

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.11.002

View this article at: <https://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2022.11.002>

LINC00461 靶向 miR-519e-5p 调控骨肉瘤细胞增殖、 迁移和侵袭的分子机制

黄桂林¹, 华莎², 周海振¹, 王志酬¹, 刘鹤鸣¹, 杨团民¹

(1. 西安交通大学附属红会医院骨病肿瘤科, 西安 710054; 2. 西安市第五医院风湿免疫科, 西安 710082)

[摘要] 目的: 探讨长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)LINC00461对骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响及分子机制。方法: 选取40例骨肉瘤患者的瘤组织及瘤旁组织, 培养人成骨细胞hFOB 1.19, 骨肉瘤细胞系Saos2、U2OS和HOS, 用real-time RT-PCR检测LINC00461和微RNA-519e-5p(microRNA-519e-5p, miR-519e-5p)表达水平。将Saos2细胞分为NC组、si-LINC00461组、si-NC组、miR-519e-5p组(miR-519e-5p类似物)、miR-NC组、si-LINC00461+anti-miR-519e-5p组、si-LINC00461+anti-miR-NC组。蛋白质印迹法检测蛋白质表达; CCK-8检测细胞活性; 克隆形成实验检测细胞克隆形成数; Transwell检测细胞迁移和侵袭数; 双荧光素酶报告实验和RNA pull-down实验检测LINC00461和miR-519e-5p的靶向关系。结果: 与瘤旁组织比较, 骨肉瘤组织中LINC00461高表达, miR-519e-5p低表达($P<0.05$)。与hFOB 1.19细胞比较, 骨肉瘤细胞系Saos2、U2OS和HOS中LINC00461表达水平升高, miR-519e-5p表达水平降低($P<0.05$)。低表达LINC00461或过表达miR-519e-5p, Ki-67、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)2、MMP9蛋白表达水平, Saos2细胞活性, 细胞克隆形成数及迁移侵袭数降低($P<0.05$)。LINC00461靶向负调控miR-519e-5p的表达。低表达miR-519e-5p可以逆转LINC00461低表达对Saos2细胞增殖、迁移和侵袭的影响。结论: 低表达LINC00461通过靶向上调miR-519e-5p抑制骨肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。

[关键词] lncRNA LINC00461; miR-519e-5p; 骨肉瘤; 增殖; 迁移; 侵袭

Molecular mechanism of LINC00461 targeting miR-519e-5p to regulate proliferation, migration, and invasion of osteosarcoma cells

HUANG Guilin¹, HUA Sha², ZHOU Haizhen¹, WANG Zhichou¹, LIU Heming¹, YANG Tuanmin¹

(1. Department of Orthopedics and Oncology, Honghui Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710054; 2. Department of Rheumatology and Immunology, Xi'an Fifth Hospital, Xi'an 710082, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effect and molecular mechanism of long non-coding RNA (lncRNA) LINC00461 on

收稿日期 (Date of reception): 2022-06-24

通信作者 (Corresponding author): 黄桂林, Email: guajih@163.com

基金项目 (Foundation item): 陕西省重点研发计划项目 (2021SF-125)。This work was supported by the Shaanxi Province Key Research and Development Program, China (2021SF-125).

the proliferation, migration, and invasion of osteosarcoma cells. **Methods:** The tumor tissues and adjacent tissues of 40 patients with osteosarcoma were selected, human osteoblast cell hFOB 1.19, osteosarcoma cell lines Saos2, U2OS, and HOS were cultured, and real-time RT-PCR was used to detect the expression levels of LINC00461 and microRNA-519e-5p (miR-519e-5p). The Saos2 cells were further divided into a NC group, a si-LINC00461 group, a si-NC group, a miR-519e-5p group (miR-519e-5p analog), a miR-NC group, a si-LINC00461 + anti-miR-519e-5p group, and a si-LINC00461 + anti-miR-NC group. Western blotting was used to detect protein expression; cell viability was detected by CCK-8; clone formation assay was performed to detect cell clone formation number; Transwell was utilized to detect cell migration and invasion number; the targeting relationship between LINC00461 and miR-519e-5p was detected by dual-luciferase reporter assay and RNA pull-down assay. **Results:** Compared with adjacent tissues, LINC00461 was highly expressed in osteosarcoma tissues, and miR-519e-5p was lowly expressed ($P < 0.05$). Compared with hFOB 1.19 cell, the expression level of LINC00461 in osteosarcoma cell lines Saos2, U2OS, and HOS was increased, and the expression level of miR-519e-5p was decreased ($P < 0.05$). After the underexpression of LINC00461 or overexpression of miR-519e-5p, the protein expression levels of Ki-67, matrix metalloproteinase (MMP)2 and MMP9, Saos2 cell activity, and the number of cell clone formation, migration, and invasion of Saos2 cell were decreased ($P < 0.05$). LINC00461 targeted and negatively regulated the expression of miR-519e-5p. The underexpression of miR-519e-5p reversed the effect of underexpression of LINC00461 on the proliferation, migration, and invasion of Saos2 cells. **Conclusion:** The low expression of LINC00461 inhibits the proliferation, migration, and invasion of osteosarcoma cells by targeting up-regulation of miR-519e-5p.

Keywords lncRNA LINC00461; miR-519e-5p; osteosarcoma; proliferation; migration; invasion

骨肉瘤是一种高度侵袭性的癌症, 治疗后转移和复发的风险高。为了更有效地治疗骨肉瘤, 探究更有针对性的靶向疗法尤为重要^[1-2]。研究^[3-4]表明: 长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)和微RNA(microRNA, miRNA)在骨肉瘤的发生、发展中起重要作用。了解其调控机制, 可为骨肉瘤诊治提供新途径。研究^[5]显示: LINC00461在乳腺癌细胞中显著高表达, 可通过竞争性结合miR-144-3p促进核转运蛋白 α -2(nuclear karyopherin alpha-2, KPNA2)表达, 从而促进乳腺癌细胞侵袭和迁移。此外, 敲除LINC00461可减弱胃癌^[6]、多发性骨髓瘤^[7]细胞增殖能力并诱导细胞凋亡。生物信息学软件预测发现LINC00461与miR-519e-5p有结合位点。miR-519e-5p是miR-515家族成员之一, 研究^[8-9]显示: lncRNA MAPKAPK5-AS1可通过靶向调控miR-519e-5p/酪氨酸3-加单氧酶/色氨酸5-加单氧酶激活蛋白 ζ (tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta, YWHAH)轴促进甲状腺癌细胞增殖和迁移; lncRNA GABPB1-AS1可通过调节miR-519e-5p/Notch2轴促进宫颈癌进展。然而LINC00461、miR-519e-5p对骨肉瘤细胞进展的影响及相关分子机制尚不清楚。本实验旨在研究LINC00461对骨肉瘤细胞进展的影响及其分子机制

是否与miR-519e-5p有关。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取西安交通大学附属红会医院2016年1月至2018年12月40例骨肉瘤患者的瘤组织及瘤旁组织(距离瘤组织边缘2~5 cm), 患者手术前未进行过放疗化疗。手术中采集组织后于液氮中冷冻过夜, 随后转移到-80℃超低温冰箱保存备用。所有患者均知情且同意, 且本研究获取西安交通大学附属红会医院医学伦理委员会的批准(审批号: 15-0221)。

1.2 细胞与主要试剂

人成骨细胞hFOB 1.19, 骨肉瘤细胞系Saos2、U2OS和HOS(美国ATCC); RPMI-1640培养基(美国Gibco公司); TRIzol试剂、荧光定量试剂盒(日本Takara公司); 蛋白质提取试剂盒、结晶紫染色液、CCK-8试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司); Transwell小室、基质胶(美国Corning公司); 双荧光素酶报告基因检测试剂盒(美国AAT Bioquest公司); RNA pull-down试剂盒(美国Thermo Scientific公司); LipofectamineTM

3000 Transfection Reagent(美国Invitrogen公司); LINC00461干扰表达载体及阴性对照、miR-519e-5p模拟物及阴性对照、miR-519e-5p抑制剂及阴性对照(上海吉玛制药技术有限公司); LINC00461过表达载体及阴性对照(广州锐博生物技术有限公司)。

1.3 细胞处理与分组

常规培养hFOB 1.19细胞和骨肉瘤细胞系Saos2、U2OS、HOS, 取对数生长期细胞Saos2, 用不含胎牛血清的细胞培养液与LINC00461干扰表达载体及阴性对照、miR-519e-5p模拟物及阴性对照、miR-519e-5p抑制剂及阴性对照混合后室温孵育5 min(A液), Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent转染试剂与不含胎牛血清的细胞培养液充分混合(B液), A液与B液充分混匀后室温孵育20 min, 并将其加入Saos2细胞, 转染6 h弃上清液后更换正常培养液, 并继续培养48 h, 记为si-LINC00461组、si-NC组、miR-519e-5p组(miR-519e-5p类似物)、miR-NC组、anti-miR-519e-5p组、anti-miR-NC组; 将LINC00461干扰表达载体分别与miR-519e-5p抑制剂及阴性对照转染至Saos2细胞, 记为si-LINC00461+anti-miR-519e-5p组、si-LINC00461+anti-miR-NC组; 常规培养的Saos2细胞作为NC组。

1.4 Real-time RT-PCR 检测 LINC00461 和 miR-519e-5p 表达水平

提取骨肉瘤组织、瘤旁组织及hFOB 1.19细胞、骨肉瘤细胞系Saos2、U2OS、HOS的总RNA, 反转录成cDNA, 按照试剂盒说明进行PCR, 相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。以GAPDH和U6为内参。

1.5 蛋白质印迹法检测蛋白表达

提取各组细胞总蛋白, 蛋白质上样量60 μg , 经SDS-PAGE后转移至PVDF膜上, 5%脱脂牛奶室温封闭2 h, 加入Ki-67、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)2、MMP9等一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 再加入二抗室温孵育2 h, 暗室中曝光显影, 定影, 分析蛋白质条带灰度值。

1.6 CCK-8 检测细胞活性

各组Saos2细胞(1×10^6 个/mL)接种于96孔板(100 μL /孔), 将其置于培养箱内继续培养, 分别于转染24、48、72 h时向每孔加入CCK-8溶液

10 μL , 继续培养2 h后酶标仪检测450 nm处吸光度值(A)。

1.7 克隆形成实验检测细胞克隆形成数

各组细胞以每孔100个接种于6孔板中, 培养2周后分别用甲醇固定15 min, 结晶紫染色30 min, 最后在显微镜下计数>50个细胞的集落。

1.8 Transwell 检测细胞迁移和侵袭

各组Saos2细胞(1×10^5 个/mL)分别接种于小室的上室(200 μL /孔), 下室加入600 μL 含有10%胎牛血清的培养液, 将其置于培养箱内继续培养24 h后使用PBS洗涤, 将多聚甲醛加入后固定20 min, 使用PBS洗涤后加入0.1%结晶紫染色液染色10 min, 清洗后晾干, 使用显微镜观察迁移细胞数。采用预冷培养液将Matrigel基质胶稀释液加入小室的上室(40 μL /孔), 孵育时间为5 h, 后续实验步骤同细胞迁移实验, 应用显微镜观察侵袭细胞数。

1.9 双荧光素酶报告实验和 RNA pull-down 实验

构建含有miR-519e-5p结合位点的LINC00461野生型及突变型报告基因载体, 在Saos2细胞中转染miR-519e-5p类似物和LINC00461野生型及突变型报告基因载体, 按说明书检测荧光素酶活性。

将生物素标记的野生型miR-519e-5p(Bio-miR-519e-5p-WT)和突变型miR-519e-5p(Bio-miR-519e-5p-MUT)转染至Saos2细胞, 收集转染48 h后的细胞, 加入RNA pull-down裂解液裂解细胞, 将裂解产物与酵母tRNA包被的M280链霉素磁珠4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h, 洗涤磁珠, 采用TRIzol试剂提取磁珠结合的RNA, 采用real-time RT-PCR检测LINC00461表达水平。

将LINC00461干扰表达载体、过表达载体及其各自的阴性对照转染至Saos2细胞, 用1.4中real-time RT-PCR方法检测LINC00461和miR-519e-5p表达水平。

1.10 统计学处理

采用SPSS 20.0统计学软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组比较行t检验, 多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 骨肉瘤组织中 LINC00461 和 miR-519e-5p 表达情况

骨肉瘤组织中 LINC00461 表达水平高于瘤旁组织, miR-519e-5p 表达水平低于瘤旁组织 ($P < 0.05$, 图1)。

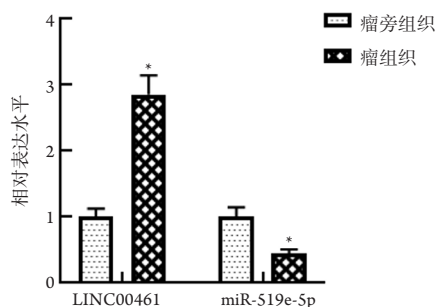


图1 骨肉瘤组织中 LINC00461 和 miR-519e-5p 表达情况

Figure 1 Expression of LINC00461 and miR-519e-5p in osteosarcoma tissues

与瘤旁组织比较, $*P < 0.05$ 。

Compared with the adjacent tissues, $*P < 0.05$.

2.2 骨肉瘤细胞系中 LINC00461 和 miR-519e-5p 表达情况

与 hFOB 1.19 细胞比较, 骨肉瘤细胞系 Saos2、U2OS 和 HOS 中 LINC00461 表达水平升高, miR-519e-5p 表达水平降低 ($P < 0.05$, 图2)。选择表达水平最显著的 Saos2 细胞用于后续试验。

2.3 低表达 LINC00461 对骨肉瘤细胞 Saos2 增殖、迁移和侵袭的影响

与 NC 和 si-NC 组比较, si-LINC00461 组 LINC00461 表达水平降低, Ki-67、MMP2、MMP9 蛋白表达水平降低, Saos2 细胞活性降低, Saos2 细胞克隆形成数以及迁移侵袭数减少 ($P < 0.05$; 表1, 图3)。

2.4 高表达 miR-519e-5p 对骨肉瘤细胞 Saos2 增殖、迁移和侵袭的影响

与 miR-NC 组比较, miR-519e-5p 组 miR-519e-5p 表达水平升高, Ki-67、MMP2、MMP9 蛋白表达水平降低, Saos2 细胞活性降低, Saos2 细胞克隆形成数以及迁移侵袭数减少 ($P < 0.05$; 表2, 图4)。

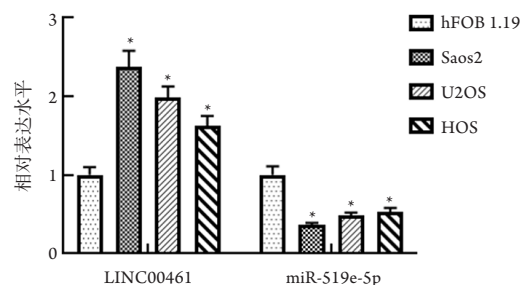


图2 骨肉瘤细胞系中 LINC00461 和 miR-519e-5p 的表达

Figure 2 Expression of LINC00461 and miR-519e-5p in osteosarcoma cell lines

与 hFOB 1.19 比较, $*P < 0.05$ 。

Compared with hFOB 1.19, $*P < 0.05$.

表1 低表达 LINC00461 对骨肉瘤细胞 Saos2 增殖、迁移和侵袭的影响 ($n=9$)

Table 1 Effect of underexpression of LINC00461 on proliferation, migration, and invasion of osteosarcoma cell Saos2 ($n=9$)

组别	LINC00461	Ki-67	MMP2	MMP9	细胞活性 [†]	细胞克隆数	细胞迁移数量	细胞侵袭数量
NC	1.00 ± 0.10	0.84 ± 0.08	0.81 ± 0.07	0.75 ± 0.07	1.035 ± 0.10	105 ± 8.36	231 ± 19.02	161 ± 12.39
si-NC	1.02 ± 0.09	0.83 ± 0.08	0.79 ± 0.07	0.74 ± 0.06	1.041 ± 0.11	108 ± 9.13	228 ± 18.52	158 ± 11.44
si-LINC00461	0.43 ± 0.04*	0.42 ± 0.04*	0.37 ± 0.03*	0.35 ± 0.03*	0.534 ± 0.05*	53 ± 4.52*	118 ± 9.43*	72 ± 6.19*
<i>F</i>	56.681	107.688	155.776	149.457	92.943	148.673	141.054	213.717
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与 NC 组比较, $*P < 0.05$ 。[†]450 nm 处的吸光度值。

Compared with NC group, $*P < 0.05$. [†]Absorbance value at 450 nm.

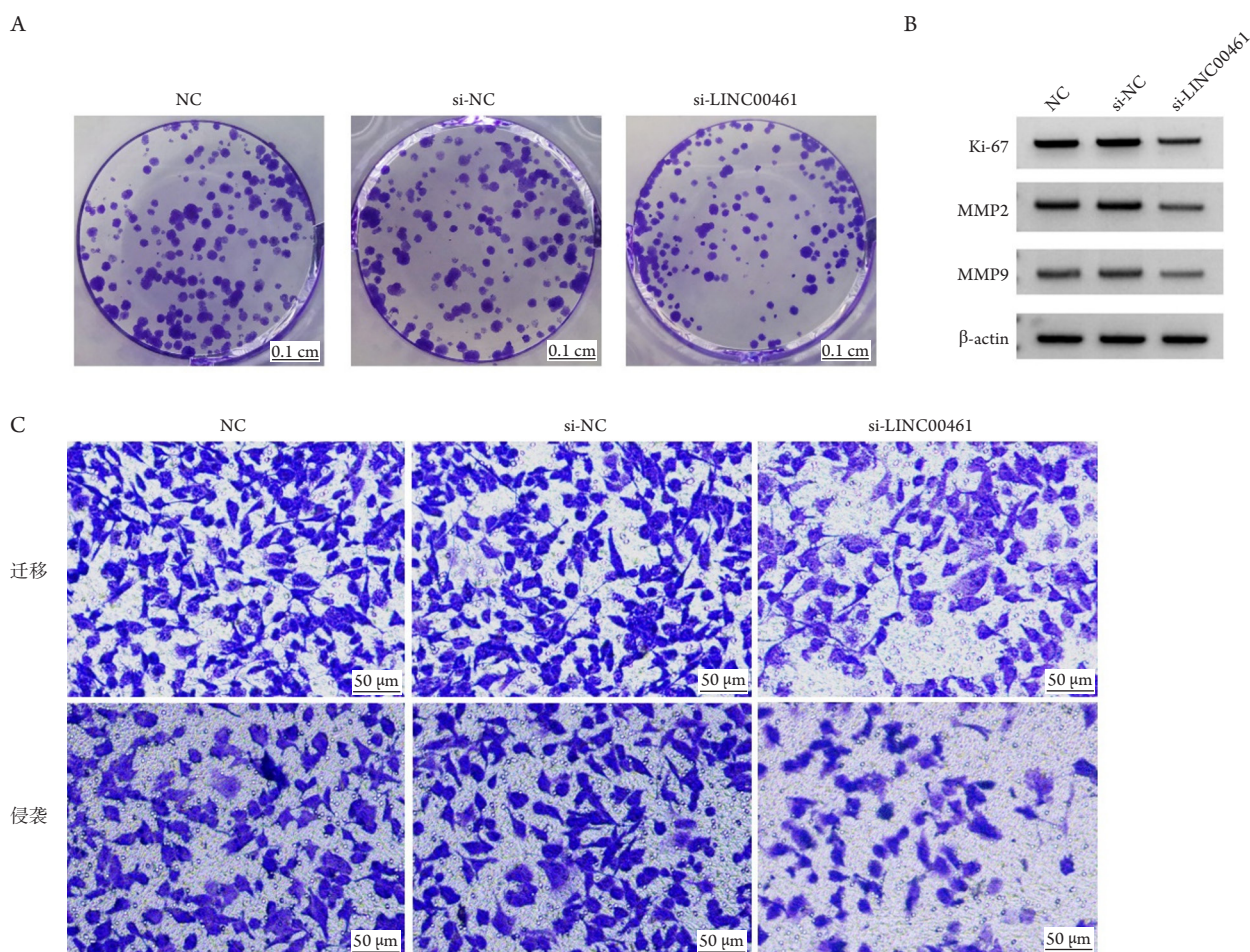


图3 低表达LINC00461对骨肉瘤细胞Saos2克隆、迁移侵袭和有关蛋白表达的影响

Figure 3 Effect of underexpression of LINC00461 on the clone, migration, and invasion of osteosarcoma cell Saos2 and the expression of related proteins

(A) 细胞克隆形成实验(结晶紫染色, $\times 40$); (B) 蛋白质印迹法检测Ki-67、MMP2、MMP9蛋白表达; (C) Transwell检测细胞迁移侵袭(0.1%结晶紫染色, $\times 200$)。

(A) Cell clone formation assay (crystal violet staining, $\times 40$); (B) Western blotting detection of Ki-67, MMP2, MMP9 protein expression; (C) Transwell detection of cell migration and invasion (0.1% crystal violet staining, $\times 200$).

表2 高表达miR-519e-5p对骨肉瘤细胞Saos2增殖、迁移和侵袭的影响($n=9$)

Table 2 Effect of overexpression of miR-519e-5p on proliferation, migration, and invasion of osteosarcoma cell Saos2 ($n=9$)

组别	MiR-519e-5p	Ki-67	MMP2	MMP9	细胞活性 [†]	细胞克隆数	细胞迁移数量	细胞侵袭数量
miR-NC	1.00 ± 0.09	0.84 ± 0.08	0.78 ± 0.07	0.73 ± 0.07	1.044 ± 0.10	111 ± 9.54	224 ± 17.03	155 ± 13.12
miR-519e-5p	3.14 ± 0.28*	0.45 ± 0.04*	0.41 ± 0.04*	0.34 ± 0.03*	0.573 ± 0.04*	61 ± 5.69*	107 ± 9.54*	83 ± 7.61*
<i>t</i>	21.829	13.081	13.768	15.363	274.838	13.504	17.982	14.241
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与miR-NC组比较, * $P < 0.05$ 。[†]450 nm处的吸光度值。

Compared with miR-NC group, * $P < 0.05$. [†]Absorbance value at 450 nm.

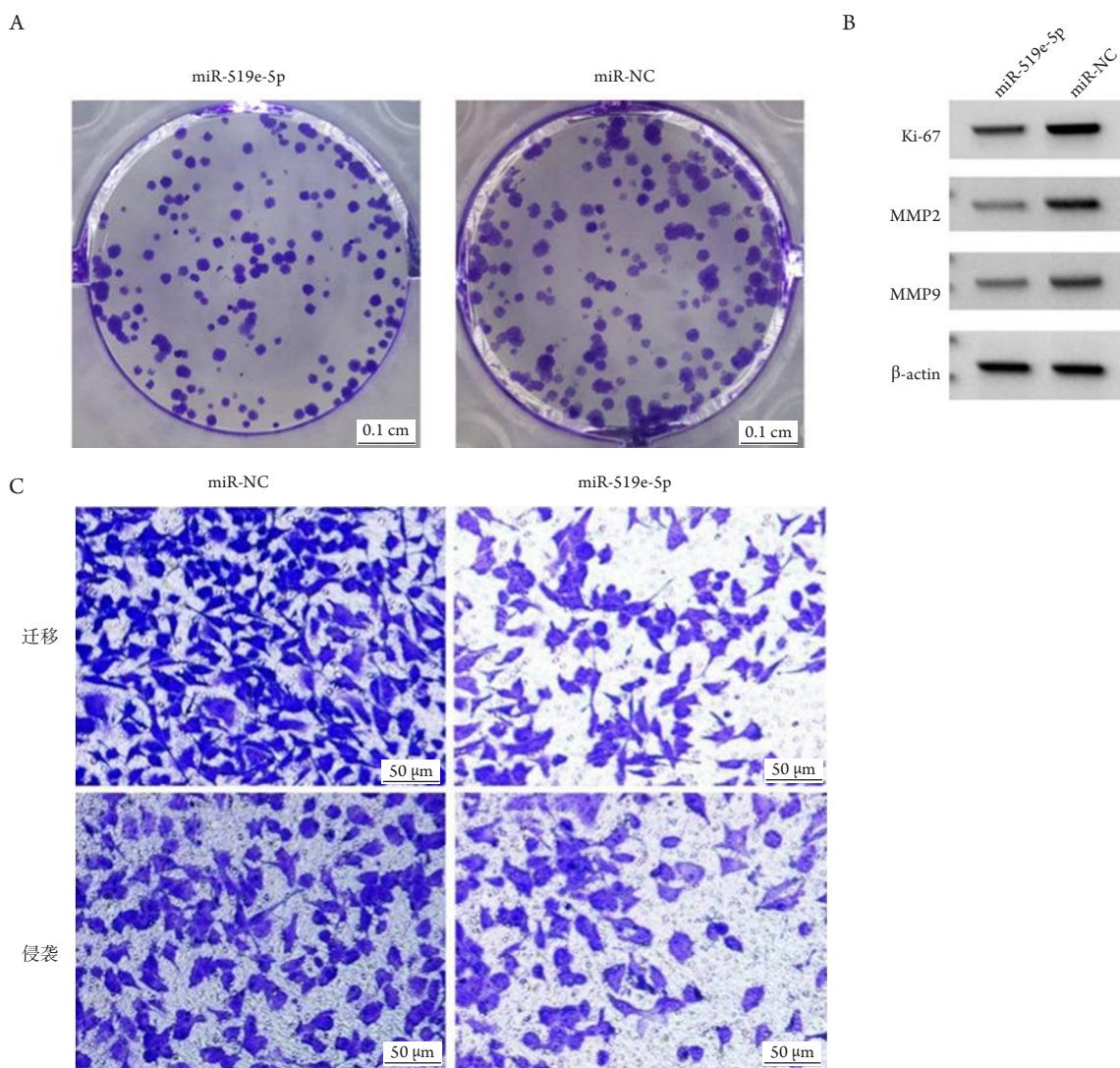


图4 高表达miR-519e-5p对骨肉瘤细胞Saos2克隆、迁移侵袭和有关蛋白表达的影响

Figure 4 Effect of overexpression of miR-519e-5p on the clone, migration, and invasion of osteosarcoma cell Saos2 and the expression of related proteins

(A) 细胞克隆形成实验(结晶紫染色, $\times 40$); (B) 蛋白质印迹法检测Ki-67、MMP2、MMP9蛋白表达; (C) Transwell检测细胞迁移侵袭(0.1%结晶紫染色, $\times 200$)。

(A) Cell clone formation assay (crystal violet staining, $\times 40$); (B) Western blotting detection of Ki-67, MMP2, MMP9 protein expression; (C) Transwell detection of cell migration and invasion (0.1% crystal violet staining, $\times 200$).

2.5 LINC00461 靶向调控 miR-519e-5p 的表达

LncBase Predicted v.2预测显示miR-519e-5p和LINC00461有结合位点(图5A)。miR-519e-5p与LINC00461野生型报告质粒共转染Saos2细胞后荧光素酶活性降低($P < 0.05$, 图5B)。Bio-miR-519e-5p-WT结合的LINC00461多于Bio-miR-519e-5p-MUT ($P < 0.05$, 图5C)。与pcDNA组比较, pcDNA-LINC00461组LINC00461表达水平升高, miR-519e-5p表达水平降低($P < 0.05$); 与si-NC组比较, si-LINC00461组LINC00461表达水平降低, miR-519e-5p表达水

平升高($P < 0.05$, 图5D)。

2.6 低表达 miR-519e-5p 可以逆转 LINC00461 低表达对 Saos2 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

与si-LINC00461+anti-miR-NC组比较, si-LINC00461+anti-miR-519e-5p组miR-519e-5p表达水平降低, Ki-67、MMP2、MMP9蛋白表达水平升高, Saos2细胞活性升高, Saos2细胞克隆形成数以及迁移侵袭数增加($P < 0.05$; 图6, 表3)。

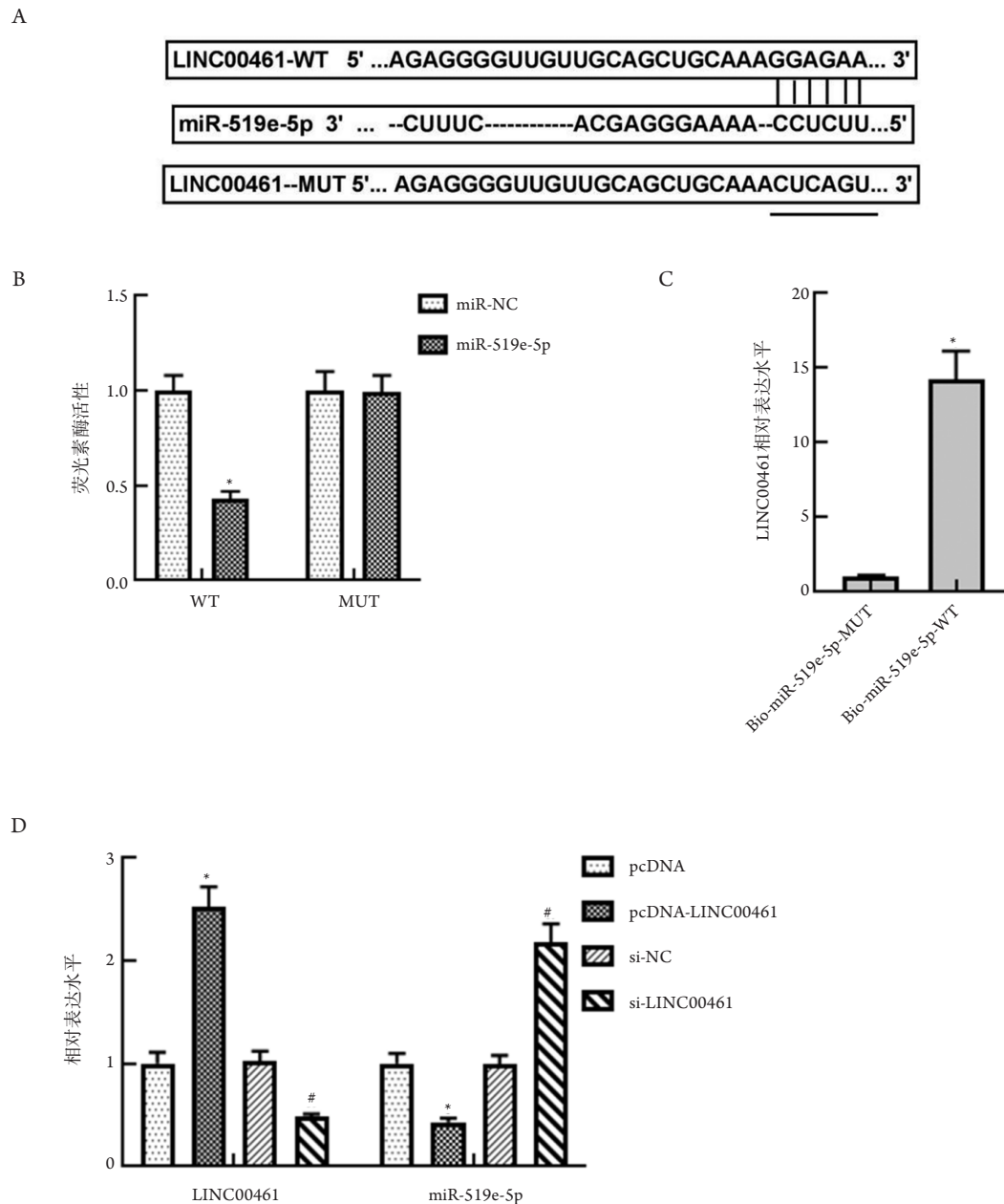


图5 LINC00461与miR-519e-5p的靶向调控关系

Figure 5 Targeting regulation relationship between LINC00461 and miR-519e-5p

(A) LncBase Predicted v.2 预测 miR-519e-5p 和 LINC00461 的靶向结合位点; (B) 双荧光素酶报告实验检测 LINC00461 与 miR-519e-5p 的靶向关系; 与 miR-NC 比较, $*P < 0.05$; (C) RNA pull-down 实验检测 LINC00461 与 miR-519e-5p 的靶向关系; 与 Bio-miR-519e-5p-MUT 比较, $*P < 0.05$; (D) Real-time RT-PCR 检测 LINC00461 和 miR-519e-5p 的表达情况; 与 pcDNA 组比较, $*P < 0.05$; 与 si-NC 组比较, $*P < 0.05$ 。

(A) LncBase Predicted v.2 predicted targeted binding sites for miR-519e-5p and LINC00461; (B) Dual-luciferase reporter assay was used to detect the targeting relationship between LINC00461 and miR-519e-5p; compared with miR-NC, $*P < 0.05$; (C) RNA pull-down assay was used to detect the targeting relationship between LINC00461 and miR-519e-5p; compared with Bio-miR-519e-5p-MUT, $*P < 0.05$; (D) Real-time RT-PCR detection of LINC00461 and miR-519e-5p expression; compared with pcDNA group, $*P < 0.05$; compared with si-NC group, $*P < 0.05$.

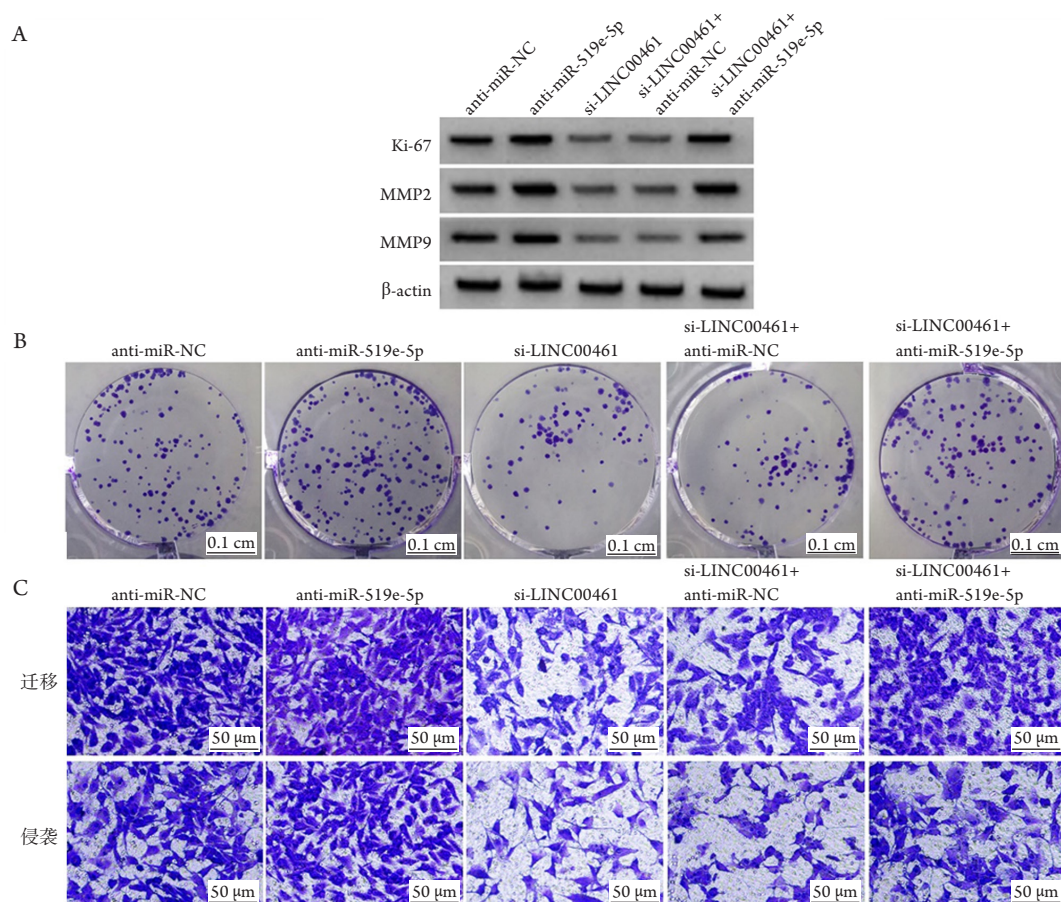


图6 低表达miR-519e-5p可以逆转LINC00461低表达对骨肉瘤细胞Saos2克隆、迁移侵袭和有关蛋白表达的影响

Figure 6 Underexpression of miR-519e-5p can reverse the effect of underexpression of LINC00461 on clone, migration, invasion of osteosarcoma cells Saos2 and the expression of related proteins

(A)蛋白质印迹法检测Ki-67、MMP2、MMP9蛋白表达; (B)细胞克隆形成实验(结晶紫染色, × 40); (C)Transwell检测细胞迁移侵袭(0.1%结晶紫染色, × 200)。

(A) Western blotting detection of Ki-67, MMP2, MMP9 protein expression; (B) Cell clone formation assay (crystal violet staining, × 40);

(C) Transwell detection of cell migration and invasion (0.1% crystal violet staining, × 200).

表3 低表达miR-519e-5p可以逆转LINC00461低表达对Saos2细胞增殖、迁移和侵袭的影响(n=9)

Table 3 Underexpression of miR-519e-5p can reverse the effect of underexpression of LINC00461 on Saos2 cell proliferation, migration, and invasion (n=9)

组别	MiR-519e-5p	Ki-67	MMP2	MMP9	细胞活性 [†]	细胞克隆数	细胞迁移数量	细胞侵袭数量
anti-miR-NC	1.00 ± 0.13	0.81 ± 0.06	0.77 ± 0.06	0.72 ± 0.05	1.041 ± 0.07	104 ± 8.22	227 ± 23.14	162 ± 16.33
anti-miR-519e-5p	0.28 ± 0.03*	1.16 ± 0.07*	1.05 ± 0.08*	0.96 ± 0.06*	1.362 ± 0.11*	167 ± 13.25*	274 ± 25.03*	184 ± 13.41*
si-LINC00461	2.25 ± 0.22*	0.42 ± 0.04*	0.35 ± 0.04*	0.33 ± 0.03*	0.531 ± 0.06*	58 ± 6.03*	116 ± 10.17*	76 ± 8.14*
si-LINC00461+ anti-miR-NC	2.31 ± 0.26	0.41 ± 0.04	0.36 ± 0.03	0.34 ± 0.03	0.539 ± 0.05	56 ± 5.19	118 ± 9.43	75 ± 7.39
si-LINC00461+ anti-miR-519e-5p	1.33 ± 0.14 [‡]	0.88 ± 0.08 [‡]	0.81 ± 0.07 [‡]	0.76 ± 0.07 [‡]	1.096 ± 0.09 [‡]	118 ± 9.47 [‡]	209 ± 18.53 [‡]	151 ± 11.64 [‡]
F	217.382	256.152	240.828	270.422	193.727	242.183	128.815	165.202
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与anti-miR-NC组比较, *P<0.05; 与si-LINC00461+anti-miR-NC组比较, [‡]P<0.05。[†]450 nm处的吸光度值。

Compared with anti-miR-NC group, *P<0.05; compared with si-LINC00461 + anti-miR-NC group, [‡]P<0.05. [†]Absorbance value at 450 nm.

3 讨论

骨肉瘤是儿童和青少年最常见的原发性恶性骨肿瘤,过去由于技术限制,没有清晰的骨肉瘤生物标志物和治疗靶标,使得治疗效果明显不佳。随着大规模新兴测序及生物信息学分析的出现和发展,涉及骨肉瘤进展和转移的机制已逐渐被发现,这些发现扩大了适用于临床前模型靶向的候选基因数量^[10-11]。近年来,因lncRNA、miRNA等RNA可调节增殖、凋亡、细胞周期、迁移等各种生物和病理过程,其在骨肉瘤发生、发展中的作用也备受关注^[12-13]。据研究^[14-15]报道:lncRNA BCRT1、lncRNA SNHG4等多个lncRNA参与调控骨肉瘤细胞增殖、迁移、侵袭等恶性生物学行为。沉默LINC00461在体外抑制了肝癌细胞增殖、迁移和侵袭,并在体内阻碍了肿瘤生长^[16]。敲低LINC00461可显著抑制非小细胞肺癌细胞增殖和迁移^[17]。下调LINC00461表达可抑制结直肠癌细胞增殖、迁移和侵袭,促进细胞凋亡^[18]。以上研究^[16-18]表明:LINC00461参与多种肿瘤的进展,且为促癌基因,但其在骨肉瘤中的作用尚不明确。本实验结果显示:相较于瘤旁组织和hFOB 1.19细胞,骨肉瘤组织和细胞系中LINC00461表达水平升高。提示LINC00461可能在骨肉瘤中也作为癌基因起作用。进一步在骨肉瘤细胞Saos2中低表达LINC00461后,Saos2细胞活性降低,克隆形成数、迁移和侵袭细胞数减少,且Ki-67、MMP2、MMP9蛋白表达水平降低,表明低表达LINC00461可抑制骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭。

多项研究^[19-21]指出:lncRNA可通过海绵化miRNA在骨肉瘤发生和进展中发挥重要调控作用。研究^[22]显示lnc_ASNR通过调节miR-519e-5p/FGFR2通路促进胃癌细胞增殖、迁移和侵袭。但是miR-519e-5p在骨肉瘤中的作用尚有待探究。本实验结果显示骨肉瘤组织和细胞系中miR-519e-5p低表达,推测miR-519e-5p可能受LINC00461等lncRNA调节在骨肉瘤中发挥肿瘤抑制作用。进一步在Saos2细胞中过表达miR-519e-5p后,Ki-67、MMP2、MMP9蛋白表达水平降低,Saos2细胞活性降低,Saos2细胞克隆形成数、迁移和侵袭数减少,表明过表达miR-519e-5p可抑制骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭。同时本研究还通过生物信息学分析、双荧光素酶报告实验和RNA pull-down实验验证发现Saos2细胞中LINC00461与miR-519e-5p存在靶向关系。另外,Saos2细胞中转染pcDNA-LINC00461过表达LINC00461后

miR-519e-5p表达水平降低,而转染si-LINC00461低表达LINC00461后miR-519e-5p表达水平升高;然而,过表达或低表达miR-519e-5p对LINC00461表达均无显著影响(由于无差异,结果中未呈现)。此外,低表达miR-519e-5p可以逆转LINC00461低表达对Saos2细胞增殖、迁移和侵袭的影响。故本研究结果表明:LINC00461可靶向负调控miR-519e-5p的表达,调节Saos2细胞增殖、迁移和侵袭。

综上所述,低表达LINC00461通过靶向上调miR-519e-5p抑制骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭。本研究为骨肉瘤提供了新的生物标志物和治疗靶点,但是尚存在一定局限性,例如仅使用一种细胞系;未探究miR-519e-5p下游靶基因及其相关通路等。针对本研究存在的不足之处,将在接下来的研究中进一步完善。

参考文献

1. Cersosimo F, Lonardi S, Bernardini G, et al. Tumor-associated macrophages in osteosarcoma: from mechanisms to therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15): 5207.
2. Wang X, Qin G, Liang X, et al. Targeting the CK1 α /CBX4 axis for metastasis in osteosarcoma[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1141.
3. Wang J, Liu S, Shi J, et al. The role of miRNA in the diagnosis, prognosis, and treatment of osteosarcoma[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2019, 34(10): 605-613.
4. Wang JY, Yang Y, Ma Y, et al. Potential regulatory role of lncRNA-miRNA-mRNA axis in osteosarcoma[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121: 109627.
5. Zhang Q, Jin X, Shi W, et al. A long non-coding RNA LINC00461-dependent mechanism underlying breast cancer invasion and migration via the miR-144-3p/KPNA2 axis[J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 137.
6. Shi X, You X, Zeng WC, et al. Knockdown of LINC00461 inhibits cell proliferation and induces apoptosis in gastric cancer by targeting LSD1[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(24): 10769-10775.
7. Deng M, Yuan H, Liu S, et al. Exosome-transmitted LINC00461 promotes multiple myeloma cell proliferation and suppresses apoptosis by modulating microRNA/BCL-2 expression[J]. *Cytotherapy*, 2019, 21(1): 96-106.
8. Zhou Y, Liu S, Luo Y, et al. lncRNA MAPKAPK5-AS1 promotes proliferation and migration of thyroid cancer cell lines by targeting miR-519e-5p/YWHAH[J]. *Eur J Histochem*, 2020, 64(4): 3177.
9. Ou R, Lv M, Liu X, et al. HPV16 E6 oncoprotein-induced upregulation of lncRNA GABPB1-AS1 facilitates cervical cancer progression by regulating miR-519e-5p/Notch2 axis[J]. *FASEB J*, 2020, 34(10):

- 13211-13223.
10. Zhao J, Dean DC, Hornicek FJ, et al. Emerging next-generation sequencing-based discoveries for targeted osteosarcoma therapy[J]. *Cancer Lett*, 2020, 474: 158-167.
 11. Zhou X, Fan Y, Ye W, et al. Identification of the novel target genes for osteosarcoma therapy based on comprehensive bioinformatic analysis[J]. *DNA Cell Biol*, 2020, 39(7): 1172-1180.
 12. Lin C, Miao J, He J, et al. The regulatory mechanism of lncRNA-mediated ceRNA network in osteosarcoma[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 8756.
 13. Xu K, Zhang P, Zhang J, et al. Identification of potential micro-messenger RNAs (miRNA-mRNA) interaction network of osteosarcoma[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 3275-3293.
 14. Han G, Guo Q, Ma N, et al. LncRNA BCRT1 facilitates osteosarcoma progression via regulating miR-1303/FGF7 axis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(11): 15501-15510.
 15. Huang YF, Lu L, Shen HL, et al. LncRNA SNHG4 promotes osteosarcoma proliferation and migration by sponging miR-377-3p[J/OL]. *Mol Genet Genomic Med*, 2020, 8(8): e1349. (2020-06-14)[2022-10-15]. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1349>
 16. Ji D, Wang Y, Li H, et al. Long non-coding RNA LINC00461/ miR-149-5p/LRIG2 axis regulates hepatocellular carcinoma progression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 512(2): 176-181.
 17. Li X, Liu J, Liu M, et al. The lnc LINC00461/miR-30a-5p facilitates progression and malignancy in non-small cell lung cancer via regulating ZEB2[J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(7): 825-836.
 18. Yu H, Ma J, Chen J, et al. LncRNA LINC00461 promotes colorectal cancer progression via miRNA-323b-3p/NFIB axis[J]. *Oncol Targets Ther*, 2019, 12: 11119-11129.
 19. Jiang M, Wang YR, Xu N, et al. Long noncoding RNA MEG3 play an important role in osteosarcoma development through sponging microRNAs[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(4): 5151-5159.
 20. Shen Y, Xu J, Pan X, et al. LncRNA KCNQ1OT1 sponges miR-34c-5p to promote osteosarcoma growth via ALDOA enhanced aerobic glycolysis[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(4): 278.
 21. Wang Z, Wei Y, Zhu H, et al. LncRNA NDRG1 aggravates osteosarcoma progression and regulates the PI3K/AKT pathway by sponging miR-96-5p[J]. *BMC Cancer*, 2022, 22(1): 728.
 22. Chen Z, Li Y, Tan B, et al. Long Non-coding RNA ASNR targeting miR-519e-5p promotes gastric cancer development by regulating FGFR2[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 679176.

本文引用: 黄桂林, 华莎, 周海振, 王志酬, 刘鹤鸣, 杨团民. LINC00461靶向miR-519e-5p调控骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭的分子机制[J]. *临床与病理杂志*, 2022, 42(11): 2603-2612. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.11.002

Cite this article as: HUANG Guilin, HUA Sha, ZHOU Haizhen, WANG Zhichou, LIU Heming, YANG Tuanmin. Molecular mechanism of LINC00461 targeting miR-519e-5p to regulate proliferation, migration, and invasion of osteosarcoma cells[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2022, 42(11): 2603-2612. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.11.002