

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.01.003

## 靶向调控 FASN 的 miRNAs 在不同侵袭力骨肉瘤细胞中的表达\*

龙新华, 刘志礼<sup>△</sup>, 刘家明, 陈宣银, 王 恒, 周 扬, 张志宏

(南昌大学第一附属医院骨科, 南昌 330006)

**摘要:**目的 检测可能调控脂肪酸合成酶(FASN)基因表达的 miRNAs 分子在不同侵袭力骨肉瘤细胞中的表达, 筛选出靶向调控 FASN 基因的 miRNAs 分子, 为研究骨肉瘤转移调控机制奠定基础。方法 应用 miRNA 和 mircoRNA.org 在线软件, 预测可能靶向调控 FASN 基因(NM\_004104)表达的 miRNAs 分子; 实时定量 PCR(RT-PCR)检测所预测到的 miRNAs 在骨肉瘤细胞 HOS 和 U2-OS 中的表达; Western blot 检测 HOS 和 U2-OS 细胞中 FASN 蛋白表达; Transwell 侵袭实验检测 HOS 和 U2-OS 细胞侵袭力。结果 2 种生物信息学预测方法预测结果均显示, FASN 基因可能是 miR-195/15a/15b/16/424/497 分子的靶基因; RT-PCR 结果显示, miR-424 在 HOS 细胞中表达水平显著高于在 U2-OS 细胞中的表达水平; FASN 在 U2-OS 细胞中表达水平显著高于 HOS 细胞中的表达水平; U2-OS 细胞侵袭能力明显高于 HOS 细胞的侵袭力。结论 miR-424 在骨肉瘤细胞中表达水平与细胞侵袭力呈负相关, miR-424 很可能通过靶向调控 FASN 基因影响骨肉瘤细胞侵袭转移。

**关键词:**骨肉瘤; 微小 RNAs; 转染; 脂肪酸合成酶; 靶向调控

**中图分类号:** R738.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1671-8348(2015)01-0007-03

## Expression of miRNAs target regulating FASN in different invasion ability osteosarcoma cells\*

Long Xinhua, Liu Zhili<sup>△</sup>, Liu Jiaming, Chen Xuanyin, Wang Heng, Zhou Yang, Zhang Zhihong

(Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

**Abstract: Objective** To detect the expression level of miRNAs which may target fatty acid synthase(FASN) in osteosarcoma (OS) cells of diverse invasion ability, and to select the miRNAs target regulating FASN, acting as the basis to investigate the mechanism of OS metastasis. **Methods** The miRNA and mircoRNA.org online software were adopted to forecast the miRNAs that might target regulate FASN(NM\_004104); RT-PCR was used to detect the expression level of the predicted miRNAs in HOS and U2-OS cells; the protein expression of FASN was detected by Western blot; Transwell invasion assay was used to evaluated the invasive ability of HOS and U2-OS cells. **Results** Two prediction methods all showed that miR-195/15a/15b/16/424/497 molecular might be target FASN gene; RT-PCR result showed that the expression level of miR-424 in HOS cells was significantly higher than that in U2-OS cells; the expression level of FASN was significantly higher in U2-OS cells than that in HOS cells; the invasive ability of U2-OS cells is significantly higher than HOS cells. **Conclusion** The expression level of miR-424 in OS cells may be negatively related to the invasive ability, and miR-424 likely may affect OS metastasis via targeting FASN.

**Key words:** osteosarcoma; MicroRNAs; transfection; fatty acid synthase; targeting regulation

近年来众多研究表明, 脂肪酸合成酶(FASN)在多种恶性肿瘤中高表达与肿瘤转移密切相关<sup>[1-3]</sup>, 大量前期研究也证实 FASN 高表达在骨肉瘤转移中扮演重要的角色<sup>[4-6]</sup>。但是 FASN 在骨肉瘤中高表达的调控机制仍不清楚。近年来, 大量研究证实 microRNA 不但参与肿瘤的发生、增殖、凋亡, 而且对肿瘤转移具有调节作用<sup>[7-9]</sup>。本研究拟通过生物信息学预测, 寻找可能调控 FASN 基因表达的 miRNA 分子, 并用 RT-PCR 法检测这些分子在不同侵袭能力骨肉瘤细胞中的表达, 从而筛选出可能靶向调控 FASN 基因影响骨肉瘤侵袭转移的 miRNA 分子, 为进一步研究骨肉瘤中 FASN 基因高表达的分子机制提供新的思路。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** U2-OS、HOS 细胞株购自上海中科院细胞库; SYBR Premix Ex TaqTM II 定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司; 实时定量 PCR(RT-PCR)引物(含内参 U6 引物)由华安平

康公司设计并合成; ReverTra Ace- $\alpha$ -TM 逆转录试剂盒购自 TOYOBO 公司; 兔抗人 FASN IgG, 鼠抗人 GAPDH IgG 购自英国 Abcam 公司; Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司。

## 1.2 方 法

**1.2.1 生物信息学预测** 应用 microRNA 在线数据库 TargetsCanHuman6.2 (<http://www.targetscan.org/>) 和 mircoRNA.org (<http://www.mircoRNA.org/mircoRNA/searchMirnas.do>), 针对 FASN 基因(NM\_004104) 预测可能调控其表达的 miRNA 分子。选取 2 种预测结果的交集 miRNA 分子进行 RT-PCR 定量检测。

**1.2.2 RT-PCR 检测** miRNA 分子在骨肉瘤细胞 HOS、U2-OS 中的表达 用 Trizol 法处理骨肉瘤细胞, 提取总 RNA, 紫外分光光度仪检测所提取的总 RNA 浓度和质量。然后取 1  $\mu$ g 总 RNA, 用 ReverTra Ace- $\alpha$ -TM 逆转录试剂盒( TOYOBO 公司) 逆转录为 cDNA, 并以此作为模板进行 RT-PCR 扩增反应。

RT-PCR 引物(含内参 U6 引物)由华安平康公司设计并合成,序列如下: hsa-miR-15a-5p 正向引物 5'-CCAGCTGGGCTTTTTGCGGTCTGG-3'; hsa-miR-15b-5p 正向引物 5'-CCAGCTGGGTAGCAGCACAGAAAT-3'; hsa-miR-16-5p 正向引物 5'-CCAGCTGGGCAGCAGCAATTCATGT-3'; hsa-miR-195-5p 正向引物 5'-CCAGCTGGGCAGCAGCAGCAACTGTG-3'; hsa-miR-495-3p 正向引物 5'-CCAGCTGGGACTCATTGTTTTGAT-3'; U6(内参)正向引物 5'-CCAGCTGGGATCACATTGCCAGGG-3'; 通用反向引物(SLR-primer) 5'-CTGGTGTCTGGAGTCGGCAATT-3'。按照 SYBR Premix Ex Taq™ II RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司)说明书进行操作。反应条件:94℃变性 5 min,一个循环,94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,共 40 个循环。反应结束后确认 RT-PCR 的扩增曲线和熔解曲线,进行数据分析。不同时间重复 6 次实验。

**1.2.3 Western blot 检测 U2-OS 和 HOS 细胞中 FASN 的表达水平** 收集对数期生长的骨肉瘤细胞,RIPA 裂解,提取总蛋白,BCA 法蛋白定量,10%十二烷基-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶电泳分离蛋白,转膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h,一抗(兔抗人 FASN IgG,1:1 000,鼠抗人 GAPDH IgG,1:2 500)室温孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,二抗(山羊抗兔和山羊抗鼠,1:5 000)室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,Pro-light HRP 化学发光检测试剂(TIANGEN,PA112)化学发光,压片,拍照,用 Image J 软件对条带灰度值进行分析。不同时间重复实验 6 次。

**1.2.4 Transwell 侵袭实验检测细胞侵袭能力** 将 HOS、U2-OS 细胞用含 10 g/L 的牛血清清蛋白(BSA)无血清培养基重悬,调整细胞浓度为  $1 \times 10^5$  个/mL,取 150  $\mu$ L 细胞悬液接种小室,然后将小室放入加有 600  $\mu$ L/孔含 10%胎牛血清的 HAM'S/F-12 培养基的 24 孔板中,常规培养 24 h。取出小室,吸弃上室液体,用 PBS 漂洗 2 次,95%乙醇固定 10 min,用棉签擦净小室膜上侧未迁移的细胞,4 g/L 结晶紫染色 20 min,PBS 漂洗 2 次。倒置显微镜下随机选取 10 个视野观察细胞穿膜情况并拍照,Image J 分析软件计数。不同时间重复实验 6 次。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS19.0 进行统计学分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用独立样本 *t* 检验比较 2 个细胞侵袭能力及各 miRNA 在 2 个细胞中的表达差异,用 Pearson 法进行相关性分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

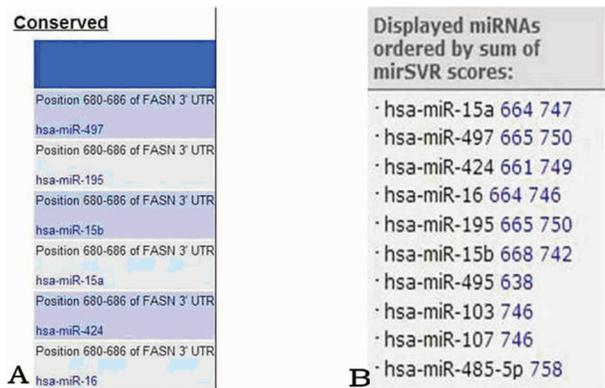
## 2 结果

**2.1 生物信息学预测结果** 生物信息学预测软件 TargetScan, human6.0 和 microrna.org 预测结果的交集显示有 6 个可能靶向调控 FASN 基因的 miRNA 分子,分别为:miR-195/15a/15b/16/424/497,见图 1。

**2.2 骨肉瘤细胞 U2-OS 和 HOS 中各 miRNA 表达量比较** RT-PCR 实验结果显示,在预测出的 6 个 miRNAs 中,miR-424 在 HOS 细胞中表达水平显著高于在 U2-OS 细胞中的表达水平,HOS/U2-OS 为  $(543.4429 \pm 39.7931)$  倍;而 miR-195/497/15a/15b/16 在 HOS 细胞中的表达水平略高或略低于 U2-OS 中的表达水平[HOS/U2-OS 分别为  $(1.5885 \pm 0.1533)$ 、 $(1.4051 \pm 0.0545)$ 、 $(0.6667 \pm 0.0692)$ 、 $(0.6532 \pm 0.3005)$  及  $(0.5277 \pm 0.0268)$  倍],均小于 2 倍,见表 2。

**2.3 骨肉瘤细胞 U2-OS 和 HOS 中 FASN 表达水平比较**

Western blot 实验结果显示(图 2),U2-OS 细胞中 FASN 表达水平高于 HOS 细胞中表达水平,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

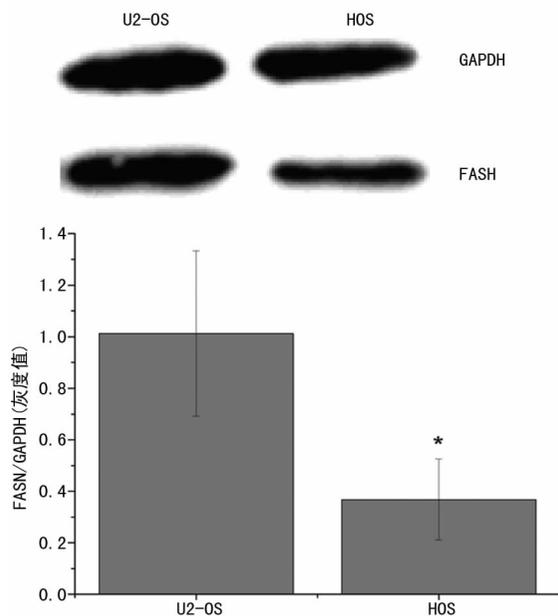


A: TargetScan, human6.0 软件预测结果; B: microrna.org 软件预测结果。

图 1 生物信息学预测结果

表 2 骨肉瘤细胞 U2-OS、HOS 中各 miRNAs 表达量比较

miRNA 名称	miRNAs 变化倍数 (HOS/U2-OS)	S	P
hsa-miR-424-5p	543.442 9	39.793 1	0.002
hsa-miR-497-5p	1.405 1	0.054 5	0.006
hsa-miR-195-5p	1.588 5	0.153 3	0.022
hsa-miR-15a-5p	0.666 7	0.069 2	0.014
hsa-miR-15b-5p	0.653 2	0.300 5	0.184
hsa-miR-16-5p	0.527 7	0.026 8	0.001



\*:  $P < 0.05$ , 与 U2-OS 比较。

图 2 Western blot 实验结果

**2.4 骨肉瘤细胞 U2-OS 和 HOS 侵袭能力的比较** Transwell 实验结果显示,24 h 内骨肉瘤细胞 U2-OS 穿膜数  $(62.4 \pm 4.4)$  个/视野,明显高于 HOS 细胞穿膜数  $(27.4 \pm 4.7)$  个/视野( $P < 0.05$ ),见图 3。结果提示 U2-OS 细胞侵袭能力

显著高于 HOS 细胞。

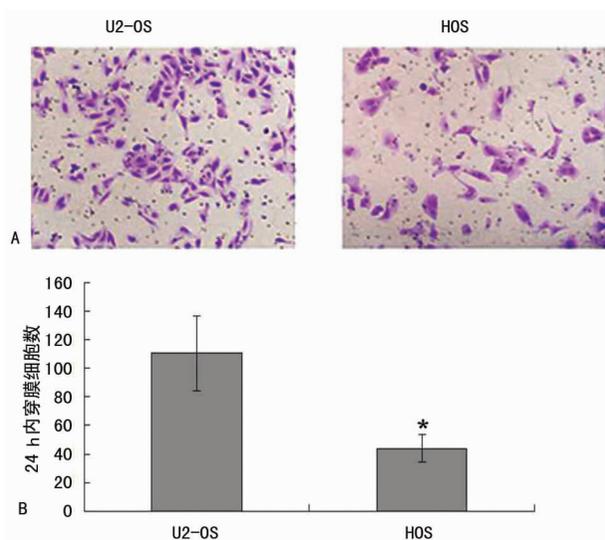


图 3 2 种细胞侵袭实验图; B: 6 次 Transwell invasion 实验 24 h 穿膜细胞数统计结果; \*:  $P < 0.05$ , 与 U2-OS 比较。

图 3 Transwell invasion 实验结果 (结晶紫染色  $\times 200$ )

### 3 讨论

骨肉瘤好发于儿童及青少年, 恶性度高, 肺部转移早, 有约 80% 的患者往往在确诊时已经存在肺部微转移<sup>[10]</sup>, 这是骨肉瘤患者总体生存率徘徊不前的主要原因, 也是骨肉瘤防治的关键所在。因此, 寻找新的分子靶点、深入研究骨肉瘤侵袭转移发生、发展的分子机制, 对提高骨肉瘤治疗具有非常重要的意义。

FASN 是细胞质内的一种大分子多功能酶, 在合成内源性脂肪酸的过程中起关键作用。FASN 与肿瘤的关系十分密切。Silva 等<sup>[1]</sup>在头颈部鳞状细胞癌研究中发现 FASN 高表达与头颈部鳞状细胞癌肺转移呈正相关, 并且 FASN 高表达是头颈部鳞状细胞癌肺转移的一个重要特征。Carvalho 等<sup>[2]</sup>利用小鼠黑色素瘤模型发现抑制 FASN 能减少黑色素瘤细胞转移扩散; Murata 等<sup>[3]</sup>在直肠癌的研究中也发现抑制 FASN 的表达能抑制直肠癌的肝转移。本研究前期对新鲜骨肉瘤组织进行实验分析结果显示, FASN 在骨肉瘤中呈高表达, 且发生转移的骨肉瘤组织中的表达量明显高于未发生远处转移骨肉瘤组织<sup>[11]</sup>。本研究在骨肉瘤细胞实验中也证实, 抑制 FASN 骨肉瘤细胞中表达能显著降低骨肉瘤细胞的迁移、侵袭能力, 下调 PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B 通路为其重要调控通路之一<sup>[5-6]</sup>。然而 FASN 在骨肉瘤中高表达的调控机制如何, 目前仍不清楚。

近年来, miRNA 的发现为研究肿瘤转移调控机制提供了新的视角。miRNA 是一类长度在 22 个核苷酸(nt)的参与基因转录后水平调控的内源性非编码小分子 RNA, 通常与靶基因 mRNA 的 3'-UTR 部分序列反向互补结合而抑制翻译过程, 具有调节细胞分化、增殖、凋亡、发育和代谢等生命活动的功能。有研究报道, miRNA-7、miRNA-10 参与神经胶质瘤、乳腺癌转移调控<sup>[12-13]</sup>; 也有研究者证实, miRNA-21、miRNA-221 等 miRNAs 在骨肉瘤发生、发展及转移过程中发挥重要作用<sup>[14-15]</sup>。因此寻找 miRNA 与靶基因之间的调控关系在骨肉瘤转移机制研究中可行而有意义。

本研究首先运用 2 种不同生物信息学预测的方法, 预测出

可能调控靶基因 FASN 的 miRNAs, 然后检测这些 miRNAs 在不同侵袭能力的骨肉瘤细胞 U2-OS 和 HOS 中的表达水平。本研究结果显示, miR-195/15a/15b/16/424/497 同时被 2 种生物信息学预测方法预测出可能靶向调控 FASN 基因表达; 用 RT-PCR 对这些 miRNA 在骨肉瘤细胞 U2-OS、HOS 中表达进行定量检测发现: miR-424 在 HOS 细胞中表达相对于 U2-OS 细胞中高出 (543.442  $\pm$  39.793 1) 倍, 而在其余 miRNA 在 HOS 中表达高出或低于 U2-OS 中表达都在 2 倍之内; U2-OS 细胞中 FASN 蛋白表达水平明显高于 HOS 中 FASN 表达水平; 同时 Tanswell invasion 实验证实骨肉瘤 U2-OS 细胞侵袭能力明显高于 HOS 细胞。

综上所述, miR-424 在骨肉瘤细胞中表达水平与细胞侵袭能力呈负相关, 因而 miR-424 很可能通过靶向调控 FASN 基因在骨肉瘤侵袭转移中发挥重要作用, 为骨肉瘤转移机制研究提供了新的思路。但是, 由于体外模拟环境和体内微环境之间存在差异, miR-424 是否确实通过靶向调控 FASN 参与骨肉瘤转移, 还需进一步大量体内外实验加以证实。

### 参考文献:

- [1] Silva SD, Cunha IW, Younes RN, et al. ErbB receptors and fatty acid synthase expression in aggressive head and neck squamous cell carcinomas[J]. Oral Dis, 2010, 16(8): 774-780.
- [2] Carvalho MA, Zecchin KG, Seguin F, et al. Fatty acid synthase inhibition with Orlistat promotes apoptosis and reduces cell growth and lymph node metastasis in a mouse melanoma model[J]. Int J Cancer, 2008, 123(11): 2557-2565.
- [3] Murata S, Yanagisawa K, Fukunaga K, et al. Fatty acid synthase inhibitor cerulenin suppresses liver metastasis of colon cancer in mice[J]. Cancer Sci, 2010, 101(8): 1861-1865.
- [4] Liu ZL, Wang G, Peng AF, et al. Fatty acid synthase expression in osteosarcoma and its correlation with pulmonary metastasis[J]. Oncol Lett, 2012, 4(5): 878-882.
- [5] Liu ZL, Zhou Y, Luo QF, et al. Inhibition of fatty acid synthase suppresses osteosarcoma cell invasion and migration[J]. Indian J Pathol Microbiol, 2012, 55(2): 163-169.
- [6] Liu ZL, Mao JH, Peng AF, et al. Inhibition of fatty acid synthase suppresses osteosarcoma cell invasion and migration via downregulation of the PI3K/Akt signaling pathway in vitro[J]. Mol Med Rep, 2013, 7(2): 608-612.
- [7] Fan X, Chen X, Deng W, et al. Up-regulated microRNA-143 in cancer stem cells differentiation promotes prostate cancer cells metastasis by modulating FNDC3B expression[J]. BMC Cancer, 2013, 13: 61.
- [8] Liu L, Nie J, Chen L, et al. The oncogenic role of microRNA-130a/301a/454 in human colorectal cancer via targeting Smad4 expression[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e55532.
- [9] Fan L, Wu Q, Xing X, et al. MicroRNA-145 targets vascular endothelial growth factor and inhibits invasion and metastasis of osteosarcoma cells[J]. Acta (下转第 13 页)

它们减少了中央神经系统的髓鞘化及渐进的失调,如颤抖、癫痫及过早死亡。因此,MBP 对正常的神经细胞形态及功能的维持是必需的,而在癌细胞中表达增强是其分化和增殖失控的结果还是调控的一个关键点,仍有待进一步深入研究。

本研究从基因沉默的角度证实了 21.5 kDa MBP 具有促进细胞增殖与抑制细胞凋亡的双重调节功能,并从基因干扰的角度为肿瘤的基因治疗进行了一次有益的尝试。本研究构建的 21.5 kDa MBP 特异性干扰重组质粒,为进一步研究 21.5 kDa MBP 的功能及神经胶质瘤的基因治疗提供了一种可供选择的物质手段。

#### 参考文献:

- [1] Pribyl TM, Campagnoni CW, Kampf K, et al. The human myelin basic protein gene is included within a 179-kilobase transcription unit; expression in the immune and central nervous systems[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(22):10695-10699.
- [2] South SA, Deibler GE, Tzeng SF. Myelin basic protein(MBP) and MBP peptides are mitogens for cultured astrocytes[J]. *Glia*, 2000, 29(1):81-90.
- [3] Chen JY, Wang XM, Liu J, et al. Inhibitory effect of human brain myelin basic protein on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis of human lung cancer cell line YTLMC-90 [J]. *Ai Zheng*, 2006, 25(2):170-174.
- [4] Kobayashi H, Chattopadhyay S, Kato K, et al. MMPs initiate Schwann cell-mediated MBP degradation and mechanical nociception after nerve damage[J]. *Mol Cell Neuroscience*, 2008, 39(4):619-627.
- [5] Pan H, Ren SC, He XL, et al. The effects of human 21.5 kDa MBP gene on HepG-2 proliferation and apoptosis [J]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2009, 40(5):775-779.
- [6] Althaus HH, Klopner S, Rohde G, et al. Myelin basic protein induces cell death of mature pig oligodendrocytes in vitro and produces demyelination in vivo[J]. *Neurosci Lett*, 2000, 283(1):77-80.

- [7] Lindsey JW, Jin R. Immune regulatory effects of central nervous system antigens in culture [J]. *Int Immunol*, 2000, 12(11):1605-1612.
- [8] 田瑞敏, 鄢佳城, 易芳, 等. 21.5kD MBP RNAi 有效靶点的筛选及验证[J]. *川北医学院学报*, 2013, 28(2):112-116.
- [9] Kagawa Y, Hirayama K, Tagami M, et al. Immunohistochemical analysis of equine pulmonary granular cell tumours[J]. *J Comp Pathol*, 2001, 124(2/3):122-127.
- [10] 袁斌, 谭燕, 张云辉, 等. 髓鞘碱性蛋白在肺腺癌 A549 细胞表达及其功能意义[J]. *昆明医学院学报*, 2011, (7):52-54.
- [11] Dmytrenko VV, Boiko OI, Shostak KO, et al. Expression of myelin basic protein and glial fibrillary acidic protein genes in human glial brain tumors[J]. *Tsitol Genet*, 2009, 43(1):28-35.
- [12] Popko B, Pearl DK, Walker DM, et al. Molecular Markers that Identify Human Astrocytomas and Oligodendrogliomas[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2002, 61(4):329-338.
- [13] Watabe M, Kakeya H, Osada H, et al. Requirement of protein kinase (Krs/MST) activation for MT-21-induced apoptosis[J]. *Oncogene*, 1999, 18(37):5211-5220.
- [14] Atkins CM, Yon M, Groome NP, et al. Regulation of myelin basic protein phosphorylation by mitogen-activated protein kinase during increased action potential firing in the hippocampus[J]. *J Neurochem*, 1999, 73(3):1090-1097.
- [15] Smith GS, Samborska B, Hawley SP, et al. Nucleus-localized 21.5-kDa myelin basic protein promotes oligodendrocyte proliferation and enhances neurite outgrowth in coculture, unlike the plasma membrane-associated 18.5-kDa isoform[J]. *J Neurosci Res*, 2013, 91(3):349-362.

(收稿日期:2014-08-08 修回日期:2014-10-30)

(上接第 9 页)

- [10] Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2012, 44(5):407-414.
- [10] Munajat I, Zulmi W, Norazman MZ, et al. Tumour volume and lung metastasis in patients with osteosarcoma[J]. *J Orthop Surg (Hong Kong)*, 2008, 16(2):182-185.
- [11] 刘志礼, 罗庆丰, 黄山虎, 等. 脂肪酸合成酶、Ki-67 在骨肉瘤中的表达及其与转移的相关性[J]. *实用医学杂志*, 2011, 27(10):1083-1085.
- [12] Wang W, Dai LX, Zhang S, et al. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by plasmid-based microRNA-7 inhibits human malignant gliomas growth and metastasis in vivo[J]. *Neoplasma*, 2013, 60(3):274-283.

- [13] Zhao FL, Hu GD, Wang XF, et al. Serum overexpression of microRNA-10b in patients with bone metastatic primary breast cancer[J]. *J Int Med Res*, 2012, 40(3):859-866.
- [14] Zhao G, Cai C, Yang T, et al. MicroRNA-221 induces cell survival and cisplatin resistance through PI3K/Akt pathway in human osteosarcoma[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1):e53906.
- [15] Ziyang W, Shuhua Y, Xiufang W, Xiaoyun L. MicroRNA-21 is involved in osteosarcoma cell invasion and migration [J]. *Med Oncol*, 2011, 28(4):1469-1474.

(收稿日期:2014-08-20 修回日期:2014-10-22)