

LncRNA TUSC7 对人骨肉瘤细胞增殖和迁移的影响

福建省三明市第二医院骨科（永安 365000） 黄立明 高 曦¹

【摘 要】 目的 探讨 LncRNA TUSC7 对人骨肉瘤细胞增殖和侵袭的影响。**方法** 构建 LncRNA TUSC7 过表达质粒，选择正常成骨细胞 hFOB 1.19 和 MG-63、U-2OS 骨肉瘤 3 种细胞株为素材，将重组质粒 TUSC7 和空质粒 pcDNA 3.1 分别对 MG-63 和 U-2OS 细胞进行转染，正常成骨细胞 hFOB 1.19 不转染，并采用 CCK-8 实验、Transwell 迁移实验观察 TUSC7 对细胞增殖和迁移能力的影响。**结果** 成功构建 LncRNA TUSC7 过表达质粒，MG-63、U-2OS 骨肉瘤未转染组、空质粒组的细胞增殖能力和迁移能力均大于正常细胞组，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ），U-2OS 转染组、MG-63 转染组的增殖能力与正常细胞组相比，差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）；MG-63 转染组与正常细胞组相比，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）；MG-63 与 U-2OS 骨肉瘤空质粒组与未转染组比较，差异无统计学意义（ $P>0.05$ ），MG-63 与 U-2OS 骨肉瘤转染组的细胞增殖能力和迁移能力均大于未转染组，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）；MG-63 与 U-2OS 骨肉瘤转染组与空质粒组相比，差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）；U-2OS 转染组与 MG-63 转染组相比，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）。**结论** LncRNA TUSC7 具有抑制骨肉瘤细胞增殖和侵袭的能力，对 U-2OS 骨肉瘤的穿膜的抑制效果更好。

【关键词】 LncRNA TUSC7；骨肉瘤；增殖；迁移

【中图分类号】 738.1 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2019)01-0121-03

骨肉瘤是一种具有高度侵袭的骨恶性肿瘤，在儿童和青少年中的发病率较高^[1]。在临床上骨肉瘤的转移率和病死率极高，虽然手术及化疗等治疗手段迅速发展，但仍有许多患者由于对化疗产生抗性，导致患者体内出现瘤细胞复发转移的情况。虽然近年来分子生物学研究为骨肉瘤分子发病机制提供了一定的理论依据，但其发生发展、转移及凋亡的分子机制尚未得到证实。因此寻找有效的骨肉瘤早期诊断方法、标志物及治疗策略，对于患者的生存及整体治疗水平有着十分重要的作用。LncRNA TUSC7 是位于人类染色体 3q13.31 位点的母源性印记基因，Cong 等^[2] 发现其低表达性与骨肉瘤转移密切相关，同时 TUSC7 可显著抑制骨肉瘤 HOS 和 MG63 细胞的增殖和克隆形成能力。目前关于

LncRNA TUSC7 在人骨肉瘤组织及细胞中表达、是否参与骨肉瘤发生、发展和恶性转化的研究较少，本实验通过构建 LncRNA TUSC7 过表达质粒，并将其转染到不同的人骨肉瘤细胞系中，观察 LncRNA TUSC7 对不同细胞增殖和迁移的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂：hFOB 1.19、MG-63、U-2 OS 细胞株（中科院上海细胞库）；人 LncRNA TUSC7 及 pcDNA3.1-TUSC7 质粒的合成（北京艾德莱生物科技有限公司）；TUSC7 上游引物序列：5'-CT-CAGTCAACTAAGCCACTT-3'，下游引物序列：5'-GACATTGCTCGTTTCACATC-3'，产物大小 325 bp。培养基、胎牛血清（美国 Gibco 公司）；脂质体 2000、双抗、Trizol 试剂盒（美国 Invitrogen

1 福州市第二医院骨科

公司); 逆转录试剂盒及 PCR 试剂盒 (杭州主诺生物技术有限公司); CCK-8 (上海七海复泰生物科技公司)。

1.2 方法:

1.2.1 正常细胞及骨肉瘤细胞的培养: 取 hFOB 1.19 成骨细胞、MG-63、U-2OS 骨肉瘤细胞株进行复苏, hFOB 1.19 细胞株采用含 G 418 的 DMEM/F 12 等体积混合培养基培养, MG-63 和 U-2OS 则使用含体积分数 10% 的胎牛血清 DMEM 培养。培养条件: 37 °C、5% CO₂、每 2 d 进行一次换液, 以维持细胞处于对数生长状态。

1.2.2 细胞转染及分组: 实验分 7 组, 分别为正常成骨细胞 hFOB 1.19 组, MG-63 未转染组、转染组和空质粒组, U-2OS 未转染组、转染组和空质粒组。转染前 1 d 将 MG-63 和 U-2OS 细胞接种于 6 孔板上, 当细胞融合度达 70%~80% 时, 第 2 天按照转染试剂说明书将 pcDNA-TUSC7 及空质粒 pcDNA 3.1 转染至 MG-63 和 U-2OS 细胞, 以未转染组作为对照。正常成骨细胞 hFOB 1.19 不转染。

1.2.3 细胞增殖能力的检测: 取各组对数生长期细胞加入到 1.5 mL 的 Eppendorf 管中, 1 000 rpm 离心 5 min, 加入培养基重悬, 按 100 μ L/孔悬液接种到 96 细胞培养板中, 每组重复 3 次; 培养 24 h, 向每孔中加入 10 μ L 预配制的 CCK-8 溶液, 置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的二氧化碳培养箱中培养避光 2 h, 然后酶标仪 450 nm 测定吸光度值, 连续重复 3 次试验。

1.2.4 细胞迁移能力的检测: 收集各组细胞, 1 000 rpm 离心 5 min, 将不同细胞采用不含血清和双抗的培养基稀释至 5×10^5 个/mL。采用 Transwell 迁移实验检测细胞迁移能力, 在 400 倍镜下随机选择 5 个视野, 计算每个视野的穿膜细胞, 以平均值作为结果。

1.3 统计学分析: 采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析。计量资料以均数 \pm 标准差表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LncRNA TUSC7 对 hFOB1.19、MG-63 和 U-2OS 细胞迁移能力的影响: MG-63、U-2OS 骨肉瘤未转染组、空质粒组、MG-63 转染组与正常细胞组比较, 差异有统计学意义 (P<0.05), U-2OS 转染组与正常细胞组相比, 差异无统计学意义 (P>0.05); MG-63 与 U-2OS 骨肉瘤空质粒组与未转染组比较, 差异无统计学意义 (P>0.05), MG-63 与 U-2OS 骨肉瘤转染组与未转染组相比, 差异有

统计学意义 (P<0.05); MG-63 与 U-2OS 骨肉瘤转染组与空质粒组相比, 差异无统计学意义 (P>0.05); U-2OS 转染组与 MG-63 转染组相比, 差异有统计学意义 (P<0.05)。见表 1。

表 1 各组细胞穿膜细胞数测定 ($\bar{x} \pm s$)

组别	MG-63	U-2OS	hFOB 1.19
未转染组	73.1 \pm 4.0*	76.0 \pm 3.2*	26.9 \pm 6.3
空质粒组	74.0 \pm 2.5*	74.0 \pm 2.3*	
转染组	42.2 \pm 3.9* [#] Δ	31.3 \pm 4.1 [#] Δ *	

注: 与人正常成骨细胞 hFOB 1.19 组比较, * P<0.05; 与未转染组比较, # P<0.05; 与空质粒组比较, Δ P<0.05; 与骨肉瘤细胞系 MG-63 转染组比较, * P<0.05。

2.2 LncRNA TUSC7 对 hFOB 1.19、MG-63 和 U-2OS 细胞增殖能力的影响: MG-63、U-2OS 骨肉瘤未转染组、空质粒组与正常细胞组相比, 差异有统计学意义 (P<0.05); U-2OS 转染组、MG63 转染组与正常细胞组相比, 差异无统计学意义 (P>0.05); MG63 与 U-2OS 骨肉瘤空质粒组与未转染组计较, 差异无统计学意义 (P>0.05), MG63 与 U-2OS 骨肉瘤转染组与未转染组相比, 差异有统计学意义 (P<0.05); MG-63 与 U-2OS 骨肉瘤转染组与空质粒组相比, 差异无统计学意义 (P>0.05); U-2OS 转染组与 MG-63 转染组相比, 差异有统计学意义 (P<0.05)。见表 2。

表 2 各组细胞吸光值的测定 ($\bar{x} \pm s$)

组别	MG-63	U-2OS	hFOB 1.19
未转染组	1.30 \pm 0.12*	1.38 \pm 0.13*	0.66 \pm 0.17
空质粒组	1.32 \pm 0.09*	1.25 \pm 0.07*	
转染组	0.72 \pm 0.08 [#] Δ	0.68 \pm 0.11 [#] Δ *	

注: 与人正常成骨细胞 hFOB 1.19 组比较, * P<0.05; 与未转染组比较, # P<0.05; 与空质粒组比较, Δ P<0.05; 与骨肉瘤细胞系 MG-63 转染组比较, * P<0.05。

3 讨论

LncRNA 是一类重要的调控分子, 随着对 LncRNA 功能的不断探索, 越来越多的证据表明 LncRNA 的异常表达与肿瘤的发生、发展有着很大的关系, LncRNA TUSC7 既往也被报道在骨肉瘤^[3]、胰导管腺癌^[4]、胃癌^[5]等多种肿瘤中异常表达, 相关报道亦证实, TUSC7 作为常见的肿瘤抑制因子, 其表达量的下降会调控多种肿瘤的恶性转化及化疗耐受, 但目前为止, TUSC7 在骨肉瘤中的研究仍处于初步探索阶段。

骨肉瘤作为临床上常见的一种原发性骨恶性肿

瘤,虽然近年随着科技的发展,其治疗手段也有了长足的发展,但是骨肉瘤细胞具有的侵袭性仍是高死亡率的重要原因^[6]。MG-63 和 U-2OS 细胞株作为体外研究骨肉瘤发生和发展的重要细胞模型,在研究骨肉瘤的发病机制中扮演着重要的角色。本研究选择正常成骨细胞 hFOB 1.19 和 MG-63、U-2OS 骨肉瘤 3 种细胞株为研究对象,将重组质粒 TUSC7 和空质粒 pcDNA3.1 分别对 MG-63 和 U-2OS 细胞进行转染,正常成骨细胞 hFOB1.19 不转染,通过 CCK-8 实验和 Transwell 迁移实验检测发现,转染 LncRNA TUSC7 对 MG-63 和 U-2OS 骨肉瘤细胞穿膜具有显著的抑制效果,且 LncRNA TUSC7 对 U-2OS 骨肉瘤的穿膜的抑制效果更好,由此说明 LncRNA TUSC7 对 MG-63 和 U-2OS 骨肉瘤细胞增殖能力均有显著的抑制效果,但是其作用的分子机制还有待进一步深入研究。

参考文献

[1] Jo V Y, Fletcher C D. WHO classification of soft tissue

tumours: an update based on the 2013 (4th) edition [J]. Pathology, 2014, 46 (2): 95-104.

- [2] Cong M, Li J, Jing R, et al. Long non-coding RNA tumor suppressor candidate functions as a tumor suppressor and inhibits proliferation in osteosarcoma [J]. Tumour Biol, 2016, 37 (7): 9441-9450.
- [3] Pasic I, Shlien A, Durbin A D, et al. Recurrent focal copy-number changes and loss of heterozygosity implicate two non-coding RNAs and one tumor suppressor gene at chromosome 3q13.31 in osteosarcoma [J]. Cancer Res, 2010, 70 (1): 160-171.
- [4] Ding Y C, Yu W, Ma C, et al. Expression of long non-coding rnaloc285194 and its prognostic significance in human pancreatic ductaladenocarcinoma [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7 (11): 8065-8070.
- [5] Qi P, Xu M D, Shen X H, et al. Reciprocal repression between TUSC7 and miR-23b in gastric cancer [J]. Int J Cancer, 2015, 137 (6): 1269-1278.
- [6] Mortus J R, Zhang Y, Hughes D P. Developmental pathways hijacked by osteosarcoma [J]. Adv Exp Med Biol, 2014 (804): 93-118.