

· 论 著 ·

Kirsten 大鼠肉瘤病毒癌基因同源物基因突变对骨关节肿瘤大鼠蛋白激酶信号通路的影响

刘亚东¹, 卢小伟², 刘志刚¹

1. 湖北省十堰市国药东风总医院骨外科, 湖北 十堰 442008;

2. 湖北省十堰市国药东风总医院心功能室, 湖北 十堰 442008

摘要: **目的** 探讨 Kirsten 大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(KRAS)基因突变对骨关节肿瘤大鼠蛋白激酶信号途径的影响。**方法** 对健康雄性 SD 大鼠 24 只(对照组)与实验动物中心提供的 KRAS 突变雄性 SD 大鼠 24 只(突变组),采用骨肉瘤细胞大鼠骨髓腔注射的方法建立骨关节肿瘤大鼠模型;在造模后 4 周与 8 周检测蛋白激酶信号途径的重要因子—Toll 样受体 4(TLR4)、蛋白激酶 B(Akt)的 mRNA 与蛋白在滑膜组织中的表达,及炎症因子(IL-6、TNF- α)的血清水平。**结果** 突变组造模后 4 周与 8 周的血清 IL-6、TNF- α 水平显著高于对照组($P < 0.01$)。对照组大鼠膝关节内皮细胞层完整,以平滑肌细胞和弹力纤维为主,内弹力板连续规整,无增殖及脂质沉积;突变组大鼠膝关节表现为内膜增厚、部分管腔闭塞,有大量空泡细胞、脂质沉积。突变组造模后 4 周、8 周的滑膜组织 TLR4、Akt mRNA 与蛋白相对表达水平显著高于对照组($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论** KRAS 突变可能通过激活骨关节肿瘤大鼠蛋白激酶信号途径的重要因子 TLR4 与 Akt 在转录与翻译水平的表达,从而促进炎症因子的释放,恶化骨关节肿瘤的病情。

关键词: 基因突变; Kirsten 大鼠肉瘤病毒癌基因同源物基因; 骨关节肿瘤; 蛋白激酶信号通路; 炎症因子

中图分类号: R-33 R 378 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2020)09-1189-04

KRAS mutation on protein kinase signaling pathway in bone and joint tumor of rats

LIU Ya-dong*, LU Xiao-wei, LIU Zhi-gang

* Department of Orthopedic Surgery, Sinopharm Dongfeng General Hospital, Shiyan, Hubei 442008, China

Corresponding author: LU Xiao-wei, E-mail: luxiaowei855@163.com

Abstract: Objective To investigate the influences of Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) gene mutation on protein kinase signaling pathway in bone and joint tumor of rats. **Methods** Rat bone and joint tumor models were established by injecting osteosarcoma cells into bone marrow cavity in 24 healthy male SD rats (control group) and 24 KRAS- mutant male SD rats (mutation group). The expression of Toll like receptor 4 (TLR4) signaling pathway, the expressions of mRNA and protein of protein kinase B (Akt) in synovial tissue and the serum levels of IL-6 and TNF- α were detected at 4 and 8 weeks after modeling. **Results** The serum IL-6 and TNF- α levels in mutation group were significantly higher than those in control group at 4 and 8 weeks after model establishment (all $P < 0.01$). In control group, the endothelial cells of the knee joint were intact, mainly composed of smooth muscle cells and elastic fibers, and the internal force plate were continuously regularized without proliferation and lipid deposition. However, in mutation group, thickening of intima, partial occlusion of lumen, a large number of vacuolar cells and lipid deposition presented in the knee joint. The relative expression levels of TLR4 and Akt mRNA and protein in synovial tissue in mutation group were significantly higher than those in control group ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion** KRAS mutation may activate the expressions of TLR4 and Akt of protein kinase signaling pathway, thus promoting the release of inflammatory factors and aggravating the condition of bone and joint tumors in rats.

Key words: Gene mutation; Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; Bone and joint tumor; Osteoarthritis; Protein kinase signaling pathway; Inflammatory factor

Fund program: Shiyuan Science and Technology Research and Development Project (14Y50)

骨关节肿瘤是指发生在骨关节内或起源于骨关节各种组织成分的肿瘤,其好发于膝关节周围,使得膝关节肿瘤比较常见^[1]。调查显示膝关节肿瘤约占全身骨肿瘤的 25.0%,其中良性肿瘤占 60% 左右^[2-3]。膝关节肿瘤易引发病理性骨折等并发症,从而影响患者的康复。特别是随着病情进展,会不断消耗人体机能,带来沉重的生理和心理负担,在严重情况下导致患者死亡^[4]。现在研究显示该病是力学和生物学等多种因素共同作用的结果,特别是蛋白激酶信号途径异常激活后将引起下游效应产物炎症因子过表达,在膝关节疾病发病过程中具有重要作用^[5]。Kirsten 大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, KRAS)是原癌基因 RAS 家族的成员之一,位于 12 号染色体,长约 35 kb。该基因可编码 KRAS4a 和 KRAS4b 蛋白,与肿瘤的血管生成、增殖、迁移均有关系^[6]。当 KRAS 突变体持续结合 GTP,导致蛋白激酶信号途径的下游信号因子-MAPK 处于过度活化状态,引起细胞过度增殖、凋亡抑制,引起细胞癌变^[7-8]。已有研究显示机体正常标本中未发现 KRAS 突变,而在肿瘤标本中发现 KRAS 基因突变,且突变能提高肿瘤细胞的侵袭和转移能力^[9-10]。本实验具体探讨 KRAS 突变对骨关节肿瘤大鼠蛋白激酶信号途径的影响,以明确 KRAS 突变的价值与机制,旨在为骨关节肿瘤患者个体化治疗和预后判断提供依据。现总结报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料 健康雄性 SD 大鼠 24 只(对照组)购自上海斯莱克实验动物有限责任公司(编号为 20194PP22),KRAS 突变雄性 SD 大鼠 24 只(突变组)由本实验动物中心提供,周龄 4~6 周。羊抗鼠 TLR4S、Akt 抗体与 GAPDH 内参抗体购自 Santa Cruz 公司;Annexin V FITC/PI 细胞凋亡试剂盒购自上海生工公司;二抗购自美国 Millipore 公司),白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)检测试剂盒购自北京百奥生物公司。

1.2 骨关节肿瘤大鼠模型的建立 所有大鼠适应性喂养 1 周后,采用改良 Hulth 法复制膝关节肿瘤模型^[11]。体外培养大鼠骨肉瘤细胞系 UMR-106,肌肉注射麻醉后,在膝关节内侧或下端外侧作切口,采用克氏针钻入骨髓腔并形成倾斜通道,用将骨肉瘤细胞稀释成 5×10^6 个/ml,每个骨髓腔内注射 0.2 ml,缝合后消毒切口后包扎,4 周即可造模成功(成功标准:

可见明显局部肿瘤形成,无自然消退现象,包块轮廓明显)。

1.3 检测指标 在造模后 4 周与 8 周检测蛋白激酶信号途径的重要因子—Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)、蛋白激酶 B(Protein kinase B, Akt) 的 mRNA 与蛋白在滑膜组织中的表达,及炎症因子(IL-6、TNF- α)的血清水平。

1.3.1 血清学检测 造模后 4 周与 8 周,经下腔静脉各采集 12 只大鼠的血液 1~2 ml,2 500 r/min 离心 5 min 后,分离出上层血清,采用酶联免疫吸附法检测血清炎症因子:白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 含量。

1.3.2 病理学检测 观察大鼠的一般状态,包括毛色、体重、活动灵敏度、饮食、饮水量等。在病理检查中,采血后脱颈椎处死大鼠,立即打开腹腔,取出肿瘤部位的膝关节,石蜡包埋、切片、HE 染色观察。

1.3.3 Real-time PCR 法检测 取处死大鼠的膝关节滑膜组织,匀浆后,Trizol 法提取总 RNA,取 1 μ g 总 RNA 反转录成 cDNA,然后以 2 μ l cDNA 为模板扩增 TLR4、Akt 和 GAPDH,以 GAPDH 为内参照基因,计算 TLR4、Akt mRNA 相对表达水平。

1.3.4 Western blot 法检测 取处死大鼠的膝关节滑膜组织,匀浆后提取总蛋白,测定蛋白浓度后每孔按照 30 μ g 上样,SDS-PAGE 凝胶电泳后进行湿转膜,室温封闭 1 h 后;一抗孵育(稀释度为 1:1 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;次日分别用二抗室温孵育 1 h,化学发光检测后进行凝胶成像仪下显影与计算 TLR4、Akt 蛋白相对表达水平。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 23.00 统计学软件进行分析。经正态性检验符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验。检验水准取 $\alpha = 0.05$,双侧检验。

2 结果

2.1 一般状况对比 对照组:大鼠膝关节肿瘤明显,毛色光泽,体重随饲养时间延长而增加,饮食、饮水量正常。突变组:大鼠膝关节肿瘤明显,精神萎靡,毛色暗淡,开始体重增长迅速,然后增长速度减缓,食量相对对照组也减少。

2.2 血清 IL-6、TNF- α 水平对比 突变组造模后 4 周与 8 周的血清 IL-6、TNF- α 水平显著高于对照组($P < 0.01$)。见表 1。

2.3 病理结果 对照组:膝关节内皮细胞层完整,以

平滑肌细胞和弹力纤维为主,内弹力板连续规整,无增殖及脂质沉积。突变组:膝关节内膜增厚、部分管腔闭塞,有大量空泡细胞、脂质沉积。见图 1。

2.4 TLR4、Akt mRNA 相对表达水平对比 突变组造模后 4 周与 8 周的滑膜组织 TLR4、Akt mRNA 相对表达水平显著高于对照组 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

2.5 TLR4、Akt 蛋白相对表达水平对比 突变组造模后 4 周与 8 周的滑膜组织 TLR4、Akt 蛋白相对表达水平显著高于对照组 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

表 1 两组造模后不同时点血清 IL-6、TNF- α 水平对比
($n = 12, \mu\text{g/ml}, \bar{x} \pm s$)

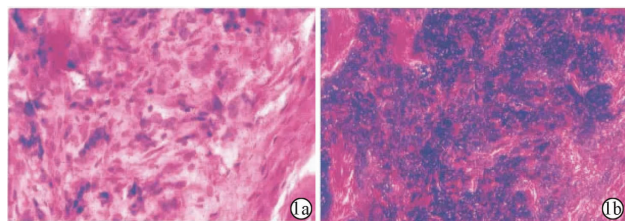
组别	造模后 4 周		造模后 8 周	
	IL-6	TNF- α	IL-6	TNF- α
突变组	15.09 \pm 3.00	11.23 \pm 1.42	19.48 \pm 3.22	17.48 \pm 2.44
对照组	7.20 \pm 1.58	3.66 \pm 0.34	8.92 \pm 1.29	4.09 \pm 0.54
<i>t</i> 值	16.024	22.942	18.930	28.013
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000

表 2 两组造模后不同时点滑膜组织 TLR4、Akt mRNA 相对表达水平对比 ($n = 12, \bar{x} \pm s$)

组别	造模后 4 周		造模后 8 周	
	TLR4	Akt	TLR4	Akt
突变组	4.24 \pm 0.13	5.02 \pm 0.14	5.22 \pm 0.24	5.98 \pm 0.31
对照组	1.22 \pm 0.15	1.33 \pm 0.09	1.43 \pm 0.32	1.54 \pm 0.44
<i>t</i> 值	6.795	8.322	8.991	9.032
<i>P</i> 值	0.010	0.004	0.001	0.001

表 3 两组造模后不同时点滑膜组织 TLR4、Akt 蛋白相对表达水平对比 ($n = 12, \bar{x} \pm s$)

组别	造模后 4 周		造模后 8 周	
	TLR4	Akt	TLR4	Akt
突变组	2.58 \pm 0.34	3.09 \pm 0.11	3.08 \pm 0.29	3.78 \pm 0.13
对照组	1.67 \pm 0.22	1.87 \pm 0.19	1.71 \pm 0.22	1.99 \pm 0.18
<i>t</i> 值	5.933	6.114	6.573	7.013
<i>P</i> 值	0.019	0.014	0.012	0.009



注:1a:对照组;1b:突变组。

图 1 造模后 8 周不同组别大鼠的病理图片 (HE 染色, $\times 400$)

3 讨论

骨肿瘤是指生长在骨骼或骨骼附属组织的肿瘤,多发生于膝关节,可严重影响患者的生存质量和寿命^[12]。骨肿瘤可破坏关节软骨结构,导致关节结构受损,使得骨的正常结构受到破坏,影响关节功

能^[13]。KRAS 基因是 RAS 基因家族成员之一,编码 KRAS 蛋白^[14]。当 KRAS 基因发生突变时,RAS 蛋白一直处于三磷酸鸟苷(GTP)结合的活化形式,可持续激活信号传递通道,刺激细胞不断地生长或分化,最终导致细胞的癌变^[15]。有研究显示 30% 的人类肿瘤细胞中出现 RAS 基因突变,可促进肿瘤细胞生长以及血管生成等过程^[16]。已有研究显示非小细胞肺癌患者 KRAS 突变率为 10.4%,非腺癌患者突变率为 3.7%;男性患者突变率为 11.4%,显著高于女性患者的 2.9%。本研究显示突变组造模后 4 周与 8 周的血清 IL-6、TNF- α 水平显著高于对照组;且突变组大鼠膝关节表现为内膜增厚、部分管腔闭塞,有大量空泡细胞、脂质沉积,表明 KRAS 突变可恶化膝关节肿瘤大鼠的病情,促进炎症因子的释放。而当膝关节受到促炎因子等刺激,也会促使 KRAS 突变,进而对细胞损伤、炎症等起到一定的促进作用,从而形成恶性循环。

当前骨肿瘤对人们健康的威胁日益严重,虽然当前治疗方法与药物不断推陈出新,但患者的 5 年生存率并没有显著提高^[17]。因此寻找影响骨肿瘤发生与发展的分子标志物,对早期诊治骨肿瘤具有重要的价值。在正常细胞中,KRAS 蛋白与 GTP 及二磷酸鸟苷(GDP)有很高的亲和性,KRAS 蛋白几乎全部与 GDP 结合,对细胞的生长、增殖发挥重要作用。KRAS 基因分为突变型和野生型,常见的 2 个突变位点位于 KRAS 基因 3 号外显子的 61 号密码子和 2 号外显子的 12 号密码子。KRAS 基因突变导致 RAS 蛋白激活和下调 GTP 酶活性,从而导致恶性肿瘤细胞凋亡与迁移异常^[18-19]。特别是在关键位点发生氨基酸突变从而产生具有致癌活性的 KRAS 蛋白,使细胞增殖失控,细胞内信号传导紊乱,引起细胞癌变。本实验突变组造模后 4 周与 8 周的滑膜组织 TLR4、Akt mRNA 与蛋白相对表达水平显著高于对照组,表明 KRAS 基因突变可激活 TLR4、Akt 在转录水平与翻译水平的表达。TLR4 与 Akt 均为蛋白激酶信号途径的重要因子,与膝关节炎发病机制密切相关。TLR4 能够识别病原相关分子模式的受体复合物,从而激活下游 Akt 的表达,并释放转录因子 NF- κ B,由胞质转位到核内,诱发炎症因子表达,引发炎症反应。由于突变后的 KRAS 基因能够激活使蛋白激酶信号途径处于过度活化状态,获得调节细胞分化和增殖的能力,从而引起膝关节肿瘤细胞增殖和进展^[20-21]。不过 KRAS 突变对骨肿瘤的调控作用是一个多因素多步骤的过程,除了 KRAS 外,表观遗传学等因素都可能在其中发挥了相应的作用,将在下一步继续明确

KRAS 突变的作用机制。

总之, KRAS 突变能激活骨关节肿瘤大鼠蛋白激酶信号途径的重要因子 TLR4 与 Akt 在转录与翻译水平表达, 从而促进炎症因子的释放, 恶化骨关节肿瘤的病期。

参考文献

- [1] 张浩强, 鲁亚杰, 李明辉, 等. 多发骨肉瘤的诊疗现状及起源问题初步探讨[J]. 中国骨与关节杂志, 2019, 8(1): 71-74.
- [2] 黄镇, 李晓东, 黄庆山, 等. 骨肉瘤不良预后相关基因研究进展[J]. 中华骨与关节外科杂志, 2019, 12(3): 236-240.
- [3] 余凤强, 王生淋, 林建华. 微小 RNA 在骨肉瘤基础研究的进展[J]. 中华实验外科杂志, 2018, 35(5): 992-996.
- [4] 胡少朴, 常君丽, 李奕麟, 等. microRNA 与骨肉瘤相关性研究进展[J]. 癌症进展, 2017, 15(7): 723-725, 770.
- [5] 羊俊亦. 环状 RNA 在骨肉瘤中的研究进展[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(11): 1597-1599.
- [6] Kieler M, Unseld M, Bianconi D, et al. Interim analysis of a real-world precision medicine platform for molecular profiling of metastatic or advanced cancers: MONDTI [J]. ESMO Open, 2019, 4(4): e000538.
- [7] Korphaisarn K, Pongpaibul A, Roothumngong E, et al. High frequency of KRAS Codon 146 and FBXW7 mutations in Thai patients with stage II-III colon cancer [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2019, 20(8): 2319-2326.
- [8] Kovalski JR, Shanderson RL, Khavari PA. Ras functional proximity proteomics establishes mTORC2 as new direct ras effector [J]. Oncotarget, 2019, 10(50): 5126-5135.
- [9] Kwon D, Kim B, Shin HC, et al. Cancer panel assay for precision oncology clinic: results from a 1-year study [J]. Transl Oncol, 2019, 12(11): 1488-1495.
- [10] Liu XC, Yang HP, Wu XH, et al. Molecular mutation characteristics of mismatch and homologous recombination repair genes in gastrointestinal cancer [J]. Oncol Lett, 2019, 18(3): 2789-2798.
- [11] Rogart JN, Barrach HJ, Chichester CO. Articular collagen degradation in the Hulth-Telhag model of osteoarthritis [J]. Osteoarthr Cartil, 1999, 7(6): 539-547.
- [12] 吴东桦, 何大为. 遗传性多发性骨软骨瘤的分子生物学特征 [J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(24): 3882-3888.
- [13] 陈瑞玲, 王刚阳, 孙梦熊, 等. 骨肉瘤精准医学的实践与进展 [J]. 中华实验外科杂志, 2018, 35(6): 1190-1194.
- [14] Serebriiskii IG, Connelly C, Frampton G, et al. Comprehensive characterization of RAS mutations in colon and rectal cancers in old and young patients [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 3722.
- [15] Strand MS, Krasnick BA, Pan H, et al. Precision delivery of RAS-inhibiting siRNA to KRAS driven cancer via peptide-based nanoparticles [J]. Oncotarget, 2019, 10(46): 4761-4775.
- [16] Sun S, Hu ZH, Huang SL, et al. REG4 is an indicator for KRAS mutant lung adenocarcinoma with TTF-1 low expression [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2019, 145(9): 2273-2283.
- [17] 赵志华, 田研, 陈奎生. 多发性骨髓瘤中 c-myc 和 MDM2 蛋白的表达及其临床意义 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2017, 33(2): 165-168.
- [18] Koopman T, Rottier BL, Ter Elst A, et al. A case report of an unusual non-mucinous papillary variant of CPAM type 1 with KRAS mutations [J]. BMC Pulm Med, 2020, 20(1): 52.
- [19] Deng HY, Liu HT, de Silva T, et al. Coxsackievirus type B3 is a potent oncolytic virus against KRAS-mutant lung adenocarcinoma [J]. Mol Ther Oncolytics, 2019, 14: 266-278.
- [20] Gao WC, Xu YT, Chen T, et al. Targeting oxidative pentose phosphate pathway prevents recurrence in mutant Kras colorectal carcinomas [J]. PLoS Biol, 2019, 17(8): e3000425.
- [21] Bouclier C, Simon M, Laconde G, et al. Stapled peptide targeting the CDK4/Cyclin D interface combined with Abemaciclib inhibits KRAS mutant lung cancer growth [J]. Theranostics, 2020, 10(5): 2008-2028.

收稿日期: 2019-11-27 修回日期: 2020-03-01 编辑: 石嘉莹