

DOI:10.3969/j.issn.1005-202X.2021.03.017

医学生物物理

低强度脉冲超声通过PI3K/AKT/mTOR信号通路抑制骨肉瘤细胞的增殖

张宇, 马成华, 景鹏举, 李培武
兰州大学第二医院急救中心, 甘肃 兰州 730000

【摘要】目的: 阐述低强度脉冲超声(LIPUS)对骨肉瘤细胞增殖的调控作用和机制,探索低强度脉冲超声治疗骨肉瘤的潜在价值。**方法:** 在时间梯度实验中,将MG-63细胞分为LIPUS组和Control组,对LIPUS组加载1、6、12、18和24 h的低强度脉冲超声,CCK-8检测各组细胞增殖活力,Western Blots检测24 h低强度脉冲超声对PI3K/AKT/mTOR信号通路的影响。在机制实验中,将MG-63细胞分为Control组、LY294002组、LIPUS组和LIPUS+740Y-P组,对各组施加对应的干预措施后使用CCK-8检测各组细胞增殖能力,Western Blots检测各组增殖相关蛋白PCNA和Cyclin D1的表达情况。所有数据重复3次后使用单因素方差分析统计。**结果:** 加载低强度脉冲超声18和24 h后,LIPUS组的细胞增殖活力较对照组显著降低($P<0.010$, $P<0.001$),这些结果表明LIPUS可抑制MG-63细胞的增殖。LIPUS可抑制p-PI3K、p-AKT和p-mTOR的表达($P<0.001$),即抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路的激活,而不影响PI3K、AKT和mTOR的表达。使用LIPUS就如同使用PI3K的抑制剂(LY294002)一样,可以抑制MG-63细胞的增殖($P<0.001$),在使用PI3K的激动剂740Y-P后,可逆转LIPUS对MG-63细胞增殖的抑制($P<0.001$)。这些结果表明LIPUS可以通过抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路的激活来抑制骨肉瘤细胞的增殖。**结论:** 低强度脉冲超声通过PI3K/AKT/mTOR信号通路抑制骨肉瘤细胞的增殖,它可能是单独或联合放化疗治疗骨肉瘤的有效方法之一。

【关键词】 低强度脉冲超声;磷脂酰肌醇3-激酶;骨肉瘤;增殖;信号通路

【中图分类号】 R363;R738.1

【文献标志码】 A

【文章编号】 1005-202X(2021)03-0355-05

Low-intensity pulsed ultrasound inhibits the proliferation of osteosarcoma cells through PI3K/AKT/mTOR signaling pathway

ZHANG Yu, MA Chenghua, JING Pengju, LI Peiwu

Emergency Center, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To clarify the role and mechanism of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) in regulating the proliferation of osteosarcoma cells, and to explore the potential value of LIPUS in the treatment of osteosarcoma. **Methods** In time gradient experiment, MG-63 cells were divided into LIPUS group and control group. MG-63 cells in LIPUS group were loaded with LIPUS for 1, 6, 12, 18 and 24 h. CCK-8 was used for detecting the cell proliferation in each group, and Western Blots for detecting the effects of 24 h LIPUS on PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. In mechanism experiment, MG-63 cells were divided into control group, LY294002 group, LIPUS group and LIPUS+740Y-P group. After treating MG-63 cells with corresponding interventions in different groups, CCK-8 was used for detecting cell proliferation in each group, and Western Blots for detecting the expressions of proliferation-related proteins PCNA and Cyclin D1. After all data were repeated 3 times, one-way ANOVA was adopted for statistical analysis. **Results** After loading LIPUS for 18 and 24 h, the cell proliferation in LIPUS group was significantly lower than that in control group ($P<0.010$, $P<0.001$), which indicated that LIPUS could inhibit the proliferation of MG-63 cells. In addition, LIPUS could inhibit the expressions of p-PI3K, p-AKT and p-mTOR ($P<0.001$) (inhibiting the activation of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway), without affecting the expressions of PI3K, AKT and mTOR. Like the inhibitor of PI3K (LY294002), LIPUS could inhibit the proliferation of MG-63 cells ($P<0.001$). The inhibition of LIPUS on proliferation of MG-63 cells could be reversed by 740Y-P (the agonist of PI3K) ($P<0.001$). These results revealed that LIPUS could inhibit the proliferation of osteosarcoma cells by inhibiting the activation of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. **Conclusion** LIPUS can inhibit the

【收稿日期】 2020-11-19

【基金项目】 国家自然科学基金(81672207)

【作者简介】 张宇,住院医师,从事骨肿瘤研究, E-mail: zhangyuldey2020@yeah.net

【通信作者】 李培武,主任医师,从事骨肿瘤研究, E-mail: lipeiwu2019@sohu.com

proliferation of osteosarcoma cells through PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. LIPUS combined with chemotherapy or not may be one of the effective methods for the treatment of osteosarcoma.

Keywords: low-intensity pulsed ultrasound; phosphatidylinositol 3-kinase; osteosarcoma; proliferation; signaling pathway

前言

骨肉瘤(Osteosarcoma, OS)是起源于间充质原始骨细胞的恶性骨肿瘤,也是骨骼系统常见的恶性骨肿瘤^[1-2]。好发于儿童和青少年,发病高峰为10~14岁^[3]。常发病于长骨的干骺端,引起肿胀、疼痛、活动受限和病理性骨折等症状^[4]。近年来,随着外科手术和放化疗的介入,OS的5年生存率不断提高,达到了70%左右^[5]。但仍有30%的患者因术后复发和转移瘤化疗耐药等出现不良预后^[6]。因此,寻找一种新的安全有效的治疗方法来提高OS患者的生存率显得尤为重要。

低强度脉冲超声(Low-Intensity Pulsed Ultrasound, LIPUS)是一种低频低强度脉冲式的非侵入性超声医疗技术^[7]。其特征是对人体无损害,且易于应用^[8]。临床广泛用于促进骨折愈合,促进牵引成骨和治疗骨折延迟愈合^[9]。LIPUS可能是通过调控成骨细胞增殖和骨髓间充质干细胞成骨分化来发挥其促进骨折愈合的作用^[10]。近年来,有研究发现LIPUS可调控OS细胞的增殖和凋亡^[11-12],而PI3K/AKT/mTOR信号通路在OS的发展过程中发挥着重要作用,如可通过抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路来抑制OS细胞的增殖^[13]。因此,本研究假设LIPUS可通过抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路进而抑制OS细胞的增殖,给MG-63细胞施加LIPUS后,检测细胞增殖能力和PI3K/AKT/mTOR信号通路相关蛋白的表达情况,确定LIPUS对MG-63细胞和PI3K/AKT/mTOR的影响,再分别使用PI3K/AKT/mTOR信号通路的抑制剂和激动剂后观察LIPUS对MG-63细胞增殖的影响,进而明确LIPUS作用于MG-63细胞的机制。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

主要试剂如下:MEM培养基、胰蛋白酶、胎牛血清、PBS、PI3K-gamma抗体(Abcam)、Anti-pan-AKT抗体(Abcam)、重组Anti-mTOR抗体(Abcam)、Phospho-PI3K抗体(Cell Signaling Technology, CST)、Phospho-Akt抗体(CST)、Phospho-mTOR抗体(CST)、PCNA抗体(CST)、Cyclin D1抗体(CST)、 β -Actin抗体(CST)和山羊抗兔(鼠)二抗(CST)等。主要仪器如下:低强度脉冲超声仪(Metron GS170, 澳

大利亚)、细胞培养箱、显微镜和离心机等。

1.2 细胞培养

将人骨肉瘤MG-63细胞(购自中国科学院细胞库)解冻后置于培养瓶中,加5 mL由基础培养基和胎牛血清配置而成的完全培养基,置于37℃细胞培养箱中培养,每3 d换液一次,每天在显微镜下观察细胞生长情况,待细胞长满瓶底90%的区域后进行传代和冻存。

1.3 加载LIPUS

低强度脉冲超声仪脉参数:脉冲频率为100 Hz,脉冲宽度为2 ms,间隔时间为8 ms。在时间梯度实验中,将超声仪换能器平放于LIPUS组细胞培养皿上分别加载1、6、12、18和24 h。机制实验分组为Control组、LY294002(PI3K的抑制剂)组、LIPUS组和LIPUS+740Y-P(PI3K的激动剂)组,Control组细胞不予处理,LY294002组细胞使用LY294002预处理,LIPUS组细胞则加载特定时间(由时间梯度实验结果决定)的LIPUS,LIPUS+740Y-P组细胞使用740Y-P预处理后加载特定时间(由时间梯度实验结果决定)的LIPUS。

1.4 细胞活力检测

使用CCK-8检测细胞活力,施加干预措施后,将各组细胞接种到96孔板中。然后,将100 μ L含有10% CCK-8试剂的培养基添加到每个孔中,并将细胞在37℃下孵育4 h。通过检测吸光度来评估细胞活力。

1.5 Western Blots检测

加载LIPUS后滴加裂解液高速离心后收集各组的总蛋白,使用BCA试剂盒测定各组的蛋白浓度,确定上样量后,沸水煮5 min,标记后冰箱冻存备用。制胶后依次上样,设定电泳参数后开始电泳,待溴酚蓝到达胶底部时停止,以目标蛋白分子量和Marker的指示数PVDF条带后开始转膜,转膜时间依蛋白分子量而定,电转结束后孵育一抗1 h后4℃过夜,10×TBST洗膜3次,共30 min,再孵育二抗1 h后洗膜30 min,滴加ECL化学发光液后曝光。

1.6 统计学方法

各组数据重复3次,计量资料用均数 \pm 标准差表示,使用单因素方差分析,条带使用Image J软件处理,使用GraphPad Prism 8.0.2软件处理数据并作图, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LIPUS 抑制 MG-63 细胞的增殖

CCK-8 实验发现加载 LIPUS 1、6 和 12 h 后, LIPUS 组的细胞增殖活力与 Control 组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 而加载 18 和 24 h 后, LIPUS 组的细胞增殖活力较 Control 组显著降低, 差异有统计学意义 ($P<0.010$, $P<0.001$)。这些结果表明 LIPUS 可抑制 MG-63 细胞的增殖 (图 1)。

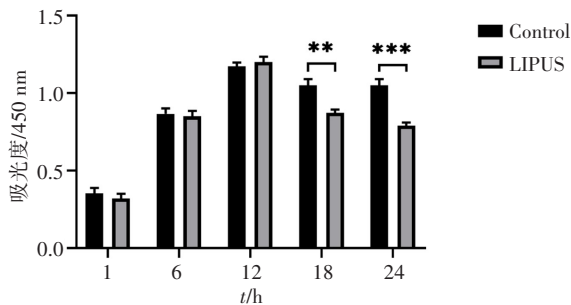


图1 CCK-8检测加载LIPUS 1、6、12、18和24 h后MG-63细胞的增殖活力(** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

Fig.1 Proliferation of MG-63 cells after loading LIPUS for 1, 6, 12, 18 and 24 h were detected by CCK-8 (** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

2.2 LIPUS 对 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的调控

对 MG-63 细胞加载 24 h LIPUS 后, 使用 Western Blots 分别检测 p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、p-mTOR 和 mTOR 的表达情况, 结果如图 2a 所示。如图 2b~图 2c 所示, LIPUS 可显著抑制 p-PI3K 的表达 ($P<0.001$), 而不影响 PI3K 的表达 ($P=0.265$)。如图 2d~图 2e 所示, 与 Control 组相比, LIPUS 组 p-AKT 的表达水平显著降低 ($P<0.001$), 而 AKT 的表达水平无明显变化 ($P=0.371$)。如图 2f~图 2g 所示, LIPUS 也显著降低了 p-mTOR 的表达 ($P<0.001$), 而不影响 mTOR 的表达 ($P=0.118$)。上述结果表明 LIPUS 可抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的磷酸化, 进而抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路介导的细胞活动。

2.3 LIPUS 通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制 MG-63 细胞的增殖

实验组别为 Control 组、LY294002 (PI3K 的抑制剂) 组、LIPUS 组和 LIPUS+740Y-P (PI3K 的激动剂) 组。CCK-8 结果显示相较于 Control 组, LY294002 组和 LIPUS 组 MG-63 细胞增殖活力显著降低 ($P<0.001$) (图 3a), 表明 LIPUS 和 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的

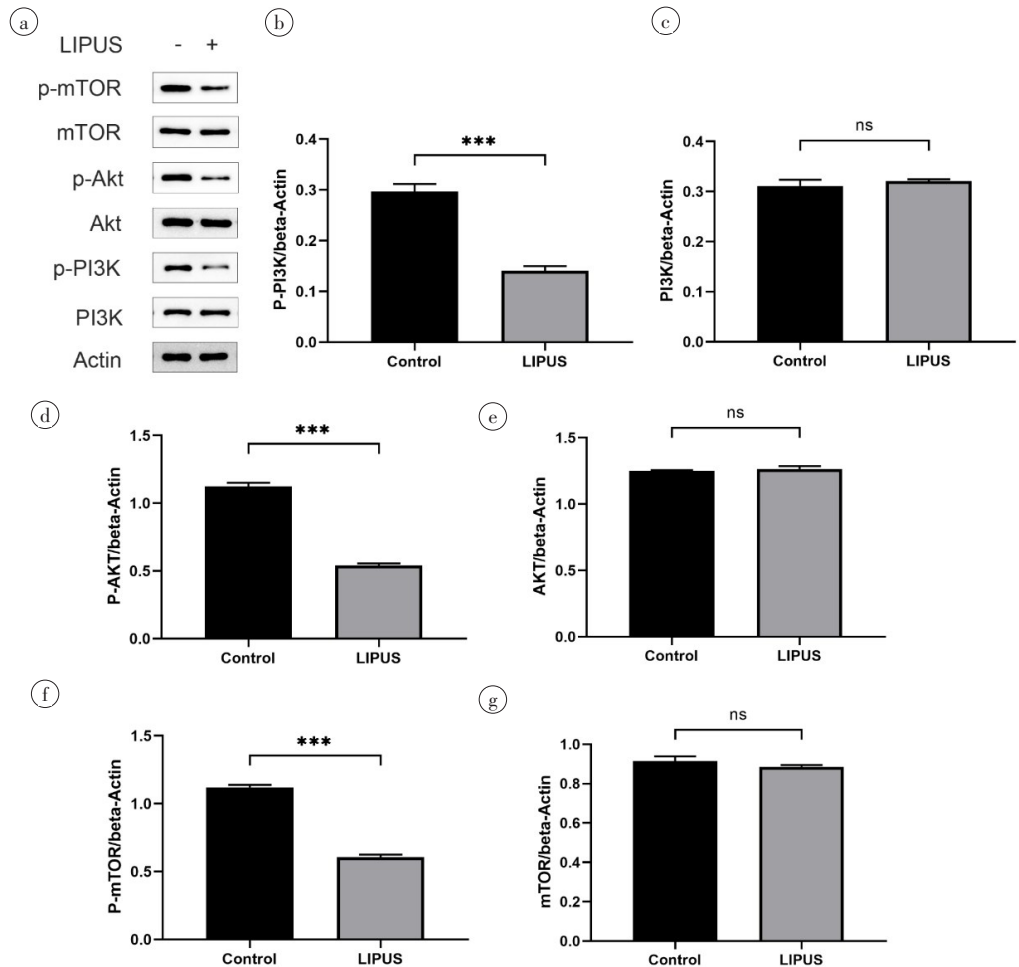


图2 Western Blots检测加载LIPUS 24 h后p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、p-mTOR和mTOR的表达水平(*** $P<0.001$, ns表示 $P>0.05$)

Fig.2 Expression levels of p-PI3K, PI3K, p-AKT, AKT, p-mTOR and mTOR after loading LIPUS for 24 h were detected by Western Blots (** $P<0.001$, ns indicates $P>0.05$)

抑制剂 LY294002 一样可以抑制 MG-63 细胞的增殖。与 LIPUS 组相比, LIPUS+740Y-P 组 MG-63 细胞的增殖活力显著升高 ($P<0.001$) (图 3a), 说明 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的激动剂 740Y-P 可以逆转 LIPUS 对 MG-63 细胞增殖的抑制。Western Blots 实验也得出了相同结果 (图 3b), 如图 3c~图 3d 所示, 相较于

Control 组, LY294002 组和 LIPUS 组增殖相关蛋白 PCNA (增殖细胞核抗原) 和 Cyclin D1 的表达水平显著降低 ($P<0.001$)。与 LIPUS 组相比, LIPUS+740Y-P 组 PCNA 和 Cyclin D1 的表达水平明显升高 ($P<0.001$)。综上所述, 这些结果说明 LIPUS 可通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制 MG-63 细胞的增殖。

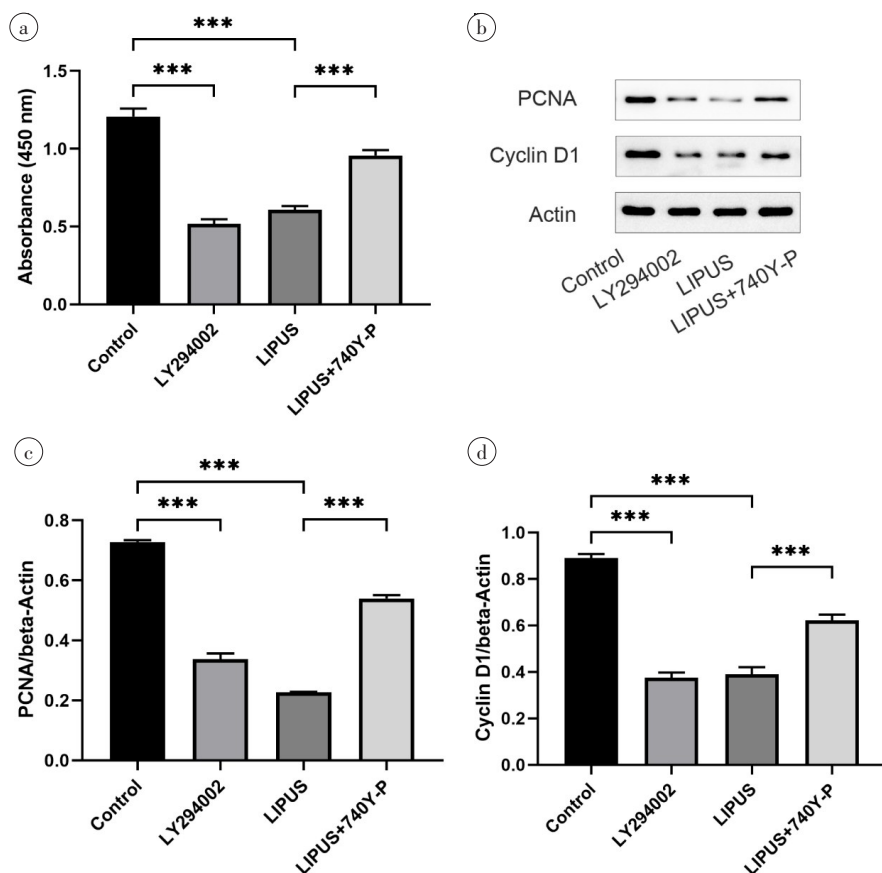


图3 LY294002、LIPUS和740Y-9对MG-63细胞增殖的影响(** $P<0.001$)

Fig.3 Effects of LY294002, LIPUS and 740Y-9 on the proliferation of MG-63 cells (** $P<0.001$)

3 讨论

LIPUS作用于机体会产生两种效应,即超声热效应和超声非热效应,其中超声非热效应又包括机械效应和空化效应等,LIPUS可促进骨髓间充质干细胞成骨分化及成骨细胞增殖,进而促进骨折的愈合,已在临床广泛应用,这可能与其对组织产生的非热效应有关^[9]。LIPUS可通过机械效应影响肿瘤细胞膜的通透性进而影响肿瘤细胞的生物学行为,但其在肿瘤中的作用未得到充分的研究。据报道,LIPUS可增强阿霉素对淋巴瘤和肝癌细胞的毒性作用,提高化疗效果^[14]。Sawai等^[12]首次报道了将LIPUS应用于转移性骨肿瘤时,它可诱导成骨细胞分化而不会促进OS细胞的增殖。据我们所知,尚没有研究阐述LIPUS对OS增殖的调控作用以及其对PI3K/AKT/mTOR信号通路的影响。因此,我们设计并开展了这项研

究。本研究发现加载LIPUS 12 h及以下时,不能抑制MG-63细胞的增殖,加载18 h及以上时可抑制MG-63细胞的增殖,24 h尤为明显。与此同时,本研究检测了LIPUS对PI3K/AKT/mTOR信号通路的影响,发现LIPUS可抑制p-PI3K、p-AKT和p-mTOR的表达,即抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路的激活,而不影响PI3K/AKT/mTOR的表达。使用LIPUS会和PI3K的抑制剂一样抑制MG-63细胞的增殖,在使用PI3K的激动剂740Y-P后,可逆转LIPUS对MG-63细胞增殖的抑制。这些结果表明LIPUS可以通过抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路的激活来抑制OS细胞的增殖。Matsuo等^[11]也报道了LIPUS对OS细胞的调控作用,他们发现LIPUS会抑制LM8细胞的增殖活力($P=0.0022$)和线粒体膜电位($P=0.0019$),流式细胞仪分析显示LIPUS组凋亡细胞($P<0.0001$)和坏死细胞($P=0.0091$)的数量明显高于对照组。在机制层

面,他们发现LIPUS显著降低了p-akt($P<0.0001$)和I κ B α ($P=0.0001$)的表达水平。本研究的结论与Matsuo等^[11]一样,即LIPUS可抑制OS细胞的增殖,与之不相同的是,我们还深入探索了LIPUS对MG-63细胞的增殖调控机制,我们发现LIPUS可通过下调p-PI3K、p-AKT和p-mTOR的表达进而抑制MG-63细胞的增殖活力。这说明LIPUS确实是一种有效抑制OS细胞增殖的方法。Matsuo等^[11]还研究发现,LIPUS会促进OS细胞的凋亡和坏死,这也进一步证实LIPUS抗癌的有效性。

辅助化疗已被证明对OS有效^[15]。尽管这种治疗取得了显著的进步并提高了患者的存活率,但OS患者的预后仍然很差^[16-17]。为了改善OS患者的预后,有必要开发新型有效的辅助治疗方法。LIPUS已被证实可有效抑制OS细胞的增殖并促进其凋亡,LIPUS与化学疗法或放射疗法相结合,可能是治疗OS患者的有效疗法^[18-20]。LIPUS无创且简单易用,临床中可通过对病灶处加载LIPUS尝试抑制OS的进展。但目前相关机制还未被阐述清楚,抑制OS的LIPUS参数也未被清楚阐述。所以,今后还需要开展大量基础研究明确LIPUS调控OS的具体机制,确定LIPUS的最佳作用参数和加载时间,方可使OS患者的收益最大化。此外,有研究报道了LIPUS可提高化疗药物的敏感性,因此LIPUS也许可通过联合化学疗法,提高现有OS化疗药物的敏感性,降低耐药性,提高OS患者的远期生存率。

本研究首次阐述了LIPUS调控MG-63细胞增殖的机制,为后续更多机制研究奠定了基础,也发现LIPUS在物理治疗OS方面具有潜在价值。当然,本研究也存在以下局限性:首先,本研究仅选用了MG-63这一细胞系,所得结论未在其他OS细胞系进行验证;其次,本研究没有探索LIPUS对OS细胞侵袭、迁移和凋亡的调控作用;最后,本研究未探索不同LIPUS工作参数对OS细胞的调控作用。

低强度脉冲超声可通过抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路进而抑制OS细胞的增殖,由于其无创性,LIPUS可能会成为有效治疗OS的疗法之一。

【参考文献】

[1] WHELAN J S, DAVIS L E. Osteosarcoma, chondrosarcoma, and chordoma[J]. J Clin Oncol, 2018, 36(2): 188-193.

- [2] GU Z, WU S, WANG J, et al. Long non-coding RNA LINC01419 mediates miR-519a-3p/PDRG1 axis to promote cell progression in osteosarcoma[J]. Cancer Cell Int, 2020, 20(1): 147.
- [3] ZHANG Y, YANG J, ZHAO N, et al. Progress in the chemotherapeutic treatment of osteosarcoma[J]. Oncol Lett, 2018, 16(5): 6228-6237.
- [4] SAPIO L, NIGRO E, RAGONE A, et al. AdipoRon affects cell cycle progression and inhibits proliferation in human osteosarcoma cells[J]. J Oncol, 2020, 2020: 7262479.
- [5] ZHU S T, WANG X, WANG J Y, et al. Downregulation of miR-22 contributes to epithelial-mesenchymal transition in osteosarcoma by targeting twist1[J]. Front Oncol, 2020, 10: 406.
- [6] WAN J, ZHANG X, LIU T, et al. Strategies and developments of immunotherapies in osteosarcoma [J]. Oncol Lett, 2016, 11(1): 511-520.
- [7] BORSJE M A, REN Y, DE HAAN-VISSER H W, et al. Comparison of low-intensity pulsed ultrasound and pulsed electromagnetic field treatments on OPG and RANKL expression in human osteoblast-like cells[J]. Angle Orthod, 2010, 80(3): 498-503.
- [8] DIMITRIOU R, BABIS G C. Biomaterial osseointegration enhancement with biophysical stimulation [J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2007, 7(3): 253-265.
- [9] HARRISON A, LIN S, POUNDER N, et al. Mode & mechanism of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) in fracture repair [J]. Ultrasonics, 2016, 70: 45-52.
- [10] XIN Z, LIN G, LEI H, et al. Clinical applications of low-intensity pulsed ultrasound and its potential role in urology[J]. Transl Androl Urol, 2016, 5(2): 255-266.
- [11] MATSUO T, SATO K, MATSUI T, et al. Inhibitory effects of low-intensity pulsed ultrasound sonication on the proliferation of osteosarcoma cells[J]. Oncol Lett, 2017, 14(3): 3071-3076.
- [12] SAWAI Y, MURATA H, KOTO K, et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on osteosarcoma and cancer cells[J]. Oncol Rep, 2012, 28(2): 481-486.
- [13] WANG B, LI J. Piccatannol suppresses the proliferation and induced apoptosis of osteosarcoma cells through PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. Cancer Manag Res, 2020, 12: 2631-2640.
- [14] KONDO T, YOSHIDA T, OGAWA R, et al. Low-intensity ultrasound adjuvant therapy: enhancement of doxorubicin-induced cytotoxicity and the acoustic mechanisms involved[J]. J Med Ultrason, 2009, 36(2): 61.
- [15] MURAMATSU Y, MATSUI T, DEIE M, et al. Pulsed electromagnetic field stimulation promotes anti-cell proliferative activity in doxorubicin-treated mouse osteosarcoma cells[J]. In Vivo, 2017, 31(1): 61-68.
- [16] LIU X Y, LI M, DONG B, et al. Caprin1 targeted by circular circ_0000885 in the tumor progression of osteosarcoma [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(9): 4665-4670.
- [17] SHEN Y, ZHANG B, SU Y, et al. Iron promotes dihydroartemisinin cytotoxicity via ROS production and blockade of autophagic flux via lysosomal damage in osteosarcoma [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 444.
- [18] BAYAT M, VIRDI A, REZAEI F, et al. Comparison of the *in vitro* effects of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound therapy on bony cells and stem cells[J]. Prog Biophys Mol Biol, 2018, 133: 36-48.
- [19] CARINA V, COSTA V, SARTORI M, et al. Adjuvant biophysical therapies in osteosarcoma[J]. Cancers (Basel), 2019, 11(3): 348.
- [20] ZHOU X Y, WU S Y, ZHANG Z C, et al. Low-intensity pulsed ultrasound promotes endothelial cell-mediated osteogenesis in a conditioned medium coculture system with osteoblasts [J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(43): e8397.

(编辑:陈丽霞)