol. 9 (1999)1047–1049.
- [86] M. Derouet, X. Wu, L. May, B. Hoon Yoo, T. Sasazuki, S. Shirasawa, J. Rak, K.V. Rosen, Acquisition of anoikis resistance promotes the emergence of oncogenic K-ras mutations in colorectal cancer cells and stimulates their tumorigenicity in vivo, Neoplasia 9 (2007)536–545.
- [87] T.R. Geiger, D.S. Peeper, Critical role for TrkB kinase function in anoikis suppression, tumorigenesis, and metastasis, Cancer Res. 67 (2007) 6221–6229.
- [88] Y. Zhang, H. Lu, P. Dazin, Y. Kapila, Squamous cell carcinoma cell aggregates escape suspension-induced, p53-mediated anoikis: fibronectin and integrin α v mediate survival signals through focal adhesion kinase, J. Biol. Chem. 279 (2004)48342–48349.
- [89] Cao, L. , Han, L. , Zhang, Z. , Li, J. , Qu, Z. , & Du, J. , et al. (2009). Involvement of anoikis-resistance in the metastasis of hepatoma cells. Experimental Cell Research, 315(7), 1148-1156.
- [90] Lin, D. , Feng, J. , & Chen, W. . (2008). Bcl-2 and caspase-8 related anoikis resistance in human osteosarcoma mg-63 cells. Cell Biology International, 32(10), 1199-1206.
- [91] Stratford R E , Munthe E , Lauvrak S U , et al. Functional characterisation of osteosarcoma cell lines and identification of mRNAs and miRNAs associated with aggressive cancer phenotypes[J]. British Journal of Cancer, 2013, 109(8):2228-2236.
- [92] Douma S , Van Laar T , Zevenhoven J , et al. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB[J]. Nature (London), 2004,430(7003): 1034-1039.
- [93] Menendez, J. A. , & Lupu, R. . (2007). Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. NATURE REVIEWS CANCER, 7(10), 763-777.
- [94] Menendez, J. A. , & Lupu, R. . (2017). Fatty acid synthase regulates estrogen receptor- α signaling in breast cancer cells. Oncogenesis, 6(2), e299.
- [95] Kant, S. , Kumar, A. , & Singh, S. M. . (2014). Tumor growth retardation and chemosensitizing action of fatty acid synthase inhibitor orlistat on t cell lymphoma: implication of reconstituted tumor microenvironment and multidrug resistance phenotype.

- BBA - General Subjects, 1840(1), 294-302.
- [96] Pascal, G. , Zoulika, Z. , Mona, A. , Andrew, B. , Raymond, L. , & Arun, R. . (2012). Blockade of fatty acid synthase triggers significant apoptosis in mantle cell lymphoma. *PLoS ONE*, 7(4), e33738-.
- [97] Zaytseva, Y. Y. , Rychahou, P. G. , Gulhati, P. , Elliott, V. A. , & Evers, B. M. . (2012). Inhibition of fatty acid synthase attenuates cd44-associated signaling and reduces metastasis in colorectal cancer. *Cancer Research*, 72(6), 1504-1517.
- [98] Relat, J., Blancafort, A., Oliveras, G., Cufí, S., Haro, D., & Marrero, P. F., et al. (2012). Different fatty acid metabolism effects of (–)-epigallocatechin-3-gallate and c75 in adenocarcinoma lung cancer. *Bmc Cancer*, 12(1), 280-280.
- [99] Walter K¹, Hong SM, Nyhan S, et al. Serum fatty acid synthase as a marker of pancreatic neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Sep;18(9):2380-5.
- [100] Fedele, G., Finn, S., Xie, W., Fiore, C., Nguyen, P., & Han, M., et al. (2008). Fatty acid synthase as a biomarker in prostate cancer: a high-throughput quantitative image analysis. *Cancer Research*, 68, 3650-3650.
- [101] Danilova O V , Dumont L J , Levy N B , et al. FASN and CD36 predict survival in rituximab-treated diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Journal of Hematopathology*, 2013, 6(1):11-18.
- [102] Alo', P. L., Visca, P., Marci, A., Mangoni, A., Botti, C., & Di, T. U. (2015). Expression of fatty acid synthase (fas) as a predictor of recurrence in stage i breast carcinoma patients. *Cancer*, 77(3), 474-482.
- [103] Visca, P., Sebastiani, V., Botti, C., Diodoro, M. G., Lasagni, R. P., & Romagnoli, F., et al. (2004). Fatty acid synthase (fas) is a marker of increased risk of recurrence in lung carcinoma. *Anticancer Research*, 24(6), 4169.
- [104] Ueda, S. M., Kai, L. Y., Davidson, B., Tian, Y., Murthy, V., & Wang, T. L., et al. (2010). Expression of fatty acid synthase depends on nacl and is associated with recurrent ovarian serous carcinomas. *J Oncol*, 2010(1), 285191.
- [105] Menendez J A, Lupu R. Oncogenic properties of the endogenous fatty acid metabolism: molecular pathology of fatty acid synthase in cancer cells.[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2006, 9(4):346-357.
- [106] LIU ZHI L I , Gao W , Fen P A , et al. Fatty acid synthase expression in osteosarcoma and its correlation with pulmonary metastasis[J]. *Oncology Letters*, 2012, 4(5):878-882.
- [107] Guo, J. , Kong, L. , Peng, A. , Long, X. , Zhou, Y. , & Shu, Y. . (2016). Transcription factor nf-ya promotes a malignant phenotype by upregulating fatty acid synthase expression. *Molecular Medicine Reports*, 14(6), 5007.
- [108] Wride, M. A. (2000). Minireview: apoptosis as seen through a lens. *Apoptosis*, 5(3), 203-209.
- [109] Thornberry, N. A. . (1998). Caspases: key mediators of apoptosis. *Chemistry and Biology* (London), 5(5), 0-0.

- [110] Puig, T., Aguilar, H., Cufí, S., Oliveras, G., Turrado, C., & Ortégutierrez, S., et al. (2011). A novel inhibitor of fatty acid synthase shows activity against her2+ breast cancer xenografts and is active in anti-her2 drug-resistant cell lines. *Breast Cancer Research*, 13, 6(2011-12-16), 13(6), R131.
- [111] Jaiswal, B. S. , Durinck, S. , Stawiski, E. , Yin, J. , Wang, W. , & Lin, E. , et al. (2018). Erk mutations and amplification confer resistance to erk-inhibitor therapy. *Clinical Cancer Research*, clincanres.3674.2017.
- [112] Chen, Ruan, Long, et al. Blocking fatty acid synthase inhibits tumor progression of human osteosarcoma by regulating the human epidermal growth factor receptor 2/phosphoinositide 3kinase/protein kinase B signaling pathway in xenograft models[J]. *Experimental & Therapeutic Medicine*, 2017, 13(5):2411.
- [113] Yang W, Lee DY, Ben-David Y. The roles of microRNAs in tumorigenesis and angiogenesis. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2011;3(2):140–55
- [114] Rao X, Di Leva G, Li M, Fang F, Devlin C, Hartman-Frey C, Burow ME, Ivan M, Croce CM, Nephew KP. MicroRNA-221/222 confers breast cancer fulvestrant resistance by regulating multiple signaling pathways. *Oncogene*.2011;30(9):1082–97
- [115] Garofalo M, Di Leva G, Romano G, Nuovo G, Suh SS, Ngankou A, Taccioli C, Pichiorri F, Alder H, Secchiero P, et al. miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation. *Cancer Cell*. 2009;16(6): 498–509;
- [116] Sun T, Yang M, Chen S, Balk S, Pomerantz M, Hsieh CL, Brown M, Lee GS, Kantoff PW. The altered expression of MiR-221/-222 and MiR-23b/-27b is associated with the development of human castration resistant prostate cancer. *Prostate*. 2012;72(10):1093–103
- [117] Quintavalle C, Garofalo M, Zanca C, Romano G, Iaboni M, Del Basso De Caro M, Martinez-Montero JC, Incoronato M, Nuovo G, Croce CM, et al. miR-221/222 overexpression in human glioblastoma increases invasiveness by targeting the protein phosphate PTPmu. *Oncogene*. 2012;31(7):858–68.
- [118] Tianhao, S. , Chen-Tian, L. , Lifeng, X. , Ziyu, N. , Frankie, L. , & Songlin, P. , et al. (2017). Mir-375-3p negatively regulates osteogenesis by targeting and decreasing the expression levels of lrp5 and β -catenin. *PLOS ONE*, 12(2), e0171281-.
- [119] Hu, G., Li, G., Ji, H., Xiong, H., Yin, H., & Hu, J., et al. (2016). The microrna-182-pdk4 axis regulates lung tumorigenesis by modulating pyruvate dehydrogenase and lipogenesis. *Oncogene*, 36(7), 989-998.
- [120] Mak, C. S. L. , Yung, M. M. H. , Hui, L. M. N. , Leung, L. L. , Liang, R. , & Chen, K. , et al. (2017). Microrna-141 enhances anoikis resistance in metastatic progression of ovarian cancer through targeting klf12/sp1/survivin axis. *Molecular Cancer*, 16(1), 11.
- [121] Jones, K. B. , Salah, Z. , Del, S. M. , Galasso, M. , Gaudio, E. , & Nuovo, G. J. , et al. (2012). Mirna signatures associate with pathogenesis and progression of osteosarcoma. *Cancer Research*, 72(7), 1865-1877.

参考文献

- [122] Benassi, & Maria. (2012). Mirna expression profile in human osteosarcoma: role of mir-1 and mir-133b in proliferation and cell cycle control. *International Journal of Oncology*.

攻读学位期间的研究成果

已发表论文:

- [1] Tianhao Sun#, Xing Zhong#, Honghai Song, et al. Anoikis resistant mediated by FASN promoted growth and metastasis of osteosarcoma. *Cell Death and Disease* : 298 (2019) .

综 述

失巢凋亡抵抗与肿瘤转移

钟 幸 综述 李金高 审校

摘 要：肿瘤的转移是一个多因素、多步骤的过程。包括肿瘤细胞从原发部位脱离，在脉管系统中存活，以及远处器官的存活、增殖，形成继发性肿瘤病灶。作为转移的屏障，细胞通常会经历一个被称为“失巢凋亡”的过程，这是一种细胞自发性、程序性死亡的一种形式，由于失去与细胞外基质或邻近细胞的接触。肿瘤细胞具备“失巢凋亡抵抗”能力，可以从原发部位脱离后，通过血液循环系统和淋巴系统播散到全身。近年来，技术进步使我们能够检测到“失巢凋亡抵抗”的微量循环肿瘤细胞，因此失巢凋亡抵抗成为当前肿瘤研究的热点。对失巢凋亡抵抗细胞进行详细的分子和功能分析，可能有助于深入了解肿瘤转移的生物学，并为预防肿瘤转移找到新的治疗靶点。本文综述了近年来有关失巢凋亡和失巢凋亡抵抗的分子和细胞机制的研究进展，包括内在和外在死亡信号、上皮-间质转化、生长因子受体、能量代谢、活性氧种、膜微区和脂筏等。

关键词：肿瘤；失巢凋亡；失巢凋亡抵抗；转移；存活信号

Anoikis resistance and Metastasis

Abstract: Metastasis is a multi-step process including dissociation of cancer cells from primary sites, survival in the vascular system, and proliferation in distant target organs. As a barrier to metastasis of cancer, cells that lost contact with the neighboring cells or extracellular matrix(Extracellular matrix, ECM) will be subjected to apoptosis. This cell death process has been termed “anoikis”. Cancer cells acquire anoikis resistance to survive after detachment from the primary sites and travel through the circulatory and lymphatic systems to disseminate throughout the body. Because recent technological advances enable us to detect rare circulating tumor cells, which are anoikis resistant, currently, anoikis resistance becomes a hot topic in cancer

research. Detailed molecular and functional analyses of anoikis resistant cells may provide insight into the biology of cancer metastasis and identify novel therapeutic targets for prevention of cancer dissemination. This paper comprehensively describes recent investigations of the molecular and cellular mechanisms underlying anoikis and anoikis resistance in relation to intrinsic and extrinsic death signaling, epithelial-mesenchymal transition(EMT), growth factor receptors, energy metabolism, reactive oxygen species, membrane microdomains, and lipid rafts.

Keywords: cancer; anoikis; anoikis resistance; metastasis; survival signal

细胞与细胞间相互作用、细胞与细胞外基质相互作用控制着机体的生长、发育、分化和稳态^[1,2]。细胞与细胞外基质或邻近细胞脱离相互作用将导致“失巢凋亡”(Anoikis)。早在 1994 年, Frisch 和 Francis 观察到上皮细胞基质附着的缺失导致细胞凋亡过程^[3]。而在一些病理情况下(如癌症), 细胞获得失巢凋亡抵抗能力, 可以逃逸失巢凋亡。本文将着重于目前对肿瘤转移与失巢凋亡抵抗的细胞和分子机制的认识。

一、肿瘤转移

肿瘤的转移是一个多因素、多步骤的过程。肿瘤转移包括脱离、侵袭、迁移、粘附 4 个步骤, 即原发部位的肿瘤细胞脱离原发病灶, 侵袭穿越基底膜并向周围间质呈浸润性生长, 穿越局部毛细血管或淋巴管壁进入管腔, 与血小板聚集或形成小瘤栓, 随着血液或淋巴液迁移至远处靶器官毛细血管床, 与该部位血管或淋巴管内皮细胞发生黏附, 穿越管壁和基底膜进入周围间质, 在远处靶器官不断增殖形成肿瘤细胞转移灶。影响肿瘤细胞侵袭和转移主要因素包括: 受肿瘤转移基因与肿瘤转移抑制基因、肿瘤血管生成、细胞外基质降解、细胞黏附、肿瘤微环境等因素影响^[4-5]。

转移是肿瘤发展过程中的关键因素, 也是肿瘤治疗失败的原因之一。主要的肿瘤转移研究集中在称为第一微环境的原发性肿瘤发生部位, 以及称为第二微环境的转移器官。然而, 目前研究对第三个微环境循环系统——“转移微环境”的重视不够^[6-7]。尽管多种研究已经表明^[8-9], 肿瘤细胞转移与逃逸因脱离原发病灶介导的细胞凋亡(失巢凋亡)有必然的联系^[10-11], 然而这其中的机制仍不清

楚。大量证据表明,肿瘤细胞释放循环系统中是肿瘤发展过程的早期事件,甚至早于原发病灶。Cao L 等研究提示,处于失巢状态的肝癌细胞可以抵抗 TRAIL 介导的细胞凋亡促进肝癌细胞转移^[12]。

二、失巢凋亡与肿瘤转移

失巢凋亡是宿主清除循环肿瘤细胞的重要机制,而抗失巢凋亡能力(Anoikis resistance)是肿瘤细胞形成有效转移的一个重要前提^[19-21]。正常上皮细胞或不具备转移性质的实体瘤细胞从原位脱落进入血液循环后就会引发失巢凋亡,失巢凋亡的意义在于防止这些脱落的细胞种植并生长于其他不适宜的地方。而肿瘤细胞,尤其是一些容易发生远距离转移的恶性肿瘤细胞,具有极强的抗失巢凋亡特性,便于转移侵袭。研究发现肿瘤细胞能通过多种方式抵抗失巢凋亡,比如肿瘤细胞高表达某些分子,如 Ras、Raf、NF- κ B 等,激活促存活信号通路;高表达抗凋亡蛋白、低表达促凋亡蛋白,抑制细胞凋亡细胞改变整合蛋白的表达模式,使之能够接收新环境的生存信号^[13-15];活性氧(Reactive oxygen species, ROS)通过不依赖配体的方式激活生长因子受体,从而逃逸凋亡^[16-19];上皮间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)激活^[20-23]等。这些方式导致细胞存活信号激活和凋亡途径抑制,最终使肿瘤细胞抗失巢凋亡,促进转移。“Cai Q 等发现“失巢凋亡抵抗”是侵袭性卵巢癌细胞的重要特征^[14],并且肿瘤细胞的这种“失巢凋亡抵抗”是肿瘤转移的重要早期事件和先决条件,被认为是转移一系列步骤中首要的关键步骤。Akekawatchai 等发现失巢凋亡抵抗促进乳腺癌细胞转移^[24]。失巢凋亡抵抗在促进胃癌和卵巢癌细胞的腹腔播散也有重要作用^[25,26]。“失巢凋亡”现象最初发现存在于上皮和内皮细胞中,但研究表明“失巢凋亡抵抗”现象不仅存在于上皮组织源性恶性肿瘤^[27-30],在间叶细胞也同样存在“失巢凋亡抵抗”现象^[31-37]。

三、细胞失巢凋亡途径

细胞发生失巢凋亡的途径包括内源性和外源性途径。当正常细胞脱离基质时,细胞启动形源性(线粒体凋亡)和外源性途径(激活死亡受体/配体介导凋亡),诱导细胞发生失巢凋亡。

(1) 在内源性细胞凋亡途径中, caspase 的激活是关键,在线粒体外膜上形

成促凋亡蛋白寡聚物的形成,促使线粒体膜通透性改变,导致细胞色素 c 释放,细胞色素 c 与 caspase-9、凋亡蛋白酶激活因子形成凋亡小体,进一步激活效应分子 caspase-3,诱导细胞凋亡^[38,39]。内源凋亡途径主要从促凋亡因子 Bim 开始。细胞脱离细胞外基质后 Bim 激活,迅速促进在线粒体外膜上合成 Bax/Bak 寡聚物,从而启动细胞凋亡^[40,41]。另外,细胞脱离 ECM 后,胞外信号调节激酶(Extra-cellular signal-regulated kinase, ERK)和磷酸肌醇-3-激酶(Phosphoinositide-3-kinase, PI3K)/Akt 介导的 Bim 磷酸化被抑制,如此,便能避免 Bim 被蛋白酶体降解,导致 Bim 在细胞内大量累积,从而诱导细胞凋亡^[7-8]。研究发现 Bid 也有跟 Bim 类似的功能,因而, Bim 和 Bid 通常被称为“凋亡激活剂”。另外, BH-3 区具有 Bcl-2 序列同源性的原凋亡蛋白,即 BH3-only 家族蛋白,比如 Bad、Bik、Bmf、Noxa、Puma 和 Hrk,被称为“凋亡致敏剂”。研究表现, EGFR 的过表达会抑制 Bim 表达和失巢凋亡^[42],缺氧会降低 Bim 和 BMF 的表达,并抑制乳腺上皮细胞失巢凋亡^[43]。

(2) 外源性凋亡途径。近年来,对死亡受体和线粒体通路在失巢凋亡和失巢凋亡抵抗中的作用进行了综述^[44]。外源性凋亡途径始于凋亡信号激活胞外死亡配体如 Fas 配体(FasL)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α),招募并激活 Fas 相关死亡域(FADD),并募集 caspase-8,从而形成死亡诱导信号复合体(Death-inducing signaling complex, DISC),caspase-8 能独立地激活效应分子 caspase-3 和 caspase-7,诱导细胞凋亡^[45,46]。

四、失巢凋亡抵抗与 EMT

在转移过程中,上皮细胞通过脱离基底膜粘附屏障,称为上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)。上皮-间质转化是极化上皮细胞发生多种生化变化的生物学过程,可导致间充质表型,如迁移能力增强、侵袭性增强、抗凋亡能力增强等^[47]。在肿瘤形成过程中, EMT 是提供上皮源性干细胞能动和高侵袭性表型的关键,最终促进转移扩散。同时, EMT 也是抑制失巢凋亡的一个重要过程。上皮-间质转化是发育过程中的一个重要过程,在组织修复和病理过程中也起诱导作用。研究显示, E 钙粘蛋白丢失在肿瘤转移过程中具有重要作用^[48,49],而 E 钙粘蛋白丢失是上皮-间质转化的主要标志^[50,51]。神经营养酪氨酸激酶受体(TrkB)可诱导上皮-间质转化,并抑制 TrkB 诱导的上皮-间质转化、

抗氧化性和肿瘤生长。此外, Twist、Snail 及其下游 Zeb1 也是必需的^[52-54]。因此, 上皮-间质转化和失巢凋亡抵抗是转移的关键过程, 它们具有共同的调控因子, 如 Twist、Snail、Zeb1 等。

五、失巢凋亡抵抗相关的信号通路

随着对细胞失巢凋亡深入研究, 失巢凋亡抵抗的分子机制被逐步揭示。目前研究显示, 多种激酶/磷酸酶相关信号分子在肿瘤失巢凋亡信号传导过程中起关键性的调节作用。主要的信号通路包括: Raf/ERK; PI3K/AKT 及 JUN 氨基末端激酶途径。

(1) PI3K/AKT 信号通路

是调控细胞增殖、分化、代谢的重要途径之一。当肿瘤细胞脱离 ECM 后, 肿瘤细胞内激活的生长因子, 如 EGFR 可激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制细胞凋亡, 促进失巢凋亡抵抗。研究显示, 上皮性肿瘤细胞发生间质转化时, PI3K/AKT 信号通路激活, 使肿瘤细胞获得失巢凋亡抵抗能力^[55]。

(2) Raf/ERK 信号通路

细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK) 主要包括 ERK1 和 ERK2 两个高度同源的亚型, 其活性形式是磷酸化 ERK (phosphorylated ERK)。ERK1/2 主要参与 Ras /Raf /MEK /ERK 信号通路促进细胞增殖、抑制细胞凋亡。该途径的基因发生异常, 可导致 Ras /Raf /ERK 信号通路异常活化, 进而影响正常细胞的凋亡、分化, 促进其向恶性转化及异常增殖, 产生肿瘤。近年来的研究明, Ras /Raf /MEK /ERK 信号通路与肿瘤发生、发展及肿瘤转移密切相关。ERK1/2 信号通路是介导肿瘤细胞失巢凋亡抵抗的重要途径之一^[56-61]。上皮性肿瘤细胞发生间质转化时, Ras/ERK 信号通路也同样被激活, 使肿瘤细胞获得失巢凋亡抵抗能力^[62,63]。Puig Teresa 等研究发现 FASN 抑制剂能显著地抑制乳腺癌细胞中 ERK1/2 信号通路的活性而诱导细胞凋亡^[64]。在雌激素诱导的 CCL39 成纤维细胞中发现, 活化的 Raf 能有效抑制失巢凋亡^[65]。miRNA-200b 可通过激活 pERK/pAKT 促进乳腺癌细胞失巢凋亡抵抗^[66]。在 DLBCL 中, FASN 的表达与 MAPK/ERK 信号通路正相关, 抑制 MAPK/ERK 信号通路可促进 DLBCL 细胞凋亡^[67]。PKC、整联蛋白激活 ERK1/2 信号通路有助于卵巢癌细胞逃避失巢凋亡^[68]。

Bcl-xl 最早是从禽类的互补 DNA(cDNA)文库中被鉴定出来的,属于 Bcl-2 家族 I 类成员,具有抑制细胞凋亡的作用。BCL-xl 是 Bcl-2 蛋白家族重要成员,Bcl-xl 蛋白是体内重要的抗凋亡蛋白,参与细胞抗凋亡过程。在正常细胞中,Bcl-xl 分布于胞质和膜上,在凋亡信号作用下,Bcl-xl 转位到线粒体外膜和其他细胞器膜上,与其他促凋亡蛋白如 Bad 结合或形成离子通道,维持线粒体外膜的完整性,抑制细胞凋亡^[69]。Bcl-xl 和 Bcl-2 在不同的细胞类型和不同的死亡信号作用过程中,两者发挥的作用并不完全相同^[70]。在肿瘤细胞中,抑制 Bcl-xL 可以抑制细胞凋亡及坏死^[71,72]。Bcl-xl 基因的表达主要在转录水平进行调节,研究显示,调控 BCL-xl 表达的主要途径有: MEK/ERK、PI3K/Akt、NF-κB/STATs、c-JUN 氨基末端激酶通路等。同时,肿瘤细胞激活的 Ras/MAPK/ERK、PI3K/AKT 等分子信号通路可通过介导 BCL-2 家族成员,包括 BCL-2、BCL-xl 表达,抑制促凋亡蛋白(Caspase-3、caspase-8、Bim、Bid 等)表达,实现凋亡抑制^[73-76]。Jazirehi. et al 在研究中发现,抑制 MEK/ERK 和 PI3K/Akt 途径可以抑制 Bcl-xL 的转录,增强非霍奇金 B 细胞淋巴瘤对利妥昔单抗治疗的敏感性,促进淋巴瘤细胞凋亡^[76]。

(3) JUN 氨基末端激酶(JNK)通路

JNK 信号通路是 MAPK 中重要的通路之一,它位于胞质,包含双磷酸化功能区(由三种氨基酸 Thr、pro 和 Tyr 组成)与 c-junN 端的活化区结合并使其第 63、73 位丝氨酸残基磷酸化,JNK 的活化是通过其氨基末端残基磷酸化实现的。上皮细胞脱离细胞外基质后可迅速激活 JNK 介导细胞凋亡。JNK 凋亡信号成员包括 Bim 和 BMF,是 BCL-2 家族中 BH3-only 的成员。Roger 等研究显示,JNK 促进细胞失巢凋亡,JNK 通过激活 BIM 及磷酸化 BMF 介导 BAK/BAX-依赖的细胞凋亡途径介导上皮细胞失巢凋亡抵抗,抑制 JNK 的活性能抑制细胞失巢凋亡抵抗^[77]。肿瘤细胞中激活的 ERK 也能降低 JUN 氨基末端激酶的活性。

六、结语与展望

正常的上皮细胞需要粘附到适当的 ECM 上才能存活和增殖,而当这种粘附的丧失会介导发现细胞程序性死亡,称为“失巢凋亡”。失巢凋亡对正常发育和组织稳态非常重要,因为它可以防止脱落的细胞重新粘附到不合适的 ECM 上,导致异常的生长发育,甚至癌变。失巢凋亡抵抗,或在不依赖 ECM 的情况下存活,

是发生肿瘤转移的先决条件，而肿瘤转移是导致癌症死亡的主要原因。获得恶性潜能的肿瘤细胞能够启动抵抗失巢凋亡的机制，从而增强肿瘤侵袭性，促进肿瘤转移。目前，由于血液循环中的肿瘤细胞对失巢凋亡具有抵抗性，使得肿瘤细胞能够从原发肿瘤转移到明显的病灶，因此失巢凋亡调控失调或耐药性在癌症研究领域引起了特别的关注。本文中，我们总结了关于失巢凋亡的分子机制，这些机制主要与生长因子、EMT、能量代谢、自噬、ROS 和脂筏的变化有关，这些目前正在成为调控失巢凋亡的重要主要因素，并有待进一步探索。深入研究失巢凋亡抵抗的分子机制，将有助于抗肿瘤新药物、新技术的发展，以清除循环肿瘤细胞和预防肿瘤转移。

参考文献：

- [1] C.M. Nelson and M. J. Bissell, "Of extracellular matrix, scafolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer," *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 22, pp. 287–309, 2006.
- [2] J. S. Desgrosellier and D. A. Cheresh, "Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities," *Nature Reviews Cancer*, vol. 10, no. 1, pp. 9–22, 2010.
- [3] S.M. Frisch and H. Francis, "Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis," *Journal of Cell Biology*, vol. 124, no. 4, pp. 619–626, 1994.
- [4] Kim Y N , Koo K H , Sung J Y , et al. Anoikis Resistance: An Essential Prerequisite for Tumor Metastasis[J]. *International Journal of Cell Biology*, 2012, 2012:1-11.
- [5] Glinsky V V , Glinsky G V , Glinskii O V , et al. Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium[J]. *Cancer Research*, 2004, 22(1):1.
- [6]. Liotta L A, Kohn E C. The microenvironment of the tumour-host interface.[J]. *Nature*, 2001,
- [7]. R.D. Loberg, Y. Fridman, B.A. Pienta, E.T. Keller, L.K. McCauley, R.S. Taichman, K.J. Pienta, Detection and isolation of circulating tumor cells in urologic cancers: a review, *Neoplasia* 6 (2004) 302–309
- [8]. C.D. Simpson, K. Anyiwe, A.D. Schimmer, Anoikis resistance and tumor metastasis, *Cancer Lett.* 272 (2008) 177–185.
- [9]. S.M. Frisch, Evidence for a function of death-receptor-related, death-domain containing proteins in anoikis, *Curr. Biol.* 9 (1999) 1047–1049.
- [10] M. Derouet, X. Wu, L. May, B. Hoon Yoo, T. Sasazuki, S. Shirasawa, J. Rak, K.V. Rosen, Acquisition of anoikis resistance promotes the emergence of oncogenic K-ras mutations in colorectal cancer cells and stimulates their tumorigenicity in vivo, *Neoplasia* 9 (2007) 536–545.

- [11]. T.R. Geiger, D.S. Peeper, Critical role for TrkB kinase function in anoikis suppression, tumorigenesis, and metastasis, *Cancer Res.* 67 (2007) 6221–6229.
- [12] Cao, L. , Han, L. , Zhang, Z. , Li, J. , Qu, Z. , & Du, J. , et al. (2009). Involvement of anoikis-resistance in the metastasis of hepatoma cells. *Experimental Cell Research*, 315(7), 1148-1156.
- [13] Frisch S M, Screaton R A. Anoikis mechanisms[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2001, 13(5):555-562.
- [14] Cai, Q. , Yan, L. , & Xu, Y. . (2015). Anoikis resistance is a critical feature of highly aggressive ovarian cancer cells. *Oncogene*, 34(25), 3315-3324.
- [15]. Haemmerle, M. , Taylor, M. L. , Gutschner, T. , Pradeep, S. , Cho, M. S. , & Sheng, J. , et al. (2017). Platelets reduce anoikis and promote metastasis by activating yap1 signaling. *Nature Communications*, 8(1), 310.
- [16] Kim, H., Park, E. K., Koo, K. H., Park, B. K., & Kim, Y. N. (2012). Abstract 2059: nadph oxidase 4 induced ros regulates anoikis resistance through activation of src and egfr. *Cancer Research*, 72(8 Supplement), 2059-2059.
- [17] Kamarajugadda, S., Cai, Q., Chen, H., Nayak, S., Zhu, J., & He, M., et al. (2013). Manganese superoxide dismutase promotes anoikis resistance and tumor metastasis. *Cell Death & Disease*, 4(2), e504.
- [18] Cai, J., Niu, X., Chen, Y., Hu, Q., Shi, G., & Wu, H., et al. (2008). Emodin-induced generation of reactive oxygen species inhibits rhoa activation to sensitize gastric carcinoma cells to anoikis. *Neoplasia*, 10(1), 41,IN19-51,IN19.
- [19] Paoli, P., Giannoni, E., & Chiarugi, P. (2013). Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression ☆. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1833(12), 3481-3498.
- [20] Preedakorn, C., Virote, S., & Pithi, C. (2013). Epithelial-mesenchymal transition mediates anoikis resistance and enhances invasion in pleural effusion-derived human lung cancer cells. *Oncology Letters*, 5(3), 1043-1047.
- [21] Jun, S. Y., Cho, H. S., Lee, J. J., Ahn, J. H., Yoon, J. Y., & Lee, J. H., et al. (2015). Abstract 1446: induction of epithelial-to-mesenchymal transition (emt) by sl-15 knockdown contributes to anoikis resistance in human colorectal cancer metastases. *Cancer Research*, 75(15 Supplement), 1446-1446.
- [22] Peyre, L., Zucchini, N., De, S. G., & Rahmani, R. (2012). Effects of endosulfan on hepatoma cell adhesion: epithelial-mesenchymal transition and anoikis resistance. *Toxicology*, 300(1-2), 19-30.
- [23]. Howe, E. N., Cochrane, D. R., & Richer, J. K. (2011). Targets of mir-200c mediate suppression of cell motility and anoikis resistance. *Breast Cancer Research Bcr*, 13(2), R45.
- [24] . Akekawatchai C , Roytrakul S , Kittisenachai S , et al. Protein Profiles Associated with Anoikis Resistance of Metastatic MDA-MB-231 Breast Cancer Cells[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(2):581-590.
- [25] T. Uekita, M. Tanaka, M. Takigahira et al., “CUB-domain-containing protein 1 regulates

- peritoneal dissemination of gastric scirrhus carcinoma,” *American Journal of Pathology*, vol. 172, no.6, pp. 1729–1739, 2008.]
- [26] S. Masoumi Moghaddam, A. Amini, D. L. Morris, and M. H. Pourgholami, “Significance of vascular endothelial growth factor in growth and peritoneal dissemination of ovarian cancer,” *Cancer and Metastasis Reviews*. Inpress.
- [27] van de Ven RA, Tenhagen M, Meuleman W, van Riel JJ, Schackmann RC, Derksen PW. Nuclear p120-catenin contributes to anoikis resistance of Lobular Breast Cancer through Kaiso-dependent Wnt11 expression. *Dis Model Mech*. 2015. pii: dmm.018648.
- [28]. Xiao YC, Yang ZB, Cheng XS, Fang XB, Shen T, Xia CF, Liu P, Qian HH, Sun B, Yin ZF, Li YF. CXCL8, overexpressed in colorectal cancer, enhances the resistance of colorectal cancer cells to anoikis. *Cancer Lett*. 2015;361(1):22-32.
- [29]. Derouet MF, Liu G, Darling GE. MiR-145 expression accelerates esophageal adenocarcinoma progression by enhancing cell invasion and anoikis resistance. *PLoS One*. 2014;9(12):e115589.
- [30]. Zhang, L., Wang, X., & Chen, P. (2013). Mir-204 down regulates sirt1 and reverts sirt1-induced epithelial-mesenchymal transition, anoikis resistance and invasion in gastric cancer cells. *Bmc Cancer*, 13(1), 290-290.
- [31] Liu B, Qu L, Yang Z, Tao H. Cyclooxygenase-2 inhibitors induce anoikis in osteosarcoma via PI3K/AKT pathway. *Med Hypotheses*. 2012;79(1):98-100.
- [32] Strauss SJ, Ng T, Mendoza-Naranjo A, Whelan J, Sorensen PH. Understanding micrometastatic disease and Anoikis resistance in ewing family of tumors and osteosarcoma. *Oncologist*. 2010;15(6):627-635.
- [33]. Zhu L, McManus MM, Hughes DP. Understanding the Biology of Bone Sarcoma from Early Initiating Events through Late Events in Metastasis and Disease Progression. *Front Oncol*. 2013;3:230
- [34]. Wang, Y., Wang, H., Zhou, R., Zhong, W., Lu, S., & Ma, Z., et al. (2017). Baicalin inhibits human osteosarcoma cells invasion, metastasis, and anoikis resistance by suppressing the transforming growth factor- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Anti-cancer drugs*, 28(6), 581
- [35]. Du, L. et al. CXCR1/Akt signaling activation induced by mesenchymal stem cell-derived IL-8 promotes osteosarcoma cell anoikis resistance and pulmonary metastasis. *Cell Death Dis* 9, 714, doi:10.1038/s41419-018-0745-0 (2018).
- [36]. Strauss, S. J., Ng, T., Mendoza-Naranjo, A., Whelan, J. & Sorensen, P. H. Understanding micrometastatic disease and Anoikis resistance in ewing family of tumors and osteosarcoma. *Oncologist* 15, 627-635, doi:10.1634/theoncologist.2010-0093(2010).
- [37]. Jaiswal, R. K., Kumar, P., Kumar, M. & Yadava, P. K. hTERT promotes tumor progression by enhancing TSPAN13 expression in osteosarcoma cells. *Mol Carcinog* 57, 1038-1054, doi:10.1002/mc.22824 (2018).
- [38] Wride, M. A. (2000). Minireview: apoptosis as seen through a lens. *Apoptosis*, 5(3), 203-209.

- [39]. Thornberry, N. A. . (1998). Caspases: key mediators of apoptosis. *Chemistry and Biology* (London), 5(5), 0-0.
- [40] Bouillet P, Strasser A. BH3-only proteins-evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci*, 2002, 115(8): 1567–1574.
- [41] Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(3): 231–241.
- [42] M.J.Reginato,K.R.Mills,J.K.Pauluset al.,“Integrins and EGFRcoordinatelyregulate thepro-apoptoticproteinBimto prevent anoikis,” *NatureCellBiology*,vol.5, no.8,pp. 733–740, 2003.
- [43] K.A.Whelan,S.A.Caldwell,K.S. Shahriari et al.,“Hypoxia suppression of Bim and Bmf blocks anoikis and luminal clearing during mammary morphogenesis,” *Molecular Biology of the Cell*, vol. 21, no. 22, pp. 3829–3837, 2010
- [44] C. D. Simpson, K. Anyiwe, and A. D. Schimmer, “Anoikis resistance and tumor metastasis,” *Cancer Letters*, vol. 272, no. 2, pp. 177–185, 2008
- [45] Frisch S M, Screaton R A. Anoikis mechanisms[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2001, 13(5):555-562.
- [46] Kim Y N , Koo K H , Sung J Y , et al. Anoikis Resistance: An Essential Prerequisite for Tumor Metastasis[J]. *International Journal of Cell Biology*, 2012, 2012:1-11.
- [47] R. Kalluri and R. A. Weinberg, “The basics of epithelial-mesenchymal transition,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 119, no.6,pp. 1420–1428, 2009.
- [48] A. Nagafuchi, Y. Shirayoshi, and K. Okazaki, “Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA,” *Nature*, vol. 329, no. 6137, pp. 341–343, 1987.
- [49] K.M.HajraandE.R.Fearon, “Cadherinand catenin alterations in human cancer,” *Genes Chromosomes and Cancer*, vol. 34, no.3,pp. 255–268, 2002.
- [50] A. Nagafuchi, Y. Shirayoshi, and K. Okazaki, “Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA,” *Nature*, vol. 329, no. 6137, pp. 341–343, 1987.
- [51] K.M. Hajra and E.R. Fearon, “Cadherin and catenin alterations in human cancer,” *Genes Chromosomes and Cancer*, vol. 34, no.3,pp. 255–268, 2002.]
- [52] M. A. Smit, T. R. Geiger, J. Y. Song, I. Gitelman, and D. S. Peeper, “A twist-snail axis critical for TrkB-induced epithelial-mesenchymal transition-like transformation, anoikis resistance, and metastasis,” *Molecular and Cellular Biology*, vol. 29, no. 13, pp. 3722–3737, 2009.
- [53] S. Spaderna, O. Schmalhofer, M. Wahlbuhl et al., “The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer,” *Cancer Research*, vol.68,no.2,pp. 537–544, 2008.
- [54] Y. Takeyama,M.Sato, M. Horioetal., “Knockdown of ZEB1,a master epithelial-to-mesenchymal transition(EMT) gene, suppresses anchorage-independent cell growth of lung

- cancer cells,” *Cancer Letters*, vol. 296, no. 2, pp. 216–224, 2010.
- [55] Paula, D. S. M. A. , de Araújo Lopes, Silvana, Pernambuco Filho, P. C. A. , Nader, H. B. , & Lopes, C. C. . (2017). Acquisition of anoikis resistance promotes alterations in the ras/erk and pi3k/akt signaling pathways and matrix remodeling in endothelial cells. *Apoptosis*.
- [56] Paula, D. S. M. A. , de Araújo Lopes, Silvana, Pernambuco Filho, P. C. A. , Nader, H. B. , & Lopes, C. C. . (2017). Acquisition of anoikis resistance promotes alterations in the ras/erk and pi3k/akt signaling pathways and matrix remodeling in endothelial cells. *Apoptosis*.
- [57] Ma, B., Sen, T., Asnaghi, L., Valapala, M., Yang, F., & Hose, S., et al. (2011). β a3/a1-crystallin controls anoikis-mediated cell death in astrocytes by modulating pi3k/akt/mtor and erk survival pathways through the pkd/bit1-signaling axis. *Cell Death & Disease*, 2(10), e217.
- [58] Cagnol, S., & Chambard, J. C. (2010). Erk and cell death: mechanisms of erk-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *Febs Journal*, 277(1), 2-21.
- [59]. Chang, F., Steelman, L. S., Shelton, J. G., Lee, J. T., Navolanic, P. M., & Blalock, W. L., et al. (2003). Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the ras/raf/mek/erk pathway (review). *International Journal of Oncology*, 22(3), 469-480.
- [60] Javle, M. M., Gibbs, J. F., Iwata, K. K., Pak, Y., Rutledge, P., & Yu, J., et al. (2007). Epithelial-mesenchymal transition (emt) and activated extracellular signal-regulated kinase (p-erk) in surgically resected pancreatic cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 14(12), 3527-3533.
- [61]. Ha, G. H., Park, J. S., & Breuer, E. K. Y. (2013). Tacc3 promotes epithelial–mesenchymal transition (emt) through the activation of pi3k/akt and erk signaling pathways. *Cancer Letters*, 332(1), 63-73.
- [62] Collins, N. L., Reginato, M. J., ‡ Jessica K. Paulus, Sgroi, D. C., Labaer, J., & Brugge, A. J. S. (2005). G1/s cell cycle arrest provides anoikis resistance through erk-mediated bim suppression. *Molecular & Cellular Biology*, 25(12), 5282-5291.
- [63] Carduner, L., Picot, C. R., Leroydudal, J., Blay, L., Kellouche, S., & Carreiras, F. (2014). Cell cycle arrest or survival signaling through α v integrins, activation of pkc and erk1/2 lead to anoikis resistance of ovarian cancer spheroids. *Experimental Cell Research*, 320(2), 329-342
- [64] Puig T, Aguilar H, Cufi S, Oliveras G, Turrado C, Ortega-Gutiérrez S, Benhamú B, López-Rodríguez ML, Urruticoechea A, Colomer R. A novel inhibitor of fatty acid synthase shows activity against HER2+ breast cancer xenografts and is active in anti-HER2 drug-resistant cell lines. *Breast Cancer Res*. 2011; 13(6):R131
- [65]. †, M. L. G., Chambard, J. C., Grall, D., & Obberghen-Schilling, E. V. (2003). Adhesion-dependent control of akt/protein kinase b occurs at multiple levels. *Journal of Cellular Physiology*, 196(1), 98–104.
- [66]. 张绪森. (2013). miRNA-200b 影响失巢凋亡的机制及其表达的自我调节. (Doctoral dissertation, 北京协和医学院).

- [67]. Lansigan F , Davis W L , Kinlaw W B , et al. Targeting The Interactions Of Fatty Acid Metabolism With PI3K/mTOR and MAPK As a Novel Therapeutic Strategy In Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL)[J]. Blood, 2013, 122(21):5133-5133.
- [68]. Carduner L, Picot CR, Leroy-Dudal J, Blay L, Kellouche S, Carreiras F. Cell cycle arrest or survival signaling through αv integrins, activation of PKC and ERK1/2 lead to anoikis resistance of ovarian cancer spheroids. Exp Cell Res. 2014;320(2):329-342.
- [69] Q. Zeng, S. Chen, Z. You et al., “Hepatocyte growth factor inhibits anoikis in head and neck squamous cell carcinoma cells by activation of ERK and Akt signaling independent of NF- κ B,” Journal of Biological Chemistry, vol. 277, no. 28, pp. 25203–25208, 2002.
- [70] S. Watanabe, T. Kishimoto, and O. Yokosuka, “Hepatocyte growth factor inhibits anoikis of pancreatic carcinoma cells through phosphatidylinositol 3-kinase pathway,” Pancreas, vol. 40, no.4, pp. 608–614, 2011.
- [71] I. Sher, S.A. Adham, J. Petrik and B.L. Coomber, “Autocrine VEGF-A/KDR loop protects epithelial ovarian carcinoma cells from anoikis,” International Journal of Cancer, vol. 124, no.3, pp. 553–561, 2009.
- [72] R. A. Cairns, I.S. Harris, and T.W. Mak, “Regulation of cancer cell metabolism,” Nature Reviews Cancer, vol. 11, no. 2, pp. 85–95, 2011.
- [73]. Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B., & Korsmeyer, S. J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for bcl-xl and bcl-2, displaces bax and promotes cell death. Cell, 80(2), 285-91.
- [74]. Cheng, E. H., Levine, B., Boise, L. H., Thompson, C. B., & Hardwick, J. M. (1996). Bax-independent inhibition of apoptosis by bcl-xl. Nature, 379(6565), 554-556.
- [75]. Zhang, Z., Zheng, Y., Zhu, R., Zhu, Y., Yao, W., & Liu, W., et al. (2014). The erk/eif4f/bcl-xl pathway mediates sgp-2 induced osteosarcoma cells apoptosis in vitro and in vivo. Cancer Letters, 352(2), 203-213.
- [76]. Jazirehi, A. R., Vega, M. I., Chatterjee, D., Goodglick, L., & Bonavida, B. (2004). Inhibition of the raf-mek1/2-erk1/2 signaling pathway, bcl-xl down-regulation, and chemosensitization of non-hodgkin's lymphoma b cells by rituximab. Cancer Research, 64(19), 7117.
- [77] Girnius N , Davis R J . JNK Promotes Epithelial Cell Anoikis by Transcriptional and Post-translational Regulation of BH3-Only Proteins[J]. Cell Reports, 2017, 21(7):1910-1921.