

人骨髓间充质干细胞通过YAP影响人脂肪肉瘤SW872细胞的生物学行为

陈华¹, 沙娜¹, 刘宁¹, 李阳², 胡海军²

(1. 暨南大学第二临床医学院 南方科技大学第一附属医院 广东省深圳市人民医院急诊外科, 广东深圳 518020; 2. 暨南大学第二临床医学院 南方科技大学第一附属医院 广东省深圳市人民医院胃肠外科, 广东深圳 518020)

[摘要] **目的:** 观察人骨髓间充质干细胞(hMSCs)条件培养基(CM)与人脂肪肉瘤SW872细胞共培养后对肿瘤细胞增殖和迁移能力的影响, 探讨hMSCs CM对脂肪肉瘤细胞的作用及可能的作用机制。**方法:** 体外培养hMSCs, 采用慢病毒方法分别转染慢病毒空载体shNS(对照组)和慢病毒shRNA Yes相关蛋白(YAP)(shYAP-hMSCs组), 采用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法和Western blotting法检测各组hMSCs中YAP mRNA和蛋白表达水平, 提取CM。体外培养SW872细胞, 分为对照组(正常培养)、hMSCs CM组和shYAP-hMSCs CM组。采用CCK-8法检测各组细胞增殖活性, 流式细胞术检测各组细胞凋亡率, 细胞划痕实验检测各组细胞划痕愈合率, Western blotting法检测各组细胞中YAP、基质金属蛋白酶9(MMP-9)和细胞周期蛋白D1(cyclin D1)蛋白表达水平。**结果:** 与对照组比较, shYAP-hMSCs组hMSCs中YAP mRNA和蛋白表达水平降低($P < 0.01$), 表明成功构建了shYAP-hMSCs稳定转染细胞株。CCK-8法, 与对照组比较, hMSCs CM组SW872细胞增殖活性升高($P < 0.05$), shYAP-hMSCs CM组SW872细胞增殖活性降低($P < 0.01$); 流式细胞术, 与对照组比较, hMSCs CM组SW872细胞凋亡率无明显变化($P > 0.05$), shYAP-hMSCs CM组SW872细胞凋亡率升高($P < 0.01$); 细胞划痕实验, 与对照组比较, hMSCs CM组SW872细胞划痕愈合率升高($P < 0.05$), shYAP-hMSCs CM组SW872细胞划痕愈合率降低($P < 0.01$); Western blotting法, 与对照组比较, hMSCs CM组SW872细胞中YAP、MMP-9和cyclin D1蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$), shYAP-hMSCs组SW872细胞中YAP、MMP-9和cyclin D1蛋白表达水平降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:** hMSCs参与调控人脂肪肉瘤SW872细胞增殖和迁移, 其机制可能与YAP表达有关。

[关键词] 骨髓间充质干细胞; 条件培养基; 脂肪肉瘤; 细胞增殖; 细胞迁移; Yes相关蛋白

[中图分类号] R73-3 **[文献标志码]** A

Effect of human bone marrow mesenchymal stem cells on biological behavior of human liposarcoma SW872 cells through YAP

CHEN Hua¹, SHA Na¹, LIU Ning¹, LI Yang², HU Haijun²

(1. Department of Emergency Surgery, Shenzhen People's Hospital, Guangdong Province, Second

[收稿日期] 2023-08-09

[基金项目] 广东省科技厅区域联合基金重点项目(2020B1515120043); 广东省深圳市科技创新委员会科技计划项目(JCYJ20190806152812751)

[作者简介] 陈华(1975—), 男, 江西省南昌市人, 副主任医师, 在读博士研究生, 主要从事肿瘤发生机制基础方面的研究。

[通信作者] 胡海军, 副主任医师, 副教授(E-mail: huhaijun2386@163.com)

Clinical Medical College, Jinan University, First Affiliated Hospital, Southern University of Science and Technology, Shenzhen 518020, China; 2. Department of Gastrointestinal Surgery, Shenzhen People's Hospital, Guangdong Province, Second Clinical Medical College, Jinan University, First Affiliated Hospital, Southern University of Science and Technology, Shenzhen 518020, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effect of human mesenchymal stem cells (hMSCs) conditioned medium (CM) co-cultured with the human liposarcoma SW872 cells on the proliferation and migration of the tumor cells, and to discuss the effect of hMSCs CM on the liposarcoma cells and the possible mechanism. **Methods:** The hMSCs were cultured *in vitro* and transfected with either lentiviral vector control shNS (control group) or lentiviral shRNA targeting Yes-associated protein (YAP) (shYAP-hMSCs group) by lentiviral methods. The expression levels of YAP mRNA and protein in the hMSCs in various groups were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting methods. The CM was then harvested. The SW872 cells were cultured *in vitro* and divided into control group (normal culture), hMSCs CM group, and shYAP-hMSCs CM group. The proliferation activities of the cells in various groups were detected by CCK-8 assay; the apoptotic rates of the cells in various groups were detected by flow cytometry; the scratch healing rates of the cells in various groups were detected by cell scratch assay; the expression levels of YAP, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and cyclin D1 proteins in the cells in various groups were detected by Western blotting method. **Results:** Compared with control group, the expression levels of YAP mRNA and protein in the cells in shYAP-hMSCs group were decreased ($P < 0.01$), indicating the successful establishment of a stable transfected cell line. The CCK-8 assay results showed that compared with control group, the proliferation activity of the cells in hMSCs CM group was increased ($P < 0.05$), and the proliferation activity of the cells in shYAP-hMSCs CM group was decreased ($P < 0.01$). The flow cytometry results showed that compared with control group, there was no significant change in the apoptotic rate of the cells in hMSCs CM group ($P > 0.05$), while the apoptotic rate of the cells in shYAP-hMSCs CM group was increased ($P < 0.01$). The cell scratch assay results showed that compared with control group, the scratch healing rate of the cells in hMSCs CM group was increased ($P < 0.05$), and the scratch healing rate of the cells in shYAP-hMSCs CM group was decreased ($P < 0.01$). The Western blotting results showed that compared with control group, there were no significant differences in the expression levels of YAP, MMP-9, and cyclin D1 proteins in the cells in hMSCs CM group ($P > 0.05$), while the expression levels of YAP, MMP-9, and cyclin D1 proteins in the cells in shYAP-hMSCs group were decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** The hMSCs regulate the proliferation and migration of the human liposarcoma SW872 cells, and its mechanism may be related to the expression of YAP.

KEYWORDS Human bone marrow mesenchymal stem cell; Conditioned medium; Liposarcoma; Cell proliferation; Cell migration; Yes-associated protein

脂肪肉瘤是一种起源于原始间叶细胞的恶性肿瘤, 是成年人中最常见的软组织肉瘤之一, 约占所有肉瘤发病率的 20%。脂肪肉瘤手术难以完整切除且复发率较高, 放疗易导致周围脏器损伤, 化疗药物可用于肿瘤转移或晚期患者, 但其生存率无明显改善, 5 年生存率为 12%~70%^[1]。间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 在各种生长因子和细胞因子等的诱导刺激下, 募集到肿瘤发生部位, 能够促进或抑制肿瘤细胞的增殖、转移、上

皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 和耐药等^[2]。研究^[3-4]显示: 包括脂肪肉瘤在内的部分肿瘤组织中转录共激活因子 Yes 相关蛋白 (Yes-associated protein, YAP) 异常表达和激活, YAP 是肿瘤发生的重要调控因子, 也是促癌基因。尽管 MSCs 与肿瘤细胞的增殖和迁移有着密切关联, 但其在脂肪肉瘤中的作用和机制尚未见报道。研究^[5]显示: 肿瘤微环境主要构成细胞类型之一的 MSCs 和作为细胞传导生物化学、力学信号

的关键分子之一的YAP基因在脂肪肉瘤生长和迁移中可能发挥相应作用。本研究通过人骨髓间充质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cells, hMSCs)条件培养基(conditioned medium, CM)与脂肪肉瘤SW872细胞共培养,在敲低hMSCs的YAP表达后,观察其对肿瘤细胞增殖和迁移的作用,探讨其可能的分子机制,为研究hMSCs在脂肪肉瘤发生发展过程中的作用提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 hMSCs(HUXMA-01001)和OriCell®细胞基础培养基(BLDM-03011)(广州赛业生物科技有限公司),人脂肪肉瘤SW872细胞和专用细胞培养基DMEM(武汉普诺赛生命科技有限公司)。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(美国Gibco公司),pLVX-shRNA2-Puro质粒(武汉维诺赛生物技术有限公司),RNA simple总RNA提取试剂盒(DP419)和SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)FP205-02(北京天根生化科技有限公司),Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit(K1622)(美国Thermo Fisher Scientific公司),YAP抗体(武汉Proteintech生物技术有限公司),基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、细胞周期蛋白D1(cyclin D1)和GAPDH抗体(美国Santa Cruz Biotechnology公司),细胞裂解液、蛋白酶抑制剂和二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),CCK-8试剂盒(日本Dojindo公司)。H1850R台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),ABI实时荧光定量PCR仪(H)7500型(美国Thermo Fisher Scientific公司),Beckman Coulter CytoFLEX流式细胞分析仪(美国Beckman Coulter公司),CKX53倒置光学显微镜(日本Olympus公司),Nikon Eclipse 80i倒置荧光显微镜(日本Nikon公司),CelMate® CLM-170B-8-NF二氧化碳培养箱(新加坡Esco Lifesciences公司),MR-96A酶标仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份公司),VE 586转移电泳槽(广州誉维生物科技有限公司),Tanon 5200化学发光仪、EPS-200电泳仪和VE180C电泳槽(上海天能科技有限公司)。

1.2 细胞培养、分组和转染 hMSCs和SW872细胞分别用含10%FBS、1%青霉素-链霉素的OriCell®细胞基础培养基和DMEM培养基,置于

37℃、5%CO₂细胞培养箱中常规培养和传代,hMSCs传代至第3代用于实验。hMSCs分为对照组(转染慢病毒空载体shNS)和shYAP-hMSCs组(转染慢病毒shRNA YAP)。取对数生长期的hMSCs以每孔 5×10^4 个细胞的密度接种于24孔细胞培养板中,待细胞生长至70%~80%融合时,加入慢病毒质粒pLVX-shRNA2-Puro-hYAP,按说明书进行转染。培养24 h后,收集上清液,0.22 μm过滤后作为CM保存于-80℃冰箱冻存备用。SW872细胞分为对照组(正常培养)、hMSCs CM组(SW872与hMSCs CM共培养)和shYAP-hMSCs CM组(SW872与shYAP-hMSCs CM共培养)。

1.3 实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)法检测各组hMSCs中YAP mRNA表达水平 收集各组hMSCs,TRIzol法提取各组细胞总RNA,根据逆转录试剂盒和RT-qPCR试剂盒说明书进行mRNA定量分析。引物序列:YAP,上游引物5'-TGACCCTC-GTTTTGCCATGA-3',下游引物5'-GCCTCT-CCTTCTCCATCTGC-3';GAPDH,上游引物5'-TTCCTTCCTGGGCATGGAGTC-3',下游引物5'-TCTTCATTGTGCTGGGTGCC-3'。采用TRIzol法提取细胞RNA,制备反转录反应混合液,进行反转录反应,生成cDNA模板,准备RT-qPCR反应混合液,进行RT-qPCR检测,在PCR仪中设置以下反应条件:95℃预变性2 min;95℃变性15 s,58℃退火20 s,72℃延伸30 s,循环40次。完成PCR循环后,进行终止反应:95℃终末延伸10 s,4℃保持。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组hMSCs中YAP mRNA表达水平。

1.4 CCK-8法检测各组SW872细胞增殖活性 细胞分组和处理方法见“1.2”。将SW872细胞悬液100 μL以每孔约 5×10^3 个细胞的密度接种于96孔细胞培养板中,置于37℃、5%CO₂培养箱中,分别培养24、48和72 h后取出培养板,向培养孔分别加入10 μL CCK-8溶液,置于细胞培养箱中继续孵育2 h,孵育结束后采用酶标仪测定450 nm波长处各孔吸光度(A)值,以A值表示各组细胞增殖活性。每组5个复孔,每组实验重复3次。

1.5 流式细胞术检测各组SW872细胞凋亡率 细胞分组和处理方法见“1.2”。SW872细胞培养处理后取出培养板,收集上清及各组细胞,使用冷的PBS缓冲液洗细胞2次,再用1×Binding Buffer缓

冲液制成密度为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 的细胞悬液。在 5 mL 培养管中加入 100 μL 细胞悬液, 加入纯化的 Annexin V 轻轻混匀, 室温反应 15 min。加入 5 μL 的 Annexin V-FITC 或 (和) PI, 轻轻混匀, 室温避光处孵育 15 min。各试验管中分别加入 400 μL $1 \times$ Binding Buffer 缓冲液, 24 和 48 h 时采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。每组实验重复 3 次。细胞凋亡率 = 早期细胞凋亡率 + 晚期细胞凋亡率。

1.6 细胞划痕实验检测各组 SW872 细胞划痕愈合率 细胞分组和处理方法见“1.2”。将 4×10^5 个细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 分别进行相应处理。当细胞生长达到 100% 融合时, 使用 200 μL 移液器尖端在细胞上刮 3 条平行线, 然后用无血清培养基洗涤细胞 3 次, 并继续孵育在常规培养基中。在 0、24 和 48 h 分别观察伤口愈合情况。每个时间点每孔随机拍摄 3 张图像, 显微镜拍照监测细胞迁移修复过程, 并测量每张图像中 3 个随机位置划痕 (伤口宽度) 两侧的距离, 计算划痕愈合率, 代表细胞迁移能力。每组实验重复 3 次。细胞划痕愈合率 = $(0 \text{ h 划痕面积} - 24 \text{ 或 } 48 \text{ h 划痕面积}) / 0 \text{ h 划痕面积} \times 100\%$ 。

1.7 Western blotting 法检测各组 hMSCs 中 YAP 蛋白表达水平及 SW872 细胞中 YAP、MMP-9 和 cyclin D1 蛋白表达水平 各组细胞经过相应处理培养 48 h 后, 使用 $1 \times$ RIPA 裂解缓冲液加入完整的蛋白酶抑制剂混合片提取细胞的蛋白质裂解液。采用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒测定样品蛋白浓度。变性的蛋白质经过凝胶电泳分离后, 转移至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶中封闭 1 h, 4°C 条件下与相应的一抗 YAP (1 : 1 000)、MMP-9 (1 : 1 000)、cyclin D (1 : 1 000) 和 GAPDH 抗体 (1 : 2 000)

孵育过夜。在一抗孵育后, 用 PBST ($\times 1$) 洗涤膜, 并加入二抗。滴加新鲜配制的 ECL 混合溶液 (A : B = 1 : 1), 暗室中曝光。根据不同的光强度调整曝光条件, 显影定影。将胶片进行扫描存档, 采用 AlphaEaseFC 软件处理系统分析目的蛋白条带的灰度值, 以 GAPDH 为内参计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平 = 目的蛋白条带灰度值 / 内参蛋白条带灰度值。每组实验重复 2 次。

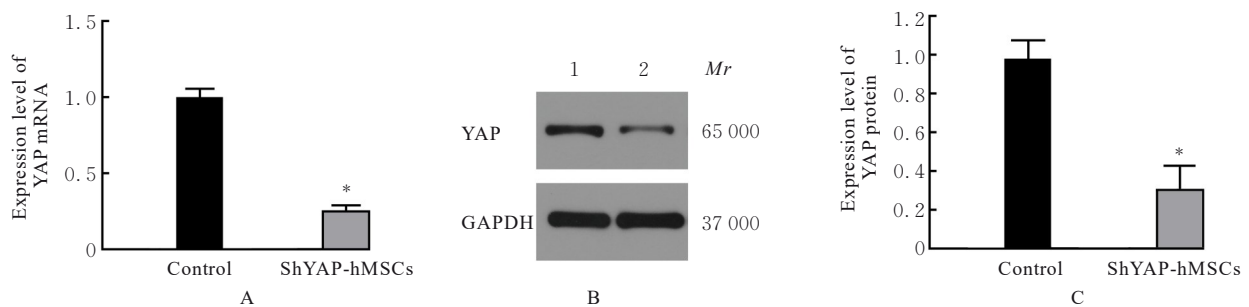
1.8 统计学分析 采用 GraphPad Prism 8.0 统计软件进行统计学分析。各组 hMSCs 中 YAP mRNA 和蛋白表达水平, 各组 SW872 细胞增殖活性、凋亡率和划痕愈合率, 各组 SW872 细胞中 YAP、MMP-9 和 cyclin D1 蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 SNK- q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 hMSCs 中 YAP mRNA 和蛋白表达水平 与对照组比较, shYAP-hMSCs 组 hMSCs 中 YAP mRNA 和蛋白表达水平均降低 ($P < 0.01$)。见图 1。

2.2 各组 SW872 细胞增殖活性 与对照组比较, 24、48 和 72 h 时 hMSCs CM 组 SW872 细胞增殖活性升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 48 和 72 h 时 shYAP-hMSCs CM 组 SW872 细胞增殖活性降低 ($P < 0.01$)。见图 2。

2.3 各组 SW872 细胞凋亡率 24 h 时, 与对照组 ($3.32\% \pm 0.37\%$) 比较, hMSCs CM 组 SW872 细胞凋亡率 ($3.42\% \pm 0.52\%$) 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), shYAP-hMSCs CM 组 SW872 细胞调



Lane 1: Control group; Lane 2: ShYAP-hMSCs group. * $P < 0.01$ vs control group.

图 1 RT-qPCR 和 Western blotting 法检测各组 hMSCs 中 YAP mRNA 表达水平(A)、YAP 蛋白表达电泳图(B)和蛋白表达直条图(C)

Fig. 1 Expression levels of YAP mRNA (A), electrophoregram (B) and histogram (C) of expressions of YAP protein in cells in two groups detected by RT-qPCR and Western blotting methods

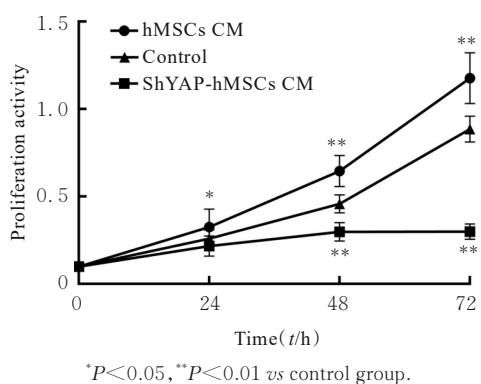
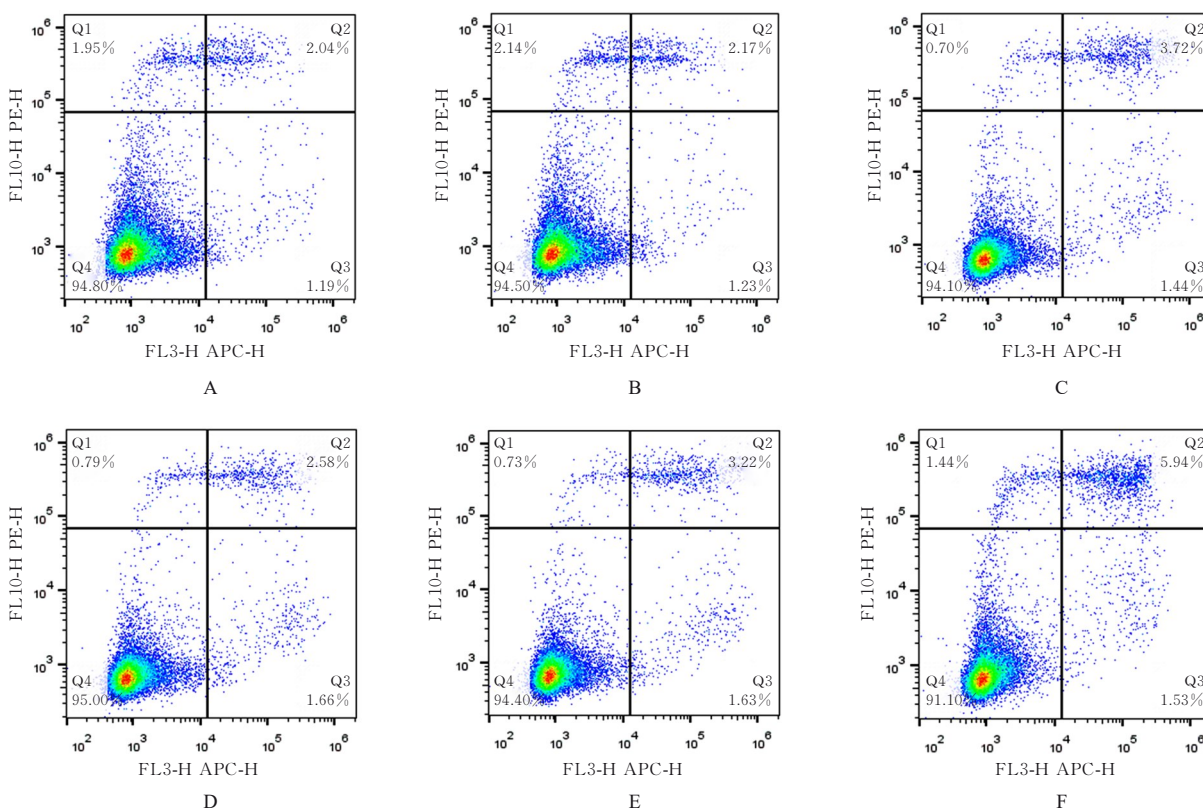


图2 CCK-8法检测各组SW872细胞增殖活性

Fig. 2 Proliferation activities of SW872 cells in various groups detected by CCK-8 method

亡率 ($5.74\% \pm 0.45\%$) 升高 ($P < 0.01$); 48 h时, 与对照组 ($4.38\% \pm 0.22\%$) 比较, hMSCs CM组 SW872细胞凋亡率 ($4.62\% \pm 0.60\%$) 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), shYAP-hMSCs CM组 SW872细胞凋亡率 ($7.87\% \pm 0.65\%$) 升高 ($P < 0.01$)。见图3。

2.4 各组SW872细胞划痕愈合率 24和48 h时, 与对照组比较, hMSCs CM组 SW872细胞划痕愈合率升高 ($P < 0.05$), shYAP-hMSCs CM组 SW872细胞划痕愈合率降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图4和5。



A—C: 24 h; D—F: 48 h; A, D: Control group; B, E: hMSCs CM group; C, F: ShYAP-hMSCs CM group.

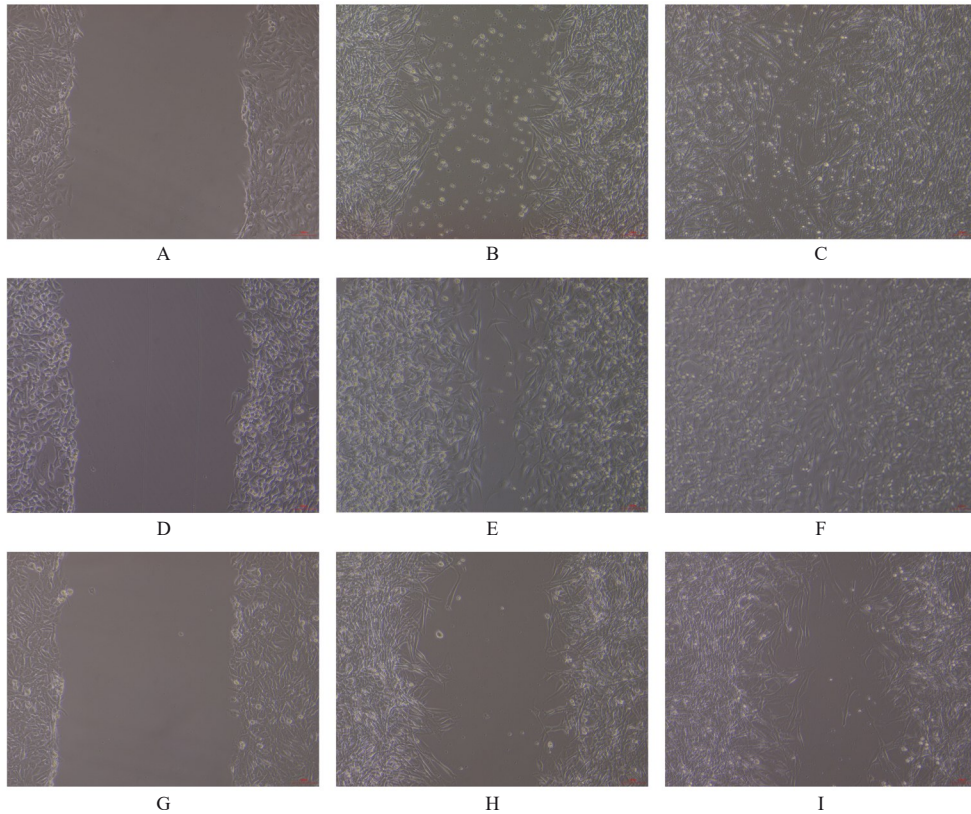
图3 流式细胞术检测各组SW872细胞凋亡率

Fig. 3 Apoptotic rates of SW872 cells in various groups detected by flow cytometry

2.5 各组SW872细胞中YAP、MMP-9和cyclin D1蛋白表达水平 与对照组比较, hMSCs CM组 SW872细胞中YAP、MMP-9和cyclin D1蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), shYAP-hMSCs CM组 SW872细胞中YAP、MMP-9和cyclin D1蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图6。

3 讨论

本研究培养hMSCs, 并建立敲低YAP基因的hMSCs稳定转染细胞株, 收集上清液作为CM, 与脂肪肉瘤SW872细胞共培养, 结果显示: hMSCs CM能够促进肿瘤细胞增殖和迁移, 敲低hMSCs中YAP表达可明显抑制肿瘤细胞的增殖和迁移, 并且升高肿瘤细胞凋亡率, 同时降低MMP-9和



A, D, G: 0 h; B, E, H: 24 h; C, F, I: 48 h; A—C: Control group; D—F: hMSCs CM group; G—I: ShYAP-hMSCs CM group.

图4 细胞划痕实验检测各组 SW872 细胞划痕愈合情况 (×10)

Fig. 4 Scratch healing of SW872 cells in various groups detected by cell scratch assay(×10)

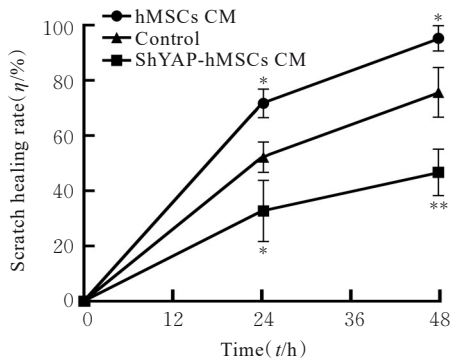


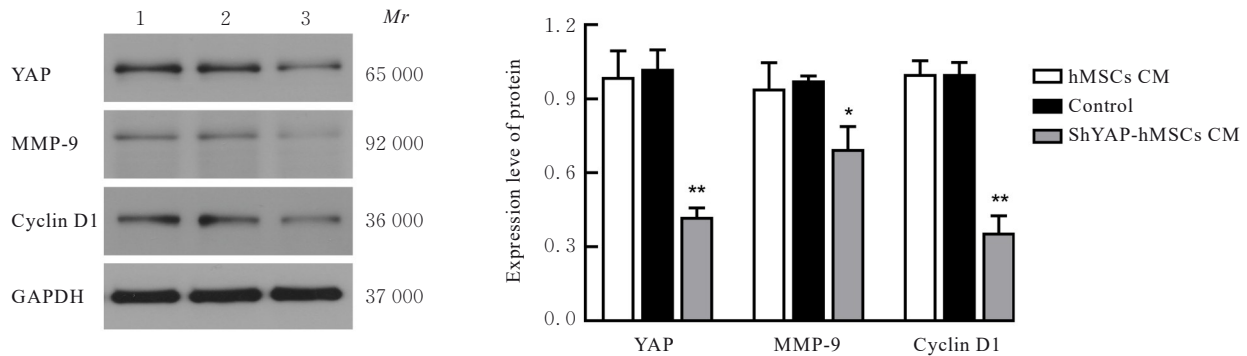
图5 不同时间点各组 SW872 细胞划痕愈合率

Fig. 5 Scratch healing rates of SW872 cells in various groups at different time points

cyclin D1 蛋白表达水平。

hMSCs 存在于多种组织中, 是肿瘤微环境中重要组成部分, 在肿瘤细胞分泌各种生长因子和细胞因子等作用下, 能够转换为肿瘤相关成纤维细胞 (cancer-associated fibroblasts, CAFs), 进而促进肿瘤的发生发展, 在癌症研究中得到广泛关注^[6]。研究^[7]显示: hMSCs CM 与骨肉瘤细胞共培养, 通

过 hMSCs 分泌的细胞因子白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 激活肿瘤细胞中信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 信号通路, 促进肿瘤细胞增殖和化疗耐药性。研究^[8]显示: hMSCs 可通过分泌 IL-6 促进鼻咽癌细胞增殖和耐药。hMSCs 通过分泌血小板活化因子 (platelet activating factor, PAF) 促进卵巢癌细胞增殖和迁移^[9]。研究^[10]显示: 在结直肠癌中, hMSCs CM 通过产生大量 CC 趋化因子受体 5 (C-C chemokine receptor 5, CCR5) 配体, 促进肿瘤生长。另有研究^[11]显示: hMSCs CM 通过 CXC 趋化因子受体 7 (C-X-C chemokine receptor 7, CXCR7) 信号通路促进乳腺癌细胞增殖。hMSCs CM 能够通过丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路、EMT 和整合素 (integrin) $\alpha 5$ 的作用, 促进肝细胞癌肿瘤细胞增殖和迁移^[12]。除了细胞因子, hMSCs 分泌的细胞外囊泡, 包括外泌体也是影响肿瘤发生的重要因素^[13-14]。hMSCs 可通过外泌体中的 miR-193a-3p、miR-210-3p 和 miR-5100 激活



Lane 1: hMSCs CM group; Lane 2: Control group; Lane 3: ShYAP-hMSCs CM group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

图6 Western blotting法检测各组SW872细胞中YAP、MMP-9和cyclin D1蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 6 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of YAP, MMP-9, cyclin D1 proteins in SW872 cells in various groups

STAT3信号通路促进肺癌肿瘤细胞侵袭和迁移^[15]。hMSCs可通过外泌体中的miR-142-3p促进结肠癌肿瘤干细胞增殖^[16]。与以上研究报道一致,本研究结果显示:hMSCs CM能够促进脂肪肉瘤SW872细胞增殖和迁移,其作用机制可能是hMSCs分泌的各种细胞因子、生长因子以及囊泡和外泌体等通过YAP信号通路发挥作用,其具体机制有待进一步研究。

cyclin D1属于高度保守的周期蛋白家族,受视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma protein, Rb)正向调控,与周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK) 4或CDK6形成复合物,调节细胞G₁/S期转换。cyclin D1的突变、扩增和过表达,改变了细胞周期的进程,进而可能导致肿瘤的发生^[17]。作为下游的靶向基因,cyclin D1的表达受到YAP的正向调控^[18]。已有研究^[19-20]表明:cyclin D1在脂肪肉瘤组织中异常表达,而下调cyclin D1能够抑制肿瘤细胞生长。在乳腺癌、肺癌和胃癌等相关研究^[21-23]中,下调cyclin D1表达能够抑制肿瘤细胞。MMP-9属于金属基质蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)家族的一员,通过降解细胞外基质和血管新生在癌症侵袭和转移中发挥重要作用^[24]。下调MMP-9能够减少结肠直肠癌、前列腺癌和肝癌等肿瘤细胞的转移。本研究结果显示:shYAP-hMSCs CM能够抑制脂肪肉瘤细胞的迁移能力,降低MMP-9蛋白表达水平,与相关研究^[25-27]报道结果相一致。

迄今为止,hMSCs在脂肪肉瘤中作用的相关报道较少。研究^[28]显示:在有致癌基因突变的hMSCs中,表达融合肉瘤-C/EBP同源蛋白(fused in

sarcoma-C/EBP homologous protein, FUS-CHOP),促使hMSCs转化为脂肪肉瘤。在预先诱导有致癌基因突变的hMSCs中,过表达鼠双微体2癌基因(mouse double minute 2, MDM2)和CDK4,hMSCs能够形成脂肪肉瘤样改变,并且促进细胞增殖和迁移^[29]。利用hMSCs固有的向肿瘤发生部位迁移的特点,可作为载体携带单纯疱疹病毒胸苷激酶治疗脂肪肉瘤,抑制肿瘤细胞生长并减少复发和转移^[30],表明hMSCs和脂肪肉瘤之间存在着密切的联系。本研究结果显示:与shYAP-hMSCs CM共培养,SW872细胞中YAP蛋白表达水平降低,与hMSCs CM共培养SW872细胞中YAP蛋白表达无明显变化,并且与hMSCs CM共培养SW872细胞中cyclin D1和MMP-9蛋白表达水平及细胞凋亡率均无明显变化,提示可能与肿瘤细胞的YAP基因表达水平变化有关,其具体机制还有待进一步研究。

综上所述,hMSCs CM能够促进脂肪肉瘤SW872细胞的增殖和迁移,敲低hMSCs中的YAP表达可抑制肿瘤细胞的生长和迁移。hMSCs来源广泛易于分离,在包括脂肪肉瘤在内的癌症及其他疾病研究中值得进一步深入探索其作用机制和治疗前景。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

陈华和胡海军参与论文选题、研究设计、论文撰写和论文审校,沙娜和刘宁参与实验操作和论文审校,李阳参与数据收集和整理及统计学分析。

[参考文献]

- [1] HADDOX C L, RIEDEL R F. Recent advances in the understanding and management of liposarcoma [J]. *Fac Rev*, 2021, 10: 1.
- [2] JAFARI A, REZAEI-TAVIRANI M, FARHADIHOSSEINABADI B, et al. Human amniotic mesenchymal stem cells to promote/suppress cancer: two sides of the same coin [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 126.
- [3] CUNNINGHAM R, HANSEN C G. The Hippo pathway in cancer: YAP/TAZ and TEAD as therapeutic targets in cancer [J]. *Clin Sci*, 2022, 136(3): 197-222.
- [4] TRAUTMANN M, CHENG Y Y, JENSEN P, et al. Requirement for YAP1 signaling in myxoid liposarcoma [J]. *EMBO Mol Med*, 2019, 11(5): e9889.
- [5] ZANCONATO F, CORDENONSI M, PICCOLO S. YAP and TAZ: a signalling hub of the tumour microenvironment [J]. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19(8): 454-464.
- [6] ANDRZEJEWSKA A, LUKOMSKA B, JANOWSKI M. Concise review: mesenchymal stem cells: from roots to boost [J]. *Stem Cells*, 2019, 37(7): 855-864.
- [7] TU B, ZHU J, LIU S, et al. Mesenchymal stem cells promote osteosarcoma cell survival and drug resistance through activation of STAT3 [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(30): 48296-48308.
- [8] ZENG J C, CHEN S S, LI C H, et al. Mesenchymal stem/stromal cells-derived IL-6 promotes nasopharyngeal carcinoma growth and resistance to cisplatin via upregulating CD73 expression [J]. *J Cancer*, 2020, 11(8): 2068-2079.
- [9] GAO T, YU Y, CONG Q, et al. Human mesenchymal stem cells in the tumour microenvironment promote ovarian cancer progression: the role of platelet-activating factor [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 999.
- [10] NISHIKAWA G, KAWADA K, NAKAGAWA J, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression via CCR5 [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(4): 264.
- [11] AL-TOUB M, ALMOHAWES M, VISHNUBALAJI R, et al. CXCR7 signaling promotes breast cancer survival in response to mesenchymal stromal stem cell-derived factors [J]. *Cell Death Discov*, 2019, 5: 87.
- [12] CHEN J, JI T, WU D, et al. Human mesenchymal stem cells promote tumor growth via MAPK pathway and metastasis by epithelial mesenchymal transition and integrin $\alpha 5$ in hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(6): 425.
- [13] WENG Z J, ZHANG B W, WU C Z, et al. Therapeutic roles of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 136.
- [14] LIN Z J, WU Y L, XU Y T, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes in cancer therapy resistance: recent advances and therapeutic potential [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 179.
- [15] ZHANG X N, SAI B Q, WANG F, et al. Hypoxic BMSC-derived exosomal miRNAs promote metastasis of lung cancer cells via STAT3-induced EMT [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 40.
- [16] LI H D, LI F. Exosomes from BM-MSCs increase the population of CSCs via transfer of miR-142-3p [J]. *Br J Cancer*, 2018, 119(6): 744-755.
- [17] MONTALTO F I, AMICIS F D. Cyclin D1 in cancer: a molecular connection for cell cycle control, adhesion and invasion in tumor and stroma [J]. *Cells*, 2020, 9(12): 2648.
- [18] MIZUNO T, MURAKAMI H, FUJII M, et al. YAP induces malignant mesothelioma cell proliferation by upregulating transcription of cell cycle-promoting genes [J]. *Oncogene*, 2012, 31(49): 5117-5122.
- [19] LOUIS-BRENNETOT C, COINDRE J M, FERREIRA C, et al. The CDKN2A/CDKN2B/CDK4/CCND1 pathway is pivotal in well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma oncogenesis: an analysis of 104 tumors [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2011, 50(11): 896-907.
- [20] YANG P P, CHEN W C, LI X H, et al. Downregulation of cyclin D1 sensitizes cancer cells to MDM2 antagonist Nutlin-3 [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(22): 32652-32663.
- [21] HOSSEINI S, CHAMANI J, HADIPANAH M R, et al. Nano-curcumin's suppression of breast cancer cells (MCF7) through the inhibition of cyclin D1 expression [J]. *Breast Cancer*, 2019, 11: 137-142.
- [22] GAO F, LI M, ZHOU L, et al. Xanthohumol targets the ERK1/2-Fra1 signaling axis to reduce cyclin D1 expression and inhibit non-small cell lung cancer [J]. *Oncol Rep*, 2020, 44(4): 1365-1374.
- [23] MENG H, LI J, SUN H P, et al. The transcription factor ATF2 promotes gastric cancer progression by activating the METTL3/cyclin D1 pathway [J]. *Drug Dev Res*, 2023, 84(6): 1325-1334.
- [24] MONDAL S, ADHIKARI N, BANERJEE S, et al.

- Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its inhibitors in cancer: a minireview [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 194: 112260.
- [25] WANG W M, LI D, XIANG L L, et al. TIMP-2 inhibits metastasis and predicts prognosis of colorectal cancer via regulating MMP-9[J]. *Cell Adh Migr*, 2019, 13(1): 273-284.
- [26] KARMAKAR D, MAITY J, MONDAL P, et al. E2F5 promotes prostate cancer cell migration and invasion through regulation of TFPI2, MMP-2 and MMP-9[J]. *Carcinogenesis*, 2020, 41(12): 1767-1780.
- [27] LIU B Q, TIAN Y S, CHEN M Y, et al. CircUBAP2 promotes MMP9-mediated oncogenic effect via sponging miR-194-3p in hepatocellular carcinoma [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 675043.
- [28] RODRIGUEZ R, TORNIN J, SUAREZ C, et al. Expression of FUS-CHOP fusion protein in immortalized/transformed human mesenchymal stem cells drives mixoid liposarcoma formation [J]. *Stem Cells*, 2013, 31(10): 2061-2072.
- [29] KIM Y J, KIM M, PARK H K, et al. Co-expression of MDM2 and CDK4 in transformed human mesenchymal stem cells causes high-grade sarcoma with a dedifferentiated liposarcoma-like morphology [J]. *Lab Invest*, 2019, 99(9): 1309-1320.
- [30] JO E B, LEE H, LEE K W, et al. Complete regression of metastatic de-differentiated liposarcoma with engineered mesenchymal stromal cells with dTRAIL and HSV-TK [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(7): 3993-4000.