

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.16.004

## miR-335 及 ROCK1 在骨肉瘤中表达及相互关系研究\*

王 勇<sup>1</sup>, 王科峰<sup>2</sup>, 赵 伟<sup>1△</sup>

(1. 沈阳医学院附属中心医院骨四科, 沈阳 110024; 2. 中国医科大学附属盛京医院泌尿外科, 沈阳 110004)

**[摘要]** **目的** 探讨 miR-335 及 rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶 1(ROCK1)在骨肉瘤组织及细胞系中表达的情况及两者的相关性。**方法** 临床选取 18 例骨肉瘤组织标本及配对正常骨骼肌组织标本; 设定人正常成骨细胞为对照组, 骨肉瘤细胞系 MG-63 和 U2-OS 为实验组, RT-PCR 检测骨肉瘤组织与各组细胞中 miR-335 与 ROCK1 mRNA 的表达差异; miR-335 mimic 转染 MG-63 和 U2-OS 两细胞系, 检测 miR-335 过表达 ROCK1 mRNA 和蛋白表达的影响。**结果** miR-335 在骨肉瘤组织及细胞系中特异性低表达, 而 ROCK1 则呈高表达, 两者呈负相关; 转染 miR-335 mimic 后, miR-335 mRNA 过表达, ROCK1 mRNA 和蛋白表达在 MG-63 和 U2-OS 两细胞系中受到显著抑制。**结论** miR-335 与 ROCK1 表达在骨肉瘤组织学水平和细胞学水平均成负相关; 过表达 miR-335 可降低 ROCK1 的表达。

**[关键词]** 微 RNA-335; rho 相关激酶类 1; 骨肉瘤; 基因表达**[中图分类号]** R738.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)16-2170-04

## The expression and correlation of miR-335 and ROCK1 in osteosarcoma\*

Wang Yong<sup>1</sup>, Wang Kefeng<sup>2</sup>, Zhao Wei<sup>1△</sup>

(1. The Forth Department of Orthopaedics, the Central Hospital Affiliated to Shenyang Medical College, Shenyang, Liaoning 110024, China; 2. Department of Urinary Surgery, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang, Liaoning 110004, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression and correlation of microRNA-335(miR-335) and ROCK1 in osteosarcoma tissue and osteosarcoma cell lines MG-63 and U2-OS. **Methods** Eighteen paired tissue specimens of osteosarcoma and matched normal tissue were chosen clinically. Two osteosarcoma cell lines MG-63 and U2-OS were chosen as experimental group while the human osteoblast cell line hFOB 1.19 as control group. Quantitative real-time PCR were used to evaluate the different expression of miR-335 and ROCK1 mRNA in osteosarcoma tissue and cell lines; miR-335 mimic was transfected into MG-63 and U2-OS, while Quantitative real-time PCR and Western blot were used to evaluate the effect of over-expressed miR-335 on ROCK1 mRNA and protein level. **Results** The result of real-time PCR indicated a special lower expression of miR-335 but higher ROCK1, and the correlation between miR-335 and ROCK1 was negative. Western blot showed that miR-335 could decrease ROCK1 protein expression. miR-335 mRNA showed a hyper-expression while lower ROCK1 mRNA and protein after transfection of miR-335 mimic. **Conclusion** The expression of miR-335 and ROCK1 shows a negative correlation in both tissue and cell level; over-expression of miR-335 can decrease ROCK1 expression.

**[Key words]** microRNA-335; rho-associated kinases 1; osteosarcoma; gene expression

骨肉瘤为间叶组织来源, 好发于青少年长骨干骺端的原发性恶性骨肿瘤, 其特点是生长迅速且侵袭力强, 血行转移发生早且肺转移发生率高, 85%~90% 的患者就诊时均存在不同程度的转移灶, 导致临床治疗相对困难和较高的病死率<sup>[1]</sup>, 预后不佳并伴有较高的致残率。

miRNA 通过靶向作用于 mRNA 的 3' UTR 区域, 引起 mRNA 的翻译抑制或降解<sup>[2]</sup>, 内源性的 miRNA 具有较高的稳定性和组织相容性, 在肿瘤的发生过程中起调控作用。文献表明, miR-335 在乳腺癌、胃癌中低表达, 过表达后抑制肿瘤侵袭转移<sup>[3-4]</sup>。rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶 1(rho associated-coiledcoil forming protein kinase, ROCK1) 是 Rho 家族的一个

主要效应分子, 目前研究发现 ROCK1 高表达与肿瘤低分化、淋巴转移和短生存期相关, 认为 Rho/ROCK 途径可能参与了肿瘤细胞局部浸润和淋巴结转移。本研究拟于组织学和细胞学水平检测 miR-335 和 ROCK1 的表达情况, 并阐明其两者可能存在的相互关系。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 所有组织为沈阳医学院附属中心医院、中国医科大学附属第一医院、中国医科大学附属盛京医院及辽宁省肿瘤医院骨科活体手术过程中获得的新鲜骨肉瘤组织标本及正常骨骼肌组织, 液氮保存运输, 收集后置于 -80℃ 低温冰箱保存。全部标本均经术后组织病理学检查诊断证实为骨肉瘤,

\* 基金项目: 辽宁省自然科学基金资助项目(2013225086); 辽宁省教育厅科学研究一般项目(L2014428); 沈阳市卫生局青年基金项目(辽科发[2013]31号); 沈阳医学院青年科学基金资助项目(20132041)。作者简介: 王勇(1980-), 主治医师、讲师, 博士, 主要从事骨肉瘤发生发展的基础研究。△ 通讯作者, Tel: 18002479377; E-mail: zhaowei3332@163.com。

男 14 例,女 4 例,患者手术前未行放疗及化疗,年龄 10~32 岁,平均 19.22 岁。病理类型:均为普通型成骨肉瘤。根据 Enneking 分期:均为 II B 期。

**1.2 细胞、试剂及器材** 人成骨细胞系 hFOB 1.19、人骨肉瘤细胞株 MG-63 及 U2-OS(中科院上细胞库);RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、PCR 试剂盒及 Lipofectamine 2000 转染脂质体试剂盒(Invitrogen 公司);ROCK1 兔源单克隆抗体(Cell Signaling 公司);miR-335 mimic 及 mimic control(广州锐博公司);引物由上海生物工程公司合成;SYBR Master Mixture (TaKaRa 公司);胎牛血清(Sigma 公司);多聚甲醛(分析纯,北京化学试剂公司);DAB 显色剂(丹麦 DAKO 公司);RPMI1640 培养基(Gibco 公司);HF90 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Biometra 公司);CR21G II 高速低温冷冻离心机(日本 Sanyo 公司);Biospectrum AC 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);MX3000P RT-PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司);

**1.3 方法**

**1.3.1 细胞培养与传代** hFOB1.19 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液中, MG-63 及 U2-OS 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,均置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的孵箱中培养。待细胞融合率达 80% 时,以 0.25% 胰蛋白酶消化并传代。

**1.3.2 脂质体介导的细胞转染** 将生长良好的 MG-6 和 U2-OS 胰酶消化后,调整细胞密度为 2×10<sup>5</sup>/孔并接种于 6 孔板中,24 h 后利用 Lipofectamine 2000 脂质体转染 miR-335 mimic 50 nmol/L 并各自设定相应的对照组。转染 48 h 后收集细胞总 RNA 和总蛋白并进行后续检测。

**1.3.3 RT-PCR 检测 miR-335 与 ROCK1 mRNA 的表达** 参照 Trizol 试剂盒说明书提取骨肉瘤组织及培养的 hFOB1.19 细胞和分组转染的各组细胞总 RNA 并标记。按照 Invitrogen 公司的试剂盒说明书进行逆转录反应,反应产物行 PCR 扩增,PCR 过程按 Invitrogen 公司的 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书在荧光定量仪上进行,miR-335 及 ROCK1 的内参照分别为 U6 和 β-actin,引物序列详见表 1。以 miR-335 与 U6 拷贝数的比值为 miR-335 的相对表达量,ROCK 1 与 β-actin 拷贝数的比值为 ROCK1 的相对表达量。

**表 1 β-actin、ROCK1、U6 和 miR-335 的引物序列表**

基因名			引物序列(5'-3')
β-actin	PCR	上游	AGTGTGACGTGGACATCCGCAAAG
		下游	ATCCACATCTG CTGGA AGGTGGAC
ROCK1	PCR	上游	AGGAAGGCGGACATATTAGTCCCT
		下游	AGACGATAGTTGGGTCCCG GC
U6	PCR	上游	CTCGCTTCGGCAGCAC
		下游	AACGCTTACGAATTTGCGT
miR-335	RT-PCR	上游	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCG
		下游	AGGTATTGCGACTGGATACGACA
	PCR	上游	AGCCGTCAAGAGCAATAACGAA
		下游	GTGCAGGGTCCGAGGT

**1.3.4 Western blot 检测 ROCK1 蛋白表达** 分别提取组织

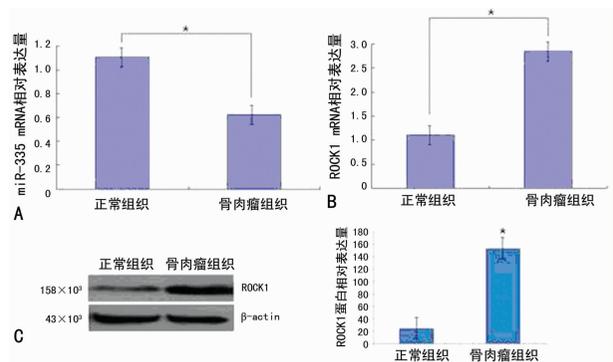
及各组细胞总蛋白,BCA 试剂盒测定各组蛋白浓度,各取 200 μL 样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转膜,封闭 1 h 后,依次行 I 抗(兔抗人 ROCK1 和兔抗人 β-actin) II 抗(HRP 标记的羊抗兔 II 抗)杂交,最后按 ECL 试剂盒说明书行电化学发光检测。

**1.3.5 免疫组织化学检测骨肉瘤组织及配对组织标本中 ROCK1 的表达** 18 例骨肉瘤组织标本及配对正常骨骼肌组织标本取材后,PBS 清洗,依次行 10% 多聚甲醛固定、组织脱水、透明、石蜡包埋切片、脱蜡、封闭、I 抗及 II 抗孵育、DAB 显色、复染、封片和结果判定,细胞核呈棕黄色或棕色为阳性。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS17.0 软件分析数据。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。两个独立样本均数比较呈正态分布的采用 *t* 检验,非正态分布的采用非参数 Mann-Whitney 检验,部分实验指标间作单因素直线相关分析,双变量正态分布资料计算 Pearson 相关系数,对不符合双变量正态分布资料,则计算 Spearman 相关系数。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 骨肉瘤组织中 miR-335 及 ROCK1 表达检测** 组织学水平检测结果显示,骨肉瘤组织中 miR-335 低表达,ROCK1 高表达。选取 18 例配对的骨肉瘤患者正常组织和肿瘤组织,提取总 RNA 和总蛋白,用 RT-PCR 检测 miR-335 及 ROCK1 mRNA 的表达,Western blot 检测 ROCK1 蛋白表达水平,免疫组织化学检测配对标本中 ROCK1 蛋白表达情况。结果显示,在配对的骨肉瘤标本中,相较于正常组织,miR-335 mRNA 在骨肉瘤组织中相对表达降低,而 ROCK1 mRNA 及蛋白表达相对升高,见图 1;免疫组织化学检测结果显示,相比于正常瘤旁组织,ROCK1 在骨肉瘤中表达明显增高,差异有统计学意义(*P*<0.05),见图 2。



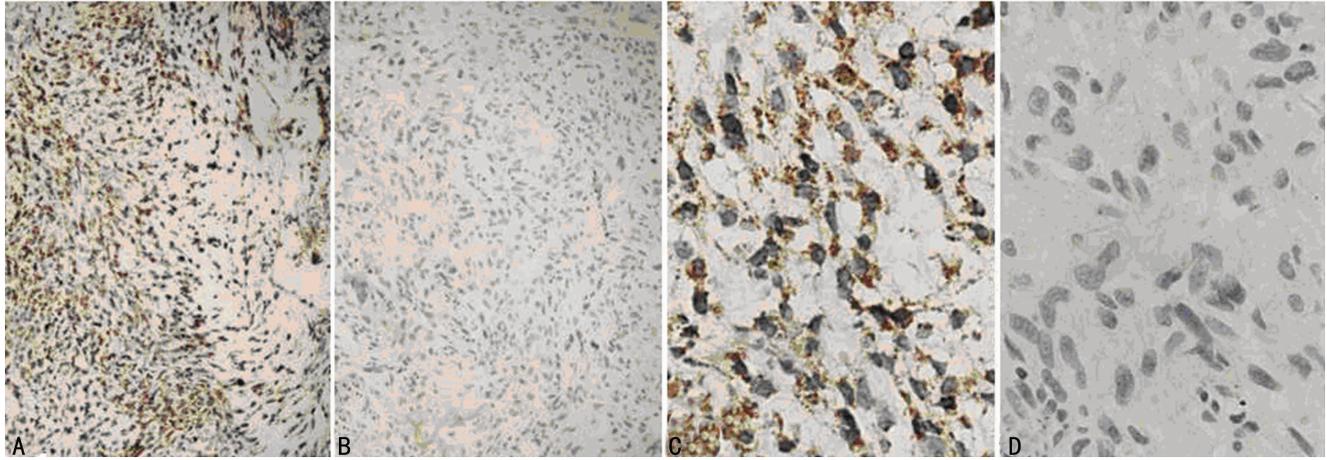
A: 骨肉瘤组织中 miR-335 mRNA 的 RT-PCR 结果; B: 骨肉瘤组织中 ROCK1 mRNA 的 RT-PCR 结果; C: 骨肉瘤组织中 ROCK1 蛋白的 Western blot 结果。

**图 1 骨肉瘤组织中 miR-335 及 ROCK1 mRNA 表达情况**

**2.2 骨肉瘤细胞 MG-63 和 U2-OS 中 miR-335 和 ROCK1 表达检测** 细胞学水平检测结果显示骨肉瘤细胞系 MG-63 和 U2-OS 中 miR-335 低表达,ROCK1 高表达,与组织学检测结果显示的趋势一致。以健康人成骨细胞 hFOB1.19 细胞作为对照组, MG-63 及 U2OS 两株骨肉瘤细胞作为实验组,用 RT-PCR 检测 miR-335 及 ROCK1 mRNA 的表达,Western blot 检测 ROCK1 蛋白表达水平。结果显示,相比于健康人成骨细胞 hFOB1.19, MG-63 及 U2OS 中 miR-335 mRNA 表达降低,而

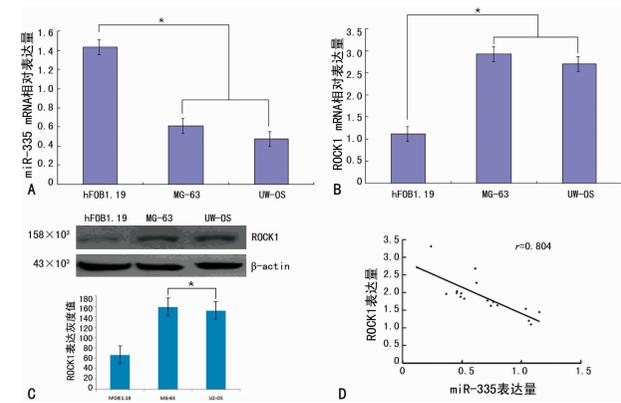
ROCK1 mRNA 表达增高,见图 3A、B;相应的,ROCK1 蛋白同样呈高水平表达,见图 3C。结果显示 miR-335 及 ROCK1 两

者表达趋势呈明显负相关,见图 3D。



A:骨肉瘤组织中 ROCK1 呈高表达( $\times 200$ );B:瘤旁组织中 ROCK1 呈低表达( $\times 200$ );C:骨肉瘤组织中 ROCK1 呈高表达( $\times 400$ );D:瘤旁组织中 ROCK1 呈低表达( $\times 400$ )。

图 2 骨肉瘤组织中 miR-335 及 ROCK1 蛋白表达情况



A:细胞水平 miR-335 mRNA 的 RT-PCR 结果;B:细胞水平 ROCK1 mRNA 的 RT-PCR 结果;C:细胞水平 ROCK1 蛋白的 Western blot 结果;D:骨肉瘤中 miR-335 和 ROCK1 相关性分析(双尾佩尔森相关性分析, $r = -0.804, P < 0.05$ )。

各自设定对照组(转染 mimic control),RT-PCR 检测 miR-335 及 ROCK1 mRNA 的表达,Western blot 检测 ROCK1 蛋白表达水平。结果显示转染 miR-335 mimic 后,miR-335 mRNA 表达水平明显上调,见图 4A,ROCK1 mRNA 表达水平下降,见图 4B;Western blot 检测结果显示上调 miR-335 后,ROCK1 蛋白表达水平较对照组明显降低,见图 4C、D。

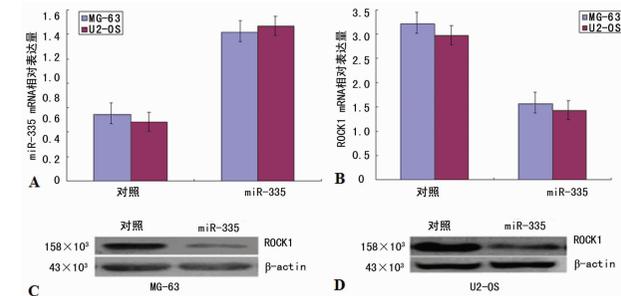
### 3 讨论

miRNA 是一种广泛存在的分子,其表达具有组织特异性和时间特异性,在胚胎形成、组织分化、器官形成、生长发育及凋亡的调控、疾病发生等众多领域协调有序的调控,使机体的各种功能蛋白基因表达处于一种平衡。miR-335 基因位于人染色体第 7q32.2 区,在人类肿瘤中发挥癌基因或抑癌基因作用。近来报道 miR-335 在乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌及胃癌中发挥抑癌基因作用<sup>[5-7]</sup>。但是在星形胶质瘤和脑膜瘤<sup>[8-9]</sup>中发挥癌基因作用,尽管这样,miR-335 在骨肉瘤中的作用目前未见报道。

ROCK1 是 Rho 家族的一个主要效应分子,在癌细胞侵袭过程中发挥重要作用<sup>[10-11]</sup>。Rho 蛋白活化后,可与 ROCK1 上的位点相结合,暴露 ROCK 的催化活性中心,将 ROCK 激活,使其空间结构发生变化。活性中心暴露,使底物磷酸化。近来研究发现 ROCK1 在脑肿瘤中高表达,并与肺癌、前列腺癌、膀胱癌的侵袭转移关系密切<sup>[12-13]</sup>。

miR-335 和 ROCK1 都与骨肉瘤的发生发展有密切关系,本研究在组织学水平及细胞学水平两个层次对它们在骨肉瘤中的表达进行了研究。通过 RT-PCR 发现,miR-335 在骨肉瘤组织和骨肉瘤细胞 MG-63 和 U2OS 细胞中呈特异性低表达,而 ROCK1 在骨肉瘤中则呈特异性高表达,这与 Liu 等<sup>[14]</sup>的研究结果相似;上调 miR-335 后则可明显降低 ROCK1 的表达水平。本研究结果说明,在骨肉瘤中 miR-335 表达水平与 ROCK1 表达水平呈负相关,而这种负相关很可能是由于 miR-335 可靶向负性调控 ROCK1 的表达形成的。Zucchini 等<sup>[15]</sup>研

图 3 miR-335 及 ROCK1 在骨肉瘤细胞 MG-63 和 U2-OS 中表达及两者相关分析



A:转染后 miR-335 mRNA 的 RT-PCR 结果;B:转染后 ROCK1 mRNA 的 RT-PCR 结果;C:转染后 MG-63 中 ROCK1 蛋白的 Western blot 结果;D:转染后 U2-OS 中 ROCK1 蛋白的 Western blot 结果。

图 4 转染后 miR-335 及 ROCK1 表达变化

2.3 转染 miR-335 mimic 后,miR-335 及 ROCK1 表达变化在 MG-63 和 U2-OS 两细胞系中分别转染 miR-335 mimic,并

究认为 RhoA/ROCK 通路关键因子 ROCK1 和 ROCK2 在骨肉瘤组织中高表达并与骨肉瘤的侵袭转移相关,抑制 ROCK1 和 ROCK2 表达使骨肉瘤侵袭转移能力下降,也就是说 RhoA/ROCK 通路中的某些关键因子如 ROCK1 可以作为抑制骨肉瘤侵袭转移的潜在靶点。进一步通过生物学信息预测的方式发现 miR-335 与 ROCK1 mRNA 3'UTR 区存在一段 7 个碱基互补配对区,那么 miR-335 与 ROCK1 是否存在靶向作用,其具体机制如何? 接下来作者将通过进一步荧光素酶报告基因实验验证 miR-335 与 ROCK1 可能存在的靶向关系并通过 Transwell 侵袭实验检测 miR-335 靶向 ROCK1 对骨肉瘤侵袭转移的影响。

miR-335 作为一种肿瘤抑制小分子 miRNA,其作用可能通过调控许多重要细胞信号转导通路内的目标靶基因引起整个信号通路活性的改变,从而调控整个细胞的生物学行为,而 miR-335 与 ROCK1 间的负相关性及可能存在的 miR-335 负性调控 ROCK1 机制可能是上述多个通路多个靶基因中的与其转移侵袭相关的一个,对其进行研究可进一步阐明肿瘤发生的机制,相信随着研究的进一步深入,miR-335 调控 ROCK1 表达可能会成为治疗骨肉瘤的一个新策略。

#### 参考文献

- [1] Berman SD, Calo E, Landman AS, et al. Metastatic osteosarcoma induced by inactivation of Rb and p53 in the osteoblast lineage[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(33):11851-11856.
- [2] Sarasin-Filipowicz M, Krol J, Markiewicz IH, et al. Decreased levels of microRNA miR-122 in individuals with hepatitis C responding poorly to interferon therapy[J]. Nat Med, 2009, 15(1):31-33.
- [3] Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis[J]. Nature, 2008, 451(7175):147-152.
- [4] Xu Y, Zhao F, Wang Z. MicroRNA-335 acts as a metastasis suppressor in gastric cancer by targeting Bel-7 and specificity protein 1[J]. Oncogene, 2012, 31(11):1398-1407.
- [5] Shu M, Zhou Y, Zhu W, Zhang H, et al. MicroRNA-335 is

required for differentiation of malignant glioma cells induced by activation of cAMP/protein kinase A pathway[J]. Mol Pharmacol, 2012, 81:292-298.

- [6] Wang F, Zheng Z, Guo J, et al. Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor[J]. Gynecol Oncol, 2010, 119:586-593.
- [7] Xiong SW, Lin TX, Xu KW, et al. MicroRNA-335 Acts as a Candidate Tumor Suppressor in Prostate Cancer[J]. Pathol Oncol Res, 2012, (15):156-159.
- [8] Yan Z, Xiong Y, Xu W, et al. Identification of hsa-miR-335 as a prognostic signature in gastric cancer[J]. PLoS One, 2012, 7(7):e40037.
- [9] Shu M, Zheng X, Wu S, et al. Targeting oncogenic miR-335 inhibits growth and invasion of malignant astrocytoma cells[J]. Mol Cancer, 2011, 10:59.
- [10] Shi L, Jiang D, Sun G, et al. miR-335 promotes cell proliferation by directly targeting Rb1 in meningiomas[J]. Neurooncol, 2012, 110(2):155-162.
- [11] Narumiya S, Tanji M, Ishizaki T. Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion[J]. Cancer Metastasis, 2011, 28(1/2):65-76.
- [12] Liu S. The ROCK signaling and breast cancer metastasis[J]. Mol Biol Rep, 2011, 38(2):1363-1366.
- [13] Oellers P, Schroer U, Senner V, et al. ROCKs are expressed in brain tumors and are required for glioma cell migration on myelinated axons[J]. Glia, 2011, 57(5):499-509.
- [14] Liu X, Choy E, Hornicek FJ. ROCK1 as a potential therapeutic target in osteosarcoma[J]. J Orthop Res, 2011, 29(8):1259-1266.
- [15] Zucchini C, Manara MC, Pinca RS. CD99 suppresses osteosarcoma cell migration through inhibition of ROCK2 activity[J]. Oncogene, 2013, 152(10):1038-1041.

(收稿日期:2014-10-28 修回日期:2015-01-16)

(上接第 2169 页)

- erythropoietin production; a paradigm for oxygen-regulated gene expression[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006, 33(10):968-979.
- [10] Hasnaoui-Saadani RE, Marchant D, Pichon A, et al. Epo deficiency alters cardiac adaptation to chronic hypoxia[J]. Respir Physiol Neurobiol, 2013, 186(2):146-154.
  - [11] Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J, et al. Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-

1alpha target gene in Hep3B and Kelly cells[J]. FASEB J, 2004, 18(12):1462-1464.

- [12] Liang C, Ren Y, Tan H, et al. Rosiglitazone via upregulation of Akt/eNOS pathways attenuates dysfunction of endothelial progenitor cells, induced by advanced glycation end products[J]. Br J Pharmacol, 2009, 158(8):1865-1873.

(收稿日期:2014-11-28 修回日期:2015-02-16)