

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.13.010

MicroRNA-21 靶向调控 β -catenin 促进骨肉瘤细胞 U2OS 的增殖与侵袭 *

李 科 刘明华[△] 张 雷 徐世伟 尹昌林 任小宝 向 强

(解放军第三军医大学西南医院急诊科 重庆 400038)

摘要 目的:研究微小 RNA-21(microRNA-21, miR-21)对骨肉瘤细胞 U2OS 增殖与侵袭的影响及其可能机制。**方法:**采用 Real-time PCR (RT-PCR) 检测 miR-21 在骨肉瘤和临近正常骨组织中的表达差异。通过脂质体转染法将 miR-21 模拟物(miR-21 mimics, 即 mimics 组)及 microRNA 无序列(miR-NC, 即 NC 组)转染入骨肉瘤细胞 U2OS, real-time PCR(RT-PCR)检测 miR-21 和 β -catenin mRNA 在 U2OS 细胞中的表达, Western blot 检测 β -catenin 蛋白在 U2OS 细胞中的表达, 并通过双荧光素酶报告基因验证 miR-21 与 β -catenin 基因 3'-非编码区(3'-untranslated region, 3'-UTR)的特异性结合作用。MTT 法检测 U2OS 细胞体外增殖能力; Transwell 侵袭模型探查 U2OS 细胞侵袭潜能。**结果:**骨肉瘤组织中 miR-21 水平显著高于正常骨组织($P<0.05$)。过表达 miR-21 能够增强细胞增殖与侵袭, 上调 U2OS 细胞 β -catenin mRNA 和蛋白的表达。双荧光素酶报告基因结果表明 miR-21 可与 β -catenin 基因 3'-UTR 结合, 从而对 β -catenin 的表达起调控作用。**结论:**miR-21 可能通过调节 β -catenin 的表达促进骨肉瘤细胞 U2OS 的增殖与侵袭。

关键词:骨肉瘤; 微小 RNA-21; β -连环蛋白; 增殖; 侵袭

中图分类号:R-33; R738 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)13-2448-05

Role of miR-21 in the Proliferation and Invasion of Osteosarcoma U2OS Cells by Regulating β -catenin Expression*

LI Ke, LIU Ming-hua[△], ZHANG Lei, XU Shi-wei, YIN Chang-lin, REN Xiao-bao, XIANG Qiang

(Department of emergency, Southwest Hospital in Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the role of microRNA-21 (miR-21) in the proliferation and invasion potential of osteosarcoma cell lines U2OS and the exact underlying mechanism. **Methods:** The expression level of miR-21 in human osteosarcoma tissues and adjacent normal bone tissues was detected by real-time PCR (qRT-PCR). Osteosarcoma cells U2OS were transfected with chemically-synthesized miR-21 mimics and miR-NC, the expression of miR-21 and β -catenin were determined by qRT-PCR and western blot. The specific binding ability of miR-21 to β -catenin 3'-UTR was theoretically predicted and detected by the dual luciferase reporter gene assay. Moreover, the proliferation and invasion of U2OS cells were detected by MTT and Transwell assay. **Results:** The expression levels of miR-21 was higher in human osteosarcoma tissues compared to adjacent normal bone tissues ($P<0.05$). miR-21 directly up-regulates the mRNA and protein expression levels of β -catenin ($P<0.05$) and promotes proliferation and invasion abilities of U2OS cells. Luciferase reporter gene assay showed that miR-21 targeted the 3'-UTR of β -catenin and regulated the expression of β -catenin. **Conclusions:** miR-21 could enhance the proliferation and invasion abilities of osteosarcoma cell lines U2OS via upregulating the β -catenin expression.

Key words: Osteosarcoma; Micro RNA-21; β -catenin; Proliferation; Invasion

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R738 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)13-2448-05

前言

骨肉瘤是一种多见于 15 岁以下人群的高度恶性的原发性骨肿瘤, 生长迅速且具有极强的组织侵袭能力, 极易发生远处转移, 预后差^[1,2]。近年来, 随着骨肉瘤的个体化治疗方案的推广, 骨肉瘤的临床治疗效果明显改善, 但骨肉瘤的高侵袭性仍是导致患者死亡率较高的主因。因此, 加强骨肉瘤细胞异常生

长转移的作用机制已成为临床迫切需要解决的问题^[3,4]。

β -catenin 是一种多功能蛋白, 主要作用为影响细胞与细胞之间黏附和参与基因的表达^[5]。既往研究表明在骨肉瘤组织中存在包括 β -catenin 在内的多种促癌基因的异常激活, 但其机制不清^[6]。近年来, 日益增多的文献表明 miRNA 参与多种肿瘤发生、发展等病理过程, 并起抑癌或癌基因的作用^[7]。骨肉瘤中 miR-21 异常升高提示 miR-21 可能发挥重要作用, 但机制不

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81071537)

作者简介: 李科(1975-), 本科, 主治医师, 主要研究方向: 急诊及创伤急救, E-mail: 583702829@qq.com, 电话: 13708332499

[△] 通讯作者: 刘明华, 急救部主任, 主任医师, 第三军医大学卫勤分队分类后送组组长,

航天救援遂宁点支医院专家组组长, E-mail: jjbicu@sohu.com

(收稿日期: 2018-12-28 接受日期: 2019-01-23)

明^[8]。本实验旨在探讨 miR-21 对骨肉瘤的增殖与侵袭能力的影响及其是否与调控 β -catenin 的表达有关。

1 材料与方法

1.1 材料

U2-OS 细胞系购自上海艾曼凯生物科技有限公司; RPMI-1640 基础培养基购自北京澳博柯特生物科技有限公司; Transwell 侵袭实验细胞小室 (8 μ m) 购自美国 Biosciences 公司; 无细胞因子细胞基质胶购自美国 Sigma 公司; 实时定量 PCR 程序所用逆转录试剂盒及试剂均购自康维世纪生物公司; CCK-8 试剂盒购自武汉兰博圣生物公司; miR-21 mimics 及其无关序列 (miR-NC)、miR-21 qPCR Quantitation Kit、U6 snRNA qRNA qPCR Normalization Kit 均由广州瑞博生物技术有限公司化学合成; 多克隆兔抗人 β -catenin 及多克隆兔抗人 β -actin 购自英国 Abclonal Biotech 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 临床标本收集与细胞培养 本研究所有肿瘤组织标本和骨肉瘤组织标本均来自于第三军医大学西南医院生物医学样本库, 纳入的所有临床标本取材均通过所在医院伦理委员会审批许可, 仅用于实验研究。从手术台上取出的新鲜标本立即放置于液氮速冻保存, 后期用于组织 RNA 的提取。U2-OS 细胞置于 15% 浓度 FBS 的 RPMI-1640 培养基中培养。

1.2.2 细胞转染 U2-OS 细胞消化后接种于 6 孔板 (5×10^5 个/孔)。培养过夜待其密度为 45-50% 进行转染。根据脂质体 Lipofectamine[®] 3000 说明书分别将 microRNA 无关序列 (miRNA-NC, 即 NC 组) 及 microRNA-21 模拟物 (miRNA-21 mimics, 即 mimics 组) 按每孔 50 nmol/L 的终浓度对 U2-OS 细胞进行转染。细胞转染后 24 h, 进行后续实验。

1.2.3 实时定量 PCR (RT-PCR) 按 TRIzol 说明书进行组织样本以及 U2-OS 细胞中 microRNA 和 RNA 的提取。PCR 扩增使用特异性 miR-21 的反转录引物, 并以 snRNA U6 作为内参, 按试剂盒进行反转录及 real-time PCR 反应。 β -catenin 和 β -actin 的引物均由南京景竹生物科技公司合成。 β -catenin: 上游 5' -GCTGGCCCCAGCCGCTGGAG-3', 下游 5' -GAGTGCAGG GTCAGCACTAC-3'; β -actin: 上游 5' -CGTTGGATCACAGCACATCAG-3', 下游 5' -GTACCAAGAGGACAGACTCAC-3'。实验结果按照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行表达量统计分析。

1.2.4 Western blot U2-OS 细胞经过指定处理之后使用 4℃ 预冷的 PBS 洗涤 3 次。随后裂解、提取总蛋白并测浓度。取 60 μ g 总蛋白上样跑电泳、转膜, 并 BSA 孵育 1h, 随后用多克隆兔抗人的 β -catenin (1:500)、多克隆兔抗人 β -actin (1:2500) 分别与膜接触 4℃ 孵育过夜。次日, TBST 清洗条带后放入 1:5000 浓度稀释后的兔二抗中常温下孵育 45 min, 虽有 TBST 清洗条带 3 次后进行显影。

1.2.5 Transwell 细胞侵袭实验 提前在 4℃ 融解 Matrigel 基质胶, 每个小室的上面铺上 40 μ L 稀释的 Matrigel 胶, 放入培养箱中 4 h 凝固备用。将第二三代 U2-OS 细胞在 IMDM 基础培养基中培养过夜使其同步化, 次日消化、重悬并将细胞密度调整至 4×10^5 /mL。上室放入 200 μ L 无血清细胞悬液, 下室

放 600 μ L 含 10% FBS 培养基。固定、染色后在显微镜下拍照、统计分析。

1.2.6 MTT 实验 将 U2-OS 细胞以 2×10^3 /孔密度接种于 96 孔板, 待细胞长到 50% 融合后转染, 不同时间点 (24, 48, 72, 96 h) 加入 50 μ L MTT 溶液 (5 mg/mL), 避光恒温孵育 2-4h 后加入 DMSO (150 μ L/孔), 摇床放置 8 分钟随后检测 450 nm 吸光度并绘制生长曲线。

1.2.7 双荧光素酶报告基因实验 采用野生型的 β -catenin 3'-UTR-wt 载体及定点突变后的 β -catenin 3'-UTR-mut 载体, 分别和 miR-21 mimics 一起通过脂质体 Lipofectamine[®] 3000 共转染入 U2-OS 细胞中, 转染 48 h 后进行检测。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。本研究所有数据以“均数 $\pm$ 标准差”展现, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较为 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨肉瘤组织中 miR-21 表达

RT-PCR 结果表明骨肉瘤组织中 miR-21 水平显著高于正常骨组织, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 1)。

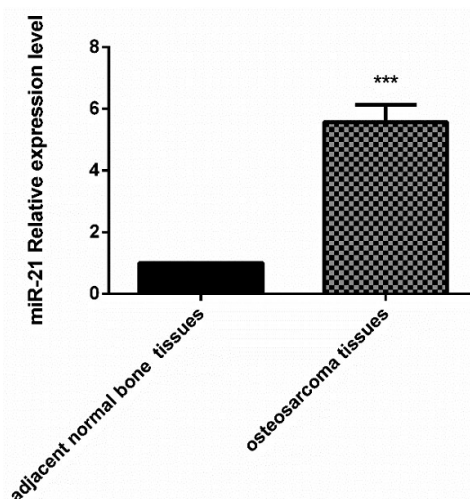


图 1 miR-21 在骨肉瘤组织和正常骨组织中的表达

Fig.1 The relative expression level of miR-21 in human osteosarcoma specimens and matched adjacent normal bone specimens

2.2 骨肉瘤细胞系 U2-OS 中 miR-21 的表达

在 U2-OS 细胞转染 miR-21 mimic 及 miR-NC 24 h 后, 免疫荧光结果显示 miR-21 mimic 组的 U2-OS 细胞中可见携带 GFP 绿色荧光蛋白, 表明转染成功 (图 2A)。RT-PCR 结果显示 miR-21 mimic 组 miR-21 明显高于空白对照组和 miR-21 NC 组 (图 2B)。

2.3 miR-21 对 U2OS 细胞增殖能力的影响

将 U2OS 细胞分为 3 组: 空白对照组、miR-21 阴性对照组 (miR-NC) 及 miR-21 模拟物组 (miR-21 mimics)。MTT 检测结果显示: 空白对照组和阴性对照组间细胞的增殖速度无明显差异, 而采用 miR-21 mimics 上调 miR-21 的表达后, U2OS 细胞的增殖速度明显加快, 有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 3)。

2.4 miR-21 对 U2OS 细胞侵袭能力的影响

将 U2OS 细胞分为 3 组:空白对照组、miR-21 阴性对照组 (miR-NC) 及 miR-21 模拟物组 (miR-21 mimics)。结果显示:

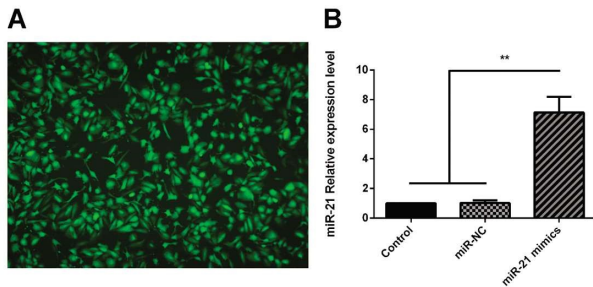


图 2 转染 miR-21 mimics 后 U2-OS 细胞中 miR-21 的表达

Fig. 2 The expression of miR-21 in osteosarcoma cell lines U2OS transfected with miR-21 mimics

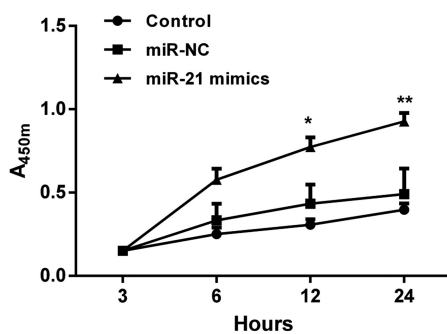


图 3 miR-21 mimic 对 U2OS 细胞增殖能力的影响

Fig.3 Effects of transfection with miR-21 mimic on the proliferation of human osteosarcoma cell lines U2OS

miR-21 mimic 组中穿膜细胞数明显多于空白对照组和 miR-21 NC 组,差异有统计学意义($P<0.05$)(图 4)。

2.5 过表达 miR-21 上调 β -catenin 基因表达

转染 miR-21 mimic 24 及 48 h 后分别提取细胞 mRNA 和总蛋白,采用 RT-PCR 和 Western blot 检测过表达 miR-21 对 β -catenin mRNA 和蛋白表达水平的影响。结果显示:miR-21 mimic 组中 β -catenin mRNA 和蛋白水平明显高于 miR-21 NC 组和空白对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)(图 5)。

2.6 miR-21 与 β -catenin 相互作用关系的双萤光素酶实验检测

本结果表明 miR-21 能显著促进野生型 β -catenin 3'-UTR-wt 载体的萤光强度($P<0.05$),而无法抑制 3'UTR 定点突变后 β -catenin 3'-UTR-mut 载体的萤光强度,提示 β -catenin 为 miR-21 的下游靶基因($P<0.05$)(图 6)。

2.7 靶向沉默 β -catenin 对 miR-21 调节的 U2OS 细胞增殖与侵袭能力的影响

在转染 miR-21 mimic 的 U2OS 细胞中同时转染 β -catenin siRNA,Transwell 实验结果显示: β -catenin siRNA 和 miR-21 mimic 同时转染 U2OS 细胞 48 h 后细胞增殖、侵袭能力均较 miR-21 mimic 组和 siRNA-NC 组显著减弱 ($P<0.05$) (图 7)。

3 讨论

虽然近些年来骨肉瘤的临床诊疗手段不断更新,但根据美国癌症协会最新的统计资料表明全球骨肉瘤患者的总体 5 年生存率仍然处于较低水平^[9-11]。这与骨肉瘤本身具有高度恶性、极易发生远处侵袭和生长有关,临床上 80%患者在初步确诊骨肉瘤时被告知已经发生其他器官转移,其中以肺部为转移居首

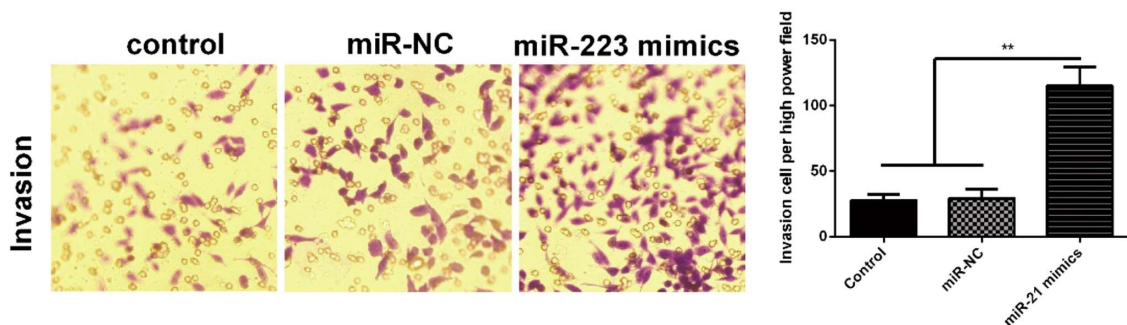


图 4 miR-21 mimic 对 U2OS 细胞侵袭潜能的影响 (结晶紫染色 $\times 200$)

Fig.4 Effects of transfection with miR-21 mimic on the invasion of human osteosarcoma cell lines U2OS (crystal violet staining $\times 200$)

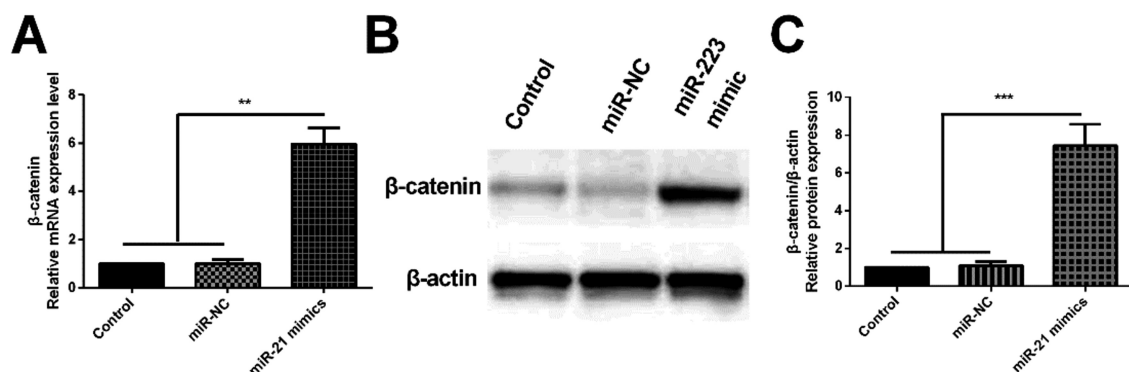


图 5 转染 miR-21 mimic 对 U2OS 细胞 β -catenin mRNA 和蛋白表达的影响

Fig.5 Effects of transfection with miR-21 mimic on the mRNA and protein expression of β -catenin in human osteosarcoma cell lines U2OS

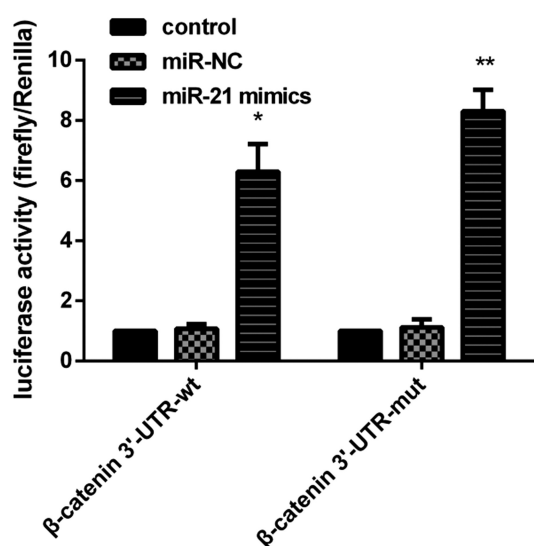


图6 β-catenin 基因相对荧光素酶活性

Fig.6 The relative luciferase activity of β-catenin

位,这也是患者死亡的最主要原因^[12,13]。因此,针对骨肉瘤高度侵袭性和异常增殖的特性进行深入研究,阐明其发生发展机制并寻找新的靶点具有重要的临床意义。

近年来,microRNA 的在恶性肿瘤中的作用日益引起国内外学者的广泛关注,为研究骨肉瘤增殖与转移的基因表达调控机制提供了新视角^[14,15]。MicroRNA 是一类小 RNA,长度 20~26 nt,常与靶基因 mRNA 3' 端非翻译区(3'UTR)互补,使得下游靶基因被降解并表达失活^[16,17]。越来越多研究表明 miR-21 的异

常表达可能参与了包括骨肉瘤在内的人类多种恶性肿瘤疾病疾病的发病过程^[18]。有文献报道 miR-21 的异常升高与骨肉瘤患者的临床病理预后呈负相关,可用作该疾病诊断的生物标志物^[19]。骨肉瘤患者血浆也被证实存在 miR-21 水平的升高,此类患者往往易并发化疗耐药。因此,miR-21 可作为一种骨肉瘤便捷的生物标志物^[19]。Lv 等研究发现 miR-21 可以通过调控 PTEN/Akt 信号通路激活骨肉瘤的异常增殖并增强其侵袭潜能,同时促进细胞存活^[20]。Zhao 等研究发现 lncRNA-ASBEL 可调控 miR-21 水平,从而骨肉瘤细胞增殖、侵袭等生物学功能中其促进作用^[21]。由此可见,miR-21 的异常激活也可能参与骨肉瘤的发病。本研究结果显示 miR-21 mimic 组 miR-21 的表达明显高于空白对照组和 miR-NC 组,同时 miR-21 mimic 组细胞的增殖与侵袭能力也显著增强,提示 miR-21 上调可能通过增强骨肉瘤增殖与侵袭能力参与骨肉瘤的发生和发展。

β-catenin 参与恶性肿瘤异常增殖与侵袭过程,通常与 E-cadherin 相互作用从而对细胞粘附进行调控,同时也可以通过入核内与 TCF-4 相结合从而调控下游一系列靶基因的转录^[22,23]。有研究表明 β-catenin 作为多种 microRNA 的下游调控靶基因,能够通过进一步调控下游靶基因对一系列诸如细胞增殖、分化、凋亡、侵袭等生物学事件进行干预,最终影响多种肿瘤的发生发展^[24,25]。然而,miR-21 是否通过调控 β-catenin 信号通路参与骨肉瘤在骨肉瘤恶性增殖与远处侵袭过程中发挥重要作用目前尚未有文献报道。因此,我们进一步检测了 miR-21 mimic 对 β-catenin 基因表达的影响,结果显示 miR-21 mimic 组的 β-catenin mRNA 和蛋白表达显著上调,同时细胞增殖、侵

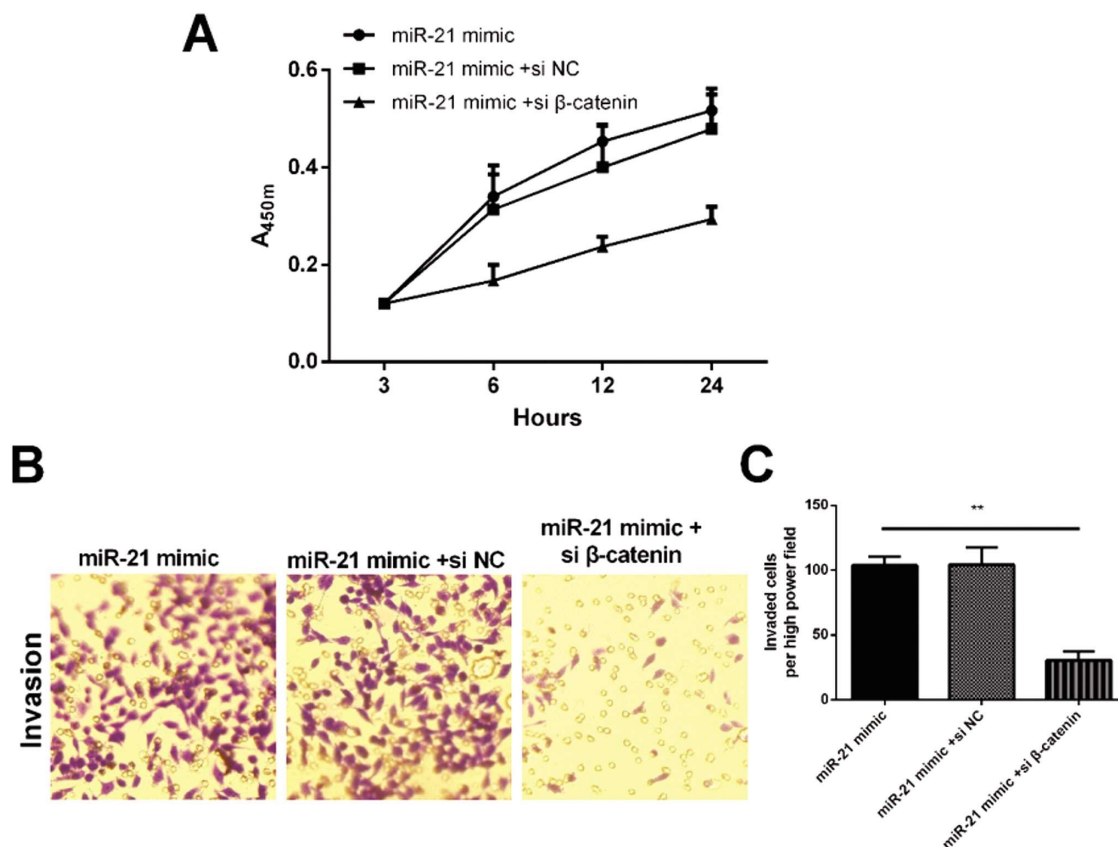


图7 β-catenin siRNA 对 miR-21 mimic 调节的 U2OS 细胞增殖与侵袭能力的影响

Fig.7 Effect of β-catenin siRNA on the proliferation and invasion potentiality of U2OS cells transfected with miR-21 mimics

袭潜能均明显增强,证实了 β -catenin 参与了 miR-21 介导的生物学事件。双荧光素酶报告基因实验结果显示 β -catenin 作为 miR-21 下游调控基因而存在,过表达 miR-21 能够显著上调 β -catenin 基因的启动子区活性。我们进一步采用 β -catenin siRNA 干预,发现 β -catenin siRNA 能够显著减弱 miR-21 mimic 介导的 U2OS 细胞增殖与侵袭,提示 β -catenin 在 miR-21 介导的 U2OS 体外异常增殖与过度侵袭中扮演重要角色。基于以上研究,我们推测 miR-21 可能通过激活 β -catenin 基因调控下游靶基因转录激活,从而增强 U2OS 细胞增殖、侵袭潜能。

综上所述,本研究证实骨肉瘤组织中 miR-21 异常上调可能通过上调 β -catenin 增强 U2OS 细胞的增殖、侵袭能力,miR-21/ β -catenin 轴可能为骨肉瘤的临床诊断与治疗提供新的靶点。

参考文献(References)

- [1] Liu H, Gao Y, Dong Y, et al. Flavonoids Active Against Osteosarcoma: A Review of the Molecular Mechanisms Involved[J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23: 1993-2001
- [2] Harrison DJ, Geller DS, Gill JD, et al. Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2018, 18: 39-50
- [3] Federman N, Bernthal N, Eilber FC, et al. The multidisciplinary management of osteosarcoma[J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2009, 10: 82-93
- [4] Vijayamurugan N, Bakhshi S. Review of management issues in relapsed osteosarcoma [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2014, 14: 151-161
- [5] Shang S, Hua F, Hu ZW. The regulation of beta-catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 33972-33989
- [6] Li C, Shi X, Zhou G, et al. The canonical Wnt-beta-catenin pathway in development and chemotherapy of osteosarcoma [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2013, 18: 1384-1391
- [7] Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy[J]. *Trends Mol Med*, 2014, 20: 460-469
- [8] Kushlinskii NE, Fridman MV, Braga EA. Molecular Mechanisms and microRNAs in Osteosarcoma Pathogenesis [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2016, 81: 315-328
- [9] Palmini G, Marini F, Brandi ML. What Is New in the miRNA World Regarding Osteosarcoma and Chondrosarcoma [J]. *Molecules*, 2017, 22: 332-33-41
- [10] Gianferante DM, Mirabello L, Savage SA. Germline and somatic genetics of osteosarcoma - connecting aetiology, biology and therapy [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2017, 13: 480-491
- [11] Bishop MW, Janeway KA, Gorlick R. Future directions in the treatment of osteosarcoma[J]. *Curr Opin Pediatr*, 2016, 28: 26-33
- [12] Ferrari S, Serra M. An update on chemotherapy for osteosarcoma[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2015, 16: 2727-2736
- [13] Gordon N, Kleinerman ES. The role of Fas/FasL in the metastatic potential of osteosarcoma and targeting this pathway for the treatment of osteosarcoma lung metastases[J]. *Cancer Treat Res*, 2009, 152: 497-508
- [14] Ram Kumar RM, Boro A, Fuchs B. Involvement and Clinical Aspects of MicroRNA in Osteosarcoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: 182-188
- [15] Zhou G, Shi X, Zhang J, et al. MicroRNAs in osteosarcoma: from biological players to clinical contributors, a review[J]. *J Int Med Res*, 2013, 41: 1-12
- [16] He M, Zhou W, Li C, et al. MicroRNAs, DNA Damage Response, and Cancer Treatment[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: 28-37
- [17] Gasparri ML, Casorelli A, Bardhi E, et al. Beyond circulating microRNA biomarkers: Urinary microRNAs in ovarian and breast cancer[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39: 1010428317695525
- [18] Hong L, Han Y, Zhang Y, et al. MicroRNA-21: a therapeutic target for reversing drug resistance in cancer [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2013, 17: 1073-1080
- [19] Hua Y, Jin Z, Zhou F, et al. The expression significance of serum MiR-21 in patients with osteosarcoma and its relationship with chemosensitivity[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21: 2989-2994
- [20] Lv C, Hao Y, Tu G. MicroRNA-21 promotes proliferation, invasion and suppresses apoptosis in human osteosarcoma line MG63 through PTEN/Akt pathway[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37: 9333-9342
- [21] Zhao J, Zhang C, Gao Z, et al. Long non-coding RNA ASBEL promotes osteosarcoma cell proliferation, migration, and invasion by regulating microRNA-21[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 13: 672-682
- [22] Krishnamurthy N, Kurzrock R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors[J]. *Cancer Treat Rev*, 2018, 62: 50-60
- [23] Aktary Z, Bertrand JU, Larue L. The WNT-less wonder: WNT-independent beta-catenin signaling [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2016, 29: 524-540
- [24] Ghahhari NM, Babashah S. Interplay between microRNAs and WNT/beta-catenin signalling pathway regulates epithelial-mesenchymal transition in cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2015, 51: 1638-1649
- [25] Peng Y, Zhang X, Feng X, et al. The crosstalk between microRNAs and the Wnt/beta-catenin signaling pathway in cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 14089-14106