

· 基础研究 ·

## miR-1247对骨肉瘤细胞增殖、凋亡的影响及机制研究

胡 华,周 忠

华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院骨科, 湖北 武汉 430014

**[摘要]** 目的:检测 microRNA-1247(miR-1247)在骨肉瘤细胞系中的表达及对骨肉瘤细胞增殖和凋亡的影响和机制。方法:采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)测定 miR-1247 在人正常成骨细胞系(U2OS、Saos-2、143B)及人骨肉瘤细胞系(hFOB1.19)中的表达,将 Saos-2 细胞系分成两组,即 miR-1247 过表达组(miR-1247 组)和阴性对照组(EV 组),采用 Lipofectamine™ 2000 分别转染 miR-1247 mimics 和阴性对照序列 scramble,采用 MTT 法和流式细胞术测定增殖和凋亡,Western blot 检测 SOX9 和 FAM129B 的表达。结果:miR-1247 在骨肉瘤细胞系中的相对表达量低于人正常成骨细胞系,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。转染后 0、1、3 d, EV 组与 miR-1247 组细胞增殖水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ );转染后 5、7 d, miR-1247 组细胞增殖水平低于 EV 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。miR-1247 组细胞凋亡率高于 EV 组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。miR-1247 组 SOX9 和 FAM129B 蛋白表达量低于 EV 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论:miR-1247 在骨肉瘤细胞系中低表达,miR-1247 上调表达可抑制细胞增殖并诱导凋亡,其机制可能与 SOX9 和 FAM129B 蛋白下调表达有关。

**[关键词]** miR-1247;骨肉瘤;增殖;凋亡**[中图分类号]** R329.25**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2020)02-200-05**doi:** 10.7655/NYDXBNS20200210

## Effects and mechanism of miR-1247 on proliferation and apoptosis of human osteosarcoma cells

HU Hua, ZHOU Zhong

Department of Orthopedics, the Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430014, China

**[Abstract]** **Objective:** This study aims to analyze the expression of miR-1247 in human osteosarcoma cell lines, as well as its effect and mechanism on proliferation and apoptosis of osteosarcoma cells. **Methods:** qRT-PCR was performed to evaluate expression of miR-1247 in human osteosarcoma cell lines (U2OS, Saos-2 and 143B) and human normal osteoblast cell line (hFOB1.19). Saos-2 cell line were divided into two groups, miR-1247 group transfected with miR-1247 mimics and EV group transfected with miR-1247 scramble. MTT assay and flow cytometry was used to assess proliferation and apoptosis ability of cells. Western blot was carried out to determine Sox9 and FAM129B proteins expression. **Results:** miR-1247 expression level in osteosarcoma cell lines was significantly lower than that in normal osteoblast cell line ( $P < 0.05$ ). There was no significantly difference in cell proliferation between EV and miR-1247 group after transfect for 0, 1, 3 d ( $P > 0.05$ ). The cell proliferation of miR-1247 group was significantly lower than that of EV group after transfect for 5, 7 d ( $P < 0.05$ ). The apoptosis rate of miR-1247 group was significantly higher than that of EV group ( $P < 0.05$ ). The expression level of SOX9 and FAM129B protein of miR-1247 group was significantly lower than that of EV group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Osteosarcoma cell lines showed lower miR-1247 expression compare to normal osteoblast cell line. miR-1247 inhibit proliferation and induce apoptosis in osteosarcoma cell lines via down-regulation of Sox9 and FAM129B proteins.

**[Key words]** miR-1247; osteosarcoma; proliferation; apoptosis

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(02):200-204]

骨肉瘤是常见的骨恶性肿瘤,具有易转移、恶性程度高、预后差等特点,在青少年和老年人中发

病率较高<sup>[1]</sup>。患者5年生存率为60%~70%,但是对转移性骨肉瘤患者,5年生存率低于20%<sup>[2]</sup>。微小

RNA(microRNA, miRNA)是一类非编码RNA,长度约19~25个核苷酸,在转录后水平抑制靶mRNA,进而影响肿瘤细胞生物学过程<sup>[3]</sup>。miR-1247是一种与人关节软骨细胞分化及表型高度相关的miRNA家族成员<sup>[4]</sup>。研究发现,miR-1247与胰腺癌预后相关且可通过靶向神经素(neuropilins, NRP)抑制细胞增殖<sup>[5]</sup>。miR-1247在去势抵抗性前列腺癌中表达上调<sup>[6]</sup>。然而,目前尚未见miR-1247对骨肉瘤细胞增殖和凋亡的影响。本研究旨在探讨miR-1247在骨肉瘤细胞系中的表达及对增殖和凋亡的影响,并阐明其可能的机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

骨肉瘤细胞系Saos-2、U2OS、143B及人正常成骨细胞系hFOB1.19购自中国医学科学院细胞库,实验所需的SOX9和FAM129B一抗(Invitrogen公司,美国),二抗(Santa Cruz公司,美国),Lipofectamine™ 2000 reagent(Invitrogen公司,美国)。miR-1247 mimics和阴性随机对照序列scramble的设计及合成均由上海吉玛生物科技有限公司完成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养、转染及分组

Saos-2、U2OS、143B及人正常成骨细胞系hFOB1.19均种植于RPMI 1640培养基,待48 h后经消化传代,Saos-2细胞系分成两组,即miR-1247过表达组(miR-1247组)和阴性随机对照组(EV组),利用Lipofectamine™ 2000分别转染miR-1247 mimics和阴性随机对照序列scramble。miR-1247 mimics序列:上游5'-GTTGTTTTTTATTTTGGGAATGTTGA-3',下游5'-AAAAATACACACTTAACACATCCAAACACC-3';miR-1247 scramble序列:上游5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',下游5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3',转染浓度为300 nmol/孔。

#### 1.2.2 RNA提取及实时荧光定量PCR(qRT-PCR)

提取RNA后,采用NanoDrop1000分光光度计对RNA浓度进行测定,在7900 HT荧光定量PCR系统(Applied Biosystems公司,美国)测定。通过阈值分析比较,采用循环数(Ct)法对数据行分析处理。内参采用U6,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法量化miR-1247的表达水平。

#### 1.2.3 细胞增殖水平测定

采用MTT法测定细胞增殖能力,将miR-1247组和EV组经消化后的细胞悬液,以 $2 \times 10^3$ 个/孔种植于

96孔板上,每孔按200  $\mu$ L的体积上样,经0、1、3、5、7 d培养后,每孔加入20  $\mu$ L MTT,经培养1 h后,酶标仪测定450 nm波长下各孔的吸光值 $D(450 \text{ nm})$ ,并绘制细胞增殖曲线,纵坐标为吸光值,横坐标为时间。

#### 1.2.4 细胞凋亡水平测定

采用流式细胞术测定,将miR-1247组和EV组细胞消化成细胞悬液后,采用Binding Buffer重悬,漂洗2次后,加入Annexin V,避光染色10 min后,加入PI染料,上流式细胞仪检测,凋亡细胞为Annexin V阳性,PI阴性细胞,计算凋亡细胞比例,实验重复3次,取平均值。

#### 1.2.5 蛋白印迹分析(Western blot)

对miR-1247组和EV组细胞裂解变性,按每孔30  $\mu$ g的标准上样,浓缩胶条件为50 min 80 V,分离胶条件为100 min 100 V,常规转膜,加入SOX9和FAM129B一抗,抗体浓度为1:200,于4℃孵育过夜,二抗(1:500)在37℃条件下孵育,并经4 h孵育后,漂洗3次,ECL液显影,目标蛋白灰度值采用Quantity One 1-D软件分析。计算公式:目标蛋白相对表达量=目标蛋白灰度值/GAPDH灰度值,实验重复3次后,取均值计算。

### 1.3 统计学方法

使用SPSS 22.0统计软件行数据分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间的比较采用 $t$ 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

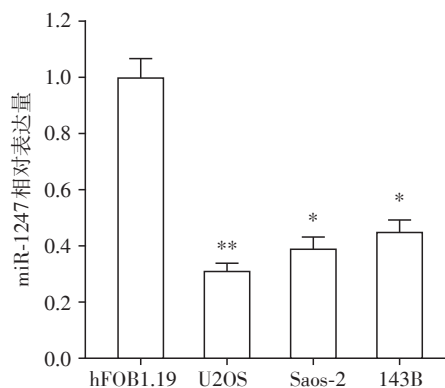
## 2 结 果

### 2.1 miR-1247低表达于人骨肉瘤细胞

qRT-PCR示,miR-1247在人正常成骨细胞系hFOB1.19的相对表达量为 $1.00 \pm 0.02$ ,在人骨肉瘤细胞系U2OS、Saos-2、143B细胞系中相对表达量分别为 $0.31 \pm 0.02$ 、 $0.39 \pm 0.03$ 、 $0.45 \pm 0.04$ ,miR-1247在骨肉瘤细胞系中的相对表达量低于人正常成骨细胞系hFOB1.19( $P < 0.05$ ,图1)。

### 2.2 miR-1247过表达抑制骨肉瘤细胞系U2OS增殖

转染24 h后,miR-1247组miR-1247相对表达量为 $19.72 \pm 0.87$ ,EV组为 $1.00 \pm 0.03$ ,miR-1247组miR-1247相对表达量显著高于EV组( $P < 0.001$ ),提示转染成功,可行后续实验(图2A);MTT示:转染后0、1、3、5、7 d,EV组和miR1247组 $D(450 \text{ nm})$ 值分别为: $0.25 \pm 0.02$  vs.  $0.24 \pm 0.02$  ( $P > 0.05$ ), $0.35 \pm 0.03$  vs.  $0.37 \pm 0.03$  ( $P > 0.05$ ), $1.37 \pm 0.07$  vs.  $1.07 \pm 0.06$  ( $P > 0.05$ ), $2.47 \pm 0.15$  vs.  $1.67 \pm 0.08$  ( $P < 0.01$ ),



与hFOB1.19细胞比较,\* $P < 0.01$ ,\*\* $P < 0.001$ 。

图1 miR-1247在正常成骨细胞及骨肉瘤细胞中的表达

Figure 1 The expression of miR-1247 in human normal osteoblast cells and osteosarcoma cells

$4.03 \pm 0.25$  vs.  $2.38 \pm 0.19$  ( $P < 0.001$ , 图2B)。

### 2.3 miR-1247过表达抑制骨肉瘤细胞U2OS凋亡

流式细胞术显示,miR-1247组细胞凋亡率为( $17.90 \pm 1.26$ )%,EV组为( $8.50 \pm 1.98$ )%,miR-1247组细胞凋亡率高于EV组( $P < 0.01$ ,图3)。

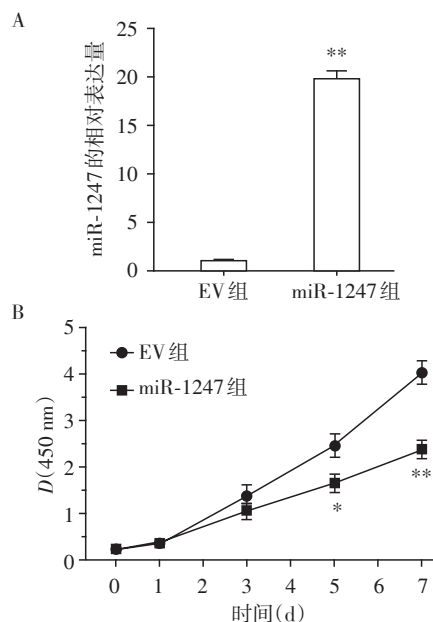
### 2.4 miR-1247过表达对SOX9和FAM129B表达的影响

Western blot显示,miR-1247组SOX9和FAM129B蛋白相对表达量分别为 $0.47 \pm 0.04$ 、 $0.37 \pm 0.04$ ,EV组分别为 $1.00 \pm 0.02$ 、 $1.00 \pm 0.03$ ,miR-1247组SOX9和FAM129B蛋白表达量低于EV组( $P < 0.01$ ,图4)。

## 3 讨论

骨肉瘤发病率约10万分之0.3,发病高峰在青春早期,平均为16岁,65%的骨肉瘤好发于四肢<sup>[1]</sup>。化疗耐药及肺转移是导致患者生存率低的主要原因<sup>[2]</sup>。

miR-1247与多种肿瘤发生发展有关<sup>[5-6]</sup>。在胰

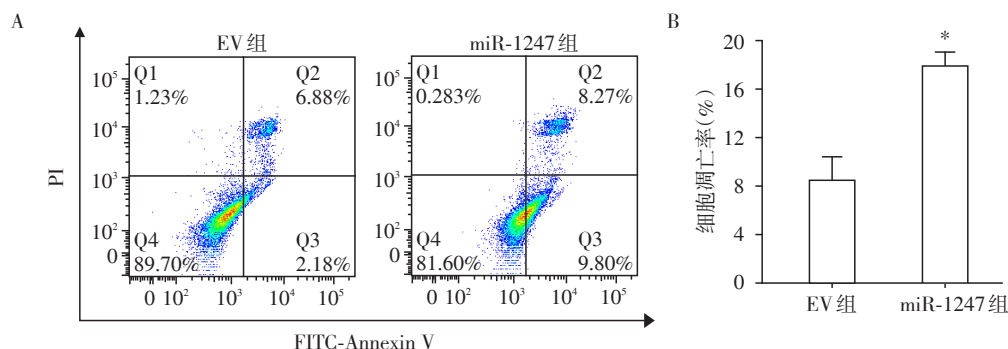


A:转染24 h后,EV组与miR-1247组miR-1247相对表达量比较;B:EV组与miR-1247组细胞增殖曲线。与EV组比较,\* $P < 0.01$ ,\*\* $P < 0.001$ 。

图2 miR-1247过表达抑制骨肉瘤细胞U2OS增殖

Figure 2 Over-expression of miR-1247 inhibit the proliferation of osteosarcoma cell U2OS

腺癌中,miR-1247下调表达,且与预后差相关,在胰腺癌细胞系中上调表达miR-1247可抑制增殖、克隆形成,并诱导G0/G1细胞周期阻滞,起抑癌基因的作用<sup>[5]</sup>。在去势抵抗的前列腺癌中,miR-1247-5p上调表达<sup>[6]</sup>。研究发现,miR-1247在骨肉瘤干细胞中表达下调,且沉默靶基因MAP3K9后,干细胞增殖和克隆形成能力明显减弱<sup>[7]</sup>。在本研究中,miR-1247低表达于骨肉瘤细胞系U2OS、Saos-2、143B,其过表达明显抑制U2OS细胞增殖并促进凋亡,提示miR-1247是作为抑癌基因参与骨肉瘤细胞增殖和凋亡过程。



A:miR-1247组与EV组流式细胞图;B:miR-1247组与EV组细胞凋亡率比较。与EV组比较,\* $P < 0.01$ 。

图3 miR-1247过表达抑制骨肉瘤细胞U2OS的凋亡

Figure 3 Over-expression of miR-1247 inhibit apoptosis of osteosarcoma cell U2OS

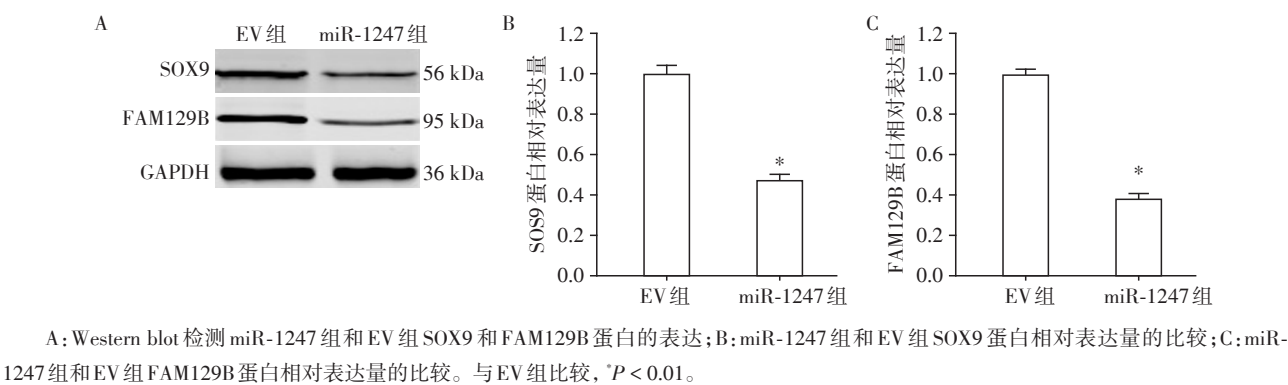


图4 miR-1247过表达对SOX9和FAM129B表达的影响  
Figure 4 The effect of miR-1247 overexpression on protein expression of SOX9 and FAM129B

SOX9 基因是一个与骨骼畸形综合征、躯干发育异常高度相关的转录因子,在软骨分化过程中起关键作用<sup>[8]</sup>。在胰腺癌细胞中,SOX9 蛋白异常高表达,通过影响细胞周期调节因子 p21 及 CDK4 参与调控细胞生长和转移<sup>[9]</sup>。本研究发现 miR-1247 过表达显著抑制 SOX9 蛋白水平,说明 SOX9 可能作为 miR-1247 的下游靶基因,参与骨肉瘤的发生发展过程。研究发现,SOX9 是肿瘤相关信号通路的正调节因子,SOX9 过表达激活乳腺癌 Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号通路,同时诱导该信号通路组件低密度脂蛋白受体相关蛋白 6(LRP6)和 T 细胞因子 4 基因的表达<sup>[10]</sup>。Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号通路是一个高度复杂的信号转导通路,具有调节基因表达、侵袭、迁移、增殖等功能,它的激活对骨肉瘤的发生发展起促进作用<sup>[11]</sup>。前人研究发现,miR-1247 发挥对 SOX9 的靶向调控作用是通过结合在 SOX9 编码区中高度保守结构域实现的,且它们之间还存在负反馈回路<sup>[4]</sup>。提示,miR-1247 可能通过结合 SOX9 编码区特异性序列,降低 SOX9 蛋白转录水平,同时负反馈回路加深这一影响,使得 Wnt/ $\beta$ -Catenin 信号通路受抑制,从而阻碍骨肉瘤细胞增殖和侵袭。

FAM129B 是近期发现的 Wnt/ $\beta$ -Catenin 的正调节因子,通过与 KEAP1 形成复合体抑制 TNF $\alpha$  凋亡途径、促进 NF- $\kappa$ B 信号通路,阻碍肿瘤细胞凋亡、促进细胞侵袭<sup>[12]</sup>。之前研究发现,miR-1247 在肿瘤中低表达,可能损害相关靶基因的表达,如细胞凋亡基因 FAM129B<sup>[13]</sup>。本研究证实了 FAM129B 蛋白受 miR-1247 过表达影响而表达下调,影响 FAM129B 与 KEAP1 之间的相互作用,进而抑制 Wnt/ $\beta$ -Catenin 和 NF- $\kappa$ B 信号通路,TNF- $\alpha$  凋亡途径被激活,这可能是影响骨肉瘤细胞凋亡的机制。

综上,miR-1247 可通过抑制其靶基因 SOX9 及

FAM129B 的转录后水平表达,抑制细胞增殖、促使凋亡,miR-1247 的功能及作用机制的研究有望为骨肉瘤的诊治提供一种新的分子靶点。

[参考文献]

[1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132

[2] NIE Z, PENG H. Osteosarcoma in patients below 25 years of age: an observational study of incidence, metastasis, treatment and outcomes [J]. Oncol Lett, 2018, 16(5): 6502-6514

[3] TASSINARI V, CESARINI V, SILVESTRIS D A, et al. The adaptive potential of RNA editing-mediated miRNA-retargeting in cancer[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 2018

[4] MARTINEZ-SANCHEZ A, MURPHY C L. miR-1247 functions by targeting cartilage transcription factor SOX9 [J]. J Biol Chem, 2013, jbc. M113. 496729

[5] SHI S, LU Y, QIN Y, et al. miR-1247 is correlated with prognosis of pancreatic cancer and inhibits cell proliferation by targeting neuropilins[J]. Curr Mol Med, 2014, 14(3):316-327

[6] SCARAVILLI M, PORKKA K P, BROFELDT A, et al. MiR-1247-5p is overexpressed in castration resistant prostate cancer and targets MYCBP2[J]. Prostate, 2015, 75(8):798-805

[7] ZHAO F, LV J, GAN H, et al. MiRNA profile of osteosarcoma with CD117 and stro-1 expression: miR-1247 functions as an onco-miRNA by targeting MAP3K9[J]. Int J Clin Exp Patho, 2015, 8(2): 1451

[8] ZHANG S, CHE D, YANG F, et al. Tumor-associated macrophages promote tumor metastasis via the TGF- $\beta$ /SOX9 axis in non-small cell lung cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(59):99801



- [9] JIANG S S, FANG W T, HOU Y H, et al. Upregulation of SOX9 in lung adenocarcinoma and its involvement in the regulation of cell growth and tumorigenicity[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(17):4363-4373
- [10] WANG H, HE L, MA F, et al. SOX9 regulates low density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6) and T-cell factor 4 (TCF4) expression and Wnt/ $\beta$ -catenin activation in breast cancer[J]. J Biol Chem, 2013, 288(9):6478-6487
- [11] VEGA O A, LUCERO C M J, ARAYA H F, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling activates expression of the bone-related transcription factor RUNX2 in select human osteosarcoma cell types[J]. J Cell Biochem, 2017, 118(11):3662-3674
- [12] HACHEM F A, CHEN S, EVANS H G, et al. FAM129B, a protein that promotes cancer cell invasion, forms a complex with KEAP1 [J]. FASEB J, 2013, 27(1 Supplement):lb200-lb200
- [13] MANCIKOVA V, CASTELBLANCO E, PINEIRO-YANEZ E, et al. MicroRNA deep-sequencing reveals master regulators of follicular and papillary thyroid tumors[J]. Modern Pathol, 2015, 28(6):748-757
- [收稿日期] 2018-02-23

(上接第190页)

- tumor microenvironment [J]. Cancer Res, 2015, 75(3):508-518
- [4] BALAN M, MIER Y, TERAN E, et al. Novel roles of c-Met in the survival of renal cancer cells through the regulation of HO-1 and PD-L1 expression[J]. J Biol Chem, 2015, 290(13):8110-8120
- [5] LI W, ZHOU Y, YANG J, et al. Gastric cancer-derived mesenchymal stem cells prompt gastric cancer progression through secretion of interleukin-8 [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2015, 34:52
- [6] HORWITZ E M, LE BLANC K, DOMIMICHI M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement[J]. Cytotherapy, 2005, 7(5):393-395
- [7] GONZALEZ M E, MARTIN E E, ANWAR T, et al. Mesenchymal stem cell - induced DDR2 mediates stromal - breast cancer interactions and metastasis growth [J]. Cell Rep, 2017, 18(5):1215-1228
- [8] ZHU W, HUANG L, LI Y, et al. Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth *in vivo* [J]. Cancer Lett, 2012, 315(1):28-37
- [9] HUANG F, WANG M, YANG T, et al. Gastric cancer-derived MSC-secreted PDGF-DD promotes gastric cancer progression[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2014, 140(11):1835-1848
- [10] DING X, JI J, JIANG J, et al. HGF-mediated crosstalk between cancer-associated fibroblasts and MET-unamplified gastric cancer cells activates coordinated tumorigenesis and metastasis[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(9):867
- [11] LU C, REDD P S, LEE J R, et al. The expression profiles and regulation of PD-L1 in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells[J]. Oncoimmunology, 2016, 5(12):e1247135
- [12] SZNOL M, CHEN L. Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(5):1021-1034
- [13] LOTE H, CAFFERKEY C, CHAU I. PD-1 and PD-L1 blockade in gastrointestinal malignancies [J]. Cancer Treat Rev, 2015, 41(10):893-903
- [14] MACE T A, SHARKYA R, PITARRESI J R, et al. IL-6 and PD-L1 antibody blockade combination therapy reduces tumour progression in murine models of pancreatic cancer[J]. Gut, 2018, 67(2):320-332
- [收稿日期] 2019-06-17