

miR-15a 和 miR-16-1 模拟物对人骨肉瘤细胞系 SOSP-9607 凋亡和增殖的影响 *

蔡承魁 贡 喆 张 涛 姜 扩 高 杰 裘秀春 马保安[△]
(第四军医大学唐都医院全军骨科中心暨全军骨肿瘤研究所 陕西 西安 710038)

摘要 目的 探讨 miR-15a 和 miR-16-1 模拟物对于人骨肉瘤细胞系 SOSP-9607 凋亡和增殖的影响。方法 将 SOSP-9607 细胞分为实验组和对照组。实验组分为 miR-15a 组、miR-16-1 组、miR-15a+miR-16-1 组。以 miR-15a 组为例, 采用 miR-15a 模拟物(hsa-miR-15a mimics)上调 SOSP-9607 细胞内的 miR-15a 表达量。对照组分为阴性对照组和空白对照组。采用流式细胞仪测定细胞凋亡率, 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法测定细胞增殖, 并计算细胞增殖效率。结果 通过统计学分析, 实验组凋亡率与阴性对照组凋亡率相比明显增高 (P<0.05); 实验组的细胞增殖率明显低于对照组 (P<0.05)。结论: 上调 SOSP-9607 细胞内 miR-15a 和 miR-16-1 的表达量可促进 SOSP-9607 细胞的凋亡并抑制其增殖。
关键词 骨肉瘤; 骨肉瘤细胞系 SOSP-9607; miR-15a; miR-16-1; 细胞凋亡; 细胞增殖
中图分类号 R730.43 R734.2 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273(2011)08-1417-03

Effects of miR-15a and miR-16-1 mimics on Apoptosis and Proliferation of Human Osteosarcoma Cell Line SOSP-9607*

CAI Cheng-kui, YUN Zhe, ZHANG Tao, JIANG Kuo, GAO Jie, QIU Xiu-chun, MA Bao-an[△]
(Department of Orthopedic Surgery and Orthopedic Oncology Institute of PLA, Tangdu hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of miR-15a and miR-16-1 mimics on apoptosis and proliferation of human osteosarcoma cell line SOSP-9607. **Methods:** Cultured SOSP-9607 cells were divided into experimental group and control group: the experimental groups contained miR-15a group, miR-16-1 group and miR-15a+miR-16-1 group. Take miR-15a group for example, we use hsa-miR-15a mimics to upgrade the expression of miR-15a in SOSP-9607 cells. The control groups contained negative control and the blank control. The apoptosis were measured by flow cytometry, and MTT assay was used to examine the proliferation efficiency of human osteosarcoma cell line SOSP-9607. **Results:** The apoptosis ratio of experimental groups was higher than the control groups (P<0.05) and the proliferation efficiency of experimental groups was higher than control groups (P<0.05). **Conclusions:** the miR-15a and miR-16-1 plays an important role in cell apoptosis and proliferation in SOSP-9607 cells.

Key Words: Osteosarcoma; SOSP-9607 cell line; miR-15a; miR-16-1; cell apoptosis; cell proliferation

Chinese Library Classification(CLC):R730.43; R734.2 **Document code:**A

Article ID:1673-6273(2011)08-1417-03

前言

MicroRNAs 是一类广泛存在于生命体内的非编码 RNA, 它主要通过切割 mRNA 或者抑制 mRNA 翻译两种机制在转录后水平对基因表达进行调控。以往的研究已经发现, microRNA 参与了生命体内许多复杂活动的调控, 包括生长发育、细胞凋亡、细胞增殖等。Cimmino^[1]等人研究发现, 慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 病人癌细胞内 miR-15a 和 miR-16-1 表达下调, 而 Bcl-2 蛋白则高表达。通过上调 miR-15a 和 miR-16-1 可以显著抑制细胞内 Bcl-2 蛋白的表达, 从而促使 CLL 细胞凋亡。骨肉瘤是最常见的恶性骨肿瘤。患者大多是 10~25 岁男性。预后极差, 可于数月内出现肺部转移。已有研究证明^[2-3], 骨

肉瘤细胞内 Bcl-2 蛋白呈高表达状态。本研究通过利用 LipofectamineTM2000 转染法将化学合成的 miR-15a 和 miR-16-1 模拟物转染入 SOSP-9607 细胞内, 初步研究其对骨肉瘤细胞凋亡和增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 实验用细胞系和主要试剂

人成骨肉瘤细胞系 SOSP-9607 由第四军医大学唐都医院全军骨科中心暨全军骨肿瘤研究所原代培养建立^[4]。Opti-MEMI (optimum-minimum essential medium) 去血清培养基, RPMI1640 培养基购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自四季青公司; LipofectamineTM2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81072194)
作者简介: 蔡承魁(1984-) 男, 硕士生, 医师, 主要从事骨肿瘤研究及临床治疗研究。
Email: xcc-0724@163.com
[△]通讯作者: 马保安(1961-) 男, 教授, 硕导, 主任医师。
Email: maban@fmmu.edu.cn
(收稿日期: 2011-01-07 接受日期: 2011-01-30)

司,四甲基偶氮唑蓝(MTT)试剂购自南京凯基生物发展公司;二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司,流式细胞仪检测在第四军医大学基础部免疫学教研室进行。

1.2 细胞培养

成骨肉瘤细胞系采用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基,在 37℃、5%CO₂、饱和湿度的条件下传代培养。待细胞汇合度达 90%时传代,使细胞保持对数生长状态。

1.3 模拟物合成与转染

根据 miRBase(<http://www.mirbase.org>)提供的 miRNA 基因序列,获取人 miR-15a:5'-uagcagcacuaaugg uuugug-3'和 miR-16-1:5'-uagcagcacguaauuugcg-3'的序列。由上海吉玛公司合成 hsa-mir-15a 和 hsa-mir-16-1 的双链 microRNA 模拟物,阴性对照(Negative control)为上海吉玛公司赠送(加水溶解后产品浓度为 20μ M/L)。采用 Lipofectamine™2000 转染试剂说明书进行转染。miRNA 模拟物的转染终浓度为 50nM/L,混合组(miR-15a+miR-16-1 组)按照 1:1 的比例转染,终浓度也为 50nM/L。

1.4 流式细胞仪测定细胞凋亡率

本实验分 5 组 miR-15a 组、miR-16-1 组、miR-15a+miR-16-1 组、随机序列阴性对照组(NC)、空白对照组(blank)。取对数生长期的 SOSP-9607 细胞,以 5×10⁴/mL 起始密度接种于 12 孔板。每组复三孔,8-12 小时后开始转染。以 miR-15a 组为例:2.5μL miR-15a 溶于 97.5μL Opti-MEMI 溶液中,2μL Lipofectamine™2000 溶于 98μL Opti-MEMI 溶液中(室温孵育 5min),再将二者混合,室温孵育 20min 后加入 12 孔板内。最后向 12 孔板中加入 800mL/孔的 Opti-MEMI 溶液,形成 50nM/L 的转染浓度。培养 5 小时后更换含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基。转染 72 小时后消化离心搜集细胞,上机检测。

1.5 MTT 分析

表 1 转染 miR-15a 和 miR-16-1 后 72h 流式细胞仪检测 SOSP-9607 细胞凋亡($\bar{X} \pm S$, n=4)

Table 1 The apoptosis of SOSP-9607 cells in 72h after transfected with miR-15a and miR-16-1($\bar{X} \pm S$, n=4)		
组别 / 凋亡率	晚期凋亡率%(Q2)	早期凋亡率%(Q4)
miR-15a	22.4± 1.7●	8.7± 1.8●
miR-16-1	18.9± 4.4●	5.3± 1.3●
miR-15a+miR-16-1	17.4± 3.4●	7.4± 1.7●
NC	2.1± 0.7	5.1± 2.0
blank	1.3± 0.3	2.9± 1.9

本实验分为实验组和对照组:实验组为 miR-15a 组、miR-16-1 组、miR-15a+miR-16-1 组。对照组为随机序列阴性对照组(NC)、空白对照组(blank)、凋零孔对照组。取对数生长期的 SOSP-9607 细胞,以 5×10⁴/mL 的起始密度接种于 96 孔板,每组复 32 孔,共铺 4 个 96 孔板,8-10 小时后开始转染。以 miR-15a 组为例,8μL miR-15a 溶于 792μL Opti-MEMI 溶液中;8μL Lipofectamine™2000 溶于 792μL Opti-MEMI 溶液中(室温孵育 5min),再将二者混合,室温孵育 20min 后加入 1.6mL Opti-MEMI 溶液,混匀后加入 96 孔板中(100μL/孔),形成 50nM/L 的转染浓度。空白对照组只加入 100μL/孔的 Opti-M-EMI 溶液。凋零孔对照组不铺细胞,只加入 100μL/孔的 Opti-MEMI 溶液。96 孔板四周用无菌 PBS 液填充。各组均在 5 小时后更换含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基。各板分别于 24h、48h、72h、96h 后加入 20μL/孔 MTT 溶液,置入孵箱继续培养 4 小时后,避光条件下小心吸出上清液,每孔加入 150μL DMSO。在酶标仪中震荡 10min,在 492nm 波长处测量每孔的光密度 OD 值(A₄₉₂),按照公式:A₀=A₄₉₂-A_{凋零孔}计算每孔的相对 OD 值(A₀)。以时间为横坐标,以平均光密度 OD 值(A₀为每个实验组的平均 A₀值)为纵坐标,绘制细胞生长率曲线。

1.6 统计学分析

本实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm S$)表示,采用 SPSS13.0 软件对多个样本均数进行完全随机区组设计的单因素方差分析,各组均数间两两比较行 q 检验。令 α=0.05。

2 结果

2.1 上调 miR-15a 和 miR-16-1 对 SOSP-9607 细胞凋亡的影响
流式细胞仪检测结果显示:实验组转染 microRNA 模拟物 72h 后与阴性对照组(NC)相比凋亡率明显增高,差异有统计学意义(P<0.05)。见表 1(Table 1)和图 1(Fig.1)。

- 3 个实验组与对照组相比 P<0.05
- three experimental groups compared with control groups, P<0.05

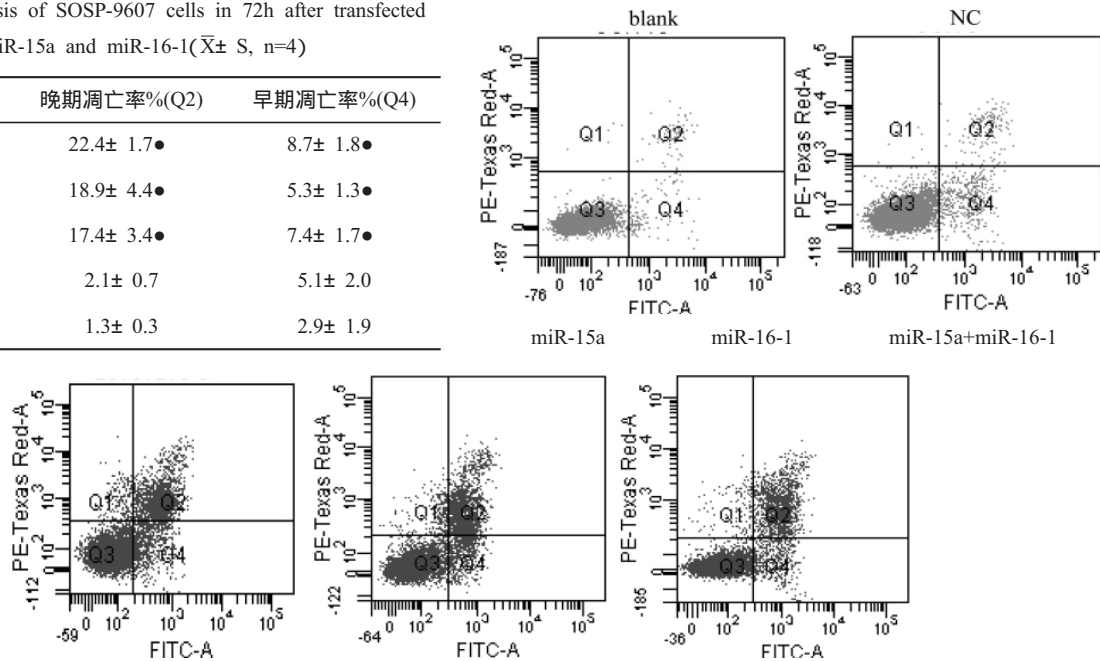


图 1 流式细胞仪检测转染后 72 小时 SOSP-9607 细胞凋亡图

Fig.1 The apoptosis of SOSP-9607 cells measured by flow cytometry

2.2 上调 miR-15a 和 miR-16-1 对 SOSP-9607 细胞增殖的影响

MTT 检测显示 随机序列阴性对照组(NC)和空白对照组(blank)相比,细胞增值率无明显差异($P>0.05$)。与随机序列阴性对照组相比,3 个实验组对 SOSP-9607 细胞的增值均有一定程度上的抑制作用($P<0.05$)。见图 2(Fig.2)。

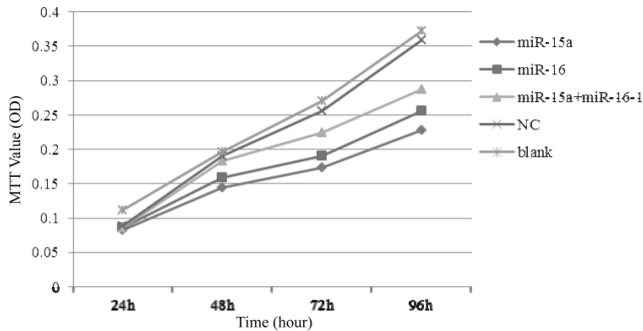


图2 转染 miR-15a 和 miR-16-1 模拟物后 SOSP-9607 细胞的增值率
Fig.2 The growth ratio of SOSP-9607 cells after transfected with miR-15a and miR-16-1

3 讨论

miR-15a 和 miR-16-1 定位于人 13q14.3 号染色体上,是一类进化上高度保守的 microRNA^[5]。关于 miR-15a 和 miR-16-1 的功能研究主要有 ①它们在人体大多数恶性肿瘤的细胞中都表现为低表达或者不表达状态。已经报道的肿瘤有肝细胞肝癌、乳腺癌、卵巢癌、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、非小细胞肺癌、前列腺癌、胃癌、垂体腺瘤、多发性骨髓瘤和骨肉瘤^[6-16]。②Nedelcu 等人研究证实^[3],在人骨肉瘤细胞中, Bcl-2 和 Livin 基因高表达, 过表达的 Bcl-2 蛋白抑制 caspase-8 的合成而使失巢凋亡(anoikis 凋亡)途径受阻, 进而使肿瘤细胞呈现高增殖能力和高侵袭性特征。③miR-15a 和 miR-16-1 的靶基因之一是 Bcl-2, 人工异位高表达的 miR-15a 和 miR-16-1 能通过特异性结合 Bcl-2 基因编码 mRNA 的 3'UTR 区而抑制其翻译过程, 从而促进癌细胞凋亡, 减少癌细胞的增值和侵袭能力^[16]。④在对多药耐药的胃癌细胞系 SGC/VCR 细胞中, 人工上调 miR-15a 和 miR-16-1 的表达可以通过抑制 Bcl-2 基因的表达增加癌细胞对抗肿瘤药物的敏感性^[8]。而通过慢病毒介导的 Bcl-2 基因抑制也加强了耐药骨肉瘤细胞对化疗药物的敏感性^[17]。本实验利用 Lipofectamine™2000 将化学合成的 miR-15a 和 miR-16-1 转染入 SOSP-9607 细胞内, 模拟细胞内功能性 miR-15a 和 miR-16-1 的高表达。进而研究其对骨肉瘤细胞凋亡和增殖的影响。实验结果显示高表达的 miR-15a 和 miR-16-1 可以抑制 SOSP-9607 细胞增殖并促进其凋亡。但对于 miR-15a 和 miR-16-1 各自的功能究竟有什么不同, 二者在细胞内有何相互作用, 其下游靶基因还有哪些, 具体的抗癌细胞耐药机制仍需要进一步研究。

参考文献(References)

[1] Cimmino A, Calin G A, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102 (39):13944-9
[2] Kaseta MK, Khaldi L, Gomatos IP, et al. Prognostic value of bax, bcl-2, and p53 staining in primary osteosarcoma [J]. J Surg Oncol,

2008, 97(3):259-66

[3] Nedelcu T, Kubista B, Koller A, et al. Livin and Bcl-2 expression in high-grade osteosarcoma [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2008, 134(2): 237-44
[4] 杨彤涛, 范清宇, 张殿忠等. 人骨肉瘤细胞系 SOSP-9607 的建立及其生物学特性的观察 [J]. 中华实验外科杂志, 2000, 17(2): 120-121
YANG Tongtao, FAN Qingyu, ZHANG Dianzhong, et al. Establishm - ent and biological characters of a human osteosarcoma cell line SOSP-9607 [J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2000, 17 (2): 120-121
[5] Bandi N, Zbinden S, Gugger M, et al. miR-15a and miR-16 are implicated in cell cycle regulation in a Rb-dependent manner and are frequently deleted or down-regulated in non-small cell lung cancer [J]. Cancer Research, 2009, 69(13):5553-9
[6] Guo CJ, Pan Q, Li DG, et al. miR-15b and miR-16 are implicated in activation of the rat hepatic stellate cell: An essential role for apoptosis [J]. J Hepatol, 2009, 50(4):766-78
[7] Lerner M, Harada, M, Loven J, et al. DLEU2, frequently deleted in malignancy, functions as a critical host gene of the cell cycle inhibitory microRNAs miR-15a and miR-16-1 [J]. Exp Cell Res, 2009, 315 (17):2941-52
[8] Xia L, Zhang D, Du R, et al. miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells [J]. Int J Cancer, 2008, 123(2):372-9
[9] Corthals SL, Jongen-Lavrencic M, de Knecht Y, et al. Micro-RNA-15a and micro-RNA-16 expression and chromosome 13 deletions in multiple myeloma [J]. Leukemia Research, 2010, 34(5):677-81
[10] Tsang WP, Kwok TT. Epigallocatechin gallate up-regulation of miR-16 and induction of apoptosis in human cancer cells [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2010, 21(2):140-6
[11] Xu F, Zhang X, Lei Y, et al. Loss of repression of HuR translation by miR-16 may be responsible for the elevation of HuR in human breast carcinoma. Journal of Cellular Biochemistry [J], 2010, 111(3):727-34
[12] Bhattacharya R, Nicoloso M, Arvizo R, et al. MiR-15a and MiR-16 control Bmi-1 expression in ovarian cancer [J]. Cancer Research, 2009, 69(23):9090-5
[13] Bonci D, Coppola V, Musumeci Met, al. The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities [J]. Nature Medicine, 2010, 14(11):1271-7
[14] Xia L, Zhang D, Du R, et al. miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells [J]. International Journal of Cancer, 2008, 123(2):372-9
[15] Bottoni A, Piccin D, Tagliati F, et al. miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas [J]. Journal of Cellular Physiology, 2005, 204(1):280-5
[16] Corthals SL, Jongen-Lavrencic M, de Knecht Y, et al. Micro-RNA-15a and micro-RNA-16 expression and chromosome 13 deletions in multiple myeloma [J]. Leukemia Research, 2010, 34(5):677-81
[17] Zhao Y, Zhang CL, Zeng BF, et al. Enhanced chemosensitivity of drug-resistant osteosarcoma cells by lentivirus-mediated Bcl-2 silencing [J]. Biophysical Research Communications, 2009, 390(3): 642-7