

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2020.08.013

· 临床研究 ·

miRNA-95在骨肉瘤组织中的表达及其对MG-63细胞增殖和侵袭的影响

董志伟, 柳丽娟, 耿的玉, 刘秋霞(青岛市海慈医疗集团 关节外科, 山东 青岛 266000)

[摘要] **目的:** 研究miRNA-95在骨肉瘤组织和细胞株中的表达情况及其对骨肉瘤MG-63细胞增殖、凋亡、细胞周期和侵袭能力的影响。**方法:** 以实时荧光定量PCR检测15例骨肉瘤组织及其癌旁组织(标本收集自2015年1月至2018年1月青岛市海慈医疗集团外科手术的病例)和骨肉瘤细胞株(MG-63、U2OS、143B和HOS)与正常人成骨细胞株hFOB1.19中的miRNA-95表达。利用Lipofectamine 2000将miRNA-95 mimics和miRNA-95 inhibitors分别转染至人骨肉瘤MG-63细胞株中,并设置miRNA-NC对照组,CCK-8法检测各组细胞增殖活力变化,流式细胞术检测各组细胞周期和凋亡变化,Transwell方法检测各组细胞侵袭能力变化,双荧光素酶活性实验检测并验证miRNA-95在MG-63细胞中的靶向基因。**结果:** miRNA-95在人骨肉瘤组织中的表达水平显著高于癌旁组织($P<0.01$),在MG-63、U2OS、143B和HOS细胞中的表达水平显著高于hFOB1.19,且在MG-63细胞中表达水平最高($P<0.01$)。与miRNA-NC对照组相比,miRNA-95 mimics组中MG-63细胞的增殖活力显著上升、细胞凋亡率显著下降而侵袭率显著上升(均 $P<0.01$)、而miRNA-95 inhibitors组中MG-63细胞增殖活力显著下降、细胞周期被阻滞、细胞凋亡率显著上升而侵袭率显著下降(均 $P<0.01$);miRNA-95在骨肉瘤MG-63细胞中靶向上皮膜蛋白-1(epithelial membrane protein-1, EMP-1)基因发挥作用。**结论:** miRNA-95在人骨肉瘤组织和细胞中均呈高表达,抑制骨肉瘤MG-63细胞中miRNA-95表达能够促进细胞凋亡进而抑制细胞增殖、细胞周期及侵袭能力,该作用可能通过靶向EMP-1基因而发挥。

[关键词] 骨肉瘤;MG-63细胞;miRNA-95;上皮膜蛋白-1;细胞增殖;细胞周期;凋亡;侵袭

[中图分类号] R735.7; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)08-0920-07

Expression of miRNA-95 in osteosarcoma tissues and its effect on proliferation and invasion of MG-63 cells

DONG Zhiwei, LIU Lijuan, GENG Diyu, LIU Qiuxia (Department of Joint Surgery, Qingdao Haici Medical Group, Qingdao 266000, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To study the expression of miRNA-95 in osteosarcoma tissues and cell lines, as well as to reveal its effect on proliferation, apoptosis, cell cycle and invasion ability of osteosarcoma cells. **Methods:** Real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect the expression of miRNA-95 in 15 pairs of osteosarcoma tissues and their adjacent normal tissues (specimens were collected from patients underwent surgery in Qingdao Haici Medical Group from January 2015 to January 2018), osteosarcoma cell lines (MG-63, U2OS, 143B and HOS) and normal human osteoblast hFOB1.19 cell line. miRNA-95 mimics and miRNA-95 inhibitors were respectively transfected into MG-63 cells by Lipofectamine 2000, and miRNA-NC group was set up as control group. CCK-8 method was used to detect the changes in cell proliferation, Flow cytometry was used to detect the changes in cell cycle and apoptosis, Transwell method was used to detect the changes in cell invasion ability, and Dual luciferase enzyme activity assay was used to detect and validate the target gene of miRNA-95 in osteosarcoma cells. **Results:** The expression level of miRNA-95 in human osteosarcoma tissues and cell lines (MG-63, U2OS, 143B and HOS) was significantly higher than that in adjacent tissues and normal human osteoblast hFOB1.19 cell line (all $P<0.01$), with the highest expression in MG-63 cells ($P<0.01$). Compared with the miRNA-NC group, the proliferation and invasion abilities of MG-63 cells in miRNA-95 mimics group increased significantly, while the apoptosis rate decreased significantly (all $P<0.01$). However, the proliferation and invasion activities of MG-63 cells in miRNA-95 inhibitor group decreased significantly, while the apoptosis rate increased significantly, and the cell cycle was obviously blocked (all $P<0.01$). miRNA-95 played a role in targeting the gene of epithelialmembraneprotein1 (EMP-1) in human osteosarcoma MG-63 cells. **Conclusion:** miRNA-95 is highly expressed in human osteosarcoma tissues and cells; inhibitor of miRNA-95 expression can promote apoptosis and inhibit proliferation, cell cycle and invasion of osteosarcoma cells, which may be related with targeting EMP-1 gene.

[作者简介] 董志伟(1988-),男,硕士生,住院医师,主要从事骨肿瘤的基础和临床研究,E-mail: hongshankeyan@163.com

[通信作者] 刘秋霞(LIU Qiuxia, corresponding author),主要从事骨科肿瘤临床治疗的研究,E-mail: haiciliuqiuxia@126.com

[Key words] osteosarcoma; MG-63 cells; miRNA-95; epithelial membrane protein 1; cell proliferation; cell cycle; apoptosis; invasion
[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(8): 920-926. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.08.013]

骨肉瘤又称成骨肉瘤,是常见的骨科恶性肿瘤之一,其常发于20岁以下的青少年或儿童,在小儿骨恶性肿瘤中最为多见,并且致死率较高^[1]。20世纪以来,针对骨肉瘤的标准治疗方法是截肢术;而随着化疗药物的出现,骨肉瘤患者能够接受术前术后的辅助化疗和择期手术的方案,使患者的5年生存期有了显著延长^[2]。尽管临床上针对骨肉瘤的治疗和研究已经有了极大进展,但其容易发生侵袭转移并且转移的骨肉瘤患者疗效较差,预后不良,仍缺乏有效的治疗方案^[3]。因此,探索并揭示骨肉瘤侵袭转移的分子调控机制和有效的分子靶点,将对于其临床治疗具有重要的意义。微小核糖核酸(microRNA, miRNA)是一类非编码的21~23个核苷酸的单链小RNA发夹样分子,它们能够调控肿瘤细胞中基因和信号通路表达进而影响肿瘤的发生发展^[4]。miRNA-95是近年来发现的miRNAs中的新成员,其与肿瘤细胞活动密切相关。在宫颈癌细胞中,miRNA-95表达呈明显上升趋势,并且它能够促进呼吸道、消化道及生殖系统肿瘤的发生发展,表明miRNA-95可能是恶性肿瘤诊断及预后预测的潜在生物标志物^[5-6]。但是目前关于miRNA-95在骨肉瘤中的表达情况及其影响作用和机制尚无研究。因此,本课题检测了骨肉瘤组织及其细胞株中miRNA-95的表达情况,并揭示其对骨肉瘤细胞增殖和侵袭能力的影响,以探索miRNA-95能否作为骨肉瘤治疗的新靶点。

1 材料与方法

1.1 临床标本

收集于2015年1月至2018年1月在本院骨科手术切除并经病理检测诊断证实为骨肉瘤的组织标本25例。其中男性16例、女性9例,年龄7~49岁、中位年龄20.8岁。所有患者术前均未行放、化疗,肿瘤组织经组织病理学切片验证为骨肉瘤,而肿瘤远端组织经过病理学验证为无肿瘤侵犯癌旁组织。手术所取骨肉瘤和癌旁组织,离体后10 min内放入液氮内冻存备用。本研究所有患者均签署知情同意书,并经过本院伦理委员会批准。

1.2 实验材料

人骨肉瘤细胞株(MG-63、U2OS、143B、HOS)和正常成骨细胞株hFOB1.19均购自中国科学院上海细胞研究所。DMEM/F12细胞培养基、RPMI 1640细胞培养基、胎牛血清、1%青霉素和链霉素双抗均购自美国Gibico公司,CCK-8试剂盒购自北京鼎国公司,Lipofectamine™2000转染试剂、miRNA-95模拟物

(miRNA-95 mimics)、miRNA-95抑制物(miRNA-95 inhibitors)均购自上海生工公司,miRNA提取试剂盒、TaqMan-MicroRNA逆转录试剂盒、qPCR试剂盒均购自大连TakaRa公司,细胞周期试剂盒、Annexin-V/PI细胞凋亡试剂盒购自北京博奥生公司,Transwell小室购自Corning公司,Matrigel基质胶购自美国Sigma公司,双荧光素酶活性实验检测试剂盒购自上海Invitrogen公司。

1.3 细胞培养

将冻存的人骨肉瘤MG-63、U2OS、143B、HOS细胞和正常成骨细胞hFOB1.19复苏后培养于含10%胎牛血清的DMEM/F12细胞培养基中,并置于37℃和5%CO₂的培养箱中培养。当细胞生长至70%以上汇合后进行0.25%EDTA-胰酶消化传代以进行后续实验。

1.4 qPCR检测骨肉瘤组织及细胞株中miRNA-95表达情况

按照TRIzol方法提取各骨肉瘤组织、癌旁正常组织及MG-63、U2OS、143B、HOS、hFOB1.19细胞中总RNA,后按照miRNA逆转录试剂盒将总RNA转录成cDNA。每例标本取500 ng的cDNA再按照试剂盒方法进行实时荧光定量qPCR检测。PCR反应中miRNA-95引物为Sense:GGCACTCAATAAATGTCTGTTGA和Anti-sense:TGCTCAATAAATACCCGTTGA,并以U6基因为内参,其引物为Sense:CTCGCTTCGGCAGCACA和Anti-sense:AACGCTTCACGAATTTGCGT,所有引物均由上海生工公司设计合成。利用Bio-Rad公司的IQ5™ Real-time PCR仪器实时检测分析各组样品中miRNA-95的相对表达量,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算。

1.5 细胞转染及分组

根据上述检测结果,选择骨肉瘤MG-63细胞为转染对象。取对数生长期MG-63细胞,消化后收集细胞并用DMEM/F12细胞培养基稀释成 10^5 个/ml细胞,接种至细胞培养板中,当细胞贴壁汇合至70%时,使用Lipofectamine™2000转染试剂盒分别将50 nmol/L的miRNA-95模拟物和miRNA-95抑制物分别转染至不同MG-63细胞中,设定为miRNA-95 mimics组和miRNA inhibitor组。并按照上述方法转染无义的miRNA至相应MG-63细胞中作为阴性对照(miRNA NC组)。各组MG-63细胞转染24 h后,利用上述qPCR方法检测转染后细胞中miRNA-95表达变化。

1.6 CCK-8法检测转染后骨肉瘤细胞的增殖变化

将转染24 h后各组MG-63细胞按照 1×10^4 个/ml

每孔 180 μ l 种植于 96 孔培养板中, 每组设置 5 个复孔。分别在培养 0、24、48、72、96、120 h 时, 每孔中加入 20 μ l 的 CCK-8 溶液, 在 37 $^{\circ}$ C 时继续孵育 2 h, 在酶标仪上测定 450 nm 处各孔光密度 (D_{450}) 值以反映各组细胞的增殖活力。

1.7 流式细胞术检测转染后各组骨肉瘤细胞周期和凋亡变化

将各组转染 24 h 后 MG-63 细胞, 消化离心并收集, 用预冷的 75% 乙醇固定 3 h。每组细胞中加入 1 g/L 的 RNase A 溶液 200 μ l, 37 $^{\circ}$ C 下作用 30 min, 再加入 10 μ l 的碘化丙啶 (PI) 避光孵育 30 min, PBS 缓冲液洗涤一次后, 利用 BD Calibur 流式细胞仪检测各组细胞周期变化。同时, 将各组转染 24 h 的 MG-63 细胞, 连续培养 48 h 后消化离心收集细胞。分别用 5 μ l 的 FITC 标记的 Annexin V 和 10 μ l 的 PI 室温孵育 20 min, 用 PBS 洗涤 2 次, 同样利用 BD Calibur 流式细胞仪上样检测各组转染后 MG-63 细胞的凋亡率变化。

1.8 Transwell 检测转染后各组骨肉瘤细胞侵袭能力变化

用含 5% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基稀释转染 24 h 后 MG-63 细胞密度至 1×10^5 个/ml。在各 Transwell 板上室膜上均匀涂抹 50 μ l 的 magtrigel 胶, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 30 min, 形成基底膜结构。将上述各组 MG-63 细胞取 100 μ l 加入到 Transwell 上室中, 而下室中加入 600 μ l 含 15% 胎牛血清的培养基, 同时设置未处理组。将 Transwell 板置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中继续培养 48 h。培养结束后将小室滤膜取出, 用 4% 多聚甲醛固定 10 min。结晶紫染色滤膜 10 min 后 PBS 洗涤 3 遍, 在显微镜下观察各组 MG-63 细胞侵袭情况, 拍照并计算各组 MG-63 细胞侵袭率变化。细胞侵袭率 = 各组平均侵袭细胞数 / 未处理对照组侵袭细胞数 $\times 100\%$ 。

1.9 生物信息学分析 miRNA-95 下游靶基因并经双荧光素酶活性实验验证

运用 miRNA 下游靶基因预测软件 (<http://targetscan.org>)、(<http://www.miranda-im.org>)、(<http://pic-tar.mdc-berlin.de>) 等对 miRNA-95 在骨肉瘤中的下游靶向基因进行筛选, 预测了其下游靶向基因为 EMP-1。根据荧光素酶实验 KOD-PLUS-Mutagenesis-Kit 的操作说明设计 EMP-1/3' UTR 的结合位点, 将结合位点 "5' -CCGUUGAAA" 突变成 "5' -GGCAA-CAAA", 载体由上海生工公司构建合成。分别将野生型 WT-EMP-1/3' UTR 载体和突变型 MUT-EMP-1/3' UTR 表达载体以 500 ng/ml 转染至已含 miRNA-95 mimics、miRNA-95 inhibitor 的 MG-63 细胞中, 将其接种于 96 孔板中, 每孔 200 μ l, 每组细胞设置 3 个重复,

在含 5%CO₂ 的细胞培养箱中继续培养 48 h。培养结束后各组细胞中加入荧光素酶缓冲试剂盒反应底物, 充分作用 10 min 后, 测定各组细胞中相对荧光强度。

1.10 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件统计分析。所有实验重复 3 次, 正态分布的计量数据采用平均值 \pm 标准差表示。组间的两两比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析、进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 骨肉瘤组织和细胞株中 miRNA-95 呈高表达

qPCR 检测 (图 1) 发现骨肉瘤组织中 miRNA-95 表达水平显著高于癌旁正常组织, (3.95 ± 0.47 vs 1.38 ± 0.22 , $P < 0.01$)。qPCR 检测结果 (图 2) 还显示, miRNA-95 在 4 种人骨肉瘤细胞株 (MG-63、U2OS、143B、HOS) 中的表达水平也显著高于正常成骨细胞 hFOB1.19 的水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且 MG-63 细胞中 miRNA-95 的表达水平最高 ($P < 0.05$)。

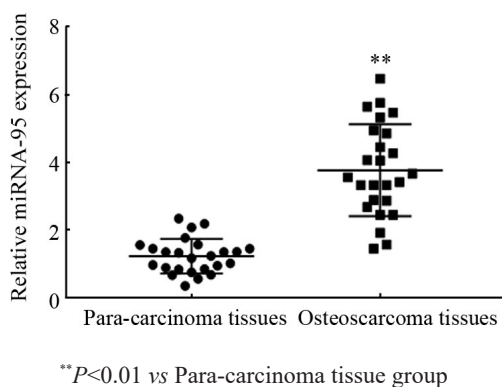


图 1 骨肉瘤组织及癌旁组织中 miRNA-95 的表达情况
Fig.1 The expression of microRNA-95 in osteosarcoma tissues and para-carcinoma tissues

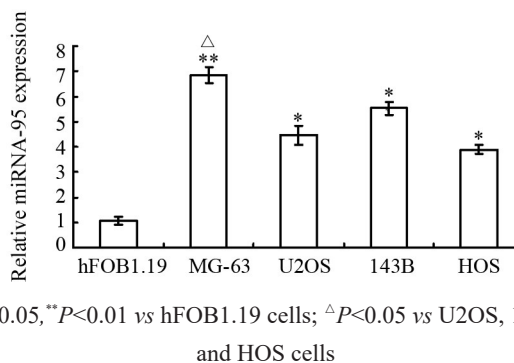
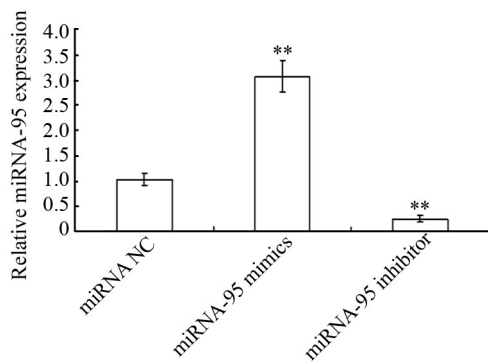


图 2 各骨肉瘤细胞株和人成骨细胞株中 miRNA-95 的表达情况
Fig.2 The expression of microRNA-95 in osteosarcoma cell lines and human osteoblast cell line

2.2 miRNA-95 mimics 和 miRNA-95 inhibitor 转染后 MG-63 细胞中 miRNA-95 的表达情况

利用 PCR 检测(图 3)发现,与 miRNA-NC 组相比,miRNA-95 mimics 转染组细胞中 miRNA-95 表达水平显著上升(3.07 ± 0.31 vs 1.03 ± 0.12 , $P < 0.01$),而 miRNA-95 inhibitor 转染组细胞中 miRNA-95 表达水平显著下降至(0.25 ± 0.06 vs 1.03 ± 0.12 , $P < 0.01$),验证了通过 miRNA-95 mimics 和 miRNA-95 inhibitor 转染可以上调和下调 MG-63 细胞中 miRNA-95 表达水平。



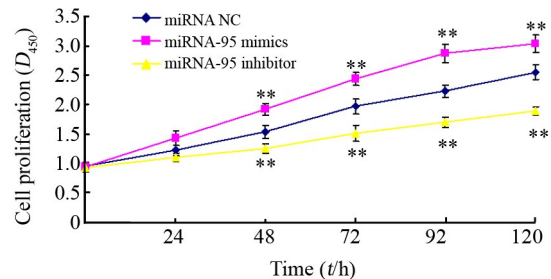
** $P < 0.01$ vs miRNA NC group

图3 miRNA-95 mimics 和 miRNA-95 inhibitor 转染 MG-63 细胞后 miRNA-95 表达的变化

Fig.3 The changes of miRNA-95 expression in MG-63 cells transfected with miRNA-95 mimics and miRNA-95 inhibitors

2.3 miRNA-95 mimics 和 miRNA-95 inhibitor 转染 MG-63 后细胞增殖活力的变化

CCK-8 法检测发现,miRNA-95 mimics 转染 MG-63 细胞 48~120 h 后细胞的增殖活力显著上升(均 $P < 0.05$; 图 4),而 miRNA-95 inhibitor 转染 MG-63 细胞 48~120 h 后细胞增殖活力显著下降(均 $P < 0.05$; 图 4)。



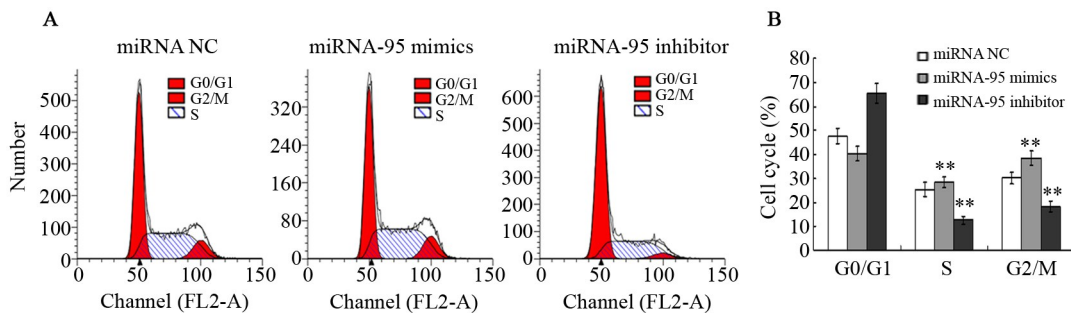
** $P < 0.01$ vs miRNA NC group

图4 miRNA-95 mimics 和 miRNA-95 inhibitor 转染 MG-63 后细胞增殖活力的变化

Fig.4 The changes in cell proliferation of MG-63 cells transfected with miRNA-95 mimics and miRNA-95 inhibitor

2.4 miRNA-95 mimics 和 miRNA-95 inhibitor 转染后 MG-63 细胞周期的变化

流式细胞术检测(图 5)发现,miRNA-95 mimics 转染 MG-63 细胞后能够促进细胞周期,而 miRNA-95 inhibitor 转染 MG-63 细胞后能够阻滞细胞周期变化。与 miRNA-NC 组相比,miRNA-95 mimics 转染组 MG-63 细胞周期中 S 期和 G2/M 期显著上升(均 $P < 0.01$),而 miRNA-95 inhibitor 转染组 MG-63 细胞周期中 S 期和 G2/M 期则显著下降(均 $P < 0.01$)。



** $P < 0.01$ vs miRNA NC group

A: Cell cycle was detected by Flow cytometry; B: Statistics of cell cycle changes

图5 miRNA-95 mimics 和 miRNA-95 inhibitor 转染后 MG-63 细胞周期的变化

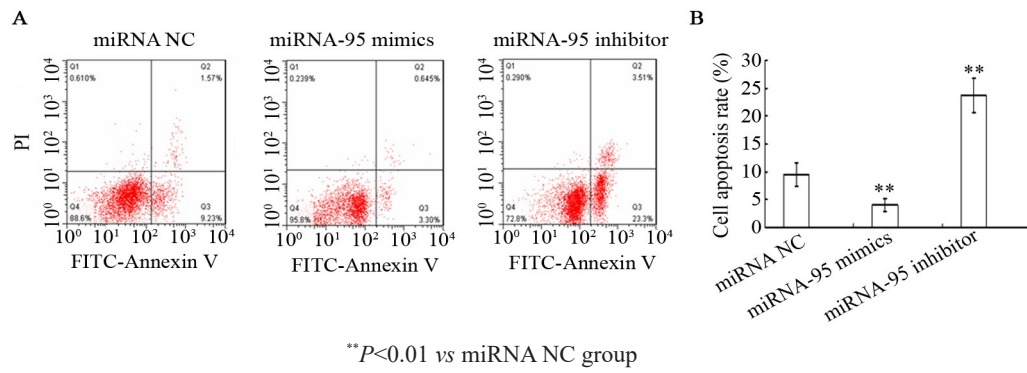
Fig.5 The changes in cell cycle of MG-63 cells transfected with miRNA-95 mimics and miRNA-95 inhibitor

2.5 miRNA-95 mimics 和 miRNA-95 inhibitor 转染后 MG-63 细胞凋亡的变化

流式细胞术检测(图 6)发现,miRNA-95 mimics 转染 MG-63 细胞后细胞凋亡率显著下降,而 miRNA-95 inhibitor 转染 MG-63 细胞后细胞凋亡率显著上升(均 $P < 0.01$)。

2.6 miRNA-95 mimics 和 miRNA-95 inhibitor 转染后 MG-63 细胞侵袭能力的变化

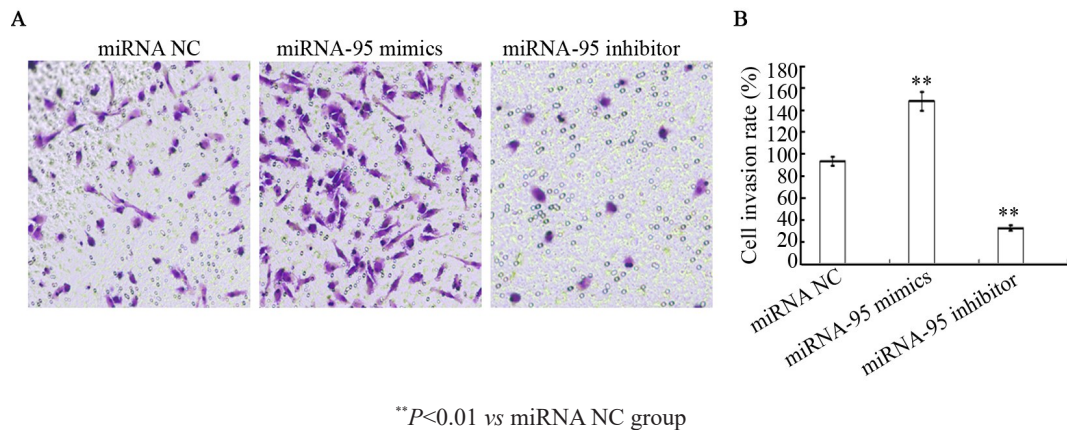
Transwell 检测(图 7)发现,miRNA-95 mimics 转染 MG-63 细胞后细胞侵袭能力显著上升,而 miRNA-95 inhibitor 转染 MG-63 细胞后细胞侵袭能力显著下降(均 $P < 0.01$)。



A: Cell apoptosis was detected by Flow cytometry; B: Statistics of cell apoptosis rate changes

图6 miRNA-95 mimics 和 miRNA-95 inhibitor 转染后 MG-63 细胞凋亡的变化

Fig.6 The changes in apoptosis of MG-63 cells transfected with mRNA-95 mimics and miRNA-95 inhibitor



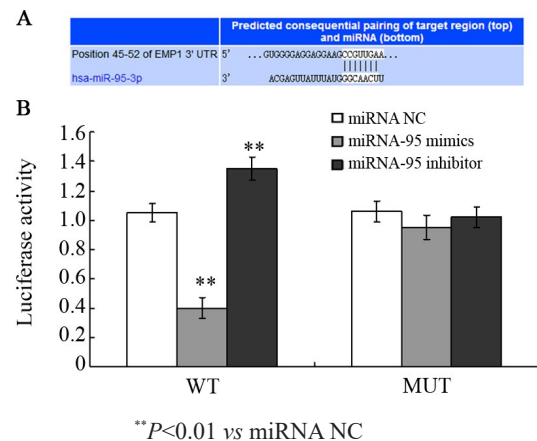
A: Cell invasion was detected by Transwell; B: Statistics of cell invasion rate

图7 miRNA-95 mimics 和 miRNA-95 inhibitor 转染后 MG-63 细胞侵袭的变化

Fig.7 The changes in invasion of MG-63 cells transfected with miRNA-95 mimics and miRNA-95 inhibitor

2.7 生物信息学预测 miRNA-95 的下游靶向基因 EMP1 及双荧光素酶实验验证结果

利用生物信息学方法,根据 Targetscan、miRdb、miRanda 生物信息学软件筛选出与骨肉瘤中 miRNA-95 表达相关的靶基因上皮膜蛋白-1 (Epithelialmembraneprotein1, EMP-1) 基因。在 TargetScan 软件中,获得 miRNA-95 和预测靶基因 EMP-1 的 3'-UTR 的结合位点(图 8A)。为进一步验证 miRNA-95 是否通过靶向 EMP-1 基因的 3'-UTR 上特异结合位点而调控 EMP-1 表达发挥作用,利用双荧光素酶实验进行检测。双荧光素酶活性实验(图 8B)发现,EMP-1-3'-UTR 野生型(WT)中,与 miRNA-NC 组相比,miRNA-95 mimics 组 MG-63 细胞中荧光值显著降低 ($P < 0.01$),而 miRNA-95 inhibitor 组 MG-63 细胞中荧光值则显著上升 ($P < 0.01$)。在 EMP-1-3'-UTR 突变型(MUT)中,不同 miRNA-95 表达水平的三组 MG-63 细胞中荧光值无显著变化(均 $P > 0.05$)。结果验证 miRNA-95 能够靶向骨肉瘤 MG-63 细胞中 EMP-1 基因发挥作用。



A: Bioinformatics analysis of microRNA-95 targeting EMP-1 gene loci; B: Statistics of double luciferase activity experiment results

图8 双荧光素酶活性实验检测 miRNA-95 在骨肉瘤细胞中是否靶向 EMP-1 基因发挥作用

Fig. 8 Double luciferase enzyme activity assay was used to detect whether miRNA-95 played a role in targeting EMP-1 gene in osteosarcoma cells

3 讨论

骨肉瘤是一种恶性程度极高的肿瘤,其侵袭能力强,且治疗预后差^[7]。尽管临床上针对骨肉瘤的治疗方案和技术手段在不断改进,但40%左右的转移骨肉瘤患者对化疗敏感性较差,5年生存率极低,常常会复发^[8]。随着分子生物学和细胞生物学的进展,分子靶向精准治疗为临床骨肉瘤治疗提供了新的希望,特别是miRNA在骨肉瘤细胞功能中发挥作用的深入研究,其为骨肉瘤的分子靶向精准治疗提供了新的思路^[9]。

近年来研究发现有些特异性的miRNA在肿瘤组织和癌旁正常组织中呈现明显表达差异,提示这些miRNAs可作为肿瘤早期筛选、评价及预后的分子标志物并应用于临床^[10]。已有研究^[11]发现miRNA-95在结肠癌、宫颈癌等肿瘤组织中高表达,其能够通过抑制p21蛋白进而促进结肠癌细胞的增殖和迁移。但关于miRNA-95在骨肉瘤中表达情况及其作用机制尚未见研究,因此本课题收集了25例骨肉瘤患者的肿瘤组织和癌旁正常组织,利用PCR检测发现,miRNA-95在骨肉瘤组织中呈显著高表达,在骨肉瘤细胞系MG-63、U2OS、143B、HOS中表达水平均显著高于正常成骨细胞hFOB1.19,并且其在高侵袭转移潜能的骨肉瘤MG-63细胞系中表达水平最高。结果证明miRNA-95的高表达与骨肉瘤肿瘤的发生发展存在相关性,也提示miRNA-95可作为骨肉瘤肿瘤早期筛选及评价的分子标志物。

尽管miRNAs和肿瘤关系密切,但是不同的miRNA在常见肿瘤中具体的功能作用并不一致^[12]。LI等^[13]研究发现,miRNA-95在胰腺癌细胞系SW1990和Panc-1中表达均明显升高,并且能够影响两个细胞系的生长、凋亡、侵袭和迁移。HUANG等^[14]研究发现,miRNA-95在直肠癌中表达上升,并能够通过SNX1影响直肠癌细胞的增殖。为了进一步揭示miRNA-95异常表达对骨肉瘤细胞的发生发展是否有影响作用,本课题构建了miRNA-95 mimics(上调表达)和miRNA-95 inhibitor(下调表达)同时转染骨肉瘤MG-63细胞,当miRNA-95抑制表达后,MG-63细胞增殖活力能够显著下降、细胞周期受阻滞,反之miRNA-95进一步诱导表达后MG-63细胞增殖活力显著上升、细胞周期进展更快,此结果表明miRNA-95在骨肉瘤细胞中发挥促癌作用。同时本研究还发现,miRNA-95能够调控骨肉瘤细胞凋亡和侵袭能力,当miRNA-95抑制表达时MG-63细胞凋亡率显著上升和侵袭能力显著下降,而miRNA-95诱导表达后MG-63细胞凋亡率显著下降和侵袭能力显著

上升,该结果与XIAO等^[15]研究miRNA-95在鸦胆素D治疗肝癌中作用机制中研究结果一致,提示miRNA-95有望成为骨肉瘤肿瘤分子治疗的新靶点。

miRNA的作用机制是在转录水平上通过与对应的靶基因mRNA的3'-UTR位点序列互补配对,而促进靶基因的mRNA降解或抑制其翻译,进而下降靶基因表达^[16]。因此,研究miRNA在肿瘤病理发生发展中的作用,都有必要检测其发挥作用的靶基因,以判定其能否应用于相关肿瘤的分子靶向治疗^[17]。本研究利用生物信息学方法来筛选与骨肉瘤中miRNA-95表达相关的靶基因,根据Targetscan、miRdb、miRanda等软件均筛选出miRNA-95可以与EMP-1基因的3'-非翻译区位点相结合,因此推测EMP-1基因为骨肉瘤中miRNA-95发挥作用的靶基因。已有研究^[18-19]发现,EMP-1可作为胃肠道间质瘤耐药的标志物,其在人结直肠癌组织中表达水平明显减低,而过表达EMP-1能够抑制SW-480肿瘤细胞的恶性生物学行为,表明EMP-1在相关肿瘤中发挥抑癌作用。为了进一步证实骨肉瘤中miRNA-95和EMP-1基因的靶向作用,本研究进行了双荧光素酶活性实验发现EMP-1-3'-UTR野生型(WT)中,miRNA-95 mimics组MG-63细胞中荧光值显著降低而miRNA-95 inhibitor组细胞中荧光值则显著上升,验证了miRNA-95能够靶向骨肉瘤MG-63细胞中EMP-1基因发挥作用。

综上所述,本研究发现miRNA-95在人骨肉瘤组织和细胞中呈高表达,而抑制骨肉瘤中miRNA-95表达水平能够显著抑制其细胞增殖、细胞周期及侵袭能力并促进细胞凋亡,这些结果均可能是通过靶向EMP-1基因发挥作用。本研究提示miRNA-95参与人骨肉瘤的发生发展,其可为骨肉瘤提供新的基因靶点和检测指标。

[参考文献]

- [1] LU J, SONG G, TANG Q, et al. MiR-26a inhibits stem cell-like phenotype and tumor growth of osteosarcoma by targeting Jagged1 [J]. *Oncogene*, 2017, 36:231 - 241.
- [2] LIU C B, PAN C Q, CAI Y Q, et al. Interplay between long noncoding RNA ZEB1-AS1 and miR-200s regulates osteosarcoma cell proliferation and migration[J]. *J Cell Bioch*, 2017, 118(8): 2250-2260.
- [3] LIU D D, ZHANG C J, LI X L, et al. MicroRNA-567 inhibits cell proliferation, migration and invasion by targeting FGF5 in osteosarcoma[J]. *EXCLI J*, 2018, 17: 102-112. DOI: 10.17179/excli2017-932.
- [4] YANG H Y, PENG Z G, DA Z Z, et al. MicroRNA-148a acts as a tumor suppressor in osteosarcoma via targeting rho-associated coiled-coil kinase[J]. *Oncol Res*, 2017, 25(8): 1231-1243. DOI: 10.3727/096504017X14850134190255.

- [5] 张其川, 王素芳, 王云峰, 等. miRNA-27b 在骨肉瘤中的表达及其临床意义[J]. 临床与病理杂志, 2017, 12:2633-2638.
- [6] HUANG X, TAEB S, JAHANGIRI S, et al. miRNA-95 mediates radioresistance in tumors by targeting the sphingolipid phosphatase SGPP1[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(23):6972-6986.
- [7] LIU B, YAN S Q, QU L Y, et al. Celecoxib enhances anticancer effect of cisplatin and induces anoikis in osteosarcoma via PI3K/Akt pathway[J]. *Cancer Cell Int*, 2017, 3(17):1-1. DOI: 10.1186/s12935-016-0378-2.
- [8] WANG X J, ZHENG H, SHOU T, et al. Effectiveness of multi-drug regimen chemotherapy treatment in osteosarcoma patients: a network meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *J Orthop Surg Res*, 2017. PMID: 28356114.
- [9] LIU Y J, LI W, CHANG F, et al. MicroRNA-505 is downregulated in human osteosarcoma and regulates cell proliferation, migration and invasion[J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(2): 491-500.
- [10] JIANG N, WANG X D, XIE X B, et al. lncRNA DANCR promotes tumor progression and cancer stemness features in osteosarcoma by upregulating AXL via miR-33a-5p inhibitor[J]. *Cancer Letters*, 2017, 405(10): 46-55.
- [11] AVNET S, DI PG, CHANO T, et al. Cancer-associated mesenchymal stroma fosters the stemness of osteosarcoma cells in response to intratumoral acidosis via NF- κ B activation[J]. *Inter J Cancer*, 2017, 140(6): 1331-1345.
- [12] CANTARA S, PILLI T, SEBASTIANI G, et al. Circulating miRNA95 and miRNA190 are sensitive markers for the differential diagnosis of thyroid nodules in a caucasian population[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(11): 4190-4198. DOI: 10.1210/jc.2014-1923.
- [13] LI B, XIE S, CAI C, et al. MicroRNA-95 promotes myogenic differentiation by down-regulation of aminoacyl-tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(67): 111356-111368.
- [14] HUANG Z, HUANG S, WANG Q, et al. MicroRNA-95 promotes cell proliferation and targets sorting Nexin 1 in human colorectal carcinoma[J]. *Cancer Research*, 2011, 71(7): 2582.
- [15] XIAO Z, CHING C S, HAN L C, et al. Role of microRNA-95 in the anticancer activity of Brucein D in hepatocellular carcinoma[J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 728(1): 141-150.
- [16] PILLI T, CANTARA S, MARZOCCHI C, et al. Diagnostic value of circulating microRNA-95 and -190 in the differential diagnosis of thyroid nodules: a validation study in 1000 consecutive patients[J]. *Thyroid*, 2017, 27(8): 1053-1057. DOI: 10.1089/thy.2017.0035.
- [17] 徐蓉, 丰宇芳, 陈正红. miRNA-95-3p 在人结肠癌中的表达及其对结肠癌细胞 SW620 增殖、迁移能力的影响[J]. *癌症进展*, 2018, 16(12):48-52.
- [18] 穆玉玲, 张良明, 陈剑. microRNA-95 与肿瘤发生机制的研究[J]. *医学研究杂志*, 2015, 44(5):16-19.
- [19] 孙国贵, 刘青, 杨从容, 等. 过表达上皮膜蛋白 1 对结直肠癌 SW-480 细胞生物学行为的影响及其可能的机制[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2014, 21(4): 396-401. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.4.007.

[收稿日期] 2020-03-10

[修回日期] 2020-06-24

[本文编辑] 韩丹