DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2019.180449
http://xbyxb.csu.edu.cn/xbwk/fileup/PDF/201907757.pdf

抑制miR-30a/HMGA2介导的骨肉瘤细胞自噬对化学药物治疗诱导的细胞凋亡的作用

夏勤，倪江东，黄俊，潘柏祺，严明明，李文钊

(中南大学湘雅二医院骨科，长沙 410011)

[摘要] 目的：探讨微小RNA(microRNA，miR)-30a/高迁移率族蛋白A2(high mobility group protein A2，HMGA2)介导的骨肉瘤细胞自噬对化学药物治疗(以下简称化疗)药物诱导的细胞凋亡的影响。**方法：**随机选取30例经化疗药物治疗后表现为化疗敏感和化疗抵抗的骨肉瘤患者组织，分为化疗敏感组(n=15)和化疗抵抗组(n=15)，采用real-time PCR检测两组中miR-30a和HMGA2的mRNA表达水平，以及骨肉瘤细胞U2-OS经不同浓度的化疗药物(顺铂、阿霉素、氨甲蝶呤)处理后miR-30a的mRNA表达水平；采用蛋白质印迹法检测细胞内自噬相关因子Beclin 1，自噬微管相关蛋白1轻链3B(microtubule associated protein 1 light chain 3B，LC3B)、自噬抑制因子P62的表达情况。在骨肉瘤细胞U2-OS中转染miR-30a模拟物和抑制剂，构建miR-30a高表达组、低表达组和对照组，采用蛋白质印迹法检测经过顺铂和阿霉素处理后上述3组细胞内Beclin 1，LC3B和P62的表达情况；采用单丹磺酰尸胺(monodansylcada，MDC)染色法检测细胞内自噬水平，ROS荧光探针-二氢乙啶(dihydroethidium，DHE)检测细胞内ROS水平，细胞计数试剂盒8(cell counting kit-8，CCK-8)检测细胞存活率，流式细胞术检测细胞凋亡程度，线粒体膜电位荧光探针JC-1检测细胞线粒体氧化损伤程度；采用双荧光素酶法检测miR-30a与HMGA2的相互作用，同时通过转染HMGA2模拟物和HMGA2-shRNA干扰质粒载体，构建HMGA2高表达组、低表达组和对照组，采用蛋白质印迹法检测经过顺铂和阿霉素处理后上述3组细胞内Beclin 1，LC3B和P62的表达情况。**结果：**化疗抵抗组中miR-30a的mRNA水平显著低于化疗敏感组(P<0.05)，HMGA2的表达与miR-30a相反(均P<0.05)。在相对低浓度(5 μml/L)的化疗药物刺激下，骨肉瘤细胞U2-OS内的miR-30a mRNA表达下调，Beclin 1和LC3B均显著上调(均P<0.01)，P62显著下调(P<0.01)。在miR-30a高表达组中，与对照组相比，Beclin 1和LC3B的表达水平与miR-30a明显下降(P<0.05)，P62的表达水平明显升高(P<0.05)，在miR-30a低表达组中则相反；在经过化疗药物处理后的miR-30a高表达组中，细胞自噬水平更低，细胞存活率更低，ROS水平更高，线粒体氧化损伤程度更高，细胞凋亡水平更高(均P<0.05)，miR-30a低表达组则相反(均P<0.05)。双荧光素酶报告基因检测验证了miR-30a与HMGA2的靶向互补配对关系；与对照组相比，HMGA2高表达组中Beclin 1和LC3B的表达水平与HMGA2明显升高(P<0.05)，P62的表达水平明显下降(P<0.05)，在HMGA2低表达组中则相反。**结论：**积极发挥miR-30a/HMGA2抑制骨肉瘤细胞自噬的功能，能够破坏细胞应对ROS介导的自噬与凋亡的平衡，增强化疗药物对细胞的杀伤作用。

[关键词] 微小RNA-30a；自噬；凋亡；骨肉瘤

Suppression of miR-30a/HMGA2-mediated autophagy in osteosarcoma cells impacts chemotherapeutics-induced apoptosis

XIA Qin, NI Jiangdong, HUANG Jun, PAN Baiqi, YAN Mingming, LI Wenzhao

收稿日期(Date of reception)：2018-07-30
第一作者(First author)：夏勤， Email: xiaqin@csu.edu.cn, ORCID: 0000-0002-5578-9438
通信作者(Corresponding author)：黄俊，Email: 505447@csu.edu.cn, ORCID: 0000-0001-8714-483X
基金项目(Foundation item)：国家自然科学基金(81302338)；湖南省自然科学基金(2018JJ2567)。This work was supported by the National Nature Science Foundation (81302338) and the Natural Science Foundation of Hunan Province (2018JJ2567), China.

(Department of Orthopedics, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

ABSTRACT

Objective: To investigate the effect of miR-30a/HMGA2-mediated autophagy in osteosarcoma cells on apoptosis induced by chemotherapeutics.

Methods: A total of 30 osteosarcoma tissues of sensitive and resistant to chemotherapeutics were divided into a chemotherapy-sensitive group and a chemotherapy-resistant group. The mRNA expression levels of miR-30a and high mobility group protein A2 (HMGA2) in the chemotherapy-sensitive group and the chemotherapy-resistant group, and the mRNA expression levels of miR-30a in osteosarcoma U2-OS cells treated by cisplatin, doxorubicin and methotrexate at different concentrations were detected by real-time PCR. The expression levels of autophagy related protein Beclin 1, microtubule associated protein 1 light chain 3B (LC3B) and autophagy factor P62 were detected by Western blotting. The osteosarcoma U2-OS cells were transfected with miR-30a mimics and miR-30a inhibitors to construct a miR-30a high expression group, a miR-30a low expression group and a control group. The expression levels of Beclin 1, LC3B and P62 in osteosarcoma U2-OS cells after treatment of cisplatin and doxorubicin in these 3 groups were detected by Western blotting; the level of autophagy was detected by monodansylcada (MDC) staining; the level of ROS was detected by dihydroethidium (DHE); the level of cell surviving rate was detected by cell counting kit-8 (CCK-8); the level of apoptosis was detected by annexin APC/PI double staining; the level of mitochondria oxidative damage was detected by mitochondrial membrane potential assay kit with JC-1 (JC-1 method). The interaction between miR-30a and HMGA2 was detected by dual luciferase reporter assay. The osteosarcoma U2-OS cells were transfected with HMGA2 mimics and HMGA2-shRNA to construct a high HMGA2 group, a low HMGA2 group, and a control group. The expression levels of Beclin 1, LC3B and P62 in osteosarcoma U2-OS cells after the treatment of cisplatin were detected by Western blotting.

Results: The level of miR-30a in the chemotherapy-resistant tissues was significantly lower than that in the chemotherapy-sensitive tissues ($P<0.05$), and the expression of HMGA2 was opposite comparing to that of miR-30a ($P<0.05$). After the treatment by low concentration (5 μmol/L) of chemotherapeutics, the level of miR-30a was down-regulated in osteosarcoma U2-OS cells, accompanied with up-regulation of Beclin 1 and LC3B ($P<0.01$) and down-regulation of P62 ($P<0.01$). Compared with the control group, the expression levels of Beclin 1 and LC3B were significantly decreased ($P<0.05$), and the expression level of P62 was significantly increased ($P<0.05$) in the miR-30a high expression group, which was opposite in the miR-30a low expression group. In the miR-30a high expression group treated by chemotherapeutics, the level of autophagy and the cell survival rate were lower than those in group with low expression of miR-30a, while the levels of ROS, the mitochondrial oxidative damage and the apoptosis were higher than those in group with low expression of miR-30a (all $P<0.05$). The targeting interaction between HMGA2 and miR-30a were verified by dual luciferase reporter assay. Compared with the control group, the expression levels of Beclin 1 and LC3B were significantly increased ($P<0.05$), and the expression level of P62 was significantly decreased ($P<0.05$) in the HMGA2 high expression group, which was opposite in the HMGA2 low expression group.

Conclusion: Suppression of miR-30a/HMGA2-mediated autophagy in osteosarcoma cells is likely to enhance the therapeutic effect of chemotherapeutics.

KEY WORDS microRNA-30a; autophagy; apoptosis; osteosarcoma

因耐药所致的化学药物治疗(以下简称化疗)失败和复发是骨肉瘤治疗中面临的主要困难。骨肉瘤耐药形成机制是多因素、多基因、多阶段共同参与的结果[1-4]。自噬作为一种重要的稳态细胞回收机制，目前正在成为机体代谢响应和高耐受性癌症治疗的关键因素之一[5]。

自噬是一种“自我消化”的细胞更新代谢过程[6-7]，已经被证明可以通过维持细胞能量产生而使肿瘤细胞继续生长[4]，此外抑制自噬也被证明可以增强抗癌治疗的有效性[8]。由于活性氧(ROS)调节自噬的许多方面，其在自噬中作用的研究在许多生物科学领域变得越来越重要[9]。大多数化疗药物和放射治疗(以下简称放疗)药物通过增加ROS应激来杀死癌细胞[10-11]，而自噬能够被升高的ROS所诱导而激活，通过分解和代谢过量或不必要的蛋白质以及受损或老化的细胞器来维持/恢复机体的代谢稳态，导致肿瘤细胞抗性的产生[4]。细胞内自噬的平衡以及ROS介导的自噬与凋亡之间的串扰对细胞的生存至关重要。因此，开发能够打破氧化还原适应的药物与癌症化疗药物结合，可能是增强化疗药物对癌细胞毒性的更好策略[12]。

微小RNA(microRNA，miR)-30a是miR-30家族成员之一，在现有的研究[13-17]中，miR-30a被普遍认为具有抑制骨肉瘤细胞系细胞增殖和侵袭的作用。在与自噬相关的研究中，miR-30a被认为是直接靶向自噬相关因子Beclin 1的重要miR之一，在促进小鼠心肌细胞收缩功能障碍[18]、抑制癌细胞自噬能力[19]及增强伊马替尼对人类慢性髓系白血病细胞的作用中发挥功能[20]。

高迁移率族蛋白(high mobility group，HMG)A2与HMGA1，HMGB1和HMGB2等均属于HMG家族蛋白，广泛参与基因的调控转录、复制、重组和DNA修复等依赖DNA的生物学过程[21]。HMGA2在分化完全的人体组织中几乎没有表达，却高表达于多种人类癌症中，但HMGA2参与癌症形成的确切机制尚不清楚[22-23]。有研究[24-25]报道HMGA2参与骨肉瘤癌干细胞的自我更新，这些特性是导致患者预后不良的原因，但与HMGA2对放疗和化疗反应的影响一样，HMGA2发挥这些作用的具体机制尚不清楚，miR-30a是否有其他不依赖于Beclin 1的途径调节细胞自噬尚不清楚。

本研究使用常规化疗药物处理骨肉瘤细胞，模拟合适的肿瘤细胞氧化应激环境，并诱发细胞内自噬水平的升高。同时提出并验证miR-30a/HMGA2轴在ROS介导的自噬与凋亡调节中的作用，以深入了解化疗药物处理细胞时胞内“程序性死亡”和“程序性存活”之间的分子对话，为进一步了解自噬调控网络提供新的思路和科学依据，也为高耐受的骨肉瘤患者提供新的靶向治疗策略。

1 材料与方法

1.1 临床样本

收集中南大学湘雅二医院(以下简称本院)骨科骨肉瘤患者的癌新鲜组织置于液氮中保存，本研究纳入经化疗后表现出抵抗性及敏感性的患者组织各15例。入选标准：所有患者经过本院病理科病理确诊，病理分期大致相同；均无其他恶性肿瘤性疾病病史；首次治疗患者在取材前4周未进行任何形式的化疗、放疗及免疫调节治疗；患者自愿参加并签署知情同意书。

1.2 细胞与试剂

骨肉瘤细胞U2-OS购自中国科学院细胞库。MiR-30a/HMGA2模拟物和miR-30a/HMGA2抑制剂及其miR阴性对照由长沙维尔生物科技有限公司合成；干扰载体HMGA2-shRNA、顺铂(cisplatin，CIS)、阿霉素(doxorubicin，DOX)、氨甲蝶呤(methotrexate，MET)、单丹磺酰尸胺(monodansylcada，MDC)染色液、ROS荧光探针、流式annexin V-APC/PI双染检测细胞凋亡试剂盒和线粒体膜电位荧光探针JC-1检测试剂盒购自美国Sigma公司；脂质体lipofectamine™ 2000购自美国Invitrogen公司；LC3B一抗、P62一抗、Beclin 1一抗、HMGA2一抗、羊抗鼠二抗均购自美国Abcam公司；细胞计数试剂盒8(cell counting kit-8，CCK-8)购自日本Dojindo公司；胎牛血清购自美国Gibco公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养

骨肉瘤细胞U2-OS使用高糖DMEM培养基和10%的胎牛血清于37 ℃，5%的CO_2恒温、恒湿培养箱中培养，细胞汇合80%以上时进行传代。

1.3.2 实验分组

为了明确miR-30a和HMGA2对骨肉瘤化疗敏感性的影响，根据化疗药物敏感性将30例骨肉瘤患者组织分为化疗敏感组(n=15)和化疗抵抗组(n=15)。

为了明确不同浓度的化疗药物CIS，DOX和MET对miR-30a的影响，取对数生长期细胞种板，24 h细胞汇合达70%时，分别用不同浓度(0，5，10，20 μml/L)的化疗药物处理骨肉瘤细胞，并将其分为3组：Cis组、Dox组、Met组。同时，为了明确不同化疗药物对细胞自噬的影响，分别用相同浓度(5 μml/L)的化疗药物处理骨肉瘤细胞，并将其分为4组：Cis组、Dox组、Met组和空白对照组。于37 ℃，5% CO_2恒温箱中

培养24 h。

为了明确miR-30a对化疗药物引起细胞自噬和氧化损伤的影响，通过转染miR-30a的模拟物(mimics)和抑制剂(inhibitor)构建miR-30a高表达与低表达的骨肉瘤细胞模型，并将其分为3组：miR-30a高表达组(miR-30a mimics组)，miR-30a低表达组(miR-30a inhibitor组)和空白对照组(scramble组)。24 h细胞汇合70%时，以相同浓度(5 μmol/L)的CIS和DOX处理3种细胞模型并分为6组：CIS处理空白对照组(scramble+CIS组)、DOX处理空白对照组(scramble+DOX组)、CIS处理低表达组(inhibitor+CIS组)、DOX处理低表达组(inhibitor+DOX组)、CIS处理高表达组(mimics+CIS组)、DOX处理高表达组(mimics+DOX组)。于37 ℃，5% CO_2恒温箱中培养24 h。

为了明确miR-30a与HMGA2的靶向互补配对关系，采用双荧光素酶报告基因检测，实验共分为4组：空白对照组(HMGA2-3'-UTR+miR-30a-control组)、高表达组(HMGA2-3'-UTR+miR-30a-mimics组)、低表达组(HMGA2-3'-UTR+miR-30a-inhibition组)、阴性对照组(HMGA2-3'-Mut+miR-30a-mimics组)。

为了明确HMGA2对化疗药物引起细胞自噬的影响，通过转染HMGA2的模拟物和HMGA2-shRNA干扰质粒载体(HMGA2-shRNA)构建HMGA2高表达与低表达的骨肉瘤细胞，并将其分为3组：HMGA2高表达组(HMGA2组)、HMGA2低表达组(HMGA2-shRNA组)和空白对照组(NC组)。24 h细胞汇合70%时，以相同浓度(5 μml/L)的CIS和DOX处理3种细胞，并将其分为6组：CIS处理空白对照组(NC+CIS组)、DOX处理空白对照组(NC+DOX组)、CIS处理低表达组(HMGA2-shRNA+CIS组)、DOX处理低表达组(HMGA2-shRNA+DOX组)、CIS处理高表达组(HMGA2+CIS组)、DOX处理高表达组(HMGA2+DOX组)。于37 ℃，5% CO_2恒温箱中培养24 h。

1.3.3 细胞转染

将骨肉瘤细胞培养于6孔板中，细胞密度为1×10^5/孔，转染前将6孔板中细胞培养基更换为1.5 mL减血清培养基，按脂质体lipofectamine™ 2000操作说明书分别转染miR-30a模拟物、miR-30a抑制剂、HMGA2模拟物、HMGA2-shRNA和miRNA对照，然后置于37 ℃，5% CO_2细胞培养箱中培养。4~6 h后将孔中转染液更换为新鲜的完全培养基，放入37 ℃，5% CO_2细胞培养箱中继续培养。48~72 h后根据实验目的进行细胞收样和检测。

1.3.4 Real-time PCR检测

细胞样品浓度按每孔1×10^6个细胞，加入500 μL RNA提取液(TRIzol试剂)混匀。组织样品用液氮研磨至粉末后加入1 mL TRIzol匀浆。mRNA反转录为20 μL反应体系，miR反转录为25 μL反应体系。采用核酸凝胶荧光染料法进行mRNA相对定量分析，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$解析法进行相对含量的计算。Beclin 1引物序列正向5'-CAGCAGTTCAAAGAAGAG-3'，反向5'-CTGGGTTTTGATGGAATAG-3'；β-actin引物序列正向5'-CATCCTGCGTCTGGACCTGG-3'，反向5'-TAATGTCACGCACGATTTCC-3'。以U6作为内参，计算miR-30a表达的相对值。

1.3.5 蛋白质印迹法检测

用细胞裂解液(150 mmol/L NaCl，50 mmol/L Tris缓冲液，pH 7.5，1%乙基苯基聚乙二醇，0.25%去氧胆酸钠，1 mmol/L苯甲基磺酰氟，1 mmol/L正钒酸钠，2 mmol/L钙螯合剂，50 μg/mL亮抑酶肽)冰上孵育裂解细胞20 min，将匀浆离心(10 000 r/min，4 ℃，5 min)。采用BCA蛋白定量试剂盒定量后，各取50 μg蛋白于10%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转膜至聚偏二氟乙烯膜，用含5%脱脂奶的磷酸盐吐温缓冲液室温下振荡2 h，LC3B一抗(1∶1 500)、P62一抗(1∶1 000)、Beclin 1一抗(1∶1 000)、HMGA2一抗(1∶1 500)孵育3 h，用含辣根过氧化酶标记的羊抗鼠二抗(1∶5 000)孵育1 h，磷酸盐吐温缓冲液室温下漂洗15 min后，采用化学发光法显影。

1.3.6 MDC染色检测自噬水平

离心(1 000 r/min，10 min)收集细胞，用洗涤液洗涤后弃去上清，重悬细胞，计数并调节细胞浓度至10^6个/mL，加入MDC染液轻轻混匀，避光、室温染色。离心收集细胞，清洗重悬后取部分滴加于载玻片上，在荧光显微镜下观察并拍照。

1.3.7 ROS荧光法检测ROS水平

采用ROS荧光探针-二氢乙啶(dihydroethidium，DHE)法进行细胞内ROS含量的测定，按操作说明进行。细胞培养于6孔板中，在避光条件下加入含10 μmol/L ROS荧光探针无血清DMEM培养液1 mL，37 ℃避光孵育1 h，用新鲜溶液清洗细胞并在显微镜下观察红色荧光数量并拍照。

1.3.8 CCK-8检测细胞存活率

将细胞以5×10^3个/mL的浓度种于96孔板，每组设6个复孔，将培养板放入37 ℃，5% CO_2恒温培养箱中处理48 h后，每孔加入CCK8液体20 μL，用酶标仪检测450 nm处的吸光度值。

1.3.9 流式细胞术检测细胞凋亡

采用流式Annexin API/PI双染检测细胞凋亡试剂盒，按操作说明进行。细胞用缓冲液稀释后，取300 μL悬浮细胞加入5 μL双染细胞凋亡检测试剂盒，混匀后，避光，室温孵育15 min；上机前5 min再加入

5 μL的碘化丙啶染色；检测时再加入200 μL缓冲液。用流式细胞仪检测。计算流式细胞仪中上左象限(up left，UL)和上右象限(up right，UR)的细胞凋亡率。

1.3.10 JC-1法测定线粒体膜电位

细胞培养于6孔板中，吸除培养液，洗涤后加入1 mL JC-1染色工作液，充分混匀后37 ℃孵育20 min，并用稀释后的JC-1染色缓冲液洗涤3次，再加入细胞培养液于倒置显微镜下拍摄红色荧光和绿色荧光图片，合并后以红与绿荧光比例表示细胞中线粒体去极化的程度。

1.3.11 双荧光素酶报告基因检测

PCR扩增含有预测的野生型或突变型miR-30a结合位点的HMGA2序列，并将其亚克隆到pGL3-basic载体，获得报告基因载体。骨肉瘤细胞系接种到24孔板中，使用脂质体lipofectamine™ 2000共同转染0.15 μg报告基因载体(HMGA2-3'-UTR)和0.15 μg带有海肾荧光酶素基因的质粒至miR-30a高表达细胞和miR-30a低表达细胞中。转染48 h后，使用双荧光素酶报告基因检测系统测量荧光素酶和海肾荧光素酶活性。

1.4 统计学处理

使用软件SPSS 18.0进行统计学分析。所有计量资料以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组之间的比较采用t检验，多组之间的比较采用方差分析，$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 化疗敏感组和化疗抵抗组中miR-30a和HMGA2的表达

Real-time PCR结果显示：化疗抵抗组miR-30a的mRNA表达水平显著低于化疗敏感组($P<0.05$，图1A)，化疗抵抗组HMGA2的mRNA表达水平明显高于化疗敏感组($P<0.05$，图1B)。

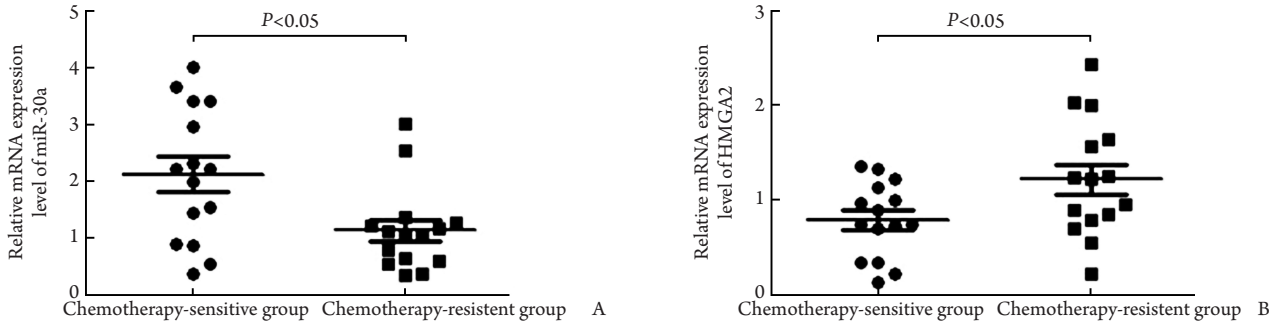

图1 MiR-30a和HMGA2在化疗敏感组和化疗抵抗组中mRNA的相对表达水平

Figure 1 Relative mRNA expression levels of miR-30a and HMGA2 in the chemotherapy-sensitive group and the chemotherapy-resistant group

A: Comparison of miR-30a mRNA expression level between the 2 groups; B: Comparison of HMGA2 mRNA expression level between the 2 groups

2.2 化疗药物刺激后骨肉瘤细胞中miR-30a，Beclin 1，LC3B和P62的表达

Real-time PCR结果显示：与对照浓度(0 μmol/L)相比较，在相对低浓度(5 μmol/L)的化疗药物刺激条件下，miR-30a就表现出了显著的表达下调，且随着化疗药物浓度的提升而继续降低，表现出一定的量效关系(图2A)。蛋白质印迹法结果显示：5 μmol/L CIS和DOX均能显著诱导自噬相关基因Beclin 1和LC3B的高表达(均$P<0.05$，图2B)，自噬抑制基因P62显著低表达(均$P<0.05$，图2C)。

2.3 MiR-30a与化疗药物引起的细胞自噬的关系

蛋白质印迹法结果显示：与scramble组相比，miR-30a mimics组Beclin 1和LC3B的蛋白表达水平明显降低，P62的蛋白表达水平明显升高；与scramble组相比，miR-30a inhibitor组Beclin 1和LC3B的蛋白表达水平明显升高，P62的蛋白表达水平明显降低(均$P<0.05$；图3A，3B)。MDC荧光染色结果显示：与scramble组相比，miR-30a inhibitor组能够诱发更多的细胞自噬，而miR-30a mimics组则相反(均$P<0.05$；图3C)。

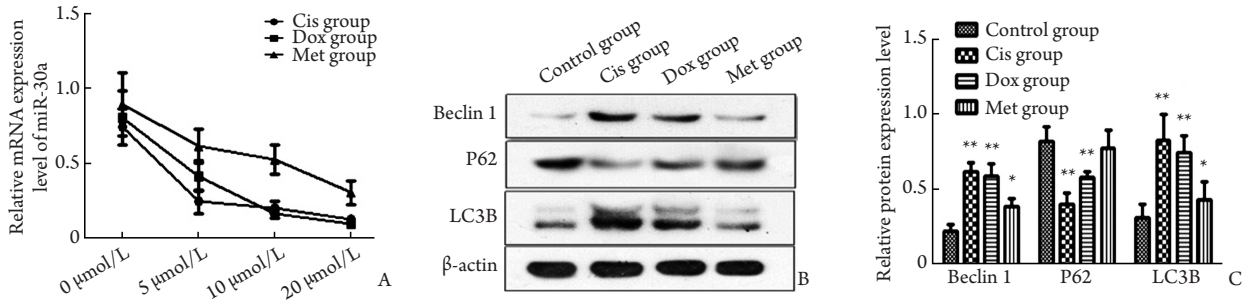

图2 不同化疗药物刺激后miR-30a及自噬相关蛋白的相对表达水平

Figure 2 Expression levels of miR-30a and autophagy proteins in osteosarcoma treated with Cis, Dox, and Met

A: Relative mRNA expression level of miR-30a; B: Electropherogram of autophagy related proteins; C: Histogram of autophagy related proteins. *P<0.05, **P<0.01 vs the control group

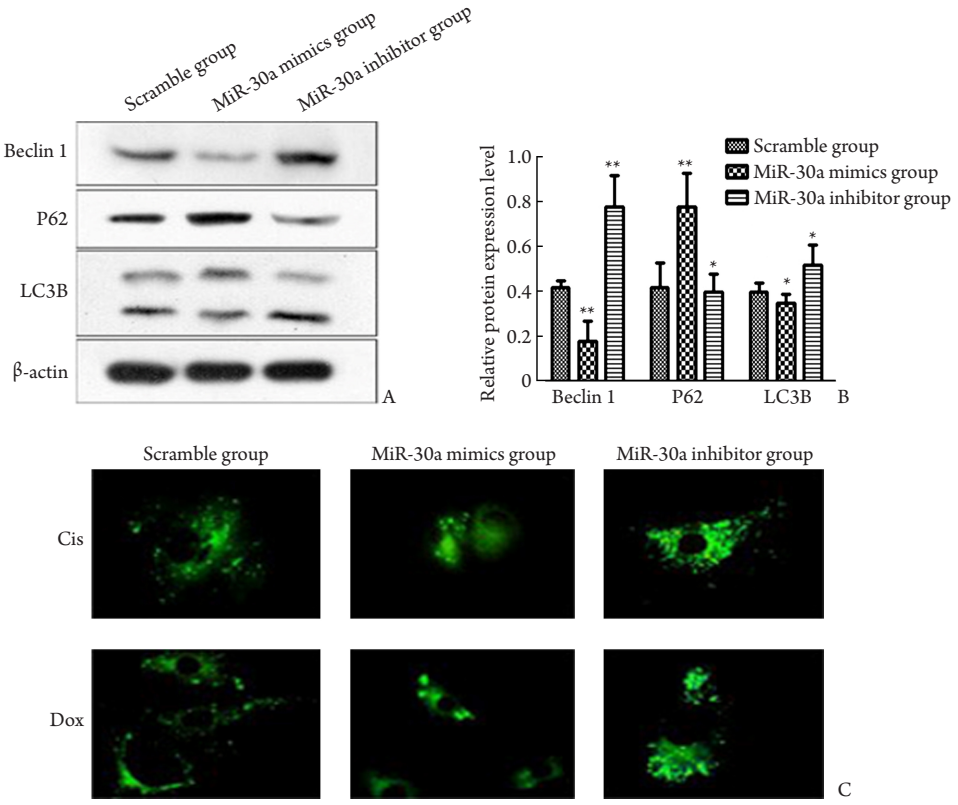

图3 MiR-30a高表达组和低表达组中自噬相关蛋白的表达水平及miR-30a对化疗药物处理后细胞自噬的影响

Figure 3 Autophagy protein relative expression levels in the miR-30a mimics group and the miR-30a inhibitor group and effects of miR-30a on cell autophagy of osteosarcoma

A: Electropherogram of autophagy related proteins in the 2 groups. B: Histogram of autophagy related proteins in the 2 groups. *P<0.05, **P<0.01 vs the scramble group. C: Cell autophagy in the miR-30a mimics group and the miR-30a inhibitor group treated by CIS and DOX

2.4 MiR-30a与化疗药物引起的氧化损伤的关系

Real-time PCR结果显示：MiR-30a模拟物和miR-30a抑制剂转染U2-OS细胞48 h后，miR-30a高表达组的miR-30a表达显著高于低表达组和对照组(图4A，P<0.05)。CCK-8结果显示：miR-30a高表达组暴露于化疗药物环境中时，存活率比对照组显著降低，

而mi-30低表达组则表现出了更高的耐受性(图4B，$P<0.05$)。DHE染色结果显示：MiR-30a高表达组暴露于化疗药物环境中时，ROS水平更高，而miR-30a低表达组则相反(图4C)。流式Annexin V-APC/PI双染检测结果显示：miR-30a高表达组暴露于化疗药物环境中时，细胞凋亡明显增加，而miR-30a低表达组则相反(图4D)。JC-1法检测结果显示：miR-30a高表达组暴露于化疗药物环境中时，线粒体膜电位变化更大，而miR-30a低表达组则相反(图4E)。早晚期细胞凋亡率[(UR+LR)%]统计结果显示：MiR-30a高表达组暴露于化疗药物环境中时，细胞凋亡率更高，而miR-30a低表达组则相反(图4F，$P<0.05$)。

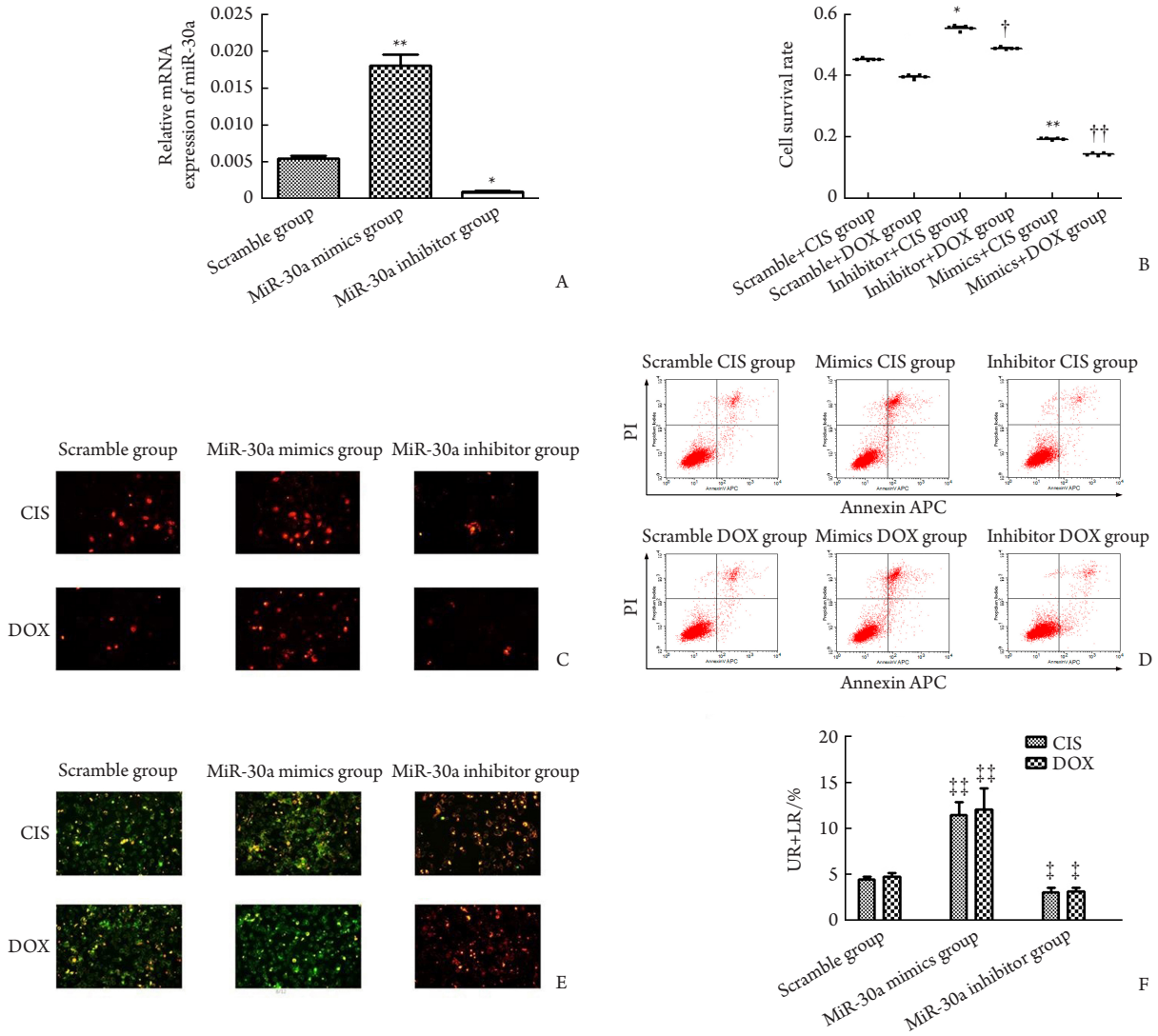

图4　MiR-30a对化疗药物处理后细胞氧化损伤的影响

Figure 4　Effects of miR-30a on cell oxidative damage of osteosarcoma treated by chemotherapeutics

A: Relative mRNA expression level of miR-30a in the miR-30a mimics group and the miR-30a inhibitor group. *$P<0.05$, **$P<0.01$ vs the scramble group. B: Cell survival rate in the miR-30a mimics group and the miR-30a inhibitor group treated with CIS/DOX by CCK-8. *$P<0.05$, **$P<0.01$ vs the scramble+CIS group; †$P<0.05$, ††$P<0.01$ vs the scramble+DOX group. C: Level of ROS in the miR-30a mimics group and the miR-30a inhibitor group treated with CIS/DOX by DHE. D: Apoptosis in the miR-30a mimics group and the miR-30a inhibitor group treated with CIS/DOX by annexin APC/PI double staining. E: Mitochondria oxidative damage in the miR-30a mimics group and the miR-30a inhibitor group treated with CIS/DOX by JC-1. F: Apoptosis rate in the miR-30a mimics group and the miR-30a inhibitor group treated with CIS and DOX. ‡$P<0.05$, ‡‡$P<0.01$ vs the scramble group

2.5 HMGA2和miR-30a的靶向关系

双荧光素酶报告基因载体实验结果显示：与HMGA2-3'-UTR+miR-30a-control组相比，HMGA2-3'-UTR+miR-30a-mimics组的荧光素酶活性明显下降(P<0.05，图5A)。蛋白质印迹法检测结果显示：与NC组相比，HMGA2组中Beclin 1和LC3B的表达水平升高，P62的表达水平下降；HMGA2-shRNA组中则相反(P<0.05，图5B)。与NC+CIS组相比，HMGA2+CIS组中Beclin 1和LC3B的表达水平升高，P62的表达水平下降(均P<0.05)；HMGA2-shRNA+CIS组则相反(均P<0.05)；同样，与NC+DOX组相比，HMGA2+DOX组中Beclin 1和LC3B的表达水平升高(均P<0.05)，P62的表达水平下降(均P<0.05)；HMGA2-shRNA+DOX组则相反(均P<0.05，图5C)。

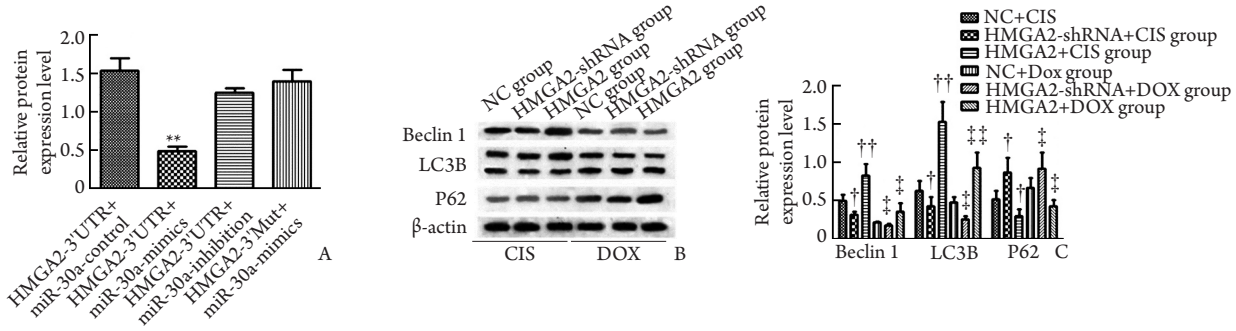

图5 HMGA2和miR-30a的靶向关系及HMAG2对自噬相关蛋白的影响

Figure 5 Targeting interaction between HMGA2 and miR-30a and effect of HMGA2 on autophagy protein

A: Luciferase activity of HMGA2 and miR-30a measured by dual luciferase reporter assay. **P<0.01 vs the HMGA2-3'UTR+miR-30a-control group. B: Electropherogram of autophagy related protein in the HMGA2 group and the HMGA2-shRNA group treated by CIS and DOX. C: Histogram of autophagy related protein in the HMGA2 group and the HMGA2-shRNA group treated by CIS and DOX. †P<0.05, ††P<0.01 vs the NC+CIS group; ‡P<0.05, ‡‡P<0.01 vs the NC+DOX group

3 讨 论

诱导细胞死亡和抑制细胞存活是癌症治疗的主要原则[26]。对化疗药物的耐药性是肿瘤学中的主要问题，这限制了抗癌药物的有效性[27]。耐药性由多种因素导致，包括宿主因素和癌细胞中特定的遗传或表观遗传改变等。虽然癌细胞在微环境中对抗癌药物产生耐药性的各种机制已得到很好的阐明，但如何规避这种抵抗力以改善抗癌功效尚有待确定[28]。

放疗和化疗能够引发胞内过量的ROS对细胞造成氧化损伤，诱导肿瘤细胞凋亡。为求胞内稳态平衡，细胞自噬水平会随之升高以及时清除受损的细胞器和胞内过量累积的ROS。很多情况下，自噬水平的升高有助于细胞对抗外界环境压力的能力，或可导致放疗和化疗抵抗[29]。

大量研究[30-31]表明：氧化应激中产生的ROS在多种条件下都是自噬的重要调节因子，它能诱导自噬发生，而自噬能通过不同的信号通路来缓解氧化应激造成的损伤，从而保护细胞存活。部分肿瘤细胞由于具备更强的ROS清除能力而能在化疗时幸免于难，并在胞内外持续的ROS诱导下形成耐受和转移。

细胞内自噬的平衡以及ROS介导的自噬与凋亡之间的串扰对细胞的生存至关重要。因此，开发能够打破氧化还原适应的药物与癌症化疗药物结合，可能是增强化疗药物对癌细胞毒性的更好策略。而深入了解ROS介导的自噬与凋亡之间的联系可能有助于阐明癌症治疗的靶向机制，尤其可能被用于高耐药性癌症的联合治疗[12]。本文发现miR-30与自噬调节有关，且它能在骨肉瘤中调控HMGA2，这是对miR-30a调控自噬的新的补充。

MiR-30a自2009年Zhu等[19]揭示了其可直接靶向于自噬看家基因Beclin 1的3'-UTR区，因而在自噬的研究领域备受瞩目。截止目前，miR-30a负向调节Beclin 1抑制细胞自噬已在肝星型细胞纤维化[32]、肺癌[33]、心肌细胞[18]等研究领域证实。细胞抗氧化作用研究[34]表明：在去除生长因子所诱发的凋亡中，ROS是促发细胞死亡的主要诱因，Bcl-2的过度表达可减少氧自由基的产生和脂质过氧化物的形成，而Bcl-2可以通过抑制线粒体释放细胞色素C来抑制半胱天冬酶途径依赖的细胞凋亡。MiR-30a能够靶向降解Bcl-2 3'-UTR区的活性而抑制其功能，进而促进细

胞进入凋亡程序。由此不难看出，miR-30a在细胞自噬与细胞凋亡中具有关键作用。本研究结果发现：化疗药物CIS，DOX和MET处理骨肉瘤细胞后可引起胞内miR-30a的表达下调，同时细胞内自噬水平在5 μml/L药物处理时即出现显著提升，自噬相关蛋白(如Beclin 1和LC3B)表达上调，P62表达下降，这些结果说明miR-30a与化疗药物引起的细胞自噬存在关联。

HMGA2是高迁移率家族蛋白成员之一，其他成员还有HMGB1，HMGB2和HMGA1等[21]。笔者曾经对HMGB1与骨肉瘤细胞自噬的关系有过较为深入的研究，并发现了HMGB1能够通过与Beclin 1形成复合物而激活细胞自噬，因此提出靶向HMGB1/Beclin 1将是逆转骨肉瘤自噬引起的化疗耐受的新策略[35-36]。相比于HMGB1的成熟研究，HMGA2与自噬的研究则相对冷清。HMGA2在成熟组织中通常缺失表达，但又在多种良性/恶性肿瘤中出现表达上调[21]，因而具备非常好的作为骨肉瘤“生物标志物”的条件。

另外，本研究通过转染miR-30a的模拟物和抑制剂构建miR-30a高表达与低表达的骨肉瘤细胞，对化疗药物引起的细胞自噬和凋亡水平进行了检测，发现miR-30a高表达组对化疗药物的处理表现出了更高的敏感度，不仅表现为自噬能力的降低，还表现为ROS清除能力的下降、线粒体损伤程度和细胞凋亡的增加。同时，通过双荧光素酶报告基因检测验证了miR-30a与HMGA2的直接靶向作用，这在骨肉瘤的研究中是首次发现。紧接着通过转染HMGA2的模拟物和HMGA2-shRNA干扰质粒载体构建HMGA2高表达与低表达的骨肉瘤细胞，在化疗药物的诱导下，差异表达HMGA2的骨肉瘤细胞也表现出了不同的自噬相关蛋白的表达变化，其功能作用与miR-30a相反。因此，本研究揭示了ROS介导的细胞自噬和凋亡中的关键分子miR-30a及其靶基因HMGA2在骨肉瘤细胞自噬中的功能，能够为后续更深入的分子机制研究做好铺垫。除此之外，本研究还存在很多有待解决的关键问题：1)仍然不清楚HMGA2参与自噬调控的具体分子机制，比如其下游靶分子及作用通路等。虽然有研究[37]报道铬诱导的细胞自噬中HMGA2能够作为转录因子启动自噬相关蛋白ATG10的转录，从而促进ATG12-ATG5的共轭结合，但在骨肉瘤自噬引起的化疗耐受领域中的作用仍需确证；2)骨肉瘤是青少年常见的原发性肿瘤，耐药导致的复发和转移是攻克该疾病的主要难点。为更好地证明miR-30a/HMGA2能够调节自噬引起的细胞耐受，体外耐药细胞模型的建立和体内动物模型的研究必不可少。这些系统性的研究正在陆续开展中，并有助于完整地了解HMG在自噬引起的骨肉瘤细胞化疗抵抗中的作用，可为骨肉瘤的分子诊断及靶向治疗提供充足的理论依据。

利益冲突声明：作者声称无任何利益冲突。

参考文献

[1] Liu L, Yang M, Kang R, et al. DAMP-mediated autophagy contributes to drug resistance[J]. Autophagy, 2011, 7(1): 112-114.

[2] Rabinowitz JD, White E. Autophagy and metabolism[J]. Science, 2010, 330(6009): 1344-1348.

[3] Levine B. Cell biology: Autophagy and cancer[J]. Nature, 2007, 446(7137): 745-747.

[4] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease[J]. Cell, 2008, 132(1): 1-42.

[5] Sui X, Chen R, Wang Z, et al. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment[J]. Cell Death Dis, 2013, 4(10): e838.

[6] Levin B. Eating oneself and uninvited guests autophagy-related pathways in cellular defense[J]. Cell, 2005, 120(2): 159-162.

[7] Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy[J]. Dev Cell, 2004, 6(4): 463-477.

[8] Yang ZJ, Chee CE, Huang S, et al. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications[J]. Mol Cancer Ther, 2011, 10(9): 1533-1541.

[9] Gibson SB. Investigating the role of reactive oxygen species in regulating autophagy[J]. Method Enzymol, 2013, 528(528C): 217.

[10] Ramsey MR, Sharpless NE. ROS as a tumour suppressor?[J]. Nat Cell Biol, 2006, 8(11): 1213-1215.

[11] Takahashi A, Ohtani N, Yamakoshi K, et al. Mitogenic signaling and the p16INK4a–Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence[J]. Nat Cell Biol, 2006, 8(11): 1291-1297.

[12] Gupta SC, Hevia D, Patchva S, et al. Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy[J]. Antioxid Redox Sign, 2012, 16(11): 1295-1322.

[13] Jun T, Haibo C, Hongyan W, et al. MiR-30a-5p inhibits osteosarcoma cell proliferation and migration by targeting FOXD1[J]. Biochem Bioph Res Co, 2018, 503(2): 1092-1097.

[14] Du L, Chen T, Zhao K, et al. miR-30a suppresses osteosarcoma proliferation and metastasis by downregulating MEF2D expression[J]. Oncotargets Ther, 2018, 11: 2195-2202.

[15] Zhong B, Guo S, Zhang W, et al. Bioinformatics prediction of miR-30a targets and its inhibition of cell proliferation of osteosarcoma by up-regulating the expression of PTEN[J]. BMC Med Genomics, 2017, 10(1): 64.

[16] Xu R, Liu S, Chen H, et al. MicroRNA-30a downregulation contributes to chemoresistance of osteosarcoma cells through

activating Beclin-1-mediated autophagy.[J] Oncol Rep, 2016, 35(3): 1757-6319.

[17] Zhang R, Yan S, Wang J, et al. MiR-30a regulates the proliferation, migration, and invasion of human osteosarcoma by targeting Runx2[J]. Tumour Biol, 2016, 37(3): 3479-3488.

[18] Guo R, Hu N, Kandadi MR, et al. Facilitated ethanol metabolism promotes cardiomyocyte contractile dysfunction through autophagy in murine hearts[J]. Autophagy, 2012, 8(4): 593-608.

[19] Zhu H, Wu H, Liu X, et al. Regulation of autophagy by a beclin 1-targeted microRNA, miR-30a, in cancer cells[J]. Autophagy, 2009, 5(6): 816-823.

[20] Yu Y, Yang L, Zhao M, et al. Targeting microRNA-30a-mediated autophagy enhances imatinib activity against human chronic myeloid leukemia cells[J]. Autophagy, 2012, 8(5): 853-855.

[21] Fedele M, Battista S, Kenyon L, et al. Overexpression of the HMGA2 gene in transgenic mice leads to the onset of pituitary adenomas[J]. Oncogene, 2002, 21(20): 3190-3198.

[22] Fedele M, Pierantoni GM, Visone R, et al. Critical role of the HMGA2 gene in pituitary adenomas[J]. Cell Cycle, 2006, 5(18): 2045-2048.

[23] Meyer B, Loeschke S, Schultze A, et al. HMGA2 overexpression in non-small cell lung cancer[J]. Mol Carcinogen, 2010, 46(7): 503-511.

[24] Di Fiore R, Drago-Ferrante R, Pentimalli F, et al. Let-7d miRNA shows both antioncogenic and oncogenic functions in osteosarcoma-derived 3AB-OS cancer stem cells[J]. J Cell Physiol, 2016, 231(8): 1832-1841.

[25] Boo LM, Lin HH, Chung V, et al. High mobility group A2 potentiates genotoxic stress in part through the modulation of basal and DNA damage-dependent phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase activation[J]. Cancer Res, 2005, 65(15): 6622-6630

[26] Ringborg U, Platz A. Chemotherapy resistance mechanisms[J]. Acta Oncol, 1996, 35(suppl5): 76-80.

[27] Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, et al. Targeting multidrug resistance in cancer[J]. Nat Rev Drug Discov, 2006, 5(3): 219-234.

[28] Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy[J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(9): 814-822.

[29] Elke F, Astrid W, Simone G, et al. Chloroquine or chloroquine-PI3K/Akt pathway inhibitor combinations strongly promote γ-irradiation-induced cell death in primary stem-like glioma cells[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e47357.

[30] Bellot GL, Liu D, Pervaiz S. ROS, autophagy, mitochondria and cancer: Ras, the hidden master?[J]. Mitochondrion, 2013, 13(3): 155-162.

[31] Liu Y, Cui Y, Shi M, et al. Deferoxamine promotes MDA-MB-231 cell migration and invasion through increased ROS-dependent HIF-1a accumulation[J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 33(4): 1036-1046.

[32] Chen J, Yu Y, Li S, et al. MicroRNA-30a ameliorates hepatic fibrosis by inhibiting Beclin 1-mediated autophagy[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(12): 3679-3692

[33] Yang X, Bai F, Xu Y, et al. Intensified Beclin-1 mediated by low expression of Mir-30a-5p promotes chemoresistance in human small cell lung cancer[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 43(3): 1126-1139.

[34] Hardwick JM, Soane L. Multiple functions of BCL-2 family proteins[J]. CSH Perspect Biol, 2013, 5(2): 152-158.

[35] Huang J, Ni J, Liu K, et al. HMGB1 promotes drug resistance in osteosarcoma[J]. Cancer Res, 2012, 72(1): 230-238.

[36] Huang J, Liu K, Yu Y, et al. Targeting HMGB1-mediated autophagy as a novel therapeutic strategy for osteosarcoma[J]. Autophagy, 2012, 8(2): 275-277.

[37] Yang F, Zhao L, Mei D, et al. HMGA2 plays an important role in Cr (VI)-induced autophagy[J]. Int J Cancer, 2017, 141(5): 986-997.

(本文编辑　傅希文)

本文引用：夏勤, 倪江东, 黄俊, 潘柏祺, 严明明, 李文钊. 抑制miR-30a/HMGA2介导的骨肉瘤细胞自噬对化学药物治疗诱导的细胞凋亡的作用[J]. 中南大学学报(医学版), 2019, 44(7): 757-766. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2019.180449

Cite this article as: XIA Qin, NI Jiangdong, HUANG Jun, PAN Baiqi, YAN Mingming, LI Wenzhao. Suppression of miR-30a/HMGA2-mediated autophagy in osteosarcoma cells impacts chemotherapeutics-induced apoptosis[J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2019, 44(7): 757-766. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2019.180449