

GAS5 对骨肉瘤 U2OS 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

阎亮¹, 孙晓泽¹, 王上增¹, 段 铮²

(1 河南省中医院关节外科; 2 肿瘤科 450002 郑州市)

【摘要】目的:观察生长停滞特异性转录因子 5(GAS5)对骨肉瘤 U2OS 细胞增殖、迁移和侵袭的影响,探讨其机制。**方法:**在人骨肉瘤 U2OS 细胞和人正常成骨 hFOB 1.19 细胞中,采用实时定量 PCR(qRT-PCR)检测 GAS5 和微小 RNA(miR)-221 的表达,Western blot 检测基质金属蛋白酶抑制物-2(TIMP2)蛋白的表达。转染 pcDNA-GAS5 重组质粒后,采用噻唑蓝(MTT)法和 Transwell 小室法检测 GAS5 对 U2OS 细胞增殖、迁移和侵袭的影响,qRT-PCR 检测 GAS5 对 miR-221 表达的影响。利用 Starbase 软件预测和双荧光素酶报告基因实验验证 GAS5 与 miR-221 以及 miR-221 与 TIMP2 的靶向关系。转染 miR-221 模拟物和 miR-221 抑制剂后,观察 miR-221 过表达对 GAS5 调控的 U2OS 细胞增殖、迁移和侵袭的影响以及 miR-221 对 TIMP2 蛋白表达的影响。**结果:**与正常 hFOB 1.19 细胞相比,U2OS 细胞中 GAS5 和 TIMP2 蛋白的表达水平明显降低,而 miR-221 表达水平显著升高(GAS5: $P=0.0001$;TIMP2: $P=0.0003$;miR-221: $P=0.0004$)。GAS5 过表达可抑制 U2OS 细胞增殖、迁移和侵袭(增殖 48h: $P=0.0005$;增殖 72h: $P=0.0002$;迁移: $P=0.002$;侵袭: $P=0.001$),而 miR-221 过表达可明显逆转 GAS5 对 U2OS 细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用(增殖 48h: $P=0.0002$;增殖 72h: $P=0.0003$;迁移: $P=0.0001$;侵袭: $P=0.0001$)。Starbase 软件预测到 miR-221 存在能够与 GAS5 互补结合的位点,还存在能够与 TIMP2 3'UTR 互补结合的位点;双荧光素酶结果显示 miR-221 过表达后野生型 GAS5(GAS5-WT)和野生型 TIMP2(TIMP2-WT)细胞的荧光素酶活性明显降低(P 均为 0.0003);同时,GAS5 过表达后,U2OS 细胞中 miR-221 表达水平明显降低($P=0.0001$),反之 miR-221 明显升高($P=0.0001$);miR-221 过表达后,U2OS 细胞中 TIMP2 蛋白的表达水平明显降低($P=0.0003$),反之 TIMP2 蛋白的表达水平明显升高($P=0.0009$)。**结论:**GAS5 可通过靶向抑制 miR-221 促进 TIMP2 表达,进而抑制 U2OS 细胞的增殖、迁移和侵袭。

【关键词】骨肉瘤;生长停滞特异性转录因子 5;微小 RNA-221;基质金属蛋白酶抑制物-2;增殖;迁移;侵袭

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2019.08.07

中图分类号:R738.1,Q786 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2019)-08-0717-08

The effect of GAS5 on proliferation, migration and invasion of osteosarcoma U2OS cells/YAN Liang, SUN Xiaozhe, WANG Shangzeng, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2019, 29 (8): 717-724

【Abstract】 Objectives: To observe the effect of growth arrest-specific 5(GAS5) on the proliferation, migration and invasion of osteosarcoma U2OS cells and its mechanism. **Methods:** In human osteosarcoma U2OS cells and normal human osteoblast hFOB 1.19 cells, to detect the expressions of GAS5 and miR-221 by qRT-PCR, and tissue inhibitor of metalloproteinase 2(TIMP2) protein by Western blot. After transfection of pcDNA-GAS5 recombinant plasmid, the effects of GAS5 on the proliferation, migration and invasion of U2OS cells were detected by MTT assay and Transwell chamber assay, and the effect on the expression of miR-221 was analyzed by qRT-PCR. The targeting relationship between GAS5 and miR-221, as well as between miR-221 and TIMP2 was predicted by Starbase software and validated by double luciferase reporter gene experiments. After transfection of miR-221 mimics and miR-221 inhibitor, the effects of miR-221 over-expression on the proliferation, migration and invasion of U2OS cells regulated by GAS5 and effect of miR-221 on the expression of TIMP2 protein were observed. **Results:** Compared with hFOB 1.19, the expression levels of GAS5 and TIMP2 in U2OS cells were decreased significantly, while the expression level of miR-221 was increased significantly (GAS5: $P=0.0001$; TIMP2: $P=0.0003$; miR-221: $P=0.0004$). The GAS5 over-expression in-

hibited the proliferation, migration and invasion of U2OS cells (proliferation 48h: $P=0.0005$; 72h: $P=0.0002$; migration: $P=0.002$; invasion: $P=0.001$), while the miR-221 over-expression significantly reversed the inhibitory effect of GAS5 on the proliferation, migration and invasion of U2OS cells (proliferation 48h: $P=0.0002$; 72h: $P=0.0003$; migration: $P=0.0001$; invasion: $P=0.0001$). Starbase predicted that there was a complementary binding site between miR-221 and GAS5, and there were also sites that could complement TIMP2 3'UTR. Double luciferase results showed that the luciferase activity of wild GAS5 (GAS5-WT) and TIMP2 (TIMP2-WT) cells significantly decreased after over-expression of miR-221 (P both=0.0003). At the same time, under the condition of GAS5 over-expression, the expression level of miR-221 in U2OS cells decreased significantly ($P=0.0001$), whereas it increased significantly ($P=0.0001$) under contrary condition. Similarly, with miR-221 over-expression, the expression level of TIMP2 protein decreased significantly ($P=0.0003$), and conversely, it increased significantly ($P=0.0009$). **Conclusions:** GAS5 promotes TIMP2 expression by targeting inhibition of miR-221, thereby inhibiting the proliferation, migration and invasion of U2OS cells

【Key words】 Osteosarcoma; Growth arrest-specific 5; MicroRNA-221; Matrix metalloproteinase inhibitor-2; Proliferation; Migration; Invasion

【Author's address】 Joint Surgery of Henan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, 450002, China

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是一种常见的原发性成骨性实体恶性肿瘤, 约占所有恶性肿瘤发生率的 2.4%^[1], 其中超过 30% 的 OS 患者可出现肿瘤细胞的肺、胸膜和心脏转移^[2,3]。临床中常采用放疗、化疗、手术切除对 OS 患者进行治疗, 尽管在一定程度上缓解了病情发展, 但对转移性或复发性 OS 患者治疗效果不理想^[4,5]。因此, 有必要对 OS 的发生机制进行深入研究。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类超过 200 个核苷酸长度的长链非蛋白编码 RNA, 最早被认为是基因转录的“噪音”, 但近年来的研究表明, 部分 lncRNA 可通过在转录或转录后水平调控基因的表达, 参与机体多种生物学过程, 如细胞周期、分化、增殖、凋亡等^[6]。有研究证实, 在多种癌症组织或细胞中均出现 lncRNA 的异常表达, 失调的 lncRNA 通过调控肿瘤相关因子表达发挥致癌或肿瘤抑制作用^[7]。生长停滞特异性转录因子 5 (growth arrest-specific 5, GAS5) 是最早在小鼠生长停滞的成纤维细胞中被发现的 lncRNA, 定位于人染色体 1q25.1 上。大量研究显示, 该 lncRNA 在多种人类肿瘤中发挥重要的肿瘤抑制作用, 如胃癌^[8]、乳腺癌^[9]、前列腺癌^[10]等, 但其在 OS 发展中的功能和机制尚不完全清楚。本研究通过观察 GAS5 对 OS 细胞系 U2OS 增殖、迁移和侵袭的影响, 以揭示 GAS5 在 OS 发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人胚胎肾细胞 293T 和人成骨细胞 hFOB 1.19 (中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库); 骨肉瘤 U2OS 细胞(美国 ATCC); 胎牛血清、DMEM 培养基、McCoy's 5A 培养基、胰蛋白酶(美国 Gibco); 脂质体 2000、cDNA 反转录试剂盒、微小 RNA (MicroRNA, miR) 反转录试剂盒、Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2×)(美国 ThermoFisher)、双荧光素酶报告分析试剂盒 (美国 Promega); 点突变试剂盒(日本 Takara); Transwell 细胞小室(孔径 8μm)(美国 Corning); Matrigel 基底膜基质 (美国 BD Biocoat); 噻唑蓝 (Methylthiazolyldiphenyl -tetrazolium bromide, MTT) 细胞增殖试剂盒、总 RNA 提取试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司); pcDNA-GAS5 重组质粒(GAS5)及对照质粒(pcDNA3.1)、GAS5 小干扰 RNA (si-GAS5) 及干扰对照 (si-NC)、miR-221 模拟物(miR-221 mimics, miR-221) 及相应的阴性对照(miR-NC)、miR-221 抑制剂(miR-221 inhibitor, anti-miR-221) 及相应的阴性对照 (anti-miR-NC)、含 miR-221 结合位点的野生型 GAS5 及基质金属蛋白酶抑制物-2(matrix metalloproteinase inhibitor-2, TIMP2) 荧光素酶报告质粒(GAS5-WT 及 TIMP2-WT) 和 miR-221 结合位点突变的突变型 GAS5 及 TIMP2 荧光素酶报告质粒 (GAS5-MUT 和 TIMP2-MUT)(上海吉玛制药技术有限公司)。

1.2 细胞培养

采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 基础培养液

培养 293T 和 hFOB 1.19 细胞, 采用含 10% 胎牛血清的 McCoy's 5A 培养基培养 U2OS 细胞, 细胞均置于 5%CO₂、37℃ 的恒温培养箱中常规培养, 当细胞铺满瓶底 80% 时, 以 0.25% 胰蛋白酶消化并按照 1:2 比例传代。实验所有细胞为生长良好的第 3 代对数生长期细胞。

1.3 细胞转染

(1) GAS5 对细胞增殖、迁移和侵袭影响的实验: 分为空载体对照 (pcDNA) 组 (转染 pcDNA3.1 质粒) 和 GAS5 过表达 (GAS5) 组 (转染 pcDNA-GAS5 质粒); (2) GAS5 对 miR-221 表达的调控实验: 除设置 pcDNA 组和 GAS5 组外, 还另设 si-NC 组 (转染 si-NC) 和 GAS5 干扰组 (转染 si-GAS5); (3) miR-221 逆转实验: 除设置 pcDNA 组和 GAS5 组外, 还设置 GAS5+miR-NC 组 (pcDNA-GAS5 质粒和 miR-NC 共转染) 和 GAS5+miR-221 组 (pcDNA-GAS5 质粒和 miR-221 模拟物共转染)。 (4) miR-221 对 TIMP2 表达调控实验: 设置 miR-NC 组 (转染 miR-NC)、miR-221 组 (转染 miR-221)、anti-miR-NC 组 (转染 anti-miR-NC)、anti-miR-221 组 (转染 anti-miR-221)。将对数生长期的 U2OS 细胞接种于 6 孔板中, 过夜培养至细胞融合度达 50% 时, 利用脂质体 2000 根据实验分组将 pcDNA-GAS5 重组质粒、si-GAS5、miR-221 模拟物和 miR-221 抑制剂及其相应对照转染到细胞中, 持续培养 48h 后, 进行后续实验操作。

1.4 实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 检测 GAS5 和 miR-221 的表达

利用总 RNA 提取试剂盒提取正常培养的 U2OS 细胞和 hFOB 1.19 细胞中的总 RNA, 紫外分光光度计测定 RNA 浓度后分别利用 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit 和 MicroRNA Reverse Transcription Kit 将 GAS5 和 miR-221 逆转录成 cDNA。以 cDNA 为模板, 利用 Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2×) 配制 qPCR 反应体系, 之后在荧光定量 PCR 仪上测定 GAS5 和 miR-221 的相对表达水平, 分别以 GAPDH 和 U6 snRNA 作为内参, 按照 2^{-ΔΔCt} 公式计算结果。然后收集转染 pcDNA-GAS5 重组质粒 48h 的 U2OS 细胞, 采用同样方法检测 GAS5 的转染效率及 GAS5 对 miR-221 表达的影响。引物见表 1。

1.5 Western blot 检测 TIMP2 蛋白的表达

正常培养的 U2OS 细胞和 hFOB 1.19 细胞中加入 RIPA 裂解液裂解细胞, 离心取上清液后, 采用 BCA 法测定蛋白浓度, 之后进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白。将蛋白转移至 PVDF 膜上, 加入 5% 的脱脂奶粉 4℃ 过夜封闭, PBST 洗涤后加入 TIMP2 和 β-actin 抗体 37℃ 孵育 2h, 再次加入 PBST 洗涤, 之后加入相应二抗孵育 1.5h。利用 ECL 化学发光液对目的条带进行显色, 并采用 Image J 软件分析蛋白灰度值。同样方法检测转染 miR-221 和 anti-miR-221 48h 后 TIMP2 蛋白

表 1 各基因反转录引物与 PCR 引物序列

Table 1 Reverse transcription primers and PCR primer sequences of each gene

基因 Gene	引物序列 Primer sequence
miR-221	
反转录引物 Stem-loop RT primer	5'-AGCUACAUGUCUGCGGUUUC-3'
PCR 引物 PCR primers	上游 Upstream: 5'-CAGCATACATGATTCCTTGTGA-3' 下游 Downstream: 5'-CTTTGGTGTGAGATGTTTG-3'
U6	
反转录引物 Stem-loop RT primer	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTGCACTGGATACGACAAAATAGTGAAC-3'
PCR 引物 PCR primers	上游 Upstream: 5'-TCCGGGTGCTCGCTTCGGCAGC-3' 下游 Downstream: 5'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGT-3'
GAS5	
PCR 引物 PCR primers	上游 Upstream: 5'-CTTCTGGGCTCAAGTGATCCT-3' 下游 Downstream: 5'-TTGTGCCATGAGACTCCATCAG-3'
β-actin	
PCR 引物 PCR primers	上游 Upstream: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' 下游 Downstream: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

的表达情况。

1.6 MTT 法检测细胞活性

将转染 pcDNA-GAS5 重组质粒 48h 的 U2OS 细胞以 3×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 每组设 3 个重复样品, 分别在转染后 24h、48h、72h 加入 MTT 试剂, 37℃、5%CO₂ 条件下孵育 4h 后, 加入甲瓚溶解液, 之后在酶标仪上测定 570nm 处的吸光值。实验重复 3 次。同样方法观察 GAS5 联合 miR-221 对 U2OS 细胞增殖的影响。

1.7 Transwell 小室法检测细胞迁移和侵袭

(1) 细胞迁移实验: 将转染 pcDNA-GAS5 重组质粒 48h 后的 U2OS 细胞用 0.25% 的胰酶消化, 磷酸缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次, 用不含血清的培养基重悬细胞, 并调整细胞密度为 5×10^5 /ml。取 200μl 细胞悬液加入 24 孔板小室上室中, 在下室内加入 500μl 含 10% 胎牛血清的完全培养基, 于 37℃、5%CO₂ 条件下培养 48h 后取出, 用棉签擦去上室内的细胞, 之后用 0.1% 结晶紫染液染色 10min, 倒置显微镜下观察并拍照, 随机选取 10 个视野进行计数, 并计算平均细胞迁移数。(2) 细胞侵袭实验: 在上室中加入人工基底膜以模仿细胞外基质, 具体操作步骤同迁移实验, 之后在倒置显微镜下观察并拍照, 随机选取 10 个视野进行计数, 计算平均细胞侵袭数。实验重复 3 次。后续同样方法检测 GAS5 联合 miR-221 对 U2OS 细胞侵袭、迁移的影响。

1.8 双荧光素酶报告分析 GAS5 与 miR-221 及 miR-221 与 TIMP2 的靶向关系

采用 Starbase 软件对 GAS5 靶基因以及 miR-221 靶基因进行预测, 利用脂质体 2000 试剂将构建的 GAS5-WT/MUT 或 TIMP2-WT/MUT 重组质粒与 miR-NC、miR-221、anti-miR-NC 或 anti-miR-221 共转染到 293T 细胞中, 48h 后利用双荧光素酶报告分析试剂盒检测各组细胞的荧光素酶活性。实验重复 3 次。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 实验数据用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间的差异比较采用 *t* 检验, 3 组及 3 组以上均值间的比较采用单因素方差分析, 多个均值的两两比较采用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GAS5 在 OS 细胞 U2OS 中的表达

与正常 hFOB 1.19 细胞中 GAS5 表达水平 (1.008 ± 0.002) 比较, U2OS 细胞中 GAS5 的表达水平 (0.297 ± 0.035) 显著降低 ($t = 35.13, P = 0.0001$)。

2.2 GAS5 过表达对 U2OS 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

采用 qRT-PCR 法对 GAS5 的转染效率进行分析, 与 pcDNA 转染组 (1.025 ± 0.025) 相比, GAS5 过表达质粒转染的 U2OS 细胞中 GAS5 表达水平 (3.251 ± 0.326) 显著升高 ($t = 11.79, P = 0.0003$)。采用 MTT 和 Transwell 小室法对细胞的增殖、迁移和侵袭能力进行分析, 结果显示, 与 pcDNA 转染组相比, GAS5 过表达的 U2OS 细胞在 48h 和 72h 的增殖活性明显降低 (48h: $t = 10.351, P = 0.0005$; 72h: $t = 12.817, P = 0.0002$) (表 2); 转染后 48h, U2OS 过表达细胞的迁移和侵袭细胞数也明显低于 pcDNA 转染组 (迁移: $t = 7.805, P = 0.002$; 侵袭: $t = 8.861, P = 0.001$) (表 2, 图 1)。

2.3 GAS5 与 miR-221 靶向关系验证

Starbase 软件预测结果显示, miR-221 序列中存在与 GAS5 互补结合的位点 (chr1: 173833269-173833292) (图 2)。采用双荧光素酶报告实验进一步分析 miR-221 和 GAS5 的靶向结合作用, 与 miR-NC 组相比 [miR-NC + GAS5-WT (1.012 ± 0.094), miR-NC + GAS5-MUT (0.966 ± 0.094)], miR-221 过表达明显抑制 GAS5-WT 的荧光素酶活性 [miR-221 + GAS5-WT (0.296 ± 0.040)] ($t = 12.14, P = 0.0003$), 但对 GAS5-MUT 荧光素酶活性 [miR-221 + GAS5-MUT (0.851 ± 0.036)] 无影响 ($t = 1.979, P = 0.119$); 与 anti-miR-NC 组相比 [anti-miR-NC + GAS5-WT (1.006 ± 0.083), anti-miR-NC + GAS5-MUT (1.106 ± 0.091)], 抑制 miR-221 表达明显促进了 GAS5-WT 的荧光素酶活性 [anti-miR-221 + GAS5-WT (3.216 ± 0.240)] ($t = 15.07, P = 0.0001$), 但对 GAS5-MUT 荧光素酶活性 [anti-miR-221 + GAS5-MUT (1.325 ± 0.125)] 无影响 ($t = 2.453, P = 0.0702$)。

2.4 miR-221 在 OS 细胞 U2OS 中的表达及 GAS5 对 miR-221 表达的调控

采用 qRT-PCR 法检测 hFOB 1.19 和 U2OS 细胞中 miR-221 的表达水平, 与正常 hFOB 1.19 细胞 (1.000 ± 0.093) 相比, U2OS 细胞中 miR-221

表 2 pcDNA 组与 GAS5 组 U2OS 细胞吸光度值、迁移数目和侵袭数目的比较 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 2 Comparison of cell absorbance, number of migration and number of invasion in each group

组别 Group	吸光度值 Absorbance value			迁移数目(个) Number of migration	侵袭数目(个) Invasion number
	24h	48h	72h		
pcDNA组 pcDNA group	0.202±0.018	0.575±0.025	0.916±0.052	96.23±10.05	109.54±10.21
GAS5 组 GAS5 group	0.211±0.023	0.337±0.031 ^①	0.448±0.036 ^①	43.18±6.13 ^①	50.26±5.48 ^①

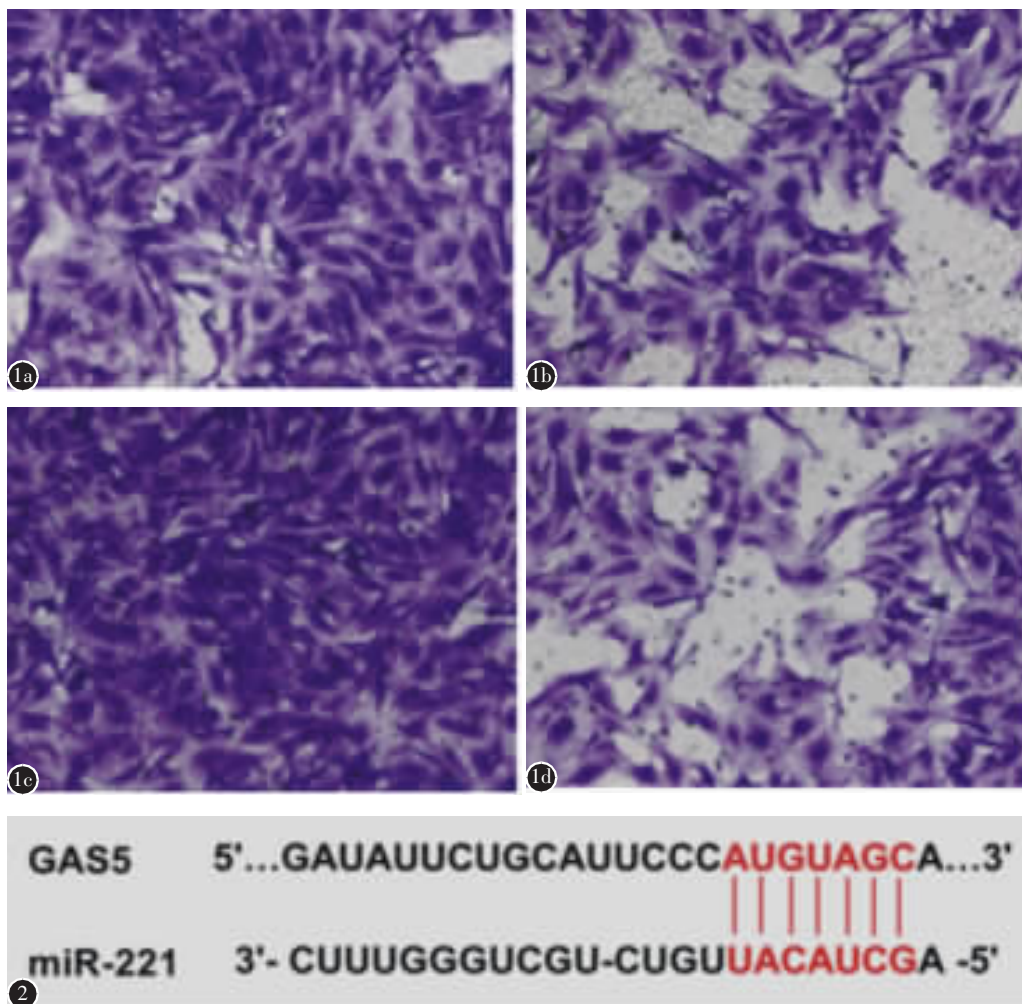
注:①与 pcDNA 组相比, $P<0.05$ Note: ①Compared with pcDNA group, $P<0.05$ 

图 1 细胞迁移和侵袭检测(结晶紫染色, $\times 200$) a pcDNA 组 U2OS 细胞迁移染色结果 b GAS5 组 U2OS 细胞迁移染色结果 c pcDNA 组 U2OS 细胞侵袭染色结果 d GAS5 组 U2OS 细胞侵袭染色结果 图 2 Starbase 软件预测 GAS5 与 miR-221 互补结合位点

Figure 1 Results of cell migration and invasion(crystal violet staining, $\times 200$) **a** The result of U2OS fine migration staining in pcDNA group **b** The result of migration staining of U2OS cells in GAS5 group **c** The result of invasive staining of U2OS cells in pcDNA group **d** The result of invasive staining of U2OS cells in GAS5 group **Figure 2** The complementary binding sites between GAS5 and microRNA-221 were predicted by Starbase software

的表达水平显著升高 (3.213 ± 0.33) ($t=11.18, P=0.0004$)。采用 qRT-PCR 检测各转染组细胞中 miR-221 的表达水平,与 pcDNA 组 (1.015 ± 0.082)

相比, GAS5 过表达的 U2OS 细胞中 miR-221 的水平 (0.248 ± 0.034) 显著降低 ($t=14.79, P=0.0001$); 与 si-NC 组 (0.986 ± 0.083) 相比, GAS5 干扰组细

胞中 miR-221 表达水平 (2.863 ± 0.205) ($t=14.70$, $P=0.0001$) 显著升高。

2.5 miR-221 逆转 GAS5 对 U2OS 细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用

与 pcDNA 相比, GAS5 组 U2OS 细胞增殖活性、迁移和侵袭能力均明显减弱 (增殖 48h: $t=5.782$, $P=0.0044$; 增殖 72h: $t=5.136$, $P=0.0068$; 迁移: $t=7.199$, $P=0.002$; 侵袭: $t=7.275$, $P=0.0019$); 与 GAS5 组相比, GAS5+miR-NC 组 U2OS 细胞未见显著变化 (增殖 48h: $t=0.8182$, $P=0.4592$; 增殖 72h: $t=0.5532$, $P=0.6096$; 迁移: $t=1.001$, $P=0.3736$; 侵袭: $t=1.957$, $P=0.122$); 与 GAS5+miR-NC 组相比, GAS5+miR-221 组 U2OS 细胞增殖活性、迁移和侵袭能力均明显增强 (增殖 48h: $t=7.02$, $P=0.0022$; 增殖 72h: $t=7.566$, $P=0.0016$; 迁移: $t=5.846$, $P=0.0043$; 侵袭: $t=6.459$, $P=0.003$) (表 3)。

2.6 miR-221 与 TIMP2 靶向关系验证

Starbase 软件预测结果显示, miR-221 与 TIMP2 3'UTR 序列存在互补结合的位点 (chr17: 76851336-76851341) (图 3)。之后, 采用双荧光素酶报告实验进一步分析 miR-221 和 TIMP2 的靶向关系, 与 miR-NC 组 [miR-NC+TIMP2-WT (1.008 ± 0.095)] 相比, miR-221 过表达明显抑制 TIMP2-WT 的荧光素酶活性 [miR-221+TIMP2-WT (0.325 ± 0.036)] ($t=11.64$, $P=0.0003$), 但对 GAS5-MUT 荧光素酶活性无影响 [miR-221+TIMP2-MUT (0.969 ± 0.092) vs miR-NC+TIMP2-MUT (1.023 ± 0.088)] ($t=7.347$, $P=0.5033$); 与 anti-miR-NC 组 [anti-miR-NC+TIMP2-WT (0.989 ± 0.086)] 相比, miR-221 抑制明显促进了 TIMP2-WT 的荧光素酶活性 [anti-miR-221+TIMP2-WT (3.335 ± 0.361)] ($t=10.95$, $P=0.0004$), 但对 GAS5-MUT 荧光素酶活性无影响

[anti-miR-221+TIMP2-MUT (1.208 ± 0.092) vs anti-miR-NC+TIMP2-MUT (1.001 ± 0.103)] ($t=2.596$, $P=0.0603$)。

2.7 TIMP2 在骨肉瘤细胞 U2OS 中的表达及 miR-221 对 TIMP2 表达的调控

hFOB 1.19 和 U2OS 细胞中 TIMP2 的蛋白表达水平如图 4a 所示, 与正常 hFOB 1.19 细胞 (1.004 ± 0.076) 相比, U2OS 细胞中 TIMP2 的表达水平 (0.405 ± 0.044) 显著降低 ($t=11.81$, $P=0.0003$)。各转染组细胞中 TIMP2 的蛋白表达水平如图 4b 所示, 与 miR-NC 组 (1.002 ± 0.076) 相比, miR-221 过表达的 U2OS 细胞中 TIMP2 的水平 (0.434 ± 0.039) 显著降低 ($t=11.52$, $P=0.0003$); 与 anti-miR-NC 组 (1.086 ± 0.088) 相比, miR-221 抑制的 U2OS 细胞中 TIMP2 表达水平 (2.585 ± 0.279) 显著升高 ($t=8.875$, $P=0.0009$)。

3 讨论

随着新型临床辅助化疗药物的开发, 极大程度缓解了 OS 患者的病情发展^[11]。然而, 恶性肿瘤转移仍然是导致 OS 患者治疗失败的主要原因^[12]。深入研究 OS 的发病机制并寻找新的治疗方法将有助于提高 OS 临床治疗效果。随着分子生物学技术的不断发展, 研究人员发现 lncRNA 在多种生物过程中发挥重要的调节作用, 异常表达的 lncRNA 可能涉及多种人类疾病, 特别是人类恶性肿瘤的发生发展, 包括 OS^[13,14]。GAS5 是一种与肿瘤发生发展关系密切的 lncRNA, 被证实在肝癌^[15]和胰腺导管癌^[16]组织和细胞中异常低表达, 且下调其表达可促进癌细胞的增殖与侵袭。相关研究显示, GAS5 在 OS 患者组织中出现异常的低表达, 并通过调控 OS 细胞的生长、迁移和侵袭发挥抗肿瘤作用^[17,18]。在本研究中, 我们对 GAS5 在 OS

表 3 各组 U2OS 细胞吸光度值、迁移数目和侵袭数目的比较

($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Table 3 Comparison of cell absorbance, number of migration and number of invasion in each group

	吸光度值 Absorbance value			迁移数目(个) Number of migration	侵袭数目(个) Invasion number
	24h	48h	72h		
pcDNA	0.213 ± 0.024	0.596 ± 0.055	1.037 ± 0.176	110.45 ± 12.39	123.32 ± 12.68
GAS5	0.208 ± 0.032	0.367 ± 0.041 ^①	0.492 ± 0.053 ^①	53.71 ± 5.73 ^①	63.41 ± 6.53 ^①
GAS5+miR-NC	0.216 ± 0.021	0.343 ± 0.030	0.514 ± 0.044	58.52 ± 6.04	53.36 ± 6.04
GAS5+miR-221	0.227 ± 0.020	0.569 ± 0.047 ^②	0.936 ± 0.086 ^②	96.46 ± 9.48 ^②	98.27 ± 10.42 ^②

注: ①与 pcDNA 组比较 $P<0.05$; ②与 GAS5+miR-NC 组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with pcDNA group, $P<0.05$; ②Compared with GAS5+miR-NC group, $P<0.05$



图 3 Starbase 软件预测 miR-221 与 TIMP2 互补结合位点 图 4 Western blot 检测 TIMP2 蛋白表达的结果 a TIMP2 在 hFOB 1.19 和 U2OS 细胞中的蛋白表达水平 b miR-221 对 TIMP2 表达的调控

Figure 3 The binding sites between miR-221 and TIMP2 predicted by using Starbase software **Figure 4** Expression of TIMP2 protein was detected by Western blot a The expression level of TIMP2 in hFOB 1.19 and U2OS cells b The regulation of TIMP2 expression by miR-221

细胞中的表达和功能进行分析,结果显示,GAS5 在 OS 细胞中表达水平显著降低,通过体外过表达 GAS5 可抑制 OS 细胞的增殖、迁移和侵袭,表明 GAS5 在 OS 中发挥肿瘤抑制作用。该结果也与之前的研究相一致。有研究证实,GAS5 作为一种内源性竞争 RNA (ceRNA),可通过抑制 miRNA 表达促进靶 mRNA 在特定组织或细胞中的表达,最终参与肿瘤的发生发展^[9]。如 GAS5 可通过与 miR-222 互补结合,抑制胶质瘤细胞的生长、侵袭、迁移和凋亡^[20];此外,GAS5 还可通过调控 miR-103 表达促进肿瘤抑制基因 PTEN 水平的升高,进而延缓子宫内膜癌的发展^[21]。然而,GAS5 是如何通过调控下游 miRNA 表达进而发挥抑制 OS 生长的并不清楚。

我们对 GAS5 的靶 miRNA 进行预测和分析,结果将 miR-221 作为研究对象。miR-221 是一种常见的致癌因子,参与多种癌症的发生发展过程。如在胃癌卵巢转移患者血清外泌体中 miR-221 表达水平显著升高,初步说明 miR-221 可能参与胃癌的卵巢转移过程^[22]。另外,miR-221 还能够促进乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[23]。同时,在宫颈癌中 miR-221 通过靶向抑制 AT 丰富结合域 1A 基因 (ARID1A) 而增强癌细胞的增殖和侵袭能力^[24]。本研究结果证实,miR-221 是 GAS5 的一个靶 miRNA,GAS5 能够通过互补结合位点负调控 miR-221 表达。提示 GAS5 可能通过抑制

miR-221 表达参与 OS 的发生发展过程。为了进一步研究 GAS5 是否通过抑制 miR-221 表达发挥抗 OS 形成作用,我们在 pcDNA-GAS5 转染的 OS 细胞中过表达 miR-221,结果显示,外源回补 miR-221 逆转了 GAS5 对 OS 细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用。表明 GAS5 可通过抑制 miR-221 抑制 OS 细胞的恶性进展。

miRNAs 是一类长约 21nt 的单链非编码短 RNA,可通过与靶基因 mRNA 3'UTR 结合,参与 mRNA 转录后的调控,影响细胞增殖、分化和转移等生物学过程,与包括 OS 在内的多种肿瘤的发生发展关系密切^[25]。为了进一步阐述在 OS 细胞恶性进展过程中 miR-221 的调控机制,我们对 miR-221 的下游靶基因进行预测和分析,最终将 TIMP2 作为研究对象。TIMP2 是一种常见的金属蛋白酶抑制剂,被证实可抑制多种癌症的恶性转移过程,包括胃癌^[26]、膀胱癌^[27]、纤维肉瘤^[28]等。本研究结果显示,miR-221 能够通过互补结合位点与 TIMP2 发生靶向结合,并负调控 TIMP2 表达。由此证实,miR-221 可靶向调控 TIMP2 表达,进而影响 OS 细胞增殖、侵袭和迁移。

综上所述,GAS5 可通过靶向调控 miR-221/TIMP2 表达抑制 U2OS 细胞的增殖、迁移和侵袭,在 OS 发展中起肿瘤抑制作用,该研究的发现进一步丰富对 OS 发生发展分子机制的了解,并提示 GAS5 具有作为 OS 抑制剂的潜能。

4 参考文献

- Picci P. Osteosarcoma(osteogenic sarcoma)[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2007, 2(1): 6.
- Aljubran AH, Griffin A, Pintilie M, et al. Osteosarcoma in adolescents and adults: survival analysis with and without lung metastases[J]. *Ann Oncol*, 2009, 20(6): 1136–1141.
- Ogura K, Fujiwara T, Yasunaga H, et al. Development and external validation of nomograms predicting distant metastases and overall survival after neoadjuvant chemotherapy and surgery for patients with nonmetastatic osteosarcoma: a multi-institutional study[J]. *Cancer*, 2015, 121(21): 3844–3852.
- Isakoff MS, Bielack SS, Meltzer P, et al. Osteosarcoma: current treatment and a collaborative pathway to success [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(27): 3029–3035.
- Shang HS, Chang JB, Lin JH, et al. Deguelin inhibits the migration and invasion of U-2 OS human osteosarcoma cells via the inhibition of matrix metalloproteinase-2/-9 in vitro[J]. *Molecules*, 2014, 19(10): 16588–16608.
- Gibb EA, Brown CJ, Lam WL. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas[J]. *Mol Cancer*, 2011, 10(1): 38–54.
- Johnsson P, Lipovich L, Grander D, et al. Evolutionary conservation of long non-coding RNAs: sequence, structure, function[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(3): 1063–1071.
- Sun M, Jin FY, Xia R, et al. Decreased expression of long non-coding RNA GAS5 indicates a poor prognosis and promotes cell proliferation in gastric cancer [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 319.
- Pickard MR, Williams GT. Regulation of apoptosis by long non-coding RNA GAS5 in breast cancer cells: implications for chemotherapy[J]. *Breast Cancer Res Tr*, 2014, 145(2): 359–370.
- Yacubusman K, Pickard MR, Williams GT. Reciprocal regulation of GAS5 lncRNA levels and mTOR inhibitor action in prostate cancer cells[J]. *Prostate*, 2015, 75(7): 693–705.
- GaetanoBacci MD, Alessandra LMD, Michela VMA, et al. Prognostic factors for osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy [J]. *Cancer*, 2010, 106(5): 1154–1161.
- Marina NM, Pratt CB, Rao BN, et al. Improved prognosis of children with osteosarcoma metastatic to the lung (s) at the time of diagnosis[J]. *Cancer*, 2015, 70(11): 2722–2727.
- Li JP, Liu LH, Li J, et al. Microarray expression profile of long noncoding RNAs in human osteosarcoma [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2013, 433(2): 200–206.
- Schmitt AM, Chang HY. Long non-coding RNAs in cancer pathways[J]. *Cancer Cell*, 2016, 29(4): 452–463.
- Chang L, Li C, Lan T, et al. Decreased expression of long non-coding RNA GAS5 indicates a poor prognosis and promotes cell proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma by regulating vimentin[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(2): 1541–1550.
- 陆熊熊. 长链非编码 RNA Gas5 在胰腺导管腺癌中的表达及其调控机理研究[D]. 上海交通大学, 2014.
- Ye K, Wang S, Zhang H, et al. Long noncoding RNA GAS5 suppresses cell growth and epithelial-mesenchymal transition in osteosarcoma by regulating the miR-221/ARHI pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(12): 4772–4781.
- Wang Y, Kong D. LncRNA GAS5 represses osteosarcoma cells growth and metastasis via sponging miR-203a[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(2): 844–855.
- Yang G, Lu X, Yuan L. LncRNA: a link between RNA and cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1839(11): 1097–1109.
- Zhao X, Wang P, Liu J, et al. Gas5 exerts tumor-suppressive functions in human glioma cells by targeting miR-222 [J]. *Mol Ther*, 2015, 23(12): 1899–1911.
- Guo C, Song WQ, Sun P, et al. LncRNA-GAS5 induces PTEN expression through inhibiting miR-103 in endometrial cancer cells[J]. *J Biomed Sci*, 2015, 22(1): 100–108.
- 唐波. 血清外泌体中 miR-221 与胃癌卵巢转移的相关性研究 [D]. 南华大学, 2016.
- Nassirpour R, Mehta PP, Baxi SM, et al. miR-221 promotes tumorigenesis in human triple negative breast cancer cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62170.
- Yang Y, Zhao X, Li HX. MiR-221 and miR-222 simultaneously target ARID1A and enhance proliferation and invasion of cervical cancer cells[J]. *Eur Rev Med Pharmacol*, 2016, 20(8): 1509–1515.
- Liu YJ, Li W, Chang F, et al. MicroRNA-505 is downregulated in human osteosarcoma and regulates cell proliferation, migration and invasion[J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(2): 491–500.
- Zhu M, Zhang N, He S, et al. MicroRNA-106a targets TIMP2 to regulate invasion and metastasis of gastric cancer [J]. *Febs Letters*, 2014, 588(4): 600–607.
- Kawamata H, Kawai K, Kameyama S, et al. Over-expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP1 and TIMP2) suppresses extravasation of pulmonary metastasis of a rat bladder carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 1995, 63(5): 680–687.
- Sounni NE, Rozanov DV, Remacle AG, et al. Timp-2 binding with cellular MT1-MMP stimulates invasion-promoting MEK/ERK signaling in cancer cells[J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(5): 1067–1078.

(收稿日期:2018-12-20 末次修回日期:2019-04-25)

(英文编审 孙浩林/谭 啸)

(本文编辑 李伟霞)