

MicroRNA-199a-3p 对人骨肉瘤细胞凋亡的影响

朱楠,张积森,荆珏华*,钱军,仇汪宝

(安徽医科大学第二附属医院骨科,安徽 合肥 230601)

[摘要] 目的:探讨 microRNA-199a-3p (miR-199a-3p) 对人骨肉瘤细胞凋亡的影响。方法:用合成的成熟 miR-199a-3p 序列模拟物(miR-199a-3p mimics)转染人骨肉瘤细胞(U2-OS),以阴性对照物序列(NC mimics)转染细胞作为阴性对照。转染后应用实时定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测各组细胞 miR-199a-3p 的表达量,Western blot 法检测各组细胞中髓样细胞白血病-1(MCL-1)蛋白的表达水平及多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP)的剪切情况,利用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率,并对实验结果进行统计学分析。结果:与对照组相比,转染 miR-199a-3p mimics 的实验组细胞中,miR-199a-3p 的表达量明显升高,MCL-1 蛋白的表达降低,PARP 蛋白的剪切水平增加,细胞的凋亡率增高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论:miR-199a-3p 可以有效促进骨肉瘤细胞的凋亡。

[关键词] 骨肉瘤;凋亡;microRNA-199a-3p;转染

[中图分类号] R738.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)02-159-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140207

Effects of microRNA-199a-3p on apoptosis of human osteosarcoma cells

Zhu Nan, Zhang Jisen, Jing Juehua*, Qian Jun, Qiu Wangbao

(Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601, China)

[Abstract] **Objective:** MicroRNA-199a-3p (miR-199a-3p) is down-regulated in many kinds of tumors, including osteosarcoma. This study was aimed to investigate the effect of miR-199a-3p on apoptosis of human osteosarcoma cells (U2-OS). **Methods:** Human osteosarcoma cells (U2-OS) were transfected with miR-199a-3p mimics or negative control mimics (NC mimics) as negative control. MiR-199a-3p expression level was detected by quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR). Expression level of myeloid cell leukemia-1 (MCL-1) protein and cleavage of poly ADP-ribose polymerase (PARP) were detected by Western blot. Cell apoptosis was detected by flow cytometry. **Results:** Compared with control group, miR-199a-3p expression level of experiment group was significantly up-regulated, MCL-1 protein expression was reduced, cleavage level of PARP was increased and cell apoptosis rate of experiment group was significantly increased. The differences between experimental and control groups have statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion:** MiR-199a-3p can dramatically promote apoptosis of human osteosarcoma cells.

[Key words] osteosarcoma; apoptosis; microRNA-199a-3p; transfection

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(02): 159-163]

骨肉瘤是最常见的原发性恶性骨肿瘤,好发于长骨的干骺端,最常见于股骨远端及胫骨近端。骨肉瘤基因水平的治疗一直是研究的热点。MicroRNA (miRNA) 是近年来新发现的一类非编码小分子 RNA,长度约 22 个核苷酸,广泛存在于真核生物中。miRNA 的主要功能是负调控基因的表达。miRNA 通

过与其目的基因 mRNA 的 3'-UTR 形成不完全或完全碱基互补配对,达到抑制或降解目的 mRNA 的作用,从而调节靶基因的表达^[1]。研究发现,miR-199a-3p 在骨肉瘤细胞中表达明显下调,与细胞的侵袭及转移密切相关^[2]。然而,miR-199a-3p 在骨肉瘤细胞凋亡中的影响尚未见报道。本研究通过合成 miR-199a-3p 的模拟物转染人骨肉瘤细胞系 U2-OS 细胞,上调骨肉瘤细胞中 miR-199a-3p 的表达量,检测细胞中髓样细胞白血病-1 (myeloid cell leukemia-1,

[基金项目] 安徽医科大学校科研基金(2013xkj033)

*通信作者(Corresponding author), E-mail:jjhhu@sina.com

MCL-1)蛋白表达量变化、多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase,PARP)剪切情况及细胞凋亡率变化,旨在探讨 miR-199a-3p 对人骨肉瘤细胞凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

人骨肉瘤细胞系 U2-OS 细胞(中国科学院细胞库)。成熟 miR-199a-3p 序列模拟物(miR-199a-3p mimics)及阴性对照物序列(NC mimics)(上海吉玛公司合成),合成序列分别为:5'-ACAGUAGUCUG-CACAUUGGUUA-3'和 5'-UUCUCCGAACGUGUCA-CGUTT-3'。胎牛血清及 DMEM 培养基(Gibco 公司,美国)。转染试剂 Lipofectamine™2000 和 TRIzol 试剂(Invitrogen 公司,美国)。TaKaRa 逆转录试剂盒及荧光定量 PCR 试剂盒(大连宝生物工程有限公司)。二甲基亚砜(DMSO,Sigma 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染

U2-OS 细胞在含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,37℃、CO₂ 体积分数为 5%条件下培养,24~48 h 换液 1 次。取对数生长期细胞接种于 6 孔板。实验设置空白对照组(不做处理)、阴性对照组(转染 NC mimics)和实验组(转染 miR-199a-3p mimics)。待 U2-OS 细胞汇片面积达 80%,更换新鲜培养基,利用 Lipofectamine™2000 及 OPTI-MEM 将模拟物转染细胞,8 h 后换液,48 h 后收获细胞用于后续检测。

1.2.2 qRT-PCR 检测各组细胞中 miR-199a-3p 的表达量

首先,应用 TRIzol 试剂盒提取各组细胞总 RNA,用分光光度计定量检测样品浓度及 RNA 是否合格。合格的 RNA 样品用 TaKaRa 逆转录试剂盒及实时荧光定量 PCR 试剂盒检测 miR-199a-3p 在 3 份样品中的差异表达情况。逆转录反应条件为:37℃ 15 min;85℃ 10 s。qRT-PCR 反应内参选择 U6,反应程序为:segment 1 (cycle 1;95℃ 30 s),segment 2 (cycle 40;95℃ 5 s;60℃ 34 s),segment 3 (cycle 1;95℃ 15 s;60℃ 60 s;95℃ 15 s)。反应结束后得到各个标本中目的基因和内参 U6 的 Ct 值,将空白对照组的 miR-199a-3p 表达量设为 1,根据公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [$\Delta\Delta Ct=(Ct_{target}-Ct_{U6})_{test}-(Ct_{target}-Ct_{U6})_{calibration}$] 计算分别得到阴性对照组及实验组目的基因 miR-199a-3p 的相对含量,再根据 3 次实验结果得到的各组目

的基因相对表达量的平均值及标准差做图,并进行统计学分析。miR-199a-3p 的逆转录引物及 qRT-PCR 反应引物设计如下:逆转录引物:5'-GTCC-TATCCAGTGCCTGTCGTGGAGTCGGCAATTGCACT-GGATACGACTAACCAAT-3',上游引物:5'-GCCA-CAGTAGTCTGCACAT-3',下游引物:5'-CAGT-GCG-TGTCGTGGAGT-3'。内参 U6 的逆转录引物及 qRT-PCR 反应引物设计如下:逆转录引物:5'-CGCTTACGAATTTGCGTGTGCAT-3',上游引物:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',下游引物:5'-AACGC-TTCACGAATTTGCGT-3'。

1.2.3 Western blot 法检测各组细胞中 MCL-1 蛋白的表达量及 PARP 的剪切情况

利用 SDS-PAGE 电泳分离各组细胞的蛋白质,并转移到 NC 膜上。脱脂奶粉加 TBST 溶液,配制 50 ml 的封闭液,4℃冰箱内封闭过夜。倒出封闭液,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。倒出 TBST,加入 anti-MCL-1 (1:1 000,Abcam,美国),anti-β-actin (1:3 000,Abcam,美国),anti-PARP (1:1 000,Santa Cruz,美国),室温摇床上慢速孵育 1.5 h。吸取一抗,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。倒出 TBST,分别加入相应的二抗,室温摇床上慢速孵育 40 min。吸取二抗,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。倒出 TBST,加入适量的显影底物,观察 MCL-1 蛋白条带的浓度变化及 PARP 的剪切情况,并应用 Image J 软件检测实验结果中各组细胞的 β-actin 蛋白与 MCL-1 蛋白条带的灰度比值,对 MCL-1 蛋白的表达进行半定量。

1.2.4 流式细胞仪检测转染后各组细胞凋亡率

转染 48 h 后收集各组细胞,制成单细胞悬液,PBS 洗涤 2 次,按照凋亡检测试剂盒操作说明采用 Annexin V-PI 双染,避光放置 10 min,利用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.3 统计学方法

所有实验进行 3 次,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS16.0 统计软件对实验结果进行 t 检验分析, $P \leq 0.05$ 判定为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染后各组细胞中 miR-199a-3p 相对表达量

应用实时荧光定量 PCR 技术检测实验组和阴性对照组细胞中 miR-199a-3p 的相对表达量,实验重复 3 次。实验组为 8.31 ± 0.60 ,阴性对照组为 1.46 ± 0.55 ,空白对照组的表达量设为 1。结果显示,实验组细胞中 miR-199a-3p 的表达明显上调,表达

量与对照组相比, 差异有明显统计学意义 ($P < 0.01$, 图 1)。

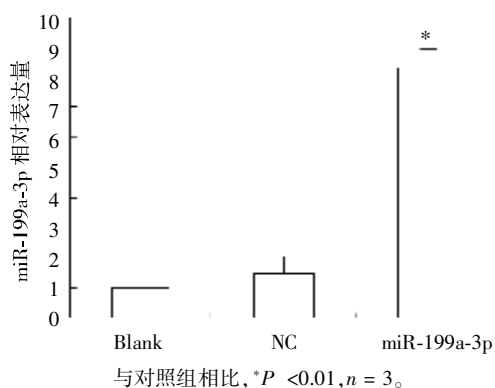
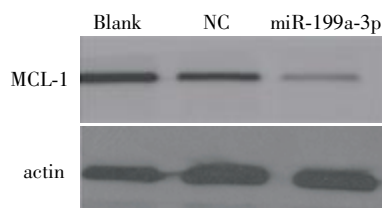


图 1 转染后各组细胞中 miR-199a-3p 的相对表达水平

Figure 1 qRT-PCR analysis of miR-199a-3p expression level after transfection

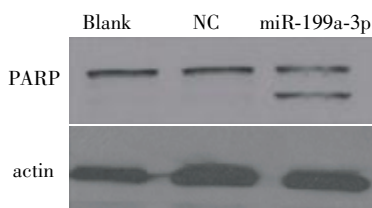
2.2 转染后各组细胞中 MCL-1 蛋白含量及 PARP 剪切情况



与对照组相比, * $P < 0.01$, $n = 3$ 。

图 2 转染后 U2-OS 细胞中 MCL-1 蛋白的表达水平变化

Figure 2 MCL-1 protein level in U2-OS cells after transfection with miR-199a-3p mimics or negative control detected by Western blotting



与对照组相比, 实验组细胞 PARP 出现明显剪切条带。

图 3 转染后 U2-OS 细胞中 PARP 蛋白的激活剪切情况

Figure 3 Cleavage level of PARP protein in U2-OS cells after transfection with miR-199a-3p mimics or negative control detected by Western blotting

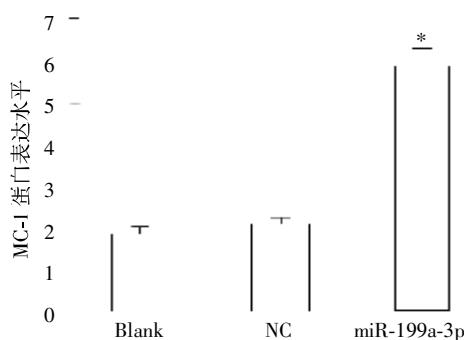
3 讨论

骨肉瘤的恶性程度高, 预后差, 即使采用手术联合化疗方案, 患者 5 年生存率不超 70%^[3]。由于当前的治疗效果仍然不理想, 因此在基因水平治疗骨肉

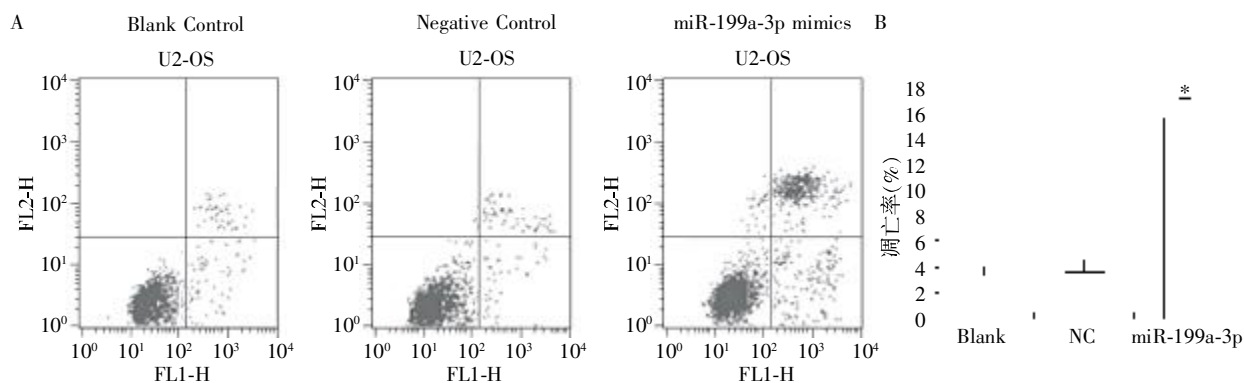
瘤一直是研究的热点内容, 而找到有效的治疗靶点是关键所在。研究表明 miRNA 可以调节多种重要生物学过程, 在多种信号通路以及细胞的分化、凋亡、增殖及肿瘤进展的调控中均扮演重要角色^[4]。miRNA 可以作为抑癌基因。研究证明, 在约 68% 的 B 淋巴细胞白血病 (B-CLL) 患者中, miR-16 与 miR-15 的表达明显下调甚至缺失, miR-15 与 miR-16 主要通过下调 Bcl-2 抗凋亡蛋白的表达来发挥其肿瘤抑制作用^[5]。miRNA 也可以作为癌基因。有证据表明, miR-155 可以通过与癌基因 myc 的相互作用而发挥其强致癌作用^[6]; miR-372 与 miR-373 可以激活细胞周期蛋白依赖激酶 CDK2 (cyclin-dependent kinase), 直接抑制抑癌基因 LATS2 的活性, 从而促进肿瘤的生长^[7]。miRNA 也可以同时作为抑癌基因和癌基因。例如, 在 HeLa 细胞中, 抑制 miR-24 的表达可以促进

2.3 转染后各组细胞的凋亡情况

利用流式细胞仪检测转染后各组细胞的凋亡率, 实验重复 3 次。实验组的凋亡率为 (15.36 ± 1.46)%, 阴性对照组的凋亡率为 (3.55 ± 0.86)%, 空白对照组的凋亡率为 (3.30 ± 0.70)%。实验组细胞凋亡率明显升高, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 4)。



瘤一直是研究的热点内容, 而找到有效的治疗靶点是关键所在。研究表明 miRNA 可以调节多种重要生物学过程, 在多种信号通路以及细胞的分化、凋亡、增殖及肿瘤进展的调控中均扮演重要角色^[4]。miRNA 可以作为抑癌基因。研究证明, 在约 68% 的 B 淋巴细胞白血病 (B-CLL) 患者中, miR-16 与 miR-15 的表达明显下调甚至缺失, miR-15 与 miR-16 主要通过下调 Bcl-2 抗凋亡蛋白的表达来发挥其肿瘤抑制作用^[5]。miRNA 也可以作为癌基因。有证据表明, miR-155 可以通过与癌基因 myc 的相互作用而发挥其强致癌作用^[6]; miR-372 与 miR-373 可以激活细胞周期蛋白依赖激酶 CDK2 (cyclin-dependent kinase), 直接抑制抑癌基因 LATS2 的活性, 从而促进肿瘤的生长^[7]。miRNA 也可以同时作为抑癌基因和癌基因。例如, 在 HeLa 细胞中, 抑制 miR-24 的表达可以促进



与对照组相比, * $P < 0.01$, $n = 3$ 。

图4 转染后 U2-OS 细胞凋亡率的变化

Figure 4 The apoptosis rate of U2-OS cells after transfection with miR-199a-3p mimics or negative control detected by flow cytometry

细胞增殖^[8]。而在肺泡上皮细胞癌中,下调 miR-24 的表达则能够显著抑制细胞的增殖。

目前已有较多研究证实,多种 miRNA 在骨肉瘤的发生、发展中起到关键作用,参与骨肉瘤的侵袭、转移及耐药性等多种生物学过程,并扮演重要角色^[9-17]。miR-199a-3p 是一种具有肿瘤抑制作用的 miRNA,已被证实在多种肿瘤细胞中呈低表达状态^[18-19]。Duan 等^[2]研究表明,miR-199a-3p 在骨肉瘤组织中低表达,且通过下调 mTOR、Met、Stat3 等基因的表达,来抑制骨肉瘤的侵袭及转移等。但是,miR-199a-3p 在骨肉瘤细胞凋亡中的影响及作用机制尚未见相关报道。因此,本研究通过体外培养人骨肉瘤细胞 U2-OS,并用人工合成的 miR-199a-3p mimics 转染细胞,获得 miR-199a-3p 含量增高的骨肉瘤细胞,初步研究其在骨肉瘤细胞凋亡中的作用。Western blot 法实验结果显示,高表达 miR-199a-3p 的实验组细胞中的抗凋亡蛋白 MCL-1 的含量较对照组明显降低。另外,PARP 是细胞凋亡核心成员 caspase 的切割底物,PARP 的激活是细胞凋亡的重要标志,本研究中实验组细胞 PARP 的全长片段减弱,剪切体含量较高,出现裂解激活,表明实验组细胞发生的凋亡比对照组更为明显。通过流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率发现,高表达 miR-199a-3p 的实验组细胞的凋亡率明显高于对照组,差异有统计学意义。

miRNA 在促进骨肉瘤的诊断及治疗中具有重要潜能,miRNA 作为一种新兴的、有效的基因治疗工具,其在抗肿瘤等新型药物的研发及治疗中拥有广阔的应用前景。本研究表明,miR-199a-3p 可以明显促进骨肉瘤细胞凋亡,其表达量或许可作为判断预后的一项新的重要指标。随着研究的不断发展,

miR-199a-3p 可能会成为一个新的治疗骨肉瘤的基因靶点。另外,本研究尚缺乏体内试验证据等不足之处,miR-199a-3p 对骨肉瘤细胞凋亡的调控机制也有待于更进一步的研究。再者,miRNA 要实际应用到骨肉瘤的诊断及治疗中,还具有许多不足的地方,如人工合成的 miRNA 稳定性差,靶向性差等,阻碍了其在临床上的应用。一旦解决了 miRNA 技术发展的关键问题,必将带来新的治疗技术的革新。所以,miRNA 技术的研究和应用具有十分重要的意义。

[参考文献]

- [1] Kobayashi E, Hornicek FJ, Duan Z. MicroRNA involvement in osteosarcoma[J]. *Sarcoma*, 2012, 2012: 359739
- [2] Duan Z, Choy E, Harmon D, et al. MicroRNA-199a-3p is downregulated in human osteosarcoma and regulates cell proliferation and migration [J]. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10(8):1337-1345
- [3] Ottaviani G, Jaffe N. The epidemiology of osteosarcoma [J]. *Cancer Treat Res*, 2009, 152(1):3-13
- [4] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2):281-297
- [5] Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(39):13944-13949
- [6] Shreeram S, Hee WK, Demidov ON, et al. Regulation of ATM/p53-dependent suppression of myc-induced lymphomas by Wip1 phosphatase [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(13):2793-2799
- [7] Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, et al. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors[J]. *Cell*, 2006, 124(6):1169-1181
- [8] Cheng A M, Byrom MW, Shelton J, et al. Antisense inhi-

- bition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(4): 1290-1297
- [9] Osaki M, Takeshita F, Sugimoto Y, et al. MicroRNA-143 regulates human osteosarcoma metastasis by regulating matrix metalloprotease-13 expression [J]. *Mol Ther*, 2011, 19(6): 1123-1130
- [10] Zhang H, Cai X, Wang Y, et al. microRNA-143, down-regulated in osteosarcoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity by targeting Bcl-2 [J]. *Oncol Rep*, 2010, 24(5): 1363-1369
- [11] Yan K, Gao J, Yang T, et al. MicroRNA-34a inhibits the proliferation and metastasis of osteosarcoma cells both in vitro and in vivo [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33778
- [12] Liu LH, Li H, Li JP, et al. miR-125b suppresses the proliferation and migration of osteosarcoma cells through down-regulation of STAT3 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 416(1-2): 31-38
- [13] Zhu J, Feng Y, Ke Z, et al. Down-regulation of miR-183 promotes migration and invasion of osteosarcoma by targeting Ezrin [J]. *Am J Pathol*, 2012, 180(6): 2440-2451
- [14] Song B, Wang Y, Xi Y, et al. Mechanism of chemoresistance mediated by miR-140 in human osteosarcoma and colon cancer cells [J]. *Oncogene*, 2009, 28 (46): 4065-4074
- [15] Song B, Wang Y, Titmus MA, et al. Molecular mechanism of chemoresistance by miR-215 in osteosarcoma and colon cancer cells [J]. *Mol Cancer*, 2010, 9(1): 96
- [16] Ziyan W, Shuhua Y, Xiufang W, et al. MicroRNA-21 is involved in osteosarcoma cell invasion and migration [J]. *Med Oncol*, 2011, 28(4): 1469-1474
- [17] Fan L, Wu Q, Xing X, et al. MicroRNA-145 targets vascular endothelial growth factor and inhibits invasion and metastasis of osteosarcoma cells [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2012, 44(5): 407-414
- [18] Jiang J, Gusev Y, Aderca I, et al. Association of microRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(2): 419-427
- [19] Ichimi T, Enokida H, Okuno Y, et al. Identification of novel microRNA targets based on microRNA signatures in bladder cancer [J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(2): 345-352

[收稿日期] 2013-07-13