

· 基础研究 ·

miR-494 对骨肉瘤细胞增殖和侵袭的作用

张 雷, 段广超, 吴智辉

(商丘市第一人民医院脊柱外科, 河南商丘 476100)

摘要: [目的] 探究 miR-494 对骨肉瘤细胞增殖和侵袭的调控作用及机制。[方法] 对骨肉瘤 MG-63 细胞采用瞬时转染法上调/下调 miR-494 水平, 采用 RT-PCR 法检测 mRNA 表达水平, CCK-8 法检测细胞的增殖能力, Transwell 法检测细胞的侵袭能力, 划痕实验检测细胞迁移能力, Western blot 检测目标蛋白表达水平。[结果] 瞬时转染后随时间推移, 两组 miR-494 的表达均显著增加 ($P<0.05$), 转染后 12、18 以及 24 h 时, 转染组的 miR-494 表达情况均高于对照组 ($P<0.05$)。随时间推移, 两组细胞增殖均显著增加 ($P<0.05$), 24、48 以及 72 h 时, 转染组细胞增殖水平均显著低于对照组 ($P<0.05$)。转染组在视野下的平均细胞数、细胞跨膜数量以及细胞迁移率均显著低于对照组 ($P<0.05$)。转染组 CDK6 的 mRNA 以及蛋白表达均显著低于对照组 ($P<0.05$)。[结论] miR-494 的高表达能够抑制骨肉瘤细胞的增殖, 并且能够导致 CDK6 的 mRNA 以及蛋白质表达水平降低。

关键词: 骨肉瘤, miR-494, CDK6, 细胞增殖

中图分类号: R738.1

文献标志码: A

文章编号: 1005-8478 (2021) 21-1974-04

Effects of miR-494 on proliferation and invasion of osteosarcoma cells // ZHANG Lei, DUAN Guang-chao, WU Zhi-hui. Department of Spine Surgery, The First People's Hospital of Shangqiu City, Shangqiu 476100, China

Abstract: [Objective] To explore the regulation and mechanism of miR-494 on proliferation and invasion of osteosarcoma cells. [Methods] By using transient transfection method, the level of miR-494 in osteosarcoma MG-63 cells were up-regulated, or down-regulated. The mRNA expression level was assessed by RT-PCR, cell proliferation capacity by CCK-8 assay, cell invasion ability by Transwell test, cell migration ability by scratch test and target protein expression level was detected by western blot. [Results] With the passage of time after transient transfection, the expression of miR-494 in the two groups increased significantly ($P<0.05$). At 12h, 18h and 24h after transfection, the expression of miR-494 in the transfection group was higher than that of the control group ($P<0.05$). In addition, the cell proliferation of the two groups increased significantly over time ($P<0.05$). At 24 h, 48 h and 72 h, the cell proliferation level of the transfection group was significantly lower than that of the control group ($P<0.05$). The average cell number, cell transmembrane number and cell migration rate of the transfection group under the field of view were significantly lower than those of the control group ($P<0.05$). The mRNA and protein expression of CDK6 in the transfection group were significantly lower than those in the control group ($P<0.05$). [Conclusion] The high expression of miR-494 can inhibit the proliferation of osteosarcoma cells, and lead to the reduction of CDK6 mRNA and protein expression levels.

Key words: osteosarcoma, miR-494, CDK6, cell proliferation

骨肉瘤 (osteosarcoma, OS) 是一种间质瘤, 通常发生于儿童和年轻人^[1-3]。发病原因较为复杂, 受遗传、表观遗传和生物学因素的影响^[4]。OS 患者的生存率仅为 15%~30%^[5]。MicroRNA (miRNA) 是非编码的内源性 RNA, 在基因组中具有高度的保守性^[6]。已有文献报道 miRNA 的失调会参与影响 OS 和 OS 衍生细胞的进程^[7]。miRNA (miR)-494 已在多种类型的肿瘤中进行了研究, 包括非小细胞

肺癌、肝癌、胆管癌、胃癌和胰腺癌^[8, 9]。但是, miR-494 的调节作用在不同肿瘤类型中具有不同作用。miR-494 的异位表达会诱导 OS 细胞中 G1/S 期的停滞^[10]。而先前研究表明细胞周期蛋白依赖性激酶 6 (CDK6) 在 G1/S 期中发挥重要作用^[11], 故本研究探讨了 miR-494 的表达情况对于 OS 的影响并进一步探究 miR-494 与 CDK6 在 OS 中的关联。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人骨肉瘤细胞株 MG-63、U2OS 细胞株购自中国科学院（中国上海）细胞库典藏中心。杜尔伯科改良伊戈尔（DMEM）培养基、 α -MEM、胰蛋白酶、胎牛血清等均购自四季青公司，基质胶购自美国 Sigma 公司，细胞计数试剂盒（CCK-8）购自日本同仁化学公司，Transwell 小室购自美国 Corning 公司，CDK6 等抗体购自 Abcam 公司。

1.2 miR-494 转染

细胞分组：MG-63 细胞所使用的培养液为含有 10% 胎牛血清及 100 U/ml 青链霉素的 DMEM 培养液，在细胞培养箱内进行培养（37℃，5% CO₂）。将处于对数生长期生长的细胞使用胰酶进行消化处理，然后分别接种于 2 个 6 孔板中，然后根据说明书分别将 miRNA 模拟物及 miRNA 对照链转染于 MG-63 细胞中。

1.3 检测指标

1.3.1 RT-PCR 检测

实时定量 PCR 检测 miR-494 的表达情况。于细胞转染 12、18 以及 24 h 后，提取对照组、转染组细胞的总 RNA，采用锐博公司试剂盒检测 miR-494 的表达水平，平行重复 3 次。

1.3.2 CCK-8 检测^[12]

瞬时转染 24 h 后，将 MG-63 细胞接种到 96 孔板中，设置空白对照组，每组设置 4 个重复组，继续培养 24、48、72 h 后采用 CCK-8 检测细胞增殖情况。检测步骤如下：首先去除培养基，然后每孔加入 10 μ l 的 CCK-8 试剂，继续培养 2 h，然后震荡混匀后采用酶标仪检测吸光度值（450 nm 波长），比较各组细胞增殖速度。

1.3.3 Transwell 检测^[13]

在孔中加入 100 μ l 的培养基，孵育 10 min，使聚碳酸酯膜亲水。转染 24 h 后，使用胰蛋白酶消化，采用无血清的细胞培养以及重悬细胞，孔中各加入 100 μ l 的细胞悬浮液，下室中每孔加入 500 μ l 的有血清的培养基。置于细胞培养箱中培养 12 h。之后，用多聚甲醛固定 15 min，然后弃掉甲醛，放置晾干后用 0.1% 结晶紫溶液染色 15 min，使用纯净水冲洗数次，晾干。于显微镜下（ $\times 200$ ）选取 10 个视野进行细胞计算。采用划痕实验检测细胞的迁移能力。将转染后的细胞重悬，在新的 6 孔板中进行增殖，等

到细胞融合率达到 75% 左右时，使用枪头划横线。之后使用 1XPBS 清洗 3 次去除划下的细胞，加入无血清培养基继续培养。在划痕结束的 0、12 h 时进行拍照，采用 Image J 软件进行测量距离，计算细胞的 12 h 的迁移情况。

1.3.4 Western blot 检测

首先提取细胞总蛋白，然后采用 SDS-PAGE 胶进行电泳，待条带分离明显，进行转膜实验，将蛋白胶电转至聚偏氟乙烯（PVDF）膜上。电压 80 V，电转 120 min 后采用牛血清蛋白封闭 1 h，过夜孵育一抗，之后使用 TBST 洗膜 5 次，之后孵育 2 抗 1 h，再次 TBST 洗膜 5 次，然后使用化学发光法进行显影。曝光扫描条带，并采用 Image J 分析灰度值。进行 3 次独立重复实验。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行数据处理分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用独立样本 *t* 检验，计数资料采用 χ^2 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-494 检测

miR-494 的 RT-PCR 检测结果见表 1，随时间推移，两组 miR-494 的表达均显著增加（*P* < 0.05），转染后 12、18 以及 24 h 时，转染组的 miR-494 表达情况均高于对照组（*P* < 0.05）。

2.2 细胞增殖 CCK-8 检测

CCK-8 检测 MG-63 细胞增殖情况见表 1，随时间推移，两组细胞增殖均显著增加（*P* < 0.05），24、48 以及 72 h 时，转染组细胞增殖水平均显著低于对照组（*P* < 0.05）。

2.3 Transwell 侵袭和迁移能力比较

侵袭和迁移能力 Transwell 检测结果见表 1，图 1。转染组在视野下的平均细胞数、细胞跨膜数量以及细胞迁移率均显著低于对照组（*P* < 0.05）。在两种细胞株中，均表现为转染组的侵袭和迁移能力弱于对照组。

2.4 miR-494 调控 CDK-6 的表达情况

使用 RT-PCR 对 CDK6 的 mRNA 进行定量比较，使用 Western blot 方法对 CDK6 进行检测比较，发现在转染组中，CDK6 的 mRNA 以及蛋白表达均低于对照组，详情见表 1、图 2。在两种细胞株中，CDK6 的 mRNA 水平均低于对照组。

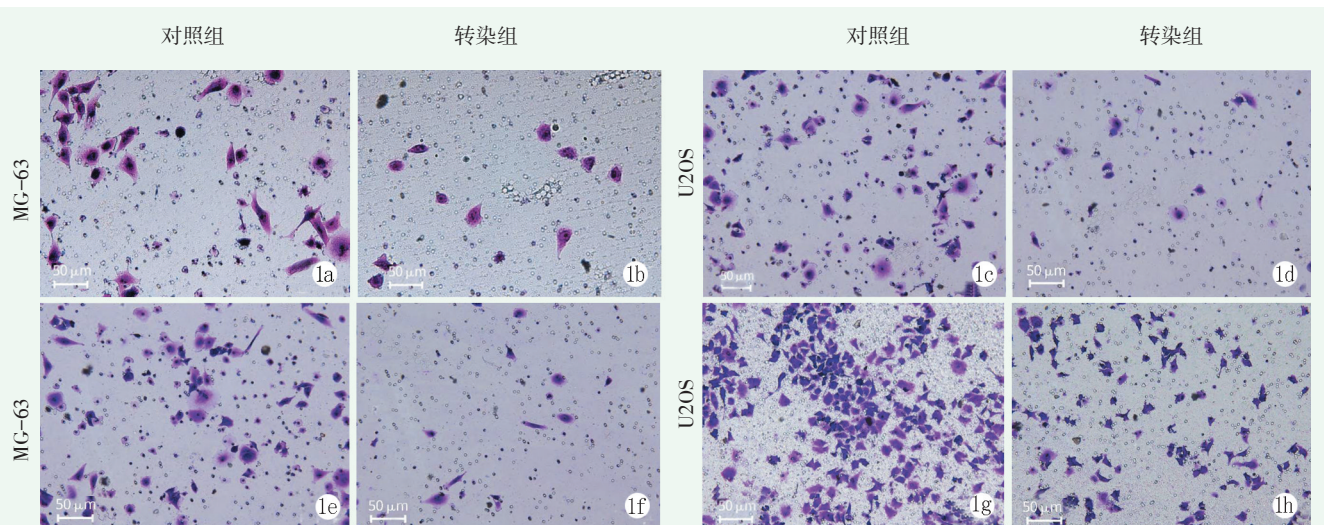


图 1 miR-494 抑制细胞的侵袭和迁移能力 1a~1d: 侵袭实验中, 显微镜下观察到 MG-63 细胞以及 U2OS 细胞的图像 1e~1h: 迁移实验中, 显微镜下观察到 MG-63 细胞以及 U2OS 细胞的图像

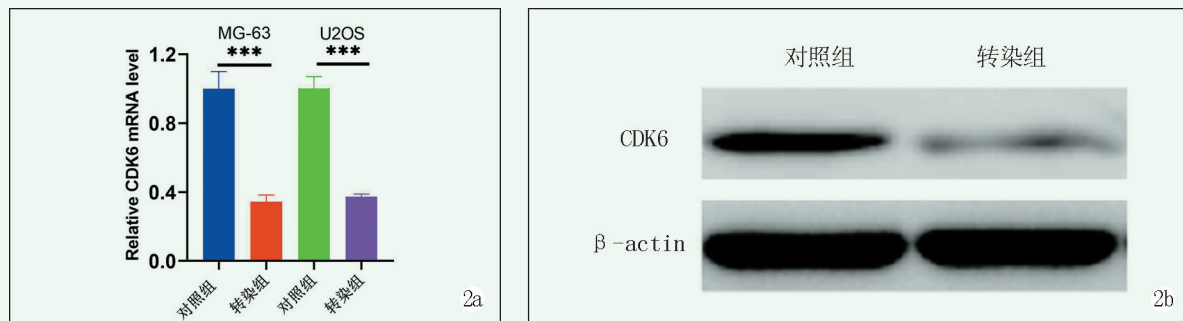


图 2 CDK6 表达情况 2a: CDK6 在 mRNA 水平上表达情况 2b: Western blot 检测 CDK6 在蛋白水平上表达情况

表 1 两组细胞检测结果 ($\bar{x} \pm s$) 与比较

指标	时间点	转染组 (n=16)	对照组 (n=24)	P 值
miR-494 表达 (相对值)	12 h	2.15±0.30	1.01±0.04	<0.001
	18 h	3.41±0.39	1.03±0.04	<0.001
	24 h	4.65±0.62	1.06±0.02	<0.001
	P 值	0.011	0.794	
CCK-8 检测 (A450)	24 h	0.10±0.01	0.20±0.03	<0.001
	48 h	0.13±0.02	0.25±0.02	<0.001
	72 h	0.32±0.04	0.52±0.05	<0.001
	P 值	0.008	<0.001	
细胞侵袭迁移能力检测				
细胞数/视野 (个)		60.39±10.31	104.15±13.08	<0.001
细胞跨膜数 (个)		48.15±10.44	90.29±14.02	<0.001
细胞迁移率 (%)		54.32±6.38	75.89±7.39	<0.001
CDK-6 mRNA 检测 (相对值)				
MG-63 mRNA		0.20±0.03	1.10±0.20	<0.001
U2OS mRNA		0.28±0.06	1.11±0.21	<0.001
CDK 蛋白水平检测 (相对值)		2.68±0.08	16.33±3.41	<0.001

3 讨论

越来越多的证据表明, miR-494 具有双重生物学

功能: 在某些特定肿瘤中高表达, 又是某些肿瘤的抑癌药物^[5]。据报道, miR-494 在几种实体瘤中表达

上调,包括肝细胞癌、急性粒细胞白血病、支气管癌变、视网膜母细胞瘤和结直肠癌^[14]。通过靶向 MCC 及 PTEN 发挥致癌作用^[15]。同时, miR-494 在许多实体瘤中表达均下调,包括胰腺癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、乳腺癌、卵巢癌和胆管癌^[16],并通过靶向 IGF1R, Sirt1, C-myc, CXCR4 及 Bim 等发挥肿瘤抑制作用^[17]。然而, miR-494 在骨肉瘤细胞中的生物学作用及其潜在机制仍不清楚。本研究采用两种常用的骨肉瘤细胞进行研究,结果表明过表达 miR-494 能够抑制骨肉瘤细胞的增殖。为了进一步探讨 miR-494 对于骨肉瘤细胞侵袭能力的影响,本研究进行 Transwell 实验以及划痕实验,在两种骨肉瘤细胞中,转染组的侵袭能力明显低于对照组,这表明过表达 miR-494 能够抑制骨肉瘤细胞的侵袭和迁移能力,能够抑制骨肉瘤的侵袭扩散。

众所周知, miRNA 通过抑制其靶基因发挥生物学活性。CDK6 在细胞周期进程中至关重要,并且抑制 CDK6 将导致肿瘤细胞的增殖不受控制^[18]。CDK6 在几种类型的癌症中发现与疾病的进展具有相关性,包括胶质母细胞瘤和淋巴样恶性肿瘤^[19]。CDK6 在 OS 组织中明显上调,在不同恶性组织中进行了进一步研究表明^[20], CDK6 的表达与肿瘤表型(转移和无转移)具有相关性,在转移性肿瘤中 CDK6 的表达升高。本研究中,过表达 miR-494 的骨肉瘤细胞的 CDK6 的表达降低,这可能提示 miR-494 与 CDK6 的表达存在相关性,进一步分析, miR-494 可能靶向调节 CDK6 的表达,当 miR-494 过表达时,抑制了 CDK6 的表达水平。miR-494 在 OS 中的作用可能由 CDK6 介导发挥作用。但是,确切的调控机理目前尚不清楚。

本研究确定了 miR-494 是 OS 细胞中的一种肿瘤抑制物 miRNA, miR-494 能够抑制骨肉瘤细胞的增殖能力和侵袭、迁移能力,其机制与调控靶基因 CDK6 有关,具体调控机理仍需进一步研究探索。

参考文献

- [1] Zhang Q, Li Y, Zhao M, et al. MiR-494 acts as a tumor promoter by targeting CASP2 in non-small cell lung cancer [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 3008.
- [2] 张翼, 张岩, 刘宏建, 等. 微小 RNA-122 对骨肉瘤增殖和侵袭的作用及其机制 [J]. *中华实验外科杂志*, 2019, 36 (3): 506-508.
- [3] Wei W, Ji L, Duan W, et al. Circular RNA circ_0081001 knock-down enhances methotrexate sensitivity in osteosarcoma cells by regulating miR-494-3p/TGM2 axis [J]. *J Orthop Surg Res*, 2021, 16 (1): 50.
- [4] 洪嵩, 蔡东峰, 张靖, 等. miR-552 靶向调控 Wnt 抑制因子-1 促进 MG-63 骨肉瘤细胞增殖、侵袭、迁移的实验研究 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2019, 24 (6): 494-499.
- [5] Zhang J, Zhu Y, Hu L, et al. miR-494 induces EndMT and promotes the development of HCC (Hepatocellular Carcinoma) by targeting SIRT3/TGF- β /SMAD signaling pathway [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 7213.
- [6] 李涛, 李娜, 李佳, 等. 微小 RNA-18a-3p 靶向调控 HEPN1 及对骨肉瘤细胞迁移侵袭的影响 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2020, 221 (5): 33-38.
- [7] 朱书涛, 席光辉, 王俊义, 等. miR-200c 通过 AKT2 对骨肉瘤细胞增殖的影响 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2018, 26 (17): 1615-1619.
- [8] Lu Q, Liu T, Feng H, et al. Circular RNA circSLC8A1 acts as a sponge of miR-130b/miR-494 in suppressing bladder cancer progression via regulating PTEN [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18 (1): 111.
- [9] Lemecha M, Morino K, Imamura T, et al. MiR-494-3p regulates mitochondrial biogenesis and thermogenesis through PGC1- α signalling in beige adipocytes [J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 15096.
- [10] Deng C, Zhu J, Yuan J, et al. Pramipexole inhibits MPP+-induced neurotoxicity by miR-494-3p/BDNF [J]. *Neurochem Res*, 2020, 45 (2): 268-277.
- [11] Xu F, Liu G, Wang L, et al. miR-494 promotes progression of retinoblastoma via PTEN through PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2020, 20 (2): 1952-1960.
- [12] 刘少斌, 刘子宸, 孟娟娟, 等. miR-214 通过调控 Notch1 信号对口腔鳞状细胞癌细胞株增殖、侵袭及增殖的作用机制研究 [J/CD]. *中华细胞与干细胞杂志(电子版)*, 2019, 9 (6): 345-350.
- [13] Zhu L, Wang X, Wang T, et al. miR-494-3p promotes the progression of endometrial cancer by regulating the PTEN/PI3K/AKT pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19 (1): 581-588.
- [14] 王苏贵, 皇立媛, 吴自余, 等. 抑制 miR-218 的表达对人去势抵抗型前列腺癌 C4-2 细胞增殖、侵袭及迁移能力的影响及其机制 [J]. *中华解剖与临床杂志*, 2019, 24 (5): 483-489.
- [15] 王俊义, 席光辉, 张成勇, 等. miR-100 对骨肉瘤细胞增殖、侵袭、迁移能力的影响 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2018, 26 (9): 840-844.
- [16] Qin W, Liu L, Wang Y, et al. Mir-494 inhibits osteoblast differentiation by regulating BMP signaling in simulated microgravity [J]. *Endocrine*, 2019, 65 (2): 426-439.
- [17] Zhang S, He K, Zhou W, et al. miR-494-3p regulates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW264.7 cells by targeting PTEN [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19 (5): 4288-4296.
- [18] 路凡, 何良志, 滕飞, 等. MALAT1 参与骨肉瘤发生发展机制的研究进展 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2019, 27 (17): 1574-1578.
- [19] Geng W, Liu L. MiR-494 alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced autophagy and apoptosis in PC-12 cells by targeting IL-13 [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2019, 28 (1): 85-94.
- [20] Orso F, Quirico L, Dettori D, et al. Role of miRNAs in tumor and endothelial cell interactions during tumor progression [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 60 (2): 214-224.

(收稿:2021-04-15 修回:2021-05-10)