

miR-335靶向Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶1抑制人骨肉瘤细胞MG-63侵袭转移的实验研究

王勇¹ 王科峰² 赵伟¹

1. 沈阳医学院附属中心医院骨四科, 辽宁 沈阳 110024 ;
2. 中国医科大学附属盛京医院泌尿外一科, 辽宁 沈阳 110004

[摘要] 背景与目的: 微小RNA(microRNA, miRNA)是一类小分子内源性RNA, 主要在转录后水平调节靶基因的表达。microRNA-335(miR-335)作为一种肿瘤抑制因子, 参与了多种人类肿瘤的发生、发展过程。本研究旨在探讨miR-335是否靶向抑制Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶1(Rho associated coiled-coil forming protein kinase, ROCK1)基因的表达, 并以此调控人骨肉瘤细胞MG-63侵袭及转移。**方法:** 理论预测并通过荧光素酶基因报告验证miR-335与ROCK1基因的3'-非翻译区(untranslated region, UTR)的特异性结合作用; real-time PCR和蛋白质印迹法(Western blot)分别从基因和蛋白水平检测miR-335对ROCK1表达的负性调控作用; Transwell小室法检测miR-335过表达及下调ROCK1表达后MG-63侵袭及转移能力的变化。**结果:** Targetscan预测显示, miR-335与ROCK1 3'-UTR存在结合位点。荧光素酶基因报告实验结果显示, miR-335 mimic和ROCK1 3'-UTR能够靶向结合; miR-335在MG-63细胞中低表达, ROCK1则呈高表达。Western blot检测结果显示, 转染miR-335 mimic或转染ROCK1 siRNA后ROCK1的蛋白表达减少。Transwell小室法检测结果显示, 过表达miR-335或下调ROCK1后穿过基膜的细胞数目明显下降。**结论:** miR-335能特异性结合于ROCK1基因的3'-UTR并下调ROCK1的表达, 抑制人骨肉瘤细胞MG-63侵袭转移。

[关键词] 微小RNA-335; Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶1; 人骨肉瘤细胞MG-63; 侵袭及转移

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.11.001

中图分类号: R738.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2014)11-0801-07

miR-335 inhibits migration and invasion of human osteosarcoma cell line MG-63 by targeting ROCK1 WANG Yong¹, WANG Ke-feng², ZHAO Wei¹ (1. The 4th Department of Orthopaedics, the Central Hospital Affiliated to Shenyang Medical College, Shenyang Liaoning 110024, China; 2. The 1st Department of Urinary Surgery, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang Liaoning 110004, China)

Correspondence to: ZHAO Wei E-mail: zhaowei3332@163.com

[Abstract] **Background and purpose:** MicroRNAs are endogenous small RNAs and involved in target gene regulation in post-transcription level. As a tumor suppressor, microRNA-335 (miR-335) was participated in the occurrence and progression in many types of human tumors. This study aimed at investigating whether miR-335 can regulate cell migration and invasion by negative targeting Rho associated coiled-coil forming protein kinase (ROCK1) in human osteosarcoma cell line MG-63. **Methods:** The specific binding ability of miR-335 to ROCK1 3'-untranslated region (UTR) was theoretically predicted and detected by the luciferase reporter gene assay. Western blot and real-time PCR were used to evaluate the effect of miR-335 on the expression of ROCK1 at protein and mRNA levels. Cell migration and invasion assays were performed by transwell chambers in MG-63 cells intervened by over-expression of miR-335 and knockdown of ROCK1. **Results:** Luciferase reporter gene assay showed that miR-335 could target ROCK1 3'-UTR. Lower miR-335 but higher ROCK1 was expressed in MG-63 cells. The results of Western blot showed that ROCK1 protein expression was decreased by transfection of miR-335 mimic or siROCK1. Transwell

chambers results showed decreased cells invading through the substrate membrane after over-expression of miR-335 or knockdown of *ROCK1* gene. **Conclusion:** miR-335 inhibits the migration and invasion ability of MG-63 human osteosarcoma cell line, which may through targeting ROCK1 3'-UTR and subsequent down-regulating ROCK1 expression.

[**Key words**] miR-335; Rho associated coiled-coil forming protein kinase; MG-63; Migration and Invasion

骨肉瘤是好发于青少年长骨干骺端的恶性肿瘤, 其来源为间叶组织, 生物学特性表现为生长迅速, 极具侵袭性, 多数患者很早即发生肺部或其他部位的转移, 预后极差, 远期生存率为55%~68%^[1], 且致残率较高。

微小RNA(microRNA, miRNA)是近年来在真核生物中发现的长度为22~25nt的内源性短链非编码RNA, 其表达具有明显的细胞和组织特异性。目前研究表明, miRNA参与多种肿瘤发生、发展等病理过程, 并起抑癌或癌基因的作用^[2-4]。miRNA通过5'-种子区与目标mRNA的3'-非翻译区(untranslated region, UTR)的碱基互补配对结合从而抑制其翻译或促进其降解, 从而在转录后水平上抑制靶基因的表达。吴德明等^[5]研究发现miR-96在骨肉瘤中高表达, 抑制其表达可抑制骨肉瘤细胞增殖; 范磊等^[6]报道miR-145可作为抑癌基因诱导骨肉瘤细胞凋亡, 抑制骨肉瘤细胞增殖。Hu等^[8]应用组织芯片技术发现microRNA-335(miR-335)在骨肉瘤细胞系中呈低表达, 提示miR-335可能参与并调控骨肉瘤的发生、发展过程。

Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶1(rho associated coiled-coil forming protein kinase, ROCK1)是Rho家族的一个主要效应分子。目前的研究认为, ROCK1高表达与肿瘤低分化、淋巴转移和短生存期相关, 多数学者认为Rho/ROCK途径可能参与了肿瘤细胞局部浸润和淋巴结转移的过程^[9-10]。本研究拟通过上调miR-335后观察其对*ROCK1*基因表达及对人骨肉瘤细胞MG-63侵袭转移能力的影响, 阐明其对*ROCK1*基因负性靶向调控作用。

1 材料和方法

1.1 材料

人骨肉瘤细胞系MG-63、人成骨细胞系hFOB1.19购自中国科学院上海生命科学

研究院生物化学与细胞生物学研究所细胞库; 质粒提取试剂盒、RNA提取试剂盒、Reverse Transcription试剂盒、PCR试剂盒及Lipofectamine™2000转染试剂盒购自美国Invitrogen公司; Transwell小室购自美国Corning公司; ROCK1兔源单克隆抗体购自美国Cell signaling公司; pGL3购自美国Promega公司; miR-335mimic及mimic control购自广州锐博生物科技有限公司; ROCK1 siRNA购自美国Santa Cruz公司; ROCK1@pMIR-Report-Luc Wt及ROCK1@pMIR-Report-Luc Mut质粒购自广州锐博生物科技有限公司; 引物由生工生物工程(上海)有限公司合成; HF90 CO₂培养箱购自美国Biometra公司, CR21G II高速低温冷冻离心机购自日本Sanyo公司; Biospectrum AC凝胶成像系统购自美国BIO-RAD公司; MX3000P Real-time PCR扩增仪购自美国BIO-RAD公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组

hFOB1.19细胞在含10%胎牛血清的DMEM/F12培养液中, MG-63细胞在含10%胎牛血清的DMEM培养液中, 均置于37℃、CO₂体积分数为5%、饱和湿度的温箱中培养。取对数生长期的MG-63细胞用胰蛋白酶消化, 制成细胞悬液, 调整细胞计数后随机分为4组: ①空白对照组, 未做任何处理; ②阴性对照组, 转染mimic control; ③实验组, 转染miR-335 mimic; ④siROCK1组, 转染ROCK1 siRNA, 相同条件下重复3次以上。

1.2.2 脂质体介导的细胞转染

取分组培养的各细胞, 调整细胞密度为 2×10^5 个细胞/孔并接种于6孔板中, 24 h后利用Lipofectamine™2000转染50 nmol/L ROCK1 siRNA和50 nmol/L miR-335mimic及相应的mimic control。48 h后收集细胞总RNA和总蛋白并进行后续实验。

1.2.3 双荧光素酶报告基因验证miR-335与ROCK1的靶向结合作用

利用Tagetscan生物信息学软件初步预测miR-335与ROCK1 mRNA 3'-UTR区的靶向结合作用；将MG-63细胞调整密度后接种于24孔板中，应用Lipofectamine™ 2000将ROCK1@pMIR-Report-Luc Wt及ROCK1@pMIR-Report-Luc Mut与miR-335 mimic共转染，同步设置pMIR-Report-Luc和miR-335 mimic共转染组为对照。转染时，质粒各转0.1 μg/孔，miRNA各转20 nmol/L，转染后48 h，利用双荧光素酶报告基因检测法检测，具体操作见说明书，活性采用萤火虫荧光素酶及海肾Renilla荧光素酶比值来

表示，实验重复3次。

1.2.4 Real-time PCR检测各组细胞中miR-335及ROCK1 mRNA的表达

参照TRIzol试剂盒说明书提取培养的hFOB1.19细胞及分组转染的各组细胞总RNA并标记。按照Invitrogen的试剂盒说明书进行逆转录反应，反应产物行PCR扩增，PCR过程按Invitrogen的SYBR Green实时荧光定量PCR试剂盒说明书在荧光定量仪上进行，miR-335及ROCK1的内参照分别为U6和β-actin，引物序列见表1。以miR-335与U6拷贝数的比值为miR-335的相对表达量，ROCK1与β-actin拷贝数的比值为ROCK1的相对表达量。

表1 β-actin, ROCK1, U6 和 miR-335的引物序列表

Tab. 1 Primer sequence for β-actin, ROCK1, U6 and miR-335

Gene name	Primer	Sequence(5'-3')
β-actin	PCR primer	Forward:AGTGTGACGTGGACATCCGCAAAG
		Reverse:ATCCACATCTG CTGGA AGGTGGAC
ROCK1	PCR primer	Forward:AGGAAGGCGGACATATTAGTCCCT
		Reverse:AGACGATAGTTGGGTCCCG GC
U6	PCR primer	Forward:CTCGCTTCGGCAGCACA
		Reverse:AACGCTTCACGAATTTGCGT
miR-335	RT primer	Reverse:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCG
		Forward:AGGTATTCCGACTGGATACGACA
	PCR primer	Reverse:AGCCGTCAAGAGCAATAACGAA Forward:GTGCAGGTCCGAGGT

1.2.5 蛋白质印迹法(Western blot)检测miR-335过表达及转染ROCK1 siRNA后ROCK1蛋白水平的变化

分别提取空白对照组、实验组及siROCK1组3组细胞总蛋白，BCA试剂盒测定各组蛋白浓度，各取200 μL样品进行SDS-PAGE凝胶电泳，转膜，封闭1 h后，依次行I抗(兔抗人ROCK1和兔抗人β-actin)、II抗(HRP标记的羊抗兔II抗)杂交，最后按ECL试剂盒说明书行电化学发光检测。

1.2.6 Transwell实验检测miR-335过表达及转染ROCK1 siRNA后细胞侵袭及转移

1.2.6.1 迁移实验

将不同转染组细胞加入无血清培养基同步化12 h，调整细胞计数为 1×10^5 个细胞/孔并接种于加入100 μL含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基的Transwell小室的上室中；下室内加入500 μL的含20%胎牛血清的RPMI-1640培养基

并于37 °C、CO₂体积分数为5%的条件下温育。48 h后取出Transwell小室，用棉签擦去Transwell小室内细胞，PBS冲洗，95%乙醇固定，0.1%结晶紫染色，于倒置显微镜下观察迁移至多聚碳酸滤膜背面的细胞并计数，每个细胞株铺6个Transwell小室，每个小室计数6个高倍镜视野，计算平均值作为这个小室的迁移细胞数。每株细胞各得到6个迁移细胞数并计算其 $\bar{x} \pm s$ 。

1.2.6.2 侵袭实验

用50 mg/L Matrigel 1:8稀释液包被Transwell小室底部膜的上室面，4 °C风干，其余步骤同迁移实验。

1.3 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件储存和分析数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两个独立样本均数比较呈正态分布的采用t检验，非正态分布的采用非参数Mann-Whitney检验。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 人成骨细胞系hFOB1.19和骨肉瘤细胞系MG-63中miR-335和ROCK1的差异表达

Real-time PCR及Western blot检测结果显示, 与正常成骨细胞系hFOB1.19相比, 人骨肉瘤细胞系MG-63中miR-335 mRNA表达明显降低($P<0.05$), ROCK1 mRNA及蛋白表达明显增加($P<0.05$, 图1)。

2.2 miR-335 mimic上调人骨肉瘤细胞系MG-63中miR-335 mRNA的表达并下调ROCK1蛋白表达, ROCK1 siRNA下调ROCK1表达

Real-time PCR检测结果显示, 与阴性对照组相比, 实验组的mRNA表达明显增加(图2A); ROCK1 mRNA表达变化不明显($P>0.05$, 图2B), 而蛋白表达水平明显下降($P<0.05$, 图2C); Real-time PCR及Western blot检测结果显示转染ROCK1 siRNA后, ROCK1 mRNA及蛋白质表达水平明显下调(图2D)。

2.3 miR-335可靶向作用ROCK1 3' -UTR

经Targetscan预测软件分析, 本研究发现ROCK1基因转录产物的3'-UTR与miR-335存在7个碱基互补区(图3A)。图3B显示的为我们拟构建的野生型和突变型荧光素酶报告载体示意图。荧光素酶报告基因检测结果显示, 经pGL3 3'-UTR和miR-335 mimic共转染的MG-63细胞的荧光素酶活性较阴性对照组有所下降($P<0.05$); 同时, ROCK1 3'-UTR与miR-335结合的位点突变后, 并进行转染, 可以看到突变后荧光素酶活性明显升高, 即抑制了miR-335与ROCK1 3'-UTR的结合(图3C)。

2.4 转染miR-335 mimic或转染ROCK1 siRNA后MG-63侵袭及转移能力下降

Transwell法检测结果显示, 与对照组相比, 实验组细胞侵袭性和迁移能力均下降($P<0.05$, 图4A、4C); 与上调miR-335表达结果类似, 通过转染ROCK1 siRNA下调ROCK1表达后, MG-63侵袭及转移能力明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图4B、4D)。

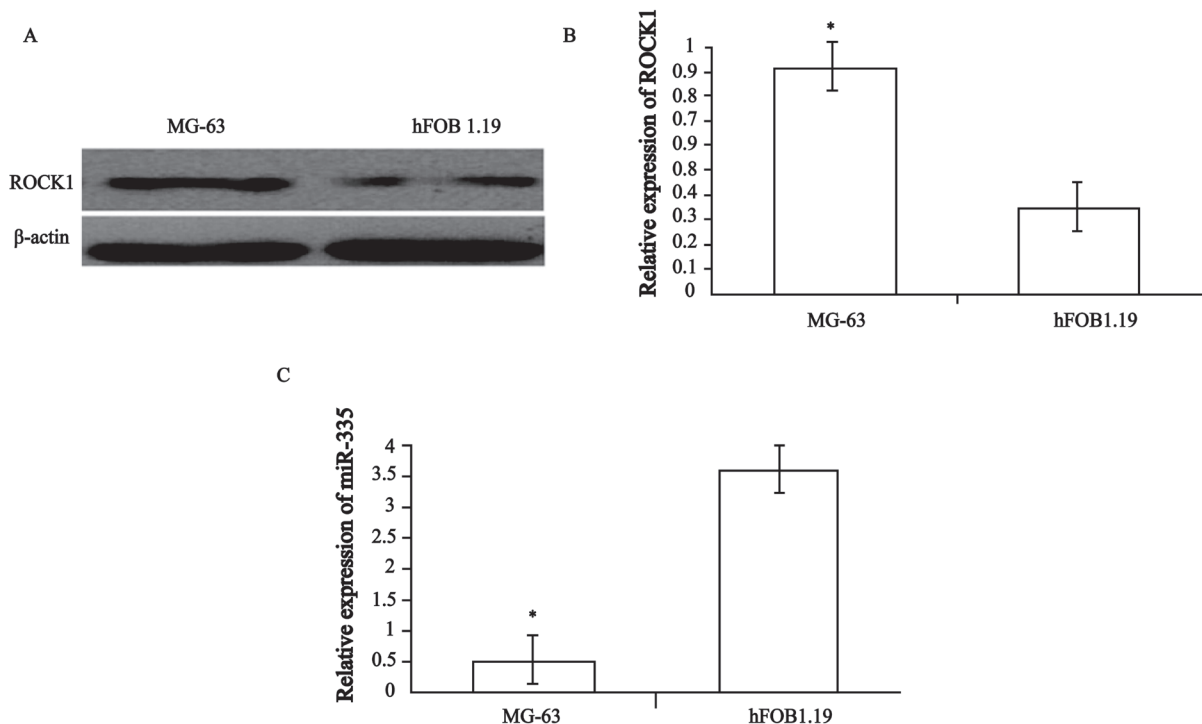


图1 人成骨细胞系hFOB1.19和骨肉瘤细胞系MG-63中miR-335和ROCK1的差异表达

Fig. 1 The different expression levels of miR-335 and ROCK1 in hFOB1.19 and MG-63

A: The different ROCK1 protein expression level in MG-63 and hFOB1.19 detected by Western blot; B, C: The different miR-335 and ROCK1 mRNA expression in MG-63 qualified by real-time PCR. *: $P<0.05$ vs hFOB1.19.

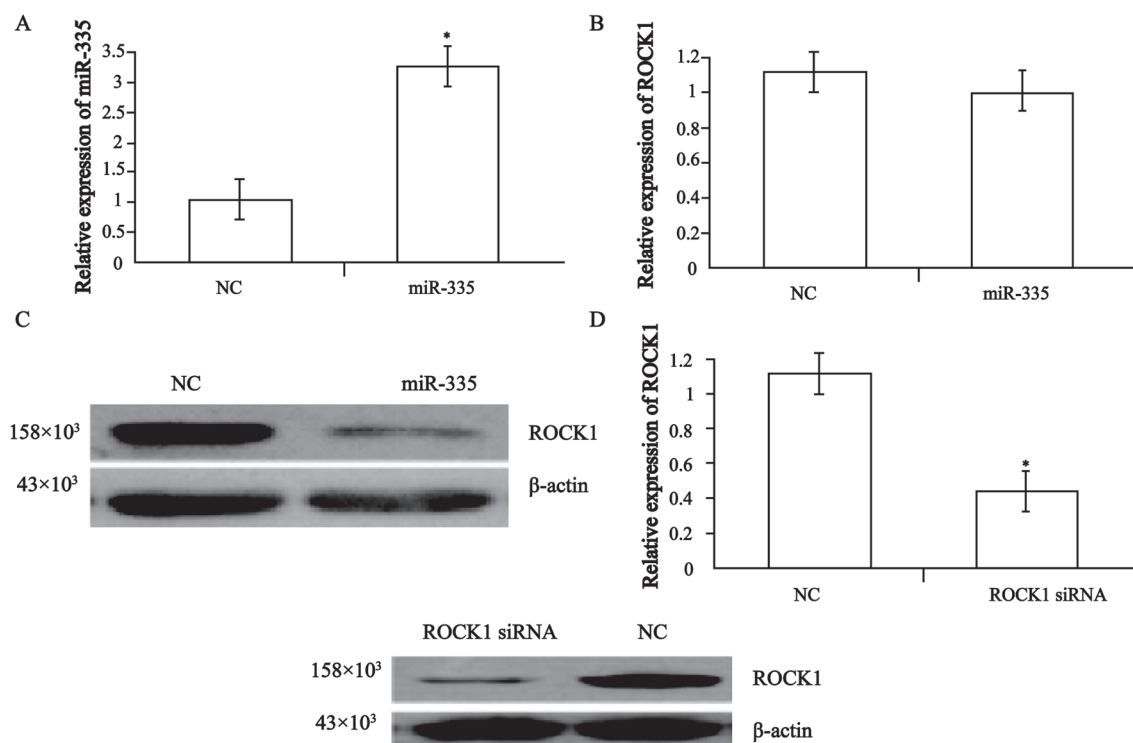


图2 Real-time PCR及Western blot分别检测转染miR-335 mimic及ROCK1 siRNA前后miR-335及ROCK1的表达变化

Fig. 2 The expression changes of miR-335 and ROCK1 in MG-63 quantified by real-time PCR and Western blot

MG-63 was transfected with miR-335 mimic and ROCK1 siRNA respectively for 48 h. A, B: Expression of miR-335 and ROCK1 mRNA after transfection with miR-335 mimic detected by real-time PCR; C: Expression of ROCK1 protein intervened by miR-335 mimic was measured by Western blot; D: Expressions of ROCK1 mRNA and protein were measured by real-time PCR and Western blot after transfected with ROCK1 siRNA. $\bar{x} \pm s, n=3$. *: $P < 0.05$ vs NC group.

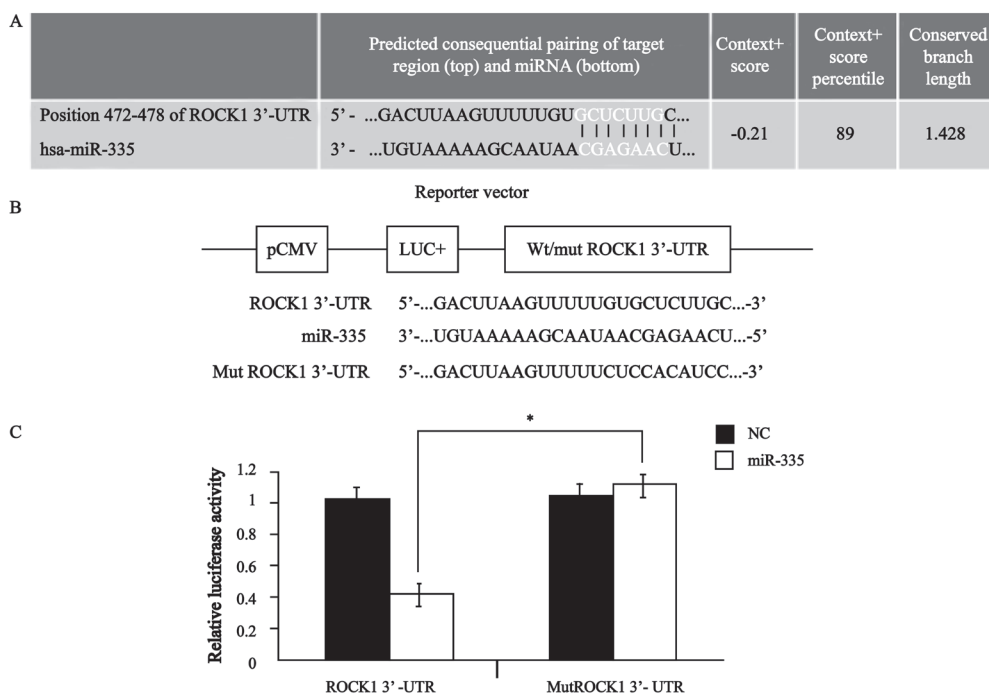


图3 荧光素酶报告基因实验检测miR-335与ROCK1 3'-UTR结合

Fig. 3 miR-335 binds to the 3'-UTR of ROCK1 mRNA tested by luciferase activity assay

A: ROCK1 was the target gene of miR-335 by targetscan prediction; B: Diagram of the luciferase reporter plasmids with the wild-type or mutant ROCK1 3'-UTR; C: The relative luciferase activity in MG-63 was determined after the plasmid with wild-type or mutant ROCK1 3'-UTR was co-transfected with miR-335 mimics. *: $P < 0.05$.

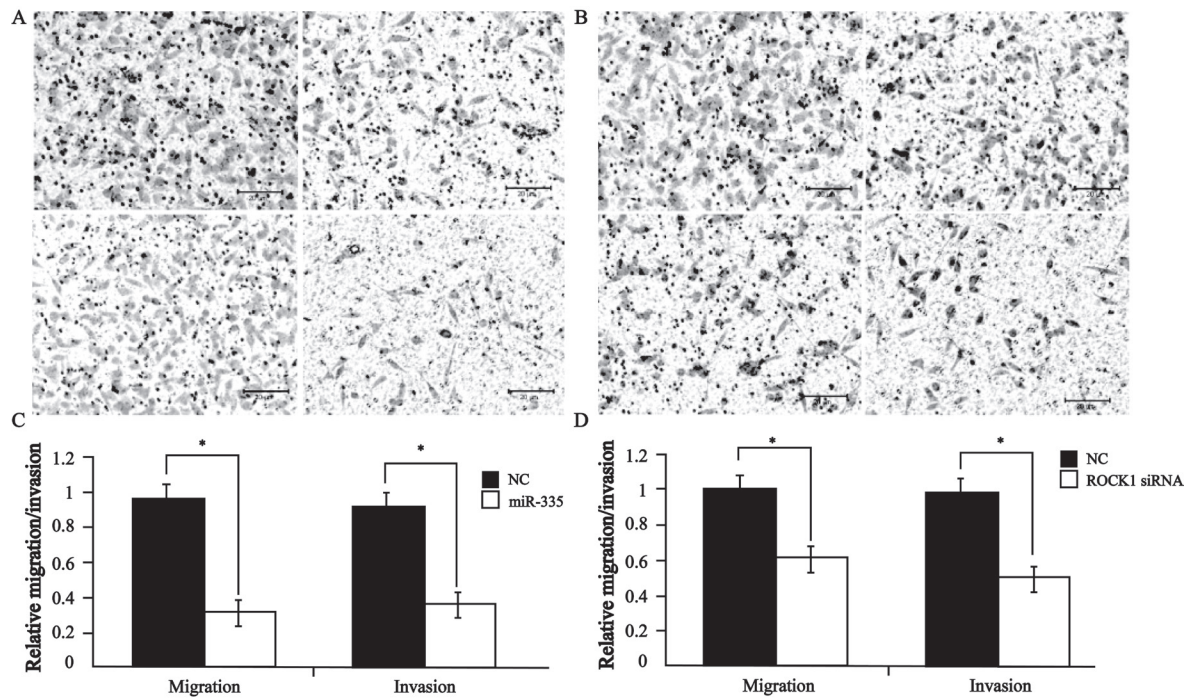


图4 分别转染miR-335 mimic及ROCK1 siRNA后MG-63细胞侵袭及转移能力均下降

Fig. 4 The migration and invasion ability was decreased by transfection of miR-335 mimic and ROCK1 siRNA in MG-63 cells

(Crystal violet staining assay, $\times 200$)
A, C: The change of migration (left) and invasion ability (right) of MG-63 cells was detected by transwell chambers after transfection of miR-335 mimics; B, D: The migration (left) and invasion (right) ability was also reduced after silence of ROCK1. *: $P < 0.05$.

3 讨论

在原发性骨肿瘤中, 骨肉瘤的发病率仅次于浆细胞骨髓瘤, 居第2位, 好发于10~25岁青年, 男女患者比例约为1.5:1。骨肉瘤的恶性程度很高, 生长非常迅速, 转移早, 侵袭性强, 在临床上确诊时已有80%左右的患者发生了肺部或其他部位的转移。目前, 骨肉瘤的治疗仍是主要针对于肿瘤整体, 通过辅助化疗和手术, 虽可切除或杀灭大多数骨肉瘤的肿瘤细胞, 但仍很难阻止骨肉瘤的复发和转移。

miRNA广泛存在于真核细胞生物中, 是一类在进化上高度保守的非编码小分子单链RNA。miRNA可以通过碱基互补配对的方式识别靶基因mRNA, 使其直接降解或翻译抑制, 从而达到基因转录后调控的作用^[11-12]。目前发现miRNA的表达与多种肿瘤相关, miRNA参与多种肿瘤的发生及转移过程^[13-16]。在肿瘤的发

生、发展及转移过程中, 这些miRNA可能起到抑癌基因或癌基因的作用^[17]。

表达miR-335的基因定位于人染色体第7q32.2区, 目前的研究发现, miR-335在不同的肿瘤中发挥着不同的作用。miR-335在乳腺癌、胃癌中低表达, 过表达后抑制肿瘤侵袭转移^[18-19], 发挥类似于抑癌基因的功能, 而在星形细胞瘤中高表达能促进肿瘤细胞增殖侵袭, 发挥癌基因的作用。本研究结果发现, 在人骨肉瘤细胞系MG-63中miR-335呈低表达, 通过细胞转染的方式将miR-335 mimic转染入骨肉瘤细胞系MG-63中从而上调miR-335的表达; 进一步通过Transwell侵袭转移实验证实, miR-335表达上调后, MG-63细胞侵袭及转移能力下降, 表明miR-335可抑制骨肉瘤细胞的侵袭及转移。

本研究结果发现, 人骨肉瘤细胞系MG-63中ROCK1蛋白高表达, 通过转染miR-335 mimic上调骨肉瘤细胞系MG-63中miR-335后,

ROCK1蛋白表达水平降低而ROCK1 mRNA表达水平变化不明显,提示miR-335可负性调控ROCK1的表达,而这种调控作用应位于转录后水平。同时,本研究利用Targetsan预测发现ROCK1 3'-UTR区存在与miR-335结合的位点,因此进一步进行了荧光素酶报告基因实验,结果证实miR-335可靶向作用于ROCK1 3'-UTR区。通过RNAi的方式下调ROCK1表达后,再次通过Transwell侵袭转移实验检测MG-63细胞侵袭转移能力的改变,结果显示,与过表达miR-335的结果类似,当沉默了ROCK1表达后,骨肉瘤细胞MG-63的侵袭及转移能力较对照组明显降低。以上研究结果提示,miR-335在骨肉瘤中低表达,而与肿瘤转移相关的ROCK1基因在骨肉瘤中则呈高表达;当上调miR-335表达后可在转录后水平抑制ROCK1表达。细胞学水平实验结果提示与RNAi的方式下调ROCK1表达结果相似,上调miR-335后可明显抑制骨肉瘤细胞MG-63的侵袭及转移;结合Luciferase的实验结果,我们可得出以下结论:miR-335可通过靶向作用于ROCK1 3'-UTR区,抑制ROCK1的表达,进而抑制骨肉瘤细胞系MG-63的侵袭及转移。

综上所述,miR-335能够与ROCK1 3'-UTR区靶结合并抑制ROCK1的表达,进而抑制骨肉瘤细胞的侵袭及转移,提示miR-335在骨肉瘤的迁移及远处转移过程中发挥了重要作用,有可能成为骨肉瘤治疗的靶基因。

[参 考 文 献]

- [1] OTTAVIANI Q, JAFLFE N. The epidemiology of osteosarcoma [J]. *Cancer Treat Res*, 2009, 152: 3-13.
- [2] ECKSTEIN F. Small non-coding RNAs as magic bullets [J]. *Trends Biochem Sci*, 2005, 30(8): 445-452.
- [3] WU W, SUN M, ZOU G M, et al. MicroRNA and cancer: Current status and prospective [J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(5): 953-960.
- [4] PETRI A, LINDOW M, KAUPPINEN S. MicroRNA silencing in primates: towards development of novel therapeutics [J].

- Cancer Res*, 2009, 69(2): 393-395.
- [5] 吴德明, 刘翔, 江川, 等. 骨肉瘤miR-96的表达与细胞增殖和凋亡 [J]. *中国癌症杂志*, 2013, 23(4): 285-291.
- [6] 范磊, 邵增务, 吴强, 等. MicroRNA-145对骨肉瘤细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *中国癌症杂志*, 2012, 22(4): 247-251.
- [7] MAIRE G, MARTIN J W, YOSHIMOTO M, et al. Analysis of miRNA-gene expression-genomic profiles reveals complex mechanisms of microRNA deregulation in osteosarcoma [J]. *Cancer Genet*, 2011, 204(3): 138-146.
- [8] HU H, ZHANG Y, CAI X H, et al. Changes in microRNA expression in the MG-63 osteosarcoma cell line compared with osteoblasts [J]. *Oncol Lett*, 2012, 4(5): 1037-1042.
- [9] NAKAJIMA M, HAYASHI K, EGI Y. Effect of Wf-536, an novel ROCK inhibitor, against metastasis of B16 melanoma [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2003, 52(4): 319-324.
- [10] ZHENG R, IWASE A, SHEN R. Neuropeptide-stimulated cell migration in prostate cancer cells is mediated by RhoA kinase signaling and inhibited by neutral endopeptidase [J]. *Oncogene*, 2006, 25(44): 5942-595.
- [11] AMBROS V. microRNAs: tiny regulators with great potential [J]. *Cell*, 2001, 107(7): 823-826.
- [12] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [13] LEIDINGER P, KELLER A, MEESE E. MicroRNAs—important molecules in lung cancer research [J]. *Front Genet*, 2012, 2: 104.
- [14] WEINSTEIN J N. MicroRNAs in cancer pharmacology and therapeutics: exploiting a natural synergy between ‘-omic’ and hypothesis-driven research [J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 10(11): 20-21.
- [15] CHO W C. MicroRNAs in cancer—from research to therapy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1805(2): 209-217.
- [16] HAMPTON T. MicroRNAs move into cancer research [J]. *JAMA*, 2005, 294 (4): 411-412.
- [17] NEGRINI M, FERRACIN M, SABBIONI S, et al. MicroRNAs in human cancer: from research to therapy [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt11):1833-1840.
- [18] TAVAZOIE S F, ALARCON C, OSKARSSON T. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis [J]. *Nature*, 2008, 451(7175): 147-152.
- [19] XU Y, ZHAO F, WANG Z. MicroRNA-335 acts as a metastasis suppressor in gastric cancer by targeting Bcl-w and specificity protein 1 [J]. *Oncogene*, 2012, 31(11):1398-1407.

(收稿日期: 2014-06-06 修回日期: 2014-10-20)