

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.07.015

miR-335 对骨肉瘤细胞增殖和迁移的影响

贾红兵 于小迪 高 云 薛升奎 张永刚

(解放军第 323 医院骨科 陕西 西安 710054)

摘要 目的: 通过研究 miR-335 对骨肉瘤细胞系 SOSP-9607 增殖和迁移的影响, 探讨 miR-335 在骨肉瘤细胞生物学行为中的作用。**方法:** 体外培养 SOSP-9607 细胞并将其分三组, 分别为实验组、阴性对照组和空白对照组。实验组转染 miR-335 模拟物 (has-miR-335 mimics), 阴性对照组转染阴性对照序列 (negative control, NC), 空白对照组细胞不行任何转染。采用噻唑蓝 (MTT) 比色实验法检测和比较细胞处理 24、48、72 和 96 h 的增殖情况, 采用 Transwell 实验检测和比较各组细胞的迁移情况。**结果:** MTT 结果显示, 实验组细胞 48、72 和 96 h 增殖率较阴性对照组明显降低 ($P < 0.01$), 而阴性对照组及空白对照组细胞增殖率比较未见明显差异 ($P > 0.05$)。在 Transwell 迁移和侵袭实验中, 与阴性对照组比较, 实验组细胞的侵袭及迁移能力也明显降低 ($P < 0.05$), 而两对照组细胞迁移及侵袭能力也无明显差异 ($P > 0.05$)。**结论:** miR-335 可显著抑制骨肉瘤细胞的增殖及迁移, 有望成为骨肉瘤治疗的新靶点, 值得深入研究。

关键词: miR-335; 骨肉瘤; 增殖; 迁移

中图分类号: R738.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)07-1263-04

Effect of miR-335 on the Proliferation and Migration of Osteosarcoma Cells

JIA Hong-bing, YU Xiao-di, GAO Yun, XUE Sheng-kui, ZHANG Yong-gang

(Department of Orthopedics, 323 Hospital of PLA, Xi'an, Shaanxi, 710054, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the role of miR-335 in biological behavior of osteosarcoma cells by observing the effect of miR-335 on cell proliferation, migration and invasion of human osteosarcoma cell line SOSP-9607. **Methods:** SOSP-9607 cells were divided into three groups: experimental group (transfected with miR-335 mimics), control group (transfected with NC) and blank group (non-transfected). MTT assay was performed to compare the proliferation ability among groups. We detected the optical density (OD) at 24 h, 48 h, 72 h and 96 h, and then presented the growth curve. Transwell assays were carried out to investigate the migratory and invasive ability of osteosarcoma cells in different groups. **Results:** In MTT assay, compared with control group, experimental group showed lower cell proliferation of efficiency at 48, 72 and 96 h ($P < 0.01$), while no significance difference was shown between control group and blank group. Meantime, in Transwell assays, cells in experimental group showed greater migratory and invasive ability than cells in control group ($P < 0.05$), and there was no significance difference between control group and blank group. **Conclusion:** The miR-335 played a significantly repressive role in the proliferation, migration and invasion of osteosarcoma, and may prove to be a novel therapeutic agent.

Key words: miR-335; Osteosarcoma; Proliferation; Migration

Chinese Library Classification (CLC): R738.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)07-1263-04

前言

骨肉瘤是原发于骨髓腔的高度恶性实体肿瘤, 以产生骨样组织的梭形基质细胞和肿瘤细胞产生的骨样组织或不成熟骨为特征, 是最常见的原发性恶性骨肿瘤, 约占所有青少年及儿童恶性骨肿瘤的 60%^[1]。其恶性程度高, 血行转移及肺转移的发生率高, 病死率也非常高。随着医学技术的发展, 虽然骨肉瘤的治疗出现了大范围肿瘤切除、化疗和放疗等治疗方案, 但乐观估计骨肉瘤患者的 5 年生存率仍只有 55-68%^[2]。新近研究表明 microRNAs (miRNAs) 与肿瘤的关系密切, 异常表达的

miRNAs 在肿瘤中普遍存在^[3,4]。miRNAs 既可作为致癌基因也可作为抑癌基因, 在肿瘤发生发展中起到重要作用^[5,6]。一些上调的 miRNAs 例如 miR-21 和 miR-155 被视为癌基因, 同时一些下调的 miRNAs 例如 miR-143 和 miR-126 则被视为抑癌基因^[7]。miR-335 在许多肿瘤中低表达, 其表达下调被认为与肿瘤的发生发展有重要关系^[8]。但关于 miR-335 与骨肉瘤的关系一直未见报道。本实验通过外源性转染 miR-335 模拟物促进其表达, 同时进行 MTT 和 Transwell 实验观察其对骨肉瘤细胞增殖和迁移能力的影响, 旨在为骨肉瘤治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

RPMI 1640 培养基、Opti-MEM 去血清培养基 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (FBS)、0.25 % 胰酶溶液 (中国四季青公司); 二

作者简介: 贾红兵 (1966-), 女, 副主任护师,

E-mail: 1120756635@qq.com

(收稿日期: 2013-07-18 接受日期: 2013-08-17)

甲基亚砷(DMSO)(美国 Sigma 公司);MTT 试剂盒(南京凯基生物发展公司);Lipofectamine™2000 转染试剂、Trizol (美国 Invitrogen 公司);Matrigel 基质胶(美国 BD 公司);6 孔板、96 孔板、Transwell 24 孔板 8 μ m 小室 (美国 Corning 公司);酶标仪(美国 Thermo 公司);ABI-PRISM 7500 (美国 Applied Bioscience 公司)。

1.2 细胞株及培养

人成骨肉瘤细胞系 SOSP-9607(第四军医大学唐都医院骨科赠送),用 RPMI1640 培养液(含 10 %FBS)在 37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂ 饱和湿度的孵箱条件下传代培养。

1.3 转染

miR-335 模拟物 (has-miR-335 mimics)、阴性对照序列 (negative control)(上海吉玛生物公司)。实验组与阴性对照模拟物转染浓度均为 100 nM,细胞转染后 48 小时收集细胞行 MTT 及 Transwell 实验。转染步骤按照脂质体 Lipofectamine TM2000 试剂说明书操作。转染效率依靠 qRT-PCR 检测 miR-335 表达。

1.4 qRT-PCR

6 孔板转染 48 小时候后,用 Trizol 进行 RNA 提取。miR-335 引物(上海生工公司):其中一条引物(5'-CTCAACT GGTGTCGT GGAGTC GGCAATT CAGTTG AGACATTTTTCGTT-3')用于反转录;一对引物(forward:5'-ACACTCCAGCTGGGTACAGTACTGTGATA-3',reverse:5'-TGGTGTCTGGAGTCG-3')用于 ABI-PRISM 7500 real-time PCR system 进行扩增。采用 U6 作为实验对照。

1.5 MTT 实验

实验采用 96 孔板,每组设 8 个复孔,设空白调零孔,孔板周围予以 PBS 充填。每孔接种 4×10^3 个细胞。分别在 24、48、72、96 h 后,取出一块 96 孔板,每孔加入 40 μ L MTT 溶液,孵箱孵育 4 h 后,小心吸去上清液,每孔加入 150 μ L DMSO。震荡 10 分钟,使紫色结晶充分溶解。在酶标仪上选择 490 nm 波长测定吸光度(OD)值,参考波长为 630 nm。每组 8 个 OD 值,去除最大与最小值,其余 6 个值计算出平均 OD 值。实验重复 3 次。

1.6 Transwell 实验

实验采用 24 孔板 8 μ m Transwell 小室,每组 3 个小室。每小室加 8×10^4 细胞,滴加 1 % RPMI1640 培养基至 200 μ L,小室下层滴加 600 μ L 20 % RPMI1640 培养基。在迁移实验中,24 h 后采用 100%乙醇固定 5 分钟后,龙胆紫染 7 分钟。在侵袭试验中,实验前在小室铺 50 μ L Matrigel 基质胶,48 h 后采用上述方法固定与染色。每小室随机选择 5 个视野在显微镜(200 $\times$)进行计数。实验重复 3 次。

1.7 统计学分析

实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{X} \pm S$)表示,采用 SPSS 19.0 软件对多个样本均数进行单因素方差分析,各均数间的两两比较行 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染效率

与阴性对照组比较,实验组转染 miR-335 模拟物后其 miR-335 表达水平显著升高($P < 0.01$)(图 1)。

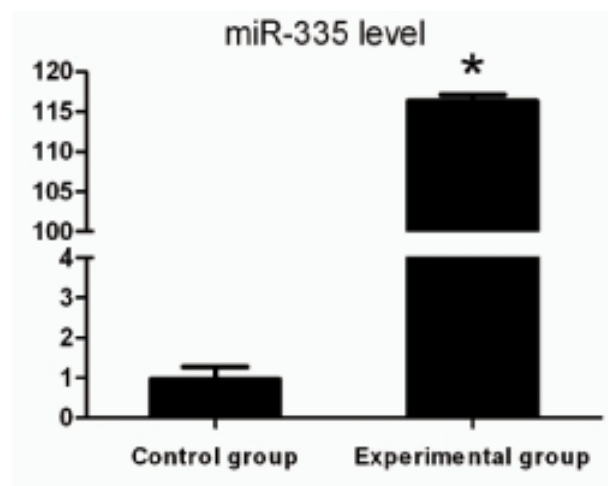


图 1 miR-335 的转染效率,* $P < 0.01$,与阴性对照组比较

Fig.1 The transfection efficiency of miR-335,* $P < 0.01$, Compared with control group

2.2 miR-335 对骨肉瘤 SOSP-9607 细胞增殖的影响

阴性及空白两对照组间细胞的增殖率未见明显差异,而实验组细胞 48、72 和 96 h 的增殖率较阴性对照组则明显降低($P < 0.05$),表明 miR-335 对骨肉瘤细胞的增殖有明显抑制作用(图 2)。

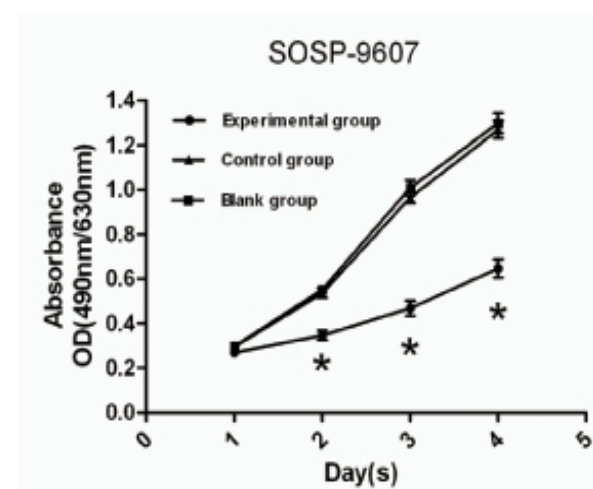


图 2 实验组、阴性对照组和正常细胞组生长曲线,* $P < 0.01$,与阴性对照组比较

Fig.2 Experimental group, Control group, Blank group growth curve,* $P < 0.01$, Compared with control group

2.3 miR-335 对骨肉瘤 SOSP-9607 细胞迁移及侵袭的影响

在 Transwell 迁移和侵袭实验中(图 3),穿过小室的细胞数目反映了细胞的迁移或侵袭能力。本实验对穿过小室的三组骨肉瘤细胞数目进行统计制图并比较(图 4),结果显示:实验组穿过小室的细胞数目明显低于阴性对照组的细胞数目($P < 0.05$),而两对照组细胞数目未见明显差别($P > 0.05$),表明 miR-335 对骨肉瘤细胞转移及侵袭能力有明显抑制作用。

3 讨论

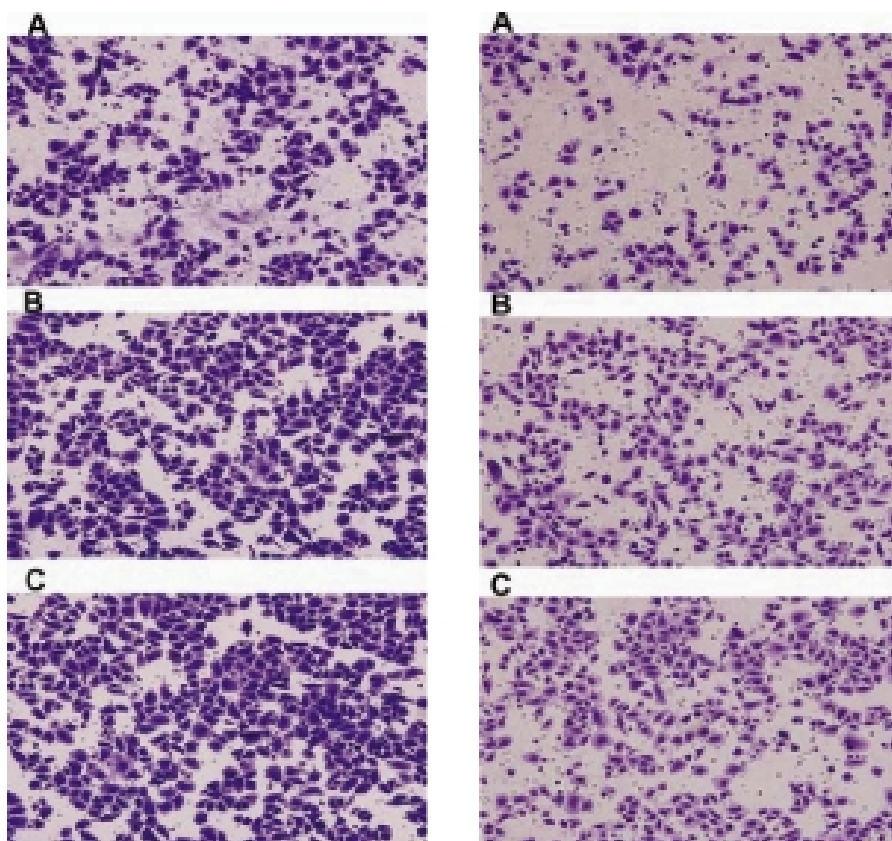


图 3 Transwell 迁移(左)及侵袭(右)实验:A.实验组;B.阴性对照组;C.空白对照组(200×)

Fig.3 Transwell migration(left) and invasion(right) assays: A.experimental group; B.control group; C.blank group(200×)

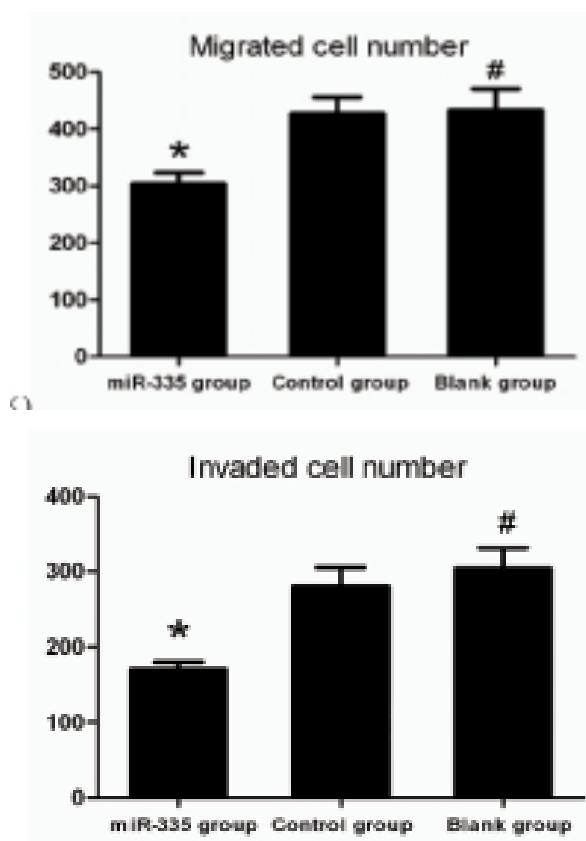


图 4 Transwell 迁移及侵袭统计图,* $P<0.05$,# $P>0.05$,与阴性对照组比较

Fig.4 Statistical histogram of the cell number in the Transwell migration and invasion assays,* $P<0.05$,# $P>0.05$,Compared with control group

MicroRNAs(miRNAs)是一组约 22 个核苷酸序列的非编码蛋白的 RNA 调控分子,在细胞增殖、凋亡、分化等细胞学行为中发挥重要作用^[9]。越来越多的研究表明 miRNAs 在许多类型的肿瘤中异常表达,且通过对肿瘤抑制分子或癌基因的调控,在许多肿瘤的发生发展中起到重要作用^[10,11]。自从 Calin GA 等^[12]第一次报道了 miRNAs 与肿瘤的关系后,miRNAs 与肿瘤的关系已成为目前研究的热点。Yubin Hao 等^[13]研究发现通过对靶基因 COX-2 的调控,miR-101 对前列腺癌体内增殖能力有明显的抑制作用。XiangMin Li 等^[14]再行结直肠癌组织与癌旁组织成对比较的时候发现,miR-126 在结直肠癌的表达水平中明显低于癌旁组织,且提高 miR-126 的表达水平会显著抑制肿瘤细胞的增殖能力。Zhenfeng Duan 等^[15]研究表明 miR-199a-3p 在人骨肉瘤细胞中表达受抑制,且其参与骨肉瘤细胞增殖和迁移方面的调控。

作为 microRNAs 家族的一个重要成员,miR-335 在许多肿瘤中表达下调,包括乳腺癌、卵巢癌、肺癌、胃癌等,miR-335 的低表达被认为在这些肿瘤的发生发展中起到重要作用。Holger Heyn 等^[16]研究发现 miR-335 通过对靶分子的调控,在乳腺癌的发展中发挥重要作用,突出表现在对乳腺癌细胞增殖与凋亡等方面的抑制作用。Antonio Sorrentino 等^[17]在行卵巢癌化疗耐药性研究发现,包括 miR-335 在内的 3 个 miRNAs 在卵巢癌的几个耐药株系均低表达,提示其与卵巢癌的化疗耐药有一定关系,为卵巢癌耐药性研究提供了思路。据 OSAMU DOHI 等^[18]研究报道,与癌旁组织相比,miR-335 在肝癌中表达明显下调,且 miR-335 的下调与肝癌的转移有一定关联。

Hao Hu 等^[9]研究发现,包括 miR-335 在内的 4 个 miRNAs 骨肉瘤 MG63 细胞系中低表达,这些异常表达的 miRNAs 可能在以后对骨肉瘤患者的诊疗和预后起到一定指示作用,但 miR-335 的低表达在骨肉瘤细胞生物学行为中所起到的作用未有进一步研究。本实验采取外源性转染 miR-335 模拟物促进骨肉瘤细胞内 miR-335 的表达,为了验证其在骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭等生物学行为中起到的作用,分别进行了 MTT 和 Transwell 实验。MTT 比色结果显示实验组在转染 miR-335 后其细胞增殖能力较对照组明显降低。Transwell 迁移和侵袭实验也提示实验组细胞的迁移及侵袭能力较对照组明显降低。

本实验通过外源性转染 miR-335 模拟物提高骨肉瘤细胞系中 miR-335 的表达水平,证明了 miR-335 对体外培养的骨肉瘤细胞增殖和转移具有抑制作用,本实验为 miR-335 作为骨肉瘤诊治的新靶点提供了参考依据。

参考文献(References)

- [1] Link MP. Osteosarcoma in adolescents and young adults: new developments and controversies. Commentary on the use of presurgical chemotherapy[J]. Cancer Treat Res, 1993, 62: 383-385
- [2] Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer[J]. Mol Oncol, 2012, 6: 590-610
- [3] Chen PS, Su JL, Hung MC. Dysregulation of microRNAs in cancer[J]. J Biomed Sci, 2012, 19: 90
- [4] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6: 259-269
- [5] Hammond SM. MicroRNAs as tumor suppressors[J]. Nat Genet, 2007, 39: 582-583
- [6] Qin X, Yan L, Zhao X, et al. microRNA-21 overexpression contributes to cell proliferation by targeting PTEN in endometrioid endometrial cancer[J]. Oncol Lett, 2012, 4: 1290-1296
- [7] Rather MI, Nagashri MN, Swamy SS, et al. Oncogenic MicroRNA-155 Down-regulates Tumor Suppressor CDC73 and Promotes Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Proliferation [J]. Implications For Cancer Therapeutics. J Biol Chem, 2013, 288: 608-618
- [8] Liu L, Yu X, Guo X, et al. miR-143 is downregulated in cervical cancer and promotes apoptosis and inhibits tumor formation by targeting Bcl-2[J]. Mol Med Report, 2012, 5: 753-760
- [9] Frampton AE, Krell J, Jacob J, et al. Loss of miR-126 is crucial to pancreatic cancer progression [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2012, 12: 881-884
- [10] Caldas C, Brenton JD. Sizing up miRNAs as cancer genes [J]. Nat Med, 2005, 11(7): 712-714
- [11] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(11): 857-866
- [12] Calin GA. Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(24): 15524-15529
- [13] Yubin Hao, Xinbin Gu, Yuan Zhao, et al. Enforced expression of miR-101 inhibits prostate cancer cell growth by modulating the COX-2 pathway in vivo cancer[J]. Med Oncol, 2011, 4(7): 1073-1083
- [14] XiangMin Li, AiMin Wang, Juan Zhang, et al. Down-regulation of miR-126 expression in colorectal cancer and its clinical significance [J]. Med Oncol, 2011, 28: 1054-1057
- [15] Zhenfeng Duan, Edwin Choy, David Harmon, et al. MicroRNA-199a-3p is downregulated in human osteosarcoma and regulates cell proliferation and migration[J]. Mol Cancer Ther, 2011, 10: 1337-1345
- [16] Heyn H, Engelmann M, Schreek S, et al. MicroRNA miR-335 is crucial for the BRCA1 regulatory cascade in breast cancer development[J]. Int J Cancer, 2011, (12): 2797-2806
- [17] Sorrentino A, Liu CG, Addario A, et al. Role of microRNAs in drug-resistant ovarian cancer cells[J]. Gynecol Oncol, 2008, (3): 478-486
- [18] Dohi O, Yasui K, Gen Y, et al. Epigenetic silencing of miR-335 and its host gene MEST in hepatocellular carcinoma[J]. J Oncol, 2013, (2): 411-418
- [19] Hu Hao, Zhang Yi, Cai Xian-hua, et al. Changes in microRNA expression in the MG-63 osteosarcoma cell line compared with osteoblasts[J]. Oncology Letters, 2012, (4): 1037-1042
- [16] KrberA, Frankson T, Grabbe S, et al. Vacuum assisted closure device improves the take of mesh grafts in chronic leg ulcer patients [J]. Dermatology, 2008, 216(3): 250-256
- [17] 吴彩玉, 王晓玲, 李艳容. 自行研发封闭式负压引流装置对难愈性伤口的治疗及护理[J]. 现代临床护理, 2011, 10(7): 31-33
Wu Cai-yu, Wang Xiao-ling, Li Yan-rong. Developed its own treatment and care of closed suction drainage devices for refractory wounds treatment and nursing[J]. Modern Clinical Nursing, 2011, 10(7): 31-33
- [18] 陈立安, 陈健民, 黄炳生. 负压封闭引流术在慢性难愈合伤口治疗的应用[J]. 岭南现代临床外科, 2011, 11(6): 458-459
Chen Li-an, Chen Jian-min, Huang Bing-sheng. Effect of vacuum sealing drainage on the treatment of chronic unhealed wounds[J]. Lingnan Modern Clinics in Surgery, 2011, 11(6): 458-459
- [19] 胡彩华, 黄春霞. 外用重组人表皮生长因子治疗烧伤创面的疗效观察[J]. 家庭护士, 2006, 4(10): 10
Hu Cai-hua, Huang Chun-xia. Effect observation of For external use recombinant human epidermal growth factor on treating burn wound [J]. Family Nurse, 2006, 4(10): 10
- [20] 孙亚妮, 何娟. 金因肽与烧伤二号治疗压疮效果观察[J]. 中国美容医学, 2011, 20(9): 1379-1371
Sun Ya-ni, He Juan. Observation of therapeutic effect of decubitus using Jin Yin Tai and NO. 2 Burning[J]. Chinese Journal of Aesthetic Medicine, 2011, 20(9): 1379-1371

(上接第 1314 页)