

miR-125b-5p 通过负调控 RAB3D 基因表达抑制骨肉瘤细胞增殖与迁移

谈秋瑜¹, 吴旭¹, 纪方², 吴少云³, 颜亮¹

¹皖南医学院活性生物大分子安徽省重点实验室, 安徽 芜湖 241002; ²海军军医大学附属长海医院, 上海 200433; ³芜湖医药卫生学校, 安徽 芜湖 241000

摘要:目的 探讨 miR-125b-5p 调控 RAB3D 在骨肉瘤增殖与迁移中的作用机制。方法 通过 qRT-PCR 检测正常骨细胞 hFOB1.19、骨肉瘤细胞系(MG63、HOS)中 miR-125b-5p 的表达水平。骨肉瘤细胞系中通过脂质体转染升高或降低 miR-125b-5p 的表达,通过 EDU 和 Transwell 实验检测骨肉瘤细胞增殖和迁移的变化;通过生物信息学软件预测 miR-125b-5p 可能调控的靶基因为 RAB3D;通过 Western blot 检测正常骨细胞 hFOB1.19、骨肉瘤细胞系(MG63、HOS)中 RAB3D 的表达水平;骨肉瘤细胞系中通过脂质体转染升高或降低 miR-125b-5p 的表达,通过 Western blot 及 qRT-PCR 实验检测骨肉瘤细胞中 RAB3D mRNA 及蛋白表达水平;并在骨肉瘤细胞中通过脂质体转染升高或降低 RAB3D 的表达,通过 EDU 和 Transwell 实验检测骨肉瘤增殖和迁移的变化;随后在骨肉瘤细胞中通过脂质体转染同时升高 miR-125b-5p 和 RAB3D 的表达量,通过 EDU 和 Transwell 实验检测骨肉瘤细胞增殖和迁移的变化。**结果** qRT-PCR 结果表明在骨肉瘤细胞(MG63、HOS)中 miR-125b-5p 的表达明显下调($P<0.05$)。3 种生物信息学软件预测 RAB3D 是 miR-125b-5p 可能调控的靶基因。qRT-PCR、Western blot 结果显示,miR-125b-5p 表达量升高,骨肉瘤细胞(MG63、HOS)中 RAB3D 的蛋白表达量下降($P<0.05$);miR-125b-5p 表达量降低,骨肉瘤细胞(MG63、HOS)中 RAB3D 的蛋白表达量下降($P<0.05$),而 RAB3D 的 mRNA 水平没有发生变化。细胞增殖及迁移实验结果显示,miR-125b-5p 与 RAB3D 对细胞增殖及迁移的影响相反,而同时在骨肉瘤细胞内升高 miR-125b-5p 与 RAB3D 的表达量,RAB3D 对骨肉瘤细胞增殖及迁移的影响在重新升高 miR-125b-5p 表达量时被阻断($P<0.05$)。**结论** miR-125b-5p 在转录后水平通过调控 RAB3D 的表达抑制了骨肉瘤细胞的增殖和迁移。

关键词: miR-125b-5p; RAB3D; 骨肉瘤细胞; 细胞增殖; 细胞迁移

miR-125b-5p inhibits proliferation and migration of osteosarcoma cells by negatively regulating RAB3D expression

TAN QiuYu¹, WU Xu¹, JI Fang², WU Shaoyun³, YAN Liang¹

¹Provincial Key Laboratory of Biological Macro-molecules Research, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China; ²Changhai Hospital Affiliated to Naval Military Medical University, Shanghai 200433, China; ³Wuhu Medical and Health School, Wuhu 241000, China

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of miR-125b-5p on proliferation and migration of osteosarcoma and the role of RAB3D in mediating this effect. **Methods** The expression level of miR-125b-5p was detected by qRT-PCR in a normal bone cell line (hFOB1.19) and in two osteosarcoma OS cell lines (MG63 and HOS). A miR-125b-5p mimic or inhibitor was transfected in the osteosarcoma cell lines via liposome and the changes in cell proliferation and migration were detected with EDU and Transwell experiments. Bioinformatic analysis was conducted for predicting the target gene of miR-125b-5p, and the expression level of RAB3D in hFOB1.19, MG63, and HOS cells was detected by Western blotting. In the two osteosarcoma cell lines transfected with miR-125b-5p mimic or inhibitor, the expression levels of RAB3D mRNA and protein in osteosarcoma cells were examined with qRT-PCR and Western blotting. The effects of RAB3D overexpression, RAB3D knockdown, or overexpression of both miR-125b-5p and RAB3D on the proliferation and migration of cells were assessed using EDU and Transwell experiments. **Results** The two osteosarcoma cell lines had significantly lower expression levels of miR-125b-5p ($P<0.05$). Bioinformatic analysis predicted that RAB3D was a possible target gene regulated by miR-125b-5p. In osteosarcoma cells, overexpression of miR-125b-5p significantly lowered the expression of RAB3D protein ($P<0.05$); inhibiting miR-125b-5p expression significantly decreased RAB3D expression only at the protein level ($P<0.05$) without obviously affecting its mRNA level. Modulation of miR-125b-5p and RAB3D levels produced opposite effects on proliferation and migration of osteosarcoma cells, and in cells with overexpression of both miR-125b-5p and RAB3D, the effect of RAB3D on cell proliferation and migration was blocked by miR-125b-5p overexpression ($P<0.05$). **Conclusion** Overexpression of miR-125b-5p inhibits the proliferation and migration of osteosarcoma cells by regulating the expression of RAB3D at the post-transcriptional level.

Keywords: miR-125b-5p; RAB3D; osteosarcoma cells; cell proliferation; cell migration

收稿日期:2022-08-26

基金项目:国家自然科学基金(81872171);安徽省科研编制计划项目科学研究项目一重大项目(2022AH040179);安徽省高校自然科学基金重点项目(KJ2021A0852, KJ2021A0856);皖南医学院青年卓越人才项目(Wyqnyx202002)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81872171).

作者简介:谈秋瑜,硕士研究生,E-mail: tanqiuYu20209010@163.com

通信作者:颜亮,副教授,博士,E-mail: liyan@wnmc.edu.cn

骨肉瘤是一种主要发生于青少年的骨组织恶性肿瘤,其结缔组织能直接诱导产生肿瘤骨或骨样组织,常发生于管状骨,且预后不良^[1,2]。虽然现在骨肉瘤的临床治疗方法不断完善,但由于骨肉瘤的高度异质性,经常出现转移性病例,而转移性病例的生存率仅仅只有20%^[3,4]。因此,对骨肉瘤发展的具体机制进行进一步研究尤为重要。

微RNA(miRNA)是一类长度为18~24核苷酸的单链非编码RNA分子,通过序列互补特定识别并结合到靶基因mRNA的3'末端非翻译区域(UTR),抑制靶基因mRNA翻译,从而起到调控基因表达的作用^[5]。现有研究证实miRNAs在细胞增殖、分化、凋亡和迁移等细胞进程方面发挥了重要作用,在多种癌症中也发现miRNAs起到抑癌或促癌的作用^[6,7]。在已有的研究中^[8],miR-125b-5p在多种肿瘤的发生与发展中发挥着重要的作用。有研究表明^[9],miR-125b-5p可以下调TPD52基因表达,从而影响乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭。另有研究表明,miR-125b-5p在膀胱癌中呈现异常表达^[10]。以往研究表明^[11],miR-125b通过抑制STAT3基因表达抑制了骨肉瘤细胞的增殖及迁移。但由于miR-125b的前体经过加工剪切后会形成miR-125b-5p及miR-125b-3p二种产物,因此有必要探讨哪一种miRNA在骨肉瘤中发挥具体作用。

RAB3D是分泌组织中表达的一类小分子GTP结合蛋白,该蛋白参与膜运输,并在细胞增殖、凋亡及迁移方面发挥了重要作用^[12]。研究表明,RAB3D在多种癌症的发展中发挥了作用,如:RAB3D促进了食管鳞状细胞癌细胞的增殖和迁移^[13];另有研究表明,RAB3D通过影响CDK4和CDK6信号传导来刺激肿瘤细胞周期进程,从而影响肿瘤细胞增殖^[14]。而在骨肉瘤中有关miR-125b-5p调控RAB3D的研究还未见报道,亟需进一步研究。

本文通过生物信息学预测,miR-125b-5p可能结合的靶基因为RAB3D,并研究了RAB3D对骨肉瘤细胞增殖及迁移的影响,在体外探讨了miR-125b-5p通过调控RAB3D抑制骨肉瘤增殖及迁移的具体机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人骨肉瘤细胞MG63、HOS、永生化人软骨细胞hFOB1.19(中科院上海细胞库)。

1.1.2 试剂 Lipofectamine 3000(Thermo);DMEM培养基(Gibco);胰酶(Gibco);胎牛血清(Sigma);RIPA裂解液(碧云天);BCA蛋白浓度检测试剂(Thermo Fisher);DMSO(Sigma);GAPDH I抗、RAB3D I抗(Proteintech);山羊抗兔II抗(Santa cruz);山羊抗鼠II抗(Santa cruz);G418(碧云天)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人骨肉瘤细胞系MG63、HOS细胞及人软骨细胞hFOB1.19培养于37℃的恒温培养箱中,用含有10%的血清的DMEM培养,待细胞融合度长至80~90%时,进行下一步实验。

1.2.2 细胞转染 将细胞在六孔板中培养,待细胞融合度达到60%~70%时,按照Lipofectamine 3000的说明书将等量的miR-125b-5p过表达(miR-125b-5p mimic,

广州锐博生物科技有限公司)及抑制剂(miR-125b-5p inhibitor,广州锐博生物科技有限公司)、RAB3D过表达质粒(OE-RAB3D,上海吉玛制药有限公司)及siRNA(si-RAB3D,上海吉玛制药有限公司)转染到骨肉瘤细胞中。细胞分组为:Control mimic;miR-125b-5p mimic;Control inhibitor;miR-125b-5p inhibitor;Si-control;Si-RAB3D;OE-control;OE-RAB3D;Control mimic+OE-control;Control mimic+OE-RAB3D;miR-125b-5p mimic+OE-control;miR-125b-5p mimic+OE-RAB3D。

1.2.3 生物信息学分析筛选miR-125b-5p可能结合的靶基因 为找出miR-125b-5p可能调控的靶基因,通过3种不同的生物信息学软件^[15](TargetScan、miRanda及PicTar)筛选可能结合miR-125b-5p的靶基因。在候选靶基因中,3种软件一致预测RAB3D是miR-125b-5p结合的靶基因。

1.2.4 细胞迁移实验 在24孔板中每孔加入600 μL的含有20%血清的DMEM,将MG63细胞用不含血清的DMEM重悬,含有 5×10^3 MG63细胞的Transwell小室插入24孔板中。24 h后将Transwell小室取出,PBS清洗一遍后放入4%多聚甲醛中,室温固定20 min,用PBS清洗3遍,放入0.5%的结晶紫溶液中染色15 min,1×PBS清洗3遍后,使用电子显微镜(Olympus BX51)进行拍照。

1.2.5 细胞增殖实验 细胞增殖实验使用EdU试剂盒法,根据说明书按照以下步骤操作:加入稀释的EdU溶液(每1 mL完全培养基中加入EdU溶液1 μL)1 mL于37℃孵育2 h;随后,PBS清洗3遍,加入150 μL的4%多聚甲醛固定30 min;吸掉培液,再加入浓度为2 mg/mL的甘氨酸溶液150 μL,室温孵育5 min;PBS清洗3遍,随后加入250 μL的渗透液(0.5% Triton×100)孵育10 min;PBS清洗1遍;加入250 μL/L的染色液(Appollo染色液)室温避光30 min,渗透液清洗3次,10 min/次;随后用1×DAPI进行细胞核染色30 min,再用PBS清洗2次;最后采用Olympus BX51荧光显微镜察并拍照。

1.2.6 总RNA提取和qRT-PCR 细胞总RNA提取使用RNA快速提取试剂盒进行,并使用逆转试剂盒将总RNA逆转录为cDNA。通过qRT-PCR法测定miR-125b-5p表达量(U6作为内参基因)及RAB3D mRNA表达量(GAPDH作为内参基因)。RAB3D和GAPDH引物序列如表1所示。数据计算使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法。

1.2.7 蛋白提取和Western blot 使用RIPA裂解细胞,冰上裂解40 min,4℃、12 000 r/min离心20 min;取上清,使用BCA法对蛋白质进行定量,随后加入1/5体积的5×SDS上样缓冲液,100℃金属浴,5 min。10% SDS-PAGE电泳后,开始转膜(300 mA,90 min),转膜结束后,将膜放入5%脱脂奶粉中,封闭1 h。最后加入RAB3D I抗(1:1000稀释),4℃孵育过夜。第2天,将膜

表1 RAB3D及GAPDH引物序列
Tab.1 Primer sequences for RAB3D and GAPDH

	Upstream sequence	Downstream sequence
GAPDH	5'-CGAGCCACATCGCTCAGACA-3'	5'-GTGGTGAAGACGCCAGTGA-3'
RAB3D	5'-TTCCTGTTCCGATACGCGG-3'	5'-TACATGAGCAGGAAGCCCAT-3'

取出加入1×TBST清洗6遍(5 min/遍)。随后,加入II抗(1:5000稀释),常温孵育1 h,将膜取出,1×TBST清洗6遍(5 min/遍)。将膜置于曝光板,确保正面朝上,加入发光底物,化学发光成像仪曝光。

1.2.8 数据统计 数据统计与分析运用SPSS v17.0软件,数据以均数±标准差表示,组间比较用单因素方差分析, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-125b-5p抑制骨肉瘤细胞的增殖和迁移

qRT-PCR结果表明(图1A),与正常的人软骨细胞hFOB1.19相比,在MG63与HOS细胞中miR-125b-5p的表达量分别只有人软骨细胞hFOB1.19的67.7% ($P<0.05$)及3.27% ($P<0.05$)。细胞增殖实验结果(图1B~E)显示,在过表达miR-125b-5p时,与对照组相比,MG63细胞和HOS细胞的增殖能力分别被抑制了36.1% ($P<0.05$)及29.4% ($P<0.05$);而在抑制miR-125b-5p时,与对照组相比,MG63细胞和HOS的增殖能力分别升高了1.32倍($P<0.05$)及1.26倍($P<0.05$)。细胞迁移实验的结果(图1F~I)显示,在过表达miR-125b-5p时,与对照组相比,MG63细胞和HOS细胞的迁移能力分别被抑制了50.3% ($P<0.05$)及50.8% ($P<0.05$);而在抑制miR-125b-5p时,与对照组相比,MG63细胞和HOS细胞的迁移能力分别升高了2.15倍($P<0.05$)及1.41倍($P<0.05$)。

2.2 生物信息学预测并验证miR-125b-5p调控RAB3D基因表达

通过3种生物信息学软件,预测了miR-125b-5p可能结合的靶基因。3种软件一致得出RAB3D是miR-125b-5p可能结合的靶基因(图2A),且RAB3D与miR-125b-5p的结合能为-20.6 kcal/mol,符合miRNAs与靶基因结合的结合能范围之内。qRT-PCR结果表明(图2B),转染miR-125b-5p mimic到骨肉瘤细胞后,与对照组相比,细胞内的miR-125b-5p明显升高($P<0.05$);而转染miR-125b-5p inhibitor到细胞后,细胞内的miR-125b-5p明显降低($P<0.05$)。Western blot实验显示(图2D,E),转染miR-125b-5p mimic到骨肉瘤细胞后,RAB3D的蛋白表达水平与对照组相比显著降低($P<0.05$);转染miR-125b-5p inhibitor到骨肉瘤细胞后,RAB3D的蛋白表达水平与对照组相比显著升高($P<0.05$);而

RAB3D的mRNA水平,与对照组相比,变化无统计学意义(图2C)。

2.3 RAB3D促进骨肉瘤细胞的增殖和迁移

Western blot实验结果(图3A)显示在骨肉瘤细胞HOS、MG63细胞中,RAB3D的蛋白表达量较正常人软骨细胞分别升高了3.37倍($P<0.05$)及2.07倍($P<0.05$)。Western blot实验结果显示,在MG63细胞(图3B~E)与HOS细胞内过表达RAB3D后,其蛋白表达量与对照组相比明显升高($P<0.05$),在细胞内干扰RAB3D的表达后,其蛋白表达量明显降低($P<0.05$)。细胞增殖实验结果(图3F~I)显示,RAB3D蛋白水平过表达后,骨肉瘤细胞MG63与HOS的增殖能力与对照组相比,分别升高了1.67倍($P<0.05$)及1.21倍($P<0.05$);而RAB3D蛋白表达水平被抑制后,骨肉瘤细胞MG63与HOS的增殖能力与对照组相比,分别抑制了36% ($P<0.05$)及29.3% ($P<0.05$)。细胞迁移实验的结果显示(图3J~M),RAB3D蛋白水平过表达后,骨肉瘤细胞MG63与HOS的迁移能力与对照组相比,分别升高了1.63倍($P<0.05$)及1.35倍($P<0.05$);而RAB3D蛋白表达水平被抑制后,骨肉瘤细胞MG63与HOS的迁移能力与对照组相比,分别抑制了65%及57.4% ($P<0.05$)。

2.4 miR-125b-5p调控RAB3D基因表达抑制了骨肉瘤细胞的增殖和迁移

因此本研究在两种骨肉瘤细胞MG63和HOS中设置4个不同的组别:Control mimic+OE-Control, OE-RAB3D+Control mimic, miR-125b-5p+OE-Control, miR-125b-5p mimic+OE-RAB3D。细胞增殖实验结果(图4A~D)显示,提高RAB3D的表达明显促进了骨肉瘤细胞的增殖能力($P<0.05$),而这种被提高的增殖能力在同时过表达miR-125b-5p后被阻断。细胞迁移实验结果(图4E~H)显示,提高RAB3D的表达明显促进了骨肉瘤细胞的迁移能力($P<0.05$),而这种被提高的迁移能力在同时过表达miR-125b-5p后被阻断。

3 讨论

有研究表明,miR-125b-5p在多种癌症中发挥了调控作用^[16]。如miR-125b-5p通过调控SOX12基因的表达抑制了乳腺癌细胞的转移^[17]。miR-125b-5p通过调控TXNRD1基因的表达抑制了肝癌细胞的增殖、迁移及侵袭^[18]。上述研究表明,miR-125b-5p在多种肿瘤中

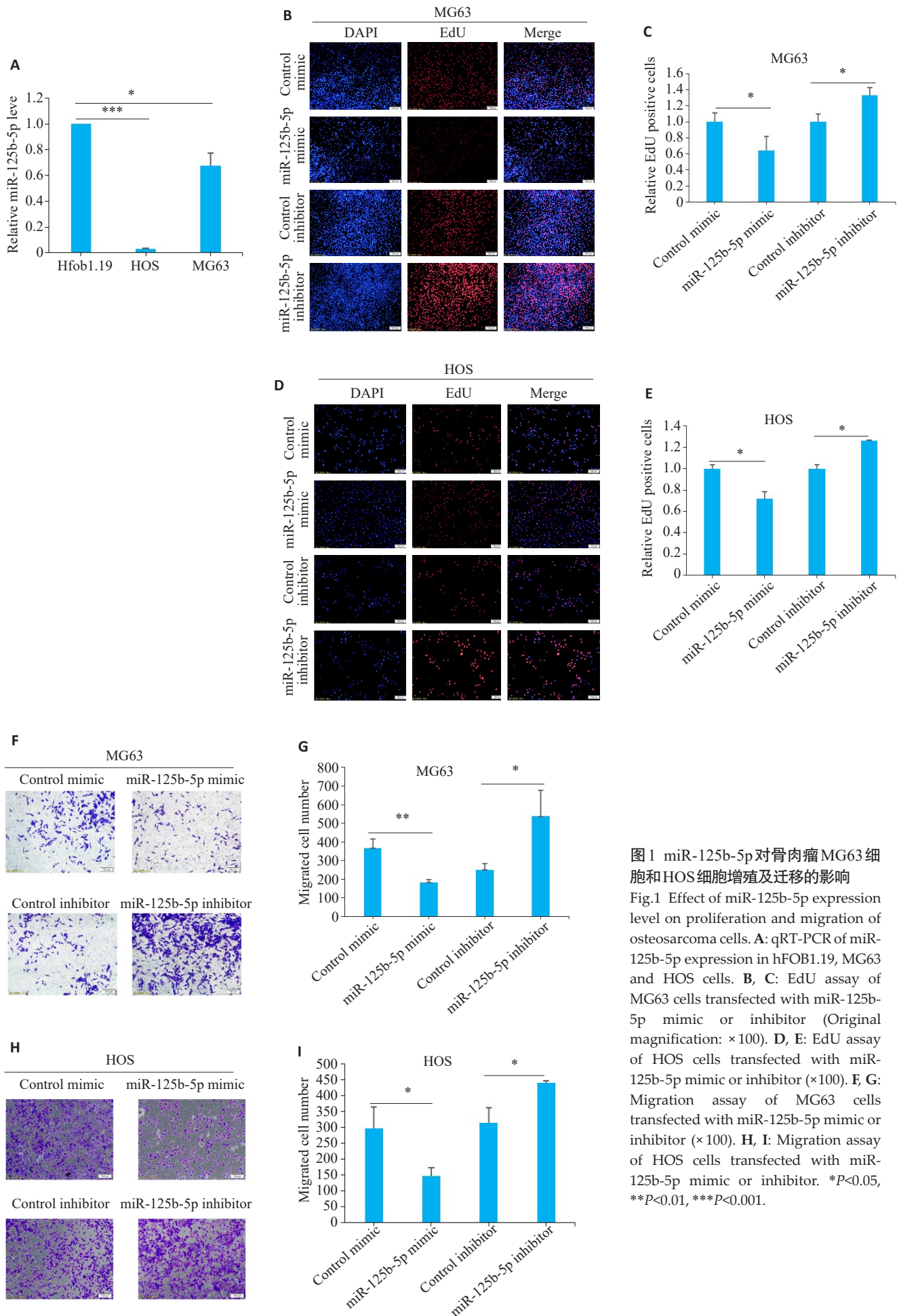


图1 miR-125b-5p对骨肉瘤MG63细胞和HOS细胞增殖及迁移的影响

Fig.1 Effect of miR-125b-5p expression level on proliferation and migration of osteosarcoma cells. **A**: qRT-PCR of miR-125b-5p expression in hFOB1.19, MG63 and HOS cells. **B**, **C**: EdU assay of MG63 cells transfected with miR-125b-5p mimic or inhibitor (Original magnification: $\times 100$). **D**, **E**: EdU assay of HOS cells transfected with miR-125b-5p mimic or inhibitor ($\times 100$). **F**, **G**: Migration assay of MG63 cells transfected with miR-125b-5p mimic or inhibitor ($\times 100$). **H**, **I**: Migration assay of HOS cells transfected with miR-125b-5p mimic or inhibitor. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

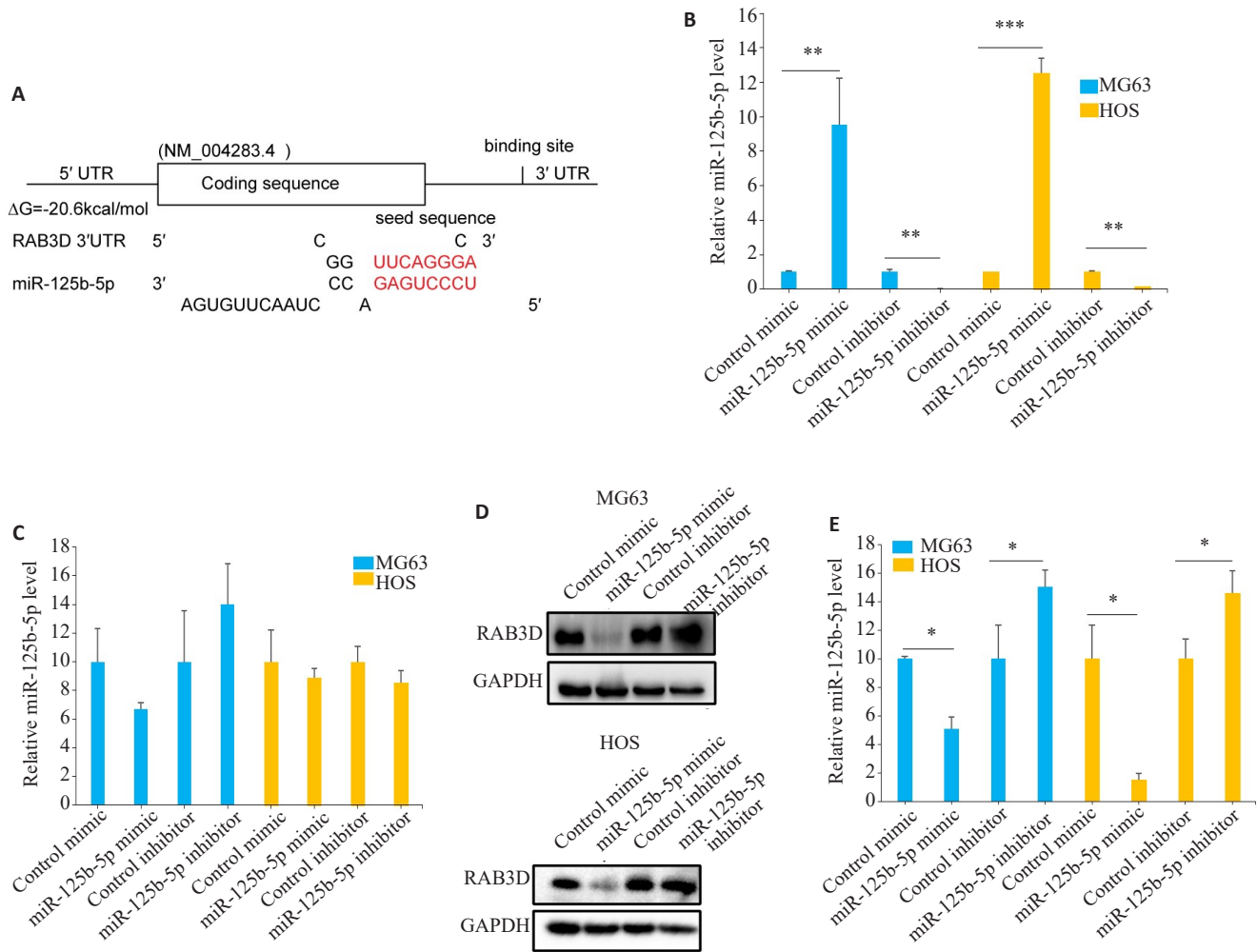


图2 骨肉瘤中 miR-125b-5p 调控 RAB3D 基因表达

Fig.2 miR-125b-5p regulates RAB3D gene expression. A: Duplex structures of miR-125b-5p and the 3'UTR of RAB3D. B: qRT-PCR of miR-125b-5p expression in cells transfected with control mimic/inhibitor or miR-125b-5p mimic/inhibitor. C: qRT-PCR of RAB3D mRNA in cells transfected with control mimic/inhibitor or miR-125b-5p mimic/inhibitor. D, E: Western blotting of cells transfected with control mimic/inhibitor or miR-125b-5p mimic/inhibitor. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

抑制了肿瘤的发展。虽有研究表明, Circular RNA 0086996 通过吸附 miR-125b-5p 在骨肉瘤中调控了肿瘤的生长及迁移^[19], 但 miR-125b-5p 在骨肉瘤中发挥功能的具体作用机制还不明确。本研究以此作为切入点, 选择 miR-125b-5p 作为研究对象。我们比较了正常人软骨细胞与骨肉瘤细胞中的 miR-125b-5p 的含量, 发现在骨肉瘤细胞系中低表达, 随后我们通过干预 miR-125b-5p 的表达证实了 miR-125b-5p 抑制骨肉瘤细胞的增殖及迁移, 这与已有的研究结果相一致^[19]。

随后, 本研究通过 3 种生物信息学软件, 预测了 miR-125b-5p 可能结合的靶基因为 RAB3D。RAB3D 作为 RAS 癌基因家族成员之一, 在多种癌症进展中起到了重要的作用^[20-22]。目前, 已有报道在多种癌症中存在 miRNAs 调控 RAB3D 基因表达的机制, 如 miR-30b-5p 通过靶向 RAB3D 抑制肾癌细胞增殖和迁移能力^[23,24]。但关于骨肉瘤中 miR-125b-5p 调控 RAB3D 的研究还未见报道。本研究通过在二种骨肉瘤细胞中干预 RAB3D

基因的表达, 通过体外功能实验, 发现 RAB3D 促进了骨肉瘤细胞的增殖与迁移, 这与 miR-125b-5p 对骨肉瘤细胞增殖及迁移的作用相反。

随后, 本研究在骨肉瘤两个细胞系中通过 western blot 实验证实了骨肉瘤中 miR-125b-5p 可以在转录后水平调控 RAB3D 基因的表达, 同时通过细胞回复实验也证实了 miR-125b-5p 通过调控 RAB3D 的表达进而抑制骨肉瘤细胞的增殖和迁移。研究表明, 多个 miRNA 可以调控一个基因的表达进而抑制或者促进肿瘤进程^[25]。结合文献及我们的研究成果, 本研究发现 miR-125b-5p 通过调控 RAB3D 的表达抑制了骨肉瘤细胞的增殖与迁移, 为 miR-125b-5p 抑制骨肉瘤细胞增殖与迁移提供了一个新的作用机制。

RAB3D 是原癌基因 RAS 基因家族的成员, 参与调控信号传导、细胞增殖等生物过程^[26,27]。在先前的报告中, RAB3D 在各种类型的癌症中表达失调^[20,27]。骨肉瘤的不断增殖与远处转移是骨肉瘤患者预后不良、

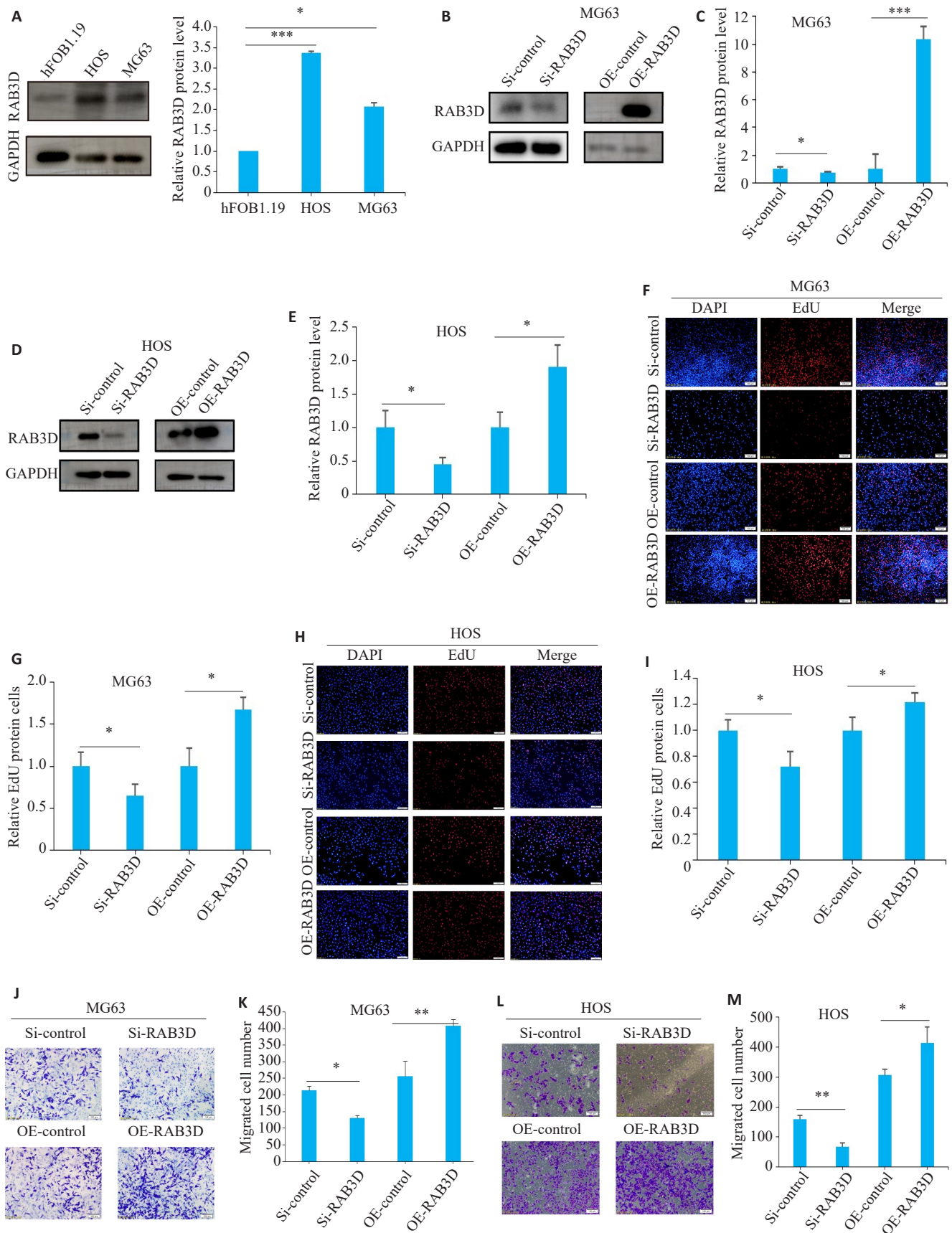


图3 RAB3D促进了骨肉瘤MG63细胞和HOS细胞的增殖及迁移

Fig.3 Effect of RAB3D expression level on proliferation and migration of osteosarcoma cells. **A**: Western blotting for detecting RAB3D expression in hFOB1.19, HOS and MG63 cells. **B**, **C**: Western blotting of RAB3D expression in MG63 cells transfected with RAB3D siRNA or overexpression vector. **D**, **E**: Western blotting of RAB3D expression in HOS cells transfected with RAB3D siRNA or overexpression vector. **F**, **G**: EdU assay of MG63 cells transfected with RAB3D siRNA or overexpression vector ($\times 100$). **H**, **I**: EdU assay of HOS cells transfected with RAB3D siRNA or overexpression vector ($\times 100$). **J**, **K**: Migration assays of MG63 cells transfected with RAB3D siRNA or overexpression vector ($\times 100$). **L**, **M**: Migration assay of HOS cells transfected with RAB3D siRNA or overexpression vector ($\times 100$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

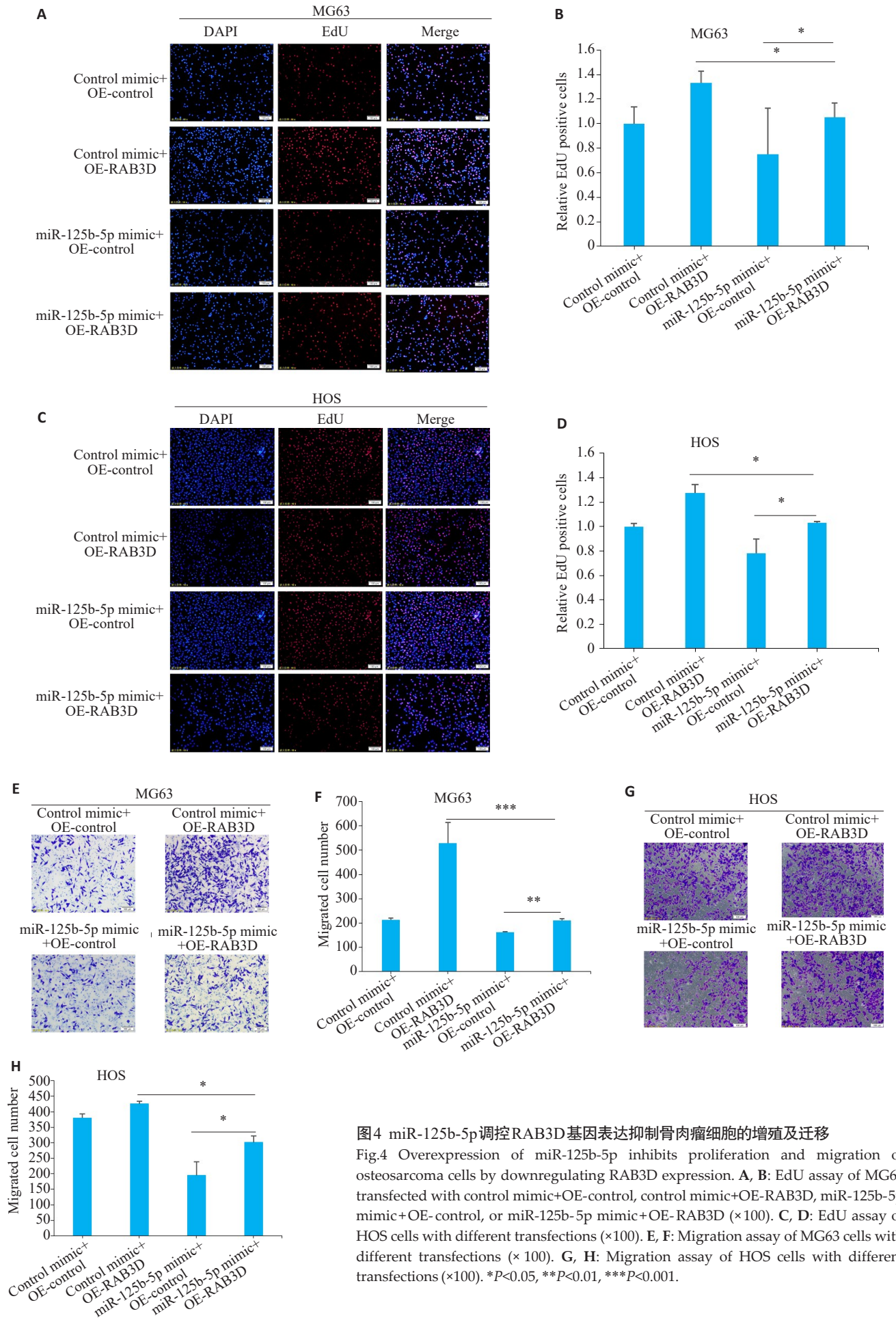


图4 miR-125b-5p调控RAB3D基因表达抑制骨肉瘤细胞的增殖及迁移

Fig.4 Overexpression of miR-125b-5p inhibits proliferation and migration of osteosarcoma cells by downregulating RAB3D expression. **A, B**: EdU assay of MG63 transfected with control mimic+OE-control, control mimic+OE-RAB3D, miR-125b-5p mimic+OE-control, or miR-125b-5p mimic+OE-RAB3D ($\times 100$). **C, D**: EdU assay of HOS cells with different transfections ($\times 100$). **E, F**: Migration assay of MG63 cells with different transfections ($\times 100$). **G, H**: Migration assay of HOS cells with different transfections ($\times 100$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

生存期短的主要原因。已有研究表明RAB3D可以通过调节PI3K/Akt信号通路参与对肿瘤细胞的增殖和转移^[28, 29]。而PI3K/Akt信号通路在调节细胞功能方面起着关键作用,包括生存、分化、血管生成、侵袭和转移^[30],且越来越多的证据表明PI3K/Akt信号通路在骨肉瘤中起重要作用^[31]。结合现有文献与我们的研究成果,推测miR-125b-5p可以通过调控RAB3D的表达抑制了骨肉瘤细胞的增殖与迁移,是由于PI3K/Akt信号通路的改变。因此在今后的研究中我们将进一步深入探讨。

综上所述,本文新发现并证实miR-125b-5p可以通过靶向调控RAB3D基因的表达从而抑制骨肉瘤细胞的功能,该发现阐明了miR-125b-5p抑制骨肉瘤细胞功能的具体分子机制。该研究结果也补充了既往关于骨肉瘤miRNA调控RAB3D表达的研究,为未来miR-125b-5p作为骨肉瘤治疗的潜在核酸药物提供新的理论基础。

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] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2022[J]. *CA A Cancer J Clinicians*, 2022, 72(1): 7-33.
- [3] Jiang RB, Dai ZB, Wu JS, et al. METTL3 stabilizes HDAC5 mRNA in an m6A-dependent manner to facilitate malignant proliferation of osteosarcoma cells[J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 179.
- [4] Gill J, Gorlick R. Advancing therapy for osteosarcoma[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(10): 609-24.
- [5] Hill M, Tran N. miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer[J]. *Dis Model Mech*, 2021, 14(4): dmm047662.
- [6] Huang XJ, Zhu XP, Yu Y, et al. Dissecting miRNA signature in colorectal cancer progression and metastasis[J]. *Cancer Lett*, 2021, 501: 66-82.
- [7] Wang JK, Wang Z, Li GD. microRNA-125 in immunity and cancer [J]. *Cancer Lett*, 2019, 454: 134-45.
- [8] Tang L, Yuan YX, Zhai HQ, et al. microRNA-125b-5p correlates with prognosis and lung adenocarcinoma progression[J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 788690.
- [9] Wang YZ, Fang J, Gu FY. miR-125b-5p/TPD52 axis affects proliferation, migration and invasion of breast cancer cells[J]. *Mol Biotechnol*, 2022, 64(9): 1003-12.
- [10] Wen Z, Huang G, Lai Y, et al. Diagnostic panel of serum miR-125b-5p, miR-182-5p, and miR-200c-3p as non-invasive biomarkers for urothelial bladder cancer[J]. *Clin Transl Oncol*, 2022, 24(5): 909-18.
- [11] Liu LH, Li H, Li JP, et al. miR-125b suppresses the proliferation and migration of osteosarcoma cells through down-regulation of STAT3 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 416(1/2): 31-8.
- [12] Raffaniello RD. Rab3 proteins and cancer: exit strategies[J]. *J Cell Biochem*, 2021, 122(10): 1295-301.
- [13] Zhang J, Kong RR, Sun LZ. Silencing of Rab3D suppresses the proliferation and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 91: 402-7.
- [14] Boulay PL, Mitchell L, Turpin J, et al. Rab11-FIP1C is a critical negative regulator in ErbB2-mediated mammary tumor progression [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(9): 2662-74.
- [15] Yan L, Li K, Feng ZY, et al. lncRNA CERS6-AS1 as ceRNA promote cell proliferation of breast cancer by sponging miR-125a-5p to upregulate BAP1 expression[J]. *Mol Carcinog*, 2020, 59(10): 1199-208.
- [16] Huang SP, Jiang YF, Yang LJ, et al. Downregulation of miR-125b-5p and its prospective molecular mechanism in lung squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2022, 37(2): 125-40.
- [17] Zhai DY, Li TF, Ye RY, et al. LncRNA LGALS8-AS1 promotes breast cancer metastasis through miR-125b-5p/SOX12 feedback regulatory network[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 711684.
- [18] Hua SN, Quan YY, Zhan MX, et al. miR-125b-5p inhibits cell proliferation, migration, and invasion in hepatocellular carcinoma via targeting TXNRD1[J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 203.
- [19] Luo ZP, Yang Y, Li DW, et al. Circular RNA 0086996 regulates growth and migration of osteosarcoma cells via miR-125b-5p [J]. *Pathol Res Pract*, 2020, 216(11): 153230.
- [20] Ma J, Li QX, Li YL. CircRNA PRH1-PRR4 stimulates RAB3D to regulate the malignant progression of NSCLC by sponging miR-877-5p[J]. *Thorac Cancer*, 2022, 13(5): 690-701.
- [21] Li S, Liu Y, Bai YF, et al. Ras homolog family member F, filopodia associated promotes hepatocellular carcinoma metastasis by altering the metabolic status of cancer cells through RAB3D[J]. *Hepatology*, 2021, 73(6): 2361-79.
- [22] Kat M, Bürgisser PE, Janssen H, et al. GDP/GTP exchange factor MADD drives activation and recruitment of secretory Rab GTPases to Weibel-Palade bodies[J]. *Blood Adv*, 2021, 5(23): 5116-27.
- [23] Zhai XQ, Wu Y, Wang ZL, et al. Long noncoding RNA LINC01133 promotes the malignant behaviors of renal cell carcinoma by regulating the miR-30b-5p/Rab3D axis [J]. *Cell Transplant*, 2020, 29: 963689720964413.
- [24] Li L, Wan K, Xiong LK, et al. CircRNA hsa_circ_0087862 acts as an oncogene in non-small cell lung cancer by targeting miR-1253/RAB3D axis[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 2873-86.
- [25] Liu YQ, Chen XR, Cheng RJ, et al. The Jun/miR-22/HuR regulatory axis contributes to tumorigenesis in colorectal cancer [J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 11.
- [26] Yang J, Liu W, Lu XA, et al. High expression of small GTPase Rab3D promotes cancer progression and metastasis[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(13): 11125-38.
- [27] Luo Y, Ye GY, Qin SL, et al. High expression of Rab3D predicts poor prognosis and associates with tumor progression in colorectal cancer [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 75: 53-62.
- [28] Yu JS, Qi HP, Wang Z, et al. RAB3D, upregulated by aryl hydrocarbon receptor (AhR), promotes the progression of prostate cancer by activating the PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Cell Biol Int*, 2022, 46(12): 2246-56.
- [29] Li HY, Shen X, Ma MJ, et al. ZIP10 drives osteosarcoma proliferation and chemoresistance through ITGA10-mediated activation of the PI3K/AKT pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 340.
- [30] He Y, Sun MM, Zhang GG, et al. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 425.
- [31] Yang BS, Li LT, Tong G, et al. Circular RNA circ_001422 promotes the progression and metastasis of osteosarcoma via the miR-195-5p/FGF2/PI3K/Akt axis[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 235.