

引用本文: 韦杰合, 韦仁杰, 周业修. 微小218-5p调控Wnt家族成员2B抑制骨肉瘤细胞143B的增殖、迁移和侵袭[J]. 安徽医药, 2021, 25(1): 13-16. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2021.01.004.

◇ 药学研究 ◇



## 微小218-5p调控Wnt家族成员2B抑制骨肉瘤细胞143B的增殖、迁移和侵袭

韦杰合, 韦仁杰, 周业修

作者单位: 河池市人民医院创伤骨科, 广西 河池 547000

**摘要:** 目的 探讨微小RNA-218-5p (miR-218-5p)对骨肉瘤细胞增殖, 侵袭和迁移能力的影响及其作用机制。方法 2016年1月至2019年1月, 实时荧光定量PCR检测miR-218-5p在骨肉瘤与正常骨组织及正常成骨细胞株与骨肉瘤细胞株的表达差异。应用CCK-8法检测过表达miR-218-5p对人骨肉瘤细胞株143B增殖的影响; 细胞划痕实验检测和Transwell小室实验检测过表达miR-218-5p对骨肉瘤细胞143B迁移能力的影响。同时, 应用在线miRNA靶基因预测软件预测miR-218-5p的靶基因, 并应用荧光素酶报告实验进行结合位点验证。蛋白质印迹法验证靶基因的蛋白表达水平。结果 miR-218-5p在骨肉瘤组织中的表达水平(0.59±0.21)%明显低于正常骨组织, 骨肉瘤细胞系中的表达水平(0.712±0.015)%、(0.685±0.016)%、(0.542±0.021)%、(0.524±0.011)%明显低于正常成骨细胞,  $P < 0.05$ 。同时, 与对照组相比, 过表达miR-218-5p (miR-218-5p mimic)的骨肉瘤细胞143B的细胞活力 $t_{6h}$ (0.274±0.011),  $t_{24h}$ (0.514±0.04),  $t_{48h}$ (0.828±0.16),  $t_{72h}$ (1.212±0.013), 侵袭(164±12)个和迁移距离(26±2.4)%明显减弱,  $P < 0.05$ 。应用TargetScan网站进行预测, 结果显示Wnt家族成员2B(WNT2B)为miR-218-5p的潜在靶基因之一; 荧光素酶报告实验结果表明miR-218-5p直接靶向WNT2B; 蛋白质印迹法证实miR-218-5p过表达组细胞中WNT2B蛋白的表达水平较对照组明显减少。结论 miR-218-5p在人骨肉瘤组织和癌细胞中低表达, 其可能通过靶向WNT2B抑制骨肉瘤细胞143B的增殖、迁移和侵袭。

**关键词:** 骨肉瘤; 微小RNA-218-5p; Wnt蛋白质类s; 增殖; 侵袭

## MiR-218-5p inhibits the proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells 143B via regulating Wnt family member 2B

WEI Jiehe, WEI Renjie, ZHOU Yexiu

Author Affiliation: Department of Orthopedics Trauma, Hechi People's Hospital, Hechi, Guangxi 547000, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of miR-218-5p on proliferation, invasion and migration of osteosarcoma cells and its mechanism. **Methods** From January 2016 to January 2019, the expression differences of miR-218-5p in osteosarcoma and normal bone tissue and normal osteoblasts cell lines and osteosarcoma cell lines were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. While the effect of miR-218-5p overexpression in osteosarcoma cells 143B were investigated using CCK-8. The effects of miR-218-5p overexpression on osteosarcoma cells 143B migration and invasion was tested using wound healing assay and transwell assay. Meanwhile, the target genes of miR-218-5p were predicted by online miRNA target gene prediction software, and the binding sites were verified by luciferase reporting experiment. **Results** The expression level of miR-218-5p in osteosarcoma tissues (0.59±0.21)% was significantly lower than that in adjacent tissues, and the expression level in osteosarcoma cell lines (0.712±0.015)%, (0.685±0.016)%, (0.542±0.021)%, (0.524±0.011)% was significantly lower than that in normal osteoblast cells ( $P < 0.05$ ). Meanwhile, compared with the control group, 143B cells of osteosarcoma cells overexpressing miR-218-5p mimic showed significantly reduced cell activity  $t_{6h}$  (0.274±0.011),  $t_{24h}$  (0.514±0.04),  $t_{48h}$  (0.828±0.16),  $t_{72h}$  (1.212±0.013), invasion (164±12), and migration distance (26±2.4)%,  $P < 0.05$ . TargetScan was used for prediction, and the results showed that Wnt family member 2B (WNT2B) was one of the potential target genes of miR-218-5p. Luciferase reporting results showed that miR-218-5p directly targeted WNT2B. Western blot confirmed that the expression level of WNT2B protein in the miR-218-5p overexpression group was significantly lower than that in the control group. **Conclusion** miR-218-5p is low expressed in human osteosarcoma tissues and cancer cells, miR-218-5p plays as suppressor in osteosarcoma, which inhibiting proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells 143B via targeting WNT2B.

**Key words:** Osteosarcoma; miR-218-5p; Wnt Proteins; Proliferation; Invasion

骨肉瘤是一种原发性骨恶性肿瘤,主要发生于儿童和青少年,占骨肿瘤的60%<sup>[1]</sup>。近十年来骨肉瘤的治疗策略有了很大的进展,包括手术切除、化疗或放疗,但骨肉瘤病人由于转移和复发程度高,疗效仍不理想<sup>[2-3]</sup>。

MicroRNA(miRNA)是一类非编码RNA,具有抑制靶基因表达的潜力,并在增殖、分化、转移等一系列细胞生物学过程中发挥关键作用<sup>[2-3]</sup>。各种研究表明,miRNA的失调是骨肉瘤发生的主要因素之一。Wang等<sup>[5]</sup>发现微小RNA-193a(miR-193a)参与了骨肉瘤细胞的耐药性,增加miR-193a的表达可以促进化疗敏感性。Liu等<sup>[6]</sup>证明微小RNA-377(miR-377)可能在骨肉瘤中作为抑癌miRNA发挥作用,诱导骨肉瘤细胞凋亡。此外,Wang等<sup>[7]</sup>发现,微小RNA-628-5p(miR-628-5p)通过降低干扰素诱导蛋白44样蛋白(IFI44L)的表达来增加骨肉瘤细胞的增殖和转移。然而,miRNA在骨肉瘤进展中的作用尚不清楚。因此,明确miRNAs的作用及相关分子机制有助于识别骨肉瘤诊断的新型生物标志物,并找到治疗的潜在靶点显得至关重要。

2016年1月至2019年1月,本研究分析了微小RNA-218-5p(miR-218-5p)在骨肉瘤中的生物学功能及其潜在机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验试剂** Matrigel基质胶购自美国BD公司,胎牛血清购于美国Gibco公司,RT试剂盒、PCR相关SYBRP、逆转录试剂盒均购自于日本Takara生物技术有限公司。兔抗人Wnt家族成员2B(WNT2B)单克隆抗体和鼠抗人三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司,实时荧光定量PCR(RT-q PCR)相关的miR-218-5p和GAPDH上游、下游引物设计及合成均由武汉天一辉远生物技术有限公司完成。

**1.2 骨肉瘤组织伦理** 骨肉瘤组织26例,邻近正常成骨细胞组织21例均选取于2016年1月至2019年1月于河池市人民医院住院手术治疗,标本均保存于液氮罐中,全部标本均经组织学鉴定。实验标本的获取均获得病人本人或其近亲属同意,本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

**1.3 细胞培养** 4个骨肉瘤细胞系(U2OS, SAOS2, MG63和143B)和正常成骨细胞(hFOB)购自中国科学院细胞库(上海)。细胞培养均采用含10%胎牛血清的高糖DMEM培养基。在5.0%二氧化碳、37℃的条件下培养,每48小时换液一次,细胞密度达到80%~90%后进行传代。状态良好的细胞用于

进一步实验。

**1.4 转染** miR-218-5p mimics(转染miR-218-5p模拟物),mimics NC(转染miR-218-5p模拟物阴性对照miR-NC)质粒由上海GenePharma(China)合成。对数期143B细胞经消化后复苏,培养至6孔板,细胞密度为 $1 \times 10^6$ 个/孔。培养18~24 h后,细胞融合率达到80%~90%,加入不含血清和抗生素的培养基。细胞转染采用Lipofectamine 2000(Life Technologies),连续孵育48 h。

**1.5 实时荧光定量PCR** 组织或细胞加入1 mL Trizol,裂解10 min。先后加入氯仿、异丙醇,12 000 rpm离心15 min后,弃去上清。沉淀经70%乙醇洗涤后,加入30 mL无酶水,测量RNA浓度。根据Takara逆转录试剂盒说明,进行逆转录。采用二步法PCR扩增程序上机操作,实验结果以GAPDH为内参,采用法进行分析。miR-218-5:正向引物TTGCG-GATGGTTCCTCAAGCA;反向引物GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT。GAPDH:正向引物ATCCAGTCAGGGTCCGAGG;反向引物GGCTGTTGT-CATACTTCTCATGG。

**1.6 CCK8** 骨肉瘤细胞以每孔1 000个铺入96孔板中,每组设置5个复孔。分别于6、24、48、72 h加入10  $\mu$ L CCK8检测试剂液。培养箱中继续培养2 h,在酶标仪450 nm处检测各孔的吸光度(OD)值,根据OD值描绘生存曲线。实验重复3次。

**1.7 小室实验**  $1 \times 10^4$ 个不同处理组的骨肉瘤细胞用无血清培养基稀释成200  $\mu$ L,接种于铺有magtrigel的上室中。下室加入10%胎牛血清DMEM培养基700  $\mu$ L,继续培养24 h后用多聚甲醛固定细胞30 min,结晶紫染色30 min。PBS洗净结晶紫染色后,显微镜下选取6个视野拍照并计数。

**1.8 划痕** 取对数生长期各组的骨肉瘤细胞,接种于6孔板继续培养细胞生长至90%以上。200  $\mu$ L tip枪头进行划痕,用PBS洗后换无血清培养基。于细胞划痕后0 h及48 h这两个时间点分别拍照,对比两时间点细胞迁移的距离。

**1.9 双荧光素酶报告基因测定** 为了验证miR-218-5p是否与WNT2B结合并调控其表达,进行了双荧光素酶报告基因实验。WNT2B的野生型(Wt)和突变型(Mut)3'-UTR被合成并亚克隆到psiCHECK-2荧光素酶报告载体(美国Promega Corporation),这两种突变体包含了miR-218-5p的可能结合位点。培养24 h后,143B细胞与Wt/Mut型WNT2B荧光素酶报告载体和miR-218-5p模拟物共转染及阴性对照。最后,使用双荧光素酶报告基因测定系统(美国Pro-

mega)测定荧光素酶活性。Lipo2000(美国 Invitrogen)用于瞬时转染的全过程。

**1.10 蛋白印记检测** 蛋白裂解液经牛血清白蛋白(BSA)定量后制样。样品经电泳、转膜至PVDF膜后,用含5%的脱脂奶粉封闭2h,分别加入一抗(鼠抗人WNT2B单克隆抗体和鼠抗人GAPDH单克隆抗体)4℃过夜。TBST洗涤3次后,再加羊抗鼠IgG后室温孵育2h,曝光。以目的条带与内参GAPDH的灰度值的比值为目的蛋白的表达量。

**1.11 统计学方法** 采用SPSS 17.0软件进行统计学分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同处理组间差异采用单因素方差分析,组间两两比较采用Dunnnett-t检验, $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 miR-218-5p在骨肉瘤临床样本及细胞系中的表达** 实时荧光定量PCR实验检测miR-218-5p在26例骨肉瘤组织与21例正常骨组织中的表达,结果显示miR-218-5p在骨肉瘤组织低表达( $t = 33.15$ ,  $P < 0.001$ )。与正常的成骨细胞hFOB相比,U2OS、SAOS2、MG63和143B在这4株骨肉瘤细胞中miR-218-5p的表达水平分别为(0.712±0.015)%、(0.685±0.016)%、(0.542±0.021)%、(0.524±0.011)%,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。骨肉瘤细胞143B中miR-218-5p表达水平最低,因此,选取143B细胞进行后续实验研究。

**2.2 miR-218-5p在体外抑制骨肉瘤细胞增殖** CCK-8实验测定miR-218-5p对骨肉瘤细胞增殖的影响,分别于6、24、48、72h时间点下测得吸光度值绘制细胞生长曲线。miR-NC组细胞培养6、24、48、72h后的OD值分别为 $t_{6h}$ (0.271±0.01), $t_{24h}$ (0.604±0.03), $t_{48h}$ (1.228±0.12), $t_{72h}$ (1.825±0.17),miR-218-5p组细胞培养6、24、48、72h后的OD值分别为 $t_{6h}$ (0.274±0.011), $t_{24h}$ (0.514±0.04), $t_{48h}$ (0.828±0.16), $t_{72h}$ (1.212±0.013),结果表明,过表达miR-218-5p抑制了骨肉瘤细胞143B的增殖( $P < 0.05$ )。

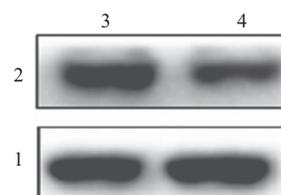
**2.3 miR-218-5p抑制骨肉瘤细胞143B的迁移能力** 细胞划痕实验检测miR-218-5p对肉瘤细胞143B的迁移能力的影响,骨肉瘤细胞143B转染miR-218-5p过表达质粒后,与对照组相比,过表达miR-218-5p骨肉瘤细胞143B的迁移距离明显变短( $t = 5.516$ ,  $P = 0.005$ ),差异有统计学意义,见图1。

**2.4 miR-1218-5p抑制骨肉瘤细胞143B细胞的侵袭能力** 侵袭实验显示:NC mimic组(376±14)个,过表达miR-1218-5p后(164±12)个。与对照组相比,过表达miR-1218-5p的骨肉瘤细胞143B侵袭数

目明显减少( $t = 6.702$ ,  $P = 0.001$ ),差异有统计学意义,见图2。

**2.5 WNT2B直接调控miR-218-5p** 首先,使用Targetscan在线工具,发现WNT2B在49-56的AAGCACAA能与miR-218-5p的3'UTR端的UUCGUGU核酸序列互补,WNT2B被预测为miR-218-5p的下游。进一步荧光素酶报告基因测定法验证这一假设。荧光素酶报告基因测定结果表明,在143B细胞中共转染miR-218-5p模拟物可以抑制包含WT WNT2B 3'-UTR序列的报告基因的荧光素酶活性( $t = 21.174$ ,  $P < 0.001$ );但是,未能抑制含有MUT WNT2B 3'-UTR的细胞( $t = 0.621$ ,  $P = 0.542$ )。

**2.6 miR-218-5p抑制WNT2B蛋白的表达水平** 蛋白质印迹法对预测结果进行验证,检测结果显示,过表达miR-218-5p细胞中WNT2B蛋白的表达水平较对照组明显下调( $t = 18.04$ ,  $P < 0.001$ ),结果表明WNT2B可能为miR-218-5p的靶基因,提示,miR-218-5p可能通过抑制WNT2B的表达,影响骨肉瘤细胞143B的增殖、迁移和侵袭。见图3。



注:1—单克隆抗体和鼠抗人三磷酸甘油醛脱氢酶;2—Wnt家族成员2B;3—转染miR-218-5p模拟物阴性对照miR-NC;4—转染miR-218-5p模拟物。

图3 miRNA-218-5p mimic处理后对骨肉瘤细胞143B中WNT2B表达水平的影响

## 3 讨论

miRNA长度为20~25个核苷酸,为一类内源性的非编码单链RNA,在真核细胞生物中广泛存在。越来越多的研究表明,miRNA与肿瘤的发生、发展等过程有着密切的关系。其中miR-218-5p在多种肿瘤组织中均发挥着癌基因或抑癌基因的作用,包括肺腺癌<sup>[8]</sup>、非小细胞肺癌<sup>[9]</sup>、肝癌<sup>[10]</sup>、胆囊癌<sup>[11]</sup>和乳腺癌<sup>[12]</sup>。Li等<sup>[13]</sup>研究表明,miR-218-5p直接靶向脂肪瘤高迁移率融合蛋白样蛋白3(LHFPL3),抑制胶质母细胞瘤的增殖和转移。Deng等<sup>[14]</sup>研究表明,miR-218-5p在胃癌中表达显著降低,且与胃癌病人的淋巴结转移和预后不良有关。此外,Li等<sup>[15]</sup>证明,抑制miR-218-5p可以增加口腔鳞状细胞癌细胞的增殖和侵袭性。而在本研究中,我们发现miR-145-5p在骨肉瘤组织和细胞系中低表达。增加miR-218-5p的表达,骨肉瘤细胞的增殖受到抑

制,骨肉瘤细胞 143B 的迁移和侵袭能力也明显降低。这是 miR-218-5p 作为骨肉瘤肿瘤抑制 miRNA 的第一个证据。

WNT2B,也叫 WNT13,是已克隆的第 13 个 WNT 基因。Deng 等<sup>[14]</sup>研究表明,WNT2B 可以激活 WNT 信号通路,细胞核中的  $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)表达增加从而促进肿瘤的增殖和转移。Wang 等<sup>[17]</sup>研究发现,miR-577 通过调控 WNT2B 介导的非小细胞肺癌 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路,抑制细胞增殖和上皮间质转化。Li 等<sup>[18]</sup>研究表明,WNT2B 在口腔癌的发生和化疗耐药中发挥作用,为 HNSCC 病人的治疗提供了潜在的治疗靶点。在人胰腺癌组织中,Jiang 等<sup>[19]</sup>发现 Wnt2B 的表达均显著高于正常胰腺组织,与神经浸润有显著相关性。而在本研究中,我们发现 WNT2B 直接与 miR-218-5p 结合。miR-218-5p 表达的增加抑制骨肉瘤细胞 143B 中 WNT2B 的蛋白表达水平。miR-218-5p 在骨肉瘤中的异常表达可能预示病人的不良预后,发生和发展具有密切的关系。

综上所述,本研究首次证实 miR-218-5p 可能在骨肉瘤中作为肿瘤抑制 miRNA。结果显示,miR-218-5p 通过靶向 WNT2B 抑制骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭。miR-218-5p 和 WNT2B 可能是诊断骨肉瘤的新的生物标志物,也是治疗骨肉瘤的有效靶点。

(本文图 1,2 见插图 1-2)

### 参考文献

- [1] ZHANG Y, ZHAO H, XU W, et al. High expression of PQBP1 and low expression of PCK2 are associated with metastasis and recurrence of osteosarcoma and unfavorable survival outcomes of the patients[J]. J Cancer, 2019, 10(9): 2091-2101.
- [2] TING M, RODRIGUEZ M, GOWDA ST, et al. Cardiovascular recurrence of high-grade osteosarcoma presenting as atrial thrombosis and pulmonary embolism: A case report and review of the pediatric literature[J]. Pediatr Hematol Oncol, 2019, 36(4): 244-251.
- [3] UMEDA K, KATO I, SAIDA S, et al. Pazopanib for second recurrence of osteosarcoma in pediatric patients[J]. Pediatr Int, 2017, 59(8): 937-938.
- [4] LOZANO CALDERÓN SA, GARBUTT C, KIM J, et al. Clinical and molecular analysis of pathologic fracture-associated osteosarcoma: microrna profile is different and correlates with prognosis[J]. Clin Orthop Relat Res, 2019, 477(9): 2114-2126.
- [5] WANG H, ZHAO F, CAI S, et al. MiR-193a regulates chemoresistance of human osteosarcoma cells via repression of IRS2[J/OL]. J Bone Oncol, 2019, 17: 100241. DOI: 10.1016/j.jbo.2019.100241.
- [6] LIU XG, XU J, LI F, et al. Down-regulation of miR-377 contributes to cisplatin resistance by targeting XIAP in osteosarcoma[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(5): 1249-1257.
- [7] WANG JY, WANG JQ, LU SB. miR-628-5p promotes growth and migration of osteosarcoma by targeting IFI44L[J]. Biochem Cell Biol, 2020, 98(2): 99-105.
- [8] YANG Q, LI J, HU Y, et al. MiR-218-5p suppresses the killing effect of natural killer cell to lung adenocarcinoma by targeting SHMT1[J]. Yonsei Med J, 2019, 60(6): 500-508.
- [9] ZHANG L, HU J, LI J, et al. Long noncoding RNA LINC-PINT inhibits non-small cell lung cancer progression through sponging miR-218-5p/PDCD4[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1): 1595-1602.
- [10] WANG T, XU L, JIA R, et al. MiR-218 suppresses the metastasis and EMT of HCC cells via targeting SERBP1[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2017, 49(5): 383-391.
- [11] WANG H, ZHAN M, XU SW, et al. miR-218-5p restores sensitivity to gemcitabine through PRKCE/MDR1 axis in gallbladder cancer[J/OL]. Cell Death Dis, 2017, 8(5): e2770. DOI: 10.1038/cddis.2017.178.
- [12] TAIPALEENMÄKI H, FARINA NH, VAN WIJNEN AJ, et al. Antagonizing miR-218-5p attenuates Wnt signaling and reduces metastatic bone disease of triple negative breast cancer cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(48): 79032-79046.
- [13] LI Z, QIAN R, ZHANG J, et al. MiR-218-5p targets LHFPL3 to regulate proliferation, migration, and epithelial-mesenchymal transitions of human glioma cells[J/OL]. Biosci Rep, 2019, 39(3): BSR20180879. DOI: 10.1042/BSR20180879.
- [14] DENG M, ZENG C, LU X, et al. miR-218 suppresses gastric cancer cell cycle progression through the CDK6/Cyclin D1/E2F1 axis in a feedback loop[J]. Cancer Lett, 2017, 403: 175-185.
- [15] LI X, HE J, SHAO M, et al. Downregulation of miR-218-5p promotes invasion of oral squamous cell carcinoma cells via activation of CD44-ROCK signaling[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106: 646-654.
- [16] JIANG Z, JIANG C, FANG J. Up-regulated lnc-SNHG1 contributes to osteosarcoma progression through sequestration of miR-577 and activation of WNT2B/Wnt/beta-catenin pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 495(1): 238-245.
- [17] WANG B, SUN L, LI J, et al. miR-577 suppresses cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition by regulating the WNT2B mediated Wnt/beta-catenin pathway in non-small cell lung cancer[J]. Mol Med Rep, 2018, 18(3): 2753-2761.
- [18] LI S J, YANG XN, QIAN HY. Antitumor effects of WNT2B silencing in GLUT1 overexpressing cisplatin resistant head and neck squamous cell carcinoma[J]. Am J Cancer Res, 2015, 5(1): 300-308.
- [19] JIANG H, LI F, HE C, et al. Expression of Gli1 and Wnt2B correlates with progression and clinical outcome of pancreatic cancer[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(7): 4531-4538.

(收稿日期:2019-10-14,修回日期:2020-06-06)