论著·基础医学

MiR-616在骨肉瘤中的表达及对其细胞增殖、凋亡、迁移侵袭的作用

付万垒,郝翔麟,曹 亚,夏吉影,周小刚,徐嘉忆,郭乔楠 陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院病理科,重庆

[摘要] **目的** 阐释miR-616对骨肉瘤恶性生物学进程的影响,并初步探索其可能机制。**方法** 采用原位杂交法(ISH)分析2018年1月至2019年12月陆军军医大学第二附属医院病理科11例骨肉瘤石蜡标本中miR-616表达;采用qRT-PCR比较成骨细胞hFOB1.19和骨肉瘤细胞系143B、HOS中miR-616的表达;通过慢病毒转染法构建miR-616敲低和过表达稳定细胞系,将细胞分为miR-616过表达组、过表达对照组、miR-616敲低组和敲低对照组。采用流式细胞术检测各组细胞增殖和凋亡情况,采用Transwell和平板克隆形成实验检测各组细胞的侵袭和迁移情况。将10只4周龄雌性裸鼠(18~20 g)采用随机数字表法分为对照组和miR-616过表达组,采用皮下动物荷瘤实验比较两组移植瘤生长情况;采用二代测序和双萤光素酶报告系统确定miR-616的靶基因。**结果** ISH结果显示,与人骨肉瘤癌旁组织比较,miR-616在骨肉瘤组织中表达增高,主要存在于细胞质中,qRT-PCR结果表明miR-616在骨肉瘤细胞系143B、HOS中均高于成骨细胞hFOB1.19($P<0.05$)。体外实验表明,与过表达对照组比较,过表达miR-616组143B和HOS细胞的增殖能力增强($P<0.01$),凋亡抑制($P<0.01$),迁移能力增强($P<0.01$),侵袭能力增加($P<0.01$);相反,敲低miR-616后,与敲低对照组比较,miR-616敲低组143B和HOS细胞增殖能力减弱($P<0.05$),迁移力减弱($P<0.05$),侵袭能力下降($P<0.05$),且miR-616-3p对骨肉瘤的凋亡影响强于miR-616-5p。动物实验表明,过表达miR-616组的小鼠移植瘤质量(98.00±17.22)mg大于对照组(33.60±8.08)mg($P<0.01$)。二代测序和双荧光素酶报告系统结果显示,miR-616的靶蛋白为KLF2。**结论** miR-616可促进骨肉瘤恶性生物学行为发展,其表达水平可能成为骨肉瘤潜在治疗的靶点。

[关键词] miR-616;骨肉瘤;增殖;凋亡;侵袭

[中图法分类号] R394.3;R730.23;R738.1 [文献标志码] A

Expression of miR-616 in osteosarcoma and its role in proliferation, apoptosis, migration and invasion of tumor cells

FU Wanlei, HAO Xianglin, CAO Ya, XIA Jiying, ZHOU Xiaogang, XU Jiayi, GUO Qiaonan Department of Pathology, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, China

[**Abstract**] Objective To elucidate the effects of miR-616 on the malignant biological processes of osteosarcoma and to preliminarily explore its potential mechanisms. Methods *In situ* hybridization (ISH) was employed to analyze miR-616 expression in 11 paraffin-embedded osteosarcoma specimens collected in our department during January 2018 to December 2019. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(8197102971)

[通信作者] 郭乔楠,E-mail:qiaonan85@263.net

2097-0927/Copyright © 2025,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:付万垒,郝翔麟,曹亚,等.MiR-616在骨肉瘤中的表达及其对细胞增殖、凋亡、迁移侵袭的作用[J].陆军军医大学学报,2025,47(20):2461-2473.DOI:10.16016/j.2097-0927.202508009.

Citation:FU W L,HAO X L,CAO Y,*et al*. Expression of miR-616 in osteosarcoma and its role in proliferation, apoptosis, migration and invasion of tumor cells[J]. J Army Med Univ,2025,47(20):2461-2473.DOI:10.16016/j.2097-0927.202508009.

compare the mRNA expression level of miR-616 in the osteoblast cell line hFOB1.19 and osteosarcoma cell lines 143B and HOS. Stable cell lines with miR-616 knockdown or overexpression were established *via* lentiviral transfection in 143B and HOS cells. Cell proliferation and apoptosis were detected by flow cytometry, while cell invasion and migration were assessed using Transwell and colony formation assays, respectively. To evaluate the effect of miR-616 on tumor growth in *vivo*, 10 female nude mice (4 weeks old, weighing 18~20 g) were randomized into a control group and a miR-616 overexpression group. After the xenograft tumor model was constructed, the growth of subcutaneous tumors was monitored. Finally, next-generation sequencing and a dual-luciferase reporter assay were performed to identify the target genes of miR-616. **Results** ISH results showed that miR-616 expression was up-regulated in osteosarcoma tissues than adjacent tissues, and primarily localized in the cytoplasm. qRT-PCR confirmed that miR-616 level was significantly higher in 143B and HOS cells than hFOB1.19 cells ($P<0.05$). *In vitro* experiments revealed that miR-616 overexpression enhanced the proliferation, migration and invasion, while suppressing apoptosis in 143B and HOS cells ($P<0.01$). Conversely, miR-616 knockdown weakened these malignant phenotypes ($P<0.05$), with miR-616-3p showing a stronger effect on apoptosis than miR-616-5p. Animal experiments demonstrated that the tumor weight in the miR-616 overexpression group was significantly greater than that of the control group (98.00±17.22 *vs* 33.60±8.08 mg, $P<0.01$). Furthermore, KLF2 was identified and confirmed as a direct target of miR-616. **Conclusion** MiR-616 promotes malignant biological behaviors in osteosarcoma, and its expression level indicates that it may serve as a potential therapeutic target.

[**Key words**] miR-616; osteosarcoma; proliferation; apoptosis; invasion

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (8197102971). Corresponding author: GUO Qiaonan, E-mail: qiaonan85@263.net

骨肉瘤(osteosarcoma,OS)是青少年最常见的原发性恶性骨肿瘤,具有高度侵袭性和早期转移倾向。目前,以手术切除结合新辅助化疗为主的综合治疗方案已将患者的5年生存率提升至60%~70%。然而,这一进展在过去30年间已陷入瓶颈。特别是对于初始即伴有肺转移或治疗后复发的患者,临床缺乏有效的干预手段,其5年生存率骤降至20%左右,预后极差[1-2]。因此,深入揭示OS发生发展的分子机制,寻找新的、可用于诊断和治疗的分子靶点,已成为改善骨肉瘤患者生存现状的迫切需求。

微小RNA(microRNA, miRNA)作为一类重要的非编码RNA,通过调控靶基因的表达,在肿瘤的增殖、凋亡、侵袭和转移等关键生物学进程中扮演着调节枢纽的角色,已成为肿瘤研究的热点领域[3-6]。MicroRNA-616(miR-616)是一种新近发现的、与肿瘤高度相关的miRNA,已在鼻咽癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤中被证实异常表达,并通过调控关键信号通路发挥促癌作用[7-10]。已有初步研究提示,miR-616的表达水平与骨肉瘤患者的生存预后密切相关[11]。然而,这一相关性背后的具体生物学功能和分子机制仍是空白。鉴于此,本研究旨在深入探究miR-616在骨肉瘤恶性生物学行为中的具体作用,初步阐明其调控机制,旨在为骨肉瘤的诊断提供潜在的新型生物标志物,并为开发靶向治疗新策略提供实验依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 临床样本来源

采用回顾性队列研究,纳入陆军军医大学第二附属医院病理科2018年1月至2019年12月骨肉瘤临床组织标本(组织蜡块),共11例。纳入标准:①病理学明确诊断为骨肉瘤;②既往不合并其他肿瘤患者。排除标准:①随访丢失患者;②不接受治疗者。本研究已通过陆军军医大学第二附属医院伦理委员会学术审查(2018-研第069-01)。

1.2 细胞培养

本研究所用到的人骨肉瘤细胞143B(143B)和人骨肉瘤细胞HOS(HOS)细胞购于广州赛库生物技术有限公司,成骨细胞hFOB1.19由重庆医科大学第一附属医院骨科馈赠。细胞培养瓶、各类规格孔板等细胞培养耗材均购于武汉拜意尔生物有限公司。骨肉瘤细胞培养的RPMI1640培养基购于美国HyClone公司,成骨细胞培养基采用DMEM培养基,胎牛血清购于北京兰杰柯科技有限公司,青-链霉素双抗溶液购于

北京兰杰柯科技有限公司。采用细胞专用恒温培养箱培养所有细胞(购于中国海尔公司)。0.25%胰酶(购于北京兰杰柯科技有限公司)进行消化细胞,每2天传代1次,取对数生长期瘤细胞进行后续相关性实验。miR-616过表达慢病毒载体、阴性对照,miR-616-3p、miR-616-5p敲低慢病毒载体和阴性对照物均购自上海汉恒生物科技有限公司。

1.3 HE染色

5 μm组织切片经二甲苯脱蜡,梯度酒精水化后,苏木精染核,70%盐酸乙醇进行分化,在流动的水下进行切片返蓝,总共时间15 min,伊红染细胞质2 min,最后经梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.4 原位杂交

原位杂交试剂盒购于武汉博士德,为miR-616专用探针试剂盒(探针序列:5′-AGGTAATTCCTCCACTCAAAACCCTTCAGTGACTTCCATG-3′;5′-GAAGTCATTGAGGGTTTGAGCAGAGGAATGACCTGTTTT-3′),该探针是针对miR-616的寡核苷酸探针,经地高辛标记。所有实验操作按照说明书进行。取5 μm组织切片,经脱蜡、水化、蛋白酶K处理等步骤后,滴加特异性miR-616探针,在恒温38~42 ℃杂交过夜。杂交后进行严格洗涤以去除非特异性结合的探针,然后加入地高辛抗体,放置于保温箱37 ℃孵育60 min,再通过显色系统DAB显色。最后用苏木精复染,脱水后二甲苯透明,封片。在显微镜下观察杂交信号的位置和强度。

1.5 细胞转染

根据汉恒生物科技慢病毒说明书,取1×10^5个处于对数生长期的143B和HOS细胞,铺板于6孔板,放入37 ℃、5% CO_2过夜培养。采用1/2小体积感染法进行感染,将病毒从冰箱取出慢慢融化,感染复数(MOI)取值为100,感染24 h后吸出含有病毒的培养基继续培养,总共培养72 h后观察转染效率。根据在两组细胞中转染添加物的不同分为miR-616过表达组(143B-LV-miR-616-OV,HOS-LV-miR-616-OV)、过表达对照组(143B-LV-miR-616-VC,HOS-LV-miR-616-VC)、miR-616敲低组(143B-LV-miR-616-3pkd,143B-LV-miR-616-5pkd,HOS-LV-miR-616-3pkd,HOS-LV-miR-616-5pkd)和敲低对照组(143B-LV-anti-miR-616-VC,HOS-LV-anti-miR-616-VC)。转染序列如下:①miR-616前体序列:TTAGGTAATTCCTCCACTCAAAACCCTTCAGTGACTTCCATGACATGAAATAGGAAGTCATTGGAGGGTTTGAGCAGAGGAATGACCTGTTTTAAAA;②hsa-miR-616-3p:CTGCTCAAACCCTCCAATGACT;③hsa-miR-616-5p:AAGTCACTGAAGGGTTTTGAGT。

1.6 实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)

采用TRIzol试剂(Invitrogen,美国)提取细胞的总RNA,并测定RNA质量。采用micro RNA逆转录专用试剂盒(TaKaRa)逆转录cDNA。采用SYBR Premix Ex Taq(日本TaKaRa公司)试剂在罗氏480系统上进行上机检测。以U6作为内参。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算倍数变化。引物序列如下:hsa-miR-616-3p正向引物:AGTCATTGGAGGGTTTGAGCA;hsa-miR-616-5p正向引物:ACTCAAAACCCTTCAGTGACTT,hsa-miR-616-3p和hsa-miR-616-5p的反向引物由TaKaRa专用试剂盒提供,内参u6正向引物:CTCGCTTCGGCAGCACA,u6反向引物:AACGCTTCACGAATTTGCGT。

1.7 细胞凋亡实验

细胞凋亡双染检测试剂盒购于上海碧云天生物有限公司,参照其步骤方法取处于对数期的143B和HOS细胞以每毫升1×10^5个取样至EP管中,用提前预冷的PBS洗涤3遍。室温条件下1 000 r/min离心10 min,去除上清液后加入缓冲液重悬细胞,加入10 μL AnnexinV-FITC、10 μL PI进行标记,在4 ℃下避光孵育30 min。孵育结束后尽快上机检测。

1.8 EdU实验

采用5-乙基-2-脱氧尿苷(EdU)检测各组细胞增殖情况。细胞按照1×10^4接种,贴壁后进行EdU实验,操作前用DMEM完全培养基按照1 000∶1的比例稀释EdU溶液,加入每孔37 ℃孵育2 h标记EdU,胰酶消化细胞至离心管,每管用4%甲醛固定30 min,去除上清液,洗涤液洗3次,1 000 r/min离心3 min(下同),再向每管中加入2 mg/mL甘氨酸置于室温孵育5 min,吸出上清洗3次,后加入0.5% Triton-X100通透液在4 ℃孵育10 min,洗涤液洗3次,去除上清液后加入现配现用的click反应液,在室温避光孵育30 min,洗涤液洗3次,再每管加入Hoechst33342进行核染,室温孵育10 min,最后PBS洗3次,避光保存,1 h内通过流式细胞术进行检测分析,最大发射波长为565 nm。

1.9 Transwell实验

基质胶4 ℃解冻后,按1∶4的比例用无血清DMEM培养基稀释基质胶,再将Transwell小室放入24孔板内,上室每孔加入15 μL基质胶,放入37 ℃,5%CO_2培养箱内待干,下室加入600 μL DMEM完全培养基。将各组消化后PBS清洗3次,细胞按照数量迁移为2×10^4个/孔、侵袭接种数量为1×10^5个/孔接种置上室,培养24 h后取出小室,PBS洗3次,4%多聚甲醛固定30 min,清洗后在室温下,结晶紫溶液染色15 min,用流动清水

洗去多余结晶紫,用棉签擦去小室内未穿过的细胞,放置干燥地方风干水分,于倒置显微镜下观察,随机选取5个视野拍照和分析。

1.10 平板克隆形成实验

各组细胞以100~500个/孔的数量铺板到6孔板中,培养1~2周,适时更换培养基,直至肉眼可见克隆形成。待克隆形成后,PBS洗2次,4%的多聚甲醛溶液固定30 min,PBS洗后采用结晶紫染色液染色,室温下染色15 min,流水缓慢冲洗去除多余染色液,晾干。用显微镜观察并计数计算克隆形成率,通常以超过50个细胞的克隆为有效克隆。

1.11 裸鼠皮下成瘤实验

本实验选用10只4周龄SPF级雌性BALB/c裸鼠(购自浙江维通利华实验动物技术有限公司),体质量18~20 g,饲养于陆军军医大学第二附属医院动物房内,温度24~26 ℃,相对湿度40%~60%,12 h光/暗交替循环,动物可自由采食标准颗粒饲料和无菌饮用水。适应性饲养1周后,采用随机数字表法将裸鼠分为:miR-616过表达组和对照组。准备单细胞悬液,细胞数为4×10^5个/只。裸鼠右侧背部消毒,将单细胞悬液注射到裸鼠背部皮下。为减轻动物的疼痛和不适,注射操作均由经验丰富的技术人员使用细径针头快速完成。本研究涉及的所有动物实验均严格遵守相关伦理准则,该方案已通过陆军军医大学实验动物福利伦理委员会的审查和批准(AMUWEC20235142)。注射后,每3天观察1次裸鼠状态及移植瘤大小。25 d后处死裸鼠,剖出裸鼠移植瘤,称量、拍照,固定于4%多聚甲醛中。本研究设定了人道终点,肿瘤体积超过1 500 mm^3、肿瘤瘤周出现破溃、小鼠体质量下降超过20%或小鼠出现严重痛苦表现等。一旦触及该终点,将立即对动物实施安乐死。在本实验周期内,未观察到任何严重的不良事件。

1.12 二代测序和Targetscan数据库靶基因分析

提取过表达miR-616的143B和HOS细胞及对照组细胞的RNA,并反转录为cDNA,将提取好的样品放入Illumina Novaseq平台进行测序。分别筛选出两种细胞的差异表达基因并取交集,利用生物信息学数据库Targetscan(http://www.targetscan.org)预测miR-616的下游靶基因。

1.13 双荧光素酶标记报告系统

构建野生型及突变型载体(购自广州锐博有限公司)的KLF2(KLF2-WT、KLF2-MUT)。将过表达及敲低的143B、HOS放置6孔板培养,细胞密度40%~50%时,将设计好的KLF2载体转染至培养好的细胞中,培养48 h。分组如下:双荧光素酶标记空载组psiCHECK2 Vector、野生组KLF2-WT1、KLF2突变组KLF2-MUT。根据试剂盒说明书,向Dual-Glo® Luciferase Substrate中加入Dual-Glo® Luciferase Buffer,当底物完全溶解时,即形成Dual-Glo® Luciferase Reagent,根据试剂盒说明书提前配置荧光素酶测定试剂。将20 μL已经裂解的细胞移到不透明96孔板中,随后每孔加入100 μL荧光素酶测定试剂。按每孔100 μL终止试剂加入96孔板,待反应2~3 s,上机检测海肾荧光素酶反应强度,RLUI/RLU2为最终结果。

1.14 统计学分析

本研究原始数据采用SPSS 19.0软件进行统计,使用GraphPad Prism 8.0进行作图。计量资料结果以$\bar{x}\pm s$表示,每组实验数据重复3次。两组间比较,满足正态分布方差齐时,采用独立样本t检验,不满足正态分布时,采用单因素方差分析。本研究所有实验均采用两组间比较,细胞实验qRT-PCR比较hFOB1.19和143B/HOS的扩增倍数,动物实验过表达miR-616组和对照组的移植瘤质量差异比较均采用两独立样本t检验。$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

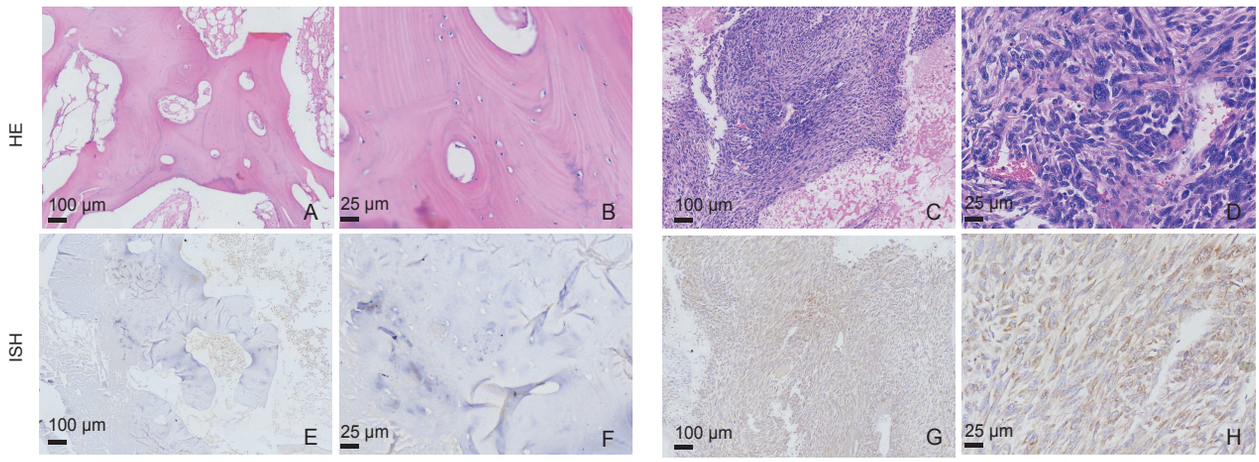
2 结果

2.1 MiR-616在人骨肉瘤组织增加

采用HE对11例临床骨肉瘤组织样本进行染色,在显微镜下观察肿瘤及瘤旁组织,结果显示,成熟骨组织中骨胶原纤维粗细均匀,可见哈弗斯管(图1A、B),在骨肉瘤组织中,瘤细胞呈弥漫性生长,大小不一,形态不规则(图1C、D);原位杂交结果显示,人骨肉瘤癌旁组织中,miR-616几乎不表达(图1E、F),而在骨肉瘤组织中呈高表达,且主要表达在细胞质中(图1G、H),提示人骨肉瘤组织中miR-616表达很高。

2.2 miR-616在骨肉瘤细胞系中的表达高于成骨细胞

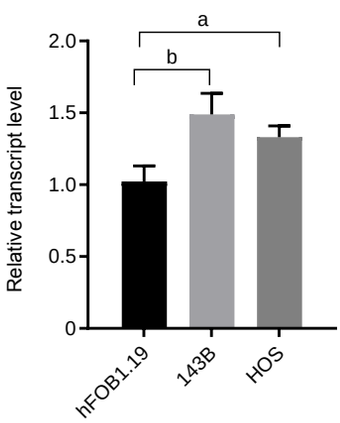
采用qRT-PCR对hFOB1.19、HOS和143B细胞中的miR-616进行检测,结果显示,miR-616在骨肉瘤细胞HOS和143B中的水平显著高于成骨细胞hFOB1.19,差异具有统计学意义($P<0.05$,图2),提示miR-616在骨肉瘤细胞系中表达增加。



A: Representative image of mature bone tissue and bone marrow tissue, with visible Haversian canals; B: Representative image of uniformly thick collagen fibers arranged in concentric lamellar patterns around Haversian canals, with scattered mature osteocytes within the bone matrix; C: Representative image of bone tumor cells in diffuse growth, accompanied by coagulative necrosis at the periphery; D: Representative image of bone tumor cells in marked pleomorphism, irregular size and shape, bizarre nuclear morphology, increased nuclear-to-cytoplasmic ratio, and prominent atypia. Irregular filamentous osteoid matrix is observed between tumor cells; E: No expression of miR-616 in mature bone tissue; F: Mature osteocytes without miR-616 expression; G: Osteosarcoma cells with diffusely expressed miR-616; H: miR-616 expressed in the cytoplasm of osteosarcoma cells

图1 HE染色和ISH检测miR-616在人骨肉瘤组中的表达

Figure 1 Expression of miR-616 in human osteosarcoma tissues by HE staining and *in situ* hybridization (ISH)



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$

图2 qRT-PCR检测miR-616在成骨细胞和骨肉瘤细胞系中的表达

Figure 2 Expression of miR-616 in osteoblasts and osteosarcoma cell lines detected by qRT-PCR

2.3 过表达或敲低miR-616在人骨肉瘤细胞143B和HOS中的验证

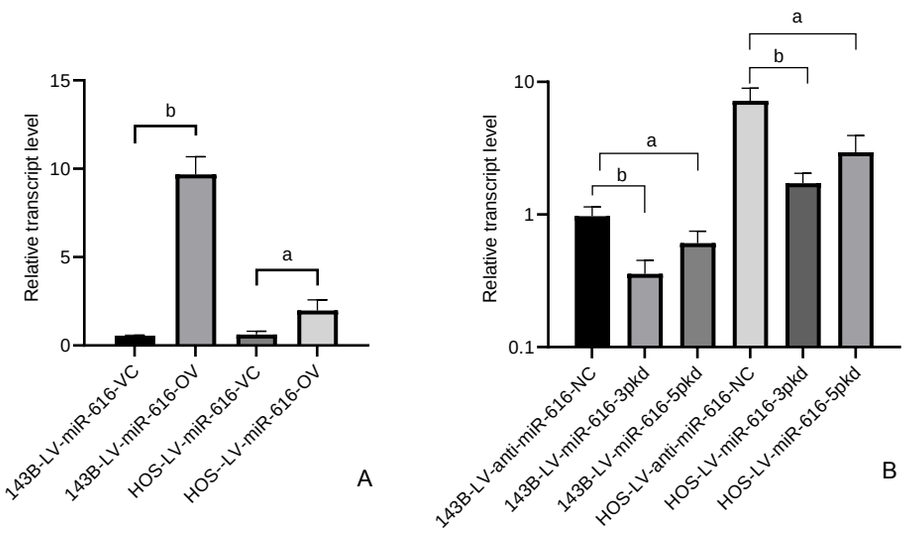
qRT-PCR结果显示,与过表达对照组143B-LV-miR-616-VC、HOS-LV-miR-616-VC比较,143B-LV-miR-616-OV、HOS-LV-miR-616-OV过表达组miR-616显著增加($P<0.05$,图3A);与敲低对照组143B-LV-anti-miR-616-VC、HOS-LV-anti-miR-616-VC比较,143B-LV-miR-616-3pkd、143B-LV-miR-616-5pkd、HOS-LV-miR-616-3pkd、HOS-LV-miR-616-5pkd组的miR-616显著降低($P<0.05$,图3B)。

2.4 过表达miR-616促进143B、HOS细胞的增殖

采用EdU检测各组细胞的增殖率,结果显示,与过表达对照组143B-LV-miR-616-VC、HOS-LV-miR-616-VC比较,143B-LV-miR-616-OV、HOS-LV-miR-616-OV组的增殖率显著增加($P<0.05$,图4A);与敲低对照组143B-LV-anti-miR-616-VC、HOS-LV-anti-miR-616-VC比较,143B-LV-miR-616-3pkd、143B-LV-miR-616-5pkd、HOS-LV-miR-616-3pkd、HOS-LV-miR-616-5pkd组的增殖率均降低,差异具有统计学意义($P<0.05$,图4B)。且在两种骨肉瘤细胞中,miR-616-3p比miR-616-5p的促增殖效果更显著,提示miR-616可以促进143B、HOS细胞的增殖,且miR-616-3p对骨肉瘤增殖的影响强于miR-616-5p。

2.5 过表达miR-616抑制143B、HOS细胞的凋亡

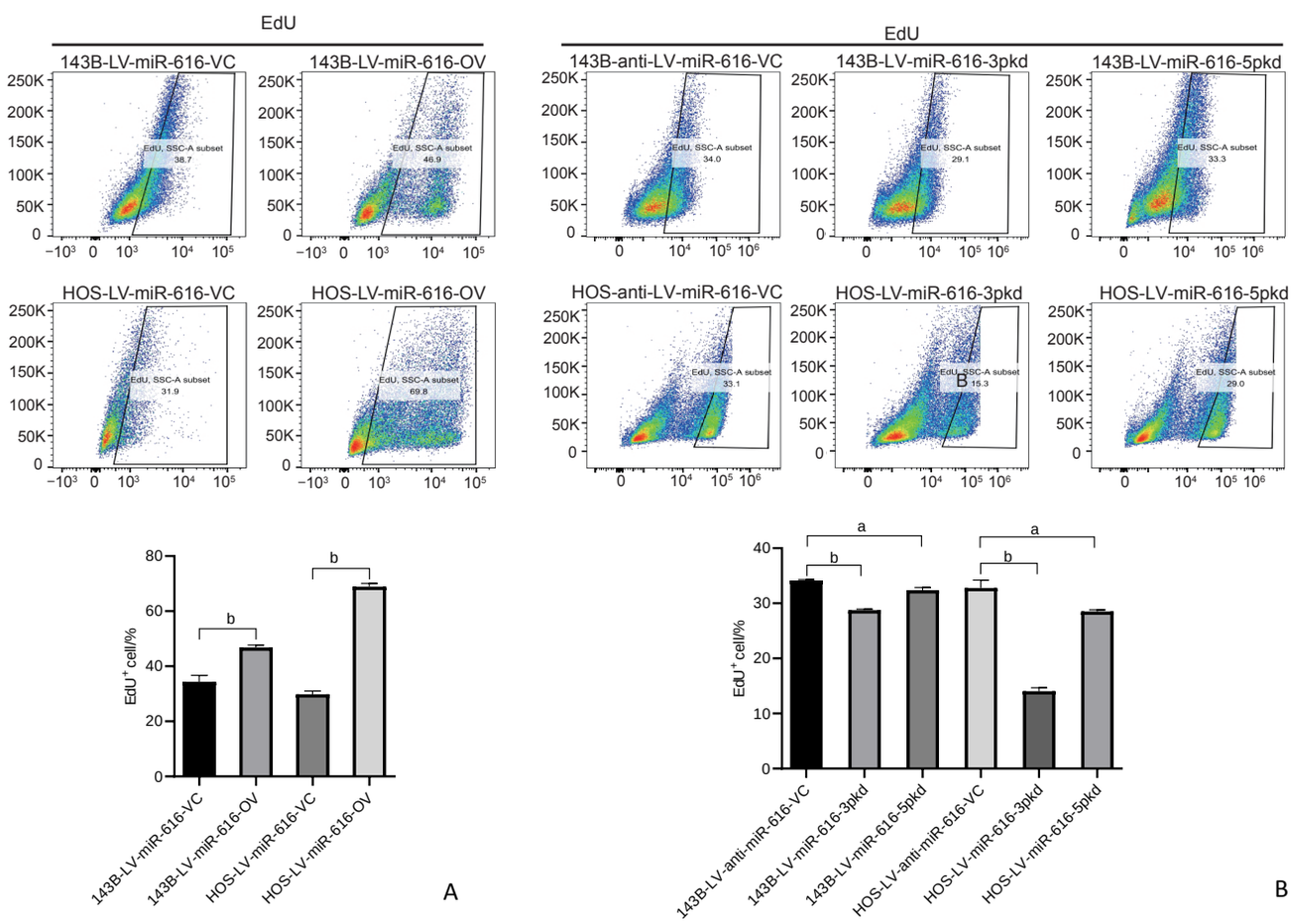
采用流式细胞术检测各组凋亡情况,结果显示,与过表达对照组143B-LV-miR-616-VC、HOS-LV-miR-616-VC比较,143B-LV-miR-616-OV、HOS-LV-miR-616-OV组的凋亡率显著减弱($P<0.01$,图5A);与敲低对照



A: qRT-PCR analysis of miR-616 overexpression; B: qRT-PCR analysis of miR-616 knockdown. a: $P<0.05$, b: $P<0.01$

图3 qRT-PCR验证过表达和敲低miR-616在143B、HOS细胞中的效率

Figure 3 Validation of miR-616 overexpression and knockdown in 143B and HOS cells by qRT-PCR



A: Effect of miR-616 overexpression on proliferative rates in 143B and HOS cells; B: Effect of miR-616 knockdown on proliferative rates in 143B and HOS cells. a: $P<0.05$, b: $P<0.01$

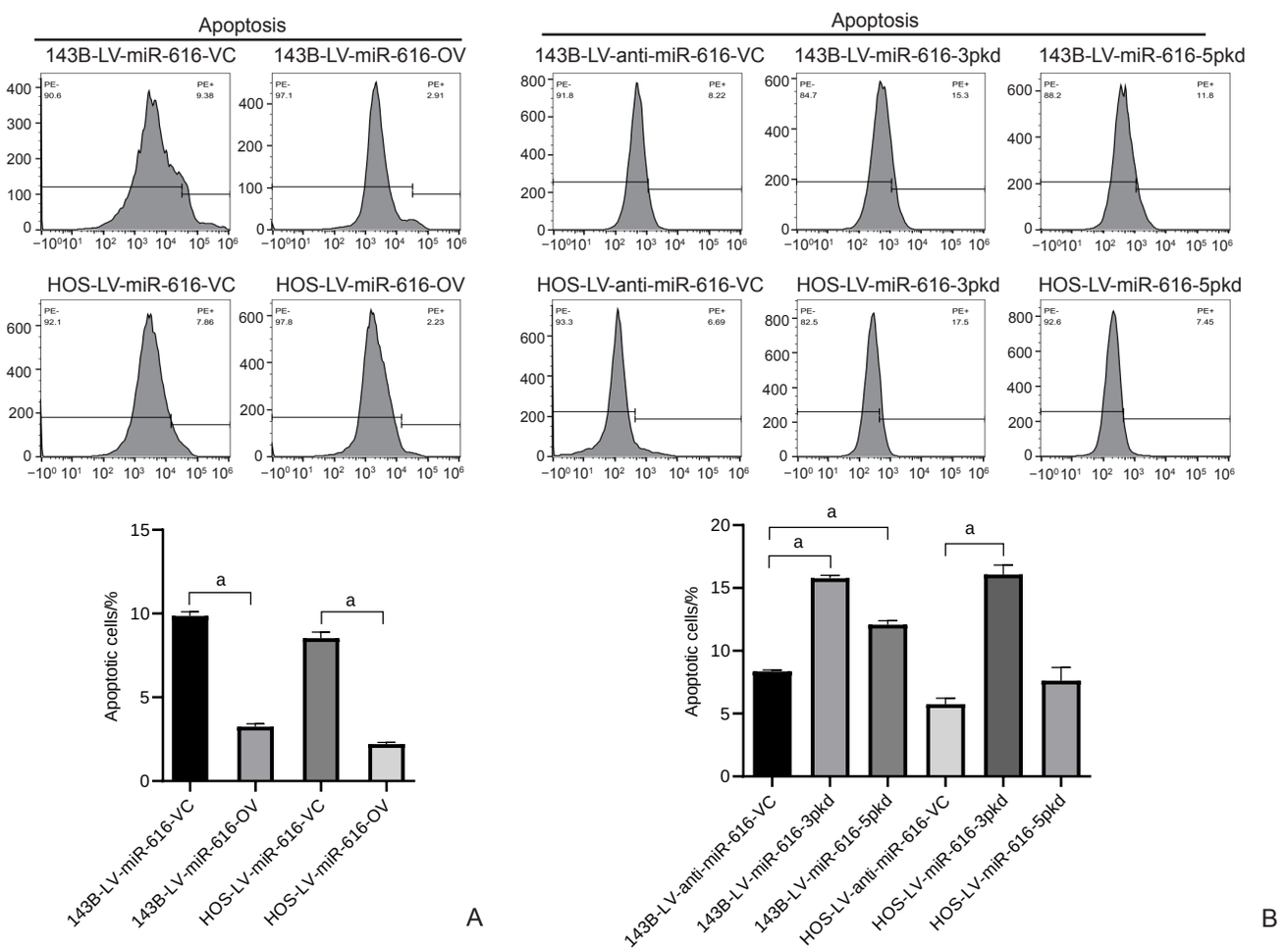
图4 EdU检测miR-616对143B、HOS细胞增殖的影响

Figure 4 Effects of miR-616 on proliferation of 143B and HOS cells assessed by EdU assay

组143B-LV-anti-miR-616-VC、HOS-LV-anti-miR-616-VC比较,143B-LV-miR-616-3pkd、143B-LV-miR-616-5pkd、HOS-LV-miR-616-3pkd组的凋亡率显著升高(P<0.01,图5B),而HOS-LV-miR-616-5pkd组无统计学差异,提示过表达miR-616可以抑制143B、HOS细胞凋亡,miR-616-3p对两种骨肉瘤凋亡调控作用较miR-616-5p更具有显著性。

2.6 过表达miR-616可促进骨肉瘤细胞的侵袭和集落形成

采用Transwell实验和平板克隆形成实验检测各组细胞侵袭力和集落形成情况,结果显示,与过表达对照组143B-LV-miR-616-VC比较,HOS-LV-miR-616-VC、143B-LV-miR-616-OV、HOS-LV-miR-616-OV组的细胞穿透数量显著增加,且穿透细胞的活性和铺展能力增强(P<0.05,图6A);与敲低对照组143B-LV-anti-miR-616-VC、HOS-LV-anti-miR-616-VC比较,143B-LV-miR-616-3pkd、143B-LV-miR-616-5pkd、HOS-LV-miR-616-3pkd、HOS-LV-miR-616-5pkd组的细胞穿透数量减少,穿透细胞活性和铺展能力减弱(P<0.05,图6B),提示miR-616可能促进骨肉瘤细胞的迁移和侵袭能力。这一结果与平板克隆形成实验结果一致,即与过表达对照组143B-LV-miR-616-VC、HOS-LV-miR-616-VC比较,143B-LV-miR-616-OV、HOS-LV-miR-616-OV组细胞的集落数量增多,集落体积变大,集落形成率增加(P<0.05,图6C);而敲低miR-616结果显示,与敲低对照组143B-LV-anti-miR-616-VC、HOS-LV-anti-miR-616-VC比较,143B-LV-miR-616-3pkd、143B-LV-miR-616-5pkd、HOS-LV-miR-616-3pkd、HOS-LV-miR-616-5pkd组的集落数量减少,集落体积变小,集落形成率降低(P<0.05,图6D),提示敲低miR-616可能通过抑制侵



A: Effect of miR-616 overexpression on apoptosis in 143B and HOS osteosarcoma cells; B: Effect of miR-616 knockdown on apoptosis in 143B and HOS osteosarcoma cells. a: P<0.01

图5 流式细胞术检测miR-616对143B、HOS细胞凋亡的影响

Figure 5 Effects of miR-616 on apoptosis of 143B and HOS cells detected by flow cytometry

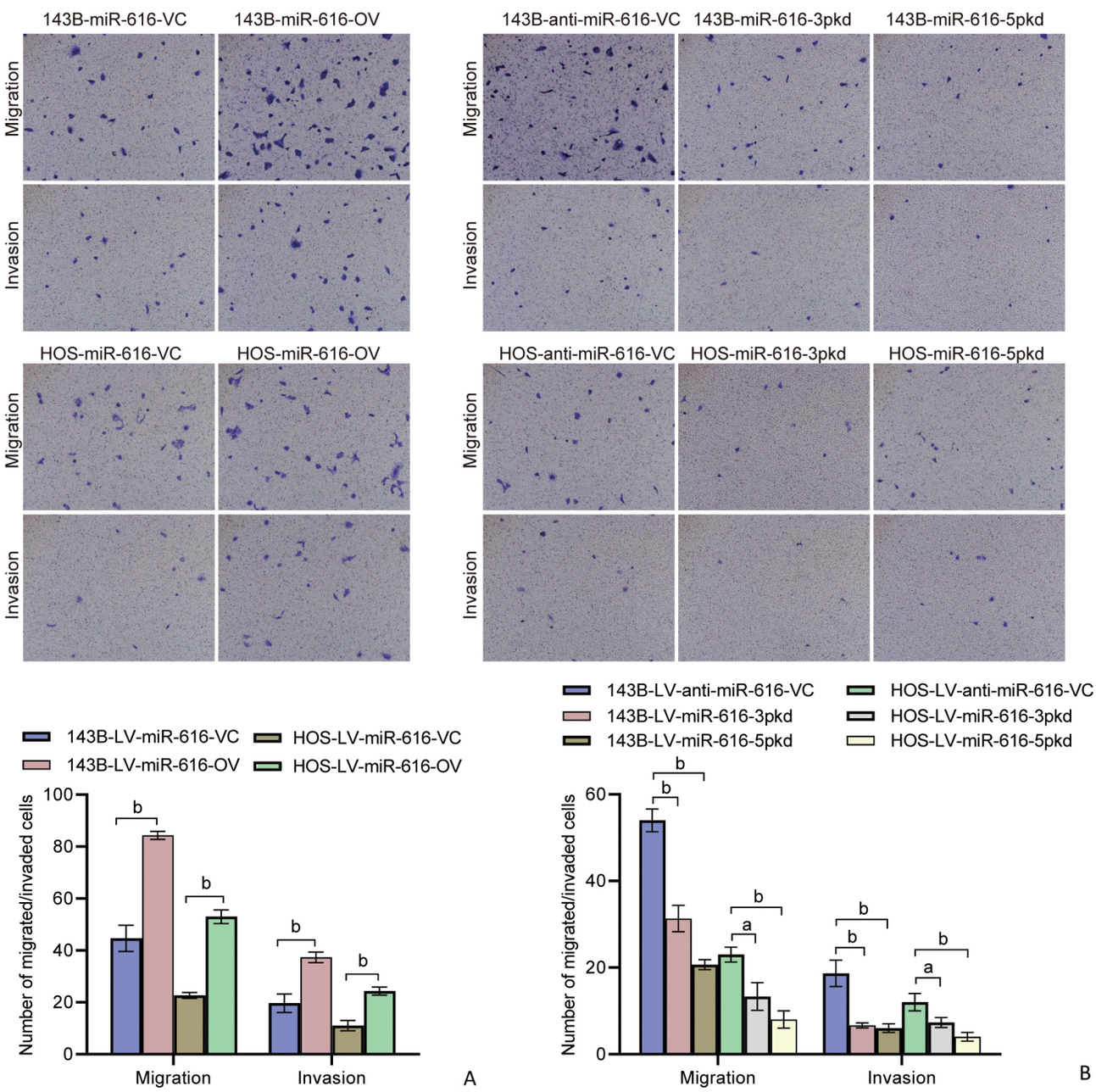
袭后细胞的存活及克隆增殖能力,从而降低肿瘤细胞的整体侵袭潜力。

2.7 miR-616对动物移植瘤生长的影响

采用过表达miR-616的143B细胞和空载143B细胞构建小鼠皮下移植瘤。结果显示(图7),过表达组143B-LV-miR-616-OV移植瘤的生长大小大于空载组143B-LV-miR-616-VC,差异具有统计学意义($P<0.01$)。

2.8 生物信息学分析miR-616下游靶基因

过表达miR-616后,提取143B、HOS的RNA,并逆转录为cDNA,并将其送检测序。通过GE02R系统在

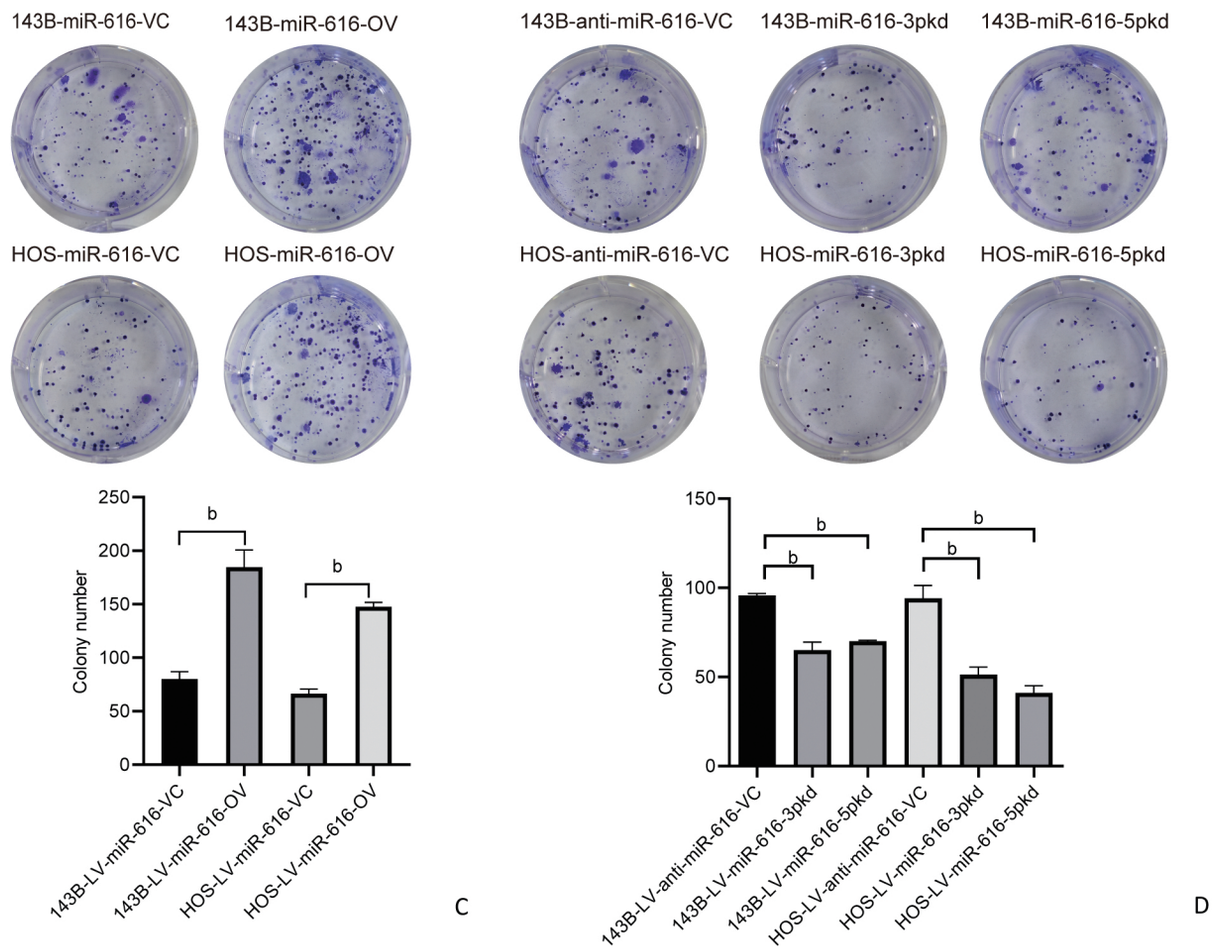


A: Effect of miR-616 overexpression on invasion and migration of 143B and HOS cells detected by Transwell assay; B: Effect of miR-616 knockdown on invasion and migration of 143B and HOS cells detected by Transwell assay. a: $P<0.05$, b: $P<0.01$

图6 Transwell和平板克隆实验检测miR-616对143B、HOS细胞侵袭、迁移的影响

Figure 6 Effects of miR-616 on invasion, migration, and colony formation of 143B and HOS cells assessed by Transwell and clonogenic assays

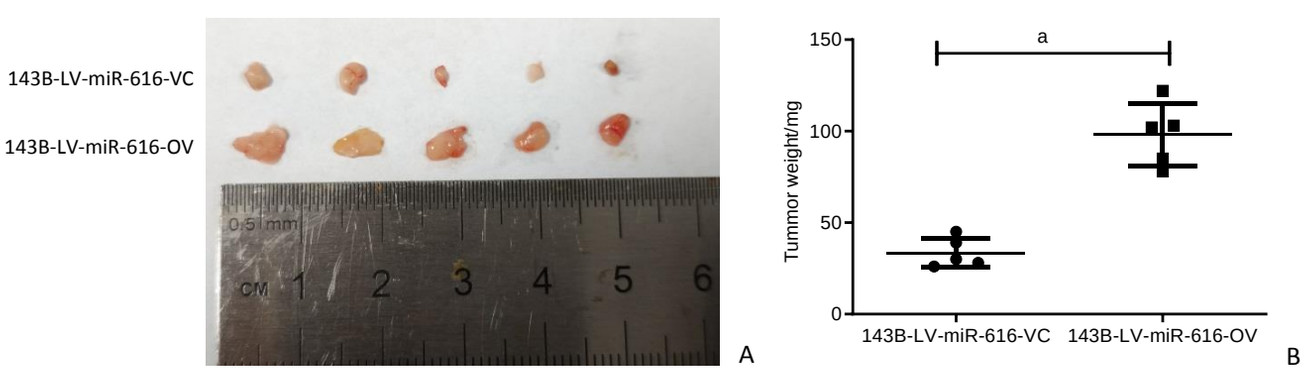
(图6C、D续下页)



C: Effect of miR-616 overexpression on colony formation of 143B and HOS cells detected by crystal violet staining; D: Effect of miR-616 knockdown on colony formation of 143B and HOS cells detected by crystal violet staining. b: $P<0.01$

续图6 Transwell和平板克隆实验检测miR-616对143B、HOS细胞侵袭、迁移的影响

Figure 6(continued) Effects of miR-616 on invasion, migration, and colony formation of 143B and HOS cells assessed by Transwell and clonogenic assays



A: Representative gross image of xenograft tumors from mice overexpressing miR-616; B: Tumor weight of xenograft tumors from mice overexpressing miR-616. a: $P<0.01$

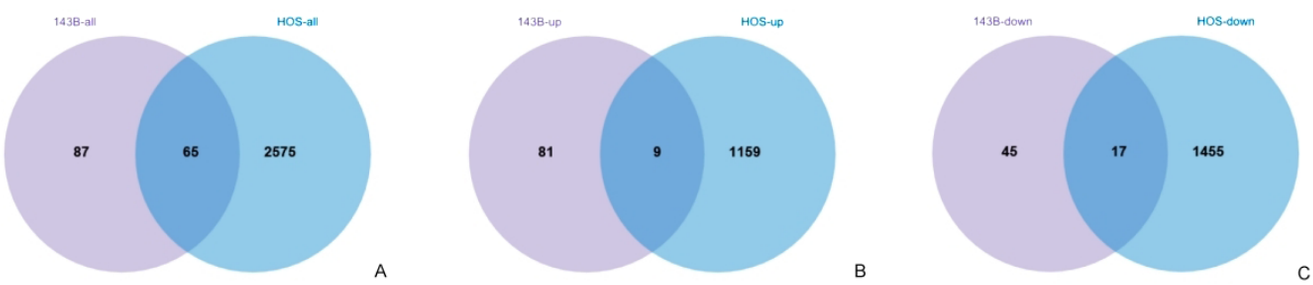
图7 过表达miR-616对小鼠移植瘤生长的影响

Figure 7 Effect of miR-616 overexpression on the growth of mouse xenograft tumors

线分析143B和HOS两个数据集的差异表达基因,以校正后$P<0.05$,且$|Log_2(\text{fold change})|>1$为筛选条件。结果显示,143B中筛选出总差异基因数为152个,其中有90个差异上调基因,62个差异下调基因(图8A);HOS中筛选出总差异基因数为2 640个,其中有1 168个差异上调基因,1 472个差异下调基因(图8B)。两种细胞系中差异上调基因交集有9个,差异下调基因有17个(图8C)。差异下调基因分别为:DKK1、KLF2、CPA4、FGF5、UCN2、ANKRD1、KIAA1755、TSPYL5、GPR132、NAP1L3、SBDSP1、MYOSLID、DUSP5-DT、TMEM167B-DT、ENSG00000273388、SH3PXD2A-AS1、DUS4L-BCAP29。其中KLF2、DKK1、FGF5、ANKRD1、GPR132和SH3PXD2A-AS1直接或间接参与细胞的生物进程。

2.9 KLF2为miR-616下游靶基因

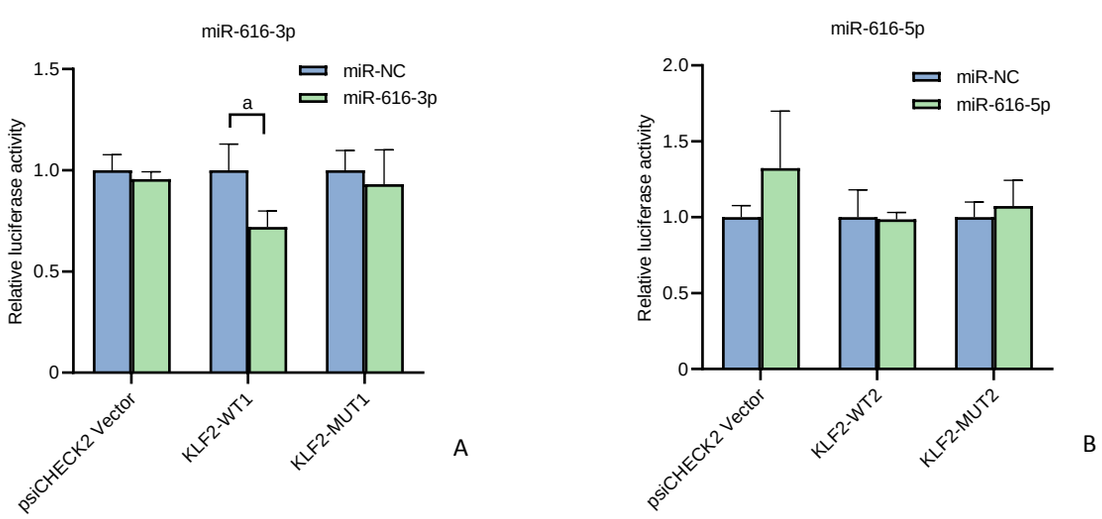
利用生物信息学数据库Targetscan预测miR-616的下游靶基因,结果显示在143B、HOS细胞中差异下调基因交集的KLF2、DKK1、FGF5、ANKRD1、GPR132和SH3PXD2A-AS1基因中,KLF2为miR-616的下游靶点。为进一步验证miR-616和KLF2存在靶向关系,使用荧光素酶报告实验证实miR-616和KLF2的联系。结果显示,与miR-NC相比,过表达miR-616-3p后细胞中荧光素酶的活性明显降低($P<0.05$),而将预测的KLF2结合位点突变后,其抑制作用消失。过表达miR-616-5p后细胞中荧光素酶的活性无明显变化,提示KLF2可能是miR-616-3p的下游靶点(图9)。



A: Intersection of total differentially expressed genes in 143B and HOS cells; B: Intersection of up-regulated differentially expressed genes in 143B and HOS cells; C: Intersection of down-regulated differentially expressed genes in 143B and HOS cells

图8 143B和HOS细胞差异基因交集

Figure 8 Intersection of differentially expressed genes in 143B and HOS cells



A: Validation of the relationship between miR-616-3p and KLF2 using dual-luciferase reporter assay; B: Validation of the relationship between miR-616-5p and KLF2 using dual-luciferase reporter assay. a: $P<0.05$

图9 双荧光素酶标记基因报告验证miR-616下游靶基因为KLF2

Figure 9 Validation of KLF2 as a downstream target gene of miR-616 by dual-luciferase reporter assay

3 讨论

3.1 MicroRNAs在骨肉瘤发生发展中的关键作用及其亚型的不同功能表现

MicroRNAs作为一类关键的非编码RNA分子,在OS的发生发展中扮演着重要角色[12],其通过调控靶基因表达参与肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭及转移等多个生物学过程[13-15]。已有研究证实,多种miRNAs在骨肉瘤中存在表达异常并发挥功能。例如,miR-744-5p通过靶向NFIX抑制骨肉瘤的细胞生长和血管生成[16];miR-659-3p则通过下调SRPK1表达,抑制骨肉瘤细胞的恶性表型及肺转移[17];而miR-767-5p在转移性骨肉瘤中高表达,不仅促进细胞侵袭迁移,还与化疗放疗敏感性相关[18]。这些研究提示,miRNAs的表达谱异常是骨肉瘤进展的重要分子机制,而挖掘新的关键miRNAs及其功能可为骨肉瘤的诊断和治疗提供新思路。

MicroRNA分子通常由其前体RNA(pre-miRNA)经加工产生,pre-miRNA的5′端和3′端可分别形成2个成熟的miRNA分子,即-5p和-3p亚型[19]。这两种亚型虽源自同一前体,但可能因序列差异而具有不同的靶基因谱和生物学功能,在肿瘤进程中发挥协同或独立作用[20-23]。miR-616作为一种进化上保守的miRNA,其前体经剪切后可生成miR-616-5p(来自5′端)和miR-616-3p(来自3′端)两种成熟亚型。近年来研究发现,这两种亚型在多种恶性肿瘤中均存在表达异常,且其功能往往与肿瘤的恶性生物学行为密切相关:例如,在膀胱癌中,miR-616-5p通过靶向NR2C2促进细胞侵袭和迁移[24];在卵巢癌中,miR-616-3p可以靶向TFPI2参与其发生发展的调控[25];而在肝癌中,miR-616(未明确亚型)的高表达与淋巴结转移和TNM分期正相关,通过抑制PTEN激活PI3K/AKT通路促进细胞增殖、迁移和侵袭[26]。这些研究提示,miR-616的-5p和-3p亚型可能作为独立的功能分子,通过不同的靶基因和信号通路参与肿瘤调控,但其在骨肉瘤中的作用及协同关系尚未明确。

3.2 miR-616在骨肉瘤中的表达及功能研究

本研究系统探讨了miR-616-3p和miR-616-5p两种亚型对骨肉瘤恶性生物学表型的影响。结果显示,miR-616相较于癌旁组织,在骨肉瘤组织中显著高表达,主要存在于细胞质中。同样,相较于成骨细胞,miR-616在两种骨肉瘤细胞系中均升高,这也从体内体外证实了miR-616在骨肉瘤中显示出高水平。本研究通过慢病毒转染的方式在两种骨肉瘤细胞(143B、HOS)进行了细胞功能实验的验证,过表达miR-616后,143B和HOS两种细胞的增殖强度、克隆形成及迁移侵袭能力均显著增加,且两种骨肉瘤细胞的凋亡率降低;而在敲低miR-616后,143B和HOS两种细胞的增殖强度、克隆形成及迁移侵袭能力呈现出完全相反的效应,值得注意的是,miR-616-3p相较于miR-616-5p在促骨肉瘤增殖、侵袭和迁移方面表现出更强的优势。这一结果提示,miR-616可能参与了骨肉瘤恶性生物学表型的调控,这与此前KELLY等[11]发表的芯片数据中所提到的"miR-616在骨肉瘤中高表达且与患者生存率高度相关"这一结论观点一致,提示miR-616可能作为一种促癌调控因子参与骨肉瘤进程。

3.3 miR-616的靶基因探索及其在骨肉瘤中的作用机制

为了进一步探索miR-616的生物学作用,本研究将过表达miR-616的143B和HOS进行测序分析,并将两种细胞下调的差异基因取交集,发现有17个基因。进一步进行功能学分析显示,KLF2、DKK1、FGF5、ANKRD1、GPR132和SH3PXD2A-AS1这6个基因直接或间接参与细胞的生物进程。通过双荧光素酶基因报告证实KLF2是miR-616的靶基因,且上游基因为miR-616-3p而非miR-616-5p。在骨肉瘤中,ZHENG等[27]研究证实CircRNA LRP6可以通过下调KLF2水平从而促进骨肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力。同样,RUAN等[28]研究表明长链非编码RNA SNHG6通过调节KLF2促进骨肉瘤细胞增殖。由此说明,KLF2在骨肉瘤的发生发展中起着重要作用。

本研究通过临床组织样本和两种骨肉瘤细胞(143B、HOS),明确了miR-616在人骨肉瘤组织中高表达,且对骨肉瘤细胞起到促肿瘤作用,涉及肿瘤细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭等多个生物学过程。此外,本研究还表明miR-616的成熟体miR-616-3p和miR-616-5p两个亚型可能共同参与骨肉瘤的恶性生物学过程,且miR-616-3p的促骨肉瘤恶性生物学行为强于miR-616-5p,通过生物信息学分析和双荧光素酶基因报告验证了miR-616-3p的靶基因KLF2。这些结果将为后续探索miR-616家族的具体骨肉瘤发生机制提供新线索和实验依据。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] ZHANG C, WU H X, XU G J, *et al*. Incidence, survival, and associated factors estimation in osteosarcoma patients with lung metastasis: a single-center experience of 11 years

in Tianjin, China[J]. BMC Cancer, 2023, 23(1): 506. DOI:10.1186/s12885-023-11024-9.

[2] ISAKOFF M S, BIELACK S S, MELTZER P, *et al*. Osteosarcoma: current treatment and a collaborative pathway to success[J]. J Clin Oncol, 2015, 33(27): 3029-3035. DOI:10.1200/JCO.2014.59.4895.

[3] MISHRA P J. microRNAs as promising biomarkers in cancer diagnostics[J]. Biomark Res, 2014, 2: 19. DOI: 10.1186/2050-7771-2-19.

[4] DEY M, SKIPAR P, BARTNIK E, *et al*. microRNA signatures in osteosarcoma: diagnostic insights and therapeutic prospects[J]. Mol Cell Biochem, 2025, 480(4): 2065-2075. DOI:10.1007/s11010-024-05135-5.

[5] 杨美菊, 武壮壮, 申振, 等. 调节骨肉瘤的微小RNA研究进展[J]. 中华实验外科杂志, 2021, 38(7): 1386-1391.
YANG M J, WU Z Z, SHEN Z, *et al*. Research progress of microRNA regulating osteosarcoma[J]. Chin J Exp Surg, 2021, 38(7): 1386-1391.

[6] 李宏维, 叶凯山, 王栓科. 外源性BMP9对骨肉瘤细胞MG63的影响与Wnt/β-catenin信号通路的关系[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(7): 655-659. DOI:10.16016/j.1000-5404.201409140.
LI H W, YE K S, WANG S K. Effect of exogenous BMP9 on osteosarcoma MG63 cells and its relationship with Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. J Third Mil Med Univ, 2015, 37(7): 655-659. DOI:10.16016/j.1000-5404.201409140.

[7] ABDOLVAND M, CHERMAHINI Z M, BAHALOO S, *et al*. New long noncoding RNA biomarkers and *CeRNA* networks on miR-616-3p in colorectal cancer: Bioinformatics-based study[J]. J Res Med Sci, 2024, 29(1): 10. DOI: 10.4103/jrms.jrms_786_22.

[8] ZHANG S S, XU M A, SHEN X F, *et al*. Up-regulated miR-616-5p promotes the progression of nasopharynx cancer through GSK3β[J]. Tohoku J Exp Med, 2025, 266(4): 353-360. DOI:10.1620/tjem.2024.j131.

[9] ARABKARI V, SULTANA A, BARUA D, *et al*. UPR-induced miR-616 inhibits human breast cancer cell growth and migration by targeting c-MYC[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(17): 13034. DOI:10.3390/ijms241713034.

[10] WANG D X, ZOU Y J, ZHUANG X B, *et al*. Sulforaphane suppresses EMT and metastasis in human lung cancer through miR-616-5p-mediated GSK3β/β -catenin signaling pathways[J]. Acta Pharmacol Sin, 2017, 38(2): 241-251. DOI:10.1038/aps.2016.122.

[11] KELLY A D, HAIBE-KAINS B, JANEWAY K A, *et al*. microRNA paraffin-based studies in osteosarcoma reveal reproducible independent prognostic profiles at 14q32[J]. Genome Med, 2013, 5(1): 2. DOI:10.1186/gm406.

[12] SCUDERI S A, CALABRESE G, PATERNITI I, *et al*. The biological function of microRNAs in bone tumors[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(4): 2348. DOI:10.3390/ijms23042348.

[13] JIANG M Y, JIKE Y, LIU K C, *et al*. Exosome-mediated miR-144-3p promotes ferroptosis to inhibit osteosarcoma proliferation, migration, and invasion through regulating ZEB1[J]. Mol Cancer, 2023, 22(1): 113. DOI: 10.1186/s12943-023-01804-z.

[14] EBRAHIMI N, ASLANI S, BABAIE F, *et al*. microRNAs implications in the onset, diagnosis, and prognosis of osteosarcoma[J]. Curr Mol Med, 2021, 21(7): 573-588. DOI:10.2174/1566524020999201203212824.

[15] RAM KUMAR R M, BORO A, FUCHS B. Involvement and clinical aspects of microRNA in osteosarcoma[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(6): 877. DOI:10.3390/ijms17060877.

[16] XIE L, LI W, LI Y. miR-744-5p inhibits cell growth and angiogenesis in osteosarcoma by targeting NFIX[J]. J Orthop Surg Res, 2024, 19(1): 485. DOI:10.1186/s13018-024-04947-x.

[17] GONG Y B, WEI Z R. miR-659-3p inhibits osteosarcoma progression and metastasis by inhibiting cell proliferation and invasion *via* targeting SRPK1[J]. BMC Cancer, 2022, 22(1): 934. DOI:10.1186/s12885-022-10029-0.

[18] LUO X L, DAI X Y, WEI Q S, *et al*. microRNA-767-5p promotes metastasis but improves chemotherapeutic and radiotherapeutic sensitivity of osteosarcoma[J]. BMC Cancer, 2025, 25(1): 702. DOI: 10.1186/s12885-025-14114-y.

[19] MISHRA S, YADAV T, RANI V. Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics[J]. Crit Rev Oncol, 2016, 98: 12-23. DOI: 10.1016/j. critrevonc. 2015.10.003.

[20] MEDINA-CALZADA Z, JING R C, MOXON S, *et al*. An intron-split microRNA mediates cleavage of the mRNA encoded by low phosphate root in Solanaceae[J]. Planta, 2025, 261(2): 27. DOI:10.1007/s00425-024-04596-8.

[21] GUO L, REN D K, ZHANG Y T, *et al*. A comprehensive pan-cancer analysis reveals cancer-associated robust isomiR expression landscapes in miRNA arm switching[J]. Mol Genet Genomics, 2023, 298(3): 521-535. DOI: 10.1007/s00438-023-01997-4.

[22] MITRA R, ADAMS C M, JIANG W, *et al*. Pan-cancer analysis reveals cooperativity of both strands of microRNA that regulate tumorigenesis and patient survival[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 968. DOI: 10.1038/s41467-020-14713-2.

[23] 张敏, 李敏, 肖猛, 等. miR-543/SNTB1轴调控结直肠癌免疫微环境[J]. 陆军军医大学学报, 2025, 47(13):

1484-1493. DOI:10.16016/j.2097-0927.202504078.
ZHANG M, LI M, XIAO M, *et al*. miR-543/SNTB1 axis modulates immune microenvironment in colorectal cancer [J]. J Army Med Univ, 2025, 47(13): 1484-1493. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202504078.

[24] REN W B, HU J, LI H H, *et al*. miR-616-5p promotes invasion and migration of bladder cancer *via* downregulating NR2C2 expression [J]. Front Oncol, 2021, 11: 762946. DOI:10.3389/fonc.2021.762946.

[25] TAVARES V, SAVVA-BORDALO J, REI M, *et al*. Plasma microRNA environment linked to tissue factor pathway and cancer-associated thrombosis: prognostic significance in ovarian cancer[J]. Biomolecules, 2024, 14(8): 928. DOI: 10.3390/biom14080928.

[26] 刘欣, 许秋然, 张美齐, 等. microRNA-616在肝细胞癌侵袭转移中的作用机制研究[J]. 浙江医学, 2017, 39(12): 979-983, 989.
LIU X, XU Q R, ZHANG M Q, *et al*. Expression of miR-616 in human hepatocellular carcinoma and its effect on tumor invasion and metastasis [J]. Zhejiang Med J, 2017, 39(12): 979-983, 989.

[27] ZHENG S N, QIAN Z Y, JIANG F, *et al*. CircRNA LRP6 promotes the development of osteosarcoma *via* negatively regulating KLF2 and APC levels [J]. Am J Transl Res, 2019, 11(7): 4126-4138.

[28] RUAN J W, ZHENG L L, HU N, *et al*. Long noncoding RNA SNHG6 promotes osteosarcoma cell proliferation through regulating p21 and KLF2 [J]. Arch Biochem Biophys, 2018, 646: 128-136. DOI: 10.1016/j.abb. 2018.03.036.

(**收稿**:2025-08-04;**修回**:2025-10-14)
(编辑 张艺霖)