

miR-27b 对骨肉瘤 MG63 细胞生长的影响及其机制探讨

高春生¹ 王小伟¹ 高俊¹ 许海霞² 晏慧超¹ 郑均华¹

【摘要】 目的 探讨 miR-27b 对骨肉瘤 MG63 细胞生长的影响及其机制。方法 将体外培养的 MG63 细胞分为模拟物对照组、miR-27b 模拟物组、抑制剂对照组和 miR-27b 抑制剂组,采用 RT-PCR 检测各组细胞中 miR-27b 的表达,MTT 法检测细胞增殖活性,Transwell 小室法检测细胞侵袭和迁移,流式细胞仪检测细胞凋亡。双荧光素酶报告基因实验检测 miR-27b 和 FOXO1 的靶向关系,Western blot 检测 FOXO1 蛋白表达。结果 过表达 miR-27b 后,骨肉瘤 MG63 细胞增殖活性升高,侵袭和迁移数增加,而细胞凋亡率降低($P < 0.05$)。抑制 miR-27b 表达与过表达 miR-27b 的作用相反。miR-27b 靶向调控 FOXO1,过表达 miR-27b 后 FOXO1 蛋白的表达水平降低,而抑制 miR-27b 表达后 FOXO1 蛋白的表达水平升高($P < 0.05$)。结论 miR-27b 可能通过靶向调控 FOXO1 促进骨肉瘤 MG63 细胞的增殖、侵袭和迁移,并抑制细胞凋亡。

【关键词】 miR-27b;骨肉瘤;细胞增殖;侵袭;迁移;凋亡

Effect of miR-27b on Growth of Osteosarcoma MG63 Cells and Possible Mechanism. GAO Chun-sheng¹, WANG Xiao-wei¹, GAO Jun¹, XU Hai-xia², YAN Hui-chao¹, ZHENG Jun-hua¹. ¹Department of Orthopaedics, Hubei Third People's Hospital, Wuhan 430030, China; ²Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Shenzhen University, Shenzhen 518035, China

Corresponding author: ZHENG Jun-hua, E-mail: goregao2000@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of miR-27b on the growth of osteosarcoma MG63 cells and the possible mechanism. **Methods** MG63 cells cultured *in vitro* were divided into mimic control group, miR-27b mimic group, inhibitor control group and miR-27b inhibitor group. The expression of miR-27b was detected by RT-PCR, cell proliferation was detected by MTT, cell invasion and migration were detected by Transwell chamber, and cell apoptosis was detected by flow cytometry. Double luciferase reporter gene assay was used to detect the targeting relationship between miR-27b and FOXO1, and the expression of FOXO1 protein was detected by Western blotting. **Results** After overexpression of miR-27b, proliferation activity of MG63 cells was increased, number of invasive and migrating cells increased, and apoptosis rate was decreased ($P < 0.05$). Inhibiting miR-27b expression had the opposite effect to overexpression of miR-27b. The miR-27b targeted and regulated FOXO1. The expression of FOXO1 protein was decreased after overexpression of miR-27b, while the expression of FOXO1 protein was increased after inhibiting miR-27b expression ($P < 0.05$). **Conclusion** The miR-27b may promote the proliferation, invasion and migration of MG63 cells and inhibit cell apoptosis by targeting FOXO1.

【Key words】 miR-27b; Osteosarcoma; Cell proliferation; Invasion; Migration; Apoptosis

骨肉瘤是一种临床常见,多发于儿童和青少年的恶性骨肿瘤,具有恶性程度高和预后效果差等特点。尽管新辅助化疗的应用使病人的预后得到显著改善,但其远期生存率仍不太理想^[1-2]。研究表明^[3-4]骨肉瘤细胞中存在包括微小 RNAs (microR-

NAs, miRNAs)在内的多种基因的正常改变,而这些 miRNAs 可通过结合靶基因的 3' 非编码区(UTR)调控转录后基因的表达,影响细胞的恶性生物学行为。miR-27b 是一种与多种肿瘤发生、发展密切相关的 miRNA,被证实存在于结直肠癌、胃癌、宫颈癌和前列腺癌等肿瘤中异常表达,发挥着致癌或抑癌基因的作用^[5-8]。近年来,有研究发现 miR-27b 在骨肉瘤病人血清中异常高表达,且与肿瘤体积、肿瘤淋巴结转移(TNM)分级等有关,但其在骨肉瘤发生、发展

DOI: 10.3969/j.issn.1674-8573.2022.01.013

作者单位:1. 湖北省第三人民医院骨外科,武汉 430030;2. 深圳大学第一附属医院肿瘤科,广东深圳 518035

通信作者:郑均华, E-mail: goregao2000@163.com

中的作用如何尚不清楚^[9]。因此,本研究旨在研究 miR-27b 对骨肉瘤 MG63 细胞增殖、侵袭、迁移和凋亡的影响,并探讨其可能的分子机制。

材料与方法

一、实验材料

人骨肉瘤细胞株 MG63 购于中国科学院细胞库。胎牛血清购于浙江天杭生物科技股份有限公司,DMEM 培养液购于美国 Hyclone,胰蛋白酶和细胞裂解液购于上海碧云天,Trizol 试剂购于大连宝生物工程有限公司,青霉素双抗、二甲基亚枫和 MTT 试剂购于美国 Sigma。FOXO1 多克隆抗体购于美国 CST,GAPDH 多克隆抗体购于美国 SantaCruz,辣根过氧化物酶标记的二抗购于武汉博士德。LipofectaminTM2000 购于美国 Invitrogen,miR-27b 模拟物、miR-27b 抑制剂及其阴性对照购于上海吉玛。细胞凋亡检测试剂盒购于北京索莱宝,双荧光素酶报告基因检测试剂盒购于美国 Promega,Matrigel 基质胶和流式细胞仪购于美国 BD,ECL 发光试剂盒和 Transwell 小室购于美国 Millipore,酶标仪和凝胶成像系统购于美国 Bio-Rad,倒置显微镜购于日本 Olympus,细胞培养箱购于美国 Thermo Fisher,荧光定量 PCR 仪购于美国 ABI。

二、细胞培养、分组及转染

MG63 细胞用 DMEM 培养基常规培养。将 MG63 细胞分为模拟物对照组(转染 miR-27b 模拟物阴性对照)、miR-27b 模拟物组(转染 miR-27b 模拟物)、抑制剂对照组(转染 miR-27b 抑制剂阴性对照)和 miR-27b 抑制剂组(转染 miR-27b 抑制剂)。按 1×10^6 个/孔的浓度将细胞液种植到 6 孔板上,细胞培养箱内常规培养过夜。待细胞汇合度达 60%~80% 时进行转染,首先用无血清培养液分别稀释待转染物和 LipofectaminTM2000,室温孵育 5 min 后,将两者混合。室温静置 20 min 后,将上述复合物加到 MG63 细胞中,置于细胞培养箱中常规培养 6 h 后,更换新鲜培养液继续培养 48 h,然后收集各组细胞,采用 RT-PCR 检测转染后 miR-27b 的表达情况。

三、RT-PCR 检测 miR-27b 的表达

向待测的 MG63 细胞中加入 1 mL Trizol 试剂提取总 RNA,逆转录成 cDNA 后根据上海生工生物合成的 PCR 引物(miR-27b, F: 5'-CCGGCCTTCACAGT-GGCTA-3', R: 5'-CGGGTCCGTGGCAGAAGCTT-3'; U6, F: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', R: 5'-AACGC-TTCACGAATTTGCGT-3'),按照 95℃ 3 min,

95℃ 10 s, 56℃ 30 s, 72℃ 30 s(38 个循环)进行 PCR 扩增。以 U6 为管家基因, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-27b 的表达水平。重复 3 次。

四、MTT 法测定细胞增殖

将转染后的 MG63 细胞接种于 96 孔板,分别培养 24、48 h 和 72 h 后,加入 20 μ L MTT 溶液(浓度为 5 g/L),孵育 4 h 后加入 100 μ L 二甲基亚枫,震荡反应,用酶标仪检测 490 nm 处的光密度(OD)值。

五、Transwell 小室测定细胞侵袭和迁移

胰蛋白酶消化收集转染细胞后,以无血清培养基悬浮细胞制成浓度为 3×10^4 个/mL 的细胞液。将 Transwell 小室放入 24 孔板中,将稀释后的 Matrigel 基质胶铺满聚碳酸酯膜,室温下充分融合(注意:迁移实验中无此步骤)。在小室上室和下室中分别加入 200 μ L 细胞液和 600 μ L 含血清的培养基,每组设置 3 个平行孔,放入细胞培养箱中培养 24 h。取出小室后,以棉签小心拭去上室中的液体,加入 600 μ L 甲醇室温条件下固定细胞 30 min。拭去上室中的固定液后,加入 800 μ L 0.5% 结晶紫室温染色 30 min。洗去染色液,晾干。于显微镜下随机选取 5 个视野观察统计侵袭或迁移实验结果。

六、流式细胞仪测定细胞凋亡

收集细胞,磷酸缓冲液洗涤,结合缓冲液重悬,加入 10 μ L 的 Annexin V-FITC 和 5 μ L 的 PI,避光、室温反应 15 min,60 min 内上流式细胞仪检测细胞凋亡率。

七、双荧光素酶报告基因实验验证 miR-27b 与 FOXO1 的靶向关系

采用 TargetScan 在线数据库预测到 miR-27b 与 FOXO1 的 3' UTR 存在结合位点。为了验证 miR-27b 与 FOXO1 有无靶向关系,构建含野生 FOXO1 3' UTR(FOXO1-WT)和突变 FOXO1 3' UTR(FOXO1-MUT)的荧光素酶报告载体。将其分别与模拟物对照、miR-27b 模拟物、抑制剂对照和 miR-27b 抑制剂共转染至 MG63 细胞,其中每组设置 3 个平行孔;培养 48 h 后,检测细胞的荧光素酶活性。

八、Western blot 检测 FOXO1 蛋白的表达

向收集到的转染细胞中加入 200 μ L 蛋白裂解液,冰上裂解 30 min 获取总蛋白。煮沸 5 min 变性后取 80 μ g 上样至 12% SDS-PAGE 凝胶中,以 90 V 电压电泳 30 min 后改换成 120 V 电压,电泳 70 min 结束。再以 210 mA 电流转膜 50 min。取出 PVDF 膜后,以 5% 脱脂奶粉室温封闭 1.5 h。经 1:1 000 倍稀释的 FOXO1 和 GAPDH 抗体 4℃ 下孵育过夜后,以

1:5 000 倍稀释的二抗室温孵育 1 h; 加入 ECL 显影, 凝胶成像系统扫描分析, 计算蛋白相对表达水平。

九、统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件 (IBM 公司, 美国) 进行统计学分析, 实验数据以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间比较使用单因素方差分析, 组间多重比较采用 SNK-*q* 检验, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、转染后各组 MG63 细胞中 miR-27b 的表达

与模拟物对照组相比, miR-27b 模拟物组 MG63 细胞中 miR-27b 的表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与抑制剂对照组相比, miR-27b 抑制剂组中 miR-27b 的表达水平降低 ($P < 0.05$)。见图 1。

二、miR-27b 对骨肉瘤 MG63 细胞增殖的影响

在 24 h 作用时间下, 模拟物对照组、miR-27b 模拟物组、抑制剂对照组和 miR-27b 抑制剂组细胞增殖活力的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在 48 h 和 72 h 作用时间下, miR-27b 模拟物组细胞的增殖活力明显高于模拟物对照组 ($P < 0.05$), 而 miR-27b 抑制剂组细胞的增殖活性低于抑制剂对照组 ($P < 0.05$)。见图 2。

三、miR-27b 对骨肉瘤 MG63 细胞侵袭和迁移的影响

与模拟物对照组相比, miR-27b 模拟物组 MG63 细胞侵袭数和迁移 MG63 细胞数明显增多 ($P < 0.05$); 同时, miR-27b 抑制剂组中侵袭细胞数和迁移细胞数较抑制剂对照组明显减少 ($P < 0.05$)。见

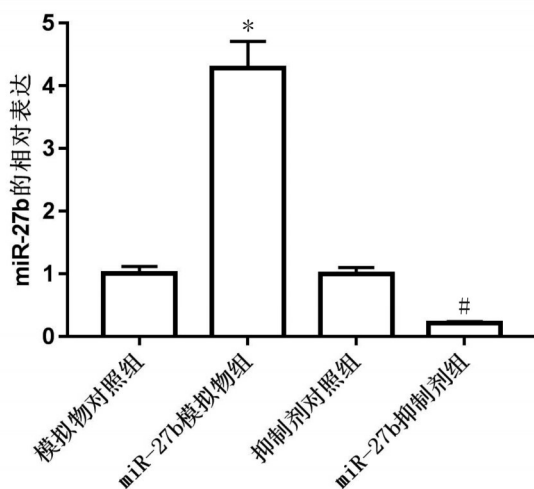


图1 各组细胞中 miR-27b 表达水平的比较 (与模拟物对照组相比, $P < 0.05$; 与抑制剂对照组相比, $P < 0.05$)

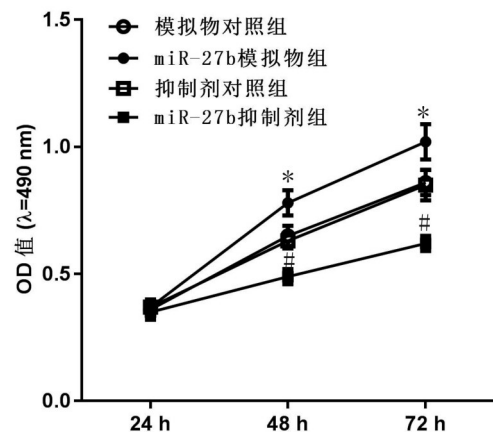


图2 miR-27b 对骨肉瘤 MG63 细胞活性的影响 (与模拟物对照组相比, $P < 0.05$; 与抑制剂对照组相比, $P < 0.05$)

图 3。

四、miR-27b 对骨肉瘤 MG63 细胞凋亡的影响

与模拟物对照组相比, miR-27b 模拟物组细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.05$); 与抑制剂对照组相比, miR-27b 抑制剂组细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$)。见图 4。

五、miR-27b 靶基因的预测及验证

生物信息学软件预测结果显示, FOXO1 3' UTR 与 miR-27b 有互补结合的核苷酸序列, 见图 5。双荧光素酶报告基因实验结果显示, miR-27b 模拟物与野生型 FOXO1 3' UTR 共转染的 MG63 细胞荧光素酶活性降低; miR-27b 抑制剂与野生型 FOXO1 3' UTR 共转染的 MG63 细胞荧光素酶活性升高 ($P < 0.05$); 但 miR-27b 模拟物和 miR-27b 抑制剂与突变型 FOXO1 3' UTR 质粒转染的 MG63 细胞荧光素酶活性的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。miR-27b 模拟物明显抑制 MG63 细胞中 FOXO1 蛋白的表达; 而 miR-27b 抑制剂则明显促进 FOXO1 蛋白的表达 ($P < 0.05$), 见图 6。

讨 论

miRNA 通过与靶 mRNA 的 3' UTR 结合从而降解或诱导翻译沉默, 在调节细胞增殖、分化、凋亡和发育过程中发挥作用。多项研究表明, miRNAs 在骨肉瘤的诊断、治疗和预后中发挥重要作用^[10]。miR-27 家族是一种有多功能的 miRNA, 参与人类多种疾病的发生、发展^[11]。miR-27b 是 miR-27 家族成员, 其在不同肿瘤中的作用不尽相同。在非小细胞肺癌和结肠癌中发现 miR-27b 表达降低, 而上调其表达可抑制癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[12-13]。但是,

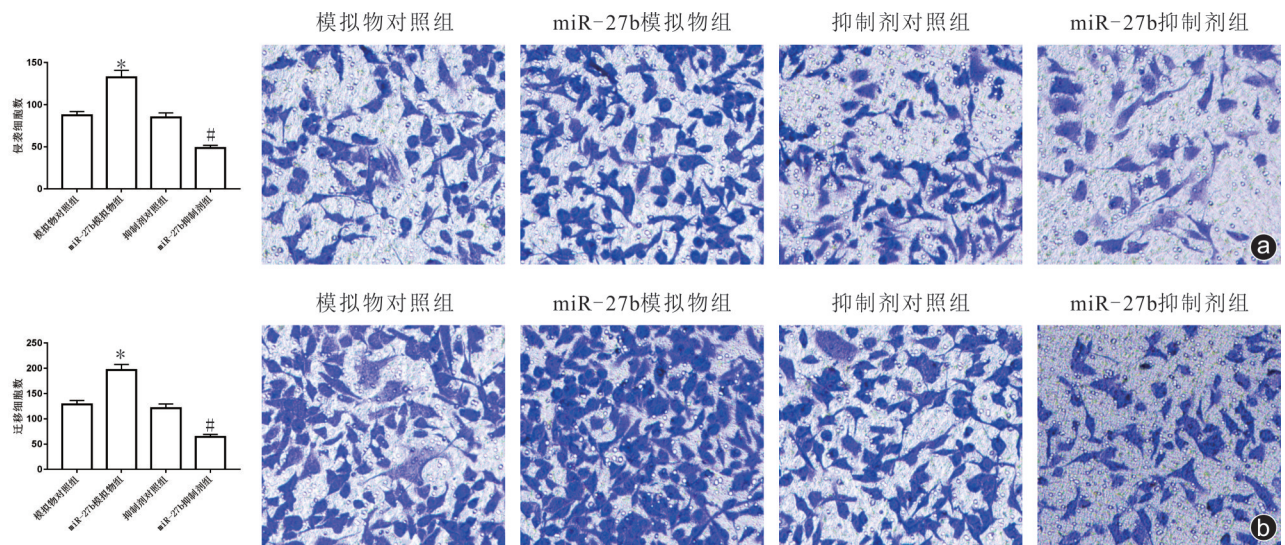


图3 miR-27b对骨肉瘤MG63细胞侵袭(a)和迁移(b)的影响(与模拟物对照组相比,* $P < 0.05$;与抑制剂对照组相比,## $P < 0.05$)

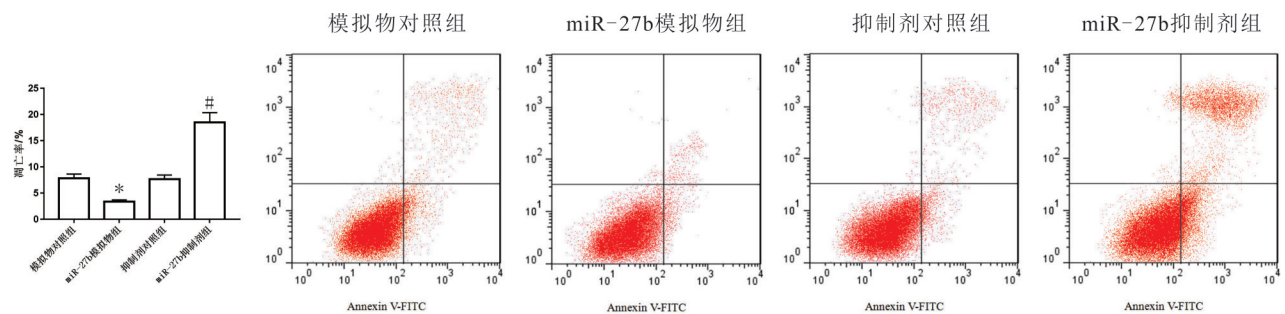


图4 流式细胞仪检测各组细胞凋亡结果(与模拟物对照组相比,* $P < 0.05$;与抑制剂对照组相比,## $P < 0.05$)

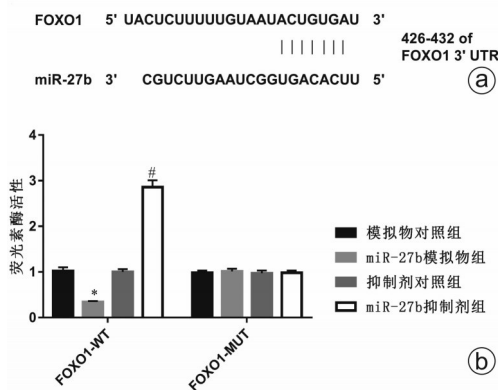


图5 FOXO1 3'-UTR与miR-27b互补结合位点(a)及荧光素酶活性检测(b)(与模拟物对照组相比,* $P < 0.05$;与抑制剂对照组相比,## $P < 0.05$)

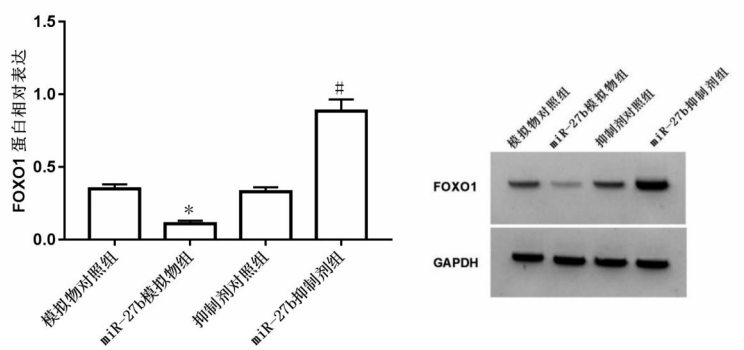


图6 Western blot检测FOXO1蛋白的表达(与模拟物对照组相比,* $P < 0.05$;与抑制剂对照组相比,## $P < 0.05$)

miR-27b在乳腺癌中表达升高,可通过靶向抑制丙酮酸脱氢酶蛋白X(PDHx)表达,解除细胞代谢,促进乳腺癌细胞增殖^[14];miR-27b上调表达可促进宫颈癌细胞的增殖、侵袭^[15]。本研究通过转染miR-27b模拟物或抑制剂成功改变骨肉瘤MG63细胞中miR-27b的表达,发现miR-27b过表达可显著增强MG63细胞增殖、侵袭、迁移和凋亡抵抗作用;而miR-

-27b低表达则呈现出相反的效果。该研究结果与前面miR-27b在宫颈癌和乳腺癌中的促癌作用相似。提示,miR-27b可能在骨肉瘤中发挥致癌作用。

FOXO1属于FOXO家族,是一种重要的转录因子,影响细胞的增殖、分化和凋亡等,且影响肿瘤的进展^[16]。研究显示,FOXO1在非小细胞肺癌、宫颈癌和胃癌等多种肿瘤中表达下调,在肿瘤发生、发

展过程中发挥着抑癌因子的作用^[17-19]。为了探讨 miR-27b 调控骨肉瘤发生发展的分子机制,本研究进一步采用生物信息学软件预测 miR-27b 的潜在靶基因,结果将 FOXO1 作为研究对象。本研究采用双荧光素酶报告基因实验检测发现,miR-27b 模拟物可与 FOXO1 3' UTR 靶向结合降低细胞荧光素酶活性,而 miR-27b 抑制剂则可升高其荧光素酶活性。同时,Western blot 结果显示,miR-27b 模拟物可降低 FOXO1 蛋白的表达,而 miR-27b 抑制剂则相反。结果表明,FOXO1 是 miR-27b 的潜在靶基因,miR-27b 可靶向调控其表达。已有研究证实 FOXO1 在骨肉瘤中低表达,抑制其表达可促进细胞增殖和集落形成^[20];而上调 FOXO1 的表达可抑制骨肉瘤细胞的增殖并诱导细胞凋亡^[21]。结果提示,在骨肉瘤发生、发展过程中,miR-27b 可能通过靶向调控 FOXO1 表达促进肿瘤的恶性进展。

综上所述,miR-27b 可能通过靶向调控 FOXO1 在骨肉瘤 MG63 细胞中促进细胞增殖、侵袭和迁移并抑制细胞凋亡。该结果有望为 miR-27b 成为骨肉瘤基因治疗提供参考依据。

参 考 文 献

- [1] Kager L, Tamamyan G, Bielack S. Novel insights and therapeutic interventions for pediatric osteosarcoma [J]. *Future Oncology*, 2017, 13(4): 357-368.
- [2] 刘盖为,代国,郭卫春. MiRNA 在骨肉瘤中作用的研究进展[J]. *临床和实验医学杂志*, 2017, 16(9): 929-932.
- [3] Georges S, Calleja LR, Jacques C, et al. Loss of miR-198 and-206 during primary tumor progression enables metastatic dissemination in human osteosarcoma[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(87): 35726-35741.
- [4] Zhang Z, Zhang W, Mao J, et al. miR-186-5p functions as a tumor suppressor in human osteosarcoma by targeting FOXK1 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2019, 52(3): 553-564.
- [5] Luo Y, Yu SY, Chen JJ, et al. MiR-27b directly targets Rab3D to inhibit the malignant phenotype in colorectal cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 9(3): 3830-3841.
- [6] Chen X, Cui Y, Xie X, et al. Functional role of miR-27b in the development of gastric cancer [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(4): 5081-5087.
- [7] Yao J, Deng B, Zheng L, et al. miR-27b is upregulated in cervical carcinogenesis and promotes cell growth and invasion by regulating CDH11 and epithelial-mesenchymal transition [J]. *Oncol Rep*, 2015, 35(3): 1645-1651.
- [8] Li T, Sun X, Liu Y. miR-27b expression in diagnosis and evaluation prognosis of prostate cancer [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2017, 10(12): 11415-11424.
- [9] 张其川,王素芳,王云峰,等. miRNA-27b 在骨肉瘤中的表达及其临床意义[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(12): 2633-2638.
- [10] Wang J, Liu S, Shi J, et al. The Role of miRNA in the diagnosis, prognosis, and treatment of osteosarcoma [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2019, 34(10): 605-613.
- [11] 杨梅,冯正平,邓华聪. MicroRNA-27 的研究进展[J]. *重庆医学*, 2013, 42(2): 223-226.
- [12] Zhou H, Liu Y, Xiao L, et al. Overexpression of microRNA-27b inhibits proliferation, migration, and invasion via suppression of MET expression [J]. *Oncol Res*, 2017, 25(1): 147-154.
- [13] Matsuyama R, Okuzaki D, Okada M, et al. Micro RNA-27b suppresses tumor progression by regulating ARFGEF 1 and focal adhesion signaling [J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(1): 28-35.
- [14] Eastlack SC, Dong S, Ivan C, et al. Suppression of PDHX by microRNA-27b deregulates cell metabolism and promotes growth in breast cancer [J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 100.
- [15] Liu F, Zhang S, Zhao Z, et al. MicroRNA-27b up-regulated by human papillomavirus 16 E7 promotes proliferation and suppresses apoptosis by targeting polo-like kinase2 in cervical cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(15): 19666-19679.
- [16] 金益,邵钦树. FOXO1 基因在肿瘤中的研究进展[J]. *肿瘤学杂志*, 2015, 21(2): 81-85.
- [17] Gao Z, Liu R, Ye N, et al. FOXO1 inhibits tumor cell migration via regulating cell surface morphology in non-small cell lung cancer cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48(1): 138-148.
- [18] Zhang B, Gui LS, Zhao XL, et al. FOXO1 is a tumor suppressor in cervical cancer [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(2): 6605-6616.
- [19] Choi Y, Park J, Ko YS, et al. FOXO1 reduces tumorsphere formation capacity and has crosstalk with LGR5 signaling in gastric cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 493(3): 1349-1355.
- [20] 任明亮,李辉,刘冬斌,等. FOXO1 表达上调对骨肉瘤细胞增殖及凋亡的影响[J]. *山东医药*, 2018, 58(21): 32-34.
- [21] Li Y, Wu Y. MiR-200-3p inhibits tumor cell proliferation and induces apoptosis by upregulation of FOXO1 in osteosarcoma cells [J]. *Mol Cell Toxicol*, 2018, 14(1): 73-78.

(收稿日期: 2021-02-28)

(本文编辑: 龚哲妮)

引用格式

高春生,王小伟,高俊,等. miR-27b 对骨肉瘤 MG63 细胞生长的影响及其机制探讨[J]. *骨科*, 2022, 13(1): 57-61. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8573.2022.01.013.