DOI:10.16781/j.0258-879x.2018.05.0515

·论　著·

Let-7d 通过靶向调控 Rhotekin 基因抑制骨肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭

荣　辉，祁　健，于兴胜，韩　康*
济南军区总医院脊髓修复科，济南 250031

[摘要]　**目的**　探讨 let-7d 在骨肉瘤组织中的表达，并研究 let-7d 及其靶基因对人骨肉瘤细胞 U2OS 增殖、迁移和侵袭的影响。**方法**　收集 2010 年至 2015 年于我科行手术切除的 25 例骨肉瘤患者的肿瘤组织和癌旁组织（距肿瘤组织边缘＞5 cm），并用 qPCR 检测 let-7d 的表达情况。构建稳定过表达 let-7d 的 U2OS 细胞，用 qPCR 验证 let-7d 过表达情况，以转染 pCDH 空病毒载体的 U2OS 细胞作为对照组细胞，并分别采用 CCK-8 实验、划痕实验和 Transwell 实验检测过表达 let-7d 对 U2OS 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。通过微 RNA 靶基因预测软件和双荧光素酶实验明确 let-7d 的下游靶基因，检测过表达 let-7d 的 U2OS 细胞中靶基因的表达水平，并通过小干扰 RNA 技术研究抑制靶基因表达对 U2OS 细胞增殖、迁移和侵袭的影响。**结果**　骨肉瘤组织中 let-7d 表达水平低于癌旁组织（$P<0.01$）。与人成骨细胞 hFOB1.19 相比，U2OS 细胞中 let-7d 表达水平下调（$P<0.01$）。与对照组相比，过表达 let-7d 能抑制 U2OS 细胞的增殖、迁移和侵袭（P 均＜0.05）。微 RNA 靶基因预测软件和双荧光素酶实验结果显示，Rhotekin（*RTKN*）基因是 let-7d 的直接靶基因，且过表达 let-7d 导致 U2OS 细胞中 *RTKN* mRNA 表达水平较对照组降低（$P<0.01$）。干扰 *RTKN* 表达能抑制 U2OS 细胞增殖、迁移和侵袭（P 均＜0.05）。**结论**　Let-7d 通过靶向调控 RTKN 抑制骨肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭，可作为骨肉瘤治疗一个新的靶点。

[关键词]　骨肉瘤；let-7d；Rhotekin 基因；细胞增殖；细胞迁移；肿瘤侵袭
[中图分类号]　R 738.1　　**[文献标志码]**　A　　**[文章编号]**　0258-879X(2018)05-0515-05

Let-7d inhibits proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells by targeting Rhotekin gene

RONG Hui, QI Jian, YU Xing-sheng, HAN Kang*
Department of Spinal Cord Repair, Jinan Military General Hospital, Jinan 250031, Shandong, China

[Abstract]　**Objective**　To investigate the expression level of let-7d in osteosarcoma tissues, and to explore the effects of let-7d and its target gene on proliferation, migration and invasion of human osteosarcoma cell line U2OS cells. **Methods**　Tumor and adjacent tumor tissues of 25 patients with osteosarcoma undergoing exairesis in our department were collected from 2010 to 2015. The distance from adjacent tumor tissues to tumor margin was greater than 5 cm. The expressions of let-7d were detected by qPCR in the tumor and adjacent tumor tissues. A U2OS cell model stably overexpressing let-7d was constructed, and the expression of let-7d was confirmed by qPCR. The U2OS cells transfected with pCDH empty virus vector were used as control cells. CCK-8 assay, scratch assay and Transwell assay were used to determine the proliferation, migration and invasion of the cell after transfection, respectively. A downstream target gene of let-7d was identified based on microRNA target gene prediction software and luciferase activity assay, and the expression of the target gene was detected in U2OS cells overexpressing let-7d. Effects of the target gene on the cell proliferation, migration and invasion were analyzed by small interfering RNA technology. **Results**　The expression level of let-7d was significantly lower in the osteosarcoma tissues than that in the adjacent tumor tissues ($P<0.01$). The expression level of let-7d was significantly lower in U2OS cells compared with human osteoblast cell line hFOB1.19 cells ($P<0.01$). Compared with the control group, overexpression of let-7d significantly reduced the proliferation, migration and invasion of U2OS cells (all $P<0.05$). MicroRNA target gene prediction software and luciferase activity assay showed that Rhotekin (*RTKN*) gene was a direct target gene of let-7d. Compared with the control group, overexpression of let-7d significantly reduced mRNA expression level of *RTKN* in the U2OS cells ($P<0.01$). Down-regulation of *RTKN* significantly inhibited the proliferation, migration and invasion

[收稿日期]　2017-09-23　　**[接受日期]**　2017-12-10
[基金项目]　济南军区总医院院长基金(2016ZX02). Supported by Dean's Fund of Jinan Military General Hospital (2016ZX02).
[作者简介]　荣　辉，住院医师. E-mail: rhearttex@163.com
*通信作者(Corresponding author). Tel: 0531-51665552, E-mail: 2160952686@qq.com

of U2OS cells (all $P<0.05$). **Conclusion** Let-7d inhibits proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells by targeting RTKN, which indicates let-7d may be a novel candidate biological therapeutic target for osteosarcoma.

[Key words] osteosarcoma; let-7d; Rhotekin gene; cell proliferation; cell migration; neoplasm invasiveness

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(5): 515-519]

骨肉瘤是一种好发于青少年的骨原发性恶性肿瘤。虽然目前可以通过化学治疗、放射治疗或手术联合进行治疗，但骨肉瘤患者预后仍然很差，5 年存活率不到 20%[1]。越来越多的研究表明，微 RNA（microRNA，miRNA）在骨肉瘤细胞的增殖、迁移、侵袭中扮演着一个关键角色，明确 miRNA 在骨肉瘤中的作用对其诊断和治疗具有重要意义[2-3]。Let-7d 在肿瘤的发生、发展过程中扮演抑癌基因的角色，其通过调控多个原癌基因的表达水平在肿瘤细胞的增殖、侵袭、血管生成和转移过程中发挥重要作用[4-5]。为了明确 let-7d 在骨肉瘤发展中的作用，本实验研究了 let-7d 在骨肉瘤中的表达，以及其对人骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响，为骨肉瘤的治疗提供新的思路。

1　资料和方法

1.1　一般资料　收集 2010 年至 2015 年在济南军区总医院脊髓修复科进行手术切除的 25 例骨肉瘤患者的肿瘤组织及相应的癌旁正常组织（距肿瘤组织边缘＞5 cm）标本，其中男性 14 例、女性 11 例，年龄为 13～62 岁，平均年龄为（18.21±11.72）岁。标本收集后置于－80 ℃ 保存。所有患者术前均未进行放射治疗或化学治疗，并知情同意。本研究获得济南军区总医院医学伦理委员会审批。

1.2　细胞培养与 let-7 过表达细胞模型构建　人骨肉瘤细胞系 U2OS（货号 TCHu88）、MG63（货号 TCHu124）、SAOS2（货号 TCHu114）和人成骨细胞系 hFOB1.19（货号 GNHu14）购自中国科学院上海细胞库，143B 细胞由本实验室保存。所有细胞均采用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养液（均购自美国 Invitrogen 公司）于 37 ℃、5% CO_2 条件下培养。由华大基因公司合成的 hsa-let-7d 序列（5′-AGA GGU AGU AGG UUG CAU AGU U-3′）被重组到含有嘌呤霉素筛选标签的慢病毒载体 pCDH 中（本实验室保存）。用 Lipofectamine™ 2000 试剂盒（美国 Invitrogen 公司）将重组载体 pCDH-let-7d 和慢病毒包装质粒（psPAX2 和 pMD2.G）共转入人胚肾细胞 293FT，6 h 后更换新鲜的 DMEM 培养液，48 h 后收集产生的含有 let-7d 的慢病毒颗粒。用慢病毒颗粒感染 U2OS 细胞 48 h，之后再用 5 μg/mL 的嘌呤霉素筛选，72 h 后得到稳定过表达 let-7d 的 U2OS 细胞。对照组细胞为感染 pCDH 空病毒载体的 U2OS 细胞。

1.3　qPCR　按照 TRIzol 试剂（美国 Invitrogen 公司）说明书提取细胞总 RNA。采用 Quanto-miR cDNA 合成试剂盒（北京旷博生物技术股份有限公司）进行反转录反应，合成 miRNA cDNA。以 *β-actin* 为内参照基因，使用 SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix 试剂盒（美国 BioRad 公司）进行 qPCR 扩增。每个检验指标设 3 个复孔，用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法相对定量 let-7d 表达水平。Hsa-let-7d 引物序列为：正向 5′-TGA GGT AGT TGG TTG TAT GGT T-3′，反向 5′-GCG AGC ACA GAA TTA ATA CGA C-3′；Rhotekin（*RTKN*）基因：正向 5′-AAA GGT GCT GGC ATA GGA TCT GC-3′，反向 5′-TGG TTG ATG TGG GAG TCA CAA-3′；*β-actin*：正向 5′-CTC CAT CCT GGC CTC GCT GT-3′，反向 5′-GCT GTC ACC TTC ACC GTT CC-3′。

1.4　细胞增殖实验　用 CCK-8 试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司）进行细胞增殖检测。将细胞以 2×10^4/mL 密度接种于 96 孔板，培养 0、12、24、36 和 48 h 进行检测，每个时间点设 5 个复孔。检测时，每孔加入 10 μL CCK-8 试剂，37 ℃ 孵育 2 h，用酶标仪（美国 BioTek 公司）测定 450 nm 波长处的光密度（*D*）值。

1.5　划痕实验　将细胞接种于 24 孔板，每组设 3 个复孔，待生长至 100% 融合时用无菌移液器枪头沿培养板底部呈“1”字形划痕，PBS 洗去脱落的细胞，于倒置显微镜下测量并记录划痕宽度，48 h 后观察划痕修复情况。实验重复 3 次。

1.6　Transwell 侵袭实验　采用美国 Corning 公司 8 μm 带基质胶 Transwell 小室，下室中加 500 μL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液，上室中加入

100 μL 含有 2.0×10^5 个细胞的 DMEM 培养液，在 37 ℃、5% CO_2 的培养箱内培养，24 h 后用棉签刮除上室底部基质胶，用 PBS 漂洗上室表面 3 次，−20 ℃ 预冷的 4% 多聚甲醛溶液固定细胞 20 min，PBS 洗 3 次后用 0.1% 结晶紫染色 10 min。每组细胞在显微镜下随机选取 5 个视野观察并计数细胞。实验重复 3 次。

1.7　*蛋白质印迹法*　用 RIPA 蛋白裂解液提取细胞总蛋白，用 BCA 试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司）进行蛋白定量。用 4%～12% 的 NuPAGE® Novex Bis-Tris 梯度胶（美国 Invitrogen 公司）电泳分离蛋白，每孔加样总蛋白量为 50 μg。浓缩胶 60 V 1 h，分离胶 100 V 2 h，常规湿法转膜 90 min，5% 的脱脂奶粉溶液封闭 2 h 后加入 RTKN 抗体（ab154954，英国 Abcam 公司，稀释比例为 1∶1 000）和 GAPDH 抗体（ab8245，英国 Abcam 公司，稀释比例为 1∶1 000），4 ℃ 过夜孵育。TBST 漂洗 3 次，加入二抗稀释液孵育 90 min，TBST 洗涤 3 次，ECL 化学发光显影、拍照。

1.8　*生物信息学检测*　运用 miRNA 靶基因在线预测软件 TargetScan（*http://www.targetscan.org/*）、miRWalk（*http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/*）、miRanda（*http://34.236.212.39/microrna/home.do*）和 PicTar（*http://www.pictar.org/*）进行预测，将在至少 3 个软件中有交集且与细胞增殖、迁移和侵袭功能密切相关的基因作为 let-7d 可能的靶基因。

1.9　*荧光素酶检测*　将 293FT 细胞接种 24 孔板（1.5×10^5/孔），待细胞生长到融合度约 80% 时，按照脂质体 Lipofectamine™ 2000 试剂盒说明书，分别用 pCDH＋pGL3-RTKN-wt、pCDH-let-7d＋pGL3-RTKN-wt、pCDH-let-7d＋pGL3-RTKN-mut 质粒共转染 293FT 细胞，6 h 后更换新鲜 DMEM 培养液。转染 48 h 后，按双荧光素酶报告基因检测试剂盒（美国 Promega 公司）说明书进行检测，以萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值表示各组细胞的荧光强度。

1.10　*RTKN 小干扰 RNA（siRNA）的合成与细胞转染*　*RTKN* siRNA 靶序列的设计与合成由英潍捷基（上海）贸易有限公司完成，siRTKN-1 序列：5′-GGA GTT GCA GAG GAA GCT A-3′，siRTKN-2 序列：5′-AGC AUC AGU AAC CAG UAU GTT C-3′。待细胞生长至融合度为 50% 时，按照脂质体 Lipofectamine™ 2000 试剂盒说明书进行转染，转染 48 h 后进行后续实验。对照组为转染随机干扰序列 siRNA-nt 的 U2OS 细胞。

1.11　*统计学处理*　采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析。呈正态分布的计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，两组数据的比较采用 t 检验，多组数据的比较采用单因素方差分析。非正态分布的计量资料以中位数（四分位数间距）表示，组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。检验水准（α）为 0.05。

2　结　果

2.1　*Let-7d 在骨肉瘤组织及细胞系中表达降低*　qPCR 检测结果显示，25 例骨肉瘤患者肿瘤组织中 let-7d 表达水平低于癌旁正常组织（$U=374.0$，$P<0.01$，图 1A），人骨肉瘤细胞 U2OS、MG63、SAOS2 和 143B 中 let-7d 的表达水平均低于人成骨细胞 hFOB1.19（P 均<0.05，图 1B）。选取 let-7d 表达水平相对较低的 U2OS 细胞用于后续研究。

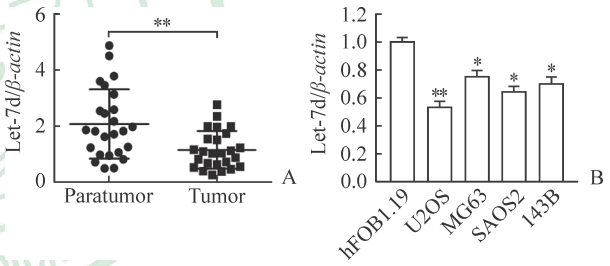

图 1　qPCR 检测 let-7d 在骨肉瘤组织和人骨肉瘤细胞系中的表达

Fig 1　Expressions of let-7d in osteosarcoma tissues and osteosarcoma cell lines detected by qPCR

A: The expressions of let-7d in osteosarcoma tissues and matched adjacent normal tissues ($^{**}P<0.01$. $n=25$, median [quartile]); B: The expressions of let-7d in human osteosarcoma cell lines U2OS, MG63, SAOS2, 143B cells and human osteoblast cell line hFOB1.19 cells ($^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ vs hFOB1.19. $n=3$, $\bar{x}\pm s$)

2.2　*过表达 let-7d 抑制骨肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭*　采用 qPCR 验证发现稳定过表达 let-7d 的 U2OS 细胞系构建成功（$P<0.05$，图 2A）。CCK-8 实验、划痕实验和 Transwell 实验结果（图 2B～2D）显示，与对照组相比，过表达 let-7d 组 U2OS 细胞增殖减慢，迁移能力降低，侵袭能力被抑制（P 均<0.05）。

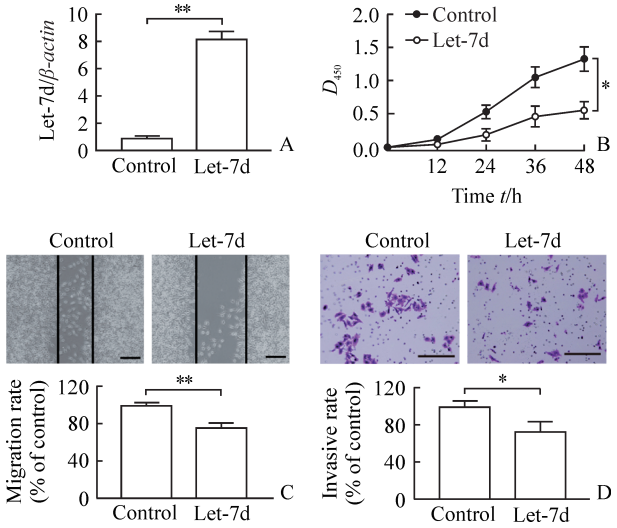

图 2　过表达 let-7d 抑制 U2OS 细胞增殖、迁移和侵袭

Fig 2　Overexpression of let-7d inhibiting proliferation, migration and invasion of U2OS cells

A: The expression of let-7d in let-7d overexpressing U2OS cells by qPCR; B: The proliferation of let-7d overexpressing U2OS cells by CCK-8 assay; C: The migration of let-7d overexpressing U2OS cells by scratch assay; D: The invasion of let-7d overexpressing U2OS cells by Transwell assay. $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$. $n=3$, $\bar{x}\pm s$. Scale bar=100 μm

2.3　*RTKN* 是 let-7d 的直接靶基因　通过 4 个 miRNA 靶基因生物预测软件（TargetScan，miRWalk，miRanda，PicTar）对 let-7d 的靶基因进行预测发现，*RTKN* 的 3′ UTR 含有一个 let-7d 的结合位点，可能是 let-7d 的一个较好的靶基因（图 3A）。荧光素酶实验结果（图 3B）显示，let-7d 可抑制 RTKN-3′ UTR-wt 荧光酶活性，而不影响 RTKN-3′ UTR-mut 荧光酶活性。qPCR 检测发现，let-7d 过表达 U2OS 细胞中 *RTKN* 的 mRNA 表达水平降低（图 3C）。这些结果提示 let-7d 可通过与 RTKN-3′ UTR 的结合，负性调控骨肉瘤细胞中 RTKN 的表达，证明 *RTKN* 是 let-7d 的靶基因。

2.4　下调 *RTKN* 抑制骨肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭　用两种 *RTKN* 特异性 siRNA 序列瞬时干扰 U2OS 细胞内 RTKN 的表达，通过蛋白质印迹法检测 U2OS 细胞内 RTKN 蛋白表达水平，选取抑制效果更明显的 siRTKN-2 序列进行实验（图 4A）。CCK-8 实验结果（图 4B）显示，抑制 *RTKN* 表达后 U2OS 细胞增殖减慢（$P<0.05$）。采用划痕实验和 Transwell 实验评估抑制 *RTKN* 对骨肉瘤细胞迁移、侵袭的影响，结果（图 4C、4D）显示抑制 *RTKN* 后 U2OS 细胞的迁移、侵袭能力均下降（P 均<0.05）。

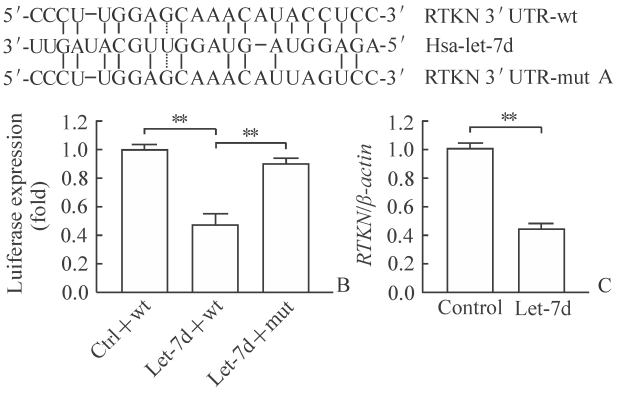

图 3　*RTKN* 是 let-7d 的直接靶基因

Fig 3　*RTKN* is a direct target gene of let-7d

A: Sequence alignment of let-7d and its conserved target site in RTKN-3′ UTR; B: Relative luciferase activity in 293FT cells co-transfected with pGL3-RTKN-3′ UTR-wt or -mut reporter plasmids containing let-7d potential binding sites (let-7d) or control plasmids (Ctrl); C: The *RTKN* mRNA expression in let-7d overexpressing U2OS cells by qPCR. $^{**}P<0.01$. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

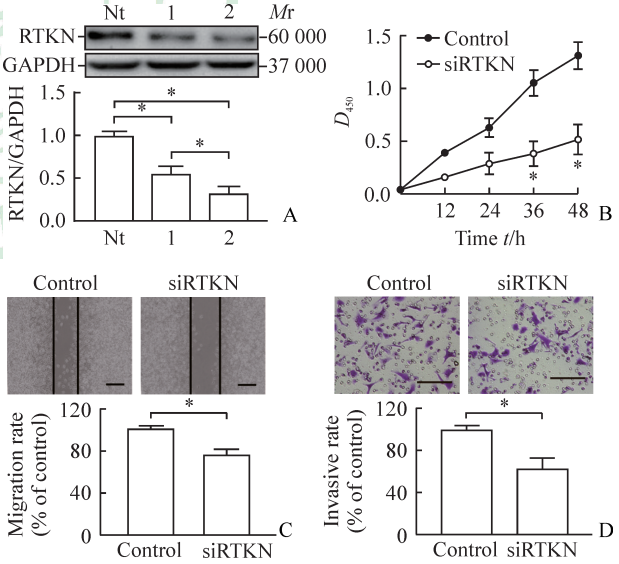

图 4　下调 *RTKN* 抑制 U2OS 细胞的增殖、迁移和侵袭

Fig 4　Down-regulation of *RTKN* inhibits proliferation, migration and invasion of U2OS cells

A: Expressions of RTKN in U2OS cells transfected with siRTKN-1 (1) and siRTKN-2 (2), and siRNA-nt (nt) detected by Western blotting; B: The proliferation detected by CCK-8 assay; C: The migration detected by scratch assay; D: The invasion detected by Transwell assay. $^{*}P<0.05$ (vs the same time point in control group in Fig 4B). $n=3$, $\bar{x}\pm s$. Scale bar=100 μm

3 讨　论

Let-7d 作为 let-7 家族的重要成员，参与胰腺癌、前列腺癌及头颈部癌等多种肿瘤细胞的增殖、凋亡等生物学过程[4-6]。这些生物学过程可能与 let-7d 调节细胞周期、分裂及凋亡相关的基因，如细胞分裂周期蛋白 25A、细胞周期蛋白依赖性激酶 6、细胞周期蛋白 D1、*caspase-3* 有密切关系[6-7]。此外，let-7d 还可通过靶向抑制 Ⅲ 型胶原蛋白 α1 和 CC 趋化因子 7 基因而抑制肾癌细胞的增殖、转移和肿瘤巨噬细胞的浸润[8]。虽然 let-7d 通过靶向多种基因调控不同肿瘤细胞的功能，但其对介导骨肉瘤细胞增殖、迁移的机制并不明确。因此，本研究通过构建稳定过表达 let-7d 的骨肉瘤细胞系，证明了 let-7d 可以抑制骨肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭；并应用生物信息学技术和双荧光素酶实验验证了 *RTKN* 是其下游靶基因，且下调 *RTKN* 表达同样能够抑制骨肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。因此，可以推测 let-7d 抑制骨肉瘤细胞的增殖、迁移是通过下调 RTKN 所导致的。

RTKN 是一种小 GTP 结合蛋白，可通过与活化型 Rho 分子结合调控细胞生长、分化和凋亡[9]。最近研究表明，RTKN 在多种恶性肿瘤中呈高表达，并与肿瘤细胞的浸润转移和患者不良预后关系密切[10-11]。这可能与 RTKN 激活 NF-κB 信号通路、诱导抗凋亡蛋白杆状病毒凋亡蛋白抑制因子重复序列 3、B 细胞淋巴瘤因子 2（B cell lymphoma 2，BCL2）样蛋白 1、BCL2 相关蛋白 A1 和 BCL2 相关蛋白 A20 的表达密切相关[12]。在本实验中，下调 *RTKN* 表达可抑制骨肉瘤细胞的增殖和迁移，虽然尚不能明确 RTKN 对骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭的调控作用是否与上述信号通路有关，但是本实验仍然从一个全新的方向阐述了骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭的机制，并为骨肉瘤的治疗提供新的靶点。

[参 考 文 献]

[1] 柴丽,董良仓. 两种方案对治疗高分化骨肉瘤患者的 5 年无瘤生存率分析[J]. 检验医学与临床,2013,10: 1138-1140.

[2] JONES K B, SALAH Z, DEL MARE S, GALASSO M, GAUDIO E, NUOVO G J, et al. miRNA signatures associate with pathogenesis and progression of osteosarcoma[J]. Cancer Res, 2012, 72: 1865-1877.

[3] CHANG L, SHRESTHA S, LACHAUD G, SCOTT M A, JAMES A W. Review of microRNA in osteosarcoma and chondrosarcoma[J/OL]. Med Oncol, 2015, 32: 613. doi: 10.1007/s12032-015-0613-z.

[4] KOLENDA T, PRZYBYŁA W, TERESIAK A, MACKIEWICZ A, LAMPERSKA K M. The mystery of let-7d–a small RNA with great power[J]. Contemp Oncol, 2014, 18: 293-301.

[5] BOYERINAS B, PARK S M, HAU A, MURMANN A E, PETER M E. The role of let-7 in cell differentiation and cancer[J]. Endocr Relat Cancer, 2010, 17: F19-F36.

[6] WANG X, CAO L, WANG Y, WANG X, LIU N, YOU Y. Regulation of let-7 and its target oncogenes[J]. Oncol Lett, 2012, 3: 955-960.

[7] NUOVO G J, GAROFALO M, VALERI N, ROULSTONE V, VOLINIA S, COHN D E, et al. Reovirus-associated reduction of microRNA-let-7d is related to the increased apoptotic death of cancer cells in clinical samples[J]. Modern Pathol, 2012, 25: 1333-1344.

[8] SU B, ZHAO W, SHI B, ZHANG Z, YU X, XIE F, et al. Let-7d suppresses growth, metastasis, and tumor macrophage infiltration in renal cell carcinoma by targeting COL3A1 and CCL7[J]. Mol Cancer, 2014, 13: 206-219.

[9] ZHOU J, ZHANG Y, QI Y, YU D, SHAO Q, LIANG J. MicroRNA-152 inhibits tumor cell growth by directly targeting RTKN in hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Rep, 2017, 37: 1227-1234.

[10] QU G Q, LU Y M, LIU Y F, LIU Y, CHEN W X, LIAO X H, et al. Effect of RTKN on progression and metastasis of colon cancer *in vitro*[J]. Biomed Pharmacother, 2015, 74: 117-123.

[11] ZHANG W, LIANG Z, LI J. Inhibition of rhotekin exhibits antitumor effects in lung cancer cells[J]. Oncol Rep, 2016, 35: 2529-2534.

[12] LI B, CHEN P, CHANG Y, QI J, HUI F, GUO H. Let-7a inhibits tumor cell growth and metastasis by directly targeting RTKN in human colon cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 478: 739-745.

[本文编辑] 杨亚红