

· 基础研究 ·

miR-181a-5p 通过 HOXB4 抑制骨肉瘤细胞 HOS 增殖和迁移

李嘉熙, 贺西京, 李飞, 雷雨田, 杨于冰, 李京, 宗高阳, 赵敏超, 常素娥
(西安交通大学第二附属医院骨科, 陕西 西安 710004)

【摘要】 目的: 研究 miR-181a-5p 对 HOS 骨肉瘤细胞增殖、周期和迁移的影响及其机制。方法: 采用实时定量 PCR 检测 hFOB1.19 成骨细胞和 HOS、U2OS、MG63 骨肉瘤细胞系中 miR-181a-5p 及 HOXB4 的表达情况。利用 Lipofectamine 2000 将 miR-181a-5p mimics 和 miR-181a-5p inhibitor 分别转染至人骨肉瘤 HOS 细胞中(分别为过表达组和抑制剂组), 并设置 miR 阴性对照组; CCK-8 法检测各组细胞的增殖能力变化, 流式细胞术检测各组细胞的细胞周期变化, 划痕愈合实验以及 Transwell 迁移实验检测各组细胞的迁移能力变化。Targetsan 网站预测 miR-181a-5p 的靶向基因, 并通过双荧光素酶报告基因系统及 Western blot 验证靶向关系。结果: 与成骨细胞 hFOB1.19 相比, miR-181a-5p 在骨肉瘤细胞 HOS、U2OS 和 MG63 中低表达($P<0.05$), 而 HOXB4 在骨肉瘤中高表达($P<0.05$)。与阴性对照组相比, 过表达 miR-181a-5p 抑制骨肉瘤 HOS 细胞的增殖和迁移能力, 并且处于细胞周期 S 期的细胞减少($P<0.05$)。敲低 miR-181a-5p 促进骨肉瘤 HOS 细胞的增殖和迁移能力, 并且处于 S 期细胞增加($P<0.05$)。生物信息学预测及双荧光素酶报告基因系统验证 HOXB4 为 miR-181a-5p 的下游靶基因($P<0.05$)。Western blot 显示, 过表达 miR-181a-5p 的 HOS 细胞中, HOXB4 蛋白表达低于阳性对照组($P<0.05$), 而敲低 miR-181a-5p 的 HOS 细胞中 HOXB4 蛋白表达高于对照组($P<0.05$)。结论: miR-181a-5p 在骨肉瘤细胞中低表达, 过表达 miR-181a-5p 能够抑制骨肉瘤细胞 HOS 增殖、周期和迁移能力, 该作用可能通过靶向 HOXB4 发挥作用。

【关键词】 骨肉瘤; 细胞增殖; 细胞周期; 细胞迁移

中图分类号: R459.9; R34; R738

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2022.11.017

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



miRNA-181a-5p inhibits proliferation and migration of osteosarcoma cell line HOS by targeting HOXB4 LI Jia-xi, HE Xi-jing, LI Fei, LEI Yu-tian, YANG Yu-bing, LI Jing, ZONG Gao-yang, ZHAO Min-chao, and CHANG Su-e. Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi, China

ABSTRACT **Objective:** To study the effects and mechanisms of miR-181a-5p on the proliferation, cycle and migration of HOS osteosarcoma cells. **Methods:** Real-time quantitative PCR was used to detect the expression of miR-181a-5p and HOXB4 in osteoblast hFOB1.19 cell line and osteosarcoma cell lines (HOS, U2OS, MG63). miR-181a-5p mimics and miR-181a-5p inhibitors were respectively transfected into HOS cells by Lipofectamine 2000, and miR NC group was set as control group. CCK-8 method was used to detect the change in cell proliferation. Flow cytometry was used to detect the changes in cell cycles. Wound healing experiments and Transwell migration experiments were used to detect the changes in cell migration ability. The target gene of miR-181a-5p was predicted by Targetsan website and validated by Dual-luciferase reporter gene system and Western blot. **Results:** Compared with osteoblast hFOB1.19, miR-181a-5p was low expressed in osteosarcoma cells HOS, U2OS, and MG63 ($P<0.05$), while HOXB4 was high expressed in osteosarcoma cells HOS, U2OS, and MG63 ($P<0.05$). Compared with the miR NC group, over expression of miR-181a-5p inhibited the proliferation and migration of osteosarcoma HOS cells, and the number of cells in S phase decreased ($P<0.05$). However, knockdown miR-181a-5p promoted the proliferation and migration of osteosarcoma HOS cells, the cells in S phase increased ($P<0.05$). Bioinformatics prediction and Dual-luciferase reporter gene system validate HOXB4 as a downstream target gene of miR-181a-5p ($P<0.05$). Western blot showed that miR-181a-5p over expression or knockdown significantly down-regulated or up-regulated HOXB4 expressions in the HOS cells respectively ($P<0.05$). **Conclusion:** miR-181a-5p is down expressed in osteosarcoma cells, and over-expression miR-181a-5p inhibits the proliferation, cell cycle and migration ability of osteosarcoma cells by targeting HOXB4.

KEYWORDS Osteosarcoma; Cell proliferation; Cell cycle; Cell migration

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81601081); 陕西省自然科学基金研究计划青年项目(编号: 2021JQ-413)

Fund program: National Natural Science Foundation of China (No.81601081)

通讯作者: 常素娥 E-mail: suechang@xjtu.edu.cn

Corresponding author: CHANG Su-e E-mail: suechang@xjtu.edu.cn

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是一种起源于间充质组织的恶性肿瘤,是青少年患者中最常见的原发性恶性肿瘤^[1-2]。OS 多发生在长骨干骺端,单病灶居多^[3]。OS 的临床表现以局部疼痛、肿胀为主,偶有关节功能障碍。常见转移部位为肺、骨骼、淋巴结。OS 的致病因素尚不清楚,但与基因缺陷累积有关。目前,随着外科手术的进步以及新型放疗手段的出现,患者的生活质量和生存时间有所提高,但仍有许多患者复发或加重,严重影响患者的身心健康^[4-5]。因此,进一步研究 OS 的发生、发展、转移及复发机制对 OS 的诊治及预后有着重要意义。MicroRNAs(miRNA)是一种非编码 RNA,能在转录后调节 60% 以上的基因组,从而影响细胞增殖、黏附、侵袭、凋亡和转移等细胞功能,表达模式具有组织和肿瘤类型特异性,在骨肉瘤的发病机制中发挥着重要的作用^[6-8]。此外,深入揭示 miRNA 作用的分子机制有助于了解骨肉瘤的发病机制,为骨肉瘤患者的诊治及预后提供基于 miRNA 的治疗方法^[9-10]。本研究发现了 miR-181a-5p 在骨肉瘤细胞中的异常表达,探讨了其对骨肉瘤细胞的增殖、周期、迁移的影响,并进一步确定了其靶基因 HOXB4,为基于 miR 治疗骨肉瘤提供了新的策略。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人骨肉瘤细胞株(HOS、U2OS、MG63),人成骨细胞株 hFOB1.19 以及人胚肾细胞 HEK293T 均购自中国科学院上海细胞研究所。miR-181a-5p 模拟物(miR-181a-5p mimics)、miR-181a-5p 抑制剂(miR-181a-5p inhibitor)以及阴性对照物(miR negative control, miR NC)购于锐博生物。胎牛血清、MEM 培养液、DMEM 培养液购于 Hyclone 公司;TRIzol 试剂及 Lipofectamine™2000 购于 Invitrogen 公司;反转录 PCR 试剂盒及 SYBR Green 试剂购于 Novoproteing 公司;1%青霉素、链霉素双抗、0.25%胰酶、RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量检测盒、PVDF 膜、DAB 显色液购于武汉赛维尔生物科技有限公司;HOXB4 和 GAPDH 一抗购自 Abcam 公司;二抗购自碧云天生物技术有限公司;CCK-8 试剂盒购自南京晶恩生物科技有限公司;细胞周期试剂盒和双荧光素酶基因报告实验检测试剂盒购于南京凯基科技发展有限公司;Transwell 小室及不同规格培养皿购于 Corning 公司;Diff-quick 试剂盒购自 IMEB 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和细胞转染 将冻存的人骨肉瘤 U2OS、HOS、MG63 细胞和正常成骨细胞 hFOB1.19 复苏后分别培养于含 10%胎牛血清和 1%青链霉素

双抗的 MEM 细胞培养基中,293T 细胞培养于含 10%胎牛血清和 1%青链霉素双抗的 MEM 细胞培养基中,所有细胞置于 37℃和 5%浓度的 CO₂ 培养箱中培养。当细胞密度长至 70%以后使用 0.25%含 EDTA 的胰酶消化传代。待培养细胞汇合度达到 80%左右时进行转染,分别设 miR-181a-5p 对照组,miR-181a-5p 抑制剂组和 miR-181a-5p 过表达组。参照 Lipofectamine™2000 转染试剂说明书,分别用 MEM 培养基稀释无义 miR、miR-181a-5p inhibitor 和 miR-181a-5p mimics,同时使用 MEM 稀释 Lipofectamine™2000 各自孵育 5 min 后将两组轻柔混匀配制转染混合物,室温静置 20 min 后将其加入培养板内。培养 6 h 后更换为含血清的培养基,继续培养用于后续实验。

1.2.2 总 RNA 提取及 qRT-PCR 检测 转染后 48 h 使用 TRIzol 试剂提取 HOS、U2OS、MG63 及 hFOB1.19 细胞中总 RNA 并用 Nano-drop 进行浓度测定。按照逆转录试剂盒说明逆转录为 cDNA。依次加入 Real-time PCR 体系:SYBR premix ExTaq™ II (2×)10 μl+F-primer 1 μl+R-primer 1 μl+cDNA(100 ng/μl)1 μl+dd H₂O 7 μl,设置反应程序为 95℃ 30 s,然后 95℃ 5 s、60℃ 30 s、72℃ 30 s 进行 40 个循环反应,2^{-ΔΔCt} 法统计各组 miR-181a-5p 和 HOXB4 的相对表达量,完成后进行溶解曲线绘制。引物序列如下:miR-181a-5p,正向 CGAACATTCAACGCTGTCCG,反向 AGTGCAGGGTCCGAGGTATT,逆转录 GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACTCAC;U6,正向 TCGGGGTGCTCGCTTCGGCAGC,反向 CCAGTGCAGGGTCCGAGGT,逆转录 CGCTTCCGAATTTGCGTGTTCAT;HOXB4,正向 GCAA GA GCGCGTCTCT,反向 GAAATTCCTTCTCCAGCT;GAPDH,正向 GCCAAAAGGGTCATCATCTC,反向 GTAGAGGCAGGGATGATGTTT。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞增殖 按上述方法转染接种在 96 孔板中的 HOS 细胞,每组设置 4 个复孔。分别在转染后 0、24、48 及 72 h 时,在每孔中加入 10 μl CCK-8 溶液,37℃孵育 1 h,立即在酶标仪上测定 450 nm 波长段各孔光密度 OD 值,绘制生长曲线评价不同分组细胞的增殖活力。

1.2.4 流式细胞术检测细胞周期 待接种在 12 孔板的 HOS 细胞长至 70%时,换无血清培养基饥饿细胞 24 h,转染各组 HOS 细胞继续培养。转染 24 h 后消化离心并收集细胞,PBS 清洗离心 2 次,然后用预冷的 70%乙醇固定,4℃固定过夜。离心去乙醇,再用 PBS 清洗离心 2 次,每组细胞中加入现配制好的比例为 1:9 的碘化丙啶和 RNaseA 混合液 500 μl,室

温避光孵育 30 min, 使用流式细胞仪检测。

1.2.5 细胞划痕愈合实验 按前述方法在 24 孔板中培养 HOS 细胞, 待细胞长至 80%~90%时, 使用 200 μ l 枪头在孔板正中垂直划出 1 条直线, 然后用 PBS 冲洗 3 次, 使悬浮细胞脱落, 然后加入无血清的 MEM 培养液并用显微镜观察划痕并拍照, 此时记录为 0 h。然后转染细胞, 在转染后 18 h 及 24 h 在相同位置观察 HOS 细胞迁移情况, 并在显微镜下观察和拍照。划痕愈合率公式为: $(0\text{ h 划痕宽度}-18\text{ h 划痕宽度})/0\text{ h 划痕宽度}$ 和 $(0\text{ h 划痕宽度}-24\text{ h 划痕宽度})/0\text{ h 划痕宽度}$, 其中划痕宽度通过 Image J 软件计算得到。

1.2.6 Transwell 法检测细胞迁移 将转染 24 h 后的各组细胞消化后稀释为每毫升 10^5 个, 然后各取 100 μ l 接种到 Transwell 上室中, 下室加入 700 μ l 含 10% 血清的培养基。将 Transwell 板置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 的培养箱中继续培养 24 h。培养结束后, 使用湿润的棉签将滤膜上层未穿透的细胞擦掉, PBS 清洗 2 次, 然后用 4% 多聚甲醛室温下固定 20 min。使用迪夫快速染料试剂盒对滤膜进行染色, 在显微镜下观察随机观察 5 个视野中细胞数量并计数。

1.2.7 miR-181a-3p 靶基因预测及双荧光素酶基因报告实验验证 使用生物信息学数据库 TargetScan 在线网站对 miR-181a-5p 的靶基因进行筛选, 预测了其下游靶基因为 HOXB4, 并构建靶基因野生型和突变型报告基因质粒, 将靶基因序列通过酶切位点 SacI 和 XhoI 连接在 pmirglo 载体上。HOXB4 野生型序列为: GGCTCCTCCTAGACTGAAATGAATGTGCTCGAGA。HOXB4 突变型序列为: GAGCTCCTCCTACTGTGAAAACTTACAGCTCGA。分别将靶基因野生型载体和突变型载体和 miR-181 mimics 和无义 miR 共转染至 HEK 293T 细胞中, 继续培养 48 h。然后按试剂盒说明在常温下裂解细胞 20 min, 取 20 μ l 细胞裂解样本加入 96 孔板中, 每组 4 个复孔。每孔先后加入萤火虫荧光素酶及 Renilla 荧光素酶反应底物, 并分别在 OD560 nm 及 OD465 nm 处读数。用萤火虫荧光素酶测定得到的 RLU (relative lightunit) 值除以 Renilla 荧光素酶测定得到的 RLU 值。根据所得比值比较报告基因的激活程度。

1.2.8 Western blot 检测 HOXB4 蛋白表达 miR-181a-5p mimics、miR-181a-5p inhibitor 及无义 miR 转染 48 h 后, 收集并裂解细胞提取总蛋白, 使用 BCA 法测定蛋白浓度。用 10% SDS-PAGE 分离等量的蛋白质, 再转移到 PVDF 膜上, 50 ml/L 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 4 $^{\circ}$ C 孵一抗 HOXB4 (1:1 000 稀释) 和

GAPDH (1:1 000 稀释) 过夜。次日用预冷的 TBST 洗膜 3 次, 37 $^{\circ}$ C 二抗孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 使用增强的化学发光溶液将蛋白质可视化。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析。所有试验独立重复 3 次, 正态分布的定量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间比较使用 LSD-*t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-181a-5p 在骨肉瘤细胞中高表达

采用 qRT-PCR 检测成骨细胞 hFOB1.19 和骨肉瘤 HOS、U2OS、MG63 细胞中 miR-181a-5p 表达情况, 结果显示 miR-181a-5p 在骨肉瘤细胞系中表达水平低于成骨细胞 hFOB1.19, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 不同细胞系中 miR-181a-5p 的表达检测结果 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 Expression of miR-181a-5p in different cell lines ($\bar{x} \pm s$)

细胞系	孔数	miR-181a-5p
hFOB1.19	24	7.085 \pm 0.438
HOS	24	1.111 \pm 0.207 ^{a1}
U2OS	24	2.760 \pm 0.271 ^{a2}
MG63	24	1.899 \pm 0.182 ^{a3}
<i>F</i> 值		83.31
<i>P</i> 值		<0.000 1

注: 与 hFOB1.19 比较, ^{a1}*t*=14.46, ^{a2}*t*=10.46, ^{a3}*t*=12.55, $P < 0.05$
Note: Compared with hFOB1.19, ^{a1}*t*=14.46, ^{a2}*t*=10.46, ^{a3}*t*=12.55, $P < 0.05$

2.2 miR-181a-5p mimics 和 miR-181a-5p inhibitor 转染后 (过表达组和抑制剂组) HOS 细胞中 miR-181a-5p 的表达情况

使用 qRT-PCR 验证转染效率, 与对照组相比, miR-181a-5p mimics 转染组 miR-181a-5p 表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 而 miR-181a-5p inhibitor 转染组 miR-181a-5p 表达水平显著下降 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.3 过表达和敲低 miR-181a-5p 后 HOS 细胞周期的改变

流式细胞术检测结果显示, 与对照组相比, 过表达 miR-181a-5p 细胞中 S 期细胞比例显著下降 ($P < 0.05$, 见表 3 和图 1; 而低表达 miR-181a-5p 细胞周期中 S 期细胞比例显著升高 ($P < 0.05$), 见表 3 和图 1。说明改变 miR-181a-5p 表达后能影响细胞周

表 2 转染后 HOS 细胞中 miR-181a-5p 的表达检测结果 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 Expressions of miR-181a-5p in HOS cells after transfection($\bar{x}\pm s$)

组别	孔数	miR-181a-5p
对照组	24	0.994±0.112
抑制剂组	24	0.608±0.027 ^{b1}
过表达组	24	4.848±0.267 ^{b2}
F 值		568.8
P 值		<0.0001

注:与对照组比较, ^{b1}t=2.536, ^{b2}t=27.07, P<0.05

Note:Compared with control group, ^{b1}t=2.536, ^{b2}t=27.07, P<0.05

期中 S 期细胞比例,进而影响细胞周期。

2.4 过表达和敲低 miR-181a-5p 后 HOS 细胞增殖活力的变化

CCK-8 法检测结果显示,在 HOS 细胞中过表达 miR-181a-5p 较对照组 48 h 和 72 h 增殖活力明显下降(P<0.05),见表 4。反之,低表达 miR-181a-5p 细胞 48 h 和 72 h 增殖活力升高(P<0.05),见表 4。

2.5 过表达和敲低 miR-181a-5p 对 HOS 细胞迁移的影响

划痕愈合实验结果显示,与对照组相比,过表达

表 3 转染后各组细胞周期检测结果($\bar{x}\pm s, \%$)

Tab.3 Results of the cell cycle of each group after transfection($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	孔数	G0/G1	S	G2/M
对照组	24	42.96±2.445	32.59±0.379	24.35±2.672
抑制剂组	24	44.45±2.078	35.88±2.366 ^{d1}	19.70±2.188
过表达组	24	47.11±2.553	29.06±0.337 ^{d2}	24.27±3.415
F 值		2.829	21.35	3.391
P 值		0.118	0.0006	0.086

注:与对照组比较, ^{d1}t=2.916, ^{d2}t=3.133, P<0.05

Note:Compared with control group, ^{d1}t=2.916, ^{d2}t=3.133, P<0.05

miR-181a-5p 的 HOS 细胞在培养 18 h 及 24 h 后愈合率受到抑制,而低表达 miR-181a-5p 的细胞在培养 18 h 及 24 h 后愈合率显著升高(P<0.05),见图 2,表 5。此外,观察细胞纵向迁移能力的 Transwell 迁移实验结果显示,与对照组相比,过表达 miR-181a-5p 的细胞穿过小室膜的数明显减少,而敲低 miR-181a-5p 的细胞穿过小室膜的数量增多(P<0.05),见表 5 和图 3。以上结果表明过表达 miR-181a-5p 可以分别抑制 HOS 细胞的横向和纵向迁移能力。

2.6 miR-181a-5p 靶基因预测与验证

利用生物信息学方法,在 TargetScan 软件中,获

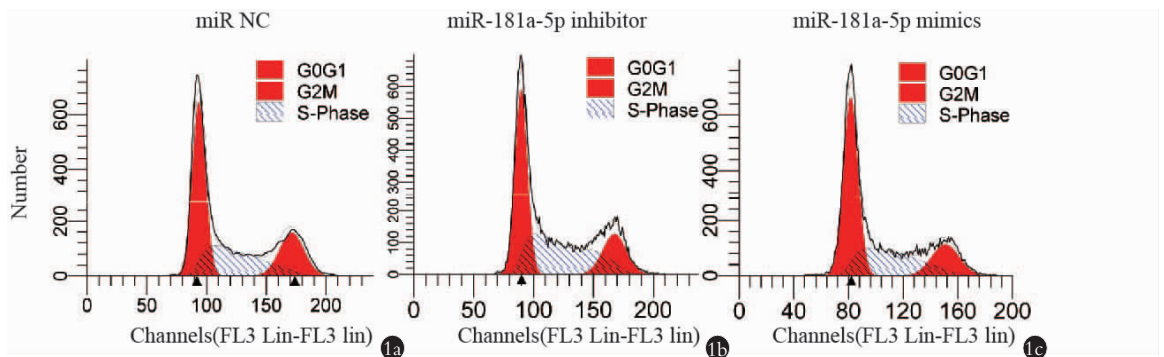


图 1 各组流式细胞术检测细胞周期分布 1a. 对照组 1b. 抑制剂组 1c. 过表达组

Fig.1 Flow cytometry detection of the cell cycle distribution 1a. control group 1b. Inhibitor group 1c. Monics group

表 4 转染后各组细胞增殖能力 OD450 值检测结果($\bar{x}\pm s$)

Tab.4 Results of the cell proliferation ability OD450 of each group after transfection($\bar{x}\pm s$)

组别	孔数	0 h	24 h	48 h	72 h
对照组	24	0.102±0.005	0.451±0.017	0.869±0.047	1.534±0.02
抑制剂组	24	0.098±0.007	0.461±0.043	1.089±0.057 ^{c1}	1.688±0.137 ^{c3}
过表达组	24	0.101±0.004	0.388±0.052	0.687±0.039 ^{c2}	1.330±0.083 ^{c4}
F 值		0.424	3.904	69.76	14.71
P 值		0.667	0.060	<0.0001	0.002

注:与对照组比较, ^{c1}t=6.454, ^{c2}t=5.340, ^{c3}t=2.318, ^{c4}t=3.089, P<0.05

Note:Compared with control group, ^{c1}t=6.454, ^{c2}t=5.340, ^{c3}t=2.318, ^{c4}t=3.089, P<0.05

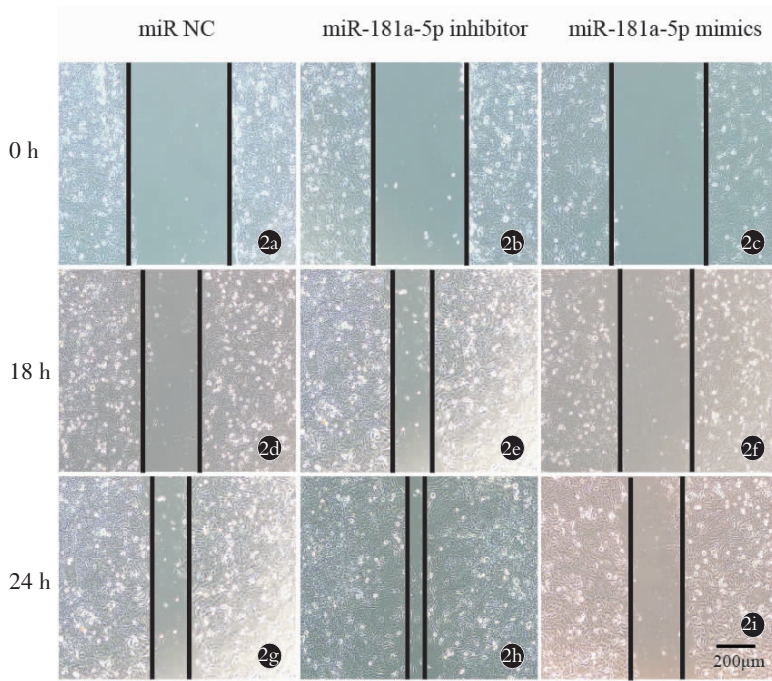


图 2 各组划痕愈合实验检测细胞迁移能力 **2a,2b,2c.** 细胞培养 0 h 对照组,抑制剂组,过表达组细胞迁移情况 **2d,2e,2f.** 细胞培养 18 h 对照组,抑制剂组,过表达组细胞迁移情况 **2g,2h,2i.** 细胞培养 24 h 对照组,抑制剂组,过表达组细胞迁移情况
Fig.2 Wound healing assay to determine cell migration **2a,2b,2c.** Cell migration in control group, inhibitor group, mimics group at 0 h of cell culture **2d,2e,2f.** Cell migration in control group, inhibitor group, mimics group at 18 h of cell culture **2g,2h,2i.** Cell migration in control group, inhibitor group, mimics group at 24 h of cell culture

表 5 转染后各组细胞迁移能力检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.5 Results of the cell migration ability of each group after transfection

组别	孔数	18 h 迁移率 (%)	24 h 迁移率 (%)	迁移细胞数 (个)
对照组	24	0.413±0.088	0.638±0.043	62.2±4.604
抑制剂组	24	0.590±0.095 ¹	0.789±0.108 ³	98.0±8.972 ⁵
过表达组	24	0.249±0.071 ²	0.381±0.089 ⁴	17.6±3.578 ⁶
<i>F</i> 值		16.0	23.0	212.6
<i>P</i> 值		0.001 1	0.000 3	<0.000 1

注:与对照组比较,¹*t*=2.943,²*t*=2.711,³*t*=2.535,⁴*t*=4.279,⁵*t*=9.162,⁶*t*=11.41,*P*<0.05
 Note:Compared with control group,¹*t*=2.943,²*t*=2.711,³*t*=2.535,⁴*t*=4.279,⁵*t*=9.162,⁶*t*=11.41,*P*<0.05

得 miR-181a-5p 和预测靶基因 HOXB4 的 3'-UTR 的结合位点(图 4a)。qRT-PCR 印证了相比于成骨细胞 hFOB1.19,HOXB4 基因在骨肉瘤细胞系 HOS、U2OS 和 MG63 中显著高表达(*P*<0.05),见表 6,进一步利用双荧光素酶报告基因实验验证 miR-181a-5p 是否通过靶向 HOXB4 上的特异结合位点发挥作用。实验结果显示,和 HOXB4 野生型(WT)共转染,与 miR-NC 组相比,miR-181a-5p mimics 组 293T 细胞

中荧光值显著降低(*P*<0.05),见表 7,而和 HOXB4 突变型(MUT)共转染,与对照组相比,miR-181a-5p mimics 组的细胞中荧光值无显著变化(*P*>0.05),见表 7。Western blot 实验结果表明,过表达 miR-181a-5p 能够抑制 HOXB4 蛋白的表达(*P*<0.05),而敲低 miR-181a-5p 能增加 HOXB4 蛋白的表达(*P*<0.05),见图 4b 和表 8。

3 讨论

骨肉瘤是骨与软组织肿瘤中恶性程度最高的肿瘤之一,侵袭性高,易转移,预后差,复发率高^[11]。尽管近年来诊治技术不断提高,骨肉瘤患者预后有一定改善,然而 5 年生存率仍然非常低,高复发率和转移率仍然是影响患者预后的主要因素^[5]。因此,进一步探究骨肉瘤发生、增殖、转移的分子机制有着重要的意义。

近年的研究逐渐揭示了 miRNA 在肿瘤发生发展中发挥着重要的生物学功能^[12]。miR-181a-5p 是当前研究较多的 miRNA 家族成员之一。有研究报道 miR-181a-5p 在侵袭性乳腺癌和结肠癌中下调,并且通过降低基质金属蛋白酶-14(matrix metalloproteinase, MMP-14)水平的降低减少癌细胞的迁移和侵袭^[13]。Liu 等^[14]发现 miR-181a-5p 通过靶向 MEG2 基因显著抑制胃癌细胞的增殖、迁移和增长。此外,也有研究发现 miR-181a-5p 在肝癌、肺癌组织中中高表达,并且促进肿瘤进展^[15]。本研究表明 miR-181a-5p 在骨肉瘤细胞系中显著低表达,抑制骨肉瘤细胞的增殖和迁移能力,表明 miR-181a-5p 在骨肉瘤细胞中发挥的是抑癌作用,而它的上游调控基因和下游靶向基因,还需要进一步研究。

笔者通过生物信息学方法根据 Targetscan 软件预测出 miR-181a-5p 可以与 HOXB4 基因的 3'-UTR 有结合位点,以此推测 HOXB4 是骨肉瘤中 miR-181a-5p 发挥作用的靶点。HOX 基因是个包含同源结构域的转录因子家族,在发育过程中决定细胞特性,调控包括凋亡、受体信号、分化、运动和血管生成等众多过程,随后在多种癌症中重新表达^[16-22]。因此,HOX 基因表达的改变可能对肿瘤发生和抑制

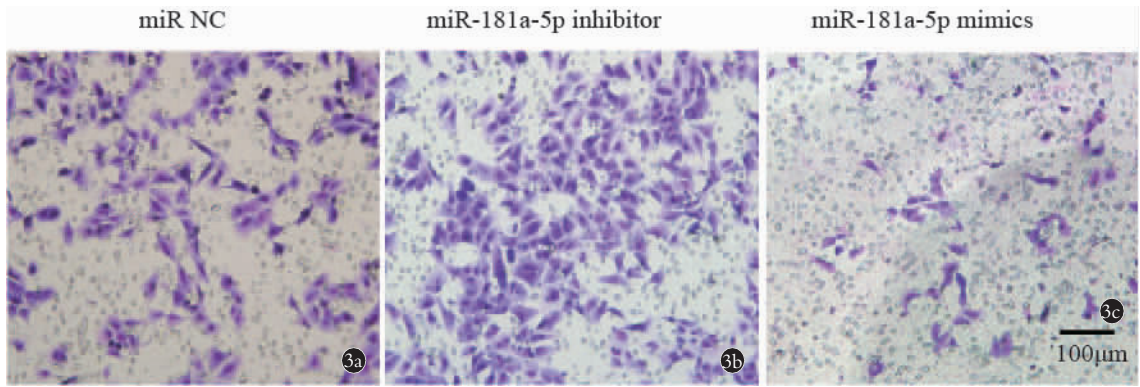


图 3 各组 Transwell 实验检测细胞迁移能力 3a. 对照组 3b. 抑制剂组 3c. 过表达组
Fig.3 Transwell assay to determine cell migration 3a. Control group 3b. Inhibitor group 3c. Mimics group

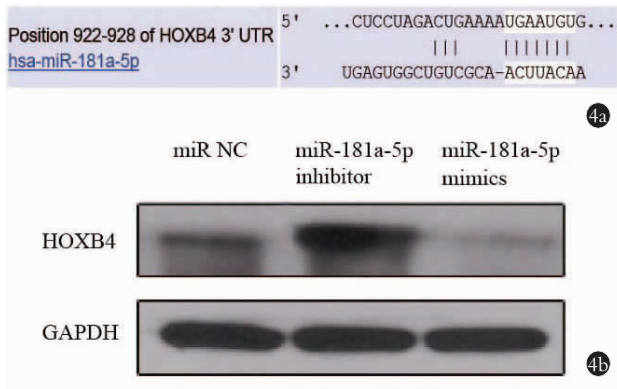


图 4 miR-181a-5p 在 HOS 细胞中靶向抑制 HOXB4 蛋白的表达
4a. miR-181a-5p 与 HOXB4 3'-UTR 结合位点 4b. Western blot 检测各组细胞 HOXB4 蛋白表达

Fig.4 miR-181a-5p inhibits the expression of HOXB4 protein in HOS cells 4a. miR-181a-5p combined with HOXB4 3'-UTR 4b. Western blot detects the expression of the HOXB4 protein

表 6 不同细胞系中 HOXB4 基因的表达检测结果 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.6 Expressions of HOXB4 in different cell lines ($\bar{x} \pm s$)

细胞系	孔数	miR-181a-5p
hFOB1.19	24	1.657±0.517
HOS	24	5.261±0.421 ¹
U2OS	24	8.216±2.436 ²
MG63	24	3.753±0.304 ³
F 值		18.32
P 值		0.000 2

注:与 hFOB1.19 比较, ¹t=3.970, ²t=7.225, ³t=2.494, P<0.05
Note: Compared with hFOB1.19, ¹t=3.970, ²t=7.225, ³t=2.494, P<0.05

有着重要作用,有研究揭示了 HOXB4 蛋白在宫颈癌癌前病变中重新表达,可能是导致宫颈癌恶变的重要因素并可以作为宫颈癌的标志物^[23]。还有研究发现 miR-23a 以 HOXB4 靶点抑制肾母细胞瘤的恶变,并通过大量临床样本数据得到证实^[24]。本研究结

表 7 转染后 HOXB4 基因荧光值表达检测结果 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.7 Expression of the fluorescence value of the HOXB4 gene after transfection ($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	野生型	突变型
对照组	24	5.988±0.469	6.495±0.573
过表达组	24	3.972±0.131	6.450±0.291
t 值		7.174	0.119
P 值		0.002	0.911

表 8 转染后各组细胞 HOXB4 蛋白表达检测结果 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.8 Expression of the HOXB4 protein after transfection ($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	HOXB4
对照组	24	0.432±0.073
抑制剂组	24	0.959±0.103 ¹
过表达组	24	0.113±0.017 ²
F 值		102.0
P 值		<0.0001

注:与对照组比较, ¹t=8.813, ²t=5.326, P<0.05
Note: Compared with control group, ¹t=8.813, ²t=5.326, P<0.05

果表明 HOXB4 基因在骨肉瘤细胞中的高表达,而 HOXB4 在骨肉瘤的分子机制还未见深入研究。本研究预测并验证了 HOXB4 是 miR-181a-5p 的靶基因,为 miR-181a-5p 在骨肉瘤的作用机制提供新的依据,而 HOXB4 作为转录因子,可以通过 Wnt/β-catenin 信号通路抑制宫颈癌的增殖和发展^[25],其是否在骨肉瘤中有 HOXB4 调控的 miRNAs 或信号通路,则是后续研究的重点方向。

综上所述,本研究显示 miR-181a-5p 通过负向调节 HOXB4 基因,抑制骨肉瘤细胞的增殖和迁移能力。为探索骨肉瘤增殖和转移的分子机制提供了新的依据,未来有望作为骨肉瘤诊治的新靶点。

参考文献

- [1] Arndt CAS, Crist WM. Medical Progress—Common musculoskeletal tumors of childhood and adolescence[J]. *N Engl J Med*, 1999, 341(5):342–352.
- [2] Sampo M, Koivikko M, Mervi T, et al. Incidence, epidemiology and treatment results of osteosarcoma in Finland—a nationwide population-based study[J]. *Acta Oncol*, 2011, 50(8):1206–1214.
- [3] Luetke A, Meyers PA, Lewis I, et al. Osteosarcoma treatment—Where do we stand? A state of the art review[J]. *Cancer Treat Rev*, 2014, 40(4):523–532.
- [4] Anderson ME. Update on survival in osteosarcoma[J]. *Orthop Clin North Am*, 2016, 47(1):283.
- [5] 尹振春, 刘丙根, 庞清江. 局限性 Enneking II 期骨肉瘤患者保肢与截肢治疗疗效的 Meta 分析[J]. *中国骨伤*, 2016, 29(12):1140–1145.
- YIN ZC, LIU BG, PANG QJ. Meta-analysis on limb salvage and amputation for patients with local Enneking II osteosarcoma[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2016, 29(12):1140–1145. Chinese with abstract in English.
- [6] Chan JJ, Tay Y. Noncoding RNA; RNA Regulatory Networks in Cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5):1310.
- [7] Ludwig N, Leidinger P, Becker K, et al. Distribution of miRNA expression across human tissues[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(8):3865–3877.
- [8] 张晓哲, 张栋, 阮安民, 等. 通络止痛凝胶制剂对 KOA 滑膜组织中 p53/miR-502-5p/NF- κ Bp65 的影响[J]. *中国骨伤*, 2020, 33(7):643–648.
- ZHANG XZ, ZHANG D, RUAN AM, et al. Effect of Tongluo Zhitong (通络止痛, TLZT) gel preparation on p53/miR-502-5p/NF- κ Bp65 in synovial tissue of knee osteoarthritis[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2020, 33(7):643–648. Chinese with abstract in English.
- [9] Sampson VB, Yoo S, Kumar A, et al. MicroRNAs and potential targets in osteosarcoma: review[J]. *Front Pediatr*, 2015, 3(3):69.
- [10] Chen JQ, Papp G, Poliska S, et al. MicroRNA expression profiles identify disease-specific alterations in systemic lupus erythematosus and primary Sjogren’s syndrome[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3):e0174585.
- [11] Misaghi A, Goldin A, Awad M, et al. Osteosarcoma: a comprehensive review[J]. *Sicot J*, 2018, 4(1):12.
- [12] Ali syeda Z, Langden SSS, Munkhzul C, et al. Regulatory mechanism of microRNA expression in cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5):1723.
- [13] Li Y, Kuscic C, Banach A, et al. miR-181a-5p inhibits cancer cell migration and angiogenesis via downregulation of matrix metalloproteinase-14[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(13):2674–2685.
- [14] Liu Z, Sun F, Hong Y, et al. MEG2 is regulated by miR-181a-5p and functions as a tumour suppressor gene to suppress the proliferation and migration of gastric cancer cells[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1):133.
- [15] Korhan P, Erdal E, Atabay N. miR-181a-5p is downregulated in hepatocellular carcinoma and suppresses motility, invasion and branching-morphogenesis by directly targeting c-Met[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450(4):1304–1312.
- [16] Sekar D, Mani P, Brunthal M, et al. Dissecting the functional role of microRNA 21 in osteosarcoma[J]. *Cancer Gene Ther*, 2019, 26(7–8):179–182.
- [17] Sun X, Dai G, Yu L, et al. miR-143-3p inhibits the proliferation, migration and invasion in osteosarcoma by targeting FOSL2[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):606.
- [18] Zhang Y, Pan Y, Xie C, et al. miR-34a exerts as a key regulator in the dedifferentiation of osteosarcoma via PAI-1–Sox2 axis[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(7):777.
- [19] de Bessa Garcia SA, Araújo M, Pereira T, et al. HOX genes function in breast cancer development[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1873(2):188358.
- [20] Wanner E, Thoppil H, Riabowol K. Senescence and apoptosis: architects of mammalian development[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 8:620089.
- [21] Paco A, de Bessa Garcia SA, Castro JL, et al. Roles of the HOX proteins in cancer invasion and metastasis[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 13(1):10.
- [22] Matsuoka Y, Monteiro A. HOX genes are essential for the development of eyespots in *Bicyclus anynana* butterflies[J]. *Genetics*, 2021, 217(1):1–9.
- [23] Barba-da la rosa AP, Briones-cerecero E, Lugo-melchor O, et al. Hox B4 as potential marker of non-differentiated cells in human cervical cancer cells[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138(2):293–300.
- [24] Koller K, Das S, Leuschner I, et al. Identification of the transcription factor HOXB4 as a novel target of miR-23a[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2013, 52(8):709–715.
- [25] Lei D, Yang WT, Zheng PS. HOXB4 inhibits the proliferation and tumorigenesis of cervical cancer cells by downregulating the activity of Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(1):105.

(收稿日期:2021-08-20 本文编辑:王玉蔓)