

# miR-146b-5p 对骨肉瘤细胞增殖抑制及克隆形成的机制研究

姜富祥, 阿尔宾, 高 飞, 王 兴

(内蒙古自治区巴彦淖尔市医院脊柱外科, 内蒙古巴彦淖尔 015000)

**摘要:**目的 检测骨肉瘤组织中 miR-146b-5p 表达, 探究其对骨肉瘤 (osteosarcoma, OS) 细胞增殖、克隆形成的影响及潜在分子作用机制。方法 选取 2018 年 1 月~2020 年 12 月内蒙古自治区巴彦淖尔市医院病理科 30 组临床骨肉瘤组织及邻近正常组织标本, 采用实时荧光定量 PCR 实验 (qRT-PCR) 法检测组织中 miR-146b-5p 表达水平; 通过介导转染 miR-146b-5p mimics 和 miR-146b-5p ASO 分别过表达和敲低 miR-146b-5p 表达, 探究其对骨肉瘤细胞增殖及克隆形成的影响。通过生物学信息数据库预测 miR-146b-5p 的潜在靶基因, 荧光素酶实验验证两者结合关系, 分析 miR-146b-5p 对靶基因的调控作用。分析靶基因在骨肉瘤中的表达特征及与 miR-146b-5p 的相关性, 通过细胞增殖实验验证两者的调控作用, 以探究在骨肉瘤中发挥功能的潜在分子机制。结果 骨肉瘤组织中 miR-146b-5p 表达 ( $4.096 \pm 1.237$ ) 显著低于邻近正常组织 ( $5.895 \pm 0.834$ ), 差异有统计学意义 ( $t=6.605$ ,  $P < 0.001$ )。miR-146b-5p 过表达抑制了骨肉瘤细胞的增殖能力 ( $t=13.233 \sim 34.599$ , 均  $P < 0.01$ )。miR-146b-5p 过表达组克隆形成数目 ( $48.912 \pm 2.032$ ) 较对照组 ( $160.834 \pm 9.031$ ) 明显降低, 差异有统计学意义 ( $t=20.942$ ,  $P < 0.001$ )。DUSP16 是 miR-146b-5p 的潜在靶基因, miR-146b-5p 负向调控双特异性磷酸酶 (dual specificity phosphatase 16, DUSP16) 表达。骨肉瘤组织中 DUSP16 表达 ( $5.683 \pm 0.457$ ) 较邻近正常组织 ( $4.665 \pm 0.531$ ) 显著升高, 差异有统计学意义 ( $t=7.959$ ,  $P < 0.001$ ), 与 miR-146b-5p 表达呈负相关 ( $r=-0.667$ ,  $P < 0.05$ )。共转染过表达 DUSP16 逆转了 miR-146b-5p 对骨肉瘤细胞增殖的抑制作用。miR-146b-5p 过表达组 P21 水平 ( $4.995 \pm 0.214$ ) 较对照组 ( $1.001 \pm 0.002$ ) 显著升高, 差异有统计学意义 ( $t=32.325$ ,  $P < 0.001$ ); 当共转染 DUSP16 过表达后, P21 表达 ( $0.986 \pm 0.012$ ) 较单独过表达 miR-146b-5p 组 ( $4.995 \pm 0.214$ ) 显著降低, 差异有统计学意义 ( $t=32.398$ ,  $P < 0.001$ )。结论 骨肉瘤组织中 miR-146b-5p 显著低表达, 其过表达抑制了骨肉瘤细胞的增殖及克隆形成; miR-146b-5p 通过靶向负调控 DUSP16 表达参与 P53 信号通路从而在骨肉瘤发生发展起重要作用。

**关键词:** 骨肉瘤; 微小核糖核酸 -146b-5p; 双特异性磷酸酶 16; 增殖; 克隆形成

**中图分类号:** R738.1; R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2022) 03-037-07

**doi:**10.3969/j.issn.1671-7414.2022.03.008

## Study on the Mechanism of miR-146b-5p on Proliferation Inhibition and Clonogenesis of Osteosarcoma Cells

JIANG Fu-xiang, ALBIN, GAO Fei, WANG Xing (Department of Spine Surgery, Bayannur City Hospital, Inner Mongolia Autonomous Region, Inner Mongolia Bayannur 015000, China)

**Abstract: Objective** The expression of miR-146b-5p in osteosarcoma tissues was detected to explore the effect of miR-146b-5p on proliferation and clonogenesis of osteosarcoma cells and its potential molecular mechanism. **Methods** Thirty clinical osteosarcoma tissue samples and adjacent normal tissue samples were selected in the Department of Pathology, Bayannur City Hospital, Inner Mongolia Autonomous Region from January 2018 to December 2020. The expression level of miR-146b-5p in the tissues was detected by qRT-PCR. The effects of miR-146b-5p mimics and miR-146b-5p ASO on the proliferation and clonal formation of osteosarcoma cells were investigated by mediating the transfection of miR-146b-5p mimics and miR-146b-5p ASO overexpression and knockdown, respectively. The potential target genes of miR-146b-5p were predicted through biological information database, and the binding relationship between the two was verified by luciferase assay, and the regulatory effect of miR-146b-5p on target genes was analyzed. The expression characteristics of target genes in osteosarcoma and their correlation with miR-146b-5p were analyzed. The expression characteristics of target genes in osteosarcoma and their correlation with miR-146b-5p were analyzed, and the regulatory effects of the two genes were verified by cell proliferation assay, so as to explore the underlying molecular mechanisms of function in osteosarcoma. **Results** The expression of miR-146b-5p in osteosarcoma tissues ( $4.096 \pm 1.237$ ) was significantly lower than that in adjacent normal tissues ( $5.895 \pm 0.834$ ), the difference

**基金项目:** 内蒙古自治区自然科学基金 (20190203MS1571)。

**作者简介:** 姜富祥 (1978-), 男, 硕士, 主任医师, 研究方向: 擅长脊柱与关节疾病、损伤的诊治, E-mail: kg8xbt1026@126.com。

was statistically significant( $t=6.605$ ,  $P<0.001$ ). The overexpression of miR-146b-5p inhibited the proliferation of osteosarcoma cells ( $t=13.233 \sim 34.599$ , all  $P<0.01$ ). The number of clone formation in miR-146b-5p overexpression group ( $48.912 \pm 2.032$ ) was significantly lower than that in control group( $160.834 \pm 9.031$ ), the difference was statistically significant ( $t=20.942$ ,  $P<0.001$ ). DUSP16 was a potential target gene of miR-146b-5p, and miR-146b-5p negatively regulates the expression of DUSP16. The expression of DUSP16 in osteosarcoma tissues ( $5.683 \pm 0.457$ ) was significantly higher than that in adjacent normal tissues( $4.665 \pm 0.531$ ), the difference was statistically significant ( $t=7.959$ ,  $P<0.001$ ), and was negatively correlated with the expression of miR-146b-5p ( $r=-0.667$ ,  $P<0.05$ ). The co-transfection and overexpression of DUSP16 reversed the inhibitory effect of miR-146b-5p on the proliferation of osteosarcoma cells. The P21 level of miR-146b-5p overexpression group ( $4.995 \pm 0.214$ ) was significantly higher than that of the control group ( $1.001 \pm 0.002$ ), the difference was statistically significant ( $t=32.325$ ,  $P<0.001$ ). After co-transfection with DUSP16 overexpression, the expression of P21 ( $0.986 \pm 0.012$ ) was significantly lower than that of miR-146b-5p alone ( $4.995 \pm 0.214$ ), the difference was statistically significant ( $t=32.398$ ,  $P<0.001$ ).

**Conclusion** The expression of miR-146b-5p was significantly lower in osteosarcoma tissues, and its overexpression inhibited the proliferation and clonal formation of osteosarcoma cells. MiR-146b-5p plays an important role in the development of osteosarcoma by negatively regulating the expression of DUSP16 and participating in the P53 signaling pathway.

**Keywords:** osteosarcoma; miR-146b-5p; dual specificity phosphatase (DUSP) 16; proliferation; clone formation

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是一种高度恶性的骨架癌,起源于间充质组织中梭形细胞的未成熟类骨质基质,是青少年最常见的原发性骨肿瘤<sup>[1-2]</sup>。目前手术、放化疗是OS的主要治疗方式,针对OS的靶向治疗药物仍在研究<sup>[3]</sup>,然而临床治疗效果有限,故深入研究OS的发生发展机制,找寻针对OS的新的有效治疗方法及分子标志物意义重大。微小核糖核酸分子(micro RNA, miRNA)是具有15~25个核苷酸的小非编码RNA(small non-coding RNA)调控分子,其可与基因3'UTR区结合发挥功能,具有广泛的生物学功能,研究证实miRNA参与了细胞凋亡、新陈代谢、发育、增殖和细胞分化等生物学过程<sup>[4-7]</sup>。近年发现,miR-146b-5p与许多人类恶性肿瘤有关,例如在乳腺癌中, lncRNA NEAT1通过抑制miR-146b-5p表达可促进人乳腺癌细胞的增殖、迁移和转移<sup>[8]</sup>。miR-146b-5p通过调节IRAK1/NF- $\kappa$ B通路提高非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)对表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)酪氨酸激酶抑制剂的敏感度<sup>[9]</sup>。证实miR-146b-5p可抑制上皮间质转化及细胞迁移和侵袭等多种致癌途径<sup>[10-12]</sup>,在人类多种肿瘤的发生发展中扮演重要角色,可作为新的肿瘤分子研究靶标。有研究显示,miR-146b-5p在OS中过表达可显著抑制肿瘤细胞增殖,促进其凋亡,但miR-146b-5p在OS细胞增殖中的相关分子机制尚在探索阶段。故本研究通过体外细胞试验拟探究miR-146b-5p在OS中的表达与其对OS细胞增殖和克隆形成的影响及相关分子机制,以期对OS的临床诊治提供新的研究靶标。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 人骨肉瘤细胞U2OS细胞购于中国科学院上海细胞库,培养在含10g/dl胎牛血清

DMEM培养基中,加入青霉素100 IU/ml和链霉素100  $\mu$ g/ml,在37 $^{\circ}$ C, 5ml/dl CO<sub>2</sub>培养箱中培养。选取2018年1月~2020年12月内蒙古自治区巴彦淖尔市医院病理科留存的30例骨肉瘤组织及对应正常组织样品,均经病理确认为骨肉瘤,术前未行任何相关治疗,组织样本来源于手术获取,低温液氮保存备用。

1.2 仪器及试剂 DMEM培养液(美国HyClone公司);链霉素、青霉素、胰酶(美国Gibco公司);Lipofectamine 2000(北京优尼康生物科技有限公司);酶标仪(瑞士Tecan公司);MTS细胞增殖检测试剂盒、克隆形成检测试剂盒(美国corning公司);PCR仪(美国ABI公司);逆转录试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司];双荧光素酶测定系统(北京Promega公司);蛋白免疫印迹实验电泳仪、转膜槽(美国Bio-Rad公司), DUSP16抗体(美国SigmaAldrich公司);miR-146b-5p引物序列, miR-146b-5p mimics, miR-146b-5p ASO(反义核酸)及siRNA-DUSP16和无义序列siCTL由上海吉玛生物制药有限公司设计合成;DUSP16-3'UTR-WT野生型质粒和DUSP16-3'UTR-MUT突变型质粒报告基因载体(美国Promega公司)。

## 1.3 方法

1.3.1 细胞转染及分组:待细胞生长密度达80%左右时,按照Lipofectamine 2000试剂盒说明书将NC-mimics, miR-146b-5p mimics, NC-ASO, miR-146b-5p-ASO及siRNA-DUSP16和siCTL分别转染至U2OS细胞,设为miR-146b-5p阴性过表达组(NC-mimics组), miR-146b-5p过表达组(miR-146b-5p mimics组)和miR-146b-5p阴性抑制组(NC-ASO), miR-146b-5p抑制组(miR-146b-5p-ASO组)及DUSP16敲低表达组(shDUSP16),

DUSP16 对照组 (siCTL 组); 更换 DMEM 培养液培养 48 h, qRT-PCR 验证转染效率。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 实验 (qRT-PCR): 取转染后各组细胞采用 Trizol 试剂盒提取细胞总 RNA, 反转录为 cDNA, 以此为模板配置 RCR 反应体系行 RT-PCR 扩增分析。miR-146b-5p 引物序列: 上游 5'-CGTGCCACTGACAAGTGAAT-3', 下游 5'-CGACCAGAACTCAGTCGACA-3'; 内参 GAPDH 上游 5'-GTCACAGCATTTGCTCGTATTG-3', 下游 5'-CTCCTGCAACATCGTGATCGG-3'; 反应条件: 95 ℃ 2 min, 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 10 s, 40 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因相对表达。试验重复三次取平均值。

1.3.3 细胞增殖实验: 取对数生长期各组细胞以  $1 \times 10^7$  个/孔接种于 96 孔板, 每孔设 3 个生物复孔, 37 ℃, 5ml/dl CO<sub>2</sub> 孵育待细胞贴壁后进行转染; 配制 MTS 反应液, 每孔加入 MTS 液 100  $\mu$ l, 继续培养 48 h, 在 490 nm 处测量各孔吸光度值 (*A* 值), 绘制细胞生长曲线, 试验重复三次取平均值。

1.3.4 克隆形成实验: 待各组细胞贴壁后进行转染, 每孔设 3 个生物复孔, 培养至出现肉眼可见的克隆时, 终止培养, 收集细胞, PBS 洗涤两次, 去除多余洗涤液, 用含 0.5g/dl 结晶紫的甲醇溶液固定 15 min, 水洗、晾干, Giemsa 染色 30 min, 在 590 nm 处测 *A* 值, 试验重复三次取平均值。

1.3.5 双荧光素酶报告基因实验: 将转染后各组细胞接种到 6 孔板, 待其生长密度为 90% 时将含有海肾荧光素酶的 DUSP16-3'UTR-WT 野生型和 DUSP16-3'UTR-MUT 突变型质粒及 miR-146b-5p 转染到细胞中, 采用双荧光素酶测定系统进行荧光素酶活性测定, 试验重复三次取平均值。

1.3.6 蛋白免疫印迹实验: 取对数生长期各组细胞加入裂解液提取总蛋白, 并测定其浓度及纯度; 取定量蛋白制样, SDS-PAGE 电泳, 转膜, 5g/dl 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 加入一抗 4 ℃ 孵育过夜; 洗膜 3 次, 加入二抗室温孵育 1 h, 洗膜 3 次, 化学发光, 暗房显影, 凝胶成像系统拍照分析。

1.3.7 miR-146b-5p 靶标预测: 通过 microRNA 网站进行预测 miR-146b-5p 与 DUSP16 的结合位点, 行进一步研究。

1.3.8 DUSP16 与骨肉瘤预后的相关性: 通过公共 osteosarcoma R2 数据库 <http://r2.amc> 分析 DUSP16 与骨肉瘤预后的关系。

1.4 统计学分析 应用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析, 数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间差异比较采用 *t* 检验; 多组间差异比较采用 one-way ANOVA 分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验;

骨肉瘤组织及其对应正常组织中表达差异比较采用配对 *t* 检验;  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 骨肉瘤中 miR-146b-5p 表达 见图 1。qRT-PCR 检测显示, 30 组骨肉瘤组织中 miR-146b-5p 表达 ( $4.096 \pm 1.237$ ) 较邻近正常组织 ( $5.895 \pm 0.834$ ) 显著降低, 差异有统计学意义 ( $t=6.605, P < 0.001$ )。

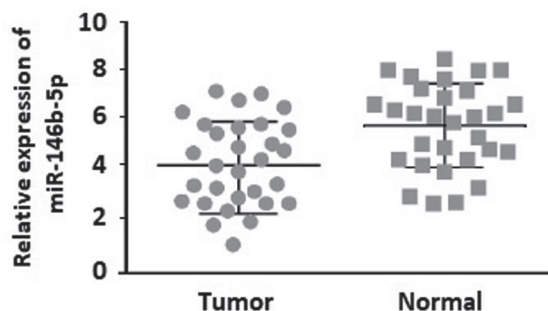


图1 miR-146b-5p 在骨肉瘤组织及邻近正常组织中的表达

2.2 过表达和敲低 miR-146b-5p 效率验证 qRT-PCR 检测显示, 转染 miR-146b-5p mimics 组细胞中 miR-146b-5p 表达 ( $4.562 \pm 0.026$ ) 较 NC-mimics 组 ( $1.003 \pm 0.002$ ) 明显升高, 差异有统计学意义 ( $t=236.393, P < 0.001$ ); 转染 miR-146b-5p-ASO 组细胞中 miR-146b-5p 表达 ( $0.394 \pm 0.002$ ) 较 NC-ASO 组 ( $1.251 \pm 0.003$ ) 明显降低, 差异有统计学意义 ( $t=411.689, P < 0.001$ ), 表明过表达和敲低 miR-146b-5p 表达的骨肉瘤细胞系构建成功, 可用于后续实验。

2.3 miR-146b-5p 对骨肉瘤细胞增殖及克隆形成的影响 见表 1。增殖实验检测显示, miR-146b-5p 过表达明显抑制了骨肉瘤细胞的增殖能力 ( $t=13.233 \sim 34.599$ , 均  $P < 0.01$ ), 敲低 miR-146b-5p 表达则显著促进了骨肉瘤细胞的增殖 ( $t=7.610 \sim 9.247$ , 均  $P < 0.01$ ), 差异均有统计学意义。细胞克隆实验检测显示, miR-146b-5p mimics 组细胞克隆形成率 ( $48.912 \pm 2.032$ ) 较 NC-mimics 组 ( $160.834 \pm 9.031$ ) 明显降低, 差异有统计学意义 ( $t=20.942, P < 0.001$ ); miR-146b-5p-ASO 组细胞克隆形成率 ( $239.658 \pm 11.034$ ) 较 NC-ASO 组 ( $128.502 \pm 2.413$ ) 明显升高, 差异有统计学意义 ( $t=17.046, P < 0.001$ )。

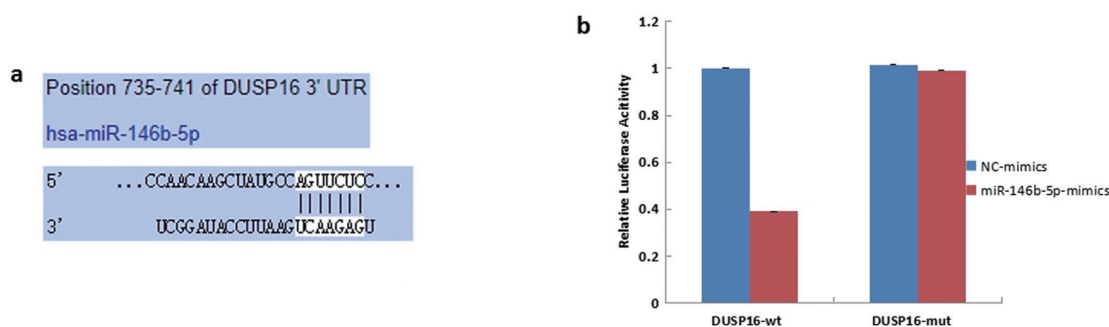
2.4 miR-146b-5p 靶基因的预测验证及调控关系 见图 2。检索 microRNA 网站发现, miR-146b-5p 与 DUSP16 3'UTR 区域存在靶向结合位点 (图 2a)。研究将 DUSP16-3'UTR-WT 和 DUSP16-3'UTR-MUT 质粒载体及 miR-146b-5p 共转染至 U2OS 细胞, 经双荧光素酶实验验证显示, 转染 miR-146b-5p mimics 组 DUSP16-3'UTR-WT 荧光素酶活性

( $0.394 \pm 0.002$ ) 较 NC-mimics 组 ( $1.001 \pm 0.002$ ) 显著降低, 差异有统计学意义 ( $t=371.710$ ,  $P < 0.001$ ); 而 DUSP16-3'UTR-MUT 荧光素酶活性 ( $0.998 \pm 0.003$ ) 较 NC-mimics 组 ( $1.001 \pm 0.001$ ) 无显著改变, 差异无统计学意义 ( $t=1.643$ ,  $P=0.176$ ) (图 2b), 证实 DUSP16 是 miR-146b-5p 的潜在靶基因。进一步发现, miR-146b-5p

mimics 组细胞中 DUSP16 表达 ( $0.231 \pm 0.013$ ) 较 NC-mimics 组 ( $1.011 \pm 0.002$ ) 明显降低, 差异有统计学意义 ( $t=102.715$ ,  $P < 0.001$ ), 相反的 miR-146b-5p-ASO 组细胞中 DUSP16 表达 ( $3.264 \pm 0.026$ ) 较 NC-ASO 组 ( $1.009 \pm 0.003$ ) 明显升高, 差异有统计学意义 ( $t=149.232$ ,  $P < 0.001$ ), 说明 miR-146b-5p 负向调控 DUSP16 表达。

表 1 过表达和敲低 miR-146b-5p 对骨肉瘤细胞增殖的影响 ( $A$  值,  $\bar{x} \pm s$ )

时间	NC-mimics 组	miR-146b-5p mimics 组	$t$	$P$	NC-ASO 组	miR-146b-5p-ASO 组	$t$	$P$
第 1 天	$0.153 \pm 0.003$	$0.152 \pm 0.006$	0.258	0.808	$0.152 \pm 0.004$	$0.153 \pm 0.005$	0.271	0.800
第 2 天	$0.262 \pm 0.002$	$0.199 \pm 0.008$	13.233	0.000	$0.273 \pm 0.004$	$0.349 \pm 0.016$	7.982	0.001
第 3 天	$0.382 \pm 0.006$	$0.248 \pm 0.003$	34.599	<0.001	$0.381 \pm 0.008$	$0.458 \pm 0.012$	9.247	0.001
第 4 天	$0.459 \pm 0.015$	$0.297 \pm 0.013$	14.136	0.000	$0.457 \pm 0.017$	$0.554 \pm 0.013$	7.851	0.001
第 5 天	$0.495 \pm 0.013$	$0.318 \pm 0.015$	15.445	0.000	$0.496 \pm 0.021$	$0.612 \pm 0.016$	7.610	0.002

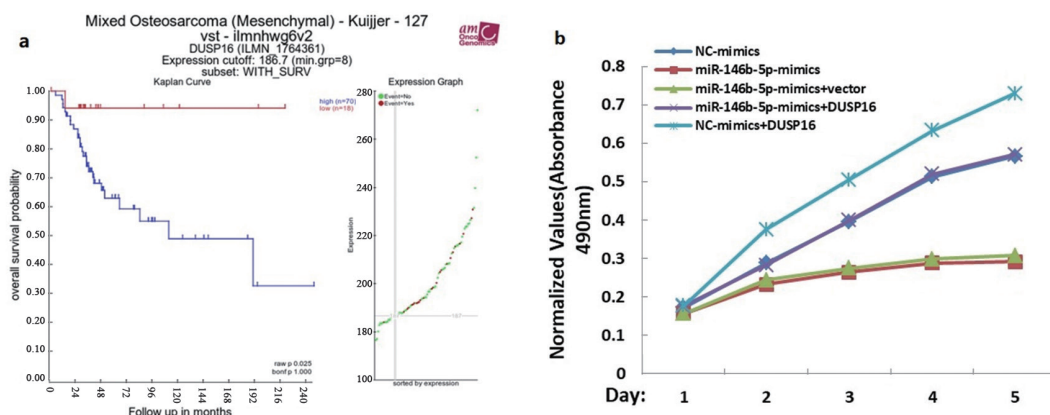


a. miRNA 网站预测 miR-146b-5p 与 DUSP16 的结合情况; b. 荧光素酶实验验证 miR-146b-5p 与 DUSP16 的结合关系

图 2 miR-146b-5p 靶基因的预测及验证

2.5 DUSP16 在骨肉瘤中的表达特征及 miR-146b-5p 与 DUSP16 的调控关系验证 见图 3, 表 2。30 组骨肉瘤组织中 DUSP16 表达 ( $5.683 \pm 0.457$ ) 相比邻近正常组织 ( $4.665 \pm 0.531$ ) 显著高表达, 差异有统计学意义 ( $t=7.959$ ,  $P < 0.001$ ), 与 miR-146b-5p 在骨肉瘤中的表达呈显著负相关 ( $r=-0.667$ ,  $P < 0.05$ ); 通过 osteosarcoma R2 数据库 <http://r2.amc> 分析发现 DUSP16 具有明显的高表达

预后差特征 (图 3a)。细胞增殖实验验证, 过表达 miR-146b-5p 显著抑制细胞增殖, 在 miR-146b-5p mimics 组细胞中过表达 DUSP16 后细胞增殖速率回归到正常水平, 在 NC-mimics 组中过表达 DUSP16 后细胞增殖速率较之前明显升高 (图 3b, 表 2), 说明 miR-146b-5p 通过负调控 DUSP16 表达在骨肉瘤细胞中发挥功能。



注: a. DUSP16 与骨肉瘤临床预后的关系; b. 细胞增殖实验验证 miR-146b-5p 与 DUSP16 的调控关系

图 3 骨肉瘤中 DUSP16 表达特征及其与 miR-146b-5p 的调控关系验证

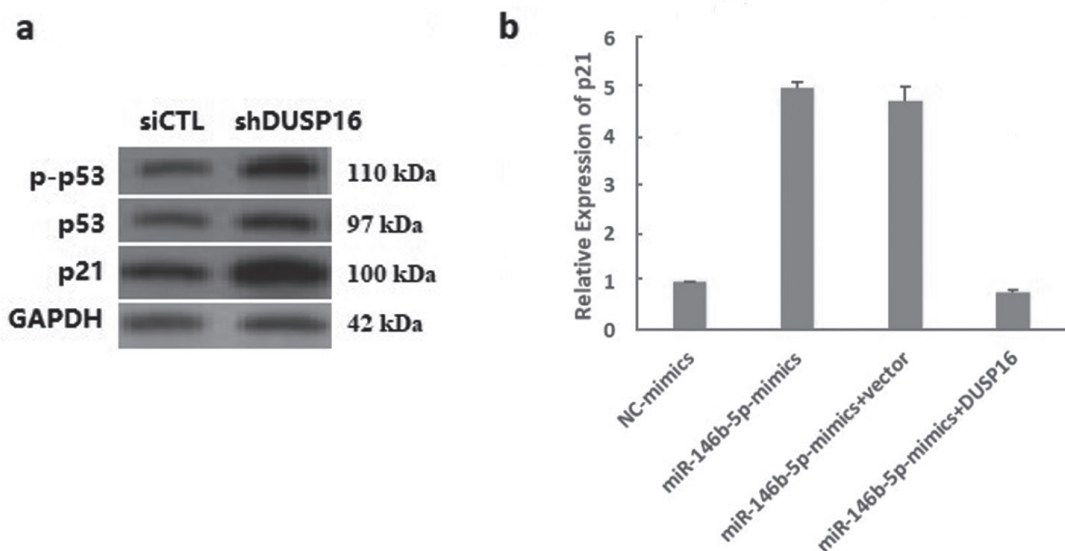
表2 miR-146b-5p 调控 DUSP16 对细胞增殖的影响 ( $A$  值,  $\bar{x} \pm s$ )

时间	NC-mimics 组	miR-146b-5p-mimics 组	miR-146b-5p-mimics+vector 组	miR-146b-5p-mimics+DUSP16 组	NC-mimics+DUSP16 组	$F$	$P$
第1天	0.177 ± 0.001	0.174 ± 0.003	0.172 ± 0.001	0.175 ± 0.002	0.174 ± 0.002	2.605	0.100
第2天	0.298 ± 0.002	0.246 ± 0.004*	0.249 ± 0.003	0.296 ± 0.002 <sup>#</sup>	0.384 ± 0.009*	409.447	< 0.001
第3天	0.401 ± 0.002	0.275 ± 0.003*	0.278 ± 0.002	0.401 ± 0.003 <sup>#</sup>	0.509 ± 0.009*	1356.056	< 0.001
第4天	0.523 ± 0.003	0.296 ± 0.004*	0.301 ± 0.001	0.254 ± 0.004 <sup>#</sup>	0.398 ± 0.008*	1651.033	< 0.001
第5天	0.566 ± 0.002	0.299 ± 0.003*	0.302 ± 0.002	0.567 ± 0.002 <sup>#</sup>	0.741 ± 0.006*	2631.974	< 0.001

注: \* 与 NC-mimics 组相比,  $t=13.338, 33.359, 60.381, 96.851; 12.568, 32.564, 59.051, 95.763; 22.059, 28.593, 33.250, 63.479$ , 均  $P < 0.001$ ; <sup>#</sup> 与 miR-146b-5p-mimics 组相比,  $t=12.825, 33.359, 11.172, 97.214$ , 均  $P < 0.001$ 。

2.6 miR-146b-5p 调控 DUSP16 参与 P53 信号通路在骨肉瘤中发挥作用 见图 4。研究经介导转染 siRNA 敲低 DUSP16 表达, 发现 siDUSP16 组 P53 磷酸化水平 ( $1.342 \pm 0.019$ ) 较转染无义序列 siCTL 组 ( $0.452 \pm 0.013$ ) 显著升高 ( $t=66.960, P < 0.001$ ), 同时 P53 靶基因 P21 (肿瘤抑制子) 表达 ( $3.136 \pm 0.145$ ) 也较 siCTL 组 ( $1.110 \pm 0.014$ ) 显著升高 ( $t=24.089, P < 0.001$ ), 差异均有统计学意义 (图 4a), 说明在骨肉瘤中 DUSP16 可参与

调控 P53 信号通路。进一步验证发现, miR-146b-5p mimics 组细胞中 P21 表达 ( $4.995 \pm 0.214$ ) 较 NC-mimics 组 ( $1.001 \pm 0.002$ ) 显著升高 ( $t=32.325, P < 0.001$ ); 在过表达 miR-146b-5p 组细胞中再次过表达 DUSP16 后, P21 表达 ( $0.986 \pm 0.012$ ) 较单独过表达 miR-146b-5p 组显著降低 ( $t=32.398, P < 0.001$ ) (图 4b), 差异均有统计学意义。由此说明 miR-146b-5p 通过靶向调控 DUSP16 表达在骨肉瘤中发挥作用是通过 P53 信号通路来实现的。



a. 敲低 DUSP16 表达对 P53 和 p21 表达的影响; b. miR-146b-5p 调控 DUSP16 对 P21 表达的调控作用

图4 miR-146b-5p 调控 DUSP16 参与 P53 信号通路在骨肉瘤中发挥作用

### 3 讨论

骨肉瘤 (OS) 占儿童恶性肿瘤的 2.4%, 恶性程度高, 易侵犯周围软组织, 常发生远处转移至肺及骨骼等部位, 约 10% ~ 20% OS 患者诊断时已发生早期转移, 预后明显恶性<sup>[13]</sup>。且据报道, 非转移性 OS 患者 5 年生存率可达 80.5%, 转移性 OS 患者 5 年生存率仅为 15% ~ 30%<sup>[14]</sup>。故基于分子生物学角度探究 OS 发生、转移的分子机制, 找寻新的有效的 OS 治疗靶标对提高患者预后意义显著。

近年研究发现 miRNA 可通过碱基互补方式与靶基因 3'-UTR 区结合, 降解 mRNA 或抑制 mRNA

翻译, 在肿瘤发生发展过程中调节细胞多种生物学过程, 参与肿瘤的恶性发展<sup>[15,6,8]</sup>。miRNAs 表达失调是肿瘤发生及转移的诱因<sup>[8]</sup>。大量研究证实, 不同 miRNAs 异常表达与 OS 细胞增殖、迁移和侵袭及不良预后相关, 如 miRNA-505, miR-210-5p 和 microRNA-320a 等<sup>[16-18]</sup>, 由此可见 mRNAs 在 OS 中的发生及转移中起着重要作用。miR-146b 是近年研究新发现的一种 miRNA, 位于第 10 号染色体, 包含 miR-146b-3p 和 miR-146b-5p 两种形式, 其中后者在人肝脏、脾脏组织中呈不同程度高表达<sup>[12]</sup>。而在肿瘤的研究中发现, miR-146b-5p 缺失通过 IL-

17A 途径能够促进 T 细胞急性淋巴细胞白血病的迁移和侵袭<sup>[19]</sup>。通过碘参与下调 miR-146b-5p 可抑制甲状腺乳头状癌细胞的增殖<sup>[10]</sup>。lnc-AL445665.1-4 可能通过与 miR-146b-5p 的相互作用参与了子宫多发平滑肌瘤的发生发展<sup>[11]</sup>。lncRNA-NEAT1 通过 miR-146b-5p/NOTCH1 信号通路促进了 T 细胞急性淋巴母细胞白血病 (T-ALL) 细胞的增殖<sup>[20]</sup>。此外还发现, miR-146b-5p 在乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌等人类恶性肿瘤中表达下调<sup>[21]</sup>, 提示其可能作为抑癌基因发挥作用, 参与恶性肿瘤的发展进程, 可作为肿瘤治疗的新靶点。本研究显示, 骨肉瘤组织中 miR-146b-5p 显著低表达, 其过表达能够抑制 OS 细胞的增殖和克隆形成, 发挥抑癌基因特性, 故探究其发挥作用的分子机制意义重大。

本研究检索生物学信息数据库发现 miR-146b-5p 与 DUSP16 存在结合位点, 经荧光素酶实验证实 DUSP16 是 miR-146b-5p 的靶基因。研究表明, 双重特异性磷酸酶 16 (DUSP16, 也称为促分裂原活化的蛋白激酶磷酸酶 7) 通过减弱磷酸丝氨酸 / 苏氨酸和磷酸酪氨酸残基 (例如 p38 和 JNK 途径 21) 的磷酸化可抑制其靶激酶的活化<sup>[22]</sup>。DUSP16 表达调节能够控制 ERK 和 p38 MAP 激酶活性, 介导化疗诱导的乳腺癌干细胞富集<sup>[23]</sup>。靶向 DUSP16/TAK1 信号通过抑制 JNK MAPK 减轻高脂饮食 (HFD) 小鼠的肝脏血脂异常和炎症<sup>[24]</sup>。并发现 DUSP16 表达上调可促进人类肝癌细胞的增殖<sup>[25]</sup>。CircDUSP16 通过调控 miR-497-5p/TKTL1 轴促进食管鳞癌细胞发育<sup>[26]</sup>。CircDUSP16 通过海绵化 miR-145-5p 促进了胃癌的发生和侵袭<sup>[27]</sup>。而本研究中发现骨肉瘤组织中 DUSP16 显著高表达, 具有明显的高表达预后差特征, 与 miR-146b-5p 存在显著负相关, 暗示了 DUSP16 的癌基因属性。经细胞实验检测证实, DUSP16 过表达促进了 OS 细胞增殖, miR-146b-5p 对 OS 细胞的增殖调控与其对 DUSP16 表达的调控相关。作用机制方面, 既往研究报道在三阴性乳腺癌化疗过程中, DUSP16 表达显著降低导致 p38 被激活, 从而促进了化疗耐药乳腺癌干细胞表型的规范, 为临床治疗提供了新靶点<sup>[23]</sup>。既往 HAO 等<sup>[28]</sup>也报道, 小鼠模型中 DUSP1 可抑制 p38 MAPK 磷酸化, 导致 HCC 细胞中 P53 磷酸化增强, 从而激活 p53 和 p21 并诱导其表达, 促进肝细胞癌细胞的凋亡。所以本研究进一步探究了 miR-146b-5p 调控 DUSP16 对 P53 信号通路的影响, 发现敲低 DUSP16 可促使 P53 磷酸化及 P53 靶基因 P21 表达显著升高, 证实 miR-146b-5p 调控 DUSP16 可能通过 P53 信号通路参与了 OS 的发生发展。故继续探究 miR-146b-5p 调控 DUSP16

对 P53 信号通路的影响机制可为 OS 的诊断及治疗提供更加有效的参考靶标。

综上所述, OS 中 miR-146b-5p 低表达通过靶向负调控 DUSP16 参与 OS 细胞的增殖及克隆形成, 与 P53 信号通路关系密切。

#### 参考文献:

- [1] HARRISON D J, GELLER D S, GILL J D, et al. Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma[J]. Expert Review of Anticancer Therapy, 2018, 18(1): 39-50.
- [2] YANG Chaofei, TIAN Ye, ZHAO Fan, et al. Bone microenvironment and osteosarcoma metastasis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(19): 6985.
- [3] SAYLES L C, BREESE M R, KOEHNE A L, et al. Genome-informed targeted therapy for osteosarcoma[J]. Cancer Discovery, 2019, 9(1): 46-63.
- [4] CHEN Liang, HEIKKINEN L, WANG Changliang, et al. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools[J]. Briefings in Bioinformatics, 2019, 20(5): 1836-1852.
- [5] 张振, 潘晴, 刘旭, 等. circRNA 与肿瘤发生的研究进展 [J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(2): 157-159, 164. ZHANG Zhen, PAN Qing, LIU Xu, et al. Research progress of the relationship between circular RNA and tumorigenesis [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(2): 157-159, 164.
- [6] ORLANDINI VON NIESSEN A G, POLEGANOV M A, RECHNER C, et al. Improving mRNA-Based therapeutic gene delivery by Expression-Augmenting 3'UTRs identified by cellular library screening[J]. Molecular Therapy, 2019, 27(4): 824-836.
- [7] KHANA Q, AHMED E I, ELAREER N R, et al. Role of miRNA-regulated cancer stem cells in the pathogenesis of human malignancies[J]. Cells (Basel, Switzerland), 2019, 8(8): 840.
- [8] LI Songming, HAO Junwen, HONG Yun, et al. Long non-coding RNA NEAT1 promotes the proliferation, migration, and metastasis of human Breast-Cancer cells by inhibiting miR-146b-5p expression[J]. Cancer Management and Research, 2020, 12: 6091-6101.
- [9] LIU Yinan, TSAI Mengfeng, WU Shanggin, et al. MiR-146b-5p enhances the sensitivity of NSCLC to EGFR tyrosine kinase inhibitors by regulating the IRAK1/NF- $\kappa$ B pathway[J]. Molecular Therapy Nucleic Acids, 2020, 22: 471-483.
- [10] PAN Yujia, YUN Weikang, SHI Bingshuai, et al. Downregulation of miR-146b-5p via Iodine involvement repressed papillary thyroid carcinoma cell proliferation[J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2020, 65(2): 1-10.
- [11] YANG E, XUE Luqi, LI Zhengyu, et al. Lnc-AL445665.1-4 may be involved in the development of multiple uterine leiomyoma through interacting with miR-146b-5p[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 709.

(下转第 104 页)