

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.10.002

View this article at: <https://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2021.10.002>

· 论著 ·

FIS1 通过 P53 通路抑制骨肉瘤对顺铂化疗的耐药

谭瑞¹, 段伟¹, 王子君², 袁鹏^{3,4}, 常乐¹, 甘璐¹, 权鹏鹤⁵, 史喜德⁶, 李沫¹, 叶正旭¹

(1. 空军军医大学第一附属医院骨科, 西安 710032; 2. 空军军医大学基础医学院学员一大队一队, 西安 710032; 3. 空军军医大学第二附属医院疼痛科, 西安 710038; 4. 空军军医大学基础医学院生理与病理生理教研室, 西安 710032; 5. 河北省军区石家庄第二离职干部休养所, 石家庄 050000; 6. 中国人民解放军32356部队卫生队, 青海 格尔木 816000)

[摘要] 目的: 探讨线粒体分裂蛋白1(mitochondrial fission protein 1, FIS1)在顺铂(cisplatin, CDDP)耐药的骨肉瘤(osteosarcoma, OS)组织中的表达及对CDDP耐药OS细胞凋亡的作用。方法: 采用免疫组织化学法(immunohistochemistry, IHC)和蛋白质印迹法检测CDDP耐药的OS组织(CDDP-resistance组)和CDDP敏感的OS组织(CDDP-sensitivity组)中FIS1的表达水平, 生物信息学方法分析FIS1在OS中的相关作用通路, 流式细胞术检测CDDP耐药细胞凋亡及过表达FIS1对细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)的作用, 蛋白质印迹法检测FIS1对P53信号通路的作用, OS公共数据分析FIS1与P53的相关性。结果: FIS1在18例CDDP-sensitivity组中表达明显比其在15例CDDP-resistance组中表达增高; FIS1在OS耐CDDP细胞系MG63/Cis-R细胞中的蛋白质表达低于普通MG63组; 人OS组织中与FIS1相关的前10位KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)通路, 凋亡通路排在首位。在OS耐CDDP细胞系MG63/Cis-R细胞中, FIS1高表达组细胞与对照组相比, 细胞凋亡比例增高($P<0.05$), ROS水平降低($P<0.05$), P53、BAX和cleaved Caspase3蛋白质表达上调, BCL-2分子表达降低; 在OS组织中同样发现FIS1与P53、BAX、cleaved Caspase3表达正相关, 与BCL-2表达负相关。结论: FIS1通过激活P53通路进而调控CDDP耐药OS细胞的凋亡, 而FIS1可能在OS CDDP耐药中发挥重要作用, 有望成为OS化疗耐药的新靶点。

[关键词] 骨肉瘤; FIS1; 顺铂耐药; 细胞凋亡; P53

Mitochondrial fission protein 1 inhibits cisplatin resistance in osteosarcoma through P53 pathway

TAN Rui¹, DUAN Wei¹, WANG Zijun², YUAN Peng^{3,4}, CHANG Le¹, GAN Lu¹, QUAN Penghe⁵, SHI Xide⁶, LI Mo¹, YE Zhengxu¹

(1. Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032; 2. Battalion of the First Regiment of Cadets of Basic Medicine, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032; 3. Department of Pain Treatment, Tangdu Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710038; 4. Department of Physiology and Pathophysiology, Basic Medical College, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032; 5. Shijiazhuang No. 2 Demobilized Cadres Rest Home of Hebei Military Command, Shijiazhuang 050000; 6. Medical Team of the Chinese People's Liberation Army 32356, Geermu Qinghai 816000, China)

收稿日期 (Date of reception): 2020-12-16

通信作者 (Corresponding author): 叶正旭, Email: yzengx@fmmu.edu.cn; 李沫, Email: limo0729@hotmail.com

基金项目 (Foundation item): 国家重点研发计划 (2017YFB1104104); 陕西省自然科学基金 (2019SF-054)。This work was supported by the National Key Research and Development Program (2017YFB1104104), and Natural Science Foundation of Shaanxi Province (2019SF-054), China.

Abstract **Objective:** To explore the expression of mitochondrial fission protein 1 (FIS1) in the tissue of cisplatin (CDDP)-resistant osteosarcoma (OS) and its effect on apoptosis of CDDP-resistant OS cells. **Methods:** Immunohistochemistry (IHC) and Western blot were used to detect FIS1 expression in CDDP resistant and sensitive OS tissues. Bioinformatics analyse the relative pathways of FIS1 in OS. The apoptosis and reactive oxygen species (ROS) of CDDP resistant cells are detected by flow cytometry. The effect of FIS1 on the P53 signaling pathway was detected by Western blot. The correlation between FIS1 and P53 was analyzed by OS public data. **Results:** FIS1 expression in 18 CDDP-sensitive OS tissues was significantly higher than that in 15 CDDP-resistant OS tissues. FIS1 protein expression in OS CDDP resistant cell line MG63/CIS-R was lower than that in normal MG63 group. Among the top 10 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways associated with FIS1 in human OS, apoptotic pathways were at the top 1. In OS CDDP resistant cell line MG63/Cis-R, FIS1 high expression group showed an increased apoptosis rate and a decreased ROS compared with the control group ($P < 0.05$); the expression of P53, BAX and cleaved Caspase3 proteins were up-regulated, while the expression of BCL-2 molecules was decreased. There was a significant positive correlation between FIS1 and P53, BAX, cleaved Caspase3 expression in OS tissues, but negatively correlated with BCL-2 expression. **Conclusion:** FIS1 regulates apoptosis of CDDP-resistant OS cells by activating P53 pathway, and FIS1 may play an important role in CDDP-resistant OS and is expected to be a new target for chemotherapy resistance of OS.

Keywords osteosarcoma; FIS1; cisplatin resistance; apoptosis; P53

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是青少年中最常见的恶性肿瘤,其发病率以每年0.3%的速度增长^[1]。虽然与其他癌症相比,OS的发病率相对较低(约占所有儿童肿瘤的6%),但由于OS具有高度侵袭性,患者5年生存率仍然很低^[2]。尽管近年来OS的综合治疗取得了一定的进展,但在OS化学药物治疗(以下简称化疗)中,化疗耐药仍然是OS面临的一大挑战。因此,迫切需要深入解析OS化疗耐药发生的内在分子机制。线粒体通过分裂和融合在数量和形态上不断变化,并对细胞增殖、凋亡、代谢、自噬以及活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生作用^[3]。线粒体分裂蛋白1(mitochondrial fission protein 1, FIS1)是线粒体分裂调控分子之一,对线粒体分裂融合稳态调控至关重要。本研究首先在顺铂(cisplatin, CDDP)耐药和敏感的OS样本中分析FIS1的表达水平,然后在细胞水平实验中观察FIS1对CDDP耐药OS细胞凋亡的作用,并初步探讨FIS1对CDDP耐药OS细胞凋亡的内在分子机制,以期为OS化疗耐药提供新方向和新靶点。

1 材料与方法

1.1 临床标本收集与保存

于空军军医大学第一附属医院骨肿瘤科及病理科收集2018—2020年于术前行CDDP化疗的

OS组织33例,其中18例为CDDP敏感的OS组织(CDDP-sensivity组),15例为CDDP耐药的OS组织(CDDP-resistance组)。将部分新鲜组织经4%多聚甲醛固定、石蜡包埋后置于4℃冰箱保存待用,剩余组织于-80℃冰箱中冻存。组织标本纳入标准:1)术后经病理学诊断证实为OS;2)术前接受CDDP化疗;3)患者临床信息、病理资料等完整。排除标准:1)OS患者术前未行CDDP化疗;2)OS患者合并其他恶性肿瘤或其他重大疾病;3)OS已发生远处转移无法手术切除;4)严重心、脑、肺、肾等器质性病变,不能耐受化疗和手术。本研究经空军军医大学第一附属医院医学伦理委员会审核批准,涉及此项研究患者及其家属均知情同意。

1.2 细胞和主要试剂

OS细胞系MG63购自中国科学院细胞库;胎牛血清购自中国BBI公司;MEM培养基购自美国GIBCO公司;转染试剂Lipofectamine™2000购自美国Invitrogen公司;兔多克隆抗体FIS1购自英国Abcam公司;兔多抗β-actin、BAX、BCL-2、cleaved Caspase3、P53抗体、羊抗兔二抗购自武汉Proteintech公司;MTS试剂购自美国Promega公司;Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒购自上海贝博生物科技有限公司;ROS检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;FIS1过表达病毒及对照病毒

购自上海吉玛生物有限公司。

1.3 免疫组织化学

OS新鲜组织样本经4%多聚甲醛固定、石蜡包埋、切片后,进行烤片、脱蜡、水化、高温高压抗原修复、3% H₂O₂溶液封闭内源性过氧化氢酶等操作后,加山羊血清封闭,28℃放置20 min后加入稀释好的抗FIS1多克隆抗体(1:800),4℃孵育过夜。次日复温后加入生物素偶联的二抗,37℃孵育20 min,28℃孵育辣根过氧化物酶20 min后进行二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色、苏木精复染以及1%盐酸乙醇分化、脱水,中性树脂胶封固。染色结果判读:染色阳性细胞计算百分比:<9%为0分、10%~25%为1分、26%~50%为2分、51%~75%为3分、76%~100%为4分。染色程度分数计算:未染色记为0分、浅黄色为1分、棕黄色为2分、棕褐色为3分。两组评分相乘得到的分数为FIS1最终染色得分。采用中位数法,将FIS1染色评分<6定义为FIS1低表达组,评分≥6定义为FIS1高表达。阳性表达的FIS1主要定位于OS细胞质中。

1.4 细胞培养及转染

将OS细胞MG63接种在含10%胎牛血清的MEM培养基的培养瓶中,37℃、5% CO₂条件下培养。接种4×10⁵个细胞/孔至细胞六孔板中培养,待细胞融合度约80%时,按照慢病毒转染操作流程,分别转染对照组和FIS1过表达组病毒。转染72 h后收集细胞待用。

1.5 蛋白质印迹法检测细胞中相关蛋白的表达

胰蛋白酶消化、收集经转染48 h后的各组MG63细胞,用细胞裂解液将各组细胞进行裂解,提取细胞总蛋白质,UV法测定浓度后各加入1/4蛋白质样品体积的5×蛋白质上样缓冲液(还原型),100℃煮沸10 min,冷却后分装、冻存于-80℃冰箱待用。蛋白质样品经12%的SDS-PAGE凝胶电泳、转膜等操作后,5%脱脂牛奶室温封闭1 h,加入一抗FIS1(1:1 000)、β-actin(1:3 000)、BAX(1:500)、BCL-2(1:800)、cleaved Caspase3(1:500)、P53(1:1 000),4℃孵育过夜,TBST摇洗3次(5 min/次)后加入兔二抗,室温孵育1 h后TBST摇洗3次(5 min/次),化学发光液显影后分析结果。

1.6 组织蛋白质提取及蛋白质印迹法检测组织中相关蛋白质的表达

从-80℃冰箱冻存的新鲜组织中各随机选取

3例CDDP-sensivity组和CDDP-resistance组,分别称量50 mg,置于圆底离心管,剪碎成1 mm³大小,用PBS冲洗吹打,1 000 r/min离心5 min,重复3次至上清不再发红。将各管中加入400 μL工作裂解液(工作裂解液=8:1:1=8 RIPA裂解液:1 磷酸酶抑制剂贮存液:1 蛋白酶抑制剂贮存液),将离心管置于冰上,匀浆器开至最大档(36次/min),分别匀浆震荡3~5 min,待组织均匀无小颗粒呈浆状时更换1.5 mL EP管在冰上裂解30 min,裂解过程中震荡3次,每次10 s。12 000 r/min离心25 min,轻轻取出EP管,得到:油-蛋白液-沉淀,吸取中层蛋白液,UV法测定蛋白质浓度后各加入1/4蛋白质样品体积的5×蛋白质上样缓冲液(还原型),100℃煮沸10 min,冷却后分装、冻存于-80℃冰箱待用。蛋白质样品经12%的SDS-PAGE凝胶电泳、转膜等操作后,5%脱脂牛奶室温封闭1 h,加入一抗FIS1(1:1 000)、β-actin(1:3 000)、BAX(1:500)、BCL-2(1:800)、cleaved Caspase3(1:500)、P53(1:1 000),4℃孵育过夜,TBST摇洗3次(5 min/次)后加入兔二抗,室温孵育1 h后TBST摇洗3次(5 min/次),化学发光液显影后分析结果。

1.7 流式细胞术检测FIS1对MG63细胞凋亡的作用

收集各组细胞,PBS洗涤后加入500 μL的Binding Buffer重悬细胞,每个样本加ANXA5-FITC染料和PI染料各5 μL,4℃避光孵育15 min。流式细胞仪用488 nm激发光波长,检测FITC荧光用波长515 nm通带滤器,另一波长>560 nm的滤器检测PI。实验重复3次。

1.8 流式细胞术检测FIS1对MG63细胞ROS水平的影响

去除转染对照组和FIS1过表达组病毒72 h后的细胞培养液,按照1:1 000用无血清培养液稀释DCFH-DA,使终浓度为10 μmol/L,向各孔加入适当体积稀释好的DCFH-DA,加入体积以能充分盖住细胞为宜。37℃细胞培养箱内孵育20 min;用无血清细胞培养液洗涤细胞3次,收集细胞后用流式细胞仪488 nm激发光波长、525 nm发射波长实时检测二氯荧光素(2',7'-dichlorofluorescein, DCF)的荧光强度。实验重复3次。

1.9 统计学处理

采用SPSS 20.0和GraphPad Prism 8.0软件进行相关数据分析。使用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)展示计量数据结果,采用t检验比较CDDP-resistance组及CDDP-sensivity组中FIS1蛋白质表达水平的差异;

FIS1蛋白质表达水平与临床病理参数间的关系使用 χ^2 检验分析。采用单因素方差来进行多组均数比较分析, 组间有统计学差异, 则进行多重比较采用Dunnett *t*检验。Pearson相关分析分析FIS1和P53的mRNA表达水平的关系。以双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FIS1在CDDP-resistance组和CDDP-sensitivity组中的表达情况

利用免疫组织化学法(immunohistochemistry, IHC)和蛋白质印迹法证实: FIS1在18例CDDP-sensitivity组中表达明显比其在15例CDDP-resistance组中表达增高(图1)。IHC染色分析结果显示: FIS1在18例CDDP-sensitivity组的染色评分高于其在15例CDDP-resistance组(4.889 ± 2.784 vs 2.400 ± 2.028 , $t = 2.880$, $P = 0.007$, 图1A)。蛋白质印迹法结果显示: FIS1在CDDP-sensitivity组的蛋白质表达高于其在CDDP-resistance组(2.325 ± 0.576 vs 1.230 ± 0.209 , $t = 3.097$, $P = 0.036$, 图1B)。

2.2 构建CDDP耐药的OS MG63/Cis-R细胞

TCGA(The Cancer Genome Atlas)数据库显示OS细胞系中, MG63表达相对其他OS细胞系较低(图2A)。蛋白质印迹法结果显示: FIS1在前期构建好的OS耐CDDP细胞系MG63/Cis-R细胞中的蛋白质表达低于普通MG63组(0.465 ± 0.113 vs 1.000 ± 0.200 , $t = 4.034$, $P = 0.016$, 图2B)。对MG63/Cis-R细胞感染FIS1慢病毒表达系统, real-time RT-PCR和蛋白质印迹法分别检测FIS1过表达效果。对照组(EV组)和FIS1过表达组(FIS1组)的FIS1相对mRNA表达量分别为 1.000 ± 0.180 和 5.218 ± 0.950 , 2组间差异有显著统计学意义($t = 7.560$, $P = 0.002$), 利用蛋白质印迹法进一步证实: EV组和FIS1组的FIS1相对蛋白质表达量分别为 1.000 ± 0.263 和 2.483 ± 0.434 , 2组间差异有显著统计学意义($t = 5.067$, $P = 0.007$, 图2C、2D)。采用CCK-8法检测不同浓度CDDP用药后不同组OS细胞 IC_{50} , 结果显示: MG63/Cis-R细胞 IC_{50} 显著高于MG63组($t = 6.794$, $P = 0.003$), 而在MG63/Cis-R细胞中过表达FIS1后, 其 IC_{50} 显著下降($t = 5.238$, $P = 0.006$)。

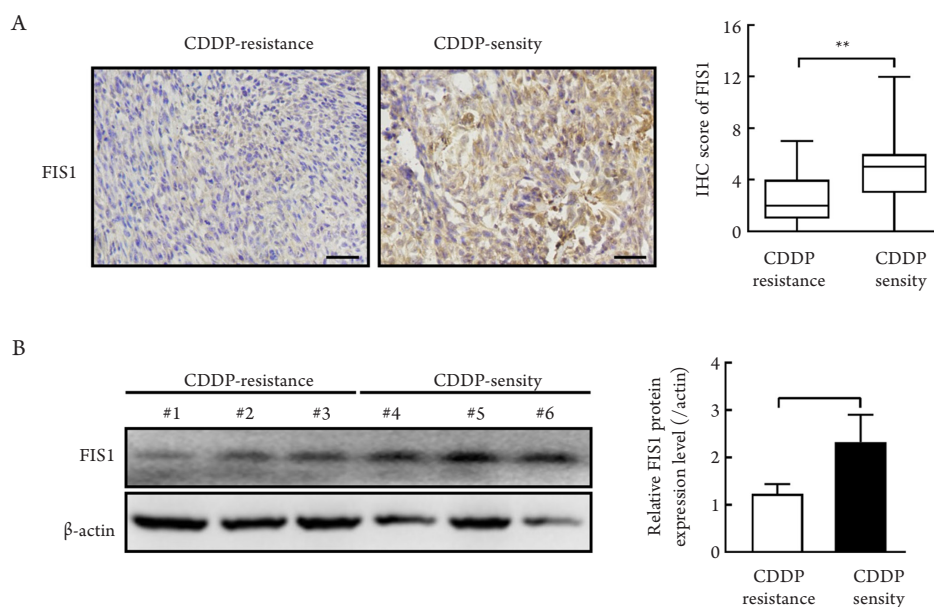


图1 FIS1在骨肉瘤组织中的表达

Figure 1 Expression of FIS1 in OS tissues

(A) IHC染色分析FIS1在骨肉瘤组织的表达水平(SP, $\times 200$); (B)蛋白质印迹法分析FIS1在骨肉瘤组织的表达水平。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 顺铂耐药组。

(A) IHC analysis for FIS1 protein level in OS tissues (SP, $\times 200$); (B) Western blotting analysis for FIS1 protein level in OS tissues. * $P < 0.05$,

** $P < 0.01$ vs CDDP-resistance.

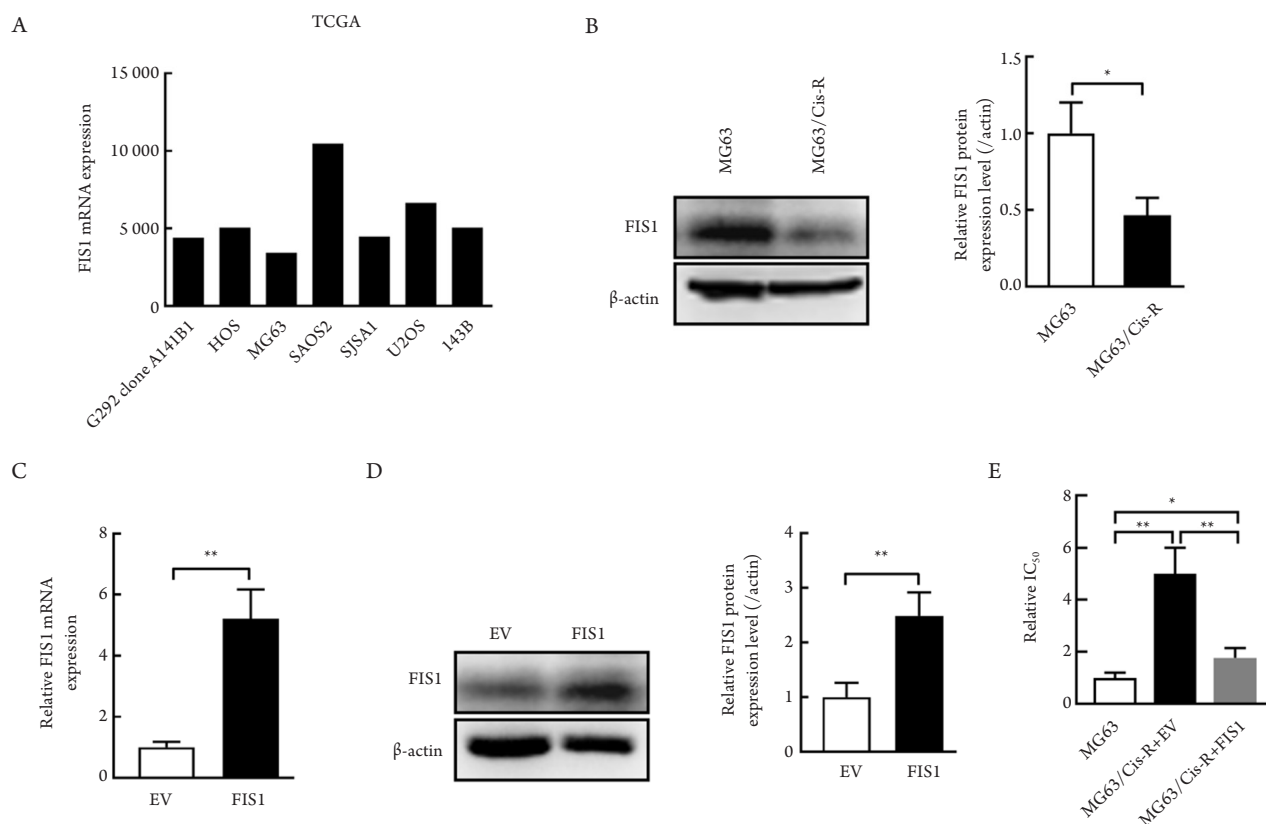


图2 实时定量PCR和蛋白质印迹法检测MG63细胞中FIS1表达效果

Figure 2 Real-time PCR and Western blotting analyses for FIS1 expression were performed in MG63 cells

(A)利用TCGA数据库分析骨肉瘤细胞系中FIS1的mRNA表达水平; (B)蛋白质印迹法分析MG63及其顺铂耐药细胞的FIS1蛋白质表达水平; (C)利用real-time PCR技术分析MG63/Cis-R细胞经慢病毒转染后FIS1的mRNA表达水平; (D)蛋白质印迹法分析MG63/Cis-R细胞经慢病毒转染后FIS1的蛋白质表达水平; (E) CCK-8法检测CDDP在OS细胞各处理组中的相对IC₅₀。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

(A) TCGA analysis for FIS1 mRNA level in OS cells; (B) Western blotting analysis for FIS1 protein level in MG63 cells with treatment as indicated; (C) Real-time PCR analysis for FIS1 mRNA level in MG63/Cis-R cells with treatment as indicated; (D) Western blotting analysis for FIS1 protein level in MG63/Cis-R cells with treatment as indicated; (E) the relative IC₅₀ of CDDP in OS cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.3 FIS1促进CDDP耐药的OS MG63细胞凋亡

利用R2 (基因组学分析和可视化平台, Genomics Analysis and Visualization Platform)分析人OS组织中与FIS1相关的前十KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)通路, 结果显示凋亡通路排在第一(图3A)。流式细胞术检测FIS1对OS MG63/Cis-R细胞ROS和凋亡的作用, 结果显示: EV组细胞ROS荧光强度高于FIS1组(61.533 ± 4.957 vs 40.000 ± 3.051 , $t = 6.407$, $P = 0.003$); EV组细胞凋亡百分比低于FIS1组(12.433 ± 1.692 vs 29.967 ± 3.325 , $t = 8.141$, $P = 0.001$, 图3B、3C)。

2.4 CDDP耐药OS细胞中FIS1激活P53信号通路

在OS MG63/Cis-R细胞中过表达FIS1

后, 蛋白质印迹法结果显示: 与EV组相比, FIS1组中P53、BAX、cleaved Caspase3表达明显升高, 而抗凋亡蛋白BCL-2表达降低(图4A)。利用R2 (Genomics Analysis and Visualization Platform)中的2个OS数据库(mixed Osteosarcoma-Guenther-20-MAS5.0-u133a和mixed Osteosarcoma-Sadikovic-14-rma_sketch-hugene10t)分析, 结果显示FIS1和P53表达呈显著正相关性(分别为 $r = 0.714$, $P = 0.0004$; $r = 0.570$, $P = 0.033$, 图4B)。P53、BAX、cleaved Caspase3在CDDP-sensivity组中表达明显比其在CDDP-resistance组中表达升高, 而抗凋亡蛋白BCL-2则表达降低(图4C)。

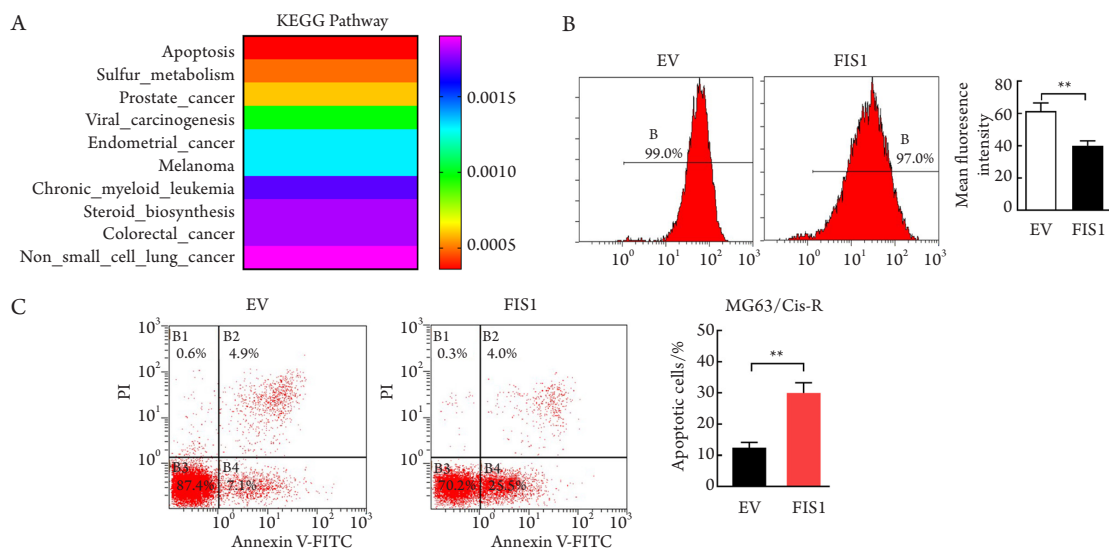


图3 FIS1对顺铂耐药骨肉瘤细胞MG63细胞活性氧和凋亡的作用

Figure 3 Effect of FIS1 on apoptosis of CDDP-resistant OS cell MG63

(A)利用R2(基因组学分析和可视化平台)分析人骨肉瘤组织中与FIS1相关的前十KEGG通路;(B)流式细胞术分析FIS1对骨肉瘤MG-63/Cis-R细胞活性氧的作用;(C)流式细胞术分析FIS1对骨肉瘤MG-63/Cis-R细胞凋亡的作用。 $**P<0.01$ 。

(A) Top 10 predicted significant KEGG pathways of FIS1 using R2 (Genomics Analysis and Visualization Platform) in human OS tissues (mixed Osteosarcoma-Guenther-20-MASS.0-u133a); (B) flow cytometry analysis for cell ROS in MG63/Cis-R cells with treatment as indicated; (C) flow cytometry analysis for cell apoptosis in MG63/Cis-R cells with treatment as indicated. $**P<0.01$.

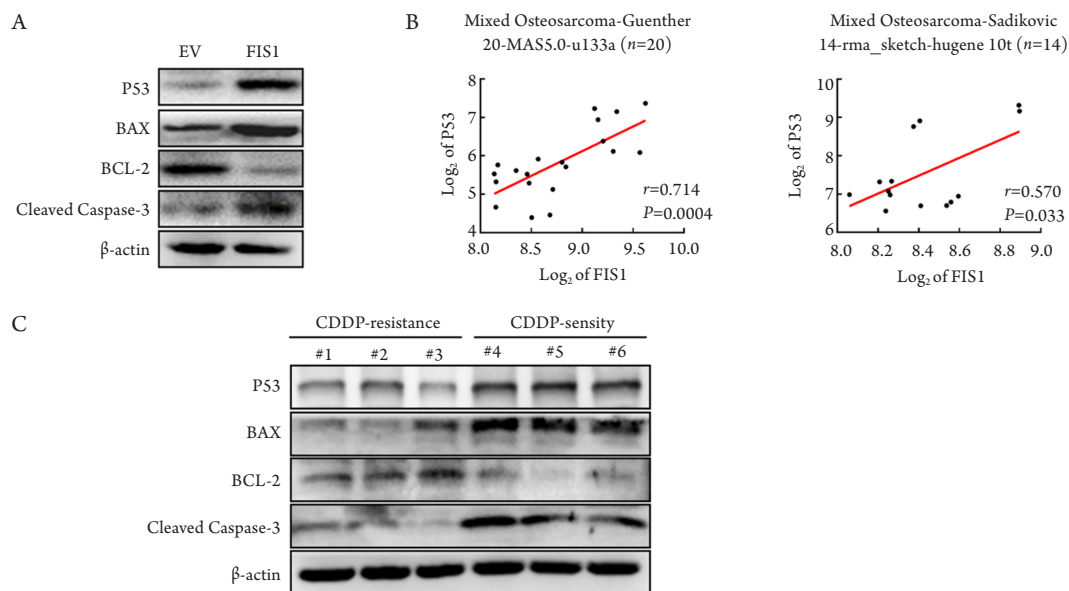


图4 FIS1激活P53通路

Figure 4 FIS1 activates the P53 pathway

(A)蛋白质印迹法分析感染过表达FIS1慢病毒后MG63/Cis-R细胞中P53、BAX、BCL-2和cleaved Caspase3的表达情况;(B)基于R2(基因组学分析与可视化平台)评估34个骨肉瘤组织中FIS1与P53 mRNA表达水平的相关性;(C)蛋白质印迹法分析顺铂耐药和敏感组织中P53、BAX、BCL-2和cleaved Caspase3的表达情况。

(A) Western blotting analysis for P53, BAX, BCL-2 and cleaved Caspase3 in MG63/Cis-R cells with treatment as indicated; (B) the correlation was evaluated between the mRNA expression levels of FIS1 and P53 in 34 OS tissues based on R2 (Genomics Analysis and Visualization Platform); (C) Western blotting analysis for P53, BAX, BCL-2 and cleaved Caspase3 in OS tissues between CDDP-resistance and CDDP-sensitivity.

3 讨论

线粒体是细胞内的半自主性的细胞器, 对细胞的生理活动至关重要。线粒体不仅是氧化呼吸产生ATP的主要场所, 也是细胞内许多关键代谢过程发生的场所^[4]。线粒体的功能具有多样性, 线粒体在细胞增殖、凋亡、钙离子储存以及ROS生成中均起重要作用^[5-6]。此外, 线粒体还在免疫和炎症中扮演重要角色^[7]。在大多数细胞中, 线粒体是高度动态的, 通过分裂和融合, 线粒体在数量和形态上不断变化, 以应对代谢改变和细胞外损伤^[8]。而线粒体的这些分裂和融合事件最终决定了线粒体的形状比例, 并进一步影响了细胞的功能。近年来越来越多的研究^[9]显示: 线粒体分裂融合的动态变化与人类各种癌症的发生和发展密切相关。在哺乳动物细胞中, 已被鉴定为与线粒体分裂相关蛋白质包括DRP1、MFF、FIS1、MID49和MID51。线粒体融合的关键分子包括MFN1、MFN2、OPA1和MIC60。

FIS1定位于线粒体外膜蛋白质, 是线粒体分裂的重要调节因子, 介导线粒体分裂复合物的组装, 参与线粒体断裂的执行^[10]。以往FIS1被认为与酵母中的同系物FIS1p具有相似的作用, 即向线粒体募集DRP1并促进线粒体分裂, 被认为是DRP1介导的线粒体分裂的辅助分子^[11]。最近, FIS1被报道在DRP1缺失的情况下调节线粒体的分裂, FIS1与MFN1、MFN2和OPA1结合, 从而抑制它们的GTPase活性和融合机制^[12]。FIS1不仅能单独作为线粒体分裂的关键调控分子, 而且在细胞的凋亡和周期调控方面也有重要作用。FIS1通过与BAX/BAK介导的线粒体外膜通透性中内质网定位的Bap31相互作用促进细胞凋亡, 导致细胞色素c释放并最终导致细胞死亡^[13]。Lee等^[14]发现FIS1缺失而导致的线粒体延长, 会导致细胞周期在G2/M期的严重缺陷, 将Myc-hFis1重新导入这些细胞, 可诱导线粒体断裂, 恢复细胞周期, 表明线粒体的形态动态变化与细胞周期密切相关。以上研究均表明FIS1不仅是维持细胞内线粒体正常分裂, 而且是维持细胞多项正常生命活动的重要分子。

为分析FIS1在CDDP耐药的OS中的生物学作用, 本研究先在CDDP-resistance组和CDDP-sensitivity组中进行FIS1的表达分析, 发现FIS1蛋白质表达水平在CDDP-sensitivity组中较相应CDDP-resistance组上调。进一步在耐CDDP细胞系MG63/Cis-R细胞中也发现FIS1蛋白质表达下调。通过利用R2 (Genomics Analysis and Visualization Platform)分析

人OS组织中与FIS1相关的前十KEGG通路, 结果显示凋亡通路排在第一。初步推测FIS1可能在OS CDDP耐药中与细胞凋亡作用有关。流式细胞术检测发现在耐CDDP细胞系OS MG63/Cis-R中, 过表达FIS1后细胞凋亡增加, 同时ROS水平降低。进一步对凋亡通路检测发现, 在耐CDDP细胞系OS MG63/Cis-R中过表达FIS1后, P53、BAX、cleaved Caspase3表达升高, 而抗凋亡分子BCL-2分子表达降低, 同时OS组织中发现FIS1和P53表达呈显著正相关。上述结果提示FIS1促进CDDP耐药OS细胞凋亡可能通过激活P53通路。

本研究揭示FIS1在CDDP-resistance组中呈低表达, 同时FIS1可通过激活P53通路进而促进CDDP耐药OS细胞凋亡。由于本研究OS样本数量相对有限, 上述结论还需要进一步增加OS患者组织样本量来验证, 同时对FIS1在CDDP耐药的OS细胞中的生物学作用及分子机制进行深入挖掘, 以期发现新的标志物和治疗。

参考文献

1. Chen J, Liu G, Wu Y, et al. CircMYO10 promotes osteosarcoma progression by regulating miR-370-3p/RUVBL1 axis to enhance the transcriptional activity of β -catenin/LEF1 complex via effects on chromatin remodeling[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 150. Erratum in: *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 75.
2. Kager L, Zoubek A, Dominkus M, et al. Osteosarcoma in very young children: experience of the Cooperative Osteosarcoma Study Group[J]. *Cancer*, 2010, 116(22): 5316-5324.
3. Ma Y, Wang L, Jia R. The role of mitochondrial dynamics in human cancers[J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(5): 1278-1293.
4. Roth KG, Mambetsariev I, Kulkarni P, Salgia R. The mitochondrion as an emerging therapeutic target in cancer[J]. *Trends Mol Med*, 2020, 26(1): 119-134.
5. Chan DC. Mitochondrial dynamics and its involvement in disease[J]. *Annu Rev Pathol*, 2020, 15: 235-259.
6. Abate M, Festa A, Falco M, et al. Mitochondria as playmakers of apoptosis, autophagy and senescence[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2020, 98: 139-153.
7. Mills EL, Kelly B, O'Neill LAJ. Mitochondria are the powerhouses of immunity[J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(5): 488-498.
8. Gao S, Hu J. Mitochondrial fusion: the machineries in and out[J]. *Trends Cell Biol*, 2021, 31(1): 62-74.
9. Chen H, Chan DC. Mitochondrial dynamics in regulating the unique phenotypes of cancer and stem cells[J]. *Cell Metab*, 2017, 26(1): 39-48.

10. Losón OC, Song Z, Chen H, et al. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission[J]. *Mol Biol Cell*, 2013, 24(5): 659-667.
11. James DI, Parone PA, Mattenberger Y, et al. hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(38): 36373-36379. Erratum in: *J Biol Chem*, 2004, 279(34): 36166.
12. Yu R, Jin SB, Lendahl U, et al. Human Fis1 regulates mitochondrial dynamics through inhibition of the fusion machinery[J]. *EMBO J*, 2019, 38(8): e99748.
13. Wang B, Nguyen M, Chang NC, et al. Fis1, Bap31 and the kiss of death between mitochondria and endoplasmic reticulum[J]. *EMBO J*, 2011, 30(3): 451-452.
14. Lee S, Park YY, Kim SH, et al. Human mitochondrial Fis1 links to cell cycle regulators at G2/M transition[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(4): 711-725.

本文引用: 谭瑞, 段伟, 王子君, 袁鹏, 常乐, 甘露, 权鹏鹤, 史喜德, 李沫, 叶正旭. FIS1通过P53通路抑制骨肉瘤对顺铂化疗的耐药[J]. *临床与病理杂志*, 2021, 41(10): 2231-2238. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.10.002

Cite this article as: TAN Rui, DUAN Wei, WANG Zijun, YUAN Peng, CHANG Le, GAN Lu, QUAN Penghe, SHI Xide, LI Mo, YE Zhengxu. Mitochondrial fission protein 1 inhibits cisplatin resistance in osteosarcoma through P53 pathway[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2021, 41(10): 2231-2238. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.10.002