论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201507098

siRNA 干扰 IRX2 对骨肉瘤细胞增殖的影响及其机制

史继德,李宏维,周 斌,王 颢,张海鸿 (730000 兰州,兰州大学第二医院骨三科)

[摘要] **目的** 探讨易洛魁族同源盒2(iroquois homebox 2, IRX2)基因在骨肉瘤细胞中的表达及其对细胞增殖和细胞周期的影响。**方法** 体外培养骨肉瘤细胞系,应用RT-PCR和Western blot检测各细胞系中IRX2表达;IRX2-siRNA干扰IRX2的表达后,分别用MTT和流式细胞仪检测MG-63细胞的增殖和周期;Western blot检测JAK3和STAT5活化水平。**结果** IRX2在骨肉瘤细胞系中的表达显著高于人成骨细胞系($P<0.05$);沉默IRX2的表达可显著抑制骨肉瘤细胞系MG-63的增殖,促使其S期细胞比例[(23.93±1.92)%]较对照组[(15.84±1.76)%]增加($P<0.05$),而G_2/M期细胞比例[(10.44±1.99)%]较对照组[(23.14±3.19)%]降低($P<0.05$)。IRX2-siRNA可下调p-JAK3和p-STAT5水平($P<0.05$),而过表达IRX2可上调p-JAK3和p-STAT5水平,并促进MG-63细胞增殖($P<0.05$)。在JAK3和STAT5抑制剂的作用下,过表达IRX2对MG-63细胞的促增殖作用显著减弱。**结论** IRX2可部分通过JAK3/STAT5信号通路调控骨肉瘤细胞的增殖。

[关键词] 骨肉瘤;siRNA干扰;细胞增殖;细胞周期;易洛魁族同源盒2基因
[中图法分类号] R394.3;R730.23;R738.1 [文献标志码] A

Effect of IRX2-siRNA interference on cell proliferation in human osteosarcoma and related mechanism

Shi Jide, Li Hongwei, Zhou Bin, Wang Hao, Zhang Haihong (Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730000, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression of iroquois homebox 2 (IRX2) gene and its effect on cell proliferation and cell cycle in human osteosarcoma. **Methods** RT-PCR and Western blotting were used to detect the expression of IRX2 in MG-63 osteosarcoma cell line. IRX2-siRNA was used to interfere with the expression of IRX2 gene, and the cell proliferation and cell cycle were estimated by MTT assay and flow cytometry. The activation of JAK3 and STAT5 was tested by Western blotting. **Results** The expression level of IRX2 was significantly higher in the osteosarcoma cell line than in human osteoblast cell line. IRX2-siRNA-induced IRX2 silencing could markedly inhibit the cell proliferation, significantly elevate the cell percentage in S phase [(23.93±1.92)%] compared with the control [(15.84±1.76)%], and significantly reduce the cell percentage in G_2/M phase [(10.44±1.99)%] compared with the control [(23.14±3.19)%]. IRX2-siRNA remarkably down-regulated p-JAK3 and p-STAT5, while IRX2 overexpression up-regulated p-JAK3 and p-STAT5 and promoted the proliferation of MG-63 cells. With the inhibitors of JAK3 and STAT5, the cell proliferation promoting effect of IRX2 was attenuated. **Conclusion** IRX2 can regulate the cell proliferation of osteosarcoma partly by JAK3/STAT5 signaling pathway.

[**Key words**] osteosarcoma; siRNA interference; cell proliferation; cell cycle; IRX2 gene

Supported by the Project of Innovative Team of Gansu Provincial Department of Science and Technology(2013GS10047) and the Natural Science Foundation of Gansu Provincial Department of Science and Technology(1208RJZA272). Corresponding author: Zhang Haihong, E-mail: aienlifz@163.com

[基金项目] 甘肃省科技厅创新研究群体计划(2013GS10047);甘肃省科技厅自然科学研究基金(1208RJZA272)
[通信作者] 张海鸿,E-mail:aienlifz@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151118.1514.037.html(2015-11-18)

骨肉瘤具有很高的局部浸润和早期转移趋势,转移性骨肉瘤5年生存率仅为10% ~20%[1-2]。因此,寻找新的治疗靶点是骨肉瘤临床治疗的迫切需求。有研究发现易洛魁族同源盒2(iroquois homebox 2, IRX2)基因的表达与部分肿瘤的发展有关[3-4]。IRX主要编码TALE超家族蛋白含高度保守同源盒序列的同源蛋白,包括IRX1 ~6六个家族成员[5]。本研究拟通过siRNA的干扰分析IRX2对骨肉瘤细胞增殖和周期的调节作用和相关机制。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

人骨肉瘤细胞系MG-63、OS732、U-20S、HOS、SAOS-2及人成骨细胞系Hfob1.19均购自美国ATCC,MTT、DMSO、青霉素和链霉素(Sigma公司),SYBR® Premix *Ex Taq*™试剂盒(TaKaRa公司),TRIzol、Lipofectamine 2000、pcDNA3.1(Invitrogen公司),硝酸纤维素膜(BioTEKE公司),兔抗IRX2(Aviva System Biology公司),兔抗p-JAK3、兔抗JAK3、兔抗STAT5和p-STAT5及辣根过氧化物标记的羊抗兔二抗(Santa Cruz公司)。

1.2 细胞培养

将人骨肉瘤细胞系MG-63、OS732、U-20S、HOS、SAOS-2及人成骨细胞系Hfob1.19置于含10%热灭活胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的DMEM培养基、37 ℃、含5% CO_2的培养箱中培养。

1.3 RT-PCR检测

TRIzol提取细胞中总RNA并测定其浓度和纯度后,用逆转录试剂盒将提取的RNA逆转录为cDNA,转录的cDNA置于-20 ℃储存备用。RT-PCR操作步骤参照SYBR® Premix *Ex Taq*™试剂盒说明书进行。RT-PCR反应体系为20 μL体系:2 μL cDNA,上下游引物各0.4 μL,SYBR® Premix *Ex Taq* 10 μL,灭菌蒸馏水7.2 μL。RT-PCR反应程序为:94 ℃预热2 min;94 ℃变性20 s,58 ℃退火15 s,72 ℃延伸15 s共40个循环。以β-actin为阴性对照。IRX2上游引物[6]:5′-ACGCACACCACCGGAATG-3′,下游引物:5′-ATGGATAGGCCGCACTGC-3′,扩增产物大小64 bp。

1.4 siRNA干扰

按照Lipofectamine 2000说明书的操作步骤将IRX2-siRNA和非特异性siRNA(Scramble)转染MG-63细胞,以未转染细胞为对照组。转染24 h后,收集细胞,测定IRX2基因的表达水平。

1.5 MTT检测

细胞增殖采用MTT法进行检测。将MG-63细胞以及转染IRX2-siRNA或Scramble的MG-63细胞1×10^5/mL接种于96孔板中,分别培养24、48、72、96 h,加入MTT(5 mg/mL)并继续培养4 h。然后添加100 μL DMSO。在酶联免疫分析仪上检测光密度值[D(490)]。

1.6 细胞周期分析

将转染IRX2-siRNA、Scramble的MG-63细胞及对照组细胞接种于6孔板中培养24 h后收集细胞,用冷的70%乙醇对细胞进行固定,经PBS清洗后,将细胞悬浮于含PI(500 μg/mL)和RNase A(1 mg/mL)的PBS溶液中并孵育30 min,上流式细胞仪对细胞周期进行分析检测。

1.7 Western blot检测

提取细胞总蛋白并测定蛋白总浓度。电泳,转膜,室温孵育1 h,随后将膜与兔抗IRX2(1∶200)、兔抗p-JAK3、兔抗JAK3、兔抗STAT5和p-STAT5一抗(1∶200)4 ℃孵育过夜,用TBST清洗膜10 min后将膜与辣根过氧化物标记的羊抗兔二抗(1∶1 000)室温孵育1 h,最后用TBST清洗10 min,采用增强化学发光法测定蛋白质的相对量。

1.8 质粒转染

将纯化的IRX2 PCR产物与质粒pcDNA3.1分别用*Eco*R Ⅴ和*Hind* Ⅲ双切酶处理构建真核表达质粒pcDNA3.1-IRX2。将处于对数期的MG-63细胞接种于6孔板中培养,待细胞长至70%汇合时,根据Lipofectamine 2000转染试剂盒说明书将pcDNA3.1空载质粒和pcDNA3.1-IRX2重组质粒分别转染MG-63细胞,以未转染质粒的MG-63细胞为对照组。转染24 h后收集细胞。

1.9 统计学分析

采用SPSS 11.0统计软件,计量资料以$\bar{x} \pm s$表示,进行独立样本t检验或单因素方差分析。

2 结果

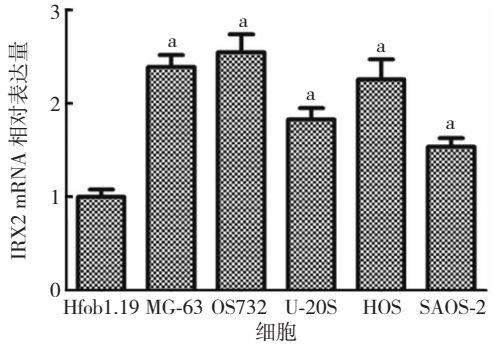
2.1 IRX2在骨肉瘤细胞系中的表达

IRX2在骨肉瘤细胞系中mRNA和蛋白的表达均高于成骨细胞系Hfob1.19($P<0.05$,图1、2)。

2.2 IRX2-siRNA干扰对骨肉瘤细胞增殖的影响

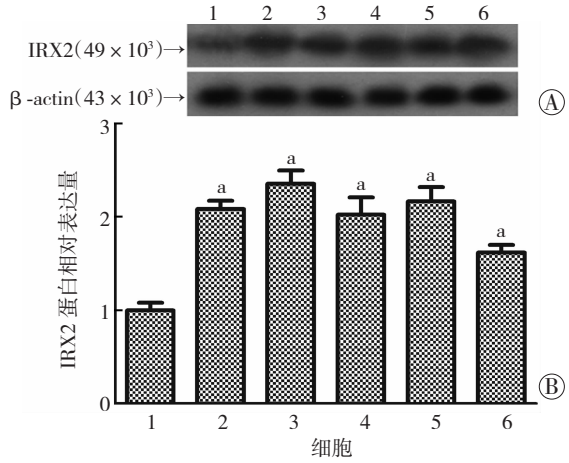
为进一步研究IRX2对骨肉瘤细胞增殖的影响,对MG-63细胞进行体外培养(图3),用IRX2-siRNA沉默IRX2的表达,检测MG-63细胞的增殖。结果发现:IRX2-siRNA使IRX2 mRNA相对表达水平从1.00 ± 0.08下降至0.36 ± 0.06($P<0.05$),而Scramble组IRX2 mRNA表达(1.02 ± 0.05)无变化($P>0.05$)。Western blot结果也显示IRX2-siRNA可沉默IRX2蛋

白的表达($P<0.05$,图4)。IRX2表达沉默后,MG-63细胞的增殖能力降低,且随着培养时间的延长,IRX2-siRNA对细胞增殖的抑制作用具有时间依赖效应($P<0.05$,图5)。



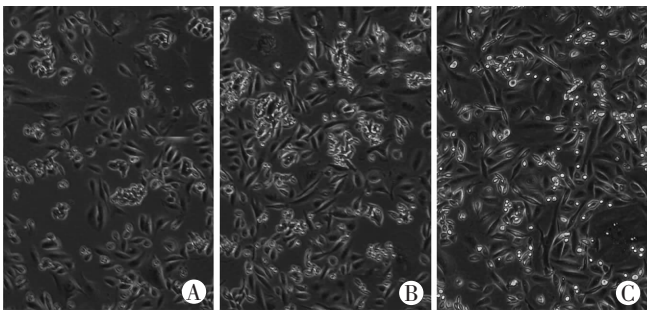
a:$P<0.05$,与Hfob1.19细胞比较

图1 RT-PCR检测各骨肉瘤细胞系中IRX2 mRNA表达



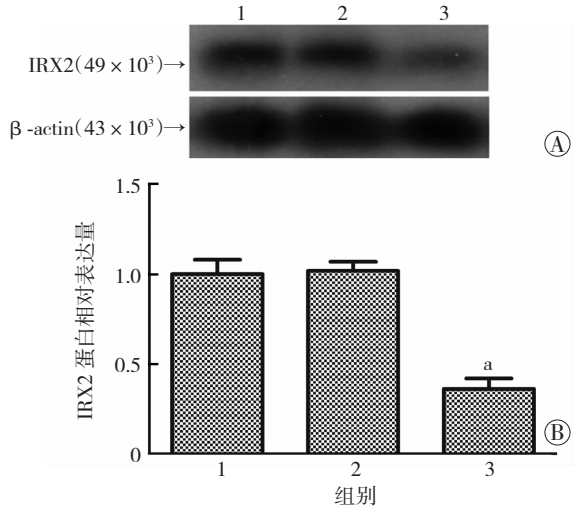
1: Hfob1.19; 2: MG-63; 3: OS732; 4: U-20S; 5: HOS; 6: SAOS-2
A:Western blot检测;B:半定量分析 a:$P<0.05$,与Hfob1.19细胞比较

图2 倒置相差显微镜下观察,Western blot检测各骨肉瘤细胞系中IRX2蛋白表达



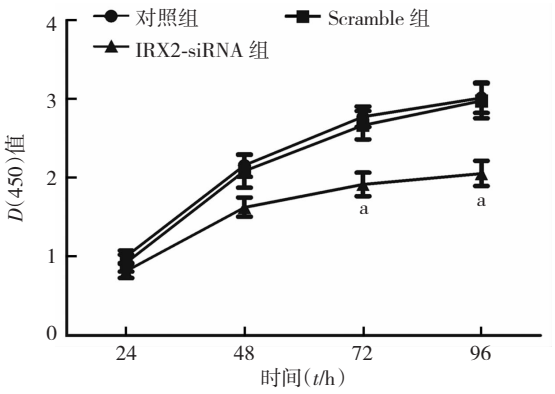
A:对照组;B:Scramble组;C:IRX2-siRNA组

图3 倒置相差显微镜下观察IRX2-siRNA干扰对MG-3细胞形态的影响 (×40)



1: 对照组;2:Scramble组; 3: IRX2-siRNA组
A:Western blot检测;B:半定量分析 a:$P<0.05$,与对照组比较

图4 Western blot检测IRX2-siRNA干扰对IRX2蛋白表达的影响

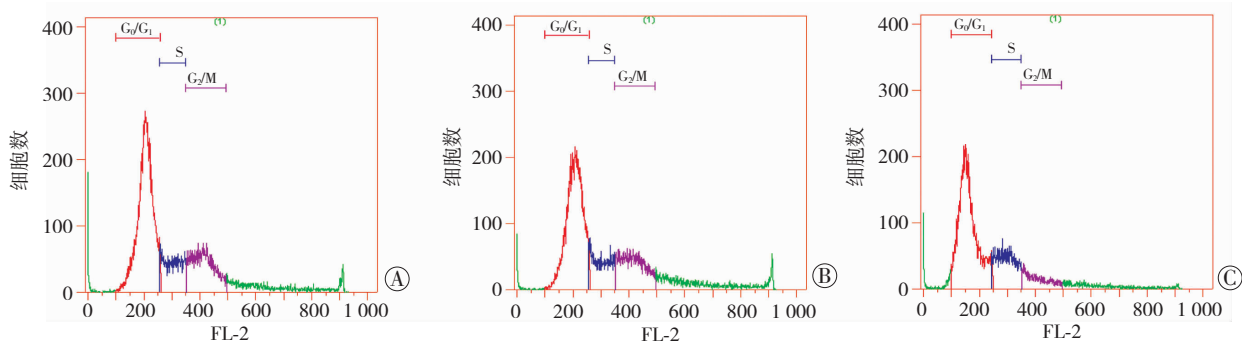


a:$P<0.05$,与对照组比较

图5 MTT检测IRX2-siRNA干扰对MG-3细胞增殖的影响

2.3 IRX2-siRNA干扰对骨肉瘤细胞周期的影响

对照组G_0/G_1期细胞比例为(61.03±11.26)%,S期为(15.84±1.76)%,G_2/M期为(23.14±3.19)%。IRX2-siRNA作用24 h后,G_0/G_1期细胞比例[(65.64±7.39)%]略有增加,但与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);S期细胞比例[(23.93±1.92)%]增加,而G_2/M期[(10.44±1.99)%]减少,与对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。Scramble组细胞各期比例[G_0/G_1:(57.95±5.78)%;S:(17.34±1.31)%;G_2/M:(24.68±2.57)%]与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$,图6)。

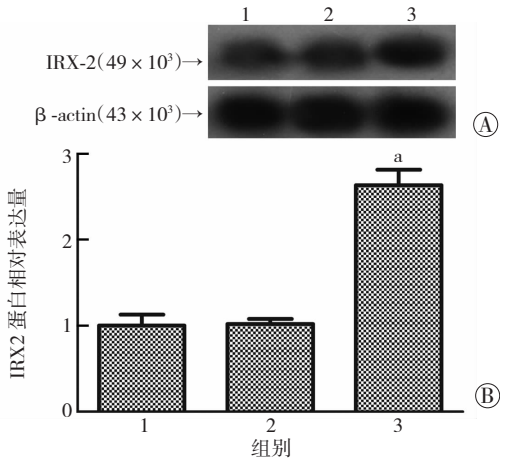


A:对照组;B:Scramble 组;C:IRX2-siRNA 组

图 6　流式细胞仪检测 IRX2-siRNA 干扰对骨肉瘤细胞周期的影响

2.4　IRX2 通过上调 JAK3/STAT5 信号通路调控骨肉瘤细胞的增殖

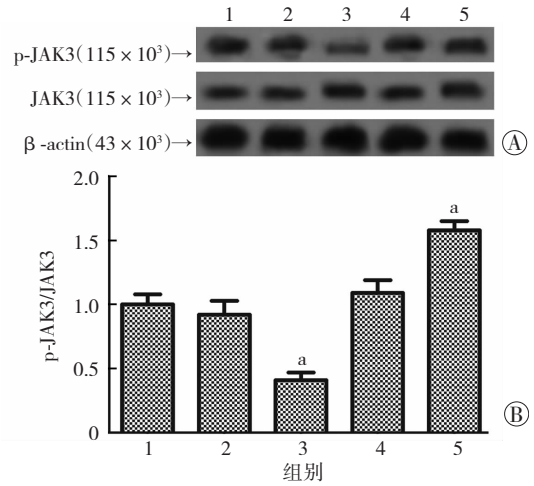
对 pcDNA3.1-IRX2 转染效率研究发现,与对照组(1.00 ± 0.09)比较,pcDNA3.1-IRX2(3.24 ± 0.21)可上调 IRX2 mRNA 表达($P < 0.05$),而 pcDNA3.1 转染(1.10 ± 0.11)对 IRX2 表达无影响($P > 0.05$)。pcDNA3.1-IRX2 还可提高 IRX2 蛋白表达(图 7)。Western blot 检测结果显示 IRX-siRNA 可抑制 JAK3 和 STAT5 的水平,而转染 pcDNA3.1-IRX2 过表达 IRX2 可上调 JAK3 水平($P < 0.05$,图 8)和 STAT5 的水平($P < 0.05$,图 9)。采用 JAK3 抑制剂 cp-690550 和 STAT5 抑制剂哌咪清(pimozide)处理细胞后,检测结果显示:过表达 IRX2 可促进 MG-63 细胞的增殖;JAK3 抑制剂 cp-690550 和 STAT5 抑制剂哌咪清均可抑制 MG-63 细胞的增殖;cp-690550 和哌咪清可部分抑制 pcDNA3.1-IRX2 诱导的细胞增殖上调($P < 0.05$,图 10)。



1:对照组;2:pcDNA3.1 组;3:pcDNA3.1-IRX2 组

A:Western blot 检测;B:半定量分析　a:$P < 0.05$,与对照组比较

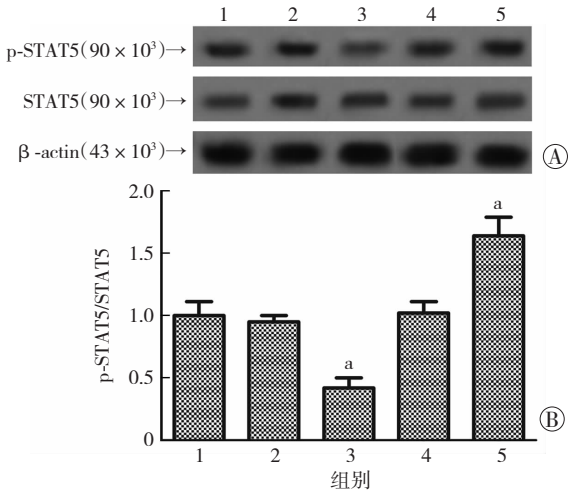
图 7　Western blot 检测 pcDNA3.1-IRX2 转染对 MG-63 细胞 IRX2 蛋白表达的影响



1:对照组;2:Scramble 组;3:IRX-siRNA 组;4:pcDNA3.1 组;5:pcDNA3.1-IRX2 组

A:Western blot 检测;B:半定量分析　a:$P < 0.05$,与对照组比较

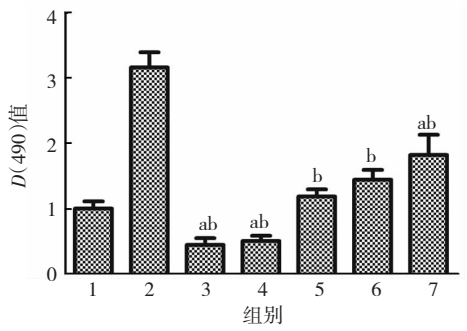
图 8　Western blot 检测 pcDNA3.1-IRX2 转染对 MG-63 细胞中 JAK3 活性的影响



1:对照组;2:Scramble 组;3:IRX-siRNA 组;4:pcDNA3.1 组;5:pcDNA3.1-IRX2 组

A:Western blot 检测;B:半定量分析　a:$P < 0.05$,与对照组比较

图 9　Western blot 检测 pcDNA3.1-IRX2 转染对 MG-63 细胞中 STAT5 活性的影响



1:对照组;2:pcDNA3.1-IRX2 组;3:cp-690550 处理组;4:Pimozide 处理组;5:pcDNA3.1-IRX2 + cp-690550 处理组;6:pcDNA3.1-IRX2 + Pimozide 处理组;7:pcDNA3.1-IRX2 + cp-690550 + Pimozide 处理组;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 pcDNA3.1-IRX2 组比较

图10 MTT 检测 pcDNA3.1-IRX2 转染对 MG-63 细胞中 STAT5 表达的影响

3 讨论

IRX2 基因定位于 5 号染色体短臂 5p15.33 位点或附近。有研究报道 IRX2 基因的表达可能与肿瘤的发生、发展具有一定的关系。余爽等[7]发现源发性肝癌组织 IRX2 表达水平显著低于癌旁组织,且其表达水平与肝癌组织的分化程度具有显著的正相关性。然而,也有研究发现 IRX2 在软组织肉瘤[8]、头颈部癌[4]和乳腺癌[3]等肿瘤中的表达水平均显著上调。本研究对骨肉瘤中 IRX 表达水平的检测发现,IRX2 在多种人骨肉瘤细胞系的表达水平均显著高于人成骨细胞系,预示着 IRX2 可能与骨肉瘤的发展具有一定的联系。因此,本研究应用 IRX2 siRNA 沉默 IRX2 在骨肉瘤细胞中的表达,检测其对细胞增殖的影响,结果发现 IRX2 基因沉默显著降低了骨肉瘤细胞的增殖率。表明 IRX2 对于骨肉瘤的发展具有重要的调控作用。

细胞周期的紊乱导致细胞的异常增殖是癌症的主要特征。细胞周期系统可通过上游信号网络作为信号转导的整合点,是诊断和治疗干预的另一个靶点[9]。研究表明 IRX2 可通过与多种细胞周期调节因子如 P21、P27 以及细胞周期蛋白 D1 的相互作用,从而参与细胞周期的调节[10]。本研究结果证实抑制 IRX2 的表达可以导致骨肉瘤细胞周期阻滞,主要表现为 S 期细胞增加,G_2/M 期细胞比例减少,表明抑制 IRX2 可将骨肉瘤细胞阻滞在 S 期,从而抑制细胞的增殖。

JAK/STAT 信号通路是细胞对细胞因子和生长因子进行应答的主要通路,这些细胞应答的方式主要有增殖、分化、迁移、凋亡以及细胞存活[11]。Czystowska 等[12]对人 T 细胞的研究发现 IRX2 可显著上调 JAK3 的表达水平,并激活 STAT5。因此,为进一步了解 IRX2 影响骨肉瘤细胞增殖和周期的具体机制,本实验对 IRX2 与 JAK3/STAT5 通路之间的相关性进行了检测,结果发现 IRX2 可显著上调磷酸化 JAK3 和磷酸化 STAT5 的表达水平,且进一步的研究发现,抑制 JAK3/STAT5 信号通路可减弱显著 IRX2 对骨肉瘤细胞增殖的调控作用,表明 IRX2 可能通过 JAK3/STAT5 信号通路作用于骨肉瘤细胞增殖。

综上所述,本研究发现 IRX2 在骨肉瘤中表达显著上调,且这种上调会通过 JAK/STAT 信号通路影响骨肉瘤细胞的增殖,提示 IRX2 可能是治疗骨肉瘤新的靶点。

参考文献:

[1] Luetke A, Meyers P A, Lewis I, *et al*. Osteosarcoma treatment - where do we stand? A state of the art review[J]. Cancer Treat Rev, 2014, 40(4): 523-532.

[2] Ta H T, Dass C R, Choong P F, *et al*. Osteosarcoma treatment: state of the art[J]. Cancer Metastasis Rev, 2009, 28(1/2): 247-263.

[3] Werner S, Stamm H, Pandjaitan M, *et al*. The transcription factor iroquois homeobox 2 (IRX2) is a candidate metastasis suppressor that acts as regulator of cellular motility and chemokine expression in breast cancer cells[J]. Cancer Res, 2014, 74(19 Suppl): 117.

[4] Berinstein N L, Wolf G T, Naylor P H, *et al*. Increased lymphocyte infiltration in patients with head and neck cancer treated with the IRX-2 immunotherapy regimen[J]. Cancer Immunol Immunother, 2012, 61(6): 771-782.

[5] Gomez-Skarmeta J L, Modolell J. Iroquois genes: genomic organization and function in vertebrate neural development[J]. Curr Opin Genet Dev, 2002, 12(4): 403-408.

[6] Label M, Agarwal P, Cheng C W, *et al*. The iroquois homeobox gene Irx2 is not essential for normal development of the heart and midbrain-hindbrain boundary in mice[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(22): 8216-8225.

[7] 余爽, 王静, 董冰, 等. IRX2 基因在原发性肝癌中表达的初步研究[J]. 解放军医学杂志, 2013, 38(3): 185-189.

[8] Adamowicz M, Radlwimmer B, Rieker R J, *et al*. Frequent amplifications and abundant expression of TRIO, NKD2, and IRX2 in soft tissue sarcomas[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2006, 45(9): 829-838.

[9] 高鹏, 蒋树财, 郭晖, 等. 大鼠增殖抑制基因抑制大鼠胶质瘤细胞的增殖及其机制[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(4): 381-385.

[10] Del-Bene F, Wittbrodt J. Cell cycle control by homeobox genes in development and disease[J]. Semin Cell Dev Biol, 2005, 16(3): 449-460.

[11] 王恒, 王勇, 江晓雳, 等. 莪术醇通过 JAK3/STAT 信号途径抑制 Jurkat 细胞增殖[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(5): 408-411.

[12] Czystowska M, Han J, Szczepanski M J, *et al*. IRX-2, a novel immunotherapeutic, protects human T cells from tumor-induced cell death[J]. Cell Death Differ, 2009, 16(5): 708-718.

(**收稿**:2015-08-06;**修回**:2015-08-14)

(编辑 龙 亮)