

microRNA-145 抑制骨肉瘤生长以及血管形成的动物实验研究

范磊,袁同洲*,陈琦,魏新程,杜江

(南京医科大学第二附属医院骨科,江苏 南京 210011)

[摘要] 目的:研究 microRNA-145(miRNA-145)对于裸鼠体内骨肉瘤细胞生长和微血管形成的影响。方法:Balb/c 裸鼠 16 只,随机分为对照组和实验组,每组 8 只,对照组用未转染的 MG63 细胞建立骨肉瘤动物模型,实验组用转染 miRNA-145 模拟物的 MG63 细胞建立骨肉瘤动物模型。荷瘤裸鼠饲养 4 周,比较两组成瘤率、瘤体大小、瘤体重量,用免疫组织化学检测两组裸鼠瘤体 VIII 因子和血管内皮生长因子(VEGF)的表达,并计算微血管密度。结果:对照组裸鼠成瘤率 87.5%,实验组裸鼠成瘤率 37.5%,实验组裸鼠肿瘤大小、重量明显低于对照组,实验组肿瘤 VEGF 的表达较对照组明显降低,微血管密度计数明显降低,有统计学意义($P < 0.05$)。结论:miRNA-145 可以降低荷瘤裸鼠的成瘤率,抑制肿瘤的体内生长和肿瘤血管的形成。

[关键词] 骨肉瘤;miRNA-145;VEGF;VIII 因子;MVD

[中图分类号] R738.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)02-160-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20150204

Effects of microRNA-145 on growth and angiogenesis of osteosarcoma cells in vivo

Fan Lei, Yuan Tongzhou*, Chen Qi, Wei Xincheng, Du Jiang

(Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effects of microRNA-145(miRNA-145) on growth and angiogenesis of osteosarcoma in vivo. **Methods:** Sixteen nude mice(Balb/c)were randomly divided into 2 groups, experimental group and control group, with 8 mice in each group. The animal model of experimental group was constructed by subcutaneous inoculation of osteosarcoma cells transfected with miRNA-145, and control group using subcutaneous inoculation of osteosarcoma cells. The osteosarcoma-bearing nude mice were feeded for 4 weeks. After 4 weeks, tumor formation rate, size, and weight of tumor were observed in each group. VIII factor expression and VEGF expression of tumor were detected by immunohistochemistry and microvessel density were calculated. **Results:** The tumor formation rate is 87.5% and 37.5% in control group and experimental group respectively. The size and weight of tumor in experimental group is significantly less than that of the control group($P < 0.05$). The VEGF expression and MVD of tumor in the experimental group is significantly lower than those in that of the control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** miRNA-145 can inhibit osteosarcoma formation of nude mice, and inhibit growth and angiogenesis of tumor in vivo.

[Key words] osteosarcoma; miRNA-145; VEGF; VIII factor; MVD

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(02): 160-163, 168]

骨肉瘤发病率在原发性恶性骨肿瘤中占据首位,该肿瘤恶性程度甚高,预后极差,即使采用手术与手术前后辅助化疗相结合的综合治疗方案,患者 5 年生存率仍只有 55%~68%^[1],其预后不良的主要原因是早期发生转移扩散,当前的抗转移治疗尚不能获得满意效果,而且全身化疗的不良反应大,对人体各脏器都有一定的损伤。骨肉瘤的侵袭及转移

严重影响着患者的生活质量和预后,基因水平的治疗一直是骨肉瘤研究中的热点,而寻求有效的治疗靶点是问题的关键^[2-3]。

最近研究表明, microRNA(miRNA)在肿瘤发生发展中发挥重要作用,这一发现为肿瘤的诊断和治疗提供了新思路。miRNA 是近年来新发现的一类长度为 22~28 个核苷酸的非编码小分子 RNA,广泛存在于真核生物中,miRNA 的前体是 pre-miRNA,通过 Dicer 酶和水解酶的作用被剪切水解最终形成长度约为 22 nt 的单链 miRNA 结构^[3-4]。miRNA 通过与靶

[基金项目] 南京医科大学校级基金资助(2013NJMU050)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: ytz2047@hotmail.com

mRNA 3'-UTR 完全或不完全的互补结合, 导致靶 miRNA 降解或翻译抑制, 从而调控靶基因的表达, 影响细胞的生物学行为^[5-8]。已有大量研究表明 miRNA 作为癌基因或抑癌基因参与肿瘤的发生发展过程, 每种 miRNA 具有多个靶基因, 形成一个复杂的网络调节系统^[9-10]。因此, miRNA 为恶性肿瘤的基因治疗提供了一个新的可供选择的策略和技术平台。

miRNA-145 是 miRNA 家族中的重要成员之一, 被认为是一种肿瘤抑制基因, 已有相关文献报道其在多种恶性肿瘤中低表达^[11-13], 对于 miRNA-145 的研究大多集中在调控肿瘤形成及凋亡上^[14-16], 最新研究发现 miRNA-145 不仅能够抑制肿瘤形成与生长, 而且可抑制肿瘤细胞侵袭转移^[17]。然而这些研究都是体外实验研究, 本研究通过上调骨肉瘤细胞 (MG63) 中 miRNA-145 的表达, 观察其对骨肉瘤细胞动物体内生物学行为的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

骨肉瘤细胞株 MG63 (CCTCC, 武汉); Balb/c 裸鼠 (湖南史莱克景达实验动物有限公司), 鼠龄 3~4 周, 雌雄各半, 体重无明显差异, SPF 级饲养。

胎牛血清 (Sigma 公司, 美国); RPMI-1640 培养基 (Gibco 公司, 美国); 胰蛋白酶 (四季青公司, 杭州); EDTA (四季青公司, 杭州); 脂质体 2000 (Invitrogen 公司, 美国); miRNA-145 模拟物和含有 Cy3 荧光素标记的对照 (锐博公司, 广州); 鼠抗人 VEGF 一抗 (博士德公司, 武汉); 鼠抗人 VIII 因子一抗 (博士德公司, 武汉); GAPDH 抗体 (博士德公司, 武汉); HRP 标记的羊抗小鼠二抗 (博士德公司, 武汉); 高速离心机 (Sigma 公司, 美国); 超净化工作台 (苏州净化设备公司); 细胞培养箱 (Heraeus 公司, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和基因转染

人骨肉瘤 MG63 细胞在含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 37℃ 5% CO₂ 条件下培养, 1~2 d 换液 1 次, 2~4 d 传代 1 次。取对数生长期细胞接种于 6 孔板, 分为对照组 (未转染组) 和实验组 (转染 miRNA-145 模拟物组), 用脂质体将 miRNA-145 模拟物转染入骨肉瘤细胞中, 转染后 24 h 荧光显微镜下根据红色荧光蛋白的表达观察转染效率。

1.2.2 动物分组和荷瘤模型建立

Balb/c 裸鼠共 16 只, 周龄和体重无明显差异, 随机分为对照组和实验组, 每组 8 只, 雌雄各半。对照组用未转染的 MG63 细胞建立骨肉瘤模型, 实验组用转染 miRNA-145 模拟物的细胞作为实验组。将细胞用胰酶消化后制成细胞悬液, 调节细胞密度为 3×10⁷ 个/ml, 裸鼠局部皮肤消毒, 每只裸鼠大腿根部皮下注射细胞悬液 0.5 ml, 注射细胞悬液时, 注射器针头在皮下潜行一段距离, 缓慢推注及拔针, 拔针后局部稍按压 30 s, 防止细胞悬液漏出影响实验结果。

1.2.3 裸鼠一般情况观察

继续饲养裸鼠, 观察裸鼠的一般情况及接种处局部情况, 4 周后比较两组成瘤率和瘤体大小; 麻醉下处死裸鼠, 完整取出瘤体, 观察肿瘤大体标本, 测量肿瘤重量。

1.2.4 免疫组织化学检测瘤体 VIII 因子和血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达

4 周后处死裸鼠, 取出生成的肿瘤团块, 常规固定, 石蜡包埋, 切片, 行 VIII 因子和 VEGF 免疫组织化学染色。光学显微镜下根据 VIII 因子染色测量瘤体微血管密度 (MVD) 以及观察 VEGF 表达的变化。微血管密度测量方法^[18]: 选取染色较好并具有代表性的组织 VIII 染色切片测量 MVD, 排除切片中的出血区和边缘反应区, 100 倍光学显微镜下确定切片中血管密度最高的区域, 然后 200 倍镜下计数 5 个视野中肿瘤内微血管数目, 计算平均值表示 MVD。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计学软件进行 *t* 检验及方差分析, 组间比较 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 观察转染效率

miRNA-145 模拟物转染 24 h 后, 荧光倒置显微镜下观察各组细胞中红色荧光, 转染效率均为 70% 以上^[19] (图 1)。

2.2 成瘤过程和成瘤率的观察

对照组中 7 只裸鼠接种肿瘤细胞 5 d 后发现皮下逐渐出现瘤体形态, 4 周后均出现直径为 (1.6 ± 0.3) cm 的肿块, 成瘤率 87.5%; 实验组中 3 只裸鼠接种肿瘤细胞 7 d 后皮下逐渐出现瘤体形态, 4 周后瘤体直径达到 (1.1 ± 0.2) cm, 成瘤率 37.5%。荷瘤裸鼠饲养中均可发现形成的瘤体周围出现较多的皮下血管, 呈放射状分布, 实验组中 1 例瘤体表面形成溃疡, 实验组裸鼠形成肿瘤大小明显小于对

对照组($P < 0.05$,图 2~3)。4 周后处死裸鼠,取出瘤体,电子天枰称重,对照组瘤体重量为(1.8 ± 0.4)g,实验组瘤体重量为(1.0 ± 0.2)g,有统计学意义($P < 0.05$,图 2~3)。

2.3 瘤体微血管生成情况

对照组肿瘤组织坏死不明显,血管染色丰富,MVD 为 17.1 ± 1.8 ;实验组肿瘤组织肿瘤血管染色较对照组明显减少,MVD 为 9.4 ± 0.8 。MVD 明显低

于对照组,有统计学意义($P < 0.05$,图 4)。

2.4 瘤体 VEGF 表达的变化

VEGF 的表达定位于细胞膜、胞浆和基质中,阳性细胞表现为胞浆、胞膜上呈弥漫性的棕黄色或棕褐色细颗粒状染色,细胞核为蓝染。在光学显微镜下进行阳性细胞计数,miRNA-145 转染组阳性细胞数较对照组明显降低,有统计学意义($P < 0.05$,图 5)。

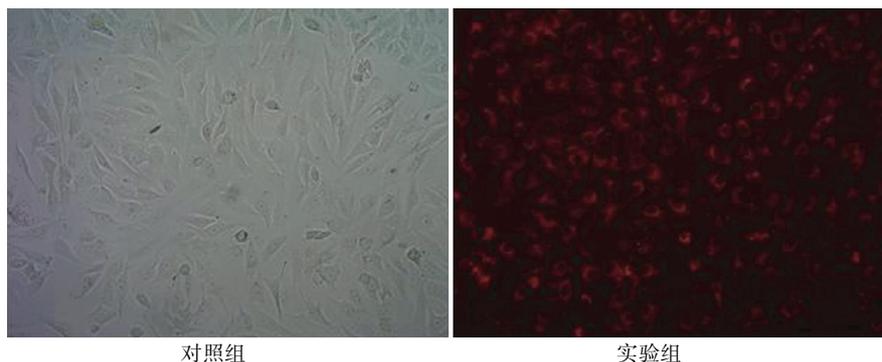


图 1 荧光显微镜下观察 miRNA-145 模拟物的转染效率

Figure1 Transfection efficiencies observed by fluorescence microscope



图 2 瘤荷裸鼠成瘤大及瘤体形态

Figure 2 Tumor formation and form of tumor in osteosarcoma-bearing nude mice

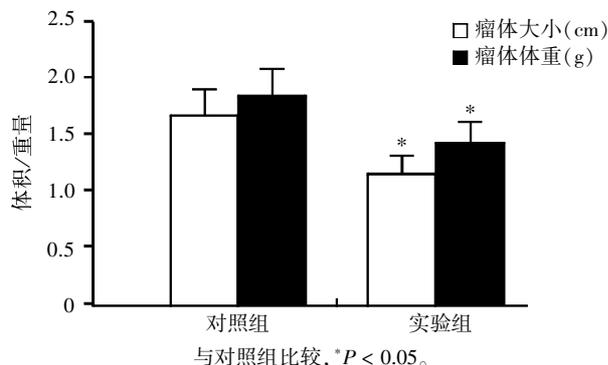


图 3 瘤体大小及重量柱状图

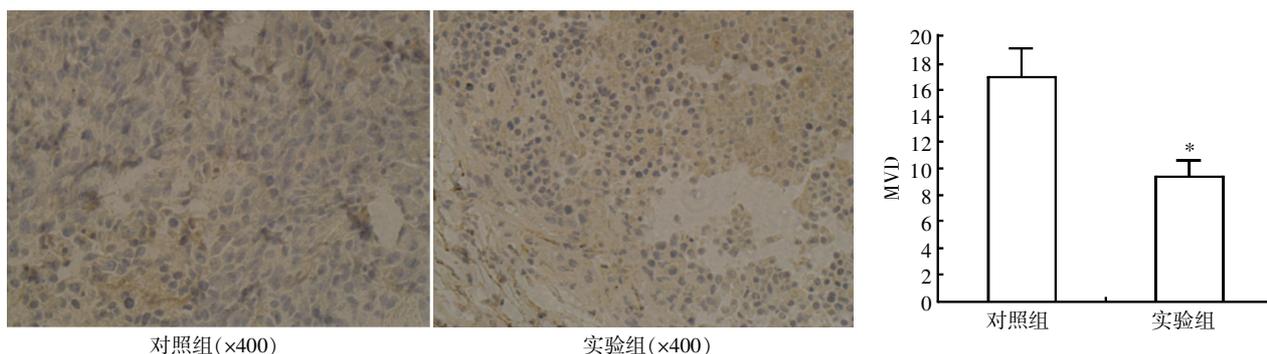
Figure 3 Histogram of tumor size and weight

骨肉瘤是常见的原发性恶性骨肿瘤,由于恶性程度高,预后差的特点,即使采用手术联合化疗的综合治疗方案,治疗效果仍然不佳,并且全身化疗的不良反较大,对人体各个脏器都有一定损伤,患者往往不愿意接受。基因水平治疗一直是骨肉瘤研

究中的热点,但具体分子学机制以及治疗手段仍有待进一步研究,寻求有效的治疗靶点是基因治疗首先需要解决的问题。当前研究已经提示 miRNA 具有广泛的基因调节功能,它能对基因活动的各个层面进行调节以及参与一系列的生物学进程如细胞增殖、细胞凋亡、细胞侵袭、胚胎发育、能量代谢等^[3,9-10]。

相关报道已经证实 miRNA-145 在多种恶性肿瘤细胞中低表达,被认为是一种肿瘤抑制基因^[12-13]。目前研究表明 miRNA-145 具有多个靶基因位点,例如 c-Myc、IRS-1、BNIP-3 等细胞周期相关基因,可以通过调节这些靶基因的活动进一步影响肿瘤的发生、发展及凋亡^[13-15]。

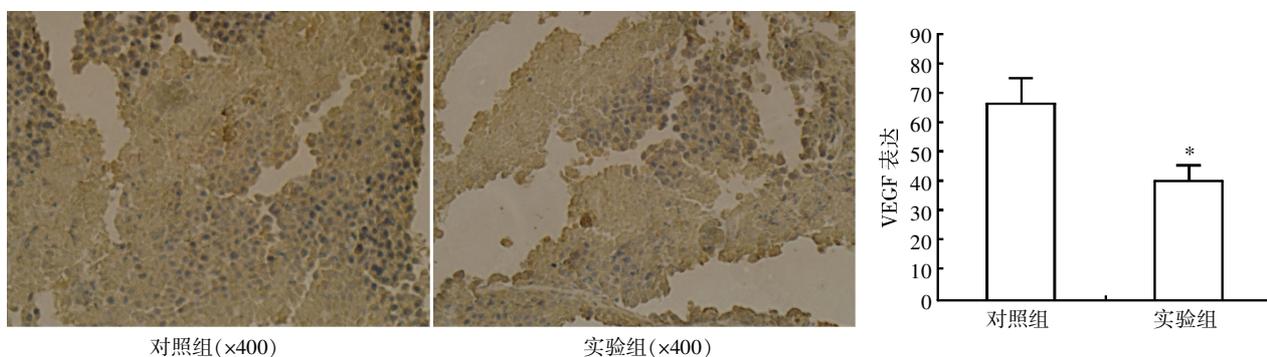
本研究中转染 miRNA-145 模拟物组裸鼠的成瘤率与对照组相比降低,4 周后肿瘤大小和重量明显减小。转染 miRNA-145 模拟物组形成瘤体组织中的 MVD 以及 VEGF 表达量明显降低。在体外实验



与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 4 肿瘤 VIII 因子免疫组织化学染色

Figure 4 Immunohistochemical staining of factor VIII in tumor



与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 5 肿瘤 VEGF 免疫组织化学染色

Figure 5 Immunohistochemical staining of VEGF in tumor

的基础上进一步从体内动物实验的角度验证了 miRNA-145 对于骨肉瘤的生长有抑制作用。VEGF 与肿瘤血管形成高度相关, 并且其表达与骨肉瘤患者的预后呈负相关, 即 VEGF 表达增高时, 肿瘤血管形成较多, 提示患者预后较差^[20]。之前本课题组的研究表明, VEGF 是 miRNA 的一个靶基因, 与本研究的结果一致, 但是本文推测可能存在其他转导通路 miRNA 抑制骨肉瘤的生长从而引起 VEGF 的表达量降低, 有待今后进一步研究。

骨肉瘤的发生发展是一个复杂的多因素过程, 转染 miRNA-145 不能完全消除肿瘤, 只能抑制其生长和增殖, 单基因治疗很难取得良好的治疗效果, 因此骨肉瘤的基因治疗以及复杂的基因调控网络系统仍需进一步探索和研究。

[参考文献]

[1] Ottaviani G, Jaffe N. The epidemiology of osteosarcoma[J]. *Cancer Treat Res*, 2009, 152(1): 3-13
[2] 范 磊, 邵增务. 小分子干扰 RNA 基因沉默与骨肉瘤治疗[J]. *国际骨科学杂志*, 2011, 32(1): 30-32
[3] 范 磊, 吴 强, 魏玉龙, 等. MicroRNA-145 对骨肉瘤

细胞增殖及凋亡的影响[J]. *中国癌症杂志*, 2012, 22(4): 247-249
[4] Bartel DP. microRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297
[5] Zeng Y. Principles of micro-RNA production and maturation[J]. *Oncogene*, 2006, 25(45): 6156-6162
[6] Volk N, Shomron N. Versatility of MicroRNA biogenesis [J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19391
[7] Zamore PD, Haley B. Ribo-gnome: the big world of small RNAs[J]. *Science*, 2005, 309(5740): 1519-1524
[8] Shin C, Nam JW, Farh KK, et al. Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing [J]. *Mol Cell*, 2010, 38(6): 789-802
[9] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(4): 259-269
[10] Hammond SM. microRNAs as tumor suppressors [J]. *Nat Genet*, 2007, 39(5): 582-583
[11] Brennecke J, Stark A, Russell RB, et al. Principles of microRNA-target recognition [J]. *PLoS Biol* 2005, 3(3): e85
[12] Wang X, Tang S, Le SY, et al. Aberrant expression of onco-

(下转第 168 页)