

## miR-21 靶向调控 PTEN/PI3K/AKT 通路对骨肉瘤细胞增殖、侵袭和凋亡的影响

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 检测微小核糖核酸 (micro RNA, miR) -21 在人正常骨细胞 hFOB1.19 与人骨肉瘤细胞系 U2OS, Saos-2 和 MG-63 中的表达, 并探讨 miR-21 对骨肉瘤细胞增殖、侵袭和凋亡的影响。方法 实时荧光定量 PCR 法 (real-time fluorescent quantitative PCR, qRT-PCR) 检测人正常骨细胞 hFOB1.19 与人骨肉瘤细胞系 U2OS, Saos-2 和 MG-63 中 miR-21 的表达。选择 MG-63 细胞随机分为 3 组, 利用脂质体 2000 分别转染空白对照 (control)、阴性对照 miR-21-NC 及抑制剂组 (miR-21-inhibitor), 再通过 qRT-PCR 法验证转染后 MG-63 细胞中 miR-21 表达。CCK-8 法检测 MG-63 细胞增殖能力变化; 流式细胞技术检测抑制 miR-21 表达对 MG-63 细胞凋亡的影响; Transwell 实验检测对 MG-63 细胞侵袭能力的影响以及采用 Western blot 检测抑制 miR-21 表达对 MG-63 细胞中 PTEN, PI3K, AKT 及 p-AKT 蛋白表达的影响。结果 人骨肉瘤细胞系 Saos-2, U2OS 和 MG-63 中 miR-21 相对表达水平分别为  $1.29 \pm 0.14$ ,  $1.75 \pm 0.21$  和  $2.12 \pm 0.25$ , 较人正常骨细胞 hFOB 1.19 中 miR-21 表达水平 ( $0.75 \pm 0.12$ ) 显著升高, 差异具有统计学意义 ( $F=38.037$ ,  $P=0.002$ )。转染抑制剂培养 48h 后, 与 Control 组 miR-21 表达水平 ( $2.07 \pm 0.28$ ) 和 miR-21-NC 组 miR-21 表达水平 ( $2.02 \pm 0.33$ ) 相比, miR-21-inhibitor 组 miR-21 表达水平 ( $1.07 \pm 0.15$ ) 显著下降, 差异具有统计学意义 ( $F=33.357$ ,  $P=0.005$ )。CCK-8 结果表明, 与 Control 组和 miR-21-NC 组相比, miR-21-inhibitor 组各个时间点 A 值均显著下降, 差异具有统计学意义 ( $F=71.409 \sim 378.281$ , 均  $P < 0.001$ )。流式细胞检测结果表明, miR-21-inhibitor 组凋亡数占比为 45.0%, 较 Control 组 (8.65%) 和 miR-21-NC 组 (10.60%) 均有增加, 差异有统计学意义 ( $F=56.134$ ,  $P < 0.001$ )。Transwell 实验结果显示, miR-21-inhibitor 组细胞穿膜数 ( $102 \pm 9$  个) 较 Control 组细胞穿膜数 ( $189 \pm 12$  个) 及 miR-21-NC 组细胞穿膜数 ( $177 \pm 16$  个) 明显减少, 差异有统计学意义 ( $F=158.781$ ,  $F < 0.001$ )。Western blot 结果表明, miR-21-inhibitor 组 PTEN 表达上调, PI3K 和 p-AKT 表达下调, 差异均有统计学意义 ( $F=86.309 \sim 138.615$ , 均  $P < 0.001$ ), 但对 AKT 蛋白表达无明显影响, 差异无统计学意义 ( $F=14.527$ ,  $P=0.152$ )。结论 miR-21 在人骨肉瘤细胞系中呈高表达, 抑制 miR-21 表达可以抑制骨肉瘤细胞增殖和侵袭, 促进其凋亡, 作用机制可能与 PTEN/PI3K/AKT 通路有关。

**关键词:** 骨瘤细胞; 微小核糖核酸 -21; PTEN/PI3K/AKT 通路; 增殖和侵袭; 凋亡

中图分类号: R738.1; R730.43 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2022) 04-018-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2022.04.004

## Effect of miR-21 Targeted Regulation of PTEN/PI3K/AKT Pathway on the Proliferation, Invasion and Apoptosis of Osteosarcoma Cells

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

**Abstract: Objective** To detect the expression of miR-21 in human normal bone cell hFOB1.19 and human osteosarcoma cell lines U2OS, Saos-2 and MG-63, and explore the effect of miR-21 on the proliferation, invasion and apoptosis of osteosarcoma cells. **Methods** Real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) method was used to detect the expression of miR-21 in human normal bone cell hFOB1.19 and human osteosarcoma cell lines U2OS, Saos-2 and MG-63. MG-63 cells were randomly divided into 3 groups, and used liposome 2000 to transfect with control, miR-21-NC and miR-21-inhibitor, respectively. Then verified the expression of miR-21 in MG-63 cells after transfection by qRT-PCR. The proliferation of MG-63 cells was detected by CCK-8 method. The effect of inhibiting miR-21 expression on MG-63 cell apoptosis was detected by flow cytometry. Transwell assay was used to detect the invasion ability of MG-63 cells. Western blot was further used to detect the effect of inhibiting the expression of miR-21 on the protein expression of PTEN, PI3K, AKT and p-AKT in MG-63 cells. **Results** The relative expression levels of miR-21 in the human osteosarcoma cell lines Saos-2, U2OS and MG-63 were  $1.29 \pm 0.14$ ,  $1.75 \pm 0.21$  and  $2.12 \pm 0.25$  compared with the miR-21 in human normal bone cells hFOB 1.19. The expression level ( $0.75 \pm 0.12$ ) increased significantly, the difference was statistically significant ( $F=38.037$ ,  $P=0.002$ ). After the transfection inhibitor was

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目 (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。

cultured for 48 hours, compared with the expression level of miR-21 in the control group ( $2.07 \pm 0.28$ ) and the expression level of miR-21-NC ( $2.02 \pm 0.33$ ), the expression level of miR-21 in the miR-21-inhibitor group ( $1.07 \pm 0.15$ ) significantly decreased, and the difference was statistically significant ( $F=33.357$ ,  $P=0.005$ ). The results of CCK-8 showed that compared with the control group and the miR-21-NC group, the  $A$  value of the miR-21-inhibitor group decreased significantly at each time point, and the difference were more statistically significant ( $F=71.409 \sim 378.281$ , all  $P < 0.001$ ). Flow cytometry results showed that the proportion of apoptotic number in the miR-21-inhibitor group was 45.0%, which was an increase compared with 8.65% in the control group and 10.60% in the miR-21-NC group, the difference was statistically significant ( $F=56.134$ ,  $P < 0.001$ ). Transwell experiment results showed that the number of cells penetrating the membrane in the miR-21-inhibitor group ( $102 \pm 9$ ) was higher than the number of cells penetrating the control group ( $189 \pm 12$ ) and the number of cells penetrating the miR-21-NC group ( $177 \pm 16$ ) significantly reduced, the difference was statistically significant ( $F=158.781$ ,  $P < 0.001$ ). Western blot results showed that the expression of PTEN in the miR-21-inhibitor group was up-regulated, and the expression of PI3K and p-AKT was down-regulated, the difference were statistically significant ( $F=86.309 \sim 138.615$ , all  $P < 0.001$ ), but it had no significant effect on the expression of AKT protein, the difference was not statistically significant ( $F=14.527$ ,  $P=0.152$ ). **Conclusion** MiR-21 was highly expressed in human osteosarcoma cell lines, and inhibition of miR-21 expression can inhibit the proliferation and invasion of osteosarcoma cells and promote their apoptosis. The mechanism of action may be related to the PTEN/PI3K/AKT pathway.

**Keywords:** osteoma cells; miR-21; PTEN/PI3K/AKT pathway; proliferation and invasion; apoptosis

骨肉瘤 (osteoma cells) 是一种来源于骨骼的原发恶性肿瘤, 好发于 10 ~ 20 岁青少年, 该年龄段是人体生长发育最快阶段, 若骨细胞发生恶性突变, 形成恶性骨肉瘤, 会严重威胁青少年健康成长, 但关于骨肉瘤的发病机制尚不明确, 仍缺乏病因治疗<sup>[1-2]</sup>。因此, 寻找在骨肉瘤发病过程中具有调节作用的关键基因, 并深入探讨其调控机制, 可以为骨肉瘤的后期治疗提供新方向。微小核糖核酸 (microRNA, miR) -21 作为具有调控作用的非编码微小 RNA, 与多种疾病的发生发展密切相关, 参与了肿瘤增殖、侵袭及转移的各个阶段<sup>[3]</sup>。有研究报道, miR-21 在肺癌中具有致癌活性, 其高表达对非小细胞肺癌的总生存期有负面影响, 并且可以预测非小细胞肺癌的术后复发率和生存率, 可作为判断肺癌疾病进展的分子预后标志物<sup>[4]</sup>。另有研究报道, miR-21 在胃癌、肾细胞癌、肝癌等多种恶性肿瘤中均作为促癌因子, 抑制 miR-21 表达, 则对患者体内癌细胞的增殖及侵袭起到一定的抑制作用, 这可能为恶性肿瘤的治疗提供新的潜在策略<sup>[5-7]</sup>。此外, 还有研究证实 miR-21 在骨肉瘤组织中高表达, 且与病理分期、肿瘤等级及肺转移等临床病理有关, 但关于 miR-21 作用骨肉瘤的调控机制却鲜有报道<sup>[8]</sup>。因此, 本研究着重分析 miR-21 在人骨肉瘤细胞系中的表达及抑制 miR-21 表达后对骨肉瘤 MG-63 细胞增殖、凋亡及侵袭的影响, 进而深入探讨 miR-21 在骨肉瘤发生发展中的分子机制。

## 1 材料及方法

1.1 细胞株来源 人正常骨细胞 hFOB1.19, 人骨肉瘤细胞 MG-63, U2OS 和 Saos-2 均购自中国科学院细胞库。

1.2 仪器与试剂 胎牛血清, DMEM 培养液 (郑

州九龙生物制品有限公司); RNA 试剂盒, RNA 逆转录试剂盒 [翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司]; CCK-8 试剂盒 (上海通蔚实业有限公司); PTEN, PI3K, AKT, p-AKT 多克隆抗体 (北京艾柏森生物科技有限公司); LipofectAMINE 2000 细胞转染试剂盒 (杭州联科美讯生物医药技术有限公司); Transwell 小室 (北京明阳科华生物科技有限公司); 细胞培养箱 (德国 Binder 公司); 荧光显微镜 (日本尼康公司)。

## 1.3 方法

1.3.1 细胞培养: 将 hFOB1.19, MG-63, U2OS 和 Saos-2 细胞接种于含 10g/dl 胎牛血清, 100 U/ml 青霉素和链霉素混合液配置的 DMEM 培养液, 放置于 37℃ 细胞培养箱中常规培养, 待细胞贴壁生长至融合度为 80% 时, 用胰蛋白酶消化、传代, 选取对数生长期的细胞进行后续实验。

1.3.2 qRT-PCR 检测各细胞中 miR-21 的表达: 依照 RNA 提取试剂盒说明书对上述对数生长期的各组细胞进行总 RNA 提取, 取少量纯度高的 RNA 加入提前灭菌的无酶离心管, 再依次加入 RNA 反转录试剂盒中的相关试剂, 通过酶促反应合成第一链 cDNA; 用上述合成的第一链 cDNA 作为模板进行 qRT-PCR 扩增, 扩增体系为 25  $\mu$ l, 扩增条件为: 95℃ 15 s; 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 循环 35 次; 所有操作完成后即可通过 PCR 仪检测各组细胞中 miR-21 表达量, 其相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算。PCR 引物序列: miR-21: 上游 5'-GTCGAGCGTCGCACGT-3', 下游 5'-GCCGGTACGTTATCACAGTGT-3'; 内参 U6: 上游 5'-CTAAC TGATACTGCGCTAGCA-3', 下游 5'-TGCGACCGACGACAATGAA-3'。

1.3.3 细胞转染:取对数生长期的MG-63细胞接种于24孔板,待细胞浑浊度为90%~95%时,将其随机分为三组,即Control组,miR-21-NC组及miR-21-inhibitor组,在每组细胞培养板中加入提前混合均匀的LipofectAMINE 2000试剂和DNA稀释液,并轻轻摇动使细胞与混合液充分融合,转染4~6h后将细胞以1:10比例转移到新鲜培养液中继续培养48h,然后通过qRT-PCR法验证转染效率。

1.3.4 细胞增殖实验:取上述转染后各组细胞,胰蛋白酶消化后接种于96孔板中,每组设5个复孔,将细胞培养板置于培养箱分别培养24,48,72,96h,取出后每孔加20  $\mu$ l CKK-8溶液,尽量避免产生气泡,继续放入培养箱孵育1~4h,用酶标仪测定450 nm处的吸光度( $A$ ),吸光度值越大则细胞增殖能力越强。

1.3.5 细胞凋亡实验:分别取上述转染后各组细胞,经消化、离心后收集全部细胞至1.5 ml离心管,用提前预冷的PBS洗涤两次,然后加入1 $\times$ 结合缓冲液1 ml重悬细胞。取100  $\mu$ l细胞重悬液加入5 ml培养管中,加入5  $\mu$ l FITC标记的Annexin-V和5  $\mu$ l PI染液,混匀后室温避光孵育15 min,然后再加入400  $\mu$ l的1 $\times$ 结合缓冲液,整个操作过程不能用力吹打细胞,反应完毕后应在1h内上机检测,用FL1通道检测FITC-Annexin V荧光,用FL2通道检测PI荧光。

1.3.6 细胞侵袭实验:用50 mg/L Matrigel 1:8稀释液包被Transwell小室底部膜的上室面,4 $^{\circ}$ C风干。取上述转染后的各组细胞,终止消化后用PBS润洗1~2遍,用含BSA的无血清培养液重悬细胞,并调整细胞浓度为 $5 \times 10^5$ ,取200  $\mu$ l细胞重悬液接种于放有Transwell小室的24孔板中,在24孔板下室加入500  $\mu$ l含FBS的培养液,若下层培养液与小室之间出现气泡,则需将小室提起,去除气泡后再放进培养板,置于细胞培养箱中常规培养24h,取出Transwell小室,用棉签擦去基质胶和上室内的细胞,下层细胞经PBS清洗和酒精固定后,用0.1 g/dl结晶紫染色20 min, PBS清洗2次,倒置晾干后即可在光学显微镜下进行计数并拍照。

1.3.7 免疫印迹实验:分别取上述转染后的各组细胞,置于冰上,加入1 ml PBS重悬后,4 $^{\circ}$ C离心5 min,除去细胞中残留的微量血清,然后加入IP细胞裂解液轻轻重悬细胞,在4 $^{\circ}$ C, 13 000 r/min的条件下离心10 min,将上清液转移至1.5 ml离心管,取5  $\mu$ l进行蛋白定量,将所有蛋白浓度调整为统一大小后,100 $^{\circ}$ C加热5 min,以充分变性蛋白。然后在提前准备好的电泳槽中开始上样,每孔上样量为10  $\mu$ l,上样完毕后盖好电泳槽盖子,选择适当

电压进行电泳,上层浓缩胶电压为80 V,下层分离胶电压为110 V,待溴酚蓝染料前沿下至凝胶末端3 cm处停止电泳。按照阴极碳板、海绵、三滤纸、胶、膜、三滤纸、海绵、阳极碳板的顺序进行转膜,转膜条件为300 mA, 60 min。转膜结束后把蛋白膜放入Western洗涤液漂洗3 min, 5 g/dl脱脂牛奶室温封闭1 h,加入提前稀释好的一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜,回收一抗,洗膜液漂洗3次后加入二抗,摇床孵育1 h,回收二抗,洗膜液漂洗3次后根据显影定影试剂说明进行洗片,常温晾干后将胶片置于凝胶成像仪观察拍照,并用Image-J软件分析各组蛋白相对表达。

1.4 统计学分析 采用SPSS 20.0软件进行实验结果分析,服从正态分布的计量数据均采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD- $t$ 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 人正常骨细胞和人骨肉瘤细胞系中miR-21表达水平比较 qRT-PCR结果表明,人骨肉瘤细胞系Saos-2, U2OS和MG-63中miR-21的相对表达水平分别为 $1.29 \pm 0.14$ ,  $1.75 \pm 0.21$ ,  $2.12 \pm 0.25$ ,较人正常骨细胞hFOB 1.19中miR-21表达水平( $0.75 \pm 0.12$ )显著升高,差异具有统计学意义( $F=38.037$ ,  $P=0.002$ )。

2.2 MG-63细胞转染效果验证 qRT-PCR验证发现,Control组miR-21表达水平为 $2.07 \pm 0.28$ , miR-21-NC组其表达水平为 $2.02 \pm 0.33$ , miR-21-inhibitor组miR-21表达水平( $1.07 \pm 0.15$ )较以上两组显著下降,差异具有统计学意义( $F=33.357$ ,  $P=0.005$ ),说明转染成功。

2.3 抑制miR-21表达对MG-63细胞增殖能力的影响 见表1。CKK-8结果表明,与Control组和miR-21-NC组相比,miR-21-inhibitor组各个时间点 $A$ 值均显著下降,其差异具有统计学意义( $F=71.409 \sim 378.281$ , 均 $P < 0.001$ ),说明抑制miR-21表达可抑制MG-63细胞增殖。

2.4 抑制miR-21表达对MG-63细胞凋亡能力的影响 流式细胞检测结果显示,Control组MG-63细胞凋亡数为8.65%, miR-21-NC组细胞凋亡数为10.60%,抑制miR-21表达后,其凋亡数占细胞总数的45.0%,较Control组和miR-21-NC组显著增加,差异具有统计学意义( $F=56.134$ ,  $P < 0.001$ )。

2.5 抑制miR-21表达对MG-63细胞侵袭能力的影响 Transwell细胞侵袭实验表明,miR-21-inhibitor组细胞穿膜数为 $102 \pm 9$ 个,较Control组细胞穿膜数( $189 \pm 12$ 个)及miR-21-NC组细胞穿



膜数 ( $177 \pm 16$  个) 明显减少, 差异有统计学意义 ( $F=158.781, P < 0.001$ ), 说明抑制 miR-21 表达

表 1 不同时间点各组细胞吸光值 ( $A$ ) 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

时间 (h)	Control <sup>①</sup>	miR-21-NC 组 <sup>②</sup>	miR-21-inhibitor 组 <sup>③</sup>	$F$	$P$
24	$0.214 \pm 0.017$	$0.205 \pm 0.021$	$0.093 \pm 0.009$	71.409	$< 0.001$
48	$0.452 \pm 0.023$	$0.431 \pm 0.017$	$0.219 \pm 0.012$	168.511	$< 0.001$
72	$0.874 \pm 0.026$	$0.842 \pm 0.028$	$0.476 \pm 0.019$	257.545	$< 0.001$
96	$1.014 \pm 0.031$	$0.992 \pm 0.027$	$0.753 \pm 0.031$	378.281	$< 0.001$

注: 24, 48, 72, 96h ③组 vs ①组,  $t=9.013, 15.936, 23.186, 10.753$ , 均  $P < 0.001$ ; ③组 vs ②组,  $t=8.343, 14.500, 21.321, 9.847$ , 均  $P < 0.001$ 。

2.6 抑制 miR-21 表达对 MG-63 细胞中 PTEN, PI3K, AKT 及 p-AKT 蛋白表达的影响 见表 2。Western blot 结果表明, 与 Control 组和 miR-21-NC 组相比, miR-21-inhibitor 组 PTEN 蛋白表达显著上升, 差异有统计学意义 ( $F=102.781$ ,

$P < 0.001$ ), PI3K 和 p-AKT 蛋白表达水平显著下降, 差异亦具有统计学意义 ( $F=86.309, P < 0.001$ ;  $F=138.615, P < 0.001$ ), 但抑制 miR-21 表达对 AKT 蛋白表达水平无明显影响, 差异无统计学意义 ( $F=14.527, P=0.152$ )。

表 2 抑制 miR-21 表达对各组细胞相关蛋白表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	Control	miR-21-NC 组	miR-21-inhibitor 组	$F$	$P$
PTEN	$0.61 \pm 0.017$	$0.65 \pm 0.021$	$1.12 \pm 0.009$	102.781	$< 0.001$
PI3K	$0.75 \pm 0.023$	$0.72 \pm 0.017$	$0.41 \pm 0.012$	86.309	$< 0.001$
AKT	$0.92 \pm 0.026$	$0.89 \pm 0.028$	$0.90 \pm 0.019$	14.527	0.152
p-AKT	$1.01 \pm 0.031$	$0.99 \pm 0.027$	$0.54 \pm 0.031$	138.615	$< 0.001$

### 3 讨论

由于骨肉瘤早期症状与普通的关节疼痛相似, 不易被重视, 且骨肉瘤侵袭能力强, 在早期极易发生转移, 导致术后 5 年生存率较低, 严重影响患者的预后<sup>[9]</sup>。因此, 急需寻找新的治疗方法和靶向药物来进一步提高骨肉瘤患者的生存率, 改善其不良预后。miR-21 属于原癌基因, 几乎所有的癌症都有参与, 主要包括细胞分化、基因调控、肿瘤发生等多种生物学行为<sup>[10]</sup>。赵琦等<sup>[11]</sup>研究表明, 与对照组相比, miR-21 在肺癌患者血浆表达水平明显升高, 且其表达水平与 TNM 分期、淋巴结转移及化疗疗效相关。ZHANG 等<sup>[12]</sup>研究结果发现 miR-21 高表达通过调节 PDCD4 基因来促进成纤维细胞的激活, 显著增加 MMP-3, MMP-9, PDGF 和 CCL-7 的表达, 进而促进胰腺导管腺癌 (PDAC) 细胞系的侵袭及增加了 PDAC 的耐药性, 说明 miR-21 是激活与癌症相关的成纤维细胞的重要调节剂。此外, 大量研究显示, miR-21 在胶质母细胞瘤、乳腺癌等多种恶性肿瘤中作为促癌因子, 与癌细胞增殖、侵袭及迁移等密切相关<sup>[13-14]</sup>。关于 miR-21 对骨肉瘤的影响也有部分报道, 但其作用机制尚不明确, 还需进一步的验证<sup>[15]</sup>。

PI3K/AKT 通路广泛存在于细胞中, 与人类肿瘤的发生、发展及治疗密切相关, 其异常激活不仅能导致细胞恶性转化, 而且能促进肿瘤细胞增殖、生长及分化等, PTEN 作为 miR-21 的靶向调控因

子, 能够通过调节 PI3K/AKT 途径影响到肿瘤细胞增殖、侵袭及凋亡, 对癌症的发生发展起到重要作用<sup>[16-17]</sup>。WU 等<sup>[18]</sup>发现 miR-21 在食道癌组织中高表达, 抑制 miR-21 表达, 可降低癌细胞增殖、侵袭及迁移活性, 并且 miR-21 低表达可以负向调控靶基因 PTEN 的表达, 进而抑制 PI3K/AKT 活化, 为食管癌的临床治疗提供了新方法。ZHAO 等<sup>[19]</sup>研究发现苦参碱可以诱导 TCP-1 细胞凋亡和细胞周期停滞, 其作用机制可能与 miR-21/ PTEN/ Akt 途径有关。有研究发现, 丙泊酚在体外通过 miR-21/ PTEN/AKT 途径抑制肺癌 A549 细胞的生长; 在体内促进肿瘤细胞凋亡, 这可能是一种更特异、更有效治疗肺癌的新方法<sup>[20]</sup>。

本研究首先采用 qRT-PCR 发现骨肉瘤细胞系中 miR-21 表达水平显著高于正常骨细胞, 因此可以推断 miR-21 与骨肉瘤的发生发展密切相关, 是一种促癌基因; 此外还能观察到 miR-21 在 MG-63 细胞中的表达最为显著, 因此, 选择该细胞进行转染实验, 结果表明转染抑制剂能显著降低 MG-63 细胞中 miR-21 的表达, 说明利用脂质体 2000 进行转染实验是稳定可行的; CKK-8 实验和 Transwell 实验发现, 干扰 miR-21 表达可以降低 MG-63 细胞的增殖和侵袭能力。流式结果显示, Control 组和 miR-21-NC 组 MG-63 细胞膜保持完好, 活细胞比例较高, 只出现了少量坏死和早期凋亡。miR-21-inhibitor 组 MG-63 正常细胞比例显著降低, 而晚

期细胞凋亡比例显著升高,推测其原因可能是通过RNA干扰技术抑制miR-21表达,则可诱导MG-63细胞从正常期向凋亡期转变,加快其凋亡进程。同时本研究经Westernblot实验检测发现,抑制miR-21表达后PTEN蛋白表达上调,预测PTEN在骨肉瘤中亦可作为miR-21的靶向结合位点;另PI3K和磷酸化AKT水平下调,对AKT表达无显著影响,提示miR-21抑制MG-63细胞增殖和侵袭,诱导凋亡可能与激活PTEN/PI3K/AKT通路有关。

综上所述,miR-21作为促癌因子在骨肉瘤细胞中高表达,并且能通过抑制miR-21表达来激活PTEN/AKT/mTOR信号通路,进而抑制骨肉瘤的发生发展。但本研究还存在一定的局限性,首先只做了体外实验,miR-21在体内实验的表达水平及调控机制还有待进一步验证;其次miR-21是否还能通过其他途径来调控骨肉瘤的发生发展还需进行深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 曹莉莉,朱岩,樊根涛,等.骨肉瘤的治疗进展[J].中国骨与关节杂志,2020,9(10):771-778.  
CAO Lili, ZHU Yan, FAN Gentao, et al. Treatment progress of osteosarcoma [J]. Chinese Journal of Bone and Joint, 2020, 9(10): 771-778.
- [2] CHALOPIN A, TELLEZ-GABRIEL M, BROWN H K, et al. Isolation of circulating tumor cells in a preclinical model of osteosarcoma: Effect of chemotherapy [J]. Journal of Bone Oncology, 2018, 12:83-90.
- [3] BHERE D, ARGHIANI N, LECHTICH E R, et al. Simultaneous downregulation of miR-21 and upregulation of miR-7 has anti-tumor efficacy[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 1779.
- [4] BICA-POP C, COJOCNEANU-PETRIC R, MAGDO L, et al. Overview upon miR-21 in lung cancer: focus on NSCLC[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2018, 75(19): 3539-3551.
- [5] DEHDASHTIAN E, TABATABAEIAN H, GHAEDI K, et al. A *H. pylori*-independent miR-21 overexpression in gastric cancer patients [J]. Gene Reports, 2019, 17:100528.
- [6] CARLSSON J, CHRISTIANSEN J, DAVIDSSON S, et al. The potential role of miR-126, miR-21 and miR-10b as prognostic biomarkers in renal cell carcinoma[J]. Oncology Letters, 2019, 17(5): 4566-4574.
- [7] LI Y C, XU F M, ZHANG G Q, et al. Down-regulation of microRNA-21 inhibits cell proliferation and invasion of high-invasion liver cancer stem cells[J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2018, 22(22): 7832-7840.
- [8] ZHAO Hui, YAN Peng, WANG Jian, et al. Clinical significance of tumor miR-21, miR-221, miR-143, and miR-106a as biomarkers in patients with osteosarcoma[J]. The International Journal of Biological Markers, 2019, 34(2): 184-193.
- [9] 陈明,黄韬,韩先伟,等. MiR-155 靶向 SOCS1 对骨肉瘤 Saos2 细胞的增殖、侵袭和迁移能力的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(10):1858-1863, 1874.  
CHEN Ming, HUANG Tao, HAN Xianwei, et al. MiR-155 regulates proliferation, migration and invasion of osteosarcoma Saos2 cells by targeting SOCS1 [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2019, 19(10):1858-1863, 1874.
- [10] ARRIGHETTI N, BERETTA G L. MiRNAs as therapeutic tools and biomarkers for prostate cancer[J]. Pharmaceuticals, 2021, 13(3): 380.
- [11] 赵琦,朱鸿静,陈广业. MiR-21 和 miR-15b 在非小细胞肺癌中的表达及其与临床病理特征和化疗疗效的关系 [J]. 世界临床药物, 2018, 39(6):398-402.  
ZHAO Qi, ZHU Hongjing, CHEN Guangye. Expression of mi R-21 and mi R-15b in non-small cell lung cancer and its relationship with clinicopathological features and chemotherapy efficacy [J]. World Clinical Drugs, 2018, 39(6):398-402.
- [12] ZHANG Lulin, YAO Jun, LI Wenyao, et al. Micro-RNA-21 regulates cancer-associated fibroblast-mediated drug resistance in pancreatic cancer[J]. Oncology Research, 2018, 26(6): 827-835.
- [13] PARVIZHAMIDI M, HADDAD G, OSTADRAHIMI S, et al. Circulating miR-26a and miR-21 as biomarkers for glioblastoma multiforme[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2019, 66(2): 261-265.
- [14] WU Xiaofei. Expressions of miR-21 and miR-210 in breast cancer and their predictive values for prognosis[J]. Iranian Journal of Public Health, 2020, 49(1): 21-29.
- [15] SEKAR D, MANI P, BIRUNTHA M, et al. Dissecting the functional role of microRNA 21 in osteosarcoma[J]. Cancer Gene Therapy, 2019, 26(7-8): 179-182.
- [16] NOOROLYAI S, SHAJARI N, BAGHBANI E, et al. The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer[J]. Gene, 2019, 698: 120-128.
- [17] LIU H Y, ZHANG Y Y, ZHU B L, et al. MiR-21 regulates the proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells through PTEN/PI3K/AKT[J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2019, 23(10): 4149-4155.
- [18] WU Yanran, QI Haijun, DENG Danfang, et al. MicroRNA-21 promotes cell proliferation, migration, and resistance to apoptosis through PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in esophageal cancer[J]. Tumour Biology, 2016, 37(9): 12061-12070.
- [19] ZHAO Lina, ZHANG Xianyu, CUI Shusen. Matrine inhibits TPC-1 human thyroid cancer cells via the miR-21/PTEN/Akt pathway[J]. Oncology Letters, 2018, 16(3): 2965-2970.
- [20] ZHENG Xiaoyu, DONG Linlin, ZHAO Su, et al. Propofol affects non-small-cell lung cancer cell biology by regulating the miR-21/PTEN/AKT pathway in vitro and in vivo[J]. Anesthesia and Analgesia, 2020, 131(4): 1270-1280.

收稿日期: 2021-06-18

修回日期: 2022-04-07