

# 沉默 Runt 相关转录因子 3 对骨肉瘤细胞恶性程度的影响

李智勇 范彬彬 陈郁鲜 路云翔 王德玉

**【摘要】 目的** 探讨沉默 Runt 相关转录因子 3 (RUNX3) 对骨肉瘤细胞增殖能力及血管新生能力的影响。**方法** 培养骨肉瘤 HEK293 细胞株并将其分为 NC 组和 RUNX3 组, 分别转染阴性对照小干扰 RNA (siRNA) 和 RUNX3-siRNA。于转染 siRNA 后 6、12、24、48 h 采用 MTS 试剂盒测定细胞增殖活力; 转染 siRNA 后 24、48 h 采用荧光定量 PCR 试剂盒测定细胞中增殖分子  $\beta$ -链蛋白、细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1)、增殖细胞核抗原 (PCNA) 的 mRNA 表达量, 采用 ELISA 试剂盒测定细胞培养基中血管内皮生长因子 (VEGF)、成纤维细胞生长因子 (bFGF)、促血管生成素-2 (Ang-2) 的含量。**结果** 转染 siRNA 后 6、12、24、48 h RUNX3 组的细胞增殖活力值均高于 NC 组 ( $0.78 \pm 0.11$  vs.  $0.57 \pm 0.09$ ,  $0.99 \pm 0.14$  vs.  $0.73 \pm 0.10$ ,  $1.31 \pm 0.18$  vs.  $0.81 \pm 0.12$ ,  $1.72 \pm 0.26$  vs.  $0.98 \pm 0.14$ ,  $P$  均  $< 0.05$ ); 转染 siRNA 后 24、48 h RUNX3 组细胞中  $\beta$ -链蛋白、CyclinD1、PCNA 的 mRNA 表达量以及细胞培养基中 VEGF、bFGF、Ang-2 的含量均高于 NC 组 ( $P$  均  $< 0.05$ )。**结论** 沉默 RUNX3 能够增强骨肉瘤细胞的增殖能力及血管新生能力。

**【关键词】** 骨肉瘤; Runt 相关转录因子 3; 增殖; 血管新生

**Effect of silencing Runt-related transcription factor 3 on malignancy of osteosarcoma cells** Li Zhiyong, Fan Binbin, Chen Yuxian, Lu Yunxiang, Wang Deyu. Department of Joint Surgery/Orthopedic Trauma, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China

Corresponding author, Li Zhiyong, E-mail: doclizhiyong8369@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of silencing Runt-related transcription factor 3 (RUNX3) on the proliferation and angiogenesis of osteosarcoma cells. **Methods** Osteosarcoma cell line HEK293 was divided into the NC group (transfected with negative control-siRNA) and RUNX3 group (transfected with RUNX3-siRNA). At 6 h, 12 h, 24 h and 48 h after transfection with siRNA, cell proliferation was determined by MTS kit. At 24 h and 48 h after transfection with siRNA, the expression levels of  $\beta$ -chain protein, CyclinD1 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) mRNA were measured by fluorescent quantitative PCR kit. The content of vascular endothelial growth factor (VEGF), promote angiogenin-2 (Ang-2) and fibroblast growth factor (bFGF) in the culture medium was quantitatively determined by enzyme-linked immunosorbent assay kit. **Results** At 6 h, 12 h, 24 h and 48 h after transfection with siRNA, the activity of cell proliferation in the RUNX3 group was significantly higher than that in the NC group ( $0.78 \pm 0.11$  vs.  $0.57 \pm 0.09$ ,  $0.99 \pm 0.14$  vs.  $0.73 \pm 0.10$ ,  $1.31 \pm 0.18$  vs.  $0.81 \pm 0.12$ ,  $1.72 \pm 0.26$  vs.  $0.98 \pm 0.14$ , all  $P < 0.05$ ). At 24 h and 48 h after transfection with siRNA, the expression levels of  $\beta$ -chain protein, CyclinD1 and PCNA mRNA in cells and VEGF, Ang-2 and bFGF in the cultured medium in the RUNX3 group were significantly higher compared with those in the NC group (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Silencing RUNX3 can enhance the proliferation and angiogenesis of osteosarcoma cells.

**【Key words】** Osteosarcoma; Runt-related transcription factor 3; Proliferation; Angiogenesis

骨肉瘤是骨科最常见的原发性恶性肿瘤,好发于儿童及青少年,具有较高的致残率和病死率。骨肉瘤组织中细胞恶性增殖以及新生血管形成是导致病情进展的重要生物学行为,多种增殖分子以及血管新生分子参与了细胞增殖以及新生血管形成过程的调控<sup>[1-2]</sup>。但是,增殖分子以及血管新生分子的上游调控分子目前仍未明确。Runt 相关转录因子 3 (RUNX3) 是 Runt 相关转录因子家族的成员之一,由  $\alpha$  亚单位和  $\beta$  亚单位构成,能够靶向结合 DNA 序列并调节基因的转录和表达,进而发挥相应的生物学效应<sup>[3]</sup>。近年来关于 RUNX3 的研究显示该转录因子具有抑癌基因的活性,在多种恶性肿瘤中呈低表达趋势并且参与恶性肿瘤病灶中细胞增殖、血管新生过程的调控<sup>[4-5]</sup>。尽管如此,RUNX3 是否参与骨肉瘤病灶中细胞增殖、血管新生过程的调控仍未见明确报道。在本研究中,我们通过转染小干扰 RNA (siRNA) 的方式沉默骨肉瘤细胞中 RUNX3 的表达,进而分析沉默 RUNX3 对骨肉瘤细胞增殖能力及血管新生能力的影响。

## 材料与方法

### 一、实验材料

骨肉瘤 HEK293 细胞株购买于中国科学院上海细胞库,DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶均购买于 Gibco 公司,siRNA 由上海吉玛公司合成,转染试剂盒为 Lipofectamine™2000 脂质体、购买于 Invitrogen 公司;MTS 细胞活力检测试剂盒购买于 Promega 公司,RNA 抽提试剂盒、互补 DNA (cDNA) 第一链合成试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒购买于北京康为世纪生物公司,ELISA 试剂盒购买于上海西唐生物公司,RIPA 蛋白裂解液及 BCA 蛋白定量试剂盒购买于上海碧云天生物公司。

### 二、实验方法

#### 1. 细胞培养、分组及处理方法

骨肉瘤 HEK293 细胞株复苏后用含有 5% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养,2~3 d 更换 1 次培养基,待细胞密度生长至 80%~90% 后用胰蛋白酶进行消化传代,传代后将细胞接种在细胞板中并用于转染 siRNA,根据转染 siRNA 不同分为阴性对照-siRNA 组 (NC 组) 和 RUNX3-siRNA 组 (RUNX3 组),NC 组转染阴性对照 siRNA、RUNX3 组转染 RUNX3-siRNA。

#### 2. 细胞活力检测方法

将用于细胞活力检测的细胞接种在 96 孔细胞板中,分别于转染 siRNA 后 6、12、24、48 h 向培养孔内加入 MTS 细胞活力检测试剂盒的检测液 20  $\mu$ l,在培养箱中继续孵育 3~4 h,而后在酶标仪上读取 450 nm 波长处的吸光值,以该吸光值作为细胞增殖活力值。

#### 3. 细胞增殖分子 mRNA 表达量的检测方法

将用于细胞活力检测的细胞接种在 12 孔细胞板中,分别于转染 siRNA 后 24、48 h 弃去培养基、收集细胞,采用 RNA 抽提试剂盒和 cDNA 第一链合成试剂盒进行实验,分离提取细胞中的总 RNA 并逆转录合成为 cDNA;而后采用酶联免疫吸附试剂盒对 cDNA 样本进行扩增,扩增的基因分别为  $\beta$ -链蛋白、细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1)、增殖细胞核抗原 (PCNA) 以及  $\beta$ -actin,以  $\beta$ -actin 为内参、计算细胞中  $\beta$ -链蛋白、CyclinD1、PCNA 的 mRNA 表达量。

#### 4. 细胞培养基中血管新生分子的检测方法

将用于细胞活力检测的细胞接种在 24 孔细胞板中,分别于转染 siRNA 后 24、48 h 收集培养基并采用 ELISA 试剂盒测定血管内皮生长因子 (VEGF)、成纤维细胞生长因子 (bFGF)、促血管生成素-2 (Ang-2) 的含量;保留细胞、加入蛋白裂解液并充分裂解细胞,采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定细胞裂解液中总蛋白的含量。计算每 mg 总蛋白中 VEGF、bFGF、Ang-2 的含量。

### 三、统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件录入细胞增殖活力、增殖分子 mRNA 表达量、血管新生分子含量的数据并进行分析,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间上述数据的分析采用  $t$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、细胞增殖活力值

转染 siRNA 后 6、12、24、48 h, RUNX3 组的细胞增殖活力值均高于 NC 组 ( $P$  均  $< 0.05$ ),见图 1。

### 二、细胞中增殖分子的 mRNA 表达量

转染 siRNA 后 24、48 h, RUNX3 组细胞中  $\beta$ -链蛋白、CyclinD1、PCNA 的 mRNA 表达量均高于 NC 组 ( $P$  均  $< 0.05$ ),见表 2。

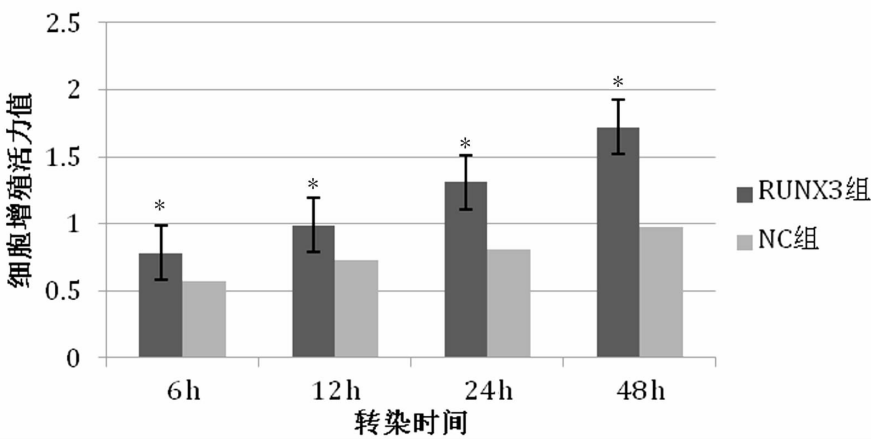


图1 RUNX3 组与 NC 组转染 siRNA 后细胞增殖活力值变化

2 组的细胞在转染 siRNA 后 6、12、24、48 h 增殖活力值均在上升，但 RUNX3 组的细胞增殖活力值始终高于 NC 组，与 NC 组比较，\**P*<0.05

表 2	RUNX3 组与 NC 组转染 siRNA 后增殖分子的 mRNA 表达量 ( $\bar{x} \pm s$ )						$\beta$ -actin
组 别	转染后 24 h			转染后 48 h			
	$\beta$ -链蛋白	CyclinD1	PCNA	$\beta$ -链蛋白	CyclinD1	PCNA	
RUNX3 组	1.95 $\pm$ 0.25	2.24 $\pm$ 0.37	2.09 $\pm$ 0.29	2.82 $\pm$ 0.41	3.18 $\pm$ 0.48	2.91 $\pm$ 0.44	
NC 组	1.00 $\pm$ 0.15	1.00 $\pm$ 0.14	1.00 $\pm$ 0.17	1.42 $\pm$ 0.20	1.39 $\pm$ 0.17	1.46 $\pm$ 0.18	
<i>t</i> 值	6.517	6.269	6.485	6.138	7.030	6.100	
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	

三、细胞培养基中血管新生分子的含量

转染 siRNA 后 24、48 h RUNX3 组细胞培养基

中 VEGF、bFGF、Ang-2 的含量均高于 NC 组 (*P* 均 <0.05)，见表 3。

表 3	RUNX3 组与 NC 组转染 siRNA 后培养基中血管新生分子含量 ( $\bar{x} \pm s$ )					ng/mg 总蛋白
组 别	转染后 24 h			转染后 48 h		
	VEGF	bFGF	Ang-2	VEGF	bFGF	Ang-2
RUNX3 组	7.94 ± 0.92	6.42 ± 0.89	2.58 ± 0.41	10.28 ± 1.84	8.87 ± 1.04	3.93 ± 0.56
NC 组	3.06 ± 0.51	3.31 ± 0.46	1.16 ± 0.17	3.9 ± 0.58	5.21 ± 0.78	1.87 ± 0.27
<i>t</i> 值	9.278	6.209	6.399	6.614	5.631	6.627
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

讨 论

细胞增殖以及血管新生是骨肉瘤重要的生物学行为，也是造成骨肉瘤组织原位生长以及远处转移的生物学基础。目前，关于骨肉瘤组织中细胞增殖以及血管新生的关键调控分子尚未明确。RUNX3 是具有抑癌基因特性的转录因子，由  $\alpha$  亚单位和  $\beta$  亚单位构成，与 DNA 序列结合后能够调控多种基因的表达，进而发挥相应的生物学效应。已有研究显示，在胃癌、结肠癌、乳腺癌组织中 RUNX3 呈低表达趋势且参与病情的发展变化<sup>[46]</sup>。但是，关

于 RUNX3 在骨肉瘤发生和发展中所发挥的作用尚未见报道。为了明确 RUNX3 在骨肉瘤的病情发展变化过程中是否发挥了抑癌基因的作用，我们采用 siRNA 转染的方式来沉默骨肉瘤细胞中 RUNX3 的表达，进而对细胞增殖活力进行了分析，结果显示：转染 siRNA 后 6、12、24、4 h RUNX3 组细胞的增殖活力均高于 NC 组，提示 RUNX3 具有抑癌基因特性，沉默 RUNX3 表达能够削弱其抑癌基因的活性，继而促进骨肉瘤细胞的增殖。

RUNX3 分子结构中的  $\alpha$  亚单位含有 S 型折叠的 RD 结构域并且能与 DNA 序列相互结合， $\beta$  亚

单位则能增强  $\alpha$  亚单位与相应 DNA 的结合。RUNX3 与 DNA 序列结合后能够调节相应 DNA 的转录过程<sup>[7]</sup>。 $\beta$ -链蛋白是受 RUNX3 调节的重要分子, RUNX3 能够减少  $\beta$ -链蛋白表达、抑制其与 T 细胞因子 4 (TCF4) 形成复合物, 进而影响下游细胞增殖相关基因 CyclinD1、PCNA 的表达<sup>[8-9]</sup>。CyclinD1 是调控细胞周期进程的分子, 与细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)4、CDK6 形成复合物后能够加速细胞周期发展、促进细胞增殖; PCNA 是调节 DNA 复制以及细胞周期进程的分子, 一方面能够作为 DNA 聚合酶的辅助蛋白来促进 DNA 复制, 另一方面能够与细胞周期蛋白相互作用并促进细胞周期的发展, 进而促进细胞增殖<sup>[10]</sup>。我们的研究显示, 转染 siRNA 后 24、48 h RUNX3 组细胞中  $\beta$ -链蛋白、CyclinD1、PCNA 的 mRNA 表达量高于 NC 组, 这提示 RUNX3 对骨肉瘤细胞中  $\beta$ -链蛋白及下游 CyclinD1、PCNA 的表达具有抑制作用, 沉默 RUNX3 能够增加  $\beta$ -链蛋白、CyclinD1、PCNA 的表达, 进而促进细胞的增殖。

在骨肉瘤病灶血管新生的过程中, 血管内皮细胞、成纤维细胞的增殖是新生血管形成的基础。已有研究证实, VEGF、bFGF、Ang-2 是调节血管内皮细胞、成纤维细胞生长以及血管新生过程的重要分子<sup>[11-12]</sup>。VEGF 是目前已知促血管新生功能最大的细胞因子, 能够促进内皮细胞增殖以及血管结构的形成, 在肿瘤新生血管形成过程中发挥关键作用; bFGF 对成纤维细胞的增殖以及内皮细胞的增殖均有调控作用, 能够诱导内皮细胞形成管腔结构、成纤维细胞形成血管支持结构; Ang-2 是血管生成素家族中参与新生血管发生的成员, 具有确切的促血管新生作用<sup>[13]</sup>。我们的研究显示, 转染 siRNA 后 24、48 h RUNX3 组细胞培养基中 VEGF、bFGF、Ang-2 的含量均高于 NC 组, 这提示 RUNX3 对骨肉瘤细胞中血管新生分子 VEGF、bFGF、Ang-2 的生成具有抑制作用, 沉默 RUNX3 能够增加 VEGF、bFGF、Ang-2 的生成, 进而促进血管新生过程。

综上所述, 我们认为, RUNX3 在骨肉瘤的病情发展变化过程中具有抑癌基因活性, 沉默 RUNX3 能够增强骨肉瘤细胞的增殖能力及血管新生能力。

# 参 考 文 献

- [1] 任媛媛, 张凌岩, 李英. 骨髓增殖性肿瘤分子靶向治疗策略. 新医学, 2012, 43 (5): 281-284.
- [2] Friebele JC, Peck J, Pan X, Abdel-Rasoul M, Mayerson JL. Osteosarcoma: a meta-analysis and review of the literature. Am J Orthop (Belle Mead NJ), 2015, 44 (12): 547-553.
- [3] Kang JT, Ryu J, Cho B, Lee EJ, Yun YJ, Ahn S, Lee J, Ji DY, Lee K, Park KW. Generation of RUNX3 knockout pigs using CRISPR/Cas9-mediated gene targeting. Reprod Domest Anim, 2016, 51 (6): 970-978.
- [4] Wang N, Sui F, Ma J, Su X, Liu J, Yao D, Shi B, Hou P, Yang Q. Site-specific hypermethylation of RUNX3 predicts poor Prognosis in gastric cancer. Arch Med Res, 2016, 47 (4): 285-292.
- [5] Kim BR, Kang MH, Kim JL, Na YJ, Park SH, Lee SI, Kang S, Joung SY, Lee SY, Lee DH, Min BW, Oh SC. RUNX3 inhibits the metastasis and angiogenesis of colorectal cancer. Oncol Rep, 2016, 36 (5): 2601-2608.
- [6] Song XY, Li BY, Zhou EX, Wu FX. The clinicopathological significance of RUNX3 hypermethylation and mRNA expression in human breast cancer, a meta-analysis. Onco Targets Ther, 2016, 26 (9): 5339-5347.
- [7] Chuang LS, Krishnan V, Ito Y. Aurora kinase and RUNX: Reaching beyond transcription. Cell Cycle, 2016, 15 (22): 2999-3000.
- [8] Wang L, Li D, Liu Y, Wang Y, Cui J, Cui A, Wu W. Expression of RUNX3 and  $\beta$ -catenin in the carcinogenesis of sporadic colorectal tubular adenoma. Tumour Biol, 2014, 35 (6): 6039-6046.
- [9] Wagih HM, El-Ageery SM, Alghaithy AA. A study of RUNX3, E-cadherin and  $\beta$ -catenin in CagA-positive helicobacter pylori associated chronic gastritis in Saudi patients. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19 (8): 1416-1429.
- [10] 桂容花, 徐洪涛, 董贺龙, 罗斌, 李羽西. Dishevelled-1、Cyclin D1 和 CD44v6 在儿童骨肉瘤中的表达及临床意义. 临床肿瘤学杂志, 2016, 21 (9): 785-788.
- [11] 吴羽, 王振虎, 于洋, 李天旺, 赵力. 老年骨肉瘤患者 VEGF、bFGF 和 BMP-2 的表达与意义. 中国老年学杂志, 2015, 35 (17): 4899-4900.
- [12] Babkina IV, Kuznetsov IN, Soloviev YN, Russo EY, Ten EA. Angiogenic factors in blood serum of bone tumor patients. Klin Lab Diagn, 2013, (10): 63-5, 31-3.
- [13] 柴大敏, 鲍正齐, 胡建国, 马莉, 刘福兴, 陶仪声. 骨肉瘤中血管生成拟态和 VEGF-C 的表达及临床意义. 华中科技大学学报 (医学版), 2013, 42 (2): 130-136.

(收稿日期: 2017-02-26)

(本文编辑: 洪悦民)