

# microRNA-708-5p对骨肉瘤细胞 凋亡与迁移的作用及机制

丰天宇<sup>1</sup> 朱中凯<sup>2</sup> 王豪<sup>1</sup> 毛筱涵<sup>1</sup> 刘丹<sup>1</sup> 袁仁杰<sup>1</sup> 刘跃华<sup>1</sup> 左国伟<sup>1</sup> 张明昊<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆市重点实验室, 重庆 400016;

<sup>2</sup>重庆医科大学附属第一医院心血管内科, 重庆 400016; <sup>3</sup>重庆医科大学实验教学管理中心, 重庆 400016)

**摘要** 该文主要研究microRNA-708-5p(miR-708-5p)在骨肉瘤细胞中的表达及对细胞凋亡、迁移的影响及机制。该研究利用miRNA基因芯片筛选差异表达miRNA; qRT-PCR(quantitative Real-time PCR)检测miR-708-5p在骨肉瘤细胞株MG63和正常细胞hMSC、HS-5中的表达; 通过阳离子脂质体介导法过表达miR-708-5p; 分别用Hoechst 33258染色、流式细胞术、划痕实验、Transwell法检测凋亡和迁移; 通过qRT-PCR检测miR-708-5p、ZEB1(Zinc finger E-box binding homeobox 1)的RNA水平; Western blot检测E-cadherin、N-cadherin、ZEB1蛋白表达; 利用TargetScan和双荧光素酶报告实验预测并验证miR-708-5p与ZEB1的靶向关系。结果显示, miR-708-5p在MG63中表达下调, 恢复miR-708-5p表达水平可诱导MG63细胞凋亡并抑制迁移。Western blot结果显示, 过表达miR-708-5p可上调E-cadherin, 下调N-cadherin和ZEB1。双荧光素酶报告实验显示, miR-708-5p可直接靶向ZEB1。敲低ZEB1可抑制MG63迁移。该项研究结果表明, miR-708-5p可诱导骨肉瘤细胞凋亡, 且通过靶向ZEB1来抑制迁移。

**关键词** miRNA-708-5p; 骨肉瘤; 凋亡; 迁移; ZEB1

## The Effects of miR-708-5p on the Apoptosis and Metastasis of Osteosarcoma Cell and Its Mechanism

Feng Tianyu<sup>1</sup>, Zhu Zhongkai<sup>2</sup>, Wang Hao<sup>1</sup>, Mao Xiaohan<sup>1</sup>, Liu Dan<sup>1</sup>, Yuan Renjie<sup>1</sup>,

Liu Yuehua<sup>1</sup>, Zuo Guowei<sup>1</sup>, Zhang Minghao<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>The Key Laboratory of Medical Diagnostics, Ministry of Education, Department of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; <sup>2</sup>Department of cardiology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; <sup>3</sup>Center for Lab Teaching and Management, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** This article aimed to investigate the expression of microRNA-708-5p (miR-708-5p) in osteosarcoma cell and its effects on cell apoptosis, migration and its mechanism. MiRNA microarray was utilized to screen differential expressed miRNAs. MiR-708-5p expression level in MG63 cell line, normal cells hMSC and HS-5 were detected by quantitative Real-time PCR (qRT-PCR). MiR-708-5p was overexpressed in osteosarcoma cell MG63 using Lipofectamine 2000. Hoechst 33258 staining, flow cytometry (FCM) were utilized to measure cell apoptosis. Wound healing assay and Transwell assay were employed

收稿日期: 2018-11-09 接受日期: 2019-01-24

国家自然科学基金(批准号: 81102035)和重庆市卫生经济学会基金(批准号: YWJK2017-1)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-65715003, E-mail: zhangminghao@cqmu.edu.cn

Received: November 9, 2018 Accepted: January 24, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81102035) and Chongqing Health Economics Association (Grant No.YWJK2017-1)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-65715003, E-mail: zhangminghao@cqmu.edu.cn

网络出版时间: 2019-04-01 13:34:12

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190401.1334.022.html>

to measure migration ability. The RNA expression of miR-708-5p and *ZEB1* (Zinc finger E-box binding homeobox 1) were examined by qRT-PCR. Protein levels of E-cadherin, N-cadherin and *ZEB1* were detected by means of Western blot. Targeting relationship between miR-708-5p and *ZEB1* was predicted and validated using TargetScan and dual-luciferase reporter assay, respectively. The results indicated that miR-708-5p was lower expressed in MG63 cell compared to normal cells. Restoring miR-708-5p could induce cell apoptosis and inhibit migration. Showed by Western blot, protein levels of E-cadherin increased after miR-708-5p overexpression while N-cadherin and *ZEB1* decreased. Indicated by dual-luciferase reporter assay, miR-708-5p directly targeted *ZEB1*. What's more, knocking down *ZEB1* can inhibit migration of MG63. These data demonstrated that miR-708-5p could induce osteosarcoma apoptosis and decrease migration ability by targeting *ZEB1*, resulting in inhibiting cell migration.

**Keywords** miRNA-708-5p; osteosarcoma; apoptosis; migration; *ZEB1*

骨肉瘤是最常见的原发性恶性骨肿瘤, 尽管每年的发病率为每百万人三例, 但死亡率却极高。转移性骨肉瘤患者预后特别差, 总生存率仅为30%<sup>[1]</sup>。有15%~20%的患者在诊断时就已经有转移的证据, 多数肿瘤转移到肺<sup>[2-3]</sup>。目前对新诊断的骨肉瘤的治疗策略为新辅助化疗加上手术切除原发肿瘤以及所有临床明显的转移性病灶, 再加上术后辅助化疗<sup>[4]</sup>。但由于耐药和转移的发生, 骨肉瘤的治疗和预后仍不理想。

MicroRNA(简称miRNA)是一种在植物、动物和某些病毒中发现的非编码RNA小分子(约含22个核苷酸), 在RNA沉默和基因表达转录后调控中起着重要作用<sup>[5-7]</sup>。在人类肿瘤中, miRNA的表达谱已经确定与诊断、分期、进展、预后和治疗反应有关<sup>[8]</sup>。在骨肉瘤中, miRNA可以作为疾病发病与进程中的标志之一<sup>[9]</sup>, 其中miR-26a可以抑制骨肉瘤细胞的增殖<sup>[10]</sup>, miR-134可以抑制骨肉瘤的血管生成以及增殖<sup>[11]</sup>, miR-454能抑制骨肉瘤细胞增殖与侵袭<sup>[12]</sup>。在非小细胞肺癌中, miR-708-5p被报道可以抑制肺癌干细胞表型<sup>[13]</sup>。在乳腺癌中, miR-708-5p被报道可以通过抑制NNAT来抑制乳腺癌的转移<sup>[14]</sup>。在肾癌细胞中, miR-708-5p又可以诱导肾癌细胞的凋亡并抑制其肿瘤发生<sup>[15]</sup>。尽管Delsin等<sup>[16]</sup>验证了miR-708-5p在骨肉瘤患者标本中表达低于非肿瘤对照, 但其对于骨肉瘤细胞MG63的凋亡以及迁移作用及其机制却未被阐明。本研究检测了miR-708-5p在骨肉瘤细胞MG63中的表达水平。我们还深入探究了其对于骨肉瘤细胞的凋亡和迁移的作用及其机制以及miR-708-5p与上皮-间充质转化过程的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞 人骨肉瘤细胞株MG63、人骨髓基质细胞HS-5以及HEK 293T细胞购自美国模式培养物集存(American Type Culture Collection, ATCC), 保存于重庆医科大学临床检验诊断学实验室。

1.1.2 主要试剂 DMEM高糖培养基和南美血源胎牛血清分别购自美国Gibco公司和Lonsera公司。Trizol和转染试剂Lipofectamine 2000购自美国Invitrogen公司。Transwell小室购自美国Millipore公司。qRT-PCR(quantitative Real-time PCR)相关试剂购自日本TaKaRa公司。结晶紫染液和Matrigel购自北京索莱宝科技有限公司。细胞凋亡检测试剂盒由重庆医科大学生命科学院流式细胞实验室提供。pGL6-miR(报告基因质粒)、Hoechst 33258、蛋白质印迹法及蛋白质提取相关试剂购自江苏碧云天生物技术有限公司。小鼠抗人E-cadherin单克隆抗体、小鼠抗人N-cadherin单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司。小鼠抗人 $\beta$ -Actin单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG和抗鼠IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司。兔抗人ZEB1多克隆抗体购自沈阳万类生物科技有限公司。MiR-708-5p mimics及随机序列RNA Oligo、ZEB1干扰RNA及阴性对照干扰RNA均购自上海吉玛制药技术有限公司。双荧光素酶报告检测试剂盒购自美国Progenia公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养及细胞转染 人骨髓间充质干细胞(hMSC)的分离培养: 经重庆医科大学附属儿童医院伦理委员会批准, 与患者签订知情同意书后, 3例

患者(骨髓象正常)的骨髓收集于肝素抗凝管中。将骨髓标本加入灭菌离心管中,加入等量PBS混匀,配置成骨髓稀释液。取另一支灭菌离心管,加入与骨髓体积相等量的淋巴细胞分离液。将稀释的骨髓缓慢加入淋巴细胞分离液液面上(淋巴细胞分离液:骨髓稀释液=1:2)。然后用水平离心机2 000 r/min离心25~30 min。离心后,细胞分为三层,从下到上分别为红细胞层、淋巴细胞分离液层、单个核细胞及间充质干细胞层。缓慢吸取最上层细胞(避免吸到淋巴细胞分离液)加入无菌培养瓶中,然后置于37 °C、CO<sub>2</sub>体积分数为5%饱和湿度的温育箱中培养,48 h后换液,去除未贴壁细胞,待原代细胞融合度达到80%以上时传代。

人骨肉瘤细胞株MG63和人骨髓基质细胞HS-5用含10%胎牛血清的DMEM高糖完全培养液(含100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素)置于37 °C、CO<sub>2</sub>体积分数为5%饱和湿度的温育箱中培养,当细胞融合度为75%~85%时,用0.25%胰酶消化并传代。待培养细胞汇合度在24 h内达到60~80%时,使用Lipofectamine 2000转染试剂将miR-708-5p mimic或随机序列RNA oligo(NC mimic)转染入细胞中,使每孔转染终浓度20 nmol/L,用无血清的DMEM配置转染混合物。以相同的方法转染ZEB1小干扰RNA(si-ZEB1)及其阴性对照干扰RNA(si-NC)。MiR-708-5p

mimic及siZEB1序列见表1。

1.2.2 MiRNA基因芯片筛选差异表达miRNA 从GEO数据库中下载GSE70367数据集中的数据,正常细胞hMSC作为对照组,骨肉瘤细胞作为实验组,使用GEO2R对所选对象做TOP250分析( $P < 0.05$ ),最后选取TOP60,利用HemI软件制作热图。

1.2.3 总RNA提取及qRT-PCR检测 Trizol提取正常对照细胞HS-5、hMSC以及骨肉瘤细胞MG63中总RNA,取2 μg RNA用茎环法使其逆转录为cDNA,对miR-708-5p进行qRT-PCR检测,U6作为内参。Trizol提取转染si-ZEB1或si-NC的MG63细胞总RNA,两步法逆转录成cDNA后用qRT-PCR法检测各组细胞中ZEB1的mRNA表达水平,GAPDH作为内参。microRNA茎环法逆转录(RT)及qRT-PCR引物见表2。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 将MG63接种于直径6 cm的培养皿中,在24 h内使细胞融合度达到60~80%,转染miR-708-5p mimic或NC mimic。24 h后收集各组细胞,1000 r/min离心3 min后弃掉上清并重悬于PBS中。PBS重悬离心后倒掉上清重新重悬于800 μL PBS中。加荧光标记的Annexin V和PI染液,室温且避光孵育5 min,上流式细胞仪进行结果检测。

1.2.5 Hoechst 33258染色实验 将MG63细胞接种

表1 MicroRNA模拟物与小干扰RNA序列

Table1 Sequences of miRNA mimic and siRNA

microRNA和小干扰RNA microRNA and siRNA	序列(5'→3') Sequences (5'→3')
miR-708-5p mimic	AAG GAG CUU ACA AUC UAG CUG G
si-ZEB1	Forward: GCC CUA UCA AUG UGA CAA ATT Reverse: UUG UCA CAU UGA UAG GGC TT

表2 逆转录及qRT-PCR引物

Table 2 Reverse transcription (RT) and qRT-PCR primers

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')
miR-708-5p (RT)	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACC CCA GC
U6 (RT)	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACT TGC GC
miR-708-5p	Forward: GGC GCG AAG GAG CTT ACA ATC TA Reverse: ATC CAG TGC AGG GTC CGA GG
U6	Forward: GTG CTC GCT TCG GCA GCA CA Reverse: ATC CAG TGC AGG GTC CGA GG
GAPDH	Forward: CAG CGA CAC CCA CTC CTC Reverse: TGA GGT CCA CCA CCC TGT
ZEB1	Forward: AGC AGT GAA AGA GAA GGG AAT GC Reverse: GGT CCT CCT CAG GTG CCT CAG



于24孔板中,待细胞在24 h内融合度达到60%~80%时转染miR-708-5p mimic或NC mimic。转染24 h后从数箱中取出24孔板,预冷的PBS洗2次后用4%多聚甲醛固定10 min,再用PBS洗2次。每孔加入200  $\mu$ L 1:1 000稀释的Hoechst 33258染液,室温中避光染色30 min。吸净染液后用PBS洗2次,70%甘油封片,倒置显微镜紫外光激发下观察细胞凋亡。

**1.2.6 细胞划痕愈合实验** 将转染后的MG63细胞接种于6孔板中,当细胞汇合度为80%~90%时,用10  $\mu$ L小枪头进行划痕,弃去培养基,PBS清洗2次后更换无血清培养基,于0 h、12 h、24 h在同一点观察细胞划痕情况并拍照,通过计算多个观察点划痕宽度平均值,得出各组细胞划痕愈合率。划痕愈合率(%)=(0 h划痕宽度-12 h或24 h划痕宽度)/0 h划痕宽度 $\times$ 100%。

**1.2.7 Transwell小室法检测细胞的迁移** 消化转染后的各组细胞,重悬于无血清培养基中计数,Transwell小室的上室中加入 $1.5\times 10^4$ 细胞悬液,下室中加入700  $\mu$ L含10%血清完全DMEM培养基,每组设置3个复孔,置于37  $^{\circ}$ C、CO<sub>2</sub>体积分数为5%的培养箱中培养48 h。取出Transwell小室,PBS清洗1次,4%多聚甲醛固定10 min,结晶紫染液染色15 min,清水洗1次,用棉签轻轻擦拭掉上室未穿过膜的细胞,自然风干,于倒置显微镜下随机观察5个视野中的细胞并计数,取平均值。

**1.2.8 预测并验证miR-708-5p靶基因** 利用Targetscan 7.2预测miR-708-5p与靶基因的结合位点并使用双荧光素酶报告实验验证。将含结合位点的ZEB1 3'UTR区的野生型片段或突变型片段插入pGL6-miR(报告基因质粒)中。采用lipofectamine 2000将ZEB1 3'UTR野生型质粒或突变型质粒与miR-708-5p mimic或NC mimic共转染HEK 293T细胞,海肾荧光素酶作为底物。共转染48 h后,检测萤火虫荧光素酶以及海肾荧光素酶的活性。

**1.2.9 蛋白质印迹法检测E-cadherin、N-cadherin和ZEB1的蛋白水平** MiR-708-5p mimic或NC mimic转染48 h后,收集细胞提取总蛋白,BCA法检测蛋白浓度。用10%或8% SDS-PAGE将蛋白分离,将分离后的蛋白转膜至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜上,5% BSA封闭2 h后,4  $^{\circ}$ C孵一抗过夜。第2天用预冷TBST洗膜3次,每次10 min,37  $^{\circ}$ C孵育二抗1 h, TBST洗膜3次, ECL发光液显色

成像。采用Image Lab 5.2软件分析灰度值以 $\beta$ -actin为内参,计算相对蛋白表达量。

**1.2.10 统计学方法** 各实验均独立重复3次,采用Graphpad Prism 6软件进行统计分析,结果以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两两比较采用 $t$ 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MiR-708-5p在人骨肉瘤细胞系中低表达

首先对GSE70367数据集中的正常细胞(hMSC)和骨肉瘤细胞做基因差异分析,发现miR-708-5p存在显著差异表达( $P<0.05$ ),miR-708-5p在骨肉瘤细胞株MG63中相较于正常细胞hMSC而言呈现低表达(图1A)。于是我们选取MG63作为研究对象,通过实时荧光定量PCR验证miR-708-5p在骨肉瘤细胞MG63中与正常细胞hMSC、HS-5相比呈现低表达( $P<0.01$ )(图1B和图1C)。

### 2.2 过表达miR-708-5p可诱导骨肉瘤细胞凋亡

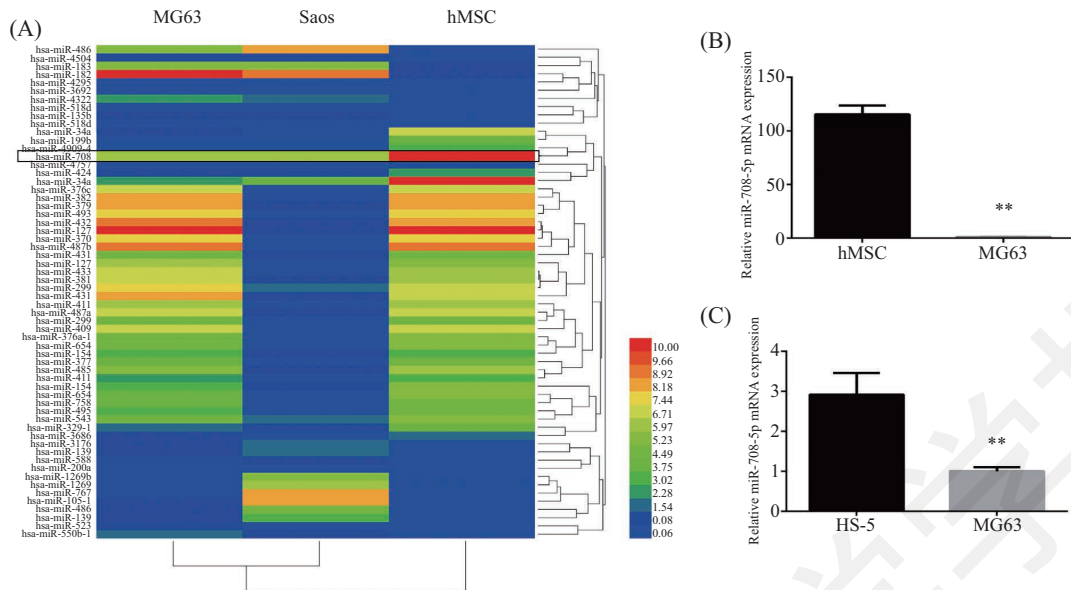
通过实时荧光定量PCR(qRT-PCR)验证转染miR-708-5p与相应阴性对照NC mimic相比能成功过表达miR-708-5p( $P<0.05$ )(图2A)。如图2B Hoechst 33258染色所示,相较于阴性对照(NC mimic)过表达miR-708-5p可以增加凋亡细胞数( $P<0.01$ )(图2C)。进一步用流式细胞术对细胞的凋亡情况进行检测(图2D),发现miR-708-5p mimic组中的细胞凋亡率明显高于对照组(NC mimic)( $P<0.05$ )(图2E)。

### 2.3 MiR-708-5p抑制骨肉瘤细胞迁移能力

如图3A和图3B所示,在MG63中过表达miR-708-5p相较于阴性对照组(NC mimic)的12 h、24 h划痕愈合率均明显降低( $P<0.05$ ),说明miR-708-5p可以抑制MG63的横向迁移能力。图3C和图3D中Transwell结果显示,在MG63中过表达miR-708-5p相较于阴性对照组(NC mimic)而言,穿膜细胞数明显减少( $P<0.01$ ),说明miR-708-5p可以抑制MG63的纵向迁移能力。

### 2.4 上皮-间质转化(EMT)相关分子的表达变化

Western blot结果显示,在骨肉瘤细胞MG63中过表达miR-708-5p可以促进上皮标志物E-钙黏蛋白(E-cadherin)的表达并且抑制间质标志物N-钙黏蛋白(N-cadherin)的表达(图4A),差异具有统计学意义(图4B)( $P<0.05$ )。这说明,miR-708-5p可以抑制骨肉瘤



A: GSE70367数据集中的microRNA差异表达; B: qRT-PCR检测hMSC与MG63中miR-708-5p RNA水平; C: qRT-PCR检测HS-5与MG63中miR-708-5p RNA水平。 \*\* $P < 0.01$ , 与hMSC或MG63组比较。

A: differentially expressed microRNAs in GSE70367 dataset; B: measurement of miR-708-5p expression in hMSC and MG63 cells by qRT-PCR; C: measurement of miR-708-5p expression in HS-5 and MG63 by qRT-PCR. \*\* $P < 0.01$  vs hMSC or MG63 group.

图1 miR-708-5p在骨肉瘤细胞中的表达情况  
Fig.1 Expression of miR-708-5p in osteosarcoma cell

上皮-间质转化(EMT)过程。

## 2.5 预测靶基因及验证

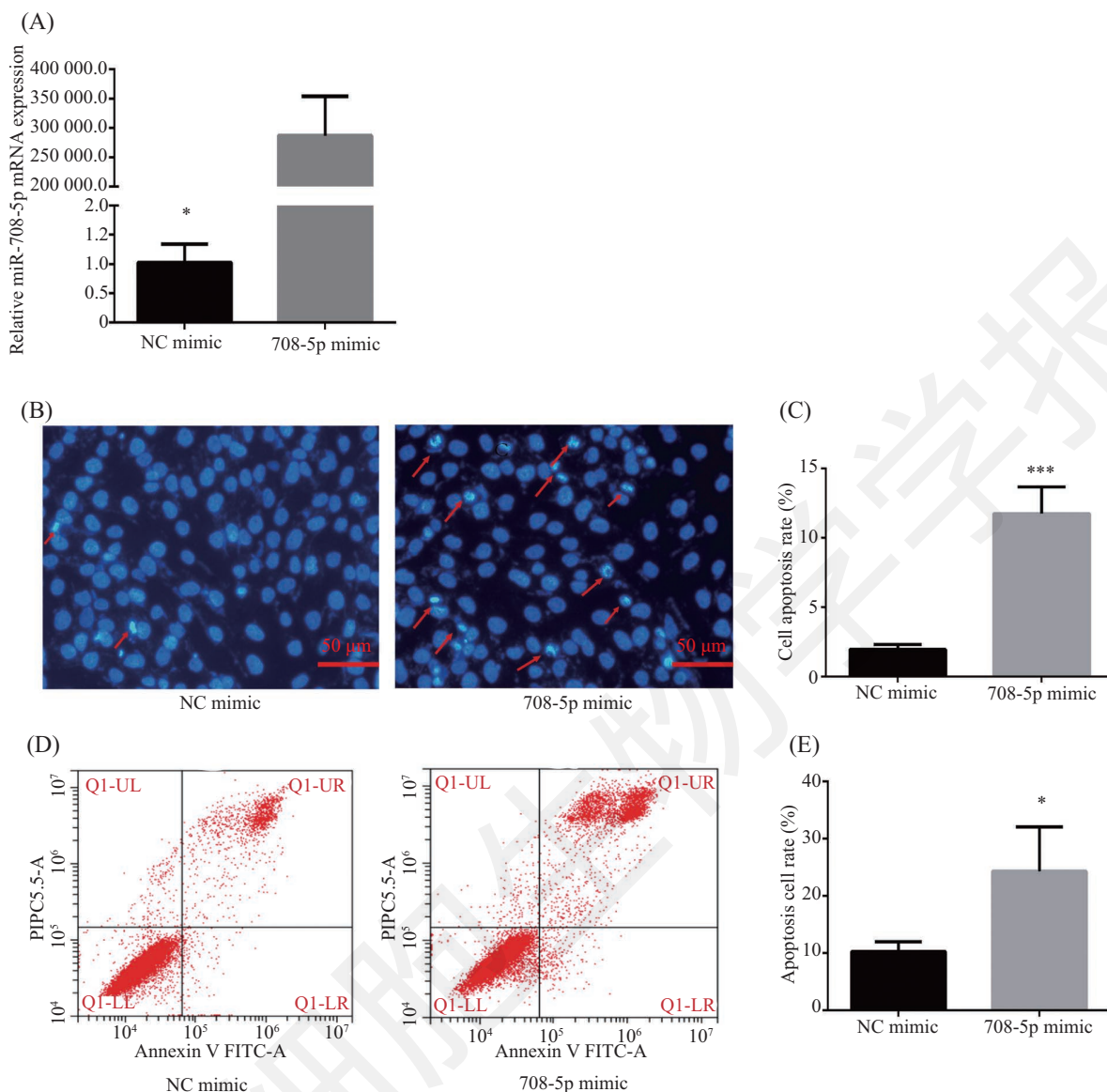
通过TargetsCan7.2数据库预测到miR-708-5p与ZEB1的3' UTR区有结合位点。双荧光素酶报告实验结果显示, ZEB1 3' UTR野生型质粒与miR-708-5p mimic共转染HEK 293T细胞后, 荧光素酶活性显著下降( $P < 0.05$ ), 将两者结合位点突变后荧光素酶报告基因质粒的荧光素酶活性得以恢复(图4C)。Western blot与qRT-PCR结果显示, miR-708-5p可以下调ZEB1的mRNA及蛋白水平的表达(图4D和图4F)。以上结果说明, miR-708-5p可以直接靶向ZEB1。

## 2.6 下调ZEB1可以抑制MG63迁移

前述结果发现, ZEB1是miR-708-5p的靶基因, 于是我们进一步探究ZEB1在miR-708-5p抑制骨肉瘤细胞MG63迁移中发挥的作用。通过Western blot实验发现, ZEB1在MG63细胞中与正常细胞HS-5而言呈现高表达( $P < 0.01$ )(图5A和图5B)。于是, 我们通过siRNA敲低ZEB1, 在成功下调ZEB1的蛋白(图5C)与mRNA(图5D)水平的表达后, 通过Transwell小室法观测细胞的迁移能力, 发现下调ZEB1可以显著抑制MG63的迁移能力( $P < 0.01$ )(图5E和图5F)。

## 3 讨论

骨肉瘤好发于儿童和青少年的长骨干骺端, 其恶性程度高且容易发生远处转移, 远期生存率低。统计显示, 单纯行截肢手术的骨肉瘤患者5年生存率不足20%。在1970年前, 治疗主要以手术切除为主。随着新辅助化疗的实施, 骨肉瘤的长期生存率从20%提高到70%, 最有效的化疗方案为大剂量甲氨蝶呤、阿霉素和顺铂(MAP)的联合应用<sup>[4,17]</sup>。然而, 尽管手术联合新辅助化疗使患者的长期生存率得到了提高, 但多药耐药和肿瘤转移使临床上仍有大部分患者预后较差<sup>[18]</sup>。因此, 阐明骨肉瘤发生发展的分子机制以及寻找新的治疗靶点成为了亟待解决的问题。MiRNA在多种生物学过程中(包括细胞生长、分化和发育)发挥着重要的作用<sup>[19]</sup>。MiRNA通过与信使RNA(mRNA)序列特异性地结合来触发转录抑制或RNA降解从而调控基因的表达<sup>[6]</sup>。MiRNA通过以下三种方式沉默mRNA: (1)将mRNA分裂成两段; (2)缩短poly A尾使mRNA失去稳定; (3)核糖体将mRNA转录成蛋白的效率降低<sup>[20-21]</sup>。已有研究表明, 在骨肉瘤中miRNA在骨肉瘤患者标本与正常标本中表达有差异, 并且与骨肉瘤的发病以及进展有关。其中, 高表达的miR-181a、miR-181b、miR-



A: qRT-PCR检测骨肉瘤细胞MG63转染后miR-708-5p的水平; B: 细胞凋亡图, 图中箭头所指为凋亡细胞; C: 对B图中凋亡细胞数计数; D: 转染后24 h的细胞凋亡情况; E: D图中各组总凋亡率。\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与阴性对照组比较。

A: measurement of miR-708-5p RNA expression level in MG63 after transfection; B: apoptosis cells in the pictures are indicated by arrows; C: count the apoptosis cells in B; D: cell apoptosis after transfected 24 h; E: total apoptosis rate in D; \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs negative control group.

图2 miR-708-5p诱导骨肉瘤细胞MG63的凋亡

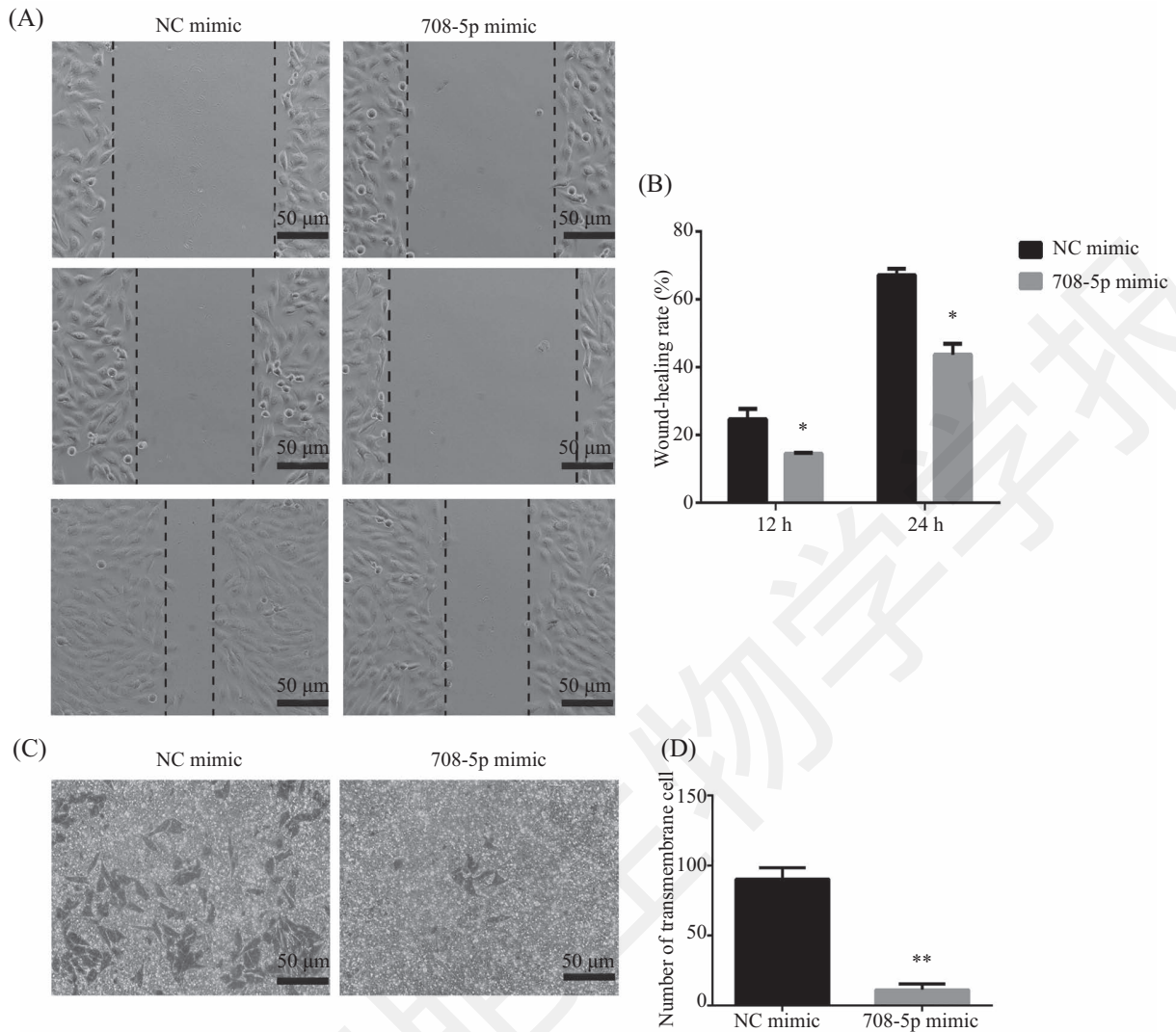
Fig.2 miR-708-5p induces apoptosis of osteosarcoma cell MG63

181c, 低表达的miR-16、miR-29b、miR-142-5p以及在有转移患者中高表达的miR-27a、miR-181c\*均可作为骨肉瘤发病和进展的特征之一<sup>[9]</sup>。MiR-708-5p已经被证实与乳腺癌、卵巢癌、肾癌、非小细胞肺癌等的转移以及预后相关。在乳腺癌中, miR-708-5p抑制转移<sup>[14]</sup>; 在卵巢癌中, 在糖皮质激素介导下miR-708-5p通过靶向Rap1B抑制卵巢癌转移<sup>[22]</sup>; miR-708在肾癌中, 诱导肾癌细胞凋亡并抑制肿瘤发生<sup>[15]</sup>; 在非小细胞肺癌中, miR-708-5p抑制细胞存活及转

移<sup>[24]</sup>。

有研究表明, 骨肉瘤的肿瘤起始细胞可能是在特定的骨微环境中发育的间充质干细胞(MSC)<sup>[25]</sup>。本研究表明, 相较于骨髓来源的间充质干细胞(hMSC), miR-708-5p在骨肉瘤细胞MG63中低表达。通过转染miR-708-5p mimic来使其过表达, 我们发现骨肉瘤细胞MG63的凋亡增多, 划痕实验与Transwell小室实验发现恢复miR-708-5p的表达后细胞迁移能力受到抑制。而上皮-间质转化(EMT)是上皮细胞失





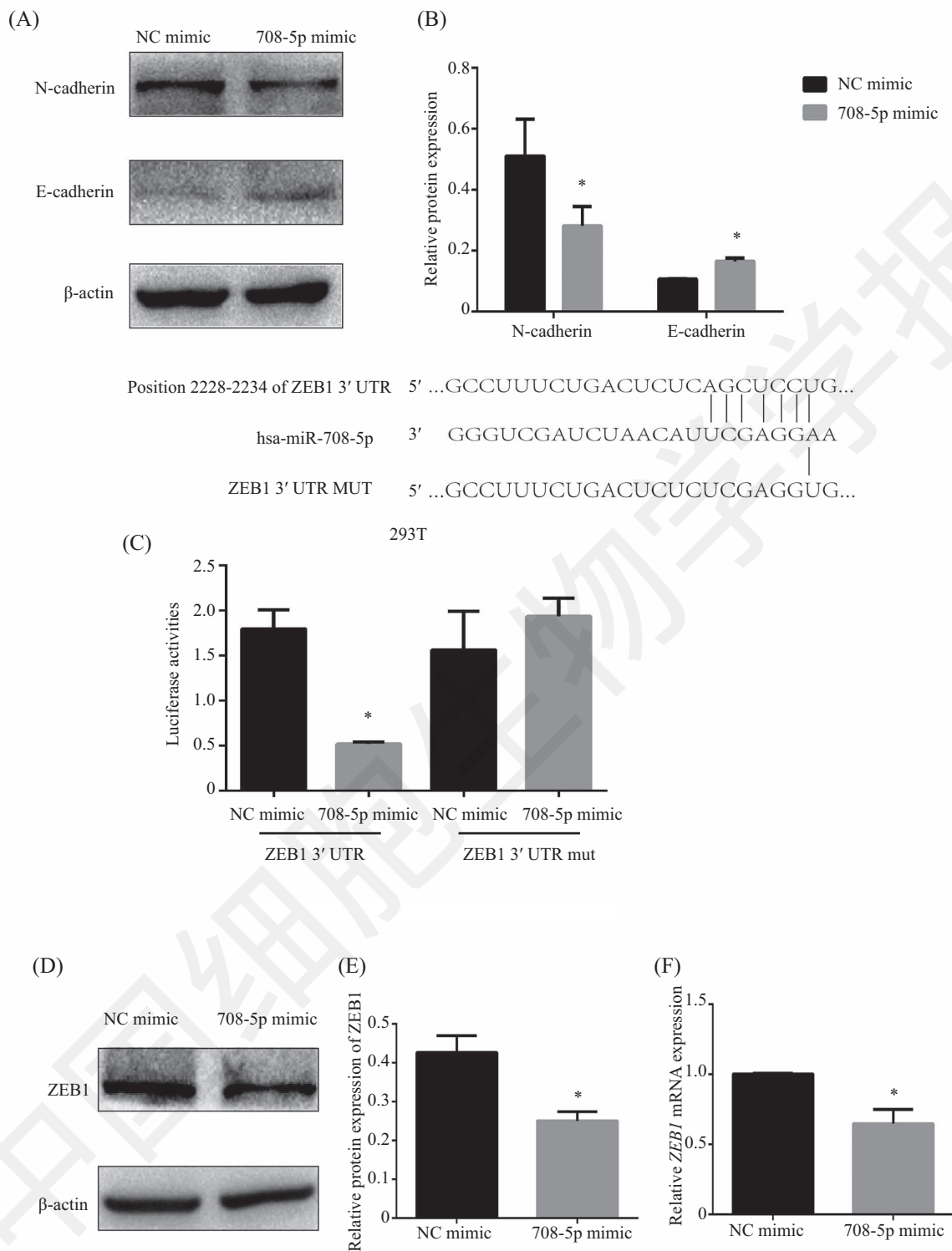
A: 阴性对照组(NC mimic)与实验组(708-5p mimic)在0 h、12 h、24 h的划痕情况; B: 与0 h相比, 12 h与24 h的划痕愈合率,  $*P<0.05$ , 与阴性对照组比较; C: 阴性对照组(NC mimic)与实验组(708-5p mimic)穿过Transwell小室细胞; D: 穿膜细胞数,  $**P<0.01$ , 与阴性对照组比较。  
A: the wound-healing of negative control group (NC mimic) and experimental group (708-5p mimic) in 0 h, 12 h, 24 h; B: wound-healing rate in 12 h and 24 h,  $*P<0.05$  vs negative control group; C: transmembrane cells of negative control group (NC mimic) and experimental group (708-5p mimic); D: number of transmembrane cells,  $**P<0.01$  vs negative control group.

图3 miR-708-5p抑制MG63迁移

Fig.3 MiR-708-5p inhibits migration of MG63

去细胞极性, 破坏细胞与细胞的连接, 增加细胞运动能力, 获得侵袭性成为间质细胞的生物学过程<sup>[26]</sup>。EMT能使肿瘤细胞获得侵袭和转移生长特性。其中, E-cadherin作为上皮标志物, N-cadherin作为间质标志物。本研究发现, 在骨肉瘤细胞MG63中miR-708-5p的过表达可以促进E-cadherin的表达同时抑制N-cadherin, 说明miR-708-5p是通过抑制骨肉瘤细胞上皮-间充质转化过程来抑制其迁移的。在对miR-708-5p的靶基因探索中, 我们发现并验证了miR-708-5p与ZEB1有直接靶向关系。过表达miR-708-5p能够下调ZEB1蛋白的表达。ZEB1是ZEB

锌指转录因子家族的一员, 在正常胚胎发育过程中发挥着重要的作用。ZEB蛋白通过下调E-cadherin来诱导上皮-间质转化, 使细胞极性丧失, 基底膜结构改变和重构, 并增加细胞迁移、侵袭从而加快恶性肿瘤的进展。ZEB1被报道在骨肉瘤组织中相较于正常组织高表达且和骨肉瘤的转移相关<sup>[27]</sup>。在本研究中, 我们比较了骨髓基质细胞HS-5与骨肉瘤细胞MG63中的ZEB1的表达, 发现ZEB1在MG63中高表达。于是我们进一步探讨敲低ZEB1后对骨肉瘤细胞迁移的影响, 利用siRNA成功敲低ZEB1的表达后, Transwell结果显示, 骨肉瘤细胞MG63的迁



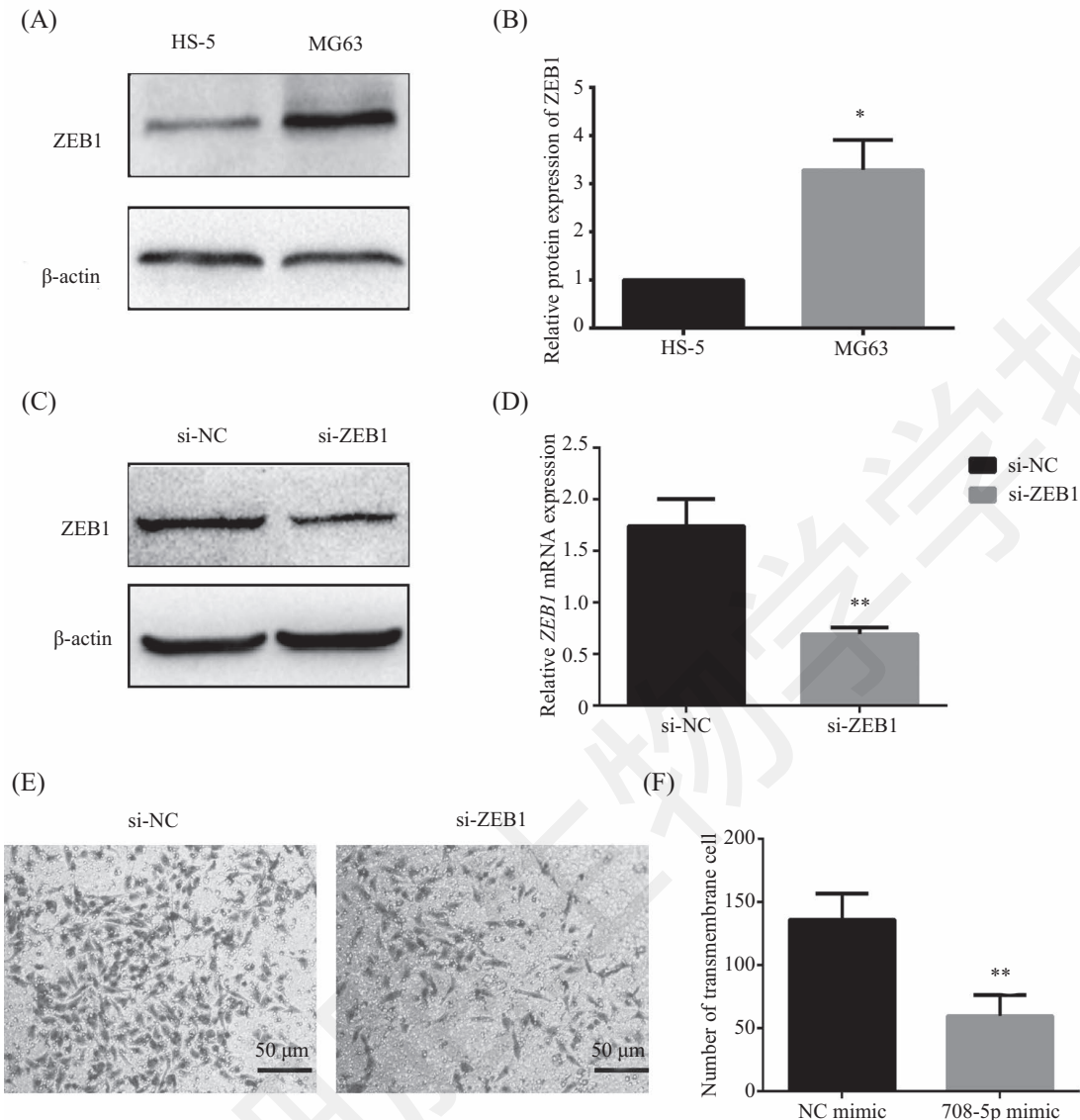
A: Western blot检测N-cadherin、E-cadherin的表达,  $\beta$ -actin作为内参; B: 蛋白相对表达水平; C: Targetscan7.2预测的miR-708-5p与ZEB1结合位点, 双荧光素酶报告基因实验验证; D: ZEB1蛋白表达; E: ZEB1蛋白相对表达水平; F: ZEB1 mRNA表达水平, GAPDH作为内参。\* $P < 0.05$ , 与阴性对照组比较。

A: measure expression of N-cadherin, E-cadherin using Western blot,  $\beta$ -actin acted as internal reference; B: relative protein levels; C: binding sites of miR-708-5p with ZEB1 predicted by Targetscan7.2, validated by dual-luciferase reporter assay; D: protein expression of ZEB1; E: relative protein expression of ZEB1; F: relative mRNA expression of ZEB1, GAPDH acted as internal reference. \* $P < 0.05$  vs negative control group.

图4 EMT相关分子表达与靶基因的验证

Fig.4 EMT markers expression and validation of target gene





A: HS-5、MG63中ZEB1的蛋白水平,  $\beta$ -actin作为内参; B: 蛋白相对表达量,  $**P < 0.01$ , 与HS-5组比较; C: siRNA敲低后MG63中ZEB1的蛋白水平,  $\beta$ -actin作为内参; D: siRNA敲低后MG63中ZEB1的mRNA水平, GAPDH作为内参,  $**P < 0.01$ , 与阴性对照相比; E: 敲低ZEB1后, MG63穿过Transwell小室细胞减少; F: 穿过Transwell小室MG63细胞数,  $**P < 0.01$ , 与阴性对照相比。

A: protein levels in HS-5, MG63,  $\beta$ -actin acted as internal reference; B: relative protein expression of ZEB1,  $**P < 0.01$  vs HS-5 group; C: relative ZEB1 protein expression after knocked down,  $\beta$ -actin acted as internal reference; D: relative mRNA expression of ZEB1 after knocked down, GAPDH acted as internal reference,  $**P < 0.01$  vs negative control group. E: number of transmembrane cell decreased after knocked down ZEB1; F: number of transmembrane cells,  $**P < 0.01$  vs negative control group.

图5 下调ZEB1抑制MG63的迁移能力

Fig.5 Knocking down of ZEB1 inhibits the migration of MG63 cells

移受到明显抑制。因此我们认为, ZEB1可能在miR-708-5p通过抑制EMT来抑制骨肉瘤细胞迁移这一过程中发挥了重要作用。

综上所述, 本研究从细胞层面上证实了miR-708-5p在骨肉瘤细胞中低表达和过表达miR-708-5p可以诱导骨肉瘤细胞凋亡, 抑制其迁移, 其机制与上皮-间充质转化受到抑制有关, 并且miR-708-5p可以直接靶向EMT的关键分子之一——ZEB1。这

为研究骨肉瘤的发生与发展及治疗提供了新的证据与思路。

#### 参考文献 (References)

- Angulo P, Kaushik G, Subramaniam D, Dandawate P, Neville K, Chastain K, *et al.* Natural compounds targeting major cell signaling pathways: a novel paradigm for osteosarcoma therapy. *J Hematol Oncol* 2017; 10(1): 10.
- Jaffe N, Puri A, Gelderblom H. Osteosarcoma: evolution of treatment paradigms. *Sarcoma* 2013; 2013: 1-7.

- 3 Meazza C, Scanagatta P. Metastatic osteosarcoma: a challenging multidisciplinary treatment. *Expert Rev Anticancer Ther* 2016; 16(5): 543-56.
- 4 Isakoff MS, Bielack SS, Meltzer P, Gorlick R. Osteosarcoma: current treatment and a collaborative pathway to success. *J Clin Oncol* 2015; 33(27): 3029-35.
- 5 Bartel DP. Metazoan microRNAs. *Cell* 2018; 173(1): 20-51.
- 6 David P, Bartel. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2): 281-97.
- 7 Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431(7006): 350-5.
- 8 Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(11): 857-66.
- 9 Jones KB, Salah Z, Del Mare S, Galasso M, Gaudio E, Nuovo GJ, *et al.* miRNA signatures associate with pathogenesis and progression of osteosarcoma. *Cancer Res* 2012; 72(7): 1865-77.
- 10 Xinyu Tan, Shicai Fan, Wen Wu and Yin Zhang. MicroRNA-26a inhibits osteosarcoma cell proliferation by targeting IGF-1. *Bone Research* 2015; 3: 15033.
- 11 Zhang L, Lv Z, Xu J, Chen C, Ge Q, Li P, *et al.* MicroRNA-134 inhibits osteosarcoma angiogenesis and proliferation by targeting the VEGFA/VEGFR1 pathway. *FEBS J* 2018; 285(7): 1359-71.
- 12 Niu G, Li B, Sun J, Sun L. miR-454 is down-regulated in osteosarcomas and suppresses cell proliferation and invasion by directly targeting c-Met. *Cell Prolif* 2015; 48(3): 348-55.
- 13 Liu T, Wu X, Chen T, Luo Z, Hu X. Downregulation of DNMT3A by miR-708-5p Inhibits Lung Cancer Stem Cell-like Phenotypes through Repressing Wnt/beta-catenin Signaling. *Clin Cancer Res* 2018,24(7): 1748-60.
- 14 Ryu S, McDonnell K, Choi H, Gao D, Hahn M, Joshi N, *et al.* Suppression of miRNA-708 by polycomb group promotes metastases by calcium-induced cell migration *Cancer Cell* 2013; 23(1): 63-76.
- 15 Saini S, Yamamura S, Majid S, Shahryari V, Hirata H, Tanaka Y, *et al.* MicroRNA-708 induces apoptosis and suppresses tumorigenicity in renal cancer cells. *Cancer Res* 2011; 71(19): 6208-19.
- 16 Delsin LEA, Roberto GM, Fedatto PF, Engel EE, Scrideli CA, Tone LG, *et al.* Downregulated adhesion-associated microRNAs as prognostic predictors in childhood osteosarcoma. *Pathol Oncol Res* 2019; 25(1): 11-20.
- 17 Jaffe N. Osteosarcoma: review of the past, impact on the future. The American experience. *Cancer Treat Res* 2009; 152: 239-62.
- 18 郑颖, 王刚阳, 陈瑞玲, 蔡郑东, 华莹奇. 骨肉瘤多药耐药的研究进展. *现代生物医学进展*(Zheng Ying, Wang Gangyang, Chen Ruiling, Cai Zhengdong, Hhua Yingqi. The research progress of osteosarcoma multi-resistance. *Progress in Modern Biomedicine*) 2017; 17(33): 6570-3.
- 19 Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development* 2005; 132(21): 4653-62.
- 20 Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136(2): 215-33.
- 21 Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem* 2010; 79: 351-79.
- 22 Lin KT, Yeh YM, Chuang CM, Yang SY, Chang JW, Sun SP, *et al.* Glucocorticoids mediate induction of microRNA-708 to suppress ovarian cancer metastasis through targeting Rap1B. *Nat Commun* 2015; 6: 5917.
- 24 Wu X, Liu T, Fang O, Dong W, Zhang F, Leach L, *et al.* MicroRNA-708-5p acts as a therapeutic agent against metastatic lung cancer. *Oncotarget* 2016; 7(3): 2417-32.
- 25 Gambera S, Abarrategi A, Rodriguez-Milla MA, Mulero F, Menendez ST, Rodriguez R, *et al.* Role of activator protein-1 complex on the phenotype of human osteosarcomas generated from mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2018; 36(10): 1487-500.
- 26 Kong D, Li Y, Wang Z, Sarkar FH. Cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-phenotypic cells: Are they cousins or twins? *Cancers (Basel)* 2011; 3(1): 716-29.
- 27 Shen A, Zhang Y, Yang H, Xu R, Huang G. Overexpression of ZEB1 relates to metastasis and invasion in osteosarcoma. *J Surg Oncol* 2012; 105(8): 830-4.