

- mation results from the CKD-EPI databases? [J]. Am J Kidney Dis, 2018, 71(3):446.
- [8] 许丽娟, 段滨红, 王丹, 等. 探讨糖尿病视网膜病变及糖尿病肾病的关系研究[J]. 糖尿病新世界, 2017, 20(22):165-166.
- [9] 李淑婷, 王相宇, 杜新华, 等. 2型糖尿病患者糖尿病视网膜病变与肾小球滤过率的相关性研究[J]. 中华眼底病杂志, 2017, 33(3): 244-248.
- [10] 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南(2017年版)[J]. 中华糖尿病杂志, 2018, 10(1): 4-67.
- [11] 牟严艳, 叶中慧, 林梅珍, 等. 糖尿病流行病学研究进展[J]. 糖尿病新世界, 2019, 20(4):196-198.
- [12] LEE R, WONG TY, SABANAYAGAM C. Epidemiology of diabetic retinopathy, diabetic macular edema and related vision loss [J]. Eye Vis (Lond), 2015, 2:17.
- [13] 张婷婷, 陈忠平. 炎症相关疾病——糖尿病视网膜病变[J]. 中国医师杂志, 2017, 19(10): 1598-1656.
- [14] 邵从军, 沈莉, 卜文君, 等. 血清同型半胱氨酸、胱抑素C及 β_2 微球蛋白联合检测对2型糖尿病肾病的诊断价值[J]. 安徽医药, 2019, 23(3):480-483.
- [15] WONG TY, CHEUNG CM, LARSEN M, et al. Diabetic retinopathy [J]. Nat Rev Dis Primers, 2016, 2:16012.
- [16] 董天慧, 孙建梅, 姚舜, 等. 波动性高糖对糖尿病视网膜病变的作用研究进展[J]. 安徽医药, 2019, 23(8):1485-1488.
- [17] 严跃红, 傅君舟, 李剑文, 等. 基于肌酐与胱抑素的CKD-EPI新方程对我国慢性肾脏病患者适用性的对比研究[J]. 实用医学杂志, 2015, 31(10): 1653-1656.
- [18] 成海梅, 张利, 陈香美. 糖尿病肾病与糖尿病视网膜病变的相关性研究进展[J/OL]. 中华肾病研究电子杂志, 2019, 8(2): 85-90. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-3216.2019.02.008.
- [19] VAISAR T, DURBIN-JOHNSON B, WHITLOCK K, et al. Urine complement proteins and the risk of kidney disease progression and mortality in type 2 diabetes [J]. Diabetes Care, 2018, 41(11):2361-2369.
- [20] HUNG CC, LIN HY, HWANG DY, et al. Diabetic retinopathy and clinical parameters favoring the presence of diabetic nephropathy could predict renal outcome in patients with diabetic kidney disease [J]. Sci Rep, 2017, 7(1):1236.

(收稿日期:2020-06-30, 修回日期:2020-08-13)

引用本文:卿海辉, 张小舟, 胡敏, 等. 微小RNA-301b-3p靶向第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源物对骨肉瘤细胞增殖、凋亡的影响[J]. 安徽医药, 2021, 25(10):1957-1961. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2021.10.012.

◇临床医学◇



微小RNA-301b-3p靶向第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源物对骨肉瘤细胞增殖、凋亡的影响

卿海辉¹, 张小舟¹, 胡敏¹, 贺茂林²

作者单位:¹武汉科技大学附属孝感医院骨科三病区, 湖北 孝感432000;

²广西医科大学第一附属医院脊柱骨病外科, 广西壮族自治区 南宁530021

通信作者:贺茂林, 男, 主任医师, 博士生导师, 研究方向为脊柱骨病外科, Email:edwardheml@163.com

基金项目:广西科技厅科学研究与技术开发资助项目(桂科攻1140003A-14)

摘要: 目的 探讨微小RNA-301b-3p(miR-301b-3p)对骨肉瘤细胞增殖、凋亡的影响及其作用机制。方法 本研究起止时间为2019年3—9月。人成骨细胞(hFOB)和骨肉瘤细胞U2OS、MG63购自美国菌种保藏中心。U2OS细胞分为miRNA抑制物阴性对照(anti-miR-NC)组、miR-301b-3p抑制物(anti-miR-301b-3p)组、anti-miR-301b-3p+小干扰RNA阴性对照(si-NC)组、anti-miR-301b-3p+第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源物(PTEN)小干扰RNA(si-PTEN)组;实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测miR-301b-3p表达水平;四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)检测细胞活性;流式细胞术检测细胞凋亡;双荧光素酶报告实验检测miR-301b-3p和PTEN的靶向关系。结果 与hFOB细胞相比, U2OS、MG63中miR-301b-3p表达水平[(0.89±0.09), (0.70±0.07)比(0.20±0.02)]显著升高。与anti-miR-NC组比较, anti-miR-301b-3p组U2OS细胞活性[(0.59±0.06)比(1.33±0.13)]显著降低, 而凋亡率[(22.06±2.31)%比(7.48±0.78)%]、PTEN蛋白表达[(0.69±0.07)比(0.35±0.03)]显著升高。PTEN是miR-301b-3p的直接靶基因。与anti-miR-301b-3p+si-NC组比较, anti-miR-301b-3p+si-PTEN组U2OS细胞活性[(1.16±0.12)比(0.56±0.06)]显著升高, 而凋亡率[(10.28±1.16)比(22.12±2.34)]显著降低。结论 抑制miR-301b-3p表达可通过调控PTEN抑制骨肉瘤细胞增殖, 促进细胞凋亡。

关键词: 骨肉瘤; 微小RNA-301b-3p; 第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源物(PTEN); 细胞增殖; 细胞凋亡

Effect of miR-301b-3p targeting PTEN on proliferation and apoptosis of osteosarcoma cells

QING Haihui¹, ZHANG Xiaozhou¹, HU Min¹, HE Maolin²

Author Affiliations:¹Department of Orthopedics Ward Three, Xiaogan Hospital, Wuhan University of Science and Technol-

ogy, Xiaogan, Hubei 432000, China;²Department of Spine and Bone Diseases, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi Zhuang Autonomous Region 530021, China

Abstract: **Objective** To explore the effect of microRNA-301b-3p (miR-301b-3p) on proliferation and apoptosis of osteosarcoma cells and its mechanism. **Methods** The start and end time of this research was from March to September 2019. Human osteoblasts (hFOB) and osteosarcoma cells U2OS and MG63 were purchased from the American Tissue Culture Collection. U2OS cells were assigned into miRNA inhibitor negative control (anti-miR-NC) group, miR-301b-3p inhibitor (anti-miR-301b-3p) group, anti-miR-301b-3p+small interfering RNA negative control (si-NC) group, anti-miR-301b-3p+phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) small interfering RNA (si-PTEN) group. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression of miR-301b-3p, methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to detect cell viability, flow cytometry was used to detect apoptosis, and dual luciferase reporter assay was used to detect the targeting relationship between miR-301b-3p and PTEN. **Results** Compared with hFOB cells, the expressions of miR-301b-3p [(0.89±0.09), (0.70±0.07) vs (0.20±0.02)] in U2OS and MG63 cells were significantly increased. Compared with the anti-miR-NC group, the cell viability [(0.59±0.06) vs (1.33±0.13)] of U2OS cells in the anti-miR-301b-3p group was significantly reduced, while the apoptosis rate [(22.06±2.31)% vs (7.48±0.78)%] and PTEN protein expression [(0.69±0.07) vs (0.35±0.03)] were significantly increased. PTEN is the direct target gene of miR-301b-3p. Compared with the anti-miR-301b-3p+si-NC group, the cell viability [(1.16±0.12) vs (0.56±0.06)] of U2OS cells in the anti-miR-301b-3p+si-PTEN group was significantly increased, while the apoptosis rate [(10.28±1.16)% vs (22.12±2.34)%] was significantly reduced. **Conclusion** Inhibition of miR-301b-3p expression can inhibit osteosarcoma cell proliferation and promote cell apoptosis by regulating PTEN.

Key words: Osteosarcoma; miR-301b-3p; Phosphatase and tensin homologue deleted chromosome 10 (PTEN); Cell proliferation; Cell apoptosis

随着分子生物学的发展,分子靶向治疗给骨肉瘤的治疗带来了新的希望^[1-2]。研究发现miRNA影响恶性肿瘤发生发展^[3];miR-301b通过靶向头帕肿瘤综合征蛋白(Cylindromatosis, CYLD)促进三阴性乳腺癌细胞增殖^[4];miR-301b在骨肉瘤肿瘤组织与外周血中上调表达^[5]。但miR-301b-3p其对骨肉瘤细胞增殖、凋亡的影响及其作用机制尚不清楚。第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源物(PTEN)是一个抑癌基因,参与调节细胞增殖和凋亡的多条通路,其异常表达与恶性肿瘤发生发展相关,PTEN能作为恶性肿瘤治疗中的潜在靶点^[6]。有研究报道PTEN基因启动子高甲基化导致的PTEN基因失活可能参与了骨肉瘤的发生、发展^[7]。DJ-1又名帕金森病蛋白7(PARK7),其可通过增加PTEN表达影响骨肉瘤细胞的恶性生物学行为^[8]。但miR-301b-3p是否通过PTEN影响骨肉瘤细胞的增殖、凋亡还尚未清楚。本研究在2019年3—9月开展,旨在确定miR-301b-3p对骨肉瘤细胞的影响及其机制是否与PTEN相关。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 人成骨细胞(hFOB)和骨肉瘤细胞U2OS、MG63购自美国菌种保藏中心;杜尔伯格氏伊戈尔培养基(DMEM)购自美国Gibico;四甲基偶氮唑盐(MTT)试剂盒购自美国Sigma;Trizol、荧光定量试剂盒购自美国Invitrogen;双荧光素酶检测试剂盒、凋亡检测试剂盒购自北京Solarbio公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 人成骨细胞hFOB和骨肉

瘤细胞U2OS、MG63用DMEM培养基常规培养,取对数生长期细胞U2OS,将miRNA抑制物阴性对照(anti-miR-NC)、miR-301b-3p抑制物(anti-miR-301b-3p)转染至U2OS细胞中,记为anti-miR-NC组、anti-miR-301b-3p组;将anti-miR-301b-3p分别与小干扰RNA阴性对照(si-NC)、PTEN小干扰RNA(si-PTEN)共转染至U2OS细胞,记为anti-miR-301b-3p+si-NC组、anti-miR-301b-3p+si-PTEN组。

1.2.2 实时荧光定量PCR (RT-qPCR)检测 miR-301b-3p 表达水平 提取hFOB细胞、骨肉瘤细胞U2OS、MG63及各组U2OS细胞的总RNA,合成cDNA后进行PCR,相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。

1.2.3 MTT检测细胞活性 各组U2OS细胞培养48 h,按试剂盒说明操作,酶标仪检测490 nm处吸光度(OD)值。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 收集各组U2OS细胞,按试剂盒说明操作,最后上流式细胞仪检测并分析凋亡情况。

1.2.5 蛋白质印迹法检测蛋白表达水平 提取总蛋白,进行电泳分离蛋白,然后转至PVDF,封闭后加入细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(P21)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl相关X蛋白(Bax)、PTEN等一抗4℃孵育过夜;洗膜后加入二抗室温孵育2 h,显影,定影,测各条带吸光度值。

1.2.6 荧光素酶报告实验检测 miR-301b-3p 对 PTEN 的靶向调控 将PTEN野生型荧光素酶报告载体(WT-PTEN)和PTEN突变型荧光素酶报告载体

(MUT-PTEN)分别与 miR-NC 和 miR-301b-3p 共转染至 U2OS 细胞,按说明书操作检测 U2OS 细胞的荧光素酶活性。将 anti-miR-NC、anti-miR-301b-3p、miR-NC、miR-301b-3p 分别转染至 U2OS 细胞中,蛋白质印迹法检测 PTEN 蛋白表达水平。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.00 进行统计学分析。满足正态分布的定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态分布数据采用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,两组比较行独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,多时点观测资料采用重复测量方差法分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

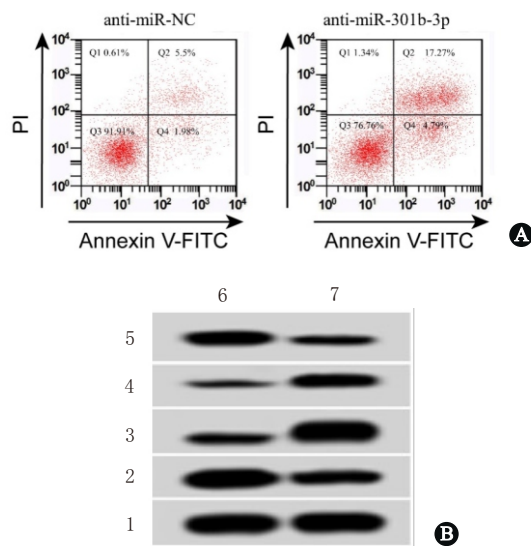
2 结果

2.1 miR-301b-3p 在人成骨细胞 hFOB 和骨肉瘤细胞 U2OS、MG63 中的表达 与人成骨细胞 hFOB 相比,骨肉瘤细胞 U2OS、MG63 中 miR-301b-3p 表达水平显著升高 $[(0.89 \pm 0.09), (0.70 \pm 0.07)]$ 比 (0.20 ± 0.02) , $F = 255.963$, $P < 0.05$ 。

2.2 抑制 miR-301b-3p 表达对细胞 U2OS 增殖、凋亡的影响 细胞活性在不同组间、不同时间点间、组间 $\times$ 时间均差异有统计学意义 ($F_{\text{组间}} = 83.774$, $P_{\text{组间}} < 0.001$; $F_{\text{时间}} = 65.178$, $P_{\text{时间}} < 0.001$; $F_{\text{组间} \times \text{时间}} = 63.286$, $P_{\text{组间} \times \text{时间}} < 0.001$);转染 anti-miR-301b-3p 的 U2OS 细胞相较于 anti-miR-NC, miR-301b-3p 表达水平显著降低, U2OS 细胞的活性以及 Cyclin D1、Bcl-2 表达水平降低,而凋亡率以及 P21、Bax 表达水平显著升高 ($P < 0.05$) (图 1, 表 1, 表 2)。

可见,抑制 miR-301b-3p 表达抑制细胞 U2OS 增殖、促进凋亡。

2.3 miR-301b-3p 靶向、调控 PTEN starBase 软件预测到 PTEN 与 miR-301b-3p 存在结合位点(图 2A)。miR-301b-3p 与 WT-PTEN 转染后细胞 U2OS 的荧光素酶活性显著降低 ($P < 0.05$) (表 3)。过表达 miR-301b-3p 可降低 PTEN 表达水平 $[(0.10 \pm 0.01)]$ 比 (0.36 ± 0.03) , $t = 24.666$, $P < 0.05$;而抑制 miR-301b-3p 表达可提高 PTEN 表达水平 $[(0.69 \pm 0.07)]$ 比 (0.35 ± 0.03) , $t = 13.393$, $P < 0.05$ (图 2B)。可见,miR-301b-3p 可靶向调控 PTEN 的表达。



注: 1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶; 2—B 细胞淋巴瘤-2; 3—Bcl 相关 X 蛋白; 4—细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂; 5—细胞周期蛋白 D1; 6—miRNA 抑制物阴性对照; 7—miR-301b-3p 的抑制物。

图 1 抑制 miR-301b-3p 表达对骨肉瘤细胞(U2OS)增殖、凋亡的影响: A 为抑制 miR-301b-3p 表达后 U2OS 细胞凋亡; B 为抑制 miR-301b-3p 表达后相关蛋白表达

2.4 抑制 PTEN 表达能逆转抑制 miR-301b-3p 对细胞 U2OS 增殖的抑制作用 与 anti-miR-301b-3p+si-NC 组相比, anti-miR-301b-3p+si-PTEN 组 PTEN、P21 表达水平显著降低, Cyclin D1 表达水平和细胞活性显著升高 ($P < 0.05$) (图 3, 表 4)。可见,抑制 PTEN 表达能逆转抑制 miR-301b-3p 对细胞 U2OS 增殖的抑制作用。

表 1 抑制 miR-301b-3p 表达对 U2OS 增殖、凋亡蛋白表达的影响/ $\bar{x} \pm s$

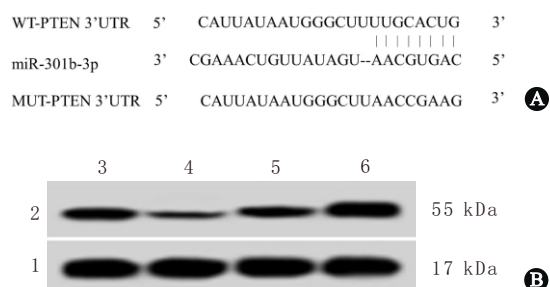
组别	重复次数	Cyclin D1 蛋白	P21 蛋白	Bax 蛋白	Bcl-2 蛋白
anti-miR-NC	9	0.65±0.06	0.15±0.01	0.23±0.02	0.78±0.08
anti-miR-301b-3p	9	0.27±0.02	0.56±0.05	0.83±0.08	0.33±0.03
t 值		18.025	24.122	21.828	15.801
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注: miR-301b-3p 为微小 RNA-301b-3p, U2OS 为骨肉瘤细胞, Cyclin D1 为细胞周期蛋白 D1, P21 为细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂, Bcl-2 为 B 细胞淋巴瘤-2, Bax 为 Bcl 相关 X 蛋白, anti-miR-NC 为 miRNA 抑制物阴性对照, anti-miR-301b-3p 为 miR-301b-3p 抑制物。

表 2 抑制 miR-301b-3p 表达对 U2OS 增殖、凋亡的影响/ $\bar{x} \pm s$

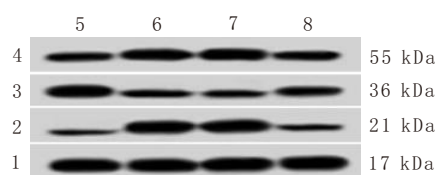
组别	重复次数	miR-301b-3p	细胞活性(490 nm)			凋亡率/%
			24 h	48 h	72 h	
anti-miR-NC	9	0.86±0.09	0.48±0.05	0.91±0.09	1.33±0.13	7.48±0.78
anti-miR-301b-3p	9	0.35±0.03	0.32±0.03	0.46±0.05	0.59±0.06	22.06±2.31
t 值		16.128	8.232	13.112	15.505	17.940
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: miR-301b-3p 为微小 RNA-301b-3p, U2OS 为骨肉瘤细胞, anti-miR-NC 为 miRNA 抑制物阴性对照, anti-miR-301b-3p 为 miR-301b-3p 的抑制物。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶;2—第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源物;3—miR-301b-3p的对照组;4—微小RNA-301b-3p;5—miRNA抑制物阴性对照;6—miR-301b-3p抑制物。

图2 miR-301b-3p靶向调控第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源物(PTEN):A为PTEN与miR-301b-3p的互补序列;B为PTEN蛋白表达



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶;2—细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂;3—细胞周期蛋白D1;4—第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源物;5—miRNA抑制物阴性对照;6—miR-301b-3p抑制物;7—miR-301b-3p抑制物与小干扰RNA阴性对照;8—miR-301b-3p抑制物与PTEN小干扰RNA。

图3 抑制PTEN和miR-301b-3p表达对骨肉瘤细胞增殖蛋白表达的影响

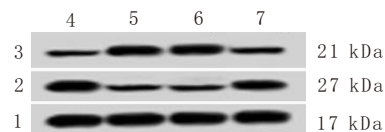
表3 双荧光素酶报告实验 $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	WT-PTEN	MUT-PTEN
miR-NC	9	0.93±0.10	0.95±0.10
miR-301b-3p	9	0.41±0.04 ^①	1.03±0.10
<i>t</i> 值		14.484	1.697
<i>P</i> 值		0.000	0.109

注:WT-PTEN为PTEN野生型荧光素酶报告载体,MUT-PTEN为PTEN突变型荧光素酶报告载体,miR-NC为miRNA模拟物阴性对照,miR-301b-3p为微小RNA-301b-3p。

①与miR-NC组比较, $P<0.05$ 。

2.5 抑制PTEN表达能逆转抑制miR-301b-3p表达对细胞U2OS凋亡的促进作用 与anti-miR-301b-3p+si-NC组相比,anti-miR-301b-3p+si-PTEN组Bcl-2表达水平升高,而Bax表达水平和细胞凋亡率降低($P<0.05$)(图4,表5)。可见,抑制PTEN能逆转抑制miR-301b-3p对U2OS细胞凋亡的作用。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶;2—B细胞淋巴瘤-2;3—Bcl-2相关X蛋白;4—miRNA抑制物阴性对照;5—miR-301b-3p抑制物;6—miR-301b-3p抑制物与小干扰RNA阴性对照;7—miR-301b-3p抑制物与PTEN小干扰RNA。

图4 抑制PTEN表达能逆转抑制miR-301b-3p表达对骨肉瘤细胞凋亡蛋白表达的影响

3 讨论

骨肉瘤具有侵袭性强、恶性程度高、进展快、转移早、预后差、易复发等特点,严重威胁人类的健康,亟需新的治疗方法^[9,10]。研究发现miR-301b在肝癌细胞中高表达,可通过抑制Kruppel样因子4(Kruppel-like Factor 4, KLF4)的表达促进肝癌的迁移^[11]。miR-301b-3p通过靶向作用于MYB与CYLD促进巨噬细胞刺激因子诱导的单核细胞自噬^[12]。以上结果表明miR-301b-3p参与调节肿瘤的进展,还有研究用miRNA表达谱芯片检测发现miR-301a-3p在人骨肉瘤细胞系中上调表达^[13]。本研究通过检测骨肉瘤细胞和正常细胞中miR-301a-3p的表达水平,发现miR-301b-3p在骨肉瘤细胞中表达水平显著升高,与文献研究结果相符。为进一步了解miR-301a-3p对骨肉瘤细胞增殖、凋亡的影响,本研究转染miR-301a-3p抑制表达载体,结果显示,骨肉瘤U2OS细胞的活性降低,而凋亡率升高;说明抑制miR-301b-3p表达抑制U2OS细胞增殖,促进细胞凋亡。此外,抑制miR-

表4 抑制PTEN和miR-301b-3p表达对U2OS增殖的影响 $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	PTEN蛋白	Cyclin D1蛋白	P21蛋白	细胞活性(490 nm)		
					24h	48h	72h
anti-miR-NC	9	0.35±0.03	0.65±0.06	0.15±0.01	0.48±0.05	0.91±0.09	1.33±0.13
anti-miR-301b-3p	9	0.69±0.07 ^①	0.27±0.02 ^①	0.56±0.05 ^①	0.32±0.03 ^①	0.46±0.05 ^①	0.59±0.06 ^①
anti-miR-301b-3p+si-NC	9	0.72±0.07	0.24±0.02	0.58±0.06	0.30±0.03	0.43±0.04	0.56±0.06
anti-miR-301b-3p+si-PTEN	9	0.46±0.04 ^②	0.51±0.05 ^②	0.22±0.02 ^②	0.41±0.04 ^②	0.75±0.07 ^②	1.16±0.12 ^②
<i>F</i> 值		94.146	201.522	274.318	42.458	113.316	144.561
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:U2OS为骨肉瘤细胞,PTEN为第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源物,Cyclin D1为细胞周期蛋白D1,P21为细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂,anti-miR-NC为miRNA抑制物阴性对照,anti-miR-301b-3p为miR-301b-3p抑制物,anti-miR-301b-3p+si-NC为miR-301b-3p抑制物与小干扰RNA阴性对照,anti-miR-301b-3p+si-PTEN为miR-301b-3p抑制物与PTEN小干扰RNA。

①与anti-miR-NC组比较, $P<0.05$ 。②与anti-miR-301b-3p+si-NC组比较, $P<0.05$ 。

表5 抑制PTEN表达能逆转抑制miR-301b-3p对骨肉瘤细胞凋亡的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	Bax蛋白	Bcl-2蛋白	凋亡率(%)
anti-miR-NC	9	0.23±0.02	0.78±0.08	7.48±0.78
anti-miR-301b-3p	9	0.83±0.08 ^①	0.33±0.03 ^①	22.06±2.31 ^①
anti-miR-301b-3p+si-NC	9	0.81±0.08	0.34±0.03	22.12±2.34
anti-miR-301b-3p+si-PTEN	9	0.35±0.03 ^②	0.62±0.06 ^②	10.28±1.16 ^②
F值		245.362	148.551	167.724
P值		0.000	0.000	0.000

注:miR-301b-3p为微小RNA-301b-3p,Bcl-2为B细胞淋巴瘤-2,Bax为Bcl相关X蛋白,anti-miR-NC为miRNA抑制物阴性对照,anti-miR-301b-3p为miR-301b-3p抑制物,anti-miR-301b-3p+si-NC为miR-301b-3p抑制物与小干扰RNA阴性对照,anti-miR-301b-3p+si-PTEN为miR-301b-3p抑制物与PTEN小干扰RNA。

①与anti-miR-NC组比较, $P<0.05$ 。②与anti-miR-301b-3p+si-NC组比较, $P<0.05$ 。

301b-3p表达可提高p21、Bax表达水平,降低CyclinD1、Bcl-2表达水平;进一步说明抑制miR-301b-3p表达可抑制U2OS细胞的恶性增殖,促进细胞凋亡。

研究发现,PTEN在骨肉瘤细胞中高表达,PTEN可通过提高半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶(cysteiny aspartate specific proteinase, caspase)-3、caspase-7、caspase-9活性,诱导人骨肉瘤MG-63细胞凋亡^[14]。说明PTEN影响骨肉瘤的发展,与骨肉瘤的进展有关。还有研究报道PTEN可作为靶基因被miRNA调控而影响肿瘤的进展^[15-16]。如过表达miR-155可通过负调控PTEN,增强磷脂酰肌醇激酶(PI3K)通路信号,从而促进肝癌细胞的增殖和迁移^[17]。miR-365通过靶向PTEN抑制结肠癌细胞的增殖并诱导其凋亡^[18]。miR-214-3p通过靶向PTEN,活化蛋白激酶B(Protein kinase B, AKT)通路,抑制骨肉瘤细胞的凋亡^[19]。然而,miR-301b-3p是否靶向PTEN及是否通过调控PTEN影响骨肉瘤的进展还尚未可知,本研究通过starBase数据库预测到PTEN与miR-301b-3p存在结合位点。进一步的荧光素酶报告实验证实miR-301b-3p可靶向调控PTEN的表达;且同时抑制PTEN和miR-301b-3p表达后,U2OS细胞活性显著升高,而U2OS细胞凋亡率显著降低;说明抑制PTEN表达逆转了抑制miR-301b-3p对细胞U2OS增殖的抑制和凋亡促进作用。提示,miR-301b-3p可能通过调控PTEN影响骨肉瘤细胞增殖和凋亡。

综上所述,抑制miR-301b-3p表达可能通过调控PTEN抑制骨肉瘤细胞增殖,促进细胞凋亡。

参考文献

- [1] 王娜,王凯,汪玉良,等.骨肉瘤精准治疗研究进展[J].癌症进展,2018,16(1):4-6.
- [2] 陈校国,肖扬,伍旭辉,等.骨肉瘤靶向治疗的研究进展[J].西南军医,2017,19(5):438-443.
- [3] 余凤强,王生淋,林建华.微小RNA在骨肉瘤基础研究的进展[J].中华实验外科杂志,2018,35(5):992-996.
- [4] SONG H, LI D, WU T, et al. MicroRNA-301b promotes cell proliferation and apoptosis resistance in triple-negative breast cancer by targeting CYLD[J]. BMB Rep, 2018,51(11):602-607.
- [5] 马草源,镐英杰,刘亚伟,等. miRNA基因在骨肉瘤患者外周血中的差异表达[J]. 河南医学研究, 2018,27(8):13667-13670.
- [6] 卢卉. 第10号染色体缺失的磷酸酶张力蛋白同源物基因在恶性肿瘤中的作用[J]. 医学分子生物学杂志, 2012,9(5):406-411.
- [7] 何博,李锋,蒋金芳,等. 骨肉瘤PTEN启动子特定区域甲基化的研究[J]. 诊断学理论与实践, 2013,12(1):86-89.
- [8] 李宏维,胡旭昌,马兵,等. 帕金森病相关蛋白DJ-1对人骨肉瘤细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移能力的影响[J]. 中南大学学报(医学版), 2018,43(10):1054-1060.
- [9] 张健峰,刘云霞. 骨肉瘤治疗的研究进展[J]. 浙江医学, 2019,41(7):723-727.
- [10] 李胜,王威,李建军. 骨肉瘤手术治疗方法的研究进展[J]. 山东医药, 2018,58(32):95-97.
- [11] 董笑,王凡,刘传,等. MiR-301b抑制转录因子Klf4影响肝癌细胞迁移[J]. 现代生物医学进展, 2018,18(10):1806-1811.
- [12] 沈健. miR-301b-3p对M-CSF诱导单核细胞自噬的调控[D]. 上海:第二军医大学, 2017.
- [13] 李帅. MicroRNA-27a调控骨肉瘤生物学行为的机制研究[D]. 武汉:华中科技大学, 2015.
- [14] 张昊,王勇,成志勇,等. 磷酸酶基因PTEN对骨肉瘤细胞凋亡机制研究[J]. 医学研究杂志, 2015,44(8):53-55.
- [15] 梁媛,冯洋洋,李琳琳,等. MicroRNA-29a靶向抑制PTEN基因诱导非小细胞肺癌细胞上皮间质转化的机制研究[J]. 现代肿瘤医学, 2018,26(5):653-659.
- [16] 孙红文,周小婷,鲍亚男,等. miR-103靶向PTEN并激活PI3K/AKT通路促进肺癌细胞A549对达沙替尼耐药[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019,26(3):266-272.
- [17] 徐钢,高轶,闫茂生. miR-155/PTEN调控轴在肝癌中的表达及其机制[J]. 肿瘤防治研究, 2018,45(2):67-72.
- [18] 熊非,陈继贵. 微小RNA-3651对结肠癌细胞增殖凋亡及PTEN表达的影响[J]. 临床肿瘤学杂志, 2017,22(10):865-868.
- [19] 韩纯杰,刘金霞,马慧勇. miR-214-3p通过靶向PTEN抑制骨肉瘤U2OS细胞凋亡的研究[J]. 长治医学院学报, 2017,31(6):411-413.

(收稿日期:2019-11-15,修回日期:2020-03-26)