DOI:10.15972/j.cnki.43-1509/r.2017.04.004

·基础医学·

MicroRNA-638 在骨肉瘤中表达下调及对其细胞增殖的影响

陈 斌,符 勇,夏 雪,郭伟明,金浩成,王晓旭*
(南华大学附属第二医院骨科,湖南 衡阳 421001)

摘 要: **目的** 探讨 miR-638 在人骨肉瘤(OS)细胞增殖行为中的影响。 **方法** 通过实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 miRNA-638 在人 OS 组织及癌旁组织、人 OS 细胞株(MG63、U2OS、HOS、SaOS2)和正常人成骨 NHOst 细胞株中的表达;用 Lipofectamine™ 2000 转染 miR-638 模拟物或抑制物,细胞增殖检测试剂盒(CCK-8)检测转染后的吸光光度值,平板克隆形成实验检测菌落数量。 **结果** miR-638 在各组细胞中均有表达;OS 细胞株中 miR-638 的表达明显下调($P<0.05$);高表达 miR-638 能抑制 OS MG63 和 U2OS 细胞的增殖($P<0.05$)。 **结论** miR-638 高表达能抑制 OS 细胞的增殖。

关键词: 骨肉瘤; MG63; U2OS; MicroRNA-638; 细胞增殖
中图分类号:R738.1 **文献标识码:**A

Effect of MicroRNA-638 expression on the proliferation of human osteosarcoma cells

CHEN Bin, FU Yong, XIA Xue, et al
(*Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan* 421001, *China*)

Abstract: **Objective** To investigate the role of miR-638 in biological behavior of osteosarcoma cell. **Methods** The expression of miR-638 in osteosarcoma MG63 and U2OS cells was detected by RT-PCR. miRNA-638 mimics (inhibhors) were transfected into MG63 and U2OS by using LipofectamineTM2000 to upregulate (deregulate) the expression of miRNA-638. The absorbance value in 24 h, 48 h, 96 h and 72 h following the transfection was detected by CCK-8. And colony forming assay was used to detect colony counts over 30 cells after 2 weeks. **Results** MiR-638 expressed in each group. The expression of miR-638 was down regulated ($P<0.001$) in the 36 groups (56.25%) compared with the corresponding non cancerous tissues. Mir-638 expression can significantly reduce the MG63 and U2OS cells growth rate ($P<0.05$), on the contrary, the suppression of miR-638 expression significantly promoted the growth of cells of U2OS and MG63 ($P<0.05$). **Conclusions** High expression of miR-638 significantly inhibits the proliferation of osteosarcoma cells. MiR-638 may become a new target for the early diagnosis and treatment of osteosarcoma.

Key words: osteosarcoma; MG63; U2OS; MicroRNA-638; cell proliferation

骨肉瘤(Osteosarcoma, OS)是儿童和青年中最常见的一种侵袭性骨肿瘤,最常见的原发部位为胫骨近端、肱骨近端及股骨远端,大约 60% 的病例是 10~20 岁的青少年患者,占青少年肿瘤的 6%[1]。在近几十年来,人们虽然付出了大量努力来明确 OS 的致癌机制,但 OS 的生存率到达了一个瓶颈,晚期 OS 的预后依然很差。其增殖速度快、易转移的特点,使得 OS 在临床上的死亡率和致残率都很高。

MicroRNA,简写为 miRNA,又名微小 RNA,是内源性的、短小的单链 RNA 分子,由 19.25 个核苷酸组成,不参与蛋白质的编码,但调节基因的表达。因为 miRNA 与靶 mRNA 不完全互补配对,所以每个

收稿日期:2017-02-10;**修回日期:**2017-06-18
基金项目:湖南省教育厅资助项目(15C1215).
* **通讯作者,**E-mail:wxx1024@163.com.

miRNA 可以有多个靶基因,而几个 miRNAs 也可以共同调节同一靶基因,由此形成复杂的调控网络,精细调控功能基因的表达。miRNA 是肿瘤分子生物学研究领域的热点,研究发现血清/血浆中存在上百种 miRNA,在肿瘤的发生、发展和转移过程中有举足轻重的作用,尤其在肿瘤的诊断、治疗及预后监测方面具有应用价值。Wang 等[2]检测了非小细胞肺癌 SPC-A1 细胞培养上清液中 miR-638 表达水平及细胞凋亡率以及裸鼠移植瘤模型后体内的血清 miR-638 表达水平。结果显示血清 miR-638 水平与非小细胞肺癌患者的生存率是相关的,在临床上 miRNA-638 水平可能被视为非小细胞肺癌预后的潜在独立预测因子。但 miR-638 在人 OS 细胞增殖行为中的作用一直不明确,鉴于文献报导 miR-638 对肿瘤的抑制作用,本实验以 miR-638 为研究对象,观察其在 OS 组织中的表达及对 OS 细胞系(MG63、U2OS)增殖的影响,为 miRNA-638 成为人 OS 新的有前景的治疗靶点提供了一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 组织与细胞 收集中山大学肿瘤研究所 2008 年 1 月~2012 年 12 月 OS 组织及癌旁组织标本 64 对,平均年龄 21 岁,其中男性 42 例,女性 22 例,收集后液氮冷冻。所有标本取得都获得了家属知情同意,且此项目经附属医院临床研究伦理委员会批准。所有收集的标本符合 OS 诊断,即有典型临床症状、体征、相应影像学表现及病理学形态,术前未经局部及全身治疗。OS 细胞株(MG63、U2OS、HOS、SaOS2)及永生化的正常骨组织细胞株 NHOst 购买于上海美轩公司。

1.2 实验试剂 氯仿、异丙醇、无水乙醇、无酶水(用双蒸水按 1∶1 000 的比例稀释 DEPC 原液,振摇混匀,37 ℃过夜,高温高压使 DEPC 降解)、75% 乙醇、RNAiso Reagent 试剂盒(日本 TaKaRa 公司)、RT 试剂盒、SYBR Premix Ex Taq 试剂盒(日本 TaKaRa 公司)、PBS 缓冲溶液、0.25% 胰蛋白酶、RPMI-1640 培养基、胎牛血清、miR-638 mimic、miR-638 inhibitor、mimic NC、inhibitors NC(上海吉玛公司)、Lipofectamine™ 2000 转染试剂(美国 Invitrogen 公司)。

1.3 仪器设备 高速冷冻离心机、各种量程移液器、吸头、EP 管、PCR 管、NanoDrop 2000、超净工作台、PCR 热循环仪、Thermal Cycler Dice Real Time System II 、6 孔板和 96 孔板、细胞计数板、细胞培养箱、超速离心机、生物安全柜、倒置显微镜、酶标仪、-80 ℃超低温冰箱。

1.4 实验分组 定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测各组织中 miR-638 相对表达量分组:实验组为 64 组人骨肉瘤组织/人骨肉瘤 MG63、U2OS、HOS、SaOS2 细胞株;对照组为 64 组对应的非癌组织/永生化的正常骨细胞株 NHOst。

细胞增殖检测试剂盒(Cell Counting Kit-8, CCK-8)实验分组:实验组为分别转染 miRNA-638 mimic 与 miRNA-638 inhibitor 的 MG63、U2OS 细胞株;阴性对照组为分别转染 mimic NC 与 inhibitor NC 的 MG63、U2OS 细胞株。

平板克隆形成试验分组:实验组为转染 miRNA-638 mimic 的 MG63、U2OS 细胞株;阴性对照组未转染的 MG63、U2OS 细胞株。

1.5 人 OS 细胞的培养 将标本于 37 ℃ 水浴溶化呈悬液,于培养基内混匀,离心后弃上清,将细胞沉淀用 1.0 mL 培养基混匀加入装有 14.0 mL 培养基质的 75 cm^2 方瓶中,于 37 ℃、5% CO_2孵育箱中培养。待细胞生长融合至 80%~90%时开始传代,继续放置于饱和湿度 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养,2~3 天更换培养基,之后根据细胞生长情况继续给予传代。

1.6 qRT-PCR 检测各组织中 miR-638 的表达 按 RNAiso Reagent 说明书分别提取实验组与对照组的总 RNA,用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计检测 RNA 质量和浓度。应用 PrimeScript RT 试剂盒进行反转录反应,反应在 Applied Biosystems 2700 热循环仪上进行。按说明书操作,配置反应液的所有操作均在冰上进行。反应体系如表 1。逆转录反应条件:37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s,4 ℃(注:10 μL 反应体系最多使用 500 ng 的 Total RNA)。将反转录的 cDNA 样品按照适当的比例稀释后,应用 SYBR Premix Ex Taq™试剂盒,在 Thermal Cycler Dice Real Time System II 扩增仪上进行 PCR 反应,实验流程按说明书进行,反应体系如表 2。每个样本设 3 个复孔,以 U6 为内参,反应条件为 95 ℃预变性 30 s,95 ℃ 5 s,60 ℃退火延伸 30 s,40 个循环。根据 PCR 所得的 CT 值运用 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 法计算 miRNA-638 的相对表达量。

表 1　反转录合成 cDNA 反应体系

试剂	使用量	终浓度
5×PrimeScript Buffer(for Real Time)	2.0 μL	1×
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 μL	
Oligo dT Primer(50 μmol/L)	0.5 μL	25 pmol
Random 6 mers(100 μmol/L)	2.0 μL	200 pmol
Total RNA	X μL	
RNase Free dH_2O	X-10 μL	

表 2　反转录合成 cDNA 反应体系

试剂	使用量	终浓度
SYBR® Premix Ex Taq II(2×)	12.5 μL	1×
PCR Forward Primer(10 μmol/L)	1.0 μL	0.4 μmol/L
PCR Reverse Primer(10 μmol/L)	1.0 μL	0.4 μmol/L
cDNA 溶液	2.0 μL	
dH_2O(灭菌蒸馏水)	8.5 μL	
Total	25 μL	

1.7　CCK-8 实验及平板克隆形成实验

1.7.1　细胞铺板　以 MG63 细胞为例。取处于对数生长期且细胞汇合度约为 80% 的 MG63 细胞,去除培养基后,经胰蛋白酶溶液消化呈悬浮状态时,终止消化并轻柔吹打使细胞全部脱壁。将细胞悬液置入 10 mL PE 管中,在 37 ℃恒温下,离心后去上清液,继续加入培养液,轻柔吹吸使细胞悬浮。分别吸取 10 μL 细胞悬液加入相应细胞计数板,计算悬液浓度以及吸取 3 000 个细胞所需悬液体积。继续轻柔吹吸离心管中悬液 50 次后,加入相应体积细胞悬液至 96 孔板的 6 组中,然后每孔添加培养液至 150 μL,周围孔取 100 μL PBS 溶液填充,铺完后“十字”摇匀。每次铺 4 块 96 孔板,分别用作 24 h、48 h、72 h 和 96 h 的 CCK-8 实验,每隔 48 h 换液。U2OS 细胞铺板步骤同 MG63 细胞。

1.7.2　细胞转染　转染步骤参照 Lipofectamine™ 2000 试剂盒说明书进行。

1.7.3　CCK-8 实验　转染完成后,在细胞箱中继续培养。每 24 h 取一块孔板,在每一孔中加入 10 μL CCK-8 溶液,继续培养 4 h。在酶标仪中震动10 min,用 490 nm 波长测定 OD 值,以 630 nm 为参考波长。

1.7.4　平板克隆形成实验　取培养于 10%胎牛血清 RPMI 培养基中的对指数生长期的 MG63、U2OS 细胞以及转染 miR-638 mimic 的 MG63、U2OS 细胞,分别制成每毫升 200 个细胞的细胞悬液。取 MG63/MG63-mimic 细胞系液 2 mL,U2OS/U2OS-mimic 细胞悬液取 4 mL,分别接种于六孔板的每一个孔中,使细胞分散均匀。六孔板置于 37 ℃ 、5% CO_2 的培养箱中培养 2 周。当培养皿中出现肉眼可见克隆时,终止培养。甲醇固定 15 min 后空气干燥。用 0.1%结晶紫进行染色 20 min,倒置显微镜观察超过 30 个细胞的菌落数。

1.8　数据处理及统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行 t 检验分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。基因相对表达量用 $2^{-\triangle\triangle CT}$法计算。

2　结　　果

2.1　qRT-PCR 实验检测骨肉瘤组织、癌旁组织、骨肉瘤细胞及正常人骨细胞中成熟的 miR-638 的表达水平

qRT-PCR 检测了 64 组骨肉瘤组织中成熟的 miR-638 的表达水平。结果显示与相应的非癌组织(对照组)相比有 36 组(56.25%)骨肉瘤组织中 miR-638 的表达是下调的($P<0.001$,图 1)。

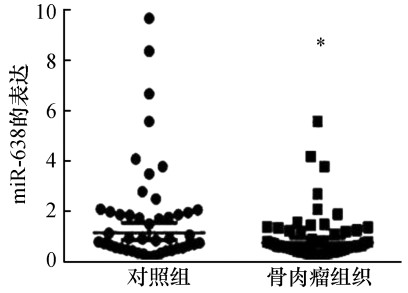

图 1　64 组骨肉瘤及癌旁组织中成熟的 miR-638 的表达水平　与对照组比较,*:$P<0.001$

实时荧光定量聚合酶链反应技术分别检测骨肉瘤 MG63、U2OS、HOS、SaOS2 细胞株和永生化的正常骨组织细胞株 NHOst(对照组)中的 miR-638 的表达水平。结果显示在骨肉瘤细胞株中 miR-638 的表达明显下调($P<0.001$,图 2)。

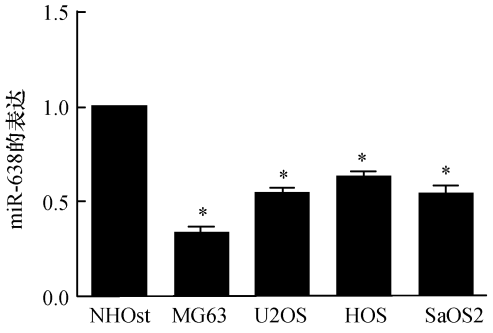

图 2　荧光定量 PCR 检测骨肉瘤 MG63、U2OS、HOS、SaOS2 细胞株与人正常骨组织细胞株 NHOst 中 miR-638 的表达

与对照组 NHOst 比较,*:$P<0.001$

2.2 CCK-8 实验检测 miR-638 的高表达或低表达对骨肉瘤 MG63 及 U2OS 细胞的增殖能力的影响 结果显示 miR-638 高表达能显著降低 MG63 和 U2OS 细胞的增殖能力($P<0.05$,见图 3)。抑制 miR-638 表达显著促进了 MG63 和 U2OS 细胞的生长($P<0.05$,图 4)。

2.3 平板克隆实验检测高表达 miR-638 对骨肉瘤 MG63 及 U2OS 细胞的集落形成能力的影响 结果显示 miR-638 的高表达能抑制人骨肉瘤 MG63 及 U2OS 细胞的增殖功能($P<0.05$,图 5、图 6)。

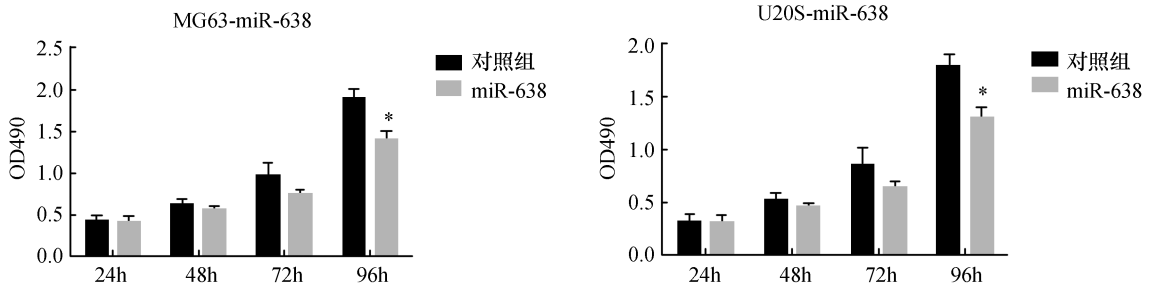

图 3 高表达 miRNA-638 抑制人 OS MG63 与 U20S 细胞增殖

与对照组比较,*:$P<0.05$

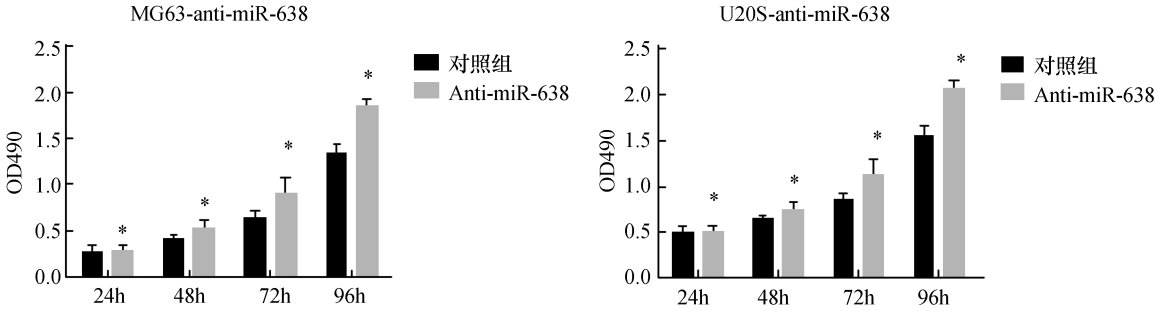

图 4 抑制 miR-638 的表达促进人 OS MG63 与 U20S 细胞增殖

与对照组比较,*:$P<0.05$

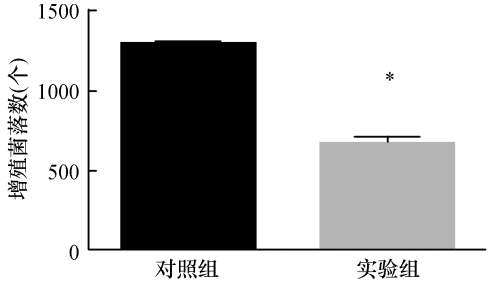

图 5 高表达骨肉瘤 U2OS 细胞中的 miR-638 会抑制其集落形成能力

与对照组比较,*:$P<0.05$

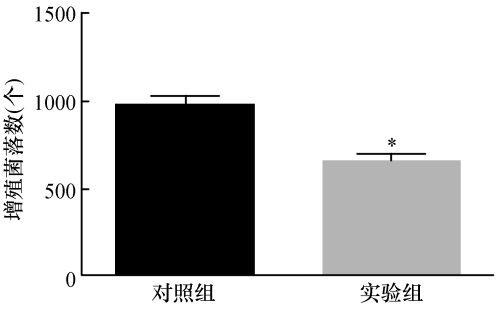

图 6 高表达骨肉瘤 MG63 细胞中的 miR-638 会抑制其集落形成能力

与对照组比较,*:$P<0.05$

3 讨 论

研究表明,OS 的病因极其复杂,同时还具有庞大基因组的不稳定性及高度异常的核型,多个染色体拷贝数的增加或者丢失会使得 OS 中多条染色体发生改变[3]。OS 的治疗包括手术、术前和术后的标准化疗或放疗,5 年生存率为 60%~70%;晚期诊断、转移性及复发性的肿瘤患者生存率更低(20%),而

其中位生存期仅为23个月[4]。为了监测OS的发展、改善OS患者的预后,探索一种能用于OS早期诊断的更方便、微创的方式,寻找新的治疗靶点成为OS诊断及治疗上亟需解决的问题。

深入研究发现,许多miRNA都在细胞增殖、凋亡、分化、运动等过程中起着重要调控作用。自20年前发现他们以来,生物信息学研究已经确定了超过1 000种的miRNA可参与人类基因组中一半基因的调节,每个miRNA可能控制数百个人类基因的转录[5]。超过50%的miRNA基因位于染色体脆弱位点,它的缺失或扩增对人类癌症有重要影响,提示miRNA直接参与肿瘤的发生过程[6]。2002年Calin等人发现miRNA-15a和miRNA-16-1可能与慢性淋巴细胞白血病的发病密切相关[7]。这一重要发现公布以后,人们逐渐在大量的肿瘤细胞系和临床肿瘤样本中发现了异常表达的miRNA,随后在动物模型实验也证实了miRNA对肿瘤的发生、发展有着重要作用[8]。

Tan等[9]人的研究发现在乳腺癌进展中,miR-638是最重要的因子之一,miR-638强制性表达可显著降低细胞增殖率及三阴乳腺癌细胞侵袭能力。在Ma的研究中[10]发现,大肠癌标本中的miR-638由于肿瘤分级不同而表达不同。miR-638抑制Sox2的表达,同时,miR-638表达水平与在人结直肠癌组织中Sox2 m RNA表达水平呈负相关,这些可以说明miR-638可以作为一种新的结直肠癌侵袭相关肿瘤抑制因子。

鉴于miR-638在前期研究中"抑癌基因"的作用,本实验采用实时荧光定量PCR的方法检测64组人OS组织及相应的非癌组织中成熟的miR-638的表达水平,结果显示与相应的非癌组织相比有36组(56.25%)OS组织中miR-638的表达是下调的,推测miR-638的表达下调可能对人OS的发生发展有促进作用,而并不能说明miRNA-638的表达与OS患者的生存率有显著相关性,同时miR-638的表达与性别、年龄,肿瘤的位置、大小、分期与分级也没有显著的联系。在CCK-8实验中,与相应的对照组相比,转染miR-638 mimic的实验组细胞增殖速度明显减慢,而转染miR-638 inhibitor的实验组细胞增殖速度明显加快。这与之前研究miRNA-638的"抑癌基因"作用一致。

值得提出的是,在转染mimic与inhibitor的实验组中,随着实验时间的推移,其增殖速度有一定的加快或减慢。主要考虑miR-638 mimic及inhibitor为瞬转,其mimic及inhibitor随着时间推移在细胞中逐渐降解,导致细胞增殖速度有一定变化。另外,CCK-8实验作为检测细胞存活与增殖的方法之一,其检测原理同常规的MTT略有差异,试剂生成物具有高度水溶性,所以简便了实验步骤也提高了实验的敏感性。有文献比较过两者的灵敏度和准确性,CCK-8法操作更简便,灵敏度高,准确性和重复性更好,是一种优于MTT法的检测细胞增殖活性的方法[11]。

本研究表明,在人OS组织中,miR-638呈低表达;miR-638的高表达显著抑制人OS MG63及U2OS的细胞增殖,而下调miR-638的表达能显著促进其增殖,为miRNA-638成为人OS新的有前景的治疗靶点提供了一定的理论依据。但还需继续进行体内荷瘤动物实验,及进一步研究miR-638抑制人OS细胞增殖的作用机制,为基础研究成果转化为临床生物治疗打下基础。

参考文献:

[1] Isakoff MS, Bielack SS, Meltzer P, et al. Osteosarcoma: current treatment and a collaborative pathway to success [J].J Clin Oncol,2015,33(27):3029-3035.

[2] Wang F,Lou JF,Cao Y,et al.miR-638 is a new biomarker for outcome prediction of non - small cell lung cancer patients receiving chemotherapy[J].Exp Mol Med,2015,47:e162.

[3] Mohseny A B,Szuhai K,Romeo S,et al.Osteosarcoma originates from mesenchymal stem cells in consequence of aneuploidization and genomic loss of Cdkn2[J].J Pathol, 2009,219(3):294-305.

[4] Fagioli F,Aglietta M,Tienghi A,et al.High-dose chemotherapy in the treatment of relapsed osteosarcoma: an Italian sarcoma group study[J].J Clin Oncol,2002,20(8):2150-2156.

[5] Hammond SM.An overview of microRNAs[J].Adv Drug Deliv Rev,2015, 87:3 - 14.

[6] Calin GA,Sevignani C,Dumitru CD,et al.Human micro RNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers[J].Proc Natl Acad Sci U S A,2004,101(9):2999-3004.

[7] Calin GA,Dumitru CD,Shimizu M,et al.Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia[J].Proc Natl Acad Sci U S A,2002,99(24):15524-15529.

(下转第363页)

丛神经阻滞对心率变异性的影响[J].临床麻醉学杂志,2016,32(9):853-856.

[2] 熊娅琴,倪娟,吴兰,等.剖宫产术硬膜外容量扩张下鞘内注射等比重布比卡因 ED50 的测定[J].四川大学学报:医学版,2015,46(6):953-956.

[3] 徐枫,杨承祥,邓硕曾.右美托咪定在围术期临床应用的研究进展[J].国际麻醉学与复苏杂志,2011,32(3):336-340.

[4] 李红,程艳欣,陈永学,等.右美托咪定对罗哌卡因臂丛神经阻滞半数有效浓度的影响[J].河北医科大学学报,2012,33(8):919-922.

[5] 徐端正.生物统计在药理学中的应用[M].北京科学出版社,1986:315-318.

[6] Dixon WJ.Staircase bioassay:the up-and-down method[J]. Neurosci Biobehav Rev,1991,15(1):47-50.

[7] Mcleod GA,Dael J,Robinson D.Detemrination of the EC_{50} of levobupivacaine for femoral and sciatic perineural infusion after total knee arthorplasty[J].Br JAnaesth,2009,102 (4):528 -533.

[8] 陈辉,许岚.α2 肾上腺素受体与痛觉调制[J].中国疼痛医学杂志,2013,19(8):490-494.

[9] 杨经文,李光婷,刘卫华,等.右美托咪定对小儿鼾症手术应激反应的影响[J].中国医院药学杂志,2015,35(3):244-246.

[10] Kimura M,Saito S,Obata H.Dexmedetomidine decreases hyperalgesia in neuropathic pain by increasingacetylcholine in the spinal cord[J].Neurosci Lett,2012,529(1):70-74.

(本文编辑:秦旭平)

(上接第 345 页)

[8] Takamizawa J,Konishi H,Yanagisawa K,et al.Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival[J]. Cancer Res,2004,64(11):3753-3756 .

[9] Tan X,Peng J,Fu Y,et al.miR-638 mediated regulation of BRCA1 affects DNA repair and sensitivity to UV and cisplatin in triple-negative breast cancer[J].Breast Cancer Res,2014,16(5):435.

[10] Ma K,Pan X,Fan P,et al.Loss of mi R-638 in vitro promotes cell invasion and a mesenchymal-like transition by influencing SOX2 expression in colorectal carcinoma cells[J].Mol Cancer,2014,13(1):118.

[11] 万文婷,李宁,刘静,等.CCK-8 法与 MTT 法检测人前列腺癌 PC3 细胞活性的比较研究[J].时珍国医国药,2010,21(12):3046-3048.

(本文编辑:蒋湘莲)