

## miR-424 负调控 PAK2 基因抑制 骨肉瘤细胞增殖和诱导凋亡的体外研究

李若飞<sup>1</sup>, 解俊杰<sup>1</sup>, 梁慧萍<sup>2</sup>, 吴静<sup>1</sup>

咸阳市中心医院骨四科<sup>1</sup>、皮肤美容科<sup>2</sup>, 陕西 咸阳 712000

**【摘要】** 目的 研究 miR-424 在骨肉瘤细胞中的表达及其对骨肉瘤细胞增殖和凋亡的影响, 并探讨其分子机制。方法 采用 RT-PCR 法和 Western blot 法检测骨肉瘤细胞和健康人成骨细胞中 miR-424、PAK2 mRNA 及 PAK2 蛋白的表达情况。采用 Lipofectamine2000 在骨肉瘤 U2-OS 细胞中转染 miR-424 或 si-PAK2, 采用 Western blot 法检测转染后骨肉瘤 U2-OS 细胞中相关蛋白的表达, CKK-8 法检测细胞的活性, 流式细胞术检测细胞的凋亡。采用双荧光素酶报告基因实验检测 miR-424 对 PAK2 的靶向作用。采用 Lipofectamine2000 在骨肉瘤 U2-OS 细胞中共转染 miR-424 和 pcDNA-PAK2, 利用上述方法检测骨肉瘤 U2-OS 细胞增殖和凋亡、相关蛋白表达。结果 与健康人成骨细胞 hFOB1.19 相比, 骨肉瘤 MG63、U2-OS、SOSP-9607 细胞中 miR-424 的表达显著下调, PAK2 mRNA 和蛋白的表达显著上调, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); miR-424 抑制骨肉瘤 U2-OS 细胞增殖并促进细胞凋亡, 减少 Cyclin D1 和 Bcl-2 的表达量, 增加 Bax 的表达量, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 双荧光素酶报告实验证实 miR-424 对 PAK2 具有靶向作用, miR-424 可负向调控 PAK2 的表达; 沉默 PAK2 抑制骨肉瘤 U2-OS 细胞增殖并促进细胞凋亡, 降低 Cyclin D1 和 Bcl-2 的表达量, 提高 Bax 的表达量, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 共转染 miR-424 和 pcDNA-PAK2 促进骨肉瘤 U2-OS 细胞增殖并抑制细胞凋亡, 增加 Cyclin D1 和 Bcl-2 的表达量, 减少 Bax 的表达量, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 miR-424 可通过负调控 PAK2 基因抑制骨肉瘤 U2-OS 细胞的增殖和诱导细胞凋亡。

**【关键词】** miR-424; PAK2; 骨肉瘤; 细胞增殖; 细胞凋亡

**【中图分类号】** R738 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2020)01-0001-05

***In vitro study of miR-424 negatively regulating PAK2 to inhibit osteosarcoma cell proliferation and induce apoptosis.*** Li Ruo-fei<sup>1</sup>, XIE Jun-jie<sup>1</sup>, LIANG Hui-ping<sup>2</sup>, WU Jing<sup>1</sup>. The 4<sup>th</sup> Department of Orthopedics<sup>1</sup>, Department of Cosmetology<sup>2</sup>, Xianyang Central Hospital, Xianyang 712000, Shaanxi, CHINA

**【Abstract】 Objective** To investigate the expression of miR-424 in osteosarcoma cells and its effect on proliferation and apoptosis of osteosarcoma cells, and to explore its molecular mechanism. **Methods** RT-PCR and western blot were used to detect the expression of miR-424, PAK2 mRNA and PAK2 protein in osteosarcoma cells and healthy human osteoblasts. Lipofectamine2000 was used to transfect miR-424 or si-PAK2 in osteosarcoma U2-OS cells. Western blot was used to detect the expression of related proteins in osteosarcoma U2-OS cells after transfection, CKK-8 method was used to detect cell activity, and flow cytometry was used to detect cell apoptosis. The Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter (DLR<sup>™</sup>) Assay System was used to detect the targeting effect of miR-424 on PAK2. miR-424 and pcDNA-PAK2 were co-transfected into osteosarcoma U2-OS cells by Lipofectamine 2000, and then the above methods were used to detect the proliferation and apoptosis of osteosarcoma U2-OS cells and the expression of related protein. **Results** Compared with healthy human osteoblast hFOB1.19, the expression of miR-424 was significantly down-regulated and the expression of PAK2 mRNA and protein were significantly up-regulated in osteosarcoma cell lines (MG63, U2-OS and SO-SP-9607); all differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). miR-424 inhibited the proliferation of osteosarcoma U2-OS cells and promoted cells apoptosis, which reduced the expression of Cyclin D1 and Bcl-2 and increased the expression of Bax; all differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter (DLR<sup>™</sup>) Assay confirmed that miR-424 had a targeting effect on PAK2, and miR-424 can negatively regulate the expression of PAK2. Silencing PAK2 inhibited the proliferation of osteosarcoma U2-OS cells and promote cells apoptosis, which reduced the expression of Cyclin D1 and Bcl-2 and increased the expression of Bax; all differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). Co-transfection of miR-424 and pcDNA-PAK2 promoted the proliferation of osteosarcoma U2-OS cells and inhibited cells apoptosis, which increased the expression of Cyclin D1 and Bcl-2 and reduced the expression of Bax; all differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** miR-424 can inhibit the proliferation and induce apoptosis of osteosarcoma U2-OS cells through negatively regulating PAK2 gene.

**【Key words】** miR-424; PAK2; Osteosarcoma; Cell proliferation; Apoptosis

骨肉瘤是原发于骨髓内的高恶性肿瘤,是最常见的原发性恶性骨肿瘤,75%的患者在10~30岁发病,且好发于男性<sup>[1]</sup>。骨肉瘤易复发并且早期转移率非常高,在初诊的骨肉瘤患者中有10%~20%出现远处转移,且90%为肺转移,骨肉瘤一旦发生转移和复发就预示预后不良<sup>[2]</sup>。因此阐明骨肉瘤的发生发展机制,对改善骨肉瘤的诊断方法和提高治疗效果有重要意义。

大量研究表明,微小型RNA (microRNA, miRNA) 是一类17~25 nt长短的小RNA分子,不具有蛋白编码功能。miRNA在调控细胞增殖、凋亡、肿瘤血管生成、浸润及转移中发挥着重要作用<sup>[3]</sup>,通过与靶基因mRNA上特定序列结合,可以剪切靶基因的mRNA分子或抑制靶基因蛋白质翻译,从而起到调控靶基因的作用<sup>[4]</sup>。研究发现,骨肉瘤细胞中miR-424抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡<sup>[5-6]</sup>,但其具体分子机制尚不清楚。研究发现,PAK2在乳腺癌细胞中上调,抑制其表达抑制细胞增殖和转移<sup>[7]</sup>。头颈鳞癌中PAK2-c-Myc-PKM2轴是一个致癌通路,促进癌症进展<sup>[8]</sup>。PAK2基因在骨肉瘤中的表达尚无报道,本文就miR-424和PAK2对骨肉瘤细胞增殖、凋亡的影响以及miR-424是否可通过调控PAK2基因来抑制骨肉瘤细胞增殖和诱导其细胞凋亡展开研究,以期为今后骨肉瘤的治疗提供新思路。

## 1 材料与方法

1.1 材料 健康人成骨细胞系hFOB1.19、骨肉瘤细胞系MG63、U2-OS、SOSP-9607购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和DMEM培养液购于Gibco, RT-PCR相关试剂盒购于日本TaKaRa, miR-424、内参U6的引物购于美国ABI公司, Lipofectamine™2000转染试剂盒购于美国Invitrogen公司,一抗PAK2购自美国Abcam公司,总蛋白提取试剂盒购于上海生工生物工程股份有限公司, CCK-8试剂盒购于Dojindo。细胞凋亡检测试剂盒购于南京凯基公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞常规培养于含10% FBS的DMEM培养液中,其中青霉素 $1 \times 10^5$  U/mL,链霉素100 mg/mL。置于37℃、5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养,选择对数生长期细胞进行后续实验。

1.2.2 Real-time PCR 法检测RNA的表达 根据Trizol法抽提总RNA,按照PrimeScript™RT Master Mix试剂盒说明书进行操作,合成cDNA。miR-424-F: 5'-CAGCAGCAATTCATGTTTTGAA-3', miR-424-R: 5'-CAAAACATGAATTGCTGCTGT-3'; PAK2-F: 5'-TGAGCACACCATCCATGTTGG-3', PAK2-R: 5'-AGGTCTGTAGTAATCGAGCCC-3'; U6作为内参, U6-F: 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3'; U6-R: 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3'。按照SYBR

Green I PCR 检测试剂盒说明书在ABI7500荧光定量PCR仪中进行PCR扩增反应,反应条件:95℃预变性30 s, 95℃变性5 s, 60℃退火32 s, 70℃延伸30 s, 循环40次。溶解曲线分析:95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 95℃ 15 s。2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup> 法测定各基因mRNA的相对表达水平。每个样品孔重复检测3次,取均值。

1.2.3 Western bolt 检测蛋白的表达 按照蛋白提取试剂盒说明书提取各实验组细胞的总蛋白。根据BCA试剂盒说明书测定蛋白浓度,取25 g蛋白上样, SDS-PAGE充分分离后,转到聚偏氟乙烯膜,室温条件下封闭液封闭1 h,加稀释后I抗,4℃条件下过夜,第二天用TBST洗膜3次,每次15 min,之后加入相应II抗,室温条件下孵育2 h, TBST洗膜,加入显影液显影,以 $\beta$ -actin作内参,利用Image J软件计算条带灰度比,利用统计软件进行统计分析。

1.2.4 细胞转染 收集对数生长期的骨肉瘤U2-OS细胞,适当密度接种到6孔板上。细胞融合到70%时,根据Lipofectamine™2000转染试剂盒说明书将过表达miR-424的模拟物和其miR阴性对照转染至U2-OS细胞中,分别标记为miR-424组和miR-con组。转染5 h后换为含血清的新鲜培养基继续培养,并用RT-PCR检测转染效果(参照上述1.2.2中的方法)。后续试验中,将U2-OS细胞随机分为anti-miR-424组(转染干扰miR-424的模拟物)、anti-miR-con组(转染干扰miR-424的miR阴性对照)、si-PAK2组(转染沉默PAK2的siRNA)、si-con组(转染沉默PAK2的阴性对照)、miR-424+ pcDNA-PAK2组(miR-424模拟物与pcDNA-PAK2载体共转染)、miR-424+pcDNA组(miR-424模拟物与pcDNA空载体共转染)六组,采用上述方法转染后进行后续实验。

1.2.5 CCK-8法检测细胞活力 将对数生长期的各组U2-OS细胞消化后,以每孔 $5 \times 10^3$ 的密度接种于96孔板中,放于细胞培养箱中培养24 h,后加入10 L CCK-8溶液,培养箱中培养2 h,酶标仪在490 nm波长处检测各孔吸光度值。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡 收集各组待测细胞,离心漂洗去上清后,按照Annexin V-FITC凋亡试剂盒说明书进行操作。具体用缓冲液重悬细胞,轻摇至均匀,避光孵育15 min,加入适量Annexin V-FITC,避光条件下孵育15 min。采用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.3 统计学方法 应用SPSS22.0软件进行数据统计分析,计量数据均经正态性检验符合正态分布,以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用独立样本t检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间多重比较使用SNK-q检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 骨肉瘤细胞系和健康人成骨细胞中 miR-424 和 PAK2 的表达水平比较 与健康人成骨细胞 hFOB1.19 相比,骨肉瘤细胞系 MG63、U2-OS、SOSP-9607 中 miR-424 的表达量明显下降,PAK2 的 mRNA 和蛋白的表达量明显上升,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 1 和表 1。

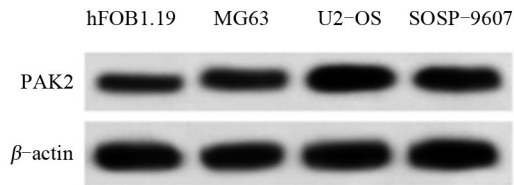


图 1 骨肉瘤细胞系和健康人成骨细胞中 PAK2 蛋白表达

2.2 上调 miR-424 表达对骨肉瘤细胞 U2-OS 增殖和细胞凋亡的影响 与 miR-con 组比较,上调

表 2 上调 miR-424 表达对骨肉瘤细胞 U2-OS 增殖和细胞凋亡的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	miR-424	细胞活力(OD <sub>490nm</sub> )			细胞凋亡率(%)	Cyclin D1	Bcl-2	Bax
		24 h	48 h	72 h				
miR-con 组	0.99±0.08	0.38±0.02	0.79±0.04	1.19±0.06	8.47±0.55	0.87±0.05	0.58±0.05	0.47±0.05
miR-424 组	4.58±0.41	0.36±0.02	0.54±0.03	0.81±0.05	21.75±1.38	0.45±0.03	0.43±0.04	0.78±0.06
<i>t</i> 值	21.051	1.732	12.247	11.918	21.897	17.644	5.738	9.722
<i>P</i> 值	<0.05	0.114	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

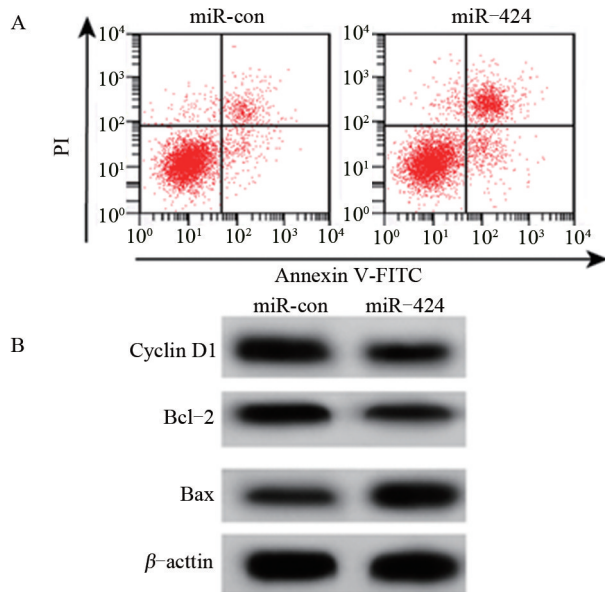


图 2 骨肉瘤细胞 U2-OS 凋亡率及增殖和凋亡相关蛋白表达

注:A,流式细胞术检测骨肉瘤细胞 U2-OS 凋亡;B,Western blot 检测骨肉瘤细胞 U2-OS 中 Cyclin D1、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达。

2.3 miR-424 靶向 PAK2 并负向调控其表达 TargetScan(<http://www.targetscan.org/>) 软件检测结果,miR-424 和 PAK2 之间存在互补结合位点,见图 3A。双荧光素酶报告基因试验结果表明,同 miR-con 与 WT-PAK2 共转染相比,miR-424 与 WT-PAK2 共转染后,U2-OS 细胞荧光素酶活性明显下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );而 miR-con、miR-424 分别与 MUT-PAK2 共转

表 1 骨肉瘤细胞系和健康人成骨细胞中 miR-424 和 PAK2 的表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	miR-424	PAK2 mRNA	PAK2 蛋白
hFOB1.19 组	1.00±0.07	1.00±0.08	0.46±0.03
MG63 组	0.48±0.05 <sup>a</sup>	4.45±0.45 <sup>a</sup>	0.76±0.06 <sup>a</sup>
U2-OS 组	0.25±0.02 <sup>a</sup>	5.87±0.59 <sup>a</sup>	0.85±0.06 <sup>a</sup>
SOSP-9607 组	0.33±0.03 <sup>a</sup>	4.28±0.43 <sup>a</sup>	0.82±0.08 <sup>a</sup>
<i>F</i> 值	313.471	137.353	53.007
<i>P</i> 值	<0.05	<0.05	<0.05

注:与 hFOB1.19 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

miR-424 表达明显增加骨肉瘤 U2-OS 细胞中 miR-424 的表达量、细胞凋亡率、促凋亡蛋白 Bax 的表达量,显著降低 48 h 和 72 h 的细胞活力、促增殖蛋白 Cyclin D1 的表达量、抑凋亡蛋白 Bcl-1 的表达量,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),而 24 h 的细胞活力差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 2 和图 2。

染后,U2-OS 细胞荧光素酶活性变化不明显,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 3。与 miR-con 组相比,miR-424 组中 PAK2 蛋白的表达量显著下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );相反,anti-miR-424 组中 PAK2 蛋白的表达量较 anti-miR-con 组显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 4 和图 3B。

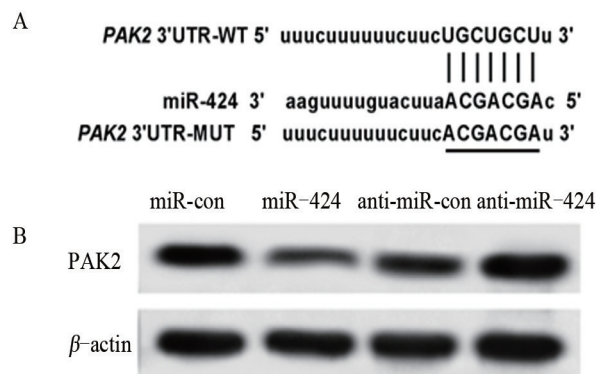


图 3 miR-424 与 PAK2 互补的核苷酸序列以及 miR-424 调控 PAK2 表达

表 3 双荧光素酶报告实验( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	WT-PAK2	MUT-PAK2
miR-con 组	1.00±0.05	0.96±0.09
miR-424 组	0.63±0.07	1.08±0.12
<i>t</i> 值	10.536	1.960
<i>P</i> 值	<0.05	0.079

表 4 miR-424 调控 PAK2 的表达( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	PAK2
miR-con 组	0.81±0.04
miR-424 组	0.38±0.05 <sup>a</sup>
anti-miR-con 组	0.69±0.06
anti-miR-424 组	0.92±0.08 <sup>b</sup>
F 值	92.482
P 值	<0.05

注:与 miR-con 组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与 anti-miR-con 组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ 。

表 5 下调 PAK2 表达对骨肉瘤细胞 U2-OS 增殖和凋亡的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	细胞活力( $OD_{490nm}$ )			细胞凋亡率(%)	PAK2	Cyclin D1	Bcl-2	Bax
	24 h	48 h	72 h					
si-con 组	0.36±0.03	0.81±0.06	1.18±0.11	8.71±0.41	0.79±0.07	0.63±0.07	0.91±0.06	0.53±0.05
si-PAK2 组	0.32±0.04	0.45±0.04	0.84±0.09	21.46±1.47	0.56±0.06	0.41±0.04	0.59±0.05	0.78±0.07
t 值	1.960	12.229	5.860	20.465	6.111	6.684	10.036	7.119
P 值	0.079	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

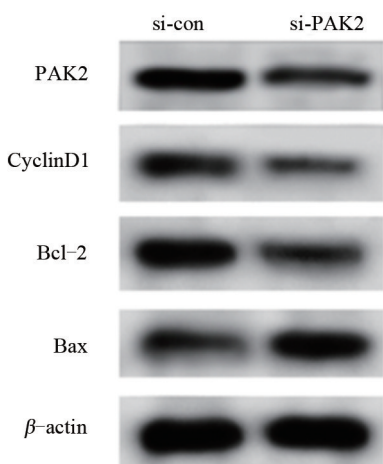


图 4 骨肉瘤细胞中 PAK2、Cyclin D1、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达

2.5 过表达 PAK2 能部分逆转 miR-424 对骨肉瘤 U2-OS 细胞的增殖和凋亡的影响 转染 24 h 后, miR-con 组与 miR-424 组细胞的吸光度值差异不明显,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。转染 48 h 和 72 h 后, miR-424 组较 miR-con 组细胞的吸光度值显著下降,细胞的凋亡率显著升高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ); PAK2 蛋白和促增殖蛋白 Cyclin D1 和抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量明显下降,促凋亡蛋白 Bax 的表达量明显升高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。转染 24 h 后,

表 6 过表达 PAK2 逆转 miR-424 表达对骨肉瘤细胞 U2-OS 增殖和凋亡的作用( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	细胞活力( $OD_{490nm}$ )			细胞凋亡率(%)	PAK2	Cyclin D1	Bcl-2	Bax
	24 h	48 h	72 h					
miR-con 组	0.36±0.04	0.77±0.06	0.88±0.07	8.53±0.63	0.83±0.07	0.88±0.08	0.85±0.07	0.47±0.07
miR-424 组	0.34±0.03	0.49±0.04 <sup>a</sup>	0.57±0.06 <sup>a</sup>	19.25±1.12 <sup>a</sup>	0.57±0.06 <sup>a</sup>	0.49±0.04 <sup>a</sup>	0.62±0.06 <sup>a</sup>	0.79±0.06 <sup>a</sup>
miR-424+pcDNA 组	0.31±0.03	0.44±0.05	0.54±0.05	22.38±1.88	0.54±0.05	0.45±0.04	0.51±0.05	0.81±0.05
miR-424+pcDNA-PAK2 组	0.34±0.04	0.61±0.06 <sup>b</sup>	0.68±0.07 <sup>b</sup>	15.33±1.05 <sup>b</sup>	0.68±0.07 <sup>b</sup>	0.61±0.05 <sup>b</sup>	0.72±0.07 <sup>b</sup>	0.63±0.07 <sup>b</sup>
F 值	2.040	45.788	35.761	136.079	26.013	74.628	31.648	37.987
P 值	0.141	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与 miR-con 组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与 miR-424+pcDNA 组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ 。

### 3 讨论

骨肉瘤是青少年最常见的恶性骨肿瘤,易发生早

2.4 下调 PAK2 表达对骨肉瘤细胞 U2-OS 增殖和凋亡的影响 与 si-con 组比较,下调 PAK2 表达明显降低 48 h 和 72 h 的细胞活力、PAK2 蛋白的表达量、促增殖 Cyclin D1 蛋白的表达量、抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量,显著提高细胞凋亡率、促凋亡蛋白 Bax 的表达量,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),而 24 h 的细胞活力差异不显著,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 5 和图 4。

miR-424+pcDNA 组与 miR-424+pcDNA-PAK2 组的细胞吸光度值差异不明显,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),转染 48 h 和 72 h 后, miR-424+pcDNA-PAK2 组较 miR-424+pcDNA 组细胞吸光度值显著升高,细胞的凋亡率显著下降;PAK2 蛋白和促增殖蛋白 Cyclin D1 和抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量明显升高,促凋亡蛋白 Bax 的表达量明显下降,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 6 和图 5。

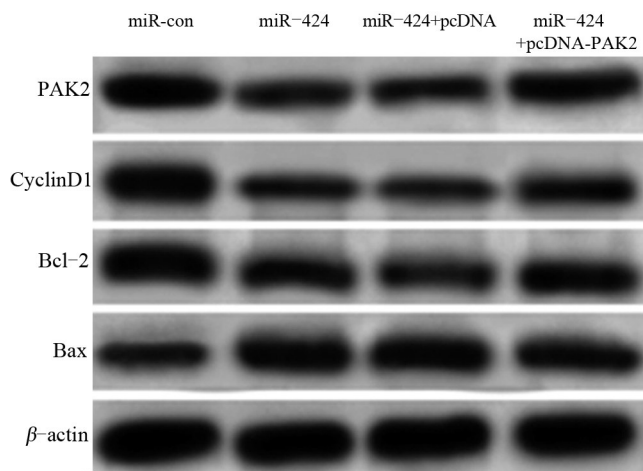


图 5 骨肉瘤细胞中 PAK2 蛋白表达

期转移,致死率和致残率较高<sup>[9-10]</sup>。目前对于骨肉瘤的治疗多采用手术治疗结合化疗、放疗的综合疗法,但

是骨肉瘤手术治疗致残率高、假体功能差,放疗和化疗毒副作用大,并且晚期肿瘤对化疗药耐受,导致骨肉瘤患者的生存率低,治疗效果不尽人意<sup>[1]</sup>。因此,寻找一种治疗骨肉瘤效果好、可行性大且不良反应小的临床新方法已成为目前研究的热点。

近年研究表明,miRNA 是肿瘤发生发展中最基本的参与者,在肿瘤进展中发挥着关键作用。miRNA 主要通过与其靶基因 mRNA 3'非编码区(3' untranslated region, 3'UTR)完全配对促使靶基因 mRNA 发生降解,或不完全配对抑制 mRNA 的翻译但不影响其稳定性,从而调控靶基因的表达,进而影响肿瘤细胞增殖、凋亡、分化、浸润及转移等<sup>[2]</sup>。miRNA 可作为癌症发生发展的指标,所以探寻与癌症相关的 miRNA 及下游靶基因有利于癌症的诊断与治疗。刘萍等<sup>[3]</sup>发现 miR-424 与肿瘤的发生、发展、治疗及预后关系密切。严贝芬等<sup>[4]</sup>发现 miR-424-5p 通过下调 Bcl-2 的表达抑制人肺癌细胞的增殖,李宏敏等<sup>[5]</sup>发现 miR-424 能够通过调控 E2F6 而抑制非小细胞肺癌细胞的生长和侵袭,孙雪梅等<sup>[6]</sup>发现 miR-424a 通过与 ARK5 mRNA 3'UTR 结合抑制胶质瘤细胞的侵袭。据研究报道,miR-424 在骨肉瘤细胞中抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡<sup>[5-6]</sup>,本文通过 RT-PCR 法和 Western blot 法检测发现,与健康成骨细胞相比,骨肉瘤细胞中 miR-424 的表达下调,提示其可能在骨肉瘤中起抑癌基因的作用。过表达 miR-424 细胞活性显著下降,凋亡率显著升高,且促增殖蛋白 Cyclin D1、抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量明显下降,促凋亡蛋白 Bax 的表达量明显升高,结果与此前研究一致,但其具体分子机制尚不清楚。

据研究报道,p21 激活激酶 2 (PAK2)在多种肿瘤中异常表达,可参与细胞骨架重构、细胞凋亡、信号传导等,在肿瘤的发生和发展中起到重要作用<sup>[7]</sup>。PAK2 在乳腺癌、胃癌、头颈鳞癌、黑色素瘤及膀胱癌等癌症中充当促癌基因的功能<sup>[18-20]</sup>,但其在骨肉瘤中的作用还未有报道。本研究通过 RT-PCR 法和 Western blot 法检测,发现 PAK2 在骨肉瘤细胞中表达上调,沉默 PAK2 抑制了骨肉瘤 U2-OS 细胞的活性,促进细胞凋亡,且明显降低细胞中促增殖蛋白 Cyclin D1、抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量,并明显升高促凋亡蛋白 Bax 的表达量,其对骨肉瘤细胞的影响与 miR-424 恰好相反。本实验利用生物信息预测 miR-424 与 PAK2 之间的关系,结果表明 miR-424 与 PAK2 之间存在结合位点。荧光素酶基因报告试验进一步验证,发现 miR-424 与 PAK2 之间存在靶向调控关系,提示 PAK2 是 miR-424 的下游靶基因。同时,过表达 miR-424 明显减少 PAK2 的表达量,而沉默 miR-424 明显升高 PAK2 的表达量,证实 miR-424 可负向调控 PAK2 的表达。此外,研究发现 PAK2 可以逆转 miR-424 对骨肉瘤细胞增殖的抑制作用,以及对细胞凋亡的促进作用。这些结果说明 miR-424 抑制骨肉瘤细胞增殖,并促进细胞凋亡可能是通过靶向调控

PAK2 表达来实现的。

综上所述,miR-424 可通过抑制 PAK2 的表达抑制骨肉瘤细胞的增殖、诱导其细胞凋亡。本文明确了 miR-424 和 PAK2 对骨肉瘤细胞增殖、凋亡的影响并初步探讨了 miR-424 可通过调控 PAK2 的表达发挥抗肿瘤作用的可能机制,为临床治疗骨肉瘤提供了可靠的理论依据和新的治疗思路。

#### 参考文献

- [1] ZAMBO I, VESELÝK. WHO classification of tumours of soft tissue and bone 2013: the main changes compared to the 3<sup>rd</sup> edition [J]. *Cesk Patol*, 2014, 50(2): 64-70.
- [2] 郭征. 我国骨肉瘤治疗的现状与问题及发展方向[J]. *中国骨与关节杂志*, 2015, 4(5): 338-342.
- [3] 冯琼, 雷章, 卢宏达. microRNA 与肿瘤关系的研究[J]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2012, 6(15): 138-140.
- [4] 沈克. Has-miR-139 调控人结肠癌细胞浸润转移及多药耐药的分子机理研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2014.
- [5] SHEKHAR R, PRIYANKA P, KUMAR P, et al. The microRNAs miR-449a and miR-424 suppress osteosarcoma by targeting cyclin A2 expression [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(12): 4381-4400.
- [6] LONG XH, MAO JH, PENG AF, et al. Tumor suppressive microRNA-424 inhibits osteosarcoma cell migration and invasion via targeting fatty acid synthase [J]. *Exp Ther Med*, 2013, 5(4): 1048-1052.
- [7] ZHANG Y, LIN P, ZOU G, et al. MiR-216a-5p act as a tumor suppressor, regulating the cell proliferation and metastasis by targeting PAK2 in breast cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(6): 2469-2475.
- [8] AMIT G, ATHIRA A, SMRITI S, et al. PAK2-c-Myc-PKM2 axis plays an essential role in head and neck oncogenesis via regulating Warburg effect [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(8): 825-840.
- [9] 李永刚. Notch-1 信号通路和 microRNAs 在天然植物药物抗骨肉瘤中的作用及机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2013.
- [10] 郭卫, 牛晓辉, 肖建如, 等. 骨肉瘤临床循证诊疗指南[J]. *中华骨与关节外科杂志*, 2018, 11(4): 53-66.
- [11] 易生辉, 秦刚, 黄肖华, 等. 骨肉瘤的治疗进展[J]. *医学综述*, 2017, 23(8): 1529-1532.
- [12] 王思念, 吕进, 张巧云, 等. miRNA 与肿瘤侵袭转移[J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(3): 485-487.
- [13] 刘萍, 赵海苹, 罗玉敏. MicroRNA-424 在肿瘤发生中的作用和机制研究进展[J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(5): 529-534.
- [14] 严贝芬, 郑月茂, 吴海波. miR-424-5p 通过下调 BCL-2 的表达抑制人肺癌 A549 细胞增殖[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2017, 33(2): 79-86.
- [15] 李宏敏, 兰海涛, 张明, 等. miR-424 对非小细胞肺癌 A549 细胞生长和侵袭的影响及分子机制[J]. *中国肺癌杂志*, 2016, 19(9): 571-576.
- [16] 孙雪梅, 郑书贤, 王瑞鸽, 等. miR-424 通过结合 ARK5 mRNA 3'-UTR 抑制胶质瘤细胞侵袭[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2017, 33(5): 104-109.
- [17] 李宝玉, 何立杰, 张向莲, 等. PAK2 的生物学特性及其与肿瘤关系的研究进展[J]. *天津医药*, 2017, 45(9): 111-114.
- [18] 郝帅, 秦玉, 吕娜, 等. miR-137 抑制人类黑色素瘤细胞体外增殖的机制研究[J]. *生命科学仪器*, 2015, 13(6): 15-20.
- [19] 党艺方, 张璐, 董寰, 等. PAK2: 一种新的乳腺癌治疗预测标志物[J]. *河南大学学报: 医学版*, 2018, 37(4): 234-238.
- [20] 石干, 田德安, 何星星, 等. RhoGDI2、PAK2 在胃癌中的原位表达及与临床病理特征的相关性[J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2013, 22(9): 836-840.

(收稿日期: 2019-05-08)