

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.09.007

## MiR-650 通过靶向 ING4 促进骨肉瘤细胞增殖的研究\*

陈贤明,张 森,王爱民,王子明<sup>△</sup>

(陆军军医大学大坪医院野战外科研究所骨科,重庆 400042)

**[摘要]** **目的** 探讨骨肉瘤组织和细胞系中 miR-650 的表达及其在肿瘤形成中的作用机制。**方法** 用实时荧光定量 PCR 的方法,检测并比较肿瘤组织及癌旁正常组织、骨肉瘤细胞系(MG63)及健康人成骨细胞(hFOB1.19)之间的 miR-650 表达情况;用 MTT 实验检测不同组细胞的增殖情况;用 Western blot 的方法检测调节生长抑制因子 4(ING4)蛋白的表达情况。**结果** miR-650 在骨肉瘤组织及细胞系中的表达显著高于癌旁正常组织及健康人成骨细胞;抑制 miR-650 的表达后, MG63 细胞的增殖能力显著减弱。此外, miR-650 表达减低后, ING4 的表达显著升高,其中阴性对照组、乱序组、miR-650 抑制剂组的 ING4 mRNA 分别为  $1.00 \pm 0.16$ 、 $1.08 \pm 0.14$ 、 $5.35 \pm 0.32$ ;蛋白表达分别为:  $0.62 \pm 0.06$ 、 $0.59 \pm 0.12$ 、 $2.45 \pm 0.20$ ; miR-650 抑制剂组与阴性对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );而抑制 ING4 升高后, MG63 细胞的增殖能力有一定的恢复。**结论** miR-650 可以通过降低 ING4 的表达促进 MG63 细胞的增殖,提示 miR-650 可能成为骨肉瘤治疗的新靶点。

**[关键词]** 骨肉瘤;MG63;miR-650;调节生长抑制因子 4**[中图分类号]** R816.8**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)09-1173-03**Study on miR-650 for promoting proliferation of osteosarcoma cells via targeting ING4\***CHEN Xianming, ZHANG Sen, WANG Aimin, WANG Ziming<sup>△</sup>

(Department of Orthopedics, Daping Hospital, Research Institute of Field Surgery, Army Medical University, Chongqing 400042, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression of miR-650 in osteosarcoma tissue and cell lines and its action mechanism in the osteosarcoma formation. **Methods** The realtime fluorescence quantitative PCR was used to detect and compare the expressions of miR-650 between osteosarcoma tissue and normal tissue or between osteosarcoma cell lines(MG63) and normal human osteoblast cell lines(hFOB1.19); the MTT experiment was used to investigate the proliferation situation in different groups; Western blot was used to detect the ING4 protein expression. **Results** The expression of miR-650 in osteosarcoma tissue and MG63 cells was higher than that in normal tissue and human osteoblast cell; after inhibiting miR-650 expression, the proliferation ability of MG63 was significantly decreased. Moreover the expression of inhibitor of growth 4(ING4) was significantly increased when miR-650 was reduced, ING4 mRNA of negative control group, scramble group and miRNA group were  $1.00 \pm 0.16$ ,  $1.08 \pm 0.14$  and  $5.35 \pm 0.32$  respectively; the ING4 protein expressions were  $0.62 \pm 0.06$ ,  $0.59 \pm 0.12$  and  $2.45 \pm 0.20$  respectively; compared with negative control group, the difference was statistically significant( $P < 0.05$ ); but after suppressing this elevation, the proliferation ability of MG63 cells had a certain recovery. **Conclusion** MiR-650 promotes MG63 proliferation via reducing ING4 expression, which suggests that miR-650 could be a new target of treating osteosarcoma.

**[Key words]** osteosarcoma;MG63;miR-650;inhibitor of growth 4

骨肉瘤是儿童和青年人群中最常见的原发性骨肿瘤,占原发性骨肿瘤的 20%<sup>[1-2]</sup>。遗传学的改变与骨肉瘤的发生发展有着紧密的联系,因此寻找一个重要的基因治疗靶标成为了人们关注的重点。微小 RNA(miRNA)是一类小非编码 RNA 分子,大量的研究已经证实 miRNA 参与了多种生物学进程,包括细胞增殖、分化、凋亡等<sup>[3-4]</sup>。近年有研究发现,miR-650 在包括胃癌、肝癌、肺腺癌等多种肿瘤组织中都有着高表达,并且参与了细胞的异常增殖<sup>[5-9]</sup>,提示其可能是一种潜在的促癌因子。本研究用实时荧光定量 PCR 的方法检测了骨肉瘤患者组织及人骨肉瘤细胞系中 miR-650 的表达情况,同时检测在抑制 miR-650 后人骨肉瘤细胞增殖情况的变化并探讨可能的机制。

**1 材料与方**

**1.1 主要材料** 骨肉瘤组织及癌旁正常组织取自本科室治疗患者,共计 4 例:1 号病例为男性,19 岁,发病于右侧股骨远端,

大小约 7 cm×9 cm, I B 期,为软骨母细胞型骨肉瘤;2 号病例为男性,17 岁,发病于左侧股骨远端,大小约 2 cm×2 cm, I A 期,为骨母细胞型骨肉瘤;3 号病例为女性,14 岁,发病于左胫骨小头,大小约 3 cm×5 cm, II A 期,为骨母细胞型骨肉瘤;4 号病例为女性,21 岁,发病于右侧股骨远端,大小约 3 cm×6 cm, I B 期,为纤维母细胞型骨肉瘤。样本搜集在经医院伦理委员会审查通过,患者签署知情同意后书后进行。人骨肉瘤细胞系 MG63 及健康人成骨细胞系 hFOB1.19 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, RPMI 1640 培养基(Gibico, 美国)、转染用培养基 OPTI MEMI(Gibico, 美国)、胎牛血清(Gibico, 美国)、Lipofectamine 2000 转染试剂(Invitrogen, 美国)、细胞培养箱(Thermo, 美国)、TRIzol(Invitrogen, 美国)、RIPA 裂解液(碧云天, 江苏)、TRIzol 试剂(Invitrogen, 美国)、四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma, 美国)、miRNA cDNA 第一链合

\* 基金项目:陆军军医大学大坪医院野战外科研究所 1135 人才基金。 作者简介:陈贤明(1980—),主治医师,本科,主要从事四肢关节骨病及骨伤的研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail: m13883280290@163.com。

成试剂盒(天根公司,北京)、抗体(Santa cruz,美国)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** MG63 细胞及 hFOB1.19 均用含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基进行培养,培养条件为 37 °C、含 5% CO<sub>2</sub> 气体、湿度饱和的培养箱中。2~3 d 换液 1 次。取对数生长期的细胞进行实验。

**1.2.2 MiR-650 抑制剂及 ING4 siRNA 转染** 采用 Lipofectamine 2000 试剂对 MG63 细胞进行转染,在转染 24 h 后用 qPCR 的方法检测 MG63 细胞中 miR-650 的表达情况。将处于对数生长期的细胞接种到 6 孔板中,设置阴性对照组(NC)、乱序组及 miR-650 抑制剂组。转染步骤根据 Lipofectamine 2000 试剂盒说明书进行。转染后 24 h 通过 qPCR 进行验证转染效率。MiR-650 抑制剂及 ING4 siRNA 购自锐博生物科技有限公司(广州),miR-650 抑制剂序列为 5'-GTC CTG AGA GCG CTG CCT CCT-3',ING siRNA 序列为 5'-GCC ACT GAG TAT ATG AGT A-3'。

**1.2.3 RNA 提取与实时荧光定量 PCR 分析** 收集了 4 例骨肉瘤患者的骨肉瘤组织及癌旁正常组织,并用 qPCR 的方法测定了 4 对组织的 miR-650 表达情况。同时对比了健康人成骨细胞系(hFOB 1.19)及人骨肉瘤细胞系(MG63)中 miR-650 的表达情况。按照 TRIzol 试剂说明书,提取细胞总 RNA。测定 A<sub>260 nm</sub>/A<sub>280 nm</sub>,以检测总 RNA 的浓度及纯度。根据逆转录试剂盒说明书的步骤将 RNA 逆转录为 cDNA。用 q-PCR 的方法检测 miR-650 及 ING4 水平。其中 miR-650 的上游引物为:5'-AGA GGA GGC AGC GCT CT-3',下游引物为:5'-CAG TGC GTG TCG TGG AGT-3';内参 U6 的上游引物为:5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3',下游引物为:5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3';ING4 的上游引物为:5'-TTT CAG AGG GAG GGT CCT TT-3',下游引物为:5'-GCC AGA GCC TAG ATG ACC TG-3';β-actin 的上游引物为:5'-AAA GAC CTG TAC GCC AAC AC-3',下游引物为:5'-GTC ATA CTC CTG CTT GCT GAT-3'。反应条件如下:95 °C 预变性 5 min;随后 95 °C 15 s 变性,59 °C 30 s 退火,72 °C 30 s 延伸及检测。通过 Ct 值及计算 2<sup>-ΔΔCt</sup> 得到其相对表达量。

**1.2.4 细胞增殖实验** 将 MG63 细胞以每孔 5 × 10<sup>3</sup> 个细胞的数量接种于 96 孔板中,在指定的时间点加入 20 μL 无菌 MTT 染料(5 mg/mL,Sigma,美国),于 37 °C 中孵育 4 h,随后移除培养基,加入 150 μL 二甲基亚砜,并在室温摇床上摇 10 min。测量 490 nm 波长的 A。

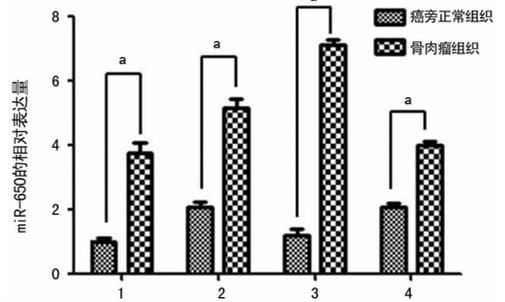
**1.2.5 Western blot 检测 ING4 蛋白的表达** 用 RIPA 裂解液对细胞进行裂解,刮取细胞悬液用超声处理 10~15 s,在冰上裂解 1 h 后,12 000 × g 离心 30 min,收集上清液。用 BCA 法对蛋白浓度进行测定,随后在蛋白样本中加入上样缓冲液,于沸水中煮 5 min,-20 °C 保存。在 Western blot 实验中,用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对蛋白样品进行分离后,将蛋白用半干转膜的方法将蛋白转移到 NC 膜上。用 5% 的脱脂奶粉进行封闭。随后加入 1:200 比例稀释的 ING4 一抗(Santa cruz),4 °C 过夜。用 TBST 清洗膜 3 次后,用相应的荧光二抗孵育 1 h。随后用 Odyssey 激光成像系统(LI-COR,Lincoln,美国)进行扫膜成像。结果用 ING4/GAPDH 的比值来表示。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS15.0 统计学软件进行统计学分析,计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  进行表示。两组之间比较采用 *t* 检验,多组样本比较用单因素方差分析。以 *P* < 0.05 为差异有统计

学意义。

## 2 结果

**2.1 miR-650 在骨肉瘤细胞系中表达升高** 在骨肉瘤组织中的 miR-650 表达量显著高于癌旁正常组织,见图 1;同时 MG63 细胞中 miR-650 的表达也显著高于 hFOB 1.19 细胞(1.00 ± 0.17 vs. 4.27 ± 0.23),差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

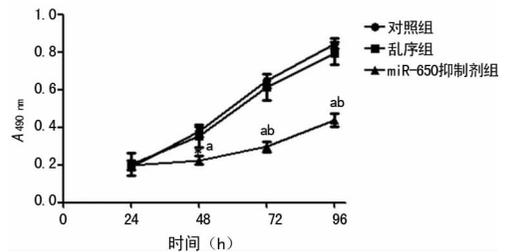


1:1 号病例;2:2 号病例;3:3 号病例;4:4 号病例;<sup>a</sup>:*P* < 0.05

图 1 患者的骨肉瘤组织和癌旁组织中 miR-650 的表达情况

**2.2 miR-650 抑制剂对 miR-650 表达的抑制效率** miR-650 抑制剂组 miR-650 的表达量为 0.32 ± 0.14,较阴性对照组(1.00 ± 0.15)、乱序组(1.02 ± 0.1)显著降低且差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

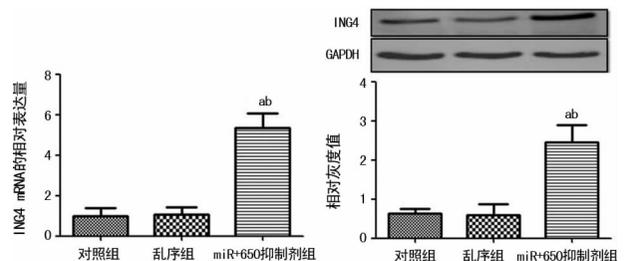
**2.3 抑制 miR-650 后,MG63 细胞增殖显著减弱** 相对于乱序组和对照组,抑制 miR-650 后在 48、72、96 h 时,MG63 细胞的增殖能力均显著受到抑制,且差异有统计学意义(*P* < 0.05),见图 2。



<sup>a</sup>:*P* < 0.05,与对照组比较;<sup>b</sup>:*P* < 0.05,与乱序组比较

图 2 抑制 miR-650 后 MG63 细胞的增殖情况

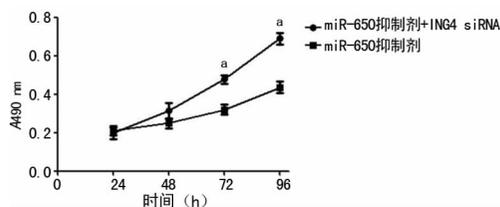
**2.4 抑制 miR-650 后 ING4 mRNA 及蛋白表达显著升高** 相对于对照组和乱序组,在 miR-650 抑制剂组,ING4 的 mRNA 水平和蛋白表达水平均显著升高(mRNA 表达分别为 1.00 ± 0.16、1.08 ± 0.14、5.35 ± 0.32;蛋白表达分别为 0.62 ± 0.06、0.59 ± 0.12、2.45 ± 0.20),见图 3。



A:抑制 miR-650 后 ING4 的 mRNA 表达情况;B:抑制 miR-650 后 ING4 的蛋白表达情况;<sup>a</sup>:*P* < 0.05,与对照组比较;<sup>b</sup>:*P* < 0.05,与乱序组比较

图 3 抑制 miR-650 后 ING4 的 mRNA 及蛋白表达情况

**2.5 siRNA 干扰 ING4 mRNA 表达后,抑制 miR-650 后对 MG63 细胞增殖的抑制作用** 在干扰 ING4 后,ING4 的 mRNA 水平显著降低;而在干扰掉 ING4 后,抑制 miR-650 降低 MG63 增殖的作用显著减弱,且在 72 h 及 96 h 处差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 4。



<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ,与 miR-650 抑制剂组比较

图 4 miR-650 抑制细胞增殖的能力比较

### 3 讨 论

大量的研究已经证实,miRNA 在肿瘤组织中的表达谱与对应正常组织有着显著的差异,并且这种差异与肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[10-12]</sup>。miR-650 在多种肿瘤组织中都有着高表达,提示其可能是潜在的促癌因子。ZENG 等<sup>[13]</sup>和 ZHANG 等<sup>[4]</sup>分别发现 miR-650 促肝癌及胃癌形成的作用与其靶向 ING4 有关。为了研究 miR-650 在骨肉瘤中是否也发挥同样的促进肿瘤细胞生成的作用,本研究对其在骨肉瘤细胞系 MG63 细胞的增殖情况进行了研究。在本研究中,证实了 miR-650 在骨肉瘤细胞系中表达较正常成骨细胞中升高,提示 miR-650 与骨肉瘤有着密切的联系。而随后的研究中发现抑制 miR-650 后可以显著降低 MG63 细胞的增殖,说明 miR-650 可能参与了骨肉瘤的发生及肿瘤组织的快速增殖。

miR-650 参与了 MG63 细胞增殖的调节,是通过什么机制完成的呢?有研究认为 miR-650 可以通过抑制包括肝癌及胃癌等肿瘤细胞中的 ING4 发挥促肿瘤形成的作用。ING4 是一种新的肿瘤抑制基因家族的一员,近年来有多项研究证实 ING4 在人骨肉瘤的发病过程中扮演了重要的作用。研究发现 ING4 能与 p53 相互作用并增强其功能。而 p53 是一种已经被广泛研究的抑癌基因,它可以通过调节细胞凋亡防止癌变,同时协助修复受损 DNA,所以增强 p53 功能对肿瘤抑制有着重要的意义。此外,ING4 还能直接阻断 NF- $\kappa$ B 信号通路,从另一个途径抑制肿瘤的生成与侵袭。ING4 可能通过多个通路对肿瘤的发生及转移发挥抑制作用,因此也成了抑制肿瘤的热门靶点。miR-650 已经在多项研究中证实可以调节 ING4 的表达,但在骨肉瘤细胞中尚未有研究,因此,为了探索 miR-650 促进 MG63 细胞促癌作用是否与 ING4 有关,本研究检测了在抑制 miR-650 后 ING4 的 mRNA 和蛋白的表达情况。结果证实抑制 miR-650 后,MG63 细胞中 ING4 的 mRNA 和蛋白的表达水平都显著升高,提示 miR-650 可以在转录和翻译水平降低 ING4 的表达。ING4 是否是介导了 miR-650 调节 MG63 细胞增殖?为了证实这个问题,本研究用 siRNA 抑制了 ING4 的表达,随后观察了 miR-650 抑制剂对 MG63 细胞增殖的抑制作用。结果发现抑制 ING4 表达后,miR-650 抑制剂对 MG63 细胞增殖的抑制作用显著减弱,提示 ING4 在 miR-650 对 MG63 细胞增殖的调节中发挥着重要的作用。本研究结果提示 miR-650 可能通过 ING4 调节骨肉瘤细胞的增殖,为骨肉瘤的治疗提供了新的靶点和思路。

### 参考文献

- [1] MARAIS L C, BERTIE J, RODSETH R, et al. Pre-treatment serum lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase as predictors of metastases in extremity osteosarcoma [J]. *J Bone Oncol*, 2015, 4(3): 80-84.
- [2] OTTAVIANI G, JAFFE N. The epidemiology of osteosarcoma [J]. *Cancer Treat Res*, 2009, 152: 3-13.
- [3] ZHAO Y, SRIVASTAVA D. A developmental view of microRNA function [J]. *Trends Biochem Sci*, 2007, 32(4): 189-197.
- [4] ZHANG X, ZHU W, ZHANG J, et al. MicroRNA-650 targets ING4 to promote gastric cancer tumorigenicity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 395(2): 275-280.
- [5] FAROOQI A A, QURESHI M Z, COSKUNPINAR E, et al. MiR-421, miR-155 and miR-650: emerging trends of regulation of cancer and apoptosis [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(5): 1909-1912.
- [6] HUANG J Y, CUI S Y, CHEN Y T, et al. MicroRNA-650 was a prognostic factor in human lung adenocarcinoma and confers the docetaxel chemoresistance of lung adenocarcinoma cells via regulating Bcl-2/Bax expression [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72615.
- [7] TANG J F, YU Z H, LIU T, et al. Five miRNAs as novel diagnostic biomarker candidates for primary nasopharyngeal carcinoma [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(18): 7575-7581.
- [8] WU H, HAAG D, MULEY T, et al. Tumor-microenvironment interactions studied by zonal transcriptional profiling of squamous cell lung carcinoma [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2013, 52(3): 250-264.
- [9] ZUO Z H, YU Y P, DING Y, et al. Oncogenic Activity of miR-650 in Prostate Cancer Is Mediated by Suppression of CSR1 Expression [J]. *Am J Pathol*, 2015, 185(7): 1991-1999.
- [10] BRONTE F, BRONTE G, FANALE D, et al. HepatomiRNoma: The proposal of a new network of targets for diagnosis, prognosis and therapy in hepatocellular carcinoma [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016, 97: 312-321.
- [11] THOMAS J, OHTSUKA M, PICHLER M, et al. MicroRNAs: Clinical Relevance in Colorectal Cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(12): 28063-28076.
- [12] NAIDU S, GAROFALO M. microRNAs: An emerging paradigm in lung cancer chemoresistance [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2015, 2: 77.
- [13] ZENG Z L, LI F J, GAO F, et al. Upregulation of miR-650 is correlated with down-regulation of ING4 and progression of hepatocellular carcinoma [J]. *J Surg Oncol*, 2013, 107(2): 105-110.