

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.12.014

· 临床研究 ·

lncRNA HIT对骨肉瘤组织和细胞U2OS顺铂抵抗的影响及其机制

康宇翔,任志鹏(天津市天津医院 骨科,天津 300211)

[摘要] **目的:**探究长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)HIT与骨肉瘤细胞顺铂(cisplatin, DDP)抵抗的关系及其上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的相关机制。**方法:**选择天津医院骨科2017年6月至2018年6月42例骨肉瘤组织及相应癌旁组织(距癌变边缘>5 cm)标本,采用qRT-qPCR检测骨肉瘤组织及相应癌旁组织中HIT及EMT标志物Snail、E-钙黏蛋白(E-cadherin)mRNA的表达水平。构建DDP抵抗的人骨肉瘤U2OS细胞株及人肾上腺293T细胞株作为抵抗组及对照组,采用慢病毒转染两组表达靶向HIT的siRNA载体于抵抗组细胞中作为干扰A组及B组,同时转染HIT过表达载体及空白载体构建HIT过表达的U2OS细胞株及空白U2OS细胞株分别作为过表达组及空白组。MTT实验检测各组细胞DDP半抑制浓度(IC₅₀),qRT-PCR实验检测各组细胞中HIT、Snail及E-cadherin mRNA的表达水平,Western blotting检测各组细胞Snail及E-cadherin的表达水平, RNA结合蛋白免疫沉淀(RNA-IP)实验检测U2OS及293T细胞中HIT与Snail蛋白分子的结合情况。**结果:**骨肉瘤组织中HIT及Snail mRNA表达显著高于癌旁组织、E-cadherin mRNA表达显著低于癌旁组织,且骨肉瘤组织中HIT与E-cadherin mRNA表达呈显著负相关(均 $P<0.01$);抵抗组细胞DDP IC₅₀显著高于对照组、干扰A组及B组细胞,过表达组DDP IC₅₀显著高于空白组(均 $P<0.01$);抵抗组细胞HIT表达显著高于对照组,干扰A组及B组细胞HIT表达显著低于抵抗组及对照组,过表达组HIT表达显著高于空白组(均 $P<0.05$ 或 $P<0.01$);抵抗组细胞Snail、E-cadherin mRNA表达水平显著高于或低于对照组、干扰A组及干扰B组,过表达组E-cadherin mRNA显著低于空白组;抵抗组细胞Snail蛋白表达水平显著高于对照组、干扰A组及B组细胞,E-cadherin蛋白表达水平则显著低于对照组、干扰A组及B组细胞,过表达组Snail蛋白表达水平显著高于空白组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);在U2OS及293T细胞中,免疫磁珠介导Anti-snail抗体下拉HIT的表达水平显著高于对照IgG抗体下拉HIT的表达水平($P<0.01$)。**结论:**HIT通过正调控Snail蛋白水平,抑制E-cadherin的转录活性,从而促进骨肉瘤细胞EMT及DDP抵抗的发生。

[关键词] 骨肉瘤;U2OS细胞;293T细胞;长链非编码RNA HIT;顺铂抵抗;上皮间充质转化**[中图分类号]** R730.51;R738.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)12-1296-07

Effect and mechanism of lncRNA HIT on cisplatin resistance in osteosarcoma tissues and U2OS cells

KANG Yuxiang, REN Zhipeng (Department of Orthopedics, Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China)

[Abstract] Objective: To investigate the relationship between long non-coding RNA (lncRNA) HIT and cisplatin (DDP) resistance in osteosarcoma cells and the mechanism related to epithelial-mesenchymal transition (EMT). **Methods:** 42 pairs of osteosarcoma tissues and corresponding para-cancerous tissues (more than 5 cm away from the edge of cancer tissues) were collected at the Department of Orthopedics, Tianjin Hospital during June 2017 to June 2018. Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect the mRNA expression of HIT and EMT related markers (Snail and E-cadherin) in the collected tissues. The DDP-resistant osteosarcoma U2OS cell line was constructed and human adrenal 293T cell line was used as control. Two sets of siRNA vectors targeting HIT loaded on lentivirus were transfected into cells with DDP-resistance as the interference group A and group B. Meanwhile, the U2OS cell line was transfected with HIT full-length vector and blank vector respectively, as over-expression group and blank group. The DDP 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was detected by MTT assay. qRT-PCR was used to detect the mRNA expressions of HIT, Snail and E-cadherin. Western blotting was used to detect the protein expressions of Snail and E-cadherin. RNA binding protein immunoprecipitation (RNA-IP) assay was used to clarify the combination of HIT and Snail protein in the U2OS and 293T cells. **Results:** The mRNA expressions of HIT and Snail in osteosarcoma tissues were significantly higher than those in para-cancerous tissues, while the mRNA expression of E-cadherin was significantly lower than that in the paracancerous tissues. The mRNA expression of HIT and E-cadherin in osteosarcoma

[基金项目] 天津市卫生局科技基金资助项目(No.2013KR17);天津市天津医院科技基金资助项目(No.TJYY1508)。Project supported by the Science and Technology Fundation of Tianjin Municipal Health Bureau(No.2013KR17), and the Science and Technology Fundation of Tianjin Hospital(No.TJYY1508)

[作者简介] 康宇翔(1986-),男,硕士,医师,主要从事骨肿瘤、创伤、关节的研究,E-mail:bnnp0311@yeah.net**[通信作者]** 康宇翔(KANG Yuxiang, corresponding author)

tissues was negatively correlated (all $P < 0.01$). The DDP IC_{50} in the DDP-resistance group was significantly higher than that in the control group, interference group A and B, and the DDP IC_{50} in over-expression group was significantly higher than that in blank group (all $P < 0.01$). The expression of HIT in resistance group was significantly higher than that in the control group, and the HIT expressions in interference group A and B were significantly lower than that in DDP-resistance and control group; moreover, the expression of HIT in over-expression group was significantly higher than that in blank group (all $P < 0.05$ or $P < 0.01$). The mRNA expression of Snail in DDP-resistance group was significantly higher than that in the control group and interference group A and B, while the mRNA expression of E-cadherin in DDP-resistance group was significantly lower than that in the control group and interference group A and B; and the mRNA expression of E-cadherin in over-expression group was significantly lower than that in blank group. The protein expression of Snail in the DDP-resistance group was significantly higher than that in the control group and interference group A and B, while E-cadherin protein expression was significantly lower; and protein expression of Snail in over-expression group was significantly higher than that in blank group (all $P < 0.05$ or $P < 0.01$). The expression of HIT in the U2OS and 293T cells treated by anti-Snail antibody induced by immunomagnetic beads was significantly higher than that in the cells treated by IgG antibody ($P < 0.01$). **Conclusion:** HIT can promote EMT and cisplatin-resistance in osteosarcoma cells through up-regulation of Snail protein and inhibition of E-cadherin transcription activity.

[Key words] osteosarcoma; U2OS cell; 293T cell; lncRNA HIT; DDP-resistance; epithelial-mesenchymal transition (EMT)

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(12): 1296-1302. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.12.014]

骨肉瘤是一类好发于青少年或儿童的恶性骨肿瘤, 占小儿肿瘤的5%, 是小儿骨恶性肿瘤最常见的类型^[1]。骨肉瘤细胞恶性程度高, 易发生早期转移, 单纯手术切除复发率较高, 现阶段以手术联合术后化疗为主要治疗方式, 但仍有相当部分的患者由于肿瘤细胞化疗耐药性的形成, 影响治疗疗效, 导致患者化疗失败及不良预后, 因此对于骨肉瘤细胞化疗抵抗形成机制的研究从未停止^[2]。上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)作为介导上皮恶性肿瘤发生的关键步骤, 参与影响细胞增殖转移及化疗抵抗等恶性行为, 包括骨肉瘤细胞顺铂(cisplatin, DDP)抵抗的形成^[3]。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是近年的热点研究领域, 其在机体内具有庞大的数量并发挥着广泛的生物学作用^[4]。lncRNA HIT是一种高度保守的lncRNA, 在哺乳动物胚胎组织中高表达并参与胚胎肢体及器官的发育。近年有研究^[5]指出, HIT在多种恶性肿瘤中重新表达且影响恶性肿瘤的发生发展, 但其在骨肉瘤中的研究尚为空白。本研究通过分子生物技术手段对HIT与骨肉瘤细胞EMT及DDP抵抗的关系进行了探究, 为揭示骨肉瘤细胞DDP抵抗发生的确切机制提供新的依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象及其临床材料

选择天津医院骨科2017年6月至2018年6月42例骨肉瘤组织及相应癌旁组织(距癌变边缘 >5 cm)标本, 术中切除标本后部分置于液氮中保存。患者临床资料: 男性27例, 女性15例; 年龄9~42岁, <25 岁患者30例, >25 岁患者12例; 存在肺转移的患者33例, 无肺转移患者9例; Enneking分期: IIA期8例、IIB

期23例、III期11例; 所有患者均具有手术指征, 经影像、病理及临床症状确诊为骨肉瘤, 且术前未经任何形式的抗肿瘤治疗, 患者及家属对本研究知情同意并签署知情同意书, 研究程序由医院伦理委员会审查批准。

1.2 细胞株与主要试剂

人骨肉瘤细胞系U2OS(HTB-96TM, 美国ATCC公司), 人肾上皮细胞系293T(CRL-3216TM, 美国ATCC公司)。注射用DDP(齐鲁制药有限公司), DMEM High Glucose培养基(美国Sigma-Aldrich公司), 注射用青霉素钠(山西联邦制药有限公司), 注射用硫酸链霉素(西安利君制药有限责任公司), TRIzol试剂(美国Invitrogen公司), Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(美国Roche公司), SYBR Green I(日本TaKaRa公司), 引物合成(上海生工生物工程技术有限公司), 慢病毒载体、HIT siRNA载体构建及HIT过表达载体(苏州吉玛基因股份有限公司), Lipofectamine[®] RNAiMAX(美国Thermo Fisher Scientific公司), Ripa裂解液、BCA试剂盒及噻唑兰(Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)试剂(上海碧云天生物技术有限公司), Anti-Snail(SAB1306281, 美国Sigma-Aldrich公司), Anti-E-cadherin(Ab#3195, 美国Cell Signaling Tech公司), Anti- β -Actin(A2228, 美国Sigma-Aldrich公司), 羊抗兔IgG H&L(HRP)(ab6721)、兔抗鼠IgG H&L(HRP)(ab6728)、Protein A Magnetic蛋白A磁珠(ab214286), (美国Abcam公司), ECL化学发光底物(美国Thermo Pierce公司)。

1.3 细胞培养及分组处理耐药

U2OS及293T细胞采用10%FBS+DMEM培养基+100 U/ml青霉素+100 μ g/ml链霉素, 在相对湿

度100%、37℃、5% CO₂环境下培养。抵抗组细胞采用0.5、1、2、4、8 μg/ml DDP进行诱导,每级质量浓度诱导2周以上,待细胞达到对数生长时常规培养3 d后进行下级浓度筛选,对照组细胞则采用同体积的生理盐水处理。进一步通过脂质体Lipofectamine® RNAiMAX介导两组HIT siRNA慢病毒载体转染至抵抗组细胞中,作为干扰A组及B组细胞;同时,介导HIT过表达载体及空白载体转染至U2OS亲本细胞中,分别作为过表达组及空白组。

1.4 qRT-PCR检测骨肉瘤组织及相应癌旁组织中HIT、Snail、E-钙黏蛋白(E-cadherin)mRNA表达水平

TRIzol法抽提组织及细胞中总RNA,取1 μg RNA逆转录,逆转录产物为cDNA模板,稀释合成引物至0.5 μmol/L,引物序列为HIT F:5'-ACAAC-TGAAAAGGTTTCGAGGA-3', R:5'-CTGGTTTTCATTTGCCACAGG-3'; Snail F:5'-GGCCTTCAACT-GCAAATACT-3', R:5'-TTGACATCTGAGTGGGTCTG-3'; E-cadherin F:5'-AACGCATTGCCACATACAC-3', R:5'-AACGCATTGCCACATACAC-3'; β -actin F:5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3', R:5'-GCTGTCACCTTCACCGTTCC-3'。根据荧光染料SYBR Green I要求的体系于8连管中进行上样,qRT-qPCR反应程序设置:95℃ 5 min;95℃ 15 s,60℃ 30 s,4℃、40个循环。设置3个重复孔,循环完成后采集各孔 Δ CT值,以 β -actin为内参基因计算相对表达量。实验重复3次。

1.5 MTT法检测细胞DDP IC₅₀值

接种 2×10^3 细胞与96孔板,设置5个重复孔,待细胞贴壁后,0、1、2、4、8、16 μg/ml DDP处理各组细胞24 h,MTT试剂与10%FBS+DMEM培养基1:9混合,更换原培养基,避光37℃孵育2 h,检测波长490 nm处的光密度(D)值,以每组细胞0 μg/ml DDP浓度D值作标准化基线,计算各组细胞IC₅₀值。实验重复3次。

1.6 Western blotting实验检测细胞蛋白表达水平

Ripa裂解液裂解细胞收集总蛋白,BCA试剂盒检测总蛋白浓度,取40 μg蛋白进行稳压120 V的10%聚丙烯酰胺凝胶电泳,稳流260 mA转至硝酸纤维素膜(NC膜),10%脱脂牛奶室温封闭2 h,1:1 000抗体4℃脱色摇床孵膜14 h,PBS洗膜3次,二抗室温孵膜2 h,PBS洗膜3次,ECL A及B液1:1混合,均匀孵膜10 s,GelDoc XR Biorad凝胶成像系统进行灰度扫描,以各基因与内参基因 β -actin的灰度比值作为各基因的相对表达量。实验重复3次。

1.7 RNA结合蛋白免疫沉淀(RNA binding protein immunoprecipitation, RNA-IP)术检测HIT与Snail蛋

白结合情况

收集对数生长期U2OS及293T细胞,预冷PBS吹打洗涤细胞,4℃、800×g离心5 min,200 μl RIP裂解液+10%蛋白酶抑制剂冰上处理细胞10 min,BCA试剂盒测蛋白浓度,取30~40 μg蛋白作为Input,取1 mg蛋白作为IgG及Snail组,分别向IgG及Snail组蛋白中加入10 μl免疫磁珠4℃预清除2~3 h,加入IgG及Snail抗体2 μg,4℃摇转14 h,30 μl免疫磁珠4℃摇转2 h,4℃、2 500×g离心30 s,弃上清后400 μl RIP buffer重悬免疫磁珠,PBS洗磁珠3次,TRIzol提取样本总RNA进行qRT-qPCR实验检测HIT的表达,以Input样本中HIT的表达为内参,计算IgG及Snail组蛋白中HIT的相对表达量。实验重复3次。

1.8 统计学处理

采用SPSS18.0软件行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析及SNK-q检验,相关性分析采用Pearson相关进行验证,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨肉瘤组织及癌旁组织HIT及Snail、E-cadherin mRNA的表达水平及比较

qRT-qPCR检测结果(图1)显示,骨肉瘤组织中HIT和Snail mRNA的表达水平显著高于癌旁组织(0.043 ± 0.005 vs 0.022 ± 0.003 , $t=3.503$, $P < 0.01$)、(0.219 ± 0.018 vs 0.079 ± 0.011 , $t=6.280$, $P < 0.01$);骨肉瘤组织E-cadherin mRNA相对表达量显著低于癌旁组织(0.223 ± 0.025 vs 0.380 ± 0.050 , $t=2.798$, $P < 0.01$)。

2.2 骨肉瘤组织中HIT表达水平与E-cadherin mRNA表达水平呈负相关

Pearson相关结果(图2)显示,HIT与Snail mRNA表达无显著相关性($R^2=0.152$, $P > 0.05$),与E-cadherin mRNA表达呈负相关($R^2=-0.437$, $P < 0.01$)。

2.3 抵抗组细胞DDP IC₅₀值显著高于其他各组

MTT检测结果显示,抵抗组细胞DDP IC₅₀值显著高于对照组、干扰A组及干扰B组[(6.38 ± 0.47 vs 2.62 ± 0.18 、 4.16 ± 0.31 、 3.85 ± 0.33) μg/ml,均 $P < 0.01$,图3A],而干扰A组及干扰B组细胞DDP IC₅₀显著高于对照组($P < 0.05$)。过表达组细胞DDP IC₅₀显著高于空白组[(3.97 ± 0.30 vs 2.55 ± 0.16) μg/ml, $P < 0.05$,图3B]。

2.4 各组细胞HIT、Snail及E-cadherin mRNA的表达水平及比较

qRT-qPCR结果(图4A、B)显示,抵抗组细胞HIT mRNA表达水平显著高于对照组,干扰A组及B组细

胞显著低于抵抗组及对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 抵抗组、干扰 A 组及 B 组细胞 Snail mRNA 表达显著高于对照组细胞; 抵抗组细胞 E-cadherin mRNA 表达显著

低于对照组、干扰 A 组及 B 组细胞。过表达组 HIT 表达显著高于空白组细胞, E-cadherin mRNA 表达显著低于空白组细胞(均 $P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

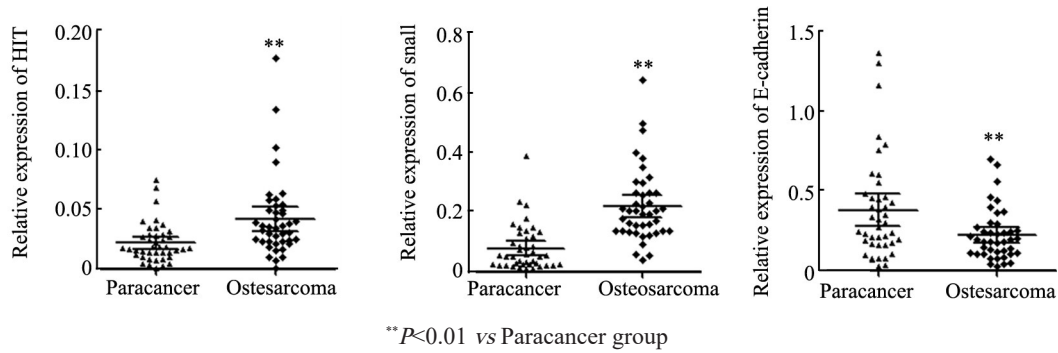


图1 骨肉瘤组织及癌旁组织 HIT 及 Snail、E-cadherin mRNA 的表达水平

Fig. 1 mRNA expressions of HIT and Snail, E-cadherin in osteosarcoma tissues and paracancer tissues

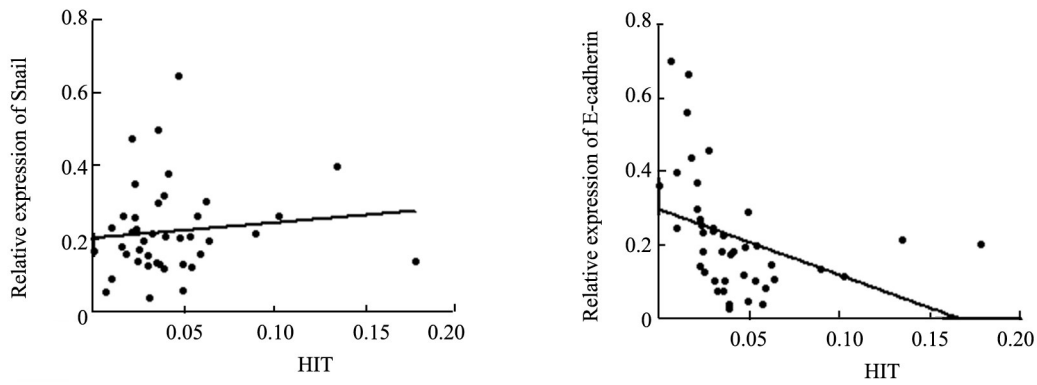
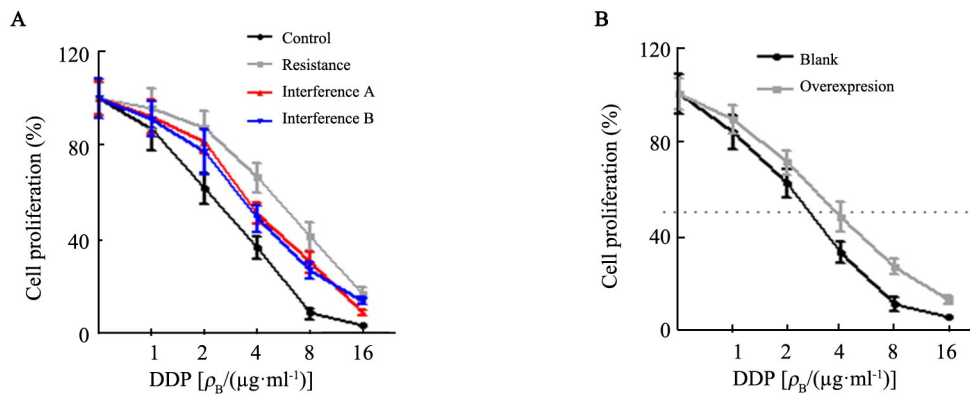


图2 骨肉瘤组织 HIT 与 Snail、E-cadherin mRNA 表达水平的相关性分析

Fig. 2 Correlation analysis of mRNA expressions of HIT and Snail, E-cadherin in osteosarcoma tissues



A: Cells with DDP-resistance; B: Cells with HIT over-expression

图3 各组细胞 DDP IC₅₀ 的比较

Fig. 3 Comparison of DDP IC₅₀ in each group of cells

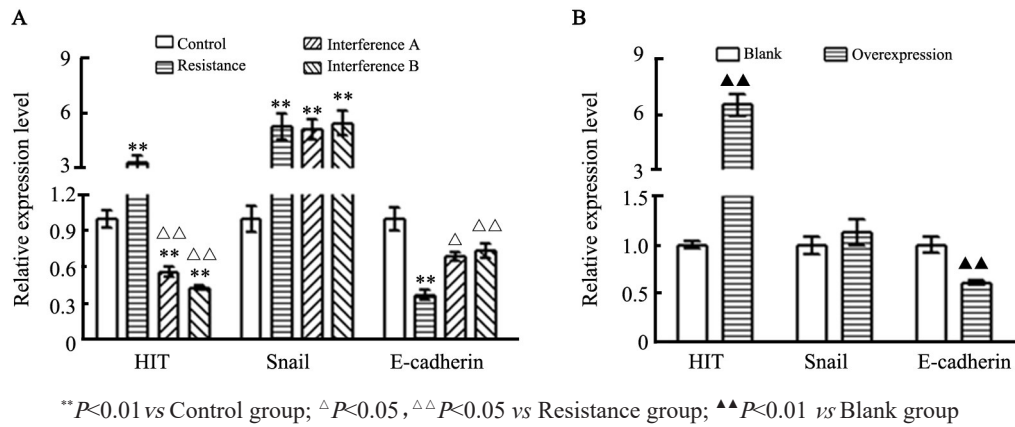
2.5 各组细胞 Snail 及 E-cadherin 蛋白表达水平及比较

Western blotting 检测结果(图5)显示,抵抗组细胞 Snail 蛋白表达水平显著高于对照组、干扰 A 组及干扰 B 组(1.322 ± 0.089 vs 0.194 ± 0.026 、 0.515 ± 0.053 、

0.348 ± 0.035 , $P<0.01$); 抵抗组细胞 E-cadherin 表达显著低于对照组、干扰 A 组及 B 组细胞(0.136 ± 0.017 vs 0.846 ± 0.087 、 0.374 ± 0.038 、 0.569 ± 0.062 , $P<0.01$)。过表达组细胞 Snail 蛋白表达水平显著高于空白组

(0.439 ± 0.041 vs 0.112 ± 0.025 , $P < 0.01$)。过表达组细胞 E-cadherin 蛋白表达水平显著低于空白组 ($0.050 \pm$

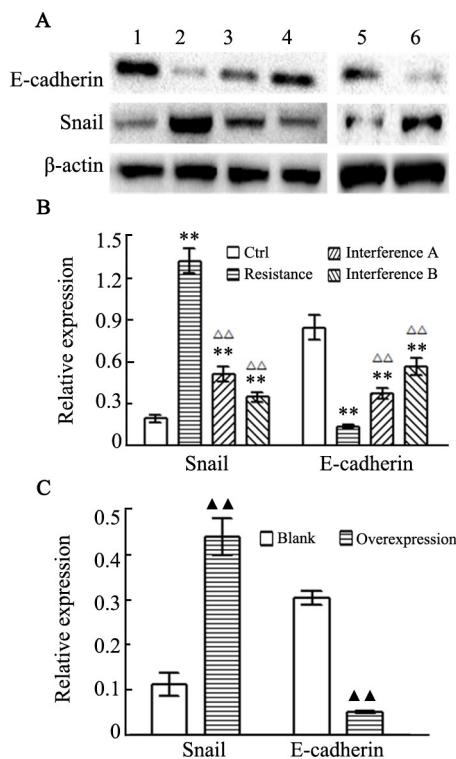
0.003 vs 0.304 ± 0.016 , $P < 0.01$)。



A: Cells with DDP-resistance; B: Cells with HIT over-expression

图4 各组细胞 HIT 及 Snail、E-cadherin mRNA 的表达水平

Fig. 4 mRNA expressions of HIT and Snail, E-cadherin in each group of cells



** $P < 0.01$ vs Ctrl group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Resistance group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Blank group

A: Western blotting; B: Cells with DDP-resistance;

C: Cells with HIT over-expression

1: Ctrl; 2: Resistance; 3: Interference A; 4: Interference B;

5: Blank; 6: Overexpression

图5 各组细胞 Snail 及 E-cadherin 蛋白表达水平

Fig. 5 Protein expressions of Snail and E-cadherin in each group of cells

RNA-IP 检测结果(图6)显示,在 U2OS 及 293T 细胞中,免疫磁珠介导 Anti-Snail 抗体下调 HIT 蛋白的表达水平显著高于对照 IgG 抗体下调的差值 ($P < 0.01$)。

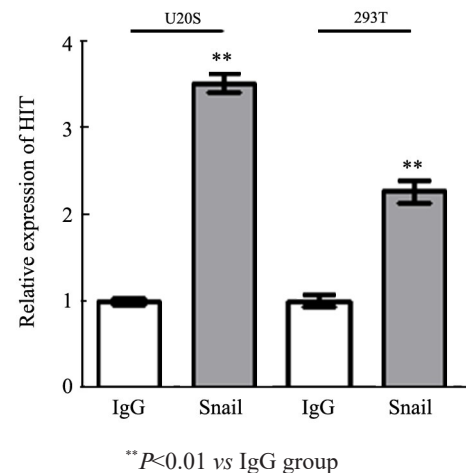


图6 Snail 及 IgG 抗体对 HIT 蛋白表达水平下调差值的影响

Fig. 6 Effect of Snail and IgG antibody on the down-regulation of HIT protein expression

3 讨论

lncRNA 是一类转录长度大于 200 nt 的非编码 RNA,其可与 DNA、RNA 及蛋白质相互结合,在转录及转录后水平发挥表观遗传调控作用^[6]。多种 lncRNA 被发现参与骨肉瘤的发生发展。lncRNA MALAT1 在骨肉瘤组织中表达上调,体外敲降 MALAT1 后细胞增殖和侵袭能力显著降低,同时增殖细胞核抗原(PCNA)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)、磷酸化 PI3K 和 AKT 的表达受到明显抑制^[7];lncRNA

2.6 HIT 与 Snail 蛋白的结合情况

HOTAIR 同样高表达于骨肉瘤组织中, 与患者肿瘤分期、组织学分级及预后密切相关, 敲降 HOTAIR 表达后细胞体内外转移能力及 MMP-2/MMP-9 分子表达受到抑制^[8]; lncRNA PVT1 则可通过负调控微小 RNA-195 (miRNA-195) 促进骨肉瘤细胞周期并抑制凋亡, 介导细胞恶性增殖及转移^[9]; lncRNA MEG3 在骨肉瘤组织中表达下调, 其表达与患者临床分期和远处转移率负相关, 且 MEG3 低表达可作为影响患者预后的独立危险因素^[10]。lncRNA HIT 是调控哺乳动物早期肢体发育的关键分子, 在成熟组织及细胞中低表达^[9]。近年有研究^[11]显示, HIT 在多种恶性肿瘤组织中表达重新上调, 包括乳腺癌及非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC), 且可通过不同途径在肿瘤细胞中发挥生物学作用: HIT 受到转化生长因子 β (TGF- β) 的调控, 敲降 HIT 表达后乳腺癌细胞 NMuMG 迁移、侵袭和 EMT 均受到显著抑制, 同时, HIT 可通过调控转录因子 E2F1 进而调控相关靶基因, 促进 NSCLC 细胞的增殖^[12]。但 HIT 在骨肉瘤中的生物学效应尚不明确。EMT 是上皮来源恶性肿瘤形成的关键步骤, 与肿瘤细胞恶性表型及放化疗抵抗密切相关。E-cadherin 是细胞间黏附连接的关键分子, 作为 EMT 最重要的分子标志物之一, 其在多种恶性肿瘤中表达下调, 进而介导细胞侵袭转移及放化疗抵抗的形成^[13-14]; Snail 则可作为转录因子与 E-cadherin 启动子上游 E-box 元件结合, 抑制 E-cadherin 的转录^[15], 同样是 EMT 关键的标志物之一。EMT 同样是骨肉瘤细胞化疗抵抗的关键因素。李玉椿等^[16]在研究中发现, lncRNA H19 可通过上调波形蛋白 (Vimentin) 及 N-cadherin 表达, 促进骨肉瘤细胞 DDP 耐药。有研究^[17]发现, S 期激酶相关蛋白 2 (s-phase kinase-associated protein 2, Skp2) 同样可促进骨肉瘤细胞 EMT 表型, 介导细胞甲氨蝶呤耐药的发生。基于 HIT 潜在的原癌作用, 本研究在临床组织中及体外水平探究了 HIT 与骨肉瘤细胞 EMT 及 DDP 抵抗的关系。

本研究在 42 例骨肉瘤组织及癌旁组织中检测了 HIT 的表达, 发现骨肉瘤组织中 HIT 表达显著上调, 提示 HIT 可能参与骨肉瘤的发生发展, 同时骨肉瘤组织中 EMT 标志物 Snail 表达增高, 与 HIT 表达无显著相关性, 而 E-cadherin 表达下调, 并与 HIT 表达负相关。表明 HIT 表达与骨肉瘤 EMT 进展存在潜在关系, 但确切调控机制不明确。基于 EMT 与肿瘤细胞化疗抵抗的密切联系, 本研究在体外构建了 DDP 抵抗的骨肉瘤细胞系, 发现 DDP 抵抗细胞中 HIT 表达上调, 且伴随 Snail mRNA 及蛋白表达的上调及 E-cadherin mRNA 及蛋白表达的下调, 提示 HIT 可能通

过影响细胞 EMT 表型, 影响骨肉瘤细胞的化疗抵抗。为了进一步明确 HIT 对 EMT 相关分子的调控作用, 通过慢病毒转染 siRNA 敲降了 DDP 抵抗细胞中 HIT 的表达, 发现细胞 DDP IC₅₀ 显著降低, 提示细胞 DDP 敏感性增加, 化疗抵抗能力减弱, 同时在亲本细胞中过表达 HIT 水平, 发现细胞 DDP IC₅₀ 显著增高, DDP 抵抗能力增强, 表明 HIT 在骨肉瘤 DDP 抵抗形成的过程中发挥着重要的促进作用。进而对 EMT 标志物进行了检测, 发现敲降及过表达 HIT 对 Snail mRNA 表达无显著影响, 但可正调控 Snail 蛋白的表达水平, 并负调控 E-cadherin mRNA 及蛋白表达水平, 提示 HIT 对 Snail 可能存在翻译后调控机制, 进而影响 E-cadherin 的转录。因此, 进一步通过 RIP 实验发现 HIT 可与 Snail 蛋白可相互结合。上述研究表明, HIT 可通过促进 Snail 蛋白表达、抑制 E-cadherin 的转录活性, 进而介导骨肉瘤细胞 DDP 抵抗。在接下来的工作中, 本课题组将进一步探究 HIT 对 Snail 蛋白的调控机制, 并通过动物模型证实 HIT 对体内 DDP 敏感性的影响, 为 HIT 作为骨肉瘤分子诊断标志物及靶向药物的开发提供前期实验依据。

[参考文献]

- [1] 张鸿程, 宋广元, 谈伟健, 等. lncRNA HOXA11-AS 对骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(5): 497-502. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.05.007.
- [2] 符策岗, 赵红卫, 刘扬, 等. 骨肉瘤继发性化疗耐药机制的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2015, 31(14): 2387-2388. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2015.14.048.
- [3] SHANG Y, CAI X, FAN D. Roles of epithelial-mesenchymal transition in cancer drug resistance[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2013, 13(9): 915-929. DOI: 10.2174/15680096113136660097.
- [4] YANG G, LU X, YUAN L. lncRNA: a link between RNA and cancer [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1839(11): 1097-1109. DOI: 10.1016/j.bbagr.2014.08.012.
- [5] CARLSON H L, QUINN J J, YANG Y W, et al. lncRNA-HIT functions as an epigenetic regulator of chondrogenesis through its recruitment of p100/CBP Complexes[J/OL]. PLoS Genetics, 2015, 11(12): e1005680 [2018-09-10]. <http://journals.plos.org/plosgenetics/article/10.1371/journal.pgen.1005680>. DOI: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1005680.
- [6] BASSETT A R, AKHTAR A, BARLOW D P, et al. Considerations when investigating lncRNA function in vivo[J]. Elife, 2014, 3(8): 3058-3066. DOI: 10.7554/eLife.3058.
- [7] DONG Y, LIANG G, YUAN B, et al. MALAT1 promotes the proliferation and metastasis of osteosarcoma cells by activating the PI3K/AKT pathway[J]. Tumor Biol, 2015, 36(3): 1477-1486. DOI: 10.1007/s13277-014-2631-4.
- [8] BO W, YUN S, YANG Q, et al. Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR promotes tumor growth and metastasis in human osteosarcoma[J]. Mol Cells, 2015, 38(5): 432-440. DOI: 10.14348/

- molcells.2015.2327.
- [9] QUAN Z, CHEN F, ZHAO J, et al. Long non-coding RNA PVT1 promotes osteosarcoma development by acting as a molecular sponge to regulate miR-195[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(50): 82620-82633. DOI: 10.18632/oncotarget.13012.
- [10] TIAN Z Z, GUO X J, ZHAO Y M, et al. Decreased expression of long non-coding RNA MEG3 acts as a potential predictor biomarker in progression and poor prognosis of osteosarcoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 8(11): 15138-15142. DOI: 10.13691/Exp Pathol/26823857.
- [11] RICHARDS E J, ZHANG G, LI Z P, et al. Long non-coding RNAs (lncRNA) regulated by transforming growth factor (TGF) β : lncRNA-HIT-mediated TGF β -induced epithelial to mesenchymal transition in mammary epithelia[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(11): 6857-6867. DOI: 10.1074/jbc.M114.610915.
- [12] YU L, FANG F, LU S, et al. lncRNA-HIT promotes cell proliferation of non-small cell lung cancer by association with E2F1[J]. *Cancer Gene Ther*, 2017, 24(5): 221-226. DOI: 10.1038/cgt.2017.10.
- [13] KAUFHOLD S, BONAVIDA B. Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2014, 33(1): 62-68. DOI: 10.1186/s13046-014-0062-0.
- [14] MALLINI P, LENNARD T, KIRBY J, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition: what is the impact on breast cancer stem cells and drug resistance[J]. *Cancer Treat Rev*, 2014, 40(3): 341-348. DOI: 10.1186/bcr2896.
- [15] CANO A, PÉREZMORENO M A, RODRIGO I, et al. The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression[J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(2): 76-83. DOI: 10.1038/35000025.
- [16] 李玉椿. 长链非编码RNA H19对骨肉瘤顺铂化疗敏感性的影响及机制[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(24): 6043-6046. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2017.24.017.
- [17] 潘海霞, 杨兰, 胡洪林, 等. lncRNAN CRNA00173在骨肉瘤组织中的表达及其临床意义[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(8): 884-888. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.08.012.
- [18] 郝俊龙, 王亚鹏, 杨凯, 等. 葡萄糖转运蛋白-1通过Wnt/ β -catenin通路促进骨肉瘤MG63细胞迁移[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(5): 469-474. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.05.005.
- [19] DING L, WANG C, CUI Y, et al. S-phase kinase-associated protein 2 is involved in epithelial-mesenchymal transition in methotrexate-resistant osteosarcoma cells[J]. *Int J Oncol*, 2018, 52(6): 1841-1852. DOI: 10.3892/ijo.2018.4345.

[收稿日期] 2018-06-19

[修回日期] 2018-10-18

[本文编辑] 王映红