

microRNA-194 模拟物对成骨肉瘤细胞系 SOSP_9607 生物学特性的影响 *

靳 雷 高 杰 刘云燕 马 琼 杨彤涛 裘秀春 范清宇 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:观察 miR-194 模拟物对于成骨肉瘤细胞系 SOSP_9607 细胞增殖、周期和凋亡的影响。**方法:**四甲基偶氮唑蓝(MTT)法绘制细胞生长曲线,流式细胞仪测定细胞凋亡和周期。将 SOSP_9607 细胞分为对照组和实验组,对照组分为阴性对照和正常细胞对照组。实验组采用 miR-194 模拟物(hsa-miR-194 mimics)转染成骨肉瘤细胞系 SOSP_9607,增强 SOSP_9607 细胞内 miR-194 的活性。**结果:**与对照组比较,实验组细胞的增殖能力明显下降。实验组凋亡率(10.1 ± 0.22)%与阴性对照组凋亡率(3.3 ± 0.19)%相比明显增高($P < 0.01$)。与对照组比较,实验组细胞周期 G0/G1 细胞比例显著增加,G2/M 期细胞比例显著减少,S 期细胞比例显著减少($P < 0.01$)。**结论:**通过转染 miR-194 模拟物增强 SOSP_9607 细胞中 miR-194 的活性对 SOSP_9607 细胞的增殖和凋亡造成显著影响。

关键词:骨肉瘤;成骨肉瘤细胞系 SOSP_9607;miR-194 ;细胞增殖;细胞凋亡

中图分类号:R738 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)04-615-03

Effects of MicroRNA-194 mimics on Proliferation and Apoptosis of Human Osteosarcoma Cell Line SOSP-9607*

JIN Lei, GAO Jie, LIU Yun-yan, MA Qiong, YANG Tong-tao, QIU Xiu-chun, FAN Qing-yu, MA Bao-an[△]

(Department of Orthopedic Surgery Center and Orthopedic Oncology Institute of PLA, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shanxi, 710038, P. R. China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of microRNA-194 mimics on proliferation, cell cycle and apoptosis of human osteosarcoma cell line SOSP-9607. **Methods:** MTT assay was used to detect cell growth. FCM was employed to detect cell apoptosis rate and cell cycle analysis. Cultured SOSP-9607 cells were divided into three groups: negative control group, blank group and experimental group. In experimental group, hsa-miR-194 mimics were used to increase the activity of miR-194. **Results:** Hsa-miR-194 mimics inhibited SOSP-9607 cell proliferation, while the control group had no obvious effect on cell proliferation. The apoptosis ratio of the experimental group[(10.1 ± 0.22)%] was obviously higher than that of the control group[(3.3 ± 0.19)%]($P < 0.01$). Hsa-miR-194 mimics increased the cell ratio of G0/G1 phase, simultaneously decreased significantly the cell ratios of G2/M phase and S phase.($P < 0.01$). **Conclusion:** The hsa-miR-194 mimics play an important role in cell proliferation and apoptosis in SOSP-9607 cells by increasing the miR-194.

Key words: Osteosarcoma; SOSP-9607 cell line; miR-194; Cell proliferation; Cell apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R738 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)04-615-03

前言

MicroRNAs(miRNAs)是一类广泛存在于植物、动物以及病毒等真核细胞生物中的不编码蛋白质的单链小分子 RNA,长约 21-25 nt。miRNA 与靶 mRNA 的 3'UTR 碱基配对,通过抑制靶 mRNA 的翻译或使其直接降解,使靶基因在转录后水平沉默,调控靶基因的表达^[1]。miRNA 参与了动植物许多复杂的生命过程,包括生长发育、器官形成、细胞增殖、细胞凋亡等。研究表明 miRNAs 表达异常与恶性肿瘤发生密切相关^[2-4]。骨肉瘤是发病率最高的原发性骨肿瘤,约 50 %的骨肉瘤患者出现肺部转移,这已成为骨肉瘤患者死亡的首要原因^[5]。肿瘤细胞的增

殖是其生长和转移的重要环节。本研究通过 miR-194 模拟物(hsa-miR-194 mimics)增强细胞中 miR-194 的活性,观察 miR-194 对于骨肉瘤细胞系 SOSP_9607 增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

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骨肿瘤研究所实验室建立。RPMI1640 培养基、Opti-MEMI (optimum - minimum essential medium) 去血清培养基购自美国 Gibco 公司;Lipofectamine™2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司;二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司;

* 基金项目国家自然科学基金项目 (No.30672143)

作者简介:靳雷(1983-),男,硕士研究生,主要研究方向:骨肿瘤的基础与临床,

电话:86-29-84777591,Email:jjj_jjj_111@hotmail.com

△通讯作者:马保安 电话:86-29-84777433, E-mail:maban@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2010-12-04 接受日期:2010-12-27)

胎牛血清购自四季青公司;MTT 检测试剂盒购自南京凯基生物发展公司。

1.2 细胞培养

成骨肉瘤细胞系 SOSP_9607 细胞用 RPMI1640 培养液(含 10 %胎牛血清) 中培养在 37 ℃、5 % CO₂ 饱和湿度的孵箱条件下传代培养,实验用细胞均取自对数生长期。

1.3 模拟物的合成与转染

has-miR-194 模拟物购自上海吉玛生物公司, 序列为 5'-UGUAAACAGCAACUCCAUGUGGA-3'、5'-CACAUGGAGU-UGCUGUUAU-3' 模拟物阴性对照 (上海吉玛生物公司赠送), 序列为 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'、5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。转染步骤按照脂质体 Lipofectamine™2000 试剂说明书操作。

1.4 MTT 分析

实验分为对照组和实验组:对照组分为 2 组, 阴性对照组 (转染模拟物阴性对照), 正常细胞对照组。每组细胞 8 复孔, 周边孔用无菌 PBS 充填, 实验重复 3 次。转染前 24 h 取对数生长期长势良好的 SOSP_9607 细胞, 以每孔 3× 10³ 个细胞接种 96 孔板, 添加含 10 %FBS 的 1640 培养液, 置于 37 ℃、5 % CO₂ 饱和湿度的孵箱培养。24 h 待细胞生长汇合度达 40%左右后, 将原培养液吸去, 实验组以 40 nmol/L 浓度进行转染, 阴性对照组转染 Opti-MEMI 去血清培养基稀释的模拟物阴性对照, 正常细胞组只加入 Opti-MEMI 去血清培养基, 置入孵箱培养。培养 5h 后, 弃去上层 Opti-MEMI 去血清培养基, 更换含 10 %FBS 的 RPMI1640 培养液继续孵箱培养。分别于转染后 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h 后, 每孔加入 20 μl MTT 溶液, 置入孵箱孵育 4h, 吸出上清液, 每孔加 150 μl DMSO。在酶标仪中震荡 10 min, 在 492 nm (参考波长 630 nm) 处测每孔的光密度 OD 值: A (492)。每组 8 复孔 OD 值, 去掉最高值和最低值。取其余 6 孔 OD 均值, 以时间 (d) 为横坐标, 吸光度 (OD) 为纵坐标绘制生长曲线。

1.5 细胞周期和凋亡测定

细胞周期测定时, 实验分为实验组和对对照组。其中实验组转染 40 nmol/L miR-194 模拟物, 对照组分为阴性对照组, 正常细胞对照组。取对数生长期长势良好的 SOSP-9607 细胞, 传代于 25 ml 培养瓶中, 添加 1640 培养液(含 10 %胎牛血清)后, 置于 37 ℃、5 % CO₂ 饱和湿度的孵箱培养。待细胞生长基本汇合后, 按实验分组分别转染各组细胞, 置入孵箱培养, 培养条件同前。培养 48 h, 弃去培养液, 用 PBS 平衡盐溶液清洗细胞 1 次。用 0.25 %胰蛋白酶溶液消化细胞, 显微镜下观察细胞收缩变圆即弃消化液, 加入含血清培养液终止消化。轻轻吹打细胞使其

脱壁, 混悬细胞。细胞混悬液以 1000 r/min 离心 5 min, 吸去上清。用 PBS 平衡盐溶液清洗细胞 2 次, 加入预冷的 70 %乙醇固定细胞 30 min, 离心收集细胞, 经磷酸盐缓冲液冲洗后, 用含有 RNA 酶的 1 %碘化丙锭 (PI) 染色 30 min, 用 PBS 平衡盐溶液清洗细胞 2 次, 洗去 PI。用 PBS 平衡盐溶液调整体积至 1 ml。将样品置入 BD-Aria FACS Calibur 流式细胞仪中检测细胞凋亡与周期。每组 3 个样本, 实验重复 3 次。

1.6 统计学方法

数据以均数± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 12.0 统计软件对多个样本均数进行单因素方差分析, 各均数间的两两比较行 q 检验。

2 结果

2.1 miR-194 模拟物对 SOSP_9607 细胞增殖的影响

用 MTT 法绘制了三组细胞 (实验组、阴性对照组、正常细胞对照组) 的生长曲线, 结果显示, 同实验组和阴性对照组相比, 实验组细胞的增殖能力明显下降。而正常细胞对照组和阴性对照组细胞的增殖能力没有显著差别。这表明外源性 miR-194 能够显著抑制成骨肉瘤 SOSP-9607 细胞的增殖能力 (图 1)。

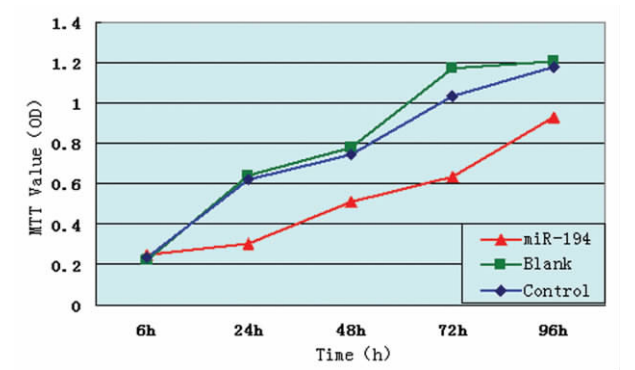


图 1 实验组、阴性对照组和正常细胞组的生长曲线图
Fig. 1 miR-194 group, Control group, Blank group growth curve

2.2 miR-194 模拟物对 SOSP_9607 细胞周期的影响

流式细胞仪检测结果显示, 正常细胞组转染 48h 后与阴性对照组相比, 处于 G0/G1 期, G2/M 期, S 期细胞比例差异无统计学意义 (P>0.05)。实验组转染 miR-194 模拟物 48h 后和阴性对照组相比处于 G0/G1 期的细胞比例显著增多, G2/M 期的细胞比例显著减少, 同时 S 期细胞比例显著减少, 差异有统计学意义 (P<0.01) (表 1)。

表 1 转染 miR-194 模拟物 48h 后 SOSP_9607 细胞周期的变化 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 SOSP_9607 cell cycle changes after transfected with miR-194 mimics for 48h

Group	G0/G1 phase (%)	Sphase (%)	G2/M phase (%)
Control group	51.47± 0.82	40.37± 0.51	8.16± 0.36
Blank group	50.44± 0.45	41.50 ± 0.88	8.06± 0.71
miR-194 group	68.13± 0.51*	26.77± 0.26*	5.10± 0.38*

Note: * P<0.01 miR-194 group compared with control group

2.3 miR-194 模拟物对 SOSP_9607 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示,正常细胞组转染 48h 后与阴性对照组比较,凋亡率差异无统计学意义($P>0.05$);实验组转染 miR-194 模拟物 48h 后凋亡率 (10.1 ± 0.22)%与阴性对照组凋亡率(3.3 ± 0.19)%相比明显增高,差异有统计学意义($P<0.01$) (图 2)。

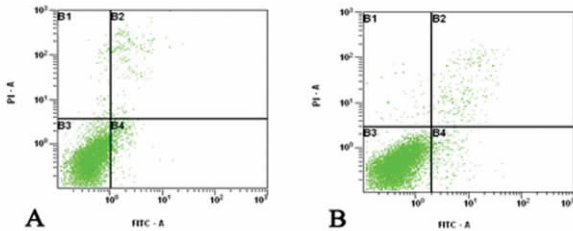


图 2 转染 miR-194 模拟物 48h 后实验组及阴性对照组细胞凋亡图:A 实验组;B 阴性对照组

Fig.2 miR-194 group, Control group cell apoptosis scatter diagram after transfected with miR-194 mimics for 48h

3 讨论

近年来,miRNA 与肿瘤的关系成为生物学领域研究的热点。研究发现有 52.5%的 miRNA 编码基因位于肿瘤相关基因区域的序列附近^[6],提示 miRNAs 对肿瘤相关基因具有调控作用。研究证实在 50%~60%的慢性淋巴细胞白血病(CLL)患者中,miR-15 和 miR-16 表达下调或缺失,推测它们可能扮演肿瘤抑制基因的角色^[7]。Johnson SM 等报道 let-7 通过抑制 RAS 蛋白的表达从而抑制肺癌细胞生长^[8]。大量的研究证明 miR-21 在肺癌、乳肝癌、腺癌、结肠癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、胃癌、胆管癌、前列腺癌等中均呈过表达。Jennifer A. Chan 等^[9]研究证实,miR-21 在神经胶质细胞瘤中是一种抗凋亡因子。miR-21 通过对靶基因的调控参与肿瘤细胞的生长、侵袭、血管浸润、转移和耐药^[10]。对于多种类型的肿瘤,miRNAs 发挥着抑癌基因或者癌基因的作用,miRNA 可能成为肿瘤治疗的新靶点^[11]。

Sara A. Georges^[12], Braun^[13], Bo Song^[14]等研究显示与正常组织相比 miR-194 在许多肿瘤细胞中低表达,P53 基因可调节 miR-194 表达升高,并可能通过与 P53 基因作用使细胞的周期发生停滞。Venugopal SK^[15]等报道 miR-194 的高表达可抑制肝星状细胞的激活及肝的纤维化。Meng Z^[16]等研究发现 miR-194 可作为肝上皮细胞的标志物并具有抑制肝癌细胞转移的能力。目前国内外关于 miR-194 对于骨肿瘤的作用尚未见报道。本研究根据本实验室对 SOSP_9607 为母系单克隆出的两对高低增殖(高转移)细胞系细胞的 miRNA 基因芯片结果,发现在两高增殖细胞系中 miR-194 均低表达,并通过荧光实时定量 PCR 得到验证(结果尚未发表)。因此推测 miR-194 可能抑制 SOSP_9607 肿瘤细胞的增殖。本研究通过上海吉玛生物公司提供的 miR-194 模拟物转染 SOSP_9607 细胞,上调 SOSP_9607 肿瘤细胞中的 miR-194 的表达,结果肿瘤细胞增殖能力明显下降,凋亡率增高,同时细胞周期中 S 期细胞比例减少。本研究揭示,miR-194 对于成骨肉瘤细胞系 SOSP_9607 具有抑制细胞增殖、促凋亡,使细胞周期停滞的作用。而 miR-194 对于

SOSP_9607 的作用是否与 P53 基因有关,以及通过具体何途径影响 SOSP_9607 的生物学性状,有待于进一步的研究。

本研究验证了上调 miR-194 能抑制 SOSP_9607 细胞的增殖,增加凋亡率,从而揭示了 miR-194 的低表达有可能促进 SOSP_9607 细胞的增殖,降低凋亡率,验证了 miR-194 对于骨肉瘤细胞 SOSP_9607 增殖、凋亡的调控及对细胞周期的影响,虽然 miR-194 对于调控骨肉瘤增殖和凋亡的机制有待于进一步深入研究,但是却为 miR-194 成为骨肉瘤生物治疗的一个靶点提供了依据。

参考文献(References)

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116: 281-297
- [2] Esquela KA, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6: 259-269
- [3] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. Nature, 2005, 435: 834-838
- [4] Calin GA, Liu CG, Sevignani C, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 11755-11760
- [5] Tsuchiya H, Tomita K, Mori Y, et al. Marginal excision for osteosarcoma with caffeine assisted chemotherapy [J]. Clin Orthop, 1999, 358: 27-35
- [6] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 2999-3004
- [7] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 15524-15529
- [8] Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family[J]. Cell, 2005, 120: 635-647
- [9] Chan JA, Krichevsky AM. MicroRNA-21 is an Antiapoptotic Factor in Human Glioblastoma Cells[J]. Cancer Res, 2005, 65: 6029-6033
- [10] Fanyin M, Roger H. MicroRNA-21 Regulates Expression of the PTEN Tumor Suppressor Gene in Human Hepatocellular Cancer[J]. Gastroenterology, 2007, 133: 647-658
- [11] Sassen S, Miska EA, Caldas C, et al. MicroRNA: implications for cancer[J]. Virchows Arch, 2008, 452: 1-10
- [12] Sara AG, Matthew CB, Soo-yeon K, et al. Coordinated Regulation of Cell Cycle Transcripts by p53-Inducible microRNAs, miR-192 and miR-215[J]. Cancer Res, 2008, 68: 10105-12
- [13] Braun CJ, Zhang X, Irina S, et al. p53-Responsive MicroRNAs 192 and 215 Are Capable of Inducing Cell Cycle Arrest [J]. Cancer Res, 2008, 68: 10094-104
- [14] Song B, Wang Y, Kudo K, et al. miR-192 Regulates Dihydrofolate Reductase and Cellular Proliferation Through the p53-miRNA Circuit [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14: 8080-8086
- [15] Wang XR, Zhang XM, Zhen J, et al. Liver fibrosis causes downregulation of miRNA-150 and miRNA-194 in hepatic stellate cells, and their overexpression causes decreased stellate cell activation[J]. Neuroreport, 2010, 21: 611-7
- [16] Meng Z, Fu X, Chen X, Zeng S, et al. miR-194 is a marker of hepatic epithelial cells and suppresses metastasis of liver cancer cells in mice [J]. Hepatology, 2010, 52: 2148-57